

# CpG联合铝佐剂增强RBD-Fc重组蛋白诱导小鼠免疫反应效果的研究



开放科学  
(OSID)

任虎<sup>1#</sup>,何远薇<sup>1#</sup>,张亚楠<sup>2#</sup>,李海<sup>1</sup>,郭晋源<sup>1</sup>,张燕<sup>1</sup>,祝双利<sup>1</sup>,  
冀天娇<sup>1</sup>,曹蕾<sup>1\*</sup>,许文波<sup>1\*</sup>

(1. 国家卫生健康委员会医学病毒和病病毒重点实验室,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,世界卫生组织西太平洋地区麻疹/风疹参比实验室,北京102206;2. 北京中医药大学东直门医院,北京102206)

**摘要:**由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)引起的2019冠状病毒病(Coronavirus disease 2019,COVID-19)大流行对全球健康和经济构成了严重威胁,SARS-CoV-2关切变异株(Variants of concern,VOCs)的出现更增加了疫苗研发的难度,因此,优化设计对突变株具有广谱免疫反应的疫苗显得尤为重要。本研究选取具有大量显性中和表位的受体结合域(Receptor-binding domain,RBD)蛋白作为目标抗原,在SARS-CoV-2经典株RBD序列的基础上引入多个VOCs的关键突变位点,将其与人IgG1 Fc片段融合表达,并结合CpG单佐剂、氢氧化铝单佐剂或CpG与氢氧化铝复合佐剂两剂次免疫小鼠,比较CpG联合铝佐剂相比单独使用铝或CpG佐剂诱导细胞免疫和体液免疫反应的增强作用,同时观察小鼠产生抗不同VOCs活病毒的交叉中和抗体滴度。结果显示,与单佐剂相比,RBD-Fc蛋白结合CpG与氢氧化铝复合佐剂免疫小鼠可产生最高的IgG结合抗体及高水平Th1偏向的细胞免疫应答。同时,小鼠血清还可以有效地中和SARS-CoV-2贝塔株(GMT:11143)、德尔塔株(GMT:4850)、经典株(GMT:3675),甚至是奥密克戎BA.1株(GMT:1393)和BA.5株(GMT:459)的感染。这些结果表明含有突变位点的SARS-CoV-2 RBD-Fc重组蛋白具有良好的潜力,联合使用CpG和铝佐剂可明显提高和平衡小鼠的细胞免疫反应,产生对不同SARS-CoV-2高滴度的交叉中和抗体,可作为一种广谱疫苗进一步研究和开发。

**关键词:**RBD-Fc;佐剂;体液免疫;细胞免疫;交叉中和抗体

**中图分类号:**R373.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2023)06-1549-12

**DOI:**10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004412

2019冠状病毒病(Coronavirus disease 2019, COVID-19)是由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)引起的严重全球公共卫生紧急事件。截至2023年8月,世界卫生组织(World Health Organization,WHO)已报告新冠病毒感染确诊病例超过7.7亿例,死亡病例超过695万例<sup>[1]</sup>。针对SARS-CoV-2的疫苗正以前所未有的速度发展,目

前已有几种疫苗获得许可或紧急使用授权,大多是基于SARS-CoV-2经典株所设计。随着疫情的发展,SARS-CoV-2不断进化出Alpha、Beta、Gamma、Delta和Omicron关切变异株(Variant of concern,VOC)。这些突变株一些关键氨基酸位点的突变,可有效的逃避疫苗诱导的对新冠病毒感染的保护,导致免疫逃逸,尤其是降低对VOCs的中和抗体滴度<sup>[2-5]</sup>。由于病毒的传播流行还在继续,这些病毒还在持续的进化,开发具有强免疫原性且可以引起广谱中和活性的候选疫苗需要持续的进行研究。

SARS-CoV-2的S蛋白由S1和S2亚基组成,是病毒粒子的主要表面蛋白。研究表明,S蛋白、S1亚基或RBD抗原可诱导B细胞和T细胞反应,产生针对SARS-CoV-2的高效中和抗体<sup>[6,7]</sup>,且RBD是COVID-19患者恢复期血清中中和抗体的主要靶点,诱导90%的中和活性<sup>[8]</sup>。然而,RBD分子量小,其免疫原性较差,因此在疫苗中的使用受到影响。此外,RBD倾向于形成链间二硫键,在溶液中建立

**收稿日期:**2023-06-13; **接受日期:**2023-09-05

**#共同第一作者:**任虎,何远薇和张亚楠

**基金项目:**国家重点研发计划(项目号:2022YFC2305600),题目:新型冠状病毒预防性鼻喷Ii-key多肽疫苗的研究

**作者简介:**任虎(1994-),男,主要从事呼吸道合胞病毒蛋白疫苗的研究,E-mail:renhucdc@163.com;何远薇(2001-),女,主要从事病毒性亚单位疫苗的研究,E-mail:yuanwei0215@outlook.com;张亚楠(1991-),女,主要从事病毒性亚单位疫苗的研究,E-mail:1148116550@qq.com

**\*通讯作者:**曹蕾(1984-),女,研究员,主要从事呼吸道相关病毒诊断及疫苗的研究,E-mail:caolei@ivdc.chinacdc.cn;许文波(1963-),男,研究员,主要从事病毒相关病原生物学、免疫学、分子流行病学等研究,E-mail:xuwb@ivdc.chinacdc.cn

单体-二聚体平衡,RBD单体和二聚体的免疫原性存在显著差异,RBD二聚体可使中和抗体滴度提高10~100倍<sup>[9]</sup>。将RBD与人IgG的Fc融合表达可使RBD二聚化,增加蛋白的稳定性,并增强与抗原提呈细胞的结合<sup>[10,11]</sup>。重要的是,基于RBD-Fc的疫苗可以提供针对SARS-CoV-2的保护,目前已完成Ⅲ期临床试验评估<sup>[12]</sup>。

除了选择合适的抗原外,亚单位疫苗同样需要选择合适的佐剂,佐剂不仅可以降低抗原剂量,也可以增强疫苗诱导的免疫应答的强度、质量和持久性<sup>[13]</sup>。氢氧化铝佐剂用于大多数病毒抗原疫苗,优先诱导更强的体液免疫,诱导T细胞免疫反应的能力较弱,尤其是1型辅助性T细胞(Type 1 T helper cell, Th1)和细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应<sup>[14-16]</sup>。CpG是一种Toll样受体9(Toll-like receptor 9, TLR9)激动剂,可通过诱导树突状细胞的成熟来增加CD8<sup>+</sup>T细胞的数量,同时诱导Th1型细胞免疫应答<sup>[17]</sup>。然而,CpG易在注射部位扩散,导致有效浓度降低。研究发现,CpG可吸附在氢氧化铝上,避免CpG的扩散,且这种组合增强了树突状细胞的抗原摄取和活化,在注射部位诱导与氢氧化铝类似的炎症反应,但减少了单独由氢氧化铝诱导产生的嗜酸性粒细胞<sup>[18]</sup>。目前,含有CpG与氢氧化铝复合佐剂的基于SARS-CoV-2 S蛋白的亚单位疫苗已完成Ⅱ/Ⅲ期临床试验,结果表明,该疫苗对SARS-CoV-2引起的中度到重度新冠肺炎的疗效为84%,对严重疾病和入院治疗的疗效为100%,证明了这种复合佐剂策略的可行性<sup>[19]</sup>。

