

## Note

Cette traduction a été générée par ordinateur. Il ne peut être garanti qu'elle est intelligible, exacte, complète, fiable ou adaptée à des fins spécifiques. Les textes résultant d'une traduction automatique ne doivent pas servir de base à des décisions cruciales, et notamment à des décisions d'ordre financier ou importantes sur le plan commercial.

## ABRÉGÉ CN112220919A

<sup>11</sup> L'invention appartient au domaine des nanomatériaux et des médicaments biologiques, et concerne un vaccin, en particulier le développement d'un nano-vaccin recombinant nucléaire contre le coronavirus 2019-nCoV. L'invention comprend également un procédé de préparation du vaccin et l'application du vaccin dans des expérimentations animales. Le nouveau vaccin contre le coronavirus contient de l'oxyde de graphène, de la carnosine, du CpG et du nouveau coronavirus RBD ; La carnosine, le CpG et le nouveau coronavirus RBD sont combinés sur une trame d'oxyde de graphène ; la séquence codante du CpG est telle que montrée dans SEQ ID NO 1 ; et le nouveau coronavirus RBD fait référence au fait qu'une nouvelle région de liaison au récepteur de protéine de coronavirus peut générer un anticorps spécifique à titre élevé visant le RBD dans un corps de souris, et un soutien solide est fourni pour la prévention et le traitement du nouveau coronavirus.

---

<sup>23</sup> The invention belongs to the field of nano materials and biological medicines, and relates to a vaccine, in particular to development of a 2019-nCoV coronavirus nuclear recombinant nano vaccine. The invention also comprises a preparation method of the vaccine and application of the vaccine in animal experiments. The novel coronavirus vaccine contains graphene oxide, carnosine, CpG and novel coronavirus RBD; The carnosine, the CpG and novel coronavirus RBD are combined on a framework of the graphene oxide; the coding sequence of the CpG is as shown in SEQ ID NO 1; and the novel coronavirus RBD refers to that a novel coronavirus protein receptor binding region can generate a high-titer specific antibody aiming at the RBD in a mouse body, and strong support is provided for prevention and treatment of the novel coronavirus.

# CN112220919A Nano-vaccin recombinant contre le coronavirus utilisant l'oxyde de graphène comme support

**Bibliographic data**

**Global Dossier**

**Applicants** SHANGHAI NAT ENGINEERING RES CENTER NANOTECHNOLOGY CO LTD +

**Inventors** CUI DAWANG, GAO ANQI, LI XUEJING, LIANG HUI, SHEN QI, TAN JING +

**Classifications**

**IPC** A61K39/215; A61K39/385; A61K39/39; A61P31/14; C07K14/185; C07K17/14;

**CPC** A61K39/12 (CN); A61K39/385 (CN); A61K39/39 (CN); A61P31/14 (CN); C07K14/009 (CN); C07K17/14 (CN); A61K2039/5551 (CN); A61K2039/60 (CN); A61K2039/62 (CN); C12N27/00022 (CN); C12N27/00034 (CN);

**Priority** CN20201193367A 2020-09-27

**Application** CN20201193367A 2020-09-27

**Publication** CN112220919A 2021-01-15

**Published as** CN112220919A

**Nano coronavirus recombinant vaccine taking graphene oxide as carrier**

**Abstract**

The invention belongs to the field of nano materials and biological medicines, and relates to a vaccine, in particular to development of a 2019-nCoV coronavirus recombinant nano vaccine. The invention also comprises a preparation method of the vaccine and application of the vaccine in animal experiments. The novel coronavirus vaccine contains graphene oxide, canister, CpG and novel coronavirus RBD. The canister, the CpG and novel coronavirus RBD are combined on a framework of the graphene oxide, the coding sequence of the CpG is as shown in SEQ ID NO 1, and the novel coronavirus RBD refers to that a novel coronavirus protein receptor binding region can generate a high-titer specific antibody aiming at the RBD in a mouse body, and strong support is provided for prevention and treatment of the novel coronavirus.

