

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 15/86 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480015275.7

[43] 公开日 2006年7月5日

[11] 公开号 CN 1798844A

[22] 申请日 2004.6.4

[21] 申请号 200480015275.7

[30] 优先权

[32] 2003.6.4 [33] KR [31] 10-2003-0035993

[86] 国际申请 PCT/KR2004/001341 2004.6.4

[87] 国际公布 WO2004/108937 英 2004.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.2

[71] 申请人 生物领先公司

地址 韩国大田广域市

共同申请人 M.D. 实验室

生物领先日本公司

韩国生命工学研究院

[72] 发明人 成文喜 金哲仲 郑昌敏 洪承杓  
李宗洙 催在哲 金光 黑田俊一  
夫夏玲

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司  
代理人 高龙鑫 王颖

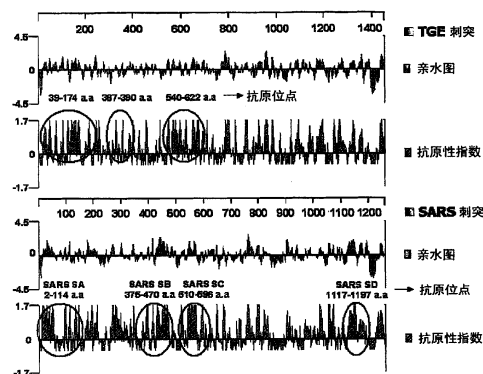
权利要求书 2 页 说明书 17 页 序列表 7 页  
附图 15 页

## [54] 发明名称

SARS 病毒抗原的细胞表面表达载体和用该载体转化的微生物

## [57] 摘要

本发明涉及一种 SARS 冠状病毒抗原的表面表达载体, 该载体包括一种编码诱导 SARS 的冠状病毒的抗原的基因, 以及一种或两种或多种编码聚 -  $\gamma$  - 谷氨酸合成酶复合物的 pgsB, pgsC 和 pgsA 基因, 还涉及被表面表达载体转化的微生物以及包括该微生物的 SARS 疫苗。本发明使得采用表达 SARS 冠状病毒抗原的重组菌株来经济地制备预防和治疗 SARS 的疫苗成为可能。



1. 一种表面表达载体，其包括编码聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物的 pgsB、pgsC 和 pgsA 基因中的任意一种或两种或多种，以及一种编码 SARS 冠状病毒的刺突抗原蛋白或核壳抗原蛋白的基因。  
5
2. 根据权利要求 1 所述的表面表达载体，其中所述的刺突抗原蛋白为 SARS SA、SARS SB、SARS SC、SARS SD 或 SARS SBC。
3. 根据权利要求 1 所述的表面表达载体，其中所述的核壳抗原蛋白为 SARS NA、SARS NB 或 SARS N。
- 10 4. 根据权利要求 2 所述的表面表达载体，其中所述的载体为 pHCE2LB: pgsA-SARS SA、pHCE2LB: pgsA-SARS SC 或 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC。
5. 根据权利要求 3 所述的表面表达载体，其中所述的载体为 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 或 pHCE2LB: pgsA-SARS N。
6. 一种被权利要求 1 至 5 任意一项所述的表达载体转化的微生物。
- 15 7. 根据权利要求 6 所述的微生物，其中所述的微生物选自下述微生物的组中：大肠杆菌、伤寒杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、霍乱弧菌、牛分枝杆菌、志贺菌、芽孢杆菌属、乳酸菌、葡萄球菌、李斯特氏菌和链球菌。
8. 一种制备 SARS 冠状病毒的刺突抗原蛋白或核壳抗原蛋白的方法，其包括培养权利要求 6 的微生物。
- 20 9. 一种预防 SARS 病毒的疫苗，其包括以权利要求 8 的方法所制备的刺突抗原蛋白或核壳抗原蛋白作为有效成分。
10. 根据权利要求 9 所述的疫苗，其中所述的抗原蛋白为微生物表面的表达形式、粗提形式或纯化形式。
11. 根据权利要求 9 所述的疫苗，其中所述的疫苗通过口服施用或存在于食物中。  
25
12. 根据权利要求 9 所述的疫苗，其中所述的疫苗用于皮下或腹膜内注射。
13. 根据权利要求 9 所述的疫苗，其中所述的疫苗用于鼻内给药。
14. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的微生物为乳酸菌。
- 30 15. 权利要求 14 所述方法制备的乳酸菌，该乳酸菌表面上表达 SARS 冠

状病毒的刺突抗原蛋白或核壳抗原蛋白。

16.一种用于预防 SARS 的疫苗，其包括权利要求 15 的乳酸菌、从所述乳酸菌中提取的抗原蛋白、或从所述乳酸菌中纯化的抗原蛋白作为有效成分。

17.根据权利要求 16 所述的疫苗，其中所述疫苗通过口服施用或存在于  
5 食物中。

18. 根据权利要求 16 所述的疫苗，其中所述疫苗用于皮下或腹膜内注射。

19. 根据权利要求 16 所述的疫苗，其中所述疫苗用于鼻内给药。

## SARS 病毒抗原的细胞表面表达载体和用该载体转化的微生物

### 5 技术领域

本发明涉及一种在微生物表面表达 SARS 抗原的载体，由该载体转化的微生物，以及用于预防 SARS 的疫苗，该疫苗包括转化的微生物或其提取物以及纯化的物质。更具体而言，本发明涉及一种表面表达载体，其包括一种编码诱导 SARS 的冠状病毒的抗原蛋白的基因，以及一种或两种或多种编码微生物表面锚定序列(anchoring motif)的聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物的 pgsB, pgsC 和 pgsA 基因，还涉及被该载体转化的微生物以及包括该转化微生物作为有效成分的 SARS 疫苗。

### 背景技术

15 严重急性呼吸性综合征(SARS)是一种新型的流行性疾病，自从 2002 年 11 月在中国广东省首次开始爆发，其已遍布全球，包括香港、新加坡、加拿大(多伦多)等地区。该流行病表现出呼吸性症状，如发烧 38°C 或更高、咳嗽、呼吸困难、非典型性肺炎。SARS 的作用物就是变异性致病冠状病毒。

通常，冠状病毒家族成员是具有(+)RNA 的很大的 RNA 病毒。染色体由约 29,000 至 31,000 碱基对组成，显微镜下可观察到该病毒呈冠状。能引起人类上呼吸道疾病，引起动物的呼吸系统、肝脏、神经和肠道疾病。自然界中存在三组冠状病毒，其中组 I 和组 II 感染哺乳动物，组 III 感染鸟类。

25 已知的冠状病毒有时会引起免疫体系能力较弱的人类发生与肺部有关的疾病，或引起动物如狗、猫、猪、鼠、鸟等的严重疾病。冠状病毒突变率很高，重组率高达约 25%。推测这些特点导致原始冠状病毒发生变异，而形成新型的突变的冠状病毒(SARS 冠状病毒)，该病毒从动物传播至人类。

30 根据世界卫生组织(WHO)的统计,自 2002 年 11 月起,31 个国家中有 7,447 名 SARS 疑似患者，其中有 551 名死亡。2003 年的 SARS 感染危险区域包括中国的北京、广东、香港、内蒙古、山西和天津，新加坡、加拿大的多伦多、台湾、蒙古的乌兰巴托、菲律宾等。然而，还有传播到全世界的风险。

自从 2002 开始爆发以来,关于 SARS 冠状病毒,德国热带医学的研究所首先对 SARS 病毒的核苷酸序列进行破译。该研究小组通过 PCR (聚合酶链式反应) 破译了一部分基因的核苷酸序列。破译结果提供给了德国生物工程公司 Artus GmbH, 用来开发检测 SARS 病毒感染的试剂盒。该试剂盒通过

5 5 通过将 SARS 疑似患者体内的病毒基因扩增来检测出 SARS 的感染。

之后,到目前 SARS 病毒的全基因组已被破译,已完全分析了超过 12 个分离出的毒株的序列。首先被分离出的 Urbani 株[取自死于 SARS 的 WHO 代表团医生的名字, SARS-Cov 株(Rota,PA, Science 108 : 5952,2003; GenBank Accession AY278741)]的全部序列是美国 CDC 研究小组破译的。加拿大大不

10 10 列颠哥伦比亚癌症研究中心 (Canada British Columbia Cancer search center) 小组分析了 2003 年 4 月 12 日从加拿大多伦多一名患者体内分离出的 SARS Tor2 病毒株的全部序列 (Marra,M.A.,Science 108:5953,2003; GenBank Accession 274119)。

尽管这两个研究小组分析了不同地区 SARS 感染者体内分离出的冠状病毒,但这两种病毒显示出的区别仅是 15 个碱基对的不同。这暗示了 SARS 是从同一病毒被诱导产生的。还有,根据 SARS 冠状病毒的基因分析结果,可以看出 SARS 冠状病毒的蛋白质组成与现存冠状病毒的蛋白质组成相同,但基因组以及基因组编码的氨基酸同源性却很低。鼠肝炎病毒和火鸡支气管病毒都与 SARS 冠状病毒有相似性。但是,分子分类学分析提供了 SARS 冠

15 15 冠状病毒与其它冠状病毒的相关性,结果说明 SARS 冠状病毒与现存的组不同。

目前,SARS 冠状病毒的鉴定始于 PCR,抗体检测的阳性结果是由 ELISA 或 IFA 所确定的。病毒的分离是通过对 PCR 鉴定的患者进行细胞培养检测,以确定 SARS 冠状病毒的感染。

目前还没有治疗 SARS 的基本方法,只有辅助治疗。对 SARS 冠状病毒这种新的流行病的作用物的研究才刚刚起步,还没有开发出预防 SARS 的疫苗。世界各地已开始了开发预防 SARS 的疫苗的多方面研究。

25 25

在微生物的细胞表面上附着并表达所需蛋白的技术被称作细胞表面展示技术 (cell surface display technology)。细胞表面展示技术采用微生物如细菌或酵母菌的表面蛋白作为表面锚定序列而在表面上表达外源蛋白,这种技术的应用范围包括重组活疫苗的制备、肽/抗体库的构建以及筛选、全细胞的吸

30 30

附、全细胞的生物转化催化剂等。该技术的应用范围由细胞表面上表达的蛋白质所决定。因此，细胞表面展示技术具有巨大的工业应用潜力。

对于连续的细胞表面展示技术，表面锚定序列是至关重要的。本技术的核心是选择并开发出能在细胞表面有效表达外源蛋白的结构。

5 因此，为了选择表面锚定序列，应考虑以下特征：(1)它应该具有分泌信号来帮助外源蛋白通过细胞内膜，从而使外源蛋白能转运至细胞表面上。(2)它应具有靶信号来帮助外源蛋白稳定地固定到细胞外膜的表面上。(3)它可在细胞表面上大量地被表达，而不影响细胞的生长。(4)它与蛋白的大小无关，且能表达外源蛋白而不会改变蛋白的三维结构。然而，还没有开发出满足上述条件的表面锚定序列。

