



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114231497 A

(43) 申请公布日 2022.03.25

(21) 申请号 202210169904.1

(22) 申请日 2022.02.24

(83) 生物保藏信息

GDMCC No:62227 2022.01.20

(71) 申请人 广州伯尼兹生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市高新技术开发区科学城揽月路3号广州国际企业孵化器F区F521

申请人 南方医科大学

(72) 发明人 毛莹莹 颜仁和 李红卫 万鹏飞

仇珍珍 陈泽典 梁铁坤 李堪贺 马曼欣

(74) 专利代理机构 广州科沃园专利代理有限公司

司 44416

代理人 张帅

(51) Int.Cl.

G12N 5/20 (2006.01)

G07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

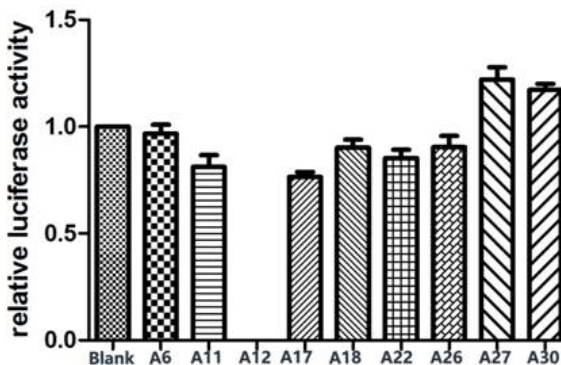
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

一株表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系及中和活性抗体

(57) 摘要

本发明属于细胞工程与免疫学领域,具体涉及一株表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系及中和活性抗体。本发明筛选获得一株能高效稳定分泌表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系以及其分泌的新冠病毒S1蛋白单克隆抗体;利用普通细胞培养皿培养本发明的重组杂交瘤细胞系,产量可达10mg/L,且纯度能达90%以上;本发明的单抗具有高中和活性,单抗浓度为0.00103 μg/mL时即可抑制50%以上新冠假病毒活性,是目前所报告的新冠单抗中和活性最佳的。本发明提供的杂交瘤细胞系或单克隆抗体在新冠病毒的血清学检测、制备新冠病毒感染的试剂或药物及制备新冠病毒抗原或抗体检测的试剂中具有重要的应用价值。



1. 一株能分泌表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系,其特征在于,所述细胞系的保藏编号为:GDMCC No:62227。
2. 一种单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体是由权利要求1所述杂交瘤细胞系分泌表达的新冠病毒S1蛋白单克隆抗体。
3. 根据权利要求2所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体含重链可变区和轻链可变区,所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。
4. 根据权利要求2所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体只与新冠病毒S1蛋白反应,不与其他冠状病毒S1蛋白反应。
5. 一种用于检测新冠病毒ELISA试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:包被捕获抗体的固相载体、检测抗体、新冠病毒阴性对照抗原、新冠病毒阳性对照抗原、封闭液、洗涤液、底物溶液和终止液;所述检测抗体为酶标记的权利要求2所述单克隆抗体。
6. 如权利要求1所述的杂交瘤细胞系或如权利要求2所述单克隆抗体在制备诊断、预防或治疗新冠病毒感染的试剂或药物中的应用。
7. 如权利要求1所述杂交瘤细胞系或如权利要求2所述单克隆抗体在制备新冠病毒抗原或抗体检测的试剂中的应用。

## 一株表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系及中和活性抗体

### 技术领域

[0001] 本发明属于细胞工程与免疫学领域,具体涉及一株表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系及中和活性抗体。

### 背景技术

[0002] 新冠病毒传染性极强,人群普遍易感,临床症状以发热、干咳、乏力为主,严重者并发急性呼吸窘迫综合征。

[0003] SARS-CoV-2属于 $\beta$ 属的新型冠状病毒,有包膜,直径为60-140nm,基因组序列是具有29903bp的单链RNA,病毒包膜结构主要由三种蛋白组成:刺突糖蛋白(S,Spike Protein)、小包膜糖蛋白(E,Envelope Protein)和膜糖蛋白(M,Membrane Protein),其中,S蛋白在识别并结合宿主细胞表面受体,并介导病毒包膜与细胞膜融合的过程中起到关键性作用。S蛋白由两个亚基组成:S1和S2,S1亚基包含病毒的受体结合域RBD(receptor binding domain,RBD),是参与冠状病毒识别细胞受体的主要部分,RBD通过结合受体细胞表面的ACE2启动病毒感染,而对S1和S2亚基的研究表明,S1亚基中的RBD包含了SARS-CoV-2的大部分中和抗原表位,作为亚单位疫苗时可产生较S2更高的中和抗体滴度,并且比全长的S蛋白诱导产生的非特异中和反应要低。

