

学校代码 84506

密级 _____ (2022 版)

武汉生物制品研究所
硕士学位论文

鼠源抗 SARS-CoV-2 单克隆抗体的
人源化改造及鉴定

申 请 人：周建花

导 师：潘勇兵 研究员

学 位 类 别：医学硕士

专 业 名 称：病原生物学

研 究 方 向：单克隆抗体

论文起止时间：2019 年 9 月至 2022 年 6 月

二〇二二年六月

**A dissertation submitted to Wuhan Institute of Biological
Products for the Degree of Master of Medicine**

**Humanized modification and
identification of murine monoclonal
antibody against SARS-CoV-2**

D.Candidate : Jianhua Zhou

Major : Pathogenic biology

Supervisor : Yongbing Pan

Wuhan Institute of Biological Products

Wuhan, Hubei 430207, P. R. China

June,2022

目录

英文缩略词表.....	1
摘要.....	3
Abstract.....	5
前言.....	8
技术路线.....	17
第一章 鼠源抗 SARS-CoV-2 单克隆抗体的嵌合改造及鉴定.....	18
1.1 实验材料.....	18
1.1.1 细胞、病毒及动物.....	18
1.1.2 表达载体.....	18
1.1.3 主要仪器.....	18
1.1.4 主要试剂与耗材.....	19
1.1.5 主要溶液的配制.....	21
1.2 实验方法.....	22
1.2.1 杂交瘤细胞的复苏及传代.....	22
1.2.2 杂交瘤细胞的冻存保种.....	22
1.2.3 杂交瘤细胞总 RNA 提取.....	22
1.2.4 RNA 产物琼脂糖凝胶电泳.....	23
1.2.5 RNA 反转录合成第一链 cDNA.....	24
1.2.6 PCR 扩增鼠源单抗重/轻链可变区序列.....	24
1.2.7 序列比对、分析及质粒合成.....	25
1.2.8 质粒转化 <i>E.coli</i> DH5 α 感受态细胞.....	25
1.2.9 提取质粒.....	26
1.2.10 质粒的酶切验证.....	26
1.2.11 ch20D8 单抗大量制备.....	27
1.2.12 Protein A 磁珠纯化 ch20D8 单抗.....	28
1.2.13 BCA 法测定 ch20D8 浓度.....	28
1.2.14 ELISA 检测 ch20D8 结合活性.....	29

1.2.15 ELISA 检测 ch20D8 阻断活性	29
1.2.16 ch20D8 对假病毒的中和活性检测	30
1.2.17 小鼠体内药效学评价	31
1.3 实验结果.....	31
1.3.1 杂交瘤细胞 RNA 产物.....	31
1.3.2 鼠源单抗重/轻链 PCR 产物	32
1.3.3 鼠源单抗重/轻链序列比对及分析	33
1.3.4 质粒的酶切验证	33
1.3.5 BCA 法测定 ch20D8 浓度	34
1.3.6 ELISA 检测 ch20D8 结合活性和阻断活性	34
1.3.7 ch20D8 对假病毒的中和活性检测	34
1.3.8 小鼠体内药效学评价	35
1.4 本章小结.....	37
1.5 本章讨论.....	38
1.5.1 鼠源单抗嵌合改造	38
1.5.2 动物模型	38
第二章 鼠源抗 SARS-CoV-2 单克隆抗体的人源化改造及鉴定.....	40
2.1 实验材料.....	40
2.1.1 细胞、抗体及病毒	40
2.1.2 表达载体	40
2.1.3 主要仪器	40
2.1.4 主要试剂与耗材	40
2.1.5 主要溶液的配制	41
2.2 实验方法.....	42
2.2.1 人源化单抗的改造及质粒合成	43
2.2.2 质粒转化 <i>E.coli</i> DH5 α 感受态细胞.....	44
2.2.3 提取质粒	44
2.2.4 h20D8 单抗的大量制备	44

2.2.5 Protein A 亲和层析纯化 h20D8 单抗	44
2.2.6 BCA 法测定 h20D8 浓度	44
2.2.7 h20D8 纯度及分子量检测	44
2.2.8 iCIEF 检测 h20D8 pI	45
2.2.9 h20D8 特异性检测	46
2.2.10 ELISA 检测 h20D8 结合活性和阻断活性	47
2.2.11 h20D8 对假病毒的中和活性检测	47
2.2.12 PRNT 检测 h20D8 对活病毒的中和活性	47
2.3 实验结果	48
2.3.1 人源化单抗的筛选及亲和力排序	48
2.3.2 质粒序列分析及比对	50
2.3.3 Protein A 亲和层析纯化人源化单抗	50
2.3.4 h20D8 纯度及分子量检测	50
2.3.5 iCIEF 检测 h20D8 pI	52
2.3.6 Western Blot 和 Dot Blot 检测 h20D8 特异性	52
2.3.7 ELISA 检测 h20D8 结合活性和阻断活性	53
2.3.8 h20D8 对假病毒的中和活性检测	54
2.3.9 PRNT 检测 h20D8 对活病毒的中和活性	54
2.4 本章小结	54
2.5 本章讨论	55
2.5.1 鼠源单抗人源化改造	55
2.5.2 病毒变异及免疫逃逸	56
第三章 总结与展望	57
3.1 全文总结	57
3.2 展望	57
参考文献	59
附录 I 图表说明	63
附录 II 攻读学位期间发表论文目录	77

致 谢..... 78

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
CoV	coronavirus	冠状病毒
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus	严重急性呼吸系统综合征冠状病毒
MERS-CoV	middle east respiratory syndrome coronavirus	中东呼吸系统综合征冠状病毒
COVID-19	coronavirus disease 2019	新型冠状病毒肺炎
kb	kilobase	千碱基对
kDa	kilodalton	千道尔顿
ORF	open reading frame	开放阅读框
NSP	non-structural protein	非结构蛋白
S	spike protein	刺突蛋白
M	membrane protein	膜蛋白
E	envelope protein	包膜蛋白
N	nucleocapsid protein	核衣壳蛋白
RBD	receptor binding domain	受体结合域
NTD	N-terminal domain	N端结构域
ACE2	angiotensin-converting enzyme 2	血管紧张素转化酶2
TMPRSS2	transmembrane protease serine 2	跨膜丝氨酸蛋白酶2
FP	fusion peptide	融合肽
HR	heptad repeat region	七肽重复序列
TM	transmembrane	跨膜
IC	intracellular	胞质
IL	interleukin	白介素
TNF- α	tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子
PRR	pattern recognition receptor	模式识别受体
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
rRNA	ribosomal RNA	核糖体RNA
IFN	interferons	干扰素
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA依赖的RNA聚合酶
VOC	variant of concern	值得关注的变异株
VOI	variant of interest	关注变异株
VUM	variant under monitoring	需进一步监测的变异株
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
NBS	newborn bovine serum	新生牛血清
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
nAb	neutralizing antibody	中和抗体
cDNA	complementary DNA	互补DNA
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白G
CDR	complementarity determining region	互补决定区
FR	framework region	骨架区
CH	constant region of heavy chain	重链恒定区
CL	constant region of light chain	轻链恒定区
VH	variable region of heavy chain	重链可变区
VL	variable region of light chain	轻链可变区
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
WB	Western Blot	蛋白质印迹实验
DB	Dot Blot	蛋白质斑点杂交实验
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
CE	capillary electrophoresis	毛细管电泳
iCIEF	imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis	成像毛细管等电聚焦电泳
pI	isoelectric point	等电点
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EC ₅₀	50% effective concentration	半数有效浓度
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	半数抑制浓度
MNT	micro-neutralization test	微量细胞中和法
PRNT	plaque reduction neutralization test	蚀斑减少中和试验
RLU	Relative light unit	相对光单位

鼠源抗 SARS-CoV-2 单克隆抗体的人源化改造及鉴定

摘要

2019 年 12 月, 由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引发的人类新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 疫情暴发, 并迅速波及全球, 严重危害了人类身体健康和全球经济发展。随着疫情的不断反复, 抗疫形势严峻。本课题旨在对前期通过杂交瘤技术筛选获得的抗 SARS-CoV-2 鼠源单抗 20D8 进行人源化改造, 并对改造后的抗体进行功能鉴定, 以期对 SARS-CoV-2 治疗性抗体药物的研发奠定一定基础。

本课题首先提取杂交瘤细胞 20D8 总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 设计特异性引物, 钓取鼠源单抗重/轻链可变区序列; 然后将鼠源单抗重/轻链可变区序列和人单抗 IgG1/ κ 的恒定区序列进行拼接, 分别加上相应的信号肽和酶切位点等, 合成至 KS001 表达载体, 构建重组质粒后, 瞬转 Expi293F 细胞表达嵌合单抗 ch20D8; 再对 ch20D8 抗体进行体外功能鉴定, 并进一步在 K18-hACE2 转基因小鼠体内进行药效学评价。结果显示, 嵌合改造后的 ch20D8 亲和力几乎未下降, ch20D8 对原型株受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 结合活性半数有效浓度 (50% effective concentration, EC_{50}) 为 2.848 ng/mL, 阻断原型株 RBD 与血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 结合的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}) 为 156.8 ng/mL, 对原型株假病毒中和活性 IC_{50} 为 1.504 ng/mL, 对其他变异株也具有较强的结合活性、阻断活性和中和活性; 小鼠体内药效学评价结果表明, ch20D8 对感染 B.1.617.2 变异株活病毒的 K18-hACE2 小鼠具有较好的保护效果。以上结果证明了钓取的鼠源单抗可变区序列的正确性, 且鼠源抗体嵌合改造成功。

为进一步降低抗体鼠源成分, 采用互补决定区 (complementarity determining region, CDR) 移植技术及回复突变技术对鼠源单抗 20D8 进行人源化改造, 并对改造后的抗体进行功能鉴定。首先, 构建人源化组合突变 Fab 文库, 并对文库进行筛选, 得到具有高亲和力且回复突变位点少的 Fab 克隆; 然后, 将筛选到的 Fab 克隆插入到已含抗体恒定区 (IgG1/ κ) 序列的 pcDNA3.4 载体中, 构建完整的重/轻链重组质粒后, 瞬转 Expi293F

细胞表达人源化单抗 h20D8；再对 h20D8 进行一系列的鉴定，包括理化及生物学活性的鉴定。理化鉴定结果显示，h20D8 重/轻链大小与理论分子量基本一致，纯度较高，等电点 (isoelectric point, pI) 为 7.928~8.716。生物学活性鉴定结果显示，h20D8 对原型株 RBD 结合活性 EC_{50} 为 3.641 ng/mL，阻断原型株 RBD 和 ACE2 结合的 IC_{50} 为 227.6 ng/mL，对原型株假病毒和活病毒中和活性 IC_{50} 分别为 2.874 ng/mL 和 14.46 ng/mL，对其他变异株也具有较强的结合活性、阻断活性和中和活性。与 ch20D8 相比，h20D8 结合活性、阻断活性和中和活性几乎未下降，人源化改造成功。

综上，本课题钓取了鼠源单抗 20D8 可变区序列，并成功对其进行了人源化改造，改造后的 h20D8 单抗亲和力及生物学活性几乎未下降，对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株均具有强中和活性，这为后续开发广谱、高效的 SARS-CoV-2 治疗性抗体药物奠定了基础。

关键词：SARS-CoV-2；单克隆抗体；嵌合改造；人源化改造；中和活性；变异株

Humanized modification and identification of murine monoclonal antibody against SARS-CoV-2

Abstract

In December 2019, the outbreak of COVID-19, caused by SARS-CoV-2, quickly spread to the world, seriously jeopardizing human health and global economic development. As the epidemic continues to recur, the situation is grim. The purpose of this project is to humanize the murine monoclonal antibody 20D8 against SARS-COV-2 obtained by hybridoma screening in the early stage, and functional identification of antibodies was performed, in order to lay a certain foundation for the development of SARS-CoV-2 therapeutic antibody drugs.

In this project, total RNA 20D8 of hybridoma cells was firstly extracted and reversely transcribed into cDNA, and specific primers were designed to obtain the variable region sequences of heavy/light chain of murine monoclonal antibodies. Then, the variable region sequences of heavy/light chain of murine monoclonal antibody and the constant region sequences of humanized monoclonal antibody IgG1/ κ were spliced, and corresponding signal peptides and restriction sites were added, respectively, to construct recombinant plasmid into KS001 expression vector. The recombinant plasmid was constructed, and the chimeric antibody ch20D8 was expressed in Expi293F cells. The functional identification of antibodies was performed in vitro, and the pharmacodynamics of ch20D8 was evaluated in K18-hACE2 transgenic mice. The results showed that the affinity of ch20D8 hardly decreased after chimeric modification. The EC_{50} of ch20D8 against RBD (prototype strain) was 2.848 ng/mL, the IC_{50} of ch20D8 against RBD (prototype strain) and ACE2 was 156.8 ng/mL, and the IC_{50} of ch20D8 against pseudovirus (prototype strain) was 1.504 ng/mL. It also had strong binding, blocking and neutralizing activities against other mutant strains. The results of pharmacodynamic evaluation in mice showed that ch20D8 had a good protective effect on K18-hACE2 mice infected with live virus (B.1.617.2 strain). The above results proved the

correctness of the variable region sequence of the obtained murine monoclonal antibody and the chimeric modification of murine monoclonal antibody was successful.

In order to further reduce the components of murine monoclonal antibody, CDR transplantation technique and reverse-mutation technique were used to humanize murine monoclonal antibody 20D8, and functional identification of antibodies was performed. First, a humanized combined mutation Fab library was constructed and screened to obtain Fab clones with high affinity and few reverting mutation sites. Then, the Fab clones were inserted into pcDNA3.4 vector containing the antibody constant region (IgG1/ κ) sequence to construct the complete heavy/light chain recombinant plasmid. The plasmid was transfected into Expi293F cells to express humanized monoclonal antibody h20D8. Then a series of identification of h20D8, including physicochemical and biological activity identification. Physicochemical identification results showed that the heavy/light chain size of h20D8 was basically consistent with the theoretical molecular weight, with high purity and isoelectric point of 7.928~8.716. Biological activity identification results showed that the EC_{50} of h20D8 against RBD (prototype strain) was 3.641 ng/mL, the IC_{50} of h20D8 against RBD (prototype strain) and ACE2 was 227.6 ng/mL, and the IC_{50} of neutralizing activity against pseudovirus and live virus (prototype strain) were 2.874 ng/mL and 14.46 ng/mL, respectively, and they also showed strong binding, blocking and neutralizing activity against other mutant strains. Compared with ch20D8, the binding activity, blocking activity and neutralizing activity of h20D8 almost did not decrease, and the humanized modification was successful.

In conclusion, the variable region sequence of murine monoclonal antibody 20D8 was obtained in this project, and the humanized modification was successfully carried out. The affinity and biological activity of the modified h20D8 monoclonal antibody almost did not decrease, and it had strong neutralizing activity against the prototype strain, B.1.1.7, B.1.351, P.1 and B.1.617.2 mutants. This laid a foundation for the subsequent development of broad-spectrum and highly effective SARS-CoV-2 therapeutic antibody drugs.

Key Word: SARS-CoV-2; Monoclonal antibody; Chimeric modification; Humanized

modification; Neutralizing activity; mutant

前言

1 SARS-CoV-2 概述

1.1 冠状病毒

冠状病毒 (coronavirus, CoV) 是一种有包膜的 RNA 病毒, 其基因组大小约为 26~32 kb, 含有已知 RNA 病毒中最大的基因组^[1], 因其包膜上有向四周伸出的突起, 状如花冠而命名^[2], 包括 4 个属 (α , β , γ 和 δ)^[3], 在自然界中广泛存在, 能够感染鸟类、哺乳动物及人类等多个物种。人类致病性冠状病毒主要有 7 种, 主要引起呼吸系统感染^[4]。其中, 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 和中东呼吸系统综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 均为高致病性的冠状病毒, 它们分别于 2002 年和 2012 年引发人类重大呼吸系统疾病^[5]。2019 年 12 月, 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的出现, 引发了全球范围内病毒性肺炎的暴发^[6]。在短短 20 年间, CoV 已经引发了 3 次严重的呼吸系统疾病爆发, 截至 2022 年 5 月 16 日, 这 3 种 CoV 均已被列入 WHO 高威胁清单。

1.2 SARS-CoV-2 基因组

SARS-CoV-2 基因组大小约 29.8 kb^[7] (见图 1.1), 为有包膜的单股正链 RNA 病毒, 而且是已知的基因组最大的 RNA 病毒^[8]。基因组序列和其他 CoV 的基因组序列相似性极高, 与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的序列一致性分别约为 79% 和 50%^[6, 9]。基因组结构与其他 β 冠状病毒相似, 包含两个侧翼非翻译区、一个编码多聚蛋白的长开放阅读框 (open reading frame, ORF)。长 ORF 至少包含 12 个小的 ORF, 编码至少 27 种蛋白质。位于 5' 端的两个 ORF 较长 (ORF1a 和 ORF1b, 约占整个 ORF 的三分之二), 主要编码与病毒复制相关的一些非结构蛋白 (non-structural protein, NSP)。其编码产生的 2 条多聚蛋白 (pp1a 和 pp1b), 会被病毒编码的木瓜样蛋白酶、主蛋白酶和 3C 样蛋白酶水解产生 16 个 NSP (NSP.1~NSP.16)^[10, 11]。位于 3' 端的 ORF, 约占整个 ORF 的三分之

一，主要编码 4 种病毒结构蛋白：刺突蛋白（spike protein, S 蛋白）、膜蛋白（membrane protein, M 蛋白）、包膜蛋白（envelope protein, E 蛋白）和核衣壳蛋白（nucleocapsid protein, N 蛋白）（见图 1.1）^[12]。

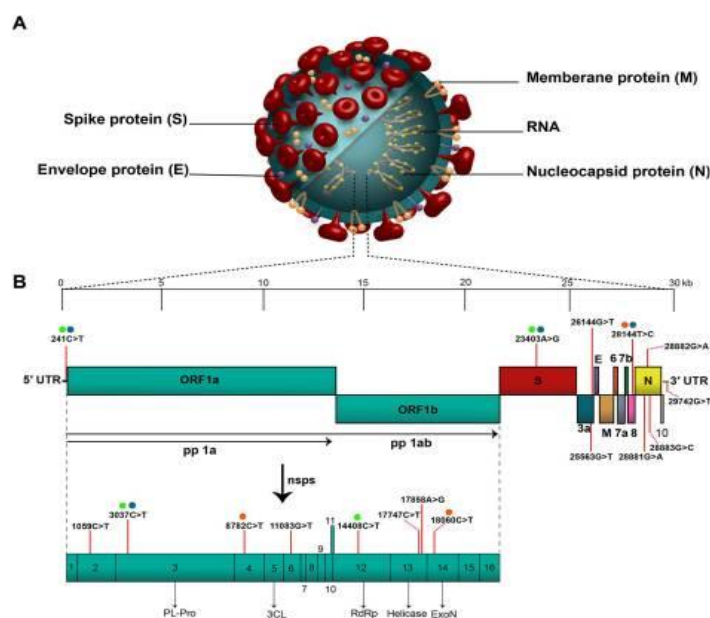


图 1.1 SARS-CoV-2 基本结构和基因组结构

Fig1.1 Basic structure and genome structure of SARS-CoV-2

注：图 A 为 SARS-CoV-2 基本结构；图 B 为 SARS-CoV-2 基因组结构。

SARS-CoV-2 编码产生的病毒相关蛋白质中，S 蛋白是介导病毒进入细胞的关键蛋白^[13]。S 蛋白是一类有大量糖基化修饰的同源三聚体蛋白，是病毒表面重要的标志蛋白，每个 S 蛋白包括 S1 和 S2 两个功能不同的亚基。S1 包含一个信号肽、N 端结构域（N-terminal domain, NTD）和受体结合域（receptor-binding domain, RBD），RBD 可以特异性和人血管紧张素转化酶 2（ngiotensin-converting enzyme 2, ACE2）受体结合。S2 包含一个融合肽（fusion peptide, FP）、2 个七肽重复序列（heptad repeat region, HR）HR1 和 HR2，一个跨膜（transmembrane, TM）结构域以及一个胞质（intracellular, IC）结构域，介导膜融合^[10]。同时 S1 和 S2 中间存在一个多碱基剪切位点，细胞的组织蛋白酶 L 和跨膜丝氨酸蛋白酶 2（transmembrane protease serine 2, TMPRSS2）通过酶切作用可以对该位点进行剪切，然后病毒便能够入侵宿主细胞。

1.3 SARS-CoV-2 的感染症状和免疫反应

SARS-CoV-2 对全世界的人口、卫生和政府呈现出前所未有的挑战，成为全球公共卫生热点，严重地影响了全球人类健康、社会生活方式以及经济发展。病毒在人体内的潜伏期是 2~14 天，时间长短主要与患者的年龄和免疫系统强弱有关。患者临床常见症状为发烧、干咳、咯痰、呼吸困难、咽喉疼痛和头痛等^[14]，有些患者还会出现腹泻和呕吐等胃肠道症状^[15]；其中，发烧和干咳是最常见的首发症状^[16]。人体感染病毒后会引发 COVID-19，大多数患者症状较轻，与普通流感没有什么差别，但也有少数重型或危重型患者会出现急性呼吸窘迫综合征、肾脏和胰腺急性损伤、胃肠道腹泻和恶心、鼻腔发炎失去嗅觉、心脏衰竭和眼睛结膜炎等症状，最终引发系统性多器官衰竭而死亡^[17]。

SARS-CoV-2 入侵宿主后会引发一系列的先天和适应性免疫反应，先天免疫反应是抗病毒感染的第一道防线。病毒入侵细胞后，细胞首先通过模式识别受体（pattern recognition receptor, PRR）、Toll 样受体或视黄酸诱导基因 I 样受体识别病毒复制过程中产生的单链 RNA 和双链 RNA。当 RNA 被这些受体识别后，PRR 被激活并通过下游信号级联触发细胞因子的分泌。其中，I/III 型干扰素（interferons, IFN）被认为是抗病毒防御最重要的，其他促炎性肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor α , TNF- α ）、白介素-1（interleukin 1, IL-1）、IL-6 和 IL-18 也被释放，这些细胞因子共同在靶细胞中诱导抗病毒免疫程序并增强^[18]。由于 IFN 途径是病毒感染的主要屏障，CoV 已经进化出多种机制来抑制 IFN 的诱导和信号转导。通常，CoV 可以通过主动隔离病毒核酸和破坏关键调控因子，或以其他方式干扰 IFN 系统来逃避 IFN 途径^[19]。事实上，重症和危重症 COVID-19 患者 IFN-I 信号显著受损，导致持续性的病毒血症，并进一步导致 TNF- α 和 IL-6 表达上调加剧炎症反应^[20]。病毒感染人体后还会引发 B 细胞和 T 细胞的免疫反应。感染后会在短时间内产生病毒特异性 IgM、IgA 和 IgG 中和抗体（neutralizing antibody, nAb），由此引发体液免疫反应，快速清除病毒并防止病毒再感染；细胞免疫中，CD4⁺T 细胞帮助 B 细胞产生抗体并协调其他免疫细胞的反应，而 CD8⁺T 细胞杀死被感染的细胞以减轻病毒负担^[18]。尽管机体的免疫系统会协同以对抗病毒感染，但是由于病毒的不断进化变异和逃逸以及个体免疫能力的有限性，导致疫情仍在持续。据 WHO 数据显示，截至 2022 年 5 月 16 日，已造成 5.19 亿确诊病例，并导致至少 626 万例死亡病例^[21]，COVID-19 已形成全球大流行，人类对疫情的关注仍需继续。

