

说明书

发明名称: 一种融合前构象的呼吸道合胞病毒重组融合蛋白、其制备方法及用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年9月29日提交的、申请号为202211199603.X、发明名称为“一种融合前构象的呼吸道合胞病毒重组融合蛋白、其制备方法及用途”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及疫苗技术领域，具体涉及一种呼吸道合胞病毒B亚型(RSV-B)重组F蛋白、由其形成的稳定化三聚体、包含其的免疫原性组合物及其制备方法和用途。

背景技术

[0004] 呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)是最常见的导致婴儿急性呼吸道感染病原体。由RSV感染引起的细支气管炎是引起2岁以下儿童住院的主要原因之一，也是导致婴儿死亡率上升的重要因素。据WHO估计，每年全球有6400万儿童感染RSV，其中16万儿童死于RSV感染。2020年，全球5岁以下儿童中RSV严重感染人数高达3460万人，其中仅中国的感染人数就达到300万人。RSV另一高危人群是老年人，几项前瞻性研究统计了社区居住的老年人的RSV的发病率，结果揭示：RSV感染的年发病率介于2%至10%之间。大规模的流行病学研究透露RSV病毒在老年人群中的引起住院和死亡率与流感相当。

[0005] RSV只有一个单一的血清型，具有两个主要的抗原亚组A和B。两种亚型的菌株通常会共同传播，但流行期通常只有其中一种亚型占主导地位。在包括我国在内的温带地区，RSV的感染表现出明显的季节性，在秋季末期到冬季初发作，在12月中旬至2月初之间达到峰值，在春季末期开始降低。全世界都迫切需要对于RSV病毒感染的安全、有效和价格低廉的预防治疗方法。

[0006] RSV属于副粘病毒科肺炎病毒属，是一种直径约120 - 300nm多形态包膜病毒，具有无节段的负义单链RNA(15 - 16kb)，其编码11种蛋白质。病毒包膜包含三种蛋白质，即附着糖(G)蛋白，融合(F)糖蛋白和小疏水(SH)蛋白。G蛋白在宿主细胞附着中起作用，F蛋白负责融合和细胞进入，而在这两个过程中都不需要SH蛋白。RSV两种表面糖蛋白是主要的中和抗原：G蛋白具有较高的序列多样性，并决定了病毒的抗原亚型(A和B)；融合蛋白(F)在两组亚型之间高度保守，被广泛的交叉中和抗体所识别。由于在RSV入侵中的关键作用并且蛋白序列高度保守，RSV F蛋白是中和抗体的靶标和疫苗开发的主要抗原。F蛋白属于I型跨膜蛋白，F蛋白首先合成574个氨基酸的前体蛋白F0，F0蛋白上有5-6个翻译后修饰的N-连接糖基化修饰。为了成为有功能的融合蛋白，F0在反式高尔基体中两个多碱基位点被细胞弗林样蛋白酶处理，产生F1(氨基酸137-574)、F2(氨基酸26-109)和Pep27多肽，最后形成以二硫键相连接的F1和F2两个片段，大小分别是55kD和15kD。同源F蛋白三聚体包含融合前和融合后两种构象。融合前F蛋白是一种亚稳定结构，当病毒与细胞发生融合后，融合前F转变为稳定的融合后F蛋白，该过程也可以自发转变。由于针对F蛋白的高活性中和抗体表位主要在融合前F蛋白上，因此，如何使F蛋白保持在融合前构象是RSV疫苗开发的关键，时至今日，仍未有上市的RSV疫苗。

[0007] 发明内容

[0008] 为克服上述现有技术中存在的问题，本申请提供了一种呼吸道合胞病毒B亚型(RSV-B)重组F蛋白(本文中，简称为“RSV-B-Fm”或“Fm”)、编码其的多核苷酸、包含该多核苷酸的核酸构建体、包含该核酸构建体的表达载体、其中转化或转染有上述多核苷酸、核酸构建体或表达载体的宿主细胞，由该重组F蛋白形成的稳定化三聚体，包含前述任一项的免疫原性组合物，及其在制备用于预防和/或治疗呼吸道合胞病毒感染的疫苗中的用途。

[0009] 具体地，本申请提供了以下技术方案：

[0010] 第一方面，本申请提供了一种呼吸道合胞病毒B亚型(RSV-B)重组F蛋白，其为基于呼吸道合胞病毒B亚型的重组F蛋白，本文也称RSV-B重组蛋白或者RSV-B重组F蛋白，所述RSV-B重组F蛋白包含RSV-B-F₁肽段和RSV-B-F₂肽段，其

中,所述RSV-B-F₁肽段和/或RSV-B-F₂肽段相对于野生型RSV-B F蛋白的相应肽段包含至少一个向脯氨酸的突变。

[0011] 在具体实施方案中,所述RSV-B-F₁肽段对应于如SEQ ID NO:1所示的野生型RSV-B F蛋白的氨基酸序列中第26-98位、第26-108位或第26-97位的氨基酸片段,所述RSV-B-F₂肽段对应于如SEQ ID NO:1所示的野生型RSV-B F蛋白的氨基酸序列中第136-513位、第145-513位、第138-513位或第137-513位的氨基酸片段,并且,所述RSV-B-F₁肽段和/或RSV-B-F₂肽段中相对于野生型RSV-B F蛋白的相应肽段包含一个或多个向脯氨酸的突变。

[0012] 作为优选,所述一个或多个向脯氨酸的突变为如SEQ ID NO:1所示的野生型RSV-B F蛋白的氨基酸序列中选自以下的突变:

[0013] K65P、T67P、D73P、L138P、G139P、L141P、E161P、Q210P、I214P、S215P、N216P、Q279P、S377P;

[0014] 优选地,所述一个或多个向脯氨酸的突变选自以下突变或突变组合:

[0015] T67P; 例如,在如SEQ ID NO:29所示的RSV-B重组F蛋白Fm 1中;

[0016] L141P; 例如,在如SEQ ID NO:30所示的RSV-B重组F蛋白Fm 2中;

[0017] Q279P; 例如,在如SEQ ID NO:31所示的RSV-B重组F蛋白Fm 3中;

[0018] S377P; 例如,在如SEQ ID NO:32所示的RSV-B重组F蛋白Fm 4中;

[0019] T67P+L141P; 例如,在如SEQ ID NO:33所示的RSV-B重组F蛋白Fm 5中;

[0020] L141P+Q279P; 例如,在如SEQ ID NO:34所示的RSV-B重组F蛋白Fm 6中;

[0021] L141P+S377P; 例如,在如SEQ ID NO:35所示的RSV-B重组F蛋白Fm 7中;

[0022] T67P+Q279P; 例如,在如SEQ ID NO:36所示的RSV-B重组F蛋白Fm 8中;

[0023] T67P+S377P; 例如,在如SEQ ID NO:37所示的RSV-B重组F蛋白Fm 9中;

[0024] Q279P+S377P; 例如,在如SEQ ID NO:38所示的RSV-B重组F蛋白Fm 10中;

[0025] T67P+L141P+Q279P; 例如,在如SEQ ID NO:39所示的RSV-B重组F蛋白Fm 11中;

[0026] T67P+L141P+S377P; 例如,在如SEQ ID NO:40所示的RSV-B重组F蛋白Fm 12中;

