

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310108604. X

[51] Int. Cl.

C07K 14/165 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月10日

[11] 授权公告号 CN 100497377C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.11.14

[21] 申请号 200310108604. X

[73] 专利权人 中国科学院上海生命科学研究院
地址 200031 上海市岳阳路 320 号

[72] 发明人 吴家睿 曾 嵘 孙 兵 杨瑞馥
施木德

[56] 参考文献

- . EMBL 登录号 AY323977. 2003
assessment of immunoreactive synthetic peptides from the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Wang Jingqiang 等. *Clinical Chemistry*, Vol. 49 No. 12. 2003

putative caveolin - binding sites in SARS - CoV proteins. CAI Quan, Cai 等. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 24 No. 10. 2003

审查员 周 霞

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 6 页

[54] 发明名称

SARS 冠状病毒结构蛋白 ORF3 及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种新的 SARS 冠状病毒结构蛋白及其应用。这个蛋白质属于 ORF3 (位于 SARS 冠状病毒基因组 S 基因和 E 基因之间) 的基因产物。ORF3 蛋白质被定位在病毒颗粒上, 与识别宿主细胞和感染有关。ORF3 蛋白或其免疫原性片段可作为抗原, 用于生产抗体以及开发检测和治疗 SARS 的制剂。

-
1. 一种抗体的用途，所述的抗体特异性地与氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示的结构蛋白 ORF3 结合，其特征在于，所述抗体用于制备体外检测样品中是否存在 SARS 病毒的试剂盒。
 2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的样品为血清或痰液。
 3. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

SARS 冠状病毒结构蛋白 ORF3 及其应用

技术领域

本发明涉及 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)的结构蛋白及其应用。具体地,本发明涉及一种新的 SARS 病毒结构蛋白 ORF3 及其片段,以及抗 ORF3 蛋白或其片段的抗体。

背景技术

WHO 于 2003 年 3 月 12 日向全球发出了近 10 年来的首次传染病预警,该曾一度被称为非典型肺炎(atypical pneumonia)的传染病自 2002 年 11 月中旬首次在中国广东境内发现,它起病急,传染力强,抗生素治疗无效,截至 5 月 10 日 18 时,全世界已有 33 个国家和地区发现该病,累计患病人数 7296 人,死亡人数 526 人,死亡率达 3-6%。

2003 年 4 月 16 日世界卫生组织正式确认引起严重急性呼吸综合症(Severe Acute Respiratory Syndrome,以下简称 SARS)的病原体为一种新型冠状病毒-SARS 冠状病毒(以下简称 SARS-CoV)。它是一种正链、单链 RNA 病毒(ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage),属套病毒目(order *Nidovirales*)、冠状病毒科(family *Coronaviridae*)、冠状病毒属(genus *Coronavirus*)、SARS 冠状病毒(SARS coronavirus)。

电镜下,冠状病毒颗粒呈不规则形,直径约为 60-220nm,有包膜,包膜上具有糖蛋白,其中一种长的包膜糖蛋白突起长度约为 20nm,包膜内含有核衣壳。通常将包装到病毒颗粒中的病毒表达蛋白称为结构蛋白,但是有些非结构蛋白也能够插到病毒包膜中。一般认为结构蛋白质与病毒颗粒的形成与释放、以及宿主细胞的识别、宿主的感染和致病有关(S. G. Siddell, Ed., *The Coronaviridae* Plenum Press New York, 1995)。序列分析表明 SARS-CoV 与已知冠状病毒一样同样存在结构蛋白:复制酶(replicase)、S 蛋白(spike protein)、E 蛋白(envelope protein)、M 蛋白(membrane protein)、N 蛋白(nucleocapsid protein),这些结构蛋白的氨基酸序列在结构和功能上与已知冠状病毒相似。其中 SARS-CoV 的 E、M、N 蛋白所包含的保守基因序列

同样存在于其他冠状病毒中；S 蛋白是冠状病毒的糖蛋白，位于病毒表面，负责参与受体细胞的受体结合以及膜融合，S 蛋白的羧基末端由跨膜域和富含半胱氨酸残基的胞质尾区组成。S 蛋白上还包含了重要的病毒中和表位，但是，由于 SARS-CoV 的 S 蛋白与其他冠状病毒 S 蛋白间的氨基酸序列差异，目前还不能够从中推知 SARS-CoV 的 S 蛋白的受体结合特异性或抗原表位的结构特征 (Paul A. Rota et al 'Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respeiratory Syndrome' *Sciencexpress*/1May 2003)。由于 S 基因的变异，其宿主范围、组织趋向及毒力都可能发生改变，因此，对于 S 蛋白及其共价复合物的研究将有助于理解 S 蛋白如何影响 SARS 的发病机制以及相关药物的开发研制。

加拿大多伦多基因组科学中心的研究小组于 4 月 12 日在网上发布了病毒全序列，SARS-CoV 全基因组序列长约 30kb，具有 5' 帽结构和 3' polyA 尾 (Marco A. Marra et al 'The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus' *Sciencexpress*/1May 2003)，来自加拿大的 SARS-CoV 分离株预测有 14 个开放阅读框 (Rota PA, Oberste MS, The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003 May 30;300(5624):1399-404.)。已知的结构蛋白复制酶、S 蛋白、E 蛋白、M 蛋白、N 蛋白的编码序列分别位于 ORF1a 和 ORF1b、ORF2、ORF5、ORF6、ORF12 (Rota PA, Oberste MS, The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003 May 30;300(5624):1399-404.)。一般说来，RNA 病毒具有高遗传突变率的特征，这既是进化的需要也是 RNA 病毒用于逃避宿主防御的有效机制 (Yijun Ruan et al)。基因序列分析表明 SARS-CoV 的基因组序列与已知的三种冠状病毒亚群序列截然不同，极有可能是独立进化而来，所以将其归为冠状病毒的一个新的分支。取自不同来源的 14 株 SARS-CoV 基因组序列比较结果显示总共有 127 个单核苷酸变异，其中 94 个改变了氨基酸残基 (Yijun Ruan et al)，但是这些差异对于 SARS-CoV 本身进化的意义以及对于不同株型是否在被感染的宿主个体间存在的各种差异上起到关键性的作用，目前还不可知。

现有 SARS 检测手段有 3 种，包括采用抗体检测的方法：ELISA (IGM/IGA) 方法可以可靠地检出出现临床症状 20 天后 SARS 病人血清中的病毒抗体。某些病人在 14-21 天时，已经可以检测到抗体；采用免疫荧光法检测可以检测出病毒感染 VERO 细胞 10 天后产生的 M 免疫球蛋白；采用分子检测方法：已经发展了 7 对引物使用于检测过程中，检测中的阳性对照 RNA 可以从 Bernhard-Nocht

Institute in Hamburg, Germany 免费获得。检测样品包括血液、粪便、呼吸道分泌物。PCR 结果可以辅助临床诊断评价,但是不能肯定或排除疾病的可能;细胞培养方法:利用 VERO 细胞来检测 SARS 病人的呼吸道分泌物和血液样品,阳性结果表示 SARS 病人感染了冠状病毒,阴性结果不表明病人不是 SARS。但是这些检测手段还不能及时有效的作为检测诊断 SARS 的有效方法,一般都还需要结合临床症状等辅助手段综合判断。

