

利用重組蛋白技術開發 流感 H7N9 HA 疫苗

林挺輝 李敏西

國家衛生研究院 感疫所

前 言

禽流感是一個在禽類之間互相傳染的疾病，過去數十年在禽流感病毒的傳播當中很少演化成功並且在人類族群當中造成互相傳染[1]。過去曾經成功在人類族群間互相傳染且爆發大流行的流感病毒分別有 1918 年的 H1N1、1957 年的 H2N2、1968 年的 H3N2 及 2009 年的 H1N1 [2-4]。根據世界衛生組的統計，在 2013 年爆發第一起人類感染禽流感 H7N9 的案例以來，至今已經造成超過 1,600 人的感染 (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/HAI_Risk_Assessment/en/)，台灣分別在 2013 年到 2014 年的第一波及第二波大流行當中造成了四個人被感染[5]。由於台灣地理位置鄰近中國，這使得我們必須開發有效且能夠快速生產的疫苗來因應流感病毒的大流行。

流感病毒表面的結構蛋白血液凝集素 (Hemagglutinin, HA)，是病毒主要結合到宿主表面受器的蛋白，也是用來生產疫苗對抗流感病毒最主要的抗原[6]。HA 蛋白以三聚體的結構透過穿膜序列分佈在病毒的表面，此序列對於 HA 蛋白的穩定性及分佈扮演著非常重要的腳色[7]。過去的研究指出在穿膜序列上進行點突變會造成 HA 蛋白的結構的不穩定進而影響到病毒的生長和感染[8]。在過去的結晶學研究也指出將此段穿膜序列拿掉的 HA 蛋白也可以透過基因工程的方式來表現出三聚體的型態[9]。

目前生產流感疫苗的方式分別為雞蛋培養及利用細胞生產。傳統雞蛋培養目前較廣泛應用在季節流感疫苗的生產，此技術需要篩選高表現量的病毒株且需要耗費較多的雞胚蛋，在時間上也需要約六個月的時間來完成整個生產的程序，目前雞胚蛋生

產的疫苗無法用於對於雞蛋過敏的人[10]。在細胞培養的技術也需要篩選高表現量的病毒株，但相對於雞胚蛋的生產時間，細胞生產疫苗所需耗費的時間相對較少。

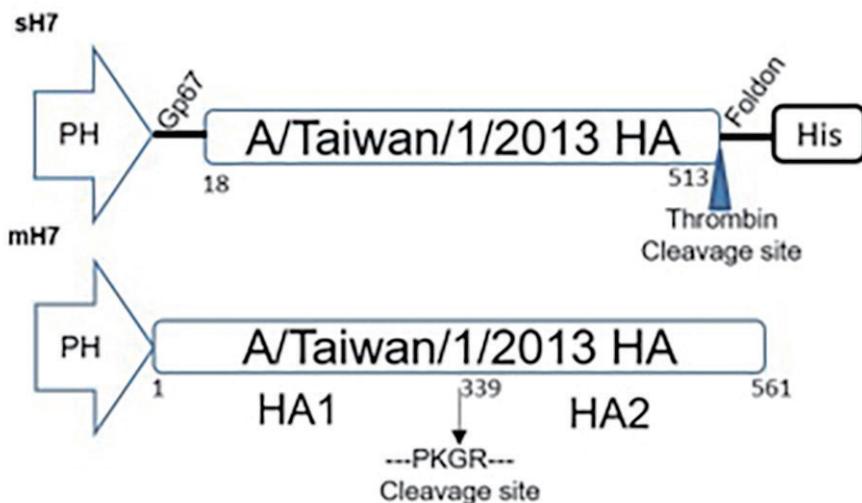
由於流感病毒具有抗原飄移(antigenic drift)的特性，疫苗病毒株必須每年重新遴選，非常的耗時[11]。基因重組蛋白是一個非常安全且快速的生產平台，只要有基因序列資訊就可以啟動生產流程。過去許多研究當中指出，利用昆蟲表現系統生產的重組蛋白或是重組病毒顆粒(virus-like particle)在動物身上可以誘發有效的抗體保護力來對抗流感病毒[12]。然而在重組蛋白 H7 的動物研究當中卻發現無法有效的誘導產生較高的抗體保護力[13]。因此有許多的研究都在嘗試利用不同的方法來提升 H7 疫苗的保護力[14]。在我們的研究當中，我們利用了桿狀病毒表現系

