

HIV-1 Env 三聚体抗原改造研究进展

沈鸿霖¹, 张芝晴², 李少伟^{1,2}, 顾颖^{1,2}

1 厦门大学 生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

2 厦门大学 公共卫生学院 分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室, 福建 厦门 361102

沈鸿霖, 张芝晴, 李少伟, 等. HIV-1 Env 三聚体抗原改造研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(1): 25–32.

Shen HL, Zhang ZQ, Li SW, et al. Progress in HIV-1 Env trimer design. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 25–32.

摘要: HIV-1 疫苗研发是当前艾滋病研究的一大热点, 其病毒表面包膜糖蛋白 Env 三聚体介导病毒与细胞融合, 是 HIV-1 疫苗研究的重要靶点。因此, 设计并在体外表达类天然 Env 三聚体对 HIV-1 疫苗的研发具有重要的意义。近年来, Env 三聚体研究取得了显著的进展。SOSIP、NFL2P、UFO 等抗原改造方法实现了类天然 Env 三聚体的体外表达, 逐步解决了改造抗原产量低、结构不稳定等问题, 且表达的 Env 三聚体抗原能在动物免疫中诱导机体产生较高的中和抗体水平。Env 三聚体改造方法促进了 HIV-1 疫苗的研究。文中综述了 SOSIP、NFL2P、UFO 三种 HIV-1 Env 三聚体抗原改造方法, 对比各个改造方法优缺点, 并结合自身工作提出相关建议, 为后续 HIV-1 抗原的相关设计提供指导。

关键词: 人类免疫缺陷病毒 I 型, Env 三聚体, 抗原设计, 中和抗体

Progress in HIV-1 Env trimer design

Honglin Shen¹, Zhiqing Zhang², Shaowei Li^{1,2}, and Ying Gu^{1,2}

1 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

2 State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract: Currently, HIV-1 vaccine development has still been a hot pot in the AIDS research. HIV-1 glycoprotein Env is the sole target in the virion surface that mediates the membrane fusion between the virion and cell in the HIV-1 infection process. Env protein is the significant immunogen for HIV-1 vaccine development. In recent years, there have been breakthroughs in the Env trimer research. For example, the strategies including SOSIP, NFL2P, and UFO had been applied to design and generate HIV-1 Env trimer. The improvement of quantity and stability is beneficial to achieve the HIV-1 native-like Env trimer for elicitation of strong neutralizing antibody responding in animal immunization. This review focuses on the different strategies for Env trimer design and compares their advantages and disadvantages, combining with our work to give some advice, which might provide relevant information for the future HIV-1

Received: April 25, 2019; **Accepted:** May 21, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81671645).

Corresponding authors: Ying Gu. E-mail: guying@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81671645) 资助。

网络出版时间: 2019-06-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190617.1050.001.html>

immunogen design.

Keywords: HIV-1, Env trimer, antigen design, neutralizing antibody

人类免疫缺陷病毒 1 型 (Human immunodeficiency virus, HIV-1) 是导致艾滋病 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 的主要病原体。据世界卫生组织 (World health organization, WHO) 统计报告, 自 1981 年 HIV-1 发现至今, HIV-1 感染者已逾 7 000 万人, 超过 3 500 万人死于艾滋病相关疾病; 截止 2017 年底, 全球仍有 3 690 多万的 HIV-1 感染者, 我国感染 HIV-1 的人数也逐年递增^[1]。近年来, 从精英患者血液中分离得到的广谱中和抗体能够中和多种亚型的 HIV-1 毒株, 这提示通过疫苗诱导机体产生广谱中和抗体是预防、治疗艾滋病的突破点。因此, 研制出高效的 HIV-1 疫苗对攻克艾滋病具有重大意义^[2]。

HIV-1 疫苗开发的主要目标是通过疫苗诱导机体产生广谱中和抗体。HIV-1 病毒粒子表面的包膜糖蛋白 (Envelope glycoprotein, Env) 三聚体是中和抗体识别的唯一靶标^[3]。通过设计并在体外表达稳定的 Env 三聚体, 是目前 HIV-1 候选疫苗抗原的研究热点。早期, 对于 Env 三聚体的设计只是简单地利用三聚体折叠序列辅助蛋白形成三聚体模序, 例如在蛋白序列中添加牛痘病毒 (Vaccinia virus, VACV) 14K 蛋白基因 (分离自 A27L 基因) 辅助 gp120 组装成三聚体^[4]; 或者在 Env 蛋白基因序列末端添加 T₄ 噬菌体折叠序列辅助蛋白形成三聚体等^[5]。随着研究的深入, 目前已经提出了各种不同的策略来克服 Env 亚稳态, 并产生用于结构和疫苗研究的稳定、均一的 Env 三聚体。其中典型的设计方法有 SOSIP、NFL2P 以及 UFO 设计方法。文中就这 3 种主要的 Env 三聚体改造策略进行综述, 分析其优缺点, 为后续的免疫原改造提供参考。