- [0027] L141P+Q279P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:41所示的RSV-B重组F蛋白Fm 13中;
- [0028] T67P+Q279P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:42所示的RSV-B重组F蛋白Fm 14中;
- [0029] T67P+L138P+G139P; 例如, 在如SEQ ID NO:43所示的RSV-B重组F蛋白Fm 15中;
- [0030] L138P+G139P+Q279P; 例如, 在如SEQ ID NO:44所示的RSV-B重组F蛋白Fm 16中;
- [0031] L138P+G139P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:45所示的RSV-B重组F蛋白Fm 17中;
- [0032] T67P+L138P+G139P+Q279P; 例如, 在如SEQ ID NO:46所示的RSV-B重组F蛋白Fm18中;
- [0033] T67P+L138P+G139P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:47所示的RSV-B重组F蛋白Fm19中;
- [0034] L138P+G139P+Q279P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:48所示的RSV-B重组F蛋白Fm 20中;
- [0035] T67P+L141P+Q279P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:49所示的RSV-B重组F蛋白Fm21中;
- [0036] T67P+L138P+G139P+Q279P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:50所示的RSV-B重组F蛋白Fm 22中;
- [0037] T67P+L138P+G139P+L141P+Q279P+S377P; 例如, 在如SEQ ID NO:51所示的RSV-B重组F蛋白Fm 23中;
- [0038] 任选地, 上述突变或突变组合中T67P突变可被K65P突变(例如, 如SEQ ID NO:52所示的RSV-B重组F蛋白Fm 24)或D73P突变(例如, 如SEQ ID NO:53所示的RSV-B重组F蛋白Fm 25)所替代;
- [0039] 任选地, 上述突变或突变组合中L141P突变可被L138P突变或G139P突变所替代;

- [0040] 任选地，上述突变或突变组合中还包括选自以下的一种或多种突变：N216P突变、Q210P突变、I214P突变、S215P突变和E161P突变。
- [0041] 例如，在一些实施方案中，上述突变中进一步引入N216P突变，例如，氨基酸序列如SEQ ID NO:54-62任一项所示的RSV-B重组F蛋白Fm 26-34中；在另一些实施方案中，上述突变中进一步引入Q210P突变，例如，氨基酸序列如SEQ ID NO:63所示的RSV-B重组F蛋白Fm 35中；在另一些实施方案中，上述突变中进一步引入I214P突变，例如，氨基酸序列如SEQ ID NO:64所示的RSV-B重组F蛋白Fm 36中；在另一些实施方案中，上述突变中进一步引入S215P突变，例如，氨基酸序列如SEQ ID NO:65-66所示的RSV-B重组F蛋白Fm 37-38中；在另一些实施方案中，上述突变中进一步引入E161P突变，例如，氨基酸序列如SEQ ID NO:67-83任一项所示的RSV-B重组F蛋白Fm 39-55中。
- [0042] 在一些实施方案中，所述RSV-B-F₁肽段和RSV-B-F₂肽段直接相连，例如，在RSV-B重组F蛋白Fm 74-76(如SEQ ID NO:102-104所示)中。
- [0043] 在另一些实施方案中，所述RSV-B-F₁肽段和RSV-B-F₂肽段通过连接桥相连；
- [0044] 优选地，所述连接桥选自：
- [0045] (i)(GS)_m连接桥，其中，m=1-5，优选为1-3；可选地，其中包含一个或多个氨基酸突变；例如，如SEQ ID NO:9所示，例如在RSV-B重组F蛋白Fm 69-71(如SEQ ID NO:97-99所示)中，或如SEQ ID NO:10所示，例如在RSV-B重组F蛋白Fm 72-73(如SEQ ID NO:100-101所示)中)；
- [0046] (ii)(GGGGS)_n连接桥，其中n=1-5，优选为1-3；任选地，其中包含一个或多个氨基酸突变，例如，向脯氨酸的突变，氨基酸的添加等；在具体实施例中，该类型的连接桥如以下序列所示：SEQ ID NO:2(例如，在RSV-B重组F蛋白Fm 1-55(如SEQ ID NO:29-83所示)中)、SEQ ID NO:3(例如，在RSV-B重组F蛋白Fm 56-59(如SEQ ID NO:84-87所示)中)、SEQ ID NO:4(例如，在RSV-B重组F蛋白Fm 60(如SEQ ID NO:88所示)中)、SEQ ID NO:5(例如在RSV-B重组F蛋白Fm 61(如SEQ ID NO:89所示)中)或SEQ ID NO:6(例如在RSV-B重组F蛋白Fm 62(如SEQ ID NO:90)中)；

- [0047] (iii)野生型F₁与F₂肽段之间的、F₀自身的连接序列，可选地，为如SEQ ID NO:7所示的序列(例如，在RSV-B重组F蛋白Fm 63-65(如SEQ ID NO:91-93)中)；
- [0048] (iv)连接桥(iii)上的弗林酶切位点进行突变获得的序列，可选地，为如SEQ ID NO:8所示的序列(例如，在RSV-B重组F蛋白Fm 66-68(如SEQ ID NO:94-96)中)。
- [0049] 优选地，所述连接桥包括选自以下的氨基酸序列，或由其组成：如SEQ ID NO:2-10所示的序列。
- [0050] 在优选的具体实施方案中，所述RSV-B重组F蛋白包括选自由以下组成的组的氨基酸序列，或由其组成：SEQ ID NO:29-104，或者与SEQ ID NO:29-104任一项所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸获得的、与其具有相同或基本相同的免疫原性的氨基酸序列。
- [0051] 此外，在一些实施方案中，所述RSV-B重组F蛋白还包括三聚体标签；
- [0052] 优选地，所述三聚体标签位于C端，且具有选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:24-27；
- [0053] 可选地，还可在C端添加如SEQ ID NO:28所示的His标签以便于后续蛋白的分离纯化。
- [0054] 此外，在一些实施方案中，所述RSV-B重组F蛋白还包括信号肽；
- [0055] 优选地，所述信号肽位于N端，且具有选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:11-23。
- [0056] 第二方面，本申请提供了一种多核苷酸，其编码如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白。
- [0057] 在具体实施方案中，所述多核苷酸为经人源密码子优化的核苷酸序列，可以为DNA或mRNA；
- [0058] 在一些实施方案中，所述多核苷酸为DNA分子，优选地，所述DNA分子包括如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列，或由其组成。
- [0059] 在另一些实施方案中，所述多核苷酸为mRNA分子，优选地，所述mRNA分子包括与如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列对应的RNA序列，或由其组成。

