



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117582493 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 23

(21) 申请号 202210992474.3

(22) 申请日 2022.08.18

(71) 申请人 艾棣维欣(苏州)生物制药有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园B1栋512室

申请人 中国科学院微生物研究所

(72) 发明人 赵干 侯佳望 高福 戴连攀

安亚玲 徐坤

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇知识产权代理

有限公司 11463

专利代理师 张金铭

(51) Int. Cl.

A61K 39/215 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

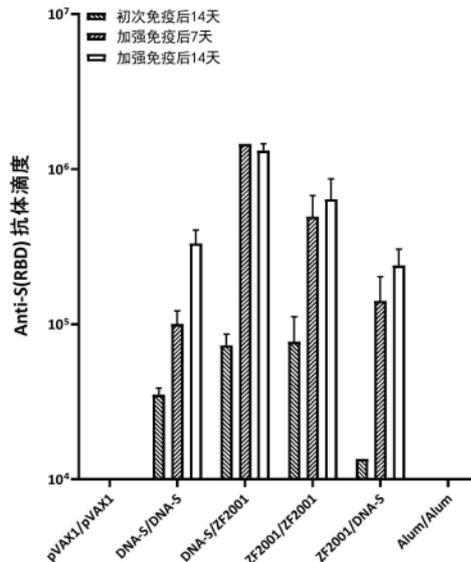
权利要求书2页 说明书13页
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒及其制备方法和应用,涉及疫苗技术领域。该新型冠状病毒疫苗试剂盒包括分别独立包装的新型冠状病毒DNA疫苗和新型冠状病毒重组蛋白疫苗,新型冠状病毒DNA疫苗含有编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段,新型冠状病毒重组蛋白疫苗以表面刺突蛋白的受体结合区作为抗原。该新型冠状病毒疫苗能够实现(序贯)Prime-boost免疫程序,从而缓解单一类型疫苗诱导的体液免疫对突变株的中和效果下降、不能同时激发强的细胞免疫的技术问题。



1. 一种用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒,其特征在于,包含至少一个第一容器和至少一个第二容器;

所述第一容器中含有新型冠状病毒DNA疫苗,所述新型冠状病毒DNA疫苗包含编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段;所述新型冠状病毒刺突蛋白抗原的氨基酸序列如seq_1所示,或与seq_1所示序列具有70%以上的一致性;

所述第二容器中含有新型冠状病毒重组蛋白疫苗,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗含有新型冠状病毒抗原或其抗原表位,所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位的氨基酸序列部分或全部来源于新型冠状病毒的表面刺突蛋白的受体结合区。

2. 根据权利要求1所述的新型冠状病毒疫苗试剂盒,其特征在于,所述编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段的核苷酸序列如seq_2所示;或与seq_2所示序列具有70%以上一致性;

优选地,所述新型冠状病毒DNA疫苗包含质粒,所述质粒由表达载体,和插入所述表达载体的外源序列部分组成,所述外源序列部分含有所述编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段;

优选地,所述表达载体包括真核表达载体,所述真核表达载体优选为pVAX1载体;

优选地,所述第一容器中含有缓冲液,所述质粒溶于缓冲液中;

优选地,所述缓冲液为SSC缓冲液;

优选地,所述质粒的核苷酸序列如seq_3所示。

3. 根据权利要求1所述的新型冠状病毒疫苗试剂盒,其特征在于,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗中的新型冠状病毒抗原或其抗原表位的氨基酸序列选自seq_4、seq_5、seq_6、seq_7和seq_8中的一种或多种的组合;

优选地,所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位的氨基酸序列含有由两个如seq_4所示的氨基酸序列直接串联得到的序列;或,含有由两个如seq_5所示的氨基酸序列直接串联得到的序列;或,含有由两个如seq_6所示的氨基酸序列直接串联得到的序列;

优选地,编码所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗中的新型冠状病毒抗原的核苷酸序列如seq_9所示;

优选地,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗还包括佐剂;

优选地,所述佐剂选自铝佐剂、MF59佐剂、类MF59佐剂和CpG寡脱氧核苷酸中的至少一种;

优选地,所述佐剂为铝佐剂;

进一步优选地,所述铝佐剂为氢氧化铝佐剂。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的新型冠状病毒疫苗试剂盒,其特征在于,所述新型冠状病毒DNA疫苗含有核苷酸序列如seq_3所示的质粒;所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗中的抗原或其抗原表位的氨基酸序列含有由两个如seq_4所示的氨基酸序列直接串联得到的序列。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的新型冠状病毒疫苗试剂盒,其特征在于,所述第一容器和所述第二容器的数量比为1~2:1~2;

优选地,所述第一容器和所述第二容器分别独立的为针剂或贴剂;

优选地,所述第一容器中的所述新型冠状病毒DNA疫苗中DNA的含量为0.1~10mg;

优选地,所述第二容器中的新型冠状病毒重组蛋白疫苗的含量为0.5mL,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗每1次人用剂量为0.5mL;

优选地,所述试剂盒还包括注射装置。

6. 根据权利要求1-3任一项所述的新型冠状病毒疫苗试剂盒,其特征在于,所述新型冠状病毒DNA疫苗和所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗还分别独立的包含药学上可接受的赋形剂;所述药学上可接受的赋形剂包括载体、稀释剂、助悬剂、转染促进剂、佐剂和编码佐剂的核苷酸中的一种或几种;

优选地,所述试剂盒中还包含DNA疫苗递送装置;

优选地,所述DNA疫苗递送装置为电脉冲装置;

优选地,电脉冲装置工作时由两组具有0.2Amp恒定电流的脉冲组成;第二脉冲组被延迟3秒;在每个组中,有两个52ms的脉冲,脉冲之间的延迟为198ms。

7. 权利要求1-6任一项所述的新型冠状病毒疫苗试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:

(a) 制备新型冠状病毒DNA疫苗并独立包装至所述第一容器;

(b) 制备新型冠状病毒重组蛋白疫苗并独立包装至所述第二容器;

(c) 将所述第一容器和所述第二容器组装为试剂盒。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤(a)包括制备质粒,所述制备质粒包括将所述编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段插入表达载体中;

优选地,所述表达载体包括真核表达载体;

优选地,所述真核表达载体包括pVAX1载体。

9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤(b)包括将编码所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位的核苷酸序列的5'端加入编码信号肽的序列,3'端加上终止密码子,进行克隆表达,筛选正确的重组子,然后转染表达系统的细胞进行表达,表达后收集细胞上清,纯化,得到所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位;

优选地,所述制备方法还包括将所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位吸附于佐剂;

优选地,编码所述新型冠状病毒蛋白疫苗中的新型冠状病毒抗原的核苷酸序列如seq_9所示;

优选地,所述表达系统的细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞;

优选地,所述哺乳动物细胞包括HEK293T细胞或CHO细胞;

优选地,所述细菌细胞包括大肠杆菌细胞。

10. 权利要求1-6任一项所述的新型冠状病毒疫苗试剂盒在制备预防和/或治疗新型冠状病毒感染和/或新型冠状病毒感染引发的疾病COVID-19的药物或产品中的应用;

优选地,所述产品中包含DNA疫苗递送装置;

优选地,所述DNA疫苗递送装置为电脉冲装置;优选地,电脉冲装置工作时由两组具有0.2Amp恒定电流的脉冲组成;第二脉冲组被延迟3秒;在每个组中,有两个52ms的脉冲,脉冲之间的延迟为198ms。

用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒 及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及疫苗技术领域,尤其是涉及一种用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 冠状病毒属于冠状病毒科(Coronaviridae),包括 α -冠状病毒、 β -冠状病毒、 γ -冠状病毒和 δ -冠状病毒四个属,此次爆发的新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)属于 β 属的冠状病毒,主要经呼吸道飞沫传播,也可通过接触传播引起肺炎(Novel Coronavirus-infected Pneumonia,NCP),人群普遍易感。

[0003] 2019年12月以来,SARS-CoV-2在中国和世界各地相继发生大规模爆发,2021年底将一新型变异株B.1.1.529命名为Omicron,疫苗接种后Omicron感染者的常见症状依次是:咳嗽、流涕、疲劳、咽痛和头痛,现有数据表明Omicron突变株传染性极强,对疫苗的免疫逃逸非常明显,真实世界中发现,Omicron感染者的症状确实较之前轻,但是目前没有证据比Delta突变株感染者更轻。新型冠状病毒至今仍然严重威胁人类健康,研制有效的预防性疫苗是除了物理隔离以外缓解疫情的有效手段。核酸疫苗或者DNA疫苗被称为“第三代疫苗”,其具有全方位诱导体液及细胞免疫应答,能够起到良好的预防疾病效果的优点;还具有生产工艺简单、保存稳定性好且无须冷链运输,适宜于大规模应用及分发的优点。

[0004] 虽然目前已被条件性批准的紧急授权使用的新冠疫苗有mRNA疫苗,腺病毒载体疫苗,蛋白疫苗、灭活疫苗等;但由于各种已上市疫苗存在着如诱导的体液免疫对突变株的中和效果下降、不能同时激发强的细胞免疫及体液免疫等问题,因此亟需结合不同形式疫苗联合免疫来克服上述不足之处。

[0005] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒,以缓解单一类型疫苗诱导的体液免疫对突变株的中和效果下降、不能同时激发强的细胞免疫的技术问题。

[0007] 本发明的第二目的在于提供上述新型冠状病毒疫苗试剂盒的制备方法及上述新型冠状病毒疫苗试剂盒的应用。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明特采用如下技术方案:

[0009] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒,包含至少一个第一容器和至少一个第二容器;

[0010] 所述第一容器中含有新型冠状病毒DNA疫苗,所述新型冠状病毒DNA疫苗包含编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段;所述新型冠状病毒刺突蛋白抗原的氨基酸序列如seq_1所示,或与seq_1所示序列具有70%以上的一致性;

[0011] 所述第二容器中含有新型冠状病毒重组蛋白疫苗,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗含有新型冠状病毒抗原或其抗原表位,所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位的氨基酸序列部分或全部来源于新型冠状病毒的表面刺突蛋白的受体结合区。

[0012] 根据本发明的另一个方面,本发明还提供了新型冠状病毒疫苗试剂盒的制备方法,包括:

[0013] (a) 制备新型冠状病毒DNA疫苗并独立包装至所述第一容器;

