

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年12月15日(15.12.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/117961 A1

- (51) 国际分类号⁷: A61K 39/215, A61P 11/00, 31/14 朝阳区北辰东路8号汇宾大厦A座909室, Beijing 100101 (CN)。
- (21) 国际申请号: PCT/CN2004/000505
- (22) 国际申请日: 2004年6月4日(04.06.2004)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中山大学肿瘤防治中心(CANCER CENTER SUN YAT-SEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省广州市东风东路651号, Guangdong 510060 (CN)。
- (72) 发明人;及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 黄文林(HUANG, Wenlin) [CN/CN]; 曾益新(ZENG, Yixin) [CN/CN]; 汪健(WANG, Jian) [CN/CN]; 刘然义(LIU, Ranyì) [CN/CN]; 黄嘉凌(HUANG, Jialing) [CN/CN]; 黄必军(HUANG, Bijun) [CN/CN]; 赖坤(LAI, Kun) [CN/CN]; 吴立志(WU, Lizhi) [CN/CN]; 梁志慧(LIANG, Zhihui) [CN/CN]; 柯妙拉(KE, Miaola) [CN/CN]; 吴秀菊(WU, Xiuju) [CN/CN]; 中国广东省广州市东风东路651号, Guangdong 510060 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- (74) 代理人: 北京中原华和知识产权代理有限责任公司 (BEIJING ZHONGYUAN HUAHE INTELLECTUAL PROPERTY AGEN); 中国北京市 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: SARS VIRUS VACCINE WITH ADENOVIRUS CARRIER AND PREPARATION METHOD THEREOF, AND USE OF SARS VIRUS S GENE FOR PREPARATION OF VACCINE

(54) 发明名称: 腺病毒载体SARS疫苗及其制备方法, 以及相关冠状病毒S基因在制备疫苗中的应用

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biological engineering technology, specifically, to a SARS virus vaccine with adenovirus carrier, preparation method thereof and use of SARS virus S gene for preparation of severe acute respiratory syndrome (SARS) virus vaccine.

(57) 摘要

本发明属于生物基因工程领域, 具体涉及腺病毒载体 SARS 疫苗, 其制备方法以及相关冠状病毒 S 基因在制备预防非典型肺炎 (SARS) 疫苗方面的应用。通过生物工程手段, 将相关冠状病毒 S 基因与缺陷型腺病毒重组结合, 使保护性免疫原蛋白或多肽在其中表达, 经过扩增培养、纯化、制剂而制成一种能引起粘膜免疫原性的基因疫苗, 诱导呼吸道粘膜免疫反应, 使机体产生相应抗体, 防止病毒侵染。本发明与传统的灭活病毒颗粒疫苗比较, 安全性高, 使用方便, 不受肌肉注射等特定条件限制, 具有广泛的临床应用前景。



WO 2005/117961 A1

腺病毒载体 SARS 疫苗及其制备方法，以及相关 冠状病毒 S 基因在制备疫苗中的应用

一、技术领域

- 5 本发明属于生物基因工程领域，具体涉及腺病毒载体 SARS 疫苗，其制备方法以及揭示相关冠状病毒 S 基因在制备预防非典型肺炎（SARS）疫苗方面的应用。

二、背景技术

- 10 中国广东地区从去年末开始爆发非典型肺炎（atypical pneumonia），发病急，传染性强，抗生素治疗无效。目前，此病已传播至 30 多个国家和地区，WHO 已将之命名为严重急性的呼吸道综合症（severe acute respiratory syndrome，SARS）。

- 15 目前，世界许多国家的科学家均从不同病人血清中独立分离到新型的冠状病毒（coronavirus），病毒基因序列分析结果表明，它们与已知的冠状病毒有 50%~60% 的同源性，世界卫生组织（WHO）已经公布，引起 SARS 的病原体是冠状病毒的变异株。

- 20 冠状病毒是一种非节段性正链的 RNA 病毒，其基因组近 30kb，可以在人和动物中传播，主要感染人和动物的呼吸系统，冠状病毒颗粒是一种具有内核心及囊膜包被地病毒，共有四种结构蛋白：刺突蛋白（spike，S），膜蛋白(membrance，M)，囊膜蛋白(envelop，E)，及核蛋白(nucleoprotein，N)。由于冠状病毒是一种 RNA 病毒，十分不稳定，容易发生突变以逃避宿主的免疫监督与排斥。因此，必须寻找