- [0060] 第三方面，本申请提供了一种核酸构建体，其包含如上述第二方面所述的多核苷酸，以及任选地，与所述多核苷酸可操作地连接的至少一个表达调控元件。
- [0061] 第四方面，本申请提供了一种表达载体，其包含如上述第三方面所述的核酸构建体。
- [0062] 第五方面，本申请提供了一种宿主细胞，其中转化或转染有如上述第二方面所述的多核苷酸、如上述第三方面所述的核酸构建体或如上述第四方面所述的表达载体；
- [0063] 可选地，所述宿主细胞为哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞；
- [0064] 进一步可选地，所述哺乳动物细胞为293T细胞，293F细胞，或CHO细胞；
- [0065] 进一步可选地，所述细菌细胞为大肠杆菌细胞。
- [0066] 第六方面，本申请提供了一种呼吸道合胞病毒B亚型(RSV-B)重组F蛋白三聚体，其由三个、如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白聚合而成。
- [0067] 第七方面，本申请提供了如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白、如上述第二方面所述的多核苷酸、如上述第三方面所述的核酸构建体、如上述第四方面所述的表达载体、如上述第五方面所述的宿主细胞或者如上述第六方面所述的RSV-B重组F蛋白三聚体在制备用于预防和/或治疗呼吸道合胞病毒感染的疫苗中的应用。
- [0068] 第八方面，本申请提供了一种疫苗或免疫原性组合物，其包含如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白、如上述第二方面所述的多核苷酸、如上述第三方面所述的核酸构建体、如上述第四方面所述的表达载体、如上述第五方面所述的宿主细胞或者如上述第六方面所述的RSV-B重组F蛋白三聚体，以及生理学可接受的媒介物、佐剂、赋形剂、载体和/或稀释剂。
- [0069] 在一些优选的具体实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为呼吸道合胞病毒重组蛋白疫苗，其包括如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白或如上述第六方面所述的RSV-B重组F蛋白三聚体，和佐剂；
- [0070] 可选地，所述佐剂为选自以下佐剂中的一种或多种：铝佐剂、MF59佐剂、类MF59佐剂和类AS系列佐剂。

- [0071] 在另一些优选的具体实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为呼吸道合胞病毒DNA疫苗，其包括：
- [0072] (1)真核表达载体；和
- [0073] (2)构建入所述真核表达载体中的、编码如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白的DNA序列，优选为如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列；
- [0074] 可选地，所述真核表达载体选自pGX0001、pVAX1、pCAGGS和pcDNA系列载体。
- [0075] 在另一些优选的具体实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为呼吸道合胞病毒mRNA疫苗，所述mRNA疫苗包括：
- [0076] (I)编码如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白的mRNA序列，优选为与如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列对应的mRNA序列；和
- [0077] (II)脂质纳米颗粒。
- [0078] 在另一个优选的具体实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为呼吸道合胞病毒-病毒载体疫苗，其包括：
- [0079] (1)病毒骨架载体；和
- [0080] (2)构建入所述病毒骨架载体中的、编码如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白的DNA序列，优选为如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列；
- [0081] 可选地，所述病毒骨架载体选自以下病毒载体中的一种或几种：腺病毒载体、痘病毒载体、流感病毒载体、腺相关病毒载体。
- [0082] 在可行的实现方式中，所述疫苗或免疫原性组合物为鼻喷剂、口服制剂、栓剂或胃肠外制剂的形式；
- [0083] 优选地，所述鼻喷剂选自气雾剂、喷雾剂和粉雾剂；
- [0084] 优选地，所述口服制剂选自片剂、粉末剂、丸剂、散剂、颗粒剂、细粒剂、软/硬胶囊剂、薄膜包衣剂、小丸剂、舌下片和膏剂；
- [0085] 优选地，所述胃肠外制剂为经皮剂、软膏剂、硬膏剂、外用液剂、可注射或可推注 制剂。
- [0086] 第九方面，本申请提供了一种如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括：

[0087] 在编码如上述第一方面所述的RSV-B重组F蛋白的、经密码子优化的核苷酸序列的5'端加上编码信号肽的核苷酸序列以及3'端加上编码三聚体标签和组氨酸标签的核苷酸序列和终止密码子,进行克隆表达,筛选正确的重组子,然后将其转染表达系统细胞进行表达,收集细胞培养上清,从中分离获得所述RSV-B重组F蛋白。

[0088] 上述方法的一种可能的实现方式中,所述表达系统细胞为哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞;可选地,所述哺乳动物细胞为293T细胞,293F细胞,或CHO细胞;可选地,所述细菌细胞为大肠杆菌细胞。

有益效果

[0089] 天然RSV-B病毒F蛋白抗原在体外重组表达时,由于融合前构象不稳定,无法拿到融合前构象的F抗原蛋白。本申请中,通过在呼吸道合胞病毒B型F蛋白的F₁和/或F₂肽段中引入一个或多个向脯氨酸的突变,从而形成稳定的、融合前构象的本申请RSV-B重组F蛋白;实验表明,所形成的RSV-B重组F蛋白包含至少一个融合前F蛋白的特异性表位,并且,其表达稳定,形式均一,产量大大提高;此外,本申请的RSV-B重组F蛋白具有很好的免疫原性,能够激发机体产生高水平的抗体滴度(不添加佐剂的重组蛋白加强免疫后,所诱导的抗原特异性抗体滴度均达到10,000以上,而添加AddaVax佐剂后,抗原特异性抗体滴度可进一步提高10-100倍),对于呼吸道合胞病毒的临床治疗和防控具有重大的意义。

附图说明

[0090] 一个或多个实施例通过与之对应的附图中的图片进行示例性说明,这些示例性说明并不构成对实施例的限定。在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

[0091] 图1显示实施例3中,使用D25单抗,通过ELISA法检测上清原液中RSV-B重组F蛋白的表达情况,其中,横坐标为实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白),纵坐标为OD450nm吸光值。

- [0092] 图2显示实施例3中,使用帕利珠单抗,通过ELISA法检测上清原液中RSV-B重组F蛋白的表达情况,其中,横坐标为实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白),纵坐标为OD450nm吸光值。
- [0093] 图3显示实施例3中,使用D25单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中部分RSV-B重组F蛋白的表达情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为 OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。
- [0094] 图4显示实施例3中,使用帕利珠单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中部分RSV-B重组F蛋白的表达情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。
- [0095] 图5显示实施例4中,RSV-B重组F蛋白Fm41的表达上清通过分子筛层析进行纯化和纯化蛋白的分析超速离心的结果图,其中,左图为RSV-B重组F蛋白Fm41的表达上清在纯化时进行分子筛层析的紫外吸收图,右图为纯化的RSV-B重组F蛋白Fm41的分析超速离心结果。
- [0096] 图6显示实施例4中,RSV-B重组F蛋白Fm23的表达上清通过分子筛层析进行纯化时的紫外吸收图。
- [0097] 图7显示实施例4中,RSV-B重组F蛋白Fm54的表达上清通过分子筛层析进行纯化时的紫外吸收图。
- [0098] 图8显示实施例6中,通过ELISA实验检测实施例5中记载的、在使用RSV-B重组F蛋白Fm 41作为免疫原对小鼠进行初次免疫和加强免疫后的小鼠血清中的特异性抗体IgG的滴度水平,其中,横坐标为表1的分组,纵坐标为抗体滴度。
- [0099] 图9显示实施例8中,使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 1-10和WT重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。

- [0100] 图10显示实施例8中,使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 11-20重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。
- [0101] 图11显示实施例8中,使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 21-30重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。
- [0102] 图12显示实施例8中,使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 31-40重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。
- [0103] 图13显示实施例8中,使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 41-50重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。
- [0104] 图14显示实施例8中,使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 51-60重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值,纵坐标为OD450nm吸光值,右边图注显示的是实验组别(即,所检测的RSV-B重组F蛋白)。
- [0105] 图15显示实施例8中,使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗,通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 61-70重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况,其中,横坐标为细胞上清液的稀释倍数

