

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

C07K 16/10 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/569 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)

[21] 申请号 200480040877.8

[43] 公开日 2007年2月14日

[11] 公开号 CN 1914226A

[22] 申请日 2004.11.24  
[21] 申请号 200480040877.8  
[30] 优先权  
[32] 2003.11.25 [33] US [31] 60/524,840  
[86] 国际申请 PCT/US2004/039750 2004.11.24  
[87] 国际公布 WO2005/060520 英 2005.7.7  
[85] 进入国家阶段日期 2006.7.24  
[71] 申请人 达纳-法伯癌症研究院有限公司  
地址 美国马萨诸塞州  
[72] 发明人 韦恩·玛拉斯科 隋建华

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
代理人 过晓东

权利要求书 8 页 说明书 88 页 附图 12 页

[54] 发明名称

SARS-CoV 抗体及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供了 scFv 抗体和中和 SARS-CoV 的单克隆抗体。同时也提供治疗和/或预防冠状病毒-相关疾病或失调,如 SARS 的方法。本发明还提供给予病人针对 SARS-CoV 的疫苗的方法。同时提供诊断冠状病毒-相关疾病或失调的方法和测定样本中冠状病毒存在情况的方法。本发明额外提供筛选调节 SARS-CoV 与 SARS-CoV 受体 ACE2 结合的化合物的方法及用于治疗 SARS-CoV-相关疾病或失调的化合物。

VR:
1:
2:
3:
4:
5:
6:
7:
8:
9:
10:
11:
12:
13:
14:
15:
16:
17:
18:
19:
20:
21:
22:
23:
24:
25:
26:
27:
28:
29:
30:
31:
32:
33:
34:
35:
36:
37:
38:
39:
40:
41:
42:
43:
44:
45:
46:
47:
48:
49:
50:
51:
52:
53:
54:
55:
56:
57:
58:
59:
60:
61:
62:
63:
64:
65:
66:
67:
68:
69:
70:
71:
72:
73:
74:
75:
76:
77:
78:
79:
80:
81:
82:
83:
84:
85:
86:
87:
88:
89:
90:
91:
92:
93:
94:
95:
96:
97:
98:
99:
100:
101:
102:
103:
104:
105:
106:
107:
108:
109:
110:
111:
112:
113:
114:
115:
116:
117:
118:
119:
120:
121:
122:
123:
124:
125:
126:
127:
128:
129:
130:
131:
132:
133:
134:
135:
136:
137:
138:
139:
140:
141:
142:
143:
144:
145:
146:
147:
148:
149:
150:
151:
152:
153:
154:
155:
156:
157:
158:
159:
160:
161:
162:
163:
164:
165:
166:
167:
168:
169:
170:
171:
172:
173:
174:
175:
176:
177:
178:
179:
180:
181:
182:
183:
184:
185:
186:
187:
188:
189:
190:
191:
192:
193:
194:
195:
196:
197:
198:
199:
200:
201:
202:
203:
204:
205:
206:
207:
208:
209:
210:
211:
212:
213:
214:
215:
216:
217:
218:
219:
220:
221:
222:
223:
224:
225:
226:
227:
228:
229:
230:
231:
232:
233:
234:
235:
236:
237:
238:
239:
240:
241:
242:
243:
244:
245:
246:
247:
248:
249:
250:
251:
252:
253:
254:
255:
256:
257:
258:
259:
260:
261:
262:
263:
264:
265:
266:
267:
268:
269:
270:
271:
272:
273:
274:
275:
276:
277:
278:
279:
280:
281:
282:
283:
284:
285:
286:
287:
288:
289:
290:
291:
292:
293:
294:
295:
296:
297:
298:
299:
300:
301:
302:
303:
304:
305:
306:
307:
308:
309:
310:
311:
312:
313:
314:
315:
316:
317:
318:
319:
320:
321:
322:
323:
324:
325:
326:
327:
328:
329:
330:
331:
332:
333:
334:
335:
336:
337:
338:
339:
340:
341:
342:
343:
344:
345:
346:
347:
348:
349:
350:
351:
352:
353:
354:
355:
356:
357:
358:
359:
360:
361:
362:
363:
364:
365:
366:
367:
368:
369:
370:
371:
372:
373:
374:
375:
376:
377:
378:
379:
380:
381:
382:
383:
384:
385:
386:
387:
388:
389:
390:
391:
392:
393:
394:
395:
396:
397:
398:
399:
400:
401:
402:
403:
404:
405:
406:
407:
408:
409:
410:
411:
412:
413:
414:
415:
416:
417:
418:
419:
420:
421:
422:
423:
424:
425:
426:
427:
428:
429:
430:
431:
432:
433:
434:
435:
436:
437:
438:
439:
440:
441:
442:
443:
444:
445:
446:
447:
448:
449:
450:
451:
452:
453:
454:
455:
456:
457:
458:
459:
460:
461:
462:
463:
464:
465:
466:
467:
468:
469:
470:
471:
472:
473:
474:
475:
476:
477:
478:
479:
480:
481:
482:
483:
484:
485:
486:
487:
488:
489:
490:
491:
492:
493:
494:
495:
496:
497:
498:
499:
500:
501:
502:
503:
504:
505:
506:
507:
508:
509:
510:
511:
512:
513:
514:
515:
516:
517:
518:
519:
520:
521:
522:
523:
524:
525:
526:
527:
528:
529:
530:
531:
532:
533:
534:
535:
536:
537:
538:
539:
540:
541:
542:
543:
544:
545:
546:
547:
548:
549:
550:
551:
552:
553:
554:
555:
556:
557:
558:
559:
560:
561:
562:
563:
564:
565:
566:
567:
568:
569:
570:
571:
572:
573:
574:
575:
576:
577:
578:
579:
580:
581:
582:
583:
584:
585:
586:
587:
588:
589:
590:
591:
592:
593:
594:
595:
596:
597:
598:
599:
600:
601:
602:
603:
604:
605:
606:
607:
608:
609:
610:
611:
612:
613:
614:
615:
616:
617:
618:
619:
620:
621:
622:
623:
624:
625:
626:
627:
628:
629:
630:
631:
632:
633:
634:
635:
636:
637:
638:
639:
640:
641:
642:
643:
644:
645:
646:
647:
648:
649:
650:
651:
652:
653:
654:
655:
656:
657:
658:
659:
660:
661:
662:
663:
664:
665:
666:
667:
668:
669:
670:
671:
672:
673:
674:
675:
676:
677:
678:
679:
680:
681:
682:
683:
684:
685:
686:
687:
688:
689:
690:
691:
692:
693:
694:
695:
696:
697:
698:
699:
700:
701:
702:
703:
704:
705:
706:
707:
708:
709:
710:
711:
712:
713:
714:
715:
716:
717:
718:
719:
720:
721:
722:
723:
724:
725:
726:
727:
728:
729:
730:
731:
732:
733:
734:
735:
736:
737:
738:
739:
740:
741:
742:
743:
744:
745:
746:
747:
748:
749:
750:
751:
752:
753:
754:
755:
756:
757:
758:
759:
760:
761:
762:
763:
764:
765:
766:
767:
768:
769:
770:
771:
772:
773:
774:
775:
776:
777:
778:
779:
780:
781:
782:
783:
784:
785:
786:
787:
788:
789:
790:
791:
792:
793:
794:
795:
796:
797:
798:
799:
800:
801:
802:
803:
804:
805:
806:
807:
808:
809:
810:
811:
812:
813:
814:
815:
816:
817:
818:
819:
820:
821:
822:
823:
824:
825:
826:
827:
828:
829:
830:
831:
832:
833:
834:
835:
836:
837:
838:
839:
840:
841:
842:
843:
844:
845:
846:
847:
848:
849:
850:
851:
852:
853:
854:
855:
856:
857:
858:
859:
860:
861:
862:
863:
864:
865:
866:
867:
868:
869:
870:
871:
872:
873:
874:
875:
876:
877:
878:
879:
880:
881:
882:
883:
884:
885:
886:
887:
888:
889:
890:
891:
892:
893:
894:
895:
896:
897:
898:
899:
900:
901:
902:
903:
904:
905:
906:
907:
908:
909:
910:
911:
912:
913:
914:
915:
916:
917:
918:
919:
920:
921:
922:
923:
924:
925:
926:
927:
928:
929:
930:
931:
932:
933:
934:
935:
936:
937:
938:
939:
940:
941:
942:
943:
944:
945:
946:
947:
948:
949:
950:
951:
952:
953:
954:
955:
956:
957:
958:
959:
960:
961:
962:
963:
964:
965:
966:
967:
968:
969:
970:
971:
972:
973:
974:
975:
976:
977:
978:
979:
980:
981:
982:
983:
984:
985:
986:
987:
988:
989:
990:
991:
992:
993:
994:
995:
996:
997:
998:
999:
1000:
1001:
1002:
1003:
1004:
1005:
1006:
1007:
1008:
1009:
1010:
1011:
1012:
1013:
1014:
1015:
1016:
1017:
1018:
1019:
1020:
1021:
1022:
1023:
1024:
1025:
1026:
1027:
1028:
1029:
1030:
1031:
1032:
1033:
1034:
1035:
1036:
1037:
1038:
1039:
1040:
1041:
1042:
1043:
1044:
1045:
1046:
1047:
1048:
1049:
1050:
1051:
1052:
1053:
1054:
1055:
1056:
1057:
1058:
1059:
1060:
1061:
1062:
1063:
1064:
1065:
1066:
1067:
1068:
1069:
1070:
1071:
1072:
1073:
1074:
1075:
1076:
1077:
1078:
1079:
1080:
1081:
1082:
1083:
1084:
1085:
1086:
1087:
1088:
1089:
1090:
1091:
1092:
1093:
1094:
1095:
1096:
1097:
1098:
1099:
1100:
1101:
1102:
1103:
1104:
1105:
1106:
1107:
1108:
1109:
1110:
1111:
1112:
1113:
1114:
1115:
1116:
1117:
1118:
1119:
1120:
1121:
1122:
1123:
1124:
1125:
1126:
1127:
1128:
1129:
1130:
1131:
1132:
1133:
1134:
1135:
1136:
1137:
1138:
1139:
1140:
1141:
1142:
1143:
1144:
1145:
1146:
1147:
1148:
1149:
1150:
1151:
1152:
1153:
1154:
1155:
1156:
1157:
1158:
1159:
1160:
1161:
1162:
1163:
1164:
1165:
1166:
1167:
1168:
1169:
1170:
1171:
1172:
1173:
1174:
1175:
1176:
1177:
1178:
1179:
1180:
1181:
1182:
1183:
1184:
1185:
1186:
1187:
1188:
1189:
1190:
1191:
1192:
1193:
1194:
1195:
1196:
1197:
1198:
1199:
1200:
1201:
1202:
1203:
1204:
1205:
1206:
1207:
1208:
1209:
1210:
1211:
1212:
1213:
1214:
1215:
1216:
1217:
1218:
1219:
1220:
1221:
1222:
1223:
1224:
1225:
1226:
1227:
1228:
1229:
1230:
1231:
1232:
1233:
1234:
1235:
1236:
1237:
1238:
1239:
1240:
1241:
1242:
1243:
1244:
1245:
1246:
1247:
1248:
1249:
1250:
1251:
1252:
1253:
1254:
1255:
1256:
1257:
1258:
1259:
1260:
1261:
1262:
1263:
1264:
1265:
1266:
1267:
1268:
1269:
1270:
1271:
1272:
1273:
1274:
1275:
1276:
1277:
1278:
1279:
1280:
1281:
1282:
1283:
1284:
1285:
1286:
1287:
1288:
1289:
1290:
1291:
1292:
1293:
1294:
1295:
1296:
1297:
1298:
1299:
1300:
1301:
1302:
1303:
1304:
1305:
1306:
1307:
1308:
1309:
1310:
1311:
1312:
1313:
1314:
1315:
1316:
1317:
1318:
1319:
1320:
1321:
1322:
1323:
1324:
1325:
1326:
1327:
1328:
1329:
1330:
1331:
1332:
1333:
1334:
1335:
1336:
1337:
1338:
1339:
1340:
1341:
1342:
1343:
1344:
1345:
1346:
1347:
1348:
1349:
1350:
1351:
1352:
1353:
1354:
1355:
1356:
1357:
1358:
1359:
1360:
1361:
1362:
1363:
1364:
1365:
1366:
1367:
1368:
1369:
1370:
1371:
1372:
1373:
1374:
1375:
1376:
1377:
1378:
1379:
1380:
1381:
1382:
1383:
1384:
1385:
1386:
1387:
1388:
1389:
1390:
1391:
1392:
1393:
1394:
1395:
1396:
1397:
1398:
1399:
1400:
1401:
1402:
1403:
1404:
1405:
1406:
1407:
1408:
1409:
1410:
1411:
1412:
1413:
1414:
1415:
1416:
1417:
1418:
1419:
1420:
1421:
1422:
1423:
1424:
1425:
1426:
1427:
1428:
1429:
1430:
1431:
1432:
1433:
1434:
1435:
1436:
1437:
1438:
1439:
1440:
1441:
1442:
1443:
1444:
1445:
1446:
1447:
1448:
1449:
1450:
1451:
1452:
1453:
1454:
1455:
1456:
1457:
1458:
1459:
1460:
1461:
1462:
1463:
1464:
1465:
1466:
1467:
1468:
1469:
1470:
1471:
1472:
1473:
1474:
1475:
1476:
1477:
1478:
1479:
1480:
1481:
1482:
1483:
1484:
1485:
1486:
1487:
1488:
1489:
1490:
1491:
1492:
1493:
1494:
1495:
1496:
1497:
1498:
1499:
1500:
1501:
1502:
1503:
1504:
1505:
1506:
1507:
1508:
1509:
1510:
1511:
1512:
1513:
1514:
1515:
1516:
1517:
1518:
1519:
1520:
1521:
1522:
1523:
1524:
1525:
1526:
1527:
1528:
1529:
1530:
1531:
1532:
1533:
1534:
1535:
1536:
1537:
1538:
1539:
1540:
1541:
1542:
1543:
1544:
1545:
1546:
1547:
1548:
1549:
1550:
1551:
1552:
1553:
1554:
1555:
1556:
1557:
1558:
1559:
1560:
1561:
1562:
1563:
1564:
1565:
1566:
1567:
1568:
1569:
1570:
1571:
1572:
1573:
1574:
1575:
1576:
1577:
1578:
1579:
1580:
1581:
1582:
1583:
1584:
1585:
1586:
1587:
1588:
1589:
1590:
1591:
1592:
1593:
1594:
1595:
1596:
1597:
1598:
1599:
1600:
1601:
1602:
1603:
1604:
1605:
1606:
1607:
1608:
1609:
1610:
1611:
1612:
1613:
1614:
1615:
1616:
1617:
1618:
1619:
1620:
1621:
1622:
1623:
1624:
1625:
1626:
1627:
1628:
1629:
1630:
1631:
1632:
1633:
1634:
1635:
1636:
1637:
1638:
1639:
1640:
1641:
1642:
1643:
1644:
1645:
1646:
1647:
1648:
1649:
1650:
1651:
1652:
1653:
1654:
1655:
1656:
1657:
1658:
1659:
1660:
1661:
1662:
1663:
1664:
1665:
1666:
1667:
1668:
1669:
1670:
1671:
1672:
1673:
1674:
1675:
1676:
1677:
1678:
1679:
1680:
1681:
1682:
1683:
1684:
1685:
1686:
1687:
1688:
1689:
1690:
1691:
1692:
1693:
1694:
1695:
1696:
1697:
1698:
1699:
1700:
1701:
1702:
1703:
1704:
1705:
1706:
1707:
1708:
1709:
1710:
1711:
1712:
1713:
1714:
1715:
1716:
1717:
1718:
1719:
1720:
1721:
1722:
1723:
1724:
1725:
1726:
1727:
1728:
1729:
1730:
1731:
1732:
1733:
1734:
1735:
1736:
1737:
1738:
1739:
1740:
1741:
1742:
1743:
1744:
1745:
1746:
1747:
1748:
1749:
1750:
1751:
1752:
1753:
1754:
1755:
1756:
1757:
1758:
1759:
1760:
1761:
1762:
1763:
1764:
1765:
1766:
1767:
1768:
1769:
1770:
1771:
1772:
1773:
1774:
1775:
1776:
1777:
1778:
1779:
1780:
1781:
1782:
1783:
1784:
1785:
1786:
1787:
1788:
1789:
1790:
1791:
1792:
1793:
1794:
1795:
1796:
1797:
1798:
1799:
1800:
1801:
1802:
1803:
1804:
1805:
1806:
1807:
1808:
1809:
1810:
1811:
1812:
1813:
1814:
1815:
1816:
1817:
1818:
1819:
1820:
1821:
1822:
1823:
1824:
1825:
1826:
1827:
1828:
1829:
1830:
1831:
1832:
1833:
1834:
1835:
1836:
1837:
1838:
1839:
1840:
1841:
1842:
1843:
1844:
1845:
1846:
1847:
1848:
1849:
1850:
1851:
1852:
1853:
1854:
1855:
1856:
1857:
1858:
1859:
1860:
1861:
1862:
1863:
1864:
1865:
1866:
1867:
1868:
1869:
1870:
1871:
1872:
1873:
1874:
1875:
1876:
1877:
1878:
1879:
1880:
1881:
1882:
1883:
1884:
1885:
1886:
1887:
1888:
1889:
1890:
1891:
1892:
1893:
1894:
1895:
1896:
1897:
1898:
1899:
1900:
1901:
1902:
1903:
1904:
1905:
1906:
1907:
1908:
1909:
1910:
1911:
1912:
1913:
1914:
1915:
1916:
1917:
1918:
1919:
1920:
1921:
1922:
1923:
1924:
1925:
1926:
1927:
1928:
1929:
1930:
1931:
1932:
1933:
1934:
1935:
1936:
1937:
1938:
1939:
1940:
1941:
1942:
1943:
1944:
1945:
1946:
1947:
1948:
1949:
1950:
1951:
1952:
1953:
1954:
1955:
1956:
1957:
1958:
1959:
1960:
1961:
1962:
1963:
1964:
1965:
1966:
1967:
1968:
1969:
1970:
1971:
1972:
1973:
1974:
1975:
1976:
1977:
1978:
1979:
1980:
1981:
1982:
1983:
1984:
1985:
1986:
1987:
1988:
1989:
1990:
1991:
1992:
1993:
1994:
1995:
1996:
1997:
1998:
1999:
2000:
2001:
2002:
2003:
2004:
2005:
2006:
2007:
2008:
2009:
2010:
2011:
2012:
2013:
2014:
2015:
2016:
2017:
2018:
2019:
2020:
2021:
2022:
2023:
2024:
2025:
2026:
2027:
2028:
2029:
2030:
2031:
2032:
2033:
2034:
2035:
2036:
2037:
2038:
2039:
2040:
2041:
2042:
2043:
2044:
2045:
2046:
2047:
2048:
2049:
2050:
2051:
2052:
2053:
2054:
2055:
2056:
2057:
2058:
2059:
2060:
2061:
2062:
2063:
2064:
2065:
2066

1. 一种中和 SARS-CoV 的单克隆抗体，其中所说的单克隆抗体结合 SARS-CoV 钉蛋白区域的表位并且中和 SARS-CoV。
2. 根据权利要求 1 的单克隆抗体，其中 SARS-CoV 钉蛋白的区域为 S1 区域。
3. 根据权利要求 2 中的单克隆抗体，其中的区域位于 S1 区域的 318 和 510 氨基酸之间。
4. 根据权利要求 3 中的单克隆抗体，其中的区域位于 S1 区域的 324 和 503 氨基酸之间。
5. 根据权利要求 1 的单克隆抗体，其中所述的单克隆抗体是单克隆抗体 80R。
6. 根据权利要求 1 的单克隆抗体，其中所述的单克隆抗体具有单克隆抗体 80R 的结合亲合力。
7. 根据权利要求 6 的单克隆抗体，其中所述的结合亲合力从大约  $10^{-6}$  M 至  $10^{-12}$  M 。
8. 根据权利要求 1 的单克隆抗体，其中所述的单克隆抗体抑制 SARS-CoV S 蛋白的 S1 区域与 ACE2 受体的结合。
9. 根据权利要求 1 的单克隆抗体，其中所述的单克隆抗体抑制在表达 SARS-CoV S 蛋白细胞和表达 SARS-CoV 受体 ACE2 细胞之间合胞体的形成。

10. 根据权利要求 1 的单克隆抗体, 其中所述的单克隆抗体与单克隆抗体 80R 竞争结合 S1 区域。
11. 根据权利要求 1 的单克隆抗体, 其中所述的单克隆抗体包括一种或多种从包括了 SED ID NOS: 2, 3, 4, 和 5 组群中选取的序列。
12. 一种能中和 SARS-CoV 的单克隆抗体, 其中所述的单克隆抗体与 80R 单克隆抗体结合相同的表位。
13. 一种中和 SARS-CoV 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体结合 SARS-CoV 钉蛋白区域的表位并且中和 SARS-CoV。
14. 根据权利要求 13 的 scFv 抗体, 其中 SARS-CoV 钉蛋白的区域是 S1 区域。
15. 根据权利要求 14 的 scFv 抗体, 其中的区域位于 S1 区域的 318 和 510 氨基酸之间。
16. 根据权利要求 15 的 scFv 抗体, 其中的区域位于 S1 区域的 324 和 503 氨基酸之间。
17. 根据权利要求 13 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体是 scFv 抗体 80R。
18. 根据权利要求 13 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体具有 scFv 抗体 80R 的结合亲合力。
19. 根据权利要求 18 的 scFv 抗体, 其中所述的结合亲合力从大约  $10^{-6}$  M 至  $10^{-12}$  M。

20. 根据权利要求 13 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体抑制 SARS-CoV S 蛋白的 S1 区域与 ACE2 受体的结合。
21. 根据权利要求 13 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体抑制在 SARS-CoV S 蛋白表达细胞和 SARS-CoV 受体 ACE2 表达细胞之间的合胞体形成。
22. 根据权利要求 13 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体与 scFv 抗体 80R 竞争与 S1 区域的结合。
23. 根据权利要求 13 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体具有 SED ID NO: 1 序列。
24. 一种能中和 SARS-CoV 的 scFv 抗体, 其中所述的 scFv 抗体与 80R scFv 抗体结合相同表位。
25. 一种阻止由冠状病毒引起的疾病和失调的方法, 该方法包括给遭受所述的疾病或失调危险的病人注射治疗有效计量的权利要求 1 的单克隆抗体。
26. 根据权利要求 25 的方法, 其中所述的方法进一步包括注射除单克隆抗体之外的其他抗-病毒药物或进入抑制剂。
27. 根据权利要求 25 的方法, 其中这种冠状病毒是 SARS-CoV 并且其中这种单克隆抗体是单克隆抗体 80R。
28. 一种阻止由冠状病毒引起的疾病和失调的方法, 该方法包括给遭受所述的疾病或失调危险的病人注射治疗有效计量的权利要求 13 的 scFv 抗体。

29. 根据权利要求 28 的方法，其中所述的方法进一步包括注射除 scFv 抗体之外的其他抗-病毒药物或进入抑制剂。
30. 根据权利要求 28 的方法，其中这种冠状病毒是 SARS-CoV 并且其中这种 scFv 抗体是 scFv 抗体 80R。
31. 一种治疗冠状病毒相关的疾病或失调的方法，该方法包括给遭受冠状病毒相关的疾病或失调的病人注射治疗有效计量的权利要求 1 的单克隆抗体。
32. 根据权利要求 31 的方法，其中冠状病毒相关的疾病或失调是 SARS 并且单克隆抗体是单克隆抗体 80R。
33. 一种治疗冠状病毒相关的疾病或失调的方法，该方法包括给遭受冠状病毒相关的疾病或失调的病人注射治疗有效计量的权利要求 13 的 scFv 抗体。
34. 根据权利要求 33 的方法，其中冠状病毒相关的疾病或失调是 SARS 并且 scFv 抗体是 scFv 抗体 80R。
35. 一种预防接种病人免受 SARS-CoV 的方法，该方法包括给需要接种疫苗的病人注射免疫有效计量的疫苗候选多肽，其中所述的疫苗候选多肽结合权利要求 1 的单克隆抗体。
36. 根据权利要求 35 的方法，其中的单克隆抗体是单克隆抗体 80R。
37. 根据权利要求 35 的方法，其中的免疫候选多肽包括单克隆抗体 80R 表位。

- 38.** 一种诊断冠状病毒-相关的疾病或失调的方法，该方法包括：
- a)来源于怀疑有冠状病毒-相关的疾病或失调的病人的测试样本与权利要求 1 的单克隆抗体接触；和
  - b)测定抗体-抗原复合物是否存在，其中若存在抗体-抗原复合物表明病人有冠状病毒-相关的疾病或失调。
- 39.** 根据权利要求 38 的诊断方法，其中冠状病毒-相关的疾病或失调是 SARS。
- 40.** 根据权利要求 38 的方法，其中的单克隆抗体是单克隆抗体 80R。
- 41.** 根据权利要求 38 的方法，其中试验样本可以从血液，头发，颊刮碎，唾液，活体组织，或精液中获得。
- 42.** 根据权利要求 38 的方法，其中检测在体内进行。
- 43.** 一种测定冠状病毒在样本中存在的方法，该方法包括：
- a)样本与权利要求 1 的单克隆抗体接触；和
  - b)测定抗体-抗原复合物是否存在，由此测定在样本中冠状病毒的存在。
- 44.** 根据权利要求 43 的方法，其中这种冠状病毒是 SARS-CoV。
- 45.** 根据权利要求 43 的方法，其中的单克隆抗体是单克隆抗体 80R。
- 46.** 根据权利要求 43 的方法，其中试验在体内进行。

47. 根据权利要求 43 的方法，其中试验样本可以从血液，头发，颊刮碎，唾液，活体组织，或精液中获得。
48. 一种组合物，其包括权利要求 1 的单克隆抗体和载体。
49. 一种试剂盒，其包括在一种或多种容器内的权利要求 48 的组合物。
50. 一种抗 SARS-CoV 被动免疫疫苗，其包括权利要求 48 的组合物。
51. 一种筛选调节 SARS-CoV 和 SARS-CoV 受体 ACE2 之间相互作用的化合物的方法，该方法包括
- a)在抗体-抗原复合物中引入候选化合物，其中所述的抗体是单克隆抗体 80R 并且所述的抗原位于 SARS-CoV S 蛋白的 S1 区域；和
  - b)测定所述的候选化合物是否干扰抗体-抗原复合物，其中抗体-抗原复合物的干扰表明候选化合物调节 SARS-CoV 和 ACE2 之间的相互作用。
52. 一种鉴定有效治疗 SARS-CoV-相关疾病或失调的化合物的方法，该方法包括
- a)至少提供一种 SARS-CoV 蛋白； b)所述的蛋白与权利要求 1 的单克隆抗体接触； c)测定抗体-抗原复合物的形式；
  - d)引入一种或更多种候选化合物；
  - e)确定所述的一种或更多种候选化合物是否干扰抗体-抗原复合物；
- 其中抗体-抗原复合物的干扰表明一种或更多种化合物有效治疗 SARS-CoV-相关疾病或失调。

- 
53. 根据权利要求 52 的方法，其中的 SARS-CoV-相关疾病或失调是 SARS。
54. 根据权利要求 53 的方法，其中的单克隆抗体是单克隆抗体 80R。
55. 根据权利要求 53 的方法，其中至少一种 SARS-CoV 蛋白包括 SARS-CoV 的钉蛋白的 S1 区域。
56. 根据权利要求 51 的方法，其中 SARS-CoV 蛋白包括 S1 区域的 318-510 的氨基酸残基。
57. 根据权利要求 56 的方法，其中 SARS-CoV 蛋白包括 S1 区域的 318-510 的氨基酸残基。
58. 根据权利要求 53 的方法，其中至少一种 SARS-CoV 蛋白作为 SARS-CoV 分子被提供。
59. 根据权利要求 53 的方法，其中至少一种 SARS-CoV 蛋白在感染 SARS-CoV 的细胞中被提供。
60. 一种提高 MAbs 80R 的中和活性的方法，该方法包括
- a)在 MAbs 80R 结合位点补充决定区域进行突变；
  - b)测定突变的 MAbs 的中和活性；和
  - c)鉴定这些突变的 MAbs 已经增加的中和活性。
61. 一种提高 scFv 80R 的中和活性的方法，该方法包括
- a)在 scFv 80R 结合位点的补充决定区域进行突变；
  - b)测定突变的 scFv 的中和活性；和
  - c)鉴定这些突变的 scFv 已经增加的中和活性。