到 SARS 相关冠状病毒中稳定性好且具有免疫保护作用的抗原，以进行相关疫苗的研制。

目前较少应用灭活的病毒颗粒疫苗，因为全病毒颗粒携带了病毒全基因组，安全性顾虑较大。虽然既往的冠状病毒易在体外培养获得，但此次 SARS 相关的冠状病毒毒性极大且遗传背景不完全清楚，因此大规模制备冠状病毒颗粒不可行。基因工程技术的发展为亚单位疫苗的开发提供了极大的便利，而且亚单位疫苗的可操作性及生物安全性好。若能筛选到具有免疫原性的病毒抗原决定簇，结合基因工程技术，可方便地对抗原决定簇进行改造，以增强其稳定性、免疫原性、生物安全性。显然，借助基因工程技术，可以非常方便地制备有效的亚单位疫苗。

根据目前研究显示，冠状病毒已知的四种结构蛋白中，刺突蛋白（spike S）是具有诱导保护性免疫反应的结构蛋白，部分学者的研究结构已经证实了冠状病毒刺突蛋白 C 末端为其抗原决定簇所在，同时，SARS 相关冠状病毒通过呼吸道引起感染，而目前仍未有可以预防 SARS 的疫苗。

另外，资料显示，腺病毒本身很容易感染呼吸道粘膜上皮，较易诱导呼吸道粘膜免疫反应，并且腺病毒作载体表达的免疫原在宿主细胞中表达、加工、折叠、修饰、提呈，基本上保持了免疫原的天然构象，生物活性高。

所述条件为利用缺陷型腺病毒作为载体研制和生产腺病毒 SARS 疫苗提供了坚实的理论基础。

三、发明内容

本发明的第一个目的在于提供一种能预防流行性疾病“非典型肺炎”的腺病毒 SARS 疫苗，更好的防止“非典型肺炎”的发生和传播；
5 本发明另外的目的在于提供一种利用缺陷型腺病毒作为载体，通过基因克隆、重组等手段，制备腺病毒载体 SARS 疫苗的方法以及揭示 SARS 相关冠状病毒 S 基因在制备疫苗中的应用。

本发明的目的是这样实现的：通过生物工程手段，将 SARS 相关冠状病毒 S 基因（冠状病毒共有四个结构基因，S 基因为其中之一，
10 见下文详述）与缺陷型腺病毒重组结合，构成一种能引起粘膜免疫原性的基因疫苗。

所用 Spike 基因片段序列为：

使用 Gene bank 中所公布的 S 基因序列（Gene bank 查询号：gb AY278554.2）作为模版，根据序列设计 PCR 引物如下：

15 v1 GGTCTAGAGT TGTGGTTTCA AGTGAT
v2 TTTCTAGACC ATGGGTTGTG TCCTTGCT
V3 TTTCTAGACC ATGGCATATA GGTTC AATG
V4 TAGGTACCAA TGCCAGTAGT GGTG
V5 TTGGTACCTC CGCCTCGACT TT
20 V6 CCGGTACCAT AAGTTCGTTT ATGTGT

其中 V1 和 V4 为一对，扩增 S 基因 N 端片段；V2 和 V5 为一对引物，扩增 S 基因 M 区片段；V3 和 V6 为一对引物，扩增 S 基因 C

端片段（如图 1）。

腺病毒 SARS 疫苗的制备：

首先，收集分离康复病人血清，通过分离提取得到冠状病毒总 RNA，通过反转录、测序、挑选等步骤得到 S 基因。接着，将 S 基因克隆到 pShuttle 质粒得到克隆体（保藏单位：中国典型培养物保藏中心；保藏日期：2003 年 5 月 18 日；保藏号：CCTCC M 203036 E. coli DH5a/pShuttle-SN 以及 CCTCC M 203037 E. coli DH5a/pShuttle-SC），再将其与腺病毒骨架质粒（pAdeno-XTM）连接（其中 pShuttle、pAdeno-X 均购自 CLONTECH Laboratory, Inc, USA）。连接后共同转染 293 细胞，经进一步的纯化鉴定后，用 293 细胞大量扩增，收集病毒液，分离纯化，即为腺病毒 SARS 疫苗。它可以制成喷雾剂或其它形式的药剂。主要的技术路线见图 4。

本发明是一种基因工程疫苗，即是使用缺陷型腺病毒作为载体的基因疫苗，它利用本身很容易感染呼吸道粘膜上皮的腺病毒作为载体，使保护性免疫原蛋白或多肽在其中表达，诱导呼吸道粘膜免疫反应；通过诱导粘膜免疫性反应，使机体产生相应抗体，防止病毒侵染。本发明与传统的灭活病毒颗粒疫苗比较，它安全性高，并且使用方便，不受肌肉注射等特定条件限制。

