

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年3月3日 (03.03.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/041745 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/10 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/086477

(22) 国际申请日: 2021年4月12日 (12.04.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010889404.6 2020年8月28日 (28.08.2020) CN
202010889400.8 2020年8月28日 (28.08.2020) CN
202010887508.3 2020年8月28日 (28.08.2020) CN
202010889418.8 2020年8月28日 (28.08.2020) CN
202010889425.8 2020年8月28日 (28.08.2020) CN
202110361333.7 2021年4月2日 (02.04.2021) CN

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

(71) 申请人: 安源医药科技(上海)有限公司 (AMPSOURCE BIOPHARMA SHANGHAI INC.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。

(72) 发明人: 李强(LI, Qiang); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 孙见宇(SUN, Jianyu); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 武翠(WU, Cui); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 张晓峰(ZHANG, Xiaofeng); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 刁家升(DIAO, Jiasheng); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 周利(ZHOU, Li); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 马心鲁(MA, Xinlu); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: ANTIBODY AGAINST SARS-COV-2 CORONAVIRUS S PROTEIN AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 针对SARS-CoV-2冠状病毒S蛋白的抗体及其用途

(57) Abstract: Provided are an antibody against SARS-CoV-2 coronavirus S protein and an application thereof in preparation of a drug for treating novel coronavirus pneumonia COVID-19. The antibody can specifically recognize and bind to the SARS-CoV-2 coronavirus S protein with a high affinity. This ensures that the antibody can block the infection of human cells by SARS-CoV-2.

(57) 摘要: 提供了一种针对SARS-CoV-2冠状病毒S蛋白的抗体及其在用于制备治疗新型冠状病毒肺炎COVID-19的药物中的用途。所述抗体能够特异性识别并高亲和力结合SARS-CoV-2冠状病毒S蛋白, 这确保了所述抗体能够阻断SARS-CoV-2对人体细胞的感染。



WO 2022/041745 A1

针对 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的抗体及其用途

技术领域

本发明涉及治疗性抗体及分子免疫学领域，更具体地，涉及一种 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的重组单克隆抗体，以及这种抗体的用途，特别是在治疗、预防和诊断由 SARS-CoV-2 引起的 COVID-19 疾病中的用途。

背景技术

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 作为一种新近出现的人类病原体，可引起发烧、乏力、干咳为主要表现的严重的呼吸系统疾病和 COVID-19 肺炎。根据世界卫生组织 2020 年 8 月 19 日的数据，全球已确诊病例为 21,756,357 人，导致 771,635 人死亡。依据基因组核酸序列，新的病原体被证明是 β 冠状病毒属的一种新型成员。SARS-CoV-2 与蝙蝠冠状病毒 RaTG13 的基因组序列相似性达 96.2% (Zhou P *et al*, 2020, *Nature*, 579:270-273)，与两种蝙蝠 SARS 样冠状病毒 bat-SL-CoVZC45 (同源性 88%) 和 bat-SL-CoVZXC21 (同源性 87%) 密切相关，但与 SARS-CoV (同源性 79%) 和 MERS-CoV (同源性 50%) 亲缘关系相对较远 (Lu R *et al*, 2020, *Lancet*, 395:565-574)。与 SARS-CoV 相比，SARS-CoV-2 冠状病毒更容易在人与人之间传播，WHO 已宣布 COVID-19 疾病为全球大流行疾病，目前新冠病毒已传播至全球各地。

与其它冠状病毒一样，新型冠状病毒 SARS-CoV-2 是一种正义 RNA 病毒，编码几种主要蛋白，S、M、N 和 E，依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 RDRP 以及十几种非结构蛋白。其中 S、M、N 和 E 蛋白用于包装病毒结构，RDRP 和十几种非结构蛋白用于病毒基因组 RNA 复制和各个蛋白 mRNA 的合成。SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 病毒很相似，氨基酸序列同源度较高，它的 S、M、N、E 和 RDRP 蛋白的氨基酸个数和与 SARS-CoV 的同源度分别为 1273 (76%)、222 (91%)、419 (91%)、75 (95%)、932 (96%)。类似于 SARS-CoV 病毒，SARS-CoV-2 病毒呈球形，有包膜，外周排列有冠状刺突。SARS-CoV-2 的刺突 S 蛋白形成三聚体 (Wrapp D *et al*, 2020, *Science*, 6483:1260-1263)，型如蘑菇状，镶嵌在病毒外表面膜上。S 蛋白是该病毒的主要抗原成分，负责病毒与被入侵宿主细胞受体 ACE2 结合以及病毒与细胞的融合。类似于 SARS-CoV 病毒 S 蛋白 (Yuan Y *et al*, 2017, *Nat Commun*, 8: 15092)，SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白主要分为两个结构域，S1 (1-685) 和 S2 (686-1122)，以及一个短跨膜区和细胞质尾端。在型如蘑菇的 S 蛋白三聚体中，三个 S1 结构域形成“蘑菇帽”，三个 S2 结构域形成“蘑菇茎”。其中，S1 中的 RBD 结构域 (Receptor binding domain, 氨基酸 331-527) 负责与被入侵宿主细胞受体 ACE2 结合，S2 负责与宿主细胞融合。S2 结构域在整体 S 蛋白中通常以折叠或蜷曲压缩的构象存在，当病毒在 S1 脱落后与宿主细胞融合时，S2 展示伸展构象以便插入宿主细胞膜 (Walls AC *et al*, 2017, *Proc Natl Acad Sci USA*, 114:11157-11162)。据报道，SARS-CoV-2 病毒的 S 蛋白与人细胞受体的结合亲和力远高于 SARS-CoV 病毒的 S 蛋白 (Wrapp D *et al*, 2020, *Science*, 6483:1260-1263; Walls AC *et al*, 2020, *Cell*, 181:281-292)。另一个与 SARS-CoV 病毒 S 蛋白的不同之处在于，SARS-CoV-2 S 蛋白有一个 Furin 酶切位点 RRAR (氨基酸 682-685)，这个酶切位点把 S 蛋白分为 S1 和 S2 两部分，酶切后的 S1 和 S2 以非共价键的形式联系在一起。由于 S1/S2 之间存在 Furin 酶切位点以及 Furin 酶在真核组织及细胞中广泛

表达,同时,包含多碱性氨基酸的 Furin 位点,还可以被其它以赖氨酸或精氨酸为靶点的酶,如细胞表面酶 TMPRSS2、核内体 cathepsin L 酶或可能的胰蛋白酶(Trypsin)等所降解(Hoffmann M *et al*, 2020, Cell, 181(2):271-280.e8; Shang J *et al*, 2020, Proc Natl Acad Sci USA, 117:11727-11734; Belouzard S *et al*, 2012, Viruses, 4:1011-1033),因此,SARS-CoV-2 的 S1/S2 之间更容易被切割,导致 S1 结构域在病毒与人细胞融合时更容易脱落,从而增加 S2 的融合能力和病毒感染力。而 SARS-CoV 病毒 S1/S2 之间仅通过一个碱性氨基酸精氨酸连接,S 蛋白在此处被细胞表面酶 TMPRSS2 和核内体中的 cathepsin L 酶切后而感染宿主细胞(Belouzard S *et al*, 2012, Viruses, 4:1011-1033; Belouzard S *et al*, 2009, Proc Natl Acad Sci USA, 106:5871-5876)。所以,以上两个不同之处,即 Furin 酶切位点的存在和与人受体 ACE2 的高亲和力,可能是造成 SARS-CoV-2 冠状病毒高传染力的原因。由于 S 蛋白负责与人体宿主细胞受体结合以及与宿主细胞的融合,S 蛋白是 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 冠状病毒治疗性中和抗体的主要靶点。

目前还没有治疗 SARS-CoV-2 冠状病毒的特效药物,疫苗和中和抗体似乎是目前最有希望成功的药物。中和抗体通过阻断病毒入侵宿主细胞而防止病毒传播,达到治疗疾病的目的。关于 SARS-CoV-2 的中和抗体,最近有许多文献报道。例如,再生元制药公司通过转基因鼠和单个 B 细胞测序平台开发了一系列针对 RBD 结构域的 SARS-CoV-2 中和抗体(Hansen J *et al*, 2020, Science, 369: 1010-1014)。另有研究者们也利用单个 B 细胞测序技术平台开发了一系列针对 SARS-CoV-2 的 S 蛋白 RBD 结构域的中和抗体(Wu Y *et al*, 2020, Science, 368, 1274-1278; Cao Y *et al*, 2020, Cell, 182: 73-84; Pinto D *et al*, 2020, Nature, 583: 290-295; Ju B *et al*, 2020, Nature, 584: 115 - 119; Chi X *et al*, 2020, Science, 369: 650-655)。

目前已有三种针对 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的中和抗体进入临床研究。2020 年 6 月 1 日,礼来公司与 AbCellera 合作研发的中和抗体 LY-CoV555 完成首批患者给药,进入 I 期临床研究。LY-CoV555 是一种 IgG1 亚型的针对 SARS-CoV-2 刺突蛋白 S 的有效中和抗体。6 月 11 日,再生元制药公司的双抗体鸡尾酒 REGN-COV2 首次进入临床研究阶段,并且基于 I 期临床良好的安全性数据,该研究目前得以直接进入 III 期临床。今年 6 月,君实生物与中国科学院微生物所共同开发的重组全人源抗 SARS-CoV-2 单克隆抗体注射液(JS016)获批进入 I 期临床试验。JS016 是国内最早进入临床的新冠病毒中和抗体。在现在全球新冠疫情严峻的形势下,尽快研发出 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白中和抗体,具有更高的特异性、更佳临床药效和更低的治疗成本,这将给 SARS-CoV-2 感染患者提供更多的用药选择。

发明内容

本发明提供了一种能够特异性识别并高亲和力结合 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的抗体。本发明所述抗体能够阻断 SARS-CoV-2 感染宿主细胞。本发明公开的 S 蛋白抗体可以(单独或其它制剂或治疗方法组合)用于治疗、预防和/或诊断由 SARS-CoV-2 引起的疾病,例如 COVID-19。

本发明第一方面,提供一种能够特异性结合 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含的重链可变区(VH)包含至少一个、两个或三个选自下组的互补决定区(CDR):

(i) HCDR1, 其具有如 SEQ ID NO: 1、7、16、22、31、37、46、52、61、67、76、82、111、117、126 或 132 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(ii) HCDR2, 其具有如 SEQ ID NO: 2、8、17、23、32、38、47、53、62、68、77、83、101、104、112、118、127、133、165 或 167 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列; 和

(iii) HCDR3, 其具有如 SEQ ID NO: 3、9、18、24、33、39、48、54、63、69、78、84、102、105、113、119、128、134、146、151、153、158、160、166 或 168 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

和/或, 其包含的轻链可变区 (VL) 包含至少一个、两个或三个选自下组的互补决定区 (CDR):

(iv) LCDR1, 其具有如 SEQ ID NO: 4、10、19、25、34、40、49、55、64、70、79、85、91、92、103、106、114、120、129、135、152 或 159 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(v) LCDR2, 其具有如 SEQ ID NO: 5、11、20、26、35、41、50、56、65、71、80、86、115、121、130、136 或 141 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列; 和

(vi) LCDR3, 其具有如 SEQ ID NO: 6、21、36、51、66、81、116、131 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中, 所述重链可变区中含有的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3, 和/或所述轻链可变区中含有的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3 由 Kabat 或 IMGT 编号系统定义。实施例 6 中的表 5 示例性地给出了鼠源抗体按 Kabat 或 IMGT 编号系统定义出的 CDR 氨基酸序列。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含 3 个 VH 可变区 CDR 和 3 个 VL 可变区 CDR, 其选自下述 26 组:

(1) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(2) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 7、8、9、10、11 或 6 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(3) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 16、17、18、19、20 或 21 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(4) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 22、23、24、25、26 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(5) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 31、32、33、34、35 或 36 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(6) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 37、38、39、40、41 或 36 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(7) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 46、47、48、49、50 或 51 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(8) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 52、53、54、55、56 或 51 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(9) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 61、62、63、64、65 或 66 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(10) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 67、68、69、70、71 或 66 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(11) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 76、77、78、79、80 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(12) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 82、83、84、85、86 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(13) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 1、2、3、91、5 或 6 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(14) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 7、8、9、92、11 或 6 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(15) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 16、101、

102、103、20 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(16) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 22、104、105、106、26 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(17) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 111、112、113、114、115 或 116 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(18) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 117、118、119、120、121 或 116 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(19) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 126、127、128、129、130 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(20) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 132、133、134、135、136 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(21) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、141 或 6 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(22) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 22、23、146、25、26 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(23) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 76、77、151、152、80 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(24) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 82、83、153、85、86 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(25) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 76、77、158、159、80 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(26) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 82、83、160、85、86 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1

个，2个或3个置换、缺失或添加）的序列；

(27) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 126、165、166、129、130 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(28) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 132、167、168、135、136 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为鼠源的或嵌合的，其重链可变区包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链 FR 区；和其轻链可变区包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链 FR 区。实施例 6 中的表 6 中给出了一些优选的鼠源抗体的可变区氨基酸序列编号。

在某些优选的实施方案中，所述鼠源抗体或其抗原结合片段包含选自下述 11 组的 VH 和 VL 结构域：

(1) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(2) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(3) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(4) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 58 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(5) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 72 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、

85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；

(6) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 87 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 88 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；

(7) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 93 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 94 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；

(8) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 97 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 98 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；

(9) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 107 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 108 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；

(10) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 122 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 123 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；

(11) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 137 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 138 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为人源化的。实施例 6 给出了人源化策略的基本流程，表 6 中给出了一些优选的人源化抗体的可变区氨基酸序列编号。

在某些优选的实施方案中，所述人源化抗体或其抗原结合片段包含选自下述 9 组的 VH 和 VL 结构域：

(1) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(2) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(3) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 74 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(4) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 142 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 143 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(5) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 147 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 148 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(6) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 154 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 155 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(7) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 161 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 162 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列;

(8) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 125 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列;

(9) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 169 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 170 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列。

在某些实施方案中, 所述抗体包含来源于人免疫球蛋白的重链恒定区和轻链恒定区。

较优选地, 所述抗体包含人 κ 链恒定区氨基酸序列 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 95 所示)。

较优选地, 所述抗体包含选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区; 更优选地, 包含选自人 IgG1、IgG2 和 IgG4 的重链恒定区; 并且, 所述重链恒定区具有天然序列或与其所源自的天然序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加的序列。例如, 在一种实施方案中, 人源化抗体分子包含野生型人 IgG1 的重链恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 96 所示)。在一种实施方案中, 人源化抗体分子包括在根据 EU 编号的含有 M252Y、S254T、T256E 和 M428L 突变的人 IgG1 的重链恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 190 所示)。在另一种实施方案中, 人源化抗体分子包含野生型人 IgG2 的重链恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 99 所示)。在一种实施方案中, 人源化抗体分子包括在根据 EU 编号的铰链区修饰的人 IgG2 (例如缺失 ERKCC, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 100 所示), 参见中国专利号 CN104177496B。在另一种实施方案中, 人源化抗体分子包含野生型人 IgG4 的重链恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 109 所示)。或采用修饰的人 IgG4 恒定区序列; 在一种实施方案中, 人源化抗体分子包括在根据 EU 编号的第 228 位突变 (例如 S 变为 P) 的人 IgG4 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 110 所示)。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体的重链具有如 SEQ ID NO: 29、59、89、139、144、149、156、163 或 171 所示的氨基酸序列; 或与上述序列中的任何相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个置换、缺失或添加) 的序列; 或与上述序列中的任何相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至

少 99%、或更高同一性的序列；和/或，所述抗体的轻链具有如 SEQ ID NO: 30、60、90、140、145、150、157、164 或 172 所示的氨基酸序列；或与上述序列中的任何相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或与上述序列中的任何相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或更高同一性的序列。

在某些较优选的实施方案中，上述的置换是保守置换。

在上述任何实施方案中，本发明所述抗体或其抗原结合片段，其中，SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白具有：

(a) 如 SEQ ID NO: 189 所示的氨基酸序列；

(b) 是对 SEQ ID NO: 189 所示的氨基酸序列置换、缺失或添加一个或几个氨基酸残基而得的氨基酸序列。

在某些优选的实施方案中，所述置换包括 K417 和/或 L452 和/或 E484 和/或 N501。

在某些优选的实施方案中，所述置换的 K417 是 K417N，和/或 L452 是 L452R，和/或 E484 是 E484K，和/或 N501 是 N501Y。

在上述任何实施方案中，本发明所述抗体或其抗原结合片段能够以 10 nM 或更低的 K_D 结合 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白，较优选地，以 1 nM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白；较优选地，以 100 pM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白；更优选地，以 10 pM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白；最优选地，以 1 pM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白。

本发明的第二方面，提供了编码上述抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子。

本发明的优选实施例中，编码所述抗体重链的 DNA 分子具有如 SEQ ID NO: 173、175、177、179、181、183、185 或 187 所示的核苷酸序列，和编码所述抗体轻链的 DNA 分子具有如 SEQ ID NO: 174、176、178、180、182、184、186 或 188 所示的核苷酸序列。

本发明的第三方面，提供了包含上述 DNA 分子的载体。

本发明的第四方面，提供了包含上述载体的宿主细胞；所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NS0 细胞或其它哺乳动物细胞，优选为 CHO 细胞；

本发明的第五方面，提供了一种药物组合物，所述组合物包含上述抗体或其抗原结合片段以及可药用赋形剂、载体或稀释剂。

本发明的第六方面，还提供了制备本发明所述抗体或其抗原结合片段的方法，其包括：(a) 获得抗体或其抗原结合片段的基因，构建抗体或其抗原结合片段的表达载体；(b) 通过基因工程方法将上述表达载体转染到宿主细胞中；(c) 在允许产生所述抗体或其抗原结合片段的条件下培养上述宿主细胞；(d) 分离、纯化产生的所述抗体或其抗原结合片段。

其中，步骤(a)中所述表达载体选自质粒、细菌和病毒中的一种或多种，优选地，所述表达载体为 pcDNA3.1；

其中，步骤(b)通过基因工程方法将所构建的载体转染入宿主细胞中，所述宿主细胞包括原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NS0 细胞或其它哺乳动物细胞，优选为 CHO 细胞。

其中，步骤(d)通过常规的免疫球蛋白纯化方法，包含蛋白质 A 亲和层析和离子交换、疏水层析或分子筛方法分离、纯化所述抗体或其抗原结合片段。

本发明的第七方面，提供了所述抗体或其抗原结合片段在制备治疗和预防由 SARS-CoV-2 冠状病毒引起的疾病的药物中的用途。

优选地，所述疾病为新型冠状病毒肺炎(COVID-19)；例如，所述疾病为由 B.1.351 突变株和/或 B.1.1.7 病毒株引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)。

本发明的第八方面，提供了一种利用上述抗体检测或测定生物样品中 SARS-CoV-2 病毒或其抗原的存在情况或进行定量的免疫测定方法；该方法包括将待测生物样品与本发明的抗 SARS-CoV-2 病毒 S 蛋白单克隆抗体或其抗原结合片段孵育，形成抗原-抗体复合物，对形成的结合复合物进行定性检测和定量测定，该复合物的存在或数量指示了 SARS-CoV-2 病毒的存在情况或者含量；具体地，所述方法包括如下步骤：

将待测生物样品与本发明的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段在合适的条件下孵育；

(2) 检测上述步骤中结合复合物的存在。

根据本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段可不依赖于使用的标记物（例如，酶、荧光等），并且不依赖于检测模式（例如，荧光免疫测定法、酶联免疫吸附测定法或化学发光测定法等）或测定法原理（例如，夹心法、竞争法等）而被用于上述免疫测定方法中；其中，所述抗原结合片段的实例包括但不限于 F(ab')₂、Fab'、Fab 和 Fv。

上述免疫测定法，包括酶免疫测定、放射免疫测定、荧光免疫测定、化学发光免疫测定、蛋白质印迹、免疫层析、乳胶凝集实验等等；并且，上述免疫测定法都可用于以竞争法或夹心法，用标记物标记的抗原或抗体测定生物样品中的靶抗原。

上述竞争性方法是基于检测标本中 SARS-CoV-2 病毒和已知量的标记的 SARS-CoV-2 病毒 S 蛋白与本发明单克隆抗体或其抗原结合片段进行定量竞争性结合反应；具体地，上述竞争法包括：将预定量的针对 SARS-CoV-2 病毒 S 蛋白的本发明单克隆抗体或其抗原结合片段包埋在固相载体上，然后加入待检测的含有 SARS-CoV-2 病毒的生物样品和预定量的用标记物标记的 SARS-CoV-2 病毒 S 蛋白，并于适当的条件下孵育足够长的时间；反应后充分洗涤所述的固相并检测保留在载体上的或测定未保留在载体上的标记物的信号值；然后将所测得的信号值与平行测得的预定量的对照样品的信号值相比较以确定样品中 SARS-CoV-2 病毒的存在及其相对量；优选地，几乎同时加入标记抗原和待检测生物样品。

上述夹心法是基于作为俘获抗体（或固相抗体）的本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段以及能够配合使用的标记抗体都能特异性结合生物样品中的 SARS-CoV-2 病毒，通过对标记抗体进行定量来测定样品中 SARS-CoV-2 病毒的含量；具体地，上述夹心法包括：将本发明的针对 SARS-CoV-2 病毒 S 蛋白的特异性单克隆抗体或其抗原结合片段结合到固相载体上形成固相抗体（也称俘获抗体或第一抗体），然后向被包被的固相载体上分别加入待检生物样品和对照样品并于适当的条件下孵育足够长的时间；反应后充分洗涤

所述的固相并加入适量标记物标记的、可与 SARS-CoV-2 病毒 S 蛋白结合的第二抗体并再次孵育；反应后充分洗涤所述的固相并以适合的方法检测与第二抗体结合的标记物的信号值；将所测得的信号值与平行测得的预定量的对样品品的信号值相比较以确定样品中 SARS-CoV-2 病毒的存在及其相对量。

第二抗体也可以是其它多克隆抗体；优选地，第二抗体为单克隆抗体。

更优选地，所述第二抗体选自本发明的任意一个能够与第一抗体配合使用的单克隆抗体或其抗原结合片段。

其中，标记物可以是放射性同位素(例如 125I)、酶、酶底物、磷光物质、荧光物质、生物素和着色物质。

优选地，本发明所用的的标记物包括如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶和葡萄糖氧化酶；标记物还可以是荧光物质，如荧光素衍生物和罗丹明衍生物；另外，标记物还可以是允许时间分辨荧光测定的稀土元素或稀土元素复合物，如铕或铕复合物；另外，标记物可以是磷光物质，如 γ 吡啶酯和异鲁米诺；或者是放射性同位素如 125I、3H、14C 和 32P；另外，标记物可以是着色物质，如乳胶颗粒和胶体金。即本发明包括利用测定颜色、荧光、时间分辨荧光、化学发光、电化学荧光或放射性而定性或定量测定生物成分中的 SARS-CoV-2 病毒的存在情况或含量。

根据上述竞争法和夹心法进行 SARS-CoV-2 免疫测定时，都需要充分洗涤固相，测量与标记物结合的活性。当标记物是放射性同位素时，用孔计数器或液相闪烁计数器进行测量。当标记物是酶时，加入底物，在显色后用比色或荧光测定酶活性。当标记物是荧光物质、磷光物质或着色物质时，可分别通过本领域已知的方法进行测量。

上述提到的生物样品选自血浆、全血、嗽口液、咽拭子、尿液、粪便和支气管灌流液。

上述提到的固相载体包括但不限于硝酸纤维素膜、胶乳颗粒、磁性颗粒、胶体金、珠子或诸如玻璃、纤维玻璃或聚合物（如聚苯乙烯或聚氯乙烯）或纤维光学传感器。

本发明的第九方面，提供了上述单克隆抗体在制备 SARS-CoV-2 病毒检测试剂盒中的用途。

本发明的第十方面，提供了一种 SARS-CoV-2 病毒的检测试剂盒，其包含本发明的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段；用于制备该检测试剂的单克隆抗体不受特别限制，可以是以上述本发明任一单克隆抗体或其抗原结合片段（如 F(ab')₂、Fab'、Fab 和 scFv）作为固相抗体或标记抗体中的其中一种被单独使用；也可以是上述本发明中针对不同抗原表位的两个单克隆抗体或其抗原结合片段分别作为固相抗体或标记抗体被组合使用。

本发明的一优选实施例中，所述检测试剂盒包括：

(1) 选自以下任一：

- a. 固相载体和第一抗体；
- b. 包被有第一抗体的固相载体；

所述第一抗体为选自本发明的任意一个单克隆抗体或其抗原结合片段；

(2) 第二抗体；

所述第二抗体任选地进行了适当标记，并且第二抗体选自本发明所述的能够与(1)中所述第一抗体配合

使用的单克隆抗体或其抗原结合片段。

上述检测试剂所包含的本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段可预先固定在固相载体上，形成固相抗体，所述固相载体包括但不限于硝酸纤维素膜、胶乳颗粒、磁性颗粒、胶体金、珠子或诸如玻璃、纤维玻璃或聚合物（如聚苯乙烯或聚氯乙烯）或纤维光学传感器；本发明的一优选实施例中，所述固相载体为微量滴定板。

上述免疫测定试剂所包含的本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段可预先用标记物进行标记，形成标记抗体，所述标记物包括但不限于放射性同位素(例如 125I)、酶、酶底物、磷光物质、荧光物质、生物素和着色物质；优选地，所述酶包括如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶和葡萄糖氧化酶；所述荧光物质包括如荧光素衍生物和罗丹明衍生物以及稀土元素或稀土元素复合物，如铕或铕复合物；所述磷光物质包括如 γ 吡啶酯和异鲁米诺；所述放射性同位素包括如 125I、3H、14C 和 32P；所述着色物质包括如乳胶颗粒和胶体金；本发明的一优选实施例中，所述标记物为生物素。

本发明的第十一方面，提供了上述免疫测定试剂在诊断 SARS-CoV-2 病毒感染所致疾病中的用途。

优选地，所述疾病为新型冠状病毒肺炎（COVID-19）；例如，所述疾病为由 B.1.351 突变株和/或 B.1.1.7 病毒株引起的新型冠状病毒肺炎（COVID-19）。

本发明公开的技术方案，取得了有益的技术效果，概括如下：

通过小鼠杂交瘤平台，用 S 蛋白（氨基酸 326-685）和 S 三聚体（氨基酸 16-1213）作为免疫抗原免疫小鼠，获得了一系列 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的鼠源抗体，这些抗体能够特异性识别并高亲和力结合 S 蛋白，KD 值达到 pM 级。

ACE2 体外竞争实验结果表明，这些鼠源抗体与人 ACE2 受体竞争 S 蛋白的结合位点，IC50 值低至 nM 级。

3、体外假病毒抑制实验结果表明，这些鼠源抗体能够有效抑制 SARS-CoV-2 冠状病毒感染宿主细胞，IC50 值低至 nM 级。

4、进一步，对鼠源抗体进行了人源化改造，降低了免疫原性。人源化抗体保留了鼠源抗体的亲和力和假病毒抑制活性，结合亲和力 KD 值达到 pM 级，假病毒抑制活性相当于 nM 级。以上这些特性为抗体在临床上的应用奠定了基础。

5、本发明提供的抗体还可以用于检测样品中 SARS-CoV-2 病毒或者其相应抗原存在情况，所述抗体的检出灵敏度低于 100 pg/ml；更优地，低于 10 pg/ml。

发明详述

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同

的含义。

缩写和定义

CDR	Complementarity-Determining Region, 免疫球蛋白可变区中的互补决定区, 用 Kabat、IMGT、Chothia 或 AbM 编号系统界定 (参见术语“超变区”或“CDR 区”或“互补决定区”)。
EC ₅₀	产生 50%功效或结合的浓度
ELISA	酶联免疫吸附测定
FR	抗体框架区 (Framework), 将 CDR 区排除在外的免疫球蛋白可变区
HRP	辣根过氧化物酶
IC ₅₀	产生 50%抑制的浓度
IgG	免疫球蛋白 G
Kabat	由 Elvin A Kabat 倡导的免疫球蛋白氨基酸序列比对及编号系统。
mAb	单克隆抗体
PCR	聚合酶链式反应
V 区	在不同抗体之间序列可变的 IgG 链区段。其延伸到轻链的 109 位 Kabat 残基和重链的第 113 位残基。
VH	免疫球蛋白重链可变区
VL	免疫球蛋白轻链可变区
K _D	平衡解离常数
k _a	结合速率常数
k _d	解离速率常数

术语“EC₅₀”是指在使用抗体或其抗原结合片段进行的体外或体内测定中, 诱导 50%应答的抗体或其抗原结合片段的浓度, 即在最大响应和基线之间一半时的浓度。

术语“EU 编号系统” (EU Numbering System or Scheme): EU 是指上个世纪 60 年代末 (1968-1969), Gerald M Edelman 等人分离纯化得到第一个人 IgG1 免疫球蛋白, 命名为 EU, 测定了其氨基酸序列并为其编号 (Edelman GM *et al*, 1969, Proc Natl Acad USA, 63:78-85)。其它的免疫球蛋白的重链恒定区与 EU 进行氨基酸序列比对, 对应氨基酸位置就是 EU 编号。EU 编号系统主要针对的是免疫球蛋白重链恒定区, 包括 CH1, CH2, CH3 和铰链区。

术语“Kabat 编号系统”(Kabat Numbering System or Scheme): 1979 年, Kabat 等人首先提出了标准化的人免疫球蛋白可变区的编号方案 (Kabat EA, Wu TT, Bilofsky H, Sequences of Immunoglobulin Chains: Tabulation and Analysis of Amino Acid Sequences of Precursors, V-regions, C-regions, J-Chain and β₂-Microglobulins. 1979. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health)。在“免疫学相关蛋白质序列”一书中 (Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition. Bethesda, MD: US Department of Health and Human

Services, National Institutes for Health), Kabat 等人对抗体轻链和重链的氨基酸序列进行了比对并编号。他们发现这些被分析序列表现出可变的长度, 缺省和插入的氨基酸或氨基酸片段只能出现在特定的位置。有趣的是, 插入点多位于 CDR 内部, 但也可能出现在在框架区的某些位置。在 Kabat 编号方案中, 轻链可变区编号到 109 位置, 重链可变区编号到 113 位置, 轻重链的插入氨基酸通过字母识别并注释(例如, 27a, 27b ...)。所有 Lambda 轻链不包含位置 10 残基, 而 Lambda 和 Kappa 轻链由两个不同的基因编码, 位于不同的染色体上。Lambda 和 Kappa 轻链可以通过它们的恒定区氨基酸序列的不同来区分。与 EU 编号系统只针对重链恒定区不同, Kabat 编号系统的编号范围覆盖全长免疫球蛋白序列, 包括免疫球蛋白轻链和重链的可变区和恒定区。

