DOI:10.16016/j.2097-0927.202312014

通用流感 mRNA 候选疫苗的构建及免疫效果评价

田昱莹[1,2],邓卓雅[2],李 聪[1,2],孙 芳[2],曹 蕊[1,2],杨鹏辉[1,2] 010110 呼和浩特,内蒙古医科大学基础医学院[1];100853 北京,中国人民解放军总医院第一医学中心肝胆胰外科医学部研究所[2]

［**摘要**］ **目的** 构建通用流感 mRNA 疫苗并全面评价其免疫保护效果。**方法** 优化流感病毒株 A/California/04/2009 的血凝素(hemagglutinin ,HA)、核蛋白(nucleoprotein ,NP)和基质蛋白 2 胞外区(matrix protein 2 ectodomain, M2e)抗原序列,并将 HA、NP 和 3 个串联的 M2e(3M2e)分别克隆至 pcDNA3.1 载体,通过线性化、体外转录、酶学法加帽、酶促加尾合成 mRNA,命名为 mRNA-HA、mRNA-NP 和 mRNA-3M2e。3 种 mRNA 分别转染 293T 细胞后,通过免疫荧光实验鉴定蛋白的表达。利用脂质纳米颗粒分别包裹 mRNA-HA、mRNA-NP 和 mRNA-3M2e 并测量其粒径和电位。再将 3 种 mRNA 等体积混合制备成 Comb-mRNA 疫苗。将 28 只 6 周雌性 Balb/c 小鼠(体质量为 18~22 g)按简单随机分组法分为 2 组:LNP 组(n = 14)和 Comb-mRNA 组(n = 14)。通过血凝抑制(hemagglutination inhibition, HI)、微量中和(microneutralization,MN)实验评价流感 mRNA 疫苗诱导小鼠产生的血清抗体滴度;通过流式细胞术评价 Comb-mRNA 疫苗诱导的细胞免疫反应。采用 $5LD_{50}$ 野生型 H1N1 流感病毒株感染小鼠评价 Comb-mRNA 疫苗的免疫保护效果。**结果** 成功构建 mRNA-HA、mRNA-NP 和 mRNA-3M2e,且 3 种 mRNA 均能在 293T 细胞表达。脂质纳米颗粒包裹 mRNA 平均粒径为(119.53±6.5)nm,平均电位为(-8.23±1.3)mV。与 LNP 组比较,Comb-mRNA 组疫苗的 HI 几何平均滴度(geometric mean titer, GMT)达 179.6,MN 的 GMT 达 201.6,同时诱导 $IFN\gamma^+CD4^+/CD8^+$T 细胞比例升高。Comb-mRNA 组在加强免疫后 2 周能够提供对 $5LD_{50}$ 野生流感 H1N1 亚型病毒的保护。**结论** 通用流感疫苗候选疫苗 Comb-mRNA 能够诱导小鼠免疫反应并保护小鼠免受病毒感染。

［**关键词**］ mRNA 疫苗;流感疫苗;血凝素;核蛋白;基质蛋白 2 胞外区
［**中图法分类号**］ R392.2; R392.7; R511.7 ［**文献标志码**］ A

Construction and evaluation of a universal influenza mRNA vaccine

TIAN Yuying[1,2], DENG Zhuoya[2], LI Cong[1,2], SUN Fang[2], CAO Rui[1,2], YANG Penghui[1,2] [1]College of Basic Medical Science, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region, 010110, [2]Institute of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery, The First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China

［**Abstract**］ **Objective** To construct a universal influenza mRNA vaccine and evaluate its immunogenicity. **Methods** The antigen sequence of hemagglutinin (HA), nucleoprotein (NP) and matrix protein 2 ectodomain (M2e) in influenza A/California/04/2009 was optimized. HA, NP and 3 tandem M2e (3M2e) were cloned into pcDNA3.1 vector, respectively. Then the mRNAs were synthesized by linearization, *in vitro* transcription, enzymatic capping and enzymatic tailing, and named as mRNA-HA, mRNA-NP and mRNA-3M2e, respectively. The protein expression of the 3 kinds of mRNAs in 293T cells was detected by immunofluorescence assay. Comb-mRNA vaccine was prepared by enveloped mRNA-HA, mRNA-NP and mRNA-3M2e with lipid nanoparticles, respectively, and the particle size and potential were identified. Twenty-eight 6-week-old female BALB/c mice (18~22 g) were randomly divided into LNP group (n=14) and Comb-mRNA group (n=14). Hemagglutination inhibition (HI) method and microneutralization (MN) test were used to evaluate the serum antibody titer induced by Comb-mRNA vaccines. The mice were