目前，SARS 正在世界各地快速传播，作为一种病毒性传染病，眼下尚未找到可以有效治疗的药物，此种情况下，预防是最好的手段。现已证实 SARS 相关冠状病毒刺突蛋白 C 末端为其抗原决定族所在。因此，本发明正是根据此发现，合成 SARS 相关冠状病毒刺突蛋

白基因，将其克隆到腺病毒载体，经过扩增培养、纯化、制剂而成，能有效诱导粘膜产生抗体，产生体液免疫防止病毒侵染机体，具有广泛的临床应用前景。

四、附图说明

5 图 1 是 S 基因片段扩增示意图。

图 2 是 pShuttle-Sc、 pShuttle-SM、 pShuttle-SN 重组体酶切结果。

图 3 pShuttle-Sc、 pShuttle-SM、 pShuttle-SN 重组体测序结果。

图 4 是本发明疫苗制备的技术路线图。

五、具体实施方式

10 以下将通过具体实施例来进一步说明本发明。

实施例 1

腺病毒载体 SARS 疫苗的制作方法：

腺病毒载体 SARS 疫苗的制备分为前期构建和后期扩增二部分：

前期构建：

15 取得 SARS 相关冠状病毒 spike (S_F 、 S_N 、 S_M 、 S_C) 基因后，用 PCR 方法进行扩增，经 PCR 后，用 XbaI+KpnI 37°C 酶切，同时用此酶酶切 pShuttle，连接，转化大肠杆菌 DH5a，利用卡那霉素 (Kan^R) 抗性筛选阳性克隆，培养、纯化后得到 p $S_F/S_N/S_M/S_C$ -Shuttle，用 I-CeuI+P1-SceI 酶切，同时用此酶酶切 PAdeno-XTM，酶切后连接，转
20 化大肠杆菌 DH5a，利用氨苄 (Amp^+) 抗性筛选阳性克隆即得 pAd- $S_F/S_N/S_M/S_C$ 。

扩大培养：

得到 pAd-S_F/S_N/S_M/S_C 后, 再经 Pacl 酶切、质粒经线化后转染包装细胞, 包装细胞为整合了 C 亚类 5 型腺病毒(Ad5) E1 区基因的细胞系(株), 例如 293 细胞。经过空斑筛选, PCR 鉴定为 Ad- S_F/S_N/S_M/S_C 后, 大量培养 293 细胞, 用 Ad- S_F/S_N/S_M/S_C 感染 293 细胞, 经氯化铯分离纯化, 制剂等步骤, 即得到腺病毒 SARS 疫苗。

所述的剂型为喷雾剂或注射剂。

SARS 疫苗包含 SARS 相关冠状病毒 S 基因和和缺陷型腺病毒。缺陷型腺病毒为 E1 区完全缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒, 即 Ad5。该缺陷型腺病毒的 E3 区可以为完全缺失或部分缺失或不缺失。缺陷型腺病毒内装 CMV 启动子和 BGHpolyA 。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因全长。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁ 结构域在内的序列。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₂ 结构域在内的序列。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁、S₂ 结构域在内的序列(碱基号为: 49~3585, 见附表一)

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因跨膜区(碱基号为: 3686~3648, 见附表一) 及 C 端片段。

20

实施例 2

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因 N 端片段。其余同实施例 1。

实施例 3

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因中间片段。
其余同实施例 1。

实施例 4

5 克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因 C 端片段。
其余同实施例 1。

实施例 5

S 基因转化 pShuttle 质粒和鉴定：

用 XbaI+KpnI 37°C 水浴条件酶切，同时用此酶酶切 pShuttle，连
10 接，转化大肠杆菌 DH5a，培养，利用卡那霉素（Kan^R）抗性筛选阳
性克隆，分别得到 pShuttle-Sc pShuttle-SM pShuttle-SN，通过
常规琼脂凝胶电泳鉴定和检测序列鉴定，结果见图 2、图 3。

实施例 6

绿猴肾细胞（Vero E6）细胞免受 SARS 攻击

- 15 1. 接种 Vero E6 细胞到 96 孔板， 2×10^4 /孔。
2. 24 小时后，接种腺病毒 SARS 疫苗，方法：用 1640 培养液按 4
倍稀释病毒原液，接种时先将 96 孔板中培养液吸出弃去，PBS
清洗孔一遍后，加入不同稀释度的病毒液，每一个稀释度加 5
个孔，50 μ L/孔。同时以 1640 培养液（不含病毒）为阴性对照。
20 37°C，5%CO₂，饱和湿度条件下孵育 1 小时后，加入含 5%新生
牛血清的 1640 培养液，200 μ L/孔，37°C，5%CO₂，饱和湿度条
件下培养。

