

1. 一种重组呼吸道合胞病毒颗粒抗原,包含RSV F蛋白重组的头部结构域和可自组装成七聚体的颗粒化结构域IMX313,其中所述重组的头部结构域从N端至C端包含直接相连或通过接头序列连接的RSV F蛋白的F1域截短片段和F2域截短片段,且所述重组的头部结构域相较于野生型RSV F蛋白的头部结构域的突变由以下组成:

(A) 非天然二硫键突变:S55C+L188C和I148C+Y286C的组合或者S55C+L188C、I148C+Y286C和H159C+I291C的组合,空腔填充突变:N67F+S190V以及天然取代P102A;或

(B) 非天然二硫键突变:S55C+L188C和I148C+Y286C的组合或者S55C+L188C、I148C+Y286C和H159C+I291C的组合,空腔填充突变:N67F+S190V+V296F,静电突变G184N以及天然取代P102A,

其中所述F1域截短片段和F2域截短片段分别对应于野生型RSV F蛋白的第146-306位和第51-104位氨基酸残基,所述野生型RSV F蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示。

2. 如权利要求1所述的颗粒抗原,其中所述重组的头部结构域的C端与所述颗粒化结构域的N端直接相连或通过接头序列相连。

3. 如权利要求2所述的颗粒抗原,其中所述颗粒抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:5、6、7、8中任一项所示。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的颗粒抗原,其中所述颗粒抗原将融合前构象的F蛋白多肽展示于七聚体纳米颗粒的表面。

5. 权利要求1-3中任一项所述的颗粒抗原在制备预防RSV感染的疫苗中的应用。

6. 一种预防RSV感染的疫苗,包含权利要求1-3中任一项的颗粒抗原;所述疫苗针对RSV A亚型和/或B亚型中的至少一种感染提供保护。

一种重组呼吸道合胞病毒颗粒抗原

技术领域

[0001] 本申请属于生物医药技术领域,特别涉及一种重组呼吸道合胞病毒颗粒抗原及其制备方法和在制备预防RSV感染的疫苗中的应用。

背景技术

[0002] 呼吸道病毒感染是全球最重要的公共卫生负担之一,每年导致全世界数百万人住院治疗。呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus,RSV)是2岁以下儿童和65岁以上成人急性下呼吸道感染的主要原因。尽管RSV感染引起的呼吸道疾病危害严重,但目前尚无几种专门针对RSV的有效治疗方法和预防性疫苗。纵观全球进入临床阶段的RSV疫苗,研发的主要方向集中在减毒活疫苗、重组亚单位疫苗和病毒载体疫苗。RSV疫苗开发主要针对3种目标人群,包括婴幼儿、孕妇和老年人(≥ 60 岁)。年龄小于6个月的婴儿,主要通过mAbs实现被动免疫保护,或由孕妇接种RSV疫苗后经胎盘转移抗体来获得被动保护;对于年龄大于6个月的婴幼儿则可以通过主动免疫RSV减毒活疫苗来获得保护;针对孕妇和老年人,RSV疫苗的开发以亚单位疫苗为主。

[0003] 主流疫苗抗原的选择主要集中在F蛋白,尤其是融合前构象的F蛋白(PreF)。融合前构象的F蛋白相比融合后构象的F蛋白可以暴露更多具有中和活性的潜在表位,如仅在PreF中存在的表位 Φ 和表位V。针对表位 Φ 和表位V产生的抗体具有优秀的中和活性,与融合前构象的F蛋白结合后,可以阻断通过F蛋白构象变化介导的病毒膜融合。尽管已有大量关于RSV F蛋白融合前构象稳定性的研究,但其作为疫苗使用的安全性和有效性仍面临巨大的挑战。

[0004] 因此,提供一种安全性高且具有增强的免疫原性和改善的稳定性的RSV抗原,以及包含其的疫苗成为本领域技术人员急需解决的技术问题。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供一种重组呼吸道合胞病毒(RSV)颗粒抗原,包含可自组装成七聚体的颗粒化结构域和RSV F蛋白重组的头部结构域,其中所述重组的头部结构域从N端至C端包含直接相连或通过接头序列连接的RSV F蛋白的F1域截短片段和F2域截短片段。

[0006] 所述重组的头部结构域包含只存在于融合前构象中的表位,所述表位包含以SEQ ID NO:1所示的野生型RSV F蛋白序列的残基62-69和196-209。

[0007] 在一些实施方式中,所述颗粒化结构域位于所述重组的头部结构域的C端,与重组头部结构域的C端直接相连或通过接头序列相连。

[0008] 在一些实施方式中,可选地,所述接头序列为GGGSSGS、GSGSG或G与S组成的4-10个氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方式中,所述颗粒化结构域可自组装成七聚体,优选地,所述颗粒化结构域为IMX313。

[0010] “IMX313”通常被认为是分子佐剂,该技术基于鸡补体抑制剂C4b结合蛋白(C4bp)的寡聚结构域的嵌合版本,以获得Pfs25的均质自组装寡聚物。当在大肠杆菌中表达时,该C4 bp寡聚结构域已被证明自发形成可溶性七聚结构,这些结构域融合的蛋白抗原可改善抗体反应。

[0011] 成熟F糖蛋白具有三个一般结构域:胞外结构域(ED)、跨膜结构域(TM)和胞质尾区(CT)。CT含有单一棕榈酰基化半胱氨酸残基。

[0012] 人RSV的F糖蛋白首先从mRNA翻译为单一574个氨基酸的多肽前体(称为“F0”或“F0前体”),其含有N-末端的信号肽序列(氨基酸1-25)。翻译后,在内质网中通过信号肽酶移除信号肽。F0前体的剩余部分(即,残基26-574)可通过细胞蛋白酶(尤其弗林蛋白酶)在两个多基础位点(a.a.109/110和136/137)进一步切割,移除名为pep27的27个氨基酸的间插序列(氨基酸110-136)且生成名为F1(C-末端部分,氨基酸137-574)和F2(N-末端部分,氨基酸26-109)的连接片段。F1含有其N-末端的疏水融合肽和两个七肽重复区(HRA和HRB)。HRA靠近融合肽,且HRB靠近TM结构域。F1和F2片段通过两个天然二硫键连接在一起。无信号肽序列的未切割的F0蛋白或F1-F2异二聚体可形成RSV F原体。3个此类原体组装以形成最终RSV F蛋白复合物,其为3个原体的同三聚体。

[0013] 在一些实施方式中,本发明所述F2域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸26-105对应的RSV F蛋白多肽,所述F1域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸137-516对应的RSV F蛋白多肽。

[0014] 在一些实施方式中,所述F1域截短片段至少包含对应于野生型RSV F蛋白的第146-306位氨基酸残基,所述F2域截短片段至少包含对应于野生型RSV F蛋白的第51-104位氨基酸残基。

[0015] 在一些实施方式中,所述F1域截短片段为对应于野生型RSV F蛋白的第146-306位氨基酸残基,所述F2域截短片段为对应于野生型RSV F蛋白的第51-104位氨基酸残基。

[0016] 在一些实施方式中,可选地,所述接头序列为GGGSSGS、GSGSG、GGPG或G与S组成的4-10个氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方式中,优选地,所述接头序列为GGPG。

[0018] 在一些实施方式中,所述重组的头部结构域进一步包含一种或多种氨基酸突变,所述氨基酸突变包括一个或多个氨基酸的添加、缺失或替换。

[0019] 在一些实施方式中,所述氨基酸突变包括添加非天然二硫键突变和空腔填充突变。

[0020] 在一些实施方式中,所述添加非天然二硫键突变包括通过成对的半胱氨酸取代形成人工的链内二硫键和/或链间二硫键。

[0021] 链间二硫键(S-S)通常是指两个不同的有机分子中的硫原子之间的键。

[0022] 链内二硫键(S-S)是指有机分子中两个相邻硫原子之间的键。

[0023] 在本发明中,连接单个结构域中两个 β -折叠的二硫键成为链内二硫键;连接两个不同结构域(例如,连接一个F1域和一个F2域)或连接两个相邻的相同结构域(例如,连接相邻的两个F蛋白单体的F1域)的二硫键称为链间二硫键。