目前,有效控制乃至消灭 SARS 对于人类生命的危害已经成为摆在全球科学家面前的重要课题。人们从发现病源到病原体的确认到基因组测序、序列分析也只有短短几个月的时间,尽管已经取得了一些进展,但目前人们对 SARS 冠状病毒知之甚少。为了获取更多有价值的线索,人们逐渐把更多的目光投向对病毒蛋白的分离、病毒蛋白的功能分析及其应用的研究上,人们迫切需要通过更多的途径寻找到更多的、有价值的 SARS-CoV 表达蛋白,进一步了解它们在病毒复制、发病机理方面的作用,提供有效的 SARS 冠状病毒的检测方法和试剂,促进 SARS 疫苗的研制和 SARS 新药的开发。目前,除了结构蛋白 S、E、M、N 被确认之外,目前,除了上述开放阅读框被确认编码 SARS-CoV 结构基因之外,还没有明确确认其他 SARS-CoV 结构基因并证实该结构基因的功能和活性特征报道,尤其是定位在病毒表面的其他蛋白。

由于临床缺少有效 SARS 的治疗药物,所以现阶段将感染病人迅速隔离治疗是最有效的防治手段。为了开发 SARS 检测方法和治疗方法,本领域迫切需要开发新的 SARS 结构蛋白以及相关的诊断方法和试剂盒。

发明内容

本发明目的就是提供一种新的 SARS 结构蛋白及其应用。

在本发明的第一方面,提供一种结构蛋白,该蛋白选自下组:

(a)具有 SEQ ID NO: 1 氨基酸序列的多肽;

(b)将 SEQ ID NO:1 氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且定位在 SARS 病毒颗粒上具有免疫原性,可与 S 蛋白形成了链间二硫键共价复合物的由(a)衍生的多肽。

在另一优选例中,该蛋白的分子量为 31KD-34KD,它能够在非还原胶上与 S 蛋白形成链间二硫键共价复合物。

较佳地,所述蛋白含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。更佳地所述蛋白的

氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在本发明的第二方面，提供了一种抗体，所述的抗体特异性地与本发明上述的结构蛋白结合。更佳地，所述的抗体是单克隆抗体。

在本发明的第三方面，提供了一种抗原性多肽，它具有 SEQ ID NO:1 中连续的 25-100 氨基酸，且与本发明上述的特异性抗体特异性结合。在另一优选例中，所述多肽具有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列。还提供了所述抗原性多肽的偶联物。

在本发明的第四方面，提供了一种检测试剂盒，它含有本发明上述的结构蛋白、上述的抗体、上述的多肽、或其组合。

在本发明的第五方面，提供了一种体外检测样品中是否存在 SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体的方法，包括步骤：

(a) 将样品与选自下组的物质接触：本发明上述的结构蛋白、上述的抗体、上述的多肽、或其组合；

(b) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在 SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体。

在另一优选例中，所述的样品为血清或痰液。

在另一优选例中，所述的物质是氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的蛋白。

在另一优选例中，所述的物质是权利要求 2 所述的抗体，且所述抗体是单克隆抗体。

在本发明的第六方面，提供了一种组合物，含有本发明上述的结构蛋白和药学上可接受的载体。

附图说明

图 1：感染病毒 24 小时的细胞质中的蛋白质电泳图谱，第 1 泳道为分子量标准，从上到下依次为 175kD, 83kD, 66kD, 43kD, 33kD, 25kD, 14kD 和 7kD。第 2 泳道为感染病毒 24 小时的细胞质中的蛋白质。

图 2：ORF3 蛋白质 N 端 7-19 位肽段 FFTLGSITAQPVK (SEQ ID NO:3) 的质谱碎片图。

图 3：ORF3 蛋白质 180-193 位肽段 LKEDYQIGGYSEDR (SEQ ID NO:4) 的质谱碎片图。

图 4：ORF3 蛋白质 C 端 236-274 位肽段 LVKDPPNVQIHTIDGSSGVANPAMDPIYDEPTTTTSVPL (SEQ ID NO:5) 的质谱碎片图。

图5: 蛋白质 C 端 236-274 位肽段

LVKDPPNVQIHTIDGSSGVANPAM[#]DPIYDEPTTTTSVPL (SEQ ID NO:6) 的质谱碎片图。其中 M[#] 为氧化的甲硫氨酸。

图 6: A 为 ORF3 蛋白免疫印迹实验, 在病毒感染的细胞(第 2 道)和分泌到细胞外的病毒(第 3 道)中都检测到 ORF3 蛋白, 第 1 道以未感染病毒的细胞作为对照。B 为 S 蛋白和 ORF3 蛋白的免疫印迹实验。左图为 S 蛋白的免疫印迹实验, 在还原胶上(第 1 道), 可在 180KD 检测到 S 蛋白, 而在非还原胶上(第 2 道), 可在 180KD 和 210KD 处同时检测到 S 蛋白。右图为 ORF3 蛋白的免疫印迹实验, 在非还原胶 210KD 处也检测到了 ORF3 蛋白(第 2 道), 说明 ORF3 蛋白与 S 蛋白确实形成了链间二硫键共价复合物。

图 7: ORF3 蛋白质金标免疫电镜观察和凝集反应, ORF3 蛋白质在冠状病毒表面呈阳性反应, 从而确认 ORF3 蛋白质定位在病毒表面, 是一个结构蛋白质。

图 8: ORF3 蛋白质抗体在病人血清中的检测, 通过 ELISA 实验在病人血清中也检测到 ORF3 蛋白质抗体呈阳性反应。A 图中采用 SBP1 多肽为检测探针; B 图中采用 SBP2 多肽为检测探针; C 图中采用 S1 多肽为检测探针; D 图表示 SBP2 多肽和 S1 多肽对病人血清检测反应的相关性。

具体实施方式

本发明人通过质谱分析 SARS 病毒的天然蛋白质, 首次发现并分离了一种新的结构蛋白质。这个蛋白质属于 ORF3(位于 SARS 冠状病毒基因组 S 基因和 E 基因之间)的基因产物。ORF3 蛋白质也定位在病毒颗粒上, 属于一种结构蛋白, 它可能与识别宿主细胞和感染有关。在此基础上完成了本发明。

本发明提供了一种新的 SARS 冠状病毒结构蛋白质, 该蛋白质的分子量为 31KD-34KD, 它能够在非还原胶上与 S 蛋白形成链间二硫键共价复合物。所述结构蛋白质是指, 包装到病毒颗粒中的病毒表达蛋白, 特别是指 ORF3 的基因产物, 它具有 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列, 该序列可以通过基因工程技术而来也可以是人工合成而来。ORF3 基因产物的分子量为 31KD-34KD, 暗示 ORF3 基因产物具有翻译后的修饰或不同形式的亚型(详见实施例 3)。