1 HIV-1 Env 的结构和功能特征

HIV-1 Env 是由异源二聚体的单体形成的三聚体, 每个单体含有受体结合蛋白 gp120 (Surface glycoprotein, SU) 和跨膜融合蛋白 gp41 (Transmembrane protein, TM), 以非共价相互作用连接^[6]。前体 Env 蛋白 (gp160) 在内质网合成, 并转运到高尔基体中进行相关糖基修饰和蛋白折叠, 以形成三聚体构象, 再由弗林蛋白酶 (Furin) 家族将 gp160 剪切为 gp120 和 gp41 亚基^[7]。

HIV-1 可感染 CD4⁺ T 淋巴细胞。在感染过程中, gp120 与靶细胞表面 CD4 受体结合发生变构, 暴露辅助受体 CCR5/CXCR4 结合部位, 使病毒与细胞紧密结合; 随后, gp41 融合肽 (Fusion peptides, FP) 进行穿膜, 重复序列 Heptad repeat 1 (HR1)、Heptad repeat 2 (HR2) 发生构象重排形成发卡结构, 拉近病毒和靶细胞的距离并进行膜融合, 以介导病毒基因组进入细胞^[8]。

Env 同样也是中和抗体结合的唯一靶标。广谱中和抗体主要是通过结合病毒表面 Env 三聚体阻止病毒入胞^[9]。但并非所有病毒表面的突刺结构都是正确的 Env 三聚体构象, 其病毒表面存在着一些单体形式的、更开放的、折叠不正确的 Env^[10], 以诱导机体产生非中和抗体进行免疫逃逸^[11]。目前所鉴定的广谱中和抗体的中和表位 V1/V2 区、V3 区、CD4 结合位点 (CD4 binding site, CD4bs)、gp120/gp41 交界面以及近膜端 (Membrane proximal external region, MPER) 均位于 Env 的胞外区段, 且大多数广谱中和抗体识别的表位在不同程度上受三聚体四级结构的影响, 更有甚者是三聚体结构依赖性抗体^[12]: 如识别 gp120 上 V1/V2 区的抗体 PGT145 以及识别 gp120/gp41 交界面的抗体 35O22^[13]。目前报道的

广谱度较好的中和抗体 VRC01 (约覆盖了由 190 种假病毒组成的假病毒盘中的 91%^[14-16]) 识别的表位 CD4bs 同样也受三聚体空间结构的影响。因此, 类天然 Env 三聚体成为 HIV-1 疫苗设计候选疫苗抗原, 设计并在体外表达稳定的类天然 Env 三聚体对 HIV-1 疫苗研究意义重大。

2 基于二硫键连接的 SOSIP 设计

2013 年, Sanders 等以 HIV-1 A 亚型毒株 BG505 为设计毒株, 通过构建二硫键 (SOS) 并引入三聚体突变 (I559P), 成功在体外表达类天然 Env 三聚体蛋白, 并将这种改造方法命名为 SOSIP 设计^[17]。改造方法如下 (图 1): 1) 引入 T501C/A605C 双突变在 gp120 和 gp41 之间构建二硫键^[18], 使 gp120 和 gp41 以共价作用连接, 构象更加稳定^[19]; 2) 对 Furin 酶切位点进行 R6 突变 (REKR→RRRRRR) 提高酶切效率; 3) 引入 I559P 突变有利于 Env 形成三聚体构象^[20]; 4) 利用人组织纤维蛋白溶酶原激活剂信号肽替换 gp120 原有的信号肽, 并在启动子前面添加 Kozak 序列 (GCCACC) 以提高蛋白的表达量; 5) 删除 gp41 高度疏水性的 MPER, 增强了蛋白的可溶性表达和均一性^[21-23]。

