

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-058

基于重组人Ⅲ型胶原蛋白的三聚体抗原疫苗策略在新冠和流感疫苗中的应用

刘泽众^{1,2}, 周洁¹, 朱赞³, 陆路¹, 姜世勃¹

(¹ 复旦大学基础医学院, 上海 200032; ² 复旦大学药学院药理系, 上海 201203; ³ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要: 新冠病毒等多种包膜病毒的糖蛋白在天然状态下呈现三聚体形式。三聚体蛋白通常较单体蛋白具有更优的免疫原性。目前使用非人蛋白来源的 Foldon 等三聚体基序可促使目的蛋白形成稳定三聚体, 但这些基序的强免疫原性会削弱目的蛋白的免疫应答, 限制了其在疫苗抗原设计中的应用。在本研究中, 发现并利用重组人源化Ⅲ型胶原蛋白 (Rh3C) 作为新型三聚体基序, 利用合成生物学方法, 与新冠病毒刺头 (spike) 蛋白受体结合域 (RBD) 融合表达后促使 RBD 形成三聚体。这种胶原-RBD (Rh3C-RBD) 三聚体蛋白在免疫小鼠后, 较 RBD 单体蛋白诱导产生了更高滴度的结合抗体和中和抗体。此外, 我们还进一步验证了该 Rh3C 基序与流感病毒 HA1 蛋白融合后, 较 HA1 单体蛋白可在小鼠体内诱导更强效的抗体应答。因此, 这种新型的 Rh3C 基序, 有望广泛用于三聚体疫苗抗原的设计和优化。

关键词: 三聚体抗原; 人胶原蛋白; 新冠病毒; 流感病毒; 疫苗设计

中图分类号: R373 **文献标志码:** A

Applications of the recombinant human collagen type Ⅲ-based trimerization motif in the design of vaccines to fight against SARS-CoV-2 and influenza virus

LIU Zezhong^{1,2}, ZHOU Jie¹, ZHU Yun³, LU Lu¹, JIANG Shibo¹

(¹ School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China; ² Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; ³ Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Glycoproteins with enveloped viruses, such as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), influenza virus, and human immunodeficiency virus (HIV), display a trimeric conformation. Different from the monomeric form, the trimeric proteins exhibit superior immunogenicity. Several trimerization motifs, such as Foldon

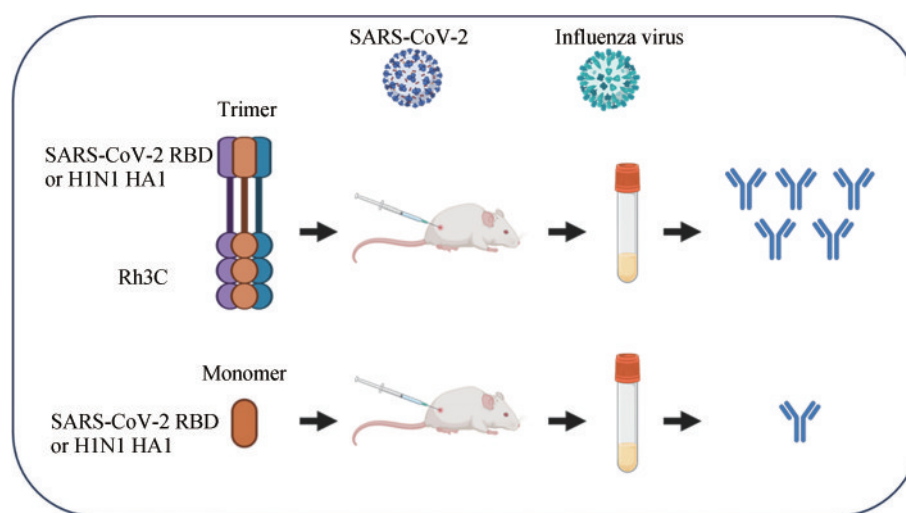
收稿日期: 2023-08-19 修回日期: 2023-11-07

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2305800); 国家自然科学基金 (92169112, 82202490)

引用本文: 刘泽众, 周洁, 朱赞, 陆路, 姜世勃. 基于重组人Ⅲ型胶原蛋白的三聚体抗原疫苗策略在新冠和流感疫苗中的应用[J]. 合成生物学, 2024, 5(2): 385-395

Citation: LIU Zezhong, ZHOU Jie, ZHU Yun, LU Lu, JIANG Shibo. Applications of the recombinant human collagen type Ⅲ-based trimerization motif in the design of vaccines to fight against SARS-CoV-2 and influenza virus[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(2): 385-395

derived from phage T4 fibrin, have been used to promote the formation of trimeric proteins with natural conformations. Although the Foldon-induced trimeric proteins are stable, their high immunogenicity limits applications in the development of vaccine antigens. In a previous study, we developed a recombinant human collagen type III protein and determined its crystal structure, revealing a triple-helix conformation. However, the potential of this recombinant protein as a trimerization motif remained unknown. In this study, we demonstrated that the recombinant humanized type III collagen (Rh3C) was able to act as a trimerization motif, facilitating the spontaneous trimer formation of the Rh3C-conjugated receptor-binding domain (RBD) within the spike (S) protein of SARS-CoV-2. This trimeric protein could induce a stronger SARS-CoV-2 RBD-specific IgG, IgG1, and IgG2a immune response, when compared with the monomeric RBD protein in the immunized mice. Notably, the Rh3C-RBD protein, when adjuvanted with the novel STING agonist CF501, also elicited significantly higher neutralizing antibody responses against both the pseudotyped SARS-CoV-2 (D614G) and its variant Omicron (BA.2.2) in the immunized mice. To showcase the broad applications of the Rh3C trimerization motif, we further demonstrated that the Rh3C-conjugated HA1 of the influenza virus could also elicit a stronger antibody response than free HA1. Considering the wide distribution of the Rh3C protein in human bodies, its use as a trimerization motif would not induce an immune response due to immune tolerance, thereby allowing the immune response to concentrate on targeted viral proteins. Therefore, this Rh3C-based trimerization motif holds great potential for the design and optimization of vaccines consisting of trimeric protein antigens.