10 已知的和目前使用的表面锚定序列通常分为四种类型的细胞外膜蛋白、脂蛋白、分泌蛋白、表面器官蛋白如鞭毛蛋白。在革兰氏阴性菌中，已经使用了细胞外膜蛋白，诸如 LamB、PhoE (Charbit et al., J.Immunol.,139:1658,1987; Agterberg et al., Vaccine, 8:85, 1990)、OmpA 等。采用的脂蛋白有诸如 TraT  
15 (Felici et al., J. Mol. Biol., 222: 301,1991)、PAL(与脂蛋白有关的肽聚糖)(Fuchs et al.,Bio/Technology, 9: 1369,1991)以及 Lpp (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 489 : 2713,1992)。作为表面锚定序列来表达外源蛋白的有：黏着在 1 型菌毛上的菌毛蛋白 (fimbriae protein)，如 FimA 或 FimH (Hedegaard et al., Gene, 85: 115,1989)，以及菌毛蛋白 (pili protein) 如 PapA pilu 亚单位。此外，  
20 还有报道能作为表面锚定序列的包括冰核蛋白(ice nucleation protein)(Jung et al., Nat. Biotechnol.,16: 576,1998; Jung et al., Enzyme Microb. Technol.,22: 348, 1998;Lee et al.,Nat.Biotechnol.,18: 645,2000), *Klebsiela oxytoca* 的支链淀粉酶(Kornacker et al., Mol. Microl. , 4: 1101,1990)、*Neiseria* 的 IgA 蛋白酶 (Klauser et al.,EMBO J.,9:1991,1990)、附着在大肠杆菌上的 AIDA-1、志贺菌  
25 属的 VirG 蛋白，以及 Lpp 和 OmpA 的融合蛋白。据报道，在使用革兰氏阳性菌的情况下，可利用金黄色葡萄球菌中的蛋白 A 和 FnBPB 蛋白为表面锚定序列、利用乳酸菌的表面壳蛋白进行表面表达、利用革兰氏阳性菌的表面蛋白如化脓性葡萄球菌遗传因子 (*Staphylococcus pyogenes*) 的 M6 蛋白  
30 (Medaglini, D et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,92:6868, 1995)、炭疽热细菌的 S-层蛋白 EA1、枯草芽孢杆菌 CotB 等作为锚定序列能有效表达疟疾抗原。

本发明人开发了一种能在微生物细胞表面上有效表达外源蛋白的新型载体，该载体使用杆菌属菌株的聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物基因(pgsBCA)作为新型表面锚定序列，还开发了一种在被该载体转化的微生物表面上大量表达外源蛋白的方法（韩国专利申请号：10-2001-48373）。

5 研究人员已开始从事利用上述表面锚定序列通过基因工程方法在适于进行大量生产的细菌体内稳定表达致病性抗原或抗原决定部位的研究。尤其是，已有报道，与减毒致病菌或病毒疫苗相比，口服表面上表达外源免疫原的非致病活菌后，能诱导更持久、更强的免疫应答。免疫应答的诱导归功于细菌表面结构的佐剂作用，从而增加了表面上表达的外源蛋白的抗原性以及活体  
10 对活菌产生的免疫应答。利用该表面表达体系开发非致病性细菌的重组活疫苗已引起了人们的注意。

因此，本发明人成功地通过选择基因并对非致病性微生物表面上的蛋白质分析，来大量表达 SARS 冠状病毒抗原，其中，食品安全得以保障，如通过源于杆菌菌株的聚- $\gamma$ -谷氨酸合成复合物基因（pgsBCA）作为表面锚定序  
15 列而转化的乳酸菌，并开发了经济且稳定的疫苗，通过口服微生物来诱导血液中产生 SARS 冠状病毒的抗体和粘膜免疫。

#### 发明内容

因此，本发明的一个目的在于提供一种通过利用微生物表面表达体系来  
20 表达 SARS 冠状病毒抗原的载体，以及被载体转化的微生物。

本发明的另一个目的在于提供一种在表面表达 SARS 冠状病毒抗原的转化的微生物，用于预防 SARS 的疫苗，该疫苗包括从微生物中提取的 SARS 冠状病毒抗原或从微生物中纯化的 SARS 冠状病毒抗原作为有效成分。

为了实现上述目的，本发明提供的表面表达载体包括一种或两种或多种  
25 编码聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物的 pgsB, pgsC 和 pgsA 基因以及一种编码 SARS 冠状病毒的刺突抗原蛋白或核壳抗原蛋白的基因。

根据本发明，任何编码 SARS 冠状病毒的刺突抗原蛋白的基因都可用作表面抗原蛋白基因。可单独使用 SARS 冠状病毒的刺突抗原蛋白基因或其两种或多种复合物。编码聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶复合物的基因优选包括 pgsA。刺突  
30 抗原蛋白可以是 SARS SA, SARS SB, SARS SC, SARS SD 或 SARS SBC，核

壳抗原蛋白可以是 SARS NA, SARS NB 或 SARS N。

本发明提供了一种被表达载体转化的微生物以及制备 SARS 冠状病毒的刺突抗原蛋白或核壳抗原蛋白的方法, 该方法包括培养所述微生物。

本发明适用的微生物可以是对生物体无毒的任何微生物或减毒微生物。

5 例如, 所述微生物适宜地选自革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌 (E.coli), 伤寒杆菌 (Salmonella typhi), 鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium), 霍乱弧菌 (Vibrio cholerae), 牛分枝杆菌 (Mycobacterium bovis), 志贺菌 (Shigella) 等, 或革兰氏阳性菌, 如芽孢杆菌属 (Bacillus), 乳酸菌 (Lactobacillus)、乳球菌 (Lactococcus), 葡萄球菌属 (Staphylococcus), 李斯特氏菌 (Listeria  
10 monocytogenes) 和链球菌 (Streptococcus) 等。尤其优选的是可食用微生物, 如乳酸菌。

本发明还提供了一种用于预防 SARS 的疫苗, 其包括表面上表达抗原蛋白的微生物、从已破碎的该微生物细胞膜组成中提取的粗提物、或从微生物中纯化的抗原蛋白作为有效成分。

15 本发明的疫苗可以作为药物应用以预防由 SARS 冠状病毒诱导产生的 SARS (严重急性呼吸综合征)。

本发明的疫苗可口服服用, 或存在于食品中, 或皮下或腹膜内注射或经鼻内途径施用。

20 至今, SARS 冠状病毒的感染已知由传染性飞沫感染呼吸器官所导致, 推测在呼吸器官的粘膜表面发生。因此, 通过粘膜免疫来预防感染是非常重要的。由于在表面上表达 SARS 冠状病毒抗原的微生物能更有效地在粘膜上诱导抗体的形成, 因此通过口服或鼻内途径施用转化的微生物得到的疫苗比胃肠外施用的疫苗在预防 SARS 冠状病毒方面更有效。

## 25 附图说明

通过结合下述附图进行详细说明, 从而对本发明的进一步目的以及优点进行更充分的了解。

30 图 1 为根据 Kyte-Doolittle 方法的亲水图、Jameson-wolf 方法的抗原性指数和 Emini 方法的表面可能性图所显示出的猪的传染性胃肠炎病毒的 4 种抗原位点 (A, B, C, D) 与 SARS 冠状病毒的刺突蛋白之间的关系。



图 2 为根据 Kyte-Doolittle 方法的亲水图, Jameson-wolf 方法的抗原性指数和 Emini 方法的表面可能性图所显示出的猪的传染性胃肠炎病毒的核壳蛋白与 SARS 冠状病毒的核壳蛋白之间的关系。

图 3A 是本发明的包括革兰氏阴性和革兰氏阳性菌为宿主的表面表达载体 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 的基因图, 图 3B 是本发明的 pHCE2LB:pgsA-SARS SC 的基因图, 图 3C 是本发明的 pHCE2LB:pgsA-SARS SBC 的基因图。

图 4A 是本发明的载体 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 的基因图, 图 4B 是本发明的 pHCE2LB:pgsA-SARS N 的基因图。

图 5A、5B 和 5C 通过 Western 免疫印迹显示 pgsA 的特异性抗体与融合蛋白间的特异性结合, 来鉴定乳酸菌中与细胞外膜蛋白 pgsA 融合的 SARS SA、SARS SC 和 SARS SBC 抗原的表达。

图 6A 和 6B 采用乳酸菌细胞的蛋白片段作为 pgsA 的特异性抗体进行 Western 免疫印迹, 来识别与乳酸菌中细胞外膜蛋白 pgsA 融合的 SARS SA 和 SARS SBC 抗原的表面表达, 图 6C 为通过 FACS 扫描检测乳酸菌中的 SARS SBC 抗原的表面表达。

图 7A 和 7B 采用乳酸菌细胞的蛋白片段作为 pgsA 的特异性抗体进行 Western 免疫印迹, 来识别与乳酸菌中细胞外膜蛋白 pgsA 融合的 SARS NB 和 SARS N 抗原的表面表达。

图 8 为本发明的分别用进行表面表达的 pHCE2LB: pgsA-SARS SA、pHCE2LB: pgsA-SARS SC 和 pHCE1LB:pgsA-SARS NB 载体转化酪乳酸杆菌菌株, 并且通过 ELISA (酶联免疫吸附检测) 鉴定出该转化菌株具有抗原部分的表面表达, 该转化菌株经口服和鼻内给药后, 在小鼠血清中所测得的 SARS SA 和 SARS SC 抗原的 IgG 抗体值。

图 9 为本发明的分别用进行表面表达的 pHCE2LB: pgsA-SARS SA、pHCE2LB: pgsA-SARS SC 和 pHCE1LB:pgsA-SARS NB 载体转化酪乳酸杆菌菌株, 并且通过 ELISA 鉴定出该转化菌株具有抗原部分的表面表达, 该转化菌株经口服和鼻内给药后, 在小鼠的洗肠液和支气管和肺泡的洗液中所测得的 SARS SA 和 SARS SC 抗原的 IgA 抗体值。

图 10 为本发明的分别用进行表面表达的 pHCE2LB:pgsA-SARS SA、

pHCE2LB: pgsA-SARS SC 和 pHCE1LB: pgsA-SARS NB 载体转化酪乳酸杆菌菌株, 并且通过 ELISA 鉴定出该转化菌株具有抗原部分的表面表达, 该转化菌株经口服和鼻内给药后, 所测定的小鼠血清中 SARS NB 抗原部分的 IgG 抗体值。

- 5 图 11 为本发明的分别用进行表面表达的 pHCE2LB: pgsA-SARS SA、pHCE2LB: pgsA-SARS SC 和 pHCE1LB: pgsA-SARS NB 载体转化酪乳酸杆菌菌株, 并且通过 ELISA 鉴定出该转化菌株具有抗原部分的表面表达, 该转化菌株经口服和鼻内给药后, 在小鼠的洗肠液和支气管和肺泡的洗液中所测得的 SARS NB 抗原的 IgA 抗体值。

10

### 最佳实施方式

通过下述实施例进一步详细说明本发明。对于本领与普通技术人员而言, 显而易见, 这些实施例仅用于对本发明进行具体解释说明, 而本发明的范围并不局限于此。

- 15 尤其是, 尽管下述实施例采用了 SARS 冠状病毒的刺突蛋白的抗原位点基因以及核壳蛋白的抗原位点基因, 但任何抗原蛋白基因都可单独使用或作为两种或多种的复合物使用。

在下述实施例中, 所采用的与聚- $\gamma$ -谷氨酸的合成有关的细胞外膜蛋白的基因 pgsBCA 是从枯草芽孢杆菌 chungkookjang 变种(KCTC 0697BP)所获得。  
20 然而, 根据本发明, 基因包括利用 pgsBCA 制备的载体, 其中 pgsBCA 是从产生 poly- $\gamma$ -谷氨酸的所有杆菌属菌株或被这些载体转化的微生物中获得的。例如, 采用来源于其它菌株且与枯草芽孢杆菌 chungkookjang 变种中存在的 pgsBCA 基因序列有 80%或更高同源性的 pgsBCA 基因制备用于疫苗的载体, 以及载体使用的技术方案也包括在本发明的范围之内。