在本研究中,将突变的SARS-CoV-2 RBD重组抗原与人IgG1的Fc片段融合表达,经一步亲和纯化后即可获得高纯度的RBD-Fc二聚体蛋白,与CpG和氢氧化铝佐剂配伍后免疫BALB/c小鼠,产生了针对经典株(Wild type, WT)、贝塔突变株(Beta)、德尔塔突变株(Delta),甚至是奥密克戎突变株(Omicron BA.1和BA.5)的高中和抗体滴度。同时,这种组合诱导了高水平及Th1偏向的细胞免疫反应。

## 材料与amp;方法

### 1 病毒、细胞和伦理

SARS-CoV-2 WT/lineage B株(Hub01)、Beta/B.1.351株(GD2021)、Delta/B.1.617.2株(CQ2021)和Omicron/BA.5株(TJ7-046)由中国疾病预防控制中心

制中心病毒病预防控制所分离和储存。SARS-CoV-2 Omicron/BA.1株(Omi-2)由香港大学提供。Vero细胞由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所储存。SARS-CoV-2毒株由Vero细胞制备,并通过TCID<sub>50</sub>方法测定储存的滴度。在中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所BSL-3实验室进行病毒扩增、滴度测定和小鼠血清中和试验。本研究所有动物实验操作均符合中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所动物实验伦理检查的要求(编号:20210507034)。动物试验研究严格按照《实验室动物护理和使用指南》中的建议进行。

### 2 主要试剂

EXPI293细胞购自Thermo Fisher公司;HiTrap MabSelect Prism A纯化柱购自Cytiva公司;蛋白预制胶购自金斯瑞生物科技;QuickBlue快速染胶液购自苏州博特龙免疫技术有限公司;一步法Ultra TMB Blotting溶液购自Thermo Fisher公司;氢氧化铝佐剂购自Croda公司;CpG ODN佐剂由华普生物技术(江苏)股份有限公司合成提供;BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;HRP结合抗人和抗小鼠IgG抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;小鼠IFN- $\gamma$ 、IL-2和IL-4预包被ELISpot试剂盒及SARS-CoV-2经典株S蛋白肽库购自Mabtech公司;小鼠淋巴细胞分离液购自北京达科为生物技术有限公司;植物血凝素(Phytohaemagglutinin, PHA)购自北京索莱宝科技有限公司。

### 3 蛋白表达与纯化

RBD序列来源于SARS-CoV-2经典株S蛋白(319~541)(GenBank:MN908947.3),在此基础上,进行了四个氨基酸的突变(K417T、L452R、E484K和N501Y)。为使重组蛋白分泌表达,在突变RBD的氨基端加入SARS-CoV-2经典株S蛋白的分泌肽。同时,在突变RBD的羧基端加入人IgG1 Fc序列以提高重组蛋白的免疫原性,两者之间以柔性linker“GGGSGGGSGGG”连接。密码子优化后将重组蛋白RBD-Fc核苷酸序列连接到表达载体pcDNA3.4中,瞬时转染EXPI293悬浮细胞。在质粒转染后的第3 d收集细胞培养上清液,并通过HiTrap MabSelect PrismA纯化柱进行纯化。

### 4 重组蛋白RBD-Fc的SDS-PAGE和Western Blot分析

对于SDS-PAGE,将纯化的蛋白质样品与加或不加还原剂二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)的

SDS上样缓冲液混匀,在95℃下加热5 min,使用蛋白预制胶进行凝胶电泳。凝胶用快速染液染色。对于Western Blot,凝胶中的蛋白质被电转到NC膜上。在室温下用含10%胎牛血清的PBS封闭1 h。洗涤后,在室温下将NC膜在HRP结合的抗人IgG抗体(1:5 000稀释)中孵育40 min。清洗NC膜后,用一步法Ultra TMB Blotting溶液进行显色。

## 5 免疫策略

将雌性BALB/c小鼠(6~8周龄)随机分为4组,每组5只。参照表1策略进行0,14 d二剂次免疫,使用剂量均为100 μL。于二免后14 d处死小鼠,取血液和脾脏。收获脾脏后,在无菌条件下,将其剪切、研磨,并通过70 μm细胞过滤器进行处理,通过添加小鼠淋巴细胞分离液分离淋巴细胞。

表1 小鼠分组与免疫策略

Table 1 Mouse grouping and immunization strategy

Groups	RBD-Fc dose	Adjuvant dose	Route of vaccination	Immunization time	Number
1	5 μg	10 μg CpG + 50 μg Al(OH) <sub>3</sub>	i.m.	0, 14 d	5
2	5 μg	10 μg CpG	i.m.	0, 14 d	5
3	5 μg	50 μg Al(OH) <sub>3</sub>	i.m.	0, 14 d	5
4	5 μg	-	i.m.	0, 14 d	5

注:i.m. 肌肉注射。

Notes:i.m. intramuscular injection.

## 6 血清抗体检测

使用酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测量小鼠血清中RBD-Fc蛋白的结合抗体。用PBS将RBD-Fc蛋白稀释至0.5 μg/mL,4℃下在ELISA平板中包被14 h。然后37℃封闭2 h。用PBST(含0.05%吐温20的PBS)洗涤ELISA平板四次,将小鼠血清连续4倍稀释(从1:50稀释开始),转移至ELISA平板,并在37℃下孵育1 h。用PBST洗涤四次后,将HRP结合的抗小鼠IgG二抗以1:5 000稀释,添加到ELISA平板中再孵育1 h。再次洗涤ELISA平板,加入TMB显色10 min后用2 M盐酸终止反应,使用酶标仪在450 nm处测量吸光度。通过GraphPad Prism 8.0.2软件中的四参数曲线拟合确定血清结合抗体滴度(EC<sub>50</sub>)。

使用中和试验检测小鼠血清的中和抗体。将小鼠血清在56℃下热灭活30 min。从1:25稀释度开始,在细胞培养基中制备2倍系列稀释血清样品。将稀释血清与SARS-CoV-2病毒(100 TCID<sub>50</sub>)以100 μL总体积1:1混合。病毒和血清样品的混合物在37℃和5% CO<sub>2</sub>下培养2 h。培养后,在每个孔中加入Vero细胞(1×10<sup>4</sup>个细胞/孔),并在37℃培养箱中培养4~5 d。在显微镜下记录每个孔的细胞病变效应(Cytopathic effect, CPE),并通过Karber方法将中和滴度计算为中和50%病毒感染所需最大稀释度的倒数。

## 7 ELISpot分析

使用小鼠ELISpot试剂盒检测分泌IFN-γ、IL-2或IL-4的淋巴细胞数量。按照说明书的操作,用无菌PBS清洗预包被抗小鼠IFN-γ、IL-2或IL-4单克隆抗体的ELISA平板,然后用含10% FBS的RPMI 1640细胞培养基平衡,将小鼠淋巴细胞(2×10<sup>5</sup>细胞/孔)添加到平板中。将RBD-Fc蛋白(500 ng/孔)和SARS-CoV-2 S蛋白肽库(200 ng/孔)添加到孔中进行刺激。加入PHA作为阳性对照。未经刺激的细胞作为阴性对照。培养42 h后,移除细胞,并用生物素化IFN-γ、IL-2或IL-4检测抗体、HRP结合的链霉亲和素和底物处理平板。当色斑强烈到可以观察时,用去离子水彻底冲洗平板,停止显影。使用自动ELISpot阅读器和图像分析软件确定斑点数量。

