

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480027159.7

[51] Int. Cl.

*C07K 14/165 (2006.01)*  
*A61K 39/215 (2006.01)*  
*A61K 39/42 (2006.01)*  
*A61K 38/16 (2006.01)*

[43] 公开日 2006年10月25日

[11] 公开号 CN 1852921A

[22] 申请日 2004.7.20

[21] 申请号 200480027159.7

[30] 优先权

[32] 2003.7.21 [33] US [31] 60/489,166

[32] 2003.11.25 [33] US [31] 60/524,642

[86] 国际申请 PCT/US2004/023345 2004.7.20

[87] 国际公布 WO2005/010034 英 2005.2.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.20

[71] 申请人 美国政府卫生及公众服务部国家卫生协会

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 D·S·迪米特罗夫 X·肖

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 王景朝

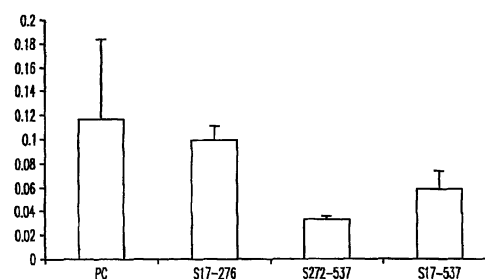
权利要求书 8 页 说明书 88 页 序列表 75 页  
附图 16 页

[54] 发明名称

SARS 冠状病毒刺突糖蛋白的可溶性片段

[57] 摘要

本发明总体涉及到与严重急性呼吸系统综合征 (SARS) 病原学上相关的病毒的刺突蛋白; 刺突蛋白的多肽和肽片段以及它们的保守性变异体; 编码刺突蛋白、刺突蛋白的多肽和肽片段、它们的保守性变异体和含有刺突蛋白或其部分的偶联蛋白的核酸片段和构建体; 肽模拟物; 疫苗; 预防和治疗严重急性呼吸系统综合征的方法; 抗体; 适体; 和含有与刺突蛋白结合的抗体和适体的试剂盒。



1. 一种 SEQ ID NO: 1 的多肽片段或其保守性变异性, 其中所述多肽当用于接种动物时可产生体液或细胞免疫反应。
2. 一种具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的多肽, 其中所述多肽当用于接种动物时可产生体液或细胞免疫反应。
3. 一种具有 SEQ ID NO: 13、14、15、25、34、46、51、52、56、57、58、59、61、62 或 63 中任何一个的多肽, 其中所述多肽当用于接种动物时可产生体液或细胞免疫反应。
4. 权利要求 1、2 或 3 的多肽, 其中所述多肽在水溶液中可溶。
5. 权利要求 1、2 或 3 的多肽, 其中所述动物为哺乳动物。
6. 权利要求 5 的多肽, 其中所述哺乳动物为人。
7. 权利要求 1、2 或 3 的多肽, 其中所述多肽是氨基端或羧基端封闭的。
8. 一种偶联蛋白, 所述偶联蛋白含有载体蛋白以及与之偶联的具有(a) SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63; (b) SEQ ID NO: 1 的肽片段; 或(a)或(b)的保守性变异性中任何一个的第二多肽。
9. 权利要求 8 的偶联蛋白, 其中所述载体蛋白在水溶液中可溶。
10. 权利要求 9 的偶联蛋白, 其中所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、匙孔蛾血蓝蛋白、卵白蛋白、小鼠血清白蛋白、兔血清白蛋白。
11. 权利要求 8 的偶联蛋白, 其中所述偶联蛋白当用于接种动物时能产生体液或细胞免疫反应。
12. 权利要求 11 的偶联蛋白, 其中所述动物为哺乳动物。
13. 权利要求 12 的偶联蛋白, 其中所述哺乳动物为人。

14. 一种免疫肽，所述免疫肽含有具有(a) SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63；或(b)SEQ ID NO: 1 的片段中任何一个的多肽以及与之偶联的对氨基苯砷酸、对氨基苯磺酸、乙酰基或间三硝苯基。

15. 权利要求 14 的免疫肽，其中所述免疫肽当用于接种动物时能产生体液或细胞免疫反应。

16. 权利要求 15 的免疫肽，其中所述动物为哺乳动物。

17. 权利要求 16 的免疫肽，其中所述哺乳动物为人。

18. 一种免疫组合物，所述免疫组合物包含佐剂和具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63；或 SEQ ID NO : 1 的片段中任何一个的多肽。

19. 权利要求 18 的免疫组合物，其中所述佐剂选自氢氧化铝、脂质 A、灭活的细菌、多糖、矿物油、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、磷酸铝、铁盐、锌盐、钙盐、乙酰化酪氨酸、乙酰化糖、阳离子衍生化的多糖、阴离子衍生化的多糖、聚磷腈、生物降解微球、单磷酸脂 A 和 quil A。

20. 权利要求 18 的免疫组合物，其中所述多肽是氨基端或羧基端封闭的。

21. 一种氨基酸序列的肽模拟物，所述氨基酸序列具有(a) SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63；(b) SEQ ID NO: 1 的片段，或(a)或(b)的保守性变异体中任何一个。

22. 一种免疫组合物，所述免疫组合物包含佐剂和具有(a) SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63；(b) SEQ ID NO: 1 的片段，或(a)或(b)的保守性变异体中任何一个的氨基酸序列的肽模拟物。

23. 权利要求 22 的免疫组合物，其中所述佐剂选自氢氧化铝、脂质 A、灭活的细菌、多糖、矿物油、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、磷酸铝、铁盐、锌盐、钙盐、乙酰化酪氨酸、乙酰化糖、阳离子衍生化的多糖、阴离子衍生化的多糖、聚磷腈、生物降解微球、单磷酸脂 A 和 quil A。

24. 一种核酸片段, 所述核酸片段编码具有(a) SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63; (b) SEQ ID NO: 1 的片段的肽, 或(a)或(b)的保守性变异体中任何一个的多肽。

25. 一种表达盒, 所述表达盒包含被操作性地连接到编码具有(a) SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63; (b) SEQ ID NO: 1 的片段的肽, 或(a)或(b)的保守性变异体中任何一个的多肽的核酸片段的启动子。

26. 权利要求 25 的表达盒, 其中所述启动子为组成型启动子或调节型启动子。

27. 一种核酸构建体, 所述核酸构建体含有载体和编码(a)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的多肽; (b) SEQ ID NO: 1 的片段的肽; (c) (a)或(b)的保守性变异体的核酸片段; 或权利要求 25 的表达盒。

28. 权利要求 27 的核酸构建体, 其中所述载体选自质粒、黏粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体、F 因子、病毒、表达载体和噬粒。

29. 一种重组病毒, 所述重组病毒含有病毒载体和编码(a)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的多肽; (b) SEQ ID NO: 1 的片段的肽; (c) (a)或(b)的保守性变异体的核酸片段; 或权利要求 25 的表达盒。

30. 权利要求 29 的重组病毒, 其中所述病毒载体选自牛痘病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒和疱疹病毒。

31. 一种组合物, 所述组合物包含药用载体和(a)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的多肽; (b) SEQ ID NO: 1 的片段的肽; 或(c) (a)或(b)的保守性变异体。

32. 权利要求 31 的组合物, 其中所述组合物被制成治疗 SARS-CoV 的制剂。

33. 权利要求 31 的组合物, 其中所述组合物被制成抑制

SARS-CoV 与哺乳动物细胞融合或进入哺乳动物细胞的制剂。

34. 一种组合物，所述组合物包含药用载体和编码(a)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的多肽；(b) SEQ ID NO: 1 的片段的肽；(c) (a)或(b)的保守性变异体的核酸片段；或权利要求 30 的表达盒。

35. 权利要求 34 的组合物，其中所述组合物被制成治疗 SARS-CoV 的制剂。

36. 权利要求 34 的组合物，其中所述组合物被制成预防 SARS-CoV 与哺乳动物细胞融合或进入哺乳动物细胞的制剂。

37. 一种病毒性疫苗，所述病毒性疫苗包含药用载体、病毒载体和编码(a)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的多肽；(b) SEQ ID NO: 1 的片段的肽；(c) (a)或(b)的保守性变异体的核酸片段；或权利要求 30 的表达盒。

38. 权利要求 34 的病毒性疫苗，其中所述病毒性疫苗被制成单位剂量形式。

39. 一种肽疫苗，所述肽疫苗包含药用载体和(a)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的肽；(b) SEQ ID NO: 1 的片段；(c) (a)或(b)的肽模拟物；或(d) (a)或(b)的保守性变异体。

40. 权利要求 39 的肽疫苗，其中所述肽疫苗被制成单位剂量形式。

41. 一种微生物疫苗，所述微生物疫苗包含药用载体和表达(a)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个的肽；(b) SEQ ID NO: 1 的片段；或(c) (a)或(b)的保守性变异体的微生物。

42. 权利要求 41 的微生物疫苗，其中所述微生物选自沙门氏菌属和单核细胞增生李斯特氏菌。

43. 权利要求 42 的微生物疫苗，其中所述微生物疫苗被制成单位剂量形式。

44. 一种 DNA 疫苗，所述 DNA 疫苗包含药用载体和插入了编

码(a)SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列; (b) SEQ ID NO: 1 的片段; 或(c) (a)或(b)的保守性变异体的核酸片段的载体。

45. 权利要求 44 的 DNA 疫苗, 其中所述载体选自质粒、黏粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体、F 因子、病毒和噬粒。

46. 权利要求 44 的 DNA 疫苗, 其中所述 DNA 疫苗被制成单位剂量的形式。

47. 权利要求 46 的 DNA 疫苗, 其中所述 DNA 疫苗进一步含有肌肉坏死剂。

48. 权利要求 47 的 DNA 疫苗, 其中所述肌肉坏死剂为布比卡因或心脏毒素。

49. 一种抗体, 所述抗体与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO: 1 的片段结合。

50. 权利要求 49 的抗体, 其中所述抗体特异性地与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO: 1 的片段结合。

51. 权利要求 49 的抗体, 其中所述抗体特异性地与 S 蛋白受体结合区结合。

52. 权利要求 49 的抗体, 其中所述抗体为单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体、抗原结合性的抗体片段或人源化抗体。

53. 权利要求 52 的抗体, 其中所述抗原结合性抗体片段是 scFv、Fv、Fab'、Fab、双链抗体、线性抗体或 F(ab')<sub>2</sub>。

54. 权利要求 49 的抗体, 其中所述抗体与检测标记物偶联。

55. 权利要求 54 的抗体, 其中所述检测标记物是荧光蛋白、荧光标记物、放射性标记物、酶或亲和标记物。

56. 权利要求 49 的抗体, 其中所述抗体与毒素偶联。

57. 权利要求 56 的抗体, 其中所述毒素是 A 链毒素、核糖体失活蛋白、 $\alpha$ -帚曲霉素、白树毒蛋白、曲霉菌素、局限毒素、核糖

核酸酶、表鬼白毒素、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素、蓖麻毒素、多柔比星、柔红霉素、紫杉醇、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、表鬼白噻吩糖苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、二羟碳疽菌素二酮、放线菌素 D、PE40、相思豆毒蛋白或糖皮质激素。

58. 一种药用组合物，所述药用组合物包含药用载体和与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合的抗体。

59. 一种免疫哺乳动物以抗严重急性呼吸系统综合征的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合的抗体。

60. 权利要求 59 的方法，其中所述抗体特异性地与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合。

61. 权利要求 59 的方法，其中所述哺乳动物为人。

62. 一种治疗哺乳动物的严重急性呼吸系统综合征的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合的抗体。

63. 权利要求 62 的方法，其中所述抗体特异性地与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合。

64. 权利要求 62 的方法，其中所述哺乳动物为人。

65. 权利要求 59 或 62 的方法，其中所述抗体与药用载体或稀释剂制成制剂。

66. 一种治疗或抑制哺乳动物严重急性呼吸系统综合征的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的含有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID

NO: 1 的片段的 S 多肽。

67. 一种在哺乳动物体内诱导抗 SARS 冠状病毒刺突蛋白的免疫反应的方法，所述方法包括给予治疗有效量的含有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段的多肽。

68. 权利要求 67 的方法，其中所述多肽含有 SEQ ID NO: 13、14、15、25、34、51、52、56、57、58、59、61、62、63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段。

69. 权利要求 67 的方法，其中所述哺乳动物为人。

70. 一种诊断动物严重急性呼吸系统综合征的方法，所述方法包括：

(a) 使获取自动物的生物样品与 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合的抗体接触；

(b) 确定所述抗体是否与所述生物样品结合。

71. 权利要求 70 的方法，其中所述动物为哺乳动物。

72. 权利要求 70 的方法，其中所述哺乳动物为人。

73. 一种制备抗体的方法，所述方法包括：获得被(a)具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的多肽的肽片段；(b)具有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列的多肽；(c) (a)或(b)的肽模拟物，或(d) (a)或(b)的保守性变异体免疫的动物；并分离与(a)结合的抗体。

74. 一种制备抗体的方法，所述方法包括获得被偶联蛋白免疫的动物，所述偶联蛋白具有载体蛋白以及与之偶联的(a) 具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的多肽的肽片段；(b)具有 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-55 中任何一个所示的氨基酸序列的多肽；(c) (a)或(b)的肽模拟物，或(d) (a)或(b)的保守性变异体；并分离与具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的多肽结合的抗体。



75. 一种试剂盒，所述试剂盒含有包装材料和与 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 片段结合的抗体或适体。

76. 权利要求 75 的试剂盒，其中所述抗体与药用载体或稀释剂制成制剂。

77. 权利要求 75 的试剂盒，进一步包含注射器。

78. 一种试剂盒，所述试剂盒含有包装材料和治疗有效量的含有 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段的 S 多肽。

79. 权利要求 78 的试剂盒，其中所述 S 多肽与药用载体或稀释剂制成制剂。

80. 权利要求 78 的试剂盒，所述试剂盒进一步包含注射器。

81. 一种单克隆抗体，所述单克隆抗体特异性地与 SEQ ID NO:1、13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列结合。

82. 一种分离的多克隆抗体，所述多克隆抗体特异性地与 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列结合。

83. 一种适体，所述适体与 SEQ ID NO:1、13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所述的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合。

84. 一种药用组合物，所述药用组合物包含药用载体和与 SEQ ID NO:1、13、14、15、20-59、61-63 中任何一个所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO: 1 的片段结合的适体。

## SARS 冠状病毒刺突糖蛋白的可溶性片段

本申请要求保护对 2003 年 7 月 21 日递交的美国申请第 60/489,166 号和 2003 年 11 月 25 日递交的美国申请第 60/524,642 号的优先权，它们通过引用被全文结合到本文中。

### 政府基金

这里所描述的发明的研发受到健康与人类服务部的资助。美国政府对本发明拥有一定权利。

### 发明领域

本发明总的来说涉及到与严重急性呼吸道综合征 (SARS) 病原学相关联的冠状病毒 (这里为 SARS-CoV) 所编码的刺突糖蛋白。本发明进一步涉及到具有与 SARS-CoV 的刺突糖蛋白片段一致的氨基酸序列的多肽、核酸和它们的保守性变体。本发明也涉及到用这些核酸、多肽、变体和片段产生识别 SARS-CoV 刺突糖蛋白的抗体，并用其生产抗 SARS-CoV 的疫苗。发明的另一个方面涉及到抑制 SARS-CoV 与动物细胞融合的刺突蛋白片段。

### 发明背景

严重急性呼吸道综合征 (SARS) 是一种最近在 32 个国家和地区的病人中确认的感染性非典型性肺炎。病原不明的非典型性肺炎最早在中国的广东省发现。随后，香港、越南、新家坡、加拿大和北京相继报告了这种在家庭成员和医务工作者中传播的严重的发热性呼吸道疾病。该疾病后来被世界卫生组织 (WHO) 命名为“严重急性呼吸道综合征(SARS)”。到 2003 年 5 月 19 日，29 个国家共向 WHO 报告了 7864 例 SARS 病例。总死亡报告为 643 例(病死率为: 8.2%)。

世界各地的研究者们对来自全球不同地区的 SARS 病原病毒的

基因组进行了序列测定，该病毒被归类到冠状病毒。冠状病毒根据其抗体的交叉反应和基因数据被分为 3 类。两种先前已知的人类病毒与 SARS-CoV 在不同的组中。引起 SARS 的冠状病毒不同于已知的任何族群。而是自身形成一个新族群。对预测的病毒蛋白的系统发生学分析提示，该病毒与任何已知的三类冠状病毒都不密切相似。大多数冠状病毒或引起呼吸道疾病或引起粪-口途径传播的肠道疾病。

SARS 的潜伏期为 2 到 7 天。感染特征为发热、干咳、气短和轻微的听诊异常和胸片实化。淋巴细胞减少、白细胞减少、血小板减少、肝酶增高和肌酐激酶增高在大多数病例中也存在。与胃肠道相关的症状在 SARS 病人中也可看到。

对广东、香港、北京、新加坡的死于 SARS 病人的病理学研究显示，肺部的浸润性肺泡损坏是最明显特征。在那些因病情严重而死亡的个体中，散在的 II 型肺泡细胞显示出明显的细胞学变化，包括多核化、巨细胞化、巨核化、核染色质澄清(clearing)和突出的核仁。虽然这些变化很严重，但仍在其他浸润性肺泡损坏的上皮细胞变化的范围内。鉴别的形态学变化包括：支气管上皮细胞剥蚀、纤毛丧失和鳞状上皮化生。其他发现包括病灶肺泡内出血、吞噬血细胞作用、小气道坏死性炎性碎片、机化性肺炎或继发性细菌性肺炎。

该病的病理机制还有待确定，然而，急性肺损伤的机理可能涉及到病毒攻击内皮或上皮细胞而对肺泡壁产生的直接损害。选择性地，病毒可感染炎性细胞通过细胞因子、白介素或肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导引起损伤。也有可能 SARS 造成的组织损伤与病毒对组织的感染无直接关系，而是病毒在肺组织以外的邻近组织诱导的细胞因子和其他因子的继发效应。

对死亡病例的病理学评价显示肝细胞脂肪变性、肝浊肿、凋亡和点状坏死，伴有 Kupffer 增生和门脉淋巴细胞浸润。在病人的胃肠道壁有局部出血、血管充血和淋巴细胞浸润。

由于 SARS-CoV 能够经空气途径传播，所以它对整个世界的广大人群造成了特殊威胁，因此，迫切需要有感染前免疫、诊断感染、感染过程中免疫和治疗 SARS-CoV 感染者的方法问世。

### 发明概述

这些需要及其他需要在这里描述的发明中得到了解决。本发明提供多肽、肽片段、病毒融合抑制剂、偶联蛋白、免疫肽、免疫组合物、仿多肽类药物、核酸片段、表达盒、核酸构建体、重组病毒、病毒性疫苗、肽疫苗、微生物疫苗、DNA 疫苗、抗体、适体、药用组合物、免疫动物的方法、治疗严重急性呼吸道综合征 (SARS) 的方法、诊断 SARS 的方法和试剂盒。

本发明提供具有的氨基酸序列与 SARS 病原学相关的多肽一致的多肽。优选多肽来自 SARS-CoV 的刺突蛋白，能够抑制 SARS 与动物细胞的融合和/或在动物体内引发免疫反应。在一些实施方案中，多肽是来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的可溶性多肽。在另一些实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 17-757 位氨基酸。在一些实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 762-1189 位氨基酸。在其他实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 17-757 位氨基酸。在一些实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 17-276 位氨基酸。在其他实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 303-537 位氨基酸。在一些实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 317-517 位氨基酸。在其他实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 272-537 位氨基酸。在一些实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 17-537 位氨基酸。在其他实施方案中，多肽包括来自 SARS-CoV 的刺突蛋白的 17-1189 位氨基酸 (与 SEQ ID NO: 1 有关)。本发明的多肽能抑制 SARS-CoV 与动物细胞的融合。本发明的核酸和多肽接种动物能引发免疫反应。在一些实施方案中，本发明的核酸和多肽接种动物后引发细胞免疫反应。在其他实施方案中，本发明的核酸和

多肽接种动物后引发体液免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽类。在某些实施方案中，动物是哺乳动物，有时是人。

本发明提供来自 SARS-CoV 刺突蛋白的肽片段，优选肽片段在水溶液中可溶。本发明的肽片段可以是 SARS-CoV 完整刺突蛋白的氨基酸序列但有一个氨基酸残基缺失。在一些实施方案中，肽片段长度至少为 3 个氨基酸。在其他实施方案中，肽片段长度至少为 10 个氨基酸。在一些实施方案中，肽片段长度至少为 20 个氨基酸。在其他实施方案中，肽片段长度至少为 30 个氨基酸。在一些实施方案中，肽片段长度至少为 40 个氨基酸。在其他实施方案中，肽片段长度至少为 50 个氨基酸。在一些实施方案中，肽片段长度至少为 60 个氨基酸。肽片段也可以是单个氨基酸单位添加到一个一定长度的片段中，例如，肽片段长度可以是 3、4、10、11、21、22、31 或 32 个氨基酸。本发明的肽片段能够抑制 SARS CoV 与动物细胞的融合或用于接种动物体后可引发免疫反应。接种动物后能够引发免疫反应的例子包括，例如序列为 DVQAPNYTQHTSSMRGC (SEQ ID NO : 58) 的 D24 肽和序列为 PSSKRFQPQQFGRDC (SEQ ID NO : 59) 的 D540 肽。在某些实施方案中，本发明的肽片段用于接种动物后引发细胞免疫反应，在其他实施方案中，本发明的肽片段用于接种动物后引发体液免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供偶联蛋白，该偶联蛋白包括一个连接到第二多肽上的载体蛋白。优选地，该载体蛋白是可溶性的。在一些实施方案中，当用于接种动物后，该载体蛋白增强对偶联蛋白的第二多肽的免疫反应。在其他实施方案中，当用于接种动物后，该载体蛋白诱导对偶联蛋白的第二多肽的细胞免疫反应。在一些实施方案中，当用于接种动物后，该载体蛋白诱导对偶联蛋白的第二多肽的体液免疫反

应。该第二多肽可以是本发明的多肽或肽片段，或其保守性变异体。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供包括本发明的多肽或肽片段或其保守性变异体并被连接到乙酰基、间三硝苯基、对氨基苯磺酸、对氨基苯磺酸上的免疫肽。在一些实施方案中，免疫肽被连接到乙酰基或间三硝苯基上。在其他实施方案中，免疫肽被连接到对氨基苯磺酸或对氨基苯磺酸上。优选地，免疫肽是可溶性的。优选地，免疫肽用于接种病人后引发免疫反应。在其他实施方案中，用于接种动物后，免疫肽能引发体液免疫反应。在一些实施方案中，用于接种动物后，免疫肽能引发细胞免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供本发明中多肽和肽片段和其保守变异体的肽模拟物，其肽键被非肽键取代。在一些实施方案中，肽模拟物能抑制 SARS Co-V 与动物细胞融合。在其他实施方案中，用于接种动物后，肽模拟物能引发免疫反应，例如，用于接种动物后，肽模拟物能引发细胞免疫反应。可选性地，用于接种动物后，肽模拟物能引发体液免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供含有佐剂和本发明的核酸、多肽、肽片段或肽模拟物的组合物，在一些实施方案中，组合物能抑制 SARS-CoV 与动物细胞的融合。在其他实施方案中，用于接种动物后，组合物引发免疫反应。在一些实施方案中，用于接种动物后，组合物引发细胞免疫反应。在其他实施方案中，用于接种动物后，组合物引发体液免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽

鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供编码本发明的多肽和肽片段和它们的保守变异体的核酸片段。

本发明提供启动子被操作性地连接到本发明的核酸片段的表达盒。在一些实施方案中，启动子是组成性的。在其他实施方案中，启动子是可诱导的。

本发明提供含有载体和本发明的核酸片段的核酸构建体，核酸构建体可包括本发明的表达盒。在一些实施方案中，载体可以是病毒。在其他实施方案中，载体可以是质粒。在进一步的实施方案中，载体可以是表达载体。

本发明提供含有病毒载体和本发明的核酸片段的重组病毒。在一些实施方案中，病毒载体是疱疹病毒。在其他实施方案中，病毒载体是金丝雀痘病毒(canary pox virus)。在其他实施方案中，病毒载体是腺病毒。在进一步的实施方案中，病毒载体是牛痘病毒。

本发明提供含有病毒载体、本发明的核酸片段和药用载体的病毒性抗 SARS 疫苗。在一些实施方案中，病毒载体是疱疹病毒。在其他实施方案中，病毒载体是金丝雀痘病毒。在一些实施方案中，病毒载体是腺病毒。在进一步的实施方案中，病毒载体是牛痘病毒。优选地，药用载体是用于注射剂的。优选地，用于接种动物后，该病毒性疫苗引发免疫反应。在一些实施方案中，用于接种动物后，该病毒疫苗引发细胞免疫反应。在其他实施方案中，用于接种动物后，该病毒疫苗引发体液免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供含有本发明的肽模拟物、多肽和肽片段或其保守性变异体和药用载体的抗 SARS 肽类疫苗。优选地，药用载体被配制成注射剂。优选地，肽类疫苗被制成单位剂量形式。优选地，用于

接种动物后，肽类疫苗引发免疫反应。在一些实施方案中，用于接种动物后，肽类疫苗引发细胞免疫反应。在其他实施方案中，用于接种动物后，肽类疫苗引发体液免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供含有表达本发明的多肽或肽片段、或它们的保守变异体的微生物及药用载体的抗 SARS 微生物疫苗。优选地，该微生物是减毒的。在一些实施方案中，微生物是沙门氏菌属(*Salmonella*)。在其他实施方案中，微生物是李斯特氏菌属(*Listeria*)。在一些实施方案中，微生物是单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)。在一些实施方案中，药用载体被配制成注射剂。在其它实施方案中，药用载体被配制成口服剂型。优选地，微生物疫苗被制成单位剂量形式。优选地，用于接种动物后，微生物疫苗引发免疫反应。在一些实施方案中，用于接种动物后，微生物疫苗引发细胞免疫反应。在其他实施方案中，用于接种动物后，微生物疫苗引发体液免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供含有插入有本发明的核酸片段的载体和药用载体的抗 SARS DNA 疫苗。该 DNA 疫苗可以含有佐剂。DNA 疫苗可以含有肌肉坏死剂。例如，肌肉坏死剂可以是布比卡因。在其他实施方案中，肌肉坏死剂可以是心脏毒素。载体可以是，例如病毒。在一些实施方案中，载体是细菌嗜菌体。在进一步的实施方案中，载体是质粒。含有插入片段的载体可以在真核细胞内制备。在一些实施方案中，含有插入片段的载体可以在原核细胞内制备。例如，含有插入片段的载体可以在细菌中制备。在一些实施方案中，药用载体被用于制备粘膜给药剂。在其他实施方案中，药用载体被用于制备注射剂。优选地，DNA 疫苗被制成单位剂量形式。优选地，用于接



种动物后，该 DNA 疫苗引发免疫反应。在一些实施方案中，用于接种动物后，该微生物疫苗引发体液免疫反应。在其他实施方案中，用于接种动物后，该微生物疫苗引发细胞免疫反应。动物可以是爬行动物。在某些实施方案中，动物可以是禽鸟类。在其他实施方案中，动物可以是哺乳动物。在进一步的实施方案中，动物可以是人。

本发明提供与本发明的多肽或肽片段，或它们的变体结合的抗体。在一些实施方案中，抗体是一种与抗原结合的抗体片段。在其他实施方案中，抗体为多克隆抗体。在进一步实施方案中，抗体是单链抗体。在其他实施方案中，抗体是单克隆抗体。在一些优选实施方案中，抗体为人源化抗体。抗体可以与一个用于检测的标记物结合，例如，检测标记物是同位素标记物。在一些实施方案中，检测标记物是亲和标记物。在其它实施方案中，检测标记物是酶。在另一些实施方案中，检测标记物是荧光标记物。抗体也可与毒素相连。

本发明提供与本发明的多肽或肽片段，或它们的保守性变体结合的适体。该适体可以与检测标记物结合。例如，检测标记物可以是同位素标记物。在一些实施方案中，检测标记物是亲和标记物。在其他实施方案中，检测标记物是酶。在进一步的实施方案中，检测标记物为荧光蛋白。在一些优选实施方案中，检测标记物是荧光标记物。适体也可与毒素结合。

本发明提供含有本发明的抗体、S 多肽或适体和药用载体的药用组合物或试剂盒。优选地，该药用组合物被配制成为注射剂。

#### 附图简述

本专利或申请文本含有至少一幅彩图。本办公室将根据要求并在收取必要费用的情况下提供带有彩图的本专利或专利申请文本。

图 1A 是含有编码本发明的刺突蛋白的插入片段的 DNA 构建体的琼脂糖电泳图。从左到右的泳道：道 1 为 1kb 的 DNA 分子量标记

(从下到上为 0.5、1.0、1.6、2.0、3.0、4.0)；道 2 显示被 BamHI/XbaI 消化后的 DNA 构建体，出现明显的载体条带（上带）和编码刺突蛋白的 DNA 片段（下带）；道 3 显示被 HindIII 消化后的 DNA 构建体，由于载体和编码刺突蛋白的 DNA 片段存在有 HindIII 的酶切位点，产生了预期的一个较小的条带和一个较大的条带。

图 1B 是全长的 SARS-CoV S 糖蛋白单体的示意图，显示了去除信号序列(1-16 位残基, SEQ ID NO : 60)之后的各种可溶性多肽片段。可溶性片段为刺突蛋白片段，命名为“S”，继后是反应构成该片段末端的刺突蛋白氨基酸位数。这样，“S756”指一个起始于第 17 位氨基酸（紧跟信号序列之后），终止于第 756 位氨基酸的可溶性刺突蛋白片段。“TM”指跨膜片段，箭头标示了在第 758-761(序列 RNTR)位氨基酸之间的可能的切割位点。“RBD”指在第 272- 537 (SEQ ID NO : 57)位氨基酸之间的潜在的受体结合区，很可能位于第 303 位氨基酸的下游残基和第 537 (SEQ ID NO : 61)位氨基酸的上游残基之间。

图 2 显示了大肠杆菌中 SARS- CoV 刺突蛋白的肽片段表达的变性聚丙烯酰胺电泳图。该肽片段为 SEQ ID NO: 1 的第 17-446 位氨基酸。编码 17-446 位氨基酸的核酸片段被克隆进 pRSET 载体，构建成 pRSET-S (17-446)，在 BL21DE3 细胞中表达。左边的数字和箭头指示以千道尔顿为单位的分子量标示。泳道含有以下多肽：M 为分子量标示；泳道 1 和 2 为不含编码 SEQ ID NO: 1 的 17-446 位氨基酸残基的核酸序列和未经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导的对照大肠杆菌的多肽；泳道 3 为不含编码 SEQ ID NO: 1 的 17-446 位氨基酸残基的核酸序列但经过异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导的对照大肠杆菌的多肽；泳道 4 为含有编码 SEQ ID NO: 1 的 17-446 位氨基酸残基的核酸序列的 pRSET 载体并经 IPTG 诱导的大肠杆菌分析。右边的箭头指示与大肠杆菌表达的 SEQ ID NO: 1 的 17-446 位氨基酸残基相应的肽片段的位置。

图 3 是 SARS-CoV 的刺突蛋白的所述多肽片段在哺乳动物细胞中表达的狭线印迹分析图。编码肽片段的核酸片段被克隆进 pSecTag2B 载体, 以表达 N 端含有具分泌功能的小鼠 k 链前导序列、C 端含有用于检测和亲和层析纯化的 c-Myc 决定簇和组氨酸标记物的肽片段。该核酸构建体被转化进入 HEK293 和 VeroE6 细胞。指定肽片段的表达用抗 c-Myc 抗体通过狭线印迹分析来检测。左右两侧的数字指示检测到的肽片段的氨基酸残基。左边的一栏代表肽片段在 HEK293 细胞中的表达, 右边的一栏代表肽片段在 VeroE6 细胞中的表达。上半栏代表获取自细胞培养基的样品(分泌蛋白), 下半栏代表获取自细胞裂解物的样品(细胞内蛋白)。PC 为阳性对照, 由提供含有 C 端带 c-Myc 标记物的 PSA 的质粒的厂家提供。NC 为阴性对照, 含来自 SARS-CoV 的全长刺突蛋白但无 c-Myc 决定簇或组氨酸标记物。

图 4A 是刺突蛋白的指定肽片段在人 293 细胞或猴 VeroE6 细胞中表达的狭线印迹分析。在有或无重组牛痘病毒表达的 T7 聚合酶存在下转染了编码 S 片段(S276, S537 和 S756)的质粒的 293 和 VeroE6 细胞的培养上清被转移到硝酸纤维素膜上并用抗 c-Myc 决定簇的抗体进行检测。左右两侧的数字指示被检出肽片段的氨基酸残基。PSA PC 为含有 C 端带 c-Myc 标记物的 PSA 阳性对照。pCDNA-S NC 为含有 SARS-CoV 全长刺突蛋白但无 c-Myc 决定簇或组氨酸标记物的阴性对照。泳道内容如下: (1) 未用 VTF7.3 牛痘病毒感染的人 293 细胞, (2) 用 VTF7.3 牛痘病毒感染的人 293 细胞, (3) 未用 VTF7.3 牛痘病毒感染的猴 VeroE6 细胞, (4) 用 VTF7.3 牛痘病毒感染的猴 VeroE6 细胞。

图 4B 如图 4A 所述将转染细胞的上清与 Ni-NTA 琼脂糖珠一起温育, 清洗并用与图 4A 中相同的抗-c-Myc 抗原表位抗体进行 Western 印迹试验。