Keywords: trimeric antigen; humanized collagen; SARS-CoV-2; influenza virus; vaccine design

新冠病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus2, SARS-CoV-2) 和流感病毒 (influenza virus) 等呼吸道病毒持续威胁人类健康。提高疫苗抗原的免疫原性, 诱导强效的免疫应答, 对于开发新冠疫苗和流感疫苗至关重要。新冠病毒的刺突 (spike, S) 蛋白包含 S1 和 S2 两个亚基。S1 亚基包含受体结合域 (receptor-binding domain, RBD) 负责识别宿主细胞的受体^[1]。S2 亚基负责介导病

毒膜与宿主细胞膜融合^[1-2]。新冠病毒的 S 蛋白, 特别是其上的 RBD 结构域抗原区, 是开发疫苗的主要抗原靶点之一^[3-4]。在天然情况下, 新冠病毒的 S/RBD 蛋白呈现同源三聚体的形式^[5]。目前有多项研究证明 S 三聚体与 RBD 三聚体较 S 单体与 RBD 单体具有更好的免疫原性, 可在机体中诱导更高滴度的中和抗体^[6-7]。与此类似, 流感病毒的糖蛋白 HA 也包含 HA1 和 HA2 两个亚基, 分别负

介导病毒与受体的识别和病毒膜与靶细胞膜的融合,是疫苗抗原设计的主要靶点^[8]。HA在天然情况下也同样为同源三聚体结构。因此,设计新冠病毒/流感病毒的三聚体疫苗抗原,对于提升疫苗效果具有重要意义。

目前人们已经开发了一些具有三聚体结构特征的蛋白基序,例如Foldon基序。Foldon是T4噬菌体次要纤维蛋白(fibrin)的C末端区域,其可自发形成典型的三聚体^[9-10]。Foldon亚基内部通过非共价键作用共同维持稳定结构,三聚体稳定性高,目前已在1型艾滋病病毒(HIV-1) gp140^[11-13]、SARS-CoV-2 RBD^[14-15]等三聚体蛋白上用作三聚体标签基序。然而,虽然Foldon可有效促使目的蛋白呈现三聚体形式,但其分子量较大,具有强免疫原性^[16]。将Foldon和病毒蛋白的融合三聚体抗原免疫人体后会产生对Foldon蛋白的强烈免疫应答,削弱了对病毒蛋白的抗原反应^[16]。因此仍需开发其他的三聚体策略用于疫苗抗原的设计。

合成生物学技术在近年来迅速发展,并在许多领域展示出巨大的应用价值。人们通过集合基因工程、分子生物学、结构生物学等手段,可以精确设计和合成具有特定结构和功能的蛋白质,比如重组人源化胶原蛋白^[17-18]。胶原蛋白在人体中含量丰富,参与形成皮肤、骨头、韧带、角膜等组织。在人体中,至少有28种类型的胶原蛋白^[19]。其中Ⅲ型胶原蛋白广泛分布于皮肤、血管等组织^[20]。在前期研究中,我们发现了人Ⅲ型胶原蛋白三螺旋区中一个重要的功能区(Gly483-Pro512)并解析了其主区域的晶体结构,发现该功能区能折叠成典型的三股螺旋结构,具有强效的细胞黏附特性^[21]。随后,我们进一步设计和表达了该功能区16重复串联的融合蛋白-重组人源化Ⅲ型胶原蛋白(Rh3C),发现Rh3C具有更强的细胞黏附特性,提示了其具有更加稳定的三螺旋构象^[21]。由于Ⅲ型胶原蛋白广泛分布于人体中,较难在人体中产生免疫应答,且可有效形成三聚体,故而在本文中,我们将SARS-CoV-2的RBD蛋白与该Rh3C基序连接后进行融合表达,发现该融合蛋白(Rh3C-RBD)可形成三聚体构象。小鼠免疫后发现,Rh3C-RBD三聚体Rh3C较RBD单体蛋白可更加强效地诱导RBD特异性结合抗体和中和抗

体。此外,我们也进一步在流感HA1抗原中验证了该策略,发现与该重组胶原融合后的HA1蛋白在小鼠体内较单体形式的HA1也可诱导较高的IgG抗体水平。因此,以上结果提示这种新型的Rh3C基序,有望广泛用于三聚体疫苗抗原的设计和优化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

EXPi293悬浮细胞、Huh-7细胞、HEK293T细胞, EasyTrans转染试剂, HRP标记的兔抗小鼠IgG、IgG1、IgG2a二抗, Luciferase检测试剂盒。

1.2 蛋白的表达与纯化

将Rh3C(GERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPA GERGAP₁₆)通过Linker(GAPGPCCGG-GGGGS₄)分别与SARS-CoV-2(Delta)RBD(Arg319-Asn532)或者H1N1(WSN)的HA1(Asp18-Arg343)的基因序列进行连接,并在C末端加入6个组氨酸,在南京金斯瑞生物进行基因合成。然后将合成后的序列分别利用ECOR I和NCO I酶切位点插入到pFUSE-hIgG₁-Fc2载体。分别命名为Rh3C-RBD和Rh3C-HA1质粒。然后利用EXPi293真核表达系统分别对这两种蛋白进行表达。具体方法参照Liu等^[22]的方法。首先当EXPi293悬浮细胞密度为 2×10^6 时,利用EasyTrans(李记生物,上海)转染试剂对质粒进行转染。转染6天后,收集细胞上清,过0.45 μ m的滤膜后,进行蛋白纯化。通过NI-NTA亲和色谱对蛋白进行纯化。首先将收集的细胞上清与NI-NTA在4℃孵育2h后,利用10 mmol/L的咪唑进行杂蛋白的洗涤。最后利用500 mmol/L的咪唑洗脱目的蛋白。将洗脱的目的蛋白进行超滤浓缩后,利用SDS-PAGE鉴定蛋白的分子量和纯度。

1.3 蛋白分子量大小的鉴定

应用凝胶过滤色谱,使用Superose 6 increase

10/300 凝胶柱在 GE 蛋白色谱纯化系统 AKATA 中分别上样纯化后的 Rh3C-RBD 蛋白和标准品蛋白。根据标准品蛋白分子量测算 Rh3C-RBD 蛋白分子量大小。此外, 利用粒径分析仪 Zetasizer Nano System, 根据操作说明, 测量 Rh3C-RBD 蛋白分子量大小。

