

· 医药生物技术 ·

H1N1、H3N2 亚型流感病毒 Mosaic-HA1 的表达及对小鼠的免疫原性评价

韩菲^{1,2}, 焦鹏涛³, 林润山^{3,4}, 李和桥², 马嘉宁^{3,4}, 裴汉中², 张鹤²,
孙蕾^{3,4}, 罗廷荣¹, 郑敏², 范文辉³, 刘文军^{1,2,3,4*}

1 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

2 深圳湾实验室, 广东 深圳 518000

3 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

4 中国科学院大学, 北京 100049

韩菲, 焦鹏涛, 林润山, 李和桥, 马嘉宁, 裴汉中, 张鹤, 孙蕾, 罗廷荣, 郑敏, 范文辉, 刘文军. H1N1、H3N2 亚型流感病毒 Mosaic-HA1 的表达及对小鼠的免疫原性评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4042-4056.

HAN Fei, JIAO Pengtao, LIN Runshan, LI Heqiao, MA Jianing, PEI Hanzhong, ZHANG He, SUN Lei, LUO Tingrong, ZHENG Min, FAN Wenhui, LIU Wenjun. Expression of influenza A H1N1 and H3N2 viruses Mosaic-HA1 antigens and evaluation of its immunogenicity in mice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4042-4056.

摘要: 流感病毒给全球公共卫生带来了严重威胁, 疫苗接种是预防流感及严重并发症的有效手段。本研究分析了北半球 2012–2022 年间人类甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)流行株血凝素(hemagglutinin, HA)中 HA1 亚基的氨基酸突变趋势和抗原显性位点变化情况。基于世界卫生组织(World Health Organization, WHO)公布的 2022 年北半球流感疫苗推荐株 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)和 A/Darwin/6/2021 (H3N2)的 HA1 氨基酸序列, 通过马赛克(mosaic)遗传算法设计了 3 种 Mosaic-HA1 抗原并将其在 293F 细胞中进行表达、纯化。将纯化后的 Mosaic-HA1 抗原与明矾佐剂以 1:1 的体积比混合制备亚单位疫苗并免疫 BALB/c 小鼠以评价免疫效果。酶联免疫吸附实验表明 Mosaic-HA1 抗原能产生同时结合两种亚型 HA1 的 IgG, 其中结合 H3 蛋白、H1 蛋白的特异性效价 IgG 效价分别达到 10^5 、 10^3 以上, 攻毒实验表明 Mosaic-HA1 能抵抗 H3N2 和 H1N1 流行毒株的攻击。本研究通过对不同亚型 IAV 毒株 HA1 中免疫显性位点进行重新组合, 为多价亚单位流感疫苗开发提供了新思路。

关键词: H1N1; H3N2; HA1 亚基; 重组蛋白; 免疫原性评价

资助项目: 内蒙古自治区科技计划(2021ZD0010-04); 国家自然科学基金(32061123001)

This work was supported by the Science and Technology Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2021ZD0010-04) and the National Natural Science Foundation of China (32061123001).

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

Received: 2024-02-10; Accepted: 2024-05-24

Expression of influenza A H1N1 and H3N2 viruses Mosaic-HA1 antigens and evaluation of its immunogenicity in mice

HAN Fei^{1,2}, JIAO Pengtao³, LIN Runshan^{3,4}, LI Heqiao², MA Jianing^{3,4}, PEI Hanzhong², ZHANG He², SUN Lei^{3,4}, LUO Tingrong¹, ZHENG Min², FAN Wenhui³, LIU Wenjun^{1,2,3,4*}

1 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518000, Guangdong, China

3 Key Laboratory of Pathogen Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Vaccination is the most effective measure for reducing and preventing influenza and related complications. In this study, we analyzed the mutation trend and the antigen dominant site changes of the amino acid sequence of hemagglutinin subunit 1 (HA1) of human influenza A virus (IAV) in the northern hemisphere from 2012 to 2022. According to the HA1 sequences of A/Darwin/6/2021 (H3N2) and A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) recommended by the World Health Organization in the 2022 influenza season in northern hemisphere, we employed the mosaic algorithm to design three Mosaic-HA1 antigens through stepwise substitution. Mosaic-HA1 was expressed and purified in 293F cells and then mixed with the alum adjuvant at a volume ratio of 1:1. The mixture was used to immunize BALB/c mice, and the immunogenicity was evaluated. Enzyme-linked immunosorbent assay showed that Mosaic-HA1 induced the production of IgG targeting two types of HA1, the specific IgG titers for binding to H3 protein and H1 protein reached 10^5 and 10^3 respectively. The challenge test showed that Mosaic-HA1 protected mice from H3N2 or H1N1. This study designs the vaccines by recombination of major antigenic sites in different subtypes of IAV, giving new insights into the development of multivalent subunit vaccines against influenza.

Keywords: H1N1; H3N2; HA1 subunit; recombinant protein; evaluation of immunogenicity

流感病毒属于正黏病毒科(Orthomyxoviridae)^[1], 是一种具囊膜的单股负链分节段 RNA 病毒, 直径约为 80–120 nm^[2]。流感病毒基因组由 8 个片段组成, 可编码血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(neuraminidase, NA)、基质蛋白(matrix protein, M1)和核蛋白(viral nucleoprotein, NP)等至少 17 种蛋白质。HA 在包膜表面不均匀分布, 呈尖峰样突起, 是流感病毒的主要抗原靶标^[2]。根据 M1、NP 抗原性的差异, 流感病毒分甲、乙、丙、丁 4 个类型^[3], 感染人类的流感病毒

包括甲型(influenza A virus, IAV)和乙型流感病毒(influenza B virus, IBV)。IAV 组间分为 18 种不同的 HA 亚型(H1–H18)^[4], H1N1 和 H3N2 亚型在 HA 进化上被划分在两个不同组, 不同亚型间 HA 诱导的交叉免疫反应弱^[5]。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计, 每年全球成年人流感的发病率为 5%–10%, 儿童发病率高达 20%–30%, 严重危害人类健康, 对社会和经济造成严重的影响^[6]。

流感防控是全世界关注的公共卫生问题^[7],

疫苗接种是预防流感最常用、最有效的手段之一^[8]。由于流感病毒持续进行抗原转换及漂移,常出现疫苗株与实际流行株不匹配的现象,导致免疫失败,造成当下使用的流感疫苗(包括灭活疫苗、减毒活疫苗和亚单位疫苗等)的保护效果不甚理想^[4]。根据美国疾控中心的数据显示,近10年来流感疫苗在北美地区的保护率仅有40%,而中国和其他发展中国家由于流感疫苗接种率低导致保护率更低^[9]。目前的大部分灭活疫苗(包括全病毒灭活疫苗和裂解疫苗)和减毒活疫苗都是鸡胚生产,普遍存在耗时长、工艺繁琐、有过敏风险的问题^[10],另外H3N2亚型不易在鸡胚中复制^[11]。因此科研人员一直在探索一种具有广谱保护性的通用流感疫苗。HA是流感病毒关键的抗原片段,含有被宿主免疫系统识别的抗原表位、宿主蛋白酶裂解表位、唾液酸受体结合位点(receptor binding site, RBS)及介导膜融合的抗原表位等^[12],对流感病毒的感染及传播有着关键作用^[13]。HA根据其结构和功能的不同被划分为HA1和HA2,在感染或接种疫苗后,诱导的高水平抗体有中和活性,往往与HA1的头部结构域结合,常作为流感疫苗研发的重点^[14]。研究表明,HA1上存在多个免疫系统识别的抗原位点^[15],以嵌合重组的方式在HA1上同时表达2种亚型IAV的抗原位点^[16],通过真核表达系统进行重组蛋白的制备^[17],对小鼠模型免疫后期望产生结合2种亚型IAV的保护性抗体,达到降低成本、缩短生产周期等目的,有利于流感疫苗的更新与制备。

本研究对抗原位点进行蛋白折叠情况及空间位置分析,并进行保守性评估,拟出嵌合方案。以WHO在2022–2023年北半球推荐的IAV疫苗株A/Wisconsin/588/2019(H1N1)和A/Darwin/6/2021(H3N2)为设计基础,以A/Darwin/6/2021的HA1为骨架,将A/Wisconsin/588/2019的HA的部分抗原位点嵌合替换骨架上适配的抗原位

