

禽流感疫苗研究进展

王卫华^{1,2,3}, 平继辉¹, 梅梅^{2,3,4*}

- (1.南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210014;
2.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏南京 210014;
3.江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014;
4.江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009)

摘要:禽流感是由禽流感病毒引起的一种传染性强、危害呼吸系统的人兽共患病, 给我国家禽养殖业和公共卫生造成严重威胁。目前, 免疫接种是我国防控禽流感的主要措施, 其中灭活疫苗应用较为普遍。随着基因工程技术如DNA重组技术、反向遗传学技术及基因编辑技术的发展, 禽流感疫苗的研发逐渐从传统的灭活疫苗和弱毒活疫苗向基因工程疫苗过渡。禽流感病毒易发生抗原漂移和抗原转变, 针对流行现状进一步更新疫苗株和开发更有效的疫苗对禽流感的防控至关重要。通用型禽流感疫苗能够对多种亚型或亚型内多个分支的禽流感病毒提供更广泛的保护, 开发能够提供交叉保护的通用型流感病毒成为大势所趋。文章对禽流感灭活疫苗、减毒活疫苗、重组活载体疫苗、基因工程亚单位疫苗、核酸疫苗和通用型疫苗的研究进展进行阐述, 为禽流感疫苗研发提供借鉴。

关键词:禽流感; 疫苗; 通用型禽流感疫苗

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-6364(2022)07-105-09

Research Progress of Avian Influenza Vaccine

WANG Weihua^{1,2,3}, PING Jihui¹, MEI Mei^{2,3,4*}

- (1.College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210014;
2.Institute of Veterinary Immunology Engineering,
Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014;
3.National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals,
Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014;
4.Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of
Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract: Avian influenza is highly contagious zoonotic disease caused by avian influenza virus, which seriously threatens poultry industry and public health. At present, immunization is the main measure for prevention and control of avian influenza in China, and inactivated vaccines are more commonly used. With the development of genetic engineering technologies such as DNA recombination, reverse genetics, and gene editing technologies, the research and development of avian influenza vaccines has gradually transitioned from traditional inactivated vaccines and attenuated live vaccines to genetic engineering vaccines. Avi-

投稿日期: 2021-12-17; 修回日期: 2022-03-21

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金(CX(21)3141)

作者简介: 王卫华(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物病毒学与免疫学, E-mail: 1299856568@qq.com

*通讯作者: 梅梅(1982-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事动物病毒学及免疫学研究, E-mail: jacqui18@163.com

an influenza virus is prone to antigenic drift and antigenic shifts. Therefore, further update of vaccine strains and development of more effective vaccines are critical to prevention and control of avian influenza. Universal avian influenza vaccines can provide broader protection against multiple subtypes or subtypes of avian influenza viruses, so it has become a general trend to develop universal influenza viruses that can provide cross protection. The research progress of avian influenza inactivated vaccines, live attenuated vaccines, recombinant live vector vaccines, genetically engineered subunit vaccines, nucleic acid vaccines and universal avian influenza vaccines were briefly expounded, which would provide reference for production and development of avian influenza vaccines.

Key words: avian influenza; vaccine; universal avian influenza vaccine

禽流感(Avian influenza, AI)是由正黏病毒科甲型流感病毒属的禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的一种危害呼吸系统的人兽共患病。根据病毒致病力的差异, AI分为高致病性禽流感(High pathogenic avian influenza, HPAI)和低致病性禽流感(Low pathogenic avian influenza, LPAI)。AIV为单股负链RNA病毒,其基因组由8个单股负链RNA分子组成,共编码10种蛋白,包括糖蛋白血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)、2个基质蛋白(M1、M2)、3个聚合酶蛋白(PB1、PB2、PA)、核蛋白(NP)和2个非结构蛋白(NS1、NS2)^[1]。AIV可根据其表面蛋白HA和NA的抗原性进一步分类,共有18个HA亚型和11个NA亚型^[2]。HA是AIV主要的表面蛋白,是一种同源三聚体表面糖蛋白,可刺激机体产生中和抗体,是研发新型AI疫苗的重要靶标蛋白^[3]。

我国将HPAI列为一类动物疫病,并强制实行免疫接种政策。HPAI主要是由高致病性H5和H7亚型AIV感染引发,可导致高发病率和死亡率高,其中H5N1亚型和H7N9亚型AI备受关注^[4]。1959年,首次在英国英格兰地区具有临床症状的鸡群中发现H5N1亚型AIV,1996年我国广州首次分离到H5N1亚型AIV^[5]。H5亚型AIV在全球范围的野鸟中普遍存在,并在60多个国家和地区引发了AI疫情。H5亚型AIV的HA基因进化形成不同的分支,其中先后在我国流行的主要分支有2.3.2、2.3.4和7.2分支,目前,通过疫苗免疫的方法大幅降低了2.3.2和7.2分支H5亚型AIV在家禽中的分离率。H7N9亚型AIV在2013年暴发,导致1500多人感染,600多人死亡,并在2017年达到疫情最高峰^[6]。

LPAI主要由H9亚型AIV感染引发,1994年在我国广东省鸡群体内首次发现H9N2亚型AIV,随后在我国大部分地区传播流行^[7]。H9亚型AIV

感染可禽类后可导致产蛋率降低,引起免疫抑制从而易混合感染多种病原如新城疫病毒和大肠杆菌等,加重发病率和死亡率,影响养禽业的健康发展^[7]。不同亚型的AIV在宿主体内易发生基因重组,其中H9N2亚型AIV在基因重组中扮演重要角色,H9亚型AIV和不同亚型AIV之间的动态重组形成新型AIV(H5N6、H5N8、H7N9、H10N3等)给公共卫生和病毒净化带来威胁^[9]。近年来,H9亚型AIV不断变异进化,已经获得了感染哺乳动物的嗜性,越来越多的H9亚型AIV跨越物种障碍传播感染人类的报道引起了广泛的关注^[10]。