1.4 小鼠免疫

Balb/c 小鼠购自北京维通利华有限公司。小鼠的性别为雌性, 8 周龄。小鼠免疫采用肌肉注射方式。每组小鼠共 6 只, 分别免疫 5 μ g 的 Rh3C-RBD/Rh3C-HA1 和 20 μ g 的 CF501; 5 μ g 的 RBD/HAI 和 20 μ g 的 CF501; 5 μ g 的 Rh3C-RBD/Rh3C-HA1 和等体积的铝佐剂 (Thermo Scientific); 5 μ g 的 RBD/HAI 和等体积的铝佐剂 (Thermo Scientific)。小鼠共免疫两次, 间隔 14 天。在第 21 天采集小鼠血清, 存放于 -20°C 。

1.5 ELISA

参考 Liu 等^[4, 23]的方法进行 ELISA 实验。分别将 1 μ g/mL 的 RBD 或 HA1 包被于 ELISA 板中, 在 4°C 过夜包被。然后加入 100 μ L 的含 5% BSA 的 PBST, 于 37°C 封闭 2 h。将小鼠血清利用 PBST 进行系列倍比稀释后, 加入到 ELISA 板中, 于 37°C 孵育 1 h。利用 PBST 进行洗涤 5 次后, 分别加入 HRP 标记的兔抗小鼠的 IgG、IgG1 和 IgG2a 二抗。于 37°C 孵育 1 h 后, 利用 PBST 洗涤 5 次。加入 TMB 底物显色, 然后加入 H_2SO_4 进行终止。利用酶标仪检测 ELISA 板中每孔的 A_{450} 数值。

1.6 SARS-CoV-2 假病毒的制备

SARS-CoV-2 假病毒的制备参考 Liu 等^[2, 22]的方法。将生长良好的 HEK293T 细胞进行传代。24 h 后, 待细胞密度在 60%~80% 时, 利用 Vigofect 转染试剂对 PNL-4-3 骨架质粒和 PcDNA-3.1-SARS-CoV-2-S 质粒进行共转染。8 h 后更换新鲜 DMEM 培养基。48 h 后收取细胞上清即为 SARS-CoV-2 假病毒。SARS-CoV-2 假病毒存放于 -80°C 。

1.7 假病毒中和实验

将生长良好的 Huh-7 细胞铺 96 孔板, 每孔 5000 个细胞。8 h 后, 对小鼠血清进行系列倍比稀释, 然后加入等体积的 SARS-CoV-2 假病毒, 于 37°C 孵育 0.5 h。将血清和假病毒混合液加入到 Huh-7 细胞中。在 12 h 后, 更换新鲜的 DMEM 培养基。继续培养 48 h 后。加入细胞裂解液作用 0.5 h。然后加入 Luciferase 底物。检测 Luciferase 活性。

1.8 统计学分析

结果以平均值 \pm 标准误差表示。使用 GraphPad Prism 分别利用 One way ANOVA、Student-*t* test、Two way ANOVA 对实验数据进行统计学分析。

2 结 果

2.1 基于重组人源化 III 型胶原蛋白 (Rh3C) 基序的 SARS-CoV-2 RBD 三聚体蛋白的设计、表达与鉴定

前期研究中, 筛选获得了人源化 III 型胶原蛋白 Gly483-Pro512 功能区, 并通过将该区域进行 16 重复的串联表达获得性质更好的 Rh3C^[21]。本研究将 Rh3C 通过 Linker 与 SARS-CoV-2 的 RBD 蛋白以融合蛋白的形式表达 (Rh3C-RBD), 期望在胶原蛋白三聚化的作用下促使 RBD 以三聚体的形式表达, 提高 RBD 的免疫原性 [图 1(a)]。利用 AlphaFold2 程序^[24], 预测了 Rh3C-RBD 融合蛋白的三聚体结构 [图 1(b)]。结果显示, 整个 Rh3C-RBD 分子可以形成规则的三聚体结构, 长度大约 140 nm。分子的前端为相互错位 1 个氨基酸的胶原三聚体结构, 后端为 3 重中心轴对称的 RBD 三聚体结构, 两个结构由柔性 Linker 连接。该分子整体结构与设计预期基本吻合 [图 1(c)]。接下来的实验结果显示, Rh3C-RBD 蛋白可被高效重组表达 [图 1(d)]。SDS-PAGE 呈现的 Rh3C-RBD 蛋白单体分子量与预期蛋白分子量一致, 约为 85 kDa 左右。通过对该蛋白进行纯化, 获得了高纯度的 Rh3C-