*Les données provenant de sources autres que l'OEB peuvent ne pas être exactes, complètes ou à jour.*

## Domaine technique

L'invention appartient au domaine des nanomatériaux et de la biomédecine, et concerne le développement d'une plateforme de développement de vaccins. Plus précisément, elle concerne le développement d'un nanovaccin recombinant nucléaire du coronavirus 2019-nCoV. L'invention comprend également l'application du vaccin dans des expériences sur des animaux.

## Contexte technique

Les vaccins constituent l'arme ultime pour éliminer les principales maladies infectieuses. Par rapport aux autres thérapies, les vaccins ont le coût le plus bas et l'avantage de la frappe préventive. Il est sans aucun doute devenu l'espoir du public. Grâce à la vaccination, les êtres humains ont éliminé les cas de variole et de polio. Cette dernière a également été réduite de 99 %. L'incidence de maladies infectieuses comme la diphtérie est rare, et l'incidence de maladies comme la rougeole et le tétanos néonatal a considérablement diminué. On ne saurait trop insister sur l'impact des vaccins sur la santé humaine. La naissance de chaque nouveau vaccin est une grande victoire de l'humanité sur une maladie infectieuse ! Jusqu'à présent, aucune mesure médicale ne peut avoir un impact aussi important, durable et profond sur la santé humaine qu'un vaccin ; et aucun médicament thérapeutique ne peut éliminer une certaine maladie de la terre à un coût extrêmement bas comme un vaccin. .

Peu après l'apparition du SRAS-CoV-2, la Chine a déjà terminé l'isolement des souches virales dans différents laboratoires. C'est un grand pas vers la recherche et le développement de vaccins. Je pense que nous atteindrons bientôt l'objectif ultime d'éliminer le SRAS-CoV-2. Cependant, jusqu'à présent, il n'y a pas eu de vaccin ou de médicament approuvé pour le traitement de l'infection par le CoV. Il est donc très urgent de mettre au point un traitement médicamenteux efficace ou de prévenir l'infection et l'apparition du coronavirus.

D'après les recherches sur les vaccins contre les coronavirus tels que le SRAS et le MERS, la cible principale des vaccins contre les coronavirus est la protéine S du coronavirus. Les vaccins doivent non seulement induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires, mais aussi induire des réponses immunitaires muqueuses, et utiliser des adjuvants pour induire une voie Th1 et Th2 équilibrée afin de produire un vaccin réellement efficace. À l'heure actuelle, les recherches sur les vaccins contre le SRAS et le MERS sont principalement axées sur les vaccins à vecteur viral et les vaccins sous-unitaires. Un grand nombre d'études ont montré que la difficulté du SRAS

et du MERS est qu'ils ne peuvent pas stimuler la production de cellules B à mémoire à long terme. Chez les patients guéris du SRAS et du MERS, les cellules à mémoire à long terme ne sont que de 2 à 3 ans et ne peuvent pas générer de mémoire immunitaire, ce qui fait échouer le développement du vaccin. Jusqu'à présent, seuls 6 vaccins potentiels contre les coronavirus sont entrés dans la phase de recherche clinique, mais aucun vaccin efficace n'a été approuvé pour la commercialisation.

## Résumé de l'invention

L'objet de la présente invention est de fournir un vaccin recombinant contre le coronavirus.

Un autre objet de la présente invention est de fournir une méthode de préparation du vaccin à virus recombinant.

Un autre objet de la présente invention est de fournir l'application du vaccin à virus recombinant.

