



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117320745 A

(43) 申请公布日 2023.12.29

(21) 申请号 202280025919.9

(22) 申请日 2022.03.29

(30) 优先权数据

21165982.6 2021.03.30 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/058280 2022.03.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/207645 EN 2022.10.06

(71) 申请人 维拉瓦克斯股份公司

地址 奥地利维也纳

(72) 发明人 P·加廷格 R·瓦伦塔

B·克拉策 W·皮克尔

F·施托尔茨

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

专利代理师 黄琳娟

(51) Int.Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

权利要求书3页 说明书54页 附图54页

(54) 发明名称

SARS-COV-2亚单位疫苗

(57) 摘要

一种免疫原性亚单位疫苗抗原,其包含 SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的至少两个与异源免疫原性载体蛋白融合的受体结合结构域(RBD),其中所述至少两个RBD中的每一个都具有以可接近的构象来结合人血管紧张素转换酶2(ACE2)受体蛋白的折叠结构。

1. 一种免疫原性亚单位疫苗抗原, 包含SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的至少两个与异源免疫原性载体蛋白融合的受体结合结构域(RBD), 其中所述至少两个RBD中的每一个具有以可接近构象来结合人血管紧张素转换酶2(ACE2)的折叠结构。

2. 根据权利要求1的疫苗抗原, 其中所述RBD中的至少一个包含或由至少180个氨基酸长度的氨基酸序列组成, 并且包括与SEQ ID NO:1或2至少95%序列同一性, 可选地, 包含一个或多个包含在一个或多个不同的天然存在的SARS-CoV-2突变体的RBD中的相同的点突变。

3. 根据权利要求1或2所述的疫苗抗原, 其中所述至少两个RBD由相同或不同的氨基酸序列组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的疫苗抗原, 其中所述折叠结构是

a) 通过在重组真核表达系统中疫苗抗原的表达获得的, 优选地, 采用哺乳动物、杆状病毒感染细胞或真菌宿主细胞, 优选地, 采用人宿主细胞; 和/或

b) 通过圆二色(CD)光谱和/或RBD-ACE2相互作用试验测定, 优选地, 其中疫苗抗原在RBD-ACE2相互作用试验中与中性和抗SARS-CoV-2抗体制剂竞争。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的疫苗抗原, 其被提供作为包含所述至少两个与所述异源免疫原性载体蛋白融合的RBD的单链融合蛋白, 优选地, 包含一个或多个肽连接序列。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的疫苗抗原, 其中所述疫苗抗原包含两个、三个或更多个RBD。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的疫苗抗原, 其中所述异源免疫原性载体蛋白是非自然与RBD融合的多肽。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的疫苗抗原, 其中所述异源免疫原性载体蛋白是病毒蛋白, 例如表面蛋白或核衣壳蛋白, 或上述任何一种的蛋白结构域。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的疫苗抗原, 其中所述异源免疫原性载体蛋白是包含B细胞表位和T细胞表位的抗原以在人类受试者中引发体液和细胞免疫反应。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的疫苗抗原, 其中所述异源免疫原性载体蛋白源自任意一种:

a) 嗜肝DNA病毒科家族的病毒, 例如人肝炎病毒或乙型肝炎病毒, 优选其中所述异源免疫原性载体蛋白是乙型肝炎病毒的表面蛋白, 例如PreS或S蛋白; 或

b) β -冠状病毒, 优选为SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS、HCoV-OC43或HKU1中的任何一种, 优选其中所述异源免疫原性载体蛋白选自S蛋白或其子结构域, 例如S1或S2结构域、或核衣壳(N)蛋白组成的组; 或

c) 人鼻病毒血清型, 优选其中所述异源免疫原性载体蛋白是病毒衣壳蛋白, 例如VP1、VP2、VP3或VP4中的任何一种; 或

d) RSV, 优选其中所述异源免疫原性载体蛋白是G-蛋白或G-蛋白的中心保守区; 或

e) 糖脂锚, 其中与锚融合的RBD由包含脂质双层包膜和包膜病毒核心蛋白的病毒样颗粒在表面表达, 如莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV), 优选地其中核心蛋白是MoMLV Gag和/或Gag-Pol; 或

f) 上述任何一种的天然存在突变体。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的疫苗抗原,其中所述异源免疫原性载体蛋白是SARS-CoV-2刺突(S)蛋白RBD以外的任何其它抗原。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的疫苗抗原,其中所述疫苗抗原包含:

a) 单链融合蛋白,包含至少两个RBD,与SEQ ID NO:19-26中的任意一个至少50%长度的乙型肝炎PreS多肽融合,且包含对应的SEQ ID NO:19-26的相应区域至少80%的序列同一性,优选地,其中至少一个RBD与PreS多肽的N端融合,且至少一个RBD与PreS多肽的C端融合;和/或

b) 至少两个组装的RBD,其中每个RBD都与糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定物融合,并连接通过编码MoMLVgag-pol表达质粒转染的哺乳动物细胞表达的病毒样颗粒的膜。

13. 编码权利要求1至12中任一项疫苗抗原的分离的核酸分子,优选包括包含与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18至少95%序列同一性的多核苷酸序列,或上述任意一种的密码子优化变体,其被优化以在特定的宿主细胞系中表达。

14. 一种疫苗,包括权利要求1至13中任一项所述的疫苗抗原和药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂中的任何一种或多种。

15. 根据权利要求14所述的疫苗,其中佐剂选自明矾(磷酸铝凝胶或氢氧化铝凝胶或两者的混合物)、AS04(明矾加单磷酸酯A)、MF59(水包油乳剂佐剂)和 toll样受体激动剂佐剂(单磷酸酯A加CpG)组成的组。

16. 根据权利要求14或15所述的疫苗,用于

a) 受试者疫苗接种以针对SARS-CoV-2包括其天然存在的突变体的感染进行预防性治疗,优选地,以激发识别天然RBD的中和抗体;和/或

b) 治疗受试者以诱导针对SARS-CoV-2的抗体,和/或生产包含针对SARS-CoV-2抗体的抗血清或血浆产品的疫苗,优选地,其中所述抗体是SARS-CoV-2中和抗体。

17. 根据权利要求16所述疫苗的用途,其中疫苗通过皮下、肌肉、鼻内、微针、粘膜、皮肤或透皮给药施用于受试者。

18. 一种用于生产权利要求1至12中任一项所述疫苗抗原的方法,包括在重组真核表达系统中表达来自权利要求13的核酸分子的疫苗抗原。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述疫苗抗原具有以下一个或多个特征:

a) 所述疫苗抗原包含两个、三个或更多个RBD;

b) 所述至少两个RBD由相同或不同的氨基酸序列组成;

c) 所述RBD中的至少一个包含或由至少180个氨基酸长度的氨基酸序列组成,并包括与SEQ ID NO:1或2至少95%的序列同一性,可选地,包含一个或多个包含在一个或多个不同的天然存在的SARS-CoV-2突变体的RBD中的相同的点突变;

d) 所述折叠结构是

i. 通过在重组真核表达系统中疫苗抗原的表达获得的,优选地,采用哺乳动物、杆状病毒感染细胞、或真菌宿主细胞,优选地,采用人宿主细胞;和/或

ii. 通过圆二色(CD)光谱和/或RBD-ACE2相互作用试验测定,优选地,其中疫苗抗原在RBD-ACE2相互作用试验中与中和性抗SARS-CoV-2抗体试剂竞争。

e) 疫苗抗原被提供作为包含所述至少两个与所述异源免疫原性载体蛋白融合的RBD的单链融合蛋白,优选地,包含一个或多个肽连接体序列;

f) 异源免疫原性载体蛋白是病毒蛋白,如表面蛋白或核衣壳蛋白,或上述任意一种的蛋白结构域;

g) 异源免疫原性载体蛋白是包含B细胞表位和T细胞表位的抗原,以在人体受试者中引发体液和细胞免疫反应;

h) 异源免疫原性载体蛋白是不与RBD自然融合的多肽;

i) 异源免疫原性载体蛋白来源于任意一种:

i. 嗜肝DNA病毒科家族的病毒,例如人肝炎病毒或乙型肝炎病毒,优选其中地,异源蛋白是乙型肝炎病毒的表面蛋白,例如PreS或S蛋白;或

ii. β -冠状病毒,优选地,SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS、HCoV-OC43或HKU1中的任意一种,优选地,其中异源蛋白选自S蛋白或其子结构域,例如S1或S2结构域,或核衣壳(N)蛋白;或

iii. 人鼻病毒血清型,优选地,其中异源蛋白是病毒衣壳蛋白,例如VP1、VP2、VP3或VP4中的任意一种;或

iv. RSV,优选地,其中异源蛋白为G-蛋白或G-蛋白的中心保守区;或

v. 糖脂锚定物,其中与锚定物融合的RBD通过包含包膜病毒的脂质双分子层包膜和核心蛋白的病毒样颗粒表面表达,如莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV),其中核心蛋白优选为MoMLV Gag和/或Gag-Pol;或

vi. 上述任意一种天然存在的突变体;

j) 异源免疫原性载体蛋白是除SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的RBD之外的任意一种异源免疫原性载体蛋白。

k) 异源免疫原性载体蛋白是任意一个:

i. 与SEQ ID NO:19-26中任意一个的至少50%长度的乙型肝炎PreS多肽,并且包含与对应的SEQ ID NO:19-26的相应区域至少80%的序列同一性,优选地,其中至少一个RBD与PreS多肽的N-端融合,并且至少一个肽与PreS多肽的C-端融合;和/或

ii. 糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定物,其与通过编码MoMLVgag-pol的表达质粒转染的哺乳动物细胞所表达的病毒样颗粒的膜连接。

20. 一种通过用药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂中的任何一种或多种配制权利要求1至12中任一项所述的疫苗抗原生产疫苗的方法。

21. 一种通过将至少第一和第二折叠RBD与所述异源免疫原性载体蛋白融合来生产具有增强的免疫原性的RBD亚单位疫苗的方法。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述异源免疫原性载体蛋白是任意一种:

a) 与SEQ ID NO:19-26中任意一个的至少50%长度的乙型肝炎PreS多肽,并且包含与对应的SEQ ID NO:19-26的相应区域至少80%的序列同一性,优选地,其中至少一个RBD与PreS多肽的N-端融合,并且至少一个肽与PreS多肽的C-端融合;和/或

b) 糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定物,其与通过编码MoMLVgag-pol的表达质粒转染的哺乳动物细胞所表达的病毒样颗粒的膜连接。

SARS-CoV-2亚单位疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防SARS-CoV-2感染的新型疫苗抗原和疫苗。

背景技术

[0002] COVID-19的病原体,SARS-CoV-2,是一种与先前发现的导致人类致命呼吸道疾病的致病病原、严重急性呼吸综合征病毒SARS-CoV和中东呼吸综合征病毒MERS (MERS-CoV) 有系统发育亲缘的 β -冠状病毒。冠状病毒通常造成大量人类和动物发病和死亡,且通过在20年内相对迅速地出现了三种高度严重的人类疾病突显了这类新型病原体的持续出现的潜力。SARS-CoV-2通过S蛋白的RBD与血管紧张素转换酶2(ACE2)的相互作用结合并进入人体细胞。已从康复期患者中分离出针对S上多个表位的有效中和单克隆抗体,并且最近的研究表明人抗体可有效治疗COVID-19。

[0003] SARS-CoV和SARS-CoV-2利用人细胞上的血管紧张素转换酶2(ACE2)作为受体,并通过它们的受体结合结构域(RBD)与其结合。RBD位于S1内的刺突(S)蛋白中,受体结合亚基靠近C-端S2膜融合亚基。

[0004] 对于某些病毒性疾病(例如呼吸道合胞病毒,RSV),需要折叠的病毒表面抗原或模拟天然和折叠的抗原的构象的免疫原来诱导中和抗体。对于其它病毒(例如乙型肝炎,HBV),已发现未折叠的表面抗原诱导保护性抗体,并且病毒的附着可被自病毒受体结合位点的未折叠的肽阻断。对于SARS-CoV-2,目前尚不清楚针对序列表位或构象表位或两者的抗体是否决定天然多克隆抗体应答的中和活性。同样地,目前尚不清楚技术人员是否能够用基于序列和/或未折叠的抗原的SARS-CoV-2疫苗诱导保护性抗体,或者疫苗是否需要包含折叠的SARS-CoV-2抗原,特别是RBD。例如,对于SARS-CoV,据报道,通过免疫真核细胞中以折叠形式表达的RBD,以及未折叠的RBD,大肠杆菌表达的RBD,可以获得有效的中和抗体和保护性免疫(Du,L.,et al.Virology.2009;393:144-150)。这些结果与对于其它传染病的几种疫苗和用于过敏的治疗疫苗的数据一致,表明技术人员可以诱导针对具有变性抗原、未折叠的重组抗原或其序列肽相应的天然的、折叠的抗原样构象表位的保护性抗体应答(Cornelius C.et al.EBioMedicine.2016;11:58-67;Tulaeva I.et al.EBioMedicine.2020;59:102953;Ni Y.,et al.Gastroenterology.2014;146:1070-83;Volkman,D.J.et al.J Immunol.1982;129:107-112;Sela,M.&Arnon,R,Vaccine.1992;10:991-999;Marsh,D.G.et al.Immunology.1970;18:705-722;Valenta,R.Nat Rev Immunol.2002;2:446-453)。相反,对于某些病毒性疾病,目前已经提出需要用正确折叠的抗原免疫以获得保护性抗体应答(McLellan,J.S.,et al.Science.2013;342:592-598;Sesterhenn,F.,et al.Science.2020;368(6492):eaay5051)。

[0005] 目前已经表明COVID-19患者产生SARS-CoV-2特异性抗体,但目前尚不清楚病毒诱导的抗体是否以及在多少感染受试者中具有保护作用。事实上,据报道,从COVID-19中康复的患者再次出现可检测的SARS-CoV-2RNA阳性(Fu et al.,J Med Virol.2020;92(11):2298-2301)。

[0006] Dai等人(*Cell* 2020,182:722-733)描述了由两个蛋白质亚基组成的CoV RBD-二聚体免疫原,每个蛋白质亚基含有通过二硫键或串联重复单链(sc)融合在一起的、不引入任何外源序列的病毒刺突受体结合结构域(RBD-sc-二聚体)。MERS-CoV和SARS-CoV-2的RBD-sc二聚体在CHO细胞中表达。

[0007] Du等人(*Virology* 2009,393:144-150)描述了在哺乳动物、昆虫和大肠杆菌细胞中表达的SARS-CoV刺突蛋白的重组受体结合结构域,以引发中和抗体应答。

[0008] 在Tan等人(*Nature Research* 2020,doi:10.21203/rs.3.rs-24574/v1预印)中描述了一种用于检测针对SARS-CoV-2的中和抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)。该测试被描述识别产生抑制SARS-CoV-2受体结合结构域(RBD)与其在人体细胞上的受体ACE2的结合的抗体的受试者。

[0009] Gattinger等人(*Allergy*.2021;76(3):878-883)描述了一种RBD-ACE2分子相互作用试验,该试验可用于识别已产生保护性抗体的受试者,并用于筛选候选疫苗以诱导抑制RBD-ACE2相互作用的抗体。

[0010] Quinlan等人(*bioRxiv*.2020;2020.11.18.388934.doi:10.1101/2020.11.18.388934.预印)公开了与两种载体蛋白偶联的RBD,该载体蛋白在免疫的啮齿动物中引发比类似的偶联的脯氨酸稳定的S蛋白胞外域更有效的中和应答。与野生型RBD或全长S蛋白相比,糖工程化的RBD表达更有效,并作为DNA疫苗抗原产生更有效的中和应答,特别是当与多价载体(如幽门螺杆菌(*H. pylori*)铁蛋白24-mer)融合时。然而,这项研究只比较了不同的免疫原,而没有比较不同版本的RBD。

[0011] WO 2017/037280公开了用于治疗HBV病毒感染的包含乙型肝炎(HBV)PreS多肽的融合蛋白,但这个申请中描述的PreS已在大肠杆菌中表达为未折叠蛋白(Cornelius C.etal.*EBioMedicine*.2016;11:58-67)。

[0012] Sun Shihui等人(*Cellular&Molecular Immunology* 2021,18(4):1070-1073)描述了用作亚单位疫苗的RBD-Fc融合。RBD结构域(aa331-524)与人类IgG1 Fc片段融合。两个融合多肽,每个都含有一个与人IgG1 Fc片段融合的RBD,通过Fc片段形成二聚体。因此,两个RBD结构域通过Fc片段融合形成具有Y-形结构的二聚体,像抗体一样。

[0013] CN 111944064A公开了一种COVID-19亚单位疫苗,其包含融合蛋白的三聚体和/或二聚体和/或单体,从N末端到C末端,融合蛋白包含人白细胞介素10信号肽、S-S-RBD和折叠蛋白。该二聚体/三聚体通过二硫键形成。

[0014] CN 111533809A公开了一种由SARS-CoV-2S蛋白的一个RBD结构域和人IgG1抗体Fc片段组成的融合蛋白。

[0015] Yang Shilong等人(*The Lancet Infectious Diseases*,2021,21(8):1107-1119)描述了一种用于临床试验中的串联重复二聚体RBD基的蛋白亚单位疫苗。

[0016] Dai等人(*Cell* 2020,182:722-733)描述了一种使用RBD二聚体作为串联重复单链的疫苗设计。

[0017] Jeong Hyein等人(*Frontiers in Immunology* 2021,12:637654)描述了一种DNA疫苗,其编码与具有W4P突变的肝炎preS1的11个氨基酸长度的N-端区域融合的RBD的嵌合蛋白。

[0018] W02014134439A1公开了一种用于MERS冠状病毒感染的免疫原性组合物,包含至少

一部分MERS-CoV S蛋白和免疫增强剂。

[0019] 需要有效的疫苗来诱导针对SARS-CoV-2的保护性免疫。特别是需要诱导高水平的RBD特异性抗体的SARS-CoV-2疫苗,该RBD特异性抗体抑制病毒与宿主细胞上的其受体(ACE2)的结合,可用于反复加强注射以维持抗体的高水平,以给予消除性免疫。

发明内容

[0020] 本发明的目的是提供新型疫苗抗原,以触发针对SARS-CoV-2的保护性抗体免疫应答。该目的是由本权利要求书的主题并如本发明进一步的描述所解决。

[0021] 在本发明中,通过免疫获得的抗体应答与折叠的和未折叠的RBD及其病毒中和活性进行比较。为此目的,用折叠和未折叠的重组RBD蛋白免疫。令人惊讶的是,与SARS-CoV相反,我们发现只有用折叠的RBD免疫而不是用未折叠的RBD免疫才能诱导针对构象RBD表位和高病毒中和滴度(VNT)的抗体。

[0022] 总的来说,目前的数据表明,COVID-19患者的抗体的病毒中和活性取决于针对RBD的构象表位的抗体的存在。然而,并非所有COVID-19患者都会产生这些抗体。重要的是,通过疫苗接种诱导此类抗体需要折叠的RBD。因此,目前的结果表明,针对构象RBD表位的抗体是SARS-CoV-2中和抗体应答的替代标记物,并对于能够诱导消除性免疫的SARS-CoV-2特异性疫苗的开发非常重要。在本发明中,描述了基于折叠RBD的能够诱导高水平中和抗体滴度的SARS-CoV-2疫苗候选及其优点。这些疫苗候选的优势在于,作为基于分离的RBD或RBD二聚体的疫苗,它们诱导了更高水平的保护性抗体(Dai et al. Cell. 2020;182:722-733)和/或提供针对其它病毒感染的额外的保护性抗体的诱导。

[0023] 疫苗候选有利地使用与接受疫苗的受试者异源的免疫原性载体蛋白。因此,在给人类受试者接种的环境中,异源载体蛋白具体是非人类的,并且在人类受试者中是免疫原性的。这避免了不期望的自身免疫反应的并发症。异源载体蛋白有利地包括T细胞表位和B细胞表位。示例性的载体蛋白是病毒来源的,例如核衣壳蛋白或preS蛋白,或其蛋白结构域。这种免疫原性的载体蛋白已经在动物模型中进行了测试,且结果表明有效地提高了与载体蛋白融合的RBD单元的免疫原性。在用本发明描述的示例性疫苗对人类受试者接种后,已证明相应的抗SARS-CoV-2免疫应答不仅针对包含疫苗抗原中使用的RBD单元的SARS-CoV-2病毒,而且还针对其变体(包括关切变异株),例如,奥密克戎变体。

[0024] 具体地,本公开涉及包含单链融合蛋白(“PreS-RBD”)的SARS-CoV-2亚单位疫苗抗原的构建和表征,该单链融合蛋白基于结构折叠的重组融合蛋白,该重组融合蛋白由两个SARS-CoV-2刺突蛋白受体结合结构域(RBD)与乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原PreS的N-和C-端融合组成,以使两个不相关的蛋白充当彼此的免疫载体。PreS-RBD,而非单独的RBD或RBD二聚体,在兔中诱导了强烈且均匀的RBD特异性IgG应答。目前可用的SARS-CoV-2基因疫苗在接种疫苗的受试者中主要诱导短暂的IgG₁应答。有利的是,PreS-RBD疫苗被发现在无SARS-CoV-2史的人类受试者中诱导由早期IgG₁和持续的IgG₄抗体应答组成的RBD特异性IgG抗体。在血清和粘膜分泌物中检测到与SARS-CoV-2变体反应的PreS-RBD特异性IgG抗体,包括关切的奥密克戎变体和和在目前已知HBV基因型的PreS上的HBV受体结合位点。免疫受试者的PreS-RBD特异性抗体更有效地抑制了RBD与其人类受体ACE2的相互作用,并且它们的VNT高于已登记的SARS-CoV-2疫苗完全免疫的健康受试者或者COVID-19康复受试者中的随机

样本的VNT中值。因此,PreS-RBD疫苗具有作为一种联合疫苗的潜力,通过抑制病毒进入细胞来阻止病毒复制,从而诱导对SARS-CoV-2和HBV的消除性免疫。

[0025] PreS-RBD是用氢氧化铝(明矾)配制的,氢氧化铝是一种佐剂,几十年来一直安全地用于针对传染性疾病的疫苗中和治疗性过敏疫苗中(即过敏原特异性免疫疗法,AIT)。AIT诱导的过敏原特异性IgG应答通常由快速形成的特异性IgG₁应答和随后但持续的中和性过敏原特异性IgG₄抗体产生组成,其甚至在停止治疗后持续数年,并使得过敏患者受到对过敏原诱导的过敏性炎症的持续保护。在本发明所述的示例性研究中获得的PreS-RBD亚单位疫苗的结果表明,PreS-RBD具有几个特征,使其成为用于诱导消除性免疫的有前途的SARS-CoV-2疫苗候选。

[0026] 本发明提供了一种免疫原性亚单位疫苗抗原,其包含SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的至少两个受体结合结构域(RBD),其与异源蛋白融合,其中所述至少两个RBD中的每一个具有以可接近的构象来结合人SARS-CoV-2受体(即血管紧张素转换酶2(ACE2)蛋白)的折叠结构。具体地,异源蛋白是一种免疫原性载体蛋白。

[0027] 在本发明中,术语“异源免疫原性载体蛋白”也以缩写形式使用,如“异源蛋白”。因此,可以理解的是,本公开的“异源蛋白”也应具体地指“异源免疫原性载体蛋白”。

[0028] 具体地,免疫原性载体蛋白在人类受试者中是免疫原性的。

[0029] 具体地,异源免疫原性载体蛋白是一种抗原,包含B细胞表位和T细胞表位,以在人类受试者中引发体液和细胞免疫应答。

[0030] 具体地,免疫原性载体蛋白是非人蛋白或人工蛋白,例如,非人蛋白的突变体。特异性免疫原性载体蛋白是病毒蛋白、病毒蛋白结构域或其亚结构,优选地,包含T细胞和B细胞表位。

[0031] 具体地,异源免疫原性载体蛋白不同于SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的RBD、或者除SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的任意其他RBD。具体来说,异源免疫原性载体蛋白是除SARS-CoV-2的RBD结构域外的病毒蛋白或病毒蛋白的结构域。

[0032] 特别优选地,异源免疫原性载体蛋白不是人蛋白,例如,抗体或其抗体片段,例如人抗体Fc结构域,或人细胞因子、白细胞介素或其片段。

[0033] 具体地,RBD具有折叠结构,并被理解为“折叠的RBD”,例如本发明所进一步描述的。

[0034] 具体地,疫苗抗原是一种融合蛋白,包含SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的至少两个受体结合结构域(RBD),其与异源免疫原性载体蛋白融合,其中所述至少两个RBD中的每一个具有以可接近的构象来结合人SARS-CoV-2受体(即血管紧张素转换酶2(ACE2)蛋白)的折叠结构。

[0035] 具体地,该至少两个RBD由或包括由两个RBD组成的RBD二聚体、由三个RBD组成的RBD三聚体或由四个或更多,优选地4-8个RBD组成的RBD低聚物组成。

[0036] 具体地,包含在RBD二聚体、三聚体或低聚物中的RBD在本发明中也被称为RBD原体。RBD原体可以包含或由相同的RBD序列,特别是在RBD的全长上(即相同的)组成,也称为RBD原体的对称二聚体、三聚体或低聚物。或者,包含在RBD二聚体、三聚体或低聚物中的RBD原体的序列可能不同,其也被称为RBD原体的不对称二聚体、三聚体或低聚物。

[0037] 根据具体方面,包含在RBD二聚体、三聚体或低聚物中的RBD可以仅包含在一种融

合蛋白中,特别是在单链融合蛋白中,其中RBD原体与融合蛋白的另一部分融合,由此使得RBD原体的C-端与另一部分的N-端融合(使用或不使用连接体);或者由此使得RBD原体的N-端与另一部分的C-端融合(使用或不使用连接体)。这种融合被理解为“串联”融合。

[0038] 具体地,至少两个RBD被包含在融合蛋白中,作为单链融合蛋白,该融合蛋白包含与异源免疫原性载体蛋白融合的所述RBD,优选地包含一个或多个肽连接体序列。

[0039] 具体地,疫苗抗原作为单链融合蛋白提供,该单链融合蛋白包含与所述异源免疫原性载体蛋白融合的所述至少两个RBD,优选地包括一个或多个肽连接体序列。

[0040] 根据另一具体方面,包含在RBD二聚体、三聚体或低聚物中的RBD可以包含在一个以上的融合蛋白中,特别是其中将一个或多个RBD原体与第一异源蛋白融合,并且将一个或多个另外的RBD原体与第二异源蛋白融合(其中第一异源蛋白和第二异源蛋白可以是相同蛋白的拷贝,也可以彼此不同),由此使得第一和第二异源蛋白显示了与各自的第一和第二异源蛋白紧密相邻地融合的RBD,从而获得包含至少两个RBD的融合RBD的组装体。该RBD的组装体在本发明中也被称为复合体,或RBD原体的非融合组装体,例如非融合的二聚体、三聚体或低聚物。该复合体具体包含具有平行拓扑结构(例如轴对称)的RBD,特别是包含原体的侧对侧二聚体界面。

[0041] 根据具体方面,疫苗抗原包含至少两个RBD,其每个都与锚定蛋白融合,该锚定蛋白在病毒样颗粒(VLP)表面显示所述RBD。具体地,所述RBD和/或结合到VLP表面的相应RBD组装体可以通过电子显微镜测定。

[0042] 具体地,所述至少两个RBD由相同或不同的氨基酸序列组成。具体的示例包括多种RBD原体,其中该RBD源自SARS-CoV-2的不同变体。

[0043] 根据具体方面,至少一个、或者至少两个所述RBD,每一个都包含或由180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、195197、198、199或200中的任一个氨基酸长度、或者超过200个氨基酸,例如最多254个氨基酸的氨基酸序列组成,其源于SARS-CoV-2S蛋白的氨基酸序列,例如识别为蛋白质ID.:GenBank:QHR63270.2,或者其是更长的,例如包含识别为SEQ ID NO:3的C-端延伸的至少一部分,例如至少包含来自QHR63270.2的氨基酸318-571的RBD部分(在没有来自S蛋白的前导的情况下计数)。

[0044] 具体地,至少一个、或至少两个、三个或每个所述RBD包含或由与SEQ ID NO:1至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性中的任意一个组成,具有或不具有C-端延伸,该C-端延伸包含至少部分或全部SEQ ID NO:3作为SEQ ID NO:1的C-端扩展,该SEQ ID NO:1在本发明中也被称为SARS-CoV-2的天然RBD序列。

[0045] 具体地,至少一个、或至少两个、三个或每个RBD包含或由与SEQ ID NO:2至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性中的任意一个组成,其包括SARS-CoV-2的天然RBD序列。

[0046] SARS-CoV-2的天然RBD序列可以经过突变以包含一个或多个,优选地,有限数量的,例如最多20个或更少,例如最多19、18、17、16、15、14、13、12、11、10或9、或8、或7、或6、或5、或4、或3、或2个点突变,或者包含不多于一个点突变。

[0047] 具体地,一个或多个所述点突变,或所述一个或多个点突变中的每个点突变,与包含在一种或多种不同的天然存在的SARS-CoV-2突变体的RBD中的点突变相同,或与包含在天然存在的SARS-CoV-2突变体的一种或多种不同的RBD(例如多种RBD)中的点突变相同。

[0048] 具体地,RBD序列中含有的一个或多个点突变选自由N501Y、E484K和K417N组成的组。具体地,RBD序列中可以含有N501Y、E484K和K417N中的一种、二种或全部三种。

[0049] 具体地,除非另有说明,本发明中提供的氨基酸位置的编号是根据SARS-CoV-2RBD的相应区域的序列(SEQ ID NO:1,氨基酸1-192,或SEQ ID NO:2,氨基酸1-254)。

[0050] 与天然RBD序列相比,点突变的数量可以增加,例如,以覆盖SARS-CoV-2突变体的任意和所有相关的天然存在的RBD点突变,由此使得包含在本发明公开的疫苗抗原中的RBD引起交叉反应性免疫应答,以覆盖任意和所有的相应突变体,以及那些可以由这些突变的重组产生的点突变。具体地说,点突变的选择是为了覆盖已经天然存在的突变,或者可以在突变后自然进化的突变。

[0051] 示例性的天然存在的SARS-CoV-2突变可以包含RBD,该RBD包含或由识别为SEQ ID NO:4、5、6或7中的任一个氨基酸序列组成。另一个示例性的天然存在的SARS-CoV-2突变可以包括包含由WHO指明的一种或多种SARS-CoV-2突变(例如新变体B.1.1.529,指明的关切变异株(VOC)、奥密克戎)中发生的突变的RBD。

[0052] 具体地,RBD具有折叠结构和相应的构象以呈现SARS-CoV-2中和抗体识别的一个或多个构象表位。

[0053] 根据具体方面,RBD的折叠结构是

[0054] a) 通过在重组真核表达系统中表达疫苗抗原获得的,优选地,该系统采用哺乳动物(例如,人或仓鼠,例如CHO细胞)、杆状病毒感染的昆虫细胞、或真菌细胞(例如酵母或丝状真菌)、宿主细胞;和/或

[0055] b) 通过圆二色(CD)光谱和/或RBD-ACE2相互作用试验测定。

[0056] 具体地,RBD具有以可接近的构象来结合hACE2的折叠结构,如通过RBD-ACE2相互作用试验(如采用相应的免疫试验或ELISA)测定。

[0057] 根据具体方面,如本发明所述的折叠的RBD和/或疫苗抗原由抗SARS-CoV-2抗体和相应的抗体制剂识别,例如包含来自COVID-19康复患者的血清或抗体的那些,或相应的单克隆抗体制剂,其抗体在所述RBD-ACE2相互作用试验中至少20%、30%、40%中的任意一种的阻断(或抑制)RBD与ACE2结合,或者优选地,至少50%、60%、70%、80%、90%或完全(100%抑制)中的任意一种。具体地,在包含至少1:50、1:60、1:70、1:80、1:90中的任意一种,优选地至少为1:100的病毒中和滴度的任意此类抗体制剂存在的情况下,测定RBD与ACE2结合的抑制作用。

[0058] 具体地,在RBD-ACE2相互作用试验中,如本发明所述折叠的RBD和/或疫苗抗原与任意中和性抗SARS-CoV-2抗体制剂竞争。

[0059] 具体地,折叠的RBD结构处于预融合构象。

[0060] 具体地,折叠的RBD结构可以通过远紫外圆二色(CD)光谱来测定。具体地,折叠的RBD可以包含或不包含一个或多个稳定RBD折叠的分子内二硫键。具体地,一个或多个分子内二硫键可以稳定RBD的一个或多个 α -螺旋结构和/或 β -折叠结构,例如1、2、3或4个二硫键,例如发生在天然RBD折叠中,和/或特别是在RBD核心和/或RBD β -折叠区域内和/或连接各自受体结合基序(RBM)远端末端的环。

[0061] 具体地,抗原包含或由重组多肽组成,其通过使用重组宿主细胞的重组表达技术和允许以折叠形式表达或生产RBD的条件产生。

[0062] 提供特定的重组宿主细胞用于预融合构象的RBD的折叠结构。优选地,这样的宿主细胞为真核宿主细胞,特别是哺乳动物宿主细胞,如用于哺乳动物表达系统中,例如,采用人类、非人灵长类动物、或啮齿类动物,如仓鼠或小鼠、细胞系。

[0063] 特定的优选宿主细胞为,例如HEK293细胞、CHO细胞、NS0细胞、Sf9细胞、High Five细胞、毕氏酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)以及许多其他宿主细胞。

[0064] 具体地,融合前构象包括如包含在病毒蛋白与目标细胞或细胞受体融合之前的病毒蛋白中的构象结构和相应的构象表位。

[0065] RBD的折叠结构,且特别是其融合前构象,包含结构中RBD内特定区域可与受体蛋白ACE2结合,且其它区域隐藏在RBD折叠结构中的结构。

[0066] 具体地,折叠的RBD的功能可以通过将RBD与其受体hACE2结合来确定,例如以相应的ACE2结合试验、或者RBD-hACE2相互作用试验、或者以BIACORE试验来确定。合适的RBD-ACE2相互作用试验被描述于Gattinger等人(*Allergy*.2021;76(3):878-883)中,或参见下面的实施例部分。

[0067] 根据具体实施例,RBD-ACE2相互作用试验是一种试验,如测定RBD与其受体ACE2结合的结合试验,采用

[0068] a) ACE2蛋白,和

[0069] b) 包含或由天然RBD(特别是折叠的RBD)组成的SARS-CoV-2多肽;

[0070] c) 至少一种检测分子或标记分子,例如允许定量a)与b)的结合量;和

[0071] d) 可选地,固定a)或b)的固体支持物。

[0072] 具体地,ACE2蛋白是人ACE2或其功能片段,其能够识别并特异性结合天然RBD。人ACE2的具体特征是包含或由识别为SEQ ID NO:30,Uniprot:Q9BYF1的氨基酸序列组成。

[0073] 具体地,RBD-ACE2相互作用试验包括步骤:

[0074] a) 将人ACE2蛋白(或其能够识别天然RBD的功能片段)与包含或由天然RBD组成的SARS-CoV-2蛋白孵育,以测定RBD-ACE2相互作用;和

[0075] b) 比较在含RBD化合物存在下的RBD-ACE2相互作用,其中在含RBD化合物存在下,RBD-ACE2相互作用的干扰或减少表明了适用于疫苗抗原的RBD折叠。

[0076] 通过RBD-ACE2相互作用试验,可以验证RBD折叠结构,其是否以竞争方式抑制病毒-受体的结合。

[0077] 当与存在较低量的所述化合物或不存在所述化合物的情况下测定的结合水平相比时,在存在所述化合物的情况下测定降低的结合水平时(例如,当结合水平相应降低大于5%,优选大于10%时),确定化合物干扰或抑制RBD-ACE2结合。未折叠的RBD被理解为在RBD-ACE2相互作用试验中不影响RBD-ACE2结合的化合物,并且当与存在较低量的所述化合物或不存在所述化合物的情况下测定的结合水平相比时,在存在所述化合物的情况下,通过在这种试验中的基本相同的结合水平(例如,当结合水平的相对差异在10%以内,优选在5%以内)来测定。

[0078] RBD的折叠结构也可以通过远紫外圆二色(CD)光谱来测定,如Resch等人(*Clin Exp Allergy*.2011;41(10):1468-77)中所述的,或如下面的实施例部分所述的。

[0079] 根据具体实施例,通过CD光谱法测定RBD的折叠的方法是一种标准方法,如在下面

的实施例部分中所述的。

[0080] 根据具体方面,融合蛋白包含一个或多个连接体,如肽连接体序列。具体地,一个连接体用于连接所述至少两个RBD,并且可选地,另一连接体用于连接所述异源蛋白。

[0081] 具体地,可以由肽键以任何顺序进行融合(具有或不具有连接体)。融合可以通过编码相应元件的核酸分子的重组来实现,或者通过合成编码核酸分子或融合多肽序列来实现。

[0082] 根据具体实施方式,融合蛋白是单链(sc)融合蛋白。

[0083] 具体地,该融合蛋白包含至少一个或至少两个、或至少三个与异源蛋白的N-端融合(使用或不使用一个或多个连接体)的RBD。

[0084] 具体地,融合蛋白包含至少一个或至少两个、或至少三个与异源蛋白的C-端融合(使用或不使用一个或多个连接体)的RBD。

[0085] 具体地,融合蛋白包含至少一个(或至少两个、或至少三个)与异源蛋白的N-端融合的RBD,和至少一个(或至少两个、或至少三个)与异源蛋白的C-端融合的RBD,使用或不使用一个或多个连接体。

[0086] 根据具体实施方式,融合蛋白仅包含一个与异源蛋白N-端融合的RBD,以及仅包含一个与异源蛋白C-端融合的RBD,使用或不使用一个或多个连接体。

[0087] 具体地,连接体可以是不同长度的连接体,例如肽连接体(也称为肽的连接体)。连接体可以由柔性残基(如甘氨酸和丝氨酸)组成,使得相邻的肽可以相对于彼此自由移动。连接体的长度是可变的,通常在5到15个氨基酸的范围。例如,当需要确保两个相邻元件不会在空间上相互干扰时,可以使用更长的连接体。示例性的肽的连接体包含或由若干G和/或S的序列组成,例如包括或由GGGGS(SEQ ID NO:31)、GGGGS(SEQ ID NO:32)、GGGSGG(SEQ ID:33)、GGGSGGG(SEQ ID NO:34)、GGGSGGGG(SEQ ID NO:35)、GGGSGGGGS(SEQ ID NO:36)、或GGSGGS(SEQ ID NO:37)、GGSGGS(SEQ ID NO:38)、GGSGGSGG(SEQ ID NO:39)、GGSGGSGGG(SEQ ID NO:40)、GGSGGSGGGG(SEQ ID NO:41)、GGSGGSGGGGS(SEQ ID NO:42),或GGGSG(SEQ ID NO:43)、GGGSGG(SEQ ID NO:44)、GGGSGGG(SEQ ID NO:45)、GGGSGGGG(SEQ ID NO:46)、GGGSGGGG(SEQ ID NO:47)、或GGGSGGGGGGS(SEQ ID NO:48)中的任意一个,或包含或由上述任意一种组成的连接体,其包含插入或删除氨基酸或由选自用G和S组成的组中的替代氨基酸进行氨基酸取代的一个或两个点突变。

[0088] 根据进一步的具体实施例,可以使用通常用于单链可变片段(Fv)抗体构建体的连接体,该构建体包含与可变轻(VL)结构域连接的可变重(VH)结构域。

[0089] 根据具体方面,疫苗抗原可以包含除连接体外的一个或多个肽间隔子,例如用于改善多肽的结构或稳定性。

[0090] 然而,本发明所述的融合蛋白可以包含待融合的元素,其可通过生物偶联、化学偶联或交联相互结合。例如,疫苗抗原可包括多聚结构域、载体或装置,如适合用于固定一系列多肽的纳米结构或珠。

[0091] 根据具体方面,在一个多肽链内提供融合蛋白,例如,长度为至少400、500、600、700、800或900个氨基酸的任意一种的多肽,优选地,最多1000、1500、2000、2500或3000个氨基酸长度的任意一种多肽。

[0092] 具体地,疫苗抗原包含至少两个、三个或四个RBD,其为相同的病毒种或变体(或突

变体)来源,或不同的病毒种或变体(或突变体)来源。例如,所述至少两个RBD来自不同的SARS-CoV-2种或突变体,例如,其中疫苗抗原的至少一个RBD来自SARS-CoV-2,而同一疫苗抗原的至少另一个RBD来自不同于SARS-CoV-2的SARS病毒,例如SARS-CoV或MERS。

[0093] 根据具体实施例,疫苗抗原包含两个、三个或更多个RBD,例如作为二聚体(其中RBD的数量为两个)、三聚体(其中RBD的数量为三个)或低聚物(其中RBD的数量超过三个)被提供,优选地,其中至少两个或至少三个RBD串联融合(具有或不具有连接体),或在RBD原体组装体中提供,优选为RBD原体复合体。具体地,在这种二聚体、三聚体或低聚物中包含的RBD是彼此相同的或不同的。

[0094] 根据具体实施例,两个串联融合的RBD被包含在包含或由SEQ ID NO:15(构建体2:RBD-L-RBD,图9)组成的构建体中,而三个串联融合的RBD被包含在包含或由SEQ ID NO:16(构建体3:RBD-L-RBD-L-RBD,图9)组成的构建体中,其中“L”表示连接体。这种结构可以包含或可以不包含一个或多个连接体序列。SEQ ID NO:15包含一个连接体序列GGGSGGGGS(SEQ ID NO:36),而SEQ ID NO:16包含两个连接体序列,每个连接体序列的特征为氨基酸序列GGGSGGGGS(SEQ ID NO:36)。连接体将一个RBD的C-端与另一个RBD的N-端融合。串联的RBD构建体可以包含或由SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16组成,例如,包括在任何此类SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16中包含连接体序列,或者可以包括替代的连接体序列,或者可以不提供任何连接体序列。

[0095] SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16中的任一个包含C-端His标签。然而,可以理解的是,这样的构建体可以提供有或不提供有任意这样的标签。

[0096] 具体地,可以使用至少两个彼此相同的RBD,例如,RBD的一个或多个拷贝。在RBD-二聚体中,在其中的RBD是相同的,可以理解的是,RBD-二聚体中的RBD拷贝数为2。在RBD-三聚体中,在其中的RBD是相同的,可以理解的是,RBD-三聚体中的RBD拷贝数为3。

[0097] 本发明所述融合蛋白的部分也被称为“元件”(或“结构域”),特别是其中元件包含或由SARS-CoV-2的所述至少两个RBD中的一个或多个,以及异源蛋白组成。

[0098] 融合蛋白可以包含或可以不包含两个或多个或所有元件,例如,串联融合的,其中将第一元件的C-端与第二元件的N-端融合,以及可选地,其中将第二元件的C-端与第三元件的N-端融合,在元件之间具有或不具有连接体序列。特别提供包含或由所有元件串联的融合组成的融合蛋白作为单链蛋白。

[0099] 根据具体方面,疫苗抗原包括

[0100] a) SARS-CoV-2的至少两个RBD,特别是其中所述至少两个RBD可以在至少一个氨基酸上是相同或不同的,包括例如也发生在SARS-CoV-2突变体的天然存在的RBD中的一个或多个点突变;和

[0101] b) 不同病毒的至少一或两个RBD,例如 β -冠状病毒,例如SARS-CoV、MERS、HCoV-OC43或HKU1。

[0102] 本发明所述的特定异源蛋白可以来自或以其它方式衍生自病毒蛋白或蛋白结构域,例如表面蛋白或核衣壳蛋白,或上述任意一种蛋白结构域。

[0103] 具体地,异源免疫原性载体蛋白是与RBD非自然融合的多肽或蛋白质。具体地,异源免疫原性载体蛋白是病毒蛋白,例如表面蛋白或核衣壳蛋白,或上述任意一种蛋白结构域。

[0104] 根据某一方面,异源蛋白可以来源于与SARS-CoV-2的所述至少一个RBD中的任何一个或多个相同的病毒或病毒突变体,并以不同的方式或在不同的位置与至少一种所述RBD融合,例如提供融合蛋白的“异源”元件。包含此类异源元件的示例性的融合具有SARS-CoV-2的S蛋白、M蛋白或核衣壳(NC)蛋白的一个或多个子结构域,例如,包括以下蛋白结构域或子结构域的任意一个或多个:RBD、S1、S2或NC。根据具体实施方式,将至少两个RBD与SARS病毒(例如SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS)的核衣壳(NC)蛋白融合,例如,其中至少一个RBD与NC蛋白的N-端融合,并且至少一个RBD与NC蛋白的C-端融合。具体地,NC蛋白序列包含或由如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,Uniprot:P0DTC9(SARS-CoV-2核蛋白,UniProtKB-P0DTC9(NCAP_SARS2);Wu F.et al.,Nature 2020;579:265-269)组成。合适的NC蛋白是SARS-CoV-2(例如SEQ ID NO:8)、MERS病毒(例如SEQ ID NO:9)或SARS-CoV(例如SEQ ID NO:10),或上述任意一种的天然存在的变体或突变体的NC蛋白。

[0105] S蛋白的具体子结构域可以包含或由S蛋白S1结构域中跨越氨基酸550-580的区域或在S-蛋白分隔S1和S2区域的弗林蛋白酶切割位点周围的跨越氨基酸676-710的区域,或在S-蛋白S2结构域中跨越氨基酸929-952的区域。本发明提供的氨基酸位置的编号是根据SARS-CoV-2S蛋白(SEQ ID NO:13)相应区域的序列,另见NCBI GenBank收录号QII57161.1(人SARS-CoV-2,S-蛋白,SEQ ID NO:13)。

[0106] 根据具体实施例,融合蛋白的异源元件包含或由至少一个额外的SARS-CoV-2RBD(也称为异源RBD)组成,从而提供至少特征是包含至少三个RBD(其可以是相同,也可以是不相同的)的三聚体结构。异源RBD可以与一个或多个其它RBD以串联方式融合或可以不与一个或多个其它RBD以串联方式融合。通过在RBD-三聚体中使用异源RBD,例如在包含多个以串联方式融合的RBD的单链融合蛋白,其中RBD的数量为3个,令人惊讶的是,与包含类似的RBD-二聚体(其中RBD的数量为2个)但不具有额外的异源RBD的疫苗抗原相比,其对SARS-CoV-2的免疫应答可以增强。

[0107] 根据在本发明所述的疫苗抗原中使用异源RBD的具体实施例,至少三个RBD以串联方式融合。在单链融合蛋白中,异源RBD可以定位为N-端或C-端蛋白结构域,或也可以被包含作为非末端蛋白结构域。

[0108] 具体地,异源RBD可能包含或由如天然存在于SARS-CoV-2种类或突变体中的天然RBD序列组成。然而,RBD可以是不同于任何天然RBD的人工分子,例如,包含任意一个或多个、或如在天然存在于各种天然RBD结构域中所有相关的点突变。

[0109] 具体地,异源RBD具有折叠结构。

[0110] 具体地,异源RBD包含或由氨基酸序列组成,该氨基酸序列与疫苗抗原中包含的SARS-CoV-2的所述至少两个RBD中的任意一个或多个或全部相同(或其拷贝),或其不同于SARS-CoV-2的所述至少两个RBD中的任何一个或多个或全部。

[0111] 具体地,异源RBD是SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS的RBD,例如包含或由相应的SEQ ID NO:1、2、11和12,或由上述任意一个(亲本序列)的衍生物或突变体组成,其包含至少50%(或至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任意一个)的亲本序列长度,且至少90%(或91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任意一个)的与亲本序列的序列同一性,其可以是或可以不是包含一个或多个点突变的人工突变,其中点突变可以表征一个或多个自然病毒突变,或者点突变可以通过定

向进化方法诱变相应的亲本病毒序列经诱变而进化。

[0112] 根据另一方面,异源蛋白并非源自如SARS-CoV-2的所述至少一个RBD中的任何一个或多个相同的病毒或病毒突变体,而是来自不同的病毒种、或其天然存在的或人工突变体,从而提供融合蛋白的异源元件。示例性来源是哺乳动物病毒的一种,例如人类或非人类动物病毒。

[0113] 根据具体方面,源病毒种是疫苗抗原中包含的任意RBD和/或异源蛋白的来源,也是目标病毒,旨在触发针对该目标病毒的免疫应答。

[0114] 根据具体方面,SARS-CoV-2是融合蛋白的所述至少两个RBD和异源蛋白的来源,且同时是目标病毒种。当提供包含此类疫苗抗原的疫苗时,免疫应答涵盖至少该SARS-CoV-2目标病毒种,其中SARS-CoV-2包括天然存在的SARS-CoV-2,包括可以在感染的季节或大流行期间进化的其突变体,或人工进化以预测天然存在突变体的突变体。

[0115] 根据另一具体方面,SARS-CoV-2是融合蛋白的所述至少两个RBD的来源,且融合蛋白的异源蛋白可以来自不同的来源,例如来自不同的目标病毒种。当提供包含此类疫苗抗原的疫苗时,免疫应答涵盖至少以SARS-CoV-2作为第一目标病毒种,其中SARS-CoV-2包括天然存在的SARS-CoV-2,包括可以在感染的季节或大流行期间进化的其突变体,或人工进化以预测天然存在突变体的突变体。此外,免疫应答至少涵盖作为异源蛋白来源的第二目标病毒种。

[0116] 具体地,异源蛋白可以用作载体蛋白,如此其可以是或可以不是免疫原性的。可以使用引发针对病原体的免疫应答的免疫原性载体蛋白,该病原体不同于SARS-CoV-2(其可选地,也不同于SARS-CoV、MERS中的任意一种或两种)。通过使用免疫原性载体蛋白,可以增强针对SARS-CoV-2的免疫应答。

[0117] 具体的载体蛋白是选自病毒蛋白组成的组。

[0118] 根据具体方面,异源蛋白来源自任意一种:

[0119] a) 嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)家族的病毒,例如人肝炎病毒或乙型肝炎病毒,优选地,其中异源蛋白是乙型肝炎病毒的表面蛋白,例如PreS或S蛋白;或

[0120] b) β -冠状病毒,优选地,SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS、HCoV-OC43或HKU1中的任意一种,优选地,其中异源蛋白选自自由S蛋白或其子结构域(例如RBD、S1或S2结构域、或核衣壳(N)蛋白)组成的组;或

[0121] c) 人鼻病毒血清型,优选地,其中异源蛋白是病毒衣壳蛋白,例如VP1、VP2、VP3或VP4中的任意一种;或

[0122] d) RSV,优选地,其中异源蛋白是G-蛋白或G-蛋白的中心保守区;或

[0123] e) 糖脂锚定物,其中与锚定物融合的RBD通过包含包膜病毒的核心蛋白的病毒样颗粒表面表达,如莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV,如本发明进一步描述的)、水泡性口炎病毒(VSV;如在Roberts等人,1999.J.Virol.;73(5):3723-32中所述的),HIV(如在Deml等人,Molecular Immunology 2005.42(2):259-277中所述的)、埃博拉病毒(如在Swenson等人,2005.Vaccine.23(23):3033-3042中所述的),优选地,其中核心蛋白是相应病毒的Gag和/或Gag-Pol蛋白,例如MoMLV Gag和/或Gag-pol;或

[0124] f) 上述的任意一种天然存在的突变体。

[0125] 本发明所述的融合蛋白可以包含一个或多个作为异源元件的异源蛋白。

[0126] 具体的异源蛋白是HBV PreS多肽,包含或由包含与天然PreS蛋白或其一个或多个片段至少80%、85%、90%、95%或100%中的任何一个序列同一性放入多肽组成。具体的HBV PreS多肽可来源于(或衍生自)HBV基因型B、C、D、E、F、G或H、或其亚型中的任意一种。乙型肝炎病毒的亚型包括A1、A2、A3、A4、A5、B1、B2、B3、B4、B5、C1、C2、C3、C4、C5、D1、D2、D3、D4、D5、F1、F2、F3和F4,如在Schaefer等人(World J Gastroenterol.2007;13:14-21)中所述的。