术语“结合”定义抗原上的特定表位与其对应抗体之间的亲和性相互作用, 一般也理解为“特异性识别”。“特异性识别”的意思是本发明的抗体不与或基本上不与目标抗原以外的任意多肽交叉反应。其特异性的程度可以通过免疫学技术来判断, 包括但不限于免疫印迹, 免疫亲和层析, 流式细胞分析等。在本发明中, 特异性识别优选通过流式细胞技术来确定, 而具体情况下特异性识别的标准可由本领域一般技术人员根据其掌握的本领域常识来判断。

术语“抗原”是外来能引发生物自身或人产生抗体的物质, 是任何可诱发免疫反应的物质, 如细菌、病毒等。外来抗原分子经过 B 细胞或抗原呈递细胞(如巨噬细胞、树突状细胞、内皮细胞和 B 细胞等)的辨识和加工处理, 并与主要组织相容性复合体(如 MHC II 分子)结合成复合物再活化 T 细胞, 引发连续的免疫反应。

术语“抗原表位”或“抗原决定簇”指具有抗原性(即可诱发特异性免疫应答)的分子上的特定化学基团或肽序列, 是免疫球蛋白或抗体特异性结合的抗原(例如 SARS-CoV-2 的 S 蛋白)上的位点。表位决定区通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖基侧链)组成且通常有特定的三维结构性质以及特定的电荷性质。抗原有两种表位或抗原决定簇(epitope), B 细胞表位和 T 细胞表位, 分别为 B 细胞和 T 细胞所识别。我们通常所说抗原表位, 一般是指 B 细胞抗原表位。B 细胞表位位于抗原分子的表面, 是与 B 细胞受体(BCR, 一种位于 B 细胞膜上的抗体)结合的抗原部位, B 细胞表位不需要加工处理即可直接被 B 细胞识别。然后 B 细胞吞噬抗原分子, 加工处理成小肽(15 个氨基酸左右大小, 抗原 T 细胞表位), 呈递给 Th 细胞(辅助性 T 细胞)。同时, 抗原分子也可以通过另一途径, 如通过巨噬细胞吞噬, 加工处理成小肽, 呈递给 Th 细胞。Th 受到 B 细胞和巨噬细胞的共刺激, 三种细胞共同相互作用, Th 细胞发出反馈信号给 B 细胞, 指示 B 细胞增殖, 分化成浆细胞和记忆细胞。浆细胞具有分泌抗体的功能, 介导体液适应性免疫。抗体通过其可变区 Fv 部分结合抗原分子, 通过其恒定区 Fc 部分与各种免疫细胞上的受体 FcR 结合, 从而指引各种免疫细胞对抗原分子进行杀伤, 行使 ADCC(通过 NK 细胞), CDC(通过补体)和 ADCP(通过巨噬细胞)功能。每种 B 细胞具有特异性, 只能分泌一种抗体。B 细胞表位依据其在蛋白氨基酸序列中的连续性可分为连续表位和构象表位(或称不连续表位)。B 细胞抗原表位大小不定, 有 5-20 个氨基酸大小。T 细胞抗原表位为 T 细胞所识别, 与 B 细胞表位不同, T 细胞表位可以位于抗原分子(例如病毒蛋白)中的任何位置, 因此 T 细胞抗原表位贯穿于整个蛋白的序列之中。T 细胞表位是连续性决定簇, 一般为 10-20 个氨基酸大小。T 细胞表位与 I 类(MHC I)或 II 类(MHC II) MHC 分子结合并呈递在细胞表面, 分别被 T 细胞的两个不

同子集 CD8⁺ T 细胞（杀伤性 T 细胞）和 CD4⁺ T 细胞（辅助性 Th 细胞）识别。因此，T 细胞表位有 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞表位两种。MHC I 分子几乎为所有细胞所表达，可以提供细胞内的一些状况，比如该细胞遭受病毒感染，则将病毒碎片之小肽分子通过 MHC I 提示在细胞表面，可以供杀手 CD8⁺ T 细胞等辨识，以进行扑杀。MHC II 分子大多位于抗原呈递细胞上，如巨噬细胞等。这类 MHC II 分子提供细胞外部（如体液中）的情况，像是组织中有细菌侵入，则巨噬细胞进行吞食后，把细菌碎片利用 MHC II 提示给辅助性 Th 细胞，启动免疫反应。B 细胞和 T 细胞只能对外来抗原分子的抗原表位进行辨识并结合，对源于生物自身的抗原片段，如蛋白分子及其片段，不具有结合能力，这是因为在 B 细胞和 T 细胞的分化、发育和成熟过程中，对自身蛋白分子或片段有高亲和力的 B 细胞和 T 细胞，被抑制发育成熟或发生凋亡。

术语“抗体”通常指具有免疫球蛋白一类功能的蛋白质结合分子。抗体的典型实例是免疫球蛋白，及其衍生物或功能片段，只要其显示所需的结合特异性即可。用于制备抗体的技术是本领域熟知的。“抗体”包括不同类的天然免疫球蛋白（例如 IgA、IgG、IgM、IgD 和 IgE）和亚类（如 IgG1、IgG2、IgA1、IgA2 等）。“抗体”还包括非天然免疫球蛋白，包括例如单链抗体，嵌合抗体（例如，人源化鼠抗体）和异源偶联抗体（例如，双特异性抗体），以及其抗原结合片段（例如，Fab', F(ab')₂, Fab, Fv 和 rIgG）。还可参见，例如，Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co, Rockford, Ill); Kuby J, Immunology, 3rd Ed, WH Freeman & Co, New York, 1997。抗体可以结合至一种抗原，称为“单特异性”；或结合至两种不同的抗原，称为“双特异性”；或结合至多于一种的不同的抗原，称为“多特异性”。抗体可以是单价、二价或多价的，即抗体可以一次结合至一个、两个或多个抗原分子。抗体“单价地”结合至某特定蛋白质，即一分子的抗体仅结合至一分子的蛋白质，但是该抗体也可以结合到不同的蛋白质。当抗体仅结合至两种不同蛋白质的每一种分子时，该抗体为“单价地”结合至每一种蛋白质，并且该抗体是“双特异性的”且“单价地”结合至两种不同蛋白质的每一种。抗体可以是“单体的”，即其包含单个多肽链。抗体可包含多个多肽链（“多聚体的”）或可包含两个（“二聚体的”）、三个（“三聚体的”）或四个（“四聚体的”）多肽链。若抗体为多聚体的，则该抗体可以是同源多聚体（homomultimer），即抗体包含多于一分子的仅一种多肽链，包括同源二聚体、同源三聚体或同源四聚体。可选的，多聚体抗体可以是异源多聚体，即抗体包含多于一种不同的多肽链，包括异源二聚体、异源三聚体或异源四聚体。

术语“单克隆抗体（mAb）”指获自基本均一抗体群体的抗体，例如除了可能少量存在的突变如天然产生的突变外，群体包含的单独抗体是相同的。因此，定语“单克隆”表示所述抗体特征为不是离散抗体的混合物。单克隆抗体由本领域技术人员所知晓的方法产生，例如通过将骨髓瘤细胞和免疫脾细胞融合制备杂合的抗体产生细胞。通过杂交瘤培养来合成，不会被其它免疫球蛋白污染。单克隆抗体也可以用如重组技术、噬菌体展示技术、合成技术，或其它现有技术得到。

术语“单链 Fv 抗体”（或“scFv 抗体”）是指包含抗体的 VH 和 VL 结构域的抗体片段，是通过接头（linker）连接的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）的重组蛋白，接头使得这两个结构域相交联以形成抗原结合位点，接头序列一般由柔性肽组成，例如但不限于 G2(GGGGS)₃。scFv 的大小一般是一个完整抗体的 1/6。单链抗体优选是由一个核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。对于 scFv 综述，可参见 Pluckthun A, 1994. Antibodies from *Escherichia coli*, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol 113, Rosenberg M and

Moore GP (EDs.), Springer-Verlag, New York, pp 269-315。还可参见国际专利申请公开号 WO 88/01649 和美国专利第 4946778 号和第 5260203 号。

术语“完整抗体”是指由两条抗体重链和两条抗体轻链组成的抗体。“完整抗体重链”是在 N-端到 C-端方向上由抗体重链可变结构域 (VH)、抗体恒定重链结构域 1 (CH1)、抗体铰链区 (HR)、抗体重链恒定结构域 2 (CH2) 和抗体重链恒定结构域 3 (CH3) 组成, 缩写为 VH-CH1-HR-CH2-CH3; 并且在 IgE 亚类的抗体的情形中, 任选地还包括抗体重链恒定结构域 4 (CH4)。优选地“完整抗体重链”是在 N-端到 C-端方向上由 VH、CH1、HR、CH2 和 CH3 组成的多肽。“完整抗体轻链”是在 N-端到 C-端方向上由抗体轻链可变结构域 (VL) 和抗体轻链恒定结构域 (CL) 组成的多肽, 缩写为 VL-CL。所述抗体轻链恒定结构域 (CL) 可以是 κ (kappa) 或 λ (lambda)。完整抗体链通过在 CL 结构域和 CH1 结构域之间 (即轻链和重链之间) 的多肽间二硫键和完整抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。典型的完整抗体的实例是天然抗体如 IgG (例如, IgG1 和 IgG2)、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是指保留与抗原 (如, SARS-CoV-2 冠状病毒的 S 蛋白) 特异性结合能力的抗体的抗原结合片段及抗体类似物, 其通常包括至少部分母体抗体 (Parental Antibody) 的抗原结合区或可变区。抗体片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。通常, 当用摩尔单位 (K_D) 来表示活性时, 抗体片段保留至少 10% 的母体结合活性。优选地, 抗体片段保留至少 20%、50%、70%、80%、90%、95% 或 100% 的母体抗体对靶标的结合亲和力。抗体片段包括但不限于: Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、Fd 片段、互补决定区 (CDR) 片段、二硫键稳定性蛋白 (dsFv) 等; 线性抗体 (Linear Antibody)、单链抗体 (例如 scFv 单抗体)、单抗体 (Unibody, 技术来自 Genmab)、二价单链抗体、单链噬菌体抗体、单域抗体 (Single Domain Antibody) (例如 VH 结构域抗体)、结构域抗体 (Domantis, 技术来自 Domantis)、纳米抗体 (nanobodies, 技术来自 Ablynx); 由抗体片段形成的多特异性抗体 (例如三链抗体、四链抗体等); 和工程改造抗体如嵌合抗体 (Chimeric Antibody) (例如人源化鼠抗体)、异缀合抗体 (Heteroconjugate Antibody) 等。这些抗体片段用本领域技术人员已知的常规技术获得, 并用与完整抗体相同的方法对这些片段的实用性进行筛选。

术语“VL 结构域”是指免疫球蛋白轻链的氨基末端可变区结构域。

术语“VH 结构域”是指免疫球蛋白重链的氨基末端可变区结构域。

术语“铰链区”包括重链分子的将 CH1 结构域连接至 CH2 结构域的那一部分。该铰链区包含约 25 个残基并且是柔性的, 从而使两个 N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可分为三个不同的结构域: 上部、中部、和下部铰链结构域 (Roux KH *et al*, 1998, J Immunol, 161:4083-4090)。

术语“功能域”指的是能够特异性识别和/或结合到表位上的三维结构, 例如抗体或抗体片段, 包括天然完整抗体、单链抗体 (scFv)、Fd 片段、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、单结构域抗体片段、分离的 CDR 片段及其衍生物。此处“单链”意思是第一和第二功能域共价连接, 可以以一个核酸分子编码的共线性氨基酸序列表示。

术语“Fab 片段”由一条重链的可变区及 CH1 区和一条轻链组成。Fab 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。“Fab 抗体”的大小是完整抗体的 1/3, 其只包含一个抗原结合位点。

术语“Fab' 片段”含有一条轻链、一条重链的 VH 结构域和 CH1 结构域、以及 CH1 和 CH2 结构域之间的

恒定区部分。

术语“F(ab)₂片段”含有两条轻链和两条重链的 VH 结构域和 CH1 结构域以及 CH1 和 CH2 结构域之间的恒定区部分，由此在两条重链间形成链间二硫键。因此，F(ab)₂片段由通过两条重链间的二硫键保持在一起的两个 Fab'片段组成。

术语“Fd 片段”由一条重链的可变区和 CH1 组成，是 Fab 片段除去轻链后剩下的重链部分。

术语“Fv 区”包含来自重链和轻链二者的可变区，但缺少恒定区，是包含完整抗原识别和结合位点的最小片段。

术语“二硫键稳定性蛋白 (dsFv)”在 VH 和 VL 区分别引入一个半胱氨酸突变点，从而在 VH 和 VL 之间形成二硫键而实现结构稳定性。术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸含有巯基，该巯基可以与第二个巯基形成二硫键或桥连。在大多数天然存在的 IgG 分子中，CH1 和 CH2 区由二硫键连接并且两个重链由两个二硫键连接，在对应于使用 Kabat 编号系统的 239 和 242 处（位置 226 或 229，EU 编号系统）连接。

术语“重链恒定区”包括来自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽至少包含以下一种：CH1 结构域，较链（例如，上部较链区、中间较链区，和/或下部较链区）结构域，CH2 结构域，CH3 结构域，或其变体或片段。例如，本申请中使用的抗原结合多肽可包含具有 CH1 结构域的多肽链；具有 CH1 结构域、至少一部分的较链结构域和 CH2 结构域的多肽；具有 CH1 结构域和 CH3 结构域的多肽链；具有 CH1 结构域、至少一部分较链结构域和 CH3 结构域的多肽链，或者具有 CH1 结构域，至少一部分较链结构域，CH2 结构域，和 CH3 结构域的多肽链。在另一个实施例中，本申请的多肽包括具有 CH3 结构域的多肽链。另外，在本申请中使用的抗体可能缺少至少一部分 CH2 结构域（例如，所有的或一部分的 CH2 结构域）。如上文所述，但本技术领域的普通技术人员应理解，重链恒定区可能会被修改，使得它们在氨基酸序列上与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

术语“轻链恒定区”包括来自抗体轻链的氨基酸序列。优选地，所述轻链恒定区包括恒定 kappa 结构域和恒定 lambda 结构域中的至少一个。

术语“Fc 区”或“Fc 片段”是指免疫球蛋白重链的 C 端区，其含有较链区的至少一部分、CH2 结构域和 CH3 结构域，其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括与位于免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）上的 Fc 受体结合或与经典补体系统的第一组分（C1q）结合。Fc 区包括天然序列 Fc 区和变异 Fc 区。

通常，人 IgG 重链 Fc 区为自其 Cys 226 或 Pro 230 位置的氨基酸残基至羧基末端的区段，但其边界可能有变化。Fc 区的 C 末端赖氨酸（残基 447，依照 EU 编号系统）可以存在或可以不存在。Fc 还可以指独立存在的，或在包含 Fc 的蛋白多肽的情况下的这一区域，例如“包含 Fc 区的结合蛋白”，还称为“Fc 融合蛋白”（例如，抗体或免疫粘合素）。本发明的抗体中天然序列 Fc 区来自包括哺乳动物（例如人）的 IgG1、IgG2（IgG2A，IgG2B）、IgG3 和 IgG4。在某些实施方案中，相对于哺乳动物 Fc 多肽氨基酸序列，两条 Fc 多肽链的氨基酸序列中每 100 个氨基酸中具有 10 个左右氨基酸的单一氨基酸的置换、插入和/或缺失。在一些实施方案中，上述 Fc 区氨基酸差异可以是延长半衰期的 Fc 改变、增加 FcRn 结合的改变、增强 Fcγ 受体（FcγR）结合的改变和/或增强 ADCC、ADCP 和/或 CDC 的改变。

在 IgG、IgA 和 IgD 抗体同种型中，Fc 区包含抗体两条重链中的每一条的 CH2 和 CH3 恒定结构域；IgM 和 IgE Fc 区包含在每条多肽链中的三个重链恒定结构域（CH2-4 结构域）。

术语“Fc 受体”或“FcR”指结合免疫球蛋白 Fc 区的受体。FcR 可以是天然序列人 FcR，例如，可以是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体)，以及这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ R 家族由三种活化受体（小鼠中的 Fc γ RI, Fc γ RIII 和 Fc γ RIV；人类中的 Fc γ RIA, Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA）和一种抑制性受体（小鼠中的 Fc γ RIIb 或等同的人类中的 Fc γ RIIB）组成。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA（“活化受体”）和 Fc γ RIIB（“抑制受体”），它们具有相似的氨基酸序列。Fc γ RIIA 的胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序（ITAM）。Fc γ RIIB 的胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序（ITIM）（参见 Dacron M, 1997, *Annu Rev Immunol*, 15:203-234）。大多数天然效应细胞类型共表达一种或多种活化 Fc γ R 以及抑制性 Fc γ RIIb，而 NK 细胞选择性只表达一种活化性 Fc 受体（小鼠中的 Fc γ RIII 和人类中的 Fc γ RIIIA），但不表达小鼠和人类中的抑制性 Fc γ RIIb 或 Fc γ RIIB。人类 IgG1 与大多数人类 Fc 受体结合，在其结合的活化性 Fc 受体的类型方面被认为等同于鼠类 IgG2a。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR，包括那些未来将会被鉴定的。术语“Fc 受体”或“FcR”还包括新生儿受体 FcRn，它负责将母体 IgG 转移给胎儿（Guyer RL *et al*, 1976, *J Immunol*, 117:587-593）。测量对 FcRn 结合的方法是已知的（参见例如 Ghetie V and Ward ES, 1998, *Immunol Today*, 18:592-598；Ghetie V *et al*, 1997, *Nat Biotechnol*, 15:637-640）。可测定人 FcRn 高亲和力结合多肽与 FcRn 的体内结合和血清半衰期，例如在表达人 FcRn 的转基因小鼠或经转染的人细胞系中。

术语“嵌合抗体”是指重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望的生物学活性（美国专利 US4816567；Morrison SL *et al*, 1984, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:6851-6855）。例如，术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体（例如人鼠嵌合抗体），其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体（例如鼠源抗体），而抗体的重链和轻链恒定区来自第二抗体（例如人抗体）。

术语“人抗体”是指具有可变区的抗体，其中框架区和 CDR 区均源自人种系免疫球蛋白序列。此外，如果抗体含有恒定区，恒定区也来源于人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。然而，如本文所用，术语“人抗体”不打算包括其中来源于另一种哺乳动物物种如小鼠的种系的 CDR 序列已经嫁接到人框架序列上的抗体。

术语“人源化抗体”是指经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。非人抗体的 CDR 域外的大部分或全部氨基酸，例如小鼠抗体被来自人免疫球蛋白的相应氨基酸置换，而一个或多个 CDR 区内的大部分或全部氨基酸未改变。氨基酸的添加，删除，插入，替换或修饰是允许的，只要它们不会消除抗体结合特定抗原的能力。“人源化”抗体保留与原始抗体类似的抗原特异性。CDR 的来源没有特别限制，可来源于任何动物。例如，可以利用源于小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体或非人灵长类动物（例如，食蟹猴）抗体的 CDR 区。框架区可以通过搜索 IMGT antibody germline database（<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>）获得人类抗体胚系序列，一般选取与被改造

的非人源抗体同源度高的人类胚系抗体序列做人源化抗体的框架区。

术语“超变区”或“CDR 区”或“互补决定区”是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基，是非连续的氨基酸序列。CDR 区序列可以由 Kabat、Chothia、IMGT(Lefranc *et al*, 2003, *Dev Comparat Immunol*, 27:55-77)和 AbM (Martin ACR *et al*, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:9268–9272)方法来定义或本领域熟知的任何 CDR 区序列确定方法而鉴定的可变区内的氨基酸残基。例如，超变区包含以下氨基酸残基：来自序列比对所界定的“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (Kabat 编号系统)，例如，轻链可变结构域的 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) 位残基和重链可变结构域的 31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) 位残基，参见 Kabat *et al*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 和/或来自根据结构来界定的“超变环” (HVL) 的残基 (Chothia 编号系统)，例如，轻链可变结构域的 26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和 91-96 (LCDR3) 位残基和重链可变结构域的 26-32 (HCDR1)、53-55 (HCDR2) 和 96-101 (HCDR3) 位残基，参见 Chothia C and Lesk AM, 1987, *J Mol Biol*, 196:901-917; Chothia C *et al*, 1989, *Nature*, 342:878-883。“框架”残基或“FR”残基为除本文定义的超变区残基之外的可变结构域残基。在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 优选地通过 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统确定。本领域技术人员可以明确地将每种编号系统赋予任何可变结构域序列，而不依赖于超出序列本身之外的任何实验数据。例如，给定抗体的 Kabat 残基编号方式可通过将抗体序列与每种“标准”编号序列对比同源区来确定。基于本文提供的序列编号方案，确定序列表中任何可变区序列的编号完全在本领域技术人员的常规技术范围内。

术语“重组”，在涉及多肽或多核苷酸时指自然状态下不存在的多肽或多核苷酸的形式，其中一个非限制性的例子，可以通过将通常不会一起出现的多核苷酸或多肽组合在一起来实现。

术语“分离的抗体分子”指的是已经从其自然环境的组分中识别和分离和/或回收的抗体分子。其自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，并可能包括酶、激素和其它蛋白质的或非蛋白质的溶质。

本文使用的关于核酸（如 DNA 或 RNA）的术语“分离的”，是指分别从其它的以天然来源的大分子存在的 DNA 或 RNA 分离的分子。本文使用的术语“分离的”也指通过重组 DNA 技术生产时基本不含细胞材料，病毒材料或培养基的核酸或多肽，或经化学合成制备时基本不含化学前体或其它化学品。此外，“分离的核酸”是指包括不是天然存在的片段并且不会以天然状态发现的核酸片段。本文中术语“分离的”也用于指从其它细胞蛋白或组织分离的细胞或多肽。分离的多肽是指包括纯化的和重组的多肽。

术语“交叉反应”是指本文所述的抗体结合来自不同物种的抗原的能力。例如，本文所述的结合 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的抗体还可结合来自其它物种的 S 蛋白（例如，SARS-CoV 的 S 蛋白）。交叉反应性可通过检测在结合测定法（例如，SPR、ELISA）中与纯化抗原的特定反应性，或与生理表达抗原的细胞的结合或以其它方式与生理表达抗原的细胞的功能相互作用来测量。本领域中已知测定结合亲和力的分析的实例包括表面等离子共振（例如，Biacore）或类似技术（例如，Kinexa 或 Octet）。

术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)”是指一种细胞毒性形式，抗体作为一种桥联形式，通过与免疫细胞或细胞毒性细胞（例如 NK 细胞、中性粒细胞或巨噬细胞）上存在的 FcR 结合，使这些细胞

毒性效应细胞特异性结合到抗体附着的靶细胞上，然后通过分泌细胞毒素杀死靶细胞。检测抗体的 ADCC 活性的方法是本领域已知的，例如可通过测定待测抗体与 FcR（例如 CD16a）之间的结合活性来评价。

术语“抗体依赖细胞介导的吞噬作用（ADCP）”指一种细胞介导的反应，在该反应中，表达 Fc γ R 的非特异性细胞毒活性细胞识别靶细胞上结合的抗体并随后引起该靶细胞的吞噬。

术语“补体系统”指在血液中发现的大量的小蛋白质，称为补体因子，其通常以不活跃的前体（前蛋白）循环。这一术语指的是这一系统的下述能力：“补充”抗体和吞噬细胞从生物体中清除病原体如细菌以及抗原-抗体复合物的能力。补体因子的一个实例是复合物 C1，其包含 C1q 和两个丝氨酸蛋白酶 C1r 和 C1s。复合物 C1 是 CDC 途径的组分。C1q 是分子量约为 460,000 的六价分子，且其结构类似郁金香的花束，其中六个胶原“茎”连接至六个球状的头部区域。为了激活补体级联，C1q 必须结合至 IgG1、IgG2 或 IgG3 的至少两个分子。

术语“补体依赖的细胞毒性（CDC）”是指通过使补体成分 C1q 与抗体 Fc 结合来激活补体级联的细胞毒性形式。检测抗体的 CDC 活性的方法是本领域已知的，例如可通过测定待测抗体与 Fc 受体（例如 C1q）之间的结合活性来评价。

术语“免疫结合”和“免疫结合性质”是指一种非共价相互作用，其发生在免疫球蛋白分子和抗原（对于该抗原而言免疫球蛋白为特异性的）之间。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以用相互作用的平衡解离常数 (K_D) 表示，其中 K_D 值越小，表示亲和力越高。所选多肽的免疫结合性质可使用本领域中公知的方法测定。一种测定方法涉及测量抗原/抗体复合物形成和解离的速度。“结合速率常数” (K_a 或 K_{on}) 和“解离速率常数” (K_d 或 K_{off}) 两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出(参见 Malmqvist M, 1993, *Nature*, 361:186-187)。 k_d/k_a 的比率等于平衡解离常数 K_D (参见 Davies DR *et al*, 1990, *Annual Rev Biochem*, 59:439-473)。可用任何有效的方法测量 K_D 、 k_a 和 k_d 值。

术语“免疫细胞”包括具有造血起源并在免疫应答中起作用的细胞，包括淋巴细胞，例如 B 细胞和 T 细胞；天然杀伤细胞；髓样细胞，例如单核细胞，巨噬细胞，嗜酸性粒细胞，肥大细胞，嗜碱性粒细胞和粒细胞。

术语“免疫应答”是指免疫系统的细胞（例如 T 淋巴细胞，B 淋巴细胞，自然杀伤（NK）细胞，巨噬细胞，嗜酸性粒细胞，肥大细胞，树突状细胞和嗜中性粒细胞）和由这些细胞或肝脏中的任何一种产生的可溶性大分子（包括抗体，细胞因子和补体）的作用，该作用导致选择性地靶向，结合，损伤，破坏和/或从脊椎动物体内清除入侵的病原体，感染病原体的细胞或组织，癌细胞或其他异常细胞，或者在自身免疫或病理性炎症的情形下，是正常的人类细胞或组织。免疫反应包括例如 T 细胞(例如效应 T 细胞或 Th 细胞，如 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞)的活化或抑制，或 Treg 细胞的抑制。

术语“免疫原性”指特定物质引发免疫应答的能力。

术语“宿主细胞”指在其中载体可以增殖并且其 DNA 可以表达的细胞，所述细胞可以是原核细胞或者真核细胞。该术语还包括受试宿主细胞的任何后代。应理解，并不是所有的后代都与亲本细胞相同，因为在复制过程中可能会发生突变，这类后代被包括在内。宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NS0 细胞或其它哺乳动物细胞。

术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时（例如，两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据），那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如，如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配，那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如，DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性（总共 6 个位置中有 3 个位置匹配）。通常，在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过计算机程序例如 Align 程序（DNASTAR, Inc.）方便地进行，通过使用 Needleman 和 Wunsch 的方法（Needleman SB and Wunsch CD, 1970, J Mol Biol, 48:443-453）来实现。

术语“突变的”、“突变体”和“突变”分别指与天然核酸或多肽相比（即可以用来定义野生型的参照序列），置换、缺失或插入一个或多个核苷酸或氨基酸。

术语“效应子功能”是指，那些可归因于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区）的生物学活性，且其随抗体不同种型而变化。抗体效应子功能的例子包括但不限于：Fc 受体结合亲和性、ADCC、ADCP、CDC、细胞表面受体（例如 B 细胞受体）的下调、B 细胞活化、细胞因子分泌、抗体和抗原/抗体复合物的半衰期/清除率等。改变抗体的效应子功能的方法是本领域已知的，例如通过在 Fc 区引入突变来完成。

术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂和/或稳定剂”，是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂和/或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，稀释剂，维持渗透压的试剂，延迟吸收的试剂，防腐剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗菌试剂和抗真菌试剂，例如对羟基苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水，水性缓冲液（如缓冲盐水），醇和多元醇（如甘油）等。防腐剂包括但不限于各种抗菌试剂和抗真菌试剂，例如硫柳汞，2-苯氧乙醇，对羟基苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义，其能够稳定药物中的活性成分的期望活性，包括但不限于谷氨酸钠，明胶，SPGA，糖类（如山梨醇，甘露醇，淀粉，蔗糖，乳糖，葡聚糖，或葡萄糖），氨基酸（如谷氨酸，甘氨酸），蛋白质（如干燥乳清，白蛋白或酪蛋白）或其降解产物（如乳白蛋白水解物）等。

术语“预防”是指，为了阻止或延迟疾病或病症或症状（例如，肿瘤或感染）在受试者体内的发生或如果它发生作用减到最小而实施的方法。

术语“载体”是指能够运输与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指其中可以连接另外的 DNA 区段的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中额外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们被导入的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点和游离型哺乳动物载体的细菌载体）。其它载体（例如非附加型哺乳动物载体）可以在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，并由此与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导它们有效连接的基因的表达。

这种载体在本文中被称为“重组表达载体”（或简称为“表达载体”）。通常，在重组 DNA 技术中有用的表达载体通常以质粒的形式存在。然而，也包括其它形式的表达载体，如病毒载体（例如，复制缺陷型逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒），其起到等同的功能。

术语“治疗”是指，为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。有益或所需的临床结果包括但不限于，降低疾病进展速率，改善或减轻疾病状态，和消退或改善的预后，无论是可检测或是不可检测的。有效缓解任何特定疾病症状的治疗剂的量可以根据诸如患者的疾病状态，年龄和体重以及药物在受试者中引起期望的响应的能力等因素而变化。疾病症状是否得到缓解可以通过任何临床测量来评估，这些测量通常由医生或其它熟练的医疗保健提供者用于评估该症状的严重程度或进展状态。

针对 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白抗体的治疗用途

可将本发明的抗体（其包括双特异性、多克隆、单克隆、人源化抗体）用作治疗剂。这些药剂可通常用于在受试者中治疗或预防新型冠状肺炎 COVID-19，增加疫苗功效或提高天然免疫应答。将抗体制剂（优选地对其靶抗原 S 蛋白具有高特异性和高亲和力的抗体制剂）给予受试者并且通常因其与靶标的结合而具有效果。抗体的给予可消除或抑制或干扰 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的活性。在使用抗体片段的情况下，特异性结合至靶蛋白的结合结构域的最小的抑制性片段是优选的。例如，基于抗体的可变区序列，其保持结合靶蛋白序列的能力。这类肽可化学合成和/或通过重组 DNA 技术制备（参见，例如，Marasco WA *et al*, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:7889-7893）。

本发明的特异性结合 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的抗体或其片段可以药物组合物的形式给予。制剂可根据治疗的特定适应症的需要而含有超过一种活性化合物，优选相互间无不利影响的具有互补活性的那些。备选地或另外，组合物可包含增强它的功能的作用剂。

