



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113201068 A

(43)申请公布日 2021.08.03

(21)申请号 202010078398.6 *A61P 11/00*(2006.01)
(22)申请日 2020.02.03 *A01N 63/50*(2020.01)
(71)申请人 深圳市雅臣智能生物工程有限公司 *A01P 1/00*(2006.01)
地址 518118 广东省深圳市坪山区宝山路 *A61L 9/14*(2006.01)
16号海科兴战略新兴产业园C栋4楼 *A61K 8/64*(2006.01)
(72)发明人 包晟 杨荣鉴 王长安 龚芹 *A61Q 11/00*(2006.01)
杨得山 *A61Q 19/10*(2006.01)
A61L 101/46(2006.01)

(74)专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司 44217

代理人 郭伟刚

(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
C07K 16/02(2006.01)
A61K 39/42(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

(54)发明名称

基因重组抗2019-nCoV和其它冠状病毒IgY及其小分子抗体以及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基因重组抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒IgY及其小分子抗体以及制备方法和应用。本发明的抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒IgY及其小分子抗体可直接抑灭“2019-nCoV”和其它冠状病毒,并封闭冠状病毒与宿主细胞作用的关键蛋白S蛋白及其RBD结构域,使其不能与细胞膜受体ACE2结合;从而,阻止“2019-nCoV”和其它冠状病毒感染呼吸道上皮细胞。同时,这些抗体还可中和受感染细胞排出的冠状病毒,阻断二次感染和扩散传播。本发明还提供抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒IgY及其小分子抗体制成的雾化剂、喷雾剂、口喷剂、鼻喷剂、滴鼻剂、滴眼剂、空气消毒剂、洗手液、粉剂、片剂、口含片、口服液、胶囊剂,应用于防治“2019-nCoV”和其它冠状病毒感染的药物、消毒产品、保健品和医疗器械中。

1. 一种抗冠状病毒的抗体制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、制备抗原:将目标冠状病毒的灭活的冠状病毒或冠状病毒蛋白成分加入佐剂,制得病毒抗原或蛋白抗原;

S2、制备免疫蛋:将所述病毒抗原或蛋白抗原免疫产蛋禽类,得到抗冠状病毒的免疫蛋;

S3、分离抗体:从所述免疫蛋中分离抗所述目标冠状病毒的IgY抗体。

2. 根据权利要求1所述的抗体制备方法,其特征在于,所述步骤S1中,所述抗原成分为如下中的至少一种:灭活的冠状病毒液、冠状病毒重组S蛋白、冠状病毒重组S1蛋白、冠状病毒重组S2蛋白、冠状病毒的受体结合域重组蛋白、冠状病毒重组N蛋白、冠状病毒重组S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白。

3. 根据权利要求2所述的抗体制备方法,其特征在于,所述灭活的冠状病毒液使用如下方法制备:

(1) 使用目标冠状病毒感染体外培养用的细胞株;

(2) 选择病毒感染量和培养条件培养目标冠状病毒,将收获的病毒反复冻融裂解备用;

(3) 灭活病毒:在不断搅拌病毒液的情况下,缓慢加入灭活剂来灭活病毒。

4. 根据权利要求2所述的抗体制备方法,其特征在于,所述冠状病毒S蛋白为基因重组表达的冠状病毒S蛋白全序列多肽,偶联KLH和BSA获得的重组多肽蛋白。

5. 根据权利要求2所述的抗体制备方法,其特征在于,所述冠状病毒重组S1蛋白、冠状病毒重组S2蛋白使用如下方法制备:

(1) 分别表达冠状病毒S1蛋白免疫优势决定区多肽和冠状病毒S2蛋白免疫优势决定区多肽;

(2) 分别与KLH和BSA偶联成多肽,获得冠状病毒重组S1蛋白重组冠状病毒重组S1蛋白。

6. 根据权利要求2所述的抗体制备方法,其特征在于,所述冠状病毒的受体结合域重组蛋白使用如下方法制备:

(1) 构建PET32(a)-RBD重组质粒;

(2) 用原核或真核表达系统进行表达;

(3) 运用Fmoc固相法或其它方法合成肽链;

(4) 与KLH和BSA偶联成多肽。

7. 根据权利要求2所述的抗体制备方法,其特征在于,所述冠状病毒N蛋白为基因重组表达的冠状病毒N蛋白全序列多肽,偶联KLH和BSA获得的重组N蛋白。

8. 根据权利要求2所述的抗体制备方法,其特征在于,所述冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白使用如下方法制备:

(1) 化学合成S蛋白片段和N蛋白片段的基因序列;

(2) 将两个基因片段串联,克隆至质粒的表达位点;

(3) 将重组质粒转化原核或真核表达系统,筛选获得高效表达的工程菌,表达和纯化冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段融合蛋白。

(4) 与KLH和BSA偶联,获得冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白抗原成份。

9. 根据权利要求1所述的抗体制备方法,其特征在于,所述步骤S1中,所述佐剂为福氏佐剂或其它佐剂,所述灭活的冠状病毒液或重组蛋白成分与所述福氏佐剂经过高速匀浆后

形成所述抗原,所述抗原为油包水乳液。

10. 根据权利要求1所述的抗体制备方法,其特征在于,所述步骤S2中,每隔两周免疫注射一次产蛋禽类,共注射2-5次,最后一次注射后的至少第12天后检取产蛋禽类所产免疫蛋。

11. 根据权利要求1所述的抗体制备方法,其特征在于,所述步骤S3中,采用纯水提取法、氯仿萃取法、冷乙醇沉淀法或硫酸铵沉淀法分离抗所述目标冠状病毒的IgY粗提物。

12. 根据权利要求1所述的抗体制备方法,其特征在于,所述纯水提取法包括如下步骤:

(1) 取所述免疫蛋的蛋黄,搅拌均匀;

(2) 再按蛋黄液体积的3-8倍加入蒸馏水,进行稀释并混合均匀,调pH至5.5-6.5;

(3) 冷却至2-6℃,静置12-24小时后高速离心;取离心分离所得的上清液置超滤器中进行超滤浓缩10-20倍;

(4) 加入浓度为1.0-3.0%的海藻酸钠液,缓慢添加海藻酸钠液至终浓度为0.1-0.2%,搅拌至出现浑浊;

(5) 再加入1.0-3.0%CaCl₂液,至终浓度为0.1-0.2%,搅拌均匀,3-4℃静置8-12小时;

(6) 高速离心并取上清液,得到IgY粗提物。

13. 根据权利要求12所述的抗体制备方法,其特征在于,所述IgY粗提物先后分别过离子交换柱和凝胶层析柱或者亲和层析柱层析,得到抗冠状病毒纯IgY溶液。

14. 根据权利要求13所述的抗体制备方法,其特征在于,还包括如下步骤:

将所述纯IgY溶液制备成IgY干粉、IgY纳米干粉、纳米脂质体IgY干粉、小分子抗体Fab、长效化小分子抗体Fab、小分子抗体Fab干粉、纳米脂质体小分子抗体Fab、偶联穿膜肽的小分子抗体Fab中的至少一种。

15. 含有权利要求1-14中所制备抗体的组合物。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其特征在于,还包括赋形剂、填充剂、溶剂、助溶剂、表面活性剂、胶囊辅料、化学药、中药中一种或多种。

17. 根据权利要求15所述的组合物,其特征在于,所述组合物制成雾化剂、喷雾剂、口喷剂、鼻喷剂、滴鼻剂、滴眼剂、空气消毒剂、空气清新剂、消毒剂、洗手液、粉剂、片剂、口含片、口服液、口服剂、胶囊剂中的至少一种。

18. 权利要求1-16中制备的抗体和组合物,在制备用于防治冠状病毒感染的药物、消毒产品、保健品或医疗器械中的应用。

基因重组抗2019-nCoV和其它冠状病毒IgY及其小分子抗体以及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物药品技术领域,具体涉及一种基因重组抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒IgY及其小分子抗体以及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 感染人类的冠状病毒在20世纪60年代首次被科学家分离出来,因在电子显微镜下可观察到病毒外表的冠状构造而得名“冠状病毒”。

[0003] 冠状病毒不仅是普通感冒的主要病原体之一,更是几次严重疫情的罪魁祸首,包括2003年肆虐的严重急性呼吸综合征冠状病毒,以及前几年影响沙特阿拉伯、韩国等地的中东呼吸综合症冠状病毒。

[0004] 人感染了冠状病毒后会出现发热、咳嗽、气促和呼吸困难,进而引起病毒血症以及肺部病变为主的全身性疾病,出现肺炎、急性呼吸综合症等。这种病毒还会触发“细胞因子风暴”(cytokine storm),攻击人的正常器官,使肺、肾等器官衰竭甚至造成死亡。

[0005] 世卫组织指出,对于新型冠状病毒没有疫苗,无法提前预防,也没有有效的治疗药物。

[0006] 世卫组织警示,一些已知的冠状病毒在动物中传播,但尚未感染人类;随着全球监测工作的改善,可能会发现更多冠状病毒,人类与冠状病毒之间的斗争任重道远。

[0007] 因此,研究开发一种可有效预防和治疗“2019-nCoV”及其它冠状病毒感染疾病的新药,是关系到人类健康和生命的大事,也是摆在国际医学科学界面前的一项重要课题。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种基因重组抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒IgY及其小分子抗体以及制备方法和应用,解决现有技术中尚未有可以有效预防和治疗“2019-nCoV”及其它冠状病毒感染疾病药物的问题。

[0009] 本发明解决技术问题所采用的技术方案是:一种基因重组抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒特异性IgY、一种基因重组抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒小分子抗体,所述基因重组抗“2019-nCoV”和其它冠状病毒特异性IgY及其小分子抗体由如下方法制备得到:

[0010] 一、制备抗原:

[0011] 本发明采用以下方法制作免疫用抗原:

[0012] (一)制作抗原成份

[0013] 1.灭活“2019-nCoV”或其它冠状病毒抗原成份

[0014] (1)使用“2019-nCoV”或其它冠状病毒感染Vero、Vero-E6和2BS细胞株。

[0015] (2)优选最佳病毒感染量和最佳培养条件,培养“2019-nCoV”或其它冠状病毒,将收获的病毒置于-20℃冰箱中反复冻融裂解细胞3次备用。

[0016] (3)灭活病毒:可选用β-丙内酯等作灭活剂,在不断搅拌病毒液条件下,缓慢加

入灭活剂,4-10℃作用,再37℃左右水浴。用Vero细胞连续传3代检测灭活效果,所有操作都在P3实验室内的生物安全柜进行。

[0017] 2. 基因工程重组抗原成份

[0018] 本发明以“2019-nCoV”冠状病毒重组抗原成份为例来说明,其它冠状病毒基因工程重组抗原成份的制作可参照以下方法同样进行,具体操作过程,这里就不赘述。

[0019] (1) 基因重组“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白抗原成份

[0020] 研究揭示,“2019-nCoV”及其它冠状病毒的S蛋白在病毒与宿主细胞表面受体结合及介导膜融合进入细胞的过程中起重要作用,也是“2019-nCoV”及其它冠状病毒主要的抗原蛋白。S蛋白通过S2的穿膜部分把整个S蛋白固定在病毒外壳膜,与宿主细胞膜融合,而S1则与病毒和受体的识别结合有关;封闭S蛋白的结合位点可阻止病毒感染细胞;因此,本发明选择S蛋白作为主要的重组蛋白抗原成份。

[0021] 具体操作如下:

[0022] A. “2019-nCoV”或其它冠状病毒的S蛋白全序列多肽

[0023] a. 从Gen Bank中获取SARS-CoVS蛋白序列,共1256个氨基酸。使用DNASar软件选取Hopp&Woods亲水性参数(Hydrophilicity)和Willing抗原性参数(Antigenicity)进行单参数预测,根据软件分析结果选择具有亲水性和较强的抗原性多肽序列

[0024] b. 载体蛋白偶联抗原表位多肽

[0025] 多肽合成 ⇨ 切割与脱保护 ⇨ HPLC纯化 ⇨ 氨基酸组分分析 ⇨ 修饰合成多肽 ⇨ 偶联KLH和BSA获得重组多肽蛋白

[0026] B. “2019-nCoV”或其它冠状病毒的S1蛋白免疫优势决定区多肽

[0027] a. 从Gen Bank中获取SARS-CoVS蛋白序列,共1256个氨基酸。使用DNASar软件选取Hopp&Woods亲水性参数(Hydrophilicity)和Willing抗原性参数(Antigenicity)进行单参数预测,根据软件分析结果选择S1蛋白免疫优势决定区多肽序列

[0028] b. 载体蛋白偶联抗原表位多肽

[0029] 多肽合成 ⇨ 切割与脱保护 ⇨ HPLC纯化 ⇨ 氨基酸组分分析 ⇨ 修饰合成多肽 ⇨ 偶联KLH和BSA获得重组免疫优势决定区(510-672)多肽蛋白

[0030] c. 用原核或真核表达系统扩增表达“2019-nCoV”或其它冠状病毒的S1区多肽蛋白

[0031] I. 构建“2019-nCoV”或其它冠状病毒S1区基因分段重组质粒

[0032] II. 用原核或真核表达系统进行表达

[0033] III. 运用Fmoc固相法或其它方法合成肽链

[0034] IV. 与KLH和BSA偶联成多肽

[0035] C. “2019-nCoV”或其它冠状病毒的S2蛋白免疫优势决定区多肽

[0036] 研究揭示,“2019-nCoV”或其它冠状病毒的S2蛋白之C-末端重复片段与细胞膜受体ACE2结合并使病毒包膜和细胞膜融合,从而使病毒进入细胞发生感染;因此,选择S2蛋白作为重组蛋白抗原成份。具体操作如下:

[0037] a. 从Gen Bank中获取SARS-CoVS蛋白序列,共1256个氨基酸。使用DNASar软件选取Hopp&Woods亲水性参数(Hydrophilicity)和Willing抗原性参数(Antigenicity)进行单

参数预测,根据软件分析结果选择S2蛋白免疫优势决定区多肽序列

[0038] b.载体蛋白偶联抗原表位多肽

[0039] 多肽合成⇨切割与脱保护⇨HPLC纯化⇨氨基酸组分分析⇨修饰合成多肽⇨

偶联KLH和BSA获得重组S2蛋白免疫优势决定区多肽蛋白

[0040] c.用原核或真核表达系统扩增表达“2019-nCoV”或其它冠状病毒的S2区多肽蛋白

[0041] I.构建“2019-nCoV”或其它冠状病毒S2区基因分段重组质粒

[0042] II.用原核或真核表达系统进行表达

[0043] III.运用Fmoc固相法或其它方法合成肽链

[0044] IV.与KLH和BSA偶联成多肽

[0045] D.“2019-nCoV”或其它冠状病毒的受体结合域(RBD)片段重组多

[0046] 肽蛋白

[0047] “2019-nCoV”或其它冠状病毒的受体结合域(RBD)包含了S蛋白的主要中和性抗原决定簇,介导了病毒与靶细胞的相互作用,可影响病毒与靶细胞的结合,在跨种属传播起了十分重要的作用。因此,本发明选择受体结合域(RBD)作为重要的重组蛋白抗原成份。

[0048] a.构建PET32(a)-RBD重组质粒

[0049] b.用原核或真核表达系统进行表达

[0050] c.运用Fmoc固相法或其它方法合成肽链

[0051] d.与KLH和BSA偶联成多肽

[0052] (2)基因重组“2019-nCoV”或其它冠状病毒N蛋白抗原成份

[0053] “2019-nCoV”及其它冠状病毒N蛋白是一种重要的结构蛋白,位于病毒颗粒的核心部分,与病毒RNA结合形成复合体,对于病毒基因组RNA特征序列的识别、与其他结构蛋白的相互作用有重要意义,在病毒组装等过程中起重要作用;因此,本发明选择N蛋白作为重要的重组蛋白抗原成份。

[0054] 具体操作如下:

[0055] 将表达“2019-nCoV”或其它冠状病毒GST-N蛋白的大肠杆菌经超声破碎,离心取上清,用GST融合蛋白纯化试剂盒纯化后鉴定。用空载体表达上清离心后,再纯化;然后,与KLH和BSA偶联,即得到纯化的“2019-nCoV”或其它冠状病毒N蛋白抗原成份。

[0056] (3)基因重组“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白抗原成份

[0057] 具体操作如下:

[0058] A.通过计算机分析“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白和N蛋白的氨基酸序列,确定含强抗原表位的S蛋白片段和N蛋白片段。

[0059] B.化学合成S蛋白片段和N蛋白片段的基因序列

[0060] C.将两个基因片段串联,克隆至质粒pET28a(+)内的Nco I/ EcoR I位点,表达S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白。

[0061] D.将重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),筛选获得高效表达“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段融合蛋白的工程菌。

[0062] E.将诱导表达融合蛋白的工程菌离心收集上清,过滤后采用S-Separese FF阳离

子柱纯化。

[0063] F. 先将纯化的S蛋白和N蛋白之融合蛋白透析,然后再用反相高压液相纯化。

[0064] G. 与KLH和BSA偶联,获得“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白抗原成份。

[0065] (二) 制备免疫用抗原

[0066] 1. 制备灭活“2019-nCoV”或其它冠状病毒抗原

[0067] 将所制得的经灭活的“2019-nCoV”或其它冠状病毒液以1-10:1-10的比例(通常为1:1)加入福氏佐剂或其它佐剂,置入高速匀浆器以30,000rpm高速匀化,形成油包水乳液,即制得病毒蛋白抗原。

[0068] 2. 基因工程表达蛋白抗原

[0069] 具体实施方法如下:

[0070] (1) “2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白全序列抗原

[0071] 将所制得的基因工程表达“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白全序列抗原成份按1-10:1-10比例(通常为1:1)加入福氏佐剂或其它佐剂,置入高速匀浆器以30,000rpm高速匀化,形成油包水乳液,即制得“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白全序列抗原。

[0072] (2) “2019-nCoV”或其它冠状病毒S1蛋白和S2蛋白复合抗原

[0073] 将所制得的以下B、C两种基因工程表达蛋白抗原成份按1-10:1-10的比例混合均匀,制成“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白复合抗原成份混合液;然后再按1-10:1-10比例(通常为1:1)加入福氏佐剂或其它佐剂,置入高速匀浆器以30,000rpm高速匀化,形成油包水乳液,即制得“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白复合抗原。

[0074] B. “2019-nCoV”或其它冠状病毒的S1蛋白免疫优势决定区多肽

[0075] C. “2019-nCoV”或其它冠状病毒的S2蛋白免疫优势决定区多肽

[0076] (3) “2019-nCoV”或其它冠状病毒的受体结合域(RBD)片段重组多肽蛋白抗原

[0077] 将所制得的“2019-nCoV”或其它冠状病毒的受体结合域(RBD)片段重组多肽蛋白抗原成份按1-10:1-10比例(通常为1:1)加入福氏佐剂或其它佐剂,置入高速匀浆器以30,000rpm高速匀化,形成油包水乳液,即制得“2019-nCoV”或其它冠状病毒的受体结合域(RBD)片段重组多肽蛋白抗原。

[0078] (4) 基因重组“2019-nCoV”或其它冠状病毒N蛋白抗原

[0079] 将所制得的“2019-nCoV”或其它冠状病毒N蛋白抗原成份按1-10:1-10比例(通常为1:1)加入福氏佐剂或其它佐剂,置入高速匀浆器以30,000rpm高速匀化,形成油包水乳液,即制得“2019-nCoV”或其它冠状病毒N蛋白抗原。

[0080] (5) 基因重组“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白抗原

[0081] 将所制得的“2019-nCoV”或其它冠状病毒S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白抗原成份按1-10:1-10比例(通常为1:1)加入福氏佐剂或其它佐剂,置入高速匀浆器以30,000rpm高速匀化,形成油包水乳液,即制得“2019-nCoV”或其它冠状病毒融合蛋白抗原。

