



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113461810 B

(45) 授权公告日 2021.12.28

(21) 申请号 202110531781.7

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2021.05.17

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113461810 A

(43) 申请公布日 2021.10.01

(73) 专利权人 深圳市福田区格物智康病原研究所

地址 518000 广东省深圳市福田区槟榔道3号深九科技创业园第3栋第13层

(72) 发明人 李利峰 陈佩雯 管静 郑作宜 金子荧 朱华晨 刘元生 管轶

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 颜希文

(51) Int.Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111153991 A, 2020.05.15

EP 3878862 A2, 2021.09.15

KR 102205028 B1, 2021.01.20

张彬,等.冠状病毒单克隆抗体治疗药物相关专利浅析.《科学通报》.2020,第65卷(第34期),第3979-3983页.

Mor, Michael. Multi-clonal SARS-CoV-2 neutralization by antibodies isolated from severe COVID-19 convalescent donors. 《PLOS PATHOGENS》.2021,第17卷(第2期),第1-26页.

审查员 贺菁

权利要求书1页 说明书12页

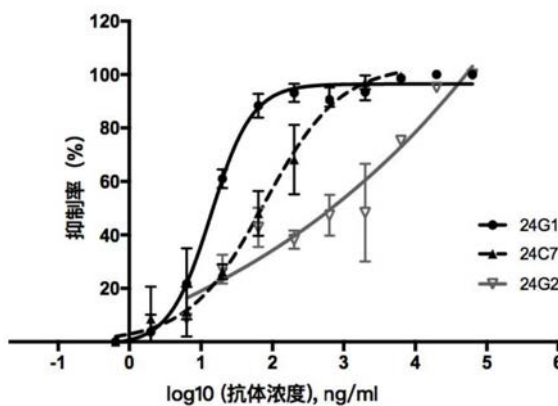
序列表7页 附图5页

(54) 发明名称

一种抗新型冠状病毒刺突蛋白的全人源单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种抗新型冠状病毒刺突蛋白的全人源单克隆抗体及其应用。本发明是目前首个提出三个抗体联用治疗新冠肺炎的单抗组合,该组合具有如下三个优点:1) 该组方中两个针对RBD抗体可以非竞争性结合RBD不同抗原表位,可阻断RBD与ACE2受体结合,起到阻断病毒进入细胞的作用;2) 本发明的三株抗体均具有不同程度的ADCC效应,可以帮助清除被感染细胞,以达到彻底清除病灶的目的;3) 本发明三株抗体结合的位置相互不干扰,联用后具有叠加抗病毒效应,同时可增强应对将来病毒突变的能力。



1. 一种与新型冠状病毒的表位特异结合的抗体,其特征在于,

所述抗体为抗体24C7,所述抗体重链可变区的CDR-H1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,CDR-H2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,CDR-H3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;所述抗体轻链可变区的CDR-L1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,CDR-L2的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,CDR-L3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;或:

所述抗体为抗体24G1,所述抗体重链可变区的CDR-H1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,CDR-H2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,CDR-H3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示;所述抗体轻链可变区的CDR-L1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,CDR-L2的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,CDR-L3的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;或:

所述抗体为抗体24G2,所述抗体重链可变区的CDR-H1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,CDR-H2的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,CDR-H3的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;所述抗体轻链可变区的CDR-L1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示,CDR-L2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,CDR-L3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体24C7重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体24G1重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

4. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体24G2重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示。

5. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的重链恒定区序列是人IgG1的重链恒定区序列。

6. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的轻链恒定区序列是人IgK的轻链恒定区序列。

7. 编码权利要求1所述抗体的核酸分子。

8. 一种载体,其特征在于,所述载体包含权利要求7所述核酸分子。

9. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞包含权利要求7所述核酸分子或权利要求8所述载体。

10. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有权利要求1~6任一所述的抗体和药学上可接受的载体。

11. 权利要求1~6任一所述抗体或所述抗体的组合在制备预防和/或治疗新型冠状病毒肺炎药物中的应用。

一种抗新型冠状病毒刺突蛋白的全人源单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种抗新型冠状病毒刺突蛋白的全人源单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 人感染新冠病毒后呈现多种临床表现,主要常见症状有发热、呼吸道症状、咳嗽、气促等,感染的持续迁延可发展为重症肺炎,引起呼吸衰竭、ARDS、休克和器官衰竭等严重并发症,部分轻症或出院患者在恢复后会出现病情反复。到目前为止,尚无针对新冠病毒感染的特异性治疗药物。国家卫健委颁发的第八版新冠病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)中对于轻型感染者主要以抗病毒和对症治疗为主,其中抗病毒药物包括 α -干扰素、利托那韦、利巴韦林、磷酸氯奎和阿比多尔。对于重症患者在对症治疗基础上,积极防治并发症,在抗病毒方面增加康复者血浆治疗疗法,在部分非对照初步病例研究中发现新冠患者在输注恢复期血浆后可改善其临床状况,显示出中和抗体在新冠病毒肺炎治疗方面的潜力。

[0003] 中和性抗体一直是治疗传染性感染性疾病的有效疗法,尽管康复者血浆疗法在治疗重症治疗患者具有一定的成效,但血浆来源难得,制品成分复杂,血浆输注存在不确定因素,因此开发出具有强中和活性、成分单一和易于大规模生产的单克隆抗体,是新冠病毒治疗药物研究的重点方向。

[0004] 但是现有技术仍存在如下的缺点:新冠病毒感染后出现病程长,部分患者出现病情反复可能是因为病毒仍然在不同脏器低水平发展。因此,清除患者体内游离病毒以及各类被感染细胞将成为彻底治愈患者的关键。新冠病毒Spike (S)蛋白作为侵染宿主细胞的关键蛋白,在被感染细胞表面广泛表达,其受体结合域(RBD)介导了病毒与ACE2受体的结合,大多数进入临床试验的抗新冠病毒抗体均靶向该区域。君实生物与中国科学院微生物研究所共同开发的重组全人源抗SARS-CoV-2S蛋白RBD单克隆抗体已于2020年7月7日完成中国I期临床试验所有受试者给药。除了单个抗体组方,美国再生元与美国国家过敏和传染病研究所合作开发的抗体鸡尾酒疗法REGN-COV2于2020年7月6日进入III期临床研究,并于2020年11月下旬被美国FDA授予紧急使用授权(EUA),该方两个抗体可以非竞争性地结合RBD两个不同抗原表位,削弱病毒因突变造成的逃逸。新冠病毒经过一年的流行后,在多个地区或国家均发现了不同突变毒株,截至到2021年2月2日,在国家生物信息中心2019新型冠状病毒信息库S序列突变分析结果中,发现在S蛋白共有2028个突变,其中有268个位于RBD,因此,仅设计靶向RBD区域抗体并不足够应对病毒将来可能发生的变异。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种抗新型冠状病毒刺突蛋白的全人源单克隆抗体及其应用。本发明筛选出两个针对RBD不同表位和一个针对S蛋白NTD的抗体作为联用组方,在中和游离病毒的基础上,着重运用抗体介导的杀伤作用清除被感染细胞,防止病毒在患者体内进一步扩散而引发的多脏器感染。同时,三个针对不同表位抗

体的联用亦可应对将来病毒发生的变异,增强抗体保护的有效性。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:提供一种与新型冠状病毒的表位特异结合的抗体,

[0007] 所述抗体为抗体24C7,所述抗体重链可变区的CDR-H1的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1所示,CDR-H2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,CDR-H3 的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;所述抗体轻链可变区的CDR-L1的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,CDR-L2的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示, CDR-L3的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;或:

[0008] 所述抗体为抗体24G1,所述抗体重链可变区的CDR-H1的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9所示,CDR-H2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,CDR-H3 的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示;所述抗体轻链可变区的CDR-L1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,CDR-L2的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,CDR-L3的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;或:

[0009] 所述抗体为抗体24G2,所述抗体重链可变区的CDR-H1的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17所示,CDR-H2的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,CDR-H3的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;所述抗体轻链可变区的CDR-L1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示,CDR-L2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22 所示,CDR-L3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示。

[0010] 作为本发明所述抗体的优选实施方式,所述抗体24C7重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0011] 作为本发明所述抗体的优选实施方式,所述抗体24G1重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16 所示。

[0012] 作为本发明所述抗体的优选实施方式,所述抗体24G2重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24 所示。

[0013] 作为本发明所述抗体的优选实施方式,所述抗体的重链恒定区序列是人 IgG1的重链恒定区序列。

[0014] 作为本发明所述抗体的优选实施方式,所述抗体的轻链恒定区序列是人 IgK的轻链恒定区序列。

[0015] 本发明还提供编码所述抗体的核酸分子。

[0016] 本发明还提供一种载体,所述载体包含所述核酸分子。

[0017] 本发明还提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含所述核酸分子或所述载体。

[0018] 本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物含有所述的抗体和药学上可接受的载体。

[0019] 本发明同时提供所述抗体或所述抗体的组合在制备预防和/或治疗新型冠状病毒肺炎药物中的应用。

[0020] 术语解释:

[0021] 新冠假病毒:新冠假病毒是一种复制缺陷型病毒的表面上表达有新冠病毒 重组膜蛋白(Spike)的嵌合病毒颗粒,这种病毒颗粒丧失病毒自我复制能力,只能进行单个细胞周期的侵染。

[0022] 新冠真病毒:是指将取自新冠感染患者体内的标本接种于特定细胞系中,并从中分离出来具有持续复制能力的新冠活病毒。

[0023] 本发明的有益效果:

[0024] 与传统化学药物相比,人源单克隆抗体具有作用机制明确,毒副作用较小,易于大规模生产等优点。本发明是目前首个提出三个抗体联用治疗新冠肺炎的单抗组合,该组合具有如下三个优点:

[0025] (1) 该组方中两个针对RBD抗体可以非竞争性结合RBD不同表位,阻断RBD与ACE2受体结合,起到中和游离病毒作用;

[0026] (2) 本发明筛选出的三株抗体均具有不同程度的ADCC效应,可以在中和游离病毒的基础上清除被感染细胞,以达到彻底清除病灶的目的;

[0027] (3) 本发明三株抗体结合的位置相互不干扰,联用后具有叠加效应,同时可有效应对将来病毒可能发生的突变。

附图说明

[0028] 图1:流式细胞仪单细胞分选SARS-CoV-2S1蛋白RBD区域特异性记忆B细胞。经富集的B细胞,采用FITC标记的S1-RBD-his去捕获RBD特异性结合的记忆B细胞,其表面分子标记为CD3-CD19+CD27+CD38int S1-RBD+。图中被框中选择的细胞被分选于96孔板中用于后续单B细胞的克隆。

[0029] 图2:流式细胞仪单细胞分选SARS-CoV-2S1蛋白非RBD区域特异性记忆B细胞。经富集的B细胞,采用FITC标记的S1-his去捕获S1特异性结合的B细胞,其表面分子标记为CD3-CD19+CD27+CD38int S1+。图中被框中选择的细胞被分选于96孔板中用于后续单B细胞的克隆。

[0030] 图3:本发明中和抗体24C7、24G1、24G2与RBD、S1蛋白的亲合活性测定结果图。

[0031] 图4:抗体的表位竞争结果图。

[0032] 图5:三株抗体的冷冻电镜结构解析及表位分析。

[0033] 图6:三株抗体的中和活性测定结果图。

[0034] 图7:抗体联合后的中和活性测定结果图。

[0035] 图8:抗体对ACE2蛋白的阻断作用测定结果图。

[0036] 图9:三株抗体的ADCC效应测定结果图。

具体实施方式

[0037] 为更清楚地表述本发明的技术方案,下面结合具体实施例进一步说明,但不能用于限制本发明,此仅是本发明的部分实施例。

[0038] 本发明涉及抗体的序列:

[0039]

重组抗体 24C7		
名称	序列	编号
重链可变区 CDR-H1	GYTFTGY Y	SEQ ID NO: 1
重链可变区 CDR-H2	INPNSGGT	SEQ ID NO: 2
重链可变区 CDR-H3	ARGWVVPAAIPYNWFDP	SEQ ID NO: 3
重链可变区完整氨基酸序列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYMHWRQAPGQGLEWM GWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRD TSISTAYMELSRLEFDDTAVYYCARG WVVPAAIPYNWFDPWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 4
轻链可变区的 CDR-L1	QSISSY	SEQ ID NO: 5
轻链可变区的 CDR-L2	AAS	SEQ ID NO: 6
轻链可变区的 CDR-L3	QQSET	SEQ ID NO: 7
轻链可变区完整氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSETFGQGTKVEVK	SEQ ID NO: 8

[0040]

重组抗体 24G1		
名称	序列	编号

[0041]

重链可变区 CDR-H1	GYTFTSYG	SEQ ID NO: 9
重链可变区 CDR-H2	INTYNGHT	SEQ ID NO: 10
重链可变区 CDR-H3	ARVESVYYGSGTCDP	SEQ ID NO: 11
重链可变区完整氨基酸序列	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCAS GYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMG WINTYNGHTNYAQKVQGRVTLTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVE SVYYGSGTCDPWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 12
轻链可变区的 CDR-L1	QSISSY	SEQ ID NO: 13
轻链可变区的 CDR-L2	IAS	SEQ ID NO: 14
轻链可变区的 CDR-L3	HQSYSSPHT	SEQ ID NO: 15
轻链可变区完整氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYIAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCHQSYSSPHTFGQGTKLE IK	SEQ ID NO: 16

[0042]

重组抗体 24G2		
名称	序列	编号
重链可变区 CDR-H1	GYTLIELS	SEQ ID NO: 17
重链可变区 CDR-H2	FDPEKGET	SEQ ID NO: 18
重链可变区 CDR-H3	AASPAIYSNYPQTYYYYYGMDV	SEQ ID NO: 19
重链可变区完整氨基酸序列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSG YTLIELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFD PEKGETIHAQNFEGRVMTEDTSTDTA YMELSSLRSEDVAVYYCAASPAIYSNYP	SEQ ID NO: 20

	QTYYYYGMDVWGQGTTVTVSS	
轻链可变区的 CDR-L1	QSLVHSDGNTY	SEQ ID NO: 21
轻链可变区的 CDR-L2	KIS	SEQ ID NO: 22
轻链可变区的 CDR-L3	TQATQFPWT	SEQ ID NO: 23
轻链可变区完整 氨基酸序列	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSL VHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKIS NRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCTQATQFPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 24

[0044] 实施例1 SARS-CoV-2S-RBD蛋白和S1蛋白特异性记忆B细胞分离

[0045] 将购自义翘神州的CoV-spike RBD (40591-V05H) 和CoV-spike-S1 (40591-V08H) 用ReadLinkFITC抗体标记试剂盒 (AATBioquest, 1299) 进行 荧光标记, 获得荧光抗原S1-RBD-his-FITC和S1-his-FITC。从汕头大学医学院 第一附属医院采集新冠恢复期患者的新鲜血液样本, 运用RosetteSep试剂盒 (Cat#: 15064, STEMCELL) 和Lymphoprep试剂 (Cat#: 07861, STEMCELL), 富集获得B细胞。在此基础上, 经过荧光抗原S1-RBD-his-FITC标记, 细胞表面分子染色, 单细胞分选新冠RBD特异性记忆B细胞 ($CD3^-CD19^+CD27^+CD38^{int}S1-RBD^+$), 结果如图1。