3. 24 小时后，接种 SARS 病毒，方法：1640 培养液稀释 SARS 病毒至 100TCID₅₀，接种时先将 96 孔板中培养液吸出弃去，PBS 清洗孔一遍后，加入不同稀释度的病毒液，每一个稀释度加 5 个孔，50 μ L/孔。同时以 1640 培养液（不含病毒）为阴性对照。
- 5 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂，饱和湿度条件下孵育 1 小时后，加入含 5%新生牛血清的 1640 培养液，200 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂，饱和湿度条件下培养。
4. 此后每隔 12 到 24 小时观察并记录细胞病变情况，计算结果时各稀释度的每孔细胞病变评分相加，得出细胞病变指数，取各
- 10 组平均数，如下：

组别 \ 病变情况%	12 小时	24 小时	48 小时	72 小时
阴性对照 (1640 液)	0	0	0	0
SARS 病毒攻击组	20	35	85	100
疫苗保护组	5	10	25	40

15

20

权利要求书

- 1、一种 SARS 疫苗，其特征在于它包含 SARS 相关冠状病毒 S 基因和复制缺陷型腺病毒。
- 5 2、根据权利要求 1 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E1 区完全缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。
- 3、根据权利要求 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E3 区完全缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。
- 4、根据权利要求 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E3 区部分缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。
- 10 5、根据权利要求 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E3 区不缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。
- 6、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒内装 CMV 启动子和 BGHpolyA 。
- 15 7、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于它包含 SARS 相关冠状病毒 S 基因全长。
- 8、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁ 结构域在内的序列。
- 20 9、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₂ 结构域在内的序列。

10、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁、S₂ 结构域在内的序列。

11、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因跨膜区（碱基号为：3686~3648，见附表一）及 C 端片段。

12、一种 SARS 疫苗的制备方法，包括

- (1) 取得 SARS 相关冠状病毒的 S 基因；
- (2) 将 S 基因与缺陷型腺病毒重组结合；
- 10 (3) 转染包装细胞；
- (4) 经扩增、分离、纯化，制成制剂。

13、根据权利要求 12 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于提取 S 基因后，将其克隆到 pshuttle 质粒，再将其与腺病毒骨架质粒（pAdeno-xTM）连接结合。

14、根据权利要求 12 所述的核酸疫苗的制备方法，其特征在于根据 S 基因序列设计 PCR 引物如下：

- v1 GGTCTAGAGT TGTGGTTTCA AGTGAT
- v2 TTTCTAGACC ATGGGTTGTG TCCTTGCT
- V3 TTTCTAGACC ATGGCAIATA GGTTCAATG
- 20 V4 TAGGTACCAA TGCCAGTAGT GGTG
- V5 TTGGTACCTC CGCCTCGACT TT
- V6 CCGGTACCAT AAGTTCGTTT ATGTGT

15、根据权利要求 12 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于包装细胞为整合了 C 亚类 5 型腺病毒(Ad5) E1 区基因的细胞系(株)。

16、根据权利要求 15 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于
5 包装细胞为 293 细胞。