在蛋白纯化方面, 通过引入 T332N 突变使真核表达的 Env 三聚体能与糖基依赖性抗体 2G12 结合^[24]。利用抗体亲和层析对 Env 三聚体进行初步纯化, 再用分子筛排阻层析 (Size exclusion chromatography, SEC) 进行二次纯化得到 Env 三聚体。改造后的 Env 三聚体与广谱中和抗体如 VRC01、3BNC117 等亲和力强, 并能在电镜下看

到其三聚体形态^[25]。

SOSIP 设计方法的出现掀起了类天然 Env 三聚体改造的热潮, 研究者在此方法的基础上进行了一系列的优化。Joyce 等将 gp120 201 位和 433 位氨基酸残基突变成两个半胱氨酸, 以引入二硫键构建稳定性更好的“DS-BG505 SOSIP.664”突变体^[26]。Ringe 等在 AMC008 SOSIP.664 的基础上进行了 L535M、L543Q/N 双突变得到了稳定性更强的 SOSIP.v3 三聚体抗原, 并在 SOSIP.v3 的基础上引入 A316W、E64K/H66R 突变得到免疫原性更强并能减少非中和表位暴露的半封闭式三聚体 SOSIP.v4^[27]; Sullivan 等通过引入二硫键和脯氨酸残基、填充 gp120 上的疏水性空腔等方法进行鸟枪法诱变, 产生 852 个变体, 以三聚体依赖性抗体 PGT145 结合活性为指标, 通过高通量 ELISA 的方法, 最终筛选出 3 株突变体 Q203F、T538F 和 I548F, 进一步提高了 SOSIP 三聚体的稳定性和免疫原性^[28]。

将 SOSIP 改造的 Env 三聚体和非天然、不剪切状态的 Env 蛋白分别在小鼠、家兔和恒河猴上进行动物免疫验证其免疫原性。免疫结果显示, SOSIP 改造的类天然 Env 三聚体可以在 3 种动物体内产生较高的血清中和滴度。其中家兔和 Balb/C 小鼠免疫产生的血清中和滴度最高, 可达到 10 000 以上; 恒河猴免疫产生的血清中滴度相对较弱。而非天然、不剪切状态的 Env 三聚体在 3 种实验动物体内的血清中和滴度较低, 均小于 100^[2,29-31]。这表明, 类天然的 Env 三聚体相较于非天然的 Env 蛋白具有更强的免疫原性和诱导中和抗体的能力。

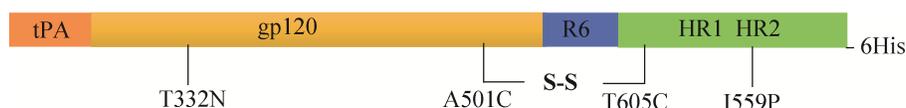


图 1 SOSIP 设计方法^[17]

Fig. 1 Design of SOSIP trimer^[17].

尽管 SOSIP 设计方法实现了类天然 Env 三聚体的体外表达, 在 HIV-1 候选疫苗抗原设计上有了质的突破, 但该方法存在通用性不高、产量低且结构不稳定等问题, 仍然需要进一步的优化。

3 不依赖于酶切的 NFL2P (Native flexibly linked) 设计

2015 年, 基于 SOSIP 改造方法的经验及存在的问题, 新一代不依赖于酶切的类天然 HIV-1 Env 三聚体改造方法 NFL2P 问世^[32]。NFL 是指以更加天然、灵活的方式连接 gp120 和 gp41 两个亚基构建 Env 三聚体; 2P 指的是利用 2 个柔性的 Linker 连接。该方法以 B 亚型毒株 JR-FL 为改造毒株, 相较于 SOSIP 改造方法, 其通用性有所提高。除了将 gp120 的信号肽替换成人类 CD5 信号肽外, 与 SOSIP 改造方法相比, NFL2P 设计方法最大的不同是直接删除了 Furin 酶切位点 REKR 并将其替换成了两个柔性的 Linker $(G_4S)_2$ (GGGGSGGGGS), 以此产生了不依赖于 Furin 酶剪切的更加稳定的类天然 Env 三聚体 (图 2)。

