



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111607002 A

(43)申请公布日 2020.09.01

(21)申请号 202010113700.7

A61P 31/14(2006.01)

(22)申请日 2020.02.24

(71)申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

(72)发明人 张辉 马显才 邹帆 袁耀昌
李镭 张旭

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 孙凤侠

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

A61K 39/215(2006.01)

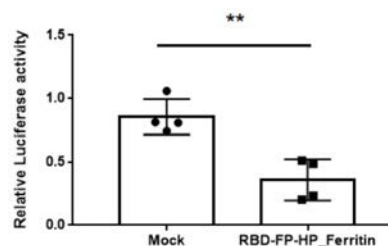
权利要求书2页 说明书8页
序列表7页 附图4页

(54)发明名称

一种基于幽门螺旋杆菌铁蛋白的新型冠状病毒病毒S蛋白双区域亚单位纳米疫苗

(57)摘要

本发明公开了一种基于幽门螺旋杆菌铁蛋白的新型冠状病毒S蛋白双区域亚单位纳米疫苗。本发明以病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)和融合肽(Fusion peptide,FP)共同作为双抗原,并与幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(HP_Ferritin)连接组成融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin,实现抗原多聚化;再利用真核细胞表达系统表达,可通过HP_Ferritin自组装作用形成二十四聚体纳米抗原。该方案可克服RBD单体免疫原性不足的缺点,所得疫苗能显著提高宿主针对病毒的中和抗体的水平,产生的抗体具有强力阻挡病毒入侵靶细胞的能力。而且本发明疫苗制备方法简单、易于纯化,安全性高,疫苗可较快的应用于临床试验。



1. 一种提高抗原免疫原性的方法,其特征在于,所述方法将病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)和融合肽(Fusion peptide,FP)共同作为双抗原,经过融合后作为抗原使用。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,是将病毒的受体结合域RBD和融合肽FP,与幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin(HP))组成一个新的融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin后作为抗原。

3. 根据权利要求1或2所述方法,其特征在于,所述抗原为冠状病毒抗原,所述病毒的受体结合域RBD和融合肽FP为冠状病毒的受体结合域RBD和融合肽FP。

4. 根据权利要求3所述方法,其特征在于,所述冠状病毒抗原为新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原,所述冠状病毒的受体结合域RBD和融合肽FP为新型冠状病毒SARS-CoV-2的受体结合域RBD和融合肽FP。

5. 根据权利要求4所述方法,其特征在于,所述新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原为新型冠状病毒SARS-CoV-2的表面刺突蛋白(S蛋白)抗原。

6. 根据权利要求5所述方法,其特征在于,新型冠状病毒SARS-CoV-2的RBD的序列如SEQ ID NO:1所示,FP的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,SEQ ID NO:1与SEQ ID NO:2可以直接连接,或两者以铰链区Linker相连构成一个新的融和蛋白RBD-FP;优选地,当所述Linker为GGSGGSGGSGGSGGG时所得融和蛋白RBD-FP的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

7. 根据权利要求6所述方法,其特征在于,所述Ferritin(HP)的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:4可以直接连接,或两者以铰链区Linker相连构成一个新的融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin;优选地,当所述Linker为GSG时所得融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

8. 根据权利要求1-7任一所述方法,其特征在于,融和蛋白再加上信号肽及纯化标签后,利用真核表达系统表达出抗原;优选地,所述信号肽为分泌型信号肽(Signal peptide,SP);优选地,所述纯化标签为His标签(His-tag);优选地,新型冠状病毒SARS-CoV-2的SP、His-tag、RBD与FP融合的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

9. 根据权利要求8所述方法,其特征在于,所述SEQ ID NO:4与SEQ ID NO:6所示序列可以直接连接,或两者以铰链区Linker相连构成一个新的融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin;优选地,当所述Linker为GSG时所得融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

10. 一种免疫原性提高的冠状病毒抗原,其特征在于,依据权利要求1-9任一所述方法构建得到的新的融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin。

11. 根据权利要求10所述冠状病毒抗原,其特征在于,新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原(融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin)的氨基酸序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7所示。

12. 权利要求10或11所述冠状病毒抗原在制备抗冠状病毒药物方面的应用。

13. 根据权利要求12所述的应用,其特征在于,所述应用是将所述冠状病毒抗原与SAS佐剂合用。

14. 根据权利要求12或13所述的应用,其特征在于,所述应用是用于制备试剂盒;所述试剂盒中含有所述抗原,或者编码所述抗原的DNA分子,或者表达所述抗原的重组载体/表达盒/转基因细胞系/重组菌。

15. 一种表达权利要求10或11所述抗原的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌。

16. 一种冠状病毒疫苗,其特征在於,以权利要求10或11所述冠状病毒抗原为抗原制备而成。

17. 权利要求10或11所述抗原的制备方法,其特征在於,在SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:4直接串联或铰链串联所示氨基酸对应的核苷酸序列、SEQ ID NO:6与SEQ ID NO:4直接串联或铰链串联所示氨基酸对应的核苷酸序列、SEQ ID NO:5所示氨基酸对应的核苷酸序列、或SEQ ID NO:7所示氨基酸对应的核苷酸序列的3'端加上翻译终止密码子,进行克隆表达,筛选正确的重组子,然后转染真核表达系统进行表达,表达后收集细胞上清,纯化,即得到冠状病毒抗原。

18. 编码表达权利要求10或11所述抗原的核苷酸序列,或包含该序列的载体或转基因细胞系。

一种基于幽门螺旋杆菌铁蛋白的新型冠状病毒S蛋白双区域亚单位纳米疫苗

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域。更具体地,涉及一种基于幽门螺旋杆菌铁蛋白的新型冠状病毒(暂定名称SARS-CoV-2,又名2019-nCoV)S蛋白双区域亚单位纳米疫苗。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒(暂定命名为SARS-CoV-2,又名2019-nCoV)引起的肺炎,临床表现与病毒性肺炎极为相似;主要临床表现为发热、疲乏、干咳等,严重者可发生休克、脓毒症、呼吸衰竭而死亡。由于目前新型冠状病毒肺炎的病毒来源、发病机制等尚不明确,并且缺乏特效抗病毒药物,为临床诊治和控制疫情带来极大困难。

