

(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 1 月 7 日 (07.01.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/000969 A2

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/50 (2006.01) *A61K 39/215* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01) *A61P 31/20* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/110086

(22) 国际申请日: 2020 年 8 月 19 日 (19.08.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010110070.8 2020年2月23日 (23.02.2020) CN
202010145657.2 2020年3月5日 (05.03.2020) CN

(71) 申请人: 广州恩宝生物医药科技有限公司
(GUANGZHOU N BIOMED LTD.) [CN/CN]; 中国

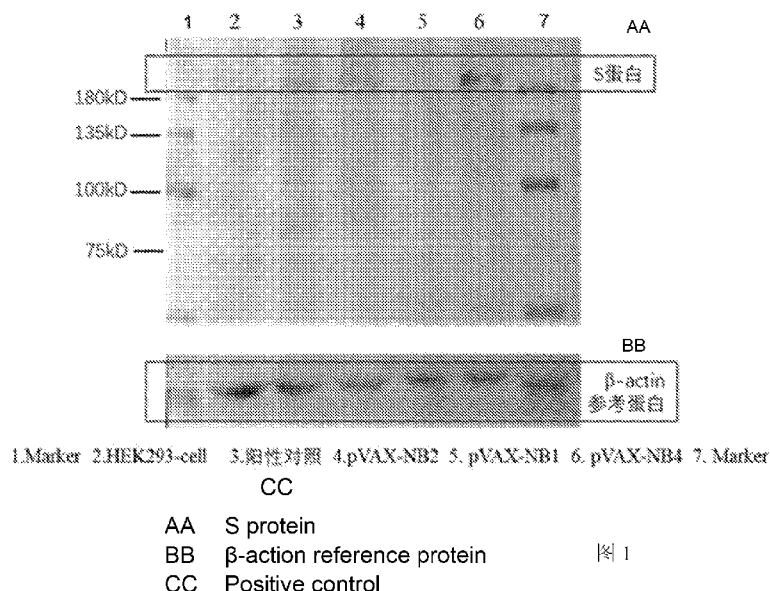
广东省广州市高新技术产业开发区瑞发路1号自编1栋二楼201室, Guangdong 510663 (CN)。

(72) 发明人: 陈凌(CHEN, Ling); 中国广东省广州市高新技术产业开发区瑞发路1号自编1栋二楼201室, Guangdong 510663 (CN)。 关素华(GUAN, Suhua); 中国广东省广州市高新技术产业开发区瑞发路1号自编1栋二楼201室, Guangdong 510663 (CN)。 杨臣臣(YANG, Chenchen); 中国广东省广州市高新技术产业开发区瑞发路1号自编1栋二楼201室, Guangdong 510663 (CN)。 刘晓琳(LIU, Xiaolin); 中国广东省广州市高新技术产业开发区瑞发路1号自编1栋二楼201室, Guangdong 510663 (CN)。

(74) 代理人: 广州嘉权专利商标事务所有限公司 (JIAQUAN IP LAW); 中国广东省广州市天

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE EXPRESSING SARS-COV-2 VIRUS ANTIGEN PEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 表达SARS-CoV-2病毒抗原肽的核酸序列及其应用



(57) Abstract: Disclosed are a nucleic acid sequence expressing SARS-CoV-2 virus antigen peptide and a use thereof. The nucleic acid sequence is Seq ID No. 1, Seq ID No. 2, or a sequence having at least 90% homology. The nucleic acid sequences in some embodiments of the present invention can be effectively expressed in human cells, produce corresponding polypeptides, induce the production of corresponding immunological protective response, and has the potential to be developed into a SARS-CoV-2 vaccine.

(57) 摘要: 本发明公开了表达SARS-CoV-2病毒抗原肽的核酸序列及其应用, 核酸序列为SEQ ID NO.: 1、SEQ ID NO.: 2或其具有至少90%同源性的序列。本发明一些实例的核酸序列, 可以在人体细胞中有效表达, 产生相应的多肽, 诱导产生相应的免疫保护反应, 有望开发为SARS-CoV-2疫苗。

河区黄埔大道西100号富力盈泰广场A栋
910, Guangdong 510627 (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, IT, 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)。

根据细则4.17的声明:

- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 根据申请人的请求, 在条约第21条(2)(a)所规定的期限届满之前进行。
- 不包括国际检索报告, 在收到该报告后将重新公布(细则48.2(g))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

