科学通报 2024 年 第 69 卷 第 33 期: 4905 ~ 4916
mRNA技术与生物医药应用专辑 论 文
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

新冠病毒变异株RBD二聚体mRNA疫苗广谱免疫原性研究

赵旭[1†], 吴鑫凯[2†], 杜沛[1], 陈茜[3], 马雪慧[1], 胡世雄[4], 吴春丽[5], 杨惠婷[1], 马任义[1], 李爽[1], 孔天翔[6], 李睿琦[1,7], 冯英浩[1], 王晓云[1], 荣笑雨[8], 郑安琪[1], 陆剑[2*], 高福[1,6,7*], 王奇慧[1,5,7,8*]

1. 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;
2. 北京大学生命科学学院, 北京 100871;
3. 澳门大学健康科学学院, 澳门 999078;
4. 山西农业大学动物医学学院, 晋中 030801;
5. 云南大学生命科学学院, 昆明 650091;
6. 清华大学医学院, 北京 100084;
7. 中国科学院大学存济医学院, 北京 100049;
8. 温州医科大学检验医学与生命科学学院, 温州 325035
† 同等贡献
* 联系人, E-mail: luj@pku.edu.cn; gaof@im.ac.cn; wangqihui@im.ac.cn

2023-06-28 收稿, 2023-08-20 修回, 2023-08-21 接受, 2023-08-22 网络版发表
国家重点研发计划(2022YFC2303403)、国家自然科学基金杰出青年科学基金(82225021)和中国科学院稳定支持基础研究领域青年团队项目(YSBR-010)资助

摘要 严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)是导致新冠病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)的病原体. 2019年末至今, SARS-CoV-2在全球范围流行, 氨基酸突变累积产生多种具有较高传播力或较强免疫逃逸能力的变异株. 目前广泛使用的COVID-19疫苗大多基于SARS-CoV-2原型株(prototype, PT)进行免疫原设计. 这些疫苗针对早期变异株具有较好的保护效果, 然而面对后续出现的Omicron系列变异株, 以原型株为免疫原的疫苗保护效力显著下降, 特别是在面对免疫逃逸极强的BF.7、BQ.1.1、CH.1.1、XBB及XBB.1.5等变异株时, 难以激发较高水平特异性中和抗体. 因此, 亟须研发针对多种SARS-CoV-2变异株产生高效中和抗体的新一代广谱疫苗. 本研究基于SARS-CoV-2受体结合域(receptor-binding domain, RBD)重复串联二聚体的构型, 设计了6种包含Delta RBD以及BA.1、BA.2和BA.5等Omicron亚型RBD的串联二聚体mRNA疫苗, 并对其表达情况及免疫原性进行了系统性评价. 同时, 还验证了在两针灭活疫苗基础上以mRNA疫苗作为加强针的序贯免疫效果. 假病毒中和数据显示, Delta-BA.2(DO_2)与Delta-BA.5(DO_5)RBD二聚体疫苗表现出较优的免疫原性, 且两者诱导的中和抗体分别针对BA.2之前和BA.5之后出现的变异株有较好的中和活性, 表现出一定的互补趋势. 因此, 我们设计了DO_2和DO_5混合免疫的策略, 实现了对二者优势的互补, 进一步扩宽了疫苗中和抗体谱. 在三剂免疫的结果中, DO_5及DO_2+DO_5免疫可产生针对CH.1.1、XBB及XBB.1.5的高水平中和抗体. 这些结果有助于我们理解不同分支变异株中和抗体谱的变化规律, 并为广谱COVID-19疫苗设计提供了参考.

关键词 SARS-CoV-2, Omicron变异株, mRNA疫苗, 广谱疫苗

引用格式: 赵旭, 吴鑫凯, 杜沛, 等. 新冠病毒变异株RBD二聚体mRNA疫苗广谱免疫原性研究. 科学通报, 2024, 69: 4905–4916
Zhao X, Wu X K, Du P, et al. Evaluation of the broad-spectrum immunogenicity of RBD dimer mRNA vaccines against SARS-CoV-2 variants (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 4905–4916, doi: 10.1360/TB-2023-0629

© 2023《中国科学》杂志社

由严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)引起的新冠病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)大流行已造成700多万人死亡和难以计量的经济损失(https://www.who.int). 疫情暴发后, 世界各国迅速布局COVID-19疫苗研发工作. 截至2022年底, 已有54种疫苗在至少一个国家获得紧急使用授权, 包括灭活疫苗[1~4]、病毒载体疫苗[5~9]、重组蛋白亚单位疫苗[10~14]及核酸疫苗[15~19]等. 大规模疫苗接种促进了群体免疫的建立, 实现了对原型株及早期变异株的保护. 然而, 变异株的免疫逃逸能力在不断增强, 已有多组研究数据表明目前使用的基于原型株设计的疫苗针对近期出现的Omicron变异株保护效力已出现不同程度的下降[20,21]. 亟须开发针对多种具有强免疫逃逸能力Omicron变异株均有效的广谱疫苗.

此前, 本团队以原型株刺突(spike, S)蛋白受体结合域(receptor-binding domain, RBD)为免疫原开发了一种同源二聚体蛋白亚单位疫苗ZF2001®[22]. 该疫苗已在中国、乌兹别克斯坦、印度尼西亚和哥伦比亚获批, 临床数据显示其对重症及死亡具有高保护效力(分别为87.6%和86.5%). 为应对具有高度逃逸能力的Omicron变异株, 我们将ZF2001®的免疫原升级为异源Delta-BA.1 RBD二聚体, 开发出蛋白亚单位疫苗[23]和mRNA疫苗[24]. 假病毒中和数据表明, 相较于原型株或Omicron RBD构成的同源二聚体, Delta-BA.1异源RBD二聚体疫苗针对多种Omicron变异株表现出更为广谱高效的保护效果, 为后续研究提供了重要理论依据[25].

目前主要流行的XBB等分支的衍生毒株对BA.1突破性感染后的免疫力具有明显的逃逸能力[26]. 因此, 需要在Delta-BA.1基础上进一步升级疫苗免疫原设计. 目前针对Omicron的疫苗设计策略之一是引入最新流行的Omicron变异株免疫原制备多价疫苗. Moderna和BioNTech的二价mRNA疫苗即采用了这种策略, 在原型株疫苗的基础上引入了基于BA.1或BA.5的免疫原构成混合疫苗[27].

因此, 本研究基于RBD重复串联二聚体免疫原设计, 首先将Delta、BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.3及BA.5的RBD分别进行组合, 共设计了5种“Delta-Omicron”型嵌合mRNA疫苗, 即Delta-BA.1、Delta-BA.1.1、Delta-BA.2、Delta-BA.3和Delta-BA.5(以下分别称为DO_1、$DO_{1.1}$、DO_2、DO_3和DO_5), 及1种“OO”型嵌合mRNA疫苗BA.1-BA.2(以下简称为O_1O_2), 并通过密码子优化提高了mRNA疫苗的表达效率和稳定性. 随后, 系统评价了这些疫苗在两针mRNA疫苗免疫后小鼠血清特异性抗体及T细胞响应水平. 考虑到国内人群免疫背景多为两针灭活疫苗, 还设计了两针灭活疫苗预接种后使用DO_1、DO_2、DO_3和DO_5进行序贯免疫. 两针mRNA疫苗免疫及序贯免疫的假病毒中和数据均显示, 6种疫苗设计中的DO_2和DO_5具有相对最优的免疫原性, 且两者的中和抗体谱具有互补倾向. 因此, 我们进一步设计了DO_2和DO_5混合免疫策略分别进行两针及三针免疫, 以提高疫苗的广谱性. 实验结果表明, 该种策略下mRNA疫苗激发特异性中和抗体谱综合了DO_2和DO_5中和抗体谱, 且在三针免疫后DO_5及DO_2+DO_5可针对CH.1.1、XBB及XBB.1.5假病毒产生较高水平中和抗体. 该结果符合新一代广谱COVID-19疫苗需求, 并为针对变异株的疫苗设计提供了重要参考.