的Log10值，纵坐标为OD450nm吸光值，右边图注显示的是实验组别(即，所检测的RSV-B重组F蛋白)。

[0106] 图16显示实施例8中，使用D25、AM14、帕丽珠单抗、MPE8、101F、hRSV90单抗，通过ELISA法检测稀释上清液中RSV-B-Fm 71-76重组F蛋白的表达以及各重组F蛋白与上述各抗体的结合情况，其中，横坐标为细胞上清液的稀释倍数的Log10值，纵坐标为OD450nm吸光值，右边图注显示的是实验组别(即，所检测的RSV-B重组F蛋白)。

[0107] 图17显示实施例9中，分离纯化后的RSV-B-Fm 36、37、38、52、53、70、75、76重组F蛋白的SDS-PAGE检测结果。

[0108] 图18显示实施例9中，分离纯化后的RSV-B-Fm 36、37、38、52、53、70、75、76重组F蛋白的Western Blot检测结果。

[0109] 图19显示实施例10中，使用D25单抗，通过ELISA法检测RSV-B-Fm 36、37、52、53、75、76重组F蛋白在30℃存放4周前后与抗体的结合情况，其中，横坐标为蛋白浓度，纵坐标为OD450nm吸光值。

[0110] 图20显示实施例10中，使用帕丽珠单抗，通过ELISA法检测RSV-B-Fm 36、37、52、53、75、76重组F蛋白在30℃存放4周前后与抗体的结合情况，其中，横坐标为蛋白浓度，纵坐标为OD450nm吸光值。

[0111] 图21显示实施例12中，通过ELISA实验检测实施例11中记载的、在使用RSV-B-Fm 23、36、37、38、41、52、53、54、70、75、76重组F蛋白分别作为免疫原对小鼠进行初次免疫(A)和加强免疫(B)后的小鼠血清中的特异性结合抗体IgG的滴度水平，其中，横坐标为疫苗分组，纵坐标为抗体滴度。

[0112] 图22显示实施例13中，通过空斑实验检测实施例11中记载的疫苗免疫后小鼠经呼吸道合胞病毒滴鼻攻毒后的小鼠肺组织的病毒载量，其中，横坐标为疫苗分组，纵坐标为病毒载量。

具体实施方式

[0113] 为使本申请实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员

在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。

- [0114] 另外，为了更好的说明本申请，在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解，没有某些具体细节，本申请同样可以实施。在一些实施例中，对于本领域技术人员熟知的原料、元件、方法、手段等未作详细描述，以便于凸显本申请的主旨。
- [0115] 除非另有其它明确表示，否则在整个说明书和权利要求书中，术语“包括”或其变换如“包含”或“包括有”等等将被理解为包括所陈述的元件或组成部分，而并未排除其它元件或其它组成部分。
- [0116] 实施例1：本申请的RSV-B重组F蛋白的表达质粒构建
- [0117] 本实施例中，设计并构建了76种本申请的RSV-B重组F蛋白，其分别命名为RSV-B-Fm 1-76，其氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29-104所示。
- [0118] 根据哺乳动物细胞密码子的偏爱性，优化编码上述本申请RSV-B重组F蛋白——RSV-B-Fm 1-76的核酸序列，得到优化的核酸编码序列，分别如SEQ ID NO:105-180所示；分别在如SEQ ID NO:105-180所示的核酸编码序列的5'端添加EcoRI酶切位点序列、Kozak序列、信号肽(如SEQ ID NO:11-23所示)的核酸编码序列，在其3'端添加三聚体标签(如SEQ ID NO:24-27所示)的核酸编码序列、His标签(如SEQ ID NO:28所示)的核酸编码序列、终止密码子和XhoI酶切位点序列后，委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因合成，再通过EcoRI和XhoI两个酶切位点，将其连接到pCAGGS载体上，获得表达重组蛋白RSV-B-Fm 1-76的表达质粒。
- [0119] 各RSV-B重组F蛋白所使用信号肽和三聚体标签的情况如下：
- [0120] Fm 1-37(氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29-65所示，优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO:105-141所示)以及Fm 39-76(氨基酸序列分别如SEQ ID NO:67-104所示，优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO:143-180所示)均使用SEQ ID NO:14所示信号肽和SEQ ID NO:24所示三聚体标签；
- [0121] Fm 38(氨基酸序列如SEQ ID NO:66所示，优化的核酸编码序列如SEQ ID NO:142所示)使用SEQ ID NO:12所示信号肽和SEQ ID NO:25所示三聚体标签。

[0122] 实施例2：检测抗体的表达和分离纯化

[0123] 本实施例中，按照文献(Z.Wei et al.,Analytical Chemistry 79,2797–2805(2007); Q.Zhu et al.,Science Translational Medicine 9,(2017))中公开的抗体重链、轻链序列及其表达质粒的构建方法，分别构建了RSV F蛋白的检测抗体——D25单抗和帕利珠单抗的重链、轻链表达质粒。

[0124] 抗体表达

[0125] 在转染前的14–16h，将293T细胞密度较大的细胞分盘(如，一盘100%铺满293T细胞的10cm培养皿以1: 3进行传代)，14–16h后，细胞密度达到70%以上即可进行转染。转染时，将抗体的重链、轻链质粒以2: 3的比例共转染293T细胞，转染4–6小时后，用PBS洗涤细胞2次，换成无血清DMEM培养基继续培养；分别于转染后第3天和7天收取细胞上清，离心去除细胞碎片，将两次获得的抗体上清混合，用于后续的抗体蛋白纯化。

[0126] 抗体纯化

[0127] 将Protein A(5ml)HP亲和柱(GE公司)连接于AKTA Purifier/Explorer/FPLC/START(GE公司)上，在仪器上的操作过程如下：先用水将柱中的20%乙醇冲出，再用20mM Na₃PO₄，pH 7.0的缓冲液平衡柱子，待仪器上电导平稳后将上述抗体上清通过10ml loop环上样的方式注入以与Protein A结合，流速2ml/min，待UV平稳后，在随后的收集管中加入1M Tris pH9.0缓冲液约0.8ml(收集体积约3.2ml)，然后在程序上改为100%的0.1M Gly pH3.0洗脱结合在柱子上的抗体，收集洗脱液，然后采用浓缩换液的方法，将抗体缓冲液置换成PBS，所得抗体溶液可直接使用或分装保存于–80℃冰箱以备后用。

[0128] 实施例3：RSV–B–Fm重组蛋白的表达和构象鉴定

[0129] 本实施例中，用实施例1构建的部分RSV–B–Fm重组蛋白(Fm 12–76)表达质粒转染HEK293T，从而表达RSV–B–Fm重组蛋白，并使用实施例2制备的检测抗体D25单抗和帕利珠单抗通过ELISA方法进行检测，以确定所表达的重组蛋白所处的构象。

[0130] 具体地，以含10%FBS的DMEM培养基培养HEK293T细胞，转染前，使细胞密度达到70%以上；用实施例1构建的RSV–B–Fm重组蛋白Fm 12–76表达质粒分别