Compte tenu des divers problèmes des vaccins traditionnels actuels, nous avons réfléchi à la manière de changer les problèmes des vaccins existants et d'améliorer la réponse immunitaire. Afin d'améliorer l'activité immunitaire des immunogènes et de renforcer la capacité de réponse immunitaire de l'organisme, la méthode la plus fondamentale est la suivante L'immunogène est mélangé à un adjuvant. L'adjuvant immunitaire est un type de promoteur qui peut renforcer la réponse immunitaire de l'organisme à l'immunogène. **L'oligodéoxynucléotide CpG (ODN) est un adjuvant très prometteur découvert ces dernières années.** Il a été prouvé que l'ODN CpG a une bonne activité adjuvante chez les animaux, in vitro et dans les études cliniques. Les plus étudiés sont le CpG7909 et le CpG1018.

Le 9 novembre 2017, la FDA américaine a approuvé Dynavax Technologies pour l'hépatite B avec adjuvant CpG1018 Le vaccin est sur le marché. Ce vaccin est le premier vaccin adjuvant CpG ODN approuvé au monde pour prévenir l'infection par le VHB chez les adultes âgés de 18 ans et plus.

En outre, de nombreux types différents de CpG ODN ont été utilisés comme adjuvants dans de multiples essais cliniques. La CpG active les cellules pDC immatures en se liant au TLR9, et induit des réponses immunitaires naturelles et adaptatives. Cependant, une structure CpG unique a une activation limitée des cellules immunitaires et est facilement hydrolysée par l'exonucléase pour la rendre stable in vivo ; insuffisante, elle peut également provoquer des effets secondaires ; l'oligodéoxynucléotide (ODN) CpG synthétisé dans la séquence peut également renforcer l'effet de stimulation. La combinaison de la CpG et d'autres protéines telles que les antigènes a un effet d'activation immunitaire très important.

**Le graphène est un nanomatériau de carbone bidimensionnel dont le réseau hexagonal en nid d'abeille est composé d'atomes de carbone et d'orbitales hybrides  $sp^2$ .** Son unité structurelle de base est le noyau benzénique à six chaînons le plus stable des matériaux organiques, qui est actuellement le matériau bidimensionnel le plus idéal. L'oxyde de graphène (GO), en tant que dérivé du graphène, est l'exfoliation de l'oxyde de graphite. En raison de son hybridation  $SP2$  unique, de sa structure bidimensionnelle parfaite et de sa haute réactivité au bord, il peut être utilisé comme une charge idéale et un support de greffe dans la conception et le développement d'une plate-forme thérapeutique basée sur lui, dans le système d'administration de nanomédicaments, les tests biologiques, le traitement des tumeurs et l'imagerie cellulaire jouent un rôle important.

**La présente invention est achevée sur la base des recherches ci-dessus.**

La présente invention développe une nouvelle méthode de développement de vaccins basée sur le matériau oxyde de graphène pour charger des molécules CpG et des protéines recombinantes dans le squelette. Sur la base de cette plateforme technologique combinée avec la protéine recombinante de la région RBD de la protéine Spike du SAR-CoV-2, un nouveau vaccin nanocoronaral a été préparé. Le vaccin nano-coronaral préparé a montré une forte immunogénicité dans les expériences sur les souris et peut produire des anticorps à haut titre.

Dans un aspect, la présente invention fournit un vaccin contre le coronavirus contenant de l'oxyde de graphène, de la carnosine, du CpG et du RBD. Dans le mode de réalisation préféré de la présente invention, il est appelé vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD.

L'oxyde de graphène (GO, graphene oxide) est l'oxyde du graphène. Après avoir été oxydé, les groupes fonctionnels contenant de l'oxygène sur celui-ci augmentent, ce qui le rend plus actif que le graphène. Par exemple, les groupes hydroxyle et les groupes époxy sont répartis au hasard sur un monolithe d'oxyde de graphène, tandis que les groupes carboxyle et carbonyle sont introduits au bord du monolithe. Les produits courants d'oxyde de graphène disponibles dans le commerce sont la poudre, les paillettes et la solution, et leur couleur est brune.

