



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113151184 B

(45) 授权公告日 2023.03.21

(21) 申请号 202110654496.4

(22) 申请日 2021.06.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113151184 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(66) 本国优先权数据  
202010544616.0 2020.06.15 CN

(73) 专利权人 上海市公共卫生临床中心  
地址 201508 上海市金山区漕廊公路2901  
号科研楼308室

(72) 发明人 徐建青 张晓燕 何香川 丁龙飞  
曹康丽

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100  
专利代理师 杨昀

(51) Int.Cl.

G12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

审查员 张晓霞

权利要求书2页 说明书19页  
序列表10页 附图8页

(54) 发明名称

基于细胞膜展示冠状病毒免疫原以诱导中和抗体的方法

(57) 摘要

本申请公开了一种基于细胞膜展示冠状病毒免疫原以诱导中和抗体的方法。具体而言,本公开中提供了一种在其细胞膜表面展示新型冠状病毒SARS-CoV-2刺突蛋白S的细胞,包含所述细胞的针对新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗或疫苗组合,所述细胞在制备用于预防或治疗新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗中的应用及其制备方法。本公开的细胞和疫苗能够在体内高效活化B细胞,诱导中和抗体应答,在预防和降低新冠病毒感染中有广泛的应用前景。

1. 一种在其细胞膜表面展示新型冠状病毒SARS-CoV-2刺突蛋白S的细胞,其中所述细胞为K562细胞,所述刺突蛋白S的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

2. 如权利要求1所述的细胞,其中,所述细胞包含具有刺突蛋白S编码序列的载体。

3. 如权利要求1所述的细胞,其中,所述细胞转入了具有SEQ ID NO: 1所示核苷酸分子的载体。

4. 如权利要求1所述的细胞,其中,每 $1 \times 10^6$ 个所述细胞提供0.3~0.6微克的刺突蛋白S。

5. 如权利要求1所述的细胞,其中,每 $1 \times 10^6$ 个所述细胞提供0.47微克的刺突蛋白S。

6. 如权利要求1所述的细胞,其中,所述细胞是通过多聚甲醛固定灭活的细胞。

7. 一种针对新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗或疫苗组合,其包含如权利要求1-6中任一项所述的细胞。

8. 如权利要求7所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述疫苗或疫苗组合的形式适于肌肉接种、皮内接种、皮下接种、生殖道、直肠或其任意组合。

9. 如权利要求7所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述疫苗或疫苗组合的形式适于肌肉注射。

10. 如权利要求7所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述疫苗组合还包含针对新型冠状病毒的一种或多种其他疫苗。

11. 如权利要求10所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述其他疫苗包括针对冠状病毒S、S1或RBD的疫苗。

12. 如权利要求11所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述的S、S1或RBD来自SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1或bat-CoV。

13. 如权利要求7所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述疫苗组合包含核酸疫苗与重组人源细胞载体疫苗的组合,且所述疫苗组合中的组分前后序贯接种。

14. 如权利要求13所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述核酸疫苗为DNA或RNA疫苗。

15. 如权利要求14所述的疫苗或疫苗组合,其中,序贯接种中先接种DNA疫苗。

16. 如权利要求7-15中任一项所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述疫苗或疫苗组合还包含佐剂。

17. 如权利要求16所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述佐剂选自下组:AS03、MF59、MnJ、CpG、氢氧化铝佐剂、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、脂多糖、RIBI佐剂或它们的任意组合。

18. 如权利要求16所述的疫苗或疫苗组合,其中,所述佐剂选自下组:Alum、Alum和CpG的组合、MnJ和CpG的组合。

19. 如权利要求1-6中任一项所述的细胞在制备用于预防或治疗新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗中的应用。

20. 一种制备针对新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗或疫苗组合的方法,所述方法包括:

(a) 提供如权利要求1-6中任一项所述的细胞;

(b) 将(a)中所提供的细胞与免疫学上或药学上可接受的载体或佐剂组合。

21. 如权利要求20所述的方法,其中,所述疫苗或疫苗组合包含佐剂。

22. 如权利要求20所述的方法,其中,所述佐剂选自下组:AS03、MF59、MnJ、CpG、氢氧化铝佐剂、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、脂多糖、RIBI佐剂或它们的任意组合。

23. 如权利要求20所述的方法,其中,所述佐剂选自下组:Alum、Alum和CpG的组合、MnJ和CpG的组合。

## 基于细胞膜展示冠状病毒免疫原以诱导中和抗体的方法

### 技术领域

[0001] 本公开属于生物技术和疫苗领域。具体而言，本公开涉及一种基于细胞膜展示冠状病毒免疫原以诱导中和抗体的方法。

### 背景技术

[0002] 迄今为止，疫苗是人类主动预防传染性疾病最为安全和有效的方式。疫苗的工作原理为通过主动免疫已灭活的病原体或基因工程化的具有较高免疫原性的蛋白质或核酸组分，诱发针对病原体的特异性免疫应答包括细胞免疫应答与抗体应答，同时形成免疫记忆，以便再次存在感染风险时，机体免疫系统能够迅速反应，产生充足的特异性免疫应答，阻断病原体入侵靶细胞。

[0003] 现有疫苗的主要形式为：灭活病毒疫苗、核酸疫苗、蛋白亚单位/病毒样颗粒疫苗及细菌/病毒载体疫苗。其中病毒样颗粒疫苗的免疫原性较高，同时辅以佐剂注射能够产生较好的免疫保护效应。但对于一些无法自组装形成病毒天然结构的囊膜病毒，探寻能够表达更接近天然构象形式的免疫原展示方式，将有助于提高抗原的免疫原性并诱导产生中和抗体。

[0004] 高等生物真核细胞特别是人源化细胞，其膜表面表达的抗原表位能够更接近病毒囊膜蛋白的天然构象形式，并保证其表面所含糖基与感染病毒类似，真实重现机体需要识别的抗原特性，可作为展示囊膜病毒抗原的优选细胞载体。K562细胞株来源于人红白血病，其特点是缺乏内源性表达HLA-A、B、C (MHC-I)、HLA-DR (MHC-II) 和血型抗原(A、B、O)分子，能够免于机体间的排斥反应，同时对NK细胞介导的杀伤非常敏感，而且在机体内不具有成瘤性，因此应用其作为囊膜病毒疫苗载体具有较好的安全性和有效性。

[0005] 冠状病毒是一类具有囊膜的正链单股RNA病毒，其中SARS-CoV-2属于β冠状病毒属B亚型冠状病毒，与严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)约有80%同源性，在人群中具有极高的传播力和较高致病性。冠状病毒主要通过刺突蛋白Spike(S蛋白)与宿主细胞受体结合，介导病毒入侵并决定病毒的宿主嗜性。其中位于S蛋白S1亚基的受体结合域RBD，能够与宿主细胞表面受体血管紧张素转化酶2(ACE2)结合，随后通过S蛋白S2亚基融合病毒和宿主细胞膜，促进其进入易感细胞。因此，靶向RBD、S1和S蛋白表位的中和抗体，能够阻断病毒RBD结合，干扰S2介导的膜融合、侵入，抑制病毒复制，可作为冠状病毒疫苗免疫原的候选靶点。

[0006] 然而，如何针对这些免疫原制得可高效诱导结合抗体和中和抗体的疫苗仍然是本领域中急需攻克的难题。本领域中迫切需要开发出可有效产生冠状病毒中和抗体的新型疫苗。

### 发明内容

[0007] 本申请中正是提供了一种可有效用于诱导针对新型冠状病毒的结合抗体和中和抗体的细胞及其相关疫苗。

[0008] 在本公开的第一方面中,提供了一种在其细胞膜表面展示新型冠状病毒SARS-CoV-2刺突蛋白S的细胞。

[0009] 在一些实施方式中,刺突蛋白S选自:(a)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽;(b) (a)中所述多肽的同源多肽,例如其与SEQ ID NO:2具有高于或等于90%,高于或等于95%,高于或等于96%,高于或等于97%,高于或等于98%,高于或等于99%的同源性;(c)在(a)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有免疫原性的由(a)衍生的蛋白质或多肽。

[0010] 在一些实施方式中,刺突蛋白S包含在融合肽中,例如与之融合的部分选自:病毒或宿主来源的蛋白,转铁蛋白(Fn)、人免疫缺陷病毒(HIV) p24蛋白、囊膜病毒的茎部,如流感病毒HA2、HIV的gp41、抗体Fc段、GM-CSF、IL-21、CD40L或CD40抗体。

[0011] 在一些实施方式中,所述细胞包含具有刺突蛋白S编码序列的载体。

[0012] 在一些实施方式中,所述刺突蛋白S编码分子为:(i)具有如SEQ ID NO:1所示核苷酸序列的分子;(ii)在严格条件下与(i)杂交的分子;(iii)与(i)或(ii)中序列具有高于或等于90%,高于或等于95%,高于或等于96%,高于或等于97%,高于或等于98%,高于或等于99%的同源性的核苷酸分子;(iv)在(i)或(ii)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个核苷酸且能够表达功能性RBD免疫原性肽的核苷酸分子。

[0013] 在一些实施方式中,所述细胞已转入了具有(i)~(iv)中任一项所述的刺突蛋白S编码分子的载体。

[0014] 在一些实施方式中,所述载体选自病毒载体,如痘病毒(如天坛株、北美疫苗株、惠氏衍生株、李斯特株、安卡拉衍生株、哥本哈根株和纽约株痘病毒)、腺病毒(如Ad5、Ad11、Ad26、Ad35、Ad68)、慢病毒载体、腺相关病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、呼肠弧病毒、弹状病毒、森林脑炎病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒、脊髓灰质炎病毒载体。

[0015] 在一些实施方式中,所述细胞为哺乳动物细胞或昆虫细胞,如K562、A549、HEK293、HeLa、CHO、NS0、SP2/0、PER.C6、Vero、RD、BHK、HT 1080、A549、Cos-7、ARPE-19、MRC-5细胞、High Five、Sf9、Se301、SeIZD2109、SeUCR1、Sf9、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、BM-N、Ha2302、Hz2E5、Ao38。

[0016] 在一些实施方式中,所述细胞为K562细胞、A549细胞、HEK293细胞。

[0017] 在一些实施方式中,所述细胞具有展示所述刺突蛋白S的完整膜结构。

[0018] 在一些实施方式中,所述细胞是已灭活的细胞,例如采用物理灭活如X-射线辐射、紫外辐射;或化学灭活如 $\beta$ 丙内酯、甲醛、多聚甲醛固定。

[0019] 在本公开的一个方面中,提供了一种针对新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗或疫苗组合,其包含本公开的细胞。

[0020] 在一些实施方式中,所述疫苗或疫苗组合的形式适于肌肉接种、皮内接种、皮下接种、滴鼻、雾化吸入、生殖道、直肠、口服或其任意组合,优选肌肉注射。

[0021] 在一些实施方式中,所述疫苗或疫苗组合包含佐剂或与佐剂联用,所述佐剂包括但不限于:铝佐剂、霍乱毒素及其亚单位、寡脱氧核苷酸、锰离子佐剂、胶体锰佐剂、弗氏佐剂、SAS佐剂、MF59佐剂、AS03佐剂、QS-21佐剂、CpG佐剂、Poly I:C、大肠杆菌粘附素及其他TLR配体、GM-CSF、IL-2、IL-3、IL-7、IL-11、IL-12、IL-18、IL-21等。

[0022] 在一些实施方式中,所述疫苗组合还包含针对新型冠状病毒的一种或多种其他疫

苗,例如所述其他疫苗包括针对冠状病毒S、S1或RBD的疫苗,例如所述的S、S1或RBD来自于包括但不限于SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、bat-CoV。

[0023] 在一些实施方式中,疫苗组合包含核酸疫苗(DNA或RNA疫苗)与重组人源细胞载体疫苗的组合,且所述疫苗组合中的组分前后序贯接种,优选先接种DNA疫苗。

[0024] 在本公开的一个方面中,提供了本公开的细胞在制备用于预防或治疗新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗中的应用。

[0025] 在本公开的一个方面中,提供了本公开的细胞,其用于预防或治疗新型冠状病毒SARS-CoV-2。

[0026] 在本公开的一个方面中,提供了预防或治疗新型冠状病毒SARS-CoV-2感染或其相关病症的方法,所述方法包括给予有需要的对象本申请的细胞或疫苗或疫苗组合物。

[0027] 在本公开的一个方面中,提供了一种制备针对新型冠状病毒SARS-CoV-2的疫苗或疫苗组合的方法,所述方法包括:

[0028] (a) 提供本申请所述的细胞;

[0029] (b) 将(a)中所提供的细胞与免疫学上或药学上可接受的载体组合。

[0030] 在本公开的一些实施方式中,本公开的细胞在其细胞膜上展示冠状病毒Spike蛋白免疫原。

[0031] 在本公开的一些实施方式中,本公开的细胞可为灭活的细胞,其灭活方式包括物理灭活如X-射线辐射、紫外辐射;或化学灭活如β丙内酯、甲醛多聚甲醛固定。

[0032] 在本公开的一些实施方式中,本公开细胞的灭活以及其他处理不破坏其细胞膜的完整性。

[0033] 在本公开的一些实施方式中,包含本公开细胞的疫苗作为初免和/或加强免疫疫苗使用。在一些实施方式中,包含本公开细胞的疫苗作为加强免疫疫苗使用。在一些实施方式中,包含本公开细胞的疫苗在DNA疫苗初免后,作为加强免疫疫苗使用。

[0034] 本领域的技术人员可对前述的技术方案和技术特征进行任意组合而不脱离本公开的发明构思和保护范围。本公开的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

## 附图说明

[0035] 下面结合附图对本公开作进一步说明,其中这些显示仅为了图示说明本公开的实施方案,而不是为了局限本公开的范围。

[0036] 图1:慢病毒表达载体质粒的构建与细胞膜展示Spike免疫原(S蛋白)的表达验证。

[0037] 整合有S蛋白基因的慢病毒表达载体质粒pHAGE-S蛋白-puro表达图谱(图1a);慢病毒表达载体pHAGE-S蛋白-puro包装的慢病毒感染K562细胞后,蛋白免疫印迹结果显示构建的K562-S蛋白细胞成功表达S蛋白(图1b);流式结果显示S蛋白在K562细胞膜上成功表达,并通过多次染色后流式分选使K562-S蛋白细胞得以富集(图1c)。