17、根据权利要求 11 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于所述制剂为喷雾剂或注射剂。

18、SARS 相关冠状病毒 S 基因在制备预防 SARS 的疫苗中的应用。

10

15

20

说明书附图

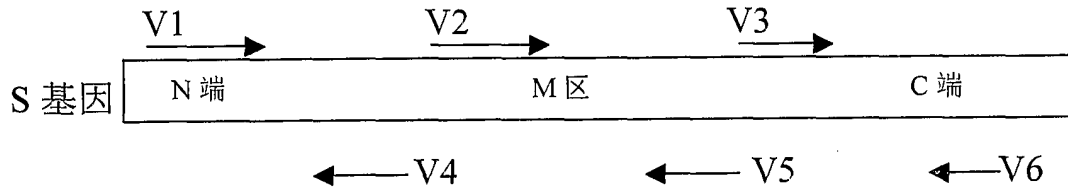


图 1

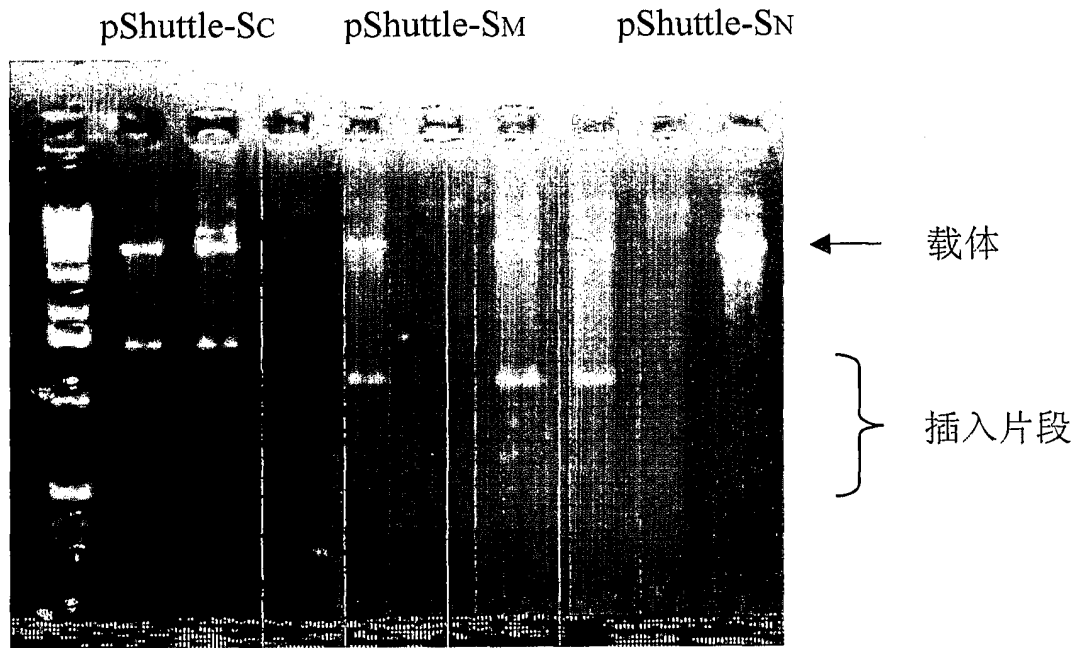


图 2