[0127] 融合蛋白中存在的一种以上的乙型肝炎PreS多肽具有呈递更多的抗原免疫系统以允许形成针对PreS的抗体的优点,。作为本公开的融合蛋白一部分的HBV PreS多肽可以衍生自相同的HBV基因型或者来自不同的基因型。例如,本发明描述的融合蛋白可以仅包含HBV基因型A的PreS多肽,或者可以是与衍生自HBV基因型B、C、D、E、F、G或H或其亚型中的任意一种的另一PreS多肽的组合。

[0128] 适合在融合蛋白中用作异源元件的PreS蛋白片段,优选地,由PreS蛋白序列的至少30、40或50个连续氨基酸残基中的任意一种组成,优选地,由SEQ ID NO:19-26中的任意一个组成的乙型肝炎PreS蛋白的氨基酸1-70之间,其中SEQ ID NO:21-26分别属于HBV基因型B至H。具体片段可以包含乙型肝炎PreS蛋白的PreS1和/或PreS2。在如本发明所述的疫苗中使用作为异源蛋白的PreS诱导预防HBV感染的抗体(Cornelius C. et al. EBioMedicine.2016;11:58-67)。

[0129] 根据具体实施例,使用异源载体蛋白,其包含或由与病毒蛋白至少80%、85%、90%、95%或100%中的任意一个的序列同一性组成,优选地,选自由以下组成的组:

[0130] a) 乙型肝炎PreS蛋白或其片段中的任意一种,例如包含或由SEQ ID NO:19-26中的任意一个组成的多肽;或

[0131] b) SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS的核衣壳,例如包含或由对应的SEQ ID NO:8、9和10组成;或

[0132] c) SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS的RBD,例如包含或由对应的SEQ ID NO:1、2、11和12组成;

[0133] 或者上述任意一项(亲本序列)的衍生物或突变体,其包括至少50%(或者是至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%中的任何一个)的亲本序列长度和与亲本序列至少80%(或者是至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%中的任意一个)的序列同一性,其可以是或可以不是包含一个或多个点突变的人工突变体,该点突变可以表征一种或多种自然病毒突变体,或可以通过定向进化方法诱变亲本病毒序列经诱变而进化。

[0134] 具体实施方式是指病毒样颗粒(VLP),在本发明中也称为病毒样纳米颗粒(VNP)。

[0135] VLP和VNP是多价抗原呈递的强大平台。数个自组装蛋白已被成功用作支架,以在其表面呈递复杂的疫苗抗原。这些颗粒包括非传染性病毒核心颗粒,包覆于来自宿主细胞质膜的脂质包膜。在缺失病毒核酸或包膜蛋白的情况下,通过表达病毒结构蛋白(优选的是MoMLV的Gag)在哺乳动物细胞中诱导非传染性包膜颗粒。

[0136] 其中蛋白质,例如本发明所述的RBD或对应融合蛋白,结合、整合于或者并入VLP的脂质双分子层包膜内,由此使它们表面表达并显示在VLP表面上,可以制备自组装病毒蛋白复合体。如本发明进一步描述的,提供自组装以用于在VLP表面形成RBD复合体。

[0137] 糖基磷脂酰肌醇 (GPI) - 锚定蛋白使用翻译后修饰以连接蛋白质和脂质双分子层膜。锚定结构通常由脂质和碳水化合物部分组成,且在真核生物中其基本特征是高度保守的,然而其分子细节上却高度可变。

[0138] 根据具体方面,RBD与GPI锚融合,并通过含有包膜病毒的核心蛋白的病毒样颗粒进行表面表达,如莫洛尼鼠白血病毒 (MoMLV),其中核心蛋白优选为MoMLV Gag和/或Gag-Pol。

[0139] 根据具体方面,疫苗抗原包含:

[0140] a) 单链融合蛋白,包含至少两个RBD,与SEQ ID NO:19-26中的任意一个至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任意一个长度的乙型肝炎PreS多肽融合,且包含对应的SEQ ID NO:19-26的相应区域至少80%的序列同一性;和/或

[0141] b) 以串联方式融合的至少三个RBD,优选地其中

[0142] i. 所述至少三个RBD来源于SARS-CoV-2和/或天然存在的SARS-CoV-2突变体,或 ii. 至少两个所述RBD来源于SARS-CoV-2和/或天然存在的SARS-CoV-2突变体,并且至少一个所述RBD来源于不同于SARS-CoV-2的 β -冠状病毒,例如SARS-CoV或MERS;和/或

[0143] c) 至少两个组装的RBD,每个RBD与糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定物融合,并连接通过编码MoMLVgag-pol的表达质粒转染的哺乳动物细胞表达的病毒样颗粒的膜。

[0144] 具体地,当使用作为异源蛋白的乙型肝炎PreS多肽,特别是作为异源载体蛋白,至少一个或至少两个RBD与PreS多肽的N-端融合且至少一个或至少两个RBD与PreS多肽的C-端融合。

[0145] 根据具体的实施例,两个RBD与HBV PreS氨基酸序列融合,例如,如包含于包含或由SEQ ID NO:14组成的构建体中(构建体1:RBD-PreS-RBD,图9)。SEQ ID NO:14包含第一RBD,PreS序列和第二RBD,其中PreS序列的N-端与第一RBD的C-端融合,并且PreS序列的C-端与第二RBD的N-端融合。可以产生包含两个RBD和一个PreS序列的替代构建体,由此,例如串联融合第一RBD和第二RBD,并且将PreS序列的N-端与串联RBD构建体的C-端融合,或者将PreS序列的C-端与串联RBD构建体的N-端融合。串联RBD构建体可以包含或由SEQ ID NO:15组成,例如包括SEQ ID NO:15中包含的连接体序列,或替代的连接体序列,或不包含任何连接体序列。

[0146] SEQ ID NO:14不包括异源连接体序列和C-端His标签。然而,可以理解的是,这样的构建体可以提供有或不提供有任何这样的连接体序列或His标签。无His标签的SEQ ID NO:14如SEQ ID NO:100所示。

[0147] 本发明进一步提供编码本发明所述的疫苗抗原的分离的核酸分子,优选地,包括包含与编码本发明所述的任意融合蛋白的序列至少95% (或至少96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的多核苷酸序列。示例性的多核苷酸序列是密码子优化序列,其在对应的宿主细胞中被优化用于重组表达,例如SEQ ID NO:17 (其编码构建体1,RBD-PreS-RBD),或SEQ ID NO:18 (其编码构建体3:RBD-L-RBD-L-RBD),或上述任意一种密码子优化的变体,其被优化以在特定的宿主细胞系中表达。

[0148] 编码核酸分子,例如cDNA,可用于在体外生产疫苗抗原。编码核酸分子,例如RNA,可用于生产RNA疫苗。

[0149] 本发明进一步提供包含编码核酸分子的表达构建体,和包含所述这些表达构建体和/或编码核酸分子的重组宿主细胞,以及在宿主细胞培养中表达疫苗抗原的方法。

[0150] 根据具体方面,本发明进一步提供通过包含本发明所述核酸分子的重组宿主细胞,在离体细胞培养中用于生产本发明所述疫苗抗原的表达系统。

[0151] 合适的宿主细胞可以选自真核宿主细胞组成的组,如哺乳动物、杆状病毒感染的细胞、昆虫、或真菌细胞,如酵母或丝状真菌,例如HEK293细胞、CHO细胞、NS0细胞、Sf9细胞、High Five细胞、毕赤酵母、酿酒酵母,以及许多其他宿主细胞。

[0152] 具体地,本发明所述的疫苗抗原或其至少一个或多个元件,即至少两个RBD和异源蛋白,可以被糖基化或非糖基化。在优选实施方式中,所述至少两个RBD被糖基化。

[0153] 具体地,RBD可以包含或不包含例如由哺乳动物(例如,非人哺乳动物,如仓鼠或小鼠)或人类细胞(例如HEK细胞或CHO细胞)表达的糖基化。

[0154] 根据具体方面,本发明进一步提供了生产本发明所述疫苗抗原的方法,其中在生产所述疫苗抗原的条件下培养或维持本发明所述重组宿主细胞。

[0155] 本发明进一步提供包含本发明所述疫苗抗原、或本发明所述核酸分子的疫苗或疫苗制剂,可选地,还包括药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂中的任意一种或多种。

[0156] 根据剂量、剂型和给药途径,本发明所述疫苗抗原可与赋形剂、稀释剂、佐剂和/或载体组合。生产疫苗制剂的合适方案是本领域技术人员已知的,并可以在例如“Vaccine Protocols”(A.Robinson,M.P.Cranage,M.Hudson;Humana Press Inc.,U.S.;第二版2003)中找到。

[0157] 具体地,疫苗包括疫苗抗原和/或在疫苗制剂中编码疫苗抗原的核酸分子,其优选地包括佐剂。

[0158] 具体优选的佐剂选自明矾(磷酸铝凝胶或氢氧化铝凝胶或两者的混合物)、AS04(明矾加单磷酸脂A)、MF59(水包油乳剂佐剂)和to11样受体激动剂佐剂(单磷酸脂A加CpG)组成的组。

[0159] 本发明所述的疫苗抗原可以用疫苗中常用的特异性佐剂配制。例如,佐剂的合适选择可以包括MF59、氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、细胞因子(例如IL-2、IL-12、GM-CSF)、皂苷(如QS21)、MDP衍生物、CpG寡核苷酸、LPS、MPL、聚磷腈、乳剂(如Freund的、SAF)、脂质体、病毒体、ISCOM、耳蜗酸盐、PLG微粒、泊洛沙姆颗粒、病毒样颗粒、不耐热肠毒素(LT)、霍乱毒素(CT)、突变毒素(如LTK63和LTR72)、微粒和/或聚合脂质体。合适的市售佐剂,例如AS01B(MPL和QS21的脂质体制剂)、AS02A、AS15、AS-2、AS-03及其衍生物(GlaxoSmithKline,美国);CWS(细胞壁骨架)、TDM(海藻糖-6,6'-二甲藻酸酯)、LeIF(利什曼原虫延伸起始因子)、铝盐,如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝;钙、铁或锌盐;不溶性酰化酪氨酸悬浮液;酰化糖;阳离子或阴离子衍生的多糖;聚磷腈;生物可降解微球;单磷酸脂A和Quil A。细胞因子,如GM-CSF或白介素-2、-7或-12也可用作佐剂。主要用于引发Th1型应答的优选佐剂包括,例如,单磷酸脂质A,优选3-O-去酰化单磷酸脂质A(3D-MPL),可选地与铝盐的组合。

[0160] 另一优选佐剂为皂苷或为皂苷模拟物或衍生物,优选QS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc.),其可以单独使用或与其它佐剂联合使用。例如,包括单磷酸脂质A和皂苷衍生物的组的增强系统,例如QS21和3D-MPL的组合。其它优选的配方包括水包油乳剂和生育酚。特别有效的佐剂配方是QS21、3D-MPL和生育酚在水包油乳剂中。用于本发

明的其它皂苷佐剂包括QS7(描述于WO 96/33739和WO 96/11711)和QS17(描述于US 5,057,540和EP 0362279B1)。

[0161] 本发明进一步提供了一种疫苗,包含有效量的本发明所述的疫苗抗原,例如免疫原性有效量。

[0162] 疫苗的具体实施方式包括编码疫苗抗原的核酸分子。疫苗的具体实施例是编码疫苗抗原的RNA疫苗。特别是, RNA分子可以用作疫苗制剂,以裸形式或与递送载体配伍。具体实施方式可以包括病毒或细菌宿主作为基因递送载体(例如,活疫苗载体),或者可以包括以游离形式进行给予基因,例如,插入质粒中。具体地,编码本发明所述疫苗抗原的核酸分子能够在哺乳动物或人类细胞中(且特别是在给受试者接种疫苗时)表达折叠的RBD。

[0163] 具体地,疫苗包括有效量的疫苗抗原,例如,每剂量范围在0.001-1mg之间,优选在50至150微克之间,例如约100微克。

[0164] 可与赋形剂组合以产生单一剂型的疫苗抗原的量将根据特定的给药方式而变化。疫苗抗原的剂量可以根据例如受试者的年龄、性别和体重因素,以及在受试者体内引起所需抗体应答的能力而变化。

[0165] 可以调整剂量方案以提供最佳的治疗反应。例如,可以每日给药若干个分开的剂量,或者由治疗情况的要求按比例减少剂量。疫苗的剂量也可以根据情况变化,以提供最佳的预防剂量反应。

[0166] 具体地,本发明所述的疫苗可以采用初免-加强策略以有效量施用于受试者。

[0167] 例如,在后续的疫苗接种之间的时间间隔中(范围在2周至5年之间,优选在15个月至最多3年之间,更优选在2个月至1.5年之间),本发明所述的疫苗可以根据初免-加强方案多次施用于受试者。具体地,本发明所述疫苗给药2至10次,优选地给药2至7次,甚至更优选地最多5次,最优选最多3次。

[0168] 根据具体实施方式,3-4周的时间间隔中给药2剂或3剂,以建立保护性免疫应答。该免疫应答可以通过在第一剂给药的6个月后给药1剂加强,并且可选地每年1次。加强给药可用于保持高抗体水平。

[0169] 本发明进一步提供用于制备本发明所述疫苗的试剂盒组分,例如,包含装有一种或多种试剂盒组分的一个或多个容器的药物试剂盒,例如疫苗抗原和佐剂。该试剂盒可用于体外制备疫苗和/或当给药时制备疫苗。在具体实施方式中,该试剂盒进一步包括用于使用该试剂盒组分的说明书。

[0170] 本发明进一步提供了用于医疗用途的疫苗。

[0171] 根据具体方面,本发明进一步提供用于医疗用途的本发明所述的疫苗抗原或疫苗、或编码该抗原的核酸分子。

[0172] 具体地,医疗用途包括免疫疗法,例如主动免疫疗法。具体的免疫疗法通过包括诱导、增强、抑制或以其它方式修改免疫应答的方法,对患有疾病、或处于感染或正遭受疾病风险或有疾病复发风险的受试者提供治疗。

[0173] 本发明进一步提供了一种药物制剂,包含本发明所述的疫苗抗原,进一步包含药学上可接受的载体,例如在免疫原性制剂中可接受的载体。

[0174] 本发明进一步提供了本发明所述的疫苗抗原或疫苗用于受试者疫苗接种以针对目标病毒(如SARS-CoV-2,包括其天然存在的突变体)感染进行预防性治疗,优选地,以激发

识别天然RBD的中和抗体。

[0175] 本发明进一步提供用于治疗受试者以诱导针对SARS-CoV-2的抗体,和/或生产包含针对SARS-CoV-2抗体的抗血清或血浆产品的疫苗,优选地,其中所述抗体是SARS-CoV-2中和抗体。具体地,血浆产物是全血浆(例如新鲜冷冻血浆),或含有抗体(例如IgG,以及可选地,IgA和/或IgM抗体)的血浆成分。具体地,血浆产品是免疫球蛋白产品或高免疫球蛋白产品。

[0176] 本发明进一步提供了用于本发明所述用途的疫苗,其中该疫苗通过皮下、肌肉内、鼻内、微针、粘膜、皮肤或透皮给药施用于受试者。

[0177] 因此,本发明具体提供了一种通过施用有效量的疫苗治疗需要预防性治疗的受试者的方法,例如,预防目标病毒感染,例如SARS-CoV-2感染或目标病毒疾病(例如SARS-CoV-2疾病或COVID-19)的爆发。

[0178] 根据本发明,进一步提供有一种通过接种疫苗和对需要其的受试者进行免疫来预防受试者感染传染病的方法。

[0179] 具体地,该传染病是由目标病毒引发的疾病或疾病状态。

[0180] 具体地,目标病毒是SARS-CoV-2(可选地,包括SARS-CoV-2的突变体)。其中使用源自另一种病毒的异源蛋白时,例如HBV(例如HBV PreS多肽),该目标病毒是SARS-CoV-2(可选地,包括SARS-CoV-2的突变体)和此类其他病毒(例如HBV)。

[0181] 本发明进一步提供了一种生产本发明所述疫苗抗原的方法,包括由本发明所述的核酸分子或本发明所述的表达构建体表达疫苗抗原。具体地,核酸分子的表达是在重组真核表达系统中。

[0182] 具体地,包含疫苗抗原的疫苗是通过将该表达疫苗抗原与药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂中的任意一种或多种结合产生的。

[0183] 本发明进一步提供了用于生产本发明所述疫苗或疫苗制剂的方法,例如,通过将本发明所述疫苗抗原与药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂中的任意一种或多种进行配制,以获得配制的疫苗制剂。

[0184] 本发明进一步提供了一种通过将至少第一和第二折叠RBD与所述异源免疫原性载体蛋白融合来生产具有增强的免疫原性的RBD亚单位疫苗的方法。具体地,疫苗抗原是一种人工融合蛋白,其中异源免疫原性载体蛋白不与SARS-CoV-2的S蛋白中的RBD自然融合。

[0185] 具体地,所述第一和第二折叠RBD的特征在于如本发明所述的疫苗抗原的所述至少两个RBD的特征。

[0186] 具体地,本发明所述的方法是指生产如本发明进一步描述的疫苗抗原。

[0187] 具体地,本发明所述的疫苗抗原的特征在于以下一个或多个特征:

[0188] a) 疫苗抗原包含2个、3个或更多RBD;

[0189] b) 所述至少两个RBD由相同或不同的氨基酸序列组成;

[0190] c) 至少一个所述RBD包含或由至少180个氨基酸长度的氨基酸序列组成,并且包括与SEQ ID NO:1或2至少95%的序列同一性,可选地,包含一个或多个包含在一个或多个不同的天然存在的SARS-CoV-2突变体的RBD中的相同的点突变;

[0191] d) 所述折叠结构是

[0192] i. 通过在重组真核表达系统中疫苗抗原的表达获得的,优选地,采用哺乳动物、杆

状病毒感染的细胞、或真菌宿主细胞,优选地,采用人宿主细胞;和/或

[0193] ii.通过圆二色(CD)光谱和/或RBD-ACE2相互作用试验测定,优选地,其中疫苗抗原在RBD-ACE2相互作用试验中与中和性抗SARS-CoV-2抗体制剂竞争。

[0194] e)疫苗抗原被提供作为包含所述至少两个与所述异源免疫原性载体蛋白融合的RBD的单链融合蛋白,优选地,包含一个或多个肽连接体序列;

[0195] f)异源免疫原性载体蛋白是病毒蛋白,如表面蛋白或核衣壳蛋白,或上述任意一种蛋白结构域;

[0196] g)异源免疫原性载体蛋白是包含B细胞表位和T细胞表位的抗原,以在人受试者中引发体液和细胞免疫应答,

[0197] h)异源免疫原性载体蛋白是不与RBD自然融合的多肽;

[0198] i)异源免疫原性载体蛋白来源于任意一种:

[0199] i.嗜肝DNA病毒科家族的病毒,例如人肝炎病毒或乙型肝炎病毒,优选其中地,异源蛋白是乙型肝炎病毒的表面蛋白,例如PreS或S蛋白;或

[0200] ii. β -冠状病毒,优选地,SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS、HCoV-OC43或HKU1中的任意一种,优选地,其中异源蛋白选自由S蛋白或其子结构域,例如S1或S2结构域,或核衣壳(N)蛋白;或

[0201] iii.人鼻病毒血清型,优选地,其中异源蛋白是病毒衣壳蛋白,例如VP1、VP2、VP3或VP4中的任意一种;或

[0202] iv.RSV,优选地,其中异源蛋白为G-蛋白或G-蛋白的中心保守区;或

[0203] v.糖脂锚定物,其中与锚定物融合的RBD通过包含包膜病毒的脂质双分子层包膜和核心蛋白的病毒样颗粒表面表达,如莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV),其中核心蛋白优选为MoMLV Gag和/或Gag-Pol;或

[0204] vi.上述任意一种天然存在的突变体。

[0205] j)异源免疫原性载体蛋白是除SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的RBD之外的任意一种异源免疫原性载体蛋白。

[0206] k)异源免疫原性载体蛋白是:

[0207] i.与SEQ ID NO:19-26中任意一个的至少50%长度的乙型肝炎PreS多肽,并且包含与对应的SEQ ID NO:19-26的相应区域至少80%的序列同一性,优选地,其中至少一个RBD与PreS多肽的N-端融合,并且至少一个肽与PreS多肽的C-端融合;和/或

[0208] ii.糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定物,其与通过编码MoMLVgag-pol的表达质粒转染的哺乳动物细胞所表达的病毒样颗粒的膜连接。

[0209] 具体地,异源蛋白的特征如本发明进一步所述,优选任意一项:

[0210] a)至少50%长度的乙型肝炎PreS多肽,例如包含与SEQ ID NO:19-26中任意一个的相应区域至少90%的序列同一性,优选地,其中至少一个RBD与PreS多肽的N-端融合,并且至少一个肽与PreS多肽的C-端融合;和/或

[0211] b)糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定物,其与通过编码MoMLVgag-pol的表达质粒转染的哺乳动物细胞所表达的病毒样颗粒的膜连接。

附图说明

[0212] 图1:COVID-19康复患者和历史对照组对微阵列SARS-CoV-2蛋白的IgG应答。在COVID-19康复患者(根据其病毒中和滴度(VNT))和历史对照组中的蛋白特异性IgG水平(x轴;蛋白质;y轴,以 \log_{10} 标度的ISU)。与历史对照组差异的P值 <0.0001 以***表示。

[0213] 图2:病毒中和滴度与折叠RBD的IgG水平和RBD结合ACE2的抑制相关。COVID-19康复受试者血清中的病毒中和滴度(VNTs)(x轴, \log_2 标度)与(A)折叠RBD和未折叠RBD的IgG抗体水平(y轴:ISU值)或(B)RBD结合ACE2的抑制百分比(y轴:抑制%)的相关性。

[0214] 图3:患者的IgG抗体主要识别折叠RBD上的构象表位。在不与或与折叠RBD、未折叠S1或RBD肽混合预吸附(x轴)情况下,患者的IgG结合折叠或未折叠的RBD。Y轴:ISU值, \log_{10} 标度,显示与无抑制相比的显著性差异。P值:*** <0.0001 。

[0215] 图4:用未折叠或折叠RBD免疫兔的抗体应答的特征。兔IgG抗体水平(光密度OD水平,y轴),每组3只,20 μ g未折叠的RBD免疫对比未折叠的S1免疫(A),40 μ g未折叠的RBD免疫对比未折叠的S1免疫(B),80 μ g未折叠的RBD免疫对比未折叠的S1免疫(C),20 μ g未折叠的RBD免疫对比折叠的RBD免疫(D),40 μ g未折叠的RBD免疫对比折叠的RBD免疫(E),80 μ g未折叠的RBD免疫对比折叠的RBD免疫(F),20 μ g未折叠的RBD免疫对比未折叠的RBD免疫(G),40 μ g未折叠的RBD免疫对比未折叠的RBD免疫(H),80 μ g未折叠的RBD免疫对比未折叠的RBD免疫(I),20 μ g未折叠的RBD免疫对比HHMO免疫(J),40 μ g未折叠的RBD免疫对比HHMO免疫(K),80 μ g未折叠的RBD免疫对比HHMO免疫(L),20 μ g折叠的RBD免疫对比未折叠的S1免疫(M),40 μ g折叠的RBD免疫对比未折叠的S1免疫(N),80 μ g折叠的RBD免疫对比未折叠的S1免疫(O),20 μ g折叠的RBD免疫对比折叠的RBD免疫(P),40 μ g折叠的RBD免疫对比折叠的RBD免疫(Q),80 μ g折叠的RBD免疫对比折叠的RBD免疫(R),20 μ g折叠的RBD免疫对比未折叠的RBD免疫(S),40 μ g折叠的RBD免疫对比未折叠的RBD免疫(T),80 μ g折叠的RBD免疫对比未折叠的RBD免疫(U),20 μ g折叠的RBD免疫对比HHMO免疫(V),40 μ g折叠的RBD免疫对比HHMO免疫(W),80 μ g折叠的RBD免疫对比HHMO免疫(X)。His标记的对照蛋白(HHMO)。出血时间点和血清稀释度显示在小图中。IgG(来自用40或80 μ g折叠RBD免疫兔,第42天的血清(Y),或者来自用40或80 μ g未折叠RBD免疫,与折叠RBD、未折叠S1、多肽混合物或单独缓冲液(无抑制)预吸附后第42天的血清(Z))与微阵列SARS-CoV-2蛋白和RBD衍生肽的结合(Y轴:ISU)。

[0216] 图5:所示为用抗FLAG-PE抗体(第一列)、COVID-19康复患者血清(第二列)或健康受试者对照组血清(第三列)染色的pEAK12 FLAG::RBD::GPI(第一行)、pEAK12 FLAG::S::GPI(第二行)或pEAK12 FLAG::NC::GPI(第三行)瞬时转染的HEK293T细胞的流式细胞术分析。使用二抗(APC偶联的山羊抗人IgG Fab)对来自血清样品的人抗体(第二和第三列)的结合进行可视化。

[0217] 图6:所示为表达指明的CD16-GPI锚定病毒抗原(FLAG::RBD::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::S::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::NC::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::Art v1::GPI来自艾蒿(*Artemisia vulgaris*)、Art v 1来自艾蒿)的纯化的SARS-CoV-2抗原表达VNP(10 μ g/泳道)、对照VNP(无抗原)、用来自COVID-19康复患者(左栏)或健康对照受试者(右栏)的血清探测的SARS-CoV-2的rArt v 1(2 μ g)或rHis RBD的非还原性免疫印迹(IB)分析。用抗MoMLVp30GAG单克隆抗体(克隆R187)除去MoMLV衣壳蛋白后上样操作。

[0218] 图7:所示为表达指明的GPI锚定抗原(FLAG::RBD::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::S::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::NC::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::Art v1::GPI来自艾蒿(*Artemisia vulgaris*)、Art v 1来自艾蒿)的纯化的SARS-CoV-2抗原表达VNP(10 μ g/泳道)、对照VNP(无抗原)、用来自COVID-19康复患者(左栏)或健康对照受试者(右栏)的血清探测的SARS-CoV-2的rArt v 1(2 μ g)或rHis RBD的非还原性免疫印迹(IB)分析。用抗MoMLVp30GAG单克隆抗体(克隆R187)除去MoMLV衣壳蛋白后上样操作。

S::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::NC::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::Art v1::GPI来自艾蒿、Art v1来自艾蒿)的纯化的抗原表达VNP (10 μ g/泳道)、对照VNP(无抗原)、用来自COVID-19康复患者的血清探测的SARS-CoV-2的rArt v1(2 μ g)或rHis RBD的还原性免疫印迹(IB)分析。

[0219] 图8:所示为来自COVID-19康复患者(黑色圆圈)和健康对照个体(空心圆圈)的、用表达指明的GPI锚定抗原(FLAG::RBD::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::S::GPI来自SARS-CoV-2、FLAG::NC::GPI来自SARS-CoV-2)的抗原表达VNP(5 μ g/ml)、空白VNP(无抗原作为对照)、FSME抗原(0.15 μ g/ml)、破伤风类毒素(0.0125IE/ml)、PHA(12.5 μ g/ml)或培养基单独孵育144小时,然后进行18小时的甲基-[3H]-胸腺嘧啶脉冲(1 μ Ci/孔)的PBMC增殖。

[0220] 图9:本发明提到的序列。

[0221] 图10:(a):由两个RBD结构域组成的融合蛋白(PreS-RBD)的结构,一个与人乙型肝炎病毒(HBV)衍生的PreS的N-端融合,一个与人乙型肝炎病毒(HBV)衍生的PreS的C-端融合,该HBV表面抗原含有HBV与肝细胞上的NTCP(钠牛磺酸胆酸共转运多肽)受体的结合位点;(b)考马斯蓝染色的SDS-PAGE,含有在还原和非还原条件下分离的大肠杆菌和HEK细胞表达的PreS-RBD和RBD。分子量以kDa表示;(c)大肠杆菌和HEK细胞表达的PreS-RBD和RBD的圆二色性分析。扫描显示在给定的波长(x-轴)处的分子椭圆率(y-轴)。通过ELISA检测的大肠杆菌和HEK细胞表达的PreS-RBD和RBD与不同稀释度的(d)抗His抗体、(e)抗PreS肽抗体、(f)抗重组PreS抗体和(g)来自COVID-19康复受试者(n=10)和历史对照组(n=10)的IgG抗体(1:50稀释)的反应性。OD(405/492nm)值(y-轴)为偏差<5%且对应于结合抗体的数量的重复测定的平均值。不含一抗的缓冲液作为阴性对照;

[0222] 图11:用不同的含RBD疫苗免疫的兔中的RBD特异性IgG反应。所示为用两种等摩尔RBD剂量(20或40微克)的折叠RBD单体(RBD)、折叠RBD二聚体、折叠RBD三聚体、折叠PreS-RBD或折叠N-RBD免疫的兔的IgG应答。每组3只兔的折叠RBD的特异性IgG抗体水平(OD405/492nm值)显示了如指明的不同出血时间点和所示血清稀释度。OD405/492nm值显示为重复测定的平均值,偏差<5%,OD值 \geq 0.5被认为是阳性的,并以粗体表示。

[0223] 图12:显示了健康的、SARS-Cov-2阴性受试者在用(a)未折叠的大肠杆菌和(b)折叠的HEK细胞表达的PreS-RBD免疫期间,注射、取样(血清、细胞、粘膜液)的时间点和日期的免疫方案。

[0224] 图13:在免疫受试者中的特异性抗体应答的进展。(a)用未折叠的大肠杆菌(白色星形)PreS-RBD和HEK细胞(黑色星形)表达的折叠PreS-RBD(x轴,时间点)免疫后,血清IgG对折叠RBD的反应性。(b)在不同时间点(x轴),用HEK细胞表达的PreS-RBD免疫后,IgG对RBD突变K417N、E484K、N501Y(α ,B.1.1.7)和K417N+E484K+N501Y(β ,B.1.351)的反应性。(c)用未折叠大肠杆菌(白色星形)PreS-RBD和HEK细胞(黑色星形)表达的折叠PreS-RBD(x轴,时间点)免疫后的PreS特异性IgG。血清1:50稀释,OD值为偏差<5%(y轴)且对应于结合抗体数量的重复测定的平均值。

[0225] 图14:来自受试者、来自COVID-19康复患者和接种已登记的SARS-CoV-2疫苗后的受试者在不同时间点时获得的血清中的SARS-CoV-2特异性保护性抗体。

[0226] 图15:(a)在指明时间点,在来自用折叠PreS-RBD免疫的受试者的以1:50稀释的血清样本中,对RBD(武汉)和RBD变体(δ ,奥密克戎)的IgG应答(小图),或(b)在来自用两剂折

叠PreS-RBD(与20或40 μ g RBD等量)免疫三周后获得的6只兔(编号7-12)的1:1000稀释的血清中,对RBD(武汉)和RBD变体(δ ,奥密克戎)的IgG应答(插图)。OD值(y轴)是偏差<5%(y轴)且对应于结合抗体的重复测定的平均值。

具体实施方式

[0227] 本说明书中使用的特定术语具有以下含义。

[0228] 本发明使用的术语“包含”、“含有”、“具有”和“包括”可同义使用,并应理解为开放的定义,允许进一步的成员或部分或元素。“组成”被认为是无进一步的组成定义特征的元素的最接近的定义。因此,“包含”是更广泛的并含有“组成”的定义。

[0229] 本发明所用的术语“约”是指相同值或与给定值差异+/-10%或+/-5%的值。

[0230] 如本发明所使用的术语“抗原”(本发明也被称为“免疫原”),是指被免疫系统识别并且可以激发免疫应答的任意分子。在一些实施方式中,抗原是多肽或蛋白质,并特别是传染性病原体的组分。

[0231] 本发明使用的术语“抗原”应具体是指任意抗原决定簇,其可以被抗体的结合位点识别或能够结合HLA I类或II类分子的肽沟,并且因此可以作为特异性T细胞的刺激物。抗原被识别为一个完整的分子或者为这样的分子的一个片段,特别是亚结构,例如多肽或碳水化合物结构,通常被称为“表位”,如B细胞表位,T细胞表位,它们是免疫相关的,即也被天然或单克隆抗体识别。

[0232] 具体地,优选的抗原是那些已经被证明是或能够是免疫或治疗相关的分子或结构,特别是那些临床有效性已经被测试过的分子或结构。如本发明所用的术语应具体包括选自包含免疫可及和免疫相关的表位的抗原中的分子或结构,特别是在一种或多种物种或血清型中发现的保守抗原。免疫可及的病毒表位通常由病毒粒子外表面或受感染的细胞的表面表达的抗原呈现或包含在病毒粒子外表面或受感染的细胞的表面中。

[0233] 本发明所述的选定的表位和多肽可以在体内触发免疫应答,从而分别诱导针对抗原和目标病毒的中和抗体。这提供了用抗原主动免疫时的有效保护。由于多肽抗原引发细胞和体液免疫应答的固有能力,因此他们是优选的抗原。

[0234] 本发明使用的术语“表位”应具体是指可以完全与抗体的结合位点构成特定结合配对或作为特定结合配对的一部分的分子结构。从化学上来说,抗体识别的表位可以由肽、碳水化合物、脂肪酸、有机物、生物化学或无机物质或者其衍生物及其任意组合物组成。如果表位是多肽,其将通常包括至少3个氨基酸,优选地,至少4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个氨基酸。肽的长度没有临界上限,其可以包含蛋白质的几乎全长多肽序列。表位可以是线性的、连续的或不连续的,且如果它们组装了结构,就可以是构象表位。线性表位由多肽或碳水化合物链的一级序列的单个片段组成。不连续的构象表位由通过多肽的折叠聚集在一起以形成三级结构的氨基酸或碳水化合物组成,并且氨基酸在线性序列中不一定彼此相邻。本发明使用的疫苗抗原具体包含一个或多个包含在折叠RBD中(例如在天然RBD中)的构象表位。

[0235] 抗原的免疫原性可以通过本领域众所周知的合适的体外(例如采用免疫细胞的离体试验)或体内试验来确定。

[0236] 疫苗抗原的免疫原性可以通过结合疫苗抗原和异源元件而增加,例如与额外的抗

原或免疫原或免疫原性载体融合。具体地,本发明所述的疫苗抗原,其包含异源RBD,或至少RBD三聚体,或其包含异源免疫原性载体蛋白,例如HBV PreS多肽,被发现与没有这种异源元件的疫苗抗原相比具有增加的免疫原性。例如,在免疫时,与PreS融合的RBD的两个拷贝比不含PreS的RBD两个拷贝的融合诱导更高水平或更加连续的RBD特异性抗体(见,例如,实施例,图11)。

[0237] 本发明所述的疫苗抗原具体包含如通过真核表达系统产生的、或当在重组真核宿主细胞中表达时,特定构象或折叠的RBD。

[0238] 术语“表达”、“表达盒”或“表达系统”在本发明中理解如下。

[0239] 表达盒包含至少一个核酸分子(多核苷酸),其含有表达被编码的多肽或目的蛋白质(POI)的目的编码序列,以及可操作连接体中的控制序列,从而使用这些分子转化或转染的宿主(或宿主细胞)包含相应的序列并能够产生相应的编码多肽或蛋白质。包含表达盒的表达构建体可包含在染色体外的载体中,或者整合到宿主细胞染色体中。表达可以是指分泌或非分泌的表达产物。如本发明所用的术语“表达”是指两者、多核苷酸或基因的表达、或对应多肽或蛋白质的表达。本发明所用的术语“表达多核苷酸”或“表达核酸分子”旨在包括选自DNA转录成mRNA、mRNA输出、mRNA成熟、mRNA翻译和加工、蛋白质折叠和/或蛋白质运输组成的组中的至少一个步骤。

[0240] 重组宿主生物包含表达盒和用于表达目的多肽或蛋白质的手段,其在本发明中被理解为“表达系统”。

[0241] 表达盒方便的以“载体”或“质粒”的形式提供,其通常是在合适的宿主生物中的克隆的重组核苷酸序列的转录和它们的mRNA翻译所需的DNA序列。表达载体或质粒通常包含自主复制的起点或宿主细胞中用于基因组整合的基因座、选择性标记(例如,氨基酸合成基因或赋予抗生素抗性的基因,例如zeocin、卡那霉素、G418,潮霉素或诺尔丝菌素)、多个限制性内切酶切割位点,合适的启动子序列和转录终止子,这些组分可操作地连接在一起。本发明使用的术语“质粒”和“载体”包括自主复制的核苷酸序列以及整合核苷酸序列的基因组,如人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)。

[0242] 表达载体可包括但不限于克隆载体、修饰的克隆载体和特殊设计的质粒。本发明所述的优选的表达载体是适合于在真核宿主细胞中表达重组基因且根据宿主生物体选择的表达载体。合适的表达载体通常包含适合于在真核宿主细胞中表达编码POI的DNA的调控序列。调控序列的示例包括启动子、操纵子、增强子、核糖体结合位点和控制转录和翻译起始和终止的序列。调节序列通常可操作地连接待表达的DNA序列。

[0243] 为了允许重组核苷酸序列在宿主细胞中表达,启动子序列通常调节和启动下游核苷酸序列的转录,并与下游核苷酸序列可操作地连接。表达盒或载体通常包含启动子核苷酸序列,其紧邻编码序列的5'末端,例如,位于编码序列的上游并紧邻编码序列,或者如果使用信号或先导序列,则分别位于所述信号和先导序列的上游并紧邻所述信号和先导序列,以促进编码序列的翻译起始和表达,以获得表达产物。

[0244] 本发明所述的具体表达构建体包含编码连接有先导序列(例如,分泌信号肽序列(前体序列)或前序列)的POI的多核苷酸,其导致POI转运进入分泌途径和/或从宿主细胞分泌POI。当计划用于重组表达和分泌的POI是非自然分泌的蛋白质并因此缺乏自然分泌先导序列,或者其核苷酸序列在没有其自然分泌先导序列情况下被克隆时,通常需要在表达载

体中存在这样的分泌先导序列。通常,可以使用任意有效引起宿主细胞分泌POI的分泌先导序列。

[0245] 本发明所述的表达系统、基因构建体或修饰可以采用本领域已知的工具、方法和 技术,如由J.Sambrook等人(分子克隆:实验室手册(第3版),冷泉港实验室,冷泉湾实验室 出版社,纽约(2001))所描述的。表达载体可以包括但不限于克隆载体、修饰的克隆载体和 特殊设计的质粒。优选地,可用于表达编码本发明所述的疫苗抗原的序列的目的的表达载 体,具体为适合于在真核宿主细胞中表达的重组表达构建体并根据宿主生物体选择的表达 载体。合适的表达载体通常包含适合于在真核宿主细胞中表达编码重组蛋白的DNA的调控 序列。调控序列的示例包括启动子、操纵子、增强子、核糖体结合位点以及控制转录和翻译 起始和终止的序列。调节序列通常可操作地连接待表达的DNA序列。

[0246] 在BRD的上下文中,如本发明所用的术语“折叠的”在本发明中被理解为折叠的二级 结构,其赋予了RBD与其受体hACE2的功能性结合,例如在RBD-ACE2相互作用试验中测定 的,例如如本发明所述的。

[0247] 具体地,折叠的RBD结构与天然RBD中存在的一样,或至少部分折叠与天然RBD中存 在的一样,如,包括例如一个 α -螺旋和/或至少一个 β -折叠的折叠和/或至少一个稳定RBD折 叠的二硫键桥,其折叠的RBD结构提供了如在RBD-ACE2结合试验中确定的RBD的功能。

[0248] 该折叠的RBD结构可以由或可以不由一个或多个二硫键稳定。二级结构可以包含 或可以不包含 α -螺旋和 β -折叠结构,如天然RBD中存在的,例如如CD测定的。

[0249] 折叠RBD的功能可以通过其与hACE2的结合来确定,例如在RBD-hACE2相互作用试 验中或在BIACORE试验中所确定的。

[0250] 参考Lan等人(Nature 2020;581:215-220);Wrapp等人(Science 2020;367:1260- 1263);和Wan等人(J.Virol.2020;94:e00127-20)。

[0251] 本发明所用的术语“宿主细胞”应是指单个细胞、单个细胞克隆或宿主细胞的细胞 系。术语“宿主细胞”应具体适用于任意的通过体外(或离体)生产方法的适合用于重组目的 以生产目的蛋白质(“POI”)的细胞。可以理解的是,术语“宿主细胞”不包括人类。术语“细胞 系”是指已经获得了在很长一段时间内增殖的能力的特定细胞类型的已建立的克隆。细胞 系通常用于表达重组核酸分子。“生产宿主细胞系”或“生产细胞系”通常被理解为在生物反 应器中随时可用于细胞培养以获得生产过程的产物(例如POI)的细胞系。

[0252] 本发明所述的具体实施方式是指重组生产宿主细胞系,其被工程化以表达如本发 明所述的融合蛋白,或包含在融合蛋白中的至少两个RBD。RBD折叠可取决于生产宿主细胞 的类型。例如,大肠杆菌细胞不容易产生如本发明所示的折叠和功能性RBD,而哺乳动物细 胞产生还如本发明所示的折叠和功能性RBD。

[0253] 具体地,如本发明所述的重组宿主细胞是人工生物体和天然(理解为天然存在的 或野生型)宿主细胞的衍生物。众所周知,本发明所述的宿主细胞、方法和用途,例如,具体 是指那些包含一种或多种遗传修饰、或人工表达构建体、所述的转染或转化的宿主细胞和 重组蛋白,是非天然存在的、是“人造的”或合成的,并为因此不被认为是“自然法则”的结 果。

[0254] 本发明中所用的关于氨基酸序列或蛋白质的术语“异源的”,是指外来的,即“外源 的”,例如在自然界中未发现的化合物,例如在天然(理解为天然存在的或野生型)蛋白质

中;或者在天然产物中发现的化合物。然而,在异源构建体(例如采用异源核酸序列或氨基酸序列)的上下文中,例如天然产物或部分天然产物的人工融合,在自然界中未发现其人工融合。

[0255] 具体地,本发明所述的疫苗抗原包含异源元件,其可以是蛋白质(或蛋白结构域),例如,100、200、300、400、500、600、700、800、900或至少1000个氨基酸长度中的至少任何一个的蛋白质(或蛋白结构域),或是多肽,例如至少20、30、40、50、60、70、80、90或100个氨基酸长度的多肽。具体地,异源元件是更大的结构的一部分,例如疫苗抗原,其元件是外源的,如此使得它对于如在天然蛋白质中发现的这种更大的结构的其它部分是外来的,或者对于其它部分不是外来的,但以非自然方式的设置。示例性异源元件可以与其它部分融合,从而获得在自然界中未发现的融合蛋白。任意重组或人工核苷酸或氨基酸序列被理解为异源的。例如,不与天然存在的或在天然的分子中的分子的其它部分相关或融合(即不是自然相关或融合的)的分子的部分(“元件”)被理解为异源的。作为示例,如包含在重组融合蛋白中以连接这种融合蛋白的元件的任何人工连接序列是该融合蛋白的异源元件。

[0256] 本发明所述疫苗抗原中包含的具体示例性异源元件是源自SARS-CoV-2以外的病毒的病毒多肽或蛋白质,例如HBV PreS多肽。

[0257] 本发明所述疫苗抗原中包含的另一具体示例性异源元件是额外的RBD(异源RBD),其源自SARS-CoV-2(或其突变体)或任意其它 β -冠状病毒,或者其是通过诱变获得的人工突变RBD,以包含如在多种SARS-CoV-2突变体中的一种或多种中产生的一个或多个相关的点突变。这种异源RBD可以与疫苗抗原包含的其他RBD融合,从而获得至少RBD二聚体或三聚体。

[0258] 如本发明所用的关于多肽、蛋白质或核酸分子(疫苗抗原和编码如本发明所述的此类疫苗抗原的核酸分子)的术语“分离的”或“分离”,应是指已从与其自然关联的环境中充分分离的化合物,从而以“纯化的”或“实质纯净”的形式存在。然而,“分离”并不一定意味着排除人工或合成的融合体或其它化合物或材料的混合物,或排除不干扰基本活性的杂质,例如,可以存在由于纯化不完全的杂质。分离的化合物可以进一步配制以生产其制剂,并且仍然出于实际目的被分离,例如,本发明所述的一组肽或相应的肽融合体可以与药理学上可接受的载体(包括那些适用于分析、诊断、预防或治疗应用的载体)或辅料(但用在诊断、药物治疗中或用于分析目的时)混合。

[0259] 本发明所用的术语“纯化的”应是指含有至少50%(w/w总蛋白),优选地,化合物的至少60%、70%、80%、90%或95%的制剂(例如,本发明所述的疫苗抗原)。高度纯化的产品基本不含有污染蛋白,并且优选地,具有至少为70%的纯度,更优选地,至少为80%,或至少为90%,或者甚至至少95%,高达100%的纯度。纯度是通过适合于该化合物的方法测定的(例如,色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、HPLC分析以及类似方法)。本发明所述的分离的、纯化的疫苗抗原可以作为通过纯化从细胞培养上清液中的宿主细胞培养物表达的产物得到的重组产物而得到,以减少或去除宿主细胞杂质或细胞碎片。

[0260] 作为用于获得纯化多肽或蛋白产物的分离和纯化方法,利用溶解度差异的方法,如盐析和溶剂沉淀,利用分子量差异的方法,如超滤和凝胶电泳,利用电荷差异的方法,如离子交换色谱,利用特异亲和性的方法,如亲和色谱,利用疏水性差异的方法,如反相高效液相色谱法,以及利用等电点差异的方法,如等电聚焦,都可以使用。可使用以下标准方法:

通过微滤或切向流过滤器 (TFF) 或离心分离和洗涤细胞 (碎片), 通过沉淀或热处理纯化蛋白质, 通过酶消化活化蛋白质, 通过色谱纯化蛋白质, 如离子交换 (IEX)、疏水色谱 (HIC)、亲和色谱、分子排阻 (SEC) 或 HPLC 色谱、蛋白质浓缩沉淀和超滤洗涤步骤。分离并纯化的蛋白质可以通过常规方法进行鉴定, 如免疫印迹法、HPLC、活性试验或 ELISA。

[0261] 对于本发明所述的核酸分子, 有时使用术语“分离的核酸”。当应用于 DNA 时, 此术语是指在其起源的生物体中的天然存在的基因组中与 DNA 分子紧密邻接的序列中分离出来的 DNA 分子。例如, “分离的核酸”可以包括插入至载体中的 DNA 分子, 例如质粒或病毒载体, 或整合到原核或真核细胞或宿主生物的基因组 DNA 中的 DNA 分子。当应用于 RNA 时, 术语“分离的核酸”主要是指由如上文所定义的分离的 DNA 分子编码的 RNA (例如 mRNA) 分子。或者, 该术语可以指已从与在其自然状态下 (即在细胞或组织中) 与其相关联的其它核酸充分分离的 RNA 分子。“分离的核酸” (DNA 或 RNA) 可以进一步表示通过生物或合成手段直接产生的分子, 并在其生产期间从其它存在的成分中分离。

[0262] 关于多肽或蛋白质, 术语“分离的”应具体是指不含有或基本上不含有与它们自然关联的物质的化合物, 例如在其天然环境中或在制备它们的环境 (例如细胞培养) 中 (当这种制备是通过在体外或体内实施的重组 DNA 技术时) 发现的其它化合物。分离的化合物可以与稀释剂或佐剂配制, 并且仍然出于实际目的被分离。例如, 当用在诊断或治疗中时, 多肽或多核苷酸可以与药学上可接受的载体或赋形剂混合。

[0263] 本发明使用的术语“核酸分子”是指包含多核苷酸序列的 DNA (包括例如 cDNA) 或 RNA (包括例如 mRNA) 分子。该分子可以是 5' 到 3' 末端读取的脱氧核糖核苷酸碱基或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。该术语包括编码序列, 如基因、人工多核苷酸, 如包含在表达相应多肽序列的表达构建体中。可使用包含简并为任何序列或简并序列的组别的核苷酸序列, 或包含在宿主中改善表达的密码子优化序列的 DNA 或 RNA 分子。例如, 可以使用特定的真核宿主细胞密码子优化序列。可以使用特定的 RNA 分子来提供相应的 RNA 疫苗。

[0264] 重组核酸可以是具有非自然产生的序列的核酸, 或者可以是具有由序列的两个其它的分片人工组合而成的序列的核酸。这种人工组合通常通过化学合成完成, 或更常见地, 通过核酸的分片的人工操作完成, 例如, 通过本领域熟知的基因工程技术。例如, 核酸可以使用天然存在的核苷酸或多种修饰的核苷酸进行化学合成, 这些核酸设计为增加分子的生物稳定性或增加杂交形成的双链的物理稳定性。

[0265] 如本发明所使用的, 可以例如通过将一定数量的点突变引入亲本氨基酸序列来提供如在野生型源病毒 (如 SARS 病毒或肝炎病毒) 中自然存在的天然存在或天然蛋白质或多肽的突变体, 如 SARS-CoV-2 或 HBV PreS 的 RBD。具体地, 使用诱变方法以引入一个或多个点突变。

[0266] 如本发明所述的点突变通常是核苷酸序列内的一个或多个核苷酸的缺失、插入和/或取代中的至少一个, 以实现在由所述核苷酸序列编码的氨基酸序列内某一限定位置处的一个 (仅单一) 氨基酸的缺失、插入和/或取代。因此, 本发明使用的术语“点突变”应是指核苷酸序列或氨基酸序列的突变。具体地, 优选的点突变是取代, 特别是保守取代。保守取代是那些发生在侧链和化学性质相关的氨基酸的家族内的取代, 这些氨基酸的。这类家族的示例是具有碱性侧链、具有酸性侧链、具有非极性脂肪侧链、具有非极性芳香侧链、具有不带电极性侧链、具有小侧链、具有大侧链等的氨基酸。优选的点突变是指具有相同极性

和/或电荷的氨基酸的替换。在这方面,氨基酸是指由64个三重密码子编码的20种天然存在的氨基酸。这20种氨基酸可以分为带中性电荷、正电荷和负电荷的氨基酸:

[0267] 具体的诱变方法在序列中提供一个或多个核苷酸的点突变,在一些实施方式中,串联点突变,如在亲本分子的核苷酸序列内改变至少或最多2、3、4或5个连续核苷酸。

[0268] 本发明使用的术语“诱变”应是指制备或提供核苷酸序列和由所述核苷酸序列编码的相应蛋白质的突变体的方法,例如,通过插入、缺失和/或取代一个或多个核苷酸,从而获得在编码区域中有至少一个改变的其变体。可以通过随机、半随机或定点突变进行诱变。诱变方法可以包括工程化核酸或使用相应的亲本序列信息作为模板重新合成核苷酸序列的方法。

[0269] 本发明所述的任意示例性蛋白质或多肽都可以,例如,用作亲本分子并被修饰以产生变体和突变,其与亲本分子具有基本相同或甚至改进的免疫原性效果,或者其可以包括在病毒的一个或多个不同的野生型突变体中发现的一个或多个点突变。例如,可以通过诱变编码源自野生型源病毒(如SARS-CoV-2或HBV)的蛋白或多肽的选定亲本核苷酸序列来制备核苷酸序列库。根据具体所需的基因型或表型,可以产生变体库并选择相应的蛋白质或多肽的合适突变体。