[0024] 在一些实施方式中,所述非天然二硫键突变选自V164C+K293C、G151C+I288C、H159C+I291C、S55C+L188C、S56C+V187C、S59C+V193C、K75C+E218C、T397C+E487C、S443C+S466C、T323C+I475C、I332C+P480C、S146C+N460C、I148C+Y286C、A149C+Y458C和S150C+

Q302C中至少一组。

[0025] 在一些实施方式中,所述非天然二硫键突变选自S55C+L188C、I148C+Y286C和H159C+I291C中至少一组。

[0026] 在一些实施方式中,所述非天然二硫键突变是S55C+L188C、I148C+Y286C和H159C+I291C的组合。

[0027] 在一些实施方式中,所述空腔填充突变包括V296F、N67F、L158F、V154L、V154I、V187F、S190V、V192M、L193H、S190F、V207L、K77E、V56I、E60F、E82Y、G139W、K168W、Q202Y、V207F、T219F、V220W、L230F和V495L。

[0028] 在一些实施方式中,所述空腔填充突变选自N67F、L158F、V187F、S190V、V296F、V192M、V495L、S190F和E82Y中的至少一种。

[0029] 在一些实施方式中,所述空腔填充突变选自N67F、S190V、V296F和V495L中至少一种。

[0030] 在一些实施方式中,所述空腔填充突变选自N67F、S190V和V296F中的至少两种。

[0031] 在一些实施方式中,优选地,所述空腔填充突变为N67F和S190V的组合。

[0032] 在一些实施方式中,优选地,所述空腔填充突变为N67F、S190V和V296F的组合。

[0033] 在本发明的颗粒抗原氨基酸序列中,特别是重组的头部结构域还包括相对于野生型RSV F蛋白序列的1个~4个天然存在的取代(P102A、I379V、M447V和E218A)。

[0034] 在一些实施方式中,所述天然存在的取代选自P102A、I379V、M447V和E218A中至少一种。

[0035] 在一些实施方式中,所述天然存在的取代为P102A。

[0036] 在一些实施方式中,所述氨基酸突变进一步还可以加入静电突变,所述静电突变减少蛋白中在折叠结构中彼此靠近的残基之间的离子排斥或增加所述残基之间的离子吸引。

[0037] 在一些实施方式中,所述静电突变包括K80E、E92D、G184N、V185N、K201Q、K209Q和S35F。

[0038] 在一些实施方式中,优选地,所述静电突变为G184N。

[0039] 本发明公开的颗粒抗原包含表达所需要的信号肽序列或者与纯化标签相连接的接头序列,这些信号肽序列或者与纯化标签相连接的接头序列可以在最终产物中除去。

[0040] 在一些实施方式中,所述颗粒抗原包含表达所需要的信号肽为异源信号肽。

[0041] 在一些实施方式中,所述异源信号肽是IgG信号肽,氨基酸序列为MGWSCIIILFLVATATGVHS。

[0042] 在一些实施方式中,所述颗粒抗原在载体构建时还引入了便于后续纯化的亲和和标签,如strep tag(氨基酸序列:WSHPQFEK)、Monoclonal Flag-Tag(氨基酸序列:DYKDDDDK)和His tag(氨基酸序列:HHHHHHHH),这些标签序列可以在最终产物中除去。

[0043] 本发明所述的颗粒抗原将融合前构象的F蛋白多肽展示于七聚体纳米颗粒的表面。

[0044] 本发明还提供所述颗粒抗原在制备预防RSV感染的疫苗中的应用。

[0045] 本发明还提供一种预防RSV感染的疫苗,包含上述的颗粒抗原,并且所述疫苗针对RSV A亚型和/或B亚型中的至少一种感染提供保护。

[0046] 本发明公开一种预防RSV感染的疫苗,进一步包含免疫佐剂,所述免疫佐剂包含铝佐剂、角鲨烯、生育酚、MPL、LPA、CpG、poly(I:C)以及QS-21中的至少一种。

[0047] 在一些实施方式中,免疫佐剂为脂质体形式的佐剂,成分包括MPL、QS-21、DOPC和胆固醇。

[0048] 本发明还提供制备所述颗粒抗原的方法,包括如下步骤:

[0049] S1、合成所述颗粒抗原对应的DNA序列,并克隆到质粒载体中;

[0050] S2、用重组质粒载体转染宿主细胞、并进行表达,所述宿主细胞为真核细胞;

[0051] S3、对培养产物进行纯化,得到所述颗粒抗原。

[0052] 在一些实施方式中,本发明所述疫苗通常还包含药学可接受载体和/或赋形剂诸如缓冲剂。药学可接受载体和赋形剂是公知的,并且可以由本领域技术人员进行选择。任选地,药学可接受载体或赋形剂还含有至少一种稳定溶解度和/或稳定性的成分。增溶剂/稳定剂的例子包括去污剂,例如月桂树肌氨酸和/或吐温。另有一些增溶剂/稳定剂的例子包括精氨酸、蔗糖、海藻糖等。因此,本领域技术人员可以选择合适的赋形剂和载体以产生适合于通过选定的使用途径向受试者施用的配制剂。合适的赋形剂包括但不限于甘油、聚乙二醇、KCl、钙离子、镁离子、锰离子、锌离子和其他二价阳离子相关盐等。

[0053] 通常在佐剂选择时应能够在接受疫苗施用的受试者或受试者群体中增强Th1偏向性免疫应答,且在受试者或受试者群体中是安全且有效的。

[0054] 本发明还提供制备上述预防RSV感染的疫苗的方法,其包括:

[0055] S1、培养哺乳动物宿主细胞以表达所述颗粒抗原;

[0056] S2、纯化经步骤(1)表达的颗粒抗原;

[0057] S3、将纯化的颗粒抗原与免疫佐剂按比例充分混合。

[0058] 在一些实施方式中,还包括基因合成、表达载体的构建、纯化蛋白的冻干等额外步骤。可以通过本领域公知的许多方法的任一种或几种来从重组细胞培养物回收和纯化所表达的融合多肽,包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、过滤、超滤、离心、阴/阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水性相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。最后,可以在最终的纯化步骤中采用高效液相层析HPLC。

[0059] 相比现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0060] 本发明通过对野生型RSV F蛋白进行针对性截短、重构、稳定化修饰和颗粒化等设计,获得了能够将保留对融合前构象蛋白质具有特异性表位的RSV F蛋白展示于七聚体纳米颗粒表面的颗粒抗原,在维持F蛋白稳定的融合前构象和蛋白装载量的同时确保了其可引起对呼吸道合胞病毒的有效中和抗体反应和结合抗体反应。

附图说明

[0061] 以下附图仅旨在于对本发明做示意性说明和解释,并不限定本发明的范围。其中:

[0062] 图1:本发明实施例10中F138和F140蛋白以4℃保存和经1次冻融后的SDS-PAGE电泳结果;

[0063] 图2:本发明实施例10中F138蛋白以4℃保存和经1次冻融后的SEC-HPLC结果;

[0064] 图3:本发明实施例10中F140蛋白以4℃保存和经1次冻融后的SEC-HPLC结果;

[0065] 图4:本发明实施例11中小鼠免疫3周血清中的Pre-F特异性IgG含量;

- [0066] 图5:本发明实施例11中小鼠免疫5周血清中的Pre-F特异性IgG含量;
- [0067] 图6:本发明实施例11中小鼠免疫3周血清中的中和抗体滴度ND₅₀;
- [0068] 图7:本发明实施例11中小鼠免疫5周血清中的中和抗体滴度ND₅₀。

具体实施方式

[0069] 下面将通过非限制性实施例进一步说明本发明,本领域技术人员公知,在不背离本发明精神的情况下,可以对本发明做出许多修改,这样的修改也落入本发明的范围。下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围,因为实施方案必然是多样的。本说明书中使用的用语仅是为了阐述特定的实施方案,而非作为限制,本发明的范围已界定在所附的权利要求中。

