



專利註冊紀錄冊
REGISTER OF PATENTS

基本資料 Basic information

	狀況: Status:	專利有效 Patent in force
	專利類別: Patent Type:	短期專利 Short-term Patent
	專利編號: Patent No.:	HK30059667
[11]	發表編號: Publication No.:	HK30059667
[21]	申請編號: Application No.:	32021042343.2
[54]	發明名稱: Title of Invention:	一種用於COVID-19的口服性疫苗及抗體加強劑 PREPARATION OF ORAL VACCINE AND IMMUNE BOOSTER FOR COVID19
[51]	分類: Classified to:	C12N 1/21, C12N 15/50
	法律程序所用語文: Language of Proceedings:	中文 Chinese

日期 Dates

[45]	批予專利日期: Patent Grant Date:	06-05-2022
[43]	專利說明書首次發表日期: Date of First Publication:	06-05-2022
[22]	提交日期: Filing Date:	11-11-2021

當事人 Parties

[71/73]	申請人/專利所有人: Applicant/ Proprietor:	夢芊細胞因子有限公司 香港 葵涌油麻磡71-77号 城市工業大廈12樓G室
---------	--------------------------------------	--

類別: 法人團體 Incorporated
Type:

公司成立為法團所在國家 / 地 香港 HONG KONG

區 / 地方:

Country/Territory/Area of
Incorporation:

[72]

發明人: 邝纬阳

Inventor:

香港

葵涌油麻磡71-77号

城市工业大厦12楼G室

宋振洲

香港

葵涌油麻磡71-77号

城市工业大厦12楼G室

林庭匡

香港

葵涌油麻磡71-77号

城市工业大厦12楼G室

[74]

代理人: 香港知識產權代理有限公司

Agent:

香港

新界白石角香港科學園第三期

科技大道西12號2樓230室

[74]

送達地址: 香港知識產權代理有限公司

Address for Service:

香港

新界白石角香港科學園第三期

科技大道西12號2樓230室

優先權 Priority

[30] 優先權日期: 28-09-2021

Priority Date:

[30] 優先權國家、地區、地方: 中國

Priority Country, Territory,

Area:

[30] 優先權申請編號: 202111143384.9

Priority Application No.:

續期 Renewal

下次續期日期: 11-11-2025

Next Renewal due date:

说明书

一种用于 COVID-19 的口服性疫苗及抗体加强剂

技术领域

本发明涉及药物领域，具体地，本发明涉及一种用于 COVID-19 的口服性疫苗及抗体加强剂。

背景技术

由 SARS-CoV-2 病毒引起的 COVID-19 (Corona Virus Disease 2019, 新型冠状病毒肺炎) 大流行对人类健康造成重大威胁。针对 SARS-CoV-2 的疫苗是控制疾病传播的有效手段，目前虽然有多种疫苗处于开发阶段，但疫苗的疗效、安全性和患者顺从性方面还存在许多问题，例如疫苗施用后血清抗体水平低、注射给药疫苗对药物的安全性带来问题，且患者对注射给药的顺从性低等等。

因此，本领域需要开发一种有效、安全性高和患者顺从性好的用于 SARS-CoV-2 病毒的疫苗。

发明内容

本发明的目的在于提供一种有效、安全性高和患者顺从性好的用于 SARS-CoV-2 病毒的疫苗。

本发明的第一方面提供了一种枯草芽孢杆菌，所述的枯草芽孢杆菌表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域。

优选地，所述的枯草芽孢杆菌为基因工程化的枯草芽孢杆菌。

优选地，枯草芽孢杆菌的菌株包括枯草芽孢杆菌 WB800N 菌株。

优选地，所述的 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

优选地，所述的 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

优选地，所述的枯草芽孢杆菌通过以下方法制备：

将表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结

合区域掺入或导入到所述的枯草芽孢杆菌中，表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域，得到枯草芽孢杆菌。

本发明第二方面，提供一种转化子，所述的转化子包括含有表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的基因的枯草芽孢杆菌。

优选地，所述的基因包括 DNA 和/或 RNA。

优选地，所述的基因掺入或导入到所述的枯草芽孢杆菌中。

优选地，枯草芽孢杆菌的菌株包括枯草芽孢杆菌 WB800N 菌株。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

优选地，所述的基因负载在质粒上。

优选地，所述的质粒包括穿梭载体 pHT01。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

优选地，所述的转化子通过以下方法制备：

将表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域掺入或导入到所述的枯草芽孢杆菌中，得到转化子。

本发明第三方面，提供一种组合物，所述的组合物包括如本发明第一方面所述的枯草芽孢杆菌和/或如本发明第二方面所述的转化子。

优选地，所述的组合物为药物组合物或疫苗组合物。

优选地，所述的组合物还包括药学上、疫苗上可接受的载体。

优选地，所述的组合物的剂型为注射用制剂、外用制剂或口服制剂。

优选地，所述的组合物的剂型为口服制剂。

优选地，所述的组合物的剂型为肠道口服制剂。

优选地，所述的组合物的剂型为小肠口服制剂。

优选地，所述的组合物的剂型为固体制剂、液体制剂或半固体制剂。

优选地，所述的组合物的剂型为片剂、胶囊剂、散剂、注射剂、粉针剂、乳剂、输液剂、口服液、气雾剂、膏剂、凝胶剂、微球、霜剂。

本发明第四方面，提供一种如本发明第一方面所述的枯草芽孢杆菌和/或如本发明第二方面所述的转化子的用途，用于制备组合物，所述的组合物用于预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19；和/或用作 SARS-CoV-2 抗体的加强剂。

优选地，所述的 SARS-CoV-2 抗体包括接种 Sinovac-Corona 疫苗产生的抗体。

优选地，所述的组合物的剂型为注射用制剂、外用制剂或口服制剂。

优选地，所述的组合物为药物组合物或疫苗组合物。

优选地，所述的组合物还包括药学上、疫苗上可接受的载体。

优选地，所述的组合物的剂型为口服制剂。

优选地，所述的组合物的剂型为肠道口服制剂。

优选地，所述的组合物的剂型为小肠口服制剂。

本发明第五方面，提供一种制备抗 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或抗 SARS-CoV-2 病毒的刺突蛋白的受体结合区域的抗体的方法，所述的方法包括步骤：

将如本发明第一方面所述的枯草芽孢杆菌和/或如本发明第二方面所述的转化子口服给药对象，从血液中分离得到抗 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的抗体和/或抗 SARS-CoV-2 病毒的刺突蛋白的受体结合区域的抗体。

优选地，所述的方法为非诊断性和非治疗性方法。

优选地，所述对象为人和非人哺乳动物。

优选地，所述的非人哺乳动物为鼠、狗、猫、牛、羊、马、猪。

本发明第六方面，提供一种预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19 的方法，所述的方法包括步骤：口服给予所述的对象如如本发明第一方面所述的枯草芽孢杆菌和/或如本发明第二方面所述的转化子，从而预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19。

优选地，所述对象为人和非人哺乳动物。

优选地，所述的非人哺乳动物为鼠、狗、猫、牛、羊、马、猪。

在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。

附图说明

图 1 为 SARS-CoV-2 的 S 蛋白的构建质粒的参考示意图。

图 2 为表达 SARS-CoV-2 的 N 蛋白和 S 蛋白表达的基因工程化枯草芽孢杆菌的蛋白质印迹。

图 3 为用 Anti-SRBD-AF488 染色的野生芽孢杆菌的孢子和表达 S 蛋白的基因工程化的芽孢杆菌孢子。

图 4 为基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的 S 蛋白印迹。

图 5 为野生型枯草芽孢杆菌和含有 S 蛋白的基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的免疫染色。

