(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115768790 A
(43)申请公布日 2023.03.07

(21)申请号 202180023056.7

(22)申请日 2021.03.25

(30)优先权数据
63/000299 2020.03.26 US
63/002896 2020.03.31 US
63/003716 2020.04.01 US
63/023545 2020.05.12 US
63/024204 2020.05.13 US
63/024248 2020.05.13 US
63/027173 2020.05.19 US
63/037984 2020.06.11 US
63/040224 2020.06.17 US
63/040246 2020.06.17 US
63/142196 2021.01.27 US
63/161890 2021.03.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/024215 2021.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/195418 EN 2021.09.30

(71)申请人 范德比尔特大学
地址 美国田纳西州

(72)发明人 J·E·小克劳 S·佐斯特 R·卡纳汉 P·吉尔丘克

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李志强 初明明

(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

权利要求书7页 说明书98页
序列表67页 附图50页

(54)发明名称

针对严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)的人单克隆抗体

(57)摘要

本披露涉及结合并中和称为SARS-CoV-2的冠状病毒的抗体及其使用方法。

CN 115768790 A

1.一种与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合的经分离的抗体或抗体片段,其中该抗体或片段含有

(a)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的CDRH3;

(b)包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的CDRH3;

(c)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDRH3;

(d)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDRH3;

(e)包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDRH3;

(f)包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的CDRH3;

(g)包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的CDRH3;

(h)包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的CDRH3;

(i)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRH3;或

(j)包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的

CDRH2、包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的CDRH3。

2.如权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或片段包含与以下氨基酸序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的重链和轻链可变序列:

(a)SEQ ID NO:33的氨基酸序列和SEQ ID NO:34的氨基酸序列;

(b)SEQ ID NO:39的氨基酸序列和SEQ ID NO:40的氨基酸序列;

(c)SEQ ID NO:21的氨基酸序列和SEQ ID NO:22的氨基酸序列;

(d)SEQ ID NO:23的氨基酸序列和SEQ ID NO:24的氨基酸序列;

(e)SEQ ID NO:25的氨基酸序列和SEQ ID NO:26的氨基酸序列;

(f)SEQ ID NO:27的氨基酸序列和SEQ ID NO:28的氨基酸序列;

(g)SEQ ID NO:29的氨基酸序列和SEQ ID NO:30的氨基酸序列;

(h)SEQ ID NO:31的氨基酸序列和SEQ ID NO:32的氨基酸序列;

(i)SEQ ID NO:35的氨基酸序列和SEQ ID NO:36的氨基酸序列;或

(j)SEQ ID NO:37的氨基酸序列和SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

3.如权利要求1或2所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或片段含有

(a)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变序列;

(b)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变序列;

(c)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变序列;

(d)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变序列;

(e)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变序列;

(f)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变序列;

(g)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变序列;

(h)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变序列;

(i)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链可变序列;或

(j)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链可变序列。

4.如权利要求1-3中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或片段是单克隆的。

5.如权利要求1-4中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。

6.如权利要求1-5中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或片段包含YTE突变。

7.如权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或片段是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。

8.如权利要求1-7中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段能够在使用Vero-E2细胞培养单层的病灶减少中和测试(FRNT)测定中中和BSL3 SARS-CoV-2活病毒,任选地其中该抗体或抗体片段能够在250ng/mL的浓度下中和96%的BSL3 SARS-CoV-2活病毒。

9.如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段阻断受体结合结构域(RBD)与人受体血管紧张素转化酶2(ACE2)的结合,任选地其中该抗体或抗体片段阻断针对hACE2的活性,IC50<150ng/mL。

10.如权利要求1-9中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段能够中和包含含有D614G取代的刺突蛋白的SARS-CoV-2病毒,任选地其中该刺突蛋白不包含E484K取代。

11.如权利要求1-10中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段能够结合呈“向上”构象的RBD。

12.如权利要求1-11中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段能够结合呈“向上”和“向下”构象的RBD。

13.如权利要求1-11中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段不能够结合呈“向下”构象的RBD。

14.如权利要求1-13中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或片段能够结合三聚体刺突蛋白胞外域并且能够与单体刺突蛋白RBD结合,任选地其中与该三聚体刺突蛋白胞外域的结合和/或与该单体刺突蛋白RBD的结合的EC50<2ng/mL。

15.如权利要求1-14中任一项所述的抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段进一步包含可检测的标记。

16.一种治疗感染SARS-CoV-2的受试者或降低有感染SARS-CoV-2的风险的受试者的感染可能性的方法,该方法包括向该受试者递送如权利要求1-15中任一项所述的第一抗体或抗体片段。

17.一种保护感染SARS-CoV-2或有感染SARS-CoV-2的风险的60岁或更大年龄受试者、免疫受损的受试者或患有呼吸障碍和/或心血管障碍的受试者的健康的方法,该方法包括向该受试者递送如权利要求1-15中任一项所述的第一抗体或抗体片段。

18.如权利要求16或17所述的方法,其中该方法进一步包括向该受试者递送第二抗体或抗体片段,任选地其中该第二抗体或抗体片段是如权利要求1-15中任一项所述的抗体或抗体片段。

19.一种治疗感染SARS-CoV-2的受试者或降低有感染SARS-CoV-2的风险的受试者的感染可能性的方法,该方法包括向该受试者递送第一抗体或抗体片段和第二抗体或抗体片段,其中该第一和第二抗体或抗体片段协同中和SARS-CoV-2。

20.如权利要求18或19所述的方法，其中该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段的协同作用得分为17.4。

21.如权利要求18-20中任一项所述的方法，其中对于在病毒中和中达到相同的效力，该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段的剂量可以比单独的该第一抗体或抗体片段或单独的该第二抗体或抗体片段的剂量减少超过三分之二。

22.如权利要求18-21中任一项所述的方法，其中该第一抗体或抗体片段能够与呈“向上”构象的RBD结合，而不能够与呈“向下”构象的RBD结合。

23.如权利要求18-22中任一项所述的方法，其中该第二抗体或抗体片段能够结合呈“向上”和“向下”两种构象的RBD。

24.如权利要求18-23中任一项所述的方法，其中该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段不竞争结合RBD。

25.如权利要求18-24中任一项所述的方法，其中该第一抗体或抗体片段含有：包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的CDRH3。

26.如权利要求18-25中任一项所述的方法，其中该第二抗体或抗体片段含有：包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的CDRH3。

27.如权利要求18-26中任一项所述的方法，其中该第一抗体或抗体片段含有：包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变序列。

28.如权利要求18-27中任一项所述的方法，其中该第二抗体或抗体片段含有：包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变序列。

29.如权利要求16-28中任一项所述的方法，其中该递送降低该受试者中INF-γ、IL-6、CXCL10和CCL2的表达。

30.如权利要求16-29中任一项所述的方法，其中该递送是静脉内的。

31.如权利要求16-30中任一项所述的方法，其中该受试者是60岁或更大年龄的，是免疫受损的，或患有呼吸障碍和/或心血管障碍。

32.如权利要求16-31中任一项所述的方法，其中与未治疗的对照相比，该递送改善该受试者的呼吸。

33.如权利要求16-32中任一项所述的方法，其中与未治疗的对照相比，该递送降低病毒载量。

34.如权利要求17-33中任一项所述的方法，其中该递送是在感染之前进行。

35.如权利要求17-33中任一项所述的方法，其中该递送是在感染之后进行。

36.一种疫苗配制品，该疫苗配制品包含如权利要求1-15中任一项所述的一种或多种抗体或抗体片段。

37.如权利要求36所述的疫苗配制品，该疫苗配制品进一步包含：与SARS-CoV-2表面刺

突蛋白结合的第二抗体或抗体片段，任选地其中该第二抗体或抗体片段是如权利要求1-15中任一项所述的抗体或抗体片段。

38.一种疫苗配制品，该疫苗配制品包含编码如权利要求1-15中任一项所述的第一抗体或抗体片段的一种或多种表达载体。

39.如权利要求38所述的疫苗配制品，其中该一种或多种表达载体是辛德毕斯病毒载体或一种或多种VEE载体。

40.如权利要求38或39所述的疫苗配制品，该疫苗配制品被配制为用于通过针头注射、喷射注射或电穿孔递送。

41.如权利要求40所述的疫苗配制品，该疫苗配制品进一步包含：编码与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合的第二抗体或抗体片段的一种或多种表达载体，任选地其中该第二抗体或抗体片段是如权利要求1-15中任一项所述的抗体或抗体片段。

42.一种在受试者中检测SARS-CoV-2的COVID-19感染的方法，该方法包括

(a)使来自该受试者的样品与如权利要求1-15中任一项所述的抗体或片段接触；以及

(b)通过该抗体或抗体片段与该样品中的SARS-CoV-2抗原的结合来检测该样品中的SARS-CoV-2。

43.如权利要求42所述的方法，其中该样品是体液。

44.如权利要求42或43所述的方法，其中该样品是血液、痰液、泪液、唾液、粘液或血清、精液、宫颈或阴道分泌物、羊水、胎盘组织、尿液、渗出液、漏出液、组织刮屑或粪便。

45.如权利要求42-44中任一项所述的方法，其中该检测包括ELISA、RIA、侧向流动测定法或蛋白质印迹。

46.一种确定SARS-CoV-2表面刺突蛋白的抗原完整性、正确构象和/或正确序列的方法，该方包括：

(a)使包含该抗原的样品与如权利要求1-15中任一项所述的抗体或片段接触；以及

(b)通过该抗体或抗体片段与该抗原的可检测的结合来确定该抗原的抗原完整性、正确构象和/或正确序列。

47.如权利要求46所述的方法，其中该样品包含重组产生的抗原。

48.如权利要求46所述的方法，其中该样品包含疫苗配制品或疫苗生产批次。

49.如权利要求46-48中任一项所述的方法，其中该检测包括ELISA、RIA、蛋白质印迹、使用表面等离振子共振或生物膜干涉技术的生物传感器、或流式细胞术染色。

50.如权利要求46-49中任一项所述的方法，该方法进一步包括再次进行步骤(a)和(b)，以确定该抗原随时间推移的抗原稳定性。

51.一种杂交瘤或工程化细胞，该杂交瘤或工程化细胞包含编码如权利要求1-15中任一项所述的抗体或抗体片段的多核苷酸。

52.一种经分离的人单克隆抗体或抗体片段，或产生该人单克隆抗体或抗体片段的杂交瘤或工程化细胞，其中该抗体与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。

53.一种经分离的多核苷酸，该经分离的多核苷酸包含编码如权利要求1-15中任一项所述的抗体或抗体片段的重链可变区的核酸序列和/或编码该抗体或抗体片段的轻链可变区的核酸序列。

54.如权利要求53所述的多核苷酸，其中该多核苷酸包含SEQ ID NO:1-20中任一个的

序列。

55.一种载体,该载体包含如权利要求54所述的多核苷酸。

56.一种宿主细胞,该宿主细胞包含如权利要求53或54所述的多核苷酸、如权利要求55所述的载体、或包含编码如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗体片段的重链可变区的核酸分子的第一载体和包含编码如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗体片段的轻链可变区的核酸分子的第二载体。

57.一种制备抗体或抗体片段的方法,该方法包括(a)培养如权利要求56所述的细胞;以及(b)从所培养的细胞中分离该抗体或其抗体片段。

58.一种组合物,该组合物包含与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合的第一抗体或抗体片段和与SAR-CoV-2表面刺突蛋白结合的第二抗体或抗体片段,任选地其中该组合物是药学上可接受的组合物。

59.一种试剂盒,该试剂盒包含与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合的第一抗体或抗体片段和与SAR-CoV-2表面刺突蛋白结合的第二抗体或抗体片段,任选地其中该试剂盒进一步包含使用该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段治疗感染SARS-CoV-2的受试者或降低有感染SARS-CoV-2的风险的受试者的感染可能性的说明书。

60.如权利要求58或59所述的组合物或试剂盒,其中该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段的协同作用得分为17.4。

61.如权利要求58-60中任一项所述的组合物或试剂盒,其中对于在病毒中和中达到相同的效力,该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段的剂量可以比单独的该第一抗体或抗体片段或单独的该第二抗体或抗体片段的剂量减少超过三分之二。

62.如权利要求58-61中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该第一抗体或抗体片段能够与呈“向上”构象的RBD结合,而不能够与呈“向下”构象的RBD结合。

63.如权利要求58-62中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该第二抗体或抗体片段能够结合呈“向上”和“向下”两种构象的RBD。

64.如权利要求58-63中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段不竞争结合RBD。

65.如权利要求58-64中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该第一抗体或抗体片段含有:包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的CDRH3。

66.如权利要求58-65中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该第二抗体或抗体片段含有:包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDRH1、包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDRH3、包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的CDRL1、包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的CDRH2、包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的CDRH3。

67.如权利要求58-66中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该第一抗体或抗体片段含有:包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变序列。

68.如权利要求58-67中任一项所述的组合物或试剂盒,其中该第二抗体或抗体片段含有:包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变序列和/或包含SEQ ID NO:40的氨基酸序

列的轻链可变序列。

69.如权利要求59-68中任一项所述的试剂盒,其中该第一抗体或抗体片段和该第二抗体或抗体片段处于单独的容器中。

针对严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)的人单克隆抗体

[0001] 对相关申请的引用

[0002] 本申请要求2020年3月26日提交的美国临时申请号63/000,299、2020年3月31日提交的美国临时申请号63/002,896、2020年4月1日提交的美国临时申请号63/003,716、2020年5月12日提交的美国临时申请号63/023,545、2020年5月13日提交的美国临时申请号63/024,204、2020年5月13日提交的美国临时申请号63/024,248、2020年5月19日提交的美国临时申请号63/027,173、2020年6月11日提交的美国临时申请号63/037,984、2020年6月17日提交的美国临时申请号63/040,224、2020年6月17日提交的美国临时申请号63/040,246、2021年1月27日提交的美国临时申请号63/142,196和2021年3月16日提交的美国临时申请号63/161,890的优先权,这些美国临时申请中的每一个通过援引以其全文并入本文。

[0003] 联邦资助披露

[0004] 本发明根据国防高级研究计划局(Defense Advanced Research Projects Agency,DARPA)授予的HR0011-18-2-0001和国家过敏与感染疾病研究所/美国国立卫生研究院(National Institutes ofAllergy and Infection Disease/National Institutes of Health)授予的HHS合同75N93019C00074在政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 对以电子方式提交的序列表的引用

[0006] 以电子方式提交的序列表(名称:4815-001PC0D_SL_ST25.txt;大小:87,769字节;以及创建日期:2021年3月24日)的内容通过援引以其全文并入本文。

背景技术

[0007] 1.披露领域

[0008] 本披露总体上涉及医学、感染疾病和免疫学领域。更特别地,本披露涉及与称为SARS-CoV-2的新型冠状病毒结合的人抗体及其使用方法。

[0009] 2.背景

[0010] 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的流行影响了中国,其他179个国家和地区也有病例。引起称为新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的急性呼吸道疾病的病毒能够在人与人之间散播。潜伏期(从暴露到症状发作的时间)范围为0至24天,平均为3-5天,但在此期间和康复后可能有感染性。症状包括发烧、咳嗽和呼吸困难。2020年2月的估计死亡率为确诊病例的2%,在需要入院的患者中更高。

[0011] 截至2020年2月上旬,尽管正在研究几种疫苗方法和抗病毒药物,但尚无得到许可的疫苗和特定的治疗。基于该病毒如果散播到医疗保健体系较弱的国家可能产生的影响,世界卫生组织(WHO)已宣布该暴发为国际公共卫生紧急事件(PHEIC)。因此,迫切需要探索SARS-CoV-2的生物学和病理学以及人类对该病毒的免疫应答。

发明内容

[0012] 因此，根据本披露，提供了一种在受试者中检测SARS-CoV-2的COVID-19感染的方法，该方法包括(a)使来自所述受试者的样品与具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段接触；以及(b)通过所述抗体或抗体片段与所述样品中的SARS-CoV-2抗原的结合来检测所述样品中的SARS-CoV-2。该样品可以是体液，诸如血液、痰液、泪液、唾液、粘液或血清、精液、宫颈或阴道分泌物、羊水、胎盘组织、尿液、渗出液、漏出液、组织刮屑或粪便。检测可以包括ELISA、RIA、侧向流动测定法或蛋白质印迹。该方法可进一步包括再次进行步骤(a)和(b)，并且确定与第一次测定相比SARS-CoV-2抗原水平的变化。该抗体或抗体片段可以由表1所列的克隆配对的可变序列编码。该抗体或抗体片段可以由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列编码，或由与表1所列的克隆配对序列具有100％同一性的轻链和重链可变序列编码。该抗体或抗体片段可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列，或与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列。该抗体或抗体片段可以与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。该抗体片段可以是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。

[0013] 在另一个实施例中，提供了一种治疗感染SARS-CoV-2的受试者或降低有感染SARS-CoV-2的风险的受试者的感染可能性的方法，该方法包括向所述受试者递送具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段。该抗体或抗体片段可以由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列编码，或由与表1所列的克隆配对序列具有100％同一性的轻链和重链可变序列编码。该抗体或抗体片段可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列，或与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列。该抗体片段可以是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。该抗体可以是嵌合抗体或双特异性抗体。该抗体可以是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段：经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用，以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分，诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变；或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖，诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。该抗体或抗体片段可以与SARS-CoV-2抗原诸如表面刺突蛋白结合。该抗体或抗体片段可以在感染之前或在感染之后施用。受试者可以是60岁或更大年龄的，可以是免疫受损的，或者可以患有呼吸障碍和/或心血管障碍。递送可以包括抗体或抗体片段的施用，或用编码该抗体或抗体片段的RNA或DNA序列或载体进行的遗传递送。

[0014] 在另一个实施例中，提供了一种单克隆抗体，其中该抗体或抗体片段的特征在于分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。该抗体或抗体片段可以由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列编码，或由与表1所列的克隆配对序列具有100％同一性的轻链和重链可变序列编码。该抗体或抗体片段可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列，或与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列。该抗体片段可以是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。该抗体可以是嵌合抗体，是双特异性抗体，或者是胞内抗体。该抗体可以是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗

体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALAPG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。该抗体或抗体片段可以与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。

[0015] 一种编码抗体或抗体片段的杂交瘤或工程化细胞,其中该抗体或抗体片段的特征在于分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。该抗体或抗体片段可以由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列编码,或由与表1所列的克隆配对序列具有100%同一性的轻链和重链可变序列编码。该抗体或抗体片段可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,或与来自表2的克隆配对序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列。该抗体片段可以是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。该抗体可以是嵌合抗体、双特异性抗体或胞内抗体。该抗体可以是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。该抗体或抗体片段可以与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。

[0016] 在又一个实施例中,提供了一种疫苗配制品,该疫苗配制品包含一种或多种抗体或抗体片段,这些抗体或抗体片段的特征在于分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。所述抗体或抗体片段中的至少一种可由依照来自表1的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列,或由与来自表1的克隆配对序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列编码。所述抗体或抗体片段中的至少一种可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,或者可以包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列。所述抗体片段中的至少一种是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。所述抗体中的至少一种可以是嵌合抗体、双特异性抗体或胞内抗体。该抗体可以是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。该抗体或抗体片段可以与SARS-CoV-2抗原表面刺突蛋白结合。

[0017] 在另一个实施例中,提供了一种疫苗配制品,该疫苗配制品包含编码如本文所述的第一抗体或抗体片段的一种或多种表达载体。该一种或多种表达载体可以是辛德毕斯病毒(Sindbis virus)载体或一种或多种VEE载体。该疫苗可以被配制为用于通过针头注射、喷射注射或电穿孔而递送。该疫苗配制品可进一步包含编码第二抗体或抗体片段,诸如权利要求26-34所述的不同抗体或抗体片段的一种或多种表达载体。

[0018] 在又一个实施例中,提供了一种保护感染SARS-CoV-2或有感染SARS-CoV-2的风险的60岁或更大年龄受试者、免疫受损的受试者或患有呼吸障碍和/或心血管障碍的受试者的健康的方法,该方法包括向所述受试者递送具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段。该抗体或抗体片段可以由与表1所列的克隆配对的可变序

列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列编码，或由与表1所列的克隆配对序列具有100％同一性的轻链和重链可变序列编码。该抗体或抗体片段可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列，或与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％、90％或95％同一性的轻链和重链可变序列。该抗体片段可以是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。该抗体可以是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段：经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用，以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分，诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变；或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖，诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。该抗体可以是嵌合抗体或双特异性抗体。所述抗体或抗体片段可以在感染之前或在感染之后施用。该抗体或抗体片段可以与SARS-CoV-2抗原诸如表面刺突蛋白结合。递送可以包括抗体或抗体片段的施用，或用编码该抗体或抗体片段的RNA或DNA序列或载体进行的遗传递送。该抗体或抗体片段与未治疗的对照相比，可以改善受试者的呼吸，和/或与未治疗的对照相比，可以降低病毒载量。

[0019] 在又一个实施例中，提供了一种确定SARS-CoV-2表面刺突蛋白的抗原完整性、正确构象和/或正确序列的方法，该方包括(a)使包含所述抗原的样品与具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的第一抗体或抗体片段接触；以及(b)通过所述第一抗体或抗体片段与所述抗原的可检测的结合来确定所述抗原的抗原完整性、正确构象和/或正确序列。该样品可以包含重组产生的抗原或疫苗配制品或疫苗生产批次。检测可以包括ELISA、RIA、蛋白质印迹、使用表面等离振子共振或生物膜干涉技术的生物传感器、或流式细胞术染色。第一抗体或抗体片段可以由表1所列的克隆配对的可变序列，由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列编码，或由与表1所列的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列编码。第一抗体或抗体片段可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列，可以包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列，或者可以包含与来自表2的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列。第一抗体片段可以是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。该方法可进一步包括再次进行步骤(a)和(b)，以确定该抗原随时间推移的抗原稳定性。

[0020] 该方法可进一步包括(c)使包含所述抗原的样品与具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的第二抗体或抗体片段接触；以及(d)通过所述第二抗体或抗体片段与所述抗原的可检测的结合来确定所述抗原的抗原完整性。第二抗体或抗体片段可以由表1所列的克隆配对的可变序列，由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列编码，或由与表1所列的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列编码。第二抗体或抗体片段可以包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列，可以包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列，或者可以包含与来自表2的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列。第二抗体片段可以是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。该方法可进一步包括再次进行步骤(c)和(d)，以确定该抗原随时间推移的抗原稳定性。

[0021] 还提供了一种人单克隆抗体或抗体片段，或产生该人单克隆抗体或抗体片段的杂

交瘤或工程化细胞,其中所述抗体与SARS-CoV-2抗原表面刺突蛋白结合。

[0022] 在本文提供的一个方面(A1)中,一种在受试者中检测SARS-CoV-2的COVID-19感染的方法包括:(a)使来自所述受试者的样品与具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段接触;以及(b)通过所述抗体或抗体片段与所述样品中的SARS-CoV-2抗原的结合来检测所述样品中的SARS-CoV-2。在A1的一个方面(A2)中,所述样品是体液。在A1或A2的一个方面(A3)中,所述样品是血液、痰液、泪液、唾液、粘液或血清、精液、宫颈或阴道分泌物、羊水、胎盘组织、尿液、渗出液、漏出液、组织刮屑或粪便。在A1-A3中任一项的一个方面(A4)中,检测包括ELISA、RIA、侧向流动测定法或蛋白质印迹。在A1-A4中任一项的一个方面(A5)中,该方法进一步包括再次进行步骤(a)和(b),并且确定与第一次测定相比SARS-CoV-2抗原水平的变化。在A1-A5中任一项的一个方面(A6)中,该抗体或抗体片段由表1所列的克隆配对的可变序列编码。在A1-A5中任一项的一个方面(A7)中,所述抗体或抗体片段由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A1-A5中任一项的一个方面(A8)中,所述抗体或抗体片段由与表1所列的克隆配对序列具有100%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A1-A5中任一项的一个方面(A9)中,所述抗体或抗体片段包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A1-A5中任一项的一个方面(A10)中,所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列。在A1-A10中任一项的一个方面(A11)中,所述抗体或抗体片段与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。在A1-A11中任一项的一个方面(A12)中,该抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。

[0023] 在本文提供的一个方面(A13)中,一种治疗感染SARS-CoV-2的受试者或降低有感染SARS-CoV-2的风险的受试者的感染可能性的方法包括向所述受试者递送具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段。在A13的一个方面(A14)中,该抗体或抗体片段由表1所列的克隆配对的轻链和重链可变序列编码。在A13或A14的一个方面(A15)中,所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A13的一个方面(A16)中,所述抗体或抗体片段包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A13的一个方面(A17)中,所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列。在A13的一个方面(A18)中,所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列。在A13-A18中任一项的一个方面(A19)中,该抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。在A13-A19中任一项的一个方面(A20)中,所述抗体是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。在A13-A18中任一项的一个方面(A21)中,所述抗体是嵌合抗体或双特异性抗体。在A13-A21中任一项的一个方面(A22)中,所述抗体或抗体片段与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。在A13-A22中任一项的一个方面(A23)中,所述抗体或抗体片段在感染之前或在感染之后施用。在A13-A23中任一项的一个方面(A24)中,所述受试者是60岁或更大年龄的,是免

疫受损的,或患有呼吸障碍和/或心血管障碍。在A13-A24中任一项的一个方面(A25)中,递送包括抗体或抗体片段的施用,或用编码该抗体或抗体片段的RNA或DNA序列或载体进行的遗传递送。

[0024] 在一个方面(A26)中,本文提供了一种单克隆抗体,其中该抗体或抗体片段的特征在于分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。在A26的一个方面(A27)中,所述抗体或抗体片段由依照来自表1的克隆配对序列的轻链和重链可变序列编码。在A26的一个方面(A28)中,所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A26的一个方面(A29)中,所述抗体或抗体片段包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A26的一个方面(A30)中,所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列。在A26-A30中任一项的一个方面(A31)中,该抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。在A26-A30中任一项的一个方面(A32)中,所述抗体是嵌合抗体,或是双特异性抗体。在A26-A32中任一项的一个方面(A33)中,所述抗体是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。在A26-A33中任一项的一个方面(A34)中,所述抗体或抗体片段与SARS-CoV-2抗原,诸如表面刺突蛋白结合。在A26-A34中任一项的一个方面(A35)中,所述抗体是胞内抗体。

[0025] 在本文提供的一个方面(A36)中,一种杂交瘤或工程化细胞编码抗体或抗体片段,其中该抗体或抗体片段的特征在于分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。在A36的一个方面(A37)中,所述抗体或抗体片段由依照来自表1的克隆配对序列的轻链和重链可变序列编码。在A36的一个方面(A38)中,所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对的可变序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A36的一个方面(A39)中,所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对的可变序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A36的一个方面(A40)中,所述抗体或抗体片段包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A36的一个方面(A41)中,所述抗体或抗体片段由与来自表2的克隆配对的可变序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A36的一个方面(A42)中,所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列。在A36-A42中任一项的一个方面(A43)中,该抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。在A36-A43中任一项的一个方面(A44)中,所述抗体是嵌合抗体、双特异性抗体或胞内抗体。在A36-A43中任一项的一个方面(A45)中,所述抗体是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。在A36-A45中任一项的一个方面(A46)中,所述抗体或抗体片段与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。

[0026] 在本文提供的一个方面(A47)中,疫苗配制品包含一种或多种抗体或抗体片段,这

些抗体或抗体片段的特征在于分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。在A47的一个方面(A48)中,所述抗体或抗体片段中的至少一种由依照来自表1的克隆配对序列的轻链和重链可变序列编码。在A47的一个方面(A49)中,所述抗体或抗体片段中的至少一种由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A47的一个方面(A50)中,所述抗体或抗体片段中的至少一种由与来自表1的克隆配对序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A47的一个方面(A51)中,所述抗体或抗体片段中的至少一种包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A47的一个方面(A52)中,所述抗体或抗体片段中的至少一种包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70%、80%、90%或95%同一性的轻链和重链可变序列。在A47-A52中任一项的一个方面(A53)中,所述抗体片段中的至少一种是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。在A47-A52中任一项的一个方面(A54)中,所述抗体中的至少一种是嵌合抗体,是双特异性抗体或胞内抗体。在A47-A54中任一项的一个方面(A55)中,所述抗体是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)FcR相互作用的聚糖,诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。在A47-A55中任一项的一个方面(A56)中,所述抗体或抗体片段与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。

[0027] 在本文提供的一个方面(A57)中,疫苗配制品包含编码根据A26-A34中任一项所述的第一抗体或抗体片段的一种或多种表达载体。在A57的一个方面(A58)中,所述一种或多种表达载体是辛德毕斯病毒载体或一种或多种VEE载体。在A57或A58的一个方面(A59)中,将疫苗配制品配制为用于通过针头注射、喷射注射或电穿孔而递送。在A57的一个方面(A60)中,该疫苗配制品进一步包含编码第二抗体或抗体片段,诸如A26-A34中任一项所述的不同抗体或抗体片段的一种或多种表达载体。

[0028] 在本文提供的一个方面(A61)中,一种保护感染SARS-CoV-2或有感染SARS-CoV-2的风险的60岁或更大年龄受试者、免疫受损的受试者或患有呼吸障碍和/或心血管障碍的受试者的健康的方法包括向所述受试者递送具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段。在A61的一个方面(A62)中,该抗体或抗体片段由表1所列的克隆配对的轻链和重链可变序列编码。在A61或A62的一个方面(A63)中,该抗体或抗体片段由与表1所列具有至少95%同一性的克隆配对的轻链和重链可变序列编码。在A61或A62的一个方面(A64)中,所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。在A61的一个方面(A65)中,所述抗体或抗体片段包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A61的一个方面(A66)中,所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列。在A61的一个方面(A67)中,所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列。在A61-A67中任一项的一个方面(A68)中,该抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。在A61-A68中任一项的一个方面(A69)中,所述抗体是IgG或包含以下的重组IgG抗体或抗体片段:经突变以改变(消除或增强)FcR相互作用,以延长半衰期和/或增加治疗功效的Fc部分,诸如LALA、LALA PG、N297、GASD/ALIE、DHS、YTE或LS突变;或经修饰以改变(消除或增强)

FcR相互作用的聚糖，诸如酶促或化学添加或去除聚糖或在以限定的糖基化模式工程化的细胞系中表达。在A61-A67中任一项的一个方面(A70)中，所述抗体是嵌合抗体或双特异性抗体。在A61-A70中任一项的一个方面(A71)中，所述抗体或抗体片段在感染之前或在感染之后施用。在A61-A71中任一项的一个方面(A72)中，所述抗体或抗体片段与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。在A61-A72中任一项的一个方面(A73)中，递送包括抗体或抗体片段的施用，或用编码该抗体或抗体片段的RNA或DNA序列或载体进行的遗传递送。在A61的一个方面(A74)中，与未治疗的对照相比，该抗体或抗体片段改善受试者的呼吸。在A61的一个方面(A75)中，与未治疗的对照相比，该抗体或抗体片段降低病毒载量。

[0029] 在本文提供的一个方面(A76)中，一种确定SARS-CoV-2表面刺突蛋白的抗原完整性、正确构象和/或正确序列的方法包括：(a)使包含所述抗原的样品与具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段接触；以及(b)通过所述第一抗体或抗体片段与所述抗原的可检测的结合来确定所述抗原的抗原完整性、正确构象和/或正确序列。在A76的一个方面(A77)中，所述样品包含重组产生的抗原。在A76的一个方面(A78)中，所述样品包含疫苗配制品或疫苗生产批次。在A76-A78的一个方面(A79)中，检测包括ELISA、RIA、蛋白质印迹、使用表面等离振子共振或生物膜干涉技术的生物传感器、或流式细胞术染色。在A76-A79中任一项的一个方面(A80)中，该抗体或抗体片段由表1所列的克隆配对的可变序列编码。在A76-A79的一个方面(A81)中，所述抗体或抗体片段由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列编码。在A76-A79中任一项的一个方面(A82)中，所述第一抗体或抗体片段由与表1所列的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列编码。在A76-A79中任一项的一个方面(A83)中，所述第一抗体或抗体片段包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A76-A79中任一项的一个方面(A84)中，所述第一抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列。在A76-A79中任一项的一个方面(A85)中，所述第一抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列。在A76-A85中任一项的一个方面(A86)中，该第一抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。在A76-A86中任一项的一个方面(A87)中，该方法进一步包括再次进行步骤(a)和(b)，以确定该抗原随时间推移的抗原稳定性。在A76-A87中任一项的一个方面(A88)中，该方法进一步包括(c)使包含所述抗原的样品与具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的第二抗体或抗体片段接触；以及(d)通过所述第二抗体或抗体片段与所述抗原的可检测的结合来确定所述抗原的抗原完整性。在A88的一个方面(A89)中，该第二抗体或抗体片段由表1所列的克隆配对的可变序列编码。在A89的一个方面(A90)中，所述第二抗体或抗体片段由与表1所列的克隆配对的可变序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列编码。在A89的一个方面(A91)中，所述第二抗体或抗体片段由与表1所列的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列编码。在A89的一个方面(A92)中，所述第二抗体或抗体片段包含依照来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。在A89的一个方面(A93)中，所述第二抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少70％、80％或90％同一性的轻链和重链可变序列。在A89的一个方面(A94)中，所述第二抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有至少95％同一性的轻链和重链可变序列。在A89的一个方面(A95)中，

该第二抗体片段是重组scFv(单链片段可变)抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段或Fv片段。在A89的一个方面(A96)中,该方法进一步包括再次进行步骤(c)和(b),以确定该抗原随时间推移的抗原稳定性。

[0030] 在一个方面(A97)中,本文提供了一种人单克隆抗体或抗体片段,或产生该人单克隆抗体或抗体片段的杂交瘤或工程化细胞,其中所述抗体与SARS-CoV-2表面刺突蛋白结合。

[0031] 当在权利要求和/或说明书中与词语“包含(comprising)”结合使用时,使用词语“一个(a或an)”可以意指“一个”,但它也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的含义一致。词语“约”意指所述数字的正或负5%。

[0032] 预期本文所述的任何方法或组合物可相对于本文所述的任何其他方法或组合物实施。通过以下详细描述,本披露的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解,尽管示出了本披露的特定实例,但是详细描述和具体实例仅以说明的方式给出,因为在本披露的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言从详细说明中将是显而易见的。

附图说明

[0033] 本专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。在请求并支付必要的费用后,官方将会提供带有一幅或多幅彩色附图的本专利或专利申请公开案的副本。

[0034] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步展示本披露的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个附图,结合本文呈现的特定实施例的详细描述,可以更好地理解本披露。

[0035] 图1.使用BSL3 SARS-CoV-2活病毒通过COV2-2196+COV2-2130的混合剂来评估协同中和活性的剂量应答矩阵。定性地,在各个mAb的最高测试浓度(250ng/mL)下,有一小部分非中和病毒(0ng/mL COV2-2196+250ng/mL COV2-2130和250ng/mL COV2-2196+0ng/mL COV2-2130处的方框),但通过组合在较低Ab浓度范围内完全中和(100%)。15.6ng/mL COV2-2196+63ng/mL COV2-2130处的方框指示15.6ng/mL的mAb COV2-2196和63ng/mL的mAb COV2-2130组合中和96%的病毒的最大协同作用的区域,而各个Ab仅分别显示6%或0%的中和作用(0ng/mL COV2-2196+63ng/mL COV2-2130和15.6ng/mL COV2-2196+0ng/mL COV2-2130处的椭圆形)。示出了一式三份技术重复的平均值。

[0036] 图2A-B.使用BSL3 SARS-CoV-2活病毒通过mAb COV2-2196+mAb COV2-2130的混合剂来评估协同中和活性的剂量应答矩阵。示出了技术重复的一式三份值的平均值。使用SynergyFinder软件可视化数据并评估协同作用。

[0037] 图3.使用BSL3 SARS-CoV-2活病毒通过mAb COV2-2196+mAb COV2-2130的混合剂来评估协同中和活性的剂量应答矩阵。协同作用得分解释:<-10:相互作用可能是拮抗的;从-10到10:相互作用可能是相加的;>10:相互作用可能是协同的。

[0038] 图4A-C.中和性人mAb针对已确定的SARS-CoV-2感染的治疗功效。(图4A)通过鼻内途径为小鼠接种10^5PFU的MA-SARS-CoV-2,并在12小时后通过腹膜内注射给予指示的抗体治疗。在病毒攻击后2天,使用空斑测定法测量肺部的病毒负荷。示出了各个小鼠的测量值和中位数滴度,并使用Kruskal-Wallis ANOVA与Dunn后检验将每个组与同种型对照进行比

较(*p<0.05)。数据表示一次实验。(图4B)用抗Ifnar1 mAb处理10至11周龄的BALB/c小鼠(每组3至9只小鼠的一次实验)并在一天后经由鼻内途径用AdV-hACE2转导。四天后,经由鼻内途径为小鼠接种10^5FFU的真实SARS-CoV-2,并在12小时后通过腹膜内注射给予指示的mAb治疗。在病毒攻击后2dpi,使用空斑测定法测量肺部的病毒负荷。用于空斑中和测定性能的两个对照包括来自各个经同种型处理的小鼠的肺匀浆,其与来自各个未感染的或经mAb COV2-2196+COV2-2130混合剂处理的小鼠的肺匀浆以1:1(体积:体积)混合。示出了各个小鼠的测量值和中位数滴度,并使用Kruskal-Wallis ANOVA与Dunn后检验将每个组与同种型对照进行比较(**p<0.01)。数据表示一次实验。(图4C)通过qPCR分析从如图4B中那样收获的肺部测量细胞因子和趋化因子基因表达。示出了来自各个小鼠的测量值和中位数值。使用曼-惠特尼U检验比较各组(*p<0.05;**p<0.01)。

[0039] 图5.将人mAb输注至猕猴体内后的抗体药代动力学。

[0040] 图6.用野生型SARS-CoV-2病毒经鼻内和气管内攻击后,猕猴支气管肺泡灌洗液中的SARS-CoV-2病毒载量(按亚基因组新制RNA测量)。

[0041] 图7.用野生型SARS-CoV-2病毒经鼻内和气管内攻击后,猕猴鼻拭子样本中的SARS-CoV-2病毒载量(按亚基因组新制RNA测量)。

[0042] 图8A-E.与Fab COV2-2196复合的S蛋白RBD的晶体结构。(图8A)与RBD复合的COV2-2196的草图表示。COV2-2196重链示为青色,轻链示为洋红色,而RBD显示为绿色。色彩在U.S.63/161,890的图8A中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图8B)使用RBD结构作为参考,将COV2-2196-RBD复合物的结构叠加到RBD-人ACE2复合物(PDB ID:6M0J)的结构上。COV2-2196-RBD复合物的颜色方案与图8A中的相同。RBD-ACE2复合物中的RBD为浅蓝色,人ACE2肽酶结构域为灰色。色彩在U.S.63/161,890的图8B中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图8C)使用呈“向上”构象的RBD作为参考,将COV2-2196-RBD复合物的结构叠加到单个RBD呈“向上”构象的刺突(PDB ID:6XM4)的结构上。COV2-2196-RBD复合物的颜色方案与图8A中的相同。刺突的三个亚基分别为灰色、黄色或浅蓝色(其RBD呈“向上”构象的亚基为黄色)。色彩在U.S.63/161,890的图8C中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图8D)COV2-2196识别的RBD表位的表面表示。表位残基为不同深浅的绿色,并以黑色标记。色彩在U.S.63/161,890的图8D中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图8E)COV2-2196和RBD之间的抗体-抗原相互作用。以与图8D相同的表面表示和取向示出RBD。COV2-2196互补位残基以棒状表示示出。重链为青色,而轻链为洋红色。色彩在U.S.63/161,890的图8E中可见,该专利通过援引以其全文并入。

[0043] 图9A-F.与Fab COV2-2196和COV2-2130两者复合的S蛋白RBD的晶体结构。(图9A)与COV2-2196和COV2-2130 Fab复合的S蛋白RBD的晶体结构的草图表示。RBD以绿色示出,COV2-2196重链以青色示出,COV2-2196轻链以洋红色示出,COV2-2130重链以黄色示出,而COV2-2130轻链以橙色示出。标记了COV2-2130的CDR。色彩在U.S.63/161,890的图9A中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图9B)使用RBD结构作为参考,将COV2-2130-RBD复合物的结构叠加到RBD-ACE2复合物(PDB ID:6M0J)的结构上。COV2-2130-RBD复合物的颜色方案与图9A中的相同。RBD-ACE2复合物中的RBD为浅蓝色,人ACE2肽酶结构域为灰色。色彩在U.S.63/161,890的图9B中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图9C)使用一个原聚体中的RBD作为参考,将COV2-2130-RBD复合物的结构叠加到其全部RBD呈“向下”构象的刺突

(PDB ID:6ZOY)的结构上。COV2-2130-RBD复合物的颜色方案与图9A中的相同。刺突的三个原聚体分别为灰色、浅蓝色或紫色。色彩在U.S.63/161,890的图9C中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图9D)使用呈“向上”构象的RBD作为参考,将COV2-2196-2130-RBD复合物的结构叠加到一个RBD呈“向上”构象的刺突(PDB ID:7CAK)的结构上。COV2-2130-RBD复合物的颜色方案与图9A中的相同。刺突的三个原聚体分别为灰色、浅蓝色或紫色。色彩在U.S.63/161,890的图9D中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图9E)COV2-2130识别的RBD表位的表面表示。表位残基以不同颜色指示,并以黑色标记。色彩在U.S.63/161,890的图9E中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图9F)COV2-2130互补位残基与表位的相互作用。以与图9E相同的表面表示和取向示出RBD。互补位残基以棒状表示示出。重链为黄色,而轻链为橙色。色彩在U.S.63/161,890的图9F中可见,该专利通过援引以其全文并入。

[0044] 图10A-B.(图10A)COV2-2196重链和轻链的IMGT/DomainGapAlign结果。方框内示出了种系基因中关键的相互作用残基及其对应残基。图10A中的序列的SEQ ID NO如下:

[0045]

	FR2-HCDR2	HCDR3-FR4	LCDR1-FR2	LCDR3-FR4
IGHV1-58	SEQ ID NO. 101	SEQ ID NO. 102		
IGHD2-2		SEQ ID NO. 103		
IGHD2-8		SEQ ID NO. 104		
IGHD2-15		SEQ ID NO. 105		
IGHJ3*02		SEQ ID NO. 106		
IGKV3-20			SEQ ID NO. 107	SEQ ID NO. 108
IGKJ1*01				SEQ ID NO. 109
COV2-2196	SEQ ID NO. 110	SEQ ID NO. 111	SEQ ID NO. 112	SEQ ID NO. 113
COV2-2381	SEQ ID NO. 114	SEQ ID NO. 115	SEQ ID NO. 116	SEQ ID NO. 117
COV2-2072	SEQ ID NO. 118	SEQ ID NO. 119	SEQ ID NO. 120	SEQ ID NO. 121
McC5t2p1_G1	SEQ ID NO. 122	SEQ ID NO. 123	SEQ ID NO. 124	SEQ ID NO. 125
HbnC3t1p2_C6	SEQ ID NO. 126	SEQ ID NO. 127	SEQ ID NO. 128	SEQ ID NO. 129
HbnC3t1p1_C6	SEQ ID NO. 130	SEQ ID NO. 131	SEQ ID NO. 132	SEQ ID NO. 133
S2E12	SEQ ID NO. 134	SEQ ID NO. 135	SEQ ID NO. 136	SEQ ID NO. 137
COV107_1	SEQ ID NO. 138	SEQ ID NO. 139	SEQ ID NO. 140	SEQ ID NO. 141
COV107_2	SEQ ID NO. 142	SEQ ID NO. 143	SEQ ID NO. 144	SEQ ID NO. 145
COV72	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.

[0046]

	146	147	148	149
COV21_1	SEQ ID NO. 150	SEQ ID NO. 151	SEQ ID NO. 152	SEQ ID NO. 153
COV21_2	SEQ ID NO. 154	SEQ ID NO. 155	SEQ ID NO. 156	SEQ ID NO. 157
COV57_1	SEQ ID NO. 158	SEQ ID NO. 159	SEQ ID NO. 160	SEQ ID NO. 161
COV57_2	SEQ ID NO. 162	SEQ ID NO. 163	SEQ ID NO. 164	SEQ ID NO. 165

[0047] (图10B)COV2-2196的点突变体的结合曲线。设计了上面方框所示的编码重链点突变体的cDNA,将其合成为DNA以制备重组IgG蛋白,并测试其与刺突蛋白的结合活性。D108残基的突变体在左上图,种系序列的推断体细胞突变的回复突变在右上图,P99突变体在左下图,而去除HCDR3中的二硫键的突变体在右下图。

[0048] 图11A-H.通过深度突变扫描联合抗性变体选择来鉴定COV2-2196和COV2-2130的关键残基。(图11A)对于COV2-2196(左)或COV2-2130(右)而言具有强逃逸的所有RBD位点的突变逃逸分数的徽标图(Logo plot)。较高的字母指示更强的抗体结合逃逸。基于突变减少RBD与人ACE2结合的程度来对突变进行着色。所示数据是使用两个独立的酵母文库进行的两次独立的逃逸选择实验的平均值;相关性示于图18B-C。这些徽标图的交互式、可缩放版本在jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/上。如方法中所述,发明人确定了逃逸分数,逃逸分数表示表达落入抗体逃逸仓中的该特定变体的细胞的估计分数,因此值为0意指该变体总是被抗体结合,而值为1意指该变体总是从抗体结合中逃逸。(图11B)可通过来自逃逸选择中使用的Wuhan-Hu-1参考毒株的单核苷酸取代获得的COV2-2196和COV2-2130的突变逃逸分数的徽标图(图11E-F)。每种取代对ACE2结合的影响如图11A所示。(图11C)左图:将COV2-2196的深度突变扫描逃逸突变作图到RBD-COV2-2196结构中的RBD表面上。使用热图展示RBD结构上废除COV2-2196结合的突变,其中蓝色表示具有最大累积抗体逃逸的RBD位点,而白色表示未检测到逃逸。灰色指出其中对RBD表达的有害影响妨碍评估突变对抗体结合的影响的残基。右图:左图的放大图,示出了RBD最强逃逸位点周围的相互作用残基。COV2-2196重链为青色,而轻链为洋红色。如图11A所示,用独立的文库进行两次重复。色彩在U.S.63/161,890的图11C中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图11D)右图:将COV2-2130的深度突变扫描逃逸突变映射到RBD-COV2-2130结构中的RBD表面。如图11C所示,使用热图展示RBD结构上废除COV2-2130结合的突变。左图:左图的放大图,示出了RBD最强逃逸位点周围的相互作用残基。COV2-2130重链为黄色,而轻链为鲜肉色。色彩在U.S.63/161,890的图11D中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图11E)示出了用COV2-2196、COV2-2130及其组合进行的VSV-SARS-CoV-2逃逸选择实验的结果的表。记录所选择的逃逸突变体的数目和进行的逃逸选择重复的总数,以及通过对逃逸突变体病毒进行测序而鉴定的残基。(图11F)示出了在亚中和浓度的AZD8895(基于COV2-2196)、AZD1061(基于COV2-2130)和AZD7442(AZD8895+AZD1061)的存在下的SARS-CoV-2的传代结果。指出了通过对中和抗性空斑测序而鉴定的抗性相关病毒突变。(图11G)示出了来自图11A的DMS数据的散布图,x轴上为突变逃逸分数,而y轴上为对ACE2结合的影响。十字形指出可仅通过多核苷

酸取代获得的突变,而圆圈指示可通过单核苷酸取代获得的突变。指出了VSV-SARS-CoV-2(K444R、K444E)或真实SARS-CoV-2(R346I)中通过COV2-2130选择的氨基酸取代。(图11H)通过FRNT测量的针对参考毒株和所关注的SARS-CoV-2变体的抗体中和。一式两份进行中和测定,并重复两次,示出一次实验重复的结果。误差线指出每个点的范围。指出了与WA-1参考毒株相比的突变。B.1.1.7-OXF含有69-70和144-145缺失及以下取代:N501Y、A570D、D614G、P681H和T716I。

[0049] 图12.RBD-COV2-2196-2130复合物中的RBD-COV2-2196结构与RBD-COV2-2196晶体结构的覆盖图。

[0050] 图13A-F.RBD-COV2-2196与刺突-S2E12复合物之间共有的RBD位点F486处的相似芳香族堆积和疏水相互作用模式。(图13A和图13B)两种复合物的结构中围绕残基F486的相同氢键结合模式。(图13C)COV2-2196和RBD之间的详细相互作用。COV2-2196重链为青色,轻链为洋红色,而RBD为绿色。重要的相互作用残基以棒状表示示出。涉及Ab-Ag相互作用的水分子表示为粉色球体。直接氢键示为橙色虚线,而水介导的氢键示为黄色虚线。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图2C中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图13D)以抗体的可变结构域作为参考,将S2E12/RBD冷冻电镜结构叠加到COV2-2196/RBD晶体结构上。COV2-2196重链为青色,而轻链为洋红色;S2E12重链为浅青色,而轻链为淡粉色。两个相应的RBD结构分别为绿色或黄色。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图2D中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图13E)COV2-2130重链与RBD之间的详细相互作用。互补位残基以棒状表示示出并且为黄色,表位残基呈绿色棒状。氢键或强极性相互作用表示为洋红色虚线。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图2E中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图13F)COV2-2130轻链与RBD之间的详细相互作用。互补位残基以棒状表示示出并且为橙色,表位残基呈绿色棒状。氢键表示为洋红色虚线。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图2F中可见,该专利通过援引以其全文并入。

[0051] 图14A-E.具有相同结合机制的抗RBD抗体的常见克隆型。(图14A)COV2-2196/RBD晶体结构。(图14B)S2E12/RBD冷冻电镜结构。(图14C)COV2-2381/RBD同源性模型。COV2-2072编码HCDR3中N-连接的糖基化序列子,用灰色球体指示。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图3D中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图14D)COV2-2072/RBD同源性模型。(图14E)COV2-2196/RBD晶体结构(图14A)和S2E12/RBD冷冻电镜结构(图14B)的覆盖图。

[0052] 图15A-B.在未经病毒感染的个体的抗体可变基因库中与COV2-2196在遗传上相似的假定公共克隆型成员的鉴定。比对来自健康个体的具有与COV2-2196重链(图15A)和轻链(图15A和图15B)相同的序列特征的抗体可变基因序列。来自三个不同供体以及脐带血的序列包括具有公共克隆型特征的序列。在COV2-2196中使用的序列特征和接触残基在每个多重序列比对下方用方框突出显示(在U.S.63/161,890的扩展数据图4A中方框为红色,该专利通过援引以其全文并入本文)。图15A中的重链序列的SEQ ID NO如下:HIP1:SEQ ID NO.166,HIP2:SEQ ID NO.167,HIP3:SEQ ID NO.168和CORD:SEQ ID NO.169。图15A中的轻链序列的SEQ ID NO如下:HIP1:SEQ ID NO.170,HIP2:SEQ ID NO.171和HIP3:SEQ ID NO.172。图15B中的HIP1轻链序列的SEQ ID NO如下:SEQ ID NO.173,SEQ ID NO.174,SEQ ID NO.175,SEQ ID NO.176和SEQ ID NO.177(从上到下)。图15B中的HIP2轻链序列的SEQ ID NO如下:SEQ ID NO.178,SEQ ID NO.179,SEQ ID NO.180,SEQ ID NO.181和SEQ ID

NO.182(从上到下)。图15B中的HIP3轻链序列的SEQ ID NO如下:SEQ ID NO.183,SEQ ID NO.184,SEQ ID NO.185,SEQ ID NO.186和SEQ ID NO.187(从上到下)。

[0053] 图16A-D.(图16A)详细的COV2-2130 HCDR3环结构。稳定环构象的短程氢键示为虚线(在U.S.63/161,890的扩展数据图5A中虚线为洋红色,该专利通过援引以其全文并入本文)。(图16B)COV2-2130轻链的残基形成芳香族堆积相互作用并且与HCDR3氢键结合以进一步稳定HCDR3环。(图16C)长的LCDR1、HCDR2和HCDR3形成到达RBD表位的互补结合表面。RBD示为灰色的表面表示。COV2-2130重链为黄色,其HCDR3为橙色,而轻链为鲜肉色,其LCDR1为洋红色。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图3D中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图16D)图16C的180°旋转视图。

[0054] 图17.与COV2-2196和COV2-2130复合的RBD晶体结构中COV2-2196与COV2-2130之间的界面。COV2-2196重链或轻链分别示为青色或洋红色的草图表示,而COV2-2130重链或轻链分别示为黄色或鲜肉色的草图表示。RBD为绿色。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图6中可见,该专利通过援引以其全文并入。界面残基以棒状表示示出。

[0055] 图18A-I.通过对影响抗体结合的突变进行深度突变扫描进行的鉴定以及用VSV-SARS-CoV-2病毒选择抗体抗性突变体的方法。(图18A)上:流式细胞术图,示出了使用前向散射和侧向散射选择单酵母细胞(前三个图)以及选择表达RBD的酵母细胞(右图)的代表性门控策略。每个图都是从前一个门得出的。下:流式细胞术图,示出了RBD^{+}、抗体$^{-}$酵母细胞(即表达RBD但其中突变阻止抗体结合的细胞)的门控。示出了COV2-2196或COV2-2130的选择实验,各自示出两个独立文库。(图18B)在使用COV2-2196、COV2-2130或COV2-2196和COV2-2130的1:1混合物进行的酵母文库选择实验之间观察到的抗体结合逃逸位点的相关性。x轴示出文库1每个位点的累积逃逸分数,而y轴示出文库2每个位点的累积逃逸分数。对于每个图,指出了相关系数和n。(图18C)在使用COV2-2196、COV2-2130或COV2-2196和COV2-2130的1:1混合物进行的酵母文库选择实验之间观察到的逃逸抗体结合的突变的相关性。x轴示出文库1的每个氨基酸突变的逃逸分数,而y轴示出文库2的每个氨基酸突变的逃逸分数。对于每个图,指出了相关系数和n。(图18D-F)COV2-2196(图18D)、COV2-2130(图18E)或COV2-2196和COV22130的1:1混合物(图18F)的DMS结果。左图:跨越整个RBD的逃逸位点由与中图和右图中的徽标图相对应的峰指示。中图:如图11A中那样,COV2-2196、COV2-2130或COV2-2196+COV2-2130具有强逃逸突变的所有RBD位点的累积逃逸突变分数的徽标图。基于突变废除RBD与人ACE2结合的程度来对突变进行着色。右图:同样,徽标图示出了累积逃逸分数,但是基于突变影响酵母展示系统中RBD表达的程度进行着色。这些徽标图的交互式、可缩放版本在jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/上。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图7F中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图18G)示出了从抗体中和中逃逸的病毒的代表性RTCA传感图。在饱和浓度(5μg/mL)的抗体COV2-2130的存在下,在接种了病毒的Vero E6细胞中动态监测细胞病变效应(CPE)。示出了逃逸(洋红色)或缺少可检测逃逸(蓝色)的代表性例子。未感染的细胞(绿色)或接种了病毒而没有抗体的细胞(红色)用作对照。洋红色和蓝色曲线表示单个代表性孔;红色和绿色对照是两个技术重复的均值。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图7G中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图18H)代表性的RTCA传感图,其证实图18G中通过COV2-2130选择的变体病毒的确从COV2-2130逃逸(洋红色),但被COV2-2196中和(浅蓝色)。色彩在U.S.63/161,890的扩展数据图7H

中可见，该专利通过援引以其全文并入。(图18I)用COV2-2196、COV2-2130或COV2-2196和COV2-2130的1:1混合物进行的逃逸选择实验的96孔E-板分析的各个孔的示例传感图。记录了从COV2-2130逃逸的例子，而在COV2-2196或COV2-2196+COV2-2130的存在下未检测到逃逸。在第一张板上指出了阳性对照和阴性对照。

[0056] 图19.用真实SARS-CoV-2病毒选择抗体抗性突变体的方法。

[0057] 图20(A-I).中和性SARS-CoV-2mAb的功能特性。(图20A)mAb中和活性、hACE2阻断活性以及与三聚体S2Pecto蛋白或单体SRBD的结合的热图。MAb按中和效力排序(顶部为最高，底部为最低)。虚线指示对于野生型病毒而言中和IC50值低于150ng/mL的13种抗体。IC50值对于病毒中和和hACE2阻断可视化，同时EC50值对于结合可视化。将交叉反应性SARS-CoV SRBD mAb CR3022的重组形式示为阳性对照，而将抗登革mAb 2D22示为阴性对照。数据代表至少2项独立实验，每项实验均以两个技术重复进行。没有抑制指示IC50值>10,000ng/mL，而没有结合指示EC50值>10,000ng/mL。(图20B-E)mAb的hACE2阻断、S2Pecto三聚体结合或SRBD结合与其中和活性的相关性。示出了对数转换值的线性回归分析的R2值。深色圆圈(在U.S.63/161,890的实例5的图1B-E中以紫色示出，该专利通过援引以其全文并入)指示中和IC50值低于150ng/mL的mAb。(图20E)hACE2阻断和S2Pecto三聚体结合的相关性。示出了对数转换值的线性回归分析的R2值。(图20F)在针对真实SARS-CoV-2病毒的中和测定中COV2-2196和COV2-2130的中和曲线。图上指出了计算的IC50值。误差线指出每个点的标准偏差。数据代表至少2项独立实验，每项实验均以两个技术重复进行。(图20G)在假病毒中和测定中COV2-2196和COV2-2130的中和曲线。误差线指出每个点的标准偏差。所示的值是来自单项实验的两个技术重复。图上指出了至少6次实验计算的IC50值。(图20H)在hACE2阻断ELISA中COV2-2196、COV2-2130和非阻断SARS-CoV mAb rCR3022的hACE2阻断曲线。图上指出了计算的IC50值。误差线指出每个点的标准偏差。所示的值是来自重复两次的代表性实验的三个技术重复。(图20I)COV2-2196、COV2-2130和rCR3022与三聚体S2Pecto的ELISA结合。图上指出了计算的EC50值。误差线指出每个点的标准偏差。所示的值是来自重复两次的代表性实验的三个技术重复。

[0058] 图21(A-D).通过一对mAb的竞争结合分析和协同中和作用进行mAb的表位作图。(图21A)左：基于生物膜干涉技术的竞争结合测定法，测量mAb阻止参考mAb COV2-2196和rCR3022与融合至上样到抗小鼠Fc生物传感器的小鼠Fc的RBD(RBD-mFc)结合的能力。方格中的值是参考mAb在竞争性mAb的存在下相对于模拟竞争对照的结合%。黑色方格指出完全竞争(相对于无竞争的对照，结合<33%)，而白色方块指出没有竞争(相对于无竞争的对照，结合>67%)。右：基于生物膜干涉技术的竞争结合测定法，测量mAb阻止hACE2结合的能力。值指出hACE2的结合%，归一化为不存在竞争的情况下的hACE2结合。阴影指出mAb与hACE2的竞争。(在U.S.63/161,890的实例5的图2A中阴影以红色示出，该专利通过援引以其全文并入。)(图21B)中和性mAb组与参考mAb COV2-2130、COV2-2196或rCR3022的竞争。将参考mAb生物素化，并在竞争ELISA中在饱和量的每种mAb的存在下测量参考mAb与三聚S2Pecto的结合。将每种参考mAb的ELISA信号归一化为非结合抗登革mAb2D22存在下的信号。黑色指出完全竞争(参考mAb的结合<25%)，灰色指出部分竞争(参考mAb的结合为25-60%)，而白色指出无竞争(参考mAb的结合>60%)。(图21C)COV2-2196和COV2-2130对野生型SARS-CoV-2的协同中和。上：每种mAb的连续稀释液的中和矩阵。实验以三次技术重复进行。示出了以

三次技术重复进行的代表性实验。在每个方块中示出了每种mAb组合的中和%。白到黑热图分别指出0%中和到100%中和。(在U.S.63/161,890的实例5的图2C中热图以白到红色示出,该专利通过援引以其全文并入。)(图21D)基于图21C中的SARS-CoV-2中和计算的协同矩阵。较深的颜色(在U.S.63/161,890的实例5的图2D中以红色示出,该专利通过援引以其全文并入)指出观察到协同中和的区域,且黑色方框指出两种mAb之间最大协同作用的区域。

[0059] 图22(A-F).mAb的表位鉴定和结构表征。(图22A)通过丙氨酸和精氨酸诱变鉴定关键的接触残基。上:通过生物膜干涉技术测得的COV2-2130(金色)、COV2-2165(栗色)或COV2-2196(深紫色)与野生型(wt)或突变体SRBD构建体的结合。y轴上示出了对于与wt SRBD的结合所观察到的归一化为信号的应答。下:COV2-2196与关键接触残基突变的wt或SRBD构建体的代表性结合曲线。色彩在U.S.63/161,890的实例5的图3A中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图22B)SARS-CoV-2(蓝色)和hACE2(绿色)(PDB(6M0J))的晶体结构。hACE2识别基序为橙色。COV2-2130的关键接触残基示为金色球体,而COV2-2196的关键接触残基示为紫色球体。色彩在U.S.63/161,890的实例5的图3B中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图22C)mAb与60个氨基酸的hACE2识别基序的ELISA结合。r2D22(一种抗登革mAb)示为阴性对照。下:具有以紫色示出的COV2-2196关键接触残基的橙色hACE2识别基序的结构。色彩在U.S.63/161,890的实例5的图3C中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图22D)COV2-2130(金色)、COV2-2165(栗色)或COV2-2196(深紫色)通过负染电子显微镜术可视化的单Fab:S2Pecto三聚体复合物。RBD以蓝色示出,而S N端结构域(NTD)以红色示出。电子密度以灰色示出。指出了每种复合物的三聚体状态(打开或闭合)。底部示出了每种复合物的代表性2D类平均值(方框大小为128像素)。色彩在U.S.63/161,890的实例5的图3D中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图22E)与S2Pecto三聚体复合的COV2-2130和COV2-2196 Fab。COV2-2130(金色)和COV2-2196(紫色)Fab与S2Pecto三聚体同时结合。电子密度以灰色示出。指出了三聚体状态(打开或闭合)。底部示出了复合物的代表性2D类平均值(方框大小为128像素)。所有图像均用Chimera制作。色彩在U.S.63/161,890的实例5的图3E中可见,该专利通过援引以其全文并入。(图22F)在S2Pecto三聚体上可视化的竞争结合分析。CR3022晶体结构对接到双Fab:S2Pecto三聚体结构中。CR3022以青色示出。色彩在U.S.63/161,890的实例5的图3F中可见,该专利通过援引以其全文并入。下:定量维恩图记录每个竞争组中的mAb数目以及组间的重叠。

[0060] 图23(A-F).针对SARS-CoV-2感染的中和性人mAb的预防功效。(图23A)SARS-CoV-2攻击模型。用抗Ifnar1 mAb处理10至11周龄的BALB/c小鼠(每组4-5只小鼠的两次实验)并在一天后经由鼻内途径用AdV-hACE2转导。四天后,经由腹膜内途径用200μg的mAb CoV2-2196、-2130或组合(1:1比率)或同种型对照mAb处理小鼠。一天后,经由鼻内途径接种SARS-CoV-2。在7dpi时收获组织用于分析(图23C和图23D)。(图23B)图a中小鼠的体重变化(普通双向ANOVA与Tukey后检验:****P<0.0001)。(图2C)通过RT-qPCR测量肺部、脾脏和心脏中的病毒负荷:Kruskal-Wallis ANOVA与Dunn后检验(*,P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001)。虚线指示检测的测定极限。(图23D)通过qPCR分析测量细胞因子和趋化因子基因表达。Kruskal-Wallis ANOVA与Dunn后检验(*,P<0.05,**P<0.01,***P<0.001)。(图23E)MA-SARS-CoV-2攻击模型。经由鼻内途径为十二周龄的BALB/c小鼠(n=10)接种105PFU的MA-SARS-CoV-2。示出了小鼠的体重变化。(图23F)在2dpi时从(图23E)通过RT-qPCR(左)或

空斑测定(右)测量肺部中的病毒载量:Kruskal-Wallis ANOVA与Dunn后检验(***P<0.001,****P<0.0001)。

[0061] 图24.mAb组的SARS-CoV-2中和曲线。人mAb对真实SARS-CoV-2的中和。示出了两次技术重复的平均值±SD。数据表示两个或更多个独立实验之一。

[0062] 图25A-B.mAb抑制S2Pecto与hACE2结合的抑制曲线。抗SARS-CoV-2中和性人mAb阻断hACE2与S2Pecto的结合。示出了一项实验三次重复的平均值±SD。抗体CR3022和2D22用作对照。

[0063] 图26A-B.抗SARS-CoV-2中和性人mAb与三聚体SRBD、S2Pecto或SARS-CoV S2Pecto抗原的ELISA结合。示出了两项实验的三次重复的平均值±SD和代表。抗体CR3022和2D22用作对照。

[0064] 图27A-B.通过丙氨酸和精氨酸诱变以及生物膜干涉技术对mAb关键接触残基作图。(图27A)左:针对wt归一化的mAb与wt或突变体SRBD构建体结合的应答值。星号指出在其中观察到mAb解离增加的残基,可能表明该残基靠近mAb表位。右:mAb与wt或突变体SRBD构建体缔合和解离的完整应答曲线。(图27B)RBD的结构,突出显示了几种mAb的关键接触残基及其在结构上的位置。

具体实施方式

[0065] 如上面所讨论的,SARS-CoV-2是重大的健康问题,活跃病例每天都在增加。因此,了解这种病毒的生物学以及人类对该病毒的免疫应答的性质和程度至关重要。发明人已经鉴定了SARS-CoV-2的人抗体的序列。本文披露了此类抗体的那些序列和用途。

[0066] 而且,通过详细研究一种抗体(COV2-2196)与RBD的相互作用,发明人鉴定了选择SARS-CoV-2的公共克隆型的分子基础,该SARS-CoV-2的公共克隆型由涉及重链和轻链两者的复杂结构构型驱动。该克隆型的共有结构特征有助于形成在重链和轻链中均包含残基的互补位,但明显不依赖于通常主导抗原-抗体相互作用的HCDR3。发明人表明,这种公共克隆型是人针对SARS-CoV-2S蛋白RBD产生的强效中和抗体的更常共有的类型之一。详细的结构研究揭示,通常形成的抗体互补位有助于“芳香族笼”,该“芳香族笼”由重链和轻链界面周围的互补位中的五个芳香族残基形成。该笼结构与SARS-CoV-2S蛋白上的芳香族残基配位,从而解释了这些抗体的高特异性和高亲和力的原因。值得注意的是,尽管需要重链和轻链两者以形成这种公共克隆型(从而限定了克隆型中规范的IGHV、IGHJ、IGLV和IGLJ基因),但HCDR3对相互作用的影响却最小。由于这些IGHV1-58-IGHJ3重链和IGKV3-20-IGKJ1轻链重组在免疫前B细胞库中很常见,因此许多个体可能在对SARS-CoV-2感染或接种疫苗的应答过程中产生此类克隆。由于人群中B细胞克隆的频率以及由可变基因区段编码的抗体的中和和保护效力,被这种公共克隆型复杂的预配置结构识别的抗原位点可能是COVID-19保护性疫苗的重要组分。

