

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年12月23日 (23.12.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/253172 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01) *A61K 39/215* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/096148

(22) 国际申请日: 2020年6月15日 (15.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 上海市公共卫生临床中心 (SHANGHAI PUBLIC HEALTH CLINICAL CENTER) [CN/CN]; 中国上海市金山区漕廊公路2901号科研楼308室, Shanghai 201508 (CN)。

(72) 发明人: 徐建青 (XU, Jianqing); 中国上海市金山区漕廊公路2901号科研楼308室, Shanghai 201508 (CN)。 张晓燕 (ZHANG, Xiaoyan); 中国上海市金山区漕廊公路2901号科研楼308室, Shanghai 201508 (CN)。 曹康丽 (CAO, Kangli); 中国上海市金山区漕廊公路2901号科研楼308室, Shanghai 201508 (CN)。 丁龙飞 (DING, Longfei); 中国上海市金山区漕廊公路2901号科研楼308室, Shanghai 201508 (CN)。 何香川 (HE, Xiangchuan); 中国上海市金山区漕廊公路2901号科研楼308室, Shanghai 201508 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** METHOD FOR INDUCING ANTI-NOVEL CORONAVIRUS NEUTRALIZING ANTIBODY USING RECEPTOR RECOGNITION DOMAIN

(54) 发明名称: 利用受体识别域诱导抗新冠病毒中和抗体的方法

(57) **Abstract:** A method for inducing an anti-novel coronavirus neutralizing antibody using a receptor recognition domain is provided. Specifically, an immunogenic peptide for novel coronavirus SARS-CoV-2 is provided, comprising an RBD region of SARS-CoV-2 virus spike protein S or a cysteine-modified RBD region, and encoding a nucleotide molecule, a vector containing the nucleotide molecule, and a host cell. A vaccine for novel coronavirus SARS-CoV-2, preparation and application thereof are also provided. The vaccine is safe, can continuously produce high-potency neutralizing antibodies, and can be used in the prevention and/or treatment of novel coronavirus infections and symptoms thereof.

(57) **摘要:** 提供了利用受体识别域诱导抗新冠病毒中和抗体的方法。具体而言, 提供了一种针对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的免疫原性肽, 其包括 SARS-CoV-2 病毒刺突蛋白 S 的 RBD 区或经半胱氨酸修饰的 RBD 区; 其编码核苷酸分子、包含该核苷酸分子的载体和宿主细胞; 还提供了针对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的疫苗、其制备和应用。该疫苗安全, 可持续产生高效价中和抗体, 可用于新型冠状病毒感染及其症状的预防和/或治疗。



WO 2021/253172 A1

利用受体识别域诱导抗新冠病毒中和抗体的方法

技术领域

本公开属于生物技术和疫苗领域。具体而言，本公开涉及利用受体识别域诱导抗新冠病毒(SARS-CoV-2)中和抗体的方法。

背景技术

迄今为止，已经确定了三种高致病性人类冠状病毒(CoVs)，包括中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒(SARS-CoV)和一种 2019 年新型冠状病毒(SARS-CoV-2，简称新冠病毒)。

目前，在全球至少 85 个国家和/或地区共报告了超 750 万例确诊的新冠病毒病例，包括超 42 万例死亡，WHO 在 3 月 11 号宣布新冠疫情已发生全球大流行。目前，新冠病毒的中间宿主仍然未知，且没有有效的预防或治疗手段。因此，开发预防和治疗新冠病毒的疫苗和药物是亟待解决的关键问题。

众所周知，在感染性疾病的预防中，疫苗自问世以来就是最为有效和经济的措施，而目前常用的预防疫苗大部分都是以活化中和抗体为目标。因此，为了能够开发出预防新冠病毒的疫苗，我们需要寻找一种能够有效活化中和抗体的免疫原。

冠状病毒包含四种结构蛋白，包括突刺蛋白(S 蛋白)、包膜蛋白、膜蛋白和核衣壳蛋白。其中，S 蛋白在病毒的附着、融合和进入过程中起着最重要的作用，也是抗体、进入抑制剂和疫苗的主要靶点。S 蛋白介导病毒进入宿主细胞，首先通过 S1 亚基的受体结合域(RBD)与宿主受体结合，然后通过 S2 亚基融合病毒和宿主细胞膜。

WHO 的《COVID-19 全球研究路线图》里指出：冠状病毒疫苗免疫后的动物，再次暴露于活病毒时，可能发生更严重的症状。疫苗免疫产生的非中和抗体或较低的抗体水平可能会引起抗体依赖性增强效应(antibody - dependent enhancement, ADE)，增强病毒致病性。概括来说，中和抗体阻断病毒与细胞表面受体结合，中和病毒感染能力；非中和抗体结合病毒但在一些情况下，抗体 Fc 段与细胞表面 Fc 受体结合，使其可以感染表达 Fc 受体的细胞。因此，为了减少 ADE 副作用，

新冠病毒 S 蛋白中的 RBD 区将是最为有效的疫苗研发靶点。

RBD 在 S 蛋白中的天然构象为三聚体，若将 RBD 单独纯化，那么少了 S2 亚基三聚体的支撑，其构象很有可能会被改变。因此如何维持 RBD 的构象是需要解决的问题。

5 本领域中迫切需要开发出可有效产生新冠病毒中和抗体的新型疫苗。

发明内容

本公开中采用新冠病毒的 RBD 特定区域作为免疫原，同时对 RBD 区进行一系列修饰，例如加入二硫键、融合蛋白、融合细胞因子，进而使其可有效诱导抗
10 SARS-CoV-2 的中和抗体。

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 的免疫原性肽，其包括 SARS-CoV-2 病毒刺突蛋白 S 的 RBD 区，所述 RBD 区进一步经半胱氨酸修饰形成 sRBD 区。

在一些实施方式中，所述经半胱氨酸修饰为在 RBD 结构域的根部增加一对半
15 胱氨酸，使之能够形成二硫键。

在一些实施方式中，所述免疫原性肽选自：(a) 具有 SEQ ID NO: 2、4、8 或 10 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、4、8 或 10 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
20 蛋白质或多肽。

在一些实施方式中，所述 RBD 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，所述经半胱氨酸修饰的 sRBD 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

在一些实施方式中，所述 RBD 区或经半胱氨酸修饰的 sRBD 区包含在融合肽
25 中，例如与之融合的部分包括：病毒或宿主来源的蛋白，转铁蛋白(Fn)、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。

在一些实施方式中，所述融合肽可进一步包括：信号肽、连接肽、标签等元件。例如，信号肽可选自：蛋白自身、CD33、CD8、CD16、小鼠 IgG1 抗体、流

感 HA。连接肽可选自：(G4S)₃、(G4S)_n、GSAGSAAGSGEF、(Gly)₆、EFPKPSTPPGSSGGAP、KESGSVSSEQLAQFRSLD、(Gly)₈、EGKSSGSGSESKST。

标签可选自：His-tag、AviTag、Calmodulin tag、polyglutamate tag、E-tag、FLAG tag、HA-tag、Myc-tag、S-tag、SBP-tag、Sof-tag 1、Sof-tag3、Strep-tag、TC tag、V5 tag、T7 tag、VSV tag、Xpress tag、3X FLAG tag、Isopep tag、Spytag、Snoop tag 和 PNE tag。

在一些实施方式中，所述免疫原性肽为 sRBD-hFn、sRBD-HA2 等。

在一些实施方式中，所述融合肽的序列如 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 10 所示。

10 在本公开的一个方面中，提供了一种核苷酸分子，其编码本公开的免疫原性肽。

在一些实施方式中，所述核苷酸分子选自：(i) 序列如 SEQ ID NO: 1、3、7 或 9 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%，15 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。

在一些实施方式中，RBD 区的编码序列如 SEQ ID NO: 1 所示，经半胱氨酸修饰的 RBD 区的编码序列如 SEQ ID NO: 3 所示，或者所述核苷酸分子的序列如 20 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 9 所示。

在一些实施方式中，所述核苷酸分子还包括编码与 RBD 区或与经半胱氨酸修饰的 RBD 区融合的部分的序列。

在本公开的一个方面中，提供了一种载体，其包含本公开的核苷酸分子。

在一些实施方式中，所述载体为：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。

在本公开的一个方面中，提供了一种宿主细胞，其包含本公开的载体和/或能

表达本公开的免疫原性肽。

在一些实施方式中，所述宿主细胞为哺乳动物细胞或昆虫细胞，如 HEK293、HeLa、K562、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、
5 Sf9、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAml、BM-N、Ha2302、Hz2E5 以及 Ao38。

