



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113388031 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 09

(21) 申请号 202110940804.X

C12P 21/08 (2006.01)

(22) 申请日 2021.08.17

A61K 39/42 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 31/14 (2006.01)

申请公布号 CN 113388031 A

C12R 1/91 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.09.14

审查员 贾星航

(73) 专利权人 上海浙江大学高等研究院

地址 201210 上海市浦东新区丹桂路799号

国创中心三期5号楼

(72) 发明人 朱永群 邓凯

(74) 专利代理机构 北京北汇律师事务所 11711

代理人 高元吉

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

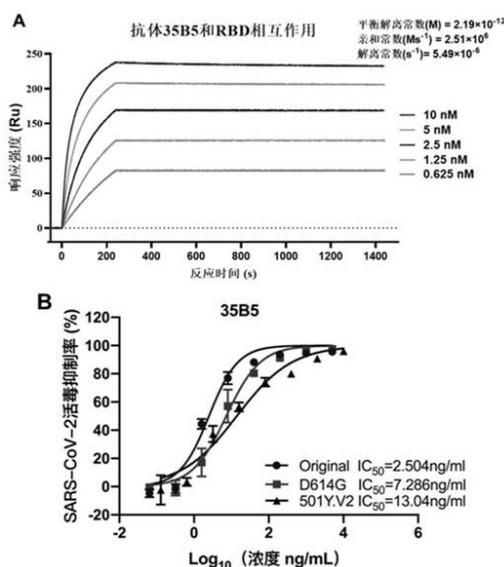
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

单克隆抗体35B5及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了单克隆抗体35B5及其制备方法和用途。本发明通过制备针对于新冠病毒RBD结构域的中和抗体35B5,在体外通过表面等离子共振检测抗体35B5可以有效地与新冠病毒的S蛋白的RBD结构域结合,通过转基因小鼠感染模型验证了抗体35B5的中和能力,测定了中和抗体35B5对于新冠感染后的肺部病毒滴度和相关炎症因子的抑制效果,结果显示该中和抗体能够明显的抑制病毒在体内的复制并降低炎症因子的产生和肺部炎症浸润。单克隆中和抗体35B5抑制新冠病毒的进入宿主细胞,达到新冠病毒中和抗体的治疗作用,可有效用于治疗或者预防新冠病毒感染引起的呼吸系统损伤。



1. 单克隆抗体35B5或其抗原结合片段,其特征在于,其含有重链可变区的抗原互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6;和轻链可变区的抗原互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12,所述单克隆抗体35B5或其抗原结合片段能够特异性结合刺突蛋白的表位。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体具有SEQ ID NO:14所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:17所示的轻链可变区氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段,其特征在于,其重链可变区的氨基酸序列包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6所示的抗原互补决定区且与SEQ ID NO:14所示序列具有至少80%的同一性;和其轻链可变区的氨基酸序列包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12所示的抗原互补决定区且与SEQ ID NO:17所示序列具有至少80%的同一性。

4. 根据权利要求1所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段,其特征在于,其中所述抗原结合片段是Fab片段、Fab'、F(ab')₂片段、单链可变片段scFv、scFv-Fc片段或单链抗体ScAb。

5. 根据权利要求1所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段,其特征在于,其能够特异性结合刺突蛋白的表位,其中,所述表位选自刺突蛋白的第340、341、344、345、346、347、348、349、351、352、354、356、399、444、449、450、451、452、466、468、469、470、481、482、483、490、492位的氨基酸残基,或者所述表位选自刺突蛋白的第E340、A344、T345、R346、F347、A348、N450、Y449、F490、N481、T470、Y351、A352、I468、N354、R466和K356,以抑制或阻断所述刺突蛋白与受体的结合。

6. 根据权利要求1所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段,其特征在于,其表现出对刺突蛋白的受体结构域小于10 nM的Kd。

7. 一种组合物,其包含根据权利要求1-6任一项所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段。

8. 一种核酸分子,其特征在于,其编码根据权利要求1-6任一项所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段。

9. 一种载体,其特征在于,其包含权利要求8所述的核酸分子。

10. 一种细胞系,其特征在于,其能够产生根据权利要求1-6任一项所述的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段。

11. 一种单克隆抗体35B5或其抗原结合片段的制备方法,其特征在于,所述方法包括培养根据权利要求10所述的细胞系,从而产生所述单克隆抗体。

12. 单克隆抗体35B5或其抗原结合片段在制备用于治疗或者预防新型冠状病毒感染的药物或试剂中的用途,其特征在于,所述单克隆抗体35B5或其抗原结合片段含有重链可变区的抗原互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6;和轻链可变区的抗原互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12;

所述单克隆抗体35B5或其抗原结合片段能够特异性结合刺突蛋白的表位,其中所述表

位选自刺突蛋白的第E340、A344、T345、R346、F347、A348、N450、Y449、N481、T470、Y351、A352、I468、N354、R466和K356,以抑制或阻断所述刺突蛋白与受体的结合。

单克隆抗体35B5及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地,本发明涉及预防和治疗新型冠状病毒感染抗体及其制备,尤其涉及单克隆抗体35B5及其制备和用途。

背景技术

[0002] SARS-CoV-2病毒粒子表面介导抗体反应的最显著靶点是同源三聚体刺突(S)蛋白。刺突蛋白通过受体结构域(RBD)与血管紧张素转换酶2(ACE2)的相互作用促进病毒进入细胞。因此,以刺突蛋白RBD结构域为靶点的抗体在对抗当前的大流行中尤为重要。

[0003] 例如,Cheolmin Kim等人通过从康复患者的外周血单个核细胞构建的抗体库筛选出对病毒刺突蛋白的受体结合域的人单克隆抗体mAb。结果表明,CT-P59单抗能有效中和SARS-CoV-2分离株,包括D614G变异体,而无抗体依赖性增强效应,其阻断受体结合域与血管紧张素转换酶2(ACE2)受体的相互作用区域。此外,在三种动物模型(雪貂、仓鼠和恒河猴)中评估了CT-P59的治疗效果,其能够降低病毒滴度。

[0004] 再例如,CN113024640A公开了一种基于新冠病毒RBD与ACE2受体结合结构域筛选的表位肽抗原检测中和抗体试剂盒,其含有基于新冠病毒RBD与ACE2受体结合结构域筛选的表位肽抗原。

[0005] 目前,仍亟需以刺突蛋白RBD结构域为靶点的抗体、其制备以及在治疗性药物或其制剂中的应用。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于弥补现有技术的不足,提供了一种新的中和抗体35B5及其制备方法和用途,从而为临床上COVID-19的治疗提供一种安全有效的抗体,本发明的抗体或其抗原结合片段具有广泛的应用前景。具体如下。

[0007] 本发明的第一方面,提供一种抗体35B5或其抗原结合片段,其能够特异性结合刺突蛋白,并且其能够结合选自刺突蛋白的第340,341,344,345,346,347,348,349,351,352,354,356,399,444,449,450,451,452,466,468,469,470,481,482,483,490,492位的氨基酸残基的表位,以抑制或阻断所述刺突蛋白与受体的结合,或者所述表位选自刺突蛋白的第E340、A344、T345、R346、F347、A348、N450、Y449、F490、N481、T470、Y351、A352、I468、N354、R466和K356。

[0008] 根据本发明的单克隆抗体35B5或其抗原结合片段,其含有重链可变区的抗原互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6;和

