

[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 03128832.4

[51] Int. Cl.

C07K 14/165 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年3月11日

[11] 授权公告号 CN 100467484C

[22] 申请日 2003.5.26 [21] 申请号 03128832.4

[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 孙兵 吴家睿 裴钢 李亦学  
石铁流 杨瑞馥 何有裕 施木德  
吕伟 季永镛

[56] 参考文献

SARS 病毒 S 蛋白部分片段 B-细胞表位的多参数预测. 曾桥等. 南华大学学报(医学版), 第31卷第4期. 2003

审查员 唐慧

[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12页 附图3页

[54] 发明名称

SARS 早期诊断及试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及 SARS 的早期诊断及试剂盒。具体地, 本发明使用人工合成的源自 SARS 病毒 S 蛋白的多肽作为抗原, 以及该多肽免疫动物后产生的抗体(单抗、多抗), 结合酶联免疫和其他方法检测人血清样品中的早期抗 SARS 抗体 IgM 或 IgG, 或直接检测血清样品中 SARS 病原体。

1. 一种多肽，其特征在于，其氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1。
2. 一种多肽偶联物，其特征在于，所述的偶联物由多肽、交联剂、和 BSA 构成，其中所述的多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1，所述的交联剂选自戊二醛或 EDAC。
3. 一种抗体，其特征在于，所述的抗体特异性地与权利要求 1 所述的多肽结合。
4. 如权利要求 3 所述的抗体，其特征在于，所述的抗体是单克隆抗体。
5. 一种检测试剂盒，其特征在于，它含有权利要求 1 所述的多肽、权利要求 2 所述的多肽偶联物、权利要求 3 所述的抗体、或其组合。
6. 一种物质的用途，所述的物质是权利要求 1 所述的多肽、权利要求 2 所述的多肽偶联物、或权利要求 3 所述的抗体，其特征在于，所述物质用于制备体外检测样品中是否存在 SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体的试剂盒。
7. 如权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述的样品为血清或痰液。
8. 如权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述的物质是氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的多肽。
9. 如权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述的物质是权利要求 3 所述的抗体，且所述抗体是单克隆抗体。

## SARS 早期诊断及试剂盒

### 技术领域

本发明涉及 SARS 的早期诊断及试剂盒。具体地，本发明使用人工合成的源自 SARS 病毒 S 蛋白的多肽，以及该多肽免疫动物后产生的抗体(单抗、多抗)，结合酶联免疫和其他方法检测人血清样品中的早期抗 SARS 抗体 IgM 或 IgG，或直接检测血清样品中 SARS 病原体。

### 背景技术

非典型肺炎即严重急性呼吸综合征(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)的病原体最近已经确认，是一种冠状病毒。该病毒是一种正链 RNA 病毒，基因组为单链 RNA，含有 Poly(A)，总长接近 30kb。病毒表面有约 20nm 左右的棒状结构，呈皇冠状。该病原体具有很强的感染性和传染性，病毒在患者体内经过早期复制过程后，在肺部引发大规模炎症反应，最终导致肺部组织损伤。由于临床缺少有效的治疗药物，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。

目前已经发展并使用的诊断方法包括：

1. RT-PCR 检查病毒。能及时检查带毒者，当痊愈后，显阴性。但受到仪器设备的限制，易产生较多的假阴性和假阳性而导致漏诊或误诊。

2. 通过临床症状综合评价诊断。这种方法在疾病的早期，因症状不明显，而无法准确的诊断。在疾病的晚期，虽然可以准确诊断，但延误了对疾病进行有效的治疗。

3. 血清免疫检查病毒抗体(荧光免疫法或 ELISA)。抗体产生需要在发病后至少 14 天，因此，这种方法不能做早期诊断。但是从免疫学角度来说，机体产生病原体特异性抗体 IgM 较早，选择合适的抗原与之结合也可以用作诊断参考。

目前正在使用的大多数是前三方法，这些方法在临床使用过程中，不能简便、快速、准确的判断与区分患者与疑似病例。

4. 抗原检测(ELISA)。通过制备病原体特异性的抗体(单抗与多抗)检测病人

血液或组织中病原体，该方法准确率高，操作简便，适合临床推广。但目前缺少病原体的特异性抗体。

因此，本领域迫切需要开发新的更加有效的早期诊断 SARS 的方法和试剂盒。

## 发明内容

本发明目的就是提供一种快速、简便、准确率高的 SARS 检测方法和试剂盒。

在本发明的第一方面，提供一种源自 SARS 病毒的多肽，其氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10。这些 SARS 特异性多肽可特异性地与抗 SARS 病毒的抗体结合。