[0004] 目前已有多种疫苗用于SARS-CoV-2的预防,但尚无特效药物针对性治疗。恢复期患者血浆中含有高浓度特异性的抗原中和抗体,输入患者体内后,可以中和新冠病原体,介导有效的免疫反应,因此,研发具有高中和活性的单抗药物将为新冠病毒的患者提供有效的治疗手段,降低死亡率,保障患者生命安全。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的第一个技术问题是提供一株能高效稳定分泌表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系以及其分泌的新冠病毒S1蛋白单克隆抗体。

[0006] 本发明所要解决的第二个技术问题是将上述分泌新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系及其分泌的新冠病毒S1蛋白单克隆抗体应用于制备诊断、预防或治疗新冠病毒感染的试剂或药物中。

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案:

本发明的第一个目的是提供一株能分泌表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系,其特征在于,其保藏于广东省微生物菌种保藏中心,地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,保藏编号为GDMCC No:62227,分类命名为杂交瘤细胞株SARS-CoV-2 A12,保藏日期为2022年1月20日,保藏期限为三十年。

[0008] 本发明的第二个目的是提供一种如上述所述杂交瘤细胞系的制备方法,包括如下步骤:

S1、以纯化的重组人SARS-Cov2 S1蛋白作为免疫原,经皮下和腹腔多点免疫8-12

周龄BALB/c小鼠,隔2周加强免疫一次,共免疫三次;

S2、对免疫后的小鼠取血,ELISA筛选抗体效价,将抗体效价高于1:80000的小鼠准备用做融合,在融合前7天,再次加强免疫,然后取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合;

S3、经过有限稀释法多次克隆筛选得到单克隆细胞系。

[0009] 优选的,所述步骤S1中重组人SARS-Cov2 S1蛋白为经优化和突变后重组表达的蛋白,所述重组人SARS-Cov2 S1蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTFWFAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTLLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVFCEQFCNDPFLGVYVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGGSHHHHHH (SEQ ID NO.1)

优选的,所述步骤S1中免疫小鼠的最优剂量为:一次免疫100 $\mu$ g/只,二次和三次免疫为50 $\mu$ g/只。

[0011] 本发明的第三个目的是提供一种单克隆抗体,所述单克隆抗体是由上述所述杂交瘤细胞系分泌表达的新冠病毒S1蛋白单克隆抗体。

[0012] 优选的,所述单克隆抗体含重链可变区和轻链可变区,所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0013] GGNLTQSPIVVSLSSDDEAASVDSYQKPGGNSFMHWYQQPKLLIYIASNLESSTQLTSGGICTVPEIDGSERQLGQRATISCRANGVLNKSWTSTLDSKDYQLPKCQYYQNYEINVKTDWGVPPCARFSGSRTDFAVTLTIDPVDEAKTSTSPDPPGSAQAQTNSSNYNADAAPTVSIFPFLNSENENECHNKDEYSERSYCTHIVKSYSMEAFNR (SEQ ID NO.2)

VQVLQLSGAVISCMVKASSNYNFKGKATFTSSGNSTLYWIEWIKTTPPSVYPLAPQRPGHGLEWIGQIQGAEVQLVEGFPGSGSLTSEDSLVPGRYAMHWVPSVTVSSAKGSAAQTVTCNVAHTYIFSSGCLVKGAVYHCARVPEVGCKPCICTDGNYPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDPKVTCVLTITLTQKVDKKIVPRDCVWPSDEVVDISKDENVQKSNWEAVTVPAQTQPREEADTSSNTAYMQLSSTPEVSSVFIPTVEVHNSTFRQPASSTFSWFVDWLNGMDDTGLYTLSSSQFTDFFWPKPKDVPDDKEFKCRPKFPEYFVYSKLNPNVSSVTISKTKGRELPIMHQSAAADITVPAPIEKEQWNGKSAPQVYTIPPPKEQMAKDKVNTQPISLTCMIA (SEQ ID NO.3)