由本发明所获得的 ORF3 基因产物通过液相色谱-电喷雾离子阱质谱鉴定, 并由质谱测序证实了该蛋白质氨基酸序列(由 SEQ ID NO: 1 所示)。ORF3

位于 S 和 E 基因之间，结构分析表明，ORF3 蛋白具有三个跨膜区，蛋白的 N 端 1-22 位在膜外，C 端 160 个氨基酸在膜内。C 端 209-264 位还存在一个潜在的 ATP 酶活性位点。ORF3 蛋白含有 8 个半胱氨酸，都位于 C 端的胞内区。该蛋白的 N 端 22 位有一个潜在的糖基化位点。在该蛋白中 N 端 11 位在不同株中有突变，本实验也证明第 11 位氨基酸由 R 变为 G(详见实施例 2)。

通过进一步抗体制备和免疫印迹实验、免疫电镜实验、临床血清 ELISA 实验(详见实施例 3、4、5)证实本发明 ORF 基因产物定位于病毒颗粒表面，是一个结构蛋白，它能够与 S 蛋白形成二硫键复合物，并且 ORF3 基因产物与 S 蛋白在功能上密切相关，从而可以与 S 蛋白共同介导病毒与宿主细胞的结合，进而完成对宿主的攻击。

如本文所用，“结构蛋白 ORF3”或“ORF3 蛋白”指具有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的多肽。该术语还包括将 SEQ ID NO:1 氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的，且同样定位在 SARS 病毒颗粒上具有免疫原性，或可与 S 蛋白形成链间二硫键共价复合物的由(a)衍生的多肽。

本发明还包括具有与 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列 75%、85%、90%、95% 同源性的且具有相同功能活性的序列，可使用欧洲生物信息学研究所(EBI)提供的 Clustal 计算机程序测定序列同源性。

本发明还包括 SARS 的 ORF3 蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然 SARS 的 ORF3 蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与抗原 IgG 片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

本发明进一步提供 SARS 冠状病毒结构蛋白质的抗原性部分或区段。所述“抗原性部分或区段”是指具有一定分子结构的 ORF3 基因产物的片段，特别是具有 SEQ ID NO: 9 所示的抗原性部分或区段，当该分子结构以适当形式

存在时，它能在患病生物体内对所属的 ORF3 基因产物诱发免疫应答。用于在已知氨基酸顺序中测试这种有用的抗原表位的各种方法是已知的，根据这些序列，可以用实验方法测定这些表位，例如借助于 W08606487 中的筛选技术。这些抗原性部分或区段同样会诱导对 SARS 冠状病毒的保护作用。因此，这些抗原的部分或区段也同样都包含在本发明的范围内。

在本发明中，术语“SARS 的 ORF3 多肽”指具有 SARS 的 ORF3 蛋白活性的 SEQ ID NO.:1 序列的多肽。该术语还包括具有与 SARS 的 ORF3 蛋白相同功能的、SEQ ID NO: 1 序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于)：若干个(通常为 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括 SARS 的 ORF3 蛋白的活性片段和活性衍生物。

在本发明中，“ORF3 蛋白保守性变异多肽”指与 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列相比，有至多 10 个，较佳地至多 8 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 1 进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明还涉及编码 ORF3 的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:1 的蛋白质，但与 SEQ ID NO:2 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

本发明的 ORF3 核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体和用本发明的载体经基因工程产生的宿主细胞。所述载体可以是质粒、病毒颗粒及其他载体形式。表达载体中的多核苷酸序列可以可操作地和表达控制序列连接，还包含用于翻译起始和转录终止的核糖体结合位点，优选的包含一个或多个选择性标记。所述宿主细胞可以是细菌如大肠杆菌，真菌如酵母，昆虫细胞如 Sf9，动物

细胞如 CHO、COS 等。通过本文的阐述，适当的载体、宿主细胞的选择都在本领域技术人员知识范围内。

本发明也涉及经重组技术产生的本发明的结构蛋白，特别是 ORF3 基因产物的方法。可以用本领域熟知的方法将多核苷酸序列插入到载体中，载体可以通过转化、转导、转染等方式进入宿主细胞。宿主细胞经过本领域所熟知的方法培养一段时间，用常规方法如物理或化学方法破碎宿主细胞，回收并纯化培养物。

此外，本发明还提供了另一种分离并纯化本发明的结构蛋白，特别是 ORF3 基因产物的方法。该方法包括：培养 SARS 冠状病毒，分离病毒蛋白并采用梯度分离胶分离病毒蛋白，切下 31KD-34KD 的条带，进行胶内酶解和质谱鉴定。

本发明结构蛋白 ORF3 或其片段可以直接用于检测抗 SARS 的抗体，也可用于与 BSA 等分子量的蛋白偶联，从而形成多肽偶联物。通常，所述的偶联物由 ORF 蛋白或片段、交联剂、和 BSA 构成，其中所述的交联剂优选戊二醛（当与 ORF3 的 N-端偶联时）、EDAC（当与 ORF3 的 C-端偶联时）。

本发明的 ORF3 蛋白或其偶联物可用于免疫兔、鼠等动物，从而获得抗本发明结构蛋白 ORF3 的抗体（“本发明抗体”）。本发明抗体包括特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于 SARS 病毒、基因产物或片段。本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段（如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段）、抗体重链、抗体轻链、嵌合抗体、人源化抗体等。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的本发明结构蛋白 ORF3 或偶联物，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。对于单克隆抗体，可利用杂交瘤技术来制备（见 Kohler 等人，Nature 256:495, 1975; Kohler 等人，Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人，Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人，In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981）。

本发明的 ORF3 蛋白、免疫原性片段（短肽）、偶联物和抗体都可用检测样品中是否存在 SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体，从而作为早期检测 SARS 的有效指标之一。

本发明还提供一种检测试剂盒，它含有本发明的 ORF3 基因产物、免疫原性片段（短肽）、偶联物和抗体，该检测试剂盒可用于检测样品中是否存在

SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体，从而作为早期检测 SARS 的有效指标之一。

本发明还提供一种体外检测样品中是否存在 SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体的方法，包括 (a) 将样品与本发明所述的结构蛋白特别是 ORF3 基因产物以及与本发明所述抗原性部分或区段、相应抗体、包括多克隆抗体、单克隆抗体、以及多肽接触；(b) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在 SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体，所述的样品可以是血清或痰液。

本发明的 ORF3 蛋白、免疫原性片段和偶联物还可用于制备治疗性的药物组合物或预防性的疫苗组合物。

因此，本发明还提供一种组合物，它含有本发明所述 (a) 安全有效量的本发明结构蛋白 ORF3、ORF3 的免疫原性片段、偶联物或其组合；以及 (b) 药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、佐剂、及其组合。本发明的组合物可通过常规方法进行制备。以结构蛋白 ORF3 计，其用量例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。此外，载体和配制方法的例子可以参见《Remington 药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science)。

此外，本发明的 ORF3 基因产物可以用于开发 ORF3 基因产物的抑制剂和促进剂以及抑制或促进 S 蛋白在介导与受体细胞的受体结合以及膜融合方面作用的抑制剂和促进剂。比如膜融合抑制剂能够阻止病毒穿入宿主细胞。

