

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-068

## 蛋白质优化设计与从头合成引领的疫苗研发革命

陈涛<sup>1,2</sup>, 赖锦涛<sup>1</sup>, 胡美林<sup>1</sup>, 马显才<sup>1,2</sup><sup>(1)</sup> 广州国家实验室, 广东 广州 510005; <sup>(2)</sup> 中山大学, 中山医学院, 广东 广州 510080)

**摘要:** 疫苗作为防控传染性疾病的有力手段, 在发展应用过程中经历了四次重要革命。近年来计算工具的迅猛发展更是推动疫苗研发走向新的阶段, 形成以结构为导向, 蛋白质优化与计算设计为核心的合成生物学研究范式。本文系统介绍了蛋白质优化设计中定向进化、半理性设计和理性设计三种策略与从头合成技术在疫苗研发中的应用与价值。在免疫原设计层面, 介绍了结构稳定性改造、表位聚焦、糖基化修饰调控等策略对提升抗原免疫原性与广谱性等特性方面的潜力。在递送系统层面, 介绍了蛋白纳米颗粒凭借高密度抗原展示与几何构象优势, 结合“马赛克”多价展示技术, 在诱导交叉中和抗体生成方面具有独特的优势。人工智能计算工具的突破性进展实现了从“结构模拟”到“功能定制”的转变, 并极大地推动了以抗原-抗体复合物结构为导向的反向疫苗学的发展。整合表位计算筛选与从头蛋白骨架设计, 实现了疫苗从天然结构到定制结构的突破。尽管面临高变异病原广谱保护、动态构象模拟等挑战, 疫苗设计与计算工具的深度融合加速了新型冠状病毒、呼吸道合胞病毒等疫苗的临床转化, 并为未来新发和突发传染病防控提供了通用设计方法。

**关键词:** 蛋白质优化; 从头合成; 疫苗设计; 纳米颗粒疫苗; 反向疫苗学

中图分类号: Q816 文献标志码: A

Revolution in vaccine development led by protein optimization design and *de novo* synthesisCHEN Tao<sup>1,2</sup>, LAI Jintao<sup>1</sup>, HU Meilin<sup>1</sup>, MA Xiancai<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Guangzhou National Laboratory, Guangzhou 510005, Guangdong, China; <sup>2</sup>Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China)

**Abstract:** Vaccines, as a cornerstone of infectious disease prevention and control, have undergone four transformative revolutions throughout their development and applications. In recent years, the rapid advancement of computational technologies has further propelled vaccine development into a new era, giving rise to a synthetic biology paradigm centered on structure-guided protein optimization and computational design. This article systematically reviews the applications and significance of three key protein optimization strategies—directed evolution, semi-rational

收稿日期: 2025-06-30 修回日期: 2025-08-19

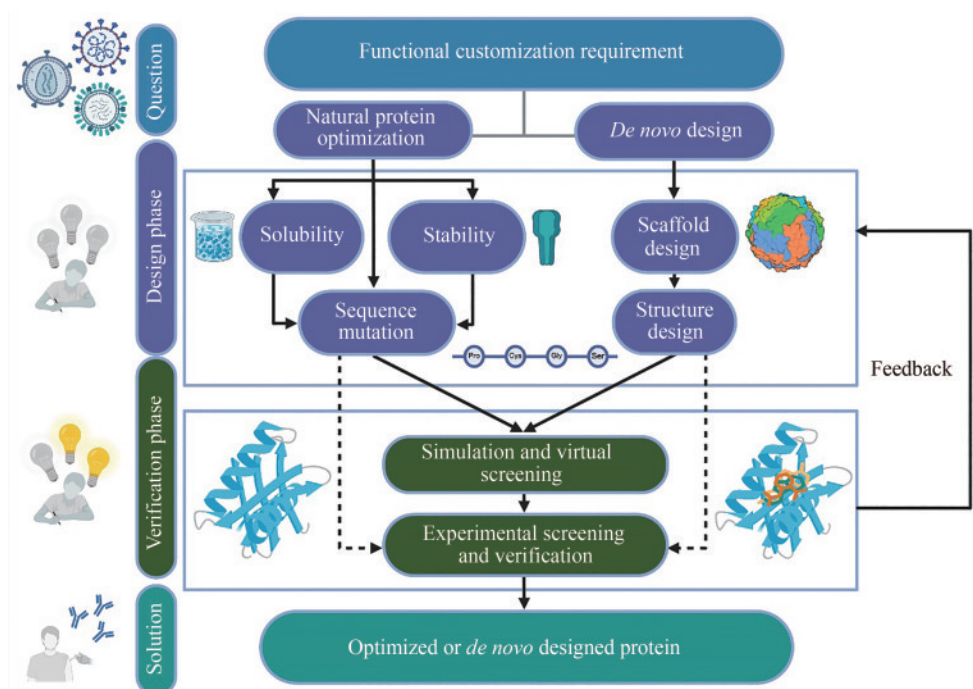
基金项目: 广州国家实验室专项 (GZNL2024A01017); 广东省基础与应用基础研究基金 (2024B1515020068)

引用本文: 陈涛, 赖锦涛, 胡美林, 马显才. 蛋白质优化设计与从头合成引领的疫苗研发革命[J]. 合成生物学, 2026, 7(1): 152-176

Citation: CHEN Tao, LAI Jintao, HU Meilin, MA Xiancai. Revolution in vaccine development led by protein optimization design and *de novo* synthesis [J].

Synthetic Biology Journal, 2026, 7(1): 152-176

design, and rational design—as well as *de novo* protein synthesis, with a focus on their roles in vaccine development. At the immunogen design level, strategies such as structural stabilization, epitope focusing, and glycosylation modulation are discussed for their potentials to enhance antigen immunogenicity and broaden protective efficacy. At the delivery system level, the unique advantages of protein nanoparticles in eliciting cross-neutralizing antibody responses are emphasized. These nanoparticles utilize high-density antigen presentation and precise geometric conformations, combined with “mosaic” multivalent display technology. Advances in artificial intelligence based computational tools have facilitated a paradigm shift from “structural simulation” to “functional customization”, thereby significantly promoting the development of structure-guided reverse vaccinology based on antigen-antibody complex structures. The integration of computational epitope screening and *de novo* protein backbone design has facilitated a transition from natural structures to customized designs in vaccine development. Although challenges remain, such as achieving broad-spectrum protection against highly variable pathogens and accurately simulating dynamic conformations, the deep synergy between vaccine design and computational tools has significantly accelerated the clinical translation of vaccines for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and respiratory syncytial virus (RSV), and established a universal design framework for the prevention and control of future emerging and unknown infectious diseases.



**Keywords:** protein optimization; *de novo* design; vaccine design; nanoparticle vaccine; reverse vaccinology

由病毒和细菌感染导致的传染性疾病对人类的生命健康造成了极大的威胁。自20世纪以来，人间传播的传染病频发。其中以流感病毒感染和冠状病毒感染最为突出。1918年爆发的西班牙大流感导致了全球约5000万人死亡，随后1957年和1968年先后爆发的两次流感大流行也分别造成了

逾百万人死亡<sup>[1]</sup>。相较于流感大流行，2003年的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒（severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV）与2012年开始广泛传播的中东呼吸综合征冠状病毒（middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV）造成的总死亡人数较少，但致死率极

高, 分别为9.6%和34.4%<sup>[2-3]</sup>。近年来, 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) 引起的新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 席卷全球, 导致了全球超700万人死亡<sup>[4]</sup>。这些大范围流行的传染性疾病严重影响了人类的生命健康, 给世界卫生领域带来了巨大挑战<sup>[4-5]</sup>。在应对这类大流行传染病的医疗对策中, 疫苗接种无疑是最为有效的策略之一, 可以实现对疫情广泛而长期的控制<sup>[6]</sup>。

最早在中国、印度、土耳其等国家中, 就有接种人痘以预防天花的先例。直到1796年英国医生詹纳采用牛痘接种疫苗开始, 人们对疫苗开始有了科学性的认识<sup>[7-8]</sup>。从巴斯德研发出鸡霍乱疫苗和狂犬病疫苗, 到之后卡介苗和灭活霍乱疫苗的相继出现, 减毒活疫苗和灭活疫苗为人类生命健康提供了重要保障, 并标志着疫苗进入研发中的第一次历史性科学革命<sup>[9-10]</sup>。此后科学家发现, 从病原体分离的具有免疫原性的蛋白、多糖等最小单元成分, 可以作为疫苗有效组分研发成为具有保护作用的亚单位疫苗, 这也标志着第二次疫苗研发革命的诞生。这类疫苗当中, 如白喉类毒素疫苗、破伤风类毒素疫苗等, 直至今日也仍然有效<sup>[8]</sup>。20世纪80年代, 随着重组DNA技术的问世, Valenzuela和Rutter等通过基因重组技术产生出乙肝病毒表面抗原, 并以此研发出首类基因重组疫苗。以乙肝疫苗为代表的基因重组疫苗的出现, 标志着疫苗研发进入第三次科学革命<sup>[8, 11]</sup>。2000年Rappuoli提出反向疫苗学 (reverse vaccinology, RV) 的概念, 并基于病原体深度测序数据研发出B群脑膜炎球菌 (meningococcal B, MenB) 疫苗。这一基于病原基因组信息, 通过生物信息学算法寻找抗原进行疫苗研发的策略, 为许多此前难以开发的疫苗提供了新的助力, 也标志着疫苗研发进入第四次革命<sup>[12]</sup>。疫苗通过向机体免疫系统递呈抗原, 进而刺激免疫细胞活化和引起中和抗体生成来发挥保护作用。其中免疫原的合理设计和向免疫系统的有效递呈是疫苗发挥作用的关键<sup>[8, 13]</sup>。然而, 大量病原特别是呼吸道传播病毒, 在人际传播过程中往往会发生免疫逃逸, 使得针对早期株的疫苗无法对预防当前流

行株提供保护。因此, 如何充分运用不同的设计策略设计广谱疫苗, 引起体内广谱中和抗体的生成, 并最终提供高效且持久的免疫保护, 是当前疫苗研发依然面临的严峻挑战。本论文综述了当前蛋白质优化设计与从头合成策略, 并阐述了基于这些策略进行的免疫原和递送载体设计方案, 同时探讨了人工智能浪潮下新型反向疫苗学设计思路, 以及当前疫苗研发的挑战与方向。

## 1 蛋白质优化设计和从头合成

### 1.1 蛋白质优化设计的策略

针对大多数病原的不同类型技术路线的疫苗, 最终需要依靠产生的蛋白类免疫原发挥功能。这些免疫原需通过递呈优势表位刺激机体产生抗病原适应性免疫应答。而这些蛋白质免疫原的功能发挥依赖于正确折叠所形成的特定构象。为了满足研究、生产、医疗等需要, 往往需要对天然蛋白质免疫原进行额外的优化设计, 使其呈现出与天然状态一致的构象或不同于天然状态下的构象, 从而保持其免疫原功能、改变其功能或是赋予其新功能。在与蛋白质优化有关的研究中, 具体有三种设计策略正处于应用: 一是基于定向进化的高通量筛选的蛋白质设计; 二是基于结构研究和同源序列分析的半理性设计; 三是运用计算工具, 基于深度学习的理性设计。

#### 1.1.1 基于定向进化的高通量筛选的蛋白质设计

基于定向进化的高通量筛选的蛋白质设计策略最早在蛋白质的研究中得到广泛应用。这一设计策略包括两个主要步骤: 首先通过随机诱变或基因重组等方式实现基因多样化, 构建多样化的基因文库; 接着进行高通量筛选以获得具有改进的蛋白<sup>[14-15]</sup>。通过反复迭代这一过程以实现更优良的蛋白质设计, 从而改进蛋白的表达水平、稳定性、原有功能等, 或是赋予其新的功能。随机诱变、聚焦诱变和同源重组是构建基因文库的常用方法, 这三种体外基因多样化的方法可以成功构建出庞大而丰富的基因文库, 充分展示蛋白质不同点突变的影响差异, 从而筛选优化出最佳序列<sup>[14, 16]</sup>。此外, 利用突变菌株、基因重组、

CRISPR-Cas9系统等可以实现体内基因多样化, 省略重复的克隆, 减少转化和转染步骤, 从而实现更高效的突变筛选<sup>[14]</sup>。

值得注意的是, 定向进化中收益递减和突变序列的权衡也是一个重要的环节, 在多层筛选迭代的过程中, 蛋白质序列中积累的突变日益增多, 但其优化指标并不完全呈线性水平提高。在优化过程中, 少数引入的突变将起到关键作用以显著改善蛋白性质, 而多数突变是发挥稳定作用, 包括对于关键突变位点的构象稳定和蛋白整体结构的稳定, 对于功能的影响则相对较小<sup>[17]</sup>。基于定向进化的设计策略需要构建大规模的基因文库并一一进行表达和筛选以确定突变序列, 这一过程工作量巨大且耗时较长, 存在一定的盲目性, 但在缺乏对蛋白已有研究的前提下, 这一方法提供了广阔的探索空间, 较高的随机性也为蛋白质性能的优化提供无限可能。

在这些定向进化设计策略中, 深度突变扫描 (deep mutational scanning, DMS) 作为一种高通量筛选技术, 常被用于定向进化蛋白质设计策略的最前端, 指导疫苗的免疫原设计。其通过构建覆盖所有单点突变的蛋白表达文库, 来筛选潜在的抗原逃逸突变位点, 进而指导病毒进化预警和突变株疫苗设计。Bloom团队<sup>[18-19]</sup>运用DMS技术对流行性和SARS-CoV-2等病毒的突变位点进行了研究, 重点探究了抗原不同突变对受体结合、细胞进入和免疫逃逸等方面的影响, 为广谱疫苗的抗原表位设计提供了重要支撑。曹云龙等<sup>[20]</sup>则利用DMS技术绘制了SARS-CoV-2的抗体逃逸图谱, 并结合ACE2结合力、密码子使用限制等参数, 构建了病毒的突变偏好性模型, 利用该模型成功预测了BA.2.75和BA.5的进化热点, 预测结果与实际流行株突变保持一致, 同时该团队基于预测设计的假病毒也与真实变异株高度相似, 证明了DMS对抗原研究和设计的巨大价值。Chakraborty团队<sup>[21]</sup>则利用DMS技术成功进行了免疫原的设计和疫苗的研发, 基于DMS数据集设计了基于计算分析的设计型受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 抗原, 这些抗原消除了抗体对易变表位的结合, 保留对保守表位的结合, 具有更强的广谱中和保护效力。

### 1.1.2 基于结构研究和同源序列分析的半理性设计

基于结构研究和同源序列分析的半理性设计依赖于对蛋白质已有信息的掌握, 通过对蛋白结构和同源序列的分析, 精确地锁定蛋白序列中具有研究价值的保守位点和关键功能位点, 并围绕这些位点构建精细的突变文库进行筛选设计<sup>[22]</sup>。这种非随机的半理性设计策略有两个显著的优势: 一是锁定了有限且影响蛋白性质较大的某些位点研究, 从而缩短了定向进化策略中烦琐的筛选迭代过程, 而且在设计过程中, 可以基于蛋白拓扑结构引入半胱氨酸突变, 人为构建二硫键, 从更高级别的二级结构对蛋白进行设计, 不仅限于氨基酸序列; 二是有选择地设计序列突变方向而非随机进行筛选尝试, 在设计过程中同时进行了对蛋白设计的“正向设计”和“负向设计”, 更高效精准地实现对蛋白的优化, 提高设计成功率。