［**通信作者**］ 杨鹏辉,E-mail: ypenghuiamms@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

infected by $5LD_{50}$ wild-type H1N1 influenza virus to evaluate the protective efficacy. **Results** The mRNA-HA, mRNA-NP and mRNA-3M2e were successfully constructed, and the 3 mRNAs could be expressed in 293T cells. The average size of mRNA encapsulated by lipid nanoparticles was 119.53±6.5 nm, and the average potential was −8.23±1.3 mV. The geometric mean titer (GMT) of HI and MN in the Comb-mRNA group were 179.6 and 201.6, compared with the LNP group. The ratio of IFN-$\gamma^+CD4^+/CD8^+$T cells was increased. The Comb-mRNA group could provide protection against $5LD_{50}$ wild type influenza H1N1 virus after 2 weeks of booster immunization. **Conclusion** Comb-mRNA, an influenza vaccine candidate, can induce immune responses and protect mice from influenza virus challenge.

[**Key words**] mRNA vaccine; influenza vaccine; hemagglutinin; nucleoprotein; matrix protein 2 ectodomain

Corresponding author: YANG Penghui, E-mail: ypenghuiamms@hotmail.com

历史上的几次流感大流行给人类健康和生命财产安全造成了严重危害,累计数亿人感染和数千万人死亡[1]。接种疫苗仍然是预防和控制流感最有效的措施。世界卫生组织(World Health Organization,WHO)与全球多家机构合作,检测世界各地流感的活动情况,每半年根据南北半球流感病毒流行情况更新流感病毒疫苗组分。据美国疾病控制中心(Center for Disease Control, CDC)统计,2004-2019 年,流感疫苗的保护效力在10%~60%[2]。流感疫苗保护效力低下可能的原因有以下 2 个方面:①流感病毒血凝素(hemagglutinin,HA)是诱导流感病毒特异性保护抗体的关键抗原,也是疫苗设计的关键靶点。HA 空间结构可分为头部和茎部两部分,当前季节性流感疫苗目的在于引起 HA 头部特异性中和抗体反应[3]。然而,HA 头部结构域易突变导致抗原漂移[4],导致季节性流感疫苗预防新突发流感病毒的作用有限[5]。②目前获批的流感疫苗大多数是以鸡胚为介质生产的,极易诱发病毒的适应性突变,降低疫苗的有效性[6-7]。因此,研制具有持久免疫效应和广泛交叉免疫反应的通用流感疫苗是亟待解决的科学问题。目前有多种新型流感疫苗处于临床前或临床试验阶段,如病毒载体疫苗、纳米颗粒疫苗和核酸疫苗等,其中 mRNA 疫苗因具有安全性高、研发周期短和生产成本低等优势备受青睐。

mRNA 疫苗是指将编码一种或多种抗原的 mRNA 递送到细胞中,在细胞质内直接翻译产生相应的抗原,诱导机体产生特异性免疫应答。mRNA 疫苗经历长达 30 年的发展历程,与灭活疫苗相比,mRNA 疫苗可以通过无细胞的生产方式进行,生产进程更快[8]。研究表明,相比病毒载体疫苗或 DNA 疫苗,mRNA 疫苗不会整合到宿主的基因组中[9]。从原理上来讲,mRNA 疫苗可以在体内快速表达所编码的抗原,迅速引起机体的免疫应答。但单链 mRNA 不稳定、体内递送效率低下等因素限制着 mRNA 疫苗的研究进展。但通过优化 mRNA 序列、开发更加有效的递送载体、控制外源 mRNA 的炎症反应等方法,mRNA 疫苗的翻译和递送效率稳定提升。

本研究拟制备表达 HA、NP、3M2e 的流感 mRNA 疫苗,并在动物模型 Balb/c 小鼠上进行全面评价,为候选通用流感 mRNA 疫苗的设计和免疫策略的制定提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒小提试剂盒 QIAprep® Spin Miniprep Ki 购自德国 QIAGEN 公司;限制性核酸内切酶 EcoR1 及 DNA 纯化试剂盒 Product Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 μg)购自美国 NEB 公司;体外转录试剂盒 T7 High Yield RNA Transcription Kit (N^1-Me-Pseudo UTP)和 mRNA 纯化试剂盒 VAHTS RNA Clean Beads 购自南京诺维赞生物科技有限公司;加帽试剂盒 Vaccinia Capping Enzyme、mRNA Cap 2′-O-Methyltransferase 及加尾试剂盒 E. coli Poly(A) Polymerase 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;脂质体购自艾伟拓(上海)医药科技有限公司;HA、NP、M2e 抗体购自美国 GeneTex 公司;流式抗体(CD45、CD3、CD4、CD8 和 IFNγ)购自美国 BioLegend 公司。