图 4C 为用两株分别抗起始于第 24 位残基(D24, 中间组)和第 540

位残基(P540, 右边组)的肽的兔多克隆抗体检测 S 片段的图示。左边的一组为用抗 c-Myc 决定簇抗体检测 S537 和 S756 的 Western 印迹对照。

图 5 是用兔多克隆抗体 P540 通过流式细胞仪显示全长的膜相关的 S 蛋白表达在细胞表面的图示。编码全长 S 糖蛋白的核酸被用于转染 293 细胞, 然后再用 VTF7.3 转染。收集细胞并与 P540 多克隆抗体和带有 FITC 的第二抗体共孵育后, 经洗涤, 再用流式细胞仪进行分析。不含编码 S 的核酸的与表达 S 的质粒一样的质粒在对照实验中被用于转染作为阴性对照 (NC) 的细胞, 转染有含有编码全长 S 糖蛋白的核酸的细胞以 S 标示。

图 6A 和 6B 显示 S 糖蛋白基本无自然发生的切割。表达 S756、Se 的转染 293 细胞的上清和表达 S 糖蛋白的 293 细胞的裂解物用 P540 抗体进行 Western 印迹, 观察发现 S 和 Se 的切割在基线水平。图 6A 是样品在 4℃ 存放 3 天后用于 Western 印迹分析切割图谱以监测非特异性蛋白酶活性效应的图示。作为对比, 图 6B 为样品制备后立即进行的印迹分析图示。

图 7A-C 显示的是 S 糖蛋白介导的细胞融合。一个无 S 插入片段的基于 pCDNA3 的质粒被用作质粒对照, S 表达细胞与 ACE2-ecto 表达细胞的融合被用作阴性对照。该 pCDNA3-ACE2-ecto 构建体只表达 ACE2 的带有 C9 肽标记物的可溶性 ecto 功能区。图 7A 显示转染有 pSecTag2B-S 和 pCDNA3-ACE2-Ecto 的 293T 细胞之间无合体细胞形成。相比之下, 图 7B 显示转染有 pSecTag2B-S 和 pCDNA3-ACE2 的 293T 细胞之间有合体细胞形成。图 7C 为用一个基于报告基因的试验来测定的细胞融合的图示, 如图所示, pCDNA3 和 pSecTag2B 载体表达的 S 糖蛋白均可在基于  $\beta$ -gal 报告基因的细胞-细胞融合试验中测到。

图 8A-C 显示 S 糖蛋白的受体-结合区 (RBD) 位于第 272 和 537 位残基之间。图 8A 为两个不同的可溶性 S 片段 (S537 和 S756) 与

293 细胞和 Vero E6 细胞结合的图示。图 8B 为各种 S 片段与 Vero E6 细胞结合的图示，背景阴性对照的 OD<sub>405</sub> 值从各 S 片段的 OD<sub>405</sub> 值中减除，得到的 OD<sub>405</sub> 值以相对 S537 的百分比表示。图 8C 为用 ELISA 法测得的 S 多肽片段与纯化后的可溶性 ACE2 相互作用的图示。在所有实验中，阴性对照 (NC) 为除了用于转染的质粒不编码任何蛋白外，其处理方式与其他样品完全相同的样品。这里显示的数据代表至少三个独立的实验。所有样品的 OD<sub>405</sub> 以相对 S537 的百分比表示。

图 9A-D 为 SARS-CoV 的 S 糖蛋白的 N 末端片段之间经证实通过免疫共沉淀和交叉连接发生二聚体化的图示。所有 N 末端片段，除含有受体结合区的最小的片段(S317-517)外，通过 P540 抗体与 S756 免疫共沉淀。P540 抗体是抗含 S 糖蛋白的第 540-555 位残基的肽的兔多克隆抗体，它能与 S756 多肽非 N 末端片段结合。

图 9A 中，编码 N 末端片段的质粒（以终止氨基酸残基的数字或起始和终止氨基酸残基的数字命名）被用于单独转染（左边 6 条道）或与编码 S756 的质粒联合转染（右边 4 条道）293T 细胞，这些细胞再用 VTF7.3 牛痘病毒转染，进行孵育后，收集细胞培养基，用能够识别所有片段的小鼠抗 c-Myc 决定簇抗体进行 Western 印迹分析的图示。

图 9B 为所有 N 末端 S 片段，除含有受体结合功能区的最小片段 (S317-517) 外，通过 P540 抗体与 S756 免疫共沉淀的图示。与图 9A 中所用培养基一样的培养基样品首先被用于与只识别 S756 的 P540 多克隆抗体进行免疫沉淀，然后用抗 c-Myc 决定簇的抗体对这些沉淀物进行 Western 印迹分析，以确定被免疫共沉淀的 N 末端片段。

图 9C 显示的是在有或无 DTT 存在的情况下，分子量大小与二聚体形式一致的新条带。为了排除可能引起免疫共沉淀的非特异性二硫键形成的可能，DTT 被用于其中的一个免疫共沉淀实验中。DTT 对分泌的 S756 (左道) 或 S756+S276 (右道) 的免疫沉淀或免疫共沉淀

无作用。含有分泌的 S756 (左道)或 S756+S276 (右道)片段的培养基样品在有或无 2 mM DTT 存在的情况下用 P540 抗体进行免疫沉淀。

图 9D 是 S 多肽寡聚体大小的示意图。S537 片段与 BS<sup>3</sup>(Pierce, Rockford, IL)如实施例中所描述的那样交叉联接, 经过 SDS-PAGE 分离后, 用抗 c-Myc 抗体通过 Western 印迹来检测 S537 的单体和它的寡聚体。正如图 9D 右边的泳道所显示, 当交叉联接剂加入后出现了一个新条带。该新条带的分子量与二聚体一致而与更高级的寡聚体不同。

图 10A 为通过排阻层析检测到的 N 末端片段 S537 的二聚体化图示。S537 和 S317-517 的洗脱谱上用箭头和数字指明标准校对蛋白被洗脱的位置和分子量。

图 10B 为用抗 c-Myc 决定簇抗体对收集到的 S537 和 S317- 517 流分进行 Western 印迹的图示。

图 11A-B 显示最远端的 N 末端功能区为 S 糖蛋白介导的细胞-细胞融合所必需。图 11A 为 S 糖蛋白的缺失突变的图示和细胞-细胞融合试验数据的总结, 其中 RBD 代表受体结合区的大致位置。因为融合而出现的信号用加号 (+) 表示, 测不到高于背景水平的信号用减号 (-) 表示。只有野生型的含第 17-1255 位氨基酸的多肽具有融合活性。含第 103-1255(Del1)和含第 311-1255(Del2)氨基酸的缺失突变体均无融合活性。图 11B 显示用 Western 分析法测得的全长 S 糖蛋白和其突变体的表达水平。各样品用同样量的细胞裂解物加样, 兔多克隆抗体 P540 用于检测。图 11C 为用流式细胞仪测得的全长 S 糖蛋白和 Del1 和 Del 2 缺失突变体在细胞表面表达的图示。虽然表面表达较低, 但只转染了空质粒的细胞的阴性对照与其他三条曲线有明显不同。

图 12A-B 显示二聚体 S1 与含受体结合域的单价片段相比能更有效地与受体 ACE2 结合。图 12A 显示用转染了 S276、S319-518 和 S537 构建体的细胞的 200 $\mu$ l 培养上清通过 ELISA 法检测到的不同 S 片段

的相对表达水平。抗组氨酸抗体和抗 c-Myc 决定簇抗体被用于三明治 ELISA 来检测分泌的带标记物的 S 蛋白。图 12B 显示用 ELISA 法测得的 S 片段与 ACE2 结合的水平。带有标记的 ACE2 通过事先包被于板上的抗 C9 抗体固定在板上，转染了各种 S 蛋白的细胞的细胞培养上清被混合后，加入 ELISA 板，在有(影线)或无(空白)抗 c-Myc 抗体存在的条件下孵育。最高的表达或结合水平推定为 100 %。如图所示，具有 N 末端二聚体化和受体结合两个功能区的 S537 片段比只含有受体结合区的 S319-518 片段与 ACE2 的结合更有效。

图 13A-B 显示在排阻层析的条件下可溶性 S 胞外域为三聚体。图 13A 中，纯化的 Se 通过用已知分子量的蛋白校正过的凝胶过滤柱层析。同样量的 BSA 被用作内部对照。在图 13B 中，从凝胶过滤柱收集到的不同的流分，通过 Western 印迹进行分析。在一些含有已知分子量的 Se 片段的流分中检测到两个 S 多肽的条带，代表 Se 片段自身(下面的条带)和它的聚合物(上面的条带)。

图 14A 显示本发明的 DNA 疫苗能够在小鼠体内引发很高滴度的抗 SARS-CoV 血清。小鼠 1A-5A 用编码含有刺突蛋白受体结合区(RBD)的 S319-518 片段的 DNA 免疫；小鼠 1B-5B 用 RBD-编码 DNA(S319-518 片段)与编码 Fc 片段的核酸的融合体免疫；小鼠 1C-3C 接种空质粒(无 S 片段 DNA)。收集抗血清，用 ELISA 法检测以确定不同分离物的滴度。在图 14A 中，第一个数字代表单个小鼠，字母代表各免疫组，最后的数字代表所用稀释度。抗血清按 50、250、1250 和 7250 的稀释系数稀释，如该柱图的 X 轴所示。这些数字提示用编码 S 蛋白的受体结合区的 DNA 进行免疫诱导出很强的针对 SARS-CoV 的免疫反应。

图 14B 显示从用 RBD-编码 DNA 免疫的小鼠获取的抗血清能够预防 S 介导的细胞融合。细胞(293T)与获取自用编码刺突蛋白受体结合区多肽(S319-518)片段的 DNA 免疫过的小鼠的抗血清孵育，然后该细胞悬液与表达 S 蛋白的细胞混合。融合的测定如实施例 20

中所述（也见，Xiao 等，BBRC 2003）。各融合反应的活性百分比（这里  $1 = 100\%$ ）被绘制在 Y 轴，无任何抑制的融合的百分比被指定为  $100\%$ 。PC 代表未加血清的阳性对照。对各组中#1 到 #2 鼠血清，所用血清稀释系数为 10（指定为 0.1）、100（指定为 0.01）和 1000（指定为 0.001）。对 A 组和 B 组中#3 到 #5 鼠血清以及对照组中 3# 鼠血清，所用血清稀释系数为 20（指定为 0.05）和 100（指定为 0.01）。这些数据提示用编码 S 蛋白的受体结合区的 DNA 进行免疫可预防 SARS-CoV 感染。

图 15 显示可溶性 S 糖蛋白片段抑制 S 介导的细胞融合。10  $\mu\text{g/ml}$  的各种 S 片段与 ACE2-表达细胞首先在室温下孵育 10 分钟。该 ACE2-表达细胞再与 S 表达细胞混合，融合试验用实施例 1 中描述的方法进行。Y 轴是各样本减去了背景噪音后的  $\text{OD}_{595}$  值。各构建体的数字代表各多肽的起始和终止残基。

### 发明详述

SARS 是重要的公共健康问题。诊断和治疗感染了 SARS-CoV 的病人的方法为预防或控制 SARS-CoV 感染的进一步传播提供了机会。由于 SARS-CoV 通过空气的途径感染人体，所以这些方法特别重要。本发明提供编码 SARS-CoV 刺突蛋白的氨基酸序列片段的核酸。本发明也提供氨基酸序列与 SARS-CoV 刺突蛋白的氨基酸片段序列一致的多肽。本发明还提供 SARS-CoV 刺突蛋白的肽片段和它们的保守性变异体，另外还有氨基酸序列部分与刺突蛋白一致的偶联蛋白和肽模拟物。

刺突蛋白是非常重要的蛋白，是由于其位于完整 SARS-CoV 的表面。因此，它可被用作在病毒有机会感染细胞之前抑制或清除完整病毒的靶目标。

本发明提供的核酸和多肽相对全长的刺突蛋白来说有明显的优势，因为核酸很容易生产，本发明的多肽也能以可溶性的形式大量制备。本发明的多肽相对天然刺突蛋白来说还有另一个优势，它们



可以被制备成对动物体内的降解有较大抵抗力的形式。本发明的多肽也能通过配制增强其抗原性使其成为更有效的抗原在动物体，如人体引发免疫反应。

所以，本发明提供可以被配制成能够用于免疫和治疗 SARS-CoV 感染者的疫苗和免疫组合物的核酸和多肽抗原。另外，本发明还提供与 SARS-CoV 的刺突蛋白结合的可以用于诊断、免疫和治疗 SARS-CoV 感染者的抗体。

定义：

“佐剂”一般情况下被定义为非特异性地加强抗原的免疫反应的物质。各种佐剂可以用于本发明的免疫肽和免疫 fragopeptides。大多数佐剂在设计上含有保护抗原不被快速代谢的物质，如氢氧化铝或矿物油，和免疫反应刺激剂，如脂质 A、百日咳薄得氏菌(*Bordetella pertussis*)或结合分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)来源蛋白。合适的佐剂市场上有售，例如，Freund's 不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, Mich. ); Merck 佐剂 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N. J. ); 铝盐如氢氧化铝凝胶(alum)或磷酸铝；钙盐、铁盐和锌盐；不可溶的酰化酪氨酸悬液；酰化糖；阳离子或阴离子衍生化的多糖；聚磷腈；生物降解微球；单磷酰脂 A 和 quil A；细胞因子，如 GM-CSF 或白介素-2、-7 或-12 也可以被用作佐剂。

“动物”指能够针对抗原的攻击调动起免疫反应的有机体。例如，爬行动物、禽鸟类和哺乳动物能够对抗原的攻击产生抗体反应。在非人有机体内产生的抗体被认为用于诊断试验有利于降低和排除交叉反应。

“适体”为与本发明的多肽或肽片段结合的肽、多肽或核酸(RNA 或 DNA)。

“载体蛋白”指可以连接到本发明的多肽或肽片段上形成偶联蛋白的多肽。载体蛋白可以为了增强多肽或肽片段的可溶性和免疫原性而连接到多肽或肽片段上。例如，生物素可以被用作载体蛋白

连接到多肽或肽片段上形成一个可以通过与亲和素的相互作用而分离出来，或通过使用荧光标记的亲和素来检测的偶联蛋白。在另一个例子中，连接有抗体的载体蛋白可以被连接到多肽或肽片段上形成一个偶联蛋白，该偶联蛋白与抗体相连而抗体又与连接蛋白的载体蛋白相连。

本发明包含分离的或基本纯化的核酸、肽、多肽或蛋白。在本发明的内容中，“分离”的核酸、DNA 或 RNA 分子或“分离”的多肽指存在于非天然环境中的核酸、DNA、RNA 分子或多肽，因此不是天然产物。分离的核酸、DNA、RNA 分子或多肽可以以纯化的形式存在或存在于一个非天然的环境中，例如，转基因宿主细胞中。“分离”的核酸分子、肽、多肽或蛋白、或其片段用重组技术生产时应基本不含其他细胞物质或培养基，用化学合成法生产时应基本不含化学前体或其他化学物质。在一个实施方案中，“分离”的核酸为不含该核酸在其来源有机体的基因组 DNA 上的天然侧翼序列（即位于该核酸 5'和 3'端的序列）。在各种实施方案中，分离的核酸分子可以含小于约 5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb 或 0.1 kb 的其来源细胞基因组 DNA 上该核苷酸序列的侧翼序列。基本不含细胞物质的蛋白、肽或多肽包括含有小于约 30%、20%、10%或 5%（干重）的污染蛋白的蛋白、肽或多肽制剂。当本发明的蛋白、或它们的生物活性部分是通过重组的方法生产时，优选培养基含小于 30%、20%、10%或 5%（干重）的化学前体或非目的蛋白化学物质。

术语多肽、肽和蛋白在这里是相互混用的。

肽或多肽“片段”在这里用于指比全长的肽、多肽或蛋白小的片段。例如，肽或多肽片段在长度上可以含有至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 10 个、至少 20 个、至少 30 个、至少 40 个氨基酸，或它们的单个单位长度。例如，片段在长度上可以是 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或更多氨基酸，肽片段在大小上无上限。但是，在一些实施方案中，肽片段在长度上可以小于 500

个氨基酸、小于 400 个氨基酸、小于 300 个氨基酸、小于 250 个氨基酸。优选肽片段用于接种动物后能够诱导出免疫反应。肽片段用于引发免疫反应可以通过将肽片段与佐剂联和后接种动物，即与佐剂结合的肽片段，或与对氨基苯砷酸、对氨基苯磺酸、乙酰基团或间三硝基苯基偶联的肽片段。肽片段中可含有非酰胺键，并可以是肽模拟物。

术语“可溶”用于这里指多肽具有在水溶液中溶解的能力，例如，可溶性多肽可与水性介质混合，使水性介质中至少有部分可测到的肽。肽的检测可以通过常规技术来实现，如光吸收法、荧光法、与染料的结合能力、减少银离子的能力和其他类似方法。

术语“特异性结合”指与单一抗原决定簇结合而不与多于一个的抗原决定簇结合的抗体，因此，与一种多肽特异性结合的抗体将与该多肽上的一个抗原决定簇结合，而不与另一个多肽上的抗原决定簇结合。

#### I 本发明的多肽、肽片段、偶联蛋白、免疫肽和肽模拟物

本发明提供含有与严重急性呼吸系统综合征(SARS)病原学相关的病毒(SARS-CoV)的刺突蛋白的氨基酸序列一致的氨基酸序列的多肽，其代表性氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，该序列被罗列于下供参考：

1 MFIFLLFLTL TSGSDLRCT TFDDVQAPNY TQHTSSMRGV  
 41 YYPDEIFRSD TLYLTQDLFL PFYSNVTGFH TINHTFGNPV  
 81 IPFKDGIYFA ATEKSNVVRG WVFGSTMNKK SQSVIIINNS  
 121 TNVVIRACNF ELCDNPFPAV SKPMGTQHT MI FDNFNCT  
 161 FEYISDAFSL DVSEKSGNFK HLREFVFKNK DGFLYVYKGY  
 201 QPIDVVRDLP SGFNTLKPIF KLPLGINITN FRAILTAFSP  
 241 AQDIWGTSAA AYFVGYLKPT TFMLKYDENG TITDAVDCSQ  
 281 NPLAELKCSV KSFEIDKGIY QTSNFRVVPV GDVVRFPNIT  
 321 NLCPPGVEFN ATKFPSVYAW ERKKISNCVA DYSVLYNSTF  
 361 FSTFKCYGVS ATKLNDLCFS NVYADSFVVK GDDVRQIAPG  
 401 QTGVIADYNY KLPDDFMGCV LAWNTRNIDA TSTGNYNKY  
 441 RYLRHGKLRP FERDISNVPF SPDGKPCTPP ALNCYWPLND  
 481 YGFYTTTGIG YOPYRVVLS FELLNAPATV CGPKLSTDLI  
 521 KNQCVNFNFN GLTGTGVLTP SSKRFQPFQQ FGRDVSDFTD  
 561 SVRDPKTSEI LDISPCAFGG VSVITPGTNA SSEVAVLYQD  
 601 VNCTDVSTAI HADQLTPAWR IYSTGNNVFQ TQAGCLIGAE  
 641 HVDTSYECDI PIGAGICASY HTVSLLRSTS QKSIVAYTMS  
 681 LGADSSIAYS NNTIAIPTNF SISITTEVMP VSMAKTSVDC  
 721 NMYICGDSTE CANLLLQYGS FCTQLNRALS GIAAEQDRNT  
 761 REVFAQVKQM YKTPTLKYFG GFNFSQILPD PLKPTKRSFI  
 801 EDLLFNKVTI ADAGFMKQYG ECLGDINARD LICAQKFNGL  
 841 TVLPPLLTDD MIAAYTAALV SGTATAGWTF GAGAALQIPF  
 881 AMQMAYRFNG IGVTONVLYE NQKQIANQFN KAISQIQESL  
 921 TTTSTALGKL QDVVNQNAQA LNTLVKQLSS NFGAISSVLN  
 961 DILSRLDKVE AEVQIDRLIT GRLQSLQTYV TQQLIRAAEI  
 1001 RASANLAATK MSECVLGQSK RVDFCGKGYH LMSFPQAAPH  
 1041 GVVFLHVITYV PSQERNFTTA PAICHEGKAY FPREGVFVFN  
 1081 GTSWFITQRN FFSPQIITTD NTFVSGNCDV VIGIINNTVY  
 1121 DPLQPELDSF KEELDKYFKN HTSPDVDLGD ISGINASVVN  
 1161 IQKEIDRLNE VAKNLNESLI DLQELGKYEQ YIKWPWYVWL  
 1201 GFIAGLIAIV MVTILLCCMT SCCSCLKGAC SCGSCCKFDE  
 1241 DDSEPVLKGV KLHYT

本发明也提供含有与严重急性呼吸系统综合征(SARS)病原学相

关的病毒(SARS-CoV)的刺突蛋白的氨基酸序列一致的氨基酸序列的肽片段,这些氨基酸序列包括 SEQ ID NO: 13、14、15、20-59 和 61-63 所代表的序列。SEQ ID NO: 1 的肽片段在长度上也可以是三个或三个以上的氨基酸,并且当用于接种动物时能够产生免疫反应。这些肽片段以那些长度为三个氨基酸,或更长一些的单氨基酸单位,如长度为 4、5、6、7、8、9、10 个氨基酸和与 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列一致的序列上缺少一个氨基酸的氨基酸序列为典型。

本发明也提供含有载体蛋白连接到本发明的多肽和肽片段上的偶联蛋白。载体蛋白可以用于增强偶联蛋白的可溶性。载体蛋白也可用于增强偶联蛋白的免疫原性以增加与本发明的多肽或肽片段结合的抗体的产量。载体蛋白还可用于分离和检测偶联蛋白,因此,偶联蛋白可以通过与偶联蛋白的载体蛋白部分相结合的其他成分的相互作用而被检测或分离出来。例如,偶联蛋白含有亲和素的载体蛋白,可通过已知的方法用生物素进行检测和分离。许多载体蛋白可被用来制备本发明的偶联蛋白。这些载体蛋白的例子包括匙孔鲈血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵白蛋白、小鼠血清白蛋白、兔血清白蛋白和其类似物。载体蛋白可以通过重组的方法以融合蛋白的形式与本发明的多肽或肽片段偶联。载体蛋白也可以通过化学的方法与本发明的多肽或肽片段偶联,或通过使用化学连接物偶联。这些偶联方法为本领域所知并且已有描述,见 Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, page 319 (Cold Spring Harbor Pub. 1988); Taylor, *Protein Immobilization*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1991)。

本发明提供本发明的多肽或肽片段连接到对氨基苯磺酸、对氨基苯磺酸、乙酰基团,或间三硝基苯基的免疫肽,与这些基团连接的方法为已知的并且已有报道,见 Weigle, *J. Exp. Med.*, 116: 913-928 (1962); Weigle, *J. Exp. Med.*, 122: 1049-1062 (1965); Weigle, *J. Exp. Med.*, 121: 289-308 (1965)。

本发明的多肽和肽片段可以是糖基化和非糖基化形式。本发明

的多肽和肽片段可以是在水溶液中可溶的或不可溶的。本发明的多肽和肽片段可以是保守性变体，保守性变体指来源于全长多肽，如示例序列 SEQ ID NO:1 的多肽和肽片段，通过删除（所谓截断）、添加或在全长多肽的 N 末端和/或 C 末端减去一个或多个氨基酸；或删除、添加或在全长多肽的 N 末端和/或 C 末端一处或多处减去一个或多个氨基酸。这些变体可由，例如，基因多态性引起或人为操纵所致，这样的操纵方法为本领域所广泛知晓。例如，SEQ ID NO:1 的氨基酸序列变体可以通过突变编码多肽的 DNA 来制备。突变及改变核苷酸序列的方法为本领域所广泛知晓。见，例如，Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)；Kunkel 等, Methods in Enzymol., 154: 367 (1987)；美国专利号 4,873, 192；Walker and Gaastra, eds., Techniques in Molecular Biology. MacMillan Publishing Company, New York (1983) 和这里引用的参考。合适的氨基酸取代的指南可以在 Dayhoff 等的 Atlas of Protein Sequence and Structure, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, C. D. (1978) 模型中找到，这里通过引用结合于此。保守性取代，如用一个性质相似的氨基酸取代另一个氨基酸为优选。例如，用一个疏水氨基酸取代另一个，或用一个亲水氨基酸取代另一个。常规的筛选试验可用来确定取代后的来自 SEQ ID NO:1 的多肽或肽片段用于动物后是否能产生免疫反应。这种筛选试验的例子为本领域所熟知，包括酶联免疫吸附试验、放射免疫试验、铬释放试验和类似试验，这些试验在 Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, page 319 (Cold Spring Harbor Pub. 1988) 上已有描述。

本发明提供本发明的多肽或肽片段的肽模拟物，肽模拟物为肽类似物，正如那些制药业常用的、特性类似于其模板肽的非肽类药物 (Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15: 29 (1986) 和 Evans 等, J. Med. Chem., 30: 1229 (1987))。肽模拟物在结构上与多肽或肽片段类似，含有肽键、但有一个或多个肽联键通过本领域已知的方法被  $-CH_2NH-$

--、--CH<sub>2</sub>S--、--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--、--CH=CH-- (顺和反式)、--COCH<sub>2</sub>--、--CH(OH)CH<sub>2</sub>--和--CH<sub>2</sub>SO—这样的联键任选取代。肽模拟物相对自然多肽的优势包括更经济地生产、更大的稳定性、改变了的特异性和加强了药理学特性，如半衰期、吸收性、强度和效果。

本发明的多肽、肽片段、偶联蛋白和肽模拟物可以通过在其氨基和/或羧基端添加封闭剂进行修饰以降低在体内的降解而用于体内。这种做法在多肽进入细胞前其末端倾向于被蛋白酶降解的情况下会有用。这样的封闭剂包括但不限于可以被连接到将要使用的多肽、肽片段、偶联蛋白和肽模拟物的外加的相关或非相关的肽序列，这可以通过普通技术人员所熟悉的方法，用化学方法在多肽、肽片段或偶联蛋白的合成过程中完成，或用重组 DNA 技术来完成。可选性的，封闭剂如焦谷氨酸和其他本领域所知的分子可以被连接到氨基端和/或羧基端残基上，或氨基端和/或羧基端残基的氨基基团可以被不同的分子取代，因此，本发明提供氨基端和羧基端残基被封闭的多肽或肽片段。

本发明的多肽或肽片段引发免疫反应的能力可以通过许多本领域认可的方法来测试，例如，它们诱导抗体产生的能力和刺激细胞毒性 T 淋巴细胞反应的能力。

本发明的多肽和肽片段可以被用于筛选试验以鉴别或分离与本发明的多肽或肽片段、或 SARS-CoV 的刺突蛋白结合的抗体。例如，多肽或肽片段可以用于噬菌体表面展示技术试验来分离与多肽或肽片段结合的抗体。在另一个例子中，本发明的多肽和肽片段被结合到一个抗体可以接触到的固体支持体上，这样，能够与多肽和肽片段结合的抗体就被固定到了固体支持体上，这些抗体过后可以从固体支持体上洗脱下来。本发明的多肽和肽片段可以通过本领域所知的其他许多方法用于分离抗体。

可以用于本发明的偶联蛋白、多肽或肽片段的小规模或大规模生产的表达系统包括但不限于：被含有本发明的核酸片段的重组核

酸构建体转化了的细胞或微生物。重组核酸构建体的例子包括细菌噬菌体 DNA、质粒 DNA、黏粒 DNA 或病毒表达载体。可以被转化的细胞和微生物的实例包括细菌(例如,大肠杆菌或枯草芽孢杆菌);酵母(例如,酵母属和毕赤酵母);昆虫细胞系统(例如,杆状病毒);植物细胞系统;哺乳动物细胞系统(例如, COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, W138,和 NIH 3T3 细胞)。可用作宿主细胞的还有转染有质粒载体或感染有病毒载体的直接从哺乳动物来源的原代或次代细胞。合适的表达载体的例子其中包括但不限于质粒和病毒载体,如疱疹病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、减毒牛痘病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和疱疹病毒。合成的方法也可用来生产本发明的多肽和肽片段,已知这些方法并已有报道,见 Merrifield, Science, 85: 2149 (1963)。

## II. 本发明的核酸片段、表达盒和核酸构建体

本发明提供编码本发明的多肽、肽片段和偶联蛋白的分离的核酸片段。本发明的核酸片段也包括由于基因密码子的简并性而编码同样氨基酸的片段,例如,氨基酸苏氨酸由 ACU, ACC, ACA 和 ACG 编码,因此是简并性的。本发明有意包括编码同样氨基酸的多核苷酸片段的所有变异体。这样的突变为本领域所知 (Watson 等, Molecular Biology of the Gene, Benjamin Cummings 1987), 突变也包括改变后的核酸片段转而编码保守性氨基酸,例如,异亮氨酸被亮氨酸取代和类似取代,这样的突变为本领域所知。如此,本发明的基因和核苷酸序列包括自然发生的序列和突变序列二者。

本发明的核酸片段可以含于载体上,载体可以包括但不限于:任何质粒、噬粒、F-因子、病毒、黏粒或双链或单链线状和环状的可以或不可以自我渗透或移动的噬菌体。载体也可通过整合入细胞基因组或以染色体外存在的形式(即含有复制区的自主复制质粒)转化原核或真核宿主。

优选地,载体上的核酸片段在合适的启动子或其他调节元件的



控制之下或被操作性的连接到启动子或其他调节元件以在体外或宿主细胞如真核细胞或微生物，如细菌内进行转录。载体可以是能在多种宿主内行使功能的穿梭载体，载体还可以是典型地含有一个或几个限制性酶切位点、外源 DNA 能以确定的方式插入的克隆载体，这样的插入不会造成克隆载体的基本生物学功能的丧失。克隆载体也可以含有适用于对该载体转化的细胞进行鉴别和筛选的标记基因，标记基因的例子有四环素和氨苄青霉素抗性基因。许多克隆载体从市场上可以买到(Stratagene, New England Biolabs, Clontech)。

本发明的核酸片段也可被插入表达载体。典型的表达载体含有编码细菌复制区域的原核细胞 DNA 元件和用于扩增和筛选细菌宿主内的表达载体的抗生素抗性基因；含有控制启动转录的调节元件如启动子；含有控制转录子的加工的 DNA 元件如内含子或转录终止/多聚腺苷酸化序列。

本领域有现成的将核酸片段装入载体的方法(Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001) ),简单地讲,将待插入核酸片段的载体用一种或多种限制性酶(限制性内切酶)处理,产生含有平末端、带 5'或 3'悬余“粘”末端或它们的任何组合的线性载体。载体可以用限制性酶处理后,再用修饰酶,如聚合酶、内切酶、去磷酸化酶或激酶处理,以得到一个具有有利于将核酸片段连接入载体的特征的线性载体。待插入载体的核酸片段用一种或多种限制性酶(限制性内切酶)处理,产生含有平末端、带 5'或 3'悬余的“粘”末端或它们的任何组合的线性片段。核酸片段也可以用限制性酶处理后,继而用其他 DNA 修饰酶处理,这些 DNA 修饰酶包括、但不限于聚合酶、内切酶、去磷酸化酶或激酶,以得到一个具有有利于将核酸片段连接入载体的特征的核酸片段。

然后,用本领域可用的方法(Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring

Harbor, N. Y. (2001)),将经过处理的载体和核酸片段连接到一起形成含有核酸片段的构建体。简单地讲,被处理过的核酸片段和被处理过的载体在有合适的缓冲液和连接酶存在的条件被混合在一起,然后在适宜的条件下进行孵育,以允许连接酶将核酸片段连接到载体上。

本发明也提供含有能够在体外或宿主细胞内指导本发明的特殊核酸片段表达的核酸序列的表达盒,如 SEQ ID NO: 2。同时,本发明的核酸片段也可被插入表达盒以产生一个反义信息。表达盒为一个独立的单元,可以为线状并能用于体外转录和翻译试验。进行这些试验的材料和方法从 Promega Corp. (Madison, Wisconsin)公司购得。例如,体外转录可以将核酸序列置于 T7 启动子的控制之下,然后用 T7 聚合酶开始体外转录。这些转录子可以通过加入兔网织红细胞裂解物进行翻译。任选性地,表达盒可被装入载体而在宿主细胞内复制和扩增,或在体外转录和翻译核酸片段。

这样的表达盒可以含有一个或多个限制性位点,允许核酸片段被置于调节序列的调节之下。表达盒也可含有操作性地连接到核酸片段的终止信号和核酸片段正常翻译所需的调节序列。表达盒所含核酸片段可以是嵌合型的,即它的一个组分相对于它的至少其他一个组分来说是外源性的。表达盒可以是天然的但以重组的形式获得以方便外源基因的表达。核酸片段在表达盒中的表达可以受组成型启动子或诱导型启动子的控制,诱导型启动子只有在宿主细胞暴露于特殊的外源刺激物时才启动转录。

表达盒可以包括 5'-3'方向的转录,一个转录和翻译启动区,一个核酸片段和一个在体外和/或体内发挥功能的转录和翻译终止区。该终止区可以是转录起始区天然所有,可以是核酸片段天然所有,或是从其他来源所得。

调节序列可以包括、但不限于增强子、启动子、阻遏子结合位点、翻译前导序列、内含子和多聚腺苷酸信号序列。它们可以包括天然的和合成的序列以及天然与合成序列的联合序列。调节序列不