[0009] 轻链可变区的抗原互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12。

[0010] 本发明的第二方面,提供一种抗体35B5或其抗原结合片段,其包含重链和轻链,并且其表现出对刺突蛋白的受体结构域小于10 nM的Kd。

[0011] 本发明的第三方面,提供一种抗体35B5或其抗原结合片段,其具有SEQ ID NO:14所示的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:17所示的轻链可变区氨基酸序列。

[0012] 根据本发明第三方面所述的抗体35B5或其抗原结合片段,优选地,其含有与选自所述氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

[0013] 根据本发明的一个方面所述的抗体35B5或其抗原结合片段,优选地,其中所述抗体35B5或其抗原结合片段是单克隆抗体、Fab片段、Fab'、F(ab')₂片段、单链可变片段scFv、scFv-Fc片段或单链抗体ScAb。

[0014] 本发明的第四方面,提供一种核酸分子,其编码根据本发明第一方面,第二方面或第三方面的所述的抗体35B5或其抗原结合片段。

[0015] 本发明的第五方面,提供一种载体,其包含根据本发明第四方面所述的核酸分子。

[0016] 本发明的第六方面,提供一种抗体35B5或其抗原结合片段的制备方法,所述方法包括通过在适于所述抗体35B5或其抗原结合片段表达的条件下培养细胞,从而产生所述单克隆抗体,其中所述细胞包含根据本发明第五方面所述的载体。

[0017] 本发明的第七方面,提供一种组合物,其含有根据本发明第一方面,第二方面或第三方面所述的抗体35B5或其抗原结合片段。

[0018] 本发明的第八方面,提供根据本发明第一方面,第二方面或第三方面所述的抗体35B5或其抗原结合片段在制备用于治疗或者预防人类新型冠状病毒感染的药物或试剂中的用途,优选地,所述新型冠状病毒包括但不限于原始株Original病毒株,英国Alpha突变病毒株B.1.1.7,南非Beta突变病毒株B.1.351以及其他突变病毒株包括P1(巴西Gama伽马毒株)、B.1.617.2(印度Delta德尔塔毒株)、B.1.427和 B.1.429(美国加州Epsilon伊普西隆毒株)、C.37(秘鲁Lambda拉姆达毒株)、B.1.617.1(Kappa卡帕毒株)、B.1.525(英国伊塔毒株)、B.1.526(纽约Iota艾塔毒株)、B.1.620(中非毒株)和B.1.621(哥伦比亚毒株)等。

[0019] 本发明的第九方面,提供在受试者中预防和/或治疗冠状病毒感染的方法,包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的抗体或抗原结合片段、其组合物、或本发明的药物或试剂。优选地,其中治疗有效量约为20 mg/kg。

[0020] 本发明的抗体35B5和新冠病毒的RBD结构域之间具有高亲和力,并且解离的十分缓慢。实验证明,本发明的抗体能够有效抑制SARS-CoV-2活毒的感染,不仅对原始株表现出显著的抑制效果,而且对突变病毒株同样具有很好地中和抑制效果,这表明相对于现有的代表性抗体来说,本发明的抗体具有优异的效果和应用前景。此外,动物模型实验进一步证明,本发明的抗体能够大大降低SARS-CoV-2的病毒滴度,而且相关炎症因子明显减少,炎性浸润情况明显得到改善。本发明人进一步对抗体和RBD结合的结构进行了表征,惊奇地发现,本发明的抗体避开了目前新冠病毒突变株的突变位点,使得其对于多种突变株都有很好的抑制效果。

附图说明

[0021] 图1是根据本发明实施例2的抗体35B5的体外抗新冠病毒效果,其中,图1的A部分显示的是抗体35B5能够梯度依赖的和新冠病毒SPR结构域的互作结果;图1的B部分显示了抗体35B5可以剂量依赖的抑制多种SARS-CoV-2突变株的感染。

[0022] 图2是根据本发明实施例3的抗体35B5在转基因小鼠新冠病毒感染模型中的效果,其中,图2的A部分为小鼠肺研磨液中新冠病毒滴度;图2的B部分为小鼠肺研磨液中相关炎症因子的表达量;图2的C部分是小鼠肺部病理变化。

[0023] 图3是根据本发明实施例4的抗体35B5与新冠病毒S蛋白结合的电镜观察结果,其中,图3的A部分为抗体35B5与新冠病毒S蛋白结合的结构图;图3的B部分为抗体35B5与新冠病毒S蛋白结合的抗原表位;图3的C部分显示了抗体35B5与新冠病毒S蛋白结合的位点与目前报道的抗体都不同。

具体实施方式

[0024] 下面将结合具体实施例详细描述本发明的实施例,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0025] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为具体公开了该范围的上限和下限以及它们之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0026] 当与数值相连使用时,术语“约”、“大约地”或“大约”旨在包括数值的集合或范围。例如,“约X”包括为X的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的数值范围,其中X为数值。在一个实施方案中,术语“约”指的是比特定值多或少5%的数值范围。在另一个实施方案中,术语“约”指的是比特定值多或少2%的数值范围。在另一个实施方案中,术语“约”指的是比特定值多或少1%的数值范围。

[0027] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0028] 本发明中,术语“刺突蛋白”是指位于新冠病毒最外层的三聚体结构的蛋白,也称为刺突糖蛋白或S蛋白。其是来源于包括SARS-CoV和2019-nCoV在内的冠状病毒的结构蛋白。因此,术语“针对冠状病毒S蛋白的抗体”、“抗冠状病毒S蛋白的抗体”、“抗S蛋白抗体”、“冠状病毒S蛋白抗体”、“S蛋白抗体”或“结合S蛋白的抗体”在本文中可互换地使用,是指本发明的抗体能够以足够的亲和力结合冠状病毒S蛋白(例如,2019-nCoV S蛋白、SARS-CoV S蛋白),由此所述抗体可以用作靶向冠状病毒S蛋白的诊断剂、预防剂和/或治疗剂。

[0029] 如本文所用,术语“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白或其片段或T-细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子(例如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面基团组成且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。其中,本发明抗体特异性结

合的表位选自刺突蛋白的第340,341,344,345,346,347,348,349,351,352,354,356,399,444,449,450,451,452,466,468,469,470,481,482,483,490,492位的氨基酸残基。优选地,其特异性结合刺突蛋白的E340、A344、T345、R346、F347、A348、N450、Y449、F490、N481、T470、Y351、A352、I468、N354、R466和K356中的至少一种表位。

[0030] 如本文所用,术语“抗体”指的是免疫球蛋白分子(Ig)分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原(与之免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与之免疫反应”“或针对”意指抗体与期望的抗原的一个或多个抗原决定簇反应且不与其他多肽反应或以低得多的亲和力(Kd)结合。本发明的抗体表现出对刺突蛋白的受体结构域小于10 nM的Kd。优选地,其具有对刺突蛋白的受体结构域小于9 nM的Kd,例如8nM、7nM、6nM,甚至小于6nM,例如5nM、4 nM、3 nM、2 nM,甚至小于1nM的Kd。抗体包括但不限于单克隆抗体、嵌合抗体、dAb(结构域抗体)、单链抗体、Fab、Fab' 和F(ab')₂片段、scFvs。优选地,本发明的抗体为单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0031] 本文所用术语“抗体”还包括人源化抗体、重组抗体、从转基因的非人动物产生的人抗体和使用本领域技术人员可得到的富集技术选自文库的抗体。