1.4 SARS-CoV-2 的感染及复制机制

SARS-CoV-2 的入侵首先是病毒 S 蛋白上的 RBD 和靶细胞上相关受体相互作用以及宿主蛋白酶对 S 蛋白的启动^[22] (SARS-CoV-2 复制周期示意图见图 1.2)。SARS-CoV-2 主要通过核内体或者溶酶体途径依赖蛋白质水解作用进入细胞^[23]。SARS-CoV-2 的 S 蛋白与靶细胞表面的 ACE2 一旦相互结合, S 蛋白上 S1 和 S2 亚基中间的多碱基剪切位点便被 TMPRSS2 剪切并激活。S2 亚基的 FP 和 TM 分别嵌入在细胞膜和病毒外壳中, 随后形成六聚物发夹结构, 细胞与病毒之间的空间距离缩短, 加速了膜融合^[24]。

病毒与细胞发生膜融合后, 病毒基因组被释放到细胞质中, 开始翻译病毒蛋白质。其中 NSP 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerases, RdRps) 形成复制复合物, 负责合成全长负链基因组 RNA。RNA 复制完成后, S、M、E 和 N 蛋白也被翻译合成。N 蛋白与基因组 RNA 结合, 而 S、M 和 E 蛋白被整合到内质网膜上, 并进一步运送到内质网-高尔基体中间区室中与 N 蛋白和病毒基因组进行组装, 再进一步运送到细胞表面并通过胞吐作用释放, 形成新的子代病毒^[25]。

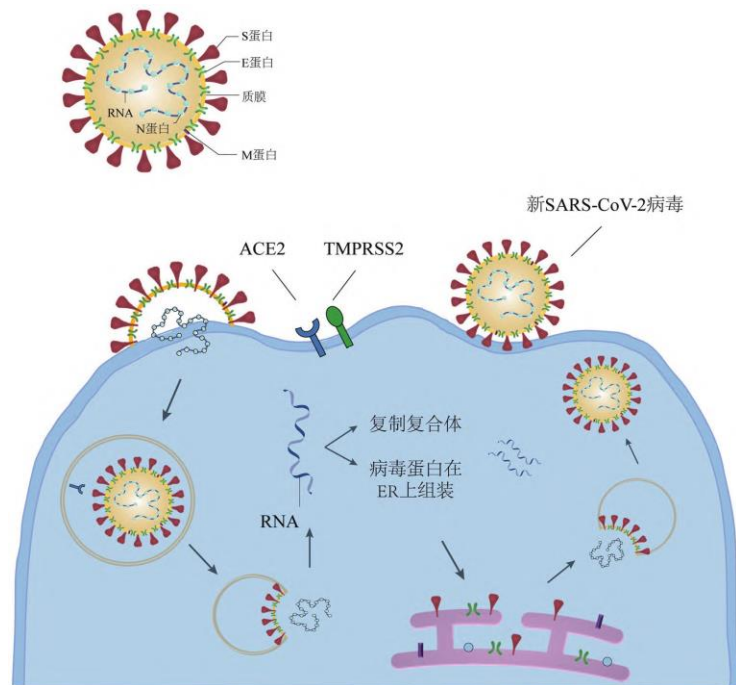


图 1.2 SARS-CoV-2 复制周期示意图^[24]

Fig1.2 Schematic diagram of replication cycle of SARS-CoV-2

1.5 SARS-CoV-2 突变机制和变异株

1.5.1 SARS-CoV-2 的突变机制

逆转录是病毒复制过程中必不可少的过程，SARS-CoV-2 是 RNA 病毒，而 RNA 病毒在逆转录过程中涉及到的低保真性的 RdRps 是病毒高突变率的重要原因之一。由于 RdRps 在逆转录合成 cDNA 的过程中缺少校正功能，合成的 cDNA 出错率较高，所以单链 RNA 病毒较之于双链 DNA 病毒更容易发生基因组突变^[26]。

此外宿主细胞内多种因子可以直接编辑 SARS-CoV-2 基因组并进而影响该病原体基因组进化。例如作用于 RNA 的腺苷脱氨酶可以将腺嘌呤脱氨为肌苷，肌苷可与胞嘧啶配对；活性氧化物可以将鸟嘌呤氧化为氧鸟嘌呤，氧鸟嘌呤可与腺嘌呤配对等^[27]。而且，SARS-CoV-2 病毒复制过程中较大的 RNA 基因组允许通过突变对基因组进行额外的修饰，从而增加了种内变异、种间“宿主跳跃”和 SARS-CoV-2 在适当条件下出现的可能性^[1, 28]。

不过，有研究表明，在病毒物种多样性、毒性和进化之间有一种微妙的平衡。RNA 病毒复制的低保真度，导致病毒的多样性，但低复制保真度允许 RNA 病毒适应不同的复制环境和选择压力，也会导致病毒灭绝^[29]。CoV 在复制过程中具有校对机制，如非结构蛋白 NSP14 在 CoV 中高度保守，其 3' -5' 外切酶校对功能可能是扩大和维持如此大的基因组复制保真性的关键因素^[30]。

1.5.2 SARS-CoV-2 变异株

据 WHO 统计，截至 2022 年 5 月 16 日，有 5 种值得关注的变异株 (variant of concern, VOC) ^[31]，分别是①Alpha 变异株，2020 年 9 月首次出现于英国，其 S 蛋白主要携带 N501Y 和 D614G 等突变位点，与早期流行毒株相比，致死性超过 30%^[32]；②Beta 变异株，2020 年 5 月首次出现于南非，其 S 蛋白主要携带 N501Y、E484K、K417N 和 D614G 等突变位点，与早期流行毒株相比，传播能力增强约 25%^[33]；③Gamma 变异株，2020 年 11 月首次出现于巴西，其 S 蛋白主要携带 N501Y、E484K、K417T 和 D614G 等突变位点，与早期流行毒株相比，传播能力增强约 38%^[33]；④Delta 变异株，2020 年 10 月首次发现于印度，其 S 蛋白主要携带 L452R、T478K、D614G 和 P681R 等突变位点，与早期流行毒株相比，传播能力增强约 97%^[33]；⑤Omicron 变异株，2021 年 11 月首次

发现于南非，其 S 蛋白有 30 多处突变，存在于 RBD 区域的突变就多达 15 处，是 RBD 中突变最多的，这些突变导致了很大程度的病毒逃逸和抗体失效，且随着疫情的持续，Omicron 已取代 Delta 成为 COVID-19 大流行的主要危险变异株。

此外，截至 2022 年 5 月 16 日，WHO 还定义了 8 种关注变异株 (variant of interest, VOI)，分别是 Epsilon、Zeta、Eta、Theta、Iota、Kappa、Lambda 和 Mu 变异株，它们具有预测或已知会影响病毒特征（如传播性、疾病严重程度、免疫逃逸、诊断或治疗逃逸）的基因变化和被确定在多个国家引起重大社区传播或多个 COVID-19 聚集性病例，随着时间的推移，相对流行率不断上升，病例数量也在增加，或产生其他明显的流行病学影响，对全球公共卫生构成了新出现的风险。WHO 还定义了 2 种需进一步监测的变异株 (variant under monitoring, VUM)，分别是 B.1.640 和 XD 变异株，它们被怀疑会影响病毒特征，有可能会在未来造成风险，需要加强监测^[31]。

2 针对 SARS-CoV-2 的治疗方法

鉴于疫情的紧迫性，各国都在探索不同的治疗策略，主要有：①小分子抗病毒药物。如 3C 样蛋白酶抑制剂可以抑制病毒 RNA 翻译出来的多肽链成为 RNA 聚合酶，是阻断病毒复制的重要途径。美国辉瑞公司的小分子口服新冠特效药 Paxlovid，在临床研究中可使 COVID-19 患者的住院率或死亡风险降低 89%^[34]。②康复者血浆。康复者血浆含有特异性抗 SARS-CoV-2 的免疫球蛋白，可以对病毒起到中和作用，使患者获得被动免疫，从而起到治疗作用。DUAN^[35]等使用康复者血浆治疗 COVID-19 危重症患者，起到了良好的效果。③单克隆抗体。单克隆抗体是由 B 细胞产生的具有高度均一性和特异性，仅针对某一特定抗原表位的抗体，具备中和活性的单克隆抗体具有靶点明确、特异性好、安全性高、便于大规模制备等优势，因此成为新冠疫情防控研究的热点。目前，国内外已有多种单抗上市，如腾盛博药医药技术有限公司的 BR11-196/BR11-198 组合单抗^[36]和美国再生元制药公司的 REGN-COV^[37]分别在中国和日本获批上市。④细胞疗法。间充质干细胞可以抑制免疫系统过度激活，产生炎性细胞因子来调节免疫系统，并促进病毒感染后肺部内源性修复和再生机制。赵春华团队的实验证明静脉移植骨髓间充质干细胞治疗 COVID-19 肺炎的安全有效性，特别是对于危重症患者疗效显著^[38]。

3 SARS-CoV-2 中和抗体筛选技术

鼠杂交瘤细胞融合技术较为传统，通过病毒抗原蛋白免疫 BALB/c 小鼠，激发小鼠免疫系统产生抗体，然后取脾脏 B 细胞和同系骨髓瘤细胞在体外发生融合，筛选出具有强结合活性或阻断活性的细胞株制备抗体。鼠源单抗亲和力高，但鼠源性成分易引起人抗鼠抗体反应，需对其进行改造以降低免疫原性。本课题中鼠源单抗 20D8 即采用该技术筛选获得。

噬菌体展示技术利用人和其他动物的 B 细胞进行体外建库并筛选与抗原特异性结合的抗体^[39]，该技术将基因表达产物和亲和选择相结合，具有周期短、筛选容量大、可发酵大量生产、方法简单等优点，是一种基于定向进化的高通量筛选技术，被广泛应用于高亲和力抗体的筛选工作。本实验室 2B11 单抗即采用该技术筛选获得^[40]，目前，正在开展 I 期临床试验。

单个 B 细胞分选技术可以直接以康复病人的外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）作为起始材料，从中分离 B 细胞，然后结合流式细胞分选技术，筛选出分泌目标抗体的 B 细胞，再通过分子生物手段获取抗体基因。该技术具有高通量和高特异性等优点，且得到的抗体保留了基因多样性和重/轻链的天然配对。美国礼来制药公司的 LY-CoV555^[41]、上海君实生物医药科技股份有限公司的 JS016^[42]和腾盛博药医药技术有限公司的 BR11-196/BR11-198^[36]就是采用该技术筛选获得。

转基因小鼠技术是通过同源重组的方法，用人的抗体基因来代替相应的鼠抗体生成基因，制备转基因小鼠，小鼠受抗原刺激后，选择人的抗体基因片段并活化 B 细胞分泌全人源抗体。该技术具备周期短和抗体亲和力高的优势。美国再生元制药公司就是联合转基因小鼠技术和单个 B 细胞分选技术，筛选获得 RGEN-COV 抗体^[37]。

4 SARS-CoV-2 中和抗体药物研究进展

疫情持续期间，国内外一直致力于中和抗体药物的研发，多家抗体药物已获批上市或处于临床研究阶段（见表 1.1）。如腾盛博药医药技术有限公司的 BR11-196/BR11-198 组合单抗、美国再生元制药公司的 REGN-COV（REGN10933/REGN10987 组合单抗）^[37]

和韩国 Celltrion 公司的 CT-P59^[43]分别在中国、日本和欧盟获批上市。在国外，美国礼来制药公司的 LY-CoV555^[44]/LY-CoV016^[45]、美国 Vir 制药公司和英国葛兰素史克(GSK)公司联合开发的 VIR-7831^[46]以及英国阿斯利康的 AZD7442 (AZD8895/AZD1061 组合单抗)^[47]等中和单抗均处于III期临床阶段，且已取得美国 FDA 的紧急使用授权。在国内，上海君实生物医药科技股份有限公司的 JS016 和 JS026^[45]、神州细胞工程有限公司的 SCTA01^[48]、北京大学与丹序生物制药有限公司合作的 DXP-593 和 DXP-604^[49]、绿叶制药集团有限公司的 LY-Cov Mab^[50]、迈威生物科技股份有限公司的 MW33^[51]、复宏汉霖生物技术有限公司的 HLX70、济民可信集团有限公司的 JMB2002^[52]、和铂医药有限责任公司的 ABBV-47D11 和本实验室的 2B11^[40]等，均已处于临床研究阶段。

表 1.1 已批准或处于临床阶段的抗 SARS-CoV-2 单抗药物

Tab 1.1 Approved or clinically advanced anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody drugs

抗体名称	抗体类型	研发机构	靶点	研发阶段
REGN-COV (REGN10999/REGN10987)	全人源组合 单抗	美国再生元制药公司	RBD	FDA 颁发 EUA 欧盟、日本获批 上市
LY-CoV555/LY-CoV016	全人源组合 单抗	美国礼来制药公司/上海君 实生物医药科技股份有限 公司	RBD	FDA 颁发 EUA
VIR-7831	全人源单抗	美国 Vir 制药公司/英国葛 兰素史克 (GSK) 公司	RBD	FDA 颁发 EUA 欧盟营销授权
AZD7442 (AZD8895/AZD1061)	全人源组合 单抗	英国阿斯利康/ 美国范德堡大学	RBD	FDA 颁发 EUA
CT-P59	全人源单抗	韩国 Celltrion 公司	RBD	欧盟获批上市
TY027	全人源单抗	新加坡 Tychan 公司	RBD	临床III期
STI-1499	全人源单抗	美国 Sorrento Therapeutics 公司	RBD	临床I期
SAB-185	全人源单抗	美国 SAB 公司	RBD	临床I期
BRII-196/BRII-198	全人源组合 单抗	腾盛博药医药技术有限公 司/清华大学	RBD	NMPA 获批上市
JS016	全人源单抗	上海君实生物医药科技股 份有限公司	RBD	临床III期
JS026	全人源单抗	神州细胞工程有限公司	RBD	临床I期
SCTA01	全人源单抗	神州细胞工程有限公司	RBD	临床II/III期
DXP-593/DXP-604	全人源组合 单抗	北京大学/丹序生物制药有 限公司	RBD	临床 II 期
LY-Cov Mab	全人源单抗	绿叶制药集团有限公司	RBD	临床II期
MW33	全人源单抗	迈威生物科技股份有限公司	RBD	临床II期
HLX70	全人源单抗	复宏汉霖生物技术有限公 司	RBD	临床I期
JMB2002	全人源单抗	济民可信集团有限公司	RBD	临床I期
ABBV-47D11	全人源单抗	和铂医药有限责任公司	RBD	临床I期
2B11	全人源单抗	武汉生物制品研究所有限 责任公司	RBD	临床I期

5 SARS-CoV-2 中和抗体功能评价

目前已有多种技术和方法来筛选抗 SARS-CoV-2 的中和抗体,在进入临床试验前,需要对中和抗体的功能进行全面的鉴定。抗 SARS-CoV-2 单抗的功能鉴定包括体外和体内两方面。

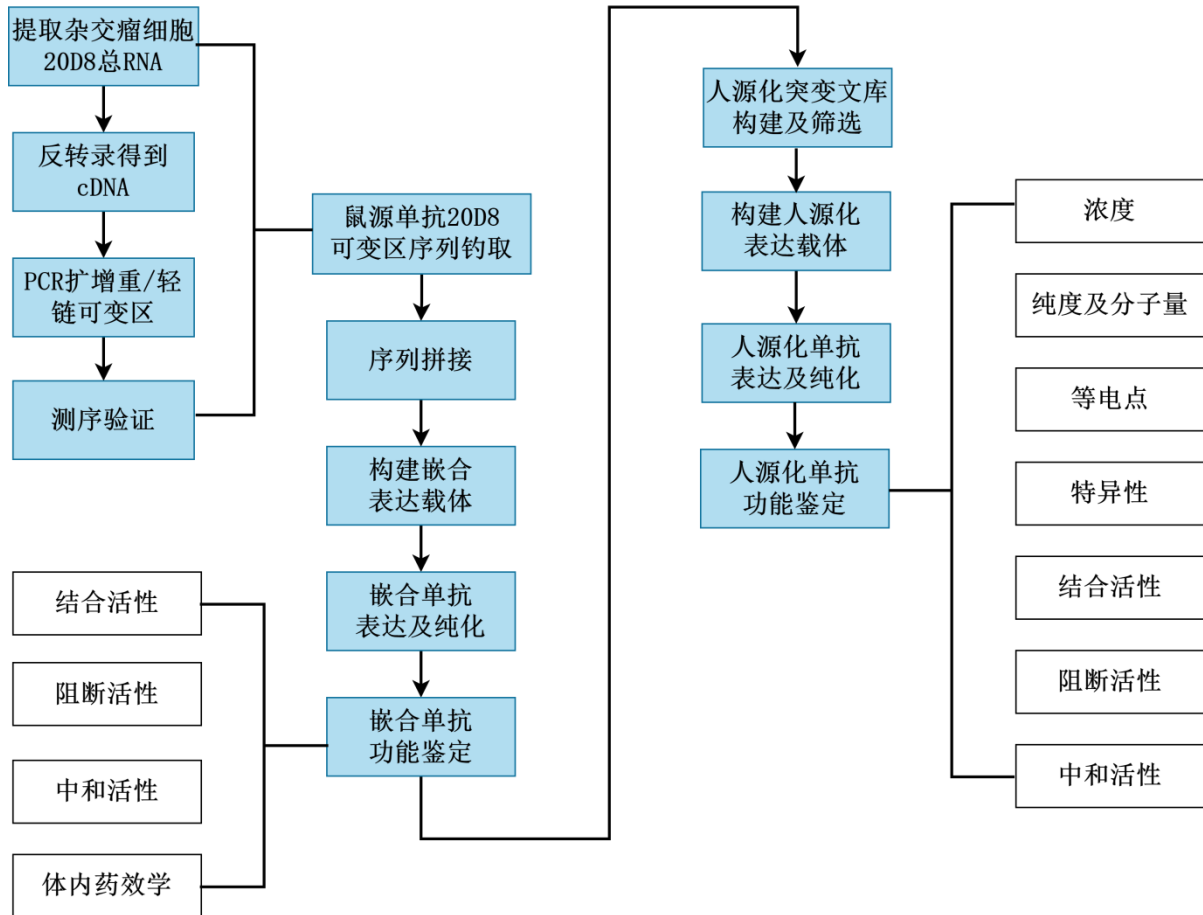
抗体的体外功能鉴定主要包括结合活性、阻断活性、亲和力及中和活性等。结合活性和阻断活性可利用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 进行检测,亲和力和阻断活性可利用流式竞争法和表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance technology, SPR) 进行快速高通量分析。中和活性常采用微量细胞中和法 (micro-neutralization test, MNT) 和蚀斑减少中和试验 (plaque reduction and neutralization test, PRNT) 等活病毒感染抑制试验进行评价。由于活病毒操作对生物安全实验室要求高,许多实验室采用假病毒来代替活病毒,进行中和活性的鉴定。

体内验证要求能够模拟病毒感染人体的机理,所以找出理想的动物模型是评价中和抗体药效的关键因素。啮齿类动物在 COVID-19 研究中应用广泛,小鼠作为科学研究中常用物种,与人类基因组高度同源,易于进行基因改造,应用更加普遍。SARS-CoV-2 以细胞表面 ACE2 为受体,但是 SARS-CoV-2 无法与小鼠细胞表面 mACE2 相结合,因此,能够表达 hACE2 蛋白的小鼠才可以作为合适的 SARS-CoV-2 模型。其中,Ad5-hACE2 致敏小鼠、叙利亚金黄仓鼠和 hACE2 转基因小鼠均是常用的 SARS-CoV-2 动物感染保护模型^[53-55],中和抗体体内药效的评价选用最多的为 hACE2 转基因小鼠模型。

6 课题研究内容、目的和意义

本所前期通过杂交瘤技术筛选获得一株抗 SARS-CoV-2 的鼠源单抗 20D8,对多种变异株具有强中和活性,本课题目的为对其进行人源化改造,并对改造后的抗体进行全面的鉴定,为开发广谱、高效的治疗性抗体药物奠定基础。

技术路线



第一章 鼠源抗 SARS-CoV-2 单克隆抗体的嵌合改造及鉴定

1.1 实验材料

1.1.1 细胞、病毒及动物

杂交瘤细胞 20D8 由本所病毒性疫苗研究一室制备并保存；Expi293F 细胞由本实验室保存；*E.coli* DH5 α 感受态细胞购自日本 Takara 公司；Huh-7 细胞购自中国食品药品检定研究院；SARS-CoV-2 B.1.617.2 变异株活病毒由本所 P3 实验室保藏；K18-hACE2 小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司。

1.1.2 表达载体

KS001 表达载体，由本实验室保存，见图 1.1。

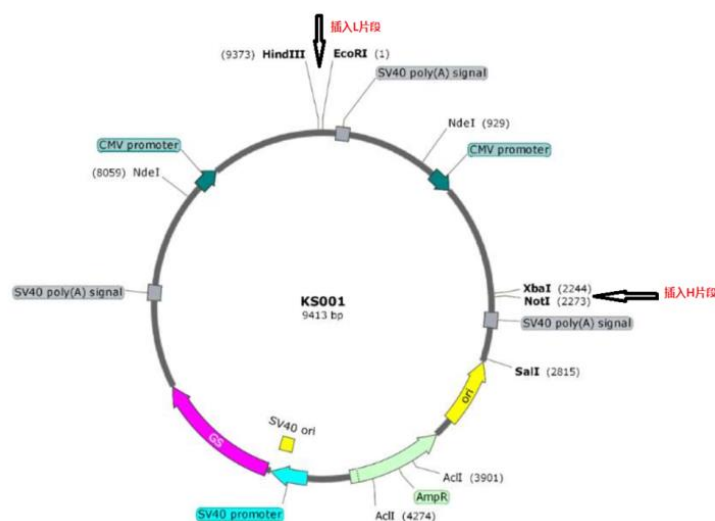


图 1.1 KS001 表达载体图谱

Fig1.1. KS001 expression vector map

1.1.3 主要仪器

主要仪器	型号	生产厂家
大容量低温高速离心机	J6-MI	美国Beckman Coulter公司
化学发光检测仪	EnSight HH3400	美国PerkinElmer公司
洗板机	50TS12	美国BioTek公司
酶标仪	216888	美国BioTek公司
蛋白电泳仪	PowerPac Basic	美国Bio-RAD公司
台式高速冷冻离心机	5417R	德国Eppendorf公司