表达 SARS-CoV-2 病毒抗原肽的核酸序列及其应用

技术领域

本发明涉及一种优化的冠状病毒 S 蛋白及其应用，特别涉及表达 SARS-CoV-2 病毒抗原肽的核酸序列及其应用。

背景技术

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的潜伏期可长达 24 天，传染性强，与引发非典的 SARS 病毒不同，部分病例潜伏期具有传染性，另有一些病毒携带者没有表现出任何明显症状。这对疫情的防控增加了难度。截止 2020 年 7 月 20 日，全球累计确认病例数接近 1500 万，死亡人数超过 60 万。迄今尚未发现 COVID-19 的特效药物。为控制疫情，多数国家实行隔离措施，关闭非必要的设施，造成了巨大的经济损失。因此，快速研制出能够提升群体免疫水平并阻断病毒传播的预防疫苗已成为当前最为紧迫的重大需求。

针对新型冠状病毒，目前国内外尚无明确验证的特效抗病毒药物和预防性疫苗。因此做好预防，阻断病毒的传播是控制疫情的关键。而疫苗的应用已在消除多种传染病中发挥了不可替代的作用。已公布的十几个 SARS-CoV-2 病毒基因组比对的结果显示病毒之间的差异非常小，目前还没发现发生变异。因此，如果 SARS-CoV-2 疫苗研发成功，必将能在很大程度上抑制新疫情的暴发。

SARS-CoV-2 的全序列如 NC_045512.2 所示，该序列的 21563..25384 核酸为刺突蛋白 (Spike protein, S) 的编码序列。S 蛋白是病毒粒子的一种主要结构蛋白，在介导病毒粒子与宿主细胞受体的结合以及诱导中和抗体中起重要作用，是理想的疫苗抗原。S 蛋白含有两个亚基，S1 和 S2。病毒感染宿主细胞时，S1 与宿主细胞受体 ACE2 结合后，经宿主细胞蛋白酶切后，S1 与 S2 脱离，加速 S2 与细胞膜的融合。以 S 蛋白为抗原的疫苗，包括核酸疫苗，亚单位疫苗和病毒载体疫苗，其 S 蛋白的表达水平、蛋白结构决定了疫苗的有效性。

实验表明 SARS-CoV-2 的刺突蛋白 S 基因在常用的亚单位疫苗表达细胞，如人肾细胞 HEK293 的表达水平很低。因此如果以原始的 S 密码子来表达为抗原，其疫苗可能无效或是效价很低，不足以抵抗病毒的感染。

发明内容

本发明的目的在于提供一种能表达对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 引起免疫原性的多肽的核酸序列及其应用。

本发明所采取的技术方案是：

本发明的第一个方面，提供：

一种能表达对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 引起免疫原性的多肽的核酸序列，所述核酸序列包含以下核酸序列中的至少一条：

- a) 核酸序列 SEQ ID NO: 1；或
- b) 核酸序列 SEQ ID NO: 2；或
- c) 与 SEQ ID NO: 1 具有至少 90%，优选 95%、98%、99% 序列相同性的核酸序列。

在一些实例中，所述多肽：

可在人体中诱导免疫应答；或

产生生物报告分子；或

用于检测的分子；或

能调节基因功能；或

成为治疗性分子。

本发明的第二个方面，提供：

一种表达载体，所述的载体含有本发明第一方面的核酸序列。

在一些实例中，所述的载体为病毒载体。

在一些实例中，所述的病毒载体为腺病毒载体。

本发明的第三个方面，提供：

一种表达细胞，所述表达细胞可基于本发明第一方面的核酸序列表达多肽。

本发明的第四个方面，提供：

一种核酸组合物，所述核酸组合物包括本发明第一方面的核酸序列，或本发明第二个方面所述的表达载体。

在一些实例中，所述核酸组合物还包括药学上可接受的佐剂、载体、稀释剂或赋形剂中的至少一种。

本发明的第五个方面，提供：

核酸组合物在制备预防或治疗 COVID-19 制剂中的应用，所述核酸组合物如本发明第四个方面所述。

本发明的第六个方面，提供：

一种预防或治疗 COVID-19 的方法，包括给予人预防量或治疗量的核酸组合物，所述核酸组合物如本发明第四个方面所述。

本发明的有益效果是：

本发明一些实例的核酸序列，可以在人体细胞中有效表达，产生相应的多肽，诱导产生相应的免疫保护反应，有望开发为 SARS-CoV-2 疫苗。

附图说明

图 1 是分别转染等剂量 pVAX-NB1, pVAX-NB2 和 pVAX-NB4 后 S 蛋白的表达结果；

图 2 是 pVAX-NB1 和 pVAX-NB2 DNA 疫苗免疫小鼠的血清的抗体水平。

具体实施方式

SARS-CoV-2 的刺突蛋白(Spike protein, S)的氨基酸序列如 YP_009724390.1 所示，表达 SARS-CoV-2 刺突蛋白的天然核苷酸序列记为 NB1。