在一些实施方式中，所述宿主细胞为 K562。在一些实施方式中，所述 K562 细胞包含 sRBD-HA2。

由此，本公开中还提供了一种在其细胞膜表面展示本文所述新型冠状病毒
10 SARS-CoV-2 免疫原性肽的细胞。在一些实施方式中，所述细胞包含具有本文所述免疫原性肽编码序列的载体。在一些实施方式中，所述细胞转入了具有免疫原性肽编码序列的载体。在一些实施方式中，所述细胞具有展示所述免疫原性肽的完整膜结构。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 β -丙内酯、甲醛、多聚甲醛固定。

15 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，其包含本公开的免疫原性肽、核苷酸分子、载体和/或宿主细胞。

在本公开的一个方面中，还提供了本公开的免疫原性肽、核苷酸分子、载体和/或宿主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 在本公开的一个方面中，还提供了本公开的免疫原性肽、核苷酸分子、载体和/或宿主细胞，其用于预防或治疗新型冠状病毒 SARS-CoV-2。

在本公开的一个方面中，还提供了一种预防或治疗新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的方法，所述方法包括给予有需要的对象本公开的免疫原性肽、核苷酸分子、载体、宿主细胞和/或疫苗。

25 在一些实施方式中，所述疫苗为核酸疫苗(DNA 或 RNA 疫苗)、重组蛋白亚单位疫苗、重组病毒载体疫苗、重组细菌载体疫苗、病毒样颗粒疫苗、纳米颗粒疫苗、细胞载体疫苗。

在一些实施方式中，所述疫苗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、QS-21 佐剂、Poly I:C 及其他 TLR 配体、GM-CSF、

IL-2、IL-3、IL-7、IL-11、IL-12、IL-18、IL-21 等。

在一些实施方式中，所述疫苗的形式适于如下接种方式：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。

5 在一些实施方式中，采用一种或多种所述疫苗进行接种，例如联合接种或前后序贯接种。

在一些实施方式中，采用一种或多种所述疫苗与其他针对新型冠状病毒的疫苗进行接种，例如所述其他疫苗包括针对冠状病毒 S 或 S1 的疫苗，例如所述的 S 或 S1 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 等。

10 在一些实施方式中，所述疫苗包含核酸疫苗(DNA 或 RNA 疫苗)与重组人源细胞载体疫苗的组合。

在一些实施方式中，所述疫苗包含 pcDNA3.1-sRBD-hFn 与 K562-HA2-sRBD 的组合。在一些实施方式中，所述疫苗组合中的组分前后序贯接种，优选先接种 DNA 疫苗。

15 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 的疫苗的方法，所述方法包括：

(a) 提供本公开的免疫原性肽、核苷酸分子、载体和/或宿主细胞；

(b) 将(a)中所提供的活性物质与免疫学上或药学上可接受的载体组合。

20 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

25 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。

图 1: S 蛋白及 sRBD-hFn(二硫键改造)真核表达载体的构建及蛋白的表达：

图 1A. pcDNA3.1-sRBD-hFn 及 pcDNA3.1-S 真核表达载体质粒构建图谱；

图 1B. pcDNA3.1-sRBD-hFn 及 pcDNA3.1-S 蛋白在 293T 细胞中成功表达。

图 2: 慢病毒表达载体 pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2-puro 的构建及 S

蛋白和 sRBD-HA2 在 K562 细胞膜上展示的表达验证：

图 2A. pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2-puro 慢病毒表达载体质粒构建图谱；

图 2B. pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2-puro 蛋白成功表达；

5 图 2C. sRBD 能够与 ACE2 受体结合。

图 3： RBD 蛋白对小鼠结合抗体和中和抗体的诱导效果：

实验所用小鼠为 6-8 周龄 C57/BL6，免疫原为新冠病毒 RBD 蛋白及 pcDNA3.1-S 质粒，所述蛋白质均采用铝佐剂进行加强。

10 图 3A. ELISA 方法检测免疫结束后第 2 周小鼠血清中结合抗体的滴度。横坐标为免疫组别，纵坐标为结合抗体的滴度；

图 3B. 293T-ACE2 细胞检测免疫结束后第 4 周小鼠血清中中和抗体的滴度。横坐标为免疫组别，纵坐标为中和抗体的滴度(ID₅₀)。*表示 p<0.05。

图 4： 质粒 pcDNA3.1-sRBD-hFn 对小鼠结合抗体和中和抗体的诱导效果：

15 实验所用小鼠为 6-8 周龄 C57/BL6，免疫原为新冠病毒 S 质粒 pcDNA3.1-S 及修饰后的 RBD 质粒 pcDNA3.1-sRBD-hFn。

图 4A. ELISA 方法检测免疫结束后第 2 周小鼠血清中结合抗体的滴度。横坐标为免疫组别，纵坐标为结合抗体的滴度；

图 4B. 293T-ACE2 细胞检测免疫结束后第 2 周小鼠血清中中和抗体的滴度。横坐标为免疫组别，纵坐标为中和抗体的滴度(ID₅₀)。

20 **图 5：** K562-HA2-sRBD 及 K562-S 细胞对小鼠结合抗体和中和抗体的诱导效果：

实验所用小鼠为 6-8 周龄 C57/BL6，免疫原为 K562-HA2-sRBD 及 K562-S。

图 5A. ELISA 方法检测免疫结束后第 2 周小鼠血清中结合抗体的滴度。横坐标为免疫组别，纵坐标为结合抗体的滴度；

25 图 5B. 293T-ACE2 细胞检测免疫结束后第 2 周小鼠血清中中和抗体的滴度。横坐标为免疫组别，纵坐标为中和抗体的滴度(ID₅₀)。

图 6： sRBD-hFn 蛋白对小鼠结合抗体和中和抗体的诱导效果：

实验所用小鼠为 6-8 周龄 C57/BL6，免疫原为 sRBD-hFn 蛋白。

图 6A. ELISA 方法检测免疫后第 1 周小鼠血清中结合抗体的滴度。横坐标为

免疫组别，纵坐标为结合抗体的滴度；

图 6B. 293T-ACE2 细胞检测免疫结束后第 1 周小鼠血清中中和抗体的滴度。横坐标为免疫组别，纵坐标为中和抗体的滴度(ID₅₀)。

5 具体实施方式

本公开涉及疫苗领域，特别涉及一种利用 RBD 区诱导抗新冠病毒(SARS-Cov-2)中和抗体的方法。采用该病毒的 RBD 区、改造的 RBD 区、融合其他蛋白或细胞因子的 RBD 区作为免疫原，可减少由非中和抗体或较低的抗体水平引起的抗体依赖性增强效果(ADE)，从而预防新冠病毒感染。动物实验结果证实，本公
10 开的疫苗安全，可持续产生高效价中和抗体，可用于新冠病毒的预防和治疗。

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，
15 所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

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±10%。

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
20 等直至 2.5 毫克/天。

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。

25 RBD 免疫原性肽及其编码分子

如本文所用，术语“RBD 免疫原性肽”、“针对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的免疫原性肽”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 病毒刺突蛋白 S 的 RBD 区或经半胱氨酸修饰的 RBD 区(在本文中亦称 sRBD 区)、且具有激发结合抗体和中和抗体作用的肽。

在本公开的一些实施方式中，免疫原性肽可为：(a) 具有 SEQ ID NO: 2、4、8 或 10 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、4、8 或 10 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。

在一些情况下，免疫原性肽可包括与 RBD 区或经半胱氨酸修饰的 RBD 区连接的其他部分，以例如增强 RBD 区的稳定性、提高中和抗体应答、形成多聚体、增加细胞应答等。可修饰或未修饰的 RBD 区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(Fn)、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。例如，所述融合肽的序列如 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 10 所示。

在一些情况下，融合肽中还可包括信号肽、接头、分子标签等元件。例如，信号肽元件可指具有引导融合蛋白分泌、定位和/或输送功能的氨基酸序列，其长度通常为 5-30 个氨基酸。在一些实施方式中，信号肽元件可选自：蛋白自身信号肽、CD33 蛋白信号肽、CD8 蛋白信号肽、CD16 蛋白信号肽、小鼠 IgG1 抗体信号肽、流感 HA 蛋白信号肽。例如，连接肽序列(或称接头)可指在本文的融合蛋白中起到连接不同元件作用的短肽，其长度通常为 1~50 (如 5~50、5~40、10~40)个氨基酸。通常，连接肽不影响或严重影响本发明的融合蛋白形成正确的折叠和空间构象。在一些实施方式中，连接肽元件可选自： $(G_4S)_3$ 接头、 $(G_4S)_n$ 、GSAGSAAGSGEF、(Gly)₆、EFPKPSTPPGSSGGAP、KESGSVSSEQLAQFRSLD、(Gly)₈、EGKSSGSGSESKST。

免疫原性肽也可包括其变异形式，例如一个或多个(通常为 1-50 个，更佳地 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，更佳地为 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。

