

论著·基础研究

基于甲型流感病毒H1N1亚型血凝素的mRNA疫苗制备和加强免疫策略研究

沈海浅¹, 俞康莹¹, 陈颖盈¹, 季萍¹, 王颖^{1,2}

1. 上海交通大学医学院上海市免疫学研究所, 上海 200025; 2. 上海市病毒研究院, 上海 200025

[摘要] **目的**·制备甲型流感病毒H1N1亚型血凝素(hemagglutinin, HA)mRNA疫苗,并探讨不同加强免疫策略的免疫保护作用。**方法**·以荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)为报告基因,构建Fluc mRNA-脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)疫苗,通过小鼠活体成像实验鉴定Fluc mRNA-LNP疫苗肌肉注射后在体内的表达情况。进一步构建H1N1亚型(A/Michigan/45/2015)HA(M15-HA)的mRNA-LNP疫苗,将20、10、5和1 μg M15-HA mRNA-LNP疫苗通过肌肉注射分别免疫不同剂量组小鼠2次(间隔3周),酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定小鼠第2次免疫2周和4周后血清抗体滴度,血凝抑制试验检测功能性抗体水平。第2次免疫后40 d,采用1 μg mRNA疫苗或10 μg HA蛋白亚单位疫苗对1 μg剂量免疫组小鼠进行加强免疫,接种2周和4周后用ELISA和血凝抑制试验分别检测特异性抗体及功能性抗体水平。**结果**·活体成像实验结果显示,小鼠接种Fluc mRNA-LNP疫苗1 d后即能在小鼠体内检测到荧光素酶活性。制备获得的M15-HA mRNA-LNP疫苗2次免疫小鼠2周和4周后,所有剂量组小鼠的特异性抗体水平均较免疫前显著上升(均 $P=0.000$);血凝抑制试验结果显示,20 μg和10 μg剂量组的功能性抗体水平均较PBS对照组显著升高(均 $P<0.05$)。对1 μg低剂量组小鼠进行HA蛋白或M15-HA mRNA-LNP的加强免疫后,均诱导产生了更高水平的特异性抗体和功能性抗体,并能维持较长时间;2种不同加强免疫策略之间差异无统计学意义。**结论**·成功制备M15-HA mRNA-LNP疫苗,显示出良好的免疫原性和抗体中和活性;低剂量mRNA疫苗免疫2次后,同源mRNA疫苗和异源蛋白疫苗加强免疫均可以诱导更强的免疫反应。

[关键词] 流感疫苗;甲型流感病毒;血凝素;mRNA疫苗;加强免疫

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.11.005 **[中图分类号]** R392.12 **[文献标志码]** A

Construction of an mRNA vaccine encoding hemagglutinin of influenza A H1N1 virus and investigation on booster immunization strategy

SHEN Haiqian¹, YU Kangying¹, CHEN Yingying¹, JI Ping¹, WANG Ying^{1,2}

1. Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Institute of Virology, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To construct an mRNA vaccine encoding hemagglutinin (HA) of influenza A H1N1 virus, and explore the protective effects of different booster vaccination strategies. **Methods**·Firefly luciferase (Fluc) was used as the reporter gene to construct Fluc mRNA vaccine enveloped in lipid nanoparticles (LNP). The *in vivo* expression of Fluc mRNA-LNP after intramuscular injection was determined by live imaging assay in mice. Furthermore, M15-HA mRNA-LNP derived from H1N1 subtype (A/Michigan/45/2015) was constructed. Mice were immunized with 20, 10, 5, or 1 μg doses of M15-HA mRNA-LNP twice (with an interval of 3 weeks) through intramuscular injection. Serum antibody titers were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at 2 weeks and 4 weeks after the second immunization, and functional antibody levels were detected by hemagglutination inhibition test. The third booster vaccination was performed 40 d after the second immunization in 1 μg dose group with 1 μg M15-HA mRNA-LNP or 10 μg HA subunit vaccine. The levels of specific antibody and functional antibody were detected by ELISA and hemagglutination inhibition test, respectively 2 weeks and 4 weeks later. **Results**·Live imaging assay showed that luciferase activity could be detected in mice 1 d after injection of Fluc mRNA-LNP. At 2 weeks and 4 weeks after the second immunization of M15-HA mRNA-LNP, HA-specific antibodies were significantly higher than those before the immunization

[基金项目] 国家重点研发计划(2021YFC2301502);上海交通大学“交大之星”计划医工交叉研究基金(YG2023ZD02)。

[作者简介] 沈海浅(1985—),男,硕士生;电子信箱:1802670873@qq.com。

[通信作者] 王颖,电子信箱:ywangssmu@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Key Research and Development Program of China (2021YFC2301502); Key Project of Medical Engineering Cross Research Fund for "Star of Jiao Tong University" of Shanghai Jiao Tong University (YG2023ZD02)。

[Corresponding Author] WANG Ying, E-mail: ywangssmu@shsmu.edu.cn。

in all vaccination groups at different doses ($P=0.000$). The hemagglutination inhibition test showed that the levels of functional antibodies in the 20 μg dose and 10 μg dose groups were significantly higher than those in the PBS control group ($P<0.05$). After 1 μg dose group mice were immunized with HA protein or M15-HA mRNA-LNP, higher levels of HA-specific antibody and functional antibody were induced and maintained for a long time. There was no significant difference between the two different booster immunization strategies. **Conclusion**·M15-HA mRNA-LNP vaccine is constructed with immunogenicity and antibody neutralization activity. Low-dose mRNA priming vaccination followed by both homologous mRNA vaccine and heterologous protein subunit vaccine booster vaccination can induce stronger immune recall responses.

[Key words] influenza vaccine; influenza A virus; hemagglutinin; mRNA vaccine; booster immunization

每年由甲型和乙型流感病毒感染引起的季节性流感在全球范围造成巨大的疾病负担。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 估计,全世界每年有 29 万~65 万例与流感相关的呼吸道死亡病例^[1]。接种疫苗依然是预防流感病毒感染的主要措施。现有流感疫苗的制造工艺多以鸡胚为基础,该工艺生产流感疫苗已有 70 多年的历史,可生产灭活疫苗和减毒(弱化)活疫苗,但其保护率仅为 40%~60%^[2],因此研发新型流感候选疫苗和改良其免疫策略有望成为提升疫苗保护作用的重要手段。