免疫接种是AI防控中最重要的生物安全措施,灭活疫苗应用最普遍。但是,随着AIV的不断变异进化,疫苗株与当前流行株匹配度不高,灭活疫苗不能提供广泛的保护力^[11,12],目前,基因工程疫苗如重组活载体疫苗、DNA疫苗和亚单位疫苗等在AI疫苗研发中占据主流地位^[13]。因此,针对流行现状进一步更新疫苗株和开发更有效的疫苗是至关重要的。本文对AI灭活疫苗、减毒活疫苗、重组活载体疫苗、基因工程亚单位疫苗、核酸疫苗以及通用型AI疫苗的研究进展进行简要阐述,旨在为AI疫苗研发提供参考。

1 灭活疫苗

自20世纪40年代第一个在鸡胚中开发出全病毒灭活疫苗以来,灭活疫苗的生产方法不断改进。AI灭活疫苗的应用有效控制了疫情,但AI灭活疫苗免疫周期短,需多次接种;AIV基因不断发生变异,灭活疫苗不能提供广泛保护力,导致免疫失败的现象时常发生^[14]。

目前,灭活疫苗主要是通过反向遗传学的方法来制备。通过反向遗传学技术构建的疫苗候选株的骨架通常源自A/Puerto Rico/8/34(H1N1, PR8),在其中加入流行株的表面抗原HA和NA基因后进一步拯救病毒而获得^[15]。由于抗原变异较大,疫

苗候选株需不断更新以匹配流行株。国家禽流感参考实验室采用反向遗传学技术研发了新型H5/H7禽流感二价灭活疫苗,该疫苗在2017年应用后使H7N9亚型AIV得到有效控制^[16]。当前,针对HPAI,我国家禽中使用的疫苗主要为重组禽流感病毒(H5+H7)三价灭活疫苗(H5N1 Re-13株+Re-14株,H7N9 H7-Re4株)。

LPAI中,H9N2亚型AI流行较为普遍,对养殖业以及公共卫生威胁较大。目前,我国针对H9亚型AIV的防控主要以接种灭活疫苗为主,商品化灭活疫苗以联苗为主,如新流二联苗、新支流三联苗和新支减流四联苗等^[17]。用于生产H9亚型AI灭活疫苗的毒株主要有WD株(哈尔滨维科生物技术有限公司)、Re-9株(普莱柯生物工程股份有限公司)、HP株(天津瑞普生物技术股份有限公司)、HL株(北京华都诗华生物制品有限公司)、HN106株(山东华宏生物工程有限公司)、JD株(北京华夏兴洋生物科技有限公司)、L株(扬州优邦生物药品有限公司)等。在临床实践中,联苗的应用极大程度上减少禽类的应激反应与免疫次数,接种一针可预防多种禽类疾病,是目前疫苗的发展趋势。

目前,在细胞方面用于AI灭活疫苗制备的主要有MDCK和Vero细胞系。其中,MDCK细胞系因能快速高效繁殖多种AIV疫苗株而更具优势^[18]。张家有等^[19]将MDCK细胞作为基质制备H5N1亚型AI疫苗,研究发现,细胞源AI灭活疫苗的免疫原性和安全性不低于鸡胚源AI疫苗。刘艳晶等^[20]对细胞源重组AIV(H5+H7)三价灭活苗(H5N1 Re-11株+Re-12株,H7N9 H7-Re3株)进行免疫效力研究,在HPAI攻毒保护试验中,所有免疫鸡均能获得完全保护,试验结果显示,与鸡胚源疫苗相比,细胞源疫苗同样具有良好的安全性和免疫效果。然而,单细胞层的培养方法导致细胞的增殖受到限制,难以实现大规模培养,使得生产时间和成本大幅增加,无血清悬浮培养MDCK细胞可有效降低生产成本,扩大生产规模。赖汉漳等^[21]将贴壁的MDCK细胞用无血清培养法方瓶驯化3代,摇瓶驯化13代最终获得一株适应无血清悬浮培养的MDCK(DHN)细胞系,在此基础上,将H9亚型AIV CN株鸡胚毒在悬浮MDCK(DHN)细胞中连续驯化9代,获得一株在悬浮细胞中能

够稳定高效复制的CN株细胞毒,且该CN株细胞毒在抗原性和免疫原性等特性上与CN株鸡胚毒并无差异,适合作为H9亚型AIV细胞源疫苗候选株。同时,MDCK细胞基质流感疫苗也存在不足,如细胞系难以优化、佐剂选择困难、宿主DNA干扰及蛋白残留等问题^[22]。

2 减毒活疫苗

减毒活疫苗是通过筛选和人工传代致弱的方式而获得的毒株所制备的疫苗,能够有效诱导机体产生广泛的机体免疫应答,但安全性不高^[23]。通过滴鼻进行免疫时,如同自然感染AIV,在激发禽类黏膜免疫应答的同时能够诱发体液免疫和细胞免疫,进而使禽类获得广泛保护力。