1.2 细胞系及病毒

293T、犬肾(Madin-Darby canine kidney,MDCK)细胞系购自美国细胞培养物收藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)细胞库;流感 H1N1 亚型病毒株(A/Beijing/501/2009)由解放军总医院第一医学中心肝胆胰外科医学部实验室分离并鉴定,-80 ℃保存备用。

1.3 mRNA 制备

选用 A/California/04/2009 流感病毒株为研究对象,将该毒株的 HA、NP 及 3 个串联的 M2e(3M2e)作为

流感 mRNA 疫苗的抗原序列。将 HA (A/California/04/2009)、NP (A/California/04/2009)和 3 个串联的 M2e 构建在表达质粒(pcDNA3.1)上[由生工生物工程(上海)股份有限公司合成]。用限制性内切酶 EcoR Ⅰ将质粒线性化作为体外转录模板。线性化的 DNA 模板通过体外转录、酶学加帽、酶促加尾和纯化,获得高纯度的 mRNA;将阳离子脂质体、辅助型脂质、胆固醇和聚乙二醇化磷脂以摩尔比 50∶38.5∶10.5∶1溶于无水乙醇,mRNA 按一定比例用柠檬酸钠溶液稀释,3 种 mRNA 溶液与脂质体按 3∶1体积通过微流控设备包封,测定粒径和电位。

1.4 细胞爬片

将 14 mm 玻片(NEST 801010)置于 24 孔板中,以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种 293T 细胞,24 h 后将合成的 HA-mRNA、NP-mRNA 和 3M2e-mRNA 通过 lip3000(赛默飞)转染 293T 细胞,24 h 后进行免疫荧光鉴定表达。

1.5 免疫荧光

弃去细胞培养基,用 PBS 清洗,再加入 4%多聚甲醛固定 20 min,接着加入 0.5% Triton X-10 通透 20 min,再用 5% BSA 封闭 30 min。4 ℃过夜孵育 HA、NP 和 M2e 一抗(美国 GeneTex 公司,1∶50)。次日用 PBST 清洗玻片,孵育二抗 1 h。PBST 清洗玻片,用镊子小心地取出玻片,并将玻片置于含有 DAPI 抗荧光率灭封片液(北京华兴博创基因技术有限公司,HXJ3109)的载玻片上。在正置荧光显微镜下拍照。

1.6 实验动物

28 只 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠(体质量为 18~22 g),从北京斯贝福实验动物技术有限公司订购(动物合格证号:110324220103903064)。动物在中国人民解放军总医院第五医学中心 SPF 级动物房中饲养。动物房昼夜 12 h 光暗交替,相对湿度 40%~70%,环境温度设定为 20~25 ℃,食水自由摄取。

1.7 动物免疫

将 mRNA-HA 、mRNA-NP 及 mRNA-3M2e 共 3 种 LNP-mRNA 等比例混合,命名为 Comb-mRNA。小鼠按简单随机分组法分为 LNP($n=14$)和 Comb-mRNA($n=14$)2 组,分别肌肉注射接种 LNP 和 Comb-mRNA,Comb-mRNA 组每只小鼠注射 4.5 μg mRNA,LNP 组每只小鼠注射等体积 LNP。第 0、28 天免疫 2 次,初次免疫第-1、27 天及加强免疫第 13 天经小鼠内眦静脉采血,分离血清-80 ℃保存备用。

1.7.1 血凝抑制(hemagglutination inhibition,HI)

血清与受体破坏酶以 1∶4比例混合,37 ℃水浴 18 h,通过 56 ℃水浴 30 min 将受体破坏酶灭活。用 PBS 于 96 孔 V 型板 2 倍稀释(1∶10~1∶1 280,每孔 25 μL),每孔加入 25 μL 的 4 个血凝单位的 H1N1 病毒静置 30 min,每孔再加入 50 μL 的鸡红细胞孵育 30 min,以完全血凝抑制的最高稀释度为血凝抑制抗体滴度,并计算几何平均滴度(geometric mean titer,GMT)。

1.7.2 微量中和(microneutralization,MN) 接种 MDCK 细胞于 96 孔板中,培养 24 h,同时用受体破坏酶处理血清并灭活。将血清在孔板中用 DMEM 培养基 2 倍稀释(1∶10~1∶1 280,每孔 100 μL),每孔加入 100 μL 经胰酶(trypsin,TPCK)处理的 100 $TCID_{50}$/100 μL 病毒,37 ℃孵育 1 h。加至贴壁单层 MDCK 细胞中,继续孵育 3 d,观察细胞病变情况,于第 3 天通过血凝实验判定血清中和抗体滴度并计算 GMT。