[0067] 下面详细描述了本披露的这些和其他方面。

[0068] I.冠状病毒2019(SARS-CoV-2)

[0069] SARS-CoV-2是一种感染性病毒,会引起称为新型冠状病毒肺炎(COVID-19)即呼吸道感染的急性呼吸道疾病。这是持续存在的2019-20年冠状病毒暴发的原因,这是全球卫生紧急事件。基因组测序已经证实,它是一种正义、单链RNA冠状病毒。

[0070] 国际病毒分类学委员会(ICTV)宣布,该病毒的正式名称为SARS-CoV-2。

[0071] 认为该病毒具有人畜共患起源。该病毒和其他病毒样品的基因序列的比较已经证实与SARS-CoV(79.5%)和蝙蝠冠状病毒(96%)相似。这一发现使得蝙蝠最终起源成为可能,但不能排除诸如穿山甲等中间宿主。该病毒可以是由两种或更多种冠状病毒形成的重组病毒。

[0072] 已经确认该病毒在人与人之间传播。冠状病毒主要通过密切接触散播,尤其是通过在约6英尺(1.8m)范围内咳嗽和打喷嚏产生的呼吸道飞沫散播。在被感染患者的粪便样品中也发现了病毒RNA。即使在潜伏期,病毒也可能具有感染性。

[0073] 利用足够数量的测序基因组,可以重建病毒家族突变史的系统树。对2003年SARS暴发起源的研究已经得到这样的发现,许多SARS样蝙蝠冠状病毒大多起源于菊头蝠属(Rhinolophus)的菊头蝠。SARS-CoV-2属于这一类别的SARS相关冠状病毒。2015年和2017年公开的中华菊头蝠(Rhinolophus sinicus)的两个基因组序列显示出与SARS-CoV-2有80%类似。来自在云南省收集的中菊头蝠(Rhinolophus affinis)的第三病毒基因组“RaTG13”与SARS-CoV-2有96%类似。[28][29]为了比较,病毒中的这种变异量与过去十年来在H3N2人流感病毒株中观察到的突变量相似。

[0074] SARS-CoV-2属于称为冠状病毒的广泛病毒家族;“nCoV”是直到选择更具体名称之前用于指新型冠状病毒的标准术语。它是一种正义单链RNA(+ssRNA)病毒。其他冠状病毒能够引起疾病,其范围从普通感冒到更严重的疾病,诸如中东呼吸综合征(MERS)和严重急性呼吸综合征(SARS)。它是继229E、NL63、OC43、HKU1、MERS-CoV和SARS-CoV之后会感染人的第七种已知冠状病毒。

[0075] 像SARS-CoV一样,SARS-CoV-2是Sarbe冠状病毒(Sarbecovirus)亚属(Beta-CoV谱系B)的成员。其RNA序列的长度大约为30,000个碱基。

[0076] SARS-CoV-2基因组的公开导致对该病毒的刺突(S)蛋白的受体结合蛋白(RBD)进行了几项蛋白质建模实验。结果表明,S蛋白对血管紧张素转化酶2(ACE2)受体保持足够的亲和力以将其用作细胞进入的机制。1月22日,中国研究完整病毒的小组和美国研究反向遗传学的小组独立地通过实验证明了人ACE2是SARS-CoV-2的受体。

[0077] 为了寻找潜在的蛋白酶抑制剂,来自ORF1a多蛋白的病毒3C样蛋白酶M(pro)也已建模用于药物对接(drug docking)实验。Innophore已基于SARS蛋白酶产生了两个计算模型,而中国科学院已经产生了重组SARS-CoV-2蛋白酶未公开的实验结构。另外,密歇根大学的研究人员使用I-TASSER对SARS-CoV-2基因组中所有成熟肽的结构进行了建模。

[0078] 该病毒的基本再生数(R-零)估计在1.4至3.9之间。这意味着,当不进行检查时,该病毒通常会每个已确立的感染导致1.4至3.9个新病例。已经确定该病毒能够沿至少四人的链传播。

[0079] 2020年1月,多个组织和机构开始基于已公开的基因组创建SARS-CoV-2疫苗的工作。在中国,中国疾病预防控制中心正在开发一种针对新型冠状病毒的疫苗。香港大学还宣布那里正在开发一种疫苗。上海东方医院也正在与生物技术公司斯微生物科技有限公司(Stemirna Therapeutics)合作开发一种疫苗。

[0080] 在其他地方,流行病防范创新联盟(CEPI)正支持三个疫苗项目,包括生物技术公司摩登纳和因诺维制药公司的项目以及昆士兰大学的另一个项目。美国国立卫生研究院

(NIH)正在与摩登纳合作生产匹配冠状病毒表面的刺突的RNA疫苗;I期临床试验于2020年3月开始。因诺维制药公司正在开发一种基于DNA的疫苗,并且正与一家中国公司合作,以便加快其被中国监管机构所接受,希望在2020年夏季对该疫苗进行人体试验。在澳大利亚,昆士兰大学正在研究一种分子钳疫苗的潜力,该分子钳疫苗将会对病毒蛋白进行基因修饰以使其模拟冠状病毒并刺激免疫反应。

[0081] 在一个独立的项目中,加拿大公共卫生局已许可萨斯喀彻温大学的国际疫苗中心(VIDO-InterVac)开展疫苗工作。VIDO-InterVac旨在于2020年3月开始生产和动物试验,并于2021年开始人体试验。伦敦帝国理工学院医学院现处于在动物上测试疫苗的阶段。

[0082] COVID-19急性呼吸道疾病是由SARS-CoV-2引起的病毒性呼吸道疾病。症状可包括发烧、干咳和呼吸短促。截至2020年3月,尚无特定的许可治疗可用,努力专注于减轻症状和支持功能。

[0083] 那些感染者可能没有症状或者可能有轻度至重度症状,如发烧、咳嗽、呼吸短促。腹泻或上呼吸道症状(例如打喷嚏、流鼻涕、喉咙痛)的频率较低。严重感染的病例可进展为严重的肺炎、多器官衰竭和死亡。世界卫生组织估计从暴露到症状发作的时间为2至10天,而美国疾病控制和预防中心(CDC)估计为2至14天。

[0084] 全球卫生组织已经公布了个体可以采取以减少SARS-CoV-2感染机会的预防措施。建议与先前针对其他冠状病毒公布的那些建议相似,包括:经常用肥皂和水洗手;勿用未洗的手触摸眼睛、鼻子或嘴巴;以及养成良好的呼吸道卫生习惯。

[0085] WHO已公布了几种针对SARS-CoV-2的测试方案。测试使用实时逆转录聚合酶链反应(rRT-PCR)。该测试可以对呼吸道或血液样品进行。结果通常可在几小时到几天内获得。

[0086] 于2020年1月开始了对该疾病的潜在治疗方法的研究。中国疾病预防控制中心于1月下旬开始在冠状病毒相关的肺炎中测试现有肺炎治疗方法。还已经检查了RNA聚合酶抑制剂瑞德西韦(remdesivir)和β干扰素。2020年1月下旬,中国医学研究人员表示有意开始对瑞德西韦、氯喹(chloroquine)和洛匹那韦(lopinavir)/利托那韦(ritonavir)的临床测试,在探索性研究中,所有这些似乎在细胞水平上对SARS-CoV-2具有“相当好的抑制作用”。2020年2月5日,中国开始申请瑞德西韦用于该疾病的专利。

[0087] 由SARS-CoV-2感染引起的总死亡率和发病率未知,这是因为在当前的暴发中病死率可随着时间而变化,而且因为进展为可诊断疾病的感染比例仍然不清楚。然而,对SARS-CoV-2急性呼吸道疾病的初步研究得出的病死率数字为2%至3%,而2020年1月,WHO提出病死率为大约3%。帝国学院在55个致死病例中进行的未经审查的预印本研究指出,由于遗漏了无症状感染,对死亡率的早期估计可能过高。他们估计平均感染死亡比率(感染者的死亡率)范围从无症状携带者的0.8%到仅包括来自湖北省的有症状病例的18%。

[0088] II.单克隆抗体及其生产

[0089] “经分离的抗体”是已经从其天然环境的组分中分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可能包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在特定的实施例中,该抗体经纯化:(1)达到通过Lowry方法测定高于抗体的95重量%,且最特别地大于99重量%;(2)达到足以通过使用转杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)达到使用考马斯蓝或银染色剂在还原或非还原条件下通过SDS-PAGE测量的均一性。经分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为

不会存在抗体天然环境的至少一种组分。然而,通常,经分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0090] 四链抗体基本单元是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的异四聚糖蛋白。IgM抗体由5个基本异四聚体单元和另一个称为J链的多肽组成,因此含有10个抗原结合位点,而分泌的IgA抗体可以聚合形成多价集合物,其包含2-5个4链基本单元和J链。就IgG而言,4链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接,而两条H链根据H链同种型通过一个或多个二硫键彼此连接。每条H链和L链还具有规律间隔的链内二硫桥。每条H链在N-端具有可变区(V_H),接着是α链和γ链各自的三个恒定结构域(C_H),以及μ和同种型的四个C_H结构域。每条L链在N-端具有可变区(V_L),接着是在其另一末端的恒定结构域(C_L)。V_L与V_H对齐并且C_L与重链的第一恒定结构域(C_{H1})对齐。据信特定氨基酸残基会在轻链与重链可变区之间形成界面。V_H和V_L配对在一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别的抗体的结构和性质,参见例如Basic and Clinical Immunology[基础免疫学和临床免疫学],第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编),康涅狄格州诺沃克的阿普尔顿和兰格公司(Appleton&Lange,Norwalk,Conn.),1994年,第71页和第6章。

[0091] 来自任何脊椎动物物种的L链可基于其恒定结构域(C_L)的氨基酸序列分配为两种明显不同类型(称为κ和λ)中的一种。根据其重链恒定结构域(C_H)的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白分配为不同的类别或同种型。免疫球蛋白有五个类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其重链分别称为α、δ、ε、γ和μ。基于C_H序列和功能上相对小的差异,将γ和α类进一步分成亚类,人表达以下亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0092] 术语“可变”是指下述事实,即在抗体间V结构域的某些区段在序列上广泛不同。V结构域介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性在可变区的110个氨基酸跨度上不均匀分布。相反,V区由称为骨架区(FR)的15-30个氨基酸的相对不变的区段组成,被称为“高变区”的各9-12个氨基酸长的极端可变性较短区域间隔。天然重链和轻链的可变区各自包含四个FR,主要采用β-折叠构型,通过三个高变区连接,这三个高变区形成连接并且在一些情况下形成β-折叠结构的一部分的环。在每条链中的高变区由FR保持紧靠在一起,并且与来自另一条链的高变区促成抗体的抗原结合位点的形成(参见卡巴特(Kabat)等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],第5版,Public Health Service[公共卫生服务],National Institutes of Health[美国国家卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州(1991))。恒定结构域不直接涉及抗体与抗原的结合,但是表现出多种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、抗体依赖性中性粒细胞吞噬作用(ADNP)和抗体依赖性补体沉积(ADCD)。

[0093] 术语“高变区”在本文中使用时是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,当按照Kabat编号系统编号时,在V_L中约残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)周围,以及在V_H中约残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)周围;Kabat等人,Sequences ofProteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],第5版Public Health Service[公共卫生服务],National Institutes of Health[美国国家卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州.(1991));

和/或来自“高变环”的那些残基(例如,当按照Chothia编号系统编号时,在V_L中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3),以及在V_H中的残基26-32(H1)、52-56(H2)和95-101(H3);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917(1987));和/或来自“高变环”/CDR的那些残基(例如,当按照IMGT编号系统编号时,在V_L中的残基27-38(L1)、56-65(L2)和105-120(L3),以及在V_H中的残基27-38(H1)、56-65(H2)和105-120(H3);Lefranc,M.P.等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究]27:209-212(1999),Ruiz,M.等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究]28:219-221(2000))。任选地,抗体在以下的一个或多个点具有对称插入:当按照AHo编号时,V_L中的28、36(L1)、63、74-75(L2)和123(L3),以及V_H中的28、36(H1)、63、74-75(H2)和123(H3);Honneger,A.和Plunkthun,A.J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]309:657-670(2001)。

[0094] “种系核酸残基”意指天然存在于编码恒定区或可变区的种系基因中的核酸残基。“种系基因”是在生殖细胞(即注定要变成卵子或精子的细胞)中发现的DNA。“种系突变”是指在单细胞阶段的生殖细胞或合子中发生的特定DNA的可遗传改变,并且当传递给后代时,这种突变并入身体的每个细胞中。种系突变与在单个体细胞中获得的体细胞突变大不相同。在一些情况下,使编码可变区的种系DNA序列中的核苷酸突变(即,体细胞突变),并用不同的核苷酸置换。

[0095] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群获得的抗体,即除了可能少量存在的可能天然存在的突变之外,构成该群的单个抗体是相同的。单克隆抗体是高特异性的,针对单个抗原位点的。此外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的有利之处在于它们可以在不被其他抗体污染的情况下被合成。修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,可用于本披露的单克隆抗体可通过首先由Kohler等人,Nature[自然],256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备,或者可以在对抗原特异性B细胞,即对感染或免疫产生反应的抗原特异性浆母细胞进行单细胞分选后,或从大量分选的抗原特异性集合中的单个细胞中捕获连接的重链和轻链后,使用重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(参见例如,美国专利4,816,567)。也可以使用例如Clackson等人,Nature[自然],352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],222:581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0096] A.通用方法

[0097] 将理解的是,与SARS-CoV-2结合的单克隆抗体将具有几种应用。这些包括生产用于检测和诊断SARS-CoV-2感染以及用于治疗该感染的诊断试剂盒。在这些情况下,可以将此类抗体与诊断剂或治疗剂连接,将它们在竞争性测定法中用作捕获剂或竞争剂,或者在不附加其他试剂的情况下单独使用它们。抗体可以突变或修饰,如下文进一步讨论。制备和表征抗体的方法是本领域众所周知的(参见例如,抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),1988;美国专利4,196,265)。

[0098] 产生单克隆抗体(MAb)的方法通常沿用于制备多克隆抗体相同的线路开始。这两种方法的第一步都是对适当宿主的免疫接种或鉴定由于先前的自然感染或用许可的或实验疫苗接种而有免疫力的受试者。如本领域众所周知的那样,用于免疫接种的给定组合物

在其免疫原性上可以不同。因此，常常有必要加强宿主免疫系统，正如可以通过将肽或多肽免疫原与载剂偶联来实现那样。示例性且优选的载剂是钥孔血蓝素(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他白蛋白，诸如卵白蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可以用作载剂。将多肽与载剂蛋白缀合的方式是本领域众所周知的，包括戊二醛、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和双重氮化联苯胺。如本领域中同样众所周知的，可以通过使用免疫应答的非特异性刺激物(称为佐剂)来增强特定免疫原组合物的免疫原性。在动物中的示例性且优选的佐剂包括完全弗氏佐剂(一种免疫应答的非特异性刺激物，含有被杀死的结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis))、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂，并且在人类中的示例性且优选的佐剂包括明矾、CpG、MFP59和免疫刺激分子的组合(“佐剂体系”，诸如AS01或AS03)。诱导SARS-CoV-2特异性B细胞的其他实验接种形式也是可能的，包括纳米颗粒疫苗或在物理传递系统中以DNA或RNA基因形式递送的，以及用针头、基因枪、经皮电穿孔装置递送的基因编码的抗原(诸如脂质纳米颗粒或金基因枪珠粒)。也可以携带由可复制型病毒载体或复制缺陷型病毒载体诸如腺病毒、腺相关病毒、痘病毒、疱疹病毒或α病毒复制子或替代性地病毒样颗粒编码的抗原基因。

[0099] 在针对天然病原体的人抗体的情况下，合适的方法是鉴定已暴露于病原体的受试者，诸如那些已被诊断为已患该病的受试者，或那些已接种疫苗以产生针对该病原体的保护性免疫的受试者，或测试实验性疫苗的安全性或功效。可以检测循环的抗病原体抗体，然后可以从抗体阳性受试者中获得编码或产生抗体的B细胞。

[0100] 用于产生多克隆抗体的免疫原组合物的量随免疫原的性质以及用于免疫接种的动物而变化。可以使用多种途径来施用免疫原(皮下、肌肉内、皮内、静脉内和腹膜内)。可以通过在免疫接种后的不同时间点对免疫动物的血液进行采样来监测多克隆抗体的产生。也可以给予第二次加强注射。重复加强和滴定的过程，直至达到合适的滴度。当获得所需水平的免疫原性时，可以对免疫动物采血，并分离和储存血清，和/或可以将动物用于产生MAb。

[0101] 免疫接种后，选择具有用于产生抗体的潜力的体细胞，特别是B淋巴细胞(B细胞)，以用于MAb产生方案中。这些细胞可从活检的脾脏、淋巴结、扁桃体或腺样体、骨髓穿刺液或活检、来自粘膜器官如肺或胃肠道的组织活检中或从循环的血液中获得。然后将来自免疫动物或免疫人的产生抗体的B淋巴细胞与永生骨髓瘤细胞的细胞融合，永生骨髓瘤细胞通常是与免疫的动物或人或人/小鼠嵌合细胞相同的物种之一。适合用在产生杂交瘤的融合程序中的骨髓瘤细胞系优选地是不产生抗体的，具有高融合效率和酶缺乏，从而使得它们不能在仅支持所需融合细胞(杂交瘤)生长的某些选择性培养基中生长。如本领域技术人员已知的，可以使用多种骨髓瘤细胞中的任一种(Goding，第65-66页，1986；Campbell，第75-83页，1984)。HMMA2.5细胞或MFP-2细胞是此类细胞特别有用的实例。

[0102] 生成产生抗体的脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂交体的方法通常包括将体细胞与骨髓瘤细胞以2:1的比例混合，但是在促进细胞膜融合的一种试剂或多种试剂(化学或电)的存在下该比例可能分别从约20:1至约1:1变化。在一些情况下，作为初始步骤用爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)转化人B细胞会增加B细胞的大小，从而增强与相对较大型的骨髓瘤细胞的融合。通过在转化培养基中使用CpG和Chk2抑制剂药物，可增强EBV的转化效率。替代性地，可以通过与表达CD40配体(CD154)的转染细胞系一起在含有其他可溶性因子(诸如IL-21和人B细胞激活因子(BAFF)，BAFF是TNF超家族的II型成员)的培养基中共培养来激活人B

细胞。Kohler和Milstein(1975;1976)已经描述了使用仙台病毒(Sendai virus)的融合方法,Gefter等人(1977)已经描述了使用聚乙二醇(PEG)诸如37％(v/v)PEG的融合方法。使用电诱导的融合方法也是适当的(Goding,第71-74页,1986),并且存在效率更佳的方法(Yu等人,2008)。融合程序通常以约1×10^{-6}至1×10^{-8}的低频率产生有活力的杂交体,但利用优化程序,可以达到接近1/200的融合效率(Yu等人,2008)。然而,相对较低的融合效率不会造成问题,因为通过在选择性培养基中培养,将融合杂交体与亲代融合细胞(特别是通常会继续无限分裂的融合骨髓瘤细胞)区分开来。选择性培养基通常是一种含有阻断组织培养基中核苷酸的从头合成的试剂的培养基。示例性且优选的试剂是氨基蝶呤、甲氨蝶呤和偶氮丝氨酸。氨基蝶呤和甲氨蝶呤会阻断嘌呤和嘧啶两者的从头合成,而偶氮丝氨酸只会阻断嘌呤的合成。如果使用氨基蝶呤或甲氨蝶呤,则为培养基补充次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸来源(HAT培养基)。如果使用偶氮丝氨酸,则为培养基补充次黄嘌呤。如果B细胞来源是经EBV转化的人B细胞系,则添加哇巴因(ouabain),以消除尚未与骨髓瘤融合的EBV转化系。

[0103] 优选的选择培养基是HAT或含哇巴因的HAT。只有能够操作核苷酸补救途径的细胞才能在HAT培养基中存活。骨髓瘤细胞缺乏补救途径的关键酶,例如次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT),它们无法存活。B细胞可以操作该途径,但它们在培养中的寿命有限且通常会在约两周内死亡。因此,唯一可以在选择培养基中存活的细胞是那些由骨髓瘤和B细胞形成的杂交体。当用于融合的B细胞来源是经EBV转化的B细胞系时,如此处所示,哇巴因也可用于杂交体的药物选择,因为经EBV转化的B细胞易被药物杀死,而选择使用的骨髓瘤伴侣则具有哇巴因抗性。

[0104] 培养提供了杂交瘤群体,从中选择了特定的杂交瘤。通常,杂交瘤的选择是通过在微量滴定板中通过单克隆稀释来培养细胞,然后测试各克隆上清液(约两到三周后)的所需反应性来进行的。该测定应该是灵敏、简单且快速的,诸如放射性免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定、空斑测定、点免疫结合测定等。然后将所选的杂交瘤进行连续稀释或通过流式细胞术分选进行单细胞分选,并克隆到单个产生抗体的细胞系中,然后这些克隆物可以无限繁殖以提供mAb。可以按两种基本方式开发细胞系用于产生MAb。可以将杂交瘤样品注射(通常注射到腹膜腔中)到动物(例如,小鼠)中。任选地,在注射之前,用烃,特别是油诸如姥鲛烷(四甲基十五烷)使动物初免。当以这种方式使用人杂交瘤时,最好为免疫低下小鼠(诸如SCID小鼠)注射,以防止肿瘤排斥。被注射的动物发展出分泌由融合细胞杂交体产生的特异性单克隆抗体的肿瘤。然后可以穿刺抽取动物的体液,诸如血清或腹水,以提供高浓度的MAb。各细胞系也可以体外培养,其中MAb自然分泌到培养基中,它们可以容易地从培养基中以高浓度获得。替代性地,可以在体外使用人杂交瘤细胞系以在细胞上清液中产生免疫球蛋白。这些细胞系可以适合在无血清培养基中生长,以优化回收高纯度的人单克隆免疫球蛋白的能力。

[0105] 如果需要,可以使用过滤、离心和各种色谱法(诸如FPLC或亲和色谱法)进一步纯化通过任一方式产生的MAb。可以通过以下方法从纯化的单克隆抗体中获得本披露的单克隆抗体的片段,这些方法包括用酶诸如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶进行消化,和/或通过化学还原裂解二硫键。替代性地,可以使用自动肽合成仪合成本披露所涵盖的单克隆抗体片段。

[0106] 还考虑到可以使用分子克隆方法生成单克隆抗体。可以使用顺磁珠选择或流式细胞术分选对由于浆母细胞或激活的B细胞标志物而被鉴定为与感染或疫苗接种相对应的单

个B细胞，或经目标抗原标记的记忆B细胞进行物理分选，然后可以从单细胞中分离RNA并通过RT-PCR扩增抗体基因。各种单细胞RNA-seq方法可用于从单细胞中获得抗体可变基因。替代性地，可以将大量分选的抗原特异性细胞群分开到微泡中，并使用重链和轻链扩增子的物理连接，或来自囊泡的重链和轻链基因的通用条形码编制，从单细胞中回收匹配的重链和轻链可变基因。还可以通过用带有RT-PCR引物和条形码的穿透细胞的纳米颗粒处理细胞，以制备每个细胞具有一个条形码的转录产物，从抗原特异性B细胞群体中获得匹配的重链和轻链基因。也可以通过杂交瘤细胞系的RNA提取来分离抗体可变基因，并且通过RT-PCR获得抗体基因并将其克隆到免疫球蛋白表达载体中。替代性地，从分离自细胞系的RNA制备组合免疫球蛋白噬菌粒文库，并通过使用病毒抗原淘选来选择表达适当抗体的噬菌粒。与常规杂交瘤技术相比，该方法的优势在于，单轮可产生和筛选的抗体数量大约是10^4倍，并且H和L链组合产生了新的特异性，这进一步增加了找到适当抗体的机会。

[0107] 各自通过援引并入本文的传授在本披露中有用的抗体的产生的其他美国专利包括美国专利5,565,332，其描述了使用组合方法产生嵌合抗体；美国专利4,816,567，其描述了重组免疫球蛋白制剂；以及美国专利4,867,973，其描述了抗体-治疗剂缀合物。

[0108] B.本披露的抗体

[0109] 首先，根据本披露的抗体可以通过它们的结合特异性来定义。本领域技术人员通过使用本领域技术人员众所周知的技术评估给定抗体的结合特异性/亲和力，可以确定此类抗体是否落入本发明权利要求的范围内。例如，给定抗体所结合的表位可以由具有3个或更多个(例如，3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个)位于抗原分子内的氨基酸的单个连续序列组成(例如，结构域中的线性表位)。替代性地，该表位可位于抗原分子内的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)组成(例如，构象表位)。

[0110] SARS-CoV-2抗原的两个主要类别是表面刺突(S)蛋白和内部蛋白，特别是核衣壳(N)蛋白。S蛋白的抗体将可用于预防、或治疗、或诊断，或用于表征疫苗。S蛋白抗体将与该蛋白具有额外的结合特异性，特定抗体与SARS-CoV-2S蛋白的全长胞外域结合(以单体或寡聚体(诸如三聚体)呈现；有或无构象稳定性突变，诸如在关键位点引入脯氨酸(“2P突变”))以及(a)与受体结合结构域(RBD)结合的抗S蛋白抗体，(b)与RBD以外的结构域结合的抗S蛋白抗体。与RBD以外的结构域结合的子集中的一些与N端结构域(NTD)结合，而其他的与NTD或RBD以外的表位结合，并且(c)进一步发现S蛋白抗体会通过阻断SARS-CoV-2S蛋白与其受体即人血管紧张素转化酶2(hACE2)的结合来中和SARS-CoV-2，而其他的中和但不阻断受体结合。最后，抗体可以与SARS-CoV-2S蛋白和其他冠状病毒(诸如SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63和/或HCoV-HKU1)的S蛋白交叉反应，以及交叉中和SARS-CoV-2和这些其他冠状病毒。

[0111] 另一种特异性将是与N抗体(或其他内部靶标)结合的抗体，这些抗体将主要具有诊断用途。例如，针对SARS-CoV-2的N蛋白或其他内部蛋白的抗体，这些抗体特异性识别SARS-CoV-2或交叉反应性识别SARS-CoV-2和其他冠状病毒，诸如SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63和/或HCoV-HKU1。

[0112] 本领域普通技术人员已知的各种技术可用于测定抗体是否与多肽或蛋白质中的“一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规的交叉阻断测定，诸如在Antibodies[抗体]，Harlow和Lane(纽约冷泉港的冷泉港出版社(Cold Spring Harbor

Press,Cold Spring Harbor,N.Y.))中描述的那些。可以在各种结合测定(诸如ELISA、生物膜干涉技术或表面等离子体共振)中测量交叉阻断。其他方法包括丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke,Methods Mol.Biol.[分子生物学方法]248:443-63,2004)、肽裂解分析、使用单颗粒重建的高分辨率电子显微镜术、冷冻电镜或断层摄影、晶体学研究和NMR分析。另外,可采用诸如抗原的表位切除、表位提取和化学修饰的方法(Tomer Prot.Sci.[蛋白质科学]9:487-496,2000)。可用于鉴定与抗体相互作用的多肽中的氨基酸的另一方法是通过质谱法检测的氢/氘交换。一般地说,该氢/氘交换方法涉及氘-标记目标蛋白质,随后使该抗体与氘-标记的蛋白质结合。接下来,将蛋白质/抗体复合物转移到水中,受抗体复合物保护的氨基酸中的可交换质子以比不是界面的一部分的氨基酸中的可交换质子更慢的速率经历氘-氢反向交换。因此,与未包括在界面中的氨基酸相比,形成蛋白质/抗体界面的一部分的氨基酸可以保留氘且因此表现出相对较高的质量。在抗体解离之后,该靶蛋白经受蛋白酶裂解和质谱法分析,从而揭示出与抗体相互作用的特定氨基酸对应的氘标记的残基。参见例如,Ehring,Analytical Biochemistry[分析生物化学]267:252-259(1999);Engen和Smith,Anal.Chem.[分析化学]73:256A-265A(2001)。当抗体中和SARS-CoV-2时,可以通过在体外或在动物模型中在高浓度抗体的存在下繁殖SARS-CoV-2来分离抗体逃逸突变体变异生物。编码抗体所靶向的抗原的SARS-CoV-2基因的序列分析揭示了赋予抗体逃逸的突变,表明表位中的残基或变构影响表位结构的残基。

[0113] 术语“表位”是指抗原上B细胞和/或T细胞对其反应的位点。B细胞表位可以由连续氨基酸形成,也可以由通过蛋白质三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位一般包括具有独特的空间构象的至少3个、更常见的至少5个、或8-10个氨基酸。

[0114] 修饰辅助分析(MAP),也称为基于抗原结构的抗体谱分析(ASAP),是一种根据每种抗体与经化学或酶促修饰的抗原表面的结合谱的相似性,对大量针对相同抗原的单克隆抗体(mAb)进行分类的方法(参见美国专利公开2004/0101920,其明确地通过援引以其全文并入本文)。每个类别可以反映与另一类别所表示的表位明显不同或部分重叠的独特表位。这种技术允许快速过滤遗传上相同的抗体,从而使表征可以集中在遗传上不同的抗体上。当应用于杂交瘤筛选时,MAP可有助于鉴定产生具有所需特征的mAb的罕见杂交瘤克隆物。MAP可用于将本披露的抗体分选为结合不同表位的抗体组。

[0115] 本披露包括可以与相同表位或该表位的一部分结合的抗体。同样,本披露还包括与本文所述的任何特定示例性抗体竞争与靶标或其片段结合的抗体。通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地测定抗体是否与参考抗体结合相同的表位,或与参考抗体竞争结合。例如,为测定测试抗体是否与和参考相同的表位结合,允许该参考抗体在饱和条件下与靶标结合。接下来,评估测试抗体与靶分子结合的能力。如果在该参考抗体饱和结合后该测试抗体能够与靶分子结合,则可以得出结论:该测试抗体与和参考抗体不同的表位结合。在另一方面,如果在该参考抗体饱和结合后该测试抗体不能与靶分子结合,则该测试抗体可与和参考抗体所结合的表位相同的表位结合。

[0116] 为测定抗体是否与参考抗SARS-CoV-2抗体竞争结合,上述结合方法以两种方向进行:在第一种方向中,允许参考抗体在饱和条件下与SARS-CoV-2抗原结合,随后评估测试抗

体与SARS-CoV-2分子的结合。在第二种方向中，允许测试抗体在饱和条件下与SARS-CoV-2抗原分子结合，随后评估参考抗体与SARS-CoV-2分子的结合。如果在两种方向中，仅有第一(饱和)抗体能够与SARS-CoV-2结合，则可以得出结论测试抗体和参考抗体竞争与SARS-CoV-2结合。如本领域普通技术人员所理解的，与参考抗体竞争结合的抗体可以不一定与和参考抗体相同的表位结合，但可以通过结合重叠或相邻表位空间阻断参考抗体的结合。

[0117] 如果两种抗体各自竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合，则两种抗体与相同或重叠的表位结合。也就是说，如在竞争性结合测定中所测量的那样，1、5、10、20或100倍过量的一种抗体将另一种抗体的结合抑制至少50％但优选75％、90％或甚至99％(参见，例如Junghans等人，Cancer Res.[癌症研究]199050:1495-1502)。替代性地，如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，则两种抗体具有重叠表位。在一些方面，与COV2-2196结合相同或重叠表位的抗体或抗体片段和与COV2-2130结合相同或重叠表位的抗体或抗体片段组合使用。

[0118] 然后可进行另外的常规实验法(例如，肽突变和结合分析)以确认所观察到的测试抗体的结合的缺失事实上是否由于与参考抗体相同的表位的结合或空间阻断(或另一现象)是否是所观察的结合的缺失的原因。可以使用本领域中可用的ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或任何其他定量或定性抗体结合测定进行这种实验。采用EM或晶体学的结构研究也可以证明竞争结合的两种抗体是否识别相同的表位。

[0119] 在另一方面，提供了单克隆抗体，其具有分别来自如表3和表4所示的重链和轻链的克隆配对的CDR。可以使用本文所述的方法，通过下文实例部分中讨论的克隆物来产生此类抗体。

[0120] 在另一方面，抗体可以由它们的可变序列定义，该可变序列包括另外的“框架”区。此外，抗体序列可以不同于这些序列，任选地使用下面更详细讨论的方法。例如，核酸序列可以与上面列出的那些的不同之处在于(a)可变区可以与轻链和重链的恒定结构域分开，(b)核酸可以不同于上面列出的那些，而不影响由此编码的残基，(c)核酸可以与上面列出的那些有给定百分比的不同，例如同源性为70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％，(d)核酸可由于在高度严格条件下的杂交能力而不同于上面列出的那些，如低盐和/或高温条件所例证的那样，诸如在约50℃至约70℃的温度下约0.02M至约0.15M NaCl所提供的，(e)氨基酸可以与上面列出的那些有给定百分比的不同，例如同源性为80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％，或(f)氨基酸可因允许保守性取代(在下面讨论)而不同于上面列出的那些。前述各项均适用于核酸序列和氨基酸序列。

[0121] 当比较多核苷酸和多肽序列时，如下所述，如果两个序列中的核苷酸或氨基酸序列在进行比对以获得最大一致性时是相同的，则将两个序列称为“相同”。两个序列之间的比较通常通过在比较窗口上比较序列以鉴定和比较具有序列相似性的局部区域来进行。如本文所用，“比较窗口”是指具有至少约20个连续位置(通常为30至约75个、40至约50个)的区段，其中在两个序列进行最佳比对后，可以将序列与具有相同数目的连续位置的参考序列进行比较。

[0122] 可以使用Lasergene生物信息学软件套件(威斯康星州麦迪逊的DNASTAR公司

(DNASTAR,Inc.,Madison,Wis.))中的Megalign程序,使用默认参数进行用于比较的序列的最佳比对。该程序体现了以下参考文献中描述的几种比对方案:Dayhoff,M.O.(1978)A model of evolutionary change in proteins--Matrices for detecting distant relationships[蛋白质进化变化模型-检测远缘关系的矩阵].在Dayhoff,M.O.(编辑)Atlas ofProtein Sequence and Structure[蛋白质序列和结构图集]中,National Biomedical Research Foundation,Washington D.C.[华盛顿特区的美国国家生物医学研究基金会]第5卷,增刊3,第345-358页;Hein J.(1990)Unified Approach to Alignment and Phylogeny[比对的统一方法和系统发育]第626-645页Methods in Enzymology[酶学方法]第183卷,Academic Press,Inc.[学术出版社有限公司],圣地亚哥,加利福尼亚;Higgins,D.G.和Sharp,P.M.(1989)CABIOS 5:151-153;Myers,E.W.和Muller W.(1988)CABIOS 4:11-17;Robinson,E.D.(1971)Comb.Theor[组合理论]11:105;Santou,N.Nes,M.(1987)Mol.Biol.Evol.[分子生物与进化]4:406-425;Sneath,P.H.A.和Sokal,R.R.(1973)数值分类学-数值分类法的原理与实践[Numerical Taxonomy--the Principles and Practice of Numerical Taxonomy],Freeman Press[弗里曼出版社],旧金山,加利福尼亚;Wilbur,W.J.和Lipman,D.J.(1983)Proc.Natl.Acad.,Sci.USA[美国国家科学院院刊]80:726-730。

[0123] 替代性地,用于比较的序列的最佳比对可通过以下方式进行:通过Smith和Waterman(1981)Add.APL.Math[应用数学进展]2:482的局部同一性算法,通过Needleman和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443的同一性比对算法,通过Pearson和Lipman(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]85:2444的相似性搜索方法,通过这些算法的计算机实现(威斯康辛遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA,遗传学计算机集团(GCG),575科学博士,威斯康星州麦迪逊),或通过检查。

[0124] 适于测定百分比序列同一性和序列相似性的算法的一个特定实例是BLAST和BLAST 2.0算法,这些算法在Altschul等人(1977)Nucl.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402和Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-410中有描述。BLAST和BLAST 2.0可以例如与本文所述的参数一起使用,以测定本披露的多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。可通过国家生物技术信息中心公开获得用于进行BLAST分析的软件。抗体序列的重排性质和每个基因的可变长度需要对单个抗体序列的多轮BLAST搜索。而且,不同基因的手动组装是困难的且容易出错。序列分析工具IgBLAST(万维网网址ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)鉴定与种系V、D和J基因的匹配,重排交界处的细节,Ig V结构域框架区和互补决定区的描绘。IgBLAST可以分析核苷酸或蛋白质序列并且可以分批处理序列,并允许同时对种系基因数据库和其他序列数据库进行搜索,以最大程度地减少可能遗漏最佳匹配的种系V基因的机会。

[0125] 在一个说明性实例中,对于核苷酸序列而言,可以使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)来计算累积分数。在以下情况时终止词语命中在每个方向上的延伸:累积比对得分从其最大实现值下降了数量X;由于一个或多个负得分残基比对的累积,累积得分变为零或更低;或到达任一序列的末端。BLAST算法的参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)默认使用为11的字长(W)和为10的期望值(E),以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff(1989)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:10915)比对,(B)为50,期望值(E)为10,M＝5,N＝-4,并且比较两条链。

[0126] 对于氨基酸序列,可以使用评分矩阵来计算累积得分。在以下情况时终止词语命中在每个方向上的延伸:累积比对得分从其最大实现值下降了数量X;由于一个或多个负得分残基比对的累积,累积得分变为零或更低;或到达任一序列的末端。BLAST算法的参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。

[0127] 在一种方法中,通过在至少20个位置的比较窗口上比较两个最佳比对的序列来测定“序列同一性的百分比”,其中多核苷酸或多肽序列在比较窗口中的部分与参考序列(不包含添加或缺失)相比,可包含20%或更少(通常5%至15%,或10%至12%)的添加或缺失(即空位)以便进行两个序列的最佳比对。通过以下方式来计算百分比:确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置数目以得到匹配位置数目,将匹配位置数目除以参考序列(即,比较窗口)中的位置总数并将结果乘以100,得到序列同一性的百分比。

[0128] 定义抗体的另一种方式是作为下述抗体及其抗原结合片段中任一种的“衍生物”。术语“衍生物”是指与抗原免疫特异性结合,但相对于“亲本”(或野生型)分子包含一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸取代、添加、缺失或修饰的抗体或其抗原结合片段。此类氨基酸取代或添加可以引入天然存在(即,DNA-编码的)或非天然存在的氨基酸残基。术语“衍生物”涵盖例如具有改变的CH1、铰链、CH2、CH3或CH4区域的变体,以便形成例如具有表现出增强或受损的效应子或结合特性的变体Fc区的抗体等。术语“衍生物”另外涵盖非氨基酸修饰,例如可糖基化(例如,具有改变的甘露糖、2-N-乙酰葡糖胺、半乳糖、果糖、葡萄糖、唾液酸、5-N-乙酰神经氨酸、5-二醇神经氨酸等含量)、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、蛋白质水解裂解、连接至细胞配体或其他蛋白质等的氨基酸。在一些实施例中,改变的碳水化合物修饰调节以下一种或多种功能:抗体的溶解、对抗体的亚细胞转运和分泌的促进、对抗体组装的促进、构象完整性和抗体介导的效应子功能。在一个特定实施例中,相对于缺少碳水化合物修饰的抗体,这些改变的碳水化合物修饰增强抗体介导的效应子功能。导致抗体介导的效应子功能改变的碳水化合物修饰是本领域众所周知的(例如,参见Shields,R.L.等人(2002)“Lack OfFucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity[人IgGN连接的寡糖上岩藻糖的缺乏改善了与人FcγRIII的结合和抗体依赖性细胞毒性],”J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277(30):26733-26740;Davies J.等人(2001)“Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line:Expression OfAntibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through HigherAffinityForFC Gamma RIII[重组抗CD20 CHO生产细胞系中GnTIII的表达:糖型改变的抗体的表达通过对FCγRIII的更高亲和力导致ADCC的增加],”Biotechnology&Bioengineering[生物技术与生物工程]74(4):288-294)。改变碳水化合物含量的方法是本领域技术人员已知的,参见例如,Wallick,S.C.等人(1988)“Glycosylation OfA VH Residue OfA Monoclonal Antibody AgainstAlpha(1----6)Dextran Increases Its Affinity ForAntigen[针对α(1----6)葡聚糖的单克隆抗体的VH残基的糖基化增加其对抗原的亲和力],”J.Exp.Med.[实验医学杂志]168(3):1099-1109;Tao,M.H.等人(1989)“Studies OfAglycosylated ChimericMouse-Human IgG.Role of

Carbohydrate in The Structure And Effector Functions Mediated By TheHuman IgG ConstantRegion[无糖基化嵌合小鼠-人IgG的研究。碳水化合物在结构和人IgG恒定区介导的效应子功能中的作用],"J.Immunol.[免疫学杂志]143(8):2595-2601;Routledge,E.G.等人(1995)"The Effect ofAglycosylation on The Immunogenicity ofA Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody[无糖基化对人源化治疗性CD3单克隆抗体的免疫原性的影响],"Transplantation[移植]60(8):847-53;Elliott,S.等人(2003)"Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering[通过糖工程技术增强治疗性蛋白质体内活性],"Nature Biotechnol.[自然生物技术]21:414-21;Shields,R.L.等人(2002)"Lack of Fucose on Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity[人IgGN连接的寡糖上岩藻糖的缺乏改善了与人FcγRIII的结合和抗体依赖性细胞毒性],"J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277(30):26733-26740。

[0129] 可以生成具有工程化序列或糖基化状态的衍生抗体或抗体片段,以在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、抗体依赖性中性粒细胞吞噬作用(ADNP)或抗体依赖性补体沉积(ADCD)功能中赋予优选的活性水平,正如通过基于珠粒或基于细胞的测定法或在动物模型中的体内研究所测量的。

[0130] 衍生物抗体或抗体片段可以使用本领域技术人员已知的技术通过化学修饰进行修饰,这些技术包括但不限于,特异性化学裂解、乙酰化、配制、衣霉素的代谢合成等。在一些实施例中,抗体衍生物将具有与亲本抗体相似或相同的功能。在另一个实施例中,抗体衍生物将表现出相对于亲本抗体改变的活性。例如,相比于亲本抗体,衍生物抗体(或其片段)可更紧密地结合到其表位或对蛋白水解更具抗性。

[0131] C.抗体序列的工程改造

[0132] 在各个实施例中,出于多种原因,诸如表达改善、交叉反应性改善或脱靶结合减少,可以选择工程改造所鉴定的抗体的序列。经修饰的抗体可以通过本领域技术人员已知的任何技术制备,这些技术包括通过标准分子生物学技术表达或多肽的化学合成。重组表达的方法在本文件的其他地方提出。以下是抗体工程改造相关目标技术的总体讨论。

[0133] 可以培养杂交瘤,然后裂解细胞,并提取总RNA。可以将随机六聚体与RT一起使用以生成RNA的cDNA拷贝,然后使用有望扩增所有人类可变基因序列的PCR引物的多重混合物进行PCR。可以将PCR产物克隆到pGEM-T Easy载体中,然后使用标准载体引物通过自动化DNA测序进行测序。可以使用从杂交瘤上清液收集并使用蛋白G色谱柱通过FPLC纯化的抗体进行结合和中和的测定。

[0134] 可以通过将重链和轻链Fv DNA从克隆载体亚克隆到IgG质粒载体中生成重组全长IgG抗体,然后转染到293(例如,Freestyle)细胞或CHO细胞中,并且可以从293或CHO细胞上清液中收集和纯化抗体。其他适当的宿主细胞系统包括细菌(诸如大肠杆菌(E.coli))、昆虫细胞(S2、Sf9、Sf29、High Five)、植物细胞(例如烟草,对类人聚糖进行或不进行工程改造)、藻类,或在多种非人转基因情况下,诸如小鼠、大鼠、山羊或牛。

[0135] 也考虑了编码抗体的核酸的表达,其既用于随后的抗体纯化的目的,又用于宿主的免疫接种。抗体编码序列可以是RNA,诸如天然RNA或经修饰的RNA。经修饰的RNA考虑了某些化学修饰,这些化学修饰赋予mRNA增加的稳定性和低的免疫原性,从而促进治疗上重要

的蛋白质的表达。例如，就翻译能力而言，N1-甲基-假尿嘧啶核苷(N1mΨ)优于其他几种核苷修饰及其组合。除了关闭对翻译的免疫/eIF2α磷酸化依赖性抑制作用之外，掺入的N1mΨ核苷酸还通过增加mRNA上的核糖体间歇和密度来显著改变翻译过程的动力学。经修饰的mRNA的核糖体负载增加，通过支持相同mRNA上的核糖体回收或核糖体重新募集，致使它们更易于起始。此类修饰可用于在接种RNA后增强体内的抗体表达。RNA，无论是天然的还是修饰的，都可以作为裸露RNA或在诸如脂质纳米颗粒的递送载体中递送。

[0136] 替代性地，可将编码抗体的DNA用于相同目的。该DNA包括在表达盒中，该表达盒包含在为其设计的宿主细胞中有活性的启动子。表达盒有利地包括在可复制的载体，诸如常规质粒或微型载体中。载体包括病毒载体，诸如考虑到了痘病毒、腺病毒、疱疹病毒、腺相关病毒和慢病毒。还考虑了编码抗体基因的复制子，诸如基于VEE病毒或辛德毕斯病毒的甲病毒复制子。此类载体的递送可以用针头通过肌内、皮下或皮内途径进行，或者在需要体内表达时通过经皮电穿孔进行。

[0137] 在与最终cGMP制造过程相同的宿主细胞和细胞培养过程中产生的抗体的快速可用性具有减少过程开发程序的持续时间的潜力。龙沙(Lonza)已开发出一种泛型方法，该泛型方法使用在CDACF培养基中生长的合并转染子，以在CHO细胞中快速产生少量(最多50g)抗体。尽管比真实瞬态系统略慢，但优点包括产品浓度更高以及使用与生产细胞系相同的宿主和工艺。在一次性生物反应器中表达模型抗体的GS-CHO库的生长和生产率的实例：在以分批补料模式操作的一次性袋式生物反应器培养(工作体积为5L)中，在转染9周内达到2g/L的收获抗体浓度。

[0138] 抗体分子将包含例如通过mAb的蛋白水解裂解产生的片段(诸如F(ab')、$F(ab')_2$)，或例如可经由重组方式产生的单链免疫球蛋白。F(ab')抗体衍生物是单价的，而$F(ab')_2$抗体衍生物是二价的。在一个实施例中，此类片段可以彼此结合，或与其他抗体片段或受体配体结合以形成“嵌合”结合分子。显著地，此类嵌合分子可含有能够与同一分子的不同表位结合的取代基。

[0139] 在相关的实施例中，抗体是所披露的抗体的衍生物，例如包含与所披露的抗体中的那些相同的CDR序列的抗体(例如，嵌合或CDR移植抗体)。替代性地，可能希望进行修饰，诸如将保守性变化引入抗体分子中。在做出此类变化时，可考虑氨基酸的亲水性指数。亲水性氨基酸指数在赋予蛋白相互作用生物功能中的重要性在本领域中已得到一致认同(Kyte和Doolittle，1982)。现已接受氨基酸的相对亲水特征促成所得蛋白的二级结构，其反过来又限定了该蛋白与其他分子间的相互作用，例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等。

[0140] 在本领域中还应理解类似氨基酸的取代可根据亲水性而有效进行。通过援引并入本文的美国专利4,554,101号陈述受其相邻氨基酸亲水性控制的蛋白的最大局部平均亲水性与该蛋白的生物学特性相关。如美国专利4,554,101中详细描述，已经为氨基酸残基分配了以下亲水性值：碱性氨基酸：精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)和组氨酸(-0.5)；酸性氨基酸：天冬氨酸(+3.0±1)、谷氨酸(+3.0±1)、天冬酰胺(+0.2)和谷氨酰胺(+0.2)；亲水性、非离子氨基酸：丝氨酸(+0.3)、天冬酰胺(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)和苏氨酸(-0.4)，含硫氨基酸：半胱氨酸(-1.0)和蛋氨酸(-1.3)；疏水性、非芳香族氨基酸：缬氨酸(-1.5)、亮氨酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、脯氨酸(-0.5±1)、丙氨酸(-0.5)和甘氨酸(0)；疏水性、芳香族氨基酸：色氨酸(-3.4)、苯丙氨酸(-2.5)和酪氨酸(-2.3)。

[0141] 应理解氨基酸可由具有类似亲水性的另一氨基酸取代并且产生经生物学或免疫学改性的蛋白质。在此类改变中，优选取代其亲水性值在±2以内的氨基酸，特别优选取代其亲水性值在±1以内的氨基酸，并且甚至更特别优选取代那些亲水性值在±0.5以内的氨基酸。

[0142] 如上面所概述的，氨基酸取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到前述各种特性的示例性取代是本领域技术人员众所周知的并且包括：精氨酸和赖氨酸；谷氨酸和天冬氨酸；丝氨酸和苏氨酸；谷氨酰胺和天冬酰胺；以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0143] 本披露还考虑了同种型修饰。通过将Fc区修饰为具有不同的同种型，可以实现不同的功能。例如，改为IgG_1可以增加抗体依赖性细胞的细胞毒性，转换为A类可以改善组织分布，而转换为M类可以提高化合价。

[0144] 替代性地或另外，将氨基酸修饰与改变IL-23p19结合分子的Fc区的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)功能的一种或多种其他氨基酸修饰组合在一起可能是有用的。特别感兴趣的结合多肽可以是与C1q结合并展示出补体依赖性细胞毒性的多肽。可以修饰具有预先存在的C1q结合活性，任选地还具有介导CDC的能力的多肽，使得这些活性中的一种或两种活性得以增强。改变C1q和/或更改其补体依赖性细胞毒性功能的氨基酸修饰例如在特此通过援引并入的WO/0042072中有描述。

[0145] 可以例如通过更改C1q结合和/或FcγR结合并由此改变CDC活性和/或ADCC活性来设计具有改变的效应子功能的抗体的Fc区。“效应子功能”负责激活或降低生物活性(例如，在受试者中)。效应子功能的实例包括但不限于：C1q结合；补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；下调细胞表面受体(例如，B细胞受体；BCR)等。此类效应子功能可能需要将Fc区与结合结构域(例如，抗体可变结构域)组合，并且可以使用各种测定法(例如，Fc结合测定法、ADCC测定法、CDC测定法等)进行评估。

[0146] 例如，可以生成具有改善的C1q结合和改善的FcγRIII结合(例如，具有改善的ADCC活性和改善的CDC活性)的抗体的变体Fc区。替代性地，如果需要降低或消除效应子功能，可以工程化变体Fc区使其具有降低的CDC活性和/或降低的ADCC活性。在其他实施例中，仅可以增加这些活性中的一种，并且任选地，也可以降低另一种活性(例如，以生成ADCC活性改善，但是CDC活性降低的Fc区变体，反之亦然)。

[0147] FcRn结合。还可以引入Fc突变并工程化，以改变它们与新生儿Fc受体(FcRn)的相互作用且改善其药代动力学特性。与FcRn的结合改善的人Fc变体的集合已有描述(Shields等人，(2001).High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI，FcγRII，FcγRIII，and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR[人IgG1上FcγRI、FcγRII、FcγRIII和FcRn的结合位点的高分辨率作图以及与FcγR的结合改善的IgG1变体的设计]，(J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276:6591-6604))。已知可以导致半衰期延长的许多方法(Kuo和Aveson，(2011))，包括可以通过包括丙氨酸扫描诱变、随机诱变和筛选在内的技术生成氨基酸修饰以评估与新生儿Fc受体(FcRn)的结合和/或体内行为。后面是诱变的计算策略也可用于选择一种氨基酸突变进行突变。

[0148] 因此，本披露提供了与FcRn的结合得到优化的抗原结合蛋白的变体。在一个特定

的实施例中，抗原结合蛋白的所述变体在所述抗原结合蛋白的Fc区中包含至少一个氨基酸修饰，其中与所述亲本多肽相比，所述修饰选自由Fc区的226、227、228、230、231、233、234、239、241、243、246、250、252、256、259、264、265、267、269、270、276、284、285、288、289、290、291、292、294、297、298、299、301、302、303、305、307、308、309、311、315、317、320、322、325、327、330、332、334、335、338、340、342、343、345、347、350、352、354、355、356、359、360、361、362、369、370、371、375、378、380、382、384、385、386、387、389、390、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、403、404、408、411、412、414、415、416、418、419、420、421、422、424、426、428、433、434、438、439、440、443、444、445、446和447组成的组，其中Fc区中氨基酸的编号是Kabat中EU索引的编号。在本披露的另一方面，修饰是M252Y/S254T/T256E。

[0149] 另外，各种出版物描述了用于获得半衰期被更改的生理活性分子的方法，参见例如Kontermann(2009)通过将FcRn结合多肽引入分子中或通过将分子与保留了FcRn结合亲和力但是对其他Fc受体的亲和力已大大降低的抗体融合或与抗体的FcRn结合结构域融合来更改半衰期。

[0150] 衍生化的抗体可用于改变亲本抗体在哺乳动物(特别是人类)中的半衰期(例如，血清半衰期)。此类改变可导致超过15天、优选超过20天、超过25天、超过30天、超过35天、超过40天、超过45天、超过2个月、超过3个月、超过4个月、或超过5个月的半衰期。本披露的抗体或其片段在哺乳动物(优选人类)中的延长的半衰期导致所述抗体或抗体片段在该哺乳动物中的更高血清滴度，并因此降低施用所述抗体或抗体片段的频率，和/或降低待施用的所述抗体或抗体片段的浓度。可以通过本领域技术人员已知的技术来生成具有延长的体内半衰期的抗体或其片段。例如，具有延长的体内半衰期的抗体或其片段可以通过修饰(例如，取代、缺失或添加)鉴定为涉及到Fc结构域与FcRn受体之间的相互作用中的氨基酸残基来生成。

[0151] Beltramello等人(2010)先前报道了由于中和性mAb倾向于增强登革热病毒感染而对它们进行修饰，方式是产生其中CH2结构域的1.3和1.2位置的亮氨酸残基(根据C结构域的IMGT唯一编号)被丙氨酸残基取代的mAb。如Hessell等人(2007)所述，这种也称为“LALA”突变的修饰消除了抗体与FcγRI、FcγRII和FcγRIIIa的结合。比较了变体和未修饰的重组mAb中和并增强被四种登革热病毒血清型感染的能力。LALA变体保持与未修饰的mAb相同的中和活性，但完全没有增强活性。因此，在当前披露的抗体的上下文中考虑了这种性质的LALA突变。

[0152] 改变的糖基化。本披露的特定实施例是经分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含基本上均质的聚糖，而没有唾液酸、半乳糖或岩藻糖。该单克隆抗体包含重链可变区和轻链可变区，两者均可以分别附连至重链或轻链恒定区。前述基本上均质的聚糖可以共价附连于重链恒定区。

[0153] 本披露的另一个实施例包括具有新型Fc糖基化模式的mAb。经分离的单克隆抗体或其抗原结合片段存在于以GNGN或G1/G2糖型表示的基本上均质的组合物中。Fc糖基化在治疗性mAb的抗病毒特性和抗癌特性中起重要作用。本披露与最近的研究一致，该研究显示在体外无岩藻糖的抗HIV mAb的抗慢病毒细胞介导的病毒抑制作用增加。具有缺乏核心岩藻糖的均质聚糖的本披露的该实施例显示出针对特定病毒的保护作用增加两倍以上。消除核心岩藻糖可显著改善自然杀伤(NK)细胞介导的mAb的ADCC活性，但似乎对多形核细胞

(PMN)的ADCC活性具有相反的作用。

[0154] 与没有基本上均质的GNGN糖型而具有含G0、G1F、G2F、GNF、GNGNF或GNGNFX的糖型的相同抗体相比，包含由GNGN或G1/G2糖型表示的基本上均质的组成的经分离的单克隆抗体或其抗原结合片段表现出对Fcγ RI和Fcγ RIII的结合亲和力增加。在本披露的一个实施例中，抗体与Fcγ RI解离，Kd为1×10^{-8}M或更低，并且与Fcγ RIII解离，Kd为1×10^{-7}M或更低。

[0155] Fc区的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分附连至天冬酰胺残基的侧链。O-连接糖基化是指糖N-乙酰基半乳糖胺(N-aceylgalactosamine)、半乳糖或木糖中的一种与羟基氨基酸的附连，该羟基氨基酸最常见的是丝氨酸或苏氨酸，但是也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。用于将碳水化合物部分酶促附连至天冬酰胺侧链肽序列的识别序列是天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸，其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸。因此，多肽中这些肽序列中的任一个的存在产生了潜在的糖基化位点。

[0156] 可以例如通过使在多肽中发现的一个或多个糖基化位点缺失，和/或添加在多肽中不存在的一个或多个糖基化位点来改变糖基化模式。通过改变氨基酸序列使其含有上述三肽序列中的一个或多个(对于N-连接的糖基化位点)，方便地将糖基化位点添加到抗体的Fc区中。示例性的糖基化变体具有重链的残基Asn 297的氨基酸取代。还可以通过向原始多肽的序列(对于O-连接的糖基化位点)添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代来进行改变。另外，将Asn 297变为Ala可以去除其中一个糖基化位点。

[0157] 在某些实施例中，使抗体在表达β(1,4)-N-乙酰葡糖胺转移酶III(GnT III)的细胞中表达，使得GnT III将GlcNAc添加至IL-23p19抗体。在WO/9954342、WO/03011878、专利公开20030003097A1和Umana等人，Nature Biotechnology[自然生物技术]，17:176-180，1999年2月中提供了以这种形式产生抗体的方法。可以使用基因组编辑技术，诸如成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)，改变细胞系以增强或减少或消除某些翻译后修饰，诸如糖基化。例如，可以使用CRISPR技术消除用于表达重组单克隆抗体的293或CHO细胞中编码糖基化酶的基因。

[0158] 消除单克隆抗体蛋白质序列不利因素。可以工程改造从人B细胞获得的抗体可变基因序列，以增强其可制造性和安全性。可以通过搜索与含有以下项的位点相关的序列基序来鉴定潜在的蛋白质序列不利因素：

[0159] 1)未配对的Cys残基，

[0160] 2)N-连接的糖基化，

[0161] 3)Asn脱酰胺化，

[0162] 4)Asp异构化，

[0163] 5)SYE截断，

[0164] 6)Met氧化，

[0165] 7)Trp氧化，

[0166] 8)N-端谷氨酸，

[0167] 9)整联蛋白结合，

[0168] 10)CD11c/CD18结合，或

[0169] 11)片段化

[0170] 可以通过改变编码重组抗体的cDNA的合成基因来消除此类基序。

[0171] 治疗性抗体开发领域的蛋白质工程研究清楚地揭示,某些序列或残基与溶解度差异相关(Fernandez-Escamilla等人,NatureBiotech.[自然生物技术],22(10),1302-1306,2004;Chennamsetty等人,PNAS[美国国家科学院院刊],106(29),11937-11942,2009;Voynov等人,Biocon.Chem.[生物共轭化学],21(2),385-392,2010)。文献中来自改变溶解度的突变的证据表明,一些亲水性残基(诸如天冬氨酸、谷氨酸和丝氨酸)明显对蛋白质溶解度的贡献比其他亲水性残基(诸如天冬酰胺、谷氨酰胺、苏氨酸、赖氨酸和精氨酸)更为有利。

[0172] 稳定性。可以对抗体进行工程化以增强其生物物理特性。可以使用平均表观解链温度,使用高温来使抗体解折叠以测定相对稳定性。差示扫描量热法(DSC)随温度的变化测量分子的热容量C_p(使其升温每度所需的热量)。可以使用DSC研究抗体的热稳定性。mAb的DSC数据特别有趣,因为它有时可以解析mAb结构内单个结构域的解折叠,从而在温谱图中产生多达三个峰(来自Fab、C_H2和C_H3结构域的解折叠)。通常,Fab结构域的解折叠会产生最强峰。DSC曲线和Fc部分的相对稳定性显示人IgG_1、IgG_2、IgG_3和IgG_4亚类的特征差异(Garber和Demarest,Biochem.Biophys.Res.Commun.[生物化学与生物物理研究通讯]355,751-757,2007)。还可以使用以圆二色谱(CD)光谱仪进行的圆二色谱法来测定平均表观解链温度。将以0.5nm的增量测量200至260nm范围内抗体的远紫外CD光谱。最终光谱可以确定为20次累积的平均值。减去背景后可以计算出残基椭圆率值。可以在235nm下从25-95℃以1℃/min的加热速率监测抗体(0.1mg/mL)的热解折叠。可以使用动态光散射(DLS)来评估聚集的倾向性。使用DLS表征包括蛋白质在内的各种颗粒的大小。如果系统在大小上不分散,则可以测定颗粒的平均有效直径。该测量取决于颗粒核的大小、表面结构的大小和颗粒浓度。因为DLS本质上测量由于颗粒引起的散射光强度的波动,所以可以测定颗粒的扩散系数。商用DLA仪器中的DLS软件展示不同直径的颗粒群体。使用DLS可以方便地进行稳定性研究。通过确定颗粒的流体动力学半径是否增加,样品的DLS测量可以显示颗粒是随时间推移而聚集还是随温度变化而聚集。如果颗粒聚集,则可以看到更大的半径增加的颗粒群体。可以通过原位控制温度来分析取决于温度的稳定性。毛细管电泳(CE)技术包括经验证的用于确定抗体稳定性特征的方法。可以使用iCE方法来解析由于脱酰胺、C端赖氨酸、唾液酸化、氧化、糖基化以及任何其他可导致蛋白质pI变化的蛋白质变化而引起的抗体蛋白质电荷变体。可以使用Protein Simple Maurice仪器在毛细管柱(cIEF)中通过高通量、自由溶液等电聚焦(IEF)来评价表达的每种抗体蛋白。可以每30秒进行一次全柱UV吸收检测,以实时监测等电点(pI)聚焦的分子。这种方法将传统凝胶IEF的高分辨率与基于柱的分离中发现的定量和自动化优势相结合,同时消除了移动步骤的需要。该技术实现对所表达的抗体的同一性、纯度和异质性的可重现定量分析。结果以吸光度和天然荧光检测模式并且以低至0.7μg/mL的检测灵敏度标识了抗体的电荷异质性和分子大小。

[0173] 溶解度。可以测定抗体序列的固有溶解度得分。固有溶解度得分可以使用CamSol Intrinsic来计算(Sormanni等人,JMolBiol[分子生物学杂志]427,478-490,2015)。可以经由在线程序来评价每个抗体片段(诸如scFv)的HCDR3中残基95-102(Kabat编号)的氨基酸序列以计算溶解度得分。也可以使用实验室技术测定溶解度。存在各种技术,包括将冻干蛋

白质添加到溶液中直至溶液变得饱和并达到溶解度极限,或在具有合适截留分子量的微型浓缩器中通过超滤进行浓缩。最直接的方法是诱导无定形沉淀,其使用涉及采用硫酸铵进行蛋白质沉淀的方法来测量蛋白质溶解度(Trevino等人,JMol Biol[分子生物学杂志],366:449-460,2007)。硫酸铵沉淀给出有关相对溶解度值的快速而准确的信息。硫酸铵沉淀产生具有明确水相和固相的沉淀溶液,并且需要相对少量的蛋白质。使用硫酸铵诱导无定形沉淀进行的溶解度测量也可以在不同的pH值下容易地完成。蛋白质溶解度非常依赖于pH,并且认为pH是影响溶解度最重要的外在因素。

[0174] 自身反应性。通常,认为应该在个体发育期间通过负选择消除自身反应性克隆物,然而很明显,许多具有自身反应特性的天然存在的人抗体在成年成熟库中持续存在,并且自身反应性可以增强许多抗体对病原体的抗病毒功能。已经注意到,在早期B细胞发育期间抗体中的HCDR3环常常富含正电荷并且表现出自身反应性模式(Wardemann等人,Science[科学]301,1374-1377,2003)。可以通过在显微镜检查(使用粘附的HeLa或HEp-2上皮细胞)和流式细胞术细胞表面染色(使用悬浮Jurkat T细胞和293S人胚肾细胞)中评估与人类起源细胞的结合水平来测试给定抗体的自身反应性。也可以使用对与组织阵列中的组织的结合的评估来测量自身反应性。

[0175] 优选的残基(“人类相似性”)。在许多最新研究中正大规模地进行对来自献血者的人B细胞的B细胞库深度测序。关于人抗体库重要部分的序列信息促进对健康人类常见的抗体序列特征的统计评估。利用人重组抗体可变基因参考数据库中关于抗体序列特征的知识,可以估计抗体序列的“人类相似性”(HL)的位置特异性程度。已经证实HL可用于开发临床使用的抗体,如治疗性抗体或作为疫苗的抗体。目的是增加抗体的人类相似性,以减少潜在的不良反应和抗抗体免疫应答,潜在的不良反应和抗抗体免疫应答将会导致抗体药物的功效显著降低或诱导严重的健康影响。可以评估三个总共具有约4亿个序列的健康人类献血者的组合抗体库的抗体特征,并创建集中于抗体的高变区的新型“相对人类相似性”(rHL)得分。rHL得分使得可以容易地区分人类序列(得分为正)和非人序列(得分为负)。可以对抗体进行工程化,以消除人类库中不常见的残基。

[0176] D.单链抗体

[0177] 单链可变片段(scFv)是通过短的(通常是丝氨酸、甘氨酸)接头连接在一起的免疫球蛋白重链和轻链可变区的融合体。该嵌合分子保留原始免疫球蛋白的特异性,尽管去除了恒定区并引入了接头肽。这种修饰通常使特异性保持不变。这些分子在历史上是为了促进噬菌体展示而产生的,其中将抗原结合结构域表达为单肽非常方便。替代性地,scFv可以直接由源自杂交瘤或B细胞的亚克隆重链和轻链产生。单链可变片段缺少在完整抗体分子中发现的恒定Fc区,并且因此缺少用于纯化抗体的共同结合位点(例如,蛋白A/G)。这些片段常常可以使用蛋白L纯化/固定,因为蛋白L与κ轻链的可变区相互作用。