在20世纪60年代,研究者通过低温条件下在鸡胚中连续传代的方式来致弱AIV,成功制备了冷适应、温度敏感的毒株^[24]。由于冷适应、温度敏感的AIV在较低温度下具有良好的复制能力,所以,病毒在上呼吸道的复制能力优于野毒株。因此,冷适应减毒毒株被进一步发展成为减毒活疫苗的供体病毒^[25,26]。目前,主要采用反向遗传学方法将AIV的HA和NA基因插入到减毒的、冷适应的、温度敏感的病毒骨架上,进而制备用于鼻内使用的减毒活疫苗。Wei等^[27]将H9N2亚型AIV经SPF鸡胚不断地传代降温,成功获得了H9N2亚型冷适应AI疫苗候选株(SD/01/10-ca),滴鼻免疫SPF鸡,能够诱导较高水平的HI抗体和细胞免疫应答,对H9N2亚型AIV提供一定的交叉抵抗力。

NS1是一种非结构蛋白,起干扰素拮抗剂的作用,NS1的缺失或截短已被证明可导致病毒复制能力显著减弱。查夕馨等^[28]以H9N2亚型AIV的冷适应株TX-25-CE₃₀作为骨架,以母本株TX的HA和NA基因替换对应基因,并采用NS1基因缺失的片段替换原有NS基因,成功拯救出冷适应联合NS1基因缺失的双重致弱毒株rTXca-HA-NA-NS₇₃,rTXca-HA-NA-NS₇₃免疫SPF鸡后可诱导鸡产生较高水平的HI抗体。以母本株rTX攻毒,rTXca-HA-NA-NS₇₃可提供90%喉头排毒保护,100%泄殖腔排毒保护。以抗原性差异大的YZ-C毒株攻毒,rTXca-HA-NA-NS₇₃不能有效阻止喉头排毒,但能显著降低泄殖腔排毒率。

部分学者通过对AIV包装信号的修饰来开发减毒活疫苗,通过对AIV包装信号的修饰可降低

AIV与其他野毒株发生重组的概率^[29]。这些减毒方法为AI减毒活疫苗的研发开拓了思路。

3 重组活载体疫苗

重组活载体疫苗是将编码免疫原蛋白的基因插入细菌或病毒载体而构建的。将多个不同病原的抗原基因插入载体中并能同时进行表达,可达到预防多种疾病的目的^[30]。虽然,基因工程活载体疫苗具有较多优势,但病毒载体依然具有毒力,且活载体疫苗对保存和运输条件要求较高。目前,常用于制备AI重组活载体疫苗病毒载体主要包括火鸡疱疹病毒(Herpes Turkey virus, HVT)、新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)和鸭瘟病毒(Duck enteritis virus, DEV)等。

3.1 HVT活载体疫苗

HVT是一种非致病性甲型疱疹病毒,基因组庞大,可插入多个外源基因,是一种高效的病毒载体。HVT不会引起动物发病,安全性好;可刺激机体产生较高的抗体水平;可诱导持续时间较长的细胞免疫应答^[31]。Chang等^[32]利用HDR-CRISPR/Cas9技术将H7N9亚型AIV的HA基因插入HVT基因组的UL45和UL46之间,成功构建重组HVT-H7HA候选疫苗株。另外,开发多价HVT载体疫苗能够同时产生针对多种禽类病原体的保护作用,具有巨大的应用价值。Tang等^[33]将传染性喉气管炎病毒(ILTV)gD-gI基因和H9N2亚型AIV HA基因插入到重组HVT-IBDV VP2病毒基因组的不同位置,成功构建了HVT-VP2-gDgI-HA三重插入重组HVT重组疫苗候选株,可同时预防除马立克氏病以外的3种主要禽类病毒病,是防控主要禽病的一项重大创新。

3.2 NDV活载体疫苗

NDV属于副黏病毒科,为单股负链RNA病毒。NDV作为疫苗载体具有很大优势:NDV基因组仅含有6个必需基因和2个辅助基因,易于进行反向遗传操作;通过呼吸道感染可刺激局部黏膜免疫;NDV不与宿主基因组整合,安全性较好。Xu等^[34]以NDV rmNA-1株基因组为骨架,成功构建了3株重组病毒,分别命名为rmNA-H9、rmNA-H9F、rmNA-H9(ECTO)。rmNA-H9表达编码HA的开放阅读框;rmNA-H9F表达与NDV F蛋白的跨膜区和细胞质尾区融合的HA的胞外区;rmNA-H9(ECTO)表达与短GS接头和GCN4序列融

合的HA的胞外区。将3个重组病毒制备的疫苗分别免疫SPF鸡,均可诱导产生NDV和H9亚型AIV的特异性抗体,并能保护鸡免受致死量NDV或H9亚型AIV的攻击,其中,rmNA-H9F疫苗组在攻毒后7d未见排毒,H9亚型AIV的抗体效价均高于其他组。此外,与商品疫苗相比,rmNA-H9F加强免疫可诱导产生更高水平的抗体。因此,重组rmNA-H9F是一种具有前景的新城疫和H9亚型AI候选疫苗。

王杨杨^[35]以嵌合NDV AI4-2FHN株基因组为骨架,在NDV基因组P和M基因之间插入不同修饰的H9N2亚型AIV HA基因,构建了5株重组病毒,免疫SPF鸡后均能有效诱导产生H9亚型AIV特异性抗体,攻毒后可显著减少排毒。其中,在P和M基因之间插入HA基因的胞外区而构建的重组病毒AI4-2FHN-HAG免疫商品鸡后1周,再加强免疫H9亚型AI灭活疫苗,诱导产生特异性抗体的速度最快。重组弱毒疫苗配合灭活疫苗的免疫方式能显著提高鸡群H9亚型AIV特异性抗体产生的速度,并能减少排毒量,为AI疫苗的免疫方式提供了新思路。