[0070] 除非特别说明,本说明书中所使用的所有技术和科学用语均和本案所属技术领域的技术人员所普遍明了的意义相同。下面就本发明的优选方法和材料加以叙述,但是与本说明书中所述方法和材料类似或等效的任何方法和材料均可用以实施或测试本发明。下述实验方法如无特别说明,均为常规方法或产品说明书所描述的方法,所使用的实验材料如无特别说明,均可容易地从商业公司获取。

[0071] 术语定义

[0072] 在本申请中,术语“F0多肽”(F0)是指RSV F蛋白的前体多肽,其由信号多肽序列、F1多肽序列、pep27多肽序列和F2多肽序列组成。极少例外,已知RSV毒株的F0多肽由574个氨基酸组成。

[0073] 在本申请中,术语“F1多肽”、“F1域”(F1)是指成熟RSV F蛋白的多肽链。天然F1包括RSV F0前体的近似残基137-574且由(从N-末端至C-末端)细胞外区域(近似残基137-524)、跨膜结构域(近似残基525-550)和细胞质结构域(近似残基551-574)组成。如本文所用,该术语涵盖天然F1多肽和来自天然序列的包括修饰(例如,氨基酸取代、插入或缺失)的F1多肽两者,所述修饰例如被设计以稳定F突变体或增强F突变体的免疫原性的修饰。

[0074] 在本申请中,术语“F2多肽”、“F2域”(F2)是指成熟RSV F蛋白的多肽链。天然F2包括RSV F0前体的近似残基26-109。如本文所用,该术语涵盖天然F2多肽和来自天然序列的包括修饰(例如,氨基酸取代、插入或缺失)的F2多肽两者,所述修饰例如被设计以稳定F突变体或增强F突变体的免疫原性的修饰。在天然RSV F蛋白中,F2多肽通过两个二硫键连接至F1多肽以形成F2-F1异二聚体。

[0075] 在本申请中,术语“天然”或“野生型”蛋白、序列或多肽是指未通过选择性突变人工修饰的天然存在的蛋白、序列或多肽。

[0076] 在本申请中,术语“pep27多肽”或“pep27”是指在RSV F蛋白成熟期间从F0前体切除的27个氨基酸的多肽。pep27的序列侧接两个弗林蛋白酶切割位点,所述弗林蛋白酶切割位点在F蛋白成熟期间通过细胞蛋白酶切割以生成F1和F2多肽。

[0077] 在本申请中,术语“DS-Cav1”是指RSV F蛋白的具有McLellan等人,Science,342(6158),592-598,2013中所述的氨基酸序列的形式。

[0078] 在本申请中,术语“D25”是指CN200880023301.9中所述的抗体,其具有重链CDR1:NYIIN,重链CDR2:GIIPVLGTVHYAPKFQG,重链CDR3:ETALVVSTTYLPHYFDN和轻链CDR1:QASQDIVNYLN,轻链CDR2:VASNLET,轻链CDR3:QQYDNLN的氨基酸序列。

[0079] 在本申请中,术语“101F”是指US11261356中所述的抗体,其具有重链CDR1:TSGMGVS,重链CDR2:HIYWDDDKRYNPSLKS,重链CDR3:LYGFTYGFAY和轻链CDR1:RASQSVDYNGISYMH,轻链CDR2:AASNPEs,轻链CDR3:QQIIEDPWT的氨基酸序列。

[0080] 在本申请中,术语“Mota”或“motavizumab”是指W02007002543A2中所述的抗体,其具有重链CDR1:TSGMSVG,重链CDR2:DIWDDDKDYNSLKS,重链CDR3:SMITNWFYFDV和轻链CDR1:SASSRVGYMH,轻链CDR2:DTSKLAS,轻链CDR3:FQGSYFPFT的氨基酸序列。

[0081] 在本申请中,术语“AM14”是参照W02008147196A2中所述的抗体,其VH区(V-D-J区段)具有氨基酸序列EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSHYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGENY YADSVKGRFSISRDNKNTVSLQMNSLRPEDTALYYCARDRIVDDYYYYGMDVWGQGATVTVSS,VL区(V-J区段)具有氨基酸序列DIQMTQSPSSLSAVGDRVITITCQASQDIKKYLNWYHQKPGKVPPELLMHDASNLETGVPS RFSGTDFTLTISLQPEDIGTYQCQQYDNLPLPLTFGGGKTKVEIKRTV。

[0082] 实施例1.质粒构建与基因合成

[0083] 按照如下表1设计颗粒蛋白及对照组的氨基酸序列,氨基酸序列按照宿主CHO细胞进行密码子优化确定核酸序列进行基因合成。

[0084] 表1.构建体氨基酸序列设计

名称	氨基酸序列SEQ ID NO:
WT	1
IMX313	2
F head-IMX313	3
DS-Cav1	4

[0086] 实施例2.质粒转化、制备及酶切鉴定

[0087] 将合成的目的基因插入真核质粒pCHO3.1载体,用于转染和表达。将构建的各重组质粒转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,将转入含有目的基因的质粒的甘油菌转接到150mL LB液体培养基(Amp终浓度为100 μ g/ml)中,在37 $^{\circ}$ C、2000rpm下摇床培养过夜,用无内毒素质粒大提试剂盒进行质粒提取,对提取物测定质粒浓度、并进行酶切鉴定,具体的反应体系如表2所示。

[0088] 表2.酶切反应体系

酶切组分	双酶切体系(μ l)	单酶切体系(μ l)
10 \times Q butter	2	2
Not I	1	2
EcoR I	1	—
质粒	1	1
H ₂ O	15	15
总体积	20	20

[0090] 质粒扩增后测定浓度,结果如表3所示,可见各质粒均能获得较高的扩增浓度。

[0091] 表3.质粒浓度测定结果

质粒	浓度(μ g/ml)	总量(μ g)
pCHO3.1-F head-IMX313	665	0.9

[0093]	pCHO3.1-IMX313	749	1.1
	pCHO3.1-DS-Cav1	935	1.4

[0094] 用1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果,在相应大小的位置可见清晰的条带。对所有质粒的进行测序,经鉴定,所有质粒目的基因序列完全正确。载有目的基因的重组质粒载体已被成功转入宿主细胞中,并已成功获得扩增。

[0095] 实施例3.蛋白表达

[0096] 通过瞬时转染的方法将得到的质粒导入CHO细胞中,经过培养后收集蛋白上清液。

[0097] 将ExpiCHO-S细胞(Thermo)在补充有6mM L-谷氨酰胺(sigma/G5146)的EmCD CHO-S203(Eminence/L20301)培养基中培养,提前一天按 0.25×10^5 cells/孔密度铺96孔板(补加10% FBS), 37°C 、8% CO_2 的培养箱中静置培养。转染当天将铺有细胞的96孔板更换新鲜的含L-谷氨酰胺的EmCD CHO-S203培养基。用含L-谷氨酰胺的EmCD CHO-S203培养基配制转染孵育体系(体积为转染体积的50%),其中DNA用量 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,转染试剂PEI(Polysciences/24765-1)与DNA的比为3,将PEI与DNA混合静置孵育5min后加入铺有细胞的96孔板中,将培养物于 37°C 、8% CO_2 的培养箱中静置培养。转染24h后降温至 32°C 培养,按5%体积比添加Advanced Feed1(sigma/24368-1L)补料。转染后第7天停止培养收取上清。

[0098] 实施例4.含中和抗体表位Site ϕ 和Site II部分的筛选

[0099] 使用PBS稀释包被抗体D25或包被抗体motavizumab(简称mota),至 $5\text{ng}/\mu\text{L}$,每孔加入 $200\mu\text{L}$, 4°C 过夜孵育。PBST洗1次。用 $250\mu\text{L}$ 2% BSA/PBS封闭ELISA检测板,室温封闭1小时,用PBST清洗1次。每孔加入 $200\mu\text{L}$ 蛋白上清液,室温孵育1h。用PBST清洗3次。用0.2% BSA/PBS中稀释HRP标记抗体到适应稀释度(D25-1:8000,mota-1:16000),每孔加入 $200\mu\text{L}$,室温孵育1小时。用PBST清洗4次。