真核细胞转录的 mRNA 前体能够通过不同剪接方式（选择不同的剪接位点组合）产生不同的 mRNA 剪接异构体的过程，最终导致同一个基因序列产生的不同的蛋白质。这对蛋白的表达是非常不利的。发明人通过对野生型的天然核酸序列进行密码子优化，同时基于自有技术去除潜在的可变剪切位点，保证了蛋白表达的唯一性，减少了蛋白后续纯化的难度。优化得到的核酸序列记为 NB2，其具体序列如 SEQ ID NO: 1 所示：

```
ATGTTTCGTGTTTCTGGTGCTGCTGCCTCTGGTGAGCTCCCAGTGCGTGAACCTGAC
CACAAGGACCCAGCTGCCACCTGCCTATACCAATAGCTTCACACGGGGCGTGTAATC
CCGACAAGGTGTTTAGATCTAGCGTGCTGCACTCCACCCAGGATCTGTTTCTGCCTTTCT
TTTCTAACGTGACATGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACAAAGCGG
TTCGACAATCCAGTGCTGCCCTTTAACGATGGCGTGTAATTCGCCTCCACCGAGAAGTCT
AACATCATCAGAGGCTGGATCTTTGGCACCACTGGACAGCAAGACCCAGTCCCTGCT
GATCGTGAACAATGCCACAAACGTGGTCATCAAGGTGTGCGAGTTCCAGTTTTGTAATG
ATCCCTTCCTGGGCGTGTAATCACAAGAACAATAAGTCTTGGATGGAGAGCGAGTTTA
GGGTGTATTCCTCTGCCAACAATTGCACCTTTGAGTACGTGAGCCAGCCTTTCCTGATGG
ACCTGGAGGGCAAGCAGGGCAATTTCAAGAACCTGAGGGAGTTCGTGTTTAAGAATATC
GATGGCTACTTCAAGATCTACTCCAAGCACACACCAATCAACCTGGTGCGCGACCTGCC
ACAGGGCTTCTCTGCCCTGGAGCCACTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCC
GGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACCCCAGGCGACAGCTCCTCT
GGATGGACAGCAGGAGCTGCCGCCTACTATGTGGGCTATCTGCAGCCCCGCACCTTCCT
GCTGAAGTACAACGAGAATGGCACCATCACAGACGCAGTGGATTGCGCCCTGGACCCC
CTGTCTGAGACCAAGTGTACACTGAAGAGCTTTACAGTGGAGAAGGGCATCTACCAGA
```

