



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113945714 A

(43) 申请公布日 2022.01.18

(21) 申请号 202110804532.0

(22) 申请日 2021.07.16

(66) 本国优先权数据

202010685450.4 2020.07.16 CN

(71) 申请人 南京蓬勃生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区雍熙路
28号4010室(江宁高新园)

(72) 发明人 王立豪 贾文双 魏照阳 郭剑鹏

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436

代理人 程淼

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

权利要求书2页 说明书12页
序列表15页 附图3页

(54) 发明名称

新型冠状病毒中和抗体类药物中和能力的
检测方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及新型冠状病毒中和抗体类药物中和能力的检测方法。本发明提供了一种检测样品中和新型冠状病毒能力的方法,运用新型冠状病毒S蛋白ECD和样品混合物与过表达人ACE2的HeLa细胞系进行Cell-based ELISA实验,最大限度地还原生理条件下新型冠状病毒与宿主细胞膜表面受体结合,更能准确反映所述样品中和新型冠状病毒结合受体的生物学活性,避免了使用病毒,大大增加了实验的安全性,减少实验复杂度和周期;该方法还能够通过严格控制检测方法实施过程中的各种变量,对结果进行定量分析,保证抗体类药物中和能力评估结果的稳定性。

1. 一种检测样品中和新型冠状病毒能力的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:
 - (1) 将标记物连接的新型冠状病毒刺突蛋白胞外结构域、样品与ACE2过表达的细胞系接触孵育;
 - (2) 获得步骤(1)孵育后的细胞,并将所述细胞与检测物质接触孵育,所述检测物质能与所述标记物反应产生检测信号;
 - (3) 通过检测步骤(2)产生的信号强弱确定所述样品中和新型冠状病毒的能力。
2. 根据权利要求1所述的方法,所述新型冠状病毒刺突蛋白胞外结构域包含与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少80%一致性的序列。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,所述步骤(1)中加入的新型冠状病毒刺突蛋白胞外结构域浓度为0.8-3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选为1.2-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,所述步骤(1)中的标记物选自His标签、Flag标签、c-Myc标签、HA标签、V5标签、HSV标签和生物素中的一种或多种,优选为His标签。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,所述步骤(1)中ACE2过表达的细胞系选自HEK293、HeLa、Vero E6或CHO,优选为ACE2过表达的HeLa细胞。
6. 根据权利要求5所述方法,加入的所述ACE2过表达的细胞系细胞浓度为 4×10^5 - 1×10^6 个细胞/ mL ,优选为 5×10^5 个细胞/ mL 。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,所述步骤(1)中接触培养包括在 18°C - 37°C 下孵育0.5-3小时,优选为室温下孵育1-2小时。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,所述步骤(2)中获得步骤(1)孵育后的细胞包括移除培养物上清和洗涤细胞步骤。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,所述步骤(2)中检测物质选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或吡啶化合物连接的抗标记物抗体。
10. 根据权利要求9所述的方法,所述标记物包含His标签,所述检测物质包含辣根过氧化物酶连接的抗His标签抗体。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,所述步骤(2)中接触孵育包括在 18°C - 37°C 下孵育0.5-1.5小时,优选为室温下孵育1小时。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,所述步骤(3)检测信号步骤包括移除步骤(2)孵育后细胞的上清,洗涤细胞,加入显色工作液孵育,再加入显色终止液,读取信号值。
13. 根据权利要求12所述的方法,所述显色工作液包括TMB过氧化物酶底物和过氧化物酶底物溶液B,所述显色终止液包括磷酸溶液。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,所述样品为抗新型冠状病毒抗体类药物。
15. 一种检测样品中和新型冠状病毒能力的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括标记物连接的新型冠状病毒刺突蛋白胞外结构域、ACE2过表达的细胞系以及能与所述标记物反应产生信号的检测物质,其中,所述ACE2过表达的细胞系为贴壁细胞系。
16. 根据权利要求15所述的方法,所述新型冠状病毒刺突蛋白胞外结构域包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少80%一致性的序列。
17. 根据权利要求15-16中任一项所述的检测试剂盒,所述标记物包含His标签,所述检测物质包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或吡啶化合物连接的抗His标签抗体。
18. 根据权利要求15-17中任一项所述的检测试剂盒,所述ACE2过表达的细胞系选自

HEK293、HeLa、Vero E6或CHO,优选为ACE2过表达的HeLa细胞。

19.根据权利要求18所述的检测试剂盒,所述ACE2过表达的细胞系的细胞浓度为 4×10^5 - 1×10^6 个细胞/mL,优选为 5×10^5 个细胞/mL。

20.根据权利要求15-19任一项所述的检测试剂盒,所述固相支持物为微孔板、微孔管、磁颗粒、微珠或塑料珠。

新型冠状病毒中和抗体类药物中和能力的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及新型冠状病毒中和抗体类药物中和能力快速检测方法。

背景技术

[0002] 根据中国国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)发布的《新型冠状病毒中和抗体类药物技术资料要求(药学)(征求意见稿)》^[1],目前对于新型冠状病毒中和抗体类药物体外生物学活性的检测方法包括:与新型冠状病毒相关蛋白的特异性结合活性,ACE2竞争结合活性,新型冠状病毒/假病毒中和或阻断生物学活性等。《要求》特别指出,“评价中和抗体中和新型冠状病毒的能力及特异性非常重要,应在分子筛选阶段确认抗体对新型冠状病毒的中和能力”,而显然与新型冠状病毒相关蛋白(如S蛋白受体结合域,以下简称RBD)的特异性结合活性检测实验并不能有效反映生理状态下中和抗体中和新型冠状病毒的能力。新型冠状病毒中和活性检测无可避免地需要使用活体新型冠状病毒,必须在经国家卫健委备案的P3(Protection 3)实验室中进行实验操作,且必须对实验人员进行严格的安全操作培训,因此只有少数实验室能获得相应资质,无法大范围推广。即使是假病毒中和抗体检测方法^[2],也要求在P2(Protection 2)实验室中进行实验操作,实验通常要持续大于一周的时间,且由于制备的病毒活性难以保持一致,必然导致方法稳定性受限,难以作为药物生产和质量控制(简称CMC)阶段的质量放行方法。

[0003] 根据我们的文献调研,目前只有血管紧张素转化酶2(ACE2)竞争结合活性检测实验可以满足作为新型冠状病毒中和抗体类药物中和活性的质量放行方法的要求,且实验周期短,无需专门的P2实验室,具有较广的应用范围。但是却没有相应的方法可以准确、稳定地定量衡量中和抗体的中和活性,因此需要开发稳定的ACE2竞争结合活性检测实验方法,以用于抗体药物CMC阶段的质量放行检测。

[0004] 综上所述,目前尚未找到相关中和活性检测方法的报道,满足实验易操作性、高通量和快速检测的同时,还能兼顾生理条件的重现性和方法的稳定性。

发明内容

[0005] 为解决上述问题,我们通过基于过表达ACE2的HeLa细胞和细胞为基础的ELISA实验,建立了一种用于评价新型冠状病毒中和抗体类药物中和能力的快速检测方法。

[0006] 一方面,本发明提供了一种检测样品中和新型冠状病毒能力的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

[0007] (1) 将标记物连接的新型冠状病毒刺突蛋白(S)胞外结构域(ECD)、样品与ACE2过表达的细胞系接触孵育;