蛋白质的天然构象往往处在一种相对稳定的状态, 即“边际稳定性”, 天然状态下的蛋白质与错误折叠的蛋白质或是缺乏构象折叠的蛋白质相比, 自由能差异较小, 易受到外界因素干扰而发生构象变化<sup>[23]</sup>, 少数关键位点的突变便对蛋白质稳定性具有显著的影响<sup>[24]</sup>。为了确保蛋白质稳定性而进行蛋白质设计, 我们需要充分考虑“正向设计”和“负向设计”所带来的影响。“正向设计”旨在维持蛋白质的有利结构, 促进蛋白质保持天然状态下的稳定构象; “负向设计”则是筛选不利于蛋白质构象折叠出错的突变设计, 例如避免特定突变引起的大幅度蛋白质构象改变或是引入补偿性突变以对抗其他位点突变引起的构象改变<sup>[25]</sup>。

在半理性设计策略中, 对于蛋白结构的关键保守位点的分析和保留体现了“正向设计”的要素。结合系统发育学对于蛋白序列的研究, 利用自然选择排除不合理的突变, 这种对突变方向的筛选与设计体现了“负向设计”的要素, 综合两方面的设计是确保半理性设计策略成功的关键。疫苗设计中应用的“共识序列”策略便是半理性设计的一个典型范例, 通过对抗原蛋白的系统发育分析, 筛选不同亚型毒株的高频共有突变, 设计广谱免疫原并开发为广谱疫苗。徐可团队利用共识序列策略成功对流行性和SARS-CoV-2进行了广谱免疫原的设计, 含有共识序列的免疫原可以诱

导更有效的广谱中和保护作用，对不同进化分支的病毒均具有中和活性<sup>[26-27]</sup>。

### 1.1.3 基于深度学习的理性设计

基于深度学习的理性设计是利用计算机辅助蛋白设计，通过构建深度学习模型应用于实际的蛋白设计策略。这一策略首先根据蛋白质设计目的构建合适的深度学习模型并验证模型预测准确性；其次提供数据集进行模型预测，筛选出优质的序列结果；接着以现有序列结果进行实验验证，筛选出高质量的蛋白序列；之后将筛选结果重新提供给模型预测，优化新的计算方法和预测模型，在进行多次的“模拟预测-实验验证”迭代后，获得最终的最优蛋白设计<sup>[28]</sup>。辉瑞公司利用计算设计生成了多个呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus, RSV）F蛋白的融合前稳定变体，并从中筛选出最优抗原，最后成功开发了高效双价RSV疫苗<sup>[29]</sup>。Gifford团队<sup>[30]</sup>利用高通量筛选和虚拟模拟设计了多种SARS-CoV-2肽疫苗，从SARS-CoV-2全蛋白组中筛选潜在的肽段，利用结合亲和力预测进行肽段评分，筛选具有应用潜力的肽段，之后利用OptiVax算法筛选人群覆盖率更高的肽段，并利用EvalVax算法计算肽段和人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）的结合率，最终获得具有最大化人群覆盖率和突出免疫原性的优势肽段。

理性设计策略的关键在于可靠模型的构建，除了需要有大量积累的数据集供模型不断学习改进外，还涉及分子力学、分子动力学、模拟退火方法、三维结构搜索与分子结构对接和以蒙特卡罗方法为代表的量子力学计算等方法<sup>[31-32]</sup>。此外，传统的蛋白质研究中已有的生化知识对于蛋白质的理性设计也同样具有重要作用<sup>[33-34]</sup>。伴随计算工具功能的不断发展、深度学习模型能力的不断提升，如今的理性设计已经可以逐步减少甚至完全脱离实验验证步骤，仅基于给定的天然蛋白骨架，通过对大量蛋白数据结构的深度学习和高精度的蛋白模拟预测，就能完成对蛋白质的优化设计<sup>[35]</sup>。

进一步而言，不受到天然蛋白质骨架的限制，实现全新蛋白质骨架的构建与序列的生成，对于已有的学习模型也并非不可能，如基于扩散模型的RFdiffusion就能够完成对蛋白质的结构和功能

的设计<sup>[36]</sup>。理性设计策略不仅有效实现了已有蛋白质的优化设计，更在蛋白质的从头合成方面展现出巨大潜力，是未来蛋白质研究不可或缺的重要方法。

### 1.1.4 计算生物学与传统方法在疫苗设计中的优势与局限性

伴随蛋白质优化设计方法从传统的定向进化逐步发展到如今的半理性设计和理性设计，并且受到计算工具迅猛发展的影响，疫苗设计已经逐渐转向全新的以结构为导向，蛋白质优化与计算设计为核心的合成生物学研究范式。图1对比展示了新旧两种研究范式中不同设计方法实现疫苗设计的过程。传统方法中的疫苗设计存在潜在的盲目性，它通过构建大规模基因文库和高通量筛选来获得良好的疫苗设计，这一过程不仅耗时长，且成功率有限，对于免疫原的优化设计也局限于氨基酸序列而缺乏整体稳定性，因此其针对复杂病原疫苗设计缺少有效性。而半理性设计和理性设计等新方法，汲取了传统研究中积累的经验，结合计算生物学，大大缩短了疫苗设计所需的研发流程，并提高了设计成功率。半理性设计中利用生物信息学分析抗原序列，结合结构预测模型，针对免疫原上特定位点构建小规模文库进行筛选，同时从蛋白的二维结构乃至三维结构和四维结构入手，从高维度出发进行更全面的免疫原设计，构建多聚体免疫原以提升免疫原性。理性设计在思路方法上与传统的定向进化有相似之处，但借助计算工具进行的模拟对接和虚拟筛选可以省去传统方法中烦琐的实验验证流程。即使考虑到虚拟筛选准确率尚待提高，也可借此减轻实验负担，聚焦于少数预测结果良好的免疫原并进行免疫原性的验证。更重要的是，理性设计可以预先根据设计目的构建预测模型，相较于定向进化的随机高通量筛选更具有靶向性。在未来的疫苗研究当中，研究者们会更加关注于抗原结构，综合运用不同设计方法，通过对蛋白质不断的优化设计改善其免疫原性，最终研发出保护效能突出的疫苗。

## 1.2 蛋白质从头合成

在蛋白质设计中，通常存在三个关键的设计

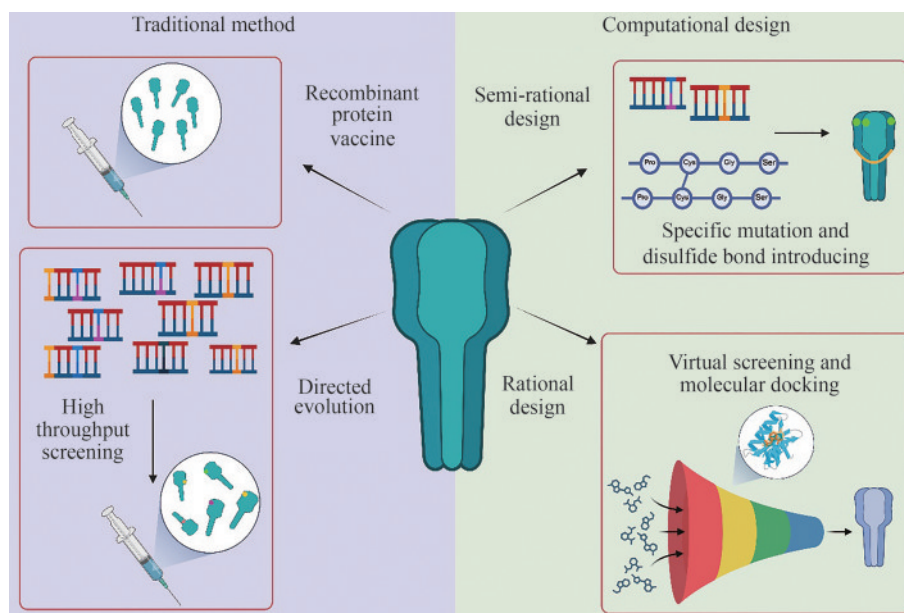


图1 两种研究范式中疫苗的不同设计方法

Fig. 1 Different design methods for vaccine development in two research paradigms

问题需要解决，包括结构预测、固定骨架设计和从头设计合成<sup>[37]</sup>。以AlphaFold为代表的结构预测软件的兴起和发展，解决了通过序列直接预测蛋白质结构的问题；而以固定骨架进行蛋白质设计的设计问题，也在前文提到的三种蛋白质优化设计策略的广泛应用中有所解决。目前，蛋白质的从头合成是蛋白质设计研究中最关键的也最难以解决的设计问题。从头合成是指完全从源头开始设计蛋白质的序列和各级结构，不参考自然界中已知蛋白质的骨架结构，最终人为设计构建全新的蛋白质<sup>[38]</sup>。

蛋白质的从头合成共经历了三个阶段，分别是手动设计阶段（20世纪70—80年代），以物理化学原理指导的计算设计（20世纪80—90年代），基于片段和生物信息学的计算设计（21世纪开始）<sup>[38]</sup>。在最早期的手动设计阶段，主要借助物理模型和简单多肽合成技术合成序列简单、结构单一的小蛋白，例如主要以 $\beta$ -折叠作为主要结构的二聚体蛋白 $\beta$ -bellin<sup>[39]</sup>。在以物理化学原理指导的计算设计，引入数学模型和侧链重包装算法进行蛋白质设计<sup>[38]</sup>，成功设计了以 $\alpha$ -螺旋作为主要结构的四螺旋束蛋白 $\alpha 4$ ，它在水溶液中仍然可以保持稳定的折叠结构<sup>[40-41]</sup>，而且 $\alpha 4$ 衍生蛋白中锌离子结合位点的引入也展现了从头合成蛋白的巨大潜力，创造一个具有全新结构和目的功能的蛋白<sup>[42]</sup>。在基于片段和生物

信息学的计算设计时代，蛋白TOP7的设计和实现标志着蛋白从头合成取得了里程碑式的成就。蛋白TOP7的设计中包括了 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠两种关键结构，不仅具备良好的稳定性，而且最终展现的真实蛋白结构也与设计之初的预测结构高度相近，这一设计突破了先前有限结构的蛋白设计，在多样化结构设计的基础之上，展现出蛋白质设计预测所能达到的高精度<sup>[43]</sup>。

深度学习模型的发展和运用，为从头合成注入了新动力。如今的蛋白质从头合成汲取了过往多种设计原理和方法的优势，发展成为以人工智能（AI）工具和数据驱动的利用深度学习模型完成的计算设计<sup>[25]</sup>。使用扩散模型根据研究目的定制蛋白，并生成预期的蛋白质骨架结构，使用蛋白质语言模型预测蛋白的目的序列<sup>[36, 44]</sup>，结合系统发育学对蛋白进化的研究与生物物理计算，高通量生成蛋白设计，通过多轮的实验筛选和深度学习确定最终的蛋白序列与结构<sup>[25]</sup>。现在蛋白质从头合成的设计正逐渐从“结构生成”向“功能定制”发展<sup>[25]</sup>，设计者们的关注点更加转向实际应用，从以往的如何设计一个结构复杂的蛋白转变为现在的如何根据目的需要设计一个具有功能结构的蛋白。David Baker团队以靶蛋白结构为起点，从广泛探索靶蛋白表面选定区域的可能结合模式的广阔空间开始，在最有可能的结合模式附

近加强搜索以确定所需的蛋白质结构，最终设计出对靶蛋白有着极高亲和力的目的蛋白，他们以信号传导相关蛋白和病原体表面蛋白为范本，成功设计了14种靶蛋白结合蛋白，并且表征了其中5种靶蛋白-设计蛋白复合物的晶体结构，复合物结构与计算预测模型高度匹配<sup>[45-46]</sup>。尽管这一设计策略尚无法完全做到从目的功能导向蛋白结构，实现最终的蛋白设计与合成，但也体现了“功能定制”从头合成蛋白的充分潜能和巨大价值，这些与靶蛋白高度匹配的人工合成蛋白已足以开发为未来潜在的靶向治疗药物。Correia团队则是开发了TopoBuilder算法，根据免疫原设计中希望展示的RSV融合前糖蛋白的三个非重叠表位，重新设计了新的蛋白质拓扑结构以高效呈现抗原表位，构建了一个不同于天然结构的人工免疫原，且免疫效果优于该团队尝试的另一种基于天然骨架模板呈现抗原表位设计的免疫原<sup>[47]</sup>。

### 1.3 常用计算工具及特点

蛋白类免疫原的优化设计和从头合成依赖于生物信息学和AI的迅猛发展。这些新兴领域的蓬

勃发展也催生了大量具有代表性的计算软件和工具。最为代表性的为AlphaFold、Rosetta、RFDiffusion、ProteinMPNN等计算软件和模型。除此之外，还有许多其他工具也在其中发挥重要作用。Schrödinger与Discovery Studio集成了分子力学、分子动力学及量子力学方法，支持从蛋白质结构优化、分子对接到ADMET属性预测的全流程研究。其中Discovery Studio 2021通过GPU加速将对接效率提升了30%，并强化了蛋白-配体相互作用可视化功能<sup>[48]</sup>。GROMACS、CHARMM等分子动力学软件基于牛顿运动方程对原子运动进行显式模拟，广泛适用于蛋白质折叠、膜通道离子传输及配体结合能计算等领域<sup>[49]</sup>。AutoDock、Zdock、HADDOCK、ClusPro等软件则解决了大分子与小分子配体、大分子与大分子之间的对接问题<sup>[50-53]</sup>。表1总结了当前常用计算设计软件及其核心特点。

2018年，DeepMind团队开发的AlphaFold一代在第13届国际蛋白质结构双盲预测竞赛(CASP13)中崭露头角，成功预测了43种蛋白质中的25种结构，在98名参赛者中名列榜首<sup>[64]</sup>。2020年，DeepMind研发了升级后的AlphaFold2，在CASP14竞赛中夺冠。不同于第一代AlphaFold