电动移液器	4430000018	
超低温冰箱	Model 702	
超微量紫外分光光度计	Nanodrop ND1000	美国Thermo Fisher Scientific公司
PCR仪	4375786	
细菌摇床	SHKE6000-8CE	
pH计	PB-30L	德国Sartorius公司
倒置显微镜	Primovert	德国Carl Zeiss公司
分析天平	ML204/02	瑞士 Metter Toledo 公司
CO ₂ 细胞培养箱	RS Biotech	韩国Galaxy公司
CO ₂ 摇床	KuhnerSHAKERX	上海比奥实业发展有限公司
全自动细胞分析仪	Countstar Altair	上海睿钰生物科技有限公司
4°C冰箱	BCD-220TCK	合肥晶弘电器有限公司
超净工作台	SW-CJ-2FD	
生物安全柜	BSC-1604 II B2	江苏苏净集团有限公司
桌面可调转速型小离心机	Super Mini Dancer	生工生物工程（上海）股份有限公司
微波炉	G8023YSL-V1	格兰仕集团
核酸电泳仪	DYY-6C	
凝胶成像分析仪	WD-9413A	北京市六一仪器厂
制冰机	FIM-2156	江苏弗格森制冷设备有限公司
脉动真空高压灭菌器	XG1.D	山东新华医疗器械股份有限公司
干式恒温器	MK200-2	杭州奥盛仪器有限公司
电热恒温水槽	CU-600	武汉恒丰中欣生物科技发展有限公司
电子天平	UTP-313	上海花湖电器有限公司
小型涡旋仪	VM-96A	国药集团化学试剂有限公司
全自动核酸提取仪	Stream SP96	广州达安基因股份有限公司
实时荧光定量PCR仪	QuantStudio5	美国ABI公司

1.1.4 主要试剂与耗材

主要试剂与耗材	货号	生物公司
DMEM 高糖培养基	SH30243.01	美国Cytiva公司
15 mL 离心管	430790	
50 mL 离心管	430829	美国Corning公司
FBS	10099-141C	
RPMI 1640 培养基	11875-085	
ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒	A14524	
Expi293™表达培养基	A14351-01	美国 Gibco 公司
Opti-MEM™ I 减血清培养基	31985-070	
0.25% Trypsin-EDTA	25200-056	
TMB 显色底物	555214	美国 BD 公司
荧光素底物	6066769	
白色不透明 96 孔酶标板	6005680	美国 PerkinElmer 公司
QuickCut™ Xba I	R0145S	
QuickCut™ Not I	R3189L	
QuickCut™ Hind III	R3104S	
QuickCut™ EcoR I	R3101S	美国New England Biolabs公司
QuickCut™ Sal I	R0138T	
CutSmart Buffer	B7204S	
超滤浓缩管（30 kDa）	UFC903096	美国Millipore公司
胰化蛋白胨	LP0042	
酵母提取物	LP0021	美国Thermo Fisher Scientific公司
Pierce® BCA 蛋白定量分析试剂盒	VL313750	

HRP 标记的羊抗人 IgG-Fc	2047-05	英国Abcam公司
HRP Anti-6×His tag [®] 抗体	ab1187	
DMSO	D5859	
台盼蓝染色液	TB154	美国Sigma公司
磷酸	43801	
甘氨酸	410225	
RNA 提取试剂盒	9186	
SMARTer RACE 5'/3'反转录试剂盒	634860	日本Takara公司
10×loading buffer (核酸电泳用)	KA2201A	
琼脂粉	111860	法国Biowest公司
Protein A 磁珠	L00695	南京金斯瑞生物科技有限公司
磁力架	L00723	
无水乙醇	10009218	
异丙醇	80109218	
咪唑	30104916	
KH ₂ PO ₄	10017618	国药集团化学试剂有限公司
Tween-20	30189328	
无水 Na ₂ CO ₃	10019260	
浓硫酸 (98%)	10021618	
TAE 溶液 (50×)	ST716	上海碧云天生物技术有限公司
Gold View 核酸染料	20100611	北京赛百盛基因技术有限公司
DL2000 DNA marker	BDIT0039	北京博奥龙免疫技术有限公司
DL8000 DNA marker	BDIT0041	
ddH ₂ O	B541017	
PBS 粉末	B40100-0005	生物工程(上海)股份有限公司
氨苄青霉素	RT501	天根生物科技(北京)有限公司
NaCl	20200412	江苏省勤奋药业有限公司
质粒提取试剂盒	DC202-01	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
枸橼酸钠	H43020205	
枸橼酸	F20050005	湖南尔康制药股份有限公司
NaOH	100920201014	
HCl	F20050003	
NaHCO ₃	H20153211	新兴凌云医药化工有限公司
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	201601106	湖南九典制药有限公司
酶标板	AT4225210529	厦门市云鹏科技发展有限公司
KCl	H12020003	天津海光药业股份有限公司
BSA 粉末	YH(B)-0500	北京元亨圣马生物科技有限公司
重组 WT RBD-His 蛋白	40592-V08H	
重组 B.1.1.7 RBD-His 蛋白	40592-V02H1	
重组 B.1.351 RBD-His 蛋白	40592-V08H85	北京义翘神州科技股份有限公司
重组 P.1 RBD-His 蛋白	40592-V08H86	
重组 B.1.617.2 RBD-His 蛋白	40592-V08H90	
ACE2-Fc 蛋白	10108-H02H	
SARS-CoV-2 WT 假病毒	80033	
SARS-CoV-2 B.1.1.7 假病毒	80043	
SARS-CoV-2 B.1.351 假病毒	80044	北京天坛药物生物技术开发公司
SARS-CoV-2 P.1 假病毒	80045	
SARS-CoV-2 B.1.617.2 假病毒	80048	
达安核酸提取或纯化试剂盒	DA0621	
达安新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸 检测试剂盒	DA0992	广州达安基因股份有限公司

注: 重组 RBD-His 蛋白中, WT RBD 代表 SARS-CoV-2 原型株 RBD 蛋白, 即没有任何突变的 RBD 蛋白; B.1.1.7 RBD 包含有 N501Y 单点突变; B.1.351 RBD 包含有 K417N, E484K 和 N501Y 等多点突变; P.1 RBD 包含有 K417T, E484K 和 N501Y 等多点突变; B.1.617.2 RBD 包含有 L452R 和 T478K 等多点突变; SARS-CoV-2 WT 假病毒代表原

型株假病毒, SARS-CoV-2 B.1.1.7、P.1 和 B.1.617.2 假病毒为含有 S 蛋白上所有突变位点的突变株假病毒; SARS-CoV-2 B.1.351 假病毒为 S 蛋白上含有 501Y.V2 突变位点的突变株假病毒。

1.1.5 主要溶液的配制

1.1.5.1 细胞培养相关培养基的配制

(1) RPMI 1640 完全培养基: 将 FBS 和 RPMI 1640 按照 1:9 比例混匀, 配制含有 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基, 置于 4°C 冰箱, 备用。

(2) DMEM 高糖完全培养基: 将 FBS 和 DMEM 高糖培养基按照 1:9 比例混匀, 配制含有 10%FBS 的 DMEM 完全培养基, 置于 4°C 冰箱, 备用。

1.1.5.2 鼠源单抗序列钓取相关溶液的配制

(1) 1×PBS: 取一袋 1×PBS 粉末, 溶解于 1 L 纯水中, 并将 pH 调至 7.4, 使用 0.22 μm 滤膜过滤, 后同。

(2) 1×TAE 电泳缓冲液: 量取 20 mL TAE 溶液 (50×), 加入 980 mL 纯水, 混匀。

1.1.5.3 细菌培养相关培养基的配制

(1) LB 液体培养基: 称取 10.0 g 胰化蛋白胨、5.0 g 酵母提取物和 10.0 g NaCl, 溶解于 1 L 纯水中, 并将 pH 调至 7.2, 置于高压灭菌锅中进行灭菌处理。

(2) LB 固体培养基: 称取 10.0 g 胰化蛋白胨、5.0 g 酵母提取物、10.0 g NaCl 和 15.0 g 琼脂粉, 溶解于 1 L 纯水中, 并将 pH 调至 7.2, 置于高压灭菌锅中进行灭菌处理。

(3) LB 平板: LB 固体培养基灭菌完成后, 待温度降至 40°C 左右, 加入适量 100 mg/mL 氨苄青霉素, 调整其浓度为 100 μg/mL, 然后倒入平板内, 平铺平板底部, 待其自然凝固后, 加盖贴封膜, 置于 4°C 冰箱倒置保存。

1.1.5.4 Protein A 磁珠纯化相关溶液的配制

(1) PBST 平衡液: 取一袋 1×PBS 粉末, 溶解于 1 L 纯水中, 加入 1 mL Tween-20。

(2) 洗脱液: 称取 7.5 g 甘氨酸溶解于 1 L 纯水中, 并将 pH 调至 2.5。

(3) 磁珠保存液: 将无水乙醇和纯水按照 1:4 比例混匀。

1.1.5.5 ELISA 相关溶液的配制

(1) 包被液: 称取 1.6 g Na₂CO₃、2.9 g NaHCO₃ 溶解于 1 L 纯水中, 并将 pH 调至 9.6。

(2) PBST 洗涤液: 称取 80.0 g NaCl、14.2 g Na₂HPO₄·H₂O、2.0 g KCl 和 2.0 g KH₂PO₄

溶解于 10 L 纯水中，并将 pH 调至 7.4，然后加入 5 mL Tween20 并搅拌均匀。

(3) 封闭液/抗体稀释液：称取 1.0 g BSA 粉末，溶解于 100 mL PBST 中，配置成 1%BSA (W/V) 溶液，现用现配。

(4) 显色液：将显色液盒中 A 组分和 B 组分按照 1: 1 比例混匀，避光，现用现配。

(5) 终止液：量取 891.5 mL 纯水，逐滴加入 108.5 mL 98% 浓硫酸，混匀。

1.2 实验方法

1.2.1 杂交瘤细胞的复苏及传代

1.2.1.1 细胞复溶：从液氮罐中取出杂交瘤细胞 20D8，迅速放入 37°C 温水浴中，待细胞溶解后，立即加入到 10 mL 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基中。

1.2.1.2 细胞离心：将细胞悬液在 1000 r/min 离心 5 min。

1.2.1.3 调整密度并培养：弃上清，使用少量培养基将细胞沉淀混匀并计数，根据计数结果将细胞调整到 1×10^5 cells/mL，置于平皿中，然后在 37°C、5%CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.1.4 细胞传代：根据细胞生长情况，待其汇合度达到 80% 以上，按 1: 6 比例对细胞进行传代。

1.2.2 杂交瘤细胞的冻存保种

1.2.2.1 处理细胞：将传代 2~3 次后的对数生长期细胞吹打混匀，并取少量细胞进行计数，剩余细胞 1000 r/min 离心 5 min。

1.2.2.2 配冻存液：将 DMSO 和 FBS 按照 1: 9 比例混匀。

1.2.2.3 细胞冻存：离心后细胞去上清，根据计数结果取适量冻存液重悬细胞沉淀，调整细胞密度为 2×10^6 cells/mL，以每管 1 mL 加入到标记好的冻存管中，迅速放入泡沫盒中，置于 -70°C 冰箱冷冻过夜，第二天转入液氮罐。

1.2.3 杂交瘤细胞总 RNA 提取

1.2.3.1 细胞离心：待杂交瘤细胞 20D8 汇合度达到 80% 以上，将细胞悬液 3 000 r/min 离心 5 min，弃上清；取适量 PBS 重悬细胞，3 000 r/min 离心 5 min，弃上清，在台面

上轻敲离心管底部使细胞沉淀松散均匀。

1.2.3.2 细胞裂解：在 343.0 μL buffer RL 中加入 7.0 μL 50 \times DTT solution，配制细胞裂解液；将细胞裂解液加入到上述细胞沉淀中重悬细胞，室温静置 2 min，待细胞完全裂解。

1.2.3.3 去除 DNA：将 gDNA Eraser Spin Column 安放到 2 mL Collection Tube 上，并将上述裂解液缓慢转移到 gDNA Eraser Spin Column 中，12 000 r/min 离心 1 min。

1.2.3.4 吸附 RNA：将得到的滤液按 1: 1 体积比加入无菌的 70%乙醇溶液，快速混匀，并立即将上述混合液全部转入到放置在 2 mL Collection Tube 上的 RNA Spin Column 中，12 000 r/min 离心 1 min，弃滤液。

1.2.3.5 洗涤：在 RNA Spin Column 中加入 500.0 μL buffer RWA，12 000 r/min 离心 30 s，弃滤液；然后在 RNA Spin Column 中加入 600.0 μL buffer RWB（预先加入 70 mL 乙醇），12 000 r/min 离心 30 s，弃滤液。

1.2.3.6 DNase I 消化：取 5.0 μL 10 \times DNase I Buffer、4.0 μL Recombinant DNase I 和 41.0 μL RNase free dH₂O 到新的 1.5 mL RNase Free Tube 中，混匀，配制 DNase I 反应液；将反应液缓慢滴在 RNA Spin Column 膜中央，室温静置 15 min。

1.2.3.7 洗涤：向 RNA Spin Column 膜中央加入 350.0 μL buffer RWB，12 000 r/min 离心 30 s，弃滤液；重复洗涤一次；将 RNA Spin Column 重新放置于 Collection Tube 中，12 000 r/min 离心 2 min。

1.2.3.8 洗脱 RNA：将 RNA Spin Column 放置到新的 1.5 mL RNase Free Collection Tube 上，并在 RNA Spin Column 膜中央加入 50.0 μL RNase Free dH₂O，室温静置 5 min，12 000 r/min 离心 2 min 洗脱 RNA；将洗脱液重新加入到 RNA Spin Column 膜中央，室温静置 5 min 后，12 000 r/min 离心 2 min，收集洗脱液。

1.2.3.9 测 RNA 浓度：取少量洗脱液，使用 Nanodrop 超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。

1.2.4 RNA 产物琼脂糖凝胶电泳

1.2.4.1 配胶：称取 1.2 g 琼脂糖，加入 60 mL 1 \times TAE 电泳缓冲液，微波炉煮沸至琼脂糖完全溶解，并加入 2.0 μL Gold View 核酸染料，搅拌均匀，然后倒入插有齿梳的模具内，

水平放置，待冷却凝固后即配制成质量分数为 2%的琼脂糖凝胶。

1.2.4.2 点样：取 2 μg RNA 加入适量 10 \times loading buffer 混匀，进行点样，并点样 8.0 μL DL2000 DNA marker。

1.2.4.3 电泳：接通电源，90 V 恒压电泳，直至胶指示剂到胶的中下部，停止电泳，并对结果进行分析。

1.2.5 RNA 反转录合成第一链 cDNA

1.2.5.1 取 PCR 管，依次加入 1.0 μL 上述 RNA 产物、1.0 μL 5' -CDS Primer A 和 9.0 μL 注射用水，混匀。

1.2.5.2 将上述步骤中的反应液置于 PCR 仪中，72 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min，然后降温至 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min，快速将 PCR 管置于冰上冷却，14 000 r/min 离心 10 s。

1.2.5.3 在上述反应液中加入 1.0 μL SMARTer II A Oligonucleotide，备用。

1.2.5.4 另取 PCR 管，依次加入 4.0 μL 5 \times First-Strand Buffer、0.5 μL 100 mM DTT 和 1.0 μL 20 mM dNTPs，轻轻混匀；然后，依次加入 0.5 μL 40 U/ μL RNase Inhibitor 和 2.0 μL 100 U SMARTScribe Reverse Transcriptase，混匀配制 5' RACE-cDNA 合成所需的 Master Mix。

1.2.5.5 将上述步骤中配制好的 Master Mix 缓慢加入到步骤 1.2.5.3 的反应液中，轻轻混匀并离心。

1.2.5.6 将 PCR 管置于 PCR 仪中 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min，然后升温至 72 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。

1.2.5.7 孵育完成后，加入 80.0 μL Tricine-EDTA buffer 稀释第一链 cDNA 产物。

1.2.6 PCR 扩增鼠源单抗重/轻链可变区序列

1.2.6.1 引物设计：

表 1.1 鼠源单抗 3' RACE PCR 特异性引物
Tab1.1 3' RACE PCR specific primer of murine mAb

引物名称	引物序列 (5'-3')
prime1-H	AATTTTCTTGTCACCTTGGTGC
prime2-H	GAAGTCCAGCTGCAGCAATCGGGCGCCGAG
prime3-L	ATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG
prime4-L	GATATTGTGCTGACCCAATCGCCAGCTTCC

1.2.6.2 配制 PCR Master Mix 反应液：取 PCR 管，依次加入 15.5 μL PCR-Grade H₂O、

25.0 μL 2 \times SeqAmp Buffer 和 1.0 μL SeqAmp DNA Polymerase, 并轻轻混匀。

1.2.6.3 配制 PCR 反应液: 在上述反应液中, 按下表依次加入下列试剂, 配制 PCR 反应液。

表 1.2 PCR 反应液
Tab1.2 PCR reaction solution

重链		轻链	
试剂	体积 (μL)	试剂	体积 (μL)
PCR Master Mix	41.5	PCR Master Mix	41.5
5' RACE-Ready cDNA	2.5	5' RACE-Ready cDNA	2.5
10 \times UPM	5.0	10 \times UPM	5.0
prime1-H or prime2-H (10 μM)	1.0	prime3-L or prime4-L (10 μM)	1.0

注: prime1-H 和 prime3-L 需配对使用, prime2-H 和 prime4-L 需配对使用。

1.2.6.4 PCR 反应: 按照 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 进行 25 个 PCR 循环, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.6.5 电泳: 对 PCR 产物进行电泳验证。

1.2.6.6 测序: 对电泳验证正确的 PCR 产物进行测序验证。

1.2.7 序列比对、分析及质粒合成

将测序结果在 IMGT 网站 (https://www.imgt.org/IMGT_vquest/analysis) 上比对, 并标出骨架区 (framework region, FR) 和互补决定区 (complementarity decision region, CDR)。然后将正确的鼠源单抗重/轻链可变区序列和人单抗 IgG1/ κ 恒定区序列进行拼接, 再加上相应的信号肽和酶切位点, 合成至 KS001 表达载体, 构建重组质粒 KS001-ch20D8。

1.2.8 质粒转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞

1.2.8.1 转化: 取 20 μL *E.coli* DH5 α 感受态细胞, 加入 2 μL 100 ng/ μL 质粒并轻轻混匀, 冰浴 10 min。

1.2.8.2 涂布: 将上述菌液滴在 LB 固体琼脂培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)平板上, 均匀涂布后静置 3~5 min, 直至菌液被完全吸收; 然后将平板倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。

1.2.8.3 培养细菌: 挑取单一菌落于 300 mL LB 液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)

中，然后置于 37°C 培养箱中培养，200 r/min 培养 16~20 h。

1.2.9 提取质粒

1.2.9.1 收获菌液：将菌液转移到离心罐中，3 500 r/min 离心 30 min。

1.2.9.2 重悬：弃上清，加入 15 mL Buffer P1（提前加入 RNase A）重悬菌液，吹打混匀。

1.2.9.3 裂解：向上述菌悬液中加入 15 mL Buffer P2，轻轻颠倒混匀 6~8 次，室温放置 3~5 min。

1.2.9.4 中和：向上述菌悬液中加入 15 mL Buffer P4，轻轻颠倒混匀 6~8 次让溶液彻底中和 Buffer P2。

1.2.9.5 离心：将上述液体 3 500 r/min 离心 15 min，小心弃掉上层漂浮的白色絮状物并吸取中层澄清液体到新 50 mL 离心管中。

1.2.9.6 去内毒素：加入 0.1 倍体积的内毒素清除剂，颠倒混匀，冰上放置 5 min，直至溶液由浑浊变得清明透亮；37°C 放置 15~25 min，溶液很快又变浑浊，颠倒混匀，3 500 r/min 离心 20 min。

1.2.9.7 吸附：离心后液体分为 2 层，将含 DNA 的上层水相小心转移到新管，并加入 0.5 倍体积的异丙醇，充分混匀，分多次转入吸附柱膜中央，10 000 r/min 离心 1 min，弃废液。

1.2.9.8 洗涤：加入 10 mL 漂洗液 PW（提前加入无水乙醇），8 000 r/min 离心 30 s，弃废液，重复 1 次；将吸附柱放回空收集管，12 000 r/min 离心 3 min，取出吸附柱，室温放置 3~5 min。

1.2.9.9 洗脱：将吸附柱放入新离心管中，在膜中央部位加 1 mL 无菌水，室温放置 3 min，12 000 r/min 离心 3 min，洗脱质粒，重复 1 次。

1.2.9.10 浓度测定：吸取少量洗脱液，使用 Nanodrop 超微量紫外分光光度计测定浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。

1.2.10 质粒的酶切验证

1.2.10.1 酶切体系如下：

表 1.3 质粒酶切验证体系

Tab1.3 The validation system of plasmid digestion

试剂	双酶切		单酶切
	重链	轻链	
QuickCut™ <i>Xba</i> I	1.0 μL	-	-
QuickCut™ <i>Not</i> I	1.0 μL	-	-
QuickCut™ <i>Hind</i> III	-	1.0 μL	-
QuickCut™ <i>Eco</i> R I	-	1.0 μL	-
QuickCut™ <i>Sal</i> I	-	-	1.0 μL
CutSmart Buffer	3.0 μL	3.0 μL	3.0 μL
KS001-ch20D8 质粒	1.0 μg	1.0 μg	1.0 μg
RNase Free H ₂ O	补至 25.0 μL	补至 25.0 μL	补至 25.0 μL

1.2.10.2 酶切：将上述溶液 37°C 水浴 1 h 进行酶切。

1.2.10.3 电泳：对酶切产物进行电泳验证。

1.2.11 ch20D8 单抗大量制备

1.2.11.1 复苏细胞：从液氮罐中取出 Expi293F 细胞，迅速放入 37°C 温水浴中，待细胞溶解后，立即加入到 30 mL Expi293™ 表达培养基中并混匀，取少量细胞进行计数，细胞活率应高于 90%，然后将其置于 37°C，8% CO₂，85% 湿度和 125 r/min 的细胞摇床中进行培养。

1.2.11.2 细胞传代：待细胞密度长至 3×10⁶ cells/mL，放大培养至 150 mL；继续等待细胞密度长至 4×10⁶ cells/mL，瞬转当天补加 50 mL Expi293™ 表达培养基调整细胞密度为 3×10⁶ cells/mL。

1.2.11.3 稀释质粒：吸取 12 mL Opti-MEM™ I 减血清培养基到 50 mL 无菌离心管中，然后加入 200 μg KS001-ch20D8 质粒，轻轻混匀。

1.2.11.4 稀释 293 转染试剂：吸取 11.2 mL Opti-MEM™ I 减血清培养基到新的 50 mL 无菌离心管中，然后加入 640 μL 293 转染试剂，混匀，静置 5 min。