在本发明的第二方面，提供了一种多肽偶联物，所述的偶联物由多肽、交联剂、和 BSA 构成，其中所述的多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10，所述的交联剂选自戊二醛或 EDAC。

在本发明的第三方面，提供了一种抗体，所述抗体特异性地与本发明的 SARS 特异性多肽结合。

在一优选例中，所述的抗体是单克隆抗体。

在本发明的第四方面，提供了一种检测试剂盒，它含有本发明的 SARS 特异性多肽、多肽偶联物、抗本发明多肽的抗体、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：本发明的 SARS 特异性多肽、多肽偶联物、抗本发明多肽的抗体、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。

在一优选例中，所述的样品为血清样品或痰液。

在另一优选例中，所述的物质是氨基酸序列为 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 的多肽。

在另一优选例中，所述的物质是单克隆抗体。

在另一优选例中，步骤(b)的检测方法是荧光检测法。

## 附图说明

图 1 显示了在 SARS 病毒感染后, IgG 和 IgM 抗体的产生情况。

图 2 显示了对 SARS 病毒 S 蛋白的结构分析。

图 3 显示了用 S6 对应的免疫前血清作为一抗进行免疫印迹的结果。

图 4 显示了用 S6-抗血清作为一抗进行免疫印迹的结果。

图 5 显示了用 S10-抗血清作为一抗进行免疫印迹的结果。

## 具体实施方式

本发明通过对 SARS 病毒潜在抗原蛋白的序列分析, 找到了具有很强抗原性的氨基酸序列, 通过合成多肽合成这些潜在抗原靶位, 再由这些多肽免疫获得的抗体, 研制出一种通过检测 SARS 病毒或抗 SARS 病毒抗体, 进行临床早期 SARS 诊断的酶联免疫方法和试剂盒。本发明可显著提高诊断效率, 并且简便、准确率高。

参见图 1。已有的研究表明: 病毒在人体内十天左右达到复制高峰, 而 SARS-IgM 抗体在发病 10~14 天时出现并很快达到高峰, 60 天时约有 1/3 的患者仍可检测到 IgM 抗体, 大部分患者中该抗体基本消失。IgG 抗体亦可在 10—14 天时检测到, 60 天时达到高峰, 90 天时仍维持在高水平。所以采用抗体检测病原体可以在病人感染后最短时间内作出有效诊断; 采用 IgM 检测可以在感染后一个星期左右作出诊断; 而检测病人体内 IgG 则最不理想。

为了获得检测 SARS 病毒所需的相关抗原与抗体, 本发明人通过对 SARS 病毒基因组的分析与比对, 结合最近与以往文献资料, 对 SARS 的潜在抗原蛋白进行分析。

通过与冠状病毒的分析与比对, 本发明人发现, 冠状病毒通过与细胞表面受体结合, 随即与细胞膜发生融合, 病毒粒子进入细胞。病毒的生活周期完全在细胞质中进行, 不需细胞核参与。SARS 病毒本身编码两大类蛋白质, 结构蛋白和非结构蛋白:

(a) 结构蛋白主要包括结合在病毒膜表面的 S(棒状结构的主要构成成分), M 蛋白, 以及与 RNA 结合构成螺旋状核衣壳样结构的 N 蛋白。

(b) 非结构蛋白则是病毒 RNA 复制密切相关的聚合酶。

在病毒表达的众多蛋白之中，S、M 蛋白构成了病毒最外层的结构，S 蛋白是一种十分重要的结构蛋白，众多的冠状病毒在这一部分差异很大，这可能和它针对不同的靶细胞有关。

参见图 2。S 蛋白分为 S1，S2 两部分，其中通过序列分析表明，S1 区包括：1-668；S2 区：669-1162。S1 蛋白它主要与靶细胞受体结合有关；S2 蛋白则介导病毒与细胞的融合。由于 S 蛋白对于病毒感染的重要性，因此很可能在其中筛选出能够用于治疗的中性抗体；而且已知的冠状病毒中性抗体都是作用于 S 蛋白区。

因此，本发明选择 SARS 的 Spike 蛋白(S 蛋白)作为抗原靶位的主要研究对象，同时考虑到 M，N 蛋白也有潜在的抗原性，适当的选择部分抗原决定表位，从临床的角度来说，这些部位产生的抗体对于疾病的早期诊断可能有些意义。