La carnosine, nom scientifique  $\beta$ -alanyl-L-histidine, est un dipeptide composé de  $\beta$ -alanine et de L-histidine, un solide cristallin. La carnosine a une forte capacité antioxydante et peut éliminer les radicaux libres réactifs de l'oxygène (ROS) et les aldéhydes  $\alpha$ - $\beta$  insaturés formés par l'oxydation excessive des acides gras dans les membranes cellulaires lors du stress oxydatif.

Le motif CpG a pour effet d'activer le système immunitaire de l'organisme et peut être utilisé comme adjuvant. De préférence, la séquence codante du CpG est représentée dans la SEQ ID NO 1.

RBD (spike receptor binding domain) est le domaine de liaison du récepteur. Le RBD dans la présente invention fait spécifiquement référence au domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine du coronavirus (protéine S). Par exemple, vous pouvez sélectionner une protéine RBD avec la séquence suivante :

```
PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIA  
DYNKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGQPFRDISTEIQAGSTPCNGQPFR  
DISTEIQAGSTPCNGQPFRDISTEIQAGSTPCNGQPFRDISTEIQPCNGQPFRDISTEIQAGSTPCNGGYS
```

Le vaccin contre le coronavirus de la présente invention est obtenu en combinant la carnosine, le CpG et le nouveau RBD du coronavirus sur de l'oxyde de graphène activé.

Dans le vaccin contre le coronavirus de la présente invention, le GO est utilisé comme base du squelette, et le dosage est généralement excessif, et le dosage de la carnosine peut être environ deux fois celui du GO. En tant que macromolécules biologiques, la CpG et le nouveau coronavirus RBD sont utilisés en petite quantité. La quantité des deux est généralement égale à un dix millième de GO, soit le rapport de masse. Le dosage de RBD est plus de deux fois supérieur à celui de CpG, par exemple, CpG:RBD=1:2-10, de préférence, le dosage de RBD est 3-6 fois celui de CpG.

D'autre part, la présente invention fournit une méthode de préparation du vaccin contre le coronavirus. La méthode de préparation comprend les étapes suivantes :

Obtenir la CpG, la protéine recombinante RBD et la carnosine ;

Ajouter la poudre lyophilisée GO à la solution tampon phosphate, et soniquer ;

Ajouter de l'EDC et du NHS pour activer la solution de GO, éliminer l'excès d'EDC/sulfo-NHS dans la solution réactionnelle par ultrafiltration, et ajuster le pH de la solution réactionnelle à neutre ;

Ajouter la carnosine, le CpG et les protéines recombinantes RBD à la solution réactionnelle et incubé avec le GO activé ;

Retirer l'excès de protéines découplées de la solution réactionnelle, stériliser et mettre de côté.

De préférence, la durée des ultrasons est de 2 à 3 heures. Les conditions ultrasoniques sont de 200 W, 40 kHz.

De préférence, la valeur du pH du tampon phosphate est neutre, telle que 6,8-7,6, plus préférablement 7,0-7,4, ou 7,2.

De préférence, la méthode pour éliminer l'excès d'EDC/sulfo-NHS ou de protéine non couplée est l'ultrafiltration.

Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, le ratio d'oxyde de graphène, de carnosine, de CpG et de RBD est de : 26 mg : 40 mg : 1,2 µg : (3-6) µg.

De préférence, la température de réaction est de 20 à 28°C. Par exemple, utiliser la température ambiante.

Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, le vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD est préparé en couplant GO à la carnosine par une méthode améliorée de réaction EDC-NHS, et en ajoutant 26 mg de poudre lyophilisée de GO à 5. Dans 20 mL de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH = 7.4), soniquer (200 W, 40 kHz) à 25°C pendant 3 h. Ajouter 6,82 mg d'EDC (N1-((éthylimino)méthylène)-N3,N3-diméthylpropane-1,3-diamine à 25°C, chinois : 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimine Imine) et 7,73 mg de NHS (NN-hydroxysuccinimide) pour activer la solution de GO. L'excès d'EDC/sulfo-NHS a été éliminé de la solution réactionnelle par ultrafiltration, puis le pH de la solution a été ajusté à 7,4. Ensuite, 40 mg de carnosine, 1,2 µg de CpG et la protéine recombinante RBD de différentes concentrations ont été ajoutés à la solution et ont réagi avec le GO activé à 25°C pendant 2 h. Ensuite, l'excès de protéine découplée est éliminé de la solution réactionnelle par ultrafiltration. Le produit préparé est appelé vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD. Enfin, la solution de vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD a été mise en contact avec un filtre stérile (0,22 µm) et stockée dans un récipient stérile à 4°C pour les expériences suivantes.

L'invention établit une plate-forme technologique de préparation de vaccins à base de nano-protéines recombinantes qui peut stimuler rapidement le système immunitaire humain, et peut produire rapidement un grand nombre de vaccins préventifs après confirmation du virus infectieux. Cette plateforme technologique utilise pleinement les caractéristiques des groupes COOH, hydroxyle et autres sur la surface de l'oxyde de graphène, et utilise l'interaction entre les liaisons π-π pour assembler la protéine recombinante sélectionnée de RBD avec des molécules CpG et de la carnosine pour préparer un vaccin à base de nano-protéines recombinantes **basé sur l'oxyde de graphène comme squelette**. Le vaccin peut stimuler le corps à produire des anticorps neutralisants RBD de haut niveau contre le SAR-CoV-2, posant une base technique pour la prévention et le traitement des infections à coronavirus et des épidémies similaires à l'avenir.

Dans un autre aspect, la présente invention prévoit l'application du vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD mentionné ci-dessus, c'est-à-dire l'application du vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD dans la préparation de médicaments pour prévenir le nouveau coronavirus.

De préférence, l'application améliore l'immunité de l'organisme contre le nouveau coronavirus.

Mieux encore, le vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD peut produire des anticorps spécifiques contre le RBD, et l'anticorps spécifique a un titre élevé. Dans le mode de réalisation de la présente invention, le vaccin à nanocouronne a montré une forte immunogénicité dans les expériences sur les souris et peut produire des anticorps à titre élevé.

## Les effets bénéfiques de la présente invention sont :

Sur la base des matériaux d'oxyde de graphène, une nouvelle plate-forme technologique de vaccin a été développée pour charger des molécules CpG et des protéines recombinantes pour l'épine dorsale. Un nouveau vaccin nanocoronavirus a été préparé en combinant la protéine recombinante de la région RBD de la protéine Spike de SAR-CoV-2. La production d'anticorps spécifiques de haut niveau contre la région RBD chez la souris apporte un soutien solide à la prévention et au traitement du nouveau coronavirus.

### Description des dessins

Afin de décrire plus clairement les solutions techniques dans les modes de réalisation de la présente demande, ce qui suit va présenter brièvement les dessins qui doivent être utilisés dans les modes de réalisation. Bien entendu, les dessins de la description suivante ne représentent que certains modes de réalisation de la présente application. Une personne de compétence ordinaire dans l'art peut obtenir d'autres dessins basés sur ces dessins sans travail de création.

La **figure 1** est un diagramme schématique du mode et du calendrier d'immunisation des souris vaccinées par GO-Car-carnosine-CpG-RBD ;

La **figure 2** montre la modification des anticorps spécifiques de RBD dans le sérum des souris 28 jours après l'immunisation et la modification de la production de cytokines par les cellules de la rate au jour 42.