1.2.11.5 脂质体复合物的形成：将 293 转染试剂和质粒混匀，静置 15 min。

1.2.11.6 脂质体复合物转入细胞：将上述脂质体复合物缓慢加入细胞中，放置到细胞摇床中培养。

1.2.11.7 补加转染增强剂：培养 18~22 h 后，补加 1.2 mL 转染增强剂 1 和 12 mL 转染增强剂 2，放置到细胞摇床中培养。

1.2.11.8 收集上清：培养第 3 d 开始计数，每天记录细胞活率，待活率降到 70% 以下，将细胞悬液进行 3 500 r/min 离心 30 min，收集上清液，待纯化。

1.2.12 Protein A 磁珠纯化 ch20D8 单抗

1.2.12.1 磁珠准备：取 140 μL 磁珠悬液放入离心管中，用磁力架吸附磁珠，弃上清，然后加入 2 mL 平衡液洗涤磁珠，重复 2 次，再加入 200 μL 平衡液重悬磁珠。

1.2.12.2 样品孵育：将磁珠加入到 40 mL 细胞上清中，置于转速为 120 r/min 的摇床中，室温孵育 2 h。

1.2.12.3 洗涤：孵育后弃上清，PBS 洗涤磁珠，重复 2 次；再使用 1 mL ddH₂O 洗涤磁珠，弃上清。

1.2.12.4 洗脱：加入 500 μL 洗脱液，静置 7 min；磁力架吸附磁珠，用移液器将上清转入干净的 EP 管中，重复 2 次。

1.2.12.5 回调 pH 及缓冲液置换：使用饱和的 Na₂HPO₄ 将洗脱液 pH 调至 5.0，然后使用 30 kDa 超滤浓缩管将蛋白离心置换到 PBS 溶液中，即得到纯化的 ch20D8 单抗。

1.2.12.6 磁珠回收：用 2 mL 平衡液洗涤磁珠，重复 2 次；加入 1 mL 0.1 M NaOH 重悬磁珠，浸泡 30 min，重复 1 次；再次用 5 mL 平衡液洗涤磁珠 2 次，最后用 20% 乙醇重悬磁珠，置于 4°C 保存。

1.2.13 BCA 法测定 ch20D8 浓度

1.2.13.1 稀释标准品：使用 PBS 对 BSA 标准品进行稀释，稀释后浓度依次为 200、40、20、10、5、2.5、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.13.2 稀释抗体：使用 Nanodrop 超微量紫外分光光度计对 ch20D8 进行初步定量，然后将 ch20D8 稀释至 40 $\mu\text{g/mL}$ 左右。

1.2.13.3 配制工作液：将试剂盒中的 MA、MB 和 MC 组分按照 25: 24: 1 比例配制成工作液。

1.2.13.4 转板：将稀释后的标准品和 ch20D8 以每孔 150 μL 依次加入到酶标板中，并设置复孔和空白对照。

1.2.13.5 加工作液：向上述每孔中分别加入 150 μL 配制好的工作液，轻轻混匀。

1.2.13.6 孵育：将板置于 37°C 水浴箱中孵育 2 h。

1.2.13.7 读板并分析：孵育完成后，在 570 nm 波长处用酶标仪读取 $A_{570\text{ nm}}$ 值，结果进行四参数拟合标准曲线，并依据标准曲线方程计算 ch20D8 浓度。

1.2.14 ELISA 检测 ch20D8 结合活性

1.2.14.1 包被：用包被液将重组 RBD-His 蛋白稀释到 1 $\mu\text{g/mL}$ ，按每孔 100 μL 加入到酶标板中，置于 4°C 冰箱过夜。

1.2.14.2 洗板：第 2 天弃酶标板内液体，每孔加入 350 μL 洗涤液，用洗板机进行 5 次洗板并拍干板内液体。

1.2.14.3 封闭：将 1% BSA 溶液按每孔 200 μL 加入到上述酶标板中，37°C 封闭 2 h。

1.2.14.4 洗板：同 1.2.14.2。

1.2.14.5 孵育一抗：在 EP 管中将 ch20D8 稀释到 5 000 ng/mL（抗体对不同变异株的结合能力不同，起始浓度会有所调整），并使用 1% BSA 进行 4 倍系列连续稀释，共 10 个梯度；将稀释好的 ch20D8 按每孔 100 μL 依次加入酶标板内，同时设置空白对照，所有孔均设复孔，37°C 孵育 1 h。

1.2.14.6 洗板：同 1.2.14.2。

1.2.14.7 孵育二抗：将 HRP 标记的 10 000 倍稀释的山羊抗人 IgG 作为二抗，按每孔 100 μL 加入到上述酶标板内，37°C 孵育 1 h。

1.2.14.8 洗板：同 1.2.14.2。

1.2.14.9 显色：将显色液 A 和显色液 B 按 1: 1 比例混匀，按每孔 100 μL 加入到上述酶标板内，37°C 避光显色 15 min。

1.2.14.10 终止并读数分析：将 2 M 的 H_2SO_4 按每孔 50 μL 加入到上述酶标板内进行终止，在 450 nm 波长处用酶标仪读取 $A_{450\text{ nm}}$ 值，结果进行四参数对数拟合并确定半数有效浓度（50% effective concentration, EC_{50} ）。

1.2.15 ELISA 检测 ch20D8 阻断活性

1.2.15.1 包被：用包被液将 ACE2-Fc 稀释到 2 $\mu\text{g/mL}$ ，按每孔 100 μL 加入到酶标板中，置于 4°C 冰箱过夜。

1.2.15.2 洗板：同 1.2.14.2。

1.2.15.3 封闭：同 1.2.14.3。

1.2.15.4 洗板：同 1.2.14.2。

1.2.15.5 孵育抗体和竞争性 RBD-His 蛋白混合物：在 EP 管中将 ch20D8 稀释到 100 000 ng/mL（抗体阻断不同变异株 RBD 和 ACE2 结合的能力不同，起始浓度会有所调整），并使用 1%BSA 进行 4 倍系列连续稀释，共 10 个梯度；将稀释好的 ch20D8 按每孔 50 μ L 依次加入酶标板内，再迅速加入 50 μ L 2 倍饱和浓度的竞争性 RBD-His 蛋白到酶标板内，同时设置不加抗体的阳性对照和空白对照，所有孔均设复孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

1.2.15.6 洗板：同 1.2.14.2。

1.2.15.7 孵育二抗：将 HRP 标记的 15 000 倍稀释的抗 His 抗体作为二抗，按每孔 100 μ L 加入到上述酶标板内，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

1.2.15.8 洗板：同 1.2.14.2。

1.2.15.9 显色：同 1.2.14.9。

1.2.15.10 终止并读数分析：终止和读数同 1.2.14.10，结果进行四参数对数拟合并确定半数抑制浓度（50% inhibitory concentration, IC₅₀）。

1.2.16 ch20D8 对假病毒的中和活性检测

1.2.16.1 抗体稀释：在 EP 管中将 ch20D8 稀释到 1 μ g/mL（抗体对不同变异株的中和能力不同，起始浓度会有所调整），并使用 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基进行 3 倍系列连续稀释，共 9 个梯度。

1.2.16.2 假病毒稀释：用 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基将 SARS-CoV-2 假病毒稀释到工作浓度（ 1.3×10^4 TCID₅₀/mL）。

1.2.16.3 中和并转板：将 ch20D8 和假病毒等体积混匀，然后按照每孔 100 μ L 依次加入到白色不透明 96 孔酶标板内，同时设细胞对照和不加抗体的病毒对照，所有孔均设复孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

1.2.16.4 加细胞并孵育：待 Huh-7 细胞长到 80~90% 汇合度时，使用胰酶对细胞进行消化，然后加入适量 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基终止消化，并取少量细胞进行计数并调整

细胞密度为 2×10^5 cells/mL, 然后按照 100 μ L/孔加入到假病毒和抗体混合物中, 置于培养箱内培养 23~25 h。

1.2.16.5 读数: 取出 96 孔板, 每孔吸弃 100 μ L 上清, 加入 100 μ L 荧光素底物进行裂解, 反应 2 min, 然后使用化学发光检测仪读取相对光单位 (relative light unit, RLU)。

1.2.16.6 结果分析: 根据公式计算中和抑制率, 公式为抑制率 $= \left(1 - \frac{\text{待测样品的 RLU 均值} - \text{细胞对照组的 RLU 均值}}{\text{病毒对照组的 RLU 均值} - \text{细胞对照组的 RLU 均值}} \right) \times 100\%$, 结果进行四参数对数拟合并确定 IC_{50} 。

1.2.17 小鼠体内药效学评价

1.2.17.1 分组: 将 6~8 周龄的 K18-hACE2 小鼠分为 4 组, 分别为预防组、12 h 治疗组、24 h 治疗组以及 PBS 对照组。

1.2.17.2 攻毒及给药: 用 200 $CCID_{50}$ 剂量的 B.1.617.2 变异株活病毒经鼻内接种小鼠; 预防组在攻毒前 24 h 腹腔注射 ch20D8 (15 mg/kg), 12 h 和 24 h 治疗组分别在攻毒后 12 h 和 24 h 腹腔注射 ch20D8 (15 mg/kg), 对照组在攻毒后 12 h 注射 PBS。

1.2.17.3 体重记录及临床症状分析: 对照组小鼠全部死亡前连续每天记录感染后存活小鼠的体重、临床症状及死亡情况, 对照组小鼠全部死亡后实验终止, 处理抗体组全部小鼠。

1.2.17.4 病毒 RNA 水平测定: 将小鼠全部解剖, 收集肺部和脑部组织, 称重后制备匀浆样本, 参考 Steward 等^[56]的方法和达安核酸提取或纯化试剂盒说明书, 使用全自动核酸提取仪自动提取核酸; 然后, 参考 Pan 等^[40]的方法和达安新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒说明书, 通过一步法 RT-PCR 检测 SARS-CoV-2 病毒 ORF1ab 基因和 N 基因 RNA 水平; 结果采用 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示统计学差异显著。

1.3 实验结果

1.3.1 杂交瘤细胞 RNA 产物

真核生物总 RNA 中核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 占 90% 以上, 而 rRNA

主要由 28S、18S 和 5.8S 组成，且分子量 $28S > 18S > 5.8S$ ^[57]。杂交瘤细胞 20D8 总 RNA 提取后，RNA 产物电泳结果见图 1.2。结果显示，28S 和 18S 条带清晰无杂带，且二者比值约 2: 1，5.8S 条带较浅，说明提取的 RNA 为完整 RNA。

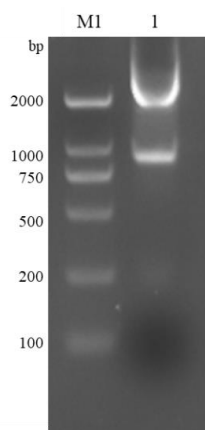


图 1.2 RNA 产物电泳结果

Fig1.2 Electrophoresis results of RNA products

注：图中 M1 为 DL 2 000 DNA marker，1 为 RNA 产物。

1.3.2 鼠源单抗重/轻链 PCR 产物

PCR 产物电泳结果见图 1.3。结果显示，使用特异性引物 prime1-H 和 prime3-L 未能扩增出重/轻链可变区序列，使用特异性引物 prime2-H 和 prime4-L 成功扩增出重/轻链可变区序列。重/轻链在约 800 bp 大小处均有明显条带，说明鼠源单抗重/轻链可变区序列扩增成功。

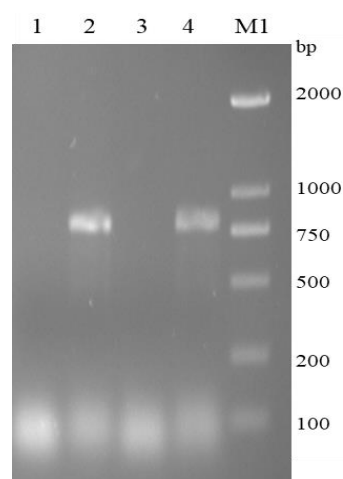


图 1.3 PCR 产物电泳结果

Fig1.3 Electrophoresis results of PCR products

注：图中 M1 为 DL 2 000 的 DNA marker，1 和 2 为使用 prime1-H 和 prime2-H 进行重链可变区 PCR 的产物，3 和 4 为使用 prime3-L 和 prime4-L 进行轻链可变区 PCR 的产物。

1.3.3 鼠源单抗重/轻链序列比对及分析

将重/轻链可变区 PCR 产物测序结果在 IMGT 网站上比对。重链可变区开放阅读框分析见附图 1，DNA 和氨基酸序列分析见附图 2，核苷酸序列同源性分析和同源性比对分析分别见附表 1 和附图 3；轻链可变区开放阅读框分析见附图 4，DNA 和氨基酸序列分析见附图 5，核苷酸序列同源性分析和同源性比对分析分别见附表 2 和附图 6。鼠源单抗重链可变区全长 354 bp，共编码 118 个氨基酸，轻链可变区全长 339 bp，共编码 113 个氨基酸。

成功构建了质粒 KS001-ch20D8。插入的重/轻链全长 DNA 和氨基酸序列分别见附图 7 和附图 8。ch20D8 重链全长 1383 bp，共编码 461 个氨基酸，轻链全长 720 bp，共编码 240 个氨基酸。

1.3.4 质粒的酶切验证

质粒酶切后电泳结果见图 1.4。结果显示，使用 *Sal* I 单酶切后，得到的条带为 11 000 bp 左右，与预期相符；使用 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切后，得到的条带分别为 10 000 bp 和 1 300 bp 左右，与预期相符；使用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切后，得到的条带分别为 10 000 bp 和 750 bp 左右，与预期相符；KS001-ch20D8 质粒提取成功。

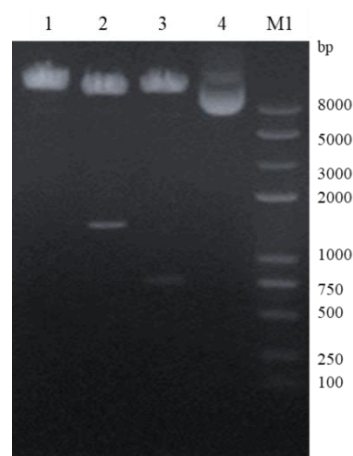


图 1.4 质粒酶切后电泳结果

Fig1.4 Electrophoresis results after plasmid digestion

注：图中 M1 为 DL8 000 DNA marker，1 为 *Sal* I 单酶切后的质粒，2 为 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切后质粒，3 为 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切后质粒，4 为未酶切的对照质粒。

1.3.5 BCA 法测定 ch20D8 浓度

BCA 法测定 ch20D8 浓度拟合的标准曲线见图 1.5，方程为 $y = \frac{1.914 - 0.09421}{(1 + x/57.79)^{1.412}} + 0.09421$ ，相关系数 $R^2 = 0.9984$ ，根据方程计算得到 ch20D8 浓度为 1 214.28 $\mu\text{g/mL}$ 。

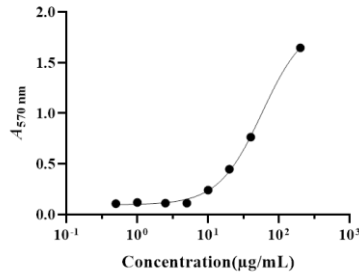


图 1.5 BCA 法测定 ch20D8 浓度的标准曲线

Fig1.5 Standard curve for ch20D8 concentration determination by BCA method

1.3.6 ELISA 检测 ch20D8 结合活性和阻断活性

ch20D8 对 RBD 结合活性的拟合曲线和 EC_{50} 见图 1.6A，阻断 RBD 和 ACE2 结合的拟合曲线和 IC_{50} 见图 1.6B。ch20D8 对原型株 RBD 结合活性 EC_{50} 为 2.848 ng/mL ，对 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 的结合能力与原型株相当；ch20D8 阻断原型株 RBD 和 ACE2 结合的 IC_{50} 为 156.8 ng/mL ，阻断 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 和 ACE2 结合能力与原型株相当。

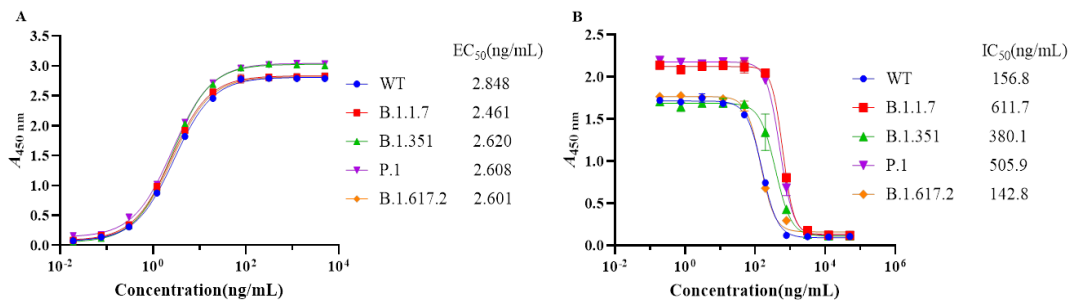


图 1.6 ch20D8 结合活性和阻断活性拟合曲线

Fig1.6. Fitting curve of binding activity and blocking activity of ch20D8

注：图 A 和 B 分别为 ch20D8 结合活性和阻断活性拟合曲线，图中拟合曲线的相关系数 R^2 均 > 0.99 。

1.3.7 ch20D8 对假病毒的中和活性检测

ch20D8 对假病毒的中和活性拟合曲线和 IC_{50} 见图 1.7。ch20D8 对原型株假病毒中和活性 IC_{50} 为 1.504 ng/mL ，对 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株假病毒的中和

活性与原型株相当。

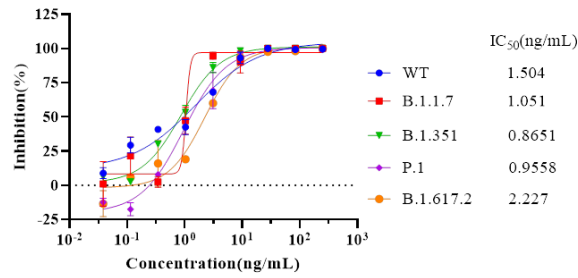


图 1.7 ch20D8 假病毒中和活性拟合曲线

Fig1.7 Fitting curve of neutralization activity of ch20D8 against pseudovirus

注：图中拟合曲线的相关系数 R^2 均>0.95。

1.3.8 小鼠体内药效学评价

小鼠体内药效学评价实验中，分组及给药示意图见图 1.8，生存曲线见图 1.9，体重变化曲线见图 1.10。对照组小鼠攻毒后第 4 天死亡 1 只，体重下降了 18.0%，第 5 天全部死亡，整组体重平均下降了 20.5%；预防组和 12 h 治疗组小鼠全部存活且状态良好，未有明显的症状，预防组体重平均下降了 0.6%，12 h 治疗组体重平均下降了 9.1%；24 h 治疗组第 5 天，小鼠死亡 1 只，体重下降了 22.6%，剩余小鼠体重平均下降 10.2%。

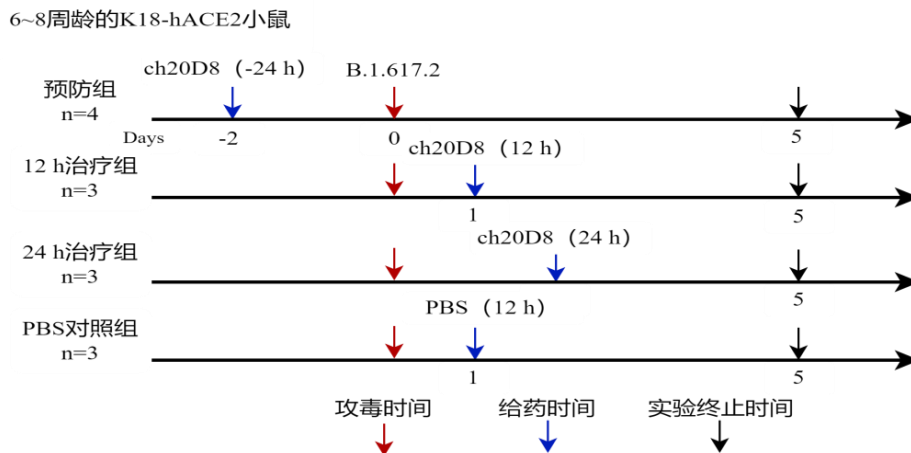


图 1.8 小鼠分组及给药示意图

Fig1.8 Schematic diagram of grouping and administration of mice

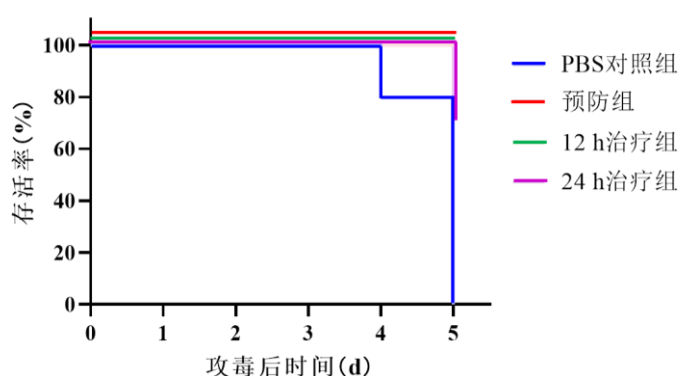


图 1.9 小鼠生存曲线图

Fig1.9 Survival curves of mice

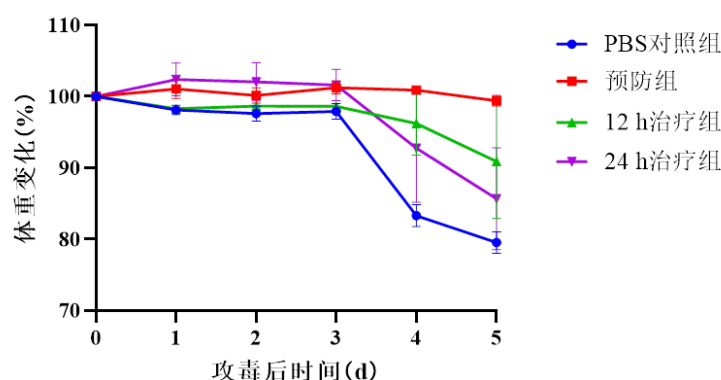


图 1.10 小鼠体重变化曲线图

Fig1.10 Curve of weight change in mice

小鼠肺部及脑部组织病毒RNA水平测定结果见图 1.11。肺部组织中,对照组 ORF1ab 基因 RNA 均值为 7.6 lg copies/mL, N 基因 RNA 均值为 8.1 lg copies/mL, 预防组、12 h 和 24 h 治疗组 ORF1ab 基因 RNA 均值分别为 4.1 lg copies/mL、5.2 lg copies/mL 和 5.3 lg copies/mL, N 基因 RNA 均值分别为 4.3 lg copies/mL、5.6 lg copies/mL 和 5.8 lg copies/mL。脑部组织中, 对照组 ORF1ab 基因 RNA 均值为 9.2 lg copies/mL, N 基因 RNA 均值为 10.2 lg copies/mL, 预防组、12 h 和 24 h 治疗组 ORF1ab 基因 RNA 均值分别为 4.3 lg copies/mL、6.6 lg copies/mL 和 7.4 lg copies/mL, N 基因 RNA 均值分别为 5.7 lg copies/mL、8.0 lg copies/mL 和 8.9 lg copies/mL。无论 ORF1ab 基因还是 N 基因 RNA, 对照组病毒 RNA 均值明显高于其他组 ($P < 0.05$), 预防组病毒 RNA 均值低于治疗组, 12 h 治疗组病毒 RNA 均值低于 24 h 治疗组; 同一组内, 肺部病毒 RNA 均值均低于脑部病毒 RNA 均值。