- 
- 62.** 根据权利要求 60 或 61 的方法，其中补充决定区域突变是通过重链或轻链交换或通过 CDR 掺杂完成。
- 63.** 一种中和 SARS-CoV 的单克隆抗体，其中所述的抗体具有一条带有三个 CDRs 区域的轻链，包含的氨基酸序列选取于包含 RASQRSNLA(SEQ ID NO: 37); DASTAT (SEQ ID NO:38) 和 QQRSNWPPT(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列组。
- 64.** 一种中和 SARS-CoV 的单克隆抗体，其中所述的抗体具有一条带有三个 CDRs 区域的重链，包含的氨基酸序列选取于包含 AH;VYDNK(SEQ ID NO: 35)和 RSYYL (SEQ ID NO:36)的序列组。

## SARS-CoV 抗体及其使用方法

### 基金支持

本发明在美国政府国家健康基金中心 A128785, A148436, 和 A1053822 支持下进行。美国政府可能会享有本发明的某些权益。

### 发明领域

本发明一般地与抗-病毒抗体和其使用方法相关。

### 发明背景

严重急性呼吸道综合症 ("SARS") 是一种高度传染的人类疾病。2003 年春季, 在全球范围产生的一次突然的, 未预料的流行性爆发, 导致超过 8000 人感染并有 800 人死亡[见 Pearson et al., Nature 424:121(2003)]。虽然通过传染控制措施阻止了 2003 年的流行, 但此传染可在任何时候再次出现并导致与 HIV/AIDS 类似的全球流行性毁坏结果[De Groot, Vaccine 21: 4095-104(2003)]。

SARS 的病源体被迅速地鉴定为一种新的冠状病毒 (SARS-CoV) [见 Rota et al, Science 300:1394-99(2003); Marra et al., Science 300:1399(2003)] 并发现可在非-人类灵长类模型中产生相似的呼吸病症[见 Fouchier et al., Nature 423:240(2003); Kulken et al., Lancet 362:263-70(2003)]。SARS 是一种表现为发热和呼吸道症状的高度传染性疾病, 可引发肺炎, 呼吸衰竭, 并导

致死亡。罕见地，该综合症也存在亚临床或非-肺炎形式[见 Ho et al., *J. Infect Dis.* 189: 634-41 (2004); Woo et al., *Lancet* 363:841-45(2004) ]。

如果再度出现高传染性和通常致死性的严重急性呼吸道综合症 (SARS) 冠状病毒 (SARS-CoV) 感染情况，则迫切需要有效的预防和治疗方法。目前，SARS 的防治极大地依赖于不断加深的认识、监督，和地方、地区和国际机构的公共-健康-关注措施 (见 Stadler et al., *Nat Rev Microbiol* 1:209-18(2003))。在 SARS 疫苗研究领域已经开始有了显著的效果，并且最近几种报道已经显示，从 SARS—CoV 感染早期的小鼠，或从免疫了编码 SARS S 蛋白 DNA 疫苗或表达 S 蛋白的牛痘病毒的小鼠中的免疫血清，可以防止肺部和下呼吸道病毒繁殖[见 Bisht et al., *Proc. Natl Acad Sci USA* 101:6641-46(2004) ) ; Subbarao et al., *J Virol* 78:3572-72(2004); Yang et al., *Nature* 428:561-64(2004)]。此外，在人感染 SARS—CoV 病例中，发现与中和抗体的升高相一致，鼻咽拭子，血清，尿和粪便中的病毒滴度有所降低[见 Li et al., *N Engl Med* 349:508-09(2003); Peiris et al., *Lancet* 361:1767-72(2003)]。已有报道用恢复期的血浆对 SARS 进行治疗 [见 burnouf et al., *Hong Kong Med. J.* 9:309-10(2003); Wong et al., *Hong Kong Med.J.* 9:199-201(2003)]。

这些研究提供了体液免疫在防治 SARS—CoV 中的重要性并显示应当研制一种特异和有效的人单克隆抗体 (Mab) 以提供 SARS 预防和早期的治疗以防在人群中再度出现零散或全面爆发的病例。

## 发明概述

这里提供中和 SARS—CoV 的单克隆抗体。具体而言，这些 MAbs 与 SARS—CoV 钉蛋白区域上的表位结合并中和 SARS—CoV。例如，SARS—CoV 钉蛋白的区域为 S1 区域并且/或者此单克隆抗体可以是单克隆抗体 80R。单克隆抗体可以结合 SARS—CoV S1 区域的 318 至 510 位氨基酸之间的区域。更特异地，单克隆抗体可以结合 324 至 503 位氨基酸之间的区域。此外，如图 11 所示，设计可以激发与 80R 相似的 MAb 的最佳多肽序列为正向或反相的 SFELxxxPFGE(SEQ ID NO:33) 和 / 或 SFELxxxxxPFGE(SEQ ID NO:34)。

本发明中的单克隆抗体具有单克隆抗体 80R 的亲合力。可变动地，亲合力可以从  $10^{-6}$ M 至  $10^{-12}$ M 范围内变动。

本发明中的单克隆抗体可以抑制 SARS—CoV S 蛋白上 S1 区域与受体 ACE2 的结合。此外，单克隆抗体也可以抑制表达 SARS-CoV S 蛋白的细胞与表达 SARS-CoV 受体 ACE2 的细胞间合胞体的形成。

与单克隆抗体 80R 竞争结合 SARS-CoV S 蛋白 S1 区域的单克隆抗体也包括在其中。本发明中的单克隆抗体具有中和 SARS-CoV 的能力，并且包括与单克隆抗体 80R 具有相同结合表位的单克隆抗体。

本发明中的抗体可以包括一种或多种从包括了 SEQ ID NOS:2,3,4,5 的组群中选取的序列。

本发明也包括中和 SARS—CoV 的 scFv 抗体。特异地，这些 scFvs 与存在于 SARS—CoV 钉蛋白区域上的表位结合并中和

SARS—CoV。例如，SARS—CoV 钉蛋白区域是 S1 区域并且/或者 scFv 可以是 scFv 抗体 80R。scFv 抗体可以结合 SARS—CoV S1 区域上 318 至 510 位氨基酸之间的区域。更特异地，单克隆抗体可以结合 324 至 503 位氨基酸之间的区域。此外，如图 11 所示，所设计可以激发与 80R 相似的 MAb 的最佳多肽序列为正向或反相的 SFELxxxPFGE(SEQ ID NO:33)和/或 SFELxxxxxPFGE(SEQ ID NO:34)。scFv 抗体具有 scFv 抗体 80R 的亲合力。可变地，亲合力可以从  $10^{-6}\text{M}$  至  $10^{-12}\text{M}$  范围内变动。

本发明中的 scFv 抗体可以抑制 SARS—CoV S 蛋白上 S1 区域与受体 ACE2 的结合。此外，scFv 抗体也可以抑制表达 SARS—CoV S 蛋白的细胞与表达 SARS—CoV 受体 ACE2 的细胞间合胞体的形成。

与 scFv 抗体 80R 竞争结合 SARS—CoV S 蛋白 S1 区域的 scFv 抗体也包括在其中。本发明中的 scFv 抗体具有中和 SARS—CoV 的能力，并且包括与 scFv 抗体 80R 具有相同结合表位的 scFv 抗体。

本发明中的 scFv 抗体具有 SEQ ID NO:1 中的序列。

这里也包括了在遭遇这些疾病或失调的威胁下，通过给予病人治疗以防止冠状病毒引起的疾病或失调的方法，在遭遇这些疾病或失调的威胁下，给予病人治疗有效剂量的本发明的单克隆抗体或 scFv 抗体。这些方法也包括除给予单克隆抗体或 scFv 抗体之外，再给予其他抗-病毒药物和/或进入抑制剂。本领域普通技术人员可以方便地选择抗-病毒药物和/或进入抑制剂，与单克隆抗体或 scFv 抗体共同使用。例如，当冠状病毒为 SARS-CoV 时，合适的单克隆抗体包括单克隆抗体 80R，而合适的 scFv 抗体包括 scFv 80R。

本发明也包括通过对患有冠状病毒-相关疾病或失调的病人给予本发明中的有效剂量的单克隆抗体或 scFv 抗体从而对冠状病毒-相关疾病或失调进行治疗的方法。例如，冠状病毒-相关疾病或失调可以是 SARS。用于治疗单克隆抗体可以是单克隆抗体 80R。合适的 scFv 抗体包括 scFv 80R。

通过给予需要免疫的病人免疫有效剂量的疫苗候选表位从而对病人进行免疫以抵抗 SARS-CoV 的方法，这里的疫苗候选表位可与本发明中的单克隆抗体或 scFv 抗体结合。例如，单克隆抗体可以是单克隆抗体 80R，疫苗候选表位可以包括单克隆抗体 80R 表位。此外，或可选地，scFv 可以是 scFv 80R 而疫苗候选表位可以包括 scFv 80R 表位。

本发明也包括诊断冠状病毒-相关疾病或失调的方法。这些方法包括将从怀疑患有冠状病毒-相关疾病或失调的病人中提取的试验样本与本发明中的单克隆抗体混合并检测抗体-抗原复合物存在或缺失的情况，其中抗体-抗原复合物的存在表明病人患有冠状病毒-相关疾病或失调。例如，冠状病毒-相关疾病或失调可以是 SARS。本领域普通技术人员应该认识到单克隆抗体可以是单克隆抗体 80R。试验样本可以从血液，头发，颊刮片，唾液，活体组织，或精液中获得。在某些情况下，检测在体内试验中进行。

同时也包括检测样本中冠状病毒存在情况的方法。这些方法包括将样本与本发明中的单克隆抗体混合并检测抗体-抗原复合物存在或缺失的情况，从而测定样本中冠状病毒存在情况。在某些情况下，冠状病毒为 SARS-CoV。例如，在混合步骤中使用的单克隆抗体可以是单克隆抗体 80R。此外，检测步骤可以在体内试验中进行。试验样本可以从血液，头发，颊刮片，唾液，活体组织，或精液中获得。

同时也提供了包括本发明的单克隆抗体或 scFv 和载体的组合物。这些组合物可以由装有该成分的一个或多个容器的试剂盒提供。针对 SARS-CoV 的被动免疫疫苗也是所考虑过的，其中被动免疫疫苗包括这些组合物。

本发明还包括筛选调控 SARS-CoV 与 SARS-CoV 受体, ACE2 之间相互作用的化合物的方法。这些方法包括将候选化合物引入抗体-抗原复合物中的步骤，其中抗体为单克隆抗体 80R 而该抗原位于 SARS-CoV S 蛋白 S1 区域上，并且检测候选化合物是否破坏抗体-抗原复合物，其中抗体-抗原复合物的破坏表明候选化合物可以调控 SARS-CoV 与 SARS-CoV 受体 ACE2 之间相互作用。SARS-CoV-相关疾病或失调包括，例如，SARS。

此外，通过提供至少一种 SARS-CoV 蛋白，本发明还包括鉴定用于治疗 SARS-CoV-相关疾病或失调的化合物的方法。将 SARS-CoV 蛋白暴露于本发明的单克隆抗体；测定抗体-抗原复合物的形成；引入一种或多种候选化合物；并测定一种或多种候选化合物是否破坏抗体-抗原复合物，其中抗体-抗原复合物的破坏表明一种或多种候选化合物可以用于治疗 SARS-CoV-相关疾病或失调。此方法中，单克隆抗体可以是单克隆抗体 80R 而至少一种 SARS-CoV 蛋白可以包括 SARS-CoV 钉蛋白的。例如，该区域可以位于 SARS-CoV S1 区域 318 至 510 位氨基酸之间。更特异地，该区域可以位于 SARS-CoV S1 区域 324 至 503 位氨基酸之间。此蛋白可以由 SARS-CoV 分子的一部分提供或由感染 SARS-CoV 的细胞提供。

这里还提供在 MAb 80R 或 scFv 80R 结合位点上通过进行补充决定区域突变(例如,通过重链或轻链交换或通过 CDR 掺杂)从而加强 MAb 80R 或 scFv 80R 中和活性的方法;测定突变 MAb 80R 或 scFv 80R 中和活性的方法;及鉴定这些已经增加了中和活

性的 MAb 80R 或 scFv 80R 的方法。例如，在本领域中所熟知，可以通过增加抗体对表位的亲合力从而加强 MAb 80R 和/或 scFv 80R 中和活性。然而，除了突变体，也可以运用本领域中熟知的可以使 MAb 80R 或 scFv 80R 识别 SARS-CoV 的方法。作为非限制性例子，增加中和活性的 MAb 80R 和/或 scFv 80R 具有中和 SARS-CoV D480G 突变体(例如，在 GD03T 病人中发现的突变体)的能。本发明也包括由此所述方法鉴定的已经增加了中和活性的突变体。

也提供了中和 SARS-CoV 的单克隆抗体，这里所述的抗体具有一条带有三个 CDRs 区域的轻链，包括的氨基酸序列选取于包括 RASQRSNLA (SEQ ID NO: 37), DASTAT (SEQ ID NO:38) 和 QQRSNWPPT(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列组；一条带有三个 CDRs 区域的重链，包括的氨基酸序列选取于包括 AHVYDNK (SEQ ID NO: 35) 和 RSYYL (SEQ ID NO:36)的序列组；或一条带有三个 CDRs 区域的轻链，包括的氨基酸序列选取于包括 RASQRSNLA (SEQ ID NO: 37), DASTAT (SEQ ID NO:38)和 QQRSNWPPT(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列组和一条带有三个 CDRs 区域的重链，包括的氨基酸序列选取于包括 AHVYDNK (SEQ ID NO:35) 和 RSYYL (SEQ ID NO:36)的序列组。

除非另有定义，这里提及的所有技术的和科学的术语与这项发明所属的普通技术领域的普遍理解具有相同的意思。尽管与这里所描述的相似的或等同的方法与材料能用于目前发明的试验与测试，但是合适的方法与材料将在下面被描述。所有出版物，专利申请，专利，和这里提及的其他参考文献都通过在此引述而全文合并于本文。如有冲突，将以本说明书，包括定义部分为准。此外，材料，方法和例子仅是说明性的，并不具有限制性。

通过下面详细的描述与权利要求，发明的其他特点与优点将会是明显的。

### 图表的简单描述

图 1 显示了 8 个抗-S1 scFvs 的氨基酸序列 (6A, 8C, 12E, 26H, 27D, 80R, 91M, 92N)。VH 和 VL 的框架区域 1-4(FW1-4), 和补充决定区域 1-3 (CDR1-3) 都被显示。也显示了 VH 和 VL 家族名称。

图 2A 显示了使用抗-S1 scFvs 的微量-中和试验结果。SARS 病人康复期的血清作为阳性对照。未感染-SARS 人员的血清作为阴性对照。scFvs 的名称标记在上端。左侧显示了抗体滴度。每孔中加入未稀释的 SARS-CoV(~37pfu)。图 2B 显示了 80R scFv 和全长 80R IgG1 的中和活性比较结果。阳性和阴性对照血清样本和病毒使用量与图 2A 中所使用的一致。抗体的滴度和浓度标记在左侧。

图 3 为一系列显示抑制合胞体形成的效果图。使用抗-S1 抗体完成合胞体形成试验。将表达 SARS-CoV S 蛋白的 293T 细胞用期望浓度的抗-S1 scFv 或 80R IgG1 预先-孵育，再与表达 ACE2(SARS-CoV 受体)的 293T 细胞混合。在存在抗体的条件下培养 36 小时，观察剂量依赖的 80R scFv 和 80R IgG1 对于合胞体形成的抑制效果并照相。典型的结果显示在图 3 中。

图 4A 为显示 S1-Ig 对 Vero E6 染色和数量分析的流式细胞柱状图。带点的线条表示用 S1(327)-Ig 染色的对照；细线表示 S1-Ig 染色的细胞数；粗线表示 0.3  $\mu$ g S1-Ig 和 0.3  $\mu$ g 80R scFv (左侧) 或 27D scFv (右侧) 预先-混合的染色结果。图 4B 显示 scFv 与 S1-Ig 竞争结合 ACE2 受体的免疫沉淀反应结果。将指定剂量的

27D scFv 或 80R scFv 预先孵育 S1-Ig 再与放射标记的 ACE2 进行免疫沉淀反应。抗-ACE2 沉淀物作为阳性对照使用。免疫沉淀反应在还原 SDS-PAGE 胶上进行并通过放射自显影显示。

图 5 为使用 80R scFv 与 S1-Ig 的 Western blot 结果。未-还原的, 还原的或去-糖基化的 S1-Ig 被加入至 10% SDS-PAGE 胶, 转移至硝化纤维素膜, 并用抗-S1 80R scFv, 随后用兔抗-His<sub>6</sub> Ig 和 HRP-标记的抗-兔 IgG 检测。与还原的 S1 相比, 80R scFv 更强地识别未-还原的 S1, 而去-糖基化 S1 和还原的 S1 与抗体的结合能力没有太大的差异。

图 6 是 SARS-CoV S1 蛋白上 7 条亲和-选择多肽氨基酸序列的阵列。多肽序列用下划线表示而与 SARS-CoV S1 蛋白一致以深色显示。用 S1 噬菌体筛选研究鉴定了这些多肽。

图 7 为选择性的噬菌体显示多肽对 scFv 80R 结合 S1 蛋白的抑制作用图。将 his-标记的 scFv 80R (1 μg/ml) 与血清-稀释的噬菌体预先-混合并加入至包被有纯化钉蛋白 (0.15 μg/ml) 的微孔板中至终体积 100 μl。板经洗涤后加入兔抗-his 抗体并用连接 HRP 的抗-兔抗体检测结合活性。(■) 噬菌体-显示多肽表现出中等的或无抑制性。(▲) 噬菌体显示多肽 (CLSATCDCTLCGP) (SEQ ID NO:6), 显示充分的抑制性。(□) 阴性对照, 噬菌体克隆显示其不与 S180 结合。(△) 阳性对照, 2-倍血清稀释 (最高浓度 40 μg/ml) 的纯化钉蛋白被加入至每孔。

图 8A-8C 显示 80R 与动物 SARS-like-CoV 和人 SARS-CoV 中不同的氨基酸替换的 S 蛋白的结合效果。图 8A 显示在 SARS-like-CoV 或其他人 SARS-CoV 中发现的单独地被不同相应氨基酸替换的 Tor2 S1 (318-510) 上的氨基酸。这些残基也被丙氨酸替换。K344A, N479A 和 T487A 的改变在某些程度上影响与

80R 的结合: N479K 的替换导致与 80R 的结合有 50% 的减弱, 而 D480G 的替换完全阻止了与 80R 的结合。图 8B 显示与从头合成 SZ3 全长 S1(12-672)相似, 将 S1 (318-510) -Ig 进行麝猫 SZ3 病毒氨基酸多重替换 (344R/360S/479K/487S) 构建的 Tor2 对于 80R 结合没有影响。将 S1 (318-510) -Ig 用人 GD03T 病毒进行氨基酸多重替换 (344R/360S/472P/480G/487S) 构建的 Tor2 和用 GD03T 进行 S1 全长替换 (12-672) 则完全失去与 80R 的结合能力。图 8C 显示全长 Tor2 S 蛋白及不同的用 SZ3 或 GD03T 进行替换的剩余氨基酸被 1D4 沉淀的结果, 而 1D4 识别位于每个 S 蛋白碳末端的 C9 标签, 或被 80R IgG1, 并用 SDS-PAGE 分析。这些全长 S 蛋白与 80R IgG1 的结合活性与 RBDs (318-510) 或 S1 区域 (12-672) 与 80R scFv 相一致。

图 9A 和 9B 显示当对 S1(318-510)进行切断或点突变以分析鉴定 80R 抗体表位的结果。S1 318-510 残基与人 IgG1fc 区域融合, 而对 S1(318-510)切断或突变形成的残基部分被代谢标记并用蛋白 A 或 80R scFv 沉淀。图 9A 显示 S1(324-503)是结合 80R 的最小片段。任何切断 N-末端或 C-末端的比 S1 (324-503) 小的变体形式已经减少其表达或与 80R 的结合能力。图 9B 显示观察到的 80R 表位上的关键残基。特别地, 单独将 S1 片段(318-510) 上 452 位谷氨酸, 454 位和 480 位天门冬氨酸替换为丙氨酸将削弱或中止与 80R 的结合。

图 10 为一系列显示 80R IgG1 对全长 SARS-CoV 钉蛋白突变体介导的假蛋白感染的中和效果图表。HIV 病毒用 Tor2, SZ3 或 GC03T 中的 S 蛋白构建成假病毒并与期望浓度的 801R IgG1(固相线, 钻石形) 或非-相关人 IgG1 (固相线, 菱形) 在感染前共同孵育 1 小时。感染后 48 小时, 目标细胞的荧光活性被测定, 通过荧光活性与 801R IgG1 或非-相关人 IgG1 的含量关系计算相

对病毒抑制性。图 10A 显示 801R IgG1 有效地抑制 Tor2 S 蛋白假病毒 HIV 感染，在浓度约为  $2 \mu\text{l/ml}$  时抑制了 90% 的活性。图 10B 显示 801R IgG1 也可中和 SZ3 S 蛋白假病毒 HIV 感染。图 10C 显示，相比于 Tor2 和 SZ3, GC03TS 蛋白假病毒在 801R IgG1 浓度达到  $50 \mu\text{l/ml}$  时仍对其中和力具有抗性。通过两次试验都得到相同结果，这些结果具有代表性。

图 11 显示了用结合了跨越全部 SARS-CoV 基因组的 4942 条线性多肽的纤维素膜进行的扫描分析结果。这些膜先前已经被用于检测 4 例 SARS 病人急性和恢复期血清。见 Guo et al., virology 324:251-56(2004)，该文献在此通过引述而全部合并于本文。由 4942 条对应于钉蛋白的 10 个氨基酸长度的一套多肽亚集合组，其相互有 8 个氨基酸重叠，被合成并结合至膜上，但不与 MAb 80R 结合。根据 SARS-CoV 表位图谱数据结果，如图 9A 所述，额外构象多肽（图 11 中 19-34 行）被合成。

特别地，合成具有环形 N-末端（S1 蛋白上约 318-424 位残基）和 C-末端（约 503-510 位残基）的氨基酸的多肽。不同长度的分隔被插入至侧翼区域之间。最终结果显示在图 11 中，其中 2 条多肽显示可与 MAb 80R 结合。这些多肽是：

RVVLSFELGPPGGPFGEVF(SEQ ID NO:31)和

VVVSFELNLCPFGE (SEQ ID NO:32)。这些结果显示在侧翼残基之间的区域所含的氨基酸可在 3-5 之间不等。例如，可引发如 80R 抗体的最适合多肽序列可以是正向或反向 SFELxxxPFGE(SEQ ID NO:33)或 SFELxxxxxPFGE(SEQ ID NO:34)。

## 发明详述

SARS 冠状病毒（SARS-CoV）是包膜的，正链-线性 RNA 病毒冠状病毒家族的一员，作为一个组群，其具有一个广阔的寄

主范围。它包括三个主要结构蛋白：钉（S），膜（M），核壳体（N）。尽管已经显示鼠科肝炎病毒（MHV，一种充分研究的冠状病毒）感染的被动保护可以通过给予针对病毒所有主要结构蛋白的 MAb 治疗获得，钉蛋白(S)仍是冠状病毒主要的抗原决定因子。抗 S 蛋白的血清学反应在寄主中有典型的提高。（见 Moore et al., Arch.Virol.142 (11): 2249-56 (1997); Talbot et al., J.Virol.62: 3032(1998); Gallagher et al., Virology 279(2): 371-74 (2001); Song et al., J.Gen.Virol.79 (4): 719-23 (1998); 和 Lamarre et al., Eur.J.Immunol.27: 3447-55 (1997), 每一篇文献在此通过引述而全部合并于本文。

在 S 蛋白的氨基端（S1）和碳端（S2）的两个结构域在冠状病毒中是保守的。钉蛋白的 S1 结构域包括多数已知冠状病毒的中和表位并且因此可能编码关于寄主定向，中和抗体和病毒毒性的决定子。SARS-CoV S 蛋白的 S1 和 S2 结构域能通过与其他冠状病毒 S 蛋白的序列比对被鉴定，尤其通过对更保守的 S2 区域队列进行比对。

而且，有证据显示 S1 与寄主细胞上的受体（ACE2）的结合是 SARS-CoV 进入细胞的关键。（见 Li W et al., Nature 426: 450-54 (2003), 该文献在此通过引述而全部合并于本文）。此外，作为产生中和抗体有效靶标的 S2 结构域是 S 蛋白的另一功能结构域。冠状病毒钉蛋白的 S1 和 S2 结构域对细胞与细胞的融合至关重要。（见 Luo and Weiss, Virol. 244:483 (1998), Tsai et al., J.Biol.Chem.247(37):26085(1999);Taguchi et al., J.Gen.Virol.81: 2867 (2000), 这些文献在此通过引述而全部合并于本文）。

在病毒粒子中，M 糖蛋白是最丰富的跨膜包膜糖蛋白。中和表位被发现存在于其他冠状病毒的 M 蛋白。（见 Kida 等, Arch.Virol.145:1-12(2000)）。在体外试验中跨膜 M 糖蛋白结合核

壳体蛋白，可能对病毒出芽，并且对包膜形成至关重要。（见 Holmes and Lai, in *Fields Virology*, Third Edition, Fields et al., eds. Lippincott-Raven (Philadelphia), pp.1075-94 (1996)）。在病毒装配形成螺旋状核壳体过程中，内在结构蛋白 N 与病毒基因 RNA 结合。

本发明提供了鉴定，生产和描述抑制 S1 与 ACE2 结合的针对 SARS-CoV 中和性人抗-S1 单克隆抗体 80R 的方法。单克隆抗体 80R 是病毒进入的抑制子（见 Sui et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2536-41(2004)，其作为一种潜在的中和抗体能阻止 SARS-CoV 的钉蛋白 S1 结构域它的受体 ACE2 结合(见 Li et al., *Nature* 426: 450-54 (2003) )。

SARS-CoVs 的最近研究证明在 SARS 株和/或爆发株之间发生的氨基酸改变主要位于 S1 区域内，也包括了 ACE2 受体结合区域。78 例报道的人 SARS-CoV 序列和 SARS-like-CoV 序列（如来自果子狸）在 ACE2 受体和 80R 结合区域（S1 318-510 残基）的变化的比较显示在表 1 中。（见 The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, *Science* 303: 1666-69 (2004) ; Guan et al., *Science* 302: 276-78 (2003) ; Xu et al., *Emerging Infectious Diseases* 10: 789-794 (2004), ; Yeh et al., *Proc Natl Acad Sci USA*

101: 2542-47 (2004)。

表 1: 人分离 SARS-相似 CoV 和 SARS-CoV 中氨基酸的改变

分离的病毒	例子		氨基酸位点					
	基因组序列名	GenBank 序列号	344	360	472	479	480	487
中/晚期 2002/2003	Tor2	AY278741	K	F	L	N	D	T
早期 2002/2003	GD01	AY278489	R/K	F	L	N	D	T
果子狸	SZ3	AY304486	R	S	L	K	D	S
广东病人 分离株 2003/2004	GD03T0013	AY525636	R	S	P	N	G	S

在此区域的第 344, 360, 472, 479, 480, 487 位点共观察到六种改变。在 2002/2003 流行季分离的人 SARS-CoV 中, early 分离株 344 位点为精氨酸或赖氨酸 (K344K/R) 而在 middle 和 late 分离株中为赖氨酸 (See The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, Science 303:1666-69(2004))。几乎所有报道的 SARS-相似株- CoV S 序列和人 SARS- CoV S 序列 472 和 480 位点分别为赖氨酸天门冬氨酸, 而在 2003/2004 Guang dong index patient S 序列中为脯氨酸和精氨酸 (0013, 这里为 GC03T) (L472P 和 D480G)。如图 1 所示, 2002/2003 人 SARS-CoV 和 SARS-相似 CoV 间主要的氨基酸改变发生在位点 360, 479, 487 (F360S, N479K, T487S, SARS-CoV/SARS-相似 CoV)。

80R 可能不识别最近从麝猫中分离的蛋白质型 SARS-相似病毒, 这可以归因于在 GD03T 病人中发现的氨基酸改变 D480G(图 9) 也在 26 个麝猫序列中发现。因此, 若 MA b 80R 被用于应付可能出现的来源于麝猫 SARS-相似病毒的爆发情况时, 可能需要

在 80R 结合位点 (CDR) (补充决定区域进行突变, 以允许抗体也能结合 S1 蛋白的 480G 突变体。例如, CDR 突变可以通过轻链和重链的交换, 通过 CDR 掺杂, 或通过这一领域已知的其他方法来完成。目前, 480G 是唯一出现在 SARS-相似冠状病毒自然突变体中的抑制 80R 结合的氨基酸。正如图 9 所示, 其他氨基酸的改变也能破坏结合。但是, 这些在自然界 (真正的病毒中) 并无发现。因此, 提高 80R 中和活性的方法能用于分离具有高中和活性的 scFvs 和/或 MAbs。例, 用在 80R 结合位点补充决定区域(CDR)的突变, 可能可以鉴定有更广阔的中和活性的抗体 (如, 高亲合力), 以使这些抗体能识别特殊的逃逸突变体。