表1 计算设计的常用软件总结

Table 1 Overview of commonly-used software for computational design

计算软件	开发时间	主要用途	核心特点
MODELLER <sup>[54-55]</sup>	1993年	基于同源建模的蛋白质三维结构预测，优化侧链构象	依赖已知同源模板，引入空间约束进行优化，适用于结构补全与局部优化
Rosetta <sup>[56]</sup>	1998年	已知蛋白质稳定性增强、活性位点改造，全新结构蛋白的构建、功能位点设计	基于物理力场与蒙特卡洛搜索，支持大规模构象采样，是蛋白质从头设计的里程碑式工具
FoldX <sup>[57]</sup>	2005年	快速评估点突变对蛋白质稳定性、结合亲和力的影响	经验力场结合机器学习，适用于高通量虚拟突变筛选
D-I-TASSER <sup>[58-59]</sup>	2008年	基于模板的蛋白质结构预测与功能注释，间接支持优化设计	整合多重线程算法和分子动力学优化，提供从结构到功能的综合分析
AlphaFold <sup>[60]</sup>	2018年	高精度蛋白质结构预测	首次将深度学习大规模应用于结构预测，显著提升精度
AlphaFold2 <sup>[60]</sup>	2020年	革命性的高精度蛋白质单链及复合物结构预测	基于注意力机制的端到端模型，预测精度接近实验水平，开源后推动结构生物学变革
RoseTTAFold <sup>[61]</sup>	2021年	结构预测与部分设计功能，支持蛋白质-蛋白质复合物建模	三轨神经网络(序列-结构-进化信息协同处理)，计算效率高，可建模蛋白质-蛋白质相互作用
ProteinMPNN <sup>[62]</sup>	2022年	蛋白质序列设计，根据目标结构生成最优氨基酸序列	基于图神经网络，设计速度更高，支持对称性设计和功能位点约束
RFDiffusion <sup>[36]</sup>	2023年	从头生成功能性蛋白质结构	基于扩散模型生成三维结构，可直接融入功能约束，开创设计新范式
AlphaFold3 <sup>[63]</sup>	2024年	预测蛋白质与核酸、配体、修饰等的复合结构，支持更广泛的分子相互作用建模	统一框架处理蛋白质+生物分子复合系统，显著提升配体结合位点预测准确性，推动药物设计发展

的最主要特征在于，它完全避开了能量函数，采用基于 Transformer 的神经网络架构，深度融合多序列比对信息，通过“端到端”的训练和循环推理机制，迭代优化预测结果，并基于蛋白质序列和结构的大数据，以及高达 9000 万参数的大模型，实现了预测精度达到原子级分辨率<sup>[60]</sup>。即使 AlphaFold2 的预测蛋白结构实现了飞跃性突破，但也还遇到了一些问题与挑战，如：过度依赖多重序列比对，对孤儿蛋白、病毒蛋白等低同源序列场景预测失败率高；对结构域间柔性连接区的预测误差较大，影响复杂蛋白的功能解析；只能预测蛋白质在一个瞬间的静态结构等。2022 年，李子青团队开发的蛋白质结构预测系统 ManiFold 在 AlphaFold2 的基础上针对其关键局限进行了针对性突破。ManiFold 融合了单序列蛋白质语言模型，减少了对同源序列信息的依赖，增强了蛋白质序列编码器的表征能力；采用旋转和平移等变约束增强了结构解码器；进一步采用主链与侧链迭代方式，优化预测结果。在 2022 年 08 月至 2022 年 10 月的 CAMEO 竞赛中，ManiFold 连续三个月的综合表现位居全球第一名，参赛四个月多次取得月排名、周排名第一至第三的佳绩。ManiFold 通过算法底层创新而非数据规模竞争，解决了 AlphaFold2 在疫苗研究等关键场景的实用瓶颈。2024 年 5 月，DeepMind 推出生命分子结构预测模型 AlphaFold3，不再局限于单个蛋白质结构的预测，而扩展到包括蛋白质、DNA、RNA、小分子、离子和修饰残基在内的诸多生命大分子复合物的联合结构预测，除了应用能力的扩展，它在计算方法上也有创新，把 AlphaFold2 中的进化模块改效率更高的成对模块，把 AlphaFold2 中的结构模块变成直接产生三维坐标的扩散模块，大幅度降低了计算的复杂度<sup>[63]</sup>。采用扩散模型技术，从原子云开始，经多步降噪形成精确分子结构，可处理更大输入集，预测结果更准确、更可靠<sup>[60, 63]</sup>。虽然 AlphaFold3 的推出使得多种生命大分子的联合预测成为可能，但目前的技术仍无法在预测蛋白质的动态功能、相互作用的时序变化以及复杂的多模态场景中提供全面的解决方案。例如，DNA、RNA 与蛋白质的相互作用、蛋白质与小分子药物的结合等都可能受到环境因素的影响。AI 模型在处理这类多模

态、动态变化的生物系统时仍处于初步阶段，缺乏足够的准确性和可靠性，其预测能力也依赖于训练数据的质量和多样性，对于某些未充分研究的分子类型，预测结果可能不够准确。后续的预测模型将依赖于更多高质量和多样性的蛋白质结构以及多模态与动态变化的生物系统等数据作为训练集，进一步提升其预测的准确性。

Rosetta 是一款计算蛋白质结构建模与设计软件套件。Rosetta 的开发始于 20 世纪 90 年代中期，最初侧重于小蛋白质的从头结构预测。随着时间的推移，应用的数量不断增加，其功能逐渐扩展到了设计和小分子对接等工作，如 RosettaDock<sup>[65]</sup>、RosettaAntibodyDesign<sup>[66]</sup>。目前 Rosetta 是基于能量函数与蒙特卡洛模拟等方法，在蛋白质结构预测、分子对接及蛋白质设计等领域广泛应用。它利用多层级能量函数描述蛋白质结构物理化学性质，以评估不同构象的稳定性和可能性，并利用蒙特卡洛程序从已知蛋白质结构中组合片段，实现从头预测蛋白质结构。同时，结合多模块采样与优化技术，如刚体采样、侧链采样、循环坐标下降等采样方法，以及梯度下降、遗传算法等优化算法，提高结构预测和设计的准确性和效率。然而，其能量函数和采样方法在描述某些复杂生物分子系统时可能存在局限性，且计算成本较高，对硬件资源要求也较高<sup>[56]</sup>。

RFdiffusion 是一款基于扩散模型的蛋白质从头设计工具，于 2023 年 3 月开源发布。RFdiffusion 基于去噪扩散概率模型在蛋白质构象空间中逐步施加高斯噪声以破坏初始结构，通过训练等变神经网络执行逆向过程，逐步重建符合物理规律的蛋白质三维构象，最终生成具有结构稳定性的非天然新型蛋白质。RFdiffusion 通过微调预训练的 RoseTTAFold 并整合条件反射机制得以实现，该机制将模型在扩散过程每一步的预测输出迭代反馈至后续输入，显著增强了生成结构的构象精度与多样性。该工具能够有效设计多种蛋白质拓扑结构，包括单体蛋白、对称寡聚体、靶标结合蛋白以及功能性蛋白结构域等<sup>[36]</sup>。RFdiffusion 通过算法创新克服了一些传统方法的限制，但它们仍然受到训练数据多样性和质量的影响。不同生物种类、环境条件甚至是蛋白质自身的变异性都会影

响模型的预测能力。例如,针对某些特定疾病或变异株的研究,现有的数据库可能不够丰富,导致模型预测的蛋白质结构与实际功能存在偏差。

ProteinMPNN是一种基于深度学习的蛋白质序列设计方法,于2022年9月公开。该工具利用图神经网络对蛋白质结构进行建模,将残基表示为图节点,残基间相互作用表示为边。通过整合多层图卷积与注意力机制,该模型能够有效捕获残基间复杂的协同关系。在序列优化设计过程中,ProteinMPNN综合分析目标蛋白质的骨架几何特征,并选择性约束关键残基,如与配体邻近或是在多重序列比对中高度保守的残基等氨基酸类型,以维持其固有的生物学功能。因此,该模型能够预测出与目标结构高度契合的氨基酸序列。实验结果表明,ProteinMPNN在天然蛋白质骨架上的序列恢复率可达52.4%,显著高于传统方法的32.9%。该模型在蛋白质功能优化方面展现出卓越性能,例如提升酶的催化活性或热稳定性以设计性能增强的变体。此外,其能够通过序列设计强化蛋白质与特定配体或靶标的结合亲和力,在疫苗开发等领域具有重要应用价值<sup>[62]</sup>。对于蛋白质功能的优化,如酶的催化活性、抗体的亲和力等,ProteinMPNN虽然能够预测出较为稳定的结构,但其在优化功能性方面的精度仍受限,尤其是在复杂环境下,如何在保留原有功能的同时增强其性能是一个挑战。

## 2 疫苗免疫原的优化设计

伴随疫苗研究的不断深入,人们对于病原生物学和免疫学的认识加深,如今的疫苗研发更加关注以抗原结构为基础的免疫原设计<sup>[13, 67-68]</sup>。一方面,需要充分考虑免疫系统所识别的抗原表位,在疫苗中以恰当的抗原结构所展示;另一方面,需要采取特定的免疫聚焦策略,通过合适途径向免疫细胞递呈抗原激活,最终诱导机体产生广谱且长期有效的中和保护抗体,在人群中实现对病毒的群体免疫。纳米颗粒疫苗是当前颇具潜力的新型疫苗技术,其中基于蛋白质纳米颗粒平台的纳米疫苗展现出了突出的优势,纳米疫苗的大小范围在10~100 nm之间,是抗原递呈细胞的理想

摄取大小,纳米疫苗对抗原的高密度展示也显著增强了其免疫原性<sup>[69-70]</sup>。在纳米疫苗的研发中,蛋白质优化设计和从头合成等方法具有重要意义,无论是抗原的合理设计,还是纳米颗粒递送载体的优化迭代都离不开这些方法,而计算工具如AlphaFold、Rosetta等的兴起和广泛运用,更是为疫苗研发的道路注入了新活力。在当前反向疫苗学2.0的研究思路引领下,研究者从抗原抗体复合物结构出发指导疫苗设计,最终诱导广谱中和抗体的生成。图2展示了目前主要的疫苗设计策略和基于反向疫苗学的基本研究思路。本部分将对以上疫苗设计策略进行详细讨论。

### 2.1 免疫原的抗原表位设计和稳定性优化

疫苗免疫原是疫苗发挥免疫保护作用的关键,免疫细胞通过识别免疫原上的抗原表位以产生抗体对抗病原体的感染,其中尤以中和表位所对应的中和抗体具有强大的保护力。抗原表位根据其空间结构特点可分成线性表位和空间表位。线性表位是由蛋白肽链上一段序列相连续的线性氨基酸残基所构成,空间表位则是由蛋白肽链中不连续的但空间位置接近的一些氨基酸或多糖残基所构成。针对疫苗免疫原的设计往往从其抗原表位的选择和优化展开,旨在设计出包含中和表位在内的能够有效激活免疫细胞和引起中和保护抗体生成的免疫原。疫苗免疫原的稳定性对于疫苗有效性至关重要,稳定性良好的免疫原确保了表位设计和天然的多聚体构象在免疫原上的有效保留,也保证了疫苗储存和接种过程中抗原的有效性。

#### 2.1.1 以线性表位为主的免疫原设计

在早期针对SARS-CoV-2的疫苗研究中,研究者们多以SARS-CoV-2表面刺突蛋白作为疫苗免疫原设计,表面刺突蛋白与宿主细胞受体ACE2的结合过程中,会经历从融合前构象到融合后构象的转变,包括了S1亚基的脱落和S2亚基的构象转变<sup>[71]</sup>。为了能够保持表面刺突蛋白的融合前构象,McLellan团队<sup>[72-73]</sup>先后设计了S-2P和HexaPro两种变体,通过在表面刺突蛋白内部引入脯氨酸突变,替换原本的柔性环区域或是 $\alpha$ -螺旋末端的氨

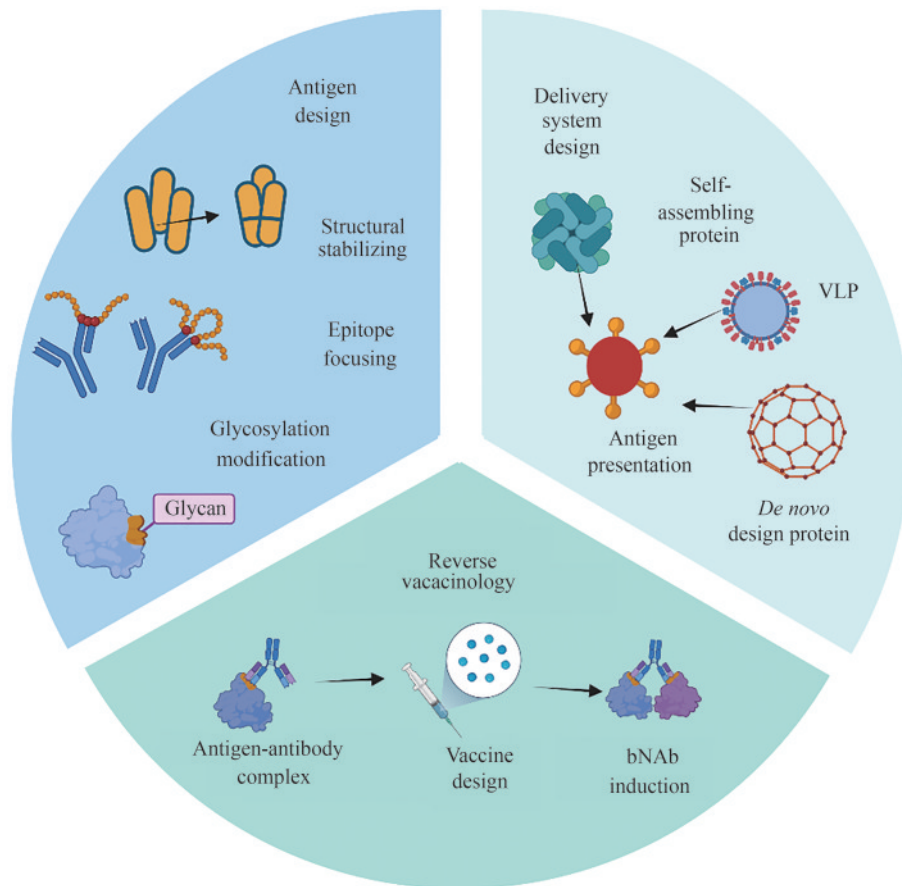


图2 疫苗设计策略和基于反向疫苗学的疫苗研究思路

Fig. 2 Vaccine design strategies and research paradigm based on reverse vaccinology

基酸残基，稳定展示了表面刺突蛋白三聚体的融合前构象，并提高其热稳定性，额外还实现了蛋白表达水平的提高，这对 SARS-CoV-2 疫苗研发具有重要意义。全球大流行背景下的 SARS-CoV-2 已经变异分化出了多种毒株，基于抗体对不同毒株的中和保护能力可将 SARS-CoV-2 分为七种血清型<sup>[74-76]</sup>，多种血清型的病毒和不同毒株潜在的免疫逃逸能力对当前 SARS-CoV-2 疫苗的开发提出了巨大挑战，合理的疫苗设计以诱导广谱中和抗体对抗不同毒株是疫苗研发的关键所在。一种可行的策略是：针对不同病毒亚型抗原的共识线性表位设计免疫原，以有效诱导广谱中和抗体。蓝柯与徐可团队<sup>[27]</sup>采用共识序列策略，基于多种毒株的传染性和免疫逃逸能力分析了 SARS-CoV-2 的表面刺突蛋白的进化路线，通过对 2675 个表面刺突蛋白的系统发育分析，筛选其中的高频共有突变，设计了一种广谱免疫原 Span，并开发为广谱疫苗。Chakraborty 团队<sup>[21]</sup>从抗体与抗原结合表位出发，

