



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105934441 A

(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201480073988.2

(22)申请日 2014.11.21

(30)优先权数据

61/909,145 2013.11.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/066843 2014.11.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/080973 EN 2015.06.04

(71)申请人 贝勒医学院

地址 美国得克萨斯

(72)发明人 P·J·霍特兹 M·E·博塔兹

詹斌 陈文祥 S·查格

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.

G07K 14/00(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书30页  
序列表2页 附图7页

(54)发明名称

新型SARS免疫原性组合物

(57)摘要

本公开的实施方案涉及用于治疗或预防严重急性呼吸综合征(SARS)的免疫原性组合物和方法。所述组合物和方法涉及SARS-CoV纤突蛋白(spike protein)的受体结合结构域(RBD)的部分。至少在特定情况下,利用RBD的部分的突变形式,诸如RBD的去糖基化突变体。

1. 一种分离的组合物,其包含严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)纤突蛋白的受体结合结构域(RBD),其中所述结构域缺乏至少一个糖基化位点或在至少一个在正常条件下被糖基化的位点上被去糖基化。
2. 权利要求1的组合物,其中所述结构域被包含在全长SARS CoV纤突蛋白内。
3. 权利要求1的组合物,其中所述结构域是所述SARS-CoV纤突蛋白的片段。
4. 权利要求3的组合物,其中所述片段包含所述SARS CoV纤突蛋白的氨基酸残基318-510。
5. 权利要求3的组合物,其中所述片段包含所述SARS CoV纤突蛋白的氨基酸残基318-536。
6. 权利要求3的组合物,其中所述片段的长度为至少190个氨基酸。
7. 权利要求3的组合物,其中所述片段的长度为至少210个氨基酸。
8. 权利要求1或3的组合物,其中所述糖基化位点为N-糖基化位点。
9. 权利要求8的组合物,其中所述N-糖基化位点为天冬酰胺位点。
10. 权利要求1或3的组合物,其中所述位点在所述SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸318上的天冬酰胺上。
11. 权利要求1或3的组合物,其中所述位点在所述SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸330上的天冬酰胺上。
12. 权利要求1或3的组合物,其中所述位点在所述SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸347上的天冬酰胺上。
13. 权利要求1或3的组合物,其中所述位点在选自所述SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸318、氨基酸330、氨基酸347及其组合的一个或多个天冬酰胺上。
14. 权利要求1或3的组合物,其中所述片段包含所述SARS CoV纤突蛋白的氨基酸残基318-536并且所述位点在所述SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸318上的天冬酰胺上。
15. 权利要求1或3的组合物,其中所述位点包含氨基酸缺失。
16. 权利要求1或3的组合物,其中所述位点包含氨基酸取代。
17. 权利要求15的组合物,其中所述氨基酸取代是至丝氨酸或丙氨酸的取代。
18. 前述权利要求的任一项的组合物,其被包含在药学上可接受的媒介物中。
19. 一种预防或延迟个体的SARS发作或减轻个体的SARS的至少一种症状的方法,其包括向所述个体提供有效量的权利要求1-17的组合物的任一种的步骤。
20. 权利要求18的方法,其中向所述个体提供所述组合物一次。
21. 权利要求18的方法,其中不止一次向所述个体提供所述组合物。
22. 权利要求18的方法,其中随后在第一提供步骤的数周、数月或数年内向所述个体提供所述组合物。
23. 权利要求18的方法,其中所述个体表现出SARS的一种或多种症状。
24. 权利要求18的方法,其中所述个体缺乏SARS的任何症状。
25. 权利要求18的方法,其中所述个体已被暴露于SARS。
26. 权利要求18的方法,其中所述个体已与患有SARS的个体接触。
27. 权利要求18的方法,其中所述个体是儿童、老年人,暴露于生物武器或处于其风险中,是军队的成员,或是卫生保健工作者。

## 新型SARS免疫原性组合物

[0001] 本申请要求2013年11月26日提交的美国临时专利申请系列号61/909,145(其通过引用整体并入本文)的优先权。

[0002] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0003] 本发明是在由美国国立卫生研究院授予的R01AI098775下由政府资助完成的。政府具有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0004] 本公开的领域至少涉及以下领域:细胞生物学、分子生物学、免疫学、病毒学、生物化学、疫苗学和医学。

### 背景技术

[0005] 2002年在中国南方的广东省出现的严重急性呼吸综合征(SARS)最终扩散至五大洲,其中其造成8,000例呼吸道感染和800例死亡(Du等,2009)。SARS冠状病毒(SARS-CoV)在2003年被鉴定为SARS的病原体(Peiris等,2003;Zhong等,2003),随后与其它具有潜在生物防卫重要性的高度传染因子一起被美国国立卫生研究院(NIH)的国家变态反应和传染病研究所(NIAID)定义为C类病原体(Jiang等,2012)。

[0006] 由于2002-03年的SARS大流行的爆发性,因此已进行了密集的工作来开发SARS对抗措施,包括疫苗(Du等,2009)。可将稳定且有效的SARS-CoV疫苗贮存起来作为国家或全球公共卫生应急准备工作的一部分(Jiang等,2012)。最初的努力集中在开发通常通过化学试剂或辐照灭活并且以明矾为佐剂的全病毒疫苗(Du等,2009)。然而,在实验室小鼠中,已观察到,此类疫苗引发嗜酸性免疫增强病理学,证据是Th2-关联肺泡损伤(Perlman等,2005;Balles等,2011)。先前,接种的儿童中的免疫增强病理学使类似开发灭活的呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗的努力脱离正常进程(Castilow等,2007)。

[0007] 作为替代方法,已开发了由SARS-CoV纤突(S)蛋白(spike protein)组成的原型亚单位疫苗(Du等,2009)。与HIV gp160和流感血凝素一样,SARS-CoV S蛋白为I类病毒融合蛋白,并且,同样地,其为宿主中和抗体的主要目标(Du等,2009;Jiang等,2012)。先前综述了开发遗传工程化SARS-CoV S蛋白疫苗的努力(Du等,2009)。简言之,以明矾为佐剂的杆状病毒表达的重组蛋白和含S-蛋白质粒的委内瑞拉马脑炎载体均显示在利用活的SARS-CoV攻击的BALB/c小鼠中引发保护作用(Du等,2009;Tseng等,2012),但发现在哺乳动物细胞中表达的一些S蛋白构建体引起抗体介导的增效作用(Jaume等,2012)。

[0008] 作为对全长S蛋白的代替者,其含有残基318-510的193个氨基酸(aa)的最小受体结合结构域(RBD)(RBD193)被鉴定并且经发现在体外结合其假定的人受体跨膜血管紧张素转化酶2(ACE2)(Wong等,2004)。另外,已证明分别在哺乳动物细胞293T和中国仓鼠卵巢细胞(CHO)-K1的培养物上清液中表达的重组蛋白RBD193及相关构建体RBD219(残基318-536)在接种的小鼠中引发中和抗体和保护性免疫(Du等,2009;Du等,2012)。此外,RBD还可吸收和除去利用全SARS-CoV或表达S蛋白构建体的痘苗病毒免疫的小鼠、猴和兔的抗血清中的

大部分中和抗体(Chen等,2005)。

[0009] 本公开通过提供SARS免疫原性组合物为本领域中的长期需要提供了解决方案,所述SARS免疫原性组合物不引发嗜酸性免疫病理学或抗体介导的疾病增效作用以及不引起有害的免疫应答,同时相较于其它SARS疫苗诱导强效的交叉中和抗体应答。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开的实施方案涉及与严重急性呼吸综合征(SARS)的治疗或预防相关的方法和/或组合物,所述治疗或预防包括例如SARS的一种或多种症状的严重度的完全预防或减轻或一种或多种症状的发作的延迟。在具体的方面,存在用于SARS的治疗或预防的与SARS-CoV纤突蛋白相关的方法和/或组合物。在某些实施方案中,SARS-CoV纤突蛋白的受体结合结构域(RBD)(所述RBD来自纤突蛋白的亚单位1(S1))与SARS的治疗或预防相关。在具体的实施方案中,存在用于SARS的治疗或预防的与SARS CoV纤突蛋白的一个或多个经修饰的RBD相关的方法和/或组合物。在具体的情况中,所述RBD修饰包括RBD序列的一个或多个糖基化位点的缺失和/或突变。在某些方面,所述RBD经修饰的组合物缺乏一个或多个天冬酰胺-连接的糖基化位点,诸如、例如,通过除去第一天冬酰胺(RBD219-N1,RBD193-N1)(诸如通过取代或物理去除)或通过在一些情况下,除了缺失第一天冬酰胺以外,取代或除去两个剩余的天冬酰胺之一或两者(RBD219-N3,RBD193-N3)。在一些情况下,经修饰的RBD组合物可具有氨基酸取代、缺失、倒转等。在具体的实施方案中,所述经修饰的RBD组合物具有除在糖基化位点外的修饰。一些实施方案包括被修饰来包括在正常条件下被糖基化的氨基酸的缺失的RBD。本公开的一些方面涉及被修饰来包括天冬酰胺对另一种氨基酸(例如,诸如丝氨酸或天冬氨酸)的取代的RBD。某些情况包括在给定的RBD蛋白分子中的不止一个氨基酸上(例如,包括在不止一个天冬酰胺上)的修饰。在具体实施方案中,所述组合物是分离的、重组的、合成的和/或未在自然界中发现的。

[0012] 在具体实施方案中,一种或多种免疫原性组合物和/或方法被用于个体以预防SARS或延迟SARS的发作和/或减轻SARS的至少一种症状的严重度。

[0013] 本公开的实施方案包括包含SARS-CoV纤突蛋白的受体结合结构域的SARS免疫原性组合物(诸如疫苗)的开发。所述疫苗或免疫原性组合物可包含一种或多种佐剂。在具体情况下,可以例如将所述疫苗或免疫原性组合物作为重组蛋白在酵母或哺乳动物系统中表达。

[0014] 在本发明的实施方案中,去糖基化的SARS-CoV纤突蛋白的受体结合结构域的酵母表达的重组蛋白用作SARS免疫原性组合物或疫苗。

[0015] 在具体情况下,存在RBD193和RBD219重组蛋白及其表达,以及它们的去糖基化形式。在具体实施方案中,在酵母巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的示例性系统中产生所述重组蛋白。突变体之一,特别是其中RBD219的N-1位置上的N-连接的糖基化天冬酰胺已经缺失的RBD219-N1,可作为重组蛋白表达以及以高得率纯化,并且维持其与哺乳动物表达的RBD193相似或甚至更好的功能性和抗原性。RBD219-N1(诸如与基于明矾的佐剂组合)引发高滴度的针对SARS-CoV假病毒和活病毒的中和抗体。因此,例如,该分子对于作为重组SARS免疫原性组合物(诸如疫苗)的开发和生产的放大工艺是有用的。

[0016] 在本发明的具体方面,待通过本公开的方法和/或组合物解决的感染是由SARS相关病毒或SAES相关病毒(诸如中东呼吸综合征(MERS)的遗传上相关的病毒)引起的感染。在

一些情况下,所述感染是可以为或可以不为SARS的冠状病毒。

[0017] 在具体实施方案中,本公开的一种或多种免疫原性组合物和/或方法被用于个体以治疗或预防MERS或延迟MERS的发作和/或减轻MERS的至少一种症状的严重度。

[0018] 在一些情况下,可能暴露于SARS或SARS相关感染,或SARS或SARS相关生物武器的个体可处于任何年龄,包括例如儿童、老年人、军队成员或卫生保健工作者。所述个体可以在或可能已经存在于已知具有患有SARS的个体的地理区域或易于使个体患SARS的地理区域。

[0019] 在本公开的实施方案中,存在一种分离的组合物,其包含严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)蛋白的受体结合结构域(RBD),其中所述结构域缺乏至少一个糖基化位点或在至少一个在正常条件下被糖基化的位点上去糖基化。在一些情况下,所述结构域被包含在全长SARS CoV纤突蛋白内,而在其它情况下,所述结构域是SARS-CoV纤突蛋白的片段。在具体实施方案中,所述片段包含SARS CoV纤突蛋白的氨基酸残基275-575、300-550、310-525或318-510,或所述片段包含SARS CoV纤突蛋白的氨基酸残基275-575、300-550、310-540或318-536。在具体实施方案中,所述片段的长度为至少190个氨基酸或所述片段的长度为至少210个氨基酸。

[0020] 在本公开的具体方面,所述糖基化位点为N-糖基化位点。所述N-糖基化位点可以为天冬酰胺位点。所述位点可位于SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸318上的天冬酰胺上、SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸330上的天冬酰胺上或SARS-CoV纤突蛋白的蛋白的氨基酸347上的天冬酰胺上。在具体实施方案中,所述位点在于选自SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸318、氨基酸330或氨基酸347的一个或多个天冬酰胺上。在具体情况下,所述片段包含SARS CoV纤突蛋白的氨基酸残基318-536,并且所述位点位于SARS-CoV纤突蛋白的氨基酸318上的天冬酰胺上。在一些情况下,所述位点包含氨基酸缺失或氨基酸取代(诸如针对丝氨酸或丙氨酸的取代)。

[0021] 本公开的任何组合物可被包含在药学上可接受的媒介物中。

[0022] 在一个实施方案中,存在预防或延迟个体的SARS的发作或减轻SARS的至少一种症状的方法,其包括向个体提供有效量的本公开的任何组合物的步骤。在具体方面,向个体提供组合物一次或不止一次。可随后在第一提供步骤后的数周、数月或数年内向个体提供组合物。在一些情况下,个体表现SARS的一种或多种症状,不存在SARS的任何症状,或已暴露于SARS。在某些方面,所述个体已与患有SARS的个体接触。在具体方面,所述个体是儿童、老年人、暴露于生物武器或处于其风险中,或为卫生保健工作者。

[0023] 在一个实施方案中,存在预防或延迟个体的MERS的发作或减轻MERS的至少一种症状的方法,其包括向个体提供有效量的本公开的任何组合物的步骤。在具体方面,向个体提供组合物一次或不止一次。可在第一提供步骤后的数周、数月或数年内向个体提供所述组合物。在一些情况下,个体表现MERS的一种或多种症状,不存在MERS的任何症状,或已暴露于MERS。在某些方面,所述个体已与患有MERS的个体接触。在具体方面,所述个体是儿童、老年人、暴露于生物武器或处于其风险中,或为卫生保健工作者。

[0024] 附图简述

[0025] 图1.不同SAR-CoV S-RBD蛋白表达构建体的示意图。RBD193-WT和RBD219-WT二者均含有3个N-糖基化位点,包括N-1、N-13和N-40。缺失或突变的N-糖基化位点分别用横穿氨

基酸的线(例如,N-1)或斜体字(例如,S-13和A-40)来突出显示。

[0026] 图2.不同SAR-CoV RBD蛋白构建体在酵母中的表达谱。在用甲醇诱导后RBD193和RBD219的野生型(WT)和不同的去糖基化蛋白在巴斯德毕赤酵母X-33中的表达通过如下方法来检测:(A)SDS-PAGE和(B)利用抗-RBD mAb 33G4(0.2 $\mu$ g/ml)的免疫印迹。每一个泳道加载有10 $\mu$ l诱导的培养物(未纯化的)。(C)酵母表达的重组RBD193-WT上的N-连接的聚糖可通过肽-N-糖苷酶F(PNGase F)消化完全除去。泳道1:蛋白质分子量标志,泳道2:RBD193-表达培养物(10 $\mu$ l),泳道3:PNGase F消化的RBD193。

[0027] 图3.通过免疫印迹检测RBD193-WT蛋白在酵母中的表达。以不同pH(泳道1:分子量标志物、泳道2:pH 5.2;泳道3:pH 6.0;泳道4:pH7.5;和泳道5:pH 8.0)和不同量的去垢剂(泳道6:pH 6.0w/0.01%Empigen和泳道7:pH 6.0w/0.05%Empigen)在巴斯德毕赤酵母培养物中诱导RBD193-WT。将培养基中的表达的蛋白质转移至PVDF上并用0.2 $\mu$ g/ml的抗-RBD mAb 33G4探测。

[0028] 图4.酵母表达的RBD蛋白的SDS-PAGE和免疫印迹分析。进行2 $\mu$ g纯化的RBD 193-N1(A)、RBD193-N3(B)、RBD219-WT(C)和RBD219-N1(D)的SDS-PAGE(SDS,左图)和免疫印迹(WB,右图)分析。利用0.2 $\mu$ g/ml的抗-RBD mAb 33G4探测免疫印迹。

[0029] 图5.酵母表达的RBD蛋白的抗原性。为了检测抗原性,,使用特异于SARS-CoV RBD的构象表位的mAb和免疫印迹。将0.2 $\mu$ g/ml的mAb 35B5(Conf IV)、33G4(Conf V)、24H8(Conf I)和31H12(Conf II)用于所述测试。蛋白质分子量标志(Marker)示于左边。