1 材料与方法

(ⅰ) 密码子优化及克隆构建. 将编码Delta RBD (EPI_ISL_2378732, 第319~541位氨基酸)及BA.1 RBD (EPI_ISL_6640916, 第319~541位氨基酸)核苷酸按照如下方法进行密码子优化: 由GTEx网站(www.gtexportal.org)获取基因表达数据, 计算人mRNA中每种密码子类型的出现次数(CDS区密码子出现次数乘以基因表达量). 分别采用两种不同的密码子筛选策略处理2个RBD序列, 避免由于序列相似性过高而导致的基因重组. 策略1: 随机使用每个氨基酸出现频率最高的2种密码子; 策略2: 使用氨基酸出现频率最高的1种密码子. 将优化序列送至金斯瑞生物科技公司合成, 克隆至pUC57载体上作为体外转录mRNA模板. 使用Golden gate方法进行氨基酸定点突变获得质粒Delta-BA.1.1、Delta-BA.2、Delta-BA.3及Delta-BA.5, 并在N端引入S蛋白原生信号肽.

(ⅱ) 体外制备mRNA. 使用*Bam*H Ⅰ消化模板质粒, 获得线性化DNA, 使用T7 High Yield RNA Transcription kit(Novoprotein)进行体外转录, Cap 1 Capping System (Novoprotein)进行5′端加帽. 转录过程采用N1-甲基假尿嘧啶代替UTP, 3′末端包含Poly(A)尾. 使用LiCl于–20°C过夜沉淀纯化mRNA, 4°C, 12000转离心20 min, 沉淀溶解于无核酸酶水中, 经琼脂糖凝胶验证后置于–80°C保存待用.

(ⅲ) mRNA-LNP(lipid nanoparticle)包装及质量检测. 使用无水乙醇溶解可电离阳离子脂质、磷脂酰胆碱、胆固醇和聚乙二醇脂质, 按照50:10:38:1.5(mol/

mol)的比例配制LNP混合物. 使用pH 4.0的乙酸钠稀释mRNA. 两相液体通过微流控芯片及纳米组装平台(Precision NanoSystems)快速混合并包装为mRNA-LNP. 收集产物液滴并转移至超滤离心管(Millipore)中, 通过切向流过滤将缓冲液换为杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS). 使用Quan-iT Ribogreen RNA kit(Thermo Fisher)测定mRNA含量, 于–4°C保存待用. 将mRNA-LNP分别溶解于pH为4.0或7.4的去离子水中, 采用Zetasizer Pro仪器(Malvern Panalytical)测定粒径分布和Zeta电位.

(ⅳ) mRNA转染及Western blot. 为了检测目的蛋白表达情况, 使用TransIT®-mRNA Transfection Kit(Mirus)转染1 μg mRNA至12孔板HEK293T细胞中. 培养36 h后收集上清, 3000转离心5 min, 在40 μL上清液中加入10 μL上样缓冲液, 在100°C下变性10 min, 使用12% SDS-PAGE分离样品. 将样品转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上. 使用含5%脱脂奶粉的PBS室温封闭1 h, 加入5000倍稀释的Omicron specific anti-SARS-CoV-2 Spike RBD(Sino bio)孵育1 h, 清洗后加入山羊抗兔IgG-HRP抗体(Easybio), 室温孵育1 h. 最后使用PBS洗涤5次, 由Beyotime BeyoECL Plus(碧云天生物技术公司)显色曝光.

(ⅴ) 动物实验. 所有疫苗均通过肌肉注射途径免疫6~8周龄雌性Balb/c小鼠, 为评估mRNA疫苗免疫原性, 分别在第0天和第14天接种两剂mRNA疫苗(每剂5 μg/只)或LNP作为阴性对照. 第14、28天经眼眶采血. 离心分取血清, 置–80°C保存待用. 在第21天取脾脏, 使用40 μm滤网制备脾单细胞悬液, 用红细胞裂解液(索莱宝)去除红细胞. 使用AO/PI染料染色, 于Celldrop FL自动细胞计数仪(DeNovix)计数, 用于酶联免疫斑点(ELISpot)检测. 为评估mRNA疫苗作为序贯加强针的免疫原性, 分别在第0天和第21天接种两剂BBIBP-CorV灭活疫苗(每剂2.6 U/只), 在第35天注射mRNA疫苗(10 μg/只)或灭活疫苗(2.6 U/只). 阴性对照组前两针注射铝佐剂, 第三针注射LNP. 第56天, 经眼眶采血并采集脾脏样本. 血液和脾脏按上述方法进行处理.

(ⅵ) 酶联免疫吸附实验(ELISA). 为测定疫苗免疫后小鼠血清中特异性结合抗体滴度, 采用每种变异株RBD分别包被ELISA板, 置于4°C过夜, 使用含5%脱脂奶粉的PBS于37°C培养箱封闭1 h, 弃去封闭液后将小鼠血清以3倍梯度稀释, 100 μL/孔加入孔板中, 37°C孵育1 h, 洗板3次并以100 μL/孔加入5000倍稀释的山羊抗鼠IgG-HRP抗体(Easybio), 37°C孵育1 h, 洗板5次, 使用TMB显色液(碧云天)显色5~30 min后加入等量2 mol/L硫酸终止, 经酶标仪于450和630 nm测定吸光值, 阴性孔读值的2.1倍视为阳性值.

(ⅶ) 假病毒包装及血清中和实验. 为测定疫苗免疫后小鼠血清中特异性中和抗体滴度, 我们对SARS-CoV-2刺突蛋白进行密码子优化, 在C端去除18个氨基酸, 构建至pCAGGS载体得到假病毒表达质粒. 每种表达质粒转染30 μg于HEK293T细胞, 24 h后加入VSV-ΔG-G-GFP假病毒, 孵育2 h后更换新鲜DMEM培养基并加入抗VSV-G抗体(I1-Hybridoma ATCC® CRL2700™), 孵育30 h. 收取上清, 3000转离心10 min, 0.45 μm无菌滤器过滤, 分装保存于–80°C. 小鼠血清于56°C处理30 min, 从1:40或1:80开始进行2倍梯度稀释. 混合等体积血清及假病毒, 于37°C培养箱孵育1 h. 将100 μL中和产物加入96孔板vero-E6细胞中. 使用等体积DMEM培养基与假病毒平行孵育作为对照. 20 h后, 使用CQ1共聚焦图像细胞仪(Yokogawa)读数计算中和抗体滴度.

(ⅷ) 酶联免疫斑点实验(ELISpot). 为测定疫苗免疫后小鼠脾脏T细胞在抗原刺激下IFN-γ分泌情况, 使用ELISpot检测试剂盒(达科为)进行检测. 将小鼠脾细胞加入预包被ELISpot板中(3×10^5个细胞/孔), 加入基于各种变异株RBD设计的肽库(2 μg/mL)刺激16 h, 使用无肽库刺激的细胞作为阴性对照, 向细胞中加入植物血凝素(PMA)作为阳性对照. 孵育结束后, 使用去离子水裂解细胞, 加入生物素标记的IFN-γ抗体100 μL/孔, 37°C孵育1 h, 使用Washing缓冲液清洗6次后再加入链霉亲和素-HRP抗体100 μL/孔, 37°C孵育1 h, 洗板, 加入显色剂并置于37°C显色15 min, 使用去离子水终止. 避光晾干后于自动读板仪(Immuno Capture 6.5.0)进行计数.

2 结果

2.1 6种mRNA疫苗的构建及质量控制

本实验构建了5种Delta-Omicron RBD二聚体, 其中Omicron RBD分别为BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.3或BA.5 RBD(DO_1、$DO_{1.1}$、DO_2、DO_3和DO_5)及1种Omicron-Omicron RBD二聚体, 由BA.1和BA.2的RBD构成(O_1O_2). 为提高mRNA的表达效率, 我们对DO_1及O_1O_2的核苷酸序列进行了密码子优化, 使其具有较高的翻译速率和稳定性. 在此基础上, 在DO_1上以单点突变的

方式构建了其他5种质粒(图1).