基于 DMS 获取的数据集和不同亚型病毒的序列，设计了基于计算分析和序列筛选的两类 RBD 抗原，但以计算设计型 RBD 为免疫原的 mosaic-2 和 mosaic-5 两类疫苗，最终只针对 SARS-CoV-2 的早期株有良好的保护效力，而对 XBB 等奥密克戎亚型的毒株缺乏效力，一个可能的原因是计算设计型 RBD 受限于有限的训练数据，最终的突变序列缺少足够的代表性以覆盖奥密克戎亚型等免疫逃逸强的毒株类型。而以序列筛选型 RBD 为免疫原的 mosaic-7 疫苗则具有强效的广谱中和能力，对奥密克戎亚型毒株也同样具有保护力。这些方法基于对抗原序列的分析，并以此指导最终疫苗免疫原的设计，设计成功与否很大程度上取决于选定序列的代表性和可靠性。在其他病毒疫苗的开发中，也有类似的研究思路，金侠团队<sup>[77]</sup>通过分析登革热四种血清型的包膜蛋白序列，设计了 cE80 (D4) 和 cE80 (max) 两种免疫原，对四种亚型的病毒均有一定的中和保护作用；HIV 疫苗的开发中

也基于共识序列设计了多种免疫原并诱导了中和抗体的生成<sup>[78-79]</sup>。计算工具快速发展也为免疫原的表位设计提供了巨大助力。早期一种常见的计算工具辅助设计方法是基于抗原序列对比和虚拟筛选等手段,从抗原中找出免疫原性较强的抗原表位,再通过分子对接、虚拟模拟等方式验证肽段的免疫原性<sup>[80-81]</sup>。Munthe团队<sup>[82]</sup>利用NIP算法对SARS-CoV-2的多个肽段进行筛选和免疫原性验证,最终发现了33个数据库中缺少的新抗原表位,新表位大多来自于SARS-CoV-2的非结构蛋白,这些出现在不同变异株中的非刺突蛋白的保守表位是广谱疫苗抗原表位设计的有利靶点。如今凭借计算工具日益强大的预测能力,多种预测模型和方法综合运用,更加快了免疫原的设计,通过结构预测和序列预测分析抗原表位及其免疫原性,重点研究特定关键残基,完成抗原的表位鉴定和疫苗免疫原的表位设计任务<sup>[83]</sup>。

### 2.1.2 以空间表位为主的免疫原设计

RSV感染是儿童和老年人等免疫低下人群呼吸道疾病的重要原因之一,为世界带来巨大的公共卫生负担,而RSV疫苗的开发此前却并不顺利,直至RSV中融合前F糖蛋白三聚体(prefusion F, pre-F)的结构的探明才有了显著进展<sup>[84]</sup>。此前以融合后F糖蛋白构象为基础开发的RSV疫苗存在较强的抗体依赖增强效应(antibody dependent enhancement, ADE),这会导致疫苗接种后不仅不能产生有效的保护作用,反而引起病毒的加强感染。而以融合前F糖蛋白构象开发的疫苗则能很好地消除ADE效应,起到有效的保护作用<sup>[85]</sup>。Graham团队<sup>[86]</sup>以pre-F三聚体构象为基础设计开发了DS-Cav1疫苗,为了阻止分子重排为融合后构象,稳定pre-F构象并保留中和位点,通过引入半胱氨酸突变成二硫键和在结构中的空腔区域引入突变以填充蛋白内部结构,明显提高了pre-F的稳定性。随后辉瑞公司在DS-Cav1的基础上继续探索抗原设计,采用二硫键突变、空腔填充和电荷优化突变三种策略进行计算设计生成了398个变体,最终筛选出最优的抗原847,将抗原847的突变位点引入到RSV的A、B两种亚型的蛋白骨架中,成功开发了一款高效的双价RSV疫苗<sup>[29]</sup>。莫德纳公司基于DS-Cav1抗原设计的mRNA疫苗和

辉瑞公司基于847抗原设计的双价疫苗均已在临床试验中得到验证并获批上市<sup>[29, 87]</sup>。pre-F三聚体结构作为疫苗免疫原的概念验证推动了RSV疫苗开发的飞速进展,这也得益于研究者对于抗原空间表位的高度重视和日益深入的认识,基于抗原结构和空间表位进行合理的免疫原设计是未来疫苗开发的重点。

从抗原空间表位出发,重视疫苗中免疫原恰当的构象展示并指导疫苗开发,这样的策略在HIV病毒、寨卡病毒、登革热病毒等的疫苗研发中也得到了运用。HIV疫苗的研发主要关注于包膜糖蛋白(envelope glycoprotein, Env)三聚体稳定的空间展示,通过氨基酸突变和二硫键引入等方式稳定Env三聚体结构<sup>[88]</sup>,并开发出了SOSIP<sup>[89]</sup>、NFL2P<sup>[90]</sup>、UFO<sup>[91]</sup>等Env三聚体设计,尽管尚无有效的HIV疫苗面世,但这些尝试仍然为HIV疫苗和其他病毒疫苗的开发提供了宝贵经验。Haynes团队<sup>[92]</sup>将分子动力学模拟与马尔可夫状态模型相结合,揭示了抗体与抗原从“相遇态”到“结合态”的动态结合路径,通过对免疫原的靶向突变和结构优化改善了免疫原性。寨卡病毒、登革热病毒等黄病毒属病毒的疫苗开发困难在于疫苗难以诱导有效的交叉中和抗体产生,无中和能力的交叉抗体反而引起了病毒自身和病毒交叉之间明显的ADE效应,加剧了病毒感染<sup>[93-94]</sup>。以线性表位为主的抗体往往不能有效中和病毒感染,反而促进了ADE效应<sup>[95]</sup>,但靶向以E蛋白二聚体的空间表位为主的抗体却表现出了优越的中和活性,且抑制了ADE效应<sup>[96-97]</sup>,表明了以空间表位为设计出发点的疫苗免疫原设计策略的重要意义。Screaton和Mongkolsapaya等通过引入二硫键设计制备了一种共价稳定的寨卡病毒E蛋白二聚体疫苗,有效避免了融合环表位等非中和表位的暴露,抗体的生成也不会诱导登革热病毒感染的ADE效应<sup>[98]</sup>。高福、戴连攀、严景华等<sup>[99]</sup>则进一步改进了疫苗免疫原的设计,通过同源替换将E蛋白中的融合环表位替换为黄病毒属中亲缘关系最远的昆虫特异性黄病毒的同源序列,改变了融合环表位上结合ADE抗体的三个关键氨基酸,并通过一系列中和保护性抗体和ADE抗体对改造后E蛋白抗原进行正向和负向筛选,提出了MutB和MutC两

种免疫原设计, 实现了融合环表位的消除和中和表位的维持, 疫苗不仅完全阻断寨卡病毒的垂直传播, 还消除了对四种血清型登革病毒的 ADE。Rey 和 Screaton 等<sup>[100]</sup> 针对广谱中和抗体 C10 的研究揭示了这类空间表位设计疫苗优势的原因, 疫苗免疫原展示出病毒抗原的天然构象, 包括 E 蛋白二聚体和完整的二十面体病毒外壳展示, 疫苗接种使得机体产生中和抗体特异性结合 E 蛋白二聚体, 并且阻止 E 蛋白构象变化, 防止病毒感染所需的 E 蛋白三聚体构象的产生。

## 2.2 免疫原的修饰对优化设计的影响

许多病毒都会采取糖基化等翻译后修饰途径对蛋白进行结构修饰以利于自身生存, 针对抗原修饰对疫苗免疫效果的影响同样是疫苗设计中的重要部分。SARS-CoV-2 中表面刺突蛋白的糖基化是疫苗设计所需要考虑的重要方面, 病毒通过糖基化遮蔽某些关键抗原表位实现了免疫逃逸<sup>[101]</sup>。为了起到良好的免疫效果, 疫苗免疫原设计时需考虑优化免疫原中的糖基化位点, 暴露出原先被遮蔽的关键中和表位, 同时也要适当保留部分糖基化位点以展示病毒的天然构象, 稳定其抗原结构<sup>[102]</sup>。尽管抗原的糖基化修饰会减弱机体的免疫反应, 不利于疫苗引起免疫应答, 但糖基化对抗原表位的遮蔽有时也会使得机体的免疫反应更加趋向保守表位而非免疫显性表位, 反而更有利于广谱中和抗体的生成<sup>[103]</sup>。HIV 疫苗免疫原 Env 表面具有高度的糖基化, HIV 疫苗免疫原的设计需要采取合理的糖基化手段对其进行修饰以诱导中和抗体生成。Mascola 团队<sup>[104]</sup> 针对 eOD-GT8 免疫原进行改造, 利用 N-连接聚糖修饰掩盖非保守 CD4 结合位点上的相关表位, 相较于未做糖基化修饰的 eOD-GT8, 突变体刺激了更强的保守 CD4 位点的特异性抗体, 证明了聚糖掩蔽修饰对疫苗免疫原设计的价值, 可以限制脱靶抗体的诱导产生, 并将免疫反应集中在保守表位。除了糖基化等病毒天然存在的表面修饰外, 人为采取的 PEG 化修饰等表面修饰策略也在疫苗免疫原设计中有所应用。Kim 团队<sup>[105-106]</sup> 提出了“保护-修饰-去保护”(protect-modify-deprotect, PMD) 的疫苗设计策略, 目的是将疫苗免疫诱导的抗体集中在由特异

性单克隆抗体结合的抗原表位上, 从而引起更强的中和保护作用。PMD 策略首先用特异性单克隆抗体与抗原结合在疫苗的靶表位形成一层保护, 接着使用 PEG 修饰抗原的剩余外表面, 限制其免疫原性, 最后去除单克隆抗体与抗原的结合, 解除靶表位的表面保护。他们以流感病毒血凝素抗原 (hemagglutinin, HA) 作为尝试验证了该策略的可行性, 设计疫苗靶向 HA 保守的茎干表位而非免疫显性的头部表位, 并成功诱导了更强的交叉反应抗体的生成<sup>[105]</sup>。

疫苗免疫原的优化设计对于疫苗的有效性至关重要, 传统疫苗设计中免疫原主要源自于病原体的天然组分, 如表面糖蛋白、荚膜多糖等组分, 这类设计能最大程度保留抗原的天然构象, 确保免疫原性, 进一步的优化则显著提升了疫苗的保护效力。而人工智能驱动蛋白质从头合成, 为疫苗设计开辟了新路径——通过精准预测与生成蛋白结构及序列, 实现免疫原的完全人工设计。这一策略突破了天然抗原的进化限制, 对 HIV、流感等高变异病毒疫苗的开发具有革命性意义。以 HIV、流感病毒为代表的高变异病原是当前疫苗设计的难题, 病原基因的高速变异不仅增强了病毒的免疫逃逸<sup>[107]</sup>, 而且限制了有效中和表位的展示, 削弱疫苗诱导产生的抗体免疫反应, 即使针对特定的保守表位进行疫苗设计, 同样存在免疫原性弱, 抗体应答水平低下的问题, 难以产生有效的广谱中和抗体<sup>[108-109]</sup>。此前高变异病原的疫苗设计主要围绕抗原表位优化和多价抗原表位展示, 旨在增强广谱中和抗体的诱导产生<sup>[110]</sup>, 弥补以往疫苗仅针对少数几类病毒毒株具有保护效力的不足。而伴随蛋白质优化和从头合成策略的深入发展, 免疫原的设计进入了新的阶段, 通过设计与病毒保守表位相似且免疫原性强的优势抗原表位, 人工合成疫苗免疫原诱导广谱中和抗体产生, 以此对抗病毒的高频突变。但从头合成目前在疫苗免疫原设计中还没有广泛得到应用, 可能是受到免疫原复杂天然构象的限制, 成功的免疫原设计需要精确展示中和表位并能够模拟抗原的天然构象变化, 避免非中和表位的暴露, 最终诱导广谱中和抗体的生成。尽管如此, 从头合成策略的巨大价值已经在疫苗的其他设计中得到了验证, 在疫苗递送载体和佐

剂的研究中,从头合成策略的应用已显著提高了疫苗的免疫原性,引起强效的保护性免疫应答。

### 3 疫苗递送载体的优化设计

在当今应用广泛的疫苗技术中,纳米颗粒疫苗作为一种独特的蛋白亚单位疫苗备受人们关注。纳米颗粒可作为疫苗的递送载体对免疫原进行递呈,纳米疫苗的尺寸大小与病原体相近,可以模拟天然状态下的病毒入侵,有助于树突状细胞的摄取和免疫应答的产生,是抗病毒疫苗的优秀载体<sup>[111]</sup>。纳米颗粒疫苗具有丰富多样的递送方式,如脂质体、外泌体、无机纳米材料、有机纳米材料和蛋白纳米颗粒等,这些方式各有优劣,而蛋白纳米颗粒递送载体作为一类新兴的疫苗递送载体展现出了其独特的优势,迅速成为当前疫苗研发的热点所在,并已有不少疫苗走向临床<sup>[112-115]</sup>。

#### 3.1 蛋白纳米颗粒疫苗的特点与优势

蛋白纳米颗粒疫苗常用的递送载体主要有病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)和自组装蛋白两种。VLP是最早用于疫苗递送的蛋白纳米颗粒载体,乙型肝炎病毒表面抗原纳米颗粒、流感基质1蛋白纳米颗粒、噬菌体AP205外壳蛋白等均是已经得到应用并验证有效性的VLP纳米颗粒载体<sup>[116]</sup>。然而VLP的表达水平相较于重组蛋白亚单位相对较低,且可能混有源自宿主表达系统中的污染物<sup>[117]</sup>,病毒基因组的缺乏也导致了VLP纳米颗粒存在一定的不稳定性<sup>[118]</sup>,这些因素影响了VLP作为纳米颗粒疫苗递送载体的大规模应用。相较之下,自组装蛋白具有的单一寡聚的蛋白结构在作为递送载体方面颇具潜力,优良的稳定性确保了疫苗递送的有效性和可靠性,以及偏离保存温度时具有更强的耐受性<sup>[119]</sup>。这也使得纳米颗粒疫苗更能应对疫苗生产、储存、运输、应用的全链条中面临的问题,如疫苗冷链运输的硬性要求和难以完全配套的硬件设施之间的冲突<sup>[120]</sup>。已经应用为纳米疫苗递送载体的自组装蛋白包括铁蛋白(ferritin)、二氧四氢蝶啶合酶(lumazine synthase, LS)、二氢硫辛酰乙酰转移酶(dihydrolipoyl

acetyltransferase, E2p)、SARS-CoV-2病毒的非结构蛋白10(nonstructural protein 10, nsp10)。铁蛋白和LS在三重对称轴处表面可以顺利展示三聚体的免疫原,这一特性十分利于SARS-CoV-2、RSV、HIV等病毒的三聚体免疫原疫苗开发,是纳米疫苗中最为常见的递送载体<sup>[116]</sup>。铁蛋白在绝大多数生物体内均存在,参与细胞内铁的储存,是由24个亚基多聚组成的蛋白;LS是一种参与核黄素合成的酶,多见于细菌和古细菌中,由60个亚基组成,比铁蛋白具有更高的亚基数,具有二十面体结构,与病毒的天然结构也更为接近。蛋白纳米颗粒作为疫苗递送载体也存在一些问题:一方面,纳米颗粒递呈疫苗的过程中存在免疫原构象改变的潜在风险,这会导致免疫原的错误折叠和免疫原性的减弱乃至消失;另一方面,纳米颗粒作为异源蛋白进入机体,也会引起相当程度的免疫应答。尽管也有研究表明机体虽然存在对纳米颗粒递送载体的免疫反应,但不会影响疫苗的中和保护作用 and 再次免疫的免疫激活<sup>[121]</sup>,而纳米颗粒自身的免疫原性仍然不可忽视<sup>[122]</sup>。

