

DOI:10.13350/j.cjpb.240501

• 论著 •

呼吸道合胞病毒 mRNA 候选疫苗的表达、鉴定及免疫效果验证*

姜人月^{1,2}, 庄忻雨², 田明尧², 唐家凤^{2,3}, 狄亚心^{2,4}, 杨松惠², 许智强^{1,2}, 于潼^{2,5}, 张桐^{2,6}, 金鑫^{1**}, 金宁一^{2**}

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 广西大学动物科学技术学院; 4. 东北农业大学动物医学学院; 5. 吉林农业大学动物医学学院; 6. 吉林大学动物医学学院)

【摘要】 目的 制备呼吸道合胞病毒 F 蛋白的融合前构象 (pre-F) mRNA 疫苗, 进行可行性验证。方法 对抗原基因进行密码子优化设计, 分别连接至 pGEM-3Zf-N3 载体上, 通过质粒线性化、体外转录、纯化和 Cap1 加帽处理, 得到功能性 mRNAs。在转染至 293T 细胞后, 利用 Western blot 和间接免疫荧光试 (IFA) 来确定目标蛋白的表达情况。通过微流控装置制备 LNP/mRNAs 疫苗免疫 C57BL/6 小鼠, 检测小鼠血清中抗原特异性 IgG 抗体效价, 评估免疫效果。结果 成功构建重组质粒 Pre-F-GCN4t 和 mDS-Cav1, 通过双酶切验证条带符合预期大小。表达目的抗原大小为 57.57 ku 和 64.35 ku。成功检测小鼠血清中抗原特异性 IgG 抗体, Pre-F-GCN4t 免疫组的效果优于 mDS-Cav1 组, 3 次免疫较 2 次免疫提升了 2 倍, 抗体效价最高可达 $1:4 \times 10^4$ 。结论 两种抗原设计模式均具有可行性, Pre-F-GCN4t 的设计方式对于激活机体的体液免疫应答更有优势, mRNA 疫苗无需体内转录, 为呼吸道合胞病毒 mRNA 疫苗的优化设计提供理论基础。

【关键词】 呼吸道合胞病毒; mRNA 疫苗; 密码子优化; 体液免疫

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)05-0497-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 May;19(5):497-501.]

Expression, identification and immune efficacy verification of respiratory syncytial virus mRNA vaccine candidate

JIANG Renyue^{1,2}, ZHUANG Xinyu², TIAN Mingyao², TANG Jiafeng^{2,3}, DI Yaxin^{2,4}, YANG Songhui², XU Zhiqiang^{1,2}, YU Tong^{2,5}, ZHANG Tong^{2,6}, JIN Xin¹, JIN Ningyi² (1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin, China; 2. Changchun Institute of Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. College of Animal Science and Technology, Guangxi University; 4. College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University; 5. College of Animal Medicine, Jilin Agricultural University; 6. College of Animal Medicine, Jilin University)***

【Abstract】 **Objective** Preparation of pre conformational (pre F) mRNA vaccine for respiratory syncytial virus F protein fusion and feasibility validation. **Methods** Perform codon optimization design on antigenic genes, connect them to pGEM-3Zf-N3 vectors, and obtain functional mRNAs through plasmid linearization, in vitro transcription, purification, and Cap1 capping treatment. After transfection into 293T cells, Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA) were used to determine the expression of the target protein. Preparation of LNP/mRNAs vaccine for immunization of C57BL/6 mice using microfluidic devices, detection of antigen-specific IgG antibody titers in mouse serum, and evaluation of immune efficacy. **Results** Successfully constructed recombinant plasmids Pre-F-GCN4t and mDS Car1, and verified the expected size of the bands through double restriction enzyme digestion. The target antigen sizes for expression are 57.57 ku and 64.35 ku. Successfully detected antigen-specific IgG antibodies in mouse serum. The Pre-F-GCN4t immunization group showed better efficacy than the mDS Car1 group, with a 2-fold increase in antibody titer after 3 immunizations compared to 2 immunizations. The highest antibody titer could reach $1:4 \times 10^4$. **Conclusion** Both antigen design modes are feasible, and the design approach of Pre-F-GCN4t has advantages in activating the body's humoral immune response. mRNA vaccines do not require in vivo transcription, providing a theoretical basis for the optimization design of respiratory syncytial virus mRNA vaccines.