新型冠状病毒(新冠病毒)引起的全球疫情推动了 mRNA 疫苗的研发和推广应用。在获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的应急使用权后, mRNA 疫苗已在全世界完成接种十数亿剂次^[3],临床试验结果^[4]显示 mRNA 疫苗可提供高达 95% 的有效率,其安全性和有效性已得到真实世界数据的支持^[5]。在对不同类型的新冠病毒疫苗接种后的保护效果进行比较研究^[6]后发现,将腺病毒疫苗作为新冠病毒疫苗的第一针后,再进行 mRNA 疫苗加强免疫,可获得 67%~79% 的有效率,显著高于 2 针同源腺病毒疫苗提供的有效率(约 50%)。国内研究^[7]亦发现接种 2 针剂全病毒灭活疫苗后,再进行亚单位疫苗加强免疫,可激发接种者体内更强而持久的体液免疫应答。因此,基于不同种类疫苗进行异源加强免疫的策略可能可以提供更好的免疫保护作用。如何借助 mRNA 平台快速研发具有高突变特征的流感病毒疫苗,并提出更高保护性的加强免疫策略,是流感疫苗研究的热点方向之一。

在早期的 mRNA 疫苗研究中,自复制 mRNA (self-amplifying mRNA, SAM) 制备平台的高速可转换性,为疫苗的快速制备和推广应用奠定了基础。如 2013 年甲型流感病毒 H7N9 亚型的血凝素 (hemagglutinin, HA) 基因编码序列被发布到网络数

据共享系统,研究人员仅用 8 d 制备出候选疫苗,且免疫保护实验结果显示小鼠能产生具有保护性的血凝抑制中和抗体^[8]。后续出现的非自复制 mRNA 的制备平台凭借其更高的体内应用安全性,逐渐成为各大疫苗研发企业的主要制备策略。但是 2 种 mRNA 的免疫反应性还是存在差异,相比 80 μg 的非自复制 mRNA, SAM 只需要 1.25 μg 就可以诱导出相同的保护水平^[9]。

流感病毒表面的 HA 是主要的免疫原,已有研究^[10]表明基于 HA 的 mRNA 候选疫苗能够在小鼠模型中诱导出高滴度的抗体水平,并提供更好的抗流感病毒感染保护作用。为此,本研究选择 WHO 推荐的 2018—2019 年北半球流感季节病毒株甲型流感病毒 H1N1 亚型 (influenza virus A/Michigan/45/2015) 的血凝素蛋白 (M15-HA) 作为疫苗靶向分子,通过制备基于脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 的 M15-HA mRNA 修饰核酸非复制型候选疫苗,在评价其免疫原性和介导抗病毒免疫保护作用的同时,探讨其结合传统亚单位疫苗进行异源接种后的免疫保护作用,为未来优化免疫接种策略提供前期理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄,购自上海灵畅生物科技有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2023-0003。实验动物委托上海交通大学医学院实验动物中心 SPF 级动物房饲养,饲养至 7~9 周龄进行实验,实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2018-0027。人胚肾细胞 HEK293T 细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 用甲

型流感病毒 H1N1 亚型 (A/Michigan/45/2015) 血凝素 A (M15-HA) 重组蛋白购自北京义翘神州科技股份有限公司, pUC57 质粒购自铂尚生物技术 (上海) 有限公司, 豚鼠红细胞购自南京森贝伽生物科技有限公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)、TMB 显色液、显色终止液、荧光素酶底物 *D-luciferin*、RIPA 裂解液、ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 牛血清白蛋白购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, T7 RNA 聚合酶、NTP 混合液、牛痘病毒加帽酶 (vaccinia capping enzyme)、mRNA-2-氧甲基转移酶 (mRNA cap 2'-O-methyltransferase)、I 型 DNA 酶购自美国 NEB 公司, *N1*-甲基假尿嘧啶购自美国 APEX BIO 公司, 核酸递送类关键辅料 ALC-0315、ALC-0159、二硬脂酰基磷脂酰胆碱 (distearoyl phosphatidylcholine, DSPC)、胆固醇购自艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司, 抗 M15-HA 小鼠单克隆抗体、Lipofectamine 3000、RiboGreen、Imject Alum 佐剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 96 孔酶标板购自美国 Corning 公司, 受体破坏酶 (RDE) 购自日本生研株式会社, 血凝抑制试验用 M15-HA 蛋白购自英国生物标准品研究所。

微流控设备 PZ-11AD-2 (上海澎赞生物技术有限公司), Zetasizer 纳米粒度电位仪 Nano ZS (Malvern, 英国), BioTek Synergy 多功能微孔板检测仪 Neo2 (Agilent, 美国), IVIS Spectrum 小动物活体光学成像系统 (Perkin-Elmer, 美国), Thermo Labsystems Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.1.3 质粒 DNA 本实验所用质粒 DNA 由铂尚生物技术 (上海) 有限公司制备获得。从 NCBI 网站获得萤火虫的荧光素酶蛋白 (firefly luciferase, FLuc) 核酸序列 (GenBank No. M15077.1) 和 M15-HA 核酸序列 (GenBank No. APC60198.1)。将上述序列经过人源密码子优化后, 人工合成全长基因, 并经过 *Hind* III 和 *Bsp* Q I 双酶切后装载至 pUC57 质粒中, 分别构建质粒 pUC57-Fluc 和 pUC57-M15-HA。

1.2 方法

1.2.1 mRNA 制备 以 pUC57-Fluc 和 pUC57-M15-HA 质粒为模板, 使用 T7 RNA 聚合酶, 通过体外转录 (*in vitro* transcription, IVT) 合成获得 mRNA 前体, 通过酶促反应在 mRNA 前体添加 5'帽结构, 琼脂

糖凝胶电泳鉴定 mRNA 纯度。

1.2.2 细胞转染 mRNA HEK293T 细胞接种在 6 孔板中, 用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM, 放置于 37 °C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养。使用 Lipofectamine 3000 转染试剂转染不同剂量 FLuc mRNA (0、0.25、0.5、1.0 μg/孔) 或 M15-HA mRNA (3 μg/孔)。转染 24 h 后收集细胞并用 RIPA 裂解缓冲液裂解后等待检测。

1.2.3 Fluc mRNA 细胞转染效率检测 将 Fluc mRNA 转染细胞后的裂解物转移到 96 孔板中, 添加荧光素酶底物并避光孵育 2 min, 使用多功能微孔板检测仪测定荧光强度。

1.2.4 Western blotting 将 M15-HA mRNA 转染细胞后的裂解物进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 并转印到 PVDF 膜上。随后加入含 10% 脱脂奶粉的 PBST (含 0.5% Tween20 的 PBS) 封闭 1 h。用抗 M15-HA 小鼠单克隆抗体孵育 1 h, PBST 洗涤; 再用 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体继续孵育 1 h, PBST 洗涤; 用 ECL 化学发光试剂盒检测。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参。