[0008] (2) 获得步骤(1)孵育后的细胞,并将所述细胞与检测物质接触孵育,所述检测物质能与所述标记物反应产生检测信号;

[0009] (3) 通过检测步骤(2)产生的信号强弱确定所述样品中和新型冠状病毒的能力。

[0010] 在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少80%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或者100%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少90%一致性的序列。在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少95%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少96%一致性的序列。在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少97%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少98%一致性的序列。在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少99%一致性的序列。在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括SEQ ID NO:1或4所示的氨基酸序列。在一个具体实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或4所示。

[0011] 在一些实施方案中,所述步骤(1)中加入的标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD浓度为0.8-3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选为1.2-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD浓度为0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在一些优选实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD浓度为1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在一个具体实施方案中,所述步骤(1)中加入的新型冠状病毒S蛋白ECD浓度为1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0012] 在一些实施方案中,所述步骤(1)中的标记物选自His标签、Flag标签、c-Myc标签、HA标签、V5标签、HSV标签和生物素中的一种或多种,优选为His标签。在一些具体的实施方案中,所述步骤(1)中的标记物为His标签和Flag标签。

[0013] 在一些实施方案中,所述步骤(1)中ACE2过表达的细胞系选自HEK293、HeLa、Vero E6或CHO,优选为ACE2过表达的HeLa细胞系。在一些具体的实施方案中,所述步骤(1)中ACE2过表达的细胞系为ACE2过表达的HeLa细胞系。

[0014] 在一些实施方案中,加入的所述ACE2过表达的细胞系的细胞浓度为 4×10^5 - 1×10^6 个细胞/mL,优选为 5×10^5 个细胞/mL。在另一些实施方案中,加入的所述ACE2过表达的细胞系的细胞浓度为 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 或 1×10^6 个细胞/mL。在一个具体的实施方案中,加入的所述ACE2过表达的细胞系的细胞浓度为 5×10^5 个细胞/mL。

[0015] 在一些实施方案中,所述步骤(1)中接触孵育包括在18 $^{\circ}\text{C}$ -37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育0.5-3小时,优选为室温下孵育1-2小时。在一些具体的实施方案中,所述步骤(1)中接触孵育包括在室温下孵育1-2小时。

[0016] 在一些实施方案中,所述步骤(2)中获得步骤(1)孵育后的细胞包括移除孵育后细胞上清和洗涤细胞步骤。所述孵育后细胞上清和洗涤细胞步骤包括移除步骤(1)接触孵育后的细胞上清液,加入实验室缓冲液洗涤,移除实验室缓冲液。其中,所述实验室缓冲液为含1%FBS的PBS溶液。

[0017] 在一些实施方案中,所述步骤(2)中检测物质选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或吡啶化合物连接的抗标记物抗体。在另一些实施方案中,所述步骤(2)中检测物质选自辣根过氧化物酶连接的链霉亲和素(识别生物素)。本发明中抗标记物抗体选自抗标签蛋白抗体,如抗His标签抗体、抗Flag标签抗体、抗c-Myc标签抗体、抗HA标签抗体、抗V5标签抗体或抗HSV标签抗体。

[0018] 在一些实施方案中,所述标记物包含His标签,所述检测物质包含辣根过氧化物酶连接的抗His标签抗体。

[0019] 在一些实施方案中,所述步骤(2)中接触孵育包括在18℃-37℃下孵育0.5-1.5小时,优选为室温下孵育1小时。在一些具体实施方案中,所述步骤(2)中接触孵育包括在室温下孵育1小时。

[0020] 在一些实施方案中,所述步骤(3)检测信号步骤包括移除步骤(2)孵育后细胞的上清,洗涤细胞,加入显色工作液孵育,再加入显色终止液,读取信号值。

[0021] 在一些实施方案中,所述显色工作液包括TMB过氧化物酶底物和过氧化物酶底物溶液B,所述显色终止液包括磷酸溶液。

[0022] 在一些实施方案中,所述样品为抗新型冠状病毒抗体类药物。在一些具体实施方案中,所述样品为抗新型冠状病毒的融合蛋白或抗新型冠状病毒的抗体。在一个具体实施方案中,所述样品为ACE2-Fc融合蛋白。在另一个具体实施方案中,所述样品为抗新型冠状病毒单克隆抗体、抗体片段或双特异性抗体。参考国家药品监督管理局药品审评中心发布的《新型冠状病毒中和抗体类药物技术资料要求(药学)(征求意见稿)》,本发明所述新冠抗体类药物包括但不限于单克隆抗体、抗体片段、Fc融合蛋白、双特异性抗体等,如ACE2-Fc融合蛋白。本发明的样品可以来源于生物学方法制备的抗新型冠状病毒的抗体或融合蛋白,也可以是新型冠状病毒免疫的受试者、动物(如小鼠、兔等)获得的血清、血浆或全血。

[0023] 本发明的一些具体实施方案中,所述步骤(1)包括将0.8-3.2μg/mL含有标记物的新型冠状病毒S蛋白ECD、样品与浓度为 4×10^5 - 1×10^6 个细胞/mL的ACE2过表达的细胞,在18℃-37℃下接触培养0.5-3小时。

[0024] 在本发明的一些具体实施方案中,所述步骤(2)包括移除步骤(1)中的细胞孵育物上清液,洗涤细胞,并将所述细胞与偶联了辣根过氧化物酶的抗标记物抗体在18℃-37℃下孵育0.5-1.5小时。

[0025] 在本发明的一些具体实施方案中,所述步骤(3)包括移除步骤(2)孵育后细胞的上清,洗涤细胞,加入TMB过氧化物酶底物和过氧化物酶底物溶液B孵育后,再加入磷酸溶液,读取信号值。

[0026] 本发明中所述步骤(1)中可以先将标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD和样品混合物与ACE2过表达的细胞进行孵育,或者先加入样品与ACE2过表达的细胞孵育,再加入标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD进行孵育。

[0027] 在本发明的一些具体实施方案中,所述方法包括:步骤(1):将0.8-3.2μg/mL含有标记物的新型冠状病毒S蛋白ECD、样品与浓度为 4×10^5 - 1×10^6 个细胞/mL的ACE2过表达的细胞,在18℃-37℃下接触培养0.5-3小时;步骤(2):移除步骤(1)中的细胞孵育物上清液,洗涤细胞,并将所述细胞与偶联了辣根过氧化物酶的抗标记物抗体在18℃-37℃下孵育0.5-1.5小时;和步骤(3):移除步骤(2)孵育后细胞的上清,洗涤细胞,加入显色物质,读取

信号值。

[0028] 在本发明的另一些具体实施方案中,所述方法包括:步骤(1):将1.2-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有His标签的新型冠状病毒S蛋白ECD、样品与浓度为 4×10^5 - 1×10^6 个细胞/ mL 的ACE2过表达的HeLa细胞,在 18°C - 37°C 下接触培养0.5-3小时;步骤(2):移除步骤(1)中的细胞孵育物上清液,洗涤细胞,并将所述细胞与偶联了辣根过氧化物酶的抗His标记物抗体在 18°C - 37°C 下孵育0.5-1.5小时;和步骤(3):移除步骤(2)孵育后细胞的上清,洗涤细胞,加入TMB过氧化物酶底物和过氧化物酶底物溶液B孵育后,在 18°C - 37°C 下孵育10-30分钟,再加入磷酸溶液,读取信号值。