【Key words】 respiratory syncytial virus; mRNA vaccine; codon optimization; humoral immunity

* **【基金项目】** 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 32202820); 国家重点研发计划项目 (No. 21ZGY30)。

** **【通讯作者】** 金宁一, E-mail: ningyik@126.com; 金鑫, E-mail: jinxin@ybu.edu.cn

【作者简介】 姜人月 (1999-), 女, 吉林长春人, 在读硕士, 主要研究方向: 预防兽医学。E-mail: 18104333980@163.com

呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus, RSV) 是一种单链 RNA 病毒, 属于副黏病毒科, 肺病毒属, 是幼儿急性下呼吸道感染的最常见病因^[1]。呼吸道合胞病毒感染可导致鼻炎、感冒等上呼吸道感染, 严重威胁儿童身心健康^[1-2]。呼吸道合胞病毒感染导致全球 0~60 月龄儿童的发病率和死亡率很高, 特别是 6 个月以下的婴儿^[3]。RSV 已成为引起儿童致死性肺炎最主要的病原体之一^[4-5]。至今, 尚无疫苗能被证实可以有效预防 RSV 感染^[6]。各种 RSV 疫苗均处于临床试验的不同阶段, 其中包括颗粒疫苗、载体疫苗、减毒活疫苗以及亚单位疫苗^[7-8]。虽然这些疫苗能产生有效的免疫反应, 但仍存在一些安全性问题^[9]。

RSV 感染主要由糖蛋白 F 和 G 介导, 黏附蛋白 (G) 与宿主细胞膜黏附, 促使病毒吸附于细胞表面^[10], 融合蛋白 (F) 介导病毒包膜与宿主细胞膜融合, 使病毒进入细胞, 在病毒融合和进入期间, F 蛋白从亚稳定的融合前构象 (pre-F) 转变为稳定的融合后构象 (post-F)^[11]。F 蛋白和 G 蛋白具有较高的免疫原性, 可刺激机体产生血清中和抗体^[12]。由于 F 蛋白在病毒包膜外, 具有特异性抗原决定簇; 亚型间序列较为保守以及膜融合过程中具有关键作用, 可引起膜融合的显著构象变化等^[13-14], 使得 F 蛋白成为 RSV 抗病毒药物及疫苗研发的重要靶点^[15-16]。

mRNA 疫苗是将含有编码抗原蛋白的 mRNA 导入人体, 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, 达到预防免疫的作用^[17]。此外, mRNA 疫苗具有抗原表达效率高、安全性好和免疫原性强的特点^[20-21]。

本研究主要通过通过对呼吸道合胞病毒融合蛋白 F 的两种已有的相关蛋白疫苗的氨基酸序列进行人源密码子优化, 分别进行候选 mRNA 疫苗的抗原的表达及鉴定, 通过小鼠免疫筛选验证最佳免疫效果。

材料与amp;方法

1 材料

限制性核酸内切酶 *Pac* I、*Xho* I、*Cla* I、T4 连接酶购自美国 NEB 公司; Research Grade RSV-neutralizing Human Antibody (D25) 特异性抗体购自武汉科斯坦生物科技有限公司; RSV-F Neutralizing Antibody 购自北京义翘神州科技股份有限公司; 蛋白 RSF-V52H7 购自北京百普赛斯生物科技股份有限公司; T7-Flash ScribeTM Transcription Kit 和 Script CapTM Cap 1 Capping System 购自美国 CELLSSCRIPT 公司; MEGAclearTM Kit Purification for Large Scale Transcription Reaction 购自美国 Thermo Fisher 公司; 40 只雌性 6 周龄 C57BL/6 小鼠

购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司; 质粒 pGEM-3Zf-N3 由长春兽医研究所分子病毒学与免疫学实验室设计并保存。

2 方法

2.1 基因的设计 通过对呼吸道合胞病毒的融合蛋白 F 人源密码子优化的两条基因序列: Pre-F-GCN4t 和 mDS-Cav1, 由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成 (图 1)。

2.2 目的基因的扩增及纯化 将质粒进行转化, 大量扩增后使天根质粒大提试剂盒对质粒进行大量提取, 通 *Cla* I、*Pac* I 进行双酶切。经过琼脂糖凝胶电泳, 通过试剂盒回收目的基因。获得的基因片段分别命名为: *Cla* I-Pre-F-GCN4t-*Pac* I、*Cla* I-mDS-Cav1-*Pac* I。

2.3 重组质粒构建与鉴定 将上述纯化产物与 pGEM-3Zf-N3 载体进行连接, 构建重组质粒 pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t、pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1。连接体系: 线性化载体 4 μ L, 纯化产物 4 μ L, T4 连接酶 1 μ L, T4 Buffer 1 μ L, 16 $^{\circ}$ C 过夜。将连接产物进行转化、培养及单菌落鉴定。鉴定正确后于 LB 培养基扩增培养 (含氨苄青霉素), 提取质粒进行双酶切鉴定, 由吉林省库美生物科技有限公司进行测序鉴定, 测序成功后使试剂盒对质粒进行大量提取, 备用。