- 25 以下实施例中, 仅基因 pgsBCA 的 pgsA 用于构建表面表达载体。然而, 可以从间接实施例推断出, 使用部分基因 pgsBCA 或者全部基因 pgsBCA 来构建疫苗用载体都包括在本发明的范围之内。

在以下实施例中, 革兰氏阴性菌伤寒杆菌和革兰氏阳性菌乳酸菌被用作载体的宿主。然而, 任何一种通过本发明方法转化的革兰氏阴性菌或革兰氏  
30 阳性菌都能获得相同结果, 这对于本领与技术人员而言是显而易见的。

此外，在下述实施例中，仅用本发明的疫苗用载体所转化的微生物作为活疫苗来施用到活体中。然而，根据与疫苗技术领域相关的知识，当将从微生物提取的粗提物表达蛋白（SARS 冠状病毒的抗原蛋白）或纯化的表达蛋白用于活体中，很自然能获得相同或相近的结果。

5

#### 实施例 1: SARS 冠状病毒的刺突蛋白的抗原位点基因的合成

SARS 冠状病毒的刺突蛋白是一种由 1256 个氨基酸构成的糖蛋白。在其它已进行大量检测的冠状病毒中，刺突蛋白大多嵌入到覆盖在病毒颗粒表面上的包膜蛋白中，而具有暴露在外面的结构。暴露位点和抗原位点已作为诱导病毒感染与预防感染的疫苗的靶抗原而被深入地研究。

因此，为了从 SARS 冠状病毒的刺突蛋白的 1256 个氨基酸中选择出能表现抗原性的位点，对其它已经研究了抗原性并合成了猪传染性胃肠炎 (TGE) 冠状病毒的刺突蛋白进行蛋白比较分析和结构比较分析，从而选择抗原位点。具体而言，已知猪传染性胃肠炎病毒的刺突蛋白的抗原位点为 4 个位点(A, B, C, D) (Enjuanes, L., Virology, 183 : 225,1991)。根据 Kyte-Doolittle 方法的亲水图，Jameson-wolf 方法的抗原性指数和 Emini 方法的表面可能性图，分析这些位点和 SARS 冠状病毒的刺突蛋白的关系，从 SARS 冠状病毒 Tor2 分离物的刺突蛋白的序列中选择出 SARS SA, SARS SB, SARS SC 和 SARS SD(图 1)。

首先，基于 SARS 冠状病毒 Tor2 分离物的刺突蛋白的序列(21492-25259 个碱基对，1255 个氨基酸)，其中全部序列都已被鉴定出，2 至 114 氨基酸位点有望成为所选择的抗原位点，称其为 SARS SA，选择的 375 至 470 氨基酸，称其为 SARS SB，选择的 510 至 596 氨基酸，称其为 SARS SC，选择的 1117 至 1197 氨基酸，称其为 SARS SD。在这些抗原位点中，对 SARS SA 和 SARS SC 位点进行了合成。

为了合成 SARS SA 的 113 个氨基酸长度对应的基因，用 SEQ ID NOs:1 至 8 为引物进行 PCR，得到含有 339bp 的扩增的 SARS SA 基因。

SEQ ID NO:1: 5'-ggatcctttattttcttattttcttactctcactagtggtagtgaccttgaccg-3'

SEQ ID NO:2: 5'-tgagtgtaattaggagcttgaacatcatcaaaagtgggtacaacgggtcaaggtc-3'

30 SEQ ID NO: 3:5'-aattacactcaacatacttcatctatgctggggtttactatcctgatgaaatttttc-3'

SEQ ID NO: 4: 5'-aaaatggaagaataaatcctgagttaaataaagagtgtctgaacgaaaaattt-3'

SEQ ID NO: 5: 5'-cttcattttattctaattgttactgggttcatactattaatcatacgtttggcaac-3'

SEQ ID NO: 6: 5'-ggcagcaaaataataaccatccttaaaaggaatgacagggttgccaaacgtatg-5'

SEQ ID NO: 7: 5'-atatttttgctgccacagagaaatcaaatgttgcctggttgggttttgg-3'

5 SEQ ID NO: 8: 5'-ggtaccaagcttattacacagactgtgacttgttgcattggttagaaccaaaaacc-3'

为了合成 SARS SC 的 87 个氨基酸长度所对应的基因,用 SEQ ID NOs: 9 至 14 位引物进行 PCR, 得到含 261bp 的扩增的 SARS SC 基因。

SEQ ID NO: 9: 5'-ggatccgtttgtggtccaaaattatctactgaccttattaagaaccagtggtcaat-3'

10 SEQ ID NO: 10: 5'-gaagaaggagttaacacaccagtagaccattaaaattaaattgacacact-3'

SEQ ID NO: 11: 5'-aactccttcttcaaagcgtttcaaccattcaacaattggccgtgatgttctga-3'

SEQ ID NO: 12: 5'-ctaaaattcagatgttttaggatcacgaacagaatcagtgaaatcagaaacat-3'

SEQ ID NO: 13: 5'-ctgaaatttagacattcaccttgcctttgggggtgtaagtgaattaca-3'

SEQ ID NO: 14: 5'-ggtaccaagcttattaacagcaacttcagatgaagcattgtaccaggtgaattac-3'

15

此外, 通过合成获得抗原位点基因, 采用来自加拿大迈克尔史密斯基因学中心 (Canada's Michael Smith Genome Science Center) 的 SARS 刺突 cDNA 克隆体(SARS 冠状病毒 TOR2)为模板, 以 SEQ ID NOs:15 和 16 为引物, 通过 PCR 扩增得到编码 264 至 596 氨基酸的含 966bp 的基因, 将其命名为 SARS

20 SBC [该基因包括能产生中和抗体的关键位点(PNAS, 101: 2536,2004)].

SEQ ID NO: 15 (SBC 正义):5'-cgcggatccctcaagtatgatgaaaat-3'

SEQ ID NO: 16 (SBC 反义):5'-cggggtaccttaaacagcaacttcaga-3'

## 实施例 2: SARS 冠状病毒的核壳蛋白的抗原位点基因的合成

25 SARS 冠状病毒的核壳蛋白是一种由 422 个氨基酸构成的蛋白。据报道, 大多数其它冠状病毒的核壳蛋白都可作为抗原。这些抗原位点已经被深入研究, 以用作预防冠状病毒感染的疫苗的靶向抗原。

因此, 通过与猪传染性胃肠炎(TGE)的冠状病毒的核壳蛋白进行蛋白比较分析, 选择 SARS 冠状病毒的核壳蛋白的氨基酸中能表现出抗原性的位点,

30 并进行合成。

具体而言, 根据 Kyte-Doolittle 方法的亲水图, Jameson-wolf 方法的抗原性指数和 Emini 方法的表面可能性图, 分析猪传染性胃肠炎病毒的核壳蛋白和 SARS 冠状病毒的核壳蛋白之间的关系, 从 SARS 冠状病毒 Tor2 分离物的核壳蛋白的序列中选择出 SARS NA 和 SARS NB(图 2)。

5 首先, 基于 SARS 冠状病毒 Tor2 分离物的核壳蛋白序列(28120-29388 个碱基对, 422 个氨基酸), 其中全部序列都已被鉴定出, 2 至 157 氨基酸位点有望成为所选择的抗原位点, 称其为 SARS NA, 选择的 163 至 305 氨基酸位点, 称其为 SARS NB。本发明合成了 SARS NB 位点的基因。

为了合成 SARS NB 的 143 个氨基酸长度所对应的基因, 用 SEQ ID  
10 NOs:17 至 26 为引物进行 PCR, 得到含有 429bp 的扩增的 SARS NB 基因。

SEQ ID NO:17: 5'-ggatcccctcaaggtacaacattgccaaaaggcttctacgcagagggtagccgtgg-3'

SEQ ID NO: 18 :5'-accacgactacgtgatgaagaacgagaagaggcttgactgccgccacggctacc-3'

SEQ ID NO: 19 : 5'-cacgtagtcgtggtaattcacgtaattcaactcctggcagcagtcgtgtaaat-3'

SEQ ID NO : 20:5'-gcgagggcagtttcaccaccaccgctagccatacagcagcaggagaattaccacga-3'

15 SEQ ID NO: 21:5'-gaaactgcctcgcacttttgctgcttgaccgttgaaccagcttgagagcaa-3'

SEQ ID NO: 22:5'-tagtgacagtttgaccttgtgtgttgcccttaccagaaactttgctctcaa-3'

SEQ ID NO: 23: 5'-caaaactgtcactaagaaatctgctgctgaggcatctaaaaagcctcgtcaaaaacgt-3'

SEQ ID NO: 24:5'-ggaccacgacgccc aaatgcttgagtacggtgactgttttgggcagctacgttttg-3'

SEQ ID NO:25:5'-gggcgtcgtggtccagaacaaaccaaggtaatcggggaccaagaccttatccgt-3'

20 SEQ ID NO: 26: 5'-ggtaccaagcttattaattgcgccaatgttgtaatcagctaccttgacggataagg-3'

此外, 通过合成获得抗原位点基因, 采用来自加拿大迈克尔史密斯基因学中心的 SARS 核壳 cDNA 克隆体(SARS 冠状病毒 TOR2)为模板, 以 SEQ ID  
25 NOs:27 和 28 为引物, 通过 PCR 扩增得到编码 2 至 305 位氨基酸的 912bp 的基因, 将其命名为 SARS N。

SEQ ID NO: 27 (N sense): 5'-cgcgatcctctgataatggtccgcaa-3'

SEQ ID NO: 28 (N anti-sense): 5'-cggggtaccttaattgcgccaatgttt-3'

30 实施例 3: 表面表达载体 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 和 pHCE2LB:pgsA-SARS SC 的构建

以革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌为宿主，利用源于杆菌属菌株、并参与合成聚- $\gamma$ -谷氨酸的细胞外膜蛋白基因(pgsBCA)中的 pgsA 来构建能表面表达 SARS 冠状病毒的刺突蛋白的抗原位点 SARS SA 和 SC 的表面表达载体 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 和 pHCE2LB: pgsA-SARS SC。

5 首先，用 BamHI 和 KpnI 消化 pHCE2LB:pgsA-HPVL1(KCTC 10349BP)，  
以将 SARS 冠状病毒的刺突蛋白中的抗原位点 SARS SA 和 SARS SC 导入到  
能在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的宿主中表达人乳突瘤病毒的 L1 抗原的  
表面表达载体上(一种载体，其含有高表达启动子 HCE 启动子、参与合成聚- $\gamma$ -  
谷氨酸的细胞外膜蛋白的基因(pgsBCA)中的 pgsA，以及常用于革兰氏阴性菌  
10 和革兰氏阳性菌的载体 pAT 中的 HPV L1。 )。

用限制酶 BamHI 和 KpnI 消化实施例 1 中合成的 SARS SA 和 SARS SC  
抗原基因，然后连接到已制备的表面表达载体 pHCE2LB:pgsA 上的参与合成  
聚- $\gamma$ -谷氨酸的细胞外膜蛋白的基因 pgsA 的 C 末端上，根据翻译密码子制备  
载体 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 和 pHCE2LB: pgsA-SARS SC (图 3A 和 3B)。  
15 用制备得到的表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS SA 和 pHCE2LB:  
pgsA-SARS SC 转化革兰氏阳性菌乳酸菌，检测乳酸菌中 pHCE2LB:  
pgsA-SARS SA 和 pHCE2LB: pgsA-SARS SC 质粒的存在。