[0030] 图6.利用RBD特异性mAb通过ELISA检测酵母表达的RBD蛋白的反应性。分别地以2.2 $\mu$ g/ml(A)或0.25 $\mu$ g/ml(B)测试特异于SARS-CoV RBD的构象表位(24H8(Conf I)、19B2(VI)、35B5(Conf IV)、33G4(Conf V)、31H12(Conf II))和线性表位(17H9)的mAb。包括293T细胞(RBD193-WT)中表达的野生型SARS-CoV RBD蛋白(Du等,2009)作为阳性对照。(A)和(B)中的数据表达为一式二个孔的平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)。

[0031] 图7.SARS-CoV RBD蛋白和与细胞结合的ACE2(ACE2/293T细胞)或sACE2的结合。使用山羊抗-ACE2mAb(0.2 $\mu$ g/ml)或抗SARS-CoV的RBD的mAb(33G4,1 $\mu$ g/ml)通过免疫印迹检测RBD蛋白(20 $\mu$ g/每一种)与ACE2/293T细胞(A)或sACE2(20 $\mu$ g)(B-C)的结合。包括含有中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)的RBD的重组蛋白(Du等,2011)作为阴性对照(对照)。

[0032] 图8.通过ELISA检测接种的小鼠血清中的SARS-CoV RBD-特异性IgG抗体。将最后一次接种后10天收集的血清用于测试。将明矾佐剂+PBS用作对照。数据呈现为每组5只小鼠的几何平均滴度(GMT)。P值表示不同接种组之间的显著差异。

[0033] 图9.检测接种的小鼠的血清中抗假型化的和活的SARS-CoV感染的中和抗体。将在最后一次接种后10天收集的血清用于测试。将明矾佐剂+PBS用作对照。(A)针对SARS假病毒的中和抗体的滴度。数据表达为50%中和抗体滴度(NT50)以及呈现为每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SD。(B)针对活的SARS-CoV感染的中和抗体的滴度。中和抗体滴度表达为在至少50%的孔中完全阻止病毒诱导的CPE的血清最高稀释的倒数(NT50),并且呈现为每组5只小鼠的平均值 $\pm$ SD。P值表示不同接种组之间的显著差异。

[0034] 发明详述

[0035] 按照长期专利法公约,词语“一个/种(a)”和“一个/种(an)”,当用于本说明书时与包含、包括权利要求的该词语一致,意指“一个/种或多个/种”。一些实施例可由本公开的一

个或多个要素、方法步骤和/或方法组成或基本上由其组成。可预期的是,相对于本文中的公开的实施方案中描述的任何其它方法或组合物,可执行本文所述的任何方法或组合物并且仍然获得类似或相似的结果,而不背离主题的精神和范围。

[0036] 如本文中所用,术语“有效量”被定义为预防SARS感染或SARS相关感染或延迟或改善SARS或SARS相关疾病的至少一种症状的发作所需的化合物的量。例如,在SARS或SARS相关疾病的治疗或预防中,改善或抑制至少一种症状的发展或延迟至少一种症状的发作或减轻其严重度的化合物将是有效的。在实施方案中,有效量的化合物不是治愈疾病所需的但会提供疾病的治疗或预防。

[0037] I. 一般实施方案

[0038] 2002年在中国南方的广东省出现严重急性呼吸综合征(SARS)并最终在世界范围内造成8,000例呼吸道感染和800例死亡。其为C类病原体,从而需要用于预防将来大范围流行和用于生物防卫准备的疫苗的开发。先前的研究已显示,由SARS-CoV纤突蛋白的受体结合结构域(RBD)组成的SARS候选疫苗可在接种的动物中诱导强效中和抗体和抗SARS-CoV攻击的保护作用。然而,在先前的研究中重组RBD的表达是昂贵的并且不可扩展,或含有非必需的标签或融合物。

[0039] 迫切需要用于预防由SARS冠状病毒(SARS-CoV)引起的严重急性呼吸综合征(SARS)的将来大范围流行和用于生物防卫准备的疫苗的开发,并且所述开发包括在本文中。先前的研究已显示,具有SARS-CoV纤突蛋白的受体结合结构域(RBD)的候选SARS疫苗抗原可在接种的动物中诱导强效中和抗体应答以及抗SARS-CoV攻击的保护作用。为了优化用于RBD疫苗候选者的放大生产的表达条件,认为这可通过除去RBD蛋白中的糖基化位点来实现。在本公开中,构建了作为实例的两个RBD蛋白变体:1)RBD193-WT(193-aa,残基318-510)及其去糖基化形式(RBD193-N1、RBD193-N2、RBD193-N3);2)RBD219-WT(219-aa,残基318-536)及其去糖基化形式(RBD219-N1、RBD219-N2和RBD219-N3)。作为实例,可将构建体在酵母中表达为重组蛋白。使用明矾作为佐剂,在小鼠中比较这些构建体的纯化的重组蛋白的抗原性、功能性和免疫原性。RBD219-N1显示更高的表达产率,并且维持其抗原性和功能性。更重要的是,相较于RBD193-WT、RBD193-N1、RBD193-N3或RBD219-WT,RBD219-N1,在免疫的小鼠中诱导显著更强的RBD特异性抗体应答和更高水平的中和抗体。因此,RBD219-N1作为最佳SARS免疫原性组合物(诸如疫苗)是有用的。

[0040] II. SARS

[0041] 被提供以本发明的组合物和/或方法的个体可以是已知患有SARS,可以是怀疑患有SARS,可以是已知已被暴露于SARS,或可以是被怀疑已被暴露于SARS的个体。

[0042] 如果个体已感染了SARS,则第一症状通常是至少38°C(100.4°C)或更高的发热。早期症状持续约2-10天并包括泛流感样症状,包括例如畏寒/僵直、肌痛、头痛、腹泻、咽喉痛、流涕、全身不适、肌肉疼痛等。随后可发展成干咳、呼吸短促和/或上呼吸道感染。血液中的淋巴细胞计数通常下降,并且血小板计数也可以是低的。血清乳酸脱氢酶(LDH)和肌酐磷酸激酶(CPK)水平可升高。可使个体经历体格检查、胸部x射线和/或HRCT扫描作为诊断的一部分。在具体实施方案中,SARS的诊断是本公开的方法中的任选或必需步骤。

[0043] 受到严重影响的患有SARS的人发展被称为成人呼吸窘迫综合征(ARD或ARDS)的呼吸衰竭的潜在致命形式。在此类情况下,病毒攻击人体中除肺外的器官,从而造成例如肾衰

竭、心包的炎症(心包炎)、因凝血系统的破坏而产生的严重全身性出血(弥散性血管内凝血)、减少的白细胞计数(淋巴细胞减少症),动脉的炎症(血管炎)或带有腹泻的肠炎。

[0044] 在本发明的一些方法中,使个体经历鉴定他们是否患有SARS的步骤。SARS-CoV可使用例如酶联免疫测定(ELISA)(对于其抗体)或逆转录酶聚合酶链式反应(PCR)测试(对于其遗传物质)来检测。测试的实例包括对呼吸道分泌物或血液进行的那些测试。

[0045] 当他们有适当的症状和/或其在实验中从事SARS-CoV的工作或其最近已暴露于感染的人或哺乳动物时,可测试个体的SARS。

[0046] III. 中东呼吸综合征(MERS)

[0047] 被提供以本发明的组合物和/或方法的个体可以是已知患有MERS,可以是怀疑患有MERS,可以是已知已被暴露于MERS,或可以是被怀疑已被暴露于MERS的个体。

[0048] MERS是在2012年于Saudi Arabia被首先报导的病毒性呼吸系统疾病。它由被称为MERS-CoV(也称为EMC/2012(HCoV-EMC/2012))的冠状病毒引起。大多数已被确认患有MERS-CoV感染的人发展出严重的急性呼吸系统疾病。他们有发热、咳嗽以及呼吸短促,并且这些人的约半数死亡。

[0049] 在本发明的一些方法中,使个体经历鉴定他们是否患有MERS的步骤。测试的实例包括对呼吸道分泌物或血液进行的那些测试,诸如针对MERS抗原的测试。

[0050] 当他们有适当的症状和/或其在实验中从事MERS的工作或其最近已暴露于感染的人或哺乳动物时,或当个体在或已在其中个体患有MERS或易于患有MERS的地理位置中时,可测试个体的MERS。在具体实施方案中,MERS的诊断是在本公开的方法中的任选或必需步骤。

[0051] IV. 蛋白质疫苗和免疫原性组合物

[0052] 在本公开的实施方案中,组合物在细胞、组织或动物(例如,人)中诱导针对抗原的免疫应答。如本文中所示,“抗原组合物”(其或者可被称为“免疫原性组合物”)可包含抗原(例如,蛋白质、肽或多肽)或抗原的经修饰的形式。在具体实施方案中,抗原组合物包含或编码SARS CoV纤突蛋白的受体结合结构域或其突变形式(包括其去糖基化的形式)的全部或部分。在某些实施方案中,免疫原性组合物或疫苗包含至少一种佐剂。在其它实施方案中,抗原组合物存在于包含另外的免疫刺激剂或编码这样的免疫刺激剂的核酸的混合物中。免疫刺激剂包括但不限于另外的抗原、免疫调节剂、抗原呈递细胞或佐剂。在其它实施方案中,一种或多种另外的试剂以任意组合共价键合至所述抗原或免疫刺激剂。在某些实施方案中,抗原组合物被缀合至HLA锚定基序氨基酸或包含HLA锚定基序氨基酸。

[0053] SEQ ID NO:1提供SARS-CoV-RBD-193(318-510aa)的核酸序列,SEQ ID NO:2提供其氨基酸序列。SEQ ID NO:3提供SARS-CoV-RBD-219(318-536aa)的核酸序列,SEQ ID NO:4提供其氨基酸序列。全长SARS-CoV纤突蛋白的实例以DQ407820.1存在于**GenBank®**中,其序列通过引用整体并入本文。

[0054] 在某些实施方案中,抗原组合物或免疫功能等效物在动物(包括人)中诱导抗-SARS体液和/或细胞介导的免疫应答中用作有效疫苗。本发明设想了用于主动和被动免疫实施方案的一种或多种抗原组合物或疫苗。

[0055] 本发明的疫苗或免疫原性组合物可在其蛋白质组分的组成上变化。应当理解的是,本文所述的各种组合物还可包含附加组分。例如,可在脂质或脂质体中包含一种或多种



疫苗或免疫原性组合物的组分。在另一个非限制性实例中,疫苗或免疫原性组合物可包含一种或多种佐剂。可通过本文公开的任何方法或如本领域技术人员根据本公开应当知晓的,制备和/或施用本公开的疫苗或免疫原性组合物及其各种组分。

[0056] 应当理解的是,可通过现有技术众所周知的方法产生免疫原性组合物,所述方法包括但不限于通过固相合成进行化学合成和通过HPLC从化学反应的其它产物纯化出来,或通过在外翻译系统中或在活细胞中(包括,例如,在酵母细胞、细菌细胞、哺乳动物细胞或杆状病毒/昆虫细胞中)表达编码包含本发明的抗原的肽或多肽的核酸序列(例如,DNA序列)进行生产。可分离和充分纯化抗原组合物以除去一种或多种不想要的小分子量分子和/或将其冷冻干燥以更容易配制入所期望的媒介物。还应理解的是,在抗原组合物组分诸如疫苗中产生的氨基酸添加、缺失、突变、化学修饰等优选地将不显著干扰表位序列的抗体识别。

[0057] 对应于SARS-CoV纤突蛋白的受体结合结构域的一个或多个抗原决定簇的肽或多肽的长度通常为10-20个氨基酸残基,并且可含有不止一个肽决定簇或至多约30-50个残基左右。可通过本领域普通技术人员已知的方法合成肽序列,所述方法是诸如、例如,使用自动化肽合成仪(诸如可从Applied Biosystems(Foster City,CA)获得的自动化肽合成仪)的肽合成。在具体实施方案中,全长肽为SARS-CoV纤突蛋白的193-aa的片段或219-aa的片段。

[0058] 还可例如通过重组方法制备更长的肽或多肽。在某些实施方案中,可使用编码本文所述的抗原组合物和/或组分的核酸,例如,在体外或体内产生抗原组合物,以用于本发明的各种组合物和方法。例如,在某些实施方案中,将编码抗原的核酸包含在例如重组细胞中的载体中。可表达所述核酸以产生包含抗原序列的肽或多肽。可从细胞分泌所述肽或多肽,或其被包含作为细胞的部分或被包含在细胞内。

[0059] A. 免疫功能等效物

[0060] 由于可在本公开内容的抗原组合物的结构中产生修饰和变化,并且仍然获得具有类似特征或另外的所需特征的分子,因此此类免疫功能等效物也包括在本发明内。

[0061] 例如,某些氨基酸可取代肽、多肽或蛋白质结构中的其它氨基酸而无与结构诸如、例如,抗体的抗原结合区、底物分子或受体上的结合位点、DNA结合位点等结构的相互结合能力的可察觉的丢失。由于肽、多肽或蛋白的相互作用能力和性质确定其生物学(例如,免疫学)功能活性,因此可在氨基酸序列(或者,当然,其内在的DNA编码序列)中产生某些氨基酸序列取代,但仍然获得具有类似(拮抗)性质的肽或多肽。因此本发明人设想,可在抗原组合物(诸如、例如SARS Co-V RBD肽或多肽)的序列中产生各种变化而无生物学效用或活性的可察觉的丢失。在具体情况下,突变或缺失RBD的一个或多个糖基化位点,并且在具体的实施方案中还存在一个或多个相较于对应的野生型序列被修饰的其它氨基酸。

[0062] 如本文中所示,“氨基分子”是指任意氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物,这对于本领域普通技术人员来说是已知的。在某些实施方案中,抗原组合物的残基包含为连续的无任何非氨基分子中断氨基分子残基的序列的氨基分子。在其它实施方案中,序列可包含一个或多个非氨基分子部分。在具体实施方案中,抗原组合物的残基的序列可被一个或多个非氨基分子部分中断。

[0063] 因此,抗原组合物,特别是本文公开的序列的免疫功能等效物,可包括包含天然合

成的蛋白质中的20种常见氨基酸的至少一种,或至少一个修饰氨基酸或特殊氨基酸的氨基酸序列。

[0064] 在免疫功能等效物方面,本领域技术人员充分理解,定义中固有的是这样的概念,即存在对可在分子的确切部分内产生并且仍然导致具有可接受的水平的等同免疫活性的变化的数目的限制。免疫功能等效物的肽或多肽因而本文中定义为其中某些而非大多数或全部氨基酸可被取代的那些肽或多肽。

[0065] 具体地,就长度更短的肽而言,可以预期的是,应当在给定的肽内产生更少的氨基酸取代。更长的多肽可有中间数目的变化。全长蛋白质将对更大数目的变化具有最大耐受性。当然,可根据本发明容易地产生和使用多种具有不同取代的不同的多肽/肽。

[0066] 还应充分理解的是,当某些残基(例如,结合区或活性部位中的残基)被证明对于蛋白质或肽的免疫或结构性质特别重要时,可能通常不交换此类残基。这在本发明中是重要的考虑,其中应仔细考虑抗原位点的变化,随后测试其以确保免疫功能(例如,抗原性)的维持,其中免疫功能的维持是所希望的。以这种方式,功能等效物在本文中被定义为维持显著量的其天然免疫活性的那些肽或多肽。

[0067] 氨基酸取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型的分析表明,精氨酸、赖氨酸和组氨酸均为带正电荷的残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸均具有相似的大小;而苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸均具有大致相似的形状。因此,基于这些考虑,精氨酸、赖氨酸和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸;以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸在本文中被定义为免疫功能等效物。

[0068] 为了实现更大量的变化,可考虑氨基酸的亲水指数。每一个氨基酸基于其疏水性和电荷特征已被赋予亲水指数,这些亲水指数是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0069] 本领域通常理解氨基酸亲水指数在赋予蛋白质、多肽或肽的相互作用生物功能中的重要性(Kyte&Doolittle,1982,其通过引用并入本文)。已知,某些氨基酸可以取代具有相似亲水指数或评分的其它氨基酸并且仍然保留相似的生物活性。在基于亲水指数产生变化中,其亲水指数在±2以内的氨基酸的取代是优选的,在±1内的那些氨基酸的取代是特别优选的,在±0.5内的那些氨基酸的取代是甚至更特别优选的。

[0070] 在本领域中还应理解的是,可基于亲水性有效地产生相似氨基酸的取代,特别是在由此产生的免疫功能等效多肽或肽旨在用于免疫学实施方案中(如在本发明的某些实施方案中)的情况下。美国专利4,554,101(其通过引用并入本文)指出蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其相邻氨基酸的亲水性控制的)与其免疫原性和抗原性(即与蛋白质的免疫性质)相关。

[0071] 如美国专利4,554,101中所详述的,以下亲水性值已被赋予氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0±1);谷氨酸(+3.0±1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5±1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-