[0014] (b) 制备新型冠状病毒重组蛋白疫苗并独立包装至所述第二容器;

[0015] (c) 将所述第一容器和所述第二容器组装为试剂盒。

[0016] 根据本发明的另一个方面,本发明还提供了上述新型冠状病毒疫苗试剂盒在制备预防和/或治疗新型冠状病毒感染和/或新型冠状病毒感染引发的疾病COVID-19的药物或产品中的应用;

[0017] 根据本发明的另一个方面,本发明还提供一种预防和/或治疗新型冠状病毒SARS-CoV-2感染和/或新型冠状病毒SARS-CoV-2感染引发的疾病COVID-19的方法,该方法包括向受试者施用上述新型冠状病毒疫苗试剂盒中的疫苗。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0019] 本发明提供的新型冠状病毒疫苗试剂盒包含分别独立包装的新型冠状病毒DNA疫苗和新型冠状病毒重组蛋白疫苗,其中DNA疫苗中含有编码刺突蛋白抗原的核酸片段,蛋白疫苗含有表面刺突蛋白的受体结合区抗原。该试剂盒用于SARS-CoV-2病毒DNA疫苗、SARS-CoV-2病毒蛋白疫苗联合方案,可用于预防COVID-19。DNA疫苗和蛋白疫苗分别独立包装,意味着DNA疫苗和蛋白疫苗分别独立使用,该试剂盒采用初免-加强(Prime-boost)免疫程序实施免疫,可以激发出更为高效的免疫反应。

[0020] 本发明提供的试剂盒将DNA疫苗和蛋白疫苗分别独立包装,可以实现异源初免-加强免疫策略。本发明发现异源初免-加强免疫策略所产生的免疫原性高于同源初免-加强免疫策略。异源初免-加强免疫策略对靶抗原的免疫反应具有加强协同作用,这种协同作用表现在抗原特异性的T细胞数量的增加、加强的细胞免疫和体液免疫,以及较为广谱的免疫反应。

[0021] 用于实现异源疫苗初免-加强免疫方案的试剂盒能够克服现有单一类型疫苗产品的不足,从而更好地发挥新冠疫苗的免疫效果。本发明提供的试剂盒联合施用DNA疫苗和蛋白疫苗所诱发的保护性免疫应答要优于单独施用单个种类疫苗所诱发的免疫应答。本发明用于实现(序贯)Prime-boost免疫方法的新型冠状病毒疫苗试剂盒能够提供针对多种SARS-CoV-2病毒突变株的保护作用。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0023] 图1A为展示了初免后14天、加强免疫后7天、14天(即第14天、第28天、第35天)SARS-CoV-2RBD蛋白的反应性;

- [0024] 图1B为展示了加强免疫后14天抗体滴度与初免后14天血清抗体滴度比值；
- [0025] 图1C为展示了加强免疫后14天血清对SARS-CoV-2RBD蛋白和S蛋白的反应性；
- [0026] 图2A-2H为展示了DNA-S/ZF2001组、ZF2001/DNA-S组序贯免疫策略激发产生针对新冠突变株的特异性抗体结果；
- [0027] 图3A为展示了初免21天RBD肽库刺激后免疫细胞IFN- γ ELISpot结果；
- [0028] 图3B和3C为展示了加强免疫14天RBD肽库/S2肽库刺激后免疫细胞IFN- γ ELISpot结果；
- [0029] 图4A-4D显示了流式细胞术检测的加强免疫后14天免疫细胞CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺TNF- α ⁺, 多功能T细胞亚群分析结果, CD8⁺IFN- γ ⁺, CD8⁺CD107a⁺, 多功能T细胞亚群分析结果；
- [0030] 图5A-5B展示了BALB/c小鼠新型冠状病毒攻击后gRNA和sgRNA检测结果。

具体实施方式

[0031] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种用于实现初免-加强(Prime-boost)免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒,该试剂盒包含至少一个第一容器和至少一个第二容器;所述第一容器中含有新型冠状病毒DNA疫苗,所述第二容器中含有新型冠状病毒重组蛋白疫苗。本发明通过将新型冠状病毒DNA疫苗和新型冠状病毒重组蛋白疫苗分别包装于第一容器和第二容器,以实现试剂盒中两种疫苗分别独立存在。分别独立包装的DNA疫苗和蛋白疫苗可以在不同的时间施用,进而实现初免-加强(Prime-boost)免疫程序,用于预防COVID-19。通过DNA疫苗、蛋白疫苗不同顺序的初免-加强免疫的组合,能够大幅度激发疫苗潜在效果。

[0033] 在一些可选的实施方式中,所述第一容器中的新型冠状病毒DNA疫苗用于初免,所述第二容器中的新型冠状病毒重组蛋白疫苗用于加强免疫。

[0034] 在另一些可选的实施方式中,所述第二容器中的新型冠状病毒重组蛋白疫苗用于初免,所述第一容器中的新型冠状病毒DNA疫苗用于加强免疫。

[0035] 新型冠状病毒DNA疫苗的具体组成如下:

[0036] 所述新型冠状病毒DNA疫苗包含编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段:所述新型冠状病毒刺突蛋白抗原的氨基酸序列如seq_1所示,或与seq_1所示序列具有70%以上的一致性;

[0037] 在一些可选的实施方式中,SARS-CoV-2刺突蛋白抗原的氨基酸序列如seq_1所示,或者为与seq_1具有70%以上一致性的序列,优选为具有70%~80%一致性,更优选为具有80%一致性。

[0038] 在一些可选的实施方式中,SARS-CoV-2刺突蛋白抗原的氨基酸序列如seq_1所示,或者为与seq_1具有80%以上一致性的序列,优选为具有80%~90%一致性。

[0039] 在一些可选的实施方式中,SARS-CoV-2刺突蛋白抗原的氨基酸序列如seq_1所示,或者为与seq_1具有90%以上一致性的序列。

[0040] 在一些可选的实施方式中,所述编码SARS-CoV-2刺突蛋白抗原的核酸片段的核苷酸序列如seq_2所示;或与seq_2所示序列具有70%以上一致性,优选为具有70%~80%一致性,更优选为具有80%一致性。

[0041] 在一些可选的实施方式中,所述编码SARS-CoV-2刺突蛋白抗原的核酸片段的核苷酸序列如seq_2所示;或与seq_2所示序列具有80%以上一致性,优选为具有80%~90%一致性。

[0042] 在一些可选的实施方式中,所述编码SARS-CoV-2刺突蛋白抗原的核酸片段的核苷酸序列如seq_2所示;或与seq_2所示序列具有90%以上一致性。

[0043] 上述“一致性”指的是,与seq_1所示序列具有70%以上的一致性SARS-CoV-2刺突蛋白抗原可以激发受试者对1株或者多株SARS-CoV-2突变株的免疫应答。

[0044] 在一些可选的实施方式中,所述新型冠状病毒DNA疫苗包含质粒,所述质粒由表达载体,和插入所述表达载体的外源序列部分组成,所述外源序列部分包括所述编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段。所述外源序列还可选的包括其他本领域可接受的用于编码功能元件的序列,例如可以为但不限于为用于编码启动子、增强子、标记基因和疫苗佐剂等的核酸片段。

[0045] 在一些可选的实施方式中,所述表达载体包括真核表达载体,所述真核表达载体优选为pVAX1载体。

[0046] 在一些可选的实施方式中,所述第一容器中含有缓冲液,所述质粒溶于缓冲液中。

[0047] 在一些可选的实施方式中,所述缓冲液为SSC缓冲液。

[0048] 在一些可选的实施方式中,所述质粒的核苷酸序列如seq_3所示。

[0049] 新型冠状病毒重组蛋白疫苗的具体组成如下:

[0050] 所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗含有新型冠状病毒抗原或其抗原表位,所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位的氨基酸序列部分或全部来源于新型冠状病毒的表面刺突蛋白的受体结合区。

[0051] 在一些可选的实施方式中,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗中的新型冠状病毒抗原或其抗原表位的氨基酸序列选自seq_4、seq_5、seq_6、seq_7和EQ ID N0.8中的一种或多种的组合;

[0052] 新型冠状病毒抗原或其抗原表位的氨基酸序列例如可以为但不限于为含有如下序列:含有seq_4、seq_5、seq_6、seq_7或EQ ID N0.8其中一种所示序列;或,含有由两个如seq_4所示的氨基酸序列直接串联得到的序列;或,含有由两个如seq_5所示的氨基酸序列直接串联得到的序列;或,含有由两个如seq_6所示的氨基酸序列直接串联得到的序列。

[0053] 在一些可选的实施方式中,编码所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗中的新型冠状病毒抗原的核苷酸序列如seq_9所示。

[0054] 在一些可选的实施方式中,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗还包括佐剂,所述佐剂例如可以为但不限于为铝佐剂、MF59佐剂、类MF59佐剂和CpG寡脱氧核苷酸中的至少一种,优选为铝佐剂,进一步优选为氢氧化铝佐剂。

[0055] 在一些优选的实施方式中,所述用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒中,所述新型冠状病毒DNA疫苗含有核苷酸序列如seq_3所示的质粒;所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗中的抗原或其抗原表位的氨基酸序列含有由两个如seq_4所示的氨

基酸序列直接串联得到的序列。

[0056] 本发明提供的新型冠状病毒疫苗试剂盒中的第一容器和第二容器可以为本领域可接受的任何用于贮存DNA疫苗或蛋白疫苗的容器,例如可以为但不限于为安瓿瓶或西林瓶。

[0057] 在一些可选的实施方式中,所述试剂盒还包括注射装置,所述注射装置可选的独立于第一容器和第二容器;或,第一容器或第二容器分别独立的为注射装置,即所述新型冠状病毒疫苗试剂盒中的新型冠状病毒DNA疫苗独立包装于注射装置中,和/或,新型冠状病毒重组蛋白疫苗独立包装于注射装置中,以实现在免疫时直接注射,简化操作的目的。

[0058] 在一些可选的实施方式中,所述第一容器和所述第二容器的数量比为1~2:1~2;例如可以为但不限于为1:1、1:2或2:2。

[0059] 在一些可选的实施方式中,所述第一容器和所述第二容器分别独立的为针剂,或,所述第一容器和所述第二容器分别独立的为贴剂。

[0060] 在一些可选的实施方式中,所述第一容器中的所述新型冠状病毒DNA疫苗中DNA的含量为0.1~10mg,例如可以为但不限于为0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10mg。