为了进一步增强类天然 Env 三聚体的免疫原性并暴露更多的广谱中和表位, Yang 等通过对 BG505 NFL gp140 和 16055 NFL Env 三聚体进行脯氨酸扫描和二硫键扫描突变, 筛选出 3 组突变方法——I201C/A433C (TD)、A501C/L663C (2CC+) 和 L555P; 并在 FP 的上游添加了肠激酶切位点 D4K 形成了结构导向更加完整的 NFL Env 三聚体抗原, 增强广谱中和表位融合肽 FP 的暴露^[33]。Dubrovskaya 等在 10655 NFL 三聚体蛋白的基础上, 通过删除 CD4 结合位点附近潜在的 N-聚糖位点

(Potential N-glycan sites, PNGS) 提高蛋白的稳定性及与靶向 CD4bs 的广谱中和抗体的亲和性, 并且能快速刺激动物机体产生抗体应答, 表明删除 CD4bs 结合位点附近的 N-聚糖有利于相应抗体的产生^[34]。

以 16055 NFL TD CC 三聚体为免疫原, 对 C₅₇BL/6 小鼠进行动物免疫, 免疫剂量为 10 μg/只; 免疫 10 周后, 其血清中和滴度达到 15 000–17 000 之间; 且该三聚体与戊二醛交联后能增强其热稳定性并减少非中和表位的暴露, 有利于诱导中和抗体^[35-37]。虽然, 不依赖于酶切的 NFL2P 改造方法相较于 SOSIP 改造方法在通用性和产量上有所提高, 并能在动物体内激起良好的血清中和效果, 但并没有彻底解决 Env 三聚体改造方法在不同毒株上的通用性问题。

4 基于 HR1 优化的 UFO (Uncleaved prefusion-optimized) 设计

2016 年, Zhu 等提出了基于 HR1 优化的 HIV-1 Env 三聚体设计方法——UFO, 解决了 Env 三聚体抗原设计在不同毒株上应用的通用性问题^[38]。UFO 设计是指不依赖于酶切并针对膜融合过程进行相关优化的类天然 HIV-1 Env 三聚体改造方法。通过对结构进行分析发现, SOSIP 设计所产生 Env 三聚体中, gp41 的 HR1 部分被包裹起来, 无法观测到其结构特征, 而 HR1 在 HIV-1 病毒入胞的过程中发生明显的构象变化介导病毒入胞。因此, HR1 可能是影响 Env 三聚体结构稳定性的关键区域。SOSIP 设计方法引入了二硫键及三聚体突变 I559P, 改变了原有的 HR1 的空间距离, 这可能使这种三聚体改造方法缺乏通用性。



图 2 NFL2P 设计方法^[32]

Fig. 2 Design of NFL2P trimer^[32].

基于此, Zhu 等开发了一种基于集合 (Ensemble-based) 的蛋白设计方法: 利用深度测序技术, 通过计算机模拟得到五段 10 氨基酸的低能结构环, 利用这些能量较低的结构环对 HR1 进行替换, 提高了 Env 三聚体的稳定性和表达量 (图 3)。相较于 SOSIP 设计方法, UFO 设计方法删除了 I559P 的突变, 并尝试了不同长度的 Linker 代替 Furin 酶切位点。通过一系列的抗原分析, 最终发现将 Furin 酶切位点替换成简单的 G₄S Linker 能够提高 Env 三聚体的稳定性。将这种设计方法应用于 HIV-1 的不同亚型的毒株, 如 A 亚型的 BG505、B 亚型的 JRFL、B'/C 亚型的 CH115.12 以及 CN54。结果显示该设计方法在不同亚型的 HIV-1 毒株中均能产生良好的适用性, 且表达的 Env 三聚体结构均一, 并能和已报道的广谱中和抗体有较好的亲和性。

UFO 的改造方法及其三聚体的晶体结构提示, gp41 ectodomain (gp41_{ECTO}) 区段是影响 Env 亚稳定性的主要因素, 而 Env 的亚稳定性是 HIV-1 疫苗设计中必须克服的难题。UFO-BG 改造方法的出现解决了 Env 三聚体亚稳定性的问题: 用 UFO 方法改造的 BG505 gp41 ECTO 区段替换野生型病毒毒株的 gp41 ECTO 区域得到 gp41 ECTO 交换三聚体。将该改造方法应用于 10 株不同 HIV-1 毒株, 跨越 5 个亚型, 均体现出良好的适配性。且该改造方法产生的三聚体能在 CHO 细胞中高效表达, 其产量、纯度及抗体亲和力均有了很大提高。UFO-BG 改造方法为 HIV-1 疫苗设计提供了重要的候选疫苗抗原^[39]。