[0270] 如本发明所用的,关于病毒种或病毒蛋白的术语“突变体”,也称为“变体”,应包括所有天然存在的或人工合成的化合物,其通过至少一个改变亲本化合物的结构或氨基酸序列的突变而不同于对应的原始(亲本)化合物。突变体可以在至少一个可以改变免疫原性或相应的抗体应答的氨基酸上不同,由此使得由亲本化合物诱导的抗体不再识别突变体化合物。为了涵盖这些突变体,优选地,诱变亲本疫苗抗原(或其一部分,例如,在疫苗抗原中所包含的至少一种或至少两种RBD),由此使得在一个或多个(多种)突变体中天然存在的所有相关点突变都包含在诱变的疫苗抗原中,从而具有诱导不仅涵盖亲本疫苗抗原的源病毒(或源自此源病毒的一部分),而且还涵盖其特征为一个或多个所述相关点突变的相应突变病毒的保护性免疫应答的效果。

[0271] 如本发明所用的关于蛋白质或多肽、或特定点突变的术语“天然存在的”应被理解为在野生型生物体或病毒(包括野生型突变病毒)中发现(发生)的。突变体可以是天然存在的或人工的。在本发明中的天然存在的(也称为“野生型”)蛋白质或多肽也被称为“天然的”。本发明具体涉及天然RBD,其具体被理解为由结构、折叠和/或功能定义的分子,其是在SARS-CoV-2病毒(或SARS病毒)中、或其天然存在的突变体中天然存在的RBD。具体地,如本发明所述的天然RBD的二级结构、折叠和/或功能被发现于、或对应于在SARS-CoV-2病毒(或SARS病毒)、或在其天然存在的突变体中的、或本质上至少,例如20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%相同或100%相同中的任意一种。具体地,天然RBD具有如在融合前或融合后构象中的折叠结构。

[0272] 如果点突变也包含在源自突变病毒的天然蛋白质或多肽中,则点突变被理解为天然存在的点突变。

[0273] 具体地,本发明所述疫苗抗原的一个或多个RBD可以是源自源病毒的天然RBD,或诱变以包含一个或多个已知在源病毒的任意一个或多个突变体中包含的额外的点突变。应当理解的是,并非所有包含在诱变的RBD中的点突变都需要源自同一突变体。一个或多个点突变可以源自同一突变体,且一个或多个其它点突变可以起源于其他突变体。

[0274] 如本发明所用的关于针对目标病毒的抗体的术语“中和”在本发明中的理解如下。具体地,中和抗体防止SARS-CoV-2感染相应的宿主细胞。这可以通过抑制病毒结合其受体ACE2来实现,也可以通过抑制病毒与宿主细胞膜的融合来实现。中和性SARS-CoV-2抗体可以通过经典的病毒中和试验(VNT)进行检测,也可以在RBD-ACE2相互作用试验中检测。如本发明所述的SARS-CoV-2中和抗体,由于其特定功能,有望保护宿主免受病毒感染。

[0275] 针对病毒株的中和活性可以在基于细胞的试验中以及体内进行测试。可以,例如,通过在抗体存在的情况下计数病毒滴度并在基于细胞的感染试验中检测细胞病变效应来测定中和抗体。叙利亚仓鼠模型(Imai M等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2020;117(28):16587-16595)是用于检测针对SARS-CoV-2中和活性的一种可能的体内模型。

[0276] 针对目标病毒的“保护性免疫应答”在本发明中的理解如下。保护性免疫应答将保护宿主免受病毒感染和/或保护宿主免受严重COVID-19疾病的侵袭。

[0277] 针对SARS-CoV-2的保护性免疫应答可以使用SARS-CoV-2感染的体内模型来测定。当疫苗抗原被设计为诱导保护性免疫时,可以,例如通过用疫苗抗原免疫动物,并用SARS-CoV-2对动物进行挑战来对其测试。或者,对动物进行免疫,并随后如本发明所述对其抗体的病毒中和能力进行测试。

[0278] 如本发明所用的关于天然存在的蛋白质或多肽或病毒种的术语“起源”或“来源”在本发明中应理解为定义与相应的天然存在的序列(其被理解为来源)相同,或可通过修饰天然存在的(源)序列以产生它的突变体或衍生物的相应氨基酸序列。这样的突变体在本发明中被理解为源自该来源的突变体。

[0279] 根据具体实施方式,本发明所述的疫苗抗原作为重组多肽来生产,例如通过重组DNA技术生产。

[0280] 如本发明所用,术语“重组”是指在宿主细胞中非天然存在的分子或构建体。在一些实施方式中,重组核酸分子含有以非自然存在的方式连接在一起的两个或多个天然存在的序列。重组蛋白是指由重组核酸编码和/或表达的蛋白质。在一些实施方式中,“重组细胞”表达在细胞的自然(即非重组)形式中未以相同形式发现的基因和/或表达由于有意的人为干预而异常的过度表达、低表达和/或根本不表达的自然基因。重组细胞含有至少一种重组多核苷酸或多肽。“重组”、“重组的”和产生“被重组的”核酸通常包括至少两个核酸片段的组装。

[0281] 如本发明所用的术语“重组”具体是指“通过基因工程制备或基因工程化的结果”,即通过人类干预。重组核苷酸序列可以通过在亲本核苷酸序列中引入一个或多个点突变来工程化,并且可以在包含包括这种重组核苷酸序列的表达盒的重组宿主细胞中表达。通过这种表达盒和宿主细胞分别表达的多肽也被称为“重组”。为了本发明所述的目的,可以采用本领域技术内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。本发明描述的具体实施方式是指疫苗抗原的生产,以及用于这种生产的重组手段,包括编码氨基酸序列的核酸、表达盒、包含编码待表达的氨基酸序列的核酸的载体或质粒,以及包含任何此类手段的宿主细胞。合适的标准重组DNA技术是本领域已知的,并描述于Sambrook等人,分子克隆:实验室手册”(1989),第2版(冷泉港实验室出版社)中。

[0282] 用于生产融合蛋白的方法是本领域熟知的,并可以在标准的分子生物学参考文献(例如Sambrook等人(《分子克隆》,第2版,冷泉港实验室出版社,1989年)和Ausubel等人

(《精编分子生物学实验指南》,第3版;威利父子出版社,1995年)中找到。通常,通过首先构建融合基因(将其插入合适的表达载体中),然后使用其转染合适的宿主细胞,从而产生融合蛋白。重组融合构建体可以通过一系列限制性内切酶消化和连接反应产生,其导致目的序列被整合到质粒中,或者通过特定的基因编辑技术产生。合成的寡核苷酸适配体或连接体可以如本领域技术人员所知的并在上述引用的参考文献中所描述的那样使用。待融合的融合蛋白的元件可以在插入至合适的表达构建体或载体中之前组装。在载体内插入序列应当在框架内,从而序列可以被转录成蛋白质。DNA构建体的组装在本领域是常规的,并且对本领域技术人员而言可以是容易完成的。

[0283] 与亲本核苷酸或氨基酸序列相比的变体或突变体的术语“序列同一性”表示两个或多个序列的同一性程度。两个或多个的氨基酸序列可以在相应的位置处具有相同残基,在一定程度上,最高100%。两个或多个核苷酸序列可以在相应的位置处具有相同或保守的碱基对,在一定程度上,最高100%。

[0284] 序列相似性检索是一种有效且可靠的策略,用于识别具有超量(例如至少80%)序列同一性的同源物。常用的序列相似性检索工具为,例如BLAST、FASTA和HMMER。

[0285] 如本发明所用的关于氨基酸序列的术语“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在对齐序列并在必要时引入间隔以实现最大序列同一性百分比后,在候选序列中与特定多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在被比较的序列全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0286] 出于本发明所述的目的,可以使用具有如下示例参数的NCBI BLAST程序版本BLASTP 2.8.1确定两个氨基酸序列之间的序列一致性:Program:blastp,Word size:6,Expect value:10,Hitlist size:100,Gapcosts:11.1,Matrix:BLOSUM62,Filter string:F,Compositional adjustment:Conditional compositional score matrix adjustment。

[0287] 使用默认设置(Matrix:EBLOSUM62;Gap open:10;Gap extend:0.5;End Gap Penalty:false;End Gap Open:10;End Gap Extend:0.5)的EMBOSS Needle web服务器(成对蛋白质序列比对;EMBLEBI,Wellcome Genome Campus,Hinxton,Cambridgeshire,CB101SD UK)对两个氨基酸序列沿其全长进行成对蛋白质序列比对。EMBOSS Needle使用Needleman-Wunsch比对算法找到两个输入序列的最佳比对(包括间隔),并将其最佳全局序列比对写入文件。

[0288] 如本发明中所用的关于核苷酸序列的术语“同一性百分比(%)”被定义为在对齐序列并在必要时引入间隔以实现最大序列同一性百分比后,在候选DNA序列中与DNA序列中的核苷酸相同的核苷酸的百分比,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。用于确定百分比核苷酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术内的多种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在被比较的序列全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0289] 对于本发明所述的目的(除非另有说明),可以使用具有以下示例性参数的NCBI BLAST程序版本BLASTN 2.8.1来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性:Program:25blastn,Word size:11,Expect threshold:10,Hitlist size:100,Gap Costs:5.2,Match/Mismatch Scores:2,-3,Filter string:Low complexity regions,标记仅用于查

找表。

[0290] 如本发明所用的术语“亚单位疫苗”是指将病原体的一种或多种抗原呈现给免疫系统而不引入整个病原体的疫苗制剂。亚单位疫苗可含有至少一种抗原或免疫原,或其包含至少两种相似或不相似的抗原或免疫原,其可引起对分子或感染性抗原的免疫应答。具体地,本发明所述的疫苗抗原是包含至少两个折叠RBD作为免疫原的亚单位疫苗抗原。

[0291] 在本发明中,术语“受试者”被理解为包括人类或哺乳动物受试者,包括家畜动物、伴侣动物和实验动物,特别是人类,其是患有特定疾病状况的患者或健康受试者。具体地,本发明所述的治疗和医疗用途适用于有预防或治疗SARS-CoV-2感染相关的疾病状况需求的受试者。具体地,可以通过干扰疾病状况(其中SARS-CoV-2是疾病的病因)的发病机制来治疗。受试者可以是处于这种疾病状况风险中或患有疾病的受试者。

[0292] 术语“处于某种疾病状况的风险中”是指可能发展出这种疾病状况的受试者,例如,通过某种易感性暴露于病毒或病毒感染的受试者中,或已经在不同阶段患有这种疾病状况,特别是与其它致病条件或其它条件或由于病毒感染而引起的并发症相关。

[0293] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人类和其它哺乳动物受试者。本发明所述的受试者可以是患者或健康受试者。

[0294] 如本发明所用的术语“治疗”应始终是指以预防(即预防感染和/或疾病状态)或治疗(即治疗疾病,无论其发病机制如何)为目的治疗受试者。本发明所述的疫苗抗原具体被提供用于主动免疫治疗。

[0295] 具体地,术语“预防”是指旨在包括预防发病开始或减少发病风险的预防性措施的预防措施。

[0296] 本发明中所用的关于治疗受试者的术语“治疗”是指旨在治愈、改善、稳定、减少发病率或预防疾病、病理状况或障碍的受试者医疗管理,这些疾病、病理状况或障碍单独或一起被理解为“疾病状况”。

[0297] 本发明所述的疫苗具体包括有效量的疫苗抗原,其在本发明中具体被理解为“免疫有效量”。

[0298] “免疫有效量”是指在治疗或预防性治疗目的的基础上,以单剂量或作为一系列剂量的部分的方式施用给受试者的该量的给药是有效的。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间内有效地达到所需的预防结果,例如预防目标病毒感染或抑制目标病毒疾病的发生或进展的量。该量将根据待治疗的受试者的健康和身体状况、年龄、受试者免疫系统合成抗体的能力、所需免疫应答的类型和程度、疫苗的配方以及其它条件而变化。

[0299] 有效量或剂量范围可以是0.001至1mg,例如在0.05至0.15mg之间,例如约0.1mg,将有效量或剂量的疫苗抗原施用给需要其的受试者,例如成人受试者。例如,疫苗抗原的有效剂量能够在抗体滴度有效水平的受试者中引起免疫应答,以结合并中和目标病毒种,例如在免疫接种后1-3个月后。可以通过在从受试者中采集的血液样本中的对应的抗体(特别是通过测定中和抗体)滴度来测定有效性。也可以通过测定病毒特异性T细胞应答来完成。

[0300] 在一些实施方式中,有效量是当作为特定给药方案的一部分(例如单次给药或如在“增强”方案中的一系列给药)施用或与有益效果相关的量。对于治疗,本发明所述的疫苗可一次施用,或可以在时间间隔中分为单组分和/或若干较小剂量施用。通常,在通过根据本发明疫苗的第一次注射初免疫受试者后,可以通过相同或不同的给药途径在一段时间内

进行一次或多次加强注射。在使用多次注射时,可以在前次注射的1至52周内进行后续注射。

[0301] 本发明所述的疫苗可以包含免疫原性配方中的疫苗抗原。具体实施方式包括一种或多种佐剂和/或药学上可接受的赋形剂或载体。

[0302] 用于促进特定给药方式的药物载体是本领域众所周知的。具体实施方式是指免疫原性制剂,其包含药学上可接受的载体和/或佐剂,其触发体液(B细胞,抗体),辅助或细胞毒性(T细胞)免疫应答。具体地,佐剂可用于增强疫苗有效性。佐剂可被直接添加到疫苗组合物中或可被单独施用,与疫苗抗原同时施用或在施用疫苗抗原之前不久或之后不久施用。

[0303] 如本发明所用的术语“佐剂”具体是指当与抗原联合施用增强和/或重定向对抗原的免疫应答,但当单独施用时不产生对抗原的免疫应答的化合物。佐剂可以通过几种机制增强免疫应答,包括募集淋巴细胞、刺激B细胞和/或T细胞、以及刺激巨噬细胞和其它抗原呈递细胞,例如树突细胞。

[0304] 佐剂的“有效量”可用于本发明所述的疫苗中,其具体被理解为增强对免疫原免疫应答的量,从而,例如需要更低或更少的免疫原性组合物剂量来产生特异性免疫应答和相应的预防或对抗病毒感染或疾病的效果。

[0305] 药学上可接受的载体通常包括与由本发明提供的抗体或相关组合物或组合具有生理相容性的任意和所有合适的溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收缓释剂以及类似物。药学上可接受载体的具体示例包括无菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲生理盐水、葡萄糖、甘油、乙醇、聚乙二醇及其类似物,以及它们的任意组合。其它的药学上可接受的载体是本领域已知的,并描述于例如Remington:《药学的科学与实践》,第22次修订版(Allen Jr, LV, ed., Pharmaceutical Press, 2012)中。液体制剂可以是溶液、乳剂或悬浮液,并且可以包含赋形剂,如悬浮剂、增溶剂、表面活性剂、防腐剂和螯合剂。示例性的载体是脂质体或阳离子肽。

[0306] 优选的制剂是即用的、存储稳定的形式,具有至少一年或两年的保质期。本发明还提供了一种递送装置,例如,预填充有根据本发明的疫苗的注射器。

[0307] 本发明所述的疫苗可以通过疫苗领域/领域内已知的常规途径给药,例如通过肠道外(例如皮下、皮内、肌内、静脉或腹腔内)途径、粘膜(例如眼、鼻、肺、口腔、胃、肠、直肠、阴道或尿道)表面,或通过局部施用于皮肤(如通过贴片)。给药途径的选择取决于一系列参数,例如疫苗中使用的佐剂。如果使用粘膜佐剂,鼻内或口服途径是优选的。如果使用脂质制剂或铝化合物,肠道外途径是优选的,皮下或肌内途径是最优选。选择也取决于疫苗剂的性质。

[0308] 因此,本发明提供了新型疫苗抗原、疫苗和改进疫苗抗原以诱导中和性免疫应答的方法,特别是赋予针对SARS-CoV-2的消除性免疫和保护的中和性IgG抗体。

[0309] 感染患者血清的病毒中和活性被发现与RBD构象表位的特异性IgG抗体(而非RBD连续表位特异性IgG抗体)和它们阻止RBD结合人受体血管紧张素转换酶2(ACE2)的能力高度相关。

[0310] 只有用折叠的RBD,而非未折叠进行免疫诱导针对具有高病毒中和活性的构象表位的抗体。需要保护的RBD构象表位在当前出现的病毒变体中似乎没有改变,并且因此,赋

予针对此类病毒变体的保护是最为重要的。这些结果对于评估自然感染或接种疫苗后的抗体应答的保护活性以及对于可以诱导高水平的赋予消除性免疫的SARS-CoV-2中和抗体的疫苗的设计具有重要意义。

[0311] 本发明描述了在大量临床特征良好的COVID-19康复患者中的多克隆抗体应答的图谱,该COVID-19康复患者具有一组全面的微阵列的折叠和未折叠的SARS-CoV-2蛋白和S衍生肽,其与它们的病毒中和活性和抑制RBD-ACE2相互作用的能力相关。对通过用折叠或未折叠的RBD进行免疫诱导的实验抗体应答进行中和潜能分析。发现针对如在折叠RBD结构中的RBD构象表位的多克隆抗体应答需要高度有效地中和SARS-CoV-2,并且发现可以用折叠RBD免疫诱导这种应答。

[0312] 参考以下实施例将可以更充分地理解上述说明。然而,这些实施例仅代表实施本发明的一个或多个实施方式的方法,且不应被理解为限制本发明的范围。

[0313] 实施例

[0314] 实施例1:疫苗抗原的产生,构建体1 (RBD-preS-RBD,SEQ ID NO:14) 和构建体3 (RBD-L-RBD-L-RBD,SEQ ID NO:16)

[0315] 包含折叠RBD的融合蛋白在HEK细胞中的表达

[0316] pcDNA3.1中的目的基因购自Genscript (Leiden, 荷兰),并为了在HEK细胞中表达,进行密码子优化。为了在哺乳动物细胞中的表达,其含有CMV增强子和启动子、IL-2信号肽、 β -珠蛋白polyAterm和潮霉素抗性元件。为了在大肠杆菌中扩增质粒DNA,该载体含有pUC-Minimal-ORI。该质粒在XL-21大肠杆菌中扩增。

[0317] 根据生产说明书将质粒DNA与Expi Fectamine™混合,并滴加到Expi293 HEK细胞 (Thermo Fisher Scientific)中(4×10^6 个细胞/ml)。细胞在37°C孵化器中的具有相对湿度 $\geq 80\%$ 和8%CO₂的轨道摇床平台上孵育4-6天。通过离心收集细胞,并如(Gattinger等人,EBioMedicine.2019;39:33-43)所述的进行Ni²⁺亲和纯化。

[0318] 包含折叠RBD的疫苗抗原是通过RBD二聚体与异源元件融合产生的。示例性的疫苗抗原:构建体1 (RBD-PreS-RBD,SEQ ID NO:14) 和构建体3 (RBD-L-RBD-L-RBD,SEQ ID NO:16)。

[0319] 根据本实施例,使用含有肝细胞结构域上的HBV与NTCP (钠牛磺酸胆酸钠共转运多肽)受体结合位点的HBV表面抗原的PreS蛋白作为免疫原性载体蛋白(图10a)。

[0320] 包含未折叠RBD的融合蛋白在大肠杆菌中的表达

[0321] 将合成基因克隆到质粒pET27b的NdeI和XhoI位点,转化至大肠杆菌BL21-DE3 (Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA)中。在OD₆₀₀达到0.5后,在含有卡那霉素和1mM IPTG (Roth,Karlsruhe,德国)的液体LB培养基中诱导表达重组蛋白。通过离心2.5小时后收获大肠杆菌细胞并用6M GuHCl pH 6.3在4°C下对颗粒进行2小时裂解。离心后,Ni-NTA琼脂糖 (Qiagen,Hilden,德国)孵育上清液4小时,用50倍床体积的100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、8M尿素pH 6.4洗涤,并用100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM Hepes、8M尿素,pH 4.5洗涤。然后用20mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM Hepes,pH 4.5进行逐步透析。

[0322] 实施例2:在SARS-CoV-2-ACE2相互作用试验中测定RBD折叠和功能

[0323] 为了评估RBD是否是功能性的以及结合其受体ACE2,可以使用模拟结合其受体ACE2的SARS-CoV-2的分子相互作用试验。该ELISA试验基于板结合的重组ACE2,例如,其允

许结合如(Gattinger P等人, Allergy. 2021; 76(3):878-883)所述的重组His标记的RBD。然后用小鼠单克隆抗His抗体,接着HRP标记的抗小鼠IgG₁第二抗体检测结合的RBD。

[0324] 使用该试验,RBD与ACE2的特异性结合以剂量依赖性和特异性的方式发生,而阴性对照蛋白,含半胱氨酸的His标记的重组Parietaria过敏原Par j 2,不与ACE2结合。从RBD测量的光密度中减去阴性对照蛋白加上3倍标准差得到反映结合的光密度水平,以用于确定RBD是否能特异性结合。为了额外的对照,可以通过与可溶性ACE2预孵育来特异性阻断RBD与ACE2的结合(Gattinger P等人, Allergy. 2021; 76(3):878-883)。通过用阴性对照蛋白代替ACE2的预试验,如重组桦树花粉主要过敏原Bet v 1(不影响RBD与ACE2的结合(Gattinger P等人, Allergy. 2021; 76(3):878-883)),所显示的来进一步对照该对照试验。

[0325] 根据该具体实施例进行相互作用试验,简单来说:在NUNC Maxisorb 96孔板(Thermofisher)上将人ACE2蛋白(GenScript)在碳酸氢盐缓冲液中包被(2μg/ml)过夜。板用洗涤缓冲液冲洗3次,然后在常温下用封闭液封闭3小时。同时,将血清样品在PBS、0.05%吐温20、1%BSA中以1:2稀释,并与200ng His标记的RBD(GenScript)孵育2小时。对于对照方案,10μg/ml ACE2蛋白(阳性对照)和10μg/ml Bet v 1(阴性对照)与100ng His标记的RBD预孵育。

[0326] 通过将预孵育的RBD样品加入至包被并封闭后的ACE2蛋白中进行覆盖,然后孵育3小时。洗涤板并用1:1000稀释的小鼠抗His标签抗体(Dianova, Hamburg, 德国)孵育过夜。洗涤3次后,1:1000稀释的HRP连接的小鼠IgG₁抗体(GE Healthcare)孵育2小时,并通过ABTS进行检测。对应于结合RBD的量的平均光密度(O.D.)值在405nm和492nm(参考)处用具有集成软件i-control 2.0(Tecan Group Ltd., Männedorf, 瑞士)的TECAN Infinite F5ELISA读取器测定。在阻断实验中,ACE2蛋白和Bet v 1分别作为阳性对照和阴性对照。从每次测量中减去缓冲液对照(无RBD覆盖)。所有的测定都是重复进行的,且结果显示为偏差<5%的平均值。抑制百分比计算如下:

[0327] 抑制百分率(%) = $(OD_{\text{Betv1}} - OD_{\text{血清}}) / (OD_{\text{Betv1}} - OD_{\text{ACE2}}) \times 100$

[0328] 实施例3:通过远紫外圆二色(CD)光谱法测定RBD折叠

[0329] 蛋白质的远紫外(紫外)CD光谱可以揭示其二级结构的重要特征。CD光谱便于用于评估处于α-螺旋构象、β-折叠构象、β-旋转构象或其它构象(例如,随机卷曲)形式的分子的比例。CD是一种标准技术和有价值的工具,特别是用于显示构象中的变化。其可以,例如,用于研究分子的二级结构如何作为温度或变性剂(如盐酸胍或尿素)浓度的函数而变化。因此,CD是用于在对其进行广泛和/或昂贵的实验之前验证蛋白质是处于天然构象的有价值的工具。

[0330] CD提供的具体结构信息比X射线晶体学和蛋白质NMR更少,例如,X射线晶体学和蛋白质NMR两者都提供原子分辨率数据。然而,CD光谱是一种不需要大量蛋白质或大量数据处理的快速的方法。因此,CD可以用来调查大量的溶剂条件、温度变化、pH、盐度和各种辅助因子的存在。

[0331] 通常,如果如远UV-CD光谱所示,存在至少20%的蛋白质以折叠构象的形式显示,优选地,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%中的任意一种的蛋白质以折叠构象的形式存在,则通过远UV-CD光谱测定天然RBD折叠。

[0332] 根据这个具体的实施例,进行圆二色光谱分析,简单来说:分别在蛋白浓度为0.1

和0.26mg/mL处,使用1mm径长的石英比色皿在Jasco J-810分光偏振计(Japan Spectroscopic Co.,东京,日本)上收集重组蛋白的远UV圆二色(CD)光谱。光谱测量范围为260至180nm,在50nm/min扫描速度时分辨率为0.5nm,并取三次扫描的平均值为结果。所有测量均在10mM Na₂HPO₄ pH 7中进行。通过减去相应的缓冲液光谱对最终的光谱进行基线校正。结果表示为给定波长下的平均残基椭圆率[θ]。利用二级结构预测程序CDSSTR计算重组蛋白的二级结构含量。

[0333] 实施例4:用折叠而非未折叠的RBD免疫诱导病毒中和抗体

[0334] 在HEK293细胞中表达的折叠RBD被吸附在氢氧化铝上(SERVA电泳,海德堡,德国),得到三种剂量配方,在0.5ml 50mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM HEPES、0.9%NaCl、pH4.5每蛋白质中,每0.75mg氢氧化铝分别含有20μg、40μg和80μg蛋白质。同样,由未折叠的受体结合结构域(RBD)和HBV衍生PreS(PreS-RBD)组成的融合蛋白被吸附在氢氧化铝上。对于对照方案,还制备了无蛋白质的混合物(在0.5ml 50mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM HEPES、0.9%NaCl、pH 4.5中包含0.75mg氢氧化铝)。在三周间隔内以每个蛋白剂量或对照配方3只兔皮下免疫4次(Charles River,Chatillon sur Chalaronne,法国)。在第一次免疫前(免疫前血清)和第一次免疫后第21、28、35、42和64天获得兔的血清样品。血清在使用前储存于-20℃。

[0335] 实施例5:SARS-CoV-2的中和需要针对构象受体结合结构域表位的抗体

[0336] 本实施例表明,SARS-CoV-2的中和需要针对构象受体结合结构域(RBD)表位的抗体,且这些抗体只能通过接种折叠RBD来诱导。

[0337] 对严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(SARS-CoV-2)的成功体液免疫应答的决定因素对于设计有效疫苗和评估暴露于该病毒所赋予的保护性免疫的程度至关重要。随着新型变种的出现,了解它们被群体抗体库抑制的可能性已经变得越来越重要。在本研究中,使用一组微阵列的结构折叠和结构未折叠的SARS-CoV-2蛋白,以及跨越病毒的表面刺突蛋白S和受体结合结构域(RBD)的连续肽,在大量的轻、重度COVID-19后的临床特征良好的患者中分析SARS-CoV-2多克隆抗体应答。S和RBD特异性抗体应答是由IgG主导(主要是IgG₁),并定向针对S2中的结构折叠的S和RBD以及三个不同的肽表位。患者血清的病毒中和活性与对于构象RBD表位特异,而非连续RBD表位特异的IgG抗体,以及它们阻止RBD与人受体血管紧张素转换酶2(ACE2)结合的能力高度相关。百分之二十的患者选择性缺乏RBD特异性IgG。只有用折叠RBD免疫,而非用未折叠RBD免疫,诱导针对构象表位的具有高病毒中和活性的抗体。所需用于保护的RBD构象表位似乎在目前出现的病毒变体中没有改变。这些结果对于预估自然感染或接种疫苗后的抗体应答的保护活性以及对于疫苗的设计是至关重要的,其能够诱导赋予消除性免疫的高水平的SARS-CoV-2中和抗体。

[0338] 重组蛋白和天然蛋白,合成肽

[0339] 编码受体结合亚基(S1)、膜融合亚基(S2)和由具有HBV衍生PreS(PreS-RBD)的受体结合结构域(RBD)组成的融合蛋白(35)(它们中的每一个都含有一个编码C-端六组氨酸标签的DNA和用于细菌表达的获得自ATG:biosynthetics(Merzhausen,德国)的优化密码子)的合成基因(SARS-CoV-2Genbank收录号.:QHD43416.1)(表1)。将合成基因克隆到质粒pET27b的Nde I和Xho I位点,转化进入大肠杆菌BL21-DE3(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,美国)。在OD₆₀₀达到0.5后,在含有卡那霉素和1mM IPTG(Roth,Karlsruhe,德国)

的液体LB培养基中诱导表达重组蛋白。通过离心2.5小时后收获大肠杆菌细胞并用6M GuHCl pH 6.3在4°C下对颗粒进行2小时裂解。离心后,Ni-NTA琼脂糖(Qiagen,Hilden,德国)孵育上清液4小时,用50倍床体积的100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、8M尿素pH 6.4洗涤,然后用100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM Hepes、8M尿素,pH 4.5洗涤。然后用20mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM Hepes、pH 4.5进行逐步透析。用Micro BCA蛋白检测试剂盒(Pierce,Rockford,Illinois,美国)测定蛋白浓度。His标记的对照蛋白、非糖基化和糖基化的马心脏肌红蛋白(HHM0、HHM2)的表达和纯化如所述的进行(36)。表1列出了在购买的大肠杆菌或真核系统中表达的纯化重组SARS-CoV-2蛋白。如前述(36)进行通过圆二色性分析对上述蛋白质的二级结构进行分析。表3列出了在微阵列中使用的天然和重组对照蛋白及其来源。

[0340] 如前所述(19、37),涵盖SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸序列的重叠25-30mer肽(Genbank收录号:QHD43416.1)(表2)固相合成法(通过使用9-苄基-甲氧基羰基(Fmoc)法在微波合成机Liberty blue(CEM-Liberty,Matthews,NC,USA and Applied Biosystems,Carlsbad,CA,美国)在Wang预载树脂(Merck,Darmstadt,德国)上)合成。然后,用50ml二氯甲烷(Roth,Karlsruhe,德国)洗涤树脂,并通过加入28.5ml三氟乙酸(Roth,Karlsruhe,德国)、0.75ml硅烷(SigmaAldrich,St.Louis,MO,美国)和0.575ml水并在室温下孵育2.5小时,以从树脂中裂解肽。如前所述(19、37)在预冷的叔丁基甲醚(Merck,Darmstadt,德国)中沉淀后,使用Aeris 5 μ m肽250 \times 21.2mm柱(Phenomenex,Torrance,CA,美国)进行反相HPLC纯化,并通过质谱(Microflex MALDI-TOF,Bruker,Billerica,MA,美国)进行分子量鉴定。在PyMOL(PyMOL分子图形系统,Version 2.5.0a0Schrödinger,LLC)中使用PDB条目6XR8计算肽13至21的溶剂可及表面积(表2)。使用1.4 Å的探针半径并在Å²中给出结果,以及将在无刺突蛋白环绕的肽时获得的理论溶剂可及面积的百分比用于计算。

[0341] 兔的免疫

[0342] 在大肠杆菌中表达的未折叠的PreS-RBD或在HEK293细胞中表达的折叠的RBD被吸附在氢氧化铝上(SERVA电泳,海德堡,德国),得到三种剂量配方,在0.5ml 50mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM HEPES、0.9%NaCl、pH 4.5每蛋白质中,每0.75mg氢氧化铝分别含有20 μ g、40 μ g和80 μ g蛋白质。同样,由未折叠的受体结合结构域(RBD)和HBV衍生的PreS(PreS-RBD)组成的融合蛋白被吸附在氢氧化铝上。对于对照方案,还制备了无蛋白质的混合物(在0.5ml 50mM NaH₂PO₄、10mM Tris、20mM HEPES、0.9%NaCl、pH 4.5中包含0.75mg氢氧化铝)。在三周间隔内以每个蛋白剂量或对照配方3只兔皮下免疫4次(Charles River,Chatillon sur Chalaronne,法国)。在第一次免疫前(免疫前血清)和第一次免疫后第21、28、35、42和64天获得兔的血清样品。血清在使用前储存于-20°C。

[0343] 通过ELISA检测特异性抗体反应

[0344] 如前所述(25),通过ELISA检测COVID-19康复患者和健康对照血清的人血清样本对SARS-CoV-2衍生蛋白的免疫球蛋白反应,具有以下改变:将2 μ g/ml等量的S或折叠RBD(Genscript,Leiden,荷兰)在NUNC Maxisorp 96孔板(ThermoFisher,Waltham,MA,美国)上包被过夜。用洗涤缓冲液(PBS,0.05%吐温20)洗涤板3次并在室温下封闭3小时后,将血清样本以1:40稀释并孵育过夜。洗涤板3次并用1:1000稀释的HRP结合的抗人IgG(BD, San Jose,CA,美国)孵育2小时,洗涤3次并用ABTS(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,美国)显影。结合的人IgM、IgA和IgG₁₋₄抗体如所述进行测定(38)。10分钟后,用Infinite F50 ELISA读取

器在405/492nm处测定光密度(Tecan, Männedorf, 瑞士)。

[0345] 兔IgG抗体对昆虫细胞表达的折叠S、HEK细胞表达的折叠RBD(Genscript, Leiden, 荷兰)和大肠杆菌表达的未折叠S1以及非糖基化His标记的对照蛋白HHMO的应答通过ELISA检测。每种蛋白以2 μ g/ml等量包被过夜,板在室温下封闭3小时并以2-10倍稀释度与兔血清孵育过夜。用1:1000稀释的驴抗兔辣根过氧化物酶偶联IgG抗体(GE Healthcare UK Limited, Chalfont St Giles, 英国)孵育2小时并随后进行如上所述的ABTS显影来检测结合的兔IgG。

[0346] 所有测量都是重复进行的,与平均值的偏差<5%,每个蛋白质和免疫球蛋白类或亚类的背景阈值水平(即对应缓冲对照的平均值加上其三倍标准差)被减去。

[0347] SARS-CoV-2微阵列

[0348] 含有被环氧树脂框架包围的六个微阵列的载玻片(Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, 德国)涂覆有具有胺反应性复合有机聚合物MCP-2(Lucidant Polymers, Sunnyvale, CA, 美国)。对每种蛋白/肽的斑点条件进行优化以获得尺寸相当的圆形致密斑点。对于最终的微阵列打印,使用SciFlexArrayer S12(Sciencion AG, Berlin, 德国)在磷酸盐缓冲液(75mM Na₂HPO₄, pH=8.4)中以0.5-1mg/ml的浓度以三重复的方式点出SARS-CoV-2抗原(19)。如下测定血清中IgG、IgM和IgA对微阵列蛋白和多肽的反应性:用PBST洗涤微阵列5分钟并通过离心干燥。随后,每个阵列加入35 μ l 1:40稀释的血清样品(样品稀释液, Thermofisher, Waltham, MA, 美国)并孵育2小时。在另一洗涤步骤后,使用30 μ l二抗并在室温下孵育30分钟。二抗分别是1 μ g/ml终浓度的DyLight 550(Pierce, Rockford, IL, 美国)标记的抗人IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, 美国)、抗人IgM或抗人IgA(均为BD, San Jose, CA, 美国)。再次清洗、干燥载玻片并随后使用共聚焦激光扫描仪(Tecan, Männedorf, 瑞士)进行扫描。通过MAPIX微阵列图像采集和分析软件(Innopsys, Carbonne, 法国)进行图像分析,并如前所述(参考文献19、37),将测量的荧光单位转换为ISAC标准化单位(ISU)。

[0349] 对于微阵列抑制实验,将人血清1:100稀释,在样本稀释液中兔血清1:800,并分别与折叠RBD、未折叠RBD、未折叠S1(10 μ g/ml)或等量的RBD衍生肽混合物(包含肽13-21)预孵育过夜(表2)。使用1 μ g/ml终浓度的DyLight 550标记的抗兔IgG抗体(Thermofisher, Waltham, MA, 美国)用于检测结合的兔IgG。如上所述进行微阵列测量和分析。

[0350] SARS-CoV-2VNT的测定和对RBD-ACE2相互作用的抑制

[0351] 如所述(参考文献25)进行分子相互作用试验,以检测患者血清对RBD与ACE2受体结合的抑制。简单来说,将1:2稀释的血清与HEK细胞表达的His标记的RBD孵育3小时,然后覆盖在结合ACE2的板上3小时。然后用小鼠单克隆抗His抗体,然后用HRP标记的抗小鼠IgG₁抗体检测并用ABTS检测结合的RBD。所有的测量都是重复进行的,误差<5%。如所述(39)进行SARS-CoV-2中和试验(VNT)。热灭活血清样品的两倍连续稀释液与50-100TCID₅₀ SARS-CoV-2在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。将混合物加入到Vero E6细胞(ATCC®CRL-1586)单层中,并在37 $^{\circ}$ C持续孵育3天。VNT表达为防止病毒诱导的细胞病变效应的血清稀释液的倒数。VNT滴度 \geq 10被认为阳性。

[0352] RBD肽和在刺突蛋白结构中报道过的RBD突变的可视化

[0353] 基于PDB条目6XR8,在PyMOL(PyMOL分子图形系统,Version 2.5.0a0,Schrödinger,LLC)中生成了SARS-CoV-2刺突蛋白的表面展示。目前在RBD中已知的突变来源于<https://spikemutants.exscalate4cov.eu/>。

[0354] 结果

[0355] 研究人群概述

[0356] 从2020年4月29日至2020年7月30日,253例SARS-CoV-2RT-PCR检测阳性和/或抗体检测阳性的COVID-19康复患者和235例年龄和性别匹配的无COVID-19体征或普通感冒样症状的对照受试者被纳入本研究。COVID-19患者组由139例(54.9%)症状轻微(肌痛和嗅觉丧失:59.7%;咳嗽:68.3%;发热:73.4%)患者组成,其在家中治疗,无需住院治疗;以及114例(45.1%)有严重症状,其曾住院并接受吸氧或重症监护治疗。轻症COVID-19患者无现肺炎,而65.8%的重症患者有肺炎。COVID-19患者的特征(即症状、合并症)与在其它研究中报道的相似(17)。与轻度COVID-19患者相比,有严重症状的患者显示出显著更高的心肺和内分泌合并症的患病率,特别是糖尿病和高血压。轻症组中的疲劳、肌痛和嗅觉丧失(59.7%)显著比重症组(42.2%)更加高频。轻和重症COVID-19患者与对照组中发生IgE相关过敏的比例相似。235名对照受试者在调查时SARS-CoV-2RT-PCR检测阴性,并且在就诊前10周内无常见感冒样症状。总体而言,对比对照个体,COVID-19患者中恶性肿瘤、内分泌或循环系统合并症的患病率显著更高。在SARS-CoV-2RT-PCR检测阳性约8周(平均61天,SD±13.7,最少19天,最多98天)后,采集COVID-19康复患者血样,其确保了它们已血清转化并且已经处于抗体生产的平台期(参考文献8、18)。为了区分SARS-CoV-2特异性抗体和通过早期感染普通感冒诱导的冠状病毒获得的抗体,在分析中包括了来自38名年龄匹配的对照受试者在COVID-19发生之前(即1996年至2019年夏季,历史对照)获得的血清。

[0357] 折叠和未折叠的SARS-CoV-2蛋白和S衍生肽的微阵列

[0358] 为了研究COVID-19患者同时针对每种血清的一组全面抗原的多克隆抗体应答,创建了一个包含一组SARS-CoV-2衍生抗原、S衍生肽和对照抗原的微阵列(以三重复的方式)(表1-3)。抗原在真核表达系统或大肠杆菌中表达,并根据圆二色性(CD)分析表现折叠或未折叠的蛋白质(表1)。跨越S蛋白的S衍生肽的长度约为30个氨基酸,特别是包括RBD(表2)。RBD衍生肽的表面暴露分析表明,肽13-15和18-20的表面暴露的氨基酸百分比最高(表2)。在RBD序列中不相邻的肽(如肽18和肽20)可能在RBD表面邻近出现。

[0359] 刺突蛋白特异性抗体主要是IgG并在患有重症COVID-19存活的患者中具有更高的滴度

[0360] 在第一组实验中,通过ELISA测量了COVID-19康复患者完整人群(轻症:n=139;重症;n=114)和235个对照组受试者中的对折叠S和RBD特异的IgG、IgG亚类、IgM和IgA水平。与轻症COVID-19患者相比,重症COVID-19患者对于S和RBD具有显著更高的IgG、IgM和IgA水平。S-和RBD特异性IgG水平高于IgM水平,而很少患者出现低IgA应答。S-和RBD特异性IgG、IgM和IgA应答之间没有发现显著相关性。

[0361] 在对照组中,7.6%(n=18)具有针对S和/或RBD的IgG。11名受试者在就诊前10周以上出现COVID-19样症状,而7名受试者(即2.9%)根本没有报告任何症状表明之前曾有无症状感染。

[0362] IgG亚类分析显示,与轻症COVID-19患者相比,在重症COVID-19患者中对S和RBD的

主要IgG₁应答的IgG₁水平显著更高。在23例COVID-19患者中发现了弱的S特异性IgG₂应答,但未检测到S特异性IgG₃或IgG₄。S-和RBD特异性IgG水平与IgG₁水平显著相关,但与IgG₂水平无显著相关。

[0363] 20%的COVID-19患者选择性缺乏RBD特异性IgG应答

[0364] 在253例COVID-19患者中,53例(即20.9%)缺乏RBD特异性IgG抗体。在这些RBD无应答者中,有比应答者更多的女性(56.6%与43%),她们的BMI(24.7与26.3)低于应答者的BMI,并且她们中轻症(75.5%)比重症COVID-19(24.5%)的比例明显更高。相比之下,在RBD应答者中轻症和重症COVID-19患者的百分比相同且他们的平均年龄(无应答者51.1岁vs应答者54.1岁)具有可比性。值得注意的是,绝大多数RBD无应答者(即83%)显示了对S和/或NP的IgG反应性,64.2%对S和NP有IgG反应性,且18.9%只对NP有IgG反应性。只有17%的无应答者缺乏S和NP特异性IgG。

[0365] 患者的病毒中和与高水平的针对RBD构象表位的IgG相关

[0366] 使用了微阵列技术评估抗体对一组全面的SARS-CoV-2蛋白和S衍生肽的反应性(参考文献19)。

[0367] 使用微阵列抗原评估COVID-19患者的IgG应答,该微阵列抗原主要针对折叠S、RBD、S1和S2。作为ISAC标准单位(ISU)测定的最高抗体水平发生在折叠蛋白(折叠S:6.8ISU-69.5ISU,平均值34.4ISU;折叠RBD:5.6ISU-93.6ISU;平均值72.5ISU;折叠S1:0.4ISU-31.4ISU,平均值8.1ISU;折叠S2:0.6ISU-28.3ISU,平均值8.5ISU),而未折叠RBD、S1和S2的IgG反应性可以忽略不计(未折叠RBD:0.2ISU-3.4ISU;平均值0.6ISU;未折叠S1:0.4ISU-7.1ISU,平均值1.3ISU;未折叠S2:0.3ISU-5.4ISU,平均值1.2ISU)。只有核衣壳蛋白(NP)对折叠蛋白和未折叠蛋白表现出相似的IgG反应性(NP折叠平均值:34.4ISU;NP未折叠平均值:44.6ISU)。除了四个S2衍生肽(肽25(平均值:15.4ISU)、肽32(平均值:11.1ISU)、肽33(平均值:30.8ISU)和肽46(平均值:24.4ISU))之外,对包括RBD衍生肽13-20的大多数S衍生的未折叠肽的IgG水平都很低,平均IgG远低于10ISU。这些肽显示对COVID-19患者血清的IgG反应性显著高于历史对照血清。另外两种多肽(即7和21)脱颖而出,因其它它们显示出可观的平均IgG水平(肽7:2.0ISU-66.8ISU,平均值8.8ISU,肽21:2.0ISU-42.8ISU,平均值6.8ISU),并且历史对照血清的IgG水平显著高于COVID-19患者的IgG水平。

[0368] 为了将COVID-19患者的血清的病毒中和滴度与应答特异性联系起来,根据他们的病毒中和滴度(VNT)将患者组成3组,VNT 10~80、VNT 120~240和VNT 320~640。图1显示了与对折叠S、S1(并尤其是折叠RBD)的IgG滴度相关的VNT。IgG水平随着VNT的显著增加并如下:VNT 10-80:S特异性IgG平均值:21.1ISU;S1特异性IgG平均值:3.7ISU;RBD特异性IgG平均值:54.4ISU;VNT 120-240:S特异性IgG平均值:42.1ISU;S1特异性IgG平均值:10.1ISU,RBD特异性IgG平均值:84.8ISU;VNT 320-640:S特异性IgG平均值:54.4ISU;S1特异性IgG平均值:15.4ISU;RBD特异性IgG平均值:93.1ISU(图1)。VNT与对折叠S、S1、S2和RBD的IgG水平之间高度且显著相关,但与未折叠S1、S2或RBD的IgG水平无关(图2A)。对于RBD衍生肽,发现VNT与特异性IgG水平之间没有(肽13、14、15、16、18、19、21)或有非常低(肽17、20)的相关性(图2A)。

[0369] 在对病毒起中和不起作用的NP(图1)以及RBD之外并因此不直接参与RBD与ACE2结合的三个S2衍生肽(即肽25、33和46)中也发现了特异性IgG水平大于15ISU且特异性IgG水

平与VNT存在关联。

[0370] 由于VNT与COVID-19患者中的针对折叠RBD的IgG抗体的水平显著相关,因此分析了VNT是否与患者血清抑制RBD与ACE2结合的能力相关。图2B显示,VNT确实与抑制COVID-19患者血清中RBD与ACE2结合有高度显著的相关性。

[0371] 进行了233例COVID-19患者血清阻断RBD与ACE2结合的能力的分析。对于该人群,发现RBD与ACE2结合的中位抑制率为24%。发现19.2%的患者抑制率大于50%,38.4%的患者中的抑制率20-50%范围内,42.4%的患者中发生抑制率小于20%。

[0372] 总之,这些结果表明,SARS-CoV-2的中和与针对折叠RBD构象表位的高水平IgG抗体及其抑制RBD与ACE2结合的能力有关。然而,患者抗体抑制RBD与ACE2结合的能力差异很大。

[0373] 仅折叠RBD而非连续的RBD肽抑制IgG与RBD构象表位的结合

[0374] 为了进一步研究构象RBD表位与连续RBD表位对患者IgG与RBD结合的重要性,进行了抑制实验。将患者的血清与含有构象表位的折叠RBD、与含有连续表位的未折叠S1或RBD衍生肽的混合物进行预孵育。出于对照目的,使用了不相关蛋白(牛血清白蛋白,BSA)。然后测定预吸附血清与折叠RBD、折叠S、未折叠S1、未折叠RBD和RBD衍生肽13-21的IgG结合(图3)。只有用折叠RBD与血清的预孵育,而非用未折叠S1或RBD衍生肽混合物与血清的预孵育显著抑制IgG对RBD上构象表位的结合,并减少IgG对折叠S的结合(图3)。在用折叠RBD、未折叠S1和RBD肽混合物与血清预孵育后,观察到IgG对未折叠RBD的低结合非显著性减少(图3)。通过用未折叠S1和RBD肽混合物预吸附,也观察到IgG对未折叠S1的低结合非显著性减少(图3)。血清与RBD肽混合物的预孵育减少了IgG对单个RBD衍生肽13-21的低结合,其中观察到肽13、17、18、20和21的显著性减少(数据未显示)。

[0375] 用折叠而非未折叠RBD免疫可诱导病毒中和抗体

[0376] 变性、合成或重组的未折叠抗原的免疫可用于诱导识别相应折叠抗原的抗体,以预防和/或治疗感染性疾病和过敏(20-23)。因此,研究了用未折叠RBD免疫是否可以诱导出表现高病毒中和活性的针对折叠RBD的IgG抗体。用三剂(20、40或80微克)含佐剂的未折叠或折叠RBD免疫各组兔,单独用佐剂作为对照目的。用未折叠RBD免疫诱导IgG对未折叠S1和未折叠RBD的反应性,但对折叠RBD几乎没有IgG应答(图4),而用折叠RBD免疫诱导针对折叠RBD的强IgG产生,但几乎没有针对未折叠RBD和未折叠S1的IgG抗体(图4)。在用折叠或未折叠RBD免疫的兔中,未观察到对不相关对照抗原(HHMO)的相关IgG应答(图4),并且在单独佐剂免疫的兔中,未观察到对任意测试抗原的IgG反应。用折叠RBD免疫的兔对折叠RBD和折叠S上的构象表位的IgG反应性仅通过用折叠RBD预吸附来抑制,而不通过用仅含有连续表位的未折叠S1或RBD衍生合成肽所抑制(图4Y)。用未折叠RBD免疫兔对未折叠蛋白和RBD衍生肽的低IgG结合仅被未折叠S1和/或RBD衍生肽所抑制(图4Z)。

[0377] 之后,在使用折叠或未折叠RBD进行第二和第三次免疫后获得的兔抗血清进行VNT检测(表4)。对于折叠RBD(40和80微克),在第三次免疫后获得的在240->1280之间的VNT。而未折叠RBD不能诱导任何VNT(表4)。这些结果表明,在免疫后诱导高VNT需要含有构象表位的折叠RBD。

[0378] 讨论

[0379] 在我们的COVID-19患者群体中获得的发现与另一项最近的群体研究一致,表明在

COVID-19患者中,SARS-CoV-2RBD的ACE2结合位点主导了多克隆中和抗体应答(参考文献9)。然而,我们的研究提供了关于保护性抗体应答特征的重要进展,并证明了如何通过实验动物中接种来诱导它。

[0380] 对253例COVID-19康复患者血清的分析表明,针对刺突蛋白和RBD的抗体应答由IgG同型决定,特别是由IgG₁亚类决定,其与先前的报道一致(参考文献24)。使用微阵列的折叠S,刺突蛋白(S1、S2、RBD)的折叠和未折叠部分以及跨越S的合成肽,本工作表明,患者血清中的VNT与针对构象但非连续RBD表位的IgG抗体水平高度相关。事实上,RBD衍生肽在RBD三维结构中的定位表明,非相邻的RBD衍生肽出现在RBD表面的相近邻近区域,其是不连续型构象表位形成所必需的。

[0381] 发现在COVID-19康复患者中多克隆抗体应答的大部分SARS-CoV-2中和活性可归因于针对构象而非针对连续RBD表位的IgG抗体的这一发现很重要,因为到目前为止,在目前报道的SARS-CoV-2变体的RBD中只观察到3个突变,其中只有一个(即E484K)出现在RBD表面,但似乎不参与ACE2相互作用。因此,来自COVID-19康复患者的针对构象RBD表位的IgG抗体可能与当前出现的SARS-CoV-2变体发生交叉反应并赋予交叉保护。

[0382] 我们研究的另一个有趣的结果为:20%的患者缺乏RBD特异性记忆IgG应答,尽管他们中的大多数人激发了针对S和NP上其它表位的SARS-CoV-2特异性IgG抗体。选择性缺乏RBD特异性IgG记忆应答的可能性因此包括遗传因素,如HLA限制和/或T辅助细胞或B细胞应答不足。缺乏RBD特异性记忆IgG应答的患者可能容易反复感染和传播病毒。

[0383] 无应答者缺乏RBD特异性IgG似乎不是严重疾病的因素,因为发现大多数RBD无应答者(即75.5%)患有轻症COVID-19。这可能是由于这些受试者的低病毒暴露、充分的早期RBD特异性IgM应答、和/或高度强效的特异性细胞免疫。此外,如果体液免疫应答导致补体固定和被感染细胞的病毒包膜或质膜的裂解,那么体液免疫应答可能是有效的,并且因此破坏病毒和受体之间相互作用通常不是抗病毒效力的先决条件。

