



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116024269 B

(45) 授权公告日 2024.02.02

(21) 申请号 202211443414.2

(22) 申请日 2022.11.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116024269 A

(43) 申请公布日 2023.04.28

(73) 专利权人 复百澳(苏州)生物医药科技有限公司
地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区
星湖街218号B6楼401C单元

(72) 发明人 刘骏 周春艳 金丽 谢伟建
金雨霏 陈雨菲

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470
专利代理师 杨佩佩

(51) Int. Cl.
G12N 15/867 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 47/46 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 112375768 A, 2021.02.19
CN 112760297 A, 2021.05.07

CN 114350711 A, 2022.04.15

US 2021246170 A1, 2021.08.12

WO 2022235678 A1, 2022.11.10

Tarun Mishra et al..SARS CoV-2 Nucleoprotein Enhances the Infectivity of Lentiviral Spike Particles.Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.2021,全文.

Di Genova, C. et al..Production, Titration, Neutralisation, Storage and Lyophilisation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Lentiviral Pseudotypes.Bio-protocol.2021,全文.

Minghai Chen et al..Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review.Int. J. Biol. Sci..2021,全文.

Alexander Thomas Sampson et al..Coronavirus Pseudotypes for All Circulating Human Coronaviruses for Quantification of Cross-Neutralizing Antibody Responses.Viruses.2021,全文.

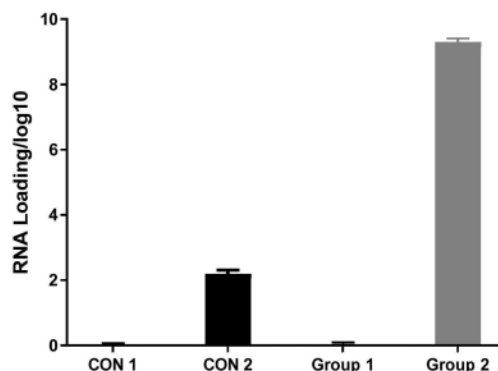
审查员 赵鹏

权利要求书1页 说明书7页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称
一种冠状病毒假病毒颗粒的制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种冠状病毒假病毒颗粒的制备方法,通过构建质粒(1):去除RT和INT基因的逆转录病毒载体,并使用冠状病毒的N蛋白基因序列替换逆转录病毒载体的NC蛋白的基因序列;和质粒(2):表达冠状病毒刺突蛋白和标签蛋白的质粒,进行冠状病毒假病毒颗粒的制备。本发明的制备方法制备的假病毒颗粒可以高效荷载RNA,增强小鼠对SARS-CoV-2-Spike免疫反应,提高抗体产生,具有很好的临床应用前景。



RNA荷载量 /log10	0.0	2.2	0.0	9.3
---------------	-----	-----	-----	-----

1. 一种冠状病毒假病毒颗粒的制备方法,其特征在于,包括质粒构建,所述的质粒包括:

质粒(1):将通用的慢病毒包装系统质粒psPAX2,通过EcoR 1酶切,获得去除了RT基因和INT基因的空载体,获得SEQ ID NO .1并克隆至该载体上SP1基因和SP2基因之间替换NC基因,获得psPAX2-SARS-COV-2-N质粒,即质粒(1);

质粒(2):合成序列5' UTR-SARS-COV-2-Spike-3' UTR,其序列为SEQ ID NO.4-SEQ ID NO.2-SEQ ID NO.5,克隆构建至pCDNA3.1载体CMV启动子后,即质粒(2)。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,还包括转染细胞,所述的细胞为293T细胞。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,转染细胞的质粒为混合转染质粒,所述的混合转染质粒中包括质粒(1)、质粒(2)和pMD2.G。

4. 权利要求1-3任一项所述的制备方法制备得到的假病毒颗粒。

5. 权利要求4所述的假病毒颗粒在制备治疗和/或预防冠状病毒的药物中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的药物为疫苗。