针对 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白抗体的诊断用途

本发明的单克隆抗体或其抗原结合性片段可用于 SARS-CoV-2 病毒的检测或定量用免疫测定。免疫测定方法本身是公知的，可以采用任何公知的免疫测定方法。即，如果以测定形式进行分类，有夹心法、竞争法、凝聚法、蛋白质印迹法等，如果以所使用的标记进行分类，则有荧光法、酶法、放射法、生物素法等，这些都可使用。还可通过免疫组织染色进行诊断。免疫测定方法中使用标记抗体时，抗体的标记方法本身是公知的，可以采用公知的任何方法。

这些免疫测定法本身是公知的，本说明书中无须赘述，简单来讲，例如夹心法是将本发明的抗体或抗原结合性片段作为第一抗体固定为固相，与待测生物样品反应，漂洗后，再使其与第二抗体反应，漂洗后测定与固相结合的第二抗体。将第二抗体用酶、荧光物质、放射性物质、生物素等标记，可以测定与固相结合的第二抗体。通过上述方法对已知浓度的多个标准品进行测定，根据测定的标记量与标准品含量的关系制作标准曲线，将对未知浓度的受检样品的测定结果对照该标准曲线，可以对受检样品中 SARS-CoV-2 病毒抗原进行定量。还可以将第一抗体和第二抗体在上述说明中替换。凝聚法中，将本发明的抗体或其抗原结合性片段固定在胶乳等颗粒上，与样品反应，测定吸光度。通过上述方法对已知浓度的多个标准品进

行测定，根据测定的标记量与标准品含量的关系制作标准曲线，将对未知浓度的受检样品的测定结果对照该标准曲线，可以对受检样品中 SARS-CoV-2 病毒抗原进行定量。

供给上述免疫测定法的生物样品只要是含有 SARS-CoV-2 病毒的 S 蛋白的样品即可，没有特别限定，例如可以来自人和动物的血清、血浆、全血，除此之外还有鼻腔拭液(鼻腔拭子)、鼻腔吸引液、咽拭液(咽拭子)等体液提取液、唾液、呼吸道分泌物、尿液、粪便、细胞或组织匀浆液等。

通过使用上述本发明的单克隆抗体，可将该抗体用作固相抗体和标记抗体的至少一方，制备 SARS-CoV-2 病毒免疫测定试剂。与上述单克隆抗体结合的固相可以使用以往免疫测定中使用的各种固相，例如有：ELISA 板、胶乳、明胶颗粒、磁性颗粒、聚苯乙烯、玻璃等各种固相，珠子，可传输液体的基质等不溶性载体等。另外，可用酶、胶体金属颗粒、着色胶乳颗粒、发光物质、荧光物质、放射性物质等标记抗体，来制备标记抗体。将这些固相抗体和/或标记抗体等试剂组合，可以制备在酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法等中使用的试剂。这些测定试剂是通过夹心法或竞争性结合测定法测定试样中的目标抗原的试剂。

上述通过夹心法进行免疫测定的试剂可以使用以下的试剂：例如准备两种本发明的单克隆抗体，以其中一种为上述标记抗体，以另外一种为与上述固相结合固相抗体。首先，使含有待测定的抗原的样品与该固相抗体反应，接着使标记抗体(第二抗体)与被捕捉到该固相抗体上的抗原反应，通过检测与不溶性载体结合的标记物的存在或活性，可以实施免疫鉴定。同样，使含有待测定的抗原的样品与固相抗体反应，接着使标记抗体(第二抗体)与被捕捉到该固相抗体上的抗原反应，通过测定与不溶性载体结合的标记物的存在或活性，即通过标记抗体的量对待测定的抗原的量进行定量，可以实施免疫测量。夹心法的免疫测定试剂中，可以使用一种单克隆抗体作为固相抗体和标记抗体(例如抗原为多聚物时)，但通常优选使用可分别识别待测定的抗原的两个不同的表位的 2 种或以上的抗体。并且，对于任何的固相抗体和标记抗体，可以从 2 种或以上的单克隆抗体中选择组合使用。

作为采用竞争性结合测定法的免疫测定试剂，例如可以制备成用酶、胶体金属颗粒、着色胶乳颗粒、发光物质、荧光物质、放射性物质等标记的一定量的病毒抗原。使用该试剂，可以与例如含有一定量的本发明的单克隆抗体、上述标记病毒抗原和待测定的抗原的样品进行竞争性反应，由与抗体结合的或未结合的标记病毒抗原的量对待测定样品中抗原的量进行定量，从而实施免疫测定。

本发明中，使上述抗体或抗原与固相或标记物结合时，可以采用物理吸附法、化学结合法等方法(参照“蛋白质核酸酵素”，别册 No. 31, 37-45(1987 年))。

上述标记抗 SARS-CoV-2 病毒单克隆抗体可以通过使抗 SARS-CoV-2 病毒单克隆抗体与标记物结合来制备。标记物可以是酶、胶体金属颗粒、着色胶乳颗粒、荧光胶乳颗粒、发光物质、荧光物质等。酶可以是酶联免疫测定法(Enzyme immunoassays, EIA)中使用的各种酶，例如碱性磷酸酶、过氧化物酶、 β -D-半乳糖苷酶等；胶体金属颗粒例如可以使用胶体金颗粒、胶体硒颗粒等。

标记物与抗 SARS-CoV-2 病毒单克隆抗体的结合方法可以利用公知的产生共价键或非共价键的方法。结合的方法例如有：戊二醛法、高碘酸法、马来酰亚胺法、二硫二吡啶法、使用各种交联剂的方法等(例如“蛋白质核酸酵素”，别册 No. 31, 37-45(1985 年))。使用交联剂的结合方法中，交联剂例如可使用 N-琥珀

酰氨基-4-马来酰氨基丁酸(GMBS)、N-琥珀酰氨基-6-马来酰氨基己酸、N-琥珀酰氨基-4-(N-马来酰氨基甲基)环己烷-1-羧酸等。通过共价键结合的方法中,可以依赖使用存在于抗体中的官能团,除此之外可以按照常规方法例如将硫羟基、氨基、羧基、羟基等官能团导入抗体中,然后采用上述结合方法,使该官能团与标记物结合,由此制备标记的抗 SARS-CoV-2 病毒单克隆抗体。通过非共价键结合的方法还有物理吸附法等。

底物可以使用对应于标记物的酶并如下表示的各种显色底物、荧光底物、发光底物等。

(a) 显色底物: 与过氧化氢组合的 2, 2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)、二氨基联苯胺(DAB) 用于过氧化物酶; 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸(BCIP)、对硝基苯磷酸酯(p-NPP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸钠(BCIP·Na) 用于碱性磷酸酶。

(b) 荧光底物: 4-甲基伞形苯基磷酸酯(4-MUP) 用于碱性磷酸酶; 4-甲基伞形基苯基- β -D-半乳糖苷(4MUG)用于 β -D-半乳糖苷酶。

(c) 发光底物: 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酰氧基)苯基-1, 2-二氧杂环丁烷·2 钠盐(AMPPD)用于碱性磷酸酶; 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''- β -D-吡喃半乳糖基)苯基-1, 2-二氧杂环丁烷(AMGPD) 用于 β -D-半乳糖苷酶; 与过氧化氢组合得到的鲁米诺、异鲁米诺用于过氧化物酶。

通过将使用本发明针对 SARS-CoV-2 病毒的 S 蛋白的单克隆抗体测定来自人或动物的各种生物样品,可以实施 SARS-CoV-2 病毒感染的诊断。

具有保守修饰的抗体

术语“保守修饰”意图指氨基酸修饰不会显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征。此类保守修饰包括氨基酸的取代、添加和缺失。修饰可以通过本领域已知的标准技术,例如定点突变和 PCR 介导的突变引入到本发明的抗体中。保守氨基酸取代指氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基替换。本领域中对具有类似侧链的氨基酸残基家族已有详细说明。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,可以用来自同一侧链家族的其他氨基酸残基替换本发明抗体 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基。

药物组合物

本发明的抗体或编码本申请抗体的核酸或多核苷酸,可以应用于制备药物组合物或无菌组合物,例如,将抗体与药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合。药物组合物可包括一种或组合的(如两种或更多不同的)本发明的抗体。例如,本发明的药物组合物可包含与靶抗原上的不同表位结合的具有互补活性的抗体或抗体片段(或免疫缀合物)的组合。治疗和诊断剂的制剂可通过以例如冻干粉末、浆液、水性溶液或悬浮液的形式与药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备。术语“药学上可接受的”指当分子本体、分

子片段或组合物适当地给予动物或人时，它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体示例包括糖类（如乳糖）、淀粉、纤维素及其衍生物、植物油、明胶、多元醇（如丙二醇）、海藻酸等。本发明的抗体或编码本申请抗体的核酸或多核苷酸可单独使用，或可与一种或更多种其它治疗剂共同使用，所述治疗剂例如疫苗。

附图说明

图 1、SARS-CoV-2 S1 抗原免疫小鼠血清滴度。

图 2、SARS-CoV-2 S1 抗原免疫小鼠血清中和抗体滴度。

图 3-1、纯化的鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-34-4 以及 S1B-8-2 与 SARS-CoV-2 S1 的结合能力测定。

图 3-2、纯化的鼠源抗体 S1B-48-2 和 S1B-64-2 与 SARS-CoV-2 S1 的结合能力测定。

图 3-3、纯化的鼠源抗体 S1B-91-3 与 SARS-CoV-2 S1 的结合能力测定。

图 3-4、纯化的鼠源抗体 S1B-82-5 与 SARS-CoV-2 S1 的结合能力测定。

图 3-5、纯化的鼠源抗体 S1B-30-3 与 SARS-CoV-2 S1 的结合能力测定。

图 3-6、纯化的鼠源抗体 S1B-14-3 与 SARS-CoV-2 S1 的结合能力测定。

图 3-7、纯化的鼠源抗体 ST-10-4 和 ST-35-4 与 S-CoV-2 ST 的结合能力测定。

图 4-1、纯化的鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-34-4 以及 S1B-8-2 与 SARS-CoV S 的交叉反应性测定。

图 4-2、纯化的鼠源抗体 S1B-48-2 和 S1B-64-2 与 SARS-CoV S 的交叉反应性测定。

图 4-3、纯化的鼠源抗体 S1B-91-3 与 SARS-CoV S 的交叉反应性测定。

图 4-4、纯化的鼠源抗体 S1B-82-5 与 SARS-CoV S 的交叉反应性测定。

图 4-5、纯化的鼠源抗体 S1B-30-3 与 SARS-CoV S 的交叉反应性测定。

图 5-1、鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-34-4 以及 S1B-8-2 与 ACE2-HRP 竞争结合 SARS-CoV-2 S1 的能力。

图 5-2、鼠源抗体 S1B-48-2 和 S1B-64-2 与 ACE2-HRP 竞争结合 SARS-CoV-2 S1 的能力。

图 5-3、鼠源单抗 S1B-91-3 与 ACE2-HRP 竞争结合 SARS-CoV-2 S1 的能力。

图 5-4、鼠源单抗 S1B-82-5 与 ACE2-HRP 竞争结合 SARS-CoV-2 S1 的能力。

图 5-5、鼠源单抗 S1B-30-3 与 ACE2-HRP 竞争结合 SARS-CoV-2 S1 的能力。

图 5-6、鼠源单抗 S1B-14-3 与 ACE2-HRP 竞争结合 SARS-CoV-2 S1 的能力。

图 6-1、鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-91-3、S1B-82-5、S1B-30-3 和阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合。

图 6-2、鼠源抗体 S1B-14-3 阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合。

图 6-3、鼠源抗体 ST-10-4 和 ST-35-4 阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合。

图 7、鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-82-5、S1B-91-3/RBD 分子对接模型、ACE2/RBD 结构(PDB 6M0J) 以及抗体 CR3022/RBD 结构(PDB 6W41)三个结构叠合图。

图 8、鼠源抗体 S1B-30-3、S1B-14-3、ST-10-4、ST-35-4/RBD 分子对接模型、ACE2/RBD 结构(PDB 6M0J) 以及抗体 CR3022/RBD 结构(PDB 6W41)三个结构叠合图。

- 图 9-1、人源化抗体 hS1B-73-3 与其亲本鼠源抗体的重链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 9-2、人源化抗体 hS1B-73-3 与其亲本鼠源抗体的轻链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 10-1、人源化抗体 hS1B-48-2 与其亲本鼠源抗体的重链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 10-2、人源化抗体 hS1B-48-2 与其亲本鼠源抗体的轻链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 11-1、人源化抗体 hS1B-91-3 与其亲本鼠源抗体的重链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 11-2、人源化抗体 hS1B-91-3 与其亲本鼠源抗体的轻链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 12-1、人源化抗体 hS1B-82-5 与其亲本鼠源抗体的重链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 12-2、人源化抗体 hS1B-82-5 与其亲本鼠源抗体的轻链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 13-1、人源化抗体 hS1B-30-3 与其亲本鼠源抗体的重链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 13-2、人源化抗体 hS1B-30-3 与其亲本鼠源抗体的轻链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 14-1、人源化抗体 hS1B-14-3-1 和 hS1B-14-3-2 与其亲本鼠源抗体的重链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 14-2、人源化抗体 hS1B-14-3-1 和 hS1B-14-3-2 与其亲本鼠源抗体的轻链可变区氨基酸序列比对结果。
- 图 15-1、间接 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-73-3 与 SARS-CoV-2 S 三聚体抗原的结合能力。
- 图 15-2、间接 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-48-2 与 SARS-CoV-2 S 三聚体抗原的结合能力。
- 图 15-3、间接 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-91-3 与 SARS-CoV-2 S 三聚体抗原的结合能力。
- 图 15-4、间接 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-82-5 与 SARS-CoV-2 S 三聚体抗原的结合能力。
- 图 15-5、间接 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-30-3 与 SARS-CoV-2 S 三聚体抗原的结合能力。
- 图 16-1、竞争 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-73-3 阻断 SARS-CoV-2 S 三聚体结合人 ACE2 的能力。
- 图 16-2、竞争 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-48-2 阻断 SARS-CoV-2 S 三聚体结合人 ACE2 的能力。
- 图 16-3、竞争 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-91-3 阻断 SARS-CoV-2 S 三聚体结合人 ACE2 的能力。
- 图 16-4、竞争 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-82-5 阻断 SARS-CoV-2 S 三聚体结合人 ACE2 的能力。
- 图 16-5、竞争 ELISA 法测定人源化抗体 hS1B-30-3 阻断 SARS-CoV-2 S 三聚体结合人 ACE2 的能力。
- 图 17-1、人源化抗体 hS1B-73-3、hS1B-48-2、hS1B-91-3、hS1B-82-5、hS1B-30-3 阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合。
- 图 17-2、人源化抗体 hS1B-14-3 阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合。
- 图 18-1、人源化抗体 hS1B-91-3 体外抑制假病毒的活性测定。
- 图 18-2、人源化抗体 hS1B-30-3 体外抑制假病毒的活性测定。
- 图 18-3、人源化抗体 hS1B-48-2、hS1B-82-5、hS1B-14-3 体外抑制假病毒突变株的活性测定。
- 图 19-1、已公开抗体与 RBD 结构结合图，以及 RBD 残基 K417、E484 和 N501 的空间位置。1A：LY-CoV555/RBD 结构取自 PDB 7KMG；1B：LY-CoV016/RBD 结构取自 PDB 7C01；1C：REGN-10933/RBD 结构取自 PDB 6XDG；1D：COV2-2196/RBD 结构来源自 COV2-2196 结构建模，以及通过 ZDOCK 软件与 RBD 结构(PDB 6M0J) 进行的分子对接计算模拟。
- 图 19-2、ACE2、抗体 hS1B-48-2 或 ST-35-4 与 RBD 结构结合图。2A：ACE2/RBD 结构取自 PDB 6M0J；2B：抗体 hS1B-48-2/RBD 结构来源自 hS1B-48-2 结构建模，以及通过 ZDOCK 软件与 RBD 结构 (PDB 6M0J)

进行的分子对接计算模拟；2C：抗体 ST-35-4/RBD 结构来源自 ST-35-4 结构建模，以及通过 ZDOCK 软件与 RBD 结构（PDB 6M0J）进行的分子对接计算模拟。

具体实施方式

实施例 1：抗 SARS-CoV-2 S 蛋白鼠源单克隆抗体制备

抗原制备：SARS-CoV-2 抗原制备过程：根据 Uniprot 中公布的新新型冠状病毒 S 蛋白全长氨基酸序列（Uniprot Entry [P0DTC2](#)），选取其中 326-685 aa 区段（S1 蛋白，标记为 S1B），及其中 16-1213aa 区段（S 三聚体，标记为 ST），用作本实施例中筛选抗体的抗原。为了获得高效表达的目的蛋白，对 S1B 和 ST 的编码基因进行人工改造和优化，并按照常规分子生物学方法构建该目的基因的真核表达载体 pcDNA3.1-S1B 和 pcDNA3.1-ST，将测序正确的重组表达质粒转染 CHO 细胞，并按常规方法进行表达和纯化，获得纯化后的抗原用于免疫。

动物免疫：将上述 SARS-CoV-2 S1 蛋白抗原和 S 三聚体蛋白抗原分别以完全弗氏佐剂充分乳化后，采用多点免疫方式免疫雄性 Balb/C 小鼠（上海斯莱克实验动物有限责任公司），50 μg /只，免疫周期为三周一。在第 3 次免疫后第 10 天，眼眶取血，以实施例 2.1 中描述的间接 ELISA 法测试血清抗 SARS-CoV-2 抗体滴度以监测小鼠免疫应答程度，结果显示于图 1，竞争 ELISA 法测试血清 SARS-CoV-2 中和抗体水平，结果显示于图 2。然后在融合前 3 天，对产生抗 SARS-CoV-2 抗体滴度最高以及中和抗体水平最高的小鼠加强免疫一次。3 天后，处死小鼠并取出该小鼠脾脏与小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞株融合。

细胞融合与抗体筛选：混合 2×10^8 Sp2/0 细胞与 2×10^8 脾细胞在 50% 聚乙二醇（分子量为 1450）和 5% 二甲基亚砜（DMSO）溶液中融合。用 Iscove 培养基（含有 10% 胎牛血清、100 单位/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、0.1 mM 次黄嘌呤、0.4 μM 氨基蝶呤和 16 μM 胸苷）来调整脾脏细胞数至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ ，以 0.3 mL 加入 96 孔培养板孔内，并置于 37°C，5% CO_2 培养箱内。培养 10 天后，采用高通量 ELISA 法分别检测上清中抗体与 HRP 标记的人 ACE2 竞争结合 SARS-CoV-2 的能力，以此筛选出与人 ACE2 竞争的阳性孔（方法参见实施例 2.3）。再将上述含有能够抑制 HRP 标记的 ACE2 与 SARS-CoV-2 结合的单克隆抗体的孔内融合细胞进行亚克隆，同样以竞争 ELISA 方法筛选得到表达高亲和力鼠单克隆抗体的杂交瘤细胞株。其中 11 个细胞株后来被证明是表达以下抗体的细胞株：S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-91-3、S1B-82-5、S1B-30-3、S1B-14-3、S1B-34-4、S1B-8-2、S1B-64-2、ST-10-4、ST-35-4。在补充 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中培养产生特异性抗体的克隆。当细胞密度达到大约 5×10^5 个细胞/mL 时，用无血清培养基替换该培养基。2 至 4 天后，将培养过的培养基离心，收集培养上清液。用蛋白 A 柱纯化抗体，然后用 150 mM NaCl 透析单克隆抗体洗脱液。通过 0.2 μm 滤器将透析的溶液过滤除菌，获得待测试的纯化的鼠单克隆抗体 S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-91-3、S1B-82-5、S1B-30-3、S1B-14-3、S1B-34-4、S1B-8-2、S1B-64-2、ST-10-4、ST-35-4。

实施例 2、抗 SARS-CoV-2 鼠源单克隆抗体的功能鉴定

2.1 间接 ELISA 法测定鼠源抗体与 SARS-CoV-2 抗原的结合能力

以 SARS-CoV-2 S1 和 S 三聚体（ACRO Biosystems）分别包被酶标板，室温过夜。弃去包被溶液，用

溶解在 PBS 缓冲液的脱脂奶粉封闭 1 h, 用 PBST (PBS 含 0.05%吐温 20(Tween-20), pH 7.4) 洗板 3~4 次。然后每孔分别加入 100 μ L 纯化的待测抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体及针对 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 S1 的人源抗体 CR3022 (其重链可变区和轻链可变区的公布于 GenBank (*Accession numbers*: DQ168569 和 DQ168570) 阳性对照, 室温孵育 1 h, 用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗孔, 然后每孔加入 100 μ L HRP 标记的羊抗鼠或羊抗人 IgG 多克隆抗体 (Jackson Laboratory) 作为检测抗体, 再以 PBST 洗板 3~4 次、加入底物 TMB 显色 10 分钟、然后加入 0.2 M H_2SO_4 终止反应, 后读取吸光度值(OD 值), 其结果示于图 3-1 至图 3-7。

结果显示, 鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-91-3、S1B-82-5、S1B-30-3、S1B-14-3、S1B-34-4、S1B-8-2、S1B-64-2、ST-10-4、ST-35-4 都能以较高亲和力与抗原结合。

2.2 抗 SARS-CoV-2 S1 鼠源抗体交叉反应测定

对获得的鼠源单克隆抗体与 SARS-CoV S 的结合能力进行测定。

用 PBS 缓冲液将 SARS-CoV S 蛋白 (ACRO Biosystems), 稀释至 0.1 μ g/mL, 以 100 μ L/孔的体积加于 96 孔板中, 4 $^{\circ}$ C 放置 16~20 h。吸掉上清, 用 PBST 缓冲液洗板 1 次后, 每孔加入 200 μ L 含 1% 脱脂奶粉的 PBST (PBST/1% 脱脂奶粉), 室温孵育 1 h 封闭。移去封闭液, 用 PBST 缓冲液洗板 3 次后, 加入上述抗 SARS-CoV-2 的鼠源抗体, 100 μ L/孔, 室温孵育 1.5 h。移去反应体系, PBST 洗板 3 次后, 50 μ L/孔加入 1:4000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 (The Jackson Laboratory), 室温孵育 1 h。再以 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100 μ L TMB, 室温孵育 5-10 min。最后, 每孔加入 50 μ L 0.2 M H_2SO_4 终止反应, 并用酶标仪在双波长 450/620 nm 处读取 OD 值。

如图 4-1 至图 4-5 所示, 鼠源抗体 S1B-82-5 与 SARS-CoV 有较强的交叉反应, 而 S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-91-3、S1B-30-3、S1B-34-4、S1B-8-2、S1B-64-2 与 SARS-CoV S 则不交叉。

2.3 竞争 ELISA 法测定鼠源抗体阻断 SARS-CoV-2 S1 与 ACE2 的结合能力

用 PBS 缓冲液将 SARS-CoV-2 S1 蛋白 (ACRO Biosystems) 稀释至 0.1 μ g/mL, 以 100 μ L/孔加于 96 孔板中, 室温过夜。弃去包被溶液, 每孔加入 200 μ L PBST/1% 脱脂奶粉, 室温孵育 1 h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 缓冲液洗板 3 次后, 然后每孔加入 100 μ L 以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 ACE2 分别和待测鼠源抗体的混合物。以 PBST 作为空白对照。充分孵育后以 PBS 洗去未结合的 HRP 标记的 ACE2, 室温孵育 1 h。再以 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100 μ L TMB, 室温孵育 5-10 min。最后, 每孔加入 50 μ L 0.2 M H_2SO_4 终止反应, 并用酶标仪在双波长 450/620 nm 处读取 OD 值。

图 5-1 至图 5-6 中显示, 鼠源单抗 S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-82-5、S1B-91-3、S1B-30-3、S1B-14-3、S1B-34-4、S1B-8-2、S1B-64-2, 都能与 ACE2 竞争结合 SARS-CoV-2 S1, 即通过阻断 SARS-CoV-2 S1 和 ACE2 的结合发挥功能。

2.4 生物薄膜干涉技术测定抗 SARS-CoV-2 S1 鼠源抗体的动力学常数和亲和力

采用生物薄膜干涉技术(BLI)对纯化的鼠源抗体 S1B-82-5、S1B-91-3、S1B-15-5、S1B-30-3、S1B-48-2、S1B-73-3、对照抗体 CR3022 以及人 ACE2 (ACRO Biosystems) 与 SARS-CoV-2 S1 (ACRO Biosystems) 的结合亲和力常数进行测定。测定时, 将待测生物素化 SARS-CoV-2 S1 固定在 SA (Streptavidin) 传感器表面, 用抗 SARS-CoV-2 S1 鼠源抗体作为分析物。处理数据, 并用分析软件 1:1 结合的模型进行拟合, 拟合数据

与实验数据基本重叠，得到结合和解离速率常数 k_a 和 k_d ，用 k_d 除以 k_a 得到平衡解离常数 K_D （见表 1）。结果显示，鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-82-5、S1B-91-3、S1B-30-3、S1B-14-3、S1B-34-4、S1B-8-2、S1B-64-2 的 K_D 值均达到 pM 级。

表 1、鼠源抗体的动力学常数和亲和力测定结果

鼠源单抗	K_D (M)	K_a (M/s)	K_d (1/s)
S1B-73-3	<1.0E-12	3.87E+05	<1.0E-07
S1B-48-2	1.56E-11	2.73E+05	4.27E-06
S1B-91-3	<1.0E-12	2.80E+05	<1.0E-07
S1B-82-5	<1.0E-12	2.27E+05	<1.0E-07
S1B-30-3	6.10E-11	1.79E+05	1.08E-05
S1B-14-3	2.22E-11	6.09E+05	1.35E-05
S1B-34-4	<1.0E-12	4.42E+05	<1.0E-07
S1B-8-2	3.54E-12	1.95E+05	6.90E-07
S1B-64-2	9.10E-11	4.87E+05	4.43E-05
CR3022	8.66E-11	2.20E+05	1.90E-05
hACE2-Fc	1.40E-09	2.34E+04	3.28E-05

2.5 抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体体外抑制假病毒实验

通过使用新冠 Spike 假病毒与待测抗体孵育后侵染 293T-ACE2 细胞，采用化学发光法检测 Luciferase 发光值 RLU，根据 RLU 读值计算待检抗体的假病毒抑制率，评价待检抗体的中和效果。新冠 Spike 假病毒基因组编码萤火虫荧光素酶，当病毒基因组进入细胞整合后，萤火虫荧光素酶的表达和活性与转导的细胞数量成正比。假病毒与真病毒相比只能一次性感染细胞。

鼠源抗体对野生型 (WT) 假病毒或突变株假病毒 (B.1.1.7、B.1.351 或 E484K) 感染的抑制实验，具体步骤如下。293T-ACE2 细胞 (上海翊圣生物)，用培养基 DMEM + 10% FBS 培养至对数生长期，以 3000 个细胞/孔接种于 384 孔白板中，并放入 37°C，5% CO₂ 培养箱中培养过夜。待测抗体样品 S1B-14-3、ST-10-4 或 ST-35-4 用含 10% FBS 的 DMEM 稀释，起始浓度为 10 μg/mL，5 倍比稀释，9 梯度；野生型 (WT) 假病毒或突变株假病毒 (B.1.1.7、B.1.351 或 E484K) (吉满生物) 从 -80°C 取出，4°C 复融，将复融后的假病毒稀释 125 倍，作为工作液；稀释后的待测抗体和假病毒工作液分别以 50 μL/孔加入到 96 孔 U 底板中混匀，37°C 预孵育 30 分钟；然后以 20 μL/孔加入到前一天细胞铺板的 384 孔白板中，阳性对照组：假病毒工作液和含 10% FBS 的 DMEM 培养基分别以 10 μL/孔加入到 384 孔白板中。阴性对照组：含 10% FBS 的 DMEM 培养基以 20 μL/孔加入到 384 孔白板中，设 4 复孔。24 小时后，以 30 μL/孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基，继续放入细胞培养箱中培养 24 小时；用移液器小心吸掉上清，以 30 μL/孔加入新配的荧光素酶显色液，室温孵育 5 分钟，将 384 孔板置于酶标仪，读取每孔的化学荧光信号。抑制率 (%) = [1 - (样品 RLU 信号值 - 阴性对照 RLU 信号值) / (阳性对照 RLU 信号值 - 阴性对照 RLU 信号值)] × 100。再以抑制率作为 Y 轴，抗体浓度作为 X 轴，通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析，得出抗体的量效曲线，使用非线性回归曲

线计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

表 2-1 至表 2-4 显示了抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体体外抑制假病毒感染的实验结果。如结果所示, S1B-14-3 能很好的抑制新冠假病毒, 而 ST-10-4 或 ST-35-4 均能很好的抑制野生型、B.1.1.7、B.1.351 或 E484K 的新冠假病毒感染, 并且 ST-10-4 或 ST-35-4 在 B.1.1.7 或 B.1.351 突变株上的中和作用明显优于野生型的, ST-35-4 在 B.1.351 上的中和作用更好。

表 2-1、抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体假病毒抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%)										IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	0.0026	
S1B-14-3	100.0	100.0	99.4	79.8	37.4	18.5	8.6	4.7	1.5	6.2	13.54
ST-10-4	98.4	95.2	90.3	76.1	42.0	8.0	15.8	1.7	2.7	-8.4	11.56
ST-35-4	100.0	99.9	97.8	81.0	43.3	14.2	16.8	23.4	19.7	6.1	14.77

表 2-2、抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体假病毒突变株 (B.1.1.7) 抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%) 假病毒突变株 B.1.1.7										IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128		
ST-10-4	96.7	95.6	93.3	85.3	55.1	36.3	36.9	24.3	11.7	7.18	
ST-35-4	99.8	99.7	98.6	87.5	59.7	33.4	22.5	24.4	5.6	7.46	

表 2-3、抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体假病毒突变株 (B.1.351) 抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%) 假病毒突变株 B.1.351										IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128		
ST-10-4	97.4	96.9	92.3	82.9	57.5	31.8	26.8	17.9	15.7	7.93	
ST-35-4	99.8	99.9	99.1	91.0	67.8	41.1	25.5	21.0	8.5	3.87	

表 2-4、抗 SARS-CoV-2 S 鼠源抗体对假病毒单点突变 (E484K) 抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%) 假病毒单点突变 E484K										IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128		
ST-10-4	98.4	95.0	89.5	76.3	49.0	25.6	17.5	14.8	17.7	12.67	
ST-35-4	100.0	99.4	97.3	76.8	41.9	21.4	9.5	8.0	12.0	14.83	