优选的,所述新冠病毒S1蛋白单克隆抗体只与新冠病毒S1蛋白反应,不与其他冠状病毒S1蛋白反应。

[0014] 本发明的第又一个目的是提供一种用于检测新冠病毒ELISA试剂盒,所述试剂盒包括:包被捕获抗体的固相载体、检测抗体、新冠病毒阴性对照抗原、新冠病毒阳性对照抗原、封闭液、洗涤液、底物溶液和终止液;所述检测抗体为酶标记的上述所述新冠病毒S1蛋白单克隆抗体。

[0015] 本发明的第又一个目的是提供一种如上述所述的杂交瘤细胞系或如上述所述新

冠病毒S1蛋白单克隆抗体在制备诊断、预防或治疗新冠病毒感染的试剂或药物中的应用。

[0016] 本发明的又一个目的是提供一种如上述所述杂交瘤细胞系或如上述所述新冠病毒S1蛋白单克隆抗体制备新冠病毒抗原或抗体检测的试剂中的应用。

[0017] 本发明的单克隆抗体具有较强的中和活性,能阻断新冠病毒S蛋白或新冠假病毒与宿主细胞表面ACE2的结合。

[0018] 本发明的主要实验原理包括:将重组SARS-CoV-2 S1蛋白与弗氏佐剂混合制成疫苗免疫小鼠并测定抗体效价,选择血清效价最高的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0融合培养制备筛选可分泌抗SARS-CoV-2 S1蛋白的杂交瘤细胞系;将杂交瘤细胞在体外用无血清培养基培养生产单克隆抗体,利用Protein A亲和层析法纯化出高纯度的抗体,再通过假病毒中和实验筛选得到能表达具有中和活性的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0019] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

(1) 本发明筛选获得一株能高效稳定分泌表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系以及其分泌的新冠病毒S1蛋白单克隆抗体;本发明的重组杂交瘤细胞系可表达高水平的单抗,利用普通细胞培养皿培养,产量可达10mg/L,且纯度能达90%以上;

(2) 本发明的单抗具有较高的中和活性,单抗浓度为0.00103 $\mu$ g/mL时即可抑制50%以上新冠假病毒活性,是目前所报告的新冠单抗中和活性最佳的;

(3) 本发明的单克隆细胞系生产表达的单克隆抗体的效价高,特异性好,只与新冠病毒S1蛋白反应,不与其他冠状病毒S1蛋白反应;并且,本发明的单克隆细胞系采用地无血清培养基培养,单克隆抗体表达分泌于培养上清,可在培养中直接回收培养上清,且可多次换液,易于表达及收集纯化,操作简便,成本低;

(4) 本发明提供的杂交瘤细胞系或新冠病毒S1蛋白单克隆抗体能特异性的与新冠S1蛋白反应,在新冠病毒的血清学检测及在制备诊断、预防或治疗新冠病毒感染的试剂或药物和制备新冠病毒抗原或抗体检测的试剂中具有重要的应用价值。

## 附图说明

[0020] 图1为9株单克隆抗体与新冠假病毒中和反应结果图;

图2为单克隆抗体SARS-CoV-2 A12中和效价测定结果图。

## 具体实施方式

[0021] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下实施例。

[0022] 所述新冠病毒S1蛋白由广州伯尼兹生物科技有限公司设计优化并生产纯化;ACE-293T细胞为广州伯尼兹生物科技有限公司和南方医科大学共同设计并构建;

所述弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自sigma厂家,型号F5881和F5506;

所述Balb/c小鼠脾细胞购自南方医科大学实验动物中心;

所述不完全培养基DMEM高糖培养基购自康宁公司;

所述PEG购自sigma厂家,所述HAT培养基和HT培养基购自thermo公司;

所述BSA购自sigma公司;

所述根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG二抗购自北京索莱宝科技有限公司。

[0023] 实施例1 表达分泌性新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系的建立  
S1、重组SARS-CoV-2-S1抗原的制备

重组新冠病毒S1抗原的制备:将纯化好的重组人新冠病毒delta株S1蛋白与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂充分混合20min,制得重组SARS-CoV-2-S1抗原。所述弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂按体积比1:5充分混合,重组SARS-CoV-2-S1蛋白用量为:以Balb/c小鼠为实验对象,一免100 $\mu$ g/只,二次和三次免疫为50 $\mu$ g/只。