3.3 重组DEV活载体疫苗

鸭瘟和AI是危害养鸭业发展重要的病毒病。水禽是AIV的储存宿主,大多数鸭在感染AIV后不发病不死亡,但可向环境中释放大量病毒粒子。鸭H5亚型AI疫苗免疫覆盖率低,活禽市场大多数未出现临床症状的健康鸭中仍可以检出H5亚型AIV^[36]。这些未免疫的隐形带毒鸭为AIV的变异和流行提供条件,因此,提高鸭AI疫苗免疫覆盖率对有效控制H5亚型AI具有重要意义。Liu等^[37]、Chen等^[38]将2.3.4分支病毒A/duck/Anhui/1/2006(H5N1)的HA基因插入DEV疫苗株的US7和US8基因之间,成功制备rDEVus78HA, rDEVus78HA免疫SPF鸭后可完全保护鸭抵抗DEV和H5N1亚型AIV的攻击。王波等^[39]将H5亚型AIV 2.3.2.1d分支代表毒株CK/LN/SD007的HA基因插入DEV基因组中,成功构建表达H5亚型AIV HA基因的重组DEV(rDEV H5-12),免疫SPF鸭后2周能提供针对DEV强毒和AIV(CK/LN/SD007)攻击的完全保护,并且免疫鸭在观察期内无排毒、无死亡,因此rDEV H5-12可作为防控H5亚型AI和鸭瘟的二联活疫苗候选株。

4 基因工程亚单位疫苗

基因工程亚单位疫苗是通过多种表达系统表达保护性抗原基因,并将表达产物加入佐剂制备的疫苗,具有较高的安全性。病毒样颗粒(Virus like particles, VLPs)疫苗是亚单位疫苗中的一种,是由一个或几个病毒的结构蛋白组装形成的颗粒,其形态类似于病毒但无核酸和感染性。研究表明,AI VLPs疫苗在没有佐剂的情况下,可以在颗粒表面以真实构象呈现病毒抗原,能够很好地激发机体的体液免疫和细胞免疫^[40]。常用于AI亚单位疫苗生产的表达系统主要为真核表达系统,真核表达系统主要包括酵母细胞表达系统、杆状病毒表达系统和哺乳动物细胞表达系统。

毕赤巴斯德酵母表达系统近年来被广泛应用,可对蛋白质进行翻译后加工,AOX强启动子可以使得外源基因表达量大幅度提高,且性质更加稳定^[41]。Liu等^[42]采用重组毕赤酵母系统表达了A/Hangzhou/1/2013(H7N9)的全长重组H7蛋白(rH7),rH7蛋白经过复杂的糖基化修饰,聚合成直径为30~50 nm的纳米颗粒,1.9 μg rH7免疫小鼠可诱导>1:40血凝抑制效价,3.75 μg rH7对鼠肺适应株A/Shanghai/2/2013(H7N9)10倍50%致死量攻毒的小鼠免疫保护率为100%。但是,毕赤酵母表达系统也存在一些缺点,如生长周期较长、操作较复杂、表达的蛋白可能存在过度糖基化等^[43]。

哺乳动物细胞表达系统表达的外源蛋白更接近于天然状态,可对外源蛋白进行复杂修饰。Buffin等^[44]利用瞬时转染技术,将含有HA、NA和M1蛋白的流感病毒的VLPs分别在CHO-K1、Vero和293T细胞中表达,在生物反应器中生产和纯化后的VLPs在抗原呈递和生物学特性方面都非常接近病毒。但是,哺乳动物细胞表达系统蛋白表达量低,细胞株不稳定,生产成本极高^[45]。

目前,杆状病毒表达系统被广泛应用于重组蛋白的表达,以制备疫苗。杆状病毒表达系统可以高效表达外源蛋白,表达能力强,且对外源蛋白有适当的翻译后修饰,使得表达产物具有很好的生物学活性^[46]。Luckow等^[47]对苜蓿多核型多角体病毒(AcMNPV)的DNA进行改造,在其基因位点插入大肠杆菌mini-F复制子、卡那霉素抗性和细菌转座子att-Tn7,即发明了“Bac-to-Bac系统”,

在生物技术实验室中,已被广泛用于昆虫细胞的真核基因表达,可实现更高的蛋白产量。昆虫细胞表达系统已被广泛用于生产各种VLPs^[48]。Kang等^[49]利用杆状病毒表达系统开发了在单个载体中表达HPAIV两个HAs(2.3.2.1和2.3.4.4分支的嵌合体)的多价VLPs疫苗,即VLP-ES2/KA435chi,接种多价VLPs的鸡比接种单价疫苗的鸡排毒量显著减少,存活率可达100%,攻毒前体内HI抗体水平可达7.6~8.5 log₂,能够保护鸡抵抗2.3.2.1和2.3.4.4分支的HPAIV。此外,该疫苗生产成本相较于灭活疫苗更低,可成为防控HPAI的候选疫苗。Li等^[50]将H9N2亚型AIV的HA和NA基因克隆至转移载体,利用杆状病毒表达系统共表达HA和NA蛋白,自组装形成VLPs,制备VLPs疫苗免疫21日龄SPF鸡,相较于H9N2亚型AI商品疫苗(A/chicken/Shanghai/F/1998),VLPs疫苗能够诱导更高的HI抗体效价,以10⁶ EID₅₀ H9N2亚型AIV(A/chicken/Shanghai/06/2015)攻毒,VLPs疫苗能够有效阻止排毒。VLPs疫苗是AI疫苗具有极大潜力的研究方向,其中杆状病毒为载体制备的基因工程亚单位疫苗,凭借表达量高和安全高效的特点成为近年的研究热点^[51]。

5 禽流感核酸疫苗

5.1 DNA疫苗

DNA疫苗是一种新型基因工程疫苗,是将AIV的保护性抗原基因插入到表达载体中,构建重组DNA,并以此制备的疫苗。DNA疫苗可刺激机体产生细胞免疫和体液免疫,同时具有免疫效果好,持久性强、制备简便和化学性质稳定的特点。此外,还可以通过突变或其他方式对基因进行编辑,以增强其免疫原性或安全性。