以 UFO 和 UFO-BG 两种 Env 三聚体免疫小

鼠, 发现两种三聚体蛋白均能在小鼠体内激起较好的中和抗体水平; 将该三聚体蛋白展示在 60 聚体的纳米颗粒上进行免疫时, 结果显示其血清中和滴度显著提高近一个数量级^[16,40]。UFO 设计方法有效解决了前两种三聚体设计方法中通用性不高、产量低及稳定性等问题, 为 HIV-1 疫苗免疫原设计提供了新方法。

5 总结与展望

HIV-1 疫苗的研发对攻克艾滋病的流行和传播具有重要的意义, 而 HIV-1 病毒表面包膜糖蛋白 Env 三聚体是抗体识别的唯一靶标, 因此, 设计并能在体外稳定表达 Env 三聚体蛋白是目前针对 HIV-1 疫苗免疫原设计的一大热点。随着研究的深入, Env 三聚体免疫原设计的难题被一步步解决。SOSIP 设计实现了从无到有的突破性进展, 但其存在通用性差、产量不高、结构不稳定等问题; 不依赖酶切的 NFL2P 设计方法大大提高了 Env 三聚体在体外表达的效率 and 产量, 但依然存在通用性不高的问题; UFO 设计方法的出现弥补了这一缺点, 不仅实现了类天然 Env 三聚体在体外的高效表达, 并可以应用在多个亚型的 HIV-1 毒株上, 其构象也更加稳定均一。三种 Env 三聚体改造策略优缺点比较如表 1 所示。

本实验室也运用了这几种主要的设计方法进行类天然 Env 抗原设计, 其中 SOSIP 设计方法表达的 Env 三聚体在产量和形态均一性上均不如 NFL2P 和 UFO 的设计方法, 3 种方法设计的 Env 三聚体均可以通过使用 His-tag 标签进行镍柱纯化, 并且适当延长 His-tag 标签 (从 6 个组氨酸延

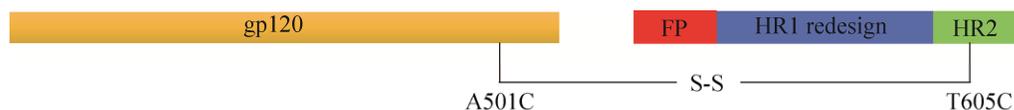


图 3 UFO 设计方法^[38]

Fig. 3 Design of UFO trimer^[38].

表 1 Env 三聚体改造策略优缺点比较

Table 1 The strategies of various Env antigen design

Name of construct	Design strategy	Advantages and disadvantages
SOSIP	① Mutation: T332N, I559P, A501C, T605C, ② Delete MPER ③ REKR to RRRRRR in gp120 ④ Add Kozak sequence, the tissue plasm-inogen activator (tPA) signal peptide replaced the natural one ⑤ Codon-optimized	① Advantages: A series of modificational methods of systemic Env trimer design were proposed, which made the expression of Env trimer <i>in vitro</i> possible and showed good adaptability in BG505 strain ② Disadvantages: low versatility, low expression
NFL2P	① Mutation: T332N, I559P, A501C, T605C, ② REKR to (G ₄ S) ₂ Linker in gp120 ③ Add Kozak sequence, The CD5 signal peptide replaced the natural one ④ Codon-optimized ⑤ Delete MPER	① Advantages: greatly improved the yield and stability of Env trimer expression <i>in vitro</i> ② Disadvantages: low universality, limited strains suitable for this method
UFO	① Mutation: T332N, A501C, T605C, ② Delete MPER ③ REKR to (G ₄ S) Linker in gp120 ④ Computational procedure used for ensemble-based <i>de novo</i> protein design of the HR1 region ⑤ Add Kozak sequence, The tissue plasm-inogen activator (tPA) signal peptide replaced the natural one ⑥ Codon-optimized	① Advantages: strong versatility ② Disadvantages: Purification methods are too complex to be commercialized

伸至8–10个组氨酸)可以提高蛋白纯化的量和纯度。三种方法表达的 Env 三聚体均可以在小鼠体内产生较好的血清中和滴度;从抗体筛选的结果表明,以单型别 Env 三聚体蛋白进行免疫很难产生交叉中和抗体,采用多型别 Env 三聚体蛋白进行序贯免疫可产生交叉中和抗体。