点,设计了3种“Mosaic-HA1”抗原,通过HEK293F悬浮细胞系进行体外表达、纯化得到重组蛋白,与明矾佐剂混合后制成亚单位疫苗免疫小鼠,采用ELISA方法评价特异性IgG水平,通过在小鼠模型上进行攻毒实验评价Mosaic-HA1蛋白对IAV保护效果。本研究设计的Mosaic-HA可同时诱导结合H1N1和H3N2亚型流感病毒HA1的特异性IgG,攻毒保护实验表明Mosaic-HA1对2种流行毒株有保护效果,Mosaic2的综合保护效果最佳,为进一步探索新型通用流感疫苗提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞

流感病毒A/Hong Kong/1/1968(H3N2)分离株由深圳湾实验室郑敏特聘研究员惠赠,A/Wisconsin/588/2019(H1N1)分离株由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所王大燕研究员惠赠,MDCK细胞为本实验室保存。SPF鸡胚购自新兴大华农禽蛋有限公司。

1.1.2 主要试剂

MEM培养基购自英潍捷基公司,IMJECT ALUM明矾佐剂购自深圳市大信生物科技有限公司,可溶性单组份TMB底物溶液购自广州百胜科创生物科技有限公司,Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)购自默瑞上海科技有限公司,TPCK-trypsin(T8802)购自默克公司。

1.1.3 实验动物

SPF级的6–8周龄BALB/c雌鼠购自广东维通利华实验动物技术有限公司,SPF级鸡胚购自新兴大华农禽蛋有限公司。本研究的动物实验方案已通过深圳湾实验室实验动物福利伦理审查(动物实验伦理审批号为:AELWJ202301)。

1.2 方法

1.2.1 IAV HA 蛋白抗原显性位点的表征

从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载 H3N2 亚型流感病毒 HA 结构(PDB 登录号: 2YP2)和 H1N1 亚型流感病毒 HA 结构(PDB 登录号: 1RUZ), 导入 PyMOL 软件中进行颜色编辑, 以“Surface”的形式展示。

1.2.2 2012–2022 年间北半球 h-H1N1 及 h-H3N2 的 HA1 序列的保守性分析

在 EpiFlu 数据库中检索符合以下条件的序列并下载: (1) 序列采集地(location)为 WHO 严格划分的北半球流感疫苗推荐株包含的国家。(2) 采样时间(collection date)限制在 2012 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日范围内。(3) 亚型(type)选择为“H1N1”或“H3N2”, 宿主(host)选择为“人源”(human)。使用 MAFFT 软件(版本 7, <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software>)进行序列对齐, 使用 BioEdit 软件(版本 7.2.5, <https://thalljscience.github.io/>)去除重复序列及氨基酸残缺序列。使用 MEGA-X 软件(版本 11, <https://www.megasoftware.net/>)截除 HA2 和信号肽部分, 得到 32 742 条 H1N1 的 HA1 序列(327 aa)及 52 428 条 H3N2 的 HA1 序列(329 aa)。

使用 Weblogo 3 软件(<https://weblogo.threeplusone.com>)对已加工序列进行保守性分析, 以序列的熵变程度衡量某一位点氨基酸的保守性, 生成 Sequence Logo 图并以 SVG 格式输出结果。

1.2.3 IAV 的遗传进化树分析

以 Worldwide Influenza Centre (<https://www.crick.ac.uk/research/>)中 2019–2022 这 4 年的北半球流感病毒中期报告为参照, 得到一份涵盖中期报告中毒株的列表, 依照 1.2.2 中的步骤进行序列的下载与处理。获得 128 条 H1N1 的 HA1 序列(327 aa)和 137 条 H3N2 的 HA1 序列(329 aa)。用 JTT+G 模型在 MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>)中进行系统发育分析, 使用 iTOL (版本 6.8.1)编辑系统发育树。

1.2.4 病毒繁殖与扩增

取 9 日龄 SPF 鸡胚, 流感病毒液稀释后, 以 1 000 PFU/100 μ L 的注射剂量接种 SPF 鸡胚, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 72 h, 收获鸡胚, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。次日用无菌巴氏管吸取尿囊液至无菌离心管中, 4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μ mol/L 滤膜过滤, 分装, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.5 空斑实验检测病毒滴度

将生长状态良好的 MDCK 细胞铺于 6 孔板 (3×10^5 个/mL), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养过夜。次日待细胞铺满单层, 弃除原培养基, 加入 10 倍倍比稀释的病毒, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 吸附 1 h。弃除病毒稀释液, PBS 清洗 2 遍, 将 2% 低熔点琼脂糖与 MEM 以 1:1 的体积混合后, 加入 TPCK-treated Trypsin 使终浓度达到 2 μ g/mL, 取琼脂糖混合物覆盖于细胞表面, 2 mL/孔。凝固后将板倒置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。

48 h 后出现明显空斑, 固定后用结晶紫染色, 清水冲洗染液, 对空斑进行计数统计。根据公式: 感染的病毒量(PFU/mL)=每孔内空斑数目 \times 感染时病毒稀释倍数/每孔接种病毒的体积(mL)计算病毒的滴度。

1.2.6 重组蛋白的真核表达与纯化

根据哺乳动物细胞(293F)密码子偏好性, 对本研究设计的 3 种 Mosaic-HA1 (分别命名为 Mosaic1、Mosaic2 和 Mosaic3)基因序列进行密码子优化与合成, 插入到真核表达质粒 pcDNA3.4 中, 构建重组表达载体 pcDNA3.4-Mosaic-HA1 (含 6 \times His 标签)。同时分别将 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)和 A/Darwin/6/2021 (H3N2)毒株的 HA1 (分别命名为 H1 和 H3)克隆至 pcDNA3.4 载体中, 构建阳性对照重组表达质粒。构建的重组表达质粒分别瞬时转染 293F 悬浮细胞进行

目的蛋白表达, 采用 His TrapTM FF 亲和柱纯化目的蛋白, 用 PBS 进行目的蛋白的置换, -80 °C 冻存备用。重组蛋白的表达和纯化均由上海百英生物科技有限公司完成。

1.2.7 纯化蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定

将纯化蛋白进行 12% SDS-PAGE 检测, 电泳结束后进行考马斯亮蓝染色, 将纯化蛋白进行 10% SDS-PAGE 检测, 电泳结束后进行 Western blotting 验证。

1.2.8 动物实验分组及免疫程序

免疫复合物制备: 明矾佐剂与 500 μg/mL 目的蛋白(Mosaic1、Mosaic2、Mosaic3、H1+H3 混合蛋白)以 1:1 的体积比混合制备, 安慰剂组以 PBS 作为安慰剂, 注射等体积的安慰剂进行免疫。现配现用, 使用前充分涡旋均匀。

用于抗体滴度检测的动物分组及免疫程序: 将 25 只 BALB/c 雌鼠随机分为 5 组, 每组 5 只, 分为 Mosaic1 组、Mosaic2 组、Mosaic3 组、H1+H3 阳性对照组和安慰剂组。免疫方式为肌肉注射, 免疫剂量为 80 μL/只, 共免疫 2 次, 免疫间隔期为 2 周。将首次免疫时间计作第 0 周, 在第 0、3、5、7、11 周对小鼠进行眼眶静脉窦采血并分离血清, 间接 ELISA 法分别检测小鼠血清中抗 H1 和 H3 的特异性 IgG 效价。

用于攻毒保护和肺组织病毒滴度测定实验的动物分组及免疫程序: 将 60 只 BALB/c 雌鼠随机分为 5 组, 每组 12 只, 分为 Mosaic1 组、Mosaic2 组、Mosaic3 组、H1+H3 阳性对照组和安慰剂组。免疫方式为肌肉注射, 免疫剂量为 80 μL/只, 共免疫 3 次, 免疫间隔期为 2 周。三免结束后第 28 d 进行攻毒保护和肺脏组织滴度测定实验。

1.2.9 ELISA 检测特异性抗体水平

(1) ELISA 板包被: 碳酸盐缓冲液(Na₂CO₃

1.59 g/L, NaHCO₃ 2.93 g/L, pH 9.6)分别稀释 H1 和 H3 重组蛋白至 1 000 ng/mL, 包被 96 孔酶标板, 100 μL/孔, 4 °C包被过夜。