[0178] 柔性接头通常由螺旋和转角促进氨基酸残基组成,诸如丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸。然而,其他残基也可以起作用。Tang等人(1996)使用噬菌体展示作为从蛋白质接头文库快速选择用于单链抗体(scFv)的定制接头的手段。构建随机接头文库,其中重链和轻链可变结构域的基因通过编码可变组成的18个氨基酸的多肽的区段连接。在丝状噬菌体上展示scFv库(大约5×10^6个不同成员),并用半抗原进行亲和选择。所选变体的群体表现出结合活性的显著增加,但是保留了相当大的序列多样性。筛选1054个单独变体随后得到了以可

溶性形式有效产生的催化活性scFv。序列分析揭示，接头中在V_H C端后两个残基处的保守性脯氨酸以及其他位置大量的精氨酸和脯氨酸是所选系链的唯一共同特征。

[0179] 本披露的重组抗体还可以涉及容许受体二聚化或多聚化的序列或部分。此类序列包括衍生自IgA的那些序列，其容许连同J链一起形成多聚体。另一多聚化结构域是Gal4二聚化结构域。在其他实施例中，可以用容许两种抗体的组合的试剂诸如生物素/抗生物素蛋白对链进行修饰。

[0180] 在一个单独的实施例中，可以通过使用非肽接头或化学单元连接受体轻链和重链来产生单链抗体。通常，轻链和重链将在不同的细胞中产生，纯化并随后以适当的方式连接在一起(即，重链的N端经由适当的化学桥附连至轻链的C端)。

[0181] 使用交联试剂形成拴系两个不同分子(例如，稳定剂和凝结剂)的官能团的分子桥。然而，考虑到可以产生相同类似物的二聚体或多聚体或由不同类似物组成的异聚复合物。为了以逐步方式连接两种不同的化合物，可以使用异双官能交联剂，其消除不希望的均聚物形成。

[0182] 示例性的异双官能交联剂包含以下两个反应性基团：一个与伯胺基团反应(例如，N-羟基琥珀酰亚胺)，另一个与硫醇基团反应(例如，吡啶基二硫化物、马来酰亚胺、卤素等)。通过伯胺反应性基团，交联剂可与一种蛋白(例如，选定的抗体或片段)的一个或多个赖氨酸残基反应，并且通过硫醇反应性基团，已拴系至第一蛋白的交联剂与另一种蛋白(例如，选择剂)的半胱氨酸残基(游离巯基)反应。

[0183] 优选的是，将采用在血液中具有合理稳定性的交联剂。已知多种类型的含二硫键的接头，其可以成功地用于缀合靶向剂和治疗剂/预防剂。含有空间位阻二硫键的接头可证明在体内具有更高的稳定性，从而防止靶向肽在到达作用位点之前释放。因此，这些接头是一组连接剂。

[0184] 另一种交联试剂是SMPT，它是一种含有二硫键的双官能交联剂，该二硫键受相邻的苯环和甲基“空间位阻”。据信，二硫键的空间位阻起到保护该键不受可存在于组织和血液中的硫醇盐阴离子诸如谷胱甘肽攻击的作用，从而有助于防止在将附连试剂递送至靶位点之前缀合物解偶联。

[0185] 与许多其他已知的交联试剂一样，SMPT交联试剂提供使官能团诸如半胱氨酸的SH或伯胺(例如，赖氨酸的ε氨基)交联的能力。交联剂的另一种可能类型包括含有可裂解的二硫键的异双官能光反应性叠氮苯，诸如磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基-水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯。N-羟基-琥珀酰亚胺基与伯氨基反应并且叠氮苯(在光解时)与任何氨基酸残基非选择性反应。

[0186] 除位阻交联剂外，根据本发明还可以采用非位阻交联剂。认为不含或不会生成受保护的二硫化物的其他有用的交联剂包括SATA、SPDP和2-亚氨基硫杂环戊烷(Wawrzynczak和Thorpe，1987)。此类交联剂的用途在本领域内是众所周知的。另一个实施例涉及柔性接头的使用。

[0187] 美国专利4,680,338描述了可用于产生配体与含胺的聚合物和/或蛋白质的缀合物，特别是用于与螯合剂、药物、酶、可检测标记等形成抗体缀合物的双官能接头。美国专利5,141,648和5,563,250披露了含有在多种温和条件下可裂解的不稳定键的可裂解缀合物。这种接头特别有用，因为目标试剂可以直接键合到该接头上，而裂解导致活性剂的释放。特

定用途包括将游离氨基或游离巯基添加至蛋白质,诸如抗体或药物上。

[0188] 美国专利5,856,456提供了用于连接多肽组成部分以制备融合蛋白(例如单链抗体)的肽接头。接头的长度最多约50个氨基酸,含有出现至少一次的带电荷的氨基酸(优选精氨酸或赖氨酸),其后是脯氨酸,并且其特征在于稳定性更强和聚集减少。美国专利5,880,270披露了可用于多种免疫诊断和分离技术中的含氨氧基的接头。

[0189] E.多特异性抗体

[0190] 在某些实施例中,本披露的抗体是双特异性或多特异性的。双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可以与单一抗原的两个不同表位结合。其他此类抗体可以将第一抗原结合位点与第二抗原的结合位点相组合。替代性地,抗病原体臂可与结合白细胞上的触发分子(诸如T细胞受体分子(例如,CD3))或IgG的Fc受体(Fcγ R)(诸如Fcγ RI(CD64)、Fcγ RII(CD32)和Fcγ RIII(CD16))的臂组合,以便将细胞防御机制集中并定位于被感染的细胞。双特异性抗体也可以用于将细胞毒性剂定位于被感染的细胞。这些抗体具有病原体结合臂和结合细胞毒性剂(例如皂草素、抗干扰素-α、长春花生物碱、蓖麻毒素A链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段(例如$F(ab')_2$双特异性抗体)。WO 96/16673描述了双特异性抗ErbB2/抗Fcγ RIII抗体并且美国专利5,837,234披露了双特异性抗ErbB2/抗Fcγ RI抗体。WO 98/02463中示出了双特异性抗ErbB2/Fcα抗体。美国专利5,821,337传授了双特异性抗ErbB2/抗CD3抗体。

[0191] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein等人,Nature[自然]305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分类,这些杂交瘤(四价体瘤)产生十种不同抗体分子的可能混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱法步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦,并且产物产率低。WO 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]10:3655-3659(1991)中披露了类似程序。

[0192] 根据不同的方法,将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。优选地,融合是与Ig重链恒定结构域(包含铰链的至少一部分)、C_{H2}和C_{H3}区融合。优选在至少一个融合体中具有含轻链键合所必需的位点的第一重链恒定区(C_{H1})。将编码免疫球蛋白重链融合体和(如果需要的话)免疫球蛋白轻链的DNA插入单独的表达载体中,并共转染到合适的宿主细胞中。在实施例中,当在构建中使用的三条多肽链的不等比率提供所需双特异性抗体的最佳产率时,这在调节三个多肽片段的相互比例方面提供更大的灵活性。然而,当至少两条多肽链以相等比率表达导致高产率时,或者当比率对所需链组合的产率没有显著影响时,可以将两条或全部三条多肽链的编码序列插入到单个表达载体中。

[0193] 在该方法的特定实施例中,双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂种免疫球蛋白重链和另一臂中的杂种免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。据发现,这种不对称结构促进所需双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分离,因为仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供了一种容易的分离方式。在WO 94/04690中披露了这种方法。对于生成双特异性抗体的更多细节,参见例如Suresh等人,

Methods in Enzymology[酶学方法],121:210(1986)。

[0194] 根据美国专利5,731,168中描述的另一种方法,一对抗体分子之间的界面可以经工程化以最大化从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比。优选的界面包含C_{H3}结构域的至少一部分。在这种方法中,用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)置换来自第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链。大小与一个或多个大侧链相同或相似的补偿"空腔"通过用较小侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链而在第二抗体分子的界面上产生。这提供一种用于提高异二聚体的产率超出其他不需要的最终产物如同型二聚体的机制。

[0195] 双特异性抗体包括交联的或"异源缀合"抗体。例如,异源缀合物中的抗体之一可以偶联至亲和素,另一个偶联至生物素。例如,已经提出此类抗体会使免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利4,676,980),并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。异源缀合抗体可以使用任何便利的交联方法制备。合适的交联剂是本领域众所周知的,并且在美国专利4,676,980中连同许多交联技术一起披露。

[0196] 由抗体片段生成双特异性抗体的技术也已在文献中进行了描述。例如,双特异性抗体可以使用化学连接来制备。Brennan等人,Science[科学],229:81(1985)描述了一种程序,其中完整的抗体经蛋白水解裂解以生成$F(ab')_2$片段。这些片段在二硫醇复合剂(dithiol complexing agent)亚砷酸钠的存在下被还原,以便稳定邻位二硫醇并且防止分子间二硫化物的形成。所生成的Fab'片段然后被转化为硫代硝基苯甲酸(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原,Fab'-TNB衍生物中的一种被重新转化成Fab'-硫醇,并且与等摩尔量的另一种Fab'-TNB衍生物混合,以便形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可以用作选择性固定酶的试剂。

[0197] 存在促进从大肠杆菌中直接回收Fab'-SH片段的技术,这些片段可以化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等人,J.Exp.Med.[实验医学杂志],175:217-225(1992)描述了人源化双特异性抗体$F(ab')_2$分子的产生。每个Fab'片段是从大肠杆菌中分泌的,并且在体外经受定向化学偶联以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够与过量表达ErbB2受体的细胞和正常人T细胞结合,以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺肿瘤靶标的裂解活性。

[0198] 还描述了各种直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的技术(Merchant等人,Nat.Biotechnol.[自然·生物技术]16,677-681(1998).doi:10.1038/nbt0798-677pmid:9661204)。例如,已经使用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体(Kostelny等人,J.Immunol.[免疫学杂志],148(5):1547-1553,1992)。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的Fab'部分连接。抗体同型二聚体在铰链区处还原以形成单体,并且然后再次氧化以形成抗体异二聚体。这种方法还可以用于产生抗体同型二聚体。Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],90:6444-6448(1993)中描述的"双体抗体"技术提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。这些片段包含通过接头与V_L连接的V_H,该接头因太短而不能使同一条链上的两个结构域配对。因此,一个片段的V_H和V_L结构域被迫与另一个片段的互补V_L和V_H结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等人,J.Immunol.[免疫学杂志],152:5368(1994)。

[0199] 在一个特定的实施例中，双特异性或多特异性抗体可以形成为DOCK-AND-LOCK™(DNL™)复合物(参见，例如，美国专利7,521,056;7,527,787;7,534,866;7,550,143和7,666,400，其中每一个专利的实例部分均通过援引并入本文。)通常，该技术利用了cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)调节(R)亚基的二聚化对接结构域(DDD)序列与源自多种AKAP蛋白中的任一种的锚定结构域(AD)序列之间发生的特异性和高亲和力结合相互作用(Baillie等人，FEBSLetters.[欧洲生化学会联合会快报]2005;579:3264;Wong和Scott，Nat.Rev.Mol.Cell Biol.[自然评论:分子细胞生物学]2004;5:959)。DDD和AD肽可以附连到任何蛋白质、肽或其他分子上。因为DDD序列自发地二聚化并与AD序列结合，所以该技术允许在可附连到DDD或AD序列的任何选定分子之间形成复合物。

[0200] 考虑到具有两个以上的化合价的抗体。例如，可以制备三特异性抗体(Tutt等人，J.Immunol.[免疫学杂志]147:60,1991;Xu等人，Science[科学],358(6359):85-90,2017)。多价抗体可以比二价抗体更快地被表达与抗体结合的抗原的细胞内化(和/或分解代谢)。因此，本披露的抗体可以是具有三个或更多个抗原结合位点的多价抗体(例如，四价抗体)，这些抗体可以通过编码抗体的多肽链的核酸的重组表达来容易地产生。多价抗体可以包含一个二聚体化结构域和三个或更多个抗原结合位点。优选的二聚体化结构域包含Fc区或铰链区(或由其组成)。在这种情形下，抗体将包含一个Fc区和Fc区的氨基端的三个或更多个抗原结合位点。本文中优选的多价抗体包含三个至约八个(但优选四个)抗原结合位点(或由其组成)。多价抗体包含至少一条多肽链(且优选两条多肽链)，其中一条或多条多肽链包含两个或更多个可变区。例如，一条或多条多肽链可以包含VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc，其中VD1是第一可变区，VD2是第二可变区，Fc是Fc区的一条多肽链，X1和X2代表氨基酸或多肽，并且n是0或1。例如，一条或多条多肽链可包含:VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc区链;或VH-CH1-VH-CH1-Fc区链。本文中的多价抗体优选进一步包含至少两条(且优选四条)轻链可变区多肽。本文中的多价抗体可以(例如)包含约两个至约八个轻链可变区多肽。这里所考虑到的轻链可变区多肽包含轻链可变区，并且任选地进一步包含C_L结构域。

[0201] 电荷修饰在多特异性抗体的情况下特别有用，其中Fab分子中的氨基酸取代引起减少轻链与不匹配的重链(Bence-Jones型副产物)的错配，这种错配可发生在基于Fab的双/多特异性抗原结合分子产生时，这些抗原结合分子在它们结合臂中的一条(或多条，在分子包含两个以上的抗原结合Fab分子的情况下)中具有VH/VL交换(另见PCT公开号WO 2015/150447，特别是其中的实例，其通过援引以其全文并入本文)。

[0202] 因此，在特定实施例中，治疗剂中所含的抗体包括

[0203] (a)与第一抗原特异性结合的第一Fab分子

[0204] (b)与第二抗原特异性结合的第二Fab分子，并且其中Fab轻链和Fab重链的可变结构域VL和VH彼此置换，

[0205] 其中第一抗原是活化T细胞抗原而第二抗原是靶细胞抗原，或者第一抗原是靶细胞抗原而第二抗原是活化T细胞抗原;以及

[0206] 其中：

[0207] i)在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CL中，位置124处的氨基酸被带正电荷的氨基酸取代(根据Kabat编号)，并且其中在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CH1中，位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸被带负电荷的氨基酸取代(根据Kabat EU指数编号);或

[0208] ii)在b)下的第二Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被带正电荷的氨基酸取代(根据Kabat编号),并且其中在b)下的第二Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸被带负电荷的氨基酸取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0209] 该抗体可以不同时包含i)和ii)下提到的修饰。第二Fab分子的恒定结构域CL和CH1不彼此置换(即,保持未交换的)。

[0210] 在抗体的另一个实施例中,在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代(根据Kabat编号)(在一个优选的实施例中,独立地被赖氨酸(K)或精氨酸(R)取代),并且在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0211] 在另一个实施例中,在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代(根据Kabat编号),并且在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0212] 在一个特定实施例中,在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代(根据Kabat编号)(在一个优选的实施例中,独立地被赖氨酸(K)或精氨酸(R)取代),并且位置123处的氨基酸独立地被赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)取代(根据Kabat编号)(在一个优选的实施例中,独立地被赖氨酸(K)或精氨酸(R)取代),并且在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代(根据Kabat EU索引编号)并且位置213处的氨基酸独立地被谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0213] 在一个更特定的实施例中,在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号)并且位置123处的氨基酸被赖氨酸(K)或精氨酸(R)取代(按Kabat编号),并且在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(根据Kabat EU索引编号)并且位置213处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0214] 在一个甚至更特定的实施例中,在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CL中,位置124处的氨基酸被赖氨酸(K)取代(根据Kabat编号)并且位置123处的氨基酸被精氨酸(R)取代(根据Kabat编号),并且在a)下的第一Fab分子的恒定结构域CH1中,位置147处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(根据Kabat EU索引编号)并且位置213处的氨基酸被谷氨酸(E)取代(根据Kabat EU索引编号)。

[0215] F.嵌合抗原受体

[0216] 人工T细胞受体(也称为嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体、嵌合抗原受体(CAR))是经工程化的受体,其将任意特异性移植到免疫效应细胞上。通常,这些受体用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上,逆转录病毒载体促进其编码序列的转移。这样,可以生成大量靶特异性T细胞用于过继细胞转移。这种方法的I期临床研究显示出功效。

[0217] 这些分子最常见的形式是源自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)融合至CD3-ζ跨膜结构域和胞内域的融合体。此类分子应答于被其靶标的scFv识别而引起ζ信号的传输。这种构建体的实例是14g2a-ζ,它是源自杂交瘤14g2a(识别双唾液酸神经节苷脂GD2)的scFv

的融合体。当T细胞表达这种分子时(通常通过致癌逆转录病毒载体转导实现),它们会识别并杀伤表达GD2的靶细胞(例如,成神经细胞瘤细胞)。为了靶向恶性B细胞,研究人员使用对B谱系分子CD19具有特异性的嵌合免疫受体,重定向了T细胞的特异性。

[0218] 免疫球蛋白重链和轻链的可变部分通过柔性接头融合以形成scFv。这种scFv的前面是信号肽,以将新生蛋白定向至内质网和后续的表面表达(这被裂解)。柔性间隔区允许scFv沿不同方向定向以实现抗原结合。跨膜结构域是典型的疏水性α螺旋,通常源自信号传导胞内域的原始分子,该分子突出进入细胞并传输所需的信号。

[0219] 实际上,I型蛋白是之间通过跨膜α螺旋连接的两个蛋白结构域。跨膜结构域所穿过的细胞膜脂质双层起到将内部(胞内域)与外部(胞外域)隔离的作用。将一种蛋白质的胞外域附连到另一种蛋白质的胞内域产生将前者的识别与后者的信号相组合的分子,并不令人惊讶。

[0220] 胞外域。信号肽将新生蛋白定向至内质网中。如果要将受体糖基化并锚定在细胞膜中,这是必不可少的。任何真核信号肽序列通常都可以很好地起作用。通常,使用天然附连至最靠氨基端的组件的信号肽(例如,在具有轻链-接头-重链这种定向的scFv中,使用轻链的天然信号)。

[0221] 抗原识别结构域通常是scFv。然而,也有许多替代物。已经描述了来自天然T细胞受体(TCR)α和β单链的抗原识别结构域,具有简单的胞外域(例如,识别HIV感染细胞的CD4胞外域)和更多外来识别组件,诸如连接的细胞因子(导致识别带有细胞因子受体的细胞)。实际上,几乎任何以高亲和力结合给定靶标的事物都可以用作抗原识别区。

[0222] 间隔区将抗原结合结构域连接至跨膜结构域。它应该具有足够柔性以允许抗原结合结构域在不同方向上定向以促进抗原识别。最简单的形式是来自IgG1的铰链区。替代物包括免疫球蛋白的CH_2CH_3区和CD3的部分。对于大多数基于scFv的构建体,IgG1铰链便足够。然而,最佳间隔区常常必须凭经验确定。

[0223] 跨膜结构域。跨膜结构域是跨越膜的疏水α螺旋。通常,使用来自胞内域的最接近膜的组件的跨膜结构域。有趣的是,使用CD3-ζ跨膜结构域可导致将人工TCR掺入天然TCR中,天然TCR是取决于天然CD3-ζ跨膜带电荷的天冬氨酸残基的存在的因子。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。CD28跨膜结构域导致大量表达的稳定受体。

[0224] 胞内域。这是受体的“业务端”。抗原识别后,受体聚集并将信号传输至细胞。最常用的胞内域组件是含有3个ITAM的CD3-ζ。抗原结合后,这会将激活信号传输至T细胞。CD3-ζ可能不会提供完全有效的激活信号,而需要其他共刺激信号传导。

[0225] “第一代”CAR通常具有来自CD3ξ链的胞内域,它是来自内源TCR的信号的主要传输器。“第二代”CAR将来自各种共刺激蛋白受体(例如CD28、41BB、ICOS)的细胞内信号传导结构域添加到CAR的细胞质尾,以向T细胞提供附加信号。临床前研究已经表明,第二代CAR设计改善T细胞的抗肿瘤活性。最近,“第三代”CAR组合了多个信号传导结构域,诸如CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-OX40,以进一步增大效力。

[0226] G.ADC

[0227] 抗体药物缀合物或ADC是一类新型的强效生物药物,被设计为治疗患有感染病的人的靶向疗法。ADC是由抗体(完整的mAb或抗体片段,诸如单链可变片段或scFv)经由具有不稳定键的稳定化学接头与生物活性细胞毒性/抗病毒有效载荷或药物连接组成的复杂分

子。抗体药物缀合物是生物缀合物和免疫缀合物的实例。

[0228] 通过将单克隆抗体的独特靶向能力与细胞毒性药物的抗癌能力相组合，抗体-药物缀合物允许灵敏地区别健康组织和患病组织。这意味着，与传统的系统方法大不相同，抗体-药物缀合物靶向并攻击被感染的细胞，使得健康细胞受到的影响不太严重。

[0229] 在开发基于ADC的抗肿瘤疗法中，抗癌药物(例如细胞的毒素或细胞毒素)与特异性靶向某一细胞标志物(例如，理想地仅会在被感染的细胞中或其上发现的蛋白质)的抗体偶联。抗体在体内追踪这些蛋白质并将其自身附连于癌细胞表面。抗体与靶蛋白(抗原)之间的生化反应会在肿瘤细胞中触发信号，然后肿瘤细胞吸收或内化抗体以及细胞毒素。ADC内化后，释放细胞毒性药物并杀伤细胞或损害病毒复制。由于这种靶向作用，理想地该药物与其他试剂相比，具有更低的副作用并且给出更宽的治疗窗口。

[0230] 抗体与细胞毒性剂/抗病毒剂之间的稳定连接是ADC的关键方面。接头基于包括二硫化物、腙或肽(可裂解)或硫醚(不可裂解)在内的化学基序，并控制细胞毒性剂向靶细胞的分布和递送。在临床前试验和临床试验中，已证明可裂解和不可裂解类型的接头是安全的。本妥昔单抗(brentuximab vedotin)包含酶敏感的可裂解接头，该接头将强效且高毒性的抗微管剂一甲基澳瑞他汀E或称MMAE(一种合成的抗肿瘤剂)递送至人特异性CD30阳性恶性细胞。由于其高毒性，通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂的MMAE不能用作单药化学治疗药物。然而，MMAE与抗CD30单克隆抗体(cAC10，一种肿瘤坏死因子或TNF受体的细胞膜蛋白)连接的组合证明在细胞外液中是稳定的，可被组织蛋白酶裂解并且用于治疗是安全的。恩美曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine)，另一种获得批准的ADC，是通过稳定、不可裂解的接头附连的微管形成抑制剂美登素(DM-1)(美坦新的衍生物)和抗体曲妥珠单抗(Herceptin®/基因泰克公司(Genentech)/罗氏公司(Roche))的组合。

[0231] 更好且更稳定的接头的可用改变了化学键的功能。可裂解或不可裂解的接头类型为细胞毒性(抗癌)药物提供了特殊特性。例如，不可裂解的接头将药物保持在细胞内。因此，整个抗体、接头和细胞毒性剂进入靶向癌细胞，在该癌细胞中抗体被降解为氨基酸水平。所得的复合物(氨基酸、接头和细胞毒性剂)现在变成活性药物。相比之下，可裂解接头受宿主细胞中的酶催化，它在宿主细胞中释放出细胞毒性剂。

[0232] 目前正在开发的另一种类型的可裂解接头，在细胞毒性药物/抗病毒药物与裂解位点之间增加额外的分子。这种接头技术允许研究人员产生具有更高柔性的ADC，而不必担心改变裂解动力学。研究人员还在开发一种新的基于埃德曼降解的肽裂解方法，该方法是对肽中的氨基酸进行测序的方法。ADC开发的未来方向还包括开发进一步改善稳定性和治疗指数的位点特异性缀合(TDC)，以及发射α的免疫缀合物和抗体缀合的纳米颗粒。

[0233] H.BiTE

[0234] 双特异性T细胞衔接子(BiTE)是已被研究用作抗癌药物的一类人工双特异性单克隆抗体。它们使宿主的免疫系统，更特别地是T细胞的细胞毒活性指向被感染的细胞。BiTE是麦克罗梅特股份公司(Micromet AG)的注册商标。

[0235] BiTE是融合蛋白，由约55道尔顿的单条肽链上不同抗体的两个单链可变片段(scFv)或来自四个不同基因的氨基酸序列组成。这些scFv中的一个经由CD3受体与T细胞结合，而另一个经由特定分子与被感染的细胞结合。

[0236] 与其他双特异性抗体一样，而与普通的单克隆抗体不同，BiTE在T细胞和靶细胞之

间形成连接。这会使T细胞通过产生蛋白质如穿孔素和颗粒酶,不依赖于MHC I或共刺激分子的存在,对被感染的细胞发挥细胞毒性/抗病毒活性。这些蛋白质进入被感染的细胞并启动细胞的凋亡。这种作用模拟在针对被感染细胞的T细胞攻击期间观察到的生理过程。

[0237] I.胞内抗体

[0238] 在特定实施例中,抗体是适于在细胞内作用的重组抗体-此类抗体称为“胞内抗体”。这些抗体可以通过多种机制来干扰靶标功能,诸如通过改变细胞内蛋白质运输,干扰酶功能,以及阻断蛋白质-蛋白质或蛋白质-DNA的相互作用。在许多方面,它们的结构模拟或类似于上面讨论的单链和单结构域抗体的结构。实际上,单转录物/单链是重要的特征,容许在靶细胞中进行细胞内表达,并且还使蛋白质跨细胞膜运输更加可行。然而,还需要其他功能。

[0239] 影响胞内抗体治疗剂的实施的两个主要问题是递送(包括细胞/组织靶向)和稳定性。关于递送,已经采用了多种方法,诸如组织定向递送,使用细胞类型特异性启动子,基于病毒的递送以及使用细胞通透性/膜易位肽。关于稳定性,该方法通常会通过强力进行筛选(包括涉及噬菌体展示的方法)并且可包括序列成熟或共有序列的开发,或更直接的修饰,诸如插入稳定序列(例如,Fc区、伴侣蛋白序列、亮氨酸拉链)和二硫键置换/修饰。

[0240] 胞内抗体可能需要的另一特征是用于细胞内靶向的信号。已经设计了可以将胞内抗体(或其他蛋白质)靶向至亚细胞区(诸如细胞质、细胞核、线粒体和ER)的载体,并且可商购获得(英杰公司(Invitrogen Corp.);Persic等人,1997)。

[0241] 依靠其进入细胞的能力,胞内抗体具有其他类型的抗体可能无法实现的其他用途。在本发明抗体的情况下,与活细胞中的MUC1胞质结构域相互作用的能力可能会干扰与MUC1 CD相关的功能,诸如信号传导功能(与其他分子的结合)或寡聚体的形成。特别是,考虑到此类抗体可用于抑制MUC1二聚体形成。

[0242] J.纯化

[0243] 在某些实施例中,本披露的抗体可以纯化。如本文所用,术语“纯化的”旨在指可与其他组分分离的组合物,其中蛋白质纯化至相对于其天然可获得的状态的任何程度。因此,纯化的蛋白质还指摆脱它可能天然存在的环境的蛋白质。在使用术语“基本上纯化的”的情况下,该名称将指这样的组合物,其中蛋白质或肽形成组合物的主要组分,诸如占组合物中蛋白质的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。

[0244] 蛋白质纯化技术是本领域普通技术人员众所周知的。这些技术在一个层面上涉及将细胞环境粗分级分离为多肽和非多肽级分。将多肽与其他蛋白质分开后,可以使用色谱和电泳技术进一步纯化目标多肽,以实现部分或完全纯化(或纯化至均质)。特别适合制备纯肽的分析方法是离子交换色谱法、排阻色谱法;聚丙烯酰胺凝胶电泳;等电聚焦。用于蛋白质纯化的其他方法包括:用硫酸铵、PEG、抗体等沉淀或通过热变性,接着进行离心;凝胶过滤,反相、羟基磷灰石和亲和色谱法;以及此类技术和其他技术的组合。

[0245] 在纯化本披露的抗体中,可能希望在原核或真核表达系统中表达多肽并使用变性条件提取蛋白质。可以使用与多肽的标记部分结合的亲和柱将多肽从其他细胞组分中纯化出来。如本领域通常已知的,据信可以改变进行各纯化步骤的顺序,或者可以省略某些步骤,并且仍然产生制备基本上纯化的蛋白质或肽的合适方法。

[0246] 通常,利用结合抗体的Fc部分的试剂(即,蛋白A)来分级分离完全抗体。替代性地,

可以使用抗原同时纯化和选择适当的抗体。此类方法常常利用与支持物诸如柱、过滤器或珠粒结合的选择剂。抗体与支持物结合，去除(例如，洗掉)污染物，并且通过施加条件(盐、热等)释放抗体。

[0247] 根据本披露，用于定量蛋白质或肽的纯化程度的各种方法对于本领域技术人员而言将是已知的。这些方法包括例如测定活性级分的比活性，或通过SDS/PAGE分析评估级分内多肽的量。评估级分纯度的另一种方法是计算级分的比活性，将其与初始提取物的比活级进行比较，从而计算纯度。当然，用于表示活性量的实际单位将取决于选择在纯化后进行的特定测定技术以及表达的蛋白质或肽是否表现出可检测的活性。

[0248] 已知多肽的迁移有时可以随不同的SDS/PAGE条件而显著变化(Capaldi等人，1977)。因此，应当理解，在不同的电泳条件下，纯化或部分纯化的表达产物的表观分子量可以变化。

[0249] III.主动/被动免疫接种以及SARS-CoV-2感染的治疗/预防

[0250] A.配制和施用

[0251] 本披露提供了包含抗SARS-CoV-2病毒抗体和用于生成该抗体的抗原的药物组合物。此类组合物包含预防或治疗有效量的抗体或其片段、或肽免疫原和药学上可接受的载剂。在特别的实施例中，术语“药学上可接受的”是指由联邦政府或州政府的监管机构批准的或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出的，用于在动物体内并且更特别地在人体内使用。术语“载剂”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、赋形剂或媒介物。此类药物载剂可以是无菌液体，诸如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的油，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水是特定的载剂。还可以将盐水溶液、水性右旋糖和甘油溶液用作液体载剂，特别是用于注射溶液。其他合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。

[0252] 如果希望的话，该组合物还以含有少量湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以呈以下形式：溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、持续释放配制品等。口服配制品可以包含标准载剂，诸如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适药剂的实例在“Remington’s Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]”中有描述。此类组合物将含有预防或治疗有效量的抗体或其片段(优选呈纯化形式)连同适量的载剂以便提供用于正确施用至患者的形式。该配制品应适合施用模式，该施用模式可以是口服、静脉内、动脉内、颊内、鼻内、雾化、支气管吸入、直肠内、阴道、局部施用或通过机械通气递送。

[0253] 还设想了活性疫苗，其中抗体如所披露的抗体是在有SARS-CoV-2感染风险的受试者体内产生的。可以将此类疫苗配制成用于肠胃外施用，例如配制成用于经皮内、静脉内、肌内、皮下或甚至腹膜内途径注射。考虑了通过皮内和肌内途径施用。替代性地，可以通过局部途径将疫苗直接施用至粘膜，例如通过滴鼻剂、吸入、通过雾化器或经由直肠内或阴道递送来施用。药学上可接受的盐包括酸式盐以及与诸如盐酸或磷酸等无机酸，或诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸形成的那些盐。与游离羧基基团形成的盐也可以衍生自无机碱(如例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有机碱(如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0254] 抗体的被动转运(称为人工获得的被动免疫)通常将涉及静脉内或肌肉内注射剂的使用。抗体的形式可以是人或动物血浆或血清,作为供静脉内(IVIG)或肌内(IG)使用的合并的人免疫球蛋白,作为来自免疫供体或来自从疾病中恢复的供体的高滴度人IVIG或IG,以及作为单克隆抗体(MAb)。这种免疫通常仅持续很短的时间,并且还存在超敏反应和血清病,特别是因非人类起源的γ-球蛋白引起的疾病的潜在风险。然而,被动免疫会提供即时保护。抗体将配制在适于注射,即无菌且可注射的载剂中。

[0255] 一般地说,本披露的组合物的成分分开或混合在一起以单位剂型提供,例如,作为在气密性密封容器中的干燥的冻干粉或无水浓缩剂,该气密性密封容器诸如是指明活性剂的量的安瓿或小药囊。在通过输注施用该组合物时,可以用含有无菌药物级水或盐水的输液瓶来分配。在通过注射施用该组合物时,可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿,使得可以在施用前将这些成分混合。

[0256] 可以将本披露的组合物配制为中性形式或盐形式。药学上可接受的盐包括由阴离子形成的那些,诸如源自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及由阳离子形成的那些,诸如源自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0257] 2.ADCC

[0258] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)是一种导致抗体包被的靶细胞受免疫效应细胞裂解的免疫机制。靶细胞是通常经由Fc区N端的蛋白质部分与包含Fc区的抗体或其片段特异性结合的细胞。“具有增加/减少的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的抗体”意指通过本领域普通技术人员已知的任何合适方法测定,具有增加/减少的ADCC的抗体。

[0259] 如本文所用,术语“增加/减少的ADCC”定义为在靶细胞周围的培养基中在给定抗体浓度下,在给定时间内通过以上定义的ADCC机制裂解的靶细胞数目的增加/减少,和/或在靶细胞周围的培养基中在给定时间内通过ADCC机制裂解给定数目的靶细胞所需的抗体浓度的减少/增加。ADCC的增加/减少是相对于使用相同的标准生产、纯化、配制和储存方法(本领域技术人员已知的),由相同类型但尚未工程化的宿主细胞产生的相同抗体所介导的ADCC。例如,由工程化为具有改变的糖基化模式(例如,表达糖基转移酶,GnTIII或其他糖基转移酶)的宿主细胞产生的抗体所介导的ADCC的增加是相对于由相同类型的未工程化的宿主细胞产生的相同抗体所介导的ADCC。

[0260] 3.CDC

[0261] 补体依赖性细胞毒性(CDC)是补体系统的功能。它是免疫系统中通过破坏病原体的膜来杀伤病原体而没有抗体或免疫系统细胞参与的过程。有三个主要过程。所有三个过程都将一种或多种膜攻击复合物(MAC)插入病原体中,导致致死性胶体渗透溶胀,即CDC。它是抗体或抗体片段发挥抗病毒作用的机制之一。

[0262] IV.抗体缀合物

[0263] 本披露的抗体可以与至少一种试剂连接以形成抗体缀合物。为了提高抗体分子作为诊断剂或治疗剂的功效,常规的是连接或共价结合或复合至少一种所需的分子或部分。这种分子或部分可以是但不限于至少一种效应分子或报告分子。效应分子包括具有所需活性(例如细胞毒活性)的分子。已附连至抗体的效应分子的非限制性实例包括毒素、抗肿瘤

剂、治疗性酶、放射性核素、抗病毒剂、螯合剂、细胞因子、生长因子和寡核苷酸或多核苷酸。相比之下，将报告分子定义为可以使用测定法检测到的任何部分。已经与抗体缀合的报告分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、生色团、光亲和分子、有色颗粒或配体(诸如生物素)。

[0264] 通常优选抗体缀合物用作诊断剂。抗体诊断剂通常分为两类，一类用于体外诊断，诸如用于多种免疫测定法中，另一类用于通常称为“抗体定向成像”的体内诊断方案中。在本领域中已知许多适当的成像剂，以及将其附连于抗体的方法(参见例如，美国专利5,021,236、4,938,948和4,472,509)。所使用的成像部分可以是顺磁性离子、放射性同位素、荧光染料、NMR可检测的物质和X射线成像剂。

[0265] 在顺磁性离子的情况下，可以举例的方式提及诸如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、锑(III)、镝(III)、钬(III)和/或铒(III)，其中钆是特别优选的。在其他情况下(诸如X射线成像)有用的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II)，尤其是铋(III)。

[0266] 在用于治疗和/或诊断应用的放射性同位素的情况下，可以提及砹^{211}、^{14}碳、^{51}铬、^{36}氯、^{57}钴、^{58}钴、铜^{67}、^{152}Eu、镓^{67}、^{3}氢、碘^{123}、碘^{125}、碘^{131}、铟^{111}、^{59}铁、^{32}磷、铼^{186}、铼^{188}、^{75}硒、^{35}硫、锝^{99m}和/或钇^{90}。^{125}I常常优选用于某些实施例，而锝^{99m}和/或铟^{111}也常常是优选的，因为它们的能量低并且适于远距离检测。本披露的放射性标记的单克隆抗体可以根据本领域众所周知的方法产生。例如，单克隆抗体可以通过与碘化钠和/或碘化钾以及化学氧化剂诸如次氯酸钠或酶促氧化剂诸如乳过氧化物酶接触而碘化。可以通过配体交换过程用锝^{99m}标记根据本披露的单克隆抗体，例如通过用亚锡溶液还原高锝酸盐，将还原的锝螯合到Sephadex柱上并将抗体施加至该柱。替代性地，可以使用直接标记技术，例如通过孵育高锝酸盐、还原剂(诸如$SNCl_2$)、缓冲溶液(诸如邻苯二甲酸钠钾溶液)和抗体。常常用于使以金属离子形式存在的放射性同位素与抗体结合的中间官能团是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0267] 考虑作为缀合物使用的荧光标记包括Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、瀑布蓝、Cy3、Cy5,6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、俄勒冈绿488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、太平洋蓝、REG、若丹明绿、若丹明红、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基若丹明和/或德州红。

[0268] 本披露中考虑的其他类型的抗体是主要旨在体外使用的那些抗体，其中该抗体与次级结合配体和/或与酶(酶标签)连接，该酶在与生色底物接触时将产生有色产物。合适的酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。优选的次级结合配体是生物素和抗生物素蛋白和链霉亲和素化合物。此类标记的使用是本领域技术人员众所周知的，并且例如在美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241中进行了描述。

[0269] 分子与抗体的位点特异性附连的另一种已知方法包括抗体与基于半抗原的亲和标记的反应。本质上，基于半抗原的亲和标记与抗原结合位点中的氨基酸反应，从而破坏该位点并阻断特异性抗原反应。然而，这可能不是有利的，因为它导致抗体缀合物的抗原结合丧失。

[0270] 含叠氮基的分子也可用于通过由低强度紫外光生成的反应性氮烯中间体与蛋白质形成共价键(Potter和Haley,1983)。特别是,嘌呤核苷酸的2-和8-叠氮基类似物已被用作定点光探针,以鉴定粗细胞提取物中的核苷酸结合蛋白(Owens和Haley,1987;Atherton等人,1985)。2-和8-叠氮基核苷酸也已被用于对纯化蛋白质的核苷酸结合结构域作图(Khatoon等人,1989;King等人,1989;Dholakia等人,1989),并且可以用作抗体结合剂。

[0271] 用于将抗体附连或缀合至其缀合物部分的几种方法在本领域中是已知的。一些附连方法涉及使用金属螯合物,该金属螯合物使用例如附连至抗体的有机螯合剂,诸如二乙烯三胺五乙酸酐(DTPA);乙三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或四氯-3α-6α-二苯基甘脲-3(美国专利4,472,509和4,938,948)。单克隆抗体也可以在偶联剂诸如戊二醛或高碘酸盐的存在下与酶反应。在这些偶联剂的存在下或通过与异硫氰酸盐反应来制备具有荧光素标志物的缀合物。在美国专利4,938,948中,使用单克隆抗体实现乳腺肿瘤的成像,并且使用诸如对羟基苯甲亚胺酸甲酯或N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟基苯基)丙酸酯之类的接头使可检测的成像部分与抗体结合。

[0272] 在其他实施例中,考虑通过使用不改变抗体组合位点的反应条件,在免疫球蛋白的Fc区中选择性地引入巯基基团进行免疫球蛋白的衍生化。披露了根据这种方法产生的抗体缀合物会表现出改善的寿命、特异性和敏感性(美国专利5,196,066,通过援引并入本文)。文献中还披露了效应分子或报告分子的位点特异性附连,其中报告分子或效应分子缀合至Fc区中的碳水化合物残基上(O'Shannessy等人,1987)。已经报道这种方法会产生有诊断和治疗前景的抗体,这些抗体目前正在临床评估中。

[0273] V.免疫检测方法

[0274] 在其他实施例中,本披露涉及用于结合、纯化、去除、定量和以其他方式大体上检测SARS-CoV-2及其相关抗原的免疫检测方法。虽然此类方法可以按传统意义应用,但另一种用途将用于疫苗和其他病毒原液的质量控制和监测,其中根据本披露的抗体可用于评估病毒中抗原的量或完整性(即,长期稳定性)。替代性地,这些方法可用于针对适当/所需的反应性概况来筛选各种抗体。

[0275] 其他免疫检测方法包括用于测定受试者中SARS-CoV-2的存在的特定测定法。考虑了多种测定形式,但是特别地是将会用于检测从受试者获得的液体(诸如唾液、血液、血浆、痰液、精液或尿液)中的SARS-CoV-2的那些测定形式。特别是,已经证明精液是用于检测SARS-CoV-2的可行样品(Purpura等人,2016;Mansuy等人,2016;Barzon等人,2016;Gornet等人,2016;Duffy等人,2009;CDC,2016;Halfon等人,2010;Elder等人,2005)。可以有利地将测定法格式化以供非保健(家庭)使用,包括类似于家庭验孕的侧向流动测定法(见下文)。这些测定法可以以试剂盒的形式与适当的试剂和说明书一起包装,以容许家庭成员的受试者使用。

[0276] 一些免疫检测方法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射性免疫测定法(RIA)、免疫放射测定法、荧光免疫测定法、化学发光测定法、生物发光测定法和蛋白质印迹等。特别是,还提供了用于检测和定量针对样品中的特定寄生虫表位的SARS-CoV-2抗体的竞争性测定法。各种有用的免疫检测方法的步骤在科学文献中已有描述,例如Doolittle和Ben-Zeev(1999),Gulbis和Galand(1993),De Jager等人(1993),以及Nakamura等人(1987)。一般而言,免疫结合方法包括获得怀疑含有SARS-CoV-2的样品,并且视情况而定,在有效地允

许形成免疫复合物的条件下,使样品与根据本披露的第一抗体接触。

[0277] 这些方法包括用于从样品中纯化SARS-CoV-2或相关抗原的方法。优选将抗体连接至固体支持物,诸如以柱状基质的形式,并且将怀疑含有SARS-CoV-2或抗原性组分的样品施加于固定的抗体。从柱上洗去不需要的组分,留下与固定的抗体免疫复合的SARS-CoV-2抗原,然后通过从柱上去除生物体或抗原来收集SARS-CoV-2抗原。

[0278] 免疫结合方法还包括用于检测和定量样品中SARS-CoV-2或相关组分的量以及检测和定量在结合过程中形成的任何免疫复合物的方法。在这里,将获得怀疑含有SARS-CoV-2或其抗原的样品,并且使该样品与结合SARS-CoV-2或其组分的抗体接触,然后检测并定量在特定条件下形成的免疫复合物的量。在抗原检测方面,所分析的生物样品可以是怀疑含有SARS-CoV-2或SARS-CoV-2抗原的任何样品,诸如组织切片或标本、匀化组织提取物、生物流体(包括血液和血清)或分泌物(诸如粪便或尿液)。

[0279] 在有效条件下使所选生物样品与抗体接触足以允许免疫复合物(初级免疫复合物)形成的时间通常是简单地将抗体组合物添加到样品中并将混合物孵育足以使抗体与存在的SARS-CoV-2或抗原形成免疫复合物,即与存在的SARS-CoV-2或抗原结合的一段时间的事件。在这段时间后,通常将洗涤样品-抗体组合物,诸如组织切片、ELISA板、斑点印迹或蛋白质印迹,以去除任何非特异性结合的抗体种类,从而仅允许那些特异性结合在初级免疫复合物内的抗体被检测到。

[0280] 一般而言,检测免疫复合物形成在本技术领域中是众所周知的并且可以通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于对标记或标志物的检测,诸如那些放射性、荧光、生物和酶促标签中的任何一种。有关使用此类标记的专利包括美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241。当然,如本领域中所知,可通过使用次级结合配体诸如第二抗体和/或生物素/抗生物素蛋白配体的结合配置而发现其他益处。

[0281] 在检测中采用的抗体本身可以与可检测标记连接,其中然后将会简单地检测到该标记,从而允许测定组合物中初级免疫复合物的量。替代性地,可以借助于对抗体具有结合亲和力的第二结合配体来检测结合在初级免疫复合物中的第一抗体。在这些情况下,第二结合配体可与可检测标记连接。第二结合配体本身往往是抗体,因此可以称为“次级”抗体。使初级免疫复合物在有效条件下与有标记的次级结合配体或抗体接触足以允许次级免疫复合物形成的一段时间。然后通常洗涤次级免疫复合物以去除任何非特异性结合的有标记的次级抗体或配体,然后检测次级免疫复合物中的剩余标记。

[0282] 其他方法包括通过两步法检测初级免疫复合物。如上所述,使用第二结合配体,诸如对抗体具有结合亲和力的抗体形成次级免疫复合物。洗涤后,再次在有效条件下使次级免疫复合物与对第二抗体具有结合亲和力的第三结合配体或抗体接触足以允许免疫复合物(三级免疫复合物)形成的一段时间。第三配体或抗体与可检测标记连接,从而允许检测到由此形成的三级免疫复合物。如果这是需要的,则该系统可以提供信号扩增。

[0283] 一种免疫检测方法使用两种不同的抗体。使用第一生物素化抗体检测靶抗原,然后使用第二抗体检测附连于复合生物素的生物素。在该方法中,首先将待测样品在含有第一步抗体的溶液中孵育。如果存在靶抗原,则一些抗体与抗原结合形成生物素化抗体/抗原复合物。然后通过在链霉亲和素(或抗生物素蛋白)、生物素化DNA和/或互补生物素化DNA的

连续溶液中孵育来扩增抗体/抗原复合物，每个步骤向抗体/抗原复合物添加另外的生物素位点。重复扩增步骤，直至达到合适的扩增水平，此时将样品在含有针对生物素的第二步抗体的溶液中孵育。该第二步抗体例如用酶标记，该酶可用于通过组织酶学，使用色原底物来检测抗体/抗原复合物的存在。通过合适的扩增，可以产生肉眼可见的缀合物。

[0284] 另一种已知的免疫检测方法利用免疫PCR(聚合酶链反应)方法。在与生物素化DNA孵育之前，PCR方法与Cantor方法相似，但是不使用多轮链霉亲和素和生物素化DNA孵育，而是用释放抗体的低pH或高盐缓冲液洗掉DNA/生物素/链霉亲和素/抗体复合物。然后使用所得的洗涤溶液在适当的对照下用合适的引物进行PCR反应。至少在理论上，可以利用PCR的巨大扩增能力和特异性来检测单个抗原分子。

[0285] A.ELISA

[0286] 免疫测定法从其最简单和直接的意义上讲是结合测定法。某些优选的免疫测定法是本领域已知的各种类型的酶联免疫吸附测定法(ELISA)和放射性免疫测定法(RIA)。使用组织切片的免疫组织化学检测也特别有用。然而，将容易理解，检测不限于此类技术，并且也可以使用蛋白质印迹、斑点印迹、FACS分析等。

[0287] 在一种示例性的ELISA中，将本披露的抗体固定到表现出蛋白质亲和力的选定表面上，诸如聚苯乙烯微量滴定板中的孔。然后，将怀疑含有SARS-CoV-2或SARS-CoV-2抗原的测试组合物添加到孔中。结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物后，可以检测结合的抗原。可以通过添加与可检测标记连接的另一种抗SARS-CoV-2抗体来实现检测。这种类型的ELISA是简单的“夹心ELISA”。还可以通过添加第二抗SARS-CoV-2抗体，然后添加对第二抗体具有结合亲和力的第三抗体来实现检测，该第三抗体与可检测标记连接。

[0288] 在另一个示例性ELISA中，将怀疑含有SARS-CoV-2或SARS-CoV-2抗原的样品固定到孔表面，然后使其与本披露的抗SARS-CoV-2抗体接触。结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物后，检测结合的抗SARS-CoV-2抗体。如果初始的抗SARS-CoV-2抗体与可检测标记连接，则可以直接检测免疫复合物。同样，可以使用对第一抗SARS-CoV-2抗体具有结合亲和力的第二抗体来检测免疫复合物，该第二抗体与可检测标记连接。

[0289] 无论采用哪种格式，ELISA都具有某些共同的特征，诸如包被、孵育和结合，洗涤以去除非特异性结合的种类，以及检测结合的免疫复合物。这些在下面有描述。

[0290] 在将板用抗原或抗体包被时，通常将会使板的孔与抗原或抗体溶液一起孵育过夜或指定的数小时。然后将洗涤该板的孔以去除不完全吸附的材料。然后，将孔的所有剩余可用表面用相对于测试抗血清为抗原性中性的非特异性蛋白质“包被”。这些蛋白质包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或乳粉溶液。包被允许阻断该固定表面上的非特异性吸附位点，且因此降低因抗血清非特异性结合到该表面上所产生的背景。

[0291] 在ELISA中，可能更习惯使用次级或三级检测手段，而不是直接程序。因此，在蛋白质或抗体与孔结合，用非反应性材料包被以减少背景，并洗涤以去除未结合的材料后，在有效地允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下，使固定化表面与待测生物样品接触。然后，检测免疫复合物需要有标记的次级结合配体或抗体，以及次级结合配体或抗体连同标记的三级抗体或第三结合配体。

[0292] “在有效地允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下”意指这些条件优选包括用诸如BSA、牛γ球蛋白(BGG)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)/吐温(Tween)的溶液稀释抗原和/或抗

体。这些添加的试剂往往也有助于降低非特异性背景。

[0293] “合适的”条件还意指在足以允许有效结合的温度下或一段时间内进行孵育。孵育步骤通常在约25℃至27℃的温度下进行约1至2至4小时左右，或者可在约4℃左右过夜。

[0294] 在ELISA中的所有孵育步骤之后，洗涤接触的表面以去除未复合的材料。优选的洗涤程序包括用诸如PBS/吐温或硼酸缓冲液等溶液洗涤。在测试样品与最初结合的材料之间形成特定免疫复合物，以及后续洗涤之后，可以测定甚至微量的免疫复合物的出现。

[0295] 为了提供检测手段，第二或第三抗体将具有相关标记以允许检测。优选地，这将是在与适当的生色底物一起孵育后产生颜色显影的酶。因此，例如，希望将第一和第二免疫复合物与脲酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或过氧化氢酶缀合的抗体接触或孵育一段时间，并且在有利于发生进一步免疫复合物形成的条件下进行(例如，于室温下在诸如PBS-吐温等含PBS的溶液中孵育2小时)。

[0296] 与标记抗体一起孵育后并且继洗涤去除未结合的材料之后，在过氧化物酶作为酶标记的情况下，例如通过与生色底物诸如尿素或溴甲酚紫或2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)或H_2O_2一起孵育对标记的量进行定量。然后通过例如使用可见光谱分光光度计测量生色程度而完成定量。

[0297] 在另一个实施例中，本披露考虑使用竞争格式。这在检测样品中的SARS-CoV-2抗体中特别有用。在基于竞争的测定法中，未知量的分析物或抗体通过其置换已知量的标记抗体或分析物的能力得以测定。因此，信号的可量化损失是样品中未知抗体或分析物的量的指标。

[0298] 在这里，发明人提出使用标记的SARS-CoV-2单克隆抗体来测定样品中SARS-CoV-2抗体的量。基本格式包括使已知量的SARS-CoV-2单克隆抗体(与可检测的标记连接)与SARS-CoV-2抗原或颗粒接触。SARS-CoV-2抗原或生物体优选附连于支持物。标记的单克隆抗体与支持物结合后，添加样品并在容许样品中任何未标记的抗体与标记的单克隆抗体竞争，并因此置换标记的单克隆抗体的条件下孵育。通过测量损失的标记或剩余的标记(并将其从结合的标记的原始量中减去)，可以测定未标记的抗体与支持物结合的量，从而测定样品中抗体的量。

[0299] B.蛋白质印迹

[0300] 蛋白质印迹(替代性地，蛋白质免疫印迹)是用于检测组织匀浆或提取物的给定样品中的特定蛋白质的分析技术。它使用凝胶电泳按多肽的长度(变性条件)或按蛋白质的3-D结构(天然/非变性条件)分离天然或变性的蛋白质。然后将蛋白质转移到膜(通常是硝酸纤维素膜或PVDF)上，在膜上使用对靶蛋白具有特异性的抗体探测(检测)蛋白质。

[0301] 样品可取自整个组织或细胞培养物。在大多数情况下，首先使用掺和器(对于较大的样品体积)，使用匀浆器(较小的体积)或通过超声处理将固体组织机械分解。细胞也可以通过上述机械方法之一破开。然而，应注意，细菌、病毒或环境样品可以是蛋白质的来源，因此蛋白质印迹法不仅限于细胞研究。可以采用各种去污剂、盐和缓冲液来促进细胞裂解并溶解蛋白质。常常添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂以防止样品被其自身的酶消化。组织制备常常在低温下进行，以避免蛋白质变性。

[0302] 使用凝胶电泳分离样品的蛋白质。蛋白质的分离可以通过等电点(pI)、分子量、电荷或这些因素的组合来进行。分离的性质取决于对样品的处理和凝胶的性质。这是测定蛋

白质非常有用的途径。也可以使用二维(2-D)凝胶,其将来自单个样品的蛋白质以二维形式散布开。在第一维度中根据等电点(具有中性净电荷的pH)分离蛋白质,而在第二维度中根据其分子量分离蛋白质。

[0303] 为了使蛋白质可用于抗体检测,将它们从凝胶中移至由硝酸纤维素或聚偏二氟乙烯(PVDF)制成的膜上。将膜置于凝胶之上,并在其上放置一叠滤纸。将整叠放置在缓冲溶液中,该缓冲溶液通过毛细作用在纸上上移,从而使蛋白质随之上移。转移蛋白质的另一种方法称为电印迹法,它使用电流将蛋白质从凝胶中拉入PVDF或硝酸纤维素膜中。蛋白质从凝胶内移动到膜上,同时保持它们在凝胶内所具有的组织构造。作为该印迹过程的结果,蛋白质暴露在薄表面层上以进行检测(见下文)。选择两种膜都是因为它们具有非特异性的蛋白质结合特性(即,同样良好地结合所有蛋白质)。蛋白质结合是基于疏水性相互作用以及膜与蛋白质之间的带电相互作用。硝酸纤维素膜比PVDF便宜,但更易碎并且不能很好地经受反复探测。蛋白质从凝胶转移到膜上的均匀性和整体有效性可以通过用考马斯亮蓝或丽春红S染料对膜染色来进行检查。一旦转移,就使用有标记的一抗或未标记的一抗检测蛋白,然后使用与一抗的Fc区结合的标记蛋白A或有标记的二抗进行间接检测。

[0304] C.侧向流动测定法

[0305] 侧向流动测定法,也称为侧向流动免疫色谱测定法,是旨在检测样品(基质)中目标分析物的存在(或不存在)的简单装置,而无需专用且昂贵的设备,尽管存在由阅读设备支持的许多基于实验室的应用。通常,这些测试用作低资源医学诊断,用于家庭测试,即时检验或实验室使用。一种广泛传播且众所周知的应用是家庭验孕。

[0306] 该技术基于一系列毛细管床,诸如多孔纸片或烧结聚合物。这些元件中的每一个都具有自发运输流体(例如尿液)的能力。第一元件(样品垫)充当海绵并容纳过量的样品流体。一经浸泡,流体就会迁移到制造商已在其中储存有所谓的缀合物的第二元件(缀合垫),该缀合物是生物活性颗粒(见下文)在含有确保靶分子(例如抗原)与已固定在颗粒表面的其化学伴侣(例如抗体)之间的优化化学反应的每种物质的盐-糖基质中的干燥形式。当样品流体溶解盐-糖基质时,它还会溶解颗粒,并且在一种组合的运输作用下,样品和缀合物混合,同时流过多孔结构。以这种方式,分析物与颗粒结合,同时进一步迁移通过第三毛细管床。这种材料具有一个或多个区域(常常称为条纹),制造商已将第三分子固定在该区域。到样品-缀合物混合物到达这些条纹时,分析物已经结合在颗粒上并且第三“捕获”分子结合复合物。一段时间后,当越来越多的流体通过条纹时,颗粒积聚且条纹区域变色。通常,至少有两个条纹:一个(对照)捕获任何颗粒,从而显示出作用良好的反应条件和技术,第二个含有特定的捕获分子,并且仅捕获分析物分子已固定到其上的那些颗粒。通过这些反应区后,流体进入最终的多孔材料-芯-其仅充当废弃物容器。侧向流动测试可以用作竞争性测定法或夹心测定法。在美国专利6,485,982中披露了侧向流动测定法。

[0307] D.免疫组织化学

[0308] 本披露的抗体还可以连同制备的新鲜冷冻的和/或福尔马林固定的、石蜡包埋的组织块一起用于通过免疫组织化学(IHC)进行研究。由这些微粒状样本制备组织块的方法已成功地用于各种预后因素的先前IHC研究中并且是本领域技术人员众所周知的(Brown等人,1990;Abbondanzo等人,1990;Allred等人,1990)。

[0309] 简言之,可以通过以下方式制备冷冻切片:在室温下将50ng冷冻的“粉碎”组织在

小塑料胶囊中的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中复水;通过离心使颗粒沉淀;将它们重新悬浮在粘性包埋介质(OCT)中;倒转胶囊和/或通过离心再次沉淀;在-70℃异戊烷中速冻;切割塑料胶囊和/或取出冷冻的组织圆柱体;将组织圆柱体固定在低温恒温切片机卡盘上;和/或从胶囊上切下25-50个连续切片。替代性地,可以将整个冷冻组织样品用于连续切片切割。

[0310] 永久切片可以通过类似的方法制备,该方法包括将50mg样品在塑料微量离心管中复水;沉淀;重新悬浮在10%福尔马林中固定4小时;洗涤/沉淀;重新悬浮在温热的2.5%琼脂中;沉淀;在冰水中冷却以使琼脂硬化;从试管中取出组织/琼脂块;将块浸润和/或包埋在石蜡中;和/或切割最多50个连续的永久性切片。同样,可以替换整个组织样品。

[0311] E.免疫检测试剂盒

[0312] 在另外的实施例中,本披露涉及与上述免疫检测方法一起使用的免疫检测试剂盒。由于抗体可用于检测SARS-CoV-2或SARS-CoV-2抗原,因此可将抗体包括在试剂盒中。因此,免疫检测试剂盒将在合适的容器装置中包含与SARS-CoV-2或SARS-CoV-2抗原结合的第一抗体,以及任选地免疫检测试剂。

[0313] 在某些实施例中,SARS-CoV-2抗体可以预先与固体支持物,诸如柱基质和/或微量滴定板的孔结合。试剂盒的免疫检测试剂可以呈多种形式中的任何一种,包括与给定抗体缔合或连接的那些可检测标记。还考虑了与次级结合配体缔合或附连的可检测标记。示例性的次级配体是对第一抗体具有结合亲和力的那些次级抗体。

[0314] 用于本发明试剂盒中的其他合适的免疫检测试剂包括双组分试剂,其包含对第一抗体具有结合亲和力的第二抗体,与对第二抗体具有结合亲和力的第三抗体,第三抗体与可检测标记连接。如上所述,许多示例性标记在本领域中是已知的并且所有此类标记可连同本披露一起使用。

[0315] 试剂盒可进一步包含SARS-CoV-2或SARS-CoV-2抗原的适当等分的组合物,无论是有标记的还是未标记的,可用于制备检测测定法的标准曲线。试剂盒可以含有呈完全缀合形式、呈中间体形式或作为要由试剂盒的使用者缀合的独立部分的抗体-标记缀合物。试剂盒的组分可以以水性介质或冻干形式包装。

[0316] 试剂盒的容器装置通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或可以将抗体置于其中或优选地将组分适当等分的其他容器装置。本披露的试剂盒通常还将包括为了商业销售用于密封容纳抗体、抗原和任何其他试剂容器的装置。此类容器可包括将所需小瓶保持在其中的注塑成型或吹塑成型的塑料容器。

[0317] F.疫苗和抗原质量控制测定

[0318] 本披露还考虑了如本文所述的抗体和抗体片段用于评估样品中病毒抗原的抗原完整性的用途。疫苗等生物医药产品与化学药物的不同之处在于,它们通常无法在分子上进行表征;抗体是具有极大复杂性的大分子,并且具有在不同制备之间广泛变化的能力。它们被施用于健康个体,包括生命开始的儿童,因此必须特别强调其质量,以尽最大可能确保它们在预防或治疗威胁生命的疾病中有效,而本身不会造成伤害。

[0319] 疫苗生产和分配的日益全球化为更好地管理公共卫生问题开辟了新的可能性,但也引起了对通过各种来源购买的疫苗的等效性和互换性的疑问。因此,原材料、生产和质量控制测试的国际标准化以及对这些产品的制造和使用方式进行监管的高期望设置,已成为持续取得成功的基石。但它仍然是一个不断变化的领域,并且该领域的持续技术进步提供

了针对最古老的公共卫生威胁以及新的公共卫生威胁(仅举几例,疟疾、大流行性流感和HIV)开发强有力的新武器的希望,但也对制造商、监管机构和广大医学界施加了巨大压力,以确保产品继续满足可达到的最高质量标准。

[0320] 因此,可以从任何来源或在制造期间的任何时间获得抗原或疫苗。因此,质量控制过程可以从制备用于免疫测定的样品开始,免疫测定鉴定本文披露的抗体或片段与病毒抗原的结合。此类免疫测定法在本文件的其他地方披露,并且这些免疫测定法中的任何一种均可用于评估抗原的结构/抗原完整性。监管机构可以建立发现样品含有可接受量的抗原性正确和完整抗原的标准。

[0321] 评估抗原完整性的另一个重要实施例是测定保质期和储存稳定性。大多数药品,包括疫苗,可随时间推移而变质。因此,至关重要的是确定随时间推移,诸如疫苗中的抗原降解或不稳定化的程度是否使得当施用于受试者时不再具有抗原性和/或不再能够产生免疫应答。同样,监管机构可以建立发现样品含有可接受量的抗原性完整抗原的标准。

[0322] 在某些实施例中,病毒抗原可以含有一个以上的保护性表位。在这些情况下,可以证明采用着眼于一种以上抗体(诸如2、3、4、5种或甚至更多种抗体)结合的测定法是有用的。这些抗体与紧密相关的表位结合,使得它们彼此相邻或甚至重叠。另一方面,它们可以代表与抗原的异种部分不同的表位。通过检查多个表位的完整性,可以确定抗原整体完整性的更完整的图片,并因此确定产生保护性免疫应答的能力。

[0323] 如本披露中所述的抗体及其片段还可以在用于通过检测保护性SARS-CoV-2抗体的存在来监测疫苗接种程序的功效的试剂盒中使用。如本披露中所述的抗体、抗体片段或其变体和衍生物还可以在用于监测具有所需免疫原性的疫苗制造的试剂盒中使用。

[0324] G.实例

[0325] 包括以下实例以展示优选的实施例。本领域技术人员应认识到,以下实例中披露的技术代表发明人发现在实施例的实践中很好地起作用的技术,因此可以认为构成了其实践的优选模式。然而,根据本披露,本领域技术人员应认识到,在不脱离本披露的精神和范围的情况下,可以对所披露的特定实施例进行许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0326] 实例1-抗体协同作用

[0327] 协同作用在本文中定义为当与相同抗体总浓度(体外)或剂量(体内)下的各个mAb介导的中和活性相比时,由两种mAb的混合剂介导的中和活性更高。为了评估两种mAb以混合剂形式是否协同中和SARS-CoV-2,发明人使用先前报道的方法来定量协同作用(Ianevski A,He L,Aittokallio T,Tang J.Bioinformatics[生物信息学].33,2413-2415,2017)。为了评价由组合mAb产生的有益效果的重要性,将观察到的组合应答(剂量-应答矩阵)与借助于协同作用评分模型计算出的预期应答进行比较(Ianevski A,He L,Aittokallio T,Tang J.Bioinformatics[生物信息学].33,2413-2415,2017)。在常规的病灶减少中和测试(FRNT)测定中,使用野生型SARS-CoV-2和Vero-E2细胞培养单层测量病毒中和作用。将各个mAb COV2-2196和COV2-2130以不同的浓度混合,以评估混合剂中不同mAb比率的中和活性。特别地,将mAb COV2-2130的七倍稀释液中的每一种(从500ng/mL开始)与mAb COV2-2196的九种稀释液中的每一种(从500ng/mL开始)混合(每种条件下的总体积为50μL),然后与50μL活SARS-CoV-2在细胞培养基(补充2%FBS的RPMI-1640培养基)中孵育,之后施加于在96孔板中生长的融合Vero-E2细胞。对照值包括针对以与混合剂中相同的剂

量评估的各个mAb COV2-2196和COV2-2130单独测量的中和活性的剂量-应答的对照值(参见图1-3)。每次测量一式两份地进行。接下来,发明人计算每种条件下的病毒中和百分比,然后计算协同作用得分值,该值将混合剂中这两种mAb之间的相互作用定义为协同的(协同作用得分=17.4)。注意,协同作用得分小于-10指示拮抗作用,得分为-10至10指示相加作用,得分大于10指示协同效应。图1-3中的实例示出了剂量-应答矩阵,并且证明混合剂中79ng/mL的组合mAb剂量(16ng/mL的COV2-2196和63ng/mL的COV2-2130)具有与250ng/mL的每种单独mAb相同的活性。这一发现表明,对于在病毒中和中达到相同的效力,在混合剂中剂量可以减少超过三分之二。

[0328] 为了评估处理的疗效,发明人首先使用MA-SARS-CoV-2攻击模型测试了mAb COV2-2196或COV2-2130或其1:1组合。接种病毒后2天,如通过用肺组织的空斑滴度测量的,所有治疗均降低了肺部的感染性病毒。以400μg/只小鼠(约20mg/kg)的剂量递送的混合剂治疗是最有效的,因为它显著降低肺部负荷,最多达到3×10^4倍;来自该治疗组的5只动物中有4只的肺部不再具有感染性病毒(图4A)。类似地,用400μg/只小鼠的mAb混合剂治疗肺部用重组腺病毒转导以表达SARS-CoV-2受体人类ACE2(AdV-hACE2)的小鼠,在真实SARS-CoV-2病毒攻击后12小时,揭示体内肺部中的感染性病毒完全中和(图4B)。与同种型对照治疗的小鼠的肺部相比,mAb混合剂治疗的小鼠的肺部中INF-γ、IL-6、CXCL10和CCL2细胞因子和趋化因子基因(它们是炎症的指标)的表达也降低(图4C)。总之,这些结果表明在小鼠SARS-CoV-2攻击模型中由COV2-2196+COV2-2130的混合剂介导的暴露后治疗功效。