CCAGCAACTTCAGGGTGCAGCCAACAGAGTCCATCGTGCGCTTTCCCAATATCACCAAC
CTGTGCCCTTTTGGCGAGGTGTTCAATGCCACACGCTTCGCCAGCGTGTACGCCTGGAA
TAGGAAGCGCATCTCCAAGTGCCTGGCCGACTATTCTGTGCTGTACAACAGCGCCTCCTT
CTCTACCTTTAAGTGTTATGGCGTGAGCCCCACCAAGCTGAATGATCTGTGCTTTACAAA
CGTGTACGCCGATTCCTTCGTGATCAGGGGCGACGAGGTGCGCCAGATCGCACCAGGAC
AGACCGGCAAGATCGCAGACTACAATTATAAGCTGCCTGACGATTCACAGGCTGCGTG
ATCGCCTGGAACTCTAACAATCTGGATAGCAAAGTGGGCGGCAACTACAATTATCTGTAC
CGGCTGTTTAGAAAGTCTAATCTGAAGCCATTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTA
CCAGGCCGGCTCTACACCCTGCAATGGCGTGAGGGGCTTTAACTGTTATTTCCCTCTGCA
GTCCTACGGCTTCCAGCCAACCAACGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGC
TGTCTTTTGAGCTGCTGCACGCACCTGCAACCGTGTGCGGGCCCAAAGAAGAGCACAAA
TCTGGTGAAGAACAAGTGCGTGAAGTTCAAGTTCAACGGACTGACCGGCACAGGCGTG
CTGACCGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTTTCAGCAGTTCGGCAGGGACATCGCAG
ATACCACAGACGCCGTGCGCGACCCTCAGACCCTGGAGATCCTGGACATCACACCATGT
TCCTTCGGCGGGCGTGTCTGTGATCACCCCAGGCACCAATACATCCAACCAGGTGGCCGT
GCTGTATCAGGACGTGAATTGCACAGAGGTGCCCCGTGGCAATCCACGCAGATCAGCTGA
CCCCTACATGGCGGGTGTACTCTACCGGCAGCAACGTGTTCCAGACAAGAGCCGGATGC
CTGATCGGAGCAGAGCACGTGAACAATAGCTATGAGTGCGACATCCCTATCGGCGCCGG
CATCTGTGCCTCCTACCAGACCCAGACAACTCCCCAAGGAGAGCCCGGTCTGTGGCCA
GCCAGTCCATCATCGCCTATACCATGAGCCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCC
AACAATTCTATCGCCATCCCTACCAACTTCACAATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCA
GTGAGCATGACCAAGACATCCGTGGACTGCACCATGTATATCTGTGGCGATTCCACAGA
GTGTTCTAACCTGCTGCTGCAGTACGGCTCCTTTTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGAC
AGGCATCGCCGTGGAGCAGGACAAGAACACCCAGGAGGTGTTCCGCCAGGTGAAGCA
GATCTACAAGACACCACCCATCAAGGACTTTGGCGGCTTCAAGTTTCAGCCAGATCCTGC
CCGATCCTAGCAAGCCATCCAAGCGGTCTTTTATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAGGTG
ACCCTGGCCGATGCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATCGCCGC
CAGAGACCTGATCTGCGCCCAGAAGTTTAATGGCCTGACCGTGCTGCCTCCACTGCTGA
CAGATGAGATGATCGCACAGTACACCTCTGCCCTGCTGGCCGGCACCATCACAAGCGGA
TGGACATTCGGCGCAGGAGCCGCCCTGCAGATCCCCTTTGCCATGCAGATGGCCTATCG

GTTCAACGGCATCGGCGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCC
AATCAGTTTAAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACTCTCTGAGCTCCACCGCCAGCGC
CCTGGGCAAGCTGCAGGATGTGGTGAATCAGAACGCCCAGGCCCTGAATACACTGGTG
AAGCAGCTGTCTAGCAACTTCGGCGCCATCTCCTCTGTGCTGAATGACATCCTGAGCCG
GCTGGACAAGGTGGAGGCAGAGGTGCAGATCGACCGGCTGATCACCGGCAGACTGCAG
TCCCTGCAGACCTACGTGACACAGCAGCTGATCAGGGCAGCAGAGATCAGGGCCTCTG
CCAATCTGGCCGCCACAAAGATGAGCGAGTGCGTGCTGGGACAGTCCAAGAGGGTGGA
CTTTTGCGGCAAGGGCTATCACCTGATGAGCTTCCCACAGTCCGCCCCCTACGGAGTGG
TGTTTCTGCACGTGACCTACGTGCCAGCCCAGGAGAAGAAGTTCACCACAGCCCCCGCC
ATCTGTCACGATGGCAAGGCCCACTTTCCTAGGGAGGGCGTGTTTCGTGAGCAACGGCAC
CCACTGGTTTGTGACACAGCGCAATTTCTACGAGCCACAGATCATCACCACAGACAATA
CCTTCGTGTCCGGCAACTGCGACGTGGTCATCGGCATCGTGAACAATACAGTGTATGATC
CTCTGCAGCCAGAGCTGGACTCTTTTAAGGAGGAGCTGGATAAGTACTTCAAGAATCAC
ACCAGCCCCGACGTGGATCTGGGCGACATCTCTGGCATCAATGCCAGCGTGGTGAACAT
CCAGAAGGAGATCGACAGACTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATC
GATCTGCAGGAGCTGGGCAAGTATGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTATATCTGGCT
GGGCTTCATCGCCGGCCTGATCGCCATCGTGATGGTGACCATCATGCTGTGCTGTATGAC
AAGCTGCTGTTCTGCCTGAAGGGCTGCTGTTCTTGTGGCAGCTGCTGTAAGTTTGATG
AGGACGATTCCGAGCCTGTGCTGAAGGGCGTGAAGCTGCACTACACCTAA (SEQ ID NO.:
1)。