[0038] 图2:K562细胞膜上表达人白细胞抗原(HLA)和人血型抗原(A、B)的鉴定。

[0039] K562细胞膜上人白细胞抗原I类(HLA-A、B)和人白细胞抗原II类(HLA-DR)分子的表达鉴定,蛋白免疫印迹结果显示K562细胞膜上基本不表达两种分子,其膜成分进入机体

将不会产生排斥反应(图2a和2b);K562细胞膜上人血型抗原A、B分子表达鉴定,蛋白免疫印迹结果显示K562细胞基本不表达人血型抗原,其膜成分不会刺激不同血型机体产生溶血反应(图2c);

[0040] 图3:比较直接应用S蛋白表位相关免疫原(RBD、S1)及膜上展示S蛋白的K562细胞(K562-S蛋白)免疫小鼠,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0041] 以表1的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫结束后2周,使用ELISA方法分别检测RBD、S1蛋白免疫和K562-S蛋白免疫诱导产生的结合抗体滴度,结果显示第二针使用RBD蛋白免疫诱导产生的RBD特异性结合抗体较微弱,而S1蛋白及K562-S蛋白免疫能够产生较高的抗体应答,其中膜上展示S蛋白的K562疫苗结合抗体滴度最高可达40 0000(图3a);与诱导产生的结合抗体趋势一致,免疫2周后K562-S蛋白诱导产生的针对SARS-CoV-2假病毒的中和抗体滴度较高,均值在1200左右,其中有一只小鼠能够达到4,500(图3b)。

[0042] 图4:采用不同接种途径免疫K562-S蛋白载体疫苗,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0043] 以表2的免疫策略对小鼠进行免疫,ELISA方法检测免疫后第1周、第2周及第4周小鼠血清中结合抗体滴度。K562细胞的免疫接种分为腹腔和肌肉注射两种方式。结果显示,实验组(K562-S蛋白)与对照组(K562)相比,通过腹腔注射和肌肉注射的两种免疫方式都能够提升RBD特异性结合抗体的滴度,其中肌肉免疫效果更佳(图4a);同时检测肌肉免疫后第1周、第2周及第4周小鼠血清中中和抗体的滴度,结果显示,与对照组相比,免疫后1周实验组的中和抗体提升较弱,而免疫后2周和4周实验组中和抗体逐步提升,中和抗体滴度最高可达3500以上(图4b);免疫后第4周,分别比较以腹腔和肌肉途径注射K562-S蛋白诱导的中和抗体,结果显示两组诱导的中和抗体均值都在1200左右,且肌肉免疫有一只小鼠能够达到3700以上(图4c)。

[0044] 图5:不同灭活方式处理K562-S蛋白载体疫苗,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0045] 对K562-S蛋白细胞分别使用x射线辐射和多聚甲醛固定的方法,以表3的免疫策略对小鼠进行免疫,检测免疫后第1周、第2周小鼠血清中结合抗体和中和抗体滴度。应用ELISA方法检测结果显示,免疫后第1周、第2周多聚甲醛处理组诱导产生的结合抗体较高,与未处理组基本相当甚至更高,而x射线处理组诱导的结合抗体在免疫后第1周时略高于未处理组,在免疫后第2周弱于未处理和多聚甲醛固定组(图5a);同时,免疫后第1周只有多聚甲醛处理组诱导产生了抗SARS-CoV-2假病毒的中和抗体,且免疫后第2周多聚甲醛处理组部分小鼠产生的中和抗体显著提升,最高可达800以上,而x射线处理组基本没有有效诱导出中和抗体,未处理组也仅能诱导出和免疫后第1周多聚甲醛处理组相当的中和抗体(图5b);

[0046] 图6:K562-S蛋白载体疫苗贯序免疫,能够诱导产生RBD特异性结合抗体和中和抗体。

[0047] 对K562-S蛋白细胞使用多聚甲醛固定的方法,将小鼠随机分2组,以表4的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。检测2次免疫后第1周、第2周小鼠血清中结合抗体和中和抗体滴度。应用ELISA方法检测结果显示,2次免疫后第1周K562-S蛋白免疫组诱导产生的结合抗体滴度平均能够达到6400,第2周结合抗体继续保持较高水平(图

6a);同时,2次免疫后第1周没有产生了抗SARS-CoV-2假病毒的中和抗体,而免疫后第2周部分小鼠能够被诱导产生中和抗体,最高滴度达到324(图6b)。提取K562-S蛋白细胞膜,以表5的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。检测2次免疫后第2周小鼠血清中结合抗体和中和抗体滴度。应用ELISA方法检测结果显示,2次免疫后第2周只有2只小鼠产生了滴度约为200的结合抗体(图6c);同时,2次免疫后第2周只有1只小鼠产生了微弱的中和抗体,滴度约为20(图6d)。

[0048] 图7:基于S免疫原的不同载体疫苗免疫,能够诱导产生RBD特异性结合抗体和中和抗体。

[0049] 将小鼠随机分4组,以表6的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。对K562-S蛋白细胞使用多聚甲醛固定的方法,后对灭活的K562-S疫苗和S三聚体蛋白疫苗配伍氢氧化铝佐剂(Alum)使用。检测2次免疫后第2周小鼠血清中结合抗体和中和抗体滴度。应用ELISA方法检测结果显示,2次免疫后DNA-S组诱导的结合抗体滴度较弱,K562-S蛋白-Alum组诱导的结合抗体GMT与S三聚体蛋白-Alum组相当,平均能够达到100000(图7a);同时,抗SARS-CoV-2假病毒的中和抗体GMT与结合抗体趋势基本一致,K562-S蛋白-Alum和S三聚体蛋白-Alum组GMT均高于1000(图7b)。S蛋白ELISA定量试剂盒检测每1e6个K562-S细胞数的S蛋白剂量约等于0.47 $\mu$ g(图7c),将S三聚体蛋白组的抗体滴度数据等比例转换为与K562-S疫苗免疫剂量相同,转换后蛋白疫苗组中和抗体GMT超过100,K562-S蛋白疫苗组中和抗体GMT超过1000,细胞疫苗中和GMT可达蛋白疫苗的13倍左右(图7d)。

[0050] 图中,n $\times$ 表示相差倍数,\*表示显著性差异。

[0051] 图8:不同类型佐剂与K562-S蛋白载体疫苗配伍使用,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异

[0052] 将小鼠随机分7组,以表7的免疫策略对小鼠进行免疫,接种方式和疫苗处理同上,配伍佐剂见表7。免疫结束后2周,分别检测不同佐剂配伍的K562-S蛋白疫苗免疫诱导产生的结合抗体滴度和中和抗体滴度,结果显示多种佐剂均能不同程度的提高K562-S蛋白疫苗的免疫原性,在多种佐剂配伍形式中,AS03乳状佐剂和两种联合型佐剂Alum+CpG和MnJ+CpG,能够诱导相对最强的免疫应答,中和抗体滴度最高,GMT约为10000;单独MnJ佐剂和乳状佐剂MF59次之;传统佐剂Alum相对于其他新型或联合佐剂的提升作用最弱,但相较于无佐剂对照而言已有明显提高,中和抗体GMT约为1000;同样的,结合抗体也与中和抗体的趋势一致(图8a,8b)。

[0053] 图9:K562-S蛋白载体疫苗配伍优势佐剂使用,能够诱导产生持久性的RBD特异性结合抗体和中和抗体。

[0054] 将ICR小鼠随机分2组,以表8的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。免疫结束后不同时间点,分别检测不同佐剂配伍的K562-S蛋白疫苗免疫诱导产生的结合抗体滴度和中和抗体滴度。

[0055] 结果显示ICR小鼠在初免后6周(加强免疫后2周)结合抗体GMT分别达到102400(Alum)和557380(MnJ+CpG),中和抗体GMT分别达到9982(Alum)和33649(MnJ+CpG),且抗体应答随时间延长而逐渐减弱,MnJ+CpG联合佐剂诱导的抗体应答强度和持久性都要优于传统Alum佐剂,在初免后24周(免疫后5个月)时,抗体应答仍维持在较高水平,结合抗体GMT分别达到13825(Alum)和32254(MnJ+CpG),中和抗体GMT分别达到535(Alum)和1045(MnJ+CpG)

(图9a,9b),该结果表明MnJ+CpG联合佐剂为优势佐剂,K562-S蛋白载体疫苗能够维持持久的免疫活性。

### 具体实施方式

[0056] 本公开涉及疫苗领域。本申请中利用生物细胞膜的特性,通过在细胞载体疫苗膜表面展示冠状病毒S蛋白,最大程度还原囊膜病毒蛋白的天然构象;并且,若所选细胞为例如K562细胞时,其除表达免疫原外,细胞膜上基本不表达如人类白细胞抗原(HLA)或血型抗原(A、B、O)等会引发排斥或溶血反应的分子,使其作为膜展示免疫原的疫苗载体具有很好的安全性;据此,该种细胞膜上展示S蛋白免疫原的载体疫苗有望作为一种有效的冠状病毒疫苗,诱导机体产生特异性的中和抗体,用于预防新冠或多种冠状病毒相关的疾病。

[0057] 在肿瘤治疗中,基因工程化的K562细胞曾被改造为一种过表达GM-CSF细胞因子的全细胞治疗性疫苗,该疫苗主要通过分泌细胞因子发挥类似佐剂的免疫激活作用,刺激抗原的摄取和诱发相应的细胞免疫反应。然而,目前仍无利用人源细胞作为预防性疫苗载体的报道,特别是在与肿瘤在致病机理、病症及其发展、以及预防和治疗方法都截然不同的感染性疾病中未见报道。

[0058] 在本申请中,基于自然感染过程中S蛋白在病毒膜上展示为天然构象的原理,我们应用人源细胞膜作为S蛋白展示的疫苗载体基质,研发基于人源细胞载体的新冠病毒疫苗。本设计使得S蛋白能够保持自然构象,也同时避免人体的排斥反应,减少疫苗的载体效应。

[0059] 我们首次通过实验证明了人源细胞载体疫苗K562-S具有优异的免疫原性和免疫反应性;在较低免疫原性物质剂量下就能够有效提升其抗体应答;通过配伍佐剂使用,可进一步提高其免疫效果。本申请证明了基于人源细胞的S蛋白疫苗为一种高效诱导针对新冠病毒中和抗体的疫苗形式,其优势效应具有不可预知性。

[0060] 动物实验结果证实,本公开的疫苗安全,可持续产生高效价中和抗体,可用于新冠病毒感染的预防和治疗。

[0061] 本文中提供的所有数值范围旨在清楚地包括落在范围端点之间的所有数值及它们之间的数值范围。可对本公开提到的特征或实施例提到的特征进行组合。本说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用,说明书中所揭示的各个特征,可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明,所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0062] 如本文所用,在数值或范围上下文中的“约”表示所引用或要求保护的数值或范围的 $\pm 10\%$ 。

[0063] 应理解,当提供参数范围时,本发明同样提供了在该范围内的所有整数及其十分位小数。例如,“0.1-2.5毫克/天”包括0.1毫克/天、0.2毫克/天、0.3毫克/天等直至2.5毫克/天。

[0064] 如本文所用,“含有”、“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

[0065] S蛋白及其编码分子

[0066] 如本文所用,术语“S蛋白”、“免疫原性肽”和“本公开/本申请的免疫原性肽”等可

互换使用,是指包括SARS-CoV-2病毒刺突Spike蛋白结构且具有激发结合抗体和中和抗体作用的肽。

[0067] 在本公开的一些实施方式中,S蛋白可为:(a)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽;(b) (a)中所述多肽的同源多肽,例如其与SEQ ID NO:2具有高于或等于90%,高于或等于95%,高于或等于96%,高于或等于97%,高于或等于98%,高于或等于99%的同源性;(c)在(a)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有免疫原性的由(a)衍生的蛋白质或多肽。

[0068] 在一些情况下,S蛋白可包括有利于增强其免疫原性或反应性或稳定性的修饰和/或连接于有利于增强其免疫原性或反应性或稳定性的其他部分,以例如增强S蛋白稳定性、提高中和抗体应答、形成多聚体、增加细胞应答等。可与修饰或未修饰的S蛋白连接的部分包括但不限于:病毒或宿主来源的蛋白,转铁蛋白、HIV p24、囊膜病毒的茎部,如流感HA2、艾滋病毒的gp41、抗体Fc段、GM-CSF、IL-21、CD40L或CD40抗体等。

[0069] S蛋白也可包括其变异形式,例如一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质或多肽的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质或多肽的功能。

[0070] 本申请的S蛋白可在适当的环境和条件下通过重组表达产生,例如由本公开的编码核苷酸分子、载体、宿主细胞产生;也可通过化学合成等方式获得。在本申请中,优选采用细胞膜(例如K562细胞)展示S蛋白,以最大程度还原囊膜病毒蛋白的天然构象,并提高安全性。

[0071] 如本文所用,术语“S蛋白编码分子”、“S蛋白编码序列”等可互换使用,均是指编码本公开所述的免疫原性S蛋白的核苷酸分子。所述核酸分子可选自,例如:(i)序列如SEQ ID NO:1所示的核苷酸分子;(ii)在严格条件下与(i)杂交的分子;(iii)与(i)或(ii)中序列具有高于或等于90%,高于或等于95%,高于或等于96%,高于或等于97%,高于或等于98%,高于或等于99%的同源性的核苷酸分子;(iv)在(i)或(ii)限定的核苷酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个核苷酸且能够表达功能性免疫原性S蛋白的核苷酸分子。

[0072] 如本文所用,术语“严格条件”是指:(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 $0.2 \times \text{SSC}$ , $0.1\% \text{SDS}$ , $60^\circ\text{C}$ ;或(2)杂交时加有变性剂,如 $50\% (\text{v/v})$  甲酰胺, $0.1\%$ 小牛血清/ $0.1\% \text{Ficoll}$ , $42^\circ\text{C}$ 等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 $50\%$ ,优选 $55\%$ 以上、 $60\%$ 以上、 $65\%$ 以上、 $70\%$ 以上、 $75\%$ 以上、 $80\%$ 以上、 $85\%$ 以上或 $90\%$ 以上,更优选是 $95\%$ 以上时才发生杂交。

[0073] 本公开的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法,可根据本公开所公开的核苷酸序列来设计引物,并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板,扩增而得有序列。当序列较长时,常常需要进行两次或多次PCR扩增,然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

[0074] 载体和宿主细胞

[0075] 本公开还涉及包含S蛋白编码核苷酸分子的载体,以及用该载体经基因工程产生的宿主细胞。

[0076] 通过常规的重组DNA技术(Science,1984;224:1431),可利用本公开的编码序列可用来表达或生产重组的免疫原性肽。一般来说有以下步骤:

[0077] (1)用本公开的编码核苷酸分子,或用含有核苷酸分子的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0078] (2)在合适的培养基中培养的宿主细胞;

[0079] (3)从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质或多肽。

[0080] 本公开中,术语“载体”与“重组表达载体”可互换使用,指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、动物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒或其它载体。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

[0081] 可采用本领域常规方法构建含S蛋白编码序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。本公开中可采用诸如pcDNA3.1载体、pIRES2-EGFP载体、AdMaxTM等表达系统。

[0082] 此外,表达载体可包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状,如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP),或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0083] 包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质或多肽。本申请中优选可在细胞膜表面展示S蛋白的宿主细胞,例如K562细胞、A549细胞、HEK293细胞等。

[0084] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属、农杆菌;真菌细胞如酵母;动物细胞等。在本公开中,可采用例如选自下组的宿主细胞:HEK293、HeLa、CHO、NS0、SP2/0、PER.C6、Vero、RD、BHK、HT 1080、A549、Cos-7、ARPE-19和MRC-5细胞;High Five、Sf9、Se301、SeIZD2109、SeUCR1、Sf9、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、BM-N、Ha2302、Hz2E5以及Ao38。

[0085] 本公开的核苷酸分子在高等真核细胞中表达时,如果在载体中插入增强子序列时将会使转录得到增强。增强子是DNA的顺式作用因子,通常大约有10到300个碱基对,作用于启动子以增强基因的转录。本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

[0086] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞膜上表达。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0087] 疫苗和免疫偶联物

[0088] 本文中还提供了一种包含本公开的细胞膜上展示冠状病毒Spike免疫原的疫苗,

或称免疫组合物。该疫苗包含其形式能够被给予脊椎动物(优选哺乳动物)的本公开的S蛋白的配制品,并且其诱导提高免疫力的保护性免疫应答以预防和/或减轻新型冠状病毒和/或其至少一种症状。

[0089] 术语“保护性免疫应答”或“保护性应答”是指通过免疫原介导的针对传染原或疾病的免疫应答,通过脊椎动物(例如人)展现,预防或减轻感染或减少其至少一种疾病症状。

[0090] 术语“脊椎动物”或“对象”或“患者”是指脊索动物亚门的任何成员,包括但不限于:人和其他灵长类动物,包括非人灵长类动物诸如黑猩猩和其他猿和猴物种;家畜诸如牛、绵羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物诸如狗和猫;实验室动物,包括啮齿动物诸如小鼠、大鼠和豚鼠;鸟包括驯养、野生和猎鸟诸如鸡、火鸡和其他鹑鸡类鸟、鸭、鹅。术语“哺乳动物”和“动物”被包括在这个定义中,旨在涵盖成年、幼年以及新生个体。

[0091] 本文的疫苗组合物中包含有效量的本文免疫原。本公开的疫苗组合物中包含足以实现希望的生物效应的量的免疫原。术语“有效量”通常是指可以诱导足以诱导免疫力的保护性免疫应答以预防和/或减轻感染或疾病和/或以减少感染或疾病的至少一种症状的免疫原的量。

[0092] 例如,本申请中所用重组质粒疫苗的免疫剂量在小鼠体内为10-200 $\mu\text{g}$ /只;重组人源细胞载体疫苗在小鼠体内为10 0000-500 0000个细胞/只;蛋白免疫剂量为1-20 $\mu\text{g}$ /只。重组质粒疫苗的人体免疫剂量可为0.1~100mg,例如0.2~50mg,0.5~10mg,1~2mg/人;重组人源细胞载体疫苗在人用剂量可为1000000~10000 0000个细胞/人;蛋白免疫的人用剂量可为0.1~200 $\mu\text{g}$ ,0.5~

[0093] 100 $\mu\text{g}$ ,1~80 $\mu\text{g}$ ,5~70 $\mu\text{g}$ ,10~65 $\mu\text{g}$ ,20-60 $\mu\text{g}$ /人。

[0094] 采用本申请的细胞免疫能够以极低的S蛋白免疫剂量获得高免疫效果。例如,在一些实施方式中,每 $\times 10^6$ 个本申请的K562-S细胞所能提供的实际S蛋白免疫剂量约为0.3~0.6 $\mu\text{g}$ ,0.4~0.5 $\mu\text{g}$ ,如0.47 $\mu\text{g}$ 。以等量的S蛋白免疫剂量进行比较,本申请的膜展示S蛋白疫苗相较于S三聚体蛋白疫苗所诱导产生中和抗体的水平提高了至少10倍,例如10~50倍,10~30倍,10~15倍。若辅以适当的佐剂,则所述水平可再提高例如2~9倍。

[0095] 在本申请中可采用未灭活或灭活的细胞疫苗,例如可采用多聚甲醛固定液进行灭活,如浓度可为0.01%~5%(g/ml;溶剂为PBS)的多聚甲醛固定液。

[0096] 在疫苗制备和处理过程中,X射线辐照虽然是肿瘤相关治疗性细胞疫苗中的常用灭活方式,且不影响过表达的GM-CSF细胞因子的生物活性,但无法据此推测X射线辐射对细胞疫苗表面展示蛋白的免疫原性的影响。辐照灭活可能对细胞疫苗的免疫活性造成一定不利影响,使其不易产生中和抗体,应慎用该灭活方式。同理,福尔马林溶液虽然也在全病毒疫苗灭活中使用,但人源细胞疫苗和全病毒疫苗的粒径、膜蛋白密度、膜成分等具有较多差异,在实际处理中也需调整,在保证其灭活完全的基础上,使其维持最大程度的免疫原性。

[0097] 本文的疫苗中还可包含佐剂。可采用本领域普通技术人员已知的佐剂,例如Vogel等人,“A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients”(第2版)中所记载的佐剂(通过引用以其全文结合在此)。已知佐剂的例子包括但不限于:完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、氢氧化铝佐剂、脂多糖(LPS)、RIBI佐剂、MF-59等。

[0098] 在一些实施方式中,可用于本文疫苗的佐剂可为选自下组中的一种或多种:Alum、AS03、MF59、MnJ、CpG或它们的任意组合,例如Alum+CpG、MnJ+CpG等。优选地,相比不包含佐

剂的相应疫苗,含佐剂的疫苗所能诱导产生的中和抗体水平显著提高,例如提高了2-100倍,5-90倍,6-80倍,8-70倍,或其间的任何倍数范围。优选地,相比不包含佐剂的相应疫苗,含佐剂的疫苗诱导产生中和抗体的持久性至少为5个月,例如半年、1年、1.5年、2年。

[0099] 本文的疫苗组合物还可包括药学上可接受的载体、稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂等辅料。例如,药学上可接受的载体是已知的,并且包括但不限于注射用水、盐溶液、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、无菌等渗水缓冲液及其组合。药学上可接受的载体、稀释剂和其他赋形剂可例如参见《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)中。

[0100] 本文疫苗组合物的形式可适于系统性或局部(尤其是呼吸道内)给予。给予疫苗组合物的方法包括但不限于:肌肉接种、皮内接种、皮下接种、滴鼻、雾化吸入、生殖道、直肠、口服或其任意组合。在一些实施方式中,采用肌肉注射、腹腔注射或其组合。

[0101] 在一些实施方式中,本文的疫苗预防、消除或减轻对象中的新型冠状病毒感染或其至少一种症状,例如呼吸道症状(如鼻塞、咽喉痛、声嘶)、头痛、咳嗽、痰、发热、啰音、喘息、呼吸困难、因感染引起的肺炎、严重急性呼吸综合症、肾衰竭等。

[0102] 本文中还可能涉及了一种免疫偶联物(也可称免疫缀合物),其包含本文的免疫原以及与其偶联的其他物质。所述的其他物质可为靶向性物质(如特异性识别特定靶标的部分)、治疗性物质(如药物、毒素、细胞毒剂)、标记性物质(如荧光标记物、放射性同位素标记物)。

[0103] 在本公开中还提供了一种组合产品,其包括本公开的宿主细胞和/或疫苗,且还可包含一种或多种有助于更好发挥预防和/或治疗新型冠状病毒感染或其症状的功能或增强前述物质稳定性的其他物质。例如,其他物质可包括针对冠状病毒S或S1的其他疫苗,如来自于包括但不限于SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、bat-CoV的S或S1疫苗;受益于T细胞活化和/或与T细胞的记忆性免疫反应的疾病或病症的其他活性物质。

#### [0104] 免疫方法

[0105] 本文还提供了一种用于预防和/或治疗新型冠状病毒感染和/或其症状的方法,其包括:至少一次给予预防和/或治疗有效量的本公开的一种或多种疫苗。可采用的接种方式包括但不限于:系统性免疫接种方式,如肌肉注射、皮下注射和皮内注射等;呼吸道内免疫接种方式,如雾化、滴鼻等。在一些实施方式中,初次免疫采用系统性接种或呼吸道内接种,优选系统性接种。

[0106] 在本公开的一些实施方式中,每两次接种之间的间隔至少为1周,例如2周、4周、2个月、3个月、6个月或更长间隔。

[0107] 在一些实施方式中,采用DNA疫苗进行初次免疫,并采用细胞疫苗进行一次或多次加强免疫。本公开的免疫方法可采用“初免-加强”或“初免-加强-再加强”的方式,可采用单一的全身系统免疫或呼吸道局部免疫方式,或采用两种免疫方式的组合。

[0108] 在一些优选的实施方式中,采用重组DNA疫苗进行系统性初免,从而建立全身系统免疫应答,再用细胞疫苗进行一次或多种免疫加强。

[0109] 采用本文的免疫方法可在呼吸道局部和全身系统有效建立的疫苗特异性免疫应答,有助于增强疫苗保护的有效性。

[0110] 以药物包或试剂盒的形式提供本文的组合产品可,例如可将本文的一种或多种疫苗组合物或其一种或多种成分包装在一个或多个容器中,例如包装在指明组合物的量的密

封容器诸如安瓿或小药囊中。可以液体、无菌冻干粉或无水浓缩物等形式提供疫苗组合物，可在临用前用适当液体（例如水、盐水等）对其进行稀释、复原和/或配制以获得用于给予至对象的适当浓度和形式。

[0111] 实施例

[0112] 下面结合具体实施例，进一步阐述本公开。应理解，这些实施例仅用于说明本公开而不用来限制本公开的范围。本领域技术人员可对本公开做出适当的修改、变动，这些修改和变动都在本公开的范围之内。

[0113] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法，可采用本领域中的常规方法，例如参考《分子克隆实验指南》（第三版，纽约，冷泉港实验室出版社，New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）或按照供应商所建议的条件。DNA的测序方法为本领域常规的方法，也可由商业公司提供测试。

[0114] 除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟知的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本公开方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0115] 实施例中涉及到的实验动物、免疫方式、免疫原、假病毒及检测方法如下：

[0116] I. 实验动物：6-8周龄雌性C57/BL6小鼠（实施例1-8）；6-8周龄雌性ICR小鼠（实施例9）。

[0117] II. 免疫方式：对小鼠左右后肢分别进行肌肉注射，或对小鼠进行腹腔注射。

[0118] III. 免疫原：S蛋白序列来自Genebank:NC\_045512.2，其核苷酸序列如SEQ ID NO: 1所示，其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示

[0119] 1. 重组质粒疫苗 (DNA) : pcDNA3.1 (空载)、pcDNA3.1-S蛋白；

[0120] 2. 蛋白亚单位疫苗 (protein) : RBD蛋白 (南京金斯瑞生物科技有限公司, Z03483-1) ; S1蛋白 (北京义翘神州科技有限公司, Z03501) ; S三聚体蛋白 (近岸蛋白质科技有限公司, DRA49) ;

[0121] 3. 重组人源细胞载体疫苗: K562、K562-S蛋白；

[0122] 4. 人源载体细胞膜碎片: K562-细胞膜、K562-S蛋白-细胞膜；

[0123] IV. 免疫原制备及免疫剂量：

[0124] 所述组合中各个免疫原的免疫剂量及灭活处理剂量如下：

[0125] 1. 重组质粒疫苗 (DNA) : 质粒 (溶于无菌PBS中) , 100 $\mu$ g/只小鼠, 100 $\mu$ L；

[0126] 2. 蛋白亚单位疫苗 (protein) : 蛋白质 (溶于无菌PBS中) 与铝佐剂 (Aluminium, InvivoGen, 货号5200) 按照体积比1:1混合后进行免疫, 10 $\mu$ g/只小鼠, 100 $\mu$ L；

[0127] 3. 重组人源细胞载体疫苗 (K562) : 100 0000个细胞/只小鼠, 100 $\mu$ L, 溶于无菌PBS中；

[0128] 4. K562细胞膜碎片疫苗 (K562-细胞膜) : 50 $\mu$ g/只小鼠, 100 $\mu$ L, 溶于无菌生理盐水；(Thermo, Mem-PERTMPlus Membrane Protein Extraction Kit, 89842) , 100 0000个细胞约提取50 $\mu$ g细胞膜, 因此此处剂量为与重组人源细胞载体疫苗一致；

[0129] 5. X射线照射: 50Gy；

[0130] 6. 多聚甲醛固定液浓度: 4% , 溶于无菌PBS中；

[0131] 7. K562-S疫苗配伍佐剂使用:多聚甲醛灭活K562-S疫苗后,将佐剂AS03和MF59 (InvivoGen) 分别按照佐剂:疫苗的体积比为1:1与K562-S疫苗混合后进行免疫,佐剂MnJ (MnStarter 技术有限公司) 按照每只小鼠100 $\mu$ g与K562-S疫苗混合后进行免疫,佐剂 CpG (InvivoGen) 按照每只小鼠30 $\mu$ g与K562-S疫苗混合后进行免疫;

[0132] 8. K562-S细胞的S蛋白含量:将一定数量的K562-S细胞裂解后,使用S蛋白定量检测试剂盒-ELISA法测定S蛋白含量 (Biodragon, BF03087)。

[0133] V. 免疫间隔:

[0134] 具体免疫间隔见下文表格。

[0135] VI. 免疫原相关载体构建:

[0136] 1. 人工合成S蛋白DNA序列 (SEQ ID NO:1), 序列5' 端带有Not1酶切位点, 3' 端带有 Xba1酶切位点, 合成片段与载体质粒pcDNA3.1 (购自优宝生物) /pHAGE-MCS-puro (购自上海鑫湾生物) 使用Not1酶切 (Thermo Scientific公司, FD0596) 与Xba1酶切 (Thermo Scientific公司, FD0685), 并通过凝胶电泳后切胶回收, 采用Sanprep柱式DNA胶回收试剂盒 (Promega公司, 货号A9282) 回收酶切片段。