[0384] 事实上,对于NP和三种S2衍生肽,也注意到VNT与高特异性抗体水平的关联性。NP特异性抗体不太可能在病毒中和中发挥作用,而针对S2衍生肽的IgG可能通过抑制病毒融合在病毒中和中发挥作用。在分子相互作用试验中对患者血清抑制RBD与ACE2结合的能力的分析表明,抗体抑制RBD与ACE2结合的能力与VNT相关,证实了针对RBD构象表位的抗体主要负责COVID-19患者多克隆抗体应答的病毒中和,而不是针对S2衍生表位的抗体。在230多例患者中,关于患者血清中是否存在能够抑制RBD与ACE结合的抗体的分析与早期在较小人群中获得的结果一致,表明这种阻断活性在患者之间可能存在很大差异(参考文献25)。因此,针对能够抑制RBD-ACE2相互作用的RBD构象表位的抗体似乎是评估疾病或疫苗接种后保护性SARS-CoV-2特异性免疫的重要参数。

[0385] 其它报告显示,对RBD外的表位或连续表位特异的单克隆抗体或富集的抗体组分可以具有SARS-CoV-2中和活性(参考文献7、26)。虽然该信息对于创造病毒的治疗性拮抗剂很有价值,但对于开发有效的疫苗策略来说它的相关性不太确定,对于开发有效的疫苗策略,了解中和应答的自然模式及其治疗意义很重要。在本发明上下文中,值得一提的是我们的分析还证实来在COVID-19大流行之前获得的历史对照血清中存在针对特定SARS-CoV-2肽的低抗体应答(参考文献27)。

[0386] SARS-CoV-2患者的血清中的大部分病毒中和活性可归因于针对RBD构象表位的抗

体,我们的结果得到了SARS-CoV早期进行的研究的支持,该病毒与SARS-CoV-2相似,也与RBD结合到ACE2。对于SARS-CoV,也已经证明刺突蛋白含有包括诱导高度强效中和抗体的构象表位(参考文献28)。此外,显示了针对SARS-CoV-2RBD的疫苗诱导保护性免疫(参考文献29)。然而,对于SARS-CoV,据报道通过用RBD在真核细胞中以折叠形式表达以及用未折叠RBD(大肠杆菌表达的RBD)免疫,可以获得强效的中和抗体和保护性免疫(参考文献30)。这些结果与其它传染病疫苗的几种疫苗和对于过敏的治疗疫苗获得的数据一致,结果表明可以诱导针对具有变性抗原的相应的天然、折叠抗原类似构象表位、未折叠重组抗原或其连续肽的保护性抗体反应(参考文献15、16、20-23)。相反,对于某些病毒性疾病,为了获得保护性抗体应答建议需要用正确的折叠抗原进行免疫(参考文献31、32)。

[0387] 为了比较通过用折叠RBD对比未折叠RBD进行免疫获得的抗体应答及其病毒中和活性,用折叠和未折叠的重组RBD蛋白免疫兔。只有用折叠RBD而非未折叠RBD免疫诱导的抗体针对RBD构象表位且高VNT。

[0388] 总的来说,我们的数据表明COVID-19患者的抗体的病毒中和活性取决于定向于RBD构象表位的抗体的存在,其在目前已知的突变的SARS-CoV-2变体中似乎没有改变。然而,并非所有COVID-19患者都产生这些抗体。重要的是,通过疫苗接种的此类抗体的诱导需要折叠RBD。因此,我们的结果表明针对RBD构象表位的抗体是SARS-CoV-2中和抗体应答的替代标记物,对于开发能够诱导消除性免疫的SARS-CoV-2特异性疫苗非常重要。

[0389] 表

[0390] 表1.微阵列上布点的SARS-CoV-2蛋白

蛋白质	计算分子量 [kDa]	根据 CD ¹ 或厂商数据表 ² 折叠	表达系统	来源
S (折叠的)	135	α 螺旋/卷曲螺旋 ¹	昆虫细胞	Genscript
S1 (折叠的)	79	α 螺旋/卷曲螺旋 ¹	HEK 细胞	Genscript
S1 (折叠的)	79	α 螺旋/卷曲螺旋 ¹	昆虫细胞	Genscript
S1 (未折叠的)	76	未折叠 ¹	大肠杆菌	内部表达
S2 (折叠的)	60	折叠 ²	HEK 细胞	Native Antigen 公司
[0391] S2 (未折叠的)	56	未折叠 ¹	大肠杆菌	内部表达
RBD (折叠的)	30	折叠 ¹	HEK 细胞	Genscript
RBD (未折叠的)	62	未折叠 ¹	大肠杆菌	内部表达
NP (折叠的)	46	折叠 ²	HEK 细胞	Biovendor
NP (未折叠的)	46	未折叠 ²	大肠杆菌	Biovendor

[0392] 表2. SARS-CoV-2刺突蛋白衍生肽

肽	氨基酸序列; 肽 1-47 (SEQ ID NO: 53-98)	分子量 [Da]	计算 pI	溶 剂 可 及 面 积 [%]	在水/蛋白质中的溶剂可及面积 [Å ²]
1	PLVSSQCVNLTRRTQLPPAYTNSFTRGVYY	3377.8	9.2	n.d	n.d
2	RGVYYDPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVT	3520.9	8.5	n.d	n.d
3	FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFND	3418.7	6.9	n.d	n.d
4	LPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDS	3249.6	4.5	n.d	n.d
5	TLDSKTQSLIVNNAATNVVIKVFCEFCND	3357.8	4.5	n.d	n.d
6	QFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSA	3648.0	6.7	n.d	n.d
7	VYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN	3431.8	4.6	n.d	n.d
8	GNFKNLREFVFKNIDGYFKIYKHTPINLV	3603.1	9.7	n.d	n.d
9	PINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITR	3171.7	4.5	n.d	n.d
10	NITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAA	3192.5	8.7	n.d	n.d
11	TAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDA	3282.6	5.7	n.d	n.d
12	TITDAVDCALDPLSEKCTKLSFTVEKGIY	3262.7	4.4	n.d	n.d
13	EKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLC	3255.7	8.2	41	3970/1614
14	FNATRFASVYAWNRKRISNCVADYS	2940.2	9.7	36	3426/1228
15	VADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK	2735.0	8.1	36	2721/968
16	VSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQA	3371.8	4.6	16	3425/540
17	VRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAW	3340.8	6.0	20	2754/557
18	CVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYLRFKSNL	3522.9	9.5	38	3774/1438
19	KPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGF	2746.0	4.4	53	2933/155
20	GVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRVV	3387.7	5.9	38	3586/1381
21	PYRVVVLSEFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN	3281.9	9.6	29	4174/1192
22	NLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFL	3200.7	9.6	n.d	n.d
23	PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLLEILDIT	3176.4	3.9	n.d	n.d
24	ILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLY	2967.3	3.8	n.d	n.d
25	AVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYST	3390.8	4.5	n.d	n.d
26	RVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSECD	3291.5	5.4	n.d	n.d
27	SYECDIPIGAGICASYQTQTNPRRARSVA	3215.5	7.7	n.d	n.d
28	TMSLGAENSVAYSNNNSIANNISAIPTNFTI	3115.4	4.0	n.d	n.d
30	TSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQL	3296.7	3.4	n.d	n.d
31	FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQI	3393.8	6.1	n.d	n.d
32	QVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPKSK	3193.6	9.4	n.d	n.d
33	PDPKSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQ	3362.8	8.8	n.d	n.d
34	GFIKQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVL	3243.7	6.0	n.d	n.d
35	TDEMIAQYTSALLAGTITSGW	2229.4	3.6	n.d	n.d
36	ITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV	3176.7	8.7	n.d	n.d
37	NGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQD	3290.6	6.0	n.d	n.d
38	GKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNT	3072.3	5.9	n.d	n.d
39	LNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDK ⁴⁸	3046.5	8.5	n.d	n.d
40	LDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQ	3245.6	4.7	n.d	n.d
41	YVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVL	3051.5	8.2	n.d	n.d
42	CVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQSAPH	2993.4	8.8	n.d	n.d
43	PHGVVFLHVITYVPAQEKNFTTAPAICHGDK	3277.7	7.3	n.d	n.d
44	CHDGKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYE	3566.9	7.0	n.d	n.d
45	RNFYEPQIITDNTFVSGNC	2319.5	4.3	n.d	n.d
46	NNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHT	3285.5	4.5	n.d	n.d
47	FKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEI	3011.3	4.6	n.d	n.d

[0395] 表3.微阵列中使用的对照蛋白

[0396]

蛋白质ID	蛋白质	天然/重组	表达系统/起源	来源
Gal d 1	卵类粘蛋白	天然	鸡	Sigma
Gal d 2	卵清蛋白	天然	鸡	Sigma
Gal d 4	溶酶菌	天然	鸡	Sigma
Gal d 5	白蛋白	天然	鸡	Sigma
Bos d LF	乳铁蛋白	天然	牛	Sigma
Bos d 8	酪蛋白	天然	牛	Sigma
BSA	白蛋白	天然	牛	Sigma
HSA	白蛋白	天然	人	Sigma
ACE2	血管紧张素转化酶	重组	HEK细胞	Genscript
HRP	辣根过氧化物酶	天然	辣根	Sigma
HHM2	糖基化标记	重组	昆虫细胞	内部表达
HHM0	糖基化标记	重组	昆虫细胞	内部表达
IgG (c3)	hIgG 500 μ g/ml	天然	人	Sigma
IgG (c4)	hIgG 250 μ g/ml	天然	人	Sigma
IgG (c5)	hIgG 125 μ g/ml	天然	人	Sigma
IgG (c6)	hIgG 75 μ g/ml	天然	人	Sigma
IgG (c7)	hIgG 37.5 μ g/ml	天然	人	Sigma

[0397] 表4. 折叠和未折叠RBD免疫兔的病毒中和滴度

[0398]

抗原- μ g	兔编号	第一次免疫后天数	VNT-滴度	第一次免疫后天数	VNT-滴度
未折叠 RBD -20	1	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -20	2	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -20	3	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -40	4	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -40	5	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -40	6	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -80	7	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -80	8	42	<10	63	<10
未折叠 RBD -80	9	42	<10	63	<10
折叠 RBD -20	1	42	160	63	240
折叠 RBD -20	2	42	240	63	320
折叠 RBD -20	3	42	10	63	40
折叠 RBD -40	4	42	<10	63	60
折叠 RBD -40	5	42	320	63	240

[0399]

折叠 RBD -40	6	42	320	63	640
折叠 RBD -80	7	42	≥ 1280	63	≥ 1280
折叠 RBD -80	8	42	480	63	480
折叠 RBD -80	9	42	20	63	240
明矾+缓冲液	1	42	<10	63	<10
明矾+缓冲液	2	42	<10	63	<10
明矾+缓冲液	3	42	<10	63	<10

[0400] 实施例5参考文献

- [0401] 1. Tang, D., Comish, P., & Kang, R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS pathogens*. 16, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008536> (2020).
- [0402] 2. Morens, D.M., et al. The Origin of COVID-19 and Why It Matters. *Am J Trop Med Hyg*. 103, 955-959. doi:10.4269/ajtmh.20-0849 (2020).
- [0403] 3. Li, F., Li, W., Farzan, M., & Harrison, S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*. 309, 1864-1868. doi:10.1126/science.1116480 (2005).
- [0404] 4. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. doi:10.1038/s41579-020-00468-6 (2020).
- [0405] 5. Liu, L., et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*. 584, 450-456. doi:10.1038/s41586-020-2571-7 (2020).
- [0406] 6. Liu, S.T.H., et al. Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score-matched control study. *Nat Med*. 26, 1708-1713. doi:10.1038/s41591-020-1088-9 (2020).
- [0407] 7. Baum, A., et al. REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science*. 370, 1110-1115. doi:10.1126/science.abe2402 (2020).
- [0408] 8. Wajnberg, A., et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*. 370, 1227-1230. doi:10.1126/science.abd7728 (2020).
- [0409] 9. Piccoli L., et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell*. 183, 1024-1042.e21. doi:10.1016/j.cell.2020.09.037. Epub 2020 Sep 16 (2020).
- [0410] 10. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 586, 516-527. doi:10.1038/s41586-020-2798-3 (2020).
- [0411] 11. Pollard A.J., & Bijker E.M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol*. 21, 83-100. doi:10.1038/s41577-020-00479-7. Epub 2020 (2021).
- [0412] 12. McLellan, J.S., et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science*. 342, 592-598. doi:10.1126/science.1243283 (2013).
- [0414] 13. Sesterhenn, F., et al. De novo protein design enables the precise induction of RSV-neutralizing antibodies. *Science*. doi:10.1126/science.aay5051 (2020).
- [0415] 14. Gerlich, W.H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where

we are now. *Virology*. doi:10.1186/1743-422X-10-239 (2013).

[0416] 15. Tulaeva, I., et al. Quantification, epitope mapping and genotype cross-reactivity of hepatitis B preS-specific antibodies in subjects vaccinated with different dosage regimens of BM32. *EBioMedicine*. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102953 (2020).

[0417] 16. Ni Y., et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*. 146,1070-83. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.024. Epub 2013 Dec 19 (2014).

[0418] 17. Huang, C., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 395,497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5 (2020).

[0419] 18. Long, Q. X., et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 26,845-848. doi:10.1038/s41591-020-0897-1 (2020).

[0420] 19. Niespodziana, K., et al. PreDicta chip-based high resolution diagnosis of rhinovirus-induced wheeze. *Nat Commun*. 9,2382. doi:10.1038/s41467-018-04591-0. (2018).

[0421] 20. Volkman, D. J., Allyn & S. P., Fauci, A. S. Antigen-induced in vitro antibody production in humans: tetanus toxoid-specific antibody synthesis. *J Immunol*. 129,107-112. (1982).

[0422] 21. Sela, M. & Arnon, R. Synthetic approaches to vaccines for infectious and autoimmune diseases. *Vaccine*. 10,991-999. doi:10.1016/0264-410x(92)90107-u. (1992).

[0423] 22. Marsh, D. G., Lichtenstein, L. M. & Campbell, D. H. Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology*. 18,705-722. (1970).

[0424] 23. Valenta, R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol*. 2,446-453. doi:10.1038/nri824. (2002).

[0425] 24. Chen, Y., et al. A comprehensive, longitudinal analysis of humoral responses specific to four recombinant antigens of SARS-CoV-2 in severe and non-severe COVID-19 patients. *PLoS Pathog*. doi:10.1371/journal.ppat.1008796 (2020).

[0426] 25. Gattinger, P., et al. Antibodies in serum of convalescent patients following mild COVID-19 do not always prevent virus-receptor binding. *Allergy*. 2021;76(3):878-883. doi:10.1111/all.14523.

[0427] 26. Li, Y., et al. Linear epitopes of SARS-CoV-2 spike protein elicit neutralizing antibodies in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 17,1095-1097. doi:10.1038/s41423-020-00523-5. (2020).

- [0428] 27. Shrock, E., et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science*. doi:10.1126/science.abd4250. (2020).
- [0429] 28. He, Y., Lu, H., Siddiqui, P., Zhou, Y., & Jiang, S. Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J Immunol*. 174, 4908-4915. doi:10.4049/jimmunol.174.8.4908. (2005).
- [0430] 29. Yang, J., et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*. 586, 572-577. doi:10.1038/s41586-020-2599-8. (2020).
- [0431] 30. Du, L., et al. Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity. *Virology*. 393, 144-150. doi:10.1016/j.virol.2009.07.018. (2009).
- [0432] 31. McLellan, J. S., et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science*. 342, 592-598. doi:10.1126/science.1243283. (2013).
- [0433] 32. Sesterhenn, F., et al. De novo protein design enables the precise induction of RSV-neutralizing antibodies. *Science*. doi:10.1126/science.aay5051. (2020).
- [0434] 33. Kratzer, B., et al. Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations. *Allergy*. doi:10.1111/all.14647. (2020).
- [0435] 34. Sonnweber, T., et al. Cardiopulmonary recovery after COVID-19-an observational prospective multi-center trial. *Eur Respir J*. 2020;2003481. doi:10.1183/13993003.03481-2020. (2020).
- [0436] 35. Niespodziana, K., et al. A hypoallergenic cat vaccine based on Fel d 1-derived peptides fused to hepatitis B PreS. *J Allergy Clin Immunol*. 127, 1562-70. doi:10.1016/j.jaci.2011.02.004. (2011).
- [0437] 36. Gattinger, P., et al. Recombinant glycoproteins resembling carbohydrate-specific IgE epitopes from plants, venoms and mites. *EBioMedicine*. 39, 33-43. doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.002. (2019).
- [0438] 37. Gallerano, D., et al. HIV microarray for the mapping and characterization of HIV-specific antibody responses. *Lab Chip*. 15, 1574-1589. doi:10.1039/c4lc01510j. (2015).
- [0439] 38. Borochova, K., et al. Features of the human antibody response against the respiratory syncytial virus surface glycoprotein G. *Vaccines (Basel)*. doi:10.3390/vaccines8020337. (2020).
- [0440] 39. Koblischke, M., et al. Dynamics of CD4 T cell and antibody responses

in COVID-19 patients with different disease severity. *Front Med (Lausanne)*. doi: 10.3389/fmed.2020.592629. (2020).

[0441] 实施例6:含有VLP的SARS-CoV-2RBD构建体

[0442] 方法

[0443] 对于构建体FLAG::RBD::GPI(氨基酸序列和DNA序列见图9),将后接3×FLAG标签和GGGGG(SEQ ID NO:31)连接体的胰蛋白酶原前体先导(参考文献40)与来自S糖蛋白的RBD序列(取自S蛋白,严重急性呼吸综合征冠状病毒2分离物WIV05,全基因组,GenBank:MN996529.1,蛋白质ID:GenBank:QHR63270.2,来自QHR63270.2的氨基酸318-571,计数不包含S蛋白的先导)融合,并在C端与最小CD16b GPI锚定物受体序列融合(取自GenBank:X07934.1,来自GenBank:X07934.1的氨基酸193-233)(参考文献41;42)。

[0444] 用磷酸钙沉淀法通过瞬时转染HEK293T细胞来证实表达。简单来说,1×10⁶个HEK293T细胞在转染前24小时被接种于内有10ml IMDM+10%FBS+庆大霉素(15mg/L)的培养皿中(直径10cm, Sarstedt)。转染前2小时,用8ml新鲜IMDM+10%FBS+庆大霉素(15mg/L)替换培养基。转染时,将30μg pEAK12::FLAG::RBD::GPI构建体以900μl ddH₂O稀释,并与100μl 2.5M CaCl₂溶液混合。随后,将1ml 2×HBS(HEPES缓冲盐溶液、140mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄、50mM HEPES)缓冲液pH 7.0逐滴加入DNA溶液中,孵育1分钟,然后逐滴加入至细胞。由此,每个培养皿总共加入2ml转染混合液。转染后18小时,用10ml新鲜IMDM+10%FBS+庆大霉素替换培养基,并孵育细胞额外24小时。总共转染后48小时,收集细胞用于流式细胞分析。为此目的,用PBS(不含Ca²⁺和Mg²⁺)将细胞从盘上冲洗下来,并用PBS洗涤2次。每个染色的5×10⁵个细胞移液至4.5ml聚苯乙烯FACS管(BD)中,并首先在室温下用0.1μl Aqua Zombie(Biolegend)孵育10分钟。之后,用4.5ml FACS缓冲液(PBS+0.5%BSA+0.05%NaN₃)洗涤细胞,500g 4℃下离心5分钟,并丢弃上清。向每个染色中加入20微升在FACS缓冲液中的1:100稀释的COVID-19康复患者或健康对照个体的血清,在冰上孵育30分钟,再次用4.5ml如上所述的FACS缓冲液洗涤。作为二抗,20μl 1:100稀释的山羊抗人IgG(γ链特异性)-APC偶联Fab(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, 美国)在冰上孵育30分钟,并之后再次洗涤细胞。随后,在配备有DIVA软件包(BD)的FACS Fortessa流式细胞仪(BD)上获得至少1×10⁴个活细胞(Aqua zombie阴性单细胞),并使用FlowJo软件进行分析。

[0445] 构建体pMD.0GP的产生由Ory等人先前描述(参考文献46)。简单来说,对于pMD.gagp o1,用pCRIPenv-(参考文献47)使用以下引物对进行PCR:5'-CGGAATTCATGGGCCAGACT GTTACC-3'(SEQ ID NO:49)和5'-AGCAACTGGCGATAGTGG-3'(SEQ ID NO:50),5'-C GGAATTCCTAGGGGGCCTCGCG-3'(SEQ ID NO:51)和5'-ACTACATGCTGAACCGGG-3'(SEQ ID NO:52)。PCR产物分别用EcoRI和XhoI以及用EcoRI和HindIII酶切,以产生0.94kb的EcoRI-XhoI和0.94kb的HindIII-EcoRI片段。这些片段与来自pCRIPenv的3.3kb XhoI-HindIII片段以及与用EcoRI和小牛肠道磷酸酶线性化处理的pUC19连接,以产生pUC19.gagp o1。来自pUC19.gagp o1的5.2kb EcoRI片段被克隆到pMD中的EcoRI克隆位点中,以产生pMD.gagp o1。pMD由来自pBC12/CMV/白细胞介素2的3.1kb EcoRI-BamHI片段构建,该片段包括pXF3骨架和HCMV增强启动子区域,以及先前描述的来自pUCMd, Bs(R)S的1.34kb BamHI XbaI片段。在EcoRI和XbaI延伸物经Klenow处理为平末端后,连接3.1kb EcoRI-

BamHI和1.34kb BamHI-XbaI片段。

[0446] 使用载体pMD-MLVogp (Harvard Medical School, SEQ ID NO:29, 9633bp)、小鼠白血病毒 (MLV) 逆转录病毒载体的辅助质粒 (编码MLV gag-pol蛋白聚体, 具有人 β -球蛋白内含子和polyA信号; 氨苄西林抗性)。

[0447] 为了产生VNP (病毒样纳米颗粒), 将 3×10^6 个HEK-293T细胞接种在150mm培养皿上, 用30 μ g MoMLV原始gag-pol (OGP) 质粒 (构建体见图9) 和60 μ g pK12::FLAG::RBD::GPI次日转染。72小时后收集含有VNP的上清液, 过滤 (0.45 μ m, Millipore, Billerica, MA), 通过超滤浓缩 (Centricon Plus-70, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, 爱尔兰), 并然后使用SW41 Ti转子 (1×10^5 g, 1小时, Beckman-Optima LE-80K, Beckman Instruments, Palo Alto, CA) 超离心进一步浓缩。测定并调整PBS洗涤的VNP制剂的蛋白浓度 (Micro BCA, Thermo Fisher, Waltham, MA)。VNP在4 $^{\circ}$ C下保存至使用 (最多4周) 而不改变生物活性 (参考文献43)。

[0448] 以10 μ g纯化的VNP样品每条泳道进行SDS-PAGE, 使用4 \times SDS-PAGE上样染料 (40%甘油、200mM Tris、4% SDS、0.04% 溴酚蓝) 进行裂解, 对于还原条件, 添加有300mM DTT或对于非还原条件, 不添加DTT, 在4-20% 聚丙烯酰胺凝胶上溶解。随后, 通过半干印迹技术 (PepLab Biotechnology, Erlangen, 德国) 将蛋白转移到PVDF膜上, 并用含有0.05%吐温20 (Biorad Laboratories, Hercules, CA, 美国) 和5%脱脂奶粉 (Maresi Austria, Vienna, 澳大利亚) (TBS-T) 的Tris缓冲盐溶液 (50mM Tris、150mM NaCl) 封闭膜, 并与COVID-19康复患者和健康对照个体的血清 (作为一抗) 在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。用TBS-T仔细洗涤5次后, 膜用山羊抗人IgG HRP偶联的Fab (Jackson Immunotechnology) 在室温下孵育1小时, 大量洗涤后, 用基于鲁米诺的指示剂系统 (Biorad Laboratories, Hercules, CA, 美国) 显示印迹, 用化学发光成像系统LAS-4000 (GE Healthcare) 拍摄。

[0449] 对于来自COVID-19康复患者和健康对照个体的PBMC增殖, 将 1×10^5 个PBMC与表达GPI锚定抗原 (FLAG::RBD::GPI来自SARS-CoV-2, FLAG::S::GPI来自SARS-CoV-2, FLAG::NC::GPI来自SARS-CoV-2) 的纯化SARS-CoV-2抗原表达VNP (5 μ g/ml)、空白VNP (5 μ g/ml)、FSME抗原 (0.15 μ g/ml)、破伤风类毒素 (0.0125IE/ml)、培养基单独或PHA (12.5 μ g/ml) 孵育, 在圆底96孔板 (Sarstedt AG, Nürnbrecht, 德国) 内总计200 μ l AIMV medium (Thermo Fisher) 加2%人血清 (Octapharma, Vienna, 奥地利) 每孔。所有条件设置为三重复并孵育144小时, 之后进行18小时的甲基-[3 H]-胸腺嘧啶脉冲 (1 μ Ci/孔)。在这段孵育时间后, 在Betaplate计数器 (Perkin Elmer, Waltham, MA) 上定量T细胞增殖。

[0450] 结果:

[0451] 作为第一步, 证实了SARS CoV-2RBD构建体 (FLAG::RBD::GPI) 在HEK293T VNP生产细胞中表达良好。对于这一结果, 使用磷酸钙沉淀法 (参考文献44) 用pEAK12 SARS CoV-2RBD瞬时转染HEK293T细胞并在72h后通过两种不同的方法验证RBD表达。首先通过与抗FLAG标签抗体的反应性, 其次, 与COVID-19康复受试者血清的反应性。图5显示了确实很大比例的SARS CoV-2RBD HEK293T细胞被抗FLAG标签抗体染色阳性 (实线; 91.7%阳性), 该抗体定向针对于N端三重FLAG标签序列 (参考文献45)。虚线代表表示细胞背景荧光的未染色HEK293T细胞获得的荧光。明确的抗FLAG抗体反应性已经表明, 正如预期的那样, FLAG::RBD::GPI融合蛋白是在很大比例的转染物的细胞表面表达。类似的, 1:100稀释的COVID-19

康复患者血清在用山羊抗人IgG(γ 链特异性)-APC偶联Fab反染色时,阳性染色了大量的转染物,表明了免疫反应性,并从而通过FLAG::RBD::GPI融合蛋白的细胞表面表达显示出RBD结构域的正确折叠。与此形成鲜明对比的是,1:100稀释的从未感染过患有COVID-19的受试者的血清不与FLAG::RBD::GPI转染物反应,即用该血清染色的细胞与未染色细胞相当,清楚地表明了COVID-19康复血清染色模式的特异性。

[0452] 在下一步中,在用FLAG::RBD::GPI转染的HEK293T细胞中诱导VNP出芽以研究VNP是否会被FLAG::RBD::GPI融合蛋白有效修饰。对于这一结果,用编码Moloney核心蛋白的MoMLV gag-pol瞬时转染HEK293T细胞,并平行共表达FLAG::RBD::GPI。3天后,将分泌到这些HEK293T细胞上清液中的VNP分离出来,并通过SDS-PAGE分析免疫反应性、正确折叠的RBD蛋白的存在,然后用来自COVID-19康复和健康对照受试者的血清在非还原(图6)和还原(图7)条件下进行Western blotting。同时,对表达FLAG::S::GPI、FLAG::NC::GPI、Art v 1::GOI、FLAG::Art v 1::GPI、空白VNP或纯化重组RBD-His蛋白的VNP进行分析。在图6中,发现在COVID-19康复受试者的血清中可以清楚地检测到40kDa和95kDa条带的FLAG::RBD::GPI,而在健康对照受试者的血清中则没有条带。有趣的是,当在二硫苏糖醇(DTT)存在的还原条件下分离VNP裂解液时,康复血清的RBD反应性消失(图7)。这些结果突出如下内容。首先,FLAG::RBD::GPI可以成功修饰MoMLV衍生的VNP。第二,FLAG::RBD::GPI融合蛋白以免疫反应形式存在于VNP表面,其被COVID-19康复患者的多克隆血清识别。第三,使用DTT还原FLAG::RBD::GPI融合蛋白中的二硫键改变了FLAG::RBD::GPI的构象,使其不再被COVID-19康复受试者的血清识别。第四,即使FLAG::RBD::GPI在VNP上以正确构象表达(非还原状态),其也不会被健康对照受试者的血清识别。第五,康复血清的免疫反应性特异于它只识别表达FLAG::RBD::GPI融合蛋白的VNP,而不识别表面修饰有其它不相关蛋白的VNP,如FLAG::Art v 1::GPI,或保持未修饰的VNP。

[0453] 图8显示VNP携带的FLAG::RBD::GPI也能被COVID-19康复受试者的T淋巴细胞识别,但不能被健康对照受试者的T细胞识别。在本T细胞激活试验中,将来自COVID-19康复患者和健康对照受试者的T细胞与5 μ g用指明融合蛋白进行修饰的或放弃不修饰的VNP共孵育6天。培养6天后,用甲基-³H-胸腺嘧啶脉冲T细胞过夜,并在第二天收获T细胞,将甲基-³H-胸腺嘧啶掺入它们新合成DNA中的程度(放射性)取作细胞增殖的衡量标准。图8显示了FLAG::RBD::GPI修饰的VNP显著刺激了康复而非健康对照受试者的T细胞增殖。刺激指数范围2.5~24.6。PHA被用作阳性对照,产生340.3倍的刺激指数。诚然,PHA诱导的多克隆T细胞活化程度显著更明显。然而,用FLAG::RBD::GPI修饰的VNP刺激T细胞的平均刺激指数为12.7 \pm 18.0。S蛋白修饰的VNP与NC蛋白修饰的颗粒结果相似(刺激指数为7.2 \pm 7.2倍和5.8 \pm 3.7倍)。这些结果表明,FLAG::RBD::GPI融合蛋白也可以被抗原呈递细胞吸收,并以免疫原性的形式呈递到T细胞,其继而导致它们显著活化。虽然来自外源蛋白的免疫原性肽对T细胞的刺激肯定不是构象依赖性的,但实验证明了在VNP上的存在对COVID-19康复而非健康对照个体的T细胞免疫反应的蛋白,并因此表达系统在T细胞水平上特异。

[0454] 实施例6参考文献

[0455] 40.Hopp,T.P.et al.A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification.Nat.Biotechnology.6,1204-1210,doi:10.1038/nbt1088-1204(1988)

[0456] 41.Derdak,S.V.et al.Direct stimulation of T lymphocytes by immunosomes:virus-like particles decorated with T cell receptor/CD3 ligands plus costimulatory molecules.Proc Natl Acad Sci U S A 103:13144-13149.doi:10.1073/pnas.0602283103. (2006)

[0457] 42.Simmons,D.,and B.Seed.1988.The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein.Nature 333:568-570.doi:10.1038/333568a0. (1988)

[0458] 43.Kratzer,B.,et al.Prevention of allergy by virus-like nanoparticles (VNP) delivering shielded versions of major allergens in a humanized murine allergy model.Allergy 74(2):246-260.doi:10.1111/all.13573. (2019)

[0459] 44.Jordan,M.,A.Schallhorn,and F.M.Wurm.Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation.Nucleic Acids Res 24:596-601.doi:10.1093/nar/24.4.596. (1996)

[0460] 45.Park,S.H.,et al.Generation and application of new rat monoclonal antibodies against synthetic FLAG and OLLAS tags for improved immunodetection.J Immunol Methods 331:27-38.doi:10.1016/j.jim.2007.10.012 (2008)

[0461] 46.Ory,D.S.,B.A.Neugeboren,and R.C.Mulligan.A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes.Proc Natl Acad Sci U S A 93:11400-11406.doi:10.1073/pnas.93.21.11400(1996)

[0462] 47.Danos,O.,and R.C.Mulligan.Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges.Proc Natl Acad Sci U S A 85:6460-6464.doi:10.1073/pnas.85.17.6460(1988)

[0463] 实施例7:重组SARS-CoV-2亚单位疫苗的特性

[0464] 如上所述制备由两个RBD结构域(一个与人乙型肝炎病毒(HBV)衍生的PreS的N-端融合,另一个与人乙型肝炎病毒(HBV)衍生的PreS的C-端融合)组成的融合蛋白(PreS-RBD)(SEQ ID NO:14,包括His标签;SEQ ID NO:100不含His标签),(图10a)。对编码PreS-RBD的合成基因以及编码单独RBD(SEQ ID NO:1)(作为对照目的)进行密码子优化以用于在大肠杆菌或在人细胞系中表达。此外,由两个连接的RBD(RBD二聚体,SEQ ID NO:15)或三个连接的RBD(RBD三聚体,SEQ ID NO:16)组成的RBD融合蛋白以及由两个RBD结构域(一个融合到SARS-CoV-2核衣壳蛋白N-端,一个融合到SARS-CoV-2核衣壳蛋白C-端(N-RBD,SEQ ID NO:99))组成融合蛋白被设计于HEK细胞中表达。N-RBD融合蛋白设计为将两个RBD(连接SARS-CoV-2核衣壳蛋白的N-端和C-端(SARS-CoV-2Genbank收录号:QHD43416.1))的融合(aa330-aa522,SARS-CoV-2Genbank收录号:QHD43416.1)。合成DNA分子进行密码子优化以用于在HEK细胞中表达,并含有编码N端IL-2信号肽(MYRMQLLSIALSLALVTNS,SEQ ID NO:101)的5' DNA和编码C端六聚组氨酸标签的3' DNA。通过镍亲和层析、通过在重组蛋白上添加六聚组氨酸标签纯化表达的蛋白。可以理解的是,所描述的每一种疫苗抗原也可以无His标签的制备。在还原和非还原条件下,大肠杆菌表达的PreS-RBD在SDS-PAGE中迁移至约60kDa处,而

HEK细胞表达的融合蛋白迁移至70kDa处(图10b)。HEK细胞表达的PreS-RBD对比大肠杆菌表达的PreS-RBD分子量更高,其与前者蛋白中六个N-糖基化位点的存在是一致的。同样的,与大肠杆菌表达的RBD(即32kDa)相比,含有两个N-糖基化位点的HEK细胞表达的RBD具有更高的分子量(即35kDa)。大肠杆菌表达的RBD在还原和非还原条件下也显示出额外的条带(图10b),其被抗His抗体染色并因此不代表杂质(数据未显示)。

[0465] 如图10c所示,利用远紫外圆二色光谱(CD)对重组RBD蛋白折叠和二级结构的存在进行分析。在HEK细胞中表达的RBD在207nm处显示最低值,其与报道的类似于主要 β -折叠结构的功能性RBD⁴⁴的表达的先前研究一致。HEK细胞表达的PreS-RBD在209nm处显示最低值,其也表明存在大量的 β -折叠二级结构(图10c)。大肠杆菌表达的RBD和PreS-RBD显示出椭圆率的大幅降低且相应最小值的大幅降低表明了蛋白质中存在高比例的未折叠结构(图10c)。

[0466] 在下一组实验中,对重组RBD和PreS-RBD蛋白与一组特异于PreS、RBD和His标签的抗体探针的反应性进行了表征(图10d-g)。图10d显示了大肠杆菌和HEK细胞表达的RBD和PreS-RBD与不同稀释度的抗His抗体发生反应(HEK细胞表达的PreS-RBD和RBD>大肠杆菌表达的PreS-RBD和RBD)。当省略一抗抗His抗体时,未观察到反应(图10d)。HEK细胞>大肠杆菌表达的PreS-RBD与针对PreS肽和针对大肠杆菌表达的PreS产生的抗血清发生反应,而重组RBD蛋白则没有反应(图10e、f)。当省略一抗抗PreS抗体时,未观察到反应(图10e、f)。接下来,对SARS-CoV-2大流行前获得的受试者血清(即历史对照血清)和COVID-19康复患者获得的血清检测IgG与大肠杆菌和HEK细胞表达的RBD和PreS-RBD蛋白的反应性。历史对照血清对折叠RBD和PreS-RBD不表现IgG反应性,而少数血清(即P003、P004、P010)对未折叠RBD和PreS-RBD表现出低反应性(图10g,左)。相反,COVID-19康复患者的血清对HEK细胞表达的PreS-RBD>RBD表现显著的IgG反应性,而对大肠杆菌表达蛋白无相关反应性(图10g,右)。只有少数血清(即B013、I002)对未折叠的细菌性表达蛋白表现出非常弱的反应性。当省略患者血清时,未观察到反应性(图10g)。

[0467] 诱导RBD特异性抗体应答

[0468] 通过免疫兔来研究折叠PreS-RBD、RBD、RBD二聚体、RBD三聚体或N-RBD诱导抗体应答的能力,其允许研究在远缘杂交动物中诱导免疫应答的均一性,并从而识别不良应答或无应答。远缘杂交动物的选择很重要,因为发现大约20%的SARS-CoV-2感染受试者不携带RBD特异性抗体,因此代表“RBD无应答者”。在三周间隔内以20、40或80 μ g明矾吸附的RBD或含有等摩尔量RBD的两剂明矾吸附的PreS-RBD、RBD二聚体、RBD三聚体或N-RBD对每组3只兔免疫3次。图11显示通过ELISA测定的三种不同稀释度的兔血清的RBD特异性IgG水平。即使是在第42天,6只RBD单免疫动物中的3只兔(兔#3、兔#5、兔#6)在1:1000稀释度下无应答和低应答(OD值<0.5)。根据相同定义,6只RBD二聚体免疫动物中的2只兔(兔#11、兔#14)为无应答,且6只RBD三聚体免疫动物中的2只兔(兔#21、兔#24)为无应答。相反,6只用20或40 μ g PreS-RBD免疫的兔中的每一只已经在第35天就已经发展出强大且均一的RBD特异性IgG水平(在1:1000血清稀释度中OD值>或=0.5)(增加至第42天)。用20 μ g和80 μ g N-RBD免疫导致了在第35天时83.3%的免疫动物的强大RBD特异性IgG水平,在第43天时增加至100%(在1:1000血清稀释度下OD值>或=0.5)(图11)。

[0469] 用折叠而非未折叠的PreS-RBD免疫诱导无COVID-19史受试者血清中与SARS-CoV-

2变体交叉反应的抗体

[0470] 首次用未折叠的大肠杆菌表达的PreS-RBD对无SARS-CoV-2史人类受试者进行免疫(图12)。总共施用三次皮下注射,间隔约4周。图13a显示,用未折叠PreS-RBD免疫不会诱导对折叠的HEK细胞表达的RBD的IgG应答。该结果与在兔中获得的数据一致,其中大肠杆菌表达的PreS-RBD未能诱导对折叠RBD的IgG应答。这些结果和仅折叠RBD在兔中诱导针对折叠RBD的IgG抗体的发现,其在体外强效中和了SARS-CoV-2感染并阻止RBD与ACE2结合,导致构建了重组PreS-RBD,其一级序列与大肠杆菌表达的版本完全相同,但由于在HEK细胞中表达而获得了折叠蛋白(图10)。随后,将用折叠的、HEK细胞表达的PreS-RBD免疫的人类受试者加入受试者中,并如第二次注射一周后(即第14次就诊)时所确定的,诱导了针对折叠RBD的强效IgG应答(图12、图13a)。此外,由基于武汉Hu-1序列的折叠PreS-RBD诱导的RBD特异性抗体诱导的IgG抗体与SARS-CoV-2变体(武汉、K417N、E484K、 α 、 β 、 δ 、奥密克戎)产生同等交叉反应(图13a、b、图15)。值得注意的是,通过用折叠的HEK细胞表达的武汉PreS-RBD蛋白免疫诱导的兔抗体与SARS-CoV变体 δ 和奥密克戎发生交叉反应(图15)。

[0471] 由于志愿者之前接种过含有PreS的草花粉过敏疫苗BM325(即VVX001)(ClinicalTrials.gov识别号:NCT03625934),早在第1次就诊时就检测到PreS特异性IgG应答,其在用大肠杆菌表达的PreS-RBD免疫期间进一步增加,甚至在用折叠的HEK细胞表达的PreS-RBD免疫后更多(图13c)。进一步分析表明,IgG同型在免疫受体中主导了RBD特异性抗体应答,并伴有低IgM应答和在免疫开始后不久达到峰值的IgA应答(数据未显示)。受试者的PreS特异性抗体应答由IgG抗体、一些IgM应答(但没有相关的IgA应答)主导(数据未显示)。

[0472] 用折叠PreS-RBD免疫诱导的抗体与HBV基因型A-H的NTCP结合位点反应

[0473] PreS蛋白在其N端含有HBV与其肝细胞上受体NTCP的结合位点,因此是预防性和治疗性HBV疫苗的候选疫苗抗原。由于先前接种过BM325(BM32的一种成分),受试者具有PreS衍生肽特异性IgG抗体,特别是对于含有HBV的NTCP结合位点的PreS P2并针对包括对HBV基因型A-H的感染性至关重要的氨基酸序列(PreS aa13-aa51)的肽。在最后一次接种大肠杆菌表达的PreS-RBD(即第7次就诊)后的大约半年,测定接种三剂未折叠的大肠杆菌表达的PreS-RBD在第9次就诊时增加的PreS肽特异性IgG应答(图12)。在第三次注射后大约4周,在第20次就诊时测定施用三剂折叠的HEK细胞表达的PreS-RBD强烈增加的跨越PreS的肽的IgG水平,特别是含有NTCP结合位点的N端肽和代表来自所有8种HBV基因型的NTCP结合位点的肽(图12)。

[0474] 用折叠PreS-RBD免疫诱导早期RBD特异性IgG₁应答,随后是延迟但持续的IgG₄应答

[0475] 先前发现用含有PreS的草花粉过敏疫苗BM32免疫诱导了双期过敏原和PreS特异性IgG反应,其由早期IgG₁,随后是延迟但持续的IgG₄亚类应答组成。该延迟且持续的IgG₄应答被认为是过敏原特异性免疫治疗的长期保护作用的原因,即使在停止接种疫苗后,这种长期保护作用仍可持续数年。

[0476] 图13d显示用折叠的HEK细胞表达的PreS-RBD免疫后受试者体内RBD特异性IgG亚类应答的发展。在第二次疫苗接种后的第14次就诊中,已经观察到对折叠RBD的强效IgG₁亚类应答,而折叠RBD特异性IgG₄抗体仅在随后(即在第三次疫苗接种后)增加。RBD特异性IgG₂水平低,未发现RBD特异性IgG₃应答(图13d)。同时,在完全接种欧洲注册的SARS-CoV-2疫苗(即杨森COVID-19疫苗、强生、Vaxzevria、阿斯利康、Comirnaty、BionTech/Pfizer)大约4周

后,分析随机招募的健康受试者中的S和RBD特异性IgG应答(图14)。随机招募的9名健康接种受试者中有4名(即A287、A292、A077、C019)仅产生低S特异性IgG应答,且几乎没有RBD特异性IgG应答。S1特异性抗体水平的定量证实了这些结果,显示它们的S1特异性抗体水平低于200BAU/ml(表5,见图14),低于大多数(即十分之八)COVID-19康复受试者(图14)。接种注册疫苗的受试者的RBD特异性IgG亚类应答主要由IgG₁亚类应答、少量IgG₂、几乎没有IgG₄和无IgG₃组成(图13d)。

[0477] PreS-RBD免疫受试者的血清、泪液和鼻分泌物中的抗体仅识别RBD构象表位

[0478] 在整个用折叠和未折叠PreS-RBD(V1-V20)免疫期间,使用固相芯片对免疫受试者中的SARS-CoV-2特异性抗体应答进行详细分析,该固相芯片含有大量微阵列SARS-CoV-2蛋白以及跨越S蛋白的肽的组。用未折叠大肠杆菌表达的PreS-RBD免疫仅诱导针对免疫原(即未折叠大肠杆菌表达的PreS-RBD)的抗体,而没有SARS-CoV-2特异性IgG、IgA或IgM抗体应答。用折叠的HEK细胞表达的PreS-RBD免疫诱导了针对折叠RBD和针对含有折叠RBD的蛋白(即昆虫细胞表达的S和S1、HEK细胞表达的S1)的强效而持续的IgG应答,而未检测到对连续RBD衍生肽表位的IgG应答。RBD特异性IgG应答伴随着初始强效但短暂的折叠RBD特异性IgA应答。在整个免疫期间未发现相关的SARS-CoV-2特异性IgM应答。用折叠PreS-RBD免疫增强了对未折叠PreS-RBD的IgG应答,其归因于PreS特异性IgG抗体引起的。值得注意的是,在整个免疫和观察期间,没有观察到对核衣壳蛋白(NP)或缺乏RBD的S2特异性的抗体。发现在第15次和第18次就诊时获得的鼻腔分泌物和泪液中,也存在高水平的特异于折叠RBD的IgG抗体,以及更低水平的针对大肠杆菌表达的未折叠PreS-RBD的IgG抗体。在这些时间点,还可以检测到中等水平的特异于折叠RBD的IgA抗体,而未发现SARS-CoV-2特异性IgM抗体。

[0479] 用折叠PreS-RBD免疫受试者诱导的抗体抑制RBD与ACE2结合并中和SARS-CoV-2

[0480] 图14提供了免疫受试者体内S1特异性IgG抗体、抑制RBD与ACE2结合的抗体和病毒中和抗体的发展的概述。在完全接种注册的COVID-19基因疫苗后大约4周(中位=27天)后,从9名健康受试者获得的血清和在SARS-CoV-2感染后约8周从10名COVID-19康复患者获得的血清被包括在试验中用于比较。用未折叠大肠杆菌表达的PreS-RBD免疫既不诱导S1特异性IgG抗体,也不诱导抑制RBD与ACE相互作用的抗体且也没有检测到病毒中和抗体(图14,第1-9次就诊)。在第19次和第20次就诊时(即第三次免疫后3周和4周),经PreS-RBD免疫的受试者的S1特异性IgG抗体水平超过2700BAU/ml,高于接种注册疫苗的受试者(即91.0-2853.8BAU/ml;中位数:838.2BAU/ml)和COVID-19康复受试者(即111.1-2963.8BAU/ml;中位数:763.9BAU/ml)的S1特异性IgG抗体中位数。在第20次就诊时从免疫受试者获得的血清抑制100ng和50ng RBD与ACE2的结合超过98%,而从接种注册基因疫苗的受试者血清获得的中位抑制率(100ng RBD:抑制-8.6-98.3%,中位抑制率:16.0%;50ng RBD:抑制-14.4-99.4%,中位抑制率:52.8%)和COVID-19康复患者血清的中位抑制率更低。在使用600TCID₅₀真实的SARS-CoV-2(BetaCoV/Munich/BavPat1/2020分离株)的病毒中和试验中,PreS-RBD免疫受试者第19次和第20次就诊时的VNT50滴度(表明两天后ELISA检测的受感染Vero细胞的抗SARS-CoV-2NP染色降低50%的血清稀释)分别为267和209,高于接种注册疫苗受试者发现的中位VNT50滴度(即12-839;中位数:90)。这些结果与使用50-100TCID₅₀SARS-CoV-2进行病毒中和试验获得的数据一致,其将VNT表达为针对病毒诱导的细胞病变效应的100%保护所需的相互血清稀释。在该实验中,PreS-RBD免疫的受试者第19次和第

20次就诊时获得的VNT分别为160和120,因此也高于在接种注册疫苗受试者中确定的中位VNT(10-320;中位数:60)。

[0481] 作为重组PreS-RBD融合蛋白的示例,本发明所述的其它亚单位疫苗也可以通过在哺乳动物细胞,如HEK细胞,中表达而大量和高纯度地生产,这一过程在全球范围内不仅对于疫苗而且对于疫苗和生物制品的生产都已建立的过程。可以说明的是,免疫原/抗原作为结构折叠的蛋白是有益的,因为用未折叠PreS-RBD免疫不能诱导抑制RBD-ACE2相互作用和实现病毒中和所必需的RBD特异性抗体。可以表明的是,PreS-RBD结构折叠的测定可以通过使用生物物理学方法(如蛋白质的圆二色性(CD)光谱分析和/或通过展示重组抗原与来自COVID-19康复患者的IgG抗体的反应性(其特异地与折叠PreS-RBD反应,而不与未折叠大肠杆菌表达的PreS-RBD反应(图10c、g))进行。

[0482] PreS-RBD是一种重组蛋白,因此可以进行精确的剂量-发现研究,以确定用于疫苗接种的最佳免疫原量,这对于基因疫苗是不可能的。重组PreS-RBD是通过吸附在氢氧化铝上制成的,氢氧化铝是一种几十年来安全用于多种疫苗的佐剂。在目前的中试稳定性研究中,发现大约90%的PreS-RBD与氢氧化铝结合,因此注射的抗原在很大程度上保留在注射部位(Gattinger和Valenta,未发表)。氢氧化铝配制的PreS-RBD在+4°C下可保持数月稳定,并且在更高温度下储存似乎不影响疫苗的稳定性和免疫原性,这是疫苗在全球分销和使用的优势,特别是在资源匮乏的国家(数据未显示)。

[0483] 本研究表明,施用两至三剂40微克摩尔当量的折叠PreS-RBD诱导RBD特异性抗体应答的强烈诱导,同时伴有特异性T细胞应答和B记忆/浆细胞应答的诱导。在本发明免疫受试者中获得的结果表明,RBD特异性抗体应答主要由IgG应答组成,其由早期IgG₁和延迟的IgG₄应答组成,到目前为止,在COVID-19基因疫苗中未观察到后者(图13d)。RBD特异性的双相诱导(即早期IgG₁和延迟、持续的IgG₄)与BM32的诱导非常相似,BM32是一种包含重组融合蛋白的治疗性草花粉过敏疫苗,该重组融合蛋白由PreS和过敏原肽组成(Eckl-Dorna, J.等人,EBioMedicine.2019.50,421-432)。在几项临床研究中,BM32已被安全地用于治疗草花粉引起的过敏(ClinicalTrials.gov识别号:NCT02643641),并且已经表明BM32诱导的PreS特异性抗体在体外对HBV感染具有保护作用,因为它们直接针对PreS的N端部分,该部分含有人肝细胞上NTCP受体的HBV结合位点(Cornelius, C.等人,EBioMedicine.2016.11,58-67;Tulaeva, I.等人,EBioMedicine.2020.59,102953)。事实上,显示用BM325(即VVX001)免疫慢性HBV感染患者在体内诱导了HBV中和抗体()⁴³。此外,PreS-RBD不仅诱导RBD特异性IgG抗体,而且还诱导与HBV基因型A-H的NTCP结合位点反应的PreS特异性抗体,因此也可以对HBV感染具有保护作用(图13c)。然而,示例性PreS-RBD融合蛋白的制备不仅旨在诱导SARS-CoV-2和HBV中和性抗体,而且还使用PreS作为载体蛋白来增强RBD的免疫原性。在先前的一项研究中发现约有20% SARS-CoV-2感染患者不产生RBD特异性IgG抗体(Gattinger, P.等人,Allergy.2021.76,878-883)。RBD特异性抗体有助于诱导对SARS-CoV-2的消除性免疫,因为这些抗体防止病毒与人类细胞上的ACE2受体结合,因此对病毒中和至关重要(Gattinger, P.等人,Allergy.2021.76,878-883)。因此,假设单独用RBD免疫将最终不足以在远缘杂交群体中诱导均一旦强效的RBD特异性抗体。事实上,用RBD、RBD二聚体、RBD三聚体和PreS-RBD或N-RBD融合蛋白免疫远缘杂交兔的结果支持了这一假设。这项研究发现,用20或40μg RBD、RBD二聚体或RBD三聚体免疫后,约有20-30%的兔未能产生强效RBD特异性

抗体,而用20或40 μg PreS-RBD免疫的所有兔均产生了均一旦强效的RBD特异性抗体,这在用20或80 μg N-RBD免疫后也可以观察到。这一结果可以通过将免疫原性较低的组分(即半抗原)共价偶联或融合到蛋白质载体的半抗原载体原理来解释,其可以增强半抗原的免疫原性(Paul, w.e.等, *J Exp Med.* 1970. 132, 283-299)。该原理被广泛应用于构建基于过敏原衍生肽与PreS融合的过敏原衍生肽的过敏疫苗,以增强过敏原肽的免疫原性(Valenta, R.等人, *Immunol Lett.* 2017. 189, 19-26)。因此,本研究的结果与先前在AIT进行的工作一致。

[0484] 在患有PreS RBD的人类受试者中诱导的RBD特异性IgG抗体与RBD突变体和变体发生交叉反应,甚至包括高度突变的VOC奥密克戎(图13b),表明基于PreS-RBD的疫苗具有交叉保护,甚至抵抗强烈突变的VOC的潜力。PreS-RBD含有两个RBD结构域,一个与PreS的N-端融合,另一个与PreS的C-端融合。可以通过将两种最不同和最常见SARS-CoV-2VOC的RBD包含在PreS-RBD构建体中来增强交叉保护作用。这将具有的优势是,两种SARS-CoV-2VOC的相关表位可以仅包含在一种抗原中,这将允许以高度有效的方式应对新出现的病毒变体的挑战。

[0485] 当通过其中位阻断活性测定,在PreS-RBD免疫的受试者中诱导的RBD特异性抗体被发现比用目前可获得和注册的COVID-19疫苗完全接种的受试者和COVID-19康复患者中获得的抗体的RBD与ACE2的结合阻断更强(图14)。这些结果是通过使用两种不同的病毒中和试验测试VNT来证实的,一种测定病毒抗原的产生,第二种测定病毒的细胞病变作用。

[0486] 除了折叠PreS-RBD诱导抗体阻断RBD-ACE2结合从而感染宿主细胞外,其它观察结果还表明,折叠PreS-RBD具有疫苗特征,可用于诱导针对SARS-CoV-2感染的消除性免疫。其中一项观察结果是,不仅在血清中检测到RBD特异性抗体,而且在粘膜液(即泪液和鼻液)中也检测到RBD特异性抗体,这些粘膜液来源于病毒最初进入人体并感染宿主细胞以及最初复制的部位。对于AIT疫苗也获得了类似的发现,事实上,AIT疫苗阻断了过敏原与粘膜部位过敏效应细胞结合的IgE抗体的对接,从而预防局部过敏性炎症(Reisinger, J.等人, *J Allergy Clin Immunol.* 2005. 116, 347-354; Shamji, M.H.等人, *J Allergy Clin Immunol.* 2019. 143, 1067-1076)。

[0487] 另一个发现为PreS-RBD免疫不仅诱导了第一波短暂的特异性IgG₁抗体,而且还诱导了第二波延迟但持续的特异性IgG₄抗体。事实上,从AIT中已知,AIT诱导的过敏原特异性IgG₄抗体在接种疫苗的受试者体内持续存在很长时间,因此被认为有助于AIT的长期保护作用(即使在停止治疗后)(Larché, M.等人, *Nat Rev Immunol.* 2006. 6, 761-771; Shamji, M.H.等人, *Allergy.* 2021. 76, 3627-3641)。因此,PreS-RBD可以具有通过诱导RBD特异性IgG₄抗体的持续产生来诱导针对SARS-CoV-2的持久的消除性免疫的潜能,这些抗体实际上被认为是非炎症中和抗体(van der Neut Kolfshoten, M.等人, *Science.* 2007. 317, 1554-1557)。

[0488] 到目前为止,在每只接种了五剂疫苗的免疫兔中未观察到不良事件。在免疫受试者中也没有观察到不良副反应。

[0489] 总结而言,本实施例描述了具有诱导针对SARS-CoV-2变体的消除性免疫的潜力的SARS-CoV-2亚单位疫苗的体外和体内表征。

[0490] 实施例7参考文献

[0491] Argentinian AntiCovid Consortium. Structural and functional comparison

of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):21779. Published 2020 Dec 11. doi:10.1038/s41598-020-78711-6

[0492] Cornelius, C., et al. Immunotherapy With the PreS-based Grass Pollen Allergy Vaccine BM32 Induces Antibody Responses Protecting Against Hepatitis B Infection. *EBioMedicine.* 11, 58-67. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.023 (2016).