[0003] 目前,人类仍缺乏有效的抗SARS-CoV-2的疫苗,在这种严峻的形势下,尽快开发安全、有效的针对SARS-CoV-2的疫苗用以保护易感人群,对于我国的人民健康与国家安全具有重要意义。

[0004] 对于疫苗的研发,就必须先要了解病毒的结构。冠状病毒是一类具有包膜的单正链RNA病毒,能够在人和其他哺乳动物以及鸟类中广泛存在,并导致呼吸、消化、肝脏和神经系统等类型的疾病。在本次疫情发生以前,目前已知有6种冠状病毒可以引发人类疾病。其中,四种229E,OC43,NL63和HKU1基本上只会导致免疫缺陷的人引起普通感冒症状,而另外两种就是我们熟知的SARS-CoV和MERS-CoV,会引发严重的传染性疾病。冠状病毒5'端的单链阳性RNA基因组的长度介于26.2和31.7kb之间,是所有RNA病毒中最长的。其基因组有六到十个开放的读码框(ORF)。第一个ORF包含基因组的三分之二,并编码复制酶蛋白质,而最后三分之一含有固定顺序的结构蛋白基因:(HE)-S-E-M-N。在这些基因之间存在着编码辅助蛋白的多个ORF。基因组被包装成螺旋状的核衣壳,核衣壳被宿主来源的脂质双层所包围。这个病毒膜至少含有三种病毒蛋白,即刺突蛋白(S)和膜蛋白(M)以及包膜蛋白(E)。

[0005] 其中,M和E蛋白主要参与病毒的组装,而S蛋白介导了病毒与宿主细胞膜上的受体结合并与宿主细胞膜相融合。因此,S蛋白在病毒的组织嗜性、细胞融合和毒力等方面起重要作用,是冠状病毒的主要中和抗原。MERS-CoV、SARS-CoV S蛋白的受体结合区(Receptor Binding Domain,RBD)被认为是诱导机体产生中和抗体的最主要的抗原靶区域。RBD作为疫苗能够将机体刺激产生的中和抗体更加聚焦在针对病毒的受体结合,可以提高疫苗的免疫原性和免疫效率。MERS-CoV通过RBD与宿主细胞的受体(CD26,又名DPP4)结合而侵入细胞,SARS-CoV通过其RBD与宿主细胞受体ACE2结合而进入细胞,其作为疫苗的核心能够将机体刺激产生的中和抗体更加聚焦在针对病毒的受体结合,进而提高疫苗的免疫原性和中和效率。然而在前期的研究中,来源于MERS-CoV以及SARS-CoV的RBD单体疫苗接种动物模型后仅能引发较低的假病毒中和抗体水平。

[0006] 因此,目前针对冠状病毒,尤其是SARS-CoV-2,开展高免疫原性和中和效率的疫苗的研发工作迫在眉睫。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是克服现有新型冠状病毒治疗药物以及疫苗的不足,为尽快开发安全、有效的针对SARS-CoV-2的疫苗用以保护易感人群。本发明以病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)及融合肽(Fusion peptide,FP)共同作为双抗原片段,并基于幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin)实现抗原多聚化,构建开发了一种RBD-FP抗原多聚体复合物。具体是以病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)及融合肽(Fusion peptide,FP)共同作为双抗原片段,并与幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin(HP))组成融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin,实现抗原多聚化,同时加上信号肽及纯化标签,通过质粒转染真核细胞表达系统(如293F细胞)表达可自组装的RBD-FP-HP_Ferritin蛋白,可通过Ferritin(HP)自行组装将RBD-FP-HP_Ferritin单聚体组装成球状二十四聚体纳米颗粒,将其展示在纳米颗粒表面,克服了RBD单体免疫原性不足的缺点,能够有效地引起更强的免疫反应,产生中和SARS-CoV-2假病毒入侵靶细胞的抗体。本发明的疫苗能显著的提高宿主针对SARS-CoV-2的中和抗体的水平;而且本发明疫苗制备方法简单、蛋白含有His标签易于纯化,NIH登记的临床试验中已证明了Ferritin抗原作为纳米疫苗载体的安全性,疫苗可较快的应用于临床试验。

[0008] 本发明的目的是提供一种基于新型冠状病毒(SARS-CoV-2)受体结合区与细菌多聚物构建的二十四聚体化的亚单位的新型冠状病毒抗原。

[0009] 本发明另一目的是提供所述新型冠状病毒抗原在制备新型冠状病毒疫苗及抗新型冠状病毒药物中的应用。

[0010] 本发明再一目的是提供所述新型冠状病毒抗原的制备方法。

[0011] 本发明再一目的是提供编码表达所述新型冠状病毒抗原的核苷酸序列、载体或转基因细胞系。

[0012] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0013] 本发明首先提供一种提高抗原免疫原性的方法,所述方法是将病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)和融合肽(Fusion peptide,FP)共同作为双抗原,经过融合后作为抗原用。

[0014] 进一步优选地,所述方法是将病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)和融合肽FP,与幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin(HP))组成一个新的融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin后作为抗原。

[0015] 铁蛋白(Ferritin)作为一种可自组装的球形蛋白,其表面每相邻两个亚单位的氨基端间距约为4.5-7.5nm,适合在外表面负载抗原。利用HP_Ferritin这样一种来源于幽门螺旋杆菌的铁蛋白能够自发形成多聚化的特性,且表面负载抗原后能诱发很强的体液免疫反应及细胞免疫反应,是非常理想的载体,可以增加单次免疫所能够承载的抗原的数量,解决RBD单体疫苗引发较弱免疫的缺点。

[0016] 本发明提高抗原免疫原性的方案以病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)及融合肽(Fusion peptide,FP)共同作为双抗原片段,并基于幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin)实现抗原多聚化,能够克服RBD单体免疫原性不足的缺点,能够有效地引起更强的免疫反应,能显著的提高宿主针对