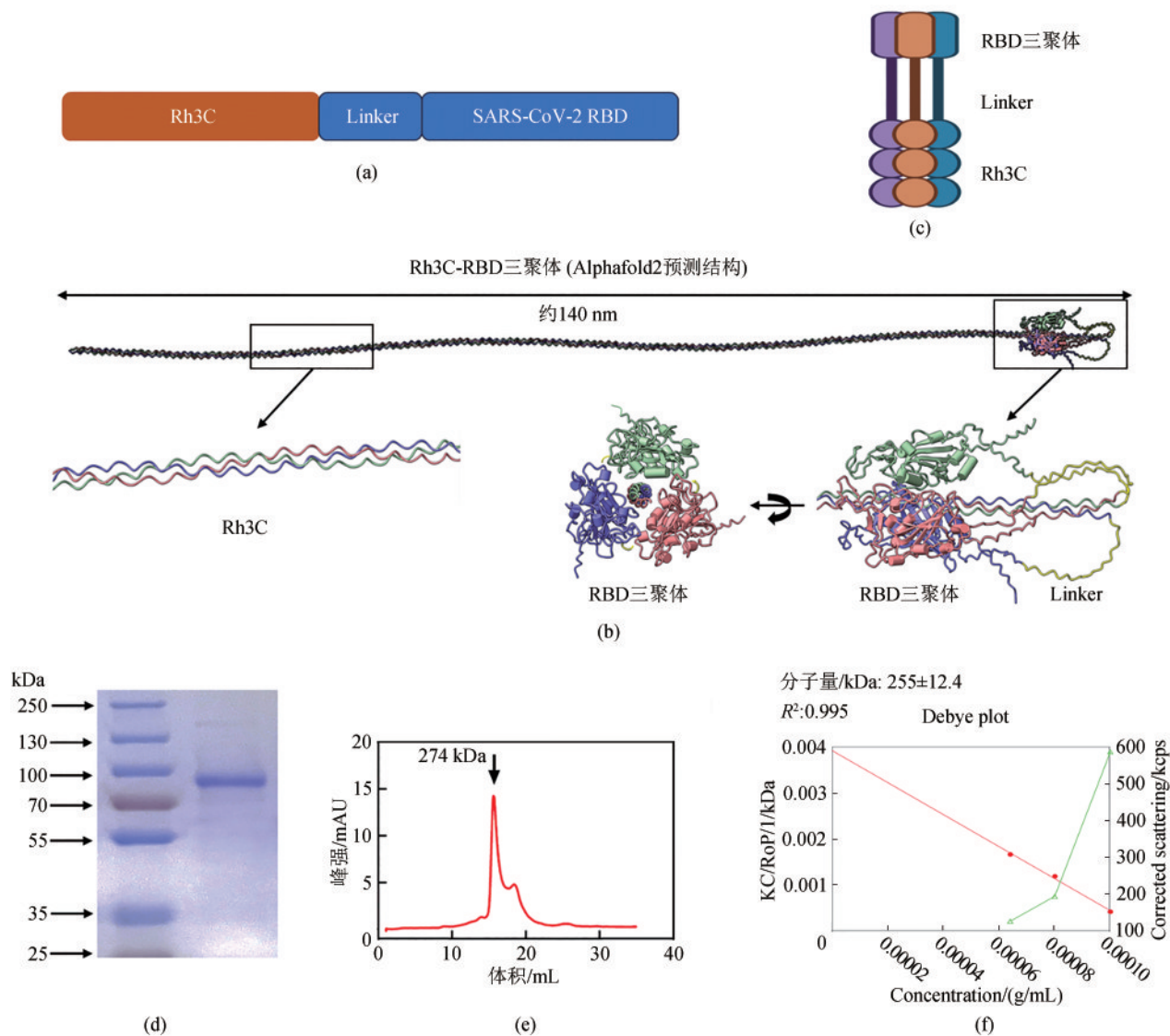


图1 基于Rh3C连接的SARS-CoV-2 RBD融合蛋白作为三聚体疫苗抗原的设计、构建和鉴定

[(a) III型胶原蛋白Rh3C同SARS-CoV-2 RBD融合蛋白的设计。(b) 利用AlphaFold2预测的Rh3C-RBD三聚体结构。整个结构由多次的分段预测结果拼接而成。放大的图分别展示了串联重复的胶原三螺旋基序结构和RBD三聚体结构。(c) III型人源化胶原蛋白Rh3C同RBD融合表达后的三聚体结构模式图。(d) III型人源化胶原蛋白Rh3C同RBD融合表达后的SDS-PAGE图片。(e) 凝胶过滤色谱分析Rh3C-RBD分子量。(f) 粒径分析Rh3C-RBD融合蛋白获得蛋白分子量]

Fig. 1 Design, construction and identification of the Rh3C-conjugated RBD in the S protein of SARS-CoV-2 as a trimeric vaccine antigen [(a) Schematic representation of the design of Rh3C-conjugated SARS-CoV-2 RBD (Rh3C-RBD) as a trimeric vaccine antigen.(b) Predicted trimeric structure of Rh3C-RBD using AlphaFold2. The entire structure is assembled from multiple segment predictions. The magnified images show the triple-helix motifs of the collagen tandem repeat and the trimeric conformation of RBD. (c) Schematic illustration of the Rh3C-RBD structure. (d) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis for the visualization of the Rh3C-RBD protein. (e) Representative elution chromatograph of the Rh3C-RBD protein using a calibrated Superose 6 Increase 10/300 column. (f) Determination of the molecular weight of Rh3C-RBD through the particle size analysis.]

RBD蛋白。通过凝胶过滤色谱检测了所表达的Rh3C-RBD的分子量，约为274 kDa，为所预测分子量的3倍左右，提示了Rh3C-RBD以三聚体形式成功被表达 [图1(e)]。进一步通过测量该蛋白的

粒径，估算出了该蛋白在天然情况下的分子量大小，约为255 kDa [图1(f)]，与凝胶过滤色谱结果一致，符合预期的三聚体分子量。结果提示，Rh3C-RBD以三聚体的形式被表达及制备。

2.2 Rh3C-RBD 三聚体和 RBD 单体免疫原性的比较

为了鉴定 Rh3C-RBD 三聚体是否比 RBD 单体具有更好的免疫原性, 利用之前研发的新型 STING 激动剂 CF501^[23, 25] 和铝佐剂 (Thermo) 分别作为 Rh3C-RBD 三聚体和 RBD 单体的佐剂免疫

Balb/c 小鼠。在免疫两次后, 对小鼠血清中的 RBD 特异性抗体进行检测。结果如图 2 所示。CF501 佐剂组, Rh3C-RBD 在小鼠体内所诱导产生的 RBD 特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 的抗体水平显著高于 RBD 单体蛋白诱导的抗体水平。CF501/Rh3C-RBD 组小鼠血清针对 RBD 的特异性 IgG 平均抗体滴度为 656 100, 较 CF501/RBD 组小鼠血清的 IgG 抗体水