图 6 为野生型枯草芽孢杆菌和基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的流式细胞术分析。

图 7 为表达 N 和 S 蛋白的基因工程化的枯草芽孢杆菌孢子灌胃小鼠后的血清抗 S 蛋白的抗体。

具体实施方式

本发明开发了一种枯草芽孢杆菌，所述的枯草芽孢杆菌表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域。本发明所述的基因工程化的枯草芽孢杆菌口服能够用于预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19。此外，本发明所述的基因工程化的枯草芽孢杆菌还能够用作 SARS-CoV-2 抗体的加强剂，从而提高 SARS-CoV-2 的治疗效果。

术语

如本文所用，术语“包括”、“包含”与“含有”可互换使用，不仅包括开放式定义，还包括半封闭式、和封闭式定义。换言之，所述术语包括了“由……构成”、“基本上由……构成”。

如本文所用，术语“刺突蛋白”与“Spike 蛋白”可互换使用。

如本文所用，术语“受体结合区域”与“RBD”可互换使用。

如本文所用，术语“枯草芽孢杆菌 WB800N”与“Bacillus Subtilis WB800N”可互换使用。

在本发明中，术语“预防”表示预防疾病和/或它的附随症状的发作或者保护对象免于获得疾病的方法。

本发明所述的“治疗”包括延缓和终止疾病的进展，或消除疾病，并不需要100%抑制、消灭和逆转。

枯草芽孢杆菌

本发明提供一种枯草芽孢杆菌，所述的枯草芽孢杆菌表达SARS-CoV-2的核衣壳蛋白和/或SARS-CoV-2的刺突蛋白的受体结合区域。

优选地，枯草芽孢杆菌的菌株包括枯草芽孢杆菌 WB800N 菌株。

在本发明的一个优选例中，所述的 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示：

SEQ ID NO: 1:

```
ATGTCAGACAATGGCCCTCAAACCAGAGAAACGCTCCCCGTATAA
CTTTTGGAGGACCGTCGGATTCAACAGGTAGCAATCAGAATGGCGAGAG
ATCTGGCGCAAGGAGTAAACAGCGGAGACCCCAGGGATTACCCAATAAT
ACAGCCTCATGGTTTACTGCCCTAACTCAGCATGGCAAAGAAGATCTTAA
GTTTCCTCGGGGTCAAGGCGTACCCATAAATACAAATTCTTCCCCGGATG
ATCAAATCGGATACTATCGCAGGGCGACTAGACGCATCAGAGGGCGGCGA
TGGCAAGATGAAGGATCTGAGTCCCAGATGGTATTTTTATTATTTGGGAA
CAGGACCCGAGGCAGGATTACCGTATGGAGCAAACAAGGATGGGATTAT
TTGGGTGGCTACGGAAGGAGCATTAAATACTCCGAAGGATCACATTGGTA
CTCGGAACCCGGCAAACAATGCTGCTATTGTCCTTCAATTACCACAAGGC
ACGACCTTACCGAAAGGCTTTTACGCGGAAGGTTCCCGCGGGCGGCTCTCA
GGCAAGCTCACGTTTCATCATCCAGATCTCGTAATAGCAGCCGGAAC TCAA
CACCCGGAAGTTCGAGAGGGACAAGCCCTGCGCGAATGGCAGGAAACGG
TGGCGACGCCGCGCTCGCCTTGTTGCTTTTGGATCGGTTGAATCAGCTTGA
GTCAAAAATGTCTGGAAAGGGGCAACAACAACAAGGTCAAACAGTGACG
```


AAAAATCAGCTGCGGAAGCGTCAAAAAACCCCGTCAAAAACGCACGG
CTACAAAGGCGTATAACGTAACACAAGCATTGGAAGAAGGGGGCCGGA
ACAAACGCAAGGTAATTTTGGAGATCAAGAACTGATTAGGCAGGGCACA
GACTATAAACACTGGCCGCAGATCGCACAGTTTGCGCCAGCGCGTCGGC
ATTTTTCGGCATGTCGCGTATTGGAATGGAGGTCACACCCAGCGGCACAT
GGCTTACGTATAACGGCGCGATCAAGCTCGACGATAAAGATCCTAACTTT
AAAGATCAGGTAATACTGTTGAACAAGCATATAGACGCTTACAAAACGTT
TCCCCCTACAGAACCTAAAAAAGATAAAAAAAAAAAAAAGCGGATGAGACC
CAAGCGTTACCCAGAGACAGAAGAAACAACAACAGTGACACTGTTAC
CAGCCGCAGATCTGGATGATTTTAGCAAACAGTTACAACAGTCTATGTCT
TCCGCTGATTCAACACAAGCGTAA (SEQ ID NO: 1)。

优选地，所述的 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示：

SEQ ID NO: 2:

AATATCACGAATTTGTGCCCATTTGGCGAAGTATTCAACGCAACGAG
ATTTGCCTCCGTTTATGCGTGGAACCGGAAGAGAATCTCAAATTGTGTCG
CGGATTATAGCGTCCTGTATAATTCAGCGTCATTCTCCACCTTTAAGTGCT
ACGGCGTGTCACCAACGAAATTGAATGATCTGTGTTTCACTAATGTATAT
GCAGATAGCTTTGTGATCCGCGGCGACGAAGTCAGACAAATTGCGCCAG
GCCAAACGGGAAAAATCGCAGATTATAATTATAAACTTCCTGATGACTTC
ACGGGATGTGTAATTGCATGGAACCTAATAACCTTGATTGAAAGTCGG
AGGAAATTATAACTATCTGTATAGACTGTTCCGCAAGAGCAATCTCAAGC
CTTTCGAACGCGATATCTCGACGGAGATTTATCAAGCCGGCAGCACCCCG
TGTAACGGTGTTGAAGGCTTCAATTGCTATTTCCCGCTGCAGAGCTATGG
CTTTC AACCGACGAACGGGGTTGGCTACCAGCCCTACCGCGTCGTGGTTC
TGTCCTTCGAATTACTCCATGCCCGGCTACGGTTTAATGAAA (SEQ ID NO:
2)。

转化子

转化子(transformant) 是掺入或导入外源DNA后获得了新的遗传标志的细菌细胞或其他受体细胞。转化后的受体菌，称转化子transformant。

本发明提供一种转化子，所述的转化子包括含有表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的基因的枯草芽孢杆菌。

优选地，所述的基因包括 DNA 和/或 RNA。

优选地，所述的基因掺入或导入到所述的枯草芽孢杆菌中。

优选地，枯草芽孢杆菌的菌株包括枯草芽孢杆菌 WB800N 菌株。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的基因的核苷酸序列如上文 SEQ ID NO: 1 所示。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的核苷酸序列如上文 SEQ ID NO: 2 所示。

优选地，所述的基因负载在质粒上。

优选地，所述的质粒包括穿梭载体 pHT01。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

优选地，所述的表达 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

组合物

本发明提供了一种组合物，所述的组合物能够用于预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19。

代表性地，所述的组合物为药物组合物或疫苗组合物。

本发明所述的组合物还可以包括药学上、疫苗上可接受的载体。

在本发明中，组合物的剂型包括(但不限于)口服制剂、注射剂、外用制剂。

代表性地，组合物的剂型包括(但不限于)：片剂、胶囊剂、散剂、注射剂、粉针剂、乳剂、输液剂、口服液、气雾剂、膏剂、凝胶剂、微球、霜剂。

术语“药学上、疫苗上可接受的载体”指的是：一种或多种相容性固体、半固体、液体或凝胶填料，它们适合于人体或动物使用，而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”是指药物组合物中的各组分和药物的活性成分以及它们之间相互掺和，而不明显降低药效。