[0137] 2. 基因回收产物与酶切线性化载体用T4 DNA连接酶的方法连接 (Thermo Scientific公司, 货号2011A): 将连接产物转化至大肠杆菌E. coli Stable, 在含氨苄霉素的培养板上过夜生长。第2天, 随机挑取单菌落进行测序, 突变位点校正, 验证全部序列正确后, 成功克隆出S蛋白基因的表达质粒 (pcDNA3.1-S蛋白) 和慢病毒载体质粒 (pHAGE-S蛋白-puro)。

[0138] VII. SARS-CoV-2包膜假病毒包装:

[0139] 1. 转染前一天准备293T细胞, 用于包装质粒的转染与表达。用DMEM完全培养基将细胞稀释至 $5 \times 10^6$ 个/mL细胞, 取1mL稀释好的细胞, 铺在10cm的皿中, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>, 培养过夜;

[0140] 2. 吸取6 $\mu$ g SARS-CoV-2膜蛋白质粒pcDNA3.1-S蛋白和6 $\mu$ g pNL4-3  $\Delta$  env (NIH AIDS Reagent Program, 3418) 骨架质粒, 加入500 $\mu$ L双无 (无血清、无双抗, 双抗为青链霉素混合液) 的DMEM中, 室温孵育5min;

[0141] 3. 用双无DMEM将24 $\mu$ L TurboFect稀释, 终体积为500 $\mu$ L/样品, 室温孵育5min;

[0142] 4. 将上述步骤2和3中的液体混匀, 1000 $\mu$ L/样品终体积, 室温孵育20min, 孵育结束后加至预先铺好于10cm培养皿中的293T细胞。6h后更换新鲜的15mL完全培养基, 继续在细胞培养箱中培养48h;

[0143] 5. 培养结束后, 收集10cm皿的细胞培养上清于15mL离心管里, 4000g, 4 $^{\circ}$ C, 离心10min, 用0.45 $\mu$ m的滤器过滤到新的15mL离心管中, 冻存于-80 $^{\circ}$ C保存, 滴定后备用。

[0144] VIII. 构建稳定表达hACE2受体的293T细胞:

[0145] 1. 人工合成人源ACE2 (hACE2) 序列 (Genbank#NCBI\_NP\_001358344.1), 其核苷酸如SEQ ID NO:3所示, 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示, 其序列5' 端带有Age1酶切位点, 3' 端带有Xba1酶切位点。合成片段与载体质粒pHAGE-MCS-puro使用Age1酶切 (Thermo Scientific公司, 货号FD1464) 与Xba1酶切 (Thermo Scientific公司, FD0685), 并通过凝胶电泳后切胶回收, 采用Sanprep柱式DNA胶回收试剂盒 (Promega公司, 货号A9282) 回收酶切片段。

[0146] 2. 基因回收产物与酶切线性化载体用T4 DNA连接酶的方法连接(Thermo Scientific公司,货号2011A):将连接产物转化至大肠杆菌E.coli Stable,在含氨苄霉素的培养板上过夜生长。第2天,随机挑取单菌落进行测序,突变位点校正,验证全部序列正确后,成功克隆出hACE2基因的慢病毒表达质粒(pHAGE-hACE2-puro)。

[0147] 3. 取10cm皿,在每个皿中接种约 $5 \times 10^6$ 个293T细胞,保证第二天转染时使细胞密度达90%为宜;将pHAGE-hACE2-puro,慢病毒包装质粒psPAX以及VSVG三种质粒,按照质量比1:2:1的比例转染293T细胞。

[0148] 4. 37℃,5%的孵箱培养48小时左右,具体时间根据细胞情况而定,收集细胞上清。将收集的细胞上清用0.45μm的滤器进行过滤,再用PEG 8000进行浓缩,即可得到较为纯化的hACE2慢病毒。

[0149] 5. 提前一天铺约 $5 \times 10^5$ 个293T细胞于12孔板的一个孔内,次日向铺好的细胞中加入步骤2中浓缩的病毒500μL,1000g,离心2小时。

[0150] 6. 离心感染结束后,继续在37℃,5%的孵箱培养12小时左右,将培养基换成添加1μg/mL嘌呤霉素(puro)的细胞培养基培养,最后能够存活的细胞便是整合有hACE2基因的293T细胞,并通过流式分选筛选出稳定表达hACE2的293T细胞(能与S蛋白结合)。

[0151] IV. 检测方法:

[0152] 采血:

[0153] 小鼠:最后一次免疫结束后4周,将小鼠脱颈处死前,通过摘眼球的方法采集小鼠外周全血,收集于1.5mL EP管中,室温静置使其自然凝血,凝固后的小鼠血清于7000g,离心15min。将小鼠血清转移至新的1.5mL EP管中。实验前需要将样品在56℃灭活30min,来破坏血清内的补体活性。灭活前短暂离心,避免管壁和瓶盖上的样品残存。水浴液面要没过样品液面,但不能超过瓶盖。

[0154] ELISA方法检测结合抗体

[0155] 1. 提前一晚将RBD蛋白溶于包被液中,以1μg/ml的蛋白浓度包被于96孔平底板,包被体积为100μl/孔,4度冰箱中放置过夜。

[0156] 2. 洗板3次:300μl/孔加入PBST,停留1分钟后弃去孔内液体,最后一次在滤纸上扣干(后续洗板操作相同)。5%牛奶封闭2小时。

[0157] 3. 洗板1次后加样,100μl/孔加入倍比稀释的血清,室温放置3小时。

[0158] 4. 洗板5次后加检测抗体:100μl/孔加入稀释后的生物素化的抗小鼠抗体(购自北京中杉金桥,货号ZB-2305)。盖上封板膜,室温孵育1小时。

[0159] 5. 洗板5次后加入TMB:100μl/孔,室温避光孵育10-30分钟。

[0160] 6. 终止反应:迅速以100μl/孔加入终止溶液终止反应。

[0161] 7. 读板:加入终止溶液后10min内在 $\lambda = 450\text{nm}$ 处读值(酶标仪,购自BioTek公司)。

[0162] 293T-hACE2细胞检测中和抗体:

[0163] 1. 取96孔透明底黑板进行中和实验,第一列设置细胞对照(CC)(150μL),第二列设置病毒对照(VC)(100μL),其他均为样品孔,对血清样品进行倍比稀释,最终孔中体积为100μL。

[0164] 2. 除细胞对照组外,每孔加50μL SARS-CoV-2假病毒稀释液,使每孔最终含假病毒为200TCID<sub>50</sub>。

[0165] 3. 轻轻震荡混匀,将上述96孔底黑板置于细胞培养箱中,37℃,5%CO<sub>2</sub>孵育1h。

[0166] 4. 当孵育时间至20min时,开始准备293T-hACE2靶细胞,并用完全培养基将细胞稀释至10<sup>5</sup>个细胞/mL。

[0167] 5. 当孵育时间至1h,向96孔透明底黑板中每孔加100μL靶细胞,使每孔细胞为10<sup>4</sup>个。

[0168] 6. 前后左右轻轻晃动96孔透明底黑板,使孔中的细胞均匀分散,再将板子放入细胞培养箱中,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养48h。

[0169] 7. 培养48h后,从细胞培养箱中取出96孔透明底黑板,吸掉孔中上清,每孔加入100μL PBS清洗一遍,吸去PBS,每孔加入50μL 1×的裂解缓冲液(购自Promega公司Cat#E153A),室温在水平摇床上孵育30min使细胞充分裂解;

[0170] 8. 加30μL荧光素酶的底物(购自Promega公司,Cat#E1501)于96孔黑板中,用仪器GloMax® 96微孔板发光-检测仪检测荧光素酶活性。

[0171] 9. 导出荧光素读值,计算中和抑制率,结合中和抑制率结果,利用Graphpad Prism 5.0软件计算ID50。

[0172] 抑制率=  $\left[ 1 - \frac{\text{样品孔发光强度均值} - \text{细胞对照CC均值}}{\text{病毒对照的发光强度VC均值} - \text{细胞对照CC均值}} \right] \times 100\%$

[0173] 实施例1:慢病毒表达载体pHAGE-S蛋白-puro的构建及冠状病毒S蛋白在K562细胞膜上展示的表达验证

[0174] 为了研究S蛋白作为生物细胞膜载体疫苗免疫原的功能,我们构建了S蛋白的慢病毒表达载体,并包装慢病毒感染K562细胞,筛选膜表面表达S蛋白的阳性克隆。

[0175] 首先,我们合成了S蛋白基因,将其通过酶切连接至pHAGE-MCS-puro慢病毒表达载体上,构建形成了pHAGE-S蛋白-puro质粒(图1a);将pHAGE-S蛋白-puro包装形成慢病毒后感染K562细胞,通过蛋白质免疫印迹方法鉴定K562-S蛋白细胞中S蛋白的表达(图1b);同时进行流式细胞染色鉴定,发现S蛋白在细胞膜上有表达,而对照感染的细胞不能检测到相关蛋白的表达,并进一步对表达S蛋白的K562细胞进行富集(图1c)。

[0176] 实验步骤如下:准备5×10<sup>5</sup>个K562细胞,用500μL完全细胞培养基重悬,放置于12孔板的一个孔内。再向铺好的细胞中加入浓缩的慢病毒,1000g,离心2小时。离心感染结束后,继续在37℃,5%的孵箱培养48小时左右。取上述感染后的K562细胞,由于表达载体质粒带有嘌呤霉素抗性,将细胞在嘌呤霉素浓度为4μg/ml的RPMI(10%FBS)中培养,最后能够存活的细胞便是整合有Spike基因的细胞。取上述感染后的细胞,使用蛋白质免疫印迹方法检测S蛋白表达,所用的一抗为ACE2-C-AVI-6his(上海近岸科技有限公司,型号0331753-4065),二抗为HRP标记山羊抗人抗体(中杉金桥公司,货号ZB2304)。结果显示,利用蛋白质免疫印迹方法能检测到K562-S蛋白细胞S蛋白高表达,而未感染K562细胞不表达S蛋白(图1b)。

[0177] 流式染色方法使用ACE2-C-AVI-6his(上海近岸科技有限公司,型号0331753-4065)/PE-streptavidin(BD Pharminge公司,货号563259)进行间接染色后,最后使用流式细胞分选(BD Pharminge公司,型号Arial)富集。结果显示,不断富集后,80%以上的K562-S蛋白细胞能够高表达目的基因S蛋白(图1c)。

[0178] 实施例2.K562细胞膜上人白细胞抗原(HLA)和人血型抗原(A、B)的表达鉴定。

[0179] 人白细胞抗原(HLA)系人组织相容性复合体(MHC)的表达产物,是构成移植排斥反应的重要抗原物质。经典的HLA I类包括HLA-A、B、C;HLA II类主要包括HLA-DP、DQ和DR;HLA I类几乎分布于身体全部细胞表面,HLA II类主要定位于巨噬细胞和B淋巴细胞的表面的糖蛋白。因此,通过流式细胞染色检测K562细胞膜表面HLA分子的表达情况,能够确认其膜成分作为免疫原呈递载体的安全性。同时HLA-A、B、C染色以293T细胞为阳性对照,结果显示K562细胞膜上不表达HLA I类分子(HLA-A、B、C)(图2a),HLA-DR染色以人B细胞为阳性对照,结果显示K562膜成分同样不表达HLA II类分子(HLA-DR)(图2b),以上说明K562细胞膜具有一定的安全性,所用流式抗体为APC抗人HLA-A,B,C抗体(购自biolegend,货号311409),APC抗人HLA-DR抗体(购自biolegend,货号327022)。此外,K562细胞作为人红系细胞,其血型抗原的表达也可能导致不同血型机体的溶血反应,通过蛋白免疫印迹检测K562细胞是否有血型抗原表达。

[0180] 结果显示,K562细胞不表达血型抗原A、B(图2c),可以排除K562细胞可能造成不同机体的溶血反应,所用抗体为Blood Group AB antigen(Z5H-2/Z2A)FITC(购自Santa,货号sc-52370)。据此,可以认为K562细胞膜成分作为免疫原呈递载体不会刺激不同机体间产生不良的排斥反应。

[0181] 实施例3.比较直接应用S蛋白表位相关免疫原(RBD、S1)及膜上展示S蛋白的K562细胞(K562-S蛋白)免疫小鼠,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0182] 将小鼠随机分4组,以表1的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。免疫结束后2周,使用ELISA方法分别检测RBD、S1蛋白免疫和K562-S蛋白免疫诱导产生的结合抗体滴度,结果显示第二针使用RBD蛋白免疫诱导产生的RBD特异性结合抗体较微弱,而S1蛋白及K562-S蛋白免疫能够产生较高的抗体应答,其中膜上展示S蛋白的K562疫苗结合抗体滴度最高可达400000以上(图3a)。

[0183] 与诱导产生的结合抗体趋势一致,免疫2周后K562-S蛋白诱导产生的针对SARS-CoV-2假病毒的中和抗体滴度较高,均值在1200左右,其中有一只小鼠能够达到4,500(图3b)。该实验证实,基于细胞膜上展示S蛋白的K562载体疫苗加强免疫,能够活化出与普通蛋白免疫相当甚至更高水平的中和抗体。

[0184] 表1.分别以蛋白质和膜上展示免疫原加强免疫的小鼠实验分组

	分组	0 周	2 周
	组 1 (n=8)	DNA-pcDNA3.1-spike	PBS
[0185]	组 2 (n=8)	DNA- pcDNA3.1-spike	RBD 蛋白
	组 3 (n=8)	DNA- pcDNA3.1-spike	S1 蛋白
	组 4 (n=5)	DNA- pcDNA3.1-spike	K562-S 蛋白

[0186] 实施例4.应用不同接种途径免疫K562-S蛋白载体疫苗,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0187] 将小鼠随机分4组,以表2的免疫策略对小鼠进行免疫,ELISA方法检测免疫后第1周、第2周及第4周小鼠血清中结合抗体滴度。第一针质粒DNA免疫接种全部为肌肉注射,第

二针K562细胞的免疫接种分为腹腔和肌肉注射两种方式。结果显示,实验组(K562-S蛋白)与对照组(K562)相比,通过腹腔注射和肌肉注射的两种免疫方式都能够提升RBD特异性结合抗体的滴度,其中肌肉免疫效果更佳(图4a)。