所有数据均使用SPSS 27进行分析。使用Kruskal-Wallis检验进行组间差异分析。如果P<0.05,则认为差异显著。

## 结 果

### 1 RBD-Fc蛋白的表达与鉴定

如图1A所示,本研究构建了由SARS-CoV-2 RBD和人IgG1 Fc片段融合表达的RBD-Fc重组蛋白,RBD序列基于SARS-CoV-2经典株产生了4个突变。在EXPI293细胞中表达并用亲和层析纯化后,可获得高产量且具有较高纯度的RBD-Fc重组

蛋白。使用SDS-PAGE在还原和未还原条件下对RBD-Fc重组蛋白进行了表征。如图1B所示,在还原条件下观察到分子量约65 kDa的条带,而

在未还原条件下则观察到约130 kDa的条带,Western Blot显示结果与SDS-PAGE相同(图1C)。

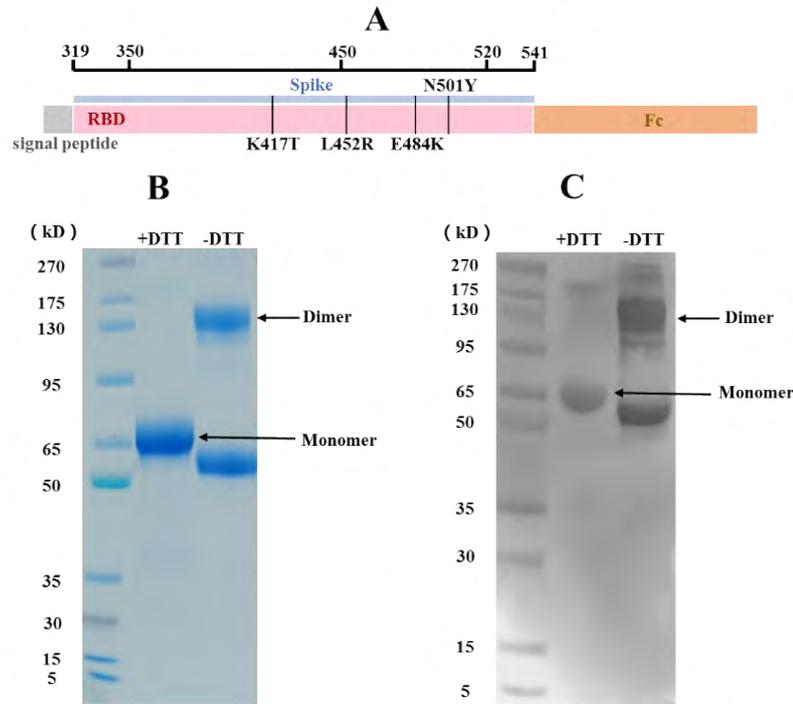


图1 RBD-Fc蛋白的表达与鉴定

注:A. 构建重组RBD-Fc蛋白的示意图;B. 重组RBD-Fc蛋白的SDS-PAGE分析;C. 重组RBD-Fc蛋白的Western Blot分析。

Figure 1 Expression and identification of RBD-Fc protein

Notes: A. Schematic diagram of construction of recombinant RBD-Fc protein; B. SDS-PAGE analysis of recombinant RBD-Fc protein; C. Western Blot analysis of recombinant RBD-Fc protein.

## 2 RBD-Fc蛋白结合氢氧化铝和CpG佐剂可诱导高滴度的抗SARS-CoV-2抗体

为了研究RBD-Fc重组蛋白结合不同佐剂诱导的体液免疫反应,对各组小鼠产生的血清结合抗体进行评估。结果表明,RBD-Fc蛋白结合CpG和氢氧化铝佐剂组诱导产生IgG结合抗体的平均滴度最高(GMT:43488),显著高于CpG佐剂组(GMT:740)和无佐剂组(GMT:408),也高于氢氧化铝佐剂组(GMT:3480)(差异无统计学意义)(图2A)。

根据结合抗体的滴度,本研究选取RBD-Fc蛋白结合CpG和氢氧化铝佐剂组的小鼠血清来测定针对SARS-CoV-2 Beta株、WT株、Delta株、Omicron BA.1株和Omicron BA.5株的中和抗体滴度。结果显示,针对Beta株的中和抗体滴度最高(GMT:11143),显著高于Omicron BA.1株(GMT:1393)和Omicron BA.5株(GMT:459),也高于WT株(GMT:3675)和Delta株(GMT:4850)(差异无统计学意义)(图2B)。

## 3 RBD-Fc蛋白结合氢氧化铝和CpG佐剂诱导高效的细胞免疫反应

为了研究RBD-Fc重组蛋白结合不同佐剂诱导的细胞免疫反应,在二免后14天取小鼠脾细胞,用蛋白和多肽特异性刺激后检测Th1(IFN- $\gamma$ 和IL-2)和Th2(IL-4)细胞免疫反应。蛋白刺激的结果表明,RBD-Fc蛋白结合CpG和氢氧化铝佐剂组诱导分泌IFN- $\gamma$ 和IL-2的细胞显著高于CpG佐剂组和无佐剂组,也高于氢氧化铝佐剂组(差异无统计学意义)(图3A和3B)。然而,在分泌IL-4的细胞中,氢氧化铝佐剂组最高,显著高于CpG佐剂组和无佐剂组,也高于CpG与氢氧化铝复合佐剂组(差异无统计学意义)(图3C)。同时,结果还显示,RBD-Fc蛋白结合CpG和氢氧化铝佐剂组分泌IFN- $\gamma$ 和IL-2的细胞与分泌IL-4的细胞的比值均最高(图3D和3E)。多肽特异性刺激的结果也显示,RBD-Fc蛋白结合CpG和氢氧化铝佐剂组分泌IFN- $\gamma$ 和IL-2的细胞与分泌IL-4的细胞的比值均最高(图3I和3J)。

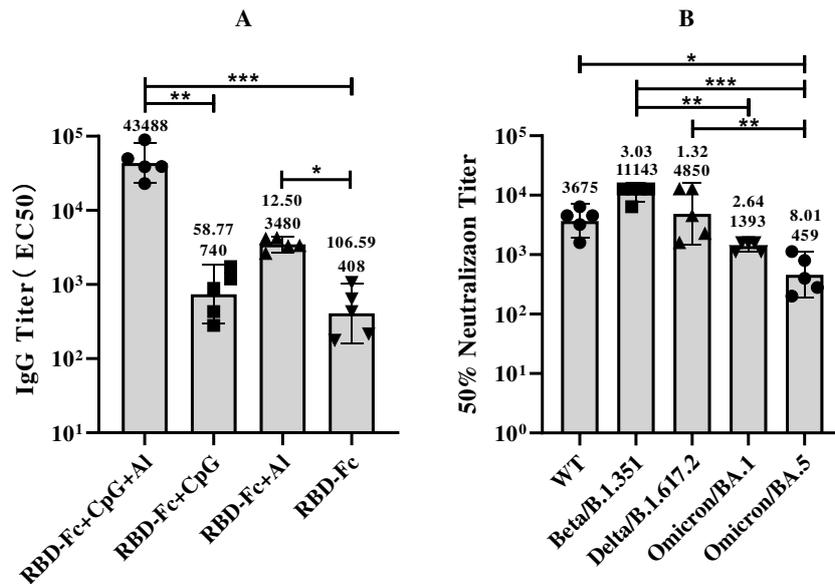


图2 小鼠对 RBD-Fc 疫苗的体液免疫反应

注:A. 二免后 14 天小鼠血清 IgG 结合抗体滴度,柱状图上方的数字为每组的平均几何滴度和以 RBD-Fc+CpG+Al 组为对照各组平均几何滴度提高或减弱的倍数;B. 二免后 14 天小鼠血清中和抗体滴度,柱状图上方的数字为每组的平均几何滴度和以 WT 组为对照各组平均几何滴度提高或减弱的倍数;误差线表示平均几何滴度 $\pm$ 95%置信区间;在显著性水平 $\alpha=0.05$ 下,\*表示 $P < 0.05$ ;\*\*表示 $P < 0.01$ ;\*\*\*表示 $P < 0.001$ 。