SARS-CoV-2的中和抗体的水平。

[0017] 在以往抗原研究中,尤其是SARS的研究,仅仅关注某一个区段的免疫原性,比如RBD区域,但目前相关疫苗的研发均宣告失败,因此我们考虑采用双区段进行抗原免疫。选择RBD和FP的原因在于:①RBD是和受体结合的区域;②FP是和受体细胞膜融合的区域。“结合”和“融合”构成了病毒侵入细胞的最关键最早期的两个步骤。将两个区域构建融合蛋白进行免疫在以往单区段疫苗研究中是不曾报道的。另外我们还对抗原片段进行HP_Ferritin的多聚化,利用HP_Ferritin(来源于幽门螺旋杆菌的铁蛋白)能够自发形成多聚化的特性,将双抗原聚集在一起形成纳米颗粒,进一步增加单次免疫承载抗原的数量,因此可以更加充分而稳定的和人体内免疫细胞进行接触而刺激产生抗体。本发明的这种“双抗原+多聚体”的策略,可从质量(RBD+FP双抗原)和数量(多聚化)上达到更加有效、快速、稳定地刺激机体产生有效免疫反应的效果。

[0018] 优选地,本发明上述抗原优选适用于冠状病毒抗原,所述病毒的受体结合域RBD和融合肽FP为冠状病毒的受体结合域RBD和融合肽FP。

[0019] 优选包括新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原,所述冠状病毒的受体结合域RBD和融合肽FP为新型冠状病毒SARS-CoV-2的受体结合域RBD和融合肽FP。

[0020] 更具体优选是指新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原为新型冠状病毒SARS-CoV-2的表面刺突蛋白(S蛋白)中和抗原,所述冠状病毒的受体结合域RBD和融合肽FP为新型冠状病毒SARS-CoV-2的受体结合域RBD和融合肽FP。

[0021] 具体地,新型冠状病毒SARS-CoV-2的RBD的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;FP的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0022] SEQ ID NO:1与SEQ ID NO:2可以直接连接得到融合蛋白RBD-FP。

[0023] 或SEQ ID NO:1与SEQ ID NO:2以铰链区Linker相连构成一个新的融和蛋白RBD-FP。作为一种可选择的优选方案,所述Linker可以为GGSGSGSGSGSGG。当所述Linker为GGSGSGSGSGSGG时,新型冠状病毒SARS-CoV-2的RBD与FP的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0024] 另外,所述Ferritin(HP)的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0025] SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:4可以直接连接得到新的融和蛋白。

[0026] 或SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:4以铰链区Linker相连构成一个新的融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin。作为一种可选择的优选方案,所述Linker可以为GSG。当所述Linker为GSG时,所得融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0027] 进一步优选地,作为一种可选择的实施方案,本发明所述提高抗原免疫原性的方法是将病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)和融合肽FP,与幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin(HP))组成融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin后,再加上信号肽及纯化标签,通过真核表达系统表达出抗原。

[0028] 优选地,所述信号肽为分泌型信号肽(Signal peptide,SP)。优选地,所述纯化标签为His标签(His-tag)。所述信号肽及纯化标签是加在RBD的氨基酸N端。

[0029] 加上信号肽及纯化标签后,新型冠状病毒SARS-CoV-2的SP、His-tag、RBD与FP融合的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示;所述Ferritin(HP)的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0030] 所述SEQ ID NO:6与SEQ ID NO:4可以直接相连。

[0031] 或SEQ ID NO:6与SEQ ID NO:4以铰链区Linker相连构成一个新的融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin。作为一种可选择的优选方案,所述Linker可以为GSG。

[0032] 当所述Linker为GSG时,所得融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示(如图2所示)。

[0033] 即本发明提供了一种含有信号肽及纯化标签的免疫原性提高的SARS-CoV-2 抗原,所述抗原是利用幽门螺旋杆菌铁蛋白自行组装未二十四聚体化的蛋白蛋白 RBD-FP-HP_Ferritin(如图1所示)。

[0034] 所述幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin(HP))为一种细菌复合物铁蛋白,所述细菌复合物铁蛋白形成存在于细菌的球状蛋白,其主要作用于控制多核三氧化二铁形成的速率和位置,通过水合铁离子和质子运输到矿化核和从矿化核运输。铁蛋白的球状形式是由单体亚基蛋白(Ferritin)构成的,其为具有分子量约17-20kD的多肽。一个这样的单体铁蛋白亚基的序列的如SEQ ID NO:4表示。这些单体铁蛋白亚基蛋白自组装为包含24个单体铁蛋白亚基蛋白的球状铁蛋白蛋白质。

[0035] 该融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin可通过Ferritin(HP)自行组装将RBD-FP-HP_Ferritin单聚体组装成球状二十四聚体纳米颗粒,将其展示在纳米颗粒表面,能够有效地引起受体更强的免疫反应,产生中和SARS-CoV-2假病毒入侵靶细胞的抗体。本发明的二十四聚体化的RBD-FP-HP_Ferritin可克服RBD单体免疫原性不足的缺点,显著提高受体针对SARS-CoV-2的中和抗体产生。

[0036] 本发明还提供一种免疫原性提高的冠状病毒抗原,具体是由上述方法构建得到的一个新的可自行组装并二十四聚体化的融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin。

[0037] 所述新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原(一个新的融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin)的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示(通过SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2以铰链区GGSGSGSGSGSGGG相连得到SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:3再与SEQ ID NO:4以铰链区GSG相连构成);或再加上信号肽及纯化标签后形成的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示(通过SEQ ID NO:6与SEQ ID NO:4以铰链区GSG相连构成)。

[0038] 即作为本发明可选择的一种优选实施方案,新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原(一个新的融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin)包含本文公开的信号肽及纯化标签、SARS-CoV-2的RBD蛋白与FP蛋白与自组装亚基蛋白Ferritin依次连接,其中所述RBD-FP-HP_Ferritin蛋白能够自组装为纳米颗粒,其在表面上展示RBD-FP蛋白的免疫原性部分。经进一步动物模型安全性与有效性研究后,RBD-FP-HP_Ferritin疫苗具备保护SARS-CoV易感人群的潜力。