HA是AIV最主要的表面蛋白之一,用于制备AI DNA疫苗效果最好^[52]。Shehata等^[53]将H9N2 A/CK/Egypt/SCU8/2014株HA基因克隆至载体pVAX1-H9和pCR-H9,构建重组质粒免疫鸡,pVAX1-H9和pCR-H9均可保护鸡免受H9N2亚型AIV的攻击。然而,DNA进入细胞的效率较低,免疫原性较低,且在体内易被降解,但通过生物可降解纳米材料解决,不仅可保护抗原蛋白不被降解,而且能促进细胞吸收,增强免疫应答^[54]。Zhao等^[55]将优化的H9N2亚型AIV HA基因片段插入pCAGGS载体,构建了真核表达质粒

pCAGGS-opti441-HA,并用树枝状聚-L-赖氨酸(DGL)包裹,制备了pCAGGS-opti441-HA/DGL,免疫雏鸡可诱导较强的细胞免疫应答,诱导T淋巴细胞活化和增殖以及CD₃⁺CD₄⁺和CD₄⁺/CD₈⁺增加,对H9N2亚型AIV攻击有完全保护作用。

5.2 RNA疫苗

RNA疫苗是将含有编码抗原蛋白的RNA导入动物体内直接进行翻译,形成相应的抗原蛋白,从而诱导机体产生特异性免疫应答,以达到预防作用。RNA疫苗具有许多优势:一是安全性高,无潜在感染风险;二是高效性,翻译效率更高,可通过修饰作用使mRNA更稳定;三是具有快速、成本低、可批量生产的优点。Bahl等^[56]通过将H7N9亚型流感病毒(A/Anhui/1/2013)HA蛋白mRNA进行修饰后制备成mRNA疫苗,该疫苗在小鼠、雪貂和非人灵长类动物中均产生强烈的免疫应答,诱导产生较高水平的HI抗体,单剂量免疫即可保护小鼠免受致命性攻击,并可降低雪貂的肺部病毒滴度。

6 通用型AI疫苗

由于AIV高频率的变异,传统AI疫苗针对不同亚型或同一亚型不同分支的AIV毒株不能提供完全保护。因此,针对流行现状进一步更新疫苗株和开发更有效的疫苗是至关重要的。在通用型AI疫苗的研发中,选择最佳的靶向抗原是最重要的策略之一,以此产生针对不同AIV毒株的广泛保护作用。

HA蛋白是AIV的主要表面蛋白,极易变异,是最具免疫原性的表位,因此是疫苗设计的理想靶点。本实验室通过构建重组HA蛋白共有序列,并通过杆状病毒表达系统表达rHA-VLPs,制备rHA-VLPs亚单位疫苗,免疫效力试验结果显示该疫苗相较于商品化H5亚型AI疫苗,能够诱导更高水平的HI抗体及中和抗体,还能刺激细胞毒性T细胞反应,诱导产生较高水平的IL-4和IFN- γ 细胞因子,能提供针对不同分支H5亚型AIV的广泛抵抗力^[57,58]。马赛克(Mosaic)疫苗是通过针对病毒抗原表位的多变性,设计抗原表位覆盖率高的蛋白序列,以实现易变异的病毒产生广泛保护作用^[59]。近年来,马赛克疫苗制备技术被应用于人类免疫缺陷病毒(HIV)疫苗研发领域,人工合成的mosaic HIV-1 Pol、Env和Gag序列

扩大了细胞免疫的广度,具有广泛的保护性。该技术亦可用于AI疫苗的研发,Kamlangdee等^[60]利用马赛克技术制备了能够产生广泛免疫应答的H5亚型AI候选疫苗MV5-H5M,该疫苗能够刺激小鼠机体产生较强的中和抗体,提供更广泛的细胞和体液免疫应答,可提供针对同亚型(H5N1毒株)和异亚型(H1N1毒株)的AIV广泛抵抗。李丽等^[61]设计、优化合成一条H9亚型AIV mosaic HA基因序列,并利用反向遗传学的方法获得重组病毒rPR8-HAm/H9,制备灭活疫苗免疫SPF鸡,可诱导产生较高水平的中和抗体和HI抗体,对异源H9N2亚型AIV JM0305具有较好的保护作用,攻毒保护率为80%。

HA的茎部蛋白在甲型流感病毒中高度保守,可以诱导交叉保护。目前针对HA茎部的通用流感疫苗主要包括去头HA和嵌合HA。Impagliazzo等^[62]基于H1N1 A/Brisbane/59/2007流感病毒的HA序列设计了稳定的三聚体HA茎部抗原mini-HA,该抗原可引发与H1、H3、H5、H7及H9亚型流感病毒HA高度结合的抗体,并可对抗同型或异型H5亚型流感病毒的攻击。通过使用不同头部区域但具有相同茎部结构域的嵌合HA疫苗进行接种,将免疫应答集中于茎部区域,可增强针对保守茎部区域的免疫应答^[63]。Liao等^[64]利用最常见的H5亚型AIV和H1亚型流感病毒的共同序列构建了各种嵌合形式,其中以H5共有序列为球形头部,H1共有序列为茎部的嵌合HA疫苗最具前景,可诱导产生广泛的CD₄和CD₈T细胞反应,并对H1、H3、H5和H7亚型流感毒株提供更强的抵抗力。基于HA茎部通用疫苗的缺点之一在于HA茎部表位部分隐蔽,导致对HA茎部抗体的诱导受限制^[65]。