应理解，在本发明中，所述的载体没有特别的限制，可选用本领域常用材料，或用常规方法制得，或从市场购买得到。药学可接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙甲基纤维素、羧甲基纤维素

钠等)、明胶、滑石粉、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油、等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、缓冲剂、螯合剂、增稠剂、pH 调节剂、透皮促进剂、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、抑菌剂、无热原水等。

代表性的, 液体剂型除了活性药物成分外, 液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂, 如水或其它溶剂, 增溶剂和乳化剂, 例如, 乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油, 特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物等。除了这些惰性稀释剂外, 组合物也可包含助剂, 如润湿剂、乳化剂和悬浮剂等

药物制剂应与给药方式相匹配。本发明药剂还可与其他协同治疗剂一起使用(包括之前、之中或之后使用)。使用药物组合物时, 是将安全有效量的药物施用于所需对象(如人或非人哺乳动物), 所述安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围内的。

用途

本发明还提供一种如本发明所述的枯草芽孢杆菌和/或如本发明所述的转化子的用途, 用于制备组合物, 所述的组合物用于预防和/或治疗SARS-CoV-2病毒感染或COVID-19; 和/或用作SARS-CoV-2抗体的加强剂。

本发明还提供一种制备抗 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或抗 SARS-CoV-2 病毒的刺突蛋白的受体结合区域的抗体的方法, 所述的方法包括步骤:

将如本发明所述的枯草芽孢杆菌和/或如本发明所述的转化子口服给药对象, 从血液中分离得到抗 SARS-CoV-2 病毒的刺突蛋白的受体结合区域的抗体。

优选地, 所述的方法为非诊断性和非治疗性方法。

优选地, 所述对象为人和非人哺乳动物。

优选地, 所述的非人哺乳动物为鼠、狗、猫、牛、羊、马、猪。

本发明还提供一种预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19 的方

法，所述的方法包括步骤：口服给予所述的对象如本发明所述的枯草芽孢杆菌和/或如本发明所述的转化子，从而预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19。

本发明的主要技术效果包括：

本发明开发了一种基因工程化枯草芽孢杆菌，所述的枯草芽孢杆菌表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域，本发明所述的基因工程化的枯草芽孢杆菌通过口服能够用于预防治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19，口服给药成本低、安全性高、服用方便、患者顺应性高。此外，本发明所述的基因工程化的枯草芽孢杆菌还能够用作 SARS-CoV-2 抗体的加强剂，从而提高 SARS-CoV-2 的治疗效果。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，以下具体实施例以本技术方案为前提，给出了详细的实施方式和具体操作过程，但本发明的保护范围并不限于本实施例。

实施例

SARS-CoV-2 的 N 蛋白为 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白。

SARS-CoV-2 的 S 蛋白为 SARS-CoV-2 的刺突蛋白（Spike）的 RBD（受体结合区域）。

表达 SARS-CoV-2 的 N 和 S 蛋白的基因工程化枯草芽孢杆菌简称基因工程化枯草芽孢杆菌。

实施例 1

1.1 表达 SARS-CoV-2 的 N 和 S 蛋白的基因工程化枯草芽孢杆菌的制备
枯草芽孢杆菌 WB800N（*Bacillus Subtilis* WB800N）菌株用于研究。该细菌用编码 SARS-CoV-2 病毒 S/N 蛋白的质粒进行转化。枯草芽孢杆菌的孢子形成是用 Difco Sporulation Medium 从营养细胞诱导的，并进一步用溶酶体处理以去除营养细胞。

包含来自枯草芽孢杆菌的全长 CotC 级联、肽连接区域和来自 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白或刺突蛋白（Spike）的 RBD（受体结合区域）的表达构建体是

针对枯草芽孢杆菌进行密码子优化的，通过 InvitrogenGeneArt 基因合成，进一步克隆到大肠杆菌 (*E.coli*) 和枯草芽孢杆菌的穿梭载体 pHT01 中。大肠杆菌菌株 DH5 α (NEB)用于克隆，表达 SARS

SARS-CoV-2 的 N 和 S 蛋白的构建质粒转化到枯草芽孢杆菌菌株 WB800N(MoBiTec)中进行 N 和 S 蛋白表达。质粒的 DNA 序列通过 Sanger 测序确认。

转化到枯草芽孢杆菌菌株 WB800N 的 pHT01-SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白构建质粒和 pHT01-SARS-CoV-2 的 Spike 蛋白的 RBD 的构建质粒的测序结果如下所示：

pHT01-核衣壳蛋白的核苷酸序列如下 SEQ ID NO: 3 所示：

SEQ ID NO: 3:

TCACAGAAAAAGAACGGGAAAAGATGATGTAAGCGTGAAAAATTTT
TTATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATTGTG
GAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAATTAAAGGAGGAAGGATCCATGG
GCTACTATAAAAAATACAAAGAAGAATACTATAACCGTTAAAAAGACATA
TTACAAGAAGTATTATGAGTACGATAAAAAAGACTATGATTGTGATTACG
ATAAAAAATATGATGACTATGATAAAAAATATTACGATCATGATAAAAA
AGACTATGATTATGTAGTAGAATATAAAAAAGCACAAAAAACATTACGGG
GGCGGGGAGGCCGCTGCGAAAGGTGGCGGCATGTCAGACAATGGCCCT
CAAACCCAGAGAAACGCTCCCCGTATAACTTTTGGAGGACCGTCGGA
TTCAACAGGTAGCAATCAGAATGGCGAGAGATCTGGCGCAAGGAGTA
AACAGCGGAGACCCAGGGATTACCCAATAATACAGCCTCATGGTTT
ACTGCCCTAACTCAGCATGGCAAAGAAGATCTTAAGTTTCCTCGGGG
TCAAGGCGTACCATAAATACAAATTCTTCCCCGGATGATCAAATCG
GATACTATCGCAGGGCGACTAGACGCATCAGAGGCGGCGATGGCAA
GATGAAGGATCTGAGTCCAGATGGTATTTTTATTATTTGGGAACAG
GACCCGAGGCAGGATTACCGTATGGAGCAAACAAGGATGGGATTATT
TGGGTGGCTACGGAAGGAGCATTAAATACTCCGAAGGATCACATTGG
TACTCGGAACCCGGCAAACAATGCTGCTATTGTCCTTCAATTACCACA
AGGCACGACCTTACCGAAAGGCTTTTACGCGGAAGGTTCCCGCGGCG
GCTCTCAGGCAAGCTCACGTTTCATCATCCAGATCTCGTAATAGCAGC
CGGAACTCAACACCCGGAAGTTCGAGAGGGACAAGCCCTGCGCGAAT

GGCAGGAAACGGTGGCGACGCCGCGCTCGCCTTGTTGCTTTTGGATC
GGTTGAATCAGCTTGAGTCAAAAATGTCTGGAAAGGGGCAACAACAA
CAAGGTCAAACAGTGACGAAAAAATCAGCTGCGGAAGCGTCAAAAAA
ACCCCGTCAAAAACGCACGGCTACAAAGGCGTATAACGTAACACAAG
CATTTGGAAGAAGGGGGCCGGAACAAACGCAAGGTAATTTTGGAGAT
CAAGAACTGATTAGGCAGGGCACAGACTATAAACACTGGCCGCAGAT
CGCACAGTTTGCGCCAGCGCGTCCGGCATTTCGGCATGTCGCGTA
TTGGAATGGAGGTCACACCCAGCGGCACATGGCTTACGTATAACGGC
GCGATCAAGCTCGACGATAAAGATCCTAACTTTAAAGATCAGGTAAT
ACTGTTGAACAAGCATATAGACGCTTACAAAACGTTTCCCCCTACAG
AACCTAAAAAAGATAAAAAAAAAAAAAAGCGGATGAGACCCAAGCGTTA
CCCCAGAGACAGAAGAAACAACAACAGTGACACTGTTACCAGCCGC
AGATCTGGATGATTTTAGCAAACAGTTACAACAGTCTATGTCTTCCGC
TGATTCAACACAAGCGTAATGAAATCTAGAGTCGACGTCCCCGGGGCAG
CCCCGCTAATGAGCGGGCTTTTTTCACGTCACGCGTCCATGGAGATCTTTG
TC (SEQ ID NO: 3) 。