[0032] 如本领域所理解,抗体是包含通过二硫键互联的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。重链包含重链可变区(VH)和重链恒定区(CH1、CH2和CH3)。轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。重链和轻链的可变区包含框架区(FR)和互补决定区(CDR)。四个FR是相对保守的,而CDR区域(CDR1、CDR2和CDR3)包含高变区。抗体结构单元已知包含四聚体。每个四聚体由两个相同多肽链对构成,每对具有一条轻链(约25 kDa)和一条重链(约50-70 kDa)。每条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的约100个至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链羧基端部分定义了主要负责效应子功能的恒定区。FR和CDR从NH₂端至COOH端如下排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。此外,所述恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合。抗体恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性(ADCC)或补体介导毒性(CDC)。通常,抗体分子涉及IgG、IgM、IgA、IgE及IgD,其彼此间因存在于分子中的重链的性质而不同。

[0033] 在本发明中,抗体重链可变区的抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:6的氨基酸序列;抗体轻链可变区的抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10及SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0034] 本文所用术语“抗体片段”包含完整抗体的一部分,诸如完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、scFv片段、双抗体、或线性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化会产生两个相同的“Fab”片段或抗原结合片段(每个具有单个抗原结合位点)和一个残余的“Fc”片段(其名称反映了它的容易结晶的能力)。抗体的胃蛋白酶处理会产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点且其保留它的交联抗原的能力。

[0035] 本文所用术语“Fv”表示含有完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该片段含有紧密地非共价结合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体。这两个结构域的折叠导致六个高变环(三个环各自来自H和L链)的形成,它们促进用于抗原结合的氨基酸残基并给所述抗体赋予抗原结合特异性。但是,即使单个可变区(或仅包含三个对抗原特异性的CDR的Fv的一半)具有识别和结合抗原的能力,尽管以较低亲和力。“单链

Fv” (“sFv”或“scFv”)是包含连接成单个多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。sFv多肽还可以包含在VH和VL结构域之间的多肽接头,其使sFv能够形成期望的结构用于抗原结合。

[0036] 本文所用术语“Fab”片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab’片段与Fab片段的差别在于几个残基在重链CH1结构域的羧基端处的添加,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。

[0037] 本文所用术语“单克隆抗体”,有时也称为“单抗”或mAb,其是指从一纯系细胞得到的免疫球蛋白,具有相同的结构和化学特性,对单一抗原决定簇有特异性。单克隆抗体与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤或重组工程细胞培养获得,不会混杂有其它免疫球蛋白。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从均一的抗体群中获得的,但这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0038] 本发明的抗体可包含Fc区,所述Fc区来自IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0039] 除非另有说明,否则本文所述抗体或其抗原结合片段为分离的抗体或其抗原结合片段。其中所用术语“分离的”是指已经从它的天然环境提取出的核酸或抗体。已经“分离的”核酸、肽和蛋白因而包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白。该术语也包括通过在宿主细胞中的重组表达而制备的核酸、肽和蛋白以及化学合成的核酸和/或多肽。

[0040] 本发明中,术语“受体结合结构域”是指S蛋白与ACE2相联结或结合的区域,也称为RBD。

[0041] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”指的是参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。抗原结合位点由重(“H”)链及轻(“L”)链的N端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链及轻链的V区中三个高度趋异段(被称为“高变区”)被插入称为“框架区”或“FR”的更保守的侧翼段之间。因此,术语“FR”指的是在免疫球蛋白高变区之间和相邻的天然发现的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高变区与重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此配置而形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补,且重链及轻链各自的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。

[0042] 本发明中,术语“结合”和“免疫结合”可互换使用,是指发生在免疫球蛋白分子与对所述免疫球蛋白特异的抗原之间的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以解离常数(Kd)表达,其中较小的Kd代表较高的亲和力。“亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,在用于本文时,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可用结合解离平衡常数(Kd)来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量,包括现有技术已知以及本文中所描述的那些。

[0043] 在本发明中,术语“特异性结合”通常是指抗体通过其抗原结合结构域与表位结合,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间具有互补性。因此,当抗体通过其抗原结合结构域与该表位结合时,比它结合到随机的、不相关的表位更容易,其被称为“特异性结合”该表位。术语“特异性”在本发明中用于限定某种抗体与某个表位结合的相对亲和力。例如,可以认为抗体“A”比抗体“B”对特定表位具有更高的特异性,或者可以认为抗体“A”比结合相关表位“D”更高的特异性结合表位“C”。

[0044] 除非另有说明,术语“片段”、“抗体片段”、“抗原-结合片段”及“抗原结合片段”可互换地使用。

[0045] 变体抗体也都被包括在本发明的范围内。因此,在本发明中列举的序列的变体也都包括在本发明的范围内。具有提高的亲合力的抗体序列的其它变体可以使用本领域已知的方法得到,并都包括在本发明的范围内。本领域技术人员利用用于生产变体多肽的重组方法和/或合成化学技术可以修改多肽的氨基酸序列。例如,可以使用氨基酸置换得到具有进一步提高的亲合力的抗体。可选地,可以使用核苷酸序列的密码子优化来提高在用于生产抗体的表达系统中的翻译效率。这样的变体抗体序列与在本发明中列举的序列具有80%或更高的(即,85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大)序列同一性。相对于在本发明中列举的序列,计算所述序列同一性。或进行最佳比对时,如通过程序GAP或使用默认值间隙权重的BESTFIT。

[0046] 在本文中,两氨基酸序列之间的百分比同源性等于两序列之间的百分比同一性。两序列间的百分比同一性为序列共有的相同位置数的函数(即%同源性=相同位置数/位置总数×100),其中需考虑产生两序列的最优比对需要引入的缺口数和每个缺口的长度。可以使用数学算法完成序列的比较和两序列间百分比同一性的测定。可以使用E.Meyers和W.Miller的算法(Comput .Appl .Biosci .,4:11-17(1988))测定两氨基酸序列间的百分比同一性。此外,可以使用Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))测定两氨基酸序列间的百分比同一性。

[0047] 本发明提供氨基酸序列修饰的抗体,优选地,本发明的抗体包含含有CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变结构域和含有CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变结构域,其中这些CDR序列中的一个或多个包含基于本文所述抗体的特定氨基酸序列或其修饰,且经过修饰的抗体保留本发明抗新型冠状病毒抗体的期望的功能特性。

[0048] 本文所用术语“修饰”意指氨基酸修饰不会显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征。此类修饰包括氨基酸的取代、添加和缺失。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。本发明的抗体可包括糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割或非天然发生的氨基酸修饰等。

[0049] 保守氨基酸取代指的是具有类似侧链的残基的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的氨基酸组为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族-羟基侧链的氨基酸组为丝氨酸及苏氨酸;具有含酰胺侧链的氨基酸组为天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的氨基酸组为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的氨基酸组为赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及具有含硫侧链的氨基酸组为半胱氨酸及甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸缬氨酸、谷氨酸-天门冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。因此,可以用来自同一侧链家族的其它氨基酸残基替换本发明抗体CDR区中的一个或多个氨基酸残基。

[0050] 如本文所述,本发明涵盖抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的微小变异,条件是氨基酸序列维持至少75%、更优选地至少80%、90%、95%,且最优选地99%的变异。特别地,预期保守氨基酸取代。保守取代是氨基酸家族中发生的那些,其与他们的侧链相关。遗传编码的氨基酸通常被分为以下家族:(1)酸性氨基酸为天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性氨基酸为赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性氨基酸为丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨

酸、甲硫氨酸、色氨酸和(4)不带电极性氨基酸为甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。氨基酸的其他族包括(i)丝氨酸及苏氨酸,其为脂肪族-羟基家族;(ii)天冬酰胺及谷氨酰胺,其为含酰胺家族;(iii)丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸,其为脂肪族家族;和(iv)苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,其为芳香族家族。例如,合理预期以异亮氨酸或缬氨酸对亮氨酸分离取代、以谷氨酸对天冬氨酸分离取代、以丝氨酸对苏氨酸分离取代或以结构相关的氨基酸类似取代氨基酸将不会对所得分子的结合或特性具有重大影响,特别是如果取代不涉及框架位置中的氨基酸。氨基酸改变是否导致功能肽可以容易地通过测定多肽衍生物的特异性活性进行确定。测定方法不特别限定,可通过本领域已知方法进行测定。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可以通过本领域技术人员容易地制备。优选片段或类似物的氨基-和羧基-端发生在功能域边界附近。结构域和功能域可以通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公开或私人序列数据库比较来鉴定。优选地,使用计算机化比较方法来鉴定序列基序或预测的蛋白质构形域(其发生在已知结构和/或功能的其他蛋白质中)。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。Bowie 等人Science 253:164 (1991)。因此,上述实例证实本领域技术人员可以识别可用于定义根据本发明的结构域及功能域的序列基序和结构构形。

[0051] 优选的氨基酸取代为以下这些:(1)降低对蛋白酶解的敏感性;(2)降低对氧化的敏感性;(3)改变对形成蛋白质复合物的结合亲和力;(4)改变结合亲和力和(4)给予或修饰此类似物的物化或功能特性。类似物可以包括除了天然发生的肽序列以外的序列的各种突变蛋白。例如,单一或多氨基酸取代(优选地保守氨基酸取代)可在天然发生的序列中进行(优选地在形成分子间接触的结构域以外的多肽部分中)。保守氨基酸取代不应实质上改变亲代序列的结构特征(例如:取代氨基酸不应当趋于破坏亲代序列中发生的螺旋,或中断表征亲代序列的其他类型的二级结构)。

[0052] 另一类可能存在的可变区修饰是突变VH和/或VK CDR1、CDR2和/或CDR3区中的氨基酸残基以改进目的抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以通过定点诱变或PCR介导的诱变来导入突变。优选导入(如上所述的)保守修饰。突变可以是氨基酸的取代、添加或缺失,但是优选为取代。此外,CDR区中残基变化通常不超过一个、两个、三个、四个或五个。

[0053] 核酸分子

[0054] 本发明提供涉及编码本发明的抗体的核酸分子。核酸可以存在于完整的细胞中、存在于细胞溶胞物中、或者以部分纯化或基本纯的形式存在。当通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl分带(banding)、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其它技术纯化除去其它细胞组分或其它污染物,例如其它细胞核酸或蛋白质时,核酸是“分离的”或“使得基本纯的”。参见F.Ausubel等人(1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本发明的核酸可以是例如DNA或RNA,而且可以含有或不含有内含子序列。在优选的实施方案中,核酸是cDNA分子。

[0055] 本发明的核酸包含编码选自SEQ ID NO.: 2、4、6、8、10、12中任一项所示氨基酸序列的核酸,或编码与选自SEQ ID NO.: 2、4、6、8、10、12中任一项所示的氨基酸序列具有至

少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的核酸。优选地,所述编码序列由SEQ ID NO.:1、3、5、7、9、11所示的序列组成。

[0056] 可以使用标准分子生物学技术来获得本发明的核酸。一旦获得编码VH和VL区段的DNA片段,进一步通过标准重组DNA技术操作这些DNA片段,以例如将可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,将编码VL或VH的DNA片段可操作的连接至编码另一蛋白质,诸如抗体恒定区或柔性接头的另一DNA片段。术语“可操作的连接”在用于本文时旨在表示连接两DNA片段从而使得这两个DNA片段所编码的氨基酸序列保持在同一读码框中(in-frame)。

[0057] 通过将编码VH的DNA可操作的连接至编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一DNA分子可以将编码VH区的分离的DNA转变为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的。

[0058] 通过将编码VL的DNA可操作的连接至编码轻链恒定区CL的另一DNA分子可以将编码VL区的分离的DNA转变为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的。

[0059] 本发明还提供了编码本发明抗体或其抗原结合片段的重链和轻链的肽序列的多核苷酸变体。这些多核苷酸变体与本发明的多核苷酸序列相比可以具有至少70%、或至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或更大的序列同一性。这样的连续序列可以编码CDR序列,或可以编码完整可变区。如本领域已知的,可变区序列可以与任何适当的恒定区序列融合。如本领域技术人员所理解,通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、读码框定位等,可以适当地调节这些值以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白的对应同一性。

[0060] 本领域可以理解的是,在本发明所公开的抗体编码序列的基础上经宿主密码子偏好性改造的序列可适用于本发明。为了适应于不同宿主的需要,可根据简并密码子来对本发明的碱基序列进行偏好性改造。密码子偏好性改造一般不改变产物蛋白或多肽的序列。

[0061] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中互换地用于表示单链或双链RNA、DNA或混合的聚合物。

[0062] 对于抗体的重组生产,将编码它的核酸插入载体中用于进一步克隆(DNA的扩增)或用于表达。根据在实施例中阐述的方法,分离编码本发明的抗体的DNA。如本领域技术人员所理解,许多载体可供用在抗体的重组生产中。载体组分通常包括但不限于以下的一种或多种:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0063] 在本发明中,载体是指表达载体,包括但不限于质粒、逆转录病毒、YAC、EBV衍生的游离基因等。合适的载体是编码功能完全的人CH或CL免疫球蛋白序列的载体,其具有经工程改造的合适的限制位点使得任何VH或VL序列可容易地插入并表达。所得的嵌合抗体可结合到任何强启动子,包括逆转录病毒LTR,例如,SV-40早期启动子、劳斯氏肉瘤病毒LTR和莫洛尼氏鼠白血病病毒LTR。同样地,可使用天然Ig启动子等。

[0064] 优选的载体包括病毒载体、融合蛋白质和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼氏鼠白血病病毒。DNA病毒载体是优选的。这些载体包括痘载体诸如:正天花或禽痘载体、疱疹病毒载体诸如:单纯疱疹I病毒(HSV)载体。具体载体的选择将取决于靶细胞和所处理的条件。导入可通过标准技术例如,感染、转染、转导或转化。基因转移模式的实例包括例

如,裸DNA、CaPO₄沉淀、DEAE聚葡糖、电穿孔、原生质体融合、脂质体转染、细胞显微注射和病毒载体。

[0065] 用于克隆或表达DNA的合适宿主细胞是原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞等。将用于本发明抗体生产的、用上述表达或克隆载体转化的宿主细胞在适当修饰的常规营养物培养基中培养,用于诱导启动子、选择转化体或扩增编码期望序列的基因。使用本领域普通技术人员已知的纯化技术,可以纯化从所述细胞制备的抗体。

[0066] 本文所用术语“受试者”和“患者”在本文中互换地用于指可能需要本文描述的抗体相关制剂或药物、治疗和疫苗的任何动物。受试者和患者因此包括但不限于,灵长类动物(包括人类)、犬科动物、猫科动物、鼠和其它哺乳动物受试者。优选地,所述受试者是人类。从在其中使用所述术语的上下文显而易见,受试者和患者表示易于被冠状病毒感染的受试者或患者和/或被冠状病毒感染的受试者或患者。