所有6种mRNA均通过体外转录和5′端加帽进行制备, 随后使用脂质包装制备6种mRNA-LNP. 在体外转录过程中, 使用N1-甲基假尿嘧啶替代UTP以避免过度的先天免疫反应并增强mRNA的稳定性. 我们评价了6种mRNA疫苗的体外表达效果, 并通过检测LNP的粒径分布的Zeta电位对疫苗进行了质量控制. Western blot检测结果表明, 所有RBD二聚体mRNA表达产物条带均位于51 kD附近, 与理论大小一致(图2(a)), 表明6种免疫原均能在细胞内完整表达. 动态光散射(DLS)检测数据显示, 6种mRNA-LNP在磷酸盐缓冲液(PBS)中的粒径平均值在76~82 nm范围内, 聚合物分散性指数(polymer dispersity index, PDI)在0.146~0.220之间(图2(b)). 同时, Zeta电位在pH 4.0时均为正值, 且在pH 7.4时变为负值(图2(c)). 以上检测结果表明, 6种mRNA-LNP均符合递送需求, 可以有效进入细胞.

2.2 RBD二聚体mRNA疫苗的免疫原性评价

为评价6种RBD二聚体mRNA疫苗的体液免疫原性, 我们给各组Balb/c小鼠(n=5)分别接种了2剂(第0、

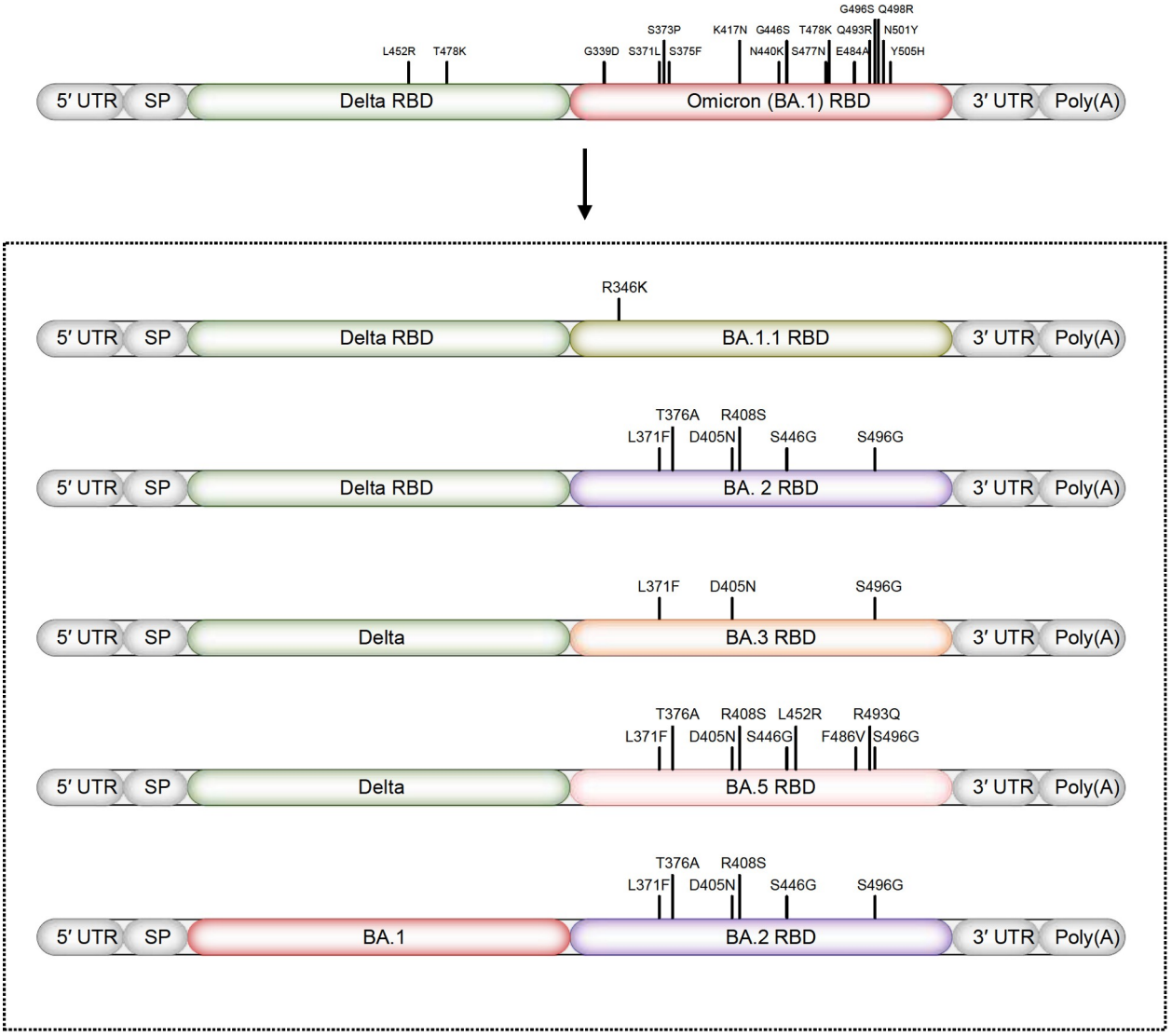


图 1 由Delta-BA.1疫苗通过点突变构建5种新型mRNA疫苗示意图. 包含Delta、BA.1.1、BA.2、BA.3和BA.5变异株RBD的5种RBD二聚体mRNA疫苗均由Delta-BA.1疫苗通过点突变构建

Figure 1 Schematic of mRNA vaccines modified from Delta-BA.1 RBD dimer vaccine. Five mRNA vaccine including the RBD of SARS-CoV-2 Delta, BA.1.1, BA.2, BA.3 and BA.5 sub-variants were designed by mutating from the Delta-BA.1 RBD dimer vaccine

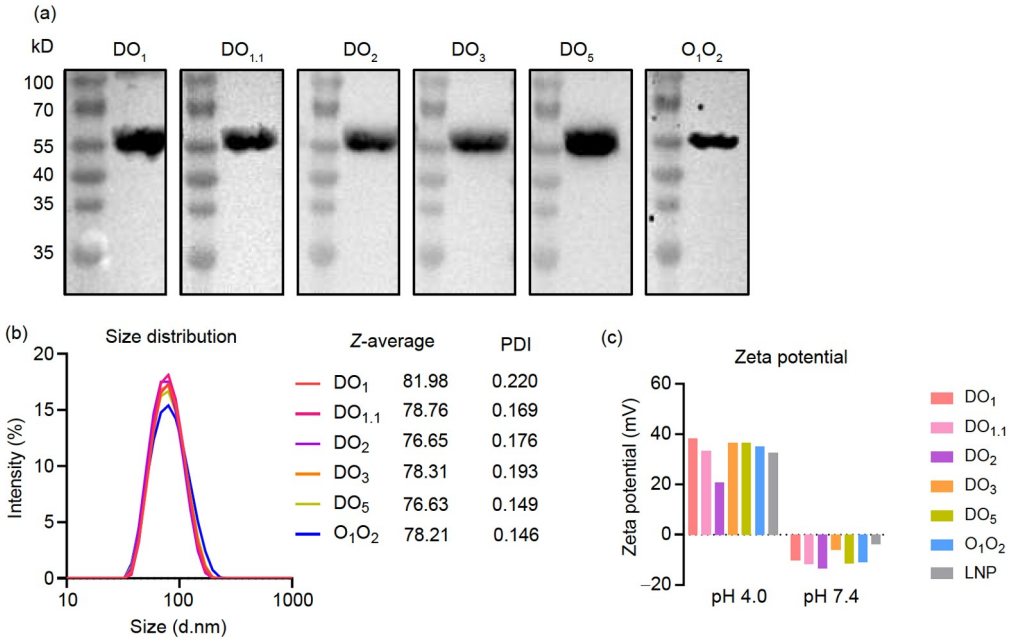


图 2 6种mRNA疫苗体外表达及质量验证. (a) 6种mRNA疫苗转染HEK293T细胞上清Western blot检测结果. (b) mRNA-LNP粒径分布动态光散射结果. 右侧两列数字分别表示平均值及PDI值. (c) mRNA-LNP分别在pH 4.0和7.4时的Zeta电位, 该图展示了两次独立重复实验中的一次结果