[0100] 加入 $100\mu\text{L}$ 底物溶液(TMB双组份溶液A:B=1:1混合),室温反应15-20min,添加 $100\mu\text{L}$ 终止液,并读数OD值。

[0101] 结果如下表所示,能够结合特异性单抗D25和mota的是具有PreF特异性表位Site ϕ 和Site II的F head部分,而颗粒结构域IMX313不具有特异性结合D25或mota的能力。

[0102] 表4.目标蛋白与D25和Mota的结合情况

蛋白	OD 值	
	D25-His HRP	mota-His HRP
F head-IMX313	3.8402	3.8972
IMX313	0.6522	0.25

[0104] 实施例5.颗粒结构域的评价

[0105] 取蛋白表达上清,在 50°C 和 70°C 条件下分别孵育1小时,再采用双抗体夹心ELISA法,以101F作为包被抗体,D25、motavizumab(后续简称Mota)作为标记抗体检测配对,检测考察不同极端温度条件下颗粒结构域IMX313对蛋白活性、PreF构象占比及稳定性的影响,其中,蛋白活性以表位特异性中和抗体检测活性浓度表示,PreF构象占比以D25与Mota的活性浓度比值表示,构象热稳定性以 50°C -1h或 70°C -1h与低温时的D25活性浓度比值表示。

[0106] 表5. 70°C 时蛋白活性及PreF构象占比情况

	抗原	OD (D25)	D25 浓度 (ng/ml)	OD (mota)	mota 浓度 (ng/ml)	D25/mota 浓度比
[0107]	F head-IMX313	1.7636	164.08	1.4688	165.16	0.993461
	DS-Cav1	0.5889	36.72	0.3522	23.08	1.590988

[0108] 表6. 构象稳定性情况

	抗原	D25 浓度比 (50°C/低温)	D25 浓度比 (70°C/低温)	mota 浓度比 (50°C/低温)	mota 浓度比 (70°C/低温)
[0109]	F head-IMX313	1.09123	0.850508	1.139491	0.868714
	DS-Cav1	1.084767	0.164516	1.084056	0.119166

[0110] 结果发现50°C条件下,蛋白活性变化不明显,且PreF蛋白构象稳定性高。在更加极端的70°C温度条件下,颗粒抗原F head-IMX313和DS-Cav1对照蛋白的蛋白活性和Pre-F构象稳定性均受到较大的影响,因此高温不利于Pre-F构象的稳定。但对于未经任何稳定化修饰的颗粒抗原F head-IMX313来说,其在50°C和70°C条件下的稳定性降幅比DS-Cav1对照蛋白小,而且即使是在如此极端条件下,颗粒抗原F head-IMX313活性仍远高于DS-Cav1对照蛋白。因此,不同于本身具有多种稳定化修饰的DS-Cav1对照蛋白(具有双半胱氨酸突变S155C和S290C、空腔填充突变S190F和V207L以及foldon三聚化结构域),本发明重构的F head和颗粒结构域IMX313均对维持蛋白活性、Pre-F构象及其稳定性做出重要贡献。

[0111] 实施例6.F蛋白单独突变方案筛选

[0112] 本发明的各突变体是基于SEQ ID NO:1中所述的野生型(简称WT)RSV F蛋白氨基酸序列来设计和制备的。本实施例说明各种F蛋白单突变体的设计,所述F蛋白单突变体包括foldon结构域和引入的氨基酸突变,例如添加非天然二硫键突变、空腔填充突变、静电突变。这些F蛋白单突变体包含IgG信号肽(MGWSCIILFLVATATGVHS)、两个单独多肽链。多肽链之一,F2多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸26-106,除了如所述的引入的突变。另一多肽链包含连接至foldon结构域N-端的F1多肽(残基136-513),除了如所述的引入的突变,它们通用引入的修饰还包括del_P27替换为ARGSGSG、R106Q和F137S。另外还包含纯化标签His-Tag(HHHHHHHH)、亲和标签Monoclonal Flag-Tag(DYKDDDDK)和接头序列(例如GSGSG)。SEQ ID NO:1的信号肽(残基1-25)和pep27(残基110-136)在表达过程期间从F0前体切割。

[0113] 按下表设计各个RSV F蛋白单独突变体及对照组蛋白的氨基酸酸序列,氨基酸序列按照宿主CHO细胞进行密码子优化确定核酸序列并进行基因合成。

[0114] 表7. 仅含添加非天然二硫键的突变体

[0115]

质粒名称	突变
pCHO3.1-F24	V164C+K293C
pCHO3.1-F25	H159C+I291C
pCHO3.1-F26	I148C+Y286C
pCHO3.1-F27	V151C+I288C
pCHO3.1-F28	S62C+K196C

[0116]	pCHO3.1-F29	S54C+V187C
	pCHO3.1-F30	S55C+L188C
	pCHO3.1-F31	S56C+V187C
	pCHO3.1-F32	S59C+V193C
	pCHO3.1-F33	S155C+V300C
	pCHO3.1-F34	T54C+V154C
	pCHO3.1-F35	T397C+E487C
	pCHO3.1-F36	D392C+S493C
	pCHO3.1-F37	I395C+A490C
	pCHO3.1-F38	S443C+S466C
	pCHO3.1-F39	L321C+I475C
	pCHO3.1-F40	T323C+I475C
	pCHO3.1-F41	I332C+P480C
	pCHO3.1-F42	I332C+S485C
	pCHO3.1-F42	I332C+S485C
	pCHO3.1-F43	L334C+I475C
	pCHO3.1-F44	F387C+I492C
	pCHO3.1-F45	K399C+S485C
	pCHO3.1-F46	S146C+N460C
	pCHO3.1-F47	E92C+N254C
	pCHO3.1-F48	G184C+N428C
	pCHO3.1-F49	K75C+E218C
	pCHO3.1-F50	V144C+I407C
	pCHO3.1-F51	D489C+S398C
	pCHO3.1-F52	Q494C+S485C
	pCHO3.1-F53	A149C+Y458C
	pCHO3.1-F54	S150C+Y458C
	pCHO3.1-F55	A153C+K461C
	pCHO3.1-F56	D486C+D489C
	pCHO3.1-F117	T54C+S150C
	pCHO3.1-F118	I57C+V192C
	pCHO3.1-F119	I148C+Q302C
	pCHO3.1-F120	L158C+I291C
pCHO3.1-F121	K168C+V296C	
pCHO3.1-F122	S330C+P480C	
pCHO3.1-F123	S150C+Q302C	

[0117] 表8. 仅含空腔填充突变的突变体

[0118]	质粒名称	突变
--------	------	----

pCHO3.1-F57	V296F
pCHO3.1-F58	N67F
pCHO3.1-F59	D486H+E487Q+F488W+D489H
pCHO3.1-F76	L158F
pCHO3.1-F77	V154L
pCHO3.1-F78	V154I
pCHO3.1-F79	V187F
pCHO3.1-F80	S190V
pCHO3.1-F81	V192M
pCHO3.1-F82	L193H
pCHO3.1-F83	I492F
pCHO3.1-F84	V495L
pCHO3.1-F85	S190F
pCHO3.1-F86	V207L
pCHO3.1-F90	K77E
pCHO3.1-F105	V56I
pCHO3.1-F106	E60F
pCHO3.1-F107	E82Y
pCHO3.1-F108	G139W
pCHO3.1-F109	K168W
pCHO3.1-F110	Q202Y
pCHO3.1-F111	V207F
pCHO3.1-F112	T219F
pCHO3.1-F113	V220W
pCHO3.1-F114	L230F
pCHO3.1-F115	S409Y
pCHO3.1-F116	I475W

[0119] 表9. 仅含静电突变的突变体

[0120]