1.2.5 mRNA-LNP 制备及其表征检测 将 Fluc mRNA 或 M15-HA mRNA 溶解在柠檬酸钠缓冲液 (pH=4) 中, 同时将核酸递送类辅料 (ALC-0315、ALC-0159、DSPC 和胆固醇) 溶解在乙醇中, 并使用微流控设备将乙醇相和水相按 1:3 进行混合, 制备 mRNA-LNP。随后通过透析方法将 mRNA-LNP 溶剂置换成磷酸盐缓冲液, 分装储存在 -80 °C 待用。用纳米粒度电位仪检测 mRNA-LNP 表征, 包括粒径和分散性指数 (polydisperse index, PDI)。将上述 mRNA-LNP 样品用 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 7.5) 稀释获得未裂解 (NL) 样品或用 1% Triton X-100 溶液裂解后获得裂解 (L) 样品, 分别加入 RiboGreen 试剂, 使用多功能微孔板检测仪在激发波长 480 nm、发射波长 520 nm 下测量荧光强度。采用以下公式计算 mRNA-LNP 封装率 (encapsulation efficiency): 封装率 = $[(\text{荧光强度}_{\text{L样品}} - \text{荧光强度}_{\text{NL样品}}) / \text{荧光强度}_{\text{L样品}}] \times 100\%$ [11]。

1.2.6 小鼠活体成像 雌性 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 每组 3 只。第 0 日 (D0), 通过后腿肌内注射不同剂量 Fluc mRNA-LNP (0.7、3.5、7.0 μg) 或 PBS。分别于 D1~D4 进行小鼠活体成像: 小鼠在含有 3% 异氟烷的小室中接受麻醉后, 行腹膜内注射荧光素酶底

物 *D-luciferin* (2 mg/只); 注射 5 min 后, 使用小动物活体成像系统, 采用 5 s 或更长的曝光时间进行生物发光成像, 使用 Living Image 软件 (版本号: 4.7.4) 测量生物发光信号。

1.2.7 小鼠免疫和采样 雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 用于研究 mRNA 制剂免疫次数和剂量对免疫原性的影响。第 0 日 (D0), 通过后腿肌肉内注射不同剂量 M15-HA mRNA-LNP 疫苗制剂 (20、10、5、1 μg) 或 PBS, 在 D21 进行第 2 次免疫接种。在 D0、D14、D35 和 D49, 通过内眦取血, 分离血清, 用于血清抗体滴度检测。

另外为了研究同源加强免疫和异源加强免疫对免疫原性的影响, 我们将已完成接种 2 针剂 1 μg M15-HA mRNA-LNP 的小鼠随机分成 2 组 (每组 3 只): 其中一组在 D61 通过肌肉内注射 1 μg M15-HA mRNA-LNP, 另一组小鼠则通过肌肉内注射含有 10 μg M15-HA 蛋白和等量 Imject Alum 佐剂混合的亚单位疫苗制剂。分别在 D75 和 D89 通过内眦取血, 分离获得血清。以肌肉内注射 PBS 为阴性对照组。

1.2.8 ELISA 检测血清 HA 特异性抗体 IgG 滴度 使用碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液稀释 M15-HA 蛋白 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 后包被于 96 孔酶标板板底, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 PBST 洗涤 5 次后, 室温下用含 10% BSA 的 PBS 封闭 1 h。待测血清用样本稀释液 (含 10% BSA 的 PBST) 稀释后, 加入封闭过的 96 孔酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。用 PBST 洗涤 5 次后, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体 (1:500 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。用 PBST 洗涤 5 次后, 加入 TMB 底物, 约 10 min 后终止显色反应。采用全波长酶标仪读取 650 nm 处的吸光度值。

抗 M15-HA 特异性抗体滴度表示为吸光度值 > 0.1 的最高血清稀释度的倒数。

1.2.9 血凝抑制试验 每只小鼠取 10 μL 血清, 加入 30 μL RDE 处理, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育过夜; 而后在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min, 然后添加 60 μL PBS, 将血清稀释 10 倍后, 再进行后续 2 倍梯度稀释。在 U 形底 96 孔板中使用 4 个血凝单位 (HAU) 的 M15-HA 蛋白和 1% 豚鼠红细胞进行血凝抑制试验。每块板上还包括反滴定以确认抗原剂量 (4 HAU/25 μL) 以及阴性对照样品 (PBS 或初始对照血清)。致血凝完全抑制的血清最高稀释度为血凝抑制滴度。

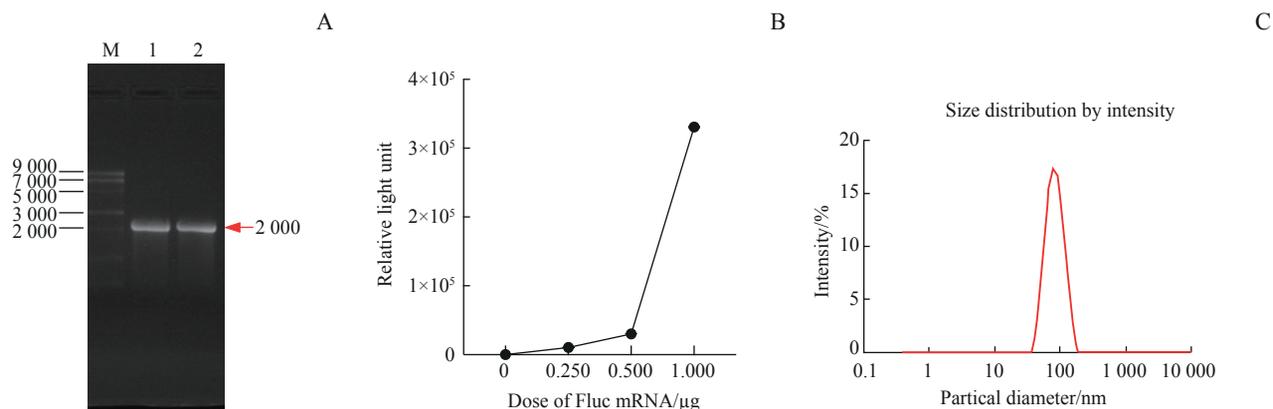
1.3 统计学分析

应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析, 定量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用双因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FLuc mRNA 的体外转录、表达鉴定及 LNP 疫苗制备

我们选择 FLuc 作为报告基因, 通过 IVT 和酶加帽的方式制备 mRNA, 全长 2 000 个核苷酸 (图 1A)。在 HEK293T 细胞系中采用 Lipofectamine 3000 转染不同剂量的 FLuc mRNA。24 h 后在细胞裂解物中可检测到荧光素酶蛋白表达, 并随转染剂量升高而增强 (图 1B)。制备获得的 FLuc mRNA-LNP 疫苗的平均粒径为 79.73 nm (图 1C), PDI 为 0.082, 包封率 > 90%。



Note: A. Full length of FLuc mRNA (2 000 nt) determined by gel electrophoresis. M—RNA ladder; lane 1—FLuc mRNA after IVT; lane 2—FLuc mRNA after 5' capping. B. Luciferase activity detection. C. The particle size of FLuc mRNA-LNP measured by dynamic light scattering method.