7. 权利要求4所述的假病毒颗粒在制备冠状病毒的抗原检测质控品中的应用。

8. 包括权利要求4所述的假病毒颗粒的药物。

9. 包括权利要求4所述的假病毒颗粒的抗原检测质控品。

一种冠状病毒假病毒颗粒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种冠状病毒假病毒颗粒的制备方法。

背景技术

[0002] 冠状病毒直径约80-120nm,基因组5'端具有甲基化的帽状结构,3'端具有poly(A)尾,基因组全长约27-32kb,是已知RNA病毒中基因组最大的病毒。冠状病毒粒子外有脂肪膜,膜表面一般有三种糖蛋白:刺突蛋白(S,Spike Protein,是受体结合位点、溶细胞作用和主要抗原位点);包膜蛋白(E,Envelope Protein,较小,与包膜结合的蛋白);膜蛋白(M,Membrane Protein,负责营养物质的跨膜运输、新生病毒出芽释放与病毒外包膜的形成)。少数种类还有血凝素糖蛋白(HE蛋白,Haemagglutinin-esterase)。冠状病毒的核酸为非节段单链(+)RNA,长27-31kb,是RNA病毒中最长的RNA核酸链,具有正链RNA特有的重要结构特征:即RNA链5'端有甲基化“帽子”,3'端有PolyA“尾巴”结构。这一结构与真核mRNA非常相似,也是其基因组RNA自身可以发挥翻译模板作用的重要结构基础。

[0003] 新冠病毒基因组全长约29.9kb,该病毒含有四种主要的结构蛋白,除膜表面的三种糖蛋白外,还包括核衣壳蛋白(Nucleocapsid,N蛋白)。S蛋白是冠状病毒非常重要的表面蛋白,与病毒的传染能力密切相关,S蛋白包含S1、S2和受体结合域(RBD),N蛋白在冠状病毒中含量丰富,是一种高度免疫原性蛋白且相对保守,突变率较低,N蛋白从受感染的细胞中释放出来后会自由漂浮。自由漂浮的蛋白引起强烈的免疫反应,导致保护性抗体的产生,N蛋白也是冠状病毒的抗原检测的靶蛋白之一。

[0004] 目前,针对冠状病毒开发的疫苗主要包括灭活疫苗、腺病毒载体疫苗、减毒流感疫苗、重组蛋白疫苗以及核酸疫苗等。除了灭活疫苗外,其余都是针对S蛋白进行免疫的。由于该病毒从开始至今一直处于不断突变的过程中,单一毒株疫苗对其保护效率较低。已有报道,基于慢病毒载体系统通过替换其ENV蛋白构建病毒样颗粒(Virus Like particles,VLP)用于疫苗制备和基因递送等方向的应用(Virus-like particles preparation,immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers)。

[0005] 申请号为CN202210120315的专利中公开了用于预防SARS-CoV-2奥密克戎株的腺病毒载体疫苗。采用密码子偏好性进行优化得到新的S基因序列,其能高效在人源细胞内高效表达,免疫机体后可高效表达S抗原,产生针对奥密克戎株SARS-CoV-2的中和抗体,可以有效保护机体免受奥密克戎株的侵袭。但其针对性较强,因此实际应用受限。

[0006] 申请号为CN201080020498的专利中公开了非整合型、非复制型逆转录病毒载体,当向动物宿主施用时在宿主中引起免疫反应。载体转导宿主中的细胞,在那里它们产生病毒样颗粒(VLP),所述病毒样颗粒在从细胞释放时在宿主中刺激另外的免疫反应。载体是非整合型、非复制型逆转录病毒载体,包括长末端重复序列、包装序列和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。还公开了制造和使用所述载体的方法。但其主要针对的是HIV疫苗,该方法针对冠状病毒特别是SARS-CoV-2的应用仍需要进一步改进。

发明内容

[0007] 为了解决上述问题,本发明基于二代慢病毒载体系统,分别对psPAX2、pMGD2.0系统质粒进行改造,并使用真核表达载体替代病毒表达载体,制备了一种新型病毒样颗粒。

[0008] 本发明中,“HA标签”是一段来源于人流感病毒血凝素(HA)蛋白第98-106位氨基酸的短序列,分子量为1.1KDa,是目前广泛应用的表位标签之一。

[0009] 一方面,本发明提供了一种冠状病毒假病毒颗粒的制备方法。

[0010] 所述的制备方法中包括质粒构建,所述的质粒包括:

[0011] 质粒(1)、去除RT基因和INT基因的逆转录病毒载体,并使用冠状病毒的N蛋白基因序列替换逆转录病毒载体的NC蛋白的基因序列;