統，將 A/Taiwan/1/2013 H7N9 的 HA 基因利用基因重組的技術表現出分泌型(sH7)及膜蛋白型(mH7)兩種不同的形式的蛋白，來評估蛋白的結構穩定性、血球凝集效價(hemagglutinin titer)及致免疫力，用於 H7N9 大流行的疫苗生產[15]。

利用昆蟲細胞表現 HA 蛋白

在此研究當中我們構築了兩種不同的表現方式的載體(圖一)。首先我們利用昆蟲細胞表現 sH7 蛋白，為了讓 sH7 在經由細胞分泌到胞外也可以維持三聚體的型態，我們在基因的 C 端加入的一段凝血酶(Thrombin)及維持三聚體的序列。

將重組的病毒感染昆蟲細胞並在 60 小時候收取上清液，利用金屬離子層析方法且透過蛋白質分子量的大小不同將此上清液中的 HA 蛋白



圖一 兩種不同的構築方式的 A/Taiwan/1/2013 H7N9 HA [15]

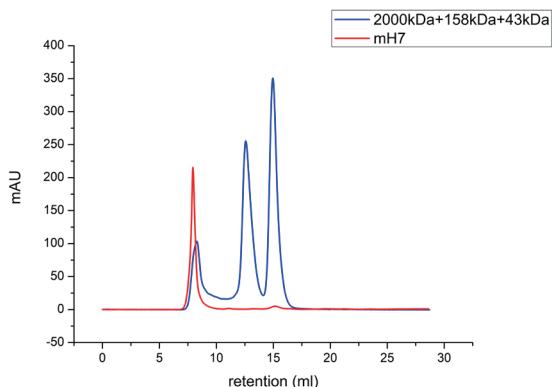
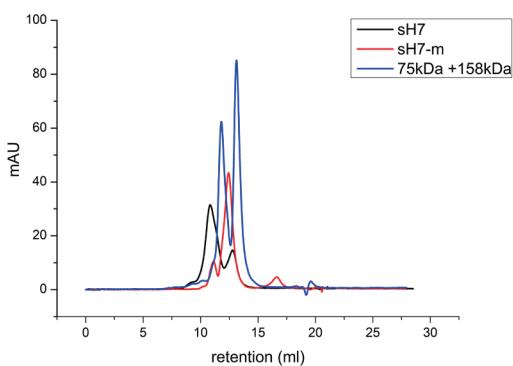
做進一步的純化。經過純化後，在分子量層析分析方法中 HA 分別有約 200 kDa 為主的三聚體 (sH7) 及分子量約 65kDa 的少量單體 (sH7-m) 存在 (圖二)，進一步的利用胰蛋白酶 (trypsin) 切割並且在 Western Blot 及 SDS-PAGE 的分析也顯示 HA 在昆蟲細胞表現後結構穩定。然而在利用凝血酶將三聚體片段移除後，sH7 却無法維持三聚體的型態而形成單體的型態。雖然在先前的文獻當中指出分泌型的 HA 可以在昆蟲細胞表現系統穩定表現，且在移除三聚體片段後還維持著原本的三聚體的型態並且廣泛運用運用在結晶學來研究 HA 的特性，此方法似乎無法適用於重組流感病毒 H7N9 HA。