[0039] 因此,所述冠状病毒抗原在制备抗冠状病毒药物方面的应用,具体包括制备抗新型冠状病毒SARS-CoV-2药物的应用,也在本发明的保护范围之内。

[0040] 作为一种可选择的实施方式,可以利用RBD-FP-HP_Ferritin蛋白与SAS佐剂合用制备抗SARS-CoV-2疫苗。

[0041] 另外作为可选择的实施方式,所述应用还包括用于制备试剂盒;所述试剂盒中含有所述蛋白抗原,或者编码所述抗原的DNA分子,或者表达所述抗原的重组载体/表达试剂盒/转基因细胞系/重组菌。

[0042] 另外本发明还提供一种表达上述抗原(融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin)的重组载

体、表达盒、转基因细胞系或重组菌。

[0043] 最后本发明还提供上述抗原的一种可选择的制备方法,具体是在SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:4直接串联或铰链串联所示氨基酸对应的核苷酸序列、SEQ ID NO:6与SEQ ID NO:4直接串联或铰链串联所示氨基酸对应的核苷酸序列、SEQ ID NO:5所示氨基酸对应的核苷酸序列、或SEQ ID NO:7所示氨基酸对应的核苷酸序列的3'端加上翻译终止密码子,克隆进真核表达载体(如图3所示, pcDNA3.1-Intron-WPRE),经酶切以及测序正确后(如图4所示),瞬时转染真核表达系统(如293F细胞)进行纳米抗原的表达(图5所示),表达后收集细胞上清,纯化,即得到新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原(多聚化RBD蛋白)。

[0044] 作为可选择的实施方案,所述真核表达系统包括但不限于HEK293T细胞、293F细胞、CHO细胞、sf9等可用于表达真核蛋白的细胞株、细胞系。相应蛋白导入真核表达系统的方案包括但不限于各种转染、感染、转座方案等。

[0045] 作为可选择的实施方案,所述纯化方法是将表达所述抗原的细胞上清液过滤除去细胞碎片,并通10K超滤管(Millipore)进行初步的提纯,随即通过HisTrap HP 镍柱(GE)、Lectin柱(GE)进行目的蛋白的捕获,最后通过使用Siperose6 Increase10/300GL柱子(GE)进行分子筛层析进行纯化,获取高纯度的目的蛋白(如图6-7所示)。

[0046] 作为可选择的实施方案,超滤洗脱的缓冲液是:pH 7.4的PBS缓冲液。

[0047] 作为可选择的实施方案,镍柱洗脱的缓冲液是:pH 7.4的PBS,含有500mM Imidazole。

[0048] 作为可选择的实施方案,Lectin柱(GE)的填料为:Concanavalin A(Con A),Wheat germ agglutinin(WGA),柱洗脱的洗脱剂是:methyl- α -D-mannopyranoside, GlcNAc。

[0049] 作为可选择的实施方案,所述分子筛层析的缓冲液是:pH 7.4的PBS缓冲液。

[0050] 本发明所得纳米疫苗是经纯化的二十四聚体RBD-FP-HP_Ferritin蛋白;所述二十四聚体的RBD-Ferritin蛋白在非还原条件下(不加DTT)的情况下大小约为48Kd。

[0051] 最后,编码表达本发明上述抗原的核苷酸序列,以及含有该核苷酸序列、编码表达所述抗原的载体或转基因细胞系,也应在本发明的保护范围之内。

[0052] 本发明具有以下有益效果:

[0053] 本发明将病毒的受体结合域(Receptor binding domain,RBD)及融合肽(Fusion peptide,FP)共同作为双抗原片段,并与幽门螺旋杆菌多聚物蛋白(Helicobacter pylori_Ferritin,Ferritin(HP))组成融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin,实现抗原多聚化,同时加上信号肽及纯化标签,通过质粒转染真核细胞表达系统(如293F细胞)表达可自组装的RBD-FP-HP_Ferritin蛋白,RBD-FP可通过HP_Ferritin自组装作用形成二十四聚体纳米抗原。该方案可克服RBD-FP单体免疫原性不足的缺点,所得疫苗能显著提高宿主针对SARS-CoV-2的中和抗体的水平。本发明通过RBD-FP-HP_Ferritin纳米抗原免疫Balb/c小鼠的实验已证实产生的抗体具有可强力阻挡SARS-CoV-2假病毒入侵靶细胞的能力。

[0054] 而且本发明疫苗制备方法简单、蛋白含有His标签易于纯化,NIH登记的临床试验中已证明了Ferritin抗原作为纳米疫苗载体的安全性,疫苗可较快的应用于临床试验。

附图说明

- [0055] 图1为RBD-FP-HP_Ferritin融合蛋白自行组装纳米颗粒示意图。
- [0056] 图2为RBD-FP-HP_Ferritin融合蛋白结构示意图。
- [0057] 图3为表达RBD-FP-HP_Ferritin的质粒结构示意图。
- [0058] 图4为RBD-FP-HP_Ferritin融合酶切验证。
- [0059] 图5为RBD-FP-HP_Ferritin融合蛋白转染293F细胞免疫荧光图。
- [0060] 图6为RBD-FP-HP_Ferritin融合蛋白纯化分子筛图。
- [0061] 图7为RBD-FP-HP_Ferritin融合蛋白纯化SDS-PAGE图(约48KD)。
- [0062] 图8为RBD-FP-HP_Ferritin纳米疫苗小鼠免疫策略。
- [0063] 图9为小鼠血清中和抗体效价检测策略。
- [0064] 图10为小鼠免疫RBD-FP-HP_Ferritin纳米疫苗产生阻挡SARS-CoV-2入侵靶细胞的中和抗体。