[0188] 同时,检测肌肉免疫后第1周、第2周及第4周小鼠血清中中和抗体的滴度。结果显示,与对照组相比,免疫后1周实验组的中和抗体提升较弱,而免疫后2周和4周实验组中和抗体逐步提升,中和抗体滴度最高可达3500以上(图4b);免疫后第4周,分别比较以腹腔和肌肉途径注射K562-S蛋白诱导的中和抗体,结果显示两组诱导的中和抗体均值都在1200左右,且肌肉免疫有一只小鼠能够达到3700以上(图4c)。

[0189] 表2.不同免疫接种方式加强免疫K562-S蛋白的小鼠实验分组

	分组	0 周	2 周
	组 1 (n=5)	DNA- pcDNA3.1-spike	K562 (腹腔)
[0190]	组 2 (n=5)	DNA- pcDNA3.1-spike	K562-S 蛋白 (腹腔)
	组 3 (n=5)	DNA- pcDNA3.1-spike	K562 (肌肉)
	组 4 (n=5)	DNA- pcDNA3.1-spike	K562-S 蛋白 (肌肉)

[0191] 实施例5.应用不同灭活方式处理K562-S蛋白载体疫苗,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0192] 对K562-S蛋白细胞分别使用x射线辐射和多聚甲醛固定的方法,将小鼠随机分4组,以表3的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。检测免疫后第1周、第2周小鼠血清中结合抗体和中和抗体滴度。应用ELISA方法检测结果显示,免疫后第1周、第2周多聚甲醛处理组诱导产生的结合抗体较高,与未处理组基本相当甚至更高,而x射线处理组诱导的结合抗体在免疫后第1周时略高于未处理组,在免疫后第2周弱于未处理和多聚甲醛固定组(图5a)。

[0193] 同时,免疫后第1周只有多聚甲醛处理组诱导产生了抗SARS-CoV-2假病毒的中和抗体,且免疫后第2周多聚甲醛处理组部分小鼠产生的中和抗体显著提升,最高可达800以上,而x射线处理组基本没有有效诱导出中和抗体,未处理组也仅能诱导出和免疫后第1周多聚甲醛处理组相当的中和抗体(图5b)。

[0194] 表3.不同灭活方式加强免疫K562-S蛋白的小鼠实验分组

	分组	0 周	2 周
	组 1 (n=7)	DNA- pcDNA3.1-RBD	K562
[0195]	组 2 (n=8)	DNA- pcDNA3.1-RBD	K562-S 蛋白
	组 3 (n=8)	DNA- pcDNA3.1-RBD	K562-S 蛋白(x 射线)
	组 4 (n=8)	DNA- pcDNA3.1-RBD	K562-S 蛋白(多聚甲醛)

[0196] 实施例6.K562-S蛋白载体疫苗贯序免疫,能够诱导产生RBD特异性结合抗体和中和抗体。

[0197] 对K562-S蛋白细胞使用多聚甲醛固定的方法,将小鼠随机分2组,以表4的免疫策

略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。检测2次免疫后第1周、第2周小鼠血清中结合抗体和中和抗体滴度。应用ELISA方法检测结果显示,2次免疫后第1周K562-S蛋白免疫组诱导产生的结合抗体滴度平均能够达到6400,第2周结合抗体继续保持较高水平(图6a)。

[0198] 同时,2次免疫后第1周没有产生抗SARS-CoV-2假病毒的中和抗体,而免疫后第2周部分小鼠能够被诱导产生中和抗体,最高滴度达到324(图6b);与以上结果比较发现2次K562-S蛋白贯序免疫与DNA-pcDNA3.1-RBD初免、K562-S蛋白加强免疫诱导产生的中和抗体水平相当,但2次K562-S蛋白贯序免疫没有DNA-pcDNA3.1-Spike初免、K562-S蛋白加强免疫诱导产生的中和抗体水平高。

[0199] 该结果提示DNA-pcDNA3.1-Spike初免、K562-S蛋白加强免疫为优选的免疫策略。

[0200] 表4.K562-S蛋白载体疫苗贯序免疫小鼠实验分组

	分组	0 周	2 周
[0201]	组 1 (n=4)	K562(多聚甲醛)	K562(多聚甲醛)
[0202]	组 2 (n=4)	K562-S 蛋白(多聚甲醛)	K562-S 蛋白(多聚甲醛)

[0203] 此外,还尝试了用从K562-S蛋白细胞提取的细胞膜以表5所示方案免疫小鼠。结果如图6c所示。结果显示采用K562提取的细胞膜作为免疫原免疫小鼠,其诱导结合抗体和中和抗体的效果明显弱于采用完整的K562细胞所能获得的效果。该结果表明S蛋白展示在结构完整的K562细胞膜上具有相对更优的免疫原性。

[0204] 表5.K562-S蛋白-细胞膜贯序免疫小鼠实验分组

	分组	0 周	1 周
[0205]	组 1 (n=5)	K562-细胞膜	K562-细胞膜
	组 2 (n=5)	K562-S 蛋白-细胞膜	K562-S 蛋白-细胞膜

[0206] 实施例7.比较直接应用多形式的S蛋白免疫原疫苗及膜上展示S蛋白的K562细胞(K562-S蛋白)免疫小鼠,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0207] 将C57/BL6小鼠随机分4组,以表6的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。免疫结束后2周,使用ELISA方法分别检测不同形式S蛋白疫苗DNA-S(即前文所述的DNA-pcDNA3.1-spike)、S三聚体蛋白-Alum和K562-S蛋白-Alum免疫诱导产生的结合抗体滴度和中和抗体滴度,结果如图7所示。

[0208] 结果显示:使用DNA-S免疫诱导产生的RBD特异性结合抗体和针对假病毒的中和抗体滴度相对较低,而S三聚体蛋白-Alum和K562-S蛋白-Alum免疫能够产生较高的抗体应答,其结合抗体几何平均滴度(GMT)均超过100000(图7a),中和抗体GMT均超过1000(图7b)。

[0209] 由于细胞疫苗(K562-S)和蛋白疫苗(S三聚体蛋白)的免疫剂量不同,通过S蛋白ELISA定量试剂盒检测每只小鼠K562-S疫苗的实际S蛋白免疫剂量,结果显示免疫所用每 $1 \times 10^6$ 个K562-S细胞数的S蛋白剂量约等于0.47 $\mu$ g(图7c)。

[0210] 通过将S三聚体蛋白组的抗体滴度数据等比例转换为与K562-S疫苗免疫剂量相同,比较其中和抗体滴度差异,结果显示蛋白疫苗组中和抗体GMT超过100,K562-S蛋白疫苗

组中和抗体GMT超过1000,细胞疫苗中和GMT约是蛋白疫苗的13倍左右(图7d)。

[0211] 该实验证实,基于细胞膜上展示S蛋白的K562载体疫苗能够有效活化出高水平的中和抗体,与相同剂量的蛋白疫苗相比,诱导的中和抗体滴度更高,说明细胞膜上展示的免疫原具有更高的免疫活性。

[0212] 表6.分别以DNA、蛋白和膜上展示S免疫原疫苗免疫小鼠的实验分组

	分组	0 周	4 周
	组 1 (n=5)	PBS	PBS
[0213]	组 2 (n=5)	DNA-S	DNA-S
	组 3 (n=5)	S 三聚体蛋白-Alum	S 三聚体蛋白-Alum
	组 4 (n=6)	K562-S-Alum	K562-S-Alum

[0214] 实施例8.比较不同类型佐剂与K562-S蛋白细胞载体疫苗配伍使用,诱导产生的RBD特异性结合抗体和中和抗体差异。

[0215] 将C57/BL6小鼠随机分7组,以表7的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。免疫结束后2周,分别检测不同佐剂配伍的K562-S蛋白疫苗免疫诱导产生的结合抗体滴度和中和抗体滴度,结果如图8所示。

[0216] 结果显示:所测试的多种佐剂均能不同程度的提高K562-S蛋白疫苗的免疫原性,在多种佐剂配伍形式中,AS03乳状佐剂和两种联合型佐剂Alum+CpG和MnJ+CpG,能够诱导相对最强的免疫应答,中和抗体滴度最高,GMT约为10000;单独MnJ佐剂和乳状佐剂MF59次之;传统佐剂Alum相对于其他新型或联合佐剂的提升作用最弱,中和抗体GMT约为1000,但相较于无佐剂的对照组而言,传统Alum佐剂已明显提高了中和抗体量。同样的,结合抗体也与中和抗体的趋势一致。

[0217] 该实验结果证明了K562-S与优势佐剂配伍能够显著提升细胞疫苗的免疫应答强度。

[0218] 此外,采用实施例7中换算方式将包含不同佐剂的膜展示K562-S疫苗与相同剂量的蛋白疫苗的免疫效果进行比较,采用各种佐剂后膜展示K562-S疫苗相对于蛋白疫苗能产生显著提高的更优异免疫效果。

[0219] 表7.分别以不同佐剂配伍膜上展示S免疫原疫苗的小鼠实验分组

	分组	0 周	4 周
	组 1 (n=6)	K562-S	K562-S
	组 2 (n=6)	K562-S-AS03	K562-S-AS03
	组 3 (n=6)	K562-S-MF59	K562-S- MF59
[0220]	组 4 (n=6)	K562-S-Alum	K562-S-Alum
	组 5 (n=6)	K562-S-MnJ	K562-S-MnJ
	组 6 (n=6)	K562-S-Alum+CpG	K562-S-Alum+CpG
	组 7 (n=6)	K562-S-MnJ+CpG	K562-S-MnJ+CpG

[0221] 实施例9.K562-S蛋白载体疫苗配伍优势佐剂使用,能够诱导产生持久性的RBD特异性结合抗体和中和抗体。

[0222] 本组实验测试ICR品系小鼠对K562-S载体疫苗的免疫应答,选用传统佐剂Alum或新型联合佐剂MnJ+CpG配伍,并观察抗体应答的持久性。

[0223] 将小鼠随机分2组,以表8的免疫策略对小鼠进行免疫,免疫原全部以肌肉注射方式接种。免疫结束后不同时间点,分别检测不同佐剂配伍的K562-S蛋白疫苗免疫诱导产生的结合抗体滴度和中和抗体滴度,结果如图9所示。

[0224] 结果显示:ICR小鼠在初免后2周结合抗体GMT分别达到94810 (Alum) 和516064 (MnJ+CpG),中和抗体GMT分别达到9791 (Alum) 和29716 (MnJ+CpG),且抗体应答随时间延长而逐渐减弱,MnJ+CpG联合佐剂诱导的抗体应答强度和持久性都要优于传统Alum佐剂,在初免后24周(免疫后5个月)时,抗体应答仍维持在较高水平,结合抗体GMT分别达到29863 (Alum) 和129016 (MnJ+CpG),中和抗体GMT分别达到1849 (Alum) 和3249 (MnJ+CpG) (图9a,9b)。

[0225] 该结果表明K562-S蛋白载体疫苗在不同品系小鼠中均保持较优免疫原性,且MnJ+CpG联合佐剂为优势佐剂;疫苗诱导的抗体应答能够维持至少5个月,说明配伍佐剂的K562-S疫苗的优越性和持久性。

[0226] 表8.膜上展示S免疫原疫苗免疫ICR小鼠的实验分组

	分组	0 周	4 周
[0227]	组 1 (n=9)	K562-S-Alum	K562-S-Alum
	组 2 (n=9)	K562-S-MnJ+CpG	K562-S-MnJ+CpG

[0228] 在本公开提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本公开的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本公开作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 上海市公共卫生临床中心	
[0003]	<120> 基于细胞膜展示冠状病毒免疫原以诱导中和抗体的方法	
[0004]	<130> 214614 1CNCN	
[0005]	<160> 4	
[0006]	<170> PatentIn version 3.3	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 3846	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列	
[0011]	<400> 1	
[0012]	atgttcgtgt ttctggtgct gctgcctctg gtgagctccc agtgcgtgaa cctgaccaca	60
[0013]	aggaccagc tgccccctgc ctataccaat tccttcacac ggggcgtgta ctatcccagc	120
[0014]	aaggtgttcc ggagcagcgt gctgcactcc acacaggatc tgtttctgcc tttcttttct	180
[0015]	aacgtgacct ggttcacgc catccacgtg agcggcacca atggcacaaa gcggttcgac	240
[0016]	aatccagtgc tgccctttaa cgatggcgtg tacttcgcct ccaccgagaa gtctaacatc	300
[0017]	atcagaggct ggatctttgg caccacactg gacagcaaga cacagtccct gctgatcgtg	360
[0018]	aacaatgcca ccaacgtggt catcaagggt tgcgagttcc agttttgtaa tgatccattc	420
[0019]	ctgggcgtgt actatcacia gaacaataag tcttgatgg agagcgagtt tcgctgtgat	480
[0020]	tcctctgcca acaattgac atttgagtac gtgtcccagc ctttctgat ggacctggag	540
[0021]	ggcaagcagg gcaatttcaa gaacctgagg gagttcgtgt ttaagaatat cgatggctac	600
[0022]	ttcaaaatct actccaagca cacccaatc aacctggtgc gcgacctgcc acagggttc	660
[0023]	tctgcctgg agccactggt ggatctgcc atcggcatca acatcaccg gtttcagaca	720
[0024]	ctgctggccc tgcacagaag ctacctgaca ccaggcgaca gctcctctgg atggaccgca	780
[0025]	ggagcagcag cctactatgt gggctatctg cagcccagga ctttctgct gaagtacaac	840
[0026]	gagaatggca ccatacaga cgccgtgat tgcgccctgg atcccctgtc tgagaccaag	900
[0027]	tgtacactga agagctttac cgtggagaag ggcattatc agacaagcaa tttcagggtg	960
[0028]	cagcctaccg agtccatcgt gcgcttccc aatatcacia acctgtgcc ttttgcgag	1020
[0029]	gtgttcaac caaccgctt cgcaagcgtg tacgcctgga ataggaagcg catctccaac	1080
[0030]	tgcgtggccg actattctgt gctgtacaac agcgcctcct tctctacct taagtctat	1140
[0031]	ggcgtgagcc ccacaaagct gaatgacctg tgctttacca acgtgtacgc cgattccttc	1200
[0032]	gtgatcaggg gcgacaggt gcgccagatc gcaccaggac agacaggcaa gatcgcagac	1260
[0033]	tacaattata agctgcctga cgatttcacc ggctgcgtga tcgcctggaa ctctaacaat	1320
[0034]	ctggatagca aagtgggcgg caactacaat tatctgtacc ggctgtttag aaagtcta	1380
[0035]	ctgaagccat tcgagaggga catctccaca gaaatctacc aggccggtc taccctctgc	1440
[0036]	aatggcgtgg agggctttaa ctgttattc cctctgcaga gctacggctt ccagccaaca	1500
[0037]	aacggcgtgg gctatcagcc ctaccgctg gtggtgctgt cttttgagct gctgcacgca	1560
[0038]	cctgcaacag tgtgcggacc aaagaagagc accaatctgg tgaagaacaa gtgcgtgac	1620
[0039]	ttcaacttca acggactgac cggcacagge gtgctgacc agtccaacaa gaagtctctg	1680
[0040]	ccttttcagc agttcggcag ggacatcga gataccacag acgccgtgcg cgaccctcag	1740
[0041]	acctggaga tcctggatat cacaccatgc tccttcggcg gcgtgtctgt gatcacacca	1800