转染HEK293T。转染4-6小时后，将细胞培养液更换成无血清的DMEM，继续培养3天，收集细胞培养上清，通过ELISA方法，分别使用D25单抗和帕利珠单抗进行抗原蛋白表达检测，具体检测方法如下：

- [0131] (1)将实施例2获得的纯化的检测抗体(D25单抗和帕利珠单抗)分别用ELISA包被液(索莱宝，C1050)稀释至1 μ g/ml，向96孔ELISA板(Coring, 3590)中每孔加入100 μ l，4℃放置12小时；
- [0132] (2)倒掉包被液，加入PBS，洗一遍；将PBS配制的5%脱脂牛奶作为封闭液加入96孔板中，每孔200 μ l，封闭，室温放置1小时；封闭完成后，用PBS溶液洗一遍；
- [0133] (3)步骤(2)所述封闭期间，用封闭液稀释细胞培养上清，从5倍起始，以3倍梯度进行稀释；之后，在ELISA板中每孔加入100 μ l各待测RSV-B重组F蛋白的培养上清原液或一部分RSV-B重组F蛋白(Fm 22、23、41、51、52、53、54、57)的各稀释度的培养上清液，阴性对照为加入封闭液，37度孵育2小时，之后使用PBST洗4遍；
- [0134] (4)加入使用HRP标记的Anti-His抗体(购自MBL)，37℃孵育1.5小时，之后PBST洗5-6遍；然后，加入TMB显色液显色，反应适当时间后，加入2M盐酸终止反应，在酶标仪上检测OD450读值。
- [0135] 上清液原液中各RSV-B重组F蛋白的表达结果如图1和2所示，从图1和2所示结果可知，与NC和野生型RSV-B F蛋白相比，所有所检测的RSV-B-Fm重组蛋白的表达均大幅提升；并且，所有所检测的RSV-B-Fm重组蛋白既可结合帕利珠单抗(既识别融合前构象的F蛋白，也可识别融合后构象的F蛋白)也可以结合D25单抗(只识别融合前构象的F蛋白)，这表明：本申请的RSV-B-Fm重组蛋白为融合前构象。
- [0136] 梯度稀释上清液中RSV-B重组F蛋白Fm 22、23、41、51、52、53、54、57的表达结果如图3和4所示，从图3和4所示结果可知，当RSV-B-Fm 22、23、41、51、52、53、54、57细胞表达上清稀释1000倍时，D25单抗或帕利珠单抗均仍可检测到蛋白，表明：RSV-B-Fm 22、23、41、51、52、53、54、57具有较高的表达量。

[0137] 实施例4: RSV-B-Fm重组蛋白表达、纯化和分子量鉴定

[0138] 本实施例中, 用实施例1构建的RSV-B-Fm 41、23、54重组蛋白表达质粒转染HEK293T, 从而表达RSV-B-Fm 41、23、54重组蛋白, 并通过His亲和层析和凝胶过滤层析(也称“分子筛层析”)进行纯化, 同时收集目的蛋白后进行分析超速离心, 以确定所表达的重组蛋白的分子量。

[0139] 具体地, 以含10%FBS的DMEM培养基培养HEK293T细胞, 转染前, 使细胞密度达到70%以上; 分别用实施例1构建的RSV-B-Fm 41、23、54重组蛋白表达质粒转染HEK293T; 转染4-6小时后, 将细胞培养液更换成无血清的DMEM, 继续培养3天, 收集上清后, 再补加DMEM培养基, 继续培养4天, 再次收集上清。将两次收集的细胞培养上清液混合, 以5000rpm离心30分钟, 离心上清液经过0.22 μ m滤膜过滤, 使得目的蛋白与HisTrap excel柱结合(5mL, GE Healthcare), 然后以包含20mM Tris、150mM NaCl、pH8.0、30mM咪唑的洗脱液洗脱非特异结合的蛋白, 再以包含20mM Tris、150mM NaCl、pH8.0、400mM咪唑的洗脱液洗脱目的蛋白; 收集包含目的蛋白的级分, 浓缩后进行分子筛层析Superdex 200 Increase 10/300 GL或Superdex 200 Hiload 16/60 GE Healthcare), 得到纯化的RSV-B-Fm重组蛋白抗原; 同时, 收集目的蛋白峰进行分析超速离心, 以确定所表达的重组蛋白的分子量。

[0140] 重组蛋白RSV-B-Fm 41的分子筛层析的紫外吸收图如图5左图所示, 其显示, 重组蛋白RSV-B-Fm 41的洗脱峰中除了包含目的蛋白峰外, 还含有少量多聚体杂峰; 收集目的蛋白峰进行分析超速离心, 其结果如图5右图所示; 由图5右图可知, 测得RSV-B-Fm41分子量为170kDa, 与其三聚体理论分子量一致, 表明所表达的RSV-B-Fm 41重组蛋白为三聚体形式。

[0141] RSV-B-Fm 23、54的分子筛层析的紫外吸收图分别如图6、7所示, 由图6、7可知, RSV-B-Fm 23的洗脱峰中除了包含目的蛋白峰外, 还含有少量多聚体杂峰, 而RSV-B-Fm54的洗脱峰几乎为单一的峰, 基本上不含杂峰。

[0142] 实施例5: RSV-B-Fm重组蛋白免疫小鼠实验

[0143] 本实施例中, 使用实施例4获得的重组蛋白RSV-B-Fm 41免疫小鼠; 实验小鼠为4-6周龄的BALB/c小鼠, 平均体重15-20g。

[0144] 具体地，在添加佐剂或不添加佐剂的情况下，用实施例4获得的重组蛋白RSV-B-Fm41对上述BALB/c小鼠进行免疫，佐剂为一种类MF59佐剂——AddaVax；同时，采用同剂量的生理盐水进行免疫，作为阴性对照。

[0145] 免疫分组情况、各组使用的免疫原、各组免疫使用的免疫原剂量和佐剂情况如表1所示，空白格表示“无”。RSV-B-Fm 41重组蛋白于生理盐水中稀释成所需浓度，添加佐剂组则需进一步与佐剂进行分组乳化，每组6只小鼠。

[0146] 表1

分组	免疫原	剂量	佐剂
1	Fm41	5 μg	AddaVax
2	Fm41	20 μg	AddaVax
3	Fm41	20 μg	
4	生理盐水		
5	生理盐水		AddaVax

[0147] 每组小鼠分别在第0和14天肌肉注射重组蛋白疫苗或生理盐水，每次免疫体积为100 μl，分别在第13天和28天尾静脉采血，小鼠血液静置后，3000rpm离心10分钟，获得血清，进一步灭活(56℃孵育30分钟)后，分装保存于-80℃冰箱。

[0148] 实施例6：ELISA实验检测疫苗诱导的特异性抗体滴度

[0149] 本实施例中，通过ELISA实验，检测实施例5中以RSV-B-Fm 41重组蛋白免疫的小鼠血清中的特异性IgG抗体的滴度。

[0150] 具体地，采用以下程序：

[0151] (1)分别将实施例4制备的RSV-B-Fm 41重组蛋白用ELISA包被液(索莱宝，C1050)稀释至3 μg/ml，96孔ELISA板(Coring，3590)每孔加入100 μl，4℃放置12小时；