### ScFvs 和单克隆抗体的鉴定与特征分析

八种唯一的抗-S1 scFvs 通过各自克隆的序列分析被鉴定。这些 scFvs 被指定为 6A,8C,12E,26H,27D,80R,91M,92N,并且它们的氨基酸序列在图 1 中列出。八种不同的 VH 和七种不同的 VL 序列被揭示 (scFvs 6A 无 VL 序列)。这些 ScFvs 的基因家族中 VH1 和 VH3 是重链而 VL1,VL2,VL8,VK1 和 VK3 是轻链 (见例 2, 3 和 14)。

单价 scFvs 80R 在体外有潜在的中和活性 (见图 2)。这些结果表明 SARS-CoV 的中和并不需要二价结合。但是, 在这一领域的技术员认识到单价的 scFvs 片段以快速血液清除率为特征。因此, 在许多情况下, 为了取得成功的被动免疫, 更适合使用二价的完整长度的免疫球蛋白以保证效果、效应功能, 并延长血清中的半衰期。

因此, 如在例 3 中所述, 80RscFvs 转变成一种二价人完整 IgG1 (80R IgG1)。转变 80R 成为二价人完整 IgG1 分子提高了抗体的半衰期, 因为 hIgG1 的半衰期大约为 21 天。而且, 80R IgG1

单克隆抗体包括各种免疫球蛋白的效应功能。正如这里所述的，80R IgG1 是与 SARS-CoV ACE 受体结合位点具有高亲和力的人抗体。

正如这里所用的术语“80R IgG1”和“单克隆抗体 80R”和“完整长度 80R”和“MAb 80R”和“80R MAb”可相互转换并表示这种二价体完整长度免疫球蛋白。

80R scFv 和 80R 单克隆抗体的核酸序列如下：

### 80R scFv

```
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTGCGCTTCAGTAGTTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCAGAC
TCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGACAGGAGCTACTACC
TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGCGGTTCCGGAGGT
GGTGGTTCTGGCGGTGGTGGCAGCGAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTT
GTCTCCAGGGAAAGGGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGGAGCAACTTAG
CCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCCCTCATCTATGATGCATCCACCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCAT
CAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCACTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTC
CGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAGTCAAA (SEQ ID NO:1)
```

### 80R IgG1 重链可变区 (VH)

```
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTGCGCTTCAGTAGTTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCAGAC
TCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGACAGGAGCTACTACC
TTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:2)
```

### 80R IgG1 重链恒定区 (Gammal, C $\gamma$ 1)

GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG  
CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA  
ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC  
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCCTGACCGTGCCTTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG  
CAACGTGAATCACAAGCCCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACA  
AAACTCACACATCCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTTCCTC  
TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAGGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT  
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG  
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTC  
CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA  
AGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC  
AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC  
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA  
GAACAATAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA  
AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT  
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ  
ID NO:3)

### 80R IgG1 轻链可变区 (Kappa, V $\kappa$ )

ACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGGCCACCCTCTC  
CTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGGAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG  
CTCCAGGCCCTCATCTATGATGCATCCACCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACT  
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC  
AGTTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGG  
AAGTCAA (SEQ ID NO:4)

### 80R IgG1 轻链恒定区 (Kappa, C $\kappa$ )

GATGGTACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCC  
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC  
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAG  
CAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCT  
CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA (SEQ ID NO:5)

scFv 抗体 80R 的 VH 和 VL 域的氨基酸序列和根据本发明的  
方法鉴定的其他 scFv 的氨基酸序列见图 1。

80R scFv 的动力率 ( $k_{on}$  和  $k_{off}$ ) 和亲合力 ( $k_a$  和  $k_d$ ), 及  
S1-Ig 的单克隆抗体 80R 和 ACE2 受体用 BIAcore-evaluation  
software 测定。(见例 6)。正如在表 2 中所示, 单克隆抗体 80R

( $k_d = 1.59\text{nM}$ ) 对 S1 的亲合力比其亲本 80R scFv 高 20 倍 ( $k_d = 32.3\text{nM}$ )。而且, 这种亲合力与 ACE2 受体 ( $k_d = 1.70\text{nM}$ ) 相当。

图 2: 80R scFv, 80R 单克隆抗体和 ACE2 对 S1-Ig 的动力学率和结合亲合力。

	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_a (M^{-1})$	$K_d (M)$
80R scFv	$2.29 \times 10^5$	$8.36 \times 10^{-3}$	$3.10 \times 10^7$	$3.23 \times 10^{-8}$
80R IgG1	$3.88 \times 10^5$	$6.18 \times 10^{-4}$	$6.28 \times 10^8$	$1.59 \times 10^{-9}$
ACE2	$2.47 \times 10^5$	$4.20 \times 10^{-4}$	$5.88 \times 10^8$	$1.70 \times 10^{-9}$

这一领域的技术人员应该认识到不同结合亲合力的其他 scFv 和单克隆抗体也可以具有治疗效应。例如, 具备大约  $10^{-6}\text{M}$  到  $10^{-12}\text{M}$  范围结合亲合力的抗体和 scFv 也具有治疗效应。

进一步的微量-中和分析, 如在图 2B 所证明的, 与其较高的亲合力相一致, 在摩尔的对比中, 单克隆抗体 80R 比 80R scFv 的有效性强 20 倍。(见图 2B) 在  $7.43\text{nM}$  浓度时, 80RscFv 对测试孔的中和率高于 50%, 而在  $0.37\text{nM}$  时 80R IgG1 已获得相同的中和活性。

因为 SARS-CoV S 蛋白表达细胞 293T 能与 ACE2 受体表达细胞 293T 融合形成多核合胞体, 合胞体的形成抑制分析由八种抗-S1 scFv 和单克隆抗体 80R 进行。与以上所述的中和结果相一致, 80R 是抑制合胞体形成的仅有的 scFv。而且, 正如图 3 所示, 80R IgG1 在阻止合胞体形成中比 80R scFv 更有效。

因此, 有假说认为, 80R 中和 SARS-CoV 的机制可能是通过抑制 S1 与 ACE2 的结合阻止病毒依附细胞膜。为了使这种假说更确定, 80RscFv 能否抑制 S1 与 ACE2 表达细胞 Vero E6 的结

合试验被测定。如图 4 所示, 当存在 80R scFv 时, Vero E6 细胞与 S1-Ig 一起孵育并且通过流动血细胞计数分析, 80R scFv 在 15ug/ml 时完全抑制 S1-Ig 与 Vero E6 细胞的结合(大约大于 S1-Ig 摩尔浓度的 5 倍)。非中和抗体 (27D) 在相同浓度下没有抑制结合。非受体结合区域的 S1(327)-Ig (见 Li W et al., Nature 426: 450-54 (2003)), 被作为 S1-Ig 与 Vero E6 细胞结合的对照。在剂量依赖的关系下, 80R scFv 特异抑制 S1-Ig 与代谢标记的 ACE2 溶液的结合 (见图 4B)。因此, 80R 中和活性的主要机制是通过抑制 S1 与 ACE2 的结合发生的。

### 80R 表位的特征

S1 上 80R 结合区域的主要表位图显示 80R 不能识别 S1 区域的 N 末端残基 12-327, 但是证明 80R 结合 C 末端残基 261-672 并且 80R 的中和活性是通过阻止 S 蛋白和其细胞受体 ACE2 的结合完成的。通过 ELISA, 比较了该结合与全长 S1 区域结合的情况。此外, 在免疫球蛋白分析中, 80R 能识别 SDS 变性的, DTT 还原的和 PNGase F 去糖基化的 S1 (见图 5), 尽管在非还原条件下结合更容易。这些主要特征的结果表示 80R 表位对于还原更敏感, 对于变性具有抗性并不依赖于糖基化。

80R 与 SARS-CoV S 蛋白结合区域上的 ACE2 受体结合进行中和测定

S1 区域 318-510 残基 193-氨基酸区域, 最近显示包括 SARS-CoV S 蛋白 ACE2 受体结合区域。(见 Wong et al., J Biol Chem 279:3197-201(2003))。放射免疫共沉淀显示两条与 193-氨基酸片段相比较短的截断变异体片段 (例如, 318-490 和 327-510 残基) 不结合 ACE2。为了更精确地定位 80R 的结合区域, 并且更好地了解 80R 如何阻止 S 蛋白与 ACE2 的结合, 测定了 S1 区

域上的三个片段（残疾 318-510, 318-490, 327-510）与 80R 的结合能力。见例 11, 如下。

数据结果表明 80R 中和决定区域和 ACE2 受体-结合区域都位于 S 蛋白上相同的区域, 特异地, 在残基 318 至 510 之间。切除此区域 N-末端和 C-末端的较短变体 (分别为 318-490 和 327-510) 失去了 80R-结合活性, 显示 S1 (318 至 510) N-末端和 C-末端上的一些残基直接对于此区域和 80R 的结合或形成正确的抗体结合区域是至关重要的。此外, 该研究也明确显示 Mab80R 中和表位是构象依赖的。最小的 80R 结合区域定位于氨基酸 324-503 之间。

#### 鉴定 80R 结合 S1 蛋白 ACE2 受体-结合区域的重要残基

318 和 510 间的一些氨基酸残基 (谷氨酸 452 和天门冬氨酸 454, 463, 480) 单独地被丙氨酸替代以验证它们在与 ACE2 结合的中的效力。结果显示 E452 和 D454 都单独地表现出 S1 与 ACE2 交互作用中的重要性。D463A 的改变也减弱了 ACE2 的结合, 但 480A 的改变并没有获得效果。(见 Wong et al., J Biol Chem 279:3197-201(2004))。

这些点-替换变体也进行了与 80R 抗体结合的实验。见例 11, 如下。在 S1(9318-510)- Ig 和全长 S1- Ig 上都有单独的丙氨酸替代突变。数据显示与 S1 与 ACE2 交互作用相似, E452 和 D454 对于 S1 蛋白与 80R 抗体的结合是至关重要的。D463 不影响 80R 与 S1 的结合, 但影响 ACE2 与 S1 的结合。D480 在 S 蛋白与 ACE2 的相互作用中没有重要作用, 但对于 80R-抗体的结合是至关重要的, 替换阻止了与 Mab80R 的结合。这些数据显示与受体-和中和抗体-结合相关的 S1 区域是部分重叠的。

80R 与在最近 SARS 爆发中进化出现的各种麝猫 SARS-like-CoV 80R 结合区域氨基酸替换 S 蛋白变异体间的结合特征

为了测试表 1 中显示的 80R 抗体结合区域序列变化是否与 80R 结合活性的重大改变相联系,运用 80R 抗体对最近分离的人 SARS-CoV (Tor2,NC\_004718) S 蛋白 S1 区域进行最初的筛选。根据替换分析,Tor2 上每一个氨基酸都单独地被相应改变的氨基酸替换以观察这些残基在与 80R 抗体结合中的作用。例如,344 位的 K (Tor2) 被替换为 R (麝猫 SARS-like-CoV, SZ3 分离株)。每一个氨基酸也分别被替换为丙氨酸以研究这些残基是否对形成 80R 表位有作用。

如图 8A 所示,在 S1(318-510)中的 F360S 和 L472P 或者 F360A 和 L472A 的改变对于 80R 结合没有影响,并且变异体 K344R 和 T487S 对于结合情况也没有严重的影响。然而,丙氨酸替换突变体 R344A 和 T487A 的结合能力分别有 ~20% 和 ~50% 的减少。在位点 479, N479K 替换导致 80R 结合力减少了 ~50%,而 N479A 替换只导致 ~20% 的减少。

这些结果显示通过形成 80R 结合位点的一部分,或是帮助蛋白正确折叠,344 位赖氨酸,479 位天冬酰胺和 487 位苏氨酸通常对 80R 与 S1 区域的结合在某些程度上相关。如图 9B 和 8A 所示,D480A 替换完全阻止了与 80R 的结合。当 2003/2004 广东病人分离株 GD03T 序列的 480 位天门冬氨酸替换为氨基乙酸时也观察到同样的结果。

将 Tor2 S1(318-510)-Ig 结构上的氨基酸引入麝猫 SZ3 和人 GD03T 形成多个氨基酸替换,分别为 344R/360S/479K/487S 和 344R/360S/472P/480G/487S,构建成对应于麝猫 SZ3 和人 GD03T

病毒分离株的 S1(318-510)-Ig。编码麝猫 SZ3 和人 GD03T 的完整 S1 蛋白的全长 S1 基因 (12-672) 也根据 Tor2 分离株完整人 SARS-CoV S1 蛋白重新合成 (见 Li et al., Nature 426:450-54(2003))。这些全长 S1 突变体包括了出现在 318-510 的氨基酸改变, 也包括此区域外的改变。麝猫 SZ3S1(318-510)和 S1(12-672)与 80R 的结合与 Tor2 相似图 8B)。

减弱了与 80R 的结合的含有 N479K 单个氨基酸替换的突变体, 对于多个替换突变体的结合并没有影响。无论 GD03T 的 S1(318-510)或 S1 (12-672) 都不与 80R scFv 结合。这与 D480 在 80R 与 S1 蛋白结合中的重要作用相一致。GD03T S1 蛋白的 D480G 改变使其对于 80R scFv 产生完全的抗性。

最终, 也评估了这些改变对于全长 S 蛋白与 80R IgG1 结合的影响。如图 8C 所示, 与 RBD S 片段及 S1 与 80R scFv 的结合相一致, 80R IgG1 有效地沉淀了 Tor2 和 SZ3 全长 S 蛋白, 而非 GD03T, 尽管由于 80R IgG1 高于 80R scFv 的亲合力导致追踪到 GC03T 与 80R IgG1 之间非常低的结合力。

这些 80R 表位中的关键氨基酸在 2002/2003 流行季中分离的人 SARS-CoVs 中并未发现有改变。因此, 目前分离的主要的 SARS-CoV 可能对 MAb 80R 敏感。

图 11 显示了运用结合了 4942 条跨越全长 SARS-CoV 基因组的线性多肽纤维素膜进行的筛选分析结果。这些膜先前用于探针敏感和 4 例 SARS 病人康复期血清试验。见 Guo et al., Virology 324: 251-56 (2004), 在此作为参考引用。一套由 10 氨基酸长度多肽构成相互有 8 肽重叠的代表钉蛋白多肽的 4942 条线性多肽被合成并固定与此膜上, 但不与 MAb 80R 结合。根据

SARS-CoV 表位图谱数据, 如图 9A 所示, 额外的构象多肽 (图 11 第 19-34 列) 被合成。

特异地, 具有回环的 N-末端氨基酸 (S1 蛋白大约 318-424 残基) 和 C-末端氨基酸 (大约 503-510 残基) 的多肽被合成。不同长度的间隔被插入到侧翼区域之间。这些研究的最终结果显示在图 11 中, 其中 2 条多肽结合 MAb 80R。这些多肽为: RVVVLSFELGPPGGPFGEVF (SEQ ID NO:31) 和 VVVSFELNLCPFGE (SEQ ID NO:32)。这些结果显示侧翼残基之间区域的氨基酸可以在 3 至 5 个间变化。例如, 可以产生 80R 抗体的设计的多肽序列可以为以正向或反相的 SFEL<sub>xxx</sub>PFGE (SEQ ID NO:33) 或 SFEL<sub>xxxxx</sub>PFGE (SEQ ID NO:34)。

### 抗体

这里使用的术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白 (Ig) 分子上具有免疫活性的部分, 例如, 具有特异结合 (具有免疫作用) 抗原的抗原结合位点的分子。“特异结合”或“具有免疫作用”指抗体与指定抗原的一个或多个抗原决定部位具有反应而不与其他多肽反应。抗体包括, 但不局限于, 多克隆, 单克隆, 人工的, dAb (结构域抗体) 单链, F<sub>ab</sub>, F<sub>ab</sub> 和 F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> 片段, scFvs, 和 Fab 表达文库。

单链 Fv (“scFv”) 多肽分子是一种共价结合 V<sub>H</sub>:V<sub>L</sub> 的异源二聚体, 其可以由包括 V<sub>H</sub>-和 V<sub>L</sub>-编码基因和多肽-编码链接的融合基因表达。(见 Huston et al. (1998) Proc nat Acad Sci USA 85(16): 5879-5883)。许多方法已经被叙述来识别化学结构, 以证实自然聚合的, 但化学地分离的 scFc 分子抗体 V 区的轻链和重链多肽, 其可以折叠为与抗原-结合位点充分相似的三维结构。见, 例如, U.S. Patent Nos. 5091513; 5132405; 和 4946778。

大量的人 scFv 文库已经并可以被创建以提供针对众多目标分子的重排抗体海量基因资源。为了分离疾病特异的抗体，更小的文库从受传染疾病的个体中被构建。（见 Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43(1992); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79(1992)）。

通常而言，人类中获得的抗体分子涉及 IgG, IgM, IgA, IgE 和 IgD 的任何种类，这些因存在在分子中的重链的属性不同而相异。某些种类还有次类，如 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> 和其他。而且，在人类中，轻链可以是 kappa 链或 lambda 链。

术语“抗原-结合位点”或“结合部位”指免疫球蛋白分子参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重链（“H”）和轻链（“L”）的 N-末端可变区域（“V”）的氨基酸残基构成。重链和轻链的 V 区域内的三种高度的扩散分支，如所指的“超变异体区域”，插入在更保守的侧面分支“结构区域”或“FRs”之间。因此，术语“FR”指在免疫球蛋白中发现的在超变异体区域之间或与之毗邻的氨基酸序列。在抗体分子中，轻链的三种超变异体区域和重链的三种超变异体区域在三维空间相互作用形成抗原结合表面。抗原-结合表面是所结合抗原三维空间的补充，重链和轻链的三维超变异体区域指“补充-决定区域”或“CDRs”。

正如图 1 所示，80R 重链 VH 区域的 CDR1 序列为：AH；80R 重链 VH 区域的 CDR2 序列为：VYDNK(SEQ ID NO:35)；80R 重链 VH 区域的 CDR3 序列为：RSYYL(SEQ ID NO:36)；80R 轻链 VL 区域的 CDR1 序列为：PASQVRSNLA(SEQ ID NO:37)；80R 轻链 VL 区域的 CDR2 序列为：DASTAT(SEQ ID NO:38)；80R 轻链 VL 区域的 CDR3 序列为：QQRSNWPPT(SEQ ID NO:39)。

正如这里所用的术语“表位”包括能特定地结合免疫球蛋白，scFv，或 T-细胞受体的蛋白决定簇。表位决定子通常包括分子的化学活性表面组分如氨基酸或糖侧链并通常有特定的三维结构特性，也具有特定的电荷特性。例，抗体可以通过多肽的 N-末端或 C-末端被诱导。

这里所用的术语“免疫学结合”和“免疫学结合特性”指出现在免疫球蛋白分子和特定免疫球蛋白特异的抗原之间的非-共价结合类型。这种力量，或免疫学结合作用的亲合力能根据相互作用的分解常数 ( $K_d$ ) 解释，越小的  $K_d$  代表越大的亲合力。所选多肽的免疫学结合特性能通过这一领域熟知的方法定量测定。这种方法之一必须测定抗原-结合位点/抗原化合物形成和分裂的速率，这些速率依靠复合物成分的浓度，相互作用的亲合力，在两个方向有同等影响作用的几何学参数。因此，通过计算浓度和实际的结合与分离速率，无论“速率常数 on” ( $K_{on}$ ) 还是“速率常数 off” ( $K_{off}$ ) 都能被测定。(见 Nature 361: 186-87 (1993))。  $K_{on} / K_{off}$  率能使与亲合力无关的参数被取消，并等于分离常数值  $K_d$ 。(见，通常，Davies et al., (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473)。正如通过放射性配基结合分析或这领域其他熟知的相似分析测定，目前发明的抗体，当平衡结合常数( $K_d$ )  $\leq 1\mu\text{M}$ , 尤其  $\leq 100\text{nM}$ , 更尤其  $\leq 10\text{nM}$ , 最尤其  $\leq 100\text{pM}$  至  $1\text{pM}$  时将特定地结合 SARS-CoV 表位。

本发明中的 SARS-CoV 蛋白 (如 S1, S2 或 M), 或其派生物, 片段, 类似体, 同族体或其中的异种同源基因, 在特定地免疫结合这些蛋白成分的抗体制备中作为免疫原被使用。

本领域中的普通技术人员可以意识到, 不用通过试验, 就可以测定一种人单克隆抗体是否具有与本发明中的单克隆抗体 (例如, 单克隆抗体 80R) 相同的特性, 即通过确定前者是否能阻止

后者结合 SARS-CoV S1 区域。如果所测试的人单克隆抗体与本发明中的人单克隆抗体相竞争，以本发明中的人单克隆抗体的结合的减少为标识，则有可能这两种单克隆抗体结合相同，或相关的，表位。

另一种测定人单克隆抗体是否具有本发明中的单克隆抗体的特征的方法是预先将本发明中的单克隆抗体与 SARS-CoV S1 蛋白共同孵育，而其通常是有反应的，再加入待测试的人单克隆抗体测定所测试的人单克隆抗体与 S1 区域的结合是否被抑制。如果待测的人单克隆抗体被抑制，在所有可能中，它具有与本发明中的单克隆抗体相同的，或功能相同的表位特异性。也可以通过利用 SARS-CoV 并测定所测试的单克隆抗体是否能够中和 SARS-CoV，对本发明中的单克隆抗体进行筛选。

本领域中的许多方法都可以用于制备多克隆或单克隆抗体以针对本发明中的蛋白，或针对其派生物，片段，同族类似物或其异种同源基因。（见，例如，Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold spring Harbor ,NY, 在此通过引述将该文献全部合并于本文）。

抗体可以通过已知的技术纯化，如利用蛋白 A 或蛋白 G 进行亲和层析，其主要提供了免疫血清中的 IgG 部分。随后，或可选地，免疫球蛋白所针对的特异抗原，或其表位，可以固定于柱中并通过免疫亲和色谱纯化免疫特异抗体。免疫球蛋白的纯化已有叙述，例如，D.Wilkinson( The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14,No.8(April 17,2000), pp.25-28 )。

术语“单克隆抗体”或“MAb”或“单克隆抗体成分”指由一种分子种类构成的抗体群体，其由唯一的轻链基因产物和唯一的

重链基因产物组成。特别地，单克隆抗体的补充决定区域(CDRs)在群体所有分子中是相同的。MAbs 包括能与其唯一亲和结合的特殊抗原表位起免疫反应的抗原结合位点。

单克隆抗体可通过细胞融合的方法制备，如由 Kohler and Milstein ,*Nature*, 256: 495 (1975) 所描述的。在细胞融合的方法中，鼠，亚洲大鼠或其他合适的寄主动物被免疫原特异免疫，引发产生或有能力产生结合免疫原的抗体的淋巴细胞增值。选择性地，淋巴细胞在体外能被免疫。

免疫原典型地包括蛋白质抗原，其片段的一部分或其融合蛋白的一部分。通常，或是如果希望得到人细胞则使用外周血淋巴细胞，如果希望得到非人类哺乳动物则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后用合适的融合试剂，如聚乙烯乙二醇，使淋巴细胞与无限细胞系融合形成融合细胞。(Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp.59-103)。无限细胞系通常是转化的哺乳动物细胞，尤其是啮齿目的，牛的，人的骨髓瘤细胞。通常，使用鼠或鼠科的骨髓瘤细胞系。融合细胞系能在包括一种或更多抑制非融合免疫细胞生长或存活物质的合适培养基中培养。例，如果亲本细胞缺失次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT 或 HPRT)，融合细胞培养基将特异地包括次黄嘌呤，氨嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷(“HAT 培养基”)，这些物质能阻止 HGPRT 缺失细胞的生长。

优选的无限细胞系能有效地融合，支持由被选择的抗体生产细胞稳定地高水平表达抗体，并且对如 HAT 培养基敏感。更首选的无限细胞系是鼠骨髓瘤细胞系，例如，其能从 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia 获得。据描述人骨髓瘤和鼠-人骨髓瘤细胞系也能生产人单克隆抗体。(见 Kozbor,

J.Immunol., 133:3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp.51-63).

从培养融合细胞的培养基中能够分析是否有结合抗原的单克隆抗体的存在。更适宜地，由融合细胞产生的单克隆抗体的结合特性可由免疫沉淀反应或体外结合分析如，放射免疫分析（RIA）或酶联免疫吸附分析（ELISA）测定。这些技术和分析在本领域中是已知的。单克隆抗体的亲和结合可通过以下方法测定，如 Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)。而且，在单克隆抗体的治疗应用方面，鉴定抗体对目标抗原的高特异性程度和高亲和结合是至关重要的。

希望得到的融合细胞被鉴定后，克隆将通过有限稀释程序进行亚克隆并且通过标准方式生长（见 Godding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp.59-103)。适合于此目的的培养基包括，如 Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 培养基。选择性地，融合细胞在体外能像在哺乳动物腹水中一样生长。

通过常规的免疫球蛋白纯化程序，如蛋白质 A-琼脂糖，羟磷灰石色谱，凝胶电泳，透析，或亲和色谱，亚克隆分泌的单克隆抗体能从培养基或腹水中分离或纯化。

单克隆抗体也能通过 DNA 重组的方式制备，如在 U.S. Patent No.4816567 中描述所描述。编码本发明的单克隆抗体的 DNA 能使用常规的程序容易地分离和测序。（例，使用能特异结合编码鼠抗体重链和轻链基因的寡核苷酸探针）。本发明的融合细胞是这种 DNA 首选的来源。一旦被分离，DNA 被插入表达载体，然后转化进入宿主细胞如猿 COS 细胞，中国仓鼠卵巢（CHO）细

胞，或不产生其他免疫球蛋白的骨髓瘤细胞，使得在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。DNA 也可以被修饰，例如通过替换，人重链和轻链的恒定区域的编码序列代替同源鼠科序列（见 U.S. Patent No. 4816567; Morrison, Nature 368812-13 (1994) 或将所有或部分非免疫球蛋白多肽通过共价连接免疫球蛋白编码序列。这种非免疫球蛋白能被本发明中的抗体的恒定区域所代替，或被本发明中的抗体的某一抗原-结合位点的可变区域代替，用以创造一种嵌合二价抗体。

完整的人抗体是包括轻链和重链整个序列，包括 CDRs，来源于人基因的抗体分子。这种抗体在这里被称为“人抗体”或“完整的人抗体”。人单克隆抗体能通过用 trioma 技术被制备。人 B-细胞融合技术（见 Kozbor, et al.,1983 Immunol Today 4: 72); 和 EBV 融合技术也可以产生人单克隆抗体（见 Cole, et al.,1985 In : MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY,Alan R.Liss, Inc.pp.77-96)。通过使用人融合细胞（见 Cote,et al.,1983.Proc Natl Acad Sci USA80: 2026-2030) 或在体外用 Epstein Barr 病毒转化人 B-细胞（见 Cole, et al.,1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY,Alan R.Liss, Inc.pp.77-96)，人单克隆抗体可以被利用和产生。

此外，人抗体也可以用其他技术，包括噬菌体显示文库得到。（见 Hoogenboom and Winter, J.Mol.Biol., 227: 381 (1991); Marks et al.,J.Mol.Biol., 222: 581 (1991)。相似地，人抗体能通过将人免疫球蛋白基因座介导进入转基因动物来获得，例如其内源免疫球蛋白基因已经被部分或全部抑制的鼠。面对挑战，观察人抗体产物，与在人所有方面所见相类似，包括基因重组，装配，和抗体集合。这种方法已经被叙述，例如 U.S.Patent Nos.5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016, and in Marks et al.,Bio/Technology 10779-783 (1992); Lonberg et al.,Nature

368856-859(1994); Morrison, Nature 368812-13(1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14826(1996); and Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 1365-93 (1995)。

人抗体另外可以用修饰的转基因非人类动物生产，其在抗原的刺激下可产生完整人抗体而非动物同源抗体。(见 PCT publication WO 94/02602)。在非人类寄主中，编码免疫球蛋白重链和轻链的内源基因被证明是无用的，编码人免疫球蛋白重链和轻链的有活性的 loci 被插入宿主的基因组。通过使用包括所需的人 DNA 片段的人造酵母染色体，人基因被整合。通过将完全修饰相比程度略少的转基因动物进行杂交产生含有所期望修饰的动物后裔。非人类动物的适宜例子是小鼠，并如 PCR 出版 WO96/33735 和 WO 96/34096 所示，限指 Xenomouse<sup>™</sup>。这种动物产生分泌人全部免疫球蛋白的 B 细胞。可以通过用所涉及的免疫原免疫动物获得抗体，例如，多克隆抗体的制备，可选地也可以通过来源于此动物的无限 B 细胞，如杂交瘤制备单克隆抗体。此外，编码人免疫球蛋白可变区域的基因可以被改造和表达以获得抗体，或可以进一步被修饰以得到抗体的类似物，如，单链 Fv(scFv)分子。

在 U.S 专利 5939598 号中描述了一种非人类宿主的制备方法，例如内源免疫球蛋白重链表达缺失的小鼠。通过以下方法可以获得，包括从位于胚胎干细胞中的至少一个内源重链上敲除 J 片段基因，以防止此位点的重排从而防止此位点重排免疫球蛋白重链的转录，运用包括编码选择标记的基因的目标载体可以完成此敲除，并从胚胎干细胞制备出转基因小鼠，其内体和胚细胞带有编码选择标记的基因。

制备所需抗体的方法,例如人源抗体,在 U.S.专利号 5916771 中有所描述。此方法包括在一种哺乳动物培养细胞中引入包括编码重链核酸序列的表达载体,并在另一种哺乳动物培养细胞中引入包括编码轻链核酸序列的表达载体,并将两种细胞融合形成杂交细胞。该杂交细胞可表达含有重链和轻链的抗体。

在 PCT 公开 WO99/53049 号中叙述了此方法进一步的改良,即鉴定免疫原中临床相关表位的方法,和筛选与相关表位免疫特异地高亲和结合的抗体的相关方法。

抗体可以由包括编码上述抗体单链的 DNA 片段的载体表达。

这里包括载体,脂质体,裸露 DNA,佐剂-附加 DNA,基因枪,导管等。载体包括 WO 93/64701 中叙述的化学共扼分子,其具有一个目标基因(例如,细胞表面受体配基)和一个核酸结合基因(例如,多聚赖氨酸),病毒载体(如, DNA 或 RNA 病毒载体), PCT/US 95/02140(WO 95/22618)中叙述的包括目标基因(例如,针对目标细胞的特异抗体)和核酸结合基因(例如鱼精蛋白)的融合蛋白,质粒,噬菌体等。载体可以是染色体形式的,非-染色体形式的或人工合成的。

优选的载体包括病毒载体,融合蛋白和化学共扼分子。逆转录病毒载体包括莫洛尼氏鼠白血病病毒。DNA 病毒载体也是首选的。这些载体包括痘病毒如天花病毒或禽痘病毒载体,疱疹病毒载体如单纯疱疹病毒 I (HSV) 载体(见 Geller,A.I.等, J.Neurochem,64: 487 (1995); Lim,F,等, in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed.(Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I.et al., Proc Natl. Acad. Sci:U.S.A. 90:7603(1993); Geller, A. L., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149(1990), 腺病毒载体(见 LeGal Lasalle et al., Science, 259:

988 (1993); davidson, et al., Nat. Genet 3: 219 (1993); Yang et al., J. virol. 69: 2004 (1995) 和腺病毒-相关病毒载体 (见 kaplitt, M.G. et al., Nat. Genet. 8:148(1994)).