接著我們利用了 H7N9 HA 的全

長序列將 HA 表現在昆蟲細胞的表面 (mH7)。利用 hemadsorption 的方式確認表現在細胞膜表面的 HA 也具有血液凝集的效價後，將此細胞收集起來後萃取純化。經過一連串的純化，mH7 蛋白在分子量層析法當中顯示約 2,000 kDa 的分子量大小 (圖二)，形成多聚合體的型式且具有非常高的血液凝集力價 (表一)。

利用胰蛋白酶及不同溫度分析 HA 的結構穩定性

HA 蛋白生成後以 HA0 的形態存在，在經過宿主內胰蛋白酶的作用後形成 HA1 及 HA2，使病毒順利在宿主感染及釋放[16]。在桿狀病毒表現系統中，因缺乏胰蛋白酶而表



圖二 利用液相層析儀 (Fast protein liquid chromatography) 分析 H7 重組蛋白[15]

表一 不同的 H7N9 抗原在血球凝集實驗的力價[15]

	inactivated virus	*negative control	sH7	sH7-anti-His	mH7
HA titer	128	< 8	< 8	16	8,192

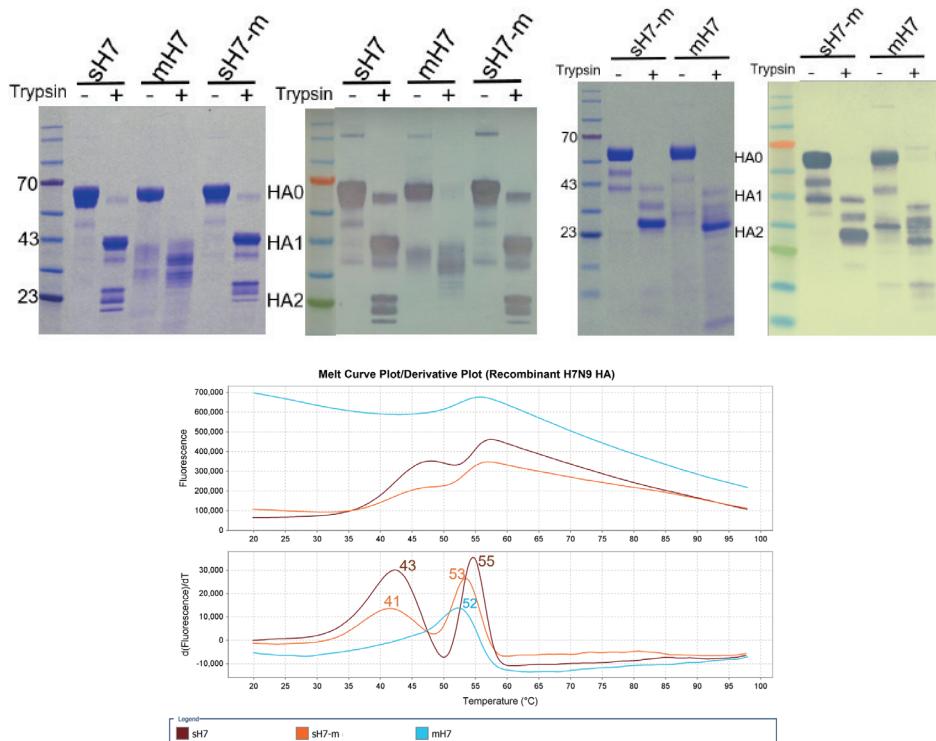
*negative control: PBS+Anti-His

現為 HA0 的型態。為了分析 HA 表現後的穩定性，我們利用了 HA 被胰蛋白酶切割後會形成 HA1 及 HA2 的特性來分析在我們的系統中表現出來的 sH7、sH7-m 及 mH7 的結構穩定性[17]。我們發現 sH7-m 經過一個月的存放後，經由胰蛋白酶作用後在 SDS-PAGE 及 Western Blot 呈現許多大小不一致的片段。相反的，mH7 及 sH7 經過胰蛋白酶作用後仍然維持著與存放前一樣的結果（圖三）。儘管 mH7 比 sH7 易受胰蛋白酶的切割，但在二級結構的分析下顯示三者的結構並沒有太大的差別。