[0067] 在本发明中,术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性或防治性措施,其目的是预防或减缓(减少)不期望发生的生理改变或紊乱,例如自身免疫性疾病的进程。有益的或期望的临床结果包括但不限于以下无论是可检测还是不可检测的结果,包括症状的缓解、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及减轻(无论是部分还是全部)。“治疗”还意指与不接受治疗时预期的生存期限相比所延长的生存期限。需要治疗的包括那些已经患有病症或紊乱的人,以及那些容易患有病症或紊乱的人,或者那些需要预防该病症或紊乱的人。

[0068] 组合物

[0069] 本发明提供一种组合物,其含有本发明的抗体35B5或其抗原结合片段。作为组合物的实例,所述组合物可以是偶联物,所述偶联物是将前面所述的单克隆抗体或其抗原结合部分与其他物质偶联而成,所述其他物质包括细胞毒素、药物、放射性毒素。

[0070] 细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害(例如杀伤细胞)的任何试剂。实例包括紫杉醇、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、依米丁、丝裂霉素,依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素类、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素,及其类似物或同系物。

[0071] 所述组合物还可以包括例如抗代谢物类(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂类(例如双氯乙基甲胺、塞替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀和洛莫司汀、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链唑霉素、丝裂霉素C、和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类抗生素(例如柔红霉素和多柔比星)、抗生素类(例如放线菌素D)、博来霉素、光神霉素、和氨基霉素(AMC)、和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)、duocarmycin、加利车霉素、美登素和auristatin,及其衍生物。

[0072] 药物

[0073] 在一个实施方案中,本发明的抗体、其片段可以用做治疗性药物。此类药物通常将用于诊断、预测、监控、治疗、缓解、预防和/或延迟与刺突蛋白相关的疾病或病理学的进展。在某些实施方案在,其能够治疗或者预防新冠病毒感染引起的呼吸系统损伤。将抗体制剂,优选地为具有对其靶抗原具有高特异性和高亲和力的抗体,施用至受试者并且通常因其

与靶标结合而将具有效果。抗体的施用可以降低、拮抗、中和、消除或抑制或干扰靶标与其天然结合的内源性配体的结合。

[0074] 本发明的药物包含本发明的抗体或其抗原结合部分,以及药学上可接受的载体。“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、等等生理学相容的载体。本发明的药物还可以以联合疗法施用,即联合其它治疗剂及其药剂。此类治疗剂包括任何抗感染活性剂、小分子药物,包括但不限于瑞德西韦、利巴韦林、奥司他韦、扎那米韦、羟氯喹、干扰素、镇痛药、阿奇霉素和皮质类固醇。

[0075] 本文所用术语“有效量”表示引发例如研究者或临床医师所追求的组织、系统、动物或人的生物学或药学响应的药物或药剂的量。此外,术语“治疗有效量”表示,与没有接受该量的相应受试者相比,引起疾病、病症或副作用的改进治疗、治愈、预防或减轻的量,或者使疾病或病况的进展速率降低的量。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量。通常,本文中的有效量根据各种因素而变化,所述因素例如给定的药物或化合物、药制剂、给药途径、疾病或病症的类型、被治疗的受试者等等,但仍然可以由本领域技术人员常规地确定。本发明的化合物的有效量可以由本领域技术人员通过本领域已知的常规方法容易地确定。

[0076] 用途

[0077] 本发明提供单克隆抗体35B5或其抗原结合片段在制备用于治疗或者预防人类新型冠状病毒感染的药物或试剂中的用途。其中,新型冠状病毒包括但不限于原始株 Original病毒株、B.1.351、B.1.1.7、P1、B.1.617.2、B.1.427、B.1.429、C.37、B.1.617.1、B.1.525、B.1.620、B.1.621等突变病毒株。更具体地,所述突变病毒株具有选自下述的突变:B.1.1.7 (N501Y); B.1.351 (K417N,E484K,N501Y); P1 (K417T,E484K,N501Y); B.1.617.2 (L452R,T478K); B.1.427/B.1.429 (L452R); C.37 (L452Q,F490S); B.1.617.1 (L452R,E484Q); B.1.525 (E484K); B.1.526 (L452R,S477N,E484K), B.1.620 (S477N,E484K) 和 B.1.621 (R346K,E484K,N501Y)。

[0078] 本文所用术语“原始株”是指2020年1月份序列公开,与GISAID编号为EPI_ISL_403934的毒株具有相同序列的SARS-CoV-2(新冠)病毒毒株。

[0079] 本文所用术语“突变株”是指与EPI_ISL_403934毒株相比较,在序列上发生突变的新冠病毒毒株。

[0080] 实施例1

[0081] 本实施例为单克隆抗体35B5的制备,具体如下。

[0082] 一、实验材料

[0083] 1、实验所需细胞,病毒和转基因小鼠、Vero E6细胞、SARS-CoV-2、人源化ACE2转基因小鼠(hACE2-mice)。

[0084] 2、实验所需试剂和材料

[0085] S5芯片购于GE公司,滤器购于PALL公司,DMEM培养基,胎牛血清(FBS)均购自于GIBCO公司。

[0086] 3、实验所需仪器

[0087] SPR表面等离子共振小分子互作仪、多功能酶标仪、q-RT PCR仪、CO₂细胞培养箱购自Thermo公司。

[0088] 二、实验方法

[0089] 1) 首先,收集26名新型冠状病毒肺炎康复患者的外周血,并分离血清与淋巴细胞进行保存,其中新型冠状病毒肺炎康复患者的病原为新冠原始病毒毒株;

[0090] 2) 接着,通过体外ELISA试验筛选了26名康复患者血清中的新型冠状病毒RBD蛋白特异性中和抗体活性,发现其中3名康复患者存在较高的中和抗体滴度;

[0091] 3) 通过细胞相关标记及流式细胞分选技术,制备该3名康复患者的新型冠状病毒RBD蛋白特异性B细胞的单细胞转录本,并通过PCR技术扩增得到对应的抗体重链基因和抗体轻链基因;

[0092] 4) 将测序验证的抗体重链基因和抗体轻链基因在真核细胞内表达,生产并纯化新型冠状病毒特异性抗体,最终得到候选抗体200个;

[0093] 5) 最后,通过体外ELISA实验、假病毒中和实验及动物实验,筛选及组合具有高亲和力的新型冠状病毒中和性抗体。

[0094] 三、实验结果

[0095] 本发明得到针对于新冠病毒的抗体35B5。该抗体对应的重链基因序列及轻链基因序列是由RBD蛋白特异性B细胞的单细胞转录本经过抗体基因特异性PCR扩增及PCR产物测序而获得,并通过IMGT网站(<http://www.imgt.org>)分析得出重链基因及轻链基因对应的可变区序列。抗体35B5具有SEQ ID NO:13所示的重链可变区核苷酸序列,SEQ ID NO:14所示的重链可变区氨基酸序列以及SEQ ID NO:15所示的重链恒定区氨基酸序列;SEQ ID NO:16所示的轻链可变区核苷酸序列,SEQ ID NO:17所示的轻链可变区氨基酸序列以及SEQ ID NO:18所示的轻链恒定区氨基酸序列。

[0096] 抗体35B5具有如SEQ ID NO:1所示的重链CDR1区域核苷酸序列,SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;SEQ ID NO:3所示的CDR2区域核苷酸序列,SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;SEQ ID NO:5所示的CDR3区域核苷酸序列,SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。抗体35B5具有如SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1区域核苷酸序列,SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;SEQ ID NO:9所示的CDR2区域核苷酸序列,SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;SEQ ID NO:11所示的CDR3区域核苷酸序列,SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0097] 实施例2