痘病毒可以介导基因进入细胞质。禽痘病毒载体只能短期内表达核酸。腺病毒载体, 腺病毒-相关病毒载体和单纯疱疹病毒 (HSV) 载体是介导核酸进入真核细胞的首选。腺病毒载体的表达期限 (约 2 个月) 比腺病毒-相关病毒载体的表达期限短 (约 4 个月), 后者又比单纯疱疹病毒载体期限短。选择特异的载体将依赖于目标细胞和针对的情况而决定。介导进入的方法可以是标准技术, 例如, 感染, 转染, 转换或转化。基因转染的模式例子有, 裸露 DNA, CaPO<sub>4</sub> 沉淀, DEAE 葡聚糖, 电转化, 原生质体融合, 脂质体转化, 细胞显微注射, 和病毒载体。

本质上载体可以用于针对任何期望的目标细胞。例如, 可以用立体定位注射直接将载体 (例如腺病毒, HSV) 引导入期望的位置。此外, 微粒输送可以利用小型泵灌输系统进行脑室注射 (icv) 灌输方法, 如 SynchroMed 灌输系统。基于整体流动, 分期对流的方法, 已经有效地运用于输送大分子至脑部延伸部位并有助于输送载体至目标细胞。(见 Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080(1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305(1994))。其他可利用的方法包括导管, 静脉内, 非肠道的, 腹膜内的和皮下注射, 和口服及其他已知的给药途径。

这些载体可以表达大量的抗体以用于不同方面。例如, 检测样本中是否含有 SARS-CoV。抗体也可以通过结合而阻止 SARS-CoV 与 SARS-CoV 受体 ACE2 的相互作用。

运用技术可以制备特异针对本发明的抗原蛋白的单链抗体 (见 U.S.Patent No.4946778)。此外, 建立构建 F<sub>ab</sub> 表达文库的方

法（见，例如，Huse, et al., 1989 Science 246:1275-1281）从而可以快速和有效地鉴定特异针对蛋白或派生物，片段，类似物或其同源物的单克隆  $F_{ab}$  片段。包括个体基因型的针对蛋白抗原的抗体可以由本领域中的技术制备，包括，但不局限于：（1）抗体分子通过胃蛋白酶切制备  $F_{(ab)}$  片段；（2）去除  $F_{(ab)}$  片段的二硫化键制备  $F_{ab}$  片段；（3）木瓜蛋白酶和还原剂作用于抗体分子制备  $F_{ab}$  片段；（4） $F_v$  片段。

复共轭对配合物抗体也包括在本发明的范围之内。复共轭对配合物抗体由两个共价结合的抗体组成。这些抗体已经，例如，运用于针对有害细胞的目标免疫系统细胞（见 U.S.Patent No.4676980），及用于治疗 HIV 感染（见 WO 91/00360;WO 92//200373; EP 03089）。预期地，抗体可以运用在合成蛋白化学中已知的方法在体外制备，包括使用交联试剂。例如，通过二硫化交换反应或硫醚结合可以制备抗毒素。用于此目的的合适的试剂包括 iminothiolate 和 methyl-4-mercaptobutyrimidate 和例如，在 U.S.Patent No. 4676980 中所叙述的。

可以期望对本发明中抗体的有关效应作用进行修饰，以提高如治疗 SARS 中的抗体的有效性。例如半胱氨酸残基能被介导进入 Fc 区域，从而允许在这一区域形成二硫化物结合链。由此产生的同源二聚体能提高内在的能力和/或提高补充-介导细胞杀伤力和抗体-依赖细胞的毒性。（ADCC）。（见 Caron et al.,J.Exp Med, 176: 1191-1195（1992）and Shopes, J.Immunol., 148: 2918-2922（1992））。选择性地，抗体可以被改造为有两个 Fc 区域并且因此能提高补充裂解和 ADCC 能力。（见 Stevenson et al.,Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230(1989)）。

本发明也属于免疫共扼，包括共扼连接细胞毒素药剂如毒素（如，细菌的，真菌的，植物的或动物组织的或其片段的酶活性毒素），或放射性同位素（如放射性变化）的抗体。

能利用的酶活性毒素和其片段包括白喉 A 链，白喉毒素的非结合活性片段，外毒素 A 链（来源于绿脓杆菌），蓖麻毒素 A 链，红豆因 A 链，莫迪素 A 链，细胞毒素基因，油桐蛋白质，康乃馨蛋白质，*Phytolaca americana* 蛋白质（PAPI, PAPII, 和 PAP-S），苦瓜抑制子，泻果素，巴豆毒素，*sapaonaria officinalis* 抑制子，白树素，mitogellin, restrictocin, 酚霉素，依诺霉素，和单端孢霉烯族化合物。多种放射性核酸可用于制备放射性连接的抗体。如包括  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , 和  $^{186}\text{Re}$ 。

抗体和性药剂的结合可以使用多种具双功能的蛋白质-结合试剂完成，如 3-( $\alpha$ -吡啶二硫基)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺基酯（SPDP），iminothiolane（IT），imidoesters 的双功能派生物（如 dimethyl adipimidate HCL），活性酯（如 disuccinimidyl suberate），醛（如 glutaredehyde），bis-azido 化合物（如 bis((p-azidobenzoyl) hexanediamine)，bis-diazonium derebatives（如 bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine），二异氰酸化物（如 tolyene2, 6-diisocyanate），和双活性氟化合物（如 1,5-双氟-2,4-双硝基苯）。例如，蓖麻蛋白免疫毒素能用在 Vitetta et al., Science238: 1098（1987）中所述的方法制备。碳 14 标记的 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) 是用于连接放射性核酸至抗体的示范性螯合试剂。（见 WO94/11026）。

这一领域的普通技术人员可以认识到许多可能的基团能与合成的抗体或本发明的其他分子连接。（见如，“Conjugate Vaccines”，Contribution to Microbiology and Immunology，

J.M.Cruise and R.E. Lewis, Jr ( eds ), Carger Press , New York, ( 1989 ), the entire content of which are incorporated herein by reference ).

耦合可以通过任何结合两种分子的化学反应来完成, 只要抗体和其他分子保持各自功能。这种连接包括许多化学机制, 如共价结合, 亲和结合, 插入, 配价结合和络合。首选的结合是, 共价结合。共价结合可以通过现有侧链的直接浓缩或外在并联分子的结合完成。许多二价的或多价的连接试剂在蛋白质分子的耦合中是有作用的, 如目前发明的抗体与其他分子的偶合。例如, 代表性的耦合试剂包括有机化合物如硫酯, 氯磺酸, 琥珀酰亚胺酯, 二异氰酸盐, 戊二醛, 重氮苯和环己二胺。这种举例不是企图彻底列举这领域已知的各种耦合试剂, 而是希望成为更通常的耦合试剂的范本。(见 Killen and Lindstrom, *Jour.Immun.*133: 1335-2549 (1984); Jansen et al., *Immunological Reviews* 62: 185-216 (1982); and Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987))。首选的耦合剂在文献中被描述。(见, 如, Ramakrishnan, S. et al., *Cancer Res.*44: 201-208 (1984) 叙述了 MBS 的使用 (M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide 酯)。也可见, Patent No. 5030719, 描述了通过寡肽连接将卤代醋酸基肺结核特效药派生物与抗体耦合。尤其首选的耦合剂包括 (i) EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride; (ii) SMPT(4-succinimidylloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)-toluene (Pierce Chem.Co., Cat.(21558G); (iii) SPDP(succinimidyl-6[3-(2-pyridyldithio)propionamido] hexanoate (Pierce Chem.Co., Cat#21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl 6[3-(2-pyridyldithio)-propionamide] hexanoate (Pierce Chem.Co.Cat#2165-G); 和 (v) sulfo-NHS

(N-hydroxysulfo-succinimide : Pierce Chem.Co. ,  
Cat.#24510)conjugated to EDC.

以上所述的连接物包括具备不同特性的成分，这样可以使共扼物具有不同的物理-化学特征。例如，烷基羧酸盐的磺基-NHS酯比芳香基羧酸盐的磺基-NHS酯更稳定。含有 NHS-酯的连接物比磺基-NHS酯更难溶。此外，连接物 SMPT 包括空间位阻二硫化物结合物，并能够形成具备高稳定性的连接物。二硫化键由于其在体外会断裂，通常比其他连接键不稳定，导致较低的连接利用性。磺基-NHS，特异地，可以增强碳化二亚胺连接的稳定性。碳化二亚胺二聚物（例如 EDC）当与磺基-NHS 共同用于连接时，形成的酯与单独进行碳化二亚胺连接反应相比，对于水解具有更高的抵抗力。

这里所述的抗体也可以制备成免疫脂质体。含有抗体的脂质体可以用本领域中已知的技术制备，例如 Epstein et al., Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 和 U.S. Pat. Nos. 4485045 和 4544545。在 U.S.Patent No.5013556 中叙述了具备增加了循环时间的脂质体。

具有特殊作用的脂质体可以利用包括卵磷脂的液体成分，胆固醇，和 PEG-来源的磷脂酰乙醇胺（PEG-PE）以反相蒸发方法制备。脂质体从设计好孔径的筛孔中挤出形成具有预期直径的脂质体。本发明的抗体 Fab'片段可以通过二硫化-交联反应与脂质体连接，如 Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288(1982)所述。

### 利用抗体拮抗 SARS-CoV

筛选具有预期特异性抗体的方法包括，但不局限于，酶联免疫反应方法（ELISA）和其他本领域中已知的免疫介导技术。

直接针对 SARS-CoV 蛋白（或其片段）的抗体可以用于本领域中与 SARS-CoV 蛋白定位和/或定量相关的方法（例如，用于测定适当的生理样本中 SARS-CoV 蛋白的水平，用于诊断方法，用于蛋白成像，及其他）。在给定情况下，SARS-CoV 蛋白或派生物，或其片段，类似物，同源物特异的抗体，其具有源于抗体的抗原结合区域，被用作药理学活性成分（这里指“疗法”）。

SARS-CoV 蛋白特异的本发明的抗体可以通过标准技术用于分离 SARS-CoV 多肽，例如免疫亲和，色谱或免疫沉淀。作为临床试验程序的一部分，直接针对 SARS-CoV 蛋白（或其片段）的抗体可以用于诊断性地监控组织中的蛋白水平，例如，测定给予治疗的效果。测定可以通过将抗体与检测底物连接（例如，物理连接）完成。检测底物的例子包括各种酶，辅基，荧光物质，发光物质，生物发光物质，和放射性物质。合适的酶的例子包括辣根过氧化酶，碱性磷酸酶， $\beta$ -半乳糖苷酶，或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基例子包括亲和生物素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；合适的荧光物质例子包括 7-羟基香豆素，荧光素，荧光素异硫氰酸酯，若丹明，dichlorotriazinylamine 荧光素，丹磺酰氯或藻红蛋白；发光物质的例子包括发光氨；生物发光物质的例子包括荧光素酶，虫萤光素，和发光蛋白质，合适的放射性物质包括  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ 。

本项发明的抗体，包括多克隆的，单克隆的，人源化和完整人类抗体，都可以作为治疗的试剂使用。通常这种试剂被用于治疗或阻止病人中冠状病毒相关的疾病或病理学（如 SARS）。制备的抗体，尤其是对它的目标抗原具有高特异性和高亲和性的抗体，被用于宿主的治疗并且通常由于其与目标的结合而产生效果。抗体治疗可以取消或抑制或干扰靶目标（如 ACE2）与其自然结合的内源配基（如 SARS-CoV 钉蛋白 S1 区域）的结合。在这一例

子中，抗体结合了靶目标并且标记出自然发生的配基的结合位点，由此通过抑制 ACE2 与 S1 的结合中和了 SARS-CoV。

通常本项发明的抗体的治疗有效剂量与治疗目标需要的数量相关。正如上面记载的那样，这可能是一种抗体和其目标抗原结合间的干扰，在特定情况下，干扰靶目标的作用。所需的治疗剂量将进一步依靠抗体与其特定抗原的亲合性结合，也将依靠治疗抗体在其他被注射宿主中的自由量的衰减速度。作为非限制性的例子，本项发明的抗体或其抗体片段的治疗性有效剂量的一般范围可以是大约 0.1mg/kg 体重至大约 50mg/kg 体重。一般的给药频率范围可以是，如从每天两次到每周一次。

本项发明中特异地结合 SARS-CoV 蛋白或其片段的抗体，与其他通过扫描分析鉴定的分子，能以药物的合成物的形式用于治疗 SARS-CoV-相关的疾病。制备这种合成物中包括的原则和注意事项,和成分选择的指导，提供如下，例如，在摘要中：The Science And Practice Of Pharmacy 19<sup>th</sup> ed. (Alfonso R.Gennaro,et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.,1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa.,1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol.4),1991,M. Dekker, New York.

当使用抗体片段时，对特异结合目标蛋白结合区域的最小抑制片段是首选的。例如，基于抗体的可变区域序列，可以设计保留结合目标蛋白质序列能力的多肽分子。这种多肽能被化学合成和/或通过 DNA 重组技术制备。(见，如，Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci.USA,90: 7889-7893 (1993))。配方也能容纳一种以上的活性合成物用于特殊情况的治疗，尤其是那些相互间无相反影响的有补充活性的物质。可选择性地，或额外地，合成物能

包括提高其作用的试剂，如，例，细胞毒素试剂，细胞因子，化学治疗试剂，或生长抑制试剂。这种分子在化合物中以一定剂量适合地存在从而达到期望的目的。

这些活性成分可以在制备时掺入微胶囊中，如通过凝聚技术或通过界面聚合，如羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚-(甲基异丁烯酸盐)微胶囊，个别地掺入胶质药剂的传递系统中(如，脂质体，白蛋白微球体，微乳液，毫微-粒子和毫微胶囊)或微乳液中。

在机体内注射的成分必须是消毒的。通过消毒过滤膜过滤可以容易地完成。

持续-释放制备物能被制备。持续-释放制备物的合适的例子包括含有抗体的固体疏水聚合体的半透性母体，这种母体以可塑形式存在，如薄膜，或微胶囊。持续-释放母体的例子包括聚酯，水凝胶(如，聚-(2-羟乙基-异丁烯酸盐)或聚(乙烯醇)，聚交酯(U.S.Pat. No.3773919)，L-谷氨酸和 $\gamma$ 乙烷基-L-谷氨酸的共聚物，非降解的乙烯基-乙烯基醋酸盐，可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮丙瑞林醋酸纤维组成的可注射的微球体)，和聚-D-3-羟基丁酸。而聚合体如乙烯基-乙烯基醋酸盐和乳酸-羟基乙酸可确保分子的释放超过100天，某些水凝胶释放蛋白质的时间更短。

属于本发明的抗体可以作为药剂用于测定样本中SARS-CoV(或其蛋白或蛋白片段)的存在情况。更适宜地，抗体包括了检测标签。抗体可以是多克隆的，更适宜地，为单克隆的。可以使用完整的抗体，或其片段(例如， $F_{ab}$ , scFv, 或  $F_{(ab)_2}$ )。术语“标签”，指探针或抗体，包括通过连接(例如，物理连接)检测底物至探针或抗体从而直接标记探针或抗体，也可以通过与其他直

接标记的试剂进行反应从而非直接标记探针或抗体。非直接标记的例子包括用荧光-标记的二抗测定一抗和对 DNA 探针进行末端生物素标记使其可以被荧光素-标记的链霉亲和素检测。术语“生物样本”包括从病人中分离的组织，细胞和生物体液，以及存在于病人中的组织，细胞和生物体液。因此，使用的术语“生物样本”包括，血液和血液中的部分或成分，包括血清，血浆，或淋巴。因此，本发明的测定方法可以用于在体外和体内试验中检测生物样本中的 mRNA，蛋白或基因组 DNA。例如，mRNA 体外测定技术包括 Northern 杂交和原位杂交。蛋白质体外测定技术包括酶联免疫反应 (ELISAs)，Western 分析，免疫沉淀，和免疫荧光。基因组 DNA 体外测定技术包括 Southern 杂交。免疫分析操作程序叙述于，例如“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, J.R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1985。此外，测定蛋白质的体内技术包括将标记抗-分析物蛋白的抗体引入受者体内。例如，抗体可以标记放射活性标记物，其在体内的存在和定位可以通过标准成像技术检测。

### 药物组合物

本发明的抗体或药剂（也指“活性成分”），和其派生物，片段，类似物和同源物，可以组合成适合于给药的药物组合物。这些组合物典型地包括抗体或药剂和药物可接受载体。这里使用的术语“药物可接受载体”包括与药物给药相容的任何和所有溶剂，分散剂，包被物，抗细菌和抗真菌药剂，等渗和缓释剂，及其类似物。合适的载体在 Remington's Pharmaceutical Sciences 最新版中的标准参考文件中有所叙述，其通过在此引述而全部合并于本

文。合适的载体或稀释液例子包括，但不局限于，水，盐溶液，ringer's 液，葡萄糖溶液，和 5% 人血清白蛋白。也可以使用脂质体和疏-水介质如不挥发油。药物活性物质的介质和药剂的使用在本领域中是熟知的。除了那些对于活性成分不相容的常规介质或试剂以外，其在成分中的使用都可以达到预期效果。补充活性成分也可以整合入合成物中。

本发明的药物组合物按照其给药途径被制备成合适的形式。给药途径的例子包括注射，例如静脉内，皮层内，皮下，口服（例如，吸入），透皮（例如，局部的），透粘膜，和直肠给药。用于注射用，皮层的，或皮下的溶液或悬液可以包括以下成分：无菌稀释液如注射用水，盐溶液，不挥发油，聚乙二醇，甘油，丙二醇或其他合成溶剂；抗细菌药剂如苯甲醇或甲基对羟苯甲酸；抗真菌药剂如维生素 C 或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸（EDTA）；缓冲液如醋酸盐，柠檬酸盐或磷酸盐，调节渗透压的药剂如氯化钠或葡萄糖。PH 可以用酸或碱调节，如盐酸或氢氧化钠。注射用药物可以制备于安瓿瓶中，可任意使用的注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

适合注射使用的药物成分包括消毒的水相溶液（水溶性的）或用于临时制备无菌注射溶液或分散剂的悬浮剂和无菌粉剂。对静脉内注射来说，合适的载体包括生理盐水，细菌抑制水剂，Cremophor EL<sup>TM</sup>（BASF,Parsippany, N.J.）或磷酸盐缓冲剂（PBS）。在所有情况下，成分必须是消毒的并具在注射器中的良好流动性。在制造和存储条件下，它必须是稳定的并且必须被保存在没有微生物如细菌和真菌污染的条件下。载体可以是溶剂或悬浮剂包括如，水，乙醇，多羟基化合物（如，丙三醇，丙烯乙二醇，和聚乙烯乙二醇，及类似物），和合适的其中的混合物。通过使用如卵磷脂作为外壳，或在悬浮情况下通过维持所需微粒的大小

和使用表面活性剂可维持适当的流动性。通过各种抗细菌的和抗真菌的药剂，如对羧苯甲酸，氯丁醇，苯酚，抗坏血酸维生素，硫柳汞及类似物能阻止微生物的活性。在许多情况下，若能在成分中包括等渗的药剂如，糖，多元醇如甘露醇，山梨(糖)醇，氯化钠，情况将变得更好。可通过在成分中包括一种延迟吸收的药剂如，铝，单硬脂酸盐和凝胶延长注射成分的吸收。

通过所需剂量的活性成分与上面列举的，所需的，适当的单一或结合溶剂混合后，过滤杀菌，能制备消毒的注射溶液。通常，将活性成分装入包括上面列举的基本悬浮媒介和其他以上所提的所需成分的容器，可以制备悬浮剂。制备无菌注射溶液的无菌粉剂的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其可产生活性成分粉剂和从先前的无菌过滤溶液中额外预期得到的成分。

口服成分通常包括无活性的稀释液或可食用的载体。它们可以被包裹在凝胶胶囊中或压缩制成片剂。为了口服治疗的目的，活性成分能与赋形剂合成一体并且以药片，片剂，或胶囊的形式被使用。口服成分也能用流动的载体制备作为漱口水使用，在流动的载体中的成分通过口服，喷射，吐出或吞下被应用。制药学上兼容的结合药剂，和/或辅佐的材料能作为成分的一部分被包括。药片，药丸，胶囊，片剂及类似物能包括下列成分，或有相似特性的化合物：粘合剂如微晶纤维素，黄蓍胶或凝胶；赋形剂如淀粉或乳糖，分裂药剂如褐藻酸，Primogel，玉米淀粉；滑润剂如硬脂酸镁或 sterotes；助流剂如胶质的二氧化硅；甜味剂如蔗糖或糖精；或调味剂如薄荷油，甲基水杨酸盐，或橙味。

对于吸入给药，化合物以包括合适的推进器的压力容器或分配器形成的气雾喷射的形式输送，例如，如二氧化碳气体，或喷雾器。

通过跨粘膜或跨皮肤的方式也能进行系统给药。对于跨粘膜或跨皮肤的注射，适于渗透屏障的渗透剂将被使用。这些渗透剂通常在本领域中是熟知的，并且包括，例如，对于跨粘膜注射，有去垢剂，胆汁盐，和梭链孢酸派生物。通过使用鼻喷雾或栓剂可进行跨粘膜给药。对于跨皮肤给药，如领域中通常所知的，活性化合物被配制成油膏，药膏，凝胶体，或面霜中。

化合物能以栓剂的形式（如，以传统的栓剂为基础如，可可油和其他甘油酯）或直肠给药缓释灌肠剂被制备。

在一实施方案中，活性成分与载体一起被制备将保护化合物不会从体内快速除去，如，被控制的释放形式，包括灌输和微胶囊输送系统。能使用生物分解的，生物适合的聚合体，如，乙烯乙烯醋酸盐，聚酐，聚乙醇酸，胶原质，聚原酸酯，和聚乳酸。制备这种形式的方法在这领域的技术人员中是显而易见的。这些材料可以通过商业途径获得如 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 脂质体悬浮（包括针对效应细胞的脂质体，其带有针对病毒抗原的单克隆抗体）也可以用于药物可接受的载体。这些都可以根据本领域中的技术人员所知的方法制备，例如，U.S. Patent No. 4522811 中所描述。

将口服或注射成分制备成剂量单位形式可便于给药并使剂量均一化。这里使用的剂量单位形式指物理分离的单位，其适合于所治疗的个体的单一用药；每一个单位包括联合了所需药物载体的可达到预期治疗效果的活性成分的预测数量。此方面的剂量单位形式的特性限定并依赖于活性成分的唯一特性和将获得的特别治疗效果，以及如治疗个体的活性成分的化合物的限制性。

药物组合物可以与使用说明书一起包括在容器，包装，或分配器中。

## 筛选方法

本发明提供了鉴定调控子，例如，调控或干扰 SARS-CoV 与 SARS-CoV 受体 ACE2 结合的候选或试验化合物或药剂（例如，多肽，拟肽，小分子或其他药物）的方法（这里也指“筛选方法”）。也提供了鉴定用于治疗 SARS 感染的化合物的方法。本发明还包括用这里所述筛选方法鉴定的化合物。

例如，本发明提供筛选候选或试验化合物的方法，其可以调节 SARS-CoV 与受体 ACE2 间的相互作用。本发明的试验化合物可以通过本领域中的组合库中大量方法中的任何一种获得，包括：生物文库；空间定位并行固相或液相噬菌体文库；需要去卷积的合成文库方法；“one-bead one-compound”文库方法；和运用亲和色谱选择的合成文库方法。生物文库方法对于多肽文库具有限制性，而其他 4 种方法对于多肽，化合物的非-多肽低聚体或小分子文库是适合的（见，例如，Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12:145）。

这里使用的“小分子”，指分子量小于 5kD，更适宜地，小于 4kD 的成分。小分子可以是，例如，核酸，多肽，聚肽，拟肽，碳水化合物，脂或其他有机或无机分子。化学文库和/或生物矩阵，如真菌，细菌，或海藻提取物，在本领域中是熟知的并可以由本发明中的任何方法进行筛选。

以下文献中可以找到合成分子文库的示例方法，例如：DeWitt, et al., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb, et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho, et al., 1993. *Science* 261:1303; Carrell, et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell, et al.,

1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and Gallop, et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233.