Figure 2 Humoral immune response of mice induced by RBD-Fc vaccine

Notes:A. Serum IgG-binding antibody titer of mice 14 days after secondary immunization, the numbers above the bar graph represent the geometric mean titers of each group and the multiples of increase or decrease in the geometric mean titers of each group compared to the RBD-Fc+CpG+Al group; B. Serum neutralizing antibody titer of mice 14 days after secondary immunization, the numbers above the bar graph represent the geometric mean titers of each group and the multiples of increase or decrease in the geometric mean titers of each group compared to the WT group; The error bar represents the geometric mean titers  $\pm$  95% confidence interval; At the significance level  $\alpha=0.05$ , \* means  $P < 0.05$ ; \*\* means  $P < 0.01$ ; \*\*\* means  $P < 0.001$ .

表明相较于氢氧化铝佐剂组、CpG 佐剂组和无佐剂组,CpG 与氢氧化铝复合佐剂组诱导了 Th1 偏向的细胞免疫反应。

## 讨 论

疫苗佐剂有助于抗原产生更强的免疫应答。佐剂的使用在新冠大流行背景下尤为重要,它可以减少每剂所需的抗原量,从而生产更多剂量的疫苗。重要的是,CpG 和氢氧化铝佐剂均已用于商业许可的疫苗,并在临床和上市后研究中具有大量的安全性数据<sup>[19, 20]</sup>。本研究比较了 CpG 单佐剂、氢氧化铝单佐剂和 CpG 与氢氧化铝复合佐剂对 RBD-Fc 重组蛋白免疫应答的影响。

从本研究可以看出,CpG 单佐剂几乎没有增加抗原的体液及细胞免疫反应,这可能与 CpG 易在注射部位扩散有关<sup>[18]</sup>。氢氧化铝单佐剂可提高抗原的

体液(结合抗体比无佐剂组高 8.53 倍)及细胞免疫反应,同时观察到该组检测出明显较多的 IL-4 分泌细胞,这与氢氧化铝佐剂优先诱导 Th2 偏向性反应的报道一致<sup>[21]</sup>。与单佐剂相比,CpG 与氢氧化铝复合佐剂具有明显的佐剂作用,能显著提高 RBD-Fc 蛋白的体液免疫(结合抗体比无佐剂组高 106.59 倍)及细胞免疫反应,这可能由于氢氧化铝佐剂和 CpG 佐剂对不同分子途径的协同激活,或 CpG 吸附在氢氧化铝佐剂上,导致形成更有效内化或增强 TLR9 激活的大分子复合物<sup>[22]</sup>。另一方面,小鼠体内高比例的 IFN- $\gamma$  和 IL-2 分泌细胞,表明复合佐剂可诱导特异性的 Th1 偏向的细胞免疫应答。Th1 免疫反应增强可能会避免疫苗增强型呼吸道疾病(Vaccine-associated enhanced respiratory disease, VAERD)的风险,因为 VAERD 通常被认为与 Th2 偏向反应有关<sup>[23, 24]</sup>。一项研究发现 CpG 与氢氧化铝复合佐剂能在老年老鼠引流淋巴结中引起和年轻

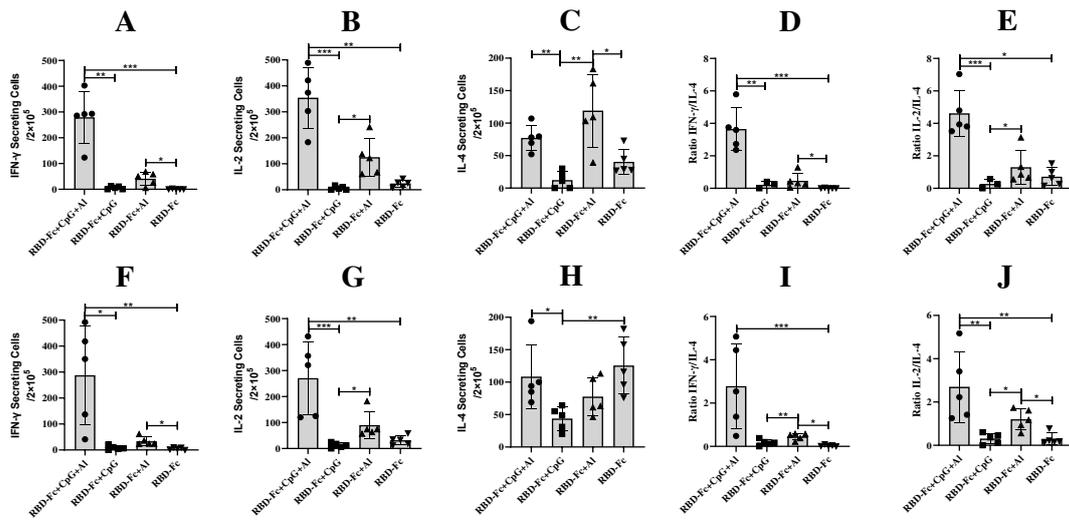


图3 小鼠对RBD-Fc疫苗的细胞免疫反应

注:A~E.用RBD-Fc特异性刺激;F~J.用SARS-CoV-2 S蛋白肽库特异性刺激;A和F.小鼠脾脏分泌IFN- $\gamma$ 的淋巴细胞数量;B和G.小鼠脾脏分泌IL-2的淋巴细胞数量;C和H.小鼠脾脏分泌IL-4的淋巴细胞数量;D和I.小鼠脾脏分泌IFN- $\gamma$ 的淋巴细胞数量与分泌IL-4的淋巴细胞数量的比值;E和J.小鼠脾脏分泌IL-2的淋巴细胞数量与分泌IL-4的淋巴细胞数量的比值;误差线表示平均值 $\pm$ 标准差;在显著性水平 $\alpha=0.05$ 下,\*表示 $P < 0.05$ ;\*\*表示 $P < 0.01$ ;\*\*\*表示 $P < 0.001$ 。

Figure 3 Cellular immune response of mice induced by RBD-Fc vaccine

Notes:A~E. Specific stimulation with RBD-Fc; F~J. Specific stimulation with SARS-CoV-2 S protein peptide pool; A and F. The number of lymphocytes secreting IFN- $\gamma$  in mouse spleen; B and G. The number of lymphocytes secreting IL-2 in mouse spleen; C and H. The number of lymphocytes secreting IL-4 in mouse spleen; D and I. The ratio of IFN- $\gamma$ -secreting lymphocytes to IL-4-secreting lymphocytes in mouse spleen; E and J. The ratio of IL-2-secreting lymphocytes to IL-4-secreting lymphocytes in mouse spleen; The error bar represents the means  $\pm$  standard deviation; At the significance level  $\alpha=0.05$ , \* means  $P < 0.05$ ; \*\* means  $P < 0.01$ ; \*\*\* means  $P < 0.001$ .