[0152] (2)倒掉包被液，加入PBS，洗一遍；将PBS配制的5%脱脂牛奶作为封闭液加入96孔板中，每孔100 μl，室温放置1小时，进行封闭；封闭完成后，用PBS溶液洗一遍；

- [0153] (3)步骤(2)所述封闭期间,用封闭液稀释小鼠血清样品,血清样品从10倍起始,以2倍梯度进行稀释;之后,在ELISA板中每孔加入100 μ l免疫血清稀释液,阴性对照为加入封闭液,37度孵育2小时,之后使用PBST洗4遍;
- [0154] (4)加入使用封闭液1:2000稀释的偶联HRP的羊抗鼠二抗(Abcam, ab6789),37 $^{\circ}$ C孵育1小时,之后PBST洗5-6遍;加入TMB显色液显色,反应适当时间后,加入2M盐酸终止反应,在酶标仪上检测OD450读值。
- [0155] 抗体滴度值被定义为反应值大于2.1倍阴性对照值的血清最高稀释倍数。当最低稀释倍数(检测限)的反应值仍小于2.1倍背景值时,该样品的滴度定义为最低稀释倍数的一半,即1:5。
- [0156] 结果如图8所示,图8结果表明,RSV-B-Fm 41重组蛋白具有良好的免疫原性,其中,不添加佐剂的重组蛋白加强免疫后,所诱导的抗原特异性抗体滴度均达到10,000以上,而添加AddaVax佐剂后,抗原特异性抗体滴度可进一步提高10-100倍。
- [0157] 实施例7:检测抗体的表达和分离纯化
- [0158] 按照文献(Jones HG.,et al.PLoS Pathog 15(7):e1007944(2019); Harshbarger,W.,et al.Mabs 13(1):1955812(2021); Wen,X.,et al.Nat Microbiol 2,16272(2017); Fabian Sesterhenn.,et al.Science 368,eaay5051(2020); Mousa,J.,et al.Nat Microbiol 2,16271(2017))中公开的抗体重链、轻链序列及其表达质粒的构建方法,分别构建了RSV F蛋白的检测抗体——AM14、MPE8、101F和hRSV90单抗的重链、轻链表达质粒。
- [0159] 抗体的表达和分离纯化具体方法参照实施例2,最后所得抗体溶液可直接使用或分装保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱以备后用。
- [0160] 实施例8:RSV-B-Fm重组蛋白的表达和构象鉴定
- [0161] 本实施例中,用实施例1构建的全部RSV-B-Fm重组蛋白(Fm 1-76)表达质粒分别转染HEK293T,从而表达RSV-B-Fm重组蛋白,并使用实施例2和7制备的检测抗体通过ELISA方法进行检测,以确定所表达的重组蛋白的表达量和所处的构象。具体方法参照实施例3。

- [0162] 上清液原液中各RSV-B重组F蛋白的表达结果如图9-16所示, 由图9-16可知, 与野生型RSV-B F蛋白相比, RSV-B-Fm 2、6、11-20、21-24、29、31、33-37、39、40、41-45、51-53、55-60、61-65、69、70、71-76重组F蛋白的表达均大幅提升; 并且, 这些重组F蛋白既可结合融合前和融合后共有表位II的对应单抗(即, 帕利珠单抗)和共有表位IV的对应单抗(即, 101F单抗), 也可以结合融合前构象特有表位例如表位 θ 的对应单抗(即, D25单抗), 三聚体依赖的空间构象表位的对应单抗(即, AM14单抗), 表位V的对应单抗(即, hRSV90单抗), 或表位III的对应单抗(即, MPE8单抗), 这表明: 本申请的RSV-B-Fm 2、6、11-20、21-24、29、31、33-40、41-45、51-60、61-65、69、70、71-76重组F蛋白为融合前构象。
- [0163] 实施例9: RSV-B-Fm重组蛋白表达、纯化和SDS-PAGE鉴定
- [0164] 本实施例中, 用实施例1构建的RSV-B-Fm 36、37、38、52、53、70、75、76重组蛋白表达质粒转染HEK293T, 从而表达RSV-B-Fm 36、37、38、52、53、70、75、76重组蛋白, 并通过His亲和层析和凝胶过滤层析(也称“分子筛层析”)进行纯化, 具体操作步骤参照实施例4。
- [0165] 经过凝胶过滤层析, 收集目的蛋白峰, 并进行SDS-PAGE分析。结果如图17所示, 图17显示, RSV-B-Fm 36、37、38、52、53、70、75、76重组蛋白均显示1条明显的蛋白带, 说明它们均具有很高的纯度, 分子量在55KDa-70Ka之间, 与理论分子量相符。
- [0166] 此外, 由于各RSV-B-Fm重组F蛋白均为带组氨酸标签的重组蛋白, 本实施例中还采用偶联有辣根过氧化物酶的抗组氨酸标签抗体进行Western Blot鉴定, 结果如图18所示; 图18显示, 各RSV-B-Fm重组F蛋白收集液中均检测到了组氨酸标签的表达, 说明这些RSV-B-Fm重组F蛋白的表达与预期一致, 均正确表达。
- [0167] 实施例10: RSV-B-Fm重组蛋白稳定性检测
- [0168] 使用实施例4和9所获得的RSV-B-Fm 36、37、52、53、75、76重组蛋白, 无菌过滤后保存于30℃, 4周后通过ELISA方法, 分别使用D25单抗(针对表位 θ)和帕利珠单抗(针对表位II)通过ELISA实验测定抗原与抗体的结合, 确定蛋白长期存放的稳定性, 具体检测方法如下:

- [0169] (1)将实施例2和8获得的纯化的抗体(帕利珠单抗和D25单抗)分别用ELISA包被液(索莱宝, C1050)稀释至 $1\mu\text{g/ml}$, 向96孔ELISA板(Corning, 3590)中每孔加入 $100\mu\text{l}$, 4°C 放置12小时;
- [0170] (2)倒掉包被液, 加入PBS, 洗一遍; 将PBS配制的5%脱脂牛奶作为封闭液加入96孔板中, 每孔 $200\mu\text{l}$, 封闭, 室温放置1小时; 封闭完成后, 用PBS溶液洗一遍;
- [0171] (3)步骤(2)所述封闭期间, 用封闭液稀释RSV-B-Fm重组蛋白, 从 300ng/ml 起始, 以3倍梯度进行稀释; 之后, 在ELISA板中每孔加入 $100\mu\text{l}$ 梯度稀释的RSV-B-Fm重组蛋白, 阴性对照为加入封闭液, 37°C 孵育2小时, 之后使用PBST洗4遍;
- [0172] (4)加入使用HRP标记的Anti-His抗体(购自MBL), 37°C 孵育1.5小时, 之后PBST洗5-6遍; 然后, 加入TMB显色液显色, 反应适当时间后, 加入2M盐酸终止反应, 在酶标仪上检测OD450读值。
- [0173] 使用D25单抗和帕利珠单抗的ELISA检测结果分别如图19和20所示, 图19和20显示, 与第0周初始的蛋白相比, RSV-B-Fm 36、37、52、53、75、76重组蛋白在 30°C 存放4周后, 每个蛋白与D25抗体和帕丽珠单抗的结合均未发生明显变化, 表明这些RSV-B-Fm重组蛋白具有很好的稳定性。
- [0174] 实施例11: RSV-B-Fm重组蛋白免疫小鼠实验
- [0175] 使用实施例4和10所获得的RSV-B-Fm 23、36、37、38、41、52、53、70、75、76重组蛋白分别免疫小鼠, 实验小鼠为6-8周龄的BALB/c小鼠, 平均体重15-20g。
- [0176] 具体地, 将上述RSV-B-Fm重组蛋白分别免疫小鼠, 每次免疫剂量为 $12\mu\text{g}$, 佐剂为氢氧化铝佐剂(购自Croda)加CpG(购自Invivogen)复合佐剂, 疫苗配制方法为: 每种RSV-B-Fm重组蛋白于生理盐水中稀释成所需浓度, 氢氧化铝佐剂先与抗原蛋白混合, 之后再与CpG佐剂混合, 安慰剂组为生理盐水。每组6-8周龄的BALB/c小鼠(平均体重15-20g)4只。