图 1 FLuc mRNA-LNP 的制备及鉴定

Fig 1 Preparation and identification of FLuc mRNA-LNP

2.2 FLuc mRNA-LNP的体内表达效率

我们使用FLuc mRNA表达确定LNP的最佳配方参数为46.3% ALC-0315、1.6% ALC-0159、9.4% DSPC和42.7%胆固醇(均为摩尔比例)^[12],并对小鼠体内mRNA-LNP递送能力进行评估。注射不同剂量(0.7、3.5或7.0 μg)的FLuc mRNA-LNP制剂,采用生物发光成像法检测FLuc mRNA-LNP接种后荧

光素酶的活性。结果发现,D1时各剂量组均能在小鼠体内检测到荧光素酶的表达,其中高剂量组(7.0 μg)相比其他剂量组在D4时依旧可在部分小鼠中检测到荧光素酶活性(图2),因此我们确定后续M15-HA mRNA疫苗的最低免疫剂量为1 μg 。上述结果表明,采用本研究方法制备的FLuc mRNA-LNP制剂可以在体内进行有效递送和蛋白表达。

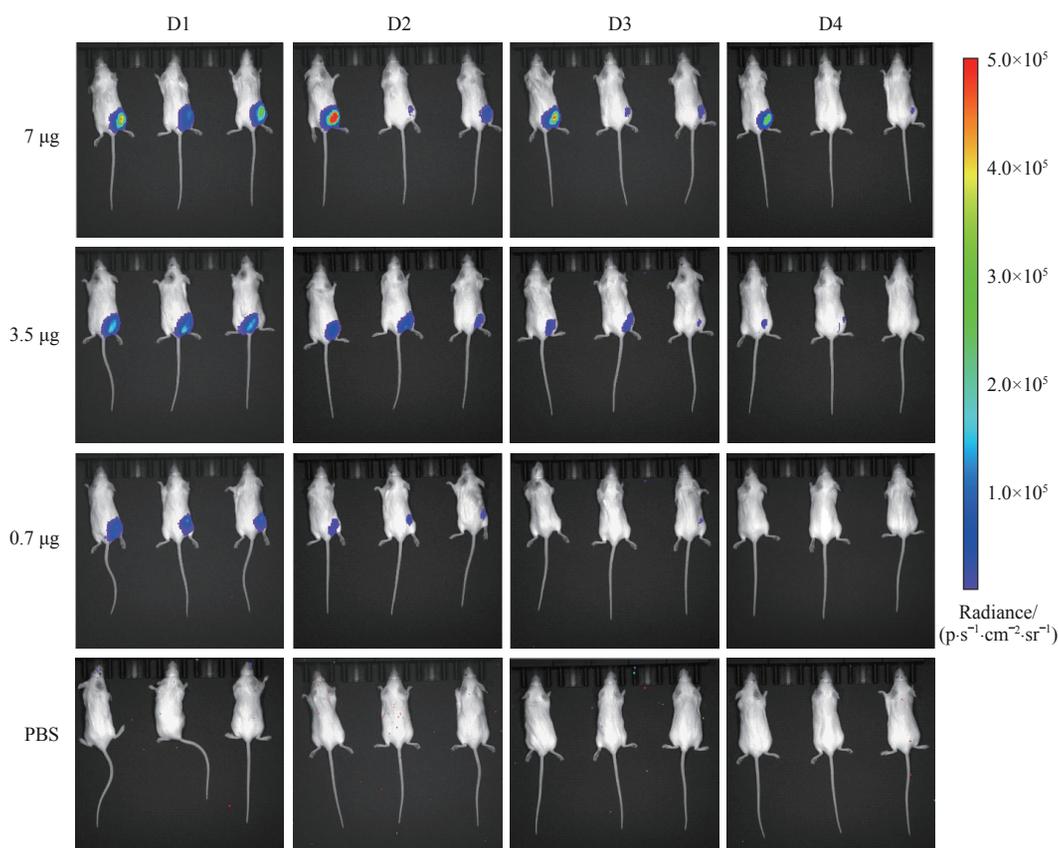


图2 小鼠经肌肉注射FLuc mRNA-LNP不同天数后体内荧光素酶活性检测

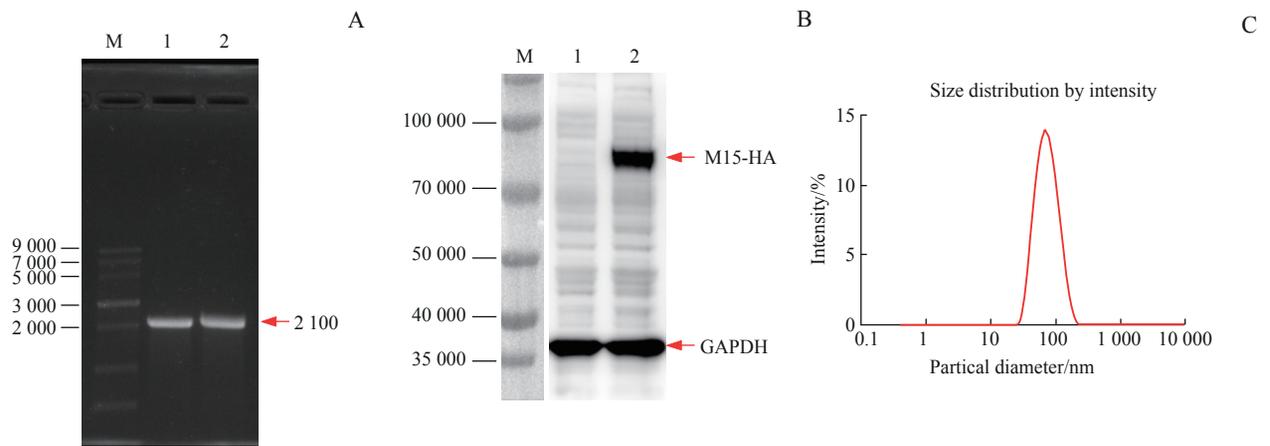
Fig 2 Detection of luciferase activity in mice at different days after intramuscular injection of FLuc mRNA-LNP