在熱穩定實驗當中，sH7 及 sH7-m 的結構分別在 43 度級 41 度瓦解，但具有穿膜序列的 mH7 結構卻到 52 度才瓦解。此外在 sH7 及 sH7-m 也偵測到在 53 度及 55 度有再一次瓦解的現象，顯示 sH7 及 sH7-m 結構的不穩定（圖三）。熱穩定分析的結果也與胰蛋白酶作用的結果一致證實了 sH7 及 sH7-m 結構的不穩定。

抗體保護力測試

為了能夠比較 sH7、sH7-m 及 mH7 在小鼠所誘發的免疫反應，

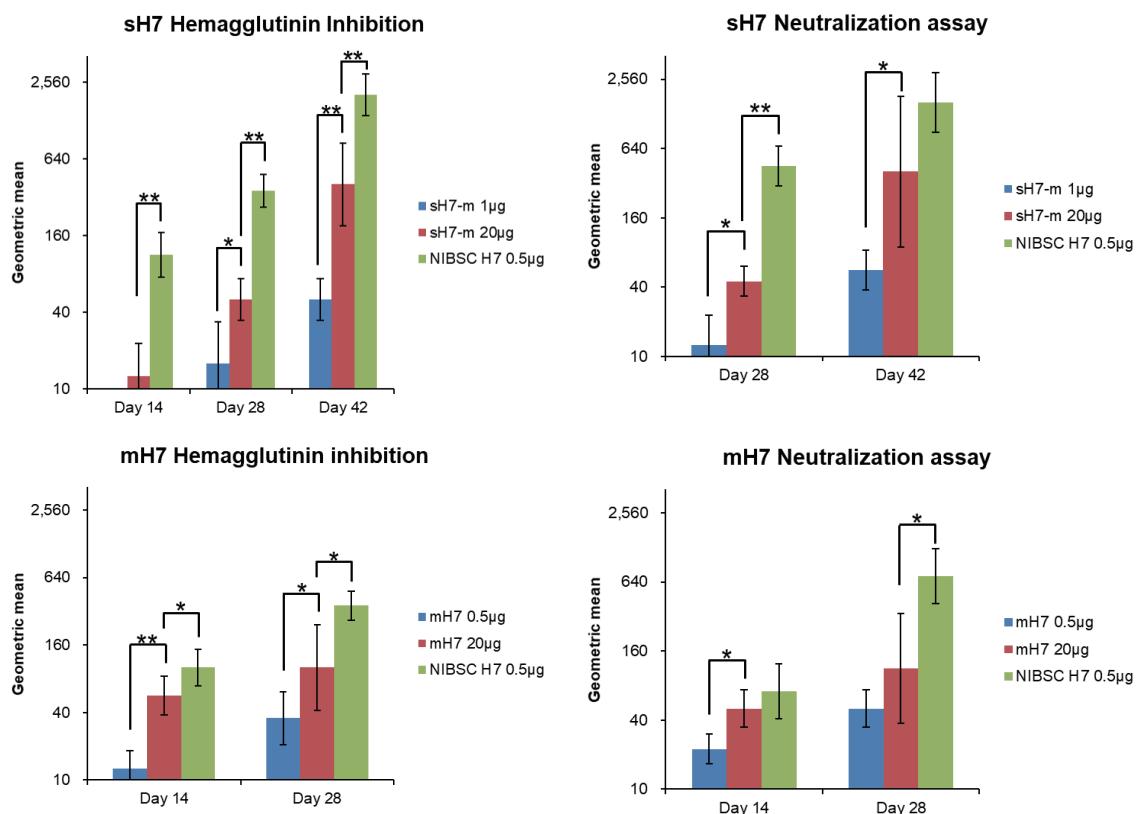


圖三 sH7、sH7-m 及 mH7 的結構經過胰蛋白酶的作用及不同溫度下的穩定性。酵素作用結果經由 SDS-PAGE 及 Western-Blot 分析 (upper panel)。熱穩定檢測 (thermal shift assays) 是利用 Real-Time PCR 儀器來分析 (lower panel) [15]