其中：CotC：无加黑下划线

肽连接区域：加黑斜体

SARS-CoV-2的核衣壳蛋白核苷酸：加黑有下划线

pHT01- Spike 蛋白的 RBD 的核苷酸序列如下 SEQ ID NO: 4 所示：

SEQ ID NO: 4:

CCGCGGAAGGGGGGGCGGAAAGATGATGTAAGCGTGAAAAATTTTT
TATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATCTTTATTATAAGAATTGTGG
AATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAATTAAAGGAGGAAGGATCCATGGG
CTACTATAAAAAATACAAAGAAGAATACTATACCGTTAAAAAGACATATT
ACAAGAAGTATTATGAGTACGATAAAAAAGACTATGATTGTGATTACGAT
AAAAAATATGATGACTATGATAAAAAATATTACGATCATGATAAAAAAG
ACTATGATTATGTAGTAGAATATAAAAAAGCACAAAAAACATTACGGGGG
CGGGGAGGCCGCTGCGAAAGGTGGCGGCAATATCACGAATTTGTGCCCA
TTTGGCGAAGTATTCAACGCAACGAGATTTGCCTCCGTTTATGCGTG
GAACCGGAAGAGAATCTCAAATTGTGTCGCGGATTATAGCGTCCTGT

ATAATTCAGCGTCATTCTCCACCTTTAAGTGCTACGGCGTGTCACCAA
CGAAATTGAATGATCTGTGTTTCACTAATGTATATGCAGATAGCTTTG
TGATCCGCGGCGACGAAGTCAGACAAATTGCGCCAGGCCAAACGGG
AAAAATCGCAGATTATAATTATAAACTTCCTGATGACTTCACGGGATG
TGTAATTGCATGGA ACTCTAATAACCTTGATTTCGAAAGTCGGAGGAA
ATTATAACTATCTGTATAGACTGTTCCGCAAGAGCAATCTCAAGCCTT
TCGAACGCGATATCTCGACGGAGATTTATCAAGCCGGCAGCACCCCG
TGTAACGGTGTTGAAGGCTTCAATTGCTATTTCCCGCTGCAGAGCTA
TGGCTTTCAACCGACGAACGGGGTTGGCTACCAGCCCTACCGCGTCG
TGGTTCTGTCCTTCGAATTACTCCATGCCCCGGCTACGGTTTAATGAA
ATCTAGAGTCGACGTCCCCGGGGCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTT
CACGTCACGCGTCCATGGAGATCTTTGTCTGCAACTGAAAAGTTTATACC
TTACCTGGAACAAATGGTTGAAACATACGAGGCTAATATCGGCTTATTAG
GAATAGTCCCTGTAC (SEQ ID NO: 4) .

其中：CotC：无加黑下划线

肽连接区域：加黑斜体

SARS-CoV-2的刺突蛋白的RBD核苷酸序列：加黑有下划线。

SARS-CoV-2的S蛋白的构建质粒的参考示意图如图1所示。

1.2 从基因工程化枯草芽孢杆菌中诱导 SARS-CoV-2 的 N 和 S 蛋白

枯草芽孢杆菌转化子将在 37 °C、200rpm 下生长，直到 OD600 值在补充有氯霉素(5 µg/mL)的 2xLB 中达到 1.0。培养物用终浓度为 1mM IPTG 进行诱导，并在 37 °C、200rpm 下再诱导 12h。收集培养物并以 4,200rpm 离心 15min。细胞沉淀将用 1x 磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH7.4) 洗涤并重悬于 1/2 体积的 DifcoSporulationMedium(DSM) (8g 营养肉汤、0.1% KCl、1mM MgSO₄ 和 10µM MnCl₂ 溶于 1L 蒸馏水中，添加 0.5mM CaCl₂ 和 1µM FeSO₄)。细胞在 37 °C、200rpm 下生长 24 小时。细胞在 37 °C 下通过溶菌酶(0.1mg/mL)裂解 1h，10,000rpm 离心 15 分钟，然后用 1xPBS 洗涤三次。来自转化的枯草芽孢杆菌孢子用 PBS 洗涤，用裂解缓冲液 (PBS+1% Triton 和完全蛋白酶抑制剂) 裂解，然后在 100 °C 下变性 10min，然后在 14,800g 下离心 15min。进行 BCA 测定以确定蛋白质浓度。100ng 刺突蛋白 (spike protein) 标准品的 RBD 和 10µg 孢子裂解物将在 SDS-PAGE 中进行分析，然后用针对刺突蛋白的 RBD 和核衣壳蛋

白单克隆抗体进行蛋白印迹考察。

1.3.人单核细胞与肠道 HT-29 细胞共培养

为了模拟肠道粘膜区域，将采用人单核细胞和肠道 HT-29 细胞的体外共培养系统。人单核细胞从健康志愿者的新鲜人血沉棕黄层中制备，用于纯化原代人类巨噬细胞。外周血单核细胞(PBMC)将通过 Ficoll 密度(1.082g/ml)以 1800rpm 离心 25min 进行分离。红细胞裂解后，CD14 特异性 MACS 珠 (MiltenyiBiotec)将用于富集 CD14+单核细胞。为了诱导巨噬细胞分化，CD14+单核细胞将在含有 L-谷氨酰胺、10% FCS、1%青霉素-链霉素、1%丙酮酸钠和 1% Glutamax (GIBCO)和 GM-CSF(25ng/mL)的 RPMI1640 培养基中培养 6-7 天和，细胞培养密度为 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 。

将人小肠上皮 HT-29 细胞在 24 孔培养板中培养至融合，然后在 37℃下用 PBS 冲洗以防止细胞脱离。然后将单核细胞悬液($5 \times 10^5/\text{ml}$)添加到培养板中的 HT-29 细胞上。上皮细胞-单核细胞共培养物在有或没有野生枯草芽孢杆菌/基因工程化枯草芽孢杆菌中孵育。通过 Bio-plex200System(Bio-Rad)的 Bio-plex 人细胞因子/趋化因子多重分析对培养上清液或小鼠血清中促炎因子(IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、干扰素- γ (IFN γ) 和 TNF- α) 的浓度进行定量分析。

1.4.体外细胞分离和 DCs 的产生

单核细胞将在 24 孔板中以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 密度铺在 24 孔板中，并在 37℃ 和 5%CO₂ 条件下粘附 45 分钟。通过用温和的培养基流冲洗孔 2 到 3 次，可以去除未贴壁的细胞。然后在存在两种细胞因子的条件下培养单核细胞：粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(50ng/ml)和 IL-4(40ng/ml)，在 37℃ 和 5% CO₂ 条件下培养。在第 3 天，50%的培养基将替换为新鲜培养基和细胞因子。然后在第 6 天收集 DCs 并洗涤。细胞成熟通过野生枯草芽孢杆菌/基因工程化枯草芽孢杆菌诱导 48 小时。脂多糖(LPS)(0.1g/ml)将用作阳性对照。收获细胞后收集 DCs 培养物的上清液，并储存在-80℃ 检测细胞因子。