[0024] S2、小鼠免疫

将上述步骤S1制备好的SARS-CoV-2-S1抗原与弗氏佐剂充分混匀后经腹腔注射BALB/c小鼠;一免后14和28天,取步骤S1制备重组抗原及弗氏不完全佐剂充分混合,多点皮下注射相同小鼠进行二次和三次免疫,每次免疫后7天尾静采血,采用ELISA方法检测免疫应答水平。三免后14天,于小鼠尾静脉取血,以重组S1蛋白包被,ELISA方法检测血清效价;若效价高于1:80000,即可达到融合条件;融合前7天加强免疫一次小鼠。

[0025] S3、杂交瘤细胞的融合

取效价高于1:80000的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,具体操作步骤如下:

1)将 $1 \times 10^8$ 脾细胞与 $2 \times 10^7$ - $5 \times 10^7$ 骨髓瘤细胞SP20混合于一支50mL融合管中,补加不完全培养基至25mL,充分混匀;

2)1000r/min离心5分钟,将上清尽量吸净;

3)沉淀细胞松散均匀;置37 $^{\circ}$ C水浴中预热,使细胞充分混合最适合温度条件融合;

4)用1mL吸管在1分钟左右加预热至37 $^{\circ}$ C的50%PEG4000 (PH 8.0) 1mL,边加边轻轻搅拌,静置2min;

5)用10mL吸管在90秒内加25mL预热至37 $^{\circ}$ C的不完全培养基;20-37 $^{\circ}$ C静置8分钟;

6)1000r/min 5分钟,弃去上清;

7)加入5mLHAT培养基,轻轻吹吸沉淀细胞(防止融合细胞吹散),使其悬浮并混匀,然后补加含腹腔巨噬细胞的HAT培养基至80-100mL。

[0026] 8)分装96孔细胞培养板已经铺好饲养层,每孔总体积0.25mL;然后将培养板置37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养;

9)5天后用HAT培养基换出1/2培养基;

10)7-10天后用HT培养基换出HAT培养基;

11)经常观察杂交瘤细胞生长情况。

[0027] S4、单克隆细胞系的筛选

筛选步骤S3中所得融合细胞中可以分泌新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞,具体步骤如下:间接ELISA法筛选细胞培养上清,选择效价较高的阳性克隆杂交瘤细胞进行亚克隆化,并用有限稀释法连续克隆化3次,直至细胞阳性率达100%;克隆筛选完成后,将筛选得到的细胞系生产单抗并与SARS-CoV2-S1蛋白进行Western Blot反应,挑选能与SARS-CoV2-S1蛋白反应的细胞系;筛选到9株能获得稳定分泌高效价的抗新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的细胞系。

[0028] S5、单抗的特异性检测

收集筛选得到的杂交瘤细胞系的培养上清,分别与SARS-CoV-2-S1蛋白和PEDV S1

蛋白、SARS-CoV-S1蛋白等其他冠状病毒蛋白通过间接ELISA的方法鉴定抗体的特异性；实验结果如下表1所示，筛选得到的细胞系都只能与SARS-CoV2-S1蛋白反应，不与其他冠状病毒蛋白反应。

[0029] 表1 单抗的特异性检测结果

SARS-CoV-2单克隆抗体细胞系编号	包被蛋白		
	PEDV-S1	SARS-CoV-S1	SARS-CoV-2 S1
A6	0.067	0.012	1.243
A11	0.086	0.101	1.341
A12	0.09	0.147	1.577
A17	0.099	0.118	1.063
A18	0.099	0.139	0.842
A22	0.065	0.138	1.343
A26	0.079	0.094	1.063
A27	0.082	0.115	1.177
A30	0.1	0.145	1.222

#### 对比例1

所述杂交瘤细胞系的制备过程与实施例1类似；

与实施例1的区别在于，对比例1中每只小鼠重组SARS-CoV-2-S1蛋白用量为一免200 $\mu$ g/只，二次和三次免疫为200 $\mu$ g/只；最后筛选得到6株稳定分泌表达抗新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的细胞系。

#### [0030] 对比例2

所述杂交瘤细胞系的制备过程与实施例1类似；

与实施例1的区别在于，对比例2中每只小鼠重组SARS-CoV-2-S1蛋白用量为一免400 $\mu$ g/只，二次和三次免疫为200 $\mu$ g/只；最后筛选得到5株稳定分泌表达抗新冠病毒S1蛋白单克隆抗体的细胞系。