1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。

[0072] 在基于相似的亲水性值产生变化中,其亲水性值在 $\pm 2$ 内的氨基酸的取代是优选的,其亲水性值在 $\pm 1$ 内的那些氨基酸的取代是特别优选的,以及其亲水性值在 $\pm 0.5$ 内的那些氨基酸的取代是甚至更特别优选的。

[0073] 许多科学出版物也已致力于从氨基酸序列的分析预测二级结构和鉴定表位(Chou&Fasman,1974a,b;1978a,b,1979)。如果需要,这些出版物的任何出版物可用于补充美国专利4,554,101的教导。

[0074] 此外,计算机程序目前可用于协助预测一种或多种蛋白质、多肽或肽的抗原部分和表位核心区。实例包括基于Jameson-Wolf分析(Jameson&Wolf,1988;Wolf等,1988)的那些程序、程序**PepPlot®**(Brutlag等,1990;Weinberger等,1985)以及用于蛋白质三级结构预测其它新程序(Fetrow&Bryant,1993)。能够进行此类分析的另一种商购可得的软件程序是MacVector(IBM,New Haven,CT)。

[0075] 在其它实施方案中,可通过经验方法鉴定肽或多肽的主要抗原决定簇,其中在重组宿主中表达编码肽或多肽的的核酸的部分,并测试所得的肽或多肽的引发免疫应答的能力。例如,可将PCR™用于制备一系列缺乏连续较长的氨基酸序列的C-末端的片段的肽或多肽。测定这些肽或多肽的每一种的免疫活性以鉴定为免疫显性的那些片段或结构域。然后,其中在每一重复(iteration)中仅去除少数氨基酸的进一步的研究允许肽或多肽的抗原决定簇的位置得到更精确地确定。

[0076] 用于确定肽或多肽的主要抗原决定簇的另一种方法是SPOTs™系统(Genosys Biotechnologies,Inc.,The Woodlands,TX)。在该方法中,在纤维素膜上合成重叠肽,在合成和去保护后,使用多克隆或单克隆抗体进行筛选。最初鉴定的肽或多肽的抗原决定簇可通过进行具有较大重叠的较小肽的随后合成以及最终替代在沿免疫反应性序列的每一个位置上的个别氨基酸来进一步定位。

[0077] 一旦完成一个或多个此类分析,就可制备含有至少一个或多个抗原决定簇的基本特性的抗原组合物,诸如例如肽或多肽。随后将抗原组合物用于产生针对所述组合物,和优选所述抗原决定簇的抗血清。

[0078] 虽然论述集中在从氨基酸变化产生的功能上等效的多肽,但应理解的是,这些变化可通过编码DNA的改变来实现;还应考虑的是遗传密码具有简并性以及两个或更多个密码子可编码同一氨基酸。还可构建编码这些抗原组合物的核酸,并通过标准方法(Sambrook等,1987),例如使用PCR™克隆法将其插入一个或多个表达载体。

[0079] 除了本文所描述的肽基化合物,本发明还设想了可配制其它立体化学上类似的化合物以模拟肽或多肽的结构的关键部分,或以与例如抗体发生特异性相互作用。可以以与本发明的肽或多肽相同的方式使用此类化合物(可被称为肽模拟物),其因而也是免疫功能等效物。

[0080] 在Johnson等(1993)中描述了模拟蛋白质二级结构元件的某些模拟物。使用肽模拟物背后的内在原理是,蛋白质的肽主链存在来主要以诸如有助于分子相互作用(诸如抗体和抗原的分子相互作用)的方式对氨基酸侧链进行定向。因此,肽模拟物被设计来允许与天然分子类似的分子相互作用。

[0081] B. 抗原诱变

[0082] 在具体实施方案中,为了诸如、例如增强其免疫原性或产生或鉴定免疫功能等效序列的目的而突变抗原组合物。诱变的方法对于本领域技术来说是众所周知的(Sambrook等,1987)。

[0083] 如本文中所示,术语“寡核苷酸定点诱变法”是指模板依赖性方法和载体介导的增殖,其导致特定核酸分子的浓度相对于其初始浓度的增加,或导致可检测信号的浓度的增加,诸如扩增。如本文中所示,术语“寡核苷酸定向诱变方法”旨在指牵涉引物分子的模板依赖性延伸的方法。术语模板依赖性方法是指RNA或DNA分子的核酸合成,其中新合成的核酸链的序列由众所周知的互补碱基配对法则指定(例如参见Watson,1987)。通常地,载体介导的方法牵涉核酸片段至DNA或RNA载体的引入、载体的克隆扩增以及扩增的核酸片段的回收。此类方法的实例由美国专利4,237,224(其明确地通过引用整体并入本文)提供。

[0084] 在优选实施方案中,使用位点专一诱变。位点专一诱变是用于通过基础DNA的特异性诱变制备抗原组合物的技术。一般地,位点专一诱变技术在本领域中是众所周知的。该技术还提供了通过向DNA中引入一个或多个核苷酸序列变化,结合一个或多个上述考虑来制备和测试序列变体的便捷能力。位点专一诱变允许通过使用特定寡核苷酸序列来产生突变体,所述寡核苷酸序列编码所需突变的DNA序列以及充足数量的相邻核苷酸,以提供具有充足大小和序列复杂度的引物序列来在待突变的位置的两侧上形成稳定的双链体。通常情况下,在待改变的位置的两侧上具有约10个至约25个或更多个残基的长度为约17个至约75个核苷酸的引物是优选的,而在待改变的位置的两侧上具有约5个至10个残基的长度约17至约25个核苷酸的引物是更优选的。

[0085] 一般地,通过首先获得单链载体,或使其在其序列内包含编码所需蛋白质的DNA序列的双链载体的两条链解链来进行位点专一诱变。正如本领域普通技术人员应理解的是,该技术通常使用以单链和双链两种形式存在的噬菌体载体。用于位点专一诱变的典型载体包括诸如M13噬菌体的载体。这些噬菌体载体是商购可得的,并且它们的使用对于本领域技术人员来说一般是众所周知的。双链质粒也被常规地用于位点专一诱变,这消除了将目的基因从噬菌体转移至质粒的步骤。

[0086] 随后将该诱变引物与单链DNA制剂退火,并将其经历DNA聚合酶(诸如、例如,大肠杆菌(E.coli)聚合酶I Klenow片段),以完成携带突变的链的合成。因此,形成其中一条链编码原始非突变序列并且第二链携带所需突变的异源双链体。随后将该异源双链载体用于转化合适的细胞(诸如大肠杆菌细胞),并选择包含携带突变的序列排列的重组载体的克隆。

[0087] 或者,可将一对引物与双链载体的两条分开的链退火,以在PCR™反应中同时合成具有所需突变的两条对应的互补链。已设计了富集包含诱变寡核苷酸的克隆的遗传选择方案(Kunkel等,1987)。或者,可将具有商购可得的热稳定性酶(诸如Taq聚合酶)的PCR™的用途用于将诱变寡核苷酸引物掺入扩增的DNA片段,随后可将所述扩增的DNA片段克隆入适当的克隆载体或表达载体(Tomic等,1990;Uppender等,1995)。还可将除了热稳定性聚合酶以外还使用热稳定性连接酶的PCR™用于将磷酸化的诱变寡核苷酸掺入扩增的DNA片段,随后可将所述扩增的DNA片段克隆入适当的克隆载体或表达载体(Michael 1994)。

[0088] 将使用位点定向诱变进行制备选定基因的序列变体作为产生潜在有用的种类的方法提供,并且这不意味着是限制性的,因为存在其中可获得基因的序列变体的其它方式。例

如,可用诱变剂(诸如羟胺)处理编码所需基因的重组载体以获得序列变体。

[0089] 此外,一个特别有用的诱变技术是丙氨酸扫描诱变,其中可用氨基酸丙氨酸单个地取代许多残基,以使得可测定失去的侧链相互作用的影响,同时使蛋白质构象的大规模扰动的风险降至最低(Cunningham等,1989)。

[0090] C. 脂质体介导的转染

[0091] 在本发明其它实施方案中,可将一种或多种疫苗或免疫原性组合物的组分包埋在脂质复合物(诸如、例如脂质体)中。脂质体是特征在于磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有多个由水性介质分开的多个脂质层。当将磷脂悬浮于过量的水性溶液中时它们自发地形成。脂质组分在形成封闭的结构之前经历自动重排,并且包埋水以及溶解在脂双层之间的溶质(Ghosh和Bachhawat,1991)。

[0092] D. 疫苗或免疫原性组合物组分的纯化

[0093] 在任何情况下,可将疫苗组分(例如,抗原肽或多肽)从化学合成试剂、细胞或细胞组分中分离和/或纯化出来。在产生疫苗或免疫原性组合物组分的方法中,通过本文所述或对于本领域技术人员来说是众所周知的任何适当技术(例如,Sambrook等,1987)来实现纯化。不存在总是以其最纯的状态提供本发明的抗原组合物或其它疫苗组合物的一般要求。实际上,可以预期的是,相对于其天然状态不十分纯的疫苗或免疫原性组合物组分(然而其在所需的化合物上被富集)将在某些实施方案(诸如、例如蛋白质产物的总回收)中或在维持所表达的蛋白质的活性中具有效用。然而,可以预期的是,无活性的产物在某些实施方案中(诸如、例如在通过抗体产生测定抗原性中)也具有效用。

[0094] 本发明还提供了纯化的,和在某些实施方案中,基本上纯化的疫苗或免疫原性组合物组分。如本文中所示,术语“纯化的疫苗组分”或“纯化的免疫原性组合物组分”旨在指至少一种各自的疫苗或免疫原性组合物组分(例如,可从细胞分离的蛋白质组合物),其中相对于其天然可获得的状态,例如相对于其在细胞提取物或化学合成的试剂中的纯度,将所述组分纯化至任何程度。在其中所述疫苗组分是蛋白质组合物的某些方面,纯化的疫苗组分也指与其天然存于其中的环境分离的野生型或突变型蛋白质、多肽或肽。

[0095] 当使用术语“基本上纯化的”时,这将是其中特定的化合物(例如,蛋白质、多肽或肽)形成组合物的主要组分,诸如构成该组合物中约50%或更多的化合物。在优选的实施方案中,基本上纯化的疫苗组分将构成组合物中超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%或甚至更多的化合物。

[0096] 在某些实施方案中,可将疫苗或免疫原性组合物组分纯化至均质(homogeneity)。如应用于本发明中的,“纯化至均质”意味着该疫苗组分具有其中所述化合物基本上不含其它化学物质、生物分子或细胞的纯度水平。例如,纯化的肽、多肽或蛋白质通常是充分不含其它蛋白质组分,以使得可成功地进行降解测序。根据本公开内容,用于定量疫苗组分的纯化程度的各种方法对于本领域技术人员来说是已知的。这些方法包括,例如,测定级分的特定蛋白质活性(例如,抗原性),或通过凝胶电泳评估级分内的多肽的数量。

[0097] 对于本领域技术人员来说是众所周知的适合用于化学、生物分子或生物学纯化的各种技术,可适用于制备本发明的疫苗组分。这些技术包括,例如,利用硫酸铵、PEG、抗体等或通过加热变性的沉淀,随后离心;分级分离、色谱法,包括但不限于,分配色谱(例如,纸色谱、薄层色谱(TLC)、气-液色谱和凝胶色谱)、气相色谱、高效液相色谱、亲和色谱、超临界流

色谱、离子交换、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石、凝集素亲和；等电聚焦和凝胶电泳(参见例如,Sambrook等1989;和Freifelder,Physical Biochemistry,第二版,第238-246页,其通过引用并入本文)。

[0098] 鉴于许多DNA和蛋白质是已知的(参见例如,美国国家生物技术信息中心的**GenBank®**和**GenPept®**数据库),或可使用本文所述的方法来进行鉴定和扩增,因此现可使用本领域技术人员已知的用于重组表达的核酸或蛋白质序列的任何纯化方法。在某些方面,可在聚丙烯酰胺凝胶上和/或利用氯化铯离心梯度,或通过本领域普通技术人员已知的任何其它装置(参见例如,Sambrook等,1989,其通过引用并入本文)纯化核酸。在其它方面,可通过将序列重组表达为融合蛋白来进行蛋白质序列的纯化。此类纯化方法在本领域中是常规的。这通过如下方面来举例说明:产生特定的蛋白质-谷胱甘肽S转移酶融合蛋白,在大肠杆菌中表达,和在谷胱甘肽-琼脂糖上使用亲和色谱分离至均质或在蛋白质的N-末端或C-末端上产生多组氨酸标签,以及随后使用Ni-亲和色谱进行纯化。在具体的方面,细胞或疫苗的其它组分可通过流式细胞术来纯化。流式细胞术牵涉液体样品中细胞或其它颗粒的分离,并且在本领域中众所周知的(参见,例如,美国专利号3,826,364、4,284,412、4,989,977、4,498,766、5,478,722、4,857,451、4,774,189、4,767,206、4,714,682、5,160,974和4,661,913)。本文所述的这些技术的任何技术和这些技术的组合以及本领域技术人员已知的任何其它技术,可用于纯化和/或测定各种化学品、蛋白质化合物、核酸、可包含本发明的疫苗的细胞材料和/或细胞的纯度。如在本领域中一般已知的,据信可改变进行各种纯化步骤的顺序,或可以省略某些步骤,并且仍然产生用于制备基本上纯化的抗原或其它疫苗组分的合适方法。

[0099] E: 另外的疫苗组分

[0100] 可以设想,可将本发明的抗原组合物与一种或多种另外的组分组合以形成更有效的组合物或疫苗。另外的组分的非限制性实例包括、例如一或多种刺激针对本发明的抗原组合物和/或另外的组分的免疫应答的抗原、免疫调节剂或佐剂。

[0101] 1. 免疫调节剂

[0102] 例如,可以设想,可以将免疫调节剂包含在疫苗中以增强细胞的应答或患者的(例如动物的)应答。可以例如将免疫调节剂作为纯化的蛋白质、编码免疫调节剂的核酸和/或表达免疫调节剂的细胞包含在疫苗组合物中。以下各节列出了感兴趣的免疫调节剂的非限制性实例,并且可以设想免疫调节剂的各种组合可用于某些实施方案(例如,细胞因子和趋化因子)。

[0103] 白细胞介素、细胞因子、编码白细胞介素或细胞因子的核酸和/或表达此类化合物的细胞被设想为可能的疫苗组分。白细胞介素和细胞因子,包括但不限于白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-18、 $\beta$ -干扰素、 $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素、血管抑素、血小板应答蛋白、内皮抑制蛋白、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、METH-1、METH-2、肿瘤坏死因子、TGF $\beta$ 、LT及其组合。

[0104] 趋化因子、编码趋化因子的核酸和/或表达此类趋化因子的细胞可用作疫苗组分。趋化因子通常充当化学引诱物来招募免疫效应细胞至趋化因子表达的部位。可能有的是表达与例如细胞因子编码序列组合的特定趋化因子编码序列,以增强其它免疫系统组分至治疗部位的招募。此类趋化因子包括,例如RANTES、MCAF、MIP1- $\alpha$ 、MIP1- $\beta$ 、IP-10及其组合。

本领域技术人员将认识到的是,还已知某些细胞因子具有趋化作用,并且也可在术语趋化因子下进行分类。

[0105] 在某些实施方案中,可将抗原组合物化学偶联于载体或与免疫原性载体肽或多肽(例如,抗原-载体融合肽或多肽)重组表达,以增强免疫反应。示例性和优选的免疫原性载体氨基酸序列包括乙型肝炎表面抗原、钥匙孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其它白蛋白诸如卵白蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可被用作免疫原性载体蛋白。用于将多肽或肽缀合于免疫原性载体蛋白的方法在本领域中是众所周知的,包括,例如戊二醛、间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和双-重氮化联苯胺。

[0106] 可以期望共施用生物应答调节剂(BRM),其经显示上调T细胞免疫或下调抑制性细胞的活性。此类BRM包括、但不限于甲胍咪胍(CIM;1200mg/d)(Smith/Kline,PA);低剂量的环磷酰胺(CYP;300mg/m<sup>2</sup>)(Johnson/Mead,NJ),或编码牵涉一个或多个免疫辅助功能的蛋白质诸如B-7的基因。

[0107] 2. 佐剂

[0108] 免疫操作方案已经使用佐剂来刺激应答多年,并且此类佐剂本身是本领域普通技术人员所众所周知的。一些佐剂影响其中呈递抗原的方式。例如,当通过明矾沉淀蛋白质抗原时,免疫应答得到增加。抗原的乳化也延长抗原呈递的持续时间。

[0109] 在一个方面,佐剂作用通过使用试剂(诸如明矾)(以约0.05%至约0.1%的磷酸盐缓冲盐水中的溶液使用)来实现。或者,将抗原制成用作约0.25%溶液的糖的合成聚合物(**Carbopol®**)的混合物。还可通过分别用在约70°C至约101°C的范围内变化的温度热处理30秒至2分钟的时间在疫苗中聚集抗原来发挥佐剂作用。还可使用通过用胃蛋白酶处理(Fab)的针对白蛋白的抗体再活化进行的聚集、与细菌细胞(诸如微小隐孢子虫(*C.parvum*))、革兰阴性细菌的内毒素或脂多糖组分的混合、于生理学上可接受的油媒介物(诸如二缩甘露醇单油酸酯(Aracel A))中的乳化,或利用用作封闭替代物(block substitute)的20%全氟化碳(**Fluosol-DA®**)的溶液的乳化。