[0082] 二、制备含高活性抗体的免疫蛋

[0083] 本发明可选用任何产蛋禽类免疫制备免疫蛋,限于篇幅仅以母鸡为例说明,其它禽类完全可依下文所述方法同样进行。

[0084] 分别采用前面方法制备的“2019-nCoV”或其它冠状病毒灭活的病毒 抗原和五种基因重组“2019-nCoV”或其它冠状病毒蛋白抗原免疫产蛋鸡，每隔两周注射一次，共注射2-5次，最后一次注射后的至少第12天后检取 产蛋鸡所产免疫蛋，并进行编码标记，得到六种抗“2019-nCoV”或其它 冠状病毒IgY免疫蛋。

[0085] 三、制备抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY粗提物

[0086] 采用纯水提取法、氯仿萃取法、冷乙醇沉淀法或硫酸铵沉淀法制备抗 “2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY粗提物。本发明以纯水提取法为例说 明，其他制备方法参照常规方法操作，具体操作过程，这里就不赘述。

[0087] 纯水提取法制备抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY粗提物的具体 操作方法如下：

[0088] 把所制备的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY免疫蛋用流动水洗 净，酒精擦洗消毒，再用打蛋机打碎抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY 免疫蛋，采用蛋黄筛筛滤去蛋清，留下蛋黄，搅拌均匀；再按蛋黄液体积 的3-8倍加入蒸馏水，进行稀释并混合均匀，用1.0N HCl溶液调pH至 5.5-6.5；将调好pH值的稀释液进一步充分搅拌均匀，然后将其冷却 至 2-6℃，静置12小时-24小时；将稀释液于高速离心；取分离所得的上清液 置超滤器中进行超滤浓缩10-20倍；继而加入浓度为1.0-3.0%的海藻酸钠 液，缓慢添加海藻酸钠液至终浓度为0.1-0.2%，搅拌至出现浑浊；再加入 1.0-3.0%CaCl₂液，至终浓度为0.1-0.2%，搅拌均匀，3-4℃静置8-12小时； 高速离心并取上清液，得到抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒 IgY粗提物。

[0089] 分别是：

[0090] 1. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原IgY

[0091] 2. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-IgY

[0092] 3. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S1+S2)-IgY

[0093] 4. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-IgY

[0094] 5. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒N蛋白抗原IgY

[0095] 6. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S+N)融合蛋白IgY

[0096] 可以将以上六种抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY中2-6种任意 组合按一定比例混合成抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒复合IgY。

[0097] 以下是两种组合的例子：

[0098] 1. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原IgY) + (抗“2019-nCoV”或 其它冠状病毒S-IgY)

[0099] 2. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原-IgY) + (抗“2019-nCoV” 或其它冠状病毒RBD-IgY)

[0100] 3. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-IgY) + (抗“2019-nCoV”或其它冠 状病毒RBD-IgY)

[0101] 4. 【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S1+S2)-IgY】+【抗“2019-nCoV” 或其它冠状病毒RBD-IgY】

[0102] 5. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-IgY) + (抗“2019-nCoV”或其它冠 状病毒N-IgY)

[0103] 6.【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S+N)融合蛋白IgY】+(抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-IgY)

[0104] 以下是3种组合的例子:

[0105] 1. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原IgY)+(抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-IgY)+(抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-IgY)

[0106] 2. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒S-IgY)+(抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-IgY)+(抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒N-IgY)

[0107] 在实际应用中,可根据需要将以上抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY任意组合使用。

[0108] 3.【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S1+S2)-IgY】+【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-IgY】+(抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒N-IgY)

[0109] 四、制备抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY溶液或干粉

[0110] 将制得一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY粗提物溶解于pH7.0、0.01mol/L的M PB磷酸盐缓冲液中,再先后分别过离子交换柱和凝胶层析柱或者亲和层析柱层析,得到抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY溶液。抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY溶液还可以经过冷冻干燥或中低温喷雾干燥或者流化床干燥以及其他不影响抗体活性的干燥方式制得抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY干粉。

[0111] 五、制备抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY纳米干粉

[0112] 制作IgY纳米干粉的方法有多种,本发明以其中一种方法举例说明如下:

[0113] 取所制得的一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY纳米干粉,加入超微粉碎机中碾磨粉碎,加工成大小在1-100nm之间、粒度超过 ≥ 15000 目的超微粒子,制得相应的纳米化抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY纳米干粉。

[0114] 六、制备纳米脂质体抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY干粉

[0115] 制作纳米脂质体IgY的方法有多种,本发明以其中一种方法举例说明如下:

[0116] 1.把卵磷脂和胆固醇各50%按1:5比例溶于乙醚中;

[0117] 2.所制得的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY纳米干粉按1:100比例或其它适当比例加入4mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS)配成浓度1%的IgY溶液;

[0118] 3.将卵磷脂和胆固醇乙醚溶液和IgY的PBS溶液按3:1比例或其它适当比例混合均匀;

[0119] 4.超声处理2min(每处理0.5min,间歇.0.5min);

[0120] 5.在水浴中减压旋转蒸发至呈凝胶状,漩涡振荡使凝胶转相,再继续蒸发除尽乙醚;

[0121] 6.超速离心(35000r/min,30min)分离除去未包入的IgY;

[0122] 7.沉淀用水洗二次,置入高速离心机离心,得沉淀;

[0123] 8.将所得的沉淀用10mmol/L PBS稀释,即制得纳米脂质体抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY溶液;将该溶液采用冷冻干燥或中低温喷雾干燥或者流化床干燥以及其他不影响抗体活性的干燥方式干燥,即获得纳米脂质体抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY干粉。

[0124] 七、制备一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab

[0125] 将一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒纯IgY溶液调节 pH至3.0-5.0,按0.01%-0.1%质量比的比例为加入催化蛋白质酶;充分搅拌溶解,产生酶促反应,然后低温高速旋转离心,弃去沉淀得上清液,对上清液进行超滤,得到浓缩液;再将超滤后所获浓缩液进行凝胶层析,将层析收集物透析浓缩,得到一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab。

[0126] 分别是:

[0127] 1. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原小分子抗体Fab

[0128] 2. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-小分子抗体Fab

[0129] 3. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S1+S2)-小分子抗体Fab

[0130] 4. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab

[0131] 5. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒N蛋白抗原小分子抗体Fab

[0132] 6. 抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S+N)融合蛋白小分子抗体Fab

[0133] 可以将以上六种抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY中2-6种任意组合按一定比例混合成抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒复合小分子抗体 Fab。

[0134] 以下是两种组合的例子:

[0135] 2. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-小分子抗体Fab)

[0136] 2. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原-小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab)

[0137] 3. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab)

[0138] 4. **【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S1+S2)-小分子抗体Fab】+【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab】**

[0139] 5. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒N-小分子抗体Fab)

[0140] 6. **【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S+N)融合蛋白小分子抗体Fab】+ (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab)**