质粒名称	突变
pCHO3.1-F91	K80E
pCHO3.1-F92	E92D
pCHO3.1-F94	G184N
pCHO3.1-F95	V185N

[0121]	pCHO3.1-F96	K201Q
	pCHO3.1-F97	K209Q
	pCHO3.1-F98	K421N
	pCHO3.1-F99	N426S
	pCHO3.1-F100	K465E
	pCHO3.1-F101	E487N
	pCHO3.1-F102	D489N
	pCHO3.1-F103	K508E
	pCHO3.1-F104	S35F

[0122] 参照实施例2的方法进行质粒转化、制备及酶切鉴定,质粒扩增后测定浓度,各质粒均能获得较高的扩增浓度。对所有质粒的进行测序,经鉴定,所得质粒目的基因序列完全正确。载有目的基因的重组质粒载体已被成功转入宿主细胞中,并已成功获得扩增。

[0123] 再参照实施例3的方法通过瞬时转染的方法将得到的质粒导入CHO细胞中,经过培养后收集蛋白上清液。

[0124] 使用PBS稀释包被抗体D25或包被抗体motavizumab(简称mota),至5ng/ μ L,96孔板每孔加入200 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜孵育。PBST洗1次。用250 μ L 2%BSA/PBS封闭ELISA检测板,室温封闭1小时,用PBST清洗1次。每孔加入200 μ L蛋白上清液,室温孵育1h。用PBST清洗3次。用0.2% BSA/PBS中稀释HRP标记抗体到适应稀释度(D25-1:8000,mota-1:16000),每孔加入200 μ L,室温孵育1小时。用PBST清洗4次。加入100 μ L底物溶液(TMB双组份溶液A:B=1:1混合),室温反应15-20min,添加100 μ L终止液,并读数OD值,并根据回归分析方程计算样品浓度。计算蛋白在4 $^{\circ}$ C条件下放置7天后的PreF构象占比,以D25与Mota的活性浓度比值表示。

[0125] 表10.F蛋白单突变体4 $^{\circ}$ C放置7天的PreF构象占比

蛋白名称	浓度比(D25/mota)	蛋白名称	浓度比(D25/mota)	蛋白名称	浓度比(D25/mota)
F24	1.119	F51	0.451	F98	0.092
F25	0.323	F52	0.255	F99	0.215
F26	0.363	F53	1.000	F100	0.417
F27	0.926	F54	0.241	F101	0.284
F28	0.322	F55	0.224	F102	0.439

[0127]	F29	0.385	F56	0.487	F103	0.303
	F30	0.779	F57	0.027	F104	0.398
	F31	1.054	F58	0.841	F105	0.200
	F32	0.973	F59	0.388	F106	0.713
	F33	0.445	F76	1.025	F107	2.250
	F34	0.195	F77	0.119	F108	0.206
	F35	0.904	F78	0.404	F109	0.473
	F36	0.316	F79	0.971	F110	0.271
	F37	0.259	F80	0.790	F111	0.337
	F38	1.068	F81	1.110	F112	0.285
	F39	0.403	F82	0.198	F113	0.296
	F40	0.749	F84	0.958	F114	0.262
	F41	1.177	F85	1.022	F115	0.339
	F42	0.557	F86	0.418	F116	0.436
	F43	0.245	F89	0.204	F117	0.180
	F44	0.282	F90	0.037	F118	0.433
	F45	0.469	F91	0.041	F119	0.348
	F46	0.842	F92	0.485	F120	0.286
	F47	0.677	F94	0.103	F121	0.230
	F48	0.653	F95	0.080	F122	0.656
F49	0.036	F96	0.145	F123	1.418	
F50	0.262	F97	0.244	DS-Cav1	0.718	

[0128] 蛋白上清液在4℃放置7天后,与DS-Cav1对照组相比,仅含添加非天然二硫键突变的F蛋白单突变体F24、F27、F30、F31、F32、F35、F38、F40、F41、F46、F53和F123,以及仅含空腔填充突变的F蛋白单突变体F58、F76、F79、F80、F81、F84、F85和F107仍具有较高的PreF构象占比。因此,在F蛋白单突变体的设计中,空腔填充突变N67F、L158F、V187F、S190V、V192M、V495L、S190F和E82Y,以及添加的非天然二硫键突变V164C+K293C、V151C+I288C、S55C+L188C、S56C+V187C、S59C+V193C、T397C+E487C、S443C+S466C、T323C+I475C、I332C+P480C、S146C+N460C、A149C+Y458C和S150C+Q302C,这些突变设计对PreF构象的稳定化做出了重要贡献。而仅含静电突变的F蛋白单突变体F91~F104并不能仅依靠此种突变方式在4℃的长时间贮存中达到良好的稳定PreF构象的效果。

[0129] 实施例7.组合突变颗粒抗原设计

[0130] 在筛选中,发明人意外地发现,虽然一些组合突变颗粒抗原引入的均为经单独突变筛选出的有利于在4℃长期贮存中维持Pre-F构象稳定的突变,但它们在60℃高温条件下维持蛋白活性或Pre-F构象热稳定性方面却表现不佳。因此,在设计组合突变颗粒抗原时并不完全摒弃在单独突变筛选时欠佳的方案。优选示例性的,按照下表进一步设计在RSV F head中具有优选的组合突变的颗粒抗原及对照组颗粒蛋白,组合突变颗粒抗原N端信号肽为IgG信号肽,其氨基酸序列为MGWSCIIILFLVATATGVHS,而后连接引入组合突变的RSV F head,其中,RSV F head的结构从N端至C端依次为F1域截短片段(残基146-306),接头序列和F2域截短片段(残基51-104),组合突变颗粒抗原C端为颗粒化结构域IMX313。另外,组合突变颗粒抗原设计时还加入了便于纯化的亲和和标签。氨基酸序列按照宿主CHO细胞进行密码子优化确定核酸序列进行基因合成,经质粒转化、制备和酶切鉴定正确后通过CHO表达系

统表达目的蛋白。

[0131] 表11.组合突变颗粒抗原设计

蛋白	RSV F head 组合突变	氨基酸序列 SEQ ID NO:
F137	N67F, S190V, P102A, S55C+L188C, I148C+Y286C	5
F138	N67F, S190V, P102A, S55C+L188C, I148C+Y286C, H159C+I291C	6
[0132] F139	N67F, S190V, V296F, P102A, S55C+L188C, I148C+Y286C, G184N	7
F140	N67F, S190V, V296F, P102A, S55C+L188C, I148C+Y286C, H159C+I291C, G184N	8
DS-Cav1-N	S190F, V207L, S155C+S290C, ferritin	9

[0133] 实施例8.组合突变颗粒抗原上清中蛋白活性、构象占比及构象热稳定性评价

[0134] 组合突变颗粒蛋白表达三天后,10000rpm离心收集表达的细胞上清,另取表达上清,在60℃和70℃条件下分别孵育1小时,再采用双抗体夹心ELISA法,以101F作为包被抗体,D25、motavizumab(后续简称Mota)或AM14作为标记抗体检测配对,检测表达的各组合突变颗粒蛋白的蛋白活性,在不同温度下孵育后不同结构的占比及Site ϕ 表位的构象热稳定性。其中,蛋白活性以表位特异性中和抗体检测活性浓度表示,不同结构占比以0d的D25或AM14与Mota的活性浓度比值表示,构象热稳定性以60℃-1h/0d、70℃-1h/0d的D25活性浓度比值表示,结果如下表所示。

[0135] 表12.不同温度孵育后上清中的蛋白活性

[0136]