#### 实施例 4：表面表达载体 pHCE2LB:pgsA: SARS SBC 的构建

20 利用源于杆菌属菌株、并参与合成聚- $\gamma$ -谷氨酸的细胞外膜蛋白基因  
(pgsBCA)中的 pgsA 来构建能表面表达 SARS 冠状病毒的刺突蛋白的抗原位  
点 SARS SBC 的表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC。

首先，按照实施例 3 中的方法，制备表面表达载体 pHCE2LB: pgsA。根  
据实施例 1 所描述的方法，以 SARS 冠状病毒的 SARS 刺突 cDNA 克隆体为  
25 模板，通过 PCR 扩增编码 264-596 氨基酸位点的基因，得到含 996bp 的 SARS  
SBC 基因。然后将 SARS SBC 基因嵌入到表面表达载体 pHCE2LB:pgsA 中，  
制备 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC (图 3C)。用制备的 pHCE2LB: pgsA-SARS  
SBC 转化革兰氏阳性菌乳酸菌，检测乳酸菌中 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC  
质粒的存在。

30

### 实施例 5: 表面表达载体 pHCE2LB: pgsA: SARS NB 的构建

利用源于杆菌属菌株、并参与合成聚- $\gamma$ -谷氨酸的细胞外膜蛋白基因 (pgsBCA)中的 pgsA 来构建能表面表达 SARS 冠状病毒的核壳蛋白的抗原位点 SARS NB 的表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS NB。

- 5 首先, 按照实施例 3 中的方法, 制备表面表达载体 pHCE2LB: pgsA。用限制酶 BamHI 和 KpnI 消化实施例 2 中合成的 SARS NB 抗原基因, 然后连接到已制备的表面表达载体 pHCE2LB:pgsA 上的参与合成聚- $\gamma$ -谷氨酸的细胞外膜蛋白的基因 pgsA 的 C 末端上, 根据翻译密码子制备载体 pHCE2LB:pgsA-SARS NB(图 4A)。再用制备得到的表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 转化革兰氏阳性菌乳酸菌, 检测乳酸菌中 pHCE2LB:pgsA-SARS NB 质粒的存在。

### 实施例 6: 表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS N 的构建

- 15 利用源于杆菌属菌株、并参与合成聚- $\gamma$ -谷氨酸的细胞外膜蛋白基因 (pgsBCA)中的 pgsA 来构建能表面表达 SARS 冠状病毒的核壳蛋白的抗原位点 SARS N 的表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS N。

- 首先, 按照实施例 3 中的方法, 制备表面表达载体 pHCE2LB: pgsA。根据实施例 2 所描述的方法, 以 SARS 冠状病毒的 SARS 核壳 cDNA 克隆体为模板, 通过 PCR 扩增编码 2-305 氨基酸位点的基因, 得到含 912bp 的 SARS N 20 基因。然后将 SARS N 基因嵌入到表面表达载体 pHCE2LB:pgsA 上, 制备 pHCE2LB: pgsA-SARS N(图 4B)。用制备的 pHCE2LB: pgsA-SARS N 转化革兰氏阳性菌乳酸菌, 检测乳酸菌中 pHCE2LB: pgsA-SARS N 质粒的存在。

### 实施例 7: 乳酸菌上的 SARS 病毒刺突抗原蛋白的表面表达的确定

- 25 用表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS SA、pHCE2LB: pgsA-SARS SC 和 pHCE2LB:pgsA- SARS SBC 转化乳酸菌, 检测各抗原蛋白的表达。

- 用 pHCE2LB: pgsA-SARS SA、pHCE2LB: pgsA-SARS SC 和 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC 转化酪乳酸杆菌, 转化的菌株在 MRS 培养基 (乳酸菌 MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA) 中培养至静止期, 37°C 下进行扩 30 增, 诱导与基因 pgsA 合成的聚- $\gamma$ -谷氨酸的 C 末端融合的 SARS 病毒刺突抗

原的抗原位点的表达。

通过 Western 免疫印迹法, 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 pgsA 的特异性抗体检测各突变抗原的表达。对已被诱导表达的酪乳酸杆菌的全细胞进行变性, 得到相同细胞浓度的蛋白来制备样本。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来  
5 分析这些蛋白, 并将分离的蛋白转移至 PVDF 膜 (聚二氟偏二乙烯膜, Bio-Rad) 上。将其上带有蛋白的 PVDF 膜放在封闭缓冲液(50 mM TrisHCl, 5 %脱脂乳, pH 8.0)中, 振摇 1 个小时进行封闭, 与 pgsA 的兔源多克隆一级抗体反应 12 个小时, 其中该抗体已用封闭缓冲液稀释 1000 倍。

反应结束后, 用缓冲液清洗膜, 再与兔的结合生物素的二级抗体反应 4  
10 小时, 其中该二级抗体已用封闭缓冲液稀释了 1000 倍。反应结束后, 用缓冲液清洗膜, 再与抗生物素蛋白-生物素试剂反应 1 个小时, 然后再清洗。用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DAB 溶液处理清洗后的膜, 将其用作底物, 用着色剂确定 pgsA 的特异性抗体和融合蛋白之间的特异性结合(图 5)。图 5A 中, 泳道 1 是未转化的酪乳酸杆菌, 泳道 2, 3 和 4 是被 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 转化的酪乳酸杆菌。  
15 图 5B 中, 泳道 1 是未转化的酪乳酸杆菌, 泳道 2, 3, 4, 5 和 6 是被 pHCE2LB:pgsA-SARS SC/转化的酪乳酸杆菌。图 5C 中, 泳道 1 是未转化的酪乳酸杆菌, 泳道 2 是被 pHCE2LB:pgsA-SARS SBC 转化的酪乳酸杆菌。

如图 5 所示, 在所有乳酸菌的细胞中检测到特异性融合蛋白[约 54kDa 的 pgsA-SARS SA (图 5A), 约 51kDa 的 pgsA-SARS SC (图 5B)和约 78kDa  
20 的 pgsA-SARS SBC(图 5C)]。

为了确定经 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 和 pHCE2LB: pgsA-SARS:SBC 表面表达载体所转化的乳酸菌的表面上是否与 pgsA 一起表达了各抗原蛋白, 通过超高速离心机将各载体转化的乳酸菌破碎成细胞壁和细胞质, 通过  
Western blot 法, 使用 pgsA 的特异性抗体检测各融合蛋白的位置。

具体而言, 收集由上述方法诱导融合蛋白质表面表达的乳酸菌, 配置成  
25 与未转化的乳酸菌相同的细胞浓度。用 TES 缓冲液(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 25%蔗糖)清洗细胞数次, 将细胞悬浮于含 5mg/ml 溶菌酶、1mM PMSF 和 1 mM EDTA 的蒸馏水中, 在-60℃下冷冻, 室温下解冻几次, 用 DNase (0.5mg/mQ)和 RNase(0.5mg/m)处理, 然后进行超声处理使细胞破  
30 碎。然后, 在 4℃、10,000 Xg 下对细胞溶解物离心 20 分钟, 使未溶解的乳



酸菌细胞（颗粒；全细胞部分）和细胞碎片（上清液）分离开。在 4℃、21,000 Xg 下对分离出的细胞碎片离心 1 个小时，得到上清液（溶解部分），上清液中含有乳酸菌和颗粒的细胞质蛋白。所得颗粒悬浮于含 1% SDS 的 TE 溶液(10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, pH 7.4)中，得到乳酸菌的细胞壁蛋白质(细胞壁部分)。

利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 pgsA 抗原的抗体，对上述各部分进行 Western 免疫印迹分析，以确定各乳酸菌部分中与细胞壁上 pgsA 融合的 SARS 病毒的刺突抗原（图 6）。在图 6A 中，泳道 1 为未转化的酪乳酸杆菌，泳道 2 是由 pHCE2LB: pgsA-SARS SA 转化的酪乳酸杆菌的全细胞，泳道 3 和泳道 4 分别是由 pHCE2LB: pgsA- SARS SA 转化的菌株的溶解部分和细胞壁部分。在图 6B 中，泳道 1 为未转化的酪乳酸杆菌，泳道 2 是由 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC 转化的酪乳酸杆菌的全细胞，泳道 3 和泳道 4 分别是由 pHCE2LB: pgsA- SARS SBC 转化的菌株的溶解部分和细胞壁部分。

如图 6 所示，在乳酸菌的全细胞和细胞壁部分识别出了与 pgsA 融合的约 54 kDa 的 SARS SA 蛋白以及与 pgsA 融合的约 78kDa 的 SARS SBC 蛋白。从这些结果可以看出，与 pgsA 融合的各个 SARS 抗原蛋白被表达并被 pgsA 迁移到乳酸菌表面上。

通过荧光激活细胞分选(FACS)流式细胞术可以鉴定出，SARS 病毒的刺突抗原的抗原部分通过与聚- $\gamma$ -谷氨酸合成蛋白 pgsA 的 C 末端融合，而在乳酸菌的表面上表达。

进行免疫荧光染色，收集相同细胞浓度的诱导表达的乳酸菌。用缓冲液(PBS 缓冲液, pH 7.4)洗涤细胞数次，再将细胞悬浮于含有 1%牛血清白蛋白的 1ml 缓冲液中,与鼠源的 SARS 病毒刺突抗原的多克隆一级抗体在 4℃反应 12 个小时，其中该抗体被稀释 1000 倍。反应完成后，用缓冲液清洗细胞数次，将细胞悬浮于含有 1%的牛血清白蛋白的 0.1ml 缓冲液中，与结合生物素的二级抗体在 4℃反应 3 个小时，其中该抗体被稀释 1000 倍。反应完成后，用缓冲液清洗细胞数次，将细胞悬浮于含有 1%的牛血清白蛋白的 0.1ml 缓冲液中，与生物素特异性的链霉亲和素-R-藻红蛋白染色试剂结合，其中该染色试剂被稀释 1000 倍。

反应完成后，清洗乳酸菌数次，用荧光激活细胞分选(FACS)流式细胞术

进行检测。可以看出，与未转化的乳酸菌不同，SARS 病毒的 SBC 刺突抗原蛋白在乳酸菌表面上被表达（图 6C）。在图 6C 中，灰色部分源于未转化的酪乳酸杆菌，而白色部分源于 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC/转化的酪乳酸杆菌。如图 6C 所示，可清晰地看出，在由 pHCE2LB: pgsA-SARS SBC 载体转化的乳酸菌上，表面表达出了 SBC 刺突抗原蛋白，而在未转化的酪乳酸杆菌中并未观察到荧光表达。

#### 实施例 8: 乳酸菌上的 SARS 病毒核壳抗原蛋白的表面表达的确定

用表面表达载体 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 和 pHCE2LB: pgsA-SARS N 转化乳酸菌，并检测各抗原蛋白的表达。

用 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 和 pHCE2LB: pgsA-SARS N 分别转化酪乳酸杆菌，转化的菌株在 MRS 培养基(乳酸菌 MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA)中培养至静止期，37℃ 下进行扩增，诱导分别与基因 pgsA 合成的聚- $\gamma$ -谷氨酸的 C 末端融合的 SARS 病毒核壳抗原的抗原位点的表达。