(2) 封闭: PBST (KH₂PO₄ 0.2 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g/L, KCl 0.2 g/L, NaCl 8.0 g/L, Tween-20 至 0.05%, pH 7.4)洗涤 2 次, 100 μL/孔, 拍干, 加入封闭液(KH₂PO₄ 0.2 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g/L, KCl 0.2 g/L, NaCl 8.0 g/L, BSA 2%, Tween-20 至 0.05%, pH 7.4), 100 μL/孔, 4 °C封闭过夜。

(3) 稀释血清: PBST 洗涤 3 次, 拍干, 加入 PBS 倍比稀释的血清, 设置 8 个稀释梯度, 100 μL/孔, 37 °C孵育 90 min。

(4) 孵育二抗: PBST 洗涤 5 次, 拍干, 加入经稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 轻链二抗, 37 °C孵育 45 min。

(5) 显色: PBST 洗涤 5 次, 拍干, 加入单组份 TMB 显色液, 100 μL/孔, 37 °C下避光显色 15 min。使用 2 mol/L 硫酸终止显色, 酶标仪读取 450 nm 下的吸光值(OD₄₅₀值)。每组实验进行 2 次重复。

(6) 数据处理: 以每个稀释度的阴性对照组 OD₄₅₀ 值的 2.1 倍作为阳性检测限, 以某一血清阳性达到的最高稀释度作为该抗体的最终效价^[18]。

1.2.10 攻毒保护实验

将小鼠分为 2 批进行滴鼻接种, 一批接种 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)病毒 4×10⁵ PFU/50 μL, 另一批接种 A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)病毒 1.5×10⁵ PFU/50 μL [疫苗株 A/Darwin/6/2021 (H3N2) 对小鼠不易感, 因此选用鼠适应株 A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)进行攻毒], 持续 14 d 监测小鼠体重、临床症状及存活情况, 对体重减轻 25%以上的小鼠进行安乐死处理。评价各组抗原对 H1N1 或 H3N2 亚型流感病毒感染提供的保护效果。

1.2.11 肺组织病毒载量测定实验

在攻毒后第 5 天, 从两批攻毒组的所有免疫组中随机取 3 只, 采集等克重同肺叶的肺组织, 在含 1 mL 无菌 PBS 的研磨管研磨, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清分装, -80°C 保存备用。空斑实验检测肺脏组织研磨上清中 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) 或 A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) 病毒滴度, 方法同 1.2.5, 评价各组疫苗在 H1N1 或 H3N2 亚型流感病毒感染后小鼠肺组织病毒滴度的影响。

1.2.12 数据处理

所有数据均以至少 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间的比较采用 *t*-test 检验 (unpaired, two-tailed Students' *t*-test) 分析差异显著性, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。使用 GraphPad Prism 9 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 IAV 抗原显性位点的分布情况及保守性分析

HA 头部结构域范围内的氨基酸突变是引起抗原性变化主要原因^[19], IAV 的 HA1 中鉴定出 5 个主要抗原位点^[19-21]。在 H1N1 亚型中被定义为: Sa (128–129 aa, 156–167 aa)、Sb (187–198 aa)、Ca1 (169–173 aa, 206–208 aa, 238–240 aa)、Ca2 (140–145 aa, 224–225 aa)、Cb (78–83 aa)^[22]; 在 H3N2 亚型中被定义为: A (122–129 aa, 132–138 aa, 142–146 aa)、B (155–160 aa, 186–197 aa)、C (50–54 aa, 275–278 aa)、D (201–208 aa, 217–221 aa)、E (62–65 aa, 78–83 aa, 260–267 aa)^[23] (图 1A)。

根据 HA 进化上的差异, H1N1 与 H3N2 亚型流感病毒分属两个不同的系统发育分支^[1]。然而不同亚型 HA 的整体结构保守, 采用相同的折叠方式, 氨基酸序列的一致性高达 40% 以

上, 为抗原位点的替换提供可能。将 H1N1 和 H3N2 亚型 IAV 的 HA 三维结构进行序列比对, 显性抗原表位展示在 Cartoon 结构上的对应性为: Sa、Ca2 位点对应部分 A 位点, Sa、Sb 位点对应 B 位点, Cb 位点对应部分 E 位点 (图 1B)。

进行氨基酸序列突变频率制图分析 2012–2022 年北半球 H1N1 和 H3N2 亚型流感病毒 HA1 氨基酸的突变频率, 其中 H1N1 亚型 HA1 的整体突变频率 (图 1C) 小于 H3N2 亚型 (图 1D), 为构建 HA1 抗原位点区域的选择提供参考依据, 也为下一步“Mosaic”抗原序列的设计参数提供参考。

2.2 Mosaic-HA1 的设计与构建

根据氨基酸保守性分析发现 H3N2 亚型 IAV 中 A、B 位点的氨基酸突变频率高, 且涵盖 RBS, 具有抗体结合优势和亚型特征, 是替换的首要位点。H3N2 亚型的抗原位点占据的范围比 H1N1 亚型广, 在维持蛋白结构的基础上保留更多位点上展示的抗原表位, 以 H3N2 亚型 IAV 的 HA1 为骨架在抗原位点进行嵌合取代, 来加强 H1N1 亚型抗原位点的比重, 期望诱导产生更多靶向 H1N1 的抗体。Mosaic-HA1 的氨基酸序列 (图 2A) 及构建策略 (图 2B), 采用逐级取代的方式将 A/Wisconsin/588/2019 的 Sa、Sb、Ca2、Cb 位点替换为 A/Darwin/6/2021 上的 B、A、E 位点, 得到目的 Mosaic1、Mosaic2、Mosaic3。

通过构建基于 HA1 氨基酸序列的系统发育树, 将 H1N1、H3N2 亚型的病毒株分别用蓝色和绿色标注, 颜色的深浅代表分离年份的远近 (图 2C)。从进化树可以看出, Mosaic1 位于 H3N2 亚群的系统发育组中, Mosaic2、Mosaic3 位于 H1N1 亚群的系统发育组中。提示 Mosaic2、Mosaic3 蛋白可能更能引发针对 H1N1 亚型 IAV 的抗体保护。