[0061] 在一些可选的实施方式中,所述第二容器中的新型冠状病毒重组蛋白疫苗的含量为0.5mL,所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗每次人用剂量为0.5mL。

[0062] 本发明提供的用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒使用时向受试者施用/免疫新型冠状病毒DNA疫苗用于初免,然后向受试者施用/免疫新型冠状病毒重组蛋白疫苗用于加强免疫;或,向受试者施用/免疫新型冠状病毒重组蛋白疫苗用于初免,然后向受试者施用/免疫新型冠状病毒DNA疫苗用于加强免疫。每次施用/免疫的间隔时间可选地为7-180天,优选14-90天,更优选28-60天。

[0063] 在一些可选的实施方式中,新型冠状病毒重组蛋白疫苗通过注射器进行给药,优选通过注射器进行肌肉给药。

[0064] 具体的施用/免疫方式例如可以为但不限于为:向受试者施用/免疫1针剂新型冠状病毒DNA疫苗用于初免,然后向受试者施用/免疫1针剂新型冠状病毒重组蛋白疫苗用于加强免疫;或,向受试者施用/免疫2针剂新型冠状病毒DNA疫苗用于初免,然后向受试者施用/免疫1针剂新型冠状病毒重组蛋白疫苗用于加强免疫;或,向受试者施用/免疫2针剂新型冠状病毒DNA疫苗用于初免,然后向受试者施用/免疫2针剂新型冠状病毒重组蛋白疫苗用于加强免疫。

[0065] 在一些可选的实施方式中,所述新型冠状病毒DNA疫苗和所述新型冠状病毒重组蛋白疫苗还分别独立的包含药学上可接受的赋形剂;所述药学上可接受的赋形剂包括载体、稀释剂、助悬剂、转染促进剂、佐剂和编码佐剂的核苷酸中的一种或几种。

[0066] 在一些可选的实施方式中,所述试剂盒中还包含DNA疫苗递送装置,所述DNA疫苗递送装置优选为电脉冲装置。

[0067] 在一些可选的实施方式中,电脉冲装置工作时由两组具有0.2Amp恒定电流的脉冲组成;第二脉冲组被延迟3秒;在每个组中,有两个52ms的脉冲,脉冲之间的延迟为198ms。

[0068] 本发明提供的用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒将DNA疫苗和蛋白疫苗分别独立包装,可以实现异源初免-加强免疫策略,能够克服现有单一类型疫苗产品的不足,从而更好地发挥新冠疫苗的免疫效果。本发明提供的试剂盒采用异源初

免-加强免疫策略所产生的免疫原性高于同源初免-加强免疫策略,对靶抗原的免疫反应具有加强协同作用,这种协同作用表现在抗原特异性的T细胞数量的增加、加强的细胞免疫和体液免疫,以及较为广谱的免疫反应。

[0069] 根据本发明的另一个方面,本发明还提供了上述新型冠状病毒疫苗试剂盒的制备方法,包括:

[0070] (a) 制备新型冠状病毒DNA疫苗并独立包装至所述第一容器;

[0071] (b) 制备新型冠状病毒重组蛋白疫苗并独立包装至所述第二容器;

[0072] (c) 将所述第一容器和所述第二容器组装为试剂盒。

[0073] 在一些可选的实施方式中,步骤(a)包括制备质粒,所述制备质粒包括将所述编码新型冠状病毒刺突蛋白抗原的核酸片段插入表达载体中;表达载体优选包括真核表达载体,更优选包括pVAX1载体。

[0074] 在一些可选的实施方式中,步骤(b)包括将编码所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位的核苷酸序列的5'端加入编码信号肽的序列,3'端加上终止密码子,进行克隆表达,筛选正确的重组子,然后转染表达系统的细胞进行表达,表达后收集细胞上清,纯化,得到所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位。

[0075] 在一些可选的实施方式中,所述制备方法还包括将所述新型冠状病毒抗原或其抗原表位吸附于佐剂。

[0076] 在一些可选的实施方式中,编码所述新型冠状病毒蛋白疫苗中的新型冠状病毒抗原的核苷酸序列如seq_9所示。

[0077] 在一些可选的实施方式中,所述表达系统的细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞,其中哺乳动物细胞可选地包括HEK293T细胞或CHO细胞;细菌细胞可选地包括大肠杆菌细胞。

[0078] 根据本发明的另一个方面,本发明还提供了上述新型冠状病毒疫苗试剂盒在制备预防和/或治疗新型冠状病毒感染和/或新型冠状病毒感染引发的疾病COVID-19的药物或产品中的应用。

[0079] 在一些可选的实施方式中,所述产品中包含疫苗递送装置,所述DNA疫苗递送装置优选为电脉冲装置。

[0080] 在一些可选的实施方式中,电脉冲装置工作时由两组具有0.2Amp恒定电流的脉冲组成;第二脉冲组被延迟3秒;在每个组中,有两个52ms的脉冲,脉冲之间的延迟为198ms。

[0081] 本发明还提供一种预防和/或治疗新型冠状病毒SARS-CoV-2感染和/或新型冠状病毒SARS-CoV-2感染引发的疾病COVID-19的方法,包括向受试者施用上述新型冠状病毒疫苗试剂盒中的疫苗。

[0082] 下面结合优选实施例进一步说明本发明的技术方案和技术效果。

[0083] 实施例1:用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒

[0084] 本实施例提供了一种用于实现Prime-boost免疫程序的新型冠状病毒疫苗试剂盒,包含独立包装的新型冠状病毒DNA疫苗和独立包装的新型冠状病毒重组蛋白疫苗。

[0085] 1. 新冠SARS-CoV-2病毒DNA疫苗(DNA-S)的制备方法如下

[0086] 1.1 质粒的构建:

[0087] 根据申请人特有的核苷酸优化规则对新冠野生型序列(MN908947.3,NCBI)优化获

得seq_2所示核苷酸序列,将如seq_2所示核苷酸序列插入pVAX1载体,验证获得阳性克隆,得到新型冠状病毒野生株质粒,序列如seq_3所示。

[0088] 1.2DNA疫苗序列转化:

[0089] 从-70℃冰箱中取100μl感受态细胞悬液,冰上解冻。加入质粒DNA溶液(体积不超过10μl)轻轻摇匀,冰上放置30min。42℃水浴中热击90秒,迅速置于冰上冷却5min。向管中加入1ml的LB液体培养基(不含抗生素),混匀后37℃振荡培养45min,使细菌恢复正常生长状态。将上述菌液摇匀后取100μL涂布于含适当抗生素的筛选平板上,正面向上放置,待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿,37℃培养8~16h。挑选边缘均匀菌体单克隆,使用移液器头将克隆扎取后置入5ml LB选择培养基中37℃过夜培养。

[0090] 1.3DNA疫苗工程菌质粒提取:

[0091] 12000rpm离心5min收集菌体。加入1mL溶液I(25mM Tris-HCl和10mM EDTA、50mM葡萄糖,pH8.0),使菌体完全、均匀地重悬于溶液中。加入2mL溶液II(0.2M NaOH,1%SDS),小心转动离心管,使溶液充分混匀。加入溶液I体积1.5倍的溶液III(5M KAc,pH4.8),轻轻震荡混匀。12000rpm离心10min,取上清加入60%体积的异丙醇,上下颠倒混匀,室温静置15min。12000rpm离心10min,弃上清,粗提结束。70%乙醇洗涤后吹干,用适量TE溶解沉淀。即制得新冠SARS-CoV-2病毒DNA疫苗(DNA-S)。

[0092] 2.SARS-CoV-2病毒蛋白疫苗(ZF2001)

[0093] SARS-CoV-2病毒蛋白疫苗(ZF2001)由安徽智飞龙科马生物制药有限公司提供。SARS-CoV-2病毒蛋白疫苗(ZF2001)的氨基酸序列为直接串联的2个重复seq_4氨基酸序列,编码SARS-CoV-2病毒蛋白疫苗(ZF2001)的核苷酸序列如seq_9所示。

[0094] 实施例2新冠SARS-CoV-2DNA疫苗联合SARS-CoV-2蛋白疫苗不同初免-加强免疫策略体内免疫原性(体液免疫)验证

[0095] 1.动物疫苗免疫

[0096] 为了评估实施例1制备的疫苗的免疫原性,以及不同免疫策略对体液免疫应答的影响,特定病原体的6周龄BALB/c雌性小鼠购于上海斯莱克公司,并将其保存在艾棣维欣Advaccine实验室(苏州)的动物设施中。

[0097] 对于DNA疫苗的免疫:将25μg实施例1所述DNA疫苗先后注射到胫骨前(TA)肌肉,然后进行电脉冲(EP)。电脉冲(EP)装置由两组具有0.2Amp恒定电流的脉冲组成。第二脉冲组被延迟3秒。在每个组中,有两个52ms的脉冲,脉冲之间的延迟为198ms。

[0098] 对于蛋白疫苗的免疫:分别肌肉注射10μg实施例1所述蛋白疫苗。将第一次初免计为0天,第21天进行第二次免疫(加强免疫)。

[0099] 实验组别设置参见图1A~C,其中pVAX1组分别为DNA疫苗载体对照,Alum为阴性对照。pVAX1每次用量为25μg,Alum每次用量为50μg(100μl)。

[0100] 其中ZF2001/ZF2001组意味着初免(第0天)和加强免疫(第21天)均使用蛋白疫苗,DNA-S/ZF2001意味着初免(第0天)使用DNA疫苗,加强免疫(第21天)使用蛋白疫苗,以此类推。在第14、28、35天采集小鼠血液样品,用ELISA法测定血清的特异性抗体滴度。分别在第21天处死部分初免疫的小鼠,在第35天处死加强免疫的小鼠,分析细胞的免疫反应。

[0101] 2.体液免疫应答的验证

[0102] 实验方法:

[0103] 使用基于ELISA方法评估针对SARS-CoV-2RBD蛋白结合抗体。将Nunc 96孔ELISA平板在4℃下用1μg/mL SARS-CoV-2RBD蛋白 (Acro Biosystems, DE, 美国) 包被过夜。将板洗涤3次, 然后用含5%牛血清白蛋白 (BSA) 的PBS (含0.05% Tween20, 即PBST缓冲液) 37℃下封闭1小时。将三倍连续稀释的小鼠血清添加到每个孔中, 并在37℃下孵育1小时。将板再次洗涤五次, 然后在37℃加入1:8000稀释的山羊抗小鼠IgG-HRP (GenScript, NJ, CN) 孵育1小时后, 随后检测结合抗体。最后洗涤后, 通过使用TMB底物使板显影, 并用TMB终止溶液 (KPL, MD, USA) 终止反应。在450nm和620nm处读数, 血清抗体滴度的终点确定为最高稀释度的倒数, 样本最高稀释度比阴性对照的吸光度高2.1倍。(判定标准: 实验组: 对照组 (阴性) OD₄₅₀₋₆₂₀值 ≥ 2.1 , 判定该OD值下对应的最高稀释度为血清抗体滴度)

[0104] 实验结果:

[0105] 图1A展示了初免后14天、加强免疫后7天、14天 (即第14天、第28天、第35天) 血清对SARS-CoV-2RBD蛋白的反应性, 由实验结果可以看出, 除pVAX1、Alum对照组外, 所有初免-加强方案在初免后均诱导了针对SARS-CoV-2RBD蛋白的IgG滴度。其中DNA-S/ZF2001组在加强免疫后7天, 抗体水平有大幅度提升, 诱导了最高水平的IgG抗体, ZF2001/DNA-S组在加强免疫后14天, 抗体水平与初免组相比, 抗体滴度倍数提高了近18倍 (如图1B所示)。在加强免疫后7天和14天, DNA-S/ZF2001组诱导了最高水平的IgG抗体。

[0106] 为了分析初免后每种加强剂对抗体增强的贡献, 将加强免疫后检测的抗体效价除以初免后抗体效价得到倍数变化, 图1B展示了加强免疫后14天抗体滴度与初免后14天血清抗体滴度倍数变化值, 由图1B的结果可以更加直接地看出, 在加强免疫后, DNA-S/ZF2001组、ZF2001/DNA-S组均达到了达到18倍左右的提升, 而同源疫苗加强的DNA-S/DNA-S组和ZF2001/ZF2001组抗体滴度变化不超过10倍, 这说明异源疫苗加强明显高于使用同源疫苗加强的体液免疫水平。

[0107] 图1C展示了加强免疫后14天血清对SARS-CoV-2RBD蛋白和S蛋白的反应性, 由实验结果可以看出, 加强免疫后14天血清对RBD蛋白和S蛋白的反应性一致, 能诱导了相似水平的IgG抗体。相似地, DNA-S/ZF2001组诱导了最高水平的IgG抗体。

[0108] 可见, 异源初免-加强免疫策略所产生的免疫原性 (体液免疫水平) 高于同源初免-加强免疫策略。异源初免-加强免疫策略对靶抗原的免疫反应具有加强协同作用, 这种协同作用表现在加强的体液免疫。其中, 尤其是DNA-S/ZF2001组、ZF2001/DNA-S组在加强免疫后产生了最高水平的抗体。

[0109] 实施例3新冠SARS-CoV-2DNA疫苗联合SARS-CoV-2蛋白疫苗异源初免-加强免疫策略的广谱性验证

[0110] 实验方法:

[0111] 为了评估异源初免-加强免疫策略的广谱性, 采用假病毒进行中和抗体实验。

[0112] 1) anti-VSV-G抗体纯化

[0113] 用透气的T175瓶培养半悬浮状态的鼠源杂交瘤细胞, 收集上清, 待收集到一定体积上清后用protein A进行纯化, 经SDS-PAGE胶初步鉴定抗体纯度; 用HEK293T细胞检测抗体对G*ΔG-VSV骨架病毒的中和程度, 判定抗体的滴度及抗体的使用稀释倍数。

[0114] 2) G*ΔG-VSV骨架病毒的包装

[0115] 提前一天铺HEK293T细胞, 150mm培养皿。按照质粒:PEI质量比1:3转染, 每盘转染G

蛋白质粒90 μ g, PEI 270 μ g。质粒、PEI分别与1mL opti-MEM混合,静置5min,之后把G质粒与PEI混合。静置20min后,弃掉细胞中原有的培养基,更换为无血清的DMEM(注意,不添加抗生素)8ml,加入2ml质粒与PEI的混合液。4h后换液为10% FBS DMEM(内含有1/1000的双抗)。24h后弃旧培养基,换新培养基(包含10% FBS+1/1000双抗),加入 Δ G-VSV假病毒(用量根据滴度计算)。30h后收毒,3000rpm,10min后过滤器(0.45 μ m),分装,保存于-80 $^{\circ}$ C。用HEK293T细胞检测G* Δ G-VSV骨架病毒滴度,10倍起始,10倍梯度稀释,共9个梯度。

[0116] 3) 假病毒包装

[0117] 提前一天铺HEK293T细胞,100mm培养皿。按照质粒:PEI质量比1:3转染,每盘转染不同病毒株的S蛋白质粒30 μ g, PEI 90 μ g。质粒、PEI分别与0.5mL opti-MEM混合,静置5min,之后把S质粒与PEI混合。静置20min后,弃掉细胞中原有的培养基,更换为4-5mL无血清、无抗生素的DMEM,每盘加入1mL S质粒与PEI的混合液,4-6h后换液为10% FBS的DMEM(内含抗生素)。每盘加入骨架毒G* Δ G-VSV 600 μ L (1.2×10^8 PFU/mL),2h后换液为10% FBS的DMEM,内含1/1000的anti-VSV-G抗体(终浓度10 μ g/mL)。30h后,镜下观察GFP强度和细胞状态,再收集病毒。收上清后,以3000rpm/min的转速于室温离心10min,用0.45 μ m滤器过滤后,分装至2mL病毒收集管,保存至-80 $^{\circ}$ C。

[0118] 4) 假病毒检测

[0119] 用Vero细胞检测假病毒滴度,BHK-21检测假病毒中是否有G* Δ G-VSV残留。假病毒3倍起始、2倍梯度进行稀释,感染Vero细胞,15h后用CQ1进行读数,读数在1000左右所用的稀释倍数为工作浓度。接毒到BHK-21细胞上观测是否残留GFP,若仍观察到荧光,则假毒不可用;若未观察到,则可用。

[0120] 5) 假病毒中和

[0121] 在96孔板(Corning[®]3799)中用10% FBS的DMEM培养基稀释血清,40倍起始,2倍比稀释,每孔60 μ L。不同假病毒株同样用10% FBS的DMEM培养基进行稀释到相同的滴度。血清稀释液与假病毒稀释液等体积混和,每孔120 μ L。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中孵育。1h后,将每孔100 μ L混合液转入到前一天铺好的Vero细胞的96孔板(Corning[®]3599)中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中继续孵育。15h后,取出培养箱,用CQ1进行读数。数据用Microsoft Excel中的宏和Graphpad Prism 9进行处理。

[0122] 实验结果:

[0123] 图2A-2H展示了DNA-S/ZF2001组、ZF2001/DNA-S组两种异源初免-加强免疫策略均能显著激发实验动物产生针对新冠突变株的特异性抗体,包括Alpha突变株、Delta突变株、Beta突变株、Gamma突变株、Kappa突变株、Lambda突变株。针对不同突变株,除pVAX1、Alum对照组外,DNA-S/ZF2001组、ZF2001/DNA-S异源免疫组均产生了高水平的特异性中和抗体,这证实了异源初免-加强免疫策略具有相当不错的广谱性,针对多种新冠突变株均能产生特异性的中和抗体,能够提供针对多种SARS-CoV-2病毒突变株的保护作用。

[0124] 实施例4.新冠DNA疫苗联合蛋白疫苗不同初免-加强免疫程序体内免疫原性(细胞免疫)验证

[0125] 实验方法:

[0126] 前期研究表明,DNA疫苗免疫可以诱导高水平的细胞免疫,我们通过ELISpot分析,进一步研究DNA疫苗是否促进蛋白疫苗获得更强的细胞免疫。免疫程序参考实施例2动物疫

苗免疫部分,实验组别设置参见图3A。分别在初免21天,加强免疫后14天分离脾细胞,进行IFN- γ ELISpot实验。

[0127] 分离脾细胞:在初免21天,加强免疫后14天,无菌环境中进行,将小鼠牺牲后取出脾脏,研磨成单细胞悬液;离心收获细胞,红细胞裂解液重悬后裂解,含FBS的PBS终止裂解;过滤,对制备好的单细胞悬液计数;将单细胞悬浮在补充有10%FBS,青霉素/链霉素的RPMI1640培养基中。

[0128] IFN- γ ELISpot实验:通过使用小鼠IFN- γ ELISpot板(Dakewe, SZ, CN)进行IFN- γ ELISpot测定。将通过上述方法分离的每只小鼠的脾脏细胞悬液以500,000cells/well的密度接种到每个包被有抗IFN- γ 抗体的孔中,并在37°C的CO₂培养箱中分别用SARS-CoV-2RBD肽库/SARS-CoV-2S2肽库刺激18小时,每孔每种肽浓度为10 μ g/mL(终浓度)(溶于RPMI-1640+10%FBS)。根据产品说明书进行操作。培养基和PMA/Iono分别作为阴性和阳性对照。阳性斑点通过iSpot Reader(AID,德国Straßberg)进行定量检测。通过减去阴性对照孔来计算每百万个细胞的斑点形成单位(SFU)。

[0129] 实验结果:

[0130] 图3A展示了初免21天RBD肽库刺激后免疫细胞IFN- γ ELISpot结果,可以看出,相较于对照组以及ZF2001初免组,使用DNA-S初免后达到了极其显著的细胞免疫水平。图3B、3C展示了加强免疫14天RBD肽库/S2肽库刺激后免疫细胞IFN- γ ELISpot结果,可以看出, DNA-S/DNA-S组效果最佳,其次为ZF2001/DNA-S组,和DNA-S/ZF2001组, ZF2001/ZF2001组最低。值得注意的是,在ZF2001/DNA-S组中, DNA-S用作加强剂,具有显著提高细胞免疫水平的效果。可见,加入了DNA疫苗的免疫策略使得CMI水平明显提升。这些结果意味着加入了DNA疫苗的初免-加强组相对于ZF2001/ZF2001组可以引发显著性增强的细胞免疫水平。