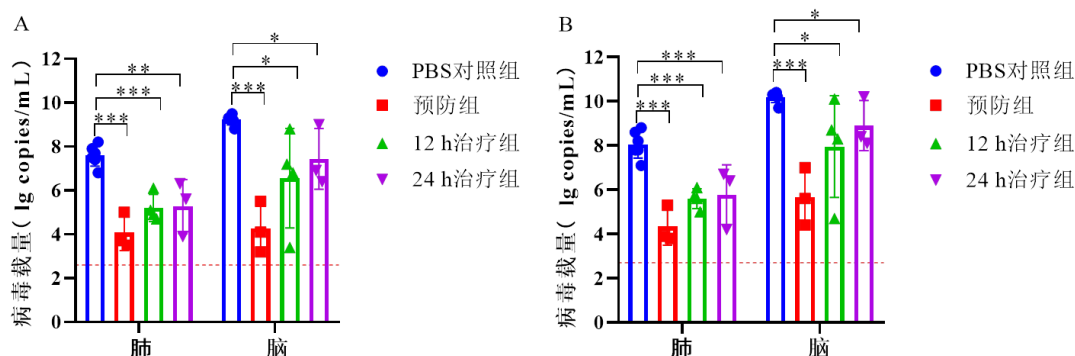


图 1.11 小鼠肺部及脑部组织病毒 RNA 水平测定结果

Fig.1.11 Determination of viral RNA levels in lung and brain tissues of mice

注：图 A 为 SARS-CoV-2 ORF1ab 基因 RNA 水平，图 B 为 N 基因 RNA 水平；结果采用 *t* 检验进行统计学分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.005$ ，*** $P < 0.001$ ；图中水平虚线表示定量限，ORF1ab 基因定量限为 2.6 lg copies/mL，N 基因定量限为 2.7 lg copies/mL。

通过对小鼠体重变化、临床症状、死亡情况的监测及肺部/脑部组织病毒 RNA 水平的测定，表明 ch20D8 对感染 B.1.617.2 变异株活病毒的 K18-hACE2 小鼠具有较好的保护效果。

1.4 本章小结

- (1) 成功提取杂交瘤细胞 20D8 总 RNA，将 RNA 反转录合成第一链 cDNA 后，通过特异性引物成功扩增出鼠源单抗重/轻链可变区序列并进行测序。测序结果显示为正确的鼠源单抗可变区序列，鼠源单抗重/轻链可变区序列钓取成功。
- (2) 将鼠源单抗重/轻链可变区序列和人单抗 IgG1/ κ 的恒定区序列进行拼接，成功构建了重组质粒 KS001-ch20D8。
- (3) 使用阳离子脂质体法将质粒成功瞬转 Expi293F 细胞，并进行了抗体表达；使用 Protein A 磁珠成功纯化得到 ch20D8 单抗，并测定 ch20D8 的浓度为 1 214.28 $\mu\text{g/mL}$ 。
- (4) ch20D8 体外功能评价中，使用 ELISA 检测 ch20D8 的结合活性和阻断活性。ch20D8 对原型株 RBD 结合活性 EC_{50} 为 2.848 ng/mL，对 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 的结合能力与原型株相当；阻断原型株 RBD 和 ACE2 结合的 IC_{50} 为 156.8 ng/mL，阻断 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 和 ACE2 结合能力与原型株相当。假病毒中和实验中，ch20D8 对原型株假病毒中和活性 IC_{50} 为 1.504 ng/mL，对

B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株假病毒的中和活性与原型株相当。

(5) 小鼠体内药效学评价实验中,通过对小鼠体重、临床症状、死亡情况的监测以及肺部/脑部组织病毒 RNA 水平的测定,表明 ch20D8 对感染 B.1.617.2 变异株活病毒的 K18-hACE2 小鼠具有较好的保护效果。

1.5 本章讨论

1.5.1 鼠源单抗嵌合改造

目前,应用于临床的抗体主要为人源化抗体,鼠源单抗应用于临床会引发人抗鼠抗体反应^[58],因此需要对其进行人源化改造。我们首先对鼠源单抗 20D8 进行嵌合改造,主要目的为对钓取的鼠源单抗可变区序列进行验证。

我们首先将改造后的抗体重/轻链合成至 KS001 表达载体,构建了重组质粒 KS001-ch20D8。KS001 是一种哺乳动物表达载体,将抗体重链插入到 KS001 载体 *Xba*I 和 *Not*I 酶切位点之间,轻链插入到 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切位点之间,重/轻链合成至同一载体构建表达质粒,然后利用 KS001 的氨苄青霉素抗性筛选克隆并提取质粒,质粒转染 Expi293F 细胞时无需摸索重/轻链转染比例,避免了因重/轻链不匹配导致低表达率的问题。本课题中大约每 10 mL 细胞上清即可表达 1 mg 抗体,表达量较高。

经过嵌合改造后的抗体,在体外保留了亲本鼠源单抗对 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的强结合活性和阻断活性,以及对 SARS-CoV-2 假病毒的强中和活性;在体内,对感染 B.1.617.2 变异株活病毒的 K18-hACE2 小鼠具有较好的保护效果。以上结果表明,本课题成功对鼠源单抗 20D8 进行了嵌合改造,证明了钓取的鼠源单抗可变区序列的正确性,下一步将继续对其进行人源化改造。

1.5.2 动物模型

Ad5-hACE2 小鼠动物模型由腺病毒载体转导 hACE2 制备。通过外源性传递复制缺陷腺病毒(Ad5-hACE2)到小鼠体中,使小鼠细胞成功表达 hACE2 蛋白,突破了小鼠对于 SARS-CoV-2 的天然不致敏性,成功构建了 Ad5-hACE2 小鼠模型^[59]。PAN 等^[40]便使用此非转基因小鼠模型对 2B11 抗体的体内疗效进行了评价。

相比于非转基因小鼠模型，转基因小鼠模型建模时间长，操作难度大。中国医学科学院医学实验动物研究所、军事医学科学院北京微生物与流行病学研究所和中国科学院武汉病毒所等都曾建立过 hACE2 转基因小鼠模型，这些小鼠感染 SARS-CoV-2 后均表现出与 COVID-19 患者相似的临床表现，适用于研究 SARS-CoV-2 的发病机制、抗病毒药物的药效学评价等^[42, 55, 60]。本课题中我们使用 K18-hACE2 小鼠模型进行 ch20D8 抗体的体内药效学评价，这种转基因小鼠模型在 SARS 流行期间构建，用于表达 hACE2 蛋白。鉴于 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 均以 hACE2 为受体，K18-hACE2 小鼠被 SARS-CoV-2 感染后，会引起剂量依赖性的致死性呼吸道疾病，其特征类似于人类严重的 COVID-19^[61]。

本课题中 B.1.617.2 变异株活病毒感染小鼠后，对照组小鼠体重下降最明显，预防组体重几乎无下降，治疗组呈现给药越早小鼠体重下降幅度越小的趋势；肺部及脑部病毒 RNA 水平测定结果显示，无论 ORF1ab 基因还是 N 基因 RNA，对照组病毒 RNA 均值明显高于其他组，预防组病毒 RNA 均值低于治疗组，12 h 治疗组病毒 RNA 均值低于 24 h 治疗组，整体也表现出给药时间越早，保护效果越好的趋势。

第二章 鼠源抗 SARS-CoV-2 单克隆抗体的人源化改造及鉴定

2.1 实验材料

2.1.1 细胞、抗体及病毒

Vero 细胞由本所 P3 实验室保存；抗 TNF- α 单克隆抗体参比品由本实验室保存；SARS-CoV-2 原型株、B.1.351 和 B.1.1.529 变异株活病毒由本所 P3 实验室保藏。

2.1.2 表达载体

pcDNA3.4 表达载体，由本实验室保存，见图 2.1。

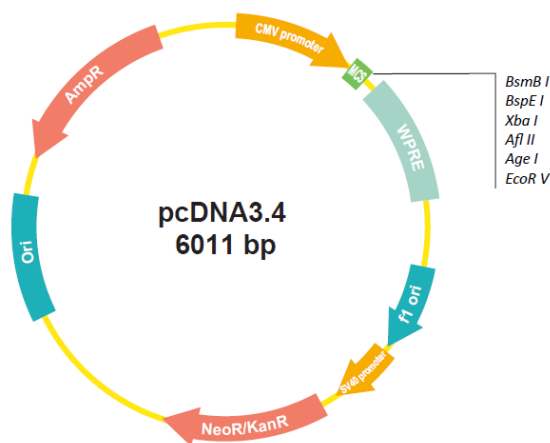


图 2.1 pcDNA3.4 表达载体图谱

Fig2.1 pcDNA3.4 expression vector map

2.1.3 主要仪器

主要仪器	型号	生产厂家
毛细管电泳仪	PA800 plus	美国 SCIEX 公司
成像毛细管等电聚焦电泳仪	iCE3	美国 Proteinsimple 公司
Biacore 8K	8K	英国 GE Healthcare 公司
荧光倒置显微镜	BDS500-FL	重庆奥特光学仪器
SCG100 全自动蛋白层析仪	SCG100	苏州赛普仪器有限公司
eBlot TM L1 快速湿转仪	L00686	南京金斯瑞生物科技有限公司

2.1.4 主要试剂与耗材

主要试剂与耗材	货号	生物公司
SDS MW Gel	A30341	美国 SCIEX 公司
CIEF pI marker 试剂盒	A58481	

β-巯基乙醇	M3148-100ML	德国 Sigma 公司
碘乙酰胺	I6125	
PVDF 膜	ISEQ00010	美国 Millipore 公司
甲基纤维素	M0512	
L-ARG	11009	德国 Sigma 公司
IDA	220000	
Pharmalyte 3~10	17045601	英国 GE Healthcare 公司
DAB 显色液	MK210	日本Takara公司
DMEM 培养基	11965-092	美国Gibco公司
双抗（青霉素-链霉素）	15140122	
8% 甲醛	P1112	北京索莱宝科技有限公司
新生牛血清（NBS）	80230-6415	浙江天杭生物科技股份有限公司
无水甲醇	80080418	国药集团化学试剂有限公司
12%SDS-PAGE 电泳预制胶	M00667	
5×SDS 还原型 loading buffer	M00726C	
Tri-MOPS 电泳缓冲液粉末	M00138	
预染蛋白 marker	M00624	南京金斯瑞生物科技有限公司
NC 膜	L00732C	
eBlot L1 NC 膜平衡液（1×）	C91012106	
eBlot L1 NC 膜转膜液（1×）	C91012106	
极速染色液	ATO00033	普健生物（武汉）科技有限公司
HRP-山羊抗小鼠 IgG	BF03001	北京博奥龙免疫技术有限公司

2.1.5 主要溶液的配制

2.1.5.1 蛋白纯化相关溶液的配制

- (1) 平衡液：称取 3.0 g Na_2HPO_4 、0.5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 8.2 g NaCl ，溶解于 1 L 纯水中，并将 pH 调至 7.4。
- (2) 洗脱液：称取 2.7 g 枸橼酸盐、4.4 g 枸橼酸和 8.2 g NaCl ，溶解于 1 L 纯水中，并将 pH 调至 3.4。
- (3) 0.1 M NaOH 溶液：称取 4.0 g NaOH ，溶解于 1 L 纯水中，后同。

2.1.5.2 SDS-PAGE、Western Blot 及 Dot Blot 相关溶液的配制

- (1) 电泳缓冲液：取一包电泳缓冲液粉末，溶解于 1 L 纯水中，颠倒混匀直至完全溶解。
- (2) PBST 洗涤液：取一包 PBS 粉末，溶解于 1 L 纯水中，然后加入 0.5 mL 的 Tween-20，混匀。
- (3) 封闭液/抗体稀释液：称取 5.0 g 脱脂奶粉，溶解于 100 mL PBST 溶液中，配制成 5% 脱脂奶粉（W/V），现用现配。
- (4) DAB 显色液：取 1 mL 显色液 B，加入 1 滴显色液 A，混匀，避光，现用现配。

2.1.5.3 十二烷基硫酸钠毛细管电泳（sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis, CE-SDS）检测单抗纯度相关溶液配制

(1) 样品缓冲液: ①先称取 5.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 溶解于 200 mL 注射用水中; ②称取 5.6 g Na_2HPO_4 , 溶解于 200 mL 注射用水中; ③取“①”溶液 68.5 mL 和“②”溶液 31.5 mL 混匀; ④称取 1.0 g SDS, 加入 20 mL “③”溶液, 再加入注射用水 60 mL, 将 pH 调至 6.5, 补充注射用水至 100 mL。

(2) 烷基化溶液: 称取 37.0 mg 碘乙酰胺, 溶解于 250 mL 注射用水中, 避光, 现用现配。

(3) 0.1M HCl 溶液: 量取 12 mol/L 的浓盐酸 833 μL , 溶解于 100 mL 注射用水中。

2.1.5.4 成像毛细管等电聚焦电泳 (imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis, iCIEF) 检测单抗等电点 (isoelectric point, pI) 相关溶液配制

(1) 1% 甲基纤维素溶液: 称取 10.0 g 甲基纤维素, 溶解于 1 L 注射用水中。

(2) 0.5% 甲基纤维素溶液: 量取 100 mL 1% 甲基纤维素溶液, 加 100 mL 注射用水, 混匀。

(3) 0.1% 甲基纤维素溶液: 量取 1% 甲基纤维素溶液 10 mL, 加 900 mL 注射用水, 混匀。

(4) 阳极电泳液: 吸取 273 μL 磷酸, 溶解于 50 mL 0.1% 甲基纤维素溶液中。

(5) 阴极电泳液: 称取 0.4 g NaOH, 溶解于 100 mL 0.1% 甲基纤维素溶液中。

(6) 阴极稳定剂: 称取 0.9 g ARG, 溶解于 10 mL 注射用水中。

(7) 阳极稳定剂: 称取 0.3 g IDA, 溶解于 10 mL 注射用水中。

2.1.5.5 活病毒中和实验相关溶液配制

(1) 细胞生长液: 将 DMEM 基础培养基、NBS 和双抗按照 89: 10: 1 比例混匀, 配制含有 10%NBS 和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基, 置于 4°C 冰箱, 备用。

(2) 抗体稀释液: 将 DMEM 基础培养基、NBS 和双抗按照 96.5: 2.5: 1 比例混匀, 配制含有 2.5%NBS 和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基, 置于 4°C 冰箱, 备用。

(3) 病毒稀释液: 将 DMEM 基础培养基和 NBS 按照 97.5: 2.5 比例混匀, 配制含有 2.5%NBS 的 DMEM 完全培养基, 置于 4°C 冰箱, 备用。

(4) 含 0.9% 甲基纤维素的维持培养基: 称取 9 g 甲基纤维素, 加入 1 L DMEM 基础培养基和 25 mL NBS, 混匀, 过滤除菌。

2.2 实验方法

2.2.1 人源化单抗的改造及质粒合成

2.2.1.1 人源化组合突变文库的构建

将鼠源单抗重/轻链 CDR 区序列移植到人单抗 IgG1/ κ 骨架上构建移植抗体, 然后, 利用计算机同源建模, 根据亲和力的变化设计回复突变位点并利用回复突变技术对 FR 区序列中关键氨基酸位点进行突变。再根据选择的突变位点设计相应的引物, 并通过重叠 PCR 将这些突变随机组合到含有功能蛋白 (SASA) 的文库中, 构建人源化组合突变 Fab 文库。

2.2.1.2 人源化单抗的筛选

待文库中单个 Fab 克隆在 96 个深孔板中表达候选抗体细胞裂解液(包含融合 SASA 蛋白)后, 对其分别进行针对 BSA (SASA 和 BSA 可紧密结合) 和 S 蛋白的 ELISA, 对大肠杆菌在培养基中的表达和结合活性进行检测。挑选出与 BSA 和 S 蛋白结合活性均较高的 11 个 Fab 克隆。

2.2.1.3 候选抗体亲和力排序

采用胺偶联法将 BSA 固定在传感器芯片上, 将挑选出的 11 个 Fab-SASA 克隆分别单独注射并被 BSA 捕获 (捕获期); 平衡后, S 蛋白注射 120 秒 (结合期); 然后运行缓冲液注射 600 秒 (解离期)。不同 Fab-SASA 克隆注射之前, 要注意表面再生, 直到分析所有抗体。

然后使用 Biacore 8K 评估软件, 运用 1: 1 相互作用模型拟合实验数据, 获得 Fab-SASA 克隆的结合常数 (k_a) 和解离常数 (k_d), 并计算对应的平衡常数 (KD)。将抗体按其平衡常数进行排序, 并将与 ch20D8 单抗具有相似或更高结合亲和力的克隆送去测序。

2.2.1.4 候选抗体序列分析及质粒构建

根据亲和力排序和 DNA 测序结果, 筛选出一个亲和力最高且回复突变位点最少的 Fab 克隆进行全长 IgG 的表达。将这株候选抗体重/轻链可变区序列和亲本鼠源单抗可变区序列在 Clustal Omega 网站 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 上进行比对并对结果进行分析。然后将这株候选抗体重/轻链可变区序列插入到已含抗体恒定区 (IgG1/ κ) 序列的 pcDNA3.4 载体中, 构建完整的重/轻链人源化质粒 pcDNA3.4-H/L-h20D8。

2.2.2 质粒转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞

方法同第一章 1.2.8。

2.2.3 提取质粒

方法同第一章 1.2.9。

2.2.4 h20D8 单抗的大量制备

方法同第一章 1.2.11。

2.2.5 Protein A 亲和层析纯化 h20D8 单抗

2.2.5.1 装填柱料：将纳微填料颠倒至完全混匀，然后快速倒入柱中，静置 30 min 至填料完全沉淀，然后进行二次压柱。

2.2.5.2 平衡：使用配制好的平衡缓冲液冲洗柱子，以 2 mL/min 的流速冲洗至少 5 个柱体积，直至 UV、pH、电导率 3 条基线均水平。

2.2.5.3 上样：根据细胞上清的体积设置进样量，然后以 2 mL/min 的流速进样。

2.2.5.4 洗涤：使用配制好的平衡缓冲液淋洗柱子，以 2 mL/min 的流速洗去未能特异性结合的杂质蛋白质，淋洗 5 个柱体积，直至 UV、pH、电导率 3 条基线均水平。

2.2.5.5 洗脱：使用配制好的枸橼酸缓冲液洗脱，以 2 mL/min 的流速洗脱 3 个柱体积，收集洗脱液。

2.2.5.6 柱再生：先后使用纯水、1M NaOH 和平衡缓冲液冲洗柱子，各冲洗 5 个柱体积，去除强结合性物质；再使用纯水冲洗 10 倍柱体积，并用 20% 乙醇冲洗后保存。

2.2.5.7 回调 pH 及缓冲液置换：使用饱和的 Na₂HPO₄ 将洗脱液 pH 调至 5.0，然后使用 30 kDa 超滤浓缩管将蛋白离心置换到 PBS 溶液中，即得到纯化的人源化单抗 h20D8。

2.2.6 BCA 法测定 h20D8 浓度

方法同第一章 1.2.13。

2.2.7 h20D8 纯度及分子量检测

2.2.7.1 SDS-PAGE 检测 h20D8 纯度及分子量

(1) 样品处理: 取纯化后的 h20D8 2 μg , 与 5 \times SDS 还原型和非还原型 loading buffer 按照 4: 1 体积比混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理 10 min; 同时, 设置抗 TNF- α 单抗参比品作为对照。

(2) 点样: 将处理好的样品点样于 12%SDS-PAGE 预制胶, 并点样 6 μL 预染蛋白 marker。

(3) 电泳: 接通电源, 180 V 恒压电泳, 直至预染蛋白 marker 条带充分分离, 溴酚兰接近蛋白胶底部。

(4) 染色: 取出凝胶, 置于极速染色液中快速染色 2 min。

(5) 脱色并分析: 取出凝胶, 置于纯水中脱色并对结果进行分析。

2.2.7.2 CE-SDS 检测 h20D8 纯度

(1) 还原或非还原样品制备: 取 100 μg 样品, 用样品缓冲液稀释至 95 μL , 然后加入 5 μL β -巯基乙醇溶液或烷基化溶液, 混匀, 6 000 r/min 离心 1 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理 (还原样品加热 15 min, 非还原样品加热 5min), 立即冷水浴 5 min, 6 000 r/min 离心 1 min, 吸取 90 μL 到样品瓶中, 待上机分析。

(2) 还原或非还原空白溶液制备: 使用 PBS 溶液代替抗体, 其余同上。

(3) 上机检测并分析: 每次运行前分别使用 0.1 M NaOH、0.1 M HCl、纯水和 SDS 凝胶分离缓冲液冲洗系统; 设置毛细管温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 10 kV 反相极性电动进样时间为 30 s, 15 kV 下运行 50 min, 运行过程中压力为 20 psi, 分析波长为 220 nm, 带宽为 10 nm, 参比波长为 350 nm, 带宽为 10 nm, 进样顺序依次为还原空白溶液、还原样品、非还原空白溶液和非还原样品; 设置完成后开始检测, 并对结果进行分析。

(4) 仪器处理: 检测完成后, 先后使用清洗液及纯水清洗仪器, 并对样品瓶进行清洗。

2.2.8 iCIEF 检测 h20D8 pI

2.2.8.1 预混液配制: 在 EP 管中依次加入 0.5 μL marker4.1 的 IEF 标志物、0.5 μL marker10.0 的 IEF 标志物、4.0 μL Pharmalyte 3~10、1.5 μL 阳极稳定剂、1.5 μL 阴极稳

定剂和 35.0 μL 1% 甲基纤维素，混匀，配制总体积为 43 μL 的预混液，配制 2 份。

2.2.8.2 空白溶液和样品制备：取 43 μL 预混液，加入 57 μL 注射用水，得到 100 μL 的空白溶液；另取 43 μL 预混液，加入 20 μg 的 h20D8，注射用水补齐体积至 100 μL ；将上述液体 13 000 r/min 离心 3 min，取 90 μl 上清至样品瓶中。

2.2.8.3 上机检测并分析：设置自动进样器温度为 10 $^{\circ}\text{C}$ ，低电压 1 500 V 预聚焦 1 min，高电压 3 000 V 聚焦 4 min，进样持续时间为 90 s，设置进样顺序为先空白溶液后样品；设置完成后开始检测，并对检测结果进行分析。