限于启动子，一些调节序列包括组成型启动子、诱导型启动子、调节型启动子、组织特异型启动子、病毒启动子和合成启动子。

启动子是一段核酸序列，通过提供 RNA 聚合酶和其他转录所必须的识别位点控制编码序列的表达。启动子包括一个最小启动子，含所有最基本的起始转录所必须的元件，如 TATA 盒和/或起始子，起始子为一段短 DNA 序列，含 TATA 盒和标示转录起始位点的其他序列，调节元件与其结合以控制表达。启动子可以完全来源于一个天然基因，或由来自不同的天然启动子的不同元件组成，甚至由合成的 DNA 片段组成。启动子可以含与蛋白因子结合的序列，该类蛋白因子能对物理或发育条件作出反应而控制转录起始的有效性。

本发明提供含有载体和表达盒的构建体。载体可以选自、但不限于任何前面已描述过的载体。可以通过本领域所知的方法和前面描述过的方法(Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 将表达盒插入载体。在一个实施方案中，表达盒的调节序列可以来源于该表达盒插入的载体以外。在另一个实施方案中，含有载体和表达盒的构建体的形成是将本发明的核酸片段插入自身带有调节序列的载体，于是，当核酸片段插入载体时表达盒得以形成。带有调节序列的载体可以在市场上购得，其使用方法为本领域所知。

### III. 本发明的免疫组合物和疫苗

本发明提供用于动物体后能够产生抗病原学上与严重急性呼吸道综合征有关的病毒的免疫反应的免疫组合物和疫苗。免疫反应可以是体液免疫反应或细胞免疫反应。

本发明的免疫组合物可以包括佐剂和核酸、多肽、肽片段、肽模拟物、偶联蛋白和免疫肽或它们的任何联合。免疫组合物可以含有与本发明的多肽、肽片段、肽模拟物、偶联蛋白和免疫肽以非化学方法连接的佐剂。免疫组合物可以含有与本发明的多肽、肽片段、肽模拟物、偶联蛋白和免疫肽以化学方法连接的佐剂。本发明的免

疫组合物也可含有药学上可接受的稀释液或载体。

免疫组合物可以通过常规的方法制备，特别是，组合物中的核酸、多肽、肽片段、肽模拟物、偶联蛋白和免疫肽或它们的任何联合可以与药学上可接受的稀释液或载体结合。药学上可接受的稀释液或载体的例子包括水或盐溶液，如磷酸盐缓冲液(PBS)。通常，根据给药的方式和途径以及标准的药学实践来选择药学上可接受的稀释液。药学上可接受的稀释液和载体以及所有那些药学组合物必需用到的东西在本领域的标准参考书 Remington's Pharmaceutical Sciences 中有描述。

免疫组合物可以含有这里描述的和本领域所知的佐剂。铝化合物可以被用作佐剂，这些铝化合物包括氢氧化铝、磷酸铝、氢氧化磷酸铝及其类似物。核酸、多肽、肽片段、肽模拟物、偶联蛋白和免疫肽或它们的任何联合可以通过标准的方法吸附或沉淀于铝化合物。其他佐剂包括聚磷腈(WO 95/2415), DC-chol (3- $\beta$ - [N-(N',N'-二甲基氨基甲烷)氨基甲酰基]胆固醇) (美国专利号 5,283,185 和 WO 96/14831), QS-21 (WO 88/9336) 和来自 ImmunoChem (Hamilton, Montana)的 RIBI。含非甲基化的 CpG 二核苷酸("CpG")的免疫刺激性寡核苷酸在本领域已知被用作系统或粘膜给药的佐剂(WO 96/02555, EP 468520,等, J. Immunol., 160: 870 (1998); McCluskie 和 Davis, J. Immunol., 161: 4463 (1998)。当 CpG 被配制进免疫组合物或疫苗时，通常在自由溶液中与自由抗原一起给药。Immunol., 161: 4463 (1998)) 或与抗原共价连接 (PCT Publication No. WO 98/16247), 或与载体如氢氧化铝配制后给药。(Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 15553 (1998))。

本发明也提供包括本发明的核酸、多肽、肽片段、肽模拟物、偶联蛋白和免疫肽或它们的任何联合的疫苗。这些疫苗可以用这里所描述的方法或疫苗领域所知的方法配制。例如，可以根据本领域所知的方法构建出表达本发明的多肽、肽片段或偶联蛋白的病毒疫

苗，用作病毒载体的例子可以包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、金丝雀疱疹病毒和类似病毒。疫苗也可被制成脂质体，其配制方法为本领域技术人员所知。见，*Liposomes: A Practical Approach*. RRC New Ed, IRL press (1990)。

本发明也提供表达本发明的多肽、肽片段或偶联蛋白的基于核酸的疫苗。例如核酸疫苗可表达 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、61-63 多肽或 SEQ ID NO: 1 的片段。用编码本发明的多肽、肽片段或偶联蛋白的核酸构建体接种动物可以诱导出对被编码抗原的体液或细胞介导的免疫反应，它被认为是骨髓来源的专业抗原递呈细胞被核酸构建体转染，被编码抗原经转录和翻译生成诱导特异性反应的免疫源性多肽所致。核酸疫苗的一个特征是它能诱导出很强的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应。这种反应是由于核酸编码的多肽在被转染的细胞内合成的缘故。此外，在细菌内生产的核酸构建体富含能被巨噬细胞认作外来物质的非甲基化的 CpG 核苷酸，因此，巨噬细胞诱发能够强化继发免疫的天然免疫，所以，核酸疫苗即使在无佐剂的情况下也很有效。

将表达盒直接注射入活宿主细胞，使许多细胞得以转化从而表达被导入的核酸和表达基因产物。被转染的细胞可以将表达的抗原片段传呈到细胞表面与 I 类和 II 类主要组织相容抗原结合成复合物。

在将核酸构建体注射动物、包括人前，通过诱导肌肉降解可以更有效地将核酸构建体导入细胞(Vitadello 等，*Hum. Gene. Ther.*, 5: 11 (1994); Danko and Wolff, *Vaccine*, 12: 1499 (1994); Davis 等, *Hum. Gene. Ther.*, 4: 733 (1993) )。例如，这样的处理被认为可以提高转染效率到 40 倍。两种最常用的肌肉坏死剂 (myonecrotic) 是局部麻醉药布比卡因和心脏毒素(Danko and Wolff, *Vaccine*, 12: 1499 (1994); Davis 等, *Hum. Gene. Ther.*, 4: 733 (1993) )。其他许多技术也被用于将核酸构建体转导入肌肉中，这些技术包括逆转录病毒载体、腺病毒载体和脂质体。但是，对于外源核酸的转导和核酸在细胞内的表

达来说，直接注射裸核酸是乎是这些导入机理中最有效的。

核酸构建体可以与药学上可接受的载体一起用药。药学上可接受的载体为生物学上相容的适合于用于人或其他哺乳动物的介质，如生理盐水。治疗有效量为核酸构建体能够在被给药的动物中引起免疫反应的量（如，加强 T 细胞反应或抗体产生），正如医疗领域所熟知，对任何一个病人的剂量取决于许多因素，包括病人的身高、体表面积、年龄、所要使用的特殊化合物、性别、给药时间和途径、一般健康状况和其他同时使用的药物。剂量是可以变化的，但是核酸构建体的优选剂量约为  $10^6$  到  $10^{12}$  拷贝的核酸构建体。如果需要，该剂量可以重复给药。

核酸构建体的给药可以有許多途径，其例子包括肌肉内、静脉内、肠外、皮内、鼻内和皮下注射，这些途径都曾在鸡体内引起抗流感病毒血凝素(HA)的免疫反应(见 Pardoll and Beckerleg 的综述, *Immunity* 3 (1995), 165-169)。基于核酸的疫苗也可通过聚合体、生物降解微粒或微囊导入载体，将其大小优化到吞噬细胞、如巨噬细胞吞噬的最佳大小。例如，可以使用直径为 1-10  $\mu\text{m}$  的 PLGA (poly-lacto-co-glycolide)微粒。核酸构建体包裹在这些微粒中，被巨噬细胞吞噬并在细胞内逐渐发生生物降解，于是释放出核酸构建体。一旦释放出来，核酸构建体会在细胞内进行表达。另一个使核酸构建体进入细胞的途径是通过使用脂质体，脂质体可以通过标准方法制备。核酸构建体可单独、也可与组织特异性抗体一道结合于这些导入载体。可选性地，也可制备核酸构建体通过静电或共价力附着于多聚-L-赖氨酸的偶联分子，多聚-L-赖氨酸能够与靶细胞上的受体的配体结合 (Cristano 等 (1995), *J.Mol.Med.*73,479)。可选性地，淋巴组织特异靶向性可以通过使用淋巴组织特异的转录调节元件 (TRE) 来实现，如 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞或树突状细胞特异性 TRE，淋巴细胞特异性 TRE 为已知 (见 Thompson 等, *Mol. Cell. Biol.*, 12:1043 (1992); Toll 等 *J. Exp.Med.*, 177: 1663 (1993); Penix 等, *J.*

Exp.Med.,178:1483(1993))。

本发明也提供基于微生物的疫苗。一般来讲，这些疫苗涉及到被表达本发明的多肽、肽片段或偶联蛋白的核酸构建体转化了的微生物。例如，单核细胞增生李斯特氏菌被用作载体诱导 T 细胞免疫，因为它能感染抗原递呈细胞，而且因为其感染为粘膜感染，见 Lieberman 和 Frankel, Vaccine, 20: 2007-10 (2002)。所以，可以用多肽、肽片段或偶联蛋白的核酸构建体转染李斯特菌，去诱导针对引起严重急性呼吸系统综合症的冠状病毒的体液免疫反应。可以根据本领域报道的方法制备高度减毒的李斯特菌，见 Lieberman 和 Frankel, Vaccine, 20: 2007-10 (2002)。沙门氏菌也可被用作载体诱导针对引起严重急性呼吸系统综合症的冠状病毒的细胞毒性 T 淋巴细胞反应。见 Pasetti 等, Infect Immun., 70: 4009 (2002)。

免疫组合物或疫苗可以通过疫苗领域的常规途径给药。例如，免疫组合物或疫苗可以通过口服或静脉滴注，或皮下、肌内、肠道外、肛内、阴道内、鼻内、胃肠道内、气管内或心血管内给药。给药途径的选择取决于诸多因素，如活性原理的性质；多肽、肽片段、肽模拟物、偶联蛋白、免疫肽、DNA 疫苗的成分；或与以上提到的分子结合的佐剂。免疫组合物的给药可以是单剂量的或一个剂量在一定时间内一次或几次给药。合适的剂量根据因素的不同而变化，这些因素包括被处理的个体（成人或小孩）、免疫组合物或抗原本身、给药的方式和频率、有否佐剂、如有，佐剂的类型和预期的作用（如保护或治疗），将由本领域的技术人员来决定。

#### IV.本发明的抗体和适体

本发明提供与 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、60、61、62、63 所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段、或其保守性变异性结合的抗体。这些抗体可以用于诊断、免疫预防和治疗严重急性呼吸道综合征 (SARS)。在某些实施方案中，抗体与具 SEQ ID NO: 58 或 59 序列的肽结合。与肽 P540 (SEQ ID NO: 59) 结合的抗体高

度有效，即使在高倍稀释后仍能检测出刺突多肽。例如，P540 抗体稀释 1: 10000 倍后仍能检测出刺突多肽。

抗体可以通过用完整的目的多肽或肽片段作为免疫抗原来制备。用于免疫的多肽或肽片段可以经 cDNA 翻译或经合成而来。如有必要，多肽或肽片段可以结合到载体蛋白上，这些通常使用的以化学方式连接到肽上的载体蛋白包括匙孔蠔血蓝蛋白 (KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白和破伤风毒素。偶联蛋白可以用于免疫动物 (如小鼠、大鼠或兔子)。

如有必要，多克隆或单克隆抗体可以进一步被纯化，例如，与结合有用于产生抗体的多肽或肽片段的基质相结合，并从该基质上洗脱下来。本领域的技术人员懂得免疫领域常用的纯化和/或浓缩多克隆抗体和单克隆抗体的技术 (见 Coligan 等, Unit9, Current protocol in Immunology, Wiley Interscience, 1991, 通过引用结合)。

通过抗独特型技术产生一个模拟抗原决定簇的单克隆抗体也是可能的。例如，抗第一单克隆抗体的抗独特型将含有高变区的结合功能区，该功能区是第一单克隆抗体所结合的决定簇的“镜影”。

适合与多肽或肽片段结合的抗体至少对多肽的某区域的一部分是特异的。例如，本领域的技术人员能够用肽片段去产生本发明中合适的抗体。本发明的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体和多克隆和单克隆抗体的片段。

制备多克隆抗体为本领域的技术人员所熟知 (见 Green 等, Production of Polyclonal Antisera, in Immunochemical Protocols (Manson, ed. ), pages 1-5 (Humana Press 1992); Coligan 等, Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters, in Current Protocols in Immunology, section 2.4. 1 (1992), 通过引用结合于此)。例如，多肽或肽片段被注射入宿主动物，优选地，根据预先决定的实施方案，再进行一次或多次加强免疫，阶段性对动物进行采血。抗多肽或肽片段的特异性抗体可以用结合有多肽或肽片段的合适的



固体支持体进行亲和层析，从而将抗体从这些抗血清中纯化出来。

单克隆抗体的制备同样是常规性的(见 Kohler & Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975); Coligan 等, sections 2.5. 1-2.6. 7; 和 Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, page 726 (Cold Spring Harbor Pub. 1988) ), 通过引用结合与此。简单地讲, 单克隆抗体可以通过用含有抗原的组合物注射小鼠, 从采集的血清标本中确认抗体存在后, 取其脾获取 B 淋巴细胞, 将 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞, 克隆杂交瘤细胞, 筛选产生针对抗原的抗体的阳性克隆, 从杂交瘤细胞的培养基中分离抗体。可以通过多种已知的方法从杂交瘤细胞的培养基中分离纯化抗体。这些分离技术包括用蛋白 A 琼脂糖进行亲和层析、分子排阻层析和离子交换层析。(见 Coligan 等, sections 2.7. 1-2.7. 12 和 sections 2.9. 1-2.9. 3; Barnes 等, *Purification of Immunoglobulin G (IgG)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, pages 79-104 (Humana Press 1992) )在体外和体内扩增单克隆抗体的方法为本领域的技术人员所熟知, 体外扩增可以在合适的培养基中, 如 Dulbecco's Modified Eagle Medium 和 PRMI1640 培养基, 适量加入哺乳动物血清如胎牛血清和微量元素, 并且加入维持生长的补充物质如正常小鼠的腹腔渗出细胞, 脾细胞和骨髓巨噬细胞。体外生产提供相对纯的抗体制剂, 并可以加大规模以大量生产需要的抗体。大规模杂交瘤培养可以通过在气升式反应器、连续搅拌反应器、或固定化或截留细胞培养来实现。体内扩增可以通过将细胞克隆注射入与父代细胞组织相容的哺乳动物体内, 例如, syngeneic 小鼠体内, 使产生抗体的肿瘤得以生长。任选注射前先用碳氢化合物, 特别是油类如四甲基十五烷激活动物, 一至三周后从动物的体液中回收单克隆抗体。

抗体也可通过噬菌体表面展示技术来制备, 在一个例子中, 用抗原, 如本发明的多肽或肽片段免疫一个生物体, 从被免疫的生物体的脾内分离淋巴细胞, 从淋巴细胞中提取总 RNA, 含于总 RNA

中的 mRNA 被逆转录成互补的脱氧核糖核苷酸 (cDNA)。编码免疫球蛋白的轻链和重链可变区的 cDNA 用聚合酶链反应 (PCR) 进行括增, 产生单链的抗体可变区片段 (scFV), 轻链和重链的扩增产物可以通过剪切重叠延伸 PCR 产生完整的序列然后连接入合适的载体中, 用编码 scFV 的载体转化大肠杆菌, 然后再用一个辅助噬菌体对其进行转染, 产生表面上带有抗体的噬菌体。可选性地, 为了产生一个完整的抗原结合片段 (Fab), 重链扩增产物可以与编码噬菌体外膜蛋白的核酸序列融合, 轻链括增产物可以克隆进一个合适的载体中, 用表达轻链括增产物的载体转化表达与噬菌体外膜蛋白融合的重链的大肠杆菌, 轻链和重链间的二硫键连接在大肠杆菌的外周胞质中形成。该方法的结果是产生一个大至  $10^9$  克隆的抗体库, 抗体库的大小还可以通过增加对来自相同或不同的生物体附加免疫的免疫反应来括增到  $10^{18}$  个噬菌体。识别特异性抗原的抗体可以通过淘选的方法来筛选, 简单地说, 将完整的抗体库暴露于期望能与抗体结合的固化的抗原, 不产生与抗原结合的抗体的噬菌体将被洗去, 表达与抗原结合的抗体的噬菌体将结合到固化的抗原上, 这些噬菌体将被洗脱下来并在大肠杆菌内括增。可以重复该过程以富集表达与抗原特异性结合的抗体的噬菌体群。在分离出表达与抗原特异性结合的抗体的噬菌体后, 含有编码抗体的序列的载体可以从噬菌体颗粒中提取出来, 再次被克隆进一个合适载体以产生可溶性抗体。在另一个例子中, 人噬菌体文库可被用于筛选抗体, 如与 SARS-CoV 的刺突蛋白结合的单克隆抗体。简单地讲, 从感染或未感染 SARS-CoV 的人体分离脾细胞, 用以上描述和本领域所知的方法创建人噬菌体文库, 这些方法可以用来获取与 SARS-CoV 的刺突蛋白结合的人单克隆抗体。噬菌体表面展示技术用于分离抗原和抗体的方法为本领域所知并已有描述(见 Gram 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 3576 (1992); Kay 等, Phage display of peptides and proteins: A laboratory manual. San Diego: Academic Press (1996); Kermani 等,

Hybrid, 14: 323 (1995); Schmitz 等, Placenta, 21 Suppl. A: S106 (2000); Sanna 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 6439 (1995))。

本发明的抗体可以来自于“人源化”的单克隆抗体,人源化单克隆抗体通过将鼠免疫球蛋白的重链和轻链的互补决定区转移到人的可变区,然后用人的残基取代鼠框架区的残基而得。来自人源化单克隆抗体的抗体成分的使用,避免了鼠恒定区的免疫源性引起的潜在问题。有关克隆鼠免疫球蛋白可变区的一般技术已有描述(见 Orlandi 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86: 3833 (1989) 通过引用整体结合于此)。产生人源化单克隆抗体的技术的描述见 Jones 等., Nature, 321: 522 (1986); Riechmann 等, Nature, 332: 323 (1988); Verhoeyen 等, Science, 239: 1534 (1988); Carter 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Sandhu, Crit. Rev. Biotech., 12: 437 (1992); 和 Singer 等, J. Immunol., 150: 2844 (1993),它们通过引用结合于此。

另外,本发明的抗体可以来自人单克隆抗体,这些抗体从被基因工程技术改造过的能针对抗原刺激产生特异性的人抗体的转基因鼠获得。在这一技术中,人重链和轻链基因座被导入其内源性重链和轻链的基因座被定向破坏了的胚胎干细胞来源的小鼠中,该转基因鼠能合成人抗原特异的人抗体,该小鼠可以被用于生产分泌人抗体的杂交瘤细胞。从转基因鼠获取人抗体的方法被描述在 Green 等., Nature Genet., 7: 13 (1994); Lonberg 等, Nature, 368: 856 (1994); 和 Taylor 等, Int. Immunol. 6: 579 (1994),它们通过引用结合于此。

本发明的抗体片段可以通过蛋白酶水解抗体或通过编码片段的 DNA 在大肠杆菌中的表达来制备。可以通过常规的方法用胃蛋白酶或木瓜酶对完整抗体进行消化来获得抗体片段。例如,通过用胃蛋白酶切割抗体可以得到一个 5S 的 F(ab)<sub>2</sub> 片段,该片段用硫代还原因子进一步切割,并可选性地用封闭基团封闭由于二硫键被切割产生的巯基基团,会产生 3.5S 的 Fab 单价片段。可选性地,通过用胃蛋白酶切割也可直接产生两个单价 Fab 和一个 Fc 片段。这些方法

已有描述(见,美国专利号 4,036,945; 4,331,647; 和 6,342,221,和含于此的参考; Porter, *Biochem. J.*, 73: 119 (1959); Edelman 等, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, page 422 (Academic Press 1967)和 Coligan 等 at sections 2.8.1-2.8.10 and 2.10.1-2.10.4)。

其他切割抗体的方法,如分离重链而形成单价轻链片段的方法,进一步切割片段的方法,或其他酶学的、化学的或基因技术的方法也可使用,只要形成的片段能够与完整抗体所识别的抗原结合。

例如, Fv 片段含连接在一起的  $V_H$  和  $V_L$  链,这种连接可以是非共价连接的(Inbar 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 69: 2659 (1972)), 可变链可以可选性地通过分子内二硫键连接或通过化学物质如戊二醛交叉连接(Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 12: 437 (1992))。优选 Fv 片段的  $V_H$  和  $V_L$  链通过肽键连接。这些单链抗原偶联蛋白(sFv)可以通过构建一个含编码  $V_H$  和  $V_L$  链、中间以寡核苷酸相连的结构基因,将该结构基因插入表达载体,再将该载体导入宿主细胞,如大肠杆菌,该重组的宿主细胞即合成含有中间以连接肽相连的两个 V 功能区的单一多肽链。有关产生 sFvs 的方法见描述(Whitlow 等, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 97 (1991); Bird 等, *Science*, 242: 423 (1988), Ladner 等, U. S. patent No. 4,946,778; Pack 等, *Bio/Technology*, 11: 1271 (1993)和 Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.*, 12: 437 (1992))。抗体片段的另一种形式是形成单一互补决定区(CDR)的肽, CDR 肽(“最小识别单位”)可以通过构建编码目标抗体的基因来获得。制备这样的基因可以通过,例如,用聚合酶链反应从抗体产生细胞的 RNA 中合成可变区(Larrick 等, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 106 (1991))。

本发明的抗体可以与某种毒素结合,这样的抗体可以用于治疗感染了在病原学上与严重急性呼吸系统综合征相关的病毒性的动物,包括人。例如,与在病原学上与严重急性呼吸系统综合征相关联的冠状病毒的刺突蛋白结合的抗体被连接上破伤风毒素,用于感染有

上述病毒的动物，结合有毒素的抗体与被感染细胞表面的刺突蛋白结合，然后将被感染细胞杀灭。

本发明的抗体可以与某种检测标记物结合，这样的抗体可以用于诊断试验以确定动物，如人，是否感染了 SARS-CoV。检测标记物的例子有荧光蛋白（即绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白）。荧光标记（即荧光素异硫氰酸、罗丹明、德克萨斯红）、放射标记（即  $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ ）、酶（ $\beta$ -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、 $\beta$ -葡萄糖醛糖苷酶碱性磷酸酶），或亲和标记（即亲和素、生物素、链霉亲和素）。抗体与检测标记物连接的方法为本领域所知。见 Harlow 等，*Antibodies: A Laboratory Manual*, page 319 (Cold Spring Harbor Pub. 1988)。

本发明也提供本发明多肽或肽片段的适体。本发明的适体可以是肽适体或核酸适体。肽适体为与本发明的多肽或肽片段结合的肽，其结合力常与单克隆抗体-抗原复合物相当。类似，核酸适体为与本发明的多肽或肽片段有很强结合力的核酸，其结合力常与单克隆抗体-抗原复合物相当。

在一个例子中，核酸适体可以通过使用随机寡核苷酸序列文库而分离得到。筛选该文库以确定某一个寡核苷酸序列与本发明的 S 多肽和肽片段结合。结合的寡核苷酸从固化的多肽或肽片段上洗脱下来，然后用 PCR 进行扩增。该过程可以重复多次以筛选出对本发明的多肽和肽片段具有高结合力的适体。然后确定编码该适体的核酸序列，并将其克隆进入一个合适的载体中以有利于该适体的生产和保存。

肽适体可以通过 mRNA 展示筛选含有启动子、起始密码子和编码随机肽的核酸序列的文库来获得。在某些实施方案中，该 DNA 文库还含有编码组氨酸标记物的核酸片段。该文库用合适的聚合酶，如 T7RNA 聚合酶进行转录。转录完成后一个含嘌呤霉素的多聚 A 接头被加到新合成的 mRNA 的 3'端。当这些 mRNA 在体外翻译后，新

生成的肽与嘌呤霉素接头共价连接形成 mRNA-肽的融合分子。用 Ni-NTA 琼脂糖和 oligo-dT 纤维素对 mRNA-肽的融合分子进行纯化。再对融合分子的 mRNA 部分进行逆转录。然后，用双链的 DNA/RNA-肽融合分子与本发明的肽或肽片段共孵育，未结合的融合分子将被洗去，结合的融合分子从固化的肽或肽片段上洗脱下来，再用 PCR 进行扩增，该过程可以重复进行以筛选出与本发明的肽或肽片段有高度结合力的适体。然后可确定编码该适体的核酸序列，并将其克隆进合适的载体。制备肽适体的方法已有描述（见(Wilson 等，Proc. Natl. Acad. Sci., 98: 3750 (2001))。所以，本发明提供能够识别本发明的肽和肽片段的适体。

#### V. 本发明的药用组合物

本发明提供含有与 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、60、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的保守变异体结合的抗体以及药学上可接受的载体的药用组合物。在某些实施方案中，抗体与具有 SEQ ID NO: 58 或 59 序列的肽结合。与肽 P540 (SEQ ID NO: 59) 结合的抗体高度有效，即使在高倍稀释的条件下也能检测出刺突多肽。例如，P540 抗体在 1:10000 倍稀释的条件下仍然可以检出刺突多肽。

本发明的药用组合物可被制备成多种形式，包括片剂、硬或软的明胶胶囊、水溶液剂、混悬液、脂质体和其他缓释制剂，如有形高分子胶。也可做成一种口服剂量制剂形式，使抗体在从胃内排入肠道后释放出来。这样的制剂在美国专利号 6,306,434 上和含于本文的参考文献中有描述。

口服的液体药用组合物可以是这些形式，例如，水性或油性的混悬液、溶液、乳剂、糖浆或酞剂，或使用前用水或其他合适介质调和后使用的干燥产品。这些液体药用组合物可以含有常规添加剂，如悬浮剂、乳化剂、非水性介质（它们可包括食用油）或防腐剂。

抗体可被做成肠外给药的制剂（例如，通过注射，如一次性注

射或连续滴注)，以单位剂量的形式装于安瓿、预灌装的注射器、小容量的滴注容器或多剂量的容器中，并加入保存剂。该药用组合物可以是悬液、溶液、或油性或水性乳剂，并可以含有悬浮剂、稳定剂和/或分散剂这样的成型剂。适合于肛内用药的制剂可被制备成单位剂量的栓剂。合适的载体包括本领域常用的盐水和其他物质。

对于吸入给药，抗体可以用吹入器、雾化器、压力包装或方便的导入气体喷雾的方式很容易地导入。压力包装可以带有合适的推进剂如二氯二氟甲烷、三氯一氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳和其他合适气体。在用加压气雾剂的情况下，可以通过提供气阀来导入计量量来确定剂量单位。

可选性地，对于吸入或吹入给药，抗体可以是干粉形式的组合物，例如，调节剂和合适的干粉基质如乳糖或淀粉的粉状混合物。粉状混合物可以以单位剂量的形式装于胶囊和药筒中，或例如明胶或泡罩包装中，药粉可以借助吸入器或吹入器从这些容器中给药。对于鼻腔给药，抗体可以通过液体喷雾，例如通过一个塑料喷雾器。

本发明的药用组合物也可含有其他成份，如调味剂、着色剂、抗微生物剂或防腐剂。用于治疗抗体的量不仅将因为所选载体不同而不同，而且会因用药途径、被治疗的病情、病人的年龄和病人的状况不同而不同，这是可以理解的。最终可能由医疗提供者决定合适剂量。另外，药用组合物可以被制成单一单位剂量形式。

#### VI. 针对严重急性呼吸系统综合征的动物的免疫、治疗和诊断的方法

本发明提供了免疫动物以抵抗严重急性呼吸系统综合征的方法。该方法涉及到给予动物有效治疗剂量的与 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、60、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的变体结合的抗体；给予动物有效治疗剂量的免疫组合物；给予动物有效治疗剂量的病毒疫苗；给予动物有效治疗剂量的核酸疫苗。动物可以是哺乳动物，如人。给予疫苗和免疫组合物的方法在这里已有描述并且为本领域所知。

根据本发明，也可通过被动免疫治疗的方法治疗感染了 SARS-CoV 的动物。例如，将与 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、60、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的保守性变异体结合的抗体给予感染了 SARS-CoV 的动物，如人。这样的用药方法可能适合于病人免疫受到抑制，不能调动起有效的抗 SARS-CoV 免疫，或对疫苗或免疫组合物不反应的情况。

本发明提供诊断动物是否患有严重急性呼吸系统综合征的方法，该方法涉及到用与 SEQ ID NO: 1、13、14、15、20-59、60、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的保守性变异体结合的抗体与来自该动物的生物标本接触，如组织样品、血、粘液或唾液，确定该抗体是否与生物样品结合。利用抗体来检测生物标本中是否有抗原存在为本领域所熟知。简单地讲，本发明的抗体可以被固定在一个表面，然后生物标本与固化的抗体接触以使标本中的抗原与抗体结合形成抗原抗体复合物，可选性地洗涤标本除去未结合的物质，本发明的第二抗体结合有一个检测标记物，如酶或放射性标记物，能与抗原抗体复合物结合使酶或放射性标记物固定到表面。然后可检测该检测标记物来决定生物标本中是否含有抗原。在另一个例子中，生物标本可以被固定于一个表面，然后，连接有检测标记物的本发明的抗体与固化的生物标本接触，并洗去未结合物质，通过检测检测标记物的存在以决定是否生物标本中是否含有抗原。这些试验的例子为本领域所熟知，包括酶联免疫吸附试验，放射性免疫试验和类似试验。

基于核酸的方法也可用于诊断严重急性呼吸系统综合征。在一个例子中，聚合酶链反应 (PCR) 可以被用于诊断 SARS-CoV 感染。简单地讲，从动物体内获得生物标本如组织标本、血液、粘液或唾液，用常规方法，如有机提取法提取标本中的核酸，提取的核酸与能够退火连接到编码 SARS 蛋白的核酸序列的正向和反向引物、聚合酶、核苷酸和含有允许聚合酶以 SARS 核酸为模板延伸正向和反



向引物的成份的典型缓冲液混合，然后检测扩增出的正向和反向引物之间的 DNA 的存在以确定标本中是否含有 SARS 来源的核酸。核酸杂交技术，如 Northern 和 Southern 印迹也可用于检测生物标本中 SARS 核酸的存在。

## VII. 试剂盒

本发明提供含有包装材料和与 SEQ ID NO : 1、13、14、15、45、46、或 47、58、59、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的保守性变异体结合的抗体的试剂盒。试剂盒可以含有注射器以将试剂盒内的抗体注射给动物，如人。在另一个实施方案中，本发明提供含有包装材料和与 SEQ ID NO : 1、13、14、15、20-59、60、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的保守性变异体结合的抗体的试剂盒，并被做成用于动物，如人的制剂。在某些实施方案中，抗体与 SEQ ID NO :59 的氨基酸序列结合。在其他实施方案中，抗体与 SEQ ID NO :58 的氨基酸序列结合。这样的试剂盒可以含有注射器以方便将试剂盒所含的抗体注射给动物，如人。

本发明提供含有包装物质和含有编码 SEQ ID NO : 1、13、14、15、45、46、或 47、58、59、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的保守性变异体的 DNA 分子或表达载体的 DNA 疫苗。该试剂盒也可含有使用 DNA 疫苗的装置（如注射器和基因枪）以方便将试剂盒内含有的疫苗用于动物，如人。

本发明也提供含有包装物质和包括具有 SEQ ID NO : 1、13、14、15、45、46、或 47、58、59、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 1 的片段或它们的保守性变异体的多肽的疫苗组合物。该试剂盒也可含有疫苗使用装置（如注射器）以方便将试剂盒内含有的疫苗用于动物，如人。

本发明提供一个含有包装物质和具有 SEQ ID NO : 1、13、14、15、45、46、或 47、58、59、61、62、63 中所示的氨基酸序列或 SEQ

ID NO: 1 的片段或它们的保守性变异体的多肽、用于检测 SARS-CoV 感染的试剂盒。多肽可以被固定在一个固体支持体上。这样的试剂盒可以被用于检测感染动物或人的血清中直接抗 SARS-CoV 的抗体。该试剂盒也包含有检测这些抗体与 S 多肽结合的方法。

VIII. Tor2SARS-CoV 病毒分离株的全长的刺突 (S) 蛋白 (氨基酸 1 - 1255) 的氨基酸序列

MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSD  
TLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG  
WVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQHTHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKNDGFLYVYKG  
YQPIDVVRDLPSGFNTLKPFIKPLPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSA  
YFVGYLKPTTFMLKYDENGTTTDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQ  
TSNERVVPDGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVAD  
YSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNLDLCSNVYADSFVVKGDDVRQIAPG  
QTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGK  
LRPFERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV  
VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKQCVNFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQP  
FQQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVAVLY  
QDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYE  
CDIPIGAGICASYHTVSLRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTN  
FSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRAL  
SGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSE

IEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLT  
DDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQ  
NVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTL  
VKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVVTQQLI  
RAAEIRASANLAATKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVV  
FLHVITYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVFVFNGTSWFITQRNFFS  
PQIITDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSP  
DVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEYIKW  
PWYVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSE  
PVLKGVKLHYT (SEQ ID NO: 1)

IX. 全长的刺突 (S) 蛋白 (氨基酸 1 - 3768) 的核酸序列

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTG  
ACCGGTGCACCACTTTTGGATGATGTTCAAGCTCCTAATTACACTCAAC  
ATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTATAGAT  
CAGACACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAA  
TGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACGTTTGGCAACCCTGTCAT  
ACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGCTGCCACAGAGAAATCAAATGT  
TGTCCTGGTTGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTC  
GGTGATTATTATTAACAATTCTACTAATGTTGTTATACGAGCATGTAA  
CTTTGAATTGTGTGACAACCCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCATGGG  
TACACAGACACATACTATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACTTT  
CGAGTACATATCTGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAGTCAGG  
TAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTAAAAATAAAGATGGGTT  
TCTCTATGTTTATAAGGGCTATCAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCT  
ACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCTCTTGGT  
ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCT  
CAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCAGCCTATTTTGTGGCTATTTA  
AAGCCAACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCAC  
AGATGCTGTTGATTGTTCTCAAATCCACTTGCTGAACTCAAATGCTC  
TGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTACCAGACCTCTAATTT  
CAGGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCTAATATTACAAA  
CTTGTGTCCTTTTGGAGAGGTTTTTAATGCTACTAAATTCCTTCTGTC

TATGCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTGTGTTGCTGATTACTCT  
GTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTT  
TCTGCCACTAAGTTGAATGATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGAT  
TCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAATAGCGCCAGGACA  
AACTGGTGTATTGCTGATTATAATTATAAATTGCCAGATGATTTTCAT  
GGGTTGTGTCCTTGCTTGGAACTAGGAACATTGATGCTACTTCAAC  
TGTAATTATAATTATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTA  
GGCCCTTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCA  
AACCTTGCACCCACCTGCTCTTAATTGTTATTGGCCATTAATGATT  
ATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTG  
TAGTACTTTCTTTTGAACCTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTGTGGAC  
CAAATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTCAATTTTAATT  
TTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGAT  
TTCAACCATTTCAACAATTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATT  
CCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTACCTTGCG  
CTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTG  
AAGTTGCTGTTCTATATCAAGATGTTAACTGCACTGATGTTTCTACAG  
CAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTCTACTG  
GAAACAATGTATTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAG  
CATGTCGACACTTCTTATGAGTGCGACATTCCTATTGGAGCTGGCATT  
TGTGCTAGTTACCATACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAA  
TCTATTGTGGCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTT  
ACTCTAATAACACCATTGCTATACCTACTAACTTTTCAATTAGCATT  
CTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTA  
ATATGTACATCTGCGGAGATTCTACTGAATGTGCTAATTTGCTTCTCC  
AATATGGTAGCTTTTGCACACAATAATCGTGCCTCTCAGGTATTG  
CTGCTGAACAGGATCGCAACACACGTGAAGTGTTTCGCTCAAGTCAA  
CAAATGTACAAAACCCCAACTTTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTT  
TCACAAATATTACCTGACCCTCTAAAGCCAATAAGAGGTCTTTTATT  
GAGGACTTGCTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATG  
AAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGATATTAATGCTAGAGATCTCAT  
TTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTTGCCACCTCTGCTCAC  
TGATGATATGATTGCTGCCTACACTGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGC  
CACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCTCTTCAAATACCTTT

TGCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAA  
ATGTTCTCTATGAGAACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAG  
GCGATTAGTCAAATTCAAGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATT  
GGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACA  
CACTTGTTAAACAACCTTAGCTCTAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGC  
TAAATGATATCCTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAA  
ATTGACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGT  
AACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAATC  
TTGCTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGA  
GTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCA  
GCCCCGCATGGTGTGTTGTTCTTCTACATGTCACGTATGTGCCATCCCAG  
GAGAGGAACTTCACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCAAAGC  
ATACTTCCCTCGTGAAGGTGTTTTTGTGTTAATGGCACTTCTTGGTTT  
ATTACACAGAGGAACTTCTTTTCTCCACAAATAATTACTACAGACAAT  
ACATTTGTCTCAGGAAATTGTGATGTCGTTATTGGCATCATTAACAAC  
ACAGTTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTCGACTCATTCAAAGAAGA  
GCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATCTTG  
GCGACATTTAGGCATTAACGCTTCTGTCTGCAACATTCAAAAAGAA  
ATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGAATCACTCAT  
TGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTT  
GGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGG  
TTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCTCAAGG  
GTGCATGCTCTTGTGGTTCTTGTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTG  
AGCCAGTTCTCAAGGGTGTCAAATTACATTACACATAA (SEQ ID NO:  
2)

### 实施例 1

#### 刺突蛋白的克隆

编码全长刺突蛋白的核酸序列用重叠聚合酶链反应 (PCR) 的方法获得。含有刺突蛋白的重叠克隆从 British Columbia Cancer Agency (Vancouver, British Columbia) 获得。以下引物在 PCR 反应中被用于扩增编码全长 SARS-CoV 刺突蛋白的核酸序列: 克隆 1: 正向引物: 5'-A GTC GGA TCC GGT AGG CTT ATC ATT AGA G-3'(SEQ ID NO: 3);

反向引物: 5'-CCA TCA GGG GAG AAA GGC AC-3 (SEQ ID NO: 4).  
克隆2: 正向引物: 5'-GTG CCT TTC TCC CCT GAT GG-3' (SEQ ID NO: 5); 反向引物: 5'-GAA GAG CAG CGC CAG CAC C-3' (SEQ ID NO: 6). 克隆3: 正向引物: 5'-GGT GCT GGC GCT GCT CTT C-3' (SEQ ID NO: 7); 反向引物: 5'-A CTG TCT AGA GTT CGT TTA TGT GTA ATG-3 (SEQ ID NO: 8).

通过重叠 PCR 扩增以上引物对之间的核酸片段所产生的核酸片段含有与严重急性呼吸系统综合征病原学相关的病毒 (SARS-CoV) 的刺突蛋白的 1 到 1255 个氨基酸残基。带有下划线的引物序列代表用于将扩增片段克隆到 pCDN3(+ )质粒中的限制性酶 BamHI 和 XbaI 的酶切位点。

该全长刺突蛋白基因的克隆如图 1 所显示, 图 1 显示的是插入了编码刺突蛋白全长的核酸片段的 pCDN3.1(+ )载体被限制性酶酶切后的胶图 (道 2: BamHI 和 XbaI 酶切; 道 3: HindIII 酶切)。

## 实施例 2

### 全长刺突蛋白的氨基端片段 (S1) 和羧基端 (S2) 片段的产生

用计算机分析确定刺突蛋白的氨基端 (S1) 和羧基端 (S2) 的潜在功能性分割点, S1 和 S2 之间的分割点在 SEQ ID NO: 1 的 758 和 761 (<sup>758</sup>RNTR<sup>761</sup>) 之间。PCR 的方法被用于制备编码刺突蛋白的氨基端片段 (S1) 和羧基端 (S2) 片段。

以下引物对, S1 正向引物: 5'-AGTC GGA TCC GAC CGG TGC ACC ACT TTT G-3' (SEQ ID NO: 9), 和 S1 反向引物: 5'-AGTC GGG CCC CTG TTC AGC AGC AAT ACC-3' (SEQ ID NO: 10) 被用于制备编码刺突蛋白的第 17 到 757 位氨基酸残基的核酸片段。两个限制性切点, BamHI 和 ApaI (两个引物序列带下划线的部分) 被用于克隆该编码刺突蛋白基因的氨基端片段的核酸片段(S1)到 pSecTag2B 质粒中进行表达。

以下引物对, S2 正向引物: 5'-ACTG GGATCC GAA GTG TTC

GCT CAA GTC-3' (SEQ ID NO: 11), 和 S2 反向引物: 5'-ACTG TCTAGA TTG CTC ATA TTT TCC C-3' (SEQ ID NO: 12)被用于 PCR 反应以制备编码刺突蛋白第 762 到 1189 位氨基酸残基的核酸片段。两个限制性切点, BamHI 和 XbaI (两个引物序列带下划线的部分) 被用于克隆该编码刺突蛋白基因的羧基端片段的核酸片段(S2)到 pCDN3.1(+)质粒中进行表达。

为了获得含有第 272 到 537 位残基的片段, 以下引物对被用于 PCR 扩增: 引物: 5' GATCGGATCCGGTACAATCACAG 3' (SEQ ID NO : 64)和引物 5' GATCGGGCCCGACACACTGGTTC 3' (SEQ ID NO : 65)。该扩增片段用 BamHI 和 ApaI 消化, 并与用同样的酶消化的 pSecTag2B 连接。全长刺突蛋白的许多可溶性刺突蛋白片段的位置见图 1B 中的图解。

在某些情况下, 编码 S 的片段和全长的 S 多肽的核酸的天然前导序列(刺突蛋白的第 1 到 16 位氨基酸, MFIFLLFLTLTSGSDL (SEQ ID NO : 60) 被小鼠 k 链前导序列取代 (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD) (SEQ ID NO : 16)以促成分泌, 正如以下所描述。

### 实施例 3

#### 缺乏胞质尾和跨膜区的完整可溶性刺突蛋白 (sS) 的获得

以下引物对被用于获取编码缺乏胞质尾的含 SEQ ID NO : 1 的第 17 到 1189 位氨基酸的核酸片段: S1 正向引物: 5'-AGTC GGATCC GAC CGG TGC ACC ACT TTT G-3' (SEQ ID NO: 9),和反向引物: 5'ACTG TCTAGA TTG CTC ATA TTT TCC C-3' (SEQ ID NO: 12)。

### 实施例 4

#### 刺突蛋白的氨基端和羧基端片段的表达

通过用含有 pSecTag2 或 pCDN3.1(+)质粒和编码氨基端 (S1)、羧基端 (S2) 片段, 或缺乏胞质尾和跨膜区的 SARS-CoV 刺突蛋白片段的表达构建体转染 293 或 E6 Vero 细胞来进行表达。跨膜区的去

除被认为可导致多肽和肽片段在水溶液中可溶。然后将测试被编码片段的表达效率。一旦用电泳分析得到阳性信号，将建立一个稳定的转染细胞系。全长的刺突蛋白和它的片段将根据常规的用于纯化高度糖基化的蛋白的方法进行纯化，如晶状体凝集素柱用于大量生产。得到的蛋白质：可溶性的 S1 (sS1)、可溶性的 S2 (sS2) 和完整 S (sS) 将含有以下氨基酸序列。黑体字代表可以被切去的信号肽，分泌出的蛋白将不含有它。

刺突蛋白的可溶性氨基端片段的氨基酸序列 (17-757 位氨基酸)

DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSN  
 VTGFHTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVI  
 IINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISD  
 AFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNT  
 LKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKY  
 DENGTTIDA VDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPDGVVRF  
 PNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKC  
 YGVSATKLNLDLCSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD  
 DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVPFSPD  
 GKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCG  
 PKLSTDLIKNQCVNFENGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSV  
 RDPKTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAIHAD  
 QLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPGAGICASYHTV  
 SLLRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMK  
 TSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQ (SEQ ID  
 NO: 13)

刺突蛋白的可溶性羧基端片段的氨基酸序列 (762-1189 位氨基酸)



EVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLA  
 DAGFMKQYGECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPLTDDMIAAYTAALV  
 SGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQ  
 FNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV  
 LNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAAT  
 KMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVITYVPSQERNF  
 TTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNC  
 DVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLDGDISGINASVV  
 NIQUEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ (SEQ ID NO: 14)

含有 SEQ ID NO: 1 的 17-757 位氨基酸和 762-1189 位氨基酸可溶性  
 刺突蛋白的氨基酸序列 (缺乏信号肽和潜在切割位点)

DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLQDLFLPFYSN  
 VTGFHTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVI  
 IINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISD  
 AFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKNDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNT  
 LKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKY  
 DENGITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVPSGDVVRF  
 PNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKC  
 YGVSATKLNLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD  
 DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVPFSPD  
 GKPCPTPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCG  
 PKLSTDLIKNCVNFENGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSV  
 RDPKTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAIHAD  
 QLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPGAGICASYHTV  
 SLLRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMK  
 TSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQDEVFAQVK

QMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQ  
 YGECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPLTDDMIAAYTAALVSGTATAG  
 WTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQI  
 QESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRL  
 DKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVL  
 GQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTVVPSQERNFTTAPAICH  
 EGKAYFPREGVVFVNGTTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNCDVVIGIINN  
 TVYDPLQPPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRL  
 NEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ (SEQ ID NO: 15)

### 实施例 5

#### 刺突蛋白的附加可溶性片段的产生

通过聚合酶链反应 (PCR) 获得含有编码 SEQ ID NO: 1 的第 17-757 位氨基酸的多肽的核酸序列。以下引物用于在 PCR 中扩增该核酸序列: 正向引物: 5'AGCT GGA TCC GAC CGG TGC ACC ACT TTT G 3' (SEQ ID NO: 9); 和反向引物: 5' AGCT GGG CCC CTG TTC AGC AGC AAT ACC 3' (SEQ ID NO: 10)。该 PCR 产物用 BamHI 和 ApaI 酶切, 编码与 SEQ ID NO: 43 氨基酸序列一致的多肽。被消化后的 PCR 产物与用同样酶消化的 pSecTag2B 连接 (Invitrogen, Carlsbad, California)。含有插入的 PCR 产物的 pSecTag2B 构建体编码多肽 SEQ ID NO: 46, 该多肽的氨基端含有鼠 k 链前导序列 (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD) (SEQ ID NO: 16), 羧基端含有用于亲和层析纯化的 myc 决定簇 (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 17) 加组氨酸标记物 (HHHHHH) (SEQ ID NO: 18)。

通过聚合酶链反应 (PCR) 获得含有编码 SEQ ID NO: 1 的第 17-276 位氨基酸的多肽的核酸序列。以下引物用于在 PCR 中扩增该核酸序列: 正向引物: 5'AGCT GGA TCC GAC CGG TGC ACC ACT TTT G 3' (SEQ ID NO: 9); 反向引物: 5' CTAG CTC GAG CAA CAG CAT CTG TG 3' (SEQ ID NO: 19)。该 PCR 产物用 BamHI 和 XhoI 酶切, 编码含有 SEQ ID NO: 44 氨基酸序列的多肽。被消化后的 PCR

产物与用同样酶消化的 pSecTag2B 连接 (Invitrogen, Carlsbad, California)。含有插入的 PCR 产物的 pSecTag2B 构建体编码多肽 SEQ ID NO : 47, 该多肽的氨基端含有鼠 k 链前导序列 (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD) (SEQ ID NO: 16), 羧基端含有用于亲和层析纯化的 myc 决定簇 (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 17) 加组氨酸标记物 (HHHHHH) (SEQ ID NO: 18)。

编码含有 SEQ ID NO: 1 第 17 - 537 位氨基酸的多肽的核酸序列通过消化编码 SEQ ID NO : 43 (如以上所描述) 的核酸序列而获得, 该核酸片段编码含 SEQ ID NO : 45 的多肽。该核酸片段与用 BamHI 和 EcoRV 消化的 pSecTag2B 连接。含有插入的 PCR 产物的 pSecTag2B 构建体编码多肽 SEQ ID NO : 48, 该多肽的氨基端含有鼠 k 链前导序列 (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD) (SEQ ID NO: 16), 羧基端含有用于亲和层析纯化的 myc 决定簇 (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 17) 加组氨酸标记物 (HHHHHH) (SEQ ID NO: 18)。

图 3 显示了这些多肽片段在哺乳动物细胞中的表达, 数据显示这些肽片段可以被分泌到表达这些肽片段的细胞生长的培养基中。图 3 还显示了肽片段在水溶液中可溶。

### 表 1

#### 本发明的附加肽片段的实施例

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1 - 16) 代表信号序列
20	1-100	<b>MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAP</b> NYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQ DLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKD GIYFAATEKSNVVRG
21	101-200	WVFGSTMNNKSQSVIINNSTNVVIRACN FELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGY
22	201-300	QPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINITN FRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLK PTTFMLKYDENGITDAVDCSQNPLAEL KCSVKSFEIDKGIY
23	301-400	QTSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVF NATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLY NSTFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYA DSFVVKGDDVRQIAPG
24	401-500	QTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRN IDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDI SNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGF YTTTGIGYQPYRVVLS
25	501-600	FELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFN FNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVS DFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSVITP GTNASSEVAVLYQD
26	601-700	VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNV FQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGIC ASYHTVSLRSTSQKSIVAYTMSLGADS SIAYSNNTIAIPTNF
27	701-800	SISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDST ECANLLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQD RNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNF SQILPDPLKPTKRSFI
28	801-900	EDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDIN ARDLICAQKFNGLTVLPPLTDDMIAAY TAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAM QMAYRFNGIGVTQNVLYE

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
29	901-1000	NQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGK LQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISS VLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSL QTYVTQQLRAAEI
30	1001-1100	RASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGK GYHLMSFPQAAPHGVVFLHVITYVPSQE RNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGT SWFITQRNFFSPQITTD
31	1101-1189	NTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELDS FKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASV VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGK YEQ
32	1-200	<b>MFIFLLFLTLTSGSDL</b> DRCTTFDDVQAP NYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQ DLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKD GIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQ SVIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSK PMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLD VSEKSGNFKHLREFVFKNKDGLYVYK GY
33	201-400	QPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINITN FRAILTAFSPAQDIWGTSAAA YFVGYLK PTTFMLKYDENGTTTDAVDCSQNPLAEL KCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPSGDVVR FPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERK KISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSA TKLNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAP G
34	401-600	QTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRN IDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDI SNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGF YTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVC GPKLSTDLIKNQCVMFNFNGLTGTGVL PSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTS EILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVAVLY QD

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
35	601-800	VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNV FQTQAGCLIGAEHVDTSYECDPIGAGIC ASYHTVSLLRSTSQKSIVAYTMSLGADS SIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMK TSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCT QLNRALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQM YKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFI
36	801-1000	EDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDIN ARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAY TAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAM QMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQF NKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQN AQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRL DKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLI- RAAEI
37	1001-1189	RASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGK GYHLMSFQAAPHGVVFLHVTYVPSQE RNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGT SWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNCDVVI GIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNH TSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNE VAKNLNESLIDLQELGKYEQ
38	1-400	<b>MFIFLLEFLTLTSGSD</b> LDRCTTFDDVQAP NYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQ DLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKD GIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQ SVIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSK PMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLD VSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFYVYK GYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINI TNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGY LKPTTFMLKYDENGITIDAVDCSQNPLA ELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPSGDV VRFPNTNLCPFGEVFNATKFPSVYAWE RKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGV SATKLNLCFSNVYADSFVVKGDDVRQI APG

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的 氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸 残基 1-16) 代表信号序列
39	1-600	<b>MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAP</b> <b>NYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYL</b> TQ DLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKD GIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQ SVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSK PMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLD VSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYK GYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINI TNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGY LKPTTFMLKYDENGTTTDAVDCSQNPLA ELKCSVKSFEDKGIYQTSNFRVVPSGDV VRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWE RKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGV SATKLNLCFSNVYADSFVVKGDDVRQI APGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWN TRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFE RDISNVFPSPDGKPCPPALNCYWPLND YGFYTTTGIGYQPVRVVLSFELLNAPA TVCGPKLSTDLIKNQCVNENFNGLTGTG VLTSSKRFQPFQQFGRDVSDFTDSVRDP KTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVA VLYQD

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的 氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸 残基 1 - 16) 代表信号序列
40	1-800	<p> <b>MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAP</b>  <b>NYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYL</b><b>TQ</b>  <b>DLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPV</b><b>IPFKD</b>  <b>GIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQ</b>  <b>SVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSK</b>  <b>PMGTQTHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLD</b>  <b>VSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYK</b>  <b>GYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINI</b>  <b>TNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGY</b>  <b>LKPTTFMLKYDENGTTDAVDCSQNPLA</b>  <b>ELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPSGDV</b>  <b>VRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAW</b>  <b>RKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGV</b>  <b>SATKLNLCFSNVYADSFVVKGDDVVRQI</b>  <b>APGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWN</b>  <b>TRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFE</b>  <b>RDISNVFSPDGKPCPPALNCYWPLND</b>  <b>YGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPA</b>  <b>TVCGPKLSTDLIKNCVNFENGLTGTG</b>  <b>VLTPSSKRFQPFQQFGRDVSDFTDSVRDP</b>  <b>KTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVA</b>  <b>VLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYS</b>  <b>TGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPI</b>  <b>GAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYTMSL</b>  <b>GADSSIAYSNTIAIPTNFSISITTEVMPVS</b>  <b>MAKTSVDCNMYICGDSTECANLLQYG</b>  <b>SFCTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFAQV</b>  <b>KQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPT</b>  <b>KRSFI</b> </p>



SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1 - 16) 代表信号序列
41	1-1000	<b>MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAP</b> <b>NYTQHTSSMRGVVYPDEIFRSDTLYL</b> TQ DLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKD GIYFAATEKSNVVVRGWVFGSTMNKSQ SVIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSK PMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLD VSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFYVYK GYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINI TNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGY LKPTTFMLKYDENGITDAVDCSQNPLA ELKCSVKSFEDKGIYQTSNFRVVPSPGDV VRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYawe RKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGV SATKLNLDLCSNVYADSFVVKGDDVRQI APGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWN TRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFE RDISNVFPSPDGKPCPPALNCYWPLND YGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPA TVCGPKLSTDLIKNCVNFENGLTGTG VLTSSKRFQPFQFGRDVSDFTDSVRDP KTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVA VLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYS TGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPI GAGICASYHTVSLRSTSQKSIVAYTMSL GADSSIAYSNNTIAPTNSISITTEVMPVS MAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYG SFCTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFQV KQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPT KRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECL GDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMI AAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIP FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIA NQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVN QNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILS RLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQ QLIRAAEI

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
42	1-1189	<b>MFIFLLFLTLTSGSDL</b> RCTTFDDVQAP NYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYL TQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKD GIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQ SVIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSK PMGTQHTMFDNAFNCTFEYISDAFSLD VSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYK GYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKLPLGINI TNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGY LKPTTFMLKYDENGITDAVDCSQNPLA ELKCSVKSFEDKGIYQTSNFRVVP SGDVVRFNITNLCPFGEVFNA TKFPSVY AWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGV SATKLNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQI APGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWN TRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFE RDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLND YGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPA TVCGPKLSTD LKNQCVNFNFENGLTGTG VLT PSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDP KTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVA VLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYS TGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPI GAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYTMSL GADSSIAYSNN TIAIPTNFSISITTEVMPVS MAKTSDCNMYICGDS TE CANLLLQYG SFCTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFQV KQMYKTP TLKYFGGFNFSQILPDPLKPT KR SFIEDLLFNKVT LADAGFMKQYGECL GDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMI AAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIP FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIA NQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVN QNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILS RLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQ QLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSK RVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHV TYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREG VFVFNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVS GNCDDVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEEL DKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQ KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ
43	17-100	<b>DRCTTFDDVQAP</b> NYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYL TQDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
44	17-200	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYLTDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVVRG WVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACN FELCDNPFPAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGY
45	17-400	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYLTDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVVRG WVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACN FELCDNPFPAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN TLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSQAQDIW GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTT DAVDCSQNPLAELKCSVKSFIDKGIYQ TSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFN ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLVNS TFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADS FVVKGDDVRQIAPG
46	17-600	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYLTDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVVRG WVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACN FELCDNPFPAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN TLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSQAQDIW GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTT DAVDCSQNPLAELKCSVKSFIDKGIYQ TSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFN ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLVNS TFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADS FVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYR YLRHGKLRPFERDISNVFSPDGKPCPTP ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQC NENFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGR DVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVS VITPGTNASSEVAVLYQD

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的 氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸 残基 1-16) 代表信号序列
47	17-800	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYLTLTQDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG WVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACN FELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN TLKPIFKLPLGINITNFRALTAFAQDIW GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTT DAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQ TSNERVVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFN ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLVNS TFFSTFKCYGVSATKLNLCFSNVYADS FVVKGDDVRQIAPGQTGVADYNYKLPD DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYR YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPTP ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCV NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGR DVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVS VITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAI HADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIG AEHVDTSYECDPIGAGICASYHTVSLLR STSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNNTIAP TNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICG DSTECANLLQYGSFCTQLNRALSGIAA EQDRNTREVFAQVKQMYKPTPLKYFGG FNFSQILPDPLKPTKRSFI

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的 氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸 残基 1-16) 代表信号序列
48	17-1000	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYLTLTQDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG WVFGSTMNNKSQSVIIIINNSTNVVIRACN FELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN TLKPIFKLPLGINITNFRAILAFSPAQDIW GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITIT DAVDCSQNPLAELKCSVKSEIDKGIYQ TSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVFN ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLVNS TFFSTFKCYGVSATKLNLDLCSNVYADS FVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYR YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPTP ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCV NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGR DVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVS VITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAI HADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIG AEHVDTSYECDIPGAGICASYHTVSLLR STSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNTIAIP TNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICG DSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAA EQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGG FNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLA DAGFMKQYGECLGDINARDLICAQKFN GLTVLPLLTDDMIAAYTAALVSGTATA GWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV TQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTT TSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLS SNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLI TGRLQSLQTYVTQQLIRAAEI

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的 氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸 残基 1-16) 代表信号序列
49	17-1189	<p>DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP  DEIFRSDTLYLTLQDLFLPFYSNVTGFHTI  NHTFGNPVVPFKDGIYFAATEKSNVVRG  WVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACN  FELCDNPFPAVSKPMGTQHTMIFDNAF  NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV  FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN  TLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFAQAQDIW  GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITIT  DAVDCSQNPLAELKCSVKSFEDKGIYQ  TSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVFN  ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNS  TFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADS  FVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD  DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYR  YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPTPP  ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV  VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNOCV  NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQQFGR  DVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVS  VITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAI  HADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIG  AEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLR  STSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNTIAIP  TNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICG  DSTECANLLQYGSFCTQLNRALSGIAA  EQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGG  FNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLA  DAGFMKQYGECLGDINARDLICAQKFN  GLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATA  GWTFGAGAALQIPFAMQMA YRFNGIGV  TQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTT  TSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLS  SNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLI  TGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLA  ATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSEF  PQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPA  ICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNF  FSPQIITDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYD  PLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLG  DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNES  LIDLQELGKYEQ</p>

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
50	17-276	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG WVFGSTMNNKSQSVIINNSTNVVIRACN FELCDNPFPAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN TLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSQAQDIW GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTT DAV
51	17-446	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYP DEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG WVFGSTMNNKSQSVIINNSTNVVIRACN FELCDNPFPAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN TLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSQAQDIW GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTT DAVDCSQNPLAELKCSVKSFIDKGIYQ TSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFN ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNS TFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADS FVVKGDDVRQLAPGQTGVIADYNYKLPD DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYR YLRHG

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的 氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸 残基 1 - 16) 代表信号序列
52	17-537	<p>DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYP  DEIFRSDTLYLTDLFLPFYSNVTGFHTI  NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG  WVFGSTMNKSQSVIIIINNSTNVVIRACN  FELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAF  NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV  FKNKDGFYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN  TLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFAQDIW  GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTTT  DAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQ  TSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFN  ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNS  TFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADS  FVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD  DFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYR  YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPPP  ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV  VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNCV  NFNFNGLTGTGV</p>



SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
53	17-757 加上 N 端小鼠 K 链前导序列和 C 端 myc 抗原表位以及聚组氨酸标记物	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGDDRCTTF  DDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSD  TLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNP  VIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTM  NNKSQSVIINNSTNVVIRACNFELCDNPF  FAVSKPMGTQTHTMIFDNAFNCTFEYIS  DAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGF  LYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKL  PLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAA  YFVGYLKPTTFMLKYDENGTTTDAVDCS  QNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVV  PSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSV  YAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFK  CYGVSATKLNDLCFSNVYADSFVVKGD  DVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGC  VLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHG  KLRPFERDISNVPFSPDGKPCPPALNCY  WPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFEL  LNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNFNGL  LTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFT  DSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSVITPGTN  ASSEVAVLYQDVNCTDVSTAIHADQLTP  AWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDT  YECDIPGAGICASYHTVSLRSTSQKSIV  AYTMSLGADSSIAYSNTIAIPTNFSISITT  EVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECAN  LLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQEQLKIS  EEDLHHHHHH</p>
54	17-276 加上 N 端小鼠 K 链前导序列和 C 端 myc 抗原表位以及聚组氨酸标记物	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGDDRCTTF  DDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSD  TLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNP  VIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTM  NNKSQSVIINNSTNVVIRACNFELCDNPF  FAVSKPMGTQTHTMIFDNAFNCTFEYIS  DAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGF  LYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKL  PLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAA  YFVGYLKPTTFMLKYDENGTTTDAVEQK  LISEEDLHHHHHH</p>

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
55	17-537 加上 N 端小鼠 K 链前导序列和 C 端 myc 抗原表位以及聚组氨酸标记物	<p>METDTLLLVVLLLVVPGSTGDDRCTTF  DDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSD  TLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNP  VIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTM  NNKSQSVIIIINNSTNVVIRACNFELCDNPF  FAVSKPMGTQHTMIFDNAFNCTFEYIS  DAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGF  LYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKPIFKL  PLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAA  YFVGYLKPTTFMLKYDENGTTTDAVDCS  QNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVV  PSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSV  YAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFK  CYGVSATKLNDLCFSNVYADSFVVKGD  DVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGC  VLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHG  KLRPFERDISNVPFSPDGKPCPPALNCY  WPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFEL  LNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNFNFG  LTGTGV EQKLISEEDLHHHHHH</p>

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
56	17-756 N 端没有信号肽	DRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYYP DEIFRSDTLYLTLQDLFLPFYSNVTGFHTI NHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRG WVFGSTMNKSQSVIINNSTNVVIRACN FELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAF NCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFV FKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFN TLKPIFKLPLGINITNFRAILTAFSQAQDIW GTSAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITIT DAVDCSQNPLAELKCSVKSFIDKGIYQ TSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFN ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNS TFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADS FVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD DFMGCVLA WNTRNIDATSTGNYNKYR YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPP ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNCV NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGR DVSDFTDSVRDPKTSEILDISPCAFGGVS VITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAI HADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIG AEHVDTSYECDIPGAGICASYHTVSLLR STSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNTIAIP TNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICG DSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAA E
57	272-537	ITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFIDKGIY QTSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFN ATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNS TFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADS FVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD DFMGCVLA WNTRNIDATSTGNYNKYR YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPP ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV VLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNCV NFNFNGLTGTGV
58	24-39 D24 肽	DVQAPNYTQH TSSMRGC
59	540-555 P540 肽	PSSKRFQPFQFGRDC

SEQ ID No	相对于 SEQ ID NO : 1 的氨基酸位置	氨基酸序列 黑体表示的氨基酸残基 (氨基酸残基 1-16) 代表信号序列
60	1-16 刺突信号序列	<b>MFIFLLFLTLTSGSDL</b>
61	303-537 含受体结合域	<b>SNFRVVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNA</b> TKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNST FFSTFKCYGVSATKLNLCFSNVYADSF VVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPD DFMGCVLA WNTRNIDATSTGNVNYKYR YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPTP ALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVV VLSFELLNAPATVCGPKLSTD LIKNQCV NFNFNGLTGTGV
62	319-517 含受体结合域	<b>ITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISN</b> CVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQT GVIADYNYKLPDDFMGCVLA WNTRNID ATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISN VPFSPDGKPCPTPALNCYWPLNDYGFYT TTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGP KLST
63	319-518 含受体结合域	<b>ITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISN</b> CVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQT GVIADYNYKLPDDFMGCVLA WNTRNID ATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISN VPFSPDGKPCPTPALNCYWPLNDYGFYT TTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGP KLSTD

### 实施例 6

#### 刺突蛋白的结构

为了弄清 SARS-CoV S 蛋白的特性和功能, 编码全长 Tor2 分离株的核酸被克隆进以上描述的表达载体, 该 Tor2 分离株在 Marra 等发表的 The genome sequence of the SARS-associated coronavirus, Science 300: 1399- 1404 (2003) 上有更多描述。得到的克隆包括含全长 S 蛋白 (1255 个残基)、去除了公认的刺突蛋白的跨膜区和胞质内尾的仅含 S 蛋白的胞外区的氨基端胞外区 Se (残基 17-1189)、含氨基端 276 (SEQ ID NO : 50)、537 (SEQ ID NO : 52) 和 756 (SEQ ID NO :

56)位氨基酸残基(分别为 S276, S537,和 S756)并带有 16 个残基的信号序列或鼠 k 链前导序列的片段及含有第 272 - 537 位残基(SEQ ID NO: 57)的内部片段(S272 - 537)的克隆(见图 1B)。

氨基酸残基 758 - 761 (RNTR)形成以下前体转化酶切割的基序:



其中 X 是任何氨基酸残基,  $n = 0, 2, 4$  或 6。

S1 亚单位几乎包含在 S756 片段中, 大小与鼠冠状病毒 S1 亚单位大小相符, 如 JHM 株, 其 S1 为 769 个残基, 人冠状病毒 OC43 为 778 个残基, 见 Gallagher & Buchmeier, *Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis*, *Virology* 279: 371-374 (2001); Kunkel & Herrler, *Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43*, *Virology* 195 417: 195-202 (1993)。但是, 人冠状病毒 229E 的 S1 被认为由一个较短的含 547 个残基的片段组成, 与 S537 相对应, 见 Bonavia 等, *Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E*, *J. Virol.* 77: 2530-2538 (2003)。

所有 S 糖蛋白片段和全长 S 糖蛋白用 SDS-PAGE 胶电泳时其位置都明显高于它们估计的分子量, 提示这些多肽很可能进行了翻译后修饰。S276 多肽的表观分子量约为 75kDa, S537 的表观分子量约为 100 - 110kDa, S756 的表观分子量约为 130 - 140 kDa, Se 和 S 的表观分子量约为 200 kDa 或更高(图 4 和 6)。这些多肽对应的条带在低曝光的情况下也较宽(图 6; 一些数据未出示)。这些数据提示有明显的糖基化发生, 正如在 S 糖蛋白和其片段上观察到的那样。基于对分子量的大致估计, 似乎 S2 亚单位不如 S756 (构成 S1 亚单位)糖基化的程度高。值得注意的是, 如果糖基化是唯一增加分子重量的因素的话, S276 糖基化程度非常高。

从细胞培养上清中获得的大多数 SARS-CoV 的 S 糖蛋白是未被切割的, 虽然小蛋白形成的弱条带在 SDS-PAGE 胶上能看到。其中

一个弱条带与 S756 在同一位置，提示非有效切割（图 4 和 6）。蛋白酶的随机切割可能发生，需要进一步的研究来确定 S 糖蛋白的切割是否为其功能所必需。

### 实施例 7

#### 大肠杆菌中肽片的表达

编码 SEQ ID NO : 51 肽片段的含 SEQ ID NO : 1 的第 17 - 446 位氨基酸残基的核酸片段被克隆进 pRSET 载体(Invitrogen, San Diego, CA) 构建成质粒 pRSET-S (17- 446)，用 pRSET-S (17- 446)转染大肠杆菌 BL21DE3，用 IPTG 诱导，图 2 显示了诱导的结果。

### 实施例 8

#### 用 T7 启动子驱动被克隆的本发明的肽片的表达

转染前一天，人 293 细胞和猴 Vero E6 细胞在 5ml DMEM+10% FBS 培养基中生长到  $1.2 \times 10^6$  细胞/ T25 培养瓶（60mm 皿），然后根据厂家提供的方法用 Polyfect (Qiagen)转染试剂盒，将含有编码各种刺突蛋白肽片段的插入片段的 pSecTag2B 构建体(各 6  $\mu$ g)转染入细胞，这些构建体的制备如以上所描述。

转染 4 小时后，以 MOI(感染量) 20 的量用一个带有 T7 聚合酶的牛痘病毒转染细胞（见 Fuerst 等，Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 11371 (1986)），这一步骤是为 pSecTag2B 载体上的 T7 启动子提供用途而不是为弱很多的 CMV 启动子(Nussbaum 等, J. Virol., 68 : 5411 (1994) )。感染后 3 小时，1.5ml 新鲜培养基被加入细胞，并将细胞转到 31°C 孵箱中培养。细胞继续培养 24 小时后，收集培养基。

在用任何一种 S 核酸构建体转染的细胞中均未观察到（数据未出示）可测得的病理变化，提示全长的和可溶性 S 糖蛋白片段可能没有明显的细胞毒性作用，然而，高水平表达时这种作用是可能的，并且以下描述的合胞体的形成有可能导致细胞死亡。

### 实施例 9

#### 刺突特异性抗体

用 0.1mg 的由计算机程序对其免疫原性进行了筛选的各种多肽免疫新西兰兔。从新西兰兔获得的血清用 ELISA 和 Western 印迹检测其反应性。由两种肽免疫的兔的血清显示出很高而且特异的抗刺突糖蛋白活性，它们被用于进一步研究。名为 D24 和 D540 的抗体分别由肽 DVQAPNYTQH TSSMRGC (SEQ ID NO : 58) 和 PSSKRFQPFQQFGRDC (SEQ ID NO : 59) 诱导产生。另一个抗 SARS-CoV S 糖蛋白的多克隆抗体 IMG-542, 识别 S 糖蛋白的 288 - 303 氨基酸，从 IMGENEX (San Diego, CA) 购得。

### **实施例 10**

#### **刺突蛋白的免疫沉淀和纯化**

可溶性刺突多肽片段从 Vero E6 或 293 cell 的培养基中获得，但全长的刺突糖蛋白只在细胞裂解物中发现。

收集转染了编码各种可溶性 S 片段的核酸的细胞的培养基，1000 转离心 10 分钟去除细胞残片，澄清的培养基与 Ni-NTA 琼脂糖珠 (Qiagen, Valencia, CA) 或免疫沉淀抗体加糖蛋白 G - 琼脂糖珠 (Sigma, St. Louis, MO) 4°C 孵育 2 小时。然后珠子与同量的 SDS 胶样品缓冲液混合，煮沸 3 分钟，并进行电泳分析。对于全长的 S 糖蛋白，细胞首先用加有 1% NP-40 和 0.5mM PMSF 的 PBS 在 4°C 裂解 1 小时。然后 14000 转/分在台式 Eppendorf 离心机上离心 20 分钟。澄清的裂解液首先用于免疫沉淀或直接用于 Western 印迹。

### **实施例 11**

#### **Western 印迹和狭线印迹**

如上所述表达 S 糖蛋白的细胞首先用基于 PBS 的 NP40 裂解缓冲液裂解，残片用离心方法澄清。对于可溶性 S 片段，收集培养基用上述方法澄清。对狭线印迹，澄清的裂解液和取自上清的培养基根据厂家 (Bio-Rad, Hercules, CA) 提供的方法直接用于在硝酸纤维素膜上印迹，然后如常规 Western 印迹的方法用抗体对膜进行检测。对于 Western 印迹，抗 c-Myc 表位的单克隆抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA)

或获取自用刺突肽免疫的兔的抗刺突蛋白兔多克隆抗体用 TBST 缓冲液稀释, 抗体与膜孵育 2 小时, 洗膜, 然后膜再与结合有 HRP 的第二抗体孵育 1 小时, 洗膜 4 次(每次 15 分钟), 最后用 ECL 试剂(Pierce, Rockford, IL)显色。

### 实施例 12

#### 细胞结合试验和 ELISA

收集含有可溶性 S 片段的培养基, 离心使其澄清。Vero E6 细胞或其他细胞( $5 \times 10^6$ )与 0.5ml 含有可溶性 S 片段的澄清的培养基和  $2 \mu\text{g}$  缀合有 HRP 的抗 c-Myc 表位的抗体  $4^\circ\text{C}$  孵育 2 小时。然后用冰冷的 PBS 洗细胞三次并离心收集细胞。细胞沉淀物与购自 Roche (Indianapolis, IN) 的 ABTS 底物室温下孵育 10 分钟, 离心澄清底物并在  $405\text{nm}$  波长测定其光密度值。

对于 ELISA, 纯化的 ACE2 (R&D, Minneapolis, MN) 以  $100\text{ng}/\text{孔}$  的浓度用  $\text{pH}9.6$  的缓冲液吸附到 Maxisorp ELISA 板上。含有各种可溶性 S 片段的培养基  $154 (150 \mu\text{l})$  和  $0.6 \mu\text{g}$  结合有 HRP 的抗 c-155 Myc 表位抗体加入各孔中  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 小时。洗孔并向各孔中加入  $60 \mu\text{l}$  ABTS 底物, 20 分钟后测定其光密度值 ( $\text{OD}_{405}$ )。

### 实施例 13

#### 荧光染料再分布细胞融合试验

转染了编码 S 糖蛋白的质粒的 HeLa 或 293 细胞, 用 Calcein AM (分子探针) 负载, Calcein AM 在细胞内可转变成 Calcein 绿, 细胞与含有  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  Calcein AM 的培养基在  $37^\circ\text{C}$  和  $5\% \text{CO}_2$  的条件下孵育 1 小时后, 经过洗涤后重悬于新鲜培养基中。接种靶细胞于板中, Vero E6 用 CMAC 浸染, Vero E6 与含有  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  的 CMAC (分子探针) 的培养基在  $37^\circ\text{C}$  和  $5\% \text{CO}_2$  的条件下孵育 1 小时后, 用培养基洗涤细胞两次, 在新鲜培养基中孵育 20 分钟后, 再次洗涤细胞, 然后每孔中加入  $0.5\text{ml}$  培养基。负载有 Calcein 的 S 表达细胞被加入靶细胞中, 在  $37^\circ\text{C}$  和  $5\% \text{CO}_2$  的条件下孵育 1、2 或 4 小时。以双重染色细胞与



接触 S 表达细胞的靶细胞总数之间的比值来衡量细胞融合。用来自 Universal Imaging 的 MethaMorph 4.0 软件进行拍照。

### **实施例 14**

#### **基于 $\beta$ 半乳糖酶报告基因的细胞-细胞融合试验**

293T 细胞 ( $1.5 \times 10^6$ ) 被接种于 T25 培养瓶, 次日, 用 Polyfect 转染试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 根据厂家提供的方法, 分别将 pCDNA3-S、pSectag2B-S、pCDNA3-ACE2 和 pCDNA3-ACE2-Ecto 转入这些细胞中。转染后 4 小时, 转染了 S 构建体的细胞用表达 T7 聚合酶的牛痘病毒转染, 转染了 ACE-2 的细胞用编码  $\beta$ -gal 的牛痘病毒 (VCB21R) 转染。转染后 2 小时, 细胞用新鲜培养基孵育并转入 31°C 孵育过夜。第二天, S 糖蛋白表达细胞和 ACE2 表达细胞以 1:1 的比例混合并在 37°C 孵育。3 小时后, 加入 NP-40 至终浓度为 0.5% 裂解细胞, 细胞裂解液与等量的 CPRG 底物混合, 1 小时后测定其 OD<sub>595</sub>。

### **实施例 15**

#### **哺乳动物细胞刺突多肽的表达**

对某些试验, 除全长 S 糖蛋白的所有蛋白都用 c-Myc 抗原表位和组氨酸标记物标记。用相应的质粒转染 293 和 Vero E6 细胞后表达这些蛋白, 之后用牛痘病毒表达 T7 聚合酶感染。

用抗 c-Myc 单克隆抗体(图 4)检测标记蛋白。如图 4 所示, T7 启动子是表达 S 糖蛋白的高度有效启动子。在这些试验中, T7 启动子产生的表达水平高于 CMV 启动子, 在大多数情况下其为强启动子(图 4A)。如图 4 所示, S 片段是可溶性片段, 它们在培养基上清中的浓度与它们的大小成反比。

### **实施例 16**

#### **抗刺突抗体**

为了能够检测未标记的蛋白, 证实通过抗-c-myc 抗体得到的数据和定位可能的抗原位点, 制备了兔多克隆抗体。这些抗体中的两个,

D24 和 P540, 分别为抗起始于第 24 和第 540 位残基的肽的抗体。D24 和 P540 抗体制剂特异性地识别特定的可溶性片段, (图 4C)。正如期待的那样, D24 识别所有的片段; P540 识别 S756、Se 和 S, 但不识别更小的片段(图 4C, 某些数据未出示)。D24 抗体制剂相对较弱, 而 P540 制剂即使稀释 1:10000 倍也相当敏感, 被广泛应用于这里所描述的实验中。

P540 被用于检测 S 糖蛋白是否在细胞内、细胞外和细胞表面表达。正如图 5 所示, 当用流式细胞仪进行测定时, 全长的 S 糖蛋白在细胞表面有表达, 但表达水平较低。

### 实施例 17

#### 刺突蛋白介导细胞融合

全长的 S 糖蛋白在中性 pH 时介导与表达受体分子的细胞融合, 进行细胞-细胞融合试验来确证全长 S 糖蛋白是功能性的, 来证实 S 蛋白的融合活性是否需要其他病毒蛋白和低的 pH。

用 pCDNA3-S 和 pSectag2B-S 两种载体表达的全长 S 糖蛋白均能有效地导致 ACE2 表达细胞的融合, 通过各种大小的合胞体的形成和基于  $\beta$ -gal 报告基因的试验(图 7)即可证实。有趣的是, S 糖蛋白的前导序列被鼠 k 链前导序列取代的 pSectag2B-S 构建体诱导合胞体形成较快, 而且, 形成的合胞体较编码天然的 S 糖蛋白的 pCDNA3-S 诱导的大且数量更多(数据未出示)。通过基于报告基因试验检测, pSectag2B-S 表达的 S 蛋白诱导融合的程度也较 pCDNA3-S 诱导的高(图 7B)。这些数据提示天然的 S 糖蛋白可能不能被有效地转送到细胞表面。这些研究也提示, 这里所描述的  $\beta$ -gal 试验可以被用作鉴别抑制 SARS-CoV 进入细胞的抑制剂的快速并定量的方法, 同时也可被用作研究 SARS-CoV 进入细胞的机理的工具。

注意, 当细胞没有用 ACE2 表达质粒转染, 只表达天然浓度的受体时, 用  $\beta$ -gal 试验或合胞体形成试验均未能检出 Vero E6 细胞的融合。为了弄清这种结果是否由于这两个试验的敏感性太低所致,

又启用了另一个试验。这个新试验是基于荧光染料的再分布试验，能够检测出单个细胞融合。即使用基于荧光染料的试验，也未发现转染了编码全长 S 糖蛋白的细胞和各种阴性对照之间有明显的统计学差异。一些阴性对照包括了在低 pH 条件下转染编码可溶性 S 片段（数据未出示）。明显的细胞-细胞融合只有当细胞转染了编码 ACE2 的质粒才能检测到，提示通过重组 ACE2 而致的受体高水平表达可能对于细胞融合是关键的。总的来讲，这些结果提示重组的 S 糖蛋白能够介导细胞融合，融合可以在中性 pH 时发生，并且融合的效率取决于受体分子的浓度。

更进一步，可溶性 S 糖蛋白片段抑制 S 介导的细胞融合。正如图 15 所示，加入含有以下描述的受体结合区的 S 片段 S272-537 和 S17-537，抑制 S 介导的细胞融合。在本试验中，S272-537 (SEQ ID NO:57) 片段最具抑制力。不含受体结合区的 S17-276 片段只有很小的或无抑制 S 介导的细胞融合作用。这些数据提示含有受体结合区的 S 多肽片段可能抑制 SARS-CoV 与细胞的融合，进而抑制或预防细胞感染。

这样，用抗-RBD 抗体、S 多肽、S 肽或适体阻断、操纵或抑制刺突蛋白受体结合区的活性，可以有效地预防和治疗 SARS-CoV 感染。

### **实施例 18**

#### **刺突蛋白受体结合区的鉴别**

本实施例阐明了刺突蛋白的受体结合区定位于第 272-537 位残基 (SEQ ID NO:57) 和可能定位于第 303-537 位残基 (SEQ ID NO:61)。后面的实验表明含有 319-517 残基的片段 (SEQ ID NO:62) 也有受体结合活性。

一个基于将各种可溶性片段结合到表达受体的 Vero E6 细胞的实验被建立起来，以定位 S 糖蛋白的受体结合区 (RBD)。该试验涉及到测定抗 S 多肽的抗体结合到 Vero E6 细胞有关的荧光，并在鉴别

SARS-CoV 的受体之前开展。对 SARS-CoV 易感的 Vero E6 细胞与全长的 S 多肽和各种可溶性 S 片段孵育，几种对 SARS-CoV 不易感的细胞同样也与全长的 S 多肽和它的可溶性片段孵育。正如图 8A 和 8B 所示，所有 S 片段都与 Vero E6 细胞结合，除了最小的一个 S 片段 (S276) 外。当几个对 SARS-CoV 不易感的细胞系与全长的 S 多肽和它的可溶性片段孵育时没有检出这样的结合。与 Vero E6 细胞的结合与片段表达的水平成正比，与片段的大小成反比。这些发现提示 RBD 位于第 272 和 537 位残基之间。

为了进一步定位 RBD，一个用含有 288 - 303 残基的肽产生的抗体 (IMG542) 被使用。该抗体不抑制 S537 与 Vero E6 细胞的结合，虽然它确实能与 S537 片段结合 (图 8B，一些数据未出示)，提示 RBD 位于 303 和 537 之间。因为抗体相对较大和立体阻碍的缘故，很有可能 RBD 位于 303 残基的下游。最近，HCoV-299E 的 RBD 位于一个含有氨基酸残基 407-547 的片段上，见 Ksiazek 等. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *N. Engl. J. Med.* 348 : 1953-1966 (2003); Rota 等 Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *Science* 300: 1394-1399 (2003)。相比之下，鼠肝炎病毒的 RBD 定位于 N 端 330 氨基酸。

含 RBD 的 SARS-CoV S1 糖蛋白片段 (如，S272-537) 和 HCoV-229E 或肝炎病毒的 RBD 之间是否存在结构上的相似，并且这种相似是否关系到用相同宿主进行复制还需进一步研究。这两种病毒使用不同的受体。这里描述的简单直接的细胞结合方法也可能对鉴别其他的病毒受体有帮助。

最近，研究人员已经对 ACE2 作为 SARS-CoV 功能性受体的鉴定进行了报道，见 Li 等 Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus, *Nature* 426: 450-54 (2003)。ACE2 作为受体的鉴定进一步证实了以上提供的结果是正确的。正如图 8C

所示, 当纯化的 ACE2 被用于 ELISA 以测定结合时, 观察到与细胞结合试验相同的结合模式, 所有的被测试的 S 片段都是如此。

这里展示的结果不仅提供了研究 SARS 病毒进入细胞的新工具, 证实了 ACE2 是 SARS-CoV S1 糖蛋白的受体和定位了 RBD, 而且为开发新的疫苗免疫原及预防和治疗 SARS 的药物提供了方便。

### 实施例 19

#### S 糖蛋白的 N 末端和 C 末端寡聚反应

本实施例阐述了 S 糖蛋白的在 RBD 上游的极远端 N 末端片段可能在融合中发挥了作用, 并且 S 胞外区形成的三聚体可能通过 6-螺旋束中间体介导融合。

#### **材料和方法**

**抗体和质粒:** 用于 Western 和 FACS 分析的兔抗-S 血清 P540 由发明者按以上描述的方法制备, 也见 Xiao 等 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312: 1159-65 (2003)。抗 Myc 表位抗体从 Invitrogen (Carlsbad, CA) 购得。抗 ACE2 山羊多克隆抗体从 R&D system (Minneapolis, MN) 购得, 用于 Western 印迹检测。

定点突变技术被用于在 pCDNA3 上的全长 SARS-CoV S 糖蛋白上制造一个与 HIV-1 胞膜糖蛋白 (Env) 和某些冠状病毒一致的共有切割位点, 根据厂家提供的方法用从 Stratagene (La Jolla, CA) 购得的 Quick Change 试剂盒来进行。对于各种 N 端 S 片段的表达, 对应的基因片段用 PCR 扩增后克隆进 pSecTag2 表达载体 (Invitrogen, Carlsbad)。表达带有 C9 肽的 ACE2 可溶性胞外段的 pCDNA3-ACE2-ecto 由 Michael Farzan (Harvard University, Boston MA) 友情赠送。

**蛋白表达和纯化:** S 糖蛋白的各种 N 端片段被亚克隆进 pSecTag2 表达载体, 转染入 293T 细胞, 继之用 VTF7.3 感染, 正如 Xiao 等在 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312: 1159-65 (2003) 中所描述。表达并分泌进入培养基的蛋白用 HiTrap Ni<sup>++</sup>-Chelating 柱在天然条件下纯化。纯化的蛋白经 PBS 透析后保存, 用作进一步分析。

通过免疫共沉淀检测 S 糖蛋白的二聚体化和其与 ACE2 的相互作用：对于 S 片段的二聚体化，不同的 S 糖蛋白构建体，单独或联合转染入 293T 细胞，正如 Xiao 等在 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312: 1159-65 (2003)中所描述。含有 S 片段的培养基用于与兔抗 S 多克隆抗血清 P540 进行免疫沉淀试验。对于一些免疫共沉淀试验，加入 DTT 创造一个还原条件，以排除分子间通过二硫键相互作用。免疫沉淀的 S 片段用抗 Myc 表位单克隆抗体通过 Western 来检测。可溶性 ACE2-C9 的表达很相似，表达进入培养基的 ACE2-C9 直接用于与各种 S 片段在 4℃ 条件下孵育 2 小时。继后，ACE2 通过与抗 C9 单克隆抗体和蛋白 G-琼脂糖珠在 4℃ 条件下孵育 1 小时进行免疫沉淀。琼脂糖珠用 PBS 洗涤 4 次，悬于 SDS-PAGE 样品缓冲液，煮沸 3 分钟后用于胶分离。样品中存在的 ACE2 或 S 用 Western 来检测，正如 Xiao 等在 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312: 1159-65 (2003)中所描述的那样。

**流式细胞仪检测:** 转染了全长 S 糖蛋白或各个 N 端缺失的 S 糖蛋白，并用 VTF7.3 感染了细胞与 P540 兔抗 S 多克隆抗体和结合了 FITC 的山羊抗兔抗体在含有 1% BSA 的 PBS 中 4℃ 孵育 2 小时，然后用冰冷 PBS 洗涤细胞 4 次，用 FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, California)进行分析。

**S 片段的胶过滤分析:** 通过 HiTrap Ni-Chelating 柱纯化、缓冲液被置换成 PBS 后，将 S 片段上样到已用 PBS 平衡过的 Superose 12 10/300 GL 柱(Pharmacia, Uppsala, Sweden)上，蛋白用 PBS 在 0.5ml/分的流速下洗脱，以 0.5ml 量收集洗脱组分。该 Superose 12 柱用蛋白分子量标准 669,440, 232,158, 67,44 和 25 kD 进行标定。从各组分中取 10μl 用于 Western 印迹分析。

**交联:** 纯化的 S537 片段用 PBS 稀释至 0.2μg/ml 的浓度，BS<sup>3</sup> (Pierce, Rockford, IL)被加入到 S537 溶液中至终浓度为 1mg/ml,并在冰上孵育 1 分钟。样品然后与等量的 4XSDS-PAGE 上样缓冲液混合，用 Western

进行分析。

细胞融合 $\beta$ -gal 报告基因试验: 转染了 pSecTag2B-S 或 pCDNA3-ACE2 并且分别用 VTF7.3 和 VCB21R 感染的细胞用胰酶消化, 用 PBS 洗涤一次, 细胞然后被悬于 pH7.4 的常规 DMEM 培养基中, 混合。经 4 小时孵育后裂解细胞, 用 CPRG 测定 $\beta$ -gal 活性, 正如 Xiao 等在 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312: 1159-65 (2003) 中所描述的那样。

ELISA: 两种 ELISA 方法被使用。在三明治 ELISA 中, ELISA 板用抗-His 标记物的抗体包被, 然后 S 片段被加入板中, 并用抗 c-Myc 表位抗体检测。这一方法被用于检测 S 片段。在第二种 ELISA 方法中, 通过抗 C9 抗体将带有 C9 标记的 ACE2 包被在板上, 然后加入 S 片段, 经洗板后, 用抗 c-Myc 表位抗体进行检测。所有实验中与抗 c-Myc 表位抗体的孵育为室温 2 小时。测定 OD 值并正态化至最大值。

## 结果

S 糖蛋白 RBD 上游的 N 端片段形成二聚体。以前已证明另一个冠状病毒(MHV)的可溶性 S1 (类似 SU) 片段形成二聚体, N 端最远端的含有受体结合区的 330 个氨基酸残基参与了二聚体化, 只有二聚体才能与 CEACAM 结合, 见 Lewicki & Gallagher, *J. Biol. Chem.* 277: 19727-34 (2002)。然而, 本发明者和其他人已将 SARS-CoV 的受体结合区定位在了 N 端极远端的下游, Xiao 等 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312: 1159-65 (2003); Wong 等 *J. Biol. Chem.* 279: 3197-3201 (2004); Babcock 等 *J. Virol.* 78: 4552-4560 (2004)。

为了探索含受体结合区片段的寡聚化反应的可能性和检测其在介导膜融合中的功能, 对几个 S 片段的寡聚化反应进行了检测。这些 S 片段包括了不与受体 ACE2 结合的 N 端极远端的片段 (残基 17 到 276, 名为 S276, SEQ ID NO: 50) 和含有第 319 到 517 残基并保留有受体结合活性的片段 (名为 S319-517, SEQ ID NO: 62)。选择这些片段部分是因为它们能独立折叠并分泌到细胞培养上清中, 尽

管它们的表达效率有明显差异（图 9A，左边），且当与 S756 共表达时它们的浓度会降低（图 9A，右边）。

为了发现是否这些片段与含有相当于包膜糖蛋白的受体结合亚单位（一般为 SU，冠状病毒为 S1）的最大片段（S756）发生寡聚反应，共表达这些多肽片段，然后将细胞培养上清中的混合物用 P540 进行免疫沉淀。正如前面例子所述，本兔多克隆抗体制剂是制备来抗 S 糖蛋白上含 540 到 555 位残基的肽（SEQ ID NO: 59）的。P450 抗体与 S756 多肽结合但不与其他多肽结合（图 9B，左边）。所有含受体结合区的 N 端片段除最小的片段(S319-517)外，均能够与 S756 通过 P540 发生免疫共沉淀（图 9B，右边）。为了排除因二硫键形成引起免疫共沉淀的非特异性反应的可能，DTT 被加入了其中的一个免疫共沉淀实验，DTT 对分泌的 S756（左道）或 S756 + S276（右道）的免疫沉淀或免疫共沉淀无影响（图 9C，左边组）。

为了弄清寡聚体的大小，其中一个片段（S537）与 BS<sup>3</sup> 交联。图 9C 右边组显示新出现的条带的分子量与二聚体一致，而与更高级别的寡聚体不符。为排除交联引起的假相的可能并进一步确证二聚体形成，S537 片段也用胶过滤法进行了分析，观察到两个胶过滤的洗脱峰：一个峰由分子量约为 230kDa 的物质引起，另一个由 110 kDa 的物质引起，分别与二聚体和单体的一致。形成对照的是，洗脱下来的含有受体结合区的最小片段（S319 - 517）只有单体，分子量约为 35kDa（图 2A，下组）。总的来讲，这些结果提示可溶性 SU 为二聚体，二聚体化的区域在 N 端极远端 317 残基的上游和受体结合区之内。

二聚体化的 N 端区为 S 介导的细胞-细胞融合所必需。因为推测的二聚体化区域在 S1 的受体结合区的上游，而融合机制在 S2 内，人们会假设二聚体化并不是介导融合所需要的。为了验证这一假设，制备了两个全长 S 糖蛋白的缺失突变子，N 端 103 个残基从一个片段上缺失，N 端 311 个残基从另一个片段上缺失（图 9A），这样，



去除了推测的二聚体化区域。两个突变子与具有融合活性的野生型全长 S 糖蛋白相比无一显示出融合活性（图 9A）。为了检测是否因表达水平的差异导致了可观察到的融合活性的缺失，用流式细胞仪和 Western 印迹对表面及总表达水平进行了测定，从两个实验获得的数据提示两个缺失突变子与野生型的表达水平无明显区别（图 11B 和 C）。这些结果提示 N 端极远端通过可能涉及或不涉及到二聚体化的机理为融合所必需。

二聚体化的 S1 与 ACE2 的结合远比含受体结合区的单体有效。以前对另一个冠状病毒（MHV）的研究提示只有二聚体化的 S1 与它的受体 CEACAM 结合，Lewicki & Gallagher, *J. Biol. Chem.* 277: 19727-734 (2002)。用 SARS-CoV 片段进行实验以弄清二聚体状态下的 S1 如何影响融合。具体的说，通过使用抗 c-Myc 表位抗体来将单价 S1 片段转化成双价来观察单价或双价形式的 S1 片段与 ACE2 的结合。这些 S1 片段的其中之一（S319-517, SEQ ID NO: 62）与固化于表面的 ACE2 无任何可测到的结合，除非其与抗 c-Myc 表位抗体结合后，该抗体在其与受体孵育之前和之中在溶液中将其转化成双价分子（图 12）。形成对比的是，S537 在没有抗体存在时与 ACE2 结合，虽然抗体的存在增强其结合力（图 12）。这些结果提示 S1 的二聚体状态可能通过增强总的结合力从而提高融合效率。

可溶性 S 胞外区为三聚体。I 类融合蛋白的病毒胞膜糖蛋白如流感病毒的血凝素（HA）通过跨膜区形成三聚体。因为 SARS-CoV S 糖蛋白最近被认为属 I 类融合蛋白，S2 亚单位可能主导整个 S 糖蛋白的三聚体化。然而，带有三聚体化的 S2 的二聚体化 S1 可能导致更高级别的寡聚体，它们的形成取决于天然 S 蛋白上可用的二聚体化结合位点。为了检测这种可能性，去除了跨膜区和胞质内段的可溶性胞外区（Se）的大小用胶过滤法进行了估计，正如图 13 所示，一个大小接近三聚体（MW 512kDa）的复合物被检出，没有发现有更高级别的寡聚体。这些结果不仅提示 Se 片段及也许全长的膜相关

S 在天然未结合状态为三聚体，而且显示 S1 的二聚体化位点不太容易被用于三聚体间的相互作用。

这些结果有以下提示：1) SARS-CoV S 糖蛋白 (S1) 的 SU 亚单位形成二聚体，2) 二聚体化区不重叠，并且在受体结合区的上游，3) 去除二聚体化区即阻断融合，4) 二聚体化的 S1 结合受体分子的效率远较含有受体结合区的单体片段强，5) 可溶性的 S 胞外区在胶过滤条件下形成三聚体。

以前已有报道，某些 I 类融合蛋白（与受体分子结合的蛋白）的 SU 亚单位能够形成二聚体，包括，例如逆转录病毒的 HIV-1 的 gp120 和 S1 冠状病毒 MHV 的 S1。Center 等 *J. Virol.* 74: 4448-55 (2000)；Lewicki 等 *J. Biol. Chem.* 277: 19727-34 (2002)。直到本研究，S1 二聚体化在介导膜融合中的作用是不清楚的，现在，可溶性胞外区如 HIV-1 的 gp140 和 SIV 的胞膜蛋白 (Env) 形成三聚体已被普遍接受，虽然也可观察到二聚体和四聚体。Center et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A.* 98: 14877-82 (2001)。类似，至少一个包括 SARS-CoV 的 S2 的冠状病毒的可能的融合中间体 4 级结构为三聚体。Liu et al. *Lancet* 363: 938-947 (2004)；Bosch et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A.* 101: 8455-60 (2004)。形成对比的是，某些数据提示 MHV 的 S2 在与 S1 分离后是单体。Lewicki 等 *J. Biol. Chem.* 277: 19727-34 (2002)。二聚体到三聚体的转化在 II 类融合蛋白介导的融合中发挥着关键作用。这样，有人认为一些冠状病毒的四级结构的改变可能在融合机理中发挥了作用。人们应该注意到 HIV-1 的 Env 和 MHV 的 S 糖蛋白均被切割，SU 亚单位可从跨膜亚单位分离，然而，这种分离可能对融合不重要。形成对照的是，SARS-CoVd 的 S 当表达为膜相关时不被切割，或可溶形式和切割不是融合所必需。这样，虽然 SARS-CoV 的 S 糖蛋白为 I 类融合蛋白，对于 I 类融合蛋白的 Env 推测被切割后转化为亚稳定的高能状态以驱动融合反应的法则来说，不被切割是一个例外。

有关 SARS-CoV 的 S 糖蛋白的 SU (S1) 区能够形成二聚体并且

与跨膜区的胞外段 (S2) 形成三聚体的发现展示了一个有趣的拓扑学情形, 假如三聚体中的两个单体也形成二聚体, 那么第三个单体仍然是自由的可以与另一个三聚体中的自由单体反应形成两个三聚体间的二聚体。另外一种状况是三聚体中的各单体的方向不允许在三聚体中形成二聚体, 留出自由结合位点与其他三聚体中的单体形成二聚体。在这种情况下, 人们可以期待一个网状的三聚体的形成。最后一种状况是三聚体的三维结构可能不允许任何单体的二聚体化位点与同一个或不同的三聚体之间的单体相互反应。后一种可能得到这里提供的初步数据的支持, 即在所述的胶过滤条件下, 未检出有高级别的寡聚体。在那些条件下, 要么三聚体内形成二聚体, 但单体的构型不允许与其他三聚体的单体相互反应, 或这样的反应太弱不足以本检测出来, 或三聚体的三维结构不允许二聚体化反应的发生。

这里提供的数据证明在删除部分二聚体化区后融合不能发生, 提示二聚体化区可能在融合中起作用, 虽然其机理可能不是通过二聚体化反应。另外, 在天然条件下, 表面 S 糖蛋白的浓度会很高, 正如在显微照像中所见, 有可能二聚体化反应在稳定相互作用的分子的“网”中起作用, 也许有些类似介导 II 类融合蛋白进入的蛋白网。这样的网, 如果有的话, 可能增加与受体分子相互作用的亲和力, 并且通过事前集合的胞膜分子网促成融合孔结构的形成, 或甚至在缺乏产生高能亚稳定状态的 S 切割的情况下提供驱动融合反应的能量。

### 实施例 20

#### 用编码 RBD 多肽的 DNA 免疫小鼠获得的血清抑制 S 介导的细胞融合

本实施例表明用编码受体结合区多肽的 DNA 免疫哺乳动物可预防 SARS 感染。

**材料和方法:**

小鼠被分为 3 组: A 组小鼠从 1 # 到 5 # 用编码含刺突蛋白的受体结合区的 S319-518 片段的质粒 pSecTag-SRBD 免疫; B 组 1 # 到 5 # 小鼠用编码与 Fc 融合的 RBD(S319-518)片段的融合蛋白的 pEAK-10-RBD-Fc 免疫; C 组 1 # 到 3 # 鼠用对照质粒免疫。各组的 5 只 BALB/C 鼠分别在 0 天、14 天和 28 天免疫。小鼠用基因枪进行免疫, 每次剂量低于  $2\mu\text{gDNA}$ 。第 56 天采集血清。在图 14A-B 中, 第一个数字代表小鼠个体, 字母代表各自的免疫组, 最后的数字代表所用稀释度。

细胞(293T)与来自被免疫的小鼠的抗血清孵育, 然后与表达 S 蛋白的细胞混合。融合用前面的例子中描述的方法进行测定(也见, Xiao 等 BBRC 2003)。PC 代表未加血清的阳性对照, 对各组的 1 # 到 2 # 鼠, 所用稀释系数为 10、100 和 1000, 对 A 组、B 组和对照组的 3 # 鼠, 所用稀释系数为 20 和 100。

## 结果

从小鼠获得的抗血清的抗体滴度见图 14A。如图所示, 用编码刺突蛋白受体区(S319-518, A 组 和 B 组)DNA 免疫的小鼠的抗体滴度非常高, 用于 ELISA 时稀释至 1: 7250 仍与抗原有很强的反应。

正如图 14B 所示, 从用编码刺突蛋白受体结合区的 DNA 免疫的小鼠获得的抗血清抑制表达有 S 蛋白的细胞的融合, 并呈剂量依赖关系。这样, 来自 1A 和 2A, 即用编码 S 的受体结合区 DNA 免疫的小鼠的抗血清, 当用 1:10 稀释时, 明显抑制 S 蛋白介导的细胞融合。更高稀释度(1: 100 和 1: 1000)时, 该抗血清的效果降低。在从来自小鼠 3A(1: 20 稀释), 小鼠 4A (1: 20 稀释), 和小鼠 5A (1: 20 稀释)的抗血清对细胞融合的抑制上也观察到类似结果。

这些数据提示用编码 S 蛋白受体结合区的多肽的 DNA 免疫哺乳动物能诱导出很强的抗刺突蛋白的免疫反应并可预防 SARS 感染。正如以上所述, 可溶性的含有受体结合区的 S 糖蛋白片段抑制 S 介导的细胞融合(见图 15)。

## 参考文献

- D. S. Dimitrov, Cell biology of virus entry, *Cell* 101 (2000) 697-702.
- D. S. Dimitrov, Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 109-122.
- K. V. Holmes, SARS-associated coronavirus, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1948-1951.
- M. M. Lai, D. Cavanagh, The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Res.* 48 (1997) 1-100.
- T. G. Ksiazek, D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J. A. Comer, W. Lim, P. E. Rollin, S. F. Dowell, A. E. Ling, C. D. Humphrey, W. J. Shieh, J. Garner, C. D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J. Y. Yang, N. Cox, J. M. Hughes, J. W. LeDuc, W. J. Bellini, L. J. Anderson, A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1953-1966.
- P. A. Rota, M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Li, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, W. J. Bellini, Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *Science* 300 (2003) 1394-1399.
- M. A. Marra, S. J. Jones, C. R. Astell, R. A. Holt, A. Brooks-Wilson, Y. S. Butterfield, J. Khattra, J. K. Asano, S. A. Barber, S. Y. Chan, A. Cloutier, S. M. Coughlin, D. Freeman, N. Giron, O. L. Griffith, S. R.