[0131] 实施例5.新冠DNA疫苗联合蛋白疫苗不同初免-加强免疫程序体内免疫原性(细胞免疫)验证

[0132] 实验方法:

[0133] 进一步评估不同免疫策略对疫苗引发的抗原特异性细胞免疫应答的影响,尤其是CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞功能的影响,免疫程序参考实施例2动物疫苗免疫部分,实验组别设置参见附图5A-5B。在加强免疫后14天分离脾细胞,进行流式细胞仪检测实验。

[0134] 分离脾细胞:在加强免疫后14天,无菌环境中进行,将小鼠牺牲后取出脾脏,研磨成单细胞悬液;离心收获细胞,红细胞裂解液重悬后裂解,含FBS的PBS终止裂解;过滤,对制备好的单细胞悬液计数;将单细胞悬浮在补充有10%FBS,青霉素/链霉素的RPMI1640培养基中。

[0135] 流式细胞仪检测实验:通过上述方法获得的来自每只小鼠的脾脏细胞悬液,37°C, 5%CO₂下用SARS-CoV-2RBD肽库或PMA/Iono刺激,同时利用1 μ g/ml的Brefeldin A阻断(BD, CA,美国)6小时。对脾细胞进行细胞内细胞因子染色,将刺激的脾细胞用FVD-eFluor780染色,然后洗涤,并在室温避光环境下分别用抗小鼠CD4, CD8a或CD107a抗体染色30分钟。用固定/通透缓冲液透化细胞,并用抗小鼠IFN- γ 抗体和抗小鼠TNF- α 抗体在4°C下进行45分钟细胞内染色。将细胞洗涤两次,并用200 μ L PBS重悬,然后使用流式细胞仪(ThermoFisher, MA,美国)进行采集,然后用FlowJo软件(FlowJo LLC, OR,美国)进行分析。

[0136] 实验结果:

[0137] 图4A-4D显示了流式细胞术检测的加强免疫后14天免疫细胞CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺TNF- α ⁺, 多功能T细胞亚群分析结果, CD8⁺IFN- γ ⁺, CD8⁺CD107a⁺, 多功能T细胞亚群分析结果。

[0138] 由图4A-4D结果看出,基本上DNA-S/DNA-S组可以刺激最高的CD4⁺IFN- γ ⁺水平,以及最高的CD107a⁺水平,这跟本领域的常规认识相符,DNA疫苗通常可以诱导更强的细胞免疫应答水平。而同源初免-加强蛋白组ZF2001/ZF2001诱导了最低的CD4⁺T细胞中的细胞因子;DNA-S/ZF2001异源初免-加强组居中。这证实了加入DNA疫苗的异源初免-加强组相对于蛋白组可以引发更强的细胞免疫水平。

[0139] 图4A CD4⁺IFN- γ ⁺的结果显示了,ZF2001/DNA-S组以及DNA-S/ZF2001组这些异源初免-加强组刺激了更高的CD4 IFN- γ 分泌,明显高于ZF2001/ZF2001组的效果。

[0140] 图4B CD4⁺TNF- α ⁺的结果显示了,DNA-S/ZF2001异源初免-加强组刺激了更高的CD4 TNF- α 分泌,高于ZF2001/ZF2001组的效果。

[0141] 图4C CD8⁺IFN- γ ⁺结果显示,DNA-S/DNA-S组刺激了明显更高的IFN- γ 分泌。ZF2001/DNA-S组以及DNA-S/ZF2001组这些异源初免-加强组居中;ZF2001/ZF2001组最低。

[0142] 图4D CD8⁺CD107a⁺的结果也显示了,DNA-S/DNA-S组刺激了明显更高的CD8⁺CD107a⁺表达。ZF2001/DNA-S组以及DNA-S/ZF2001组这些异源初免-加强组居中;ZF2001/ZF2001组最低。

[0143] 相较于ZF2001/ZF2001组,无论将DNA用作初免剂还是加强剂,几乎所有异源的初免-加强型组均在CD4⁺T和CD8⁺T细胞中获得更高水平的细胞因子表达,这表明DNA疫苗确实产生Th1偏向的细胞免疫反应。

[0144] 实施例4-5的结果基本一致,相对于ZF2001/ZF2001组而言,ZF2001/DNA-S组、DNA-S/ZF2001组及DNA-S/DNA-S组引发了更高的细胞免疫应答,即,加入了DNA疫苗的初免-加强组相对于蛋白/蛋白组可以引发更高的细胞免疫应答。

[0145] 实施例6.新冠DNA疫苗联合蛋白疫苗初免-加强免疫程序体内攻毒保护验证

[0146] 实验方法:

[0147] 为了进一步评估不同免疫策略对病毒的抑制效果,通过滴鼻的方式使BALB/c小鼠感染Ad5-hACE2 (8×10^9 vp of Ad5-hACE2),有效表达hACE2,作为新型冠状病毒的感染模型。5天后,通过同样的方式使小鼠感染SARS-CoV-2 (5×10^5 TCID₅₀, SARS-CoV-2 (hCoV-19/China/CAS-B001/2020, GISAID No. EPI_ISL_514256-7)。5天后解剖小鼠,取肺组织,一部分固定到4%多聚甲醛溶液,剩余肺组织放入研磨管中,称重,加入800 μ l DMEM进行研磨,Omni BeadRuptor12均质器进行研磨。离心分离肺组织上清液,取50 μ l进行核酸提取(QIAGEN kit),进行qPCR。在安全柜里按FastKing One Step Probe RT-qPCR试剂盒使用说明配置qPCR体系,如下表1,通过检测SARS-CoV-2的gRNA(N基因)和sgRNA来判断小鼠肺组织中病毒载量以及病毒在肺组织里的增殖情况。

[0148] 表1FastKing One Step Probe RT-qPCR kit配置qPCR体系

试剂	体系(单位: μ l)
2xqPCR	10
酶	0.8
F	0.5
R	0.5
探针	0.4

[0149]

[0150]	ddH ₂ O	2.8
	模板 RNA	5
	体系体积	20

[0151] 引物和探针:

[0152] N-gene-F, GACCCCAAATCAGCGAAAT; (seq_10)

[0153] N-gene-R, TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG; (seq_11)

[0154] N-gene-probe, FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-TAMRA; (seq_12)

[0155] sgRNA-E-F, CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC; (seq_13)

[0156] sgRNA-E-R, ATATTGCAGCAGTACGCACACA; (seq_14)

[0157] sgRNA-E-probe, FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-TAMRA (seq_15)

[0158] 实验结果:

[0159] BALB/c小鼠攻毒后5天解剖小鼠取肺部组织研磨,测定肺中病毒载量,分别检测gRNA和sgRNA,结果如图5A-5B所示。gRNA检测的是病毒N基因,检测到gRNA说明肺组织中有病毒的存在,说明病毒感染了肺组织;sgRNA是新型冠状病毒复制的中间产物,如果检测到sgRNA说明病毒感染了细胞且利用宿主细胞的环境进行了自我复制。从结果来看两个对照组都检测较高的SARS-CoV-2gRNA基因,pVAX1组和Alum组分别检测到小鼠肺脏组织gRNA平均每克高达 $10^{9.07}$ copies和 $10^{9.79}$ copies,说明在对照组里有大量病毒的感染,而疫苗组gRNA水平相对对照组降低很多。ZF2001/ZF2001组、DNA-S/DNA-S组、DNA-S/ZF2001组、ZF2001/DNA-S相对于pVAX1组分别降低了8636、2249、6970、3756倍;相对于Alum组降低了44788、11666、36147、19480倍。可以看到DNA-S/ZF2001组、ZF2001/DNA-S两组异源Prime-Boost的降低倍数都比DNA-S/DNA-S组高,尤其DNA-S/ZF2001组降低倍数比同源DNA-S/DNA-S组高很多。虽然降低倍数没有ZF2001/ZF2001组高,但DNA-S/ZF2001组与其比较接近。在感染病毒5天的时候,两个对照组全部或部分小鼠检测到了sgRNA,说明有病毒感染了细胞并在细胞里进行了复制,而在疫苗组中没有检测到sgRNA,说明在疫苗组可以阻止或抑制病毒在体内的复制。可见,四个疫苗组都能有效阻止或抑制病毒在体内的复制。

[0160] 综上,本发明异源初免-加强免疫策略所产生的免疫原性高于同源初免-加强免疫策略。异源初免-加强免疫策略对靶抗原的免疫反应具有协同加强作用,这种协同作用表现在抗原特异性的T细胞数量的增加、加强的细胞免疫和体液免疫,以及较为广谱的免疫反应。

[0161] 本发明提供的用于实现初免-加强异源免疫方案的试剂盒能够克服现有单一类型疫苗产品的不足,从而更好地发挥新冠疫苗的免疫效果。相较于DNA疫苗初免-加强组,DNA疫苗和蛋白疫苗初免-加强异源组,可以诱发明显更高的体液免疫水平,甚至高于蛋白疫苗组。相较于蛋白疫苗初免-加强组,DNA疫苗和蛋白疫苗初免-加强异源组,可以诱发非常显著地增高的细胞免疫水平。本发明提供的试剂盒联合施用DNA疫苗和蛋白疫苗所诱发的保护性免疫应答,综合来看,要优于单独施用单个种类疫苗所诱发的免疫应答。本发明用于实现Prime-boost免疫方法的新型冠状病毒疫苗试剂盒能够提供针对多种SARS-CoV-2病毒突变株的保护作用。