实施例 3、抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合

细胞水平上, 通过 FACS 法测定待测抗体竞争阻断刺突 S-鼠 Fc 融合蛋白 (S-mFc) 与 293T-ACE2 细胞的结合, 通过荧光标记的羊抗鼠第二抗体, 检测细胞上结合的 S-mFc 平均荧光强度, 计算待测抗体阻断 S 蛋白与细胞表面 ACE2 结合的 IC₅₀, 评价待检抗体的阻断效果。S-mFc 抗原制备过程: 根据 Uniprot 中公布

的新型冠状病毒 S 蛋白全长氨基酸序列 (Uniprot Entry P0DTC2), 选取 S 蛋白全长区段, 并在 S 蛋白 C 端连接鼠 IgG2a Fc 片段 (Uniprot Entry P01863 (107-330aa)), 构建用作本实施例中评价中和抗体的抗原 S-mFc 融合蛋白。为了获得高效表达的目的蛋白, 对 S-mFc 的编码基因进行人工改造和优化, 并按照常规分子生物学方法构建该目的基因的真核表达载体 pcDNA3.1-S-mFc, 将测序正确的重组表达质粒转染 CHO 细胞, 并按常规方法进行表达和纯化。

鼠源抗体体外阻断实验, 具体步骤如下: 293T-ACE2 细胞胰酶消化, 以细胞密度 1×10^6 个/mL, 100 μ L/孔加入 96 孔 U 底板, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟; 将 S-mFc (安源医药科技 (上海) 有限公司) 用 1% PBSB 稀释至一定浓度; 待测鼠源抗体样品分别稀释为 8 μ g/mL, 4 倍比稀释, 9 个梯度, 然后将稀释后的 S-mFc 和不同浓度梯度的抗体 1:1 混合, 室温预孵育 30 分钟, 加入到上述 96 孔 U 底板中, 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时; 离心去上清, 用 1% PBSB 洗涤细胞 3 次; 将 AF647-羊抗鼠 IgG Fc (Jackson Immuno) 用 1% PBSB 以 1: 400 稀释, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时; 离心去上清, 用 1% PBSB 洗涤细胞 3 次; 用 1% PBSB 重悬细胞, 150 μ L/孔; 流式细胞仪检测信号强度。再以平均荧光强度作为 Y 轴, 抗体浓度作为 X 轴, 通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析, 计算抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体阻断 S-mFc 蛋白与 293T-ACE2 细胞结合的 IC₅₀ 值。

如图 6-1 至图 6-3 和表 3 所示, 细胞水平上, 抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-91-3、S1B-82-5、S1B-30-3、S1B-48-2、S1B-14-3、ST-10-4 和 ST-35-4 均能很好的竞争阻断 S 蛋白与 ACE2 的结合, IC₅₀ 处于 5-20 ng/mL 之间, 其中鼠抗 S1B-73-3 阻断效果最好, 其次鼠抗 S1B-91-3、S1B-30-3、S1B-48-2、ST-35-4 阻断效果相当, 而鼠抗 S1B-82-5、S1B-14-3、ST-10-4 阻断作用较弱。

表 3、抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合 IC₅₀

鼠抗名称	IC ₅₀ (ng/mL)
S1B-73-3	6.13
S1B-48-2	10.77
S1B-91-3	13.70
S1B-82-5	15.96
S1B-30-3	11.93
S1B-14-3	16.79
ST-10-4	16.55
ST-35-4	11.79

实施例 4、采用计算机分子对接技术评估抗 SARS-CoV-2 鼠源抗体对 RBD/ACE2 之间结合能力的影响

采用计算机软件 Discovery Studio 对鼠源抗体 S1B-73-3、S1B-15-5、S1B-30-3、S1B-48-2、S1B-82-5 以及 S1B-91-3 进行结构建模, 并对这些鼠源抗体与其抗原 RBD 结构域的分子对接空间构象进行模拟, 预测 S 蛋白鼠源抗体在 RBD 结构域上的结合位点, 评估抗体对 RBD/ACE2 之间结合能力的影响。

运用 Discovery Studio 软件, 构建鼠源抗体三维结构模型。建模采取 3 个步骤进行: 1、搜索与鼠源抗体轻链和重链可变区分别具有氨基酸序列高相似度的三维结构模板。搜索与整体鼠源抗体可变区 (轻重链

合在一起)具有氨基酸序列高相似度的三维结构模板,以便确定鼠源抗体可变区中轻链和重链的相对取向;

2、运用步骤1获得的3个结构模型模板以及鼠源抗体可变区轻重链氨基酸序列,构建鼠源抗体骨架区结构模型;

3、在步骤2的基础上,构建六个CDR环状区的结构模型。分子对接模拟计算中的RBD结构模型采用蛋白质数据库中2.45 Å高分辨率的RBD结构(PDB ID 6M0J)。通过比较两个RBD结构(PDB ID 6M0J和6W41),把6M0J中的F486残基的侧链构象调整为与6W41中的一致,即rotamer1构象。这个构象占有率最高,而且,6M0J中RBD由于结合ACE2的缘故,F486的侧链不以这个构象存在。分子对接的软件采用的是Discovery Studio软件包中的ZDOCK软件。分子对接模拟实验所用参数均采取默认值。鼠源抗体作为分子对接受体,RBD作为分子对接配体。受体封闭氨基酸(receptor blocked residues)选取远离CDR区、空间位置位于CDR区反方向的可变区氨基酸。受体结合位点氨基酸(receptor binding site residues)选取HCDR3 loop暴露在蛋白表面最顶端的一个氨基酸。鼠源抗体S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-82-5、S1B-91-3、S1B-30-3、S1B-14-3、ST-10-4和ST-35-4与RBD的分子对接结果参见图7和图8。通过RBD结构叠合引入ACE2(PDB 6M0J, Lan J *et al*, 2020, Nature, 581:215-220)和抗体CR3022结构(PDB 6W41, Yuan M *et al*, 2020, Science, 368:630-633)。分子对接结果表明,鼠源抗体S1B-73-3、S1B-48-2、S1B-82-5、S1B-91-3、S1B-30-3、S1B-14-3、ST-10-4和ST-35-4与ACE2竞争结合RBD,能够阻断RBD与ACE2之间的结合,为这些抗体能够抑制SARS-CoV-2病毒感染宿主细胞提供了分子水平上的合理解释。

实施例5、SARS-CoV-2冠状病毒S1蛋白鼠源抗体的人源化

我们采用CDR移植方法(CDR grafting)对鼠源抗体进行人源化改造。CDR grafting的基本原理是通过把鼠抗的CDR区移植到人源抗体模板上,同时把稳定CDR构象和对抗原-抗体结合重要的几个或一些关键鼠抗FR区残基,也一并引入到人源抗体模板上(backmutations),从而达到既降低鼠抗的免疫原性又保持鼠抗的亲亲和力的目的。除了上述CDR grafting操作外,我们还进一步对CDR grafting后的人源化抗体的等电点(PI)、疏水聚集(aggregation)、翻译后修饰(PTM,如糖基化、断裂、异构化位点等)和免疫原性(immunogenicity)四方面进行计算,对于造成这四方面问题的氨基酸进行突变,以便使人源化抗体在临床使用时充分发挥出药效。

抗体人源化的具体流程如下。搜索IMGT网站的人抗体胚系数据库(IMGT human antibody germline database, <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>),获得与鼠抗具有高相似度的人源抗体模板(表4)。用Discovery Studio对鼠抗和人源抗体模板进行CDR区注释,按Kabat或IMGT方案定义出CDR区(表5)。用鼠抗的六个CDR区分别替换人源抗体模板的六个CDR区。移植的6个CDR区中的单独每个CDR区可以是按Kabat定义出的氨基酸区域,或按IMGT定义出的氨基酸区域。CDR移植后进行从鼠源抗体到人源化模板FR区的回复突变。稳定抗体CDR区构象和对抗原-抗体结合重要的关键鼠抗FR区氨基酸包括4类氨基酸残基:1) CDR区6Å以内埋藏在抗体表面下的氨基酸;2) CDR区6Å以内暴露在抗体表面的氨基酸;3) 抗体轻链和重链结构域之间的界面氨基酸;和4) 稳定抗体CDR区构象的vernier zone residues (Foote J and Winter G, 1992, J Mol Biol, 224:487-499)。以上4类关键鼠抗FR区残基是通过建立鼠抗三维结构模型确定的。对于与鼠抗序列不一致的人源模板的这4类氨基酸,通过三维结构分析,选择对保

持 CDR 构象和抗原-抗体结合重要的氨基酸, 进行从鼠抗到人源模板的氨基酸移植或替换。然后, 对 4 类氨基酸移植后产生的人源化抗体进一步计算等电点、疏水聚集、翻译后修饰和免疫原性, 对问题氨基酸进行突变, 从而得到最终的人源化抗体序列 (表 6)。图 9-1 至图 14-2 分别显示了上述人源化抗体与其亲本鼠源抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列的比对结果。

表 4、示例性的鼠源抗体在人源化时所用人抗体胚系模板

	VH	VL
S1B-73-3	IGHV1-69*02	IGKV1-16*01
S1B-48-2	IGHV1-46*01	IGKV4-1*01
S1B-91-3	IGHV1-69*02	IGKV2-28*01
S1B-82-5	IGHV3-11*01	IGKV1-9*01
S1B-30-3	IGHV3-7*01	IGKV1-39*01
S1B-14-3	IGHV1-69*02	IGKV3-11*01

表 5、鼠源抗体可变区中的 CDR 区

抗体编号	CDR	Kabat	IMGT
S1B-73-3	HCDR1	NFLIE (SEQ ID NO: 1) HCDR1-1	GYAFTNFL (SEQ ID NO: 7) HCDR1-2
	HCDR2	MINPGSGDTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 2) HCDR2-1	INPGSGDT (SEQ ID NO: 8) HCDR2-2
	HCDR3	QLGLPGFVY (SEQ ID NO: 3) HCDR3-1	ARQLGLPGFVY (SEQ ID NO: 9) HCDR3-2
	LCDR1	KASQDINSYLT (SEQ ID NO: 4) LCDR1-1	QDINSY (SEQ ID NO: 10) LCDR1-2
	LCDR2	RANRLVD (SEQ ID NO: 5) LCDR2-1	RAN (SEQ ID NO: 11) LCDR2-2
	LCDR3	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-1	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-1
S1B-48-2	HCDR1	NYVMH (SEQ ID NO: 16) HCDR1-1	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 22) HCDR1-2
	HCDR2	YFNPYNDDAEYNEKFKG (SEQ ID NO: 17)	FNPYNDDA (SEQ ID NO: 23)

		HCDR2-1	HCDR2-2
	HCDR3	LRQETDY (SEQ ID NO: 18) HCDR3-1	ACLRQETDY (SEQ ID NO: 24) HCDR3-2
	LCDR1	RASESVDNYGFSLMN (SEQ ID NO: 19) LCDR1-1	ESVDNYGFSL (SEQ ID NO: 25) LCDR1-2
	LCDR2	EASNQGS (SEQ ID NO: 20) LCDR2-1	EAS (SEQ ID NO: 26) LCDR2-2
	LCDR3	HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 21) LCDR3-1	HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 21) LCDR3-1
S1B-91-3	HCDR1	DYWLH (SEQ ID NO: 31) HCDR1-1	GYSFTDYW (SEQ ID NO: 37) HCDR1-2
	HCDR2	MLDPSDGETRLNQKFKD (SEQ ID NO: 32) HCDR2-1	LDPDSDGET (SEQ ID NO: 38) HCDR2-2
	HCDR3	RHFQYDFDY (SEQ ID NO: 33) HCDR3-1	ARRHFQYDFDY (SEQ ID NO: 39) HCDR3-2
	LCDR1	RSSKSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO: 34) LCDR1-1	KSLLSNGNTY (SEQ ID NO: 40) LCDR1-2
	LCDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO: 35) LCDR2-1	RMS (SEQ ID NO: 41) LCDR2-2
	LCDR3	MQHLEYPLT (SEQ ID NO: 36) LCDR3-1	MQHLEYPLT (SEQ ID NO: 36) LCDR3-1
S1B-82-5	HCDR1	SYAMS (SEQ ID NO: 46) HCDR1-1	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 52) HCDR1-2
	HCDR2	TINSGGNFIYPDSVKG (SEQ ID NO: 47) HCDR2-1	INSGGNFI (SEQ ID NO: 53) HCDR2-2
	HCDR3	HSGNYVDSAMDY (SEQ ID NO: 48) HCDR3-1	GRHSGNYVDSAMDY (SEQ ID NO: 54) HCDR3-2
	LCDR1	SASSSVSDMH (SEQ ID NO: 49) LCDR1-1	SSVSD (SEQ ID NO: 55) LCDR1-2
	LCDR2	STSNLAS	STS

		(SEQ ID NO: 50) LCDR2-1	(SEQ ID NO: 56) LCDR2-2
	LCDR3	HQWSTWT (SEQ ID NO: 51) LCDR3-1	HQWSTWT (SEQ ID NO: 51) LCDR3-1
S1B-30-3	HCDR1	DAWMD (SEQ ID NO: 61) HCDR1-1	GFTFSDAW (SEQ ID NO: 67) HCDR1-2
	HCDR2	QIRNKANSHATNYADSVKG (SEQ ID NO: 62) HCDR2-1	IRNKANSHAT (SEQ ID NO: 68) HCDR2-2
	HCDR3	GLTGYVLDY (SEQ ID NO: 63) HCDR3-1	IRGLTGYVLDY (SEQ ID NO: 69) HCDR3-2
	LCDR1	KASQNVRTAVA (SEQ ID NO: 64) LCDR1-1	QNVRTA (SEQ ID NO: 70) LCDR1-2
	LCDR2	LASNRHT (SEQ ID NO: 65) LCDR2-1	LAS (SEQ ID NO: 71) LCDR2-2
	LCDR3	LQHWNYP LT (SEQ ID NO: 66) LCDR3-1	LQHWNYP LT (SEQ ID NO: 66) LCDR3-1
S1B-14-3	HCDR1	GYVH (SEQ ID NO: 76) HCDR1-1	GHTFTGYY (SEQ ID NO: 82) HCDR1-2
	HCDR2	WIYPGNVKTQYNEKFKG (SEQ ID NO: 77) HCDR2-1	IYPGNVKT (SEQ ID NO: 83) HCDR2-2
	HCDR3	EDHGNYCDY (SEQ ID NO: 78) HCDR3-1	AREDHGNYCDY (SEQ ID NO: 84) HCDR3-2
	LCDR1	RANSSVPYMH (SEQ ID NO: 79) LCDR1-1	SSVPY (SEQ ID NO: 85) LCDR1-2
	LCDR2	ATSNLPS (SEQ ID NO: 80) LCDR2-1	ATS (SEQ ID NO: 86) LCDR2-2
	LCDR3	QQWSSDPPA (SEQ ID NO: 81) LCDR3-1	QQWSSDPPA (SEQ ID NO: 81) LCDR3-2
S1B-34-4	HCDR1	NFLIE (SEQ ID NO: 1) HCDR1-1	GYAFTNFL (SEQ ID NO: 7) HCDR1-2

	HCDR2	MINPGSGDTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 2) HCDR2-1	INPGSGDT (SEQ ID NO: 8) HCDR2-2
	HCDR3	QLGLPGFVY (SEQ ID NO: 3) HCDR3-1	ARQLGLPGFVY (SEQ ID NO: 9) HCDR3-2
	LCDR1	KASQDIYSYLT (SEQ ID NO: 91) LCDR1-1	QDIYSY (SEQ ID NO: 92) LCDR1-2
	LCDR2	RANRLVD (SEQ ID NO: 5) LCDR2-1	RAN (SEQ ID NO: 11) LCDR2-2
	LCDR3	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-1	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-2
S1B-8-2	HCDR1	NFLIE (SEQ ID NO: 1) HCDR1-1	GYAFTNFL (SEQ ID NO: 7) HCDR1-2
	HCDR2	MINPGSGDTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 2) HCDR2-1	INPGSGDT (SEQ ID NO: 8) HCDR2-2
	HCDR3	QLGLPGFVY (SEQ ID NO: 3) HCDR3-1	ARQLGLPGFVY (SEQ ID NO: 9) HCDR3-2
	LCDR1	KASQDINSYLT (SEQ ID NO: 4) LCDR1-1	QDINSY (SEQ ID NO: 10) LCDR1-2
	LCDR2	RANRLVD (SEQ ID NO: 5) LCDR2-1	RAN (SEQ ID NO: 11) LCDR2-2
	LCDR3	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-1	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-2
S1B-64-2	HCDR1	NYVMH (SEQ ID NO: 16) HCDR1-1	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 22) HCDR1-2
	HCDR2	YFNPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO: 101) HCDR2-1	FNPYNDGT (SEQ ID NO: 104) HCDR2-2
	HCDR3	LRQRADY (SEQ ID NO: 102) HCDR3-1	ACLRQRADY (SEQ ID NO: 105) HCDR3-2
	LCDR1	RASEVDNYGFSFMN (SEQ ID NO: 103)	ESVDNYGFSF (SEQ ID NO: 106)

		LCDR1-1	LCDR1-2
	LCDR2	EASNQGS (SEQ ID NO: 20) LCDR2-1	EAS (SEQ ID NO: 26) LCDR2-2
	LCDR3	HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 21) LCDR3-1	HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 21) LCDR3-2
ST-10-4	HCDR1	SSNMGVS (SEQ ID NO: 111) HCDR1-1	GFSLDSSNMG (SEQ ID NO: 117) HCDR1-2
	HCDR2	HIYWGDDNRYNPSLKS (SEQ ID NO: 112) HCDR2-1	IYWGDDN (SEQ ID NO: 118) HCDR2-2
	HCDR3	KWNWDWFPY (SEQ ID NO: 113) HCDR3-1	ARKWNWDWFPY (SEQ ID NO: 119) HCDR3-2
	LCDR1	RASKSVSASGYSEFMH (SEQ ID NO: 114) LCDR1-1	KSVSASGYSEF (SEQ ID NO: 120) LCDR1-2
	LCDR2	LASNLES (SEQ ID NO: 115) LCDR2-1	LAS (SEQ ID NO: 121) LCDR2-2
	LCDR3	QHSRELPLT (SEQ ID NO: 116) LCDR3-1	QHSRELPLT (SEQ ID NO: 116) LCDR3-1
ST-35-4	HCDR1	TYTIH (SEQ ID NO: 126) HCDR1-1	GYTFTTYT (SEQ ID NO: 132) HCDR1-2
	HCDR2	AVNPGNGDTSYSQKFKG (SEQ ID NO: 127) HCDR2-1	VNPGNGDT (SEQ ID NO: 133) HCDR2-2
	HCDR3	DGYPFYFALDS (SEQ ID NO: 128) HCDR3-1	ARDGYPFYFALDS (SEQ ID NO: 134) HCDR3-2
	LCDR1	RAGQEISSYLT (SEQ ID NO: 129) LCDR1-1	QEISSY (SEQ ID NO: 135) LCDR1-2
	LCDR2	AASTLDS (SEQ ID NO: 130) LCDR2-1	AAS (SEQ ID NO: 136) LCDR2-2
	LCDR3	LQYASYPWT (SEQ ID NO: 131) LCDR3-1	LQYASYPWT (SEQ ID NO: 131) LCDR3-1
hS1B-73-3	HCDR1	NFLIE	GYAFTNFL

		(SEQ ID NO: 1) HCDR1-1	(SEQ ID NO: 7) HCDR1-2
	HCDR2	MINPGSGDTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 2) HCDR2-1	INPGSGDT (SEQ ID NO: 8) HCDR2-2
	HCDR3	QLGLPGFVY (SEQ ID NO: 3) HCDR3-1	ARQLGLPGFVY (SEQ ID NO: 9) HCDR3-2
	LCDR1	KASQDINSYLT (SEQ ID NO: 4) LCDR1-1	QDINSY (SEQ ID NO: 10) LCDR1-2
	LCDR2	RANRLVE (SEQ ID NO: 141) LCDR2-1	RAN (SEQ ID NO: 11) LCDR2-2
	LCDR3	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-1	LQHDEFPLT (SEQ ID NO: 6) LCDR3-2
hS1B-48-2	HCDR1	NYVMH (SEQ ID NO: 16) HCDR1-1	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 22) HCDR1-2
	HCDR2	YFNPYNDDAEYNEKFKG (SEQ ID NO: 17) HCDR2-1	FNPYNDDA (SEQ ID NO: 23) HCDR2-2
	HCDR3	LRQETDY (SEQ ID NO: 18) HCDR3-1	ASLRQETDY (SEQ ID NO: 146) HCDR3-2
	LCDR1	RASESVDNYGFSLMN (SEQ ID NO: 19) LCDR1-1	ESVDNYGFSL (SEQ ID NO: 25) LCDR1-2
	LCDR2	EASNQGS (SEQ ID NO: 20) LCDR2-1	EAS (SEQ ID NO: 26) LCDR2-2
	LCDR3	HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 21) LCDR3-1	HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 21) LCDR3-2
hS1B-14-3-1	HCDR1	GYVVH (SEQ ID NO: 76) HCDR1-1	GHTFTGYY (SEQ ID NO: 82) HCDR1-2
	HCDR2	WIYPGNVKTQYNEKFKG (SEQ ID NO: 77) HCDR2-1	IYPGNVKT (SEQ ID NO: 83) HCDR2-2
	HCDR3	EDHGNYADY (SEQ ID NO: 151) HCDR3-1	AREDHGNYADY (SEQ ID NO: 153) HCDR3-2

	LCDR1	RAQSSVPYMH (SEQ ID NO: 152) LCDR1-1	SSVPY (SEQ ID NO: 85) LCDR1-2
	LCDR2	ATSNLPS (SEQ ID NO: 80) LCDR2-1	ATS (SEQ ID NO: 86) LCDR2-2
	LCDR3	QQWSSDPPA (SEQ ID NO: 81) LCDR3-1	QQWSSDPPA (SEQ ID NO: 81) LCDR3-2
hS1B-14-3-2	HCDR1	GYYVH (SEQ ID NO: 76) HCDR1-1	GHTFTGY (SEQ ID NO: 82) HCDR1-2
	HCDR2	WIYPGNVKTQYNEKFKG (SEQ ID NO: 77) HCDR2-1	IYPGNVKT (SEQ ID NO: 83) HCDR2-2
	HCDR3	EDHGQYSDY (SEQ ID NO: 158) HCDR3-1	AREDHGQYSDY (SEQ ID NO: 160) HCDR3-2
	LCDR1	RAQSSVPYMH (SEQ ID NO: 159) LCDR1-1	SSVPY (SEQ ID NO: 85) LCDR1-2
	LCDR2	ATSNLPS (SEQ ID NO: 80) LCDR2-1	ATS (SEQ ID NO: 86) LCDR2-2
	LCDR3	QQWSSDPPA (SEQ ID NO: 81) LCDR3-1	QQWSSDPPA (SEQ ID NO: 81) LCDR3-2
	hST-10-4	HCDR1	SSNMGVS (SEQ ID NO: 111) HCDR1-1
HCDR2		HIYWGDDNRYNPSLKS (SEQ ID NO: 112) HCDR2-1	IYWGDDN (SEQ ID NO: 118) HCDR2-2
HCDR3		KWNWDWFPY (SEQ ID NO: 113) HCDR3-1	ARKWNWDWFPY (SEQ ID NO: 119) HCDR3-2
LCDR1		RASKSVSASGYSEFMH (SEQ ID NO: 114) LCDR1-1	KSVSASGYSEF (SEQ ID NO: 120) LCDR1-2
LCDR2		LASNLES (SEQ ID NO: 115) LCDR2-1	LAS (SEQ ID NO: 121) LCDR2-2
LCDR3		QHSRELPLT (SEQ ID NO: 116)	QHSRELPLT (SEQ ID NO: 116)

		LCDR3-1	LCDR3-1
hST-35-4	HCDR1	TYTIH (SEQ ID NO: 126) HCDR1-1	GYTFTTYT (SEQ ID NO: 132) HCDR1-2
	HCDR2	AVNPGNADTSYSQKFKG (SEQ ID NO: 165) HCDR2-1	VNPGNADT (SEQ ID NO: 167) HCDR2-2
	HCDR3	DAYPYFYALDS (SEQ ID NO: 166) HCDR3-1	ARDAYPYFYALDS (SEQ ID NO: 168) HCDR3-2
	LCDR1	RAGQEISSYLT (SEQ ID NO: 129) LCDR1-1	QEISSY (SEQ ID NO: 135) LCDR1-2
	LCDR2	AASTLDS (SEQ ID NO: 130) LCDR2-1	AAS (SEQ ID NO: 136) LCDR2-2
	LCDR3	LQYASYPWT (SEQ ID NO: 131) LCDR3-1	LQYASYPWT (SEQ ID NO: 131) LCDR3-1

表 6、鼠源抗体，对应的人源化抗体以及它们的可变区氨基酸序列

抗体编号	VH 氨基酸序列	VL 氨基酸序列
S1B-73-3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
S1B-48-2	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
S1B-91-3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 43
S1B-82-5	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58
S1B-30-3	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
S1B-14-3	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88
S1B-34-4	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 94
S1B-8-2	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 98
S1B-64-2	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108
ST-10-4	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123
ST-35-4	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 138
hS1B-73-3	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 143
hS1B-48-2	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 148
hS1B-91-3	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
hS1B-82-5	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
hS1B-30-3	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75

hS1B-14-3-1	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 155
hS1B-14-3-2	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 162
hST-10-4	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 125
hST-35-4	SEQ ID NO: 169	SEQ ID NO: 170

为了获得由两条重链和两条轻链组成的全长抗体序列,将表 6 中所示 VH 和 VL 序列的与抗体重链恒定区(优选自人 IgG1、IgG2 或 IgG4)和轻链恒定区(优选自人 κ 轻链,氨基酸序列如 SEQ ID NO: 95 所示)序列采用常规技术进行拼接或组装。例如,在一种实施方案中,人源化抗体分子包含野生型人 IgG1 的重链恒定区(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 96 所示)。在一种实施方案中,人源化抗体分子包括在根据 EU 编号的含有 M252Y、S254T、T256E 和 M428L 突变的人 IgG1 的重链恒定区(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 190 所示)。在另一种实施方案中,人源化抗体分子包含野生型人 IgG2 的重链恒定区(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 99 所示)。或采用修饰的人 IgG2 恒定区序列;在一种实施方案中,人源化抗体分子包括在根据 EU 编号的铰链区修饰的人 IgG2 (例如缺失 ERKCC,氨基酸序列如 SEQ ID NO: 100 所示)。在另一种实施方案中,人源化抗体分子包含野生型人 IgG4 的重链恒定区(氨基酸序列如 SEQ ID NO: 109 所示)。或采用修饰的人 IgG4 恒定区序列;在一种实施方案中,人源化抗体分子包括在根据 EU 编号的第 228 位突变(例如 S 变为 P)的人 IgG4 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 110 所示)。

表 7、人 κ 轻链和突变的人 IgG 重链的恒定区氨基酸序列

人 κ 恒定区氨基酸序列	
SEQ ID NO: 95	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
人 IgG1 (M252Y、S254T、T256E、M428L) 突变体恒定区氨基酸序列 (EU 编号)	
SEQ ID NO: 190	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKVV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG2 (216-ERKCC-220 删除) 突变体恒定区氨基酸序列 (EU 编号)	
SEQ ID NO: 100	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHVDWLNGLKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
人 IgG4 (S228P) 突变体恒定区氨基酸序列 (EU 编号)	

SEQ ID NO: 110	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVDSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTIKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK
----------------	--

实施例 6、人源化抗体表达载体的构建和蛋白表达

用上述方法中获得的人源化抗体的重链和轻链的编码 cDNA 插入到 PcDNA3.1 或其衍生质粒，或其它真核表达载体中，构建人源化抗体表达载体。优选地，使用的载体质粒应含有在哺乳动物细胞中高水平表达所需的巨细胞病毒早期基因启动因子-增强子。同时，载体质粒中含有可选择标记基因，从而在细菌中赋予氨苄青霉素抗性，而在哺乳动物细胞中赋予 G418 抗性。另外，载体质粒中含有 DHFR 基因，在合适的宿主细胞中，能以氨甲喋呤(Methotrexate, MTX, Sigma) 共扩增人源化抗体基因和 DHFR 基因（例如，参见专利 CN103333917B）。

将上述已构建的重组表达载体质粒转染入哺乳动物宿主细胞系，以表达人源化抗体。为了稳定高水平的表达，优选的宿主细胞系是二氢叶酸还原酶 (DHFR) 缺陷型的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞（参见，例如 Chasin,L 等人的美国专利 4818679 号）。优选的转染方法是电穿孔，也可以使用其他方法，包括磷酸钙共沉降，脂转染和原生质融合等。在电穿孔中，用设为 250V 电场和 960 μFd 电容的 Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories)，在比色杯内加入 2×10⁷ 个细胞悬浮在 0.8 ml 的 PBS 中，并含有 10 μg 用 PvuI (Takara)线性化的表达载体质粒 DNA。转染 2 天后，加入含有 0.2 mg/mL G418 以及 200 nM 氨甲喋呤 (methotrexate 或 MTX)。为了实现较高水平的表达，用受 MTX 药物抑制的 DHFR 基因共扩增转染的人源化抗体基因。用极限稀释亚克隆转染子及 ELISA 的方法测定各细胞系的分泌率，选出高水平表达人源化抗体的细胞株。收集人源化抗体的条件培养基，用于测定其体外和体内生物学活性。

例如，将表 8 所示编码人源化抗体的重链和轻链的核苷酸序列插入上述构建的表达载体中，经过加压筛选、亚克隆稳定、高表达目的抗体的细胞株，再经培养、纯化得到各目的抗体。

表 8、人源化抗体重链和轻链的氨基酸序列及其编码核苷酸序列

抗体编号	HC 氨基酸序列	LC 氨基酸序列	HC 核苷酸序列	LC 核苷酸序列
hS1B-73-3	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 173	SEQ ID NO: 174
hS1B-48-2	SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 150	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 176
hS1B-91-3	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 178
hS1B-82-5	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 180
hS1B-30-3	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 181	SEQ ID NO: 182
hS1B-14-3-1	SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 184
hST-10-4	SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 186
hST-35-4	SEQ ID NO: 171	SEQ ID NO: 172	SEQ ID NO: 187	SEQ ID NO: 188

实施例 7、人源化抗体的功能鉴定

7.1、间接 ELISA 法测定人源化抗体与 SARS-CoV-2 S 三聚体抗原的结合能力

以 SARS-CoV-2 S 三聚体 (ACRO BioSystem) 包被酶标板, 室温过夜。弃去包被溶液, 用溶解在 PBS 缓冲液的脱脂奶粉封闭 1h, 用 PBST (pH7.4, PBS 含 0.05% 吐温-20) 洗板 3~4 次。然后每孔分别加入 100 μ l 纯化的抗 SARS-CoV-2 S1 RBD 人源化抗体 hS1B-73-3 及针对 SARS-CoV-2 S1 RBD 的受体 hACE2-Fc (ACRO BioSystem), 室温孵育 1h, 用含有 0.05% 吐温(Tween)20 的 PBS 洗孔, 然后每孔加入 100 μ l HRP 标记的羊抗人 IgG 多克隆抗体 (Jackson Laboratory) 作为检测抗体, 再以 PBST 洗板 3~4 次、加入底物 TMB 显色 10 分钟、然后加入 0.2 M H₂SO₄ 终止反应, 后读取吸光度值 (OD 值), 其结果示于图 15-1 至图 15-5。