1.7.3 流式细胞术 小鼠接种疫苗后第 12 天,将脾脏研磨并裂解红细胞,分离脾淋巴细胞,加入刺激剂(1 μL/1×10^6 个细胞)孵育 4 h,再加入 CD45、CD3、CD4 和 CD8 抗体(5 μL/1×10^6 个细胞)4 ℃孵育 30 min,加入固定液(fixation buffer)固定细胞,再加入 IFNγ 抗体室温孵育 30 min,PBS 清洗并重悬细胞上机检测。

1.7.4 攻毒保护性评价 LNP 组和 Comb-mRNA 组小鼠于加强免疫后第 14 天,经滴鼻给予 $5LD_{50}$ 流感 H1N1 亚型活病毒攻击,每天测量小鼠体质量并观察小鼠生存期,观察时间为 2 周。于病毒攻击后第 4 天检测小鼠肺病毒载量。

1.8 统计学分析

所有实验至少重复 3 次,数据均服从正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流感 mRNA 疫苗抗原制备及表达能力鉴定

将 HA、NP、3M2e 序列构建在 pcDNA3.1 载体上(图 1),提取质粒。再将质粒通过限制性内切酶线性化成为体外转录模板。利用修饰的核苷酸及模板合成 HA、NP、3M2e 序列的 mRNA,并加帽加尾,通过琼脂糖凝胶电泳对 mRNA-HA、mRNA-NP、mRNA-3M2e 进行鉴定(图 2),mRNA-HA 分布于 1 800 bp,mRNA-NP 分布于 1 000 bp, mRNA-3M2e 分布于 500 bp。将合成的 mRNA 通过 lip3000 转染至 293T 细胞,通过免疫荧光实验验证 mRNA-HA、mRNA-NP、mRNA-3M2e 可在细胞中翻译表达对应的蛋白质(图 3)。

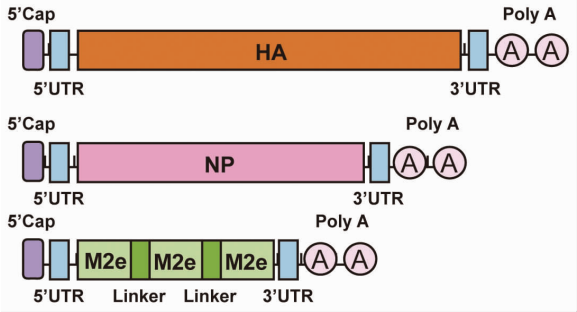


图 1 流感 mRNA 疫苗抗原序列构建示意图

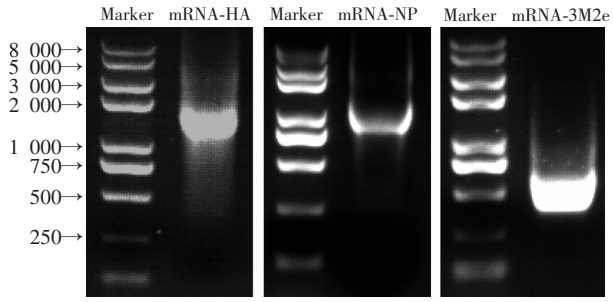


图 2 琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA-HA、mRNA-NP、mRNA-3M2e 基因片段