具体实施方式

- [0065] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。
- [0066] 除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。
- [0067] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。
- [0068] 实施例1构建新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原(融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin)
- [0069] 融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin自行组装纳米颗粒示意图以及结构示意图分别如图1和图2所示。
- [0070] 具体地,融和蛋白RBD-FP-HP_Ferritin的构建制备方法如下:
- [0071] 1、表达RBD-Ferritin抗原的载体的制备
- [0072] 将RBD-FP-HP_Ferritin核苷酸序列(SEQ ID NO:4所示)3'端加上翻译终止密码子后克隆到添加Intron以及WPRE增强表达的表达载体(pcDNA3.1-Intron-WPRE)的Xho I和Xba I酶切位点之间,构建表达载体 pcDNA3.1-Intron-WPRE-RBD-FP-Ferritin(HP)-IRES-GFP(如图3所示)。
- [0073] 重组质粒转化DH5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C过夜培养,筛选和PCR鉴定出阳性克隆。提取去内毒素的质粒,经酶切以及测序验证后用于纳米抗原蛋白的表达(如图4所示)。将质粒通过脂质体转染的方案转染HEK293F细胞,转染3天后经离心收获细胞上清(RBD-FP-HP_Ferritin蛋白转染293F细胞免疫荧光图如图5所示),进行目的蛋白RBD-FP-HP_Ferritin纯化。
- [0074] 2、RBD-FP-HP_Ferritin纳米抗原纯化
- [0075] 将表达RBD-FP-HP_Ferritin的细胞上清通过0.22 μ m的滤膜过滤,除去细胞碎片。经10K超滤管超滤后,将过滤后的细胞上清液与HisTrap-excel于4 $^{\circ}$ C结合30分钟,使用HisTrap excel镍柱进行粗纯。
- [0076] 之后,首先使用PBS(pH 7.4)缓冲液和低浓度咪唑缓冲液(PBS,50mM Imidazole,pH 7.4)分别进行洗涤50ml,去除流穿的杂蛋白。其后,通过含高咪唑缓冲液(PBS,500mM

Imidazole, pH 7.4;) 进行目的蛋白洗脱。随后,目的蛋白使用Con A与WGA以1:1比例填料的Lectin Agarose柱(GE)进行目的蛋白的富集。

[0077] 收集合并RBD-FP-HP_Ferritin二十四聚体的洗脱峰,最后通过使用Siperose6 Increase10/300GL柱子(GE)进行分子筛层析进行纯化,获得纯度大于99%的二十四聚体RBD-FP-HP_Ferritin蛋白(如图6-7所示),分子筛层析的缓冲液是: PBS, pH 7.4。目的蛋白浓缩后,分装成小份,用液氮迅速冷冻后于-80℃保存。

[0078] 实施例2小鼠免疫实验

[0079] 将实施例1得到的RBD-FP-HP_Ferritin抗原按照表1用生理盐水稀释至100 μg/ml,并与等体积佐剂SAS进行分组乳化。然后对6-8周龄的Balb/C小鼠进行分组免疫。免疫策略如图8所示,即通过腹腔注射的方式,每只小鼠分别在第0天,第3周(21天),第14周(108天)接受3次疫苗免疫,每次200μl的接种体积(10μg)。第10、31、108天,对小鼠进行眼眶取血。小鼠血清在静置一段时间待血清析出后,通过4℃,2800rpm离心15分钟获得,立刻用于SARS-CoV-2假病毒中和检测实验。

[0080] 表1

抗原/对照	抗原含量	佐剂	动物数量(只)
RBD-FP-HP_Ferritin	10μg	SAS	4
PBS	0	SAS	4

[0082] 实施例3假病毒中和试验

[0083] 1、假病毒的制备:

[0084] 根据NCBI公布序列,合成SARS-CoV-2的Spike蛋白,并将其插入pcDNA3.1表达载体。将SARS-CoV-2Spike蛋白的表达载体与pHIV-luciferase和psPAX2质粒共同转染293T细胞,转染5小时后,PBS洗涤细胞2次,换为无血清DMEM培养基继续培养。48小时后收取上清,离心去除细胞碎片。后用小体积无血清DMEM溶解获得HIV-luc/SARS-CoV-2-S假病毒。

[0085] 该假病毒可以有效模拟野生型SARS-CoV-2入侵细胞的过程。当其感染生产细胞或靶细胞后,SARS-CoV-2假病毒所携带的荧光素酶报告基因的表达能够准确反映病毒感染结果,使得实验系统的结果能够被精准快捷地读取,可以作为优秀的抗体中和效价监测系统(如图9所示)。

[0086] 2、假病毒TCID₅₀测定

[0087] 将上一步收取的病毒液按5倍比稀释,加入到96孔板中的HEK293T细胞中。感染4小时后,弃掉病毒液,PBS洗涤细胞2次,换为含10%血清的DMEM完全培养基。48小时后,弃掉培养基,PBS洗涤2次,加入细胞裂解液,震荡裂解30分钟。-80℃冻融一次后,每孔取30μl利用GloMax 96 (Promega)检测荧光素酶活性值。通过Reed-Muech法计算TCID₅₀。

[0088] 3、中和试验

[0089] 将纯化的抗体2倍倍比稀释,与TCID₅₀终浓度假病毒混合,37℃共孵育1小时。将混合液加入到已密度为70%左右的HEK293T细胞中的96孔板中。48小时后,弃掉培养液,PBS洗涤细胞2次,加入细胞裂解液,检测荧光素酶活性值。

[0090] 4、结果分析

[0091] 结果如图10。将RBD-FP-HP_Ferritin纳米抗原免疫Balb/c小鼠后10天血清即检测到对SARS-CoV-2假病毒的中和活性,t检验显示实验组与对照组组间存在差异显著性。

在显著性水平为0.05的情况下,双尾概率水平小于0.05。

[0092] 结果表明,本发明RBD-FP-HP_Ferritin与SAS佐剂合用,经一次免疫后10 天即可激发小鼠体液免疫,小于平行对照的二十四聚体组所激发的中和抗体效价,且差异显著。

[0093] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 中山大学

<120> 一种基于幽门螺旋杆菌铁蛋白的新型冠状病毒S蛋白双区域亚单位纳米疫苗

<130>

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 194

<212> PRT

<213> RBD氨基酸序列

<400> 1

```

Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg
1           5           10           15
Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val
           20           25           30
Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys
           35           40           45
Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn
           50           55           60
Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile
65           70           75           80
Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro
           85           90           95
Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp
           100          105          110
Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys
           115          120          125
Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln
           130          135          140
Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe
145          150          155          160
Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln
           165          170          175
Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala
           180          185          190