免疫原性肽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，只要其具有所需的氨基酸序列和免疫原性和反应性。

如本文所用，术语“免疫原性肽编码分子”、“RBD 编码序列”等可互换使用，
5 均是指编码本公开所述的免疫原性肽的核苷酸分子。所述核酸分子可选自，例如：
(i) 序列如 SEQ ID NO: 1、3、7 或 9 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
10 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。

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×SSC，0.1%SDS，60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲
酰胺，0.1%小牛血清/0.1%Ficoll，42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少
15 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。

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有关核苷酸序列来设计
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，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR
20 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

载体和宿主细胞

本公开还涉及包含 RBD 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。

25 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：

(1)将本公开的编码核苷酸分子，或将含有核苷酸分子的重组表达载体转入
合适的宿主细胞；

(2)在合适的培养基中培养的宿主细胞；

(3)从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质或多肽。

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。

5 可采用本领域常规方法构建含 RBD 免疫原性肽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。

10 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。

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。宿主细胞可以是原核细胞，
15 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、K562、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、
20 BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、BM-N、Ha2302、Hz2E5 以及 Ao38。

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。

25 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内或在细胞膜上表达或分泌到细胞外。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。

疫苗和免疫偶联物

本文中还提供了一种包含本公开的免疫原性肽、核苷酸分子、载体和/或宿主
5 细胞的疫苗，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)的本公开的免疫原性肽和/或核酸分子的配制品，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。

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
10 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。

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
15 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
他鸸鹋类鸟、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。

本文的疫苗可为重组蛋白疫苗、重组 DNA 疫苗、重组病毒载体疫苗(例如腺
病毒载体、痘病毒载体、腺相关病毒载体、单纯疱疹病毒载体、巨细胞病毒载体)、
重组细菌载体疫苗、重组酵母载体疫苗或重组病毒样颗粒疫苗。在一些实施方式
20 中，本文的疫苗选自重组 DNA 疫苗、重组腺病毒载体、重组痘病毒载体或其中
一种或两种或三种的组合。

在一些实施方式中，可采用选自下组的一种或多种疫苗或其组合：重组质粒
疫苗(DNA)，如包含与人重组 Ferritin 或 HA2 融合的经半胱氨酸修饰的 RBD 区编
码序列的 DNA 疫苗(例如 pcDNA3.1-sRBD-hFn)；重组蛋白亚单位疫苗(protein)，
25 如 RBD 蛋白(不包含二硫键修饰)、与人重组 Ferritin 或 HA2 融合的经半胱氨酸修
饰的 RBD 蛋白(sRBD-hFn 蛋白、sRBD-HA2 蛋白)；重组人源细胞载体疫苗，如
K562-HA2-sRBD。

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。

5 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。

10 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。

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。

15 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。

20 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)。

25 在本公开中还提供了一种组合产品，其包括本公开的免疫原性肽、核苷酸分子、载体、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。

免疫方法

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
5 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。

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。

10 在一些实施方式中，采用 DNA 疫苗进行初次免疫，并采用重组病毒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。

15 根据不同载体疫苗的特点，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，再用其他疫苗(例如重组腺病毒疫苗或重组痘病毒疫苗)进行一次或多种免疫加强，所述免疫加强可包括至少一次呼吸道内免疫加强(例如，采用腺病毒疫苗)。

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。

20 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。

25 本公开中的组合产品可用于在呼吸道内局部诱导高水平抗原特异性 CD8+ T 细胞应答的特征，使得其在预防呼吸道病原体感染、降低呼吸道病原体致病力和呼吸道肿瘤的预防治疗中均有应用前景。

实施例

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适用于限制本公开的范围。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。

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。

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悉的意义相同。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。

下述实验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：

I. 实验动物：6-8周龄雌性 C57/BL6 小鼠

II. 免疫方式：对小鼠左、右后肢分别进行肌肉注射

III. 免疫原的选择：

S 及 RBD 序列均来自 Genebank: NC_045512.2, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome; hFn 序列来自于 Genebank: M97164.1, HA2 序列来自于 Genebank: AGI60292.1, 具体序列见序列表。

1. 重组质粒疫苗(DNA): pcDNA3.1-sRBD-hFn、pcDNA3.1-S、pcDNA3.1 (空载);

2. 重组蛋白亚单位疫苗(protein): RBD 蛋白(不包含二硫键修饰)、sRBD-hFn 蛋白;

3. 重组人源细胞载体疫苗: K562、K562-S、K562-HA2-sRBD。

IV. 免疫原制备及免疫剂量：

免疫原的制备参见实施例 1

在实施例中所采用的免疫原免疫剂量如下：

1. 重组质粒疫苗(DNA): 100 μ g /只小鼠, 100 μ L, 溶于无菌生理盐水中;

2. 重组蛋白亚单位疫苗(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, RBD 蛋白, 10 µg /只小鼠, 100 µL; sRBD-hFn 蛋白, 20 µg /只小鼠, 100 µL;

3. 重组人源细胞载体疫苗(K562、K562-S、K562-HA2-sRBD): 1E6 个细胞/
5 只小鼠, 100 µL, 溶于无菌 PBS 中。

V. 免疫间隔:

具体免疫间隔见下文表格

VI. SARS-CoV2 包膜假病毒(Pseudovirus)包装:

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
10 培养基将细胞稀释至 5×10^6 个/mL 细胞, 取 1 mL 稀释好的细胞, 铺在 10 cm 的皿
中, 37°C, 5% CO₂, 培养过夜;

2. 吸取 SARS-CoV2 膜蛋白质粒 pcDNA3.1-S 4 µg 和 pNL4-3Δenv 骨架质粒 8
µg (NIH AIDS Reagent Program, 3418)加入 500 µL 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 5 min;

15 3. 用双无 DMEM 将 24 µL TurboFect (Thermo Fisher Scientific)稀释, 终体积
为 500 µL /样品, 室温孵育 5 min;

4. 将 2 与 3 两者混匀, 1000 µL/样品终体积, 室温孵育 20 min, 孵育结束后
加到 10 cm 培养皿的 293T 细胞中。6 h 后更换新鲜的 15 mL 完全培养基, 继续在
细胞培养箱中培养 48 h;

20 5. 培养结束后, 收集 10 cm 皿的细胞培养上清, 于 15 mL 离心管里, 然后
4000 g, 4°C, 离心 10 min, 用 0.45 µm 的滤器过滤到新的 15 mL 离心管中, 冻存
于-80°C 保存, 滴定后备用。

VII. 构建稳定表达 hACE2 受体的 293T 细胞:

1. 人工合成人源 ACE2 (hACE2) 序列(Genebank#NCBI_NP_001358344.1),如
25 SEQ ID NO:13 所示, 序列 5'端带有 AgeI 酶切位点, 3'端带有 XbaI 酶切位点,
合成片段与载体质粒 pHAGE-MCS-puro 使用 AgeI 酶切(Thermo Scientific 公司,
货号 FD1464)与 XbaI 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。

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

5 (pHAGE-hACE2-puro)。

3. 取 10 cm 皿, 在每个皿中接种约 5×10^6 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。

4. 37°C, 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 0.45 μ m 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。

5. 提前一天铺 5×10^5 的 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 500 μ L, 1000 g, 离心 2 小时。

6. 离心感染结束后, 继续在 37°C, 5% 的孵箱培养 12 小时左右, 将培养基换成添加 1 μ g/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)。

VIII. 检测方法:

采血:

20 最后一次免疫结束后第 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 1.5 mL EP 管中, 室温静置使其自然凝血, 凝固后的小鼠血清于 7000 g, 离心 15 min。将小鼠血清转移至新的 1.5 mL EP 管中。实验前需要将样品在 56°C 灭活 30 min, 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。

25 ELSIA 检测结合抗体:

1. 用 4°C 预冷的 ELISA 包被液稀释检测的抗原蛋白(S1 或者 RBD), 至终浓度为 1 μ g/mL。在 ELISA 板的每孔加入 100 μ L 包被抗原溶液, 4°C 过夜;

2. 第二天, 取出 ELISA 板, 弃掉包被液, 用 0.05% 的 PBST 缓冲液洗板 3 次, 每次 220 μ L;