[0012] 和质粒(2)、表达冠状病毒刺突蛋白和标签蛋白的质粒。

[0013] 所述的标签蛋白为HA。

[0014] 所述的质粒(2)上还包括冠状病毒的5' UTR和3' UTR序列。

[0015] 优选地,所述的逆转录病毒载体为慢病毒载体。

[0016] 进一步优选地,所述的慢病毒载体为慢病毒包装系统质粒psPAX2。

[0017] 优选地,所述的冠状病毒为SARS-COV-2。

[0018] 进一步优选地,所述的N蛋白基因序列为SEQ ID NO.1。

[0019] 所述的的N蛋白基因序列与检测标签6×His融合。

[0020] 在一些具体的实施例中,所述的质粒(1)的构建方法为:将通用的慢病毒包装系统质粒psPAX2,通过EcoR 1酶切,获得去除了RT基因和INT基因的空载体,通过基因合成的方法获得SEQ ID NO.1并克隆至该载体上,获得psPAX2-SARS-COV-2-N质粒,即质粒(1)。

[0021] 所述的EcoR 1酶切位置为382bp和4752bp处。

[0022] 优选地,所述的质粒(2)表达冠状病毒刺突蛋白的基因序列为:SEQ ID NO.2。

[0023] 优选地,所述的质粒(2)标签蛋白的基因序列为:SEQ ID NO.3。

[0024] 优选地,所述的质粒(2)的载体骨架为pCDNA3.1载体。

[0025] 优选地,所述的质粒(2)的5' UTR序列为SEQ ID NO.4,3' UTR序列为SEQ ID NO.5。

[0026] 具体地,所述的制备方法目的在于制备冠状病毒假病毒颗粒,因此还包括转染细胞。

[0027] 优选地,所述的细胞为293T细胞。

[0028] 优选的,转染细胞的质粒为混合转染质粒,所述的混合转染质粒中包括质粒(1)、质粒(2)和pMD2.G。

[0029] 本发明基于二代慢病毒载体系统,使用SARS-COV-2-N替换psPAX2质粒的NC蛋白的基因序列,同时去除了整合酶和逆转录酶的部分序列,构建了VLP的骨架结构蛋白表达载体psPAX2-SARS-COV-2-N,结构示意图如图2,其中psPAX2系统质粒包括NC蛋白,SARS-COV-2-N为新冠病毒核蛋白基因序列。

[0030] 本发明基于pCDNA3.1载体构建了pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike-HA的表达质粒,用于转录出可以被荷载的mRNA及翻译出被递呈与VLP表面新冠病毒刺突蛋白(SARS-COV-2-Spike)同时C端融合标签蛋白HA。设计结构如图3。

[0031] 本发明假病毒颗粒具体的制备流程如图4。

[0032] 本发明的假病毒颗粒上含有SARS-COV-2-N氨基酸序列SEQ ID NO.6和SARS-COV-

2-Spike氨基酸序列SEQ ID NO.7。

[0033] 另一方面,本发明提供了前述的制备方法制备得到的假病毒颗粒。

[0034] 本发明提供的新型病毒样颗粒具有以下结构特点:

[0035] (1) 病毒囊膜上同时含有新冠病毒Spike蛋白和水泡型口炎病毒糖黏蛋白VSV-G;
(2) 病毒囊膜包裹有新冠病毒结构蛋白N,并通过其荷载SARS-COV-2-Spike的mRNA;(3)
SARS-COV-2-Spike基因前后含有5' UTR和3' UTR。

[0036] 本发明构建的假病毒颗粒结构示意图如图1。

[0037] 再一方面,本发明提供了前述的假病毒颗粒在基因递送中的应用。

[0038] 优选地,所述的基因递送为RNA递送。

[0039] 所述的RNA可以为核酸药物。

[0040] 又一方面,本发明提供了前述的假病毒颗粒在制备治疗和/或预防冠状病毒的药物中的应用。

[0041] 优选地,所述的药物为疫苗。

[0042] 进一步优选地,所述的疫苗为SARS-COV-2疫苗。

[0043] 又一方面,本发明提供了前述的假病毒颗粒在制备抗原检测质控品中的应用。

[0044] 优选地,所述的抗原检测质控品为冠状病毒的抗原检测质控品。

[0045] 进一步优选地,所述的冠状病毒为SARS-COV-2。

[0046] 又一方面,本发明提供了包括前述的假病毒颗粒的药物。

[0047] 优选地,所述的药物为疫苗。

[0048] 进一步优选地,所述的疫苗为SARS-COV-2疫苗。

[0049] 又一方面,本发明提供了包括前述的假病毒颗粒的抗原检测质控品。

[0050] 优选地,所述的抗原检测质控品为冠状病毒的抗原检测质控品。

[0051] 进一步优选地,所述的冠状病毒为SARS-COV-2。

[0052] 本发明的有益效果:

[0053] (1) 和新冠病毒灭活疫苗和蛋白疫苗相比,通过在VLP囊膜上表达spike蛋白,具有更好的结构完整性和构象一致性,能更好的模拟病毒进入机体后引起的免疫应答。

[0054] (2) 所获得的VLP通过VSV-G和SARS-COV-2-Spike分别和LDL及ACE2受体结合,介导病毒进入细胞内,实现SARS-COV-2-Spike mRNA的细胞内递送,再翻译成SARS-COV-2-Spike蛋白展示于细胞表面,刺激机体进一步产生免疫应答,实现mRNA疫苗的作用。

[0055] (3) 所获得的VLP同时含有刺突蛋白(Spike protein,S蛋白)和核衣壳蛋白(Nucleocapsid,N蛋白)获得双重免疫作用。

[0056] (4) 所获得的VLP颗粒同时具备蛋白免疫、mRNA免疫等多重功能。

[0057] (5) 所获得的VLP可以通过ENV蛋白实现靶向递送mRNA。

[0058] (6) 所获得的VLP实行递送功能时,不具有基因组整合等安全风险。

附图说明

[0059] 图1为本发明构建的假病毒颗粒结构示意图。

[0060] 图2为psPAX2-SARS-COV-2-N设计结构。

[0061] 图3为pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike相关质粒设计结构。

- [0062] 图4为本发明假病毒颗粒具体的制备流程。
- [0063] 图5为psPAX2-SARS-COV-2-N、pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike相关质粒电泳结果。
- [0064] 图6为QPCR方法对病毒所荷载的RNA进行相对定量结果。
- [0065] 图7为WB检测VLP相关结构蛋白的表达结果。
- [0066] 图8为VLP细胞内RNA的递送效率。
- [0067] 图9为免疫后小鼠血清效价ELISA测定结果。

具体实施方式

[0068] 下面结合具体实施例,对本发明作进一步详细的阐述,下述实施例不用于限制本发明,仅用于说明本发明。以下实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0069] 逆转录病毒载体主要特征之一是在两端具有长的同向末端重复序列(Long terminal repeat,LTR),LTR反转录转座子的典型结构包括GAG(病毒颗粒结构蛋白类似物)和POL区段,其中POL区段包括逆转录酶基因(RT)和DDE整合酶基因(INT)。

[0070] 所述的“FBS”指胎牛血清,是一种浅黄色澄清、无溶血、无异物稍粘稠液体,血清中所含的抗体、补体等对细胞有害的成分较少,含有丰富的细胞生长必须的营养成份,常用于动物细胞的体外培养。

[0071] “DMEM培养基”是一种含各种氨基酸和葡萄糖的培养基,是在MEM培养基的基础上研制的,为本领域常用的培养基。

[0072] “PEI”指聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine,PEI),又称聚氮杂环丙烷,是一种水溶性高分子聚合物,多用于生物学实验中的转染。

[0073] “OMEM”指Opti MEM培养基,该培养基中无血清,不含大量蛋白组分,不干扰DNA与转染试剂形成复合物。OMEM有利于细胞恢复健康状态,为本领域常用的转染用培养基。

[0074] “BCA定量”是一种蛋白定量方法,BCA(bicinchoninic acid)与二价铜离子的硫酸铜等其他试剂组成的试剂,混合一起即成为苹果绿,即BCA工作试剂。在碱性条件下,BCA与蛋白质结合时,蛋白质将 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+} ,一个 Cu^{+} 螯合二个BCA分子,工作试剂由原来的苹果绿形成紫色复合物,562nm处有最高的吸收值,可在540-595nm测定其吸收值,颜色的深浅与蛋白质浓度成正比,与标准曲线对比,即可计算待测蛋白的浓度。

[0075] 实施例1病毒制备相关质粒构建

[0076] (1)全基因合成的方法获得以下基因序列。

编号	合成序列名称	序列说明
[0077]	1 GAG/POL-SA RS-COV-2-N	序列包括了 psPAX2 质粒中的 GAG 和 POL 序列, 但缺失了 NC、RT 和 INT 部分, NC 部分的序列位置插入了新冠病毒 N 蛋白密码子优化后核苷酸序列, 同时 N 蛋白融合了检测标签 6×His。即 SEQ ID NO.1。
	2 5'UTR-SARS-	序列包括了 SARS-COV-2 的 5'UTR (SEQ ID
[0078]	COV-2-Spike- 3'UTR	NO.4)、SARS-COV-2-Spike 密码子优化后的核苷酸序列并融合了 HA 标签蛋白的核苷酸序列 (SEQ ID NO.2)、SARS-COV-2 的 NSP15 部分核苷酸序列和 SARS-COV-2 的 3'UTR 序列 (SEQ ID NO.5)。