[0046] 为了获得新型冠状病毒除RBD以外的S1特异性记忆B细胞, 经富集得到的B细胞, 首先与抗原RBD孵育, 再用荧光抗原S1-his-FITC捕获以及细胞表面分子染色, 最终进行流式单细胞分选获得新冠S1特异性记忆B细胞 ($CD3^-CD19^+CD27^+CD38^{int}S1^+$), 结果如图2。所有的抗原特异性B细胞被分选于96孔板中, 用于后续抗体可变区序列获得。

[0047] 实施例2抗体可变区序列获取

[0048] 将实施例1中用于抗原特异性B细胞分选的96孔板, 每孔预先加入5 μ l TCL (Qiagen); 单个B细胞分选完成后, 每孔加入10 μ l超纯水和33 μ l RNA Beads (南京诺唯赞), 吹吸混匀后室温放置10分钟, 置磁力架5分钟后弃上清, 用200 μ l 80%乙醇漂洗磁珠两次, 弃上清、风干磁珠后每孔加入10 μ l Mix A, 吹吸混匀后室温放置5分钟; 置磁力架2分钟后每孔转移5 μ l至新的96孔板, 500g离心10s, 运行程序1; 程序1完成后每孔加入5 μ l Mix B (ThermoFisher), 混匀离心后运行程序2, 完成cDNA合成。

[0049] Mix A: H₂O、dNTP、Random 6、Oligo_dT按31:5:2:2混合。

[0050] Mix B: H₂O、Buffer、DTT、RNase I、RTase IV按17:16:4:2:1混合。

[0051] 程序1: 65 $^{\circ}$ C 5min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C ∞

[0052] 程序2: 23 $^{\circ}$ C 10min \rightarrow 50 $^{\circ}$ C 30min \rightarrow 80 $^{\circ}$ C 10min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C ∞

[0053] 采用巢式PCR的方法扩增抗体重链 (IgG) 以及轻链 (IgK) 可变区基因。第一轮PCR以cDNA为模板在一个反应体系中 (20 μ l) 同时扩增抗体IgG和 IgK可变区基因; 第二轮PCR以第一轮PCR产物为模板在两个反应体系中分别扩增抗体IgG和IgK可变区基因。DNA聚合酶均用Dream Taq Green (ThermoFisher), 引物序列源自于Human Monoclonal Antibodies书中第114至 115页, 反应条件参照该书第130、131页。第二轮PCR产物经琼脂糖凝胶电泳

分析,挑选轻、重链阳性配对的用VAHTS DNA Clean Beads (诺唯赞)纯化, 然后进行抗体轻、重链可变区Sanger测序(ThermoFisher)。

[0054] 实施例3抗体瞬时表达

[0055] 从一名志愿者的PBMC中提取RNA、合成cDNA并作为模板,用设计好的正向带有信号肽(MGWSIILFLVATATGVHS, SEQ ID NO:25)编码序列的引物分别PCR扩增Human-IgG1和Human-IgK恒定区基因,PCR产物纯化后分别插入到表达载体pcDNA3.4(ThermoFisher)的多克隆位点处。经转化大肠杆菌(DH5 α)、挑取单菌落、扩大培养、提质粒、测序确认后得到抗体表达载体pcDNA3.4-hIgG1和pcDNA3.4-hIgK。

[0056] 通过对抗体轻、重链可变区序列进行分析、比对、分类(IgBLAST),选择合适的引物(Human Monoclonal Antibodies书中第114至115页)以第一轮PCR产物为模板扩增抗体轻、重链可变区基因,并分别将其克隆入真核瞬时表达载体pcDNA3.4-hIgK和pcDNA3.4-hIgG1的恒定区编码基因上游,转入大肠杆菌(DH5 α)进行扩增,抽提获得抗体轻、重链质粒。根据Expi293TM Expression System(ThermoFisher)的操作说明,将抗体的轻、重链质粒转入Expi293F细胞中进行表达。转染后第三天,收获上清,用Octet Red 96e蛋白互作仪(ForteBio)测定抗体浓度。

[0057] 实施例4中和抗体初步筛选

[0058] 将通过密码子优化后合成的新冠病毒S基因克隆进PiggyBac转座系统转座子载体(System Biosciences)中的多克隆位点中,构建S蛋白表达载体pMie-Swtd18S。将GFP基因克隆进第二代慢病毒系统转移载体(Addgene, 85133)的多克隆位点中,构建pLV-GFP报告基因载体。将pMie-Swtd18S、pLV-GFP和第二代慢病毒系统包装载体psPAX(Addgene, 12260)共转染至293T细胞中,分别收获培养48小时和72小时的细胞培养上清,经浓缩纯化后得到新冠假病毒。

[0059] 将收获的细胞培养上清的起始浓度分别稀释为10 μ g/ml、1 μ g/ml和0.1 μ g/ml,将带有GFP报告基因的新冠假病毒稀释为1500TU,取等体积的新冠假病毒与稀释抗体混匀,37度作用1h后,全部转移至过表达hACE2的H1299细胞中,培养48小时后,利用PerkinElmer公司OperaPhenix高内涵成像系统测定每孔全视野下所有表达有GFP荧光的细胞,计算出每株抗体不同浓度下的抑制率,抑制率=[(空白对照孔平均GFP阳性细胞数-抗体孔GFP阳性细胞数)/(空白对照孔平均GFP阳性细胞数)]*100。

[0060] 抑制率结果显示,在0.1 μ g/ml浓度下,共有4株RBD抗体其抑制率高于75%,结合非RBD在0.1 μ g/ml浓度下有5株抗体其抑制率高于50%(表1)。对结合RBD的抗体进一步测定IC₅₀,结果如表2所示,选出两株中和活性最优的抗体,其针对新冠假病毒的IC₅₀分别为3.51ng/ml(24G1)和16.45ng/ml(24C7)。针对S1 non-RBD抗体,其中和活性不如结合RBD抗体,但上述筛选出的5株抗体分别与24G1和24C7以1:1联用后,发现5株结合S1抗体与24G1联用后可以提高高浓度抗体下的抑制率,另外将24G2与24C7联用后IC₅₀降至9.66ng/ml,将24G1、24C7和24G2三者以1:1:1比例联用后,IC₅₀为6.16ng/ml(表3),提示这三株抗体的联用可有效抑制新冠假病毒的感染。

[0061] 表1候选抗体不同浓度下抑制率结果

	结合位置	候选抗体	10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml
[0062]	RBD	24C7	97%	96%	94%
	RBD	24G5	87%	94%	85%

	RBD	25E10	89%	92%	90%
	RBD	24G1	74%	79%	78%
	S1 non-RBD	24B10	70%	61%	59%
[0063]	S1 non-RBD	24H5	64%	63%	56%
	S1 non-RBD	24A7	63%	55%	56%
	S1 non-RBD	24H8	73%	62%	53%
	S1 non-RBD	24G2	52%	41%	52%

[0064] 表2结合RBD候选抗体IC₅₀比较

[0065]	候选抗体	IC ₅₀ (ng/ml)
	24G1	3.51
	24C7	16.45
	24G5	94.29
	24E10	56.51

[0066] 表3不同抗体联用后IC₅₀比较

[0067]	抗体组合	抗体比例	IC ₅₀ (ng/ml)
	24G1+24C7	1:1	4.50
	24G1+24G2	1:1	6.52
	24C7+24G2	1:1	9.66
	24G1+24C7+24G2	1:1:1	6.16

[0068] 实施例5:中和抗体亲和力测定

[0069] 将初筛的抗体克隆表达上清,采用AKTA pure的MabSelectPrismA纯化柱 (Cat: 17-5498-53,GE),进行亲和纯化。应用Fortebio公司的Octet Red96e蛋白互作仪测定筛选所得抗体与S1-RBD-His及S1-His蛋白抗原(购买自义翘神州)结合的亲和力。主要步骤如下:

[0070] 采用AHC探针 (Cat:18-5060) 捕获抗体Fc段的方法测定抗体与S1-RBD- His和S1-His的结合。测定时将纯化后的24C7、24G1和24G2重组抗体 (4ug/mL),流经AHC探针表面,时间为120s。不同浓度稀释的S1-RBD-His 和S1-His作为流动相。结合时间为240s,解离时间为240s。实验完毕,扣除 空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,Global减对照线 分析结果,计算抗原抗体结合的动力学常数,结果如表4和图3所示。

[0071] 由图3可见,三个抗体均对S1重组蛋白有nM级的亲和力,但24G2抗体 跟RBD蛋白没有明显的结合曲线,说明其结合位点在S1蛋白的非RBD区域。

[0072] 表4候选抗体与S1-RBD-His和S1-His重组蛋白的亲和力结果

	Spike protein	mAbs	KD (nM)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
	RBD	24G1	1.43 (\pm 0.01)	5.53 (\pm 0.02) x 10 ⁵	7.91 (\pm 0.05) x 10 ⁻⁴
[0073]	RBD	24C7	3.61(\pm 0.02)	4.59 (\pm 0.02) x 10 ⁵	1.66 (\pm 0.01) x 10 ⁻³
	S1	24G1	0.84 (\pm 0.06)	8.58 (\pm 0.03) x 10 ⁴	7.17 (\pm 0.49) x 10 ⁻⁵
	S1	24C7	2.28 (\pm 0.07)	8.27 (\pm 0.04) x 10 ⁴	1.88 (\pm 0.06) x 10 ⁻⁴
	S1	24G2	1.31 (\pm 0.10)	6.76 (\pm 0.04) x 10 ⁴	8.84 (\pm 0.65) x 10 ⁻⁵

[0074] 实施例6:中和抗体表位竞争结合活性分析

[0075] 将初筛出的3个抗体克隆24C7、24G1、24G2,利用Octet蛋白互作仪,采取夹心法(Sandwich)进行表位分析。根据Biotin标记试剂盒EZ-Link™ NHS-PEG12-Biotin的说明(Cat:A35389,ThermoFisher),对抗体24C7、24G1、24G2进行Biotin标记。利用Fortebio公司的Octet Red96e仪器,采用链霉亲和素(SA)生物探针(Cat:18-5019)捕获Biotin的方法测定不同抗体的识别表位。测定时,先将SA探针在Kinetics Buffer(PBS+0.02% tween20+1mg/ml BSA, pH 7.4)中平衡60s,然后将Biotin标记的24C7、24G1、24G2重组抗体(5ug/mL),流经SA探针表面,时间为90s,每个抗体各loading 4根SA探针。流动相为100nM的S1-His蛋白(购自义翘神州),结合180s;再次Kinetics Buffer平衡60s后,更换流动相为重组抗体24C7、24G1、24G2,浓度为100 nM,结合120s。实验完毕,观察各个抗体的识别表位是否存在竞争关系。

[0076] 实验设计如表5所示,结果如图4所示。由图4可见,24C7结合S1-His 抗原后,不能再次结合24C7抗体,但可以很好的结合24G1和24G2抗体,这提示24C7与24G1、24G2抗体识别的是不同的抗原表位。同样的情况,也完全适用于24G1和24G2抗体。这说明,24C7、24G1和24G2这三个抗体识别的是S1-His抗原上的3个不同表位,且相互之间没有竞争关系。

[0077] 表5重组抗体结合表位分析的上样顺序

Sensor location	Loading Sample ID	Sample ID
A4	24C7-Biotin	24C7-Biotin
B4	24C7-Biotin	24G1-Biotin
C4	24C7-Biotin	24G2-Biotin
D4	24C7-Biotin	K Buffer
A5	24G1-Biotin	24C7-Biotin
B5	24G1-Biotin	24G1-Biotin
C5	24G1-Biotin	24G2-Biotin
D5	24G1-Biotin	K Buffer
A6	24G2-Biotin	24C7-Biotin
B6	24G2-Biotin	24G1-Biotin
C6	24G2-Biotin	24G2-Biotin
D6	24G2-Biotin	K Buffer

[0079] 实施例7三株候选抗体分子的识别表位

[0080] 为进一步探索三株候选中和抗体的表位信息,我们通过冷冻电子三维重构技术(cryo-EM)解析S蛋白与抗体Fab片段的免疫复合物结构,分析抗体所识别的表位。具体步骤如下:

[0081] (1) 将纯化的三株候选抗体(24C7、24G1和24G2)进行木瓜蛋白酶切割制备Fab片段。木瓜蛋白酶与抗体按质量比1:400~1:1600的浓度配比,在37℃下反应10~12小时,最终加入碘乙酰胺(终浓度为30mmol/L)避光反应45min,终止酶切反应。将上述混合液过夜透析至20mM Tris-HCl pH=8.0的缓冲液,使用阴离子DEAE-HPLC柱子纯化获得Fab片段。

[0082] (2) 将纯化获得的Fab片段与S蛋白按质量比1.2:1的比例在37℃下反应1小时,选用quantifoil商品化Holey Carbon铜网(规格为R2/2或2/1)用于冷冻样品制备。使用Thermo Fisher Mark IV Vitrobot自动制样机对样品快速冷冻。吸取3μL左右免疫复合物,滴加在铜网上,用滤纸吸去多余的液滴,滤纸blot时间设为5s,blot force设为0,吸取残留液滴后,通过Vitrobot快速冷冻至液态乙烷中,并转移至液氮中保存备用。

[0083] (3) 将铜网转移至Gatan 626型冷冻样品杆。将冷冻样品杆冷却至接近液氮温度(-196℃),在液氮环境中,迅速将样品杆置入Thermo FisherF30冷冻电镜样品腔室,电镜的放大倍数为93,000倍,pixel size为1.12Å,数据采集的相机Thermo FisherFalcon3电子直接探测相机,使用Thermo Fisher EPU软件自动采集冷冻电镜数据。

[0084] (4) 将采集的数据利用Motioncorr2软件进行图片漂移校正;使用Gctf软件进行CTF评估,确定欠焦水平和分辨率评估;使用cryoSPARC软件进行颗粒挑选、2D分类、初始模型重构和三维重构,最终获得复合物的三维结构。

[0085] 免疫复合物结构解析的结果如图5所示,三个抗体对应的免疫复合物的分辨率分别为:S:24C7,8.2 Å,S:24G1,6.8 Å,S:24G2,7.5 Å。抗体24C7和24G1结合RBD,每个S三聚体分别结合三个抗体Fab片段;抗体24G2则结合NTD,每个S三聚体结合三个24G2 Fab片段。

[0086] 24C7主要针对表位为S蛋白第444位至第448位氨基酸(aa444-448)以及第484位至第505位氨基酸(aa484-505);24G1主要针对表位为S蛋白第343位至第347位氨基酸(aa343-447)以及第440位至第450位氨基酸(aa440-450);24G2主要针对表位为S蛋白第144位至第153位氨基酸(aa144-153)以及第246位至第255位氨基酸(aa246-255)。从3株候选中和抗体与S蛋白的复合物结构可以看出,两株RBD抗体24C7和24G1的表位有一定程度的重叠,但与NTD抗体24G2表位无重叠。