3. 洗涤完毕后,在吸水纸上拍干,每孔用 200 μL ELISA 封闭液(0.5%脱脂奶粉, PBST 溶解)进行封闭,室温封闭 2 h;
4. 封闭结束后,用 0.05%的 PBST 洗板 3 次,每次 220 μL ;
5. 对于血清或者血浆,用 ELISA 样品稀释液(0.5%脱脂奶粉, PBST 溶解)稀释,从 1:100 起始,进行 2 倍比稀释。用未免疫的小鼠血清设置为阴性对照。设置 Blank 孔,只加样品稀释液,每个样品需做 2 个复孔,每孔终体积为 100 μL ,室温孵育 3 h;
6. 样品孵育结束后,继续用 PBST 洗板 5 次,每次 220 μL ;
7. 用 ELISA 封闭液(0.5%脱脂奶粉, PBST 溶解)稀释相对应比例的二抗(山羊抗鼠),每孔加入 100 μL ,室温孵育 1-1.5 h;
8. 二抗孵育结束后,用 0.05%的 PBST 洗板 5 次,每次 220 μL ;
9. 取一对金银片 OPD 底物,溶解于 20 mL 去离子水中,随后每孔加入 100 μL ,避光反应 5 min;
10. 显色结束后,用 50 μL 2 nM H_2SO_4 进行终止,在酶标仪上读取 OD_{492} - OD_{630} 值;
11. 以最后一个稀释度 OD_{492} 大于 2 倍的(negative mean + SD)值对应的血清稀释比的倒数作为抗体滴度。

293T-ACE2 细胞检测中和抗体:

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)(150 μL),第二列设置病毒对照(VC)(100 μL),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 100 μL 。
2. 除细胞对照组外,每孔加 50 μL SARS-CoV-2 假病毒稀释液,使每孔最终含假病毒为 200 TCID_{50} 。
3. 轻轻震荡混匀,将上述 96 孔底黑板置于细胞培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵育 1 h。
4. 当孵育时间至 20 min 时,开始准备 293T-hACE2 靶细胞,并用完全培养基将细胞稀释至 10^5 个细胞/mL。
5. 当孵育时间至 1 h,向 96 孔透明底黑板中每孔加 100 μL 靶细胞,使每孔细胞为 10^4 个。

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°C, 5% CO₂ 培养 48 h。

7. 培养 48 h 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 100 μL PBS 清洗一遍, 吸去 PBS, 每孔加入 50 μL 1×的裂解缓冲液(购自 Promega 公司 Cat#E153A), 室温在水平摇床上孵育 30 min 使细胞充分裂解;

8. 加 30 μL 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。

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。

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

10

实施例 1: S 及 sRBD-hFn (二硫键改造)真核表达载体的构建及蛋白表达

为了研究 RBD 的功能, 我们构建了 S 及 sRBD-hFn 的真核表达载体, 并在体外细胞系中真核表达出成熟的蛋白质。

15 首先, 我们人工合成了 S 基因(序列如 SEQ ID NO: 11 所示)、sRBD-hFn 基因(具体序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 其中 sRBD 部分基于如 SEQ ID NO: 3 所示的序列, hFn 部分基于如 SEQ ID NO: 5 所示的序列), 合成片段与载体质粒 pcDNA3.1(购自优宝生物)使用 BamHI 酶切(Thermo Scientific 公司, FD0054)与 NotI 酶切(Thermo Scientific 公司, FD0596), 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。sRBD-hFn 基因在 RBD 基因部分的 N 和 C 端各加了一个半胱氨酸, 使之在 RBD 的根部形成二硫键, 稳定 RBD 的结构。sRBD 表达在 hFn 的 N 端, 两者之间采用接头连接。

20 随后, 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 及 sRBD-hFn 的真核表达载体 pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-sRBD-hFn, 质粒构建图谱如图 1A。

我们进一步检测了 S 及 sRBD-hFn 能否在真核细胞系 293T 中表达。

首先, 取 6 孔板, 在每个孔中接种约 6×10^5 个 293T 细胞, 保证第二天转染时使细胞密度达 90% 为宜; 用 pcDNA3.1、pcDNA3.1-S 及 pcDNA3.1-sRBD-hFn 分别转染 293T 细胞(转染试剂 TurboFect)。37°C, 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, 进行蛋白质免疫印迹(WB)鉴定, 发现 S 在细胞中表达, 大小为 200KD 左右; sRBD-hFn 在细胞中表达, 大小为 55KD 左右, 而 pcDNA3.1 对照转染的细胞不能检测到 sRBD-hFn 蛋白的表达(图 1B)。

所表达的 sRBD-hFn 的结构为: sRBD 表达在 hFn 的 N 端, 两者之间采用(G4S)₃ 连接。

10 实施例 2: 慢病毒表达载体 pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2-puro 的构建及 S 蛋白和 sRBD-HA2 在 K562 细胞膜上展示的表达验证

为了验证二硫键修饰后的 RBD (sRBD) 的构象是否正确, 我们构建了慢病毒表达载体 pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2-puro, 并将蛋白表达在 K562 细胞膜上, 验证了蛋白的表达及构象。

15 首先, 我们人工合成了 S 基因(序列如 SEQ ID NO: 11 所示), sRBD-HA2 基因(序列如 SEQ ID NO: 9 所示), 合成片段序列 5' 端带有 NotI 酶切位点, 3' 端带有 XbaI 酶切位点, 合成片段与载体质粒 pHAGE-MCS-puro(购自上海鑫湾生物技术有限公司)使用 NotI 酶切(Thermo Scientific 公司, FD0596)与 XbaI 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 20 胶回收试剂盒(Promega 公司, 货号 A9282)回收酶切片段。

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 及 sRBD-HA2 的慢病毒表达载体 25 pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2-puro (图 2A)。

将 pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2-puro 转染 293T 细胞, 通过蛋白质免疫印迹方法鉴定 K562-S 细胞中蛋白的表达(图 2B); 同时进行流式细胞染色鉴定, 发现 S 蛋白与 sRBD-HA2 蛋白在细胞膜上有表达, 及都能够与受体 ACE2 结合, 而对照感染的细胞不能检测到相关蛋白的表达, 表明二硫键修饰的 RBD 本身的构

象保持的较为完整，不影响其主要功能(图 2C)。

实验步骤如下：取 6 孔板，在每个孔中接种约 6×10^5 个 293T 细胞，保证第二天转染时使细胞密度达 90% 为宜；用 pHAGE-S-puro 及 pHAGE-sRBD-HA2 -puro 分别转染 293T 细胞(转染试剂 TurboFect)。37°C，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，进行蛋白质免疫印迹(WB)鉴定，发现 S 在细胞中表达，大小为 200KD 左右；sRBD-HA2 在细胞中表达，大小为 80KD 左右，而 pCDNA3.1 对照转染的细胞不能检测到 sRBD-hFn 蛋白的表达(图 2B)。准备 5×10^5 K562 细胞，用 500 μ L 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，1000 g，离心 2 小时。离心感染结束后，继续在 37°C，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 4 μ g/ml 的 RPMI (10% FBS) 中培养，最后能够存活的细胞便是整合有 S 基因和 sRBD-HA2 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目的蛋白高表达 (图 2B)。

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 细胞和 K562-HA2-sRBD 细胞能够与 ACE2 结合，说明二硫键修饰的 RBD 本身的构象并不影响其主要功能(图 2C)。

实施例 3：RBD 蛋白对小鼠结合抗体和中和抗体的诱导效果

采用 RBD 蛋白(购买自南京金斯瑞生物科技)免疫 C57/BL6 小鼠，佐剂为铝佐剂，在完成免疫 2 周后，评价免疫组合诱导针对 RBD 蛋白和 S1 蛋白的结合抗体滴度。同时评价免疫结束 4 周后，针对 SARS-CoV-2 假病毒的中和抗体滴度。

实验步骤如下：将小鼠随机分为 2 组，根据免疫原分别命名为对照组、RBD 组。具体免疫组合如表 1 所示。RBD 组产生针对 RBD 蛋白和 S1 蛋白的结合抗体滴度如图 3A 所示；针对不同蛋白(S1 蛋白和 RBD 蛋白)的结合抗体滴度基本一致，

均值都在 8000 左右，部分小鼠结合抗体没有被诱导起来，其可能的原因在于小鼠的个体差异性。免疫结束后 4 周，RBD 组产生针对 SARS-Cov-2 假病毒的中和抗体滴度如图 3B 所示：除了一只滴度在 1000 以上，其他的都在 200 左右，部分小鼠中和抗体未被诱导起来，其可能的原因在于小鼠的个体差异性。

5 该实验证实，RBD 蛋白可诱导结合抗体的产生(其效果与 S 蛋白诱导相似)，且单纯的 RBD 蛋白能够活化出较高水平的中和抗体。

表 1. RBD 蛋白诱导结合抗体及中和抗体实验

	0 周	1 周
对照(n=8)	pcDNA3.1	PBS
RBD(n=8)	DNA-pcDNA3.1-S	RBD 蛋白

10 实施例 4：质粒 pcDNA3.1-sRBD-hFn 对小鼠结合抗体及中和抗体的诱导效果

根据实施例 1 得出的结论(质粒能够正确表达出所需蛋白)，采用二硫键修饰后的 RBD 质粒(pcDNA3.1-sRBD-hFn)免疫 C57/BL6 小鼠，在完成免疫 2 周后，评价免疫组合诱导针对 RBD 蛋白的结合抗体滴度和针对 SARS-CoV-2 假病毒的中和抗体滴度。