[0110] 一些佐剂,例如,获自细菌的某些有机分子,作用于宿主而非抗原。一个实例为胞壁酰二肽(N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺[MDP])、细菌肽聚糖。对于大多数佐剂而言,MDP的作用还不完全清楚。MDP刺激巨噬细胞,但似乎也直接刺激B细胞。因此,佐剂的作用不是抗原特异性的。然而,如果将它们与纯化的抗原一起施用,它们可被用于选择性地促进针对抗原的应答。

[0111] 佐剂已被实验性用于促进针对未知抗原的免疫的广义增强(例如,美国专利4,877,611)。在某些实施方案中,血蓝蛋白和血赤藓素(hemoerythrin)也可用于本发明中。钥匙孔血蓝蛋白(KLH)的使用在某些实施方案中是优选的,尽管可使用其它软体动物和节肢动物的血蓝蛋白和血赤藓素。

[0112] 也可使用各种多糖佐剂。例如,已描述了对小鼠的抗体应答使用各种肺炎球菌多糖佐剂(Yin等,1989)。应当如所指示的(Yin等,1989),使用产生最佳应答或以其它方式不产生抑制的剂量。多糖的多胺种类是特别优选的,诸如壳多糖和壳聚糖,包括脱乙酰壳多糖。

[0113] 另一组佐剂是胞壁酰二肽(MDP,N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺)组的细菌肽聚糖。还可考虑胞壁酰二肽的衍生物,诸如氨基酸衍生物苏氨酸-MDP和脂肪酸衍生物

MTPPE。

[0114] 美国专利4,950,645描述了针对在从磷脂酰胆碱和磷脂酰甘油形成的人工脂质体中的使用所描述的胞壁酰二肽的亲脂性二糖-三肽衍生物。它在活化人单核细胞和破坏肿瘤细胞中是有效的,但在一般高剂量中是无毒的。美国专利4,950,645和PCT专利申请WO 91/16347的化合物被考虑与本发明的细胞载体和其它实施方案一起使用。

[0115] 考虑用于本发明中的另一种佐剂是BCG。还可将BCG(卡介苗,分枝杆菌的减毒菌株)和BCG细胞壁骨架(CWS)与或不与海藻糖二霉菌酸酯一起在本发明中用作佐剂。海藻糖二霉菌酸酯可单独使用。已显示在小鼠中海藻糖二霉菌酸酯施用与增强的对流感病毒感染的抗性相关(Azuma等,1988)。可如美国专利4,579,945所述,制备海藻糖二霉菌酸酯。

[0116] BCG因其免疫刺激性质而为重要的临床工具。BCG用于刺激网状内皮系统,激活天然杀伤细胞和增加造血干细胞的增殖。BCG的细胞壁提取物已被证明具有优异的免疫佐剂活性。用于分枝杆菌的分子遗传学工具和方法已提供了将外来基因引入BCG的工具(Jacobs等,1987;Snapper等,1988;Husson等,1990;Martin等,1990)。

[0117] 活的BCG是全球范围内用于预防结核病的有效且安全的疫苗。BCG和其它分枝杆菌是高度有效的佐剂,并且已广泛研究了针对分枝杆菌的免疫应答。鉴于近20亿人的免疫,BCG在人中具有长期安全使用记录(Luelmo,1982;Lotte等,1984)。它是可在出生时给予的少数疫苗之一,其仅使用单次剂量就可产生长期免疫应答,并且存在具有BCG接种的经验的全局分布网络。示例性BCG疫苗是市售的**TICE**<sup>®</sup>BCG(Organon Inc.,West Orange,NJ)。

[0118] 两亲和表面活性剂例如皂苷及衍生物诸如QS21(Cambridge Biotech),形成又一组与本发明的免疫原一起使用的佐剂。也可使用非离子型嵌段共聚物表面活性剂(Rabinovich等,1994;Hunter等,1991)。寡核苷酸是另一组有用的佐剂(Yamamoto等,1988)。Quil A和香菇多糖(lentinan)是可用于本发明的某些实施方案的其它佐剂。

[0119] 一组优选用于本发明的佐剂是脱毒的内毒素,诸如美国专利4,866,034的精制的脱毒内毒素。这些精制的脱毒内毒素在哺乳动物中有效产生佐剂应答。当然,可将所述脱毒内毒素与其它佐剂组合来制备包含多佐剂的细胞。例如,特别地设想了脱毒内毒素与海藻糖二霉菌酸酯的组合,如美国专利4,435,386中所描述的。还设想了脱毒内毒素与海藻糖二霉菌酸酯和内毒素糖脂的组合(美国专利4,505,899),这正如脱毒内毒素与细胞壁骨架(CWS)或CWS与海藻糖二霉菌酸酯的组合,如美国专利4,436,727、4,436,728和4,505,900中所描述的。还预期仅CWS与海藻糖二霉菌酸酯的组合(无脱毒内毒素)是有用的,如美国专利4,520,019中所描述的。

[0120] 在其它实施方案中,本发明设想了多种佐剂可用于细胞的膜,从而导致改善的免疫原性组合物。通常地,唯一的要求是所述佐剂能够掺入所讨论细胞的细胞膜,与其物理缔合,或缀合于其。本领域技术人员将了解可按照本发明缀合于细胞疫苗的不同类型的佐剂,这些佐剂包括烷基溶血磷脂(ALP);BCG;和生物素(包括生物素化的衍生物)等。特别地设想来使用的某些佐剂是来自革兰氏细胞的磷壁酸。这些佐剂包括脂磷壁酸(LTA)、核糖醇磷壁酸(RTA)和甘油磷壁酸(GTA)。也可结合本发明使用它们的合成对应物的活性形式(Takada等,1995a)。

[0121] 各种佐剂,甚至通常不用于人的那些佐剂,仍然可以用于动物,其中,例如,人们希望产生抗体或随后获得活化的T细胞。可由佐剂或细胞造成的毒性或其它有害作用(例如如



可使用未辐照的肿瘤细胞发生的)与此类情况无关。

[0122] 一组优选用于本发明的一些实施方案的佐剂是可由核酸(例如,DNA或RNA)编码的那些佐剂。设想了可在编码抗原的核酸(例如,表达载体)中,或在单独的载体或其它构建体中编码此类佐剂。可以直接递送这些编码佐剂的核酸,诸如例如利用脂质或脂质体。

[0123] 3.赋形剂、盐和辅助物质

[0124] 可将本发明的抗原组合物与一种或多种另外的组分(例如,赋形剂、盐等)混合,所述另外的组分是药学上可接受的并且与至少一种活性成分(例如,抗原)相容的。合适的赋形剂是、例如水、盐水、葡萄糖(dextrose)、甘油、乙醇及其组合。

[0125] 可将本发明的抗原组合物配制为中性或盐形式的疫苗。药学上可接受的盐,包括酸加成盐(与肽的游离氨基形成的)和与无机酸诸如、例如盐酸或磷酸,或有机酸诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的那些酸加成盐。与游离羧基形成的盐也可从无机碱诸如、例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,和有机碱诸如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡及其组合衍生而来。

[0126] 此外,如果需要,抗原组合物可包含少量的一种或多种辅助物质(诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂等),其增强了抗原组合物或疫苗的效力。

[0127] F.疫苗和免疫原性组合物制剂

[0128] 在产生、合成和/或纯化后,可将抗原或其它疫苗组分制备为用于给个体施用的疫苗或免疫原性组合物。疫苗的制备在本领域中是众所周知的,如由美国专利号4,608,251、4,601,903、4,599,231、4,599,230和4,596,792(均通过引用并入本文)举例说明的。根据本公开内容,此类方法可用于制备包含含有SARS-CoV的特定RBD作为活性成分的抗原组合物的疫苗。在具体的实施方案中,将本发明的组合物制备为药学上可接受的疫苗。

[0129] 本发明的药物疫苗或免疫原性组合物包含有效量的溶解或分散在药学上可接受的载体中的SARS-CoV的一种或多种特定的RBD。短语“药学上可接受的或药理学上可接受的”是指当向动物诸如、例如人在适当的情况下施用时不产生有害的、变应性或其它不良反应的分子实体。根据本公开内容,包含SARS-CoV的至少一个RBD的药物组合物的制备对于本领域技术人员来说是已知的,如由Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Printing Company,1990(通过引用并入本文)举例说明的。此外,对于动物(例如,人)施用,应当理解的是,制剂应当满足如由FDA生物标准办公室所要求的无菌、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0130] 如本文中所述的,“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等物质及其组合,如本领域普通技术人员所知晓的(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Printing Company,1990,第1289-1329页,其通过引用并入本文)。取决于以固体、液体还是气溶胶形式施用其以及对于诸如注射的此类施用途其是否必需是无菌的,SARS-CoV的经修饰的RBD可包含不同类型的载体。除非任何常规载体与活性成分不相容,否则设想其在治疗或药物组合物中的使用。

[0131] 在任何情况下,所述组合物可包含各种抗氧化剂来延缓一种或多种组分的氧化。另外,可利用防腐剂(诸如各种抗菌剂和抗真菌剂),包括但不限于对羟基苯甲酸酯(例如,

对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合来实现对微生物作用的预防。

[0132] 可将SARS-CoV的经修饰的RBD配制成游离碱性形式、中性形式或盐形式的组合物。药学上可接受的盐,包括酸加成盐,例如与蛋白质组合物的游离氨基形成的那些酸加成盐,或与无机酸诸如例如盐酸或磷酸,或与有机酸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸形成的酸加成盐。与游离羧基形成的盐也可从无机碱诸如例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁;或有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因衍生而来。

[0133] 在其中组合物以液体形式存在的实施方案中,载体可以是溶剂或分散介质,其包含但不限于,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、脂质(例如,甘油三酯、植物油、脂质体)及其组合。适当的流动性可以例如通过使用包衣,诸如卵磷脂;通过维持所需粒度(通过在载体诸如、例如在液体多元醇或脂质中分散);通过使用表面活性剂诸如、例如羟丙基纤维素;或此类方法的组合来维持。在许多情况下,优选地包含等渗剂诸如、例如,糖、氯化钠或其组合。

[0134] 在其它实施方案中,可在本公开中使用滴眼剂、鼻用溶液或喷雾剂、气雾剂或吸入剂。此类组合物通常被设计来与靶组织类型相容。在非限制性实例中,鼻用溶液通常是被设计来以滴剂或喷雾剂向鼻腔施用的水溶液。制备鼻用溶液,以使得它们在许多方面与鼻分泌物相似,以使正常的纤毛作用得以保持。因此,在优选实施方案中,水性鼻用溶液通常是等渗的或略微被缓冲以维持约5.5至约6.5的pH。另外,如果需要,可在制剂中包含抗微生物防腐剂(与用于眼用制剂、药物的那些防腐剂类似)或适当的药物稳定剂。例如,各种商业鼻用制剂是已知的,并且包括药物诸如抗生素或抗组胺药。

[0135] 在某些实施方案中,制备SARS-CoV的RBD以用于通过这样的途径如口服摄取进行施用。在这些实施方案中,固体组合物可包含,例如溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊(例如,硬或软壳明胶胶囊)、缓释制剂、口服组合物、锭剂、酞剂、悬浮液、糖浆、薄糖片(wafer)或其组合。可将口服组合物与饮食的食物直接合并。用于口服施用的优选载体包含惰性稀释剂、可吸收的可食用载体或其组合。在本发明的其它方面,可将所述口腔组合物制备为糖浆或酞剂。糖浆或酞剂,可包含例如至少一种活性剂、甜味剂、防腐剂、调味剂、染料、防腐剂或其组合。

[0136] 在某些优选实施方案中,口服组合物可包含一种或多种粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、调味剂及其组合。在某些实施方案中,组合物可包含以下物质的一种或多种:粘合剂,诸如、例如,黄耆胶、阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶或其组合;赋形剂,诸如、例如,磷酸氢钙、甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或其组合;崩解剂,诸如、例如,玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸或其组合;润滑剂,诸如、例如,硬脂酸镁;甜味剂,诸如、例如,蔗糖、乳糖、糖精或其组合;调味剂,诸如、例如薄荷、冬青油、樱桃调味剂、橙子调味剂等或前述物质的组合。当剂量单位形式是胶囊时,除了上述类型的材料以外,其可含有载体诸如液体载体。各种其它材料可作为包衣存在或以其它方式改变剂量单位的物理形式。例如,可用虫胶,糖或两者对片剂、丸剂或胶囊进行包衣。

[0137] 适合于其它施用模式的另外的制剂包括栓剂。栓剂是通常含有药物的具有不同重量和形状的固体剂型,用于插入直肠、阴道或尿道。在插入后,栓剂软化、融化或溶化在腔液中。一般地,对于栓剂,传统载体可包括、例如聚亚烷基二醇、甘油三酸酯或其组合。在某些

实施方案中,栓剂可从含有例如在约0.5%至约10%、优选约1%至约2%的范围内的活性成分的混合物形成。

[0138] 无菌注射液通过将活性化合物以所需量与(视需要)各种上述例举的其它的成分一同掺入适当的溶剂,接着进行过滤灭菌来制备。通常,分散体通过将各种灭菌的活性成分掺入含有基本分散介质和/或其它成分的无菌媒介物来制备。在用于无菌注射液、混悬液或乳剂的制备的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥或冷冻干燥技术,所述技术产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的液体介质的任何另外的所需成分的粉剂。必要时,应当对所述液体介质进行适当地缓冲,并且在注射之前先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。还设想了用于直接注射的高度浓缩的组合物的制备,其中设想将DMSO用作溶剂来导致非常快速的渗透,从而将高浓度的活性剂递送至小区域。

[0139] 所述组合物在生产和贮存条件下必须是稳定的,并且保持抗微生物诸如细菌和真菌的污染作用。应当理解的是,应当在安全水平将内毒素污染保持在最低限度,例如,低于0.5ng/mg蛋白质。

[0140] 在具体实施方案中,可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(诸如、例如单硬脂酸铝、明胶或其组合)来实现。

[0141] G. 疫苗或免疫原性组合的施用

[0142] 疫苗或免疫原性组合物的施用方式可广泛变化。用于疫苗或免疫原性组合物的施用的任何常规方法是适用的。例如,疫苗可通过如下途径常规地施用:静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、瘤内、肌内、腹膜内、皮下、囊泡内(intravesicularlly)、经粘膜、心包内、口服、经直肠、经鼻、局部(topically)、在眼滴剂中、局部(locally)、使用气雾剂、注射、输注、连续输注、直接局部灌注浸浴靶细胞、经导管、经灌注、在霜剂(creme)中、在脂质组合物(例如、脂质体)中,或通过其它方法或前述已为本领域普通技术人员所知晓的方法的任意组合(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Printing Company,1990,其通过引用并入本文)。

[0143] 考虑到例如因素,诸如患者的体重和年龄、待治疗的疾病的类型、病况的严重度、先前或当前的治疗干预、施用方式等,患者的接种或免疫原性组合物递送安排和剂量可根据患者基本情况而变化,这可由本领域普通技术人员来容易地确定。

[0144] 可以用与剂量制剂相容的方式和以如将在治疗上是有效的和具有免疫原性的这样的量施用疫苗或免疫原性组合物。例如,肌内途径在具有体内短半衰期的毒素的情况下可以是优选的。待施用的量取决于待治疗的受试者,包括,例如,个体免疫系统合成抗体的能力和所需保护的程。疫苗的剂量将取决于施用途径,并将根据宿主的大小而变化。需要被施用的活性成分的精确量取决于医师的判断。在某些实施方案中,药物组合物可包含、例如至少约0.1%的活性化合物。在其它实施方案中,所述活性化合物可包含约2%与约75%之间、或约25%至约60%之间的单位重量,例如以及可从其中导出的任何范围内的单位重量。然而,合适的剂量范围可每接种具有、例如数百微克活性成分的量级。在其它非限制性的实例中,剂量还可以每接种包含约1微克/kg/体重、约5微克/kg/体重、约10微克/kg/体重、约50微克/kg/体重、约100微克/kg/体重、约200微克/kg/体重、约350微克/kg/体重、约500微克/kg/体重、约1毫克/kg/体重、约5毫克/kg/体重、约10毫克/kg/体重、约50毫克/kg/

体重、约100毫克/kg/体重、约200毫克/kg/体重、约350毫克/kg/体重、约500毫克/kg/体重至约1000mg/kg/体重或更多,和可从其中导出的任何范围。在来自本文所列的数目的可导出范围的非限制性实例中,可基于上述数目施用约5mg/kg/体重至约100mg/kg/体重、约5微克/kg/体重至约500毫克/千克/体重等的范围。用于初始施用和加强施用(例如,接种)的合适的方案也是可变的,但以初始施用接着随后的接种或其它施用为代表。