2.3 M15-HA mRNA的制备、体外表达鉴定及脂质纳米颗粒疫苗制备

我们采用M15-HA作为流感mRNA疫苗的靶抗原,并制备经核酸修饰的M15-HA mRNA-LNP,用于小鼠免疫模型的评估。采用IVT和酶加帽的方式制备的M15-HA mRNA为2 100个核苷酸的全长基因(图3A)。在HEK293T细胞系中转染M15-HA mRNA,细胞裂解物经Western blotting鉴定,检测到M15-HA蛋白的表达(图3B)。制备获得的M15-HA mRNA-LNP颗粒的平均粒径为67.35 nm(图3C),PDI为0.124,包封率>90%。

2.4 M15-HA mRNA-LNP在小鼠中的免疫原性

我们在BALB/c雌性小鼠中评估M15-HA mRNA-LNP的免疫原性,免疫方案见图4A。单次免疫2周后(D14)评估血清中的M15-HA特异性IgG的水平,结果显示所有mRNA接种组均可检测到M15-HA特异性IgG抗体,显著高于免疫前血清抗体水平(均 $P=0.000$),且抗体水平随接种mRNA制剂剂量升高而升高(均 $P<0.05$),20 μg 、10 μg 、5 μg 和1 μg 免疫组抗体几何平均滴度(geometric mean titer, GMT)分别为4 677、1 044、1 298、173。在第2次免疫后,所有mRNA接种组M15-HA特异性IgG抗体水平均显著上升($P=0.000$),且在D35时已经达到平台期,20 μg 、10 μg 、5 μg 和1 μg 免疫组抗体GMT分别为

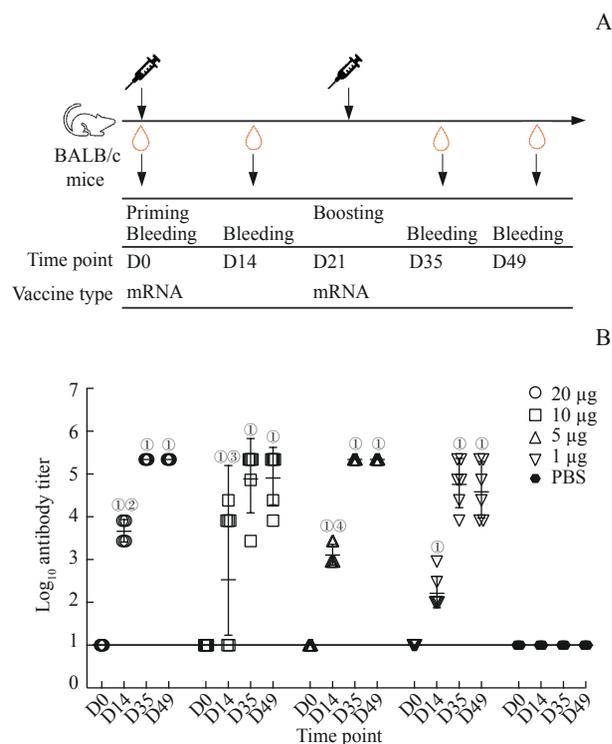


Note: A. Full length of M15-HA mRNA (2 100 nt) determined by gel electrophoresis. M—RNA ladder; lane 1—M15-HA mRNA after IVT; lane 2—M15-HA mRNA after 5' capping. B. Detection of M15-HA protein in HEK293T cells transfected with M15-HA mRNA by Western blotting. M—protein marker; lane 1—the control without transfection; lane 2—the cells transfected with M15-HA mRNA. C. The particle size of M15-HA mRNA-LNP measured by dynamic light scattering method.

图3 M15-HA mRNA-LNP 制备及鉴定

Fig 3 Preparation and identification of M15-HA mRNA-LNP

218 700、87 548、218 700 及 60 703, D49 时为 218 700、87 548、218 700 及 42 089 (图 4B)。以上结果提示, 肌内注射 M15-HA mRNA-LNP 制剂 2 次 (1~20 μg) 可在小鼠体内诱导产生较高水平的 M15-HA 抗原特异性 IgG。

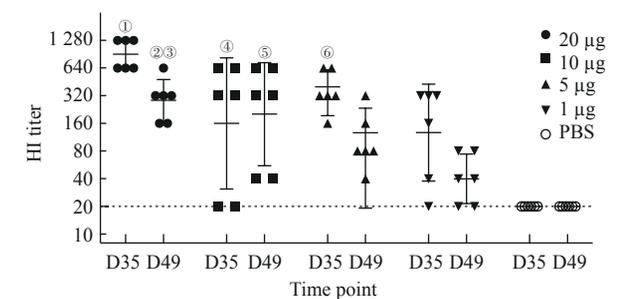


Note: A. Schematic diagram of the experimental design. B. M15-HA-specific IgG antibody titers determined by ELISA. ①P=0.000, compared with D0 in the same dose group; ②P=0.000, ③P=0.034, ④P=0.015, compared with D14 in the 1 μg group.

图4 M15-HA mRNA-LNP 免疫小鼠后血清抗原特异性 IgG 抗体滴度变化

Fig 4 Determination of serum antigen-specific IgG antibody titers in M15-HA mRNA-LNP-vaccinated mice

采用同一病毒株来源的 HA 抗原进行血凝抑制试验可以进一步评价小鼠体内功能性抗体的水平。结果显示, 在第 2 次免疫后 (D35 和 D49), 4 个免疫组 M15-HA 功能性抗体水平相对于 PBS 对照组均上升, 其中 20 μg 和 10 μg 免疫组在 D35 和 D49 时功能性抗体滴度水平均显著高于 PBS 组 (均 P<0.05)。但是, 20 μg 组在 D49 时, 功能性抗体滴度水平较 D35 时显著衰减 (P=0.000)。D35 时 20 μg、10 μg、5 μg 和 1 μg 免疫组功能性抗体 GMT 分别为 905、160、359 及 127, D49 时分别为 285、202、101 及 40 (图 5)。



Note: HI—hemagglutination inhibition test. ①P=0.000, ③P=0.038, ④P=0.033, ⑤P=0.028, ⑥P=0.005, compared with the corresponding time point in the PBS group; ②P=0.000, compared with D35 in the 20 μg group.