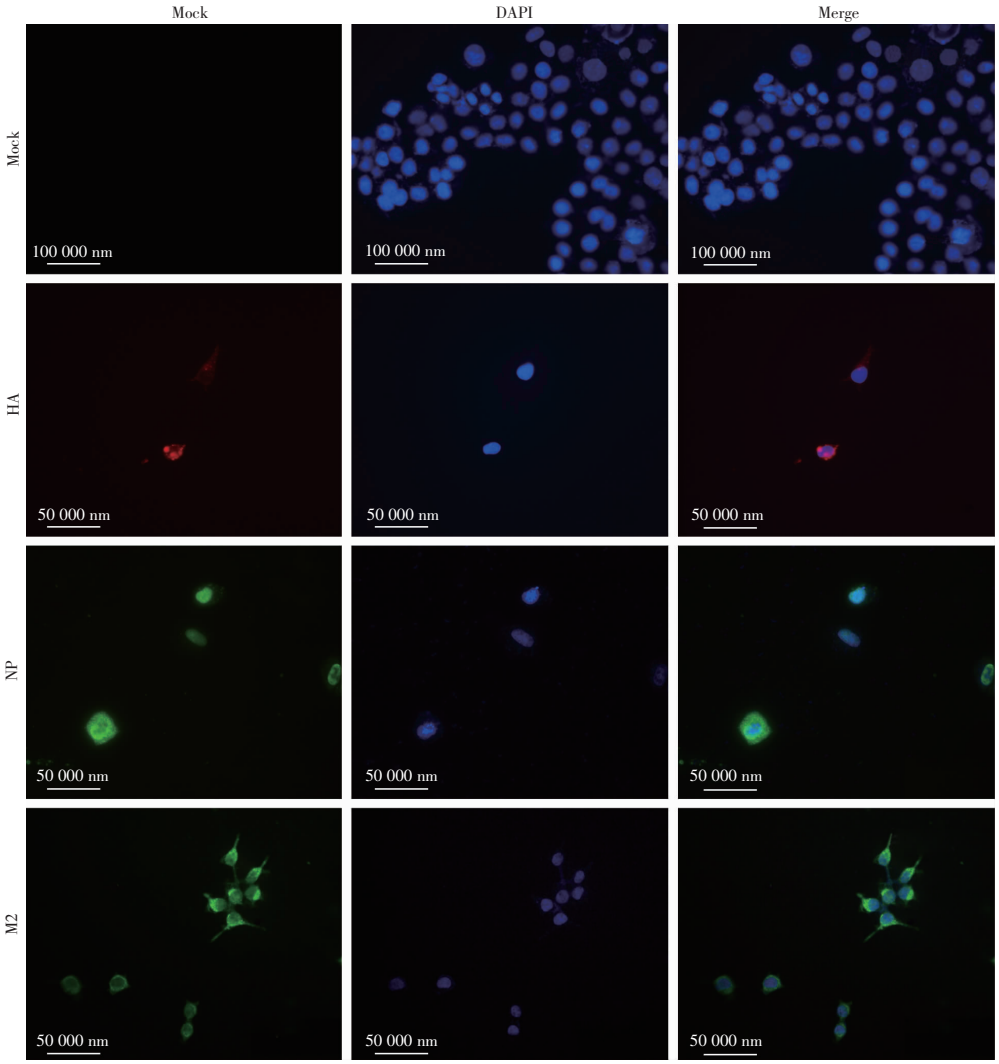


图 3 免疫荧光检测 mRNA-HA、mRNA-NP、mRNA-3M2e 的蛋白表达

2.2 流感 mRNA 疫苗剂型确定

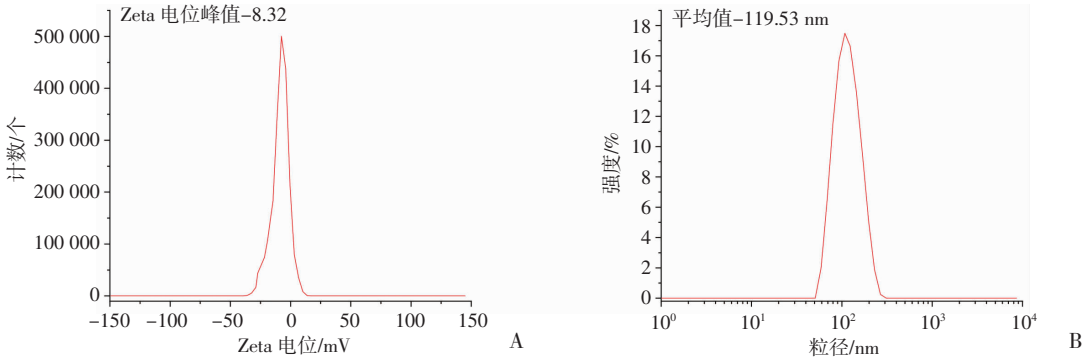
经测定所有 mRNA 的包封率大于 95%,平均粒径大小为(119.53±6.5)nm,电位为(−8.23±1.3) mV(图 4)。

2.3 流感 mRNA 疫苗可激发小鼠体液免疫反应

为检测中和抗体水平,测定 A/Beijing/501/2009 毒株的 HI 和 MN 滴度(图 5)。结果显示,初次免疫第 27 天血抑效价 GMT 值为 89.8,加强免疫后第 14 天血抑效价 GMT 值为 179.6;而微量中和滴度 GMT 分别为 100.8 和 201.6。