使用自组装蛋白递送的纳米颗粒疫苗具有独特的免疫原展示方式,这些使得纳米颗粒疫苗有着远强于以往重组亚单位疫苗的免疫应答和中和保护能力,并且在诱导广谱交叉保护方面也具有优势。以自组装蛋白单独亚基递呈免疫原,最终自组装为多聚的纳米颗粒疫苗,这种疫苗递送方式使得单个纳米颗粒表面能够展示数十个免疫原,实现高密度的抗原展示,显著提高免疫应答水平,引起更多的特异性抗体生成<sup>[123-124]</sup>。而不同聚体数的自组装蛋白存在免疫原展示数的差异,这种差异也会影响抗体的生成水平和中和保护效力<sup>[125]</sup>。自组装蛋白的结构还为纳米疫苗提供了多样的几何展示方式,将免疫原集中于特定表面进行递呈,以自组装蛋白载体为基础实现免疫原三聚体蛋白的共同递呈,纳米颗粒疫苗的几何展示方式能够稳定免疫原的三聚体结构,增强抗原递呈,诱导更多中和抗体的产生<sup>[126-127]</sup>。纳米颗粒疫苗的抗原展示中最具有潜力的莫过于抗原多价展示,自组装蛋白各个亚基负载不同抗原并进行自组装,在单个纳米颗粒疫苗表面轻易便可展示多种抗原,这种mosaic(“马赛克”)策略能够明显提升疫

苗的免疫效果，通常可以引起比多型单价免疫原的疫苗混合物更强的免疫应答。**mosaic**策略构建的多价纳米疫苗可以与多个B细胞受体形成交联，给予强烈且多样的抗原刺激，通过亲和力效应可以激活更多低亲和力的初始B细胞生成，显著增加B细胞克隆型多样性，通过体细胞超突变诱导出超强中和能力或跨病毒中和能力的强大抗体<sup>[128]</sup>；**mosaic**策略还可以改善免疫原的表位展示，在SARS-CoV-2<sup>[129]</sup>、HIV<sup>[130-131]</sup>、流感<sup>[121]</sup>等病毒的疫苗研发中，运用**mosaic**策略可以减少免疫原的非中和表位的展示，增加对于中和表位尤其保守的中和表位的展示，从而促进了广谱中和抗体的生成。而与**mosaic**策略相近的多免疫原融合共表达展示策略的价值也得到了验证，Bjorkman、Townsend、Howarth等<sup>[132]</sup>对于四重蛋白纳米笼的研究表明多免疫原融合共表达展示可以引起与**mosaic-8**疫苗相当甚至更强的免疫反应。

### 3.2 蛋白纳米颗粒递送载体的优化设计

以自组装蛋白递送的纳米颗粒疫苗的成功应用充分体现了递送载体对疫苗的重要意义，蛋白纳米颗粒递送载体可以明显改善疫苗免疫的应答反应，而适当的优化设计可以进一步改进蛋白纳米颗粒的性能以满足需要。

免疫原通常需以一定的方式附着于蛋白纳米颗粒表面展示，当前常见的附着方式主要为化学偶联、融合表达和标签偶联三种方式<sup>[116, 133]</sup>，它们具有各自的优势。化学偶联方式可以通过氨基酸修饰和化学处理完成免疫原的负载，方法简单，且已被证明能够显著提高免疫应答，但需在化学修饰完成后去除冗余辅料成分以进一步提纯疫苗<sup>[133]</sup>；融合共表达方式在蛋白的表达和纯化层面更为简单易行，相较于化学偶联有更高的附着精度，但需要选择适宜的表达系统以避免融合体无法表达或是免疫原构象错误折叠；标签偶联方式则利用“即插即用”的SpyTag/SpyCatcher等偶联系统实现免疫原的附着，但偶联系统本身会引起一定的非中和抗体应答，而且偶联系统的偶联效率也是一个潜在的需要解决的问题<sup>[125, 134]</sup>。我们团队曾以SpyTag/SpyCatcher系统为基础，将SARS-

CoV-2免疫原与铁蛋白偶联，构建了针对SARS-CoV-2的纳米颗粒疫苗，该疫苗可以诱导高滴度的针对野生型SARS-CoV-2的中和抗体，然而在实际应用中也发现该偶联系统的偶联效率并非百分之百，免疫原并未如预期达到最大负载上限，在制备的纳米颗粒疫苗中存在未偶联免疫原的铁蛋白亚单位<sup>[135]</sup>。因此，需要通过进一步的优化设计改进已有的抗原附着方式，提供更为可靠的偶联策略。一方面可以对偶联系统本身进行优化设计，如SpyTag/SpyCatcher系统的迭代升级<sup>[136-138]</sup>；另一方面则是从蛋白纳米颗粒自身出发构建偶联系统。郭宇团队<sup>[139]</sup>通过对蛋白纳米颗粒自身的改造，为铁蛋白设计了全新的适配标签Fagy-tag，以人类铁蛋白重链和其天然受体NCOA4的复合物为基础，分析其分子结构和作用模式，采用生物信息学以及人工智能辅助工具，构建了仅16个氨基酸残基的靶向结合多肽，该多肽对铁蛋白纳米颗粒表面具有较好的亲和力和稳定性，他们以Fagy-tag为基础成功开发了狂犬病纳米疫苗，证实了这一设计的有效性。

纳米颗粒疫苗的自组装特性和高密度的免疫原展示为应用**mosaic**策略提供了充分的支持，融合共表达方式通过共表达多个不同的免疫原-自组装蛋白基因，在表达和蛋白自组装的阶段将免疫原分布于纳米颗粒表面<sup>[128, 140-141]</sup>，标签偶联方式则更为简单，用多种带有标签的免疫原与自组装蛋白共孵育，在标签偶联的过程中分布免疫原<sup>[128, 142-143]</sup>，最终顺利开发出广谱疫苗。然而，这种构建**mosaic**疫苗的策略存在一定的随机性问题，即使共表达或是共孵育时保持各种免疫原含量等比例投入，仍然不能保证纳米颗粒疫苗表面不同免疫原的均匀分布，这种随机性可能限制**mosaic**策略的发挥。Bjorkman团队<sup>[144]</sup>以流感疫苗为基础探究了**mosaic**疫苗的免疫反应，他们发现**mosaic**疫苗的抗体应答水平虽然高于同型单价免疫原疫苗，但与多型单价免疫原混合疫苗相比并无明显差异，表明了**mosaic**策略在解决多价疫苗诱导抗体应答水平上，尚未完全做到优于多价亚单位疫苗。为解决这一问题，一种思路便是改进现有的自组装蛋白纳米颗粒，Kwong和Mascola团队<sup>[145]</sup>没有使用常见的细菌来源铁蛋白，而是使用昆虫来源的

铁蛋白作为优化设计起点, 利用其重链和轻链两种亚基的结构特点构建双价疫苗, 同时截去野生型铁蛋白N末端位置的部分残基, 使得其N末端更利于抗原三聚体的展示, 并在流感和HIV免疫原上验证了该设计的可行性, 双价纳米颗粒可以在N端和C端分别融合共表达不同免疫原, 或是利用两套不同的偶联系统偶联免疫原, 从而精确地负载免疫原, 减小了随机负载免疫原存在的不利影响。

基于计算工具发展的蛋白纳米颗粒递送载体的设计具有广阔的前景。当前自组装蛋白大多来源于自然界天然存在的多聚体蛋白, 其筛选开发和实际应用需要一定的探索时间, 但计算设计的自组装蛋白纳米颗粒可以根据应用需要直接进行结构设计, 有较强的导向性。它可以在设计之初便根据免疫原递呈的需要, 有目的地开发特定结构的自组装蛋白, 直接控制免疫原展示的几何形状。例如在端点处展示三聚体等融合前免疫原结构或是整体展示为类病毒的二十面体外壳结构, 突破了天然骨架的局限性。也可以直接调控递送载体的聚体数进而改变免疫原的展示密度<sup>[146]</sup>。多数情况下, 高密度的抗原展示会增强对B细胞的刺激活化, 明显增强抗体反应, 但过高的抗原密度也会在一定程度上影响抗原表位的可及性, 在HIV的BG505 Env三聚体纳米颗粒疫苗中, 高密度的抗原展示反而不利于三聚体抗原基底近端表位的展示, 而这类保守表位的暴露与广谱中和抗体的生成密切相关, 所以纳米颗粒疫苗设计需要控制合理的抗原展示密度, 兼顾抗体的强度和广度<sup>[130, 142, 147]</sup>。I53-50为代表的系列计算设计蛋白纳米颗粒最早得到了应用, 在RSV疫苗的研发中I53-50递送的纳米疫苗不仅有更强的稳定性, 更改善了疫苗的抗原提呈和抗体反应质量<sup>[126]</sup>。尽管后续研究表明疫苗中递送的F糖蛋白构象稳定性欠佳, 同时保留有融合前和融合后两种构象<sup>[142]</sup>, 但也证明了计算设计蛋白纳米颗粒的巨大应用价值。最新的纳米颗粒计算设计吸取了病毒天然结构的特点, 提出了两种可供广泛应用的通用设计方法<sup>[148-149]</sup>。病毒会采取两种措施改变其外壳结构的对称性, 形成体积更大、更为复杂的外壳结构: 一是将不同构象的同一亚基放置在不同环境下, 即“准对称性”(quasisymmetry); 二是用高度相

关但不完全相同的亚基组建对称结构, 即“赝对称性”(pseudosymmetry)<sup>[148]</sup>。在计算设计中利用准对称性和赝对称性的思路将已有的纳米颗粒进行优化设计, 从而创造出更高聚体数、更大体积的纳米颗粒。第一种通用设计方法从寡聚体纳米颗粒出发, 首先设计出由同源三聚体多聚组成的纳米颗粒, 其次在同源三聚体的骨架中分别引入三条异源序列, 设计出由三个不同序列亚基组成的异源三聚体, 经过精心设计后的异源三聚体中每个亚基的交界面由异源序列结构维持, 确保了ABC型异源三聚体的准确组装, 最后将异源三聚体插入在同源三聚体之间, 组装而成 $T=4$ 的大纳米笼结构( $T$ 用于描述纳米颗粒的排列模式,  $T$ 越大代表颗粒体积越大和亚基数越多)<sup>[148]</sup>。这种方法能够构建严格对称且组装模式高度符合预期的新纳米颗粒, 但其组成要求四个异源亚基的设计和构建, 且伴随 $T$ 的增加对异源亚基数目的要求也随之提高。第二种通用设计方法综合了准对称性和赝对称性, 同样从寡聚体纳米颗粒开始, 对同源三聚体进行序列突变和筛选, 利用破坏性突变和补偿性突变破坏原有的CCC型同源三聚体结构并构建稳定的AAB型和ABB型异源三聚体, 之后将AAB型异源三聚体和CCC型同源三聚体相组装, 形成 $T=4$ 的纳米颗粒, 接着引入ABB型异源三聚体乃至BBB型异源三聚体, 即可进一步形成 $T$ 为9、16、36的更复杂纳米颗粒。这种方法利用赝对称性将异源三聚体以不同构象设计于纳米颗粒组成中, 从而实现了 $T$ 的逐级递增, 提升了纳米颗粒的应用价值。且设计中仅要求三个异源亚基的序列, 后续通过改变同源三聚体和异源三聚体的组成比例即可根据设计提高纳米颗粒的 $T$ , 有更强的经济性, 然而实际组装过程中, 异源三聚体的排列顺序并不完全依照设计进行, 而更倾向于低 $T$ 值的排列方式, 这一现象使得该方法在纳米颗粒设计的精确度上有所欠缺<sup>[149]</sup>。而无论哪种设计思路, 最终都能够显著改变纳米颗粒的聚体数和亚基类型数, 这使得其作为疫苗载体应用开发时可以更轻易地提高抗原的递呈密度, 并且构建出精准比例的多价疫苗, 消除常规的多价纳米颗粒疫苗中mosaic策略的随机性问题。

### 3.3 蛋白纳米颗粒递送系统与佐剂的联合应用

以蛋白纳米颗粒递送系统为基础的纳米颗粒疫苗主要利用尺寸效应和高密度抗原展示提高疫苗的免疫反应，纳米颗粒疫苗恰当的尺寸大小有利于抗原递呈细胞的摄取和保留，抗原的高密度展示则进一步增强了免疫细胞尤其B细胞的刺激活化，从而引起更加迅速强效的抗体反应<sup>[116, 123]</sup>。而与不同佐剂的联合应用可以进一步增强纳米颗粒疫苗的免疫效应，通过对不同免疫机制的激活，实现对机体产生更为强大的抗体保护。

当前已被批准用于临床应用的佐剂包括铝佐剂、MF-59、AS04、AS03、AS01、CpG ODN 1018、Matrix-M 和 Alhydroxyquim II 等<sup>[8]</sup>，这些佐剂主要从两个方面增强免疫：一是改变抗原性状以提升其生物利用度，二是作为免疫刺激剂激活先天免疫，不同佐剂在具体的免疫激活机制上存在一定的差异，可以根据疫苗设计和特定的免疫需求选择合适的疫苗佐剂。常见的铝佐剂是通过在注射部位形成抗原库控制抗原持续释放来增强免疫，MF-59、AS03 等佐剂在此基础上还能够在此注射部位形成趋向炎症的免疫生态位，招募巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞等细胞浸润于注射部位，提高抗原的摄取利用<sup>[150-151]</sup>。AS04、CpG ODN 1018 等佐剂主要作为免疫刺激剂激活先天免疫系统通过激活特定的模式识别受体启动下游通路，最终引起不同类型的免疫反应，例如 AS04 包含的单磷酸脂质 A 可以特异性激活 Toll 样受体 4，CpG ODN 1018 则激活 Toll 样受体 9，随后通过 MyD88 通路启动信号传导，激活 NF- $\kappa$ B，诱导促炎细胞因子分泌，促进 Th1 型细胞极化<sup>[150]</sup>。AS01、Matrix-M 等皂苷类佐剂协同激活先天免疫与适应性免疫，具有较高的应用价值，皂苷类佐剂在注射部位募集先天免疫细胞，将抗原转运至引流淋巴结改善抗原的摄取和递呈，在抗原递呈细胞内，皂苷破坏溶酶体膜实现抗原逃逸，激活 NLRP3 炎症小体和促进 MHC 分子交叉递呈；在适应性免疫方面，皂苷类佐剂促进生发中心反应，诱导高亲和力抗体及长寿命浆细胞，且有促进抗体表位扩散的作用，诱导偏向 Th1 型免疫反应发生<sup>[150, 152]</sup>。