[0329] 实例2-非人灵长类动物攻击研究

[0330] MAb的产生和纯化。已合成(美商扭转生物科技有限公司(Twist Bioscience))并克隆到IgG1单顺反子表达载体(命名为pTwist-mCis_G1)中的mAb序列用于哺乳动物细胞培养mAb分泌。该载体含有增强的2A序列和GSG接头,允许在转染后来自单个构建体的mAb重链和轻链基因同时表达[1]。发明人先前描述了在96孔板中的1mL ExpiCHO培养物中的mAb的微量表达[2]。对于大规模mAb表达,发明人使用Gibco™ExpiCHO™表达系统和用于50mL微型生物反应器管(康宁(Corning))的方案(如供应商所述),进行CHO细胞培养物的转染(每种抗体1至300mL)。使用HiTrap MabSelect SuRe(思拓凡(Cytiva),前身为GE医疗生命科学(GE Healthcare Life Sciences))在24柱平行蛋白质色谱系统(蛋白质生物溶液(Protein BioSolutions))上纯化培养上清液。将纯化的mAb缓冲液交换成PBS,使用Amicon® Ultra-450KDa离心过滤装置(密理博西格玛(Millipore Sigma))浓缩并储存在4℃下直至使用。常规性地测试纯化的mAb的内毒素水平,对于NHP研究而言发现内毒素水平<1EU/mg IgG。使用灵敏度范围为10至0.1EU/mL的PTS201F筒(查尔斯河(Charles River))和EndosafeNexgen-MCS仪器(查尔斯河)进行内毒素测试。

[0331] 发明人使用最近描述的SARS-CoV-2非人灵长类动物(NHP)攻击模型测试mAb的保护功效[3,4]。对于该模型,发明人作为单一疗法COV2-2196测试由与COV2-2196相同的可变基因区段编码的中和mAb,但在HCDR3和LCDR3中使用了许多明显的氨基酸差异。动物在第-3天静脉接受一剂50mg/kg的mAb COV2-2196或同种型对照mAb,然后在第0天用1.1×10^4PFU SARS-CoV-2的剂量经鼻内和气管内攻击。攻击后,发明人通过RT-qPCR评估支气管肺泡灌洗液(BAL)和鼻拭子中的病毒RNA。在同种型对照mAb治疗的NHP中观察到高水平的亚基因组病毒RNA,鼻拭子中位数峰值为7.53(范围5.37至8.23)$\log_{10}$ RNA拷贝数/拭子而BAL中位数峰

值为4.97(范围3.81至5.24)$\log_{10}$ RNA拷贝数/mL。在来自mAb治疗组的样品中未检测到亚基因组病毒RNA(LOD＝50[1.7$\log_{10}$]RNA拷贝数/拭子或每mL),显示出保护作用。药代动力学分析揭示,NHP中的循环人mAb的浓度稳定。

[0332] NHP攻击研究。NHP研究遵循Guide for the Care and Use of Laboratory Animals[实验动物的护理和使用指南]第八版中规定的原则。进行这项研究的机构(马里兰州罗克维尔市的Bioqual公司(Bioqual Inc.,Rockville,MD))已获得国际实验动物管理评估与认证协会(AAALAC)的全面认可,并拥有经过批准的实验动物福利办公室。NHP研究是依照所有相关的地方、州和联邦法规进行的并且得到相关实验动物管理和使用委员会(IACUC)的批准。

[0333] 研究了八只印度来源的健康成年恒河猴(猕猴(Macaca mulatta))(体重5至15kg)。将动物随机分配至抗SARS-CoV-2mAb治疗组(每组n＝4)和一个对照(经同种型治疗的)组(每组n＝4)。动物在第-3天静脉内接受一剂50mg/kg的mAb COV2-2196或同种型对照mAb,然后在三天内用1.1×10^4PFU SARS-CoV-2攻击,在鼻内途径中以1mL而在气管内途径中以1mL施用。攻击后,在所述的多个时间点通过RT-qPCR评估支气管肺泡灌洗液和鼻拭子中的病毒RNA[5,6]。对所有动物给予身体检查。另外,每天用实验动物管理和使用委员会批准的内部评分方案对所有动物进行监测。这些研究未设盲。

[0334] 检测NHP血清中的循环人mAb。将ELISA板在4℃下用1μg/mL山羊抗人IgG(H+L)二抗(猴预先吸附的)(罗福斯生物(Novus Biological))包被过夜,然后封闭2小时。在PBS(赛默飞世尔(ThermoFisher))稀释剂中的阻断剂酪蛋白中以1:3的稀释度开始以3倍稀释测定血清样品。将样品在环境温度下孵育1小时,然后取出,并洗涤板。然后将孔与HRP缀合的山羊抗人IgG(猴预先吸附的)(南方生物技术公司(Southern Biotech))以1:4,000的稀释度孵育1小时。洗涤孔,然后用SureBlue Reserve TMB微孔过氧化物酶底物(塞拉卡(Seracare))(100μL/孔)孵育3分钟,再用TMB终止液(塞拉卡)孵育以终止反应(100μL/孔)。在450nm下读取微孔板。使用Prism软件8.0版(格雷夫派得(GraphPad))从纯化的人IgG(西格玛(Sigma))标准曲线的线性范围中内插人mAb的浓度。

[0335] 实例3-实例4的材料和方法

[0336] SARS-CoV-2刺突蛋白的重组受体结合结构域(RBD)的表达和纯化。对与S蛋白RBD(残基319-528)相对应的DNA区段进行序列优化以进行表达,合成并克隆到IL-2信号肽(MYRMQLLSCIALSLALVTNS)下游的pTwist-CMV表达DNA质粒中(美商扭转生物科技有限公司)。在表达构建体的C端掺入三个氨基酸的接头(GSG)和His标签,以促进蛋白质纯化。用编码RBD的质粒瞬时转染Expi293F细胞,并在5天后收获培养上清液。用HisTrap Excel柱(GE医疗生命科学)通过镍亲和色谱法从上清液中纯化RBD。对于结晶试验中使用的蛋白质生产,在培养基中包含5μM几夫碱(kifunensine),以产生具有高甘露糖聚糖的RBD。随后将高甘露糖糖蛋白用糖苷内切酶F1(密理博(Millipore))处理以获得均匀去糖基化的RBD。

[0337] 重组COV2-2196和COV2-2130 Fab的表达和纯化。合成对应于COV2-2196和COV2-2130的具有人IgG1 CH1结构域的重链可变结构域和具有人κ链恒定结构域的轻链可变结构域的DNA片段,并将其克隆到pTwist载体(美商扭转生物科技有限公司)中。该载体包括每个Fab的重链,随后是GGGGS接头、弗林蛋白酶裂解位点、T2A核糖体裂解位点和每个Fab的轻链。重链和轻链的表达由相同的CMV启动子驱动。通过用表达质粒瞬时转染,在ExpiCHO细胞

中表达了COV2-2196和COV2-2130 Fab。使用抗CH1 CaptureSelect柱(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific))从培养上清液中纯化重组Fab。对于RBD/COV2-2196复合物，使用COV2-2196的野生型序列进行表达。对于RBD/COV2-2196/COV2-2130复合物，使用COV2-2196 Fab的修饰型式，其中可变区的前两个氨基酸从QM突变为EV。

[0338] 抗体-抗原复合物的结晶和结构测定。将纯化的COV2-2196 Fab与去糖基化的RBD以1:1.5的摩尔比混合，并用Superdex-200Increase柱(GE医疗生命科学)通过尺寸排阻色谱法进一步纯化混合物，以获得抗体-抗原复合物。为了获得RBD/COV2-2196/COV2-2130三重复合物，将纯化且去糖基化的RBD与COV2-2196和COV2-2130 Fab以1:1.5:1.5的摩尔比混合，并用Superdex-200Increase柱纯化该三重复合物。将复合物浓缩至约10mg/mL，并经受结晶试验。RBD/COV2-2196复合物在16％-18％PEG 3350、0.2Tris-HCl(pH8.0-8.5)中结晶，而RBD/COV2-2196/COV2-2130复合物在5％(w/v)PEG 1000、100mM磷酸氢二钠/柠檬酸(pH 4.2)、40％(v/v)试剂醇中结晶。对于两种复合物的晶体而言，通过将结晶溶液与100％甘油以20:7的体积比混合来制备低温保护溶液。将蛋白质晶体快速浸泡在冷冻保护溶液中后，在液氮中快速冷冻。在先进光子源(Advanced Photon Source)处，对于RBD/COV2-2196复合物而言在光束线21-ID-F下并且对于RBD/COV2-2196/COV2-2130复合物而言在光束线21-ID-G下收集衍射数据。用XDS[58]和CCP4套件[59]处理衍射数据。使用与Fab CC12.1复合的RBD结构(PDB ID 6XC2)和MR78的Fab结构(PDB ID 5JRP)，用程序Phaser[60]，通过分子置换来解析晶体结构。分别用Phenix[61]或Coot[62]对结构进行精制和手动重建。这些模型已存放到蛋白质数据库中。使用PyMOL软件[63]制作所有结构图。

[0339] 氢氘质谱(HDX-MS)实验。使用与M级Acquity LC系统和HDX管理器(英国威姆斯洛的沃特世有限公司(Waters Ltd.,Wilmslow,UK))偶联的自动化样品处理机器人(美国佛罗里达州劳德代尔堡的LEAP技术公司(LEAP technologies,Fort Lauderdale,FL,USA))进行HDX-MS实验。将7.6μL的4.3μM SARS-CoV-2S2P刺突三聚体(单独的或含有1:1.12摩尔比的AZD1061或AZD8895)添加到52.4μL标记缓冲液(50mM磷酸钾pD 6.2)中，并在20℃下孵育1分钟。孵育后，将50μL的该样品在1℃下添加到50μL淬灭溶液(50mM磷酸钾、200mM TCEP、2M Gdn-HCl，pH 2.3)中。在20℃使50μL淬灭样品以100μLmin^{-1}(约4,000psi)通过固定的BEH胃蛋白酶柱(英国威姆斯洛的沃特世有限公司)，持续4分钟，之后使用Vanguard柱前Acquity UPLC BEH C18捕集柱(1.7μm，2.1mm×5mm，英国威姆斯洛的沃特世有限公司)捕集所得的肽。阀切换后，使用Acquity UPLC BEH C18分析柱(1.7μm，1mm×100mm)在6分钟内以40μLmin^{-1}，通过0至35％在H_2O(0.2％v/v甲酸)中的MeCN(0.2％v/v甲酸)的梯度洗脱在1℃下分离肽。使用以分辨率为120K的轨道阱检测模式(氘化样品)或轨道阱-离子阱DDA模式(t＝0样品)工作的Orbitrap Fusion质谱仪(德国不莱梅的赛默飞世尔(Thermo Fisher,Bremen,Germany))对肽进行分析。使用BioPharma Finderv3.0(德国不莱梅的赛默飞世尔)分析用于鉴定肽的肽MS/MS数据，并使用HDExaminer v2.0(塞拉分析(Sierra Analytics))氘吸收量进行了定量。使用内部R:脚本重新格式化来自HDExaminer的肽库结果和摄取汇总表csv输出，以便使用PAVED(利兹大学(University ofLeeds))生成吸收图和结构热图[64]。

[0340] COV2-2196突变体的ELISA结合。在4℃下，将384孔微量滴定板的孔用纯化的重组SARS-CoV-2S 6P蛋白包被过夜。将板用在含0.05％吐温-20(DPBS-T)的DPBS中的2％脱脂乳粉和2％正常山羊血清封闭1小时。将抗体稀释至10μg/mL，并在DPBS-T中两倍滴定23次，并

添加到孔中，然后在室温下孵育1小时。使用与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人IgG(南方生物技术公司)和TMB底物(赛默飞世尔科技)检测结合的抗体。用1N盐酸淬灭反应，并在450nm下使用分光光度计(伯腾(Biotek))测量吸光度。

[0341] 对逃逸抗体结合的所有突变的作图。逃逸抗体结合的所有突变均经由DMS方法作图[41]。发明人使用先前描述的酵母展示RBD突变体文库[41,42]。简言之，在来自SARS-CoV-2(分离株Wuhan-Hu-1，Genbank登录号MN908947，残基N331-T531)的刺突受体结合结构域(RBD)中构建了重复的突变体文库，并且含有3,819个可能氨基酸突变中的3,804个，其中>95％的氨基酸突变作为单一突变体存在。每个RBD变体都与16个核苷酸的唯一条形码序列连接，以促进下游测序。如先前所述，针对RBD表达和ACE2结合对文库进行分选以消除完全错误折叠或无功能(即，缺乏适度的ACE2结合亲和力[41])的RBD变体。

[0342] 如先前所述[41]，进行细微修改，使用两个独立的突变体RBD文库以生物学重复进行抗体逃逸作图实验。简言之，洗涤诱导表达RBD的突变体酵母文库，并用400ng/mL的抗体在室温和轻轻搅拌下孵育1小时。抗体孵育后，再用针对RBD表达标记的1:100FITC缀合的抗MYC抗体(免疫学咨询实验室(Immunology Consultants Lab)，CYMC-45F)和针对结合的抗体标记的1:200PE缀合的山羊抗人IgG(杰克逊免疫研究(Jackson ImmunoResearch)109-115-098)标记文库。使用流式细胞术分选经由选择门富集表达抗体结合减少的RBD变体的细胞，该选择门用于捕获在文库样品抗体浓度1％下标记的未突变的SARS-CoV-2细胞。对于每个样品，在细胞计数仪上处理了大约1千万个RBD+细胞。抗体逃逸细胞在SD-CAA(6.7g/L酵母氮源基础、5.0g/L酪蛋白氨基酸、1.065g/LMES酸和2％w/v右旋糖)中生长过夜，以扩增细胞，然后提取质粒。

[0343] 如先前所述[41]，通过抗体逃逸细胞(Zymoprep酵母质粒Miniprep II)的预选和过夜培养制备质粒样品。通过PCR扩增标识每个RBD变体的16个核苷酸的条形码序列，并且如所述[41,42]，在具有50bp单端读段的IlluminaHiSeq 2500上进行测序。

[0344] 如所述[41]，进行如下所示的细微修改，计算逃逸分数。发明人使用dms_variants包(jbloomlab.github.io/dms_variants/，版本0.8.2)，使用先前描述的条形码/RBD查阅表[65]将Illumina序列处理为每个预分选和抗体逃逸群体中每种带条形码的RBD变体的计数。

[0345] 对于每次抗体选择，发明人使用原始和抗体逃逸群体中每种变体的深度测序计数以及经由先前描述的式[41]得到的逃逸抗体结合的文库的总分数来计算每种带条形码的变体的“逃逸分数”。这些逃逸分数表示表达落入抗体逃逸仓中的该特定变体的细胞的估计分数，因此值为0意指该变体总是被血清结合，而值为1意指该变体总是从抗体结合中逃逸。然后，发明人应用一种计算过滤器，以去除具有低测序计数或者可能仅仅通过导致正确折叠的RBD在酵母细胞表面不良表达而引起抗体逃逸的高度有害突变的变体[41,42]。特别地，他们如先前所述[42]，使用变体水平和突变水平的深度突变扫描得分，去除ACE2结合得分<-2.35或表达得分<-1的(或含有ACE2结合得分<-2.35或表达得分<-1的突变)的变体。注意，这些过滤标准比先前用于绘制一组人类抗体[41]的标准更为严格，但与定义影响mAb[65]和多克隆血清[54]结合的RBD残基的最近研究中使用的那些标准相同。

[0346] 接下来，发明人使用在dms_variants包中执行的全局上位性模型[66]将变体水平的逃逸得分去卷积为单个突变的逃逸分数估计值，如(jbloomlab.github.io/dms_variants/dms_variants.globalepistasis.html)详述和描述的[41]。整个论文中报告的逃逸得分是整

个文库的平均值(图18A-B中所示的相关性);这些得分也在表B中。启发式地将用于在徽标图中突出显示的每种抗体的强烈逃逸的位点确定为突变逃逸得分总和为选择的逐位点中位总和的至少10倍,并且是最强选择位点的逐位点总和的10倍以内的位点。计算分析的完整文档见github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs。这些结果也可以以交互形式在https://jbloomlab.github.io/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/上获得。

[0347] 用VSV-SARS-CoV-2进行抗体逃逸选择实验。为了用COV2-2196和COV2-2130进行逃逸选择实验,发明人使用具有复制能力的重组VSV病毒,该病毒编码有21个氨基酸的C端缺失的SARS-CoV-2的刺突蛋白[43]。如先前所述[43],使表达刺突的VSV病毒在MA104细胞(非洲绿猴,ATCC CRL-2378.1)中繁殖,并在Vero E6细胞单层培养物中滴定病毒原液。使用中性红染色使空斑可视化。为了筛选在COV2-2196、COV2-2130或由COV2-2196和COV2-2130的1:1混合物组成的混合剂的存在下选择的逃逸突变,发明人使用实时细胞分析测定法(RTCA)和xCELLigence RTCA MP分析仪(ACEA生物科学有限公司(ACEA Biosciences Inc.))以及先前描述的逃逸选择方案[41]。简言之,将50μL细胞培养基(补充有2%FBS的DMEM)添加到96孔E板的每个孔中,以获取背景读数。每个孔中接种在50μL细胞培养基中的一万八千(18,000)个Vero E6细胞,并将板置于分析仪上。每15分钟自动进行一次测量,并使用RTCA软件2.1.0版(ACEA生物科学有限公司)使传感图可视化。将VSV-SARS-CoV-2病毒(每孔5e3个空斑形成单位(PFU),～0.3MOI)与饱和中和浓度的COV2-2196、COV2-2130或COV2-2196和COV2-2130抗体的1:1混合物(抗体总浓度为5μg/mL)以100μL的总体积混合并且在37℃下孵育1小时。接种细胞后16-20小时,将病毒-抗体混合物添加到细胞单层中。在每个板上包括不存在抗体仅含病毒的孔和在培养基中仅含Vero E6细胞的孔作为对照。对板进行连续(每15分钟)72小时测量。通过监测细胞活力下降的细胞指数来鉴定逃逸突变。为了从抗体选择中验证逃逸,在随后的RTCA实验中在10μg/mL的COV2-2130或COV2-2196的存在下,评估在COV2-2130的存在下观察到细胞病变作用的孔。在确认所选病毒对COV2-2130中和作用的抗性后,在10μg/mL的COV2-2130的存在下,将病毒分离株在Vero E6细胞上扩增。使用QiAmp病毒RNA提取试剂盒(凯杰(QIAGEN)),根据制造商方案分离病毒RNA,并用SuperScript IV一步RT-PCR试剂盒(赛默飞世尔科技),使用侧接S基因的引物对SARS-CoV-2刺突基因进行逆转录和扩增。使用SPRI磁珠(贝克曼库尔特(Beckman Coulter))以1:1的比率纯化扩增的PCR产物,并通过Sanger方法,使用给出RBD的正向和反向读段的引物进行测序。

[0348] 连续传代和测试SARS-CoV-2以选择mAb抗性突变。使SARS-CoV-2毒株USA-WA1/2020在含AZD8895、AZD1061或AZD7442的Vero细胞单层培养物中连续传代,其浓度从其各自的IC_{50}值开始并且每次传代逐步增加至其IC_{90}值。作为对照,使病毒在不存在抗体的情况下传代。最终传代后,通过空斑测定法评价病毒在为IC_{90}浓度10倍的最终浓度下针对相应抗体的敏感性。随机选择空斑(n＝6)用于AZD1061培养,并对它们的病毒刺突编码基因进行测序。

[0349] 包括带有变异残基的病毒在内的真实SARS-CoV-2病毒的分离或生成。从英格兰肯特郡(Kent,England)的感染个体的鼻咽拭子中获得UK B.1.1.7-OXF分离株。英国牛津(Oxford,U.K.)的约翰瑞德克里夫医院(John Radcliffe Hospital)批准了在书面知情同意后获得样本的临床研究。将样品在含2%FBS的DMEM中稀释,并使其通过0.45μm过滤器,之后添加到Vero-hACE2-TMPRSS2细胞单层中(A.Creanga和B.Graham的礼物)。两天后,收获上

清液以建立零代(p0)原液。从美国疾病控制中心(CDC)获得SARS-CoV-2的2019n-CoV/USA_WA1/2019分离株,并使其在Vero E6细胞上传代。如先前所述[67],将刺突基因中的单个点突变(D614G和E484K/D614G)引入2019n-CoV/USA_WA1/2019毒株的感染性cDNA克隆物中。将核苷酸取代引入含有SARS-CoV-2野生型感染性克隆物的刺突基因的亚克隆puc57-CoV-2-F6中[68]。按照先前描述的方案[68],通过体外连接七个连续的cDNA片段来组装变体SARS-CoV-2病毒的全长感染性cDNA克隆物。然后进行体外转录以合成全长基因组RNA。为了回收突变体病毒,将RNA转录物电穿孔到Vero E6细胞中。40h后从细胞上清液中收集病毒,并用作p0原液。通过测序确认所有病毒原液。

[0350] 病灶减少中和测试。将mAb或血清的连续稀释液与10^2个病灶形成单位(FFU)的SARS-CoV-2的不同毒株或变体在37℃下孵育1h。将抗体-病毒复合物添加到96孔板中的Vero-hACE2-TMPRSS2细胞单层培养物中,并在37℃下孵育1h。随后,将细胞用在补充有2%FBS的MEM中的1%(w/v)甲基纤维素覆盖。20h后,去除覆盖物收获板,并在室温下用在PBS中的4%PFA固定20分钟。洗涤板并依次用抗S mAb和HRP缀合的山羊抗人IgG的寡克隆库在补充有0.1%皂苷和0.1%牛血清白蛋白的PBS中孵育。使用TrueBlue过氧化物酶底物(KPL)使SARS-CoV-2感染的细胞灶可视化,并在ImmunoSpot微量分析仪(细胞技术公司(Cellular Technologies))上进行定量。

[0351] 多序列比对。发明人搜索具有与编码COV2-2196的那些相同的特征的抗体可变基因序列,并从检查的每个个体的库中检索出匹配序列。他们在三个健康个体和脐带血库(存放在SRP174305中)的公开可用的大规模抗体序列库中搜索相似序列。重链的搜索参数是具有IGHV1-58和IGHJ3与P99、D108和F110残基的序列。另外,轻链的搜索参数是具有Y92和W98残基的序列。将属于每个个体的匹配克隆型的序列与Clustal O(重链)或MUSCLE(轻链)比对。然后,使用WebLogo生成比对序列的徽标图。

[0352] 数据和材料的可用性:本论文中报道的晶体结构已经以登录号7L7D、7L7E存放到蛋白质数据库中。比对的人类抗体基因库数据集的序列读段档案存放在NCBI:PRJNA511481。所有其他数据在正文或补充材料中可获得。

[0353] 软件的可用性。用于抗体逃逸突变的深度突变扫描分析的计算渠道在GitHub:github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs上可获得。FASTQ文件可作为BioProject PRJNA639956的一部分在BioSample SAMN17532001下的NCBI序列读段档案中获得。每个突变的逃逸分数在GitHub(github.com/jbloomlab/SARS-CoV-2-RBD_MAP_AZ_Abs/blob/main/results/supp_data/AZ_cocktail_raw_data.csv)和表B中可获得。

[0354] 实例4-结果与讨论

[0355] 正在研究将基于COV2-2196的抗体与基于非竞争性RBD特异性抗体COV2-2130的抗体组合用于预防或治疗。为了了解COV2-2196和COV2-2130识别RBD的分子细节以及在动物模型[1]中两种非竞争性mAb的预防性保护中显示的协同作用基础的可能结构机制,发明人确定了以$2.50\ \text{Å}$与COV2-2196复合(图8A-E、表B)和以$3.00\ \text{Å}$与COV2-2196和COV2-2130两者复合(图9A-F,表B)的S蛋白RBD的晶体结构。RBD-COV2-2196-2130复合物中RBD-COV2-2196的亚结构可与RBD-COV2-2196复合物的结构叠加(图12)。在两种晶体结构中,COV2-2196与RBD之间的界面的掩埋表面积为约$650\ \text{Å}^2$,而COV2-2130与RBD之间的界面的掩埋表面积为

约740 Å^2。COV2-2196与RBD的受体结合脊，而COV2-2130与残基K444周围RBD边缘的一侧和受体结合基序(RBM)的鞍状区域结合，从而重叠ACE2结合位点(图8A-B、图9A-B)。这些特征解释了我们先前研究中抗体与ACE2之间对RBD结合的竞争，例如，COV2-2196和COV2-2130均通过阻断RBD接近人受体ACE2来中和病毒[1]。来自COV2-2196重链和轻链的芳香族残基形成包围RBD残基F486和相邻残基(G485、N487)的疏水口袋(图8A、图8D和图8E；图13A-C)。Ab-Ag相互作用的这种模式的异常之处在于，抗体口袋的形成是因HCDR3和LCDR3的空间间隔很大引起的。另外，尽管COV2-2196识别的抗原位点没有掩埋在S三聚体本身的原聚体之间的界面处，但由于与相邻S原聚体中RBD的空间冲突，COV2-2196不能结合呈“向下”构象的RBD。因此，COV2-2196仅与呈“向上”构象的RBD结合(图8C)。与COV2-2130复合的RBD的亚结构(图9C)和与COV2-2196和COV2-2130两者复合的RBD的结构(图9D)的重叠表明COV2-2130能够结合S三聚体的呈“向上”和“向下”构象的RBD。这些结构发现与我们先前使用负染色电子显微镜术得到的该复合物的较低分辨率结果一致[1]。

[0356] 与RBD复合的COV2-2196的结构分析揭示COV2-2196如何识别RBD上的受体结合脊。主要接触残基之一F486位于结合位点的中心，与COV2-2196重链/轻链之间的疏水口袋(重链的残基P99和由5个芳香族侧链形成的“芳香族笼”)经由疏水作用和范德华相互作用广泛地相互作用(图8D-E、图13A-B)。以4个直接的Ab-Ag H键和16个水介导的H键构建的氢键(H键)网络包围残基F486并增强Ab-Ag相互作用(图13C)。重要的是，对于除与表位广泛相互作用的一个残基(重链的P99残基)以外的所有残基，它们均由种系序列(对于重链而言为IGHV1-58*01和IGHJ3*02，对于轻链而言为IGKV3-20*01和IGKJ1*01)编码(图10A)或仅它们的骨架原子参与Ab-Ag相互作用，诸如重链N107和G99以及轻链S94。发明人注意到文献中的另一种抗体S2E12，该抗体由相同的IGHV/IGHJ和IGKV/IGKJ重组编码，具有与COV2-2196相似但最有可能不同的IGHD基因(IGHD2-15对比IGHD2-2)[38]。对与S蛋白(PDB 7K4N)复合的S2E12的冷冻电镜结构的比较表明mAb S2E12可能使用与COV2-2196几乎相同的Ab-Ag相互作用，但是可以看到界面残基侧链构象的变型(图13D)。例如，对于轻链残基Y92而言，晶体结构中的苯环与所配合的EM结构中的环垂直。

[0357] 发明人搜索基因数据库以确定这些结构特征是否存在于由其他人分离的其他SARS-CoV-2mAb中，并且发现了克隆型的其他成员(图10A)。另两项研究报道了从多个COVID-19康复期患者分离出的相同或相似的抗体克隆型[4,38]，并且一项研究发现三种具有相同IGHV1-58和IGKV3-20配对的抗体，但未提供有关D或J基因使用的信息[39]。据报道，所有这些抗体均大幅结合SARS-CoV-2RBD，并以高效力中和病毒[1,4,38,39]。到目前为止，由这些$V_H(D_H)J_H$和V_K-J_K重组编码的抗体只有两种原子分辨率结构可用，即这里呈现的COV2-2196的结构和S2E12的结构[38]。发明人对来自我们自己的抗SARS-CoV-2抗体组的这种克隆型的另外两种抗体进行了同源性建模，称为COV2-2072和COV2-2381。正如预期的那样，假定这些抗体是共有基因克隆型的成员，则COV2-2072/RBD和COV2-2381/RBD复合物的建模结构实际上可与Ab-Ag界面处的COV2-2196/RBD和S2E12/RBD的结构叠加(图14A-E)。另外，考虑到CDR的糖基化可能对抗原识别有不利影响，COV2-2072编码HCDR3中N-连接的糖基化序列子(图14D)，这是抗体的不寻常特征。然而，COV2-2196结构显示该克隆型中二硫键固定的HCDR3与结合位点成一定角度，从而解释了在不损害结合的情况下如何耐受COV2-2072中这种异常的HCDR3糖基化作用(图14E)。

[0358] 接下来,发明人确定了他们是否可以在来自未经SARS-CoV-2感染的个体的循环B细胞的抗体可变基因库中鉴别出这种公共克隆型的潜在前体。发明人在先前描述的源自没有SARS-CoV-2感染史的3个健康人类供体的综合库数据集以及在来自COVID-19大流行之前收集的脐带血的数据集中搜索V(D)J和VJ基因[40]。在每个供体或脐带血库中分别发现了该SARS-CoV-2反应性公共克隆型的总共386、193、47或7个重链序列(图15A)。另外,发明人发现了具有相同轻链V-J重组(IGKV3-20-IGKJ1*01)的516,738个人抗体序列。在每个供体中分别针对该公共克隆型发现总计103,534、191,039或222,165个轻链序列。由于序列的数量大,因此比对来自每个供体的前五个丰富序列。使用ClustalOmega为每个供体的序列生成多个序列比对,并生成徽标图。在每个供体中具有相同重组事件的前5个序列是相同的,从而产生相同的徽标图(图15A-B)。

[0359] 发明人注意到,抗体中对结合很重要的9个常见残基中的8个由种系基因序列编码,并且全部存在于这里所列出的来自四个不同抗体发现小组的公共克隆型的所有14个成员中(图10A)。为了证实这些特征的重要性,他们表达了在互补位中具有点突变的变体抗体,以确定在保守残基处的变异影响(图10B)。将D108残基改为A、N或E几乎没有影响,但是去除HCDR3中使该环固定的二硫键使结合减少。使HCDR3环远离与抗原的相互作用位点定向的P99残基也很重要,因为P99G突变体表现出结合减少,并且具有P99的COV2-2196的种系回复突变形式与抗原结合,但种系回复突变背景中的P99G不与抗原结合(图10B)。

[0360] 在临床试验中,正在与基于COV2-2130的抗体组合测试基于COV2-2196的抗体。具有22个氨基酸残基的COV2-2130 HCDR3对于人抗体而言相对较长,并且从推断的种系IGHD3基因高度突变。HCDR3形成由小环构成的长的结构化环,通过HCDR3内的短程氢键和疏水相互作用/芳香族堆积而稳定,并且通过它与轻链残基的相互作用(氢键和芳香族堆积)进一步强化(图16A-B)。COV2-2130重链和轻链分别由种系基因IGHV3-15和IGKV4-1编码,并且这两个基因编码最长的种系编码的HCDR2(10个氨基酸)和LCDR1(12个氨基酸)环,这些环用于COV2-2130中。重链V(D)J重组、HCDR3突变以及重链和轻链的配对在重链与轻链之间产生结合槽,与以S443-Y449环为中心的RBD区域的形状相匹配(图9A、图16C)。与这些结构特征紧密相关,仅HCDR3、LCDR1、HCDR2和LCDR2参与互补位的形成(图9E-F、图13E-F)。对Ab-Ag界面的检查揭示了可能驱动大部分相互作用能量的区域。RBD残基K444侧链被HCDR3环的子环Y104-V109包围,并且侧链NZ原子上的正电荷被HCDR3残基D107侧链,来自Y105、D107和V109的三个主链羰基氧原子,以及Y104苯环的富电子面(阳离子-π相互作用)中和(图13E)。由于相互作用的原子被完全保护不受溶剂的影响,因此在这种受限空间内高度集中的相互作用在能量上是有利的。此外,Ab-Ag界面的“热点”被溶剂所包围或通过具有较小自由能增益的Ab-Ag相互作用受到保护而不受溶剂影响,这些相互作用包括RBD残基R346与HCDR2D56之间的盐桥,RBD R346与HCDR3 Y106主链氧之间的静电相互作用,RBD N450与HCDR3 Y105主链氧之间的氢键,RBD V445主链氧与HCDR3 Y104侧链之间的氢键,V445侧链与HCDR3 L113和F118侧链之间的疏水相互作用(图13E)。同样,HCDR3残基Y105与LCDR2残基W56之间的芳香族堆积参与了“热点”对溶剂的屏蔽(图13E)。另外,COV2-2130轻链LCDR1和LCDR2与RBD具有广泛的接触。其中,LCDR1 S32侧链、S33主链氧、N34侧链和LCDR2Y55侧链与RBD E484侧链、S494主链氮、Y449主链氧和G446主链氮形成氢键(图13F)。残基LCDR1 K36、Y38和LCDR2 W56经由芳香族堆积和阳离子-π相互作用与RBD Y449相互作用,从而形成“相互作用簇”(图

13F),但这些相互作用在能量上可能不如RBD K444那样强。

[0361] 在与COV2-2196和COV2-2130两者复合的RBD的晶体结构中,发明人注意到紧密间隔的COV2-2196和COV2-2130 Fab之间的相互作用(图17)。呈RBD结合状态的两个Fab之间的相互作用可能有助于先前观察到的SARS-CoV-2的协同中和[1]。然而,尚不清楚多少协同作用可归因于这种Fab-Fab相互作用。

[0362] 为了更好地了解对于COV2-2196和COV2-2130的结合至关重要的RBD位点,发明人使用深度突变扫描(DMS)方法对逃逸抗体结合的所有RBD突变作图[41];(图18)。对于两种抗体,他们鉴定了几个关键位点,全部在抗体的结构足迹中,其中RBD突变强烈破坏结合(图11A-D)。发明人利用我们先前的工作,量化RBD突变对ACE2结合的影响[42]以覆盖废除抗体与RBD结合的突变对ACE2结合的影响(图11A-B)。对于COV2-2196,F486和N487的许多突变的逃逸分数接近1(即,那些RBD变体在测试条件下完全逃逸了抗体结合),从而增强了这两个残基对抗体结合的贡献的重要性。类似地,对于COV2-2130,位点K444突变为其他19种氨基酸中的任何一种都废弃了抗体结合,表明该位置的赖氨酸对Ab-Ag相互作用至关重要。

[0363] 然而,并非所有抗体接触残基都被鉴定为突变大大减少结合的位点。可能有几种解释:1)一些结合位点残基可能对结合并非至关重要;2)一些残基可使用其骨架原子与远离结合界面的侧链相互作用,或3)一些位点的突变可能不耐受[42]。例如,残基L455、F456和Q493是COV2-2196的结构限定的结合位点的一部分(图8D),但是这些位点的突变并未可检测地影响抗体的结合(图11A和图11C),表明这些残基不产生关键的结合贡献。将COV2-2196/RBD结构叠加到S2E12/RBD结构上清楚地展示了RBD脊与RBD其余部分之间的柔性铰链区,当抗体结合时该柔性铰链区得以维持(图13D)。这一发现表明,这三个位置的突变对于Ab-Ag结合而言可以很好地耐受,并且支持这些特定残基对于COV2-2196或S2E12结合的非必需性质。

[0364] 重要的是,COV2-2196和COV2-2130不竞争与RBD的结合[1],表明它们可包含供预防或治疗用途的抗逃逸混合剂。实际上,这两种抗体的结构结合位点和逃逸变体图谱是不重叠的。为了测试是否存在可以逃逸两种抗体的结合的单突变,发明人用COV2-2196和COV2-2130抗体的1:1混合物进行逃逸变体作图实验,但是他们没有检测到逃逸分数大于0.2的任何突变,而对于每种单一抗体影响最大的突变大约为1(图18D)。

[0365] 尽管这些实验对逃逸抗体与RBD结合的所有突变作图,但本发明人也试图确定在病毒生长期间有可能出现的突变。为了解决这个问题,他们首先尝试使用表达SARS-CoV-2S糖蛋白(VSV-SARS-CoV-2)的重组VSV来选择逃逸突变[43];(图11E)。发明人预期,在病毒生长期间将会被选择的唯一氨基酸突变是那些:1)由单核苷酸RNA变化引起的突变;2)对ACE2结合和表达产生最小有害影响的突变;以及3)实质性影响抗体结合的突变[41,42]。实际上,发明人未检测到任何单核苷酸可及且相对于对ACE2结合的影响而言相对耐受较好的COV2-2196诱导的突变(图11B),这可以解释在抗体的存在下重组VSV生长的88个独立重复中的任何一个中都未选择逃逸突变体的原因(图11E、图18G)。对于COV2-2130,位点K444(相对耐受突变的位点[42])的突变,在通过VSV嵌合病毒进行的高通量抗体逃逸选择中展示出最高频率的抗体结合逃逸。在40%的抗体选择实验中,在病毒生长期间出现了两种对抗体结合影响最大的单核苷酸突变:K444R(在20个重复中的6个中选择的)和K444E(在20个重复中的2个中选择的)(图11E、图18G)。

[0366] 为了探索对真实感染病毒的抗性，使SARS-CoV-2毒株USA-WA1/2020在含有基于COV2-2196(AZD8895)、COV2-2130(AZD1061)或它们的1:1组合(AZD7442)的临床抗体的Vero细胞单层培养物中连续传代，其浓度从其各自的IC_{50}值开始并且每次传代逐步增加至其IC_{90}值(图19)。作为对照，使病毒在不存在抗体的情况下传代。最终传代后，通过空斑测定法评价病毒在为IC_{90}浓度10倍的最终浓度下针对相应抗体的敏感性。发明人未检测到任何对AZD8895(基于COV2-2196)或AZD7442混合剂的中和具有抗性的空斑。在AZD1061中连续传代的病毒在为10倍IC_{90}值浓度的AZD1061的存在下形成空斑，达到1.2×10^{7}pfu/mL的滴度，但用AZD7442未形成空斑。随机选择空斑(n＝6)，并对它们的病毒刺突编码基因进行测序，揭示了在所有6个独立选择和测序的空斑中相同的3个氨基酸变化:N74K、R346I和S686G(图11F)。先前已报道S686G变化与从雪貂[45]或NHP[46]的攻击研究中分离出来的Vero细胞中的SARS-CoV-2的连续传代相关[44]，并且预计会降低弗林蛋白酶活性[44]。N74K残基位于AZD1061结合位点外的N端结构域中，并导致聚糖丢失[47]。R346I残基位于AZD1061的结合位点并且可能与AZD1061抗性相关。图11G中示出了R346I变化对AZD1061(COV2-2130)与S蛋白结合的影响。在VSV-SARS-CoV-2系统中选择的K444R和K444E取代以及通过真实SARS-CoV-2传代选择的R346I取代可通过单核苷酸取代获得并保持ACE2结合活性(图11G)，表明我们的DMS分析预测了在COV2-2130抗体的存在下选择的突变。总的来说，这些结果全面地反映了所有氨基酸取代对COV2-2196和COV2-2130结合的影响，并鉴定了可能涉及病毒进化的位点。也就是说，在GISAID数据库中存在的所有测序病毒中，在残基K444和R346处含有突变的变体很少(在12/23/20访问时，全部≤0.01％)。

[0367] 最近，已报道了临床分离株中具有增加的传播性和潜在抗原突变的病毒变体[48-51]。发明人测试了这些快速出现的毒株中的一些变体残基是否会废除这些有效中和抗体的活性。他们测试了来自英国牛津获得的鼻样品中的病毒分离株(称为UKB.1.1.7-OXF的B.1.1.7病毒)，该病毒分离株含有限定刺突基因变化的B.1.1.7谱系，这些刺突基因变化包括NTD中的69-70和144-145缺失，以及N501Y、A570D、D614G和P681H的取代[49]。发明人还在WA-1毒株背景(2019n-CoV/USA_WA1/2019，[WA-1])下测试了等基因的D614G和E484K变体，所有变体均制备为真实SARS-CoV-2病毒并用于病灶减少中和测试中[43]。E484K突变特别受关注，因为该残基位于Fab和RBD的复合物中个mAb的4.5 Å以内，尽管位于Fab足迹的最外围，但仍存在于新兴谱系B.1.351(501Y.V2)[50]和P.1(501Y.V3)[51]中，并且已证明会改变一些单克隆抗体[52,53]以及人多克隆血清抗体[54]的结合。还已证实含有E484K的变体被来自SARS-CoV-2存活者[55,56]的恢复血清和血浆中和的效率较低。对于COV2-2196、COV2-2130和COV2-2050(本发明人进行比较所包括的第三种中和抗体，因为它与残基E484相互作用)，他们发现D614G突变或UK B.1.1.7-OXF毒株中存在的成套突变几乎没有影响;如果有的话，发明人观察到针对后一种循环病毒稍微改善(IC_{50}值减小2-3倍)的趋势(图11H)。然而，他们确实观察到了对D614G/E484K病毒中和的影响。COV2-2050完全丧失中和活性，这与我们先前的研究将E484K定义为废除COV2-2050结合的突变一致[41]。相比之下，COV2-2196、COV2-2130和COV2-2196+COV2-2130仅显示出略低的抑制能力(IC_{50}值增加2至5倍)。

[0368] 讨论。这些结构分析为频繁选择共有靶向SARS-CoV-2S RBD的相同区域的重链V-D-J和轻链V-J重组的人抗体的公共克隆型定义了分子基础。重链和轻链中种系抗体基因编码的残基在抗原识别中起着至关重要的作用，表明该克隆型的抗体成熟需要的体细胞突变

很少。IGHD2基因编码的二硫键为HCDR3提供了额外的限制，以采取与RBD上的抗原位点具有形状和化学互补性的构象。似乎有三个不同的IGHD2基因(IGHD2-2、IGHD2-8和IGHD2-15)编码可以在这种克隆型的背景下发挥功能的HCDR3部分。发明人提出，这种具有预先配置的使得高特异性和强效中和活性成为可能的结构特征的通用种系基因编码的抗体的出现，是未曾预料到的人类对SARS-CoV-2的主要免疫应答的有益特征。从这种公共克隆型中选择B细胞使得快速分离出抵抗逃逸的超强效中和抗体成为可能，并且可能部分地是临床上正在观察到的基于S蛋白的疫苗的显著功效的原因。可以预想到有机会使用针对该抗原位点的基于结构域或基序的疫苗设计，以甚至更高的中和效力来引发血清中和抗体滴度，从而引起人类免疫应答以引发这种克隆型。

[0369] 这里呈现的RBD-COV2-2196和RBD-COV2-2130复合物的结构分析表明，这两种抗体通过每单位界面表面积以高能量密度形成“铆钉样”相互作用与RBD抗原结合，并且这一发现解释了此类强效抗体可以如何在Ab-Ag界面中具有这种相对较小($< 750\ Å^2$)的掩埋表面积。这里研究的两种抗体的逃逸突变的作图表明，逃逸突变的基因座与由我们的Ab-Ag晶体结构确定的结合位点一致，进一步证实了DMS方法的准确性。发明人提出，逃逸分数数据将来可以用作将抗体计算对接到抗原上或更普遍地将蛋白质计算对接到蛋白质上的限制，因为例如，分别对于COV2-2130或COV2-2196而言，具有最高逃逸分数的K444或F486残基在抗原-抗体复合物的结构中显示出与抗体最强烈的相互作用。

[0370] 传播性增加且在许多已知的中和位点中序列改变的变体病毒谱系的最新出现与开发和测试中SARS-CoV-2规避当前抗体对策的能力有关。发明人测试了抗体和两者的混合剂的活性，并且发现针对几种重要变体的持续活性，这些重要变体包括含有E484K突变的病毒和具有多个S基因变异的B.1.1.7病毒。在发明人在这里呈现的晶体结构和DMS研究中揭示了这种广泛活性的遗传和结构基础。COV2-2196中的“芳香族笼”结构域对相对不变的F486残基的集中识别是有益的，因为该残基的变异与病毒适应性降低相关。与识别“打开”和“闭合”S三聚体的mAb COV2-2130组合，靶向该结合位点在协同中和的情况下似乎特别有效。因此，这种组合似乎提供了抵抗逃逸的广泛且强效的抑制机制。

[0371] 扩展数据表1.RBD-COV2-2196和RBD-COV2-2196-2130复合物晶体的数据收集和细化统计

[0372]

数据收集		
晶体	RBD-COV2-2196	RBD-COV2-2196-2130
PDB ID	7L7D	7L7E
波长 (Å)	0.97872	0.97857
空间群	$P2_1$	$P2_1$
晶胞尺寸		
a, b, c (Å)	44.1, 81.6, 101.2	97.2, 152.5, 199.2
α, β, γ	90.0, 96.6, 90.0	90.0, 94.7, 90.0
分辨率 (Å)	43.98 – 2.50	35.21 – 3.00
独特反射	24896 (13417)	115751 (16908)
冗余度	3.7 (3.7)	7.7 (7.7)
完整性 (%)	99.9 (99.6)	99.9 (100)
$R_{合并}$ (%)	4.6 (24.5)	23.1 (81.0)
I/σ(I)	19.2 (4.8)	6.4 (2.3)
细化统计		
$R_{因子}$ (%)	18.5	21.5
$R_{自由}$ (%)	23.1	27.3
R.m.s.d. (键) (Å)	0.0030	0.0023
R.m.s.d. (角) (度)	0.563	0.598
拉氏图		
有利的 (%)	95.82	95.34
允许的 (%)	4.18	4.37
离群值 (%)	0.00	0.09

[0373] $R_{合并} = \Sigma\Sigma|I_{hkl} - I_{hkl(j)}|/\Sigma I_{hkl}$, 其中$I_{hkl(j)}$是观测强度而$I_{hkl}$是最终平均强度。

[0374] $R_{工作} = \Sigma||Fobs|-|Fcalc||/\Sigma|Fobs|$和$R_{自由} = \Sigma||Fobs|-|Fcalc||/\Sigma|Fobs|$,其中$R_{自由}$和$R_{工作}$是分别使用5%数据的随机选择测试集合和排除该5%测试集合的所有反射计算的。括号中的数字是对于最高分辨率的壳而言的。

[0375] **********

[0376] 实例1和实例2的参考文献

[0377] 1.ter Meulen,J.,et al.Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets.Lancet 363,2139-2141(2004).

[0378] 2.Zhou,P.,et al.A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.Nature 579,270-273(2020).

[0379] 3.Robbiani,D.F.,et al.Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 infection in convalescent individuals.bioRxiv,2020.2005.2013.092619(2020).

[0380] 4.Brouwer,P.J.M.,et al.Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability.bioRxiv, 2020.2005.2012.088716(2020).

[0381] 5.Niu,P.,et al.Ultrapotent human neutralizing antibody repertoires against Middle East Respiratory Syndrome coronavirus from a recoveredpatient.JInfectDis 218,1249-1260(2018).

[0382] 6.Wang,L.,et al.Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape.J Virol 92, e02002-17(2018).

[0383] 实例3和实例4的参考文献

[0384] 1Zost,S.J.et al.Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2.Nature 584,443-449,doi:10.1038/s41586-020-2548-6(2020).

[0385] 2Yuan,M.et al.Structural basis ofa shared antibody response to SARS-CoV-2.Science 369,1119-1123,doi:10.1126/science.abd2321(2020).

[0386] 3Nielsen,S.C.A.et al.Human B Cell Clonal Expansion and Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2.Cell Host Microbe 28,516-525e515,doi:10.1016/j.chom.2020.09.002(2020).

[0387] 4Robbiani,D.F.et al.Convergent antibody responses to SARS-CoV-2in convalescent individuals.Nature 584,437-442,doi:10.1038/s41586-020-2456-9(2020).

[0388] 5Brouwer,P.J.M.et al.Potent neutralizing antibodies from COVID-19patients define multiple targets of vulnerability.Science 369,643-650,doi:10.1126/science.abc5902(2020).

[0389] 6Zhou,P.et al.A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.Nature 579,270-273,doi:10.1038/s41586-020-2012-7(2020).

[0390] 7Zhu,N.et al.A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China,2019.N Engl J Med 382,727-733,doi:10.1056/NEJMoa2001017(2020).

[0391] 8Hoffmann,M.et al.SARS-CoV-2Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.Cell 181,271-280e278,doi:10.1016/j.cell.2020.02.052(2020).

[0392] 9Letko,M.,Marzi,A.&Munster,V.Functional assessment ofcell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage Bbetacoronaviruses.Nat Microbiol 5,562-569,doi:10.1038/s41564-020-0688-y(2020).

[0393] 10 Wahba,L.et al.An Extensive Meta-Metagenomic Search Identifies SARS-CoV-2-Homologous Sequences in Pangolin Lung Viromes.mSphere 5,doi:10.1128/mSphere.00160-20(2020).

[0394] 11 Walls,A.C.et al.Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion.Proc NatlAcad Sci USA 114,11157-11162,doi:10.1073/pnas.1708727114(2017).

[0395] 12 Algaissi,A.et al.SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients.Sci Rep 10,16561,doi:10.1038/s41598-020-73491-5(2020).

[0396] 13 Long,Q.X.et al.Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19.Nat Med 26,845-848,doi:10.1038/s41591-020-0897-1(2020).

[0397] 14 Piccoli,L.et al.Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology.Cell,doi:10.1016/j.cell.2020.09.037(2020).

[0398] 15 Cao,Y.et al.Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2

Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients'B Cells.Cell 182,73-84 e16,doi:10.1016/j.cell.2020.05.025(2020).

[0399] 16 Hansen,J.et al.Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail.Science 369,1010-1014,doi:10.1126/science.abd0827(2020).

[0400] 17 Ju,B.et al.Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection.Nature 584,115-119,doi:10.1038/s41586-020-2380-z(2020).

[0401] 18 Liu,L.et al.Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike.Nature 584,450-456,doi:10.1038/s41586-020-2571-7(2020).

[0402] 19 Rogers,T.F.et al.Isolation of potent SARS-CoV-2neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model.Science 369,956-963,doi:10.1126/science.abc7520(2020).

[0403] 20 Shi,R.et al.A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2.Nature 584,120-124,doi:10.1038/s41586-020-2381-y(2020).

[0404] 21 Weitkamp,J.H.et al.Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires.J Immunol 171,4680-4688,doi:10.4049/jimmunol.171.9.4680(2003).

[0405] 22 Benton,D.J.et al.Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion.Nature,doi:10.1038/s41586-020-2772-0(2020).

[0406] 23 Wrapp,D.et al.Cryo-EM structure ofthe 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.Science 367,1260-1263,doi:10.1126/science.abb2507(2020).

[0407] 24 Wrobel,A.G.et al.SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects.Nat Struct Mol Biol 27,763-767,doi:10.1038/s41594-020-0468-7(2020).

[0408] 25 Zost,S.J.et al.Rapid isolation and profiling ofa diverse panel ofhuman monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein.NatMed 26,1422-1427,doi:10.1038/s41591-020-0998-x(2020).

[0409] 26 Tian,C.et al.Immunodominance ofthe VH1-46 antibody gene segment in the primary repertoire of human rotavirus-specific B cells is reduced in the memory compartment through somatic mutation of nondominant clones.J Immunol 180,3279-3288,doi:10.4049/jimmunol.180.5.3279(2008).

[0410] 27 Wu,X.et al.Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing.Science 333,1593-1602,doi:10.1126/science.1207532(2011).

[0411] 28 Zhou,T.et al.Structural Repertoire of HIV-1-Neutralizing Antibodies Targeting the CD4 Supersite in 14 Donors.Cell 161,1280-1292,doi:

10.1016/j.cell.2015.05.007(2015).

[0412] 29 Huang,C.C.et al.Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1coreceptor-binding site on gp120.Proc Natl Acad Sci U S A 101,2706-2711,doi:10.1073/pnas.0308527100 (2004).

[0413] 30 Williams,W.B.et al.HIV-1 VACCINES.Diversion ofHIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies.Science 349, aab1253,doi:10.1126/science.aab1253(2015).

[0414] 31 Joyce,M.G.et al.Vaccine-Induced Antibodies that Neutralize Group 1 and Group 2 Influenza A Viruses.Cell 166,609-623,doi:10.1016/ j.cell.2016.06.043(2016).

[0415] 32 Pappas,L.et al.Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations.Nature 516,418-422,doi:10.1038/ nature13764(2014).

[0416] 33 Sui,J.et al.Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses.Nat Struct Mol Biol 16, 265-273,doi:10.1038/nsmb.1566(2009).

[0417] 34 Wheatley,A.K.et al.H5N1 Vaccine-Elicited Memory B Cells Are Genetically Constrained by the IGHV Locus in the Recognition of a Neutralizing Epitope in the Hemagglutinin Stem.JImmunol 195,602-610,doi: 10.4049/jimmunol.1402835(2015).

[0418] 35 Bailey,J.R.et al.Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance.JCI Insight 2,doi:10.1172/ jci.insight.92872(2017).

[0419] 36 Giang,E.et al.Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex ofhepatitis C virus.Proc NatlAcad Sci U SA 109, 6205-6210,doi:10.1073/pnas.1114927109(2012).

[0420] 37 Rappuoli,R.,Bottomley,M.J.,D'Oro,U.,Finco,O.&De Gregorio,E.Reverse vaccinology 2.0:Human immunology instructs vaccine antigen design.J Exp Med 213,469-481,doi:10.1084/jem.20151960(2016).

[0421] 38 Tortorici,M.A.et al.Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms.Science,doi:10.1126/ science.abe3354(2020).

[0422] 39 Kreer,C.et al.Longitudinal Isolation ofPotent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients.Cell 182,843-854 e812, doi:10.1016/j.cell.2020.06.044(2020).

[0423] 40 Soto,C.et al.High frequency ofshared clonotypes in human B cell receptor repertoires.Nature 566,398-402,doi:10.1038/s41586-019-0934-8(2019).

[0424] 41 Greaney,A.J.et al.Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2

spike receptor-binding domain that escape antibody recognition.CellHostMicrobe,doi:10.1016/j.chom.2020.11.007(2020).

[0425] 42 Starr,T.N.et al.Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding.Cell 182,1295-1310 e1220,doi:10.1016/j.cell.2020.08.012(2020).

[0426] 43 Case,J.B.et al.Neutralizing antibody and soluble ACE2 inhibition of a replication-competent VSV-SARS-CoV-2 and a clinical isolate of SARS-CoV-2.Cell Host Microbe 28,475-485 e475,doi:10.1016/j.chom.2020.06.021(2020).

[0427] 44 Klimstra,W.B.et al.SARS-CoV-2 growth,furin-cleavage-site adaptation and neutralization using serum from acutely infected hospitalized COVID-19 patients.J Gen Virol 101,1156-1169,doi:10.1099/jgv.0.001481(2020).

[0428] 45 Sawatzki,K.et al.Ferrets not infected by SARS-CoV-2 in a high-exposure domestic setting.bioRxiv,2020.2008.2021.254995,doi:10.1101/2020.08.21.254995(2020).

[0429] 46 Baum,A.et al.REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters.Science 370,1110-1115,doi:10.1126/science.abe2402(2020).

[0430] 47 Li,Q.et al.The impact ofmutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity.Cell 182,1284-1294 e1289,doi:10.1016/j.cell.2020.07.012(2020).

[0431] 48 Galloway,S.E.et al.Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7Lineage-United States,December 29,2020-January 12,2021.MMWR Morb Mortal Wkly Rep 70,95-99,doi:10.15585/mmwr.mm7003e2(2021).

[0432] 49 Leung,K.,Shum,M.H.,Leung,G.M.,Lam,T.T.&Wu,J.T.Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom,October to November 2020.Euro Surveill 26,doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106(2021).

[0433] 50 Tegally,H.et al.Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2(SARS-CoV-2)lineage with multiple spike mutations in South Africa.medRxiv,2020.2012.2021.20248640,doi:10.1101/2020.12.21.20248640(2020).

[0434] 51 Voloch,C.M.et al.Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro,Brazil.medRxiv,2020.2012.2023.20248598,doi:10.1101/2020.12.23.20248598(2020).

[0435] 52 Liu,Z.et al.Landscape analysis of escape variants identifies SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization.bioRxiv,2020.2011.2006.372037,doi:10.1101/2020.11.06.372037(2021).

[0436] 53 Weisblum,Y.et al.Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2

spike protein variants.Elife 9,doi:10.7554/eLife.61312(2020).

[0437] 54 Greaney,A.J.et al.Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies.bioRxiv,2020.2012.2031.425021,doi:10.1101/2020.12.31.425021(2021).

[0438] 55 Wibmer,C.K.et al.SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma.bioRxiv,2021.2001.2018.427166,doi:10.1101/2021.01.18.427166(2021).

[0439] 56 Andreano,E.et al.SARS-CoV-2 escape in vitro from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma.bioRxiv,2020.2012.2028.424451,doi:10.1101/2020.12.28.424451(2020).

[0440] 57 Huo,J.et al.Neutralization of SARS-CoV-2 by destruction of the prefusion spike.Cell Host Microbe 28,445-454 e446,doi:10.1016/j.chom.2020.06.010(2020).

[0441] 58 Kabsch,W.Xds.Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66,125-132,doi:10.1107/S0907444909047337(2010).

[0442] 59 Winn,M.D.et al.Overview of the CCP4 suite and current developments.Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 67,235-242,doi:10.1107/S0907444910045749(2011).

[0443] 60 McCoy,A.J.et al.Phaser crystallographic software.J Appl Crystallogr 40,658-674,doi:10.1107/S0021889807021206(2007).

[0444] 61 Adams,P.D.et al.PHENIX:a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66,213-221,doi:10.1107/S0907444909052925(2010).

[0445] 62 Emsley,P.&Cowtan,K.Coot:model-building tools for molecular graphics.Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60,2126-2132,doi:10.1107/S0907444904019158(2004).

[0446] 63 Schrodinger,LLC.The PyMOL Molecular Graphics System,Version 1.8(2015).

[0447] 64 Cornwell,O.,Radford,S.E.,Ashcroft,A.E.&Ault,J.R.Comparing hydrogen deuterium exchange and fast photochemical oxidation of proteins:a structural characterisation of wild-type and deltaN6 beta2-microglobulin.J Am Soc Mass Spectrom 29,2413-2426,doi:10.1007/s13361-018-2067-y(2018).

[0448] 65 Starr,T.N.et al.Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19.bioRxiv,doi:10.1101/2020.11.30.405472(2020).

[0449] 66 Otwinowski,J.,McCandlish,D.M.&Plotkin,J.B.Inferring the shape ofglobal epistasis.Proc NatlAcadSci USA 115,E7550-E7558,doi:10.1073/pnas.1804015115(2018).

[0450] 67 Plante,J.A.et al.Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness.Nature,doi:10.1038/s41586-020-2895-3(2020).

[0451] 68 Xie,X.et al.An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2.Cell HostMicrobe 27,841-848 e843,doi:10.1016/j.chom.2020.04.004(2020).