### Moyens détaillés

Ce qui suit va décrire clairement et complètement les solutions techniques dans les modes de réalisation de la présente demande. Évidemment, les modes de réalisation décrits ne sont qu'une partie des modes de réalisation de la présente demande, plutôt que tous les modes de réalisation. Sur la base des modes de réalisation de la présente demande, tous les autres modes de réalisation obtenus par des personnes de compétence ordinaire dans l'art sans travail créatif entreront dans le champ de protection de la présente demande. Pour les méthodes et techniques non spécifiquement décrites, toutes les techniques conventionnelles et bien connues de l'art peuvent être utilisées pour le fonctionnement. Par exemple, se référer au Molecular Cloning Handbook de Cold Spring Harbor, etc.

### Exemple 1

Procédé de préparation de la formulation vaccinale de la protéine recombinante oxyde de graphène (GO)-carnosine-CpG-RBD

La séquence d'acide nucléique du récepteur TLR9 CpG ODN M362, qui présente une réaction croisée avec les humains et les souris, a été sélectionnée. La séquence spécifique est la suivante 5'-TCGTCGTCGTTTC:GAACGACGTTGAT-3' (25 mer, SEQ ID NO 1), et une méthode améliorée de réaction EDC-NHS est adoptée. Dans le processus de couplage de GO à la carnosine, 26 mg de poudre lyophilisée de GO ont été ajoutés à 5,20 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH = 7,4), et soniqués (200 W, 40 kHz) à 25°C pendant 3 heures. Ajouter 6,82 mg d'EDC(N1-((éthylimino)méthylène)-N3,N3-diméthylpropane-1,3-diamine à 25°C, chinois : 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbon Diimine) et 7,73

mg de NHS (NN-hydroxysuccinimide) pour activer la solution de GO. L'excès d'EDC/sulfo-NHS a été éliminé de la solution réactionnelle par ultrafiltration, puis le pH de la solution a été ajusté à 7,4. Ensuite, 40 mg de carnosine, 1,2 ug de CpG et différentes concentrations de protéine recombinante RBD sont ajoutés à la solution et réagissent avec le GO activé à 25°C pendant 2 h. Ensuite, l'excès de protéine découplée est éliminé de la solution réactionnelle par ultrafiltration. Le produit préparé est étiqueté vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD. Enfin, la solution de vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD a été mise en contact avec un filtre stérile (0,22um) et stockée dans un récipient stérile à 4°C pour les expériences suivantes.

## Exemple 2

Expérience d'immunisation de souris avec un vaccin à base de protéine recombinante oxyde de graphène (GO)-carnosine-CpG-RBD

Selon le calendrier indiqué sur la figure 1, des souris BALB/cmice femelles âgées de 6 semaines ont été immunisées par injection sous-cutanée aux jours 0, 14 et 28, jusqu'à 28 et 42 jours. Le sang a été collecté et le sérum a été séparé. Détecter les anticorps spécifiques contre le RBD dans le sérum. Les souris ont été sacrifiées au 42ème jour, les splénocytes ont été séparés, et la réponse immunitaire spécifique des cellules T et la sécrétion de cytokines ont été détectées.

Le regroupement et la détermination de la dose des souris immunisées :

1. (Oxyde de graphène + carnosine) + 1,2ug cpG+3ug RBD
2. oxyde de graphène + carnosine + 1,2 g de cpG + 6 g de RBD
3. hydroxyde d'aluminium + 6ug RBD (1:1)
4. 6ug RBD
5. groupe Liposome (lipo) + 6ug RBD

Souche de souris : Souris BALB/c (n=6).

Le programme d'immunisation des souris avec le vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD est le suivant : le sang est collecté et immunisé pour la première fois comme point de départ de l'immunisation des souris.

Le 7e jour, le deuxième sang est prélevé pour étudier le nouveau système de coronavirus et en maîtriser les principes.

Le 14e jour, le sang est prélevé pour la troisième fois afin de renforcer l'immunité.

Le 28e jour, le sang est prélevé pour la quatrième fois afin de renforcer l'immunisation et de détecter les anticorps dans le sérum.