15 实验步骤如下：将小鼠随机分为 2 组，根据第二针的免疫原分别命名为对照组和 RBD-hFn 组。具体免疫组合如表 2 所示。不同免疫组合产生针对 RBD 蛋白的结合抗体滴度如图 4A 所示：大部分都在 2000 左右。第二针免疫结束后 2 周，不同的免疫组合产生针对 SARS-CoV-2 假病毒的中和抗体滴度如图 4B 所示：除一只中和抗体滴度大于 80，其他的都在 20 左右。

20 该实验证实，修饰后的 RBD 重组质粒疫苗能够在小鼠体内诱导出中和抗体。

表 2. 修饰后的 RBD-hFn 质粒诱导结合抗体及中和抗体实验

	0 周	1 周	2 周
对照(n=4)	DNA-pcDNA3.1	DNA-pcDNA3.1	DNA-pcDNA3.1
RBD-hFn (n=10)	DNA-pcDNA3.1-S	DNA-pcDNA3.1-sRBD-hFn	DNA-pcDNA3.1-sRBD-hFn

实施例 5: K562-HA2-sRBD 细胞及 K562-S 细胞对小鼠结合抗体及中和抗体的诱导效果

根据实施例 4 中得出的结果, 将 sRBD-hFn 组的 10 只小鼠分为两组, 再次免疫 K562-S 和 K562-HA2-sRBD, 在完成免疫 2 周后, 评价免疫组合诱导针对 RBD 蛋白的结合抗体滴度和针对 SARS-CoV-2 假病毒的中和抗体滴度。

具体免疫组合如表 3 所示。免疫结束后 2 周, 不同免疫组合产生针对 RBD 蛋白的结合抗体滴度如图 5A 所示: K562-S 组结合抗体滴度大部分在 50000 左右, K562-HA2-sRBD 组结合抗体滴度大部分在 80000 左右。免疫结束后 2 周, 不同的免疫组合产生针对 SARS-CoV-2 假病毒的中和抗体滴度如图 5B 所示: K562-S 组中和抗体滴度大部分在 350 左右, K562-HA2-sRBD 组中和抗体滴度有一只达到 2000, 其他在 400 左右。

该实验证实, K562-HA2-sRBD 细胞相比于 K562-S 细胞在小鼠体内能够诱导出相对更高的结合抗体及中和抗体。

表 3. K562-S 及 K562-HA2-sRBD 诱导结合抗体及中和抗体实验

	0 周	1 周	2 周	7 周
对照 (n=4)	DNA-pcDNA3.1	DNA-pcDNA3.1	DNA-pcDNA 3.1	K562
K562-S 组 (n=5)	DNA-pcDNA3.1-S	DNA-pcDNA3.1	DNA-pcDNA	K562-S
K562-HA2-sRBD 组 (n=5)		-RBD-hFn	3.1-RBD-hFn	K562-HA2-sRBD

15

实施例 6: sRBD-hFn 蛋白对小鼠结合抗体及中和抗体的诱导效果

采用纯化的 sRBD-hFn 蛋白免疫 C57/BL6 小鼠, 在完成免疫 1 周后, 评价免疫组合诱导针对 RBD 蛋白的结合抗体滴度和针对 SARS-CoV-2 假病毒的中和抗体滴度。

实验步骤如下: 将小鼠随机分为 2 组, 根据免疫原分别命名为对照组和 sRBD-hFn 组。具体免疫组合如表 4 所示。免疫结束后一周产生针对 RBD 蛋白的结合抗体滴度如图 6A 所示: sRBD-hFn 组有三只小鼠的结合抗体达到 52000, 除一只在 3200 之外, 其他的都大于一万。免疫结束后 1 周, 产生针对 SARS-CoV-2 假病毒的中和抗体滴度如图 6B 所示: 有三只有中和抗体, 滴度都在十几。

表 4. sRBD-hFn 蛋白诱导结合抗体及中和抗体实验

	0 周	1 周	3 周
对照(n=6)	PBS	PBS	PBS
sRBD-hFn (n=6)	sRBD-hFn 蛋白	sRBD-hFn 蛋白	sRBD-hFn 蛋白

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。

附表 1. 序列列表对应信息

SEQ ID NO:	序列信息	SEQ ID NO:	序列信息
1	RBD 编码序列	9	sRBD-HA2 编码序列
2	RBD 蛋白	10	sRBD-HA2 肽
3	sRBD 编码序列	11	S 蛋白编码序列
4	sRBD 蛋白	12	S 蛋白
5	Fn 编码序列	13	hACE2 编码序列
6	Fn 肽	14	hACE2 肽
7	sRBD-Fn 编码序列		
8	sRBD-Fn 肽		

权 利 要 求

1. 一种针对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的免疫原性肽，其包括 SARS-CoV-2 病毒刺突蛋白 S 的 RBD 区，其中，所述 RBD 区进一步经半胱氨酸修饰形成 sRBD 区。
5 区。
2. 如权利要求 1 所述的免疫原性肽，其中，所述 RBD 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，所述经半胱氨酸修饰的 sRBD 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。
10
3. 如权利要求 1 所述的免疫原性肽，其中，所述 RBD 区或经半胱氨酸修饰的 sRBD 区包含在融合肽中，例如与之融合的部分包括：病毒或宿主来源的蛋白，转铁蛋白(Fn)、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，如所述融合肽的序列如 SEQ ID
15 NO: 8 或 SEQ ID NO: 10 所示。
4. 一种核苷酸分子，其编码如权利要求 1-3 中任一项所述的免疫原性肽。
5. 如权利要求 4 所述的核苷酸分子，其中，所述 RBD 区的编码序列如 SEQ ID
20 NO: 1 所示，所述经半胱氨酸修饰的 RBD 区的编码序列如 SEQ ID NO: 3 所示，或者所述核苷酸分子的序列如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 9 所示。
6. 一种载体，其包含如权利要求 4-5 中任一项所述的核苷酸分子。
- 25 7. 一种宿主细胞，其包含如权利要求 6 所述的载体，且能表达如权利要求 1-3 中任一项所述的免疫原性肽。
8. 一种针对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的疫苗，其包含如权利要求 1-3 中任一项所述的免疫原性肽、如权利要求 4-5 中任一项所述的核苷酸分子、如权利要求
30 6 所述的载体和/或如权利要求 7 所述的宿主细胞。

9. 如权利要求 1-3 中任一项所述的免疫原性肽、如权利要求 4-5 中任一项所述的核苷酸分子、如权利要求 6 所述的载体和/或如权利要求 7 所述的宿主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。

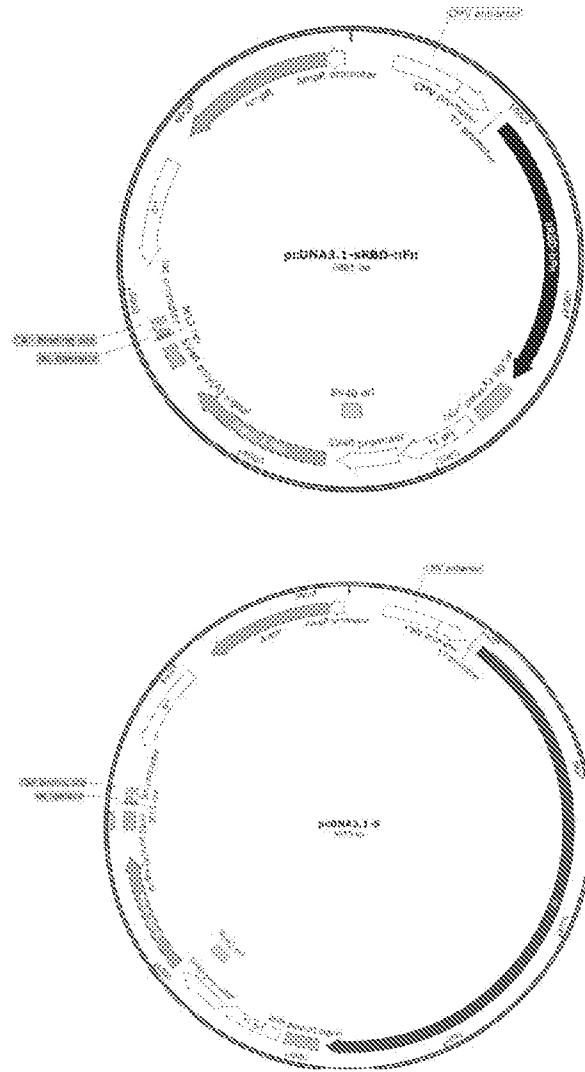
5

10. 一种制备针对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的疫苗的方法,所述方法包括:

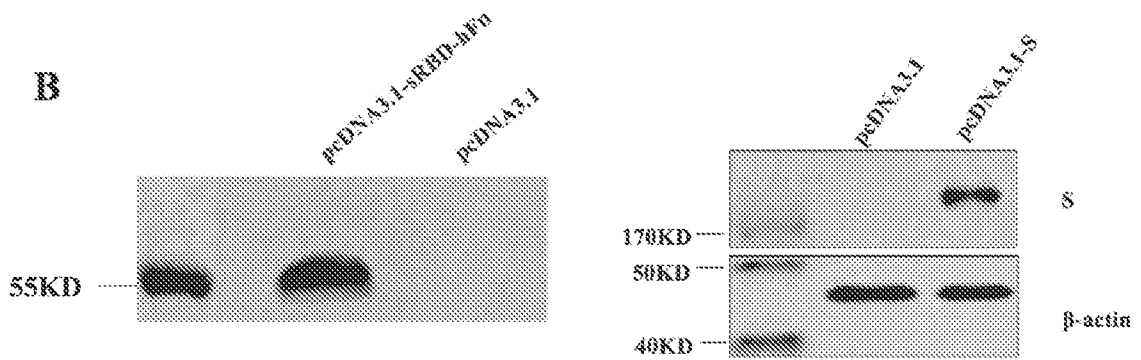
(a) 提供包含如权利要求 1-3 中任一项所述的免疫原性肽、如权利要求 4-5 中任一项所述的核苷酸分子、如权利要求 6 所述的载体和/或如权利要求 7 所述的宿主细胞;

10 (b) 将(a)中所提供的活性物质与免疫学上或药学上可接受的载体组合。

A

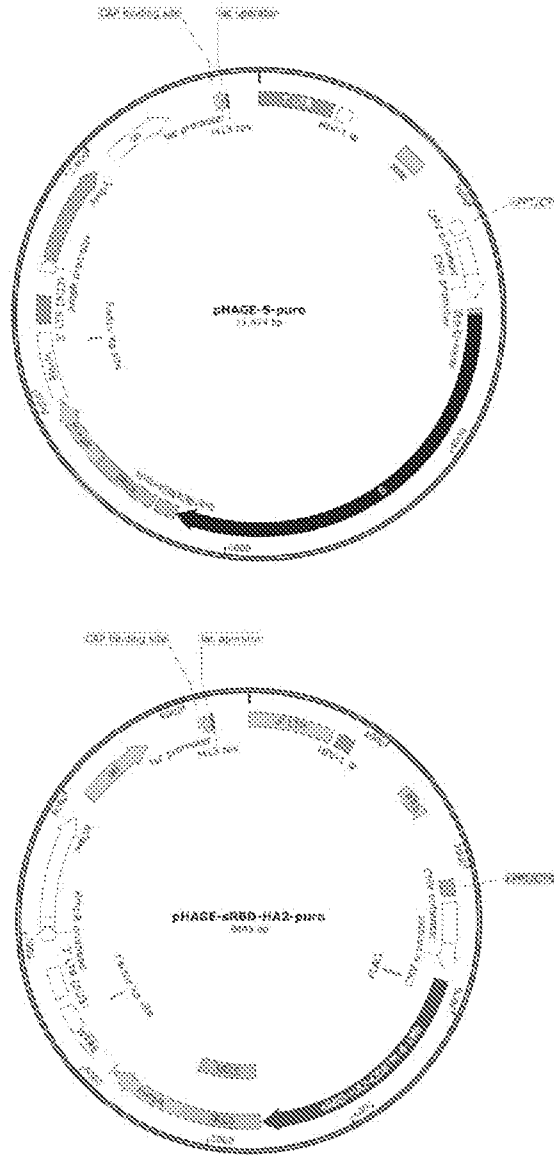


B

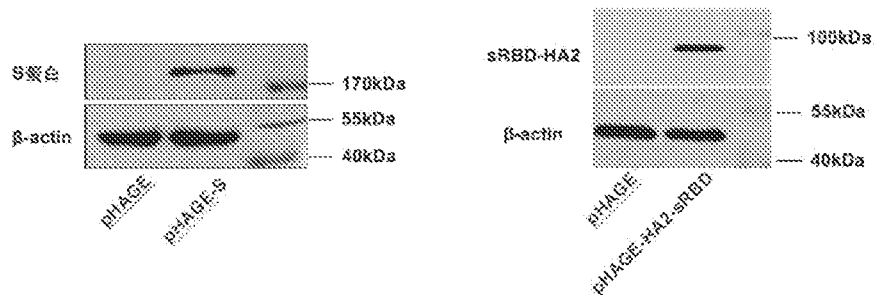


1

A



B



2

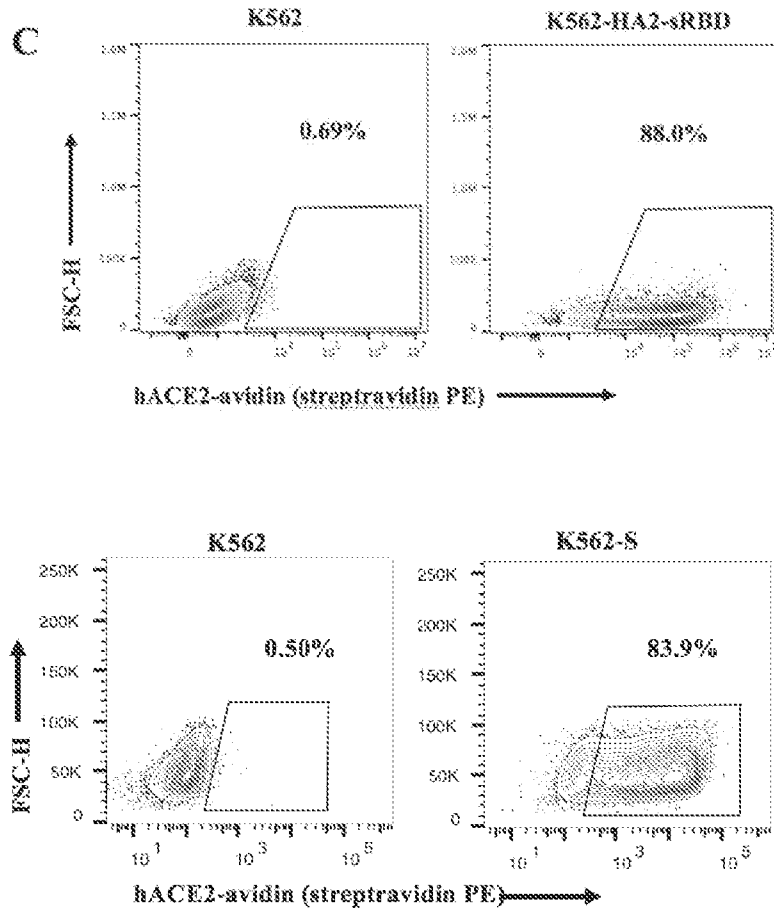
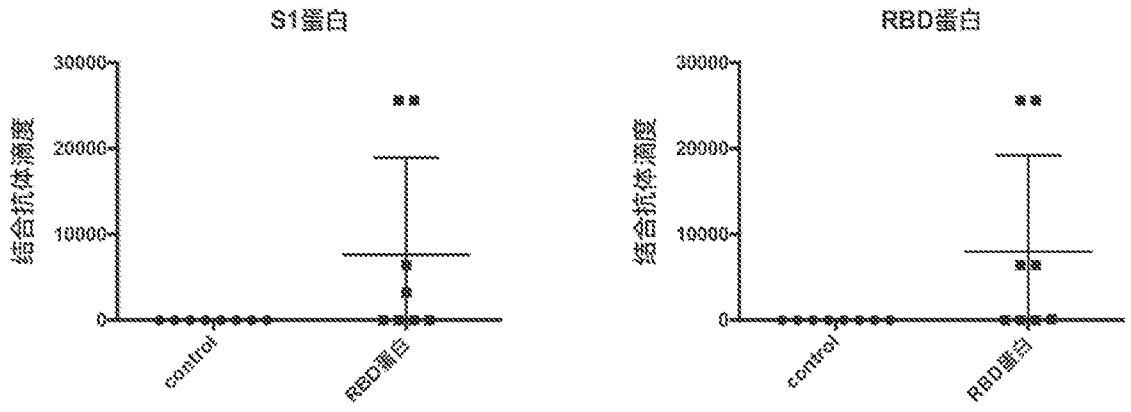
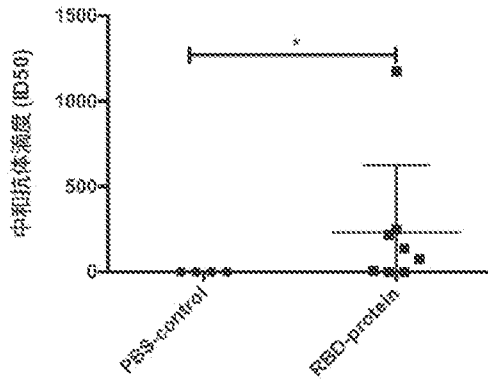