[0079] (2) 将通用的慢病毒包装系统质粒 psPAX2 (Addgene#12259), 通过 EcoR1 酶切 (载体上位置为 382bp 和 4752bp 处), 获得去除了 RT 基因和 INT 基因的空载体, 通过基因合成的方法获得 SEQ ID NO.1 并克隆至该载体上, 获得 psPAX2-SARS-COV-2-N 质粒。

[0080] (3) 通过基因合成的方式获得 SARS-COV-2-Spike 相关序列 (编号 2) 并克隆构建至 pCDNA3.1 载体, 命名为: pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike。

[0081] 并通过琼脂糖凝胶电泳和质粒一代测序进行序列验证。

[0082] psPAX2-SARS-COV-2-N 和 pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike 的电泳结果如图 5。

[0083] 实施例 2 病毒样颗粒包装实验

[0084] (1) 转染前, 显微镜下观察 293T 细胞的状态, 确定细胞状态良好、密度 90% 左右, 无污染;

[0085] (2) 每盘细胞更换 10mL 含 2% FBS 的 DMEM 培养基;

[0086] (3) 实验分组及转染体如下:

实验分组	质粒 1 (μg/盘)		质粒 2 (μg/盘)		质粒 3 (μg/盘)	
[0087] CON 1	psPAX2	2.5 μg	pMD2.G	2.5 μg	pCDNA3.1-SAR S-COV-2-Spike	0 μg
CON 2	psPAX2	2.5 μg	pMD2.G	2.5 μg	pCDNA3.1-SAR S-COV-2-Spike	5 μg
Group 1	psPAX2-SAR S-COV-2-N	2.5 μg	pMD2.G	2.5 μg	pCDNA3.1-SAR S-COV-2-Spike	0 μg
Group 2	psPAX2-SAR S-COV-2-N	2.5 μg	pMD2.G	2.5 μg	pCDNA3.1-SAR S-COV-2-Spike	5 μg

[0088] (4) 各组分别操作:加入转染试剂1×PEI 30 μ L/盘,混合转染质粒加入到含500 μ L MEM的EP管中,室温静置15min;

[0089] (5) 将转染体系分别缓慢滴加至细胞培养皿中,保持培养皿水平,晃动培养皿,使得转染复合物均匀分布于细胞表面;

[0090] (6) 转染后8h,每盘细胞更换10mL含2% FBS的DMEM培养基;

[0091] (7) 转染后48h收集细胞上清液,该上清液中已经含对应的病毒样颗粒;

[0092] (8) 上清液按照500 μ L/组留样进行病毒样颗粒RNA荷载量检测;

[0093] (9) 按照50,000g/min×3H,进行超速离心;

[0094] (10) 用PBS重悬离心后沉淀,过滤除菌,冻存-80℃冰箱。

[0095] 实施例3病毒样颗粒RNA荷载量检测

[0096] (1) 使用病毒RNA提取试剂盒(Beaverbio,Cat.NO.70406)进行病毒上清液的中RNA的提取,提取实验按照实验说明书执行;

[0097] (2) 病毒RNA提取后使用一步法QPCR检测试剂盒(诺唯赞,HiScript IIOne Step qRT-PCR SYBR Green Kit,货号:Q221-01)进行QPCR检测,该试剂盒可以同时完成RT-PCR将RNA反转成cDNA和QPCR实时定量检测。

[0098] (3) QPCR反应体系配制如下:

组分	体积 (μ L)
Yeasen SYBR Green Master Mix	10
Forward Primer (10 μ M)	0.4
Reverse Primer (10 μ M)	0.4
模板	2
ddH ₂ O	7.2

[0100] QPCR的引物序列信息

[0101]	基因名称:spike
	Forward-primer:SEQ ID NO.8
	Reverse-primer:SEQ ID NO.9

[0102] 通过QPCR方法对病毒所荷载的RNA进行相对定量,结果显示,Group 2即psPAX2-SARS-COV-2-N、pMD2.G和pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike所制备的VLP含量较其他组别,可以高效荷载RNA。结果见图6。

[0103] 实施例4病毒样颗粒相关蛋白检测

[0104] (1) 按照浓度为沉积胶5%,分离胶10%进行配制SDS-PAGE用胶;

[0105] (2) 将不同来源的VLP经过BCA定量,按照10 μ g/孔取样与6×SDS上样缓冲液混合;