7.2、竞争 ELISA 法测定人源化抗体的阻断 SARS-CoV-2 S 三聚体结合 ACE2 的能力

用 PBS 缓冲液将 SARS-CoV-2 S 三聚体蛋白 (ACRO BioSystem) 稀释至 0.1 μ g/ml, 以 100 μ l/孔加于 96 孔板中, 室温过夜。弃去包被溶液, 每孔加入 200 μ l PBST/1% 脱脂奶粉, 室温孵育 1h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 缓冲液洗板 3 次后, 然后每孔加入 100 μ l 以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 hACE2-Fc 分别和人源化抗体 hS1B-73-3 及针对 SARS-CoV-2 S1 RBD 的受体 hACE2-Fc 的混合物。以 PBST 作为空白对照。充分孵育后以 PBS 洗去未结合的 HRP 标记的 hACE2-Fc, 室温孵育 1h。再以 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100 μ l TMB, 室温孵育 5-10 min。最后, 每孔加入 50 μ l 0.2 M H₂SO₄ 终止反应, 并用酶标仪在双波长 450/620 nm 处读取 OD 值。其结果示于图 16-1 至图 16-5。

7.3、竞争 ELISA 法测定人源化抗体阻断 SARS-CoV-2 S1 与 ACE2 的结合能力

竞争 ELISA 法测定人源化抗体阻断 SARS-CoV-2 S1 与 ACE2 的结合能力实验方法参见实施例 2.3。

结果如表 9 所示, 上述人源化抗体能与 hACE2 竞争结合 SARS-CoV-2 S1, 即通过阻断 SARS-CoV-2 S1 和 hACE2 的结合发挥功能。

表 9、人源化抗体竞争结合 hACE2 的能力

	EC ₅₀ (μ g/ml)
hS1B-73-3	0.02539
hS1B-48-2	0.01965
hS1B-91-3	0.07377
hS1B-82-5	0.16588
hS1B-30-3	0.03307
hACE2-Fc	1.31470

7.4、生物薄膜干涉技术测定抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体的动力学常数和亲和力

人源化抗体动力学常数和亲和力平衡解离常数测定的实验方法参见实施例 2.4。实验结果见表 10。与鼠抗相比, 人源化抗体的亲和力平衡解离常数保持在同一 pM 级别。

表 10、人源化抗体的动力学常数和亲和力测定结果

人源化单抗	K_D (M)	K_a (M/s)	K_d (1/s)
hS1B-73-3	2.07E-11	1.07E+06	2.22E-05
hS1B-48-2	1.13E-12	8.67E+05	9.81E-07
hS1B-91-3	6.41E-12	6.26E+05	4.01E-06
hS1B-82-5	<1.0E-12	2.97E+05	<1.0E-07
hS1B-30-3	2.09E-12	7.88E+05	1.65E-06
CR3022	8.66E-11	2.20E+05	1.90E-05
hACE2-Fc	1.40E-09	2.34E+04	3.28E-05

7.5、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合

刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞结合的阻断实验方法参见实施例 3。实验结果见图 17-1 至图 17-2 和表 11。细胞水平上，抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体均能很好的竞争阻断 S 蛋白与 ACE2 的结合， IC_{50} 处于 4-20 ng/mL 之间，其中 hS1B-73-3 阻断效果最好，其次人源化抗体 hS1B-91-3、hS1B-30-3、hS1B-48-2、hS1B-14-3 阻断效果相当，而人源化抗体 hS1B-82-5 阻断作用较弱。与鼠源抗体相比较，人源化之后抗体的阻断效果没有显著变化。

表 11、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体阻断刺突 S 蛋白与 293T-ACE2 细胞的结合 IC_{50}

人源化抗体名称	IC_{50} (ng/mL)
hS1B-73-3	4.33
hS1B-91-3	8.13
hS1B-82-5	19.29
hS1B-30-3	6.91
hS1B-48-2	5.82
hS1B-14-3	7.54

7.6、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化单克隆抗体外抑制假病毒实验

通过使用新冠 S 蛋白假病毒与待测抗体孵育后侵染 293T-ACE2 细胞，采用化学发光法检测 Luciferase 发光值 RLU，根据 RLU 读值计算待检抗体的假病毒抑制率，评价待检抗体的中和效果。新冠 S 蛋白假病毒基因组编码萤火虫荧光素酶，当病毒基因组进入细胞整合后，萤火虫荧光素酶的表达和活性与转导的细胞数量成正比。假病毒与真病毒相比只能一次性感染细胞。

人源化抗体对野生型 (WT) 假病毒或突变株假病毒 (B.1.1.7、B.1.351 或 E484K) 感染的抑制实验，具体步骤如下。293T-ACE2 细胞 (上海翊圣生物)，用培养基 DMEM + 10% FBS 培养至对数生长期，以 3000 个细胞/孔接种于 384 孔白板中，并放入 37°C，5% CO₂ 培养箱中培养过夜。待测抗体样品用含 10% FBS 的 DMEM 稀释，起始浓度为 10 μ g/mL，5 倍比稀释，9 梯度；野生型 (WT) 假病毒或突变株假病毒 (B.1.1.7、B.1.351 或 E484K) (吉满生物) 从 -80°C 取出，4°C 复融，将复融后的假病毒稀释 125 倍，作为工作液；稀释后的待测抗体和假病毒工作液分别以 50 μ L/孔加入到 96 孔 U 底板中混匀，37°C 预孵育 30 分钟；然后以

20 μL/孔加入到前一天细胞铺板的 384 孔白板中，阳性对照组：假病毒工作液和含 10% FBS 的 DMEM 培养基分别以 10 μL/孔加入到 384 孔白板中。阴性对照组：含 10% FBS 的 DMEM 培养基以 20 μL/孔加入到 384 孔白板中，设 4 复孔。24 小时后，以 30 μL/孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基，继续放入细胞培养箱中培养 24 小时；用移液器小心吸掉上清，以 30 μL/孔加入新配的荧光素酶显色液，室温孵育 5 分钟，将 384 孔板置于酶标仪，读取每孔的化学荧光信号。抑制率 (%) = [1 - (样品 RLU 信号值 - 阴性对照 RLU 信号值) / (阳性对照 RLU 信号值 - 阴性对照 RLU 信号值)] × 100。再以抑制率作为 Y 轴，抗体浓度作为 X 轴，通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析，得出抗体的量效曲线，使用非线性回归曲线计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

表 12-1 至表 12-5 显示了抗 SARS-CoV-2 S1 人源化单克隆抗体外抑制假病毒的实验结果。如图 18-1 至图 18-2 和表 12-1 所示，人源化单克隆抗体 hS1B-91-3 和 hS1B-30-3 均能显著地，且呈剂量依赖性地的抑制野生型新冠假病毒侵染 293T-ACE2 细胞，能够阻断 SARS-CoV-2 的感染对宿主细胞的早期入侵，起到保护作用。

此外，如图 18-3 和表 12-2 至表 12-5 所示，hS1B-82-5、hS1B-48-2 和 hS1B-14-3 均能很好的抑制野生型和 B.1.1.7 的新冠假病毒感染，同时 hS1B-82-5、hS1B-48-2 和 hS1B-14-3 也能很好的抑制 B.1.351 或 E484K 新冠假病毒突变株感染，并且 hS1B-82-5 或 hS1B-48-2 在 B.1.351 突变株上中和作用明显优于野生型的，hS1B-48-2 的表现更好。

表 12-1、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体野生型假病毒抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%)							
	10000	3300	1100	370.3	123.46	41.15	13.72	4.57
hS1B-91-3	100.37%	99.15%	92.40%	83.34%	77.67%	72.62%	61.03%	41.63%
hS1B-30-3	100.61%	100.48%	98.41%	82.43%	72.05%	64.20%	47.15%	12.13%

表 12-2、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体野生型假病毒抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%) 野生型假病毒										IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128		
hS1B-82-5	100.0	99.1	74.4	42.8	29.3	32.3	26.3	6.74	17.7	105.8	
hS1B-48-2	100.0	100.0	99.7	82.2	45.4	28.3	13.2	16.4	-4.8	9.40	
hS1B-14-3	99.9	99.9	99.6	74.0	21.1	7.6	2.1	-4.7	-4.3	17.51	

表 12-3、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体假病毒突变株 (B.1.1.7) 抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%) 假病毒突变株 B.1.1.7										IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128		
hS1B-82-5	99.9	99.3	82.6	29.5	16.8	12.4	9.4	15.7	5.0	87.46	
hS1B-48-2	99.9	99.9	99.7	93.1	50.4	17.8	6.1	13.7	5.0	8.89	
hS1B-14-3	97.4	97.2	96.7	92.5	24.9	-4.7	0.0	-1.9	-6.5	11.66	

表 12-4、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体假病毒突变株 (B.1.351) 抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%) 假病毒突变株 B.1.351									IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	
hS1B-82-5	99.8	99.3	83.7	24.9	4.0	-5.1	-1.2	-3.8	-4.6	73.54
hS1B-48-2	99.7	99.6	99.7	98.6	74.7	26.8	5.6	3.0	6.9	3.90
hS1B-14-3	99.8	99.7	99.6	88.1	35.1	14.5	3.7	1.4	-5.3	11.13

表 12-5、抗 SARS-CoV-2 S1 人源化抗体对假病毒单点突变 (E484K) 抑制结果

单抗名称	抗体浓度 (ng/mL)-抑制率 (%) 假病毒单点突变 E484K									IC ₅₀ (ng/mL)
	5000	1000	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	
hS1B-82-5	99.9	97.4	68.0	24.9	15.2	11.3	10.1	6.6	10.2	130.5
hS1B-48-2	100.0	99.6	99.8	89.2	51.2	28.5	17.2	16.6	11.4	9.29
hS1B-14-3	99.9	99.9	99.3	69.1	31.8	14.8	17.7	20.7	19.6	27.59

实施例 8、S 蛋白 RBD 结构域上的突变对本发明的抗 SARS-CoV-2 抗体的影响

与野生型 SARS-CoV-2 病毒不同, B.1.351 南非突变株 S 蛋白 RBD 结构域包含 3 个氨基酸突变, 分别是 K417N, E484K 和 N501Y。这三个氨基酸 K417、E484 和 N501 基本上位于 S 蛋白 RBD 结构域与这些抗体结合的界面上 (图 19-1), 这个界面也是 S 蛋白 RBD 结构域与人源 ACE2 分子结合的界面 (图 19-2A)。几个已公开的 SARS-CoV-2 冠状病毒抗体, 针对 SARS-CoV-2 冠状病毒南非突变株 B.1.351 都失活或中和活性减弱了, 例如, 礼来公司的抗体 LY-CoV55、LY-CoV016 和再生元的 REGN-10933 抗体失活, 以及阿斯利康的 COV2-2196 中和活性减弱 14.6 倍 (Wang *et al*, 2021, Nature, DOI: 10.1038/s41586-021-03398-2; Chen RE *et al*, 2021, Nat Med, DOI: 10.1038/s41591-021-01294-w)。运用 Discovery Studio 软件, 我们计算了这三个界面氨基酸突变导致的抗原/抗体结合自由能变化, 可以很好地解释为什么以上这些已公开抗体对 SARS-CoV-2 病毒突变株 B.1.351 失活或活性减弱。例如, LY-CoV55 抗体/RBD 结合界面上主要的氨基酸突变 E484K 导致 6.54 Kcal/mol 自由能变化, LY-CoV016 抗体/RBD 结合界面上主要的氨基酸突变 K417N 导致 0.75 Kcal/mol 自由能变化, REGN-10933 抗体/RBD 结合界面上主要的氨基酸突变 K417N 和 E484K 分别导致了 0.68 Kcal/mol 和 2.0 Kcal/mol 自由能变化。自由能变化大于 0.5 Kcal/mol 的突变, 就对抗原/抗体结合力有明显影响; 突变导致的自由能变化为正值, 表明这种突变降低抗原/抗体结合力。由于以上这些突变导致这些抗体不再能够结合 B.1.351 病毒株 S 蛋白 RBD 结构域或结合减弱, 这些抗体针对 B.1.351 突变株就失去中和活性或中和活性降低。

通过竞争 ELISA 法阻断 ACE2/RBD 结合的实验、抗体针对野生型及三种 SARS-CoV-2 假病毒突变株的中和能力比较、以及抗体/RBD 的分子对接计算模拟, 我们确定出本发明提供的抗体 hS1B-48-2 或 ST-35-4 在 S 蛋白 RBD 结构域上的结合表位。竞争 ELISA 法阻断 ACE2/RBD 结合的实验结果表明, 抗体 hS1B-48-2

或 ST-35-4 均能阻断 ACE2 与 RBD 之间的结合（参见实施例 2.3 和实施例 3，分别为分子和细胞阻断）。这说明抗体 hS1B-48-2 或 ST-35-4 在 RBD 结构域上结合的抗原表位，与 RBD 和 ACE2 结合的界面相似或相同。这个 RBD 界面可以用空间上呈三角形分布的三个 RBD 残基 E484、N501 和 K417 来大致界定（图 19-2A）。进一步地，如实施例 2.5 和实施例 7.6 所示，我们对抗体 hS1B-48-2 或 ST-35-4 针对野生型及三种 SARS-CoV-2 假病毒突变株的中和能力 IC_{50} 进行了测定（表 13）。与野生型 SARS-CoV-2 病毒不同，B.1.1.7 突变株 S 蛋白 RBD 结构域包含一个氨基酸突变 N501Y，而 B.1.351 突变株包含 3 个氨基酸突变 (K417N, E484K, N501Y)。从结果中可以看出，针对野生型以及包含单个氨基酸突变的 E484K 突变株和 B.1.1.7 病毒株，抗体 hS1B-48-2 的中和活性 IC_{50} 值并没有明显差别，表明 N501Y 和 E484K 突变对抗体 hS1B-48-2 的中和活性没有影响；但针对包含三个氨基酸突变的 B.1.351 病毒株，抗体 hS1B-48-2 的 IC_{50} 值降低为 3.9 ng/mL，表明 K417N 突变导致抗体 hS1B-48-2 的中和活性升高。一个合理的解释是，K417N 突变导致 hS1B-48-2 抗体/RBD 结合能力增强，从而使 hS1B-48-2 抗体能更有效地中和 SARS-CoV-2 假病毒突变株 B.1.351。至于抗体 ST-35-4，相较于野生型病毒，E484K 突变对抗体中和活性无明显影响，而 N501Y 突变导致抗体中和活性增强， IC_{50} 值降低，K417N 突变导致抗体中和活性进一步增强， IC_{50} 进一步降低。合理的解释是，N501Y 和 K417N 突变导致抗体 ST-35-4 与 RBD 的亲力和结合力增强，从而使抗体能更有效地中和 SARS-CoV-2 假病毒突变株 B.1.351。综合以上结果，抗体 hS1B-48-2 与 RBD 结构域的 K417 或其同等位置的突变残基 N417 结合或有相互作用；抗体 ST-35-4 与 RBD 结构域的 N501 和 K417 或其同等位置的突变残基 Y501 和 N417 结合或有相互作用。进一步地，运用 ZDOCK 软件，我们对抗体 hS1B-48-2 或 ST-35-4 在 RBD 结构域上的结合表位进行了分子对接 (docking) 计算模拟。计算模拟结果表明，抗体 hS1B-48-2 或 ST-35-4 在 RBD 上的结合表位与 ACE2 在 RBD 上的结合界面大致重叠，抗体 hS1B-48-2 或 ST-35-4 与 RBD 残基 E484、N501 和 K417 有相互作用，此外，与 RBD 残基 L452 也有相互作用（图 19-2A、19-2B 以及 19-2C）。

表 13、抗 SARS-CoV-2 抗体针对野生型及三种 SARS-CoV-2 假病毒突变株的中和活性

抗体名称	抗体针对野生型及三种 SARS-CoV-2 假病毒突变株的 IC_{50} (ng/mL)			
	野生型	SARS-CoV-2 E484K 假病毒突变株 (E484K)	B.1.1.7 (N501Y)	B.1.351 (K417N, E484K, N501Y)
hS1B-48-2	9.40	9.29	8.89	3.90
ST-35-4	14.77	14.83	7.46	3.87

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

1、一种能够特异性结合 SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含的重链可变区（VH）包含至少一个、两个或三个选自下组的互补决定区（CDR）：

(i) HCDR1，其具有如 SEQ ID NO：1、7、16、22、31、37、46、52、61、67、76、82、111、117、126 或 132 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(ii) HCDR2，其具有如 SEQ ID NO：2、8、17、23、32、38、47、53、62、68、77、83、101、104、112、118、127、133、165 或 167 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(iii) HCDR3，其具有如 SEQ ID NO：3、9、18、24、33、39、48、54、63、69、78、84、102、105、113、119、128、134、146、151、153、158、160、166 或 168 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

和/或，其包含的轻链可变区（VL）包含至少一个、两个或三个选自下组的互补决定区（CDR）：

(iv) LCDR1，其具有如 SEQ ID NO：4、10、19、25、34、40、49、55、64、70、79、85、91、92、103、106、114、120、129、135、152 或 159 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(v) LCDR2，其具有如 SEQ ID NO：5、11、20、26、35、41、50、56、65、71、80、86、115、121、130、136 或 141 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(vi) LCDR3，其具有如 SEQ ID NO：6、21、36、51、66、81、116、131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

优选的，(i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

2、如权利要求 1 所述抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含 3 个 VH 可变区 CDR 和 3 个 VL 可变区 CDR，其选自下组：

(1) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO：1、2、3、4、5 或 6 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(2) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO：7、8、9、10、11 或 6 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(3) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO：16、17、18、19、20 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(4) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO：22、23、24、25、26 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如

1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(5) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 31、32、33、34、35 或 36 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(6) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 37、38、39、40、41 或 36 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(7) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 46、47、48、49、50 或 51 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(8) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 52、53、54、55、56 或 51 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(9) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 61、62、63、64、65 或 66 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(10) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 67、68、69、70、71 或 66 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(11) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 76、77、78、79、80 或 81 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(12) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 82、83、84、85、86 或 81 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(13) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 1、2、3、91、5 或 6 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(14) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 7、8、9、92、11 或 6 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(15) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 16、101、102、103、20 或 21 所示的序列, 或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(16) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 22、104、

105、106、26 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(17) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 111、112、113、114、115 或 116 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(18) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 117、118、119、120、121 或 116 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(19) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 126、127、128、129、130 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(20) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 132、133、134、135、136 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(21) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、141 或 6 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(22) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 22、23、146、25、26 或 21 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(23) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 76、77、151、152、80 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(24) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 82、83、153、85、86 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(25) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 76、77、158、159、80 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(26) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 82、83、160、85、86 或 81 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(27) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 126、165、166、129、130 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(28) 其 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有如 SEQ ID NO: 132、167、168、135、136 或 131 所示的序列，或者与上述序列中的任何相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列。

3、如权利要求 2 所述抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段为鼠源的或嵌合的，其重链可变区包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链 FR 区；和其轻链可变区包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链 FR 区。

4、如权利要求 3 所述抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的 VH 和 VL 序列：

(1) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(2) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(3) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(4) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 58 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(5) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 72 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代））的序列；

(6) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 87 所示的氨基酸序列，或与上述序列基本上相同（例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取

代))的序列;和其VL结构域包含如SEQ ID NO: 88所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;

(7) VH结构域包含如SEQ ID NO: 93所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;和其VL结构域包含如SEQ ID NO: 94所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;

(8) VH结构域包含如SEQ ID NO: 97所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;和其VL结构域包含如SEQ ID NO: 98所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;

(9) VH结构域包含如SEQ ID NO: 107所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;和其VL结构域包含如SEQ ID NO: 108所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;

(10) VH结构域包含如SEQ ID NO: 122所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;和其VL结构域包含如SEQ ID NO: 123所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;

(11) VH结构域包含如SEQ ID NO: 137所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;和其VL结构域包含如SEQ ID NO: 138所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列。

5、如权利要求2所述抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段为人源化的。

6、如权利要求5所述抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的VH和VL序列:

(1) VH结构域包含如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列;和其VL结构域包含如SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列,或与上述序列基本上相同(例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性或具有一个或多个氨基酸取代

(例如保守性取代)) 的序列;

(2) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列;

(3) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 74 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列

(4) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 142 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 143 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列;

(5) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 147 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 148 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列;

(6) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 154 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 155 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列;

(7) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 161 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 162 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列;

(8) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代)) 的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 125 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同 (例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代

(例如保守性取代))的序列;

(9) VH 结构域包含如 SEQ ID NO: 169 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同(例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列; 和其 VL 结构域包含如 SEQ ID NO: 170 所示的氨基酸序列, 或与上述序列基本上相同(例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性或具有一个或更多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列。

7、如权利要求 6 所述抗体, 其特征在于, 所述抗体包含来源于人免疫球蛋白的重链恒定区和轻链恒定区; 较优选地, 所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区; 更优选地, 所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区; 并且, 所述重链恒定区具有天然序列或与其所源自的天然序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加的序列; 和所述轻链恒定区优选如 SEQ ID NO: 95 所示的人 kappa 链的恒定区。

8、如权利要求 7 所述抗体, 其特征在于, 所述抗体包含的重链恒定区选自下组:

- (i) 如 SEQ ID NO: 96 所示的野生型人 IgG1 的重链恒定区;
- (ii) 如 SEQ ID NO: 190 所示的含有 M252Y、S254T、T256E 和 M428L 突变的人 IgG1 的重链恒定区;
- (iii) 如 SEQ ID NO: 99 所示的野生型人 IgG2 的重链恒定区;
- (iv) 如 SEQ ID NO: 100 所示的铰链区修饰的人 IgG2 的重链恒定区;
- (v) 如 SEQ ID NO: 109 所示的野生型人 IgG4 的重链恒定区;
- (vi) 如 SEQ ID NO: 110 所示的含有 S228P 突变的人 IgG4 的重链恒定区。

9、如权利要求 7 或 8 所述的抗体, 其特征在于, 所述抗体的重链具有如 SEQ ID NO: 29、59、89、139、144、149、156、163 或 171 所示的氨基酸序列; 或与上述序列中的任何相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个置换、缺失或添加)的序列; 或与上述序列中的任何相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或更高同一性的序列; 和/或, 所述抗体的轻链具有如 SEQ ID NO: 30、60、90、140、145、150、157、164 或 172 所示的氨基酸序列; 或与上述序列中的任何相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个置换、缺失或添加)的序列; 或与上述序列中的任何相比具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或更高同一性的序列。

10、如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, SARS-CoV-2 冠状病毒 S 蛋白具有:

- (a) 如 SEQ ID NO: 189 所示的氨基酸序列;
- (b) 是对 SEQ ID NO: 189 所示的氨基酸序列置换、缺失或添加一个或几个氨基酸残基而得的氨基酸序列。

11、如权利要求 10 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 置换包括 K417 和/或 L452 和/或 E484 和/或 N501。

12、如权利要求 10 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, K417 是 K417N, 和/或 L452 是 L452R, 和/或 E484 是 E484K, 和/或 N501 是 N501Y。

13、如权利要求 1-12 任一项权利要求所述抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段以 10 nM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白, 较优选地, 以 1 nM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白; 较优选地, 以 100 pM

或更低的 K_D 结合 S 蛋白；更优选地，以 10 pM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白；最优选地，以 1 pM 或更低的 K_D 结合 S 蛋白。

14、编码如权利要求 1-13 任一项所述抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子。

15、如权利要求 14 所述的 DNA 分子，其特征在于，编码所述抗体重链的 DNA 分子具有如 SEQ ID NO: 173、175、177、179、181、183、185 或 187 所示的核苷酸序列，和编码所述抗体轻链的 DNA 分子具有如 SEQ ID NO: 174、176、178、180、182、184、186 或 188 所示的核苷酸序列。

16、包含如权利要求 14 或 15 所述 DNA 分子的载体。

17、包含如权利要求 16 所述载体的宿主细胞；所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，优选为 CHO 细胞。

18、一种药物组合物，所述组合物包含如权利要求 1-13 任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及可药用赋形剂、载体或稀释剂。

19、制备如权利要求 1-13 任一项所述抗体或其抗原结合片段的方法，其包括：(a) 获得抗体或其抗原结合片段的基因，构建抗体或其抗原结合片段的表达载体；(b) 通过基因工程方法将上述表达载体转染到宿主细胞中；(c) 在允许产生所述抗体或其抗原结合片段的条件下培养上述宿主细胞；(d) 分离、纯化产生的所述抗体或其抗原结合片段；

其中，步骤(a)中所述表达载体选自质粒、细菌和病毒中的一种或多种，优选地，所述表达载体为 PX1A1M 载体；

其中，步骤(b)通过基因工程方法将所构建的载体转染入宿主细胞中，所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NS0 细胞或其它哺乳动物细胞，优选为 CHO 细胞；

其中，步骤(d)通过常规的免疫球蛋白纯化方法，包含蛋白质 A 亲和层析和离子交换、疏水层析或分子筛方法分离、纯化所述抗体或其抗原结合片段。

20、如权利要求 1-13 任一项所述抗体或其抗原结合片段在制备治疗和预防由 SARS-CoV-2 冠状病毒引起的疾病的药物中的用途；优选地，所述疾病为新型冠状病毒肺炎 (COVID-19)；例如，所述疾病为由 B.1.351 突变株和/或 B.1.1.7 病毒株引起的新型冠状病毒肺炎 (COVID-19)。

21、一种检测样品中 SARS-CoV-2 病毒或者其相应抗原存在情况的方法，包括如下步骤：

(1) 将待测生物样品与权利要求 1-13 任一项中所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段在合适的条件下孵育；

(2) 检测上述步骤中结合复合物的存在；

其中，所述生物样品选自血浆、全血、嗽口液、咽拭子、尿液、粪便和支气管灌流液。

其中，所述抗原结合片段选自 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab 和 Fv。

22、如权利要求 1-13 任一项所述的单克隆抗体在制备 SARS-CoV-2 病毒检测试剂盒中的用途。

23、一种检测试剂盒，其包含如权利要求 1-13 任一项所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段。

24、如权利要求 23 所述的检测试剂盒，所述试剂盒包括：

(1) 选自以下任一：

a. 固相载体和第一抗体；

b. 包被有第一抗体的固相载体；

所述第一抗体为选自权利要求 1-13 任一项的任意一个单克隆抗体或其抗原结合片段；

(2) 第二抗体；

所述第二抗体任选地进行了适当标记，并且第二抗体选自权利要求 1-13 任一项所述能够与(1)中所述第一抗体配合使用的单克隆抗体或其抗原结合片段。

25、如权利要求 24 所述的检测试剂盒，所述固相载体选自硝酸纤维素膜、胶乳颗粒、磁性颗粒、胶体金、珠子或诸如玻璃、纤维玻璃或聚合物（如聚苯乙烯或聚氯乙烯）或纤维光学传感器。

26、如权利要求 24 所述的检测试剂盒，所述标记物可以是放射性同位素、酶、酶底物、磷光物质、荧光物质、生物素和着色物质；优选地，所述酶包括如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶和葡萄糖氧化酶；所述荧光物质包括如荧光素衍生物和罗丹明衍生物以及稀土元素或稀土元素复合物，如铈或铈复合物；所述磷光物质包括如 γ 吡啶酯和异鲁米诺；所述放射性同位素包括如 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 和 ^{32}P ；所述着色物质包括如乳胶颗粒和胶体金。

27、如权利要求 23-26 任一项所述检测试剂盒在诊断 SARS-CoV-2 病毒感染所致疾病中的用途；优选地，所述疾病为新型冠状病毒肺炎（COVID-19）；例如，所述疾病为由 B.1.351 突变株和/或 B.1.1.7 病毒株引起的新型冠状病毒肺炎（COVID-19）。