[0145] 在许多情况下,将期望具有疫苗或免疫原性组合物的多次施用,通常不超过6次接种,例如,通常不超过4次接种和在一些情况下一次或多次,通常至少约3次接种。接种的间隔可以是2至12周的间隔,更常见地3至5周的间隔,但本文中涵盖较长的间隔。可期望以1至5年、通常3年的间隔进行的周期性加强来维持抗体的保护水平。

[0146] 在免疫的过程之后,可针对上清液抗原进行抗体测定。所述测定可通过用常规标记物诸如放射性核素、酶、荧光等标记来进行。这些技术是众所周知的,并且可见于说明这些类型的测定的各种专利(诸如美国专利号3,791,932、4,174,384和3,949,064)中。可进行其它免疫测定,并且在免疫后可进行免受用SARS-CoV的RBD的攻击的保护的测定。

[0147] V. 本公开的试剂盒

[0148] 可将本文所述的任何组合物包含在试剂盒中。在非限制性实例中,可将经修饰的SARS-CoV纤突蛋白的RBD组合物包含在试剂盒中。在非限制性实例,可将包含经修饰的SARS-CoV纤突蛋白的RBD组合物的免疫原性组合物包含在试剂盒中。在非限制性实例,可将包含经修饰的SARS-CoV纤突蛋白的RBD组合物包括去糖基化的疫苗包含在试剂盒中。

[0149] 可以在水性介质中或以冻干形式包装试剂盒的组分。试剂盒的容器装置通常会包括至少一个可在其中放入组分(并且优选适当地等分的)小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其它容器装置。当在试剂盒中存在不止一种组分时,所述试剂盒通常还会含有可在其中单独放置额外组分的第二、第三或其它额外的容器。然而,可将组分的各种组合包含在一个小瓶中。本发明的试剂盒通常还会包括用于以密闭约束的方式含有组合物和任何其它试剂容器的装置以便商业销售。此类容器可包括可在其中保留所需小瓶的注塑或吹塑成型的塑料容器。

[0150] 试剂盒的组分可以作为干粉提供。当作为干粉提供试剂盒的试剂和/或组分时,可通过添加合适的溶剂将干粉进行重构。可设想的是,还可在另一容器装置中提供溶剂。所述试剂盒可包含用于含有无菌、药学上可接受的缓冲液和/或其它稀释剂的容器装置。

[0151] 不论容器的数目和/或类型,本发明的试剂盒还可包含用于帮助最终组合物在动物体内的注射/施用和/或放置的器械,和/或与所述器械一起被包装。此类器械可以是注射器、移液管、镊子和/或任何此类医疗批准的递送载体。在一些情况下,存在一个或更多鉴定来自个体的样品中存在SARS的装置。

## 实施例

[0152] 以下实施例被包括来示范本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解的是,以下实施例中公开的技术代表由本发明人发现的在本发明的实践中充分发挥作用的技术,因此可被认为构成了用于其实施的优选方式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解的是,可在公开的特定实施方案中产生许多变化,但仍然获得相似或类似的结果而不背离本发明的精神和范围。

[0153] 实施列1

[0154] 示例性材料和方法

[0155] 在巴斯德毕赤酵母中克隆和表达RBD

[0156] 基于酵母密码子的使用偏爱对编码SARS-CoV RBD的193-aa(RBD193,残基318-510)和219-aa(RBD219,残基318-536)的DNA进行密码子优化,并由GenScript(Piscataway, NJ)合成所述DNA,随后使用EcoRI/XbaI限制性位点将其亚克隆入毕赤酵母分泌表达载体pPICZαA(Invitrogen,Grand Island,NY)。使用载体侧接引物α-因子和3'AOX-1通过双链测序确认重组质粒的正确插入序列和阅读框。随后通过电穿孔将所述重组质粒DNA转化入巴斯德毕赤酵母X-33。在30℃利用0.5%的甲醇诱导重组RBD193和RBD219的表达,进行72小时,并且如先前所述,选择最高表达克隆以产生20%甘油中的种子原液。

[0157] 因为酵母中表达的RBD193/RBD219-野生型(WT)的高糖基化可造成产率和重复再现性问题,因此除去或突变RBD序列中负责N-糖基化的3个天冬酰胺以产生如下的去糖基化形式:N1:第一Asn(N-1)(第一N-糖基化位点)的缺失;N2:除了N1缺失以外的第二N-糖基化Asn(N-13)至Ser的突变;和N3:除N1和N2缺失/突变以外的第三N-糖基化的N-40至Ala的突变(图1)。利用在实验室开发的抗-RBD单克隆抗体(mAb)33G4(Goud等,2004),通过SDS-PAGE和免疫印迹确认重组RBD193-WT和RBD219-WT的表达和糖基化水平以及它们的去糖基化形式。

[0158] 糖苷酶测定

[0159] 为了确定表达的重组RBD193-WT是否被糖基化,利用肽-N-糖苷酶F(PNGase F)(New England Biolabs(NEB),Ipswich,MA)消化酵母表达的RBD193-WT。简言之,将10μl用0.5%甲醇诱导(进行72小时)的RBD193-WT/pPICZαA/巴斯德毕赤酵母培养物与1μl变性缓冲液(NEB)在1.5ml管中混合,并于100℃下变性10分钟。随后在管中添加2μl的G7缓冲液、2μl的10%NP40(均随PNGase F一起)、1μl的N-PNGase F和5μl的去离子水。随后将混合物在37℃温育1小时。通过SDS-PAGE,随后使用抗-RBD mAb 33G4通过免疫印迹确认聚糖的去除。

[0160] 通过pH和去垢剂优化诱导条件

[0161] 将RBD193-WT/pPICZαA/巴斯德毕赤酵母X-33的种子在225rpm、30℃下于5ml缓冲甘油-复合培养基(Buffered Glycerol-complex Medium,BMGY)中生长过夜直至OD600达到2-6。在10ml含有0.5%的甲醇的具有5.2、6.0、7.5和8.0的不同pH的缓冲甲醇-复合培养基(BMMY)(起始OD600=1.0)中诱导重组RBD193-WT的表达。将**EMPIGEN®**BB去垢剂以0.01%和0.05%的终浓度添加至培养物(pH 6.0)中,以确定所述去垢剂是否能够破坏表达的重组蛋白的任何可能的聚集。使诱导持续72小时。使用抗-RBD mAb 33G4通过免疫印迹鉴定不同培养基中的表达的重组RBD193的表达、产率和完整性。

[0162] 发酵和纯化

[0163] 为了放大在酵母中重组RBD的表达,如先前所述(Du等,2009),在5L发酵中发酵pPICZαA/巴斯德毕赤酵母X33中的RBD193-N1、RBD193-N3、RBD219-WT和RBD219-N1的构建体。简言之,将每一个构建体的种子原液用于接种1L的缓冲最小甘油(Buffered Minimal Glycerol,BMG)培养基,并在以225rpm摇动的条件下于37℃培养过夜,直至OD600达到~10.0。将110ml的该培养物用于在含有3.5ml/L的PTM1微量元素和3.5ml/L的0.02%的d-生物素的发酵罐中接种2.5L的无菌BSM。在30℃起始发酵,并且将初始pH设置在5.0。将空气和

搅拌调整至维持30%的溶解氧(DO)。在分批阶段过程中耗尽甘油后(DO峰值),在6至8小时的时间上以0.8ml/L/h至10ml/L/h泵入甲醇,使用14%氢氧化铵将pH调整至6.0,并在26℃维持诱导75小时。发酵后,通过在4℃以7,000rpm离心30分钟收获培养物,并将其通过0.22µm的瓶顶过滤单元进行过滤。通过SDS-PAGE和光密度法测定重组RBD在发酵培养物中的表达产率。为了纯化RBD193N1、RBD219-WT和RBD219-N1,用2份30mM Tris和3M硫酸铵(pH 8.0)稀释1份发酵上清液,随后以1.5ml/min的流速将其加载至HiTrap Butyl Sepharose HP,然后用30mM Tris和2M硫酸铵洗涤,以除去未结合的蛋白质。用始于2M的硫酸铵梯度洗脱结合的RBD蛋白。将含有靶蛋白的级分合并在一起,将其浓缩,并用Toyopearl HW55S尺寸排阻柱进一步纯化以消除剩余污染物。为了纯化RBD193-N3,使用阴离子交换Q Sepharose XL柱对发酵培养物上清液进行色谱分离。收集流穿物,将其浓缩,并与其它RBD蛋白一样,利用Toyopearl HW55S尺寸排阻柱进一步纯化。使用在实验室中开发的抗-RBD mAb 33G4、35B5、24H8和31H12(Goud等,2004)通过SDS-PAGE和免疫印迹确认重组RBD的纯度。

#### [0164] 动物

[0165] 将4至6周龄雌性BALB/c小鼠用于研究,将其置于纽约血液中心的动物设施中。按照美国国立卫生研究院的实验室动物的护理和使用的推荐进行动物研究。动物操作方案得到纽约血液中心的动物实验伦理委员会的批准(许可号:194.14)。

#### [0166] 小鼠接种和血清收集

[0167] 如先前所述,通过一些改进(Du等,2009;Du等,2010;Du等,2009),进行免疫操作方案。简言之,用铝胶2%(氢氧化铝凝胶,在下文中称为明矾)佐剂(InvivoGen, San Diego, California)配制的酵母表达的重组RBD蛋白(RBD193-N1、RBD193-N3、RBD219-N1或RBD219-WT)皮下(s.c.)免疫小鼠(20µg/小鼠)。将表达SARS-CoV RBD蛋白(RBD193-WT)的哺乳动物细胞293T(Du等,2009)和PBS分别用作阳性和阴性对照。以21天的间隔用相同的明矾配制的免疫原(10µg/小鼠)加强免疫小鼠2次。在免疫之前和在每一次接种之后10天收集小鼠血清,以测量体液IgG抗体应答和中和抗体。

#### [0168] ELISA

[0169] ELISA用于验证酵母表达的SARS-CoV RBD蛋白对实验室中开发的RBD特异性mAb的构象(Goud等,2004)。简言之,在4℃下分别用每一种酵母表达的RBD蛋白(1µg/ml)预包被96孔ELISA板过夜,并在37℃用2%脱脂乳封闭2小时。将一系列构象依赖性mAb(包括24H8(Conf I)、31H12(Conf II)、35B5(Conf IV)、33G4(Conf V)、19B2(Conf VI))和线性依赖性mAb 17H9(Goud等,2004)添加至板,并于37℃温育1小时,随后进行4次洗涤。将结合的抗体与缀合辣根过氧化物酶(HRP)的抗-小鼠IgG(1:3,000, Invitrogen)在37℃反应1小时。在4次洗涤后,将底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(Zymed)添加至板,并通过添加1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。利用ELISA酶标仪(Tecan, San Jose, CA)测量450nm处的吸光度(A<sub>450</sub>)。

[0170] 另外,还使用具有一些改进的先前描述的操作方案(Du等,2009;Du等,2010;Du等,2009)通过ELISA测量所收集的小鼠血清中的多克隆抗体对表达的RBD的反应性。简言之,在4℃下分别用酵母表达的RBD219-WT蛋白(1µg/ml)预包被96孔ELISA板过夜,随后添加系列稀释的小鼠血清。通过使用缀合有HRP的抗-小鼠IgG(1:2,000),随后进行如上所述的相同操作方案检测结合的IgG抗体。

#### [0171] 拉下(pull-down)结合测定

[0172] 使用具有一些改进的先前描述的操作方案(Du等,2013;Du等,2013)通过拉下测定进行酵母表达的重组SARS-CoV RBD蛋白对与细胞结合的受体ACE2或可溶性ACE2(sACE2)(R&D Systems,Minneapolis,MN)的结合。简言之,分别用重组SARS-CoV RBD蛋白加上17H9线性mAb(Goud等,2004)以及蛋白A和G(针对与细胞结合的ACE2)或Ni-NTA亲和柱(针对sACE2)温育表达ACE2的293T细胞(ACE2/293T)的裂解物或sACE2。在于4℃旋转过夜后,通过离心除去混合物的上清液。在用PBS洗涤3次后,将具有结合蛋白的沉淀物煮沸10分钟,并如下所述将上清液经历SDS-PAGE和免疫印迹。

[0173] SDS-PAGE和免疫印迹

[0174] 使用具有一些改进的先前所述的操作方案(Du等,2011;Du等,2008;Du等,2008)进行SDS-PAGE和免疫印迹。简言之,将拉下的蛋白质经历SDS-PAGE,随后转移至硝酸纤维素膜,在4℃用具有0.05%Tween-20的PBS(PBST)中的5%脱脂乳封闭过夜,随后在室温下用山羊抗-ACE2mAb(1μg/ml)和HRP-标记的抗-山羊IgG(1:1,000,R&D Systems)相继温育1小时。利用ECL免疫印迹底物试剂(GE Healthcare,Piscataway,NJ)和Amersham Hyperfilm(GE Healthcare)使信号可视化。

[0175] 假病毒中和测定

[0176] 使用如先前所述的具有一些改进的假病毒中和测定(Du等,2009;Du等,2009)测量重组RBD免疫的小鼠血清的中和抗体滴度。简言之,使用磷酸钙法,用编码SARS-CoV S蛋白的质粒和编码Env-缺陷型表达荧光素酶的HIV-1基因组的质粒(pNL4-3.luc.RE)共转染293T细胞。转染后72小时收获培养物上清液,将其用于表达SARS-CoV受体ACE2的293T细胞(ACE2/293T)的单循环感染。将细胞以 $10^4$ /孔接种在96孔培养板中,并在37℃温育4-6小时以形成单层。将系列2倍稀释的小鼠血清与SARS-CoV假病毒在37℃混合1小时,随后转移至单层细胞。在温育72小时后,通过Ultra 384照度计(Tecan)测量相对荧光酶活性。计算SARS假病毒中和并将其表达为50%中和抗体滴度(NT50)。

[0177] 基于活病毒的中和测定

[0178] 使用具有一些改进的如先前所述的基于活病毒的中和测定(He等,2004;He等,2005)进一步测量重组RBD免疫的小鼠血清的中和滴度。简言之,将系列2倍稀释的小鼠血清在37℃与~100个感染性SARS-CoV混合,进行1小时,随后以一式二份将其添加至单层Vero E6细胞。每天观察每一个孔中的细胞病变效应(CPE),并在感染后第3天进行记录。将中和滴度报告为在至少50%的孔中完全阻止CPE的血清的最高稀释度的倒数(NT50)。

[0179] 实施例2

[0180] 重组RBD在巴斯德毕赤酵母中的表达

[0181] 将RBD193和RBD219(WT、N1、N2和N3)的不同构建体转化入巴斯德毕赤酵母X-33,并在10ml管中用0.5%甲醇诱导来自每个转化的20个克隆的重组蛋白表达。在诱导72小时后,通过SDS-PAGE考马斯染色的凝胶和利用抗-RBD mAb 33G4的免疫印迹观察不同构建体的具有不同大小的重组RBD。重组RBD的表观分子量(M.W.)比基于序列预期的分子量更高,并且观察到高度M.W.拖尾(smear),尤其是在野生型(WT)构建体中(在RBD193和RBD219二者中),这表明重组RBD-WT被糖基化或是聚集的(图2A和2B)。通过用N-糖苷酶PNGase F消化蛋白质来确认RBD193-WT的糖基化程度。消化后,高度M.W.拖尾消失,RBD193-WT的大小返回至预期的M.W.(23kDa)(图2C)。该测定还确认了高度M.W.拖尾来自酵母表达的RBD的高度糖基化,

而非来自聚集。当N-连接的糖基化位点缺失或突变(N1、N2和N3)时,酵母表达的RBD的糖基化的进一步证据得到确认;重组RBD的糖基化程度和表观M.W.二者均相应地下降(图2A和2B)。这些具有去糖基化形式的构建体允许在放大生产和质量控制测试过程中进行精确和可重现的控制。值得注意的是,当N-连接的糖基化位点缺失/突变时,也观察到重组RBD的表达产率依次降低(产率水平:WT>N1>N2>N3;图2A和2B)。这表明在产品开发过程中应当考虑表达产率与糖基化水平之间的可行的平衡。

#### [0182] 实施例3

##### [0183] 表达条件的优化:pH和去垢剂

[0184] 为了使重组RBD在巴斯德毕赤酵母X33中的表达产率最大化和使可能的聚集最小化,将RBD193-WT用作原型来使用具有不同pH和/或不同Empigen去垢剂浓度的培养基测试优化的诱导条件。基于利用抗-RBD mAb 33G4的免疫印迹,用于RBD193表达的最佳pH为pH 6.0。在具有pH 5.0的培养物中没有靶蛋白表达,并且在具有高于6.0的pH的培养基中看到甚至更少的RBD193表达。Empigen去垢剂(0.01%或0.05%)的添加未提高表达产率或改变表达的RBD的模式,这表明聚集不影响表达的RBD193-WT(图3)。