[0162] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依

然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

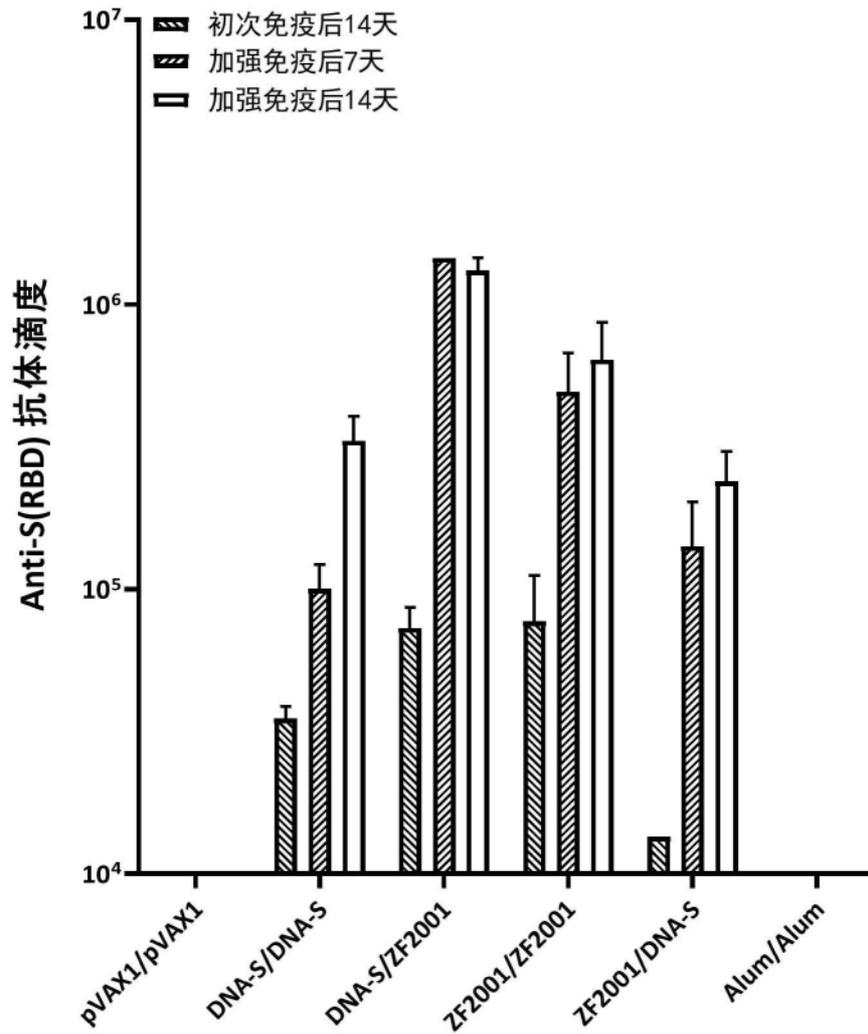


图1A

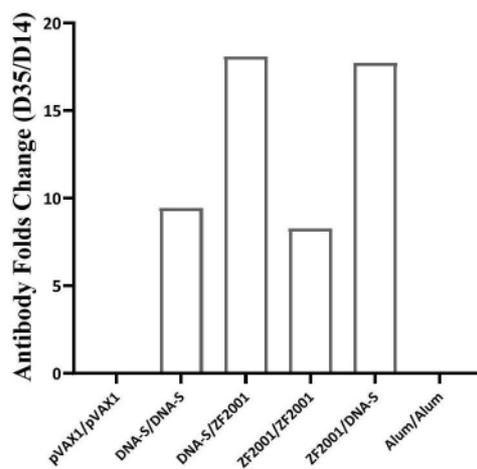


图1B

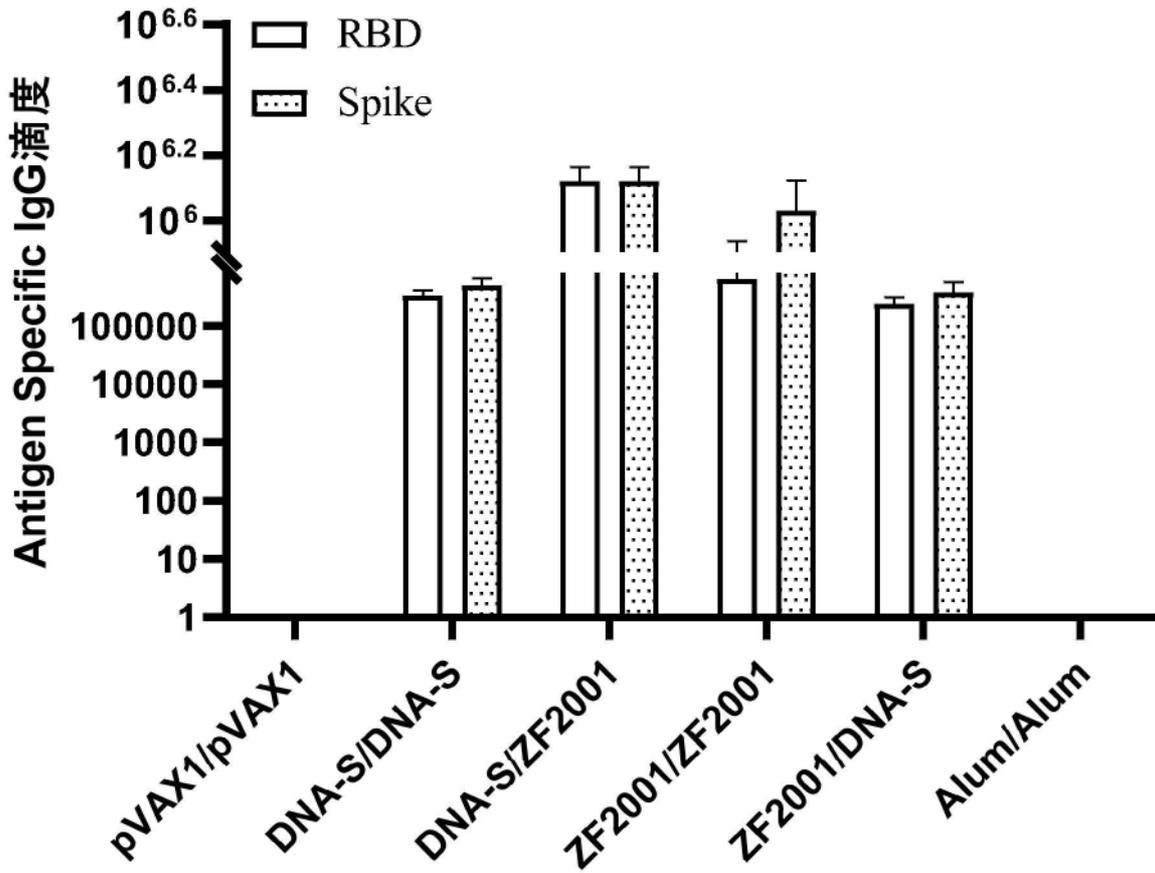


图1C

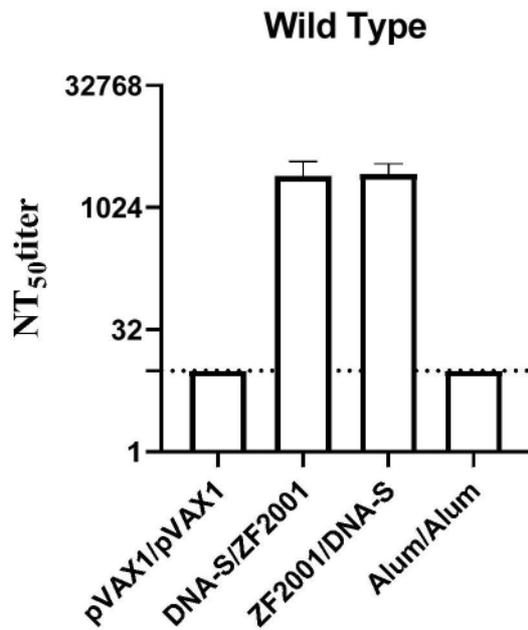


图2A

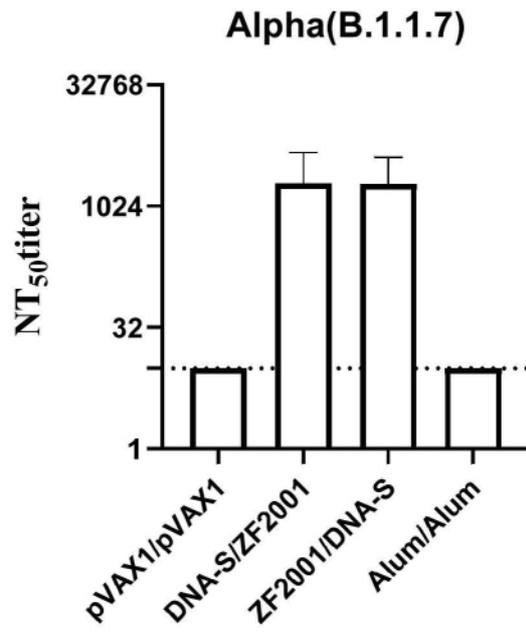


图2B