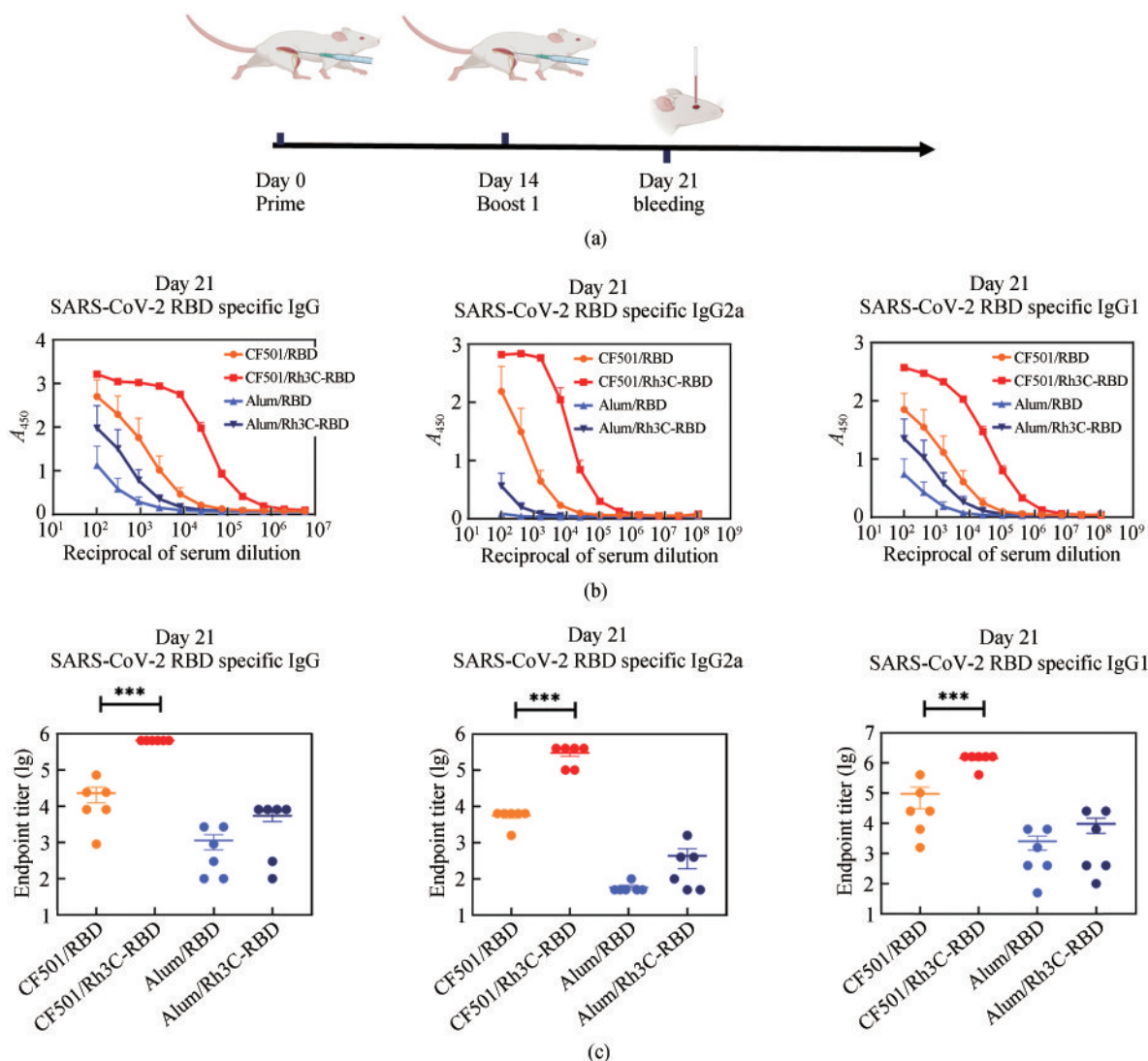


图2 Rh3C-RBD和RBD免疫小鼠后体液免疫应答的评价

[(a) 小鼠的免疫程序, 分别在第0和14天进行免疫, 在第21天收集小鼠血清; (b) 免疫两次后第7天检测小鼠血清中针对RBD特异性的IgG、IgG1和IgG2a抗体; (c) RBD特异性的IgG、IgG1和IgG2a抗体滴度。One-way ANOVA用于分析统计学差异。*** $P < 0.0001$ 。每组小鼠 $n=6$]

Fig. 2 Evaluation of the humoral immunity induced by Rh3C-RBD and RBD in the mice

[(a) Overview of the immunization protocol. Mice were vaccinated at day 0 and day 14, with serum collected at day 21; (b) Quantification of the SARS-CoV-2 RBD-specific IgG, IgG1, and IgG2a in different serum dilutions from day 21 using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); (c) Determination of the RBD-specific IgG, IgG1, and IgG2a titers in sera collected at day 21. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA. *** indicating the statistical significance at $P < 0.0001$.]

平高约 27 倍 ($P<0.0001$) Alum/Rh3C-RBD 组小鼠血清针对 RBD 的特异性 IgG 平均抗体滴度为 5467, 较 Alum/RBD 组小鼠血清的 IgG 抗体水平高约 4 倍。同样 CF501/Rh3C-RBD 组小鼠所诱导的 RBD 特异性 IgG1 和 IgG2a 的抗体滴度分别为 1 433 600 和 307 200, 高出 CF501/RBD 组小鼠血清中抗体滴度 14 倍 ($P=0.0069$) 和 53 倍 ($P<0.0001$)。这些数据提示了, 融合 Rh3C 后的 RBD 三聚体较 RBD 单体可在小鼠体内诱导更加强效的特异性抗体免疫应答。

2.3 Rh3C-RBD 三聚体和 RBD 单体抗原在小鼠体内诱导的中和抗体评价

为了进一步鉴定 Rh3C-RBD 三聚体是否会诱导更高的中和抗体水平, 将 SARS-CoV-2 (D614G) 的刺突蛋白表达在 HIV 骨架蛋白表面, 构建了 SARS-CoV-2 的假病毒。并利用 SARS-CoV-2 (D614G) 和 Omicron (BA.2.2) 假病毒系统检测小鼠血清中的中和抗体效价。结果如图 3 所示, CF501/Rh3C-RBD 组小鼠血清中对 D614G 和 BA.2.2