通过 Bio-plex200System(Bio-Rad)的 Bio-plex 人细胞因子/趋化因子多重分析测定(IL-1、IL-12、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α) 的浓度。

1.5.DCs 的流式细胞分析

第 8 天，收集 DCs（树突状细胞），洗涤并用荧光色素偶联抗体标记。标记后，清洗细胞悬浮液并重新悬浮以进行流式细胞术分析。FITC、PE 和 PE-cyanin5.1 (PC5)-偶联同型对照和 CD11c-APC、CD14-FITC、CD40-PerCP、CD80-FITC、CD83-PE、CD86-PE 和 HLA-DR-APC 抗体。DCs 通过标准前向散射和侧向散射曲线测定大细胞，将不同 CD 标记物的平均荧光强度与 RPMI 处理的阴性对照的平均荧光强度归一化为相对荧光强度。

1.6. 免疫方案

1.6.1 首先使用上述体外实验研究和比较野生枯草芽孢杆菌/基因工程化枯草芽孢杆菌的不同组合的免疫调节活性。后续动物研究中使用的是野生枯草芽孢杆菌/基因工程化枯草芽孢杆菌基于体外实验的结果。

使用 BALB/小鼠，8 周大的小鼠将通过灌胃(p.o.)途径接种野生枯草芽孢杆菌或基因工程化枯草芽孢杆菌的孢子。

第 1 组：野生未免疫组

第 2 组： 1.0×10^{10} 个孢子的基因工程化枯草芽孢杆菌

通过不锈钢圆头饲插管灌胃给予小鼠含有 1×10^{10} 个孢子的悬浮液（0.5 毫升等分试样）。在施用孢子前 30min，小鼠灌胃给予 0.5ml 0.1M 碳酸氢钠溶液。将在免疫方案前三天和第给药后收集血液，测试每个小鼠组的个体血液样品的抗体反应。

1.6.2 抗体的血清学

小鼠在全身麻醉下放血，用于 ELISA 分析，并将血清冷冻以备将来检测。靶向抗原是 SARS-CoV-2N 和 S 蛋白。为了确定小鼠血清中抗体的滴度，ELISA 平板上涂有抗原，通常为 0.1ng/孔。将在含有 1% HSA 的 PBS 中连续稀释的血清上清液加入包被板的孔中，并在室温下孵育 1h。山羊抗小鼠 IgM 或 IgG 与碱性磷酸酶偶联（SouthernBiotechnology,Birmingham,AL,USA）作为二抗。抗体效价定义为最高血清稀释度，其吸光度比正常血清样品的吸光度高 0.1 或更高。如果反应性滴度从无法检测到的预处理增加到疫苗接种后的至少 1:40，或者如果可检测到预处理的 8 倍，则反应效价通过 ELISA 测定为阳性的。

1.6.3 脾细胞的分离和活化

最后一次免疫后，将处死小鼠，无菌收集脾脏用于脾细胞分离。脾脏将灌注 RPMI-1640(添加有 10% 热灭活胎牛血清、25mM HEPES、2mM L-谷氨酰胺、

1mM 丙酮酸钠、100IU/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素) 和配备 26G 针头的 5ml 注射器将用于获得脾细胞的单细胞悬液。脾细胞悬液将在 $300\times g$ 离心 5 分钟。RBCs 使用 3ml 0.84% 的无菌 NH_4Cl 裂解 2 分钟。细胞用 RPMI-1640 洗涤以去除裂解的红细胞和 NH_4Cl 。脾细胞($2\times 10^5/\text{ml}$)将在不存在或存在纯化的重组 SARS-CoV-2S 和 N 蛋白的情况下培养 48 小时。然后将收集含有释放的细胞因子的上清液样品并储存在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 。SARS-CoV-2S 和 N 蛋白刺激的细胞分泌的 IL-1、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 和 TNF- α 的水平将通过 Bio-plex200System(Bio-Rad)的 Bio-plexhuman 进行细胞因子/趋化因子多重分析。

1.7 临床试验

志愿者被随机分成未接种疫苗组和接种疫苗组。

对于未接种其它疫苗组的志愿者，志愿者分别在第0天、14天和28天口服1粒含有 1×10^{10} CFU 基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的胶囊，分别在第0天、27天和42天进行血液检测。

对于接种其它疫苗组的志愿者，在接种 Sinovac-Corona 疫苗4个月后，进行血液检测（计为第0天），然后口服1粒含有 1×10^{10} CFU 基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的胶囊后第14天进行血液检测。

对血液样本进行 MAGLUMI SARS-CoV-2 中和抗体测试，以定量测定志愿者中抗 SARS-CoV-2 的中和抗体滴度，测定的检测限为 $0.003\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.8. 统计分析

将使用 GraphPad PRISM 软件 5.0 版 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 进行统计分析和显著性分析，如通过配对样本的学生 t 检验或单向方差分析 (ANOVA) 进行测量。在所有比较中， $p < 0.05$ 将被视为具有统计学意义。

2. 实验结果

2.1 从基因工程化的枯草芽孢杆菌中诱导 SARS-CoV-2 的 N 蛋白和 S 蛋白
通过枯草芽孢杆菌裂解物的蛋白质印迹和用抗 S 蛋白的 RBD-AF488 染色孢子，证实工程化枯草芽孢杆菌的 SARS-CoV-2 的 N 和 S 蛋白表达，如图 2 和图 3 所示。

2.2 孢子的表征

通过蛋白质印迹和免疫染色也证实了的孢子特征，如图 4 和图 5 所示。染色后的孢子还通过流式细胞仪进一步确认其特征，流式细胞仪分析结果如图 6 所

示。

2.3 动物实验

小鼠在第0天开始进行3个疗程给予表达N蛋白和S蛋白的枯草芽孢杆菌孢子的灌胃（First log），第98天后另外连续3天、每天一次的灌胃（Second log）则给予表达S蛋白的枯草芽孢杆菌孢子，小鼠血清中的抗S蛋白的抗体IgM和IgG的含量如图7所示。

可以看出，口服给予表达N蛋白和S蛋白的枯草芽孢杆菌孢子后，血清中能够高含量的产生抗体SARS-CoV-2的S蛋白抗体IgM和IgG，表明表达N蛋白和S蛋白的枯草芽孢杆菌能够口服用作SARS-CoV-2感染的疫苗。

2.4 人细胞因子/趋化因子多重分析测定结果

人细胞因子/趋化因子多重分析测定IL-1、IL-12、IL-10、IFN- γ 和TNF- α 的浓度在人单核细胞与肠道HT-29上皮细胞共培养物和DCs通过野生枯草芽孢杆菌/基因工程化枯草芽孢杆菌诱导下，以及小鼠免疫后分离的脾细胞在存在纯化的重组SARS-CoV-2S和N蛋白活化下，均有显著的上升。

2.5 临床试验结果

对于未接种其它疫苗组的志愿者，在口服基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的胶囊后的第0天、27天和42天，血液中的抗体SARS-CoV-2的含量如下表1所示：

表1 未接种其它疫苗组的志愿者口服基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的胶囊后的第0天、27天和42天血液中的抗体SARS-CoV-2中和抗体的含量

志愿者	第 0 天	第 27 天	第42天
男性（65岁）	<0.003 μ g/ml	0.016 μ g/ml	0.037 μ g/ml
女性（58岁）	<0.003 μ g/ml	0.003 μ g/ml	0.034 μ g/ml
女性（48岁）	<0.003 μ g/ml	<0.003 μ g/ml	0.022 μ g/ml
男性（54岁）	<0.003 μ g/ml	0.003 μ g/ml	0.050 μ g/ml
男性（71岁）	<0.003 μ g/ml	<0.003 μ g/ml	0.042 μ g/ml