Figure 2 *In vitro* characterization of six mRNA vaccines. (a) *In vitro* expression of six RBD dimer mRNAs after being transfected into HEK293T cells. Expression of dimeric RBDs in the supernatant was analyzed by Western blot. (b) Particle size distributions of mRNA-LNPs characterized by dynamic light scattering (DLS). Numbers in legend indicate Z-average and PDI. (c) Zeta potential for mRNA-LNPs at pH 4.0 and 7.4. For (b) and (c), one representative result from two independent experiments is shown

14天)mRNA疫苗(每剂5 μg/只)或LNP. 血清样本分别在两次免疫后14天(第14、28天)采集(图3(a)). 一方面, 我们用ELISA检测了血清中特异性结合14种SARS-CoV-2 RBD(PT、Delta、BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.2.12.1、BA.2.75、BA.3、BA.5、BF.7、BQ.1.1、CH.1.1、XBB和XBB.1.5)的IgG终点滴度. 与LNP对照相比, 在第一次免疫后, 6种疫苗针对多种RBD都激发了高水平的特异性IgG. 第28天时, IgG滴度进一步提高, 相比第14天时提高了约1~2个数量级(图3(b)). 另一方面, 我们还通过假病毒中和试验得到的几何平均滴度(geometric mean titer, GMT)揭示了不同疫苗之间中和抗体谱的显著差异. 在6种疫苗中, 5种DO型疫苗组的血清中均含有高水平针对PT、BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.2.12.1、BA.2.75、BA.3、BA.5和BF.7的中和抗体, 相较于O_1O_2表现出更为广泛的中和谱. O_1O_2诱导的针对BA.5(GMT: 294)和BF.7(GMT: 102)的中和抗体较少, 且没有针对PT和Delta的有效中和抗体(图3(c)). 该结果表明, Delta-Omicron型RBD嵌合疫苗优于仅含有Omicron RBD(BA.1或BA.2)的疫苗, 突出表明了在免疫原中保留Delta RBD的必要性. 值得注意的是, DO_5对近期出现的变异株BA.5(GMT: 9597)、BF.7(GMT: 5530)、BQ.1(GMT: 1968)、BQ.1.1(GMT: 1517)、CH.1.1(GMT: 467)、XBB(GMT: 184)和XBB.1.5(GMT: 310)表现出相对较好的中和作用(图3(c)). 与DO_5相比, DO_2可对早期出现的SARS-CoV-2变异株表现出更好的免疫原性, 包括PT(GMT: 1774/1153, 以下按DO_2/DO_5排序)、Delta(GMT: 3469/2998)、BA.1(GMT: 14946/1774)、BA.1.1(GMT: 13234/1186)、BA.2(GMT: 17222/3772)、BA.2.12.1(GMT: 21555/5308)、BA.2.75(GMT: 2569/1521)和BA.3(GMT: 9997/1500)(图3(c), (d)). 这一实验结果显示, DO_2和DO_5对于不同的变异株具有各自的优势. 此外, 我们使用酶联免疫斑点(ELISpot)法评估了6种疫苗的细胞免疫水平(图3(e)), 发现不同变异株RBD(PT、Delta、BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.2.12.1、BA.2.75、BA.3和BA.5)肽库刺激后, 第21天小鼠脾细胞均产生IFN-γ^+斑点, 表明所有6种嵌合mRNA疫苗都能诱导高水平的细胞免疫应答, 且不同组别之间无显著差异.

2.3 RBD二聚体mRNA疫苗作为序贯加强针的免疫原性评价

为检验mRNA疫苗作为序贯加强针的免疫原性,

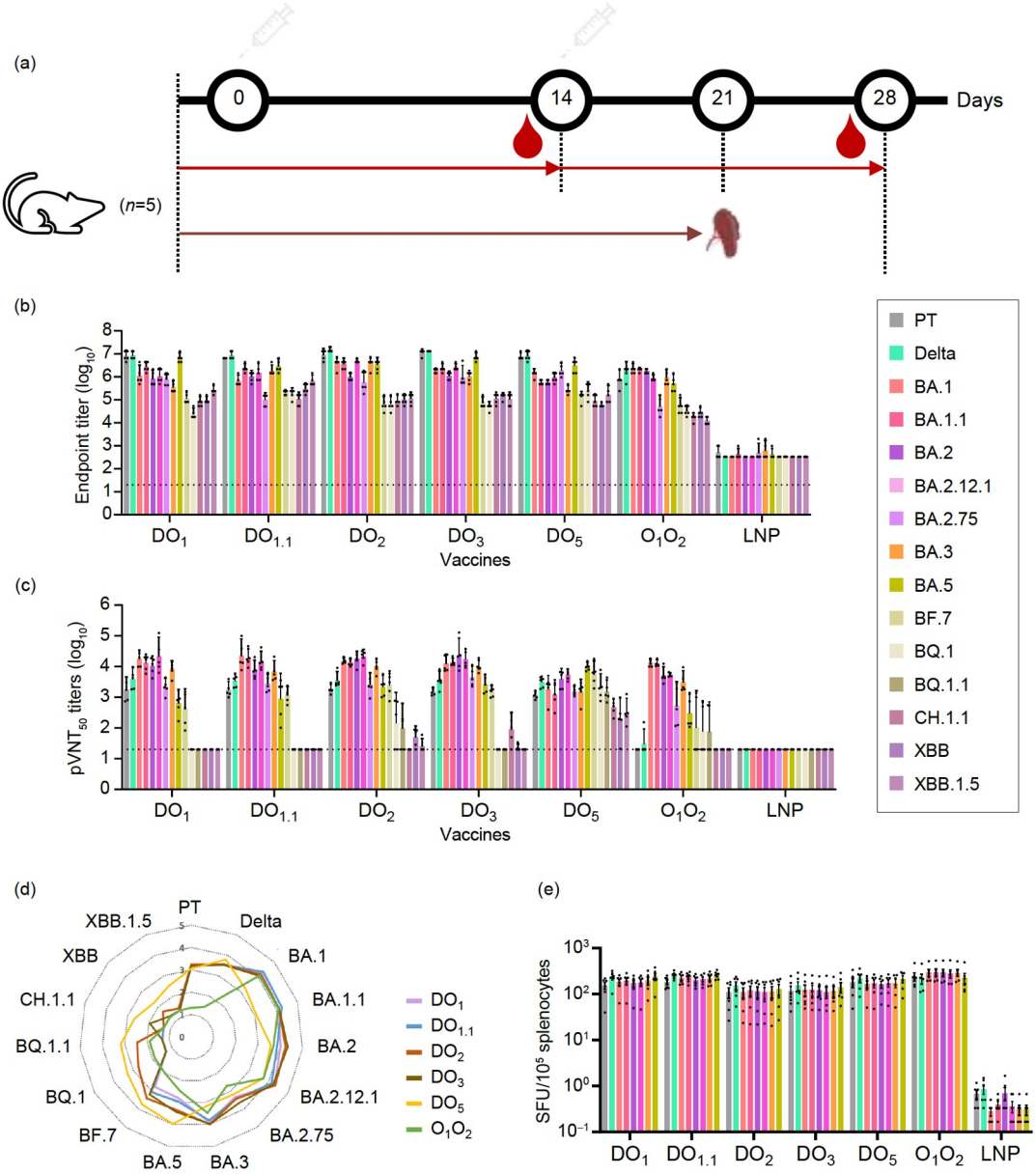


图 3 RBD二聚体mRNA疫苗免疫原性评价. (a) 小鼠免疫及取样时间点. (b) 第28天血清中针对变异株RBD特异性结合抗体滴度, 虚线表示起始稀释梯度. (c) 第28天血清中针对变异株假病毒的中和抗体NT_{50}, 虚线表示起始稀释梯度, 数据均表示为GMT±95%置信区间(CI). (d) 根据第28天血清中和抗体GMT值绘制雷达图, 雷达图边缘以顺时针标注变异株假病毒名称, 各组以不同颜色的封闭图形表示在中央. (e) ELISPOT测定第21天变异株RBD肽库刺激下分泌IFN-γ阳性细胞数. 数据以平均值 ± SEM(平均值标准误差)表示. 经Mann-Whitney检验计算差异有统计学意义(*, P<0.05; **, P<0.01). 图中所示结果为两次独立实验中的一次结果