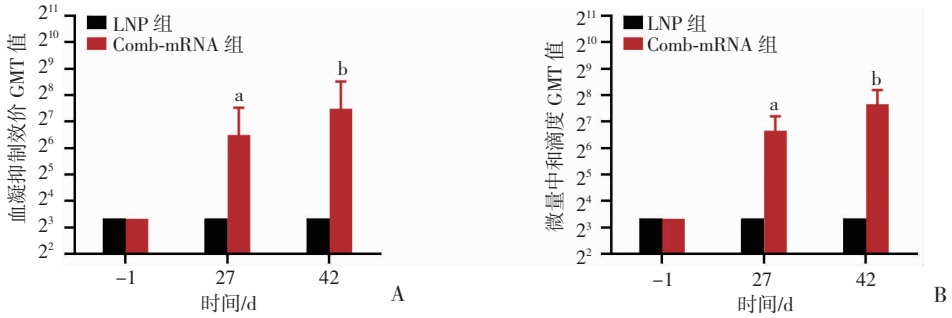
2.4 流感 mRNA 疫苗可激发小鼠细胞免疫反应

为了评价 mRNA 疫苗诱导的细胞免疫反应,检测了 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞应答。结果发现,Comb-mRNA 疫苗可诱导 $CD4^+$ T 细胞比例达 11.4%(图 6A),$IFN\gamma^+CD8^+$ T 细胞比例达 13.24%,与 LNP 组比较,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6B)。



A:LNP-mRNA 粒径分布;B:LNP-mRNA 电位分布

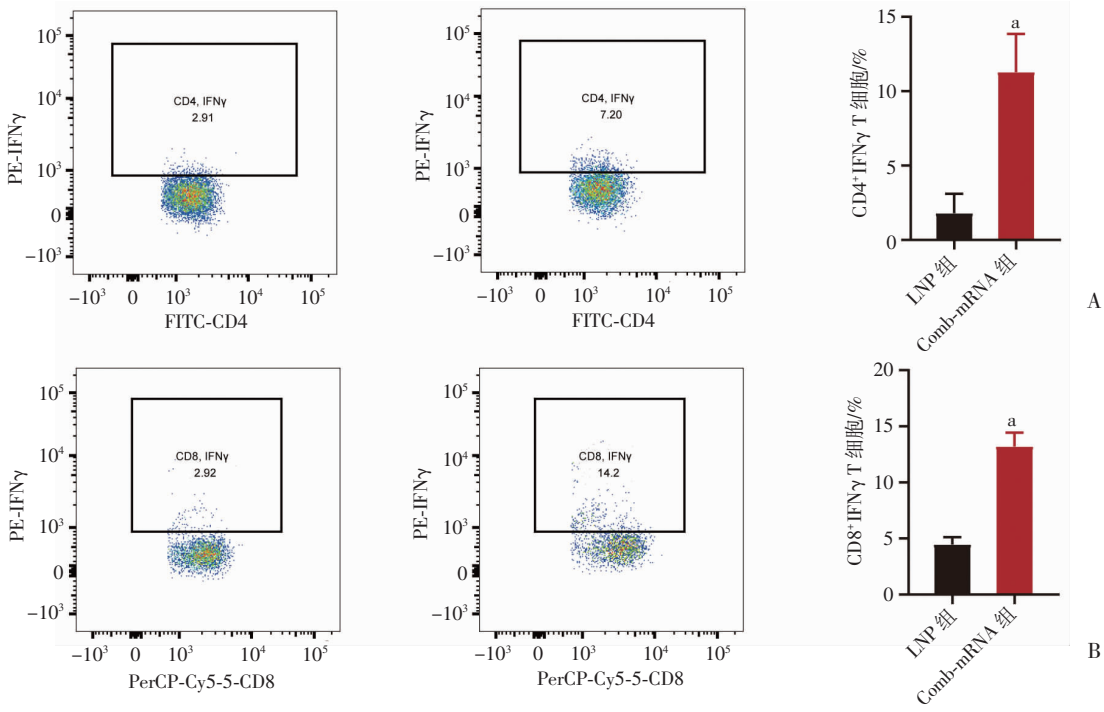
图 4 LNP-mRNA 粒径及电位分布



a:$P<0.01$,与第 27 天 LNP 组比较;b:$P<0.01$,与第 42 天 LNP 组比较

A:LNP 和 Comb-mRNA 组血凝抑制效价比较;B: LNP 和 Comb-mRNA 组微量中和滴度比较

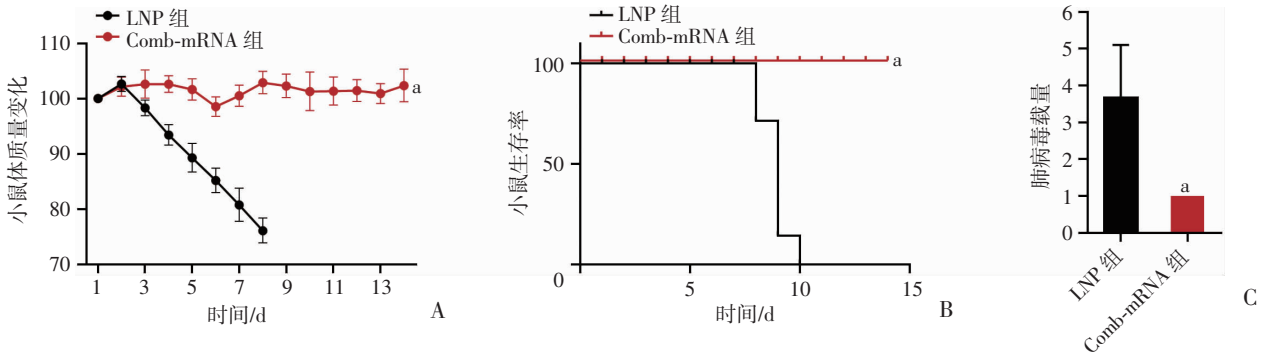
图 5 流感 mRNA 疫苗激发小鼠体液免疫反应($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.001$,与 LNP 组比较