对于接种其它疫苗组的志愿者，在接种Sinovac-Corona 疫苗4个月后（计为第0天）和口服基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的胶囊后第14天血液中的抗体SARS-CoV-2中和抗体的含量如下表2所示：

表2 接种其它疫苗组的志愿者在接种Sinovac-Corona 疫苗4个月后（计为第0天）和口服基因工程化枯草芽孢杆菌孢子的胶囊后第14天血液中的抗体

SARS-CoV-2中和抗体的含量

志愿者	第 0 天	第 14 天
男性（58岁）	0.08 μ g/ml	0.082 μ g/ml
男性（58岁）	0.108 μ g/ml	0.194 μ g/ml
男性（55岁）	0.073 μ g/ml	0.090 μ g/ml

从表1和表2中可以看出，口服表达SARS-CoV-2的N和S蛋白的基因工程化枯草芽孢杆菌能够产生抗体SARS-CoV-2中和抗体，从而对SARS-CoV-2进行治疗，表明表达N蛋白和S蛋白的枯草芽孢杆菌能够口服用作SARS-CoV-2感染的疫苗。

以上所述是本发明针对一种案例设计的实施方案，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下还可以作出若干改进，这些改进也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种枯草芽孢杆菌，其特征在于，所述的枯草芽孢杆菌表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域。

2、如权利要求 1 所述的枯草芽孢杆菌，其特征在于，枯草芽孢杆菌的菌株包括枯草芽孢杆菌 WB800N 菌株。

3、一种转化子，其特征在于，所述的转化子包括含有表达 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或 SARS-CoV-2 的刺突蛋白的受体结合区域的基因的枯草芽孢杆菌。

4、如权利要求 3 所述的转化子，其特征在于，所述的基因掺入或导入到所述的枯草芽孢杆菌中。

5、一种组合物，其特征在于，所述的组合物包括如权利要求 1 所述的枯草芽孢杆菌和/或如权利要求 3 所述的转化子。

6、如权利要求 5 所述的组合物，其特征在于，所述的组合物为药物组合物或疫苗组合物。

7、如权利要求 5 所述的组合物，其特征在于，所述的组合物的剂型为口服制剂。

8、一种如权利要求 1 所述的枯草芽孢杆菌和/或如权利要求 3 所述的转化子的用途，其特征在于，用于制备组合物，所述的组合物用于预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19；和/或用作 SARS-CoV-2 抗体的加强剂。

9、一种制备抗 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白和/或抗 SARS-CoV-2 病毒的刺突蛋白的受体结合区域的抗体的方法，其特征在于，所述的方法包括步骤：

将如权利要求 1 所述的枯草芽孢杆菌和/或如权利要求 3 所述的转化子口服给药对象，从血液中分离得到抗 SARS-CoV-2 的核衣壳蛋白的抗体和/或抗 SARS-CoV-2 病毒的刺突蛋白的受体结合区域的抗体，预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19。

10、一种预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19 的方法，其特征在于，口服给予所述的对象如权利要求 1 所述的枯草芽孢杆菌和/或如权利要求 3 所述的转化子，而预防和/或治疗 SARS-CoV-2 病毒感染或 COVID-19。

说明书附图

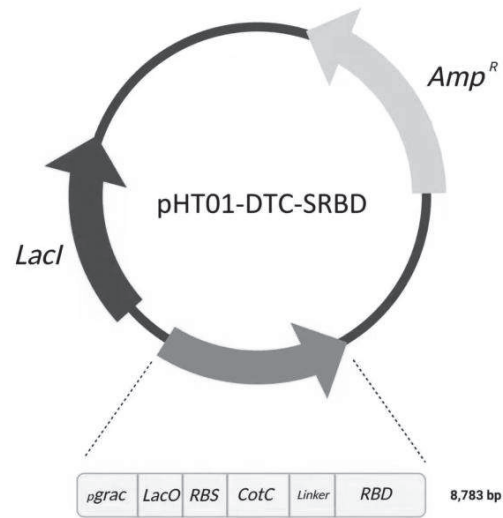


图 1

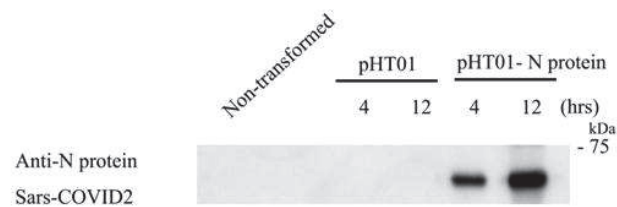
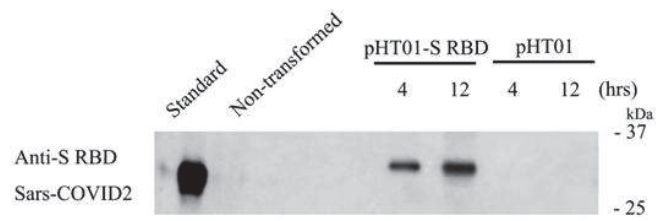