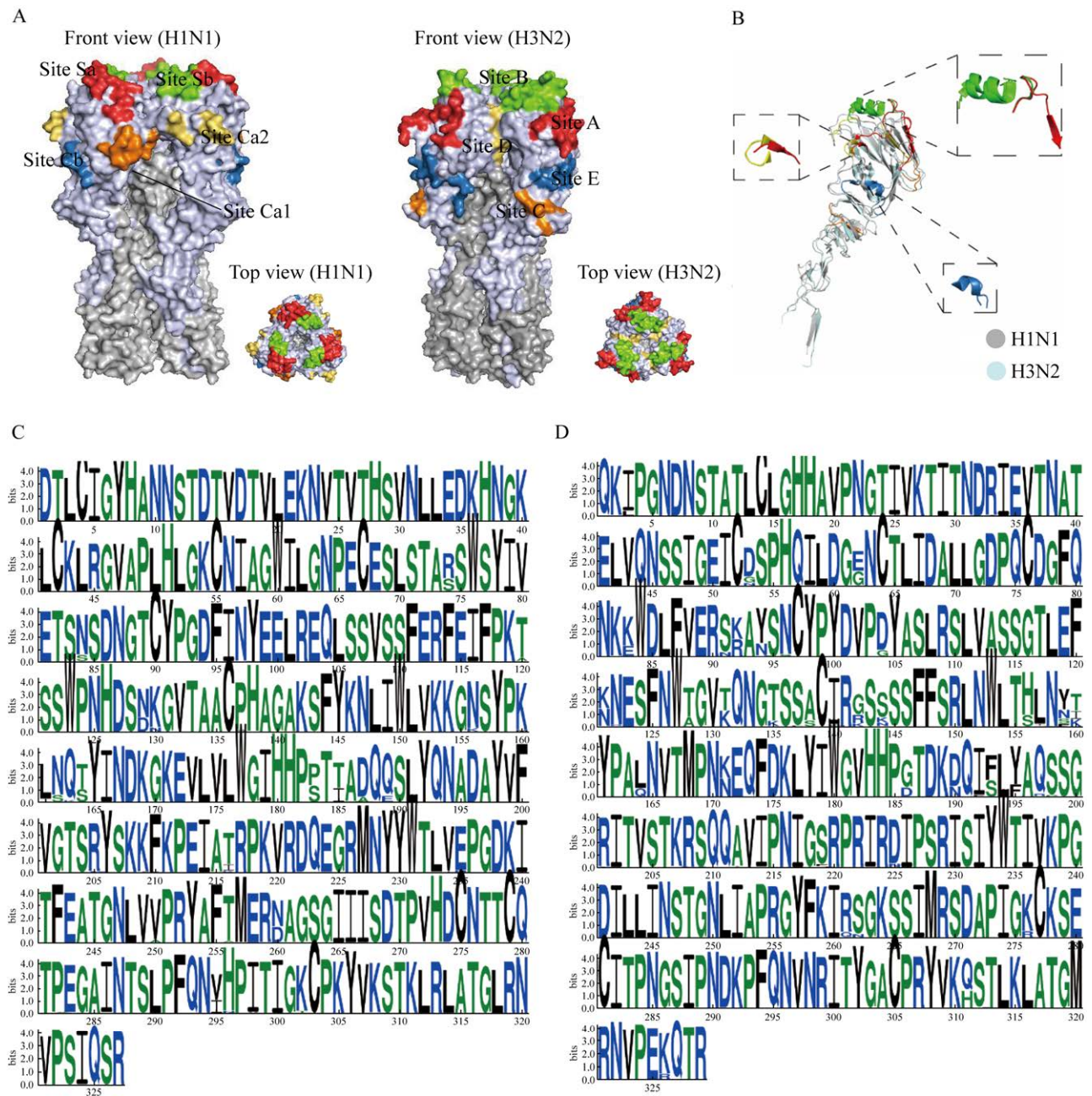


图 1 HA1 抗原显性位点及蛋白序列保守性分析

Figure 1 Major antigenic sites of HA1 and analysis of protein sequence conservation. A: The five major antigenic sites on the front and top views of influenza A H1N1 and H3N2 viruses HA (PDB ID: 1RUZ, 2YP2). B: Correspondence in major antigenic sites of influenza A H1N1 and H3N2 viruses HA1. C: Conservation analysis of the amino acid sequence of influenza A H1N1 HA1. D: Conservation analysis of amino acid sequence of influenza A H3N2 HA1. The horizontal axis represents the sequence number of the total amino acid sequence after sequence alignment, the vertical axis represents conservatism, and the horizontal bars stacked on each column represent the number of sequences with residuals at that position.

2.3 重组蛋白 Mosaic-HA1 的表达及纯化

在 Mosaic-HA1 的构建过程中, C 端连接 His 标签作为纯化标签。用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度(图 3A), 其中 M 为 Marker, Vector 代表细胞阴性对照。目标蛋白理论分子量为 37 kDa, 而表达得到的实际蛋白大小为 50–70 kDa, 推测由于 HA1 上存在固有糖基化位点, 真核表达得到的蛋白会被糖基化修饰导致分子量变大^[24]。Western blotting 检测结果表明纯化蛋白为目标蛋白(图 3B)。通过分光光度计测定 Mosaic1、Mosaic2、Mosaic3、H3、H1 的蛋白浓度分别为: 0.99、0.59、0.94、1.94、7.63 mg/mL。灰度分析表明, 5 个目的蛋白的纯度均达到 95% 以上。

2.4 体液免疫反应评估

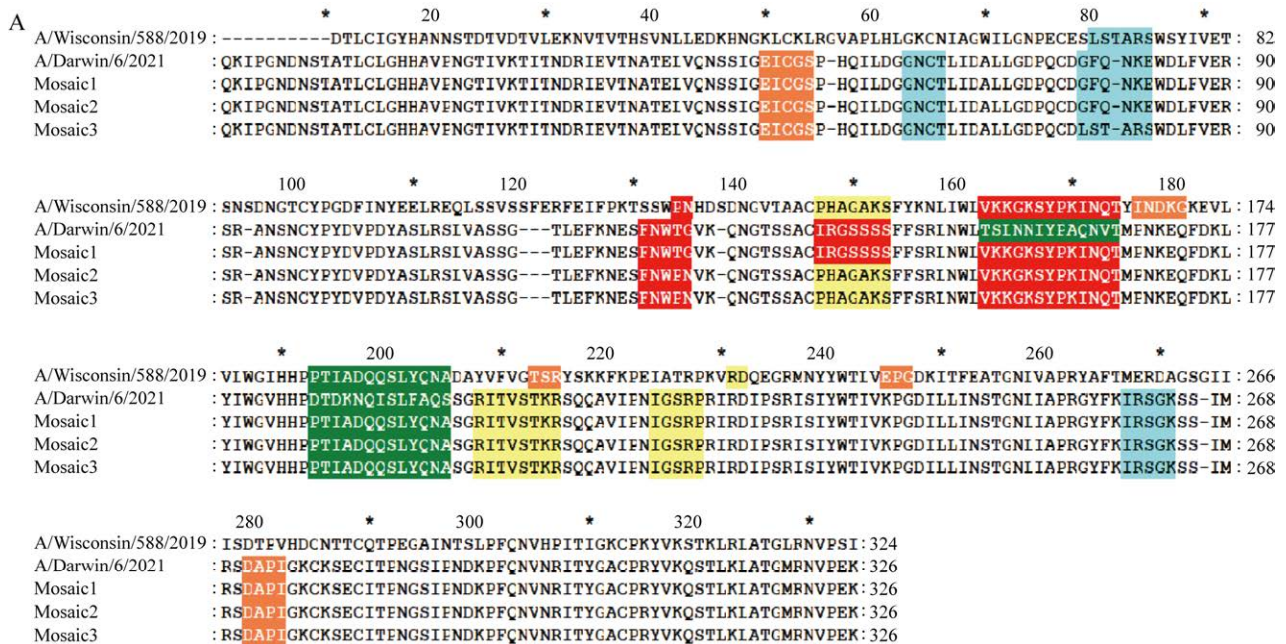
免疫程序及采血周期如图 4A 所示。采用间接 ELISA 检测血清中特异性 IgG 水平, 结果表明 3 种 Mosaic-HA1 均诱导小鼠产生结合 H1N1 和 H3N2 两种亚型 HA1 的抗体。与 H1 结合的特异性 IgG 水平最高可达 1×10^3 以上(图 4B), 与 H3 结合的特异性 IgG 水平普遍达 1×10^5 , 与对照组

相比, 二免后 3 周的中和抗体滴度有极其显著的差异($P < 0.0001$), 且在 11 周后维持在 1×10^3 (图 4C)。

2.5 攻毒保护实验

在抗体滴度检测有效的前提下, 开展攻毒保护实验(图 5A)。流感感染后小鼠均出现体重下降、被毛粗乱、畏寒等症状。在 A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) 攻毒组中, Mosaic3 组小鼠体重下降趋势较缓, 安慰剂组体重急速下降并全部达到安乐死界定标准(图 5B)。Mosaic3 免疫组无死亡现象, Mosaic1、H1+H3 免疫组均有 1 只死亡, 存活率为 2/3; Mosaic2 免疫组出现 2 只死亡, 存活率为 1/3 (图 5D)。在 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1) 攻毒组中, 无死亡情况发生。Mosaic2、Mosaic3 免疫组体重下降幅度小。Mosaic2 免疫组和 H1+H3 阳性对照组均在第 4 天体重开始回升, Mosaic3 免疫组体重下降速率缓, Mosaic1 与安慰剂组下降趋势差异不明显。安慰剂组在 7 d 内体重持续下降(图 5C)。

肺组织病毒载量测定结果表明, 在 A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) 攻毒组中, Mosaic1 免疫组