为了确定经 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 和 pHCE2LB: pgsA-SARS N 表面表达载体所转化的乳酸菌的表面上是否与 pgsA 一起表达了各抗原蛋白，用实施例 7 相同的方法，通过超高速离心机将各载体转化的乳酸菌破碎成细胞壁和细胞质，通过 Western blot 法，使用 pgsA 的特异性抗体检测各融合蛋白的位置。

结果是，利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 pgsA 抗原的抗体，对上述各部分进行 Western 免疫印迹分析，以确定各乳酸菌部分存在着与细胞壁上 pgsA 融合的 SARS 病毒的核壳抗原（图 7）。在图 7 A 中，泳道 1 为未转化的酪乳酸杆菌，泳道 2 是由 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 转化的酪乳酸杆菌的全细胞，泳道 3 和泳道 4 分别是由 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 转化的菌株的溶解部分和细胞壁部分。在图 7 B 中，泳道 1 为未转化的酪乳酸杆菌，泳道 2 是由 pHCE2LB: pgsA-SARS N 转化的酪乳酸杆菌的全细胞，泳道 3 和泳道 4 分别是由 pHCE2LB: pgsA-SARS N 转化的菌株的溶解部分和细胞壁部分。

如图 7 所示，从乳酸菌的全细胞和细胞壁部分中识别出了与 pgsA 融合的约 57 kDa 的 SARS NB 蛋白以及与 pgsA 融合的约 75kDa 的 SARS N 蛋白。

从这些结果可以看出，表达了与 pgsA 融合的各个 SARS 抗原蛋白，并且被 pgsA 迁移到了乳酸菌表面上。

5 实施例 9：具有表面表达 SARS 病毒的刺突抗原和核壳抗原蛋白的乳酸菌疫苗效果的分析

用前述实施例中制备出的表面表达载体 pHCE2LB:pgsA-SARS SA、pHCE2LB:pgsA-SARS SC 和 pHCE2LB: pgsA-SARS NB 转化革兰氏阳性菌酪乳酸杆菌，诱导酪乳酸杆菌表面上的抗原的表达。用小鼠模型检测与涉及聚- $\gamma$ -谷氨酸合成的细胞外膜蛋白 pgsA 相融合的 SARS 病毒刺突抗原蛋白和核壳抗原蛋白的抗原性。

具体而言，根据本发明，用表面表达载体 pHCE2LB:pgsA-SARS SA、pHCE2LB:pgsA-SARS SC 和 pHCE2LB:pgsA-SARS NB 转化酪乳酸杆菌。收集细胞，得到相同的细胞浓度，用缓冲液(PBS 缓冲液，pH7.4)清洗细胞数次。给 4-6 周 BALB/c 小鼠每日 3 次隔日口服  $5 \times 10^9$  具有表面表达的抗原的乳酸菌，一周后隔日服用每日 3 次，两周后隔日服用每日 3 次，4 周后隔日服用每日 3 次。给小鼠每日 3 次隔日通过鼻内给予  $1 \times 10^9$  具有表面表达的抗原的乳酸菌，一周后隔日每日 3 次给药，两周后每两日给药每日 2 次，4 周后每两日给药每日 2 次。口服和鼻内给药后，每两周取各小鼠的血清①，用 ELISA 检测血清中的刺突抗原蛋白和核壳抗原蛋白的 IgG 抗体值，并检测②清洗各小鼠肠道的悬浮液和清洗各小鼠支气管和肺泡的悬浮液中的刺突抗原蛋白和核壳抗原蛋白的 IgA 抗体值。

25 每组分有 10 只 BALB/c 小鼠(4-6 周)。将分别表达 SARS SA 和 SARS SC 的乳酸菌的混合物分为一组，表达 SARS NB 的乳酸菌分为一组，分别表达 SARS SA、SARS SC 和 SARS NB 的乳酸菌混合物分为一组。将这三组分成分口服给药组和鼻内给药组，包括对照组共 8 个组。

图 8 示出小鼠血清中 SARS 病毒的刺突抗原蛋白 SARS SA 和 SARS SC 抗原的 IgG 抗体值。图 9 是在清洗小鼠肠道的悬浮液和清洗小鼠支气管和肺泡的悬浮液中，用 ELISA 检测到的刺突抗原蛋白 SARS SA 和 SARS SC 抗原的 IgA 抗体值，其中 A 是口服组的 IgA 抗体值，B 是鼻内给药组的 IgA 抗体值。

图 10 示出小鼠血清中 SARS 病毒的核壳抗原蛋白 SARS NB 抗原的 IgG 抗体值。图 11 是在清洗小鼠肠道的悬浮液和清洗小鼠支气管和肺泡的悬浮液中，用 ELISA 检测到的 SARS 病毒核壳抗原蛋白 SARS NB 抗原的 IgA 抗体值，其中 A 是口服组的 IgA 抗体值，B 是鼻内给药组的 IgA 抗体值。

5 如图 8 至图 11 所示，可以看出，与对照组相比，单独施用或联合施用 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 、 pHCE2LB:pgsA-SARS SC 和 pHCE2LB:pgsA-SARS NB 转化的乳酸菌的 BALB/c 小鼠的血清、肠洗液和支气管-肺泡洗液中，SARS 病毒的刺突抗原蛋白和核壳抗原蛋白的 IgG 抗体值和 IgA 抗体值明显高。

10 因此，根据本发明，含有表面表达 SARS 病毒的刺突和核壳抗原蛋白的抗原部分的微生物能有效用作活疫苗。

虽然本发明参照具体示例性实施方式进行了说明与描述，但本发明并不仅限于这些实施方式，而由权利要求限定。可以理解，本领域技术人员在不背离本发明的范围和精神而改变或调整实施方式。

15

#### 工业实用性

如上所述，根据本发明，在表面上能表达诱导 SARS 的冠状病毒的抗原蛋白的转化的微生物，以及从微生物中提取和纯化的抗原蛋白可有效用作预防和治疗 SARS 的疫苗。尤其是，本发明使得采用表达 SARS 冠状病毒抗原的重组菌株来经济地制备口服疫苗成为可能。

20

<110> 生物领先公司  
M.D.实验室  
生物领先日本公司  
韩国生命工学研究院

<120> SARS病毒抗原的细胞表面表达载体和用该载体转化的微生物

<130> PCF052440C

<150> KR10-2003-0035993

<151> 2003-06-04

<160> 28

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 1

ggatccttta tttcttatt atttcttact ctactagtg gtagtgacct tgaccg 56

<210> 2

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 2

tgagtgtaat taggagcttg aacatcatca aaagtggtac aacggtaag gtc 53

<210> 3

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 3

aattacactc aacatacttc atctatgcgt ggggtttact atcctgatga aatftttc 58

<210> 4  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 4  
 aaaatggaag aaataaatcc tgagttaaataa aaagagtgtc tgaacgaaaa attt 54

<210> 5  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 5  
 cttccatttt attctaattgt tactgggttt catactatta atcatacgtt tggcaac 57

<210> 6  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 6  
 ggcagcaaaa taaataccat ccttaaaagg aatgacaggg ttgccaacg tatg 54

<210> 7  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 7  
 attatttttg ctgccacaga gaaatcaaat gttgtccgtg gttgggtttt tgg 53

<210> 8  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 8  
 ggtaccaagc ttattacaca gactgtgact tgttggtcat ggtagaacca aaaacc 57

<210> 9  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 9  
 ggatecgttt ggtgtccaaa attatctact gaccttatta agaaccagtg tgccaat 57

<210> 10  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 10  
 gaagaaggag ttaacacacc agtaccagtg agaccattaa aattaaatt gacacact 58

<210> 11  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 11  
 aactccttct tcaagcgtt tcaaccatt tcaacaattt ggccgtgatg ttctga 57

<210> 12  
 <211> 54  
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 12

ctaaaatttc agatgtttta ggatcacgaa cagaatcagt gaaatcagaa acat 54

<210> 13

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 13

ctgaaathtt agacatttca ccttgtgctt ttgggggtgt aagtgttaatt aca 53

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 14

ggtaccaagc ttattaaaca gcaacttcag atgaagcatt tgtaccaggt gtaattac 58

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物(SBC sense)

<400> 15

cgcggatccc tcaagtatga tgaaaat 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>



<223> PCR 引物(SBC anti-sense)

<400> 16

cggggtacct taaacagcaa cttcaga

27

<210> 17

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 17

ggatcccctc aaggtacaac attgccaaaa ggcttctacg cagagggtag ccgtgg

56

<210> 18

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 18

accacgacta cgtgatgaag aacgagaaga ggcttgactg ccgccacggc tacc

54

<210> 19

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 19

cacgtagtcg tggtaatca cgtaattcaa ctctggcag cagtcgtggt aat

53

<210> 20

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 20

gcgaggcag ttcaccacc accgctagcc atacgagcag gagaattacc acga 54

<210> 21  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 21  
 gaaactgcc tcgcactttt gctgcttgac cgttgaacc agcttgagag caa 53

<210> 22  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 22  
 tagtgacagt ttgacctgt tgtgttggc cttaccaga aacttgctc tcaa 54

<210> 23  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 23  
 caaactgtca ctaagaaatc tgctgctgag gcatctaaaa agcctcgtca aaaacgt 57

<210> 24  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 引物

<400> 24  
 ggaccacgac gcccaaatgc ttgagtgcg ttgtactgtt ttgtggcagt acgttttg 59

<210> 25  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> PCR 引物  
  
 <400> 25  
 gggcgtcgtg gtccagaaca aaccaaggt aattcgggg accaagacct tatccgt 57  
  
 <210> 26  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> PCR 引物  
  
 <400> 26  
 ggtaccaagc ttattaaatt tgcggccaat gtttgaatc agtacctga cggataagg 59  
  
 <210> 27  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> PCR 引物(N sense)  
  
 <400> 27  
 cgcggatcct ctgataatgg tccgcaa 27  
  
 <210> 28  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> PCR 引物(N anti-sense)  
  