小鼠相似的细胞因子和趋化因子基因富集模式,激活固有免疫反应,并且,还可以增强青年人和老年人单核细胞中细胞因子和趋化因子的产生,进一步显示出CpG与氢氧化铝复合佐剂可以在多个年龄组进行应用的潜力<sup>[22]</sup>。CpG与氢氧化铝复合佐剂在体内和体外的潜在分子作用机制,还需要进一步的研究。

多种基于SARS-CoV-2经典株开发的疫苗已被证明在保护新冠感染重症和死亡方面起着重要和有效的作用<sup>[25-27]</sup>。然而,大量SARS-CoV-2突变株的出现,使得恢复期或者疫苗接种者的血清样本中和抗体滴度呈现不同程度的降低<sup>[2]</sup>。因此,研究开发基于突变株的SARS-CoV-2疫苗,特别是能引起针对不同VOCs广谱免疫反应的疫苗,是预防新冠大流行的有效措施。研究数据表明,额外的基于原始株疫苗加强剂量有助于增强免疫的持久性和减少因VOCs而导致的免疫逃避<sup>[28, 29]</sup>。然而,经过基于突变株疫苗的加强,可以实现对变异株更好的免疫保护<sup>[30, 31]</sup>。本研究中,我们对RBD突变了4个氨基

酸(K417T、L452R、E484K和N501Y),这些位点存在于Beta,Delta和Omicron株中,也已被证实影响中和表位<sup>[32, 33]</sup>。基于突变的RBD-Fc抗原在CpG和氢氧化铝佐剂的作用下,仅2剂次免疫,就可以产生对Beta株高达11143真病毒中和抗体滴度,Delta株高达4850,比WT株分别高3.03和1.32倍。虽然产生对Omicron BA.1和BA.5的交叉中和活性较WT株减低了2.64和8.01倍,但依旧能产生高达1393和459的中和抗体滴度,其降低倍数低于之前报道的接受mRNA疫苗的个体(约4~14和8.4~17倍)<sup>[34-36]</sup>。

除了广谱的体液免疫反应,T细胞介导的保护性免疫在控制SARS-CoV-2感染中起着关键作用。研究显示,在疫苗接种或感染的人群,可以产生对不同变异株交叉的细胞免疫反应<sup>[37-39]</sup>。在本研究中,通过使用基于WT株的SARS-CoV-2 S蛋白肽库刺激免疫小鼠脾淋巴细胞,仍然观察到经WT株多肽刺激后,产生特异性分泌IL-2和IFN- $\gamma$ 的细胞显著增加,以及偏向Th1的细胞免疫反应,再次证实了

基于RBD区域T细胞表位对SARS-CoV-2不同毒株的保守性,也显示出该疫苗对不同VOCs可以诱导广谱细胞免疫反应的作用和潜力。另外,对于使用肽库刺激的结果,本研究还发现单独免疫RBD-Fc蛋白能够诱导产生与佐剂组相当甚至更多的分泌IL-4的细胞,这可能是由于使用肽库刺激引起的,该结果也提示CpG或CpG与氢氧化铝复合佐剂的使用可能会抑制分泌Th2类因子(IL-4)细胞的数量,因此表现出佐剂组分泌Th2类因子(IL-4)细胞的数量低于单独抗原免疫组,这也进一步提示可以用不同的刺激物和方法来更全面的评价小鼠的细胞免疫反应。

本研究在SARS-CoV-2经典株RBD序列的基础上引入突变株的关键突变位点融合Fc片段进行表达纯化,并配伍CpG和氢氧化铝复合佐剂通过小鼠实验初步验证了这种策略对基于变异株SARS-CoV-2疫苗研究的潜力和适用性,相比于多价疫苗,本研究仅利用单一组分抗原即可引起针对不同变异株平衡的交叉中和活性。同时,本研究使用的CpG和氢氧化铝佐剂均为生产质量管理规范(Good manufacturing practices, GMP)车间生产,且已在临床试验中使用,具有较好的安全性<sup>[40]</sup>。此外,简单高效的纯化方式也大大缩短了疫苗的研发时间,在新冠大流行背景下具有重要意义。随着新冠病毒进一步的变异,基于此设计和平台,可以快速更迭针对新流行变异株疫苗,以期找到应对新冠病毒感染的通用疫苗策略。然而,本研究仍存在一些不足。第一,基于变异株的疫苗主要将用于已有基础免疫的人群,需要进一步通过序贯免疫的策略评估该疫苗作为加强免疫的优势和潜力。第二,该研究只基于小鼠的免疫实验,还需要在其它动物模型上(包括灵长类动物)更好的评估该疫苗的免疫原性。第三,在人类中,TLR9仅在浆细胞样树突状细胞和B细胞中表达。而在小鼠中,除了上述细胞外,TLR9还在巨噬细胞和髓系树突状细胞中表达<sup>[41,42]</sup>,这可能会影响CpG佐剂从临床前研究到临床试验的转化。然而,在探究重组乙型肝炎疫苗(含CpG和铝佐剂)安全性及免疫原性的I期临床试验中,本研究使用的CpG佐剂已被证明与疫苗结合可增强免疫反应,其产生的抗体水平显著高于商品化重组乙型肝炎疫苗(国药准字S20040016,含铝佐剂)<sup>[40]</sup>。最后,TLR9主要通过识别CpG引起炎症反应,过度的炎症反应会损害靶细胞,甚至导致全身炎症反应和多器官功能衰竭<sup>[43]</sup>,故将CpG佐剂应用于人体时应注意佐剂

的使用剂量,本研究未探究CpG佐剂的安全剂量范围。

综上所述,本研究表明针对突变株设计的SARS-CoV-2 RBD-Fc蛋白候选疫苗与CpG和氢氧化铝佐剂配伍后,可在小鼠体内诱导广谱的、高水平的抗体反应及Th1偏向的细胞免疫反应,对突变株疫苗的设计具有借鉴意义,值得进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard with vaccination data[EB/OL]. (2023-08-30)[2023-09-01]. <https://covid19.who.int/>.
- [2] Garcia-Beltran W F, Lam E C, St Denis K, Nitido A D, Garcia Z H, Hauser B M, Feldman J, Pavlovic M N, Gregory D J, Poznansky M C, Sigal A, Schmidt A G, Iafate A J, Naranbhai V, Balazs A B. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity [J/OL]. *Cell*, 2021, 184(9): 2372-2383. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.013.
- [3] Feikin D R, Abu-Raddad L J, Andrews N, Davies M A, Higdon M M, Orenstein W A, Patel M K. Assessing vaccine effectiveness against severe COVID-19 disease caused by omicron variant. Report from a meeting of the World Health Organization [J/OL]. *Vaccine*, 2022, 40(26): 3516-3527. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.04.069.
- [4] Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rickeard T, Gallagher E, Gower C, Kall M, Groves N, O'Connell A M, Simons D, Blomquist P B, Zaidi A, Nash S, Iwani Binti Abdul Aziz N, Thelwall S, Dabrera G, Myers R, Amirthalingam G, Gharbia S, Barrett J C, Elson R, Ladhani S N, Ferguson N, Zambon M, Campbell C N J, Brown K, Hopkins S, Chand M, Ramsay M, Lopez Bernal J. COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant[J/OL]. *N Engl J Med*, 2022, 386(16): 1532-1546. DOI: 10.1056/NEJMoa2119451.
- [5] Jacobsen H, Strengert M, Maass H, Ynga Durand M A, Katzmarzyk M, Kessel B, Harries M, Rand U, Abassi L, Kim Y, Luddecke T, Metzendorf K, Hernandez P, Ortmann J, Heise J K, Castell S, Gorny D, Glockner S, Melhorn V, Kemmling Y, Lange B, Dulovic A, Marsall P, Haring J, Junker D, Schneiderhan-Marra N, Hoffmann M, Pohlmann S, Krause G, Cicin-Sain L. Diminished neutralization responses towards SARS-CoV-2 Omicron VoC after mRNA or vector-based COVID-19 vaccinations[J/OL].