#### [0031] 实验一、效价测定

S1、免疫血清效价测定：采用间接ELISA法测定免疫血清效价，包括以下步骤：

取300 $\mu$ g重组SARS-CoV-2-S1蛋白溶解于10mL 0.05M pH9.6的碳酸盐缓冲液，包被96孔酶标板，100 $\mu$ L/孔，4 $^{\circ}$ C过夜。次日，使用PBS（含有0.05%（V/V）Tween-20）洗板三次，小鼠于每次免疫后7天眼眶采血，鼠免疫血清用含1%BSA 10mMPBS以 $10^{-1}$ - $10^{-8}$ 倍稀释，加入96孔板，100 $\mu$ L/孔37 $^{\circ}$ C 1h，PBS（含有0.05%（V/V）Tween-20）洗板三次后，加入以PBS 1:1000倍稀释辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠IgG二抗，100 $\mu$ L/孔37 $^{\circ}$ C 1h，同上洗板后，TMB显色，100 $\mu$ L/孔，室温避光10min，加100 $\mu$ L/孔2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应，测450nm吸收值，以免疫前小鼠血清作为阴性对照，以测定值与对照值的比 $\geq 2.1$ 为阳性来判断免疫血清的效价。

[0032] S2、纯化抗体的效价测定：100 $\mu$ g重组SARS-CoV-2-S1蛋白溶于10mL pH9.6的0.05M碳酸盐包被液缓冲液中，加入96孔板，100 $\mu$ L/孔，4 $^{\circ}$ C包被过夜。PBST洗板三次，用含1%BSA封闭液的PBS150 $\mu$ L/孔，37 $^{\circ}$ C封闭1h；PBST洗板三次后，每孔加入100 $\mu$ L纯化抗体，37 $^{\circ}$ C孵育1h，PBST洗板三次后，加入辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠IgG二抗，100 $\mu$ L/孔37 $^{\circ}$ C 1h，PBST洗板三次后，TMB显色，100 $\mu$ L/孔，室温避光15min，加100 $\mu$ L/孔2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应，测450nm吸收值。

[0033] 实验结果如下表2所示，最后总共筛选得到20株杂交瘤细胞系，其中实施例1筛选

得到的细胞系最多,效价也最高。

[0034] 表2 效价测定结果

实验样品	单克隆抗体细胞系数数量	单克隆抗体最高效价
实施例1	9	1:1024000
对比例1	6	1:512000
对比例2	5	1:128000

#### 实验二、单克隆抗体的生产及纯化

S1、单克隆抗体的生产:将杂交瘤细胞系在150mm细胞培养皿中用无血清培养基培养生长至细胞密度达到80%以上进行扩大培养,一般一个150mm培养皿细胞传代5个150mm培养皿细胞进行培养96h后收集无血清培养基并继续换新鲜无血清培养基96h,再次收集细胞上清液合并后进行纯化。

#### [0035] S2、单克隆抗体的纯化

1) 水洗:用8CV纯化水以0.5mL/min清洗介质,去除介质中20%乙醇;

2) 平衡:用8CV平衡液以0.5mL/min平衡介质,直至基线平稳后调零;平衡介质,保证介质中的溶液的组分和pH与样本一致;

3) 上样:样品经过离心、过滤(0.45 $\mu$ m)后以0.5mL/min进行上样,上样完成后用平衡液清洗直至基线为零;

4) 洗脱:用5-10CV洗脱液以0.5mL/min进行洗脱,收集洗脱液,洗脱完成后用中和液(50-200 $\mu$ L中和液/mL洗脱液)将洗脱液pH调节至中性(也可以预先加在收集管中);

#### S3、单抗的纯度及亚型鉴定

收集纯化洗脱液用PBS缓冲液透析12h或过夜,期间更换2-3次缓冲液,取透析后单抗上清用SDS-PAGE测定单克隆抗体的纯度;使用BIO-RAD公司生产的Smart Spec plus蛋白测定仪测定抗体浓度;采用Hbt公司的鼠单抗亚型鉴定试剂盒鉴定杂交瘤细胞系的亚型。