- Leach, M. Mayo, H. McDonald, S. B. Montgomery, P. K. Pandoh, A. S. Petrescu, A. G. Robertson, J. E. Schein, A. Siddiqui, D. E. Smailus, J. M. Stott, G. S. Yang, F. Plummer, A. Andonov, H. Artsob, N. Bastien, K. Bernard, T. F. Booth, D. Bowness, M. Czub, M. Drebot, L. Fernando, R. Flick, M. Garbutt, M. Gray, A. Grolla, S. Jones, H. Feldmann, A. Meyers, A. Kabani, Y. Li, S. Normand, U. Stroher, G. A. Tipples, S. Tyler, R. Vogrig, D. Ward, B. Watson, R. C. Brunham, M. Kraiden, M. Petric, D. M. Skowronski, C. Upton, R. L. Roper, The genome sequence of the SARS-associated coronavirus, *Science* 300 (2003) 1399-1404.
- T. M. Gallagher, M. J. Buchmeier, Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis, *Virology* 279 (2001) 371-374.
- F. Kunkel, G. Herrler, Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43, *Virology* 195 (1993) 195-202.
- A. Bonavia, B. D. Zelus, D. E. Wentworth, P. J. Talbot, K. V. Holmes, Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E, *J. Virol.* 77 (2003) 2530-2538.
- W. Li, M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe, M. Farzan, Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus, *Nature* 426: 450-54 (2003).
- P. L. Earl, B. Moss, Mutational analysis of the assembly domain of the HIV-1 envelope glycoprotein, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 9 (1993) 589-94.
- R. J. Center, P. Schuck, R. D. Leapman, L. O. Arthur, P. L. Earl, B. Moss, J. Lebowitz, Oligomeric structure of virion-associated and soluble forms of the simian immunodeficiency virus envelope protein in the prefusion activated conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98

(2001) 14877- 14882.

- R. J. Center, P. L. Earl, J. Lebowitz, P. Schuck, B. Moss, The human immunodeficiency virus type 1 gp120 V2 domain mediates gp41-independent intersubunit contacts, *J. Virol.* 74 (2000) 4448-4455.
- D. N. Lewicki, T. M. Gallagher, Quaternary structure of coronavirus spikes in complex with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule cellular receptors, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19727-19734.
- B. Tripet, M. W. Howard, M. Jobling, R. K. Holmes, K. V. Holmes, R. S. Hodges, Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core, *J Biol. Chem.* 279 (2004) 20836-20849.
- J. Zhu, G. Xiao, Y. Xu, F. Yuan, C. Zheng, Y. Liu, H. Yan, D. K. Cole, J. I. Bell, Z. Rao, P. Tien, G. F. Gao, Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (2004) 283-288.
- B. J. Bosch, B. E. Martina, Z. R. van der, J. Lepault, B. J. Haijema, C. Versluis, A. J. Heck, R. de Groot, A. D. Osterhaus, P. J. Rottier, Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101 (2004) 8455-8460.
- S. Liu, G. Xiao, Y. Chen, Y. He, J. Niu, C. R. Escalante, H. Xiong, J. Farmer, A. K. Debnath, P. Tien, S. Jiang, Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors, *Lancet* 363 (2004) 938-947.
- B. J. Bosch, Z. R. van der, C. A. de Haan, P. J. Rottier, The coronavirus

spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex, *J. Virol.* 77 (2003) 8801- 8811.

H. Bisht, A. Roberts, L. Vogel, A. Bukreyev, P. L. Collins, B. R. Murphy, K. Subbarao, B. Moss, Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101 (2004) 6641-6646.

G. J. Babcock, D. J. Eshaki, W. D. Thomas, Jr. , D. M. Ambrosino, Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor, *J. Virol.* 78 (2004) 4552-4560.

G. Simmons, J. D. Reeves, A. J. Rennekamp, S. M. Amberg, A. J. Piefer, P. Bates, Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101 (2004) 4240-4245.

S. K. Wong, W. Li, M. J. Moore, H. Choe, M. Farzan, A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3197-3201.

这里引用或提到的所有的专利和出版物代表着与本发明有关的本领域技术人员的技术水平，作为参考的各专利或出版物通过引用结合到本文中，其程度与通过引用以其整体单独结合到本文或以其整体列于本文相同。申请者保留在此说明中引述任何这些提到的专利或出版物的任何和所有材料和信息权利。

这里所述的特殊方法和组合物为代表性优选实施方案，是示例性的，无意作为对本发明范围的限制。当本领域的技术人员在研究本说明时产生的其他的目的、方向和实施方案，正如权利要求的权



限中所定义，被本发明的精神所涵盖。本领域的技术人员应该相当清楚地知道，对这里公开的发明的各种取代和修改不偏离本发明的范围和精神。这里解说性地描述的本发明可能适于在缺乏这里没有作为要素公开的任何元素或某些元素、或任何限制或某些限制的情况下实施。这里解说性地描述的方法和过程可能适于用不同次序的步骤实施，它们不必拘泥于这里提到的或权利要求中的步骤次序。正如用于这里和附加的权利要求中的“一”、“一个”和“所述”，除非文中特别指明，包括一或多的含义。例如，“一个宿主细胞”的内容包括了多个这种细胞的（例如培养物和群体）和类似情况。在任何情况下本专利都不能被解释为限于这里具体公开的特殊例子或实施方案。在任何情况下本专利都不能被解释为受限于专利和商标局的任何审查员、官员或雇员的申明，除非这样的申明被申请人特别地、无条件无保留地以书面形式表示采纳。

所用术语和表达被用作描述性术语而非限制性术语，这里无意用这些术语和表达来将所展示和描述的特征的等同物或等同物的某部分排除在外，但是，正如所主张的，应该认可在本发明范围内的各种修改是可能的。这样，虽然本发明通过优选的实施方案和可选性特征被具体公开，本领域的那些技术人员可能会谋求对这里公开的概念的修饰和改变，这样的修饰和改变被认为在本发明的涵盖范围内，正如附加权利要求中所定义的那样。

这里对本发明进行了宽泛地、一般性地描述，各种在本一般性公开范围内的较窄的和次一般性的描述也构成本发明的一部分。这包括带有附加条件或从上位概念中去除任何主题的否定性限制的本发明的一般性描述，无论被摘除的材料是否在此有具体叙述。

其他实施方案在以下的权利要求中。另外，当本发明的特征或方面以 Markush 组来描述时，那些本领域的技术人员应该意识到本发明也以 Markush 组的任何个体成员或亚组成员来描述。

<110> 美国政府卫生及公众服务部国家卫生协会(National Institutes of Health)

D. S. 迪米特罗夫(Dimitrov, Dimiter S.)

X. 肖(Xiao, Xiaodong)

<120> SARS 冠状病毒刺突糖蛋白的可溶性片段

<130> 1662.024W01

<150> US 60/489,166

<151> 2003-07-21

<150> US 60/524,642

<151> 2003-11-25

<160> 65

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1255

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 1

```

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu
 1           5           10           15
Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln
           20           25           30
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg
           35           40           45
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser

```





Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 705                               710                               715                               720  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
                                   725                               730                               735  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
                                   740                               745                               750  
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys  
                                   755                               760                               765  
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe  
                                   770                               775                               780  
 Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile  
 785                               790                               795                               800  
 Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met  
                                   805                               810                               815  
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile  
                                   820                               825                               830  
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr  
                                   835                               840                               845  
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala  
                                   850                               855                               860  
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe  
 865                               870                               875                               880  
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn  
                                   885                               890                               895  
 Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala  
                                   900                               905                               910  
 Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly  
                                   915                               920                               925  
 Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu  
                                   930                               935                               940  
 Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn  
 945                               950                               955                               960  
 Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp  
                                   965                               970                               975  
 Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln  
                                   980                               985                               990  
 Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala  
                                   995                               1000                               1005  
 Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe  
                                   1010                               1015                               1020  
 Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His

1025                    1030                    1035                    1040  
 Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn  
                           1045                    1050                    1055  
 Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro  
                           1060                    1065                    1070  
 Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln  
                           1075                    1080                    1085  
 Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val  
                           1090                    1095                    1100  
 Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr  
 1105                    1110                    1115                    1120  
 Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys  
                           1125                    1130                    1135  
 Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser  
                           1140                    1145                    1150  
 Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu  
                           1155                    1160                    1165  
 Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu  
                           1170                    1175                    1180  
 Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu  
 1185                    1190                    1195                    1200  
 Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu Leu  
                           1205                    1210                    1215  
 Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys Ser Cys  
                           1220                    1225                    1230  
 Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys  
                           1235                    1240                    1245  
 Gly Val Lys Leu His Tyr Thr  
                           1250                    1255

<210> 2

<211> 3768

<212> DNA

<213> SARS 冠状病毒

<400> 2

atgtttattt tcttattatt tcttactctc actagtggtg gtgaccttga cgggtgcacc        60  
 acttttgatg atgttcaagc tcctaattac actcaacata cttcatctat gagggggggt        120  
 tactatcctg atgaaatfff tagatcagac actctttatt taactcagga tttatttctt        180  
 ccattttatt ctaatgttac agggtttcat actattaatc atacgtttgg caaccctgtc        240  
 atacctttta aggatgggat ttattttgct gccacagaga aatcaaatgt tgtccgtggt        300

tgggtttttg gttctacat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat taacaattct	360
actaatgttg ttatacgage atgtaacttt gaattgtgtg acaaccotth ctttgcgttt	420
tctaaacca tgggtacaca gacacatact atgatattcg ataatgcatt taattgcact	480
ttcagagtaca tatctgatgc cttttcgctt gatgtttcag aaaagtcagg taattttaaa	540
cacttacgag agtttgtgtt taaaaataaa gatgggtttc tctatgttta taagggetat	600
caacctatag atgtagttcg tgatctacct tctggtttta acactttgaa acctatthtt	660
aagttgcctc ttggtattaa cattacaaat ttagagcca ttcttacage cttttcacct	720
gctcaagaca ttgggggcac gtcagctgca gcctatthttg ttggtatttt aaagccaact	780
acatttatgc tcaagtatga tgaaaatggt acaatcacag atgctgttga ttgttctcaa	840
aatccacttg ctgaactcaa atgctctgtt aagagctthg agattgacaa aggaatttac	900
cagacctcta atttcagggt tgttccctca ggagatgttg tgagattccc taatattaca	960
aacttggtgc cttttggaga ggtthttaat gctactaaat tcccttctgt ctatgcatgg	1020
gagagaaaa aaatttctaa ttgtgttget gattactctg tgctctacaa ctcaacattt	1080
ttttcaacct ttaagtgcta tggcgtttct gccactaagt tgaatgatct ttgcttctcc	1140
aatgtctatg cagattcttt tgtagtcaag ggagatgatg taagacaaat agcgccagga	1200
caactgggtg ttattgctga ttataattat aaattgccag atgatttcat gggttgtgtc	1260
cttgcttggg aactagggaa cattgatgct acttcaactg gtaattataa ttataaatat	1320
aggtatctta gacatggcaa gcttaggccc tttgagagag acatatctaa tgtgcctttc	1380
tcccctgatg gcaaaccttg cacccacct gctcttaatt gttattggcc attaaatgat	1440
tatggtthtt acaccactac tggcatttggc taccaacctt acagagttgt agtactttct	1500
tttgaacttt taaatgcacc ggccacggtt tgtggaccaa aattatccac tgacctattt	1560
aagaaccagt gtgtcaattt taattthaat ggactcaactg gtactgggtg gttactcct	1620
tcttcaaaga gatttcaacc atttcaacaa tttggcctg atgtttctga tttcactgat	1680
tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata ttagacattt caccttgcgc ttttgggggt	1740
gtaagtgtaa ttacacctgg aacaaatgct tcatctgaag ttgctgttct atatcaagat	1800
gtaactgca ctgatgtttc tacagcaatt catgcagatc aactcacacc agcttggcgc	1860
atatattctc ctggaacaa tgtattccag actcaagcag gctgtcttat aggagctgag	1920
catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt cctattggag ctggcatttg tgctagttag	1980
catacagttt ctttattacg tagtactage caaaaatcta ttgtggetta tactatgtct	2040
ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct aataacacca ttgctatacc tactaacttt	2100
tcaattagca ttactacaga agtaatgcct gtttctatgg ctaaacctc cgtagattgt	2160
aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa tgtgctaat ttgcttctca atatggttag	2220
ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga togaacaca	2280
cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaaatg tacaaaacc caactttgaa atattttggt	2340
ggtthttaat tttcacaaat attacctgac cctctaaagc caactaagag gtctthttat	2400
gaggacttgc tctthtaataa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc	2460
gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat ctcaatttgt cgcagaagtt caatggactt	2520
acagtgttgc cacctctgct cactgatgat atgattgctg cctacactgc tgctctagtt	2580
agtggtactg ccactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctcttca aataccttht	2640
gctatgcaaa tggcatatag gttcaatggc attggagtta cccaaaatgt tctctatgag	2700
aaccaaaaac aatcgccaa ccaatttaac aaggcgatta gtcaattca agaactcact	2760

acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgttg ttaaccagaa tgctcaagca	2820
ttaaacaacac ttgttaaaca acttagctct aatTTTggTg caatttcaag tTgTctaaat	2880
gataTccttt cgcgacttga taaagTcgag gcgaggttac aaattgacag gTtaattaca	2940
ggcagacttc aaagccttca aacTatgta acacaacaac taatcagggc Tgctgaaatc	3000
agggcttctg ctaatcttgc Tgctactaaa atgtctgagt gTgttcttgg acaatcaaaa	3060
agagTtgaet tttgtggaaa gggetaccac ctTatgtcct Tcccacaagc agccccgat	3120
gTgtTtTct tctacatgt cacgtatgtg ccatcccagg agaggaactt caccacagcg	3180
ccagcaattt gTcatgaagg caaagcatac Ttccctcgtg aaggtgtttt TgtgttTaat	3240
ggcacttctt gTtttattac acagaggaac Ttcttttctc cacaaataat tactacagac	3300
aatacattg Tctcaggaaa TtgtgatgTc gTtattgTca Tcattaacaa cacagTttat	3360
gatcctctgc aacctgagct cgactcattc aaagaagagc Tggacaagta ctTcaaaaat	3420
catacatcac cagatgttga Tcttggcgac attTcaggca Ttaacgcttc Tgtcgtcaac	3480
attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gTcgtcaaaa attTaaatga atcactcatt	3540
gacctTcaag aattgggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta Tgtttggctc	3600
ggcttcattg ctggactaat Tgccatcgtc atggtTcaaa TcttTgcttTg Ttgcattgact	3660
agTtTtTgca gTtgcctcaa gggTgcattc TcttTggtt ctTgctgcaa gTttgatgag	3720
gatgactctg agccagTtct caagggtgTc aaattacatt acacataa	3768

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 3

agTcgatcc gTtaggctta Tcattagag

29

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 4

ccatcagggg agaaaggcac

20

<210> 5



<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 5

gtgcctttct ccctgatgg

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 6

gaagagcagc gccagcacc

19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 7

ggtgctggcg ctgctcttc

19

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

---

<400> 8	
actgtctaga gttcgtttat gtgtaatg	28
<210> 9	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 9	
agtcggatcc gaccggtgca ccacttttg	29
<210> 10	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 10	
agtcgggccc ctgttcagca gcaatacc	28
<210> 11	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 11	
actgggatcc gaagtgttcg ctcaagtc	28
<210> 12	
<211> 26	

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 12

actgtctaga ttgctcatat tttccc

26

<210> 13

<211> 740

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 13

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
1                   5                   10                   15

His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
                  20                   25                   30

Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
                  35                   40                   45

Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
50                   55                   60

Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
65                   70                   75                   80

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
                  85                   90                   95

Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
                  100                   105                   110

Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
115                   120                   125

Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
130                   135                   140

Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
145                   150                   155                   160

Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
                  165                   170                   175

Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
180                   185                   190

Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu

195	200	205
Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro		
210	215	220
Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr		
225	230	235
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile		
	245	250
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys		
	260	265
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn		
	275	280
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr		
	295	300
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser		
305	310	315
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr		
	325	330
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly		
	340	345
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala		
	355	360
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly		
	375	380
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe		
385	390	395
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser		
	405	410
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu		
	420	425
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly		
	435	440
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp		
	455	460
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val		
465	470	475
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly		
	485	490
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn		
	500	505
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg		
	515	520
		525

Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp  
 530 535 540  
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys  
 545 550 555 560  
 Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser  
 565 570 575  
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr  
 580 585 590  
 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr  
 595 600 605  
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu  
 610 615 620  
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile  
 625 630 635 640  
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys  
 645 650 655  
 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala  
 660 665 670  
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile  
 675 680 685  
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 690 695 700  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 725 730 735  
 Ala Ala Glu Gln  
 740

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 429

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 14

Glu Val Phe Ala Gln Val Lys Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys  
 20 25 30  
 Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr  
 35 40 45

Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp  
 50 55 60  
 Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala  
 85 90 95  
 Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly  
 100 105 110  
 Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn  
 115 120 125  
 Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile  
 130 135 140  
 Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn  
 165 170 175  
 Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly  
 180 185 190  
 Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val  
 195 200 205  
  
 Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser  
 210 215 220  
 Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg  
 225 230 235 240  
 Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly  
 245 250 255  
 Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser  
 260 265 270  
 Phe Pro Gln Ala Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr  
 275 280 285  
 Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His  
 290 295 300  
 Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile  
 325 330 335  
 Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly  
 340 345 350  
 Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser  
 355 360 365

Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp  
 370 375 380  
 Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile  
 385 390 395 400  
 Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu  
 405 410 415  
 Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln  
 420 425

<210> 15

<211> 1170

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 15

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 1 5 10 15  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
 20 25 30  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
 35 40 45

Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
 50 55 60

Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 65 70 75 80

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
 85 90 95

Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
 100 105 110

Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
 115 120 125

Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 130 135 140

Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 145 150 155 160

Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
 165 170 175

Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 180 185 190

Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu

195	200	205
Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro		
210	215	220
Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr		
225	230	235
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile		
	245	250
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys		
	260	265
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn		
	275	280
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr		
	290	295
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser		
305	310	315
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr		
	325	330
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly		
	340	345
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala		
	355	360
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly		
	370	375
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe		
385	390	395
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser		
	405	410
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu		
	420	425
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly		
	435	440
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp		
	450	455
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val		
465	470	475
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly		
	485	490
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn		
	500	505
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg		
	515	520
		525



Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp  
 530 535 540  
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys  
 545 550 555 560  
 Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser  
 565 570 575  
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr  
 580 585 590  
 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr  
 595 600 605  
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu  
 610 615 620  
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile  
 625 630 635 640  
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys  
 645 650 655  
 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala  
 660 665 670  
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile  
 675 680 685  
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 690 695 700  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 725 730 735  
 Ala Ala Glu Gln Asp Glu Val Phe Ala Gln Val Lys Gln Met Tyr Lys  
 740 745 750  
 Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu  
 755 760 765  
 Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu  
 770 775 780  
 Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met Lys Gln Tyr Gly  
 785 790 795 800  
 Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys  
 805 810 815  
 Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr Asp Asp Met Ile  
 820 825 830  
 Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala Thr Ala Gly Trp  
 835 840 845  
 Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met

850	855	860
Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu		
865	870	875
Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala Ile Ser Gln Ile		
	885	890
Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp		
	900	905
Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu		
	915	920
Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser		
	930	935
Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr		
945	950	955
Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg		
	965	970
Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser		
	980	985
Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly		
	995	1000
Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His Gly Val Val Phe		
	1010	1015
Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala		
1025	1030	1035
Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val		
	1045	1050
Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe		
	1060	1065
Ser Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys		
	1075	1080
Asp Val Val Ile Gly Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln		
	1090	1095
Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn		
1105	1110	1115
His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala		
	1125	1130
Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala		
	1140	1145
Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr		
	1155	1160
Glu Gln		
1170		

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 k 链前导序列

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1                    5                    10                    15

Gly Ser Thr Gly Asp

20

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 myc 抗原表位

<400> 17

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1                    5                    10

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的组氨酸标记物

<400> 18

His His His His His His

1                    5

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 19

ctagctcgag caacagcatc tgtg

24

<210> 20

<211> 100

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 20

```

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu
 1             5             10             15
Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln
             20             25             30
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg
             35             40             45
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser
 50             55             60
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val
65             70             75             80
Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn
             85             90             95

```

Val Val Arg Gly

100

<210> 21

<211> 100

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 21

```

Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln Ser Val Ile Ile
 1             5             10             15
Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys Asn Phe Glu Leu
             20             25             30

```

Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met Gly Thr Gln Thr  
           35                          40                          45  
 His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Ile  
           50                          55                          60  
 Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser Gly Asn Phe Lys  
 65                          70                          75                          80  
 His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly Phe Leu Tyr Val  
                           85                          90                          95  
 Tyr Lys Gly Tyr  
                           100

<210> 22

<211> 100

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 22

Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu  
 1                          5                          10                          15  
 Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg  
                           20                          25                          30  
 Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser  
                           35                          40                          45  
 Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu  
                           50                          55                          60  
 Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln  
 65                          70                          75                          80  
 Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp  
                           85                          90                          95  
 Lys Gly Ile Tyr  
                           100

<210> 23

<211> 100

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 23

Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe  
 1                          5                          10                          15  
 Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr

```

                20                25                30
Lys Phe Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys
                35                40                45
Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe
                50                55                60
Lys Cys Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser
65                70                75                80
Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln
                85                90                95
Ile Ala Pro Gly
                100

```

<210> 24  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> SARS 冠状病毒

```

<400> 24
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe
 1                5                10                15
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser
                20                25                30
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu
                35                40                45
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly
                50                55                60
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp
65                70                75                80
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
                85                90                95
Val Val Leu Ser
                100

```

<210> 25  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> SARS 冠状病毒

```

<400> 25
Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys Leu Ser
 1                5                10                15

```

Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn Gly Leu  
                   20                  25                  30  
 Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg Phe Gln Pro Phe  
                   35                  40                  45  
 Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp Ser Val Arg Asp  
                   50                  55                  60  
 Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys Ala Phe Gly Gly  
 65                  70                  75                  80  
 Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser Glu Val Ala Val  
                   85                  90                  95  
 Leu Tyr Gln Asp  
                   100

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 26

Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr  
   1                  5                  10                  15  
 Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln  
                   20                  25                  30  
 Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys  
                   35                  40                  45  
 Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser  
                   50                  55                  60  
 Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser  
 65                  70                  75                  80  
 Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile  
                   85                  90                  95  
 Pro Thr Asn Phe  
                   100

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 27

Ser Ile Ser Ile Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr

```

1           5           10           15
Ser Val Asp Cys Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala
                20                25                30
Asn Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala
                35                40                45
Leu Ser Gly Ile Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe
                50                55                60
Ala Gln Val Lys Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly
65                70                75                80
Gly Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys
                85                90                95
Arg Ser Phe Ile
                100

```

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 28

```

Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met
1           5           10           15
Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile
                20                25                30
Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr
                35                40                45
Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala
                50                55                60
Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe
65                70                75                80
Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn
                85                90                95
Val Leu Tyr Glu
                100

```

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 29



Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala Ile Ser Gln Ile  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp  
                   20                    25                    30  
 Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu  
                   35                    40                    45  
 Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser  
                   50                    55                    60  
 Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg  
                   85                    90                    95  
 Ala Ala Glu Ile  
                   100

<210> 30

<211> 100

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 30

Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met  
                   20                    25                    30  
 Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr  
                   35                    40                    45  
 Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys  
                   50                    55                    60  
 His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn  
 65                    70                    75                    80  
 Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile  
                   85                    90                    95  
 Ile Thr Thr Asp  
                   100

<210> 31

<211> 90

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 31

Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Ile Asn  
 1                   5                   10                   15  
 Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu  
                   20                   25                   30  
 Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu  
                   35                   40                   45  
 Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu  
                   50                   55                   60  
 Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile  
 65                   70                   75                   80  
 Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln  
                   85                   90

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 200

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 32

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
                   20                   25                   30  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
                   35                   40                   45  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
                   50                   55                   60  
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
 65                   70                   75                   80  
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
                   85                   90                   95  
 Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
                   100                   105                   110  
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
                   115                   120                   125  
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
                   130                   135                   140  
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 145                   150                   155                   160  
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser

```

                165                170                175
Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly
                180                185                190
Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr
                195                200

```

<210> 33

<211> 200

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 33

```

Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu
 1                5                10                15
Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg
                20                25                30
Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser
                35                40                45
Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu
                50                55                60
Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln
65                70                75                80
Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp
                85                90                95
Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp
                100                105                110
Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val
                115                120                125
Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys
                130                135                140
Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe
145                150                155                160
Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp
                165                170                175

Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp
                180                185                190
Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
                195                200

```

<210> 34

<211> 200

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 34

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

<210> 35

<211> 200

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 35

Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln

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

<210> 36

<211> 200

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 36

Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met  
 1 5 10 15  
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile  
 20 25 30  
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr  
 35 40 45  
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala  
 50 55 60  
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe  
 65 70 75 80  
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn

```

      85              90              95
Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala
      100              105              110
Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly
      115              120              125
Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu
      130              135              140
Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn
      145              150              155              160
Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp
      165              170              175
Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln
      180              185              190
Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile
      195              200

```

<210> 37

<211> 190

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 37

```

Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu
  1              5              10              15
Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met
      20              25              30
Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr
      35              40              45
Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys
      50              55              60
His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn
      65              70              75              80
Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile
      85              90              95
Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile
      100              105              110
Gly Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp
      115              120              125

Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro
      130              135              140

```

Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn  
                          165                    170                    175  
 Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln  
                          180                    185                    190

<210> 38

<211> 400

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 38

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

Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu

```

      210              215              220
Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro
225              230              235              240
Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr
      245              250              255
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile
      260              265              270
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys
      275              280              285
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn
      290              295              300
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr
305              310              315              320
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser
      325              330              335
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
      340              345              350
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
      355              360              365
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala
      370              375              380
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
385              390              395              400

```

<210> 39

<211> 600

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 39

```

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu
 1              5              10              15
Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln
      20              25              30
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg
      35              40              45
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser
      50              55              60
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val
65              70              75              80

```



Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 85 90 95  
 Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
 100 105 110  
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
 115 120 125  
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
 130 135 140  
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 145 150 155 160  
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 165 170 175  
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
 180 185 190  
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 195 200 205  
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
 210 215 220  
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 245 250 255  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
 260 265 270  
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
 275 280 285  
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn  
 290 295 300  
 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser  
 325 330 335  
 Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr  
 340 345 350  
 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly  
 355 360 365  
 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala  
 370 375 380  
 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe

	405		410		415
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser					
	420		425		430
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu					
	435		440		445
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly					
	450		455		460
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp					
	465		470		480
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val					
	485		490		495
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly					
	500		505		510
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn					
	515		520		525
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg					
	530		535		540
Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp					
	545		550		560
Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys					
	565		570		575
Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser					
	580		585		590
Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp					
	595		600		

<210> 40

<211> 800

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 40

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu					
1		5		10	15
Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln					
		20		25	30
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg					
		35		40	45
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser					
		50		55	60
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val					

65	70	75	80
Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn			
	85	90	95
Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln			
	100	105	110
Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys			
	115	120	125
Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met			
	130	135	140
Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr			
	145	150	155
Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser			
	165	170	175
Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly			
	180	185	190
Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp			
	195	200	205
Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu			
	210	215	220
Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro			
	225	230	235
Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr			
	245	250	255
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile			
	260	265	270
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys			
	275	280	285
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn			
	290	295	300
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr			
	305	310	315
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser			
	325	330	335
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr			
	340	345	350
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly			
	355	360	365
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala			
	370	375	380
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly			



Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 725 730 735  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 740 745 750  
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys  
 755 760 765  
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe  
 770 775 780  
 Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile  
 785 790 795 800

<210> 41

<211> 1000

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 41

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

Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 195 200 205  
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
 210 215 220  
  
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 245 250 255  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
 260 265 270  
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
 275 280 285  
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn  
 290 295 300  
 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser  
 325 330 335  
 Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr  
 340 345 350  
 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly  
 355 360 365  
 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala  
 370 375 380  
 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe  
 405 410 415  
 Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser  
 420 425 430  
 Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu  
 435 440 445  
 Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly  
 450 455 460  
 Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp  
 465 470 475 480  
 Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val  
 485 490 495  
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly  
 500 505 510

Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn  
 515 520 525  
 Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg  
 530 535 540  
 Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp  
 545 550 555 560  
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys  
 565 570 575  
 Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser  
 580 585 590  
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr  
 595 600 605  
 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr  
 610 615 620  
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu  
 625 630 635 640  
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile  
 645 650 655  
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys  
 660 665 670  
 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala  
 675 680 685  
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile  
 690 695 700  
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 705 710 715 720  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 725 730 735  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 740 745 750  
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys  
 755 760 765  
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe  
 770 775 780  
 Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile  
 785 790 795 800  
 Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met  
 805 810 815  
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile  
 820 825 830  
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr

835	840	845		
Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala				
850	855	860		
Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe				
865	870	875	880	
Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn				
	885	890	895	
Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala				
	900	905	910	
Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly				
	915	920	925	
Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu				
	930	935	940	
Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn				
	945	950	955	960
Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp				
	965	970	975	
Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln				
	980	985	990	
Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile				
	995	1000		

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 1190

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 42

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu				
1	5	10	15	
Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln				
	20	25	30	
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg				
	35	40	45	
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser				
	50	55	60	
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val				
	65	70	75	80
Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn				
	85	90	95	
Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln				





---

420	425	430		
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu				
435	440	445		
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly				
450	455	460		
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp				
465	470	475	480	
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val				
	485	490	495	
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly				
	500	505	510	
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn				
	515	520	525	
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg				
	530	535	540	
Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp				
	545	550	555	560
Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys				
	565	570	575	
Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser				
	580	585	590	
Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr				
	595	600	605	
Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr				
	610	615	620	
Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu				
	625	630	635	640
His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile				
	645	650	655	
Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys				
	660	665	670	
Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala				
	675	680	685	
Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile				
	690	695	700	
Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys				
	705	710	715	720
Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu				
	725	730	735	
Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile				
	740	745	750	

Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys  
 755 760 765  
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe  
 770 775 780  
 Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile  
 785 790 795 800  
 Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met  
 805 810 815  
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile  
 820 825 830  
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr  
 835 840 845  
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala  
 850 855 860  
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe  
 865 870 875 880  
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn  
 885 890 895  
 Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala  
 900 905 910  
 Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly  
 915 920 925  
 Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu  
 930 935 940  
 Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn  
 945 950 955 960  
 Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp  
 965 970 975  
 Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln  
 980 985 990  
 Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala  
 995 1000 1005  
 Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe  
 1010 1015 1020  
 Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His  
 1025 1030 1035 1040  
 Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn  
 1045 1050 1055  
 Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro  
 1060 1065 1070  
 Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln

1075	1080	1085	
Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val			
1090	1095	1100	
Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr			
1105	1110	1115	1120
Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys			
	1125	1130	1135
Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser			
	1140	1145	1150
Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu			
	1155	1160	1165
Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu			
	1170	1175	1180
Leu Gly Lys Tyr Glu Gln			
1185	1190		

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 43

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln				
1	5	10	15	
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg				
	20	25	30	
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser				
	35	40	45	
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val				
	50	55	60	
Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn				
	65	70	75	80
Val Val Arg Gly				

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 44

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

<210> 45

<211> 384

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 45

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 1                   5                   10                   15  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
                   20                   25                   30  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
                   35                   40                   45  
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
                   50                   55                   60  
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 65                   70                   75                   80

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
 85 90 95  
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
 100 105 110  
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
 115 120 125  
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 130 135 140  
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
 165 170 175  
  
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 180 185 190  
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
 195 200 205  
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
 210 215 220  
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 225 230 235 240  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
 245 250 255  
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
 260 265 270  
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn  
 275 280 285  
 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr  
 290 295 300  
 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser  
 305 310 315 320  
 Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr  
 325 330 335  
 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly  
 340 345 350  
 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala  
 355 360 365  
 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly  
 370 375 380

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 584

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 46

```

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln
 1           5           10           15
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg
           20           25           30
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser
           35           40           45
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val
 50           55           60

Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn
65           70           75           80
Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln
           85           90           95
Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys
           100          105          110
Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met
           115          120          125
Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr
           130          135          140
Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser
           145          150          155          160
Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly
           165          170          175
Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp
           180          185          190
Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu
           195          200          205
Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro
           210          215          220
Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr
           225          230          235          240
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile
           245          250          255
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys
           260          265          270
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn

```

275	280	285
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr		
290	295	300
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser		
305	310	315
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr		
	325	330
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly		
	340	345
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala		
	355	360
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly		
	370	375
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe		
385	390	395
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser		
	405	410
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu		
	420	425
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly		
	435	440
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp		
	450	455
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val		
465	470	475
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly		
	485	490
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn		
	500	505
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg		
	515	520
Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp		
	530	535
Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys		
545	550	555
Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser		
	565	570
Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp		
	580	

&lt;210&gt; 47



&lt;211&gt; 784

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; SARS 冠状病毒

&lt;400&gt; 47

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 1                   5                   10                   15  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
                   20                   25                   30  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
                   35                   40                   45  
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
                   50                   55                   60  
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 65                   70                   75                   80  
  
 Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
                   85                   90                   95  
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
                   100                   105                   110  
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
                   115                   120                   125  
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
                   130                   135                   140  
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
                   165                   170                   175  
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
                   180                   185                   190  
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
                   195                   200                   205  
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
                   210                   215                   220  
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 225                   230                   235                   240  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
                   245                   250                   255  
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
                   260                   265                   270  
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn

275	280	285
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr		
290	295	300
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser		
305	310	315
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr		
325	330	335
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly		
340	345	350
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala		
355	360	365
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly		
370	375	380
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe		
385	390	395
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser		
405	410	415
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu		
420	425	430
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly		
435	440	445
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp		
450	455	460
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val		
465	470	475
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly		
485	490	495
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn		
500	505	510
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg		
515	520	525
Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp		
530	535	540
Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys		
545	550	555
Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser		
565	570	575
Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr		
580	585	590
Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr		
595	600	605

Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu  
 610 615 620  
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile  
 625 630 635 640  
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys  
 645 650 655  
 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala  
 660 665 670  
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile  
 675 680 685  
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 690 695 700  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 725 730 735  
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys  
 740 745 750  
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe  
 755 760 765  
 Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile  
 770 775 780

<210> 48

<211> 984

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 48

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 1 5 10 15  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
 20 25 30  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
 35 40 45  
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
 50 55 60  
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
 85 90 95

---

Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
 100 105 110  
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
 115 120 125  
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 130 135 140  
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
 165 170 175  
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 180 185 190  
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
 195 200 205  
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
 210 215 220  
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 225 230 235 240  
  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
 245 250 255  
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
 260 265 270  
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn  
 275 280 285  
 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr  
 290 295 300  
 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser  
 305 310 315 320  
 Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr  
 325 330 335  
 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly  
 340 345 350  
 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala  
 355 360 365  
 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly  
 370 375 380  
 Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe  
 385 390 395 400  
 Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser  
 405 410 415

Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu  
 420 425 430  
 Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly  
 435 440 445  
 Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp  
 450 455 460  
 Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val  
 465 470 475 480  
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly  
 485 490 495  
 Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn  
 500 505 510  
 Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg  
 515 520 525  
 Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp  
 530 535 540  
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys  
 545 550 555 560  
 Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser  
 565 570 575  
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr  
 580 585 590  
 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr  
 595 600 605  
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu  
 610 615 620  
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile  
 625 630 635 640  
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys  
 645 650 655  
 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala  
 660 665 670  
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile  
 675 680 685  
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 690 695 700  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 725 730 735  
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys



---

	20		25		30	
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser						
	35		40		45	
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val						
	50		55		60	
Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn						
65		70		75		80
Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln						
		85		90		95
Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys						
	100		105		110	
Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met						
	115		120		125	
Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr						
	130		135		140	
Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser						
145		150		155		160
Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly						
		165		170		175
Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp						
	180		185		190	
Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu						
	195		200		205	
Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro						
	210		215		220	
Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr						
225		230		235		240
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile						
		245		250		255
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys						
	260		265		270	
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn						
	275		280		285	
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr						
	290		295		300	
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser						
305		310		315		320
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr						
		325		330		335
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly						

340	345	350
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala		
355	360	365
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly		
370	375	380
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe		
385	390	395
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser		
405	410	415
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu		
420	425	430
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly		
435	440	445
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp		
450	455	460
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val		
465	470	475
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly		
485	490	495
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn		
500	505	510
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg		
515	520	525
Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp		
530	535	540
Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys		
545	550	555
Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser		
565	570	575
Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr		
580	585	590
Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr		
595	600	605
Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu		
610	615	620
His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile		
625	630	635
Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys		
645	650	655
Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala		
660	665	670



Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile  
 675 680 685  
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys  
 690 695 700  
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile  
 725 730 735  
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys  
 740 745 750  
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe  
 755 760 765  
 Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile  
 770 775 780  
 Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met  
 785 790 795 800  
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile  
 805 810 815  
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr  
 820 825 830  
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala  
 835 840 845  
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe  
 850 855 860  
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn  
 865 870 875 880  
 Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala  
 885 890 895  
 Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly  
 900 905 910  
 Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu  
 915 920 925  
 Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn  
 930 935 940  
 Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp  
 945 950 955 960  
 Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln  
 965 970 975  
 Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala  
 980 985 990  
 Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe

995                                    1000                                    1005  
 Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala Pro His  
 1010                                    1015                                    1020  
 Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln Glu Arg Asn  
 1025                                    1030                                    1035                                    1040  
 Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro  
                                   1045                                    1050                                    1055  
 Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln  
                                   1060                                    1065                                    1070  
 Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val  
                                   1075                                    1080                                    1085  
 Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr  
 1090                                    1095                                    1100  
 Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys  
 1105                                    1110                                    1115                                    1120  
 Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser  
                                   1125                                    1130                                    1135  
 Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu  
                                   1140                                    1145                                    1150  
 Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu  
                                   1155                                    1160                                    1165  
 Leu Gly Lys Tyr Glu Gln  
 1170

<210> 50

<211> 260

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 50

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 1                                    5                                    10                                    15  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
                                   20                                    25                                    30  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
                                   35                                    40                                    45  
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
                                   50                                    55                                    60  
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 65                                    70                                    75                                    80

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
                   85                  90                  95  
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
                   100                  105                  110  
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
                   115                  120                  125  
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
                   130                  135                  140  
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 145                  150                  155                  160  
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
                   165                  170                  175  
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
                   180                  185                  190  
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
                   195                  200                  205  
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
                   210                  215                  220  
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 225                  230                  235                  240  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
                   245                  250                  255  
 Thr Asp Ala Val  
                   260

<210> 51

<211> 430

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 51

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
   1                  5                  10                  15  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
                   20                  25                  30  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
                   35                  40                  45  
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
                   50                  55                  60  
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn

65	70	75	80
Val Val Arg Gly Trp	Val Phe Gly Ser Thr	Met Asn Asn Lys Ser Gln	
	85	90	95
Ser Val Ile Ile Ile	Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys		
	100	105	110
Asn Phe Glu Leu Cys Asp	Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met		
	115	120	125
Gly Thr Gln Thr His Thr	Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr		
	130	135	140
Phe Glu Tyr Ile Ser Asp	Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser		
145	150	155	160
Gly Asn Phe Lys His Leu	Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly		
	165	170	175
Phe Leu Tyr Val Tyr Lys	Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp		
	180	185	190
Leu Pro Ser Gly Phe Asn	Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu		
	195	200	205
Gly Ile Asn Ile Thr Asn	Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro		
	210	215	220
Ala Gln Asp Ile Trp Gly	Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr		
225	230	235	240
Leu Lys Pro Thr Thr Phe	Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile		
	245	250	255
Thr Asp Ala Val Asp Cys	Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys		
	260	265	270
Ser Val Lys Ser Phe Glu	Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn		
	275	280	285
Phe Arg Val Val Pro Ser	Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr		
	290	295	300
Asn Leu Cys Pro Phe Gly	Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser		
305	310	315	320
Val Tyr Ala Trp Glu Arg	Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr		
	325	330	335
Ser Val Leu Tyr Asn Ser	Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly		
	340	345	350
Val Ser Ala Thr Lys Leu	Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala		
	355	360	365
Asp Ser Phe Val Val Lys	Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly		
	370	375	380
Gln Thr Gly Val Ile Ala	Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe		
	385	390	395
			400

Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser  
 405 410 415

Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly  
 420 425 430

<210> 52

<211> 521

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 52

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 1 5 10 15

His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
 20 25 30

Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
 35 40 45

Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
 50 55 60

Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 65 70 75 80

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
 85 90 95

Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
 100 105 110

Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
 115 120 125

Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 130 135 140

Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 145 150 155 160

Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
 165 170 175

Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 180 185 190

Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
 195 200 205

Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
 210 215 220

Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr

```

225          230          235          240
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile
          245          250          255
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys
          260          265          270
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn
          275          280          285
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr
          290          295          300
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser
305          310          315          320
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
          325          330          335
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
          340          345          350
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala
          355          360          365
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
          370          375          380
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe
385          390          395          400
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser
          405          410          415
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu
          420          425          430
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly
          435          440          445
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp
          450          455          460
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
465          470          475          480
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
          485          490          495
Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn
          500          505          510
Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val
          515          520

```

<210> 53

<211> 777

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 SEQ ID NO:1 的 17-157 位氨基酸序列外加小鼠 K 链前导序列 N 端以及 myc 抗原表位 C 端和多聚组氨酸标记物

<400> 53

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
  1             5             10             15
Gly Ser Thr Gly Asp Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala
          20             25             30
Pro Asn Tyr Thr Gln His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro
          35             40             45
Asp Glu Ile Phe Arg Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe
          50             55             60
Leu Pro Phe Tyr Ser Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr
  65             70             75             80
Phe Gly Asn Pro Val Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala
          85             90             95
Thr Glu Lys Ser Asn Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met
          100            105            110
Asn Asn Lys Ser Gln Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val
          115            120            125
Val Ile Arg Ala Cys Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala
          130            135            140
Val Ser Lys Pro Met Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn
          145            150            155            160
Ala Phe Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp
          165            170            175
Val Ser Glu Lys Ser Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe
          180            185            190
Lys Asn Lys Asp Gly Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile
          195            200            205
Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile
          210            215            220
Phe Lys Leu Pro Leu Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu
          225            230            235            240
Thr Ala Phe Ser Pro Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala
          245            250            255
Tyr Phe Val Gly Tyr Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp
          260            265            270

```

Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu  
 275 280 285  
 Ala Glu Leu Lys Cys Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile  
 290 295 300  
 Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg  
 305 310 315 320  
 Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala  
 325 330 335  
 Thr Lys Phe Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn  
 340 345 350  
 Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr  
 355 360 365  
 Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe  
 370 375 380  
 Ser Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg  
 385 390 395 400  
 Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys  
 405 410 415  
 Leu Pro Asp Asp Phe Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn  
 420 425 430  
 Ile Asp Ala Thr Ser Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu  
 435 440 445  
 Arg His Gly Lys Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro  
 450 455 460  
 Phe Ser Pro Asp Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr  
 465 470 475 480  
 Trp Pro Leu Asn Asp Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr  
 485 490 495  
 Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro  
 500 505 510  
 Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln  
 515 520 525  
 Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr  
 530 535 540  
 Pro Ser Ser Lys Arg Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val  
 545 550 555 560  
 Ser Asp Phe Thr Asp Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu  
 565 570 575  
 Asp Ile Ser Pro Cys Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly  
 580 585 590  
 Thr Asn Ala Ser Ser Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys



```

          595              600              605
Thr Asp Val Ser Thr Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp
  610              615              620
Arg Ile Tyr Ser Thr Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys
  625              630              635              640
Leu Ile Gly Ala Glu His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro
          645              650              655
Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg
          660              665              670
Ser Thr Ser Gln Lys Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala
          675              680              685
Asp Ser Ser Ile Ala Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn
  690              695              700
Phe Ser Ile Ser Ile Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys
  705              710              715              720
Thr Ser Val Asp Cys Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys
          725              730              735
Ala Asn Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg
          740              745              750
Ala Leu Ser Gly Ile Ala Ala Glu Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
          755              760              765
Glu Asp Leu His His His His His His
  770              775

```

<210> 54

<211> 297

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 SEQ ID NO:1 的 17-276 位氨基酸序列外加小鼠 K 链前导序列 N 端以及 myc 抗原表位 C 端和多聚组氨酸标记物

<400> 54

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
  1              5              10              15
Gly Ser Thr Gly Asp Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala
          20              25              30
Pro Asn Tyr Thr Gln His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro
          35              40              45
Asp Glu Ile Phe Arg Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe

```

```

      50              55              60
Leu Pro Phe Tyr Ser Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr
65              70              75              80
Phe Gly Asn Pro Val Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala
      85              90              95
Thr Glu Lys Ser Asn Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met
      100             105             110
Asn Asn Lys Ser Gln Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val
      115             120             125
Val Ile Arg Ala Cys Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala
      130             135             140
Val Ser Lys Pro Met Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn
145             150             155             160
Ala Phe Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp
      165             170             175
Val Ser Glu Lys Ser Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe
      180             185             190
Lys Asn Lys Asp Gly Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile
      195             200             205
Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile
      210             215             220
Phe Lys Leu Pro Leu Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu
225             230             235             240
Thr Ala Phe Ser Pro Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala
      245             250             255
Tyr Phe Val Gly Tyr Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp
      260             265             270
Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
      275             280             285
Glu Asp Leu His His His His His His
      290             295

```

<210> 55

<211> 558

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 SEQ ID NO:1 的 17-537 位氨基酸序列外加小鼠 K 链前导序列 N 端以及 myc 抗原表位 C 端和多聚组氨酸标记物

&lt;400&gt; 55

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Ser Thr Gly Asp Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala  
                   20                   25                   30  
 Pro Asn Tyr Thr Gln His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro  
                   35                   40                   45  
 Asp Glu Ile Phe Arg Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe  
                   50                   55                   60  
 Leu Pro Phe Tyr Ser Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Asn Pro Val Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala  
                   85                   90                   95  
 Thr Glu Lys Ser Asn Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met  
                   100                   105                   110  
 Asn Asn Lys Ser Gln Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val  
                   115                   120                   125  
 Val Ile Arg Ala Cys Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala  
                   130                   135                   140  
 Val Ser Lys Pro Met Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn  
 145                   150                   155                   160  
 Ala Phe Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp  
                   165                   170                   175  
 Val Ser Glu Lys Ser Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe  
                   180                   185                   190  
 Lys Asn Lys Asp Gly Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile  
                   195                   200                   205  
 Asp Val Val Arg Asp Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile  
                   210                   215                   220  
 Phe Lys Leu Pro Leu Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu  
 225                   230                   235                   240  
  
 Thr Ala Phe Ser Pro Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala  
                   245                   250                   255  
 Tyr Phe Val Gly Tyr Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp  
                   260                   265                   270  
 Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu  
                   275                   280                   285  
 Ala Glu Leu Lys Cys Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile  
                   290                   295                   300  
 Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg

```

305          310          315          320
Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala
          325          330          335
Thr Lys Phe Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn
          340          345          350
Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr
          355          360          365
Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe
          370          375          380
Ser Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg
385          390          395          400
Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys
          405          410          415
Leu Pro Asp Asp Phe Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn
          420          425          430
Ile Asp Ala Thr Ser Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu
          435          440          445
Arg His Gly Lys Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro
          450          455          460
Phe Ser Pro Asp Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr
465          470          475          480
Trp Pro Leu Asn Asp Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr
          485          490          495
Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro
          500          505          510
Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln
          515          520          525
Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Glu Gln
          530          535          540
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
545          550          555

```

<210> 56

<211> 739

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 SEQ ID NO:1 的 17-756 位氨基酸序列, N 端没有信号肽

&lt;400&gt; 56

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln  
 1 5 10 15  
 His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg  
 20 25 30  
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser  
 35 40 45  
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val  
 50 55 60  
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln  
 85 90 95  
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys  
 100 105 110  
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met  
 115 120 125  
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr  
 130 135 140  
 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly  
 165 170 175  
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp  
 180 185 190  
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu  
 195 200 205  
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro  
 210 215 220  
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr  
 225 230 235 240  
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile  
 245 250 255  
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys  
 260 265 270  
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn  
 275 280 285  
 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr  
 290 295 300  
 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser  
 305 310 315 320

Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr  
 325 330 335  
 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly  
 340 345 350  
 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala  
 355 360 365  
 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly  
 370 375 380  
 Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe  
 385 390 395 400  
 Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser  
 405 410 415  
 Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu  
 420 425 430  
 Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly  
 435 440 445  
 Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp  
 450 455 460  
 Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val  
 465 470 475 480  
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly  
 485 490 495  
 Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn  
 500 505 510  
 Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg  
 515 520 525  
 Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp  
 530 535 540  
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys  
 545 550 555 560  
 Ala Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser  
 565 570 575  
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr  
 580 585 590  
 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr  
 595 600 605  
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu  
 610 615 620  
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile  
 625 630 635 640  
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys

```

                645                650                655
Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala
                660                665                670
Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile
                675                680                685
Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys
                690                695                700
Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu
705                710                715                720
Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile
                725                730                735
Ala Ala Glu

```

<210> 57

<211> 265

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 SEQ ID NO:1 的 272-537 位氨基酸序列

<400> 57

```

Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys
  1                5                10                15
Cys Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser
                20                25                30
Asn Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Asn Ile Thr
                35                40                45
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser
  50                55                60
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
  65                70                75                80
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
                85                90                95
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala
                100                105                110
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
                115                120                125
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe
  130                135                140

```

---

Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser  
 145                                    150                                    155                                    160  
 Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu  
    165                                    170                                    175  
 Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly  
    180                                    185                                    190  
 Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp  
    195                                    200                                    205  
 Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val  
    210                                    215                                    220  
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly  
 225                                    230                                    235                                    240  
 Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn  
    245                                    250                                    255  
 Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val  
    260                                    265

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 58

Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln His Thr Ser Ser Met Arg Gly  
 1                                    5                                    10                                    15  
 Cys

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒

<400> 59

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

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> SARS 冠状病毒



&lt;400&gt; 60

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu  
 1                    5                    10                    15

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 235

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的 SEQ ID NO:1 的 303-537 位氨基酸序列, 含有受体结合域

&lt;400&gt; 61

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

Cys Gly Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn  
 210 215 220

Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val  
 225 230 235

<210> 62

<211> 199

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 SEQ ID NO:1 的 319-517 位氨基酸序列, 含有受体结合域

<400> 62

Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe  
 1 5 10 15

Pro Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala  
 20 25 30

Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys  
 35 40 45

Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val  
 50 55 60

Tyr Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala  
 65 70 75 80

Pro Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp  
 85 90 95

Asp Phe Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala  
 100 105 110

Thr Ser Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly  
 115 120 125

Lys Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro  
 130 135 140

Asp Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu  
 145 150 155 160

Asn Asp Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr  
 165 170 175

Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val  
 180 185 190

Cys Gly Pro Lys Leu Ser Thr  
 195

<210> 63

<211> 200

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 SEQ ID NO:1 的 319-518 位氨基酸序列, 含有受体结合域