为了降低基因的 GC 含量,发明人在 NB2 基础上进一步将密码子优化,合成的序列命名为 NB4,具体序列如 SEQ ID NO: 2 所示:

ATGTTTGTCTTCCTGGTGCTGCTGCCTCTGGTCTCTTCTCAGTGTGTGAACCTGACC
ACCAGGACACAGCTGCCTCCTGCTTACACCAACTCCTTCACACGGGGCGTCTACTACCC
TGACAAGGTCTTCAGGTCCTCTGTGCTGCACTCCACACAAGACCTGTTCTGCCATTCTT
CTCCAACGTGACCTGGTTCCATGCCATCCATGTCTCTGGCACCAATGGCACCAAGAGGT
TCGACAACCCTGTGCTGCCATTCAACGACGGCGTCTACTTTGCCTCCACCGAGAAGTCC
AACATCATCAGGGGCTGGATCTTTGGCACCAACCCTGGACTCCAAGACCCAGTCCCTGCT
GATTGTGAACAATGCCACCAACGTGGTGATCAAAGTCTGCGAGTTCCAGTTCTGCAATG
ACCCATTCTGGGGCGTCTACTACCACAAGAACAACAAGTCCTGGATGGAGTCTGAGTTC

AGGGTCTACTCCTCTGCCAACAACCTGCACCTTTGAATATGTCTCCCAGCCATTCTGATG
GACCTGGAGGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGAGGGAGTTCGTCTTCAAGAACA
TCGACGGCTACTTCAAGATCTACTCCAAGCACACACCCATTAATCTCGTCCGGGATCTGC
CTCAGGGCTTCTCTGCCCTGGAGCCCCCTGGTGGACCTGCCCATTGGCATCAACATCACA
CGCTTTCAGACCCTGCTGGCTCTGCACCGGTCTTACCTGACACCTGGCGACTCCTCCTCT
GGCTGGACAGCTGGCGCTGCTGCCTACTATGTGCGGTACCTGCAGCCTAGGACCTTCCT
GCTGAAGTACAATGAGAATGGCACCATCACAGATGCTGTGGACTGTGCCCTGGACCCCC
TGTCTGAGACCAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACAGTCGAGAAGGGCATCTACCAGAC
CTCCAACCTCCGGGTGCAGCCCACAGAGTCCATTGTCAGGTTCCCCAACATCACCAACC
TGTGCCCATTTGGCGAGGTCTTCAATGCCACACGCTTTGCCTCTGTCTATGCCTGGAACA
GGAAGAGGATCTCCAACCTGTGTGGCTGACTACTCTGTGCTGTACAACCTCTGCCTCCTTCT
CCACATTTAAGTGCTATGGCGTCTCCCCACCAAGCTGAATGACCTGTGCTTCACCAATG
TCTATGCTGACTCCTTTGTGATCCGGGGCGATGAAGTTAGGCAGATTGCCCTGGCCAGA
CAGGCAAGATTGCTGACTACAACCTACAAGCTGCCTGATGACTTCACCGGCTGTGTGATT
GCCTGGAACCTCCAACAACCTGGACTCTAAAGTTGGCGGCAACTACAACCTACCTGTACAG
GCTGTTTCAGGAAGTCCAACCTGAAGCCATTTGAGAGGGACATCTCCACAGAGATCTACC
AGGCTGGCTCCACCCCATGCAATGGCGTGGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCCCTGCAA
TCCTATGGCTTCCAACCCACCAATGGCGTGGGCTACCAGCCATACAGGGTGGTGGTGCT
GTCCTTTGAGCTGCTGCATGCCCCTGCCACCGTCTGTGGCCCCAAGAAGTCCACCAACC
TCGTGAAGAACAATGTGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACAGGCACAGGCGTGCT
GACAGAGTCCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAACAGTTTGGCAGGGACATTGCTGAC
ACCACCGATGCTGTCAGGGACCCCCAGACCCTGGAGATCCTGGACATCACCCCATGCTC
CTTTGGCGGCGTCTCTGTGATCACCCCTGGCACCAACACCTCTAATCAAGTCGCTGTGCT
GTACCAGGACGTGAACTGCACAGAGGTTCCCTGTGGCCATCCATGCTGACCAGCTGACCC
CCACCTGGAGGGTCTACTCCACCGGCTCCAATGTCTTCCAAACACGGGCTGGCTGCCTG
ATTGGCGCTGAGCATGTGAACAACCTCCTATGAGTGTGACATCCCCATTGGCGCTGGCATC
TGTGCCTCCTACCAAACCCAGACCAACTCCCCTCGGAGGGCTCGCTCTGTGGCTTCTCA
GTCTATCATTGCCTACACCATGTCCCTGGGCGCTGAGAACTCTGTGGCCTACTCCAACAA
CTCCATTGCCATCCCCACCAACTTCACCATCTCTGTGACCACCGAGATCCTGCCTGTCTC
CATGACCAAGACCTCTGTGGACTGCACCATGTACATCTGTGGCGACTCCACAGAGTGCT