2.2.8.4 仪器处理：检测完成后，先后使用清洗液及纯水清洗仪器，并对样品瓶进行清洗。

2.2.9 h20D8 特异性检测

2.2.9.1 Western Blot 检测 h20D8 特异性

(1) SDS-PAGE：取原型株 RBD 蛋白 2 μg ，与 5 \times SDS 还原型 loading buffer 按 4: 1 体积比混匀，按照 2.2.7.1 的方法进行样品处理和 SDS-PAGE，电泳完成后，将蛋白胶置于纯水中浸泡。

(2) 平衡膜：取 0.22 μm 孔径的 NC 膜，剪成凝胶一般大小后，置于 NC 膜平衡液中浸泡 1 min。

(3) 转膜：按照从负极到正极的顺序（海绵-凝胶-NC 膜-海绵）组装转膜夹，确保每层之间无气泡产生；然后将电转夹“FRONT”标志朝外置于转膜仪中，按下“START”键开始转膜。

(4) 封闭：转膜完成后，取出 NC 膜，将膜进行裁剪后置于槽内，加入封闭液至完全覆盖膜，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。

(5) 洗膜：弃掉封闭液，使用 PBST 洗涤液洗膜 3 次，每次置于摇床上温和震荡 10 min。

(6) 孵育一抗：弃掉洗涤液，阳性对照槽、样品槽和阴性对照槽中分别加入 3000 ng/mL 鼠源单抗 20D8、人源化单抗 h20D8 和抗 TNF- α 单抗参比品；摇床上温和震荡 2 min，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

(7) 洗膜：同(5)。

(8) 孵育二抗: 弃掉洗涤液, 阳性对照槽内加入 HRP 标记的 2000 倍稀释的山羊抗鼠 IgG, 样品槽和阴性对照槽内加入 HRP 标记的 2000 倍稀释的山羊抗人 IgG-Fc; 摇床上温和震荡 2 min, 37°C 孵育 1 h。

(9) 洗膜: 同(5)。

(10) 显色: 配制 DAB 显色液, 将膜内洗涤液弃掉, 显色液缓慢滴到膜上, 直至膜上出现明显条带后清水漂洗并对结果进行分析。

2.2.9.2 Dot Blot 检测 h20D8 特异性

(1) 膜激活: 取 PVDF 膜, 置于 100% 甲醇溶液中浸泡 1 min 以激活膜。

(2) 点样: 取出 PVDF 膜, 将 2 μ g 原型株 RBD 蛋白点样于膜上成圆点状, 然后水平放置直至膜完全风干。

(3) 封闭: 加入封闭液至完全覆盖膜, 37°C 封闭 2 h。

(4) 其他: 封闭后方法同 2.2.9.1。

2.2.10 ELISA 检测 h20D8 结合活性和阻断活性

方法同第一章 1.2.14 和 1.2.15。

2.2.11 h20D8 对假病毒的中和活性检测

方法同第一章 1.2.16。

2.2.12 PRNT 检测 h20D8 对活病毒的中和活性

2.2.12.1 细胞准备: 中和实验前一天, 对长至 80~90% 汇合度的 Vero 细胞进行消化处理, 计数并调整细胞密度为 2×10^5 cells/mL, 然后按照每孔 1 mL 加入到 12 孔细胞培养板中, 置于 37°C 培养箱内过夜。

2.2.12.2 抗体稀释: 在 EP 管中将 h20D8 稀释到 500 ng/mL (抗体对不同变异株的中和能力不同, 起始浓度会有所调整), 然后转移 400 μ L 到 24 孔板第一孔; 分别在第 2~6 孔中加入 300 μ L 抗体稀释液, 将第一孔混匀, 吸 100 μ L 至第 2 孔混匀, 依此类推, 直至第 6 孔, 第 6 孔弃 100 μ L。

2.2.12.3 活病毒稀释: 用病毒稀释液将病毒稀释至 600 PFU/mL。

2.2.12.4 中和：将稀释好的活病毒按照每孔 300 μL 加入到抗体稀释液中，混匀，同时设置不加抗体的空斑对照（设 4 个复孔），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内中和 1 h。

2.2.12.5 混合物转板：弃去 Vero 细胞中培养基，将中和 1 h 后的抗体和病毒混合物按照每孔 0.5 mL 加入到细胞培养板中，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱吸附 1 h。

2.2.12.6 细胞培养：弃去板内液体，每孔加入 900 μL 含 0.9% 甲基纤维素的维持培养基，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 3~4 天。

2.2.12.7 固定并染色：弃去细胞培养板中液体，按照每孔 1 mL 加入 8% 甲醛固定液，室温固定 1 h；弃去固定液，用水润洗 3 次，按照每孔 300 μL 加入 0.5% 结晶紫进行染色，染色 10min 后，用水润洗 5 次并拍照。

2.2.12.8 结果分析：数出所有孔中出现的空斑数目，然后计算空斑对照孔（4 个复孔）空斑数目的平均值(\bar{X})，将 h20D8 不同稀释度对应的空斑数记为 M ，按照抑制率= $(1-M/\bar{X}) \times 100\%$ 的公式，计算不同稀释度抗体对病毒的抑制率，结果进行四参数对数拟合并确定 IC_{50} 。

2.3 实验结果

2.3.1 人源化单抗的筛选及亲和力排序

通过 ELISA 法挑选出与 BSA 和 S 蛋白结合活性均较高的 11 个 Fab 克隆后（命名为 AHF13770~AHF13780），运用 SPR 技术对这些克隆以及 ch20D8 单抗、移植单抗、阴性对照和空白对照进行亲和力检测，结合传感器曲线见图 2.2，结合动力学参数见表 2.1。这 11 个 Fab 克隆上清液与 S 蛋白均可特异性结合，其中，AHF13772 与 S 蛋白的结合常数 (k_a) 为 $1.47\text{E}+06/\text{Ms}^{-1}$ ，解离常数 (k_d) 为 $1.66\text{E}-06/\text{s}^{-1}$ ，对应的平衡常数 (KD) 为 $1.13\text{E}-12\text{ M}$ ， KD 最小 (KD 越小，亲和力越高)，亲和力最高，且比 ch20D8 单抗的亲和力更高 (ch20D8 单抗 KD 为 $9.12\text{E}-12\text{ M}$)。测序结果也显示，AHF13772 重/轻链均只有一个氨基酸突变，故选择 AHF13772 进行全长 IgG 的表达。

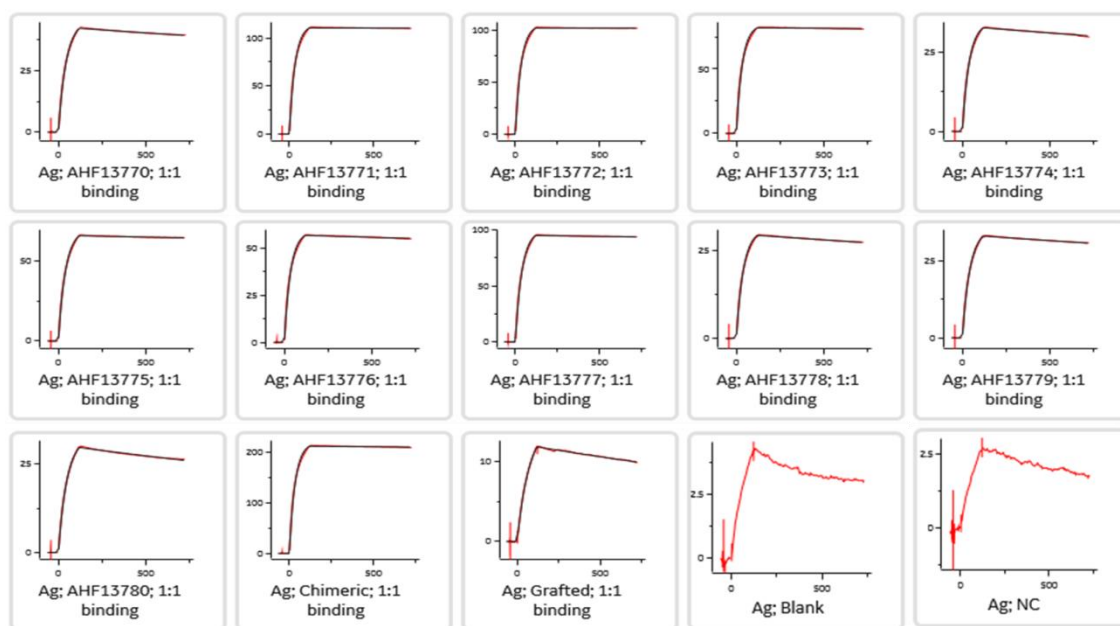


图 2.2 候选抗体及对照与 Biacore 8k 结合传感器曲线图

Fig2.2 Binding sensor image of Biacore 8K for candidate antibody and control

注：图中横坐标为时间，单位为秒（S），纵坐标为相对响应值。

表 2.1 候选抗体及对照与 S 蛋白结合的动力学参数

Tab2.1 Binding kinetic parameters of candidate antibody and control

配体	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	亲和力排序
AHF13770	S 蛋白	1.11E+06	1.18E-04	1.06E-10	8
AHF13771	S 蛋白	1.49E+06	4.23E-06	2.85E-12	2
AHF13772	S 蛋白	1.47E+06	1.66E-06	1.13E-12	1
AHF13773	S 蛋白	1.47E+06	1.29E-05	8.75E-12	3
AHF13774	S 蛋白	1.26E+06	1.36E-04	1.08E-10	10
AHF13775	S 蛋白	1.21E+06	3.41E-05	2.82E-11	5
AHF13776	S 蛋白	1.41E+06	4.82E-05	3.42E-11	6
AHF13777	S 蛋白	1.28E+06	2.12E-05	1.66E-11	4
AHF13778	S 蛋白	1.22E+06	1.18E-04	9.69E-11	7
AHF13779	S 蛋白	1.13E+06	1.20E-04	1.06E-10	8
AHF13780	S 蛋白	9.98E+05	2.17E-04	2.18E-10	11
ch20D8 单抗	S 蛋白	1.46E+06	1.33E-05	9.12E-12	-
移植单抗	S 蛋白	6.96E+05	2.90E-04	4.16E-10	-
Blank	S 蛋白	NA	NA	NA	-
阴性对照	S 蛋白	NA	NA	NA	-

2.3.2 质粒序列分析及比对

将候选抗体 AHF13772 重/轻链序列插入到已含抗体恒定区 (IgG1/ κ) 序列的 pcDNA3.4 载体中, 构建了完整的重/轻链人源化质粒 pcDNA3.4-H/L-h20D8。插入的重/轻链全长 DNA 和氨基酸序列分别见附图 9 和附图 10。h20D8 重链可变区全长 1 401 bp, 共编码 467 个氨基酸, 轻链可变区全长 720 bp, 共编码 240 个氨基酸。

将 h20D8 单抗和亲本鼠源单抗的可变区序列在 Clustal Omega 网站上进行序列比对, 重链可变区核苷酸序列和氨基酸序列比对分析见附图 11 和附图 12, 轻链可变区核苷酸序列和氨基酸序列比对分析见附图 13 和附图 14。虽然 h20D8 单抗和鼠源单抗重/轻链 CDR 区碱基序列不完全一致, 但编码产生的氨基酸序列完全一致。

2.3.3 Protein A 亲和层析纯化人源化单抗

Protein A 亲和层析纯化 h20D8 的图谱见图 2.3。图中洗脱峰明显, 说明 h20D8 和 Protein A 柱特异性结合并被成功洗脱。



图 2.3 Protein A 亲和层析纯化 h20D8 图谱

Fig2.3 Map of protein A affinity chromatography purification of h20D8

注: 图中箭头指示位置为洗脱峰。

2.3.4 h20D8 纯度及分子量检测

2.3.4.1 SDS-PAGE 检测 h20D8 纯度及分子量

h20D8 的 SDS-PAGE 结果见图 2.4。h20D8 纯度较高, 且重/轻链保持完整, 大小与理论分子量 (轻链约 25 kDa, 重链约 50 kDa) 基本一致。

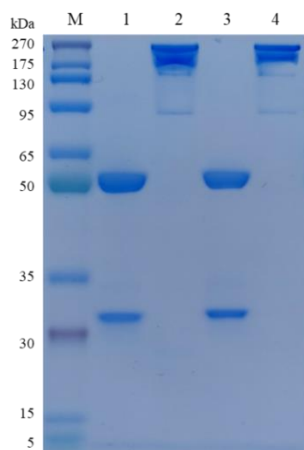


图 2.4 h20D8 SDS-PAGE 结果

Fig2.4 SDS-PAGE result of h20D8

注：图中 M 为预染蛋白 marker, 1 和 2 分别为抗 TNF- α 单抗参比品还原和非还原状态下条带, 3 和 4 分别为 h20D8 还原和非还原状态下条带。

2.3.4.2 CE-SDS 检测 h20D8 纯度

h20D8 还原和非还原状态下的 CE-SDS 结果分别见图 2.5 和图 2.6。还原状态下纯度大于 97%，非还原状态下纯度大于 96%，纯度较高。

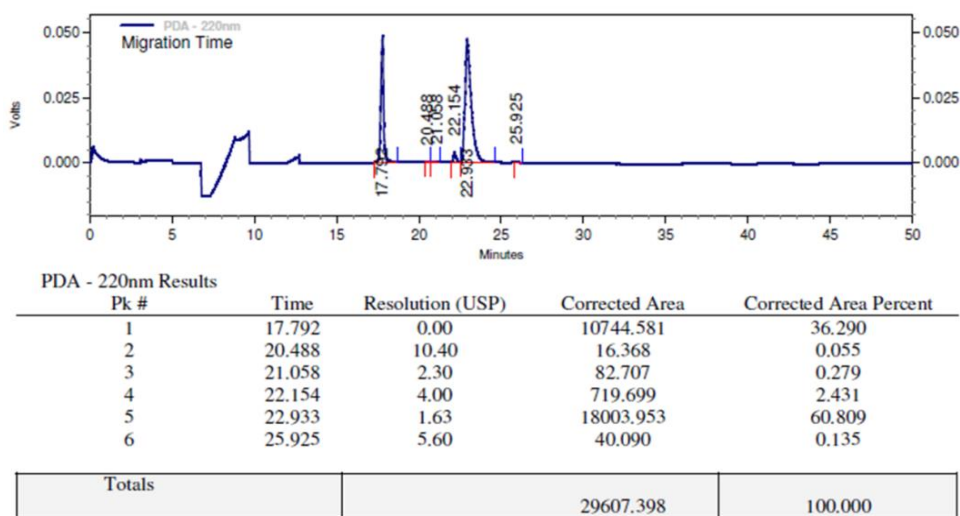


图 2.5 还原状态下 h20D8 CE-SDS 结果

Fig2.5 CE-SDS results of h20D8 in reduced state

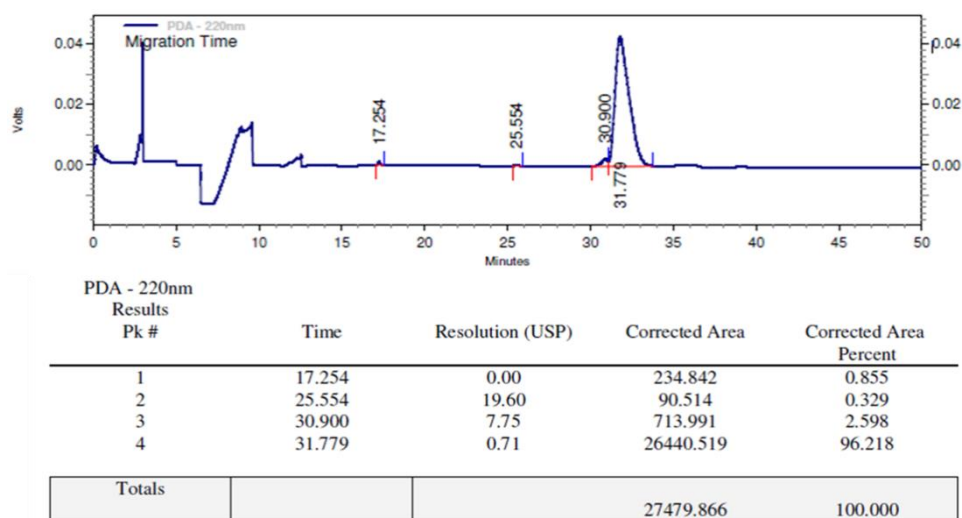


图 2.6 非还原状态下 h20D8 CE-SDS 结果
Fig2.6 CE-SDS results of h20D8 in non-reduced state

2.3.5 iCIEF 检测 h20D8 pI

iCIEF 检测 h20D8 pI 的图谱见图 2.7，h20D8 pI 为 7.928~8.716。

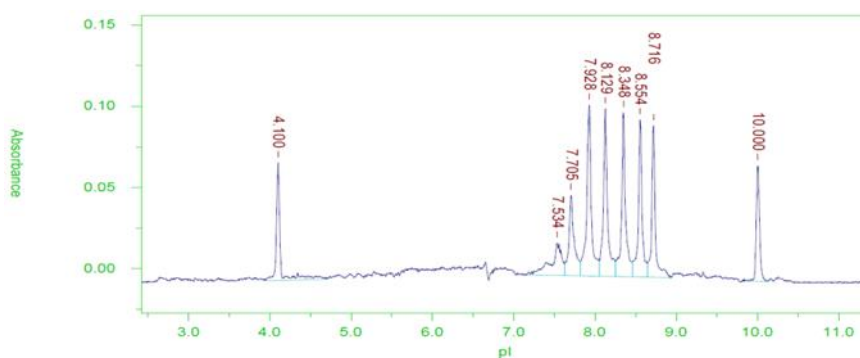


图 2.7 iCIEF 检测 h20D8 pI
Fig2.7 The pI of h20D8 was detected by iCIEF

2.3.6 Western Blot 和 Dot Blot 检测 h20D8 特异性

Western Blot 和 Dot Blot 检测 h20D8 特异性的结果分别见图 2.8 和 2.9。h20D8 可特异性结合原型株 RBD 蛋白，且结合的是 RBD 线性表位。

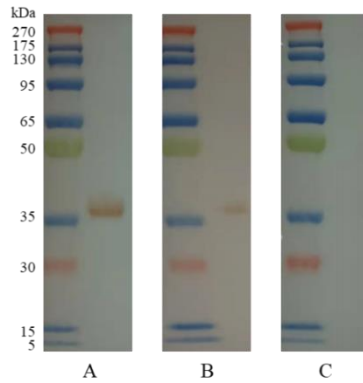


图 2.8 h20D8 Western Blot 结果

Fig2.8 Western Blot results of h20D8

注：图中 A 为阳性对照（鼠源单抗 20D8），B 为样品 h20D8 单抗，C 为阴性对照（抗 TNF- α 单抗参比品）。

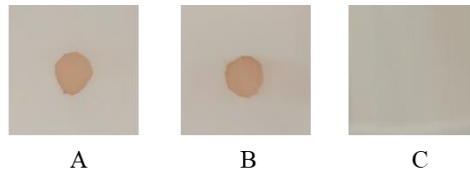


图 2.9 h20D8 Dot Blot 结果

Fig2.9 Dot Blot results of h20D8

注：图中 A 为阳性对照（鼠源单抗 20D8），B 为样品 h20D8 单抗，C 为阴性对照（抗 TNF- α 单抗参比品）。

2.3.7 ELISA 检测 h20D8 结合活性和阻断活性

h20D8 对 RBD 结合活性的拟合曲线和 EC_{50} 见图 2.10A，阻断 RBD 和 ACE2 结合的拟合曲线和 IC_{50} 见图 2.10B。h20D8 对原型株 RBD 结合活性 EC_{50} 为 3.641 ng/mL，对 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 的结合能力与原型株相当；h20D8 阻断原型株 RBD 和 ACE2 结合的 IC_{50} 为 227.6 ng/mL，阻断 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 和 ACE2 结合能力与原型株相当。与 ch20D8 相比，h20D8 结合活性和阻断活性几乎未下降。

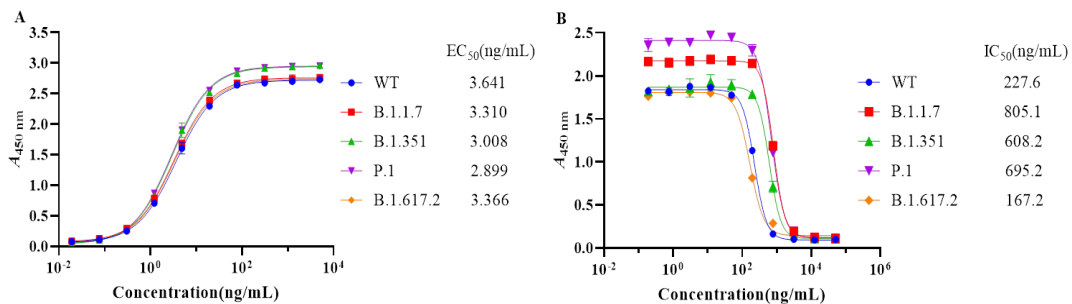


图 2.10 h20D8 结合活性和阻断活性拟合曲线

Fig2.10 Fitting curve of binding activity and blocking activity of h20D8

注：图 A 和 B 分别为 h20D8 的结合活性和阻断活性拟合曲线，图中拟合曲线的相关系数 R^2 均 >0.99 。

2.3.8 h20D8 对假病毒的中和活性检测

h20D8 对假病毒中和活性的拟合曲线和 IC_{50} 见图 2.11。h20D8 对原型株假病毒中和活性 IC_{50} 为 2.874 ng/mL，对 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株假病毒的中和活性与原型株相当。与 ch20D8 相比，h20D8 对假病毒的中和活性几乎未下降。

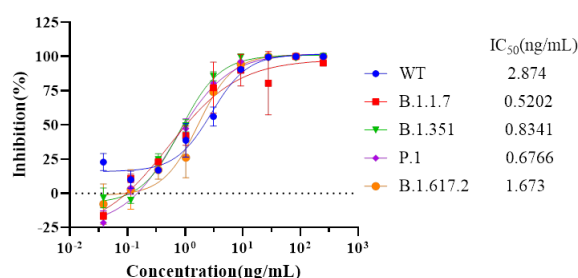


图 2.11 h20D8 假病毒中和活性拟合曲线

Fig2.11 Fitting curve of neutralization activity of h20D8 against pseudovirus

注：图中拟合曲线的相关系数 R^2 均>0.95。

2.3.9 PRNT 检测 h20D8 对活病毒的中和活性

h20D8 对活病毒中和活性的拟合曲线和 IC_{50} 见图 2.12。h20D8 对原型株活病毒中和活性 IC_{50} 为 14.46 ng/mL，对 B.1.351 变异株活病毒中和活性 IC_{50} 为 5.099 ng/mL。