Si le résultat est positif, on se prépare à prélever des cellules de la rate.

Le 42e jour, le sang a été collecté pour la cinquième fois, après quoi le sang a été sacrifié et les cellules de la rate ont été séparées pour les expériences sur les cytokines.

Les résultats des tests ont montré que le vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD a produit des anticorps spécifiques de haut niveau contre le RBD dans les groupes 3ug et 6ug après immunisation des souris. Par rapport au groupe ayant reçu l'adjuvant traditionnel, le groupe RBD et le groupe liposome présentent des différences significatives (figure 2).

Une analyse plus approfondie de la réponse immunitaire spécifique des cellules T isolées de la rate a montré que le vaccin GO-Car-carnosine-CpG-RBD peut stimuler l'organisme à produire des cytokines IFN-gamma spécifiques, améliorer l'immunité de l'organisme et combattre le nouveau coronavirus de l'épidémie.

Ce qui précède n'est qu'une mise en œuvre spécifique de cette demande, mais l'étendue de la protection de cette demande n'est pas limitée à cela.

Toute personne qualifiée dans l'art peut facilement penser à des changements ou des substitutions dans le cadre du champ d'application technique divulgué dans cette application. Tous devraient être couverts par la portée de la protection de cette demande. Par conséquent, la portée de la protection de cette demande devrait être soumise à la portée de la protection des revendications.

## SEQUENCE LISTING

<110> Shanghai National Engineering Research Center for Nanotechnology and Application Co., Ltd.

<120> Nano-New Coronavirus Recombinant Vaccine Based on Graphene Oxide

<130> 20200920

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial sequence

<400> 1

tcgtcgtcgt tcgaacgacg ttgat 25

<210> 2

<211> 192

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial sequence

<400> 2

Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr

1 5 10 15

Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys

20 25 30

Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln

65 70 75 80

Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu

85 90 95

Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu

100 105 110

Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg

115 120 125

Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr

130 135 140

Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr

145 150 155 160

Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr

165 170 175

Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro

180 185 190

## REVENDEICATIONS

CN112220919A Nano-vaccin recombinant contre le coronavirus utilisant l'oxyde de graphène comme support

1. Vaccin à base de coronavirus, caractérisé en ce que le coronavirus contient de l'oxyde de graphène, de la carnosine, du CpG et de nouvelles régions de liaison au récepteur du coronavirus ; le squelette de l'oxyde de graphène est combiné avec de la carnosine, du CpG et de nouvelles régions de liaison au récepteur du coronavirus ; la séquence codante du CpG est représentée dans la SEQ ID NO 1 ; la nouvelle région de liaison au récepteur du coronavirus se réfère à la nouvelle région de liaison au récepteur de la protéine S du coronavirus.
2. Coronavirus selon la revendication 1, dans lequel le coronavirus est obtenu en connectant la carnosine, la CpG et les régions de liaison du récepteur du coronavirus sur l'oxyde de graphène activé.
3. Procédé de préparation de coronavirus selon la revendication 1, caractérisé en ce que le procédé de préparation comprend les étapes suivantes :  
Obtenir la CpG, la protéine recombinante de la région de liaison du récepteur et la carnosine, la séquence codante de la CpG est représentée dans la SEQ ID NO 1 ;  
Ajouter la poudre lyophilisée d'oxyde de graphène à la solution tampon de phosphate et traitement par ultrasons ;  
Ajouter de l'EDC et du NHS pour activer la solution d'oxyde de graphène, éliminer l'excès d'EDC/sulfo-NHS dans la solution réactionnelle par ultrafiltration, et ajuster le pH de la solution réactionnelle à neutre ;  
Ajouter la carnosine, le CpG et la protéine recombinante de la région de liaison du récepteur à la solution réactionnelle et incubé avec l'oxyde de graphène activé ;  
Retirer l'excès de protéine découplée de la solution réactionnelle, stériliser et mettre de côté.
4. Méthode de préparation de la revendication 3, dans laquelle la durée des ultrasons est de 2 à 3 heures.
5. Méthode de préparation de la revendication 3, dans laquelle le pH du tampon phosphate est de 6,8-7,6.
6. Méthode de préparation de la revendication 3, dans laquelle la méthode pour éliminer l'excès d'EDC/sulfo-NHS ou éliminer la protéine non couplée est l'ultrafiltration.
7. Procédé de préparation selon la revendication 3, dans lequel la quantité de carnosine est supérieure à 1,5 fois celle de l'oxyde de graphène, la quantité de région de liaison au récepteur est de 2 à 10 fois celle de CpG, et la quantité de CpG est un dix millièmes de celle de l'oxyde de graphène, rapport de qualité.
8. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, dans lequel la température de réaction est de 20 à 28°C.
9. Utilisation du coronavirus selon la revendication 1, caractérisée en ce que le nouveau vaccin contre le coronavirus est utilisé dans la préparation de médicaments pour la prévention du coronavirus.
10. Application selon la revendication 9, dans laquelle le coronavirus amène l'organisme à produire des anticorps contre la protéine recombinante dans la région de liaison au récepteur.