[0452]

表 A-活性数据

克隆 ID (COV2-xxxx)	结合测定结果					中和测定结果				
	ELISA-纯化的 IgG（OD 450 nm）					是/否定性测试，或 IC50 值（ng/mL）				
	SARS-CoV-2 刺突三聚体	SARS-CoV-2 RBD	SARS-CoV-2 NTD	SARS-CoV 刺突三聚体	hACE2 阻断	SARS-CoV-2 xCelligence 中和测试（细胞阻抗）		SARS-CoV-2 病灶减少测试	纳米荧光素酶病毒减少测试	
						定性的	估计 IC50		SARS-CoV-2	SARS
2196	4.2	4.2	0.05	0.09	是	是	nt	29	< 100	nt
2838	3.67	3.62	0.12	0.21	nt	是	< 60	14	nt	nt
2952	3.54	3.55	0.1	0.15	nt	是	> 304	89	NT	nt
2514	3.56	3.56	0.09	3.6	nt	是	< 200	84	nt	nt
2165	4.2	4.2	0.05	0.17	nt	是	nt	185	< 400	nt
2391	3.57	3.65	0.1	0.1	nt	是	< 600	45	nt	nt
3025	3.70	3.70	NT	0.21	是	是	nt	31	nt	nt
2094	4.3	4.3	0.1	4.1	是	是	nt	151	< 50	> 1,000
2096	4.3	4.3	0.12	0.11	是	是	nt	290	< 200	nt
2130	4.3	4.2	0.18	0.1	是	是	nt	121	< 100	nt

[0453] 实例5:阻断SARS-CoV-2受体结合并保护动物的强效中和人抗体

[0454] 作者:Seth J.Zost[1*],Pavlo Gilchuk[1*],James Brett Case[3],Elad Binshtein[1],

Rita E.Chen[2,3],Joseph X.Reidy[1],Andrew Trivette[1],Rachel S.Nargi[1],Rachel E.Sutton[1],Naveenchandra Suryadevara[1],Lauren E.Williamson[4],Elaine C.Chen[4],Taylor Jones[1],Samuel Day[1],Luke Myers[1],Ahmed O.Hassan[3],Natasha M.Kafai[2,3],Emma S.Winkler[2,3],Julie M.Fox[3],James J.Steinhardt[6],Kuishu Ren[7],Yueh-Ming Loo[7],Nicole L.Kallewaard[7],David R.Martinez[5],Alexandra Schäfer[5],Lisa E.Gralinski[5],Ralph S.Baric[5],LarissaB.Thackray[3],Michael S.Diamond[2,3,8,9],Robert H.Carnahan[1,10**],James E.Crowe,Jr.[1,4,10**]

[0455] 附属机构：

[0456] [1]美国田纳西州纳什维尔,范德堡大学医学中心,范德堡疫苗中心,37232

[0457] [2]美国密苏里州圣路易斯,华盛顿大学医学院,病理与免疫学系,63110

[0458] [3]美国密苏里州圣路易斯,华盛顿大学医学院,医学系,63110[4]美国田纳西州纳什维尔,范德堡大学医学中心,病理、微生物学和免疫学系,37232

[0459] [5]美国北卡罗来纳州教堂山,北卡罗来纳大学教堂山分校,流行病学系,27599

[0460] [6]美国马里兰州盖瑟斯堡,阿斯利康公司,生物制药研发部,抗体发现与蛋白质工程,20878

[0461] [7]美国马里兰州盖瑟斯堡,阿斯利康公司,生物制药研发部,微生物科学,20878

[0462] [8]美国密苏里州圣路易斯,华盛顿大学医学院,分子生物学系,63110

[0463] [9]美国密苏里州圣路易斯,华盛顿大学医学院,AndrewM.和Jane M.Bursky人类免疫学和免疫疗法计划中心,63110

[0464] [10]美国田纳西州纳什维尔,范德堡大学医学中心,儿科,37232

[0465] 联系信息：

[0466] James E.Crowe,Jr.,M.D.[主要联系人]

[0467] 儿科、病理学、微生物学和免疫学系以及范德堡疫苗中心

[0468] 邮寄地址：

[0469] 范德堡疫苗中心

[0470] 11475医学研究楼IV

[0471] 加兰大道2213号

[0472] 美国田纳西州纳什维尔37232-0417

[0473] 电话(615)343-8064

[0474] 电子邮件james.crowe@vumc.org

[0475] 附加标题页脚注

[0476] *这些作者同等贡献

[0477] **通讯作者

[0478] 关键字：新冠病毒;SARS-CoV-2;SARS-CoV;COVID-19;单克隆抗体;人;获得性免疫。

[0479] COVID-19大流行是对全球健康的主要威胁,对此,仅有有限的医学对策,并且我们对体液免疫的机制缺乏透彻的了解[1,2]。从靶向分离自感染受试者的B细胞的刺突

[0480] (S)糖蛋白的一组单克隆抗体(mAb)中,我们鉴定了几种在假病毒或野生型(wt)SARS-CoV-2中和测试中分别表现出强效中和活性且IC50值低至0.9ng/mL或15ng/mL的mAb。

最强效的mAb完全阻断S的受体结合结构域(SRBD)与人ACE2的相互作用。竞争结合、结构和功能研究允许将mAb聚集成识别SRBD上的主要抗原位点内的不同表位的限定类别。电子显微镜研究揭示,这些mAb识别三聚体S蛋白的不同构象状态。识别独特位点的强效中和mAb即COV2-2196和COV2-2130同时与S结合,并协同中和真实SARS-CoV-2病毒。在SARS-CoV-2感染的两个鼠模型中,单独的COV2-2916或COV2-2130或两种mAb的组合的被动转移保护小鼠免于体重严重下降并且减少了病毒负荷和肺部炎症。这些结果鉴定了SRBD上的保护性表位并且为合理的疫苗设计和稳健的免疫治疗混合剂的选择提供了基于结构的框架。

[0481] SARS-CoV-2的S蛋白是病毒附连、融合和进入宿主细胞的分子决定因素[3]。SARS-CoV-2的融合前稳定的三聚体S蛋白胞外域(S2Pecto)的冷冻电镜结构揭示了与SARS-CoV S蛋白相似的特征[4]。这种I型整合膜蛋白和I类融合蛋白具有介导与受体结合的N端亚基(S1)和介导病毒-细胞膜融合的C端亚基(S2)。S1亚基含有N端结构域(SNTD)和受体结合结构域(SRBD)。在其基因组中共有大约78%的序列同一性[1]的SARS-CoV-2和SARS-CoV两者均使用人类血管紧张素转化酶2(hACE2)作为进入受体[5-7]。先前对人类对其他高致病性人畜共患β冠状病毒(包括SARS-CoV[8-12]和中东呼吸综合征(MERS)[13-22])的免疫的研究显示,病毒表面刺突(S)糖蛋白的Ab介导保护性免疫。最强效的S蛋白特异性mAb似乎通过与SRBD上直接介导受体接合的区域结合而阻断病毒附着于宿主细胞来中和β冠状病毒。当人Ab用于SARS-CoV-2感染的预防、暴露后预防或治疗时,很可能有望在SARS-CoV-2感染期间用于改善疾病[23]。目前正在进行许多研究,包括评价恢复期血浆的随机对照试验和评价超免疫性免疫球蛋白的试验,但尚不清楚此类治疗是否可以降低发病率或死亡率[24]。

[0482] 我们从两个先前感染SARS-CoV-2的个体的B细胞中分离出一大组SARS-CoV-2S蛋白反应性mAb[25]。在用真实SARS-CoV-2进行的快速筛选测定中,那些与S的受体结合结构域(SRBD)结合的抗体的子集表现出中和活性[25]。在这里,我们定义了SARS-CoV-2的抗原态势并确定了是保护性mAb的靶标的SRBD位点。我们在用SARS-CoV-2毒株WA1/2020进行的定量病灶减少中和测试(FRNT)中对我们先前通过快速中和筛选测定预先选择的40种抗S人mAb进行了测试。这些测定法揭示该组表现出从15到超过4,000ng/mL的半数最大抑制浓度(IC50)值范围(在图20a中可视化为热图,值示于表B中,而完整曲线示于图24)。我们假设这些SRBD反应性mAb中的许多通过阻断SRBD与hACE2的结合来中和病毒感染。实际上,我们所测试的大多数中和mAb直接抑制hACE2与三聚体S蛋白的相互作用(图20a、图25)。与这些结果一致,这些mAb也与三聚体S胞外域(S2Pecto)蛋白质或单体SRBD牢固地结合(图20a、图26)。我们评价了是S2Pecto或SRBD结合还是hACE2阻断效力独立地预测结合中和效力,但是这些测量值均与中和效力无关(图20b-d)。然而,中和效力滴度最高(IC50<150ng/mL)的每种mAb也揭示出针对hACE2的最强阻断活性(IC50<150ng/mL)以及对S2Pecto三聚体和SRBD的异常结合活性(EC50<2ng/mL)(图20e)。(图20f)中示出了两种强效中和mAb(称为COV2-2196和COV2-2130)的代表性中和曲线。强效中和使用假病毒中和测定法得以证实,该测定法揭示处远比野生型病毒更敏感的中和表型并且证明需要使用活病毒测定法才能评估mAb效力(图20g)。这些mAb中的两者均与S2Pecto三聚体牢固地结合并完全阻断hACE2结合(图20h-i)。

[0483] 接下来,我们通过竞争结合分析定义了SRBD上用于中和mAb的主要抗原位点。我们首先使用以最小SRBD结构域进行的基于生物膜干涉技术的竞争测定法来筛选与强效中和mAb COV2-2196或识别保守性隐蔽表位的先前描述的SARS-CoV mAb CR3022的重组型式竞

争结合的mAb[10,26]。我们鉴定了三大类竞争性mAb(图21a)。最大一类mAb阻断COV2-2196,但不阻断rCR3022,而一些mAb被rCR3022阻断,但不被COV2-2196阻断。两种mAb(包括COV2-2130)均未被任何参考mAb阻断。大多数mAb与hACE2竞争结合,表明它们结合在SRBD的hACE2结合位点附近。我们在用三聚体S2Pecto蛋白进行的基于ELISA的竞争结合测定中使用COV2-2196、COV2-2130和rCR3022并且还发现SRBD含有三个主要抗原位点,一些mAb可能在一个以上的位点产生接触(图21b)。大多数强效中和mAb直接与COV2-2196竞争结合。

[0484] 由于COV2-2196和COV2-2130不竞争与SRBD的结合,因此我们评估了这些mAb是否协同进行病毒中和,这是先前对SARS-CoV mAb观察到的现象[10]。我们在FRNT中使用SARS-CoV-2测试组合应答(参见剂量-应答中和矩阵,图21c),并将这些实验值与通过协同评分模型计算的期望应答进行比较[27]。比较揭示,COV2-2196+COV2-2130的组合具有协同作用(协同作用得分为17.4,其中任何>10的得分均指示协同作用)。图21c中的数据示出了剂量-应答协同作用矩阵,并且证明混合剂中79ng/mL的组合mAb剂量(16ng/mL的COV2-2196和63ng/mL的COV2-2130)具有与250ng/mL的每种单独mAb相同的活性(参见图21c)。这一发现表明,对于在体外达到相同的病毒中和效力,使用混合剂各mAb的剂量可以减少超过三分之二。

[0485] 接下来,我们定义了两个协同进行中和的主要竞争结合类别中的代表性mAb所识别的表位。我们使用丙氨酸或精氨酸取代进行SRBD的诱变研究,以确定用于中和mAb的结合的关键残基(图27)。失去结合的研究揭示F486A或N487A是COV2-2196的关键残基,而N487A是COV2-2165的关键残基,这些残基相互竞争结合,并且同样使用K444A和G447R突变体对COV2-2130进行的诱变研究将这些残基定义为对识别至关重要(图22a)。先前的结构研究已定义了SRBD与hACE2之间的相互作用(图22b)[28]。SRBD中的大多数相互作用残基包含在限定hACE2识别基序的60个氨基酸的线性肽内(图22c)。接下来,我们测试了人mAb与这种最小肽的结合并且发现最大竞争结合类别的强效中和成员(包括COV2-2196、COV2-2165和COV2-2832)识别这种肽(图22c),表明这些mAb在hACE2识别基序内产生关键接触。

[0486] 我们使用S2Pecto三聚体/Fab复合物的负染色电子显微镜术以在结构上确定这些mAb的表位。强效中和抗体COV2-2196和COV2-2165与SRBD的hACE2识别基序结合并识别S2Pecto三聚体的“打开”构象状态(图22d)。然而,这两种抗体的接合模式不同,因为一种抗体的结合姿势和相对于刺突“主体”的角度与另一种抗体相比不同。代表第二竞争结合类别的COV2-2130与处于“闭合”位置的S2Pecto中的RBD结合(图22d)。由于COV2-2196和COV2-2130不竞争结合,所以我们试图制备同时与S2Pecto三聚体结合的两个Fab的复合物。我们发现,当S2Pecto三聚体处于打开位置时,两个Fab同时结合,表明COV2-2130可以识别呈两种构象的SRBD(图22e)。将两个Fab的复合物与RBD:CR3022复合物的结构重叠[26],正如基于我们的竞争结合研究所预测的那样,我们观察到这些抗体与SRBD上的三个不同位点结合(图22f)。

[0487] 接下来,我们在BALB/c小鼠中在新开发的SARS-CoV-2感染模型中测试了COV2-2196或COV2-2130单一疗法或COV2-2196+COV2-2130的组合的预防功效,其中在鼻内腺病毒(AdV-hACE2)转导后hACE2在肺部表达。在这种相对严格的疾病模型中,我们还施用了单剂量的抗Ifnar1抗体以增强病毒感染和发病机制,从而导致弥漫性间质性肺炎(A.Hassan和M.Diamond,已提交出版)。我们将单剂量的mAb COV2-2196(10mg/kg)、COV2-2130(10mg/kg)、COV2-2196+COV2-2130的组合(各5mg/kg)或同种型对照mAb(10mg/kg)被动转移至经

AdV-hACE2转导的小鼠，一天后用4×10^5PFU的SARS-CoV-2进行鼻内攻击。在感染的第一周，用COV2-2196或COV2-2130或其组合预防防止严重的SARS-CoV-2诱导的体重严重下降(图23a)。在7dpi时，在肺部和包括心脏和脾脏在内的远端部位中病毒RNA水平显著降低(图23b)。在7dpi-疾病高峰期时，作为炎症指标的干扰素γ(INF-g)、IL-6、CXCL10和CCL2细胞因子和趋化因子基因的表达在经治疗的小鼠的肺部也降低(图23c)。

[0488] 我们还使用小鼠适应性(MA)SARS-CoV-2病毒在免疫活性模型中测试了COV2-2196或COV2-2130或其组合的预防功效[29](图23d)。体外测试显示，这些mAb对于野生型和MA SARS-CoV-2病毒的中和IC50值是同等的(数据未示出)。与同种型对照组相比，以200μg/只小鼠(约8mg/kg)的剂量递送的每种mAb治疗在2dpi时使肺部的病毒RNA水平降低高达10^5倍(图23e，左)。相应地，如通过肺组织空斑滴度测量的，来自COV2-2196和COV2-2196+COV2-2130治疗组的所有动物以及来自COV2-2130治疗的10只动物中的8只在2dpi时肺部不再具有感染性病毒(图23e，右)。总的来说，小鼠中的这些结果表明，单独或组合的COV2-2196或COV2-2130是治疗或预防COVID-19的有希望的候选物。

[0489] 在这里，我们定义了一大组针对SARS-CoV-2的高度强效mAb的抗原态势。从数百种的较大组中鉴定出这一组mAb的这些详细研究和筛选研究证明[25]，尽管SARS-CoV-2的自然感染引发各种人中和抗体，但那些mAb中只有一小部分具有高效力(针对SARS-CoV-2活病毒IC50<50ng/mL)，因此适合治疗剂开发。这些强效mAb的生物化学和结构分析限定了SRBD上的三个主要抗原位点，这些抗原位点易受因SARS-CoV的自然感染引发的人mAb的中和作用损伤。已经证实来自两个最强效抗原位点的代表性mAb在体外协同作用，并且如同体内混合剂那样具有保护作用。这一发现揭示了对SARS-CoV-2的有效体液免疫的关键特征，并且表明协同中和活性在多克隆应答中的作用应进一步探讨。而且，随着SARS-CoV-2继续循环，由自然感染引起的群体免疫可以开始选择从中和抗体的选择压力中逃逸的抗原变体，从而增强在疫苗或免疫治疗剂中靶向S蛋白多个表位的需要。

[0490] 迄今为止，已报道的全球常见S基因变体位于位置D614G、V483A、L5F、Q675H、H655Y和S939F[30]，远离在我们针对这里研究的主要mAb的突变研究中鉴定的残基486或487处的氨基酸变体。合理选择的治疗性混合剂(如这里所描述的治疗性混合剂)可能会对SARS-CoV-2逃逸提供更强的抗性。这些研究为临床前评价和开发已鉴定的mAb打好基础，这些mAb作为在人类中用作COVID-19免疫治疗剂的候选物。

[0491] 数据可用性。EM图已经存放在电子显微镜数据库中，登录代码为EMBD 21965(S2Pecto apo)、EMD-21974(S2Pecto+Fab COVs-2165)、EMD-21975(S2Pecto+Fab COVs-2196)、EMD-21976(S2Pecto+Fab COVs-2130)和EMD-21977(S2Pecto+Fab COV2-2196+Fab COV2-2130)。将会使该研究中报告的材料可用，但可能需要签署Materials Transfer Agreement[材料转移协议]。

[0492] 致谢。我们感谢Angela Jones和范德堡VANTAGE核心实验室的工作人员加急测序，Ross Trosseth帮助进行数据管理和分析，VUMC的Robin Bombardi和Cinque Soto关于基因组学方法的技术咨询，WUSTL的ArthurKim、Adam Bailey、Laura VanBlargan、James Earnest、Broc McCune和Swathi Shrihari的实验帮助和关键试剂，以及阿斯利康的Kevin M.Tuffy、Seme Diallo、Patrick M.McTamney和Lori Clarke生成蛋白质和假病毒试剂及有关数据。该研究得到国防高级研究计划局(DARPA)资助HR0011-18-2-0001和HR0011-18-3-

0001、NIH合同75N93019C00074和75N93019C00062以及范德堡桃莉·帕顿COVID-19研究基金的支持。这项工作得到NIH对于下一代核酸测序仪的资助1S10RR028106-01A1支持，下一代核酸测序仪由范德堡先进基因组学技术(VANTAGE)和范德堡临床和转化研究所收藏，并且受到(来自NCATS/NIH的UL1TR002243)资助支持。S.J.Z.得到NIH T32 AI095202支持。J.B.C.得到海伦·海·惠特尼基金会的博士后奖学金支持。D.R.M.得到NIH T32 AI007151和伯勒斯惠康基金博士后进修计划奖支持。J.E.C.是德国达姆施塔特(Darmstadt)默克集团(Merck KGaA)的2019未来洞察奖的获得者，默克集团为该研究提供研究资助支持。内容仅是作者的责任，并不一定代表美国政府或其他赞助者的官方观点。

[0493] 作者的贡献。项目构思:S.J.Z.、P.G.、R.H.C.、L.B.T.、M.S.D.、J.E.C.;筹集资金:J.E.C.和M.S.D.进行实验室实验:S.J.Z.、P.G.、J.B.C.、E.B.、R.E.C.、J.X.R.、A.T.、R.S.N.、R.E.S.、N.S.、L.E.W.、A.O.H.、N.M.K.、E.W.、J.M.F.、L.B.T.、J.J.S.、K.R.、Y.-M.L.、A.S.、L.E.G.、D.R.M.;进行计算工作:E.C.C.、T.J.、S.D.、L.M.;监督研究:N.L.K、M.S.D.、L.B.T.、R.S.B.、R.H.C.、J.E.C.撰写论文初稿:S.J.Z.、P.G.、R.H.C.、J.E.C.;所有作者均审查并批准了最终手稿。

[0494] 利益冲突。R.S.B.曾担任武田(Takeda)和赛诺菲巴斯德(Sanofi Pasteur)疫苗相关问题的顾问。M.S.D.是因比奥斯(Inbios)、威尔生物技术公司(Vir Biotechnology)、美商NGM生物制药公司(NGM Biopharmaceuticals)、礼来公司(Eli Lilly)的顾问，并且在莫德纳科学咨询委员会(Scientific Advisory Board ofModerna)任职，过去是莫德纳非相关研究资助的接受者，并且现在是紧急生物解决方案公司(Emergent BioSolutions)非相关研究资助的接受者。J.E.C.曾担任赛诺菲的顾问并且在CompuVax和Meissa疫苗的科学顾问委员会任职，是莫德纳和赛诺菲先前非相关研究资助的接受者并且是ID生物制药公司(IDBiologics,Inc.)的创始人。范德堡大学已经申请了关于与这项工作有关的SARS-CoV-2抗体的专利。阿斯利康已为与这项工作相关的材料/发现申请了专利。J.J.S.、K.R.、Y.-M.L.和N.L.K.是阿斯利康的职工并且目前持有阿斯利康的股票或股票期权。所有其他作者都声明无利益冲突。

[0495] 附加信息

[0496] 本论文有补充信息可用。

[0497] 信函和材料要求应寄给J.E.C.。

[0498] 参考文献

[0499] 1.Zhou,P.,et al.A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus ofprobable bat origin.Nature 579,270-273(2020).

[0500] 2.Zhu,N.,et al.A novel coronavirus from patients with pneumonia in China,2019.NEnglJMed382,727-733(2020).

[0501] 3.Pillay,T.S.Gene of the month:the 2019-nCoV/SARS-CoV-2novel coronavirus spike protein.JClin Pathol(2020).

[0502] 4.Wrapp,D.,et al.Cryo-EM structure ofthe 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.Science 367,1260-1263(2020).

[0503] 5.Wan,Y.,Shang,J.,Graham,R.,Baric,R.S.&Li,F.Receptor recognition by the novel Coronavirus from Wuhan:an Analysis Based on Decade-Long Structural

Studies ofSARS Coronavirus.J Virol 94(2020).

[0504] 6.Hoffmann,M.,et al.SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor.Cell 181,271-280 e278(2020).

[0505] 7.Li,W.,et al.Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus.Nature 426,450-454(2003).

[0506] 8.Sui,J.,et al.Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome(SARS)coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association.Proc NatlAcadSci USA 101,2536-2541(2004).

[0507] 9.ter Meulen,J.,et al.Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets.Lancet 363,2139-2141(2004).

[0508] 10.ter Meulen,J.,et al.Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus:synergy and coverage ofescape mutants.PLoS Med3,e237(2006).

[0509] 11.Zhu,Z.,et al.Potent cross-reactive neutralization of SARS coronavirus isolates by human monoclonal antibodies.Proc NatlAcad Sci USA 104,12123-12128(2007).

[0510] 12.Rockx,B.,et al.Structural basis for potent cross-neutralizing human monoclonal antibody protection against lethal human and zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus challenge.J Virol 82,3220-3235(2008).

[0511] 13.Chen,Z.,et al.Human neutralizing monoclonal antibody inhibition ofMiddle East respiratory syndrome coronavirus replication in the common marmoset.JInfectDis 215,1807-1815(2017).

[0512] 14.Choi,J.H.,et al.Characterization of a human monoclonal antibody generated from a B-cell specific for a prefusion-stabilized spike protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus.PLoS One 15,e0232757(2020).

[0513] 15.Niu,P.,et al.Ultrapotent human neutralizing antibody repertoires against Middle East respiratory syndrome coronavirus from a recoveredpatient.JInfectDis 218,1249-1260(2018).

[0514] 16.Wang,L.,et al.Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape.J Virol 92 (2018).

[0515] 17.Wang,N.,et al.Structural definition of a neutralization-sensitive epitope on the MERS-CoV S1-NTD.CellRep 28,3395-3405 e3396(2019).

[0516] 18.Zhang,S.,et al.Structural definition of a unique neutralization epitope on the receptor-binding domain of MERS-CoV spike glycoprotein.CellRep 24,441-452(2018).

[0517] 19.Corti,D.,et al.Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus.Proc Natl AcadSci USA 112,

10473-10478(2015).

[0518] 20.Jiang,L.,et al.Potent neutralization ofMERS-CoV by human neutralizing monoclonal antibodies to the viral spike glycoprotein.Sci TranslMed 6,234ra259(2014).

[0519] 21.Tang,X.C.,et al.Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution.Proc NatlAcadSci USA 111,E2018-2026(2014).

[0520] 22.Ying,T.,et al.Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies.J Virol 88, 7796-7805(2014).

[0521] 23.Jiang,S.,Hillyer,C.&Du,L.Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses.Trends Immunol 41,355-359(2020).

[0522] 24.Valk,S.J.,et al.Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19:a rapid review.Cochrane Database SystRev 5,CD013600 (2020).

[0523] 25.Zost,S.J.,et al.Rapid isolation and profiling ofa diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein.bioRxiv, 2020.2005.2012.091462(2020).

[0524] 26.Yuan,M.,et al.A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV.Science 368,630-633(2020).

[0525] 27.Ianevski,A.,He,L.,Aittokallio,T.&Tang,J.SynergyFinder:a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data.Bioinformatics 33,2413-2415(2017).

[0526] 28.Lan,J.,et al.Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor.Nature 581,215-220(2020).

[0527] 29.Dinnon,K.H.,et al.A mouse-adapted SARS-CoV-2 model for the evaluation of COVID-19 medical countermeasures.bioRxiv,2020.2005.2006.081497 (2020).

[0528] 30.Laha,S.,et al.Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission.bioRxiv,2020.2005.2003.066266 (2020).

[0529]

表 B. mAb 组与 S2Pecto 或 SRBD 抗原结合的中和 IC50、hACE2 阻断 IC50 和 EC50 值

MAb	中和 IC50，ng/mL	hACE2 阻断 IC50，ng/mL	S2Pecto 结合 EC50，ng/mL	SRBD 结合 EC50，ng/mL	SARS-CoV S2Pecto 结合 EC50，ng/mL
COV2-2094	154	53	1.8	1.4	11.7
COV2-2096	59	67	1.0	1.0	—
COV2-2130	107	61	1.5	0.7	—
COV2-2165	332	62	1.4	0.6	—
COV2-2196	15	48	1.2	1.1	—
COV2-3025	37	41	1.1	1.1	—

[0530]

rCR3022	—	—	10.2	1.1	5.2

[0531]

r2D22	—	—	—	—	—

[0532]

表C.单独的或与人Fab复合的SARS-CoV-2 S2Pecto的电子显微镜数据采集和统计汇总

		与所示Fab复合的SARS-CoV-2 S2Pecto蛋白质的结构				
		无Fab*	Fab COV2-2165	Fab COV2-2196	Fab COV2-2130	Fab COV2-2196 + Fab COV2-2130
	EMDB #:	EMD-21965	EMD-21974	EMD-21975	EMD-21976	EMD-21977
显微镜设置	显微镜	TF-20	TF-20	TF-20	TF-20	TF-20
	电压（kV）	200	200	200	200	200
	检测器	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD	US-4000 CCD
	放大倍数	50,000x	50,000x	50,000x	50,000x	50,000x
	像素大小	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18
	曝光量（e-/Å2）	25	25	25	30	38
	散焦范围（μm）	1.5至1.8	1.5至1.8	1.5至1.8	1.5至1.8	1.5至1.8
数据	显微照片数	122	83	190	550	466
	颗粒数	3,836	3,705	5,471	10,000	9,434
	2D后的颗粒数	2,718	1,868	3,595	2,684	4,231
	最终颗粒数	2,188	1,057	2,737	1,385	3,018
	对称	C1	C1	C1	C1	C1
模型对接	CoV-2-S CC	PDB：6VXX 0.895	PDB：6VYB 0.836	PDB：6VYB 0.828	PDB：6VXX 0.900	PDB：6VYB 0.8952
	Fab (PDB: 12E8) CC	不适用	0.916	0.905	0.91	0.8648 / 0.8929

*先前报道过，Zost等人, 2020（参考文献25）。

[0533] 方法

[0534] 抗体.本论文中研究的人抗体分离自北美两名受试者的血液样品，这两名受试者具有在中国获得的先前实验室确认的有症状的SARS-CoV-2感染。在书面知情同意获得样本的原始临床研究先前有描述[1]并且已经获得范德堡大学医学中心机构审查委员会和多伦多大学研究伦理委员会的批准。使用各种工具分离和克隆单个的抗原特异性B细胞和编码单

克隆抗体的抗体可变基因,分离出抗体[1]。

[0535] 细胞培养。将Vero E6(CRL-1586,美国模式培养物保藏所(美国模式培养物保藏所,ATCC))、Vero CCL81(ATCC)、HEK293(ATCC)和HEK293T(ATCC)于37℃、5%CO_2下保持在杜尔贝科最小必需培养基(DMEM)中,该培养基含有10%(vol/vol)热灭活的胎牛血清(FBS)、10mM HEPES pH 7.3、1mM丙酮酸钠、1×非必需氨基酸和100U/mL青霉素-链霉素。Vero-furin细胞获自T.Pierson(NIH)并且先前已有描述[2]。将Expi293F细胞(赛默飞世尔科技,A1452)于37℃、8%CO_2下保持在Expi293F表达培养基(赛默飞世尔科技,A1435102)中。将ExpiCHO细胞(赛默飞世尔科技,A29127)于37℃、8%CO_2下保持在ExpiCHO表达培养基(赛默飞世尔科技,A2910002)中。每月使用基于PCR的支原体检测试剂盒(ATCC,30-1012K)对Expi293F和ExpiCHO培养物进行支原体测试。

[0536] 病毒。从疾病控制和预防中心获得SARS-CoV-2毒株2019n-CoV/USA_WA1/2020(来自Natalie Thornburg的礼物)。使病毒在Vero CCL81细胞中传代,并在Vero E6细胞上通过空斑测定进行滴定。用感染性SARS-CoV-2进行的所有工作均获得华盛顿大学医学院或北卡罗来纳大学教堂山分校生物安全机构委员会的批准,并且在批准的BSL3设施中使用适当的动力空气净化呼吸器和个人防护设备进行。

[0537] 重组抗原和蛋白。合成编码融合前构象稳定的SARS-CoV-2刺突的胞外域(S2Pecto)的基因并将其克隆到哺乳动物细胞的DNA质粒表达载体中。先前报道了类似设计的具有两个脯氨酸并去除了弗林蛋白酶裂解位点以稳定S的预融合形式的S蛋白抗原[3]。简言之,该基因包括SARS-CoV-2的胞外域(至残基1,208)、T4纤维蛋白(fibritin)三聚化结构域、AviTag位点特异性生物素化序列和C端8x-His标签。为了使构建体稳定呈融合前构象,我们包括了取代K986P和V987P并且使残基682-685处弗林蛋白酶裂解位点从RRAR突变为ASVG。在HisTrap Excel柱(GE医疗(GE Healthcare))上通过金属亲和色谱法分离这种重组刺突2P稳定蛋白(这里称为S2Pecto),并且在Superose 6Increase 10/300柱(GE医疗)上通过尺寸排阻色谱法进一步纯化蛋白制剂。通过负染色电子显微镜术验证了三聚体、融合前构象S蛋白的存在[1]。对于S和Fab的电子显微镜检查,我们使缺乏AviTag但含有C端Twin-Strep-标签的S2Pecto变体表达,与先前描述的相似[3]。在HisTrap Excel柱(GE医疗)上通过金属亲和色谱法分离表达的蛋白,然后在StrepTrap HP柱(GE医疗)上进一步纯化,并且在TSKgel G4000SW XL(东曹(TOSOH))上进行尺寸排阻色谱法。为了表达SARS-CoV-2S蛋白的SRBD亚结构域,将残基319-541克隆到哺乳动物表达载体中IL-2信号肽下游以及凝血酶裂解位点、AviTag和6x-His标签上游。与小鼠IgG1 Fc结构域融合的RBD蛋白(称为RBD-mFc)购自义翘神州科技股份有限公司(Sino Biological)(40592-V05H)。对于通过丙氨酸扫描进行的表位作图,将SARS-CoV-2RBD(残基334-526)或RBD单突变变体与N端CD33前导序列和C端GSSG接头、AviTag、GSSG接头和8xHisTag一起克隆。使刺突蛋白在FreeStyle 293细胞(赛默飞世尔)中表达并且使用HisTrap柱(GE医疗)通过亲和色谱法分离,然后用Superdex200柱(GE医疗)通过尺寸排阻色谱法分离。通过SDS-PAGE分析纯化的蛋白质,以确保纯度和适当的分子量。

[0538] SARS-CoV-2S2Pecto蛋白质或S2Pecto/Fab复合物的电子显微镜(EM)染色网格的制备、成像和处理。为进行EM成像,使用树脂固定的半胱氨酸蛋白酶(FabALACTICA,圣诺维(Genovis))通过消化经重组色谱法纯化的IgG来产生Fab。消化在室温下于100mM磷酸钠、

150mMNaCl(pH 7.2)中进行约16小时。为了去除裂解的Fc和完好的IgG,将消化混合物与CaptureSelectFc树脂(圣诺维)一起在室温下于PBS缓冲液中孵育30分钟。如果需要,通过用Zeba离心柱(飞世尔科技)离心将Fab缓冲液交换成Tris缓冲液。

[0539] 对于与人Fab复合的负染色的(NS)SARS-CoV-2S2Pecto蛋白质的筛选和成像,将蛋白质孵育约1小时并将大约3μL浓度为约10至15μg/mL的样品施加到400方形网孔铜EM网格(电子显微镜科学(Electron Microscopy Sciences))上具有连续碳膜的辉光放电网格上。将网格用0.75%甲酸双氧铀(UF)染色[4]。使用在200keV下工作并用SerialEM控制的FEI TF20(TFS)透射电子显微镜在Gatan US40004k×4k CCD相机上记录图像[5]。所有图像均在低剂量模式下以1.5μm至1.8μm的散焦以50,000x放大倍数和2.18 Å/pix的像素大小获得。显微照片的总剂量为约25至38 $e^{-}/Å^{2}$。使用cryoSPARC软件包进行图像处理[6]。导入图像,并对颗粒进行CTF估计。然后将图像去噪并使用Topaz进行拾取[7]。以256像素的框大小提取颗粒,然后将其分成128像素。进行2D类平均,并为从头开始模型选择良好类别并进行无对称细化。对于SARS-CoV-2S2Pecto蛋白的EM模型对接,在Chimera[8]中使用闭合模型(PDB:6VXX)以与EM图谱对接(详情另见表C)。对于SARS-CoV-2S2Pecto/Fab COV2-2165和SARS-CoV-$2S2P_{ecto}$/Fab COV2-2165复合物而言,在Chimera中使用SARS-CoV-2(PDB:6VYB)和Fab(Fab:12E8)的打开模型以与EM图谱对接(详情另见表C)。对于SARS-Cov-2 S2Pecto/Fab COV2-2130复合物,在Chimera中使用封闭模型和Fab(PDB:12E8)以与EM图谱对接(详情另见表C)。所有图像均用Chimera制作。

[0540] MAb的产生和纯化。已合成(美商扭转生物科技有限公司)并克隆到IgG1单顺反子表达载体(命名为pTwist-mCis_G1)中的mAb序列用于哺乳动物细胞培养mAb分泌。该载体含有增强的2A序列和GSG接头,允许在转染后来自单个构建体的mAb重链和轻链基因同时表达[9]。我们先前描述了在96孔板中1mL ExpiCHO培养物中mAb的微量表达[1]。对于大规模mAb表达,我们使用Gibco™ExpiCHO™表达系统和用于50mL微型生物反应器管(康宁(Corning))的方案,如供应商所述,进行CHO细胞培养物的转染(每种抗体1至300mL)。使用HiTrap MabSelect SuRe(思拓凡(Cytiva),前身为GE医疗生命科学(GEHealthcare Life Sciences))在24柱平行蛋白质色谱系统(蛋白质生物溶液(Protein BioSolutions))上纯化培养上清液。将纯化的mAb缓冲液交换成PBS,使用Amicon®Ultra-450 KDa离心过滤装置(密理博西格玛)浓缩并储存在4℃下直至使用。

[0541] ELISA结合测定。在4℃下,将96孔微量滴定板的孔用纯化的重组SARS-CoV-2S蛋白或SARS-CoV-2SRBD蛋白包被过夜。将板用在含0.05%吐温-20(DPBS-T)的DPBS中的2%脱脂乳粉和2%正常山羊血清封闭1小时。使用与HRP(辣根过氧化物酶)缀合的山羊抗人IgG(南方生物技术公司)和TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物(赛默飞世尔科技)检测结合的抗体。监测显色,添加1N盐酸以终止反应,并使用分光光度计(伯腾)在450nm下测量吸光度。对于剂量-应答测定,将纯化mAb的连续稀释液施加于孔中,一式三份,并且如上所述检测mAb结合。在使用S形剂量-应答非线性回归分析对mAb浓度进行对数转换后,使用Prism v8.0软件(格雷夫派得(GraphPad))测定结合的半最大有效浓度(EC50)值。

[0542] RBD最小ACE2结合基序肽结合ELISA。在4℃下,将384孔微量滴定板的孔用1μg/mL链霉亲和素包被过夜。将板用在含0.05%吐温-20(DPBS-T)的DPBS中的0.5%BSA封闭1小时。将板用1xPBST洗涤4次,并添加2μg/mL生物素化的ACE2结合基序肽(目录号LT5578,来自

来福泰恩有限公司(LifeTein,LLC)),以在室温下结合链霉亲和素1小时。将纯化的mAb在封闭缓冲液中稀释,添加到孔中,并在室温下孵育1小时。使用与HRP(辣根过氧化物酶)缀合的山羊抗人IgG(目录号2014-05,南方生物技术公司)和TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物(赛默飞世尔科技)检测结合的抗体。监测显色,添加1N盐酸以终止反应,并使用分光光度计(伯腾)在450nm下测量吸光度。对于剂量-应答测定,将纯化mAb的连续3倍稀释液(从10μg/mL浓度开始)施加于孔中,一式三份,并且如上所述检测mAb结合。

[0543] 分析抗体与具有丙氨酸或精氨酸点突变的变异RBD蛋白的结合。使用Octet RED96仪器(ForteBio;颇尔生命科学(Pall Life Sciences))和野生型RBD蛋白或在限定位置的单个氨基酸变为丙氨酸或精氨酸的突变体RBD蛋白进行生物层光干涉测量法(BLI)。首先通过将带有八个His标签的RBD野生型或突变体蛋白从10μg/mL(≈200nM)的溶液中捕获到Penta-His生物传感器上持续300秒来证实RBD蛋白的结合。然后将生物传感器尖端浸入结合缓冲液(PBS/0.2%吐温20)中进行60秒洗涤,然后浸没在含有150nM mAb的溶液中180秒(缔合),随后浸没在结合缓冲液中180秒(解离)。将每种RBD突变体蛋白的应答归一化为野生型RBD蛋白的应答。

[0544] 病灶减少中和测试(FRNT)。将mAb的连续稀释液与10^2FFU的SARS-CoV-2在37℃下孵育1小时。将mAb-病毒复合物添加到96孔板中的Vero E6细胞培养单层中,在37℃下保持1小时。随后,将细胞用在补充为含有2%热灭活FBS的最小必需培养基(MEM)中的1%(w/v)甲基纤维素覆盖。30小时后,去除覆盖物将板固定,并在室温下用在PBS中的4%PFA固定20分钟。将板依次用1μg/mL的rCR3022抗S抗体[10]和辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗人IgG在补充有0.1%(w/v)皂苷(西格玛)和0.1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS中孵育。使用TrueBlue过氧化物酶底物(KPL)使SARS-CoV-2感染的细胞灶可视化,并在ImmunoSpot 5.0.37宏观分析仪(细胞技术公司)上进行定量。使用Prism软件8.0版(格雷夫派得)处理数据。

[0545] S蛋白假型慢病毒的生成。接种悬浮293细胞并用表达荧光素酶的第三代基于HIV的慢病毒载体连同编码以下物质的包装质粒一起转染:具有C端19个氨基酸缺失、Rev和Gag-pol的SARS-CoV-2刺突蛋白。转染后16至20小时更换培养基,24小时后收获含病毒的上清液。通过低速离心去除细胞碎片,并且使上清液通过0.45μm的过滤装置。通过超速离心使假病毒沉淀,并使其重悬于PBS中制成100倍浓缩原液。

[0546] 假病毒中和测定。在384孔微量滴定板中制备mAb的连续稀释液,并在37℃下与假病毒预孵育30分钟,向其中添加293个稳定表达人ACE2的细胞。将板放回37℃培养箱中,然后在48小时后在EnVision 2105多模式酶标仪(珀金埃尔默(Perkin Elmer))上使用Bright-Glo™荧光素酶测定系统(普洛麦格(Promega))根据制造商的建议测量荧光素酶活性。相对于仅假病毒的对照计算抑制百分比。使用Prism软件版本8.1.0(格雷夫派得),通过非线性回归测定IC_{50}值。由至少3个独立实验测定每种抗体的平均IC_{50}值。

[0547] 通过抗体组合测量协同中和作用。协同作用定义为当与体外相同抗体总浓度下的各个mAb介导的中和活性相比时,由两种mAb的混合剂介导的中和活性更高。为了评估两种mAb以混合剂形式是否协同中和SARS-CoV-2,我们使用先前报道的方法来定量协同作用[11]。为了评价组合mAb产生的有益效果的重要性,将观察到的组合应答(剂量-应答矩阵)与借助于协同作用评分模型计算出的预期应答进行比较[11]。在常规的病灶减少中和测试(FRNT)测定中,使用野生型SARS-CoV-2和Vero E6细胞培养单层测量病毒中和作用。将各个mAb

COV2-2196和COV2-2130以不同的浓度混合，以评估混合剂中不同mAb比率的中和活性。特别地，将mAb COV2-2130的七倍稀释液中的每一种(从500ng/mL开始)与mAb COV2-2196的九种稀释液中的每一种(从500ng/mL开始)混合，每种条件下的总体积为50μL，然后与50μL活SARS-CoV-2在细胞培养基(补充2％FBS的RPMI-1640培养基)中孵育，之后施加于在96孔板中生长的融合Vero E6细胞。对照值包括用于测定针对以与混合剂中相同的剂量评估的各个mAb COV2-2196或COV2-2130单独测量的中和活性的剂量-应答的对照值。每次测量一式两份地进行。接下来我们计算每种条件下的病毒中和百分比，然后计算协同作用得分值，该值定义混合剂中这两种mAb之间的相互作用。协同作用得分小于-10指示拮抗作用，得分为-10至10指示相加作用，得分大于10指示协同效应[11]。

[0548] MAb定量。通过使用NanoDrop分光光度计进行紫外分光光度法并考虑人IgG的消光系数来进行纯化mAb的定量。

[0549] 通过生物膜干涉技术进行的竞争结合分析。将Octet HTX生物层干涉测量仪器(福特生物(FortéBio))上的抗小鼠IgG Fc捕获生物传感器(福特生物18-5089)在1x动力学缓冲液(美谷分子(Molecular Devices)18-1105)中浸泡10分钟，然后进行基线信号测量60秒。将融合至小鼠IgG1的重组SARS-CoV-2RBD(RBD-mFc，义翘神州科技股份有限公司40592-V05H)固定到生物传感器尖端上180秒。在1x动力学缓冲液中进行洗涤步骤30秒后，将参考抗体(5μg/mL)与含抗原的生物传感器孵育600秒。参考抗体包括SARS-CoV人mAb CR3022和COV2-2196。在1x动力学缓冲液中进行洗涤步骤30秒后，将生物传感器尖端浸没到第二抗体(5μg/mL)中300秒。将每种抗体的最大结合量归一化为仅缓冲液的对照。减去自我阻断量。使用每种抗体的最大信号之间的比较来测定每种抗体的结合百分比。在参考抗体的存在下，将最大信号降至<未竞争信号的33％视为对第二抗体结合的完全竞争。在参考抗体的存在下，将最大信号降至未竞争信号的33％至67％视为对第二抗体结合的中等竞争。在参考抗体的存在下，将最大信号的结合百分比>67％视为对第二抗体的结合不存在竞争。

[0550] 高通量ACE-2结合抑制分析。在4℃下，将384孔微量滴定板的孔用纯化的重组SARS-CoV-2S2Pecto蛋白包被过夜。将板用在DPBS-T中的2％脱脂乳粉和2％正常山羊血清封闭1小时。将来自微量表达的纯化mAb在封闭缓冲液中稀释两倍，从10μg/mL开始一式三份，添加到孔中(20μL/孔)，并在环境温度下孵育1小时。将具有C端FLAG标签蛋白的重组人ACE2以2μg/mL添加到孔中，体积为5μL/孔(ACE2的最终浓度为0.4μg/mL)，无需洗涤抗体，然后在环境温度下孵育40分钟。洗涤板，并使用HRP缀合的抗FLAG抗体(西格玛)和TMB底物检测结合的ACE2。没有抗体的ACE2结合用作对照。对于在测试抗体的每种稀释液的存在下的ACE2结合获得的信号表示为减去背景信号后没有抗体的ACE2结合的百分比。在使用S形剂量-应答非线性回归分析(Prism软件，GraphPad Prism 8.0版)对抗体浓度进行对数转换后，测定mAb对S2Pecto蛋白与ACE2结合的抑制的半最大抑制浓度(IC_{50})值。

[0551] 使用生物层干涉测量生物传感器进行的ACE2阻断测定。将Octet HTX生物层干涉测量仪器(福特生物)上的抗小鼠IgG生物传感器在1x动力学缓冲液中浸泡10分钟，然后进行基线信号测量60秒。将融合至小鼠IgG1的重组SARS-CoV-2RBD(RBD-mFc，义翘神州科技股份有限公司40592-V05H)固定到生物传感器尖端上180秒。在1x动力学缓冲液中进行洗涤步骤30秒后，将抗体(5μg/mL)与抗原包被的生物传感器孵育600秒。在1x动力学缓冲液中进行洗涤步骤30秒后，将生物传感器尖端浸没到ACE2受体(20μg/mL)(西格玛奥德里奇(Sigma-

Aldrich)SAE0064)中300秒。将ACE2的最大结合量归一化为仅缓冲液的对照。将抗体存在下的ACE2结合百分比与ACE2最大量结合进行比较。将最大信号降至<30％视为ACE2阻断。

[0552] 高通量竞争结合分析。在4℃下,将384孔微量滴定板的孔用纯化的重组SARS-CoV-2S蛋白包被过夜。将板用在含0.05％吐温-20(DPBS-T)的DPBS中的2％BSA封闭1小时。将微量纯化的未标记mAb在封闭缓冲液中稀释十倍,一式四份添加至孔中(20μL/孔),并在环境温度下孵育1小时。将基于先前描述的mAb CR3022[12]的可变基因序列的重组mAb还有新鉴定的识别SARS-CoV-2S蛋白的不同抗原区的mAb COV2-2096、COV2-2130和COV2-2196的生物素化制剂添加到四个孔中的每个孔中,各mAb为2.5μg/mL,体积为5μL/孔(生物素化mAb的最终浓度为0.5μg/mL),无需洗涤未标记的抗体,然后在环境温度下孵育1小时。洗涤板,并使用HRP缀合的抗生物素蛋白(西格玛)和TMB底物检测结合的抗体。对于在未标记的测试抗体的存在下的生物素标记的参考抗体的结合获得的信号表示为减去背景信号后单独的参考抗体结合的百分比。如果测试的mAb的存在使参考抗体的结合降至其最大结合的41％以下,则将测试的mAb视为竞争性的,而如果信号大于71％,则将测试的mAb视为非竞争性的。将40-70％的水平视为中等竞争。

[0553] mAb与丙氨酸或精氨酸RBD突变体的结合分析。使用Octet RED96仪器(福特生物;颇尔生命科学)进行生物层光干涉测量法。首先通过将带有八个His标签的RBD突变体10μg/mL(≈200nM)捕获到Penta-His生物传感器上持续300秒来证实结合。然后将生物传感器浸入结合缓冲液(PBS/0.2％吐温20)中洗涤60秒,然后浸没在含有150nM mAb的溶液中180秒(缔合),随后浸没在结合缓冲液中180秒(解离)。将每种RBD突变体的应答归一化为野生型RBD的应答。

[0554] 使用经人hACE2转导的小鼠进行的小鼠实验。根据Guide for the Care and Use of Laboratory Animals ofthe National Institutes ofHealth[美国国立卫生研究院实验动物的护理和使用指南]中的建议进行动物研究。该方案已由华盛顿大学医学院的实验动物管理和使用委员会批准(保障号A3381-01)。在由盐酸氯胺酮和甲苯噻嗪诱导并维持的麻醉下进行病毒接种,并尽一切努力使动物的痛苦最小化。

[0555] BALB/c小鼠购自杰克逊实验室(Jackson Laboratories)(品系000651)。为雌性小鼠(10-11周龄)给予单次腹膜内注射2mg抗Ifnar1mAb(MAR1-5A3[13],领科(Leinco)),一天后鼻内施用2.5×10^{8}PFU的AdV-hACE2。AdV转导后五天,通过鼻内途径给小鼠接种4×10^{5}PFU的SARS-CoV-2。在SARS-CoV-2接种前24小时施用抗SARS-CoV-2人mAb或同种型对照mAb。每天监测体重,并且在感染后第5或7天处死动物,并收获组织。

[0556] 病毒负荷的测量。称取组织并在MagNA Lyser仪器(罗氏生命科学(Roche Life Science))中在补充有2％热灭活的FBS的1ml DMEM培养基中用氧化锆珠粒匀化。通过以10,000rpm离心5分钟使组织匀浆澄清并储存在-80℃下。使用MagMax mirVana总RNA分离试剂盒(赛默科技(Thermo Scientific))和Kingfisher Flex 96孔提取机(赛默科技)提取RNA。使用SARS-CoV-2(MN908947)序列作为向导,设计TaqMan引物靶向N基因的保守性区域(L引物:ATGCTGCAATCGTGCTACAA;R引物:GACTGCCGCCTCTGCTC;探针:/56-FAM/TCAAGGAAC/ZEN/AACATTGCCAA/3IABkFQ/)。为了建立RNA标准曲线,我们在gBlocks片段(IDT)中生成N基因的串联区段,并将其克隆到PCR-II topo载体(英杰公司)中。将载体线性化,并进行体外T7-DNA依赖性的RNA转录,以生成用于定量标准曲线的材料。

[0557] 细胞因子和趋化因子mRNA的测量。如上所述，在7dpi时从肺匀浆中分离RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(赛默科技)，添加RNA酶抑制剂，按照制造商的规定，由DNA酶处理过的RNA合成cDNA。使用TaqMan快速通用PCR预混液(赛默科技)和对IFNγ(IDT:Mm.PT.58.41769240)、IL-6(Mm.PT.58.10005566)、CXCL10(Mm.PT.58.43575827)、CCL2(Mm.PT.58.42151692)有特异性的商用引物/探针集测定细胞因子和趋化因子的表达并且将结果归一化为GAPDH(Mm.PT.39a.1)水平。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法测定倍数变化，该方法将抗SARS-CoV-2特异性或同种型对照mAb治疗的小鼠与未经治疗的小鼠进行比较。

[0558] 使用野生型小鼠进行的小鼠实验。根据Guide for the Care and Use ofLaboratory Animals ofthe National Institutes ofHealth[美国国立卫生研究院实验动物的护理和使用指南]中的建议进行动物研究。该方案获得北卡罗来纳大学教堂山医学院的实验动物管理和使用委员会批准(NIH/PHS动物福利保障号为D16-00256(A3410-01))。在由盐酸氯胺酮和甲苯噻嗪诱导并维持的麻醉下进行病毒接种，并尽一切努力使动物的痛苦最小化。

[0559] 小鼠适应性SARS-CoV-2(MA-SARS-CoV-2)病毒。如前所述[14]，生成病毒。使病毒在含10％胎儿克隆物II和1％青霉素/链霉素的DMEM中生长的Vero E6细胞中繁殖。通过空斑测定法测定病毒滴度。简言之，将病毒进行连续稀释并接种到Vero E6细胞的融合单层上，然后进行琼脂糖覆盖。在感染后第2天，用中性红染料染色后，使空斑可视化。

[0560] 野生型小鼠。在实验中使用来自恩维戈(Envigo)的12月龄BALB/c小鼠。在实验开始之前，使小鼠在BSL3中适应至少72小时。感染前6小时，用200μg人单克隆抗体经由腹膜内注射对小鼠进行预防性治疗。第二天，用氯胺酮和甲苯噻嗪的混合物麻醉小鼠，并用10^5PFU稀释于PBS中的MA-SARS-CoV-2经鼻内感染。测定每日减重，并且在感染后两天，用过量的异氟烷使小鼠安乐死，然后收获组织。

[0561] 肺组织匀浆的空斑测定。使用MagnaLyser(罗氏(Roche))将右肺下叶在1mL PBS中匀化。在Vero E6细胞培养单层上滴定病毒的连续稀释液，并在接种后两天通过中性红染色使病毒空斑可视化。本测定的检测极限是每个肺100PFU。

[0562] 量化和统计分析。正如指出的那样，测定连续变量的描述统计平均值±SEM或平均值±SD。图例中描述了技术和生物学重复。在小鼠研究中，分别通过双因素方差分析和曼-惠特尼(Mann-Whitney)检验确定体重变化和体内病毒负荷的分析。使用Prism v8.0(格雷夫派得)进行统计分析。

[0563] 在线方法的参考文献

[0564] 1Zost SJ,G.P.,Chen RE,Case JB,Reidy JX,Trivette A,Nargi RS,Sutton RE,Suryadevara N,Chen EC,Binshtein E,Shrihari S,Ostrowski M,Chu HY,Didier JE,MacRenaris KW,Jones T,Day S,Myers L,Lee FE-H,Nguyen DC,Sanz I,Martinez DR,Baric RS,Thackray LB,.Diamond MS,Carnahan RH,Crowe JE Jr..Rapid isolation and profiling ofa diverse panel ofhuman monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2spike protein.bioRxiv 2020.05.12.091462;doi:https://doi.org/10.1101/2020.05.12.091462(2020)

[0565] 2Mukherjee,S.et al.Enhancing dengue virus maturation using astable furin over-expressing cell line.Virology 497,33-40,doi:10.1016/

j.virol.2016.06.022(2016).

[0566] 3Wrapp,D.et al.Cryo-EM structure ofthe 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.Science 367,1260-1263,doi:10.1126/science.abb2507(2020).

[0567] 4Ohi,M.,Li,Y.,Cheng,Y.&Walz,T.Negative staining and image classification-Powerful tools in modern electron microscopy.Biol Proced Online 6,23-34,doi:10.1251/bpo70(2004).

[0568] 5Mastronarde,D.N.Automated electron microscope tomography using robust prediction ofspecimen movements.JStructBiol152,36-51,doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007(2005).

[0569] 6Punjani,A.,Rubinstein,J.L.,Fleet,D.J.&Brubaker,M.A.cryoSPARC:algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination.NatMethods 14,290-296,doi:10.1038/nmeth.4169(2017).

[0570] 7Bepler,T.,Noble,A.J.,and Berger,B.Topaz-Denoise:general deep denoising models for cryoEM.bioRxiv.doi:10.1101/838920(2019).

[0571] 8Pettersen,E.F.et al.UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.J Comput Chem 25,1605-1612,doi:10.1002/jcc.20084(2004).

[0572] 9Chng,J.et al.Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells.MAbs 7,403-412,doi:10.1080/19420862.2015.1008351(2015).

[0573] 10Yuan,M.et al.A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2and SARS-CoV.Science 368,630-633,doi:10.1126/science.abb7269(2020).

[0574] 11Ianevski,A.,He,L.,Aittokallio,T.&Tang,J.SynergyFinder:a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data.Bioinformatics 33,2413-2415,doi:10.1093/bioinformatics/btx162(2017).

[0575] 12ter Meulen,J.et al.Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets.Lancet 363,2139-2141,doi:10.1016/S0140-6736(04)16506-9(2004).

[0576] 13Sheehan,K.C.et al.Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN-alpha/beta receptor subunit 1(IFNAR-1)from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection.J Interferon Cytokine Res 26,804-819(2006).

[0577] 14Dinnon KH,et al.A mouse-adapted SARS-CoV-2model for the evaluation of COVID-19medical countermeasures.bioRxiv2020.05.06.081497;doi:https://doi.org/10.1101/2020.05.06.081497(2020).

[0578] **********

[0579] 表1-抗体可变区的核苷酸序列

[0580]

克隆	Seq ID	链	可变序列区
COV2-2165	1	重链	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGACTCACCGTCCGTAGCAACTACATGACCTGGGTCCGCCAGACTCCAGGG AAGGGGCTGGAATGGGTGTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATTCTACGCAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTTCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCGTGACTTACGGTTTGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	2	轻链	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGACA GCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTATTACTGTCAACTACTTAATAGTCACCCCCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAG ATTAAA
CO	3	重链	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCC TGCAAGGCTTCTGGATTCACCTTTATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGA

[0581]

V2-2838			CAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTGGTAACACAAACTACGCACAGAAG TTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCCCCATATTGTAGTAGTATCAGC TGCAATGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG
	4	轻链	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTC TCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTC AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT GCAGTGTATTACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGGGTTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAG GTGGAAATCAAAC
COV2-2952	5	重链	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGACTCACCGTCCGTAGCAACTACATGACCTGGGTCCGCCAGACTCCAGGG AAGGGGCTGGAATGGGTGTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATTCTACGCAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTTCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCGTGACTTACGGTTTGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	6	轻链	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGACA GCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTATTACTGTCAACTACTTAATAGTCACCCCCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAG ATTAAAC
COV2-2514	7	重链	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCATCTTTGATGATTATGACATGACCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCAGACTCT GTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAAC AGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCAGTGATTATGTCTCCAATCCCCCGT TATAGTGGCTACGATTGGGCGGGTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC GTCTCTTCAG
	8	轻链	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACA TGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGTC CCTATACTTGTCATCTATGATAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGC TCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGAC TATTACTGTAACTCCCGGGACAGCAGTGGTAACGCCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTAG
COV2-2391	9	重链	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCC TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCGGCAGCTTTGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATGAACTCTAACAGTGGGAACACAGCCTATGCACAGAAG TTCCAGGGCAGAGTCACTATGACCAGGGACACCTCCACAAATACAGCCTACATGGAGTTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGAGAATGCGCAGTGGCTGGCCCACA CATGGCCGCCCGGATGACTTCTGGGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
	10	轻链	CAGTCTGTGCTGACTCAGGCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCT TGTTCTGGAAGCAACTCCAATATCGGAAGTTATACTATAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCCAAACTCCTCATTTATGGTAATGATCAGCGGACCTCAGGGGTCCCTGACCGATTC TCTGGCTCCAAGTTTGGCACCTCGGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAA

[0582]

			AATAATTATTACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAATGGCCTGGTATTCGGCGGAGGGACC AAACTGACCGTCCTAG
COV2-3025	11	重链	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCC TGCAAGGCTTCTGGATTCACCTTTATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGA CAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTGGTAACACAAACTACGCACAGAAG TTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCCCCATATTGTAGTAGTATCAGC TGCAATGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	12	轻链	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAGAGAGTCACCCTC TCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTC AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT GCAGTGTATTACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGGGTTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAG GTGGAAATCAAA
COV2-2196	13	重链	CAAATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGACCTCAGTGAAGGTCTCC TGCAAGGCTTCTGGATTCACCTTTATGAGCTCTGCTGTGCAGTGGGTGCGACAGGCTCGTGGA CAACGCCTTGAGTGGATAGGATGGATCGTCATTGGCAGTGGTAACACAAACTACGCACAGAAG TTCCAGGAAAGAGTCACCATTACCAGGGACATGTCCACAAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGCCCCATATTGTAGTAGTATCAGC TGCAATGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
	14	轻链	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTC TCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTC AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT GCAGTGTATTACTGTCAGCACTATGGTAGCTCACGGGGTTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAG GTGGAAATCAAA
COV2-2094	15	重链	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCATCTTTGATGATTATGACATGACCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCAGACTCT GTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAAC AGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCAGTGATTATGTCTCCAATCCCCCGT TATAGTGGCTACGATTGGGCGGGTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC GTCTCTTCA
	16	轻链	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACA TGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGTC CCTATACTTGTCATCTATGATAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGC TCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGAC TATTACTGTAACTCCCGGGACAGCAGTGGTAACGCCGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG ACCGTCCTA
COV2-2	17	重链	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCC TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCGGCAGCTTTGATATCAACTGGGTGCGACAGGCCACTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATGAACTCTAACAGTGGGAACACAGCCTATGCACAGAAG TTCCAGGGCAGAGTCACTATGACCAGGGACACCTCCACAAATACAGCCTACATGGAGTTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGAGAATGCGCAGTGGCTGGCCCACA CATGGCCGCCCGGATGACTTCTGGGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0583]

096	18	轻链	CAGTCTGTGCTGACTCAGGCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCT TGTTCTGGAAGCAACTCCAATATCGGAAGTTATACTATAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA ACGGCCCCCAAACTCCTCATTTATGGTAATGATCAGCGGACCTCAGGGGTCCCTGACCGATTC TCTGGCTCCAAGTTTGGCACCTCGGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAA AATAATTATTACTGTGCAGTATGGGATGACAGCCTGAATGGCCTGGTATTCGGCGGAGGGACC AAACTGACCGTCCTA
COV2-2130	19	重链	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGAGACGTCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAAAGCAAAATTGATGGTGGGACAACAGACTACGCT GCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGCGGGAAGCTATTAC TATGATACTGTTGGTCCAGGCCTCCCAGAGGGAAAATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTG GTCACCGTCTCCTCA
	20	轻链	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATC AACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTAC CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATGTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGG GTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGGCAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGGCTGAAGATGTGGCAATTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGA GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0584] 表2-抗体可变区的蛋白质序列

[0585]

克隆	Seq ID	链	可变序列区
COV2-21655	21	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTVRSNYMTWVRQTPGKGLEWVSVI YSGGSTFYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVTY GLDVWGQGTTVTVSS
	22	轻链	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGTAPNLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQLLNSHPLTFGQGT RLEIK
COV2-28388	23	重链	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFMSSAVQWVRQARGQRLEWIGWI VIGSGNTNYAQKFQERVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAPYCS SISCNDGFDIWGQGTMVTVSS
	24	轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSRGWTFGQ GTKVEIK
CO	25	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTVRSNYMTWVRQTPGKGLEWVSVI YSGGSTFYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVTY

[0586]

V2-2952			GLDVWGQGTTVTVSS
	26	轻链	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGTAPNLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQLLNSHPLTFGQGT RLEIK
COV2-25144	27	重链	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFIFDDYDMTWVRQAPGKGLEWVSGI NWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAVIMSP IPRYSGYDWAGDAFDIWGQGTMVTVSS
	28	轻链	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQVPILVIYDKN NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNAVVFGGG TKLTVL
COV2-23911	29	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGSFDINWVRQATGQGLEWMGRM NSNSGNTAYAQKFQGRVTMTRDTSTNTAYMELSSLRSEDTAMYYCARMRSG WPTHGRPDDFWGRGTLVTVSS
	30	轻链	QSVLTQAPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSYTINWYQQLPGTAPKLLIYG NDQRTSGVPDRFSGSKFGTSASLAISGLQSEDENNYYCAVWDDSLNGLVFG GGTKLTVL
COV2-30255	31	重链	EVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFMSSAVQWVRQARGQRLEWIGWI VIGSGNTNYAQKFQERVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAPYCS SISCNDGFDIWGQGTMVTVSS
	32	轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSRGWTFGQ GTKVEIK
COV2-21966	33	重链	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFMSSAVQWVRQARGQRLEWIGWI VIGSGNTNYAQKFQERVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAPYCS SISCNDGFDIWGQGTMVTVSS
	34	轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSRGWTFGQ GTKVEIK
C	35	重	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFIFDDYDMTWVRQAPGKGLEWVSGI

[0587]

COV2-2094		链	NWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDIWGQGTMVTVSS
	36	轻链	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQVPILVIYDKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNAVVFGGGTKLTVL
COV2-2096	37	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGSFDINWVRQATGQGLEWMGRMNSNSGNTAYAQKFQGRVTMTRDTSTNTAYMELSSLRSEDTAMYYCARMRSGWPTHGRPDDFWGRGTLVTVSS
	38	轻链	QSVLTQAPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSYTINWYQQLPGTAPKLLIYGNDQRTSGVPDRFSGSKFGTSASLAISGLQSEDENNYYCAVWDDSLNGLVFGGGTKLTVL
COV2-2130	39	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDVWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKIDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTAGSYYYDTVGPGLPEGKFDYWGQGTLVTVSS
	40	轻链	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGAEFTLTISSLQAEDVAIYYCQQYYSTLTFGGGTKVEIK

[0588] 表3-重链序列

[0589]

克隆	CDRH1	CDRH2	CDRH3
COV2-2165	GLTVRSNY	IYSGGST	ARDLVTYGLDV
	41	42	43
COV2-2838	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	44	45	46
COV2-2952	GLTVRSNY	IYSGGST	ARDLVTYGLDV
	47	48	49
COV2-2514	GFIFDDYD	INWNGGST	AVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDI
	50	51	52
COV2-2391	GYTFGSFD	MNSNSGNT	ARMRSGWPTHGRPDDF
	53	54	55
COV2-3025	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	56	57	58
COV2-2196	GFTFMSSA	IVIGSGNT	AAPYCSSISCNDGFDI
	59	60	61

[0590]

COV2-2094	GFIFDDYD	INWNGGST	AVIMSPIPRYSGYDWAGDAFDI
	62	63	64
COV2-2096	GYTFGSFD	MNSNSGNT	ARMRSGWPTHGRPDDF
	65	66	67
COV2-2130	GFTFRDVW	IKSKIDGGTT	TTAGSYYYDTVGPGLPEGKFDY
	68	69	70

[0591] 表4-轻链序列

[0592]

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

[0593] **********

[0594] 根据本披露，无需过度实验即可制备和实施本文披露和要求保护的所有组合物和方法。虽然已经根据优选实施例描述了本披露的组合物和方法，但是对于本领域技术人员而言显而易见的是，在不背离本披露的概念、精神和范围的情况下，可以对组合物和方法以及在本文所述的方法的步骤或步骤顺序中施以改变。更特别地，显而易见的是，在化学和生理学上相关的某些试剂可以替代本文所述的试剂，同时将会获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有此类相似的替代和修改都被认为在所附权利要求所限定的本披露的精神、范围和概念之内。

[0595] VII.参考文献

[0596] 以下参考文献，在它们提供了补充本文所阐述内容的示例性程序或其他细节的意义上来说，明确地通过援引并入本文。

[0597] 美国专利3,817,837

[0598] 美国专利3,850,752

[0599] 美国专利3,939,350

[0600] 美国专利3,996,345
[0601] 美国专利4,196,265
[0602] 美国专利4,275,149
[0603] 美国专利4,277,437
[0604] 美国专利4,366,241
[0605] 美国专利4,472,509
[0606] 美国专利4,554,101
[0607] 美国专利4,680,338
[0608] 美国专利4,816,567
[0609] 美国专利4,867,973
[0610] 美国专利4,938,948
[0611] 美国专利5,021,236
[0612] 美国专利5,141,648
[0613] 美国专利5,196,066
[0614] 美国专利5,563,250
[0615] 美国专利5,565,332
[0616] 美国专利5,856,456
[0617] 美国专利5,880,270
[0618] 美国专利6,485,982
[0619] “Antibodies:A Laboratory Manual,”Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY,1988.
[0620] Abbondanzo et al.,Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.,12(4),480-489,1990.
[0621] Allred et al.,Arch.Surg.,125(1),107-113,1990.
[0622] Atherton et al.,Biol.ofReproduction,32,155-171,1985.
[0623] Barzon et al.,Euro Surveill.2016 Aug 11;21(32).
[0624] Beltramello et al.,CellHostMicrobe 8,271-283,2010.
[0625] Brown et al.,J.Immunol.Meth.,12;130(1),:111-121,1990.
[0626] Campbell,In:Monoclonal Antibody Technology,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,Vol.13,Burden and Von Knippenberg, Eds.pp.75-83,Amsterdam,Elsevier,1984.
[0627] Capaldi et al.,Biochem.Biophys.Res.Comm.,74(2):425-433,1977.
[0628] De Jager et al.,Semin.Nucl.Med.23(2),165-179,1993.
[0629] Dholakia et al.,J.Biol.Chem.,264,20638-20642,1989.
[0630] Diamond et al.,J Virol 77,2578-2586,2003.
[0631] Doolittle and Ben-Zeev,Methods Mol.Biol.,109,:215-237,1999.
[0632] Duffy et al.,N.Engl.J.Med.360,2536-2543,2009.
[0633] Elder et al.Infections,infertility and assisted reproduction.Part II: Infections in reproductive medicine&Part III:Infections and the assisted reproductive laboratory.Cambridge UK:Cambridge University Press;2005.

[0634] Gefter et al.,Somatic Cell Genet.,3:231-236,1977.

[0635] Gornet et al.,Semin Reprod Med.2016 Sep;34(5):285-292.Epub 2016 Sep 14.

[0636] Gulbis and Galand,Hum.Pathol.24(12),1271-1285,1993.

[0637] Halfon et al.,PLoS ONE 2010;5(5)e10569

[0638] Hessell et al.,Nature 449,101-4,2007.

[0639] Khatoon et al.,Ann.ofNeurology,26,210-219,1989.

[0640] King et al.,J.Biol.Chem.,269,10210-10218,1989.

[0641] Kohler and Milstein,Eur.J.Immunol.,6,511-519,1976.

[0642] Kohler and Milstein,Nature,256,495-497,1975.

[0643] Kyte and Doolittle,J.Mol.Biol.,157(1):105-132,1982.

[0644] Mansuy et al.,LancetInfectDis.2016 Oct;16(10):1106-7.

[0645] Nakamura et al.,In:Enzyme Immunoassays:Heterogeneous and Homogeneous Systems,Chapter 27,1987.

[0646] O'Shannessy et al.,J.Immun.Meth.,99,153-161,1987.

[0647] Persic et al.,Gene 187:1,1997

[0648] Potter and Haley,Meth.Enzymol.,91,613-633,1983.

[0649] Purpura et al.,Lancet Infect Dis.2016 Oct;16(10):1107-8.Epub 2016 Sep 19.

[0650] Remington's Pharmaceutical Sciences,15th Ed.,3:624-652,1990.

[0651] Tang et al.,J.Biol.Chem.,271:28324-28330,1996.

[0652] Wawrzynczak&Thorpe,In:Immunoconjugates,Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy OfCancer,Vogel(Ed.),NY,Oxford University Press,28,1987.

[0653] Yu et al.,J Immunol Methods 336,142-151,doi:10.1016/j.jim.2008.04.008,2008.