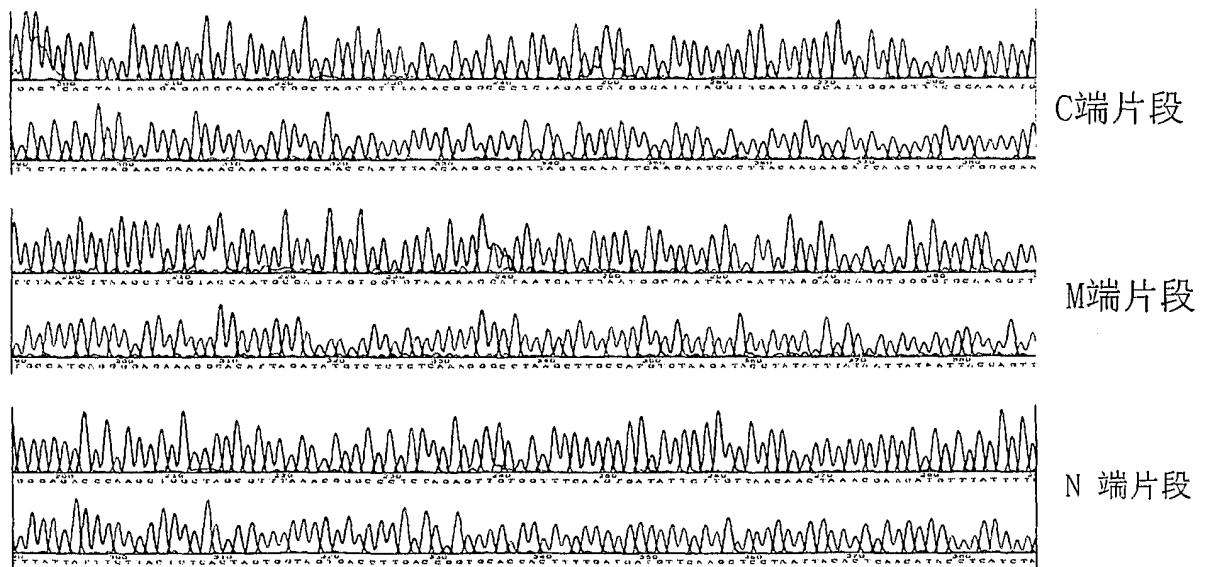


图 3

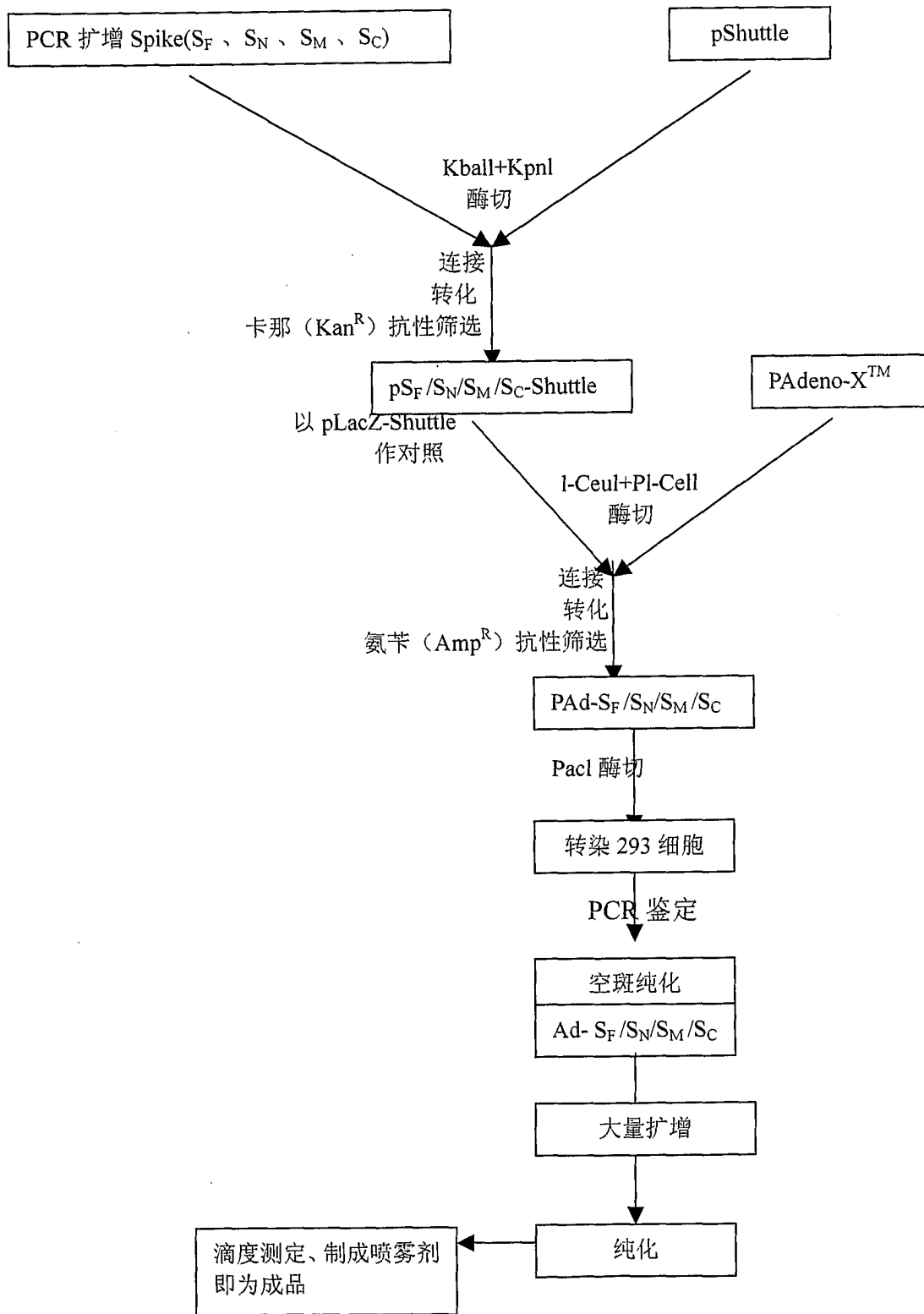


图 4

Ad-SARS 序列表

<110>中山大学肿瘤防治中心

<120>腺病毒载体 SARS 疫苗及其制备方法,以及相关冠状病毒 S 基因在制备疫苗中的应用

<160>4

<210>1

<211>3780

<212>DNA

<213>病毒种

<220>

<221>CDS

<222>(1) ... (3780)