[0098] 本实施例为单克隆抗体35B5体外的抗新冠病毒效果,具体如下。

[0099] 1. 实验方法与结果

[0100] 1.1 单克隆抗体35B5与新冠病毒RBD结构域等离子共振互作检测

[0101] 1) 将表达纯化后的RBD蛋白与芯片偶联,然后用缓冲液稳定过夜。

[0102] 2) 用缓冲液将单克隆抗体35B5从10 nM开始两倍梯度稀释,使用0.2滤器过滤之后离心除去气泡。

[0103] 3) 上样检测单克隆抗体35B5和新冠病毒RBD的亲合常数和解离常数。

[0104] 结果如图1中A所示:单克隆抗体35B5可以高效迅速的和新冠病毒的RBD结构域结合,亲和常数达到 2.51×10^6 。其解离常数为 5.49×10^{-6} ,通过分析和计算二者之间的平衡解离常数为 2.19×10^{-12} 。说明单克隆抗体35B5和新冠病毒的RBD结构域之间具有很高的亲和力,并且解离的十分缓慢。

[0105] 1.2 单克隆抗体35B5抗体中和实验

[0106] 1)将Vero E6细胞铺于48孔板中,37℃孵育24小时。

[0107] 2)以MOI=0.005感染(1)中的细胞,将单克隆抗体35B5用含有2%胎牛血清的培养基从10 μg/mL开始5倍梯度稀释,加入到(1)中的细胞。

[0108] 3)感染48小时后将上清取出,用空斑试验检测病毒滴度。

[0109] 4)将Vero E6细胞铺于96孔板中于37℃孵育24小时,然后将上述病毒上清梯度稀释加到96孔板中,在37℃孵育1小时,然后弃掉上清再加入含有1.6%的羟甲基纤维素的培养基200 μL。

[0110] 5)培养24小时后用4%的多聚甲醛固定细胞并加入0.5%的吐温 X-100通透细胞。随后加入抗SARS-CoV-2核衣壳的抗体孵育,再加入HRP标记的二抗。

[0111] 结果如图1中B所示。抗体35B5可以有效地抑制SARS-CoV-2活毒的感染,对于原始株以及两种SARS-CoV-2突变株D614G和501Y.V2(即B.1.1.7和B.1.351毒株)都具有很好地中和抑制效果,其IC₅₀分别为2.5 ng/mL,7.28 ng/mL和13.04 ng/mL。然而目前已经公布的代表性的抗体CC12.1和REGN10987针对于D614G突变株的IC₅₀分别是22 ng/mL和19.4 ng/mL,他们对于南非突变株中和效果很微弱。CV07-270的IC₅₀是82.3 ng/mL。

[0112] 实施例3

[0113] 本实施例为抗体35B5在人源化小鼠模上的抗病毒效果,具体如下。

[0114] 1. 实验流程:

[0115] 1)将8周龄人源ACE2转基因(hACE)小鼠随机分为药物评价组,4只小鼠。阴性对照组3只小鼠。正式实验前,小鼠适应环境2-3 d。

[0116] 2)攻毒当天,小鼠经1%戊巴比妥钠轻度麻醉(每克体重约0.1 ml麻醉药),然后用移液枪采用滴鼻方式感染 4×10^4 PFU 的 SARS-CoV-2病毒液。

[0117] 3)感染病毒后第6小时腹腔内注射20 mg/kg的抗体。每天定时称量记录每组动物体重变化,观察小鼠生存状况。

[0118] 4)感染后第五天处死小鼠,取出肺脏并研磨。用qRT-PCR的方法分别检测肺研磨液的病毒滴度和相关炎症因子的表达情况。同时取出小鼠肺脏进行组织病理学检测。

[0119] 5)根据统计结果,绘制出体重变化曲线和存活率曲线。

[0120] 2、实验结果

[0121] 结果如图2中A所示,抗体35B5在转基因小鼠模型上可以有效的降低SARS-CoV-2的病毒滴度,病毒感染五天后抗体治疗组相对于病毒对照组小鼠肺脏中的病毒滴度降低了90%。同时,如图2中B所示,抗体35B5处理后肺部相关炎症因子的表达也明显减少。如图2中C所示,肺部的验证浸润情况也得到改善。综上所述,抗体35B5在SARS-CoV-2转基因小鼠模型上仍然具有优秀的保护效果,明显地抗病毒能力。

[0122] 实施例4

[0123] 本实施例为抗体35B5和S蛋白结合的结构解析,具体如下。

[0124] 1、实验流程

[0125] 1)蛋白的表达和纯化:表达SARS-CoV-2原始毒株spike蛋白的S-6P突变体,该突变体为具有spike蛋白的6个丝氨酸突变成6个脯氨酸的突变体。HEK293F细胞在含8% CO₂的SMM 293T-I培养基中培养,温度为37℃。当细胞密度达到 2×10^6 个/mL时,在PEI:DNA质量比为3:1,每升培养1mg DNA的情况下,用25-kDa线性聚乙烯亚胺将S-2P和S-6P质粒瞬时转染

HEK293F细胞。收集细胞培养上清,10000×g离心30分钟。使用HisPur™钴树脂和StrepTactin树脂纯化分泌的S-2P和S-6P蛋白。采用Superose 6 10/300色谱柱,在含有20 mM HEPES pH 7.2、150 mM NaCl和10%海藻糖的缓冲液中进行纯化。木瓜蛋白酶在含20 mM HEPES pH 7.2、150 mM NaCl、5 mM EDTA和5 mM L-半胱氨酸的缓冲液中,37℃消化40 min后获得抗体35B5的Fab区。所得Fab用脱盐柱纯化L-半胱氨酸,然后用HiTrap Q柱进一步纯化。收集纯化的Fabs,浓缩至0.6 mg/mL。

[0126] 2) 2mL的S-6P (1.2 mg/mL)和2mL的35B5 Fab (0.6 mg/mL)在室温下孵育3min,然后装载到发光放电的金栅格上。用含有20 mM HEPES、pH 7.2和150 mM NaCl的缓冲液清洗栅格。使用Mark IV Vitrobot在100%湿度和16℃下印迹网格3 s,然后通过浸入式冷冻将栅格浸入液体乙烷中。S-6P-35B5 Fab复合物的显微照片记录在300 kV的FEI Titan Krios电子显微镜上。在K3 Summit直接电子探测器上,以标称放大81,000倍的超分辨率模式,离焦范围为1.2至1.3mm,共记录了3740个动态过程。探测器采用狭缝宽度为20eV的GIF量子能量滤波器。显微照片的剂量分成32帧,总电子曝光约50个电子每Å。

[0127] 2、实验结果

[0128] 结果如图3中A所示,通过结构解析发现单克隆抗体35B5可以与新型冠状病毒“down”和“up”状态下的RBD结合,并通过位阻效应进一步的导致RBD的结构发生变化从而使得三聚体的S蛋白发生解离,最终导致新冠病毒失去感染能力。同时发现,35B5与目前报道的其他抗体的抗原表位都不一样。其抗原表位包含S蛋白的340,341,344,345,346,347,348,349,351,352,354,356,399,444,449,450,451,452,466,468,469,470,481,482,483,490,492位的氨基酸残基(结果如图3中B所示)。35B5与新冠病毒RBD结构域有多达30个相互作用的氨基酸残基,并且都避开了目前新冠病毒突变株在RBD上的突变位点,使得其对于多种突变株都有很好的抑制效果。图3中C表示35B5作用的抗原表位不同于先前发现第二类和第三类新冠RBD抗体的抗原表位,是一个全新的抗原表位。35B5作用的抗原表位不仅包括第二类和第三类新冠RBD抗体的抗原表位的部分氨基酸残基,还有大量独特的表位氨基酸残基。