这三种设计方法均是在原有的基础上一步一步改进,并都能在动物体内激起较好的抗体水平,为 HIV-1 疫苗设计提供了指导方向。然而,这些设计目前也是仅仅基于实验室阶段。由于需要经过抗体亲和层析粗纯化,再经过多次 SEC 纯化才能得到构象正确的 Env 三聚体,这样的纯化方法不适用于工业化大量生产制备。因此,在纯化方面还需要进一步的优化,以便大量获得 HIV-1 Env 三聚体。另外,现有的免疫原虽然能在动物体内激起较好的抗体应答,但从免疫的动物体内筛到 VRC01 类的广谱中和抗体的相关报道还比较少,

因此,在免疫策略和免疫方法的设计上还需要进一步优化和改进。

REFERENCES

- [1] Moore PL, Gorman J, Doria-Rose NA, et al. Ontogeny-based immunogens for the induction of V2-directed HIV broadly neutralizing antibodies. *Immunol Rev*, 2017, 275(1): 217–229.
- [2] Sanders RW, van Gils MJ, Derking R, et al. HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. *Science*, 2015, 349(6244): aac4223.
- [3] Wu XL, Kong XP. Antigenic landscape of the HIV-1 envelope and new immunological concepts defined by HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Curr Opin Immunol*, 2016, 42: 56–64.
- [4] Vijayan A, Garcia-Arriaza J, Raman SC, et al. A chimeric HIV-1 gp120 fused with vaccinia virus 14K (A27) protein as an HIV immunogen. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0133595.

- [5] Frank S, Kammerer RA, Mechling D, et al. Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering. *J Mol Biol*, 2001, 308(5): 1081–1089.
- [6] Aldon Y, McKay PF, Allen J, et al. Rational design of DNA-expressed stabilized native-like HIV-1 envelope trimers. *Cell Rep*, 2018, 24(12): 3324–3338.e5.
- [7] Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(7): a006924.
- [8] Planès R, Serrero M, Leghmari K, et al. HIV-1 envelope glycoproteins induce the production of TNF- α and IL-10 in human monocytes by activating calcium pathway. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17215.
- [9] Go EP, Ding HT, Zhang SJ, et al. Glycosylation benchmark profile for HIV-1 envelope glycoprotein production based on eleven env trimers. *J Virol*, 2017, 91(9): e02428-16.
- [10] Hiener B, Horsburgh BA, Eden JS, et al. Identification of genetically intact HIV-1 proviruses in specific CD4⁺ T cells from effectively treated participants. *Cell Rep*, 2017, 21(3): 813–822.
- [11] Shaik M, Peng HQ, Lu JM, et al. Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike. *Nature*, 2019, 565(7739): 318–323.
- [12] Sanders RW, Moore JP. Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design. *Immunol Rev*, 2017, 275(1): 161–182.
- [13] Huang JH, Kang BH, Pancera M, et al. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. *Nature*, 2014, 515(7525): 138–142.
- [14] Wu XL. HIV broadly neutralizing antibodies: VRC01 and beyond//Zhang LQ, Lewin SR, Eds. *HIV Vaccines and Cure: The Path Towards Finding an Effective Cure and Vaccine*. Singapore: Springer, 2018, 1075: 53–72.
- [15] LaBranche CC, McGuire AT, Gray MD, et al. HIV-1 envelope glycan modifications that permit neutralization by germline-reverted VRC01-class broadly neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*, 2018, 14(11): e1007431.
- [16] Duan HY, Chen XJ, Boyington JC, et al. Glycan masking focuses immune responses to the HIV-1 CD4-binding site and enhances elicitation of VRC01-class precursor antibodies. *Immunity*, 2018, 49(2): 301–311.e5.
- [17] Sanders RW, 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. *PLoS Pathog*, 2013, 9(9): e1003618.
- [18] Binley JM, Sanders RW, Clas B, et al. A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J Virol*, 2000, 74(2): 627–643.
- [19] Binley JM, Sanders RW, Master A, et al. Enhancing the proteolytic maturation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol*, 2002, 76(6): 2606–2616.
- [20] Sanders RW, Vesanen M, Schuelke N, et al. Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2002, 76(17): 8875–8889.
- [21] Apellániz B, Rujas E, Carravilla P, et al. Cholesterol-dependent membrane fusion induced by the gp41 membrane-proximal external region-transmembrane domain connection suggests a mechanism for broad HIV-1 neutralization. *J Virol*, 2014, 88(22): 13367–13377.
- [22] Klasse PJ, Depetris RS, Pejchal R, et al. Influences on trimerization and aggregation of soluble, cleaved HIV-1 SOSIP envelope glycoprotein. *J Virol*, 2013, 87(17): 9873–9885.
- [23] Fu QS, Shaik MM, Cai YF, et al. Structure of the membrane proximal external region of HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(38): E8892–E8899.