图 2

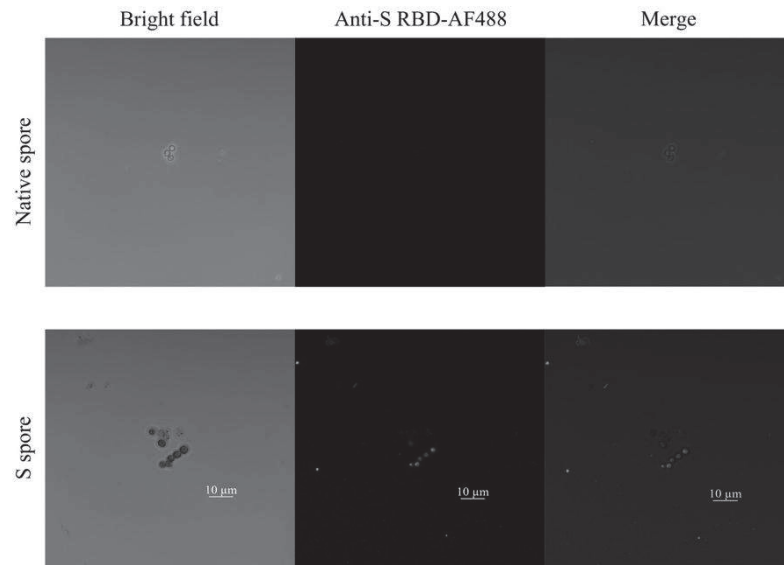


图 3

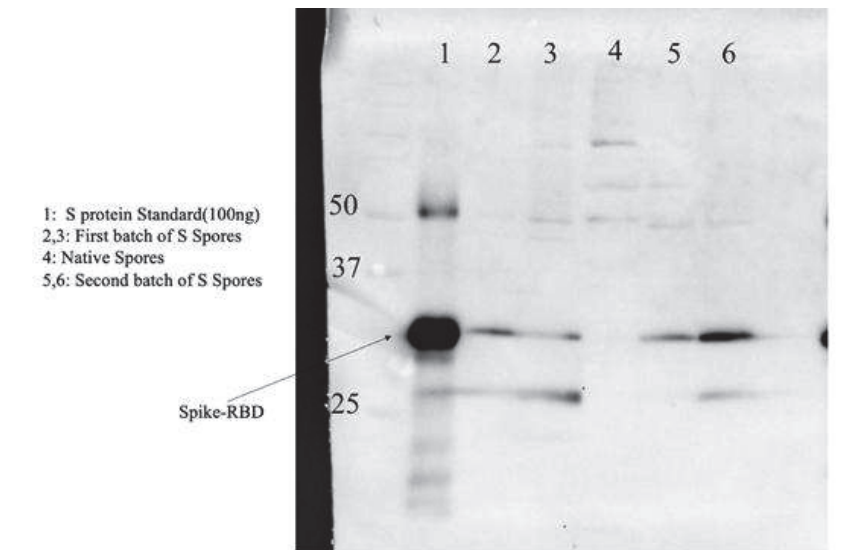


图 4

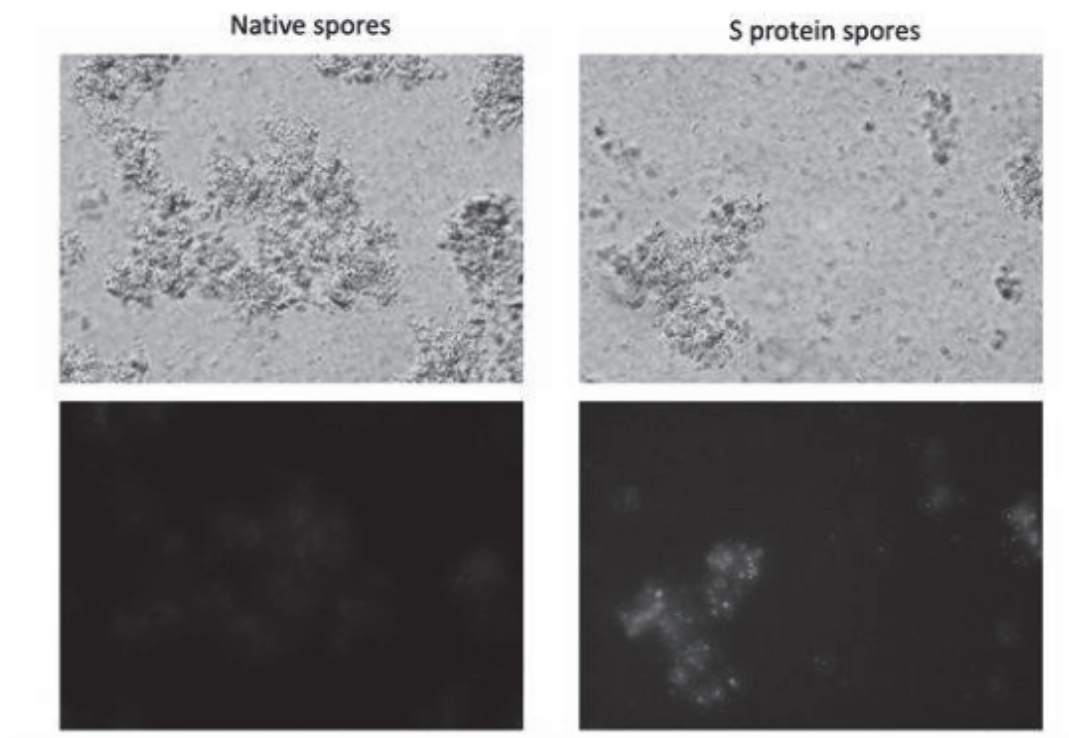
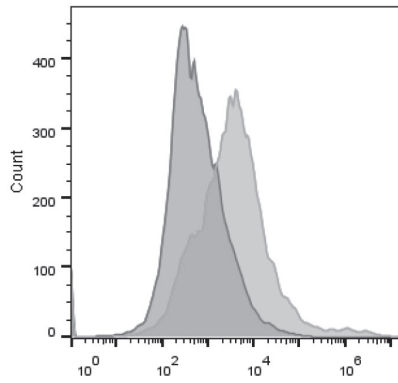


图 5

Unstained control

Stained with AF-488 anti-sRBD

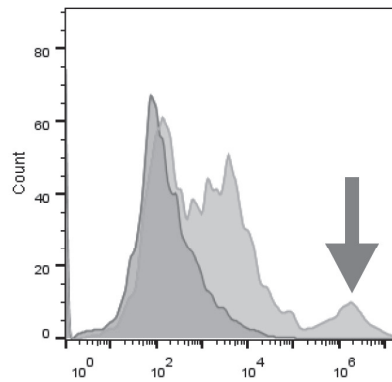
Native spore



Sample Name	Subset Name	Count
A04 A04 Naive spore_AF488-RBD.fc	Ungated	20000
A01 A01 Naive spore_AF488-RBD.fc	Ungated	20000

RBD+ of native spore = 3.11%

Recombinant spore



Sample Name	Subset Name	Count
B02 B04 GM spore_AF488-RBD_5.fc	Ungated	5000
A05 B01 GM spore_AF488-RBD_0.fc	Ungated	3000

RBD+ of recombinant spore = 7.28%

图 6

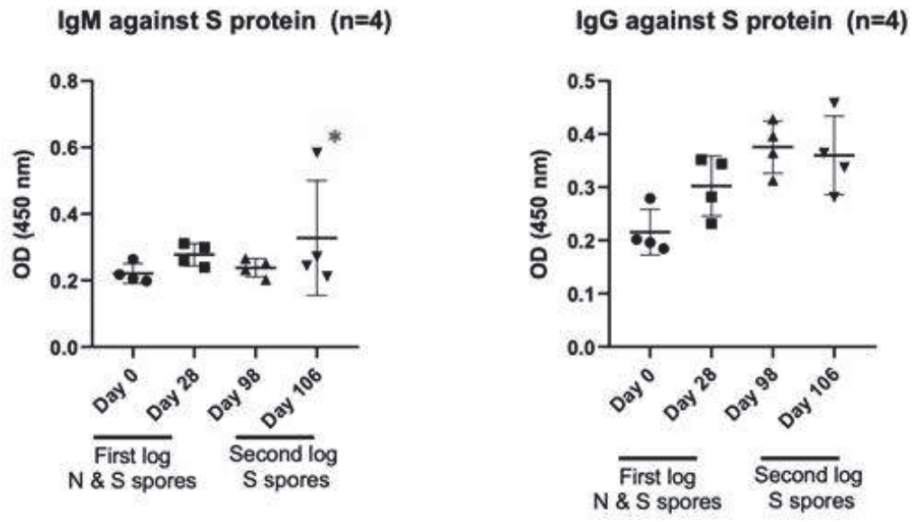


图 7

序列表

<110> 申请人名称 萝苒细胞因子有限公司

<120> 一种用于 COVID-19 的口服性疫苗及抗体加强剂

<130> 本所案号 GWGC210906DI-LQ

<150> CN202111143384.9

<151> 2021-9-28

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1260

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 1

atgtcagaca atggccctca aaaccagaga aacgctcccc gtataacttt tggaggaccg	60
tcggattcaa caggtagcaa tcagaatggc gagagatctg gcgcaaggag taaacagcgg	120
agaccccagg gattacccaa taatacagcc tcatggttta ctgccctaac tcagcatggc	180
aaagaagatc ttaagtttc tcgggtcaa ggcgtacca taaatacaaa ttcttccccg	240
gatgatcaaa tcggatacta tcgcagggcg actagacgca tcagaggcgg cgatggcaag	300
atgaaggatc tgagtcccag atggtatfff tattatttgg gaacaggacc cgaggcagga	360
ttaccgtatg gagcaaaaa ggatgggatt atttgggtgg ctacggaagg agcattaaat	420
actccgaagg atcacattgg tactcggaac cggcaaaaa atgctgctat tgccttcaa	480
ttaccacaag gcacgacctt accgaaaggc ttttacgagg aaggttcccg cggcgctct	540
caggcaagct cacgttcac atccagatct cgtaatagca gccggaactc aacaccggga	600
agttcgagag ggacaagccc tgcgcgaatg gcaggaaacg gtggcgacgc cgcgctcgcc	660
ttgttgcttt tggatcggtt gaatcagctt gactcaaaaa tgtctggaaa ggggcaaaaa	720
caacaaggtc aaacagtgc gaaaaaatca gctgcggaag cgtcaaaaa accccgtcaa	780
aaacgcacgg ctacaaaggc gtataacgta acacaagcat ttggaagaag gggccggaa	840
caaacgcaag gtaatfffagg agatcaagaa ctgattagc agggcacaga ctataaacac	900
tggccgcaga tcgcacagtt tgcgcccagc gcgtcgcat ttttcggcat gtcgctatt	960