[0106] (3) 金属浴,100℃热变性处理5min;

[0107] (4) 上样电泳,浓缩胶电泳电压为120V,分离胶电泳电压调200V,当指示剂溴酚蓝跑至距凝胶下缘约0.5cm处时,结束电泳;

[0108] (5) 常规转膜、封闭、一抗孵育,洗脱,二抗孵育,洗脱和显影。

[0109] WB(Western Blot)检测VLP相关结构蛋白的表达结果见图7。

[0110] 实施例5VLP感染细胞

[0111] (1) 实验前24H,接种293T-ACE2细胞于24孔板中,约 1×10^5 个/孔,500 μ L/孔,于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂条件下培养;

[0112] (2) 实验前在显微镜下,对实验用细胞进行观察,确定细胞饱满、分部均匀、无污染后再进行后续实验;

[0113] (3) 根据病毒核酸检测的拷贝数,按照MOI=10将所获得的病毒样颗粒感染24孔板中293T细胞,三个复孔,同时设置一组无病毒样颗粒侵染的空细胞作为对照;

[0114] (4) 24H后收取细胞总RNA,通过QPCR检测外源基因的含量。

[0115] 收集细胞Total RNA通过QPCR的方法检测VLP细胞内RNA的递送效率,结果(见图8)显示,通过Group 2即psPAX2-SARS-COV-2-N、pMD2.G和pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike所获得VLP可以实现细胞内的RNA递送。

[0116] 实施例6小鼠免疫和抗体检测

[0117] (1) 将不同来源(实施例2的不同组别)的VLP经过BCA定量作为抗原,用生理盐水将抗原稀释到2倍最终浓度(按每针次10 μ g/50 μ L用量配制);

[0118] (2) 无菌条件下取出所需用量混匀佐剂(按每针次50 μ L,复百澳生物,货号:FBC2591)与抗原按体积比1:1迅速混匀;

[0119] (3) 通过后腿小腿肌肉注射免疫小鼠,每只小鼠注射100 μ L;

[0120] (4) 第14天按同样方式加强免疫一针;

[0121] (5) 第21天眼眶取血进行ELISA测定。

[0122] 经免疫后小鼠血清效价ELISA测定结果(图9)显示,通过Group 2即psPAX2-SARS-COV-2-N、pMD2.G和pCDNA3.1-SARS-COV-2-Spike所获得VLP可以增强小鼠对SARS-CoV-2-Spike免疫反应,提高抗体产生。