Figure 3 Evaluation of immunogenicity of the six RBD dimer mRNA vaccines. (a) Mice immunization and sample collection schedule. (b) Titers of IgG specific to the RBD of the indicated SARS-CoV-2 variants at day 28. Dashed line indicates starting dilution factor. (c) NT50 of neutralizing antibody against the pseudotyped viruses (pVirus) of indicated SARS-CoV-2 variants. Dashed line indicates starting dilution factor. All data are shown as GMT ±95% confidential interval (CI). Pseudotyped virus neutralization assays were repeated twice. (d) Radar chart drawn based on indicated GMT. GMTs are represented by colored polygons in the radar chart. The name of the SARS-CoV-2 pseudotyped viruses are indicated clockwise on the edge. (e) ELISpot assay quantifying the IFNγ-secreting splenocytes after re-stimulation by the indicated peptide pool. Data are shown as means ± SEM (standard error of the mean). Statistical significances were calculated by Mann-Whitney test (*, P<0.05; **, P<0.01). Data represent one of two independent experiments.

我们首先以21天的间隔为Balb/c小鼠(n=5)免疫了两剂基于原型株设计的灭活疫苗(IV_{PT})(每剂2.6 U/只). 然后在第42天分别使用4种mRNA疫苗(DO_1、DO_2、DO_3和DO_5)作为加强针进行序贯免疫(每剂10 μg/只)(图4(a)).

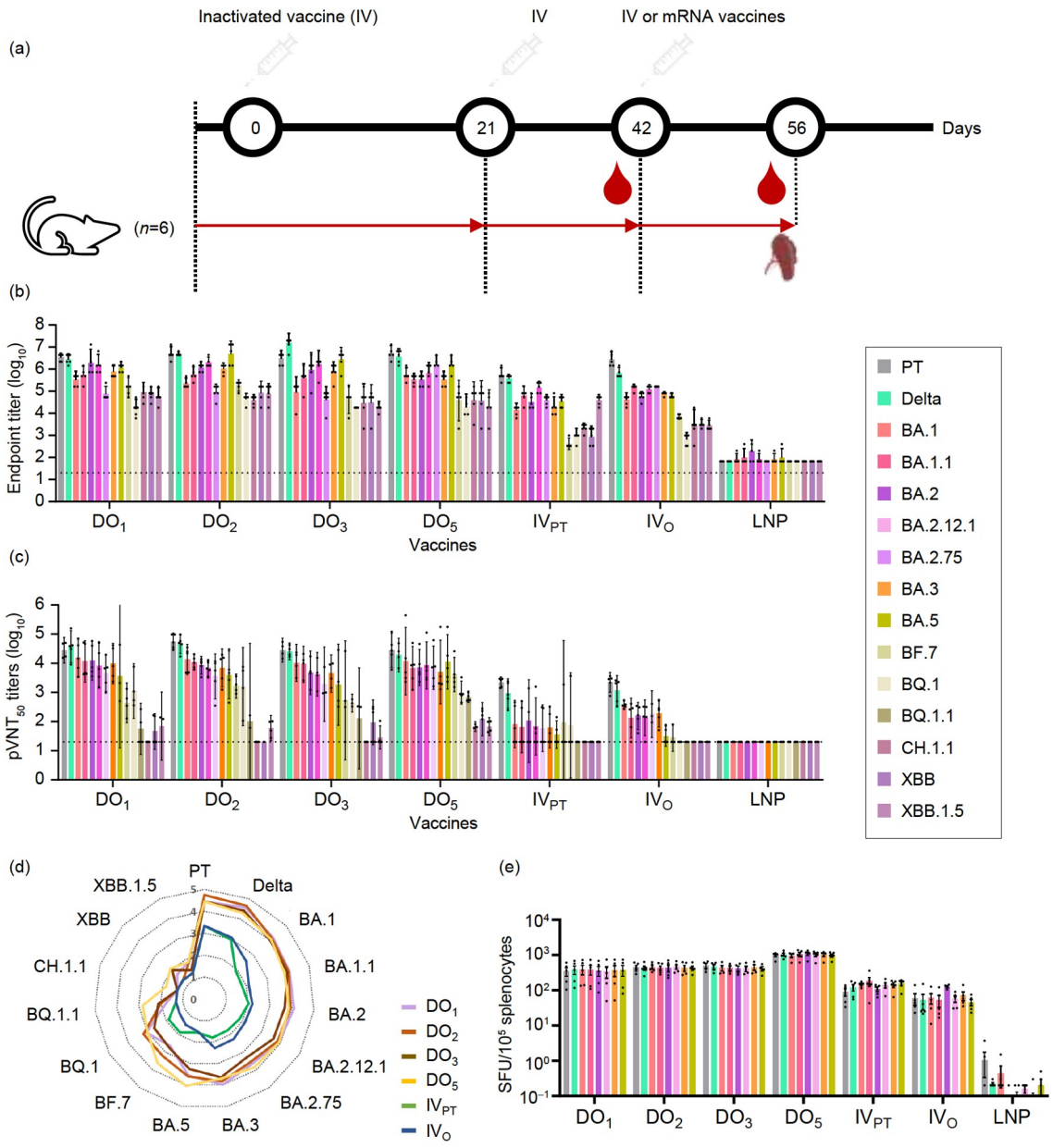


图 4　RBD二聚体mRNA疫苗作为序贯加强针免疫原性评价. (a) 小鼠免疫及取样时间点. (b) 使用图示mRNA疫苗或灭活疫苗加强免疫后针对变异株RBD特异性IgG滴度. 数据均以GMT±95% CI表示. (c) 使用mRNA疫苗或灭活疫苗加强免疫后针对变异株假病毒的中和抗体的NT50. 数据均展示为GMT±95% CI, 虚线表示起始稀释梯度. (d) 根据血清中和抗体GMT值绘制的雷达图. 雷达图边缘以顺时针标注变异株假病毒名称, 各组以不同颜色的封闭图形表示在中央. (e) ELISpot测定加强免疫后14天变异株RBD肽库刺激下分泌IFN-γ阳性细胞数. 数据以平均值±SEM (平均值标准误差) 表示. 经Mann-Whitney检验计算差异有统计学意义(*, P<0.05; **, P<0.01). 图中所示结果为两次独立实验中的一次结果

Figure 4　Evaluation of immunity of the Delta-Omicron mRNA vaccines as boosters. (a) Mice immunization and sample collection schedule for booster immunization. (b) Titers of IgG specific to the RBD of the indicated SARS-CoV-2 variants before and after the booster immunization with indicated mRNA or IV vaccine. Data are shown as GMT±95% CI. (c) NT50 of neutralizing antibody against the pseudotyped virus of the indicated SARS-CoV-2 variants. Data are shown as GMT±95% CI. Dashed line indicates starting dilution factor. (d) Radar chart drawn based on indicated GMT. GMTs are represented by colored polygons in the radar chart. The name of the SARS-CoV-2 pseudotyped viruses are indicated clockwise on the edge. (e) ELISpot assay quantifying the IFNγ-secreting splenocytes after re-stimulation by the indicated peptide pool. Data are shown as means±SEM (standard error of the mean). Statistical significances were calculated by Mann-Whitney test (*, P<0.05; **, P<0.01). Data represent one of two independent experiments