当前纳米颗粒疫苗应用较多的佐剂多为铝佐剂或是 MF-59 等水包油佐剂，也有部分疫苗应用 CpG 等免疫刺激剂类佐剂，这些纳米颗粒疫苗和佐剂联合应用已被证实具有明显的免疫反应<sup>[153]</sup>。但这些联合应用目前主要局限在铝佐剂等常用的疫苗佐剂，尽管安全性得到了过往临床应用中的充分验证，但也存在免疫增强效应有限的不足，尤其是 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫反应的缺失，可能存在抗体反应强效但不持久的问题，无法实现长期的免疫保护。为了进一步改善纳米颗粒疫苗的免疫反应，尤其针对 HIV、流感等高变异病原，需要将佐剂的选择和优化纳入设计考量当中，使疫苗诱导的抗体反应更加持续长久，实现机体的长期保护。Irvine 团队采用铝佐剂和 SMNP 双佐剂系统进行免疫，双佐剂系统显著改善了抗原的递送和淋巴摄取过程，铝佐剂形成局部抗原库限制抗原释放后，SMNP 佐剂募集先天免疫细胞聚集并不断摄取、递呈抗原，从而促进了生发中心和抗体反应的显著增强，并提高了抗体的多样性<sup>[154]</sup>。未来纳米颗粒疫苗设计也可采取类似的佐剂联用策略，选择与纳米颗粒递送载体互补的佐剂协同作用，如与皂苷类佐剂联用，在纳米颗粒向抗原递呈细胞高密度呈递抗原后，进一步在内部发挥溶酶体逃逸作用，改善抗原的摄取和呈递以增强疫苗免疫。

## 4 反向疫苗学 2.0 时代下的疫苗研发

### 4.1 反向疫苗学 1.0 时代和 2.0 时代

反向疫苗学最早于 2000 年由 Rappuoli 提出，其核心是指利用病原体的基因组序列信息来发现和筛选候选疫苗抗原，然后在体外表达这些候选蛋白，进行免疫原性和保护效力测试<sup>[12]</sup>。不同于传统疫苗学通过物理、化学方法灭活或减毒整个病原体，或者从培养物中分离纯化其主要成分的方法，反向疫苗学从基因到疫苗的直接设计突破了病原体培养的限制，且更具全面性、高效性和安全性。反向疫苗学最为经典和成功的疫苗设计莫过于 B 群脑膜炎球菌疫苗的设计，克服了传统多糖疫苗免疫原性差且可能引发自身免疫反应的问题，成功推动了多款疫苗的临床应用。疫苗设计

过程中首先对多个 MenB 菌株进行全基因组测序, 利用生物信息学筛选出近 600 个编码表面暴露或分泌蛋白的候选基因, 随后在大肠杆菌中表达并纯化了其中 350 多种重组蛋白, 接着进行小鼠免疫, 检测生成的抗体是否能结合不同 MenB 菌株的表面并发挥中和活性, 通过多次的疫苗免疫和抗体检测最终筛选出一些能诱导广谱中和抗体的抗原。利用这样的设计方法, 研究者们成功开发了多款 MenB 疫苗, 其中尤以葛兰素史克公司开发的 Bexsero 和辉瑞公司开发的 Trumenba 两款疫苗保护效果最为突出, 疫苗接种者中绝大多数均产生了有效的中和抗体, 且具有广谱保护效力<sup>[155-156]</sup>。但存在抗体保护有效期短的缺点, 因此需要进行多次加强免疫。反向疫苗学指导的疫苗研发同时也存在一些局限性, 包括过度依赖生物信息学的预测; 对于非蛋白抗原如多糖、脂类等缺少关注和设计; 对于抗原复杂变异的情况针对性差, 缺少广谱中和保护。这些局限性限制了反向疫苗学 1.0 的应用空间, 但它新颖的设计理念为后续更强大的反向疫苗学 2.0 奠定了牢固基础, 并极大地推动了后续的新型疫苗开发。

反向疫苗学 2.0 是在反向疫苗学 1.0 的基础上发展而来的, 反向疫苗学 2.0 进一步拓宽了反向疫苗学的内涵, 除了从病原体基因组中挖掘潜在免疫原, 还引入了结构疫苗学 (structural vaccinology) 的设计理念<sup>[157]</sup>。在反向疫苗学 2.0 时代下, 疫苗研发以抗原结构为导向, 从抗原-抗体免疫复合物分子结构出发, 通过结构生物学和 B 细胞技术等方法, 找出抗原关键中和表位, 从而为免疫原的理性设计提供结构基础<sup>[158]</sup>。随着结构生物学、单细胞技术和蛋白工程等领域的迅猛发展, 反向疫苗学 2.0 逐渐成为主流<sup>[159]</sup>。其核心理念是以高分辨率抗原-抗体复合物的空间结构信息为基础, 识别和解析能被高亲和力中和抗体有效识别的功能性表位。研究团队通过 X 射线晶体学、冷冻电镜等手段, 将抗体与病原抗原形成的复合物进行三维结构解析。这种方法突破了传统基于序列或预测的筛选方式, 实现了从“被动筛选”向“结构理性设计”的转变。例如在 RSV 疫苗研发中, 通过结构方法确定 F 蛋白的前融合构象, 并通过工程化手段加以稳定, 使其在疫苗中能高效诱导出广谱中和抗体,

带来了结构指导疫苗开发的首次重大突破。此外, 单 B 细胞分离与高通量测序技术则极大丰富了可供研究的抗体库<sup>[157]</sup>。通过单 B 细胞技术, 研究者能够从自然感染者或疫苗接种者体内分离出大量具有广泛中和活性的抗体, 并对其进行基因测序与功能验证。随后, 这些中和抗体可用于与靶抗原形成复合物, 通过结构生物学手段解析结合界面, 识别抗原中的关键中和表位。以流感、HIV、RSV 等病毒为代表的高变异病原体, 均出现了利用单 B 细胞测序联合结构解析的“抗体指导疫苗设计”成功案例, 这也标志着疫苗开发逐步从序列主导向结构主导转型<sup>[157]</sup>。

## 4.2 其他技术与反向疫苗学 2.0 的融合发展

反向疫苗学 2.0 进一步吸收了抗体工程以及计算生物学等多学科的进展。例如, Stanfield 团队<sup>[160]</sup>以广谱中和抗体 Z13e1 与 HIV 包膜糖蛋白 gp41 的膜近端外部区域复合物结构为起点, 通过 PDB 数据库筛选出主链构象相近的 IL-22 作为蛋白骨架, 设计了 Z13-IL22-2 免疫原, 尽管成功复现了 HIV 关键表位的空间构象, 但其诱导的中和效力有限。Patel 团队则利用 Ab2 抗体对抗原表位结构高度模拟的特性, 将 B2.1A 抗体开发为 HCV 疫苗的免疫原<sup>[161]</sup>。与此同时, Gacche 团队<sup>[162]</sup>将计算表位预测与实验验证相结合筛选并鉴定了两种 HCV E1 糖蛋白的免疫原性肽, 使用 IEDB 和 SYFPEITHI 等表位预测算法获取数据, 并使用分子动力学模拟和免疫信息学分析筛选确定潜在的表位候选者。Correia 团队<sup>[47]</sup>开发的 TopoBuilder 算法能够根据设计需求构建全新蛋白骨架, 实现了 RSV 融合前糖蛋白多个表位的高效空间呈现, 最终开发了可重塑免疫反应、集中中和能力的三价 RSV 疫苗 Trivax。TopoBuilder 算法首先枚举与目标表位兼容的蛋白折叠空间, 之后将蛋白二维拓扑结构透射于立体空间中, 进一步优化其二级结构空间排布, 最后使 Rosetta FunFolDes 进行原子级结构优化与具体的蛋白序列设计。综上, 这类方法为不同病毒疫苗的免疫原精准设计提供了通用思路, 更加突破了对天然抗原结构的依赖。前期通过计算筛选确定具有良好免疫原性的有效表位,

后期从头合成适宜的蛋白骨架展示目的表位，最终直接设计出优越的疫苗免疫原而不受限于天然抗原结构。

在抗体-抗原结构解析的基础上，计算模拟和蛋白工程也作为反向疫苗学2.0不可或缺的组成部分<sup>[158]</sup>。研究者利用分子动力学模拟、蛋白对接分析和“从头”设计等算法，对已确定的中和表位进行结构优化或重构。此外，种系靶向（germline targeting）策略已成为疫苗设计领域的前沿方向。该策略通过解析广谱中和抗体的进化路径与种系抗体的结构特征，针对性地设计能有效结合并激活特定种系B细胞受体的免疫原，从而在免疫应答起始阶段就引导B细胞沿生成广谱中和抗体的路径进化。此方法尤其适用于HIV、流感等高度变异病原体的疫苗研发。例如，eOD-GT8等HIV免疫原通过结构优化，能够选择性激活VRC01类抗体种系B细胞，在动物模型和人体试验中已展现诱导广谱抗体的潜力<sup>[158]</sup>。类似的思路也已被应用于流感茎部抗原和RSV疫苗的开发，为后续疫苗的精准设计和广谱保护提供了新的解决方案。

总体来看，反向疫苗学2.0在理念和技术路径上实现了从基因组信息挖掘到结构理性设计的全方位升级。其流程涵盖抗体发现（通过单B细胞分离与测序）、高分辨率三维结构解析、结构模拟与蛋白工程等计算优化手段，以及在体外和体内进行的免疫原性功能验证，各环节协同推进，极大提升了针对复杂和多变病原体的疫苗开发效率。与此同时，这一新范式也为未来应对未知新发传染病疫苗的快速研发提供了坚实的理论基础与技术平台。随着人工智能、深度学习等前沿技术及结构预测工具的不断应用，反向疫苗学2.0有望持续引领疫苗研发迈向更高效、更精准、更具个性化的发展方向。

## 5 疫苗设计的挑战与未来

多样化的疫苗设计策略推动了疫苗研发的不断进步，蛋白质优化与从头合成的应用使得疫苗设计日益理性化和系统化，而计算工具的蓬勃发展更为此注入了新鲜活力。在疫苗的漫长研发进程中，研究者发展和总结了许多可靠的通用设计

方法，蛋白质优化设计中定向进化、半理性设计、理性设计方法，还有从头合成的计算设计方法，这些方法作为蛋白质设计的核心基础支撑疫苗设计。针对疫苗免疫原的设计包括了以抗原表位为主的设计和引入表面修饰的设计，这些设计方法在SARS-CoV-2、RSV等病毒疫苗的研发中发挥了重要作用。在几年间便推动了多款疫苗的开发，并顺利走向临床，而且克服了原先存在的免疫原性差的关键问题。纳米颗粒疫苗作为一类充满潜力的新型疫苗悄然兴起，这既为疫苗开发创造了新渠道，也对疫苗的优化设计提出了更高的要求，在兼顾免疫原设计的同时，还需要对纳米颗粒递送载体进行设计，通过对天然自组装蛋白改造或是计算设计合成新多聚体蛋白改进疫苗设计，可以助力于克服现有的局限性，进而拓宽疫苗应用。随着计算工具的不断发展和大量运用，计算设计在疫苗研发领域的重要性日益凸显。反向疫苗学日益成为当前疫苗研发的重要策略，它以抗原-抗体复合物结构为基础进行疫苗研发，其中包括结构分析、表位筛选、蛋白结构与优化等多个环节，计算工具的帮助不仅加速了这些复杂环节，还提升了疫苗设计的精确性和效率。同时，纳米颗粒疫苗的安全性也需要密切关注，虽然铁蛋白或是I53-50等纳米颗粒均源于自然界的天然蛋白及其改造蛋白，但它们的安全性问题仍然无法忽视。当前应用的纳米颗粒大多存在一定的免疫原性，除了对疫苗有效性带来的挑战，其生物安全风险也值得考量<sup>[122, 163]</sup>。针对纳米内核过强的免疫反应可能会为机体带来不必要的炎症反应，具有一定的隐患。正如其他新型疫苗平台的应用一样，纳米颗粒疫苗在临床应用中需要面临严格监管与审批，只有通过全面的临床前和临床试验确证纳米疫苗的安全性和有效性，充分考量了纳米颗粒自身免疫原性和在体药代动力学等安全性问题后，才能顺利走向临床应用<sup>[122]</sup>。

未来的疫苗设计中将主要围绕两方面的挑战展开。一方面，针对目前已知的SARS-CoV-2、HIV、流感等高变异病毒设计开发疫苗，诱导广谱中和抗体的产生和免疫保护。尤其是HIV疫苗，自研发以来大量失败的尝试和积累的研究经验表明广谱中和抗体在免疫保护中不可替代的关键作

用。另一方面,针对未来可能新发的未知传染病需要进行疫苗战略储备,当新一轮大流行蔓延之际,我们可以快速采取对应的防护措施以控制疫情发展。在未来疫苗研发中,广谱疫苗的设计与开发至关重要。目前,计算设计手段加快了免疫原的设计和筛选,极大提升了疫苗研发的效率。通过模拟和算法预测即可快速筛选出具有潜在广谱保护能力的抗原表位,对免疫原进行精准设计和优化。同时,计算设计还助力构建新型多聚纳米颗粒蛋白,为广谱纳米疫苗的递送提供多样化的优质平台。这些纳米颗粒蛋白能高效负载和展示多种抗原,显著改善免疫原递呈,激活广谱免疫反应。以新兴病原体疫苗候选物评估为例,不仅需明晰蛋白质结构,更要精确预测其免疫原性、与宿主免疫系统的交互作用等功能特性。现有的AI蛋白质设计工具在疫苗优化与从头合成方面取得了突破,但它们在功能性预测、应对新兴病原体、处理多模态数据以及资源效率等方面仍面临一定挑战。例如,在预测蛋白质的抗原表位方面,抗原表位是病原体上能被免疫系统识别的关键区域,对疫苗设计至关重要。AI模型虽能依据结构特征进行一定预测,可抗原表位的识别受多种复杂因素影响,包括氨基酸序列的柔性、蛋白质构象的动态变化以及周围微环境等。AI模型难以全面捕捉这些动态且复杂的信息,导致预测准确性大打折扣。未来的研究需要进一步扩展模型的功能性预测能力,提升多样性数据的整合,优化计算效率,并在实际生物学环境中进行更多验证。疫苗抗原的蛋白优化设计与从头合成将聚焦于在多尺度智能计算框架的支持下持续发展,通过生成式AI驱动的拓扑优化引擎实现抗原表位的精确空间调控。结合动态构象模拟算法量化抗原-抗体相互作用的变构路径,并基于多目标约束框架执行逆折叠计算,协同收敛自由能景观驱动的热稳定性、表面亲水性最大化及表位构象偏差的量子化指标深度优化蛋白质序列,构建程序化生物降解逻辑与自适应佐剂设计系统,将为疫苗的免疫效果与安全性提供新的保障。通过实现“计算生成-数字孪生验证-湿实验迭代”的闭环智能系统的开发,疫苗研发将从传统的经验驱动模式转变为全栈可编程的研发流程,推动疫苗设计和生产进