#### [0185] 实施例4

##### [0186] RBD构建体的发酵和纯化

[0187] 当甲醇诱导超过48小时的时候,作为表达的RBD193-WT对酵母细胞的毒性的可能结果,RBD193-WT酵母构建体停止生长。因此,选择4种其它构建体(包括不同的去糖基化形式(RBD193-N1、RBD193-N3、RBD219-WT和RBD219-N1))用于5L规模的发酵,以获得重组蛋白用于免疫原性和效力的比较。在5L发酵后,通过Butyl HP和尺寸排阻色谱(SEC)从发酵的培养物纯化重组RBD193-N1、RBD219-WT和RBD219-N1,以及通过在Q Sepharose XL上进行负性捕获、随后进行SEC来纯化重组RBD193-N3。

[0188] 如通过SDS-PAGE考马斯染色的凝胶和利用抗-RBD mAb 33G4的免疫印迹显示的,使用疏水相互作用(Butyl HP)色谱和随后的尺寸排阻柱从发酵培养物纯化RBD193-N1、RBD219-WT和RBD219-N1的初步努力得到95%的纯化的蛋白质(图4)。此外,可利用该两步纯化法高效去除高度糖基化的RBD和宿主蛋白质污染物,从而可靠地得到纯且可溶的产物。与使用其它表达系统(Du等,2009;Du等,2010;Du等,2009)的另外的表达的RBD蛋白不同,这些酵母表达的RBD不含任何6×His标签或其它标签融合蛋白,从而允许将来用于人使用的放大生产。

#### [0189] 实施例5

##### [0190] 酵母表达的SARS-COV的RBD的抗原性分析

[0191] 为了确认所选择的纯化的RBD构建体(RBD193-N1、RBD193-N3、RBD219-WT和RBD219-N1)是否与哺乳动物细胞(293T)表达的RBD共有相同的抗原性或抗原表位,已知所述哺乳动物细胞(293T)表达的RBD可引发中和抗体的产生(Du等,2009;Du等,2010),针对4种构象抗-RBD mAb(包括24H8(Conf I)、31H12(Conf II)、35B5(Conf IV)和33G4(Conf V))进行免疫印迹(图5)。值得注意的是,mAb 33G4强烈地识别所有RBD构建体,与哺乳动物细胞表达的RBD的识别模式类似,而24H8仅微弱地识别它们。此外,当增加胶片曝光时间时,所有酵母表达的RBD219构建体可被4种特异性mAb更强烈地识别,这与RBD193构建体(Du等,2009;Du等,2010)相反,并与先前的结果一致。该证据链强烈地表明野生型和去糖基化构建



体表现出相似的抗原性。

[0192] 为了进一步验证这些RBD蛋白的抗原性,利用5种构象抗-RBD mAb(24H8、31H12、35B5、33G4和19B2(Conf VI))和一种线性抗-RBD mAb(17H9)(Goud等,2004)进行ELISA。如图6A中所示,虽然所有酵母表达的RBD(1 $\mu$ g/ml)均与抗-RBD mAb(2.2 $\mu$ g/ml)反应,但RBD219-WT和RBD219-N1表现出对所有测试的mAb的最强的结合。RBD193-N3与Conf IV mAb 35B5、Conf VI mAb 19B2和线性mAb 17H9的反应性比另外的野生型和突变型RBD的反应性低得多。mAb浓度下降至0.25 $\mu$ g/ml没有显著影响RBD219-N1或RBD219-WT对所有5种构象mAb的结合,然而它们对线性抗-RBD mAb 17H9的反应性被显著降低(图6B)。这些数据表明去糖基化的RBD219-N1蛋白,与RBD219-WT一样,尽管N1糖基化位点缺失,能够维持构象和抗原性。

[0193] 实施例6

[0194] 酵母表达的RBD蛋白的功能性

[0195] 基于这些蛋白结合以与细胞结合的形式或可溶性形式(sACE2)存在的ACE2(SARS-CoV的受体)的能力进一步确认酵母表达的RBD蛋白的功能性。为了建立这些蛋白和与细胞结合的ACE2的结合,首先将测试蛋白(20 $\mu$ g/每一种)在线性抗-RBD mAb 17H9(Goud等,2004)和蛋白A及G珠存在的情况下与ACE2/293T细胞混合,随后使用特异性针对ACE2的抗体进行免疫印迹。如图7A中显示的,在用各自的RBD蛋白拉下所有细胞裂解物中观察到一条对应于ACE2的大小的清晰条带;所有RBD蛋白均与ACE2-特异性mAb强烈反应,但是RBD193-N3混合物显示更弱的反应。这些结果表明酵母表达的RBD蛋白能够高效地结合细胞表面受体ACE2。如所预期的,没有条带(结合)与对照蛋白(MERS-CoV RBD)一致(图7A)。

[0196] 通过在Ni-NTA珠存在的情况下将等浓度的RBD蛋白与sACE2(含有6 $\times$ His标签)混合,随后如上进行免疫印迹来进一步检测RBD蛋白与sACE2的结合。如图7B-C中显示的,在拉下样品中显示两条对应于sACE2和各自的RBD蛋白的大小的清晰条带,而在仅含有sACE2或RBD蛋白的样品中只显示一条对应于sACE2或各自RBD蛋白的大小的条带,其全部与分别针对ACE2或SARS-CoV RBD(33G4)的抗体强烈反应。然而,在含有MERS-CoV的RBD蛋白加上sACE2的对照中,或仅含sACE2的对照中只显示一条对应于sACE2的大小的条带(图7B-C)。这些结果确认了这些酵母表达的RBD与SARS-CoV的受体ACE2的特异性结合,从而表明所有具有或不具有突变的RBD蛋白维持足够的功能性。

[0197] 实施例7

[0198] 酵母表达的SARS-CoV的RBD引发强劲的全身性体液免疫应答

[0199] 为了比较酵母表达的RBD蛋白的免疫原性,使用这些蛋白免疫小鼠,并分析最后一次接种后10天收集的小鼠血清中的IgG抗体应答。如图8中所示,所有酵母表达的RBD蛋白均能够诱导强的针对RBD219-WT的IgG抗体应答。具体地,RBD219-N1诱导比针对其它RBD蛋白(包括RBD193-WT、RBD193-N1、RBD193-N3和RBD219-WT)显著更高的针对RBD219-WT的IgG抗体应答,分别具有 $1.4 \times 10^6$ (RBD219-N1)、 $3.5 \times 10^5$ (RBD193-WT)、 $1.8 \times 10^5$ (RBD193-N1)、 $1.9 \times 10^5$ (RBD193-N3)和 $1.8 \times 10^5$ (RBD219-WT)的几何平均滴度。通过比较,SARS-CoV RBD193-WT诱导分别比针对RBD193-N1、RBD193-N3和RBD219-WT显著更高的针对RBD219-WT的IgG抗体应答。在SARS-CoV RBD193-N1、RBD193-N3或RBD219-WT之间未观察到显著差异。利用明矾加上PBS免疫的对照小鼠只显示本底抗体应答(图8)。这些结果表明RBD219-N1表现出最高

的免疫原性,这进而在接种的小鼠中引发最强的RBD特异性抗体应答。

[0200] 实施例8

[0201] 酵母表达的SARS-CoV RBD蛋白在接种的小鼠中诱导可比较的针对SARS-CoV的中和抗体的滴度

[0202] 为了比较酵母表达的SARS-CoV RBD蛋白引发中和抗体的能力,使用基于SARS假病毒的中和测定测试在最后一次接种后10天从接种的小鼠收集的血清。如图9A中所示,利用RBD193-WT、RBD219-WT或RBD219-N1的免疫一致地引发强效中和抗体应答,其中和抗体滴度分别为约 $4 \times 10^4$ ,这显著强于由RBD193-N1或RBD193-N3诱导的中和抗体滴度,其中和抗体滴度分别为 $4.3 \times 10^3$ 和 $1.4 \times 10^4$ 。如所预期的,明矾佐剂加上PBS对照未诱导针对SARS假病毒的中和抗体应答(图9A)。

[0203] 为了进一步确认诱导的中和抗体的功能性,随后进行基于活的SARS-CoV的中和测定。如图9B中所示,利用RBD219-N1的免疫导致比由RBD193-WT、RBD193-N1、RBD193-N3或甚至RBD219-WT引发的针对活的SARS-CoV感染的中和抗体应答的滴度显著更高的所述滴度,中和抗体滴度分别达到 $4.5 \times 10^3$ (RBD219-N1)、 $2.3 \times 10^3$ (RBD193-WT)、 $2.5 \times 10^2$ (RBD193-N1)、 $1.6 \times 10^3$ (RBD193-N3)和 $2.2 \times 10^3$ (RBD219-WT)。虽然在RBD193-WT组与RBD219-WT组之间未看到显著差异,但由RBD193-N1和RBD193-N3诱导的针对活的SARS-CoV感染的中和抗体的滴度显著低于由RBD193-WT诱导的滴度,从而表明RBD193中的N1糖基化位点(RBD193-N1)的缺失和/或第二和第三糖基化位点(RBD193-N3)的突变可能已影响酵母表达的RBD193蛋白中的中和表位的构象。类似地,明矾对照组没有诱导针对活的SARS-CoV的中和抗体(图9B)。上述数据进一步确认R在被测试的RBD蛋白当中BD219-N1具有最强的免疫原性,所述测试在接种的动物中诱导针对活的SARS-CoV的强效中和抗体应答。

[0204] 实施例9

[0205] 某些实施方案的意义

[0206] SARS-CoV S蛋白的RBD含有多个构象依赖性表位,所述表位诱导强效的针对广谱SARS-CoV菌株的的中和抗体应答,从而作用于开发SARS疫苗的重要靶(Goud等,2004;He等,2006;Punt等,2002;Dean,1999)。先前已证明,含有与Fc标签融合的RBD结构域的193个氨基酸的重组蛋白(RBD193-Fc)在接种的动物中诱导高度强效的中和抗体应答和保护性免疫(Du等,2009;Du等,2010Du等,2009)。为了消除可能由这些候选疫苗中的Fc片段诱导的潜在有害作用,在不同表达系统(包括哺乳动物293T和CHO-K1细胞、Sf9昆虫细胞和大肠杆菌)中陆续表达几种无Fc标签的RBD蛋白。已显示这些不具有Fc标签的RBD蛋白中的大部分仍然可在接种的动物中诱导针对SARS-CoV攻击的强中和抗体应答和保护(Du等,2009;Du等,2010Du等,2009)。这些发现表明所述RBD蛋白本身可引发强效中和抗体应答和保护动物以及在具体实施方案中还保护人免受SARS-CoV感染。

[0207] SARS-CoV S-RBD(残基318-510)在N-1、N-13和N-40位置上含有N-连接的糖基化位点(Wong等,2004)。虽然具有高度糖基化的哺乳动物细胞表达的RBD蛋白诱导显著的中和活性,但大肠杆菌表达的无聚糖的RBD蛋白能够与RBD特异性的构象依赖性mAb反应,以及还能够接种的动物中诱导显著的中和抗体应答(Du等,2009),这表明当用作候选疫苗时,无聚糖的重组RBD蛋白可以仍然维持其基本抗原性和免疫原性。

[0208] 甲醇营养型酵母巴斯德毕赤酵母因其以下能力已被广泛用于异源蛋白表达(以用

于制药和疫苗应用):1)在不存在动物来源的生长因子的确定成分培养基中产生大量蛋白;和2)以低成本提供容易的放大(He等,2005;Shibata等,1985)。作为真核表达系统,酵母能够进行许多翻译后修饰,诸如蛋白水解加工、折叠、二硫键形成和糖基化,这可以是所表达的蛋白的功能所必需的。然而,与哺乳动物细胞不同,巴斯德毕赤酵母频繁地将单糖添加至所表达的蛋白以变成高糖基化(Hopkins等,2011)。存在于高糖基化的聚糖中的残基的程度和键联可取决于酵母菌株和细胞培养条件而变化(Li等,2005),作为后果,这引起关于表达产率、同种的产物的重现性和质量控制的关注(Prabakaran等,2006)。由于这些关注,除去或突变RBD序列中负责N-糖基化的3个天冬酰胺以产生去糖基化的RBD形式。

[0209] 在本公开中,通过突变或缺失对应糖基化位点上的残基来表达具有不同长度(RBD193-WT和RBD219-WT)的两种野生型RBD以及它们的去糖基化突变体(RBD193-N1、RBD193-N2、RBD193-N3;RBD219-N1、RBD219-N2、RBD219-N3)(图1)。随后比较它们的抗原性、功能性和免疫原性。SDS-PAGE分析显示酵母表达的RBD193-WT和RBD219-WT二者均呈拖尾迁移,表观分子量高于其计算的M.W.,这表明这些重组RBD-WT被高度糖基化或是聚集的(图2B)。在用N-糖苷酶PNGase F消化RBD193-WT后,所述高M.W.拖尾消失,并且RBD193-WT的大小返回至预期的M.W.(图2C),这确认了高M.W.拖尾来自酵母表达的RBD的过度糖基化而非任何聚集。当缺失或突变RBD193-WT和RBD219-WT中的N-连接的糖基化位点中的一些位点(N1、N2和N3)时,重组RBD的表观M.W.相应地减小(图2B)。因此,这些去糖基化突变体已允许我们在放大生产和质量控制测试过程中精确且可重现地控制表达过程。值得注意的是,具有缺失或突变的N-连接的糖基化位点的重组RBD的表达产率相较于它们的对应的野生型RBD的表达产率得以减少(图2B);因此,这指出了对在产品开发过程中发现表达产率与糖基化水平之间的可行的平衡的需要。

[0210] 重要的是,当与野生型形式相比较时,RBD219-N1表现出较低的糖基化水平而无明显受损的表达产率(图2B)。在两步纯化(包括疏水相互作用(Butyl HP)色谱和尺寸排阻柱)后,大多数糖基化种类和宿主蛋白质污染物被除去(图3和4)。因此,重组RBD219-N1蛋白被选择用于进一步评估。通过使用两个单独的方法:免疫印迹(图5)和ELISA(图6),RBD219-N1被构象抗-RBD mAb高度识别(Goud等,2004;Dean,1999),这进一步验证了该去糖基化蛋白维持其抗原性等于野生型蛋白的抗原性的能力。此外,与野生型RBD一样,RBD219-N1和与细胞结合的受体ACE2以及可溶性受体ACE2充分结合(图7),进一步确认该酵母表达的RBD突变体维持其功能性。

[0211] 比较RBD219-N1与野生型RBD和一些其它去糖基化蛋白的免疫原性,RBD219-N1相较于野生型RBD、RBD219-WT和RBD193-WT以及另外的去糖基化蛋白(诸如RBD193-N1和RBD193-N3)似乎诱导显著更高的SARS-CoV RBD特异性IgG抗体应答;RBD193-N1和RBD193-N3表现出比RBD193-WT相对更低的抗原性和免疫原性(图6、8和9)。在所有测试的酵母表达的RBD当中,RBD219-N1引发最高滴度的针对假型化的SARS-CoV和活的SARS-CoV感染的中和抗体(图9)。在具体实施方案中,RBD219-N1的N-1糖基化位点的缺失可能已暴露了RBD中的中和表位,从而导致中和抗体应答的更好诱导。在埃博拉病毒中观察到类似的现象。埃博拉病毒糖蛋白亚单位1(GP1)上的两个N-连接的位点的突变导致增强的免疫原性,这可能是通过暴露GP1上的保护性抗体表位导致的(Zakhartchouk等,2007)。

[0212] 在体内就其功效、保护动物免受SARS-CoV攻击进一步评估RBD219-N1候选疫苗。根

据先前的经验,预期可诱导NT50>1,000的针对活的SARS-CoV的中和抗体滴度的基于RBD的候选疫苗可以完全保护动物免受病毒感染(Du等,2009;Du等,2009)。本数据显示由RBD219-N1在接种的小鼠中诱导的针对活的SARS-CoV的中和抗体的滴度>2,000(图9B),这显示了其高效地保护免疫的动物免受SARS-CoV攻击的前景。

[0213] 总之,酵母表达的无任何额外标签但具有一个缺失的糖基化位点的RBD(RBD219-N1)可表现出更低的糖基化水平和更高的表达产率,诱导的更强的RBD特异性抗体应答和更强效的针对假型化和活的SARS-CoV二者的中和抗体,从而指出其在人中用作针对SARS-CoV的有效且安全的亚单位疫苗的用途。

[0214] 实施例10

[0215] 发酵过程的实例

[0216] 如下描述用于来自SARS-CoV纤突蛋白的RBD组合物的实例的上游和下游处理的方法的实例:

[0217] 上游处理-发酵:

[0218] 用克隆RBD219-N1/pPICZaA/巴斯德毕赤酵母X33接种500mL BMG中的培养物,并在30°C,225rpm下温育18-24小时。

[0219] 此后,将过夜培养物用于接种发酵罐中的培养基。发酵始于30°C并将初始pH设置在5.0。调整空气和搅拌以维持30%的DO。在分批阶段过程中耗尽甘油后(DO峰值),使培养物饥饿1小时(无进料)。在1小时饥饿的过程中,将温度从30°C变化成25°C,并使pH从5.0升高至6.5。在pH和温度斜线变化后,起始甲醇诱导。对于诱导的头6个小时(第0小时至第6小时),使甲醇进料速度从1ml/L/hr升高至11ml/L/hr。在6小时的斜线变化后,将甲醇进料速度维持在11ml/L/hr持续18小时(第6小时至第24小时),在18小时的11ml/L/hr的稳定流速后,再次使甲醇流速在6小时内(第24小时至第30小时)从11ml/L/hr升至13ml/L/hr,并将其在13ml/L/hr维持另外18小时(第30小时至第48小时);最后,在18小时的13ml/L/hr的稳定流速后,使流带在6小时内(从第48小时至第54小时)从13ml/L/hr升至15ml/L/hr,并将其在15ml/L/hr维持运行的剩余时间。

[0220] 发酵后,通过将培养物无菌泵入无菌收获容器来收获培养物。通过在4°C下使用JLA 8.1000转子以7000rpm(~12,500xg)离心30分钟来除去细胞。使用0.22um瓶顶过滤单元过滤上清液,将过滤的上清液转移至1L PETG瓶中并保存直至纯化。

[0221] 下游处理-纯化:

[0222] 将发酵上清液浓缩3-4倍。将氢氧化铝和硫酸铵添加在浓缩的发酵上清液中以将其pH和导电性分别调整至约 $8.0 \pm 5$ 和 $220 \pm 10$ ms/cm。

[0223] 在进行pH和导电性调整后,将浓缩的发酵上清液通过0.22um过滤,随后加载至Butyl HP柱上,结合条件为30mM Tris,2M硫酸铵(AS),pH8.0。用2个柱体积(CV)的30mM Tris,2M AS,pH8.0洗涤柱子以除去柱中未结合的蛋白质,随后利用30mM Tris,0.7M AS,pH8.0进行10V的第一步洗脱,以除去结合的污染物,最终利用30mM Tris,pH8.0进行10CV的第二步洗脱以获得洗脱混合物(pool)。

[0224] 将洗脱混合物进一步浓缩 $40 \pm 10$ 倍,以及将其加载至Superdex75尺寸排阻柱上以除去剩余的污染物。

[0225] 为了表征RBD219-N1和建立化学稳定性,可利用一种或多种蛋白质特异性测定:

[0226]

测定名称	目的
pH 和外观	身份和稳定性
内毒素测试	污染的分析
SDS-PAGE(还原的和非还原的)	身份、纯度和稳定性
免疫印迹	身份、纯度和稳定性
宿主细胞蛋白质印迹	纯度
HPLC-SEC(连同光散射和折射率)	身份、纯度和稳定性
UPLC-RP	身份、指纹图谱、质量和稳定性
其它测定	
UPLC-HILIC	聚糖分析

[0227] 参考文献

[0228] 本说明书中提及的所有专利和出版物指明本发明所属领域内的技术人员的水平。所有专利和出版物通过引用并入本文,其引用程度就如同每一个别的出版物被明确地和单独地通过引用并入。

[0229] 出版物

[0230] Du L,He Y,Zhou Y,Liu S,Zheng BJ,Jiang S.The spike protein of SARS-CoV:a target for vaccine and therapeutic development.Nat.Rev.Microbiol.2009;7(3):226-36.

[0231] Peiris JSM,Lai ST,Poon LLM,et al.Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome.Lancet 2003;361(9366):1319-25.

[0232] Zhong NS,Zheng BJ,Li YM,et al.Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome(SARS)in Guangdong,People's Republic of China,in February,2003.Lancet 2003;362(9393):1353-8.

[0233] Jiang S,Bottazzi ME,Du L,et al.Roadmap to developing a recombinant coronavirus S protein receptor-binding domain vaccine for severe acute respiratory syndrome.Expert Rev.Vaccines2012;11(12):1405-13.

[0234] Perlman S,Dandekar AA.Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS.Nat Rev Immunol.2005;5(12):917-27.

[0235] Bolles M,Deming D,Long K,et al.A double-inactivated SARS-CoV vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic pro-inflammatory pulmonary response upon challenge.J.Virol.2011;85(23):12201-15.(23):12201-15.

[0236] Castilow EM,Olson MR,Varga SM.Understanding respiratory syncytial virus(RSV)vaccine-enhanced disease.Immunol.Res.2007;39(1-3):225-39.

[0237] Tseng CT,Sbrana E,Iwata-Yoshikawa N,et al.Immunization with SARS

coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35421

[0238] Jaume M, Yip MS, Kam YW, et al. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralisation and enhancement. *Hong Kong Med J* 2012;18Suppl 2:31-6.

[0239] Wong SK, Li WH, Moore MJ, Choe H, Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 2004;279(5):3197-201.

[0240] Du L, Zhao G, Chan CC, et al. Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity. *Virology* 2009;393(1):144-50.

[0241] Du L, Zhao G, Chan CC, et al. A 219-mer CHO-expressing receptor-binding domain of SARS-CoV S protein induces potent immune responses and protective immunity. *Viral Immunol* 2010;23(2):211-9.

[0242] Chen Z, Zhang L, Qin C, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *J. Virol.* 2005;79(5):2678-88.

[0243] Goud GN, Zhan B, Ghosh K, et al. Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant Ancylostoma-secreted protein(ASP)-1 and ASP-2 from Ancylostoma ceylanicum. *J. Infect. Dis.* 2004;189(5):919-29.

[0244] Du L, Zhao G, Li L, et al. Antigenicity and immunogenicity of SARS-CoV S protein receptor-binding domain stably expressed in CHO cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;384(4):486-90.

[0245] He Y, Lu H, Siddiqui P, Zhou Y, Jiang S. Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J Immunol.* 2005;174(8):4908-15.

[0246] Du L, Zhao G, Kou Z, et al. Identification of a receptor-binding domain in the s protein of the novel human coronavirus middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development. *J. Virol.* 2013;87(17):9939-42.

[0247] Du L, Zhao G, Kou Z, et al. Identification of a receptor-binding domain in the S protein of the novel human coronavirus Middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development. *J. Virol.* 2013;87(17):9939-42.

[0248] Du L, Zhao G, Kou Z, et al. Identification of a receptor-binding domain in the s protein of the novel human coronavirus middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine

development. *J. Virol.* 2013;87(17):9939-42.

[0249] Du L, Zhao G, Sun S, et al. A critical HA1 neutralizing domain of H5N1 influenza in an optimal conformation induces strong cross-protection. *PLoS ONE* 2013;8(1):e53568

[0250] Du L, Leung VH, Zhang X, et al. A recombinant vaccine of H5N1 HA1 fused with foldon and human IgG Fc induced complete cross-clade protection against divergent H5N1 viruses. *PLoS ONE.* 2011;6(1):e16555

[0251] Du L, Zhao G, Lin Y, et al. Intranasal vaccination of recombinant adeno-associated virus encoding receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) spike protein induces strong mucosal immune responses and provides long-term protection against SARS-CoV infection. *J. Immunol.* 2008;180(2):948-56.

[0252] Du L, Zhao G, Lin Y, et al. Priming with rAAV encoding RBD of SARS-CoV S protein and boosting with RBD-specific peptides for T cell epitopes elevated humoral and cellular immune responses against SARS-CoV infection. *Vaccine* 2008;26(13):1644-51.

[0253] He Y, Zhou Y, Liu S, et al. Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;324(2):773-81.

[0254] He Y, Zhu Q, Liu S, et al. Identification of a critical neutralization determinant of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus: Importance for designing SARS vaccines. *Virology* 2005;334(1):74-82.

[0255] He Y, Li J, Li W, Lustigman S, Farzan M, Jiang S. Cross-neutralization of human and palm civet severe acute respiratory syndrome coronaviruses by antibodies targeting the receptor-binding domain of spike protein. *J. Immunol.* 2006;176(10):6085-92.

[0256] Punt PJ, van BN, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den HC. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 2002;20(5):200-6.

[0257] Dean N. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim. Biophys. Acta* 1999;1426(2):309-22.

[0258] Shibata N, Ichikawa T, Tojo M, et al. Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;243(2):338-48.

[0259] Hopkins D, Gomathinayagam S, Rittenhour AM, et al. Elimination of beta-mannose glycan structures in *Pichia pastoris*. *Glycobiology* 2011;21(12):1616-26.

[0260] Dowling W,Thompson E,Badger C,et al.Influences of glycosylation on antigenicity,immunogenicity,and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines.J.Virol.2007;81(4):1821-37.



序列表

<110> Hotez, Peter  
 Bottazzi, Maria E.  
 Zhan, Bin  
 Chen, Wen-Hsiang  
 Chag, Shivali

<120> 新型SARS免疫原性组合物  
 <130> BAYM.P0122  
 <140> 未知  
 <141> 2014-11-21  
 <150> PCT/US2014/066843  
 <151> 2014-11-21  
 <150> US 61/909,145  
 <151> 2013-11-26  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 582  
 <212> DNA  
 <213> 未知  
 <220>  
 <223> SARS冠状病毒  
 <400> 1  
 aaacatcacca aceitgtgcc cttcggcgag gtgttcaacg ccaccaagtt ccccagcgt 60  
 tacgctggg agaggaagaa gatcagcaac tgcgtggccg actacagcgt gctgtacaac 120  
 agcaccttct tcagcacctt caagtgttac gccgtgagcg ccaaccaagct gaacgacctg 180  
 tgettcaaca acgtgtacgc cgacagcttc gtggtgaagg gcgacgacgt gaggcagatc 240  
 gctcctggac agaccggcgt gatcggcgac tacaactaca agctgcccga cgacttcatg 300  
 ggctgcgtgc tggcctggaa caccaggaac atcgacgccca ccagcaccgg caactacaac 360  
 tacaagtaca ggtacctgag gcacggcaag ctgaggccct tcgagaggga catcagcaac 420  
 gtgccattca gccctgacgg caagccctgc acaccacctg cctggaactg ctactggcca 480  
 ctgaacgact acggttcta caccaccacc gccatcggtt accagcccta caggggtggtg 540  
 gtgctgagct tcgagetgct gaacgctcct gccaccgtgt ga 582

<210> 2  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> 未知  
 <220>  
 <223> SARS冠状病毒  
 <400> 2  
 Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys  
 1 5 10 15  
 Phe Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val  
 20 25 30  
 Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys  
 35 40 45  
 Cys Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn  
 50 55 60  
 Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile  
 65 70 75 80  
 Ala Pro Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro  
 85 90 95  
 Asp Asp Phe Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp  
 100 105 110  
 Ala Thr Ser Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His  
 115 120 125  
 Gly Lys Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser  
 130 135 140  
 Pro Asp Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asp Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro  
 165 170 175  
 Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr  
 180 185 190  
 Val

<210> 3  
 <211> 657  
 <212> DNA  
 <213> 未知  
 <220>  
 <223> SARS冠状病毒

[0001]

```

<400> 3
aacatcacca acctgtgecc cttcggegag gtgitcaacg ccaccaagtt ccccagcgta      60
tacgcctggg agaggaagaa gatcagcaac tgcgtggcgg actacagcgt gctgtacaac      120
agcaccctct tcageacctt caagtgetac ggcgtgagcg ccaccaagct gaacgacctg      180
tgcttcagca acgtgtacgc cgacagcttc gtggtgaagg gcgacgacgt gaggcagatc      240
gctcctggac agaccggcgt gatcgccgac tacaactaca agctgcccga cgacttcatg      300
ggctgcgtgc tggcctggaa caccaggaac atcgacgcc aacgaccgg caactacaac      360
tacaagtaca ggtactctgag geacggcaag ctgaggecct tcgagaggga catcagcaac      420
gtgccattca gccctgacgg caagccctgc acaccacctg cctgaactg ctactggcca      480
ctgaacgact acggettcta caccaccacc ggcacggcct accagcccta cagggtggtg      540
gtctgagctc tcgactgctc gaacgctcct gccaccgtgt gcggccctaa gctgagcaac      600
gacctgatca agaaccagtg cgtgaacttc aactcaacg gcctgaccgg caccggc      657
    
```

```

<210> 4
<211> 219
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> SARS冠状病毒
<400> 4
    
```