[0036] 经检测,纯化后单克隆抗体纯度达到98%以上,浓度达到1.5mg/mL。所得单克隆抗体为IgG亚型,轻链为Kappa链。

#### [0037] 实验三、假病毒中和实验测定单抗的中和活性

##### S1、9株单克隆抗体中和活性初筛

在感染前一天将ACE2-293T细胞接种于96孔板。将筛选得到的9株单抗分别稀释至10 $\mu$ g/mL,取50 $\mu$ L与等体积的SARS-CoV-2假病毒(MOI=0.3)混合,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;然后,用混合物感染ACE2-293T细胞,每个单抗设置3个复孔;感染12h后,更换新鲜培养基,48h后测定细胞荧光素酶活性;用裂解缓冲液(Glo lysis buffer, Promega)裂解细胞,然后加入荧光素酶底物(Bright-Glo荧光素酶测定底物, Promega)。使用GloMax 96微孔板光度计(Promega)测量荧光素酶活性,相对发光单位(RLU)大于背景值平均值三倍的被定义为阳性,筛选得到一株单克隆抗体(1012)具有中和活性,标记为:A12。

[0038] 筛选结果如图1所示,将筛选得到的9株单克隆抗体与新冠假病毒进行中和反应,其中单克隆抗体SARS-CoV-2 A12(10 $\mu$ g/mL)几乎100%抑制假病毒感染。

#### [0039] S2、单克隆抗体SARS-CoV-2 A12的中和效价测定

将初筛具有中和活性的单克隆抗体SARS-CoV-2 A12分别稀释至10 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、10 $^{-1}$  $\mu$ g/mL、10 $^{-2}$  $\mu$ g/mL、10 $^{-3}$  $\mu$ g/mL,取50 $\mu$ L与等体积的SARS-CoV-2假病毒(MOI=0.3)混合,37



℃孵育1小时;然后感染ACE2-293T细胞,每个单抗设置3个复孔;感染12h后,更换新鲜培养基,48h后测定细胞荧光素酶活性;用裂解缓冲液(Glo lysis buffer,Promega)裂解细胞,然后加入荧光素酶底物(Bright-Glo荧光素酶测定底物,Promega)。使用GloMax 96微孔板光度计(Promega)测量荧光素酶活性,相对发光单位(RLU)大于背景值平均值三倍的被定义为阳性;采用SPSS软件进行概率分析,计算50%中和效价。

[0040] 如图2所示,单抗A12的IC<sub>50</sub>约为0.00103μg/ml,即单抗浓度为0.00103μg/ml时可抑制50%以上新冠假病毒活性,据目前所报告的新冠单抗中,本发明中的A12单抗具有较高的中和活性。

[0041] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

## SEQUENCE LISTING

<110> 广州伯尼兹生物科技有限公司,南方医科大学

<120> 一株表达新冠病毒S1蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系及中和活性抗体

<130> 2022.2.16

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 660

<212> PRT

<213> 重组人SARS-Cov2 S1蛋白的氨基酸序列(Amino acid sequence of recombinant human SARS-Cov2 S1 protein)

<400> 1

```

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

```

Glu Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln  
 210 215 220  
 Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln  
 245 250 255  
 Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp  
 260 265 270  
 Ala Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu  
 275 280 285  
 Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg  
 290 295 300  
 Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu  
 305 310 315 320  
 Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr  
 325 330 335  
 Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val  
 340 345 350  
 Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser  
 355 360 365  
 Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser  
 370 375 380  
 Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr  
 385 390 395 400  
 Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly  
 405 410 415  
 Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly  
 420 425 430  
 Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro  
 435 440 445  
 Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro  
 450 455 460  
 Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val  
 485 490 495  
 Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro  
 500 505 510  
 Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe

515	520	525
Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe		
530	535	540
Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala		
545	550	555
Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser		
565	570	575
Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln		
580	585	590
Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala		
595	600	605
Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly		
610	615	620
Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His		
625	630	635
Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Gly Ser His His		
645	650	655
His His His His		
660		

<210> 2

<211> 218

<212> PRT

<213> 轻链可变区氨基酸序列(Light chain variable region amino acid sequence)

<400> 2

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

Asn Tyr Glu Ile Asn Val Lys Thr Asp Trp Gly Val Pro Pro Cys Ala  
 115 120 125  
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Ala Val Thr Leu Thr Ile Asp  
 130 135 140  
 Pro Val Asp Glu Ala Lys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Asp Pro Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Ser Asn Tyr Asn Ala Asp Ala Ala Pro  
 165 170 175  
 Thr Val Ser Ile Phe Pro Phe Leu Asn Ser Ser Glu Asn Glu Cys His  
 180 185 190  
 Asn Lys Asp Glu Tyr Ser Glu Arg Ser Tyr Thr Cys Thr His Ile Val  
 195 200 205  
 Lys Ser Tyr Ser Met Glu Ala Phe Asn Arg  
 210 215