M2e特异性抗体不能中和病毒,但可以刺激巨噬细胞,使其吞噬与抗体结合的流感病毒。M2e短肽N端的8个氨基酸残基在不同亚型的甲型流感病毒中都未发生变异,在甲型流感病毒中高度保守。由于M2e仅含24个氨基酸,免疫原性较弱,为了提高其免疫原性和稳定性,在研究中常将M2e和载体蛋白,如乙肝核心蛋白(Hepatitis B virus core protein, HBc)或新型佐剂等融合表达应用于疫苗研制。

NP是AIV的核蛋白,高度保守,可诱导产生

可针对同种亚型以及不同亚型毒株的交叉免疫反应。研究发现,人类免疫缺陷病毒1型的蛋白转导结构域TAT蛋白在加入外源蛋白后能够介导多种外源蛋白进入细胞。Yin等^[66]在大肠杆菌中高效表达了重组蛋白TAT-NP,纯化后可作为流

感疫苗的候选抗原,制备的疫苗鼻腔免疫试验结果表明,TAT-NP免疫小鼠不仅能诱导体液免疫产生较高水平的IgG和IgA,还能诱导较强的细胞免疫,并能够保护小鼠免受异亚型(H3N2和H9N2)流感病毒的致死量攻击。

表1 AI疫苗分类

疫苗类型	疫苗名称	引用文献
灭活疫苗	(H5+H7)三价灭活疫苗(H5N1 Re-13株+Re-14株,H7N9 H7-Re4株);细胞源重组AIV(H5+H7)三价灭活疫苗(H5N1 Re-11株+Re-12株,H7N9 H7-Re3株);H9亚型禽流感灭活苗(WD株、Re-9株、HP株、HL株、HN106株、JD株、L株等)	[20,67]
减毒活疫苗	H9N2亚型冷适应禽流感疫苗候选株(SD/01/10-ca);冷适应联合NS1基因缺失的双重致弱毒株rTX _{ca} -HA-NA-NS ₁ ;互换HA和NS1基因包装信号的H9N2亚型AIV减毒活疫苗rTX-NS1-128(mut)	[27-29]
重组活载体疫苗	H7亚型禽流感重组火鸡疱疹病毒活载体疫苗HVT-H7HA;H5亚型禽流感重组鸭瘟病毒活载体疫苗rDEV-H5-12;H9亚型禽流感重组新城疫活载体疫苗A14-2FH-HAG;H9亚型禽流感重组火鸡疱疹病毒活载体疫苗HVT-VP2-gDgI-HA	[32, 33, 35, 38, 39]
基因工程亚单位疫苗	高致病性禽流感多价VLPs疫苗VLP-ES2/KA435chi	[49]
核酸疫苗	H9N2禽流感病毒DNA疫苗pCAGGS-opti441-HA/DGL;H7N9 RNA疫苗	[55, 56]
通用型禽流感疫苗	通用型H5亚型禽流感亚单位疫苗;通用型H9亚型禽流感灭活疫苗(rPR8-HAm/H9);TAT-NP疫苗	[58, 61,66]

7 展望

AI是一种传染性强,危害呼吸系统的人兽共患病,严重影响养禽业的健康发展,并给公共卫生和人类健康带来威胁。免疫接种是我国AI防控中最重要的生物安全措施,灭活疫苗应用最普遍。由于AIV的不断变异进化,疫苗株与流行株的匹配度不高,灭活疫苗不能提供广泛的保护力。随着生物技术的不断更新发展,多种新型流感疫苗不断出现(见表1),目前AI疫苗研究方向主要集中在基因工程疫苗。据研究发现,使用与当地流行株匹配度低的疫苗株可能会对AIV的变异进化有促进作用^[68]。为了更好地防控AIV,一方面可以通过不断筛选流行株、研制具有广谱保护性的AI疫苗、开发新型佐剂等,提高免疫效果;另一方面,加强对AIV的监测,提高生物安全防控措施,从而保障养禽业的发展和公共卫生的安全。

参考文献:

[1] 李素华,季佳,李钰萍,等.基于NCBI数据库的禽源H5N2 AIV的HA基因进化分析[J].中国家禽,2021,43(2):32-36.
 [2] KRAMMER F, SMITH G, FOUCHIER R, et al. Influenza [J]. Nature reviews disease primers, 2018, 4(1):3.
 [3] DAS D, GOVINDAN R, NIKIC-SPIEGEL I, et al. Direct visualization of the conformational dynamics of single influenza hemagglutinin trimers [J]. Cell, 2018, 174(4):937.
 [4] SHI J, DENG G, KONG H, et al. H7N9 virulent mutants detected in chickens in China pose an increased threat to humans [J]. Cell research, 2017, 27(12):1409-1421.
 [5] 唐秀英,田国斌,赵传删,等.中国禽流感流行株的分离鉴定[J].中国畜禽传染病,1998(1):2-6.