[0002]

```

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

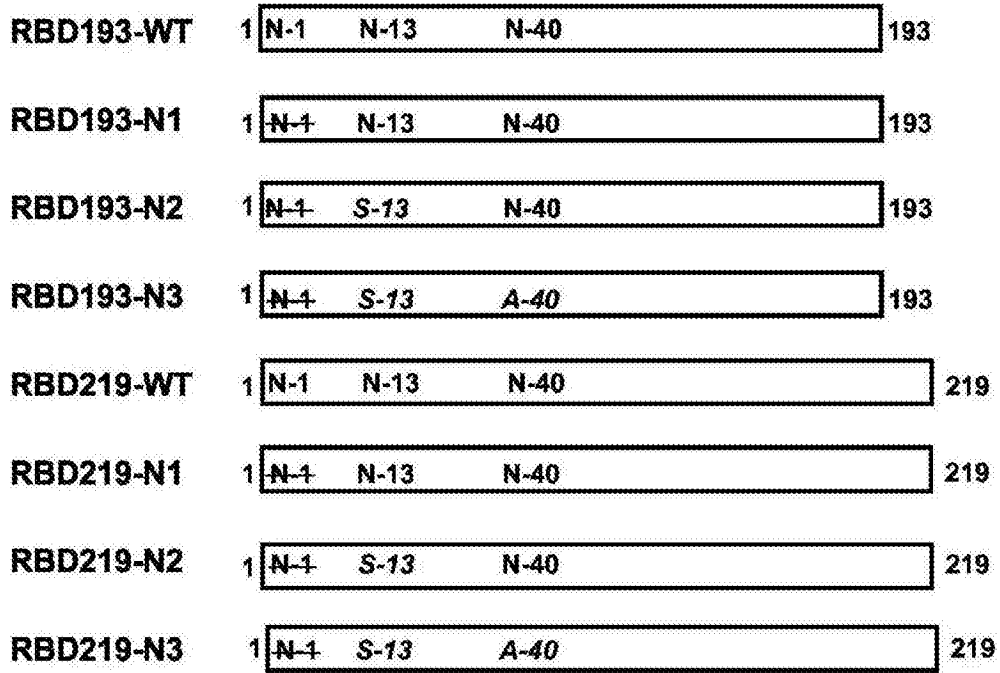


图1

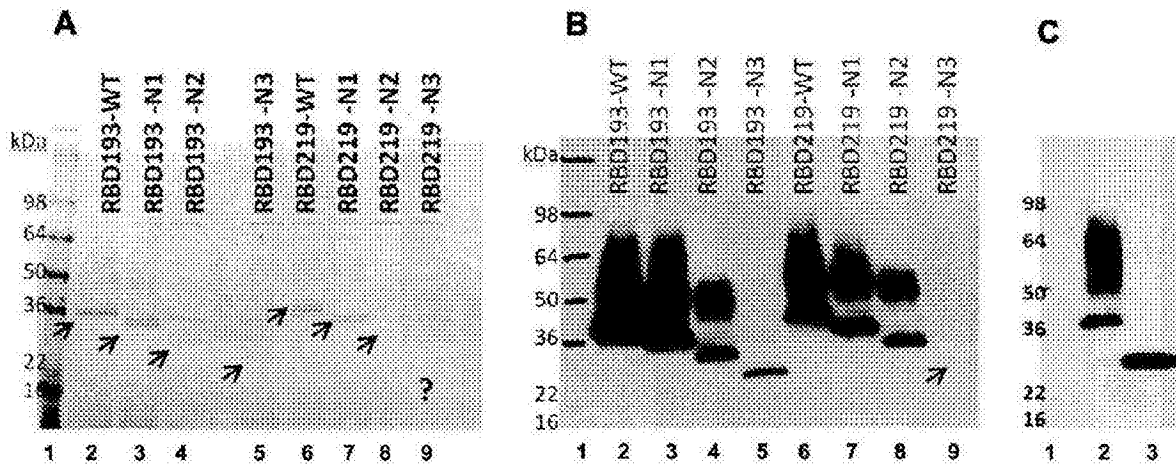


图2

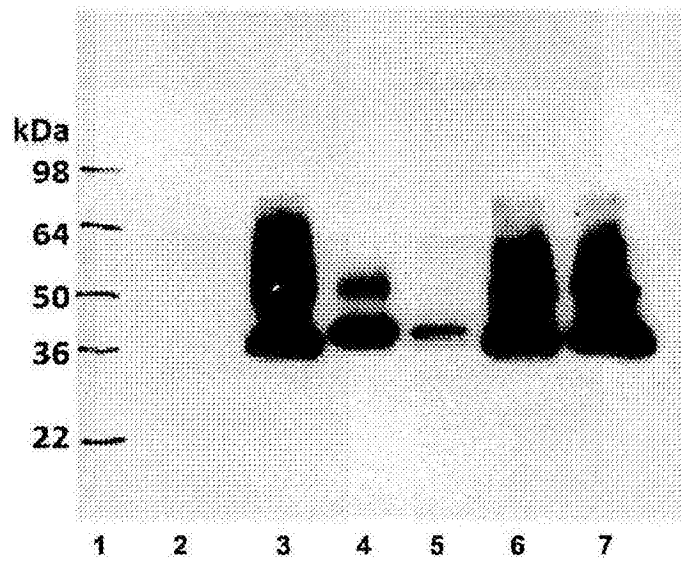


图3

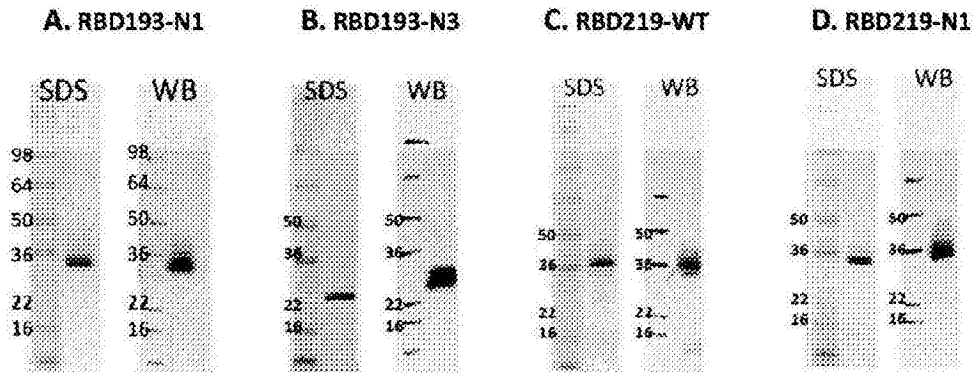


图4

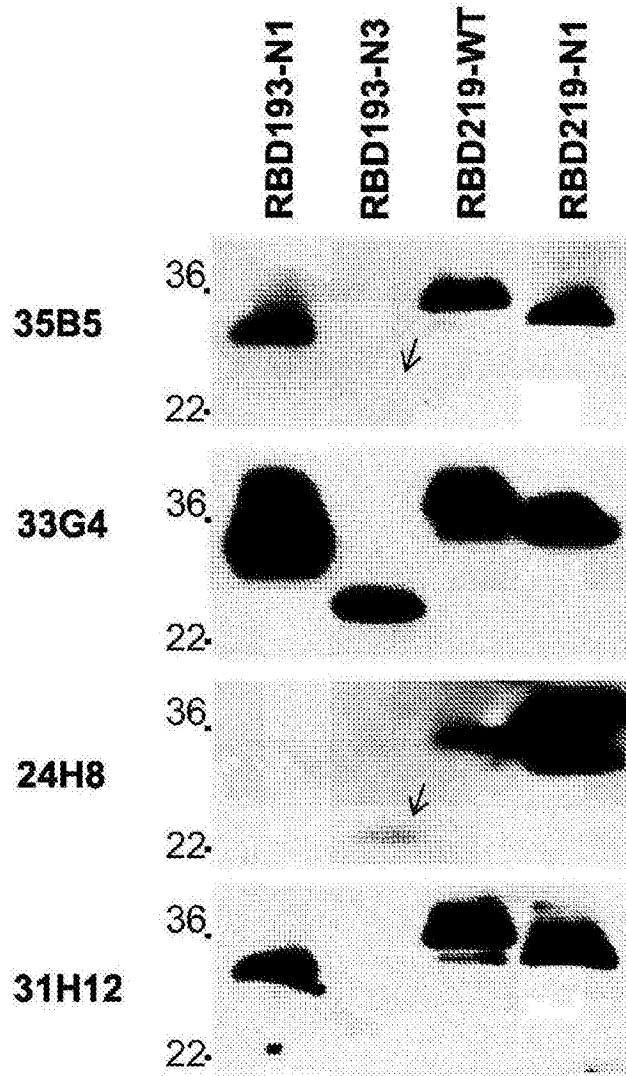


图5

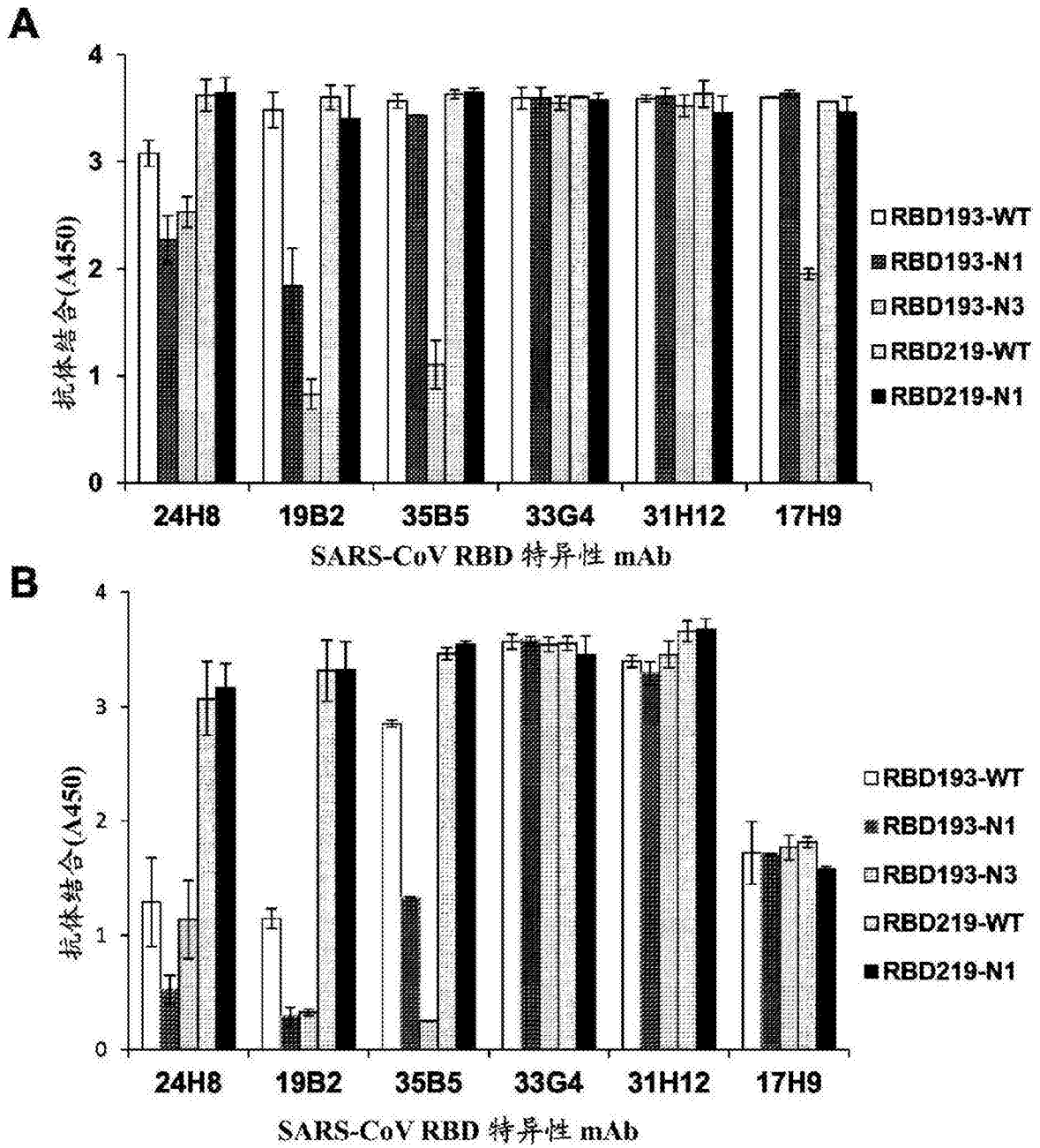


图6

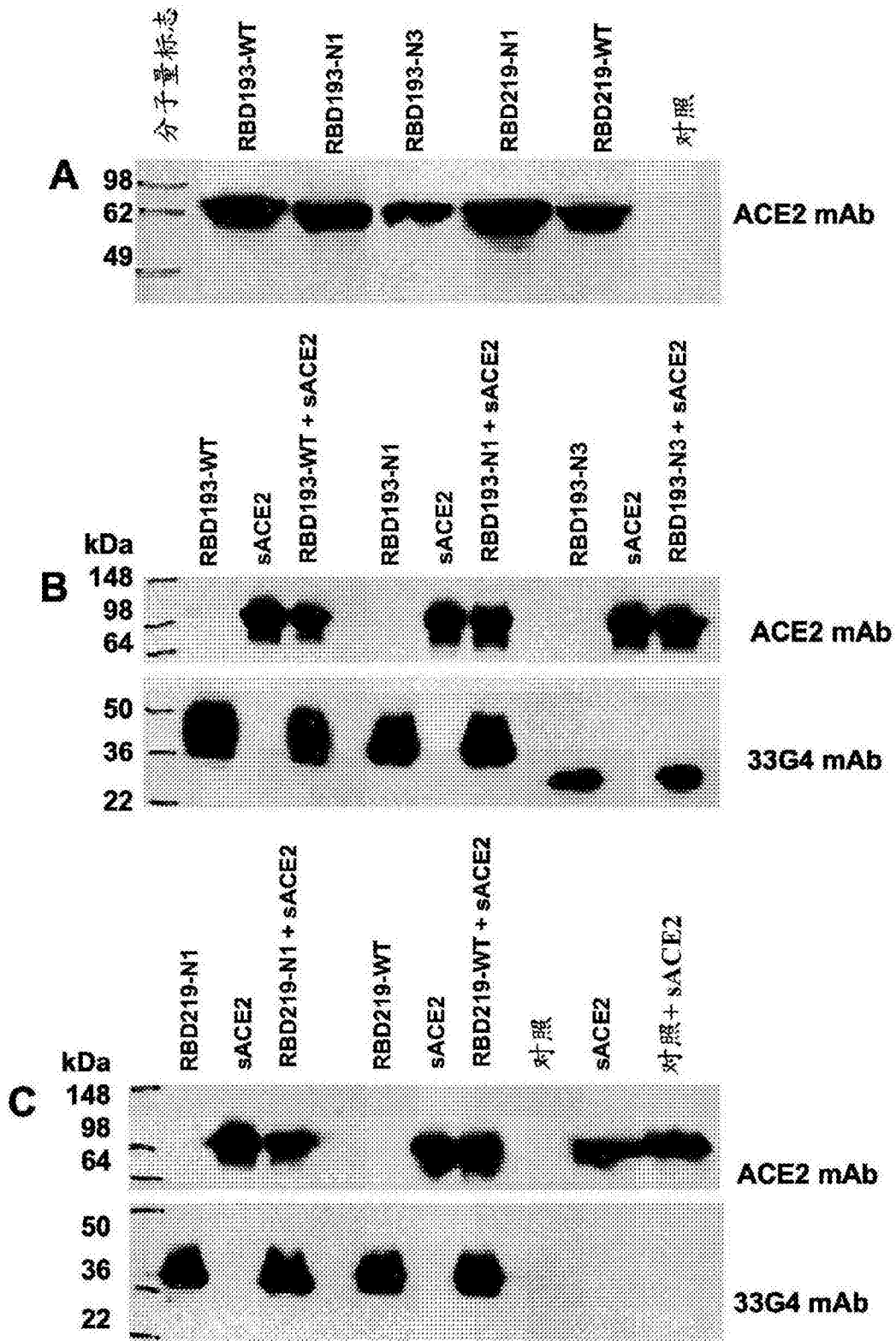


图7

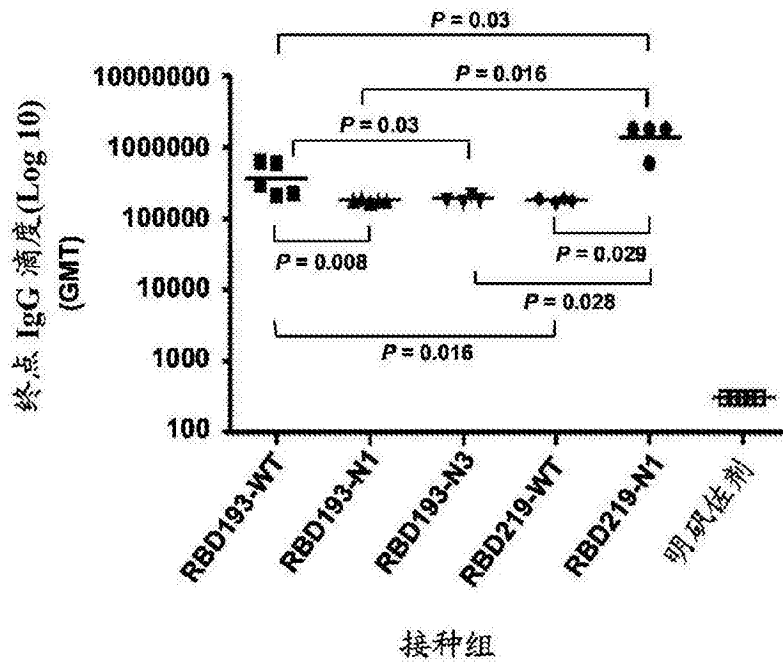


图8



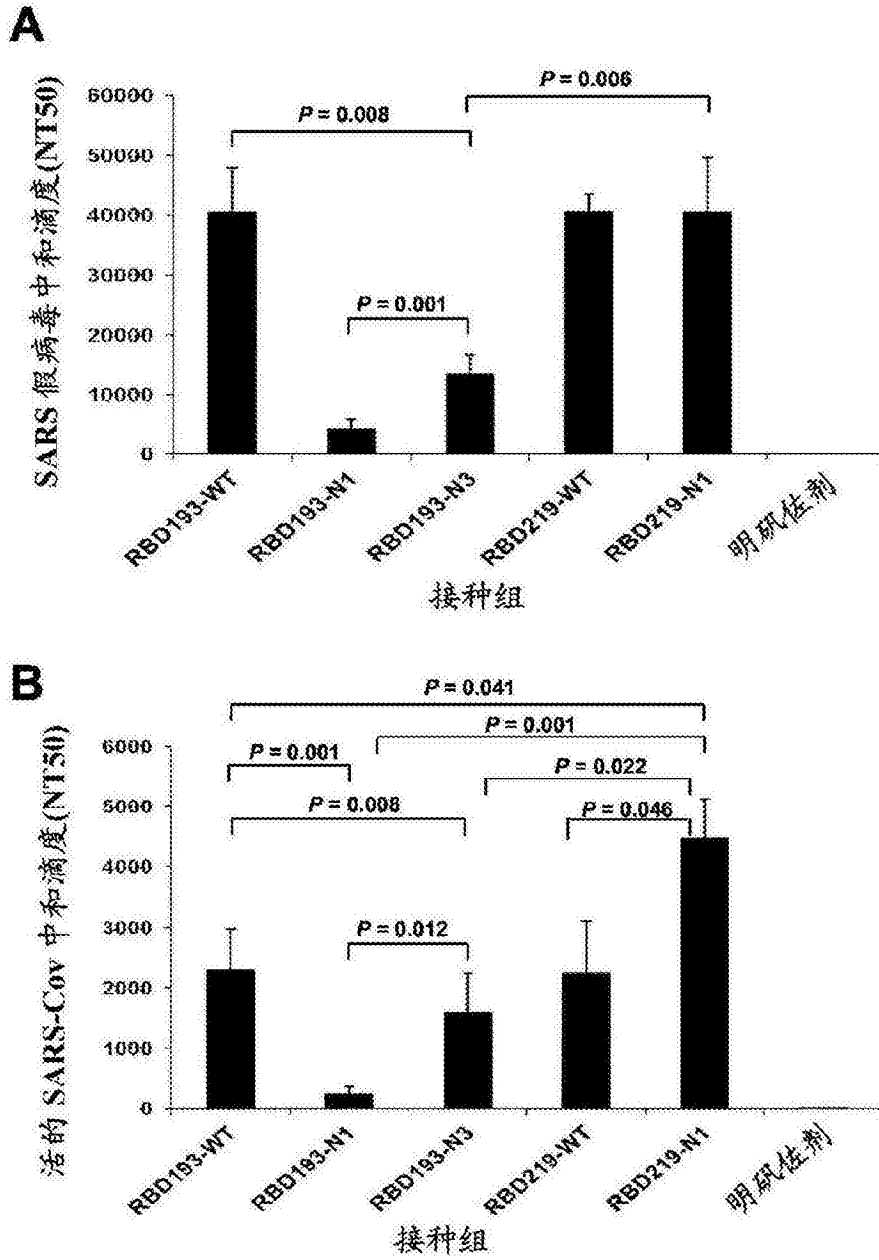


图9