[0029] 在本发明的一个具体实施方案中,所述方法包括:步骤(1):将1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有His标签的新型冠状病毒S蛋白ECD和样品混合物与浓度为 5×10^5 个细胞/ mL 的ACE2过表达的HeLa细胞,在室温下接触培养1-2小时;步骤(2):去除步骤(1)中的细胞培养物上清液,洗涤细胞,并将所述细胞与偶联了辣根过氧化物酶的抗His标记物抗体在室温下孵育1小时;和步骤(3):移除步骤(2)孵育后细胞的上清,洗涤细胞,加入TMB过氧化物酶底物和过氧化物酶底物溶液B孵育后,室温孵育10-30分钟,再加入磷酸溶液,读取信号值。

[0030] 另一方面,本发明还提供了一种检测样品中和新型冠状病毒能力的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD、ACE2过表达的细胞系以及能与所述标记物反应产生信号的检测物质,其中,所述ACE2过表达的细胞系为贴壁细胞。

[0031] 在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少80%的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或者100%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少90%一致性的序列。在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少95%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少96%一致性的序列。在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少97%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少98%一致性的序列。在一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括与SEQ ID NO:1或4所示氨基酸序列至少99%一致性的序列。在另一些实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括SEQ ID NO:1或4所示的氨基酸序列。在一个具体实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或4所示。

[0032] 在一些实施方案中,所述标记物包含His标签,所述检测物质包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或吡啶化合物连接的抗His标签抗体。

[0033] 在一些实施方案中,所述ACE2过表达的细胞系的细胞浓度为 4×10^5 - 1×10^6 个细胞/ mL ,优选为 5×10^5 个细胞/ mL 。

[0034] 在一些实施方案中,所述ACE2过表达的细胞系选自HEK293、HeLa、Vero E6或CHO,优选为ACE2过表达的HeLa细胞。

[0035] 在一些实施方案中,所述固相支持物为微孔板、微孔管、磁颗粒、微珠或塑料珠。在一个具体实施方案中,所述固相支持物为微孔板。固相载体原料一般有聚苯乙烯、尼龙、硝

基纤维素、聚乙烯醇等。

[0036] 本发明检测新型冠状病毒抗体的原理在于,将过表达ACE2的细胞系铺板,加入标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD和样品混合物进行孵育,或者先加入样品与细胞孵育,再加入标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD孵育。在此过程中,过表达ACE2的细胞中过表达的ACE2蛋白会与标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD结合,随后加入与所述标记物反应的检测抗体进行孵育,前述每一步孵育后均通过洗涤除去游离的反应物,最后加入可以使检测物质显色的工作液,当过表达ACE2的细胞与标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD的结合时,会发生显色反应;当样品(中和抗体类药物,如ACE2-Fc融合蛋白)与标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD结合时,该结合物会被洗涤去除,显色反应会被抑制或不会发生显色反应。通过测定显色物质的信号强弱即可反映样品抑制标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD与过表达ACE2的细胞的结合情况。本发明中所述信号强弱具体是指光密度的高低,通过测量光密度的高低可以定性和定量所述样品中和新型冠状病毒的能力。定性判断的具体方法为:当测得的光密度高时,说明样品与标记物连接的新型冠状病毒S蛋白ECD的结合能力差,即样品中和新型冠状病毒的能力弱;当测得的光密度低时,说明样品与新型冠状病毒S蛋白ECD的结合能力强,即样品中和新型冠状病毒的能力强;定量判断的具体方法为:使用分析软件,基于信号值和浓度的对数值,拟合量效曲线,拟合参数为四参数拟合(4P-Fit),得到每条曲线的半数有效浓度(EC₅₀),下渐近线(Bottom),上渐近线(Top),斜率(HillSlope),窗口(Span),LogEC₅₀等参数;

[0037] $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}})$

[0038] 根据对照品和样品的拟合曲线记录各参数值,计算样品的相对活性:

[0039] 相对活性(%) = (对照品EC₅₀值/样品EC₅₀值) × 100%

[0040] 其他计算公式分别如下:

[0041] 相对活性均值计算公式:

[0042]
$$\text{Mean} = \frac{\sum x}{n}$$

[0043] 标准偏差(SD)计算方法:

[0044]
$$\text{SD} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

[0045] 变异系数(CV)或相对标准偏差(RSD)的计算方法:

[0046] $\text{CV}(\%) = (\text{标准偏差} / \text{平均值}) \times 100\%$

[0047] 本发明提供一种检测样品中和新型冠状病毒能力的方法,特别地,该方法使用新冠病毒S蛋白的膜外区域(ECD)取代新冠病毒/假病毒/RBD,最大限度地还原生理条件下新冠病毒与宿主细胞膜表面受体的结合,同时避免了病毒的使用,大大增加了实验的安全性,减少实验复杂度和周期;其次,该方法使用过表达人ACE2的HeLa细胞系代替人ACE2蛋白包板进行Cell-based ELISA实验,对生理条件下ACE2受体的构象还原度更高,因此检测得到的中和抗体相对活性更能准确反映抗体中和新冠病毒结合受体的生物学活性;除此之外,本发明的检测方法可以通过Cell-based ELISA实验严格控制检测方法实施过程中的各种变量,包括相关蛋白的浓度和活性,HeLa/ACE2细胞系的铺板密度等,对结果进行定量分

析,保证了抗体中和能力评估结果的稳定性。

[0048] 本发明提供的检测样品中和新型冠状病毒能力的方法,具有如下所述的有益技术效果:

[0049] 1.使用新型冠状病毒S蛋白的膜外全长(新型冠状病毒S蛋白ECD)来代替受体结合域RBD,与使用RBD的技术相比更接近病毒侵染细胞的真实生理状态,更能准确反映药物阻断病毒与宿主细胞受体结合的生理过程。

[0050] 2.使用新型冠状病毒S蛋白的膜外全长(新型冠状病毒S蛋白ECD)代替新型冠状病毒/假病毒,与现有的病毒/假病毒中和实验相比实验周期短,操作简单,且在普通实验室中即可进行,无需P2/P3实验室。

[0051] 3.使用稳定过表达ACE2受体的HeLa细胞系,受体表达量高,且比现有技术使用ACE2蛋白铺板更能反映受体的天然构象,因此对药物阻断病毒与受体结合的生理过程的模拟更

[0052] 4.基于稳定的Cell-based ELISA方法,实验重复性强,能够准确反映中和抗体类药物的生物学活性,能够用于药物生产过程中的放行检测。

[0053] 名词解释:

[0054] 术语“新型冠状病毒”(SARS-CoV-2),亦称为2019-nCoV,是指2019年12月最先报告的引起不明原因肺炎的致病微生物,其属于 β 属冠状病毒,有包膜,病毒颗粒呈圆形或椭圆形,直径为60-140nm。其基因组与非典(SARS-CoV-1)的基因组相似度仅为80%,而与从中菊头蝠(*Rhinolophus affinis*)分离得到的冠状病毒(*Bat coronavirus RaTG13*)基因序列相似度高达96%。