图5 血凝抑制试验检测 M15-HA mRNA-LNP 免疫小鼠功能性抗体滴度

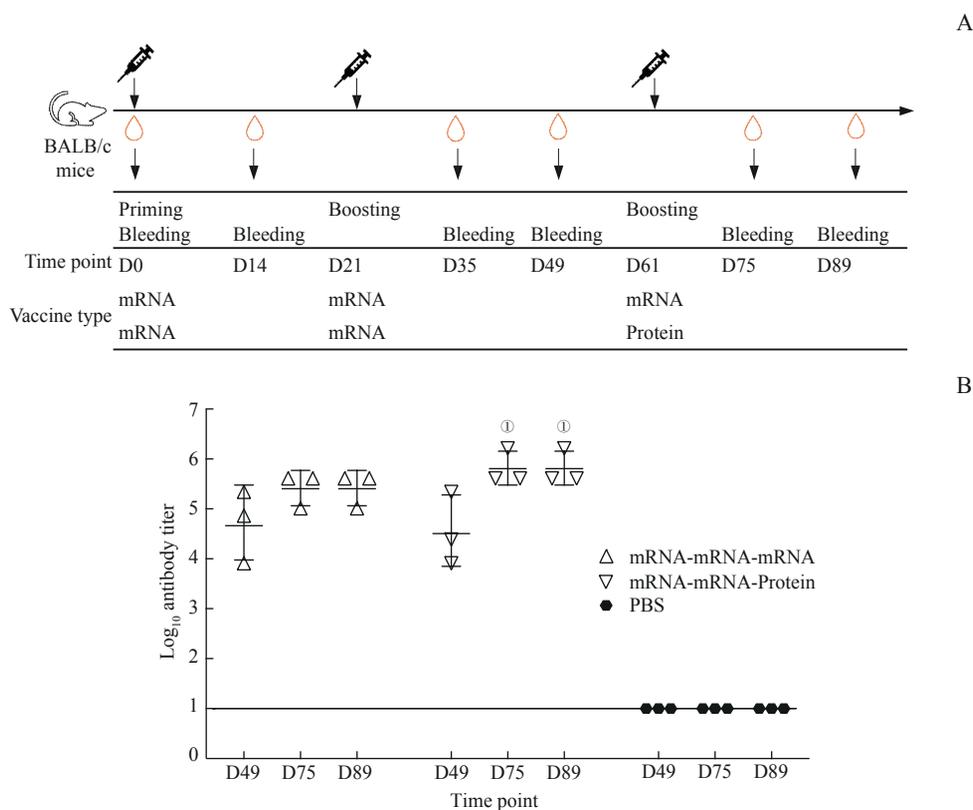
Fig 5 Determination of functional antibody titers in M15-HA mRNA-LNP-vaccinated mice by hemagglutination inhibition test

2.5 基于 mRNA 制剂和重组蛋白的加强免疫效果

由于 1 μg 剂量 M15-HA mRNA-LNP 免疫组在第 2 次免疫 4 周 (D49) 后功能性抗体水平下降明显, 我

们在D61时对其进行第3针加强免疫。将该组小鼠分为2组,分别注射1 μg M15-HA mRNA-LNP制剂(同源加免组)和10 μg M15-HA重组蛋白及等量佐剂(异源加免组)(图6A)。在第3次免疫2周后(D75),2种免疫方式都能够小鼠外周诱导出较强的免疫反应,其中异源加免组抗体水平较加强免疫前显著上升(均 $P=0.025$)。与同源加免组相比,异源

加免组诱导的抗体水平略高,但差异无统计学意义。其中同源及异源加免组在D49(第3次免疫接种前)血清中的总IgG抗体GMT分别为50 546和35 047,加强免疫2周后(D75)GMT分别为258 032和650 199,加强免疫4周后(D89)GMT分别为258 032和650 199。因此,第3次免疫4周后小鼠外周血清总IgG水平能持续保持在较高滴度(图6B)。

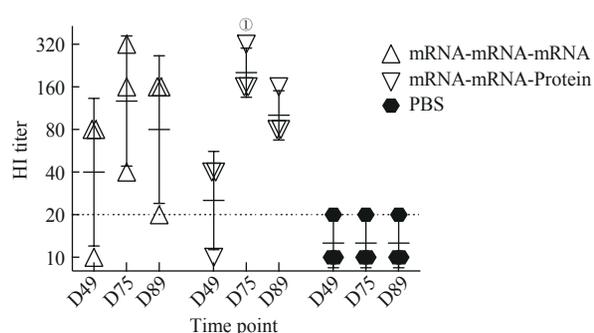


Note: A. Schematic diagram of the experimental design. B. M15-HA-specific IgG antibody titers were determined by ELISA. ^① $P=0.025$, compared with D49 in the same group.

图6 小鼠经过同源或异源加强免疫后外周血清抗原特异性IgG抗体滴度变化

Fig 6 Determination of serum antigen-specific IgG antibody titers in mice after homologous or heterologous immunization

血凝抑制试验结果显示,异源加强免疫2周后(D75),可在小鼠外周诱导出更高滴度水平的功能性抗体($P=0.008$);加强免疫4周后(D89)同源和异源加免组功能性抗体水平均有所下降,但其水平仍然略高于未加强免疫前。同源及异源加免组在D49(第3次免疫接种前)血清中的功能性抗体GMT分别为40和25,D75时为127和202,D89时为80和101(图7)。由此可见,2种加强免疫策略均可诱导产生较高水平的特异性IgG抗体及功能性抗体滴度,并能维持较长时间,2种免疫策略间无明显差异。



Note: ^① $P=0.008$, compared with D49 in the same group.

图7 血凝抑制试验检测小鼠经同源或异源加强免疫后功能性抗体滴度的变化

Fig 7 Determination of functional antibody titers in the mice after homologous or heterologous immunization by hemagglutination inhibition test

3 讨论

核酸修饰的mRNA-LNP疫苗已成为控制传染病的重要疫苗制备平台。包封在LNP中的mRNA疫苗,接种后可在宿主细胞内释放mRNA,随后表达所编码的蛋白质抗原,这些蛋白质(通常是病原体的抗原)刺激机体产生免疫效应分子,最终达到清除病原体和保护机体的目的。目前的mRNA疫苗制备主要采用非复制的方式。在确定抗原序列后,体外合成获得编码抗原的核酸序列,制备质粒模板后,再经体外转录和酶加帽获得核酸修饰的mRNA,经微流控设备处理与脂质分子进行混合,被LNP包封后完成制备。目前获批上市或紧急使用的新冠病毒mRNA疫苗,如Pfizer-BioNTech的BNT162b2^[4]、Moderna的mRNA-1273^[13]、沃森联合中国军事科学院军事医学研究院及艾博生物共同研发的AWcorn^[14]和石药集团的SYS6006^[15]等均采用类似的制备流程。本研究中,我们以制备流感病毒mRNA疫苗为目标,搭建了从靶抗原(HA分子)mRNA的序列设计、体外转录合成、LNP包封的完整制备平台,免疫结果也显示制备获得的HA mRNA-LNP在小鼠中可以有效地诱导特异性抗体,并显示出良好的中和活性。