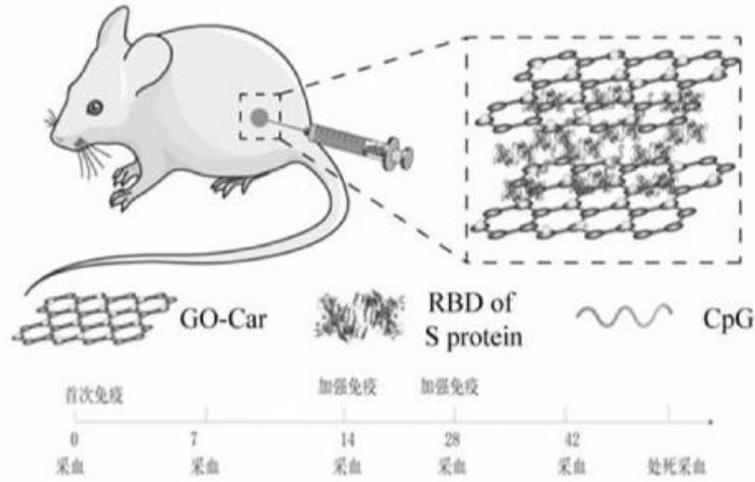


图1

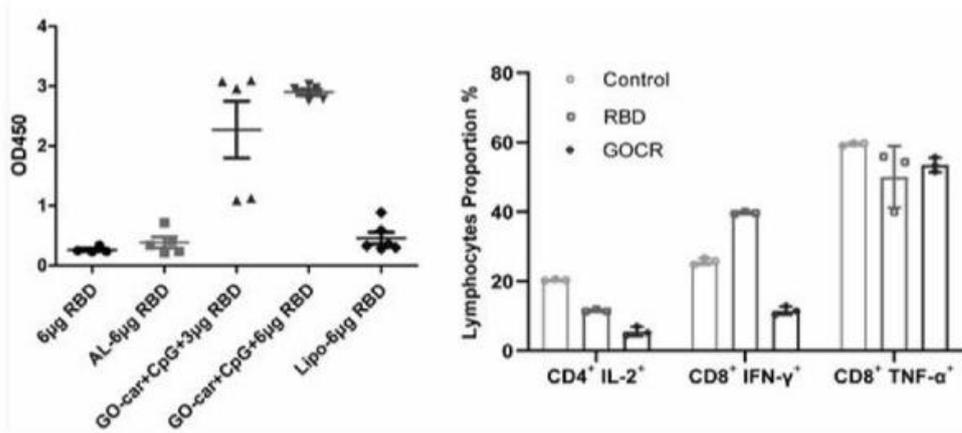


图2