[0055] 术语“新型冠状病毒S蛋白ECD”是指新型冠状病毒颗粒表面的刺突蛋白(Spike protein)的膜外结构域(Ectodomain,ECD)。本发明中所述新型冠状病毒S蛋白ECD包括新型冠状病毒的受体结合区域(receptor binding domain,RBD),RBD结构域是与人ACE2(血管紧张素转化酶2)受体的相互作用位点,在病毒的侵染过程中发挥着重要作用。在一些具体实施方案中,所述新型冠状病毒S蛋白ECD包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0056] 本发明中“ACE2”或“ACE2蛋白”可以体现为重组ACE2蛋白,可以体现为可溶性ACE2蛋白,可以体现为Fc标签ACE2蛋白。本发明中ACE2过表达的细胞系是指通过本领域常规的重组表达的方法生产进行细胞表面的ACE2蛋白的表达。在一些实施方案中,所述ACE2包含SEQ ID NO:2或3所示的氨基酸序列。

[0057] 术语“中和”是指样品与SARS-CoV-2病毒的S蛋白结合阻止其与细胞膜黏附,融合和进入细胞的过程。本文所用的术语“中和抗体”指通过与病毒分子结合防止细胞被某种抗原或感染源侵害的抗体,其原理是通过抑制乃至中和它们的某种生化作用。

[0058] 关于“百分比(%)一致性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。可以本领域技术范围内的多种方式进行序列对比以测定百分比氨基酸序列同一性,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megaalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定测量对比的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大对比所需的任何算法。

[0059] 术语“EC50”亦称为半最大效应浓度,是指能引起50%最大效应的浓度。

[0060] 术语“IC50”亦称为半最大抑制浓度,是指能引起50%最大抑制效果的浓度。

附图说明

[0061] 图1为新型冠状病毒中和抗体类药物中和活性ELISA检测原理示意图。(A) His-ECD蛋白与HeLa/ACE2细胞结合活性示意图。(B) 加入ACE2-Fc融合蛋白(指代中和抗体类药物)后,中和效果ELISA检测原理示意图;

[0062] 图2为RBD/ECD与HeLa/ACE2细胞结合的量效曲线;

[0063] 图3为ACE2-Fc融合蛋白中和ECD与HeLa/ACE2细胞结合量效曲线,图3a为第一次实验,图3b为第二次实验;图3c为第三次实验。

具体实施方式

[0064] ELISA是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术。由于抗原、抗体的反应在一种固相载体——聚苯乙烯微量滴定板的孔中进行,每加入一种试剂孵育后,可通过洗涤除去多余的游离反应物,从而保证试验结果的特异性与稳定性。在本项目中,通过接种过表达ACE2的HeLa细胞,加入梯度稀释的中和抗体类药物(如ACE2-Fc融合蛋白)与固定浓度的新型冠状病毒ECD蛋白混合溶液,最后通过检测试剂来评价上述药物(如ACE2-Fc融合蛋白)中和新型冠状病毒ECD蛋白与靶细胞的结合能力。

[0065] 根据前期预实验结果初步确定的实验参数调整新型冠状病毒ECD蛋白的浓度,进行实验参数优化。根据初步确定的实验参数,由不同实验人员进行重复实验,初步确认实验参数,以建立新型冠状病毒抗体类药物中和活性的评价方法。实验原理如图1所示,将过表达ACE2的HeLa细胞系铺板,依次加入His-ECD蛋白和样品混合物、偶联辣根过氧化物酶(HRP)的anti-His检测抗体以及反应底物,每一步孵育后均通过洗涤除去游离的反应物,则最终通过催化产生有色底物所测得的光密度值即可反映ECD蛋白与ACE2受体的结合情况。若控制ECD蛋白的浓度,即可准确测定中和抗体类药物(ACE2-Fc融合蛋白)中和ECD蛋白与ACE2受体相互作用的活性,达到定量衡量中和抗体中和活性的目的。

[0066] 实施例1.ACE2单过表达HeLa细胞系构建

[0067] 人ACE2蛋白的DNA序列进行基因合成后,同时利用相同限制性内切酶酶切质粒载体pLVX-Puro(Clontech,Cat.No.632164),酶切后获得的ACE2-Flag蛋白ORF DNA片段(编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示)和带有粘性末端的质粒载体片段,使用Genscript的CloneEZ™PCR克隆试剂盒进行连接,转化大肠杆菌感受态细胞,获得质粒pLVX-Puro-ACE2。

[0068] 慢病毒生产:将HEK293T细胞用胰酶消化,重悬后加入10%FBS的DMEM中,铺6-10×10⁶HEK293T/培养皿(10cm)。每个培养皿按照7-10μg pPAX2,5-8μg pMD2.G-VSV-G和9-13μg pLVX-Puro-ACE2转染,将Lipofectamine 3000(Thermo Fisher,Cat.No.L3000001)与三种质粒混合加入培养皿中。转染后6-8小时换新鲜培养液。转染后48-56小时收集病毒上清,收集后以0.45μm滤器过滤,超速离心。将病毒沉淀用500μl新鲜培养基重悬,置于-80℃保存。

[0069] 感染靶细胞:将HeLa细胞铺至12孔板,细胞数以第二天达到50%为宜,培养过夜。准备完全培养基和Polybrene(Sigma,Cat.No.H9268-10G)混合物,Polybrene终浓度为3-6μg/ml。移去培养基并添加0.5ml Polybrene/培养基混合物于每孔中。感染前,从冰箱取出并

融化病毒,吸去细胞原有培养基,加入1/2体积新鲜培养基,再将病毒原液加入HeLa细胞中混匀。感染后第二天(约24小时),吸去含病毒的培养液,换上新鲜的完全培养液,继续37℃培养。

[0070] 嘌呤霉素(Puromycin)抗性筛选:细胞培养基中加入1-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin,2-3天换含Puromycin的完全培养液一次,至不感染筛选对照组细胞被Puromycin杀光。连续筛选至获得稳定细胞株。

[0071] FACS检测ACE2-Flag表达:取一部分获得的稳定细胞至FACS管中,离心去掉上清。加入4%多聚甲醛室温固定20分钟。20分钟后去上清,加入BD Fixation/Permeabilization (BD Biosciences, Cat.No.554714) 4℃孵育20分钟。20分钟后洗掉上清,加入PE anti-DYKDDDDK Tag Antibody (Biolegend, Cat.No.637310) 孵育30分钟。30分钟后洗去上清,重悬在FACS缓冲液,上机检测ACE2表达水平,筛选到ACE2高表达的细胞。再对高表达ACE2的细胞进行单克隆挑选(具体步骤如下),筛选出单克隆细胞株。高表达ACE2的单克隆扩大培养直至建立稳定的细胞株。

[0072] 单克隆挑选:将细胞池极限稀释至96孔板中,7天后显微镜下观察96孔板,并标记出有单克隆的孔。单克隆细胞转移至24孔板中,随后扩大至6孔板。

[0073] 实施例2.ECD与HeLa/ACE2结合实验

[0074] 2.1试剂配制:

[0075] 样品工作液:His-RBD样品(Cat.No.Z03479-1)和His-ECD样品(Cat.No.Z03481-1)均由GenScript合成。在实验开始前,使用实验缓冲液(含有1%FBS的PBS溶液,下同)将His-RBD样品和His-ECD样品分别梯度稀释至表1所示浓度以配制样品工作液,并置于4℃备用。