```

Thr Val

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> FP氨基酸序列

<400> 2

Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe Asn Phe Ser
1 5 10 15

Gln Ile Leu

<210> 3

<211> 228

<212> PRT

<213> RBD-FP的氨基酸序列

<400> 3

Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg
1 5 10 15

Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val
20 25 30

Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys
35 40 45

Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn
50 55 60

Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile
65 70 75 80

Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro
85 90 95

Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp
100 105 110

Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys
115 120 125

Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln
130 135 140

Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe
145 150 155 160

Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln
165 170 175

Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala
180 185 190

Thr Val Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
195 200 205

Gly Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe Asn Phe
210 215 220

Ser Gln Ile Leu

225

<210> 4

<211> 163

<212> PRT

<213> Ferritin (HP) 的氨基酸序列

<400> 4

Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Glu	Gln	Val	Asn	Lys	Glu	Met	Gln	Ser
1			5					10					15		
Ser	Asn	Leu	Tyr	Met	Ser	Met	Ser	Ser	Trp	Cys	Tyr	Thr	His	Ser	Leu
		20					25					30			
Asp	Gly	Ala	Gly	Leu	Phe	Leu	Phe	Asp	His	Ala	Ala	Glu	Glu	Tyr	Glu
		35				40						45			
His	Ala	Lys	Lys	Leu	Ile	Ile	Phe	Leu	Asn	Glu	Asn	Asn	Val	Pro	Val
	50					55					60				
Gln	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Glu	His	Lys	Phe	Glu	Gly	Leu	Thr
65				70						75				80	
Gln	Ile	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Glu	His	Glu	Gln	His	Ile	Ser	Glu	Ser
				85						90				95	
Ile	Asn	Asn	Ile	Val	Asp	His	Ala	Ile	Lys	Ser	Lys	Asp	His	Ala	Thr
			100							105				110	
Phe	Asn	Phe	Leu	Gln	Trp	Tyr	Val	Ala	Glu	Gln	His	Glu	Glu	Glu	Val
			115							120				125	
Leu	Phe	Lys	Asp	Ile	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Leu	Ile	Gly	Asn	Glu	Asn
			130									140			
His	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ala	Asp	Gln	Tyr	Val	Lys	Gly	Ile	Ala	Lys	Ser
145					150						155				160

Arg Lys Ser

<210> 5

<211> 394

<212> PRT

<213> 融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin的氨基酸序列(不含SP-His-tag)

<400> 5

Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Cys	Pro	Phe	Gly	Glu	Val	Phe	Asn	Ala	Thr	Arg
1				5						10				15	
Phe	Ala	Ser	Val	Tyr	Ala	Trp	Asn	Arg	Lys	Arg	Ile	Ser	Asn	Cys	Val
			20						25				30		
Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Lys
			35						40				45		

Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn
 50 55 60
 Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro
 85 90 95
 Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp
 100 105 110
 Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys
 115 120 125
 Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln
 130 135 140
 Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln
 165 170 175
 Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala
 180 185 190
 Thr Val Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe Asn Phe
 210 215 220
 Ser Gln Ile Leu Gly Ser Gly Asp Ile Ile Lys Leu Leu Asn Glu Gln
 225 230 235 240
 Val Asn Lys Glu Met Gln Ser Ser Asn Leu Tyr Met Ser Met Ser Ser
 245 250 255
 Trp Cys Tyr Thr His Ser Leu Asp Gly Ala Gly Leu Phe Leu Phe Asp
 260 265 270
 His Ala Ala Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys Lys Leu Ile Ile Phe Leu
 275 280 285
 Asn Glu Asn Asn Val Pro Val Gln Leu Thr Ser Ile Ser Ala Pro Glu
 290 295 300
 His Lys Phe Glu Gly Leu Thr Gln Ile Phe Gln Lys Ala Tyr Glu His
 305 310 315 320
 Glu Gln His Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn Ile Val Asp His Ala Ile
 325 330 335
 Lys Ser Lys Asp His Ala Thr Phe Asn Phe Leu Gln Trp Tyr Val Ala
 340 345 350
 Glu Gln His Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys Asp Ile Leu Asp Lys Ile

355	360	365
Glu Leu Ile Gly Asn Glu Asn His Gly Leu Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr		
370	375	380
Val Lys Gly Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser		
385	390	
<210> 6		
<211> 263		
<212> PRT		
<213> SP-His-tag-RBD-FP的氨基酸序列		
<400> 6		
Met Gly Ile Leu Pro Ser Pro Gly Met Pro Ala Leu Leu Ser Leu Val		
1	5	10
Ser Leu Leu Ser Val Leu Leu Met Gly Cys Val Ala Glu His His His		
	20	25
His His His Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn		
	35	40
Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser		
	50	55
Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser		
65	70	75
Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys		
	85	90
Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val		
	100	105
Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr		
	115	120
Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn		
	130	135
Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu		
145	150	155
Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu		
	165	170
Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn		
	180	185
Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val		
	195	200
Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His		
	210	215
Ala Pro Ala Thr Val Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly		

225	230	235	240
Ser Gly Gly Gly Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly			
	245	250	255
Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu			
	260		
<210> 7			
<211> 429			
<212> PRT			
<213> 融合蛋白RBD-FP-HP_Ferritin的氨基酸序列(含SP-His-tag)			
<400> 7			
Met Gly Ile Leu Pro Ser Pro Gly Met Pro Ala Leu Leu Ser Leu Val			
1	5	10	15
Ser Leu Leu Ser Val Leu Leu Met Gly Cys Val Ala Glu His His His			
	20	25	30
His His His Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn			
	35	40	45
Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser			
	50	55	60
Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser			
65	70	75	80
Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys			
	85	90	95
Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val			
	100	105	110
Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr			
	115	120	125
Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn			
	130	135	140
Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu			
145	150	155	160
Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu			
	165	170	175
Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn			
	180	185	190
Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val			
	195	200	205
Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His			
	210	215	220
Ala Pro Ala Thr Val Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly			