[0493] Eckl-Dorna, J., et al. Two years of treatment with the recombinant grass pollen allergy vaccine BM32 induces a continuously increasing allergen-specific IgG4 response. *EBioMedicine.* 50, 421-432. doi:10.1016/j.ebiom.2019.11.006 (2019).

[0494] Gattinger, P., et al. Antibodies in serum of convalescent patients following mild COVID-19 do not always prevent virus-receptor binding. *Allergy.* 76, 878-883. doi:10.1111/all.14523 (2021).

[0495] Larché, M., Akdis, C.A., & Valenta, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 6, 761-771. doi:10.1038/nri1934 (2006).

[0496] Paul, W.E., et al. Carrier function in anti-hapten immune responses. II. Specific properties of carrier cells capable of enhancing anti-hapten antibody responses. *J Exp Med.* 132, 283-299. doi:10.1084/jem.132.2.283 (1970).

[0497] Reisinger, J., et al. Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 347-354. doi:10.1016/j.jaci.2005.04.003 (2005).

[0498] Shamji, M.H., et al. Nasal allergen-neutralizing IgG4 antibodies block IgE-mediated responses: Novel biomarker of subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 143, 1067-1076. doi:10.1016/j.jaci.2018.09.039 (2019).

[0499] Shamji, M.H., et al. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy.* 76, 3627-3641. doi:10.1111/all.14908 (2021).

[0500] Tulaeva, I., et al. Quantification, epitope mapping and genotype cross-reactivity of hepatitis B preS-specific antibodies in subjects vaccinated with different dosage regimens of BM32. *EBioMedicine.* 59, 102953. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102953 (2020).

[0501] Valenta, R., Campana, R., & Niederberger, V. Recombinant allergy vaccines based on allergen-derived B cell epitopes. *Immunol Lett.* 189, 19-26. doi:10.1016/j.imlet.2017.04.015 (2017).

[0502] van der Neut Kolfschoten, M., et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 317, 1554-1557. doi:10.1126/science.1144603 (2007).

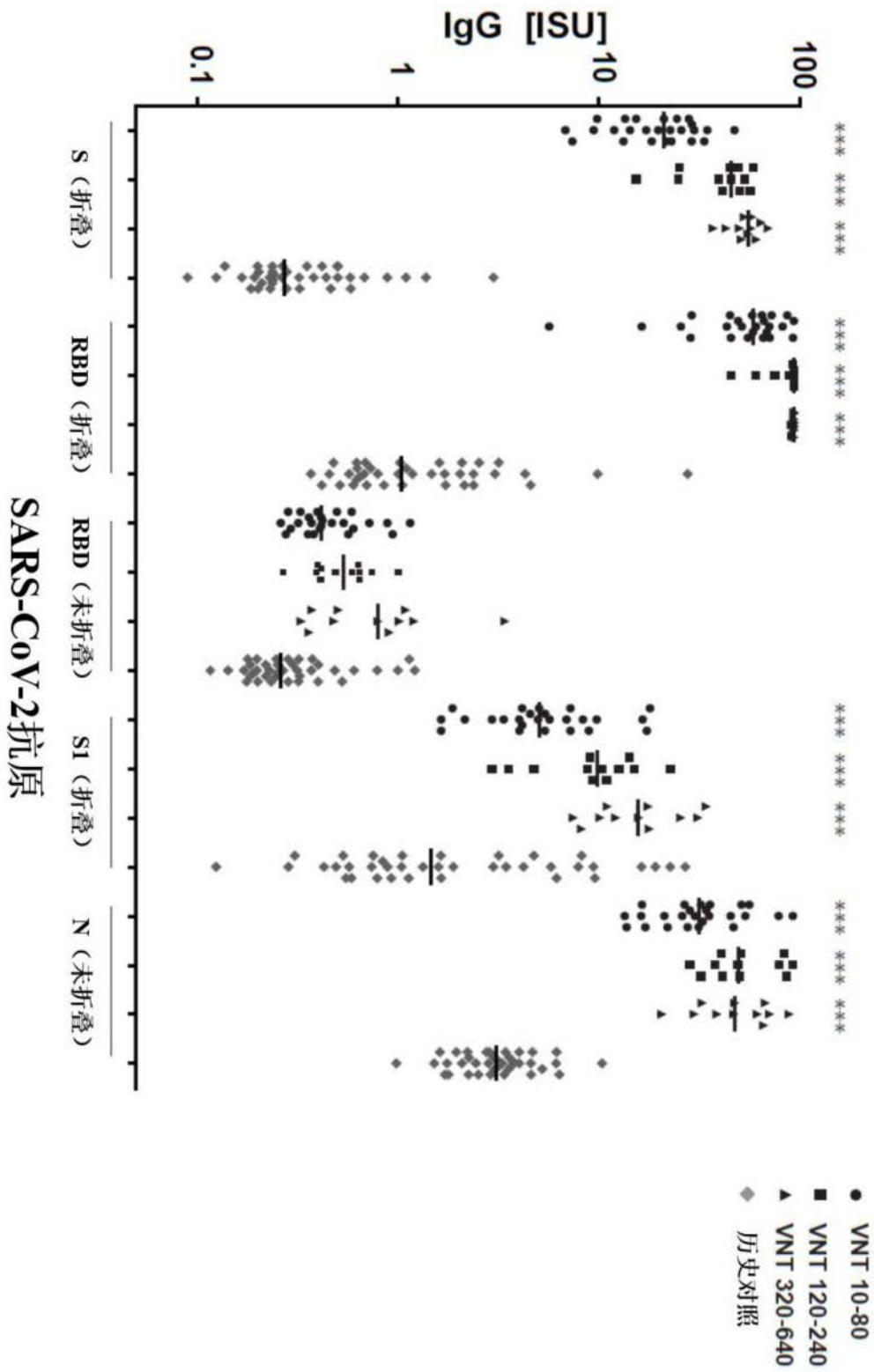


图1

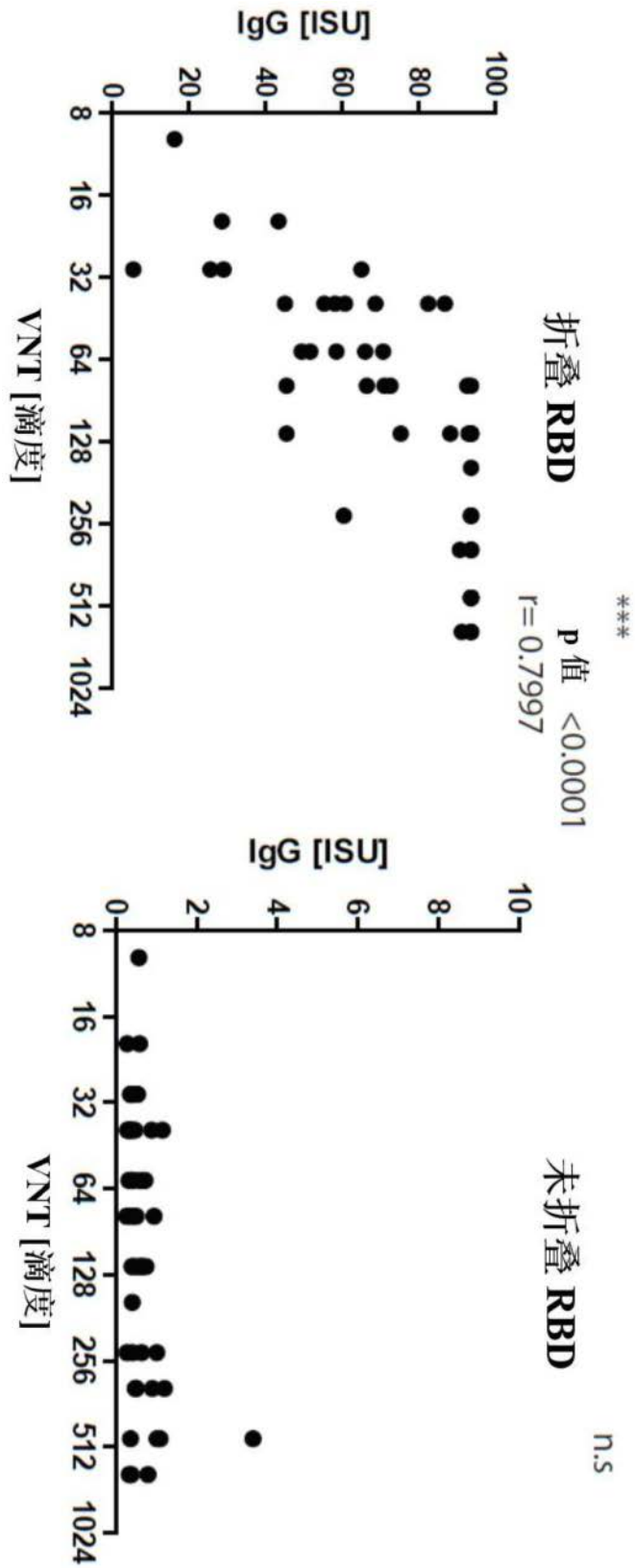


图2A

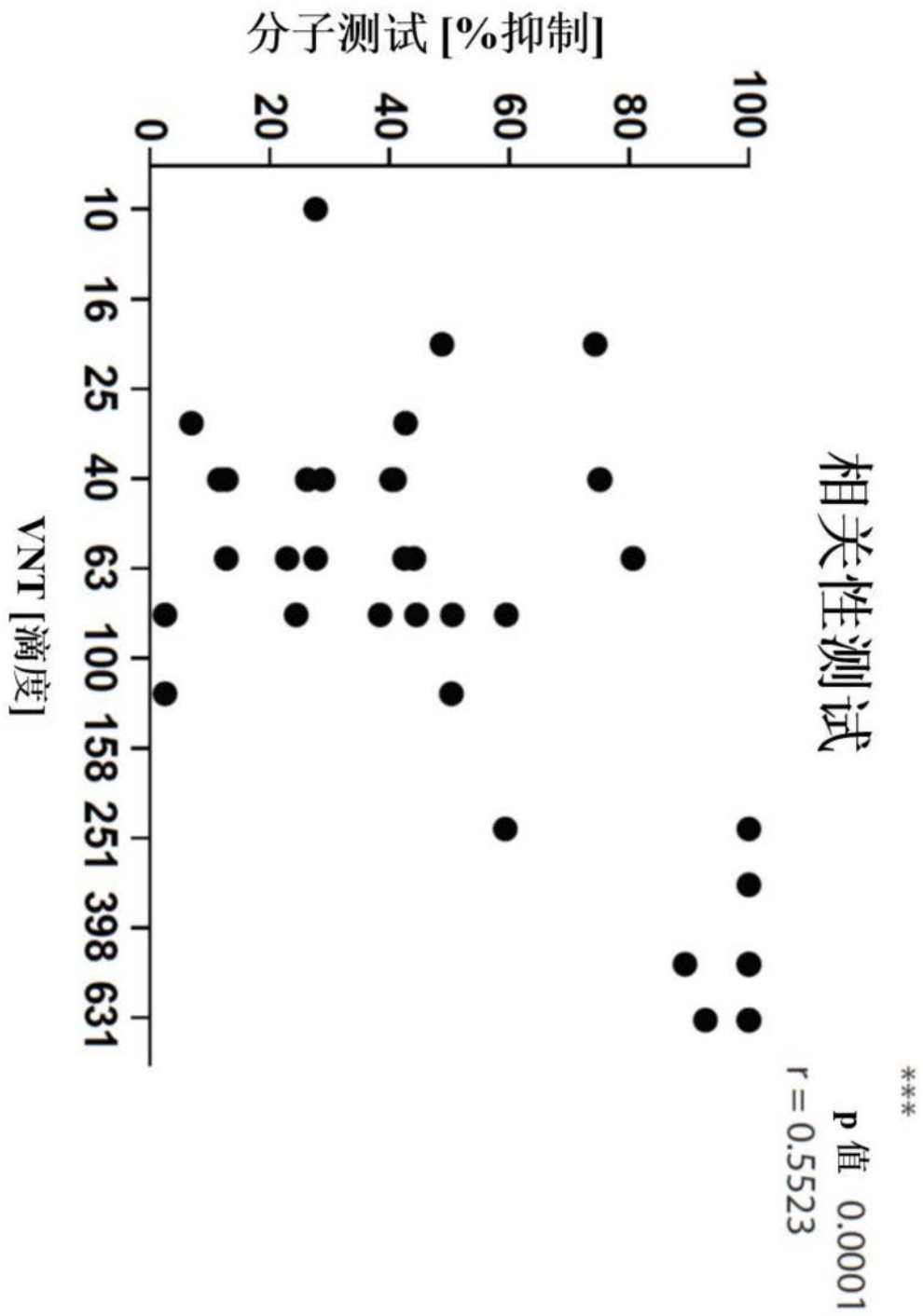


图2B

RBD (折叠)