- [0177] 每组小鼠分别在第0和14天肌肉注射重组蛋白疫苗或生理盐水，每次免疫体积为100 μ l，分别在第13天和28天尾静脉采血，小鼠血液静置后，3000rpm离心10分钟，获得血清，进一步灭活(56℃孵育30分钟)后，分装保存于-80℃冰箱。
- [0178] 实施例12：ELISA实验检测疫苗诱导的抗原特异性抗体滴度
- [0179] 本实施例中，通过ELISA实验，检测实施例11中以RSV-B-Fm 23、36、37、38、41、52、53、70、75、76重组蛋白疫苗在初次免疫和二次免疫后的小鼠血清中的特异性IgG抗体的滴度(Log抗体滴度)。具体方法和抗体滴度值的定义均参照实施例6。
- [0180] 初次免疫和二次免疫的小鼠血清中的特异性IgG抗体滴度结果分别如图21A和图21B所示，图21A和21B显示，所有RSV-B-Fm重组F蛋白疫苗在一免后所诱导的抗原特异性抗体滴度均达到10,000以上，在二免后所诱导的抗原特异性抗体滴度可进一步提高至1,000,000以上，表明：RSV-B-Fm 23、36、37、38、41、52、53、70、75、76重组F蛋白疫苗均有优异的免疫原性。
- [0181] 实施例13：疫苗免疫攻毒保护效果评价
- [0182] 对于实施例11中的各疫苗免疫小鼠，在二次免疫后的第4周通过滴鼻方式进行呼吸道合胞病毒Long毒株攻毒，攻毒剂量为 10^4 PFU/50 μ l/只。在攻毒后第5天，对小鼠实施安乐死，取肺脏。每组中四只小鼠肺脏称重并记录后，加入DMEM培养基然后使用组织匀浆器匀浆，通过5000g/分钟，离心10分钟后获得肺组织上清。通过空斑实验，检测肺组织上清样品中的呼吸道合胞病毒的病毒量，最后计算每克肺组织中的病毒拷贝数。
- [0183] 空斑实验具体方法如下：使用12孔板提前一天铺好BHK细胞，每孔 1×10^5 个细胞，起始孔为组织原液10倍稀释，即50 μ l肺组织上清计入到450 μ l DMEM培养基中混匀，之后按照10倍倍比稀释6个梯度。使用PBS将待感染细胞清洗2遍，取稀释后肺组织上清样品感染细胞，每孔400 μ l，37℃孵育2小时，之后使用PBS清洗细胞，再加入2%羧甲基纤维素钠与2XDMEM等体积混合液，每孔加1ml。放置37℃孵育4天。细胞用PBS洗一遍，加入的甲醇室温固定10分钟，PBS洗1遍后，加入含5%脱脂牛奶的PBST，37℃封闭1小时，加入用5%脱脂牛奶稀释的帕

丽珠单抗，37℃孵育1小时，用PBST(PBS加入0.05% Tween20)洗3遍，再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG二抗(购自碧云天生物)，37℃孵育1小时，用PBST(PBS加入0.05% Tween20)洗3遍，加入AEC底物(购自BD Biosciences)反应，棕色斑点判定为阳性斑，并计数每个样本的PFU值。

[0184] 结果如图22所示，图22显示，安慰剂免疫组疫苗攻毒后，肺组织可检测到高滴度的呼吸道合胞病毒，而所有疫苗免疫组，均检测不到病毒，这表明，RSV-B-Fm 23、36、37、38、41、52、53、70、75、76重组蛋白疫苗免疫后均可保护机体免受呼吸道合胞病毒的感染，产生了很好的保护效果。

[0185] 最后应说明的是：以上实施例仅用以说明本申请的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述实施例对本申请进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本申请技术方案的精神和范围。

工业实用性

[0186] 本申请提供的RSV-B重组F蛋白包含至少一个融合前F蛋白的特异性表位，能够形成稳定的、融合前构象的F蛋白三聚体，并且，其表达稳定，形式均一，产量大大提高；所形成的F蛋白三聚体具有很好的免疫原性，能够激发机体产生高水平的抗体滴度，对于呼吸道合胞病毒的临床治疗和防控具有重大的意义。

权利要求书

- [权利要求 1]

一种呼吸道合胞病毒B亚型(RSV-B)重组F蛋白，其特征在于，所述RSV-B重组F蛋白包含RSV-B-F₁肽段和RSV-B-F₂肽段，其中，所述RSV-B-F₁肽段和/或RSV-B-F₂肽段相对于野生型RSV-B F蛋白的相应肽段包含至少一个向脯氨酸的突变。
- [权利要求 2]

根据权利要求1所述的RSV-B重组F蛋白，其特征在于，所述RSV-B-F₁肽段对应于如SEQ ID NO:1所示的野生型RSV-B F蛋白的氨基酸序列中第26-98位、第26-108位或第26-97位的氨基酸片段，所述RSV-B-F₂肽段对应于如SEQ ID NO:1所示的野生型RSV-B F蛋白的氨基酸序列中第136-513位、第145-513位、第138-513位或第137-513位的氨基酸片段，并且，所述RSV-B-F₁肽段和/或RSV-B-F₂肽段中相对于野生型RSV-B F蛋白的相应肽段包含一个或多个向脯氨酸的突变。
- [权利要求 3]

根据权利要求2所述的RSV-B重组F蛋白，其特征在于，所述一个或多个向脯氨酸的突变为如SEQ ID NO:1所示的野生型RSV-B F蛋白的氨基酸序列中选自以下的突变：
K65P、T67P、D73P、L138P、G139P、L141P、
E161P、Q210P、I214P、S215P、
N216P、Q279P、S377P；
优选地，所述一个或多个向脯氨酸的突变选自以下突变或突变组合：
T67P；
L141P；
Q279P；
S377P；
T67P+L141P；
L141P+Q279P；

L141P+S377P;

T67P+Q279P;

T67P+S377P;

Q279P+S377P;

T67P+L141P+Q279P;

T67P+L141P+S377P;

L141P+Q279P+S377P;

T67P+Q279P+S377P;

T67P+L138P+G139P;