<400>1

```

atgtttatth tcttattatt tcttactctc actagtggta gtgacctga ccggtgcacc 60
acttttgatg atgttcaagc tcctaattac actcaacata cttcatctat gagggggggtt 120
tactatcctg atgaaattht tagatcagac actctthtatt taactcagga thtatttctt 180
ccattthtatt ctaatgttac agggthtcat actattaatc atacgtttgg caaccctgtc 240
atacctthta aggatgggtat thtatttgct gccacagaga aatcaaagt tgtccgtgg 300
tgggtthttg gttctaccat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat taacaattct 360
actaatgttg ttatacgagc atgtaactth gaattgtgtg acaaccctth ctttgctgtt 420
tctaaacca tgggtacaca gacacatact atgatattcg ataatgcatt taattgcact 480
ttcgagtaca tatctgatgc cthttcgctt gatgtthtcag aaaagtcagg taattthtaa 540
cacttacgag agthttgtgtt taaaataaa gatgggtthc tctatgtthta taagggtat 600
    
```

caacctatag atgtagttcg tgatctacct tctggtttta acactttgaa acctatTTTT 660
aagttgcctc ttggtattaa cattacaaat ttagagcca ttcttacagc cttttcacct 720
gtcaagaca tttggggcac gtcagctgca gcctatTTTg ttggctatTT aaagccaact 780
acatttatgc tcaagtatga tgaaaatggt acaatcacag atgctgttga ttgtttctcaa 840
aatccacttg ctgaactcaa atgctctggt aagagctttg agattgaaa aggaatttac 900
cagacctcta atttcagggt tgttcctca ggagatggtg tgagattccc taatattaca 960
aacttggtc cttttggaga ggtttttaat gctactaaat tcccttctgt ctatgcatgg 1020
gagagaaaa aaatttctaa ttgtgttgct gattactctg tgctctaaa ctcaacattt 1080
ttttcaacct ttaagtgcta tggcgtttct gccactaagt tgaatgatct ttgcttctcc 1140
aatgtctatg cagattcttt ttagtcaag ggagatgatg taagacaaat agcgccagga 1200
caactgggtg ttattgctga ttataattat aaattgccag atgatttcat gggttgtgtc 1260
cttgcttgga atactaggaa cattgatgct acttcaactg gtaattataa ttataaatat 1320
aggatctta gacatggcaa gcttaggcc tttgagagag acatatctaa tgtgcctttc 1380
tccctgatg gcaaacttg caccacact gctcttaatt gttattggcc attaaatgat 1440
tatggTTTT acaccactac tggcattggc taccaacctt acagagttgt agtactttct 1500
tttgaacttt taaatgcacc ggccacggtt tgtggaccaa aattatccac tgaccttatt 1560
aagaaccagt gtgtcaattt taattttaat ggactcactg gtactgggtg gttactcct 1620
tcttcaaaga gatttcaacc atttcaaaa tttggccgtg atgtttctga tttactgat 1680
tccgttctgag atcctaaaac atctgaaata ttagacattt caccttgcgc ttttgggggt 1740
gtaagtgtaa ttacacctgg acaaatgct tcatctgaag ttgctgttct atatcaagat 1800
gtaactgca ctgatgtttc tacagcaatt catgcagatc aactcacacc agcttggcgc 1860
atatattcta ctggaacaaa tgtattccag actcaagcag gctgtcttat aggagctgag 1920

catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt cctattggag ctggcatttg tgctagttac 1980
 catacagttt ctttattacg tagtactagc caaaaatcta ttgtggctta tactatgtct 2040
 ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct aataacacca ttgctatacc tactaacttt 2100
 tcaattagca ttactacaga agtaatgcct gtttctatgg ctaaaacctc cgtagattgt 2160
 aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa tgtgctaatt tgcttctcca atatggtagc 2220
 ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga tcgcaacaca 2280
cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaaatg tacaaaacc caactttgaa atattttgg 2340
 ggttttaatt tttcacaat attacctgac cctctaaagc caactaagag gtcttttatt 2400
 gaggacttgc tctttaataa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc 2460
 gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat ctcatttgtg cgcagaagtt caatggactt 2520
 acagtgttgc cacctctgct cactgatgat atgattgctg cctacactgc tgctctagtt 2580
 agtggactg ccaactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctcttca aatacctttt 2640
 gctatgcaaa tggcatatag gttcaatggc attggagtta ccáaaatgt tctctatgag 2700
 aaccaaaaac aaatcgccaa ccaatttaac aaggcgatta gtcaaattca agaactcactt 2760
 acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgttg ttaaccagaa tgctcaagca 2820
 ttaaacacac ttgttaaaca acttagctct aattttgggtg caatttcaag tgtgctaaat 2880
gatatccttt cgcgacttga taaagtcgag gggaggtac aaattgacag gttaattaca 2940
 ggcagacttc aaagccttca aacctatgta acacaacaac taatcagggc tgctgaaatc 3000
 agggcttctg ctaatcttgc tgctactaaa atgtctgagt gtgttcttgg acaatcaaaa 3060
 agagttgact tttgtgaaa gggctaccac cttatgtcct tcccacaagc agccccgcat 3120
 ggtgttgtct tcctacatgt cacgtatgtg ccatcccagg agaggaactt caccacagcg 3180
 ccagcaattt gcatgaagg caaagcatac ttcctctgtg aagggtgttt tgtgtttaat 3240