[0087] 实施例8抗体对新冠病毒中和活性(IC₅₀)测定

[0088] 利用空斑减少实验对三株中和抗体对新冠真病毒中和活性进行评估。将纯化得到的抗体起始浓度稀释为63.2ug/ml,进行3.16倍倍比稀释,共10个稀释度。向上述各个抗体稀释度分别与100PFUSARS-CoV-2病毒等体积混匀后,37度孵育1小时,空白对照中加入抗体稀释液替代抗体。1小时后,将病毒抗体混合物全部转移至Vero细胞中,37℃吸附1小时后弃去吸附液,向Vero细胞中加入半固体培养基(DMEM/0.9%低熔点琼脂糖凝胶),4℃放置半小时后转入37℃,5%CO₂倒置培养3天。培养3天后,向细胞中加入4%甲醛固定,2小时后弃去甲醛和半固体培养基,加入0.1%结晶紫染液染色半小时,最后弃去结晶紫染液,冲洗晾干后,数出每个细胞孔中病毒成斑数,计算每个抗体稀释度下的病毒抑制率,抑制率(%)=[(空白对照孔平均成斑数-抗体孔成斑数)/(空白对照孔平均成斑数)]*100。

利用Prism 7软件对各个浓度下的抑制率 进行非线性拟合分析计算各抗体的 IC_{50} 值。

[0089] 结果如图6和表6所示。结果显示两株针对RBD抗体 (24G1和24C7) 的 中和活性优于 针对S1非RBD抗体24G2,其 IC_{50} 分别为0.0138ug/ml (24G1), 0.077ug/ml (24C7),在6.32ug/ml浓度下抑制率为100%。根据抑制率结果, 24G2在约2ug/ml浓度下抑制率约为50%,在63.2ug/ml浓度下抑制率为100%。

[0090] 同样利用空斑减少实验对三株中和抗体联用后的中和活性进行评估。将纯 化后的三株抗体进行两两联用以及三个抗体联用,组方抗体均以等比例混合。结果如图7和表6所示,两个抗体两两组合后其中和活性均出现显著提高,其 主要表现在各抗体组合达到100%抑制率的浓度降低了10~30倍。尽管24G2 中和活性弱于24G1和24C7,但24G2分别与24G1和24C7联用后其中和活性 有所提高。表位竞争结果显示三株抗体结合在三个不同表位,这提示两两组合 后中和活性提高可能是叠加效应所致。

[0091] 表6各抗体组合中和活性 (IC_{50}) 比较

抗体组合	结合区域	中和活性 (ug/ml)	
		IC_{100}	IC_{50}
24G1	RBD	~6.32	0.0138
24C7	RBD	~6.32	0.077
[0092] 24G2	S1 (非 RBD)	~63.2	~2
24G1+24C7	RBD+RBD	~0.2	0.0222
24G1+24G2	RBD+S1	~0.632	0.0193
24C7+24G2	RBD+S1	~0.632	0.0546
24G1+24C7+24G2	RBD+S1	~0.632	0.0273

[0093] 实施例9:抗体ACE2阻断活性检测

[0094] 3株高亲和力抗体中,24C7和24G1结合在S1-RBD抗原上。利用Octet Red96e蛋白互作仪,采用预混法 (Pre-mix) 来检测这两个抗体是否可以阻断 S1-RBD抗原与SARS-CoV-2受体蛋白ACE2的结合。首先,将浓度为 75 μ g/mL的抗体24G1、24C7和CR3022 (对照抗体) 以及PBS跟100nM的 S1-RBD抗原1:1混匀,室温孵育30min。测定时,先将His1K探针 (Cat:18-5120) 在Kinetics Buffer中平衡60s,然后将浓度为20 μ g/mL的重组ACE2-His 蛋白(购自义翘神州) 流经His1K探针表面,时间为180s;再次在Kinetics Buffer中平衡180s,然后更换流动相为预混的抗体和S1-RBD抗原混合物,结 合180s。实验完毕,观察预混的抗原抗体混合物是否有结合信号。

[0095] 结果如图8所示,重组抗体24C7与S1-RBD抗原混合后,再跟ACE2蛋白 结合,没有明显的结合信号,说明24C7抗体阻断了S1-RBD与ACE2的结合; 而重组抗体24G1和对照抗体CR3022跟S1-RBD结合后,跟ACE2蛋白出现了 明显的结合信号,说明这两个抗体不能阻断

S1-RBD与ACE2的结合。上述结果表明,虽然24C7和24G1都结合在S1-RBD抗原上,但只有24C7可以阻断 S1-RBD与ACE2的结合。

[0096] 实施例10三株候选抗体分子的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)

[0097] ADCC是利用抗体介导清除被感染细胞(靶细胞)的理想机制。抗体与靶细胞表面上的目标抗原结合,如果抗体的Fc段同时结合到效应细胞(主要为自然杀伤细胞,NK cells)表面的Fc γ RIIIa(CD16)受体上,两种类型的细胞即发生反应,导致ADCC作用机制通路的激活。

[0098] 为了检测三株候选分子的ADCC效应,我们选择过表达ACE2受体的H1299细胞,并与S抗原共孵育作为靶细胞。抗体24G1、24C7、24G2以300ug/ml的起始浓度,3倍梯度稀释九个稀释度后分别与 5×10^4 个/孔H1299-S细胞共同孵育1小时,再加入 1×10^5 个/孔Jurkat细胞作为效应细胞,共同培养10小时。取上清检测效应细胞的激活情况。效应细胞中由NFAT(活化T细胞核因子)通路介导的基因转录的激活是ADCC作用机制通路激活过程中较早的事件。此外,Jurkat细胞稳定表达了Fc γ RIIIa(CD16)受体(和由NFAT应答元件驱动表达的萤火虫萤光素酶。抗体在ADCC作用机制中的生物活性通过NFAT通路活化产生的萤光素酶定量,而效应细胞中的萤光素酶活性通过生物发光读数定量。我们以不加入抗体组荧光信号作为背景值,从而计算出相应抗体不同浓度下荧光信号增加的倍数。

[0099] 结果如图9所示。我们发现24G2比24G1和24C7有更强的ADCC作用,尤其是在较低浓度抗体水平下依旧能够维持其ADCC作用。

[0100] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 深圳市福田区格物智康病原研究所
 [0003] <120> 一种抗新型冠状病毒刺突蛋白的全人源单克隆抗体及其应用
 [0004] <130> 2021.04.28
 [0005] <160> 25
 [0006] <170> PatentIn version 3.3
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 8
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工合成
 [0011] <400> 1
 [0012] Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 [0013] 1 5
 [0014] <210> 2
 [0015] <211> 8
 [0016] <212> PRT
 [0017] <213> 人工合成
 [0018] <400> 2
 [0019] Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 [0020] 1 5
 [0021] <210> 3
 [0022] <211> 17
 [0023] <212> PRT
 [0024] <213> 人工合成
 [0025] <400> 3
 [0026] Ala Arg Gly Trp Val Val Pro Ala Ala Ile Pro Tyr Asn Trp Phe Asp
 [0027] 1 5 10 15
 [0028] Pro
 [0029] <210> 4
 [0030] <211> 124
 [0031] <212> PRT
 [0032] <213> 人工合成
 [0033] <400> 4
 [0034] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0035] 1 5 10 15
 [0036] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 [0037] 20 25 30
 [0038] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0039]	35	40	45
[0040]	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0041]	50	55	60
[0042]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[0043]	65	70	75
[0044]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0045]	85	90	95
[0046]	Ala Arg Gly Trp Val Val Pro Ala Ala Ile Pro Tyr Asn Trp Phe Asp		
[0047]	100	105	110
[0048]	Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0049]	115	120	
[0050]	<210> 5		
[0051]	<211> 6		
[0052]	<212> PRT		
[0053]	<213> 人工合成		
[0054]	<400> 5		
[0055]	Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
[0056]	1	5	
[0057]	<210> 6		
[0058]	<211> 3		
[0059]	<212> PRT		
[0060]	<213> 人工合成		
[0061]	<400> 6		
[0062]	Ala Ala Ser		
[0063]	1		
[0064]	<210> 7		
[0065]	<211> 5		
[0066]	<212> PRT		
[0067]	<213> 人工合成		
[0068]	<400> 7		
[0069]	Gln Gln Ser Glu Thr		
[0070]	1	5	
[0071]	<210> 8		
[0072]	<211> 103		
[0073]	<212> PRT		
[0074]	<213> 人工合成		
[0075]	<400> 8		
[0076]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0077]	1	5	10
			15