<400> 63

```

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

```

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 64

gatcggatcc ggtacaatca cag

23

<210> 65

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 65

gatcggggccc gacacactgg ttc

23

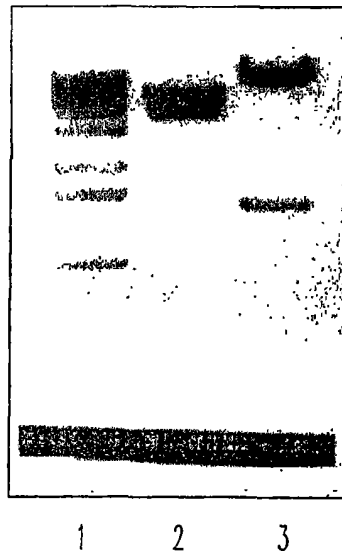


Fig. 1A

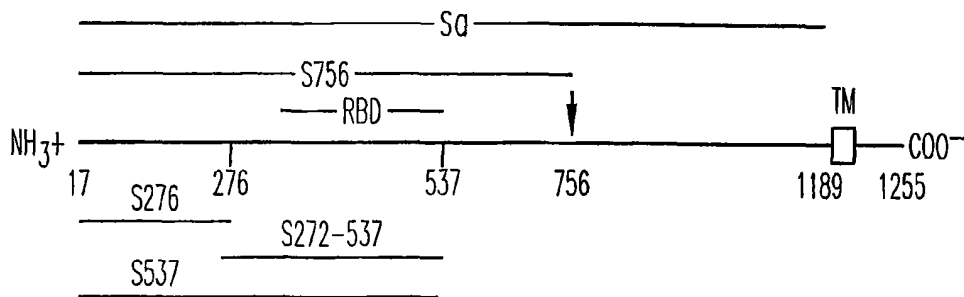


Fig. 1B

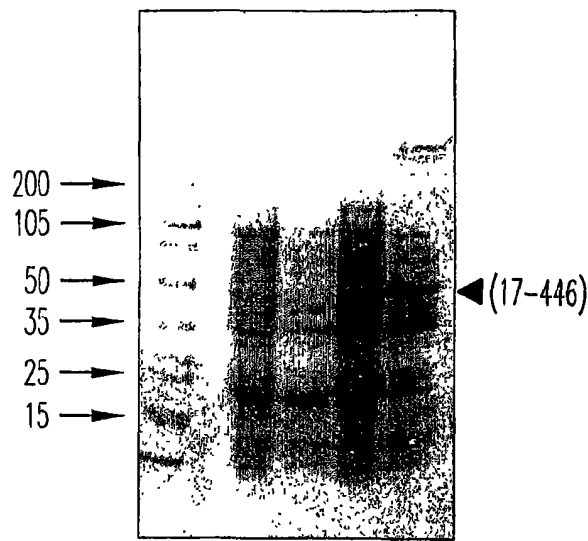


Fig. 2

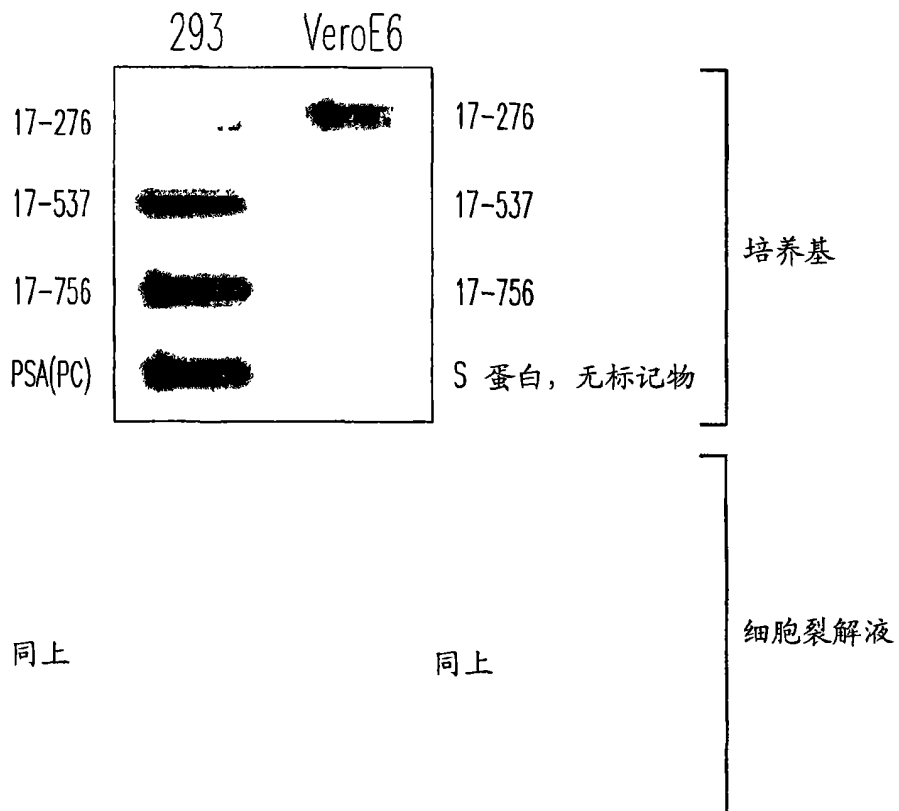


Fig. 3

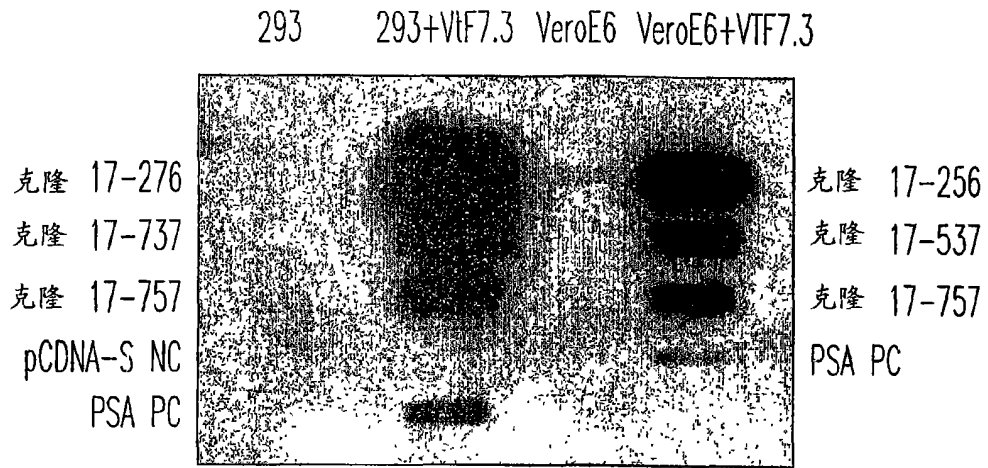


Fig. 4A

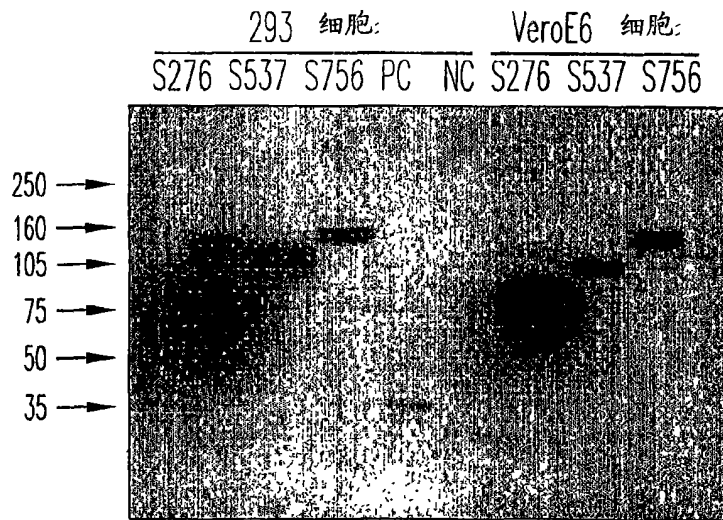


Fig. 4B

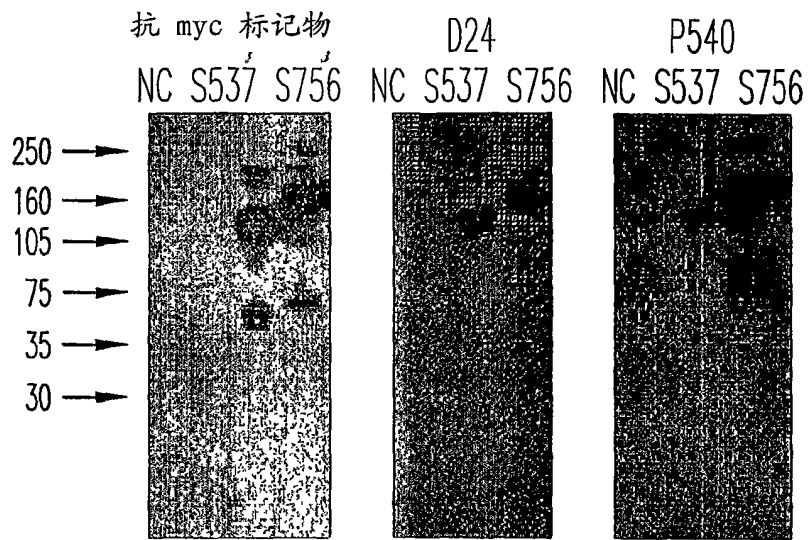


Fig. 4C

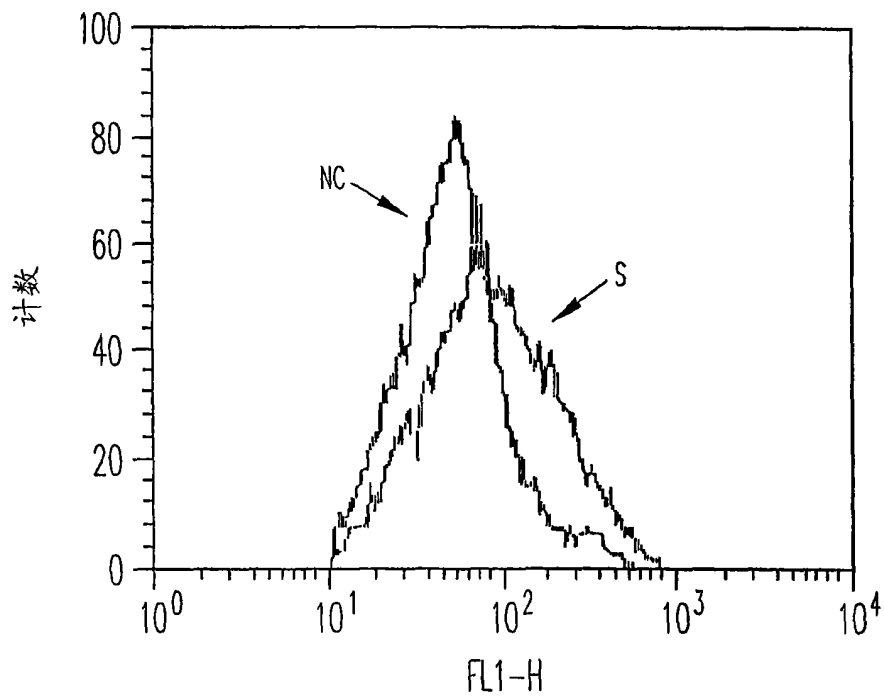


Fig. 5



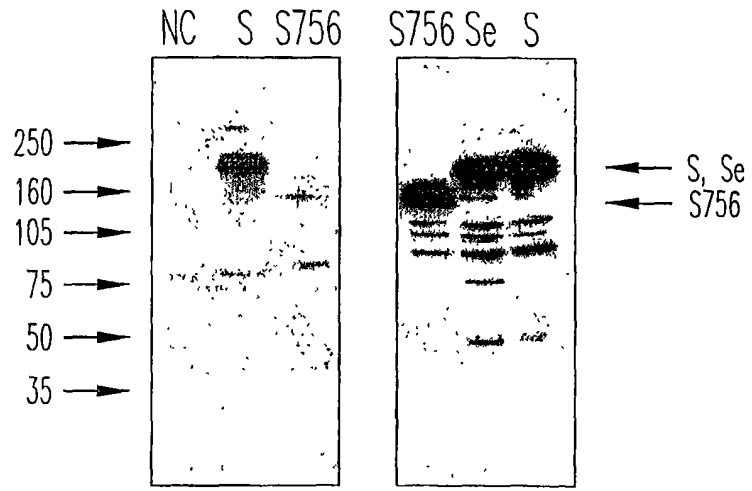


Fig. 6A

Fig. 6B

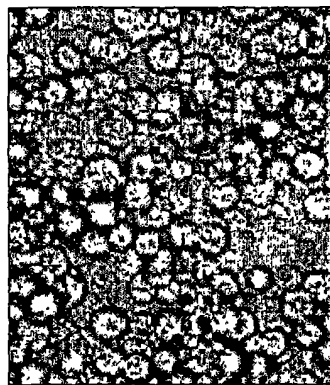


Fig. 7A

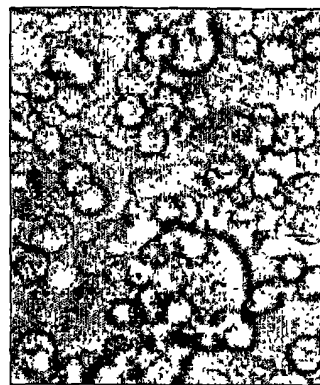


Fig. 7B

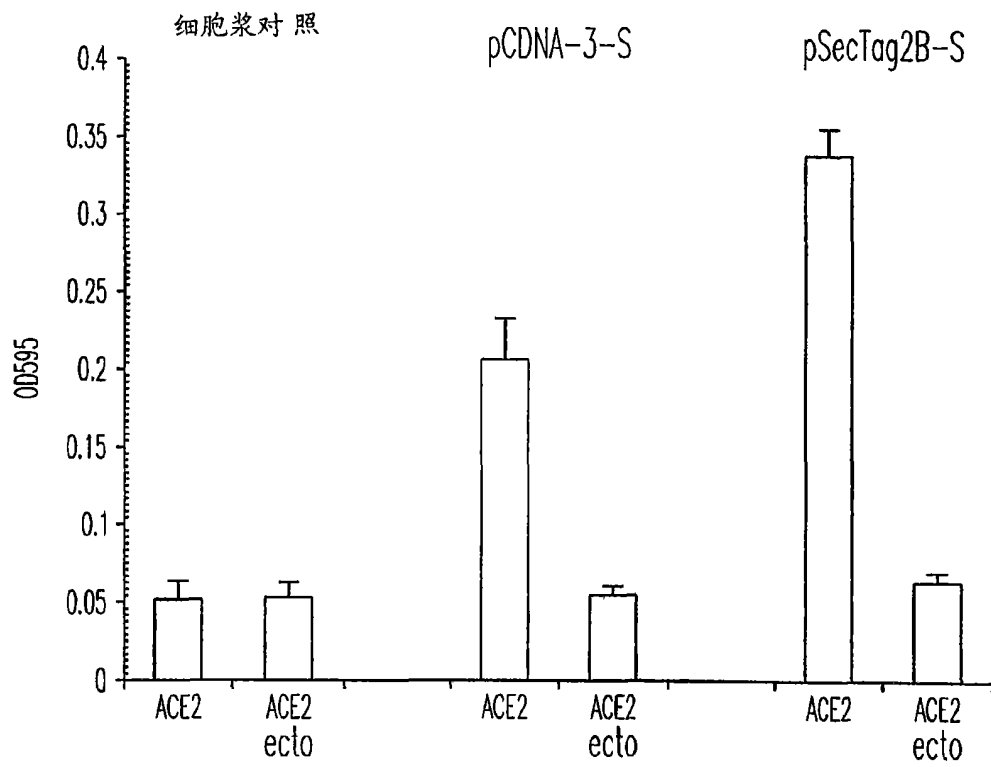


Fig. 7C

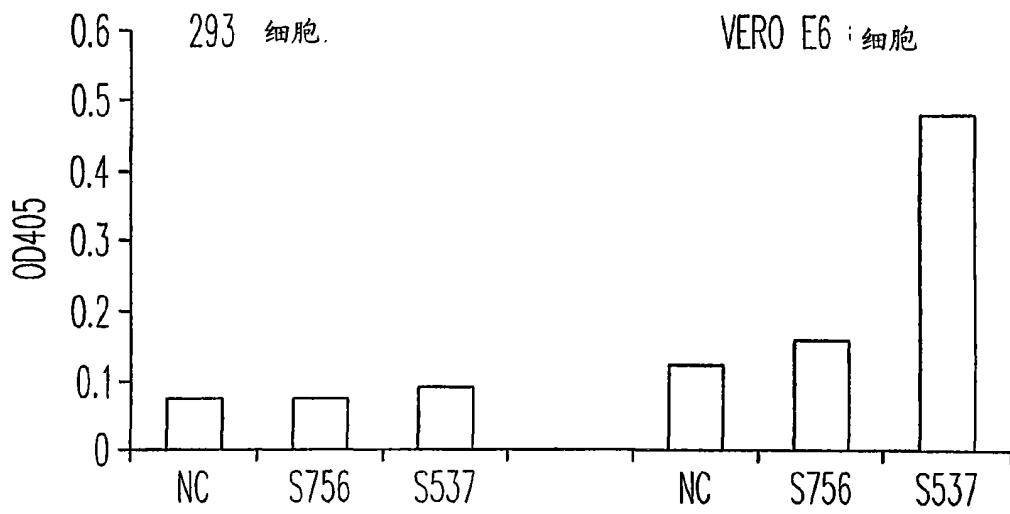


Fig. 8A

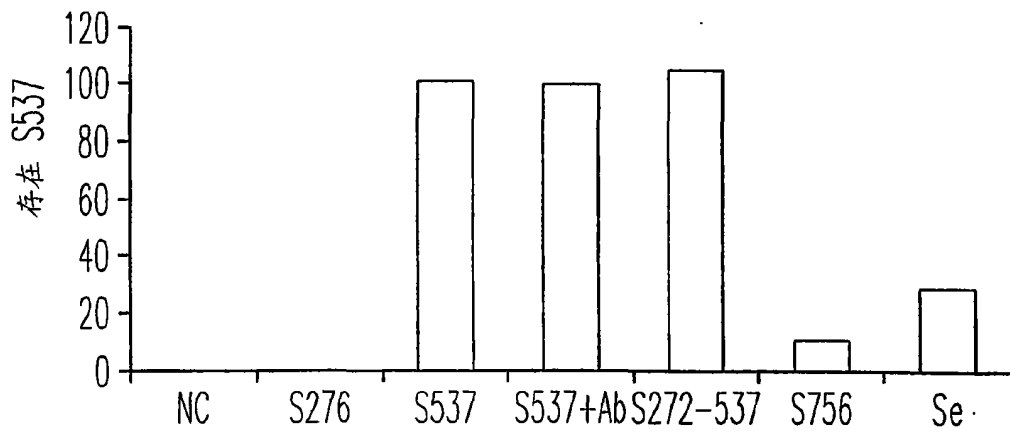


Fig. 8B

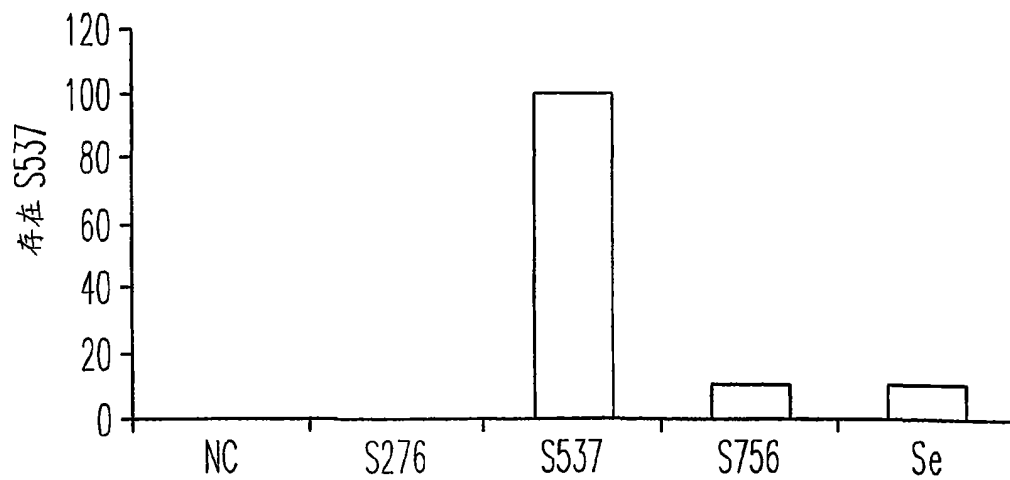


Fig. 8C

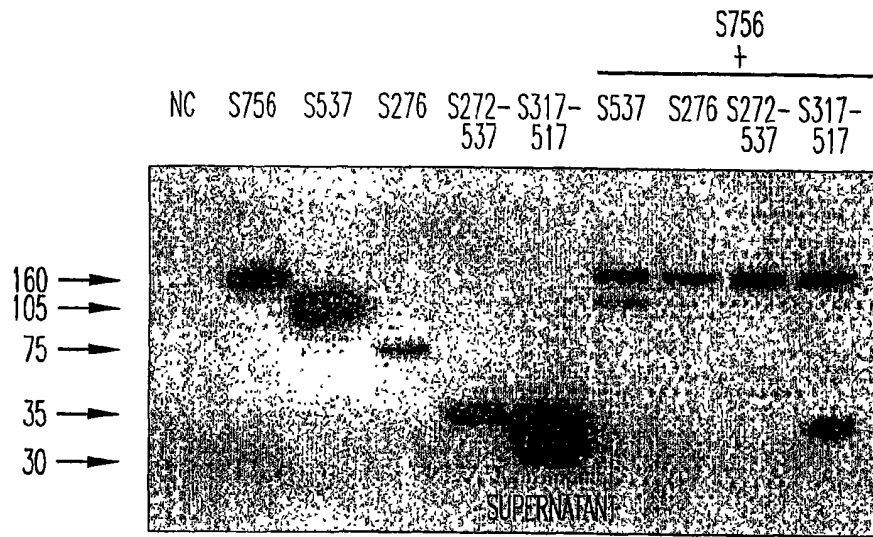


Fig. 9A

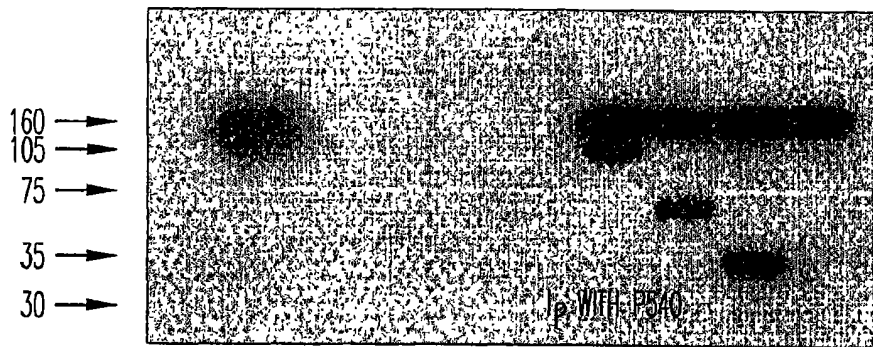


Fig. 9B

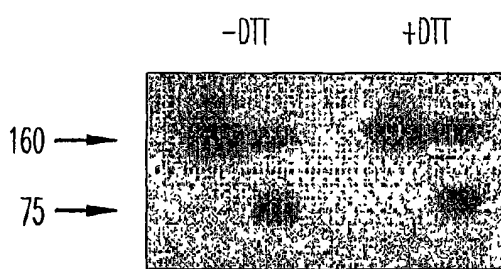


Fig. 9C

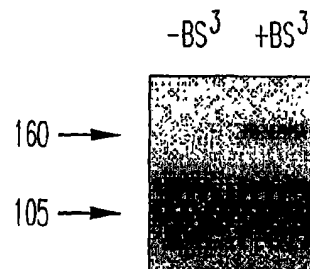


Fig. 9D

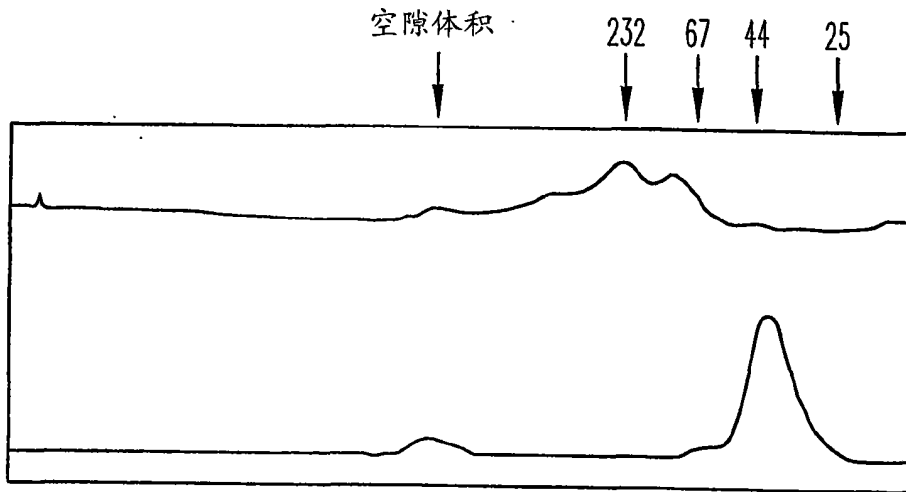


Fig. 10A

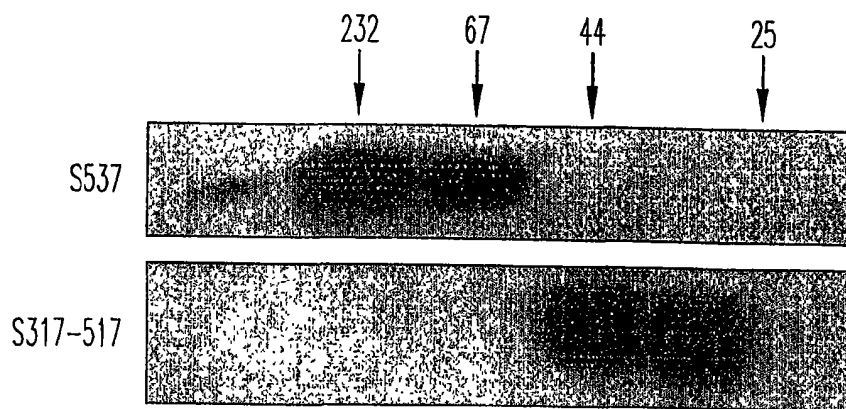


Fig. 10B

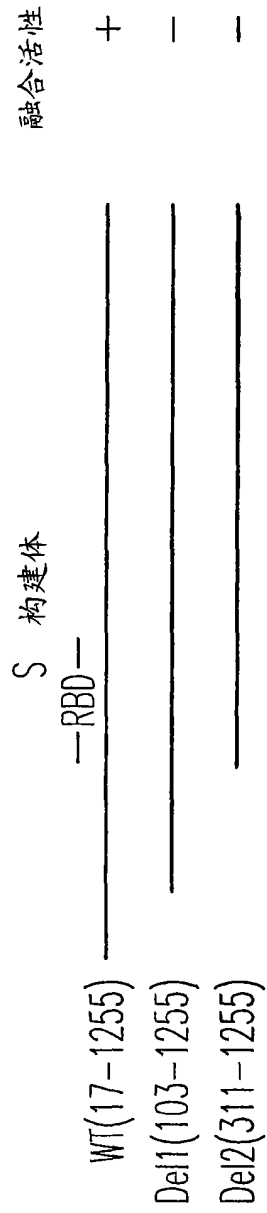


Fig. 11A

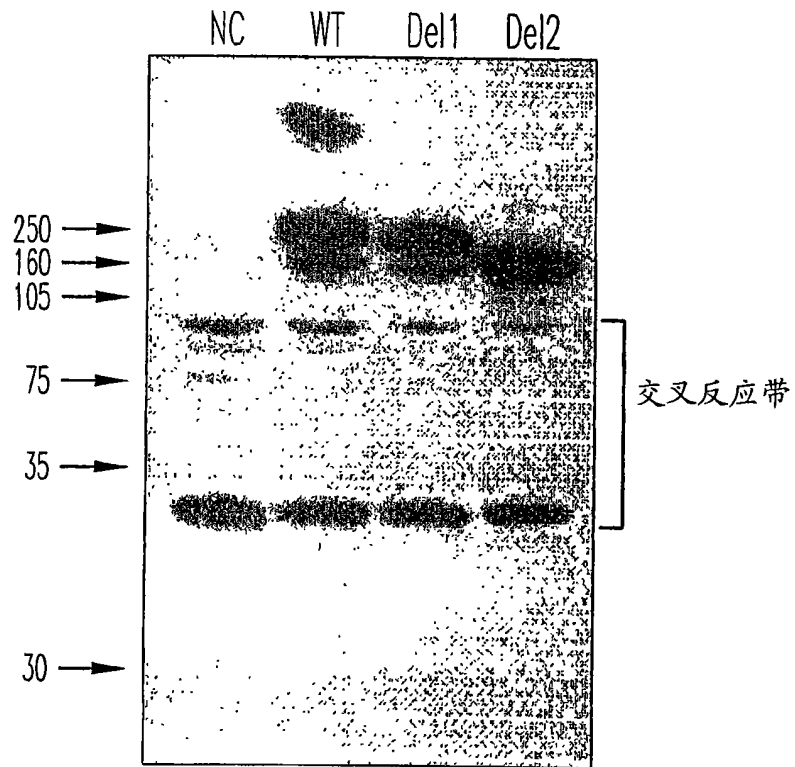


Fig. 11B

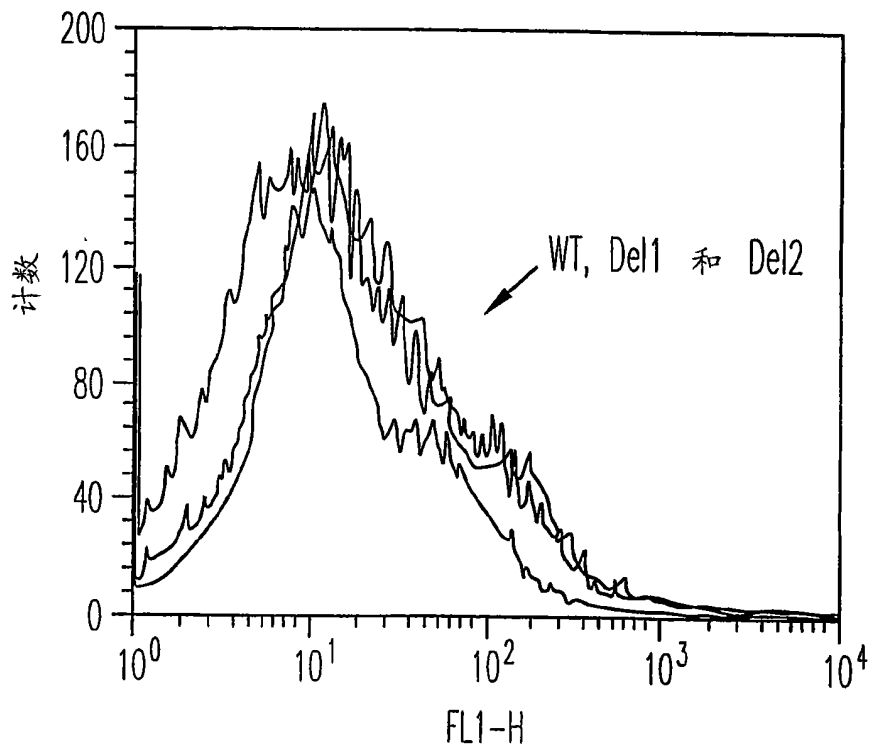


Fig. 11C

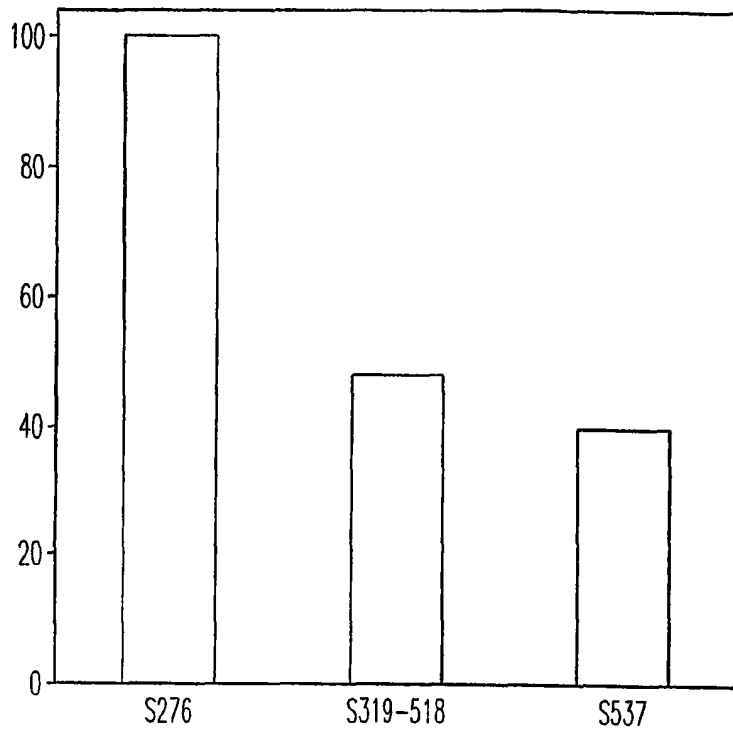


Fig. 12A

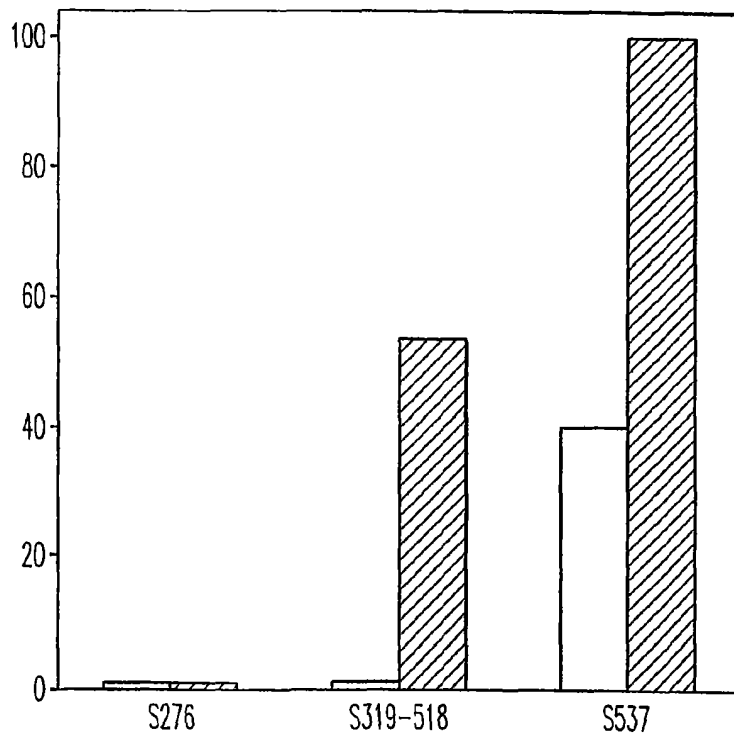


Fig. 12B



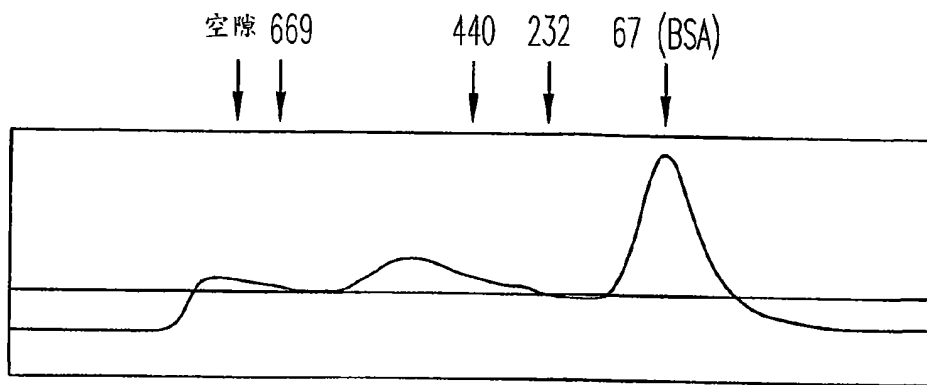


Fig. 13A

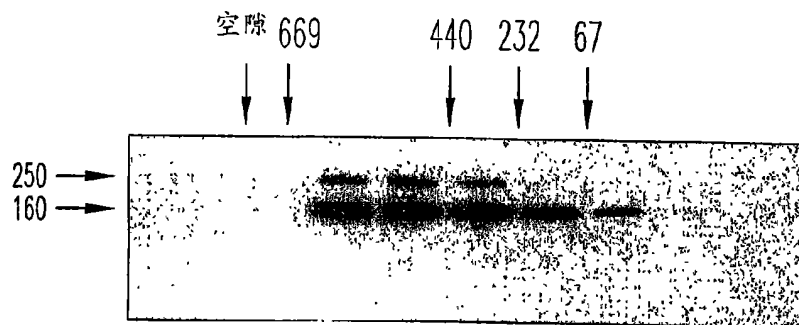


Fig. 13B

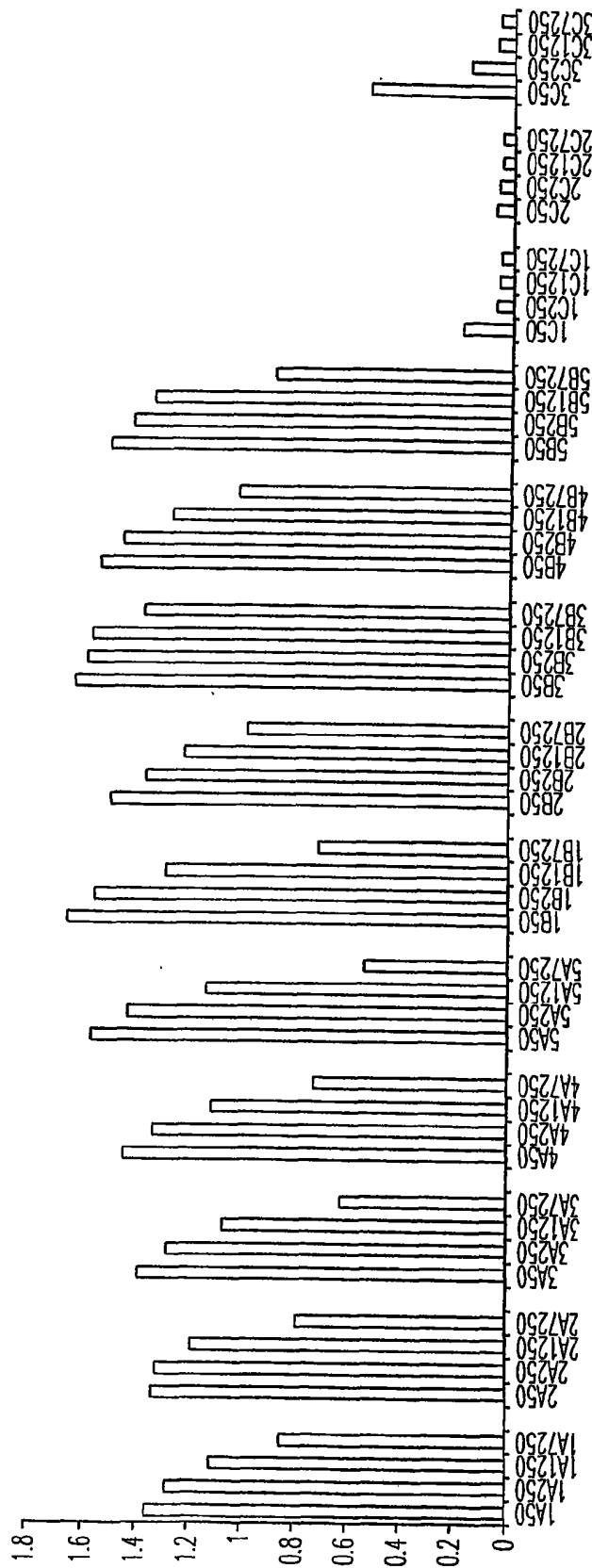


Fig. 14A

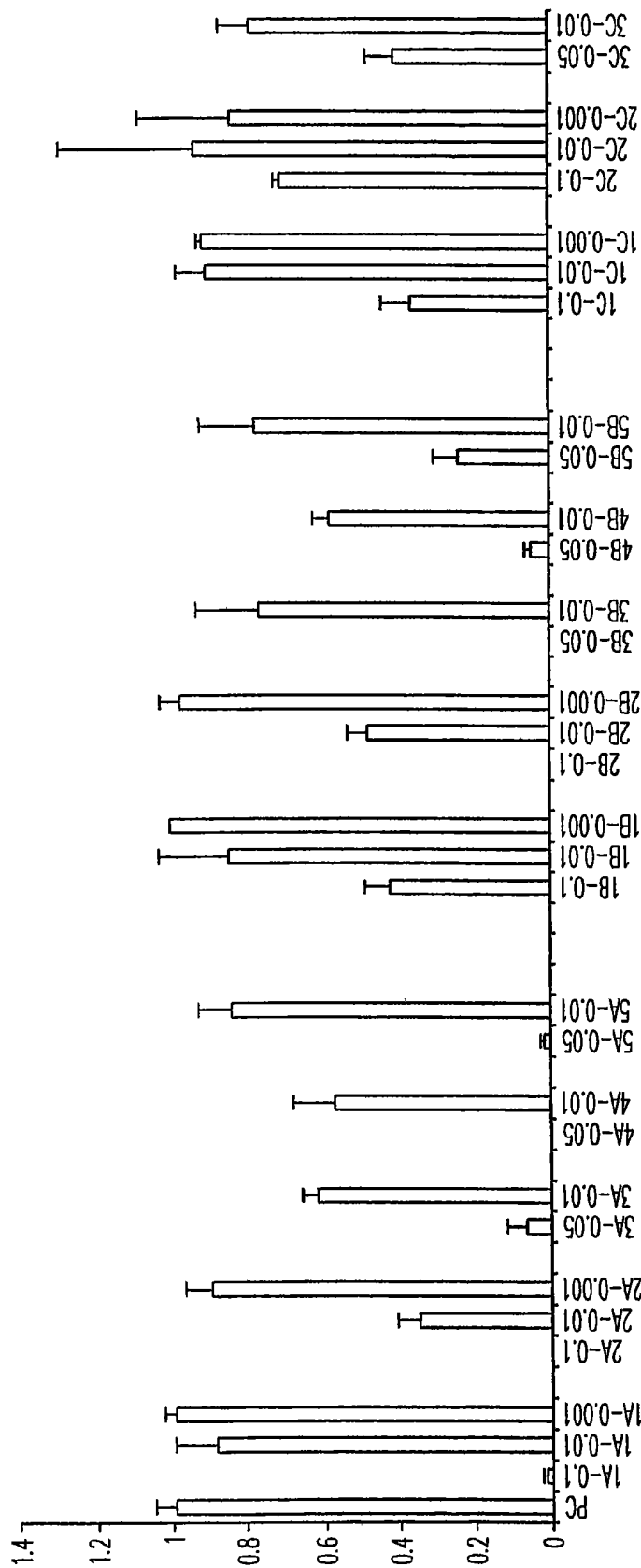


Fig. 14B

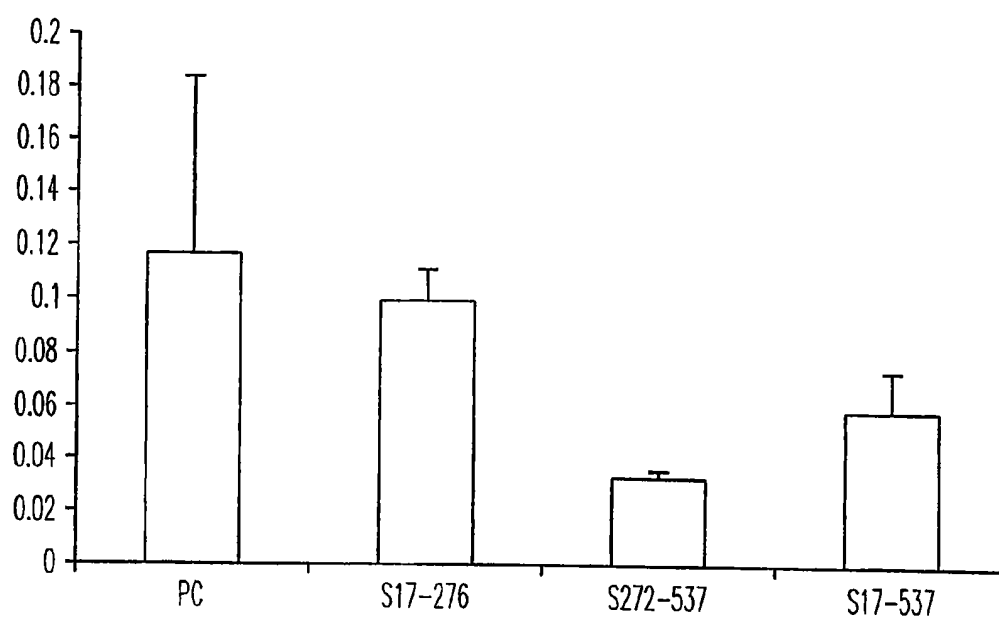


Fig. 15