<110> 范德堡大学(Vanderbilt University)
克罗詹姆斯E Jr.(Crowe, James E Jr.)
周斯特·赛斯(Zost, Seth)
卡纳汉·罗伯特(Carnahan, Robert)
吉恰克·帕夫洛(Gilchuk, Pavlo)
<120> 针对严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)的人单克隆抗体
<130> 4815.001PCOD
<150> US 63/000,299
<151> 2020-03-26
<150> US 63/002,896
<151> 2020-03-31
<150> US 63/003,716
<151> 2020-04-01
<150> US 63/023,545
<151> 2020-05-12
<150> US 63/024,204
<151> 2020-05-13
<150> US 63/024,248
<151> 2020-05-13
<150> US 63/027,173
<151> 2020-05-19
<150> US 63/037,984
<151> 2020-06-11
<150> US 63/040,224
<151> 2020-06-17
<150> US 63/040,246
<151> 2020-06-17
<150> US 63/142,196
<151> 2021-01-27
<150> US 63/161,890
<151> 2021-03-16
<160> 187
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> COV2-2165重链

<400> 1

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggGtc tctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggact caccgtccgt agcaactaca tgacctgggt ccgccagact 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtgtcagtt atttatagcg gtggtagcac attctacgca 180
gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac ggtgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatctcgtg 300
acttacggtt tggacgtctg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc a 351

<210> 2

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2165轻链

<400> 2

gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggcattagc aattatttag cctggtatca gcaaaaacca 120
gggacagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacta cttaatagtc acccCctcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 3

<211> 370

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2838重链

<400> 3

caaatgcagc tggtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt cacctttatg agctctgctg tgcagtgggt gcgacaggct 120
cgtggacaac gccttgagtg gataggatgg atcgtcattg gcagtggtaa cacaaactac 180
gcacagaagt tccaggaaag agtcaccatt accagggaca tgtccacaag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggccccatat 300
tgtagtagta tcagctgcaa tgatggtttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360
gtctcttcag 370

<210> 4

<211> 328

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> COV2-2838轻链
<400> 4
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cactatggta gctcacgggg ttggacgttc 300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaac 328
<210> 5
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952重链
<400> 5
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggGtc tctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggact caccgtccgt agcaactaca tgacctgggt ccgccagact 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtgtcagtt atttatagcg gtggtagcac attctacgca 180
gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac ggtgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatctcgtg 300
acttacggtt tggacgtctg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc a 351
<210> 6
<211> 322
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952轻链
<400> 6
gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggcattagc aattatttag cctggtatca gcaaaaacca 120
gggacagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacta cttaatagtc acccccctcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa ac 322
<210> 7
<211> 388
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> COV2-2514重链
<400> 7
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt catctttgat gattatgaca tgacctgggt ccgccaagct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt atcactgtgc agtgattatg 300
tctccaatcc cccgttatag tggctacgat tgggcgggtg atgcttttga tatctggggc 360
caagggacaa tggtcaccgt ctcttcag 388
<210> 8
<211> 325
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514轻链
<400> 8
tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagtt ggtaccagca gaagccagga 120
caggtcccta tacttgtcat ctatgataaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaacgccgt ggtattcggc 300
ggagggacca agctgaccgt cctag 325
<210> 9
<211> 370
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391重链
<400> 9
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcggc agctttgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
actggacaag ggcttgagtg gatgggacgg atgaactcta acagtgggaa cacagcctat 180
gcacagaagt tccagggcag agtcactatg accagggaca cctccacaaa tacagcctac 240
atggagttga gcagcctgag atctgaggac acggccatgt attactgtgc gagaatgcgc 300
agtggctggc ccacacatgg ccgcccggat gacttctggg gccggggaac cctggtcacc 360
gtctcctcag 370
<210> 10
<211> 331

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391轻链
<400> 10
cagtctgtgc tgactcaggc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcttgttctg gaagcaactc caatatcgga agttatacta taaactggta ccagcagctc 120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatttat ggtaatgatc agcggacctc aggggtccct 180
gaccgattct ctggctccaa gtttggcacc tcggcctccc tggccatcag tgggctccag 240
tctgaggatg aaaataatta ttactgtgca gtatgggatg acagcctgaa tggcctggta 300
ttcggcggag ggaccaaact gaccgtccta g 331
<210> 11
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-3025重链
<400> 11
gaggtgcagc tggtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt cacctttatg agctctgctg tgcagtgggt gcgacaggct 120
cgtggacaac gccttgagtg gataggatgg atcgtcattg gcagtggtaa cacaaactac 180
gcacagaagt tccaggaaag agtcaccatt accagggaca tgtccacaag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggccccatat 300
tgtagtagta tcagctgcaa tgatggtttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360
gtctcttca 369
<210> 12
<211> 327
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-3025轻链
<400> 12
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagtcacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cactatggta gctcacgggg ttggacgttc 300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaa 327
<210> 13

<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196重链
<400> 13
caaatgcagc tggtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt cacctttatg agctctgctg tgcagtgggt gcgacaggct 120
cgtggacaac gccttgagtg gataggatgg atcgtcattg gcagtggtaa cacaaactac 180
gcacagaagt tccaggaaag agtcaccatt accagggaca tgtccacaag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggccccatat 300
tgtagtagta tcagctgcaa tgatggtttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360
gtctcttca 369
<210> 14
<211> 327
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196轻链
<400> 14
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cactatggta gctcacgggg ttggacgttc 300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaa 327
<210> 15
<211> 387
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2094重链
<400> 15
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt catctttgat gattatgaca tgacctgggt ccgccaagct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt atcactgtgc agtgattatg 300
tctccaatcc cccgttatag tggctacgat tgggcgggtg atgcttttga tatctggggc 360

caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 387

<210> 16

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2094轻链

<400> 16

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagtt ggtaccagca gaagccagga 120

caggtcccta tacttgtcat ctatgataaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaacgccgt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 17

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2096重链

<400> 17

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcggc agctttgata tcaactgggt gcgacaggcc 120

actggacaag ggcttgagtg gatgggacgg atgaactcta acagtgggaa cacagcctat 180

gcacagaagt tccagggcag agtcactatg accagggaca cctccacaaa tacagcctac 240

atggagttga gcagcctgag atctgaggac acggccatgt attactgtgc gagaatgcgc 300

agtggctggc ccacacatgg ccgcccggat gacttctggg gccggggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 18

<211> 330

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2096轻链

<400> 18

cagtctgtgc tgactcaggc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcaactc caatatcgga agttatacta taaactggta ccagcagctc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatttat ggtaatgatc agcggacctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtttggcacc tcggcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aaaataatta ttactgtgca gtatgggatg acagcctgaa tggcctggta 300
ttcggcggag ggaccaaact gaccgtccta 330

<210> 19
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130重链
<400> 19

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGtc ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcaga gacgtctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaattgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gcgggaagct attactatga tactgttggt ccaggcctcc cagagggaaa atttgactac 360
tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc tca 393

<210> 20
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130轻链
<400> 20

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tgtactgggc atctacccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg gggcagagtt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca atttattact gtcagcaata ttatagtacc 300
ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa 336

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2165重链
<400> 21

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

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

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2165轻链
<400> 22
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Leu Leu Asn Ser His Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> COV2-2838重链
<400> 23
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser
20 25 30
Ala Val Gln Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 24
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2838轻链
<400> 24
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg
85 90 95
Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952重链
<400> 25

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

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952轻链
<400> 26

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

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

<210> 27
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514重链
<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
85 90 95
Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala
100 105 110
Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514轻链
<400> 28
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Ala
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 29
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391重链
<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Phe
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Met Asn Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Arg Ser Gly Trp Pro Thr His Gly Arg Pro Asp Asp Phe
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> COV2-2391轻链

<400> 30

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

<210> 31

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-3025重链

<400> 31

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

<210> 32
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-3025轻链
<400> 32

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

<210> 33
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196重链
<400> 33

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

85 90 95
Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196轻链
<400> 34
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg
85 90 95
Gly Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2094重链
<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
85 90 95
Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala
100 105 110
Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2094轻链
<400> 36

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

<210> 37
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2096重链
<400> 37

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

<210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2096轻链
<400> 38

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

<210> 39
<211> 131

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130重链
<400> 39

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

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130轻链
<400> 40

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

65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2165 CDRH1
<400> 41
Gly Leu Thr Val Arg Ser Asn Tyr
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2165 CDRH2
<400> 42
Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2165 CDRH3
<400> 43
Ala Arg Asp Leu Val Thr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2838 CDRH1
<400> 44

Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser Ala
1 5
<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2838 CDRH2
<400> 45
Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2838 CDRH3
<400> 46
Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15
<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952 CDRH1
<400> 47
Gly Leu Thr Val Arg Ser Asn Tyr
1 5
<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952 CDRH2
<400> 48
Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5
<210> 49

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952 CDRH3
<400> 49
Ala Arg Asp Leu Val Thr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10
<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514 CDRH1
<400> 50
Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr Asp
1 5
<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514 CDRH2
<400> 51
Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr
1 5
<210> 52
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514 CDRH3
<400> 52
Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala
1 5 10 15
Gly Asp Ala Phe Asp Ile
20
<210> 53
<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391 CDRH1
<400> 53
Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Phe Asp
1 5
<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391 CDRH2
<400> 54
Met Asn Ser Asn Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 55
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391 CDRH3
<400> 55
Ala Arg Met Arg Ser Gly Trp Pro Thr His Gly Arg Pro Asp Asp Phe
1 5 10 15
<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-3025 CDRH1
<400> 56
Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser Ala
1 5
<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> COV2-3025 CDRH2
<400> 57
Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-3025 CDRH3
<400> 58
Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15
<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 CDRH1
<400> 59
Gly Phe Thr Phe Met Ser Ser Ala
1 5
<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 CDRH2
<400> 60
Ile Val Ile Gly Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 CDRH3
<400> 61
Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2094 CDRH1

<400> 62

Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr Asp

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2094 CDRH2

<400> 63

Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 64

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2094 CDRH3

<400> 64

Ala Val Ile Met Ser Pro Ile Pro Arg Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Ala

1 5 10 15

Gly Asp Ala Phe Asp Ile

20

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV2-2096 CDRH1

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Phe Asp

1 5

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2096 CDRH2
<400> 66
Met Asn Ser Asn Ser Gly Asn Thr
1 5
<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2096 CDRH3
<400> 67
Ala Arg Met Arg Ser Gly Trp Pro Thr His Gly Arg Pro Asp Asp Phe
1 5 10 15
<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130 CDRH1
<400> 68
Gly Phe Thr Phe Arg Asp Val Trp
1 5
<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130 CDRH2
<400> 69
Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr
1 5 10
<210> 70
<211> 22
<212> PRT

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

<220>
<223> COV2-2838 CDRL1
<400> 74
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5
<210> 75
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2838 CDRL2
<400> 75
Gly Ala Ser
1
<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2838 CDRL3
<400> 76
Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr
1 5 10
<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952 CDRL1
<400> 77
Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
1 5
<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952 CDRL2
<400> 78

Ala Ala Ser
1
<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2952 CDRL3
<400> 79
Gln Leu Leu Asn Ser His Pro Leu Thr
1 5
<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514 CDRL1
<400> 80
Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
1 5
<210> 81
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514 CDRL2
<400> 81
Asp Lys Asn
1
<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2514 CDRL3
<400> 82
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Ala Val Val
1 5 10
<210> 83

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391 CDRL1
<400> 83
Asn Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Thr
1 5
<210> 84
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391 CDRL2
<400> 84
Gly Asn Asp
1
<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2391 CDRL3
<400> 85
Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Leu Val
1 5 10
<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-3025 CDRL1
<400> 86
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5
<210> 87
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> COV2-3025 CDRL2
<400> 87
Gly Ala Ser
1
<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-3025 CDRL3
<400> 88
Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr
1 5 10
<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 CDRL1
<400> 89
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5
<210> 90
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 CDRL2
<400> 90
Gly Ala Ser
1
<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 CDRL3
<400> 91

Gln His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr
1 5 10
<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2094 CDRL1
<400> 92
Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
1 5
<210> 93
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2094 CDRL2
<400> 93
Asp Lys Asn
1
<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2094 CDRL3
<400> 94
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Ala Val Val
1 5 10
<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2096 CDRL1
<400> 95
Asn Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Thr
1 5
<210> 96

<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2096 CDRL2
<400> 96
Gly Asn Asp
1
<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2096 CDRL3
<400> 97
Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Leu Val
1 5 10
<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130 CDRL1
<400> 98
Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10
<210> 99
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2130 CDRL2
<400> 99
Trp Ala Ser
1
<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> COV2-2130 CDRL3
<400> 100
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr
1 5
<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGHV1-58 FR2-HCDR2
<400> 101
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 102
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGHV1-58 HCDR3-FR4
<400> 102
Cys Ala Ala
1
<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGHD2-2 HCDR3-FR4
<400> 103
Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Ala
1 5 10
<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGHD2-8 HCDR3-FR4
<400> 104

Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Tyr Ala
1 5 10
<210> 105
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGHD2-15 HCDR3-FR4
<400> 105
Gly Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser
1 5 10
<210> 106
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGHJ3*02 HCDR3-FR4
<400> 106
Asp Ala Phe Asp Ile Trp
1 5
<210> 107
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGKV3-20 LCDR1-FR2
<400> 107
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGKV3-20 LCDR3-FR4
<400> 108
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
1 5
<210> 109

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IGKJ1*01 LCDR3-FR4
<400> 109
Trp Thr Phe Gly
1
<210> 110
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 FR2-HCDR2
<400> 110
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 111
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 HCDR3-FR4
<400> 111
Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Ile Ser Cys Asn Asp Gly Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 LCDR1-FR2
<400> 112
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 113
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2196 LCDR3-FR4
<400> 113
His Tyr Gly Ser Ser Arg Gly Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2381 FR2-HCDR2
<400> 114
Ile Gly Trp Ile Ala
1 5
<210> 115
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2381 HCDR3-FR4
<400> 115
Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Arg Thr Ser Cys His Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 116
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2381 LCDR1-FR2
<400> 116
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 117
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> COV2-2381 LCDR3-FR4
<400> 117
His Phe Gly Ser Ser Ser Gln Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2072 FR2-HCDR2
<400> 118
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 119
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2072 HCDR3-FR4
<400> 119
Cys Ala Ala Pro His Cys Asn Arg Thr Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Leu Trp
<210> 120
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2072 LCDR1-FR2
<400> 120
Ser Ser Tyr Leu Gly Trp
1 5
<210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV2-2072 LCDR3-FR4
<400> 121

Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 122
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> MnC5t2p1_G1 FR2-HCDR2
<400> 122
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 123
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> MnC5t2p1_G1 HCDR3-FR4
<400> 123
Cys Ala Ala Pro Arg Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Gly Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> MnC5t2p1_G1 LCDR1-FR2
<400> 124
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> MnC5t2p1_G1 LCDR3-FR4
<400> 125
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10

<210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p2_C6 FR2-HCDR2
<400> 126
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 127
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p2_C6 HCDR3-FR4
<400> 127
Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Ser Thr Arg Cys Tyr Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 128
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p2_C6 LCDR1-FR2
<400> 128
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 129
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p2_C6 LCDR3-FR4
<400> 129
Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 130
<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p1_C6 FR2-HCDR2
<400> 130
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 131
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p1_C6 HCDR3-FR4
<400> 131
Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Ser Thr Ile Cys Tyr Asp Gly Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 132
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p1_C6 LCDR1-FR2
<400> 132
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 133
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HbnC3t1p1_C6 LCDR3-FR4
<400> 133
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> S2E12 FR2-HCDR2
<400> 134
Val Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 135
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> S2E12 HCDR3-FR4
<400> 135
Cys Ala Ser Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Ser Asp Gly Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 136
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> S2E12 LCDR1-FR2
<400> 136
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 137
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> S2E12 LCDR3-FR4
<400> 137
Gln Tyr Val Gly Leu Thr Gly Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV107_1 FR2-HCDR2

<400> 138
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 139
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV107_1 HCDR3-FR4
<400> 139
Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Ser Thr Ser Cys Phe Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 140
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV107_1 LCDR1-FR2
<400> 140
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV107_1 LCDR3-FR4
<400> 141
Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV107_2 FR2-HCDR2
<400> 142
Ile Gly Trp Ile Val

1 5

<210> 143

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV107_2 HCDR3-FR4

<400> 143

Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Ser Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile Trp

<210> 144

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV107_2 LCDR1-FR2

<400> 144

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV107_2 LCDR3-FR4

<400> 145

Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10

<210> 146

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> COV72 FR2-HCDR2

<400> 146

Ile Gly Trp Ile Val
1 5

<210> 147

<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV72 HCDR3-FR4
<400> 147
Cys Ala Ala Val Asp Cys Asn Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 148
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV72 LCDR1-FR2
<400> 148
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 149
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV72 LCDR3-FR4
<400> 149
Gln Tyr Asp Ile Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV21_1 FR2-HCDR2
<400> 150
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 151
<211> 18
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> COV21_1 HCDR3-FR4
<400> 151
Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Gly Gly Ser Cys Leu Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 152
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV21_1 LCDR1-FR2
<400> 152
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV21_1 LCDR3-FR4
<400> 153
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 154
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV21_2 FR2-HCDR2
<400> 154
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 155
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> COV21_2 HCDR3-FR4
<400> 155
Cys Ala Ala Pro His Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV21_2 LCDR1-FR2
<400> 156
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 157
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV21_2 LCDR3-FR4
<400> 157
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 158
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_1 FR2-HCDR2
<400> 158
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 159
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_1 HCDR3-FR4
<400> 159

Cys Ala Ala Asn His Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Gly Phe Asp
1 5 10 15
Ile Trp
<210> 160
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_1 LCDR1-FR2
<400> 160
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 161
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_1 LCDR3-FR4
<400> 161
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Met Phe Gly
1 5 10
<210> 162
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_2 FR2-HCDR2
<400> 162
Ile Gly Trp Ile Val
1 5
<210> 163
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_2 HCDR3-FR4
<400> 163
Cys Ala Ala Pro Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Asn Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile Trp
<210> 164
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_2 LCDR1-FR2
<400> 164
Ser Ser Tyr Leu Ala Trp
1 5
<210> 165
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COV57_2 LCDR3-FR4
<400> 165
Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
1 5 10
<210> 166
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP1重链
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (81)..(81)
<223> Xaa可以是Met、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (100)..(100)
<223> Xaa可以是Trp、Ser、Arg
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (101)..(101)
<223> Xaa可以是Asp、Arg、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性

<222> (102)..(102)
<223> Xaa可以是Leu、Arg、Ala
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (103)..(103)
<223> Xaa可以是Ala、Gly
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (104)..(104)
<223> Xaa可以是Tyr、Ile
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (107)..(107)
<223> Xaa可以是Val、Cys
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (108)..(108)
<223> Xaa可以是Val、Tyr、Thr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (109)..(109)
<223> Xaa可以是Gly、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (110)..(110)
<223> Xaa可以是Asp、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (111)..(111)
<223> Xaa可以是Cys、Ala
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (112)..(112)
<223> Xaa可以是Ser、Thr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (113)..(113)
<223> Xaa可以是Arg、His、Ala
<400> 166

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

<210> 167
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP2重链
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可以是Gln、Pro
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (4)..(4)
<223> Xaa可以是Leu、Arg
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (34)..(34)
<223> Xaa可以是Met、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (100)..(100)
<223> Xaa可以是Gly、Asn、Asp、Gln、Thr、Ser、Leu、Arg

<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (101)..(101)
<223> Xaa可以是Pro、Gly、Leu、Ser、Val、Lys、Ala
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (102)..(102)
<223> Xaa可以是Ser、Gly、Ile、Val、Arg、Pro、Ala、Met
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (103)..(103)
<223> Xaa可以是Tyr、Leu、Ile、Arg、Asn、Ala
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (104)..(104)
<223> Xaa可以是Cys、Ser、Val、Tyr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (105)..(105)
<223> Xaa可以是Ser、Arg、Val、Tyr、Met
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (106)..(106)
<223> Xaa可以是Ser、Gly、Val、Cys
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (107)..(107)
<223> Xaa可以是Gly、Thr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (108)..(108)
<223> Xaa可以是Ser、Gly、Val、Thr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (109)..(109)
<223> Xaa可以是Cys、Ala、Thr、Asp
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (110)..(110)

<223> Xaa可以是Tyr、Arg、Phe、Pro、Thr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (111)..(111)
<223> Xaa可以是Ala、Pro、Gly、Val、Cys、Arg
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (112)..(112)
<223> Xaa可以是Asp、Thr、Ser、Asn、Leu、Ile、Tyr、Pro
<400> 167

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

<210> 168
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP3重链
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可以是Gln、Pro
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (34)..(34)

<223> Xaa可以是Met或Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (35)..(35)
<223> Xaa可以是Gln、Arg
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (43)..(43)
<223> Xaa可以是Gln、Arg
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (100)..(100)
<223> Xaa可以是Tyr、Pro、Ala、Arg、Gly
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (101)..(101)
<223> Xaa可以是Glu、Leu、Pro、Tyr、Ser
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (102)..(102)
<223> Xaa可以是Gly、Val、Ser、Cys、Tyr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (103)..(103)
<223> Xaa可以是Cys、Asp、Val、Gln、Thr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (104)..(104)
<223> Xaa可以是Gly、Asn
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (106)..(106)
<223> Xaa可以是Asp、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (108)..(108)
<223> Xaa可以是Tyr、Ala、His
<220>
<221> 尚未归类的特性

<222> (109)..(109)
<223> Xaa可以是Thr、Gln、Ser
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (110)..(110)
<223> Xaa可以是Val、His
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (111)..(111)
<223> Xaa可以是Thr、Arg
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (112)..(112)
<223> Xaa可以是Ala、Pro
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (113)..(113)
<223> Xaa可以是Leu、Phe、Ala、Gly、Asn
<400> 168

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

<210> 169
<211> 106
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> CORD重链
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (19)..(19)
<223> Xaa可以是Arg、Leu
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是Val、Glu、Gly
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (79)..(79)
<223> Xaa可以是Pro、Gly或His
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (80)..(80)
<223> Xaa可以是Cys、Ile、Tyr
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (81)..(81)
<223> Xaa可以是Ser、Cys、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (85)..(85)
<223> Xaa可以是Cys、Ser、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (86)..(86)
<223> Xaa可以是Tyr、Ser、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (87)..(87)
<223> Xaa可以是Ser、Thr、Val
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (88)..(88)
<223> Xaa可以是Tyr、Ala、Ser

<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (89)..(89)
<223> Xaa可以是Ser、Ala、Cys
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (90)..(90)
<223> Xaa可以是Asp、Tyr
<400> 169

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

<210> 170
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP1轻链
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (97)..(97)
<223> Xaa可以是Pro、Leu、Ser、Thr
<400> 170

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

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

<210> 171
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP2轻链
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (97)..(97)
<223> Xaa可以是Pro、Leu、Ser、Thr
<400> 171
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Xaa Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 172
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> HIP3轻链
<220>
<221> 尚未归类的特性
<222> (97)..(97)
<223> Xaa可以是Pro、Leu、Ser、Thr
<400> 172

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

<210> 173
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP1轻链
<400> 173

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 174
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP1轻链
<400> 174

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

<210> 175
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP1轻链
<400> 175

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

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

<210> 176
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP1轻链
<400> 176
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ser
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 177
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP1轻链
<400> 177
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

<210> 178
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP2轻链
<400> 178

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

<210> 179
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP2轻链
<400> 179

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

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

<210> 180
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP2轻链
<400> 180
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 181
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP2轻链
<400> 181

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

<210> 182
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP2轻链
<400> 182

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

<210> 183
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIP3轻链
<400> 183

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

<210> 184
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP3轻链
<400> 184

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

<210> 185

<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP3轻链
<400> 185

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

<210> 186
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP3轻链
<400> 186

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 187
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HIP3轻链
<400> 187

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

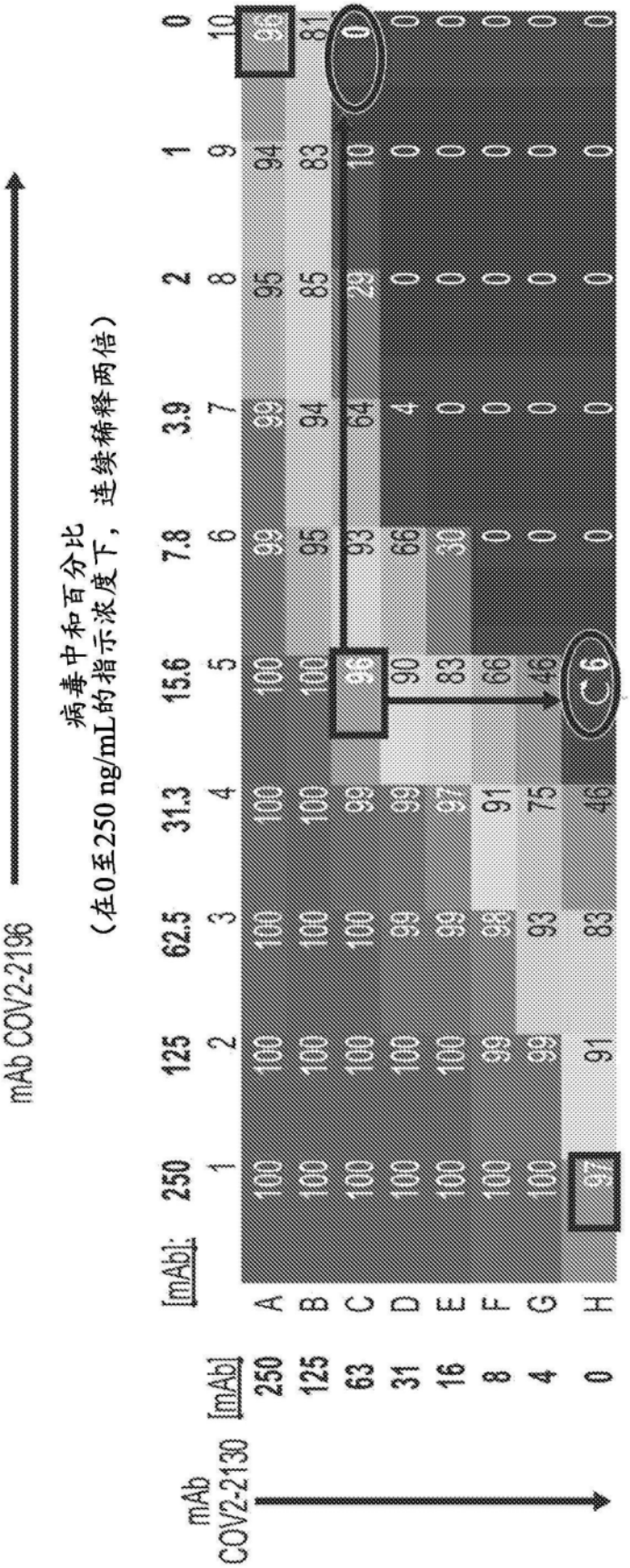

mAb COV2-2196
病毒中和百分比
（在0至250 ng/mL的指示浓度下，连续稀释两倍）
[mAb]: 250 125 62.5 31.3 15.6 7.8 3.9 2 1 0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
A 100 100 100 100 100 99 99 95 94 96
B 100 100 100 100 100 95 94 85 83 81
C 100 100 100 99 96 93 64 29 10 0
D 100 100 99 99 90 66 4 0 0 0
E 100 100 99 97 83 30 0 0 0 0
F 100 99 98 91 66 0 0 0 0 0
G 100 99 93 75 46 0 0 0 0 0
H 97 91 83 46 C6 0 0 0 0 0
mAb COV2-2130 [mAb]
250
125
63
31
16
8
4
0

图1

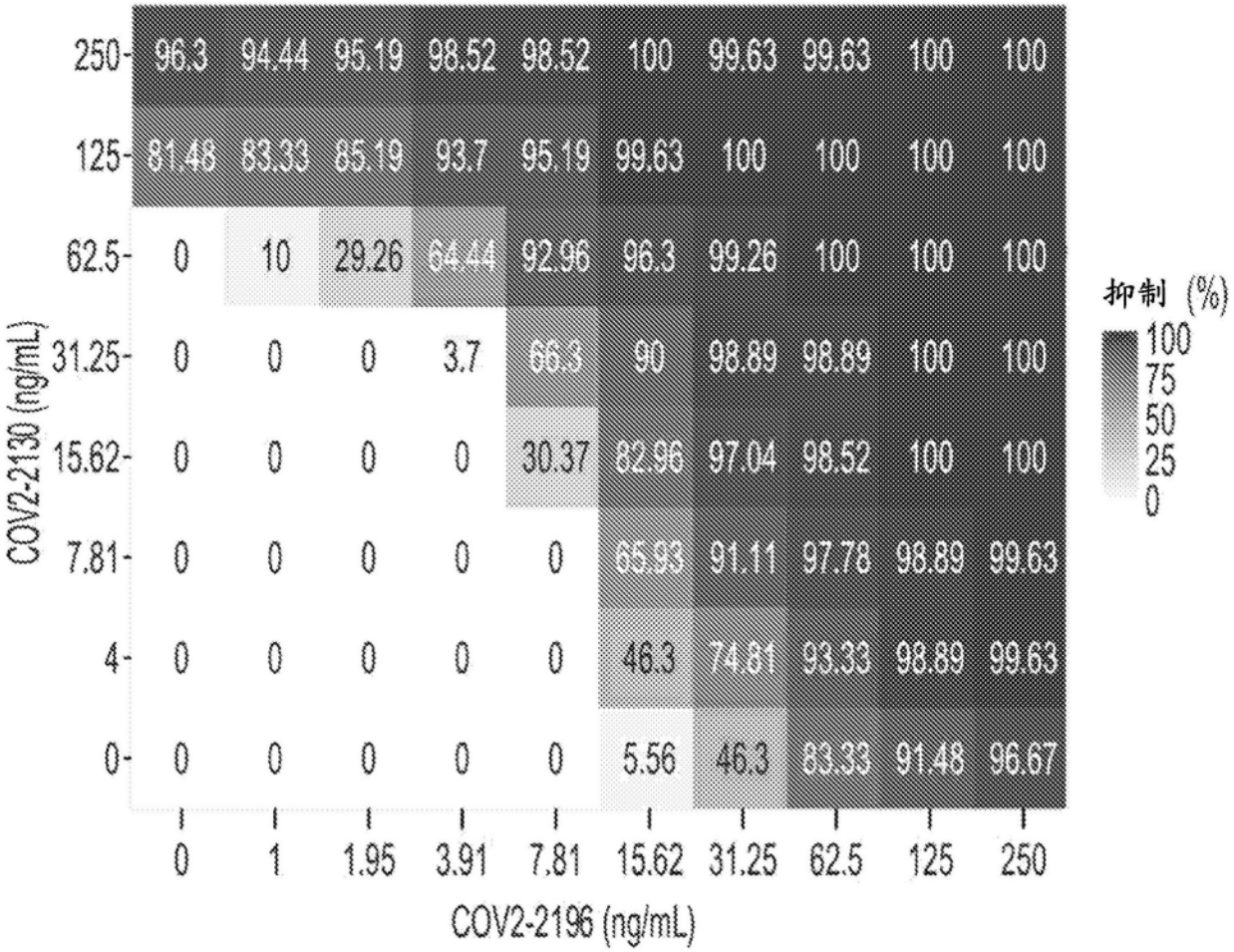

250 96.3 94.44 95.19 98.52 98.52 100 99.63 99.63 100 100
125 81.48 83.33 85.19 93.7 95.19 99.63 100 100 100 100
62.5 0 10 29.26 64.44 92.96 96.3 99.26 100 100 100
31.25 0 0 0 3.7 66.3 90 98.89 98.89 100 100
15.62 0 0 0 0 30.37 82.96 97.04 98.52 100 100
7.81 0 0 0 0 0 65.93 91.11 97.78 98.89 99.63
4 0 0 0 0 0 46.3 74.81 93.33 98.89 99.63
0 0 0 0 0 0 5.56 46.3 83.33 91.48 96.67
COV2-2130 (ng/mL)
0 1 1.95 3.91 7.81 15.62 31.25 62.5 125 250
COV2-2196 (ng/mL)
抑制 (%)
100
75
50
25
0

图2A

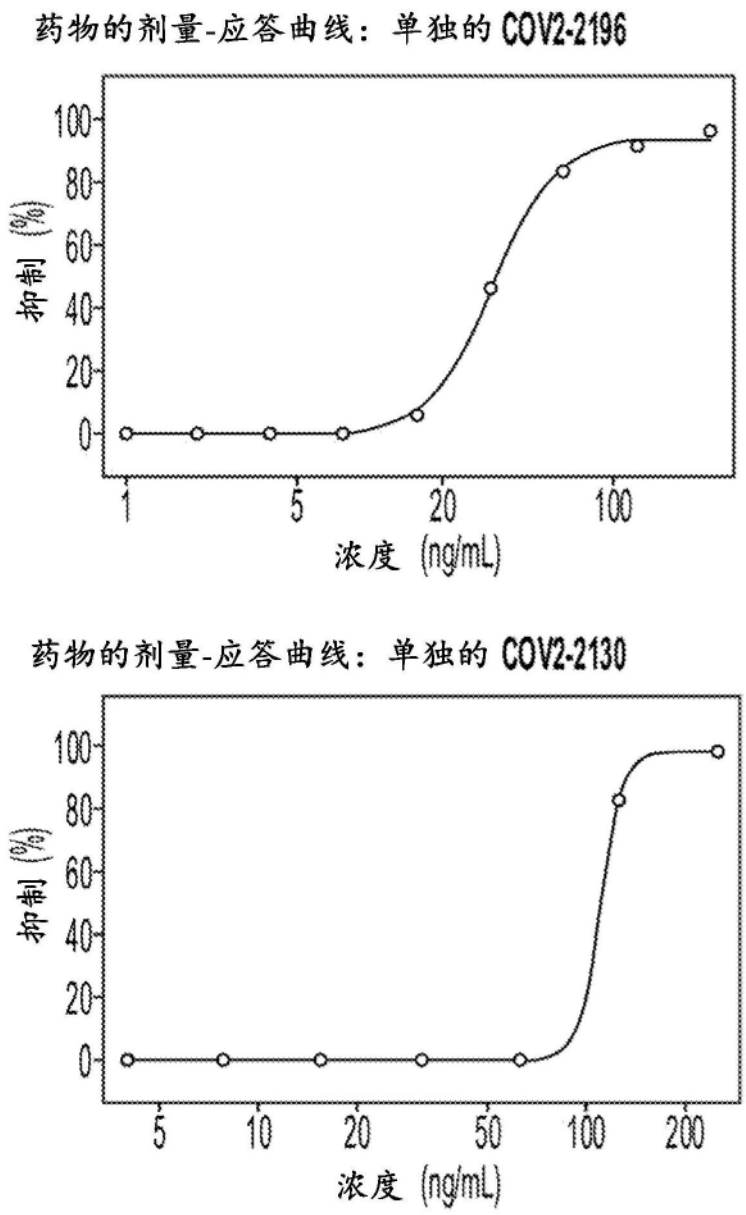

药物的剂量-应答曲线：单独的 COV2-2196
抑制 (%)
100
80
60
40
20
0
1
5
20
100
浓度 (ng/mL)
药物的剂量-应答曲线：单独的 COV2-2130
抑制 (%)
100
80
60
40
20
0
5
10
20
50
100
200
浓度 (ng/mL)

图2B

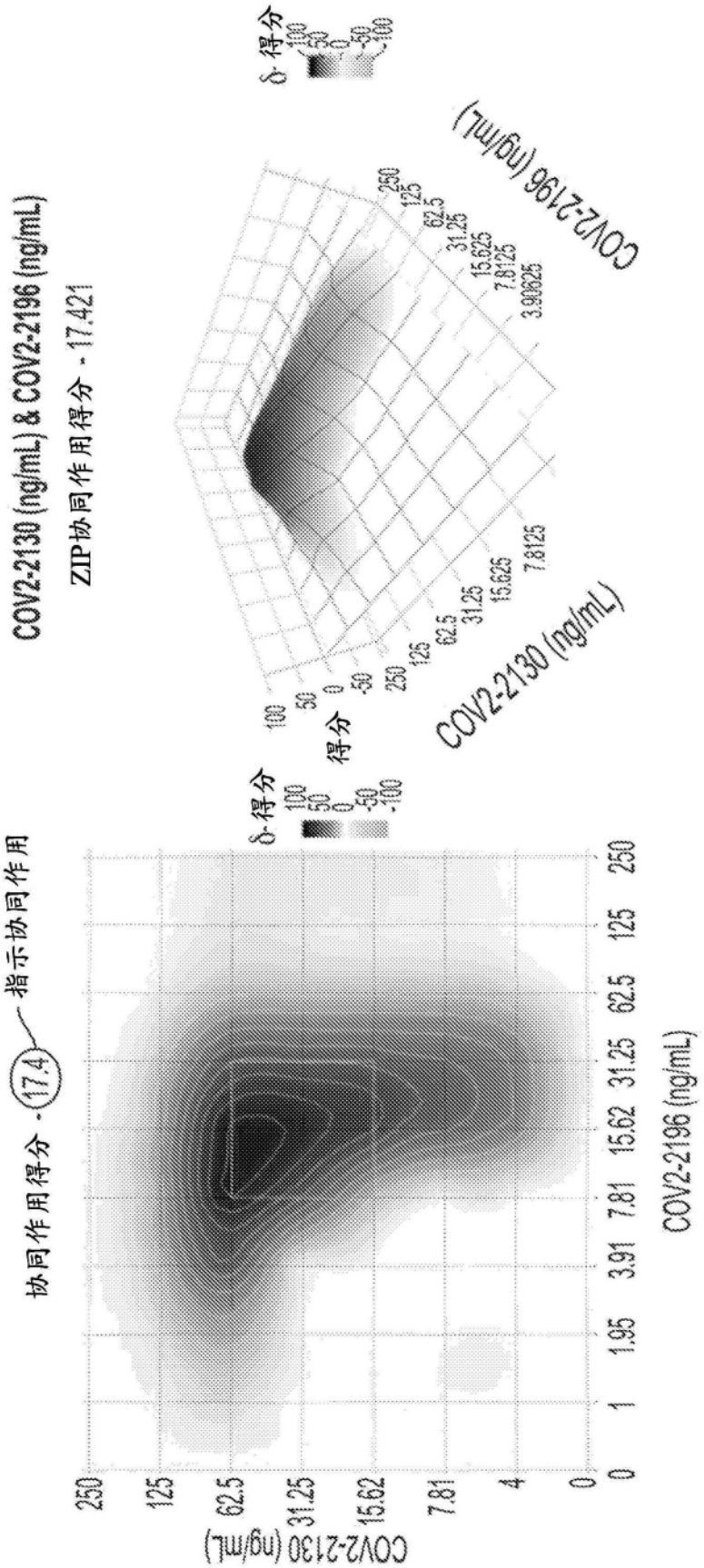

COV2-2130 (ng/mL) & COV2-2196 (ng/mL)
ZIP协同作用得分 - 17.421
δ-得分
100
50
0
-50
-100
得分
COV2-2130 (ng/mL)
COV2-2196 (ng/mL)
协同作用得分 - (17.4) 指示协同作用
250
125
62.5
31.25
15.62
7.81
4
0
1
1.95
3.91
7.81
15.62
31.25
62.5
125
250

图3

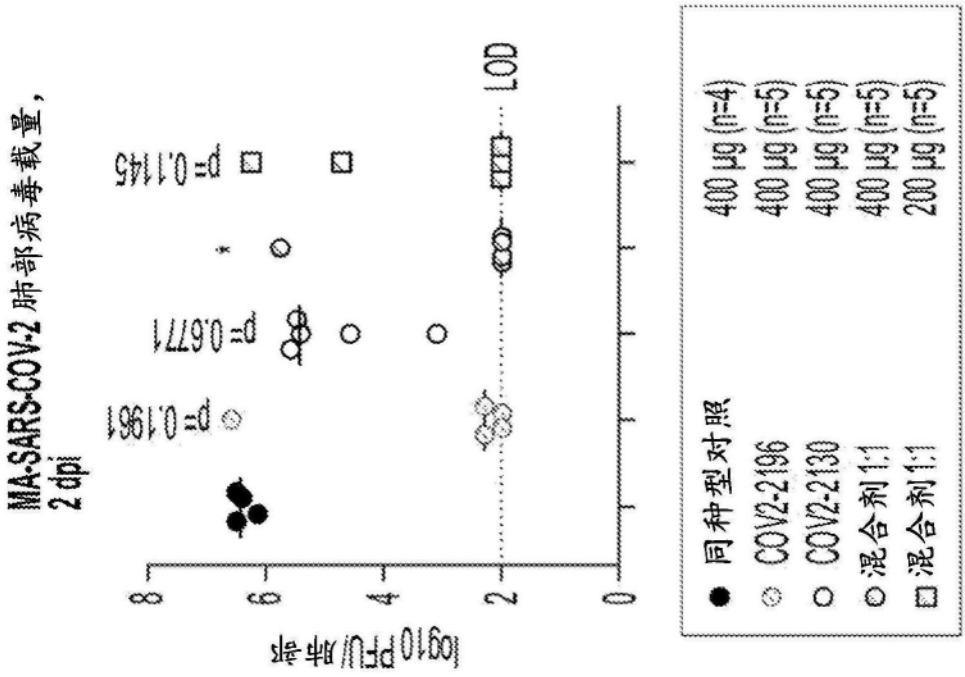

MA-SARS-COV-2 肺部病毒载量，
2 dpi
log10 PFU/ 肺部
LOD
p= 0.1361
p= 0.6771
p= 0.1145
同种型对照 400 μg (n=4)
COV2-2196 400 μg (n=5)
COV2-2130 400 μg (n=5)
混合剂 1:1 400 μg (n=5)
混合剂 1:1 200 μg (n=5)

图4A

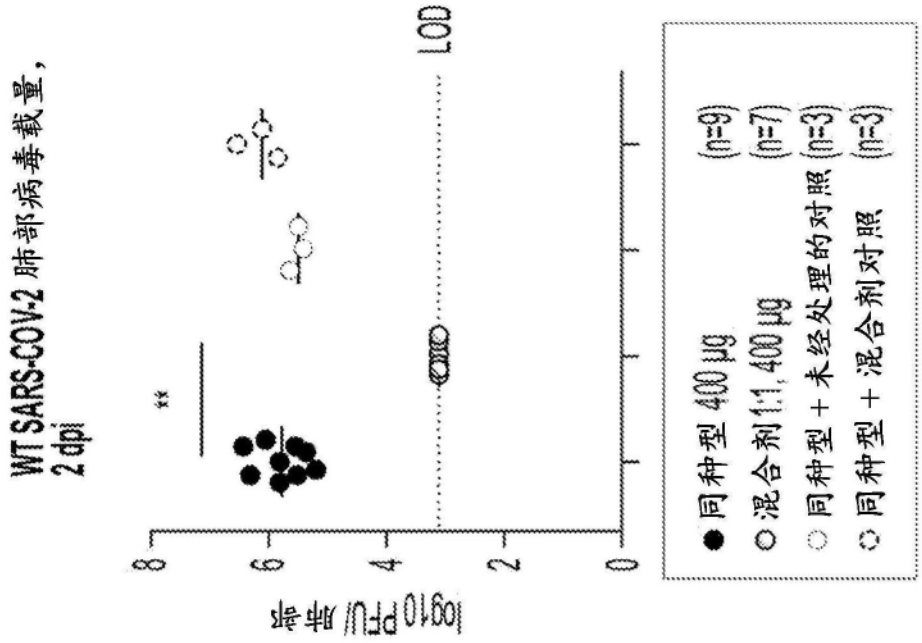

WT SARS-COV-2 肺部病毒载量，
2 dpi
log10 PFU/ 肺部
LOD
同种型 400 μg (n=9)
混合剂 1:1, 400 μg (n=7)
同种型 + 未经处理的对照 (n=3)
同种型 + 混合剂对照 (n=3)

图4B

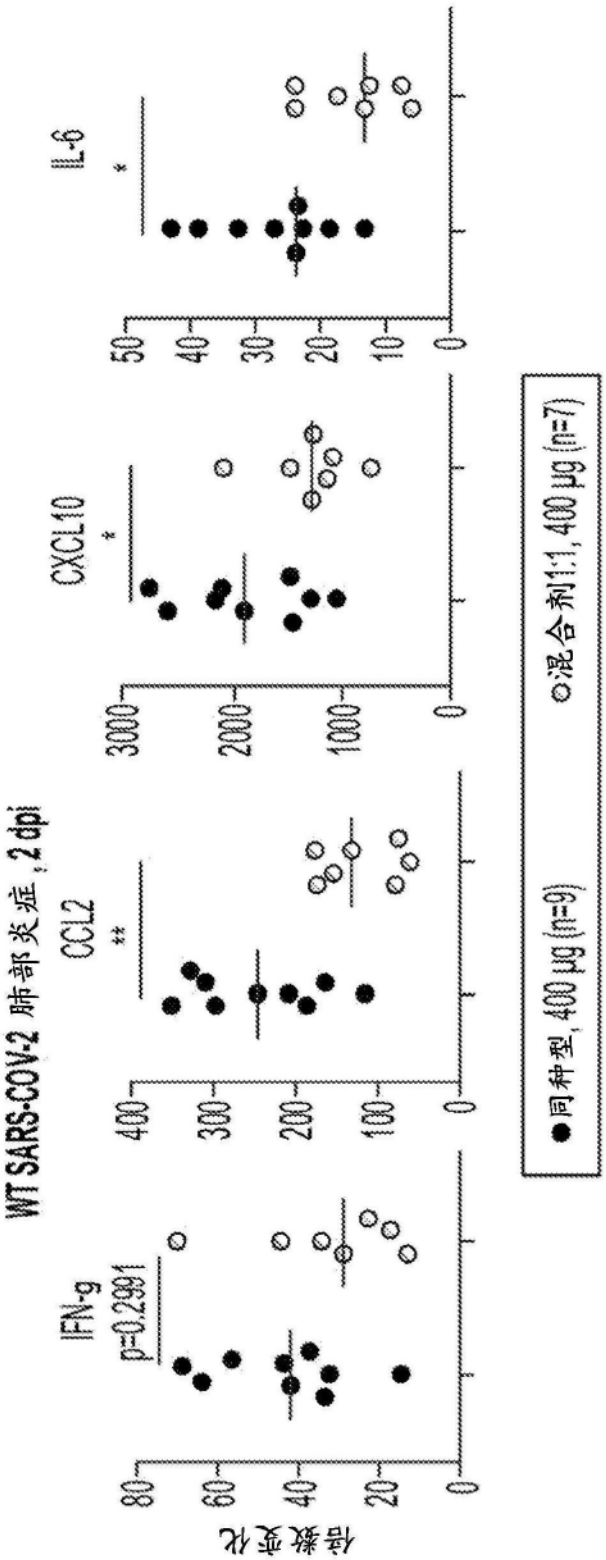

WT SARS-COV-2 肺部炎症，2 dpi
IFN-g
p=0.2991
CCL2
**
CXCL10
*
IL-6
*
倍数变化
●同种型，400 μg (n=9)
○混合剂1:1，400 μg (n=7)

图4C

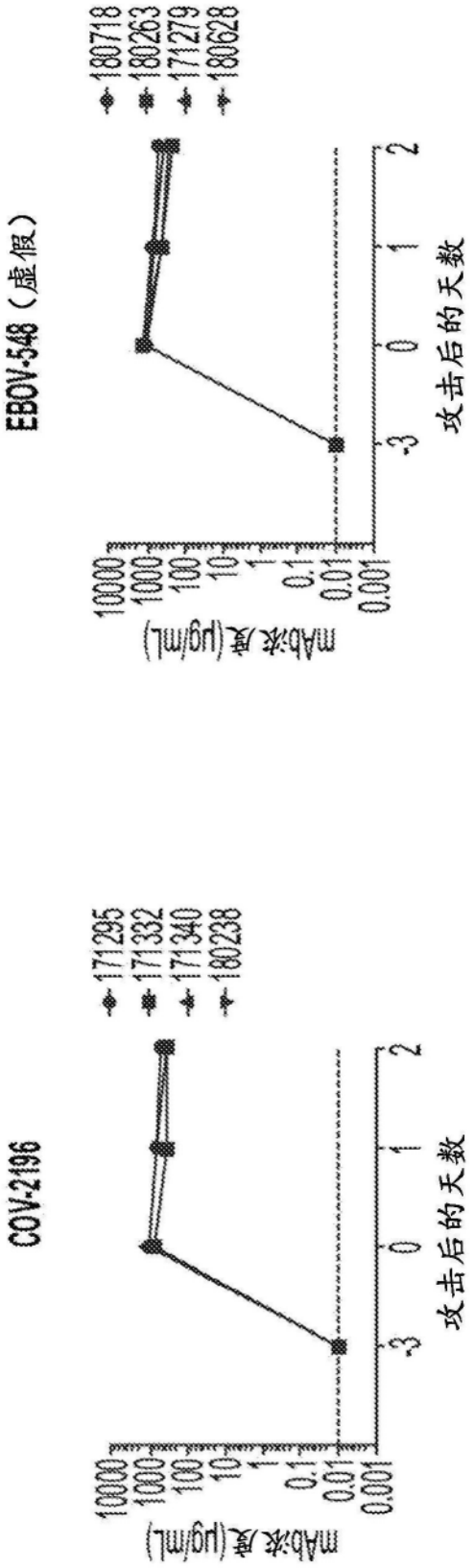

EBOV-548（虚假）
180718
180263
171279
180628
mAb浓度(μg/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
-3
0
1
2
攻击后的天数
COV-2196
171295
171332
171340
180238
mAb浓度(μg/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
-3
0
1
2
攻击后的天数

图5

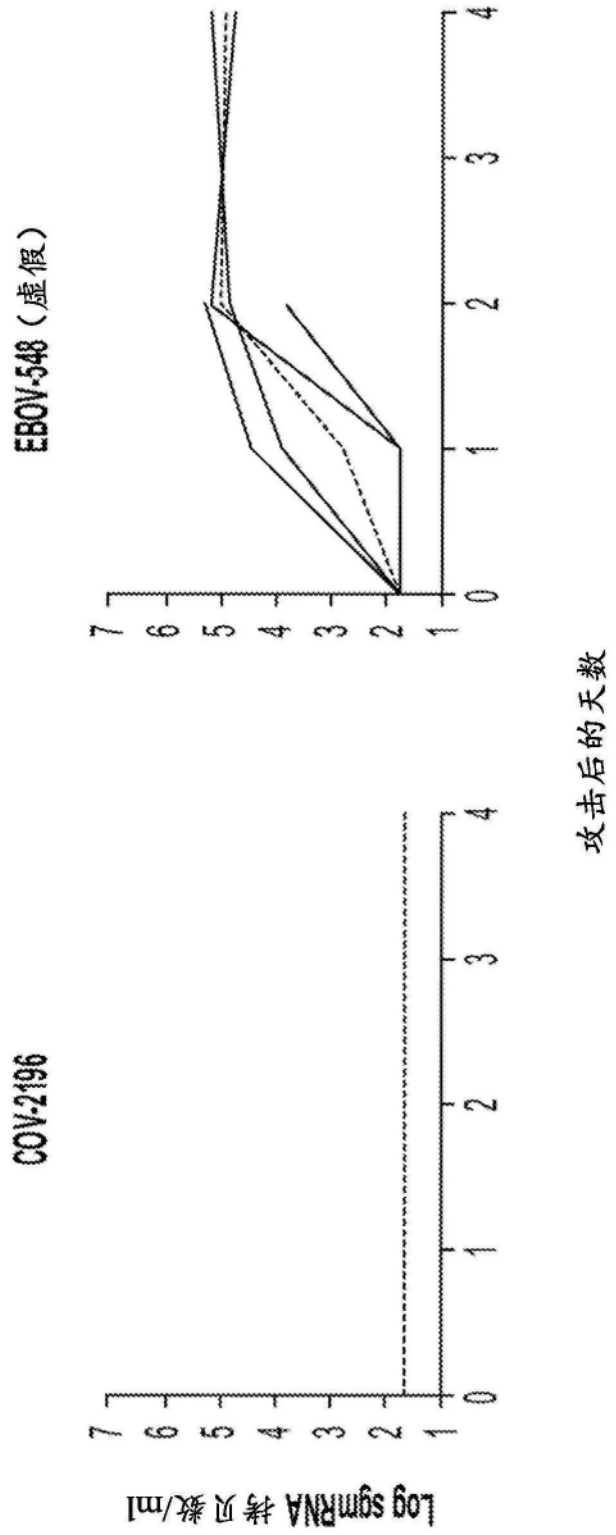


图6

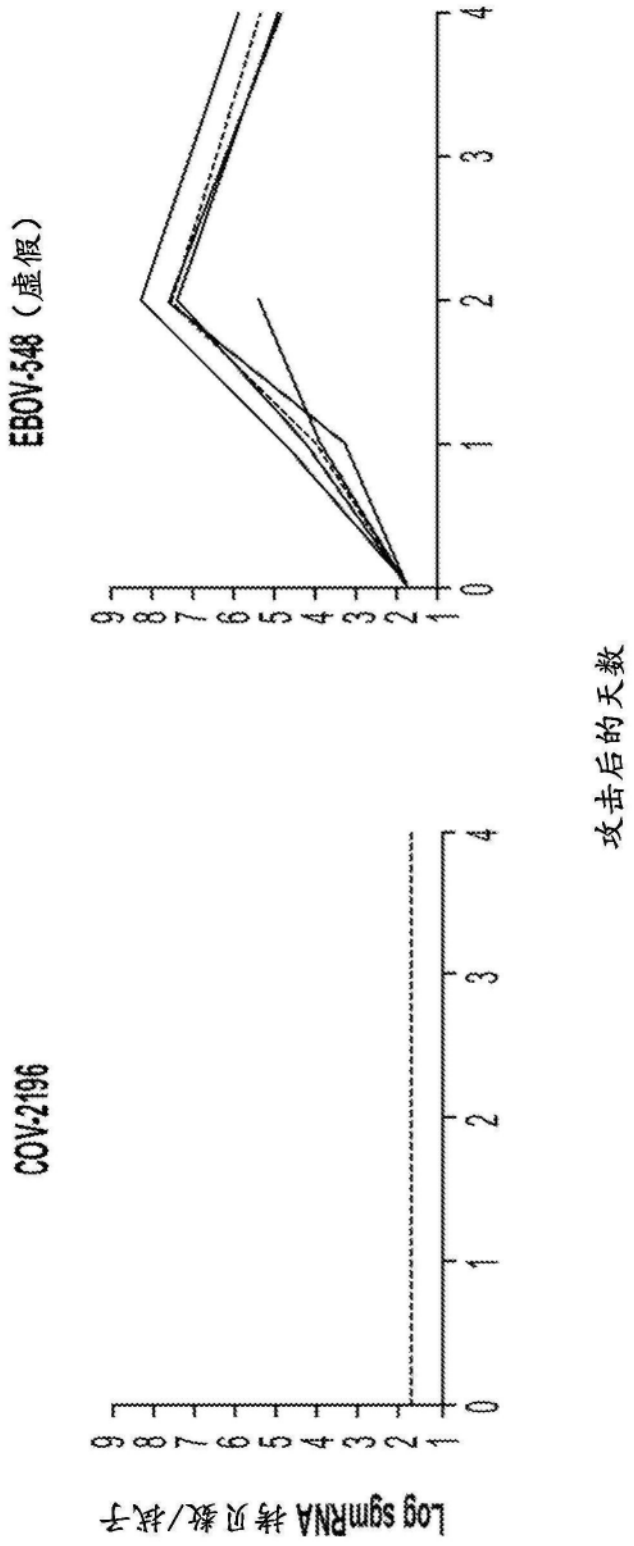

EBOV-548（虚假）
COV-2196
Log sgmRNA 拷贝数/拭子
攻击后的天数
0
1
2
3
4
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图7

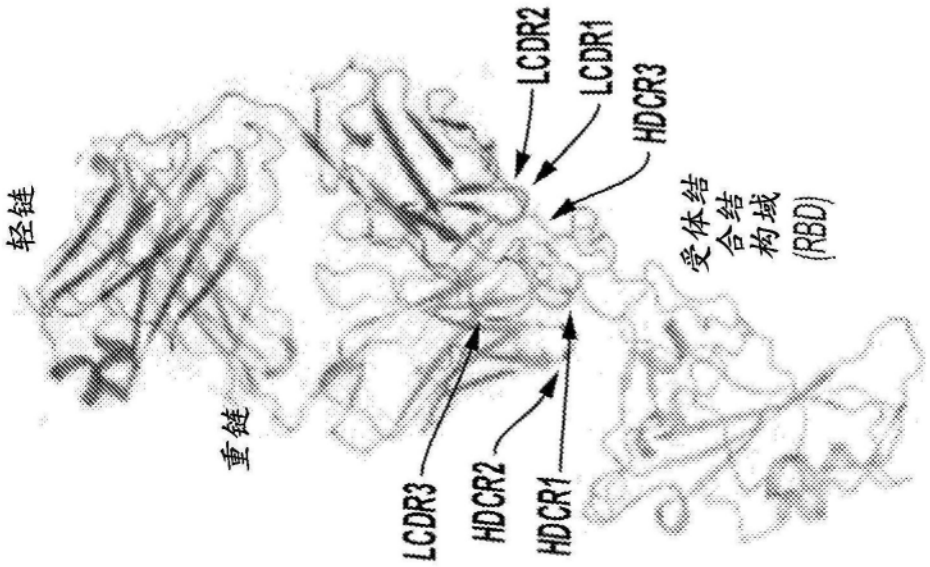

轻链
重链
LCDR2
LCDR1
HDCR3
受体结合构域(RBD)
LCDR3
HDCR2
HDCR1

图8A

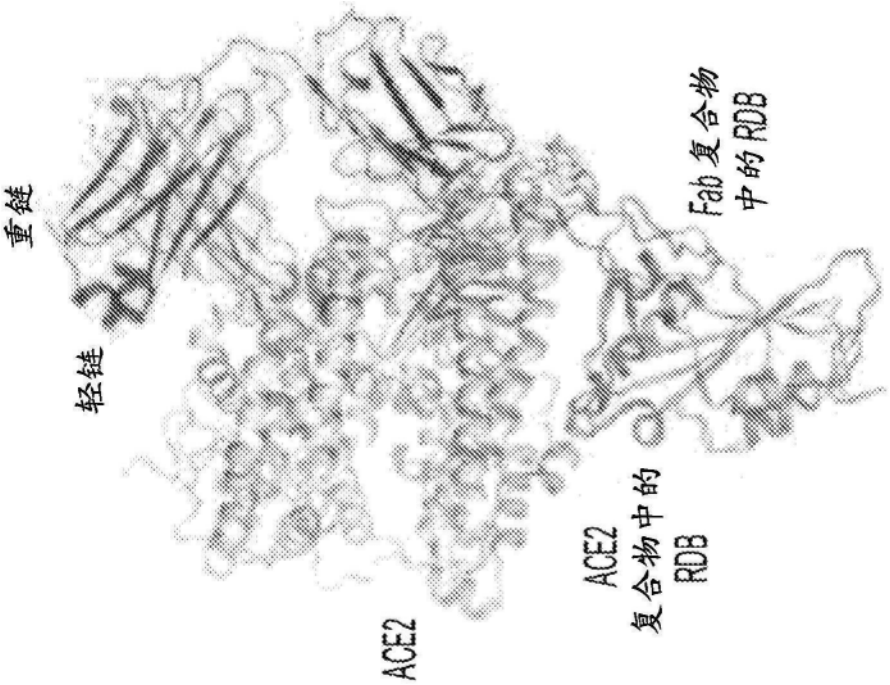

重链
轻链
Fab复合物中的RDB
ACE2复合物中的RDB
ACE2

图8B

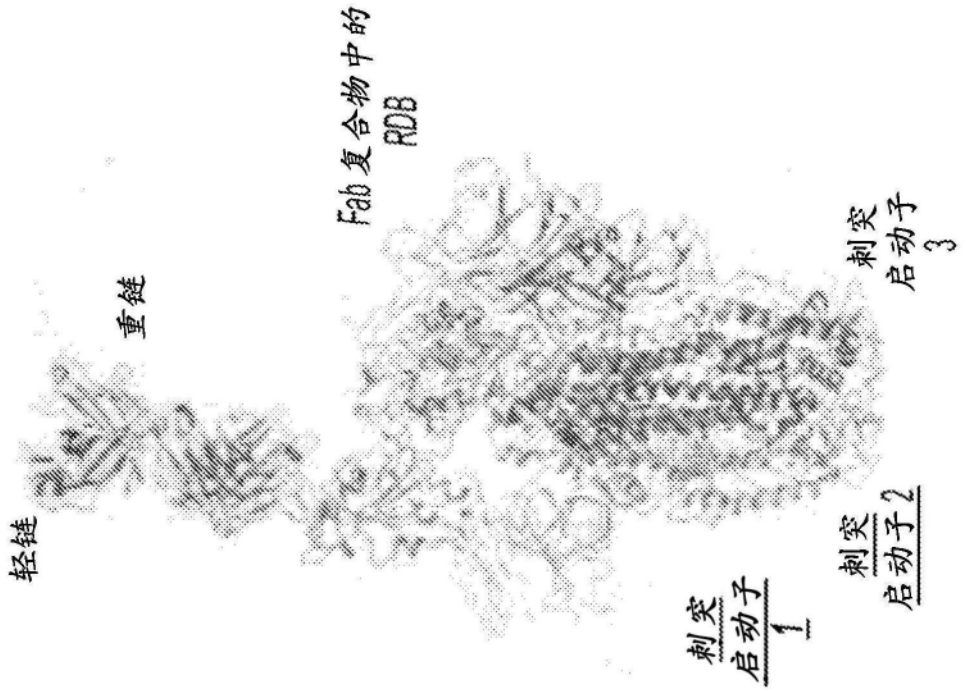

轻链
重链
Fab 复合物中的
RDB
刺突
启动子
1
刺突
启动子 2
刺突
启动子
3

图8C

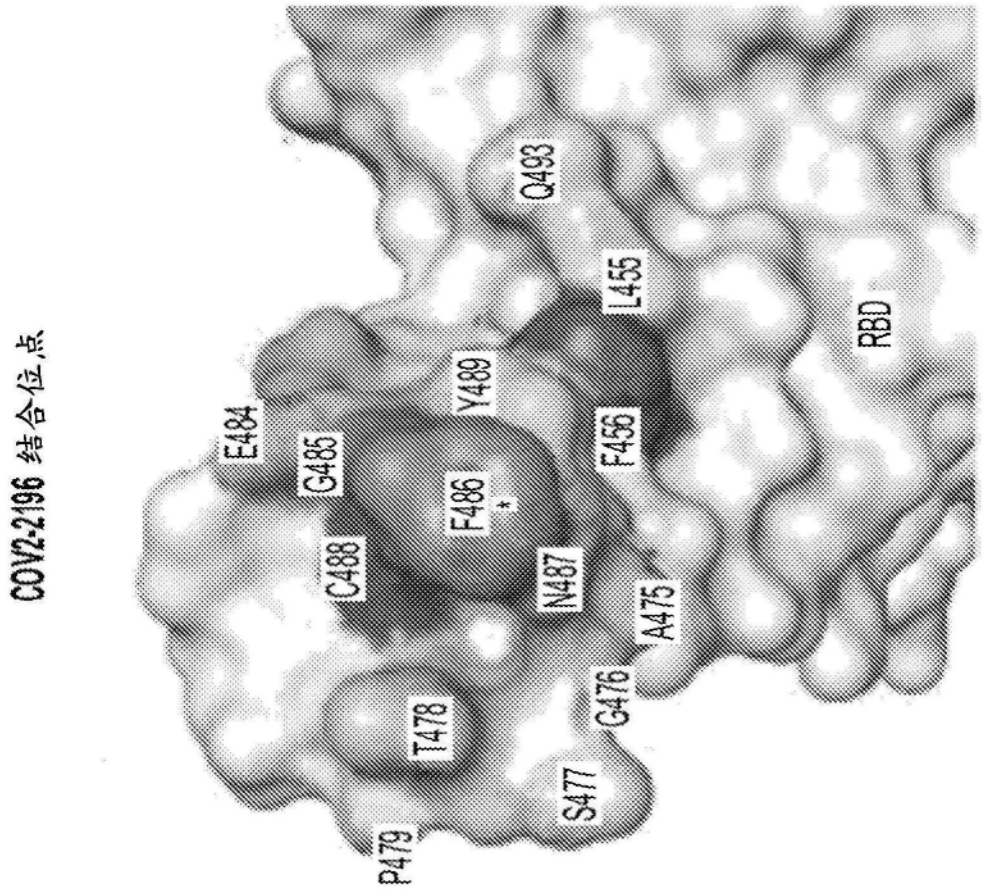

COV2-2196 结合位点
E484
G485
C488
F486
Y489
Q493
L455
F456
N487
A475
G476
T478
S477
P479
RBD

图8D

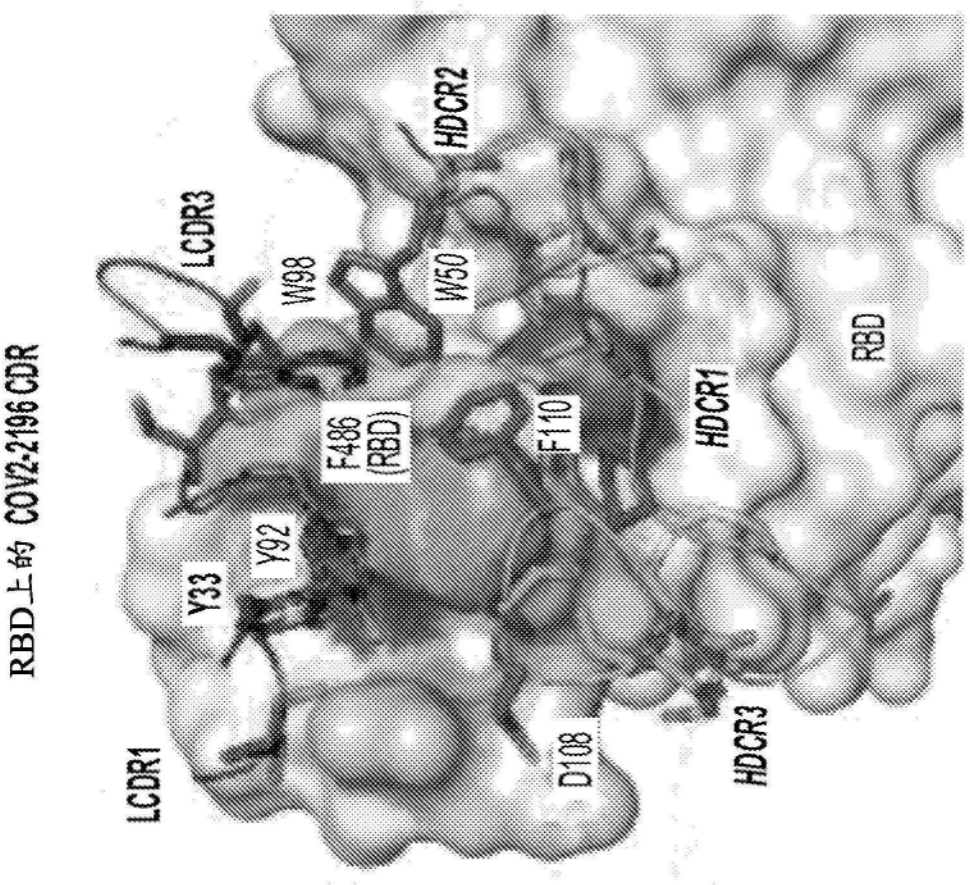

RBD上的 COV2-2196 CDR
LCDR3
W98
HDCR2
W50
RBD
F486 (RBD)
F110
HDCR1
Y92
Y33
LCDR1
D108
HDCR3

图8E

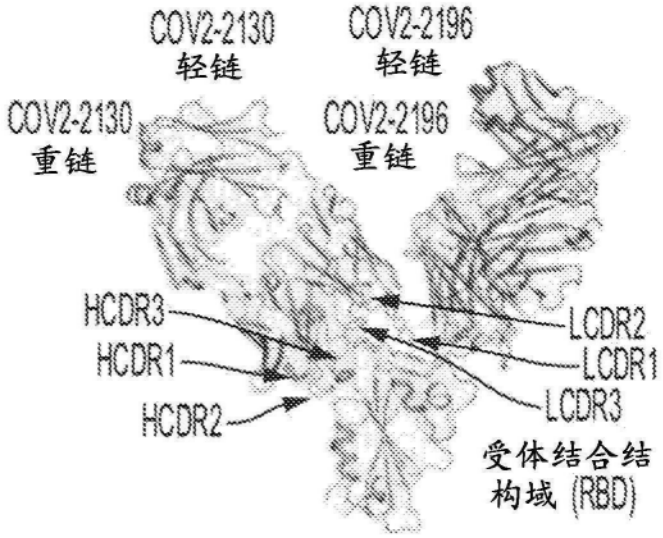

COV2-2130 轻链
COV2-2196 轻链
COV2-2130 重链
COV2-2196 重链
HCDR3
HCDR1
HCDR2
LCDR2
LCDR1
LCDR3
受体结合结构域 (RBD)