[0042]	ggcaccaata caagcaacca ggtggccgtg ctgtatcagg acgtgaattg taccgaggtg	1860
[0043]	cccgtggcaa tccacgcaga tcagctgacc cctacatggc ggggtgtactc taccggcagc	1920
[0044]	aacgtgttcc agacaagagc aggatgacctg atcggagcag agcacgtgaa caatagctat	1980
[0045]	gagtgcgaca tcctatcgg cgccggcatc tgtgcctcct accagacca gacaaactcc	2040
[0046]	ccaaggagag cacggtctgt ggcaagccag tccatcatcg cctataccat gagcctgggc	2100
[0047]	gccgagaatt ccgtggccta ctccaacaat tctatcgcca tcctacca cttcacaatc	2160
[0048]	tcctgacca cagagatcct gccagtgagc atgaccaaga catccgtgga ctgcacaatg	2220
[0049]	tatatctgtg gcgattccac cgagtgtctt aacctgtgc tgcagtacgg ctctttttgt	2280
[0050]	accagctga atagagcct gacaggcatc gccgtggagc aggacaagaa cacacaggag	2340
[0051]	gtgttcgcc aggtgaagca aatctacaag accccacca tcaaggactt tggcggcttc	2400
[0052]	aacttcagcc agatctgcc cgatcctagc aagccatcca agcggctctt tatcgaggac	2460
[0053]	ctgctgttca acaaggtgac cctggccgat gccggttca tcaagcagta tggcgattgc	2520
[0054]	ctggcgaca tcgccccag agacctgac tgtgccaga agtttaatgg cctgaccgtg	2580
[0055]	ctgcctccac tgctgacaga tgagatgac gccagtaca catctgccct gctggcaggc	2640
[0056]	accatcacia gcggatggac ctccggcga ggagccgcc tgcagatccc ctttgccatg	2700
[0057]	cagatggcct atcggttcaa cggcatcggc gtgaccaga atgtgctgta cgagaaccag	2760
[0058]	aagctgatcg ccaatcagtt taactccgc atcggcaaga tccaggactc tctgagctcc	2820
[0059]	acagcaagcg ccctgggcaa gctgcaggat gtggtgaatc agaacgcca ggccctgaat	2880
[0060]	acctggtga agcagctgtc tagcaacttc ggcgccatct cctctgtgct gaatgatatc	2940
[0061]	ctgagcaggc tggacaaggt ggaggcagag gtgcagatcg accggtgat cacaggcaga	3000
[0062]	ctgcagccc tgcagaccta cgtgacacag cagctgatca gggcagcaga gatcagggca	3060
[0063]	tctgccaatc tggccgccac caagatgagc gagtgcgtgc tgggccagtc caagagagtg	3120
[0064]	gacttttgtg gcaaggcta tcacctgatg agcttccac agtccgccc tcacggagtg	3180
[0065]	gtgtttctgc acgtgaccta cgtgccagcc caggagaaga acttcaccac agcaccagca	3240
[0066]	atctgccacg atggcaagc acacttctc agggagggcg tgttcgtgag caacggcacc	3300
[0067]	cactggtttg tgacacagcg caatttctac gagccacaga tcatcaccac agacaataca	3360
[0068]	ttcgtgtccg gcaactgtga cgtggtcatc ggcatcgtga acaataccgt gtatgatcct	3420
[0069]	ctgcagccag agctggactc ttttaaggag gagctggata agtacttcaa gaatcacacc	3480
[0070]	agccccgagc tggatctggc cgacatctc ggcatcaatg ccagcgtggt gaacatccag	3540
[0071]	aaggagatcg acaggtgaa cgaggtggc aagaatctga acgagtcct gatcgatctg	3600
[0072]	caggagctgg gcaagtatga gcagtacatc aagtggcct ggtatatctg gctgggcttc	3660
[0073]	atcggcgcc tgatgccat cgtgatggtg accatcatgc tgtgctgtat gacaagctgc	3720
[0074]	tgttctgcc tgaaggctg ctgttctgt ggcagctgct gtaagtttga tgaggacgat	3780
[0075]	agcgagcctg tgctgaaggc cgtgaagctg cactacacca ccggtctgca gctagctcga	3840
[0076]	gtctag	3846
[0077]	<210>	2
[0078]	<211>	1281
[0079]	<212>	PRT
[0080]	<213>	人工序列
[0081]	<400>	2
[0082]	Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val	
[0083]	1	5 10 15

[0084]	Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe
[0085]	20 25 30
[0086]	Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu
[0087]	35 40 45
[0088]	His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp
[0089]	50 55 60
[0090]	Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp
[0091]	65 70 75 80
[0092]	Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu
[0093]	85 90 95
[0094]	Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser
[0095]	100 105 110
[0096]	Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile
[0097]	115 120 125
[0098]	Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr
[0099]	130 135 140
[0100]	Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr
[0101]	145 150 155 160
[0102]	Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu
[0103]	165 170 175
[0104]	Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe
[0105]	180 185 190
[0106]	Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr
[0107]	195 200 205
[0108]	Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu
[0109]	210 215 220
[0110]	Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr
[0111]	225 230 235 240
[0112]	Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser
[0113]	245 250 255
[0114]	Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro
[0115]	260 265 270
[0116]	Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala
[0117]	275 280 285
[0118]	Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys
[0119]	290 295 300
[0120]	Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val
[0121]	305 310 315 320
[0122]	Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys
[0123]	325 330 335
[0124]	Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala
[0125]	340 345 350

[0126]	Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu
[0127]	355 360 365
[0128]	Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro
[0129]	370 375 380
[0130]	Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe
[0131]	385 390 395 400
[0132]	Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
[0133]	405 410 415
[0134]	Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
[0135]	420 425 430
[0136]	Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn
[0137]	435 440 445
[0138]	Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe
[0139]	450 455 460
[0140]	Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys
[0141]	465 470 475 480
[0142]	Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly
[0143]	485 490 495
[0144]	Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
[0145]	500 505 510
[0146]	Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys
[0147]	515 520 525
[0148]	Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn
[0149]	530 535 540
[0150]	Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu
[0151]	545 550 555 560
[0152]	Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val
[0153]	565 570 575
[0154]	Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
[0155]	580 585 590
[0156]	Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val
[0157]	595 600 605
[0158]	Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
[0159]	610 615 620
[0160]	His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser
[0161]	625 630 635 640
[0162]	Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val
[0163]	645 650 655
[0164]	Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala
[0165]	660 665 670
[0166]	Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala
[0167]	675 680 685

[0168]	Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser
[0169]	690 695 700
[0170]	Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile
[0171]	705 710 715 720
[0172]	Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val
[0173]	725 730 735
[0174]	Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu
[0175]	740 745 750
[0176]	Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr
[0177]	755 760 765
[0178]	Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln
[0179]	770 775 780
[0180]	Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe
[0181]	785 790 795 800
[0182]	Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser
[0183]	805 810 815
[0184]	Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly
[0185]	820 825 830
[0186]	Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp
[0187]	835 840 845
[0188]	Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu
[0189]	850 855 860
[0190]	Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly
[0191]	865 870 875 880
[0192]	Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile
[0193]	885 890 895
[0194]	Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr
[0195]	900 905 910
[0196]	Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn
[0197]	915 920 925
[0198]	Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala
[0199]	930 935 940
[0200]	Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn
[0201]	945 950 955 960
[0202]	Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val
[0203]	965 970 975
[0204]	Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln
[0205]	980 985 990
[0206]	Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val
[0207]	995 1000 1005
[0208]	Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn
[0209]	1010 1015 1020

[0210]	Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys
[0211]	1025 1030 1035
[0212]	Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro
[0213]	1040 1045 1050
[0214]	Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
[0215]	1055 1060 1065
[0216]	Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His
[0217]	1070 1075 1080
[0218]	Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn
[0219]	1085 1090 1095
[0220]	Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln
[0221]	1100 1105 1110
[0222]	Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
[0223]	1115 1120 1125
[0224]	Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro
[0225]	1130 1135 1140
[0226]	Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
[0227]	1145 1150 1155
[0228]	His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
[0229]	1160 1165 1170
[0230]	Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu
[0231]	1175 1180 1185
[0232]	Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu
[0233]	1190 1195 1200
[0234]	Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile Trp Leu
[0235]	1205 1210 1215
[0236]	Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met
[0237]	1220 1225 1230
[0238]	Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys
[0239]	1235 1240 1245
[0240]	Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro
[0241]	1250 1255 1260
[0242]	Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr Thr Gly Leu Gln Leu
[0243]	1265 1270 1275
[0244]	Ala Arg Val
[0245]	1280
[0246]	<210> 3
[0247]	<211> 2418
[0248]	<212> DNA
[0249]	<213> 人工序列
[0250]	<400> 3
[0251]	atgtcaagct cttcctggct ccttctcagc cttgttgetg taactgetgc tcagtccacc 60

[0252]	attgaggaac aggccaagac atttttggac aagtttaacc acgaagccga agacctgttc	120
[0253]	tatcaaagtt cacttgcttc ttggaattat aacaccaata ttactgaaga gaatgtccaa	180
[0254]	aacatgaata atgctgggga caaatggtct gcctttttaa aggaacagtc cacacttgcc	240
[0255]	caaatgtatc cactacaaga aattcagaat ctcacagtca agcttcagct gcaggctctt	300
[0256]	cagcaaatg ggtcttcagt gctctcagaa gacaagagca aacggttgaa cacaattcta	360
[0257]	aatacaatga gcaccatcta cagtactgga aaagtttcta acccagataa tccacaagaa	420
[0258]	tgcttattac ttgaaccagg tttgaatgaa ataatggcaa acagtttaga ctacaatgag	480
[0259]	aggctctggg cttgggaaag ctggagatct gaggtcggca agcagctgag gccattatat	540
[0260]	gaagagtatg tggctctgaa aatgagatg gcaagagcaa atcattatga ggactatggg	600
[0261]	gattattgga gaggagacta tgaagtaaat ggggtagatg gctatgacta cagccgcggc	660
[0262]	cagttgattg aagatgtgga acataccttt gaagagatta aaccattata tgaacatctt	720
[0263]	catgcctatg tgaggcaaaa gttgatgaat gcctatcctt cctatatcag tccaattgga	780
[0264]	tgctccctg ctcatttctg tggatgatg tgggtagat tttggacaaa tctgtactct	840
[0265]	ttgacagttc cttttggaca gaaaccaaac atagatgta ctgatgcaat ggtggaccag	900
[0266]	gcctgggatg cacagagaat attcaaggag gccgagaagt tctttgtatc tgttggctct	960
[0267]	cctaataatga ctcaaggatt ctgggaaaat tccatgctaa cggaccagg aaatgttcag	1020
[0268]	aaagcagtct gccatcccac agcttgggac ctggggaagg gcgacttcag gatccttatg	1080
[0269]	tgacaaaagg tgacaatgga cgacttctg acagctcatc atgagatggg gcatatccag	1140
[0270]	tatgatatgg catatgctgc acaaccttt ctgctaagaa atggagctaa tgaaggattc	1200
[0271]	catgaagctg ttggggaaat catgtcactt tctgcagcca cacctaagca tttaaaatcc	1260
[0272]	attggtcttc tgtcaccoga ttttcaagaa gacaatgaaa cagaaataaa cttctgctc	1320
[0273]	aaacaagcac tcacgattgt tgggactctg ccatttactt acatgttaga gaagtggagg	1380
[0274]	tggatggtct ttaaagggga aattcccaaa gaccagtgga tgaaaaagt gtgggagatg	1440
[0275]	aagcgagaga tagttggggt ggtggaacct gtgccccatg atgaaacata ctgtgacccc	1500
[0276]	gcactctgt tccatgtttc taatgattac tcattcattc gatattacac aaggaccctt	1560
[0277]	taccaattcc agtttcaaga agcactttgt caagcagcta aacatgaagg ccctctgca	1620
[0278]	aaatgtgaca tctcaaacct tacagaagct ggacagaaac tgttcaatat gctgaggctt	1680
[0279]	ggaaaatcag aaccctggac cctagcattg gaaaatgttg taggagcaaa gaacatgaat	1740
[0280]	gtaaggccac tgctcaacta ctttgagccc ttatttacct ggctgaaaga ccagaacaag	1800
[0281]	aattcttttg tgggatggag taccgactgg agtccatag cagaccaaag catcaaagt	1860
[0282]	aggataagcc taaaatcagc tcttgagat aaagcatatg aatggaacga caatgaaatg	1920
[0283]	tacctgttcc gatcatctgt tgcatatgct atgaggcagt actttttaa agtaaaaaat	1980
[0284]	cagatgattc tttttgggga ggaggatgt cgagtggcta atttgaaacc aagaatctcc	2040
[0285]	tttaatttct ttgtcactgc acctaaaaat gtgtctgata tcattcctag aactgaagt	2100
[0286]	gaaaaggcca tcaggatgtc ccggagccgt atcaatgatg ctttccgtct gaatgacaac	2160
[0287]	agcctagagt ttctgggat acagccaaca cttggacct ctaaccagcc ccctgtttcc	2220
[0288]	atatggctga ttgtttttg agttgtgat ggagtgatag tggttggcat tgtcatcctg	2280
[0289]	atcttactg ggatcagaga tcggaagaag aaaaataaag caagaagtgg agaaaatcct	2340
[0290]	tatgcctcca tcgatattag caaaggagaa aataatccag gattccaaaa cactgatgat	2400
[0291]	gttcagacct ctttttag	2418
[0292]	<210>	4
[0293]	<211>	805

