

研究热点

严重急性呼吸道综合征冠状病毒疫苗研究现状

叶 迅^{1,2)} 孟 夏^{1,2)} 董继斌³⁾ 梁 雯^{2,4)} 胡 放²⁾ 陈红专^{1)*}¹⁾上海第二医科大学药理学教研室, 上海 200025; ²⁾上海三维生物技术有限公司, 上海 201206;³⁾复旦大学药学院生物化学教研室, 上海 200032; ⁴⁾复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032)

摘要 冠状病毒被认为是新近爆发的严重急性呼吸道综合征的病原体。迄今公共数据库中已发表了不同国家和地区分离的 12 个 SARS 病毒株基因组完整序列。突起蛋白是冠状病毒的主要抗原, 包含许多抗原决定簇。SARS 冠状病毒突起蛋白的相对保守性为有效疫苗的开发奠定了很好的研究基础。灭活或减毒的冠状病毒疫苗存在一定的局限性和危险性。开展基因工程疫苗和核酸疫苗的制备研究以及相关候选疫苗的联合应用研究将是一个切实可行的途径。

关键词 严重急性呼吸道综合征 (SARS), 冠状病毒, 突起蛋白, 疫苗

学科分类号 O71

近来许多国家发生严重急性呼吸道综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS), 我国又称为传染性非典型肺炎, 给人类身体健康、社会稳定、经济发展带来严重的威胁。目前我国已在相关研究领域取得相当进展。在病原学方面, 我国作为世界卫生组织建立的国家实验室网络成员国之一^[1], 参与并确定了 SARS 流行病的主要致病原是一种新型的冠状病毒^[2]。在基因组测序方面, 中国科学院北京基因组研究所与军事医学科学院微生物流行病学研究所通力合作, 目前已经完成了一株与 SARS 疾病相关的冠状病毒 BJ01 基因组全部序列的测序工作^[3]。结果显示, 这一病毒的长度约为 3 万个核苷酸, 与中国香港、加拿大、美国、新加坡报告的序列基本一致, 同源性在 99% 以上, 其基因组序列没有显著的基因插入或删除, 也没有与已知的其他冠状病毒发生大的基因重组。在 SARS 的辅助诊断方面, 国家食品药品监督管理局 (SFDA) 已经正式批准“冠状病毒 (变异株) IgM 抗体检测试剂盒”和“冠状病毒 (变异株) IgG 抗体检测试剂盒”生产上市。在药物防治方面, SFDA 正式批准“重组人干扰素 α -2b 喷雾剂”和“重组人干扰素 ω 喷鼻剂”用于高危人群 (接触 SARS 病人的医护人员、密切接触 SARS 患者的家属或其他人群) 预防 SARS 的临床研究。在临床诊断和治疗方面, 现已总结出一系列临床救治指导性方案。这对于规范治疗、降低病死率, 将起积极作用。

引起 SARS 的冠状病毒 (coronavirus) 粒子呈球状, 具有多形性, 直径为 60~220 nm, 有包膜。在包膜表面一般可见两种包膜糖蛋白, 即膜蛋白 (membrane protein, M, 又称为 E1) 和突起蛋白 (spike protein, S, 又称为 E2)。其中突起蛋白是成“棒棒糖”状的膜蛋白。突起蛋白构成长的杆状包膜突起, 每个突起由 3 个突起蛋白通过非共价连接而成。突起蛋白三聚体具有多方面的功能, 它与冠状病毒侵入细胞的过程密切相关, 并且是冠状病毒具有抗原性的主要部位, 能够刺激机体产生中和抗体和介导细胞免疫反应。经过对 12 株已知完整基因组序列的 SARS 冠状病毒编码突起蛋白的基因序列比较, 发现其全长序列 3 768 nt 中有 6 个突变点, 分别是: A230G, T731C, C1 683T, T1 729G, C2 301T, C3 381T。翻译后, 该糖蛋白的蛋白质序列上有 3 个氨基酸发生了点突变: G77D, I244T, S577A, 它们分别由基因点突变 A230G, T731C, T1 729G 引起。而 C1 683T, C2 301T, C3 381T, 则未引起氨基酸的改变 (表 1)。由此可见, 引起 SARS 疾病的冠状病毒的突起蛋白在这几株中表现出了较高的保守性。