[0078] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 [0079] 20 25 30
 [0080] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0081] 35 40 45
 [0082] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0083] 50 55 60
 [0084] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0085] 65 70 75 80
 [0086] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Glu Thr Phe Gly Gln
 [0087] 85 90 95
 [0088] Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
 [0089] 100
 [0090] <210> 9
 [0091] <211> 8
 [0092] <212> PRT
 [0093] <213> 人工合成
 [0094] <400> 9
 [0095] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
 [0096] 1 5
 [0097] <210> 10
 [0098] <211> 8
 [0099] <212> PRT
 [0100] <213> 人工合成
 [0101] <400> 10
 [0102] Ile Asn Thr Tyr Asn Gly His Thr
 [0103] 1 5
 [0104] <210> 11
 [0105] <211> 15
 [0106] <212> PRT
 [0107] <213> 人工合成
 [0108] <400> 11
 [0109] Ala Arg Val Glu Ser Val Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Cys Asp Pro
 [0110] 1 5 10 15
 [0111] <210> 12
 [0112] <211> 122
 [0113] <212> PRT
 [0114] <213> 人工合成
 [0115] <400> 12
 [0116] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala

[0117]	1	5	10	15															
[0118]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr			
[0119]			20					25					30						
[0120]	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met			
[0121]			35					40					45						
[0122]	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Asn	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Val			
[0123]			50					55					60						
[0124]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr			
[0125]			65					70					75						80
[0126]	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[0127]						85					90					95			
[0128]	Ala	Arg	Val	Glu	Ser	Val	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Thr	Cys	Asp	Pro	Trp			
[0129]						100					105					110			
[0130]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
[0131]						115													120
[0132]	<210>	13																	
[0133]	<211>	6																	
[0134]	<212>	PRT																	
[0135]	<213>	人工合成																	
[0136]	<400>	13																	
[0137]	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr													
[0138]	1					5													
[0139]	<210>	14																	
[0140]	<211>	3																	
[0141]	<212>	PRT																	
[0142]	<213>	人工合成																	
[0143]	<400>	14																	
[0144]	Ile	Ala	Ser																
[0145]	1																		
[0146]	<210>	15																	
[0147]	<211>	9																	
[0148]	<212>	PRT																	
[0149]	<213>	人工合成																	
[0150]	<400>	15																	
[0151]	His	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ser	Pro	His	Thr										
[0152]	1																		5
[0153]	<210>	16																	
[0154]	<211>	107																	
[0155]	<212>	PRT																	

[0156] <213> 人工合成
 [0157] <400> 16
 [0158] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0159] 1 5 10 15
 [0160] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 [0161] 20 25 30
 [0162] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0163] 35 40 45
 [0164] Tyr Ile Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0165] 50 55 60
 [0166] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0167] 65 70 75 80
 [0168] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Tyr Ser Ser Pro His
 [0169] 85 90 95
 [0170] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0171] 100 105
 [0172] <210> 17
 [0173] <211> 8
 [0174] <212> PRT
 [0175] <213> 人工合成
 [0176] <400> 17
 [0177] Gly Tyr Thr Leu Ile Glu Leu Ser
 [0178] 1 5
 [0179] <210> 18
 [0180] <211> 8
 [0181] <212> PRT
 [0182] <213> 人工合成
 [0183] <400> 18
 [0184] Phe Asp Pro Glu Lys Gly Glu Thr
 [0185] 1 5
 [0186] <210> 19
 [0187] <211> 21
 [0188] <212> PRT
 [0189] <213> 人工合成
 [0190] <400> 19
 [0191] Ala Ala Ser Pro Ala Ile Tyr Ser Asn Tyr Pro Gln Thr Tyr Tyr Tyr
 [0192] 1 5 10 15
 [0193] Tyr Gly Met Asp Val
 [0194] 20

[0195] <210> 20
 [0196] <211> 128
 [0197] <212> PRT
 [0198] <213> 人工合成
 [0199] <400> 20
 [0200] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0201] 1 5 10 15
 [0202] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ile Glu Leu
 [0203] 20 25 30
 [0204] Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0205] 35 40 45
 [0206] Gly Gly Phe Asp Pro Glu Lys Gly Glu Thr Ile His Ala Gln Asn Phe
 [0207] 50 55 60
 [0208] Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 [0209] 65 70 75 80
 [0210] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0211] 85 90 95
 [0212] Ala Ala Ser Pro Ala Ile Tyr Ser Asn Tyr Pro Gln Thr Tyr Tyr Tyr
 [0213] 100 105 110
 [0214] Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [0215] 115 120 125
 [0216] <210> 21
 [0217] <211> 11
 [0218] <212> PRT
 [0219] <213> 人工合成
 [0220] <400> 21
 [0221] Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 [0222] 1 5 10
 [0223] <210> 22
 [0224] <211> 3
 [0225] <212> PRT
 [0226] <213> 人工合成
 [0227] <400> 22
 [0228] Lys Ile Ser
 [0229] 1
 [0230] <210> 23
 [0231] <211> 9
 [0232] <212> PRT
 [0233] <213> 人工合成

[0234] <400> 23
 [0235] Thr Gln Ala Thr Gln Phe Pro Trp Thr
 [0236] 1 5
 [0237] <210> 24
 [0238] <211> 112
 [0239] <212> PRT
 [0240] <213> 人工合成
 [0241] <400> 24
 [0242] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 [0243] 1 5 10 15
 [0244] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 [0245] 20 25 30
 [0246] Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 [0247] 35 40 45
 [0248] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 [0249] 50 55 60
 [0250] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0251] 65 70 75 80
 [0252] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Gln Ala
 [0253] 85 90 95
 [0254] Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0255] 100 105 110
 [0256] <210> 25
 [0257] <211> 19
 [0258] <212> PRT
 [0259] <213> 人工合成
 [0260] <400> 25
 [0261] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 [0262] 1 5 10 15
 [0263] Val His Ser