图9A

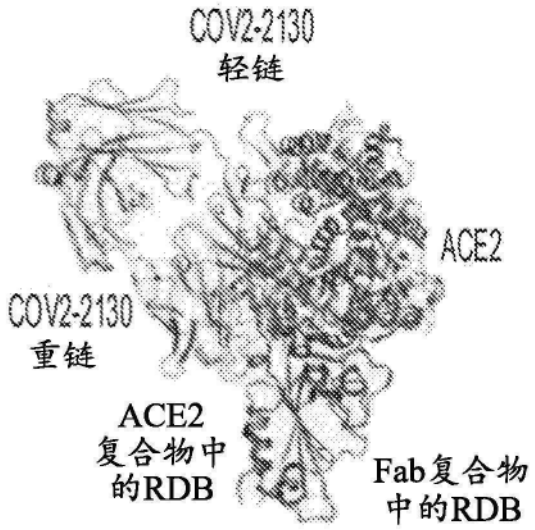

COV2-2130
轻链
ACE2
COV2-2130
重链
ACE2
复合物中
的RDB
Fab复合物
中的RDB

图9B

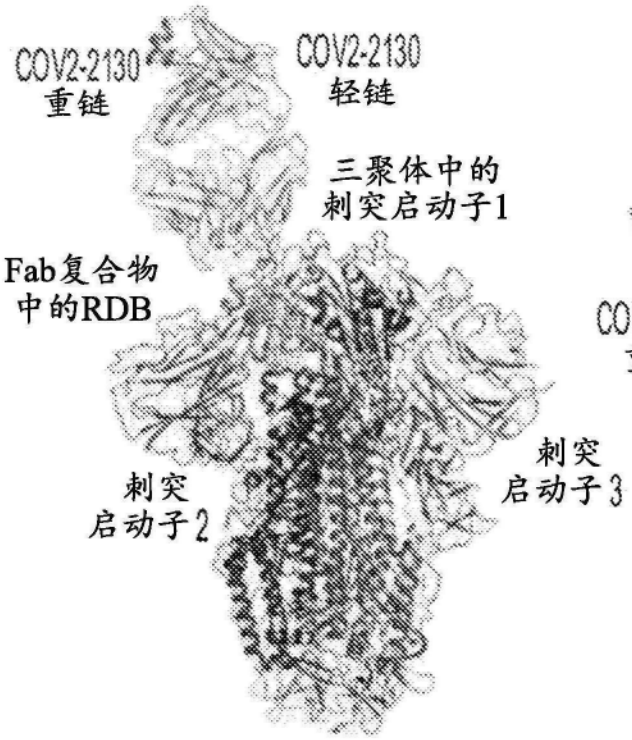

COV2-2130
重链
COV2-2130
轻链
三聚体中的
刺突启动子1
Fab复合物
中的RDB
刺突
启动子2
刺突
启动子3

图 9C

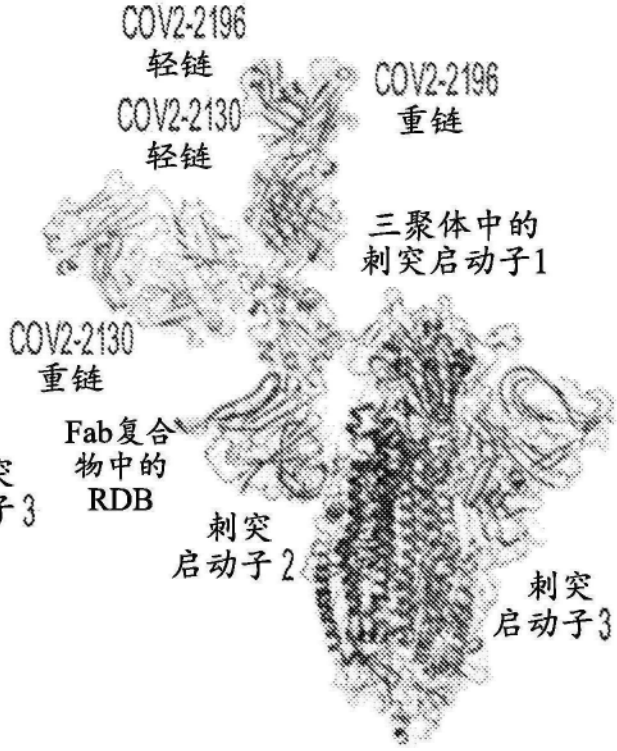

COV2-2196
轻链
COV2-2196
重链
COV2-2130
轻链
三聚体中的
刺突启动子1
COV2-2130
重链
Fab复合
物中的
RDB
刺突
启动子2
刺突
启动子3

图 9D

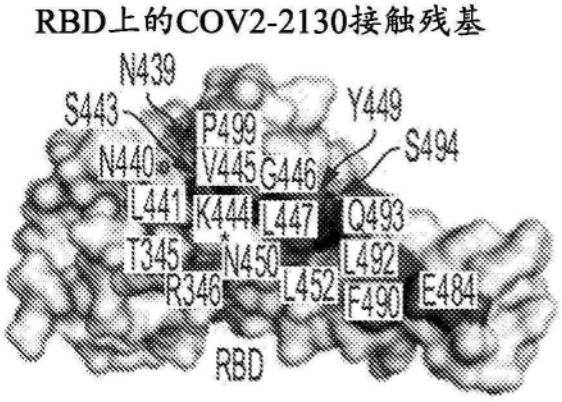

RBD上的COV2-2130接触残基
N439
S443
P499
Y449
N440
V445
G446
S494
L441
K444
L447
Q493
T345
N450
L492
R346
L452
F490
E484
RBD

图9E

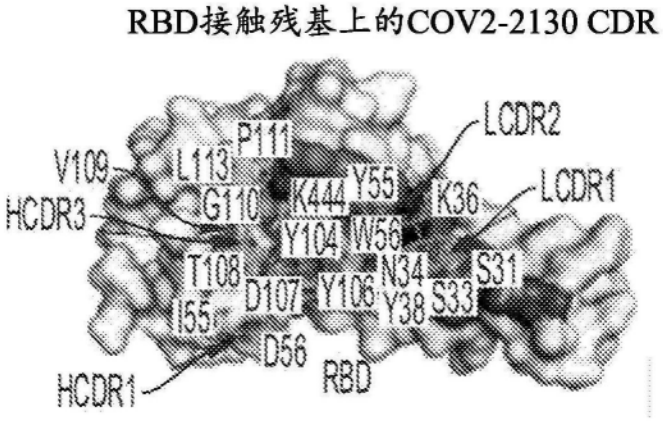

RBD接触残基上的COV2-2130 CDR
P111
LCDR2
V109
L113
Y55
HCDR3
G110
K444
K36
LCDR1
Y104
W56
T108
N34
S31
D107
Y106
Y38
S33
I55
D56
HCDR1
RBD

图9F

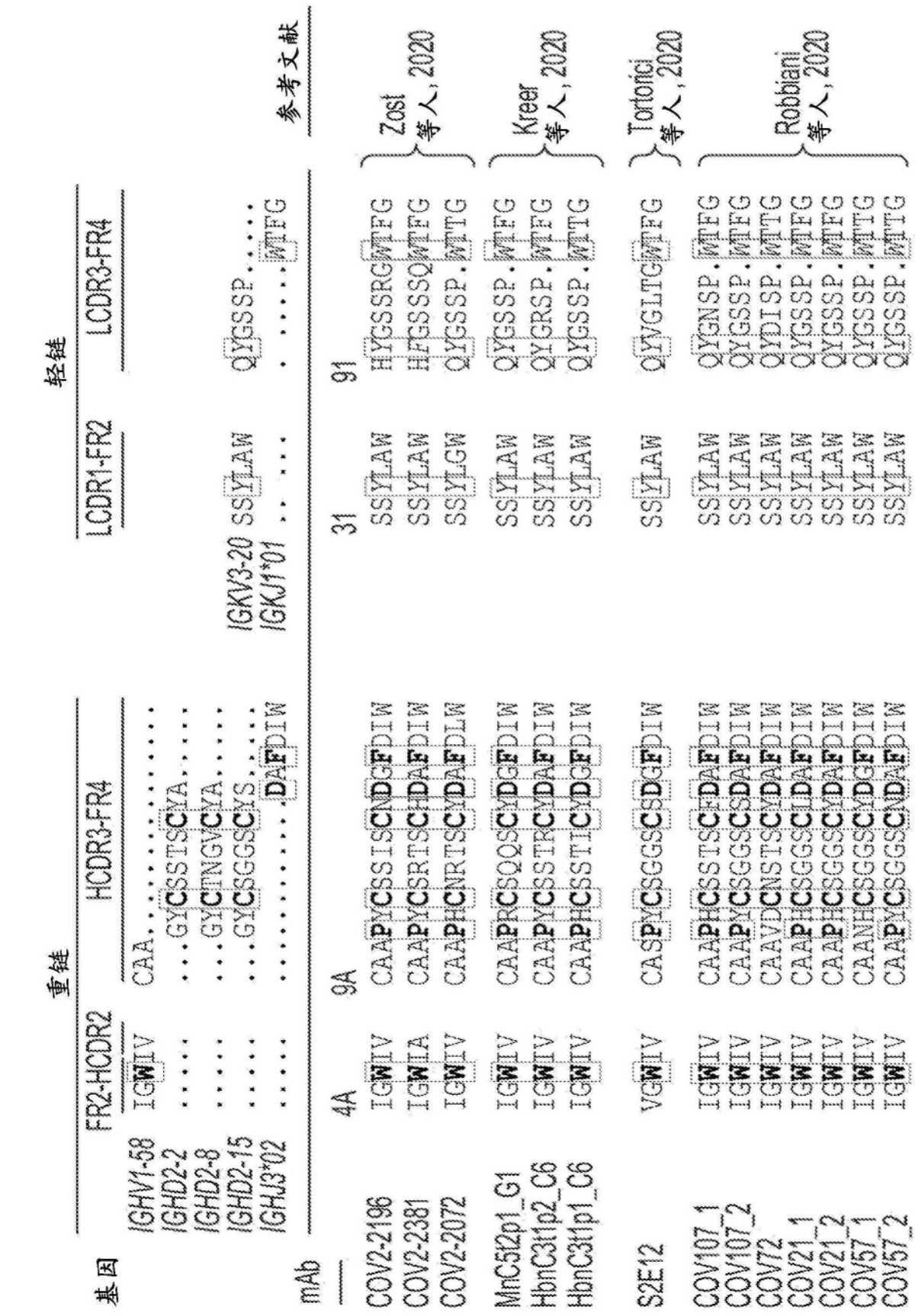

重链
轻链
基因
FR2-HCDR2
HCDR3-FR4
LCDR1-FR2
LCDR3-FR4
参考文献
IGHV1-58
IGHD2-2
IGHD2-8
IGHD2-15
IGHJ3*02
IGKV3-20
IGKJ1*01
mAb
4A
9A
31
91
COV2-2196
COV2-2381
COV2-2072
MnC5l2p1_G1
HbnC3l1p2_C6
HbnC3l1p1_C6
S2E12
COV107_1
COV107_2
COV72
COV21_1
COV21_2
COV57_1
COV57_2
Zost 等人, 2020
Kreer 等人, 2020
Tortorici 等人, 2020
Robbiani 等人, 2020

图10A

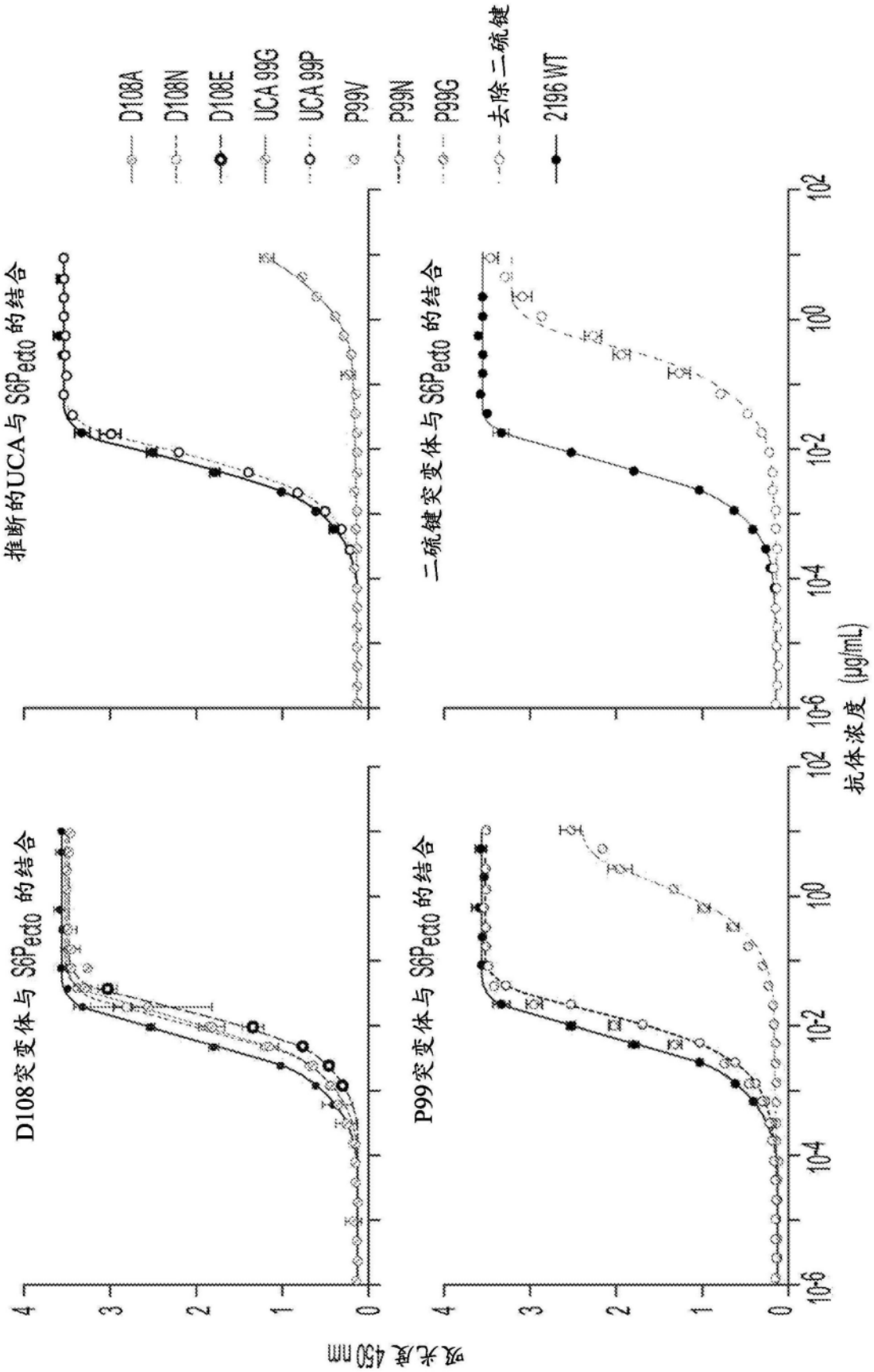

D108A
D108N
D108E
UCA 99G
UCA 99P
P99V
P99N
P99G
去除二硫键
2196 WT
推断的UCA与 S6Pecto 的结合
二硫键突变体与 S6Pecto 的结合
D108突变体与 S6Pecto 的结合
P99突变体与 S6Pecto 的结合
双光波 450 nm
抗体浓度 (μg/mL)

图10B

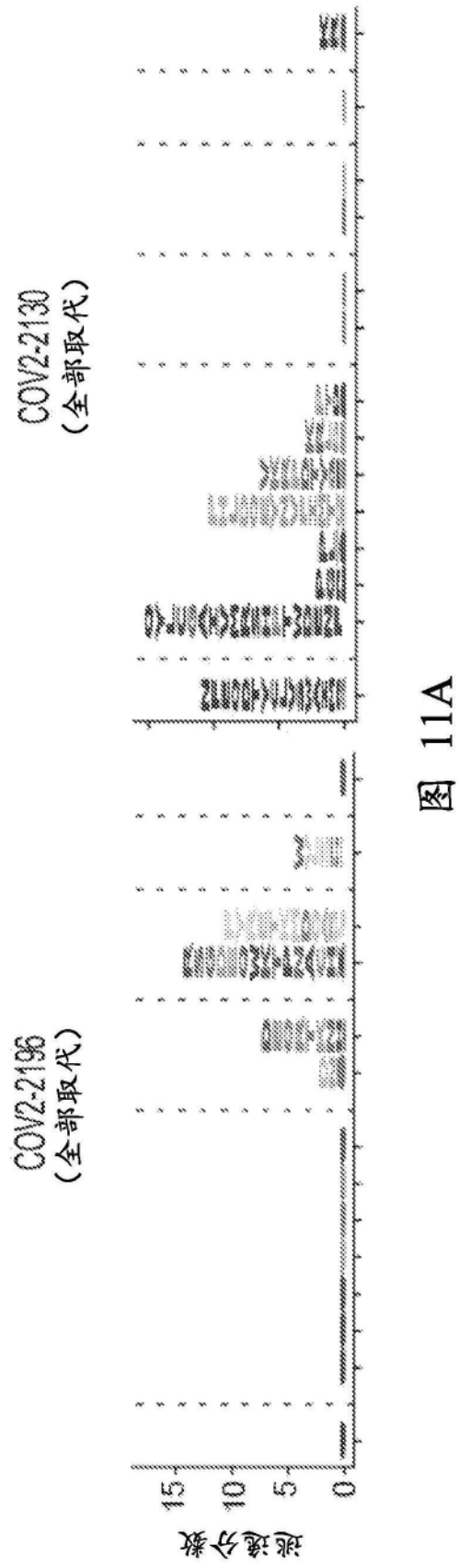

COV2-2196
(全部取代)
COV2-2130
(全部取代)
逃逸分数
15
10
5
0

图 11A

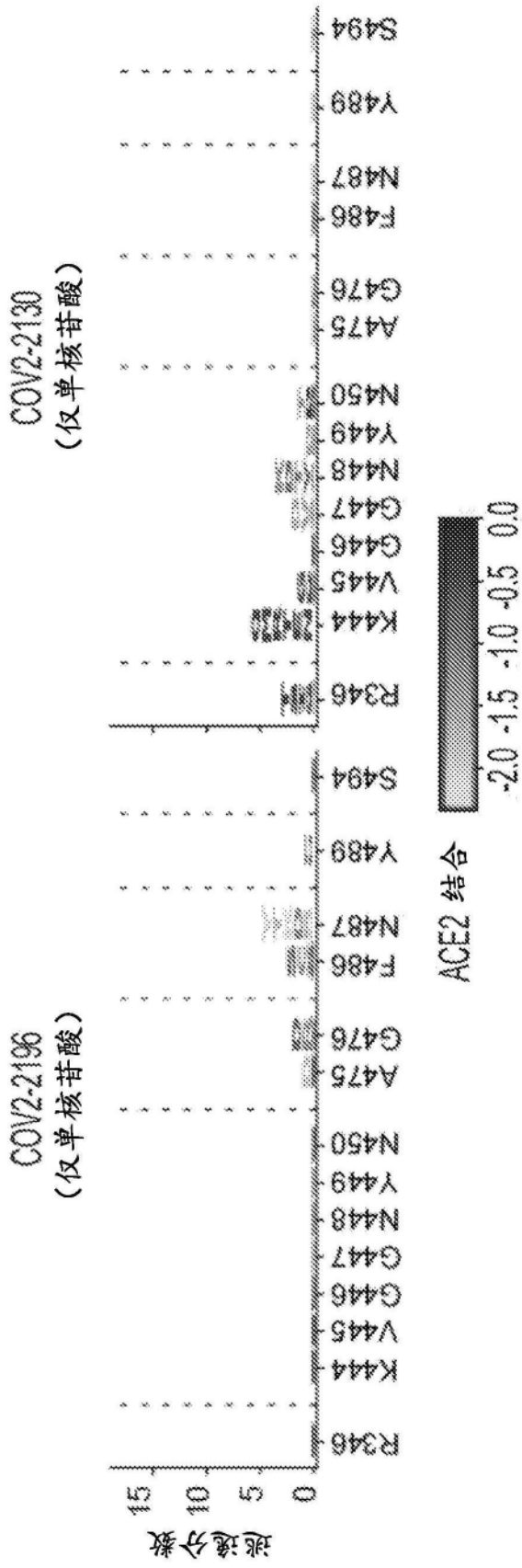

COV2-2196
(仅单核苷酸)
COV2-2130
(仅单核苷酸)
逃逸分数
15
10
5
0
R346
K444
V445
G446
G447
N448
Y449
N450
A475
G476
F486
N487
Y489
S494
ACE2 结合
-2.0 -1.5 -1.0 -0.5 0.0

图 11B

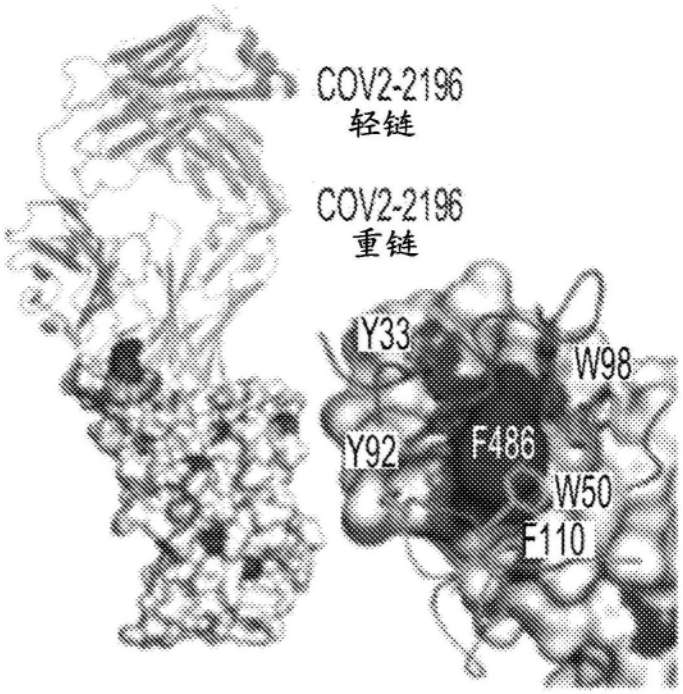

COV2-2196
轻链
COV2-2196
重链
Y33
W98
Y92
F486
W50
F110

图11C

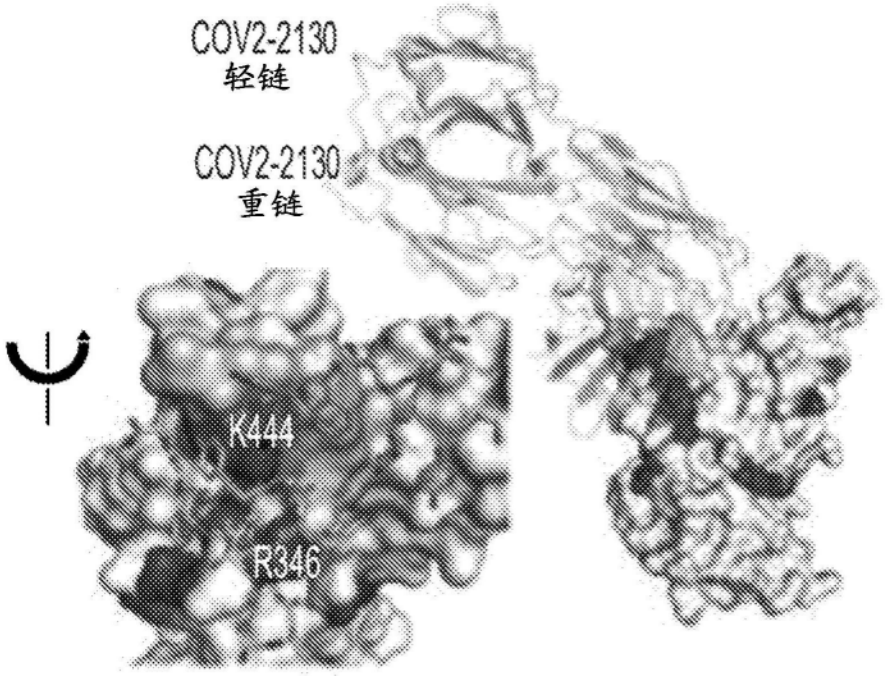

COV2-2130
轻链
COV2-2130
重链
K444
R346

图11D

VSV-SARS-CoV-2 逃逸变体选择

选择条件	有逃逸的重复数/总数	鉴定的突变
COV2-2196	0/88 (0%)	N/A
COV2-2130	8/20 (40%)	K444R (6), K444E (2)
混合剂 (2196+2130)	0/104 (0%)	N/A

图11E

SARS-CoV-2 抗性变体选择

传代条件	测试条件	检测到抗性	鉴定的突变
AZD8895 (COV2-2196)	AZD8895	否	N/A
	AZD7442	否	
AZD1061 (COV2-2130)	AZD1061	是	N74K, R346I
	AZD7442	否	N/A
AZD7442 （混合剂）	AZD7442	否	N/A

图11F

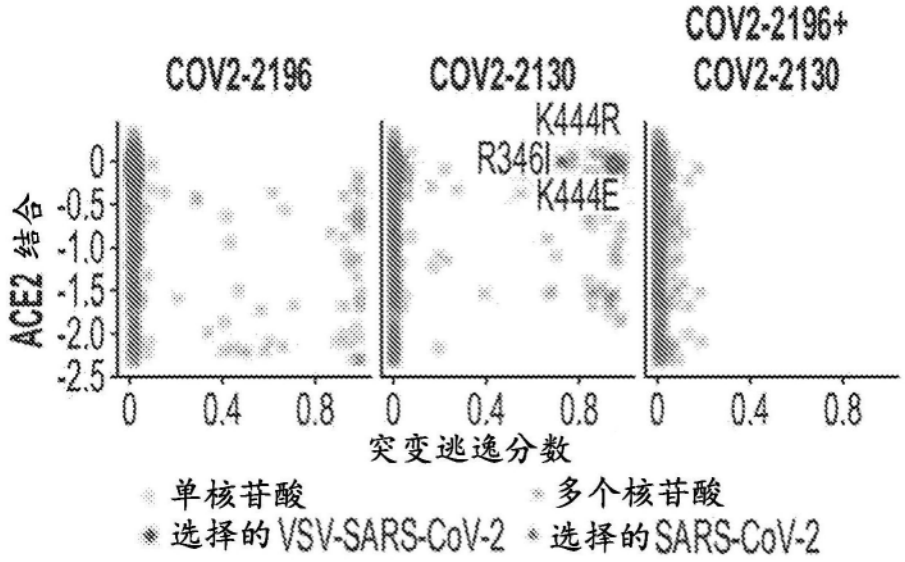

COV2-2196
COV2-2130
COV2-2196+
COV2-2130
K444R
R346I
K444E
ACE2 结合
0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
-2.5
0
0.4
0.8
突变逃逸分数
单核苷酸
多个核苷酸
选择的VSV-SARS-CoV-2
选择的SARS-CoV-2

图11G

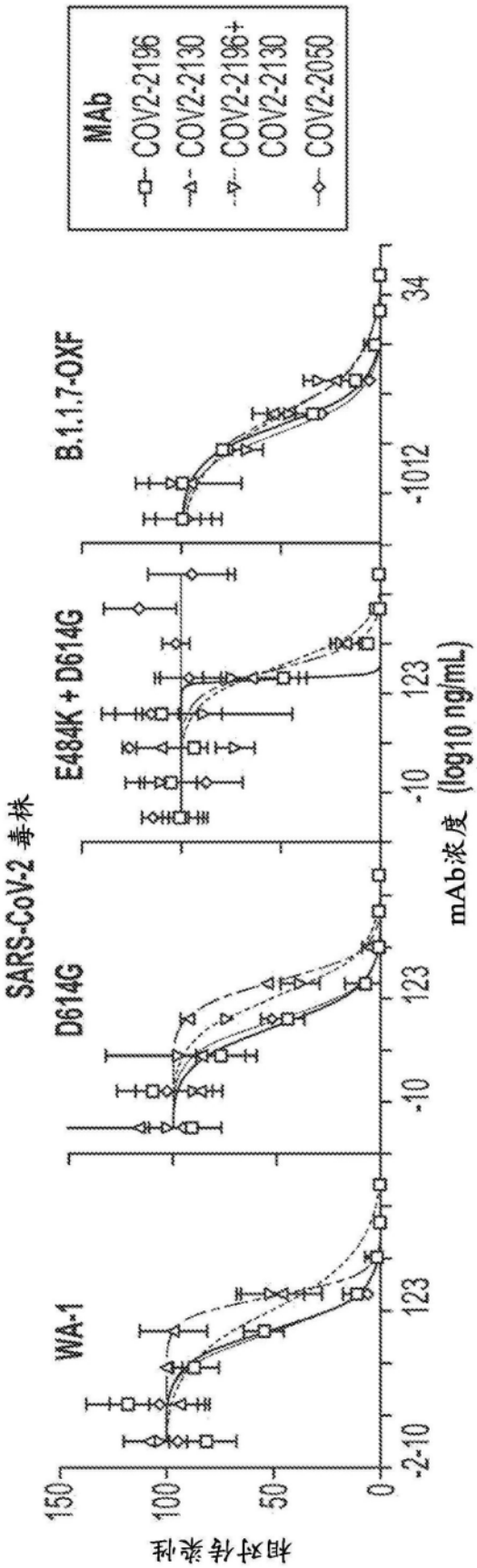

MAb
COV2-2196
COV2-2130
COV2-2196+
COV2-2130
COV2-2050
SARS-CoV-2 毒株
WA-1
D614G
E484K + D614G
B.1.1.7-OXF
mAb浓度 (log10 ng/mL)
相对传染性
150
100
50
0
-2-10
123
-10
-1012
34

图11H

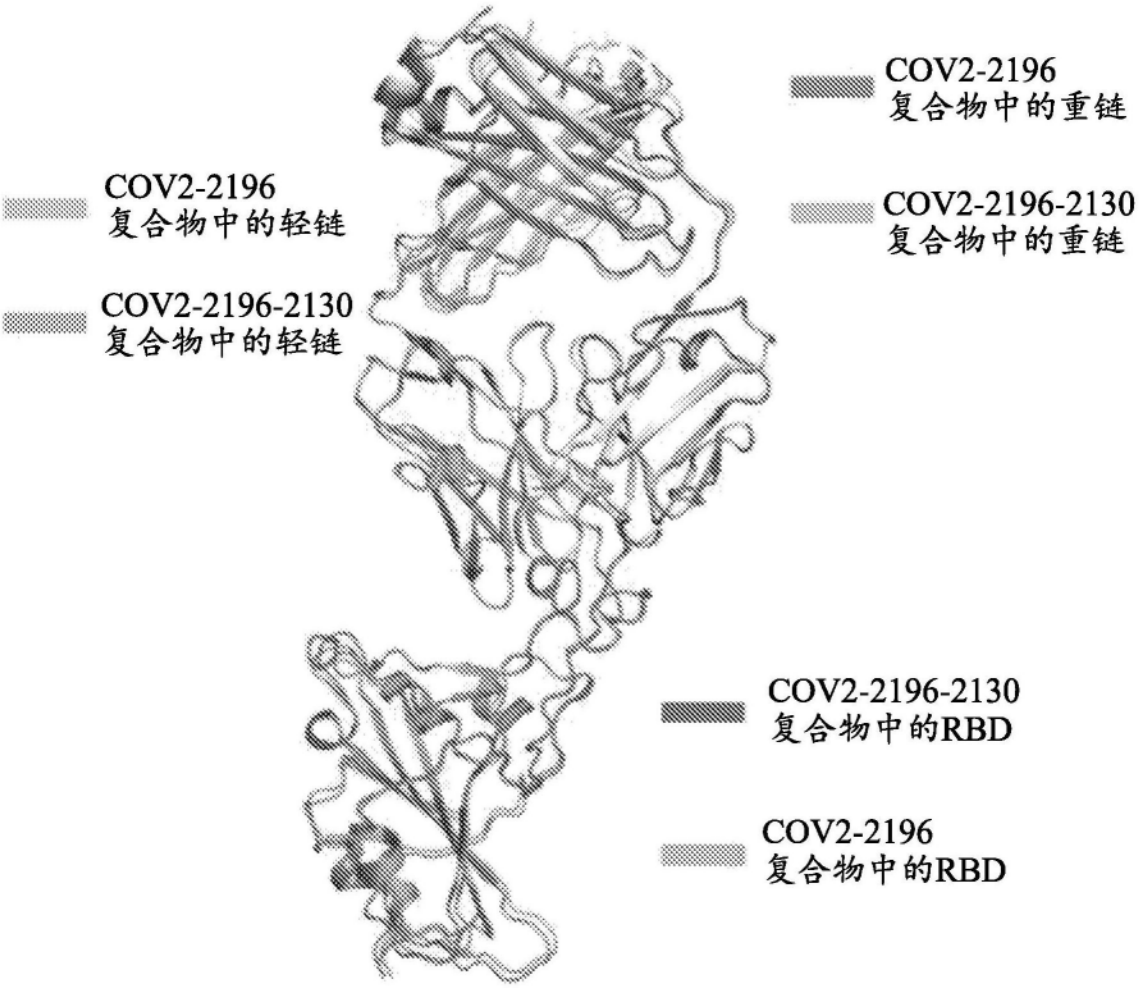

COV2-2196
复合物中的重链
COV2-2196-2130
复合物中的重链
COV2-2196
复合物中的轻链
COV2-2196-2130
复合物中的轻链
COV2-2196-2130
复合物中的RBD
COV2-2196
复合物中的RBD

图12

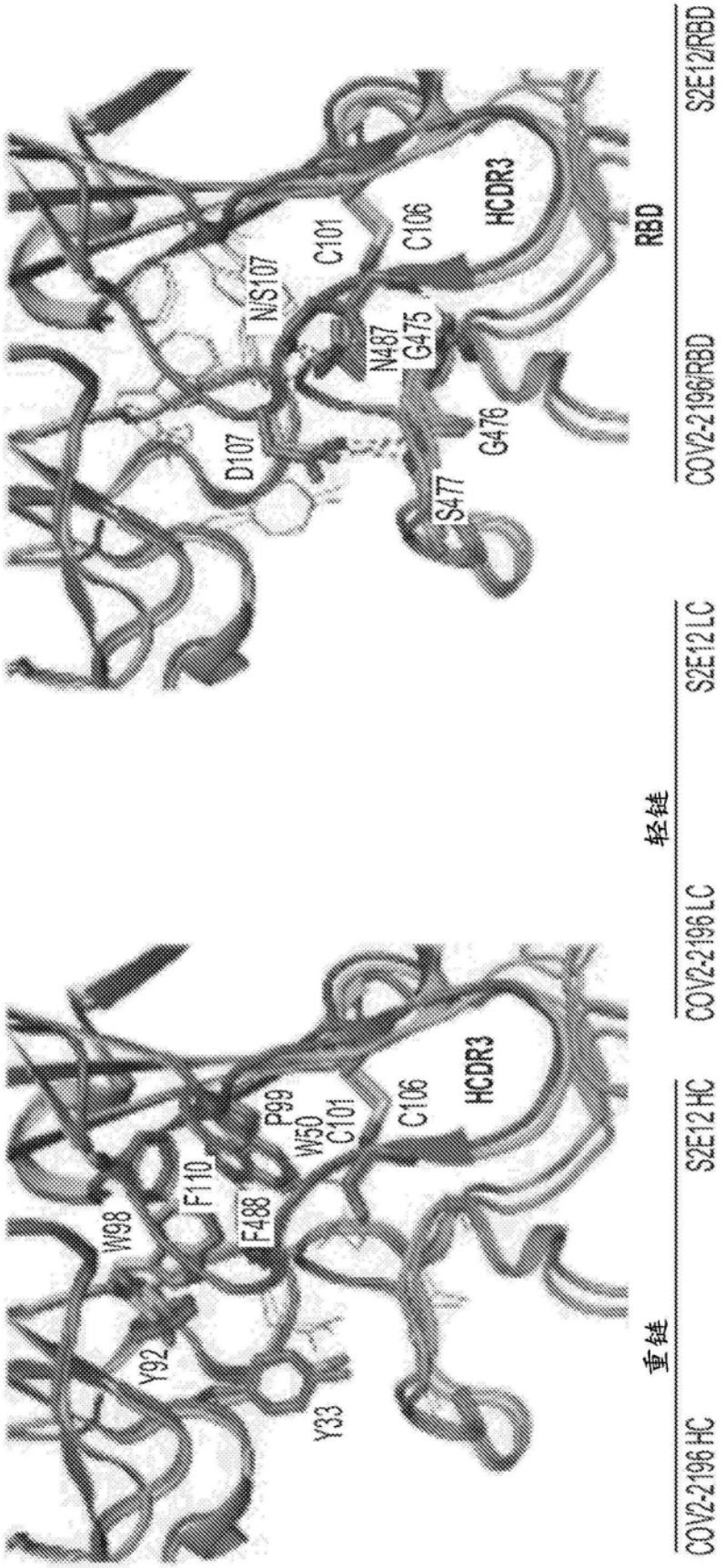

W98
Y92
F110
F488
Y33
P99
W50
C101
C106
HCDR3
重链
COV2-2196 HC
S2E12 HC
COV2-2196 LC
轻链
S2E12 LC
D107
N/S107
C101
C106
HCDR3
N487
G475
G476
S477
RBD
COV2-2196/RBD
S2E12/RBD

图 13A

图 13B

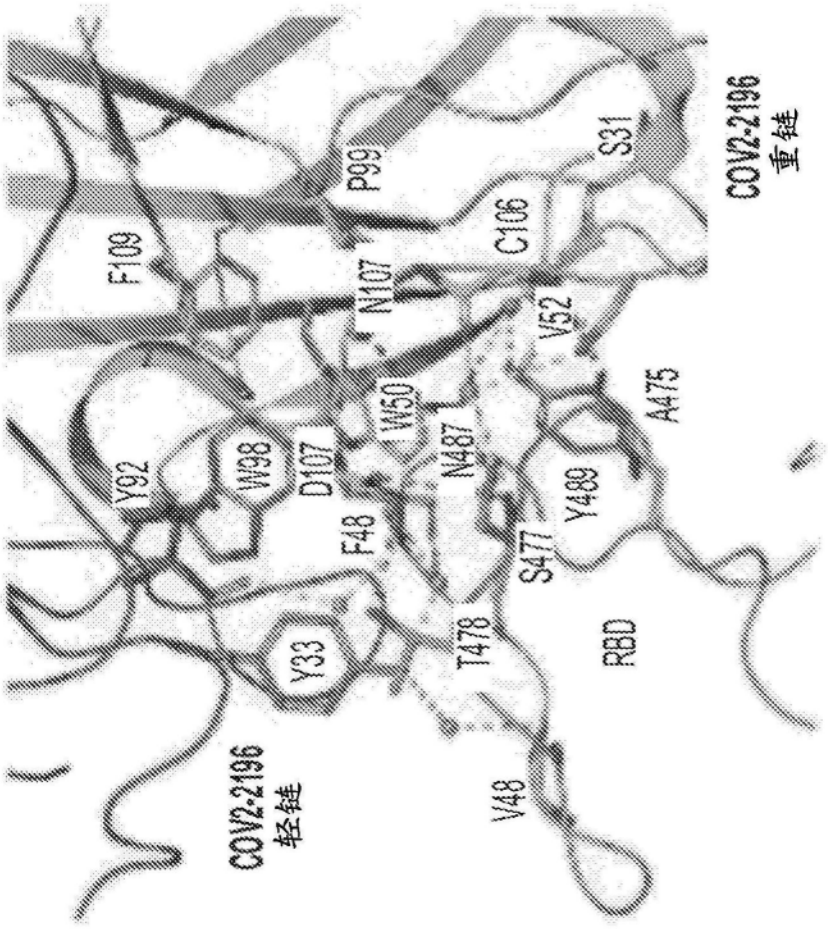

COV2-2196
轻链
COV2-2196
重链
F109
Y92
W98
Y33
D107
F48
W50
N107
P99
C106
S31
V52
N487
A475
Y489
S477
T478
RBD
V48

图13C

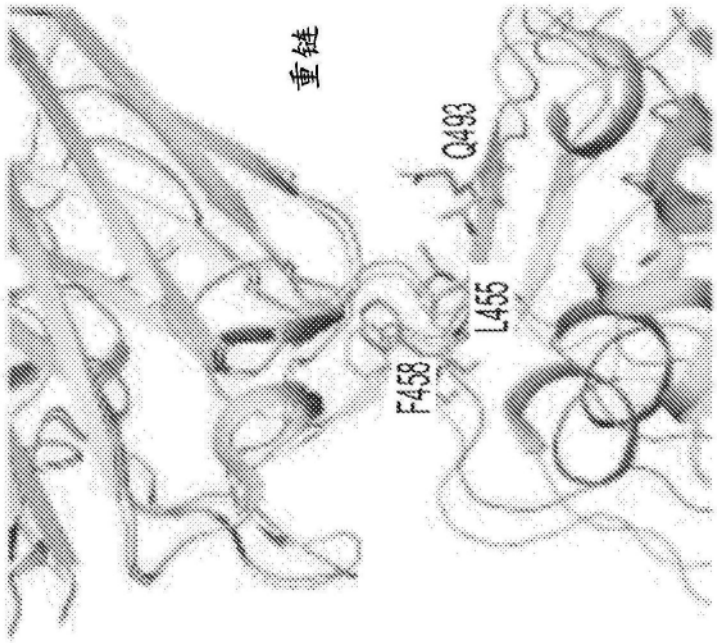

重链
Q493
L455
F458

图13D

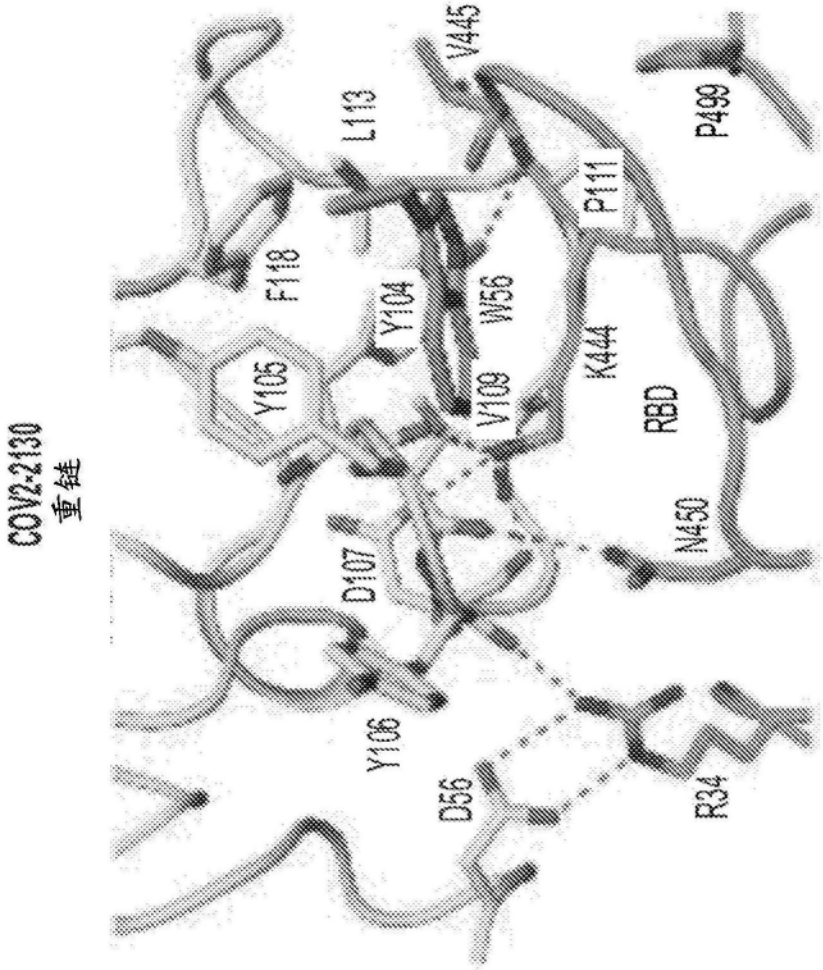

COV2-2130
重链
F118
L113
V445
P499
P111
Y105
Y104
W56
K444
V109
RBD
D107
N450
Y106
D56
R34

图13E

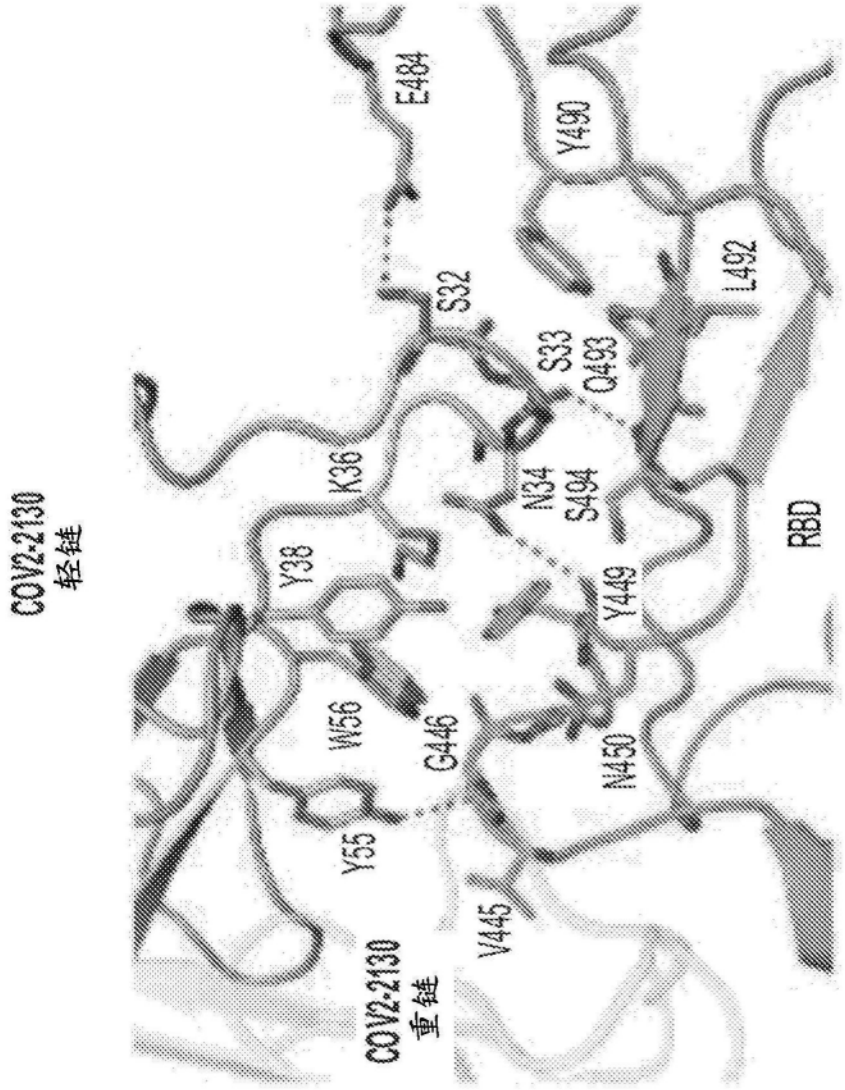

COV2-2130
轻链
Y38
K36
E484
S32
Y490
L492
S33
Q493
N34
S494
RBD
Y449
W56
G446
N450
Y55
V445
COV2-2130
重链

图13F

图 14A

图 14B

图 14C

图 14D

图 14E

重链	
COV2-2196 HC	S2E12 HC
COV2-2381 HC	COV2-2072 HC

轻链	
COV2-2196 LC	S2E12 LC
COV2-2381 LC	COV2-2072 LC

RBD	
RDB/COV2-2196	RDB/S2E12
RDB/COV2-2381	RBD/COV2-2072

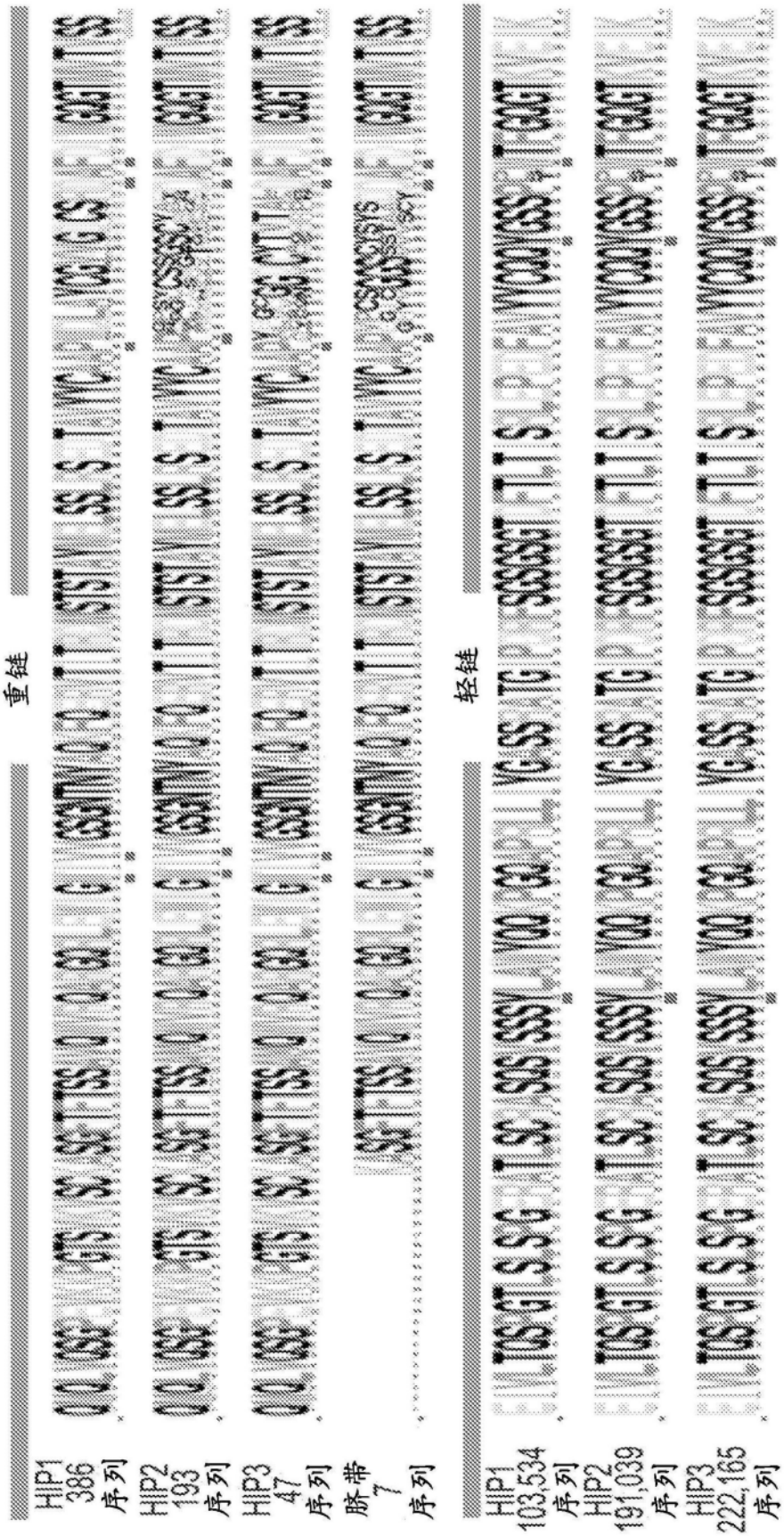

重链
轻链
HIP1 386 序列
HIP2 193 序列
HIP3 47 序列
脉带 7 序列
HIP1 103,534 序列
HIP2 191,039 序列
HIP3 222,165 序列

图15A

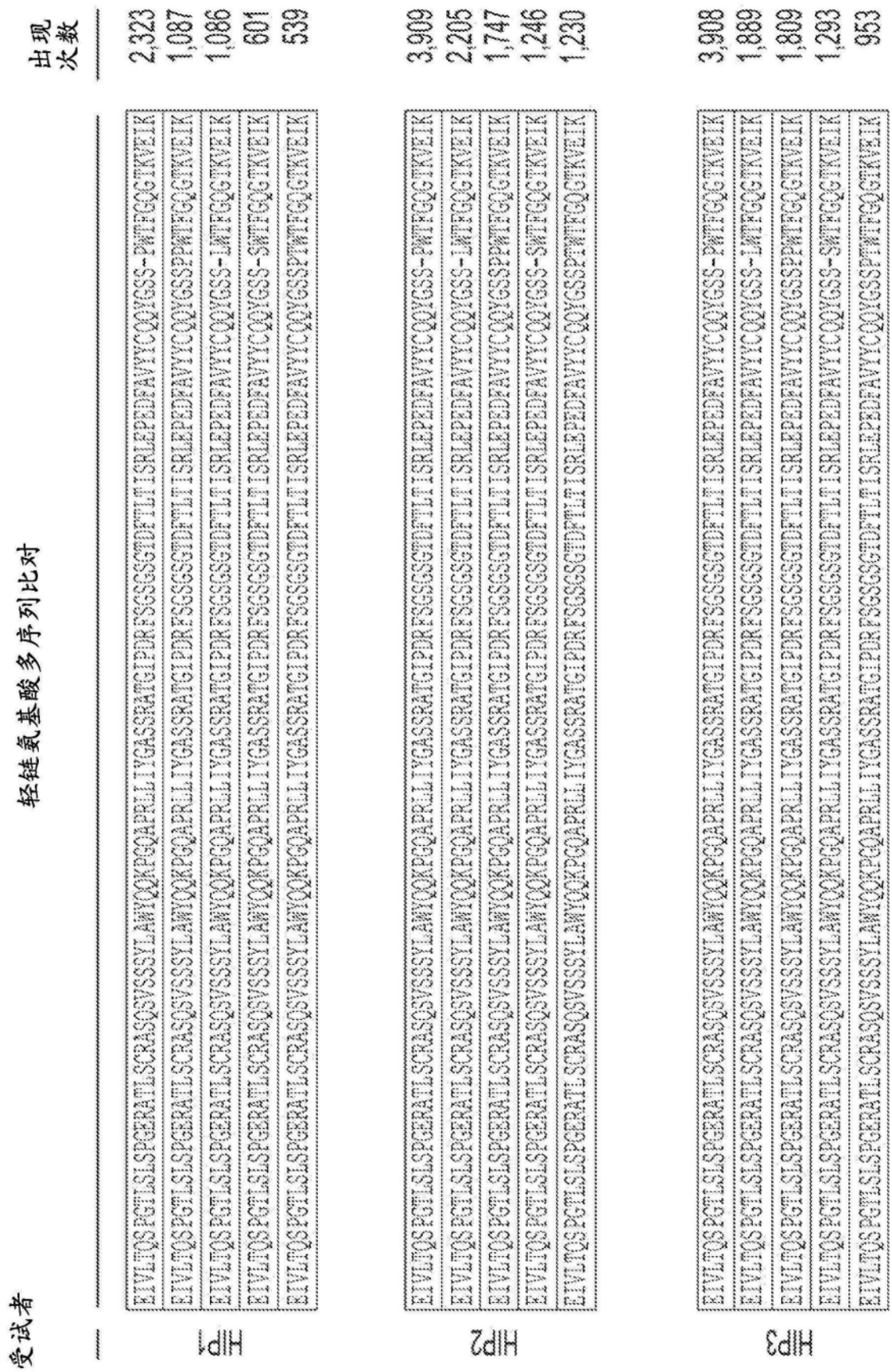

受试者
轻链氨基酸多序列比对
出现次数
HP1
HP2
HP3
2,323
1,087
1,086
601
539
3,909
2,205
1,747
1,246
1,230
3,908
1,889
1,809
1,293
953

图15B

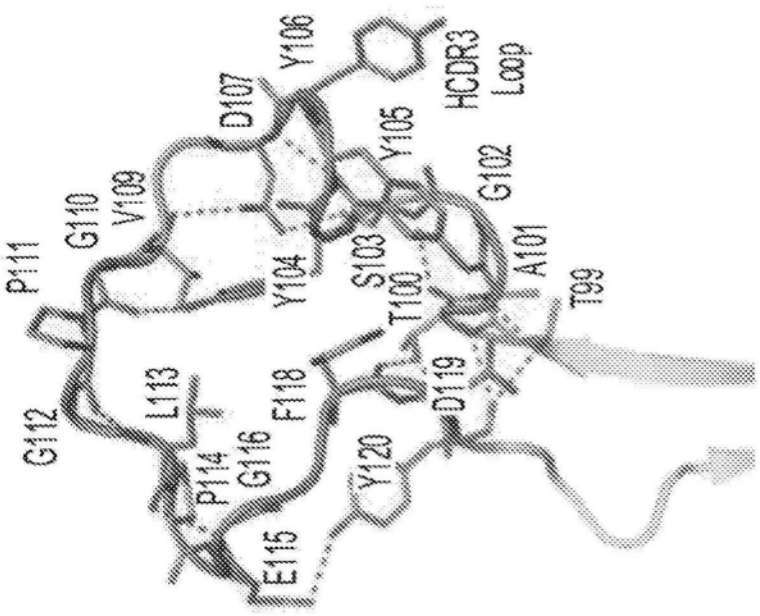

Y106
D107
HCDR3
Loop
Y105
V109
G110
G102
P111
S103
A101
Y104
T100
T99
L113
F118
D119
G112
G116
Y120
P114
E115

图16A

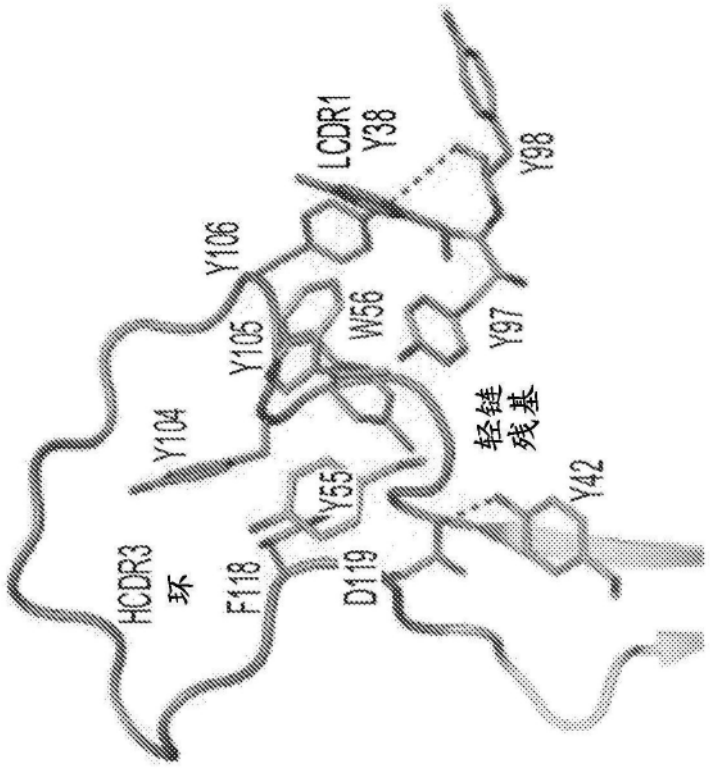

LCDR1
Y38
Y98
Y106
W56
Y97
Y105
Y104
轻链
残基
Y55
Y42
HCDR3
环
F118
D119

图16B

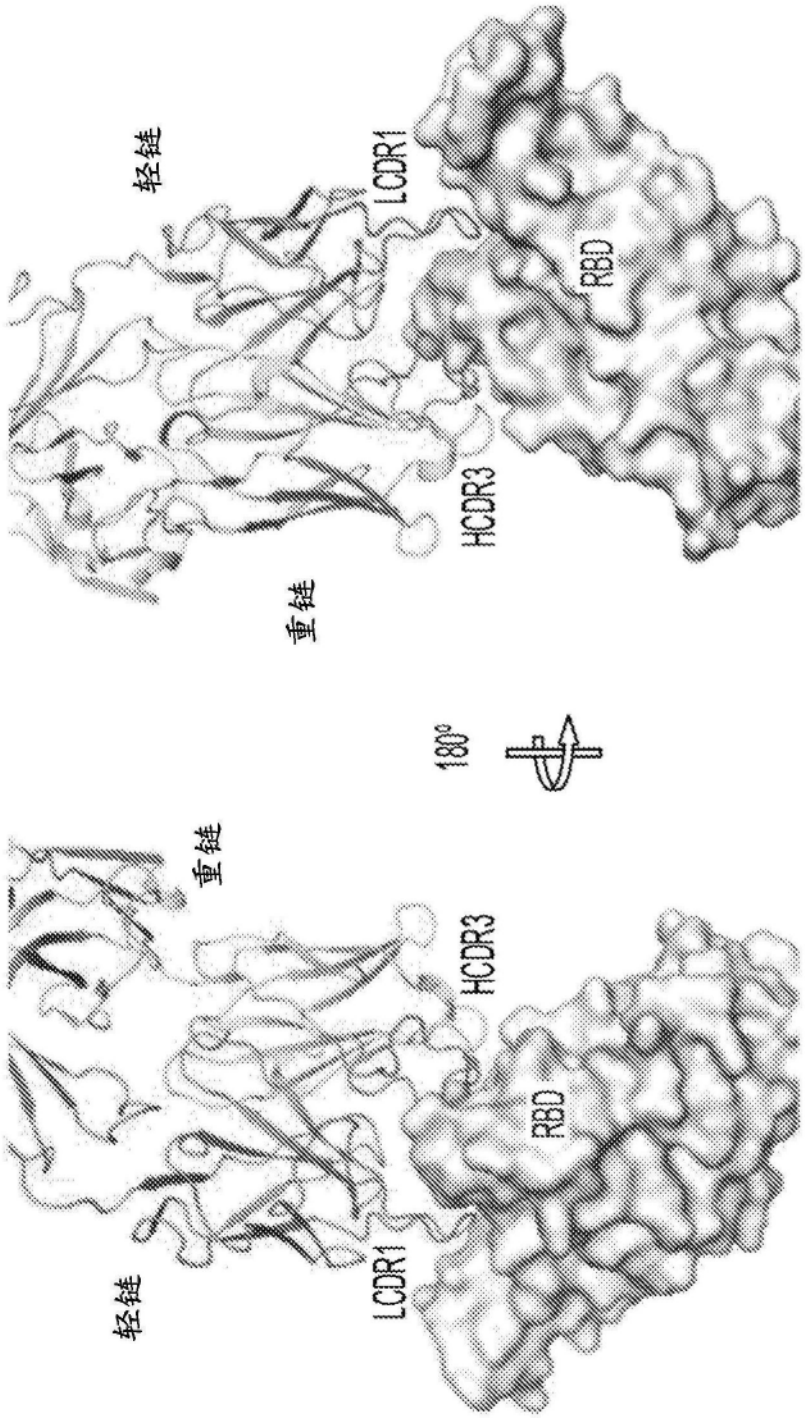


图 16D

图 16C

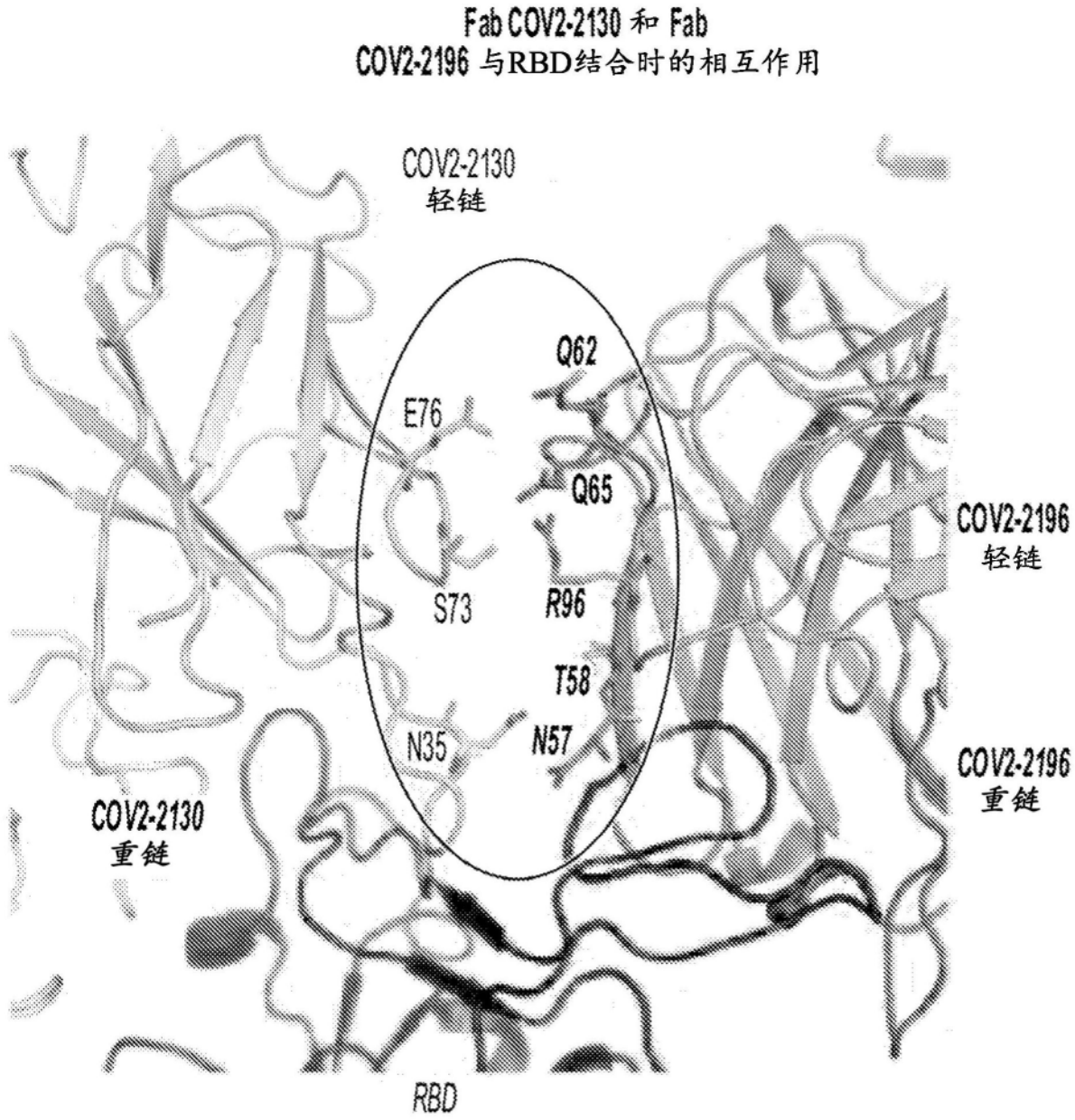

Fab COV2-2130 和 Fab
COV2-2196 与RBD结合时的相互作用
COV2-2130
轻链
Q62
E76
Q65
COV2-2196
轻链
S73
R96
T58
N35
N57
COV2-2196
重链
COV2-2130
重链
RBD