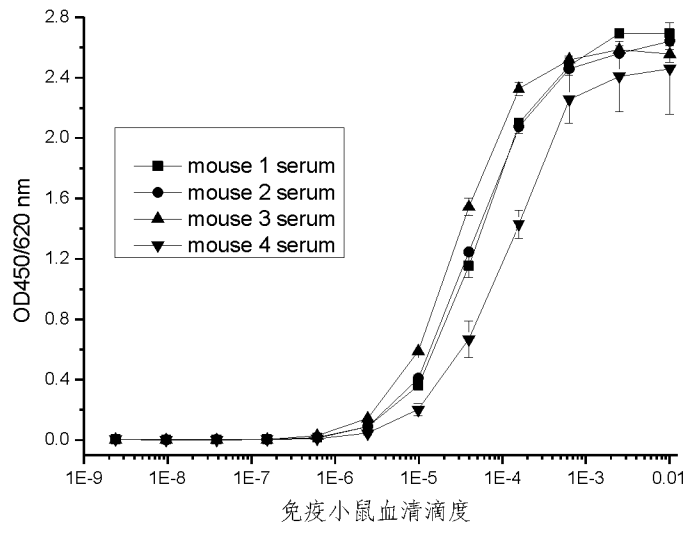


图 1

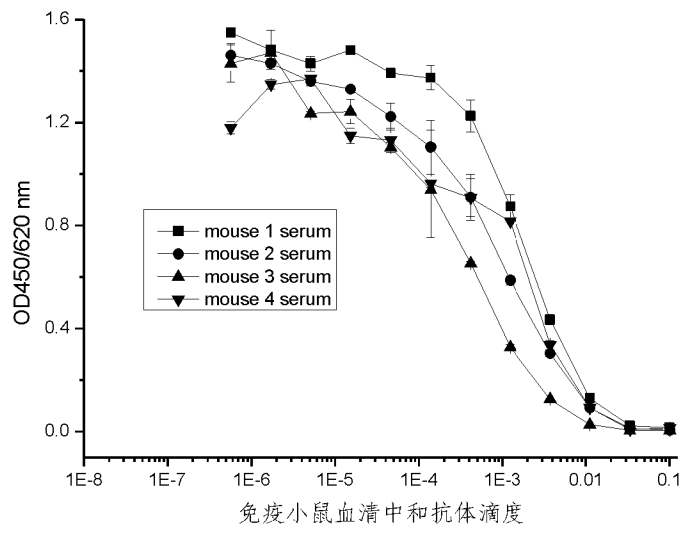


图 2

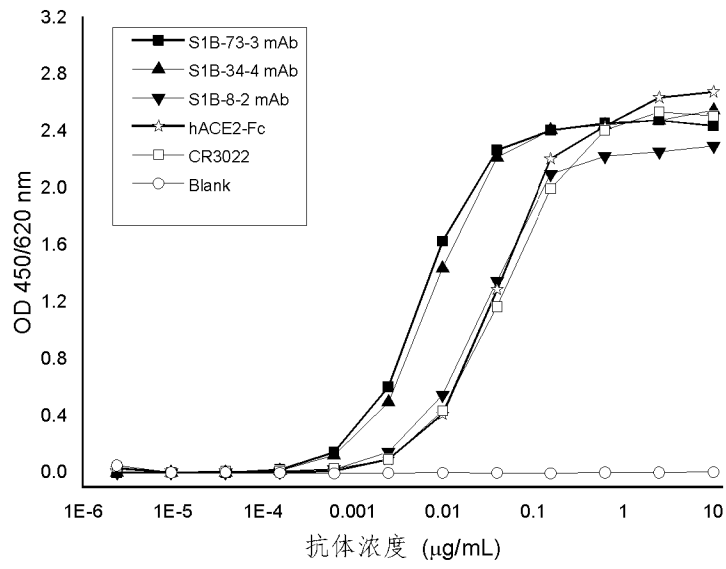


图 3-1

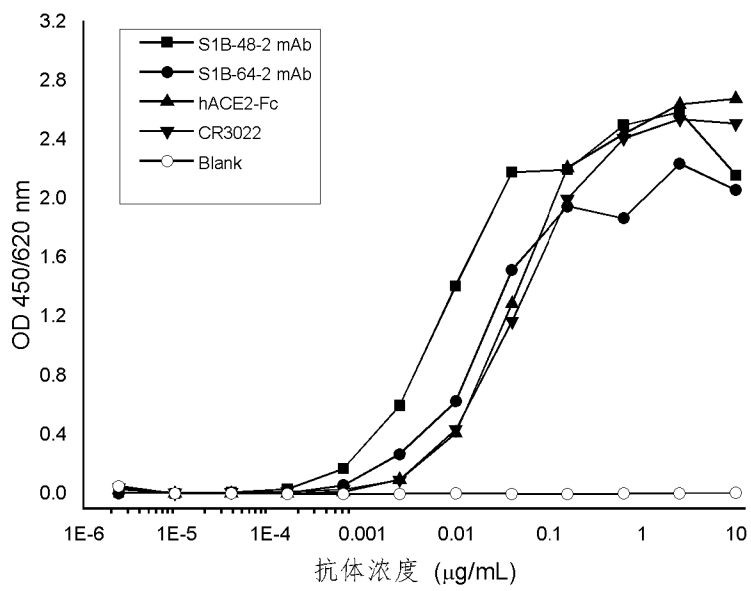


图 3-2

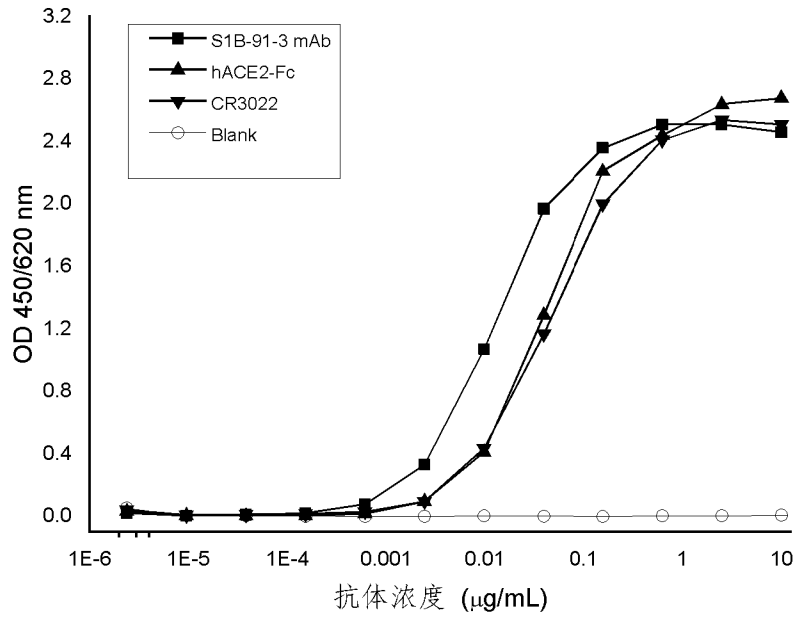


图 3-3

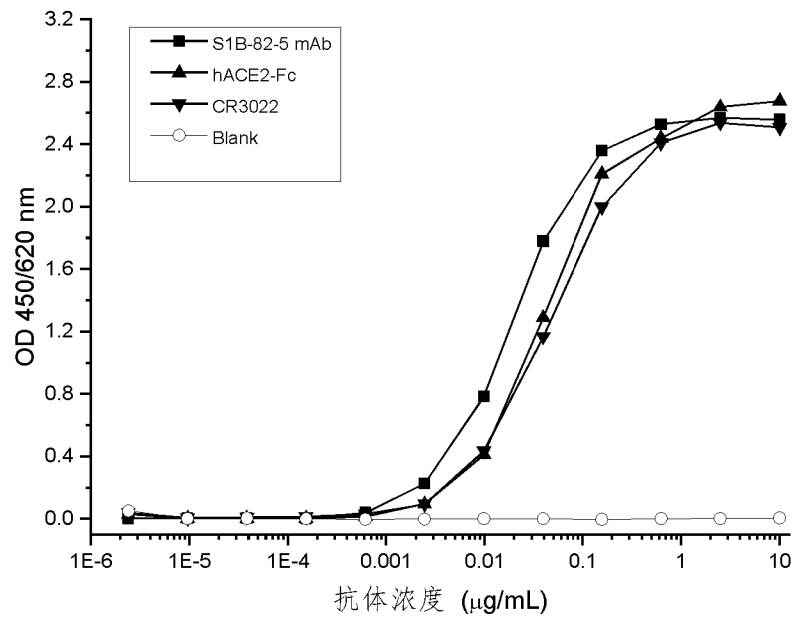


图 3-4

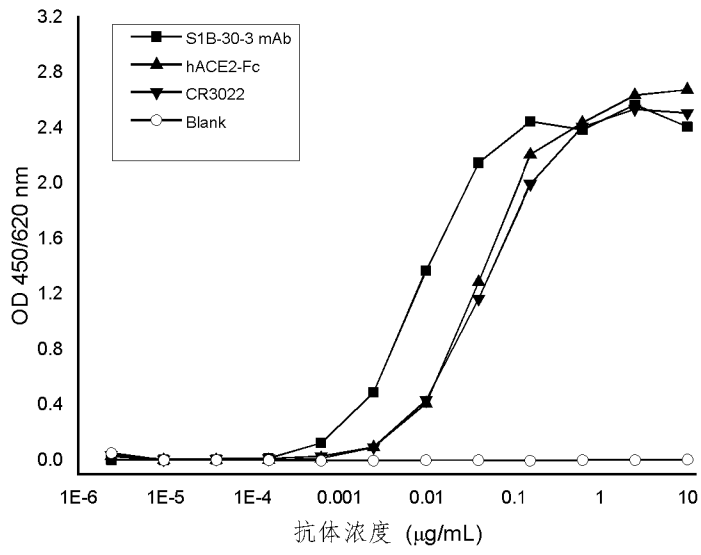


图 3-5

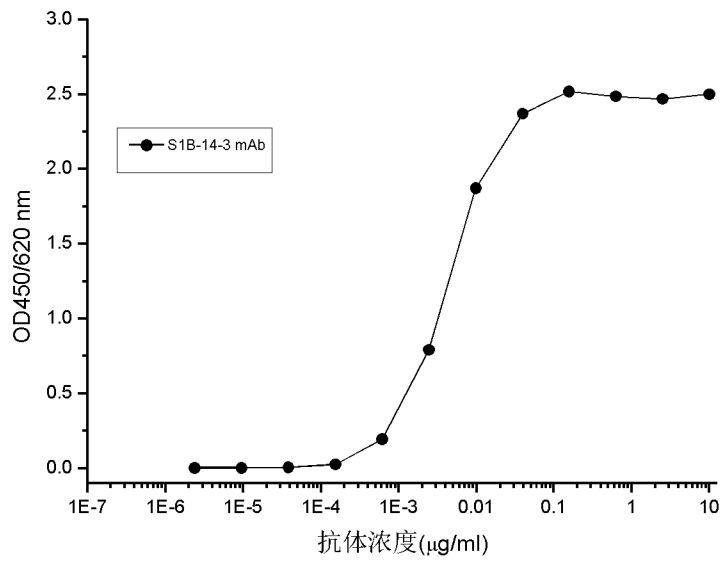


图 3-6

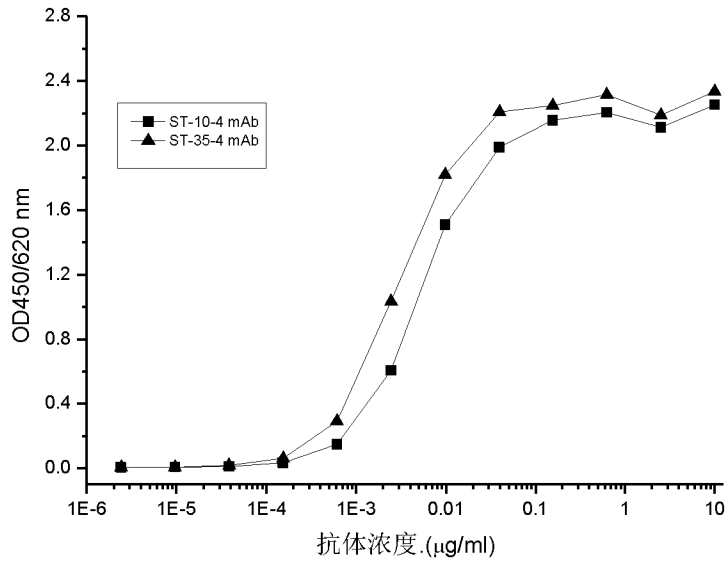


图 3-7

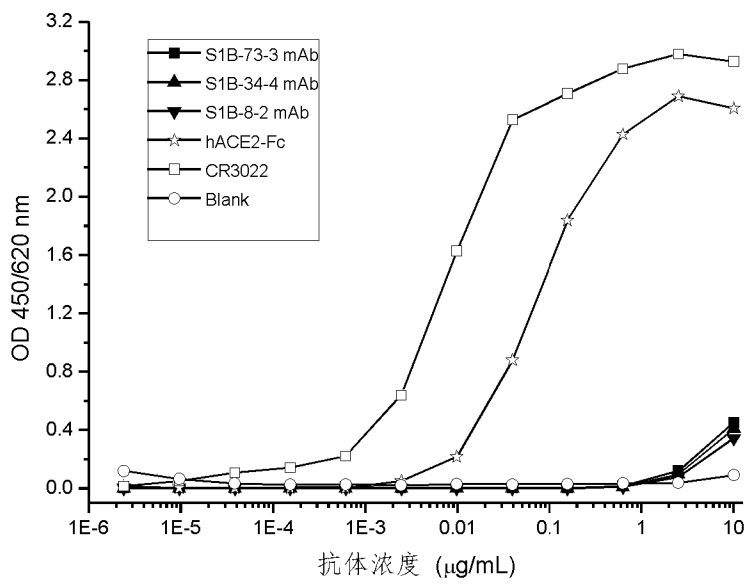


图 4-1

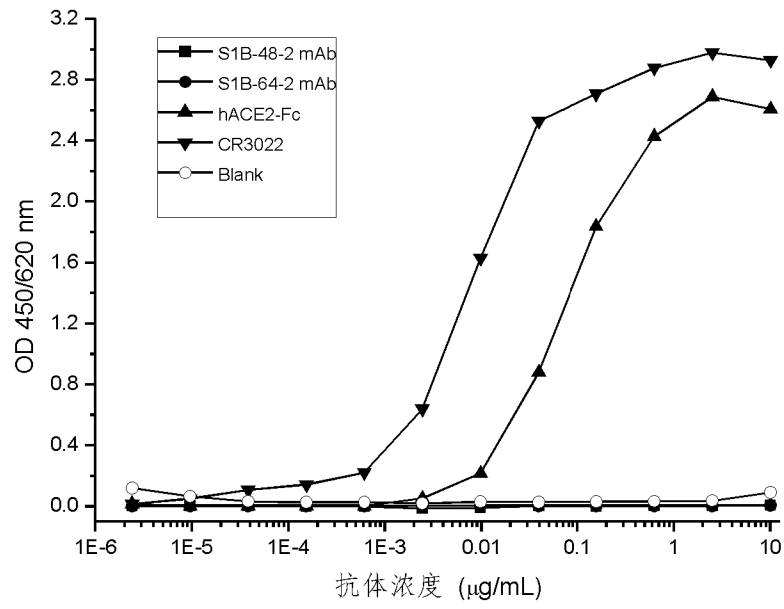


图 4-2

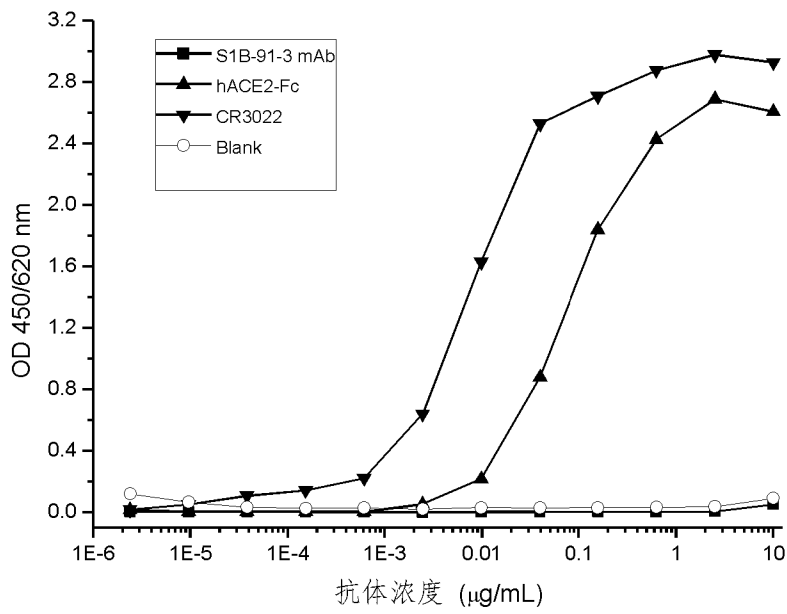


图 4-3

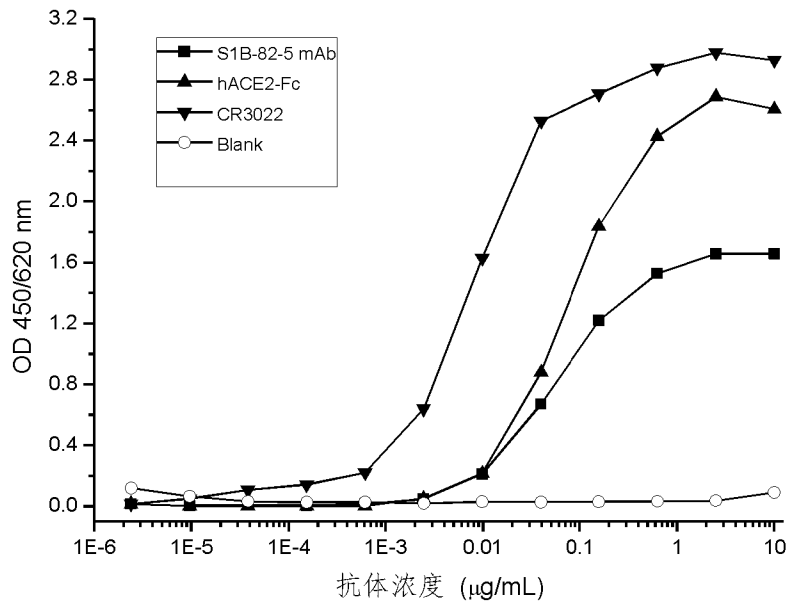


图 4-4

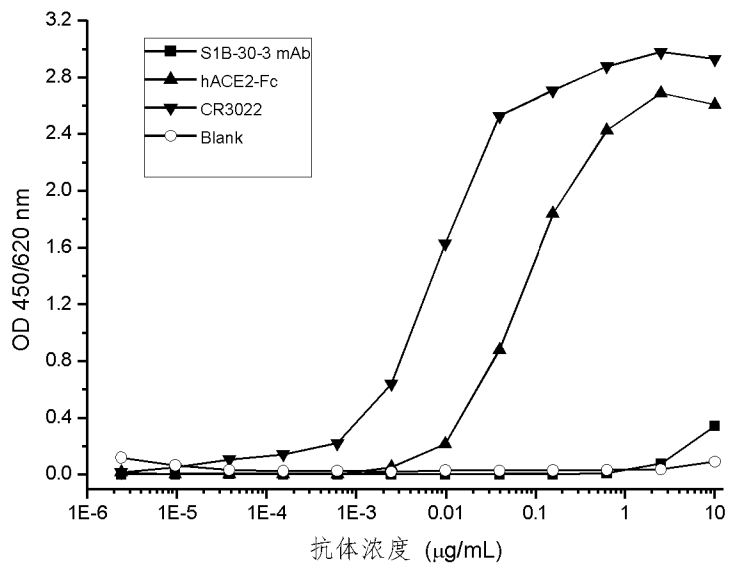


图 4-5

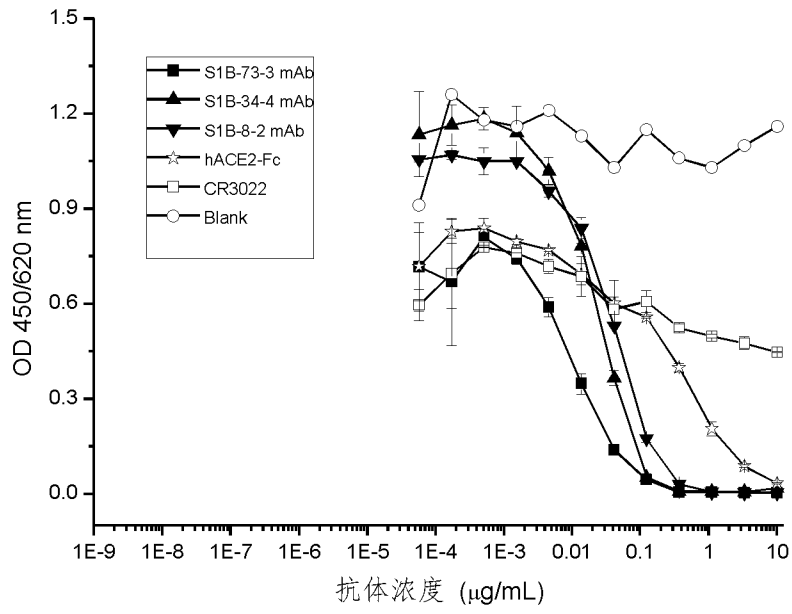


图 5-1

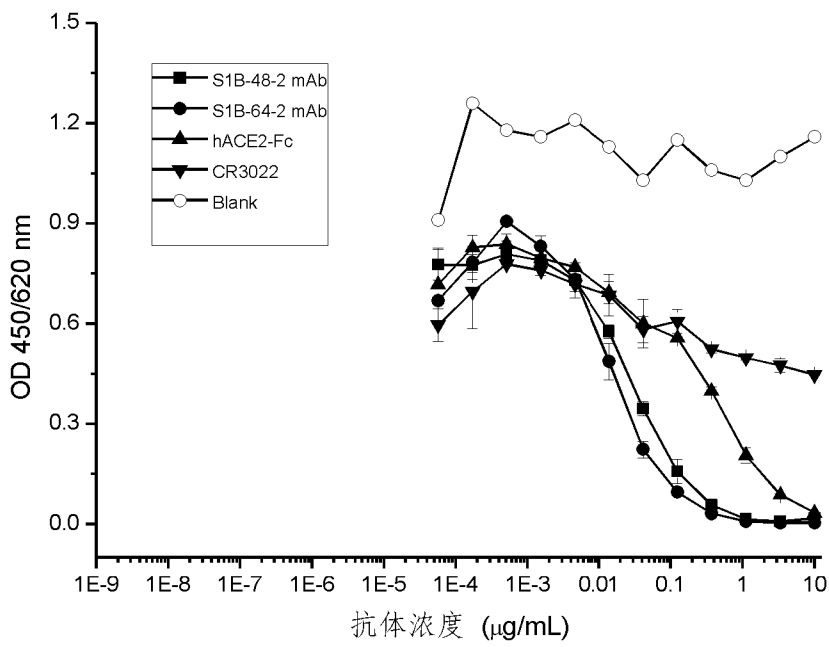


图 5-2

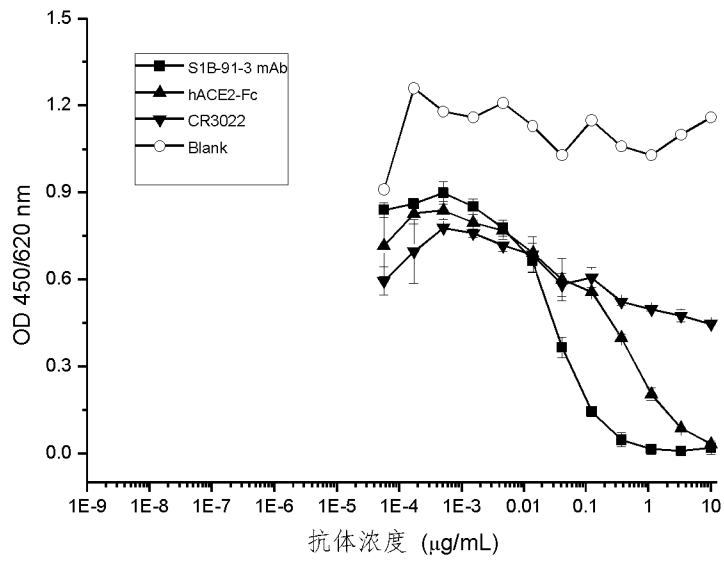


图 5-3

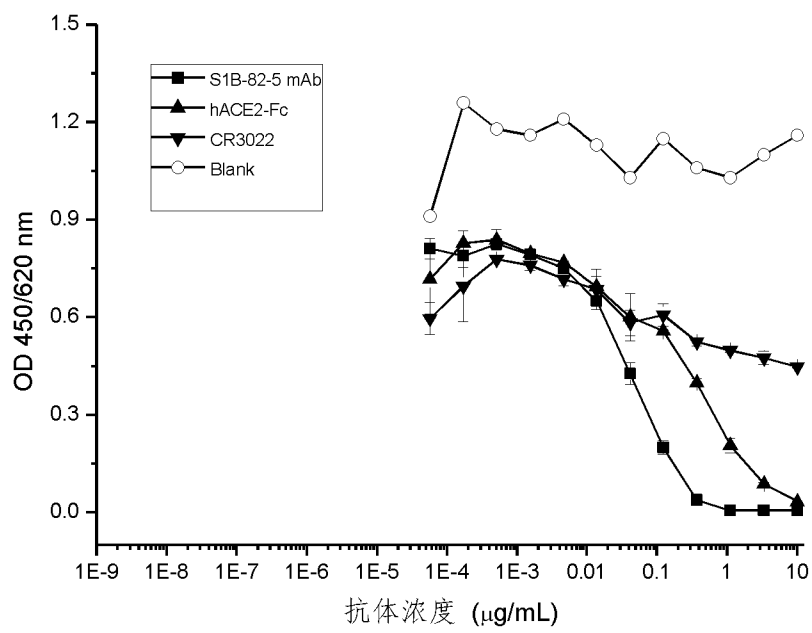


图 5-4

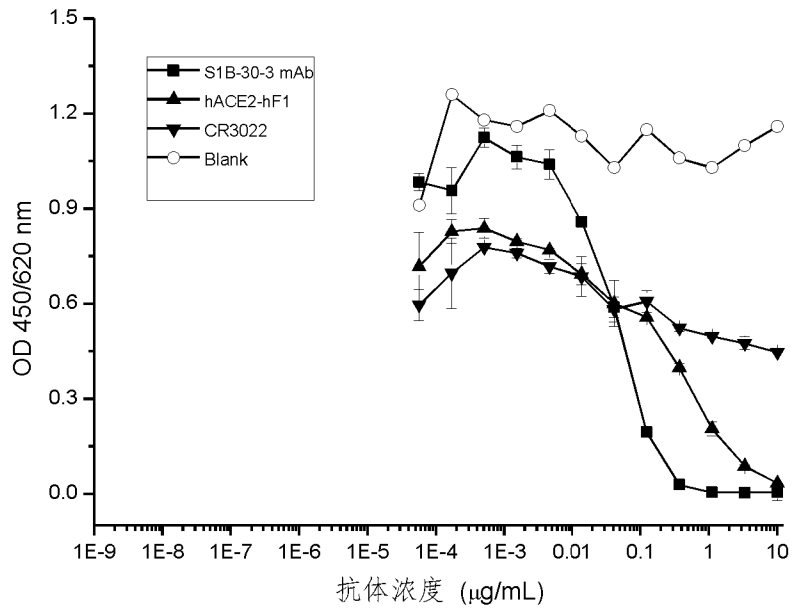


图 5-5

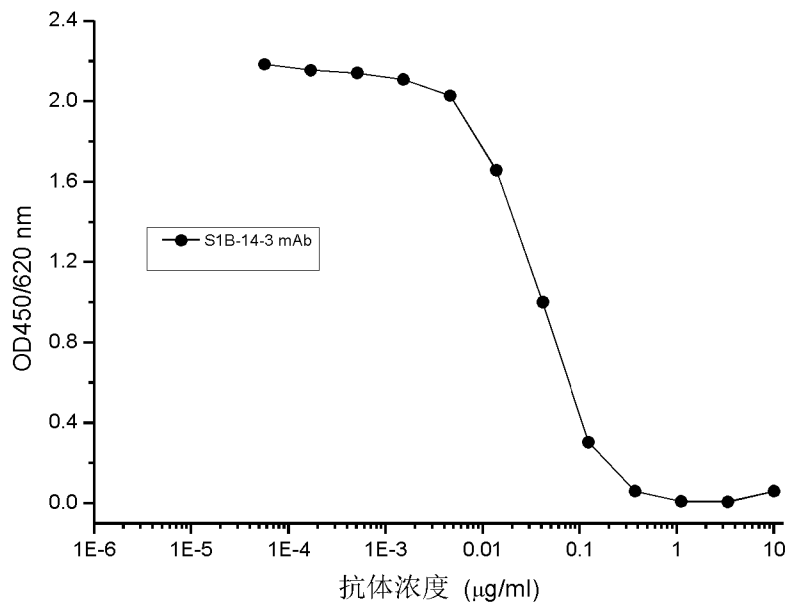


图 5-6

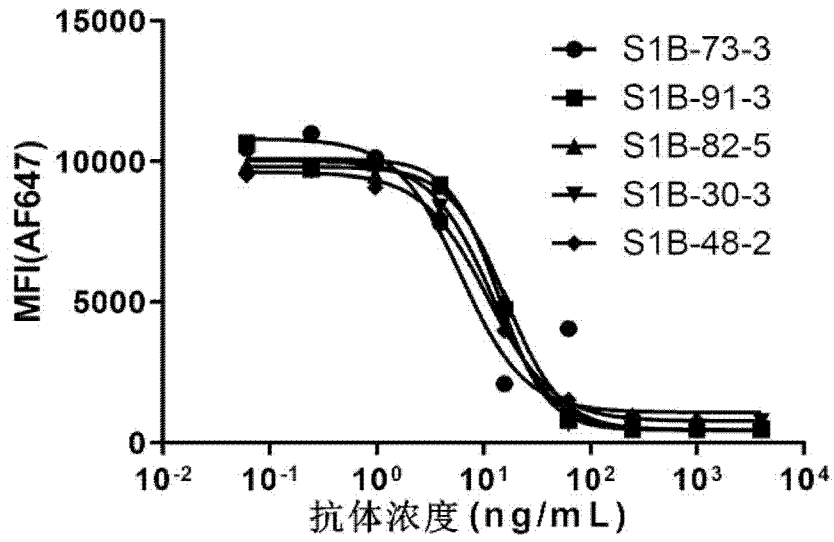


图 6-1

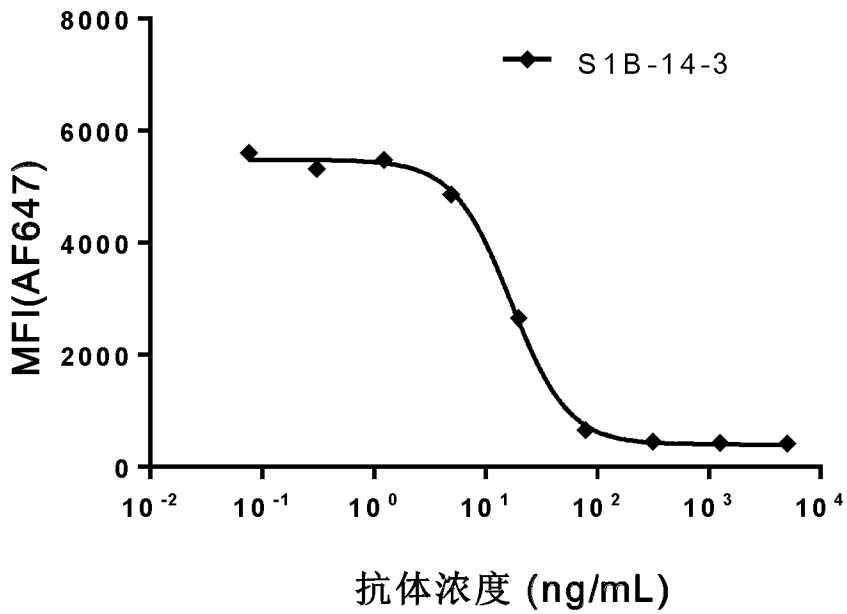


图 6-2

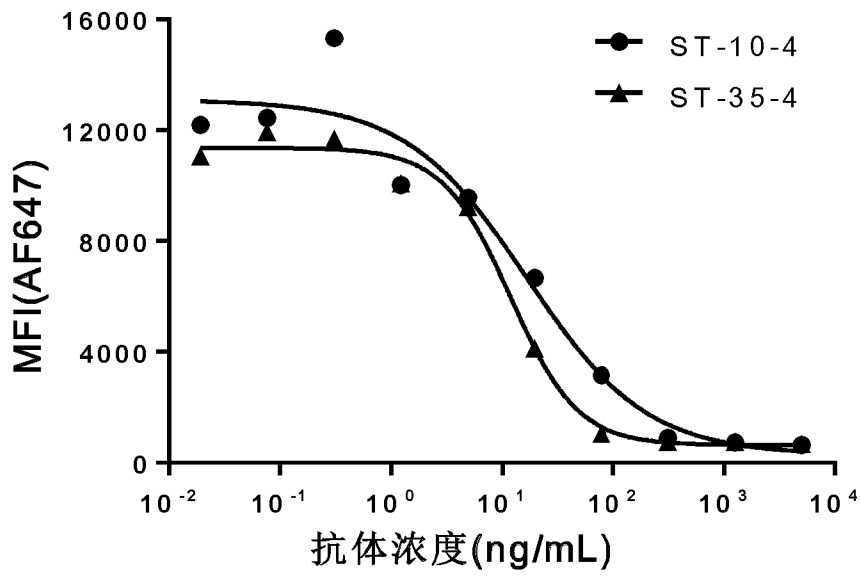


图 6-3



图 7

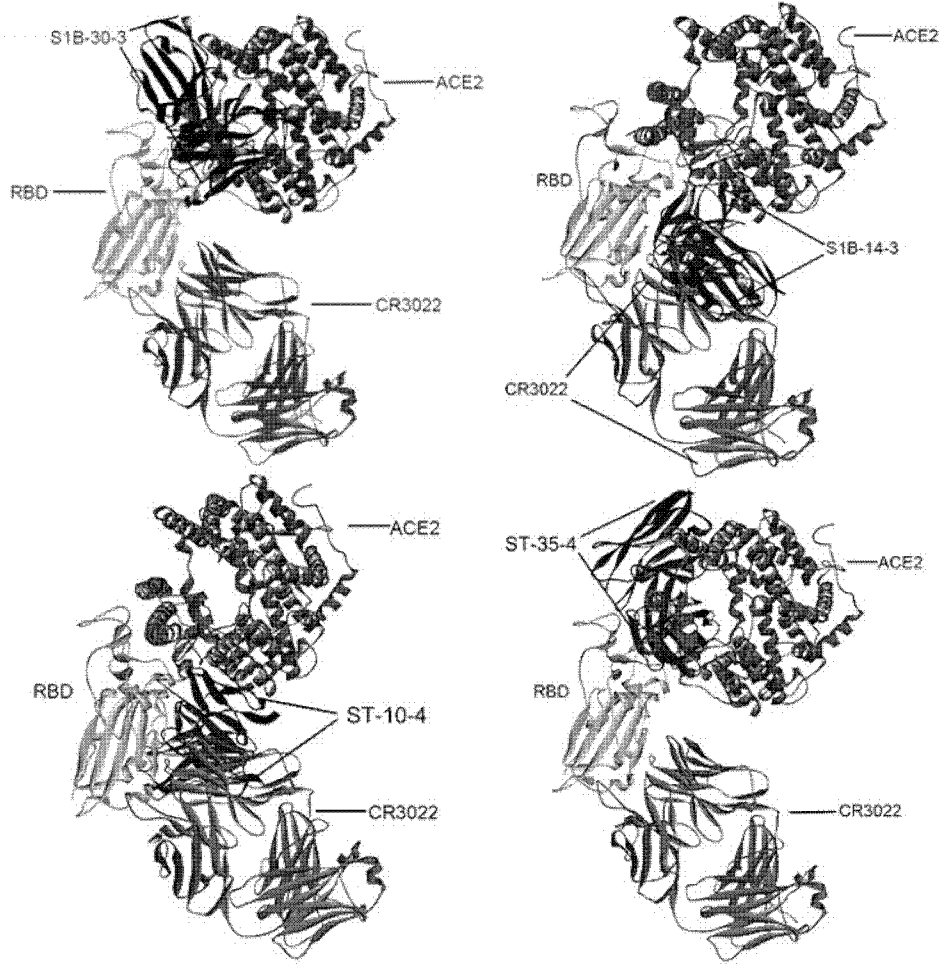


图 8

S1B-73-3	- QVQLQQSGAELARPGT	SVKVSCKVSGYAFTNFLIEWV	KER	- 40
hS1B-73-3	- EVQLVQSGAEVKKPGS	SVKVSCKASGYAFTNFLIEWV	REA	- 40
	3			
S1B-73-3	- PGQGLEWIGMINPGSGDTNYNEKFKGKATLTADKSS	STVY	- 80	
hS1B-73-3	- PGQGLEWIGMINPGSGDTNYNEKFKGKATLTADKST	STVY	- 80	
	3			
S1B-73-3	- MQLSSLTSDDSAVYFCARQLGLPGFVYWGRGTL	TVTVSS	- 11	
			8	
hS1B-73-3	- MELSSLRSED	TAVYFCARQLGLPGFVYWGRGTT	TVTVSS - 11	
	3		8	

图 9-1

S1B-73-3 - DIKMTQSPSSMYVSLGERVTISCKASQDINSYLTWLQQKP- 40
 hS1B-73-3 - DIQMTQSPSSLASVGDRTITCKASQDINSYLTWLQQKP- 40

S1B-73-3 - GKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDFSLTIRSLLEY- 80
 hS1B-73-3 - GKSPKTLIYRANRLVEGVPSRFSGSGSGQDFTLKISSLQP- 80

S1B-73-3 - EDMGVYYCLQHDEFPLTFGAGTKLELR - 10
 hS1B-73-3 - EDIATYYCLQHDEFPLTFGQGTKLEIK - 10

图 9-2

S1B-48-2 - EVQLQ^QSGPELEKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHVVKQK- 40
 hS1B-48-2 - EVQLV^QSGAEVKKPGASVKV^SCKASGYTFTNYVMHVV^RQA- 40

S1B-48-2 - PGQGLEWIGYFNPYNDDAEYNEKFKGKATLTSDKSSSTAY- 80
 hS1B-48-2 - PGKGLEWIGYFNPYNDDAEYNEKFKGKATLTSDKSTSTAY- 80

S1B-48-2 - MVLSSLTSEDSAVYYCACLRQETDYWGQGTTLTVSS - 116
 hS1B-48-2 - MKLSSLRSEDTAVYYCASLRQETDYWGQGTTLTVSS - 116

图 10-1

S1B-48-2 - DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDNYGFSLMNWF- 40
 hS1B-48-2 - DIVLTQSPSSLAVSLGERATINCRASEVDNYGFSLMNWF- 40

S1B-48-2 - QQKPGQPPKLLIYEASNQSGVPARFSGSGGTDFSLNIH- 80
 hS1B-48-2 - QQKPGKPPKLLIYEASNQSGVPARFSGSGGTDFTLKISS- 80

S1B-48-2 - PMEEDDTAMYFCHQSKEVPWTFGGGTKLEIK - 111
 hS1B-48-2 - RLQAEDVAVYFCHQSKEVPWTFGGGTKLEIK - 111

图 10-2

S1B-91-3 - QVQLQ^QSGPQLVRRPGASVKISCKASGYSFTDYWLHVVKQR- 40
 hS1B-91-3 - EVQLV^QSGAEVKKPGSSVKV^SCKASGYSFTDYWLHVV^RQA- 40

S1B-91-3 - PGQGLEWIGMLDPSDGETRLNQKFKDKATLTVDKSSTTAY- 80
 hS1B-91-3 - PGQGLEWIGMLDPSDGETRLNQKFKDKATLTVDKSTTTAY- 80

S1B-91-3 - MQLSSPTSEDSAVYYCARRHFGYDFDYWGQGTTLTVSS - 118
 hS1B-91-3 - MQLSSLRSEDTAVYYCARRHFGYDFDYWGQGTTLTVSS - 118

图 11-1

S1B-91-3 - DIVMTQAA~~PS~~VPVTPGESV~~S~~ISCRSSKSL~~L~~HSNGNTYLYW - 40
 hs1B-91-3 - DIVMTQ~~S~~PS~~S~~LPVTPGQ~~P~~ASISCRSSKSL~~L~~HSNGNTYLYW - 40

S1B-91-3 - FLQ~~R~~PGQ~~S~~SPQLLIYRMSN~~L~~ASGV~~P~~DRFSGSGSGT~~A~~FTL~~R~~I - 80
 hs1B-91-3 - FLQ~~K~~PGK~~S~~SPQLLIYRMSN~~L~~ASGV~~P~~DRFSGSGSGT~~D~~FTL~~K~~I - 80

S1B-91-3 - SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGGGTK~~L~~EVK - 112
 hs1B-91-3 - SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGGGTK~~V~~EIK - 112