ggcacttctt ggtttattac acagaggaac ttcttttctc cacaaataat tactacagac 3300
aatacatttg tctcaggaaa ttgtgatgtc gttattggca tcattaacaa cacagtttat 3360
gatcctctgc aacctgagct tgactcattc aaagaagagc tggacaagta cttcaaaaat 3420
catacatcac cagatggtga tcttggcgac atttcaggca ttaacgcttc tgtcgtcaac 3480
attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gtcgctaaaa atttaaata ga atcactcatt 3540
gaccttcaag aattgggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta tgtttggctc 3600
ggcttcattg ctggactaat tgccatcgtc atggttacaa tcttgctttg ttgcatgact 3660
agttggtgca gttgcctcaa gggtgcatgc tcttgtggtt cttgctgcaa gtttgatgag 3720
gatgactctg agccagttct caagggtgtc aaattacatt acacataaac gaacttatgg 3780

<210>2

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>根据 spike 基因碱基序列设计的用于 PCR 扩增 spike 基因 N 端的引物 (一对)

<400>2

ggtctagagt tgtggtttca agtgat

taggtaccaa tgccagtagt ggtg

<210>3

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>根据 spike 基因碱基序列设计的用于 PCR 扩增 spike 基因 M 端的引物（一对）

<400>3

tttctagacc atgggttgct tccttgct

ttggtacctc cgctcgact tt

<210>4

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>根据 spike 基因碱基序列设计的用于 PCR 扩增 spike 基因 M 端的引物（一对）

<400>4

tttctagacc atggcatata ggttcaatg

ccggtacat aagttcgttt atgtgt

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/000505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int Cl⁷ : A61K39/215, A61P 11/00, A61P 31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int Cl⁷ : A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNPAT、CNKI、BA

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT、CNKI、WPI、EPODOC、BA、

search terms: Severe Acute Respiratory Syndrome virus、Spike gene、vaccine、replication defective adenovirus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Guo YJ et al, "Cloning of SARS coronavirus S2 gene and immunization effect of its DNA vaccine", Acad J Sec Mil Med Univ, 24(7),2003.7, pp.707-709, the whole document	1-18
A	YE Xun et al, "Current Research on SARS Coronavirus Vaccine", Prog. Biochem. Biophys, 30(3),2003, pp.331-334, the whole document	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
22. Apr. 2005 (22.04. 2005)

Date of mailing of the international search report

19 · MAY · 5 · 2005

Name and mailing address of the ISA/

State Intellectual Property Office of P.R.China
6 Xitucheng Road Haidian District Beijing P.R. China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer



Telephone No. (86-10) 6208.5091

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/000505

A. 主题的分类
Int CI⁷ : A61K39/215, A61P 11/00, A61P 31/14
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)
Int CI⁷ : A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献
CNPAT、CNKI、BA

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))
CNPAT、CNKI、WPI、EPODOC、BA, 检索词: SARS、严重急性呼吸道综合征冠状病毒、SARS 相关冠状病毒、刺突基因、Spike 基因、疫苗、复制缺陷型腺病毒、Severe Acute Respiratory Syndrome virus、Spike gene、vaccine、replication defective adenovirus

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	郭瀛军等, “SARS 相关冠状病毒 S2 基因的克隆及其 DNA 疫苗的免疫效果”, 第二军医大学学报, 24 (7), 2003.7, pp.707-709, 全文	1-18
A	叶迅等, “严重急性呼吸道综合征冠状病毒疫苗研究现状”, 生物化学与生物物理进展, 30 (3), 2003, pp.331-334, 全文	1-18

其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:
 “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件
 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
 “&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期: 22.4 月 2005 (22.04.2005)
 国际检索报告邮寄日期: 2005 年 5 月 20 日 (2005.05.20)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
 传真号: (86-10)62019451
 授权官员: 孙奕龙
 电话号码: (86-10) 62085091