蛋白	D25					
	0d		60°C-1h		70°C-1h	
	D25 OD	D25 浓度 (ng/ml)	D25 OD	D25 浓度 (ng/ml)	D25 OD	D25 浓度 (ng/ml)
F137	0.882	859.13	0.8273	787.11	1.4367	413.26
F138	0.586	481.49	0.4877	362.42	1.2221	332.87
F139	0.9414	938.53	0.8114	766.37	1.4007	399.44
F140	0.7106	636.89	0.6023	501.54	1.4029	400.28
DS-Cav1-N	0.3645	305.83	0.1724	112.49	0.3458	7.18
蛋白	Mota					
	0d		60°C-1h		70°C-1h	
	Mota OD	Mota 浓度 (ng/ml)	Mota OD	Mota 浓度 (ng/ml)	Mota OD	Mota 浓度 (ng/ml)
F137	0.8763	730.05	0.8571	709.13	1.4664	372.66
F138	0.5337	378.77	0.5082	354.01	1.2491	294.78
F139	0.9545	817.17	0.9475	809.24	1.5526	406.93
F140	0.7196	564.15	0.6674	511.05	1.5267	396.41
DS-Cav1-N	0.425	265.14	0.1596	57.88	0.641	11.31
蛋白	AM14					
	0d		60°C-1h		70°C-1h	
	AM14 OD	AM14 浓度 (ng/ml)	AM14 OD	AM14 浓度 (ng/ml)	AM14 OD	AM14 浓度 (ng/ml)
F137	0.1561	48.70	0.1758	80.44	0.1794	21.49
F138	0.17	71.38	0.1567	49.72	0.1482	8.72
F139	0.1129	/	0.094	/	0.0894	/
F140	0.1485	35.43	0.1202	/	0.1349	2.04
DS-Cav1-N	0.0772	64.76	0.0378	1.55	0.0501	0.58

[0137] 注：“/”表示未检测到反应性或未测定

[0138] 表13. 结构占比与构象热稳定性

[0139]

蛋白	综合			
	不同结构占比		构象热稳定性	
	D25/Mota	AM14/Mota	60°C-1h/0d	70°C-1h/0d

	浓度比(0d)	浓度比(0d)	D25 浓度比	D25 浓度比
[0140] F137	1.18	0.07	0.92	0.48
F138	1.27	0.19	0.75	0.69
F139	1.15	/	0.82	0.43
F140	1.13	0.06	0.79	0.63
DS-Cav1-N	1.15	0.24	0.37	0.02

[0141] 在蛋白活性方面,组合突变颗粒蛋白组和DS-Cav1-N对照组颗粒蛋白都能够正常表达,且F137、F138、F139和F140在不同温度条件下的蛋白活性均远高于DS-Cav1-N对照组,受高温影响较小。在不同结构占比方面,与DS-Cav1-N对照组相比,F140的D25/Mota比值(0d)与其相当,而F137、F138和F139的D25/Mota比值(0d)均高于对照组,说明本发明提供的颗粒抗原在颗粒聚体表面上展示的F蛋白呈融合前构象。且各组合突变颗粒蛋白的AM14/Mota比值均较低,进一步印证了本发明成功构建了颗粒抗原而非三聚体蛋白抗原。

[0142] 在热稳定性方面,经60℃处理后的所有组合突变颗粒蛋白的Pre-F构象稳定性良好,基本未受到实质性影响。经70℃极端高温处理后,所有蛋白稳定性均明显下降,尤其是DS-Cav1-N对照组几乎丢失全部Pre-F构象,而本发明的组合突变颗粒蛋白仍能保持至少约50%的Pre-F构象,因此本发明的颗粒抗原在极端温度的条件下具有更优的热稳定性,尤其是F138和F140在各方面表现俱佳。

[0143] 实施例9. 温度对蛋白质质的影响

[0144] 大量制备的F138、F139和F140蛋白使用镍柱亲和层析和分子筛层析两步纯化方法纯化后,将蛋白浓度稀释至检测浓度4ng/ml,再使用Pre-F融合前构象特异性单抗D25鉴定纯化的蛋白构象的稳定性,构象热稳定性以60℃-1h/4℃的D25活性浓度比值表示、4℃条件下的贮存稳定性以4℃-7d/4℃的D25活性浓度比值表示,结果如下表所示。

[0145] 表14. 蛋白纯化得率

蛋白	纯化后得率 (mg/L)
[0146] F138	18.6

[0147] F139	53.1
F140	46.4

[0148] 表15. 蛋白构象热稳定性及贮存稳定性表征

蛋白	D25					
	4°C		60°C-1h		4°C-7d	
	D25 OD	D25 浓度 (ng/ml)	D25 OD	D25 浓度 (ng/ml)	D25 OD	D25 浓度 (ng/ml)
[0149] F138	0.8717	0.80	0.9123	0.84	1.018	0.71
F139	0.7954	0.72	0.6952	0.64	1.0347	0.73
F140	0.7488	0.68	0.8143	0.74	1.0522	0.75

[0150] 表16. 蛋白构象热稳定性及贮存稳定性表征续表

蛋白	D25 浓度比	
	60°C-1h/4°C	4°C-7d/4°C
[0151] F138	1.05	0.89
F139	0.88	1.01
F140	1.09	1.10

[0152] 本发明的公开的颗粒抗原蛋白表达量及纯化得率高,在稳定性方面,相较于处理前,无论60°C孵育1h或4°C贮存7天,所有组合突变颗粒蛋白的融合前构象F蛋白稳定性几乎没有显著变化,更为稳定。本发明的组合突变颗粒蛋白的热稳定性良好,且可以保证在4°C条件下贮藏至少7天。另外,为获得更稳定的贮藏条件,发明人还以颗粒蛋白F138和F140为待测样品尝试了-80°C冻存的贮藏方式。

[0153] 实施例10. 冻融对蛋白质性质的影响

[0154] 取出-80°C冻存的蛋白样品,并将其放置在冰上或4°C低温环境中,缓慢地加入适量的蛋白质溶解缓冲液,同时轻轻搅拌样品,继续在低温下搅拌样品直至蛋白质完全溶解。为探究冻融1次是否会改变蛋白质性质,分别从蛋白降解情况、粒径变化、构象变化和蛋白分子量多方面进行表征。

[0155] 10.1 SDS-PAGE:

[0156] 以4°C保存和经1次冻融的F138和F140蛋白为待测样品,进行SDS-PAGE电泳,结果如图1和图2所示,冻融1次后蛋白条带和4°C保存蛋白一致,4°C保存的蛋白降解条带略多,-80°C冻存较好。

[0157] 10.2 DLS粒径检测:

[0158] 经DLS(Dynamic Light Scattering,动态光散射)检测,F138蛋白冻融后粒径变化较显著,由13.4nm减小至12nm,F140蛋白冻融前后粒径变化均无显著性差异,颗粒粒径为13±0.3nm左右,符合预期。

[0159] 10.3 ELISA构象变化:

[0160] 采用双抗体夹心ELISA法,以101F作为包被抗体,D25作为标记抗体检测配对,检测4°C保存和经1次冻融的F138和F140蛋白活性浓度。结果如下表,冻融1次后和4°C保存蛋白D25构象浓度检测比在1附近,因此,冻融1次对蛋白构象没有影响。

[0161] 表17. 冻融前后构象变化

蛋白	0天-4℃保存		0天-冻融一次		冻融一次/4℃ D25 浓度比
	D25 OD	ELISA 浓度 (ng/mL)	D25 OD	ELISA 浓度 (ng/mL)	
F138	0.406	0.50	0.5321	0.69	1.39
F140	0.3292	0.39	0.4387	0.55	1.40

[0163] 10.4SEC-HPLC:

[0164] 采用SEC-HPLC方法对4℃保存和经1次冻融的F138和F140蛋白分别进行分子量的确定,结果如图3和图4所示,蛋白冻融前后出峰位置一致,冻融1次对蛋白大小和纯度几乎无影响。