CCAACCTGCTGCTGCAGTATGGCTCCTTCTGCACCCAACCTGAACAGGGCCCTGACAGGC
ATTGCTGTGGAGCAGGACAAGAACACCCAGGAGGTCTTTGCCCAAGTCAAGCAGATCT
ACAAGACCCCCCCCATCAAGGACTTTGGCGGCTTCAACTTCTCCCAAATCCTGCCTGAC
CCATCCAAGCCATCCAAGAGGTCCTTCATTGAGGACCTGCTGTTCAACAAGGTTACCCT
GGCTGATGCTGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGACTGCCTGGGCGACATTGCTGCCAGGG
ACCTGATCTGTGCCCAAAAGTTCAATGGCCTGACAGTGCTGCCCCCCTGCTGACCGAT
GAGATGATTGCCCAGTACACATCTGCTCTGCTGGCTGGCACAATCACCTCTGGCTGGAC
CTTTGGCGCTGGCGCTGCCCTGCAAATCCCATTTGCCATGCAAATGGCCTACAGGTTCAA
TGGCATTGGCGTGACCCAGAACGTGCTGTATGAGAACCAGAAGCTGATTGCCAACCAGT
TCAACTCTGCCATTGGCAAGATCCAGGACTCCCTGTCCTCCACCGCCTCTGCCCTGGGC
AAGCTGCAGGATGTGGTGAACCAGAATGCCCAGGCCCTGAACACCCTGGTGAAGCAGC
TGTCTCCAACCTTTGGCGCCATCTCCTCTGTGCTGAATGACATCCTGTCCCGGCTGGACA
AGGTGGAGGCTGAGGTGCAGATTGACAGGCTGATCACAGGCAGGCTGCAGTCCCTGCA
AACCTATGTGACCCAGCAGCTGATCAGGGCTGCTGAGATCAGGGCCTCTGCCAACCTGG
CTGCCACCAAGATGTCTGAATGTGTGCTGGGCCAGTCCAAGAGGGTGGACTTCTGTGGC
AAGGGCTACCATCTGATGTCCTTCCCCCAATCTGCCCCCATGGCGTGGTCTTCCTGCAT
GTGACCTATGTGCCTGCTCAGGAGAAGAACTTCACCACAGCCCCTGCCATCTGCCATGA
TGGCAAGGCCCACTTCCCTCGGGAGGGCGTCTTTGTCTCCAATGGCACCCACTGGTTTG
TGACCCAGAGGAACTTCTATGAGCCTCAGATCATCACCACAGACAACACCTTTGTCTCT
GGCAACTGTGATGTGGTGATTGGCATTGTGAACAACACAGTCTATGACCCCCTGCAGCC
TGAGCTGGACTCCTTCAAAGAGGAGCTGGACAAGTACTTCAAGAACCACACCTCCCCT
GATGTGGACCTGGGCGACATCTCTGGCATCAATGCCTCTGTGGTGAACATCCAGAAGGA
GATTGACAGGCTGAATGAGGTGGCCAAGAACCTGAATGAGTCCCTGATTGACCTGCAA
GAGCTGGGCAAGTATGAGCAGTACATCAAGTGGCCATGGTACATCTGGCTGGGCTTCAT
TGCTGGCCTGATTGCCATTGTGATGGTGACCATCATGCTGTGCTGCATGACCTCCTGCTG
CTCCTGCCTGAAAGGCTGCTGCTCCTGTGGCTCCTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACT
CTGAGCCTGTGCTGAAGGGCGTGAAGCTGCACTACACCTAATAA (SEQ ID NO.: 2)。