實驗組為 0.5 微克及 20 微克兩種不同濃度的 sH7-m 加上 300 微克的佐劑，對照組為以 0.5 微克的去活化 H7N9 病毒加上 300 微克的佐劑，肌肉注射 3 劑，每劑間隔 2 週，分別在注射後 2、4、6 個禮拜採集老鼠血清，採集到的血清與去活化病毒混合反應後利用血球凝集抑制的分析來評估血清抗體的效價。此外我們也利用 MDCK 細胞與 A/Anhui/1/2013 H7N9 疫苗株病毒來評估中和抗體的效價。結果顯示接種去活化病毒的老鼠可以有效的在注射第二劑後誘發顯著的免疫反應 (HI GMT = 359, NT GMT =

452)。然而在 20 微克的 sH7-m 必須在注射第三劑後才能誘發顯著的免疫反應 (HI GMT = 403)。相反的，注射 1 微克的 sH7-m 在三劑後還是無法有效地誘發免疫反應 (HI GMT = 40) (圖四)。

接著我們也將 mH7 分為兩種不同的濃度 0.5 微克及 20 微克並搭配 300 微克的佐劑注射到老鼠體內。結果顯示注射 0.5 微克 mH7 的老鼠與注射 1 微克的 sH7-m 在接種第二劑後誘發的 HI 抗體效價約為 40 及 15，注射 20 微克 mH7 的老鼠卻可以比注射 20 微克的 sH7-m (HI GMT =



圖四 比較老鼠接種不同濃度的 sH7、mH7 及雞蛋生產的去活化病毒 (NIBSC) 在血球凝集抑制實驗與中和抗體力價分析的差異[15]

25) 在接種第二劑後誘發顯著的免疫反應 (HI GMT = 101, NT GNT = 114) (圖四)，整體而言，mH7 比 sH7-m 可引發較高的抗體效價。

結 語

自從 2013 年以來，禽流感 H7N9 已經在禽類造成大流行且導致超過 1,600 人類感染的案例。因此有必要開發 H7N9 的疫苗來預防大流行的爆發。桿狀病毒昆蟲細胞表現系統生產生物製劑有以下的優點：1. 桿狀病毒不會感染哺乳類動物，生物安全等級需求較低 (BSL-1)；2. 懸浮細胞大量生產的技術門檻較低；3. 有著類似哺乳類動物的後轉譯修飾[18]。因此我們利用此昆蟲細胞表現平台來開發 H7N9 疫苗，在之前的文獻中，並沒有同時針對兩種不同重組蛋白 sH7 及 mH7 的免疫反應比較。為了讓重組蛋白 sH7 在分泌到細胞外的同時也能夠保留其原來的三聚體型態，在構築載體的同時加入三聚體的序列及純化用的 His-tag，這些外加的勝肽並不適用在人類疫苗的開發，因此在疫苗的製備過程必須被移除，移除後 sH7 分裂成單體 sH7-m，導致 sH7-m 在儲存的過程因結構的不穩定而無法在老鼠身上誘導引發有效的免疫反應。這個現象也被發現在基因重組 A/Shanghai/1/2013 (H7N9) 及 A/Shanghai/2/2013 的 HA 蛋白研究 [19]。有趣的是重組蛋白 H5 在移除