[0129] 目前已知的突变毒株在RBD上的突变情况概括在此:B.1.1.7 (N501Y); B.1.351 (K417N, E484K, N501Y); P1 (K417T, E484K, N501Y); B.1.617.2 (L452R, T478K); B.1.427/B.1.429 (L452R); C.37 (L452Q, F490S); B.1.617.1 (L452R, E484Q); B.1.525 (E484K); B.1.526 (L452R, S477N, E484K), B.1.620 (S477N, E484K)和B.1.621 (R346K, E484K, N501Y)。这些突变位点中N501、K417、T478、S477、E484不在35B5的抗原表位上,而L452R的突变会让35B5跟RBD形成两个新的氢键,R346K突变不影响35B5与RBD相互作用,因而35B5能对目前发现的新冠病毒突变株都具有很好的中和效果。

[0130] 尽管已经参考示例性实施方案对本发明进行了描述,但应理解本发明不限于公开的示例性实施方案。在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对示例性实施方案做多种调整或变化。本发明的范围应基于最宽的解释以涵盖所有修改和等同结构与功能。

[0039]	gcaaaagctg tcgagatggt tcggggactt atggggttgg gagcggaccc cgaatacgtt	60
[0040]	atggacgtc	69
[0041]	<210> 6	
[0042]	<211> 23	
[0043]	<212> PRT	
[0044]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0045]	<400> 6	
[0046]	Ala Lys Ala Val Glu Met Val Arg Gly Leu Met Gly Leu Gly Ala Asp	
[0047]	1 5 10 15	
[0048]	Pro Glu Tyr Gly Met Asp Val	
[0049]	20	
[0050]	<210> 7	
[0051]	<211> 33	
[0052]	<212> DNA	
[0053]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0054]	<400> 7	
[0055]	cagagcctcc tgcataagtaa tggatacaac tat	33
[0056]	<210> 8	
[0057]	<211> 11	
[0058]	<212> PRT	
[0059]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0060]	<400> 8	
[0061]	Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr	
[0062]	1 5 10	
[0063]	<210> 9	
[0064]	<211> 9	
[0065]	<212> DNA	
[0066]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0067]	<400> 9	
[0068]	ttgggttct	9
[0069]	<210> 10	
[0070]	<211> 3	
[0071]	<212> PRT	
[0072]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0073]	<400> 10	
[0074]	Leu Gly Ser	
[0075]	1	
[0076]	<210> 11	
[0077]	<211> 27	

[0156] <212> PRT
 [0157] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0158] <400> 17
 [0159] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 [0160] 1 5 10 15
 [0161] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 [0162] 20 25 30
 [0163] Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [0164] 35 40 45
 [0165] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 [0166] 50 55 60
 [0167] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0168] 65 70 75 80
 [0169] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 [0170] 85 90 95
 [0171] Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 [0172] 100 105 110
 [0173] <210> 18
 [0174] <211> 107
 [0175] <212> PRT
 [0176] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0177] <400> 18
 [0178] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 [0179] 1 5 10 15
 [0180] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [0181] 20 25 30
 [0182] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 [0183] 35 40 45
 [0184] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 [0185] 50 55 60
 [0186] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 [0187] 65 70 75 80
 [0188] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 [0189] 85 90 95
 [0190] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0191] 100 105