- Sci Rep, 2022, 12(1): 19858. DOI: 10.1038/s41598-022-22552-y.
- [6] Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez S I, Mateus J, Dan J M, Moderbacher C R, Rawlings S A, Sutherland A, Premkumar L, Jadi R S, Marrama D, de Silva A M, Frazier A, Carlin A F, Greenbaum J A, Peters B, Krammer F, Smith D M, Crotty S, Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals [J/OL]. Cell, 2020, 181(7): 1489-1501. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.015.
- [7] Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 [J/OL]. Cell, 2021, 184(4): 861-880. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
- [8] Piccoli L, Park Y J, Tortorici M A, Czudnochowski N, Walls A C, Beltramello M, Silacci-Fregni C, Pinto D, Rosen L E, Bowen J E, Acton O J, Jaconi S, Guarino B, Minola A, Zatta F, Sprugasci N, Bassi J, Peter A, De Marco A, Nix J C, Mele F, Jovic S, Rodriguez B F, Gupta S V, Jin F, Piumatti G, Lo Presti G, Pellanda A F, Biggiogero M, Tarkowski M, Pizzuto M S, Cameroni E, Havenar-Daughton C, Smithey M, Hong D, Lepori V, Albanese E, Ceschi A, Bernasconi E, Elzi L, Ferrari P, Garzoni C, Riva A, Snell G, Sallusto F, Fink K, Virgin H W, Lanzavecchia A, Corti D, Veesler D. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology [J/OL]. Cell, 2020, 183(4): 1024-1042. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.037.
- [9] Dai L, Zheng T, Xu K, Han Y, Xu L, Huang E, An Y, Cheng Y, Li S, Liu M, Yang M, Li Y, Cheng H, Yuan Y, Zhang W, Ke C, Wong G, Qi J, Qin C, Yan J, Gao G F. A universal design of Betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS [J/OL]. Cell, 2020, 182(3): 722-733. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.035.
- [10] Soleimanpour S, Hassannia T, Motiee M, Amini A A, Rezaee S A. Fc $\gamma$ 1 fragment of IgG1 as a powerful affinity tag in recombinant Fc-fusion proteins: immunological, biochemical and therapeutic properties [J/OL]. Crit Rev Biotechnol, 2017, 37(3): 371-392. DOI: 10.3109/07388551.2016.1163323.
- [11] Liu X, Drelich A, Li W, Chen C, Sun Z, Shi M, Adams C, Mellors J W, Tseng C T, Dimitrov D S. Enhanced elicitation of potent neutralizing antibodies by the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain Fc fusion protein in mice [J/OL]. Vaccine, 2020, 38(46): 7205-7212. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.09.058.
- [12] Wang X Y, Mahmood S F, Jin F, Cheah W K, Ahmad M, Sohail M A, Ahmad W, Suppan V K, Sayeed M A, Luxmi S, Teo A H, Lee L Y, Qi Y Y, Pei R J, Deng W, Xu Z H, Yang J M, Zhang Y, Guan W X, Yu X. 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 [J/OL]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 1910-1919. DOI: 10.1080/22221751.2022.2088406.
- [13] Pulendran B, P S A, O'Hagan D T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants [J/OL]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(6): 454-475. DOI: 10.1038/s41573-021-00163-y.
- [14] Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, Li X, Peng C, Zhang Y, Zhang W, Yang Y, Chen W, Gao X, You W, Wang X, Wang Z, Shi Z, Wang Y, Yang X, Zhang L, Huang L, Wang Q, Lu J, Yang Y, Guo J, Zhou W, Wan X, Wu C, Wang W, Huang S, Du J, Meng Z, Pan A, Yuan Z, Shen S, Guo W, Yang X. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: interim analysis of 2 randomized clinical trials [J/OL]. JAMA, 2020, 324(10): 951-960. DOI: 10.1001/jama.2020.15543.
- [15] Gao Q, Bao L L, Mao H Y, Wang L, Xu K W, Yang M N, Li Y J, Zhu L, Wang N, Lv Z, Gao H, Ge X Q, Kan B, Hu Y L, Liu J N, Cai F, Jiang D Y, Yin Y H, Qin C F, Li J, Gong X J, Lou X Y, Shi W, Wu D D, Zhang H M, Zhu L, Deng W, Li Y R, Lu J X, Li C G, Wang X X, Yin W D, Zhang Y J, C Q. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 [J/OL]. Science, 2020, 369(6499): 77-81. DOI: 10.1126/science.abc1932.
- [16] Wang H, Zhang Y, Huang B, Deng W, Quan Y, Wang W, Xu W, Zhao Y, Li N, Zhang J, Liang H, Bao L, Xu Y, Ding L, Zhou W, Gao H, Liu J, Niu P, Zhao L, Zhen W, Fu H, Yu S, Zhang Z, Xu G, Li C, Lou Z, Xu M, Qin C, Wu G, Gao G F, Tan W, Yang X. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2 [J/OL]. Cell, 2020, 182(3): 713-721. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.008.
- [17] Klinman D M, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants [J/OL]. Immunol Rev, 2004, 199: 201-216. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00148.x.