本发明首次确认并获得 ORF3 基因产物与 S 蛋白结合的链间二硫键共价复合物；首次在病人血清中获得 ORF3 的抗体，并与 S 蛋白质抗体呈强相关性；首次通过基因工程技术获得大规模的 ORF3 基因表达产物；首次通过蛋白分离纯化方法获得 ORF3 基因产物。结构蛋白 ORF3 的确定，以及功能的鉴定，功能和抗原决定簇蛋白的确定将有助于进一步理解基因组序列的差别与病毒发病机理之间的关系以及有助于 SARS 检测手段的改进，新型疫苗、药物的开发。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按

照制造厂商所建议的条件。

实施例 1 分离 ORF3 蛋白

1、细胞培养和蛋白质提取

非洲绿猴肾细胞株 Vero-E6(购自 ATCC)在添加了 10% 胎牛血清(FBS), 100 U/ml 青霉素(penicillin), 50 μ g/ml 链霉素(streptomycin)的 DMEM 培养液(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)中, 于 37 摄氏度和 5% CO₂ 条件下培养。所有细胞培养用试剂购自 GIBCO BRL 公司。将含有 SARS 冠状病毒株 BJ-01(购自军事医学科学院)的原液(病毒的滴度为 TCID₅₀ 10⁶)用 DMEM 培养液(含 2% 胎牛血清)稀释 10 倍, 每 1 ml 稀释液感染 107 Vero-E6 细胞; 感染 1 小时后除去病毒稀释液, 然后加入 DMEM 培养液(含 2% 胎牛血清), 于 37 摄氏度和 5% CO₂ 条件下培养。

将病毒液或感染病毒的细胞收集后, 用 100mM Tris, 0.5% NP-40 溶解收集细胞质, 煮沸 10 分钟后保存。(以上工作均在生物安全 3 级实验室进行)

2、SDS-PAGE 电泳胶内蛋白质酶解:

采用 7.5-17% 的梯度分离胶分离病毒蛋白。图 1 为感染病毒 24 小时的细胞质中的蛋白质电泳图谱。第 1 泳道为分子量标准, 从上到下依次为 175kD, 83kD, 66kD, 43kD, 33kD, 25kD, 14kD 和 7kD。第二泳道为从感染病毒 24 小时的细胞中提取的蛋白质。第 2 泳道中的蛋白质条带经质谱鉴定后, 发现有 SARS 病毒的 N 蛋白存在, 同时, 在 1, 2 和 3 条带中, 均发现有 ORF3 蛋白质(见实施例 2)。

将图 1 中条带 1 和条带 2 切下, 置于 50% H₂O-40% MeOH-10%HAc 中漂洗脱色后, 冻干。依次加入 5mM 二硫苏糖醇和点 20 mM 碘代乙酰胺还原和封闭半胱氨酸。胶条捣碎置于 100mM NH₄HCO₃ (pH 8.3), 加入 TPCK-胰蛋白酶, 37°C 保温 24 小时。酶解后, 凝胶内蛋白质经 0.1%TFA-60% ACN 抽提 2-3 次后, 冻干浓缩。

实施例 2 液相色谱-电喷雾离子阱质谱鉴定蛋白质

测定在 Finnigan MAT LCQ 离子阱质谱仪上进行, 毛细管温度, 200°C; 喷雾电压, 4.25 kV; 鞘气流速, 50; 联用的 HPLC 为 Survey 型, 反相 C18 柱(Keystone 公司产品), 50x1.0.18 I.D. mm, 流速: 2 μ l/min; 洗脱液, A

液, 0. 1% FA-H₂O; B液, 0. 1% FA-ACN。MS/MS 能量为 35%。数据库检索采用 Sequest 自动检索软件进行, 检索数据库 SARS 病毒基因组数据库。将条带 1, 2, 3 分别用质谱进行酶解肽谱分析。图 2, 3, 4, 5 为肽段的质谱图。

根据检测结果, 并经过数据库检索, 发现条带 1, 2, 3 中出现 ORF3 的基因产物, ORF3 蛋白质的氨基酸序列列于 SEQ ID NO:1。质谱鉴定出的肽段为: FFTLGSITAQPVK (SEQ ID NO:3)、L KEDYQIGGYSEDR (SEQ ID NO:4)、LVKDPPNVQIHTIDGSSGVANPAMD PIYDEPTTTT SVPL (SEQ ID NO:5), 这些肽段的氨基酸覆盖率占总蛋白质的 24.08%, 并由质谱测序确证了该蛋白质的序列 (SEQ ID NO:1) 是可靠的。

ORF3 蛋白质的氨基酸序列列于 SEQ ID NO:1。

```
MDLFMRFFTL GSITAQPVKI DNASPASTVH ATATIPLQAS LPFGWLVIGV 50
AFLAVFQSAT KIIALNKRWQ LALYKGFQFI CNLLLLFVTI YSHLLLVAAG 100
MEAQFLYLYA LIYFLQCINA CRIIMRCWLC WKCKSKNPLL YDANYFVCWH 150
THNYDYCIPY NSVTDTIVVT EGDGISTPKL KEDYQIGGYS EDRHSGVKDY 200
VVVHGYFTEV YYQLESTQIT TDTGIENATF FIFNKLVKDP PNVQIHTIDG 250
SSGVANPAMD PIYDEPTTTT SVPL 274
(SEQ ID NO:1)
```

ORF3 编码序列参见 SEQ ID NO:2。

实施例 3 抗体制备和免疫印迹实验

在多肽合成仪上, 通过人工合成了 S 蛋白质的抗原肽 S1 (332-351 位, TKFPSVYAWERKKISNCVAD, SEQ ID NO:7) 和 S2 (758-780 位, RNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFG, SEQ ID NO:8) 以及 ORF3 蛋白质的抗原肽 SBP1 (176-199 位, STPKLKEDYQIFFYSEDRHSGVKD, SEQ ID NO:9), 对兔子免疫后制备获得多克隆抗体。

N 蛋白抗体采用全长 N 蛋白 (实施例 1) 免疫获得。

分别采用 S2 和 SBP1 抗体与转膜后的蛋白质反应, 用 ECL 显色。分别用 ORF3 蛋白质的抗体 (抗 SBP1) 进行免疫印迹实验, 在病毒感染的细胞和分泌到细胞外的病毒中都检测到 ORF3 蛋白质 (图 6A)。检测的蛋白质分子量在 31KD-34KD 左右, 与 SDS-PAGE 的结果相符, 并暗示 ORF3 蛋白质可能有翻译后修饰或不同形式的亚型。

用 S 蛋白的抗体 (抗 S2) 进行免疫印迹实验, 在还原胶上, 可在 180KD 处

检测到 S 蛋白，而在非还原胶上，可在 180KD 和 210KD 处同时检测到 S 蛋白，说明 S 蛋白与其他蛋白质形成了链间二硫键复合物，复合物的分子量在 210KD。再用 ORF3 蛋白的抗体(抗 SBP1)进行免疫印迹实验，在非还原胶 210KD 处也发现了 ORF3 蛋白。这说明 ORF3 蛋白与 S 蛋白确实形成了链间二硫键共价复合物。结果见图 6B。

实施例 4 免疫电镜实验

首先是把 ORF3 蛋白抗体(抗 SBP1)与 SARS 冠状病毒颗粒混合后温浴，然后用金标(Protein A-Gold)进行标记号并在透射电子显微镜下观察。结果表明 ORF3 蛋白存在于病毒颗粒上(图 7A)。