图 11-2

S1B-82-5 - EVILV~~E~~SGGGLV~~K~~PGGSL~~K~~LSCAASGFTFSSYAMSWIRQT - 40
 hs1B-82-5 - EVILS~~E~~SGGGS~~V~~KPGGSL~~R~~LSCAASGFTFSSYAMSWIRQA - 40

S1B-82-5 - PEK~~R~~LEWGA~~T~~INSGGNFIYYPDSVKGRFTISRDN~~A~~KN~~T~~LY - 80
 hs1B-82-5 - PGK~~R~~LEWGS~~T~~INSGGNFIYYPDSVKGRFTISRDN~~A~~KN~~S~~LY - 80

S1B-82-5 - LQMS~~S~~LR~~S~~EDTAMYFCGRHSGNYVDSAMDYWGQGT~~S~~VTVS - 120
 hs1B-82-5 - LQMNSL~~R~~AEDTAVYFCGRHSGNYVDSAMDYWGQGT~~T~~VTVS - 120

S1B-82-5 - S - 121
 hs1B-82-5 - S - 121

图 12-1

S1B-82-5 - QIVLTQSPAIMS~~A~~S~~L~~GEEITLTCSASSVSDMH~~W~~YQQKSG - 40
 hs1B-82-5 - EIVLTQSPATLS~~V~~S~~P~~GERATLSCSASSVSDMH~~W~~YQQKPG - 40

S1B-82-5 - SPKLLIYSTSNLASGVPSR~~F~~SGSGSGT~~F~~YSL~~T~~VSS~~V~~EAE - 80
 hs1B-82-5 - KSPKLLIYSTSNLASGVPSR~~F~~SGSGSGT~~E~~Y~~T~~L~~T~~ISS~~I~~QPE - 80

S1B-82-5 - DAADYYCHQWSTWTFGGGTK~~L~~EIK - 104
 hs1B-82-5 - DVATYYCHQWSTWTFGGGTK~~V~~EIK - 104

图 12-2

S1B-30-3 - EVK~~V~~EESGGGLVQPGGSM~~K~~LSCAASGFTFSDAWMDWVRQS - 40
 hs1B-30-3 - EVQ~~L~~LVESGGGLVQPGGSL~~R~~LSCAASGFTFSDAWMDWVRQA - 40

S1B-30-3 - PEKGLDWVAQIRNKANSHATNYADSVKGR~~F~~FISRDDS~~K~~SS - 80
 hs1B-30-3 - PGKGLDWVAQIRNKANSHATNYADSVKGR~~F~~TISRDDS~~K~~NS - 80

S1B-30-3 - VYLQMN~~S~~LRAEDT~~G~~IYYCIRGLTGYVLDYWGQGT~~S~~VTVSS - 120
 hs1B-30-3 - VYLQMN~~S~~LKTEDTAVYYCIRGLTGYVLDYWGQGT~~T~~VTVSS - 120

图 13-1

S1B-30-3 - **DI**V**MTQS**Q**KFMSAS**V**GDRV**N**IT**SKASQNVRTAVAWYQQKP - 40
 hs1B-30-3 - **DI**Q**MTQS**P**SSL**S**ASVGDRV**T**IT**CKASQNVRTAVAWYQQKP - 40

S1B-30-3 - **GQSPKALIFLASNRHTGVPDRFT****GSGSGTDFTLTIS**N**VQS** - 80
 hs1B-30-3 - **GQSPKALIFLASNRHTGVPDRFS****GSGSGTDFTLTIS**S**LQP** - 80

S1B-30-3 - **EDL**A**DYFCLQHWNYPLTFGGG**T**KL**EIK - 107
 hs1B-30-3 - **ED**F**ATYFCLQHWNYPLTFGGG**T**KV**EIK - 107

图 13-2

S1B-14-3 VH - **QVQL**Q**QSGPE**L**V**K**PGASV**R**LSCKASGHTFTGY**Y**VH**W**LK**Q**R** - 40
 hs1B-14-3-1 VH - **EVQL**V**QSGAE**V**K**K**PGASV**K**LSCKASGHTFTGY**Y**VH**W**L**R**Q**A - 40
 hs1B-14-3-2 VH - **EVQL**V**QSGAE**V**K**K**PGASV**K**LSCKASGHTFTGY**Y**VH**W**L**R**Q**A - 40

S1B-14-3 VH - **PGQGLEWIGWIYPGNVKT**Q**YNEKF**K**GKATLTADRS**S**S**STAY - 80
 hs1B-14-3-1 VH - **PGQGLEWIGWIYPGNVKT**Q**YNEKF**K**GKATLTADRS**T**S**STAY - 80
 hs1B-14-3-2 VH - **PGQGLEWIGWIYPGNVKT**Q**YNEKF**K**GKATLTADRS**T**S**STAY - 80

S1B-14-3 VH - **MQLS**R**LT**S**EDS**A**VYFCAREDHG**N**Y**C**DYWGQGTTL**T**V**SS - 118
 hs1B-14-3-1 VH - **MQLS**S**LR**S**EDT**A**VYFCAREDHG**N**Y**A**DYWGQGT**T**V**SS - 118
 hs1B-14-3-2 VH - **MQLS**S**LR**S**EDT**A**VYFCAREDHG**Q**Y**S**DYWGQGT**T**V**SS - 118

图 14-1

S1B-14-3 VL - **QIVLS**Q**SPAI**L**S**A**SPG**E**KV**T**MS**C**RAN**S**S**V**PYMH**W**Y**Q**Q**K**PG** - 40
 hs1B-14-3-1 VL - **EIVLT**Q**SPAT**L**S**L**SPGER**A**TLS**C**R**A**Q**S**S**V**PYMH**W**Y**Q**Q**K**PG** - 40
 hs1B-14-3-2 VL - **EIVLT**Q**SPAT**L**S**L**SPGER**A**TLS**C**R**A**Q**S**S**V**PYMH**W**Y**Q**Q**K**PG** - 40

S1B-14-3 VL - **S**S**PK**P**WIYATS**N**L**P**S**G**V**P**ARF**S**G**S**G**S**G**T**S**Y**S**L**I**I**S**R**V**E**A**E - 80
 hs1B-14-3-1 VL - **Q**S**PK**P**WIYATS**N**L**P**S**G**V**P**ARF**S**G**S**G**S**G**T**D**Y**T**L**K**I**S**R**L**E**P**E - 80
 hs1B-14-3-2 VL - **Q**S**PK**P**WIYATS**N**L**P**S**G**V**P**ARF**S**G**S**G**S**G**T**D**Y**T**L**K**I**S**R**L**E**P**E - 80

S1B-14-3 VL - **DAAT**Y**YCQ**Q**WSS**D**PPA**F**GAGTKLE**L**K** - 106
 hs1B-14-3-1 VL - **DFAV**Y**YCQ**Q**WSS**D**PPA**F**GAGTKLE**L**K** - 106
 hs1B-14-3-2 VL - **DFAV**Y**YCQ**Q**WSS**D**PPA**F**GAGTKLE**L**K** - 106