- [18] Lu F, Mosley Y C, Carmichael B, Brown D D, HogenEsch H. Formulation of aluminum hydroxide adjuvant with TLR agonists poly (I: C) and CpG enhances the magnitude and avidity of the humoral immune response [J/OL]. *Vaccine*, 2019, 37 (14) : 1945-1953. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.02.033.
- [19] Bravo L, Smolenov I, Han H H, Li P, Hosain R, Rockhold F, Clemens S A C, Roa C, Jr., Borja-Tabora C, Quinsa A, Lopez P, Lopez-Medina E, Brochado L, Hernandez E A, Reynales H, Medina T, Velasquez H, Toloza L B, Rodriguez E J, de Salazar D I M, Rodriguez C A, Sprinz E, Cerbino-Neto J, Luz K G, Schwarzbald A V, Paiva M S, Carlos J, Montellano M E B, de Los Reyes M R A, Yu C Y, Alberto E R, Panaligan M M, Salvani-Bautista M, Buntinx E, Hites M, Martinot J B, Borhat Q E, Badat A, Baccarini C, Hu B, Jurgens J, Engelbrecht J, Ambrosino D, Richmond P, Siber G, Liang J, Clemens R. Efficacy of the adjuvanted subunit protein COVID-19 vaccine, SCB-2019: a phase 2 and 3 multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial[J/OL]. *Lancet*, 2022, 399(10323): 461-472. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00055-1.
- [20] Campbell J D. Development of the CpG adjuvant 1018: a case study[J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1494: 15-27. DOI: 10.1007/978-1-4939-6445-1\_2.
- [21] Deming D, Sheahan T, Heise M, Yount B, Davis N, Sims A, Suthar M, Harkema J, Whitmore A, Pickles R, West A, Donaldson E, Curtis K, Johnston R, Baric R. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants[J/OL]. *PLoS Med*, 2006, 3(12): e525. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030525.
- [22] Nanishi E, Borriello F, O'Meara T R, McGrath M E, Saito Y, Haupt R E, Seo H S, van Haren S D, Cavazzoni C B, Brook B, Barman S, Chen J, Diray-Arce J, Doss-Gollin S, De Leon M, Prevost-Reilly A, Chew K, Menon M, Song K, Xu A Z, Caradonna T M, Feldman J, Hauser B M, Schmidt A G, Sherman A C, Baden L R, Ernst R K, Dillen C, Weston S M, Johnson R M, Hammond H L, Mayer R, Burke A, Bottazzi M E, Hotez P J, Strych U, Chang A, Yu J, Sage P T, Barouch D H, Dhe-Paganon S, Zanoni I, Ozonoff A, Frieman M B, Levy O, J. D D. An aluminum hydroxide: CpG adjuvant enhances protection elicited by a SARS-CoV-2 receptor binding domain vaccine in aged mice[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2022, 14 (629): eabj5305. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj5305.
- [23] DiPiazza A T, Leist S R, Abiona O M, Moliva J I, Werner A, Minai M, Nagata B M, Bock K W, Phung E, Schafer A, Dinnon K H, 3rd, Chang L A, Loomis R J, Boyoglu-Barnum S, Alvarado G S, Sullivan N J, Edwards D K, Morabito K M, Mascola J R, Carfi A, Corbett K S, Moore I N, Baric R S, Graham B S, Ruckwardt T J. COVID-19 vaccine mRNA-1273 elicits a protective immune profile in mice that is not associated with vaccine-enhanced disease upon SARS-CoV-2 challenge[J/OL]. *Immunity*, 2021, 54(8): 1869-1882. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.06.018.
- [24] Ma X, Zou F, Yu F, Li R, Yuan Y, Zhang Y, Zhang X, Deng J, Chen T, Song Z, Qiao Y, Zhan Y, Liu J, Zhang J, Zhang X, Peng Z, Li Y, Lin Y, Liang L, Wang G, Chen Y, Chen Q, Pan T, He X, Zhang H. Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain (RBD) and heptad repeat (HR) of SARS-CoV-2 elicit robust protective immune responses [J/OL]. *Immunity*, 2020, 53(6): 1315-1330. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.11.015.
- [25] Baden L R, El Sahly H M, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector S A, Rouphael N, Creech C B, McGettigan J, Khetan S, Segall N, Solis J, Brosz A, Fierro C, Schwartz H, Neuzil K, Corey L, Gilbert P, Janes H, Follmann D, Marovich M, Mascola J, Polakowski L, Ledgerwood J, Graham B S, Bennett H, Pajon R, Knightly C, Leav B, Deng W, Zhou H, Han S, Ivarsson M, Miller J, Zaks T, Group C S. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J/OL]. *N Engl J Med*, 2021, 384(5): 403-416. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.
- [26] Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez J L, Perez Marc G, Moreira E D, Zerbini C, Bailey R, Swanson K A, Roychoudhury S, Koury K, Li P, Kalina W V, Cooper D, Frenck R W, Jr., Hammitt L L, Tureci O, Nell H, Schaefer A, Unal S, Tresnan D B, Mather S, Dormitzer P R, Sahin U, Jansen K U, Gruber W C, Group C C T. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine [J/OL]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (27) : 2603 - 2615. DOI: 10.1056/NEJMoa2034577.
- [27] Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwegh D, Truyers C, de Groot A M, Stoop J, Tete S, Van Damme W, Leroux-Roels I, Berghmans P J, Kimmel M, Van Damme P, de Hoon J, Smith W, Stephenson K E, De Rosa S C, Cohen K W, McElrath M J, Cormier E, Scheper G, Barouch D H, Hendriks J,