[0076] 表1.His-RBD样品工作液和His-ECD样品工作液分别进行梯度稀释的浓度

	His-RBD样品	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	His-ECD样品	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
[0077]	浓度1	20	浓度1	20
	浓度2	4	浓度2	4
[0078]	浓度3	0.8	浓度3	0.8
	浓度4	0.16	浓度4	0.16
	浓度5	0.032	浓度5	0.032
	浓度6	0.0064	浓度6	0.0064
	浓度7	0.00128	浓度7	0.00128
	浓度8	0.000256	浓度8	0.000256

[0079] 检测抗体工作液:检测抗体使用THETM His Tag Antibody [HRP], mAb, Mouse (GenScript, Cat.No.A00612), 储液浓度为0.5mg/mL, 用实验缓冲液稀释500倍, 以配制检测抗体工作液。

[0080] 显色工作液:将TMB过氧化物酶底物和过氧化物酶底物溶液B (KPL, Cat.No.50-76-00) 取出并恢复室温, 按1:1的配比混合均匀以配制显色工作液。

[0081] 2.2实验步骤

[0082] 使用2mL StemPro Accutase (Gibco, Cat.No.A1105-01) 消化收集实施例1制备的ACE2高表达HeLa细胞系, 重悬细胞并计算细胞数量及活率, 用完全培养基稀释细胞悬液至

细胞密度为500,000cells/mL。转移100 μ L细胞悬液至96孔细胞培养板的相应孔中,将酶标板转移至细胞培养箱中孵育过夜贴壁(37 $^{\circ}$ C,通入5%CO₂,培养时间12~18小时)。从细胞培养箱中取出酶标板,除尽剩余上清液。转移300 μ L实验缓冲液至相应孔中,混匀孔内液体后,移除洗板缓冲液,重复2~3次。转移50~100 μ L样品工作液至相应孔中,室温孵育1~2小时。

[0083] 取出酶标板,移除上清液并除尽剩余液体。用300 μ L实验缓冲液洗板3次。转移100 μ L检测抗体工作液至相应孔中,室温孵育约1小时。取出酶标板,移除上清液并除尽剩余液体。用300 μ L实验缓冲液洗板3次。转移100 μ L显色工作液至相应孔中,室温孵育10~30分钟。完成孵育后,转移100 μ L显色终止液(2M磷酸溶液,下同)至相应孔中以终止显色。

[0084] 使用酶标仪读取光密度信号值。检测波长和参比波长分别选择450nm和630nm,实验原始数据为检测波长读取信号值和参比波长信号值的差值。分析实验数据,拟合量效曲线。

[0085] 2.3实验结果

[0086] 根据上述实验步骤进行ECD与HeLa/ACE2的结合实验,测得的病毒RBD蛋白和ECD蛋白分别与HeLa/ACE2细胞结合的量效曲线如图2所示。结果显示,病毒RBD蛋白和ECD蛋白同HeLa/ACE2细胞结合能力有较大差异,并同时分别得到了RBD和ECD与细胞结合的EC₅₀,分别为0.0813 μ g/mL和1.632 μ g/mL。考虑到ECD比RBD能够更好地模拟生理状态下的新型冠状病毒S蛋白结构,因此我们选取ECD的EC₅₀浓度用于中和实验ECD的蛋白浓度。

[0087] 实施例3.新型冠状病毒中和抗体类药物中和ECD与HeLa/ACE2结合实验

[0088] 3.1试剂配置:

[0089] 中和样品工作液:使用实验缓冲液将His-ECD储液稀释至3.2 μ g/mL(1:1稀释后即实施例2中获得的EC₅₀浓度)以配制His-ECD工作液,将ACE2-Fc融合蛋白(GenScript, Cat.No.Z03484-1)样品梯度稀释至表2所示浓度以配制样品工作液,His-ECD工作液和对应浓度的ACE2-Fc融合蛋白样品工作液按1:1体积比混合以配制中和样品工作液。

[0090] 表2.中和样品工作液中的His-ECD的浓度和对应的ACE2-Fc融合蛋白的浓度梯度

中和样品工作液终浓度	His-ECD终浓度 (μ g/mL)	ACE2-Fc融合蛋白终浓度 (μ g/mL)
浓度1	1.60	160
浓度2	1.60	40
浓度3	1.60	10
浓度4	1.60	2.5
浓度5	1.60	0.625
浓度6	1.60	0.1562
浓度7	1.60	0.03906
浓度8	1.60	0.009766

[0091] 检测抗体工作液:同实施例2.1的试剂配置方法;

[0092] 显色工作液:同实施例2.1的试剂配置方法。

[0093] 3.2实验步骤

[0094] 使用2mL StemPro Accutase(Gibco,Cat.No.A1105-01)消化收集实施例1制备的ACE2高表达HeLa细胞系,重悬细胞并计算细胞数量及活率,用完全培养基稀释细胞悬液至

细胞密度为500,000cells/mL。转移100 μ L细胞悬液至96孔细胞培养板的相应孔中,将酶标板转移至细胞培养箱中孵育过夜贴壁(37 $^{\circ}$ C,通入5%CO₂,培养时间12~18小时)。从细胞培养箱中取出酶标板,除尽上清液。转移300 μ L实验缓冲液至相应孔中,混匀孔内液体后,移除洗板缓冲液并除尽剩余液体,重复2~3次。转移100 μ L中和样品工作液至相应孔中,室温孵育1~2小时。

[0096] 取出酶标板,移除上清液以除尽剩余液体。用300 μ L实验缓冲液洗板3次。转移100 μ L检测中和抗体样品工作液至相应孔中,室温孵育约1小时。取出酶标板,移除上清液并除尽剩余液体。用300 μ L实验缓冲液洗板3次。转移100 μ L显色工作液至相应孔中,室温孵育10~30分钟。完成孵育后,转移100 μ L显色终止液至相应孔中以终止显色。

[0097] 使用酶标仪读取光密度信号值。检测波长和参比波长分别选择450nm和630nm,实验原始数据为检测波长读取信号值和参比波长信号值的差值。分析实验数据,拟含量效曲线。

[0098] 3.3实验结果

[0099] 分别由不同实验人员A和B,以ACE2-Fc融合蛋白为供试品,按照实施例3的操作步骤,于不同实验日期进行三次独立重复,每次重复均设置参比品(RS)和质控品(QC),进行方法初步确认,结果如图3所示。RS和QC样品均为按照实施例3的操作步骤独立配制的ACE2-Fc融合蛋白,通过比较QC样品与RS样品的检测结果差异,即可衡量实验方法的准确性和稳定性。其中图3a为第一次实验,设置了人IgG1蛋白作为中和实验阴性对照,第二次和第三次实验的量效曲线图见图3b和图3c,三次独立重复实验数据总结见表3,从实验结果可以看出,三次独立实验QC的相对活性都在80%~120%范围内波动,三次实验的QC样品相对活性取平均值为96%,表现出良好的系统适用性,说明该检测方法得到的检测方法准确度高;相对活性的变异系数(CV)为13.6%,小于15%,提示该方法较为稳定、应用本发明方法得到的检测结果波动较小,即实验结果的精密度高。非相关抗体人IgG1未表现出中和能力,说明该方法特异性良好,能够特异性地检测抗体中和ECD与ACE2结合的能力。