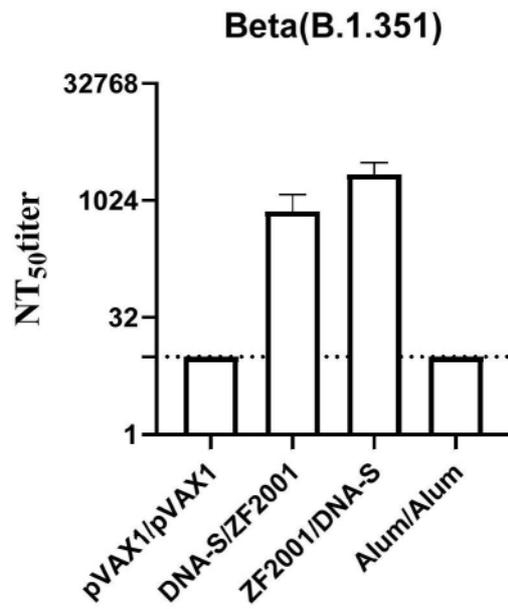


图2C

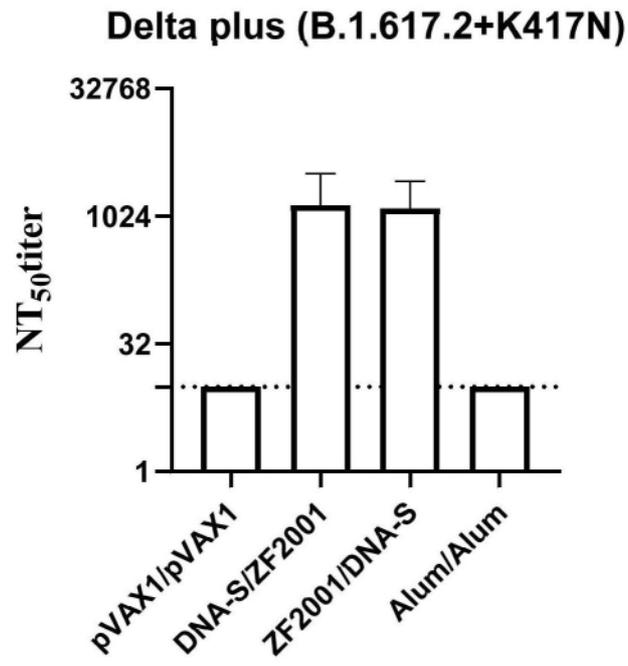


图2D

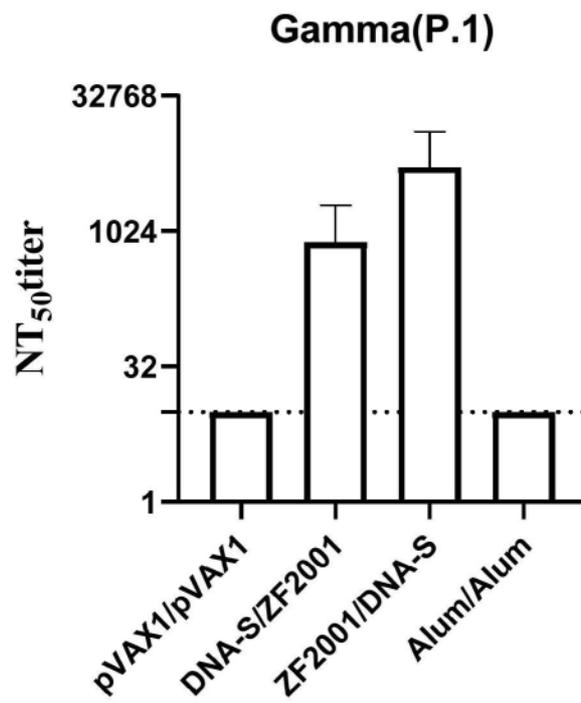


图2E

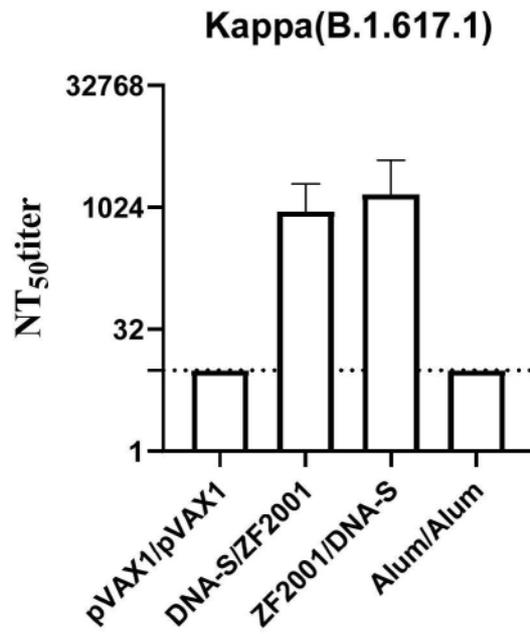


图2F

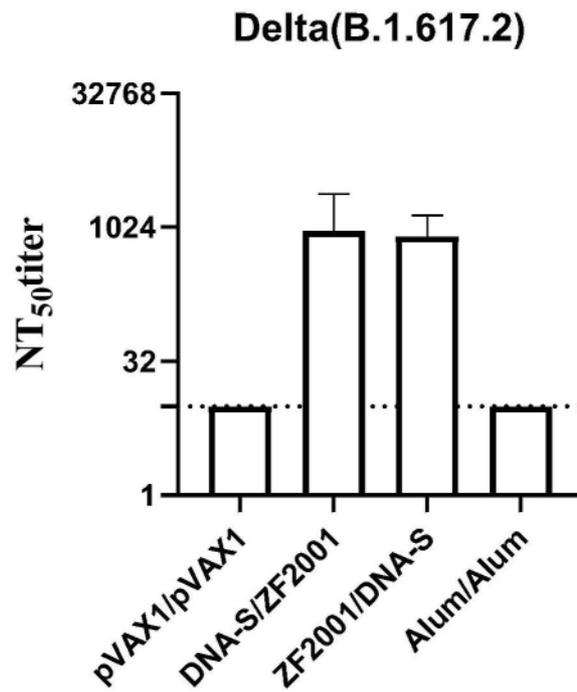


图2G

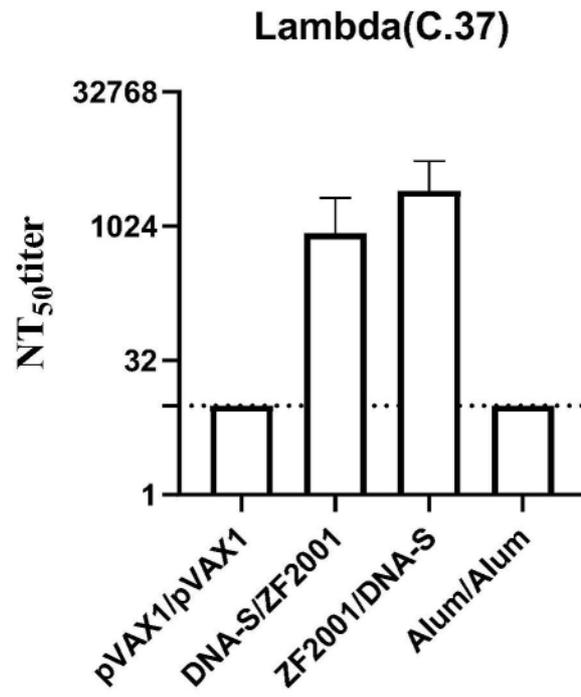


图2H

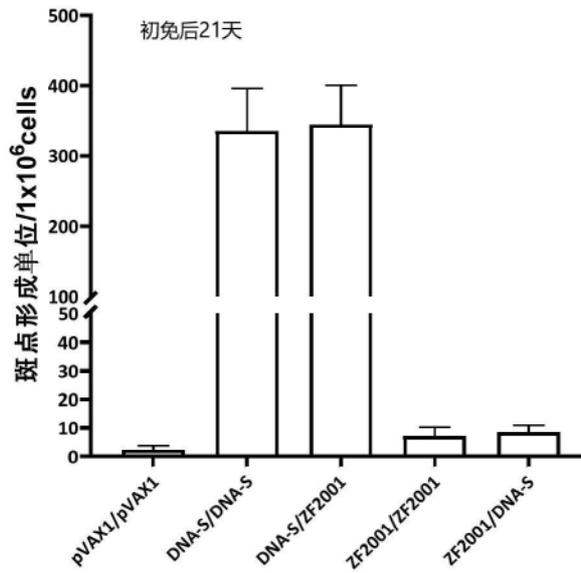


图3A

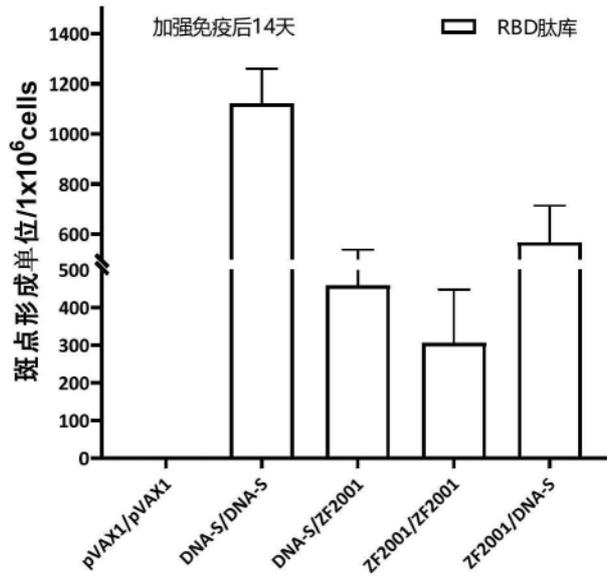