突起蛋白具有 4 个结构域, 分别是一个胞质域, 一个跨膜区和两个包膜外域 (分别称为 S1 和

* 通讯联系人。

Tel: 021-64671610, E-mail: yaoli@shsmu.edu.cn

收稿日期: 2003-05-07, 接受日期: 2003-05-14

S2), 跨膜区与 S2 相连. 通过对 SARS 冠状病毒突起蛋白的二级结构预测发现, 突起蛋白变异集中在序列的 S1 区, 这与对其他冠状病毒突起蛋白的研究结果相吻合 (研究表明突起蛋白的 S2 较 S1 有较高的保守性^[4, 5]). 而集中在 S1 上的这 3 个突变, 对于单个氨基酸残基来说都有很大的理化性质改变, 我们推测这 3 个突变可能会影响突起蛋白的空

间构象, 从而影响其功能, 影响病毒的侵袭力和毒力. 应用 ProPred 生物信息学分析软件^[6], 对突起蛋白进行功能部位预测, 结果发现该蛋白质中可能存在多个抗原肽位点, 即可能存在多个冠状病毒的抗原决定簇. 在已发生的突变中, 有一个突变位点在预测的抗原决定簇内 (表 1).

Table 1 Substitutions of the nucleotide in spike coding sequence and amino acid in spike protein in 12 SARS coronaviruses

表 1 12 株 SARS 冠状病毒突起蛋白编码基因的碱基突变和突起蛋白的氨基酸突变

BJ01 编码 基因碱基 突变位置	氨基酸 突变 位置	AY274119 (TOR2)	AY278488 (BJ01)	AY278554 (CUHK-W1)	AY278741 (US)	AY282752 (CUHK-Su10)	AY278491 (HKU)
21702	77	G(甘氨酸)	A(天冬氨酸)	A(天冬氨酸)	G(甘氨酸)	G(甘氨酸)	G(甘氨酸)
22203	244*	T(异亮氨酸)	C(苏氨酸)	C(苏氨酸)	T(异亮氨酸)	T(异亮氨酸)	T(异亮氨酸)
23155	561	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)
23201	577	G(丙氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)
23773	767	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)
24853	1127	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)	C(亮氨酸)	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)
BJ01 编码 基因碱基 突变位置	氨基酸 突变 位置	AY283798 (SIN2774)	AY283797 (SIN2748)	AY283796 (SIN2679)	AY283795 (SIN2677)	AY283794 (SIN2500)	AY291451 (TW1)
21702	77	G(甘氨酸)	G(甘氨酸)	G(甘氨酸)	G(甘氨酸)	G(甘氨酸)	G(甘氨酸)
22203	244*	T(异亮氨酸)	T(异亮氨酸)	T(异亮氨酸)	T(异亮氨酸)	T(异亮氨酸)	T(异亮氨酸)
23155	561	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)	T(丝氨酸)	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)	C(丝氨酸)
23201	577	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)	T(丝氨酸)
23773	767	T(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)	C(缬氨酸)
24853	1127	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)	T(亮氨酸)

* 在预测抗原决定簇内^[6].

SARS 冠状病毒疫苗是预防 SARS 流行最有效的一条途径. 传统和现代疫苗制备方法主要包括灭活或减毒病毒疫苗、亚单位疫苗、基因工程疫苗和核酸疫苗等. 尽管灭活或减毒的病毒疫苗, 因为携带了所有的病毒抗原, 从理论上讲应该是最为有效的一类疫苗. 但该类疫苗在制备上难度大、生产条件要求高, 在使用方面存在一定的风险, 现阶段应由国家从整体角度慎重考虑. 亚单位疫苗是将病毒基因组中的某一个特异基因重组到原核表达系统和真核表达系统中, 使其产生相应的蛋白质. 再把蛋白质注入机体以产生相应抗体. 重组蛋白在结构上和天然蛋白会有一些差别, 我们难以推测亚单位疫苗单独应用时的有效性. 因此利用现在已取得的关于 SARS 病毒基因组和生物学特性的研究成果, 尽快开展基因工程疫苗和核酸疫苗制备研究, 以及开展相关候选疫苗的联合应用研究将是一个切实可行的途径.