 <400> 28  
 cggggtacct taaattgcg gccaatgttt 30

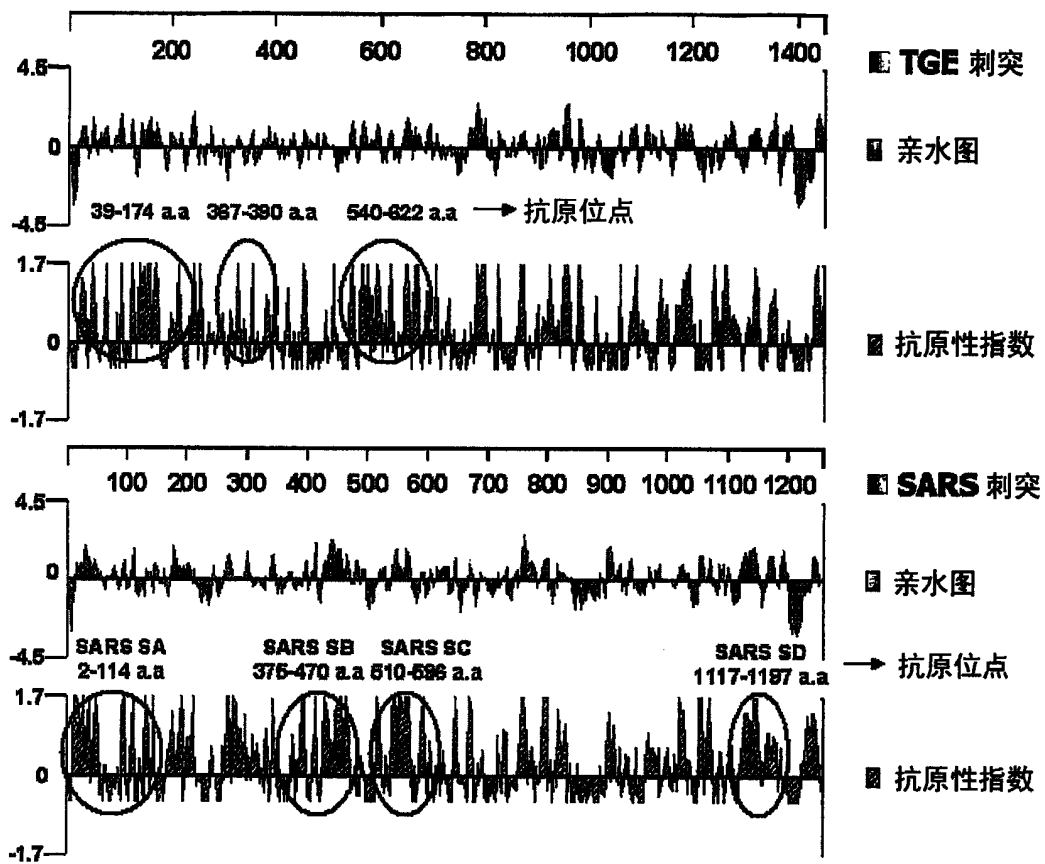


图 1

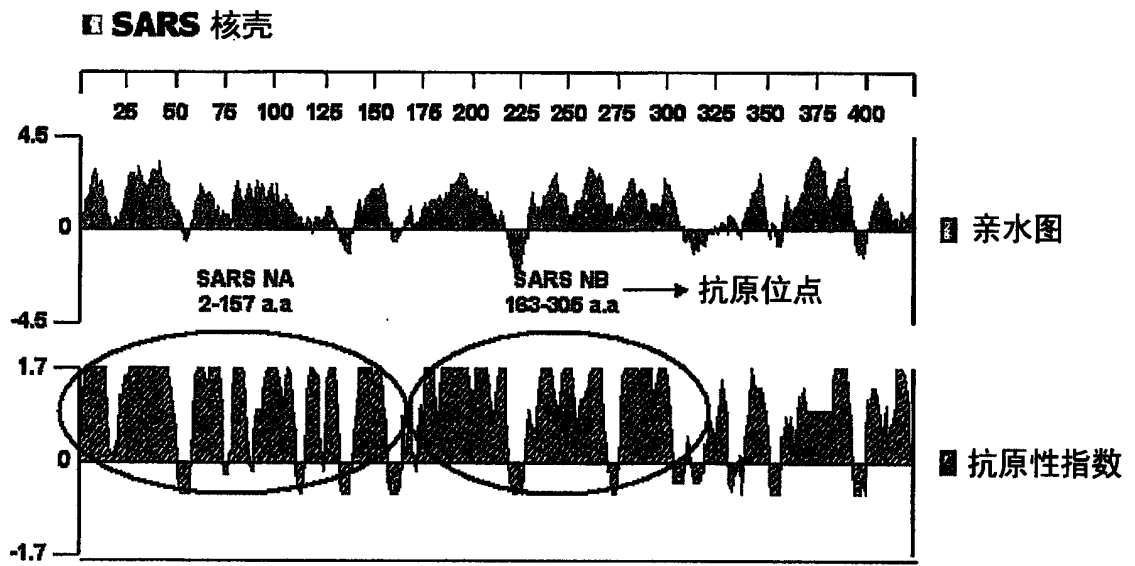


图 2

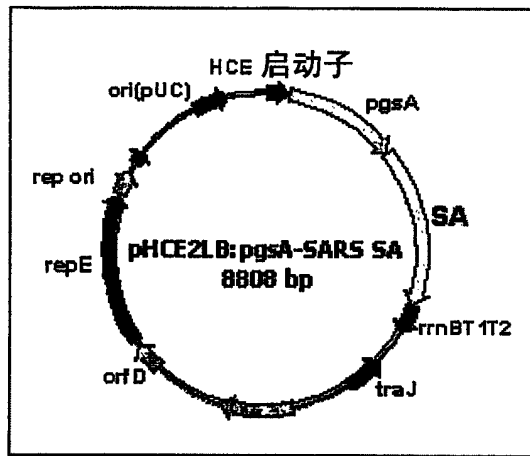


图 3A

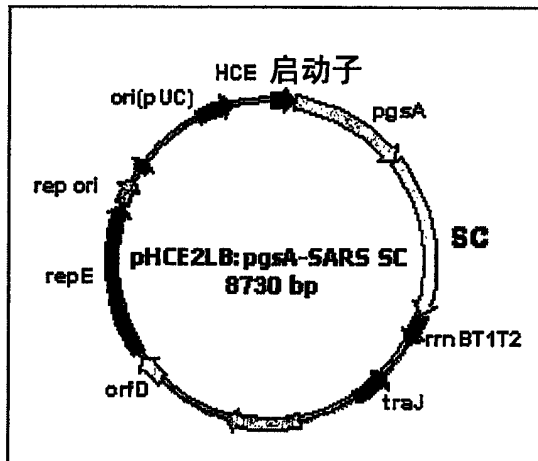


图 3B

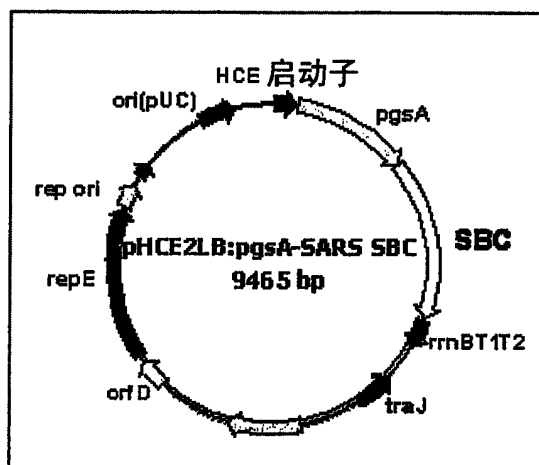


图 3C

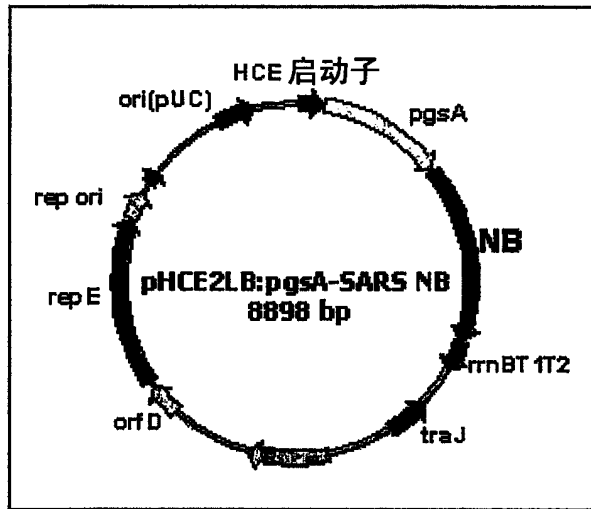


图 4A

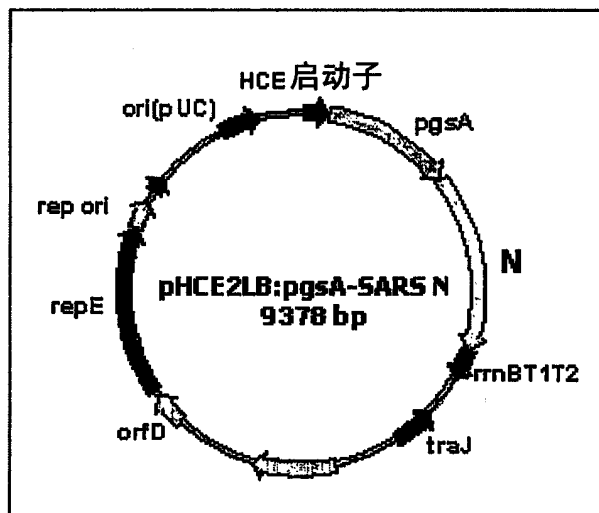
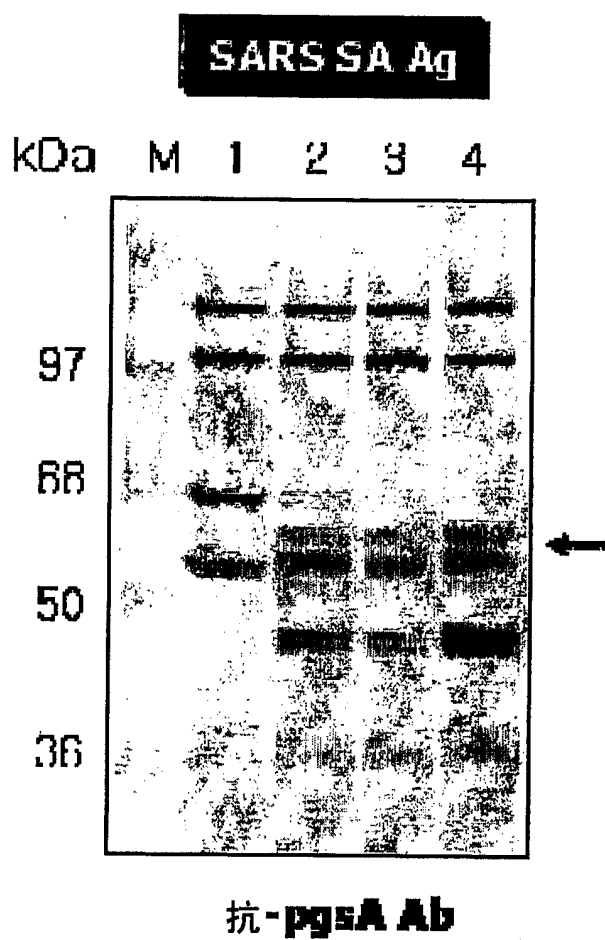