随后又进行了免疫凝集实验。把 ORF3 蛋白抗体(抗 SBP1)与 SARS 冠状病毒颗粒混合后温浴，然后在透射电子显微镜下观察，同时用抗 S2 和抗 N 蛋白的抗体作为阳性对照。结果表明，在抗 SBP1 抗体存在的情况下出现了病毒颗粒的凝集(图 7B)。实验确认 ORF3 蛋白定位在病毒颗粒，是一个结构蛋白。

ORF3 蛋白抗体(抗 SBP1)金标免疫电镜观察和凝集反应结果如图 7 所示。图 7A 为 ORF3 蛋白抗体(抗 SBP1)存在下的 SARS 冠状病毒颗粒的金标免疫电镜图。图 7B 为 ORF3 蛋白抗体(抗 SBP1)、抗 S2 和抗 N 蛋白的抗体存在下的 SARS 冠状病毒颗粒的免疫凝集电镜图。

实施例 5 临床血清 ELISA 实验

选用了 56 个 SARS 病人和 36 个正常人的血清，分别与 ORF3 的抗原肽 SBP1 和 SBP2 进行 ELISA 实验，以 S1 抗原肽作为阳性对照。

结果见图 8。SARS 病人中一部分人的血清均与有 SBP1 和 SBP2 有显著反应，另一部分则低于正常人的反应。此外，与 SBP2 有显著反应的病人血清在检测 S1 抗原肽的反应时出现类似的反应。统计分析表明它们有显著的相关性(图 8D)，这表明，ORF3 蛋白和 S 蛋白在功能上密切相关。

实施例 6 抗原多肽的与载体的连接(偶联物的制备)

对于实施例 3 合成的 ORF3 蛋白质的抗原肽 SBP1(SEQ ID NO:9)，先用 PBS 溶解(对某些不溶的多肽，可以先用半量 PBS 溶解，若不溶则用 1M NaOH 调节 PH 使之全溶)，取 0.5ml 多肽(浓度分别为 0.5mg/ml、1mg/ml)与 15mg BSA(1.5ml)混匀，然后加入交联剂(针对交联方向的不同，选择不同的交联剂，

N-端交联加入戊二醛，C-端加入 EDAC)，混合后于室温反应 5 小时，避光不断摇晃；交联结束后，放入透析袋中，对 PBS 4℃ 透析过夜；量体积，以 BSA 计算浓度，于 -20℃ 保存备用。

实施例 7 抗原多肽免疫动物制备抗体：

取实施例 6 制备的偶联物约 0.5ml (偶联物含量分别为 0.1mg、0.5mg)，加入 PBS 1.5ml 后与 CFA (完全弗氏佐剂) 混合，在三通管中反复推打，直至感觉费力，放置 3-5 分钟后，无两相分离即可。

将经过佐剂乳化处理的抗原免疫兔子和小鼠；每只兔子注射抗原 3ml 左右，小鼠则注射 0.8ml/只。分别皮下注射动物两足垫、颈部、背部多点注射 (每点 0.2ml)。

初次免疫三周后，取同样剂量多肽抗原、PBS，混合 2ml IFA (不完全弗氏佐剂)，乳化后对动物进行加强免疫，注射剂量不变。

三周后对动物取血，收集抗血清。使用 BSA 包被的层析柱，清除针对 BSA 的抗体。挑选抗体滴度较高的抗原多肽，制得单克隆抗体。

实施例 8 检测应用

(1) 抗原多肽检测病人血清样品：

使用经过处理的实施例 3 制备的抗原多肽 (SEQ ID NO:9) 包被，与病人血清混合反应，结果本发明的抗原肽段可以识别病人血清中早期针对 SARS 的特异性抗体，并与之结合，洗涤后加入 HRP 酶连二抗反应；最后加入显色底物，进行检测。

结果表明，本发明的 ORF 免疫原性肽可特异性地与抗 SARS 病毒的抗体结合。

(2) 抗体 (单抗与多抗) 检测病原体：

对于实施例 7 获得的抗体 (多抗和单抗)，用 ELISA 法与病人血清反应，检测病人组织液、血液中的病毒结合，对病原体进行检测。

结果表明，本发明的多抗和单抗可特异性地与 SARS 病毒结合。

实施例 9 SARS 冠状病毒 ORF3 蛋白原核表达及纯化：

在本实施例中，用对应于 SARS 冠状病毒 ORF3 蛋白的全长基因克隆 (SEQ ID NO:2) 两端序列 20bp 的引物，通过反转录 PCR 扩增得到 ORF3 的全长序列，

然后插入原核表达载体 pQE30 中(Qiagen 公司)的多克隆位点。将重组质粒转化大肠杆菌 M15 诱导表达蛋白。挑单克隆在相应的抗性培养液中培养过夜后,以 1:10 比例接种至相同抗性的培养液中振荡培养至 OD600 为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L 诱导表达蛋白。重组的 ORF3 蛋白按照操作手册经 Ni-NTA 亲和层析纯化后, SDS-PAGE 检测。分子量约为 34KD,与预测值相符。

Western 印迹:

纯化后的 ORF3 蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜。用封闭液(3% Gelatin)封闭后,加入免疫后兔抗血清(1/1000 稀释), 37℃ 孵育 1 小时,洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔的 IgG(H+L), 37℃ 孵育 1 小时,充分洗涤后 ECL 显色。

结果,重组表达的 ORF3 在约 34kDa 处有一显色条带,与预测相符。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文章被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

- <110> 中国科学院上海生命科学研究院
 <120> SARS 冠状病毒结构蛋白 ORF3 及其应用
 <130> 035182
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> SARS 病毒(SARS virus)
 <400> 1

```

Met Asp Leu Phe Met Arg Phe Phe Thr Leu Gly Ser Ile Thr Ala Gln
1           5           10           15
Pro Val Lys Ile Asp Asn Ala Ser Pro Ala Ser Thr Val His Ala Thr
           20           25           30
Ala Thr Ile Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Phe Gly Trp Leu Val Ile
           35           40           45
Gly Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Gln Ser Ala Thr Lys Ile Ile Ala
           50           55           60
Leu Asn Lys Arg Trp Gln Leu Ala Leu Tyr Lys Gly Phe Gln Phe Ile
65           70           75           80
Cys Asn Leu Leu Leu Leu Phe Val Thr Ile Tyr Ser His Leu Leu Leu
           85           90           95
Val Ala Ala Gly Met Glu Ala Gln Phe Leu Tyr Leu Tyr Ala Leu Ile
           100          105          110
Tyr Phe Leu Gln Cys Ile Asn Ala Cys Arg Ile Ile Met Arg Cys Trp
           115          120          125
Leu Cys Trp Lys Cys Lys Ser Lys Asn Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Asn
           130          135          140
Tyr Phe Val Cys Trp His Thr His Asn Tyr Asp Tyr Cys Ile Pro Tyr
145          150          155          160
Asn Ser Val Thr Asp Thr Ile Val Val Thr Glu Gly Asp Gly Ile Ser
           165          170          175
Thr Pro Lys Leu Lys Glu Asp Tyr Gln Ile Gly Gly Tyr Ser Glu Asp
           180          185          190
Arg His Ser Gly Val Lys Asp Tyr Val Val Val His Gly Tyr Phe Thr
           195          200          205
Glu Val Tyr Tyr Gln Leu Glu Ser Thr Gln Ile Thr Thr Asp Thr Gly
           210          215          220
Ile Glu Asn Ala Thr Phe Ile Phe Asn Lys Leu Val Lys Asp Pro
225          230          235          240
Pro Asn Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser Ser Gly Val Ala Asn