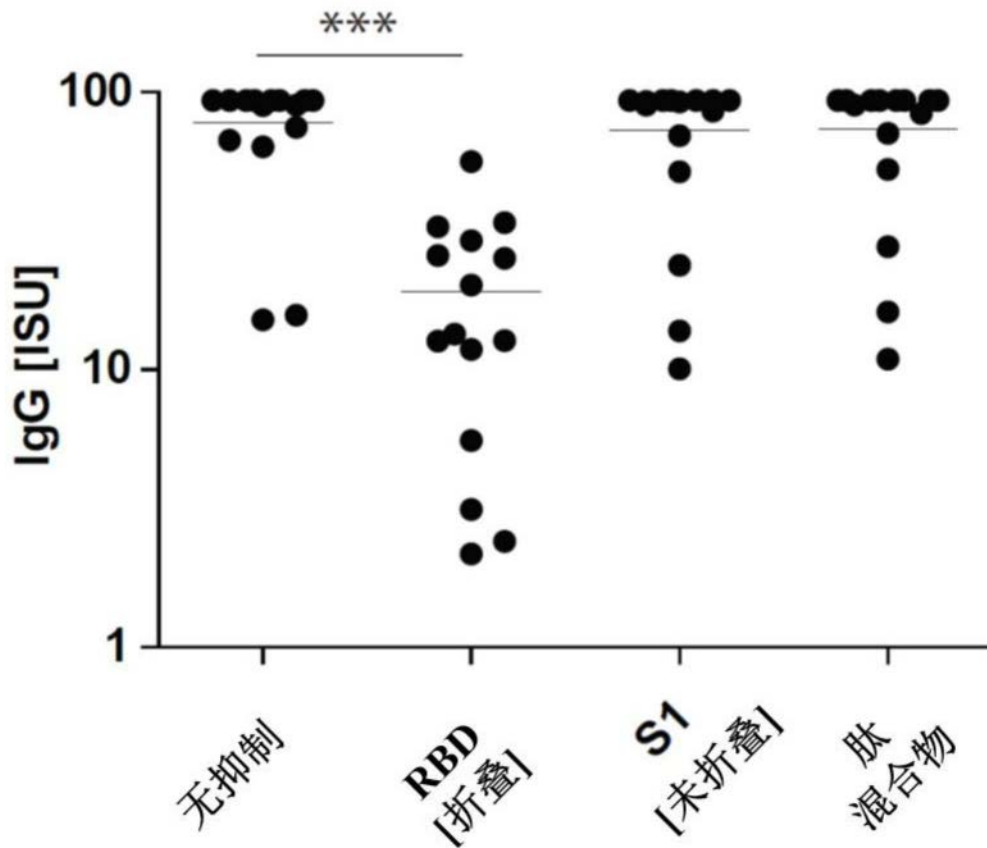


图3

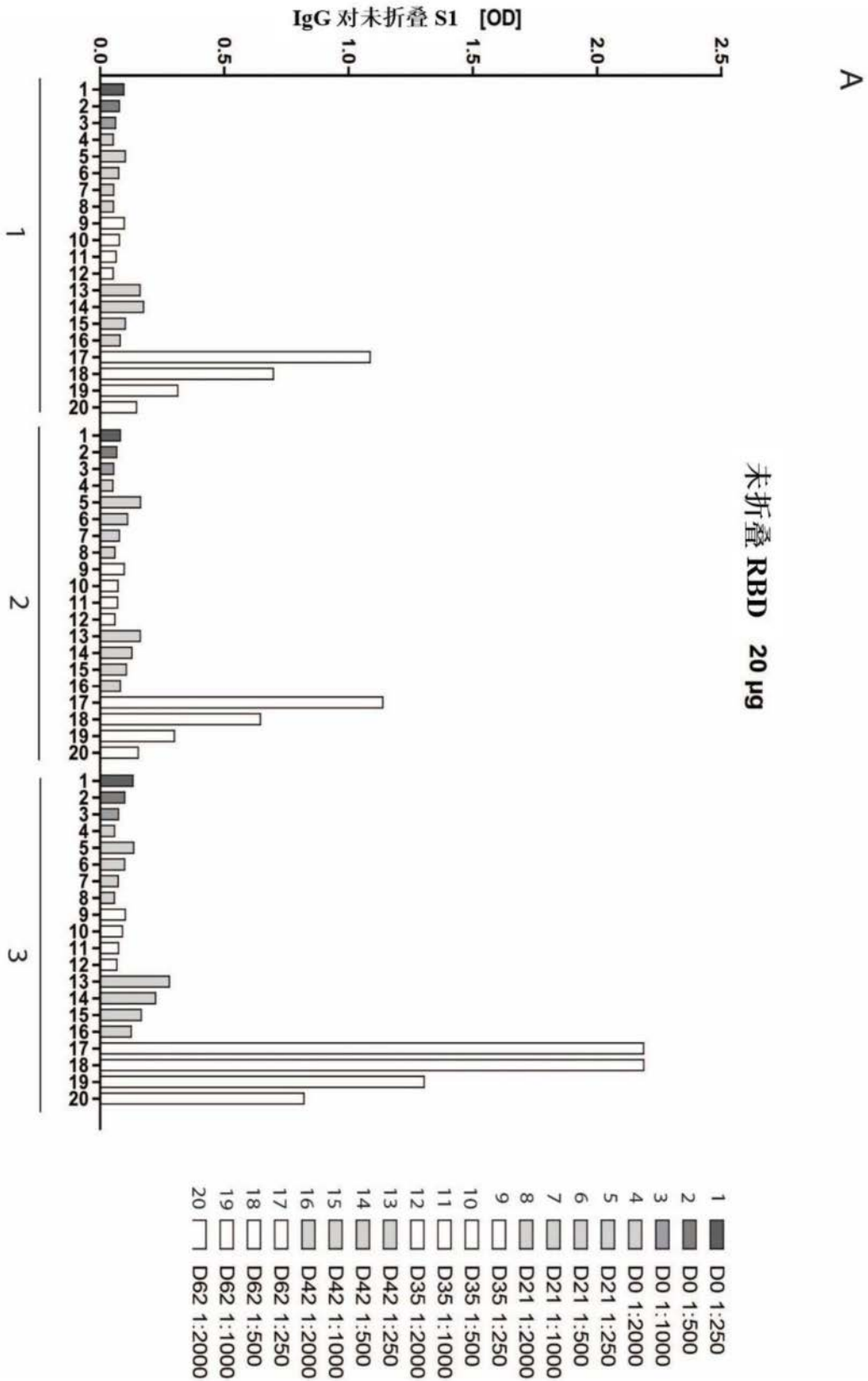


图4A

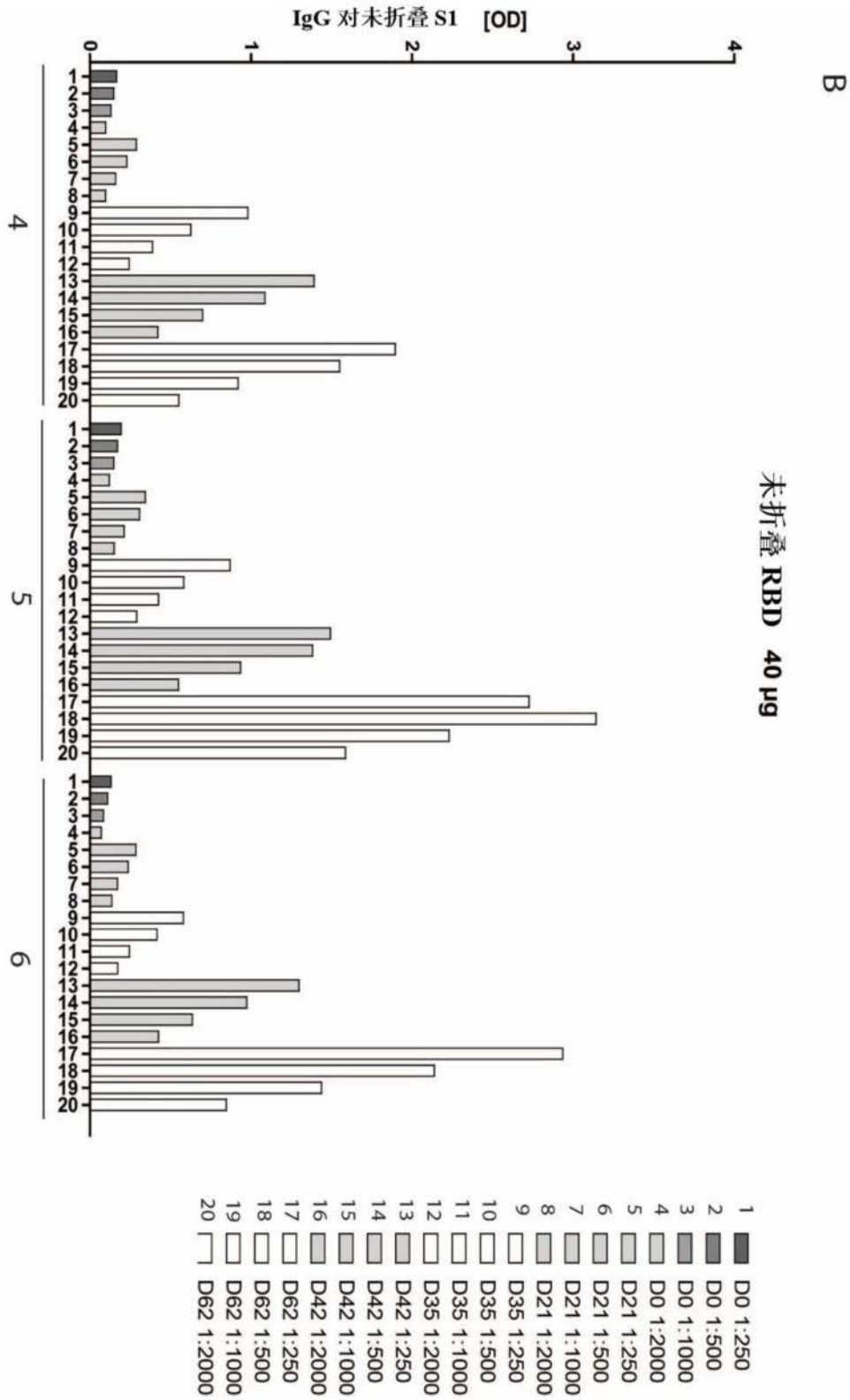


图4B

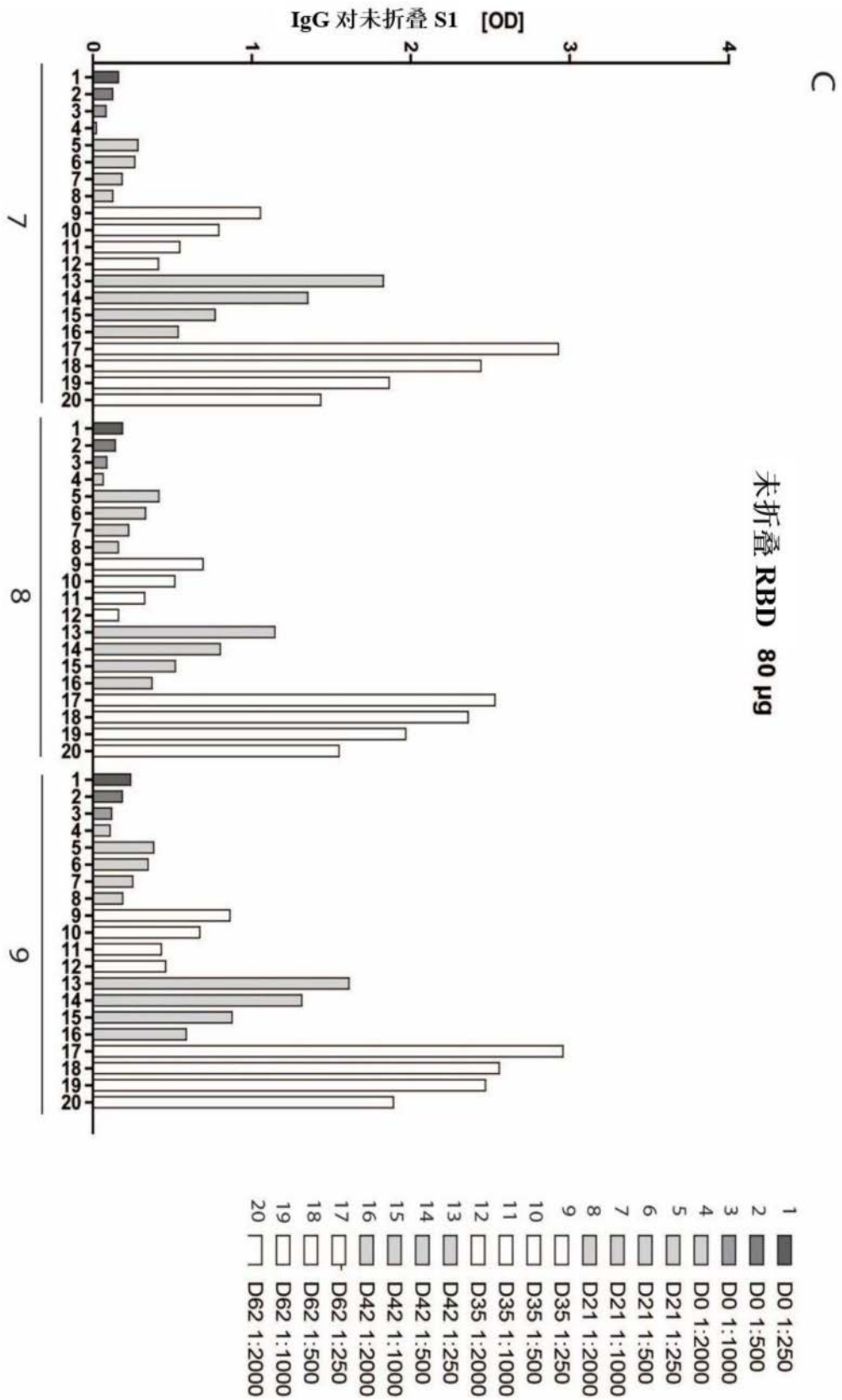


图4C

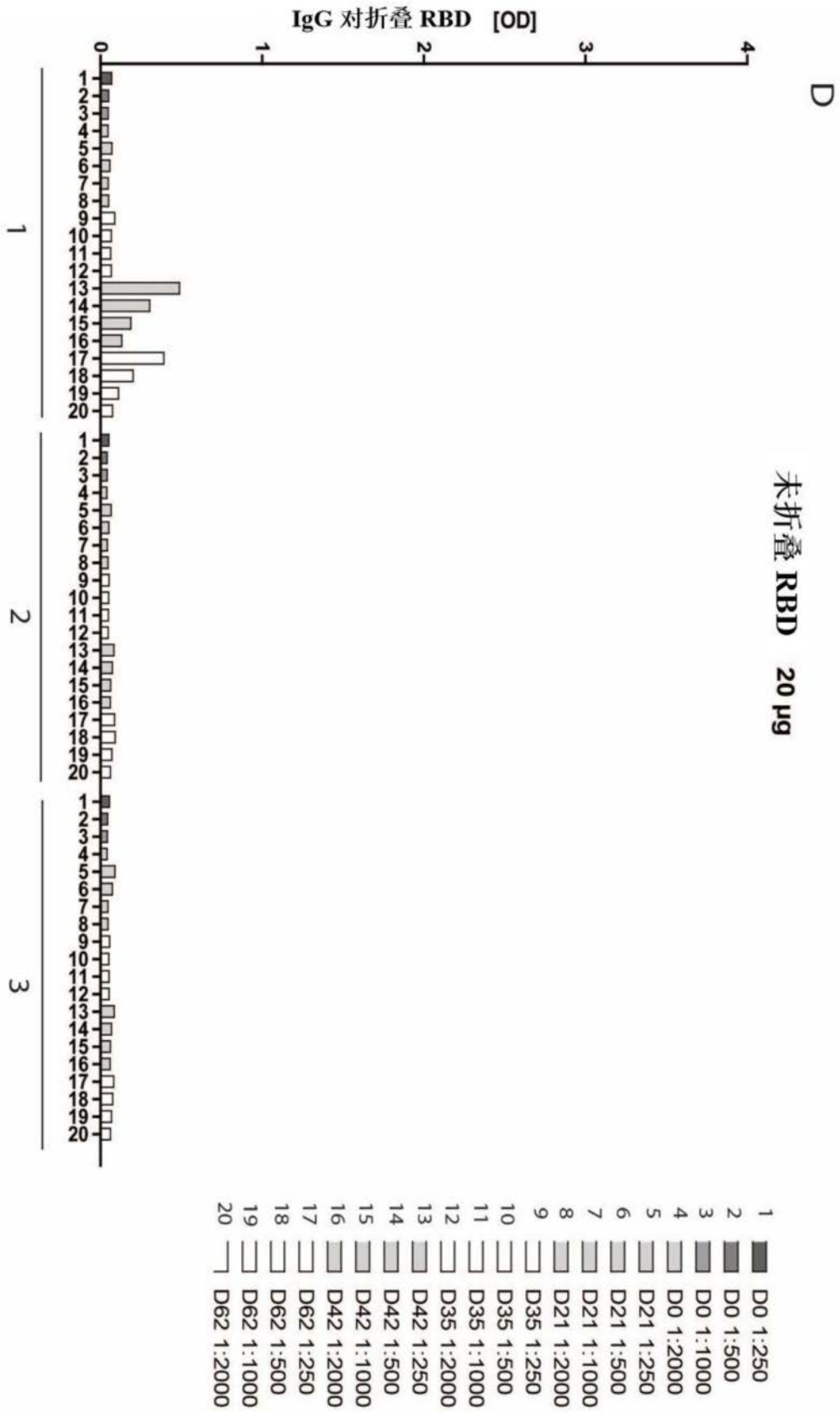


图4D

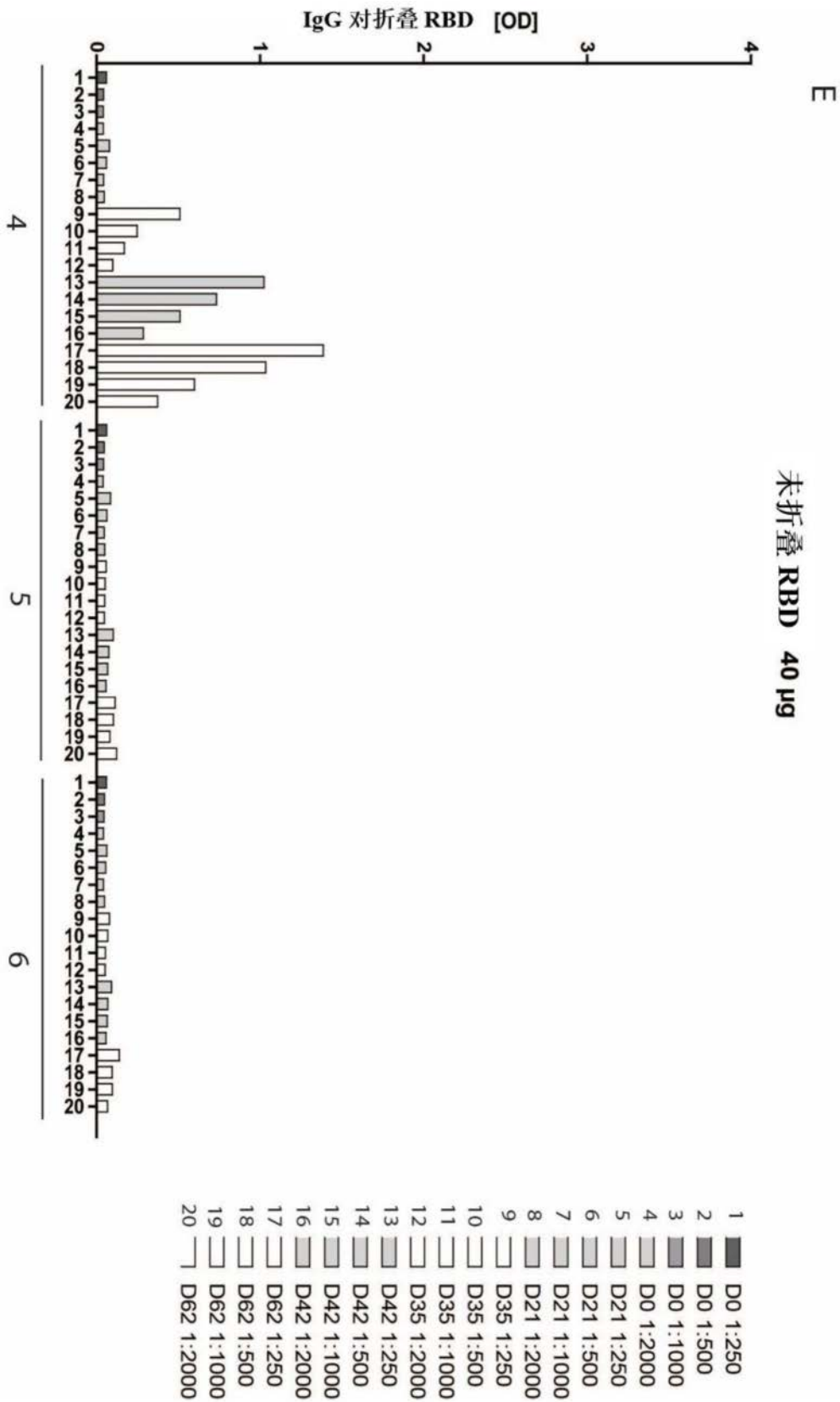


图4E

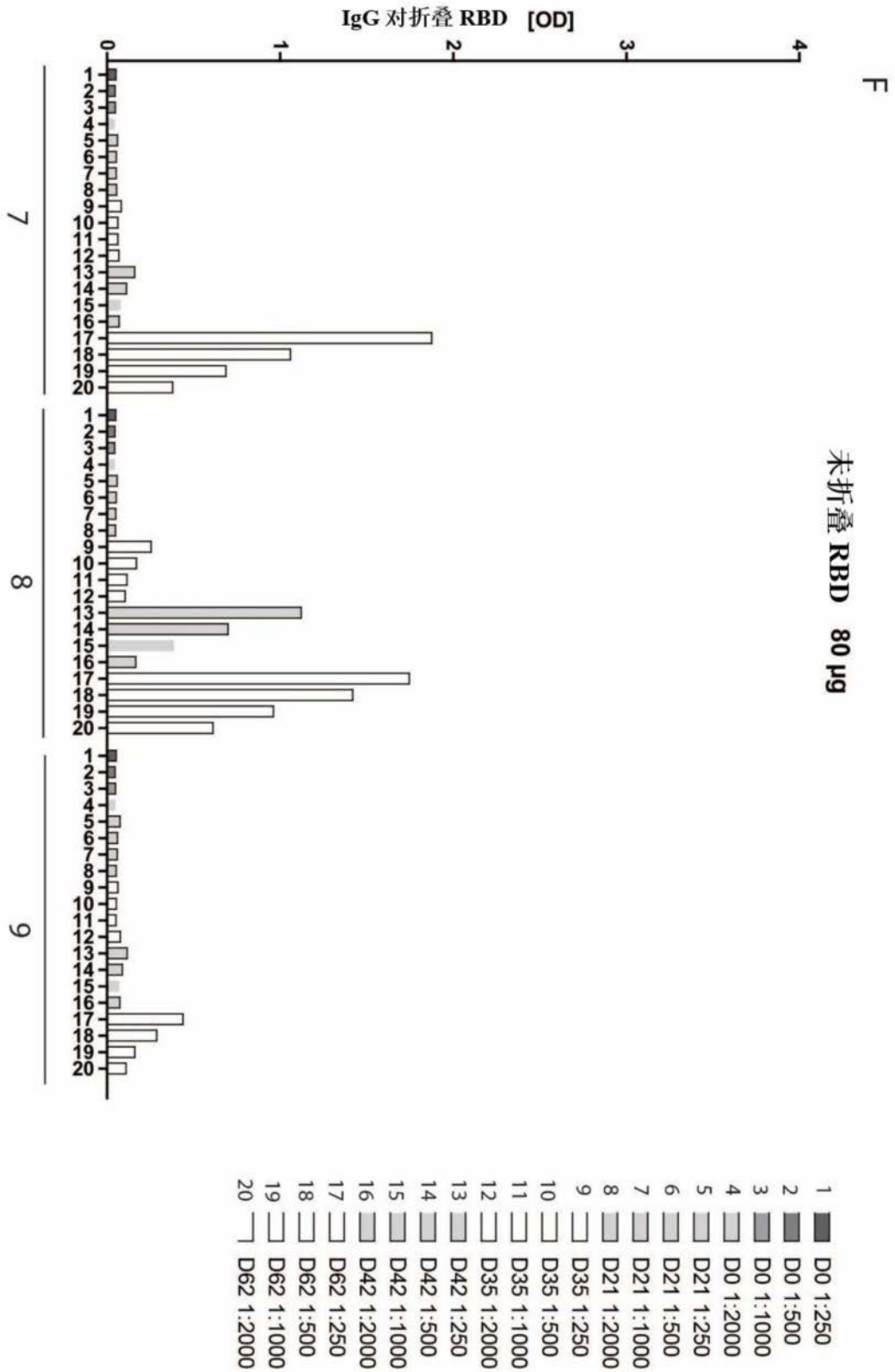


图4F

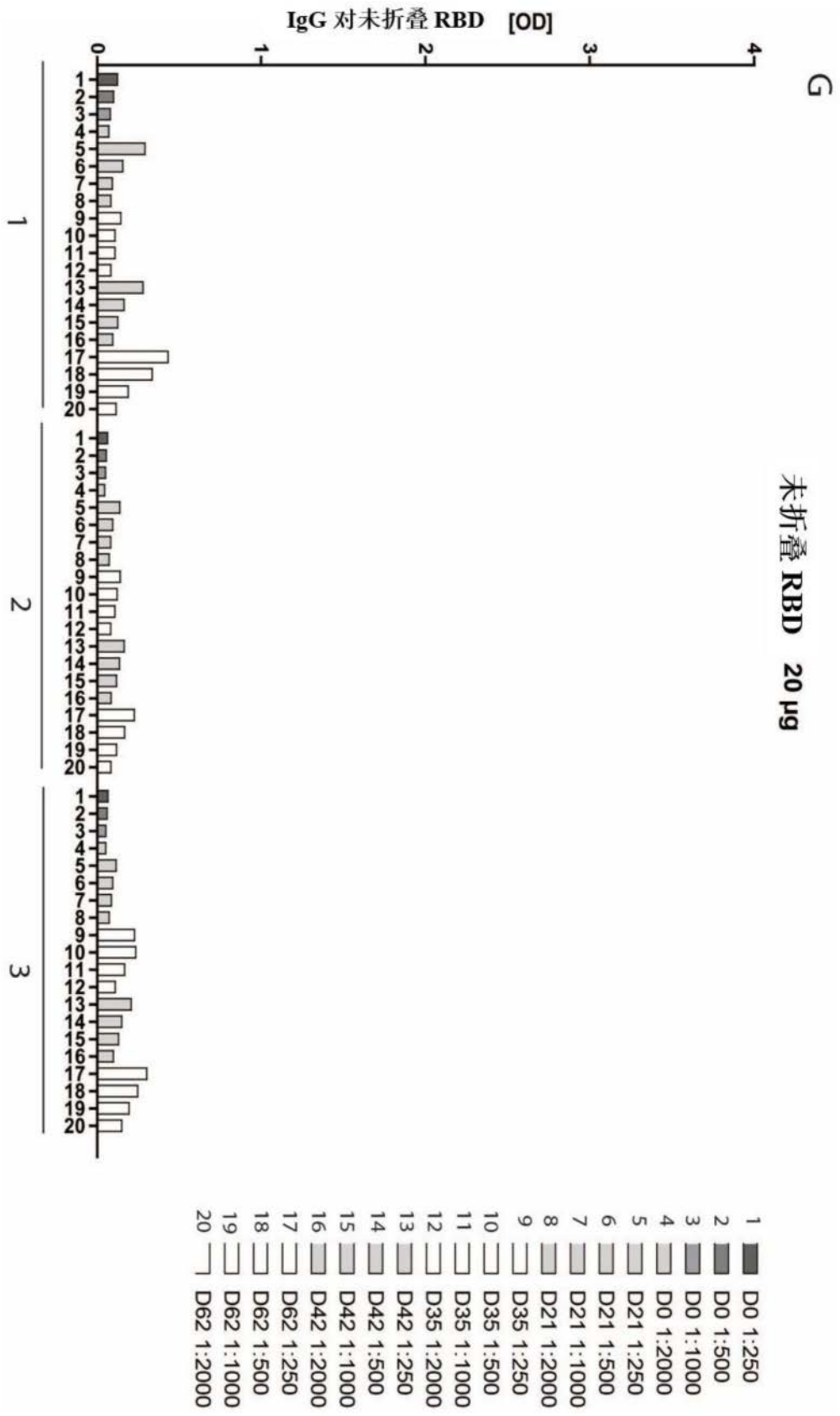


图4G

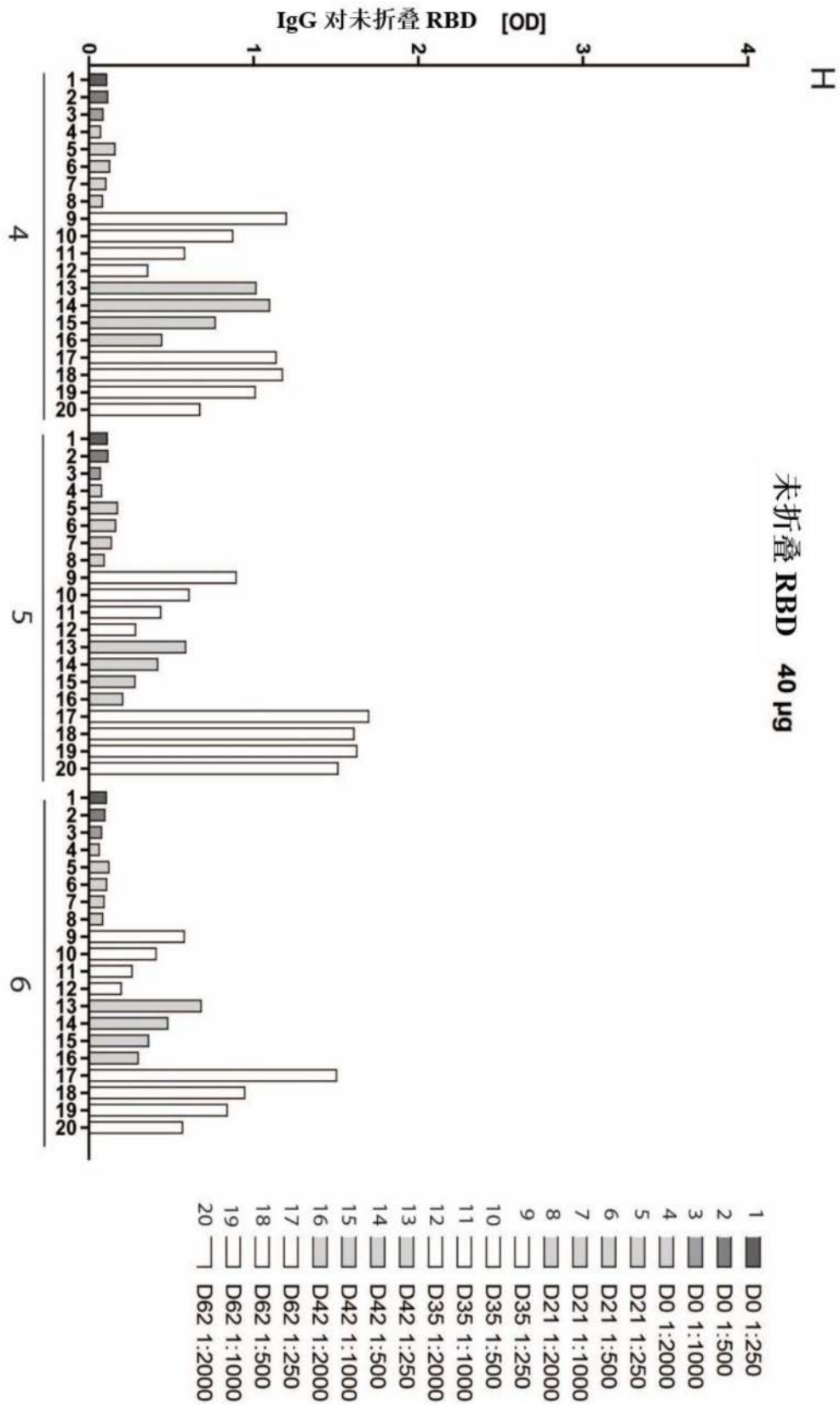


图4H

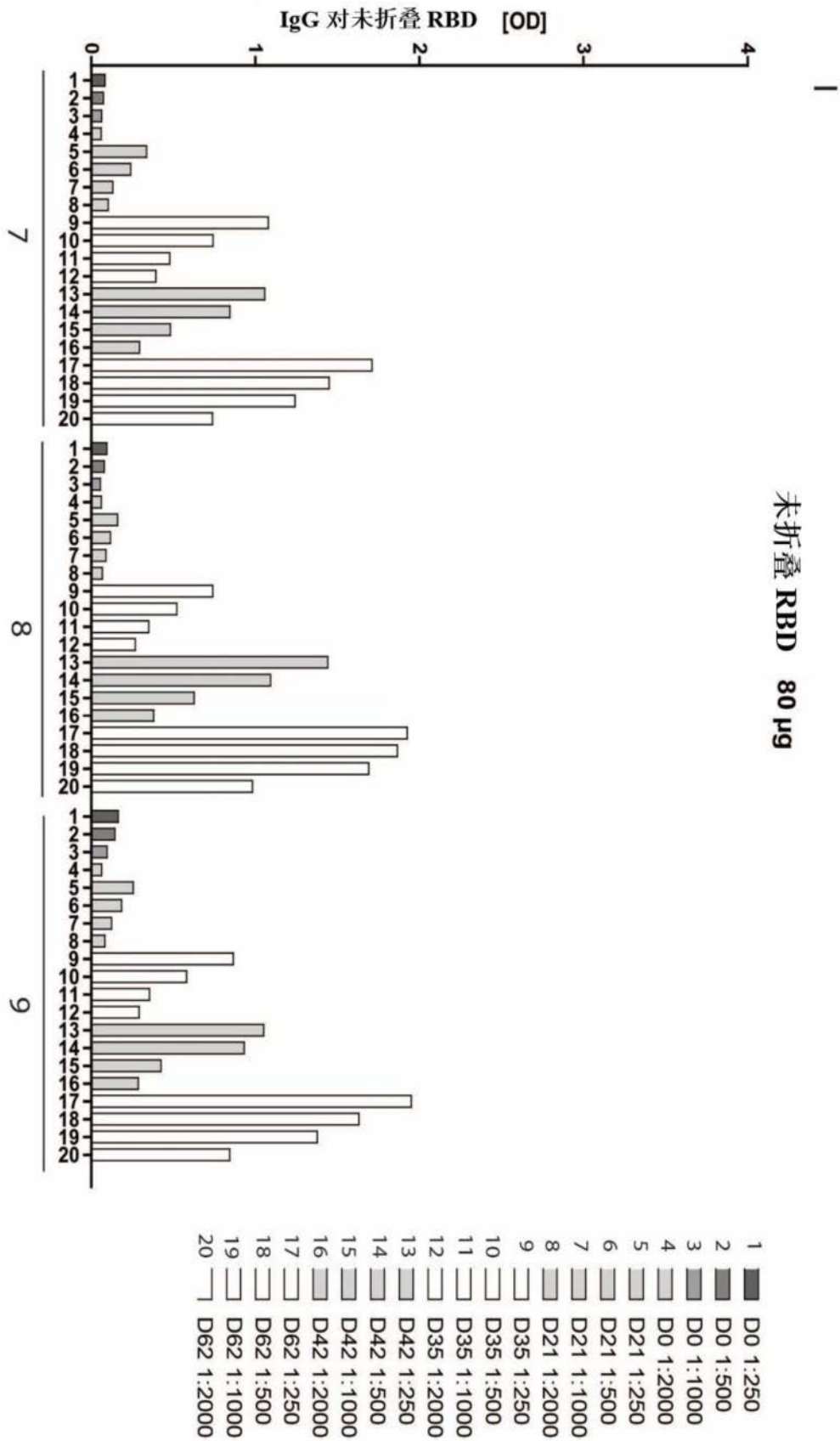


图4I

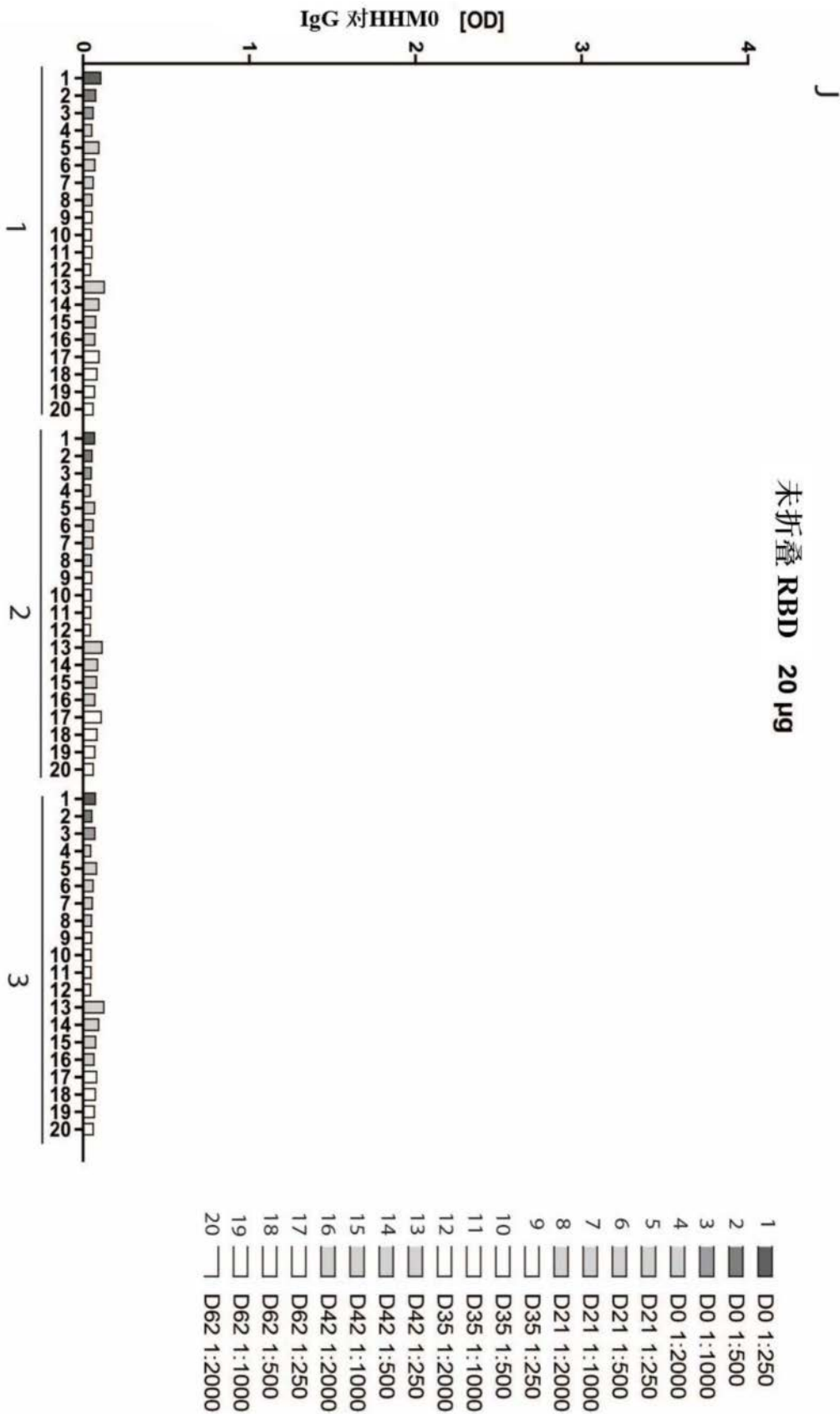


图4J

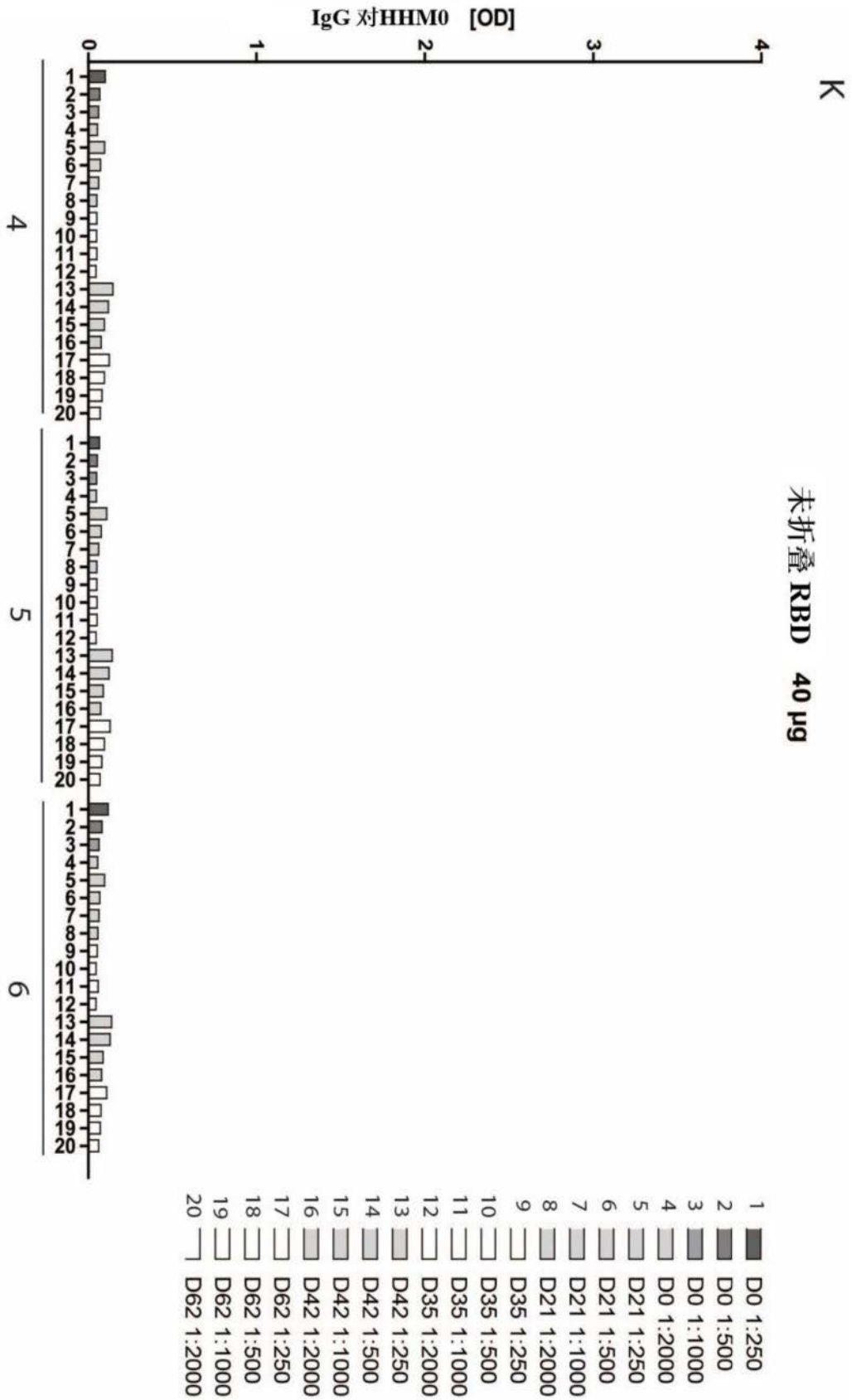


图4K

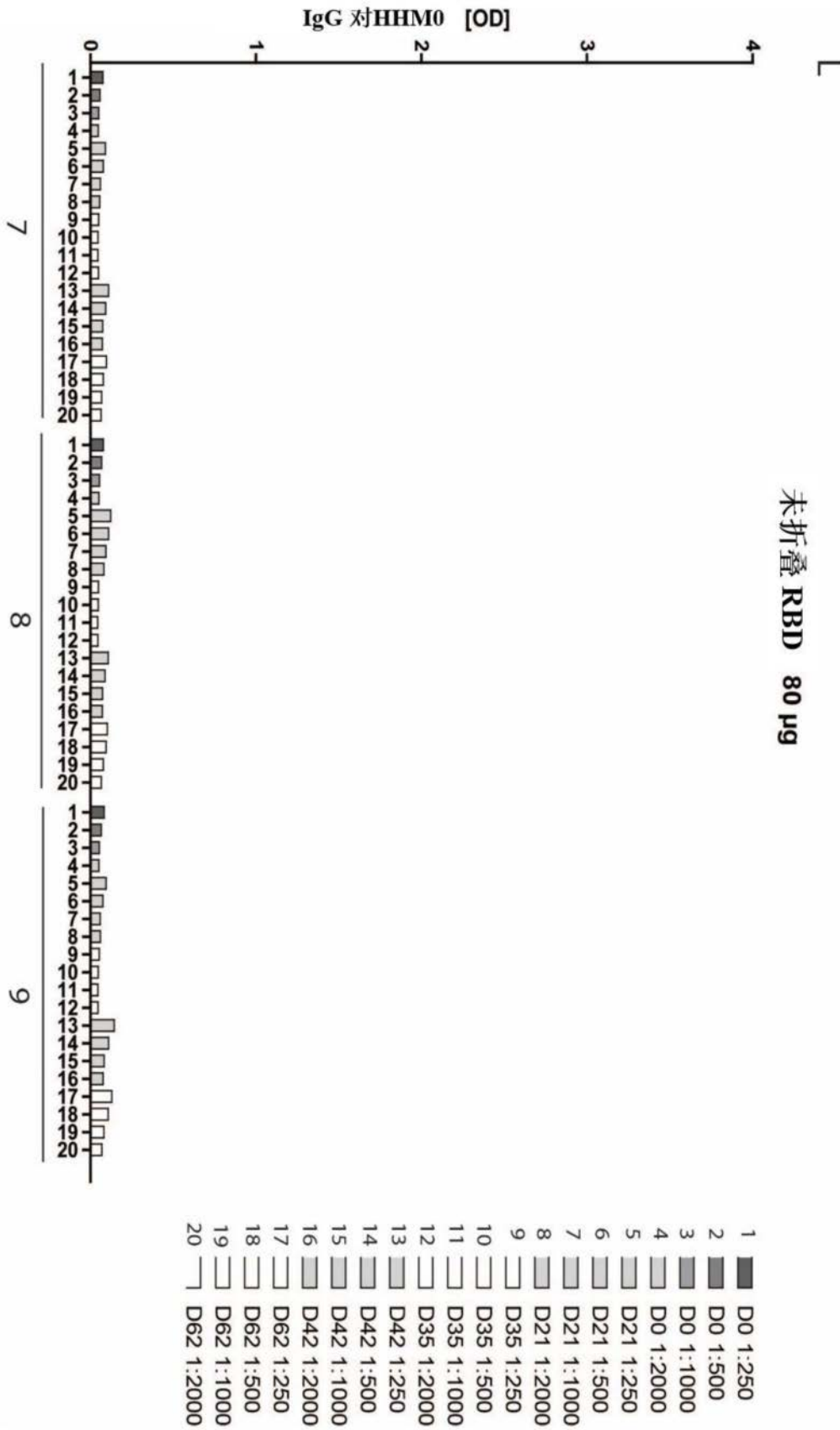


图4L

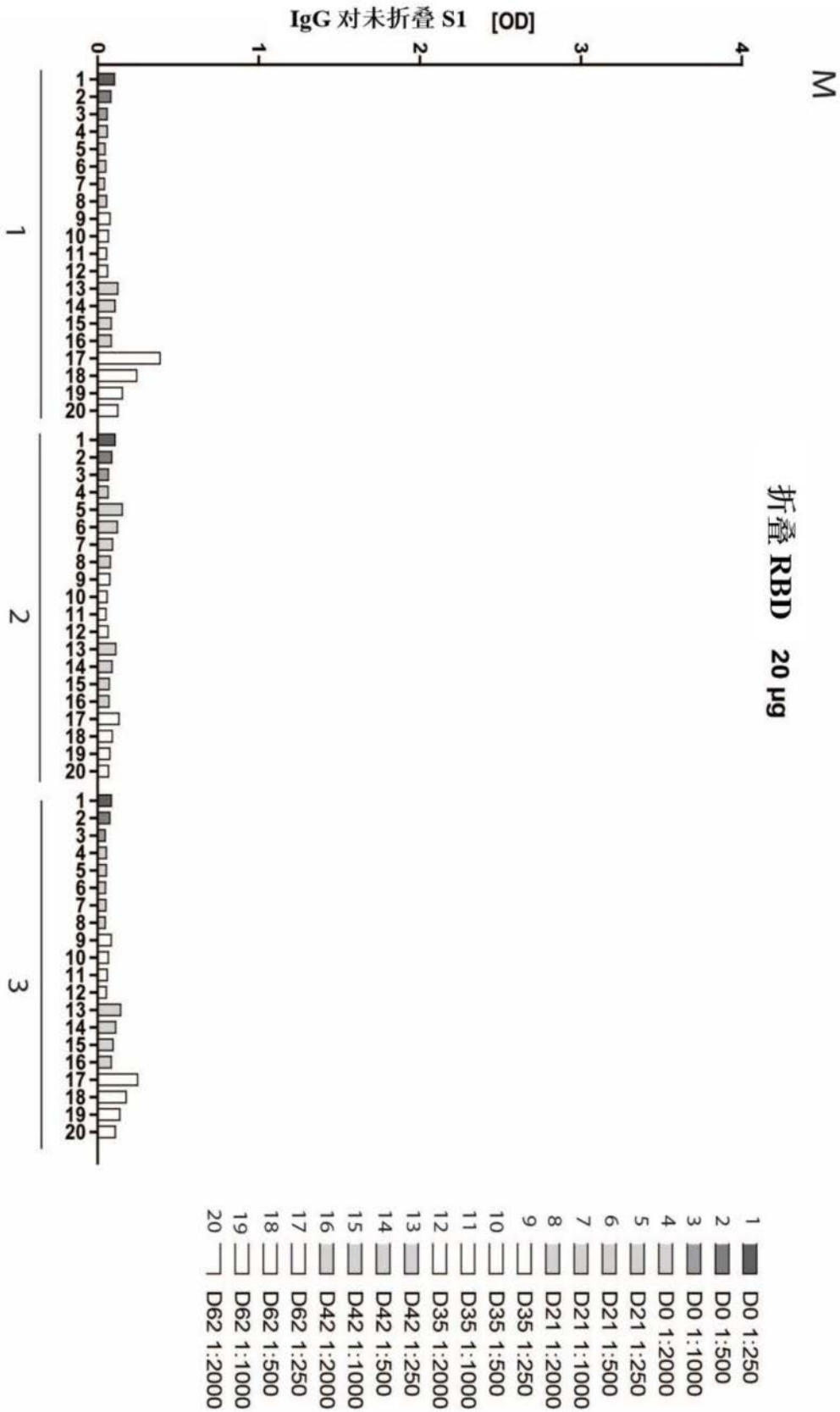


图4M

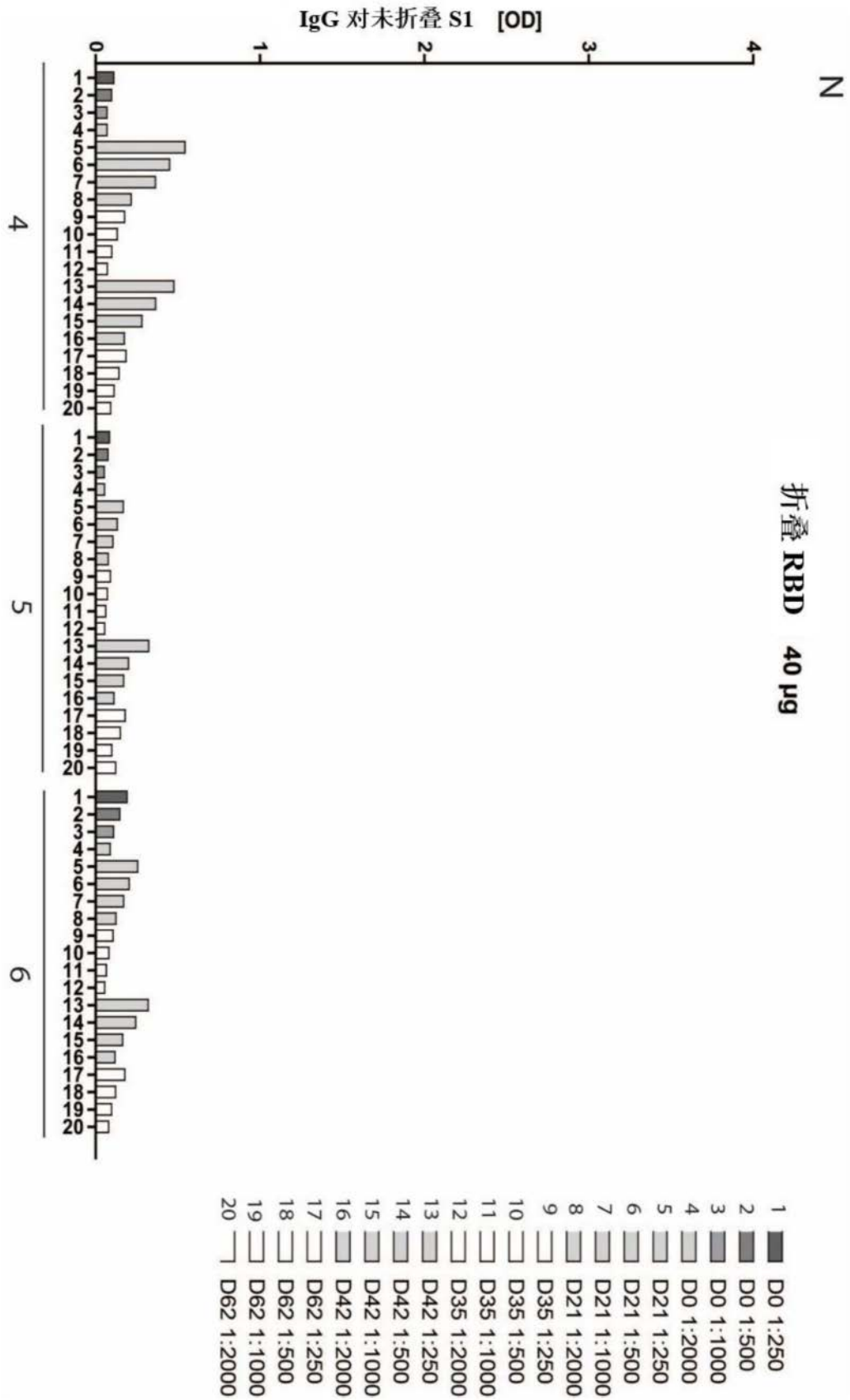


图4N

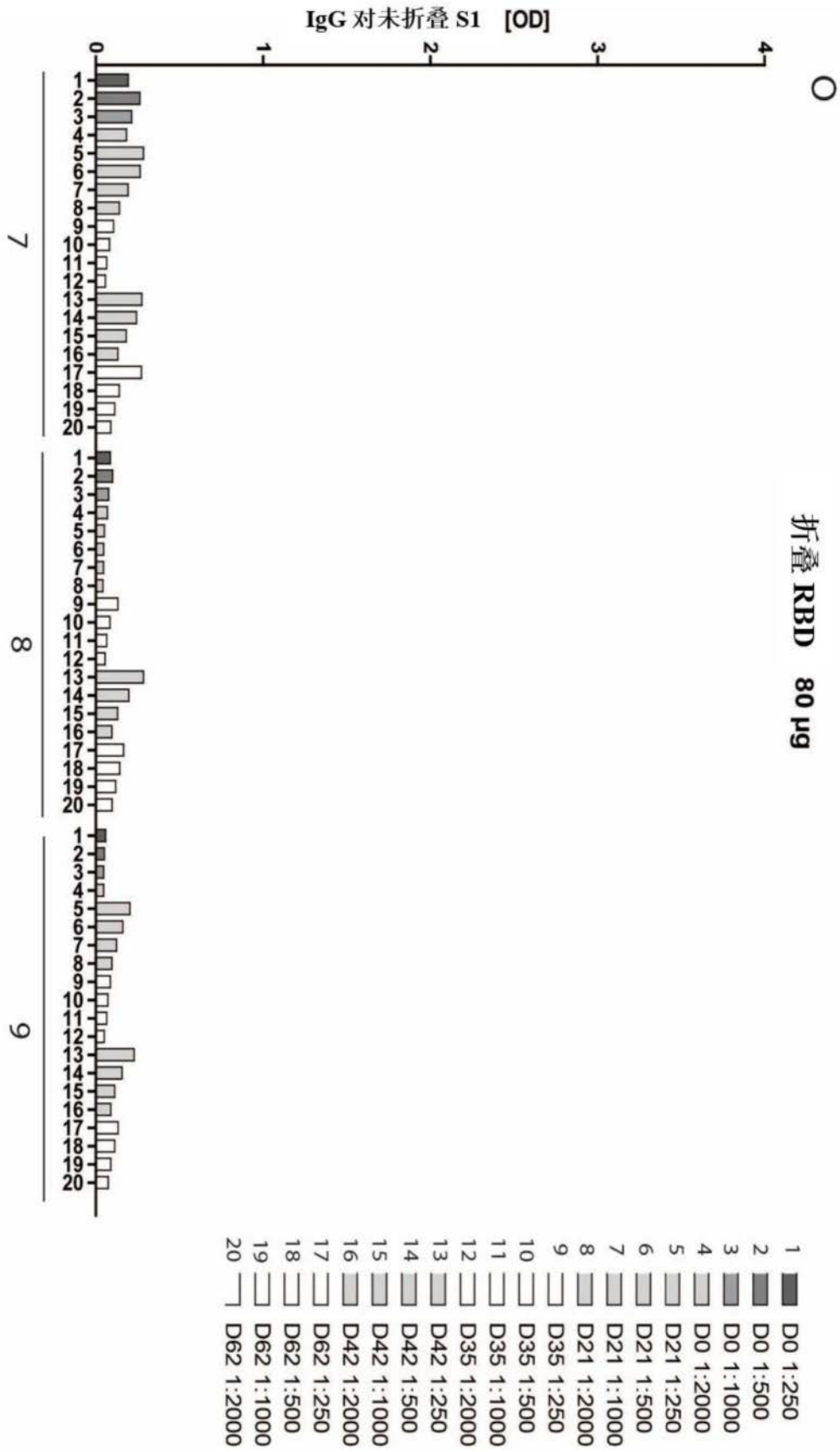


图40

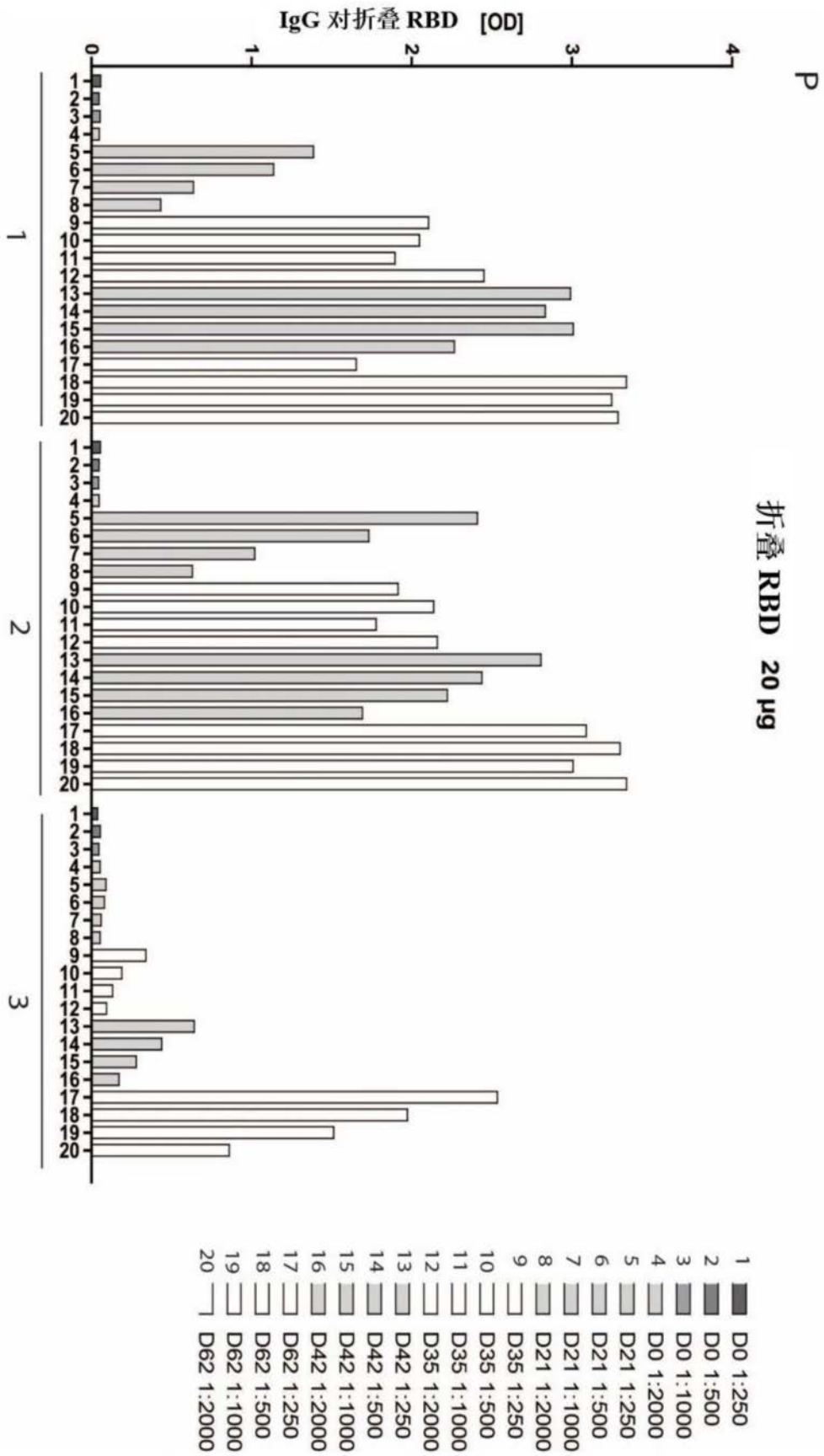


图4P

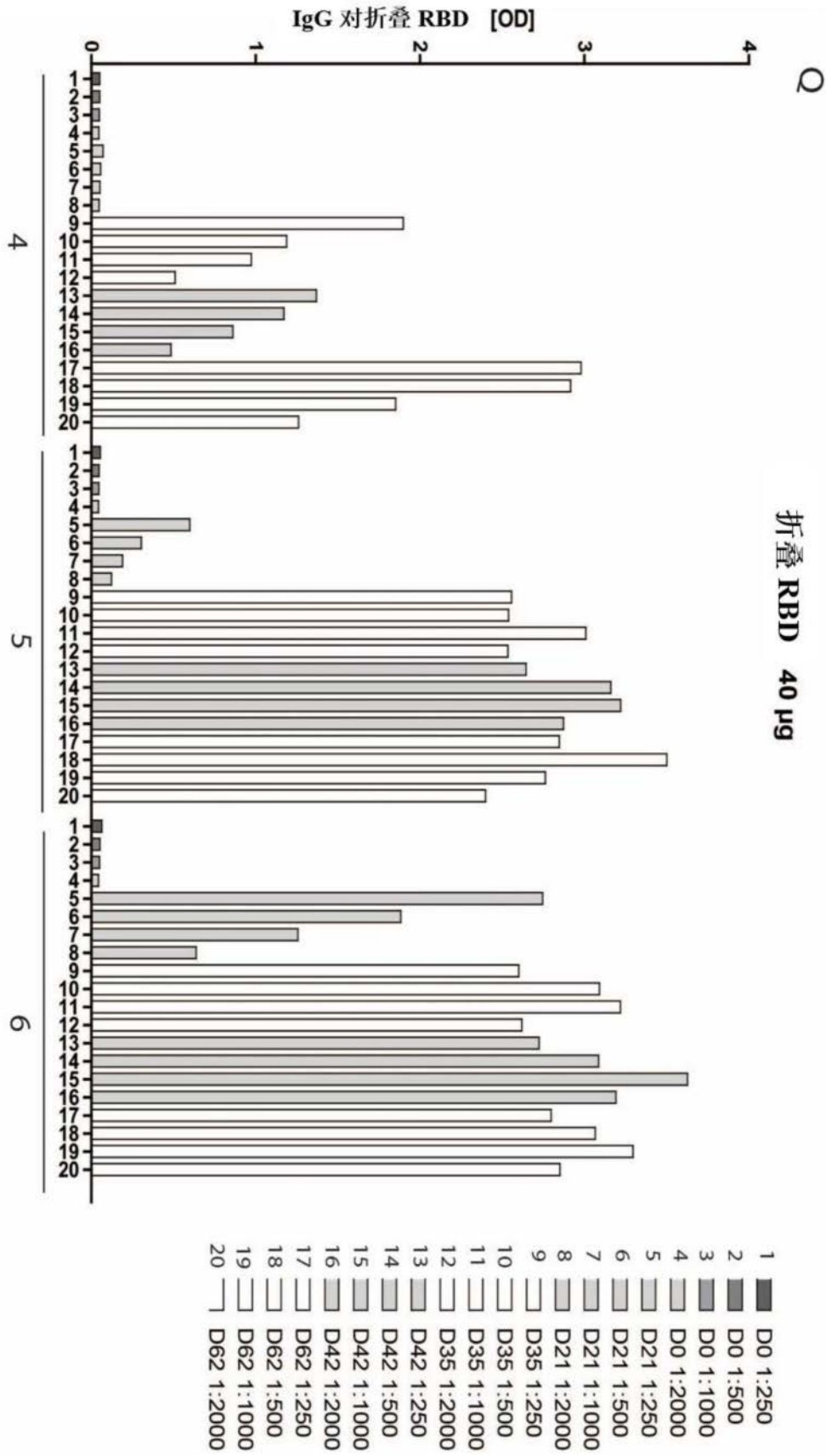


图4Q

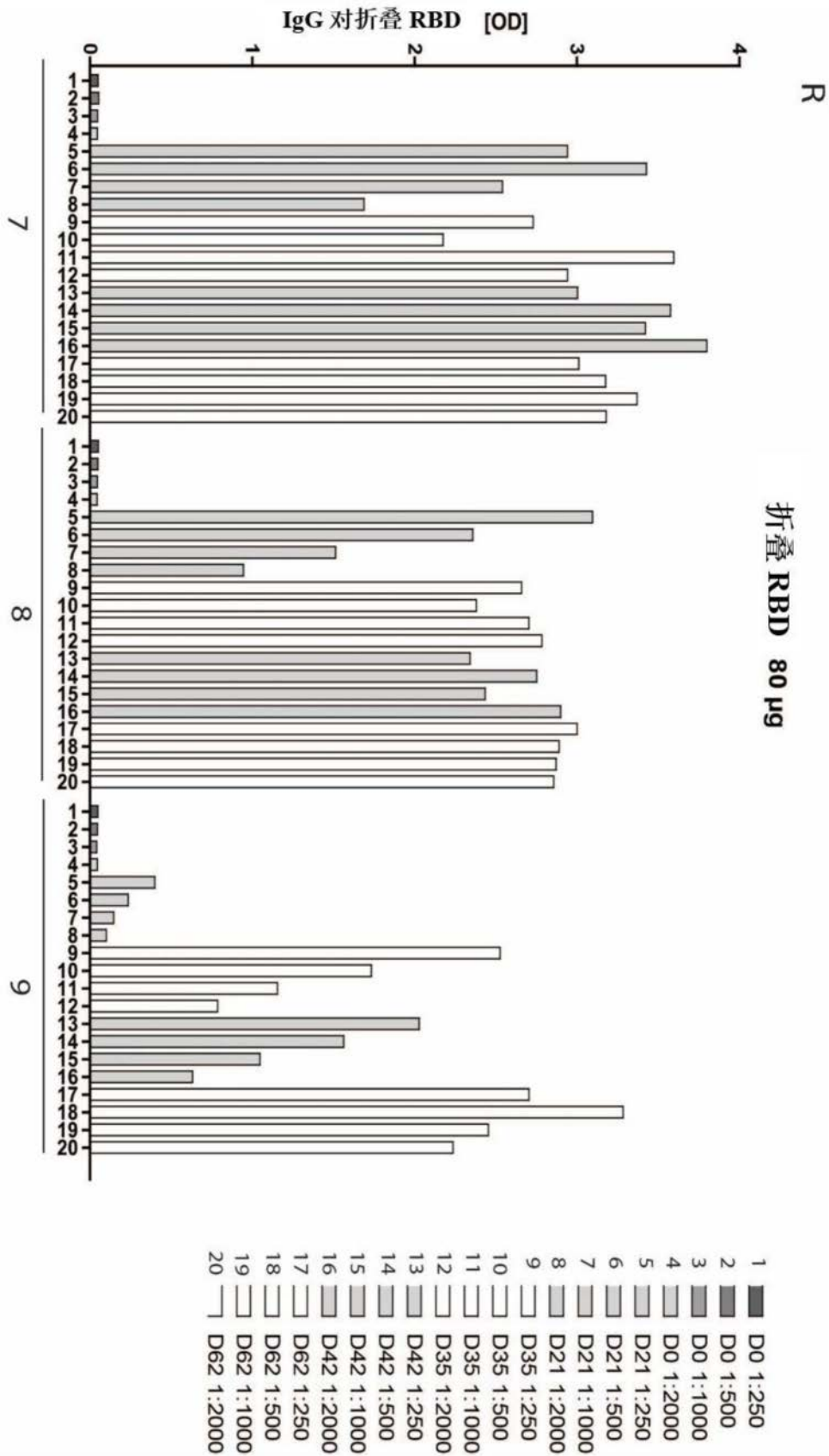


图4R

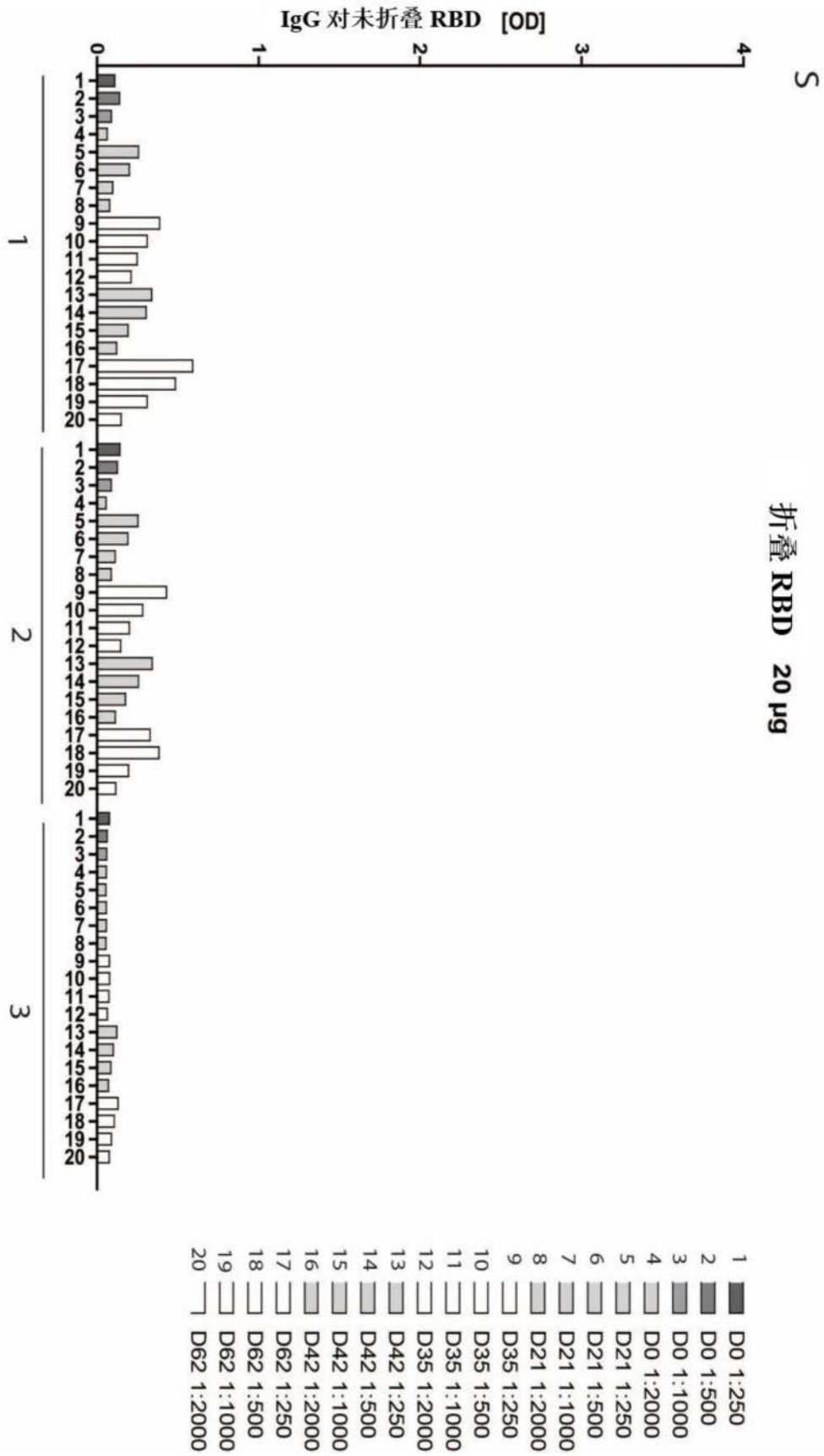


图4S

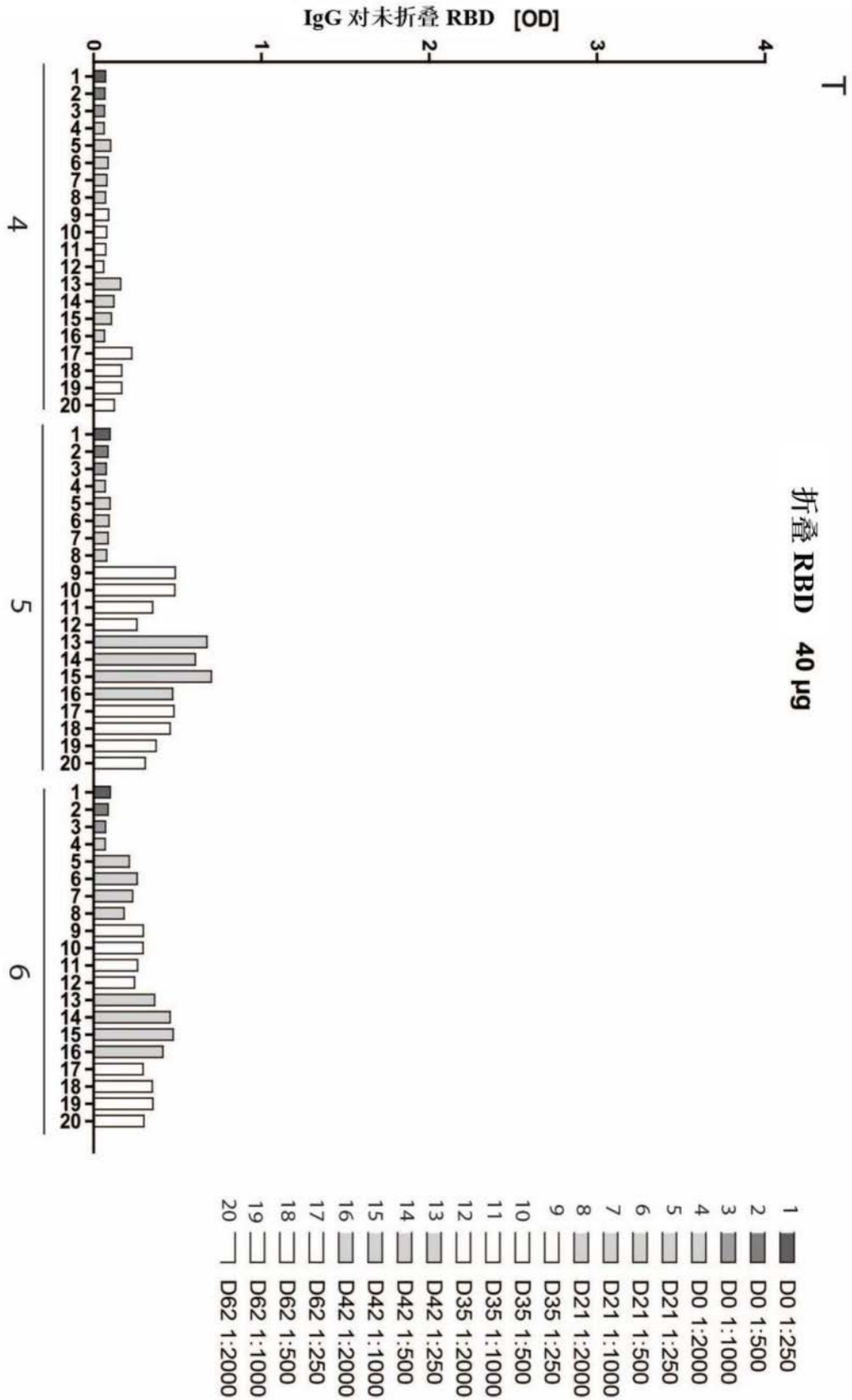


图4T

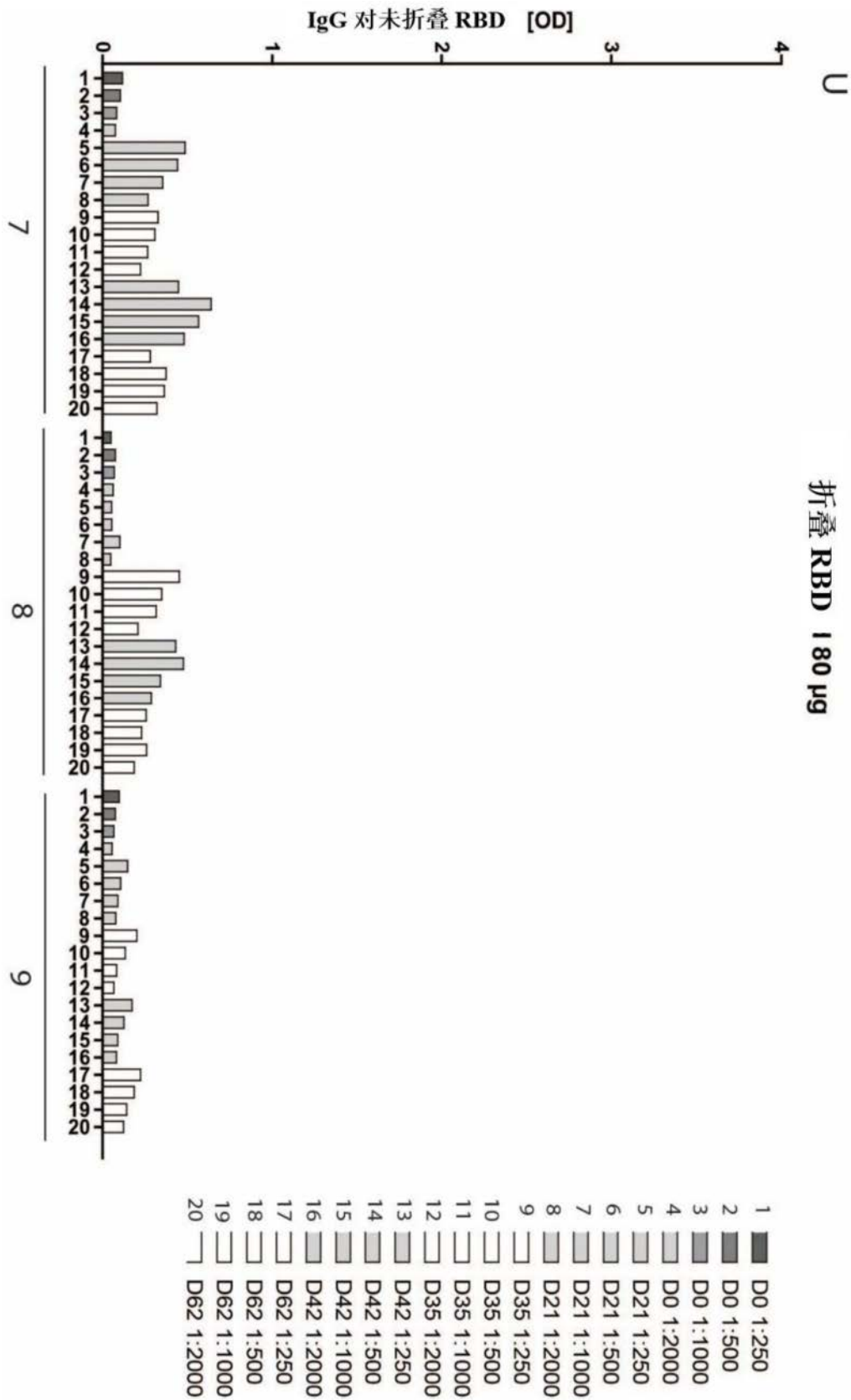


图4U

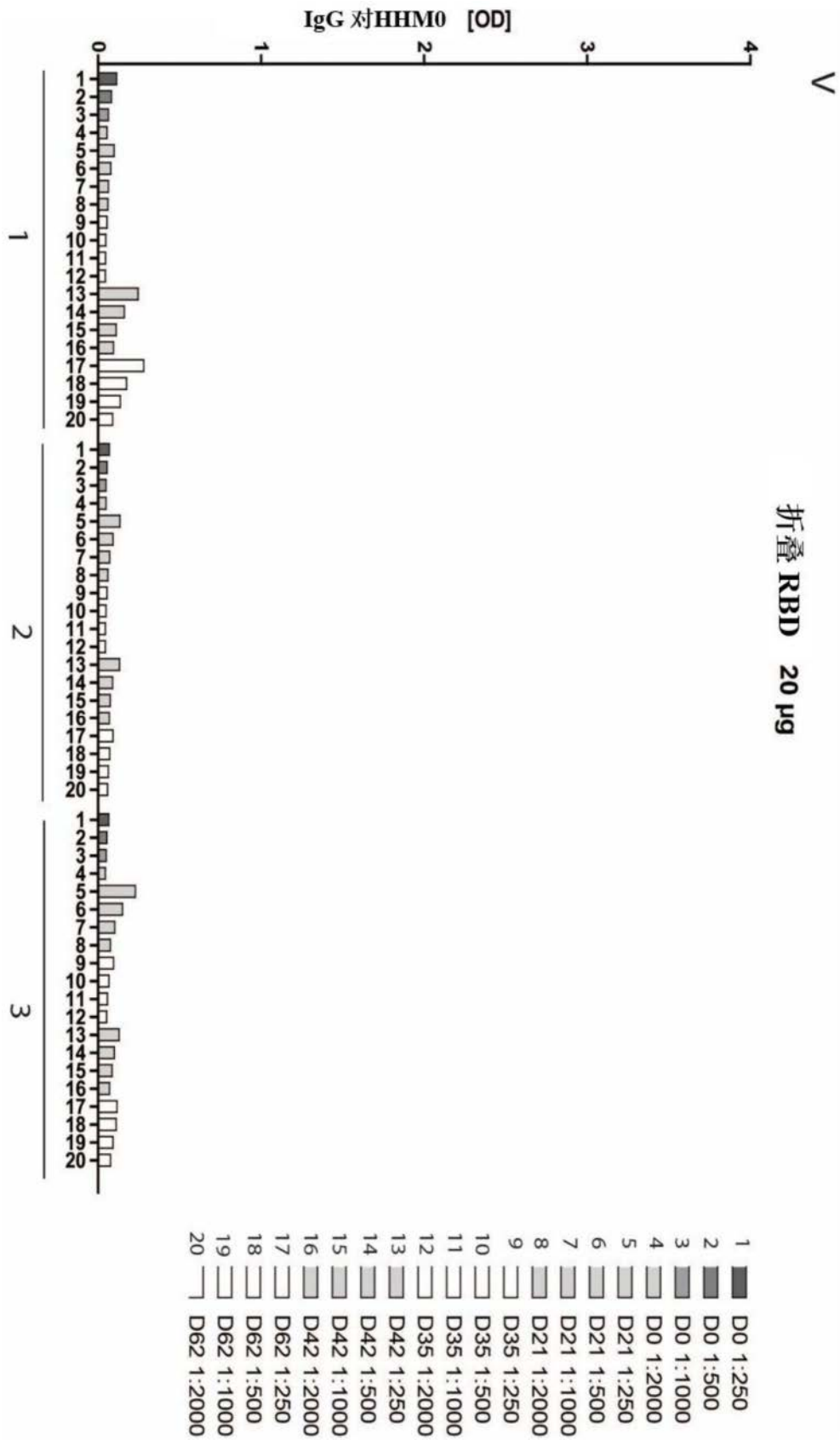


图4V

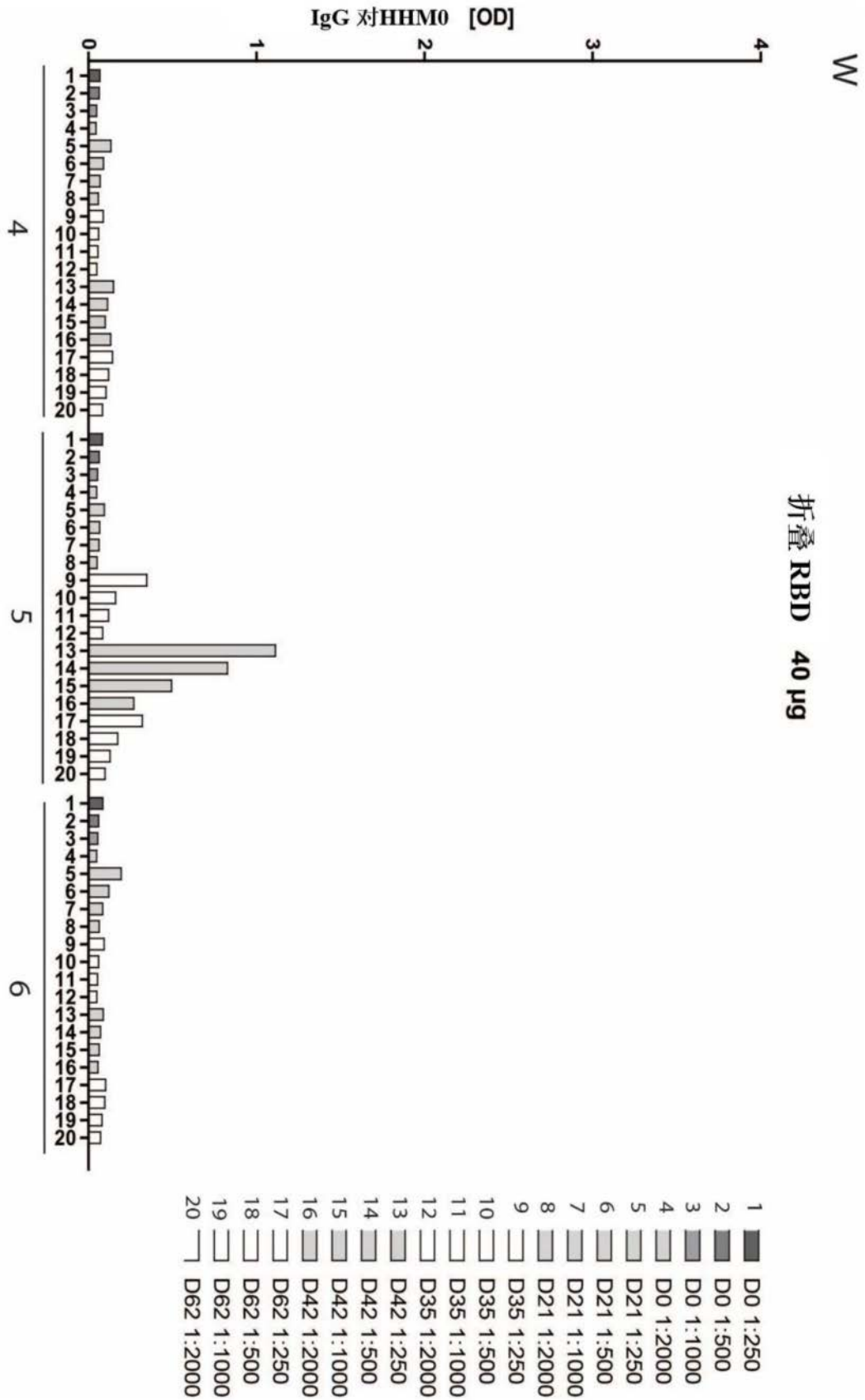


图4W

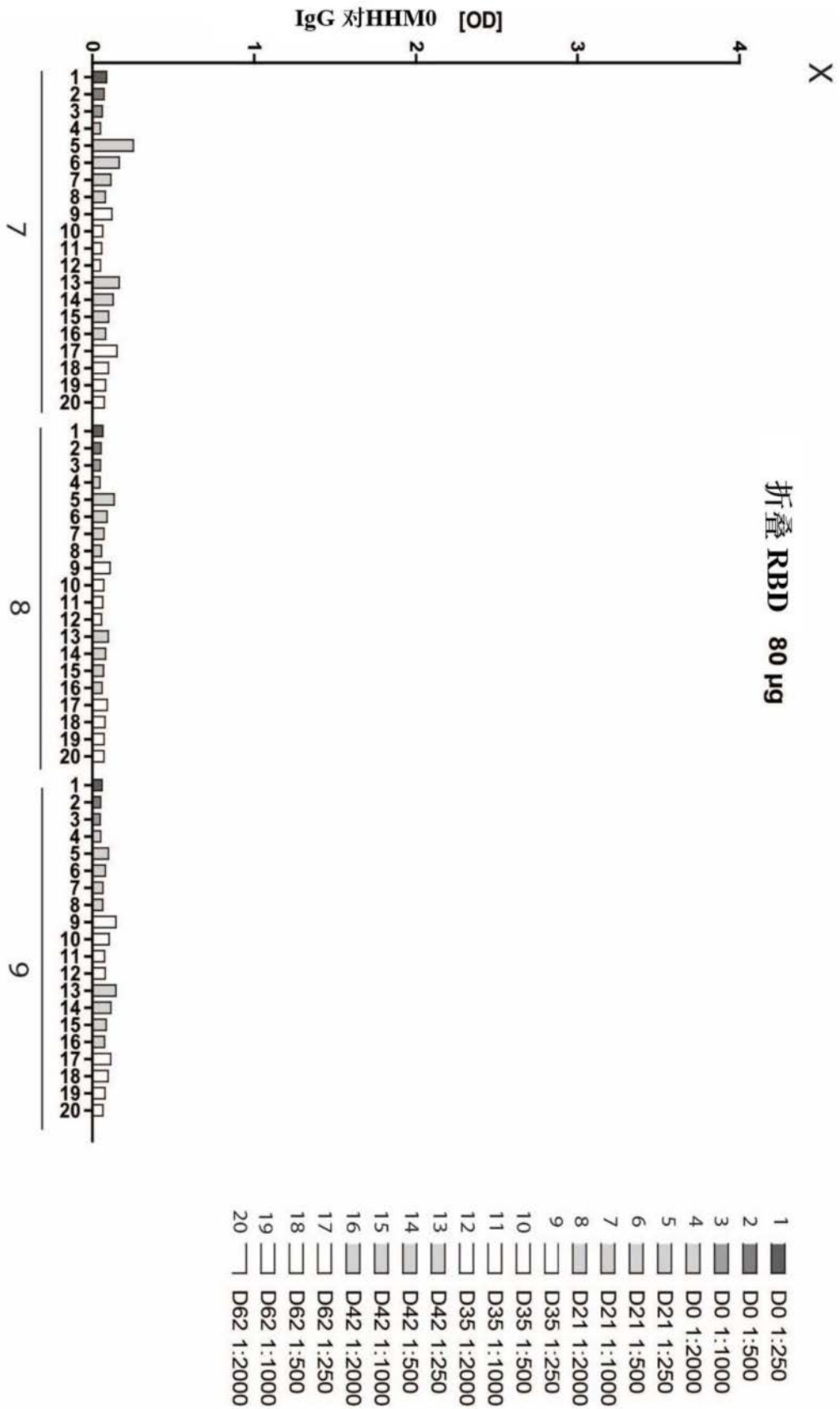


图4X

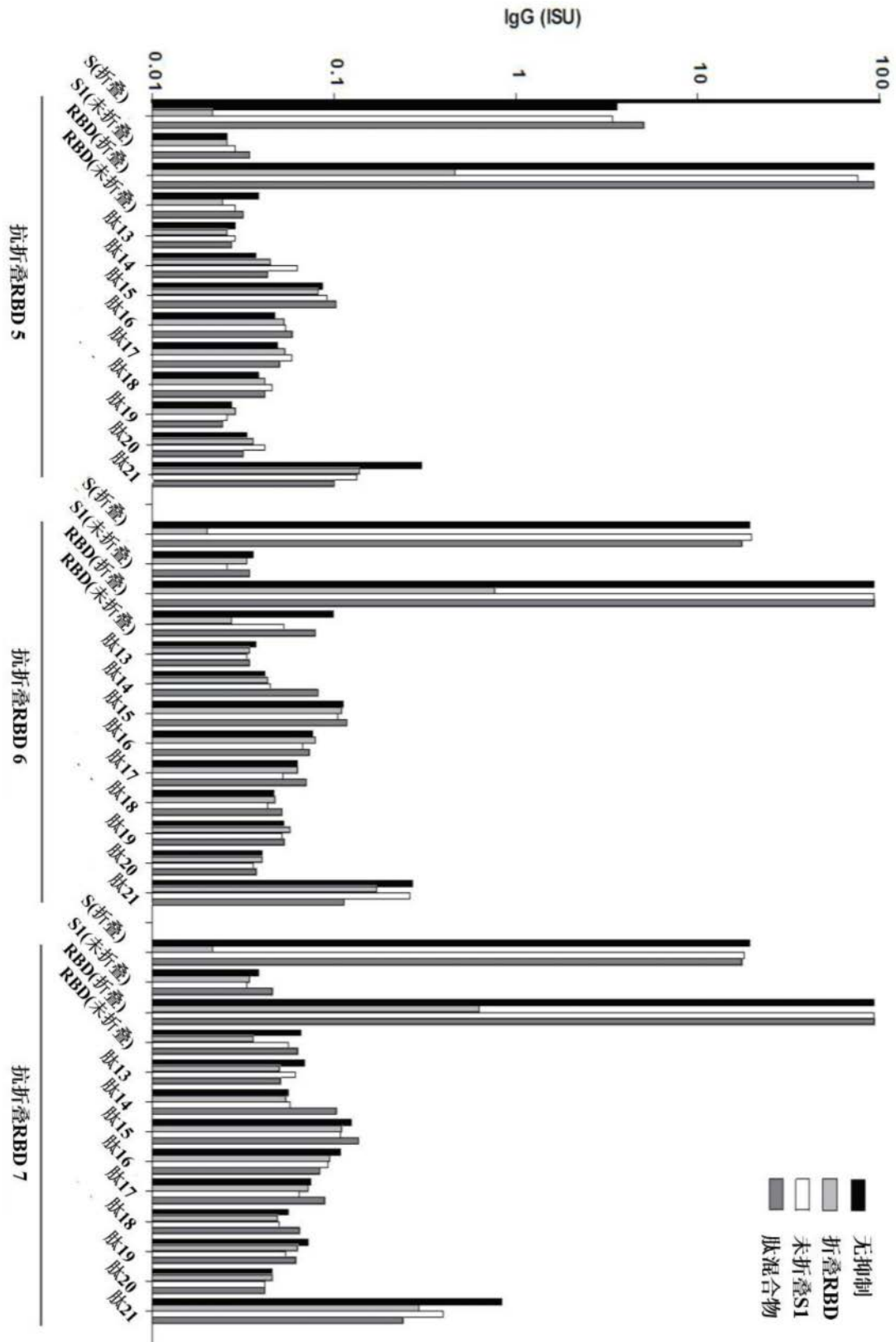


图4Y

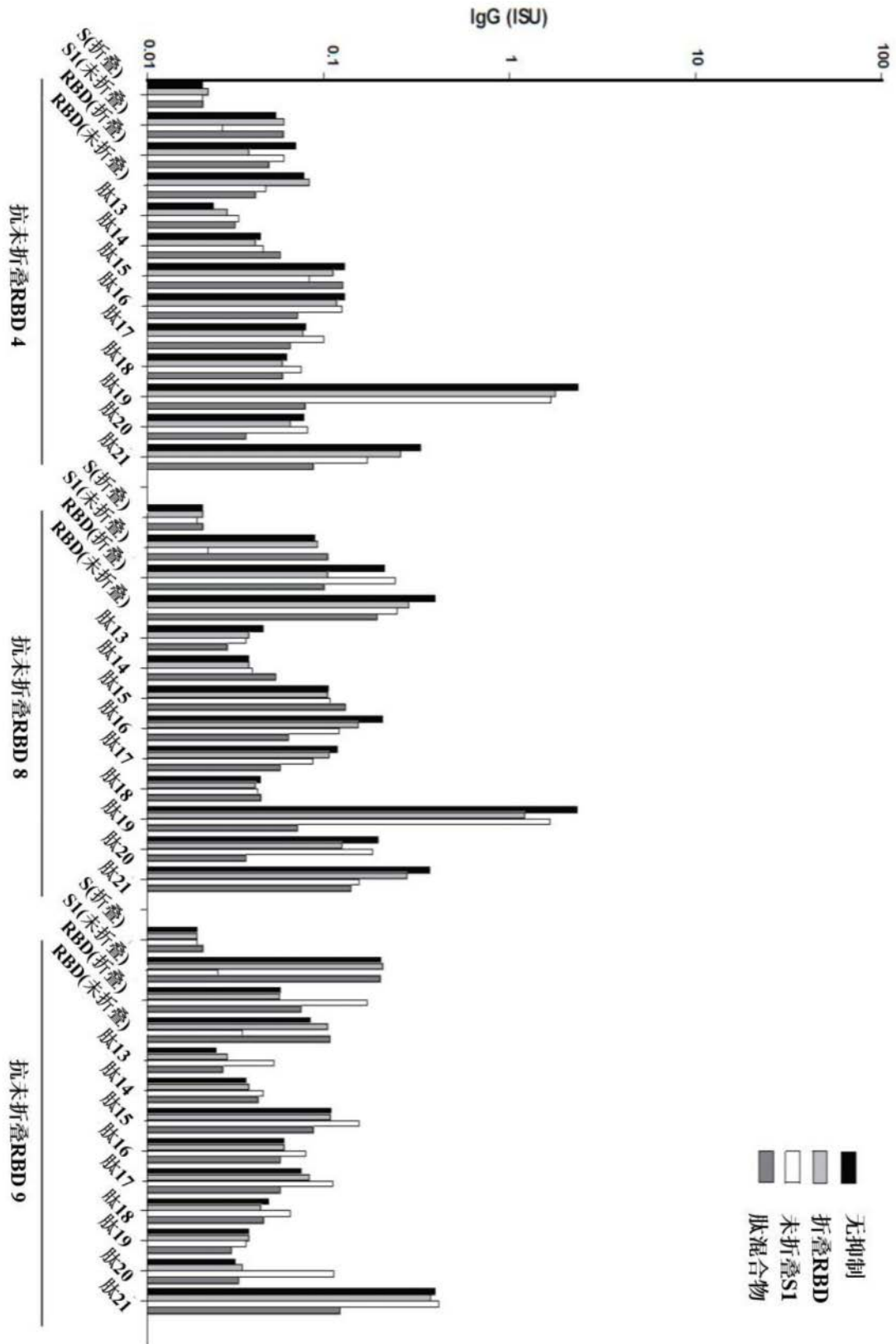


图4Z

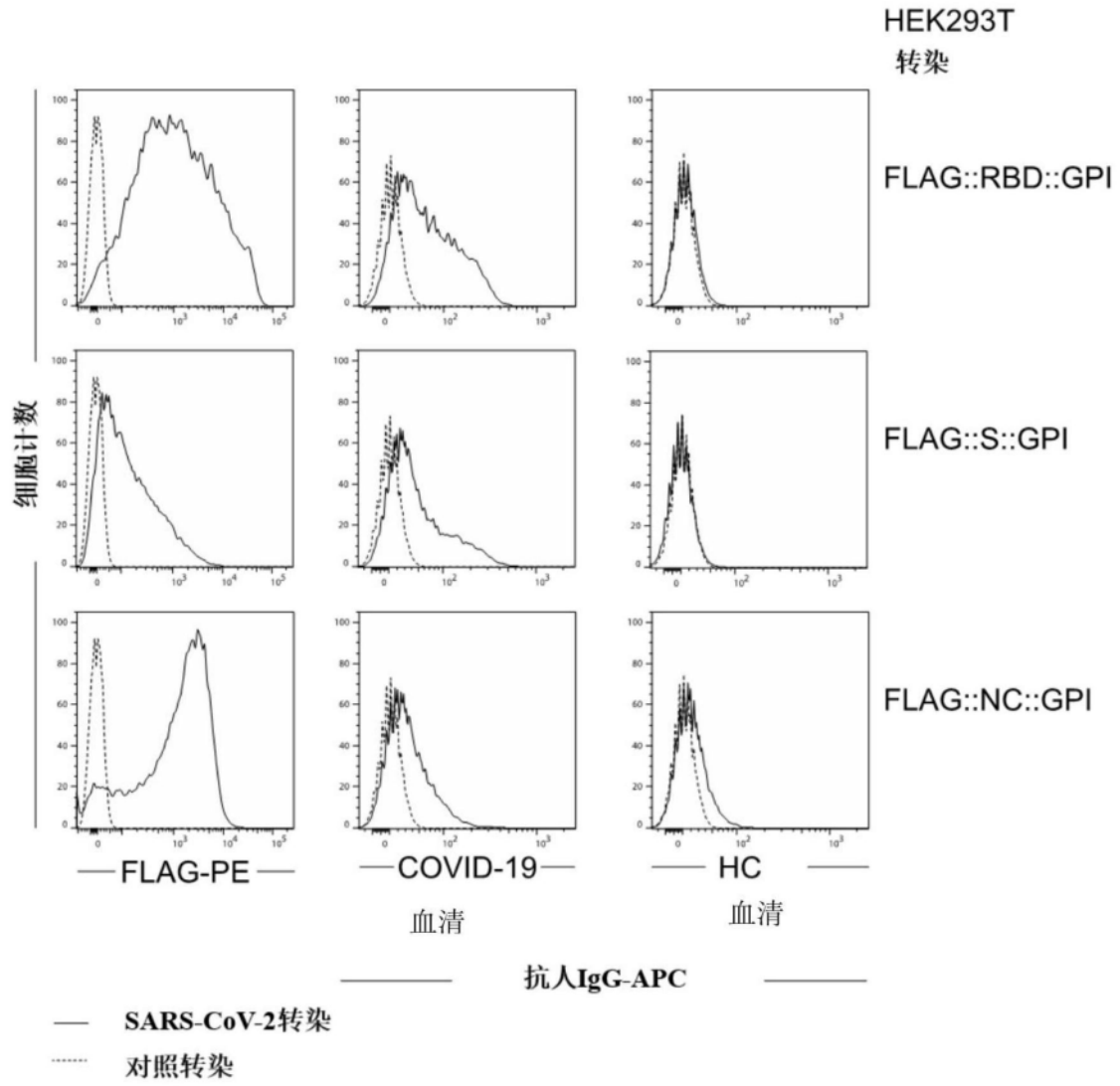


图5

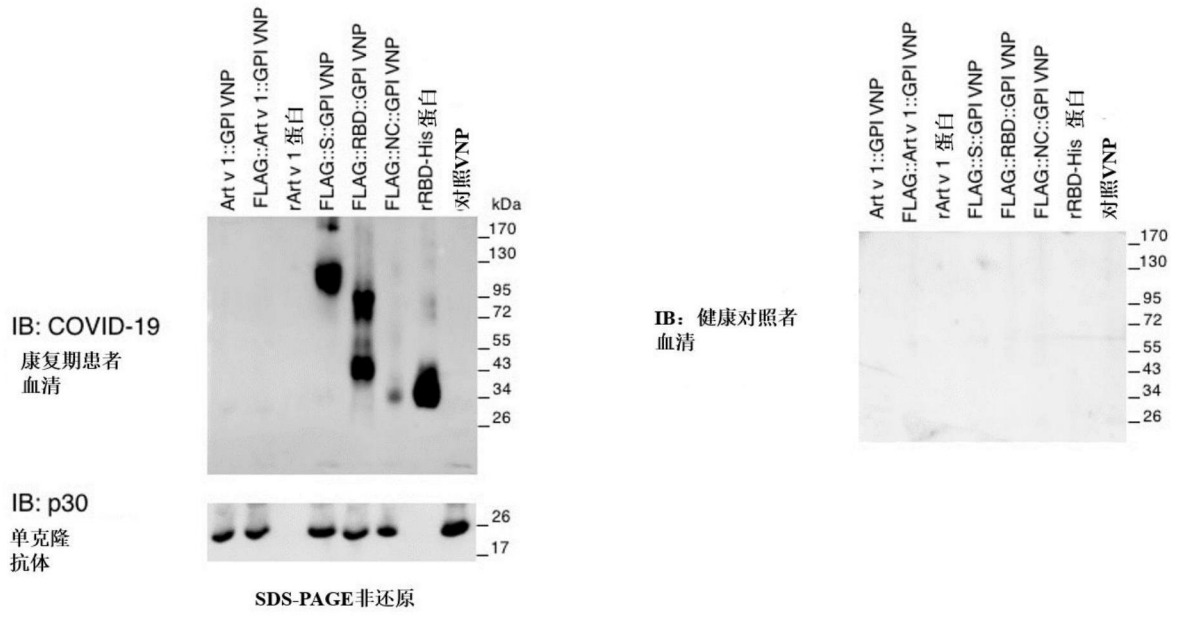


图6

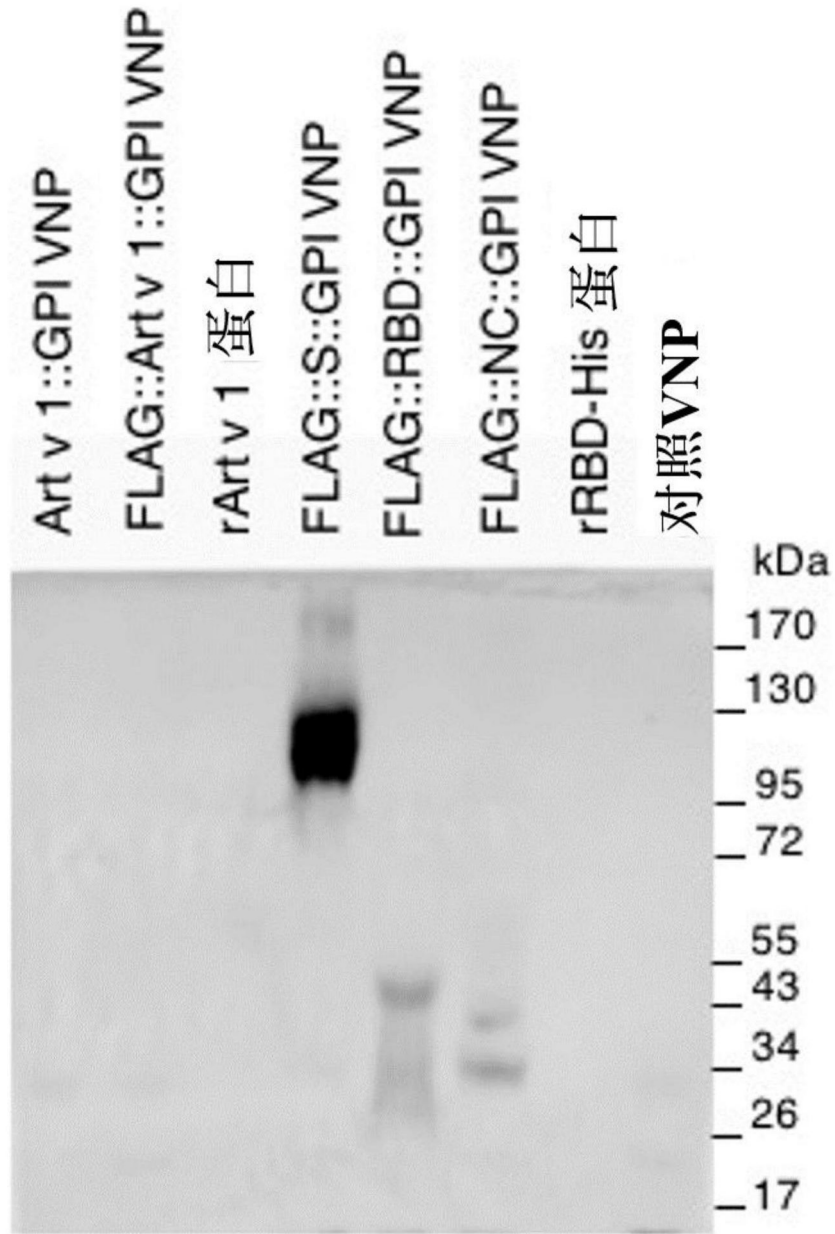


图7

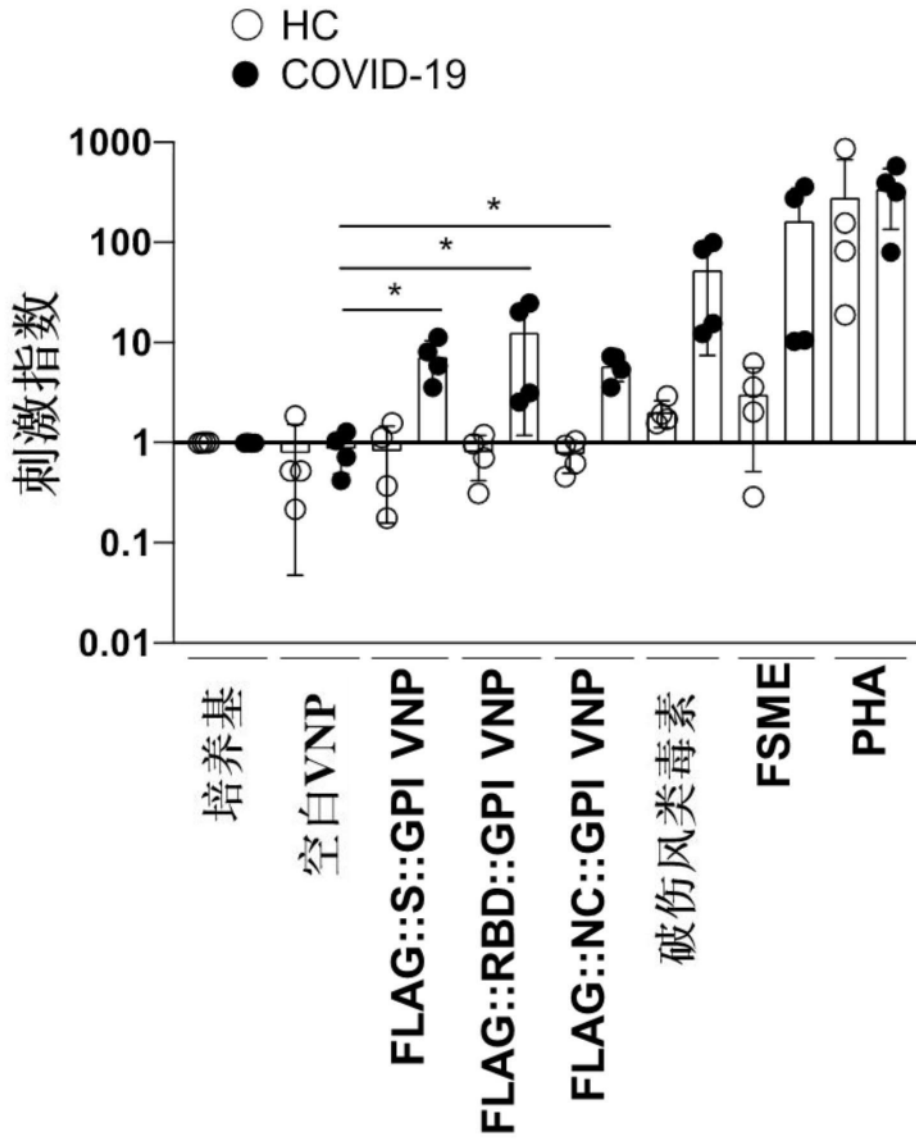


图8

SEQ ID NO:1
SARS-CoV-2 RBD
PNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TNGVGYQPYRVVLSFELLHAP

SEQ ID NO:2
SARS-CoV-2 RBD [of Construct FLAG::RBD::GPI 构建体] 包括序列 SEQ ID NO:3 的 C 端延伸

PNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLE

SEQ ID NO:3, RBD 的 C 端延伸:
ATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLE

SEQ ID NO:4
SARS-CoV-2 RBD, 天然存在的 N501Y 突变体(点突变如粗体和下划线)
PNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TYGVGYQPYRVVLSFELLHAP

SEQ ID NO:5
SARS-CoV-2 RBD, 天然存在的 E484K 突变体(点突变如粗体和下划线)
PNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQP
TNGVGYQPYRVVLSFELLHAP

SEQ ID NO:6
SARS-CoV-2 RBD, 天然存在的 K417N 突变体(点突变如粗体和下划线)
PNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TNGVGYQPYRVVLSFELLHAP

SEQ ID NO:7
SARS-CoV-2 RBD, 天然存在的 N501Y+ E484K+ K417N 突变体(点突变如粗体和下划线)
PNITNLCPFGVEFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TYGVGYQPYRVVLSFELLHAP

SEQ ID NO:8, 核衣壳 SARS-CoV-2
SARS-CoV-2 核衣壳 (NC) 蛋白
>sp|P0DTC9|NCAP_SARS2 核蛋白 OS=严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 OX=2697049 GN=N PE=1 SV=1
MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHKGEDLKFPRGQGVPIINTNSSPDDQIG
YYRRATRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI I WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPGK
FYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNSTPGSSRGTSPARMAGGGDAALALLLLDRLNQLLESKMSGKQQQQGQTVTKKSAEAS
KKPRQKRTATKAYNVTAQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLD
DKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPEPKKDKKKKADETQALPQRQKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA

SEQ ID NO:9, 核衣壳 MERS
MASPAAPRAVSFADNNDITNTLSRGRGRNPKPRAAPNNTVSWYTGLTQHGVPLTFPPQGVP LNANSTPAQAGYWRQRDRKI
NTGNGIKQLAPRWYFYTTGTGPEAALPFAVKDGI VVWVEDGATDAPSTFGTRNPNNDSAIVTQFAPGKLPKNFHIEGTGGNSQ
SSSRASSVSRNSSRSSQSGSRGNSTRGTS PGSPGIGAVGGDLLYLDLLNRLQALESKVKQS QPKVITTKDAAAANKMRHKRT
STKSFNMVQAFLRGPDLQGNFGDLQLNKLGTEPRWPQIAELAPTASAFMGMSQFKLTHQNNDHGNPVYFLRYS GAIKLDPK
NPYNKWLLELLEQNI DAYKTFPKKEKKQKAPKEESTDQMSEPPKEQRVQGSITQRTRTRPSVQPGPMIDVNTD

SEQ ID NO:10, 核衣壳 SARS-CoV
MSDNGPQSNQRSAPRITFGGPTDSTDNNQNGRNGARPKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHKGEEELRFPFGQGVPIINTNSGPDDQI
GYRRATRIRVGGDGKMKELS PRWYFYLLGTGPEASLPYGANKGIVVWVATEGALNTPKDHIGTRNPNNNAATVQLPQGTTLPGK
GFYAEGSRGGSQASSRSSRSRGNSTRGTS PGSSRGNSPARMASGGGETALALLLLDRLNQLLESKMSGKQQQQGQTVTKKSAEAS
SKKPRQKRTATKQYNVTAQAFGRRGPEQTQGNFGDQDLIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYHGAIKL
DDKDPQFKDNVILLNKHIDAYKTFPPEPKKDKKKKDEAQLPQRQKQPTVTLLPAADMDDFSRQLQNSMSGASADSTQA

图9

SEQ ID NO:11, SARS-CoV RBD:

PSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNLDLCSFNSVYADSFVVKGDVVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGC
VLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVVPSFDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTTGIGYQPYRVVVLSFELL
NAPATVCG

SEQ ID NO:12, MERS RBD:

PQVYNFKRLVFTNCSNLYLTKLLSLSFVNDFTCQSIPAAIASNCYSSLLIDYFSYPLSMKSDLSVSSAGPISQFNKQSFNPTC
LILATVPHNLTITKPLKYSYINKSRLLSDDRTEVPQLVNAQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRQKLSPLEGGGWLVASGSTVAM
TEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCP

SEQ ID NO:13, SARS-CoV-2, S 蛋白

NCBI 收录号 QII57161.1 (人 SARS-CoV-2, S 蛋白)

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPYPAYNSFTRGVVYPDKVFRSSVVLHSTQDLFLPFFSNVTFWHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWI FGTTLDLSTQSLIVNNAITNVVIVKCFEQFCNDPF
LGVYYHKNKNSWMESEFRVYSSANNCTFEYVVSQPFIMDLGKQGNFKNLRVFKNIDGKIFKYSKHTPI
NLVRDLPPQGFSALEPLVLDLPIGINITRFQTLALHRSYLTSGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYN
ENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASV
YAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIAD
YNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFNGLTGTVLTESNKKFL
PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTEILDIITPCSFSGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLT
PTWRVYSTGNSVFTQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNTPRRARSVASQSI IAYTMSLG
AENSVAYSNNISAIPTNFTISVTEILPVSMTKTSVDCMYICGDSTECNSLLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDC
LGDIAARDLICAQKFNGLTVLPLLTDEMI AQYTSALLAGTITSGWTFGAGAAQLIPFAMQMAYRFNGIG
VTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKI QDSLSTASALGKLDQVNVNQAQALNTLVKQLSSNFGA ISSVNLNDI
LSRLDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMECVLQSKRVDFCGKGYHLM
SFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFREGVVFVSNGTHWFVTVQRNFYEPQIITDNT
FVSGNCDVIVGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVIQKEIDRLNEVA
KNLNEGLDQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCMTCSCSCLGCCSCGSCCKFDEDD
SEPVLLKGVKLYHT

SEQ ID NO:14, 构建体 1: RBD-preS-RBD (RBD 序列如下划线, HBV PreS 序列如黑体, His 标签如斜体)

PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPPLQSYGFQ
TNGVGYQPYRVVVLSFELLHAP **GGWSSKPRKMGMTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWPAANQVGVGAFG**
PGLTTPPHGGILGWSPPQAQGIITTVSTI PPPASTNRQSGRQPTPI SPPLRD SHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVRGLYFPAGSSSG
TVNPAPNIA SHISSI SARTGDPVTNPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLN
LDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQ
AGSTPCNGVEGFNCYFPPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAP *HHHHHH*

SEQ ID NO:15, 构建体 2: RBD-L-RBD (RBD 序列如下划线, 连接体序列如黑体, His 标签如斜体)

PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPPLQSYGFQ
TNGVGYQPYRVVVLSFELLHAP **GGGGSGGGGS**PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYG
VSPKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFER
DISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAP *HHHHHH*

SEQ ID NO:16, 构建体 3: RBD-L-RBD-L-RBD (RBD 序列如下划线, 连接体序列如黑体, His 标签如斜体)

PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPPLQSYGFQ
TNGVGYQPYRVVVLSFELLHAP **GGGGSGGGGS**PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYG
VSPKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFER
DISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAP **GGGGSGGGGS**PNITNLCPFGEVFNATRFAS
VYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIA
WNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAP
HHHHHH

图9(接上)

SEQ ID NO:17, DNA 构建体1: RBD-preS-RBD

AATATCACAACCTGTGTCCTTTTGGGGAGGTGTTTAAACGCAACACGCTTTGCAAGCGTGTACGCATGGAATCGCAAGAGAATTT
CCAACCTGCGTTGCCGACTACAGCGTGTGTACAATTCCGCTTCTTTTTCCACATTTAAATGTTACGGGGTCAGCCCCACCAAACCT
GAATGACCTCTGTTTACAAATGTGTATGCCGATAGCTTTGTTATCCGCGCGCATGAGGTTCCGGCAGATCGCTCCCGGGCAGACA
GGAAAAATCGCCGACTACAATTACAAGCTCCCGCAGGATTTACCAGGTTGCGTCAATTGCCTGGAACCTAACAACCTGGATTCTA
AGGTTGGAGGAACTACAATTATCTGTACAGACTCTCCGGAAAAGCAACCTCAAACCTTTTGAGCGGGATATCTCCACCGAAAT
CTATCAGGCCGGGAGCACTCCCTGCAATGGTGTGGAAGGTTTTAACTGCTACTTCCCTCTGCAGAGCTATGGGTTCCAACCTACC
AACGGCGTCCGGCTACCAGCCTTACCAGGTTGGTCTGTTGAGCTTTGAGCTGCTGCACGCACCTGGCGGCTGGTCTCCAAGCCAA
GAAAAGGCATGGGAACAAATCTGTCTGTGCCAACCTCTCGTTTTCTTCCCTGATACCAACTGGATCCCGCCTTTGGCGCAAA
CAGCAATAATCCAGATTGGGACTTTAATCCAATCAAAGATCATTTGGCCAGCCGCCAACCCAGGTCGGTGTGGGCGCTTTCCGACCC
GGCCTCACTCCCCCTCATGGCGGCATCCTCGGCTGGAGCCCTCAGGCCAAGGCATCCTGACAACTGTGTCCACCATTCCCCAC
CAGCCAGCACAACCGGCAATCCGGCAGACAGCCTACCCCTATCTCTCCCCACTCAGGGATTCCCACCCACAGGCCATGCAATG
GAATAGCACAGCTTTTACCAGGCACTGCAGGACCCCGCGTTAGAGGACTGTATTTCCCTGCCGGAGGTAGCAGCAGCGGCACT
GTGAACCCCGCCCCAATATTGCATCCATATCTCTTCCATCTGTCCAGAACAGGAGATCCTGTTACCAACCCAAACATCACTA
ACCTGTGTCCATTTGGGGAGGTTTCAACGCAACTAGGTTTGCCTCCGTTGATGCTTGGAAACAGAAAGAGGATTTCTAATTTGTGT
GGCTGACTATTCTGTGCTCTACAATAGCGCCTCCTTCAGCACATTCAAATGCTACGGTGTAGCCCCACAAAGCTGAATGACCTC
TGTTTTACTAACGTGTACGCGACTCTTTCGTTATCAGAGGGCATGAGGTCGCCAGATTGCCCGGGCAGACAGGCAAGATCG
CAGATTATAACTACAAGCTCCAGACGACTTTACCAGGCTGCGTCAATTGCTTGAATTTCAATAACCTGGATTCCAAGGTTGGCGG