[0100] 表3.ACE2-Fc融合蛋白中和ECD与HeLa/ACE2细胞结合量实验数据比较

实验编号	01		02		03	
实验人员	A		A		B	
样品	RS	QC	RS	QC	RS	QC
Bottom/下渐近线	0.07385	0.08624	0.06472	0.06972	0.2365	0.2016
Top/上渐近线	1.190	1.213	1.204	1.198	2.021	2.012
LogEC50	0.03143	0.004644	-0.06328	-0.06759	0.3569	0.4463
HillSlope/斜率	-1.470	-1.597	-1.426	-1.367	-0.9825	-0.9425
IC50/半数抑制浓度	1.075	1.011	0.8644	0.8559	2.275	2.794
Span/窗口	1.116	1.127	1.139	1.129	1.785	1.81
QC/RS 上渐近线比值	N/A	1.02	N/A	1.00	N/A	1.00
QC/RS 曲线斜率比	N/A	1.09	N/A	0.96	N/A	0.96
RS/QC 相对活性%	N/A	106	N/A	101	N/A	81
平均相对活性%	96					
相对活性 CV%	13.6					

[0102] SEQ ID NO:1新型冠状病毒S蛋白ECD(含标签蛋白)

[0103] MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIH

VSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLI VNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
 KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSA
 EPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTLLKYNGTITDAVDCALDPLSETK
 CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLNSASFSTF
 KCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYR
 LFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
 NLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQV
 AVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRAA
 SVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQ
 LNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGD
 CLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVL
 YENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQI
 DRLITGRQLSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAPHGVVFLHVTYVPA
 QEKNFTTAPAI CHDGAHFPPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
 FKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPHHHHHHHHDYK
 DDDDK

[0104] SEQ ID NO:2 ACE2-Flag序列:

[0105] MSSSSWLLL SLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKW
 SAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEP
 GLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVKGQLRPLYEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLI
 EDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMVDQ
 AWDAQRI FKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGD FRI LMCTKVTMDDFLTAHHEMG
 HIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTI VGTLPFTY
 MLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQ
 AAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTALENNVGAKNMNRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWST
 DWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDEMILFRSSVAYAMRQYFLKVNQMILFGEEDVRVANLKPRI SFNFFV
 TAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPVS IWLIVFGVVMGVI VVGIVILIF
 TGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSFDYKDDDDK

[0106] SEQ ID NO:3 ACE2序列

[0107] MSSSSWLLL SLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKW
 SAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEP
 GLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVKGQLRPLYEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLI
 EDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMVDQ
 AWDAQRI FKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGD FRI LMCTKVTMDDFLTAHHEMG
 HIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTI VGTLPFTY
 MLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQ
 AAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTALENNVGAKNMNRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWST
 DWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDEMILFRSSVAYAMRQYFLKVNQMILFGEEDVRVANLKPRI SFNFFV
 TAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPVS IWLIVFGVVMGVI VVGIVILIF

TGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPQNTDDVQTSF

[0108] SEQ ID NO:4新型冠状病毒S蛋白ECD

[0109] MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIH
VSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSKTQSLLI VNNATNVVIVKVECFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPPQGSAL
EPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK
CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLVNSASFSTF
KCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYR
LFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
NLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQV
AVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRAA
SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQ
LNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGD
CLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLL TDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVL
YENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQI
DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPA
QEKNFHTTAPAI CHDGAHFPRGVFVSNVTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
FKEELDKYFKNHTSPDVLDGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP

[0110] 参考文献:

[0111] [1]国家药品监督管理局药品审评中心,《新型冠状病毒中和抗体类药物技术资料要求(药学)(征求意见稿)》,2020年5月。

[0112] [2]Nie,Jianhui,et al."Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2."Emerging microbes&infections 9.1(2020): 680-686.

SEQUENCE LISTING

<110> 南京金斯瑞生物科技有限公司

<120> 新型冠状病毒中和抗体类药物中和能力的检测方法

<130> BD-C21211CN

<150> CN202010685450.4

<151> 2020-07-16

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 新型冠状病毒S蛋白ECD(含标签蛋白)

<400> 1

```

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

```


Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
 500 505 510
 Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
 515 520 525
 Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
 530 535 540
 Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
 545 550 555 560
 Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val
 565 570 575
 Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
 580 585 590
 Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val
 595 600 605
 Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
 610 615 620
 His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser
 625 630 635 640
 Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val
 645 650 655
 Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala
 660 665 670
 Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Ala Ser Val Ala
 675 680 685
 Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser
 690 695 700
 Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile
 705 710 715 720
 Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val
 725 730 735
 Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu
 740 745 750
 Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr
 755 760 765
 Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln
 770 775 780
 Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe
 785 790 795 800
 Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser

	805	810	815
Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly			
	820	825	830
Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp			
	835	840	845
Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu			
	850	855	860
Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly			
865	870	875	880
Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile			
	885	890	895
Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr			
	900	905	910
Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn			
	915	920	925
Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala			
	930	935	940
Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn			
945	950	955	960
Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val			
	965	970	975
Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln			
	980	985	990
Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val			
	995	1000	1005
Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn			
	1010	1015	1020
Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys			
	1025	1030	1035
Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro			
	1040	1045	1050
Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val			
	1055	1060	1065
Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His			
	1070	1075	1080
Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn			
	1085	1090	1095
Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln			
	1100	1105	1110

Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
 1115 1120 1125
 Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro
 1130 1135 1140
 Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
 1145 1150 1155
 His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
 1160 1165 1170
 Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu
 1175 1180 1185
 Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu
 1190 1195 1200
 Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro His His His His His
 1205 1210 1215
 His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1220 1225

<210> 2

<211> 813

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ACE2-Flag序列

<400> 2

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

Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu
 130 135 140
 Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu
 145 150 155 160
 Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu
 165 170 175
 Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg
 180 185 190
 Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu
 210 215 220
 Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu
 225 230 235 240
 His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile
 245 250 255
 Ser Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly
 260 265 270
 Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys
 275 280 285
 Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala
 290 295 300
 Gln Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro
 325 330 335
 Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly
 340 345 350
 Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp
 355 360 365
 Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala
 370 375 380
 Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe
 385 390 395 400
 His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys
 405 410 415
 His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn
 420 425 430
 Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly

435	440	445
Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met	Leu Glu Lys Trp Arg	Trp Met Val Phe
450	455	460
Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp	Gln Trp Met Lys Lys	Trp Trp Glu Met
465	470	475
Lys Arg Glu Ile Val Gly Val	Val Glu Pro Val Pro	His Asp Glu Thr
485	490	495
Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu	Phe His Val Ser Asn Asp	Tyr Ser Phe
500	505	510
Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr	Leu Tyr Gln Phe Gln Phe	Gln Glu Ala
515	520	525
Leu Cys Gln Ala Ala Lys His	Glu Gly Pro Leu His Lys	Cys Asp Ile
530	535	540
Ser Asn Ser Thr Glu Ala Gly	Gln Lys Leu Phe Asn Met	Leu Arg Leu
545	550	555
Gly Lys Ser Glu Pro Trp Thr	Leu Ala Leu Glu Asn Val	Val Gly Ala
565	570	575
Lys Asn Met Asn Val Arg Pro	Leu Leu Asn Tyr Phe Glu	Pro Leu Phe
580	585	590
Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn	Lys Asn Ser Phe Val Gly	Trp Ser Thr
595	600	605
Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp	Gln Ser Ile Lys Val Arg	Ile Ser Leu
610	615	620
Lys Ser Ala Leu Gly Asp Lys	Ala Tyr Glu Trp Asn Asp	Asn Glu Met
625	630	635
Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val	Ala Tyr Ala Met Arg Gln	Tyr Phe Leu
645	650	655
Lys Val Lys Asn Gln Met Ile	Leu Phe Gly Glu Glu Asp	Val Arg Val
660	665	670
Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile	Ser Phe Asn Phe Phe Val	Thr Ala Pro
675	680	685
Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile	Pro Arg Thr Glu Val Glu	Lys Ala Ile
690	695	700
Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile	Asn Asp Ala Phe Arg Leu	Asn Asp Asn
705	710	715
Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile	Gln Pro Thr Leu Gly Pro	Pro Asn Gln
725	730	735
Pro Pro Val Ser Ile Trp Leu	Ile Val Phe Gly Val Val	Met Gly Val
740	745	750