- [24] Julien JP, Lee JH, Cupo A, et al. Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(11): 4351–4356.
- [25] Ringe RP, Pugach P, Cottrell CA, et al. Closing and opening holes in the glycan shield of HIV-1 envelope glycoprotein SOSIP trimers can redirect the neutralizing antibody response to the newly unmasked epitopes. *J Virol*, 2019, 93: 4.
- [26] Joyce MG, Georgiev IS, Yang YP, et al. Soluble prefusion closed DS-SOSIP.664-env trimers of diverse HIV-1 strains. *Cell Rep*, 2017, 21(10): 2992–3002.
- [27] Ringe RP, Ozorowski G, Rantalainen K, et al. Reducing V3 antigenicity and immunogenicity on soluble, native-like HIV-1 Env SOSIP trimers. *J Virol*, 2017, 91(15): e00677-17.
- [28] Sullivan JT, Sulli C, Nilo A, et al. High-throughput protein engineering improves the antigenicity and stability of soluble HIV-1 envelope glycoprotein SOSIP trimers. *J Virol*, 2017, 91(22): e00862-17.
- [29] Bianchi M, Turner HL, Nogal B, et al. Electron-microscopy-based epitope mapping defines specificities of polyclonal antibodies elicited during HIV-1 BG505 envelope trimer immunization. *Immunity*, 2018, 49(2): 288–300.e8.
- [30] Ozorowski G, Cupo A, Golabek M, et al. Effects of adjuvants on HIV-1 envelope glycoprotein SOSIP trimers *in vitro*. *J Virol*, 2018, 92(13): e00381-18.
- [31] He LL, De Val N, Morris CD, et al. Presenting native-like trimeric HIV-1 antigens with self-assembling nanoparticles. *Nat Commun*, 2016, 7: 12041.
- [32] Sharma SK, De Val N, Bale S, et al. Cleavage-independent HIV-1 Env trimers engineered as soluble native spike mimetics for vaccine design. *Cell Rep*, 2015, 11(4): 539–550.
- [33] Yang LF, Sharma SK, Cottrell C, et al. structure-guided redesign improves NFL HIV Env trimer integrity and identifies an inter-protomer disulfide permitting post-expression cleavage. *Front Immunol*, 2018, 9: 1631.
- [34] Dubrovskaya V, Guenaga J, De Val N, et al. Targeted N-glycan deletion at the receptor-binding site retains HIV Env NFL trimer integrity and accelerates the elicited antibody response. *PLoS Pathog*, 2017, 13(9): e1006614.
- [35] Soldemo M, Àdori M, Stark JM, et al. Glutaraldehyde cross-linking of HIV-1 Env Trimers skews the antibody subclass response in mice. *Front Immunol*, 2017, 8: 1654.
- [36] Bale S, Martiné A, Wilson R, et al. Cleavage-independent HIV-1 trimers from CHO cell lines elicit robust autologous Tier 2 neutralizing antibodies. *Front Immunol*, 2018, 9: 1116.
- [37] Guenaga J, Garces F, De Val N, et al. Glycine substitution at helix-to-coil transitions facilitates the structural determination of a stabilized subtype C HIV envelope glycoprotein. *Immunity*, 2017, 46(5): 792–803 e3.
- [38] Kong L, He LL, de Val N, et al. Uncleaved prefusion-optimized gp140 trimers derived from analysis of HIV-1 envelope metastability. *Nat Commun*, 2016, 7: 12040.
- [39] He LL, Kumar S, Allen JD, et al. HIV-1 vaccine design through minimizing envelope metastability. *Sci Adv*, 2018, 4(11): eaau6769.
- [40] Morris CD, Azadnia P, De Val N, et al. Differential antibody responses to conserved HIV-1 neutralizing epitopes in the context of multivalent scaffolds and native-like gp140 trimers. *mBio*, 2017, 8(1): e00036-17.

(本文责编 郝丽芳)