225	230	235	240
Ser Gly Gly Gly Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly			
	245	250	255
Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Gly Ser Gly Asp Ile Ile Lys Leu Leu			
	260	265	270
Asn Glu Gln Val Asn Lys Glu Met Gln Ser Ser Asn Leu Tyr Met Ser			
	275	280	285
Met Ser Ser Trp Cys Tyr Thr His Ser Leu Asp Gly Ala Gly Leu Phe			
	290	295	300
Leu Phe Asp His Ala Ala Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys Lys Leu Ile			
305	310	315	320
Ile Phe Leu Asn Glu Asn Asn Val Pro Val Gln Leu Thr Ser Ile Ser			
	325	330	335
Ala Pro Glu His Lys Phe Glu Gly Leu Thr Gln Ile Phe Gln Lys Ala			
	340	345	350
Tyr Glu His Glu Gln His Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn Ile Val Asp			
	355	360	365
His Ala Ile Lys Ser Lys Asp His Ala Thr Phe Asn Phe Leu Gln Trp			
	370	375	380
Tyr Val Ala Glu Gln His Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys Asp Ile Leu			
385	390	395	400
Asp Lys Ile Glu Leu Ile Gly Asn Glu Asn His Gly Leu Tyr Leu Ala			
	405	410	415
Asp Gln Tyr Val Lys Gly Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser			
	420	425	