Ile Val Val Gly Ile Val Ile Leu Ile Phe Thr Gly Ile Arg Asp Arg
 755 760 765
 Lys Lys Lys Asn Lys Ala Arg Ser Gly Glu Asn Pro Tyr Ala Ser Ile
 770 775 780
 Asp Ile Ser Lys Gly Glu Asn Asn Pro Gly Phe Gln Asn Thr Asp Asp
 785 790 795 800
 Val Gln Thr Ser Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 805 810
 <210> 3
 <211> 805
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ACE2序列
 <400> 3
 Met Ser Ser Ser Ser Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe
 20 25 30
 Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp
 35 40 45
 Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn
 50 55 60
 Ala Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala
 65 70 75 80
 Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln
 85 90 95
 Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys
 100 105 110
 Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser
 115 120 125
 Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu
 130 135 140
 Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu
 145 150 155 160
 Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu
 165 170 175
 Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg
 180 185 190

Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu
 210 215 220
 Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu
 225 230 235 240
 His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile
 245 250 255
 Ser Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly
 260 265 270
 Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys
 275 280 285
 Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala
 290 295 300
 Gln Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro
 325 330 335
 Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly
 340 345 350
 Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp
 355 360 365
 Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala
 370 375 380
 Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe
 385 390 395 400
 His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys
 405 410 415
 His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn
 420 425 430
 Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly
 435 440 445
 Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe
 450 455 460
 Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met
 465 470 475 480
 Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe

Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro
 260 265 270
 Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala
 275 280 285
 Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys
 290 295 300
 Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys
 325 330 335
 Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala
 340 345 350
 Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu
 355 360 365
 Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro
 370 375 380
 Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe
 385 390 395 400
 Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
 405 410 415
 Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
 420 425 430
 Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
 435 440 445
 Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe
 450 455 460
 Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys
 465 470 475 480
 Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly
 485 490 495
 Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
 500 505 510
 Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
 515 520 525
 Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
 530 535 540
 Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
 545 550 555 560
 Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val

	565		570		575
Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe					
	580		585		590
Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val					
	595		600		605
Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile					
	610		615		620
His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser					
625		630		635	640
Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val					
	645		650		655
Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala					
	660		665		670
Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Ala Ser Val Ala					
	675		680		685
Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser					
	690		695		700
Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile					
705		710		715	720
Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val					
	725		730		735
Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu					
	740		745		750
Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr					
	755		760		765
Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln					
	770		775		780
Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe					
785		790		795	800
Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser					
	805		810		815
Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly					
	820		825		830
Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp					
	835		840		845
Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu					
	850		855		860
Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly					
865		870		875	880

Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile
 885 890 895
 Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr
 900 905 910
 Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn
 915 920 925
 Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala
 930 935 940
 Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn
 945 950 955 960
 Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val
 965 970 975
 Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln
 980 985 990
 Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val
 995 1000 1005
 Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn
 1010 1015 1020
 Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys
 1025 1030 1035
 Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro
 1040 1045 1050
 Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
 1055 1060 1065
 Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His
 1070 1075 1080
 Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn
 1085 1090 1095
 Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln
 1100 1105 1110
 Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
 1115 1120 1125
 Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro
 1130 1135 1140
 Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
 1145 1150 1155
 His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
 1160 1165 1170
 Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu

1175	1180	1185
Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu		
1190	1195	1200
Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro		
1205	1210	