化合物的文库可以以溶液的形式存在（见，如，Houghten, 1992. *Biotechniques* 13:412-421），或以珠粒形式存在（见，Lam, 1991. *Nature* 354:82-84），或以碎片形式存在（见 Fodor, 1993. *Nature* 364:555-556），细菌（见 U.S. Patent No. 5223409），孢子（见 U.S. Patent 5233409），质粒（见 Cull, et al., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869）或以噬菌体存在（见（Scott and Smith, 1990. *Science* 149:386-390; Devlin, 1990. *Science* 249:404-406; Cwirla, et al., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222:301-310; and U.S. Patent No. 5233409）。

在一个实施方案中，候选化合物被介导入抗体-抗原复合物并且测定候选化合物是否使抗体-抗原复合物分裂，若这一复合物分裂则表明候选化合物调节 SARS-CoV 和 ACE2 之间的相互作用。如，抗体可以是单克隆抗体 80R 并且抗原可以定位于 SARS-CoV 的 S 蛋白的 S1 区域。

在另一实施方案中，至少提供一种 SARS-CoV 蛋白，其暴露于至少一种中和单克隆抗体。抗体-抗原复合物的形式被探测，一种或更多候选化合物被介导入复合物中。在一种或更多候选化合物被介导进入后，若抗体-抗原复合物被分裂，则表明候选化合物对于治疗 SARS-CoV 相关的疾病或失调有效，例如 SARS。如，至少一种 SARS-CoV 蛋白可以作为 SARS-CoV 分子被提供，或在另一方面，至少一种 SARS-CoV 蛋白可以在受到 SARS-CoV 感染的细胞中被提供。例如，细胞可以是哺乳动物的器官细胞或酵母细胞。

化合物干扰或分裂抗体-抗原复合物的能力可以通过测定完成,如通过将试验化合物与放射性同位素或酶标耦合,测定在复合物中的标记化合物,从而测定试验化合物与抗原或其生物-活性部分的结合。如,试验化合物能直接或间接被 $^{125}\text{I}$ , $^{35}\text{S}$ , $^{14}\text{C}$ ,或 $^3\text{H}$ 标记,通过直接计量放射发射或通过闪烁计数测定放射性同位素。选择性地,试验化合物能被如,辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,或荧光素酶标记,并且通过适当的底物到产物的转化的测定可以测定酶标的结果。

在一实施方案中,此方法包括将抗体-抗原复合物与试验化合物接触,并测定试验化合物与抗原的相互作用或干扰抗体-抗原复合物形成的能力。在这方面,测定试验化合物与抗原相互作用和/或干扰抗体-抗原复合物的能力,包括测定试验化合物对比于抗体,优先结合抗原或其生物活性部分的能力。

在另一实施方案中,此分析包括将抗体-抗原复合物和试验化合物的接触,并测定试验化合物调节抗体-抗原复合物的能力。测定试验化合物调节抗体-抗原复合物的能力可通过如,在试验化合物存在下,测定抗原与抗体的结合或相互作用来完成。

在本领域的普通技术人员应该认识到,在这里揭示的任何筛选方法中,抗体可以是 SARS-CoV 中和抗体,如单克隆抗体 80R。此外,抗原可以是 SARS-CoV 蛋白,或其部分(如 SARS-CoV 蛋白的 S1 区域)。这里描述的任何分析,候选混合物对 80R 单克隆抗体和 SARS-CoV 钉蛋白 S1 区域结合的干扰能力表明,候选混合物可以干扰或调节 SARS-CoV 与 ACE2 受体的结合。而且,由于 S1 蛋白与 ACE2 的结合是 SARS-CoV 进入细胞的因素(见 Li et al., Nature 426:450-54(2003),该文献通过在此引述而全部合并于本文),这种候选化合物也有利于治疗 SARS-CoV 相关疾病或失调如, SARS。

这里揭示的筛选方法可以是基于-细胞的分析或非-细胞分析。本项发明的细胞自由分析可用可溶的形式或 SARS-CoV 蛋白和其片段的膜骨架形式进行。在包括 SARS-CoV 蛋白的膜骨架形式的细胞自由分析情况下，可以使用一种增溶剂使膜骨架形式的蛋白保持在溶液中。这样的增溶剂的例子包括非-离子去垢剂，如， n-octylglucoside, n-dodecylglucoside ,n-dodecylmaltoside, octanoyl-N- methylglucamide, decanoyl -N- methylglucamide, Triton X-100, Triton X-114, Thesit, Isotridecypoly(ethylene glycol ether)<sub>n</sub>, N-dodecyl-N,N-dimethyl-3- ammonio-1-propane sulfonate, 3-(3-cholamidopropyl) dimethylamminiol -1-propane sulfonate (CHAPS), 或 3- (3\_cholamidopropyl) dimethylamminiol -2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO)。

在更多的实施方案中，将抗体或抗原固定不动，介导候选化合物进入后，可使其一或两者的复合物更容易地与非复合物分离，以及进行自动化分析检测。在存在或不存在候选化合物的情况下，对抗体-抗原复合物的观察能在包括反应物的任何容器中完成。例如，微量滴定板，试管，微量-离心管。在一实施方案中，可以通过增加一个区域提供融合蛋白，使一种或两种蛋白结合于矩阵。如，GST-抗体融合蛋白或 GST-抗原融合蛋白能被谷胱甘肽琼脂糖珠（Sigma Chemical ,St. Louis,MO）或 glutathione derivatized microtiter plates 吸收，然后与测试混合物结合，在有利于复合物形成的条件下（如，生理盐水的浓度和 PH）孵育混合物。随着孵育，珠或微量滴定板将被洗脱以移去未结合的混合物，固定凝胶矩阵，直接或间接测定复合物。选择性地，复合物可以从矩阵分离，并且用标准技术可以测定抗体-抗原复合物形成的水平。

其他在矩阵上固定蛋白质的技术也能被用于本项发明的筛选分析。如，抗体（80R）或抗原（SARS-CoV 的 S1 蛋白质）能

用生物素和链霉亲和素的连接固定。生物素标记抗体或抗原分子能在这领域熟知的技术(如, 生物素标记试剂盒, Pierce Chemicals, Rockford, III) 由 NHS-生物素 (N-羟基-琥珀酰亚胺) 制备, 并被固定在链霉亲和素-包被的 96 孔板 (Pierce Chemical)。选择性地, 其他与抗体或重要抗原反应, 但并不干扰重要抗体-抗原复合物形成的抗体, 可以加入板中的孔内, 并且未结合的抗体或抗原通过抗体连接被捕获于孔中。这种复合物的测定方法, 除了上面对 GST-固定的复合物的描述, 还包括使用与抗体或抗原反应的抗体对复合物进行免疫测定。

本发明进一步包括通过任何上述的筛选方法对新药剂进行鉴定及这里所述的在治疗中的应用。

### 诊断分析

通过合适的分析如, 传统类型的免疫分析, 目前发明的抗体能被测定。例如, 当 SARS-CoV 蛋白 (如 S1, S2, 和/或 M) 或其片段附着在固相时, 三明治分析能被执行。孵育充足的时间以允许样本中的抗体结合固相中的固定多肽。在第一次孵育后, 固相与样本分离。洗脱固相以去除未结合的材料和干扰物质如可能存在于样本中的非特异性蛋白质。包括结合固定多肽的抗体 (如, 单克隆抗体 80R) 的固相随之与第二种, 标记抗体或连接生物素或生物素蛋白药剂的抗体孵育。二抗可以是另一种抗 SARS-CoV 抗体或其他抗体。抗体标记是这一领域熟知的, 包括放射性核, 酶 (如马来酸盐脱氢酶, 辣根过氧化物酶, 葡萄糖氧化酶, 过氧化氢酶), 氟 (荧光素 异硫氰酸盐, 若丹明, 藻青蛋白, fluorescamine), 生物素和类似物。标记抗体与固相一起孵育并且结合固相的标记可以被测定。这些以及其他的免疫分析能由这一领域的普通技术人员完成。

测定生物样本中冠状病毒（如 SARS-CoV）存在与否的示范方法，包括从测试对象中获得生物样本并且将生物样本与标记的单克隆或 scFv 抗体相接触，根据发明这种冠状病毒的存在将在生物样本中被测定。

正如这里所用的，涉及探针或抗体的术语“标记的”包括通过连接（如物理连接）一种可探测物质到探针或抗体上的探针或抗体的直接标记，和通过与直接标记的另一种反应物反应，从而对探针或抗体进行间接标记。间接标记的例子包括通过荧光标记的链霉亲和素测定，用荧光标记的二抗和末端标记生物素的 DNA 探针测定主要抗体。术语“生物样本”包括从宿主分离的组织，细胞和生物体液，和存在于宿主内的组织，细胞和体液。就是说，本项发明的测定方法能在体外或在体内测定生物样本中的 SARS-CoV。如，在体外测定 SARS-CoV 的技术包括酶联免疫吸收分析（ELISAs），Western blots，免疫沉淀反应，和荧光免疫检验法。进一步，在体内测定 SARS-CoV 的技术包括介导标记的抗 SARS-CoV 抗体进入宿主。如，抗体被放射性标记，通过标准的成像技术测定抗体在宿主内的存在性与位置。

在某一方面，生物样本包括来自测试宿主的蛋白质分子。首选的生物样本是从宿主通过传统方式分离的外周血白细胞样本。

发明也包括测定生物样本中是否存在 SARS-CoV 的试剂盒。试剂盒包括：能测定生物样本中 SARS-CoV（如，抗 SARS-CoV scFc 或单克隆抗体）的标记混合物和试剂；测定样本中 SARS-CoV 数量的方法；和通过标准比较样本中 SARS-CoV 数量的方法。混合物和试剂被包装在合适的容器中。试剂盒可以进一步包括使用试剂盒测定样本中 SARS-CoV 的说明书。

## 被动免疫

被动免疫已经被证明对病毒疾病的阻止和治疗策略是有效和安全的。(见 Keller et al., Clin.Microbiol.Rev.13:602-14(2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20:114(2002);Shibata et al., Nat. Med. 5:204-10(1999);and Igarashi et al., Nat. Med. 5:211- 16(1999),每一篇文献都通过在此引述而全文合并于本文)。使用中和人单克隆抗体的被动免疫,可以为 SARS 的紧急预防和治疗提供一种直接的治疗策略,尽管可供选则的并且耗时的疫苗和新药的发展正在进行中。对其他冠状病毒的研究已经表明被动注射中和抗体能阻止疾病(见 Klob et al., J. Virol. 75: 2803 (2001),并且可能引发抗线性的(Godet et al., J. Virol. 68: 8008 (1994); Talbot et al., J.Virol. 62: 3032 (1988);)和构象的(见 Yu et al., Virology 271:182(2000))冠状病毒钉蛋白,和/或膜骨架蛋白表位的中和抗体。(见 Kida et al., Arch. Virol. 75: 2803 (2001) and Vennema et al., Virology 181:327(1991)。在一些情况下,这些中和抗体也已经被显示授予保护。(见 Talbot et al.,1988; Koo et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 96(14):7774-79(1999); and Yu et al., 2000)。

而且,有报道在康复期病人中具有高滴定度的 SARS-CoV IgG 保护性抗体。同样的,如果给予来源于先前感染病人的免疫血清, SARS 病人则表现出临床上的改善。(见 Pearson et al., Nature 424:121\_26(2003); Li et al.,N. Engl.J. Med. 349:508-9(2003)。这些观察表明,人单克隆抗体的被动免疫能用于治疗 SARS。(见 Holmes, J.Clin.Invest. 111:1605-9(2003)。

正如在前述例 9 中所示,在人类中获得成功治疗的剂量下,被动转移 80R IgG1 能完全地阻止老鼠肺组织中 SARS-CoV 的复制从而起到保护作用。MAb 80R 潜在的病毒-中和活性可能是由于在 80R 表位和 S 蛋白的 ACE2 受体-结合域之间的重叠。因为

RNA 病毒的高突变率，可能出现 SARS-like-CoV 的基因变异，有必要对基因型进行监控，使基于中和抗体反应的预防策略能有效地使用。

基于其他冠状病毒的试验，这一领域的普通技术人员应该认识到，亚单位疫苗能期望引发抗 SARS 的中和抗体。这样，发展中性和人单克隆抗体和基于 SARS CoV 钉蛋白和膜蛋白表位的亚单位疫苗将在治疗方法中扮演重要角色。

与传统免疫原相比亚单位疫苗提供了潜在地显著优越性。它们避免了常规灭活或减毒全-病原体疫苗的制备，分配，和输送中的内在的安全难题。而且，它们能被理性地设计成仅仅包括验证了的保护表位，因此避免了抑制性 T 表位（见 Steward et al., *J.Virol.* 69:7668(1995)）或 B 表位，而其可以通过引入无效的，非-保护应答扰乱免疫系统。（如，“诱饵”表位）。（见 Garrity et al., 159:279(1997)）。

对 SARS 至关重要的是，亚单位疫苗可以解决在一些其他冠状病毒中出现的抗体-依赖疾病加重的问题（见 De Groot, *Vaccine* 21: 4095-104(2003)，其也可以是表位依靠的（见 Vennema et al., *Virology* 181:327(1991)和 Corapi et al., *J. Virol.* 69:2858(1995)）。亚单位疫苗也能提供潜在的解决问题的方法，包括经常影响疫苗发展的病原体变异和超突变。需要在亚单位疫苗中包括仅来源于不变的，保守的病原体抗原结构区域的表位，从而，保证了对个人和人群的长期免疫。选择性地，为了模仿高突变表位的变异范围，代表抗原多重变异体的多重多肽能被装配。（见 Taboga et al., *J.Virol.* 71:2606(1997)）。最后，亚单位疫苗能更便宜地制造并且比许多其他疫苗形式更加稳定。

而且,这一领域的普通技术人员应该认识到,对许多病毒,传播途径,和动物模型来说,在体外的抗体中和活性和在体内的保护之间存在良好的相关性(见 Burton, Natl. Rev. Immunol. 2:706-13 (2002); Parren et al., Adv. Immunol. 77:195-262 (2001))。这里显示的在体外和在体内的数据表明,人 80R 单克隆抗体能在动物体内进一步发展和试验,以确定其作为潜在的进入抑制子用于 SARS 病毒紧急预防和治疗的临床效用。因此,包括 80R 表位的 SARS-CoV S 蛋白的 180 氨基酸区域是 S 蛋白重要核心区域,其对应的亚单位疫苗能引发潜在的中和抗体反应。

### 疫苗接种中的抗原-Ig 嵌合体

自从第一种抗体作为骨架用于免疫系统的抗原决定子的有效递呈已经有十年多的时间(见 Zanetti, Nature 355:476-77(1992); Zaghouni et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35(1995))。当一种多肽包括于 IgG 分子的整体部分时(如,这里描述的 80R IgG1 单克隆抗体),多肽表位的抗原性和免疫原性相比于自由多肽将大大提高。这种提高可能归因于仿效它们自然结构的抗原-IgG 嵌合体的更长的半衰期,更好的表达和强制性的构造。

而且,使用抗原-IgG 嵌合体的额外好处是无论是可变区还是抗原-IgG 嵌合体的 Fc 区域能作为抗原-表达细胞(APCs)专业的靶标。目前,重组体 Igs 已经产生,重链可变基因( $V_H$ )的补充-决定区域(CDRs)被各种 B 或 T 细胞识别的抗原多肽取代。这种抗原-Ig 嵌合体已经被用于引发体液和细胞免疫反应(见 Bona et al., Immunol. Today 19:126-33(1998))。

带有连接到 CDR3 环的特异表位的嵌合体已经被用于引发针对 HIV-1gp120 V3-环或人 CD4 受体的第一胞外区域(D1)的体液反应。(见 Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11683-87

1993 ) ; Aghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35(1995)). 免疫血清能通过 HIV-1MN (抗-gp120 V3C) 或抑制合胞体形成 (抗-CD4-D1) 阻止 CD4 supT1 细胞的感染。CDR2 和 CDR 能被多肽表位同时取代, 并且插入多肽的长度能达到 19 个氨基酸。

选择性地, 其中一组已经发展了 “troybody”策略, 其中多肽抗原表达于嵌合体 Ig 恒定区域和可变区域的环型区域, 并且能用于针对存在于 B-细胞表面的或包括 B-细胞, 树枝状细胞(DC) 和巨噬细胞的专业 APCs 上的 MHC 类 II 分子上的 IgD(见 Lunde et al., Biochem. Soc. Trans. 30: 500-6 (2002))。

一种抗原-Ig 嵌合体能由抗原与 IgG 分子的 Fc 部分的直接融合制成。You et al., Cancer Res. 61:3704-11(2001)能获得所有特异免疫应答的种类, 包括用这种方法制成的高水平的肝炎 B 病毒核心抗原的抗体。

### DNA 接种疫苗

DNA 疫苗是稳定的, 能提供抗原自然加工的机会, 也能介导长期应答。尽管作为一种非常吸引人的免疫策略, DNA 疫苗经常只有非常有限的力量介导免疫反应。注射的 DNA 通过专业 APCs, 如树枝状的细胞 (DCs) 的有限吸收, 可能是这种限制性的主要原因。结合抗原-Ig 嵌合体疫苗, 作为基于提高 APC 抗原表达的有希望的新 DNA 疫苗策略已经被报道。(见 Casares, et al., Viral Immunol. 10:129-36(1997); Gerloni et al., Nat. Biotech. 15:876-81(1997); Gerloni et al., DNA Cell Biol. 16:611-25(1997); You et al., Cancer Res. 61:3704-11(2001), 其有利于 DCs 表面的 Fc 受体 (Fc  $\gamma$  Rs) 的存在。

生产一种编码抗原 (Ag) - Ig 嵌合体的 DNA 疫苗是可能的。针对免疫反应, Ag- Ig 融合蛋白能由吸收 DNA 分子的细胞表达和分泌。被分泌的 Ag- Ig 融合蛋白, 其可引发 B-细胞反应, 能通过 Fc 片段和在 DC 表面的 Fc $\gamma$ Rs 相互作用被捕捉和内在化, 其将有效促进抗原的表达并大大提高抗原-特异免疫反应。应用相同的原理, 编码带有抗 MHC-II 特异 scFv 区域功能性的基因的抗原- Ig 嵌合体的 DNA 也能针对所有三种 APCs 类型的免疫原。如果需要, 使用在体外产生的相同的蛋白质抗原, 免疫反应能被进一步地加强。(如, “原初和加强”)。用这种策略, 通过肌肉注射 DNA 疫苗, 完成针对流行性感冒感染的特异细胞和体液免疫反应 (见 Casares et al. , *Viral. Immunol.* 10:129-36(1997))。

### 疫苗组合物

这里提供了治疗的或预防疾病的组合物, 通常包括一种或更多种单克隆抗体或 scFv 和其相组合的混合物。预防疾病的疫苗能用于阻止 SARS-CoV 的感染, 治疗性的疫苗则在 SARS-CoV 感染后用于治疗个体。预防疾病的使用包括在接种疫苗的宿主内增加 SARS-CoV 抗体的浓度。在这种方式中, 在接触 SARS 的高度危险个体中能被给予被动的 SARS-CoV 免疫。

这些疫苗组合物能与辅助免疫调整试剂一起被注射。例如, 细胞因子, 淋巴因子, 和炎症趋化因子, 包括但非限制于, IL-2, 修饰的 IL-2(Cys125 $\rightarrow$ Ser125), GM-CSF, IL-12,  $\gamma$ -干扰素, IP-10, MIP1 $\beta$ , 和 RANTES。

### 对具有疫苗潜力的抗原蛋白片段 (APFs) 进行评估

针对体液免疫的疫苗候选者必须满足至少三种标准才能成功: 必须激起强烈的抗体反应 (“免疫原性”); 它激发的一种抗

体重要片段必须与病源体具有交叉反应(“免疫原适应性”);和它激发的抗体必须是保护性的。尽管通过佐剂或载体,免疫原性通常能被提高,但是免疫原适应性和保护能力(如中和作为例证)是抗原的本质特征,这将最终决定抗原作为疫苗成分的成功性。

### 免疫原适应性的评估

“免疫原适应性”是由抗原引发的具有与病原体交叉反应的抗体片段(见 Matthews et al., J. Immunol. 169: 837 (2002))。它不同于免疫原性,它由通过抗原引发的所有抗体的滴度测定,包括不与病原体起交叉反应的那些抗体。不适当的免疫原适应性可能与目前多肽疫苗数据令人失望的追踪记录有关。高亲和结合抗体并且激起高抗体滴度量的多肽通常缺乏足够的免疫原适应性,并且,因此,它们未能作为潜在疫苗的成分。因此,将免疫原适应性作为选择 SARS 疫苗候选者的标准之一是重要的。

对于较差的免疫原适应性的普遍解释是大多数短肽的构象适应性。特别的,灵活的多肽可以很好地结合来自于病人的抗体,并且在宿主中引起充足的抗体滴度量。但是,如果多肽有庞大的构象库,那么宿主中诱导的优势抗体就不可能与完整病原体相应表位起交叉反应。

正如短肽一样,一些 APFs 也具有高度灵活性,并且,因此不可能成为疫苗成分。最具免疫原适应性的 APFs 本质上可能由限制在整个蛋白质外的,自我折叠的蛋白亚区域组成。

因为免疫原适应性是 APFs 的重要特性,并且不属于免疫系统反应,因此免疫原适应性能在动物中被评估(如,在鼠中),甚至 APF 能在人类中被评估。

由 APF 获得的免疫原适应性通过纯化的钉或膜骨架蛋白的抗-APF 免疫血清的免疫吸收被评估，类似的程序在 Matthews et al., J.Immunol.169:837(2002)中被描述。从被免疫的老鼠中收集的免疫血清中纯化 IgG。纯化的，生物素标记钉和膜骨架蛋白（适当地，依靠于特异的用于免疫老鼠的 APF）与老鼠 IgG 相混合并被孵育。加入足够数量的链霉亲和素-包被的琼脂糖凝胶以捕捉所有结合 IgG 的生物素标记钉和膜骨架蛋白。在小型离心机下，以 13000rpm 的速度离心，移去链霉亲和素-包被的凝胶，留下经钉或膜骨架蛋白的抗体筛选过的 IgG。以相同的方式平行执行模拟免疫吸收，除此之外，生物素标记 BSA 代替 SARS 蛋白作为模拟吸收剂。

为了测试 APFs 的免疫原适应性，针对免疫 APF，钉-或膜骨架-吸收抗体和模拟-吸收抗体一起在 ELISA 中测定浓度。根据噬菌体显示 NPL 选择的 APFs 亲合力，这些 ELISAs 的抗原可以是纯化的 APF-GST 融合蛋白。对于来源于哺乳细胞的显示 NPL 的潜在糖基化的 APFs，这些 ELISAs 的抗原是由哺乳细胞分泌并且由蛋白质 A 纯化的 APF-Fc 融合蛋白。相比于模拟-吸收抗体，钉-或膜骨架-吸收抗体的抗-APF 滴定量的百分比的减少值，将提供 APF 的免疫原适应性的量度标准。

### 治疗方法

本项发明提供了在冠状病毒-相关疾病或失调的危险中，对病人进行预防和治疗的方式。这种疾病或失调，包括，但非限制性的如，SARS。

## 预防方法

在某一方面，发明提供了在病人中，通过给病人注射发明的单克隆抗体或 scFv 抗体或根据本项发明的方式鉴定的药剂，阻止冠状病毒-相关疾病或失调的方法。如，scFv 80R 和/或单克隆抗体 80R 可以以治疗有效剂量被注射。

处于冠状病毒-相关疾病或失调危险中的病人包括已经接触感染的病人或以其他方式已经接触到冠状病毒的病人。在出现冠状病毒-相关疾病或失调的症状特征迹象之前注射预防药剂，能够使疾病或失调被阻止或选择性地被延迟。

根据这里描述的扫描分析能决定适当的药剂。选择性地，或额外的，被注射的药剂是根据发明的方法鉴定的能中和 SARS 的 scFv 或单克隆抗体。

## 治疗方法

发明的另一方面是治疗病人的冠状病毒-相关疾病或失调的方法。在某一方面，方法包括给病人注射能中和冠状病毒的药剂（如，这里描述的通过扫描分析鉴定的药剂和/或根据发明的方法鉴定的 scFv 抗体或单克隆抗体）或药剂混合物使病人避免遭受疾病或失调。

下列例子进一步描述了发明，但并未限制权利要求书中描述的本发明的范围。

## 实施例

### 实施例 1: SARS-CoV S1 以及剪切 S1 的表达与纯化

融合了人 IgG1 的 Fc 区域(分别被命名为 S1-Ig,S1(327)-Ig 和 S1(264-672) -Ig) 的编码 SARS-CoV S 蛋白 S1 区域(残基 12-672), S1N-末端(残基 12-327)或 S1C-末端(残基 264-672)的质粒被转染进入 293T 细胞以获得短暂的表达。融合了 C9 的 C-末端(S1-C9)的编码 S1 区域的质粒(残基 12-672)也被转染入 293T 细胞以获得表达。标记 Ig 的蛋白质通过蛋白 A 琼脂糖被纯化。抗-C9 抗体 1D4(从国家细胞培养中心获得)与蛋白 A 琼脂糖相连并用于 S1-C9 的纯化。通过 SDS-PAGE 检测纯度并且通过蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度(Bio Rad, Hercules, CA)。

### 实施例 2 噬菌体文库的选择和噬菌体抗体的扫描

由 57 种未-免疫自愿者的 B-细胞构建的两种人类非-免疫 scFv 文库(总共有  $2.7 \times 10^{10}$  成员)用于筛选纯化的 S1-C9 的 scFv。从每一文库制备的  $5 \times 10^{11}$  pfu 噬菌体-scFv 被混合并且被介导入包被有 10ug S1-C9 的 Maxisorp 免疫管(Nunc, Naperville, IL)。非-特异吸收的噬菌体通过充分地洗脱被移去。特异结合的噬菌体通过 100mM 三乙胺被洗脱, 中和, 扩增并且用于进一步筛选, 如 Harrison et al., Methods. Enzymol. 267:83-109(1996)。

三轮筛选后, 随意挑取的噬菌体-scFv 单克隆用酶联免疫反应(ELISA)筛选特异结合 S1-C9 的成分。在 96 孔 Maxisorp 免疫板中每板加入 0.2ug S1-C9 或对照蛋白 HIV-1gp120-C9 和 BSA, 用 4% 脱脂牛奶封闭。在 2% 脱脂牛奶的 PBS 中加入噬菌体-scFv。通过加入连接 HRP 的鼠抗-M13 测定特异结合的噬菌体并且加入 TMB 底物显色。在 450nm 下测定吸收值。结合 S1-C9

的克隆的  $A_{450}$  值大于 1.0 则记录为阳性, 相反的, 阴性克隆的值小于 0.2。对于 S1-C9 特异结合克隆来说, 对重链 (VH) 和轻链 (VL) 可变区域的基因进行测序并且排列比较它们对应的氨基酸序列 (见图 1)。

### 实施例 3: scFv 以及全部人类 IgG 的表达和纯化

八种 S1-特异 scFv 的 VH 和 VL 基因片段 (6A, 8C, 12E, 26H, 27D, 80R, 91M 和 92N) 被克隆进入原核的表达载体。它们中的一些 (scFv, 6A, 80R, 91M 和 92N) 被克隆进入 pSyn1 载体 (见 Schier et al., Immunotechnology 1:73-81(1995); Bai et al., J. Biol. Chem. 278:1433-42(2003)), 在 E.Coli. XL1-Blue 中表达 (Stratagene, La Jolla, CA), 并从细胞周质部分中纯化。其他 (如 scFv 8C, 12E, 26H, 27D) 被克隆入 pET22b(+) 载体 (Novagen, Madison, WI), 在 E.Coli BL21(DE3) 中表达 (Novagen) 并从内容物中不溶成份中进行纯化。

所有 scFv s 带有 His-6 标签以便于通过金属螯合亲和层析 (IMAC) 纯化。从细胞周质部分中纯化的 scFv s 用 PBS 透析, 从不溶成份中纯化的 scFv s 在 PBS 透析之后再用 0.4ML-精氨酸缓冲液透析变性。通过 S1-C9 和 S1-Ig ELISA 验证纯化的可溶性 scFv s 的 S1-结合活性。兔抗-His-6 多克隆抗体 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) 和 HRP-标记的抗-兔 Ig (Pierce, Rockford, IL) 被用于检测 ELISA 中结合的 scFv s。

对于制备全部的人类 IgG1, scFv 的 VH 和 VL 基因片段分别亚克隆入人类 IgG1 kappa 轻链表达载体 TCAE5。(见 Reff et al., Blood 83:435-45(1994)。通过暂时转染, IgG1 在 293T 细胞中表达并由蛋白 A 琼脂糖亲和色谱纯化。

#### 实施例 4: 微量-中和试验

在 96 孔组织培养板中进行抗体预先系列稀释, 加入 ~37 噬斑形成单位 (pfu) 的 SARS-CoV (Urani 株), 混合物在 37°C 孵育 1 小时。随后, 每一个抗体/病毒混合物中加入 ~ $2 \times 10^5$  Vero E6 细胞, 板子置 37°C/5% CO<sub>2</sub> 孵育 3-4 天。为了观察结果, 板子用结晶紫-甲醛室温染色 1 小时 (0.013% 结晶紫, 2.5% 乙醇和溶于 0.01M 磷酸缓冲盐的 10% 甲醛)。重复该方法三次。

#### 实施例 5: 抗-S1 抗体进行合胞体抑制实验

293T 细胞, (较适宜地在 T75 瓶中生长至 30%), 用编码 SARS-CoV S 蛋白或受体 ACE2 的全长编码-适宜形式的质粒转染。转染 1 天后, 细胞用胰蛋白酶处理并在培养基中洗涤一次。这些 S 蛋白表达细胞预先分别与 0, 25, 50, 100nM 抗-S1 scFvs 或 IgG1 混合置于室温 10 分钟。然后, 这些细胞与表达 ACE2 的细胞以 1: 1 比例混合并被置于 24 孔板中。在抗体的存在下培养细胞。36 小时后, 观察合胞体并拍摄有代表性的图像。结果分别被显示在图 3 中。

#### 实施例 6: 通过 BIAcore 测定亲合力

通过表面等离子体共振 (BIAcore3000, Sweden), 分析纯化的 S1-Ig 中和抗体和 ACE2 受体的结合动力学和亲和性。运用 PH4.5, 10mM 醋酸钠缓冲溶液, 通过氨基结合试剂盒 (BIAcore), 纯化的 S1-Ig 通过氨基簇被共价固定至 CM5 传感器芯片。实验在 HBS-EP 缓冲液 10ul/min 流速下进行 (BIAcore)。在 PH2.0 下, 用 10mM 氨基乙酸-HCl 更新表面。在抗体或受体的不同摩尔浓度下, 测定结合动力学参数, 并用 BIA-评估软件评估。