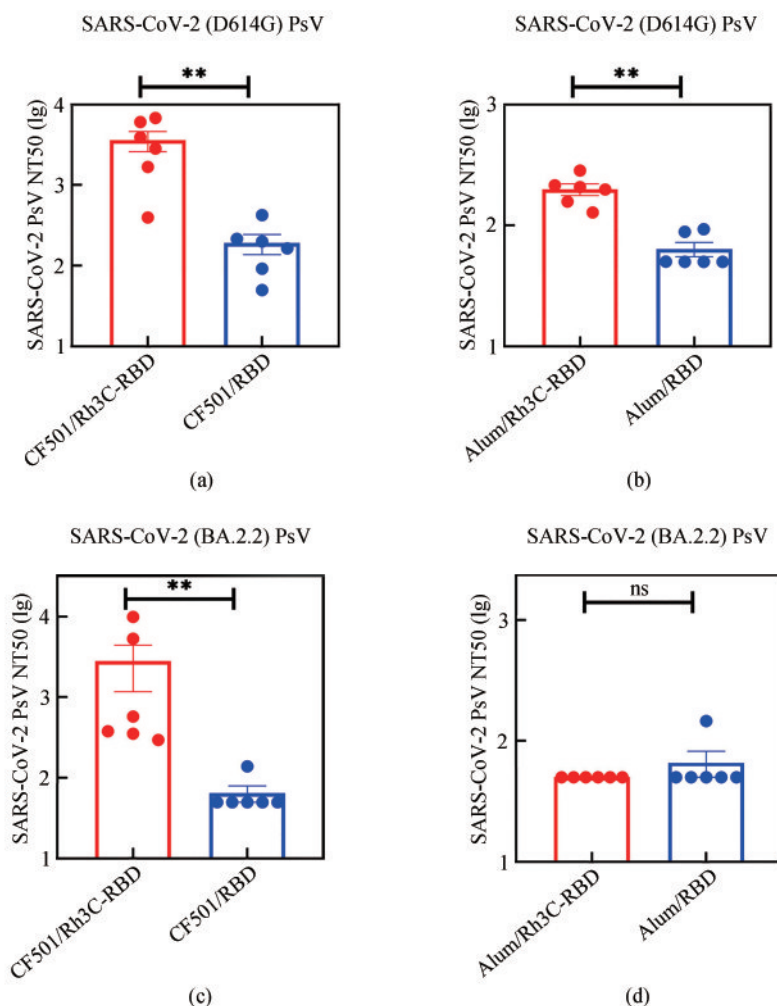


图3 免疫后小鼠血清中针对 SARS-CoV-2 假病毒中和抗体的评价 (每组小鼠 $n=6$)

[(a) 以 CF501 为佐剂, Rh3C-RBD 和 RBD 免疫小鼠后, 小鼠血清针对 SARS-CoV-2 (D614G) 假病毒中和抗体滴度。 (b) 以 Alum 为佐剂, Rh3C-RBD 和 RBD 免疫小鼠后, 小鼠血清针对 SARS-CoV-2 (D614G) 假病毒中和抗体的评价。 (c) 以 CF501 为佐剂, Rh3C-RBD 和 RBD 免疫小鼠后, 小鼠血清针对 SARS-CoV-2 (BA.2.2) 假病毒中和抗体滴度。 (d) 以 Alum 为佐剂, Rh3C-RBD 和 RBD 免疫小鼠后, 小鼠血清针对 SARS-CoV-2 (BA.2.2) 假病毒中和抗体的评价。 t 检验用于分析统计学差异。 ** $P<0.001$]

Fig. 3 Evaluation of the neutralizing antibodies against the pseudovirus SARS-CoV-2 (D614G) in the sera of immunized mice [Assessment of the neutralizing antibody titers against SARS-CoV-2 (D614G) in the sera of mice immunized with CF501/RBD or CF501/Rh3C-RBD (a), Alum/RBD or Alum/Rh3C-RBD (b), CF501/RBD or CF501/Rh3C-RBD (c), and Alum/RBD or Alum/Rh3C-RBD (d). Statistical analysis was performed using the Student t test. ** indicating the statistical significance at $P<0.001$.]

假病毒的平均中和抗体效价为3620和2807,而CF501/RBD组小鼠的平均效价仅为191和64。同样地,Alum/Rh3C-RBD组小鼠血清对D614G假病毒的平均中和抗体效价为198,而Alum/RBD组小鼠血清的平均中和抗体效价仅为63。Alum/Rh3C-RBD和Alum/RBD组小鼠血清对BA.2.2假病毒都未产生强效的中和作用。以上数据提示了,Rh3C-RBD不仅可显著提高抗原特异性结合抗体,还可以有效增强中和抗体的免疫应答。

2.4 Rh3C三聚体策略在流感病毒抗原设计中的应用

为了评价该Rh3C是否可作为一种增加抗原免

疫原性的通用元件,进一步将该Rh3C与流感病毒H1N1 HA1蛋白进行融合表达[图4(a)]。经过SDS-PAGE鉴定后,发现Rh3C-HA1成功被表达,并具有较高的纯度[图4(b)]。进一步将Rh3C-HA1和HA1分别与佐剂CF501或Alum联用免疫Balb/c小鼠[图4(c)]。免疫两次后利用ELISA检测HA1特异性的IgG抗体水平。结果如图4(d)、(e)所示。无论是利用CF501佐剂还是铝佐剂,Rh3C-HA1所诱导的HA1特异性IgG抗体滴度要显著性地高于HA1抗原诱导的IgG抗体水平。该结果提示,Rh3C三聚化策略不仅可提高SARS-CoV-2 RBD抗原诱发特异性结合抗体和中和抗体,还可提高流感HA1诱发的特异性结合抗体。有望成为一种通用的增强抗原免疫原性的三聚化策略。