[6] YANG Y, WONG G, YANG L, et al. Comparison between human infections caused by highly and low pathogenic H7N9 avian influenza viruses in Wave Five: clinical and virological findings [J]. The journal of infection, 2019, 78(3):241-248.
 [7] SUN Y, LIU J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern [J]. Protein & cell, 2015, 6(1):18-25.
 [8] 胡馨允. H9N2亚型禽流感流行趋势与预防概述 [J]. 北方牧业, 2022(1):25.
 [9] SAMY A, NAGUIB M. Avian respiratory coinfection and impact on avian influenza pathogenicity in domestic poultry: field and experimental findings [J]. Veterinary sciences, 2018, 5(1):23.
 [10] KOUTSAKOS M, KEDZIERSKA K, SUBBARAO K. Immune responses to avian influenza viruses [J]. Journal of immunology, 2019, 202(2):382-391.
 [11] LOPEZ C E, LEGGE K L. Influenza A virus vaccination: immunity, protection, and recent advances toward a universal vaccine [J]. Vaccines, 2020, 8(3):434.
 [12] WU N, WILSON I. Influenza hemagglutinin structures and antibody recognition [J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2020, 10(8):a038778-a038778.
 [13] ALQAZLAN N, ASTILL J, RAJ S, et al. Strategies for enhancing immunity against avian influenza virus in chickens: a review [J]. Avian pathology: journal of the WVPA, 2022, 51(3):211-235.
 [14] CHEN J, MA C, WONG C. Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza [J]. Trends in biotechnology, 2011, 29(9):426-434.
 [15] AN S, SON S, SONG J, et al. Selection of an optimal recombinant egyptian H9N2 avian influenza vaccine strain for poultry with high antigenicity and safety [J]. Vaccines, 2022, 10(2):162.

- [16] ZENG X, TIAN G, SHI J, et al. Vaccination of poultry successfully eliminated human infection with H7N9 virus in China[J]. Science China life sciences, 2018, 61(12): 1465-1473.
- [17] SONG C, LIAO Z, SHEN Y, et al. Assessing the efficacy of a recombinant H9N2 avian influenza virus-inactivated vaccine [J]. Poultry science, 2020, 99(9): 4334-4342.
- [18] PÉREZ RUBIO A, EIROS J. Cell culture-derived flu vaccine: present and future [J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2018, 14(8): 1874-1882.
- [19] 张家友, 闫新业, 赵巍. 以 MDCK 为基质的 H5N1 流感全病毒灭活疫苗的制备及其免疫学评价[J]. 中国生物制品学杂志 2020, 33(1): 1-5.
- [20] 刘艳晶, 潘舒心, 麻琦, 等. 重组禽流感病毒(H5+H7)三价灭活疫苗(细胞源, H5N1Re-11 株+Re-12 株, H7N9 H7-Re3 株)的免疫效力研究[J/OL]. 中国预防兽医学报, 2021: 1-6 (2021-04-01)[2022-02-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1417.S.20210401.1459.002.html>.
- [21] 赖汉漳, 谭文松, 詹烜子, 等. 全悬浮 MDCK 细胞驯化与 H9 亚型禽流感疫苗毒种制备[J]. 广东畜牧兽医科技, 2021, 46(6): 45-49.
- [22] 张哲罡. MDCK 细胞基质与鸡胚基质培养对流感病毒及其疫苗影响的研究[D]. 武汉: 武汉生物制品研究所, 2020.
- [23] 谢青梅, 封柯宇, 沈勇. 动物病毒重组活载体疫苗研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 102-110.
- [24] MAASSAB H, FRANCIS T, DAVENPORT F, et al. Laboratory and clinical characteristics of attenuated strains of influenza virus[J]. Bulletin of the world health organization, 1969, 41(3): 589-594.
- [25] JANG Y, SEONG B. Immune responses elicited by live attenuated influenza vaccines as correlates of universal protection against influenza viruses[J]. Vaccines, 2021, 9(4): 353.
- [26] SUBBARAO K. Live attenuated cold-adapted influenza vaccines[J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2020, 11(9): a038653.
- [27] WEI Y, QI L, GAO H, et al. Generation and protective efficacy of a cold-adapted attenuated avian H9N2 influenza vaccine [J]. Scientific reports, 2016, 6: 30382.
- [28] 查夕馨. 重组 H9N2 亚型禽流感病毒冷适应和 NS 截短致弱活疫苗的研制[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [29] 王辉. 互换 HA 和 NSI 基因包装信号的 H9N2 亚型 AIV 减毒活疫苗的研制[D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [30] JORGE S, DELLAGOSTIN O A. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches[J]. Biotechnology research and innovation, 2017, 1(1): 6-13.
- [31] 郝小利, 刘秀梵. 禽流感-火鸡疱疹病毒重组活载体疫苗的研究进展[J]. 中国家禽, 2015, 37(21): 48-52.
- [32] CHANG P, AMEEN F, SEALY J, et al. Application of HDR-CRISPR/Cas9 and erythrocyte binding for rapid generation of recombinant turkey herpesvirus- vectored avian influenza virus vaccines[J]. Vaccines, 2019, 7(4): 192.
- [33] TANG N, ZHANG Y, SADIGH Y, et al. Generation of A triple insert live avian herpesvirus vectored vaccine using CRISPR/Cas9-based gene editing[J]. Vaccines, 2020, 8(1): 97.
- [34] XU X, XUE C, LIU X, et al. A novel recombinant attenuated Newcastle disease virus expressing H9 subtype hemagglutinin protected chickens from challenge by genotype VII virulent Newcastle disease virus and H9N2 avian influenza virus [J]. Veterinary microbiology, 2019, 228: 173-180.
- [35] 王杨杨. 表达 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因重组嵌合 NDV 的构建及其免疫效力[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [36] CHEN Pucheng, DING Leilei, JIANG Yongping. 新型水禽用禽流感载体疫苗可有效阻断 H5 亚型禽流感病毒的复制和扩散[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(11): 1190.
- [37] LIU J, CHEN P, JIANG Y, et al. A duck enteritis virus- vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus infection in ducks[J]. Journal of virology, 2011, 85(21): 10989-10998.
- [38] CHEN P, DING L, JIANG Y, et al. Protective efficacy in farmed ducks of a duck enteritis virus- vectored vaccine against H5N1, H5N6, and H5N8 avian influenza viruses [J]. Vaccine, 2019, 37(40): 5925-5929.
- [39] 王波, 赵玉博, 胡玉珍, 等. 表达 2.3.2.1d 分支 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因重组鸭瘟病毒的构建和评价[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(12): 1262-1267.
- [40] FUENMAYOR J, GÓDIA F, CERVERA L. Production of virus-like particles for vaccines [J]. New biotechnology, 2017, 39: 174-180.
- [41] 范文辉, 王萌, 刘丽蓉, 等. H5 亚型流感病毒 HA 头部球状结构域在毕赤酵母中的高效表达及其免疫原性分析[J]. 生物工程学报, 2019, 35(1): 49-58.
- [42] LIU B, SHI P, WANG T, et al. Recombinant H7 hemagglutinin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* forms nanoparticles that protect mice from challenge with H7N9 influenza virus[J]. Vaccine, 2020, 38(50): 7938-7948.
- [43] CEREGHINO G, CEREGHINO J, ILGEN C, et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* [J]. Current opinion in biotechnology, 2002, 13(4): 329-332.
- [44] BUFFIN S, PEUBEZ I, BARRIERE F, et al. Influenza A and B virus-like particles produced in mammalian cells are highly immunogenic and induce functional antibodies [J]. Vaccine, 2019, 37(46): 6857-6867.
- [45] WANG T, GUO X. Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2020, 104(13): 5673-5688.
- [46] 任慧梅, 陈庆华. 昆虫细胞在预防性疫苗中的应用及外源