图 2 (续)

A

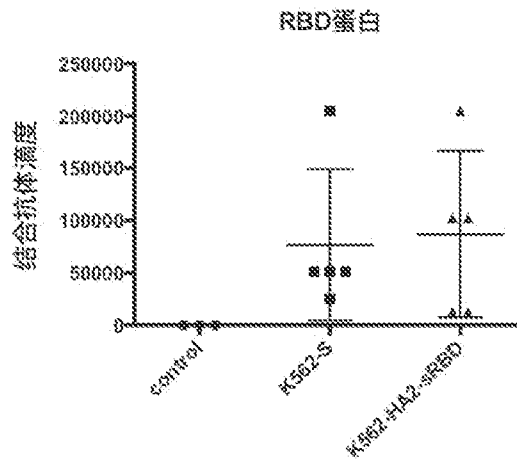


B

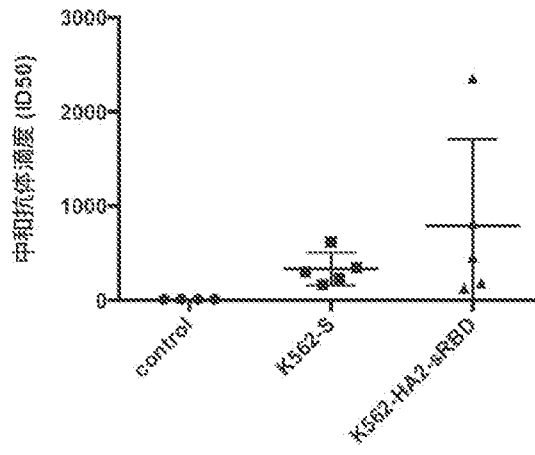


3

A

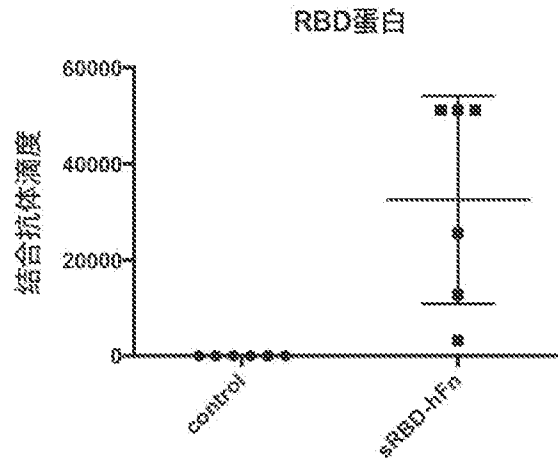


B



■ 5

A



B

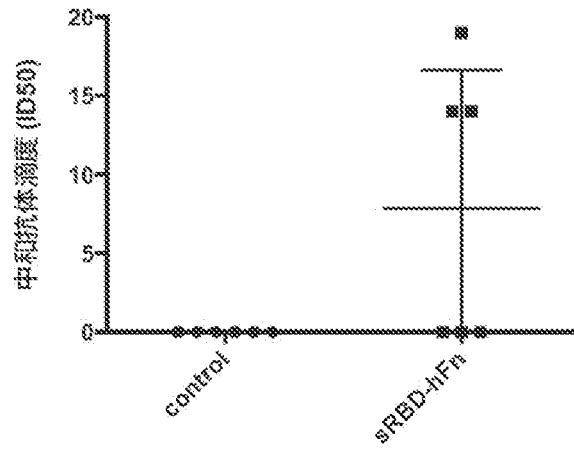


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/096148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/165(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 39/215(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K

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

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

CNABS, DWPI, EPODOC, VEN, ISI Web of Science, Genbank, CNKI, WANFANG: 冠状病毒, 刺突蛋白, 受体识别域, 半胱氨酸, 二硫键, 修饰, 流感病毒, 转铁蛋白, 融合, 免疫原, 中和抗体, applicant/inventor, SARS-COV, COVID-19, Spike protein, RBD, receptor binding, cysteine, disulfide bond, modify, HA2, ferritin, fusion, antigen, neutralizing antibody, SEQ ID NO: 2, 4, 7, 9

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 111217917 A (CANSINO BIOLOGICS INC.) 02 June 2020 (2020-06-02) claims 1-3, 5-12	1, 3, 4, 6-10
Y	CN 103842374 A (NOVARTIS AG) 04 June 2014 (2014-06-04) description paragraphs 68-71	1, 3, 4, 6-10
Y	CN 101848719 A (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND et al.) 29 September 2010 (2010-09-29) claims 1, 12, 17-18, description paragraphs 54,112	1, 3, 4, 6-10
Y	CN 111217919 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 02 June 2020 (2020-06-02) claims 1-5, 11-17	1, 3, 4, 6-10
Y	WO 2007059190 A2 (PSMA DEVELOPMENT COMPANY, LLC) 24 May 2007 (2007-05-24) claims 1, 14, 23, 33-35, 39, 49	1, 3, 4, 6-10
Y	US 2006188519 A1 (CHEUNG, T. et al.) 24 August 2006 (2006-08-24) claims 1, 21-25, description paragraph 64, embodiment 1	1, 3, 4, 6-10

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2021

Date of mailing of the international search report

11 March 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/096148

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106928326 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 07 July 2017 (2017-07-07) entire document	1-10
A	GONZALEZ-REICHE, A.S. et al. "surface glycoprotein, partial [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]" <i>GenBank: QJD25214.1</i> , 23 April 2020 (2020-04-23), entire document	1-10
A	DE TAEYE, S.W. et al. "Stabilization of the V2 loop improves the presentation of V2 loop-associated broadly neutralizing antibody epitopes on HIV-1 envelope trimers" <i>J. Biol. Chem.</i> , Vol. 294, No. 14, 06 February 2019 (2019-02-06), pp. 5616-5631	1-10

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/096148

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111217917	A	02 June 2020	CN	111217917	B	23 October 2020
CN	103842374	A	04 June 2014	EP	2707385	B1	20 September 2017
				DK	2707385	T3	20 November 2017
				WO	2012158613	A1	22 November 2012
				ES	2651143	T3	24 January 2018
				SI	2707385	T1	31 January 2018
				NO	2707385	T3	17 February 2018
				BR	112013029169	A2	19 September 2017
				EP	3275892	B1	08 January 2020
				CY	1119849	T1	27 June 2018
				LT	2707385	T	11 December 2017
				AU	2012255971	A1	02 May 2013
				LT	3275892	T	10 April 2020
				PT	2707385	T	19 December 2017
				US	2018237476	A1	23 August 2018
				PT	3275892	T	08 April 2020
				EP	2707385	A1	19 March 2014
				PL	3275892	T3	07 September 2020
				ES	2782119	T3	10 September 2020
				US	2014248314	A1	04 September 2014
				SI	3275892	T1	30 June 2020
				JP	2014519819	A	21 August 2014
				HU	E048777	T2	28 August 2020
				RS	56748	B1	30 March 2018
				CA	2835644	A1	22 November 2012
				DK	3275892	T3	06 April 2020
				HR	P20171703	T1	15 December 2017
				PL	2707385	T3	30 March 2018
				MX	2013013133	A	20 February 2014
				MX	351011	B	28 September 2017
				RU	2013155485	A	20 June 2015
				EP	3275892	A2	31 January 2018
				SG	194755	A1	30 December 2013
				HU	E034673	T2	28 February 2018
				EP	3275892	A3	14 March 2018
				HR	P20200451	T1	26 June 2020
CN	101848719	A	29 September 2010	CN	101848719	B	23 September 2015
				CA	2691358	A1	31 December 2008
				IL	202450	A	31 May 2015
				JP	2013241432	A	05 December 2013
				AU	2008269081	A1	31 December 2008
				KR	20180021930	A	05 March 2018
				EP	2170365	B1	25 May 2016
				PT	2170365	T	12 July 2016
				KR	20150117303	A	19 October 2015
				US	2014194347	A1	10 July 2014
				ES	2581381	T3	05 September 2016
				KR	20160113331	A	28 September 2016
				BR	PI0813922	A2	09 May 2017
				EA	017957	B1	30 April 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/096148