[0294] <212> PRT  
 [0295] <213> 人工序列  
 [0296] <400> 4  
 [0297] Met Ser Ser Ser Ser Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Ala  
 [0298] 1 5 10 15  
 [0299] Ala Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe  
 [0300] 20 25 30  
 [0301] Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp  
 [0302] 35 40 45  
 [0303] Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn  
 [0304] 50 55 60  
 [0305] Ala Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala  
 [0306] 65 70 75 80  
 [0307] Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln  
 [0308] 85 90 95  
 [0309] Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys  
 [0310] 100 105 110  
 [0311] Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser  
 [0312] 115 120 125  
 [0313] Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu  
 [0314] 130 135 140  
 [0315] Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu  
 [0316] 145 150 155 160  
 [0317] Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu  
 [0318] 165 170 175  
 [0319] Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg  
 [0320] 180 185 190  
 [0321] Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu  
 [0322] 195 200 205  
 [0323] Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu  
 [0324] 210 215 220  
 [0325] Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu  
 [0326] 225 230 235 240  
 [0327] His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile  
 [0328] 245 250 255  
 [0329] Ser Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly  
 [0330] 260 265 270  
 [0331] Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys  
 [0332] 275 280 285  
 [0333] Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala  
 [0334] 290 295 300  
 [0335] Gln Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu

[0336]	305	310	315	320
[0337]	Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro			
[0338]		325	330	335
[0339]	Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly			
[0340]		340	345	350
[0341]	Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp			
[0342]		355	360	365
[0343]	Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala			
[0344]		370	375	380
[0345]	Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe			
[0346]	385	390	395	400
[0347]	His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys			
[0348]		405	410	415
[0349]	His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn			
[0350]		420	425	430
[0351]	Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly			
[0352]		435	440	445
[0353]	Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe			
[0354]		450	455	460
[0355]	Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met			
[0356]	465	470	475	480
[0357]	Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr			
[0358]		485	490	495
[0359]	Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe			
[0360]		500	505	510
[0361]	Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala			
[0362]		515	520	525
[0363]	Leu Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile			
[0364]		530	535	540
[0365]	Ser Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu			
[0366]	545	550	555	560
[0367]	Gly Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala			
[0368]		565	570	575
[0369]	Lys Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe			
[0370]		580	585	590
[0371]	Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr			
[0372]		595	600	605
[0373]	Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu			
[0374]		610	615	620
[0375]	Lys Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met			
[0376]	625	630	635	640
[0377]	Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu			

[0378]		645		650		655
[0379]	Lys Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val					
[0380]		660		665		670
[0381]	Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro					
[0382]		675		680		685
[0383]	Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile					
[0384]		690		695		700
[0385]	Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn					
[0386]	705		710		715	720
[0387]	Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln					
[0388]		725		730		735
[0389]	Pro Pro Val Ser Ile Trp Leu Ile Val Phe Gly Val Val Met Gly Val					
[0390]		740		745		750
[0391]	Ile Val Val Gly Ile Val Ile Leu Ile Phe Thr Gly Ile Arg Asp Arg					
[0392]		755		760		765
[0393]	Lys Lys Lys Asn Lys Ala Arg Ser Gly Glu Asn Pro Tyr Ala Ser Ile					
[0394]		770		775		780
[0395]	Asp Ile Ser Lys Gly Glu Asn Asn Pro Gly Phe Gln Asn Thr Asp Asp					
[0396]	785		790		795	800
[0397]	Val Gln Thr Ser Phe					
[0398]		805				