突起蛋白是冠状病毒的主要抗原部位, 可以作

为疫苗研究的重要靶点^[7]. 选用适当载体携带突起蛋白编码基因导入动物或人体后, 在动物或人体内表达相应蛋白, 刺激机体产生免疫反应, 从而保护个体在一定的时间内免受冠状病毒的感染. 一些冠状病毒, 如引起腹泻的牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCoV) 和引起传染性胃肠炎的猪冠状病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV), 由于它们的突起蛋白突变率相对较低^[8, 9], 因而容易获得有效疫苗; 另外一些冠状病毒, 如引起腹泻、呕吐的狗冠状病毒 (canine coronavirus, CCV) 和引起传染性支气管炎的鸟冠状病毒 (avian infectious bronchitis virus, IBV), 由于它们的突起蛋白突变率较高^[10, 11], 因而难以获得有效疫苗. 而目前在人群中流行的 SARS 冠状病毒突起蛋白变异率非常低 (表 2). 通过对测序完整的 12 株 SARS 冠状病毒进行序列分析比较发现^[12], 突起蛋白氨基酸突变率和编码碱基突变率分别仅为 0.23% 和 0.16%, 因此 SARS 冠状病毒的毒力和

致病性难以因其在人群中的流行而很快减退。而突起蛋白的相对保守性为有效疫苗的开发奠定了很好的研究基础^[13, 14]。但人体针对 SARS 冠状病毒的免疫应答机制以及突起蛋白突变对免疫应答的影响尚需要进一步深入研究。

Table 2 Substitution rate of the nucleotide in spike coding sequence and amino acid in spike protein in coronaviruses

表 2 冠状病毒突起蛋白编码基因的碱基突变率和突起蛋白的氨基酸突变率

冠状病毒*	氨基酸突变率	碱基突变率
严重急性呼吸道综合征冠状病毒	0.23%	0.16%
猪传染性胃肠炎冠状病毒	3.38%	3.19%
牛冠状病毒	3.45%	3.15%
狗冠状病毒	9.57%	10.55%
鸟传染性支气管炎冠状病毒	28.99%	31.05%

* 冠状病毒突起蛋白编码基因序列和突起蛋白的氨基酸序列均来源于美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库。严重急性呼吸道综合征冠状病毒: AY274119, AY282752, AY278491, AY278741, AY278488, AY278554, AY283798, AY283797, AY283796, AY283795, AY283794, AY291451; 猪传染性胃肠炎冠状病毒: NC-002306, M94099, AF494337, AF302263, X53128; 牛冠状病毒: NC-003045, U00735, AF220295, M64668, D00731; 狗冠状病毒: D13096, A22886, A22732, X77047, A22882; 鸟传染性支气管炎冠状病毒: AY189157, AY180958, X87238, U04739, NC-001451。

为防治 SARS, 世界各国政府、科研机构和企业都在进行着不懈的努力。我国科技部已组织全国的科研力量进行 SARS 治疗药物和预防疫苗的研发。目前核酸疫苗和活载体疫苗的研究受到广泛的重视。核酸疫苗最大的优点是疫苗抗原可能在靶细胞内以天然的方式合成、加工并呈递给免疫系统^[15]; 活载体疫苗也具有良好的免疫原性, 并且活载体本身还可作为免疫佐剂^[16]。另外, 多种不同疫苗混合应用有可能达到任何单一形式的疫苗难以达到的理想效果。这种联合免疫的形式一般是先用含有 DNA 的疫苗作为初始免疫, 随后用不含 DNA 的亚单位疫苗加强免疫^[17]。结合目前已掌握的技术^[18]和信息, 我们已着手尝试下列两种候选预防疫苗的研发。

a. 以质粒为载体介导的冠状病毒突起蛋白的核酸疫苗: 应用质粒作为疫苗载体具有易于制备、可塑性大、生产工艺简单、成本低等优点。以质粒为载体的核酸疫苗可以采用肌肉注射的接种方式, 相关研究可以参考其他核酸疫苗的研究成果^[19]和质粒介导的基因治疗临床研究成果^[20]。由于突起