[0141] 以下是3种组合的例子:

[0142] 1. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒抗原小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒S-小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab)

[0143] 2. (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒病毒S-小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab) + (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒N-小分子抗体Fab)

[0144] 3. **【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒(S1+S2)-小分子抗体Fab】+【抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒RBD-小分子抗体Fab】+ (抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒N-小分子抗体Fab)**

[0145] 在实际应用中,可根据需要将以上抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab任意组合使用。

[0146] 八、制备长效化抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab

[0147] 将所制得的一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab采用聚乙二醇、右旋糖苷或聚氨基酸长效化修饰,得到长效化的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab。

[0148] 本发明以采用聚乙二醇进行长效化修饰的方法为例说明如下,其它长效化修饰的方法可参照以下方法。

[0149] 调节硼酸缓冲液pH值至6.5-10.0,在抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab中加入调节pH后的硼酸缓冲液,使抗人乳头瘤病毒小分子抗体Fab的浓度为0.1-0.5mg/mL,加入聚乙二醇进行反应,且抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab与聚乙二醇的摩尔比的比值为1/10~1/30,反应温度为15℃~30℃,反应时间控制在1h~3h。

[0150] 九、制备抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab干粉

[0151] 将一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab溶液经过冷冻干燥或中低温喷雾干燥或者流化床干燥以及其他不影响抗体活性的干燥方式制得一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab干粉。

[0152] 为了增强这种小分子抗体渗透呼吸道粘膜的能力,进一步提高治疗指数,可将一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab参照前面所叙方法纳米脂质体化。

[0153] 十、制备偶联穿膜肽的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab

[0154] 为了提高抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab渗透细胞膜进入受“2019-nCoV”或其它冠状病毒感染的细胞杀灭“2019-nCoV”或其它冠状病毒的能力,本发明采用天然来源的CPPs或人工合成的CPPs偶联一种或多种复合抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab。本发明以其中一种偶联的方法为例说明,其它偶联的方法参照以下方法:

[0155] 取如下质量份数的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab干粉1-3份、CPPs-EGFP1-3份、BSA-NS蛋白微球5-10份,分别溶于各自的pH7.5、0.01mol/L的PBS,得到浓度为0.5-1.5g/L的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab溶液、浓度为0.5-1.5g/L的CPPs-EGFP溶液、浓度为2.5-5g/L的蛋白微球溶液,再分别以体积比1:10~1:30的比例缓慢加入10-25mol/L的乙醇溶液,室温搅拌反应10-30分钟,将抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab的反应混合物和CPPs-EGFP的反应混合物分别加入超滤离心管,分别以pH4.5、0.01mol/L的醋酸盐缓冲液和pH7.5、0.01mol/L的PBS为洗涤液在4℃条件下离心洗涤;将BSA-NS蛋白微球反应混合物加入超滤离心管,并以pH7.5、0.01mol/L的PBS在4℃条件下离心洗涤,以去除剩余SPDP,分别得到抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab-PDP、CPPs-EGFP-PDP、BSA-NS-PDP的SPDP衍生物,4℃保存备用;在得到的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab-PDP醋酸盐溶液中加入适量DTT使反应体系中DTT终浓度为50mmol/L,室温下轻搅30分钟,加入超滤离心管中,以pH7.5、0.01mol/L的PBS为洗涤液在4℃条件下离心洗涤,去除剩余DTT,得到抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab-PDP-SH溶液,并立即与CPPs-EGFP-PDP、BSA-NS-PDP溶液混合,4℃搅拌15-20h,用PBS离心洗涤,沉淀,最终得到CPPs-EGFP-BSA-NS-抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒小分子抗体Fab蛋白偶联物。

[0156] 本发明还提供了上述的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体在制

备用于防治“2019-nCoV”或其它冠状病毒感染的药物、消毒产品、保健品或医疗器械中的应用。

[0157] 本发明还提供了一种组合物,包括了上述的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体以及至少一种其它药学上可接受的组分。

[0158] 在本发明的组合物中,所述抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体添加辅料或基料或者化学药、中药,制成雾化剂、喷雾剂、口喷剂、鼻喷剂、滴鼻剂、滴眼剂、空气消毒剂、空气清新剂、消毒剂、洗手液、粉剂、片剂、口含片、口服液、口服剂、胶囊剂中的至少一种。

[0159] 本发明还提供了上述的组合物在制备用于防治“2019-nCoV”或其它冠状病毒感染的药物、消毒产品、保健品或医疗器械中的应用。

[0160] 如上所叙,可将所制备的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体制成各种稳定制剂。所述制剂包括但不限于这些制剂:

[0161] 优选地,该制剂还包括赋形剂、填充剂、溶剂、助溶剂、表面活性剂和胶囊辅料中一种或多种。

[0162] 优选地,该制剂为雾化剂、消毒剂、消毒液、空气清新剂、洗手液等。

[0163] 优选地,该制剂为片剂、喷雾剂、粉剂、液剂或胶囊。

[0164] 实施本发明的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体和组合物以及制备方法和应用,具有以下有益效果:本发明的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体不但可直接抑灭“2019-nCoV”和其它冠状病毒,还可特异性与“2019-nCoV”和其它冠状病毒的关键蛋白S蛋白及其RBD结构域结合并将其封闭,使其失去介导病毒侵染细胞和扩散的功能;从而,阻止“2019-nCoV”和其它冠状病毒感染呼吸道上皮细胞。同时,这些抗体还可中和受感染细胞排出的病毒,消除二次感染和阻断散发传播致病,这些独特优点对于全民预防“2019-nCoV”和其它冠状病毒感染以及防控疫情蔓延具有特别重大的意义。使用本发明的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体和组合物包括应用这些抗体和组合物制成的系列产品既可达到有的放矢、精准防治的目的,又没有化学抗病毒药和化学抑制剂的毒副作用和诱发耐药性的问题。

具体实施方式

[0165] 下面结合试验例和实施例,对本发明的抗“2019-nCoV”或其它冠状病毒IgY及其小分子抗体及其组合物以及制备方法和应用作进一步说明:

[0166] 试验例1:

[0167] 抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY对相对应的灭活“2019-nCoV”病毒的抗体结合效价检测。

[0168] 选择灭活“2019-nCoV”病毒作为检测抗原,用“ELISA”方法(酶联免疫法)检测所制得的抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY的抗体效价,结果如下表所示:

抗体	抗原	抗体结合效价
抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY	“2019-nCoV”病毒抗原	1:32768

[0170] 注:测试样本中的抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体溶液浓度均为1mg/mL。

[0171] 从以上检测结果可看出,所制备的抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY对“2019-nCoV”病

毒有很高的抗体结合效价。

[0172] 试验例2:

[0173] 抗“2019-nCoV”IgY抗体对相对应的“2019-nCoV”冠状病毒有代表性重组抗原成份的抗体结合效价检测。

[0174] 分别选择“2019-nCoV”S蛋白全序列多肽、“2019-nCoV”S1蛋白免疫优势决定区多肽、“2019-nCoV”S2蛋白免疫优势决定区多肽、“2019-nCoV”受体结合域(RBD)片段重组多肽蛋白、“2019-nCoV”N蛋白抗原、“2019-nCoV”S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白抗原作为检测抗原,用“ELISA”方法(酶联免疫法)检测所制得的抗“2019-nCoV”冠状病毒IgY及其小分子抗体的抗体效价,结果如下表所示:

	抗体	抗原	抗体结合效价
	抗“2019-nCoV” S蛋白全序列多肽-IgY	“2019-nCoV” S蛋白全序列多肽	1:16384
[0175]	抗“2019-nCoV” S蛋白复合抗原-IgY	“2019-nCoV”S1蛋白	1:16384
		“2019-nCoV”S2蛋白	1:8192
	抗“2019-nCoV” 受体结合域(RBD)-IgY	“2019-nCoV”受体结合域 (RBD)	1:16384
	抗“2019-nCoV” N蛋白-IgY	“2019-nCoV”N蛋白	1:16384
	抗“2019-nCoV” S和N融合蛋白-IgY	“2019-nCoV”S蛋白	1:8192
		“2019-nCoV”N蛋白	1:8192

[0176] 注:测试样本中的抗“2019-nCoV”-IgY系列抗体溶液浓度均为1mg/mL。

[0177] 从以上检测结果可看出,所制备的抗“2019-nCoV”-IgY系列抗体对相对应的“2019-nCoV”蛋白抗原都有很高的抗体结合效价。

[0178] 试验例3:

[0179] 抗“2019-nCoV”小分子抗体Fab对相对应的“2019-nCoV”蛋白抗原的抗体结合效价检测。

[0180] 分别选择“2019-nCoV”S蛋白全序列多肽、“2019-nCoV”S1蛋白免疫优势决定区多肽、“2019-nCoV”S2蛋白免疫优势决定区多肽、“2019-nCoV”受体结合域(RBD)片段重组多肽蛋白、“2019-nCoV”N蛋白抗原、“2019-nCoV”S蛋白片段和N蛋白片段的融合蛋白抗原作为检测抗原,用“ELISA”方法(酶联免疫法)检测所制得的抗“2019-nCoV”小分子抗体Fab的抗体效价,结果如下表所示:

	抗体	抗原	抗体结合效价
[0181]	抗“2019-nCoV” S蛋白全序列多肽- 小分子抗体 Fab	“2019-nCoV” S蛋白全序列多肽	1:8192
	抗“2019-nCoV” S蛋白复合抗原-	“2019-nCoV” S1 蛋白	1:8192
		“2019-nCoV” S2 蛋白	1:4096
[0182]	小分子抗体 Fab		
	抗“2019-nCoV” 受体结合域 (RBD) - 小分子抗体 Fab	“2019-nCoV”受体结合域 (RBD)	1:4096
	抗“2019-nCoV” N蛋白- 小分子抗体 Fab	“2019-nCoV” N蛋白	1:4096
	抗“2019-nCoV” S和N融合蛋白- 小分子抗体 Fab	“2019-nCoV” S蛋白	1:4096
“2019-nCoV” N蛋白		1:4096	

[0183] 注:测试样本中的抗“2019-nCoV”小分子抗体Fab抗体溶液浓度均为 1mg/mL。

[0184] 从以上检测结果可看出,所制备的抗“2019-nCoV”小分子抗体Fab 对相对应的“2019-nCoV”蛋白抗原都有很高的抗体结合效价。

[0185] 实施例1:采用中和试验法测定抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY中和 “2019-nCoV”病毒的效价

[0186] 1. 试验材料:

[0187] (1) 抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY:蛋白含量40mg/ml 2份标本分1 号和2号

[0188] (2) HRP酶标兔抗鸡IgG

[0189] (3) 阴性抗体(未免疫鸡蛋的IgY抗体):蛋白含量60mg/ml

[0190] (4) 阳性对照:“2019-nCoV”病毒感染病人恢复期血清2份,标本3 号4号

[0191] (5) 阴性对照:婴儿脐带血清2份,标本5号6号

[0192] (6) 病毒:

[0193] a. “2019-nCoV”病毒分离株I:从“2019-nCoV”病毒感染病人咽 拭子标本分离鉴定。

[0194] b. “2019-nCoV”病毒分离株II:从“2019-nCoV”病毒感染病人 血清标本分离鉴定。

[0195] (7) 细胞:非洲绿猴肾传代细胞。

[0196] 2. 正式试验:

[0197] 在VERO E6细胞培养检测抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体试验 实验目的:

[0198] 在VERO E6细胞培养内,采用中和试验法,测定抗“2019-nCoV”病 毒抗原IgY(用分离的2株“2019-nCoV”病毒株);用Reed-Muench法, 计算50%抗体中和终点。

[0199] 固定病毒-稀释抗体法

[0200] 将上述抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体、“2019-nCoV”病毒感 染病人恢复期血清

及婴儿脐带血清,分别在56℃灭活1小时后,分别用Egale'S液2倍稀释9个浓度,既L 8—1:1024与100TCID50“2019-nCoV”病毒分离株I和“2019-nCoV”病毒分离株II之病毒悬液混合37℃水浴1小时后,接种VERO E6细胞96孔培养板,每浓度4孔,同时设抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体、病人恢复期血清及婴儿脐带血清对照,病毒对照、正常细胞对照。37℃5%CO₂孵箱培养5天,每天在倒置显微镜下观察病毒(CPE),以25%以下形态变化为“+”,26%~50%形态变化为“++”,51%~75%形态变化为“+++”,76%~100%形态变化为“++++”,以病毒对照出现“++++++”时结束试验。

[0201] 用Reed-Muench法,计算50%抗体中和终点。

[0202] 3. 抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体中和试验检测结果

[0203] (1) 抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体1号标本:1:512的抗体可保护50%细胞不产生细胞病变。

[0204] (2) 抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体2号标本:1:256的抗体可保护50%细胞不产生细胞病变。

[0205] 阴性抗体:不能中和“2019-nCoV”病毒。

[0206] 阳性对照:

[0207] (1) “2019-nCoV”病毒感染病人恢复期血清3号标本:1:512的血清可保护50%细胞不产生细胞病变。

[0208] (2) “2019-nCoV”病毒感染病人恢复期血清4号标本:1:512的血清可保护50%细胞不产生细胞病变。

[0209] 阴性对照:

[0210] (1) 婴儿脐带血清5号标本:不能中和“2019-nCoV”病毒。

[0211] (2) 婴儿脐带血清6号标本:不能中和“2019-nCoV”病毒。

[0212] 实施例2:采用免疫印迹(Western blot)检测,确定抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY抗体与“2019-nCoV”病毒的结合。