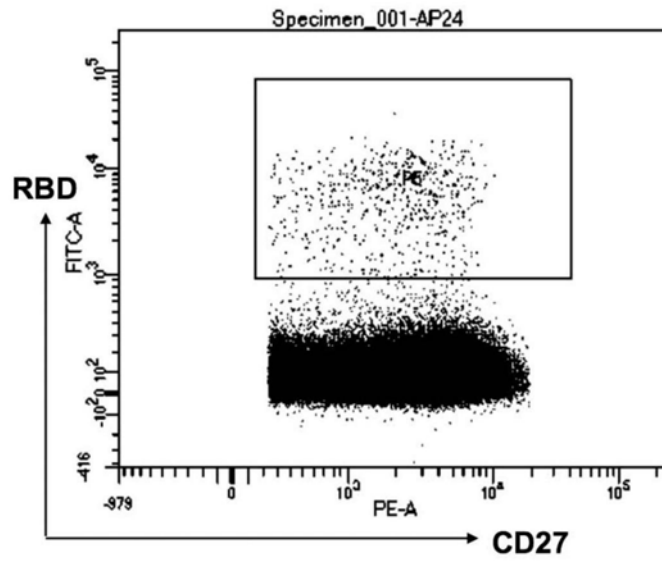


图1

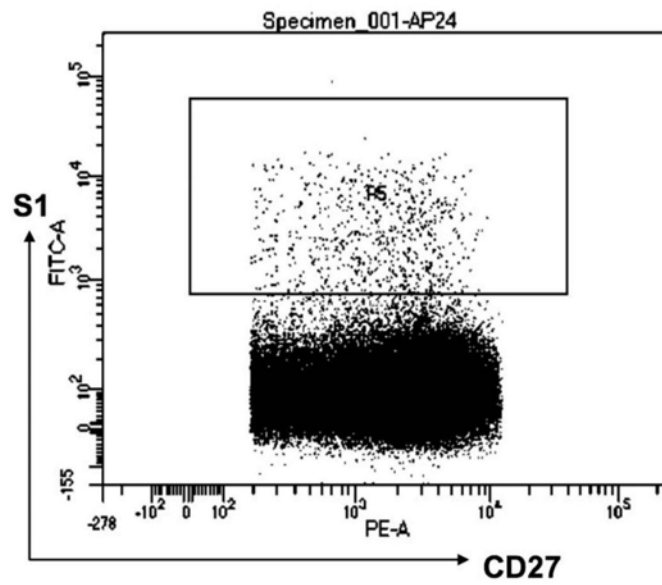


图2

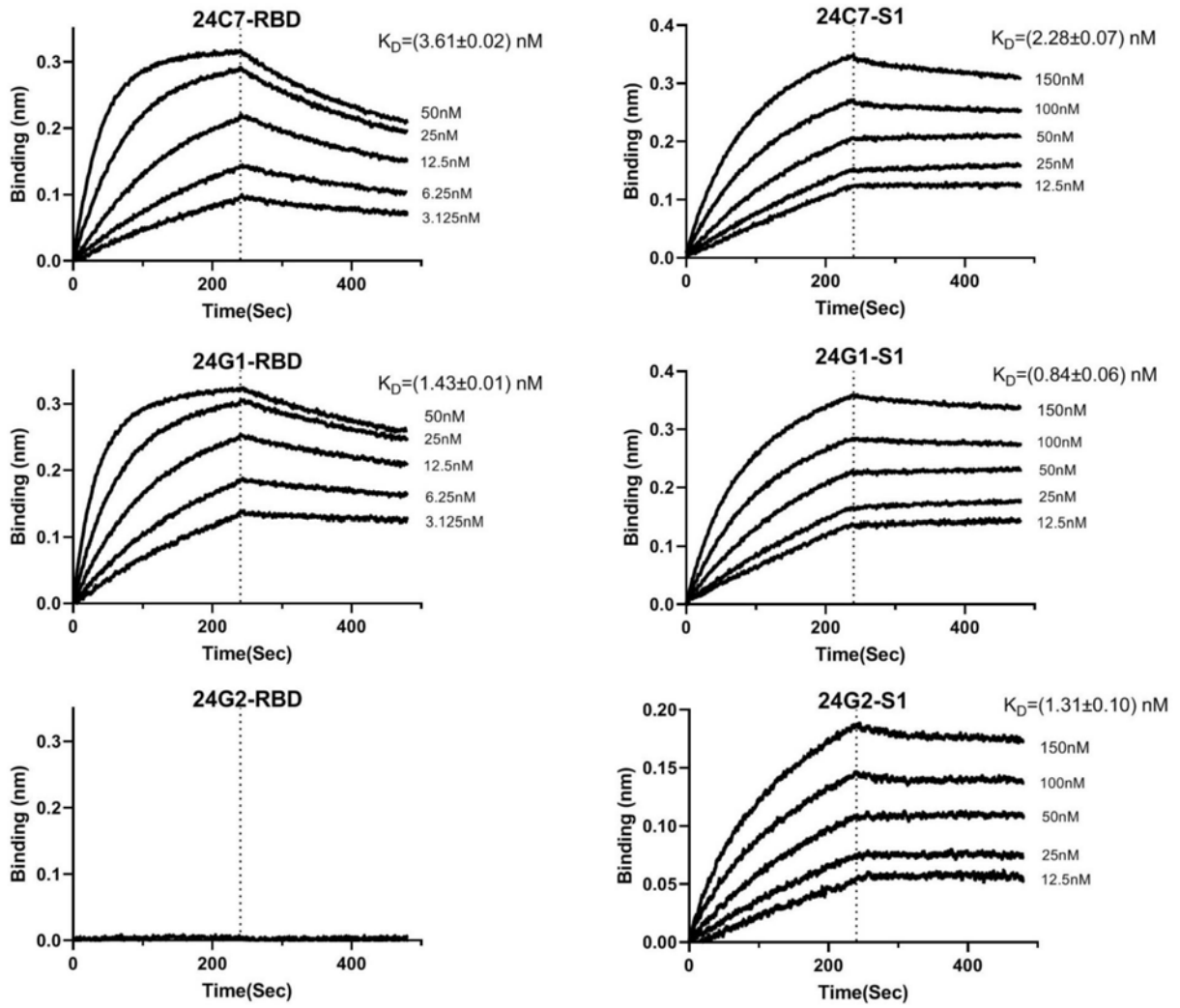


图3

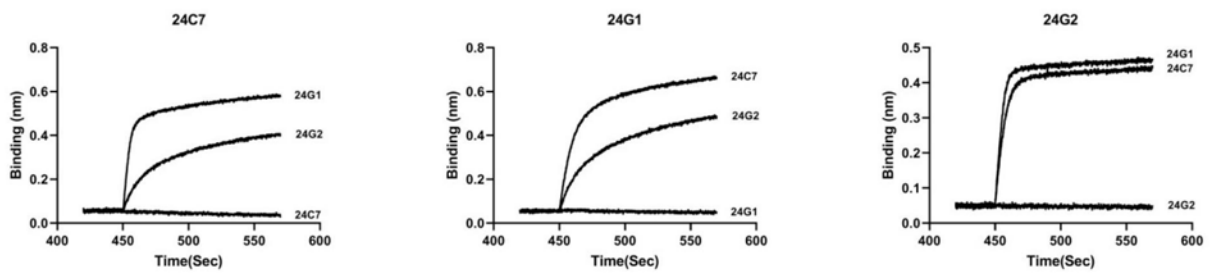


图4

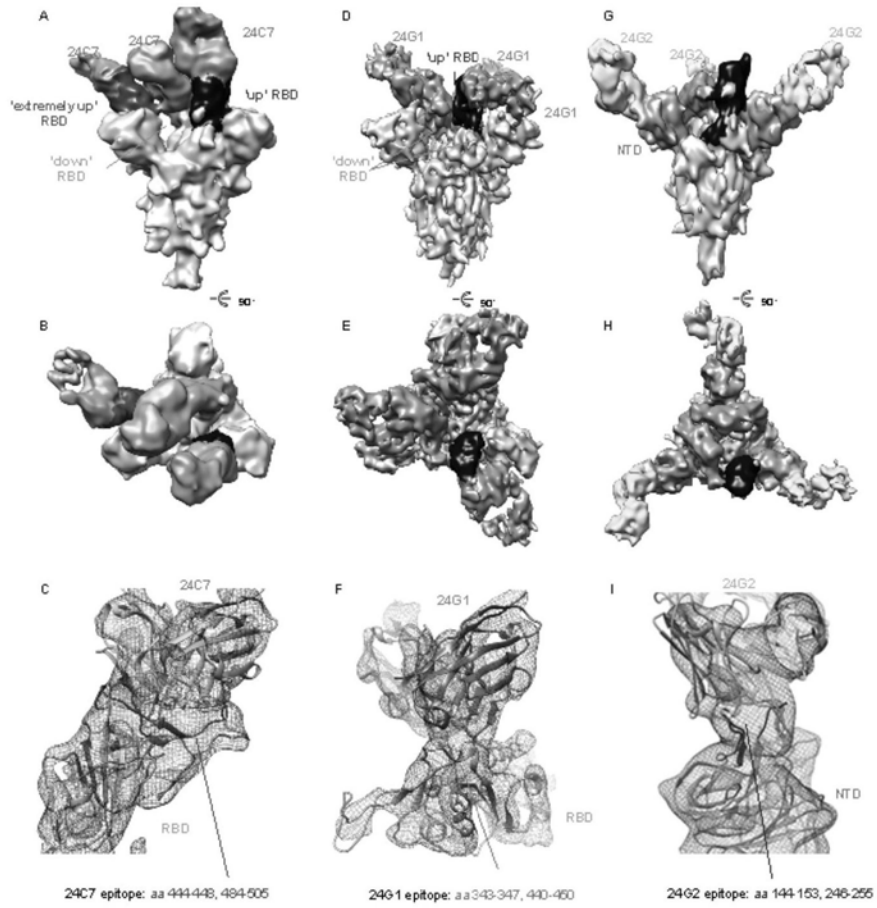