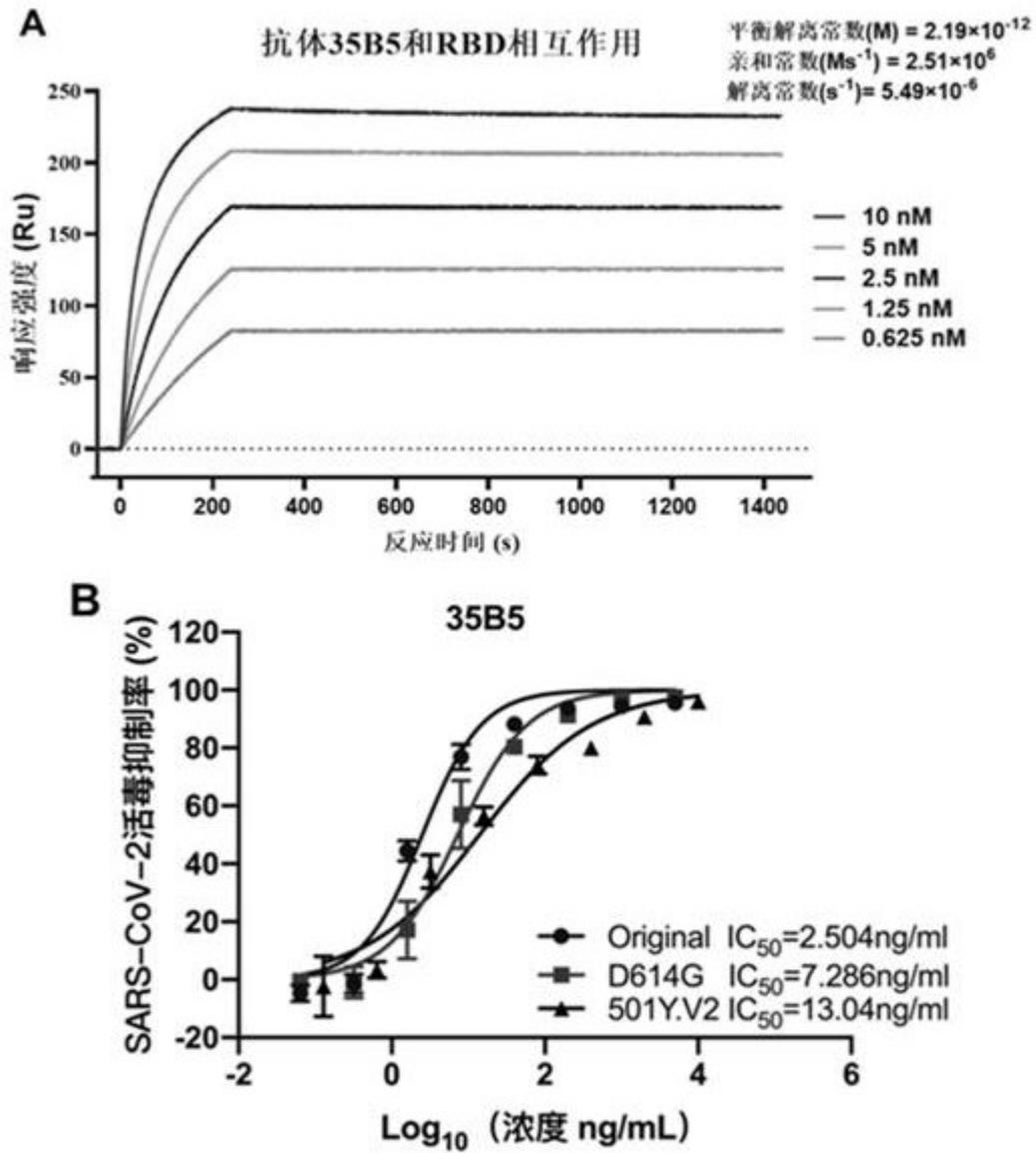


图1

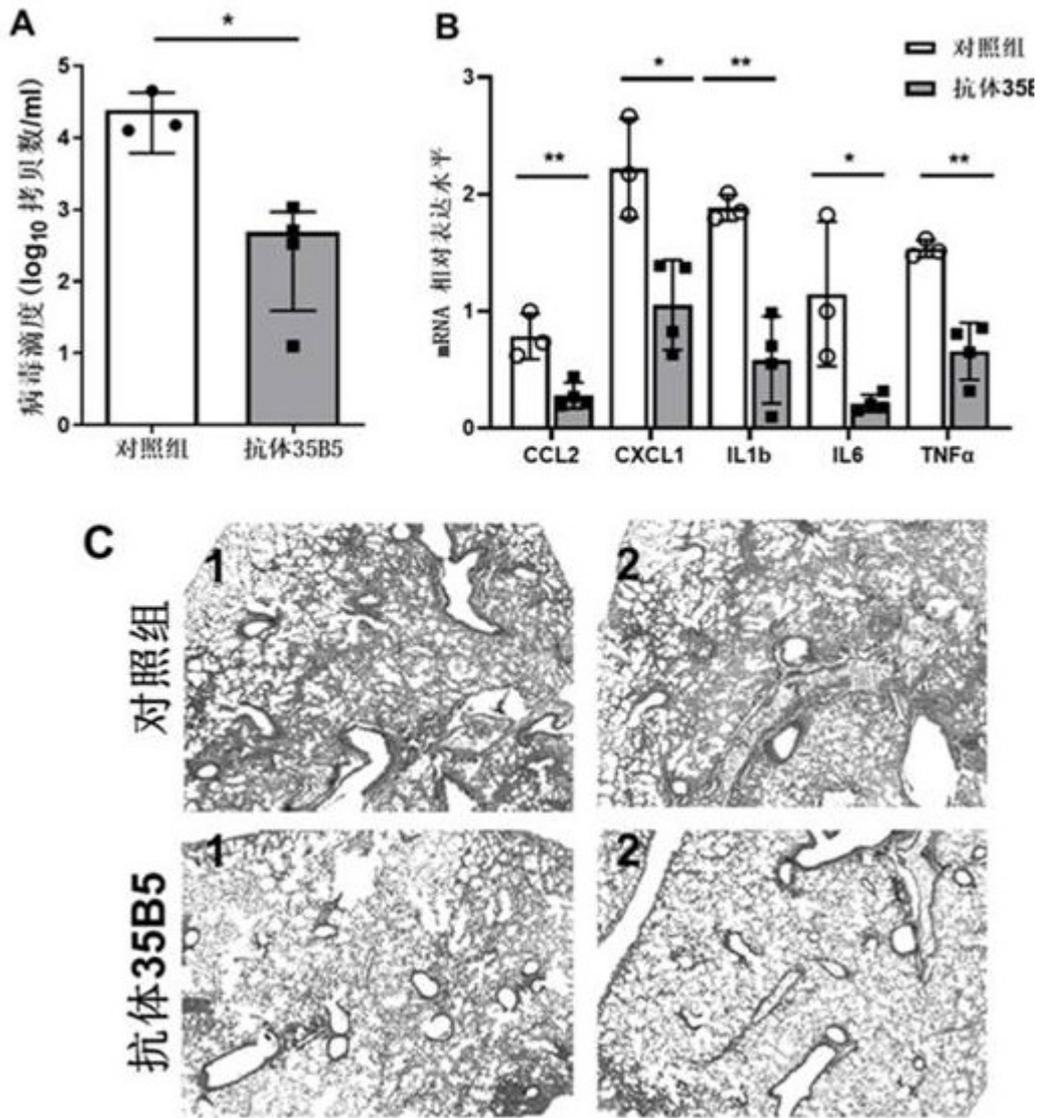


图2

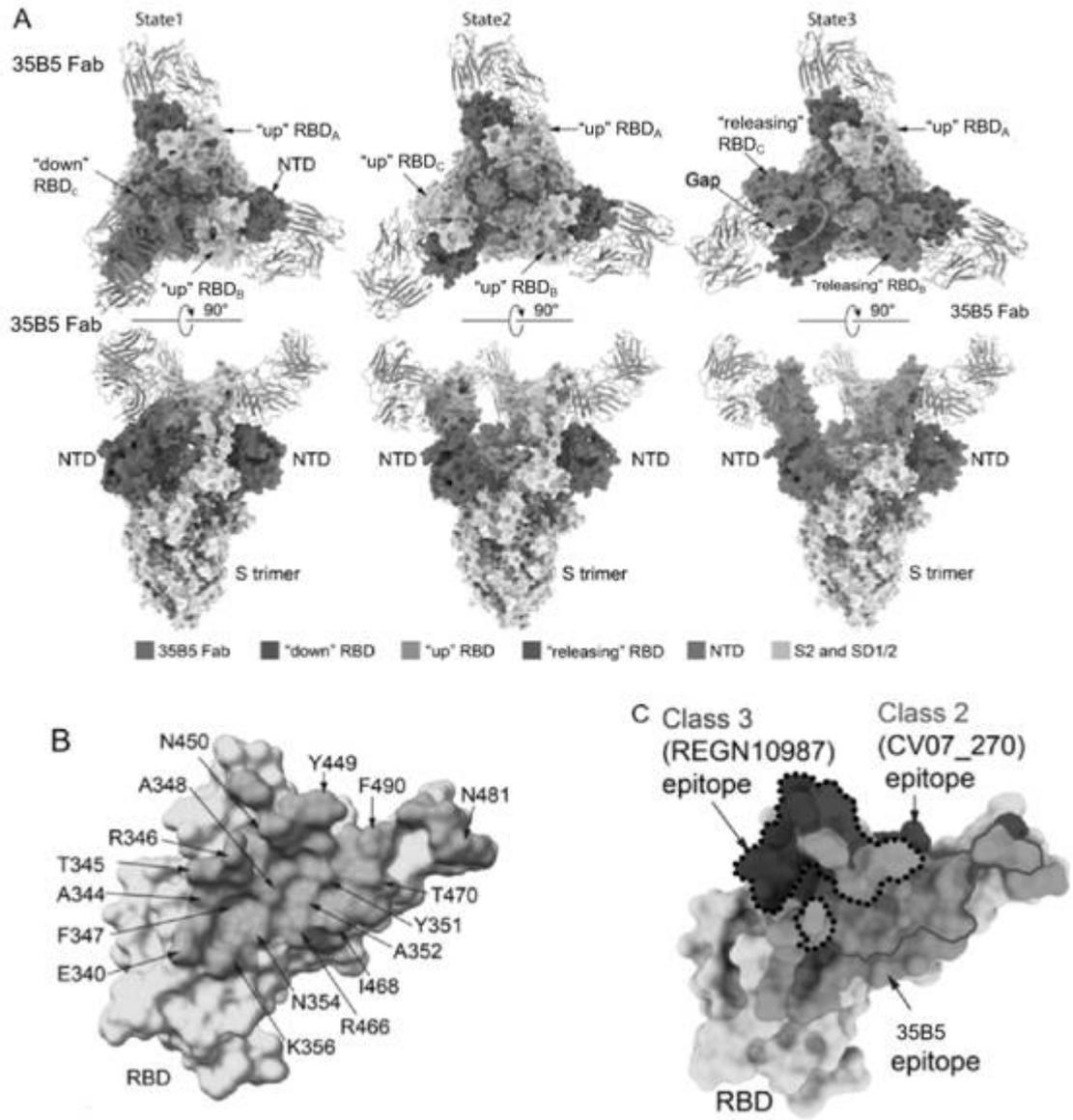


图3