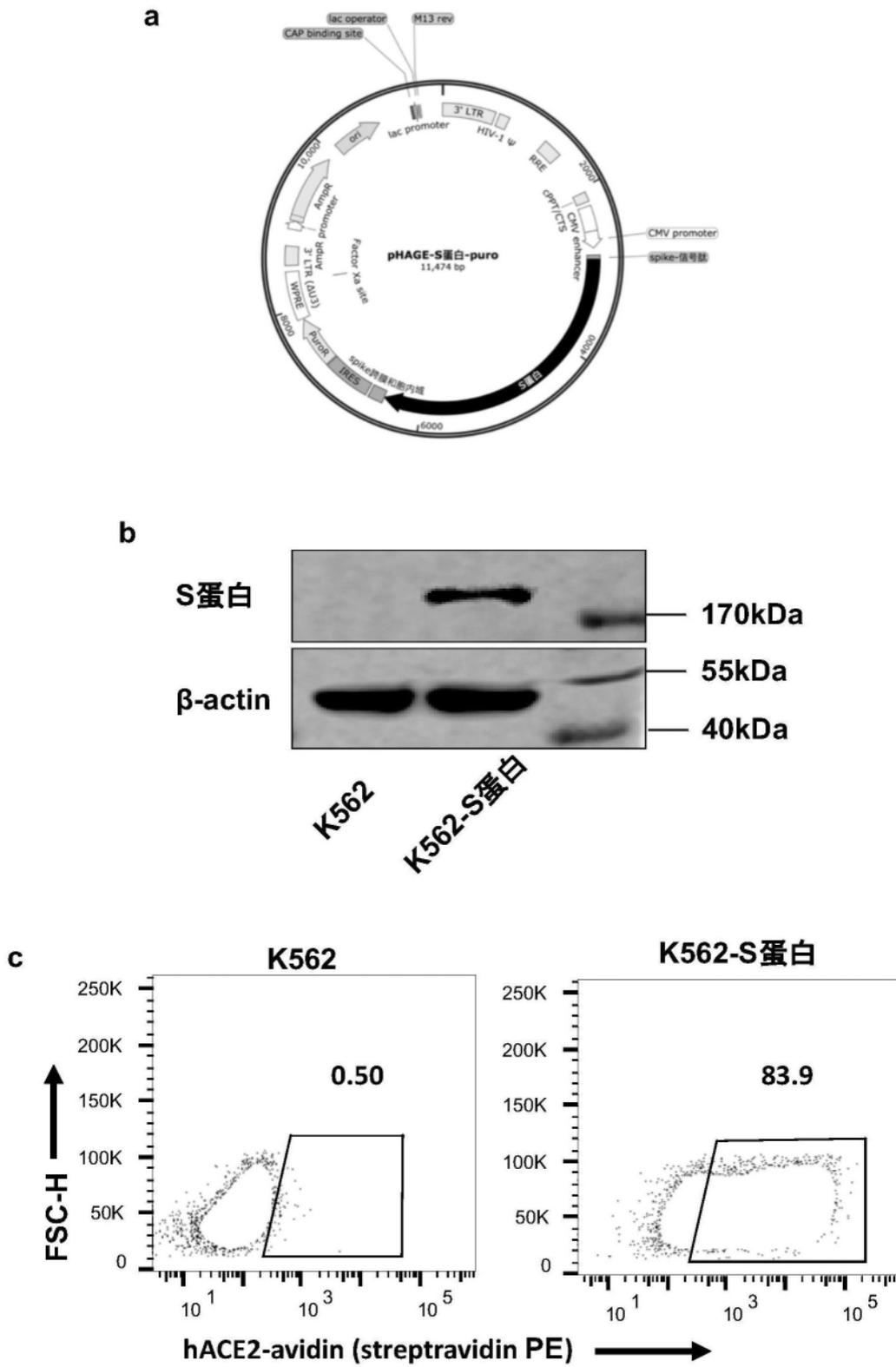


图1

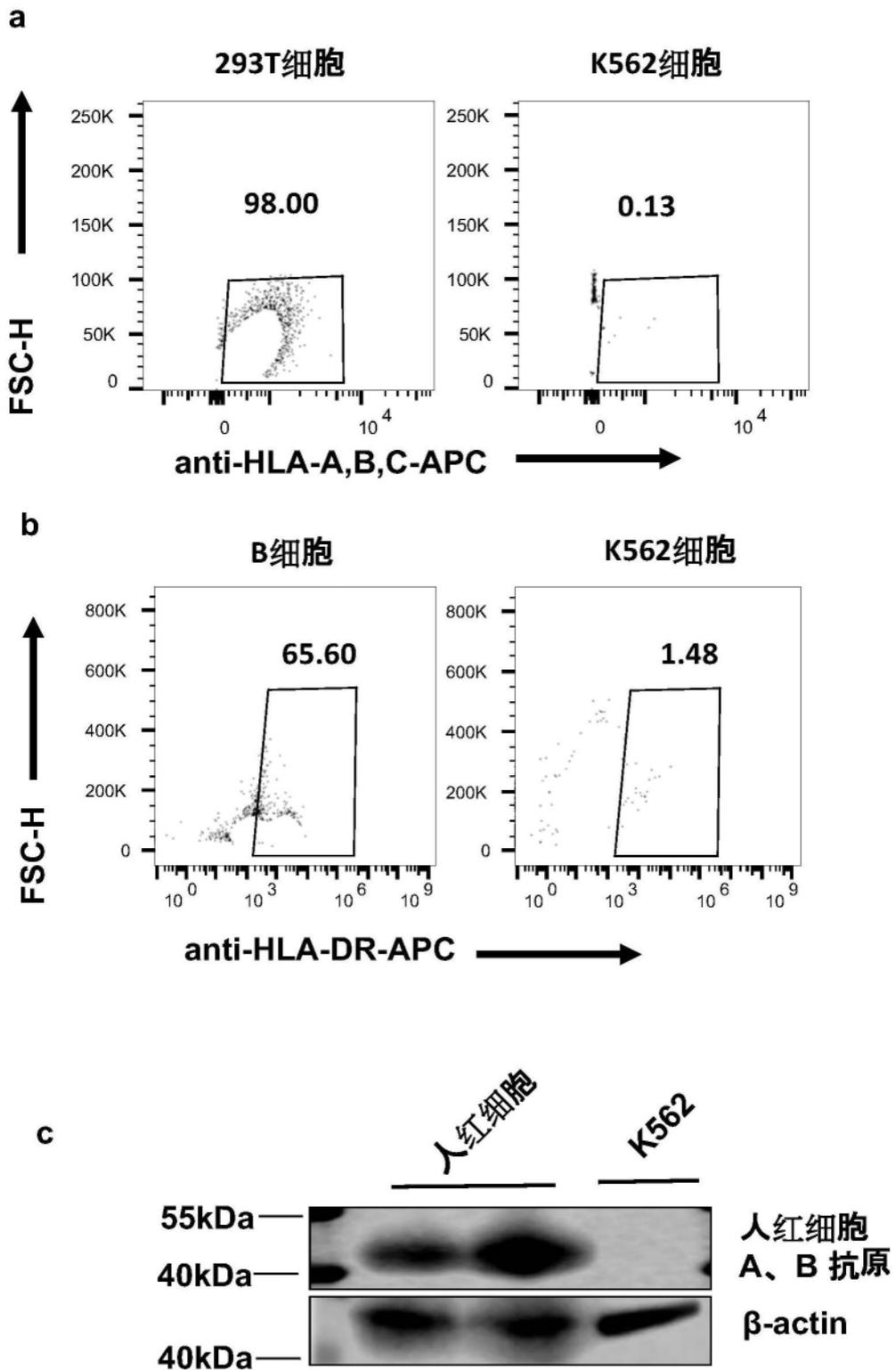


图2



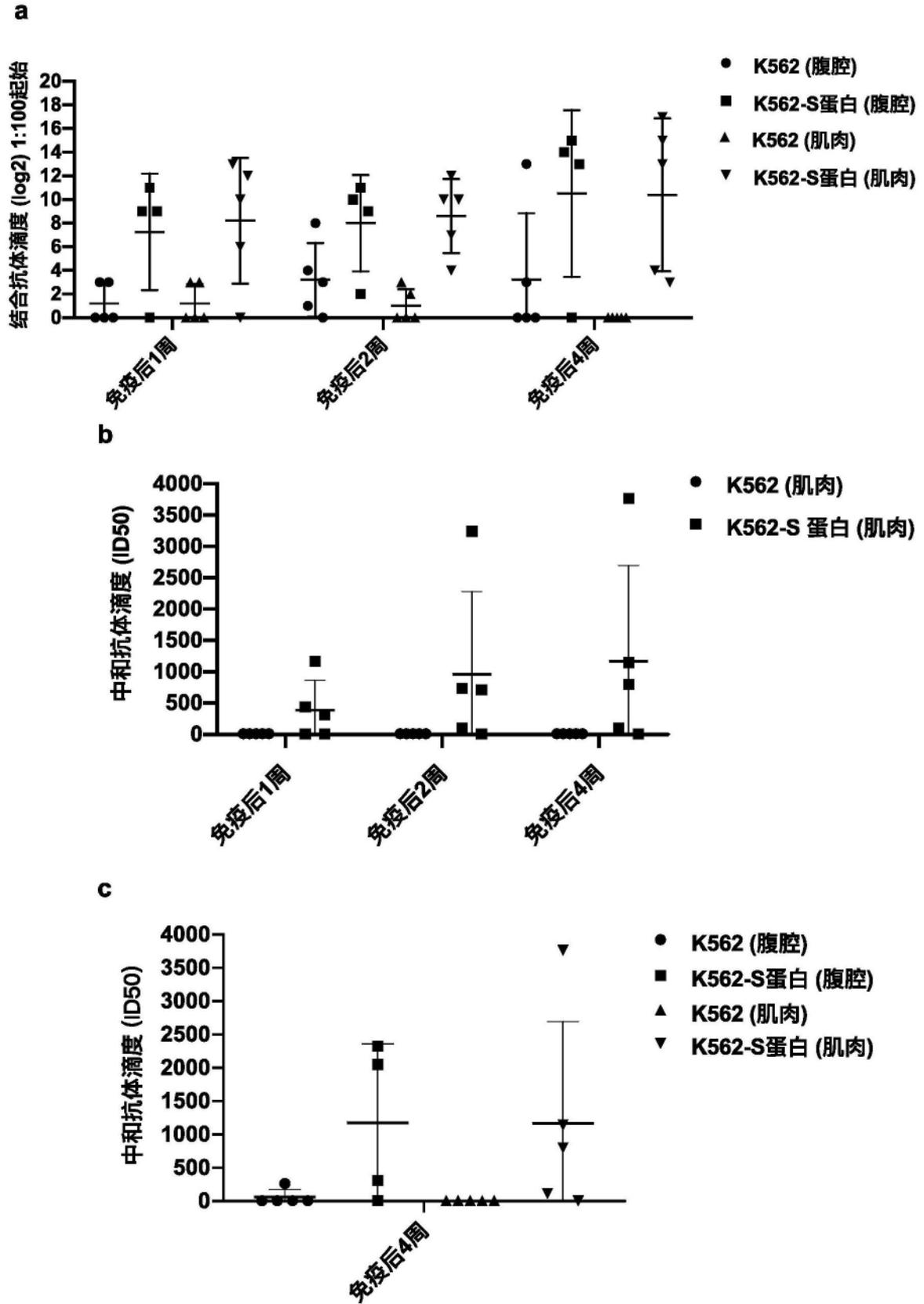


图4

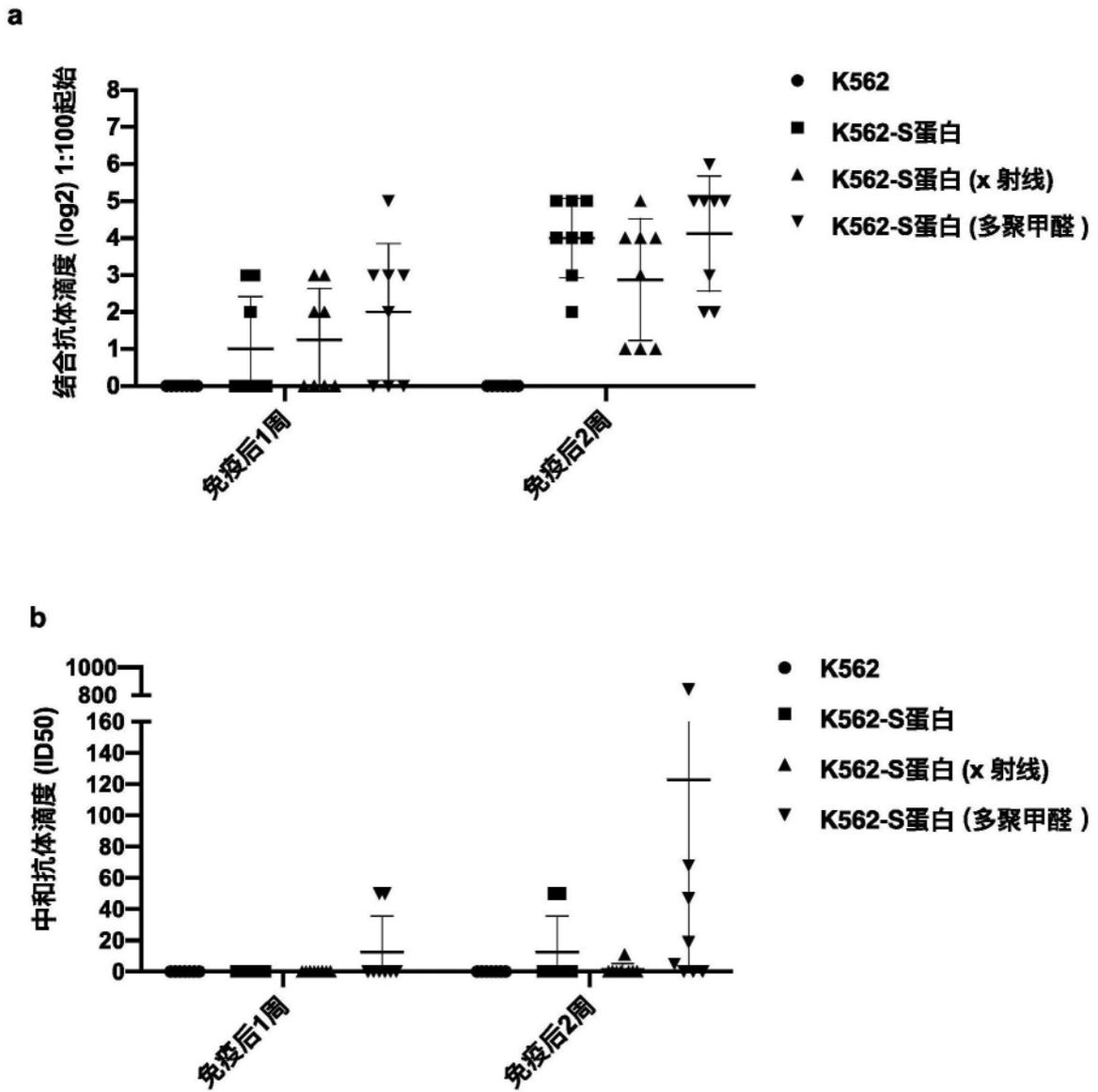


图5

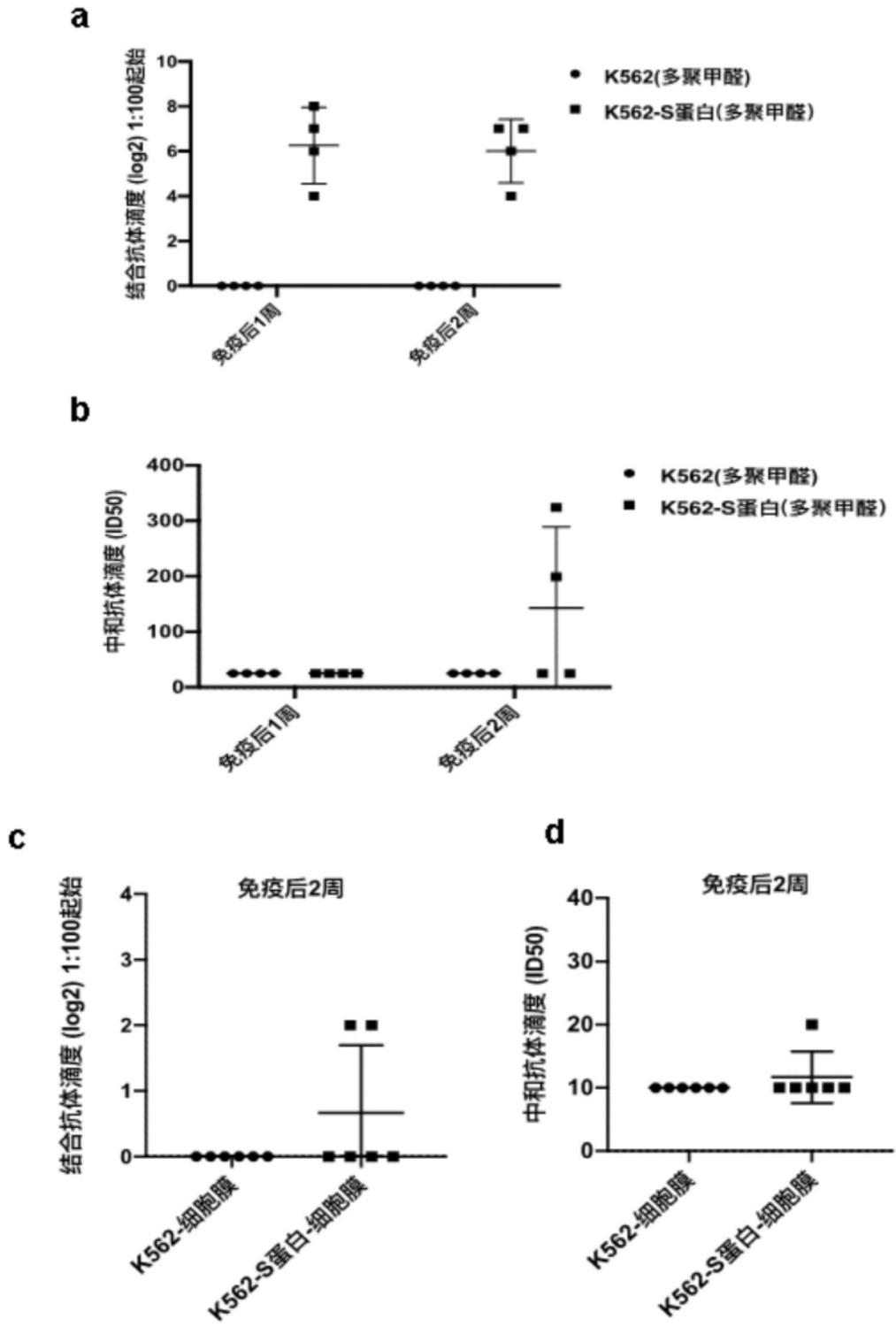


图6

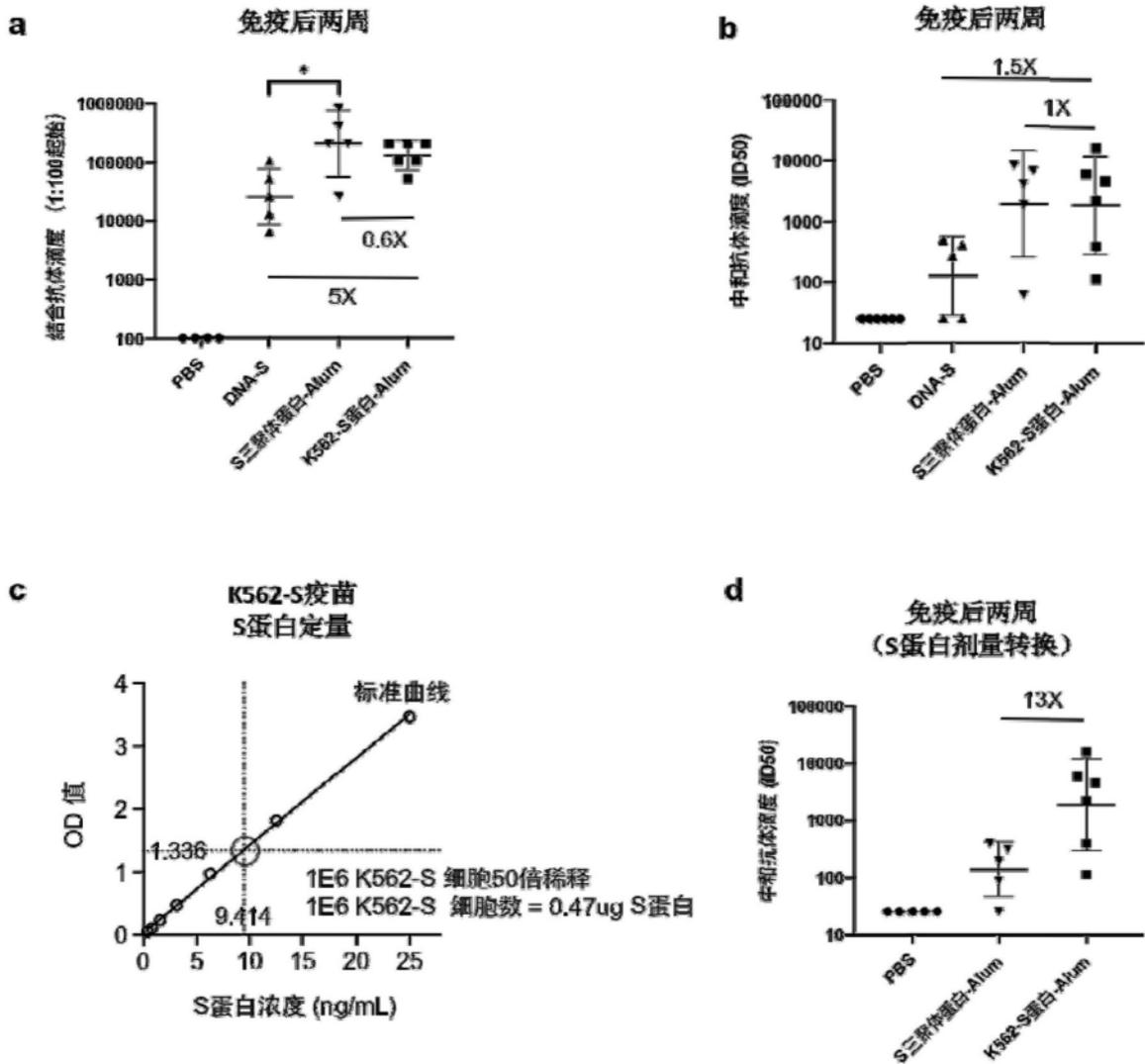


图7

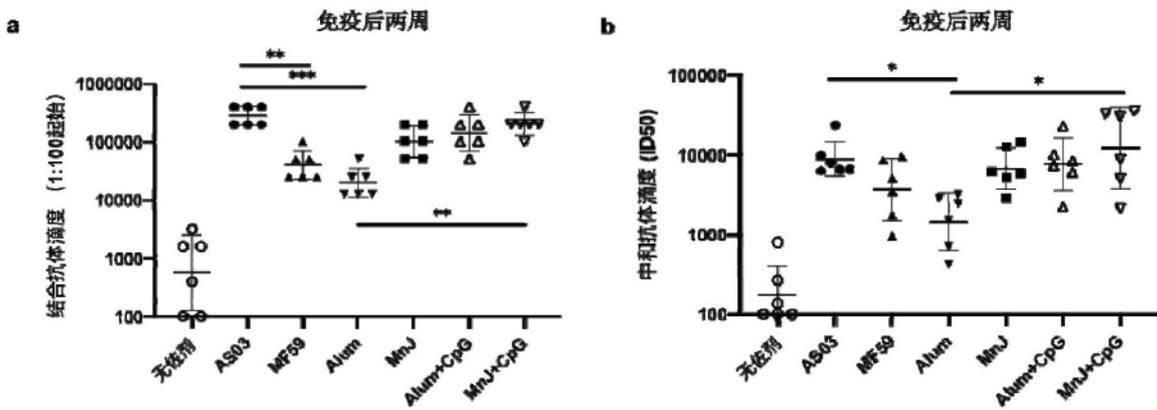
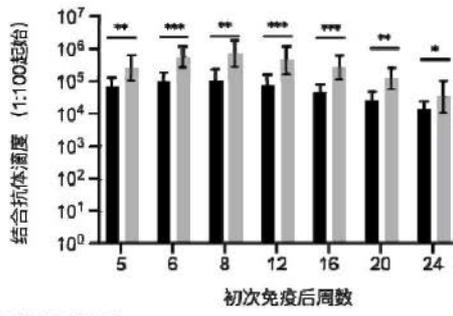


图8

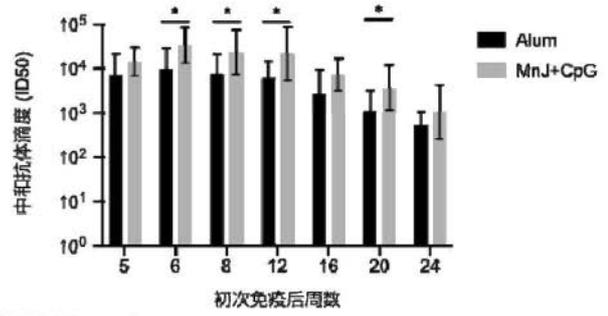
a



几何平均滴度 (GMT)

周数	5	6	8	12	16	20	24
Alum	69672	102400	110598	75250	43891	25600	13825
MnJ+CpG	258032	557380	702254	442392	258032	119453	32254

b



几何平均滴度 (GMT)

周数	5	6	8	12	16	20	24
Alum	7106	9982	6387	6131	2637	1088	535
MnJ+CpG	14155	33649	23635	21781	7123	3610	1045

图9