[0213] 具体操作方法如下:

[0214] 1. 电泳:

[0215] (1) 样品处理:将“2019-nCoV”病毒N抗原(200 μ g/ml),已灭活的“2019-nCoV”病毒vero细胞(CPE++)与5X加样缓冲液(电泳加样缓冲液:25mmol Tris-CL(pH6.8),50mmol DTT,2%SDS,0.1%溴酚蓝,10%甘油)混合;

[0216] 样品处理:将“2019-nCoV”病毒N抗原(200 μ g/ml)5 μ l,已灭活的“2019-nCoV”病毒vero细胞加样缓冲液(电泳加样缓冲液:25mmol Tris-CL(pH6.8),50mmol DTT,2%SDS,0.1%溴酚蓝,10%甘油)混合;

[0217] (2) 沸水中加热10min;

[0218] (3) 离心3000rpm,2min;

[0219] (4) 分别取经以上处理的N抗原(200 μ g/ml)5 μ l,已灭活的“2019-nCoV”病毒vero细胞10 μ l加样,15%SDS-PAGE电泳(15%分离胶:11.5ml水,12.5ml 1.5mmol Tris-CL(pH8.8),25ml 30%SDS-PAGE胶贮液,10%SDS 0.5ml,临用前加10%过硫酸胺10 μ l TEMED(10 μ l/ml)。5%成层胶:6.8ml水,1.7ml 30%SDS-PAGE胶贮液,1.25ml 1.5mmol Tris-CL(pH6.8),10%SDS 0.1ml,临用前加10%过硫酸胺10 μ l TEMED(1 μ l/ml);

- [0220] (5) 电压80V(成层胶),156V(分离胶)电泳,待指示剂出凝胶底部10min关闭电源。
- [0221] 2.转膜:
- [0222] (1) 小心将凝胶放置于转移液(39mmol甘氨酸,48mmolTris-CL,0.037% SDS,20% 甲醇)中浸泡过三层滤纸之上,小心将硝酸纤维素膜(浸泡5min)放在凝胶之上,覆盖浸泡过的三层滤纸,准确对齐各层,赶尽气泡;
- [0223] (2) 60mA转膜1h
- [0224] 3.免疫学检测:
- [0225] (1) 转膜完毕,揭去滤纸,小心将膜取出,PBST(0.05%Tween-20/PBS)漂洗2min;
- [0226] (2) 5%脱脂奶(脱脂奶/PBS)封闭过夜;
- [0227] (3) 将抗“2019-nCoV”病毒抗原IgY悬液1:2、1:4稀释(PBS),37℃与膜反应2h;
- [0228] (4) PBST洗膜3次,10min/次;
- [0229] (5) 辣根过氧化物酶标记的抗鸡IgG(1:250)稀释,37℃与膜反应 2h;
- [0230] (6) PBST洗膜3次,10min/次;
- [0231] (7) 0.05mol/L DAB(3,3-二氨基联苯胺50mg,50mmolTris-CL(pH8.0),100ml,0.01% H_2O_2)显色;
- [0232] (8) 待出现明显条带即用蒸馏水冲洗终止反应。
- [0233] 4.结果:
- [0234] (1) 与SARS病毒裂解后不同组分(M,N抗原)反应(lane1);
- [0235] (2) 与表达的N抗原(40KD处)反应(lane2)。
- [0236] 实施例3:生产抗“2019-nCoV”S蛋白全序列多肽-小分子抗体Fab雾化剂,供各种雾化吸入机和公共环境空气消毒机、空气清新器和家庭用空气消毒器、空气清新器以及移动喷雾消毒器械作为药用雾化液使用。
- [0237] 配方:

原料	含量(%)
抗“2019-nCoV”S蛋白全序列多肽-小分子抗体Fab纳米脂质体溶液或干粉	0.30
医药级甘油(医药级)	2.00
K-30(分散剂)	0.50
S-40	1.00
吐温-80	2.00
薄荷油	0.05ml
香精(甜橙香精+柠檬香精)	0.10
蒸馏水	94.05

- [0239] 工艺:
- [0240] (1) 将配方量K-30、S-40、吐温-80、薄荷油、香精用紫外光照射灭菌消毒24小时,无菌密封备用;
- [0241] (2) 按配方量蒸馏水加热至至90℃,再分别加入S-40和K-30分散剂,搅拌30分钟

以上,溶解均匀;再冷却至60℃,分别缓慢加入吐温(滴加)和薄荷油以及甘油(滴加),低速搅拌60分钟至充分溶解;然后,冷却至室温,形成溶液A;

[0242] (3) 一边搅拌一边将抗“2019-nCoV”S蛋白全序列多肽-小分子抗体 Fab纳米脂质体溶液或干粉加入溶液A中,低速搅拌60min,直至完全混合均匀,得溶液B;

[0243] (4) 一边搅拌一边将香精加入溶液B中,低速搅拌60min,直至完全溶解,得溶液C;

[0244] (5) 用pH计测量溶液C的pH值,用柠檬酸调节pH值至 6.8 ± 0.1 ;

[0245] (6) 静置至上部泡沫全部消溶后,再将溶液C分装在清洗消毒过的喷雾瓶中,贴上标签出厂。

[0246] 实施例4:生产抗“2019-nCoV”S和N融合蛋白-小分子抗体Fab鼻喷剂或滴鼻剂或滴眼剂

[0247] 配方:

原料	含量 (%)
抗“2019-nCoV”S和N融合蛋白-小分子抗体Fab纳米脂质体溶液或干粉	0.30
医药级甘油(医药级)	2.00
K-30(分散剂)	0.50
S-40	1.00
吐温-80	2.00
薄荷油	0.05ml
香精(甜橙香精+柠檬香精)	0.10
蒸馏水	94.05

[0248] 工艺:

[0250] (1) 将配方量K-30、S-40、吐温-80、薄荷油、香精用紫外光照射灭菌消毒24小时,无菌密封备用;

[0251] (2) 按配方量蒸馏水加热至至90℃,再分别加入S-40和K-30分散剂,搅拌30分钟以上,溶解均匀;再冷却至60℃,分别缓慢加入吐温(滴加)和薄荷油以及甘油(滴加),低速搅拌60分钟至充分溶解;然后,冷却至室温,形成溶液A;

[0252] (3) 一边搅拌一边将抗“2019-nCoV”S和N融合蛋白-小分子抗体Fab纳米脂质体溶液或干粉加入溶液A中,低速搅拌60min,直至完全混合均匀,得溶液B;

[0253] (4) 一边搅拌一边将香精加入溶液B中,低速搅拌60min,直至完全溶解,得溶液C;