GAACTACAACCTATCTCTATAGACTGTTTACAGAAATCTAACCTGAAGCCTTTTGAAGGGACATTTCCACCGAAATCTATCAGGCT
GGTAGCACTCCCTGCAATGGCGTGAAGGTTCAACTGTTATTTCCCACTGCAGAGCTATGGTTTTTCAGCCTACAAACGGCGTGG
GATATCAACCTTACCAGGTTGGTCTGAGCTTTGAACTGCTGCATGCCCCACATCACCACCACCTACTG

SEQ ID NO:18, DNA 构建体3: RBD-L-RBD-L-RBD

AATATCACAACCTGTGTCCTTTTGGGGAGGTGTTTAAACGCAACACGCTTTGCAAGCGTGTACGCATGGAATCGCAAGAGAATTT
CCAACCTGCGTTGCCGACTACAGCGTGTGTACAATTCCGCTTCTTTTTCCACATTTAAATGTTACGGGGTCAGCCCCACCAAACCT
GAATGACCTCTGTTTACAAATGTGTATGCCGATAGCTTTGTTATCCGCGCGCATGAGGTTCCGGCAGATCGCTCCCGGGCAGACA
GGAAAAATCGCCGACTACAATTACAAGCTCCCGCAGGATTTACCAGGTTGCGTCAATTGCCTGGAACCTAACAACCTGGATTCTA
AGGTTGGAGGAACTACAATTATCTGTACAGACTCTCCGGAAAAGCAACCTCAAACCTTTTGAGCGGGATATCTCCACCGAAAT
CTATCAGGCCGGGAGCACTCCCTGCAATGGTGTGGAAGGTTTTAACTGCTACTTCCCTCTGCAGAGCTATGGGTTCCAACCTACC
AACGGCGTCCGGCTACCAGCCTTACCAGGTTGGTCTGTTGAGCTTTGAGCTGCTGCACGCACCTGGCGGCGGAGGATCCGGAGGAG
GAGGCTCTCCTAATATTACCAACCTGTGCCCTTCCGAGAGGTTTTTAAACGCCACCCGCTTCCGCTAGCGTGTATGCATGGAATAG
GAAAAGGATTTCTAATTGCGTGGCTGACTACTCCGTTGCTCTATAATTTCCGCTCCTTTTCTACCTTTAAATGCTATGGGGTGTCC
CCAACCAAGCTCAATGATCTGTGCTTTACCAATGTGTATGCTGATTCCTTCGTTATCAGAGGCGATGAGGTCGGCAGATCGCCC
CCGGGCAACAGGCAAGATCGCTGACTACAATTATAAACTGCCAGATGACTTCACTGGTTGTGTGATTGCCTGGAATTTCTAATAA
CCTCGACAGCAAGGTCGGGGCAATTACAACCTATCTGTATCGGCTGTTTACAGGAAATCTAATCTCAAGCCCTTCAACGGGATATT
TCTACTGAGATCTACCAGCCGGTAGCACTCCATGTAACGGTGTGGAAGGTTTCAACTGTTACTTCCCCTGCAGAGCTACGGCT
TCCAACCAACCAACGGGGTGGGCTACCAACCTACAGAGTCGTGGTGTGCTTTTCGAGCTGCTGCATGCACCTGGCGGCGGAGG
ATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAACATCACTAACCTGTGTCCATTTGGGGAGGTTTCAACGCAACTAGGTTTGCCTCCGTTGAT
GCTTGGAACAGAAAGAGGATTTCTAATTGTGTGGCTGACTATCTGTGCTCTACAATAGCGCCTCCTTACAGCACATTTCAAATGCT
ACGGTGTAGCCCCACAAAGCTGAATGACCTCTGTTTTACTAACGTGTACGCCGACTCTTTCGTTATCAGAGGCGATGAGGTCGG
CCAGATGCCCCCGGGCAGACAGGCAAGATCGCAGATTATAACTACAAGCTCCCAGACGACTTTACCAGGCTGCGTCAATTGCTTGG
AATTTCAATAACCTGGATTCCAAGGTTGGCGGGAACCTACAACCTATCTCTATAGACTGTTTACAGGAAATCTAACCTGAAGCCTTTTG
AAAGGGACATTTCCACCGAAATCTATCAGGCTGGTAGCACTCCCTGCAATGGCGTGAAGGTTCAACTGTTATTTCCCACTGCA
GAGCTATGGTTTTTCAGCCTACAAACGGCGTGGGATATCAACCTTACCAGGTTGGTGGTCTGAGCTTTGAACTGCTGCATGCCCCA
CATCACCACCACCTACTG

SEQ ID NO:19, HBV PreS 构建体1 氨基酸序列:

GGWSSKPRKG MGTNLSVNP LGFFPDHQLD PAFGANSNNP DWDFNPIKDH
WPAANQVGVG AFGPGLTPPH GGILGWSPQA QGILTTVSTI PPPASTNRQS
GRQPTPI SPP LRDSHPQAMQ WNSTAFHQAL QDPRVRGLYF PAGGSSSGTV
NPAPNIASHI SSISARTGDP VTN

PreS 替换序列:

SEQ ID NO:20, HBV PreS aa sequence of HBV genotype B
GGWSSKPRKG MGTNLSVNP LGFFPDHQLD PAFKANSNPN DWDLNPHKDN
WPDSNKVGVG AFGPGLTPPH GGILGWSPQA QGILTTVPAA PPPASTNRQV
ARPPTPLSPP LRDTHPQAMQ WNSTTFHQTL QDPRVRALYF PAGGSSSGTV
NPVQNTASSI SSILSKTGP VTN

图9(接上)

SEQ ID NO:21, HBV PreS 基因型 C 氨基酸序列

GGYSSKPRKG MGTNLSVNP LGFLPDHQLD PAFGANSNNP DWDFNPNKDP
WPEAWQVGVG AFGPGFTPPH GLLGWSPQA QGILTVPVAA PPPASTNRQS
GRQPTPISTP LRDSHPQAMQ WNSTTFHQAL LDPVRGLYF PAGSSSGTT
NPVPTTASPI SSIFSRTGDP APN

SEQ ID NO:22, HBV PreS 基因型 D 氨基酸序列

GQNLSTSNPL GFFPDHQLDP AFRANTANPD WDFNPNKDTW PDANKVGAGA
FGLGFTPPHG GLLGWSPQAQ GILQTLPTNP PPASTNRQSG RQPTPLSPPL
RNTHPQAMQW NSTTFHQTLQ DPRVRGLYFP AGGSSSGTVN PVPTTVSHIS
SIFSRIGDPA LN

SEQ ID NO:23, HBV PreS 基因型 E 氨基酸序列

GLSWTVPLEW GKNHSTTNPL GFFPDHQLDP AFRANTRNPD WDHNPKNKDH
TAANKVGVGA FGPFTPPHG GLLGWSPQAQ GMLKTLPADP PPASTNRQSG
RQPTPISTPPL RDTHPQAMQW NSTTFHQALQ DPRVRGLYFP AGGSSSGTVN
PVPTTASLIS SIFSRIGDPA PN

SEQ ID NO:24, HBV PreS 基因型 F 氨基酸序列

GAPLSTTRRG MGQNLVSNP LGFLPDHQLD PLFRANSSSP DWDFNPKSKDN
WPMANKVGVG GYGPGFTPPH GLLGWSPQA QGVLTTLPAD PPPASTNRRS
GRKPTPVSP LRDTHPQAMQ WNSTQFHQAL LDPVRVRLYF PAGSSSSETQ
NPAPTIASLT SSIFLKTGGP AMN

SEQ ID NO:25, HBV PreS 基因型 G 氨基酸序列

GLSWTVPLEW GKNLSTSNPL GFLPDHQLDP AFRANTNPNPD WDFNPKKDPW
PEANKVGVGA YGPGFTPPHG GLLGWSPQSQ GTLTTLPADP PPASTNRQSG
RQPTPISTPPL RDSHPQAMQW NSTAFHQALQ NPKVRGLYFP AGGSSSGIVN
PVPTIASHIS SIFSRIGDPA PN

SEQ ID NO:26, HBV PreS 基因型 H 氨基酸序列

GAPLSTARRG MGQNLVSNP LGFFPDHQLD PLFRANSSSP DWDFNTNKDN
WPMANKVGVG GFGPGFTPPH GLLGWSPQA QGILTTSPPD PPPASTNRRS
GRKPTPVSP LRDTHPQAMQ WNSTQFHQAL LDPVRVRLYF PAGSSSSETQ
NPAPTIASLT SSIFSRTGDP AMN

SEQ ID NO:27

构建体 FLAG::RBD::GPI: Hind III - Xho I -SRBD-GPI_BK (SEQ ID NO:27) - STOP - Not I
MNPLLLILTFVAAALADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGGGSPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSA
SFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRLEFR
KSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFN
FNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLESLAVSTISSFSPPGYQVSFCLVMVLLFAVDVTGLYFSVKNTNI

FLAG::RBD::GPI 构建体的描述, 重点在 SEQ ID NO:27 中指出:

- 前导: 胰蛋白酶前体前导(PPT) 前导体 (下划线, SRBD-GPI_BK 中氨基酸(aa) 1-15),
- 3× FLAG 标签 (粗体, SRBD-GPI_BK 中氨基酸(aa) 16-37),
- 连接体 (GGGG [SEQ ID NO:31] 连接体, 斜体, SRBD-GPI_BK 中氨基酸(aa) 38-42);
- RBD 序列: 黑色, SRBD-GPI_BK 中的氨基酸(aa) 43-296, 取自 S 蛋白, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 分离株 WIV05, 全基因组, GenBank: MN996529.1, 蛋白质 ID.: GenBank: QHR63270.2, 来自 QHR63270.2 氨基酸 318-571 (S 蛋白前导体不纳入计数)
- CD16b 的 GPI 锚定物受体序列 (点划线, SRBD-GPI_BK 中氨基酸(aa) 297-337) 来源于 GenBank: X07934.1, 氨基酸 193-233 来源于 GenBank: X07934.1

该基因由 ATG:biosynthetics GmbH, Weberstrasse 40 D-79249 Merzhausen 合成并反向翻译

图9 (接上)

SEQ ID NO:28

构建体 FLAG::RBD::GPI 的 DNA 序列

```

aagcttctcgagATGAATCCACTCCTGATCCTGACCTTCGTTGCCGCCGCCCTGGCAGATTACAAAGATCAGGATGGGGACTATA
AGGATCATGATATTGATTACAAGGACGACGACGATAAGGGAGGAGGGGGATCTCCAAATATTACAAATCTGTGCCCTTTCGGAGA
GGTGTTTAATGCAACTAGGTTTGCTTCTGTGTATGCATGGAACCGGAAACGGATTAGCAATTGCGTGGCCGATTATAGCGTTCTG
TACAACCTGCCTCTTTAGCACTTTCAAATGCTATGGCGTCAGCCCTACCAAACCTGAACGATCTCTGTTTACAAACGTTGACG
CAGACTCTTTTGTGATCAGAGGAGACGAGGTCCGCCAGATTGCCCCAGGGCAGACAGGGAAGATTGCTGACTATAACTACAAGCT
CCCCGATGACTTTACAGGCTGTGTGATCGCTTGGAAATTCTAATAACCTCGACTCCAAGGTTGGCGGGAACTACAATTATCTCTAT
CGGCTGTTACAGGAAATCCAATCTGAAGCCATTTGAAAGGGATATTTCTACCGAGATCTACCAGGCTGGATCCACTCCTTGCAACG
CGCTCGAAGGCTTTAACTGTACTTCCCCCTGCAAAGCTATGGCTTTGAGCCTACCAATGGCGTTGGATATCAGCCCTACCGCGT
CGTCGTGTCTCTTTTGAGCTGCTGCACGCCCCAGCCACTGTTTGTGGGCCAAGAAATCCACCAACCTGGTGAAGAACAATAATGC
GTCAACTTCAATTTTAAACGGCCTGACCGGAACCTGGCGTCTACTGAGAGCAACAAGAAATTCCTGCCCTTCCAACAATTCGGCA
GAGACATCGACACACCACAGACGCTGTAGAGACCCCCAGACCCTGGAAATCCCTCGCCGTCAGCACAATCAGCTCCTTCAGCCC
TCTTGGGTACCAGGTGCTCTCTGTCTCGTGATGGTGCTGCTGTTGCTGTGGATACAGGGCTCTACTTCTCCGTGAAGACCAAT
ATCTAAagcggccgc

```

FLAG::RBD::GPI 构建体的描述，重点在 SEQ ID NO:28 中指出：

- Hind III 酶切位点 (位置 1-6, 小写字母)
- Xho I 酶切位点 (位置 7-12, 小写字母)
- 前导: 胰蛋白酶原前体前导体 (PPT) 前导体 (下划线, 位置 13-57),
- 3× FLAG 标签 (粗体, 位置 58-123),
- 连接体 (GGGGS [SEQ ID NO:31] 连接体, 斜体, 位置 124-138);
- RBD 序列: 黑色, 139-900, 取自 S 蛋白, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 分离株 WIV05, 全基因组, GenBank: MN996529.1, 蛋白质 ID.: GenBank: QHR63270.2, 来自 QHR63270.2 氨基酸 318-571 (S 蛋白前导体不纳入计数)
- CD16b 的 GPI 锚受体序列 (点划线, 位置 901-1023)
- 终止子 (位置 1024-1027)
- Not I 酶切位点 (位置 1028-1035, 小写字母)

SEQ ID NO:29, pMD-MLVogp, 9633 bp

序列 9633 BP; 2511 A; 2574 C; 2323 G; 2225 T; 0 其它;

```

agcttggccc attgcatacg ttgtatccat atcataatat gtacatttat attggctcat 60
gtccaacatt accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta 120
cggggtcatt agttcatagc ccatattgga gttccgcggt acataactta cggtaaatgg 180
cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg ccccttgacg tcaataatga cgtatgttcc 240
catagtaacg ccaatagggg ctttcattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaac 300
tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa 360
tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg acctatggg actttcctac 420
ttggcagtac atctacgtat tagtcatogc tattaccatg gtgatgggt tgtgacgta 480
catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga 540
cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac tttccaaat gtcgtaaaaa 600
ctccgcccc a ttgacgaaa tggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag 660
agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctg gagacgccat ccacgctggt ttgacctcca 720
tagaagacac cgggaccgat ccagcctccc ctgcaagctt tacatgtggt accgagctcg 780
gatcctgaga acttcagggt gactctatgg gacccttgat gttttctttc cccttctttt 840
ctatggttaa gttcatgtca taggaagggg agaagtaaca gggtacacat attgacaaa 900
tcagggtaat tttgcatttg taattttaaa aaatgctttc ttcttttaat ataacttttt 960
gtttatctta tttctaatac tttcccta atctttcttt cagggcaata atgatacaat 1020
gtatcatgcc tctttgcacc attctaaga ataacagtga taatttctgg gttaaggcaa 1080
tagcaatatt tctgcatata aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagaggttt 1140
catattgcta atagcagcta caatccagct accattctgc ttttatttta tgggtgggat 1200
aaggctggat tattctgagt ccaagctagg cccttttgat aatcatgttc atacctcta 1260
tcttctccc acagctcctg ggcaacgtgc tggctgtgtg gctggcccat cactttggca 1320
aagaattcat gggccagact gttaccactc ccttaagttt gaccttaggt cactggaaag 1380
atgtcgagcg gatcgctcac aaccagtcgg tagatgtcaa gaagagacgt tgggtacct 1440
tctgctctgc agaatggcca acctttaaag tcggatggcc gcgagacggc acctttaa 1500
gagacctcat caccaggtt aagatcaagg tcttttcacc tggcccgcac ggacaccag 1560
accaggtccc ctacatcgtg acctgggaag ccttggtttt tgacccccct ccctgggtca 1620
agccctttgt acaccctaag cctccgcctc ctcttctctc atccgcccgt tctctcccc 1680
ttgaacctcc tcgttcgacc ccgctcgtat cctcccttta tccagccctc actccttctc 1740
taggcgcaa acctaaacct caagtcttt ctgacagtgg gggccgctc atcgacctac 1800
ttacagaaga cccccgcct tatagggacc caagaccacc ccctccgac agggacggaa 1860