### 实施例 7: 流式细胞计数分析抗体对 S1 结合 Vero E6 细胞的抑制作用

在 4℃ 下将 0, 5, 15, 或 30ug/ml 的 scFvs 与 40ul, 15ug/ml 的 S1-Ig 混合 1 小时。每种混合物被加入到 Vero E6 细胞 ( $2 \times 10^5$ ) 中, 并且在 4℃ 下孵育 1 小时。S1 (327) -Ig 作为 S1-Ig 的对照也与 Vero E6 细胞一起孵育。细胞用含有 0.5% BSA 和 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 PBS 洗涤 3 次。为了测定 S1-Ig 与 Vero E6 的结合, FITC-标记的山羊抗-人 IgG 被作为二抗并且在 4℃ 下被孵育 30 分钟。细胞如上被洗涤。用带有 CellQuest 软件的 Becton Dickinson FACScan 分析样本。

### 实施例 8: 放射-免疫沉淀反应分析抗体对 ACE2 与可溶性 S1 结合的抑制作用

将 1.5 ug 的 S1-Ig 与不同剂量的 (0.1, 0.5, 1.5, 4.5 ug) scFvs 混合并在 4℃ 下孵育 1 小时。可溶的 ACE2 在 293T 细胞中表达并且用 [<sup>35</sup>S]- 半胱氨酸和蛋氨酸 (NEN Life Science, Boston, MA) 代谢标记 24 小时。预混和的 S1-Ig 与 scFvs 或山羊抗-人 ACE2 多克隆抗体 (R & D system, Minneapolis, MN) 被加入至 100ul 的代谢标记的 ACE2 和蛋白 A 琼脂糖凝胶中并且在 4℃ 下孵育 1 小时。细胞用含有 0.25% NP<sub>40</sub> 和 0.01% SDS 的 PBS 洗脱 4 次。用还原 Lammlie 样本缓冲液, 100℃ 下, 洗涤结合蛋白 5 分钟。用 8% SDS-PAGE 分离蛋白质并且在 Kodak Biomax MR film 上显现放射自显图谱。

### 实施例 9：以老鼠 SARS 的免疫预防研究评估人 MAb 80R

所有老鼠研究由 NIH 动物福利和利用委员会认可并且在被认可的动物生物安全 3 级设备水平下操作，进入设备的人员佩戴动力空气净化呼吸器（3M HEPA AirMate, Saint Paul, MN）。

每个鼠笼装有 4 只 16 周大小的 BALB/c 鼠（见 Subbarao et al., J.Virol. 78:3572-77(2004)）。在接受抗体治疗前，老鼠用异氟醚轻度麻醉。第一天，对三组老鼠（每组 4 只）用三种不同剂量的 80R IgG 1（在 500ul PBS 中，80R IgG 1 的浓度分别为 500ug/ml, 100ug/ml 和 20ug/ml）进行腹膜内注射。对照组（每组 4 只）用 500ul 的 500ug/ml 的人 IgG 1 同型对照抗体注射，其缓冲液与 80R IgG 1 相同。一天后，对老鼠进行 SARS-CoV（Urbandi 株） $10^4$  50% 组织培养感染剂量（TCID<sub>50</sub>）鼻腔内感染，并且在两天后被杀死。摘取老鼠的肺使其均匀分布在含 10% w/v 悬浮液的 Leibovitz 15 培养基中。（Invitrogen, Carlsbad, CA）在 96 孔板单层培养的 Vero 细胞中测定病毒的滴度。

在对老鼠进行  $10^4$ （TCID<sub>50</sub>）鼻腔内感染前一天给 BALB/c 鼠进行 80R IgG 1 腹膜内注射，并且在两天后，测试肺组织的病毒滴定量。正如在表 3 中显示，最高 80R 剂量实验中（未稀释，250 ug/小鼠，约等于 12.5mg/kg 体重），4/4 小鼠病毒量出现大于 4 log 的减少（在实验限度之下），其中相等量的人 IgG 1 未有效果。在 50 ug/小鼠的剂量下，1/4 的小鼠显示了处于检测限度之下的病毒量的减少，而 3/4 的小鼠显示了接近 4 log 的病毒量的减少。在最低的剂量下（1: 25 稀释，10 ug/小鼠），4/4 小鼠变得易感而病毒量减少约 10 倍。

保护水平与注射了来源于先前感染小鼠康复期血清的动物中所观察到的结果相比较（见 subbarao et al., J Virol

78:3572-77(2004)。结果显示 80R 的预防治疗可以有效地阻止小鼠感染 SARS-CoV。

表 3: 被动给予抗-SARS 单克隆抗体 80R 对于小鼠下呼吸道中病毒复制的阻抑作用

被动给予 MAb <sup>1</sup> (500 μg/ml)	感染小鼠肺中病毒的复制 <sup>2</sup>		P 值 <sup>3</sup>
	# 未感染 / # 试验数	平均 (± SE) 病毒 滴度 <sup>4</sup>	
未稀释的对照 MAb	4/4	5.7 ± 0.1	
80R 未稀释	0/4	1.5 ± 0*	0.00000001
80R 1: 5 稀释	3/	2.0 ± 0.2	0.0000035
80R 1: 25 稀释	4/4	4.6 ± 0.26	0.007

1 指示稀释度的 500 μl MAb 通过腹膜内注射入受体小鼠。

2 10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>SARS-CoV 鼻腔内感染小鼠。

3 P 值指比较了 two-tailed student's t-test 中注射对照抗体的小鼠中病毒滴度。

4 病毒滴度以 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/gm 组织表示。

\* 未检测到病毒; 在 10% w/v 肺组织匀浆悬液中病毒感染检测的下限为 1.5 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/gm。

#### 实施例 10: 构建完整长度的钉, S1-Ig, 截短变异性, 和突变体

编码 S1 基因密码子-优化形式的质粒 (残基 12-672 被命名为 SARS-CoV S 蛋白的 S1 区域) 与人 IgG1 的 Fc 部分 (S1-Ig)

融合,已与先前描述。(见 Li et al., J. Virol. 78: 11429-33 (2004); Li et al., Nature 426: 450-54 (2003); Wong et al., J. BiolChem 279: 3197-201 (2004))。以 S1-Ig 为模板通过 PCR 制备编码 S1 残基 318-510, 327-510, 318-490 和截短变异体的质粒。

用 QuikChange 方式对位点直接突变制备 S1-Ig 突变体或 S1 (318-510)-Ig。通过回归 PCR 重新制备 S1 或 SARS-CoV Tor2(GenBank accession number:AY274119), GD03T(GenBank accession number:AY525636) 和 SARS-like-CoV SZ3 (GenBank accession number:AY304486) 的完整-长度钉基因。完整-长度的钉蛋白在羧基末端融合了 9 个氨基酸 (C9) 尾巴以进行免疫沉淀反应, (见 Li et al., Nature 426:450-54(2003); Moore et al., J Virol 78:10628-35(2004))。通过 DNA 测序验证所有的变异体和突变体。

#### 实施例 11: S1, 截短变异体和突变体的放射免疫沉淀反应

S1-Ig, S1(318-510)-Ig, 和其他截短变异体和突变体在 293T 细胞中被表达, 在培养上清中分泌并且用 [<sup>35</sup>S]-半胱氨酸和 [<sup>35</sup>S]-蛋氨酸代谢标记 24 小时 (NEN Life Science)。在 PBS 缓冲液中, 在 4℃ 下, 1μg 的 80R scFv 与 20ul 抗-His6 琼脂糖凝胶连接孵育 2 小时并且用 1mlPBS 洗涤 2 次。80R scFv 凝胶被用于沉淀 Fc-标记的 S1 或其派生物。在 4℃ 下, 500ul 包括代谢标记的 S1 或其派生物的培养上清与凝胶一起孵育 4 小时, 然后, 用包括 0.25% Nonidet P40 的 PBS 洗涤凝胶三次。完整-长度的 S 蛋白也在 293T 细胞中被表达并被代谢标记, 用 1% CHAPSO/PBS 中裂解。1μg80R IgG1 或抗-C9 抗体 1D4 被用于从细胞裂解液中沉淀 S 蛋白。蛋白在还原 Laemmli 样本缓冲液中于 100℃ 洗涤 5 分钟。蛋白经 10% SDS/PAGE 电泳, 成像显示, Imagequant 软件定量分析。

## 通过联合 ACE2 受体结合区域进行 80R 中和测定

80R scFv-联合琼脂糖和蛋白 A 琼脂糖被单独地用于代谢标记 Fc-标记的可溶性 S1 截断的沉淀反应。将 80R scFv 沉淀的 S1 Ig 蛋白量与蛋白-A 沉淀的蛋白量标准化。如图 9A 所示, 不同变异体间都显示相似的蛋白量, 如蛋白 A 沉淀所示。80R scFv 沉淀 S1 193-aa 片段(318-510)-Ig 的效果与蛋白 A 相似。然而, 在相似的条件, 80R scFv 不沉淀 S1 更小的截断(318-490), 并且其沉淀 S1(327-510) 的量只有蛋白 A 沉淀量的 5%。在运用这些变异体进行 ACE2 沉淀研究中发现同样的结果。

这些数据显示 80R 中和决定簇和 ACE2 受体结合区域位于 S 蛋白上相同的区域, 特异地, 位于残基 318 和 510 之间。N-末端和 C-末端截短的变异体(318-490 和 327-510) 都失去了 80R-结合活性, 揭示 S1 N-末端和 C-末端(318 至 510) 上的某些残基直接对此区域与 80R 的结合或对于抗体-结合区域的正确折叠起作用。

更小的 Fc-标记的 S1 N-末端和 C-末端(318 至 510) 截短变异体被制备, 以验证单克隆抗体 80R 上更小的结合区域。如图 9A 所示, 321-503 变异体与 S1(318-510) 表达相似并且显示了与 S1(318-510) 相同的结合活性。变异体 321-500 表达效果不佳并且不能检测到 80R 的结合活性。然而, 变异体 324-503 的 80R 结合活性与 S1(318-510) 相似, 虽然其表达量有较大的减少。因此, 最小的 80R 结合区域位于氨基酸 324-503 之间。

鉴定 S1 蛋白 ACE2 受体-结合区域上对于 80R 结合的重要氨基酸

在氨基酸 318 至 510 之间的一些酸性残基（谷氨酸 452 和）天门冬氨酸 454, 463 和 480）先前已经单独地替换成碱性残基以试验其与 ACE2 结合的效果。结果显示 E452 和 D454 单独地对于 S1 与 ACE2 的相互作用是至关重要的。D463A 替换导致 ACE2 结合的减弱, 但 D480A 替换没有产生影响。(见 Wong et al., J Biol chem 279:3197-201(2004))。

这些点-替换变异体被用于测试与 80R 抗体的结合。特异地, 在 S1(318-510)-Ig 和全长 S1-Ig 中它们都单独地被替换为丙氨酸。蛋白 A 和 80R-scFv-连接的琼脂被用于沉淀代谢标记的 S1(318-510)-Ig, S1-Ig 和其变异体。80R-scFv 沉淀 S1(318-510)-Ig 或 S1-Ig 的数量与蛋白 A 沉淀 S1(318-510)-Ig 或 S1-Ig 的数量间的比值被计算, 而 80R-scFv 沉淀的变异体的数量被相应地标准化。如图 9B 所示, 相对于野生型 S1(318-510)-Ig, 80R-scFv 沉淀 E452A 和 D463A 变异体的量分别为 10% 和 100%。D454A 和 D480A 变异体没有检测到, 80R-scFv 沉淀形成。在 S1-Ig 变异体也获得同样的结果。

### 实施例 12: 80R 抑制 S-蛋白-假病毒的感染

如前所述制备表达荧光报告基因的 S-蛋白-假型病毒（见 Naldini et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:11382-88(1996); Yang et al., J Virol 78:5642-50(2004)）。简要地, 293T 细胞经编码修正了 C-末端的 S-蛋白变异体 ht2(15)的质粒, 编码 HIV-1 Gag-Pol 的 pCMV  $\Delta$ R8.2 质粒, 和编码在 HIV-1 常末端重复控制下的荧光素报告基因的 pHIV-Luc 质粒共转染。48 小时后, 收集病毒上清, 在 96 孔板中用 5  $\mu$ l S-蛋白-假病毒感染 6000ACE2-表达细胞。用 EG&G Berthold Microplate Luminometer LB 96V 测定目标细胞中的荧光活性从而对感染效果进行定量。

利用假病毒系统可评估 80R 针对不同 SARS-CoV 的中和活性。由变异体 Tor2, SZ3, 或 GD03T 的 S 蛋白制备 HIV 病毒假模标本, 来试验提高浓度的 80R IgG1 或非-相关人 IgG1 的中和敏感度。正如所期望的, Tor2 对于 80R IgG1 的中和活性具有高敏感度, 在约 2  $\mu$ g/ml 浓度时抑制效果达到 90% (图 10A)。80R IgG1 也可以有效地抑制 SZ3 假病毒的感染 (图 10B)。相反地, GD03T 在浓度范围试验中具有对 80R IgG1 中和活性本质上的抗性。

### 实施例 13: S1-Ig 去-糖基化及利用 scFv 进行 Western Blotting

纯化的 S1-Ig 用 PNGase F(New England Biolabs, Beverly, MA), 一种根据厂家提供变性条件, 去除 N-连接糖基化的酶进行去-糖基化。为进行 Western Blotting, 未处理的或去-糖基化的 S1-Ig (50ng) 用含有 20  $\mu$ l 变性剂 (1% SDS) 或还原剂 (50mM DTT, 1%SDS) 的样品缓冲液煮沸进行变性或还原并进行 10% SDS-PAGE 电泳。S1 通过抗-S1 scFv 和单克隆兔抗-His<sub>6</sub> 抗体 (Santa Cruz) 及 HRP-标记的抗-兔 IgG(Pierce)显色。利用 SuperSignal Chemiluminescent substrate Kit(Pierce)进行发光检测。

### 实施例 14: 鉴定抗-S1 噬菌体抗体, 可溶性 scFvs 的表达和纯化

纯化的重组 S1-C9 被用于从两个非-免疫人 scFv 文库中筛选抗体。S1-C9 进行三轮筛选之后, 通过 ELISA 得到 S1 特异结合的 288 个克隆。104 个克隆特异 S1-C9 蛋白, 但不识别 HIV-1pg 120-C9 和 BSA 对照蛋白。通过单独对克隆进行序列测定, 鉴定了八个独特的抗-S1 scFv (scFv 6A, 8C, 12E, 26H, 27D, 80R, 91M, 92N)。此外, 八个标记了 His<sub>6</sub> 的 scFv 通过 E.coli 表达并用 IMAC 纯化。载体 pSyn1 被用于表达 6A, 80R, 91M, 92N, 其他四种 scFv (8C, 12E, 27D, 80R) 由于在载体 pSyn1 中表达量较低而

用载体 pET22b(+)表达。ScFv 的结合活性和特异性用 S1-C9 和 S1-Ig 通过 ELISA 验证。

### 实施例 15: S1 蛋白上 80R 表位的噬菌体多肽图谱

最初为了优化被 scFv 80R 中和抗体识别的 S1 区域图谱, scFv 80R 被用于筛选十个噬菌体显示随意多肽文库, 其中噬菌体-显示多肽由合成的随意简并寡核苷酸链插入片段编码。有关的固定位置上二硫结合半胱氨酸分子的约束影响作用的显示形式以及存在与否与该文库并不一致 (见 Matthews. et al., J. Immunol. 169:837(2002))。

根据“一步”法, 纯化的 scFv 80R 被用于从十个文库中亲合-选择噬菌体-来源多肽(见 Yu and Smith, Methods in Enzymology 267:3(1996))。三轮亲合-选择后, 从十个文库中分别扩增出 48 种不同的单独克隆。这些 480 个克隆用 ELISA 筛选与 scFv 80R 的亲合力。根据 80R ELISA 结合活性标准 284 个克隆鉴定为阳性, 与同样具有 VH 和 VL 基因家族框架非相关的 scFv 相比, 其结合活性至少有 5 倍的提高。120 个克隆显示了最高的 ELISA 活性, 其中包括至少分别来源于 8 个阳性克隆文库的 8 个克隆, DNA 测序推导出显示多肽的氨基酸序列。7 个多肽序列在一定程度上与 S1 蛋白线性相关。(见图 6)。

11 个噬菌体克隆, 包括 7 个显示了与 SARS 钉蛋白具有相似序列的克隆, 被测定阻止 scFv 80R 与钉蛋白结合的能力(见图 7)。一个噬菌体-显示多肽 (CLSATCDCTLCGP(SEQ ID NO:26), 见图 7) 充分地阻止了 scFv 80R 与钉蛋白的结合 (▲, 图 7), 而其他具有中等的抑制活性。

(利用噬菌体筛选研究获得的)数据与图 11 中的数据(利用纤维素酶着色获得)具有差异。图 11 中的多肽是根据删除研究合成的并且表示了 SARS-CoV S1 蛋白氨基酸序列,图 6 中分离的多肽来源于随意多肽文库。这样,本领域中的普通技术人员可以认识到两种补充的方法可以用于获得这些数据并且这两种方法可得到差异的结果。需要额外的研究以确定哪种方法正确。验证哪种多肽为正确的试验可以最终从这里所述的两种方法中鉴定正确的方法。例如,Enshell-Seijffers et al.叙述了一种计算机算法,其可以用于协助解码构造性非连续表位(见 Enshell-Seijffers et al. J.Mol. Biol.334:87-101(2003),该文献通过在此引述而全文合并于本文)。此外,根据图 6 中随意多肽数据,80R scFv 和 S1(318-510)形成的共-沉淀结构可以提供额外的信息。

只有在根据试验验证正确的多肽之后,本领域的技术人员将认识到图 6 中分离的多肽或是图 11 中分离的多肽可以用作抗原。然而,应当注意图 11 中的数据与图 8 和 9 中的扩大表位图谱具有高度一致性。

#### 实施例 16: 设计 SARS-CoV 钉/膜融合蛋白作为蛋白和 DNA 疫苗

不同形式的 IgG 分子,单链 Fv 片段(scFv),Fab,scFv-Fv,和/或全长 IgG 可以在不同细胞类型中制备。许多含有 IgG-或 Fc-的 DNA 质粒和假病毒转化质粒可以用于制备这些分子。例如,SARS S1,S3 或 M-IgG 融合蛋白可以用于蛋白和 DNA 疫苗。可以制备表达适合于疫苗应用形式的 SARS-相关表位的 IgG-融合框架。

编码 SARS-IgG 融合蛋白的 DNA 质粒被瞬时转染入 293T 细胞，以试验表达和分泌。培养上清中分泌性融合蛋白的存在情况可以用以下方法测定（1）用羊-抗-人 IgG1-Fc 进行三明治定量 ELISA 分析，（2）SDS-PAGE 分析可溶的，蛋白 G 亲和-纯化的，<sup>35</sup>S-蛋氨酸代谢标记的融合蛋白。

具发现 scFv 抗体的链内-连接（ICL）可以调整 ~ 30 个氨基酸长度的回环结构的适当折叠，从而保持其抗原结合活性（见 Q.Zhu and W.Marasco,unpublished data）。当这里和其他发现的表位的正确结构被发现时，可以运用这个试验发现将回环结构引入中和抗体的 ICL，如 80R 表位。

#### 实施例 17: 制备在动物模型中用于针对 SARS 的免疫预防和治疗策略的 GLP 级 80R hMAbTo

小鼠和非洲绿猴 SARS 感染动物模型被用于提供预防模型和感染后模型试验。目前，两种模型都是感染模型而非致病机理模型。然而，希望于发展一种致病机理模型用于在先前-或后-感染模型中判断 80R MAb 是否可以阻止 SARS 的临床发展。需要建立高分泌 80R hMAbd 转染细胞系和纯化克级的 80R MAb 以在非-人类灵长类中开展研究。

基因转染的哺乳动物细胞中的表达水平可以用综合位点的细胞 DNA 进行测定。人免疫球蛋白 IgG1 kappa 表达载体 80R TCAE5 将用于对提供高水平表达的哺乳动物中的位点进行定位。这些载体编码免疫球蛋白重链和轻链基因，吡嗪叶酸还原酶（DHFR）基因，和显性选择标记的新霉素磷酸转移酶（Neo）基因。通过对包围于新霉素初始密码子的 Kozak 序列进行内部破坏获得完全破坏的 Kozak 序列，大部分的但拷贝部分在存活选择中将不能表达足够的 Neo。（见 Kozak, Nucleic Acid Research

15:8125-32(1987))。结果是全部的 G418 抗性细胞都极大地减少，从而有助于筛选。具有更高百分比的克隆存活筛选方法是将破坏的 Neo 基因整合入基因组的“热点”，其伴随着产生非常高水平的连接基因的表达（见 Barnett et al, in *Antibody Expression and Engineering*, Chapter 3, pgs. 27-40(1995)）。

一旦分离，表达高水平免疫球蛋白的转化子将利用氨甲蝶呤（MTX）筛选嘌呤叶酸抗性基因诱导其抗性基因的扩增（Kaufman and Sharp, *J. Molecular Biology* 159:601-602(1982)）。DHFR 基因拷贝数可以通过扩增增加，在免疫球蛋白基因拷贝数的增加和免疫球蛋白的增加之间具有高相关性。对最初的高水平表达克隆进行扩增获得的细胞可以从最少的基因拷贝数中制备高水平免疫球蛋白。

2-4  $\mu\text{g}$  的质粒 DNA 通过电转化转染进入  $4 \times 10^6$  CHO DG44 细胞（适合于在无血清的培养基中生长）并筛选 G418 抗性。当其生长至 30%-100% 汇合，例如，30000 至 100000 个细胞时，至少 100 个 G418 抗性克隆（来源于大约 20 个 96 孔板）以用于筛选制备 IgG 的候选（抗-人 IgG ELISA）。扩增其中 10-12 个 Ig 产量最高的克隆，并用 Southern blotting 分离 HMW DNA 以测定整合拷贝数。利在每个质粒上只有一个切点的 EcoR1 酶切 5mg HMW DNA，对应于每个整合入细胞 DNA 位点的情况将产生两种不同大小的片段。

三个高产量，低拷贝数的细胞克隆用提高浓度的 MTX(5nM→50nM→500nM) 进行基因扩增。相比于 50nM 和 500nM，在 5nM MTX 时三个 G418 克隆都得到最佳的扩增效果。在此阶段，选择性扩增适应于在旋转瓶中生长。此时 transfectoma 抗体可以通过蛋白 A 从上清中纯化。当细胞产量为 50pg/细胞/天并且两倍扩增期为 36 小时或更短时，其将被认为是生产细胞

系，并制备原始种子库。整个过程将耗时 35-45 个星期。然而，可以在早期收集培养上清以对 80R 进行特性分析。

最初，用 1mg/kg 和 10mg/kg 剂量的 MAb IgG 进行动物试验。在小鼠试验中，需要的蛋白量较少，并可用短暂转化的 293T 细胞制备并用蛋白 A 柱子纯化。三组小鼠（每组四只）在鼻内感染 SARS 前 24 小时都给予不同浓度的 80R。感染前获取血清以测定 80R MAb 浓度。动物接种病毒 48 小时后，收集并制备肺组织，用 Vero-E6 细胞验证病毒滴度。目前使用的方法是从目标器官（如肺）中进行的病毒滴度还原分析。

#### 实施例 18：对逃避 MAb 80R 的 SARS-CoV 的研究

SARS-CoV，类似于 HIV，是一种 RNA 病毒，其复制具有错误-倾向。高基因组突变率可以导致产生新的病毒株，并且是一种病毒逃避宿主防御的机制。对 14 种形成于单一来源的 SARS 分离株的研究揭示了对免疫压力产生应答的发展模式。（见 Ruan, et al., *The Lancet* 361(9371):1779-1785(2003)）。一些冠状病毒以其产生突变从而逃避宿主免疫应答而著名。

SARS 的突变模式对于其致病机理和对可能出现的疾病爆发情况进行控制方面是非常重要的。用中和抗体 80R 进行体外试验鉴定中和抗体逃避突变体，将依据在体外 SARS-CoV 感染时是否产生逃避突变体从而获得有关信息。

如果中和逃避已经产生，突变病毒的生物学特性将被分析以测定其引发病变的能力是增高或降低，及 S1 逃避型病毒是否编码与结合 ACE2 的中和抗体相比具有与 S1 受体更高亲合力的 S1 蛋白。

## 研制 80R MAb 中和逃避突变体

### 策略 I

为研制 80R 中和逃避突变体,运用上述的微量中和实验测定 Vero-E6 细胞中 80R 中和 SARS-CoV 的 IC<sub>90</sub>(见例 4,前述)。(由 Dalziel, et al., J. Virol. 59:4636,71(1986) 和 Yo et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:297-302 (2001) 叙述的) 制备突变体的程序,可以被改良为制备 80R 逃避 SARS-CoV 突变体。等体积的野生型 SARS-CoV (Urbani 株) 和 80R 中和抗体混合置 37℃ 孵育 60 分钟并加入至 Vero-E6 细胞中于 37℃ 孵育 1 小时。

作为对照,细胞用已知浓度的非相关 hMAb 处理。接着,去除接种的病毒,细胞用含有不同浓度的 MAb 80R 0.7% 琼脂糖覆盖,其 MAb 80R 浓度可以减少 10 倍。孵育三天后,细胞着色显示蚀斑。首先从含有最高浓度 MAb 80R 的孔中取出蚀斑并用 1ml 培养基重悬。从用较低浓度 MAb 80R 处理的板中分离部分抗性噬斑。噬斑-提取的病毒在 MAb 80R 存在的情况下在 Vero-E6 细胞上扩增并传代三次直到出现细胞病变。10 倍稀释的子代病毒在 MAb 80R 存在或不存在的条件下在噬斑上进行扩增,验证 MAb 抗性显型并制备噬斑-纯化的(亚克隆)突变病毒。在不存在 80R MAb 的情况下制备的子代病毒也作为对照使用,验证 80R 抗性显型在没有选择压力的条件下是否稳定。逃避病毒突变体的亚克隆在 Vero 细胞上扩增,验证其 80R 抗性突变体显型,分装,保存于 -70℃。为验证 DNA 序列并对 80R 抗性病毒进行序列分析,从感染了 80R 抗性病毒的新鲜 Vero 细胞中提取全部 RNA。用 SARS-CoV S 基因特异的引物进行 RT-PCR 扩增出突变的 S 基因。

将 PCR 产物克隆入 Topo 克隆载体,鉴定不同的 80R MAb 抗性 S1 突变体之间的 S1 氨基酸差异是否有可识别的模式。进行

DNA 测序并测定突变体的推断氨基酸序列。S1 蛋白序列用于评估部分和抗性病毒中的氨基酸变化。在此项研究中，通过 PCR 和 DNA 测序从部分和抗性病毒中克隆了 10 个全长 S1 基因序列，并将此 DNA 序列与从同一时间分离的对照病毒克隆（非相关 MAb 处理）的 S1 基因相比较。进行 DNA 序列比对以测定是否出现已经报道的在人类 SARS-CoV 感染中自然发生的 DNA 序列的变化（见 Ruan, et al., The Lancet 361(9371):1779-1785(2003)）。

## 策略 II

### 实验 A:

1) 100  $\mu$ l SARS-CoV( $1 \times 10^5$  PFU(噬斑形成单位))与等体积的 1/2 系列稀释的 hMAb 80R（例如，最终稀释度从 1:100-1:3200）混合置于 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 45 分钟。实验重复三次。

2) “病毒 + 80R”混合物分别吸附于 24 孔组织培养板中的 Vero-E6 单层细胞。在 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱吸附 45 分钟。

3) 去除“病毒 + 80R”接种物，每孔加入 1ml MEM-琼脂糖。MEM-琼脂糖置室温 20 分钟增加稳定性随后置 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2 天。

4) 感染 2 天后在倒置显微镜下观察噬斑。噬斑用中性红色-PBS 着色剂染色并置于 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱过夜。

结果：每个稀释度 80R 的噬斑数量：1:100(5,4,0); 1:200(13,14,14); 1:400(大量可见的噬斑但不易计数), 1:800 和更高（完全裂解单层细胞）。

### 实验 B:

1) 用无菌巴斯德吸管, 从 1:100 和 1:200 稀释度分离 15 个噬斑, 并分别在 200  $\mu$ l MEM 中保存。冻融噬斑 3 次。

2) 在 24 孔组织培养板中感染 Vero-E6 单层细胞, 并在 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱吸附 45 分钟。

3) 每孔中加入 300  $\mu$ l MEM/5%fcs 和相应于最终稀释度的 80R。置 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱培养 3-5 天。

结果: 在 1:100 稀释度的 80R 只得到一个产生细胞病变效应 (CPE) 的噬斑, 在 1:200 稀释度时得到三个 CPE 噬斑。分别收集感染的细胞, 冻融三次, 1:100 或 1:200 稀释度的样本 (A,B,C) 标记为的 “1<sup>0</sup> (原始) 裂解物”。

### 实验 C:

1) 各取 4 种 “1<sup>0</sup> 裂解物” 200  $\mu$ l, 与对应于 1:100 或 1:200 稀释度的 80R 混合, 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 45 分钟。