图3B

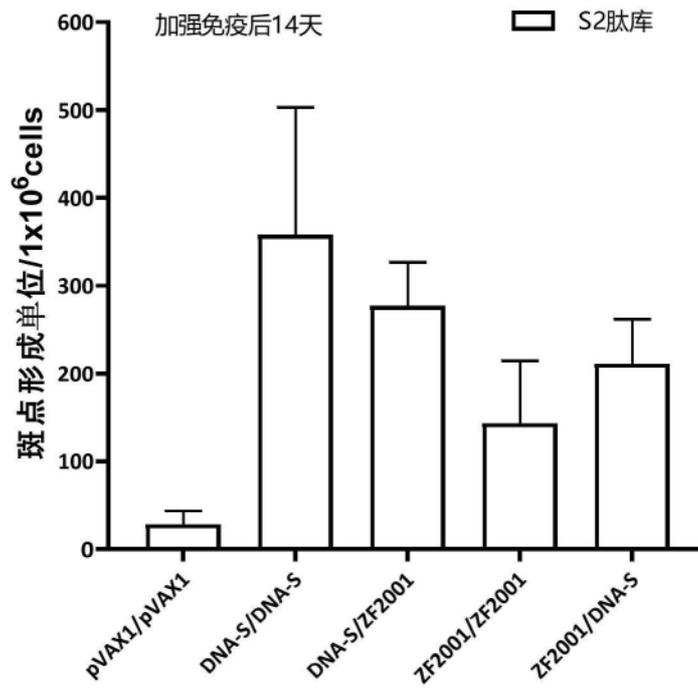


图3C

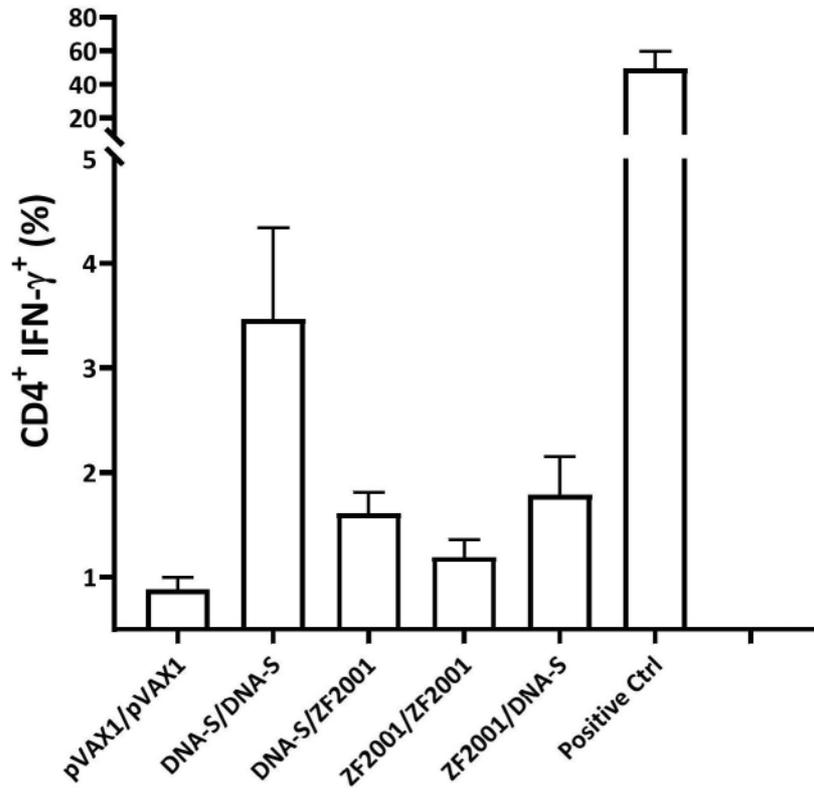


图4A

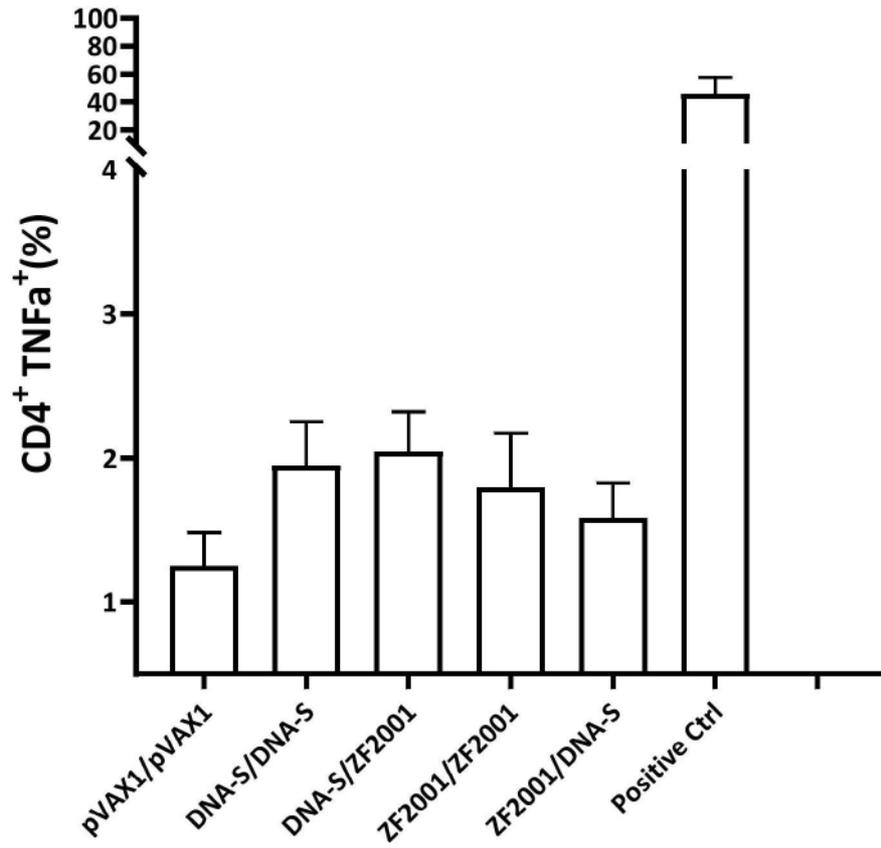


图4B

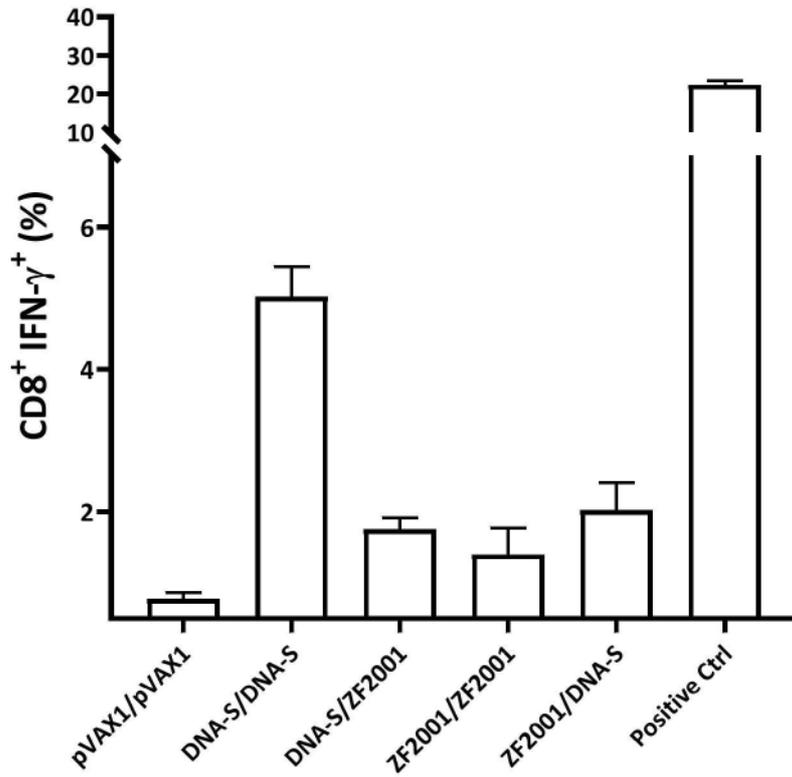


图4C

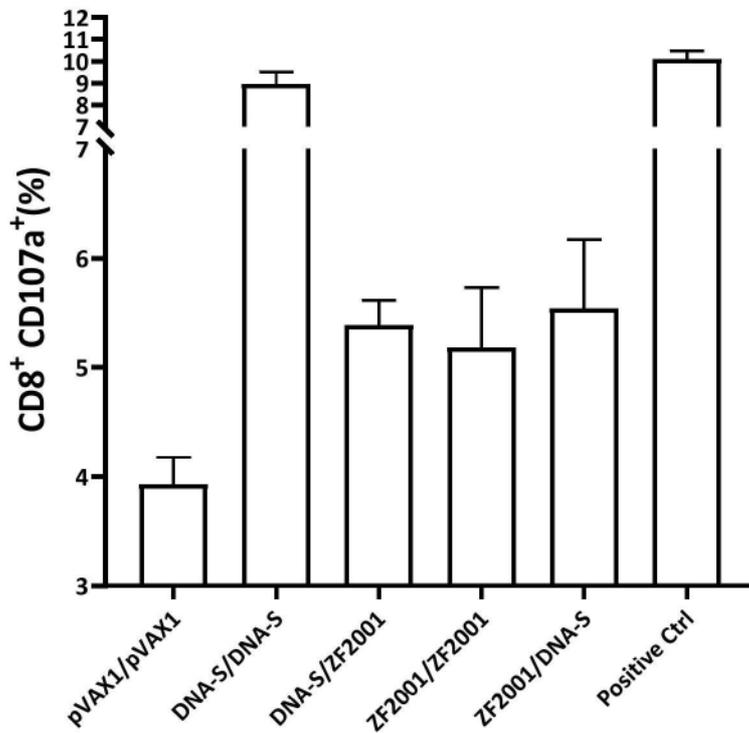


图4D

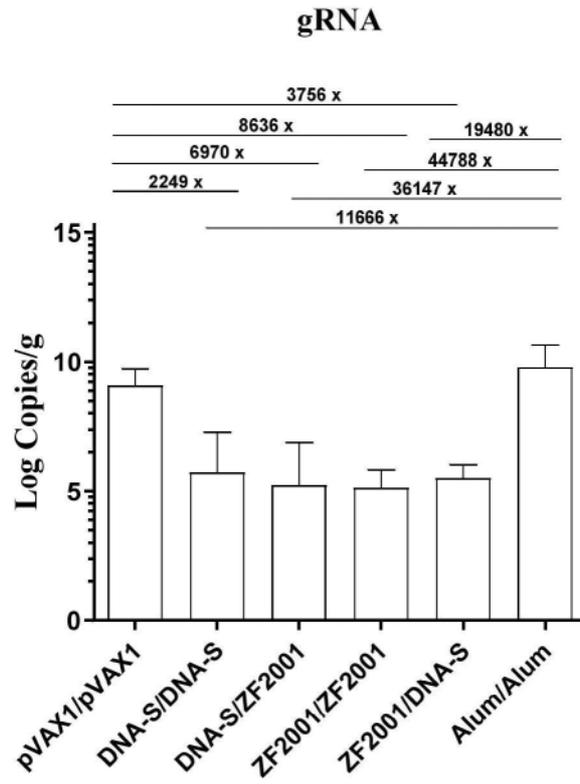


图5A

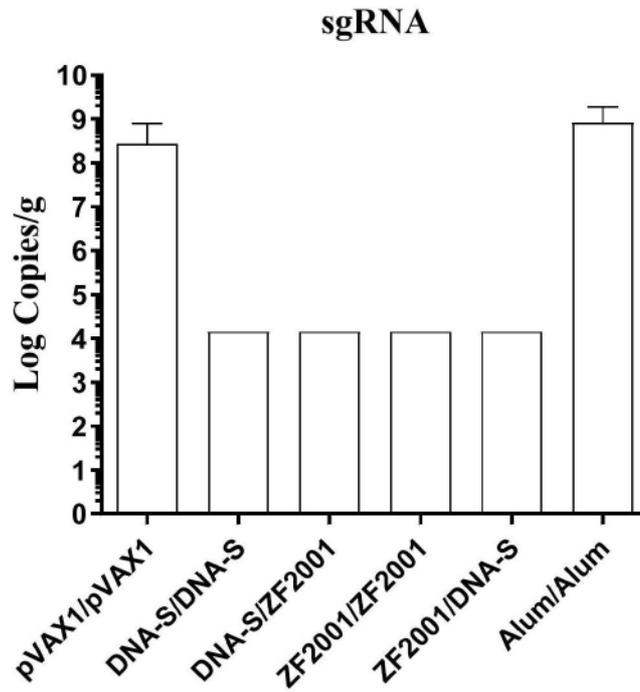


图5B