- 因子的控制[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(2): 230-233+239.
- [47] LUCKOW V, LEE S, BARRY G, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli* [J]. Journal of virology, 1993, 67(8): 4566-4579.
- [48] LAI C, CHENG Y, CHEN P, et al. Process development for pandemic influenza VLP vaccine production using a baculovirus expression system [J]. Journal of biological engineering, 2019, 13(1): 78.
- [49] KANG Y, CHO H, KIM J, et al. Single dose of multi-clade virus-like particle vaccine protects chickens against clade 2.3.2.1 and clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza viruses [J]. Scientific reports, 2021, 11(1): 13786.
- [50] LI X, JU H, LIU J, et al. Influenza virus-like particles harboring H9N2 HA and NA proteins induce a protective immune response in chicken [J]. Influenza and other respiratory viruses, 2017, 11(6): 518-524.
- [51] NINYIO N, HO K, OMAR A, et al. Virus-like particle vaccines: a prospective panacea against an avian influenza pandemic [J]. Vaccines, 2020, 8(4): 694.
- [52] 冯亚亚, 郭晶, 李玉保. 禽流感DNA疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(11): 3667-3675.
- [53] SHEHATA A, BASIOUNI S, ALI A, et al. Immunization of turkeys with a DNA vaccine expressing the haemagglutinin gene of low pathogenic avian influenza virus subtype H9N2 [J]. Journal of virological methods, 2020, 284: 113938.
- [54] PORTER K, RAVIPRAKASH K. DNA Vaccine delivery and improved immunogenicity [J]. Current issues in molecular biology, 2017, 22: 129-138.
- [55] ZHAO K, RONG G, TENG Q, et al. Dendrigraft poly-L-lysines delivery of DNA vaccine effectively enhances the immunogenic responses against H9N2 avian influenza virus infection in chickens [J]. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine, 2020, 27: 102209.
- [56] BAHL K, SENN J, YUZHAVKOV O, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses [J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2017, 25(6): 1316-1327.
- [57] WU P, LU J, ZHANG X, et al. Single dose of consensus hemagglutinin-based virus-like particles vaccine protects chickens against divergent H5 subtype influenza viruses [J]. Frontiers in immunology, 2017, 8: 1649.
- [58] 张雪花, 陆吉虎, 华涛, 等. 通用型H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗抗原表达和免疫效力研究[J]. 病毒学报, 2019, 35(6): 864-872.
- [59] BAROUCH D, O'BRIEN K, SIMMONS N, et al. Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys [J]. Nature medicine, 2010, 16(3): 319-323.
- [60] KAMLANGDEE A, KINGSTAD-BAKKE B, OSORIO J. Mosaic H5 hemagglutinin provides broad humoral and cellular immune responses against influenza viruses [J]. Journal of virology, 2016, 90(15): 6771-6783.
- [61] 李丽, 唐国毅, 冯贺龙, 等. 基于马赛克HA序列的H9亚型禽流感灭活疫苗的免疫效力分析[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(12): 3569-3577.
- [62] IMPAGLIAZZO A, MILDER F, KUIPERS H, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen [J]. Science, 2015, 349(6254): 1301-1306.
- [63] KRAMMER F. Novel universal influenza virus vaccine approaches [J]. Current opinion in virology, 2016, 17: 95-103.
- [64] LIAO H, WANG S, KO Y, et al. Chimeric hemagglutinin vaccine elicits broadly protective CD₄ and CD₈ T cell responses against multiple influenza strains and subtypes [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2020, 117(30): 17757-17763.
- [65] SAUTTO G, KIRCHENBAUM G, ROSS T. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal [J]. Virology journal, 2018, 15(1): 17.
- [66] YIN Y, LI B, ZHOU L, et al. Protein transduction domain-mediated influenza NP subunit vaccine generates a potent immune response and protection against influenza virus in mice [J]. Emerging microbes & infections, 2020, 9(1): 1933-1942.
- [67] 刘艳晶, 麻琦, 潘舒心, 等. 现用重组禽流感病毒(H5+H7)三价灭活疫苗对近期H5和H7亚型毒株的免疫效力研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(4): 1-6.
- [68] READ A, BAIGENT S, POWERS C, et al. Imperfect vaccination can enhance the transmission of highly virulent pathogens [J]. PLoS biology, 2015, 13(7): e1002198. 