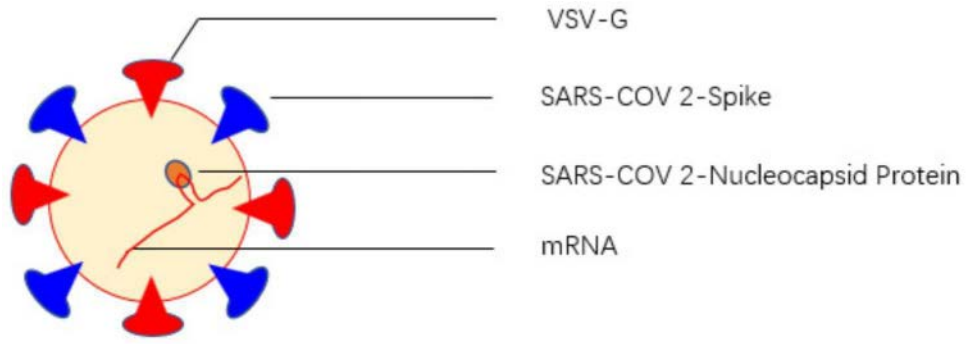


图1

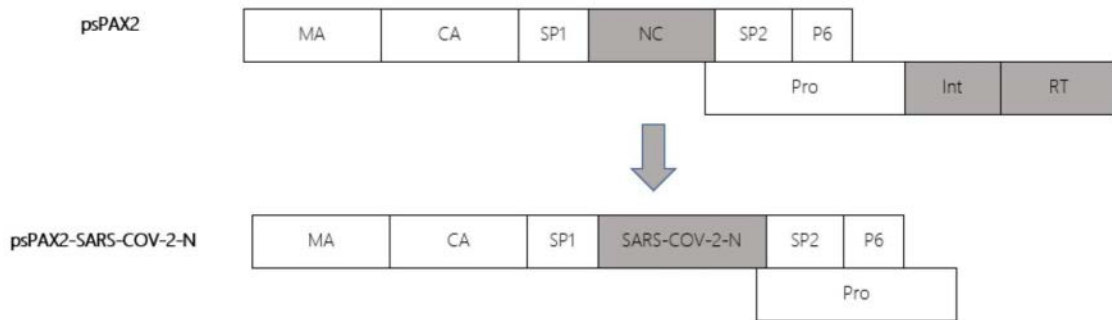


图2



图3



图4

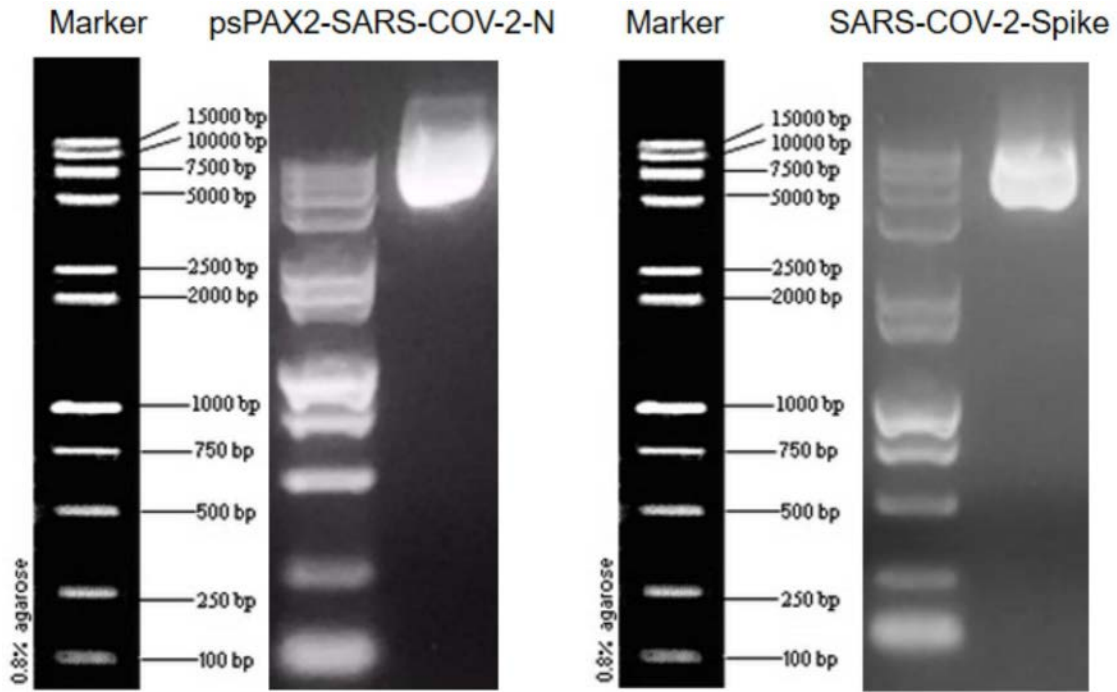


图5