[0165] 综上,颗粒蛋白F138和F140均适宜-80℃冻存的贮藏方式。

[0166] 实施例11.免疫评价

[0167] 选择6-8周龄的雌性BALB/C小鼠进行免疫,随机分组,每组6只,在0天、21天通过肌肉注射对小鼠进行疫苗双点免疫,左、右腿各50μL,免疫原包括候选抗原F138和F140;PBS为阴性对照组。抗原剂量为12μg/只小鼠,AS01佐剂剂量为每只小鼠1/20HD(1HD AS01佐剂为0.5ml,含50μg MPL、50μg QS-21、1mg DOPC、0.25mg胆固醇、4.835mg氯化钠、0.15mg无水磷酸氢二钠、0.54mg磷酸二氢钾和注射用水)。分别在第20天和第35天收集血清,采集的血清储存于-20℃,后续进行中和抗体和结合抗体检测。

[0168] 11.1结合抗体检测:

[0169] (1) 待检血清样本使用样本稀释液稀释;

[0170] (2) 阴性对照血清使用样品稀释液1:200倍稀释;

[0171] (3) 加样:将系列稀释的待测血清样本、阴性对照血清以100μl/孔加至pre-F酶标板中,待测血清样本加1孔,对照溶液加2孔;IgG-UNLB标曲酶标板条以100μl/孔加入样品稀释液;

[0172] (4) 温育:酶标板置于37℃温育30分钟,于自动洗板机用洗涤液洗板5次;

[0173] (5) 加酶:将酶标二抗(HRP Goat Anti-Mouse IgG(H+L), ABclonal)以100μl/孔加至酶标板内,置于37℃温育30分钟,于自动洗板机用洗涤液洗板5次;

[0174] (6) 显色:显色A液与显色B液(飞净生物)等体积混匀,100μl/孔加至酶标板内,于室温避光孵育15分钟;

[0175] (7) 终止:以50μl/孔加入终止液终止反应;

[0176] (8) 读板:用酶标仪在波长450nm处测定吸光度(参比波长为620nm),结果如下表及图4、图5所示。

[0177] 表18. (3周血清)Pre-F特异性IgG含量

小鼠编号	AS01 佐剂+免疫原	免疫原		
		PBS	F138	F140
[0178]	1	0.31	89.48	57.12
	2	0.31	64.17	65.74
	3	0.31	83.69	211.13
	4	0.31	72.31	68.74
	5	0.31	109.60	35.98
[0179]	6	0.31	97.65	110.37
	W3 PreF IgG GMC(几何平均浓度) $\mu\text{g/mL}$	0.3	84.8	77.5

[0180] 表19. (5周血清)Pre-F特异性IgG含量

小鼠编号	AS01 佐剂+免疫原	免疫原		
		PBS	F138	F140
[0181]	1	0.31	2016.37	3367.10
	2	0.42	2045.77	2724.00
	3	0.31	2804.62	7270.08
	4	0.31	2424.11	3779.56
	5	0.31	2469.89	2734.47
	6	0.38	3304.48	5157.27
	W5 PreF IgG GMC(几何平均浓度) $\mu\text{g/mL}$	0.3	2473.3	3906.5

[0182] 结果显示,在用免疫原F138和F140配合佐剂对小鼠基础免疫后,3周血清中均检测出显著的Pre-F IgG抗体,并且在加强免疫后,小鼠5周血清中检测到的Pre-F IgG GMC(几何平均浓度)均有不同程度的大幅提升,分别为3周时的29倍和50倍。虽然结合抗体还没有建立起与保护的免疫相关性,但高浓度的血清抗体与感染后严重下呼吸道疾病风险的显著降低有关。

[0183] 11.2中和抗体检测:

[0184] 中和抗体是可以特异性识别病毒表面的抗原中和位点,阻止病毒入侵细胞繁殖,保护机体免受其害,具有真正抗病毒作用的评价免疫效果的指标。委托中科国邦利用RSV A2毒株通过荧光斑点减少中和试验(FRNT法)进行中和抗体检测。具体步骤为:

[0185] (1) 样品准备:室温解冻-20℃储存的血清,56℃热灭活30min,30min后取出并冷却至室温,然后将每组的6份血清充分混合获得各组混合血清样品。

[0186] (2) 样品加样及稀释:40倍初始稀释,后续4倍稀释,作6个稀释度。取96孔板,第2列做为细胞对照(CC),第3列做为病毒对照(VC)。于B4-B11孔中加入已稀释20倍的样品,使用多道移液器对B4-B11孔中液体轻柔的反复混匀,然后进行4倍比稀释,直至G4-G11孔中。另

取阴性参考品进行加样及稀释。

[0187] (3) 病毒稀释: 在冰盒上将病毒稀释至800~1200FFU/孔, 加入除细胞对照外的各孔。

[0188] (4) 将上述96孔板置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育1h。

[0189] (5) 将HEp-2细胞消化计数, 使用完全培养基调整至 2.0×10^5 个/mL, 100μL/孔加入到96孔板中。

[0190] (6) 置于37℃、5%CO₂培养箱中培养, 24-28小时后用细胞成像多功能微孔板检测系统进行GFP荧光斑点计数, 并记录结果。

[0191] (7) 50%中和抗体抑制率(ND₅₀)的计算: 将仪器读取的荧光斑点数值输入数据分析模板, 使用Reed-Muench法计算样品50%中和抗体抑制率(ND₅₀)。结果如下表及图6、图7所示。

[0192] 表20. 中和抗体滴度

中和抗体滴度 (ND ₅₀ , FRNT 法)	AS01 佐剂+免疫原	
	F138	F140
免疫3周血清	60	<40
免疫5周血清	2491	2216

[0194] 结果显示, 在用候选抗原F138和F140配合佐剂对小鼠进行基础免疫后, 小鼠3周血清中均能检测出针对RSV A2毒株的中和性抗体。并且, 在随后的加强免疫中, 相较于基础免疫3周后的结果, 从经候选抗原加强免疫后的小鼠血清中的中和抗体滴度来看, 候选抗原F138和F140均诱导产生了更高水平的中和抗体, 检测到的中和抗体滴度分别为3周时的41.5倍和55.4倍, 表现出显著的疫苗保护性。

[0195] 由上述实验可以看出, 本发明提供的抗原稳定性高, 抗原及疫苗组合物可诱导产生针对RSV病毒的高滴度的中和抗体, 这也提示在病毒入侵时疫苗将提供较好的保护性效果, 对RSV候选疫苗的研发具有重要意义。

[0196] 以上所述的具体实施例, 对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明, 应理解的是, 以上所述仅为本发明的具体实施例而已, 并不用于限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内, 所做的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