蛋白具有一定的突变性, 可以在实际研究和应用中密切追踪。如果该突变从根本上影响抗冠状病毒疫苗有效性, 研究人员可以紧随基因测序的结果, 对突起蛋白编码基因进行相应点突变。将突起蛋白编码基因突变体随质粒载体导入个体体内后, 将保护个体在一定的时间内免受 SARS 冠状病毒突变体的感染。

b. 以腺病毒为载体介导的冠状病毒突起蛋白基因工程疫苗: 人体对腺病毒具有很好的耐受性, 以重组腺病毒为载体的基因治疗临床研究也已经有十多年的历史。而且以重组腺病毒为载体的基因疫苗可以采用吸入喷雾的接种方式, 相关研究可以参考重组腺病毒呼吸道给药针对肺囊性纤维化 (cystic fibrosis) 基因治疗临床研究成果^[21]。此外应用腺病毒介导表达猪传染性胃肠炎冠状病毒 (TGEV) 突起蛋白进行仔猪免疫, 获得很好的免疫学效果^[22]。不但在仔猪血清和唾液中获得针对 TGEV 的中和抗体^[23, 24], 还在仔猪的肺及小肠内发现针对 TGEV 的分泌型抗体 IgA^[8]。因此我们认为应用腺病毒为载体的基因工程疫苗可成为未来预防 SARS 的一个重要选择。

值得指出, 疫苗开发具有固有的过程和周期, 只有在敏感动物实验和动物模型实验中充分证实疫苗的安全性和有效性后, 才能展开临床试验。因此, 期望短期内开发成功 SARS 疫苗是不切实际的。我们希望通过国内外研究人员的全力合作, 尽快研制出多种 SARS 候选疫苗, 以期为全人类的健康做出贡献。

致谢 感谢加拿大不列颠哥伦比亚癌症研究所基因组研究中心 M. A. Marra 和 R. Hanson, 不列颠哥伦比亚疾病控制中心 R. C. Brunham, M. Krajden, M. Petric, D. M. Skowronski 和美国华盛顿大学 A. Lieber 给予我们研究工作的帮助和指导。

参 考 文 献

- 1 Enserink M, Vogel G. Infectious diseases: Deferring competition, global net closes in on SARS. *Science*, 2003, **300** (5617): 224~225
- 2 Poutanen S M, Low D E, Henry B, *et al.* Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med*, 2003, Available April 10 at <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030634v3.pdf>
- 3 Qin E D, Zhu Q Y, Yu M, *et al.* A complete sequence and comparative analysis of strain (BJ01) of the SARS-associated virus. *Chin Sci Bull*, 2003, **48** (10): 941~948
- 4 Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory

- syndrome. Science, 2003, Available May 1 at <http://www.sciencemag.org/cgi/rapidpdf/1085952v1.pdf>
- 5 Marra M A, Jones S J, Astell C R, *et al.* The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science, 2003, Available May 1 at <http://www.sciencemag.org/cgi/rapidpdf/1085953v1.pdf>
 - 6 Singh H, Raghava G P S. ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics, 2001, **17** (12): 1236~1237
 - 7 Walgate R. SARS vaccine race: US and European groups moving forward, but WHO would rather put SARS "back in the box", Available May 2 at <http://www.biomedcentral.com/news/20030502/03>
 - 8 Tuboly T, Nagy E. Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. J Gen Virol, 2001, **82** (pt 1): 183~190
 - 9 Hussain K A, Storz J, Kousoulas K G. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains. Virology, 1991, **183** (1): 442~445
 - 10 Wesley R D. The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus. Virus Res, 1999, **61** (2): 145~152
 - 11 Jia W, Karaca K, Parrish C R, *et al.* A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. Arch Virol, 1995, **140** (2): 259~271
 - 12 Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res, 1988, **16** (22): 10881~10890
 - 13 Altman L K, Grad Y D. Study of SARS genome shows no big mutations. Available May 9 at <http://www.nytimes.com/2003/05/09/science/sciencespecial/09INFE.html>
 - 14 Ruan Y J, Wei C L, Ee L A, *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. The Lancet, 2003, Available May 9 at <http://image.thelancet.com/extras/03art4454web.pdf>
 - 15 Chattergoon M, Boyer J, Weiner D B. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. FASEB J, 1997, **11** (10): 753~763
 - 16 Tuettenberg A, Jonuleit H, Tuting T, *et al.* Priming of T cells with Ad-transduced DC followed by expansion with peptide pulsed DC significantly enhances the induction of tumor-specific CD8+ T cells: implications for an efficient vaccination strategy. Gene Ther, 2003, **10** (3): 243~250
 - 17 Vordermeier H M, Lowrie D B, Hewinson R G. Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial HSP65 against bovine tuberculosis by protein boosting. Vet Microbiol, 2003, **93** (4): 349~359
 - 18 Bernt K, Liang M, Ye X, *et al.* A new type of adenovirus vector that utilizes homologous recombination to achieve tumor-specific replication. J Virol, 2002, **76** (21): 10994~11002
 - 19 Srivastava I K, Liu M A. Gene vaccines. Ann Intern Med, 2003, **138** (7): 550~559
 - 20 Bragonzi A, Conese M. Non-viral approach toward gene therapy of cystic fibrosis lung disease. Curr Gene Ther, 2002, **2** (3): 295~305
 - 21 Griesenbach U, Ferrari S, Geddes D M, *et al.* Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. Gene Ther, 2002, **9** (20): 1344~1350
 - 22 Torres J M, Sanchez C, Sune C, *et al.* Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein. Virology, 1995, **213** (2): 503~516
 - 23 Torres J M, Alonso C, Ortega A, *et al.* Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. J Virol, 1996, **70** (6): 3770~3780
 - 24 Callebaut P, Enjuanes L, Pensaert M, *et al.* An adenovirus recombinant expressing the spike glycoprotein of porcine respiratory coronavirus is immunogenic in swine. J Gen Virol, 1996, **77** (pt 2): 309~313

Current Research on SARS Coronavirus Vaccine

YE Xun^{1,2)}, MENG Xia^{1,2)}, DONG Ji-Bin³⁾, LIANG Min^{2,4)}, HU Fang²⁾, CHEN Hong-Zhuan^{1)*}

¹⁾Department of Pharmacology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

²⁾Shanghai Sunway Biotech, Shanghai 201206, China;

³⁾Department of Biochemistry, School of Pharmacy Fudan University, Shanghai 200032, China;

⁴⁾Liver Cancer Institute, Zhong Shan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract A novel coronavirus has been identified to be associated with the newly outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS). To date 12 whole genome sequences from various samples are available in public-domain database. Spike protein of coronavirus is considered to be the major antigen and contains many potential antigenicity domains. The relatively low mutation rate in spike protein provides high opportunity for effective vaccine development. Since inactivated or attenuated coronavirus holds some potential limitations and risks to prepare and to inoculate, the current best hope for protection is to combine a protein vaccine (i.e., a purified SARS coronavirus spike protein) with a "vectored" vaccine, consisting of a plasmid or a harmless virus, such as recombinant adenovirus which has been genetically engineered to produce coronavirus spike protein.

Key words SARS, coronavirus, spike protein, vaccine

* Corresponding author. Tel: 86-21-64671610, E-mail: yaoli@shsmu.edu.cn

Received: May 7, 2003 Accepted: May 14, 2003