图17

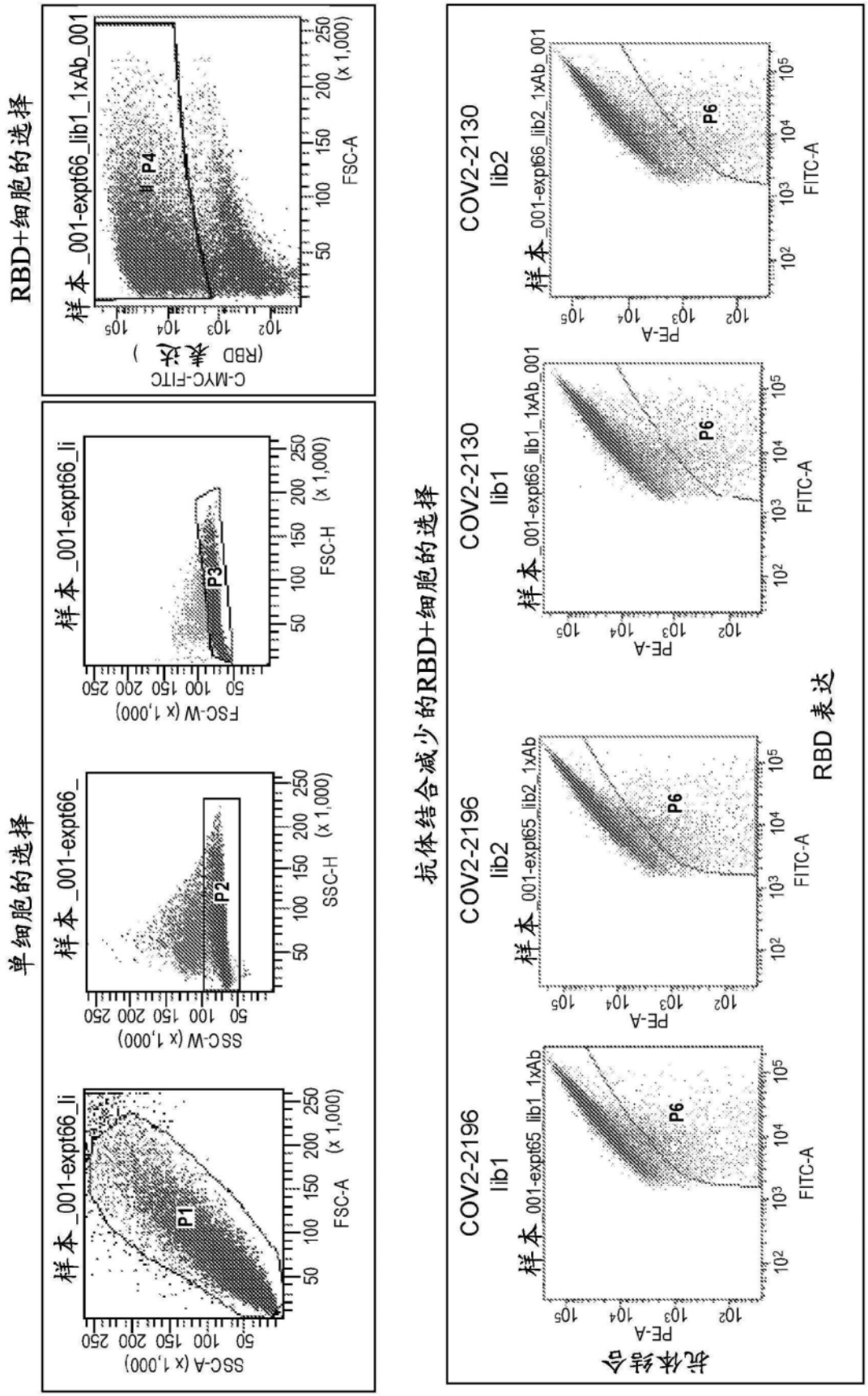

单细胞的选择
样本_001-expt66_li
P1
SSC-A (x 1,000)
FSC-A (x 1,000)
样本_001-expt66_
P2
SSC-W (x 1,000)
SSC-H (x 1,000)
样本_001-expt66_li
P3
FSC-W (x 1,000)
FSC-H (x 1,000)
RBD+细胞的选择
样本_001-expt66_lib1_1xAb_001
P4
C-MYC-FITC (RBD 表达)
FSC-A (x 1,000)
抗体结合减少的RBD+细胞的选择
COV2-2196
lib1
样本_001-expt65_lib1_1xAb
P6
抗体结合
PE-A
FITC-A
COV2-2196
lib2
样本_001-expt65_lib2_1xAb
P6
PE-A
FITC-A
COV2-2130
lib1
样本_001-expt66_lib1_1xAb_001
P6
PE-A
FITC-A
COV2-2130
lib2
样本_001-expt66_lib2_1xAb_001
P6
PE-A
FITC-A
RBD 表达

图18A

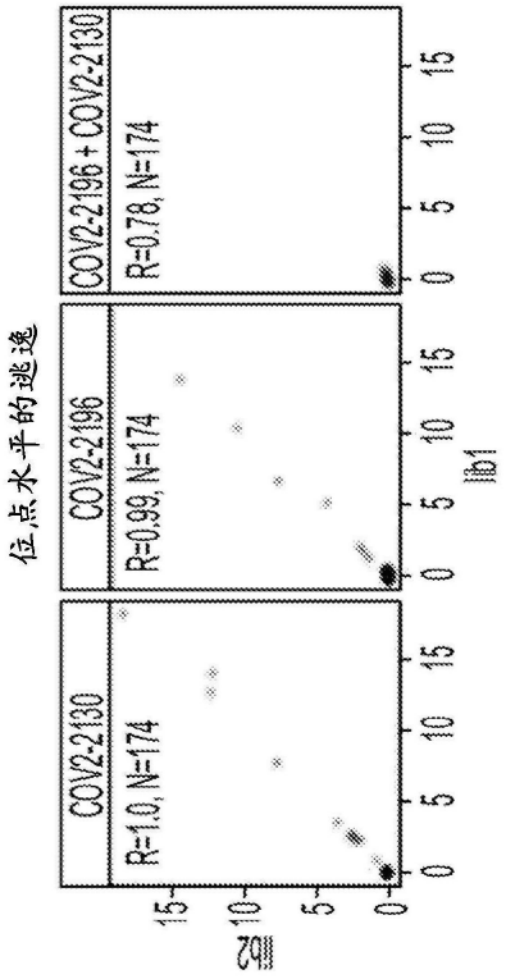

位点水平的逃逸
COV2-2130
R=1.0, N=174
COV2-2196
R=0.99, N=174
COV2-2196 + COV2-2130
R=0.78, N=174
lib2
lib1
0
5
10
15

图18B

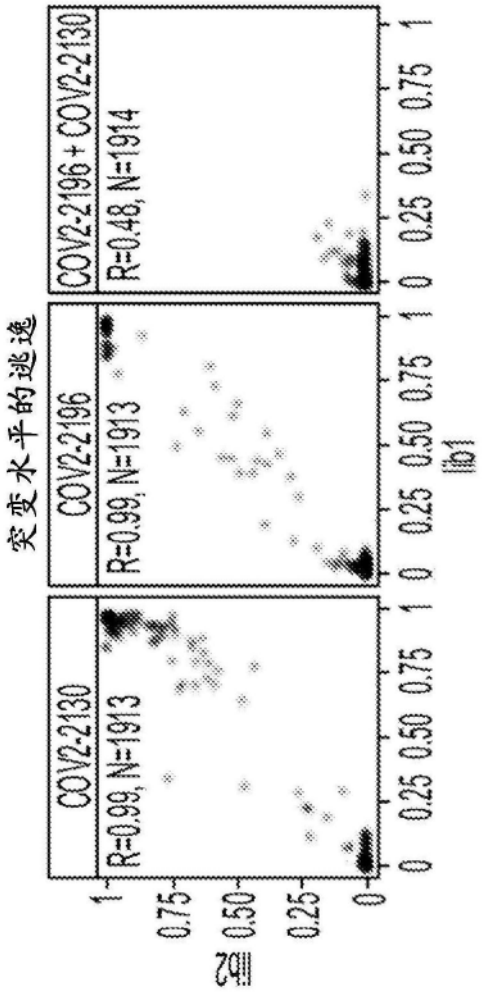

突变水平的逃逸
COV2-2130
R=0.99, N=1913
COV2-2196
R=0.99, N=1913
COV2-2196 + COV2-2130
R=0.48, N=1914
1
0.75
0.50
0.25
0
0 0.25 0.50 0.75 1
0 0.25 0.50 0.75 1
0 0.25 0.50 0.75 1
lib1

图18C

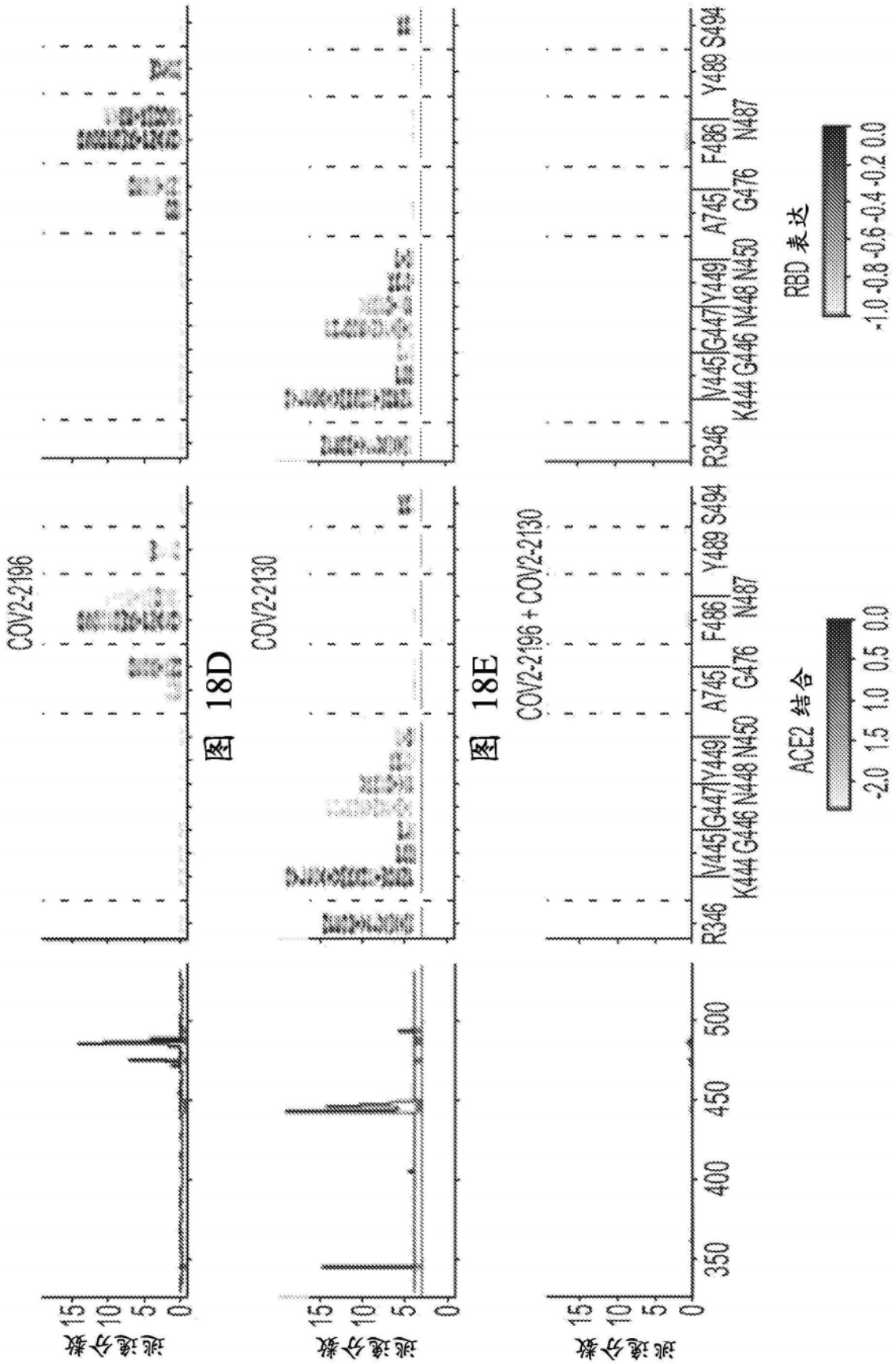


图 18D 图 18E 图 18F

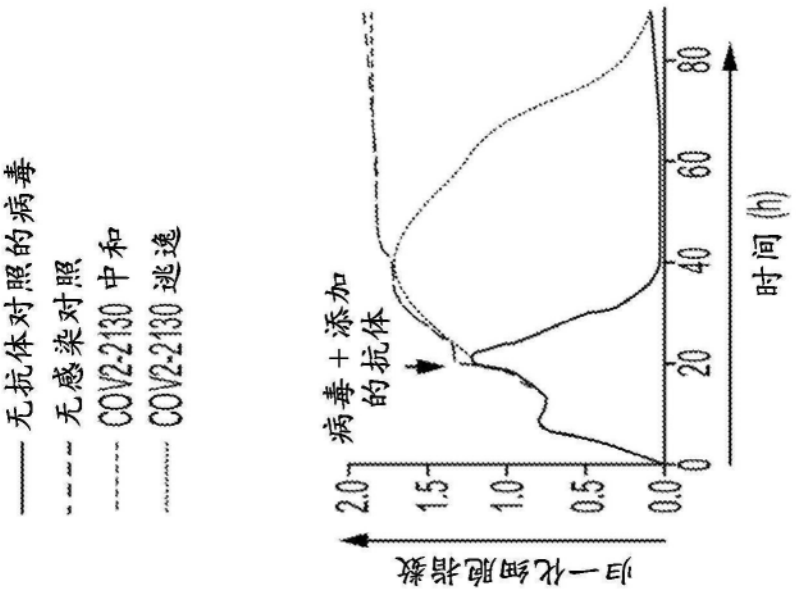

无抗体对照的病毒
无感染对照
COV2-2130 中和
COV2-2130 逃逸
归一化细胞指数
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
20
40
60
80
病毒 + 添加
的抗体
时间 (h)

图18G

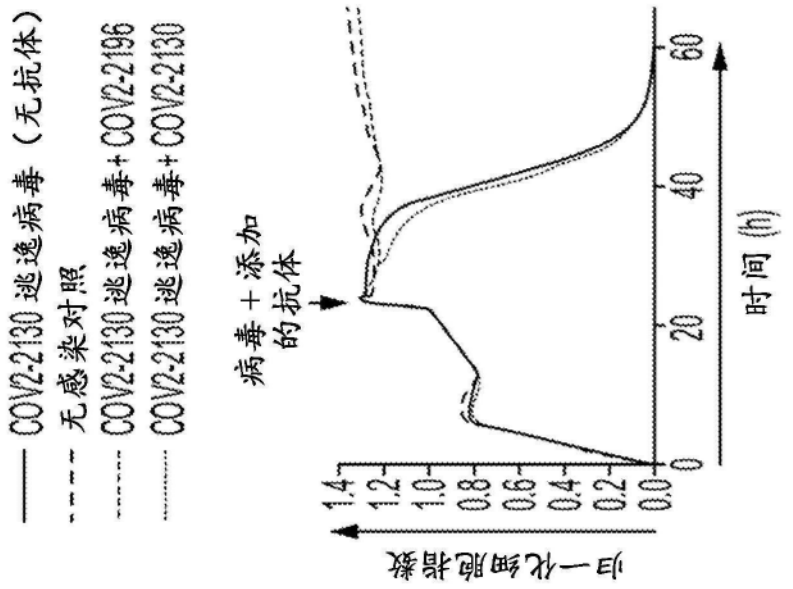

COV2-2130 逃逸病毒（无抗体）
无感染对照
COV2-2130 逃逸病毒 + COV2-2196
COV2-2130 逃逸病毒 + COV2-2130
归一化细胞指数
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
20
40
60
病毒 + 添加
的抗体
时间 (h)

图18H

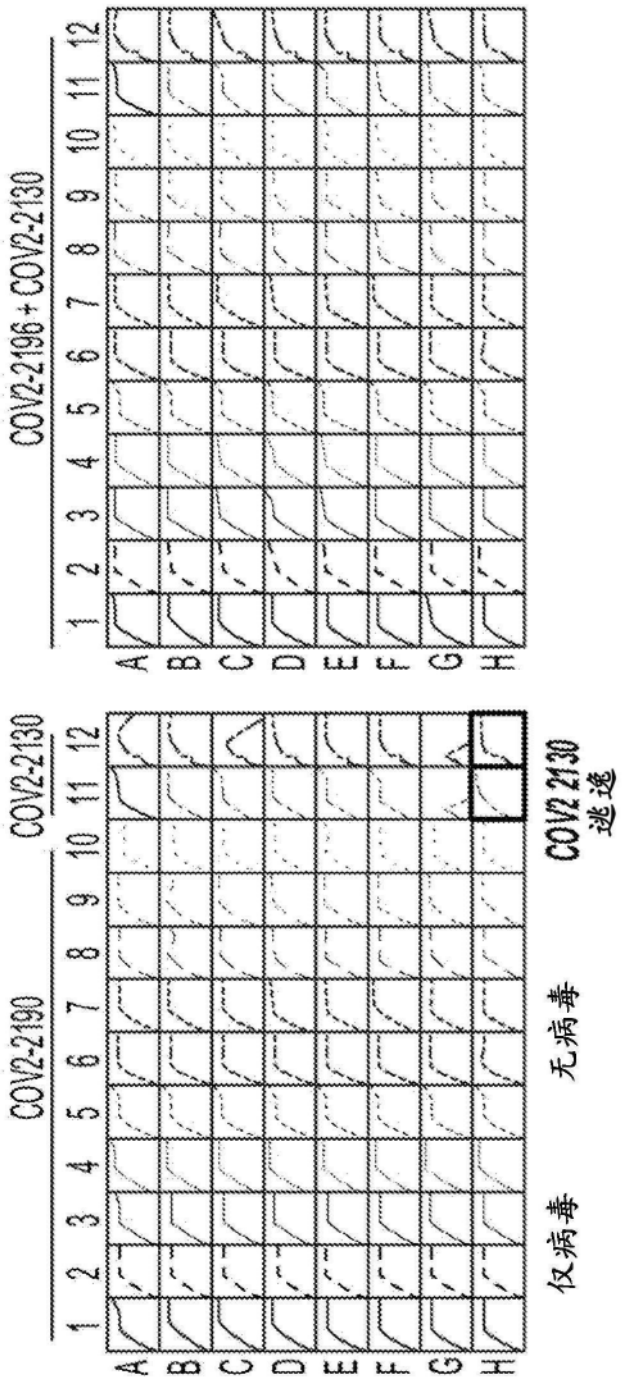

COV2-2196+COV2-2130
COV2-2190
COV2-2130
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A B C D E F G H
仅病毒
无病毒
COV2 2130
逃逸

图18I

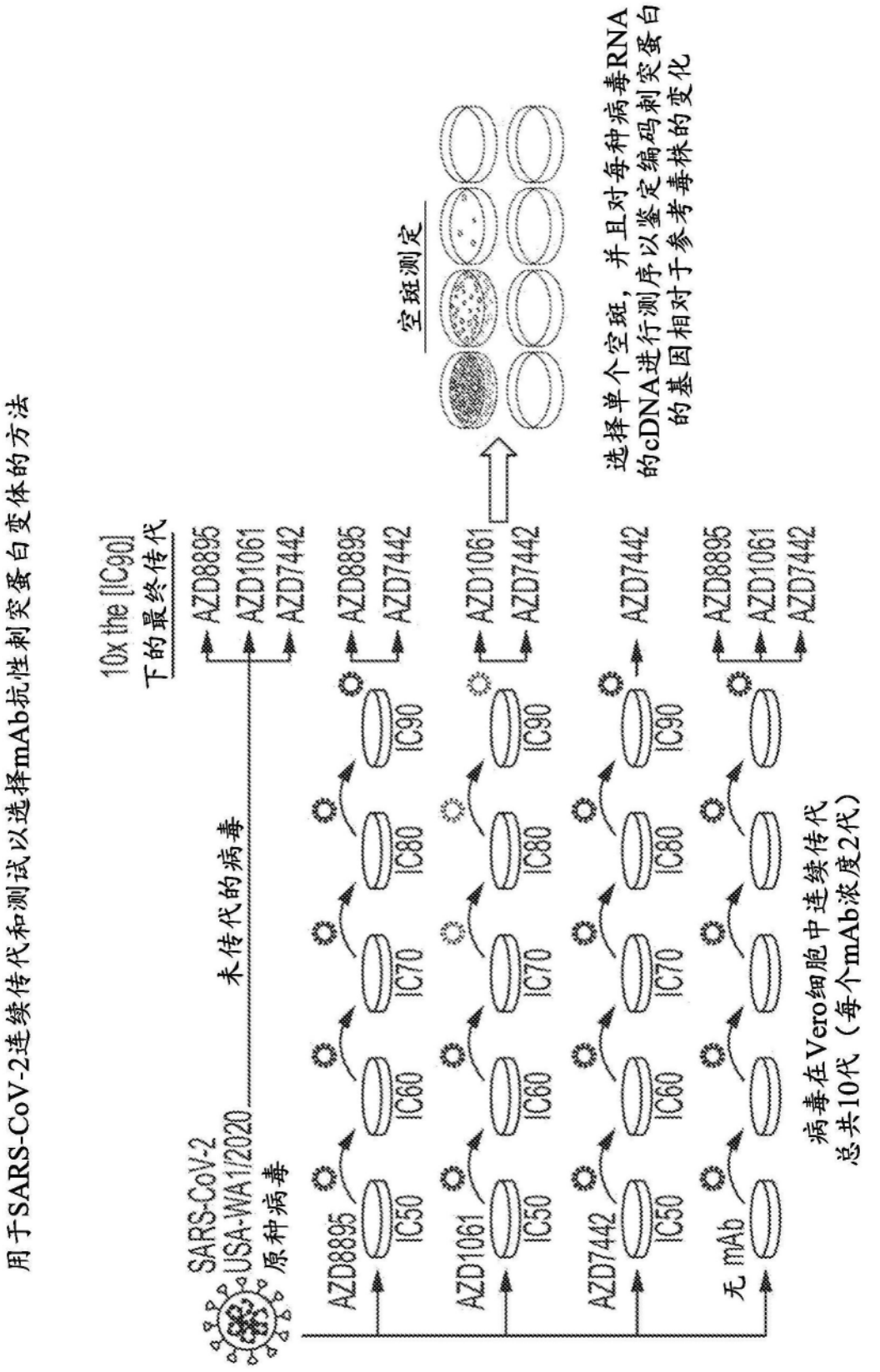

用于SARS-CoV-2连续传代和测试以选择mAb抗性刺突蛋白变体的方法
SARS-CoV-2
USA-WA1/2020
原种病毒
未传代的病毒
10x the IIC90I
下的最终传代
AZD8895
AZD1061
AZD7442
无 mAb
IC50
IC60
IC70
IC80
IC90
空斑测定
选择单个空斑，并且对每种病毒RNA
的cDNA进行测序以鉴定编码刺突蛋白
的基因相对于参考毒株的变化
病毒在Vero细胞中连续传代
总共10代（每个mAb浓度2代）

图19

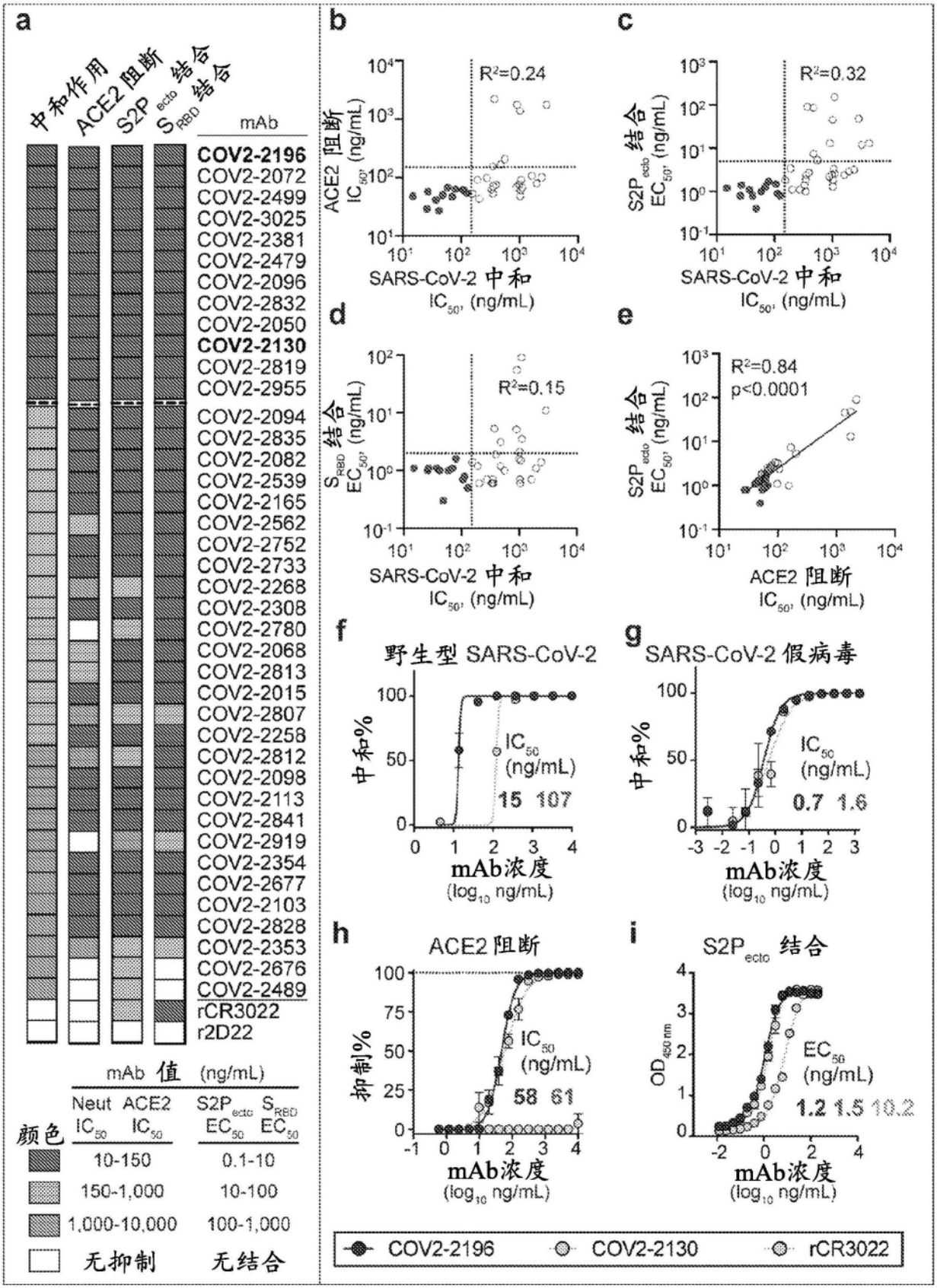

a
中和作用
ACE2 阻断
S2P ecto 结合
S RBD 结合
mAb
COV2-2196
COV2-2072
COV2-2499
COV2-3025
COV2-2381
COV2-2479
COV2-2096
COV2-2832
COV2-2050
COV2-2130
COV2-2819
COV2-2955
COV2-2094
COV2-2835
COV2-2082
COV2-2539
COV2-2165
COV2-2562
COV2-2752
COV2-2733
COV2-2268
COV2-2308
COV2-2780
COV2-2068
COV2-2813
COV2-2015
COV2-2807
COV2-2258
COV2-2812
COV2-2098
COV2-2113
COV2-2841
COV2-2919
COV2-2354
COV2-2677
COV2-2103
COV2-2828
COV2-2353
COV2-2676
COV2-2489
rCR3022
r2D22
mAb 值 (ng/mL)
颜色
Neut IC50
ACE2 IC50
S2P ecto EC50
S RBD EC50
10-150
150-1,000
1,000-10,000
无抑制
0.1-10
10-100
100-1,000
无结合
b
R²=0.24
ACE2 阻断 IC50, (ng/mL)
SARS-CoV-2 中和 IC50, (ng/mL)
c
R²=0.32
S2P ecto 结合 EC50, (ng/mL)
SARS-CoV-2 中和 IC50, (ng/mL)
d
R²=0.15
S RBD 结合 EC50, (ng/mL)
SARS-CoV-2 中和 IC50, (ng/mL)
e
R²=0.84
p<0.0001
S2P ecto 结合 EC50, (ng/mL)
ACE2 阻断 IC50, (ng/mL)
f
野生型 SARS-CoV-2
中和%
IC50 (ng/mL)
15 107
mAb浓度 (log10 ng/mL)
g
SARS-CoV-2 假病毒
中和%
IC50 (ng/mL)
0.7 1.6
mAb浓度 (log10 ng/mL)
h
ACE2 阻断
抑制%
IC50 (ng/mL)
58 61
mAb浓度 (log10 ng/mL)
i
S2P ecto 结合
OD450 nm
EC50 (ng/mL)
1.2 1.5 10.2
mAb浓度 (log10 ng/mL)
COV2-2196
COV2-2130
rCR3022

图20

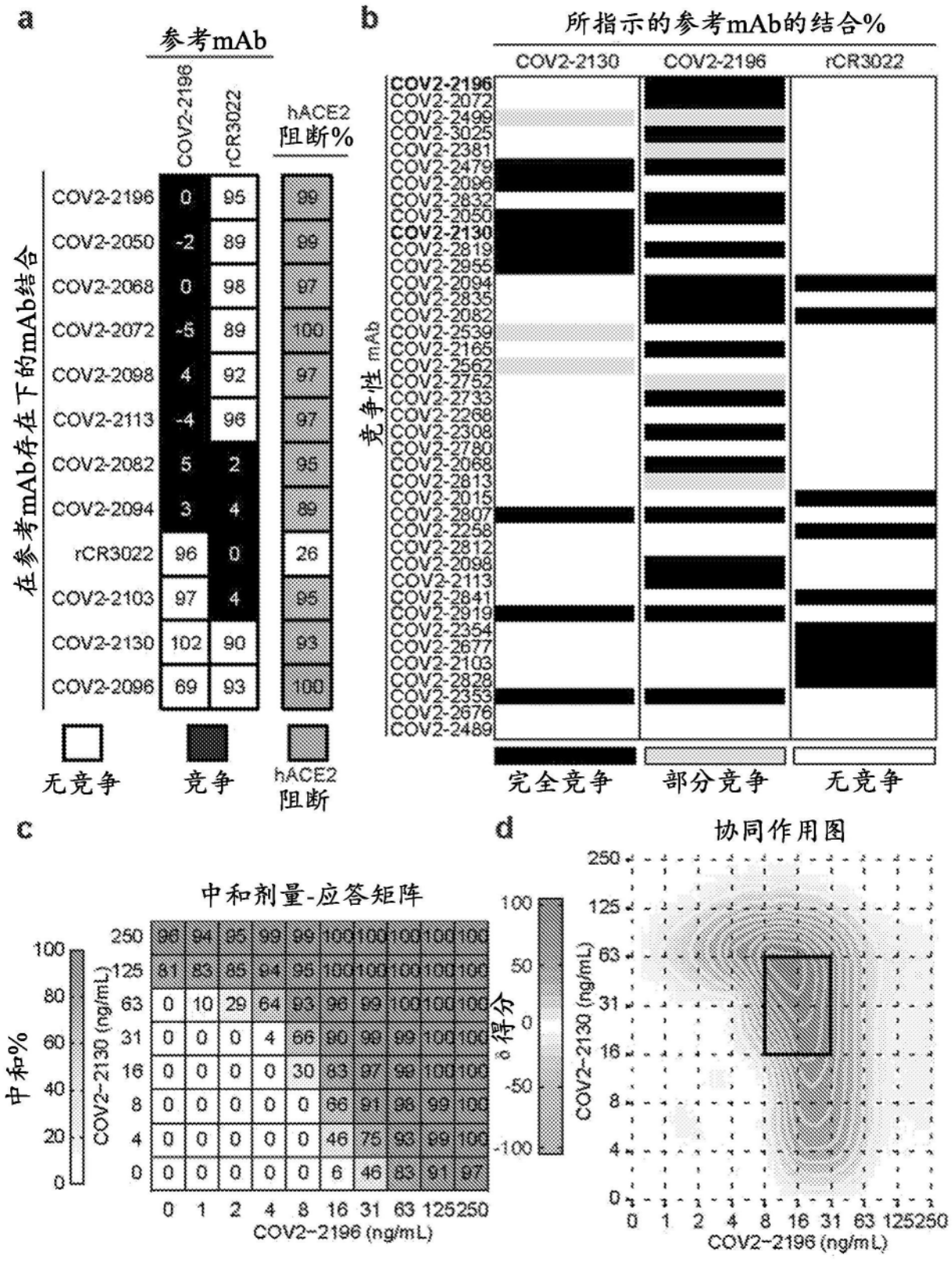

a
参考mAb
COV2-2196
rCR3022
hACE2阻断%
在参考mAb存在下的mAb结合
COV2-2196 0 95 99
COV2-2050 -2 89 99
COV2-2068 0 98 97
COV2-2072 -5 89 100
COV2-2098 4 92 97
COV2-2113 -4 96 97
COV2-2082 5 2 95
COV2-2094 3 4 89
rCR3022 96 0 26
COV2-2103 97 4 95
COV2-2130 102 90 93
COV2-2096 69 93 100
无竞争
竞争
hACE2阻断
b
所指示的参考mAb的结合%
COV2-2130
COV2-2196
rCR3022
竞争性mAb
完全竞争
部分竞争
无竞争
c
中和剂量-应答矩阵
中和%
COV2-2130 (ng/mL)
COV2-2196 (ng/mL)
d
协同作用图
δ得分
COV2-2130 (ng/mL)
COV2-2196 (ng/mL)

图21

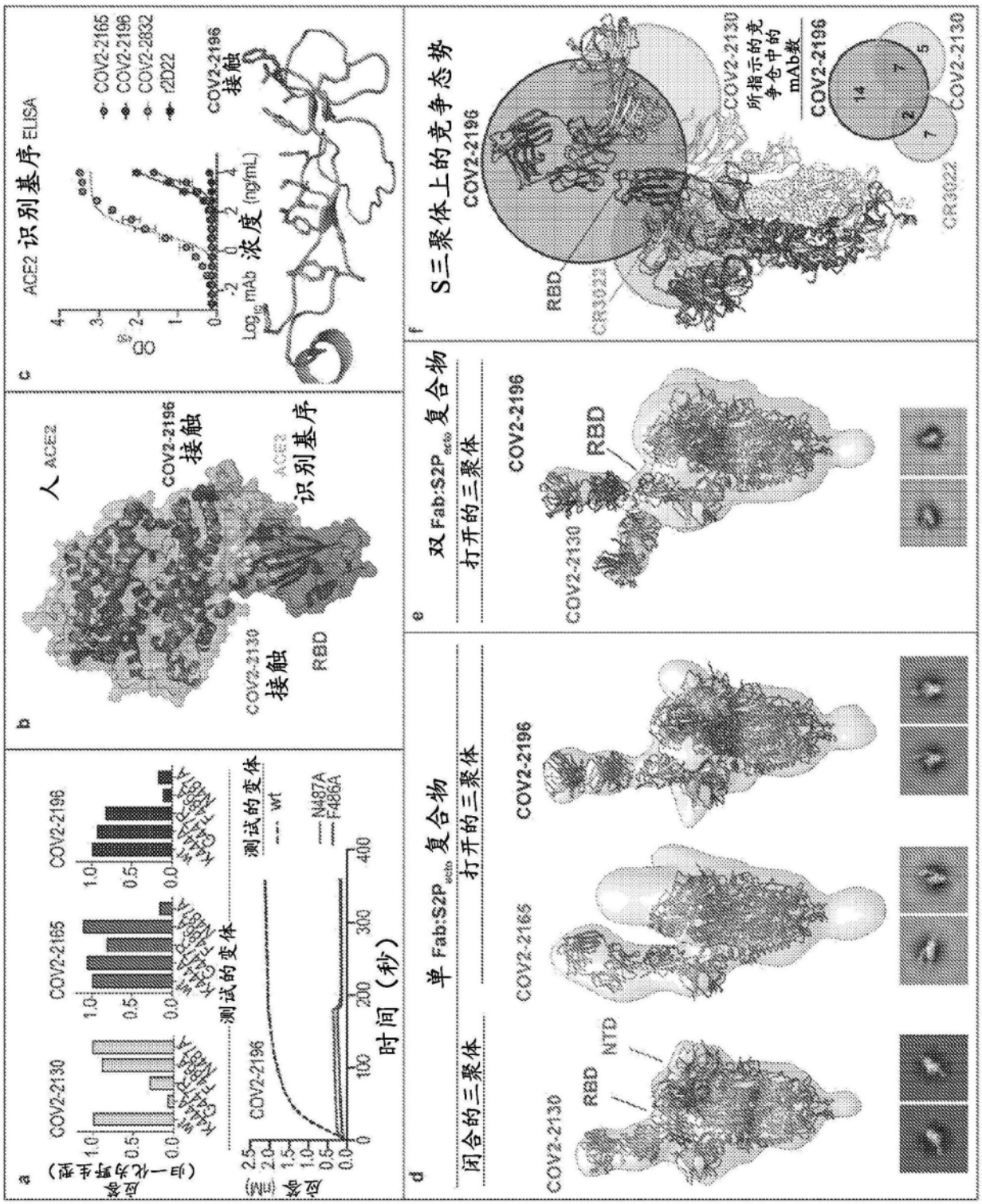

a
COV2-2130
COV2-2165
COV2-2196
测试的变体
wt
N487A
F486A
时间（秒）
b
人 ACE2
COV2-2196 接触
ACE2 识别基序
COV2-2130 接触
RBD
c
ACE2 识别基序 ELISA
COV2-2165
COV2-2196
COV2-2832
f2D22
COV2-2196 接触
浓度 (ng/mL)
d
单 Fab:S2P 复合物
闭合的三聚体
打开的三聚体
COV2-2130
RBD
NTD
COV2-2165
COV2-2196
e
双 Fab:S2P 复合物
打开的三聚体
COV2-2130
RBD
COV2-2196
f
S三聚体上的竞争态势
COV2-2196
RBD
CR3022
COV2-2130
所指示的竞争仓中的 mAb数
COV2-2196
CR3022
COV2-2130

图22

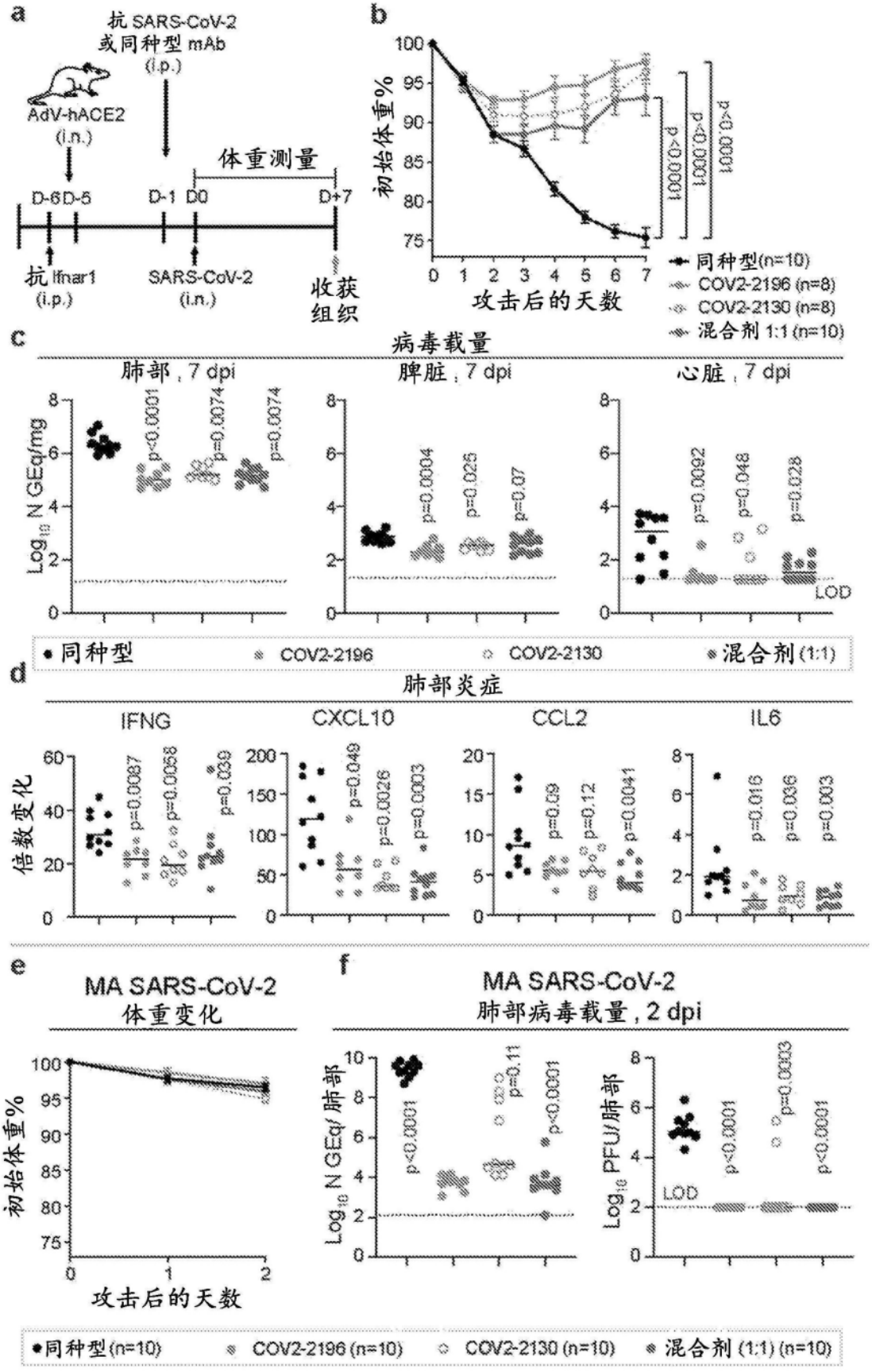

a
抗 SARS-CoV-2
或同种型 mAb
(i.p.)
AdV-hACE2
(i.n.)
体重测量
D-6 D-5 D-1 D0 D+7
抗 Ifnar1
(i.p.)
SARS-CoV-2
(i.n.)
收获
组织
b
初始体重%
攻击后的天数
同种型(n=10)
COV2-2196 (n=8)
COV2-2130 (n=8)
混合剂 1:1 (n=10)
c
病毒载量
肺部，7 dpi
脾脏，7 dpi
心脏，7 dpi
Log10 N GEq/mg
LOD
同种型
COV2-2196
COV2-2130
混合剂(1:1)
d
肺部炎症
IFNG
CXCL10
CCL2
IL6
倍数变化
e
MA SARS-CoV-2
体重变化
初始体重%
攻击后的天数
f
MA SARS-CoV-2
肺部病毒载量，2 dpi
Log10 N GEq/ 肺部
Log10 PFU/肺部
LOD
同种型(n=10)
COV2-2196 (n=10)
COV2-2130 (n=10)
混合剂 (1:1) (n=10)

图23

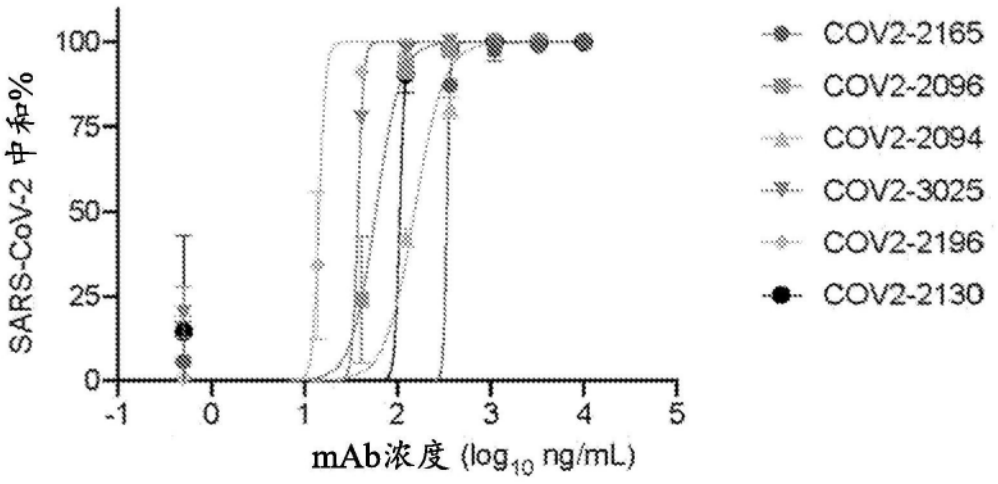

SARS-CoV-2 中和%
100
75
50
25
0
-1
0
1
2
3
4
5
mAb浓度 (log10 ng/mL)
COV2-2165
COV2-2096
COV2-2094
COV2-3025
COV2-2196
COV2-2130

图24

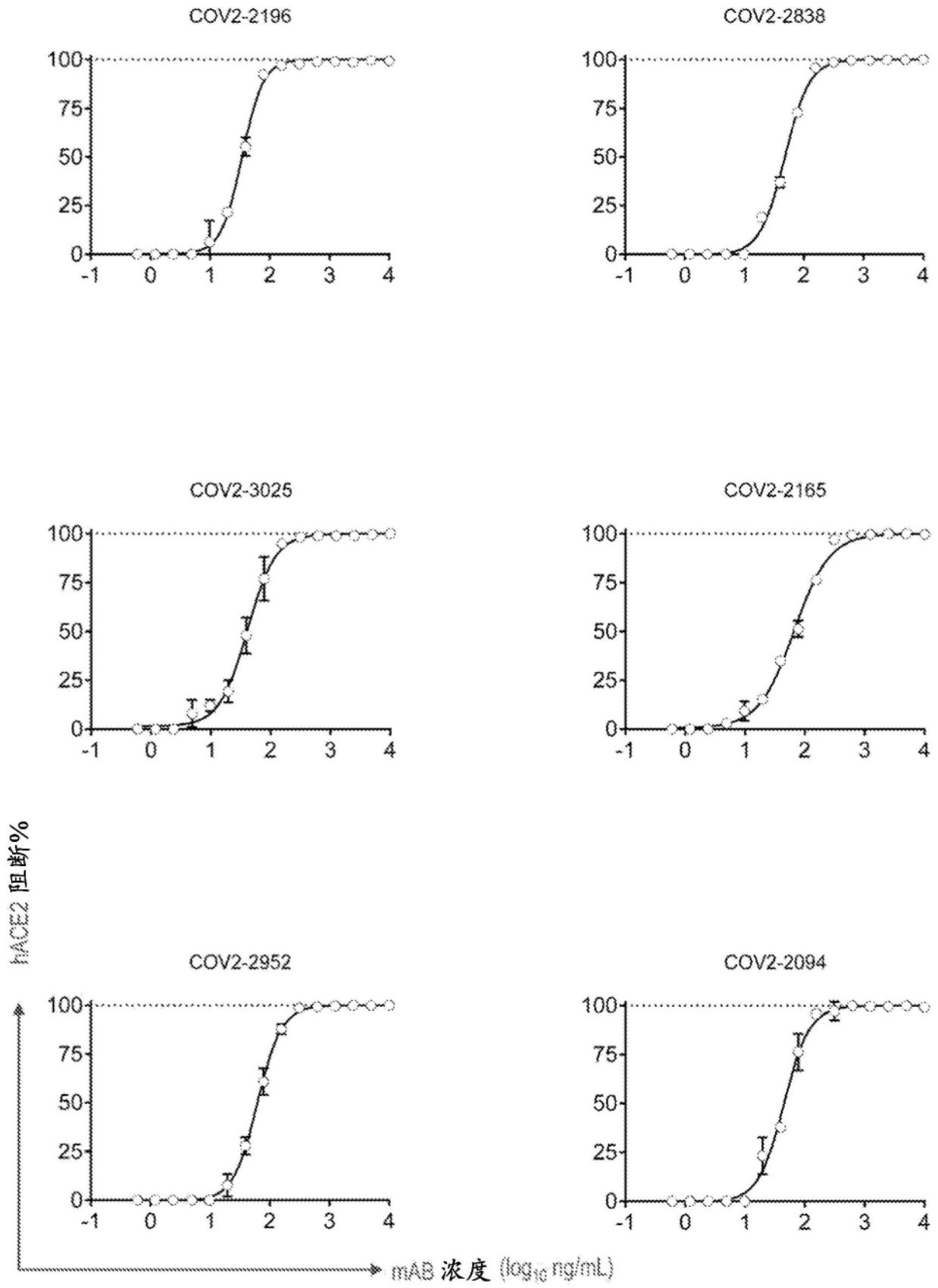

COV2-2196
COV2-2838
COV2-3025
COV2-2165
COV2-2952
COV2-2094
hACE2 阻断%
mAB 浓度 (log10 ng/mL)

图25A

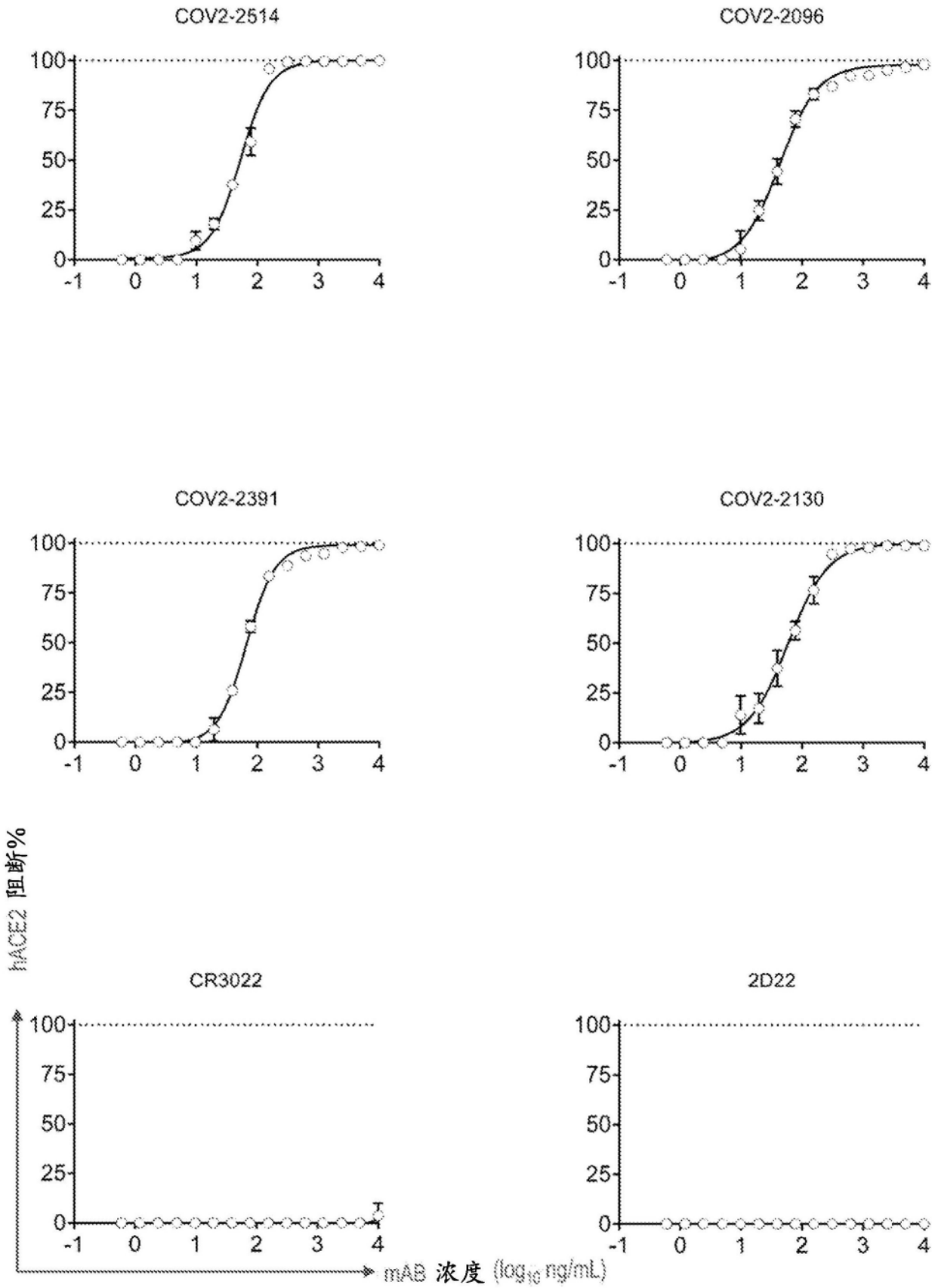

COV2-2514
COV2-2096
COV2-2391
COV2-2130
CR3022
2D22
hACE2 阻断%
100
75
50
25
0
-1
0
1
2
3
4
mAB 浓度 (log_{10} ng/mL)

图25B

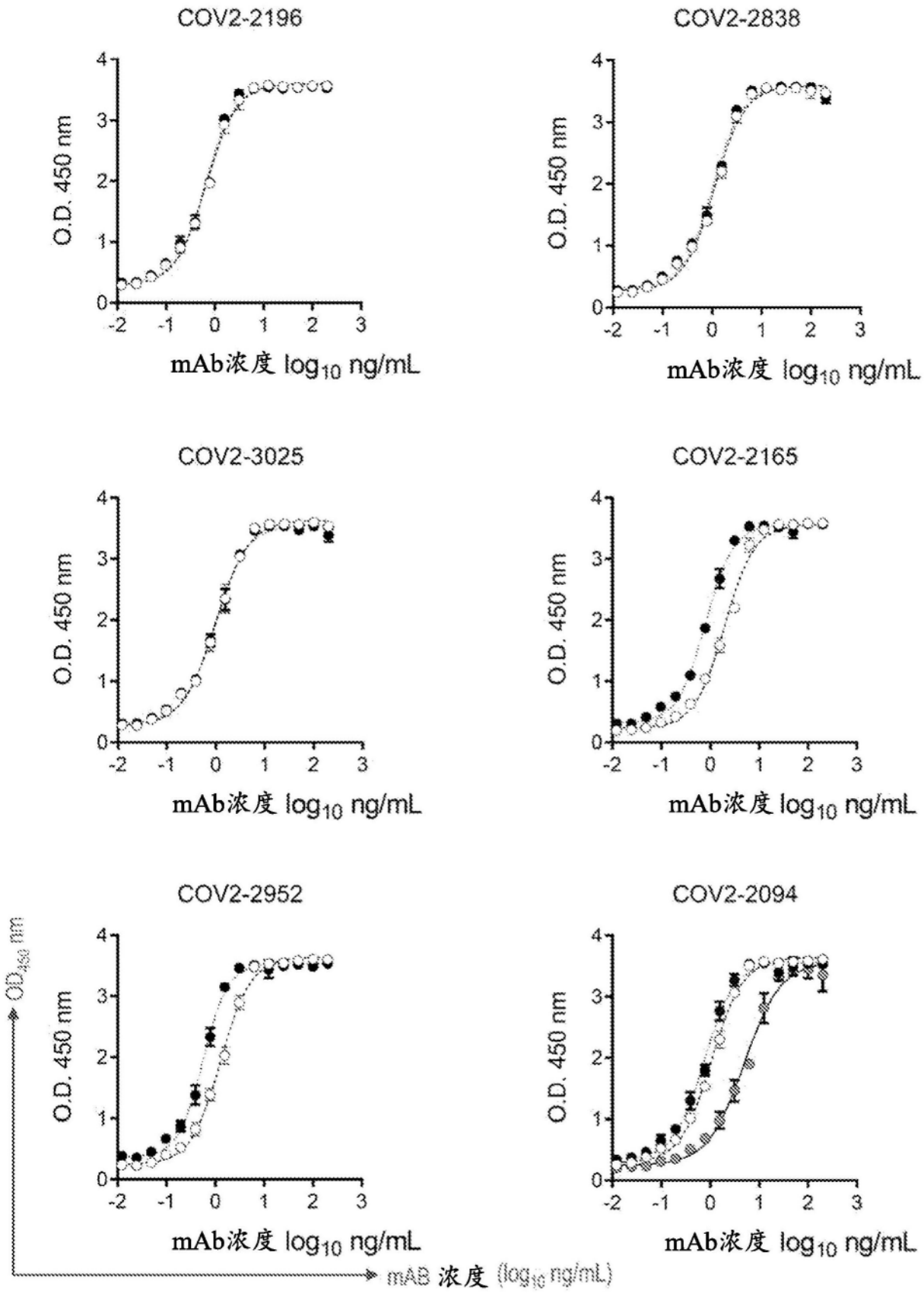

COV2-2196
COV2-2838
COV2-3025
COV2-2165
COV2-2952
COV2-2094
O.D. 450 nm
mAb浓度 log10 ng/mL
OD450 nm
mAB 浓度 (log10 ng/mL)

图26A

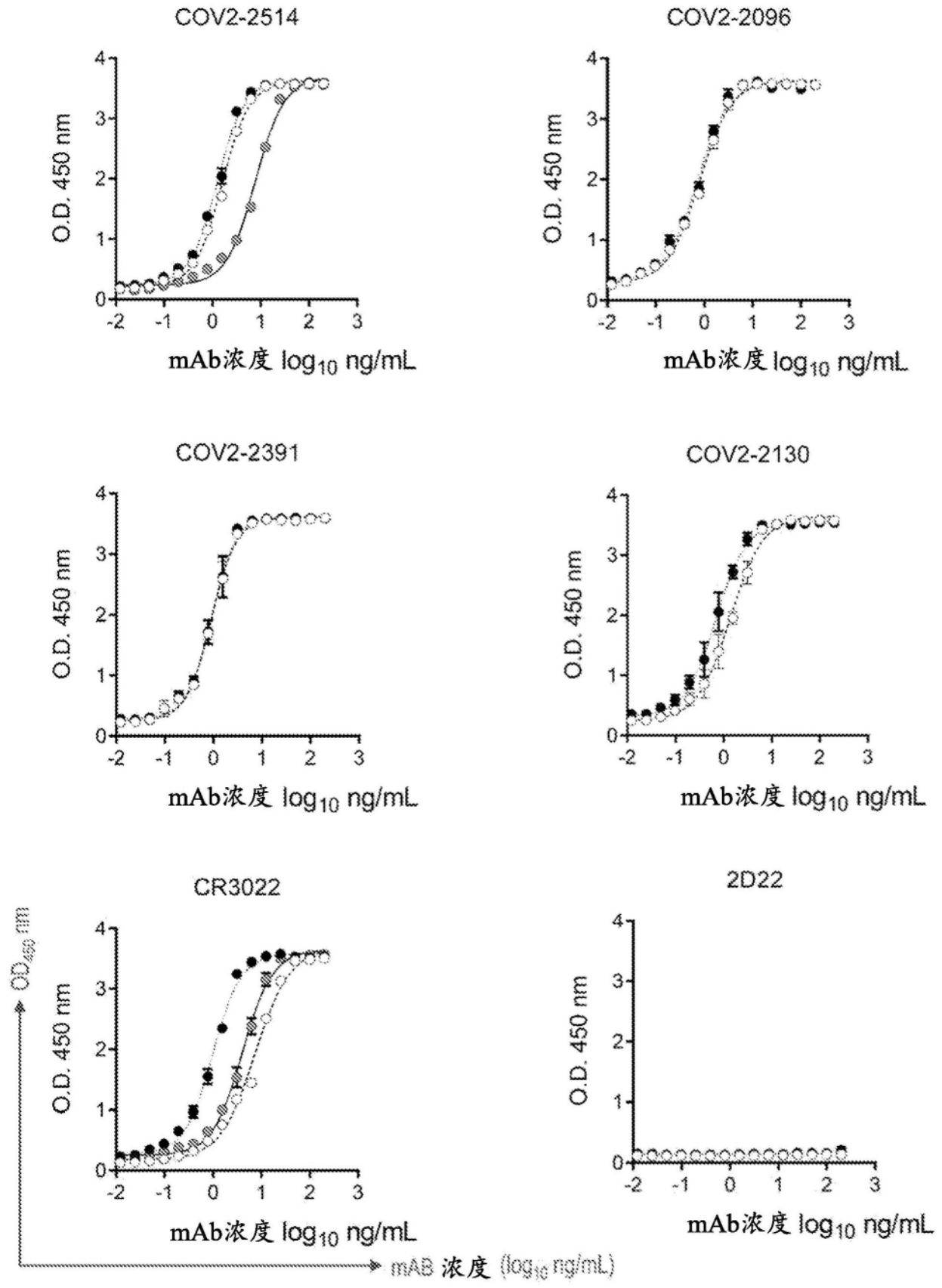

COV2-2514
O.D. 450 nm
mAb浓度 log10 ng/mL
COV2-2096
O.D. 450 nm
mAb浓度 log10 ng/mL
COV2-2391
O.D. 450 nm
mAb浓度 log10 ng/mL
COV2-2130
O.D. 450 nm
mAb浓度 log10 ng/mL
CR3022
O.D. 450 nm
mAb浓度 log10 ng/mL
2D22
O.D. 450 nm
mAb浓度 log10 ng/mL
OD450 nm
mAB 浓度 (log10 ng/mL)

图26B

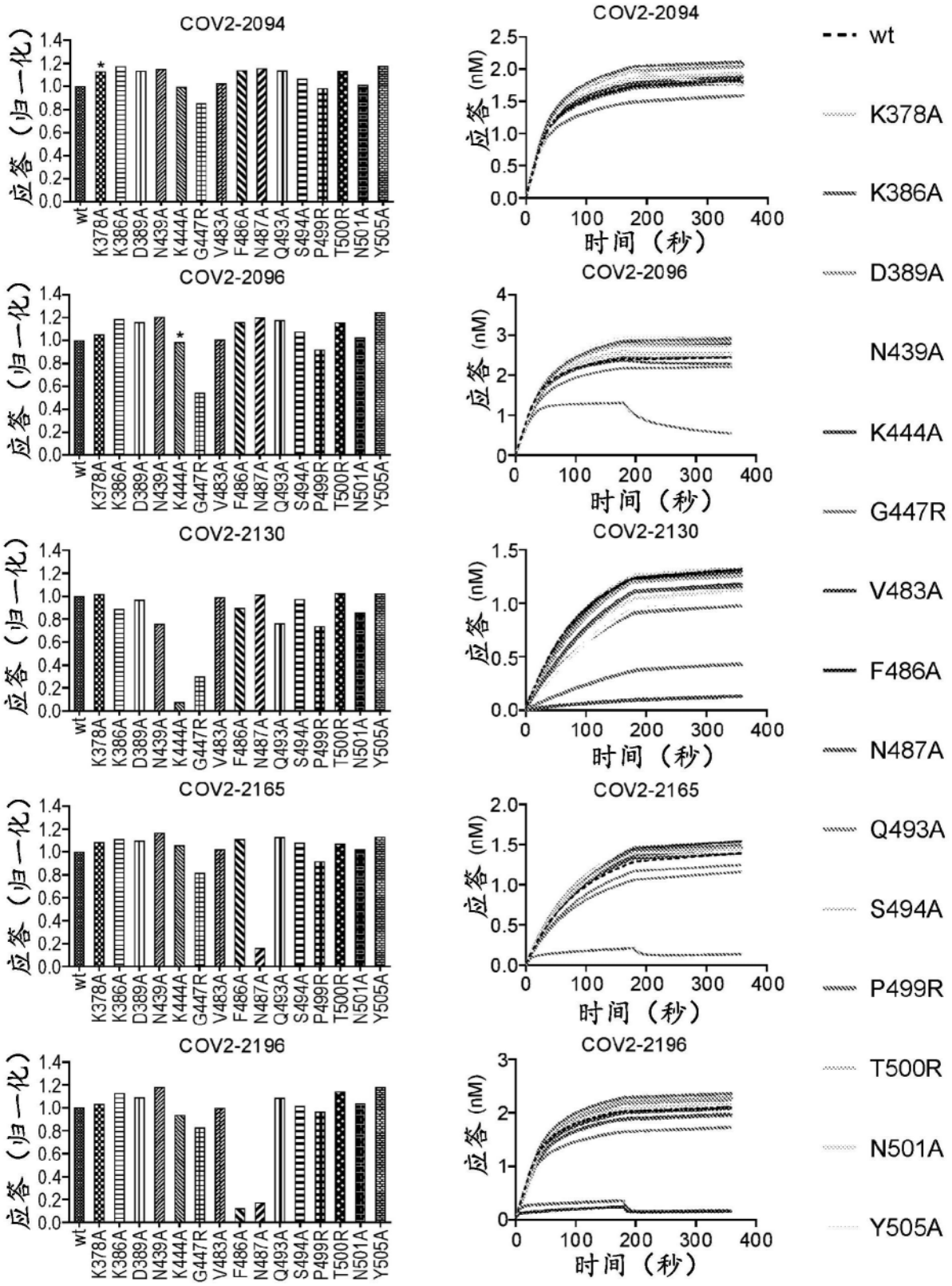

COV2-2094
COV2-2096
COV2-2130
COV2-2165
COV2-2196
应答（归一化）
wt
K378A
K386A
D389A
N439A
K444A
G447R
V483A
F486A
N487A
Q493A
S494A
P499R
T500R
N501A
Y505A
应答 (nM)
时间（秒）

图27A

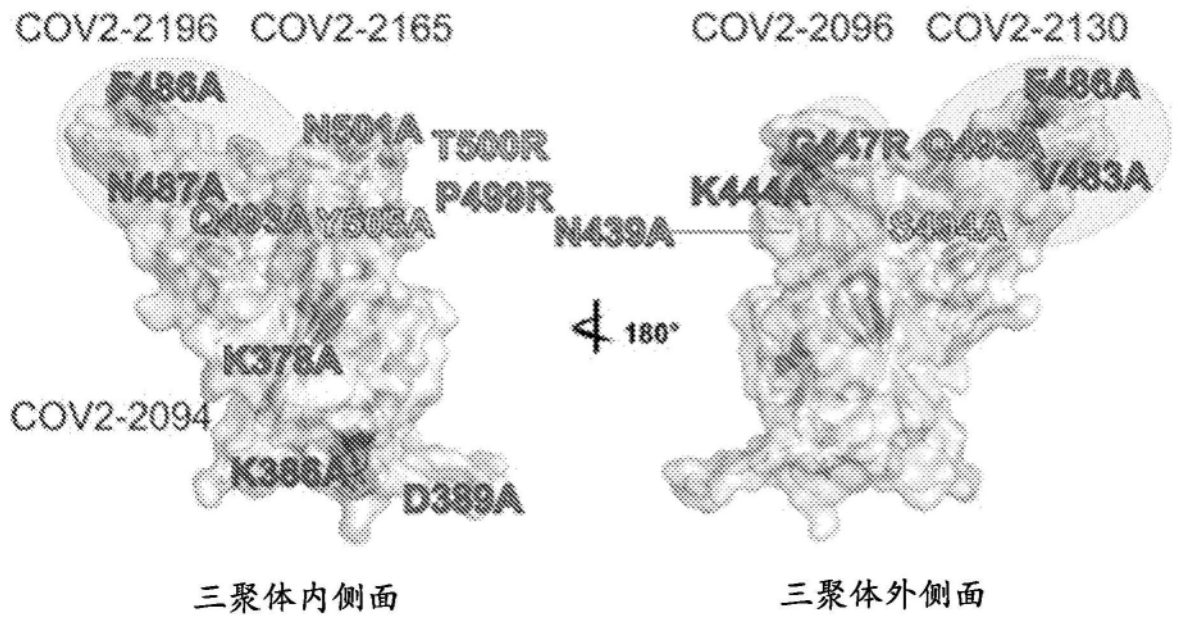

COV2-2196
COV2-2165
COV2-2096
COV2-2130
F486A
N501A
T500R
N487A
P499R
K444A
V483A
N439A
180°
K378A
COV2-2094
K386A
D389A
三聚体内侧面
三聚体外侧面

图27B