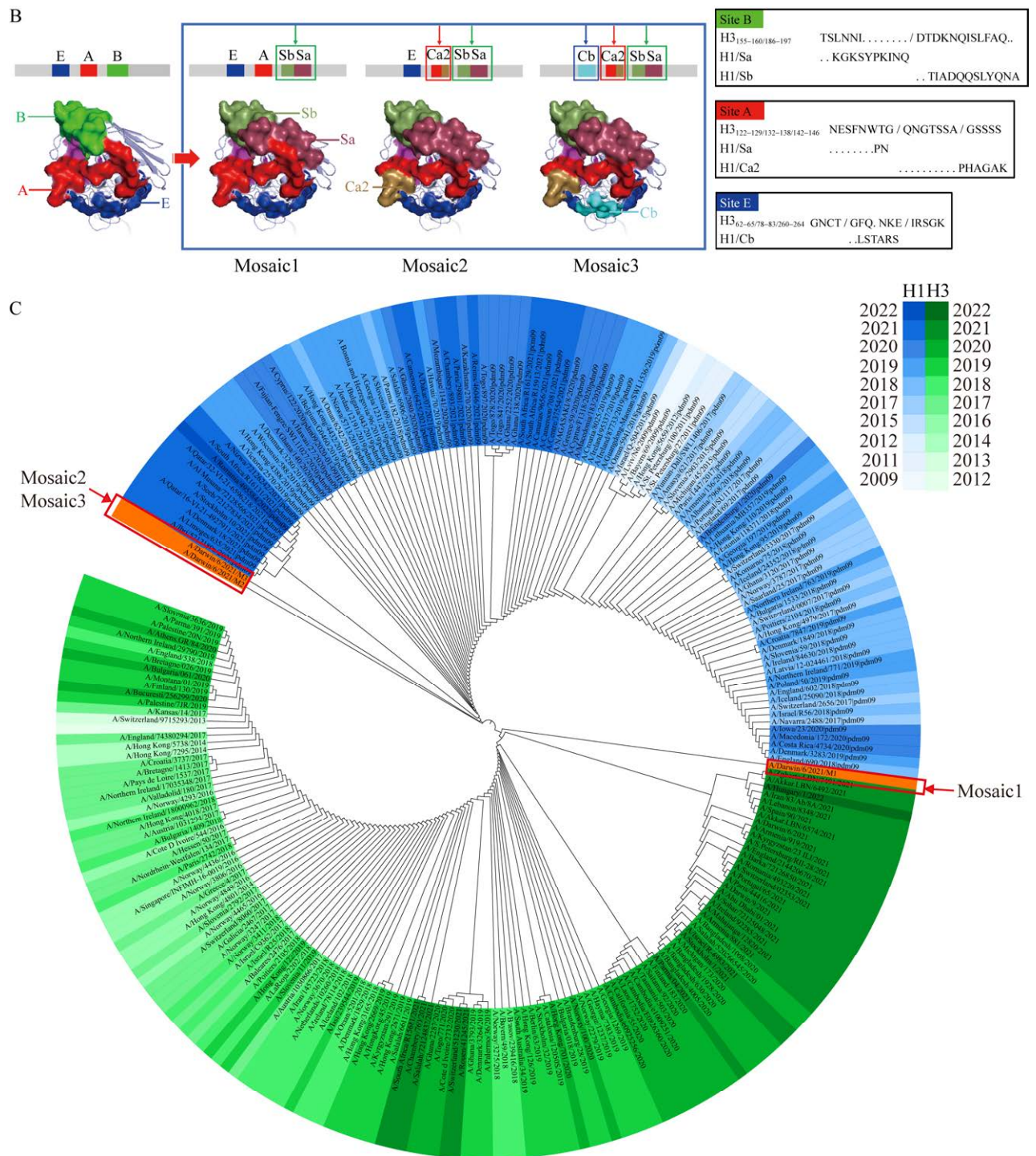


图 2 Mosaic-HA1 构建示意图及系统发育分析

Figure 2 Mosaic-HA1 construction diagram and phylogenetic analysis. A: Sequence alignment of major antigenic sites from Mosaic-HA1 and antigen design strains. Site Ca1 and site C are indicated in orange, site Cb and site E are indicated in blue, site Sa and site A are indicated in red, site Sb and site B are indicated in green, site Ca2 and site D are indicated in yellow. B: Replacement model for Mosaic-HA1. C: Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of influenza A H1N1 and H3N2 viruses and Mosaic-HA1.

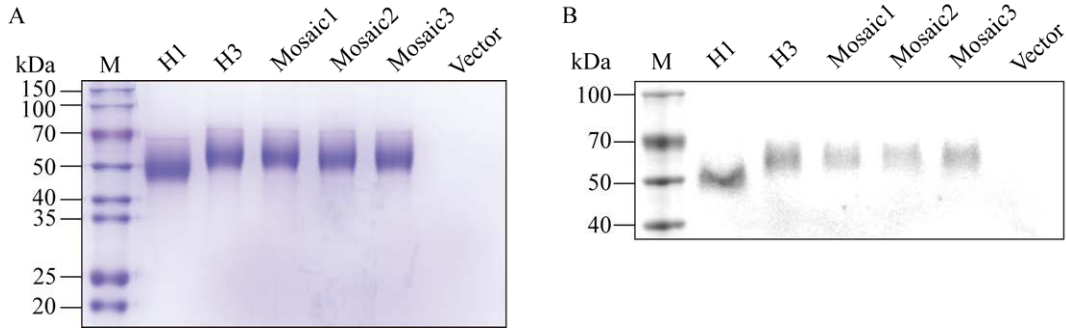


图 3 Mosaic-HA1 蛋白表达与纯化

Figure 3 Expression and purification of Mosaic-HA1 protein. A: Purification results of H1, H3, Mosaic1, Mosaic2, Mosaic3 protein and vector (negative control). M: Protein marker. B: Western blotting results of H1, H3, Mosaic1, Mosaic2, Mosaic3 protein and vector (negative control).

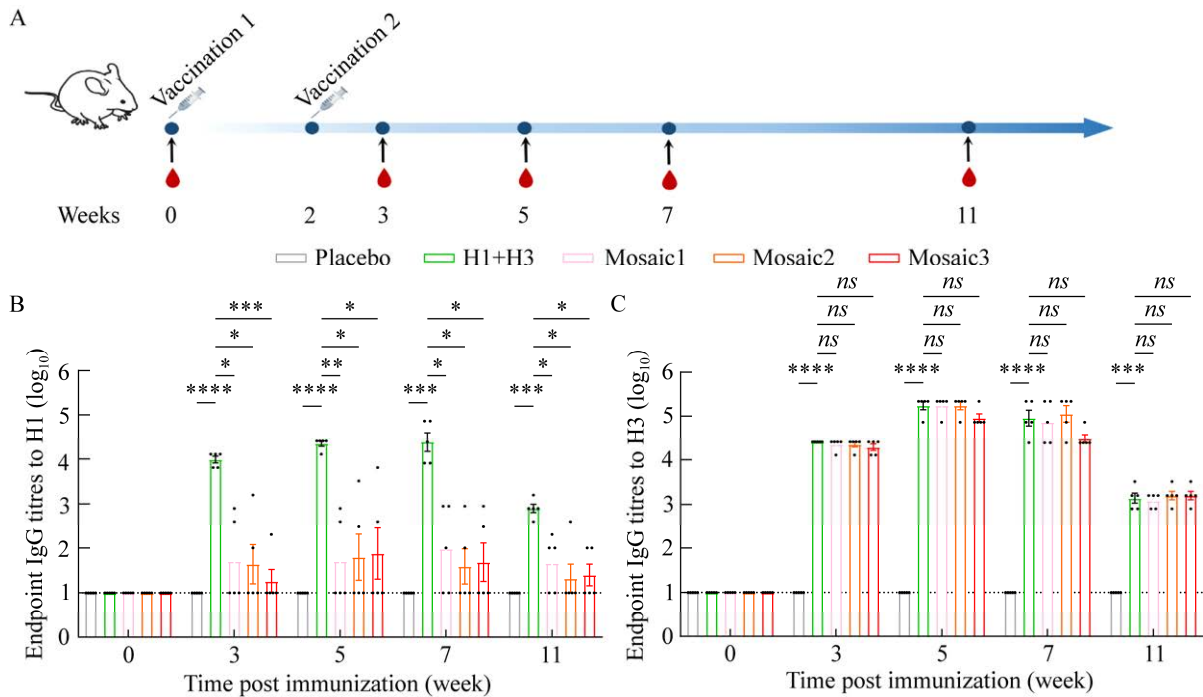


图 4 体液免疫评估结果

Figure 4 Results of humoral immune evaluation. A: Schematic diagram of immunization regime and blood collection cycle. B: ELISA continuously assesses sera H1-specific IgG levels of mice in different immune groups ($n=5$). C: ELISA continuously assays sera H3-specific IgG levels of mice in different immune groups ($n=5$). All values shown in the figure are $\bar{x} \pm s$, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$, *** represents $P<0.001$, **** represents $P<0.0001$, ns represents no significant difference.