入更加精细化、自动化的新时代。总的来说,蛋白质优化与从头合成在疫苗研发中的应用前景广阔,引领着未来的疫苗研究发展,但同时也面临着诸多挑战,通过不断的技术创新和方法迭代,势必能在未来开发出更加高效、安全的广谱疫苗,为人类健康事业保驾护航。

## 参 考 文 献

- [1] MORENS D M, TAUBENBERGER J K. Influenza cataclysm, 1918[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 379(24): 2285-2287.
- [2] DONNELLY C A, GHANI A C, LEUNG G M, et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong[J]. *The Lancet*, 2003, 361(9371): 1761-1766.
- [3] ARABI Y M, BALKHY H H, HAYDEN F G, et al. Middle east respiratory syndrome[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 376(6): 584-594.
- [4] MSEMBURI W, KARLINSKY A, KNUTSON V, et al. The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic[J]. *Nature*, 2023, 613(7942): 130-137.
- [5] SCHUMACHER A E, KYU H H, AALI A, et al. Global age-sex-specific mortality, life expectancy, and population estimates in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1950—2021, and the impact of the COVID-19 pandemic: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *The Lancet*, 2024, 403(10440): 1989-2056.
- [6] MURA M, TRIGNOL A, LE DAULT E, et al. Lessons for medical countermeasure development from unforeseen outbreaks[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2025, 14(1): 2471035.
- [7] IWASAKI A, OMER S B. Why and how vaccines work[J]. *Cell*, 2020, 183(2): 290-295.
- [8] RAPPUOLI R, ALTER G, PULENDRAN B. Transforming vaccinology[J]. *Cell*, 2024, 187(19): 5171-5194.
- [9] FINE P E M. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity[J]. *The Lancet*, 1995, 346 (8986): 1339-1345.
- [10] FOURNIER J M. The current status of research on a cholera vaccine[J]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1998, 91(5 Pt 1-2): 412-415.
- [11] GERBERDING J L, HAYNES B F. Vaccine innovations - past and future[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(5): 393-396.
- [12] RAPPUOLI R. Reverse vaccinology[J]. *Current Opinion in*

- Microbiology, 2000, 3(5): 445-450.
- [13] PULENDRAN B, LI S Z, NAKAYA H I. Systems vaccinology [J]. *Immunity*, 2010, 33(4): 516-529.
- [14] WANG Y J, XUE P, CAO M F, et al. Directed evolution: methodologies and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(20): 12384-12444.
- [15] PEISAJOVICH S G, TAWFIK D S. Protein engineers turned evolutionists[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(12): 991-994.
- [16] PACKER M S, LIU D R. Methods for the directed evolution of proteins[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(7): 379-394.
- [17] TOKURIKI N, JACKSON C J, AFRIAT-JURNOU L, et al. Diminishing returns and tradeoffs constrain the laboratory optimization of an enzyme[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 1257.
- [18] DADONAITE B, AHN J J, ORT J T, et al. Deep mutational scanning of H5 hemagglutinin to inform influenza virus surveillance[J]. *PLoS Biology*, 2024; 22(11):e3002916.
- [19] DADONAITE B, BROWN J, MCMAHON T E, et al. Spike deep mutational scanning helps predict success of SARS-CoV-2 clades[J]. *Nature*, 2024, 631(8021): 617-626.
- [20] CAO Y L, JIAN F C, WANG J, et al. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution [J]. *Nature*, 2023, 614(7948): 521-529.
- [21] WANG E, COHEN A A, CALDERA L F, et al. Designed mosaic nanoparticles enhance cross-reactive immune responses in mice[J]. *Cell*, 2025, 188(4): 1036-1050.e11.
- [22] LUTZ S. Beyond directed evolution: semi-rational protein engineering and design[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(6): 734-743.
- [23] GOLDENZWEIG A, FLEISHMAN S J. Principles of protein stability and their application in computational design[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2018, 87: 105-129.
- [24] TOKURIKI N, TAWFIK D S. Stability effects of mutations and protein evolvability[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2009, 19(5): 596-604.
- [25] LISTOV D, GOVERDE C A, CORREIA B E, et al. Opportunities and challenges in design and optimization of protein function[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2024, 25(8): 639-653.
- [26] PING X Q, HU W B, XIONG R, et al. Generation of a broadly reactive influenza H1 antigen using a consensus HA sequence [J]. *Vaccine*, 2018, 36(32): 4837-4845.
- [27] ZHAO Y L, NI W J, LIANG S M, et al. Vaccination with S (pan), an antigen guided by SARS-CoV-2 S protein evolution, protects against challenge with viral variants in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2023, 15(677): eabo3332.
- [28] YANG K K, WU Z, ARNOLD F H. Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(8): 687-694.
- [29] CHE Y, GRIBENKO A V, SONG X, et al. Rational design of a highly immunogenic prefusion-stabilized F glycoprotein antigen for a respiratory syncytial virus vaccine[J]. *Science Translational Medicine*, 2023, 15(693): eade6422.
- [30] LIU G, CARTER B, BRICKEN T, et al. Computationally optimized SARS-CoV-2 MHC Class I and II vaccine formulations predicted to target human haplotype distributions [J]. *Cell Systems*, 2020, 11(2): 131-144.e6.
- [31] XIONG W, LIU B, SHEN Y J, et al. Protein engineering design from directed evolution to *de novo* synthesis[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 174: 108096.
- [32] ROMERO-RIVERA A, GARCIA-BORRÀS M, OSUNA S. Computational tools for the evaluation of laboratory-engineered biocatalysts[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(2): 284-297.
- [33] WINNIFRITH A, OUTEIRAL C, HIE B L. Generative artificial intelligence for *de novo* protein design[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2024, 86: 102794.
- [34] DING W Z, NAKAI K, GONG H P. Protein design *via* deep learning[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, 23(3): bbac102.
- [35] ANAND N, EGUCHI R, MATHEWS I I, et al. Protein sequence design with a learned potential[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 746.
- [36] WATSON J L, JUERGENS D, BENNETT N R, et al. *De novo* design of protein structure and function with RFdiffusion[J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1089-1100.
- [37] HUANG P S, BOYKEN S E, BAKER D. The coming of age of *de novo* protein design[J]. *Nature*, 2016, 537(7620): 320-327.
- [38] KORENDOVYCH I V, DEGRADO W F. *De novo* protein design, a retrospective[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2020, 53: e3.
- [39] QUINN T P, TWEEDY N B, WILLIAMS R W, et al. Betadoublet: *de novo* design, synthesis, and characterization of a beta-sandwich protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(19): 8747-8751.
- [40] DEGRADO W F, REGAN L, HO S P. The design of a four-helix bundle protein[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1987, 52: 521-526.
- [41] REGAN L, DEGRADO W F. Characterization of a helical protein designed from first principles[J]. *Science*, 1988, 241(4868): 976-978.
- [42] HANDEL T M, WILLIAMS S A, DEGRADO W F. Metal ion-dependent modulation of the dynamics of a designed protein [J]. *Science*, 1993, 261(5123): 879-885.
- [43] KUHLMAN B, DANTAS G, IRETON G C, et al. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy[J]. *Science*, 2003, 302(5649): 1364-1368.

- [44] HAYES T, RAO R, AKIN H, et al. Simulating 500 million years of evolution with a language model[J]. *Science*, 2025, 387(6736): 850-858.
- [45] CAO L X, GORESHNIK I, COVENTRY B, et al. *De novo* design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors[J]. *Science*, 2020, 370(6515): 426-431.
- [46] CAO L X, COVENTRY B, GORESHNIK I, et al. Design of protein-binding proteins from the target structure alone[J]. *Nature*, 2022, 605(7910): 551-560.
- [47] SESTERHENN F, YANG C, BONET J, et al. *De novo* protein design enables the precise induction of RSV-neutralizing antibodies[J]. *Science*, 2020, 368(6492): eaay5051.
- [48] AHMAD S, DEMNEH F M, REHMAN B, et al. *In silico* design of a novel multi-epitope vaccine against HCV infection through immunoinformatics approaches[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 267: 131517.
- [49] SABZIAN-MOLAEI F, AHMADI M A, NIKFARJAM Z, et al. Inactivation of cell-free HIV-1 by designing potent peptides based on mutations in the CD4 binding site[J]. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2024, 62(2): 423-436.
- [50] KOZAKOV D, HALL D R, XIA B, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(2): 255-278.
- [51] FILIPOVIĆ J, VÁVRA O, PLHÁK J, et al. CaverDock: a novel method for the fast analysis of ligand transport[J]. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 2020, 17(5): 1625-1638.
- [52] VREVEN T, VANGAVETI S, BORRMAN T M, et al. Performance of ZDOCK and IRAD in CAPRI rounds 39-45[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2020, 88(8): 1050-1054.
- [53] HONORATO R V, TRELLET M E, JIMÉNEZ-GARCÍA B, et al. The HADDOCK2.4 web server for integrative modeling of biomolecular complexes[J]. *Nature Protocols*, 2024, 19(11): 3219-3241.
- [54] ŠALI A, BLUNDELL T L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 234(3): 779-815.
- [55] WEBB B, SALI A. Comparative protein structure modeling using MODELLER[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016, 54(1): 5.6.1-5.6.37.
- [56] LEAVER-FAY A, TYKA M, LEWIS S M, et al. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules[J]. *Methods in Enzymology*, 2011, 487: 545-574.
- [57] GUEROIS R, NIELSEN J E, SERRANO L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320(2): 369-387.
- [58] ROY A, KUCUKURAL A, ZHANG Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction[J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(4): 725-738.
- [59] ZHENG W, WUYUN Q, LI Y, et al. Deep-learning-based single-domain and multidomain protein structure prediction with D-I-TASSER[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2025. (2025-05-23) [2025-06-01]. <https://doi.org/10.1038/s41587-025-02654-4>.
- [60] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [61] BAEK M, DIMAIO F, ANISHCHENKO I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network[J]. *Science*, 2021, 373(6557): 871-876.
- [62] SUMIDA K H, NÚÑEZ-FRANCO R, KALVET I, et al. Improving protein expression, stability, and function with ProteinMPNN[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(3): 2054-2061.
- [63] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. *Nature*, 2024, 630(8016): 493-500.
- [64] SENIOR A W, EVANS R, JUMPER J, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning[J]. *Nature*, 2020, 577(7792): 706-710.
- [65] ALFORD R F, LEAVER-FAY A, JELIAZKOV J R, et al. The Rosetta all-atom energy function for macromolecular modeling and design[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017, 13(6): 3031-3048.
- [66] ADOLF-BRYFOGLE J, KALYUZHNIY O, KUBITZ M, et al. RosettaAntibodyDesign (RABD): a general framework for computational antibody design[J]. *PLoS Computational Biology*, 2018, 14(4): e1006112.
- [67] BURTON D R. Antibodies, viruses and vaccines[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(9): 706-713.
- [68] OSCHERWITZ J. The promise and challenge of epitope-focused vaccines[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016, 12(8): 2113-2116.
- [69] DIAZ D, CARE A, SUNNA A. Bioengineering strategies for protein-based nanoparticles[J]. *Genes*, 2018, 9(7): 370.
- [70] PATI R, SHEVTSOV M, SONAWANE A. Nanoparticle vaccines against infectious diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2224.
- [71] WALLS A C, TORTORICI M A, SNIJDER J, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(42): 11157-11162.
- [72] WRAPP D, WANG N S, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation

- [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [73] HSIEH C L, GOLDSMITH J A, SCHAUB J M, et al. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes[J]. *Science*, 2020, 369(6510): 1501-1505.
- [74] TAN C W, ZHU F, CHIA W N, et al. Distinctive serotypes of SARS-related coronaviruses defined by convalescent sera from unvaccinated individuals[J]. *hLife*, 2023, 1(1): 26-34.
- [75] DU P, WU C L, HU S X, et al. The Omicron BA. 2.86 subvariant as a new serotype of SARS-CoV-2[J]. *The Lancet Microbe*, 2024, 5(6): e516.
- [76] DU P, LI J J, KONG T X, et al. Defining the serotypes of SARS-CoV-2 subvariants up to December, 2024[J]. *The Lancet Microbe*, 2025, 6(8): 101124.
- [77] SUN J, LI M, WANG Y N, et al. Elaboration of tetravalent antibody responses against dengue viruses using a subunit vaccine comprised of a single consensus dengue envelope sequence[J]. *Vaccine*, 2017, 35(46): 6308-6320.
- [78] SLIEPEN K, HAN B W, BONTJER I, et al. Structure and immunogenicity of a stabilized HIV-1 envelope trimer based on a group-M consensus sequence[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2355.
- [79] REISS E I M M, VAN HAAREN M M, VAN SCHOOTEN J, et al. Fine-mapping the immunodominant antibody epitopes on consensus sequence-based HIV-1 envelope trimer vaccine candidates[J]. *NPJ Vaccines*, 2022, 7: 152.
- [80] RAHMAN M S, HOQUE M N, ISLAM M R, et al. Epitope-based chimeric peptide vaccine design against S, M and E proteins of SARS-CoV-2, the etiologic agent of COVID-19 pandemic: an *in silico* approach[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9572.
- [81] ABDELMAGEED M I, ABDELMONEIM A H, MUSTAFA M I, et al. Design of a multipitope-based peptide vaccine against the E protein of human COVID-19: an immunoinformatics approach[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 2683286.
- [82] FEDERICO L, MALONE B, TENNØE S, et al. Experimental validation of immunogenic SARS-CoV-2 T cell epitopes identified by artificial intelligence[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1265044.
- [83] BRAVI B. Development and use of machine learning algorithms in vaccine target selection[J]. *NPJ Vaccines*, 2024, 9: 15.
- [84] MCLELLAN J S, CHEN M, JOYCE M G, et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus[J]. *Science*, 2013, 342(6158): 592-598.
- [85] GRAHAM B S. Vaccines against respiratory syncytial virus: the time has finally come[J]. *Vaccine*, 2016, 34(30): 3535-3541.
- [86] CRANK M C, RUCKWARDT T J, CHEN M, et al. A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans[J]. *Science*, 2019, 365(6452): 505-509.
- [87] CHANG L A, PHUNG E, CRANK M C, et al. A prefusion-stabilized RSV F subunit vaccine elicits B cell responses with greater breadth and potency than a postfusion F vaccine[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(676): eade0424.
- [88] TORRENTS DE LA PEÑA A, SANDERS R W. Stabilizing HIV-1 envelope glycoprotein trimers to induce neutralizing antibodies[J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1): 63.
- [89] SANDERS R W, DERKING R, CUPO A, et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP. 664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(9): e1003618.
- [90] SHARMA S K, DE VAL N, BALE S, et al. Cleavage-independent HIV-1 env trimers engineered as soluble native spike mimetics for vaccine design[J]. *Cell Reports*, 2015, 11(4): 539-550.
- [91] KONG L, HE L L, DE VAL N, et al. Uncleaved prefusion-optimized gp140 trimers derived from analysis of HIV-1 envelope metastability[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12040.
- [92] HENDERSON R, ANASTI K, MANNE K, et al. Engineering immunogens that select for specific mutations in HIV broadly neutralizing antibodies[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 9503.
- [93] DEJNIRATTISAI W, JUMNAINSONG A, ONSIRISAKUL N, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans[J]. *Science*, 2010, 328(5979): 745-748.
- [94] STETTLER K, BELTRAMELLO M, ESPINOSA D A, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection[J]. *Science*, 2016, 353(6301): 823-826.
- [95] DEJNIRATTISAI W, SUPASA P, WONGWIWAT W, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus[J]. *Nature Immunology*, 2016, 17(9): 1102-1108.
- [96] HASAN S S, MILLER A, SAPPARAPU G, et al. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14722.
- [97] LONG F, DOYLE M, FERNANDEZ E, et al. Structural basis of a potent human monoclonal antibody against Zika virus targeting a quaternary epitope[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(5): 1591-1596.
- [98] SLON-CAMPOS J L, DEJNIRATTISAI W, JAGGER B W, et al. A protective Zika virus E-dimer-based subunit vaccine engineered to abrogate antibody-dependent enhancement of dengue infection[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(10): 1291-1298.
- [99] DAI L P, XU K, LI J H, et al. Protective Zika vaccines engineered to eliminate enhancement of dengue infection *via*