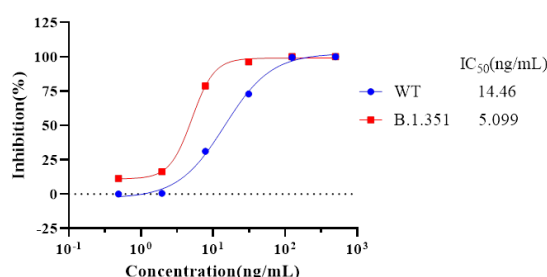


图 2.12 h20D8 活病毒中和活性拟合曲线

Fig2.12 Fitting curve of neutralization activity of h20D8 against true virus

注：图中拟合曲线的相关系数 R^2 均>0.95。

2.4 本章小结

(1) 成功构建了人源化组合突变 Fab 文库，通过结合 ELISA 法筛选到 11 个 Fab 克隆，然后通过 SPR 最终筛选出一个亲和力最高且回复突变位点最少的 Fab 克隆；将这株候选抗体重/轻链序列成功插入到已含抗体恒定区 (IgG1/ κ) 序列的 pcDNA3.4 载体中，构建了完整的重/轻链人源化质粒 pcDNA3.4-H/L-h20D8，质粒转染 Expi293F 细胞，成功表

达了 h20D8 抗体。

(2) h20D8 理化鉴定结果显示, h20D8 重/轻链大小与理论分子量基本一致, 纯度较高, pI 为 7.928~8.716。

(3) h20D8 结合活性和阻断活性检测结果显示, h20D8 对原型株 RBD 结合活性 EC_{50} 为 3.641 ng/mL, 对 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 的结合能力与原型株相当; h20D8 阻断原型株 RBD 和 ACE2 结合的 IC_{50} 为 227.6 ng/mL, 阻断 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 和 ACE2 结合能力与原型株相当。与 ch20D8 相比, h20D8 结合活性和阻断活性几乎未下降, 人源化改造成功。

(4) h20D8 中和活性检测结果显示, h20D8 对原型株假病毒中和活性 IC_{50} 为 2.874 ng/mL, 对 B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株假病毒的中和活性与原型株相当; h20D8 对原型株活病毒中和活性 IC_{50} 为 14.46 ng/mL, 对 B.1.351 变异株活病毒中和活性 IC_{50} 为 5.099 ng/mL, 即 h20D8 对以上 SARS-CoV-2 病毒株具有极高的中和活性。

2.5 本章讨论

2.5.1 鼠源单抗人源化改造

鼠源单抗的嵌合改造在减少鼠源性成分的同时, 又很大程度地保留了鼠源单抗的亲合力, 但是嵌合单抗仍含有 30% 左右鼠源性成分, 仍可诱发人抗鼠抗体反应^[58]。通过嵌合改造验证了鼠源单抗可变区序列的正确性之后, 可对其继续进行人源化改造。

人源化抗体主要有 CDR 移植抗体和 SDR 移植抗体, CDR 移植抗体将鼠源单抗上的 CDR 移植到人抗体相应的 CDR 区^[62], 再通过对 CDR 区附近可能影响可变区结构的氨基酸残基进行替换来优化抗体。本课题通过 CDR 移植抗体技术和构建组合突变 Fab 文库的方法, 成功筛选到一株亲和力最高且回复突变位点最少的 Fab 克隆, 将此 Fab 克隆成功连接至 pcDNA3.4 载体后, 表达了全长 IgG 抗体, 表达的抗体 CDR 区氨基酸序列与亲本鼠源单抗 CDR 区序列完全一致。经鉴定, 改造的 h20D8 单抗与鼠源单抗相比, h20D8 单抗亲和力几乎未下降, 且具有非常高的生物学活性(结合、阻断及中和活性)。

2.5.2 病毒变异及免疫逃逸

SARS-CoV-2 的遗传多样化、遗传突变及基因高频重组都增加了该病毒扩大传播的风险。在传播过程中,随着自然选择和药物作用的压力,病毒会不断发生变异,截至 2022 年 5 月 16 日,SARS-CoV-2 有 5 种 VOC(B.1.1.7、B.1.351、P.1、B.1.617.2 和 B.1.1.529)。随着变异株的出现,不同药物对于 COVID-19 的治疗出现了不同程度的失效,已有体外研究表明,对于 B.1.1.529 变异株,目前获批上市或处于临床研究中的单抗,除 Vir-7831、DXP-604 和 B11-196/B11-198 组合单抗还保留有一定中和活性外,大部分单抗都呈现出不同程度的失效^[63-66]。本课题中 20D8 单抗对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株均具有强中和活性,但是 B.1.1.529 变异株由于存在于 RBD 上的突变位点多达 15 个,导致 20D8 中和效力显著下降(结果未展示)。

由于单抗的作用位点单一,在治疗过程中,病毒在选择压力下,易发生免疫逃逸。可选择作用于不同位点且具有协同作用的单抗组成组合抗体,如 CR3014 和 CR3022 组合单抗可以有效预防 SARS-CoV 逃逸^[67]。本课题中 20D8 单抗单独使用,对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株均具有强中和活性,与本实验室识别其他表位的抗体(D2)混合使用,可有效中和包括 B.1.1.529 在内的所有 VOC 假病毒(结果未展示),具有较大的应用价值。

第三章 总结与展望

3.1 全文总结

3.1.1 本课题成功钓取了鼠源单抗重/轻链可变区序列，并成功构建了嵌合抗体表达质粒 KS001-ch20D8，成功表达了嵌合单抗 ch20D8。

3.1.2 ch20D8 体外生物学活性鉴定结果显示，ch20D8 对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 均具有强结合活性；对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 和 ACE2 结合均具有强阻断活性；对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株假病毒均具有强中和活性。

3.1.3 小鼠体内药效学评价实验中，通过对小鼠体重变化、临床症状、死亡情况的监测及肺部/脑部组织病毒 RNA 水平的测定，表明 ch20D8 对感染 B.1.617.2 变异株活病毒的 K18-hACE2 小鼠具有较好的保护效果。

3.1.4 采用 CDR 移植技术及回复突变技术对鼠源单抗 20D8 进行了人源化改造，成功构建了完整的重/轻链人源化质粒 pcDNA3.4-H/L-h20D8，并成功表达了 h20D8 抗体；h20D8 重/轻链大小与理论分子量基本一致，纯度较高，pI 为 7.928~8.716，可特异性结合原型株 RBD 蛋白。

3.1.5 与 ch20D8 相比，h20D8 对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株 RBD 结合活性和阻断活性几乎未下降；对原型株、B.1.1.7、B.1.351、P.1 和 B.1.617.2 变异株假病毒中和活性几乎未下降；h20D8 对原型株和 B.1.351 变异株活病毒具有非常高的中和活性。以上结果表明，本课题成功对鼠源单抗 20D8 进行了人源化改造。

3.2 展望

抗 SARS-CoV-2 鼠源单抗 20D8 为具有强中和活性的单抗，本课题主要对其进行人源化改造。通过抗体的人源化改造，一方面减少了鼠源性成分，降低了临床使用中可能引起的人抗鼠抗体反应，另一方面保留了鼠源单抗的亲合力和强中和活性。但是由于 SARS-CoV-2 病毒的变异，不断有各种新冠单抗发生了不同程度的失效，本课题中 20D8 也被 B.1.1.529 变异株逃逸。

将识别不同表位的单抗进行混合，是应对病毒免疫逃逸、提高抗体抗病毒广谱性的

有效手段。我们将 20D8 与本实验室识别其他表位、且能中和 B.1.1.529 变异株的抗 SARS-CoV-2 单抗 (D2) 进行混合, 可有效中和包括 B.1.1.529 变异株在内的所有 VOC。

后续我们将构建稳定表达 h20D8 的 CHO 工程细胞株, 并与 D2 等抗 SARS-CoV-2 单抗进行组合, 以期开发更为广谱的抗 SARS-CoV-2 中和抗体药物, 为我国新冠疫情的防控作出应有的贡献!

参考文献

- [1] SU S, WONG G, SHI W, *et al.* Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses [J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24(6): 490-502.
- [2] WEISS S R, NAVAS-MARTIN S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(4): 635-664.
- [3] FEHR A R, PERLMAN S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1282: 1-23.
- [4] SKARIYACHAN S, CHALLAPILLI S B, PACKIRISAMY S, *et al.* Recent aspects on the pathogenesis mechanism, animal models and novel therapeutic interventions for middle east respiratory syndrome coronavirus infections [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 569.
- [5] LEDNICKY J A, TAGLIAMONTE M S, WHITE S K, *et al.* Isolation of a novel recombinant canine coronavirus from a visitor to haiti: further evidence of transmission of coronaviruses of zoonotic origin to humans [J]. *Clin Infect Dis*, 2021. doi:10.1093/cid/ciab924.
- [6] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [7] 安欢欢, 钱莎莎, 于代冠, 等. 严重急性呼吸道综合征冠状病毒 2 全长 cDNA 的构建新途径 [J]. *中国生物制品学杂志*. 2021, 34(12): 1418-1426.
- [8] RAHIMI A, MIRZAZADEH A, TAVAKOLPOUR S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection [J]. *Genomics*, 2021, 113(1 Pt 2): 1221-1232.
- [9] LU R, ZHAO X, LI J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [10] CHAN J F, KOK K H, ZHU Z, *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221-236.
- [11] CHEN Y, LIU Q, GUO D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 418-423.
- [12] WANG Y, GRUNEWALD M, PERLMAN S. Coronaviruses: an updated overview of their replication and pathogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2203: 1-29.
- [13] LI F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins [J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1): 237-261.
- [14] CHEN N, ZHOU M, DONG X, *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 507-513.
- [15] 李芳. 新型冠状病毒肺炎病毒人源中和抗体的筛选及鉴定 [D]. 中国农业科学院, 2021. doi: 10.27630/d.cnki.gznky.2021.000888.
- [16] WANG W, TANG J, WEI F. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 441-447.
- [17] XU Z, SHI L, WANG Y, *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory

- distress syndrome [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(4): 420-422.
- [18] VABRET N, BRITTON G J, GRUBER C, *et al.* Immunology of COVID-19: current state of the science [J]. *Immunity*, 2020, 52(6): 910-941.
- [19] KINDLER E, THIEL V, WEBER F. Interaction of SARS and MERS coronaviruses with the antiviral interferon response [J]. *Adv Virus Res*, 2016, 96: 219-243.
- [20] HADJADJ J, YATIM N, BARNABEI L, *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients [J]. *Science*, 2020, 369(6504): 718-724.
- [21] WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard, (2022-05-15) [2022-05-16]. <https://covid19.who.int/>.
- [22] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280 + e278.
- [23] BURKARD C, VERHEIJE M H, WICHT O, *et al.* Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(11): e1004502.
- [24] 李悦, 林昶东. 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)概述 [J]. *生命的化学*, 2021, 41(3): 413-419.
- [25] PERLMAN S, NETLAND J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(6): 439-450.
- [26] 罗晓君, 章文贤. 冠状病毒的结构及生物学特性概述 [J]. *生物学教学*, 2020, 45(7): 4-6.
- [27] MOURIER T, SADYKOV M, CARR M J, *et al.* Host-directed editing of the SARS-CoV-2 genome [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 538: 35-39.
- [28] WONG A C P, LAU S K P, WOO P C Y. Interspecies jumping of bat coronaviruses [J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2188.
- [29] ROBSON F, KHAN K S, LE T K, *et al.* Coronavirus RNA proofreading: molecular basis and therapeutic targeting [J]. *Mol Cell*, 2020, 79(5): 710-727.
- [30] GORBALENYA A E, ENJUANES L, ZIEBUHR J, *et al.* Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome [J]. *Virus Res*, 2006, 117(1): 17-37.
- [31] WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants [EB/OL], (2022-05-15)[2022-05-16]. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
- [32] BUCHAN S A, TIBEBU S, DANEMAN N, *et al.* Increased household secondary attacks rates with variant of concern severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 index cases [J]. *Clin Infect Dis*, 2022, 74(4):703-706.
- [33] CAMPBELL F, ARCHER B, LAURENSEN-SCHAFFER H, *et al.* Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021 [J]. *Euro Surveill*, 2021, 26(24): 2100509.
- [34] Pfizer Inc. Pfizer's novel COVID-19 oral antiviral treatment candidate reduced risk of hospitalization or death by 89% in interim analysis of phase 2/3 EPIC-HR study [EB/OL], (2021-11-05) [2022-05-16].<https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizers-novel-covid-19-oral-antiviral-treatment-candidate>.
- [35] DUAN K, LIU B, LI C, *et al.* Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(17): 9490-9496.
- [36] JU B, ZHANG Q, GE J, *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection [J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 115-119.

- [37] HANSEN J, BAUM A, PASCAL K E, *et al.* Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail [J]. *Science*, 2020, 369(6506): 1010-1014.
- [38] LENG Z, ZHU R, HOU W, *et al.* Transplantation of ACE2(-) mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia [J]. *Aging Dis*, 2020, 11(2): 216-228.
- [39] 孙玮, 张利宁. 噬菌体抗体库技术研究进展 [J]. *山东医药*, 2007, (14): 81-82.
- [40] PAN Y, DU J, LIU J, *et al.* Screening of potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 using convalescent patients-derived phage-display libraries [J]. *Cell Discov*, 2021, 7(1): 57.
- [41] CHEN P, NIRULA A, HELLER B, *et al.* SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with COVID-19 [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 229-237.
- [42] JIANG R D, LIU M Q, CHEN Y, *et al.* Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell*, 2020, 182(1): 50-58 + e58.
- [43] RYU D K, SONG R, KIM M, *et al.* Therapeutic effect of CT-P59 against SARS-CoV-2 South African variant [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 566: 135-140.
- [44] JONES B E, BROWN-AUGSBURGER P L, CORBETT K S, *et al.* The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(593): eabf1906. doi: 10.1126/scitranslmed.abf1906.
- [45] SHI R, SHAN C, DUAN X, *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 120-124.
- [46] PINTO D, PARK Y J, BELTRAMELLO M, *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody [J]. *Nature*, 2020, 583(7815): 290-295.
- [47] DONG J, ZOST S J, GREANEY A J, *et al.* Genetic and structural basis for SARS-CoV-2 variant neutralization by a two-antibody cocktail [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(10): 1233-1244.
- [48] BARAL P K, YIN J, JAMES M N G. Treatment and prevention strategies for the COVID-19 pandemic: A review of immunotherapeutic approaches for neutralizing SARS-CoV-2 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 186: 490-500.
- [49] CAO Y, SU B, GUO X, *et al.* Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells [J]. *Cell*, 2020, 182(1): 73-84 + e16.
- [50] ZHANG Q, ZHOU R, YANG J, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, first-in-human clinical trial to assess safety, tolerability, and pharmacokinetics of LY-CovMab, a potent human neutralizing antibody against SARS-CoV-2 [J]. *Infect Dis Ther*, 2022, 11(1): 405-422.
- [51] MENG X, WANG P, XIONG Y, *et al.* Safety, tolerability, pharmacokinetic characteristics, and immunogenicity of MW33: a phase 1 clinical study of the SARS-CoV-2 RBD-targeting monoclonal antibody [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1): 1638-1648.
- [52] GU C, CAO X, WANG Z, *et al.* A human antibody of potent efficacy against SARS-CoV-2 in rhesus macaques showed strong blocking activity to B.1.351 [J]. *MAbs*, 2021, 13(1): 1930636.
- [53] 杨钧婷, 王晓堂, 续国强, 等. 新型冠状病毒肺炎动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志* 2020, 30(9): 111-116.
- [54] ROGERS T F, ZHAO F, HUANG D, *et al.* Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model [J]. *Science*, 2020, 369(6506): 956-963.
- [55] SUN S H, CHEN Q, GU H J, *et al.* A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. *Cell*

- Host Microbe, 2020, 28(1): 124-133 + e124.
- [56] STEWARD G F, CULLEY A I. Extraction and purification of nucleic acids from viruses [M]. 2010.
- [57] 李萍, 熊凡, 富青, 等. 一种简便的 RNA 完整性检测方法 [J]. 湖北中医学院学报, 2005(03): 39-40.
- [58] GONZALES N R, DE PASCALIS R, SCHLOM J, *et al.* Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application [J]. Tumour Biol, 2005, 26(1): 31-43.
- [59] SUN J, ZHUANG Z, ZHENG J, *et al.* Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. Cell, 2020, 182(3): 734-743 + e735.
- [60] BAO L, DENG W, HUANG B, *et al.* The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. Nature, 2020, 583(7818): 830-833.
- [61] ZHENG J, WONG L R, LI K, *et al.* COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice [J]. Nature, 2021, 589(7843): 603-607.
- [62] NAKANO K, ISHIGURO T, KONISHI H, *et al.* Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization [J]. Anticancer Drugs, 2010, 21(10): 907-916.
- [63] VANBLARGAN L A, ERRICO J M, HALFMANN P J, *et al.* An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies [J]. Nat Med. 2022, 28(3): 490-495.
- [64] HOFFMANN M, KRÜGER N, SCHULZ S, *et al.* The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic [J]. Cell, 2022, 185(3): 447-456 + e411.
- [65] CATHCART A L, HAVENAR-DAUGHTON C, LEMPP F A, *et al.* The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and in vivo activity against SARS-CoV-2 [J]. 2021. doi: 10.1101/2021.03.09.434607.
- [66] CAO Y, WANG J, JIAN F, *et al.* Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies [J]. Nature. 2022, 602(7898):657-663.
- [67] TER MEULEN J, VAN DEN BRINK E N, POON L L, *et al.* Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants [J]. PLoS Med, 2006, 3(7): e237.

附录I 图表说明

```

          10      20      30      40      50      60
1  GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA
1  E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I
1  R S S C N S L D L N W * S L G L Q * R Y
1  G P A A T V W T * T G E A W G F S E D

          70      80      90      100     110     120
61 TCCTGCAAGACATCTGGATACACCTTCACTGAATACACCATGTATTGGGTGAAGCAGAGT
21 S C K T S G Y T F T E Y T M Y W V K Q S
21 P A R H L D T P S L N T P C I G * S R V
20 I L Q D I W I H L H * I H H V L G E A E

          130     140     150     160     170     180
121 CATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATAAATCCTAACATTGGTGATACTGGCTAC
41 H G K S L E W I G G I N P N I G D T G Y
41 M E R A L S G L E V * I L T L V I L A T
40 S W K E P * V D W R Y K S * H W * Y W L

          190     200     210     220     230     240
181 AACCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAGTCCTCCAGTACAGCCTAC
61 N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y
61 T R S S R A R P H * L W T S P P V Q P T
60 Q P E V Q G Q G H I D C G Q V L Q Y S L

          250     260     270     280     290     300
241 ATGGAGATCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATACT
81 M E I R S L T S E D S A V Y Y C A R D T
81 W R S A A * H L R I L Q S I T V Q E I L
80 H G D P Q P D I * G F C S L L L C K R Y

          310     320     330     340     350
301 GGCAACTACCCGTTTACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
101 G N Y P F D Y W G Q G T T L T V S S
101 A T T R L T T G A K A P L S Q S P
100 W Q L P V * L L G P R H H S H S L L
    
```

附图 1 鼠源单抗重链可变区开放阅读框分析

```

          10      20      30      40      50      60
1      GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA
1      E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I

          70      80      90      100     110     120
61     TCCTGCAAGACATCTGGATACACCTTCACTGAATACACCATGTATTGGGTGAAGCAGAGT
21     S C K T S G Y T F T E Y T M Y W V K Q S

          130     140     150     160     170     180
121    CATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATAAATCCTAACATTGGTGATACTGGCTAC
41     H G K S L E W I G G I N P N I G D T G Y

          190     200     210     220     230     240
181    AACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAGTCCTCCAGTACAGCCTAC
61     N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y

          250     260     270     280     290     300
241    ATGGAGATCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATACT
81     M E I R S L T S E D S A V Y Y C A R D T

          310     320     330     340     350
301    GGCAACTACCCGTTTACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
101    G N Y P F D Y W G Q G T T L T V S S
    
```

附图 2 鼠源单抗重链可变区 DNA 和氨基酸序列分析

附表 1 鼠源单抗重链可变区核苷酸序列同源性分析

		Score	Identity
AC090843	Musmus IGHV1-18*01 F	1251	92.71% (267/288 nt)
AC073565	Musmus IGHV1-26*01 F	1251	92.71% (267/288 nt)
AC073565	Musmus IGHV1-22*01 F	1242	92.36% (266/288 nt)
AC073565	Musmus IGHV1-34*01 F	1224	91.67% (264/288 nt)
L17134	Musmus IGHV1-34*02 F	1206	90.97% (262/288 nt)

```

<----- FR1-IMGT -----
20D8-H      gaggtccagctgcaacagtctggacct...gaactggtgaagcctgggcttcagtgaag
AC090843 Musmus IGHV1-18*01 F      -----g-----
AC073565 Musmus IGHV1-26*01 F      -----a-----g-----
AC073565 Musmus IGHV1-22*01 F      -----g-----
AC073565 Musmus IGHV1-34*01 F      -----gt-----
L17134 Musmus IGHV1-34*02 F      -----g-----a-----

-----> CDR1-IMGT <-----
20D8-H      atatcctgcaagacatctggatacacctc.....actgaatacaccatgtat
AC090843 Musmus IGHV1-18*01 F      --c-----g-t-----a-----c---a---g-c
AC073565 Musmus IGHV1-26*01 F      -----t-g-t-----g-----c---ta---a-c
AC073565 Musmus IGHV1-22*01 F      --g-----g-t-----a-----c---a---c-c
AC073565 Musmus IGHV1-34*01 F      --g-----g-t---c---a-----c---ta---c-c
L17134 Musmus IGHV1-34*02 F      --g-----g-t---c---a-----c---ta---g-c

----- FR2-IMGT -----> CDR
20D8-H      tgggtgaagcagagtcattggaagagccttgagtgattggaggatataatcctaac...
AC090843 Musmus IGHV1-18*01 F      -----c-----a-t-----...
AC073565 Musmus IGHV1-26*01 F      -----c-----a-t-----...
AC073565 Musmus IGHV1-22*01 F      -----c-----ta-t-c-----...
AC073565 Musmus IGHV1-34*01 F      -----c-----ta-tt-----...
L17134 Musmus IGHV1-34*02 F      -----c-----ta-tt-----...

2-IMGT <-----
20D8-H      ...attggtgatactggctacaaccagaagttcaag...ggcaaggccacattgactgtg
AC090843 Musmus IGHV1-18*01 F      ...a---g---at-----...a
AC073565 Musmus IGHV1-26*01 F      ...a---g---a-----...a
AC073565 Musmus IGHV1-22*01 F      ...a---g---a-----...a
AC073565 Musmus IGHV1-34*01 F      ...a---g---a-----...a
L17134 Musmus IGHV1-34*02 F      ...a---g---a---t-----...a

----- FR3-IMGT -----
20D8-H      gacaagtctccagtagcctacatggagatccgcagcctgacatctgaggattctgca
AC090843 Musmus IGHV1-18*01 F      -----c-----c-----ca-----
AC073565 Musmus IGHV1-26*01 F      -----c-----c-----c-----
AC073565 Musmus IGHV1-22*01 F      a-----c-----c-----g-----
AC073565 Musmus IGHV1-34*01 F      -----c-----c-----c-----
L17134 Musmus IGHV1-34*02 F      -----c-----c---a-----c-----

-----> CDR3-IMGT -----
20D8-H      gtctattactgtgcaagagatactggcaactaccggttgactactggggccaaggcacc
AC090843 Musmus IGHV1-18*01 F      -----
AC073565 Musmus IGHV1-26*01 F      -----
AC073565 Musmus IGHV1-22*01 F      -----
AC073565 Musmus IGHV1-34*01 F      -----
L17134 Musmus IGHV1-34*02 F      -----