```

245 250 255
 Pro Ala Met Asp Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr Thr Thr Thr Ser Val
 260 265 270
 Pro Leu

- <210> 2
- <211> 825
- <212> DNA
- <213> SARS 病毒(SARS virus)

<400> 2
 atggatttgt ttatgagatt ttttactcct ggatcaatta ctgcacagcc agtaaaaatt 60
 gacaatgctt ctctgcaag tactgttcat gctacagcaa cgataccgct acaagcctca 120
 ctccctttcg gatggcttgt tattggcggt gcatttcttg ctgtttttca gagcgctacc 180
 aaaaataattg cgctcaataa aagatggcag ctagcccttt ataagggtt ccagttcatt 240
 tgcaatttac tgcgtctatt tgttaccatc tattcacatc ttttgcttgt cgctgcaggt 300
 atggaggcgc aatttttcta cctctatgcc ttgatataatt ttctacaatg catcaacgca 360
 tgtagaatta ttatgagatg ttggcttctg ttggaagtga aatcccagaa cccattactt 420
 tatgatgcca actactttgt ttgctggcac acacataact atgactactg tataccatat 480
 aacagtgtca cagatacaat tgcgttact gaaggtgacg gcatttcaac accaaaactc 540
 aaagaagact accaaattgg tggttattct gaggatagc actcaggtgt taaagactat 600
 gtcgtttgtac atggtctatt caccgaagtt tactaccagc ttgagtctac acaaattact 660
 acagacactg gtattgaaaa tgctacattc ttcattctta acaagcttgt taaagacca 720
 ccgaatgtgc aaatacacac aatcgacggc tcttcaggag ttgctaattc agcaatggat 780
 cccatttatg atgagccgac gacgactact agcgtgcctt tgtaa 825

- <210> 3
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> SARS 病毒(SARS virus)

<400> 3

Phe Phe Thr Leu Gly Ser Ile Thr Ala Gln Pro Val Lys
 1 5 10

- <210> 4
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> SARS 病毒(SARS virus)

<400> 4

Leu Lys Glu Asp Tyr Gln Ile Gly Gly Tyr Ser Glu Asp Arg
 1 5 10

- <210> 5
- <211> 39
- <212> PRT

<213> SARS 病毒(SARS virus)

<400> 5

```

Leu Val Lys Asp Pro Pro Asn Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser
1           5           10           15
Ser Gly Val Ala Asn Pro Ala Met Asp Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr
           20           25           30
Thr Thr Thr Ser Val Pro Leu
           35

```

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> SARS 病毒(SARS virus)

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> Met 为氧化的甲硫氨酸

<400> 6

```

Leu Val Lys Asp Pro Pro Asn Val Gln Ile His Thr Ile Asp Gly Ser
1           5           10           15
Ser Gly Val Ala Asn Pro Ala Met Asp Pro Ile Tyr Asp Glu Pro Thr
           20           25           30
Thr Thr Thr Ser Val Pro Leu
           35

```

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> SARS 病毒(SARS virus)

<400> 7

```

Thr Lys Phe Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn
1           5           10           15
Cys Val Ala Asp
           20

```

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> SARS 病毒(SARS virus)

<400> 8

```

Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys Gln Met Tyr Lys Thr