```

图9 (接上)

atggtggaga	agcgaccct	gcgggagagg	caccggacc	ctcccaatg	gcatctgcg	1920
tacgtgggag	acgggagccc	cctgtggccg	actccaactac	ctcgcaggca	ttccccctcc	1980
gcgcaggagg	aaacggacag	cttcaatact	ggccgttctc	ctcttctgac	ctttacaact	2040
ggaaaaataa	taacccttct	ttttctgaag	atccaggtaa	actgacagct	ctgatcgagt	2100
ctgttctcat	cacccatcag	cccacctggg	acgactgtca	gcagctggtg	gggactctgc	2160
tgaccggaga	agaaaaacaa	cgggtgctct	tagaggctag	aaaggcggtg	cggggcgatg	2220
atggggcgcc	cactcaactg	cccaatgaag	tcgatgccg	ttttcccctc	gagcgcccag	2280
actgggatta	caccacccag	gcaggtagga	accacctagt	ccactatcgc	cagttgctcc	2340
tagcgggtct	ccaaaacgcg	ggcagaagcc	ccaccaattt	ggccaaggta	aaaggaataa	2400
cacaagggcc	caatgagtct	ccctcggcct	tcctagagag	acttaaggaa	gcctatcgca	2460
ggtacactcc	ttatgaccct	gaggaccag	ggcaagaaac	taatgtgtct	atgtctttca	2520
tttggcagtc	tgccccagac	attggggagaa	agttagagag	gttagaagat	ttaaaaaaca	2580
agacgcttgg	agatttgggt	agagaggcag	aaaagatctt	taataaacga	gaaaccccgg	2640
aagaaagaga	ggaacgtatc	aggagagaaa	cagaggaaaa	agaagaacgc	cgtaggacag	2700
aggatgagca	gaaagagaaa	gaaagagatc	gtaggagaca	tagagagatg	agcaagctat	2760
tggccactgt	cgttagtgga	cagaaacagg	atagacaggg	aggagaacga	aggaggtccc	2820
aactcgatcg	cgaccagtgt	gcctactgca	aagaaaaggg	gcactgggct	aaagattgtc	2880
ccaagaaacc	acgaggacct	cggggaccaa	gaccccagac	ctccctcctg	accctagatg	2940
actagggagg	tcagggtcag	gagccccccc	ctgaacccag	gataaccctc	aaagtccggg	3000
ggcaacccgt	caccttccctg	gtagatactg	gggcccaca	ctccgtgctg	acccaaaatc	3060
ctggaccctc	aagtgataag	tctgcctggg	tccaaggggc	tactggagga	aagcggtatc	3120
gctggaccac	ggatcgcaaa	gtacatctag	ctaccggtaa	ggtcaccac	tctttcctcc	3180
atgtaccaga	ctgtccctat	cctctgttag	gaagagattt	gctgactaaa	ctaaaagccc	3240
aaatccactt	tgagggatca	ggagctcagg	ttatgggacc	aatggggcag	ccctgcaag	3300
tgttgaccct	aaatagaaa	gatgagcatc	ggctacatga	gacctcaaaa	gagccagatg	3360
tttctctagg	gtccacatgg	ctgtctgatt	ttcctcaggc	ctgggcggaa	accgggggca	3420
tgggactggc	agttcgccaa	gctcctctga	tcatacctct	gaaagcaacc	tctacccccg	3480
tgtccataaa	acaatacccc	atgtcacaag	aagccagact	ggggatcaag	ccccacatac	3540
agagactggt	ggaccaggga	atactgttac	cctgccagtc	cccctggaac	acgcccctgc	3600
tacccgttaa	gaaaccaggg	actaatgatt	ataggcctgt	ccaggatctg	agagaagtca	3660
acaagcgggt	ggaagacatc	caccccaccg	tgcccaaccc	ttacaacctc	ttgagcgggc	3720
tcccaccgtc	ccaccagtgg	tacactgtgc	ttgatttaaa	ggatgccttt	ttctgcttga	3780
gactccaccc	caccagttag	cctctcttcg	cctttgagtg	gagagatcca	gagatgggaa	3840
tctcaggaca	attgacctgg	accagactcc	cacagggttt	caaaaacagt	cccaccctgt	3900
ttgatgaggc	actgcacaga	gacctagcag	acttccggat	ccagaccca	gacttgatcc	3960
tgctacagta	cgtggatgac	ttactgtctg	ccgccacttc	tgagctagac	tgccaacaag	4020
gtactcgggc	cctgttataa	accctagggg	acctcgggta	tcgggcctcg	gccaagaaag	4080
cccaaatttg	ccagaaacag	gtcaagtatc	tggggtatct	tctaaaagag	ggtcagagat	4140
ggctgactga	ggccagaaaa	gagactgtga	tggggcagcc	tactccgaag	accctcgcac	4200
aactaagggg	gttcctaggg	acggcaggct	tctgtcgcct	ctggatccct	gggtttgcag	4260
aaatggcagc	ccccttgtac	cctctcacca	aaacggggac	tctgtttaat	tggggcccag	4320
accaacaaaa	ggcctatcaa	gaaatcaagc	aagctcttct	aactgcccc	gccctggggg	4380
tgccagattt	gactaagccc	tttgaactct	ttgtcgacga	gaagcagggc	tacgcccagg	4440
gtgtcctaac	gcaaaaactg	ggaccttggc	gtcggccggg	ggcctacctg	tccaaaaagc	4500
tagaccaggt	agcagctggg	tggccccctt	gcctacggat	ggtagcagcc	attgcccgtac	4560
tgacaaaagg	tgcaggcaag	ctaaccatgg	gacagccact	agtcatctct	gccccccatg	4620
cagtagaggc	actagtcaaa	caaccccccg	accgctgggt	ttccaacgcc	cggatgactc	4680
actatcaggg	cttgcttttg	gacacggacc	gggtccagtt	cggaccgggtg	gtagccctga	4740
acccggctac	gctgctccca	ctgcctgagg	aaggctgca	acacaactgc	cttgatatcc	4800
tggccgaagc	ccacggaacc	cgacccgacc	taacggacca	gccgctccca	gacgcccagc	4860
acacctggta	cacggatgga	agcagctctc	tacaagaggg	acagcgtaag	gcgggagctg	4920
cggtgaccac	cgagaccgag	gtaatctggg	ctaaagccct	gccagccggg	acatccgctc	4980
agcgggctga	actgatagca	ctcaccaggg	ccctaaagat	ggcagaaggt	aagaagctaa	5040
atgtttatc	tgatagccgt	tatgcttttg	ctactgcccc	tatccatgga	gaaatataca	5100
gaaggcgtgg	gttgctcaca	tcagaaggca	aagagatcaa	aaataaagac	gagatcttgg	5160
ccctactaaa	agccctcttt	ctgcccaaaa	gacttagcat	aatccattgt	ccaggacatc	5220
aaaagggaca	cagcgcggag	gctagaggca	accggatggc	tgaccaagcg	gcccgaaggg	5280
cagccatcac	agagactcca	gacacctcta	ccctcctcat	agaaaattca	tcaccctaca	5340
cctcagaaca	ttttcattac	acagtgactg	atataaagga	cctaaccaag	ttgggggcca	5400
tttatgataa	aacaaagaag	tattgggtct	accaaggaaa	acctgtgatg	cctgaccagt	5460
ttacttttga	attattagac	tttcttcac	agctgactca	cctcagcttc	tcaaaaatga	5520
aggctctcct	agagagaagc	cacagtcctc	actacatgct	gaaccgggat	cgaacctca	5580
aaaatatac	tgagacctgc	aaagcttgtg	cacaagtcaa	cgccagcaag	tctgcccgtta	5640

图9(接上)

aacaggggaa	taggggtccgc	gggcatcggc	ccggcactca	ttgggagatc	gatttcaccg	5700
agataaaagc	cggattgtat	ggctataaat	atcttctagt	ttttatagat	accttttctg	5760
gctggataga	agccttccca	accaagaaag	aaaccgcaa	ggtcgtaacc	aagaagctac	5820
tagaggagat	cttccccagg	ttcggcatgc	ctcaggtatt	gggaactgac	aatgggcctg	5880
ccttcgtctc	caaggtgagt	cagacagtgg	ccgatctggt	ggggattgat	tggaaattac	5940
attgtgcata	cagaccocaa	agctcaggcc	aggtagaaaag	aatgaataga	accatcaagg	6000
agactttaac	taaattaacg	cttgcaactg	gctctagaga	ctgggtgctc	ctactcccct	6060
tagccctgta	ccgagcccgc	aaacgcccgg	gccccatgg	cctcaccocca	tatgagatct	6120
tatatggggc	acccccgccc	cttgtaaact	tccctgaccc	tgacatgaca	agagttacta	6180
acagccctc	tctccaagct	cacttacagg	ctctctactt	agtccagcac	gaagtctgga	6240
gacctctggc	ggcagcctac	caagaacaac	tggaccgacc	gggtgtacct	cacccttacc	6300
gagtcggcga	cacagtgtgg	gtccgcccgc	accagactaa	gaacctagaa	cctcgcctgga	6360
aaggacctta	cacagtcctg	ctgaccaccc	ccaccgccct	caaagttagac	ggcatcgcag	6420
cttgataca	cgccgcccac	gtgaaggctg	ccgaccccgg	gggtggacca	tcctctagac	6480
tgacatggcg	cgttcaacgc	tctcaaaaacc	ccttaaaaat	aaggttaacc	cgcgaggccc	6540
cctaagaatt	caccccacca	gtgcaggctg	cctatcagaa	agtggtggct	gggtggtgta	6600
atgccctggc	ccacaagtat	cactaagctc	gctttcttgc	tgtccaattt	ctattaaagg	6660
ttcctttggt	ccctaagtcc	aactactaaa	ctgggggata	ttatgaaagg	ccttgagcat	6720
ctggattctg	cctaataaaa	aacatthatt	ttcattgcaa	tgatgtattt	aaattatttc	6780
tgaatatttt	actaaaaagg	gaatgtggga	ggctcagtgca	tttaaaacat	aaagaaatga	6840
agagctagtt	caaaccttgg	gaaaatacac	tatatcttaa	actccatgaa	agaaggtgag	6900
gctgcaaaac	gctaatgac	attggcaaca	gccctgatgc	ctatgcctta	ttcatccctc	6960
agaaaaggat	tcaagtagag	gcttgatttg	gaggttaaag	ttttgctatg	ctgtatttta	7020
cattacttat	tgtttttagct	gtcctcatga	atgtcttttc	actaccatt	tgcttatcct	7080
gcattcctca	gccttgactc	cactcagttc	tcttgcttag	agataccacc	tttcccctga	7140
agtggtccct	ccatgtttta	cggcgaagat	ggtttctcct	cgctggcca	ctcagcctta	7200
gttgtctctg	ttgtcttata	gaggtctact	tgaagaagga	aaaacagggg	gcatggtttg	7260
actgtcctgt	gagcccttct	tcctgcctc	ccccactcac	agtgaccocgg	aatccctcga	7320
catggcagtc	tagaattctt	gaagacgaaa	gggcctcogt	atacgctat	ttttataggt	7380
taatgcatg	ataataatgg	tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcy	7440
cggaaccocct	atthgtttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	tcatgagaca	7500
ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	7560
ccgtgtcgc	cttattccct	ttttgcccgc	atthgtcctt	cctgtttttg	ctcaccaga	7620
aacgtgggtg	aaagtaaaa	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacagtgty	gttacatcga	7680
actggatctc	aacagcggta	agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	7740
gatgagcact	tttaaagttc	tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtgttg	acgcccggca	7800
agagcaactc	ggtcgcccga	tacactatct	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	7860
cacagaaaag	catcttacgg	atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	7920
catgagtgat	aacactgcgg	ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	7980
aaccgctttt	ttgcacaaca	tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcgtt	gggaaccgga	8040
gctgaatgaa	gccataccaa	acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgcag	caatggcaac	8100
aacggtgcgc	aaactattaa	ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	aaacaattaat	8160
agatgctgat	gagcgggata	aagtgtcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggcttg	8220
ctggtttatt	gctgataaat	ctggagcccg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcatgacgc	8280
actggggcca	gatggtaagc	cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	8340
aactatggat	gaacgaaata	gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	8400
gtaactgtca	gaccaagttt	actcatatat	actttagatt	gatttaaaac	ttcattttta	8460
atthaaaagg	atctaggtga	agatccgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	8520
taccagcggg	ggtttgtttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	8580
gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	8640
acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgctct	gctaatcctg	ttaccagtgg	8700
ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	ccgggttggg	ctcaagacga	tagttaccgg	8760
ataagggcga	gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	8820
cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	gtgagctatg	agaaagcggc	acgcttcccg	8880
aagggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	gcccaggggt	cggaacagga	gagcgcacga	8940
gggagcttcc	agggggaaac	gcctgggtatc	tttatagttc	tgctcgggtt	cgccacctct	9000
gacttgagcg	tcgatttttg	tgatgctcgt	cagggggggc	gagcctatgg	aaaaacgcca	9060
gcaacgggat	cgccgcgtgc	ggctgctgga	gatggcggac	gcgatggata	tgttctgcca	9120
aggggtgggt	tgcgcattca	cagttctccg	caagaattga	ttggctccaa	ttcttgaggt	9180
ggtgaaatcc	ttagcgaggt	gccgcgggct	tccattcagg	tcgaggtggc	ccggctccat	9240
gcaccgcgac	gcaacgcggg	gaggcagaca	aggtataggg	cggcgcctac	aatccatgcc	9300
aaccggttcc	atgtgctcgc	cgagggcgca	taaatccccg	tgacgatcag	cggtccaatg	9360
atcgaagtta	ggctggtaag	agccgcgagc	gatccttgaa	gctgtcccctg	atggtcgtca	9420
tctacctgcc	tggacagcat	ggcctgcaac	gccggcatcc	cgatgcccgc	ggaagcgaga	9480
agaatcataa	tggggaaggc	catccagcct	cgctcggggg	agcttttttg	aaaagcctag	9540
gcctcaaaaa	aagcctcctc	actacttctg	gaatagctca	gaggccgagg	cggcctcggc	9600
ctctgcataa	ataaaaaaaa	ttagtcagcc	atg			9633

图9(接上)

SEQ ID NO:30: 人ACE2

>sp|Q9BYF1|ACE2_人血管紧张素转化酶2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACE2 PE=1 SV=2

MSSSSWLLLSLVAVTAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQ
 NMNNAAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLLQALQQNGSSVLSSEDKSKRLNTIL
 NTMSTIYSTGKVCNPNPQECLELLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGGKQLRPLY
 EEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHL
 HAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMVDQ
 AWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRIILM
 CTKVTMDDFLTAHHEMGIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKS
 IGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTI VGTLPFTYMLEKWRWVFKGEIPKDQWMKKWEM
 KREIVGVPEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQALCQAAKHEGPLH
 KCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTALALENVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNK
 NSFVWGSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKKN
 QMILFGEEDVRVANLKPRI SFNFVVTAPKNVSDII PRTEVEKAIRMSR SRINDAFRLNDN
 SLEFLGIQPTLGGPPNQPPVSIWLVIVFGVVMGVI VVGIVILIFTGIRDRKKKNKARSGENP
 YASIDISKGNNPGFQNTDDVQTSF

SEQ ID NO:99: RBD-N-RBD

PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNRYADSFVIRGDEVRQIAPGQ
 TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNLYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
 TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSQRPPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
 KFPRGQVPINTNSSPDDQIGYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI IWVATEGALNTPKDHIGTR
 NPANNAIIVLQLPQGTTL PKGFYAEGSRGGSQASRRSSSRNRRNRRNTPGSSRGTS PARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLESKM
 SGKGGQQQGTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSR
 IGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPEPKKDKKKADETTALPQRQKQQTVTLLPAADLDDFS
 KQLQQSMSSADSTQAPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNRYADSF
 FVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNLYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVE
 GFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPHHHHH-

SEQ ID NO:100: SEQ ID NO:14 无 His 标签

构建体 1: RBD-preS-RBD (RBD 序列如下划线, HBV PreS 序列如粗体)

PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNRYADSFVIRGDEVRQIAPGQ
 TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNLYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
 TNGVGYQPYRVVLSFELLHAP GGWSSKPRKMGMTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANSNPDWDFNPIKDHWPAAANQVGVGAFG
PGLTPPHGGILGWSPQAQGI LTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTAFHQALQDPRVRGLYFPAGGSSG
TVNPAENIASHISSISARTGDPVTNPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLD
 LCTNRYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNLYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQ
 AGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAP

图9(接上)

a)



b)

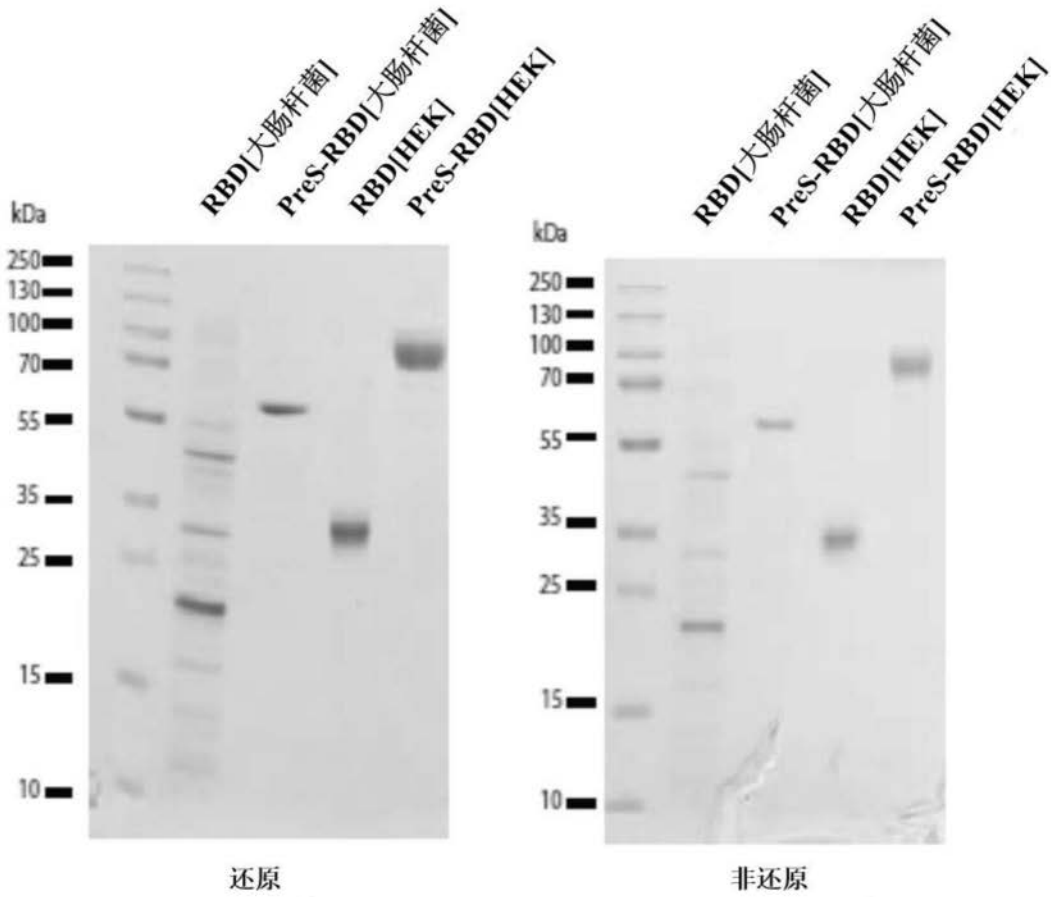


图10

c)

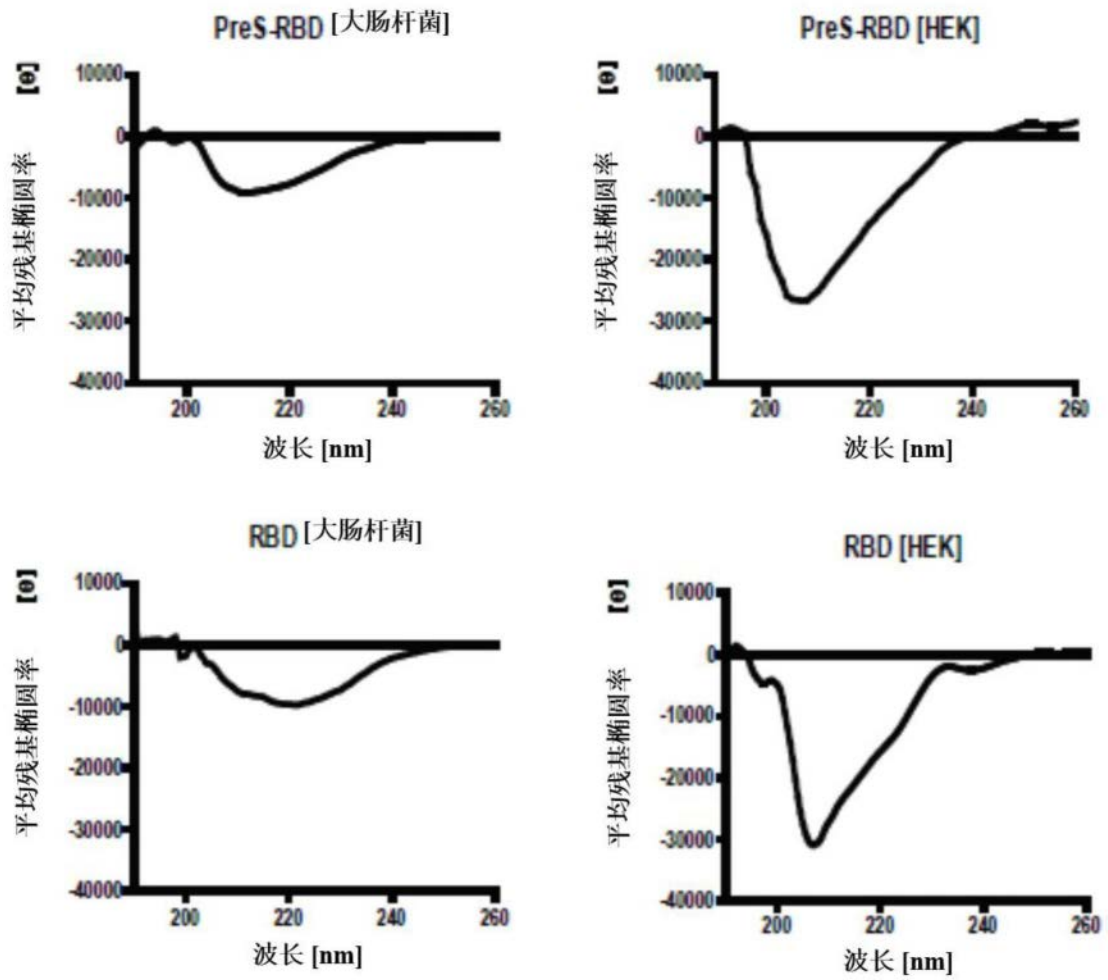


图10(接上)

d)

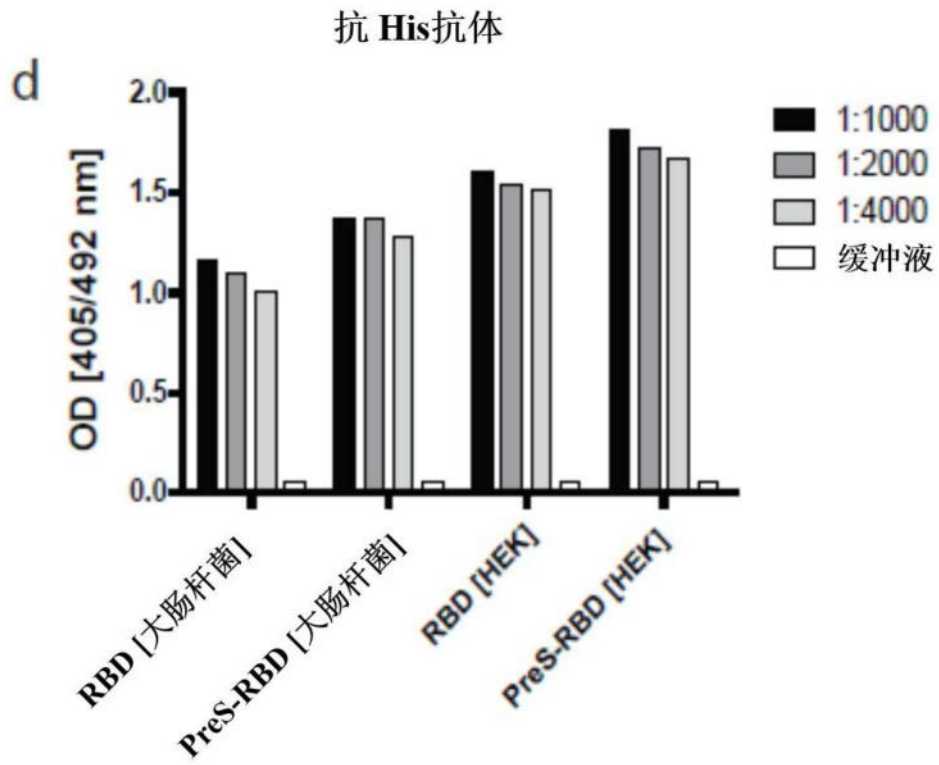
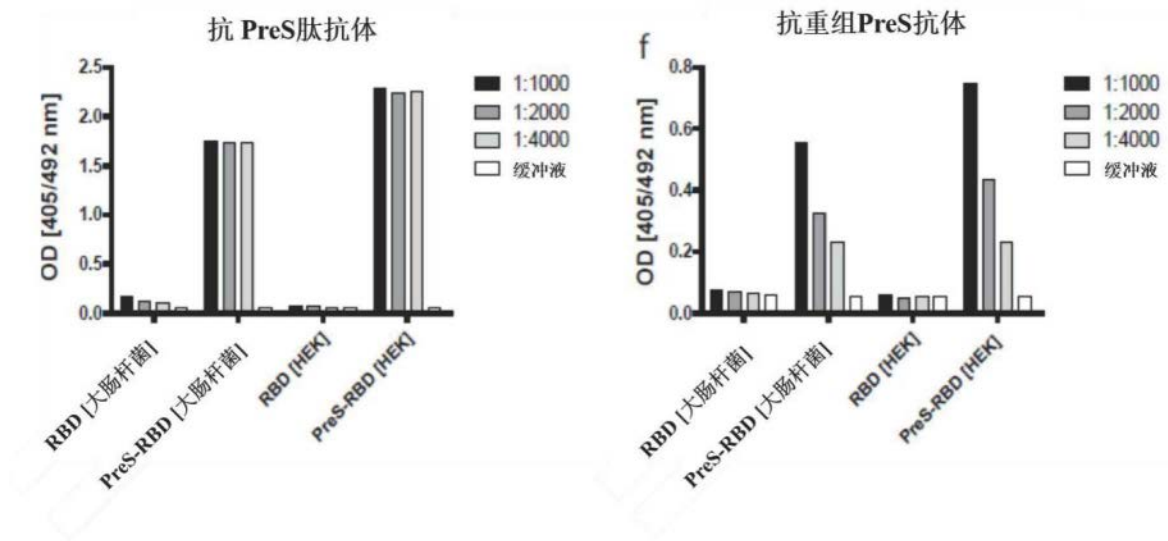


图10(接上)

e)和 f)



g) 历史对照 IgG (左) 和康复期患者 IgG (右)

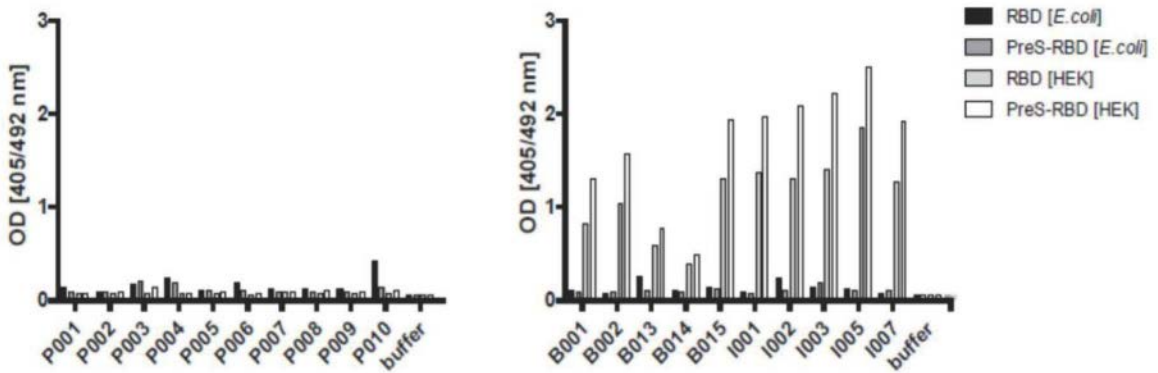


图10(接上)

			IgG 对 RBD [OD]							
			第 0 天		第 21 天		第 35 天		第 42 天	
			血清稀释度		血清稀释度		血清稀释度		血清稀释度	
抗原	μg	兔 ID	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000	1:1000	1:5000
RBD	20	1	0.07	0.06	0.07	0.07	0.72	0.24	0.76	0.22
RBD	20	2	0.07	0.06	0.14	0.08	1.15	0.39	1.23	0.47
RBD	20	3	0.07	0.06	0.09	0.07	0.11	0.07	0.12	0.07
RBD	40	4	0.06	0.06	0.23	0.12	0.80	0.35	1.47	0.74
RBD	40	5	0.07	0.06	0.15	0.09	0.35	0.14	0.42	0.17
RBD	40	6	0.06	0.06	0.26	0.11	0.29	0.19	0.37	0.24
% 阳性			0	0	0	0	50	0	50	16.6
RBD 二聚体	20	10	0.06	0.06	0.19	0.09	2.45	1.36	2.58	1.45
RBD 二聚体	20	11	0.06	0.06	0.07	0.06	0.12	0.07	0.14	0.08
RBD 二聚体	20	12	0.06	0.06	0.43	0.15	0.72	0.30	1.36	0.51
RBD 二聚体	40	13	0.06	0.06	0.37	0.13	2.14	0.98	1.60	0.96
RBD 二聚体	40	14	0.07	0.06	0.57	0.20	1.04	0.36	1.06	0.39
RBD 二聚体	40	15	0.07	0.08	0.09	0.07	0.25	0.12	0.37	0.18
% 阳性			0	0	16.6	0	66.6	33.3	66.6	50
RBD 三聚体	20	19	0.08	0.08	0.44	0.16	2.37	1.38	2.64	1.52
RBD 三聚体	20	20	0.07	0.06	0.10	0.07	0.50	0.17	0.50	0.16
RBD 三聚体	20	21	0.07	0.06	0.09	0.07	0.23	0.10	0.30	0.12
RBD 三聚体	40	22	0.07	0.06	0.29	0.12	1.48	0.55	1.28	0.64
RBD 三聚体	40	23	0.07	0.08	0.47	0.16	2.00	1.16	2.21	1.27
RBD 三聚体	40	24	0.07	0.07	0.09	0.07	0.29	0.13	0.34	0.12
PreS-RBD	20	28	0.09	0.06	0.27	0.11	1.61	0.73	1.52	0.71
% 阳性			0	0	0	0	83.3	66.6	83.3	66.6
PreS-RBD	20	29	0.07	0.06	0.25	0.11	1.50	0.58	1.70	0.65
PreS-RBD	20	30	0.07	0.06	0.70	0.23	1.92	0.95	2.07	1.13
PreS-RBD	40	31	0.07	0.07	0.11	0.07	1.08	0.44	1.44	0.65
PreS-RBD	40	32	0.07	0.06	1.54	0.55	2.23	1.41	2.50	1.64
PreS-RBD	40	33	0.07	0.06	0.46	0.14	2.05	1.12	2.30	1.17
% 阳性			0	0	33.3	16.6	100	83.3	100	100
N-RBD	20	37	0.07	0.06	0.22	0.09	1.50	0.76	1.72	0.79
N-RBD	20	38	0.08	0.06	0.50	0.17	2.72	1.38	2.55	1.54
N-RBD	20	39	0.07	0.06	0.99	0.33	2.56	1.47	2.71	1.66
N-RBD	40	40	0.07	0.06	0.52	0.18	2.22	1.12	2.18	1.18
N-RBD	40	41	0.08	0.07	1.68	0.61	2.59	1.56	2.90	1.75
N-RBD	40	42	0.07	0.06	0.07	0.06	0.35	0.13	0.63	0.20
% 阳性			0	0	66.6	16.6	83.3	83.3	100	83.3

图11

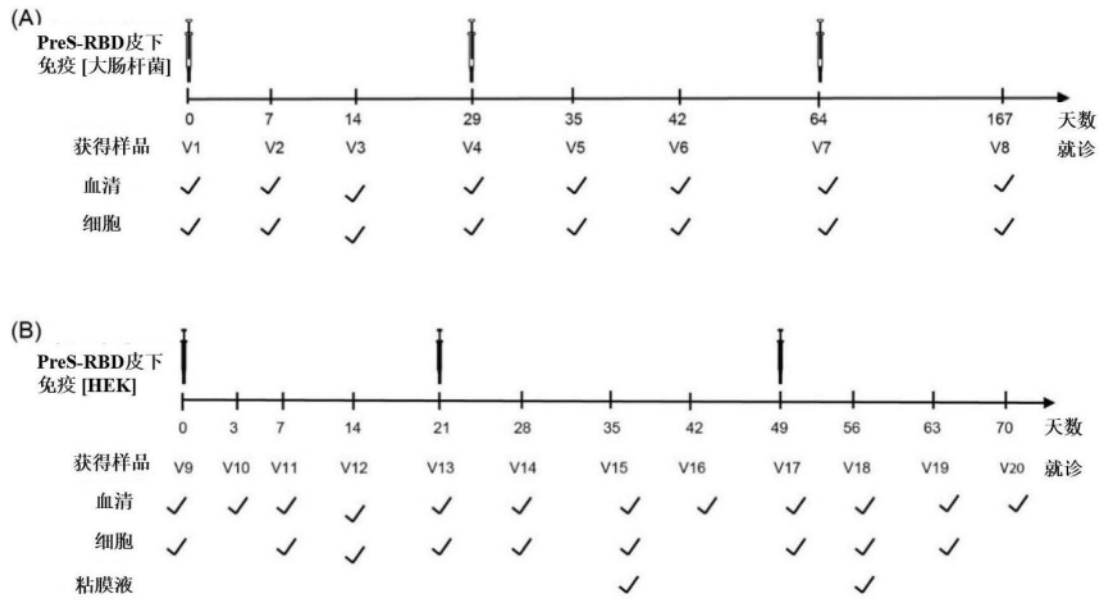
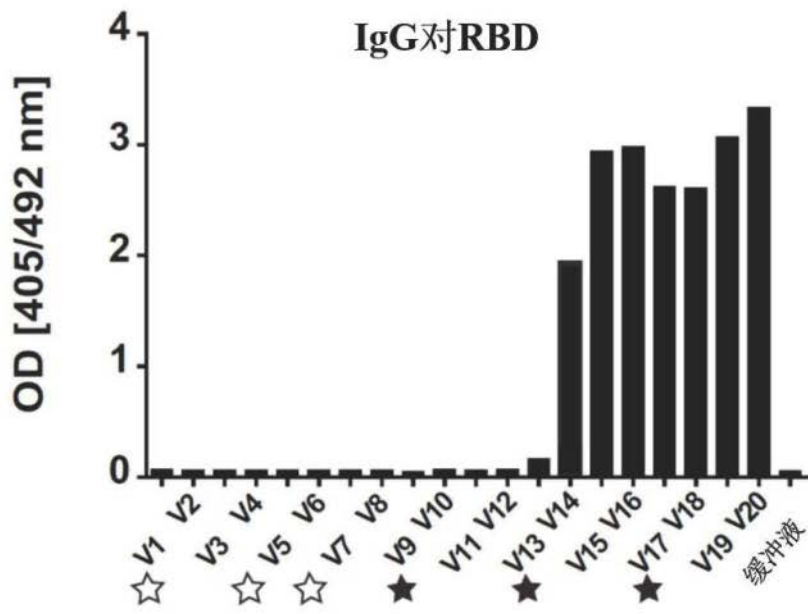


图12

a)



b)

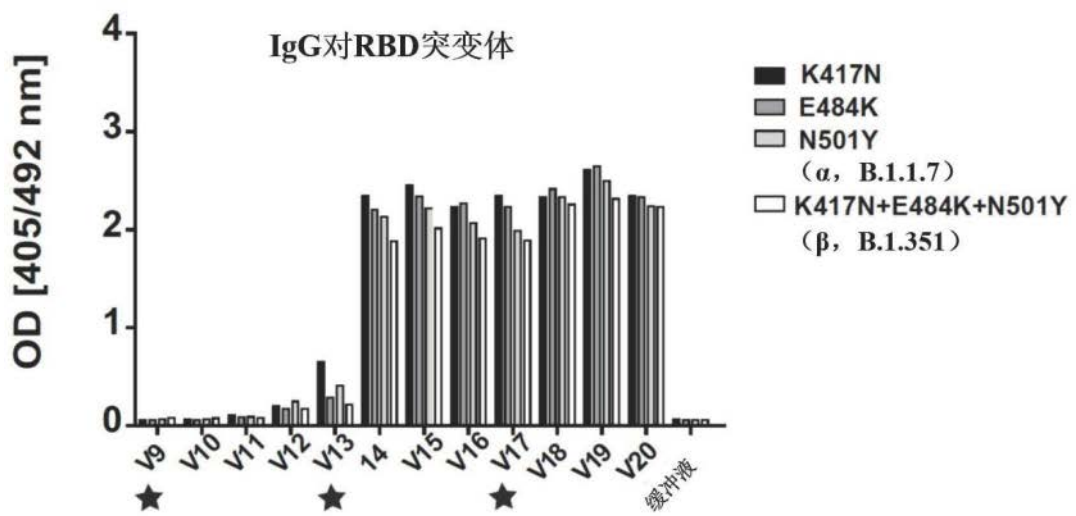


图13

c)

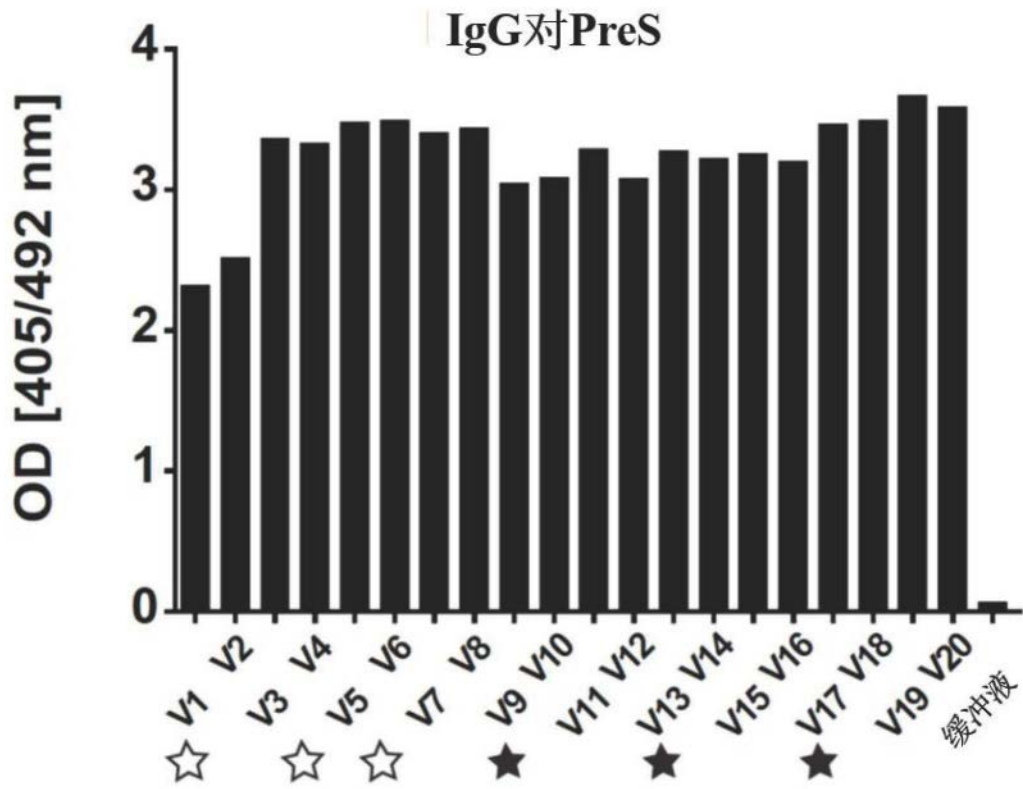


图13(接上)

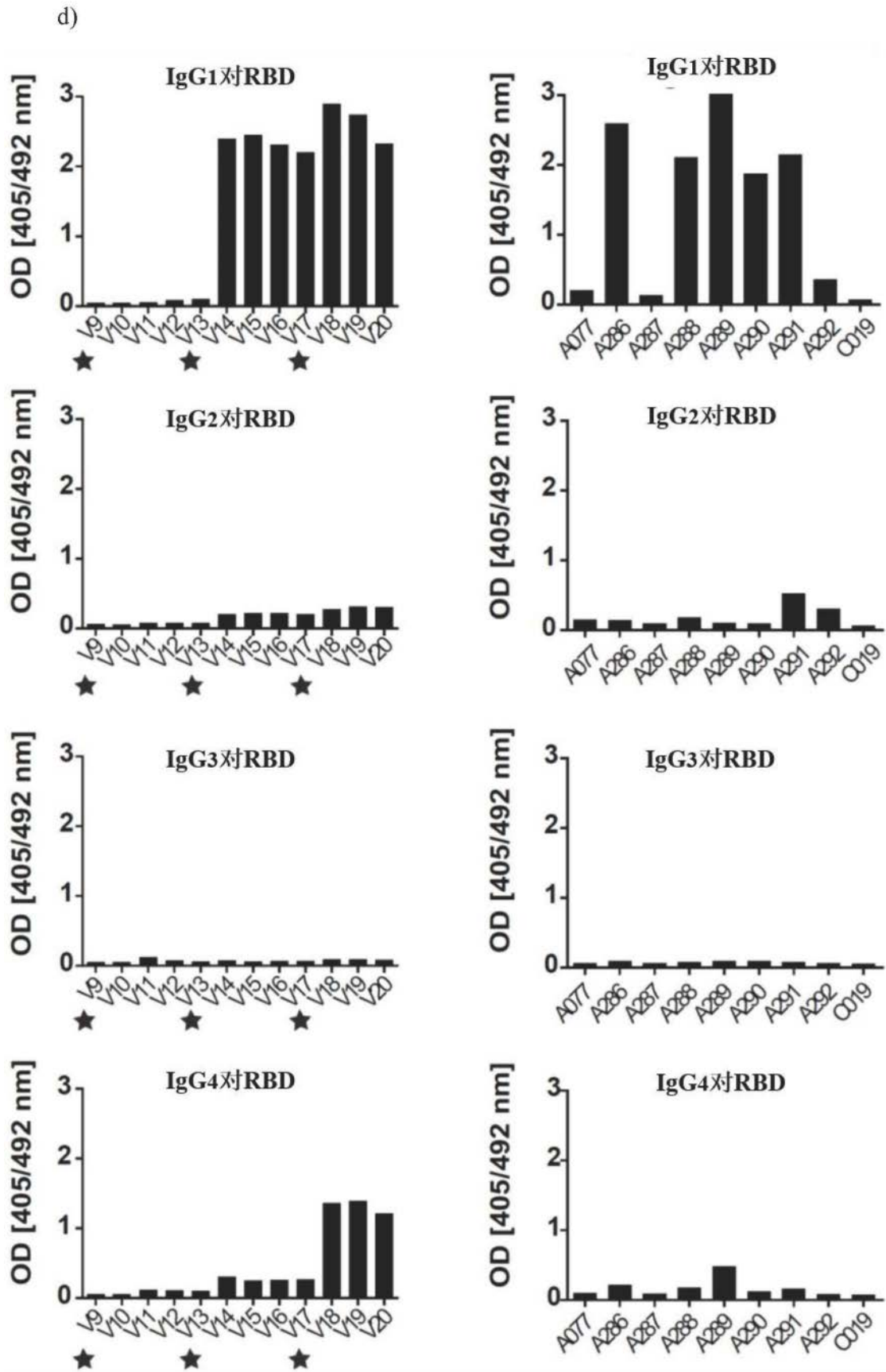


图13(接上)

使用免疫	样品 ID	% 抑制率 ¹		S1 特异性 IgG [BAU/ml] ²	中和性试验 [VNT50 滴度] ³	病毒中和性测试 [滴度] ⁴
		100ng RBD	50ng RBD			
PreS-RBD [大肠杆菌]	V1	6.8	-2.0	<3.2	<10	<20
	V2	-4.3	-2.1	<3.2	n.d.	<20
	V3	2.2	8.9	<3.2	n.d.	n.d.
PreS-RBD [大肠杆菌]	V4	-0.9	-8.4	<3.2	n.d.	n.d.
	V5	-3.0	5.0	<3.2	n.d.	n.d.
PreS-RBD [大肠杆菌]	V6	-0.9	-5.7	<3.2	<10	n.d.
	V7	0.2	-5.3	<3.2	n.d.	n.d.
	V8	3.9	-4.5	<3.2	<10	n.d.
PreS-RBD [HEK]	V9	-8.5	1.7	<3.2	<10	<20
	V10	5.6	5.8	<3.2	<10	n.d.
	V11	8.6	6.6	<3.2	<10	n.d.
	V12	-4.3	5.2	42.8	<10	n.d.
PreS-RBD [HEK]	V13	1.5	-6.0	59.7	<10	<20
	V14	48.1	90.5	1530.0	57	30
	V15	40.3	88.9	1653.4	87	60
	V16	46.2	95.9	1275.7	78	40
PreS-RBD [HEK]	V17	94.2	81.4	1130.1	39	40
	V18	95.6	100.1	2360.0	171	120
	V19	83.9	96.5	2864.1	267	160
	V20	98.5	99.7	2745.2	209	120
使用注册的 SARS-CoV-2 疫苗免疫						
Janssen COVID-19 疫苗	A077	5.1	5.1	130.2	25	10
Janssen COVID-19 疫苗	C019	1.2	-1.7	91.0	12	10
Vaxzevria	A287	35.1	32.5	157.3	18	10
Vaxzevria	A292	-8.6	-14.4	164.5	59	30
Comirnaty	A288	3.5	95.2	1309.6	166	120
Comirnaty	A286	97.3	98.6	2853.8	836	320
Comirnaty	A290	16.0	52.8	838.2	90	60
Comirnaty	A291	82.9	99.4	1414.4	207	120
交叉接种 (Vaxzevria, Comirnaty)	A289	98.3	99.0	2728.9	522	240
	中位数 值 [§]	16	52.8	838.2	90	60

图14

		% 抑制率 ¹		S1 特异性 IgG [BAU/ml] ²	中和性试验 [VNT50 滴度] ³	病毒中和性测试 [滴度] ⁴
COVID-19 康复期患者						
轻症 COVID-19	B001	-18.3	3.9	476.4	n.d.	n.d.
轻症 COVID-19	B002	-23.0	7.2	376.6	n.d.	n.d.
轻症 COVID-19	B013	56.5	87.6	149.6	n.d.	n.d.
轻症 COVID-19	B014	14.7	30.3	111.1	n.d.	n.d.
轻症 COVID-19	B015	46.0	99.8	910.9	n.d.	n.d.
重症 COVID-19	I001	47.1	96.8	667.9	n.d.	n.d.
重症 COVID-19	I002	9.6	19.5	1186.5	n.d.	n.d.
重症 COVID-19	I003	19.8	25.8	2963.8	n.d.	n.d.
重症 COVID-19	I005	26.8	99.7	2606.0	n.d.	n.d.
重症 COVID-19	I007	76.8	100	859.9	n.d.	n.d.
	中位数 值 ⁵	23.3	58.95	763.9	n.d.	n.d.

¹ 100 或 50 ng RBD 分子相互作用测试测定 RBD 与 ACE2 结合的抑制率%。

² 用抗 SARS-CoV-2- QuantiVac-ELISA 试剂盒(Euroimmun,Lübeck,, 德国)定量测定 S1 特异性 IgG。结果以 WHO 标准化结合抗体单位 (BAU)/ml 计算, >35,2 BAU/ml 的值被认为是阳性。

³ 600 TCID₅₀ SARS-CoV-2 血浆样品的病毒中和以 VNT50 滴度(50%病毒中和滴度)给出。<10 的值被认为是阴性。

⁴使用 50–100 TCID₅₀ SARS-CoV-2 的病毒中和滴度。<20 的值被认为是阴性。

⁵使用注册的 SARS-CoV-2 疫苗对受试者进行接种的中位数值 (表 S1)。

⁵COVID-19 康复期患者的中位数值。

n.d. 未进行

图14(接上)

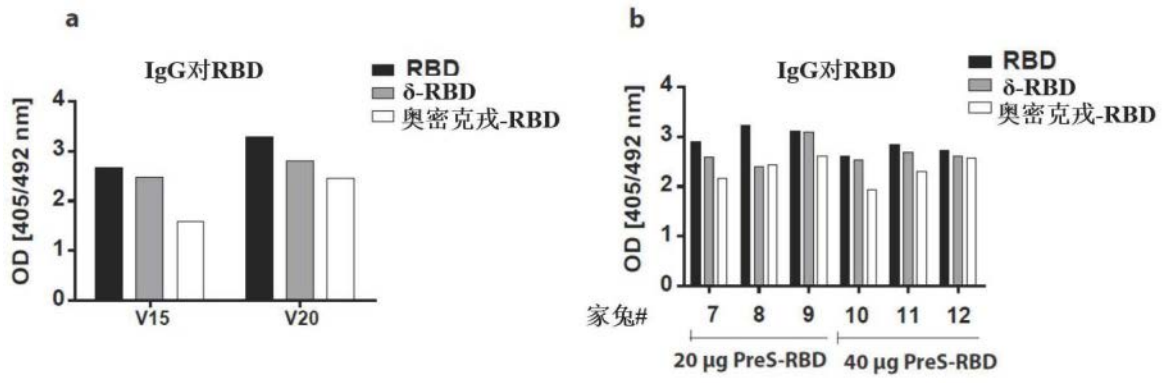


图15