与安慰剂组相比有极显著差异($P<0.0001$), Mosaic2 免疫组、阳性对照组与安慰剂组有显著性差异($P<0.001$)。在 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)

攻毒组中, 阳性对照组保护小鼠免受携带 H1 蛋白的同源病毒侵染, 与安慰剂组相比有极显著差异($P<0.0001$)。因为检测对象为部分肺组

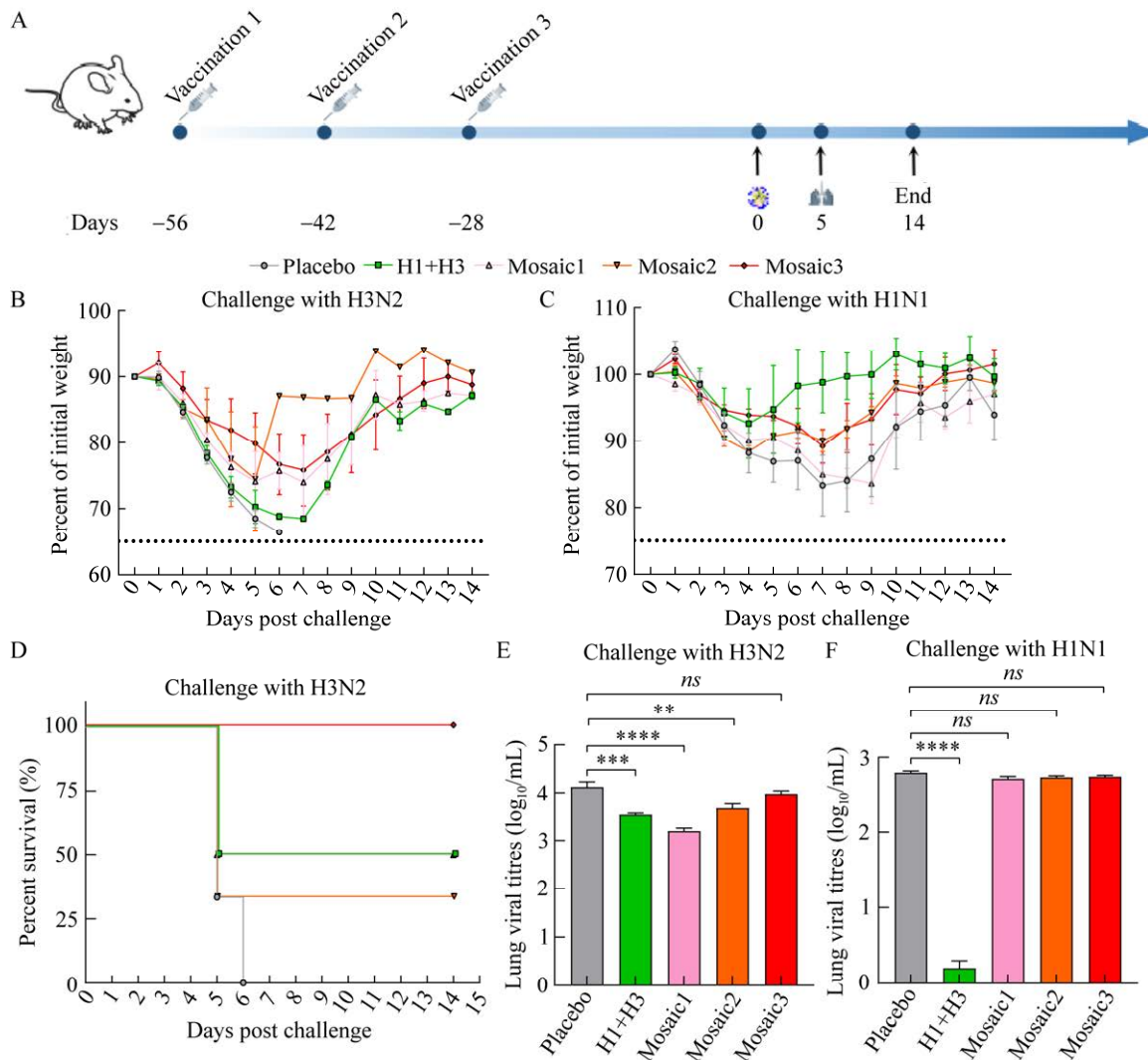


图5 BALB/c小鼠攻毒保护实验结果

Figure 5 Results of virus challenge studies in mice. A: Schematic diagram of immunization regime, attack and collection of lung samples. After three immunizations, mice were challenged intranasally with H1N1 or H3N2 viruses. Weight was monitored daily for a period of 14 days, and animals that lost 25% or more of their initial body weight were scored dead and humanely euthanized. And lung samples were collected on the 5th day after mice challenged. B, C: Weight curves of mice challenged with the indicated viruses ($n=3$). D: Survival curve of H3N2 attack group ($n=3$). E, F: Determination of viral load in lung tissue of the indicated viruses ($n=3$). All values shown in the figure are $\bar{x} \pm s$, * represents $P < 0.05$, ** represents $P < 0.01$, *** represents $P < 0.001$, **** represents $P < 0.0001$, *ns* represents no significant difference.

织, 组织区域的不同会导致病毒的感染数量有差异, 可能造成实验结果有偏差。

3 讨论与结论

目前的季节性流感疫苗旨在针对两种流行

的IAV亚型(H1N1和H3N2)和一种或两种流行的IBV提供毒株特异性保护, H1N1和H3N2亚型流感病毒会以更快的突变频率逃逸原有免疫保护, 导致每年季节性流感小范围暴发, 甚至有大量流行的隐患^[25], 流感疫苗根据病毒的流行情

况进行重新配置,疾控中心(central for disease, CDC)的统计数据显示,当疫苗株与流行株匹配时,疫苗的保护率最高仅为 60%,不匹配时保护率仅 19%–29%^[26]。因此研发能提供长期保护效果的新型流感疫苗十分重要。本研究通过设计含两种亚型抗原位点的 Mosaic-HA1 抗原并表达纯化,以 BALB/c 小鼠为模型进行免疫后,血清中检测到与两种亚型结合的特异性 IgG,攻毒保护实验结果显示其能对小鼠提供保护。

为寻找具有引发广泛交叉免疫保护效果的抗原,流感疫苗选择更保守的抗原进行开发,如 HA 茎部蛋白^[27-28]、NA 蛋白^[29]、Me 蛋白等^[30]。靶向 HA 茎部的广泛中和抗体无法提供持续的保护;HA 在流感病毒表面 NA 的数量仅为 HA 的 10%–20%,抗原性差,在自然感染情况下无法立即发挥免疫保护效果,因此 HA1 仍是关键免疫靶标^[17]。HA1 作为靶点进行疫苗的制作和研究早已熟练运作^[31-32],Xuan 等^[33]认为基于 HA 球状头部结构的合理设计可用于针对流感病毒的亚型特异性疫苗^[31],那么结合嵌合策略通过沉默显性抗原位点以此来表征 HA1 上更多保守性的抗原位点^[34-36],Broecker 等^[37]的研究中将 H3N2 亚型流感病毒 HA1 作为骨架,在抗原表位嵌合相应的外来禽类血凝素序列进行沉默,诱导广泛的免疫应答。Sun 等^[35]运用“mosaic”替换策略进行 IBV 疫苗的制作,小鼠模型表现出对 IBV 广泛的交叉保护^[34]。本研究以 HA1 上主要抗原位点为构建对象,基于 2012–2022 年北半球 HA1 氨基酸序列的突变频率分析,H3N2 亚型的总体进化速率快于 H1N1 亚型,尤其在 H3N2 亚型 A、B 位点的频繁取代,Koel 等^[38]表明负责抗原突变的主要抗原位点为 A、B 位点与毒株抗原性密切相关。另外在 Ca2、Cb 位点可取代的 H3N2 亚型抗原范围窄,单独取代难以凸显 H1N1 亚型抗原性。因此根据在位置和结构上有对应性的位点,以“mosaic”替换策略,选取 Sb、Sa 位点,Ca2 位点,

Cb 位点的位点范围内的氨基酸序列逐级叠加代替 B 位点,A 位点,E 位点,突出 H1N1 亚型 HA1 优势免疫位点的同时扩大 H1N1 亚型抗原位点的广度,期待诱导更多 H1N1 亚型的相关抗体。