图 14-2

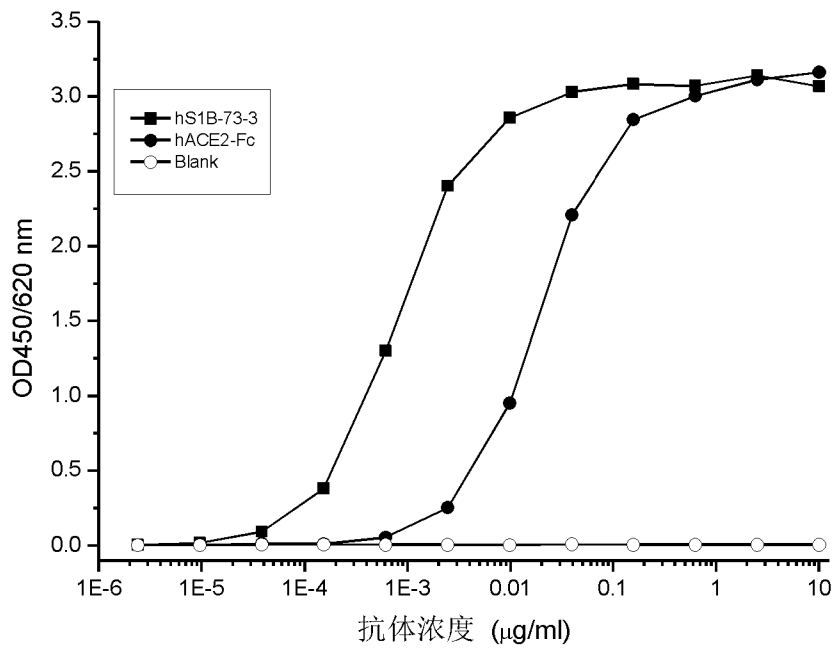


图 15-1

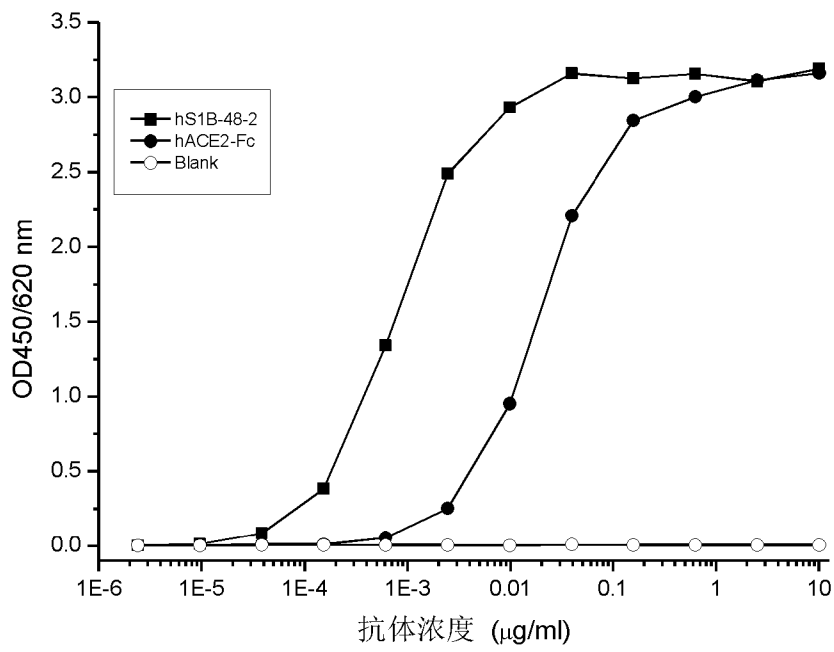


图 15-2

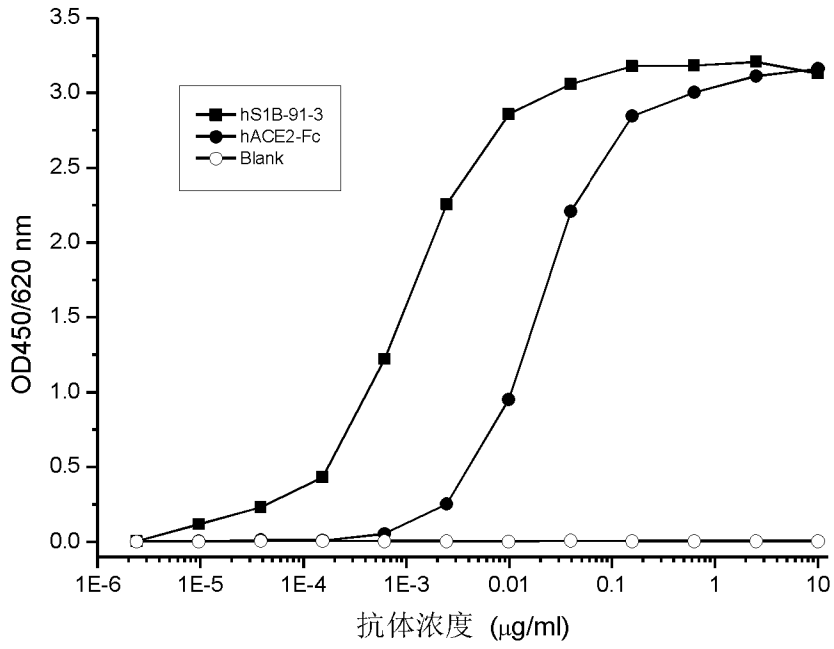


图 15-3

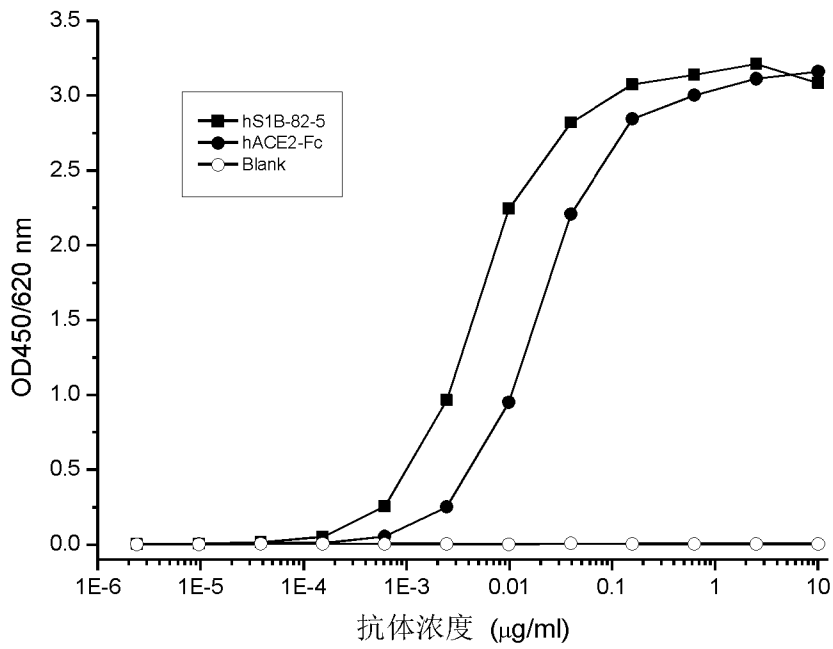


图 15-4

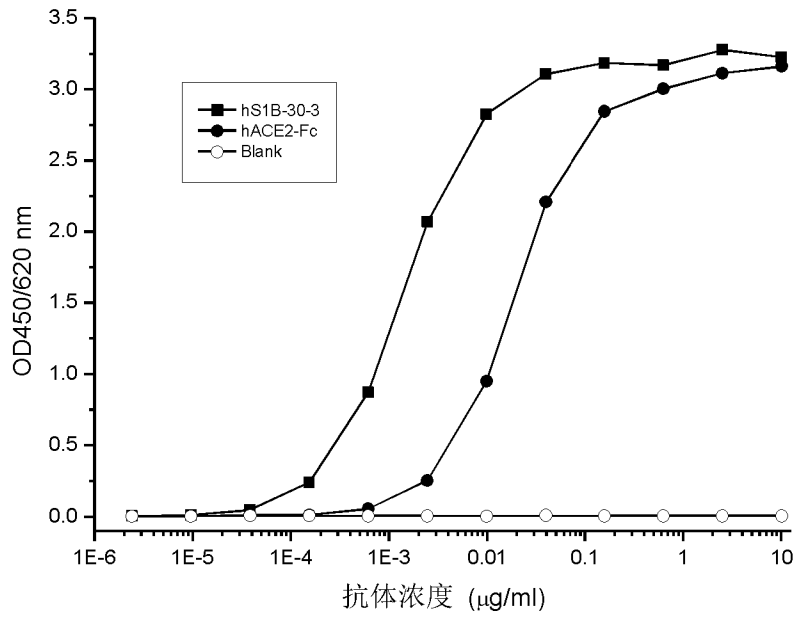


图 15-5

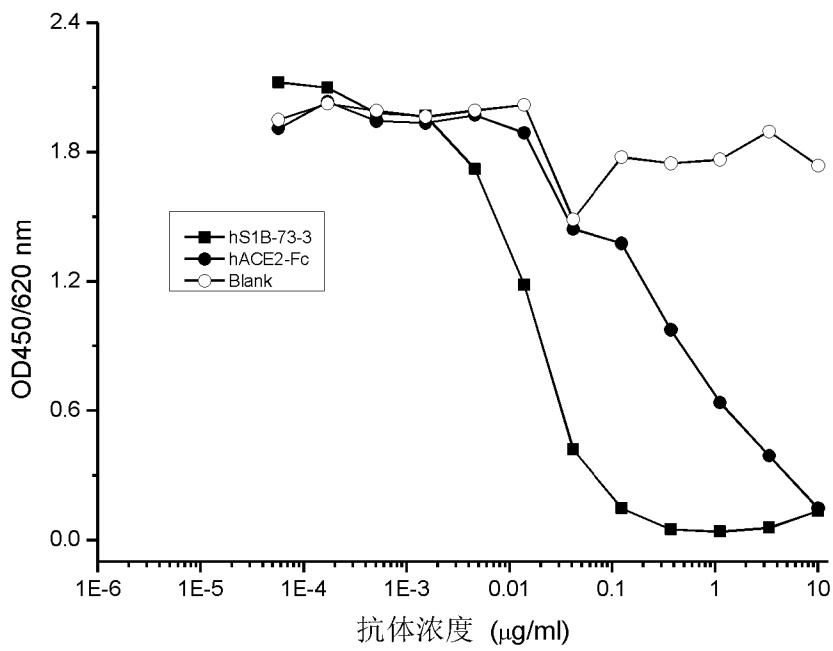


图 16-1

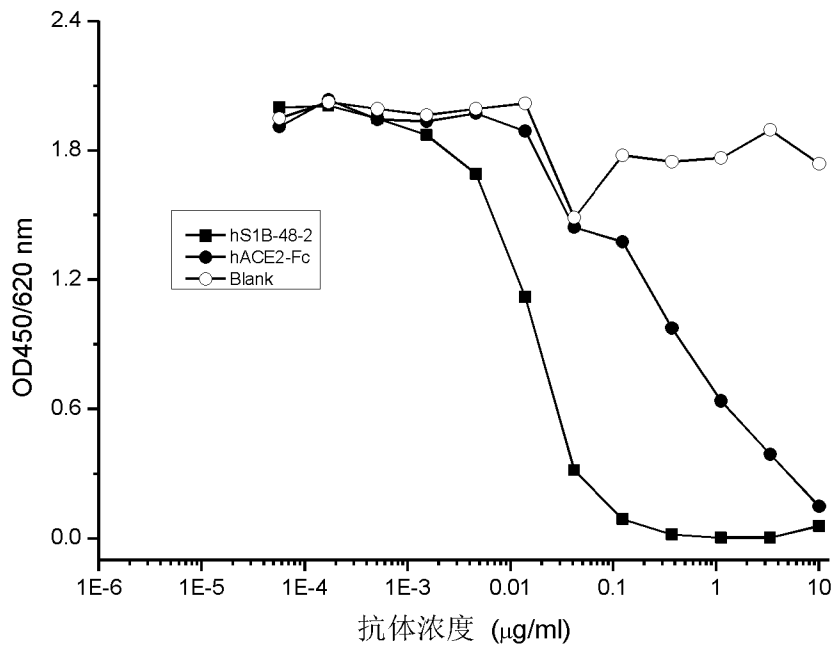


图 16-2

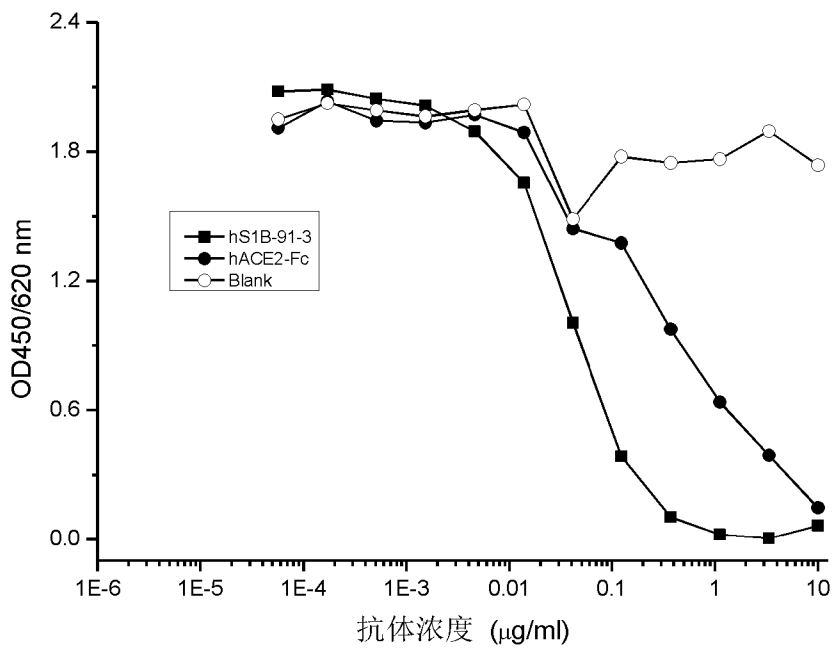


图 16-3

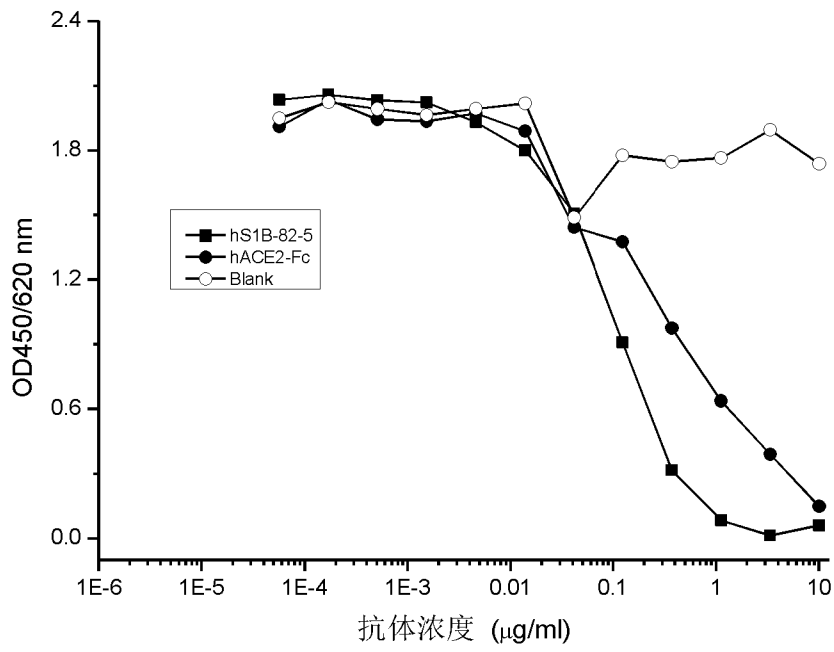


图 16-4

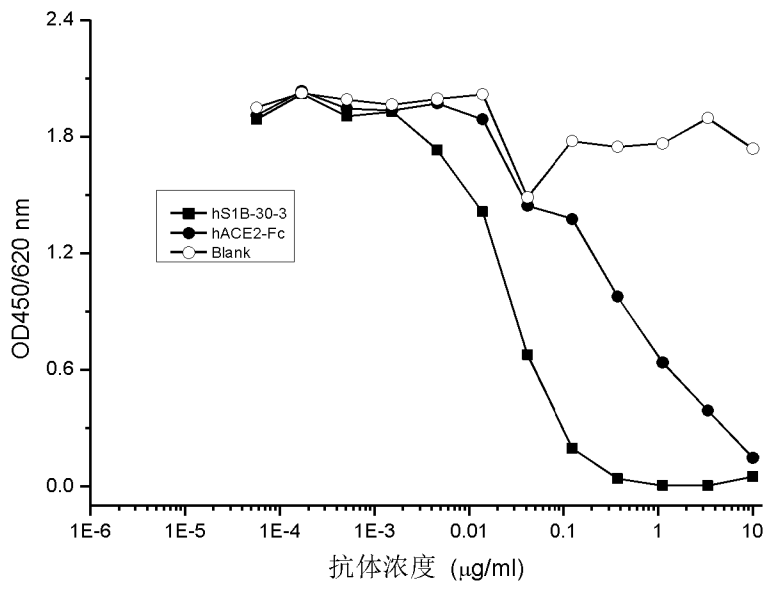


图 16-5

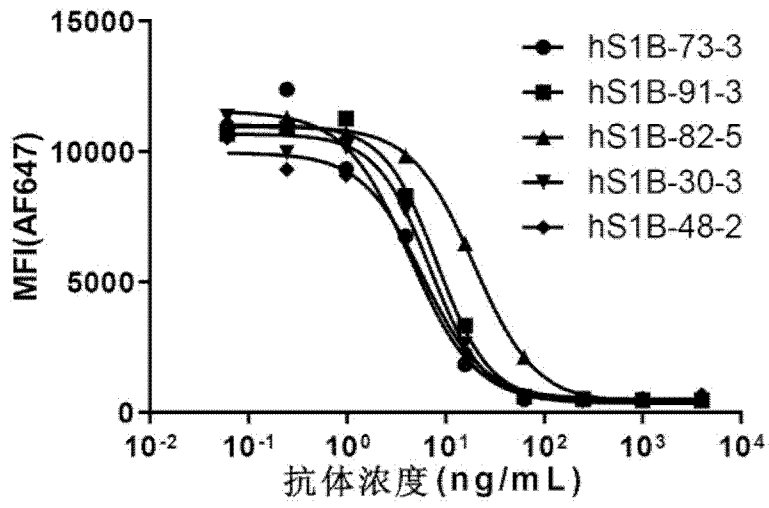


图 17-1

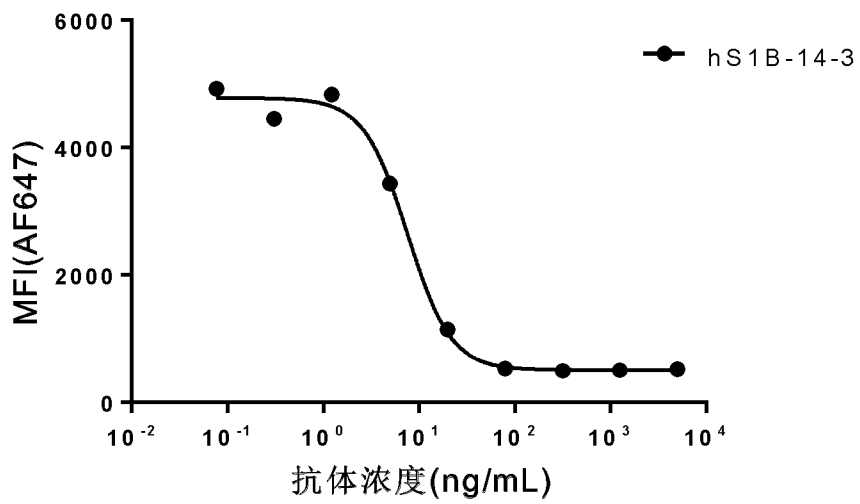


图 17-2

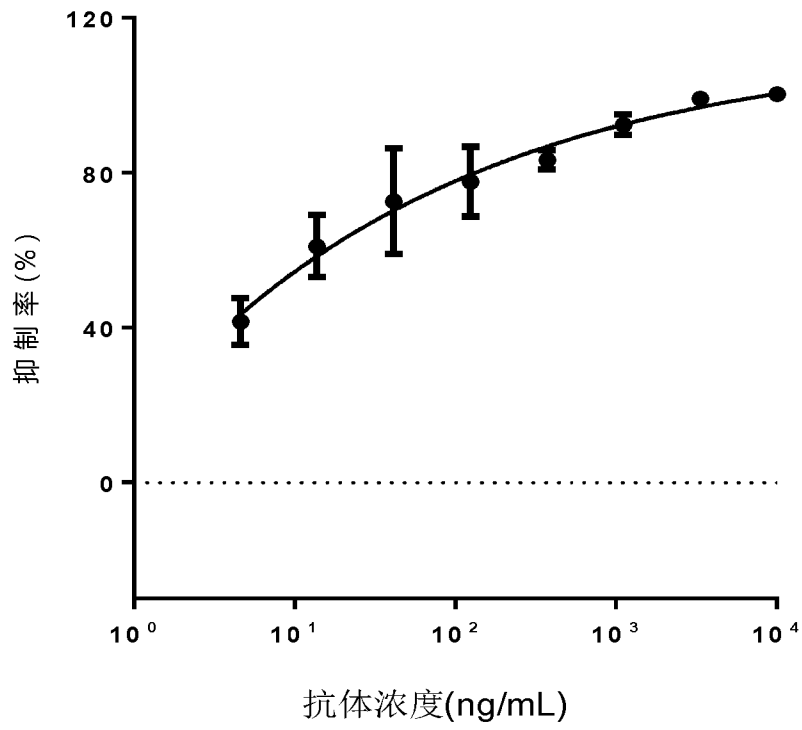


图 18-1

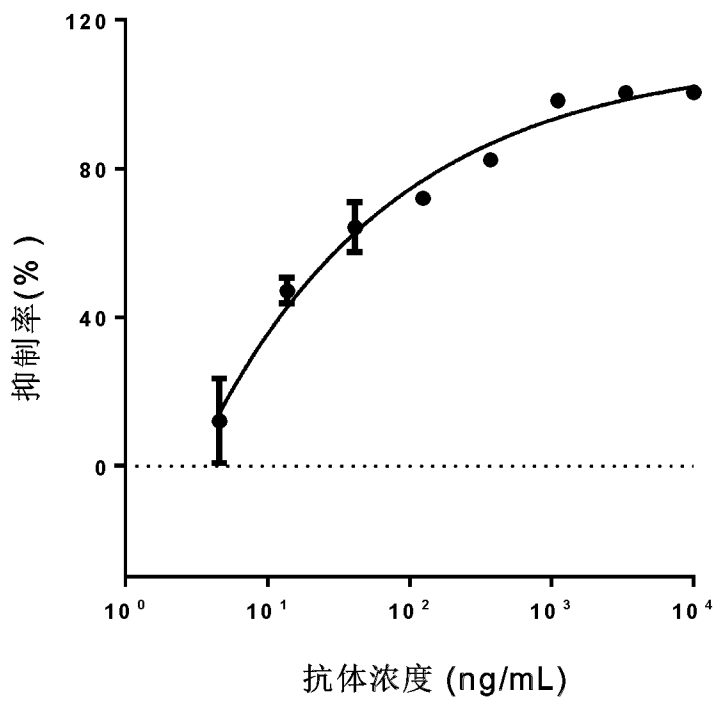


图 18-2

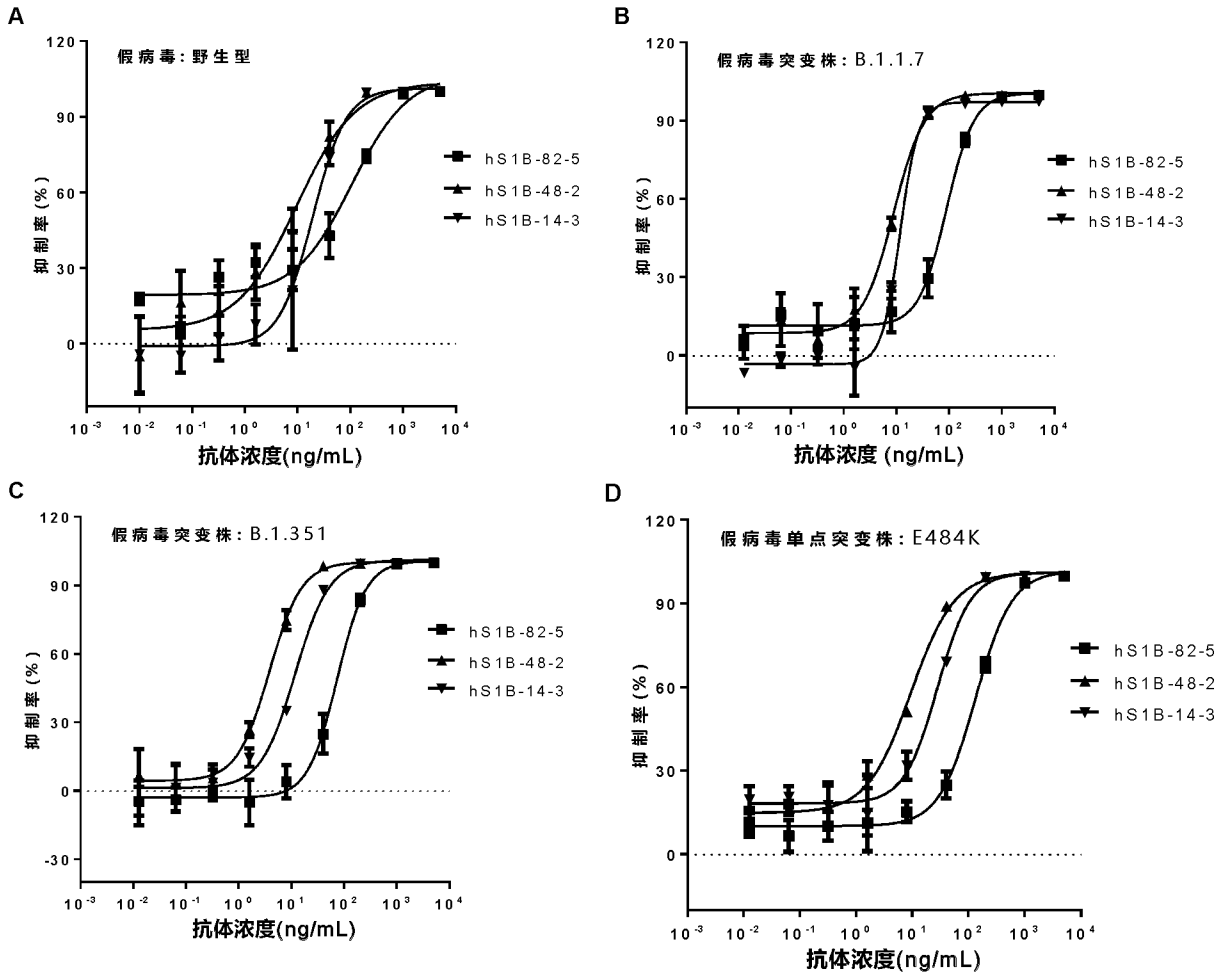


图 18-3

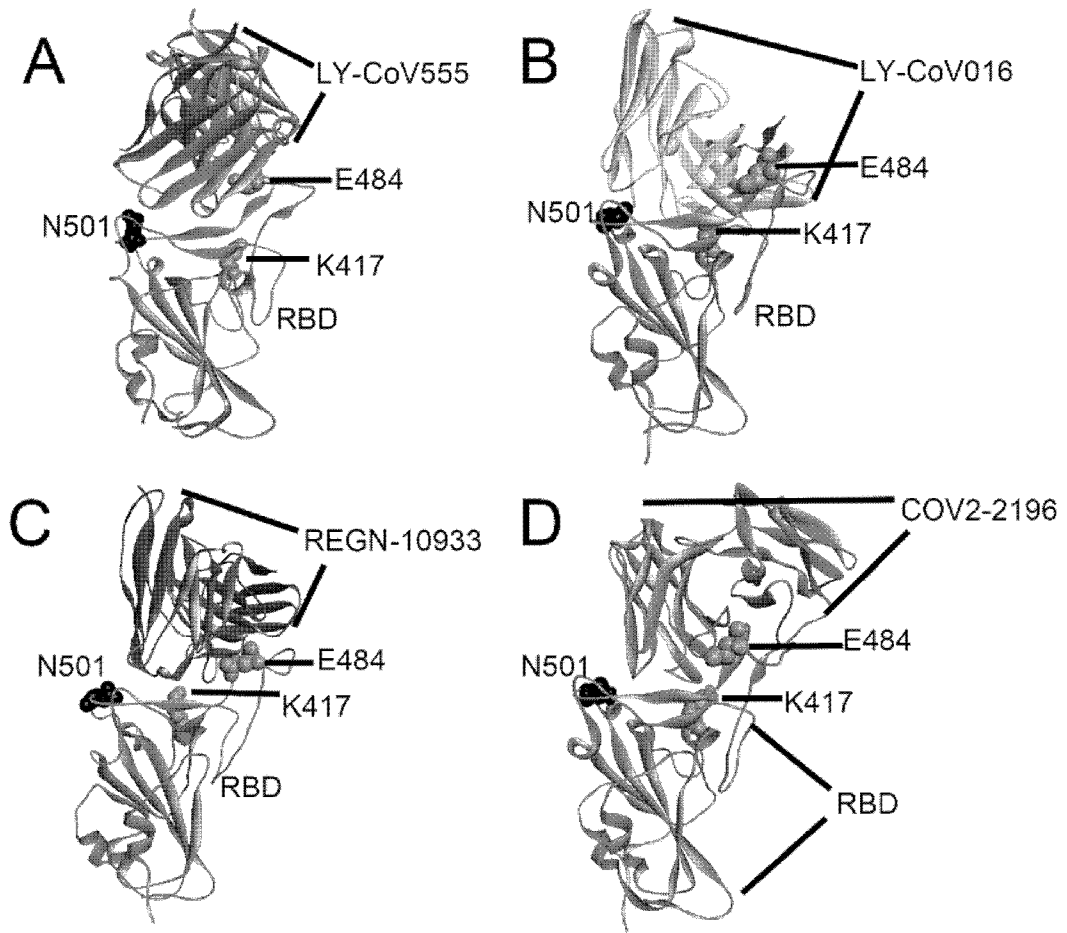


图 19-1

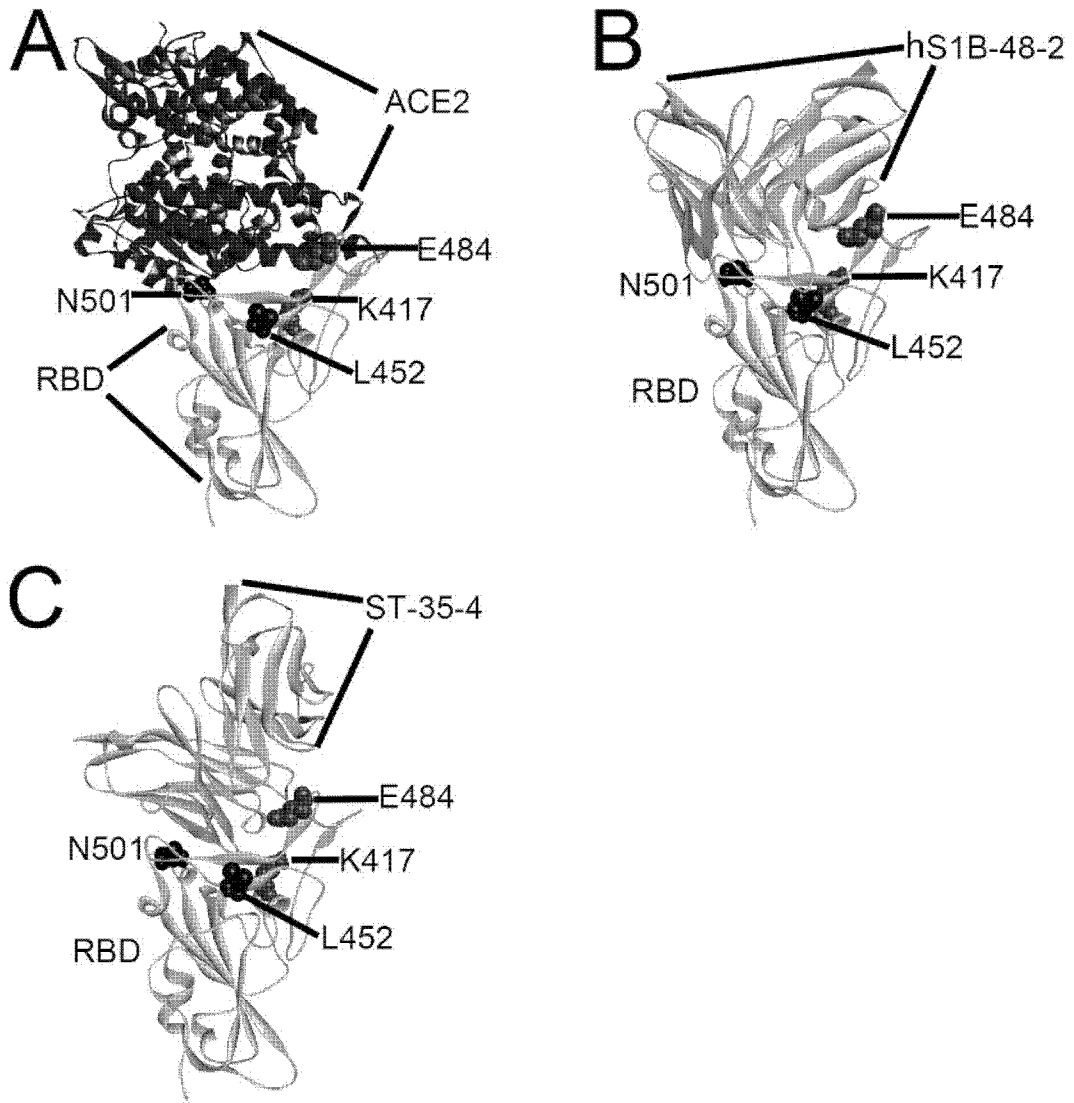


图 19-2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/086477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN; CNABS; STN; NCBI; CNKI; ISI; 万方数据库; S蛋白, spike, 抗体, antibody+, 冠状病毒, SARS-CoV-2, COVID-19, 刁家升, 马心鲁, 孙见宇, 李强, 张晓峰, 周利, 武翠, sequence search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111333722 A (JIANGSU DISEASE CONTROL AND PREVENTION CENTER (JIANGSU PUBLIC HEALTH INSTITUTE)) 26 June 2020 (2020-06-26) entire document	1-27
A	CN 103665155 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 26 March 2014 (2014-03-26) claims 1-15, SEQ ID NO: 8	1-27
A	WO 2013054320 A1 (TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.) 18 April 2013 (2013-04-18) claims 1-33, SEQ ID NO: 2	1-27
A	CN 103298833 A (ABBOTT GMBH. & CO. KG et al.) 11 September 2013 (2013-09-11) claims 1-48, SEQ ID NO: 20	1-27
A	CN 109776677 A (SHANGHAI KAITUOZHE BIOMEDICAL CO., LTD.) 21 May 2019 (2019-05-21) claims 1, 12-24, SEQ ID NO: 7	1-27
A	CN 110382544 A (INNATE PHARMA S.A.) 25 October 2019 (2019-10-25) claims 17, 41-44, SEQ ID NO: 29	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 June 2021		Date of mailing of the international search report 15 July 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/086477

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, C. Y. et al. "A Human Monoclonal Antibody Blocking SARS-CoV-2 Infection." <i>Nature Communications</i> , Vol. 11, 04 May 2020 (2020-05-04), document 2251, pages 1-6	1-27
A	葛燕 等 (GE, Yan et al.). "新型冠状病毒的生物技术药物研发进展 (Advances in Biotechnology Drug Development for COVID-19)" <i>国外医药抗生素分册 (World Notes on Antibiotics)</i> , Vol. 41, No. 4, 31 July 2020 (2020-07-31), pp. 264-273	1-27
A	CAI, Y.F. et al. "6XR8_A:Chain A, Spike glycoprotein" <i>GenPept</i> , 22 July 2020 (2020-07-22), entire document	1-27

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/086477

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)		
CN	111333722	A	26 June 2020	None			
CN	103665155	A	26 March 2014	CN	103665155	B	06 July 2016
WO	2013054320	A1	18 April 2013	BR	112014008893	A2	28 November 2017
				RU	2650869	C2	17 April 2018
				US	2014271618	A1	18 September 2014
				IL	231931	A	30 June 2019
				AU	2012322272	B2	17 August 2017
				PL	2744829	T3	29 June 2018
				EP	2744829	A1	25 June 2014
				ES	2661488	T3	02 April 2018
				LT	2744829	T	26 March 2018
				WO	2013054331	A1	18 April 2013
				HK	1199646	A1	10 July 2015
				US	2017355781	A1	14 December 2017
				AU	2012322272	A1	10 April 2014
				IN	873MUN2014	A	03 July 2015
				US	2021070884	A1	11 March 2021
				JP	2015502138	A	22 January 2015
				RU	2014118773	A	20 November 2015
				EP	2744829	B1	13 December 2017
				AU	2012322272	C1	02 November 2017
				WO	2013054331	A8	10 April 2014
				US	9771431	B2	26 September 2017
				KR	20140069206	A	09 June 2014
				CA	2851762	A1	18 April 2013
				CN	103987729	B	31 May 2017
				IL	231931	D0	28 May 2014
				KR	102189409	B1	14 December 2020
				CN	103987729	A	13 August 2014
				EP	2744829	A4	03 June 2015
				EP	3360899	A1	15 August 2018
				JP	6170926	B2	26 July 2017
CN	103298833	A	11 September 2013	US	9062101	B2	23 June 2015
				MX	358739	B	03 September 2018
				CA	2808187	A1	23 February 2012
				EP	3533803	A1	04 September 2019
				US	2014227291	A1	14 August 2014
				MX	2013001834	A	28 June 2013
				WO	2012024187	A1	23 February 2012
				CN	105348387	A	24 February 2016
				EP	2603524	A1	19 June 2013
				CN	105348387	B	25 August 2020
				US	2015368299	A1	24 December 2015
				CN	103298833	B	16 December 2015
				JP	2013537424	A	03 October 2013
				US	10047121	B2	14 August 2018
				JP	2017048194	A	09 March 2017
				JP	6147665	B2	14 June 2017
CN	109776677	A	21 May 2019	WO	2019096219	A1	23 May 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/086477

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110382544	A	25 October 2019	AU	2018235092	A1	15 August 2019
				CA	3051640	A1	20 September 2018
				US	2019389961	A1	26 December 2019
				KR	20190129866	A	20 November 2019
				WO	2018167267	A1	20 September 2018
				IL	269150	D0	28 November 2019
				EP	3596124	A1	22 January 2020
				BR	112019018685	A2	28 April 2020
				MX	2019010848	A	30 October 2019
				JP	2020513809	A	21 May 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/086477

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>VEN;CNABS;STN;NCBI;CNKI;ISI;万方数据库:S蛋白, spike, 抗体, antibod+, 冠状病毒, SARS-CoV-2, COVID-19, 刁家升, 马心鲁, 孙见宇, 李强, 张晓峰, 周利, 武翠, 序列检索</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 111333722 A (江苏省疾病预防控制中心江苏省公共卫生研究院) 2020年 6月 26日 (2020 - 06 - 26) 全文</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103665155 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 权利要求1-15、SEQ ID NO: 8</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013054320 A1 (TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.) 2013年 4月 18日 (2013 - 04 - 18) 权利要求1-33、SEQ ID NO:2</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103298833 A (雅培股份有限两合公司等) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 权利要求1-48、SEQ ID NO: 20</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109776677 A (上海开拓者生物医药有限公司) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21) 权利要求1、12-24、SEQ ID NO:7</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110382544 A (先天制药公司) 2019年 10月 25日 (2019 - 10 - 25) 权利要求17、41-44、SEQ ID NO: 29</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WANG, C.Y. 等. "A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection" Nature Communications, 第11卷, 2020年 5月 4日 (2020 - 05 - 04), 文献2251第1-6页</td> <td>1-27</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 111333722 A (江苏省疾病预防控制中心江苏省公共卫生研究院) 2020年 6月 26日 (2020 - 06 - 26) 全文	1-27	A	CN 103665155 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 权利要求1-15、SEQ ID NO: 8	1-27	A	WO 2013054320 A1 (TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.) 2013年 4月 18日 (2013 - 04 - 18) 权利要求1-33、SEQ ID NO:2	1-27	A	CN 103298833 A (雅培股份有限两合公司等) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 权利要求1-48、SEQ ID NO: 20	1-27	A	CN 109776677 A (上海开拓者生物医药有限公司) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21) 权利要求1、12-24、SEQ ID NO:7	1-27	A	CN 110382544 A (先天制药公司) 2019年 10月 25日 (2019 - 10 - 25) 权利要求17、41-44、SEQ ID NO: 29	1-27	A	WANG, C.Y. 等. "A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection" Nature Communications, 第11卷, 2020年 5月 4日 (2020 - 05 - 04), 文献2251第1-6页	1-27
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
A	CN 111333722 A (江苏省疾病预防控制中心江苏省公共卫生研究院) 2020年 6月 26日 (2020 - 06 - 26) 全文	1-27																								
A	CN 103665155 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 权利要求1-15、SEQ ID NO: 8	1-27																								
A	WO 2013054320 A1 (TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.) 2013年 4月 18日 (2013 - 04 - 18) 权利要求1-33、SEQ ID NO:2	1-27																								
A	CN 103298833 A (雅培股份有限两合公司等) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 权利要求1-48、SEQ ID NO: 20	1-27																								
A	CN 109776677 A (上海开拓者生物医药有限公司) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21) 权利要求1、12-24、SEQ ID NO:7	1-27																								
A	CN 110382544 A (先天制药公司) 2019年 10月 25日 (2019 - 10 - 25) 权利要求17、41-44、SEQ ID NO: 29	1-27																								
A	WANG, C.Y. 等. "A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection" Nature Communications, 第11卷, 2020年 5月 4日 (2020 - 05 - 04), 文献2251第1-6页	1-27																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 6月 27日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 7月 15日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>罗洋</p> <p>电话号码 86-(10)-53961959</p>																								

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	葛燕等. “新型冠状病毒的生物技术药物研发进展” 国外医药抗生素分册, 第41卷, 第4期, 2020年 7月 31日 (2020 - 07 - 31), 第264-273页	1-27
A	CAI, Y.F. 等. “6XR8_A:Chain A, Spike glycoprotein” GenPept, 2020年 7月 22日 (2020 - 07 - 22), 全文	1-27

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

a. 作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式

纸件或图形文件形式

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

c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/086477

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111333722	A	2020年 6月 26日	无			
CN	103665155	A	2014年 3月 26日	CN	103665155	B	2016年 7月 6日
WO	2013054320	A1	2013年 4月 18日	BR	112014008893	A2	2017年 11月 28日
				RU	2650869	C2	2018年 4月 17日
				US	2014271618	A1	2014年 9月 18日
				IL	231931	A	2019年 6月 30日
				AU	2012322272	B2	2017年 8月 17日
				PL	2744829	T3	2018年 6月 29日
				EP	2744829	A1	2014年 6月 25日
				ES	2661488	T3	2018年 4月 2日
				LT	2744829	T	2018年 3月 26日
				WO	2013054331	A1	2013年 4月 18日
				HK	1199646	A1	2015年 7月 10日
				US	2017355781	A1	2017年 12月 14日
				AU	2012322272	A1	2014年 4月 10日
				IN	873MUN2014	A	2015年 7月 3日
				US	2021070884	A1	2021年 3月 11日
				JP	2015502138	A	2015年 1月 22日
				RU	2014118773	A	2015年 11月 20日
				EP	2744829	B1	2017年 12月 13日
				AU	2012322272	C1	2017年 11月 2日
				WO	2013054331	A8	2014年 4月 10日
				US	9771431	B2	2017年 9月 26日
				KR	20140069206	A	2014年 6月 9日
				CA	2851762	A1	2013年 4月 18日
				CN	103987729	B	2017年 5月 31日
				IL	231931	D0	2014年 5月 28日
				KR	102189409	B1	2020年 12月 14日
				CN	103987729	A	2014年 8月 13日
				EP	2744829	A4	2015年 6月 3日
				EP	3360899	A1	2018年 8月 15日
				JP	6170926	B2	2017年 7月 26日
CN	103298833	A	2013年 9月 11日	US	9062101	B2	2015年 6月 23日
				MX	358739	B	2018年 9月 3日
				CA	2808187	A1	2012年 2月 23日
				EP	3533803	A1	2019年 9月 4日
				US	2014227291	A1	2014年 8月 14日
				MX	2013001834	A	2013年 6月 28日
				WO	2012024187	A1	2012年 2月 23日
				CN	105348387	A	2016年 2月 24日
				EP	2603524	A1	2013年 6月 19日
				CN	105348387	B	2020年 8月 25日
				US	2015368299	A1	2015年 12月 24日
				CN	103298833	B	2015年 12月 16日
				JP	2013537424	A	2013年 10月 3日
				US	10047121	B2	2018年 8月 14日
				JP	2017048194	A	2017年 3月 9日
				JP	6147665	B2	2017年 6月 14日
CN	109776677	A	2019年 5月 21日	WO	2019096219	A1	2019年 5月 23日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/086477

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110382544	A	2019年 10月 25日	AU	2018235092	A1	2019年 8月 15日
				CA	3051640	A1	2018年 9月 20日
				US	2019389961	A1	2019年 12月 26日
				KR	20190129866	A	2019年 11月 20日
				WO	2018167267	A1	2018年 9月 20日
				IL	269150	D0	2019年 11月 28日
				EP	3596124	A1	2020年 1月 22日
				BR	112019018685	A2	2020年 4月 28日
				MX	2019010848	A	2019年 10月 30日
				JP	2020513809	A	2020年 5月 21日