图 4B



**图 5A**



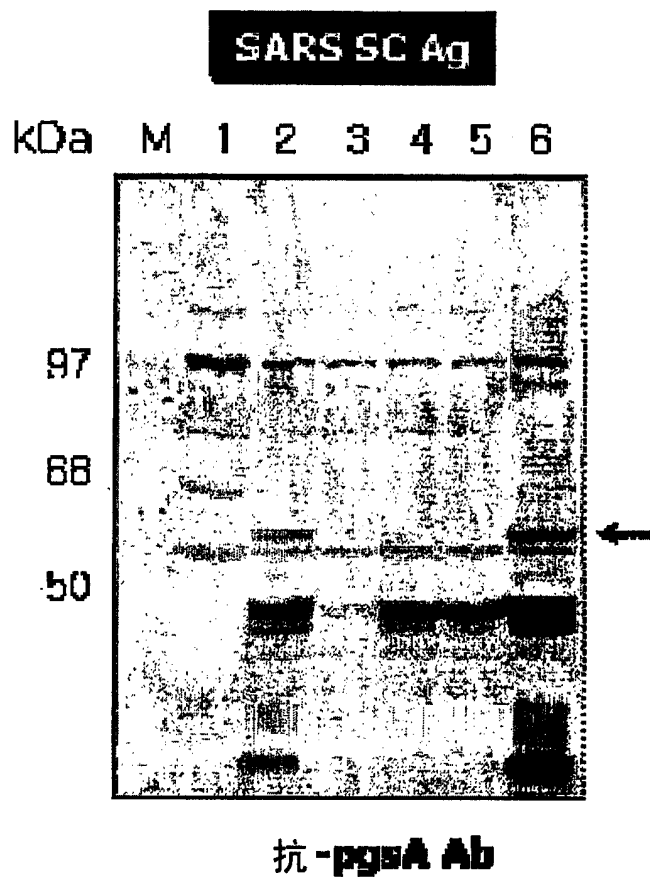


图 5B

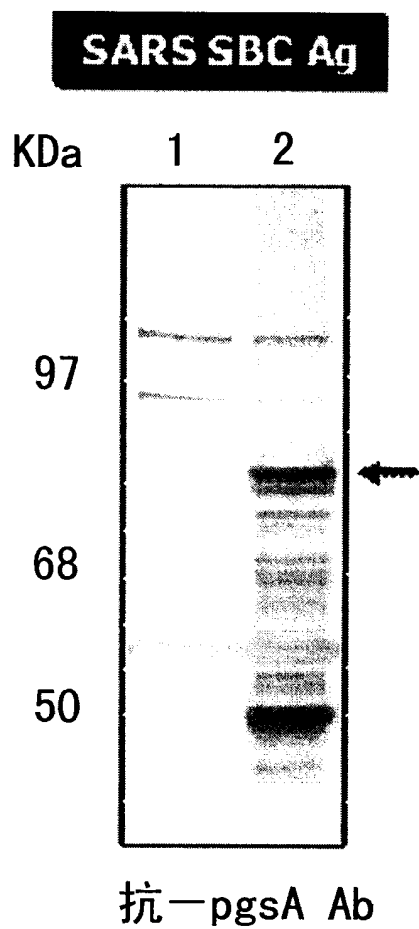


图 5C

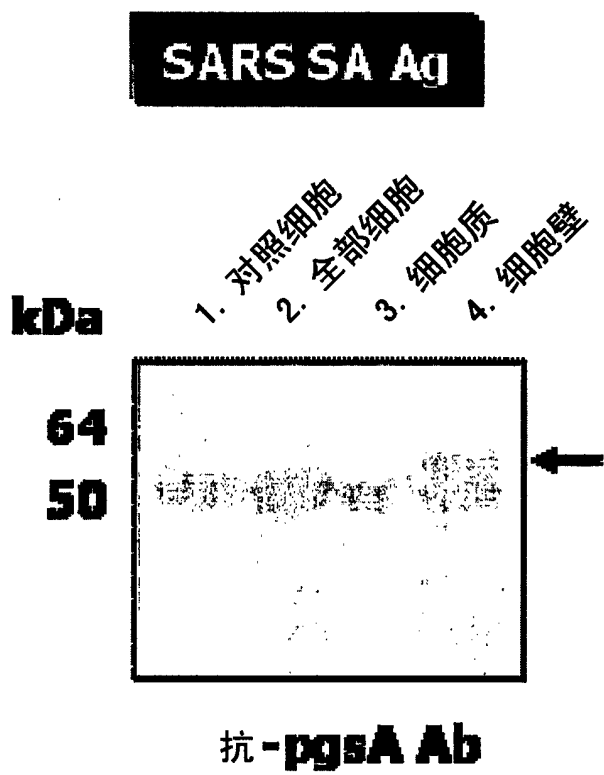
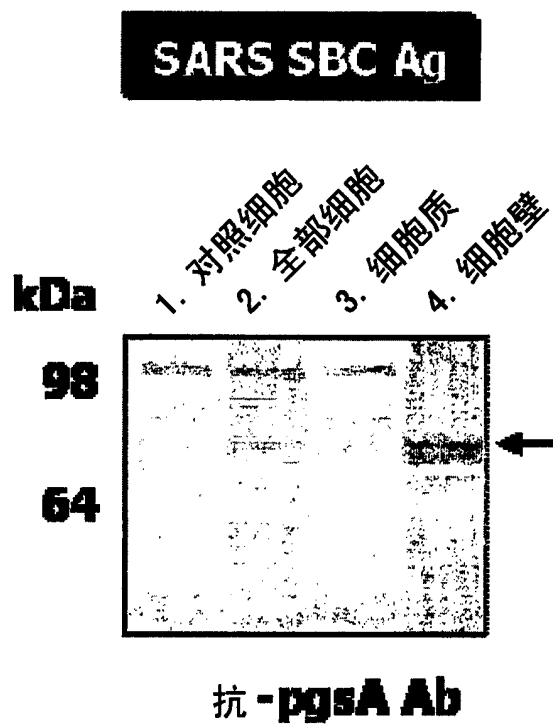