确定靶蛋白后，本发明使用多种抗原性分析软件和网站对蛋白完整序列，综合考虑氨基酸序列的亲水性(高亲水性)和多级结构(多为  $\alpha$ -螺旋,  $\beta$ -折叠)，优先考察那些存在于膜表面部分，剔除包含在膜内的部分，这样从 S 蛋白长达 1200 个氨基酸序列中筛选出以下多个潜在抗原位点 (表 1)。

如本文所用，“本发明多肽”或“SARS 特异性多肽”指氨基酸序列如表 1 所示的多肽。

本发明多肽可用常规方法人工合成，也可用重组方法生产。

本发明多肽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，所述的偶联物由多肽、交联剂、和 BSA 构成，其中所述的交联剂优选戊二醛(当与本发明多肽的 N-端偶联时)、EDAC(当与本发明多肽的 C-端偶联时)。

本发明的偶联物可用于免疫兔、鼠等动物，从而获得抗本发明多肽的抗体(“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)<sub>2</sub>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，纯化的本发明多肽或偶联物，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)。

本发明的多肽、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。

除了用于检测, 本发明的 SARS 特异性多肽还可在体内与病毒竞争受体, 阻止病毒与膜融合, 抑制病毒感染正常细胞。此外, 本发明的多肽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, 另一方面, 本发明还提供了一种组合物, 它含有(a)安全有效量的本发明多肽、偶联物或其组合物; 以及(b)药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于): 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。以本发明多肽计, 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。

本发明的主要优点在于:

(a) 因为本发明的 SARS 特异性多肽、多肽偶联物与抗 SARS 病毒抗体的亲和力高, 本发明抗体与 SARS 病毒的亲和力高, 因此, 本发明的检测方法灵敏、简便、准确率高。

(b) 本发明的 SARS 特异性多肽还可在体内与病毒竞争受体, 阻止病毒与膜融合, 抑制病毒感染正常细胞, 所以本发明具有很高的临床应用价值。

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

### 多肽的人工合成

按表 1 所示的氨基酸序列，在多肽合成仪上用合成多肽。合成后经质谱法验证，证明合成的多肽与设计相符。

表 1: 本发明多肽的氨基酸序列

编号:	序 列	SEQ ID NO:
S 蛋白		
S1-(34-54)	TSSMRGVVYYPDEIFRSDTLYL	1
S2-(94-113)	KSNVVRGWVFGSTMNNKSQS	2
S3-(197-216)	YKGYQPIDVVRDLPSGFNTL	3
S4-(273-293)	TDAVDCSQNPLAELKCSVKSF	4
S5-(297-316)	KGIYQTSNFRVVPSGDVVRF	5
S6-(332-351)	TKFPSVYAWERKKISNCVAD	6
S7-(436-455)	YNYKYRYLRHGKLRPFERDI	7
S8-(540-559)	PSSKRFQPFQQFGRDVSDFT	8
S9-(731-753)	CANLLLQYGSFCTQLNRALSGIA	9
S10-(758-780)	RNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFG	10

## 实施例 2

### 抗原多肽的与载体的连接(偶联物的制备)

对于实施例 1 合成的各多肽，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 3

### 抗原多肽免疫动物制备抗体:

取实施例 2 制备的各偶联物约 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，制备单克隆抗体。

## 实施例 4

### 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 1 制备的抗原多肽包被，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，本发明的多肽可特异性地与抗 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 3 获得的获得的抗体 (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 5

### 免疫印迹实验

在本实施例中，所用抗体分别为 S6 对应的免疫前血清，S6-抗血清和 S10-抗血清 (免疫兔后的血清中抗体，未纯化)。

免疫印迹实验流程如下：

#### 1. SDS-PAGE：

样品：SARS 病毒感染的细胞裂解液

上样量：20ul

上层胶 3.5%，下层胶 7%，上层胶 100V 1 小时， 下层胶 200V 15 小时

2. 转膜：

电流：1.0mA/cm<sup>2</sup>，2 小时

3. 封闭：

5%脱脂奶粉封闭 6 小时

4. 杂交

一抗，1：500 稀释在 TBS-Tween 中，室温杂交 1 小时

二抗(goat-anti-rabbit-HRP，购自 Santa Cruze 公司)：1：4000 稀释，杂交 1 小时

显色：ECL-Plus(购自 Amersham 公司)