此外，还使用基于原型株或BA.1(IV_O)设计的灭活疫苗作为加强针进行对照，使用注射两剂铝佐剂后第三剂注射LNP组别作为阴性对照．序贯免疫后14天(第56天)，收集各组小鼠血清和脾细胞样本，分别用于体液

免疫原性和细胞免疫原性评价(图4(a)). 与两种灭活疫苗相比, 4种mRNA疫苗诱导的RBD特异性IgG滴度提高约1个数量级(图4(b)). 在假病毒中和实验结果中, mRNA疫苗也显示出更高的免疫原性, 其诱导的中和抗体滴度比灭活疫苗组提高1~2个数量级(图4(c)). 与IV_{PT}组相比, 接种基于BA.1免疫原的灭活疫苗(IV_O)组别对几种Omicron变异株(BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.1.12.1、BA.2.75和BA.3)的中和抗体滴度更高, 但仍低于接种mRNA疫苗组别. 该数据表明, 4种mRNA疫苗可以作为灭活疫苗的序贯加强针, 且在此情况下具有比灭活疫苗更强的诱导体液免疫的能力(图4(c), (d)). 作为灭活疫苗的加强针, DO_5对BA.5、BF.7、BQ.1、BQ.1.1和XBB的中和作用优于DO_2, 但针对早期出现的变异株的中和效果弱于DO_2. 这一结果与前文所述mRNA疫苗免疫原性实验结果相符. 此外, ELISpot结果同样表明, 作为加强针的mRNA疫苗引发了相比灭活疫苗更强的细胞免疫反应. DO_1、DO_2、DO_3及DO_5诱导的IFN-γ^+斑点数量明显高于灭活疫苗诱导的IFN-γ^+斑点数量(图4(e)). 值得关注的是, 作为加强针时, DO_5作为加强针引起的细胞免疫应答明显强于DO_2, 这与两剂mRNA疫苗引起的细胞免疫应答不一致(图4(e)). 综上, 4种RBD二聚体mRNA疫苗适合作为两剂灭活疫苗后的加强针, 且在免疫原性及广谱性上相比灭活疫苗具有优势.

2.4 RBD二聚体mRNA疫苗混合免疫策略的设计及评价

在两针mRNA疫苗免疫以及灭活疫苗序贯免疫时, DO_2和DO_5疫苗诱导产生抗体的中和谱均呈现出互补的趋势. DO_2诱导的抗体对先于BA.5出现的SARS-CoV-2变异株(包括PT、Delta、BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.2.12.1、BA.2.75和BA.3)表现出最佳的中和谱, 但对BA.5、BF.7、BQ.1、BQ.1.1、CH.1.1、XBB和XBB.1.5的中和弱于DO_5诱导的抗体. 这一趋势与DO_2和DO_5的免疫原组成相符合. 在免疫过程中同时引入Delta、BA.2和BA.5免疫原可能会同时具备DO_2和DO_5的中和抗体谱, 从而获得广谱疫苗. 因此, 我们设计了将DO_2与DO_5疫苗进行混合免疫的策略.

为评价混合策略(以下简称为DO_2+DO_5)的免疫原性, 我们使用DO_2、DO_5(剂量5 μg/只)和DO_2+DO_5(2.5 μg DO_2+2.5 μg DO_5)及LNP, 在第0、14天免疫Balb/c小鼠(n=5), 在第28天采集血清并检测了各组血清针对15种假病毒(PT、Delta、BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.2.12.1、BA.2.75、BA.3、BA.5、BF.7、BQ.1、BQ.1.1、CH.1.1、XBB和XBB.1.5)的中和抗体滴度. 结果显示, DO_2+DO_5组与DO_2或DO_5组相比, 表现出了更宽的中和抗体谱, 表明了该策略确实能够优化疫苗的广谱性(图5(a), (b)). 然而, DO_2+DO_5组尚不能有效中和CH.1.1、XBB和XBB.1.5变异株假病毒(GMT: 217/53/329). 为了解决该问题, 我们在第二次接种疫苗两个月后, 进一步注射了第3剂(5 μg/只). 对3次免疫后14天采集得到的血清进行假病毒中和实验表明, 每组在三免后均显著增强了对CH.1.1、XBB和XBB.1.5的中和作用, 依次为DO_5(GMT: 2821/4571/3541)、DO_2 + DO_5(GMT: 2035/2353/2440)和DO_2(GMT: 579/805/757)(图5(d), (e)), 说明在第3次免疫后, 这些mRNA疫苗可对高度逃逸的Omicron变异株产生较好中和效果. 此外, ELISpot检测显示, DO_2+DO_5组在肽库刺激下也能诱导出与DO_2或DO_5疫苗相似水平的IFN-γ^+细胞数, 表明该种策略同样能诱导强效的细胞免疫(图5(c)). 综上, DO_2+DO_5的混合免疫策略能够有效提高疫苗的广谱性, 且通过三针免疫能够实现对CH.1.1、XBB和XBB.1.5变异株的高效中和.

3 结论与讨论

截至2023年6月, BQ、XBB系列变异株仍在持续传播. 有研究表明, 在接种过疫苗或感染康复者的血清中, 针对BQ.1、BQ.1.1及XBB的中和抗体滴度显著降低. 该研究检测了接种过3针或4针PT疫苗、在3针PT疫苗基础上加强免疫PT或BA.5二价mRNA疫苗, 以及感染BA.2或BA.5的康复者血清, 发现其中和滴度从针对D614株的7687-24970分别降低至139-1644(BQ亚型)和108-243(XBB亚型), 表明BQ和XBB亚型的存在对当前的COVID-19疫苗和抗体效果构成了严重威胁. 新型变异株越来越强的免疫逃逸能力使得人们对目前广泛使用的疫苗有效性感到担忧, 研发针对多种Omicron变异株有效的广谱疫苗至关重要.

本研究系统性地分析了6种RBD二聚体mRNA疫苗的免疫原性. 结果表明, 4种Delta-Omicron构型的RBD二聚体mRNA疫苗作为加强针可以诱导出显著高于灭活疫苗的抗体水平, 并能够激发极高的细胞免疫水平. 其中, DO_2和DO_5诱导的抗体分别针对BA.2及之前和BA.5及之后出现的新冠病毒变异株表现出相对更好的中和活性, 二者的中和抗体谱表现出一定的互补