针对流感病毒流行株的多样性和复杂性,借助mRNA疫苗平台的通用性,使制备含有多种流行株的mRNA疫苗的路径更为直接。目前季节性流感mRNA疫苗以四价疫苗为主,抗原组成为WHO推荐的H1N1亚型、H3N2亚型和2种乙型流感病毒株的HA,如Moderna公司的mRNA-1010疫苗即编码WHO推荐的用于南半球预防流感的4种流感病毒株的HA蛋白。最近公布的Ⅲ期临床试验^[16]中期分析显示,相对于传统灭活疫苗,mRNA-1010疫苗能够有效诱导针对H1N1亚型和H3N2亚型的抗体,但针对2种乙型流感病毒的效果均弱于现有疫苗。此外全球有多个流感mRNA疫苗临床试验在同时开展。Pfizer于2022年9月在美国开展的修饰核酸流感mRNA疫苗Ⅲ期临床试验,目前还未公布相关数据。2023年6月Sanofi通过媒体报道其流感mRNA疫苗临床试验观察到与Moderna类似的结果,即只能诱导出针对甲型流感病毒的抗体^[17]。CureVac和GSK合作研发的流感病毒mRNA修饰核酸疫苗于2023年第4季度开展了Ⅱ期临床试验^[18]。美国国家卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)也于2023年5月开展了Ⅰ期临床试

验,用于测试通用型流感病毒mRNA疫苗^[19]。在本研究中,我们初步建立了基于M15-HA的mRNA-LNP疫苗,理化分析结果显示出良好的均一性,同时在细胞中可以有效表达。2次免疫小鼠后,4种剂量的mRNA疫苗均能够诱导较高水平的HA特异性抗体的产生,并具有较好的中和活性。比较4种免疫剂量,在第2次免疫后可以发现虽然HA特异性抗体的水平相当,但是其中和活性随着接种剂量的减少而降低,特别是在第2次免疫4周后抗体中和活性下降更为明显。其中的原因在于不同免疫剂量的mRNA可能在体内翻译后产生的抗原水平不同,进而所诱导产生的具有中和活性的抗体水平也不相同。因此,如果需要维持高水平的中和抗体活性,需采用高剂量的mRNA免疫,或在低剂量组中采用多次加强免疫的策略。

为此,我们在研究中还初步分析了完成2次低剂量(1 μg)mRNA-LNP疫苗接种后,进行异源蛋白疫苗(10 μg HA蛋白)或同源mRNA疫苗(1 μg)加强免疫后的免疫反应性和中和活性的比较。事实上,新冠病毒疫苗的临床研究^[20]发现,相比BNT162b2 mRNA疫苗同源加强免疫,S-268019-b刺突蛋白疫苗异源加强免疫产生的与刺突蛋白受体结合域(receptor-binding domain, RBD)结合的IgG维持时间更长。人群研究^[21-22]也发现,对mRNA疫苗、病毒载体疫苗或灭活新冠病毒疫苗采用异源初免-加强策略比同源加强免疫,能诱导出更强的免疫反应。在流感疫苗领域,PR8 HA mRNA(influenza virus A/Puerto-Rico/8/34病毒株)疫苗动物实验^[23]结果显示,免疫顺序也会影响疫苗诱导的体液反应强度,与HA蛋白初免+HA mRNA疫苗加强免疫相比,HA mRNA疫苗初免+HA蛋白加强免疫可诱导更高滴度的IgG2a;在对小鼠进行PR8病毒攻毒实验后,不同免疫顺序所诱导的CD4⁺或CD8⁺T细胞产生的细胞因子水平也不同。因此,通过设计更优的异源疫苗接种策略提高疫苗的免疫应答的有效性和长效性,也具有重要的现实意义。在我们的研究结果中,2次低剂量的M15-HA mRNA疫苗免疫后,进行同源mRNA疫苗和异源HA蛋白疫苗接种2周后,均能诱导产生更高水平的HA特异性抗体,并在4周后仍然维持在较高的水平;表明低剂量的HA mRNA疫苗接种后,可以通过低剂量的mRNA疫苗或蛋白疫苗加强免疫提高疫苗接种的有效性。虽然在我们的研究结果中,未

能观察到2种加强免疫策略的显著差异,这可能与我们初次接种 mRNA 疫苗的量 and 加强免疫用的抗原的量的配比尚未优化有关;也提示在进行异源加强免疫策略的实验设计中,需要设计更多的实验组别,在获得最低疫苗使用量后,再确定加强策略的最佳免疫效果。而已有报道^[24-27]发现,蛋白亚单位疫苗在获得理想的免疫效果的同时,可降低多次使用 mRNA 疫苗所诱导的不良反应,提示 mRNA 疫苗+蛋白疫苗的综合免疫策略的建立,有可能是未来疫苗接种策略研究方向之一。

综上所述,本研究成功建立了修饰核酸 mRNA 疫苗制备平台,并根据 WHO 推荐的来自于 H1N1 的 HA 抗原为靶抗原,制备了单价 M15-HA mRNA LNP 疫苗;该疫苗接种小鼠后显示出较好的免疫原性和血凝抑制活性。对低剂量的 mRNA 疫苗接种组进行 mRNA 疫苗和蛋白疫苗的加强免疫可以诱导更高水平的免疫反应。后续我们将进一步构建针对 WHO 推荐的北半球流行流感病毒株的多价 mRNA 疫苗,设计异源疫苗接种策略,为 mRNA 流感疫苗的转化研究提供重要的前期基础。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院科学伦理委员会的审核批准(文件号 JUMC2023-021-A)。所有实验过程均遵照《上海交通大学医学院实验动物管理制度/标准操作规程》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Science Ethics Committee of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. JUMC2023-021-A), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Experimental Animal Management Regulation/Standard Operating Procedure*.

作者贡献/Authors' Contributions

王颖负责实验设计;王颖、沈海浅负责论文的写作和修改;沈海浅、俞康莹负责实验操作;陈颖盈、季萍提供技术支持。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by WANG Ying. WANG Ying and SHEN Haiqian wrote and revised the manuscript. SHEN Haiqian and YU Kangying performed the experiment. CHEN Yingying and JI Ping provided technical support. All the authors have read the manuscript and consented for the submission.