額外的序列後依然維持著三聚體的型態，也能夠在老鼠體內誘發顯著的免疫反應[20]。

為了改善 sH7 的免疫反應，我們構築了另一個 mH7 的載體，此 mH7 序列包含了原生的穿膜序列讓 HA 可以穩定的表現在細胞膜上。許多研究指出突變某些在穿膜序列上的氨基酸導致 HA 的結構不穩定而影響 HA 在膜上的分佈及排列。在 H3 的研究當中指出減少在穿膜序列上多餘的 cystine 可以改善 HA 的結構穩定和免疫原性。在我們的研究中，mH7 的穿膜序列僅帶有一個 cystine 能使結構穩定且能夠在老鼠體內誘發較好的免疫反應。不同於過去的研究利用 Cryo-EM 解析 mHA 為一個 rosette 的構型，我們利用小角度 X 光散射解析 mH7 在水相當中呈現一個高度排列聚合體。在二級解構上 sH7、sH7-m 及 mH7 並無顯著不同，此結果顯示可能為分子間作用力影響 HA 的結構穩定。

總結上述，在我們的研究當中發現 A/Taiwan/1/2013 H7N9 HA 的重組蛋白結構並不穩定，然而利用昆蟲表現系統產生的 mH7 蛋白形成高度排列的多聚合體使其每一個三聚體之間互相穩定可以引起較好的免疫反應，因此證實昆蟲細胞表現平台可以當作流感病毒大流行的疫苗製備平台。

參考文獻

1. Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, et al: Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses. *Trends in microbiology.* 2014;22:623-31.
2. Lin CY, Chia MY, Chen PL, et al: Assessment of pathogenicity and antigenicity of American lineage influenza H5N2 viruses in Taiwan. *Virology.* 2017;508:159-63.
3. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, et al: Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96:1651-6.
4. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, et al: On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology.* 1978;87:13-20.
5. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, et al: Characterization of influenza A (H7N9) viruses isolated from human cases imported into Taiwan. *PloS one.* 2015;10:e0119792.
6. Stevens J, Corper AL, Basler CF, et al: Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science (New York, NY).* 2004;303:1866-70.
7. Takeda M, Leser GP, Russell CJ, et al: Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100:14610-7.
8. Zhang J, Pekosz A, Lamb RA. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *Journal of virology.* 2000;74:4634-44.
9. Yang H, Carney PJ, Donis RO, et al: Structure and receptor complexes of the hemagglutinin from a highly pathogenic H7N7 influenza virus. *Journal of virology.* 2012;86:8645-52.
10. Wood JM, Weir JP. Standardisation of inactivated influenza vaccines-Learning from history. *Influenza and other respiratory viruses.* 2018;12:195-201.
11. Wood JM. Selection of influenza vaccine strains and developing pandemic vaccines. *Vaccine.* 2002;20 Suppl 5:B40-4.
12. Liu YV, Massare MJ, Pearce MB, et al: Recombinant virus-like particles elicit protective immunity against avian influenza A(H7N9) virus infection in ferrets. *Vaccine.* 2015;33:2152-8.
13. Blanchfield K, Kamal RP, Tzeng WP, et al: Recombinant influenza H7 hemagglutinins induce lower neutralizing antibody titers in mice than do seasonal hemagglutinins. *Influenza and other respiratory viruses.* 2014;8:628-35.
14. Kamal RP, Blanchfield K, Belser JA, et al: Inactivated H7 Influenza Virus Vaccines Protect Mice despite Inducing Only Low Levels of Neutralizing Antibodies. *Journal of virology.* 2017;91.
15. Ting Hui L, Chia MY, Lin CY, et al: Improving immunogenicity of influenza virus H7N9 recombinant hemagglutinin for vaccine development. *Vaccine.* 2019;37:1897-903.
16. Bottcher C, Ludwig K, Herrmann A, et al: Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS letters.* 1999;463:255-9.
17. Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, et al: Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine.* 1999;17:2265-74.
18. van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *The Journal of general virology.* 2015;96:6-23.
19. Yang H, Carney PJ, Chang JC, et al: Structural analysis of the hemagglutinin from the recent 2013 H7N9 influenza virus. *Journal of virology.* 2013;87:12433-46.
20. Wei CJ, Xu L, Kong WP, et al: Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *Journal of virology.* 2008;82:6200-8.