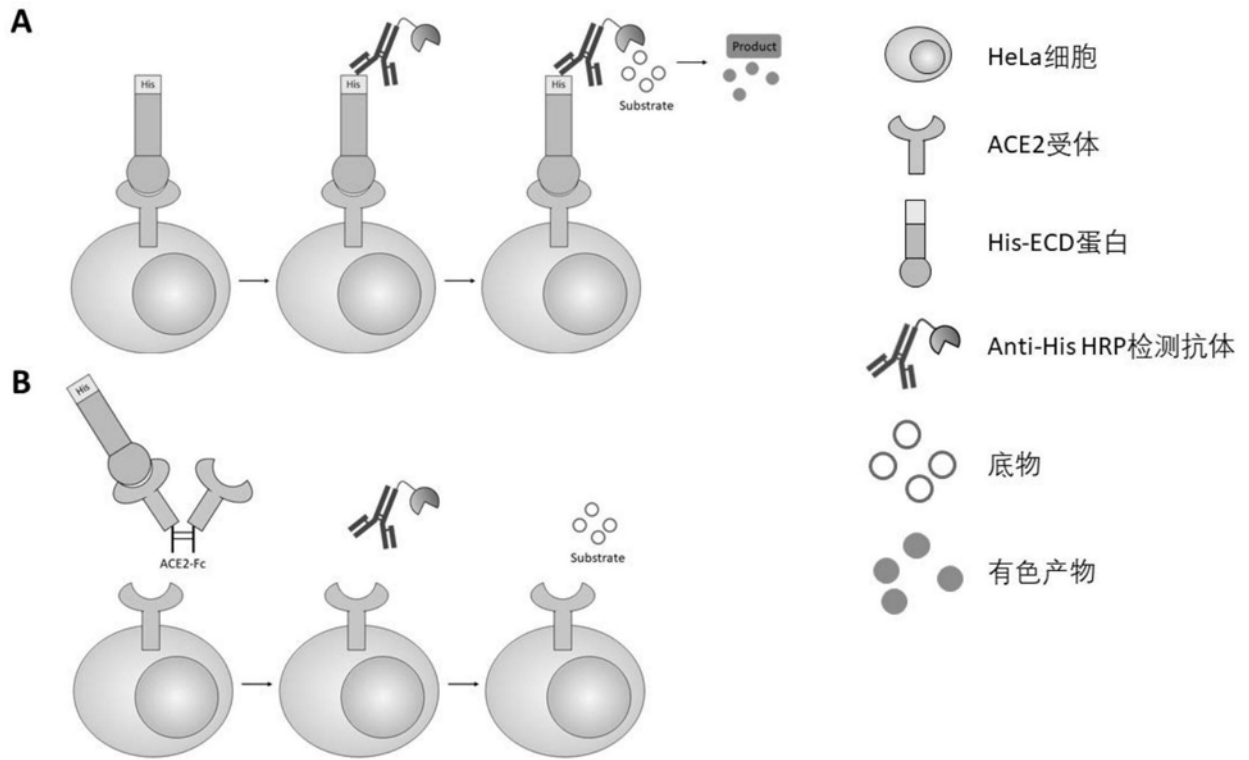


图1

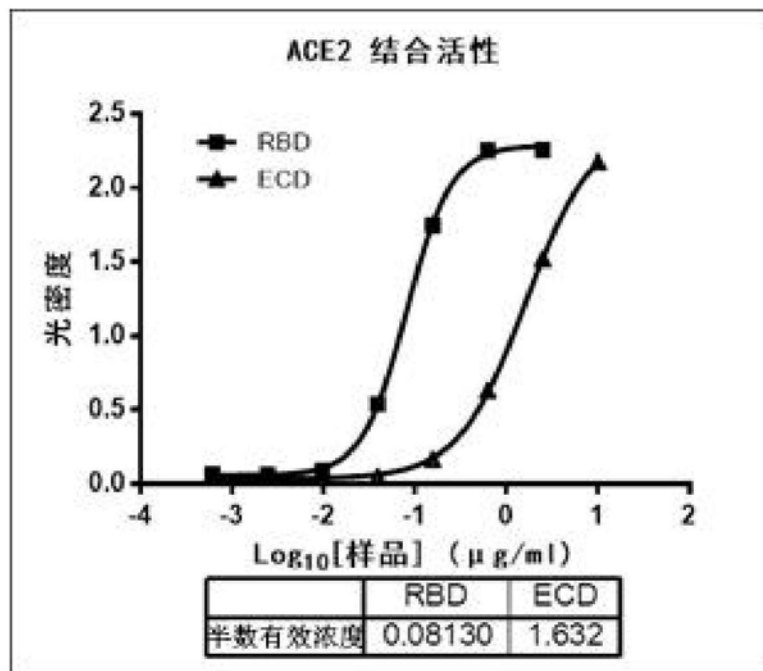


图2

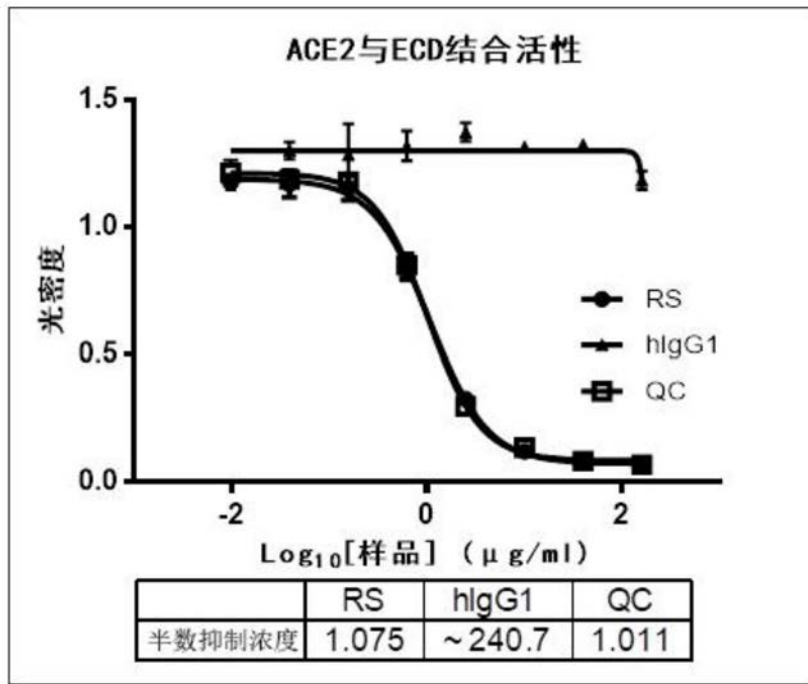


图3A

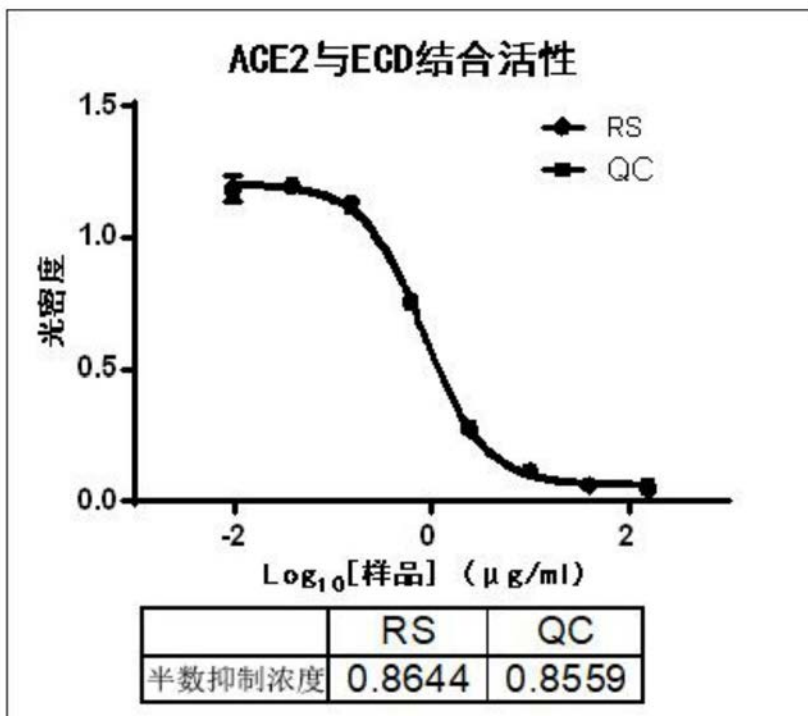


图3B

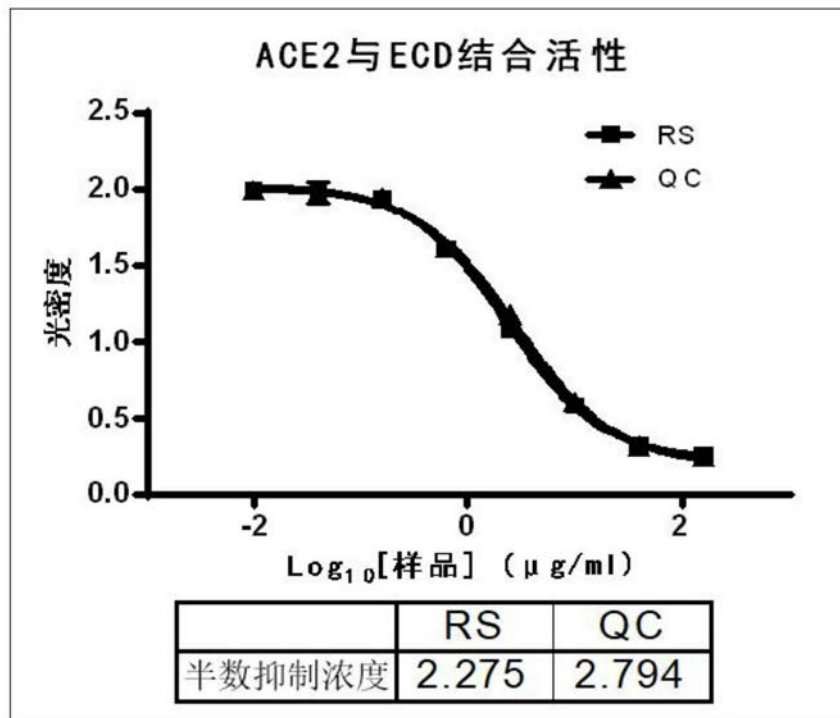


图3C