下面结合实验，进一步说明本发明的技术方案。

Spike 基因表达载体的 pVAX-NB1, pVAX-NB2 和 pVAX-NB4 构建：

分别以 NB1 和 NB2 为模板，以 NB1-F 和 NB1-R 为引物 PCR 扩增获得 NB1 片段，以

NB2-F 和 NB2-R 为引物 PCR 扩增获得 NB2 片段, 以 NB4-F 和 NB4-R 为引物扩增获得 NB4 片段后, 再分别以各 CMV-R 和 BGH-F 为引物, 以本公司已有的 pVAX 质粒为模板, PCR 扩增各载体质粒骨架 pVAX 后, 采用同源重组酶 (Exnase) 分别与 NB1, NB2 和 NB4 片段进行体外二片段重组, 得到 pVAX-NB1, pVAX-NB2 和 pVAX-NB4。

检测 Spike 基因表达:

按照常规方法, 利用阳离子脂质体, 分别将 2.5ug 的 pVAX-NB1, pVAX-NB2 和 pVAX-NB4 转染法转染 293 细胞, 转染 48 小时后, 收集细胞, 按照常规的 WesternBlot 方法处理样品, 并进行蛋白检测 (图 1)。可以看出, pVAX-NB1 样品中没有检测到 S 蛋白的表达, 而经过密码子优化的 pVAX-NB2 和 pVAX-NB4 样品中能够观察到 S 蛋白的表达, pVAX-NB4 的 S 蛋白表达量约为 pVAX-NB2 的 2~3 倍。说明 NB4 的序列具有意料之外的效果。

DNA 疫苗免疫原性动物实验:

分别将 S 的表达质粒 pVAX-NB1 和 pVAX-NB2 的 DNA 以 100ug/只的剂量, 肌肉注射, 配方为: 100ug 质粒 DNA 加 10%葡萄糖至 200ul, 按照说明书, 加 10ul 的 Turbofect (Thermos fisher) 混合, 肌注小鼠。免疫 14 天后, 眼眶取血, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA), 以新冠病毒的 S 蛋白为抗原检测血清中的抗体水平。具体操作为:

- 1) 96 孔板, 每孔加 100ul 的 PBS 和 50ng S 蛋白, 4℃过夜, 16-18 小时;
- 2) 吸掉上清, PBST 洗一遍, 加入 200ul 5%脱脂牛奶室温封闭 2h;
- 3) PBST 洗 2 次;
- 4) 加样: 加入 100ul 稀释后的血清样品, 37℃孵育 2h, 用 PBST 洗 5 次;
- 5) 加酶标抗体: 加入 100ul 稀释后 HRP 标记 IgM 或 IgG 二抗, 37℃孵育 2h;
- 6) PBST 洗 6-8 次;
- 7) 加底物液显色: 加入 100ul TMB 显色;
- 8) 终止反应: 加入 50ul 1M 硫酸终止反应;
- 9) 结果判定: 测 OD 值, OD 值控制在 0.1-4。

实验结果表明, 只有 NB2 能够诱异小鼠产生抗体 (图 2)。

1. 一种能表达对 SARS-CoV-2 引起免疫原性的多肽的核酸序列，所述核酸序列包含以下核酸序列中的至少一条：
 - a) 核酸序列 SEQ ID NO: 1; 或
 - b) 核酸序列 SEQ ID NO: 2; 或
 - c) 与 SEQ ID NO: 1 具有至少 90% 序列相同性的核酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的核酸序列，其特征在于，所述多肽：
可在人体中诱导免疫应答；或
产生生物报告分子；或
用于检测的分子；或
能调节基因功能；或
成为治疗性分子。
3. 一种表达载体，其特征在于，所述的载体含有权利要求 1 所述的核酸序列。
4. 根据权利要求 3 所述的表达载体，其特征在于：所述的载体为病毒载体。
5. 根据权利要求 4 所述的表达载体，其特征在于：所述的病毒载体为腺病毒载体。
6. 一种表达细胞，其特征在于：所述表达细胞可基于权利要求 1 所述的核酸序列表达多肽。
7. 一种核酸组合物，其特征在于：所述核酸组合物包括权利要求 1 所述的核酸序列，或权利要求 3~5 所述的表达载体。
8. 根据权利要求 7 所述的核酸组合物，其特征在于：还包括药学上可接受的佐剂、载体、稀释剂或赋形剂中的至少一种。
9. 核酸组合物在制备预防或治疗 COVID-19 制剂中的应用，所述核酸组合物如权利要求 7 或 8 所述。
10. 一种预防或治疗 COVID-19 的方法，包括给予人预防量或治疗量的核酸组合物，所述核酸组合物如权利要求 7 或 8 所述。