[0254] (5) 用pH计测量溶液C的pH值,用柠檬酸调节pH值至 6.8 ± 0.1 ;

[0255] (6) 静置至上部泡沫全部消溶后,再将溶液C分装在清洗消毒过的滴鼻器或滴眼器以及鼻用喷雾瓶中,贴上标签出厂。

[0256] 实施例5:生产抗“2019-nCoV”S和N融合蛋白-小分子抗体Fab口喷剂或漱口水

[0257] 配方:

	原料	含量 (%)
[0258]	抗“2019-nCoV”S蛋白全序列多肽-	0.30
	小分子抗体Fab纳米脂质体溶液或干粉	
	医药级甘油 (医药级)	2.00
	K-30 (分散剂)	0.50
	S-40	1.00
[0259]	吐温-80	2.00
	薄荷油	0.05ml
	香精 (甜橙香精+柠檬香精)	0.10
	蒸馏水	94.05

[0260] 工艺:

[0261] (1) 将配方量K-30、S-40、吐温-80、薄荷油、香精用紫外光照射灭菌消毒24小时, 无菌密封备用;

[0262] (2) 按配方量蒸馏水加热至至90℃, 再分别加入S-40和K-30分散剂, 搅拌30分钟以上, 溶解均匀; 再冷却至60℃, 分别缓慢加入吐温 (滴加) 和薄荷油以及甘油 (滴加), 低速搅拌60分钟至充分溶解; 然后, 冷却至 室温, 形成溶液A;

[0263] (3) 一边搅拌一边将抗“2019-nCoV”S蛋白全序列多肽-小分子抗体 Fab纳米脂质体溶液或干粉加入溶液A中, 低速搅拌60min, 直至完全混合均匀, 得溶液B;

[0264] (4) 一边搅拌一边将香精加入溶液B中, 低速搅拌60min, 直至完全溶解, 得溶液C;

[0265] (5) 用pH计测量溶液C的pH值, 用柠檬酸调节pH值至 6.8 ± 0.1 ;

[0266] (6) 静置至上部泡沫全部消溶后, 再将溶液C分装在清洗消毒过的口腔用喷雾罐或漱口瓶中, 贴上标签出厂。

[0267] 实施例6: 生产抗“2019-nCoV”受体结合域 (RBD) -IgY洗手液

[0268] 配方:

原料	含量 (%)
抗“2019-nCoV”受体结合域 (RBD) -IgY	5.00
403 (脂肪醇聚氧乙烯醚磺基琥珀酸单酯二钠)	33.48
503 (脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸铵, 浓度70%)	20.51
医药级甘油	2.00
海藻精华	0.10
香精 (玫瑰花香精)	0.05
薄荷油	0.05ml
蒸馏水	38.81

[0270] 工艺:

[0271] (1) 将配方量海藻精华、医药级甘油、薄荷油、香精以及403、503发泡剂用紫外光照射灭菌消毒24小时, 无菌密封备用;

[0272] (2) 将配方量蒸馏水加热至90℃,停留15分钟;再冷却至60℃,一边搅拌一边先后加入海藻精华和医药级甘油,低速搅拌30分钟,直至完全溶解,冷却至室温,得溶液A;

[0273] (3) 一边搅拌一边将香精(玫瑰花香精)加入溶液A中,低速搅拌60min,直至完全溶解,得溶液B;

[0274] (4) 将403加热至80℃,然后一边搅拌一边将503徐徐滴加入到403中,低速搅拌30min,得到溶液C;

[0275] (5) 保持溶液C温度在80℃,一边搅拌一边将薄荷油徐徐滴加入到溶液C中,低速搅拌60min,得到溶液D;

[0276] (6) 将溶液D加热至90℃高温灭菌5min,然后冷却至室温;

[0277] (7) 一边搅拌一边将溶液B缓慢地加到溶液D中,低速搅拌60min;如未形成均质稳定的乳状溶液,则需延长搅拌时间,制得溶液E;

[0278] (8) 一边搅拌一边将抗“2019-nCoV”受体结合域(RBD)-IgY缓慢地加到溶液E中,低速搅拌60min;如未形成均质稳定的乳状溶液,则需延长搅拌时间,制得溶液F;

[0279] (9) 用pH计测量溶液F的pH值,采用柠檬酸或pH4.5磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液调节pH值至 4.5 ± 0.1 ;

[0280] (10) 静置一夜,直至上部泡沫全部消溶后,再将溶液F液分装在清洗消毒过的洗手液容器中,贴上标签出厂。

[0281] 实施例7:生产抗“2019-nCoV”S蛋白复合抗原-IgY口含片

[0282] 配方:

	原料	重量百分比 (%)
	抗“2019-nCoV”S蛋白复合抗原-IgY	20.0
[0283]	羧甲基纤维素	0.5
	硬脂酸镁	0.06
	乙醇(30%浓度)	适量(溶解羧甲基纤维素成1%乙醇溶液)
	山梨糖醇	约79(加足量)

[0284] 工艺

[0285] (1) 山梨糖醇过60目筛两次备用;

[0286] (2) 羧甲基纤维素分散于30%乙醇中制成1%乙醇溶液;

[0287] (3) 将(1)项用适量(2)项制软材,14目筛网制粒,60℃通风干燥,18目筛整粒;用40目筛筛出适量细粉与抗“2019-nCoV”S蛋白复合抗原-IgY充分混匀;

[0288] (4) 再拌入硬脂酸镁,一起与整批颗粒混合均匀,密闭4小时以上;

[0289] (5) 压片机压片,每片600mg;

[0290] (6) 检验合格后,包装,全验出厂。

[0291] 实施例8:生产抗“2019-nCoV”S蛋白复合抗原-IgY粉剂,供粉末雾化装置作药用粉剂。

[0292] 配方:

	原料	重量百分比 (%)
[0293]	抗“2019-nCoV”S蛋白复合抗原-IgY干粉 或纳米脂质体抗“2019-nCoV”S蛋白 复合抗原-IgY干粉	10.0
	药用葡萄糖	90.0

[0294] 工艺:

[0295] (1) 将配方量抗“2019-nCoV”S蛋白复合抗原-IgY干粉或纳米脂质体抗“2019-nCoV”S蛋白复合抗原-IgY干粉和配方量药用葡萄糖混合,充分搅拌均匀;

[0296] (2) 将粉剂分装,检验出厂。

[0297] 本发明所包含的信息,在未脱离上述权利要求的精神和保护范围下,本发明各种偏离精确的描述,对于与本发明相关的本领域技术人员来说是显而易见的。本发明并不认为限制在所定义的程序、性质或组成的范围内,因为优选的实施例和其他描述只用于说明目前提供发明的特定方面。对于在化学、生物化学或相关领域的技术人员来说,实现本发明于各种修改的描述模式,都应属于本发明所附权利要求的保护范围内。

[0298] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进或变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围之内。