2) 在 24 孔组织培养板中将各个裂解物 + 80R 混合物感染 Vero-E6 单层细胞, 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱吸附 45 分钟。

3) 每孔中加入 300  $\mu$ l MEM/5%fcs 和相应于最终稀释度的 80R。置 37°C/CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2-3 天。

结果: 所有四个原始的裂解物在第二天都显示了良好的 CPE。如前所述收集 (2<sup>0</sup> (第二) 裂解物) 并冻融三次。对于每

个  $2^0$  裂解物在  $25\text{cm}^2$  瓶中重复实验 C。2 天后，所有瓶子都显示了良好的 CPE。如前所述收集 ( $3^0$  (第三) 裂解物) 并冻融三次。

### 策略 III

#### 实验 A:

1)  $100\ \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^5\text{PFU}$ ),  $10\ \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4\text{PFU}$ ),  $1\ \mu\text{l}$  ( $1 \times 10^3\text{PFU}$ ) SARS-CoV 分别与  $100\ \mu\text{l}$  含有 1:200 或 1:400 最终稀释度的 80R 的 MEM 混合。病毒-80R 混合物置  $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  培养箱孵育 45 分钟。

2) 在 24 孔组织培养板中将各个病毒-80R 混合物感染 Vero-E6 单层细胞,  $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  培养箱吸附 45 分钟。

3) 每孔中加入  $300\ \mu\text{l}$  MEM/5%fcs 和相应于最终稀释度的 80R。置  $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  培养箱培养 3-5 天。每天观察 CPE。

结果: 仅有三个混合物显示了 CPE-1:200 ( $100\ \mu\text{l}$ ), 1:400 ( $100\ \mu\text{l}$ ), 1:400 ( $10\ \mu\text{l}$ )。分别收集 (+1 裂解物) 并冻融三次。

#### 实验 B:

1) 每种 (+1 裂解物) 分别取  $200\ \mu\text{l}$  与相应稀释度的 80R 混合,  $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  培养箱孵育 45 分钟。

2) 每种 “+1 裂解物-80R 混合物” 在 24 孔组织培养板中感染 Vero-E6 单层细胞,  $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  培养箱吸附 45 分钟。

3) 每孔中加入  $300\ \mu\text{l}$  MEM/5%fcs 和相应于最终稀释度的 80R。置  $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$  培养箱培养 3-5 天。每天观察 CPE。

结果：第二天三个样本都显示了良好的 CPE (+2 裂解物)。收集并冻融三次。以“+2 裂解物”重复实验 B 获得“+3 裂解物”。相似地，每个样本以“+3 裂解物”在 25cm<sup>2</sup> 瓶中重复实验 B 以获得“+4 裂解物”保存株。

### 未来的研究

接下来的实验将关注于策略 II 中的“3<sup>0</sup> 裂解物”。最初地，每个裂解物将在 96 孔组织培养板上重复三孔进行滴定以确定引起 Vero-E6 单层细胞完全裂解的最高稀释度。接着，在存在或缺少系列稀释的 80R 的情况下对每个裂解物进行 SARS-MNt 实验。对照病毒可以是原始的 SARS-CoV 保存株。对比于对照，在存在 80R 情况下的完全裂解表明该裂解是“80R-逃避-突变”。如果出现这种情况，裂解物将用 RNA 抽提缓冲液处理以进行进一步的分子生物学分析。

### 表达突变 S 蛋白并验证其受体和中和抗体结合活性

为了测定抗性机制是否由于病毒结合 ACE2 的高亲和力引起的，期望的带有 C9 标签的突变 S1 基因被克隆入 pcDNA3.1 并表达。突变的 S1-C9 蛋白在 293T 细胞中放射标记。为了测定与 ACE2 的结合活性，(<sup>35</sup>S-蛋氨酸/半胱氨酸) 标记的 S1 蛋白与可溶性 ACE2 受体混合并用抗-ACE2 抗体进行免疫共沉淀。混合物与蛋白 A 琼脂糖凝胶于 4℃ 孵育 1 小时，用含有 0.25% NP<sub>40</sub> 和 0.01% SDS 的 PBS 洗涤 4 次，结合的蛋白用还原样品缓冲液在 100℃ 洗脱 5 分钟。蛋白用 8% SDS-PAGE 分离并用 Kodak Biomax MR 胶片放射自显影显像。

通过比较野生型和突变 S1 蛋白的 ACE2 结合活性，可以根据突变 S1 蛋白是否具有更高的 ACE2 结合活性做出决定。可以

进行一种相似的细胞标记实验，将不同浓度放射标记的野生型和突变 S1 蛋白与固定数量的 Vero 细胞孵育，经过洗涤测定结合细胞的具有放射活性的 S1 蛋白。

细胞结合在低浓度的放射标记突变 S1 蛋白时获得饱和的，表明与 ACE2 结合的高亲合力。BIAcore 分析被用于直接测定突变 S1 蛋白和 ACE2 间的亲合结合常数。

为了测定抗性机制是否由于 80R scFv 和 IgG1 与突变 S1 蛋白间较低的亲合力引起的，可以制备突变的 S1-Ig 蛋白并通过表面等离子体共振(BIAcore 3000,Sweden)测定 80R scFv, 80R -IgG1 和受体 ACE2 对于纯化的 S1-Ig 蛋白的亲合动力学。用 amine coupling kit(BIAcore),在 10mM 醋酸钠, PH4.5 缓冲液中, 纯化的 S1-Ig 通过氨基簇共价固定于 CM5 传感芯片, 制备出 6388 个单元的表面。实验以 10  $\mu$  l/min 低速 HBS-EP 缓冲液(BIAcore)进行。表面用 PH2.0,10mM 氨基乙酸-HCl 再生。测定在不同摩尔浓度下的抗体或受体并用 BIA-评估软件评估结合动力学参数。可溶性抗体和结合的 ACE2 间的结合稳定性将同野生型和突变 S1-Ig 相比较。

为了测定抗性机制是否由于病毒具有更好地竞争结合 ACE2 受体的能力所引起, 测定了 80R scFv 或 80R IgG1 与野生型和突变 S1 蛋白相竞争结合可溶性或细胞表面的 ACE 的情况。需要更高浓度的抗体以同突变 S1 蛋白竞争结合 ACE2, 表明抗性的一种机制是突变 S1 蛋白具有更高的 ACE2 亲合力。

S1 与 ACE2 亲合力的增高提示 S1 突变病毒可以进入表达低浓度 ACE2 的细胞。这可在四环素控制下用 ACE2 表达细胞系进行实验验证。最近报道了一项类似的调查 HIV-1 对于 CCR5 antagonist 的逃避突变研究。(见 Reeves et al., Proc. Natl. Sci.

USA 99(25):16249-54(2002)。在转化细胞中与四环素诱导的基因表达高度相关的自身-失活(SIN)假病毒载体结构已经被报道(见 Ogueta et al., Mol.Med. 7(8):56-79(2001)and Zhu,et al.,Gene Ther Mol Biol.8:91-102(2004))。

不表达 ACE2 的 Cf2 细胞(犬胸腺细胞系),用在四环素开关调控下编码 ACE2 的四环素诱导的 SIN 载体进行转染(SINminipiACE2)。获得纯化的转染细胞克隆。细胞用不同浓度的四环素诱导从低水平(约 1000-5000)至高水平(约 50000)的 ACE2 表达。ACE2 表达水平随后用 FITC-标记的抗-ACE2 MAb 进行 FACS。尝试将野生型和突变 S1 蛋白引入 MuLV 或 HIV-1 荧光素报告病毒制成假型病毒。仍需测定 S1 假模标本制备的最佳条件。感染后在不同时间点研究病毒进入情况从而测定感染动力学和数量的增加是否由高亲合作用引起。如果突变病毒能更高效地进入表达低水平 ACE2 的细胞,就可以扩大感染突变病毒的宿主细胞范围。

为了研究突变 S1 蛋白的致病机理,将在体外和 SARS-CoV 体内复制中对膜融合进行研究。293T 细胞,在 T75 培养瓶中生长至大约 30%汇合,用编码野生型突变 S1 蛋白或 ACE2 的质粒转染。转染一天后,细胞用胰蛋白酶作用并用培养基洗涤一次。S 蛋白表达细胞与 ACE2 受体表达细胞以不同比例混合并在 24 孔板中培养。培养 36 小时后,收集多核巨细胞,进行计数并拍摄典型的照片。测定表达突变 S1 细胞中合胞体的数量和大小。如果合胞体-介导的曲线向左偏转(更低浓度的突变 S1 可获得野生型 S1 蛋白相等的合胞体),则意味突变 S1 蛋白具有更高的致病性。

为了进行体内致病机理研究,80R 逃避突变的复制能力将在小鼠模型中进行实验直到建立非-人灵长类致病机理模型。表达

突变 S1 蛋白的病毒按上述进行亚克隆并通过鼻腔内接种感染。感染 48 小时后，处死小鼠，在 VeroE6 细胞上测定来源肺组织的病毒滴度。感染动力学和数量的变化表明突变 S1 蛋白具有更高的致病性，而此模型中 R80 MAb 保护作用的丢失将证实这一点。

## 结果

图 8B, 8C,9B (与 D480G 突变相关) 及图 10C (与 GD03T 序列相关) 中的数据与前述表 1 中的数据相一致。在 GD03T 病人中，480 位点存在 D 替换 G 的突变，其可导致 SARS 病毒完全抵抗 80R 的中和活性。目前正在进行额外的体内实验。

### 实施例 19: 鉴定除 80R 之外的中和表位

虽然钉蛋白体现了冠状病毒主要的抗原决定簇，然而鼠肝炎病毒 (MHV) 被动免疫研究已经表明用病毒所有主要结构蛋白特异 MAb 进行治疗后可产生保护作用。

如实施例 2 中所述，用包括 270 亿非-免疫人类 scFv 文库针对 S1 的中和抗体进行筛选。然而，经过三轮筛选只挑选出 288 个单独的克隆并鉴定了一个中和抗-S1 抗体，(80R)，其可以阻止 S1 与其受体的结合。在第三轮筛选中从数千份克隆中分离出数十个，可能更多的抗-S1 scFvs 已经被筛选出并且其中的一些可以直接针对 S1 上不同的中和表位。这样，可用 tecan 仪建立高-通量的和有效的方法从抗-S1 亚-文库中大量筛选抗体。这将导致鉴定出更多的新抗-S1 中和抗体。当对成千上万的噬菌体进行高通量筛选时，Tecan 仪将协助对大量待检测的噬菌体流动相进行操作。

除对抗-S1 亚-文库进行筛选之外, 筛选也将在 S 蛋白其他功能区域上进行, 如 S2 区域, 此区域对应于膜融合因此也将是产生中和性人抗体的有效目标。此外, M 糖蛋白是病毒中最丰富的跨膜包装糖蛋白, 并已经报道在其他冠状病毒 M 蛋白上具有中和表位 (见 Kida et al, Arch.Virol.145:1-12(2000))。因此, 从非-免疫人类文库中鉴定拮抗 S2 和 M 蛋白的中和性人类抗体也是可行的。

#### A. SARS-CoV S1, S2, M 蛋白表达和纯化

获得编码 SARS-CoV S 蛋白的 S1 (残基 12-672), S2 区域 (残基 672-1255) 优化密码子并融合 C9 标签的质粒。应用同样的密码子优化策略以获得编码 M 蛋白的 DNA 序列并将重新合成的 DNA 片段克隆入带有 C9 标签的 pcDNA3.1 载体。质粒转染 293T 细胞以获得重组蛋白表达并用连接了蛋白 A 琼脂糖的抗-C9 抗体 1D4(National Cell Culture Center)纯化 C9-标记的蛋白。C9-标记的蛋白被用于筛选噬菌体显示文库并挑选出目标特异的克隆。与 C9-标记的蛋白相比, 由于针对 S1,S2,M 蛋白的人类 IgG1 Fc 片段具有高水平表达和简单的纯化过程, 对其进行表达可是可行的。这些蛋白将在 293T 细胞中表达并用蛋白 A 琼脂糖纯化并用于进一步对目标特异抗体进行分离和特征化。

#### B. 文库选择并筛选抗-S2 或 M 蛋白 scFv 表达噬菌体 (噬菌体-scFvs)。

随意挑选单克隆并根据前述例 2 方法分析与 S1,S2,M 的特异结合情况。简要地, 96 孔 maxisorp 免疫板 (Nunc) 用 0.2  $\mu$ l/孔 S1-C9,S2-C9,M-C9 或对照蛋白 HIV-1 gp120-C9 和 BSA 包被, 4%脱脂牛奶/PBS 封闭。加入 HRP-连接的鼠抗-M13 和 TMB 底物进行显色测定。

### C.制备可溶性目标特异 scFv Abs

可溶性目标特异 scFv 抗体按前述例 3 中的方法制备。

### D.微量中和实验

按前述例 4 方法进行微量中和实验。典型地,实验重复三次,并以 2/3 孔生长受抑制的最高稀释度测定中和滴度。

### E.抗-S1 或 S2 抗体的合胞体抑制实验

抗-S1 或 S2 抗体的合胞体抑制实验按例 5 中所述的方法进行。虽然抗-M 中和抗体在此实验中是否起作用还不清楚,其仍可以进行合胞体抑制实验。

### F. 运用 BIAcore 进行亲合测定

scFvs 和 IgG1 对于纯化目标蛋白的结合动力学和亲合力将根据例 6 中叙述的方法进行分析。

## 实施例 20: SARS 疫苗研究策略

与直接运用蛋白或合成多肽免疫相比,运用“抗原化抗体”联合 DNA 疫苗可以极大地增加抗原表达和递呈。(见 Zanetti, *Nature* 355: 476-77 (1992); Ulmer, *Nat. Biotech* 15: 842-43 (1997), and Bona et al., *Immunol. Today* 19:126-33 (1998))。根据两个主要方面来设计和鉴定合适的 S-IgG 和 M-IgG 分子的形式,作为免疫原引发宿主针对 SARS 病毒蛋白的免疫应答,随之,将抑制 SARS 病毒的感染:

1.对按照图 6 和 11 中描述的方法鉴定的新 APF-IgG 融合蛋白进行分子克隆和体外特征化,其包括显示中和表位的抗原蛋白片段。鉴定的表位将位于含有 IgG 分子的不同骨架中,其保留了生物学功能和 /或结构特征。为了增强疫苗效果,IgG 骨架将被设计为特异针对专业抗原递呈细胞 (APCs)。

2.运用“初始-追加”策略对小鼠进行基因免疫从而验证 APF-IgG 融合蛋白的免疫原性。由于表位的自然性,当监控细胞-介导应答时,最初的焦点将是对体液免疫应答进行特征化。测定每个 APF-IgG 融合抗原的免疫原适应性。最后,将根据在体外中和实验中具有引发阻止 SARS 病毒感染能力的中和抗体作为最好的疫苗候选。

建立 SARS APFs 作为疫苗成分的主要挑战包括:合适的构像表现,抗原表达和递呈能力的最大化。与相应的多肽比较,将 APFs 间接 IgG 骨架不仅极大增强其抗原性和免疫原性,而且通过在 IgG 骨架中保留表位的自然构像提高免疫适应性。此外,APFs-Ig 融合子比其多肽副本具有更长的血清半衰期。

通过在体外实验中设计和优化不同类型的 APF 融合分子来验证这种假设。APF 融合分子接着在体内试验其诱导免疫应答的能力。这些结果将为合理地设计有效的 SARS 疫苗提供重要的参照。

#### A. 研究设计和方法

APFs 最初以两种不同形式联合 IgG 分子表达:以线性形式与人 IgG1 分子 Fc 片段形成框架内融合及作为构像约束表位与人 IgG1 scFv-Fv 分子的连接区域相连。分泌型 APF-IgG 融合蛋白在体外进行纯化并鉴定其特征。随后在小鼠基于 DNA 初始-追加免

疫策略中 APF-IgG 融合蛋白作为免疫原使用。引发的免疫反应进行体外分析包括评估抗体和 T-细胞对 S 和 M 蛋白的应答以及体外试验中免疫血清中和 SARS 病毒感染的能力。

### APF-IgG 融合蛋白的分子克隆

由于人类 IgG1 可以结合鼠类 DCs, APF-Fc 融合克隆的最初形式是: 5' CMV 启动子-IgG 引导区-APF-人 IgG1 Fc 3'。为了以构像约束结构形式表达特定表位 (APFs), 可以将其与新骨架的回环结构相连, 在其中他们将插入位于 IgG 重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )可变区之间的 scFv-Fv 结构的连接区域内。连接区域由于其具有适合于更长表位的柔韧特性而被使用, 已有报道大于 28 氨基酸的连接子被用于制备 scFv (见 Huston et al., Cell Biophy 22:189-24(1993))。此外, 利用连接子作为抗原递呈位点则可以用 Fc 区域和 scFv (如抗-MHC II scFv) 作为 APC 目标, 这样创造了一种新的多功能分子并潜在地提高了抗原递呈。基于先前对 hCCR5 ECL2-IgG1 Fc 融合蛋白的研究, 具预测当  $V_H$  与  $V_L$  相互作用并形成自然链内二硫键时, APF 表位将形成与通常的柔韧连接子相似的回环结构。

APFs 与抗-MHC II scFv 连接, 使得 scFv 可以作为体内针对 APF 的 APC 目标配基。带有抗-鼠 MHC II 的 scFv 从来源于 ATCC 的杂交瘤细胞系如 14-4-4S 通过克隆获得。编码重链和轻链可变区的 DNA 序列根据标准程序由 cDNA 通过 PCR 进行扩增。抗-MHC II scFv 与人 IgG1 Fc 连接并用于表达插入至连接子区域的 APFs 或表达在引导序列之后的 N-末端 APFs。可选地, 抗-MHC II scFv-Fc 片段可以与 APF-Fc 嵌合体 制备成异源二聚体形式, 如 Carter 所述, J.Immunol. Methods 248:7-15(2001)。

### APF-IgG 融合蛋白的体外特征

融合蛋白表达的生化特征包括在适当时候对分泌，翻译后修饰，和 APF-IgG 融合蛋白阻止膜融合或病毒进入的能力进行分析。

成功的关键之一是引导序列的正确切割，其可导致融合蛋白的有效分泌，通过还原和非-还原 SDS-PAGE 分析或凝胶亲合色谱鉴定融合蛋白是否以单体或二聚体分泌。为了评估 APFs 的正确糖基化，经蛋白 G 分离之后，分泌的融合蛋白用糖苷酶处理并用 SDS-PAGE 分析。

APF-IgG 融合蛋白通过与在 293T 细胞中表达的 SARS 受体结合从而影响膜融合的能力被试验。此外，APF-IgG 融合蛋白影响/中和 SARS 病毒感染的能力用体外微量中和试验评估，如例 4 所述。

### APF-IgG 融合蛋白的体外制备

为了有效地大量制备分泌性 APF-IgG 融合蛋白用于生物学试验和疫苗应用，有必要对每一个单独结构的不同引导序列进行试验以便获得正确的切割并使蛋白分泌最大化。分泌性 APF-IgG 融合蛋白最初用 Invitrogen Free-Style 293 Express System 表达，以无血清细胞培养基大量制备蛋白。APF-IgG 融合蛋白用蛋白 A/G 亲合色谱纯化。为了建立每一融合蛋白的高产细胞系需要挑选稳定的克隆。带有鉴定的 IgG 引导子和 Fc 盒的假病毒载体能用于协助将 APF-IgG 融合基因稳定地整合入细胞基因组。由于从产生了蛋白的细胞毒性，使得建立稳定的细胞系存在困难，因此四环素-调控的基因表达在 DNA 质粒和假病毒载体形式中也是可

行的(见 Ogueta et al., Mol. Med. 7(8):569-79(2001) and Zhu et al., J. Immunol. Meth. 231:207-22 (2001)。

### B. 运用“初始和追加”方法对小鼠进行基因免疫测定 APF-IgG 融合分子的免疫原性

#### 用 APF-IgG 免疫原对小鼠进行免疫

预先进行体外试验的编码 APF-IgG 融合蛋白的质粒 DNA 按照初始-追加免疫程序被用于免疫小鼠(见 Zuber,et al., Virology 278:400-11(2000) and Radaelli et al.,Vaccine 21:2061-73(2003))。数组 6-8 周大小的 BALB/c 鼠(每组 5 只)用单独抗原每 2-3 周以 50-150  $\mu$ g 质粒 DNA/小鼠的剂量四头肌内注射免疫,共 3 次。从哺乳动物细胞培养制备的并经蛋白 G-亲和纯化的 APF-IgG 融合蛋白可用于追加免疫,在 2-4 周间隔内以 20  $\mu$ g 的剂量免疫 2 次。最初接种 2 周后每 2 周采集血液/血清直到处死,以监控抗-SARS-特异抗体的应答。最初,小鼠在最后一次追加免疫 4 周后处死,用从免疫小鼠的脾脏和/或淋巴结分离的 T 淋巴细胞测定细胞-介导的 SARS-特异免疫应答情况。

设计初始-追加方案以提高抗体应答,因为可溶性蛋白抗原,无论由接受了 DNA 疫苗或由接种了蛋白免疫原的宿主细胞分泌,都通过 APC 细胞内吞作用摄取并主要由 MHC II 分子表达。增加抗体应答的其他方案仍需继续试验,包括生物佐剂如编码细胞因子 IL-4 或 IL-10 的质粒(见 Piccirillo and Prud'homme, Curr. Pharm. Des. 9:83-94(2003)),以及合成佐剂。

## 分析由钉-Ig 和膜-Ig 疫苗引发的免疫应答

APF-IgG 融合蛋白诱导体液免疫应答的能力可通过抗体分析和细胞增殖分析测定。此外，将对细胞免疫应答进行监控以获取 B-和 T-细胞表位信息用于未来的疫苗设计。

### (a) 体液免疫分析

抗体分析: 全部的血清 IgG/IgA 和特异针对 SARS APFs 的抗体可用纯化的 SARS 蛋白通过 ELISA 进行定量, 而免疫血清额外地用于评估免疫 APF 的免疫原适应性。

此外, 分析了免疫血清阻止 SARS 病毒感染的能力。在血清与同源钉和膜抗原吸收之前和之后, 免疫血清-介导的阻止 SARS-CoV 的特异性最初用微量中和试验评估 (见例 4) 以分析免疫原适应性。免疫动物血清的抗病毒 (中和) 活性将与 SARS 康复期病人的血清相比较。

分析 B-细胞应答. 在初始免疫后两周及最终追加后四周运用 (Milligan 和 Bernstein, *Virology* 206:234-41(1995); Kuklin et al., *Virology* 240:245-53(1998); and Zuber et al., *Virology* 278: 400-11 (2000)) 叙述的抗体 ELISPOT 方法, 对产生抗-SARS 蛋白-特异 IgG 抗体的脾脏细胞或循环细胞的数量进行体外计数。不包括任何 APFs 的人 IgG 分子被用作对照。

### (b) 细胞应答的分析

T 细胞增值分析. 小鼠最终追加免疫四周后处死, 从脾脏中分离 T 淋巴细胞在体内进行 T-细胞增值试验, 分析细胞介导的 SARS-CoV 钉和膜-特异性免疫应答的存在情况。简要地, 根据所

述方案 (Dynal. Lake Success,N.Y) 运用 Dynabeads mouse pan B(B220)磁珠收集 B-细胞,脾细胞在存在或不存在纯化的 APF-Ig 蛋白免疫原的条件下培养。加入  $^3\text{H}$ -标记的胸腺嘧啶脱氧核苷并测定胸腺嘧啶整合情况。(见 Zuber et al., Virology 278:400-11(2000))。PHA 或 ConA 刺激的细胞作为细胞生存的阳性对照。

细胞因子分析。分别运用特异 ELISA 试剂盒或细胞因子 ELISPOT 方法测定两种类型-1 细胞因子 (INF- $\gamma$  和 IL-2) 及两种类型-2 细胞因子 (IL-4 和 IL-10) 进一步研究 T-细胞免疫应答的自然性。运用针对 Th1 应答的 INF- $\gamma$ /IL-2 特异 ELISPOT 和针对 Th2 应答的 IL4 特异 ELISPOT, 对用不同钉-Ig 嵌合体免疫小鼠中的细胞-介导免疫应答在细胞水平上进行定量分析, 如 (Gaudulin et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:14031-36(1999))。

#### 其他方面

虽然这里已经详细叙述了具体的实施方案, 但都是仅仅出于说明目的, 并不期望限定以下相应权利要求书的范围。特别地, 发明者预期, 在不偏离权利要求中定义的本发明的精神和范围的条件下, 可有对本发明进行的各种替代, 改变, 和修正。其他的情况, 利益, 和修正被认为属于以下权利要求的范围内。这里的权利要求代表了这里所述的发明。此外, 未要求的发明也是预期的。申请者保留在随后的权利要求中追加这些发明的权利。

VH:

1	FWL	CDRL	FW2	CDR2	FW3	CDR3	FW4	Family
6A	QYQVDSGG.V.PG.SEUSCASCFES	SV.NS	WRCQPCKELEW.	IS.CS.YIANDVAG	RTTSDRNSNTLH.QANSURAEOTAVYICAR	D.....DY	WQGTIVTVSS	(SEQ ID NO:6)
8C	.....V.Q..R.....V	NY..	.....S	V.YSG..T.....	.....K	.YGEF.....	.....	(SEQ ID NO:7)
12E	.....L.K..G.....	D.Y.	I.....S	Y..SS..T.....	.....G	WYSEF.....	.....	(SEQ ID NO:8)
26H	.....AEVKK.A.VKV.K.Y.T	T.GI.	I.....Q.....MG	W.AYKNTN..QKIQ.	V.MT.T.TS.A.MELR..SD	WYTGDIANGFYTIGA.V	.....	(SEQ ID NO:9)
27D	.....QE...L.K..G.....	D.Y.	I.....S	Y..SS..T.....	.....G	WYTGDIANGFYTIGA.V	.....	(SEQ ID NO:10)
80R	.....LQ..G.....	NY..	.....S	V.YSG..T.....	.....K	WYTGDIANGFYTIGA.V	.....	(SEQ ID NO:11)
91M	.....V.O..K.....A	.AH	.....A	V.YD..NK.....	.....RSTL.....	WYTGDIANGFYTIGA.V	.....	(SEQ ID NO:12)
92N	.....L.Q..G.....	.SW	.....A	Y.KQD..EK..V.....	.....A.S..D.....	WYTGDIANGFYTIGA.V	.....	(SEQ ID NO:13)
	.....AEVKK.A.VKV.K.Y.T	S.GI.	.....Q.....MG	W.AYKNTN..QKIQ.	V.MT.T.TS.A.MELR..SD	WYTGDIANGFYTIGA.V	.....	(SEQ ID NO:14)

VL:

137	FWL	CDRL	FW2	CDR2	FW3	CDR3	FW4	Family
8C	Q.LTOP.S.SGSPQR.ITSC	.G.SS..G.N.VS	WYQQ.PG.APKLLI	....RPS	GVPRSSGSGT.ASLETISGLQ.EDEADYTC	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:15)
12E	.....S.L.A.V.D.V.T.	RATQ.ISTR--LN-	.....R.G.K.....	GASTLE..S.....G..EFT..S..P..F..T..	.....S.....G..EFT..S..P..F..T..	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:16)
26H	.....P.A..T.....V	S.S.SI.S-ET.N	I..T.....	SNNQ.....S.....A.....S.....	.....S.....A.....S.....	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:17)
27D	.....EP.F.V.....GT.IE.	DEN.GVSSSEP.	.....T.Q..ET.....	NNTL.S.....ALL.NK.A..T.A.A..S.....	.....S.....A.....S.....	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:18)
80R	.....S.A..A.V.....SI.....	T.T.DL.GH.F.	.....H.K..M.....	DVFN.....SS.....NT.....A.....F.....	.....S.....A.....S.....	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:19)
91M	.....SA..A.V.....SI.....	RASQ.VRSN--LA-	.....K.O..PP.....	DAST.AT.I.....G..DET..R.EP..F.V..	.....S.....A.....S.....	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:20)
92N	.....PG...P.A..T.....V.....	S.SR.MI.G-T.N	.....H.K..M.....	DWSK.....NT.....A.....F.....	.....S.....A.....S.....	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:21)
	.....S.SR.MI.G-T.N		.....H.V..T.....	SNNQ.....S.....A.....RS.....E.....	.....S.....A.....S.....	.....V	FG.GHKLIVAG	(SEQ ID NO:22)