A:LNP 和 Comb-mRNA 组 $CD4^+$ $IFN\gamma^+$T 细胞比例;B:LNP 和 Comb-mRNA 组 $CD8^+IFN\gamma^+$T 细胞比例

图 6 流感 mRNA 疫苗激发小鼠细胞免疫反应($n=5$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.001$,与 LNP 组比较

A:LNP 和 Comb-mRNA 组小鼠感染 H1N1 后体质量变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$);B: LNP 和 Comb-mRNA 组小鼠感染 H1N1 后存活率($n=6$, $\bar{x}\pm s$); C:LNP 和 Comb-mRNA 组小鼠感染 H1N1 后第 4 天肺病毒载量($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

图 7 流感病毒攻击后小鼠体质量变化及存活率

2.5 流感 mRNA 疫苗可有效保护小鼠免受流感病毒的攻击

通过用 H1N1 流感病毒感染 Balb/c 小鼠的方法,评价 mRNA 疫苗的保护效力。LNP 组小鼠在第 8 天存活率为 66.7%,第 9 天存活率为 16.7%,第 10 天存活率为 0。而 Comb-mRNA 组存活率 100%,2 组相比差异具有统计学意义($P<0.001$,图 7A、B)。同样的,与 LNP 组比较,Comb-mRNA 组小鼠肺组织第 4 天病毒载量明显下降($P<0.001$,图 7C)。

3 讨论

mRNA 疫苗具有安全性高、研发周期短、抗原序列快速优化等优势,因此 mRNA 疫苗已成为传染病疫苗领域的研究热点。目前新型冠状病毒、人偏肺病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒等 mRNA 疫苗均取得良好的临床前研究进展。但季节性流感疫苗主要根据 HA 头部特异性结构域设计,而 HA 头部结构域易突变,导致季节性流感疫苗保护效力有限。因此,研究通用 mRNA 流感疫苗是十分必要的。

流感病毒 HA 是介导病毒入侵宿主细胞的关键蛋白,也是流感病毒中和抗体的主要靶点。HA 包含 HA1 和 HA2 两个亚单位,以三聚体突刺形式分布于病毒囊膜表面。HA 三聚体从结构上可分为头部和茎部两部分,头部突变位点较多,茎部相对保守[10],根据 HA 头部不同的突变位点将流感病毒分为 18 种亚型。目前 mRNA 流感疫苗临床试验集中在季节性流感疫苗,难以应对新突发流感大流行,因此通用流感疫苗仍然是目前研究的主流趋势。通用流感 mRNA 疫苗最关键的是其编码的抗原在所有亚型的流感病毒中广泛存在。最新研究发现,用 mRNA 编码了 20 种 HA 抗原全长序列,针对性诱导每种抗原的特异性免疫反应,使小鼠和雪貂免受流感病毒的致命攻击[11]。但目前更多的研究是通过 mRNA 编码流感病毒的保守抗原[12-13],诱导交叉免疫反应,以获得更全面的保护。

本研究旨在构建通用流感 mRNA 疫苗,通过选用 HA 全长序列作为流感疫苗抗原,增强疫苗的免疫原性;选择在不同毒株高度保守的 NP 及 M2e 蛋白作为流感疫苗抗原,增加流感疫苗的通用性。FREYN 等[14]研究发现,只接种流感病毒基质蛋白 2(matrix protein,M2)的保护效力有限,且 M2e 是 M2 的胞外区,序列较短,因此本研究将 M2e 重复 3 次,通过 linker 串联,以达到加强疫苗免疫原性的目的。再将 mRNA-HA、mRNA-NP 和 mRNA-3M2e 混合成 Comb-mRNA 去免疫小鼠,以全面评价其免疫原性及免疫保护效果。