当前 2 种取代鸡胚的疫苗生产方式已投入使用^[39]。在美国,以重组流感疫苗和基于细胞培养的灭活流感疫苗(cell-culture based inactivated influenza vaccine, CCIIV)为首^[15]。Flucelvax Quadrivalent 是美国唯一的 CCIIV,另外还有在昆虫细胞中转导重组杆状病毒来过表达 HA 蛋白生产重组流感疫苗(recombinant influenza vaccine, RIVs)^[40]。这些流感疫苗的生产平台不依赖鸡胚进行生产,避免了鸡胚的适应性突变,但仍需要进行病毒的生产,存在一定安全隐患。减毒灭活疫苗(live attenuated influenza vaccine, LAIV)以鼻内给药的方式更好刺激黏膜免疫,被 WHO 批准应用于生产^[41-42],但是在接种年龄上受限,在不同年龄阶段展现出来的保护效果相差极大。随着 COVID-19 的暴发,mRNA (nucleoside-modified messenger RNA)疫苗投入应用,Arevalo 等^[43]开发了一种 mRNA-脂质纳米颗粒流感疫苗,编码 20 种已知 IAV 和 IBV 谱系的 HA 抗原,并在小鼠和雪貂中引发了高水平的交叉反应性。但 Mulrone 等^[44]的研究表明 mRNA N1-甲基假尿苷修饰会引发核糖体移码,提示基于 mRNA 平台进行疫苗的制作可能有潜在的脱靶效应。以细胞平台进行重组流感疫苗的生产安全而成熟^[45],是一种快速的疫苗生产平台。本研究中嵌合蛋白 Mosaic-HA1 使用 293F 真核表达系统表达,使蛋白翻译后的折叠、修饰更准确^[46],且生产周期短。

免疫小鼠血清用间接 ELISA 法,终点滴度定义为吸光度高于背景的 2.1 倍时最大血清稀释度的倒数作检测限,Sun 等^[18]的研究中使用了同样的评定方法。虽然血清中检测出针对 H1 抗原的特异性 IgG 抗体,但抗体水平低,推测

是因为替换序列所占比重小, 激发的体液免疫有限, 其中 Mosaic1、Mosaic2、Mosaic3 中替换序列分别占原始序列的 7.4%、10%、11.7%, 同时糖基化会影响 B 细胞对抗原表面的识别, Cherry 等^[47]证实了 N-糖基化位点对 HA 抗原特性的影响, Wu 等^[48]总结了聚糖屏蔽对受体识别的干扰, H3N2 亚型 HA1 上的固有糖基位点多于 H1N1 亚型^[24], 推测受到抗原表面糖基化的影响, 造成抗原表位受到一定的屏蔽作用^[33]。攻毒实验表明 Mosaic2 的综合保护效果最佳, 由于 H3N2 攻毒组使用的病毒株为小鼠适应株(属 Clade3c.2a4)非抗原设计株(属 Clade2a), H3N2 亚型不同分支上的交叉免疫保护效果差, 因此导致免疫组高达 2/3 的死亡。后期会使用人源流感病毒易感小鼠进行优化实验。

本研究对设计、纯化的 Mosaic-HA1 进行初步抗原性评价, 利用抗体滴度检测 3 种 Mosaic-HA1 均有激发结合两种亚型毒株 HA1 的特异性 IgG 抗体产生, 在病毒的感染条件下提供免疫保护。后期实验期望获取不同 Clade 分支的 IAV 进行微量中和实验、进行 HI 实验, 并多次重复感染实验, 增加感染小鼠只数确保结果的可靠性, 取全肺进行病毒载量测定以及肺组织切片 HE 染色观察病变情况, 完善免疫评估。此外, 还可通过更换免疫佐剂^[49-50], 如 MF59、AF03、AS03 等, 来更有效地激发免疫系统^[51]。本研究通过“mosaic”的疫苗策略, 对抗原位点进行合理替换, 为双价甲型流感疫苗的开发进行初步探索, 是一种简化疫苗生产、提高疫苗开发效率的方法, 为开展下一代具有广泛保护性或具有通用性的流感病毒疫苗的生产提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] KRAMMER F, SMITH GJD, FOUCHIER RAM, PEIRIS M, KEDZIERSKA K, DOHERTY PC, PALESE P, SHAW ML, TREANOR J, WEBSTER RG, GARCÍA-SASTRE A. Influenza[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4(1): 3.
- [2] UYEKI TM, HUI DS, ZAMBON M, WENTWORTH DE, MONTO AS. Influenza[J]. The Lancet, 2022, 400(10353): 693-706.
- [3] DUNNING J, THWAITES RS, OPENSHAW PJM. Seasonal and pandemic influenza: 100 years of progress, still much to learn[J]. Mucosal Immunology, 2020, 13(4): 566-573.
- [4] YAMAYOSHI S, KAWAOKA Y. Current and future influenza vaccines[J]. Nature Medicine, 2019, 25(2): 212-220.
- [5] COX RJ. Correlates of protection to influenza virus, where do we go from here?[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2013, 9(2): 405-408.
- [6] MORENS DM, TAUBENBERGER JK, FAUCI AS. Rethinking next-generation vaccines for coronaviruses, influenza viruses, and other respiratory viruses[J]. Cell Host & Microbe, 2023, 31(1): 146-157.
- [7] HOUSER K, SUBBARAO K. Influenza vaccines: challenges and solutions[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(3): 295-300.
- [8] LAMBERT LC, FAUCI AS. Influenza vaccines for the future[J]. New England Journal of Medicine, 2010, 363(21): 2036-2044.
- [9] CHEN YQ, WOHLBOLD TJ, ZHENG NY, HUANG M, HUANG YP, NEU KE, LEE J, WAN HQ, ROJAS KT, KIRKPATRICK E, HENRY C, PALM AK, STAMPER CT, LAN LYL, TOPHAM DJ, TREANOR J, WRAMMERT J, AHMED R, EICHELBERGER MC, GEORGIOU G, et al. Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies[J]. Cell, 2018, 173(2): 417-429.e10.
- [10] ZOST SJ, PARKHOUSE K, GUMINA ME, KIM K, PEREZ SD, WILSON PC, TREANOR JJ, SANT AJ, COBEY S, HENSLEY SE. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(47): 12578-12583.
- [11] WU NC, ZOST SJ, THOMPSON AJ, OYEN D, NYCHOLAT CM, MCBRIDE R, PAULSON JC, HENSLEY SE, WILSON IA. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(10): e1006682.
- [12] De VRIES RD, NIEUWKOOP NJ, PRONK M, BRUIN ED, ROELS GL, HUIJSKENS EGW, VAN BINNENDIJK RS, KRAMMER F, KOOPMANS MPG, RIMMELZWAAN GF. Influenza virus-specific antibody dependent cellular cytotoxicity induced by vaccination or natural infection[J]. Vaccine, 2017, 35(2): 238-247.
- [13] PICA N, HAI R, KRAMMER F, WANG TT, MAAMARY J, EGGINK D, TAN GS, KRAUSE JC,