<210> 3

<211> 416

<212> PRT

<213> 重链可变区氨基酸序列 (Heavy chain variable region amino acid sequence)

<400> 3

Val Gln Val Leu Gln Leu Ser Gly Ala Val Ile Ser Cys Met Val Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Ser Asn Tyr Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Ser Thr Leu Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys Thr Thr Pro Pro  
 35 40 45  
 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp  
 50 55 60  
 Ile Gly Gln Ile Gln Gly Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Gly Phe Pro  
 65 70 75 80  
 Gly Ser Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 85 90 95  
 Tyr Ala Met His Trp Val Pro Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Gly  
 100 105 110  
 Ser Ala Ala Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Thr Tyr Ile Phe  
 115 120 125  
 Ser Ser Gly Cys Leu Val Lys Gly Ala Val Tyr His Cys Ala Arg Trp  
 130 135 140  
 Pro Glu Val Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Asp Gly Asn Tyr Phe

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

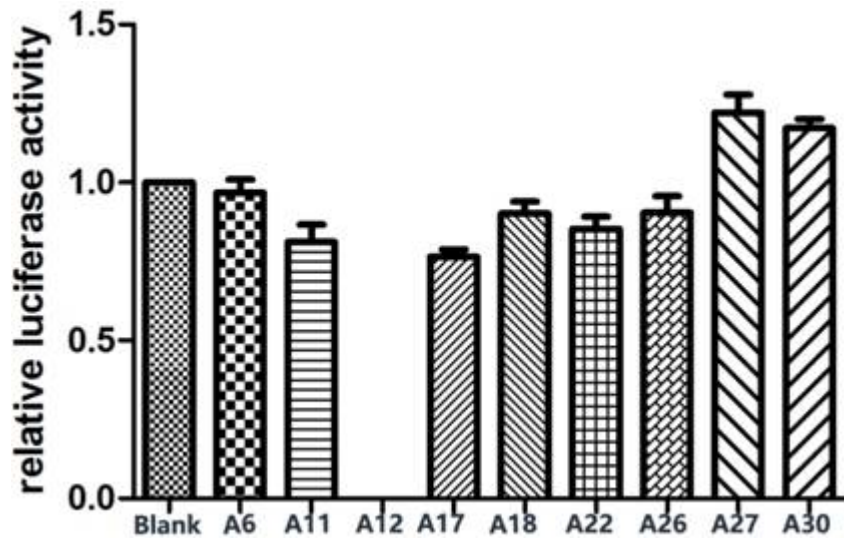


图1

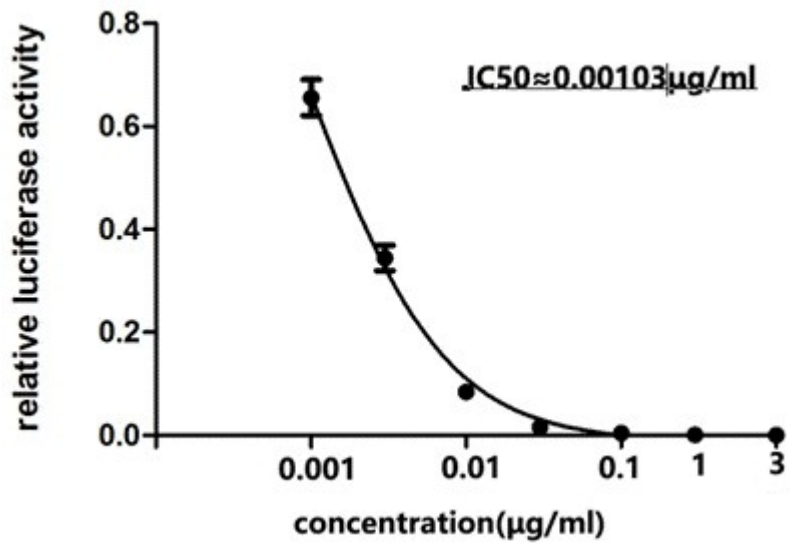


图2