```

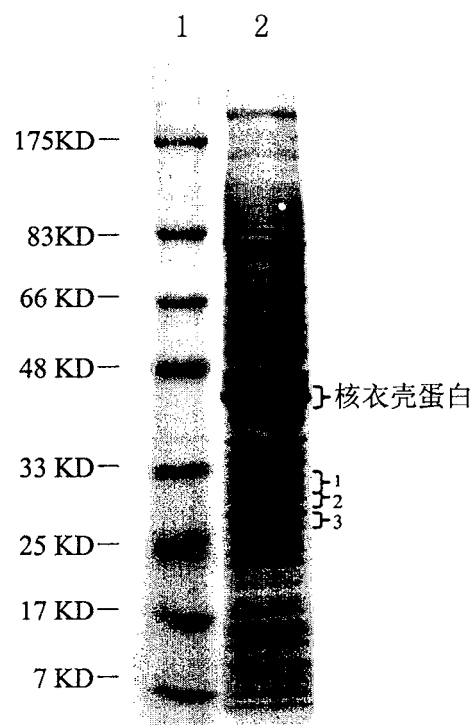



图 1

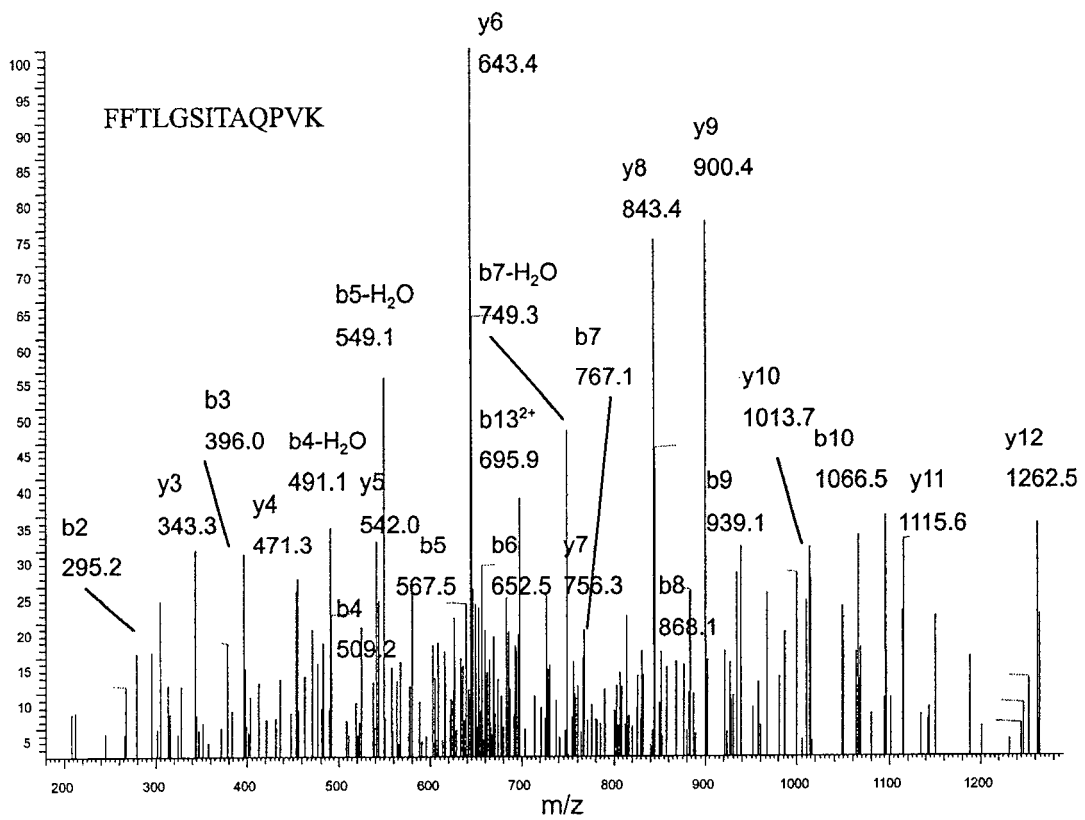


图 2

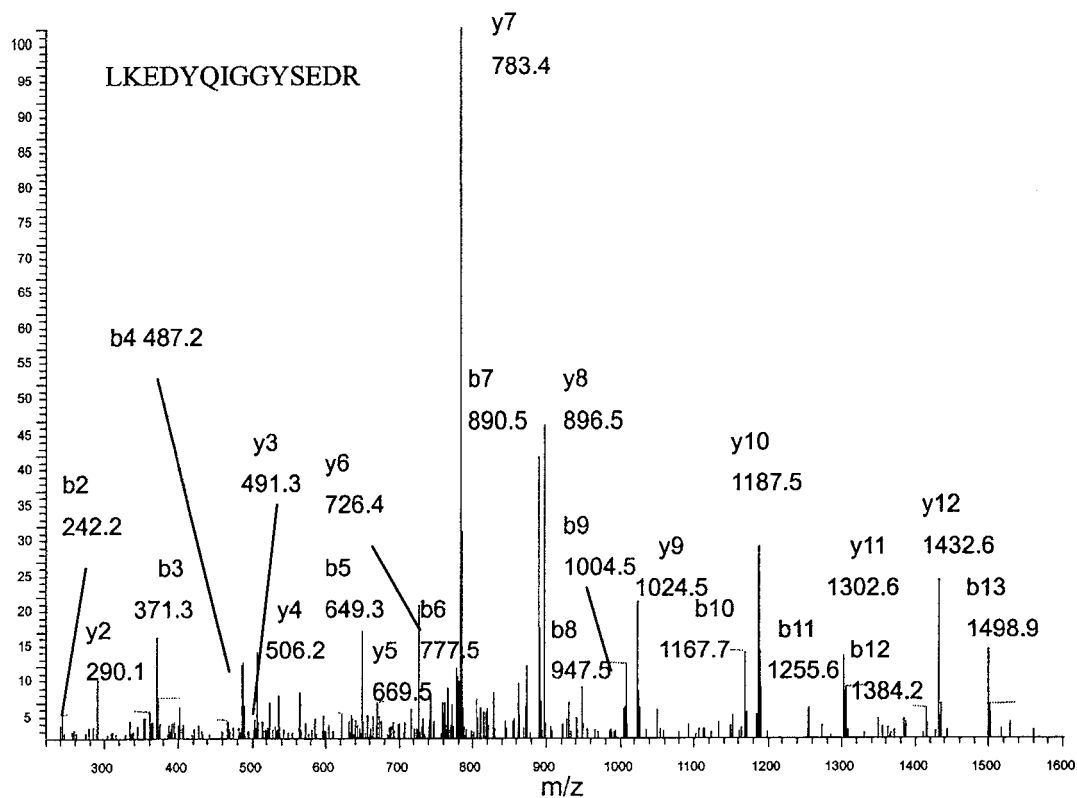


图 3

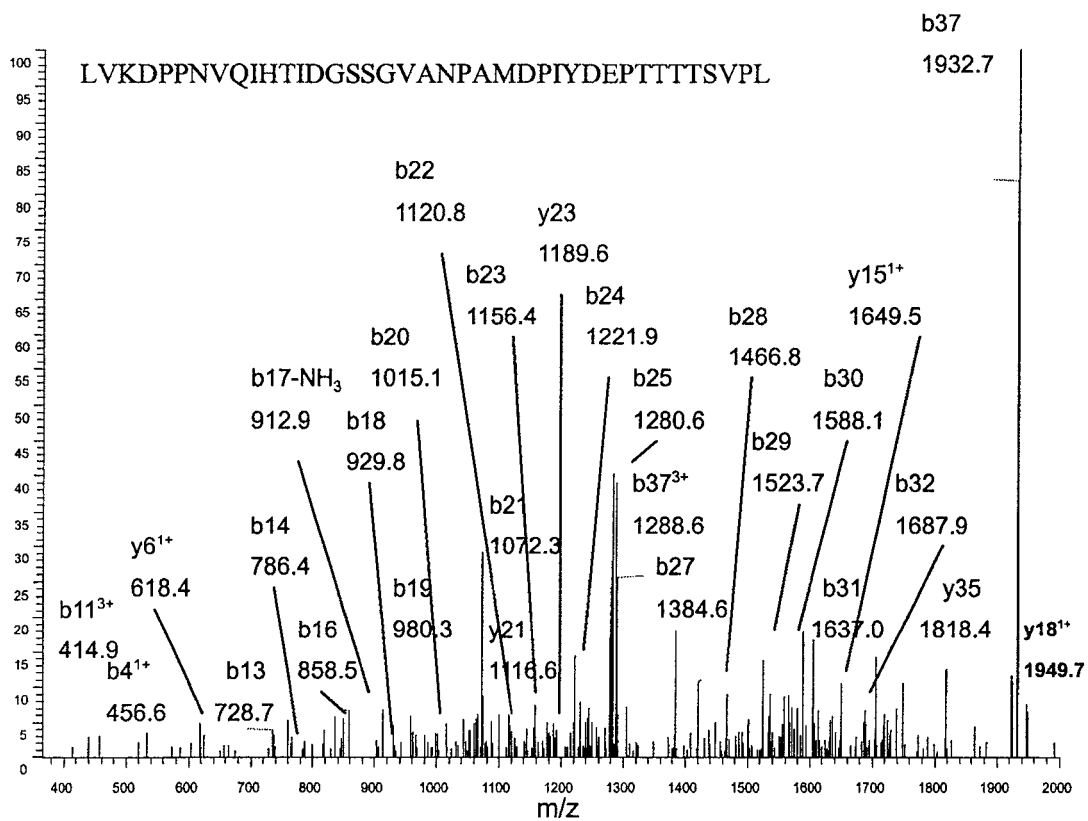


图 4

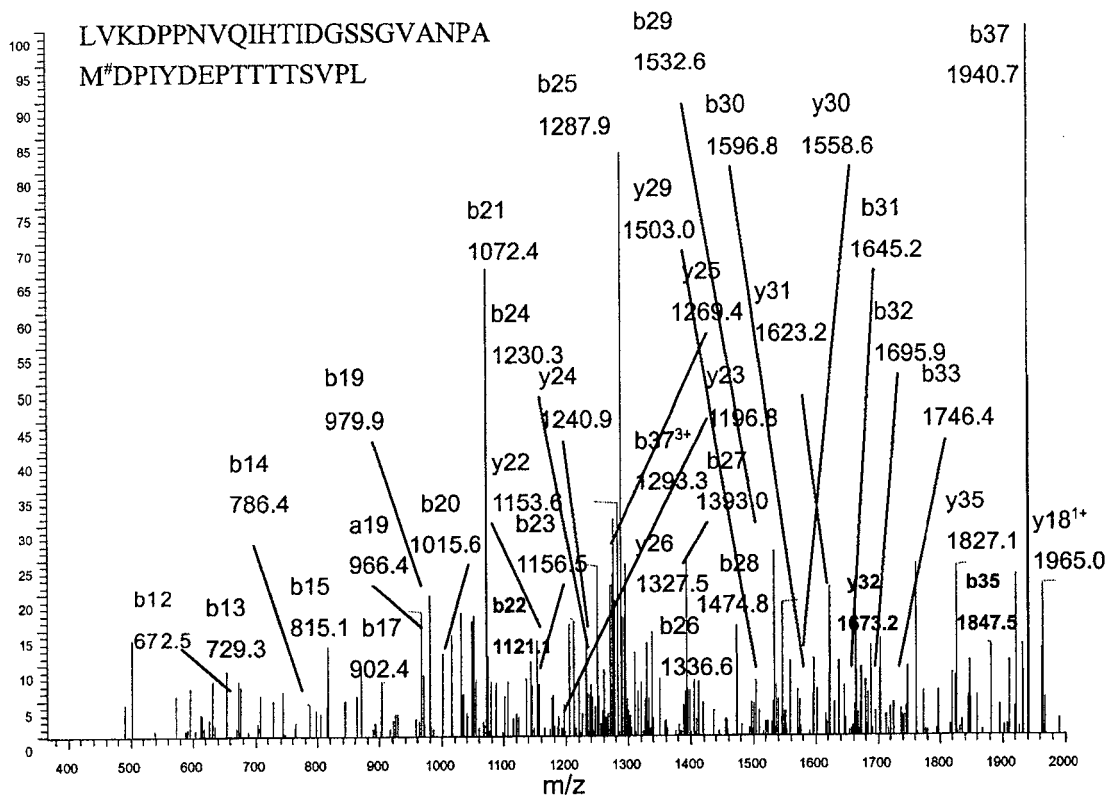


图 5

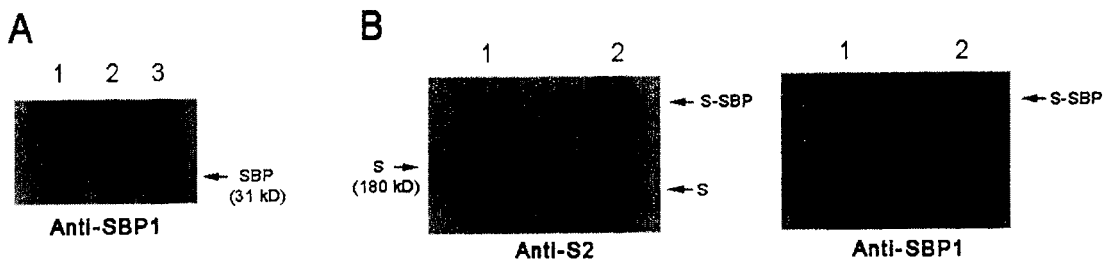


图 6

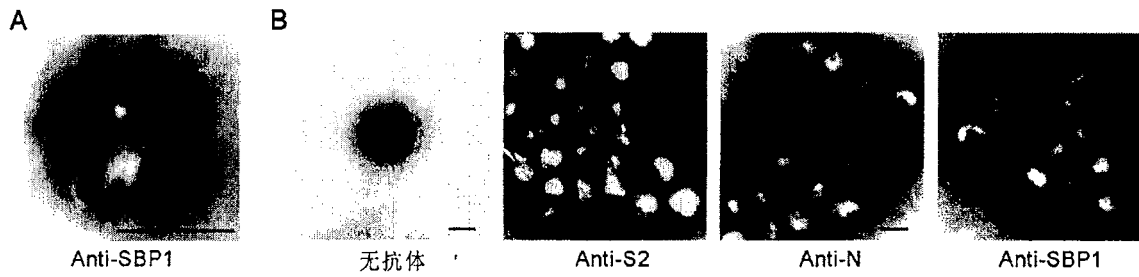


图 7

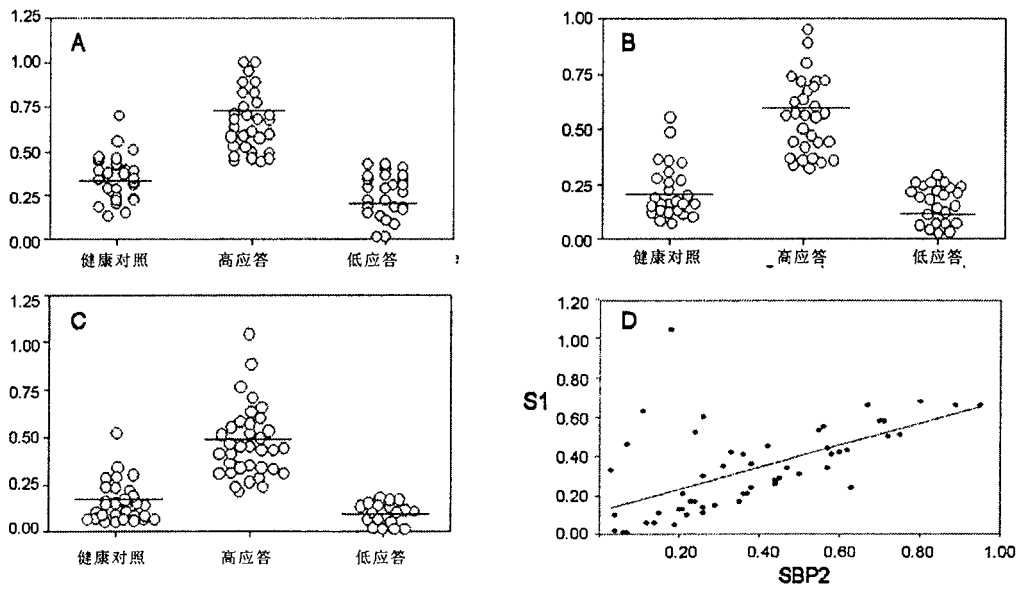


图 8

专利名称(译)	SARS冠状病毒结构蛋白ORF3及其应用		
公开(公告)号	CN100497377C	公开(公告)日	2009-06-10
申请号	CN200310108604.X	申请日	2003-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	吴家睿 曾嵘 孙兵 杨瑞馥 施木德		
发明人	吴家睿 曾嵘 孙兵 杨瑞馥 施木德		
IPC分类号	C07K14/165 C07K16/10 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/53 A61K38/16 A61P31/14 A61P11/00 C07K16/08		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	周霞		
其他公开文献	CN1616485A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种新的SARS冠状病毒结构蛋白及其应用。这个蛋白质属于ORF3(位于SARS冠状病毒基因组S基因和E基因之间)的基因产物。ORF3蛋白质被定位在病毒颗粒上，与识别宿主细胞和感染有关。ORF3蛋白或其免疫原性片段可作为抗原，用于生产抗体以及开发检测和治疗SARS的制剂。