- Received: 2023-08-21
- Accepted: 2023-10-19
- Published online: 2023-11-28

参·考·文·献

- [1] PAGET J, TAYLOR R J, et al. Estimates of mortality associated with seasonal influenza for the European Union from the GLaMOR project[J]. *Vaccine*, 2022, 40(9): 1361-1369.
- [2] PAULES C I, SULLIVAN S G, SUBBARAO K, et al. Chasing seasonal influenza: the need for a universal influenza vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(1): 7-9.
- [3] MATHIEU E, RITCHIE H, ORTIZ-OSPINA E, et al. A global database of COVID-19 vaccinations[J]. *Nat Hum Behav*, 2021, 5(7): 947-953.
- [4] POLACK F P, THOMAS S J, KITCHIN N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [5] LAU J J, CHENG S M S, LEUNG K, et al. Real-world COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron BA.2 variant in a SARS-CoV-2 infection-naive population[J]. *Nat Med*, 2023, 29(2): 348-357.
- [6] NORDSTRÖM P, BALLIN M, NORDSTRÖM A. Effectiveness of heterologous ChAdOx1 nCoV-19 and mRNA prime-boost vaccination against symptomatic Covid-19 infection in Sweden: a nationwide cohort study[J]. *Lancet Reg Health Eur*, 2021, 11: 100249.
- [7] AI J W, ZHANG H C, ZHANG Q R, et al. Recombinant protein subunit vaccine booster following two-dose inactivated vaccines dramatically enhanced anti-RBD responses and neutralizing titers against SARS-CoV-2 and Variants of Concern[J]. *Cell Res*, 2022, 32(1): 103-106.
- [8] HEKELE A, BERTHOLET S, ARCHER J, et al. Rapidly produced SAM[®] vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2(8): e52.
- [9] VOGEL A B, LAMBERT L, KINNEAR E, et al. Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 446-455.
- [10] AREVALO C P, BOLTON M J, LE SAGE V, et al. A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 899-904.
- [11] LEUNG A K K, HAFEZ I M, BAOUKINA S, et al. Lipid nanoparticles containing siRNA synthesized by microfluidic mixing exhibit an electron-dense nanostructured core[J]. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, 2012, 116(34): 18440-18450.
- [12] SCHOENMAKER L, WITZIGMANN D, KULKARNI J A, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability[J]. *Int J Pharm*, 2021, 601: 120586.
- [13] BADEN L R, EL SAHLY H M, ESSINK B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(5): 403-416.
- [14] LIU X Q, LI Y H, WANG Z F, et al. Safety and superior immunogenicity of heterologous boosting with an RBD-based SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Chinese adults[J]. *Cell Res*, 2022, 32(8): 777-780.

- [15] GUI Y Z, CAO Y, HE J J, et al. Safety and immunogenicity of a modified COVID-19 mRNA vaccine, SYS6006, as a fourth-dose booster following three doses of inactivated vaccines in healthy adults: an open-labeled Phase 1 trial[J]. *Life Metab*, 2023, 2(3): load019.
- [16] Moderna announces interim phase 3 safety and immunogenicity results for mRNA-1010, a seasonal influenza vaccine candidate [EB/OL]. (2023-02-16)[2023-10-10]. <https://news.modernatx.com/news/news-details/2023/Moderna-Announces-Interim-Phase-3-Safety-and-Immunogenicity-Results-for-mRNA-1010-a-Seasonal-Influenza-Vaccine-Candidate/default.aspx>.
- [17] BURGER L. Sanofi says it's back to the drawing board on mRNA flu vaccines[EB/OL]. (2023-06-29) [2023-10-10]. <https://www.nasdaq.com/articles/sanofi-says-its-back-to-the-drawing-board-on-mrna-flu-vaccines>.
- [18] CureVac advances seasonal flu study to phase 2 in collaboration with GSK following selection of promising mRNA vaccine candidate with broad coverage[EB/OL]. (2023-09-12) [2023-10-10]. <https://www.curevac.com/en/curevac-advances-seasonal-flu-study-to-phase-2-in-collaboration-with-gsk-following-selection-of-promising-mrna-vaccine-candidate-with-broad-coverage/>.
- [19] Clinical trial of mRNA universal influenza vaccine candidate begins [EB/OL]. (2023-09-12) [2023-10-10]. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/clinical-trial-mrna-universal-influenza-vaccine-candidate-begins>.
- [20] TAKANO T, SATO T, KOTAKI R, et al. Heterologous SARS-CoV-2 spike protein booster elicits durable and broad antibody responses against the receptor-binding domain[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1451.
- [21] CLEMENS S A C, WECKX L, CLEMENS R, et al. Heterologous versus homologous COVID-19 booster vaccination in previous recipients of two doses of CoronaVac COVID-19 vaccine in Brazil (RHH-001): a phase 4, non-inferiority, single blind, randomised study[J]. *Lancet*, 2022, 399(10324): 521-529.
- [22] ATMAR R L, LYKE K E, DEMING M E, et al. Homologous and heterologous covid-19 booster vaccinations[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(11): 1046-1057.
- [23] PARK H J, BANG Y J, KWON S P, et al. Analyzing immune responses to varied mRNA and protein vaccine sequences[J]. *NPJ Vaccines*, 2023, 8(1): 84.
- [24] AL KHAMES AGA Q A, ALKHAFFAF W H, HATEM T H, et al. Safety of COVID-19 vaccines[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(12): 6588-6594.
- [25] HOSSEINI R, ASKARI N. A review of neurological side effects of COVID-19 vaccination[J]. *Eur J Med Res*, 2023, 28(1): 102.
- [26] FRAIMAN J, ERVITI J, JONES M, et al. Serious adverse events of special interest following mRNA COVID-19 vaccination in randomized trials in adults[J]. *Vaccine*, 2022, 40(40): 5798-5805.
- [27] SHINKAI M, SONOYAMA T, KAMITANI A, et al. Immunogenicity and safety of booster dose of S-268019-b or BNT162b2 in Japanese participants: an interim report of phase 2/3, randomized, observer-blinded, noninferiority study[J]. *Vaccine*, 2022, 40(32): 4328-4333.

[本文编辑] 瞿麟平

学术快讯

上海市免疫学研究所邹强课题组等揭示膳食果糖增强肿瘤免疫应答的机制

2023年10月19日,上海交通大学医学院上海市免疫学研究所邹强研究团队等在*Cell Metabolism*杂志在线发表了题为*Dietary fructose-mediated adipocyte metabolism drives antitumor CD8⁺ T cell responses*的研究论文。该研究揭示了一条免疫内分泌通路,即果糖—脂肪细胞—瘦素—CD8⁺T细胞轴,描述了膳食果糖在塑造脂肪细胞代谢以启动抗肿瘤CD8⁺T细胞反应中的关键作用,提示该免疫内分泌通路在探索癌症免疫治疗方案中可能有重要意义。