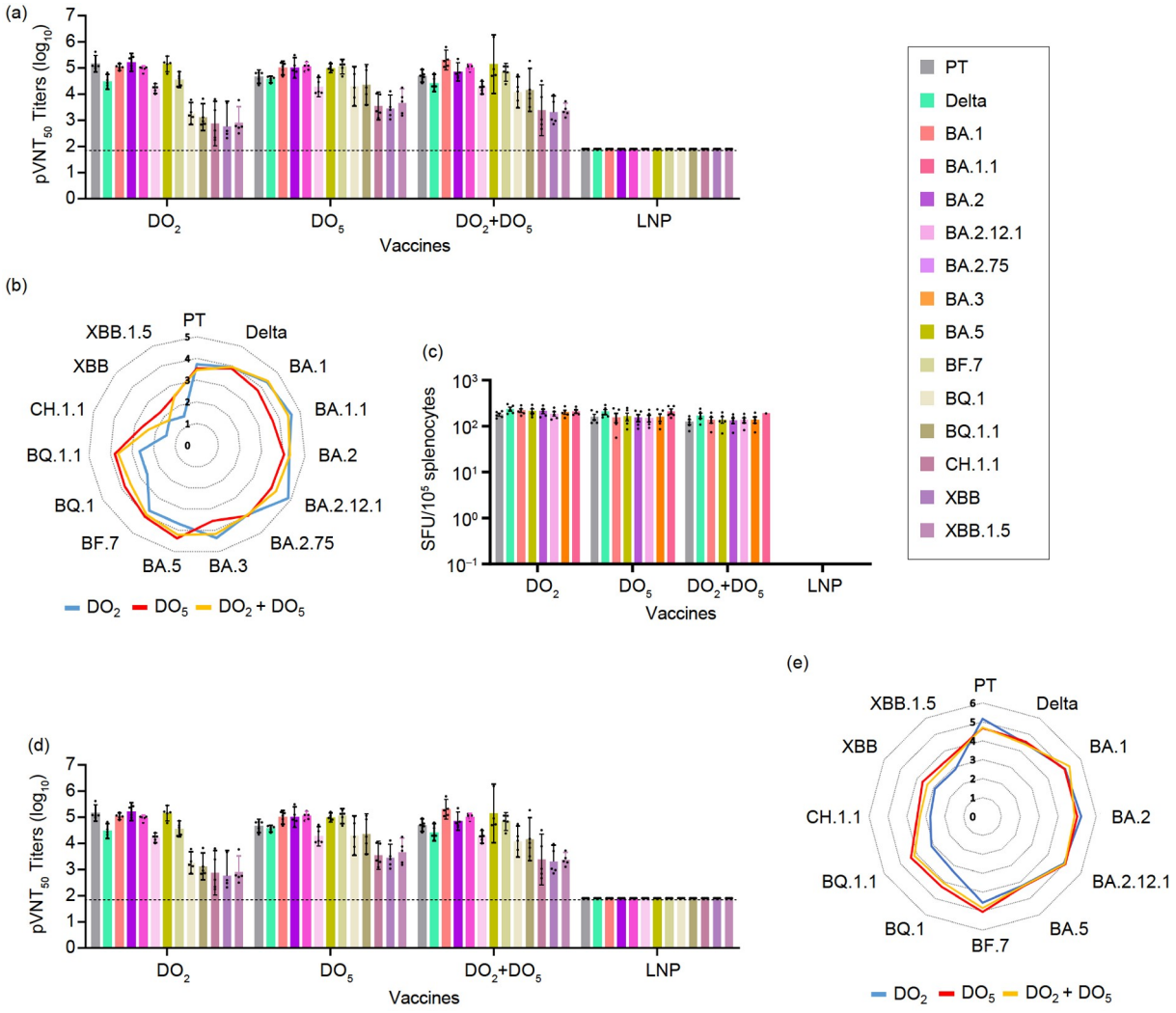


图 5 RBD二聚体mRNA疫苗混合策略免疫原性评价. (a), (d) 二免及三免后14天小鼠血清中针对变异株假病毒(pVirus)的中和抗体NT50. (b), (e) 根据二免及三免后中和抗体GMT值绘制雷达图. 所有数据均以GMT±95%置信区间(CI)表示. 假病毒中和试验均重复两次. (c) ELISpot检测变异株肽库刺激下分泌IFN-γ阳性的脾细胞数量. 数据均以平均值±SEM(平均值标准误差)表示

Figure 5 Evaluation of the immunity of the cocktail mRNA vaccines. (a), (d) NT50 of neutralizing antibody against the pseudotyped viruses (pVirus) of indicated SARS-CoV-2 variants. All data are shown as GMT±95% confidence interval (CI). Pseudotyped virus neutralization assays were repeated twice. (b), (e) Radar charts drawn based on GMT. (c) ELISpot assay quantifying the IFNγ-secreting splenocytes after re-stimulation by the indicated peptide pool. Data are shown as means ± SEM (standard error of the mean)

性. 这一发现与Omicron变异株的抗原性的研究相一致[28], 即BA.5代表了Omicron演化中的一个新的阶段, 其RBD上出现的新型突变位点(如F486V)导致其抗原性相比BA.2有较大变化, 表现为相比BA.2显著提升的免疫逃逸能力. 因此, 我们进一步设计了一种由DO_2+DO_5构成的二价疫苗, 通过DO_2和DO_5免疫原性的互补, 获得了针对PT、Delta及多种Omicron变异株(BA.1、BA.1.1、BA.2、BA.2.12.1、BA.2.75、BA.3、BA.5、BF.7、BQ.1、BQ.1.1、CH.1.1、XBB、XBB.1.5)的广谱免疫原性. 同时, 通过3针免疫进一步提升了免疫原性, 可诱导针对CH.1.1、XBB、XBB.1.5等强免疫逃逸的变异株的高水平中和抗体. 以上实验结果充分展现了DO_2、DO_5及DO_2+DO_5疫苗的免疫原性, 以及DO_2+DO_5疫苗混合接种的价值.

目前, 对于新变异株的出现尚未有非常好的预测方法, 因此一旦新发变异株出现了传播优势, 就需要迅速验证现有疫苗效果, 并根据结果更新疫苗. 疫苗的免疫原设计是决定其广谱性的关键, 设计包含多种免疫原的二价或多价疫苗是提高疫苗广谱性的常用策略. 本研究中的RBD二聚体设计可以结合两种RBD的优

点, 拓宽疫苗的保护范围, 使用混合免疫策略则可以增加更多免疫原从而激发针对更多变异株的中和抗体, 为新疫苗的开发提供高度灵活性.

值得注意的是, 本研究的实验结果显示, 预先接种的灭活苗可能削弱作为加强针接种的DO型疫苗诱导的针对Omicron系列变异株的中和抗体. 这一现象可能是由于Omicron突破感染后主要唤起SARS-CoV-2 PT感染诱导的记忆B细胞的结果[28], 其潜在机制值得进一步研究. 由于时间和资源有限, 在本实验中无法使用活病毒进行动物实验. 后续应采用多种SARS-CoV-2变异株活病毒感染接种过疫苗的小鼠, 以进一步检验RBD二聚体mRNA疫苗的保护效果.

综上, 本研究系统性地评估了6种RBD二聚体构型的mRNA疫苗在不同免疫程序下的免疫原性. 数据显示DO_2、DO_5及DO_2+DO_5均可作为提供广谱保护效果的候选疫苗, 能够激发针对多种Omicron变异株的高水平中和抗体, 并揭示了不同RBD组合疫苗中和抗体谱区别. 这些广谱疫苗有潜力用于未接种疫苗人群三针免疫或作为加强疫苗进行接种, 为COVID-19疫苗的未来设计提供了有价值的信息.