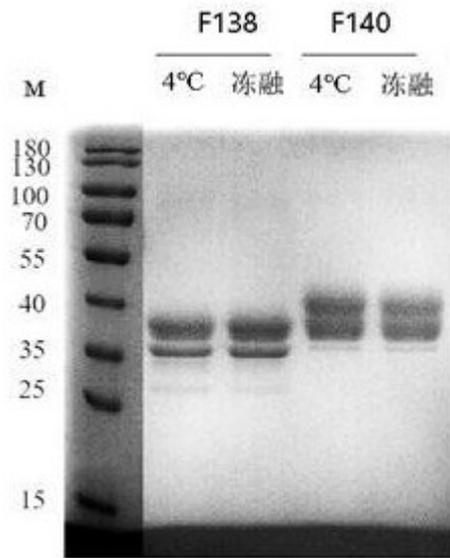


图 1

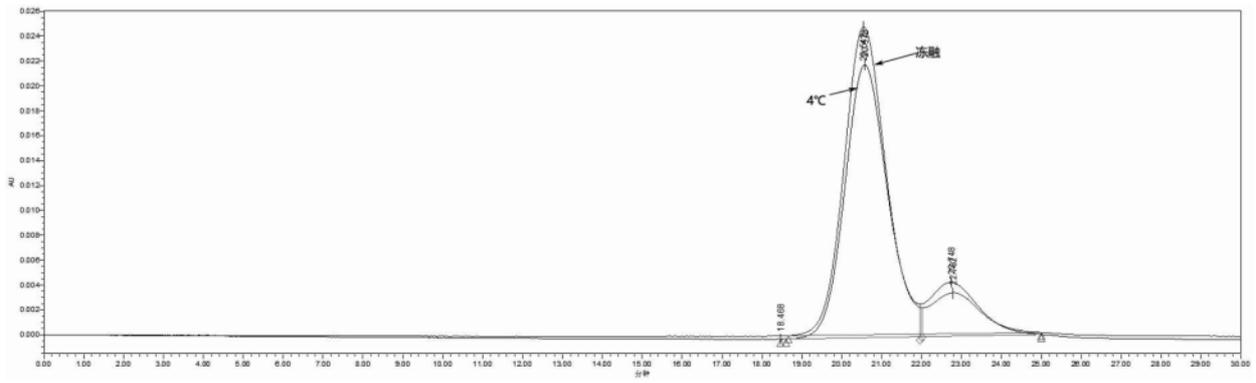


图 2

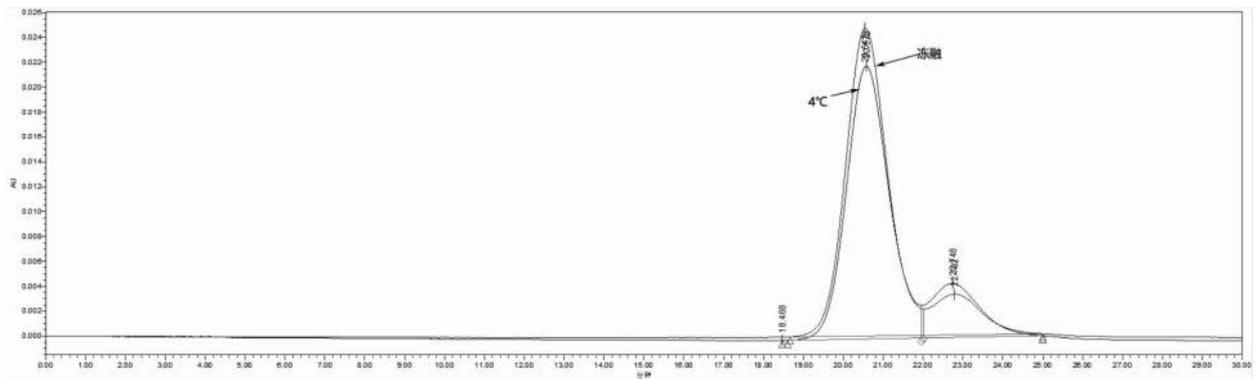


图 3

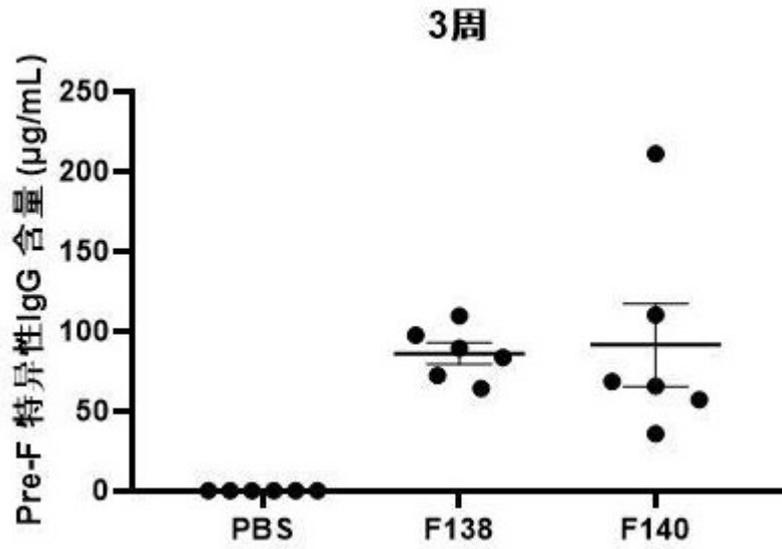


图 4

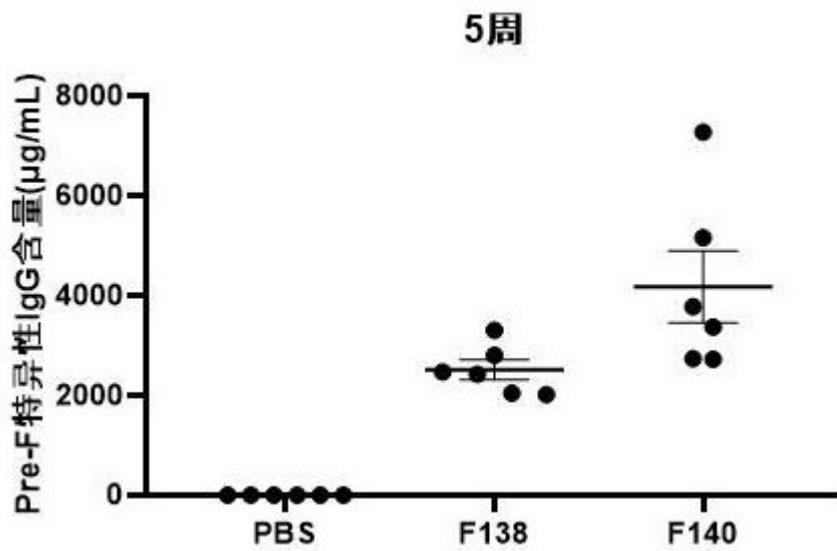


图 5

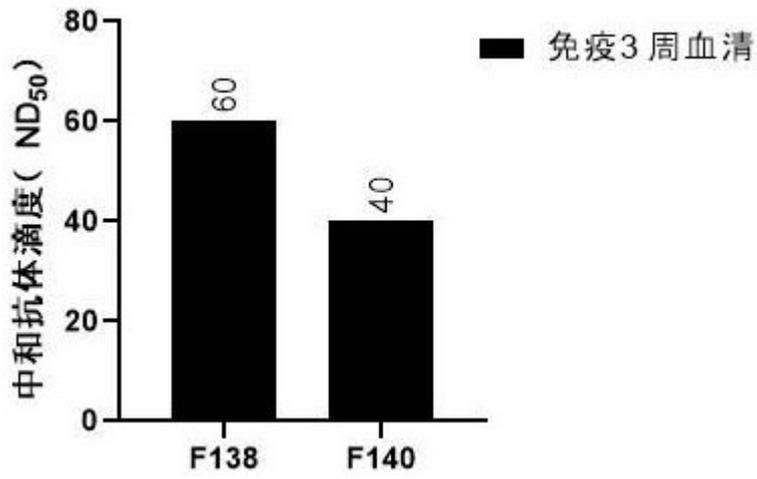


图 6

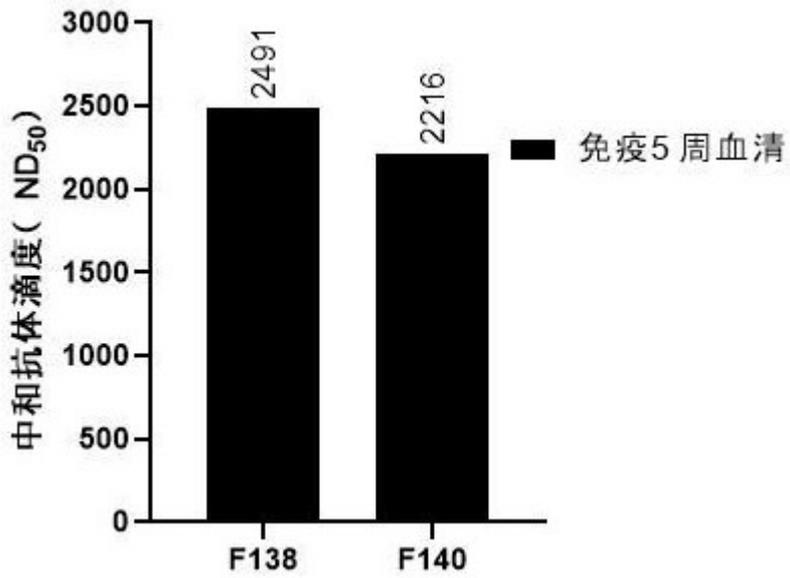


图 7