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		HK 1215037 A1	12 August 2016
		KR 20100056442 A	27 May 2010
		MX 2009013635 A	19 May 2010
		MX 363240 B	15 March 2019
		ZA 200909130 B	29 September 2010
		JP 5450402 B2	26 March 2014
		IL 202450 D0	01 August 2011
		KR 101719135 B1	23 March 2017
		ZA 200909130 A	29 September 2010
		PL 2170365 T3	31 March 2017
		CN 105237629 A	13 January 2016
		EP 2170365 A1	07 April 2010
		CN 105237629 B	18 June 2019
		EA 201070053 A1	30 August 2010
		US 8604165 B2	10 December 2013
		IL 238404 D0	30 June 2015
		HK 1142804 A1	17 December 2010
		JP 5764621 B2	19 August 2015
		JP 2010531362 A	24 September 2010
		DK 2170365 T3	05 September 2016
		KR 101660363 B1	28 September 2016
		EP 2170365 A4	02 May 2012
		US 9353157 B2	31 May 2016
		HU E029921 T2	28 April 2017
		CA 2691358 C	22 August 2017
		US 2010152109 A1	17 June 2010
		WO 2009002516 A1	31 December 2008
		IL 238404 A	30 March 2017

CN	111217919	A	02 June 2020

WO	2007059190	A2	24 May 2007
		AU 2006315500	A1 24 May 2007
		WO 2007059190	A3 23 October 2008
		EP 1948688	A2 30 July 2008
		CA 2629635	A1 24 May 2007
		US 2009311225	A1 17 December 2009

US	2006188519	A1	24 August 2006

CN	106928326	A	07 July 2017
		CN 106928326	B 24 December 2019

A. 主题的分类		
C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/165(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 39/215(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; C12N; A61K		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, DWPI, EPDOC, VEN, ISI Web of Science, Genbank, CNKI, WANFANG:冠状病毒, 刺突蛋白, 受体识别域, 半胱氨酸, 二硫键, 修饰, 流感病毒, 转铁蛋白, 融合, 免疫原, 中和抗体, 申请人/发明人, SARS-COV, COVID-19, Spike protein, RBD, receptor binding, cysteine, disulfide bond, modify, HA2, ferritin, fusion, antigen, neutralizing antibody, SEQ ID NO:2, 4, 7, 9		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 111217917 A (康希诺生物股份公司) 2020年 6月 2日 (2020 - 06 - 02) 权利要求1-3, 5-12	1, 3-4, 6-10
Y	CN 103842374 A (诺华股份有限公司) 2014年 6月 4日 (2014 - 06 - 04) 说明书第68-71段	1, 3-4, 6-10
Y	CN 101848719 A (图兰恩教育基金管理人等) 2010年 9月 29日 (2010 - 09 - 29) 权利要求1, 12, 17-18, 说明书第54, 112段	1, 3-4, 6-10
Y	CN 111217919 A (中山大学) 2020年 6月 2日 (2020 - 06 - 02) 权利要求1-5, 11-17	1, 3-4, 6-10
Y	WO 2007059190 A2 (PSMA DEVELOPMENT COMPANY, LLC) 2007年 5月 24日 (2007 - 05 - 24) 权利要求1, 14, 23, 33-35, 39, 49	1, 3-4, 6-10
Y	US 2006188519 A1 (CHEUNG, T. 等) 2006年 8月 24日 (2006 - 08 - 24) 权利要求1, 21-25, 说明书第64段, 实施例1	1, 3-4, 6-10
A	CN 106928326 A (中国科学院动物研究所 等) 2017年 7月 7日 (2017 - 07 - 07) 全文	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2021年 2月 21日		2021年 3月 11日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		毛颖
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(10)-53961979

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	GONZALEZ-REICHE, A.S. 等. "surface glycoprotein, partial [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]" GenBank: QJD25214.1, 2020年 4月 23日 (2020 - 04 - 23), 全文	1-10
A	DE TAEYE, S.W. 等. "Stabilization of the V2 loop improves the presentation of V2 loop - associated broadly neutralizing antibody epitopes on HIV-1 envelope trimers" J. Biol. Chem., 第294卷, 第14期, 2019年 2月 6日 (2019 - 02 - 06), 第5616 - 5631页	1-10

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/096148

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111217917	A	2020年 6月 2日	CN	111217917	B	2020年 10月 23日
CN	103842374	A	2014年 6月 4日	EP	2707385	B1	2017年 9月 20日
				DK	2707385	T3	2017年 11月 20日
				WO	2012158613	A1	2012年 11月 22日
				ES	2651143	T3	2018年 1月 24日
				SI	2707385	T1	2018年 1月 31日
				NO	2707385	T3	2018年 2月 17日
				BR	112013029169	A2	2017年 9月 19日
				EP	3275892	B1	2020年 1月 8日
				CY	1119849	T1	2018年 6月 27日
				LT	2707385	T	2017年 12月 11日
				AU	2012255971	A1	2013年 5月 2日
				LT	3275892	T	2020年 4月 10日
				PT	2707385	T	2017年 12月 19日
				US	2018237476	A1	2018年 8月 23日
				PT	3275892	T	2020年 4月 8日
				EP	2707385	A1	2014年 3月 19日
				PL	3275892	T3	2020年 9月 7日
				ES	2782119	T3	2020年 9月 10日
				US	2014248314	A1	2014年 9月 4日
				SI	3275892	T1	2020年 6月 30日
				JP	2014519819	A	2014年 8月 21日
				HU	E048777	T2	2020年 8月 28日
				RS	56748	B1	2018年 3月 30日
				CA	2835644	A1	2012年 11月 22日
				DK	3275892	T3	2020年 4月 6日
				HR	P20171703	T1	2017年 12月 15日
				PL	2707385	T3	2018年 3月 30日
				MX	2013013133	A	2014年 2月 20日
				MX	351011	B	2017年 9月 28日
				RU	2013155485	A	2015年 6月 20日
				EP	3275892	A2	2018年 1月 31日
				SG	194755	A1	2013年 12月 30日
				HU	E034673	T2	2018年 2月 28日
				EP	3275892	A3	2018年 3月 14日
				HR	P20200451	T1	2020年 6月 26日
CN	101848719	A	2010年 9月 29日	CN	101848719	B	2015年 9月 23日
				CA	2691358	A1	2008年 12月 31日
				IL	202450	A	2015年 5月 31日
				JP	2013241432	A	2013年 12月 5日
				AU	2008269081	A1	2008年 12月 31日
				KR	20180021930	A	2018年 3月 5日
				EP	2170365	B1	2016年 5月 25日
				PT	2170365	T	2016年 7月 12日
				KR	20150117303	A	2015年 10月 19日
				US	2014194347	A1	2014年 7月 10日
				ES	2581381	T3	2016年 9月 5日
				KR	20160113331	A	2016年 9月 28日
				BR	PI0813922	A2	2017年 5月 9日
				EA	017957	B1	2013年 4月 30日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/096148

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		HK 1215037 A1	2016年 8月 12日
		KR 20100056442 A	2010年 5月 27日
		MX 2009013635 A	2010年 5月 19日
		MX 363240 B	2019年 3月 15日
		ZA 200909130 B	2010年 9月 29日
		JP 5450402 B2	2014年 3月 26日
		IL 202450 D0	2011年 8月 1日
		KR 101719135 B1	2017年 3月 23日
		ZA 200909130 A	2010年 9月 29日
		PL 2170365 T3	2017年 3月 31日
		CN 105237629 A	2016年 1月 13日
		EP 2170365 A1	2010年 4月 7日
		CN 105237629 B	2019年 6月 18日
		EA 201070053 A1	2010年 8月 30日
		US 8604165 B2	2013年 12月 10日
		IL 238404 D0	2015年 6月 30日
		HK 1142804 A1	2010年 12月 17日
		JP 5764621 B2	2015年 8月 19日
		JP 2010531362 A	2010年 9月 24日
		DK 2170365 T3	2016年 9月 5日
		KR 101660363 B1	2016年 9月 28日
		EP 2170365 A4	2012年 5月 2日
		US 9353157 B2	2016年 5月 31日
		HU E029921 T2	2017年 4月 28日
		CA 2691358 C	2017年 8月 22日
		US 2010152109 A1	2010年 6月 17日
		WO 2009002516 A1	2008年 12月 31日
		IL 238404 A	2017年 3月 30日

CN	111217919 A	2020年 6月 2日	无

WO	2007059190 A2	2007年 5月 24日	AU 2006315500 A1 2007年 5月 24日
			WO 2007059190 A3 2008年 10月 23日
			EP 1948688 A2 2008年 7月 30日
			CA 2629635 A1 2007年 5月 24日
			US 2009311225 A1 2009年 12月 17日

US	2006188519 A1	2006年 8月 24日	无

CN	106928326 A	2017年 7月 7日	CN 106928326 B 2019年 12月 24日