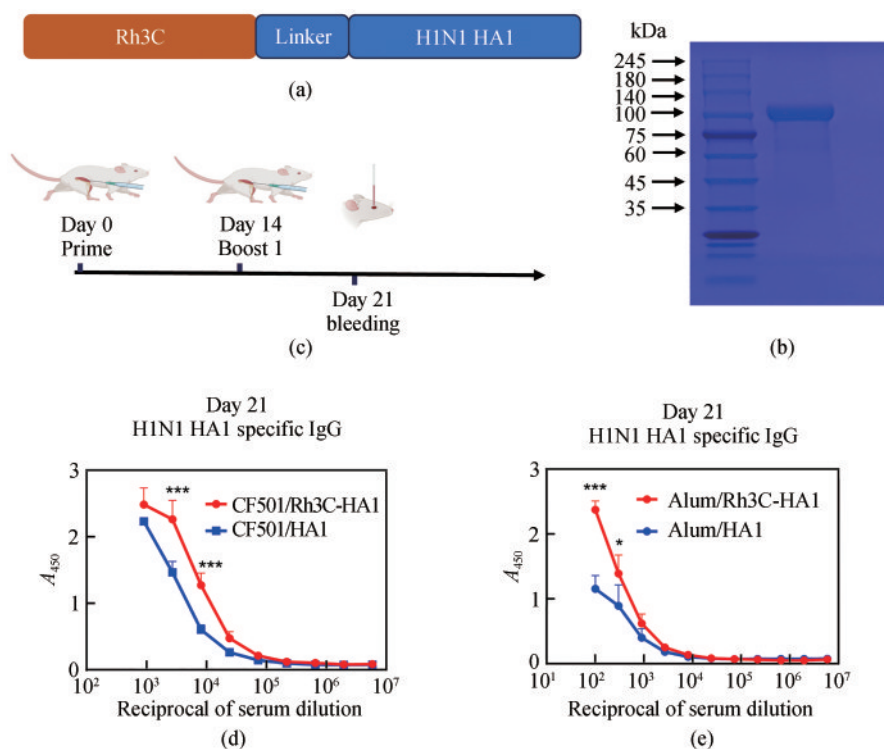


图4 基于Rh3C连接的H1N1 HA1融合蛋白作为三聚体流感疫苗抗原的设计构建及其免疫原性评价

[(a) 基于Rh3C连接的H1N1 HA1重组融合蛋白(Rh3C-HA1)的设计。(b) SDS-PAGE图片验证Rh3C-HA1蛋白的表达。(c) 小鼠的免疫程序。(d) 以CF501为佐剂免疫小鼠后血清中针对HA1特异性的IgG抗体水平。(e) 以Alum为佐剂免疫小鼠后血清中针对HA1特异性的IgG抗体水平。利用Two-way ANOVA进行统计学分析。*** $P<0.0001$, * $P<0.05$]

Fig.4 Design and construction of the Rh3C-conjugated influenza virus HA1 (Rh3C-HA1) and evaluation of its immunogenicity [(a) Design of the Rh3C-conjugated influenza virus HA1 (Rh3C-HA1); (b) SDS-PAGE analysis for the expressed Rh3C-HA1 protein; (c) Overview of the immunization protocol. Mice were vaccinated at day 0 and day 14, with serum collection at day 21; (d and e) ELISA analyses of the HA1-specific IgG in the serum collected at day 21 from mice immunized with CF501/RBD or CF501/Rh3C-RBD and Alum/RBD or Alum/Rh3C-RBD. Statistical analysis was performed using the two-way ANOVA. *** and * indicating the statistical significance at $P<0.0001$ and $P<0.05$, respectively.]

3 讨论

I型包膜病毒的糖蛋白在天然状态大多以三聚体形式呈现,例如HIV-1 Env蛋白、流感病毒HA蛋白、新冠病毒S蛋白和呼吸道合胞病毒F蛋白等。制备和天然状态相近的三聚体抗原对于研发这些疫苗至关重要。目前应用最为普遍的是利用Foldon作为三聚化基序与目的蛋白融合表达,获得三聚体构象蛋白^[26]。融合Foldon的三聚体蛋白虽然也可显著提高目的蛋白的免疫原性,但机体中会产生对Foldon本身的大量抗体,削弱了对目的蛋白的免疫应答^[16]。Rh3C基序蛋白在免疫小鼠后,在小鼠体内可能会诱发对该Rh3C本身的抗体。Rh3C来自于全人源Ⅲ型胶原蛋白的部分片段,Ⅲ型胶原蛋白广泛存在于人体各组织器官中,具有安全无毒、免疫原性低等特征。由于T细胞和B细胞在发育过程中需经历阳性选择和阴性选择,存在中枢和外周免疫耐受机制,因此来自于人Ⅲ型胶原蛋白功能区天然序列的三聚化基序,较难在人体中产生特异性抗体。即使与佐剂配伍使用,引起针对自身胶原蛋白的抗体可能性也较低。因此融合Rh3C的抗原可让免疫应答更加聚焦目的蛋白。此外,该Rh3C可作为三聚化基序促使与之融合表达的目的蛋白呈现三聚体形式,增加目的蛋白的免疫原性。同时,该Rh3C三聚体策略具有通用性,可促使多种抗原形成三聚体。

新冠病毒的RBD单体蛋白免疫原性较差,通过利用多种策略将RBD构建成二聚体或三聚体可显著提高其免疫原性。例如通过串联表达的方式构建的RBD二聚体较RBD单体可显著诱导免疫应答^[27];将RBD同人IgG1 Fc融合表达后可获得RBD-Fc二聚体蛋白,除增加RBD免疫原性外,Fc还可发挥分子内佐剂的作用^[4];将RBD同Foldon融合表达形成稳定的三聚体也可显著增强抗体免疫应答^[15]。本文所构建的Rh3C蛋白优势在于提供了一种来自于人Ⅲ型胶原蛋白片段的三聚体基序,在生物相容性和安全性等方面可能更具有优势。

如今,合成生物技术在当前科学研究和应用中扮演着越来越重要的角色。该技术的重要性在于提供了一种精确、可控的方法来设计和构建新的生物分子,从而实现对生物分子及生物体的精

确操控和优化。例如,本研究中利用的基于合成生物技术设计的Rh3C,已被发现具有良好的生物学性能和广泛的应用场景,包括治疗阴道萎缩^[28]、心血管支架涂层^[29]、快速修复慢性糖尿病伤口感染^[30]、抗炎与血管生成^[31]、改善盆底功能障碍^[18]、缓解皮肤光老化^[32]、改善慢性子宫内膜炎^[33]等。本研究利用基于合成生物技术设计的Rh3C基序,为三聚体疫苗抗原的设计和 optimization 提供了新的思路和方法。目前所设计、表达和制备的Rh3C-RBD和Rh3C-HA1抗原蛋白,初步证明了较未融合该Rh3C基序的RBD或HA1抗原,在小鼠模型上诱导产生了更加强效的体液免疫应答。这显示了合成生物学技术的应用潜力,为各类病毒的三聚化抗原设计提供了一种有效的、普适的新型抗原设计策略。后续我们还将深入分析这类抗原蛋白的精细结构特征,并在灵长类动物模型中证明该类融合蛋白的免疫原性,包括评估针对胶原基序产生抗体的情况。同时,也还将设计开发更多种类和特性的该类基序蛋白,进一步提高疫苗的免疫原性和保护效果,为解决人类面临的越来越严峻的病原微生物挑战提供新的解决方案。

参考文献

- [1] DU L Y, HE Y X, ZHOU Y S, et al. The spike protein of SARS-CoV—a target for vaccine and therapeutic development[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(3): 226-236.
- [2] XIA S A, LIU M Q, WANG C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion[J]. *Cell Research*, 2020, 30(4): 343-355.
- [3] ZHOU J, LIU Z Z, ZHANG G X, et al. Development of variant-proof severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, pan-sarbecovirus, and pan-β-coronavirus vaccines[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(1): e28172.
- [4] LIU Z Z, XU W, XIA S, et al. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5: 282.
- [5] WRAPP D, WANG N S, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.