```

附图 3 鼠源单抗重链可变区核苷酸序列同源性比对分析

```

          10      20      30      40      50      60
1      GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACT
1      D I V M S Q S P S S L A V S V G E K V T
1      T L * C H S L H P P * L C Q L E R R L L
1      H C D V T V S I L P S C V S W R E G Y

          70      80      90      100     110     120
61     ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTGGCG
21     M S C K S S Q S L L Y S S N Q K N Y L A
21     * A A S P V R A F Y I V A I K R T T W R
20     Y E L Q V Q S E P F I * * Q S K E L L G

          130     140     150     160     170     180
121    TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAGTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGG
41     W Y Q Q K P G Q S P K V L I Y W A S T R
41     G T S R N Q G S L L K C * F T G H P L G
40     V V P A E T R A V S * S A D L L G I H *

          190     200     210     220     230     240
181    GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
61     E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T
61     N L G S L I A S Q A V D L G Q I S L S P
60     G I W G P * S L H R Q W I W D R F H S H

          250     260     270     280     290     300
241    ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTAT
81     I S S V K A E D L A V Y Y C Q Q Y Y S Y
81     S A V * R L K T W Q F I T V S N I I A I
80     H Q Q C E G * R P G S L L L S A I L * L

          310     320     330
301    CCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
101    P L T F G A G T K L E L K
101    R S R S V L G P S W S *
100    S A H V R C W D Q A G A E

```

附图 4 鼠源单抗轻链可变区开放阅读框分析


```

          10      20      30      40      50      60
1      GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACT
1      D I V M S Q S P S S L A V S V G E K V T

          70      80      90      100     110     120
61     ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCG
21     M S C K S S Q S L L Y S S N Q K N Y L A

          130     140     150     160     170     180
121    TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAGTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGG
41     W Y Q Q K P G Q S P K V L I Y W A S T R

          190     200     210     220     230     240
181    GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
61     E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T

          250     260     270     280     290     300
241    ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTAT
81     I S S V K A E D L A V Y Y C Q Q Y Y S Y

          310     320     330
301    CCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
101    P L T F G A G T K L E L K
    
```

附图 5 鼠源单抗轻链可变区 DNA 和氨基酸序列分析

附表 2 鼠源单抗轻链可变区核苷酸序列同源性分析

		Score	Identity
AJ235948	Musmus IGKV8-30*01 F	1467	99.33% (295/297 nt)
AJ235944	Musmus IGKV8-24*01 F	1278	92.26% (274/297 nt)
Y15982	Musmus IGKV8-21*01 F	1269	91.92% (273/297 nt)
Y15980	Musmus IGKV8-19*01 F	1260	91.58% (272/297 nt)
L17135	Musmus IGKV8-28*02 F	1251	91.25% (271/297 nt)

```

<----- FR1-IMGT ----->
20D8-L
AJ235948 Musmus IGKV8-30*01 F
AJ235944 Musmus IGKV8-24*01 F
Y15982 Musmus IGKV8-21*01 F
Y15980 Musmus IGKV8-19*01 F
L17135 Musmus IGKV8-28*02 F

-----> CDR1-IMGT <-----
20D8-L
AJ235948 Musmus IGKV8-30*01 F
AJ235944 Musmus IGKV8-24*01 F
Y15982 Musmus IGKV8-21*01 F
Y15980 Musmus IGKV8-19*01 F
L17135 Musmus IGKV8-28*02 F

----- FR2-IMGT -----> CDR
20D8-L
AJ235948 Musmus IGKV8-30*01 F
AJ235944 Musmus IGKV8-24*01 F
Y15982 Musmus IGKV8-21*01 F
Y15980 Musmus IGKV8-19*01 F
L17135 Musmus IGKV8-28*02 F

2-IMGT <----->
20D8-L
AJ235948 Musmus IGKV8-30*01 F
AJ235944 Musmus IGKV8-24*01 F
Y15982 Musmus IGKV8-21*01 F
Y15980 Musmus IGKV8-19*01 F
L17135 Musmus IGKV8-28*02 F

----- FR3-IMGT -----
20D8-L
AJ235948 Musmus IGKV8-30*01 F
AJ235944 Musmus IGKV8-24*01 F
Y15982 Musmus IGKV8-21*01 F
Y15980 Musmus IGKV8-19*01 F
L17135 Musmus IGKV8-28*02 F

-----> CDR3-IMGT -----
20D8-L
AJ235948 Musmus IGKV8-30*01 F
AJ235944 Musmus IGKV8-24*01 F
Y15982 Musmus IGKV8-21*01 F
Y15980 Musmus IGKV8-19*01 F
L17135 Musmus IGKV8-28*02 F

```

附图 6 鼠源单抗轻链可变区核苷酸序列同源性比对分析

ch20D8-H: Signal sequence-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-Constant region-Stop codon

	10	20	30	40	50	60
1	*****					GAG
1	* * * * *					E
	70	80	90	100	110	120
61	GTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC					
21	V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S					
	130	140	150	160	170	180
121	TGCAAGACATCTGGATACACCTTCACTGAATACACCATGTATGGGTGAAGCAGAGTCAT					
41	C K T S G Y T F T E Y T M Y W V K Q S H					
	190	200	210	220	230	240
181	GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATAAATCCTAACATTGGTGATACTGGCTACAAC					
61	G K S L E W I G G I N P N I G D T G Y N					
	250	260	270	280	290	300
241	CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAGTCCTCCAGTACAGCCTACATG					
81	Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M					
	310	320	330	340	350	360
301	GAGATCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATACTGGC					
101	E I R S L T S E D S A V Y Y C A R D T G					
	370	380	390	400	410	420
361	AACTACCCGTTTACTACTGGGGCCAAGGCCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACG					
121	N Y P F D Y W G Q G T T L T V S S A K T					
	430	440	450	460	470	480
421	ACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTG					
141	T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V					
	490	500	510	520	530	540
481	ACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAAGTCT					
161	T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S					
	550	560	570	580	590	600
541	GGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCCCTGCAGTCTGACCTCTACACT					
181	G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T					
	610	620	630	640	650	660
601	CTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCCGTCACCTGCAAC					
201	L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N					
	670	680	690	700	710	720
661	GTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGT					
221	V A H P A S S T K V D K K I V P R D C G					
	730	740	750	760	770	780
721	TGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCACTTCCCCCAAG					
241	C K P C I C T V P E V S S V F I F P P K					

```

781      790      800      810      820      830      840
261      CCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATC
      P K D V L T I T L T P K V T C V V V D I

841      850      860      870      880      890      900
281      AGCAAGGATGATCCCAGGTCAGTTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACA
      S K D D P E V Q F S W F V D D V E V H T

901      910      920      930      940      950      960
301      GCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAAGT
      A Q T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L

961      970      980      990      1000      1010      1020
321      CCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCA
      P I M H Q D W L N G K E F K C R V N S A

1021     1030      1040      1050      1060      1070      1080
341      GCTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAAGGCTCCA
      A F P A P I E K T I S K T K G R P K A P

1081     1090      1100      1110      1120      1130      1140
361      CAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACC
      Q V Y T I P P P K E Q M A K D K V S L T

1141     1150      1160      1170      1180      1190      1200
381      TGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAG
      C M I T D F F P E D I T V E W Q W N G Q

1201     1210      1220      1230      1240      1250      1260
401      CCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTC
      P A E N Y K N T Q P I M D T D G S Y F V

1261     1270      1280      1290      1300      1310      1320
421      TACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCT
      Y S K L N V Q K S N W E A G N T F T C S

1321     1330      1340      1350      1360      1370      1380
441      GTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCTGGT
      V L H E G L H N H H T E K S L S H S P G

1381     AAATGA
461     K *

```

附图 7 ch20D8 单抗重链全长 DNA 和氨基酸序列

ch20D8-L: Signal peptide-**FR1**-**CDR1**-**FR2**-**CDR2**-**FR3**-**CDR3**-**FR4**-Constant region-Stop codon

```

          10       20       30       40       50       60
1  *****
1  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          70       80       90       100      110      120
61  GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACT
21  D I V M S Q S P S S L A V S V G E K V T

          130      140      150      160      170      180
121  ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGACTACTTGGCG
41  M S C K S S Q S L L Y S S N Q K N Y L A

          190      200      210      220      230      240
181  TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAGTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGG
61  W Y Q Q K P G Q S P K V L I Y W A S T R

          250      260      270      280      290      300
241  GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
81  E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T

          310      320      330      340      350      360
301  ATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAATATTATAGCTAT
101  I S S V K A E D L A V Y Y C Q Q Y Y S Y

          370      380      390      400      410      420
361  CCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGGCTGATGCTGCACCAACT
121  P L T F G A G T K L E L K R A D A A P T

          430      440      450      460      470      480
421  GTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGC
141  V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C

          490      500      510      520      530      540
481  TTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAA
161  F L N N F Y P K D I N V K W K I D G S E

          550      560      570      580      590      600
541  CGACAAAATGGCGTCCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGC
181  R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S

          610      620      630      640      650      660
601  ATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAAACGACATAACAGCTATACCTGT
201  M S S T L T L T K D E Y E R H N S Y T C

          670      680      690      700      710      720
661  GAGGCCACTCACAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
221  E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C

721  TAG
241  *
    
```

附图8 ch20D8单抗轻链全长DNA和氨基酸序列

h20D8-H: **Signal sequence-VH-hIgG1CH** -Stop codon

```
          10          20          30          40          50          60
1  ***** CAA
1  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * Q

          70          80          90          100         110         120
61  GTGCAGCTGGTTCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGGTGTCC
21  V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S

          130         140         150         160         170         180
121  TGCAAGGCCAGCGGATATACATTTACCGAGTACCCATGTACTGGGTGCGGCAGGCTACA
41  C K A S G Y T F T E Y T M Y W V R Q A T

          190         200         210         220         230         240
181  GGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCGGCATCAACCCTAATATCGGCGACACCGGATACAAC
61  G Q G L E W M G G I N P N I G D T G Y N

          250         260         270         280         290         300
241  CAGAAGTTCAAGGGCAGAGTGACAATGACCGTGAACACCAGCATCAGCACCGCTACATG
81  Q K F K G R V T M T V N T S I S T A Y M

          310         320         330         340         350         360
301  GAACTGAGCTCCCTGAGAAGCGAGGACACCGCGTG TACTACTGTGCCAGAGATACAGGC
101  E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D T G

          370         380         390         400         410         420
361  AACTACCCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTG TCTAGCGCCAGCACC
121  N Y P F D Y W G Q G T L V T V S S A S T

          430         440         450         460         470         480
421  AAGGGCCCTTCCGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTCTAAAATCCACATCTGGCGGCACCGCC
141  K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A

          490         500         510         520         530         540
481  GCCCTGGGCTG TCTGGTGAAGGACTACTCCAGAGCCTGTGACAGTGTCTGGA TCT
161  A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S

          550         560         570         580         590         600
541  GCGGCCGTGACATCCGGCGTGACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGTCCGGCCTGTAC
181  G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y

          610         620         630         640         650         660
601  AGCCTGTCTAGCGTGGTGACAGTGCCCTCTTAGCCTGGGCACACAGACCTATATCTGC
201  S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C

          670         680         690         700         710         720
661  AACGTGAATCACAAGCCAAGCAATACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTGT
221  N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C
```

```

721          730          740          750          760          770          780
GATAAGACACACACCTGCCCCCTTGTCCTGCTCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCTAGCGTG
241          D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V

          790          800          810          820          830          840
781          TTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAGGACACCTGATGATCTCCCGACACCCGAGGTGACC
261          F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T

          850          860          870          880          890          900
841          TGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGAT
281          C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D

          910          920          930          940          950          960
901          GGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACCTCTACATAT
301          G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y

          970          980          990          1000          1010          1020
961          AGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAG
321          R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
1021         TGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCCGCCCCCATCGAGAAGACAATCAGCAAGGCCAAG
341         C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
1081         GGCCAGCCTCGGGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCTCCATCCAGAGACGAGCTGACAAAG
361         G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
1141         AACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTAGCGATATCGCCGTGGAG
381         N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
1201         TGGGAGTCCAATGGCCAGCCAGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCC
401         W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
1261         GATGGCTCCTTCTTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGC
421         D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G

          1330          1340          1350          1360          1370          1380
1321         AACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCC
441         N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S

          1390          1400
1381         CTGTCCTGTCACCTGGAAAGTGATAA
461         L S L S P G K * *
    
```

附图9 h20D8单抗重链全长DNA和氨基酸序列

h20D8-L: Signal sequence-VL-hlgk CL-Stop codon

```

10      20      30      40      50      60
1 ***** GAT
1 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * D

70      80      90      100     110     120
61 ATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACAGCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAACGGGCCACAATC
21  I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I

130     140     150     160     170     180
121 AACTGCAAGAGCTCTCAGAGCCTGCTGTACTCCTCCAACCAGAAAAATTACCTGGCCTGG
41  N C K S S Q S L L Y S S N Q K N Y L A W

190     200     210     220     230     240
181 TACCAGCAGAAGCCCGGCCAACCTCCTAAGGTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAG
61  Y Q Q K P G Q P P K V L I Y W A S T R E

250     260     270     280     290     300
241 AGCGGCGTGCCTGATAGATTCAAGCAGGATCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATC
81  S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I

310     320     330     340     350     360
301 AGCAGCCTCCAGGCCGAGGACGTGGCCGTCTACTATTGTCTCAGCAATACTACAGCTACCCC
101 S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S Y P

370     380     390     400     410     420
361 CTGACATTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAATCAAGAGGACAGTGGCCGCCAAGCGTG
121 L T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V

430     440     450     460     470     480
421 TTCATCTTTCCCCTTCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCAGCGCGTGGTGTGCCTG
141 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L

490     500     510     520     530     540
481 CTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTCCAGTGGGAAGGTGGATAACGCCCTG
161 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q

550     560     570     580     590     600
541 TCTGGCAATAGCCAGGAGTCCGTGACCAGGACTCTAAGGATAGCACATATTCCTG
181 S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L

610     620     630     640     650     660
601 TCTAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAAGGTGTATGCCTGTGAA
201 S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E

670     680     690     700     710     720
661 GTCACCCATCAGGGGCTGTCATCACCCTCACTAAGTCATTCAATCGCGGAGAATGTGA
221 V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C *

721 TAA
241 *
```

附图10 h20D8单抗轻链全长DNA和氨基酸序列

m20D8-VH	1	GAGGTCAGCTGCAACAGT-CTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTT	49
	:: ::. . .:. . . .	
h20D8-VH	1	CAAGTGCAGCTGGTTCAGAGCGGCC-GAGGTGAAAAGCCTGGCGCTT	49
m20D8-VH	50	CAGTGAAGATATCCTGCAAGA-CATCTGGATACACCTTCACTGAATACAC	98
		: 	
h20D8-VH	50	CTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGC-GGATATACATTTACCGAGTACAC	98
			CDR1
m20D8-VH	99	CATGTATIGGGTGAAGCAGAGT-CATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGA	147
		
h20D8-VH	99	CATGTACTGGGTGCGGCAGGCTACA-GGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGC	147
			CDR1
m20D8-VH	148	GGTATAAATCCTAACATTGGTGATACTGGCTACAACCAGAAGTTCAAGGG	197
		
h20D8-VH	148	GGCATCAACCCTAATATCGGCGACACCGGATACAACCAGAAGTTCAAGGG	197
			CDR2
m20D8-VH	198	CAAGGCCACATTGACTGTGGACAAGTCCT-C--CAGTACAGCCTACATGG	244
	:	
h20D8-VH	198	CAGAGTGACAATGACCGTGAACA---CCAGCATCAGCACCGCCTACATG-	243
m20D8-VH	245	AGATC----CGCAGCTGACAT-CTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTG	289
		: . . . : 	
h20D8-VH	244	-GAACTGAGCTC--CCTGAGAAGC-GAGGACACCGCCGTGACTACTGTG	289
m20D8-VH	290	CAAGAGATACTGGCAACTACCCGTTTACTACTGGGGCCAAGG--CACCA	337
		
h20D8-VH	290	CCAGAGATACAGGCAACTACCCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGAACACTG	339
			CDR3
m20D8-VH	338	CTCTCAC-AGTCT--CCTCA 354	
		. : :	
h20D8-VH	340	GTCAC-CGTGCTAGC---- 354	

附图 11 鼠源单抗和 h20D8 单抗重链可变区核苷酸序列比对分析

m20D8-VH	1	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMYWVKQSHGKLSLEWIGG	50
		::. .: .: . .: .: .: .: .: .: .: .: .:	
h20D8-VH	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYTMYWVRQATGQGLEWMGG	50
			CDR1
m20D8-VH	51	INPNIGDTGYNQLFKGKAILTVDKSSSTAYMEIRSLTSEDSAVYYCARDT	100
		. . . : .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
h20D8-VH	51	INPNIGDTGYNQLFKGRVTMTVNTSISTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDT	100
			CDR2
m20D8-VH	101	GNYPFDYWGQGTLTVSS 118	
		. . .	
h20D8-VH	101	GNYPFDYWGQGLTLTVSS 118	
			CDR3

附图 12 鼠源单抗和 h20D8 单抗重链可变区氨基酸序列比对分析

m20D8-VL	1	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGAGTTGGAGA	50
		
h20D8-VL	1	GATATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACAGCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGA	50
m20D8-VL	51	GAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGT---	97
		
h20D8-VL	51	ACGGGCCACAATCAACTGCAAGAGCTCTCAGAGCCTGCT-----GTACTC	95
		CDR1	
m20D8-VL	98	--GCAATCAAAGAAGTACTTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGT	145
		
h20D8-VL	96	CTCCAACCAGAAAATTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAAC	145
		CDR1	
m20D8-VL	146	CTCCTAAAGTGTGATTTACTTGGGCATCCACTAGGGA-ATCTGGGGTCCC	194
		
h20D8-VL	146	CTCCTAAGGTGTGATCTACTTGGCCAGCACCAGAGAGC-GGCGTGCC	194
		CDR2	
m20D8-VL	195	TGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT-----GGGACAGATTTCACTCTCA	238
		.	
h20D8-VL	195	TGATAGATT-----CAGCGATCTGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGA	238
m20D8-VL	239	CCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAA	288
		
h20D8-VL	239	CCATCAGCAGCCTCCAGGCCGAGGACGTGGCCGTCTACTATTGTCAGCAA	288
		CDR3	
m20D8-VL	289	TATTATAGCTATCCGCTCAGTTCGGTGCTGGG-ACCAAGCTGGAGCTGA	337
		
h20D8-VL	289	TACTACAGCTACCCCTGACATTTGG-CCAGGGCACAAAGCTGGAAATCA	337
		CDR3	
m20D8-VL	338	AA 339	
		.	
h20D8-VL	338	AG 339	

附图 13 鼠源单抗和 h20D8 单抗轻链可变区核苷酸序列比对分析

m20D8-VL	1	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP	50
		: : : : :	
h20D8-VL	1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPP	50
		CDR1	
m20D8-VL	51	KVLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVKAEDLAVYYCQQYYSY	100
		: : : : :	
h20D8-VL	51	KVLIYWASTRESGVPDRFSGSGTDFLTISLQAEDEVAVYYCQQYYSY	100
		CDR2	
		CDR3	
m20D8-VL	101	PLTFGAGTKLELK 113	
		: :	
h20D8-VL	101	PLTFGQGTKLEIK 113	

附图 14 鼠源单抗和 h20D8 单抗轻链可变区氨基酸序列比对分析

附录II 攻读学位期间发表论文目录

1. 周建花,桂芳,张囡,敬兆飞,乐鑫,潘勇兵.2 周重复给予重组全人源抗新型冠状病毒单克隆抗体 2B11 注射液未导致恒河猴出现毒性反应[J].中国药理学与毒理学杂志,2022,36(4):241-252.
2. 周建花, 乐鑫, 潘勇兵. 抗呼吸道病毒单克隆抗体药物的研发进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2022(已录用).

致 谢

时光荏苒，在武汉生物制品研究所的研究生学习和生活即将画上句号。回首过去的三年，记忆犹新。

初来武汉，是 2019 年的 3 月份，这个城市到处弥漫着樱花的气息，车流不息，人群不止，城市喧嚣而热闹，便被这个城市的美好深深吸引。奔着目的地来到武生所，内心彷徨不安却又充满期待。在这里，我如愿通过了面试，顺利成为武生所的一员。从研一的理论课学习到研二研三的课题选择、设计和完成，从理论到实践，我一步步成长和进步，整个过程虽然充满了艰辛，却从未想过放弃。值此论文完稿之际，我想向武生所以及所有帮助、支持和关心过我的老师、同学、家人和朋友们表示最诚挚的感谢！

首先，我要感谢武生所和我的导师！武生所为我的深造提供了良好的科研环境和不可多得的机遇，帮助我圆了科研梦想，抗体研究室是武生所优秀科室之一。进入抗体研究室以来，我的导师潘勇兵研究员指导我完成了整个课题，从课题选择、设计到完成，每一步都有您孜孜不倦的指导和帮助，您是我科研道路上的一盏指明灯。每当我遇到挫折，彷徨无助的时候，您都会给我指点迷津，把我拽入正轨，并不断给我信心和帮助。您无私的辅导和渊博的学识让我的科研路不再无助，跌跌撞撞最终顺利毕业。非常庆幸这三年能得到您的教诲，也很庆幸我能顺利留在武生所，未来在您的带领下继续工作。

其次，感谢武生所段凯、李新国和王泽鏊等所领导，感谢科研开发部黄仕和经理、杜洪桥经理和韩会珍老师等在三年的学习和生活中给与的关怀和帮助；感谢抗体研究室张囡、端义坤和彭祥兵等老师，桂芳、詹珊珊、吴小丽、邓小杰、陈莹、唐杰、张雪逸和黄嘉欣等师姐以及王炯、宋刚、敬兆飞、刘建邦、杨溢民、乐鑫、杜剑晖、师江龙和孙文泽等师兄师弟在相关实验中提出的宝贵建议和给与的积极帮助；感谢新发传染病研究室卢佳老师和张秋老师等在动物实验中提供的帮助；感谢三年研究生学习生活中的同学们！

最后，特别感谢我的家人，尽管你们不在身边，却总在我遇到困难和挫折时，无条件支持我，给与我和鼓励 and 安慰；还要感谢邓涛同志，他总是在背后默默帮助我陪伴我，让我相信自己，勇往直前；是你们无私的爱给了我信心和勇气，一路向前。

衷心感谢在座的每一位专家、领导、老师及同学，感谢你们抽出时间来参加我的毕业答辩，并对我的论文予以指导。感恩这三年的时光，感恩遇到的每一个人，感恩一切，让我有勇气走向社会，不断拼搏，挑战自我！