L138P+G139P+Q279P;

L138P+G139P+S377P;

T67P+L138P+G139P+Q279P;

T67P+L138P+G139P+S377P;

L138P+G139P+Q279P+S377P;

T67P+L141P+Q279P+S377P;

T67P+L138P+G139P+Q279P+S377P;

T67P+L138P+G139P+L141P+Q279P+S377P;

任选地，上述突变或突变组合中T67P突变可被K65P突变或D73P突变所替代；

任选地，上述突变或突变组合中L141P突变可被L138P突变或G139P突变所替代；

任选地，上述突变或突变组合中还包括选自以下的一种或多种突变：N216P突变、Q210P突变、I214P突变、S215P突变和E161P突变。

[权利要求 4]

根据权利要求1-3任一项所述的RSV-B重组F蛋白，其特征在于，所述RSV-B-F₁肽段和RSV-B-F₂肽段直接相连，或者通过连接桥相连；

优选地，所述连接桥选自：

(i)(GS)_m连接桥，其中， $m=1-5$ ，优选为1-3；可选地，其中包含一个或多个氨基酸突变；

(ii)(GGGS)_n连接桥，其中 $n=1-5$ ，优选为1-3；可选地，其中包含一个或多个氨基酸突变；

(iii)野生型F₁与F₂肽段之间的、F0自身的连接序列；

(iv)连接桥(iii)上的弗林酶切位点进行突变获得的序列；

进一步优选地，所述连接桥包括选自以下的氨基酸序列，或由其组成：SEQ ID NO:2-10。

[权利要求 5] 根据权利要求1-4任一项所述的RSV-B重组F蛋白，其特征在于，所述重组F蛋白包括选自以下的氨基酸序列，或由其组成：SEQ ID NO:29-104，或者与SEQ ID NO:29-104任一项所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸获得的、与其具有相同或基本相同的免疫原性的氨基酸序列。

[权利要求 6] 根据权利要求1-5任一项所述的RSV-B重组F蛋白，其特征在于，所述重组F蛋白还包括三聚体标签；
优选地，所述三聚体标签位于C端，且具有选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:24-27。

[权利要求 7] 根据权利要求1-6任一项所述的RSV-B重组F蛋白，其特征在于，所述重组F蛋白还包括信号肽；
优选地，所述信号肽位于N端，且具有选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:11-23。

[权利要求 8] 一种多核苷酸，其编码如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白。

[权利要求 9] 根据权利要求8所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸为DNA分子或mRNA分子；
优选地，所述DNA分子包括如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列，或由其组成；

优选地，所述mRNA分子包括与如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列对应的RNA序列，或由其组成。

- [权利要求 10] 一种核酸构建体，其包含如权利要求8或9所述的多核苷酸，以及任选地，与所述多核苷酸可操作地连接的至少一个表达调控元件。
- [权利要求 11] 一种表达载体，其包含如权利要求10所述的核酸构建体。
- [权利要求 12] 一种宿主细胞，其中转化或转染有如权利要求8或9所述的多核苷酸、如权利要求10所述的核酸构建体或如权利要求11所述的表达载体；
可选地，所述宿主细胞为哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞；
进一步可选地，所述哺乳动物细胞为293T细胞，293F细胞，或CHO细胞；
进一步可选地，所述细菌细胞为大肠杆菌细胞。
- [权利要求 13] 一种B型呼吸道合胞病毒(RSV-B)重组F蛋白三聚体，其由三个、如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白聚合而成。
- [权利要求 14] 如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白、如权利要求8或9所述的多核苷酸、如权利要求10所述的核酸构建体、如权利要求11所述的表达载体、如权利要求12所述的宿主细胞或如权利要求13所述的RSV-B重组F蛋白三聚体在制备用于预防和/或治疗呼吸道合胞病毒感染的疫苗中的应用。
- [权利要求 15] 一种疫苗或免疫原性组合物，其包含如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白、如权利要求8或9所述的多核苷酸、如权利要求10所述的核酸构建体、如权利要求11所述的表达载体、如权利要求12所述的宿主细胞或权利要求13所述的RSV-B重组F蛋白三聚体，以及生理学可接受的媒介物、佐剂、赋形剂、载体和/或稀释剂。
- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的疫苗或免疫原性组合物，其为呼吸道合胞病毒重组蛋白疫苗，其包括如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白或如权利要求13所述的RSV-B重组F蛋白三聚体和佐剂；

可选地，所述佐剂为选自以下佐剂中的一种或多种：铝佐剂、MF59佐剂、类MF59佐剂和类AS系列佐剂。

[权利要求 17]

根据权利要求15所述的疫苗或免疫原性组合物，其为呼吸道合胞病毒DNA疫苗，所述DNA疫苗包括：

- (i)真核表达载体；和
 - (ii)构建入所述真核表达载体中的、编码如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白的DNA序列，优选为如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列；
- 优选地，所述真核表达载体选自pGX0001、pVAX1、pCAGGS和pcDNA系列载体。

[权利要求 18]

根据权利要求15所述的疫苗或免疫原性组合物，其为呼吸道合胞病毒mRNA疫苗，所述mRNA疫苗包括：

- (I)编码如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白的mRNA序列，优选为与如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列对应的mRNA序列；和
- (II)脂质纳米颗粒。

[权利要求 19]

根据权利要求15所述的疫苗或免疫原性组合物，其为呼吸道合胞病毒病毒载体疫苗，其包括：

- (1)病毒骨架载体；和
- (2)构建入所述病毒骨架载体中的、编码如权利要求1-7任一项所述的RSV-B重组F蛋白的DNA序列，优选为如SEQ ID NO:105-180之一所示的DNA序列；

可选地，所述病毒骨架载体选自以下病毒载体中的一种或几种：腺病毒载体、痘病毒载体、流感病毒载体、腺相关病毒载体。

[权利要求 20]

根据权利要求15-19任一项所述的疫苗或免疫原性组合物，其特征在于，所述疫苗或免疫原性组合物为鼻喷剂、口服制剂、栓剂或胃肠外制剂的形式；

优选地，所述鼻喷剂选自气雾剂、喷雾剂和粉雾剂；

优选地，所述口服制剂选自片剂、粉末剂、丸剂、散剂、颗粒剂、细粒剂、软/硬胶囊剂、薄膜包衣剂、小丸剂、舌下片和膏剂；

优选地，所述胃肠外制剂为经皮剂、软膏剂、硬膏剂、外用液剂、可注射或可推注制剂。

[权利要求 21]

根据权利要求1-5任一项所述的RSV-B重组F蛋白的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括：

在编码如权利要求1-5任一项所述的RSV-B重组F蛋白的、经密码子优化的核苷酸序列的5'端加上编码信号肽的核苷酸序列以及3'端加上编码三聚体标签和组氨酸标签的核苷酸序列和终止密码子，进行克隆表达，筛选正确的重组子，然后将其转染表达系统细胞进行表达，收集细胞培养上清，从中分离获得所述RSV-B重组F蛋白；

可选地，所述表达系统细胞为哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞；

进一步可选地，所述哺乳动物细胞为293T细胞，293F细胞，或CHO细胞；

进一步可选地，所述细菌细胞为大肠杆菌细胞。