参考文献

1 Hadj Hassine I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. Rev Med Virol, 2022, 32: e2313
2 Wang H, Zhang Y, Huang B, et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. Cell, 2020, 182: 713–721.e9
3 Gao Q, Bao L, Mao H, et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. Science, 2020, 369: 77–81
4 Jin L, Li Z, Zhang X, et al. CoronaVac: A review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against SARS-CoV-2. Hum Vaccines ImmunoTher, 2022, 18: 2096970
5 Stebbings R, Armour G, Pettis V, et al. AZD1222 (ChAdOx1 nCov-19): A single-dose biodistribution study in mice. Vaccine, 2022, 40: 192–195
6 Feng L, Wang Q, Shan C, et al. An adenovirus-vectored COVID-19 vaccine confers protection from SARS-COV-2 challenge in rhesus macaques. Nat Commun, 2020, 11: 4207
7 Rossi A H, Ojeda D S, Varese A, et al. Sputnik V vaccine elicits seroconversion and neutralizing capacity to SARS-CoV-2 after a single dose. Cell Rep Med, 2021, 2: 100359
8 Stephenson K E, Le Gars M, Sadoff J, et al. Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19. JAMA, 2021, 325: 1535–1544
9 Sunagar R, Prasad S D, Ella R, et al. Preclinical evaluation of safety and immunogenicity of a primary series intranasal COVID-19 vaccine candidate (BBV154) and humoral immunogenicity evaluation of a heterologous prime-boost strategy with COVAXIN (BBV152). Front Immunol, 2022, 13: 1063679
10 An Y, Li S, Jin X, et al. A tandem-repeat dimeric RBD protein-based Covid-19 vaccine zf2001 protects mice and nonhuman primates. Emerging Microbes Infects, 2022, 11: 1058–1071
11 Heath P T, Galiza E P, Baxter D N, et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine. N Engl J Med, 2021, 385: 1172–1183
12 Wang X Y, Mahmood S F, Jin F, et al. Efficacy of heterologous boosting against SARS-CoV-2 using a recombinant interferon-armed fusion protein vaccine (V-01): A randomized, double-blind and placebo-controlled phase III trial. Emerging Microbes Infects, 2022, 11: 1910–1919
13 Arzumanyan V G, Bystritskaya E P, Kolyganova T I, et al. Antimicrobial activity of the serum before and after vaccination with EpiVacCorona. Bull Exp Biol Med, 2022, 173: 354–360
14 Tian J H, Patel N, Haupt R, et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. Nat Commun, 2021, 12: 372
15 Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. N Engl J Med, 2021, 384: 403–416
16 Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. N Engl J Med, 2020, 383: 2603–2615
17 Xu K, Lei W, Kang B, et al. A novel mRNA vaccine, SYS6006, against SARS-CoV-2. Front Immunol, 2022, 13: 1051576
18 Liu X, Li Y, Wang Z, et al. Safety and superior immunogenicity of heterologous boosting with an RBD-based SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Chinese adults. Cell Res, 2022, 32: 777–780
19 Gui Y Z, Li X N, Li J X, et al. Safety and immunogenicity of a modified COVID-19 mRNA vaccine, SW-BIC-213, as a heterologous booster in healthy adults: an open-labeled, two-centered and multi-arm randomised, phase 1 trial. eBioMedicine, 2023, 91: 104586
20 Ai J, Wang X, He X, et al. Antibody evasion of SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.1.1, BA.2, and BA.3 sub-lineages. Cell Host Microbe, 2022, 30: 1077–1083.e4
21 Zhao X, Zhang R, Qiao S, et al. Omicron SARS-CoV-2 neutralization from inactivated and ZF2001 vaccines. N Engl J Med, 2022, 387: 277–280
22 Dai L, Zheng T, Xu K, et al. A universal design of betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. Cell, 2020, 182: 722–733.e11

23 Xu K, Gao P, Liu S, et al. Protective prototype-Beta and Delta-Omicron chimeric RBD-dimer vaccines against SARS-CoV-2. Cell, 2022, 185: 2265–2278.e14
24 Han Y, An Y, Chen Q, et al. mRNA vaccines expressing homo-prototype/Omicron and hetero-chimeric RBD-dimers against SARS-CoV-2. Cell Res, 2022, 32: 1022–1025
25 Chen Q, Du P, Han Y, et al. Rapid evaluation of heterologous chimeric RBD-dimer mRNA vaccine for currently-epidemic Omicron sub-variants as booster shot after inactivated vaccine. BioSaf Health, 2023, 5: 89–100
26 Tuekprakhon A, Nutalai R, Dijokaite-Guraliuc A, et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. Cell, 2022, 185: 2422–2433.e13
27 Chalkias S, Harper C, Vrbicky K, et al. A bivalent Omicron-containing booster vaccine against Covid-19. N Engl J Med, 2022, 387: 1279–1291
28 Cao Y, Yisimayi A, Jian F, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. Nature, 2022, 608: 593–602

Summary for “新冠病毒变异株RBD二聚体mRNA疫苗广谱免疫原性研究”

Evaluation of the broad-spectrum immunogenicity of RBD dimer mRNA vaccines against SARS-CoV-2 variants

Xu Zhao[1†], Xinkai Wu[2†], Pei Du[1], Qian Chen[3], Xuehui Ma[1], Shixiong Hu[4], Chunli Wu[5], Huiting Yang[1], Renyi Ma[1], Shuang Li[1], Tianxiang Kong[6], Ruiqi Li[1,7], Yinghao Feng[1], Xiaoyun Wang[1], Xiaoyu Rong[8], Anqi Zheng[1], Jian Lu[2*], George Fu Gao[1,6,7*] & Qihui Wang[1,5,7,8*]

[1] *CAS Key Laboratory of Pathogen Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*
[2] *School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;*
[3] *Faculty of Health Sciences, University of Macau, Macau 999078, China;*
[4] *College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;*
[5] *School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China;*
[6] *School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;*
[7] *Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*
[8] *School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China*
† Equally contributed to this work
* Corresponding authors, E-mail: luj@pku.edu.cn; gaof@im.ac.cn; wangqihui@im.ac.cn

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the causative agent of coronavirus disease 2019 (COVID-19), has been spreading globally since the end of 2019. During this period, the virus has undergone mutations that led to the emergence of multiple variants with high transmissibility or capability of immune evasion. To prevent the spread of the virus, large-scale vaccination campaigns were conducted in many countries. However, as SARS-CoV-2 continues to mutate, the prevalent COVID-19 vaccines, which were primarily designed using the SARS-CoV-2 prototype (PT) and effectively safeguarded against early SARS-CoV-2 variants, have displayed considerably diminished efficacy against subsequent Omicron sub-variants, especially against the more recent BF.7, BQ.1.1, CH.1.1, XBB, and XBB.1.5 that has higher capability immune escape. Therefore, there is an urgent need to develop a new generation of broad-spectrum vaccines that can generate high levels of neutralizing antibodies against multiple SARS-CoV-2 variants. Previously, our group developed the ZF2001 vaccine with a tandem repeat homodimer of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD), which has been approved in 4 countries and vaccinated over 300 million doses worldwide. To tackle the Omicron variant, we also upgraded the RBD homodimer of ZF2001 vaccine to a Delta-BA.1 chimeric heterodimer and developed protein subunit and mRNA vaccine that both demonstrated potent broad-spectrum immunogenicity against pre-Omicron variants as well as some Omicron sub-variants such as BA.1 and BA.2. With further evolution of Omicron, the prevalent XBB derivatives have displayed severe immune escape to the BA.1 immunogen. Therefore, we aim to further broaden the immunogenicity of RBD dimer vaccines by upgrading the Delta-BA.1 RBD dimer immunogen using the RBDs of more recent Omicron sub-variants. In this study, we developed six novel RBD dimer mRNA vaccines, each incorporating an RBD dimer consisting of Delta RBD or the RBD from specific Omicron sub-variants such as BA.1, BA.2, or BA.5. By systematically evaluating the expression and immunogenicity of these RBD dimer mRNA vaccines, we validated their immunogenicity and potential as booster shots following two doses of inactivated vaccine, as these vaccines demonstrated potent humoral and cellular immunogenicity against a wide range of SARS-CoV-2 variants. Notably, the neutralization antibodies elicited by Delta-BA.2 (DO_2) and Delta-BA.5 (DO_5) vaccines showed complementary spectra of neutralization. In other words, DO_2 and DO_5 are more effective against SARS-CoV-2 variants that emerged before BA.2 and after BA.5, respectively. Thus, we further designed a cocktail vaccine by mixing the DO_2 and DO_5 vaccines, aiming to achieve a more broad-spectrum immunogenicity. Neutralization data showed that the cocktail vaccine successfully expanded the spectrum of immunogenicity compared with the DO_2 or DO_5 vaccine. Moreover, by administering a third booster dose, the DO_5 and DO_2 + DO_5 cocktail vaccines effectively stimulated high levels of neutralizing antibodies targeting CH.1.1, XBB, and XBB.1.5. These findings contribute to our understanding of the spectrum neutralization across diverse variants, offering insights for the development of broad-spectrum COVID-19 vaccines.

SARS-CoV-2, Omicron variant, mRNA vaccine, broad-spectrum vaccine

doi: 10.1360/TB-2023-0629