- MORAN T, STEIN CR, BANACH D, WRAMMERT J, BELSHE RB, SASTRE AG, PALESE P. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(7): 2573-2578.
- [14] RUSSELL CJ, HU M, OKDA FA. Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(10): 841-853.
- [15] HEGDE NR. Cell culture-based influenza vaccines: a necessary and indispensable investment for the future[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2015, 11(5): 1223-1234.
- [16] DREYFUS C, LAURSEN NS, KWAKS T, ZUIJDEEST D, KHAYAT R, EKIERT DC, LEE JH, METLAGEL Z, BUJNY MV, JONGENELEN M, VLUGT RVD, LAMRANI M, KORSE HJWM, GEELLEN E, SAHIN O, SIEUWERTS M, BRAKENHOFF JPI, VOGELS R, LI OTW, POON LLM, et al. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses[J]. *Science*, 2012, 337(6100): 1343-1348.
- [17] CHEN JR, MA C, WONG CH. Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(9): 426-434.
- [18] SUN S, CAI Y, SONG TZ, PU Y, CHENG L, XU H, SUN J, MENG C, LIN Y, HUANG H, ZHAO F, ZHANG S, GAO Y, HAN J, FENG X, YU DD, ZHU Y, GAO P, TANG H, ZHAO J, et al. Interferon-armed RBD dimer enhances the immunogenicity of RBD for sterilizing immunity against SARS-CoV-2[J]. *Cell Research*, 2021, 31(9): 1011-1023.
- [19] SRIWILAIJAROEN N, SUZUKI Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus[J]. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 2012, 88(6): 226-249.
- [20] WU NC, WILSON IA. A perspective on the structural and functional constraints for immune evasion: insights from influenza virus[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(17): 2694-2709.
- [21] HAN T, MARASCO W A. Structural basis of influenza virus neutralization[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1217: 178-190.
- [22] CATON AJ, BROWNLEE GG, YEWEDELL JW, GERHARD W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype)[J]. *Cell*, 1982, 31(2): 417-427.
- [23] ZUO T, SUN J, WANG G, JIANG L, ZUO Y, LI D, SHI X, LIU X, FAN S, REN H, HU H, SUN L, ZHOU B, LIANG M, ZHOU P, WANG X, ZHANG L. Comprehensive analysis of antibody recognition in convalescent humans from highly pathogenic avian influenza H5N1 infection[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8855.
- [24] XU R, EKIERT DC, KRAUSE JC, HAI R, CROWE JE, WILSON IA. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus[J]. *Science*, 2010, 328(5976): 357-360.
- [25] TAUBENBERGER JK, KASH JC. Influenza Virus evolution, host adaptation, and pandemic formation[J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 7(6): 440-451.
- [26] Centers for Disease Control and Prevention. CDC Seasonal Flu Vaccine Effectiveness Studies[R]. CDC 24/7: Saving Lives, <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectiveness-studies.htm>.
- [27] HAI R, KRAMMER F, TAN GS, PLCA N, EGGINK D, MAAMARY J, MARGINE I, ALBRECHT RA, PALESE P. Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(10): 5774-5781.
- [28] YASSINE HM, BOYINGTON JC, MCTAMNEY PM, WEI C, KANEKIYO M, KONG W, GALLAGHER JR, WANG L, ZHANG Y, JOYCE MG, LINGWOOD D, MOIN SM, ANDERSEN H, OKUNO Y, RAO SS, HARRIS AK, KWONG PD, MASCOLA JR, NABEL GJ, GRAHAM BS. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(9): 1065-1070.
- [29] WALZ L, KAYS S-K, ZIMMER G, MESSLING VV. Neuraminidase-inhibiting antibody titers correlate with protection from heterologous influenza virus strains of the same neuraminidase subtype[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(17): e01006-18.
- [30] KIM Y-J, LEE Y-T, KIM M-C, KO E-J, SONG JM, KANG SM. Cross-protective efficacy of influenza virus M2e containing virus-like particles is superior to hemagglutinin vaccines and variable depending on the genetic backgrounds of mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1730.
- [31] WOHLBOLD TJ, NACHBAGAUER R, MARGINE I, TAN GS, HIRSH A, KRAMMER F. Vaccination with soluble headless hemagglutinin protects mice from challenge with divergent influenza viruses[J]. *Vaccine*, 2015, 33(29): 3314-3321.
- [32] WANG TT, TAN GS, HAI R, TAN GS, HIRSH A, KRAMMER F. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(44): 18979-18984.
- [33] XUAN C, SHI Y, QI J, ZHANG W, XIAO H, GAO GF. Structural vaccinology: structure-based design of influenza A virus hemagglutinin subtype-specific subunit

- vaccines[J]. *Protein & Cell*, 2011, 2(12): 997-1005.
- [34] CORDER BN, BULLARD BL, DEBEAUCHAMP JL, ILYUSHINA NA, WEBBY RJ, WEAVER EA. Influenza H1 mosaic hemagglutinin vaccine induces broad immunity and protection in mice[J]. *Vaccines*, 2019, 7(4): E195.
- [35] SUN W, KIRKPATRICK E, ERMILER M, NACHBAGAUER R, BROECKER F, KRAMMER F, PALESE P. Development of influenza B universal vaccine candidates using the “Mosaic” hemagglutinin approach[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(12): e00333-19.
- [36] GILES BM, ROSS TM. A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets[J]. *Vaccine*, 2011, 29(16): 3043-3054.
- [37] BROECKER F, LIU STH, SUNTRONWONG N, SUN W, BAILEY MJ, NACHBAGAUER R, KRAMMER F, PALESE P. A mosaic hemagglutinin-based influenza virus vaccine candidate protects mice from challenge with divergent H3N2 strains[J]. *npj Vaccines*, 2019, 4(1): 31.
- [38] KOEL BF, BURKE DF, BESTEBROER TM, VLIET SVD, ZONDAG GCM, VERVAET G, SKEPNER E, LEWISNS, SPRONKEN MIJ, RUSSELL CA, EROPKIN MY, HURT AC, BARR IG, JONG JCD, RIMMELZWAAN GF, OSTERHAUS ADME, FOUCHIER RAM, SMITH DJ. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution[J]. *Science*, 2013, 342(6161): 976-979.
- [39] DAWOOD FS, NALEWAY AL, FLANNERY B, LEVINE MZ, MURTHY K, SAMBHARA S, GANGAPPA S, EDWARDS L, BALL S, GRANT L, BELONGIA E, BOUNS K, CAO W, GROSS FL, GROOM H, FRY AM, HUNT DR, JEDDY Z, MISHINA M, KIM SS, et al. Comparison of the immunogenicity of cell culture-based and recombinant quadrivalent influenza vaccines to conventional egg-based quadrivalent influenza vaccines among healthcare personnel aged 18–64 years: a randomized open-label trial[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, 73(11): 1973-1981.
- [40] MATHEW NR, ANGELETTI D. Recombinant influenza vaccines: saviors to overcome immunodominance[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 10: 2997.
- [41] ZHENG M, WANG P, SONG W, LAU S, LIU S, HUANG X, MOK BW, LIU Y, CHEN Y, YUE K, CHEN H. An A14U Substitution in the 3' noncoding region of the M segment of viral RNA supports replication of influenza virus with an NS1 deletion by modulating alternative splicing of M segment mRNAs[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(20): 10273-10285.
- [42] ZHANG J, NIAN X, LI X, HUANG S, DUAN K, LI X, YANG X. The epidemiology of influenza and the associated vaccines development in China: a review[J]. *Vaccines*, 2022, 10(11): 1873.
- [43] AREVALO CP, BOLTON MJ, Le SAGE V, YE N, FUREY C, MURAMATSU H, ALAMEH M, PARDI N, DRAPEAU EM, PARKHOUSE K, GARRETSON T, MORRIS JS, MONCLA LH, TAM YK, FAN SHY, LAKDAWALA SS, WEISSMAN D, HENSLEY SE. A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 899-904.
- [44] MULRONEY TE, PÖYRY T, YAM-PUC JC, RUST M, HARVEY RF, KALMAR L, HORNER E, BOOTH L, FERREIRA AP, STONELEY M, SAWARKAR R, MENTZER AJ, LILLEY KS, SMALES M, HAAR TVD, TURTLE L, DUNACHLE S, KLENERMAN P, THAVENTHIRAN JED, WILLIS AE. N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting[J]. *Nature*, 2023.
- [45] CARASCAL MB, PAVON RDN, RIVERA WL. Recent progress in recombinant influenza vaccine development toward heterosubtypic immune response[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 878943.
- [46] NIGI I, FAIRALL L, SCHWABE JWR. Expression and purification of protein complexes suitable for structural studies using mammalian HEK 293F cells[J]. *Current Protocols in Protein Science*, 2017, 90(1).
- [47] CHERRY JL, LIPMAN DJ, NIKOLSKAYA A, WOLF Y. Evolutionary dynamics of N-glycosylation sites of influenza virus hemagglutinin[J]. *PLoS Currents*, 2009, 1: RRN1001.
- [48] WU NC, WILSON IA. Influenza hemagglutinin structures and antibody recognition[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2020, 10(8): a038778.
- [49] MCELHANEY JE, BERAN J, DEVASTER J-M, ESEN M, LAUNAY O, LEROUX-ROELS G, RUIZ-PALACIO GM, ESSEN AV, CAPLANUSI A, CLAEYS C, DURAND C, DUVAL X, ELLDRISSI M, FALSEYT AR, FELDMANT G, FREY SE, GALTIER F, HWANG S, INNIS BL, KOVACT M, et al. AS03-adjuvanted versus non-adjuvanted inactivated trivalent influenza vaccine against seasonal influenza in elderly people: a phase 3 randomised trial[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2013, 13(6): 485-496.
- [50] Del GIUDICE G, RAPPUOLI R. Inactivated and adjuvanted influenza vaccines[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2015, 386: 151-180.
- [51] LESLIE M. Solution to vaccine mystery starts to crystallize[J]. *Science*, 2013, 341(6141): 26-27.

(本文责编 郝丽芳)