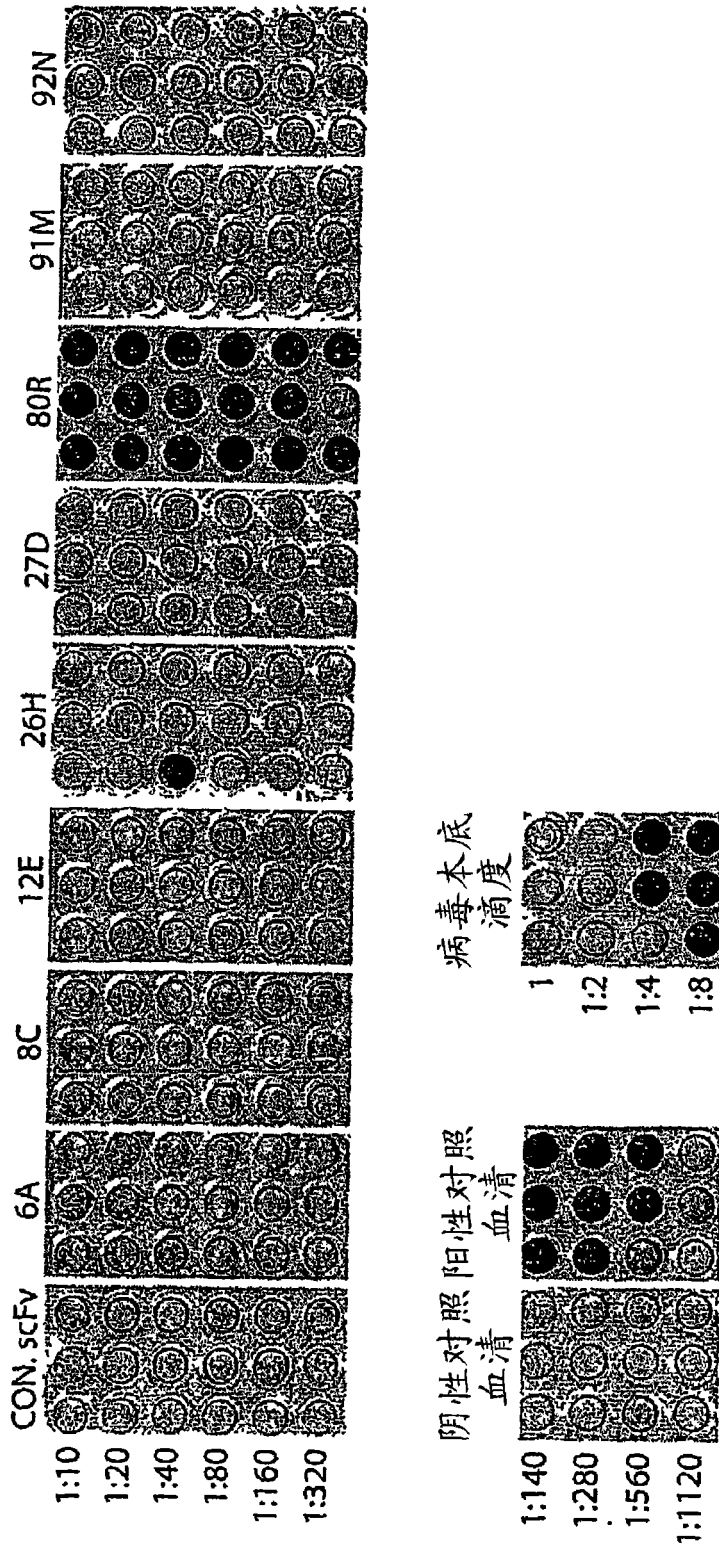


图 2A

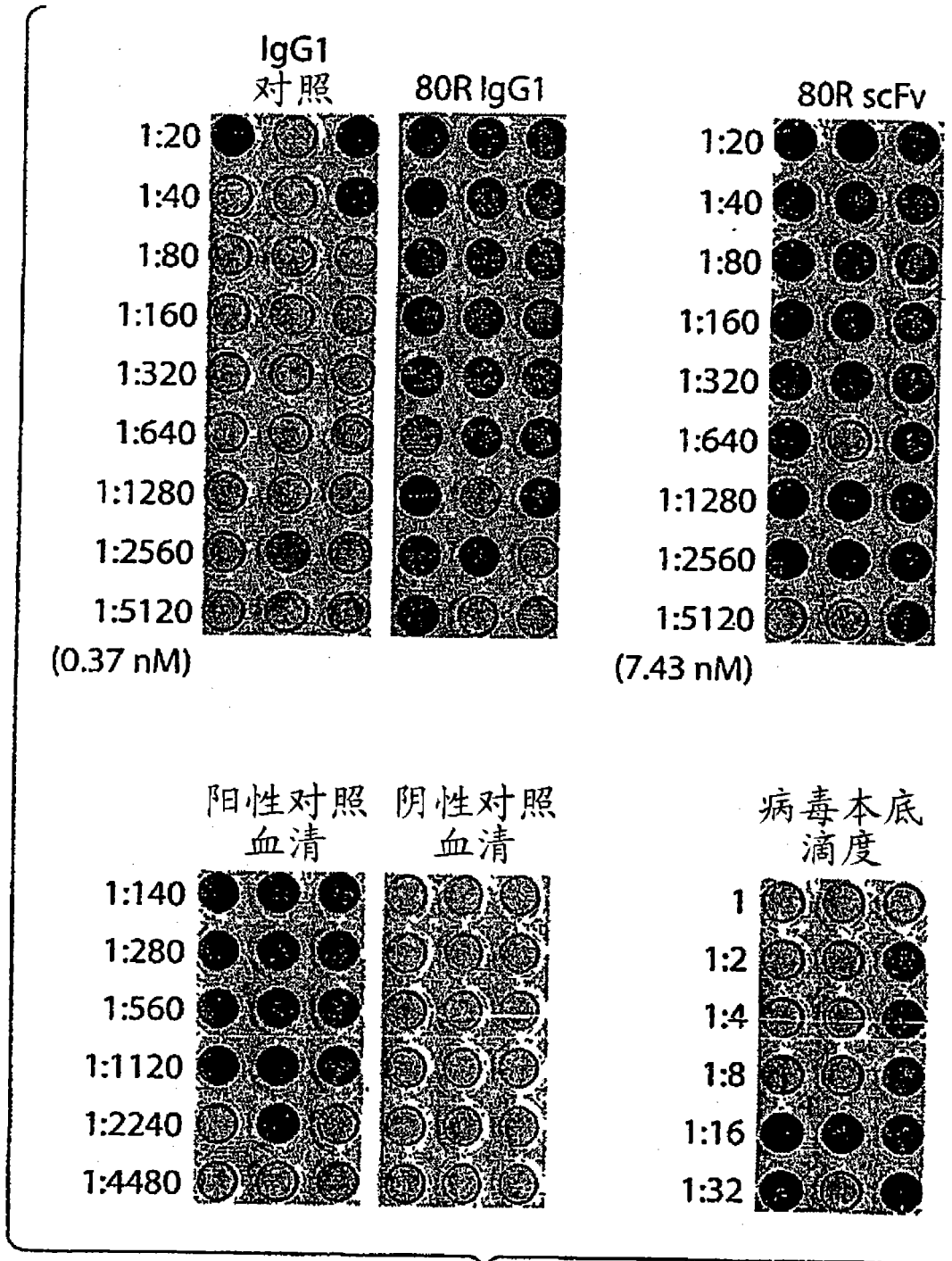


图 2B

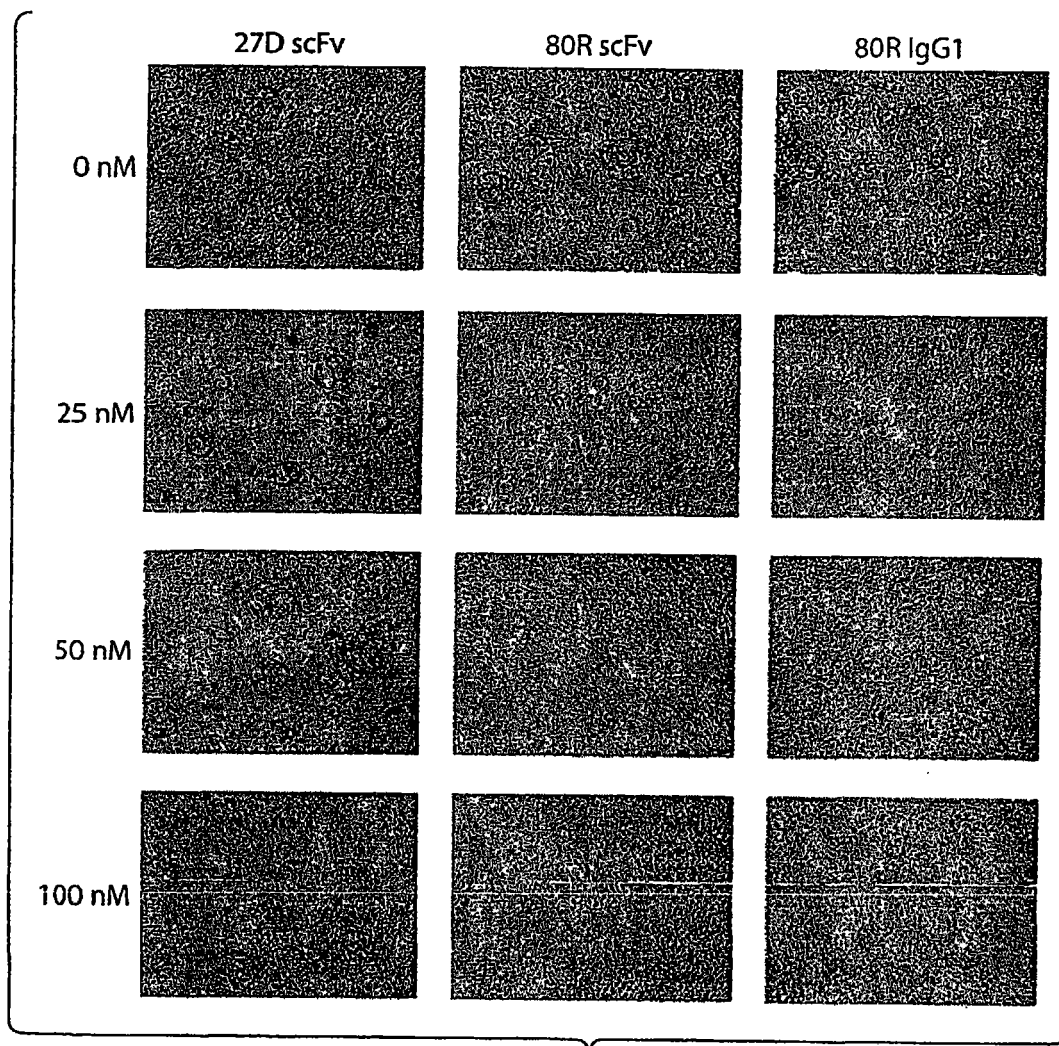


图 3

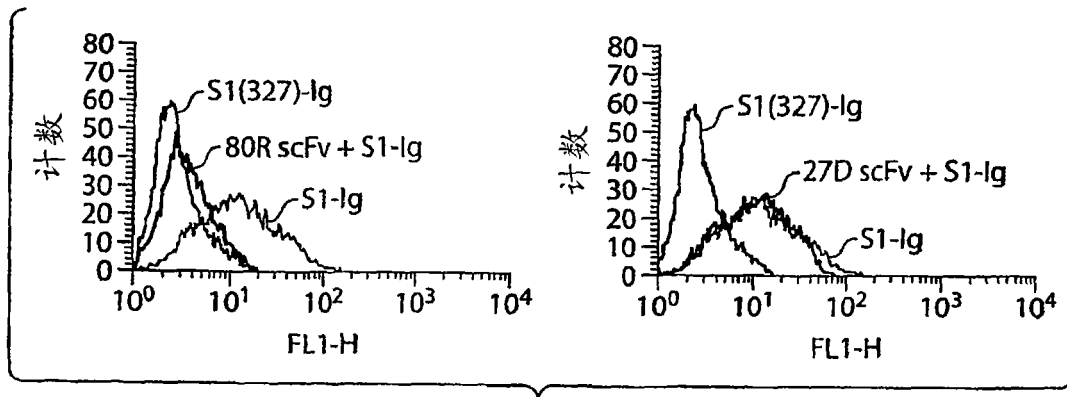


图 4 A

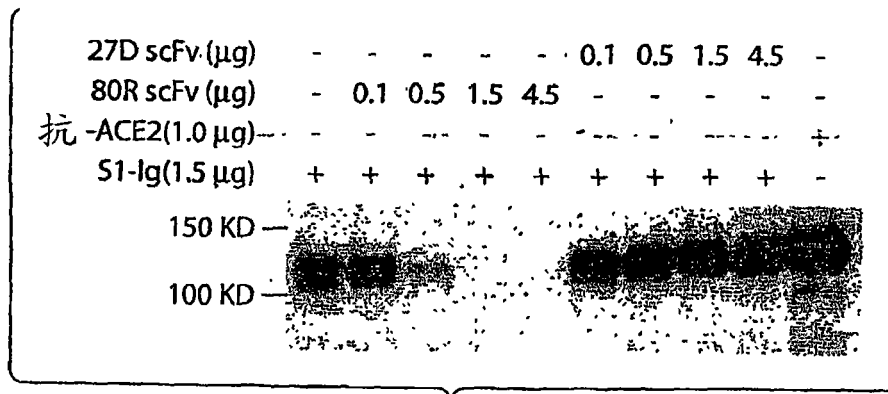


图 4 B

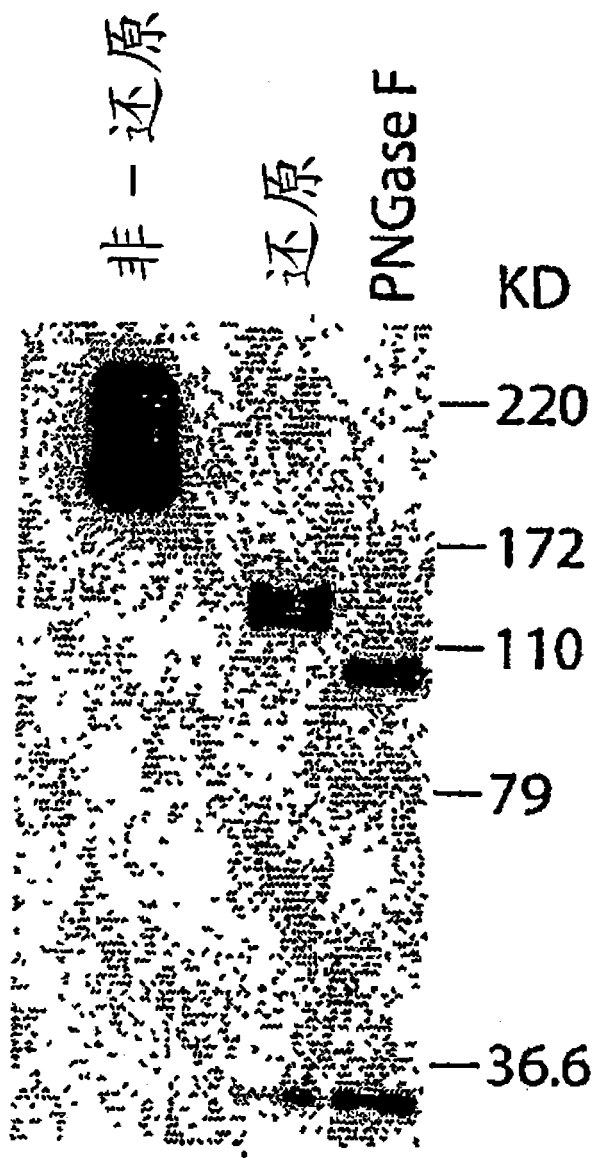


图 5



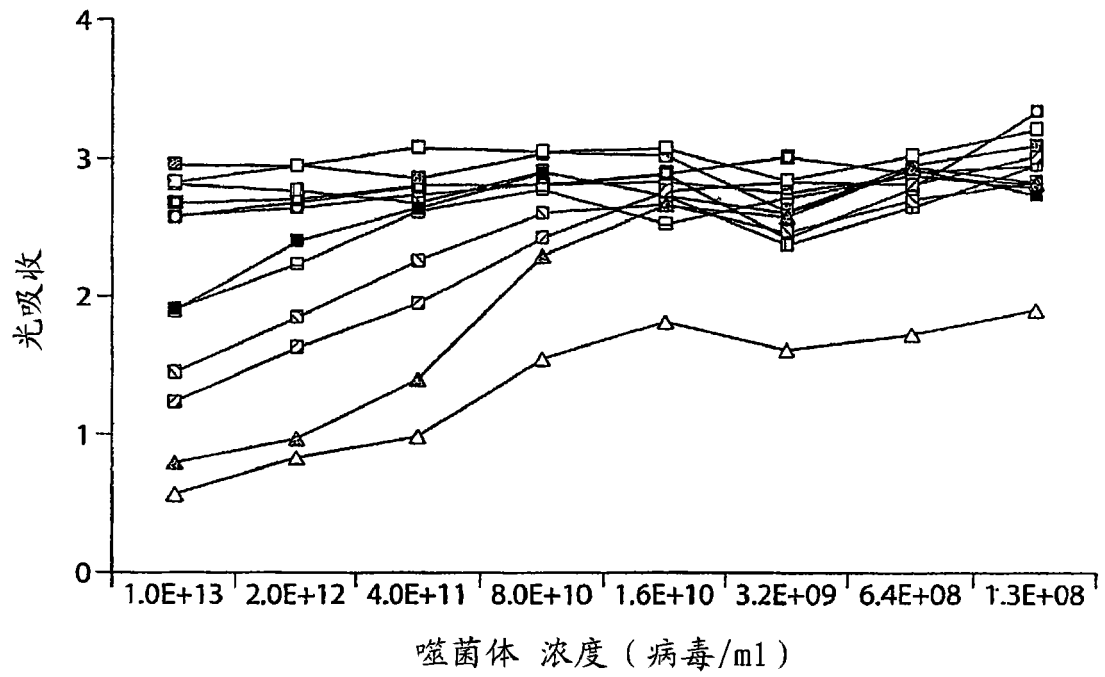


图 7

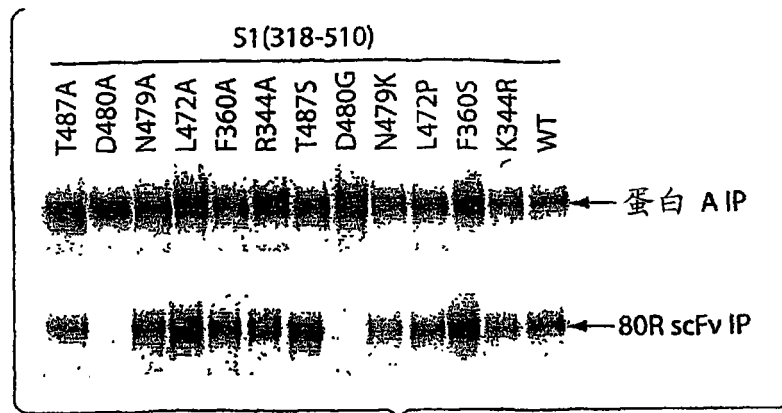


图 8A

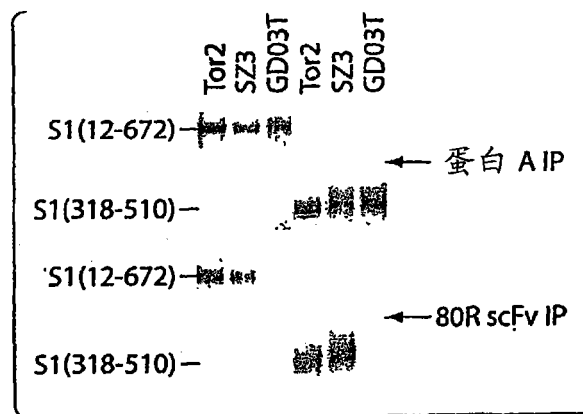


图 8B

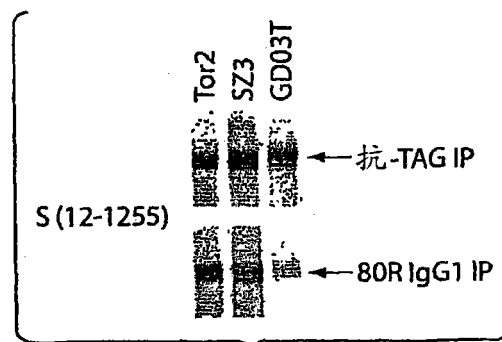


图 8C

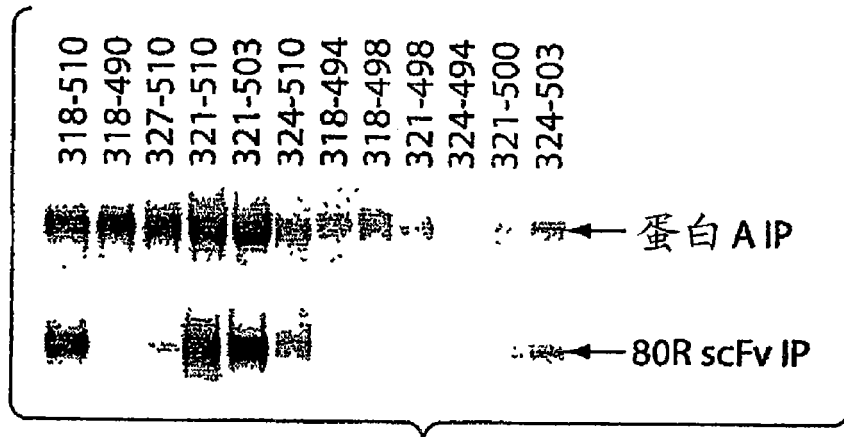


图 9A

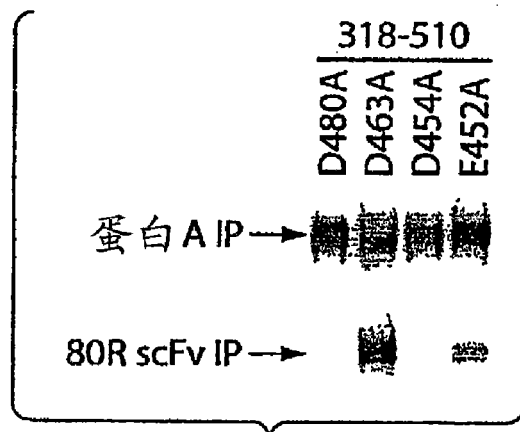


图 9B

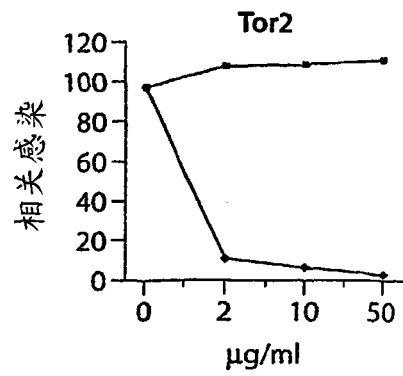


图 10A

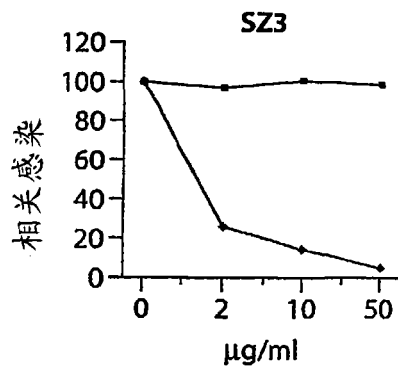


图 10B

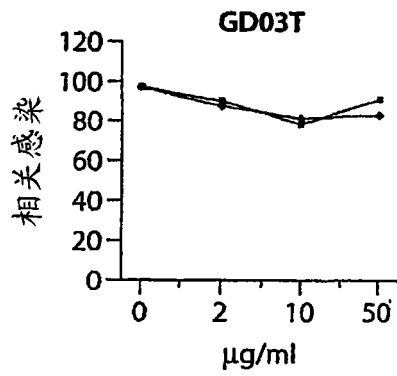
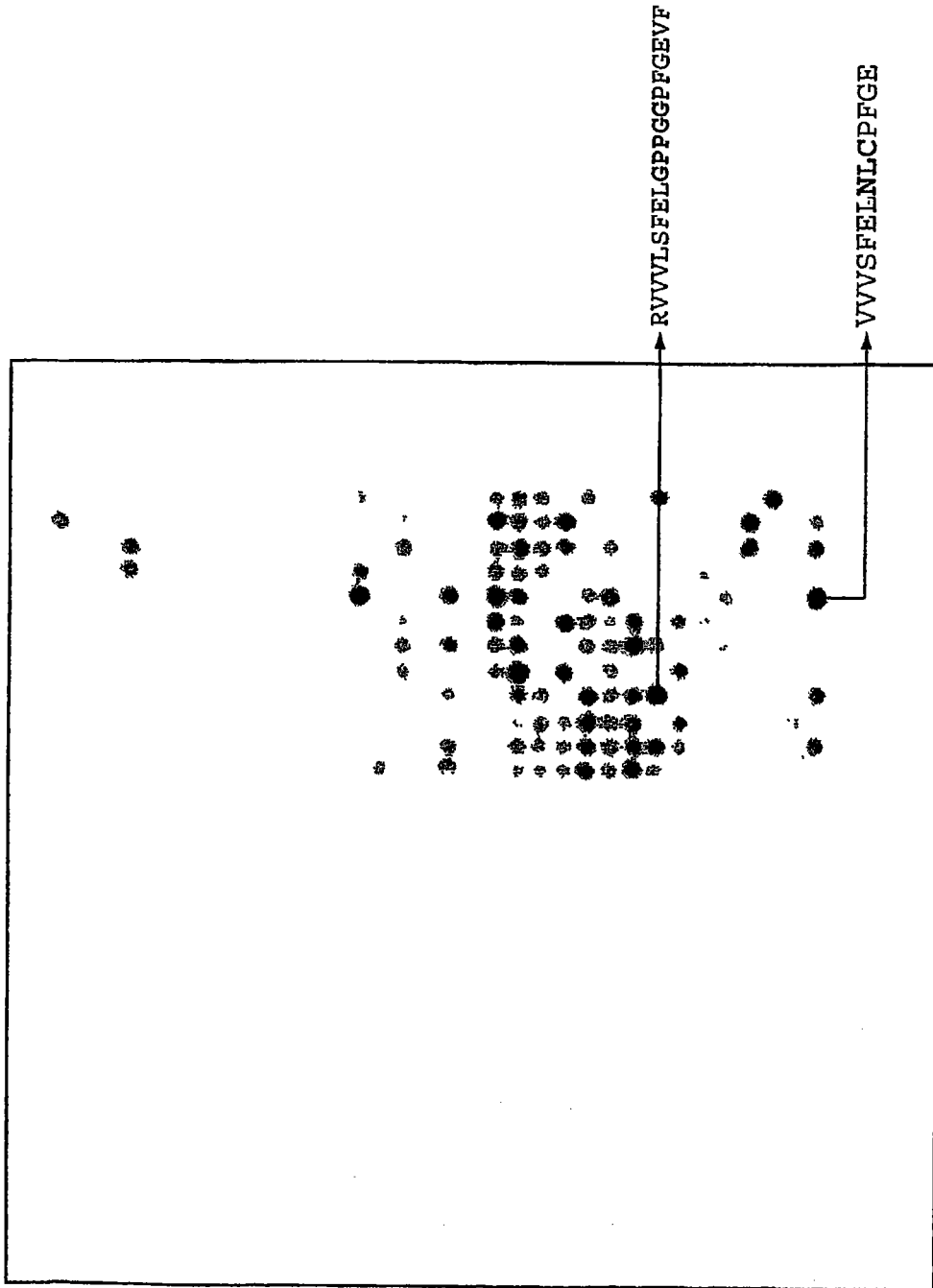


图 10C



对照

80R Ab

图 11

专利名称(译)	SARS - CoV抗体及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1914226A</a>	公开(公告)日	2007-02-14
申请号	CN200480040877.8	申请日	2004-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	达纳-法伯癌症研究院有限公司		
[标]发明人	韦恩玛拉斯科 隋建华		
发明人	韦恩·玛拉斯科 隋建华		
IPC分类号	C07K16/10 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/00 A61K39/42		
CPC分类号	C07K2317/34 C07K2317/622 A61K2039/545 C07K2317/21 C12N2770/20011 A61K2039/505 C07K16/10 C07K2319/30 C07K2317/56 C07K2316/96 C07K2317/76		
优先权	60/524840 2003-11-25 US		
其他公开文献	CN1914226B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了scFv抗体和中和SARS - CoV的单克隆抗体。同时也提供治疗和/或预防冠状病毒 - 相关疾病或失调, 如SARS的方法。本发明还提供给予病人针对SARS - CoV的疫苗的方法。同时提供诊断冠状病毒 - 相关疾病或失调的方法和测定样本中冠状病毒存在情况的方法。本发明额外提供筛选调节SARS - CoV与SARS - CoV受体ACE2结合的化合物的方法及用于治疗SARS - CoV - 相关疾病或失调的化合物。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000