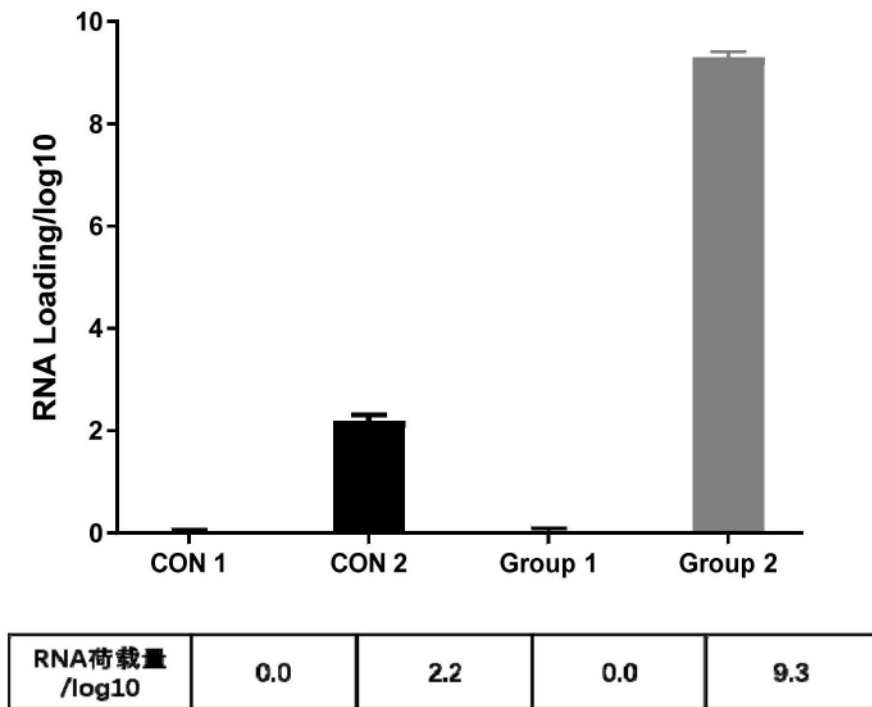


图6

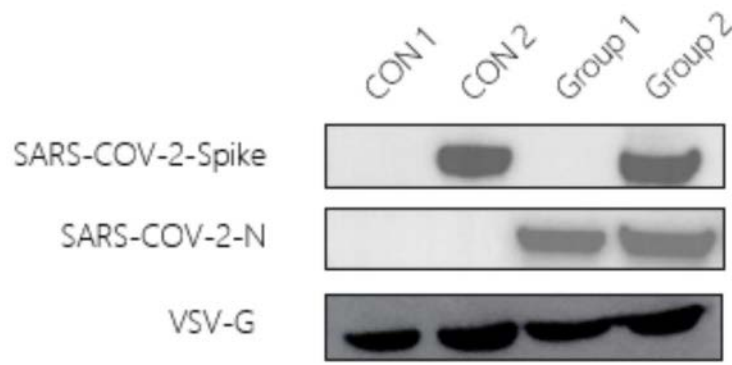


图7

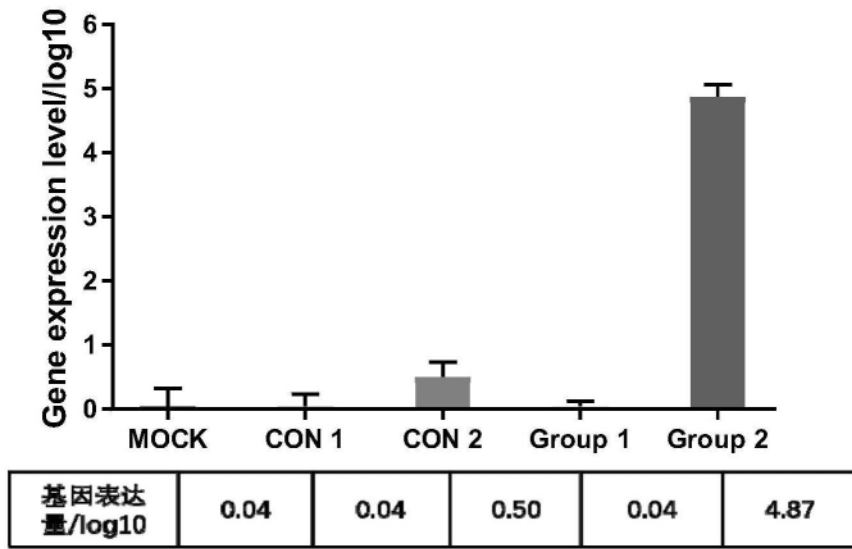


图8

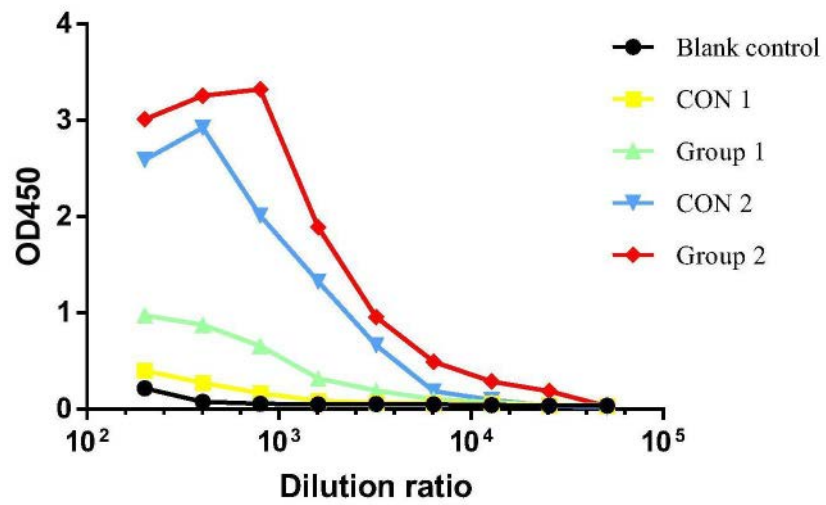


图9