图 6A



**图 6B**

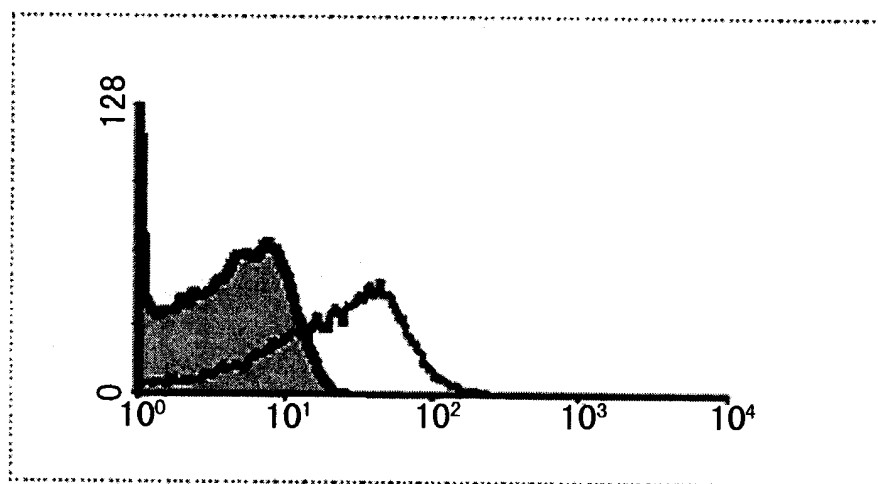


图 6C

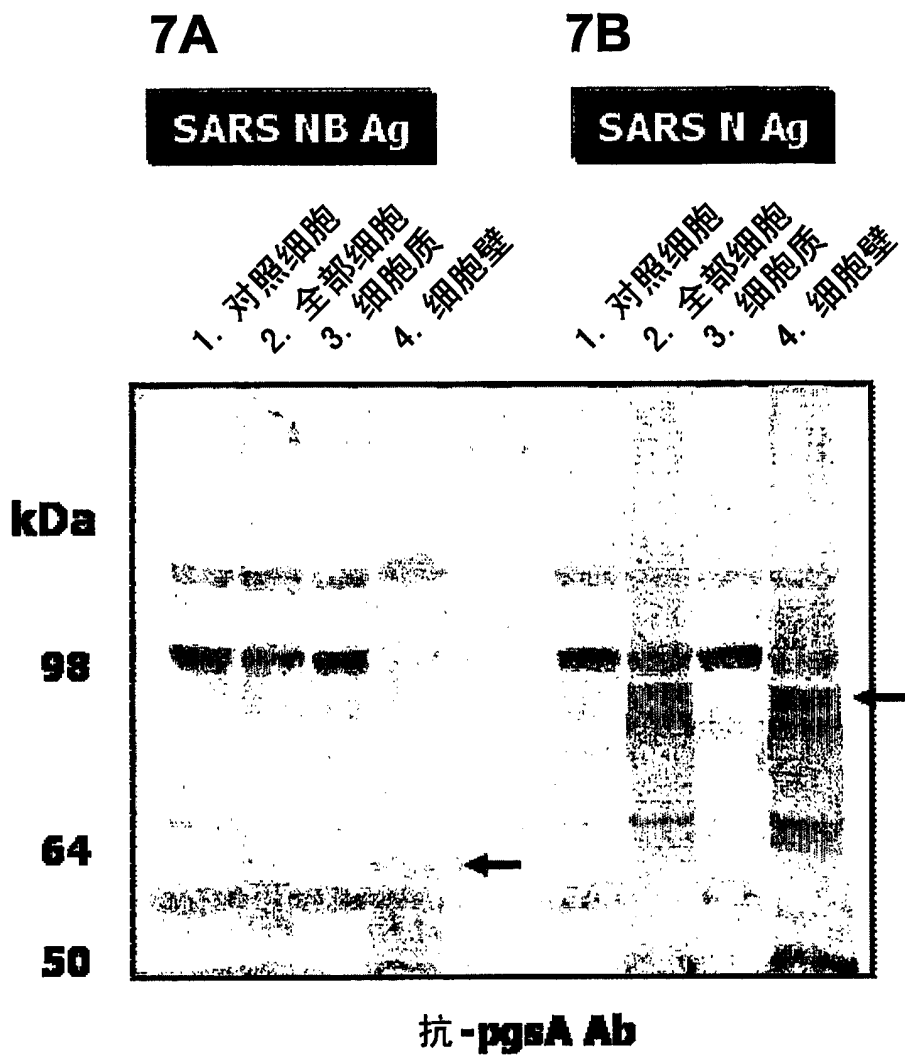


图 7

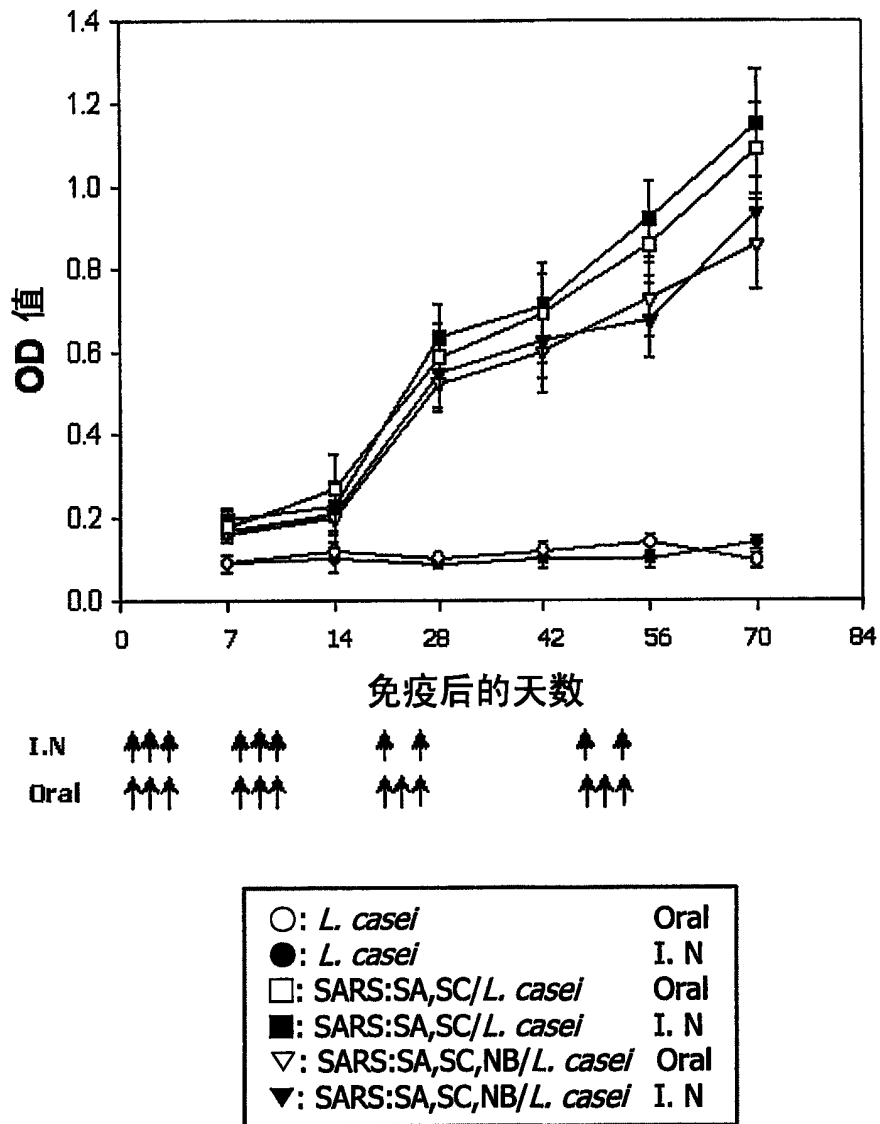


图 8

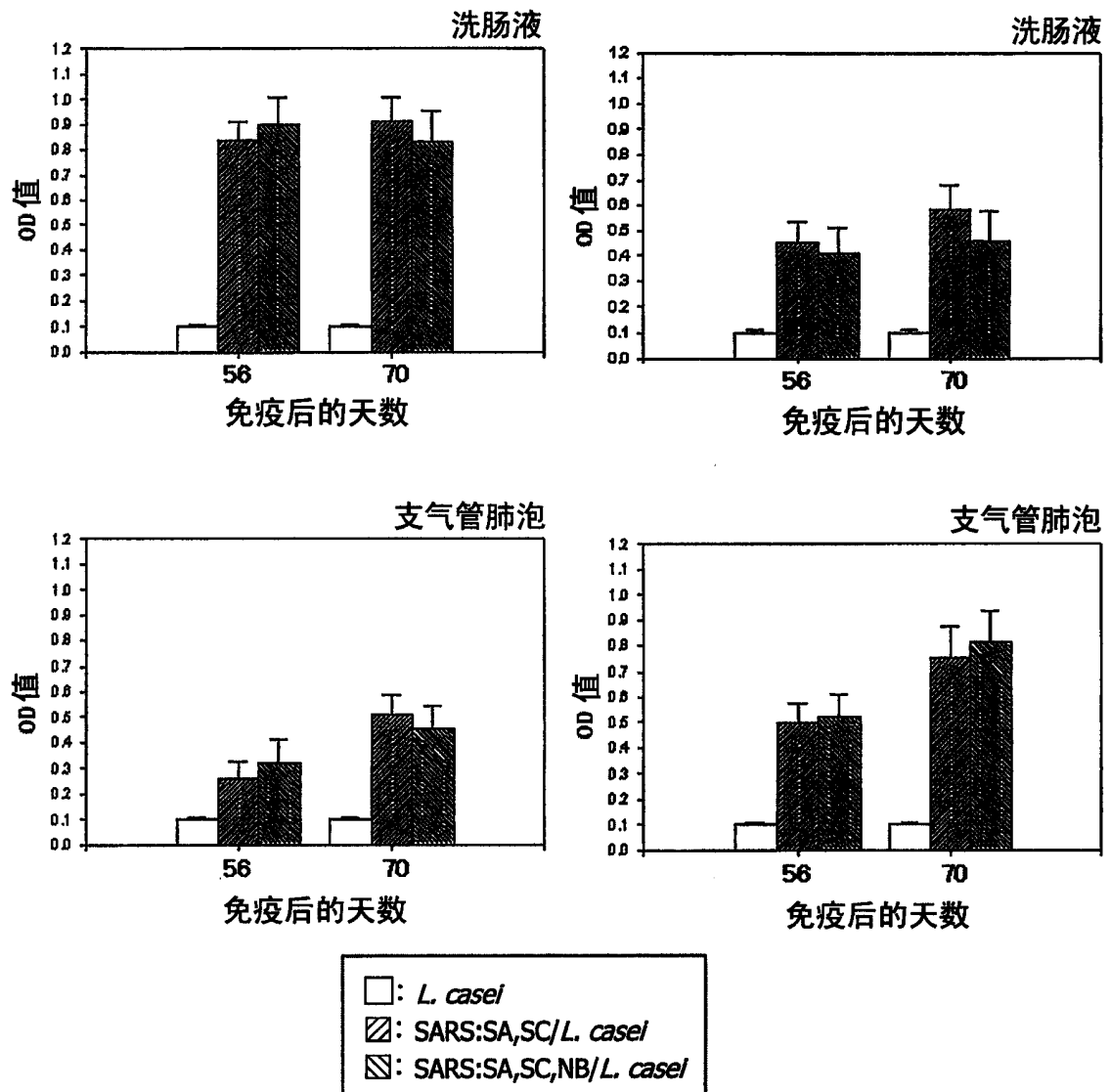


图 9



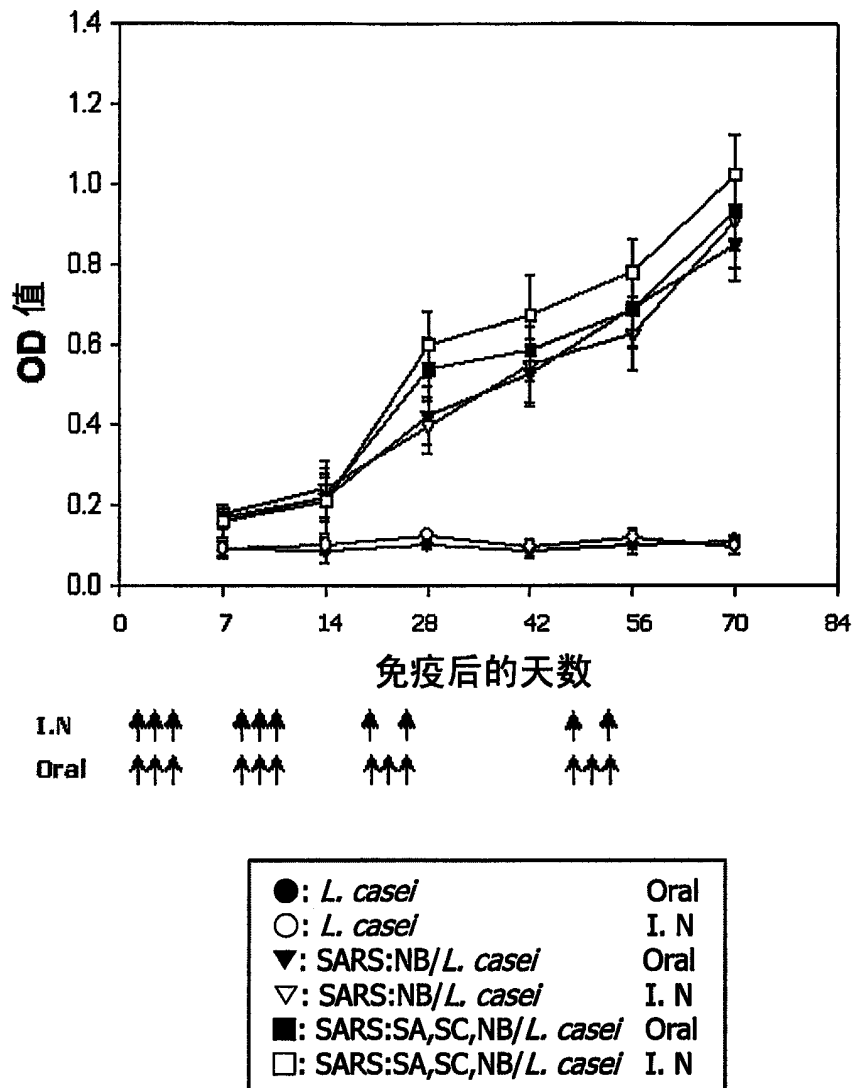


图 10

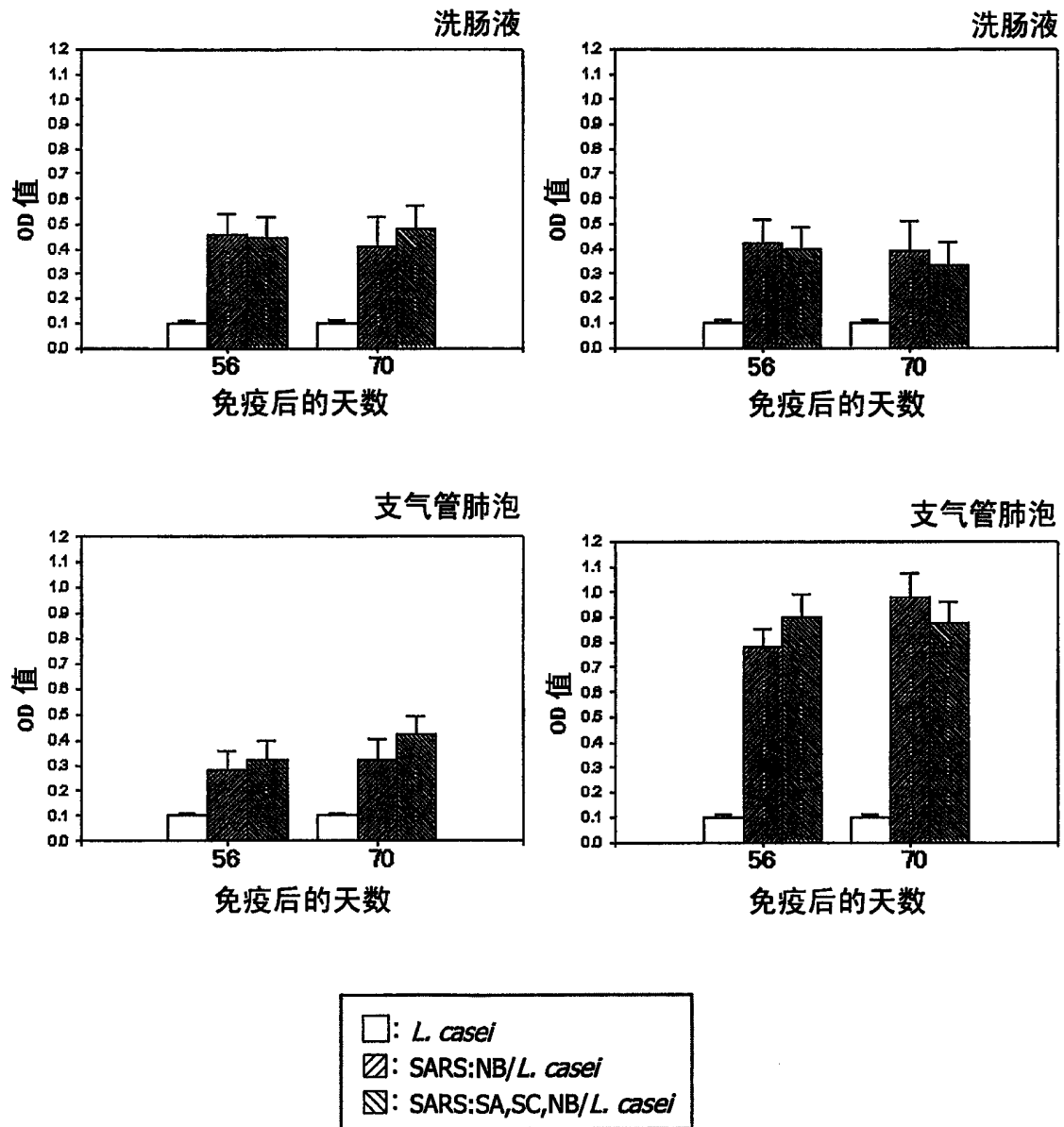


图 11