既往研究发现,接种名为 Cal09 HA-mRNA 的流感疫苗,HI 的 GMT 为 160,且可提供对致死剂量野生毒株攻击的保护[15];给小鼠接种 10 μg A/Cal09 HA mRNA-LNP,HI 的 GMT 可达 320。VAN 等[13]研究发现,小鼠免疫 NP+M1+PB1mRNA 疫苗,诱导 $IFN\gamma^+CD4^+T$ 细胞比例达 10%,$IFN\gamma^+CD8^+T$ 细胞比例为 20%。与前期研究报道类似,本研究 Comb-mRNA 组的小鼠均能产生中和抗体,最高可达 320,与 LNP 组相比差异具有统计学意义。进一步攻毒实验发现,LNP 组小鼠在 $5LD_{50}$ 的毒株攻击后陆续死亡,病毒感染后第 4 天肺组织病毒载量较高。Comb-mRNA 组的小鼠感染 H1N1 病毒后体质量变化不明显,表明疫苗具有良好的免疫保护效果。本课题组将在下一步用不同亚型的流感病毒感染小鼠,全面评价其交叉免疫保护效果,并在雪貂等敏感动物模型进一步验证其有效性及交叉保护性。

综上所述,本研究制备了包含 HA、NP 和 3M2e 的

流感通用 mRNA 疫苗候选株,能够激发机体产生较强的体液和细胞免疫反应,可保护小鼠抵抗致死剂量的野生型流感病毒攻击,有望成为极具潜力和发展前景的流感通用疫苗候选株。

参考文献:

[1] 2022-2023 U.S. Flu season: preliminary in-season burden estimates [EB/OL], [2023-03-24], https://www.cdc.gov/flu/about/burden/preliminary-in-season-estimates.htm?msclkid=ffacd4dbce3c11eca39a9738d63f1f64.

[2] CDC seasonal flu vaccine effectiveness studies [EB/OL], [2023-05-06], https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectiveness-studies.htm.

[3] KRAMMER F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(6): 383-397. DOI: 10.1038/s41577-019-0143-6.

[4] HEATON N S, SACHS D, CHEN C J, *et al*. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(50): 20248-20253. DOI: 10.1073/pnas.1320524110.

[5] KIM H, WEBSTER R G, WEBBY R J. Influenza virus: dealing with a drifting and shifting pathogen[J]. Viral Immunol, 2018, 31(2): 174-183. DOI: 10.1089/vim.2017.0141.

[6] ZOST S J, PARKHOUSE K, GUMINA M E, *et al*. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(47): 12578-12583. DOI: 10.1073/pnas.1712377114.

[7] AINSLIE K E C, HABER M, ORENSTEIN W A. Challenges in estimating influenza vaccine effectiveness[J]. Expert Rev Vaccines, 2019, 18(6): 615-628. DOI: 10.1080/14760584.2019.1622419.

[8] SILVERMAN A D, KARIM A S, JEWETT M C. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications[J]. Nat Rev Genet, 2020, 21(3): 151-170. DOI: 10.1038/s41576-019-0186-3.

[9] QIU X R, XU S Y, LU Y, *et al*. Development of mRNA vaccines against respiratory syncytial virus (RSV)[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 68: 37-53. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2022.10.001.

[10] DENG L, MOHAN T, CHANG T Z, *et al*. Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 359. DOI: 10.1038/s41467-017-02725-4.

[11] AREVALO C P, BOLTON M J, SAGE V L, *et al*. A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes[J]. Science, 2022, 378(6622): 899-904. DOI: 10.1126/science.abm0271.

[12] FLYNN J A, WEBER T, CEJAS P J, *et al*. Characterization of humoral and cell-mediated immunity induced by mRNA vaccines expressing influenza hemagglutinin stem and nucleoprotein in mice and nonhuman primates[J]. Vaccine, 2022, 40(32): 4412-4423. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.03.063.

[13] VAN D V K, LANFERMEIJER J, VAN D H, *et al*. A universal influenza mRNA vaccine candidate boosts T cell responses and reduces zoonotic influenza virus disease in ferrets[J]. Sci Adv, 2022, 8(50): eadc9937. DOI: 10.1126/sciadv.adc9937.

[14] FREYN A W, RAMOS D S J, ROSADO V C, *et al*. A multi-targeting, nucleoside-modified mRNA influenza virus vaccine provides broad protection in mice[J]. Mol Ther, 2020, 28(7): 1569-1584. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.04.018.

[15] CHIVUKULA S, PLITNIK T, TIBBITTS T, *et al*. Development of multivalent mRNA vaccine candidates for seasonal or pandemic influenza[J]. NPJ Vaccines, 2021, 6(1): 153. DOI: 10.1038/s41541-021-00420-6.

(收稿:2023-12-04;修回:2024-01-16)

(编辑 刘秋池)