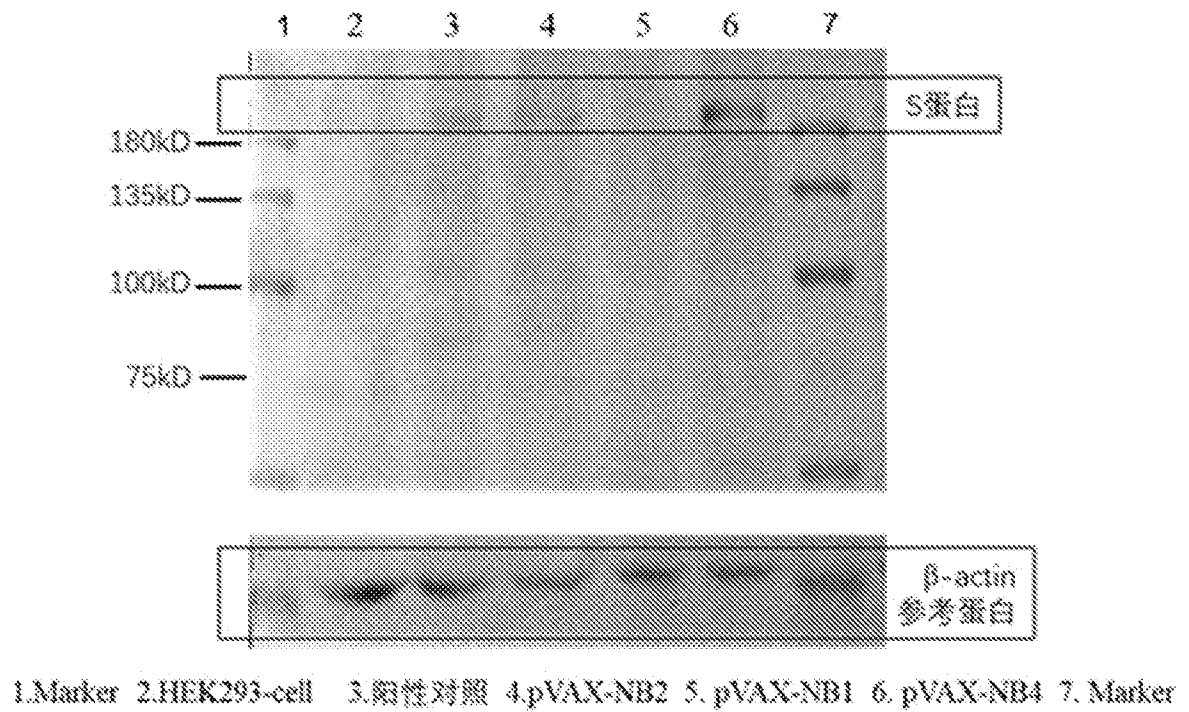


图 1

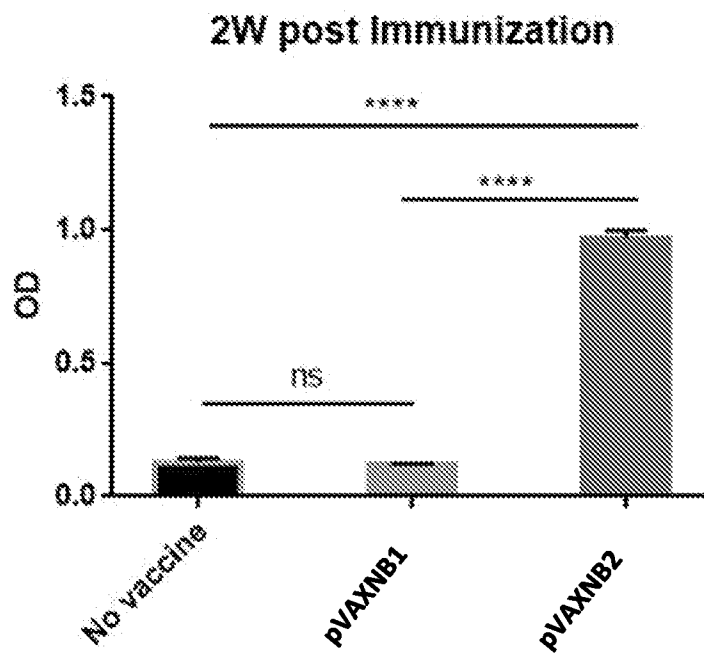


图 2