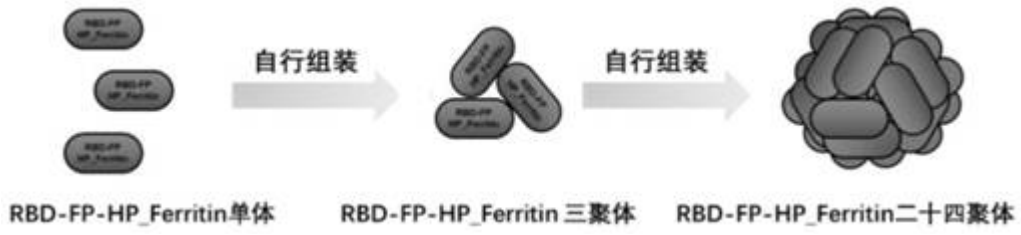


图1



图2

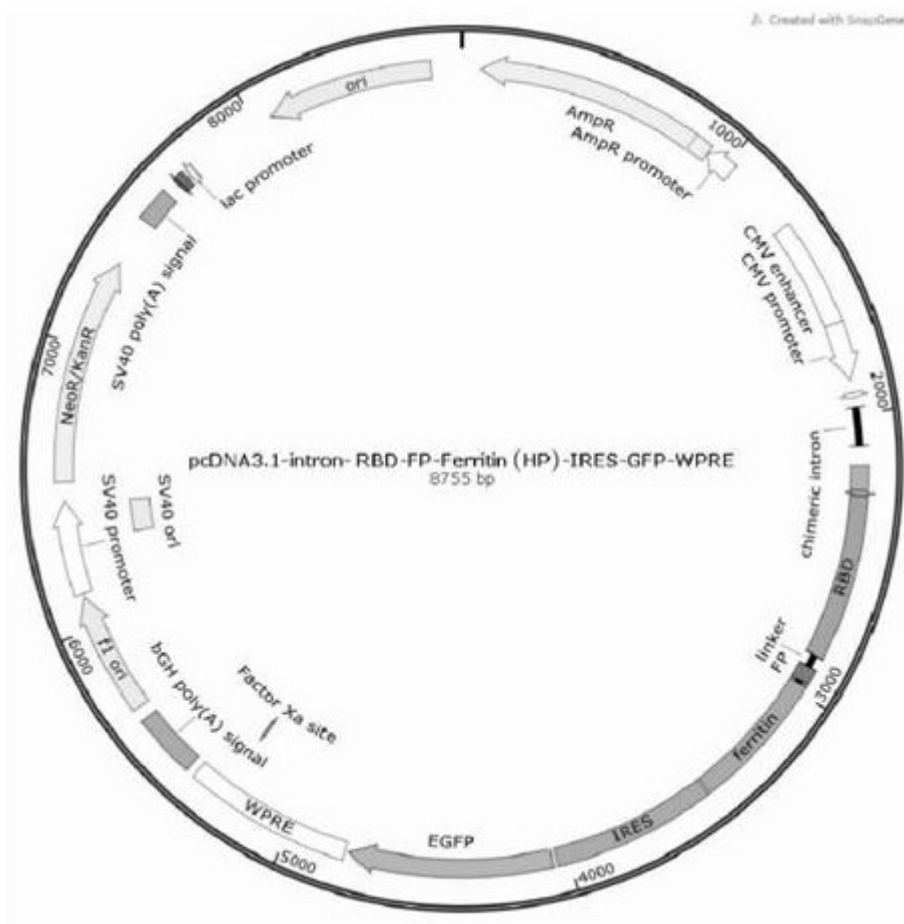


图3

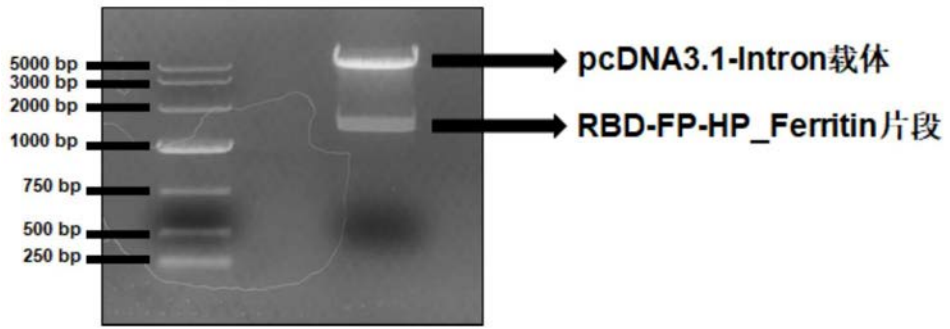


图4

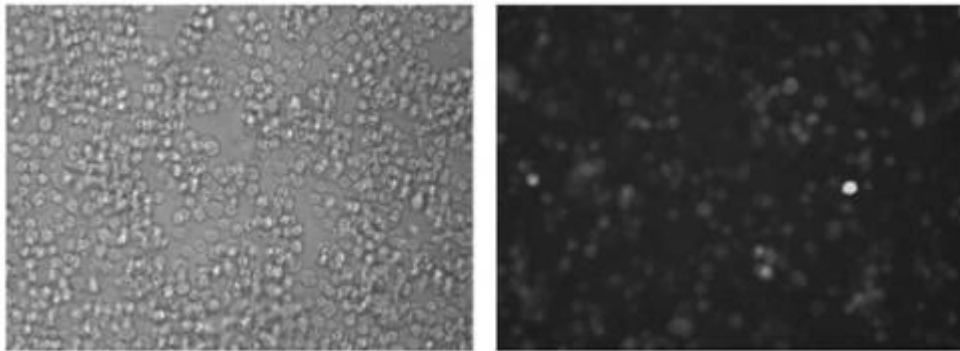


图5

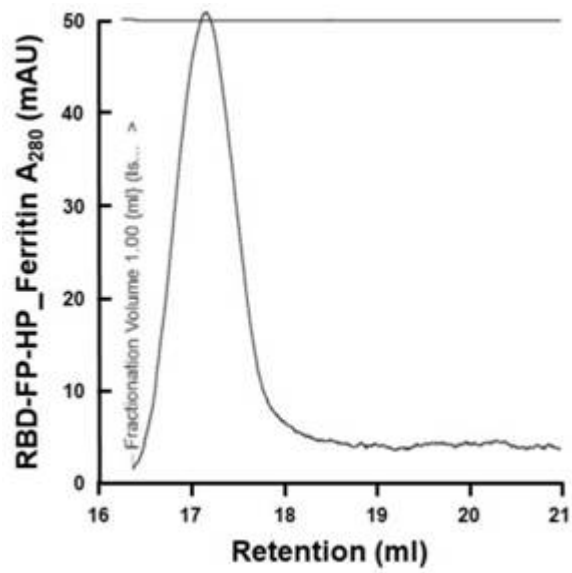


图6

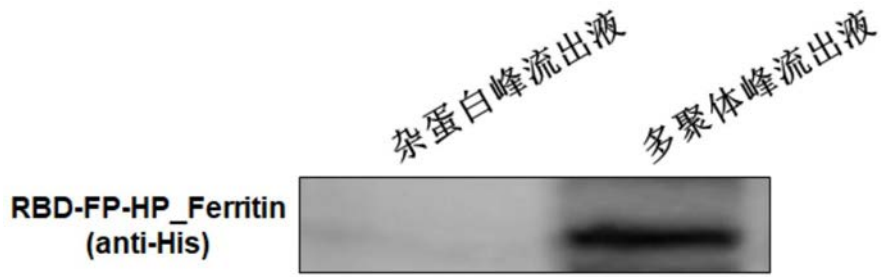


图7

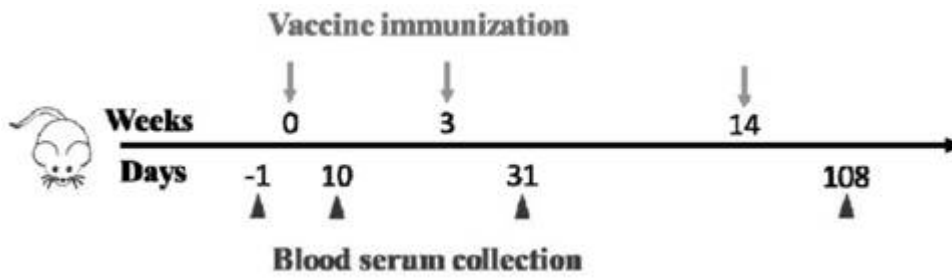


图8

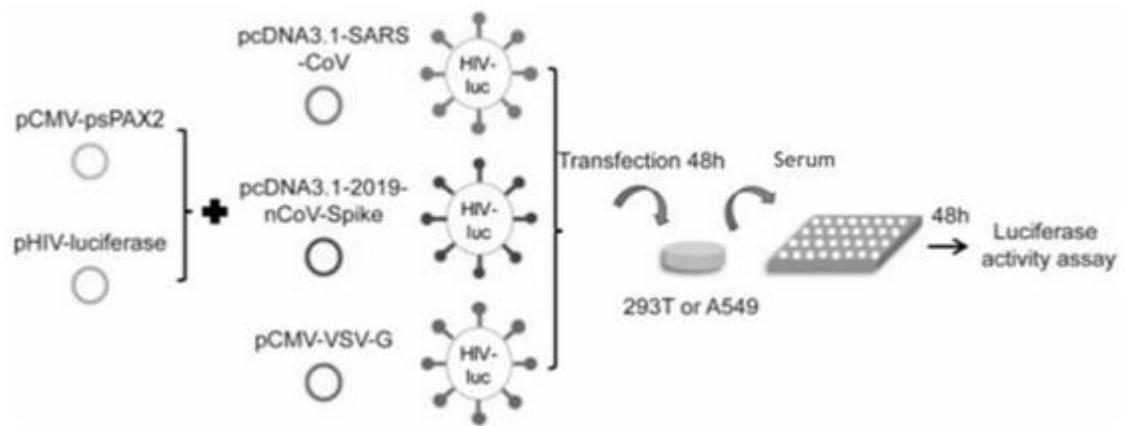


图9

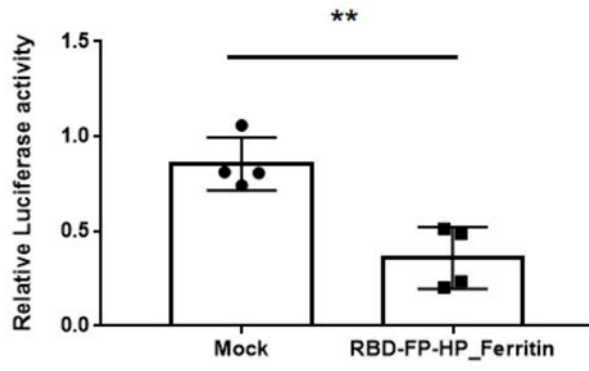


图10