图5

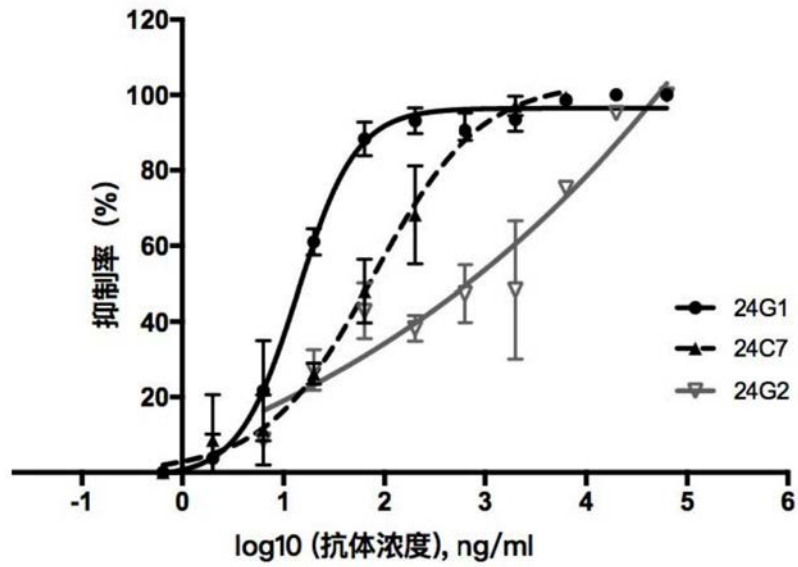


图6

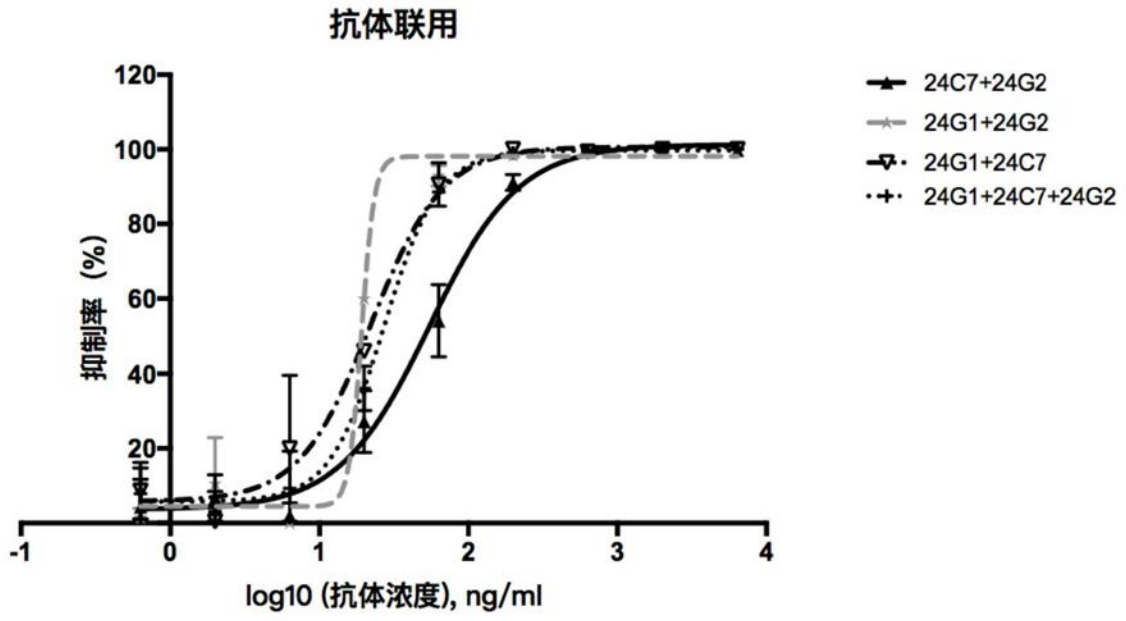


图7

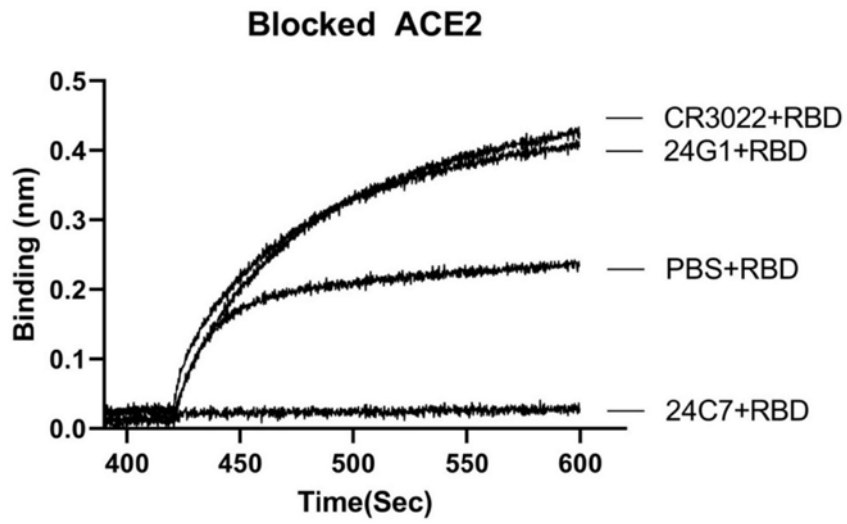


图8

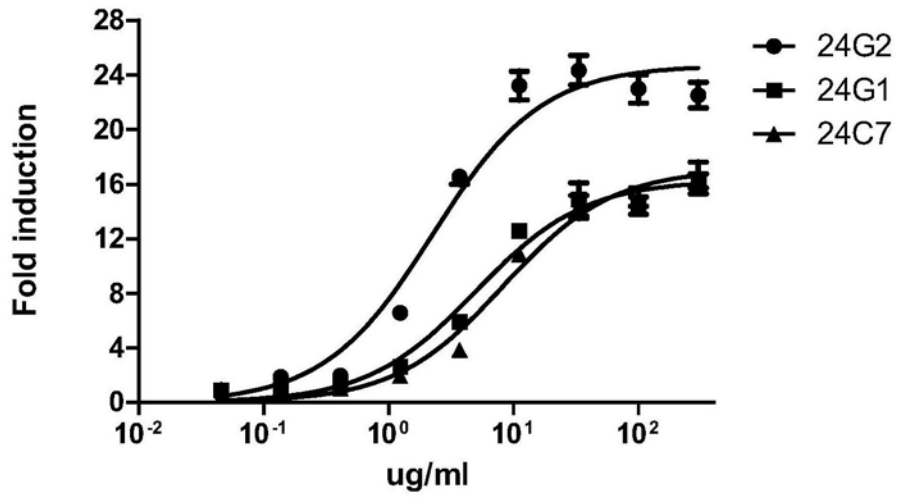


图9