ggaatggagg tcacaccag cggcacatgg cttacgtata ccggcgcgat caagctcgac 1020
gataaagatc ctaactttaa agatcaggta atactgttga acaagcatat agacgcttac 1080
aaaacgtttc cccctacaga acctaataaaa gataaaaaaa aaaaagcggg tgagacccaa 1140
gcgttaccac agagacagaa gaaacaacaa acagtgcacac tgttaccagc cgcagatctg 1200
gatgatttta gcaaacagtt acaacagtct atgtcttccg ctgattcaac acaagcgtaa 1260

<210> 2
<211> 590
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 2
aatatcacga atttgtgcc atttggcgaa gatttcaacg caacgagatt tgcctcgtt 60
tatgcgtgga accggaagag aatctcaaat tgtgtcggg attatagcgt cctgtataat 120
tcagegcat tctccacctt taagtgetac ggcgtgtcac caacgaaatt gaatgatctg 180
tgtttcacta atgtatatgc agatagcttt gtgatccgcg gcgacgaagt cagacaaatt 240
gcgccaggcc aaacgggaaa aatcgcagat tataattata aacttctga tgacttcacg 300
ggatgtgtaa ttgcatgaa ctctaataac cttgattcga aagtcggagg aaattataac 360
tatctgtata gactgttccg caagagcaat ctcaagcctt tcgaacgca tatctcgacg 420
gagatttata aagccggcag caccccgtgt aacgggttg aaggcttcaa ttgctatttc 480
ccgctgcaga gctatggctt tcaaccgacg aacggggttg gctaccagcc ctaccgctc 540
gtggttctgt ccttcgaatt actccatgcc ccggctacgg tttaatgaaa 590

<210> 3
<211> 1716
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 3
tcacagaaaa agaacgggaa aagatgatgt aagcgtgaaa aatTTTTTat cttatcactt 60
gaaattggaa gggagattct ttattataag aattgtggaa ttgtgagcgg ataacaattc 120

ccaattaaag gaggaaggat ccatgggcta ctataaaaaa tacaagaag aatactatac 180
 cgttaaaaag acatattaca agaagtatta tgagtacgat aaaaaagact atgattgtga 240
 ttacgataaa aaatatgatg actatgataa aaaatattac gatcatgata aaaaagacta 300
 tgattatgta gtagaatata aaaagcacia aaaacattac gggggcgggg aggccgctgc 360
 gaaaggtggc ggcattgctag acaatggccc tcaaaaccag agaaacgctc cccgtataac 420
 ttttgagga ccgtcggatt caacaggtag caatcagaat ggcgagagat ctggcgcaag 480
 gagtaaacag cggagacccc agggattacc caataataca gcctcatggt ttactgcct 540
 aactcagcat ggcaaagaag atcttaagtt tcctcggggt caagcgctac ccataaatac 600
 aaattcttc ccgatgatc aaatcggata ctatcgagg gcgactagac gcatcagagg 660
 cggcgatggc aagatgaagg atctgagtcc cagatggtat ttttattatt tgggaacagg 720
 acccgaggca ggattaccgt atggagcaaa caaggatggg attatttggg tggctacgga 780
 aggagcatta aatactccga aggatcacat tggtaactcg aaccggcaa acaatgctgc 840
 tattgtcctt caattaccac aaggcagcag cttaccgaaa ggcttttac cggaaggttc 900
 ccgcccggc tctcaggcaa gctcacgttc atcatccaga tctcgtata gcagccgga 960
 ctcaacacc ggaagtcca gagggacaag ccctgcgca atggcaggaa acggtggcga 1020
 cgccgcgctc gccttgttgc ttttgatcg gttgaatcag cttgagtcaa aaatgtctgg 1080
 aaaggggcaa caacaacaag gtcaaacagt gacgaaaaaa tcagctcgg aagcgtcaaa 1140
 aaaacccgt caaaaacgca cggctacaaa ggcgtataac gtaacacaag catttgaag 1200
 aagggggccg gaacaacgc aaggtaattt tggagatcaa gaactgatta ggcagggcac 1260
 agactataaa cactggccgc agatgcaca gtttgcgcc agcgcgctcg cattttcgg 1320
 catgtcgcgt attggaatgg aggtcacacc cagcggcaca tggcttacgt ataccggcg 1380
 gatcaagctc gacgataaag atcctaactt taaagatcag gtaatactgt tgaacaagca 1440
 tatagacgct taaaaacgt ttcccctac agaacctaaa aaagataaaa aaaaaaagc 1500
 ggatgagacc caagcgttac ccagagaca gaagaacaa caaacagtga cactgttacc 1560
 agccgcagat ctggatgatt ttagcaaca gttacaacag tctatgtctt ccgctgattc 1620

aacacaagcg taatgaaatc tagagtcgac gtccccgggg cagccccctt aatgagcggg 1680
 cttttttcac gtcacgcgtc catggagatc tttgtc 1716

 <210> 4
 <211> 1125
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial sequence)

 <400> 4
 ccgcggaagg gggggcggaa agatgatgta agcgtgaaaa attttttate ttatcacttg 60
 aaattggaag ggagatcttt attataagaa ttgtggaatt gtgagcggat aacaattccc 120
 aattaaagga ggaaggatcc atgggctact ataaaaata caaagaagaa tactataccg 180
 ttaaaaagac atattacaag aagtattatg agtacgataa aaaagactat gattgtgatt 240
 acgataaaaa atatgatgac tatgataaaa aatattacga tcatgataaa aaagactatg 300
 attatgtagt agaatataaa aagcacaaaa aacattacgg gggcggggag gccgctgcga 360
 aagggtggcgg caatatcacg aattttgtcc catttggcga agtattcaac gcaacgagat 420
 ttgcctccgt ttatgcgtgg aaccggaaga gaatctcaaa ttgtgtcgcg gattatagcg 480
 tcctgtataa ttcagcgtca ttctccacct ttaagtgcta cggcgtgtca ccaacgaaat 540
 tgaatgatct gtgtttcact aatgtatatg cagatagctt tgtgatccgc ggcgacgaag 600
 tcagacaaat tgcgccaggc caaacgggaa aaatcgaga ttataattat aaacttctctg 660
 atgacttcac gggatgtgta attgcatgga actctaataa ccttgattcg aaagtcggag 720
 gaaattataa ctatctgtat agactgttcc gcaagagcaa tctcaagcct ttcgaacgcg 780
 atatctcgac ggagatttat caagccggca gcaccccggtg taacgggtgtt gaaggettca 840
 attgctatatt cccgctgcag agctatggct ttcaaccgac gaacgggggtt ggctaccagc 900
 cctaccgcgt cgtggttctg tccttcgaat tactccatgc cccggctacg gtttaatgaa 960
 atctagagtc gacgtccccg gggcagcccc cctaagtagc gggctttttt cacgtcacgc 1020
 gtccatggag atctttgtct gcaactgaaa agtttatacc ttacctggaa caaatggttg 1080
 aaacatacga ggctaataatc ggcttattag gaatagtccc tgtac 1125