- [6] ZHANG N R, JI Q T, LIU Z Z, et al. Effect of different adjuvants on immune responses elicited by protein-based subunit vaccines against SARS-CoV-2 and its delta variant[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 501.
- [7] ROUTHU N K, CHEEDARLA N, BOLLIMPELLI V S, et al. SARS-CoV-2 RBD trimer protein adjuvanted with Alum-3M-052 protects from SARS-CoV-2 infection and immune pathology in the lung[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3587.
- [8] YAMAYOSHI S, KAWAOKA Y. Current and future influenza vaccines[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(2): 212-220.
- [9] GÜTHE S, KAPINOS L, MÖGLICH A, et al. Very fast folding and association of a trimerization domain from bacteriophage T4 fibrin[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 337(4): 905-915.
- [10] TAO Y Z, STRELKOV S V, MESYANZHINOV V V, et al. Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain[J]. *Structure*, 1997, 5(6): 789-798.
- [11] LI T T, ZHANG Z Y, ZHANG Z Q, et al. Characterization of native-like HIV-1 gp140 glycoprotein expressed in insect cells [J]. *Vaccine*, 2019, 37(11): 1418-1427.
- [12] RINGE R P, YASMEEN A, OZOROWSKI G, et al. Influences on the design and purification of soluble, recombinant native-like HIV-1 envelope glycoprotein trimers[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(23): 12189-12210.
- [13] YANG X Z, LEE J, MAHONY E M, et al. Highly stable trimers formed by human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins fused with the trimeric motif of T4 bacteriophage fibrin[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(9): 4634-4642.
- [14] AHN J Y, LEE J, SUH Y S, et al. Safety and immunogenicity of two recombinant DNA COVID-19 vaccines containing the coding regions of the spike or spike and nucleocapsid proteins: an interim analysis of two open-label, non-randomised, phase 1 trials in healthy adults[J]. *The Lancet Microbe*, 2022, 3(3): e173-e183.
- [15] VOGEL A B, KANEVSKY I, CHE Y, et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2021, 592(7853): 283-289.
- [16] SLIEPEN K, VAN MONTFORT T, MELCHERS M, et al. Immunosilencing a highly immunogenic protein trimerization domain[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(12): 7436-7442.
- [17] CAO Y L, JIAN F C, WANG J, et al. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution [J]. *Nature*, 2023, 614(7948): 521-529.
- [18] LI H, YOU S, YANG X, et al. Injectable recombinant human collagen-derived material with high cell adhesion activity limits adverse remodelling and improves pelvic floor function in pelvic floor dysfunction rats[J]. *Biomaterials Advances*, 2022, 134: 112715.
- [19] GORDON M K, HAHN R A. Collagens[J]. *Cell and Tissue Research*, 2010, 339(1): 247-257.
- [20] LIU X, WU H, BYRNE M, et al. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(5): 1852-1856.
- [21] HUA C, ZHU Y, XU W, et al. Characterization by high-resolution crystal structure analysis of a triple-helix region of human collagen type III with potent cell adhesion activity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(4): 1018-1023.
- [22] LIU Z Z, ZHOU J, WANG X L, et al. A pan-sarbecovirus vaccine based on RBD of SARS-CoV-2 original strain elicits potent neutralizing antibodies against XBB in non-human primates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(11): e2221713120.
- [23] LIU Z Z, ZHOU J, XU W, et al. A novel STING agonist-adjuvanted pan-sarbecovirus vaccine elicits potent and durable neutralizing antibody and T cell responses in mice, rabbits and NHPs[J]. *Cell Research*, 2022, 32(3): 269-287.
- [24] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [25] LIU Z Z, CHAN J F W, ZHOU J, et al. A pan-sarbecovirus vaccine induces highly potent and durable neutralizing antibody responses in non-human primates against SARS-CoV-2 Omicron variant[J]. *Cell Research*, 2022, 32(5): 495-497.
- [26] RAINHO-TOMKO J N, PAVOT V, KISHKO M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of RSV G central conserved domain vaccine with a prefusion nanoparticle[J]. *NPJ Vaccines*, 2022, 7: 74.
- [27] DAI L P, ZHENG T Y, XU K, et al. A universal design of betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 722-733. e11.
- [28] YOU S, LIU S B, DONG X J, et al. Intravaginal administration of human type III collagen-derived biomaterial with high cell-

- adhesion activity to treat vaginal atrophy in rats[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2020, 6(4): 1977-1988.
- [29] YANG L, WU H S, LU L, et al. A tailored extracellular matrix (ECM)-Mimetic coating for cardiovascular stents by stepwise assembly of hyaluronic acid and recombinant human type III collagen[J]. Biomaterials, 2021, 276: 121055.
- [30] HU C, LIU W Q, LONG L Y, et al. Microenvironment-responsive multifunctional hydrogels with spatiotemporal sequential release of tailored recombinant human collagen type III for the rapid repair of infected chronic diabetic wounds[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(47): 9684-9699.
- [31] LONG L Y, LIU W Q, LI L, et al. Dissolving microneedle-encapsulated drug-loaded nanoparticles and recombinant humanized collagen type III for the treatment of chronic wound *via* anti-inflammation and enhanced cell proliferation and angiogenesis[J]. Nanoscale, 2022, 14(4): 1285-1295.
- [32] WANG J, QIU H, XU Y, et al. The biological effect of recombinant humanized collagen on damaged skin induced by UV-photoaging: an *in vivo* study[J]. Bioactive Materials, 2021, 11: 154-165.
- [33] YOU S, ZHU Y, LI H, et al. Recombinant humanized collagen remodels endometrial immune microenvironment of chronic endometritis through macrophage immunomodulation[J]. Regenerative Biomaterials, 2023, 10: rbad033.



通讯作者: 姜世勃(1953—),男,教授,博士生导师。研究方向为微生物学。
E-mail: shibojie@fudan.edu.cn



通讯作者: 陆路(1982—),男,研究员,博士生导师。研究方向为微生物学。
E-mail: lul@fudan.edu.cn



第一作者: 刘泽众(1990—),男,青年研究员,博士生导师。研究方向为微生物学。
E-mail: zezhongliu@fudan.edu.cn

广告索引:安及义实业(上海)有限公司(后彩一)/诚志生命科技有限公司(后彩二)/安徽华恒生物科技股份有限公司(封三)