结果如图 3-5 所示。其中图 3 显示了用 S6 对应的免疫前血清作为一抗进行免疫印迹的结果。图 4 显示了用 S6-抗血清作为一抗进行免疫印迹的结果。图 5 显示了用 S10-抗血清作为一抗进行免疫印迹的结果。三张图左侧四个箭头为标准分子量，从上到下分别为：175Kd，83Kd，62Kd，47Kd。右侧箭头提示为 S 蛋白。

从图 3-5 可以看出，S6 和 S10 这两个抗体均在 180Kd 附近有一条明显的条带，而一抗为免疫前血清(相当于阴性对照)的没有。差异条带大小与 S 蛋白类似，提示右侧箭头所指处条带是 S 蛋白。这表明，抗 S6 和 S10 抗体特异性地与 SARS 病毒的 S 蛋白结合。另外，由于在别的位置和免疫前血清比未发现明显差异，所以提示 S 蛋白在 SARS 病毒中未发生剪切。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献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 早期诊断及试剂盒

<130> 033041

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 1

Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg Ser  
1                   5                   10                   15

Asp Thr Leu Tyr Leu  
                  20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 2

Lys Ser Asn Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn  
1                   5                   10                   15

Lys Ser Gln Ser  
                  20

<210> 3

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 3

Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly  
 1                   5                   10                   15

Phe Asn Thr Leu  
                   20

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 4

Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
 1                   5                   10                   15

Ser Val Lys Ser Phe  
                   20

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 5

Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp  
 1                   5                   10                   15

Val Val Arg Phe  
                   20

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 6

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> 7  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 7

Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu Arg Pro Phe  
 1                    5                    10                    15

Glu Arg Asp Ile  
                   20

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 8

Pro Ser Ser Lys Arg Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val  
 1                    5                    10                    15

Ser Asp Phe Thr

20

<210> 9  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 9

Cys Ala Asn Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn  
 1                    5                    10                    15

Arg Ala Leu Ser Gly Ile Ala  
 20

<210> 10  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 非典病毒(SARS virus)

<400> 10

Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys Gln Met Tyr Lys Thr  
 1                    5                    10                    15

Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly  
 20

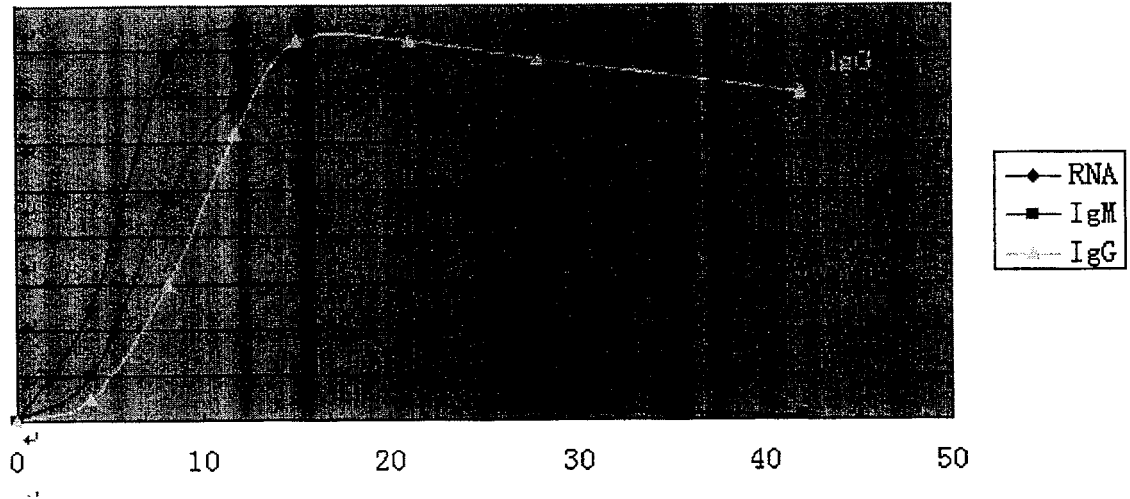


图 1

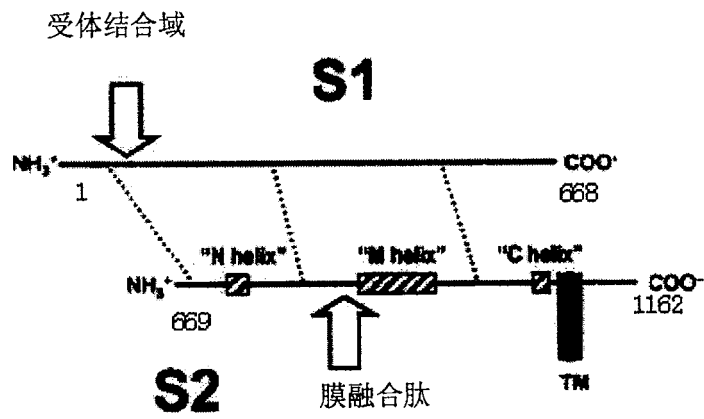


图 2

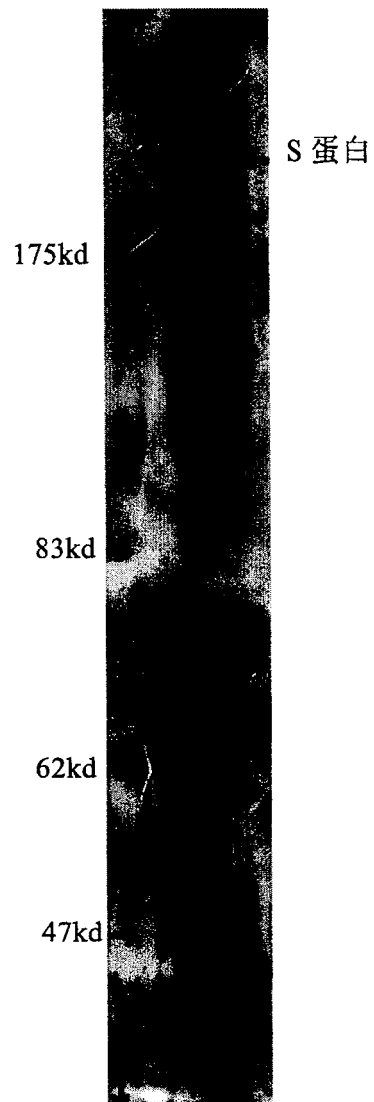


图 3



图 4

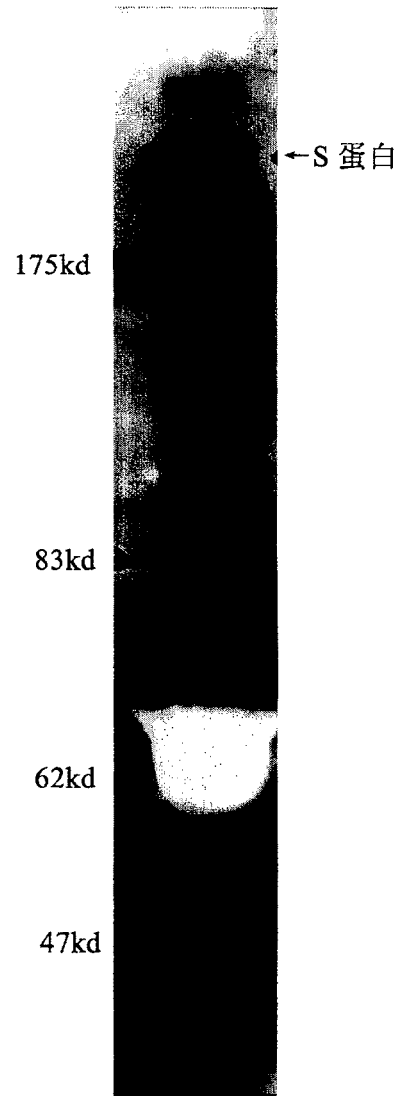


图 5

专利名称(译)	SARS早期诊断及试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN100467484C</a>	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN03128832.4	申请日	2003-05-26
[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	孙兵 吴家睿 裴钢 李亦学 石铁流 杨瑞馥 何有裕 施木德 吕伟 季永镛		
发明人	孙兵 吴家睿 裴钢 李亦学 石铁流 杨瑞馥 何有裕 施木德 吕伟 季永镛		
IPC分类号	C07K14/165 C07K16/08 G01N33/68 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/533		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	唐慧		
其他公开文献	CN1552729A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及SARS的早期诊断及试剂盒。具体地，本发明使用人工合成的源自SARS病毒S蛋白的多肽作为抗原，以及该多肽免疫动物后产生的抗体(单抗、多抗)，结合酶联免疫和其他方法检测人血清样品中的早期抗SARS抗体IgM或IgG，或直接检测血清样品中SARS病原体。

Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg Ser  
1            5            10            15

Asp Thr Leu Tyr Leu  
20