- immunodominance switch[J]. *Nature Immunology*, 2021, 22(8): 958-968.
- [100] SHARMA A, ZHANG X K, DEJNIRATTISAI W, et al. The epitope arrangement on flavivirus particles contributes to Mab C10's extraordinary neutralization breadth across Zika and dengue viruses[J]. *Cell*, 2021, 184(25): 6052-6066.e18.
- [101] CHENG N N, LIU M Z, LI W T, et al. Protein post-translational modification in SARS-CoV-2 and host interaction [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1068449.
- [102] SHAJAHAN A, PEPI L E, ROUHANI D S, et al. Glycosylation of SARS-CoV-2: structural and functional insights[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(29): 7179-7193.
- [103] RINGE R P, OZOROWSKI G, RANTALAINEN K, et al. Reducing V3 antigenicity and immunogenicity on soluble, native-like HIV-1 env SOSIP trimers[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(15): e00677-17.
- [104] DUAN H Y, CHEN X J, BOYINGTON J C, et al. Glycan masking focuses immune responses to the HIV-1 CD4-binding site and enhances elicitation of VRC01-class precursor antibodies[J]. *Immunity*, 2018, 49(2): 301-311.e5.
- [105] WEIDENBACHER P A, KIM P S. Protect, modify, deprotect (PMD): a strategy for creating vaccines to elicit antibodies targeting a specific epitope[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(20): 9947-9952.
- [106] MUSUNURI S, WEIDENBACHER P A B, KIM P S. Bringing immunofocusing into focus[J]. *NPJ Vaccines*, 2024, 9: 11.
- [107] FANG Z Y, JIANG W L, LIU P, et al. Targeting HIV-1 immune escape mechanisms: key advances and challenges in HIV-1 vaccine design[J]. *Microbiological Research*, 2025, 299: 128229.
- [108] VAN GILS M J, SANDERS R W. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: templates for a vaccine[J]. *Virology*, 2013, 435(1): 46-56.
- [109] WEST A P, SCHARF L, SCHEID J F, et al. Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy[J]. *Cell*, 2014, 156(4): 633-648.
- [110] NG'UNI T, CHASARA C, NDHLOVU Z M. Major scientific hurdles in HIV vaccine development: historical perspective and future directions[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 590780.
- [111] LIU S, HU M L, LIU X Q, et al. Nanoparticles and antiviral vaccines[J]. *Vaccines*, 2023, 12(1): 30.
- [112] WUERTZ K M, BARKEI E K, CHEN W H, et al. A SARS-CoV-2 spike ferritin nanoparticle vaccine protects hamsters against Alpha and Beta virus variant challenge[J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6: 129.
- [113] JOYCE M G, CHEN W H, SANKHALA R S, et al. SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccines elicit broad SARS coronavirus immunogenicity[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(12): 110143.
- [114] SONG J Y, CHOI W S, HEO J Y, et al. Safety and immunogenicity of a SARS-CoV-2 recombinant protein nanoparticle vaccine (GBP510) adjuvanted with AS03: a randomised, placebo-controlled, observer-blinded phase 1/2 trial[J]. *EClinicalMedicine*, 2022, 51: 101569.
- [115] LI Y Y, ZHANG Y N, ZHOU Y, et al. An RBD virus-like particle vaccine for SARS-CoV-2 induces cross-variant antibody responses in mice and macaques[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 173.
- [116] NGUYEN B, TOLIA N H. Protein-based antigen presentation platforms for nanoparticle vaccines[J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6: 70.
- [117] LUA L H L, CONNORS N K, SAINSBURY F, et al. Bioengineering virus-like particles as vaccines[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(3): 425-440.
- [118] LU Y, CHAN W, KO B Y, et al. Assessing sequence plasticity of a virus-like nanoparticle by evolution toward a versatile scaffold for vaccines and drug delivery[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(40): 12360-12365.
- [119] ZHANG X F, MEINING W, FISCHER M, et al. X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex Aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 306(5): 1099-1114.
- [120] PIOT P, LARSON H J, O'BRIEN K L, et al. Immunization: vital progress, unfinished agenda[J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 119-129.
- [121] BOYOGLU-BARNUM S, ELLIS D, GILLESPIE R A, et al. Quadrivalent influenza nanoparticle vaccines induce broad protection[J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 623-628.
- [122] CAO S N, MA D X, JI S W, et al. Self-assembled ferritin nanoparticles for delivery of antigens and development of vaccines: from structure and property to applications[J]. *Molecules*, 2024, 29(17): 4221.
- [123] LADENSTEIN R, MORGUNOVA E. Second career of a biosynthetic enzyme: lumazine synthase as a virus-like nanoparticle in vaccine development[J]. *Biotechnology Reports*, 2020, 27: e00494.
- [124] REUTOVICH A A, SRIVASTAVA A K, AROSIO P, et al. Ferritin nanocages as efficient nanocarriers and promising platforms for COVID-19 and other vaccines development[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2023, 1867(3): 130288.
- [125] KANG Y F, SUN C, ZHUANG Z, et al. Rapid development of

- SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(2): 2738-2752.
- [126] MARCANDALLI J, FIALA B, OLS S, et al. Induction of potent neutralizing antibody responses by a designed protein nanoparticle vaccine for respiratory syncytial virus[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1420-1431.e17.
- [127] TAI W B, CHAI B J, FENG S Y, et al. Development of a ferritin-based nanoparticle vaccine against the SARS-CoV-2 Omicron variant[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7: 173.
- [128] KANEKIYO M, JOYCE M G, GILLESPIE R A, et al. Mosaic nanoparticle display of diverse influenza virus hemagglutinins elicits broad B cell responses[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(3): 362-372.
- [129] KANG Y F, SUN C, SUN J, et al. Quadrivalent mosaic HexaPro-bearing nanoparticle vaccine protects against infection of SARS-CoV-2 variants[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 2674.
- [130] BRINKKEMPER M, SLIOPEN K. Nanoparticle vaccines for inducing HIV-1 neutralizing antibodies[J]. *Vaccines*, 2019, 7(3): 76.
- [131] STEPHENSON K E, WEGMANN F, TOMAKA F, et al. Comparison of shortened mosaic HIV-1 vaccine schedules: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 trial (IPCAVD010/HPX1002) and a preclinical study in *Rhesus* Monkeys (NHP 17-22)[J]. *The Lancet HIV*, 2020, 7(6): e410-e421.
- [132] HILLS R A, TAN T K, COHEN A A, et al. Proactive vaccination using multiviral Quartet Nanocages to elicit broad anti-coronavirus responses[J]. *Nature Nanotechnology*, 2024, 19(8): 1216-1223.
- [133] LENEHGAN D B, MIURA K, TAYLOR I J, et al. Nanoassembly routes stimulate conflicting antibody quantity and quality for transmission-blocking malaria vaccines[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 3811.
- [134] ZHANG Y N, PAYNTER J, SOU C, et al. Mechanism of a COVID-19 nanoparticle vaccine candidate that elicits a broadly neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 variants[J]. *Science Advances*, 2021, 7(43): eabj3107.
- [135] MA X C, ZOU F, YU F, et al. Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain (RBD) and heptad repeat (HR) of SARS-CoV-2 elicit robust protective immune responses[J]. *Immunity*, 2020, 53(6): 1315-1330.e9.
- [136] LI L, FIERER J O, RAPOPORT T A, et al. Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide tag[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(2): 309-317.
- [137] KEEBLE A H, BANERJEE A, FERLA M P, et al. Evolving accelerated amidation by SpyTag/SpyCatcher to analyze membrane dynamics[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(52): 16521-16525.
- [138] KEEBLE A H, TURKKI P, STOKES S, et al. Approaching infinite affinity through engineering of peptide-protein interaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(52): 26523-26533.
- [139] FU D, WANG W M, ZHANG Y, et al. Self-assembling nanoparticle engineered from the ferritinophagy complex as a rabies virus vaccine candidate[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 8601.
- [140] CHOI A, BOUZYA B, CORTÉS FRANCO K D, et al. Chimeric hemagglutinin-based influenza virus vaccines induce protective stalk-specific humoral immunity and cellular responses in mice[J]. *ImmunoHorizons*, 2019, 3(4): 133-148.
- [141] ZHANG J, HAN Z B, LIANG Y, et al. A mosaic-type trimeric RBD-based COVID-19 vaccine candidate induces potent neutralization against Omicron and other SARS-CoV-2 variants[J]. *eLife*, 2022, 11: e78633.
- [142] OLS S, LENART K, ARCOVERDE CERVEIRA R, et al. Multivalent antigen display on nanoparticle immunogens increases B cell clonotype diversity and neutralization breadth to pneumoviruses[J]. *Immunity*, 2023, 56(10): 2425-2441.e14.
- [143] LIU C Y, XU S Y, ZHENG Y X, et al. Mosaic RBD nanoparticle elicits immunodominant antibody responses across sarbecoviruses[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(5): 114235.
- [144] COHEN A A, YANG Z, GNANAPRAGASAM P N P, et al. Construction, characterization, and immunization of nanoparticles that display a diverse array of influenza HA trimers[J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0247963.
- [145] GEORGIEV I S, JOYCE M G, CHEN R E, et al. Two-component ferritin nanoparticles for multimerization of diverse trimeric antigens[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2018, 4(5): 788-796.
- [146] UEDA G, ANTANASIJEVIC A, FALLAS J A, et al. Tailored design of protein nanoparticle scaffolds for multivalent presentation of viral glycoprotein antigens[J]. *eLife*, 2020, 9: e57659.
- [147] BROUWER P J M, ANTANASIJEVIC A, BERNDSEN Z, et al. Enhancing and shaping the immunogenicity of native-like HIV-1 envelope trimers with a two-component protein nanoparticle[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4272.
- [148] LEE S M, KIBLER R D, AHN G, et al. Four-component protein nanocages designed by programmed symmetry breaking[J]. *Nature*, 2025, 638(8050): 546-552.
- [149] DOWLING Q M, PARK Y J, FRIES C N, et al. Hierarchical design of pseudosymmetric protein nanocages[J]. *Nature*, 2025, 638(8050): 553-561.

- [150] ZHAO T M, CAI Y L, JIANG Y J, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 283.
- [151] MONI S S, ABDELWAHAB S I, JABEEN A, et al. Advancements in vaccine adjuvants: the journey from alum to nano formulations[J]. *Vaccines*, 2023, 11(11): 1704.
- [152] STERTMAN L, PALM A E, ZARNEGAR B, et al. The Matrix-M™ adjuvant: a critical component of vaccines for the 21st century[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2023, 19(1): 2189885.
- [153] SUNG H D, KIM N, LEE Y, et al. Protein-based nanoparticle vaccines for SARS-CoV-2[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13445.
- [154] RODRIGUES K A, ZHANG Y J, LAM J, et al. Vaccines combining slow release and follicle targeting of antigens increase germinal center B cell diversity and clonal expansion [J]. *Science Translational Medicine*, 2025, 17(803): eadw7499.
- [155] CARTER N J. Multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB; Bexsero®): a review of its use in primary and booster vaccination[J]. *BioDrugs*, 2013, 27(3): 263-274.
- [156] SHIRLEY M, TAHA M K. MenB-FHbp meningococcal Group B vaccine (Trumenba®): a review in active immunization in individuals Aged  $\geq 10$  Years[J]. *Drugs*, 2018, 78(2): 257-268.
- [157] DORMITZER P R, GRANDI G, RAPPUOLI R. Structural vaccinology starts to deliver[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(12): 807-813.
- [158] RAPPUOLI R, BOTTOMLEY M J, D'ORO U, et al. Reverse vaccinology 2.0: human immunology instructs vaccine antigen design[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(4): 469-481.
- [159] DORMITZER P R, ULMER J B, RAPPUOLI R. Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines [J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(12): 659-667.
- [160] STANFIELD R L, JULIEN J P, PEJCHAL R, et al. Structure-based design of a protein immunogen that displays an HIV-1 gp41 neutralizing epitope[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 414(3): 460-476.
- [161] COWTON V M, OWSIANKA A M, FADDA V, et al.

Development of a structural epitope mimic: an idiotypic approach to HCV vaccine design[J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6(1): 7.

- [162] MESHARAM R, KOLTE B, GACCHE R. Reverse vaccinology approach for identification of epitopes from E1 protein as peptide vaccine against HCV: a proof of concept[J]. *Vaccine*, 2024, 42(24): 126106.

- [163] LAINŠČEK D, FINK T, FORSTNERIČ V, et al. A nanoscaffolded spike-RBD vaccine provides protection against SARS-CoV-2 with minimal anti-scaffold response[J]. *Vaccines*, 2021, 9(5): 431.



**通讯作者:** 马显才(1991—),男,研究员,博士生导师。研究方向为病毒与宿主互作的机制研究及其抗病毒纳米颗粒疫苗研发。

E-mail: ma\_xiancai@gzlab.ac.cn



**第一作者:** 陈涛(2002—),男,博士研究生。研究方向为抗呼吸道病毒新型纳米颗粒疫苗研发。

E-mail: chen\_tao02@gzlab.ac.cn



**共同第一作者:** 赖锦涛(2001—),男,研究实习员。研究方向为蛋白类仿生纳米材料的人工智能优化与设计。

E-mail: lai\_jintao@gzlab.ac.cn