- Struyf F, Douguih M, Van Hoof J, Schuitemaker H. Interim results of a phase 1-2a trial of Ad26.COV2.S COVID-19 Vaccine[J/OL]. *N Engl J Med*, 2021, 384(19): 1824-1835. DOI: 10.1056/NEJMoa2034201.
- [28] Bar-On Y M, Goldberg Y, Mandel M, Bodenheimer O, Freedman L, Kalkstein N, Mizrahi B, Alroy-Preis S, Ash N, Milo R, Huppert A. Protection of BNT162b2 vaccine booster against COVID-19 in Israel [J/OL]. *N Engl J Med*, 2021, 385(15): 1393-1400. DOI: 10.1056/NEJMoa2114255.
- [29] Falsey A R, Frenc Jr R W, Walsh E E, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Bailey R, Swanson K A, Xu X, Koury K, Kalina W, Cooper D, Zou J, Xie X, Xia H, Türeci Ö, Lagkadinou E, Tompkins K R, Shi P Y, Jansen K U, Şahin U, Dormitzer P R, Gruber W C, Gruber W C. SARS-CoV-2 neutralization with BNT162b2 vaccine dose 3[J/OL]. *N Engl J Med*, 2021, 385(17): 1627-1629. DOI: 10.1056/NEJMc2113468.
- [30] Wu K, Choi A, Koch M, Elbashir S, Ma L, Lee D, Woods A, Henry C, Palandjian C, Hill A, Jani H, Quinones J, Nunna N, O'Connell S, McDermott A B, Falcone S, Narayanan E, Colpitts T, Bennett H, Corbett K S, Seder R, Graham B S, Stewart-Jones G B E, Carfi A, Edwards D K. Variant SARS-CoV-2 mRNA vaccines confer broad neutralization as primary or booster series in mice [J/OL]. *Vaccine*, 2021, 39(51): 7394-7400. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.11.001.
- [31] Launay O, Cachanado M, Luong Nguyen L B, Ninove L, Lachâtre M, Ben Ghezala I, Bardou M, Schmidt-Mutter C, Lacombe K, Laine F A J S, Botelho-Nevers E, Tavalacci M P, Chidiac C, Pavese P, Dussol B, Priet S, Deplanque D, Touati A, Curci L K E, Ben Hamouda N, Besbes A, Nubret E, Capelle F, Berard L, Rousseau A, Tartour E, Simon T, X. d L. Immunogenicity and safety of Beta- adjuvanted recombinant booster vaccine [J/OL]. *N Engl J Med*, 2022, 387(4): 374-376. DOI: 10.1056/NEJMc2206711.
- [32] Zhang L, Cui Z, Li Q, Wang B, Yu Y, Wu J, Nie J, Ding R, Wang H, Zhang Y, Liu S, Chen Z, He Y, Su X, Xu W, Huang W, Wang Y. Ten emerging SARS-CoV-2 spike variants exhibit variable infectivity, animal tropism, and antibody neutralization [J/OL]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1196. DOI: 10.1038/s42003-021-02728-4.
- [33] Cao Y, Wang J, Jian F, Xiao T, Song W, Yisimayi A, Huang W, Li Q, Wang P, An R, Wang J, Wang Y, Niu X, Yang S, Liang H, Sun H, Li T, Yu Y, Cui Q, Liu S, Yang X, Du S, Zhang Z, Hao X, Shao F, Jin R, Wang X, Xiao J, Wang Y, Xie X S. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies [J/OL]. *Nature*, 2022, 602(7898): 657-663. DOI: 10.1038/s41586-021-04385-3.
- [34] Davis-Gardner M E, Lai L, Wali B, Samaha H, Solis D, Lee M, Porter-Morrison A, Hentenaar I T, Yamamoto F, Godbole S, Liu Y, Douek D C, Lee F E, Roupheal N, Moreno A, Pinsky B A, Suthar M S. Neutralization against BA.2.75.2, BQ.1.1, and XBB from mRNA bivalent booster [J/OL]. *N Engl J Med*, 2023, 388(2): 183-185. DOI: 10.1056/NEJMc2214293.
- [35] Wang Q, Bowen A, Valdez R, Gherasim C, Gordon A, Liu L, Ho D D. Antibody response to Omicron BA.4-BA.5 bivalent booster [J/OL]. *N Engl J Med*, 2023, 388(6): 567-569. DOI: 10.1056/NEJMc2213907.
- [36] Zou J, Kurhade C, Patel S, Kitchin N, Tompkins K, Cutler M, Cooper D, Yang Q, Cai H, Muik A, Zhang Y, Lee D Y, Şahin U, Anderson A S, Gruber W C, Xie X, Swanson K A, Shi P Y. Neutralization of BA.4-BA.5, BA.4.6, BA.2.75.2, BQ.1.1, and XBB.1 with bivalent vaccine [J/OL]. *N Engl J Med*, 2023, 388(9): 854-857. DOI: 10.1056/NEJMc2214916.
- [37] Ahmed S F, Quadeer A A, McKay M R. SARS-CoV-2 T cell responses elicited by COVID-19 vaccines or infection are expected to remain robust against Omicron [J/OL]. *Viruses*, 2022, 14(1): 79. DOI: 10.3390/v14010079.
- [38] Keeton R, Tincho M B, Ngomti A, Baguma R, Benede N, Suzuki A, Khan K, Cele S, Bernstein M, Karim F, Madzorera S V, Moyo-Gwete T, Mennen M, Skelem S, Adriaanse M, Mutithu D, Aremu O, Stek C, du Bruyn E, Van Der Mescht M A, de Beer Z, de Villiers T R, Bodenstein A, van den Berg G, Mendes A, Strydom A, Venter M, Giandhari J, Naidoo Y, Pillay S, Tegally H, Grifoni A, Weiskopf D, Sette A, Wilkinson R J, de Oliveira T, Bekker L G, Gray G, Ueckermann V, Rossouw T, Boswell M T, Bhiman J N, Moore P L, Sigal A, Ntusi N A B, Burgers W A, Riou C. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron [J/OL]. *Nature*, 2022, 603(7901): 488-492. DOI: 10.1038/s41586-022-04460-3.
- [39] Tarke A, Coelho C H, Zhang Z, Dan J M, Yu E D, Methot N, Bloom N I, Goodwin B, Phillips E, Mallal S, Sidney J, Filaci G, Weiskopf D, da Silva Antunes

- R, Crotty S, Grifoni A, Sette A. SARS - CoV - 2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross - recognize variants from Alpha to Omicron [J/OL]. *Cell*, 2022, 185(5): 847-859. DOI: 10.1016/j.cell.2022.01.015.
- [40] 梁贞贞, 邵彦, 王慎玉, 严传富, 陈波, 张筠, 陈颖萍, 胡晓松, 吕华坤. 成人接种重组(汉逊酵母)乙型肝炎疫苗(CpG ODN佐剂)的安全性及免疫原性: I期临床试验初步结果[J]. *中华预防医学杂志*, 2020, 54(8): 7.
- [41] Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides [J/OL]. *J Immunol*, 2002, 168(9): 4531-4537. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4531.
- [42] Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg A M, Hartmann G. Toll - like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL - 12 [J/OL]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(10): 3026-3037. DOI: 10.1002/1521 - 4141 (2001010) 31: 10<3026::aid-immu3026>3.0.co;2-h.
- [43] Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser C J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury [J/OL]. *Nature*, 2010, 464 (7285): 104 - 107. DOI: 10.1038/nature08780.

## Enhanced Immune Response of Mice Induced by RBD-Fc Recombinant Protein Combined with CpG-Aluminum Adjuvant

REN Hu<sup>1#</sup>, HE Yuanwei<sup>1#</sup>, ZHANG Yanan<sup>2#</sup>, LI Hai<sup>1</sup>, GUO Jinyuan<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, ZHU Shuangli<sup>1</sup>,  
JI Tianjiao<sup>1</sup>, CAO Lei<sup>1\*</sup>, XU Wenbo<sup>1\*</sup>

(1. National Health Commission Key Laboratory of Medical Virology and Viral Diseases, National Institute for Viral Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO WPRO Regional Reference Measles/Rubella Laboratory, Beijing 102206, China; 2. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102206, China)

**Abstract:** The 2019 coronavirus disease (COVID-19) pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) poses a serious threat to global health and the economy. The emergence of variants of concern (VOCs) in SARS-CoV-2 has made vaccine development more challenging. Therefore, designing vaccines that can elicit a broad immune response against mutant strains is crucial. In this study, the receptor-binding domain (RBD) protein, which contains dominant neutralizing epitopes, was selected as the target antigen. The RBD sequence of the SARS-CoV-2 Wild-type (WT) strain was served as the basis for introducing several key mutation sites of VOCs, and fused with human IgG1 Fc fragments. The RBD-Fc protein was expressed and administered with either CpG single adjuvant, aluminum hydroxide single adjuvant, or CpG combined with aluminum hydroxide adjuvant in two doses to mice. This study compared the enhancement of cellular and humoral immune responses induced by CpG combined with aluminum hydroxide adjuvant with those induced by aluminum or CpG adjuvant alone. The cross-neutralizing antibody titers against live viruses of different VOCs were also observed. The results demonstrated that RBD-Fc protein combined with CpG and aluminum hydroxide adjuvant induced the highest IgG binding antibodies and high-level of Th1-biased cellular immune response in immunized mice compared to single adjuvant. Additionally, mouse serum could effectively neutralize infections of SARS CoV-2 beta strain (GMT: 11143), Delta strain (GMT: 4850), classic strain (GMT: 3675), and even Omicron BA.1 strain (GMT: 1393) and BA.5 strain (GMT: 459). These results indicate that the SARS-CoV-2 RBD-Fc recombinant protein containing mutation sites has excellent potential, and the combined use of CpG and aluminum adjuvant can significantly improve and balance the cellular immune response of mice, produce cross-neutralizing antibodies against different SARS-CoV-2 variants with high titers, which can be further studied and developed as a broad-spectrum vaccine.

**Key words:** RBD-Fc; Adjuvants; Humoral immunity; Cellular immunity; Cross neutralizing antibody

\* Corresponding authors : CAO Lei, E-mail: caolei@ivdc.chinacdc.cn; XU Wenbo, E-mail: xuwb@ivdc.chinacdc.cn