2.4 mRNA 制备 用 *Xho* I 进行质粒线性化单酶切处理, 体系: *Xho* I 4 μ L, 重组质粒 pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t、pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1 各 16 μ g, 10 \times CutSmart Buffer 5 μ L, 加水补至 50 μ L。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 3 h。通过琼脂糖凝胶电泳, 120 V, 40 min, 用试剂盒进行产物回收, 备用。通过体外转录、纯化及加帽反应的相应试剂盒进行 mRNA 的制备, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.5 mRNA 体外转染细胞试验 将 293T 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 当细胞密度达到 80% 时, 将转染试剂 LipofetamineTM 3000 Reagent 和 Cap-mRNA 按照体积与质量比为 1 μ L : 2 μ g 的比例混匀, 室温静置 15 min 后滴入孔中, 孔内培养基换成双无培养基, 放入温箱继续培养 24 h, 收取细胞。

2.6 mRNA 功能验证

2.6.1 蛋白质免疫印迹试验 (Western blot) 当 Cap-mRNA 转染 24 h 后, 使用 RIPA 细胞裂解液 (100 : 1 加入蛋白酶抑制剂 PMSF) 充分裂解细胞并转入 1.5 mL EP 管中, 超声处理 10~20 min 后, 加入 5 \times SDS Loading Buffer, 100 $^{\circ}$ C 水浴变性后收集样品进行 10% SDS-PAGE 电泳。采用湿转法将凝胶中的蛋白转印到 NC 膜上, 用 5% 脱脂乳室温封闭 2 h; 加入不同检测抗体, 室温孵育 1.5 h, 用 TBST 洗 3 次, 10

min/次;对应加入 HRP 标记的山羊抗鼠/兔/人 Ig(H+L) 抗体,室温孵育 35 min,洗涤 3 次后显色并拍照。

2.6.2 间接免疫荧光法验证 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 2 组 Cap-mRNA 转染 293T 细胞 24 h 后,弃去细胞悬液并使用多聚甲醛固定液固定 10 min, PBST 洗涤 2 次, 3 min/次;使用 3% BSA 封闭液室温作用 30 min, PBST 洗涤 2 次, 3 min/次;加入鼠源 His 抗体, 37 °C 孵育 1 h (1:800 稀释), PBST 洗涤 3 次, 3 min/次;加入 Cy3 标记山羊抗鼠 Ig(H+L) 抗体, 37 °C 孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次, 3 min/次;加入 DAPI 染色液进行细胞核染色, 室温放置 3~5 min, PBST 洗涤 2 次, 3 min/次, 荧光显微镜下观察结果。

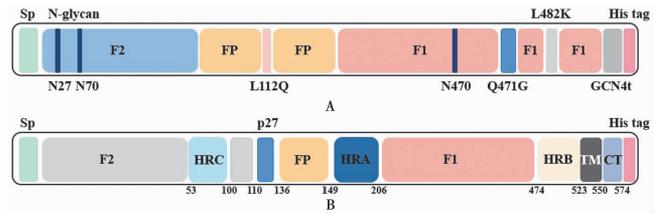
2.7 小鼠的疫苗免疫试验 将雌性 C57BL/6 小鼠 6 周龄 40 只随机分为 4 组, 每组 10 只, 其中 2 组实验组 (LNP-m-Pre-F-GCN4t、LNP-m-mDS-Cav1)、2 组对照组 (LNP 佐剂组、PBS 组)。A 组为 LNP-m-Pre-F-GCN4t 疫苗组、B 组为 LNP-m-mDS-Cav1 疫苗组、C 组为 LNP 佐剂对照组、D 组为 PBS 阴性对照组, 腿部肌肉注射, 免疫 3 次, 时间间隔为 2 周, 免疫剂量为 15 μg/只。每次免疫前 24 h 采血, 分离血清后测定抗原特异性免疫球蛋白 (IgG) 抗体效价。

2.8 酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 将蛋白 RSF-V52H7 用 ELISA 包被液稀释至终浓度 2 μg/mL, 96 孔酶标板中每孔加入 100 μL, 4 °C 条件下包被过夜。取 3% 牛血清白蛋白溶液每孔加入 300 μL, 置于 37 °C 恒温箱孵育 2 h。PBST 每孔加入 300 μL 洗涤 2 次, 一次 2 min, 使用 PBS 将所有样品从 1:100 开始, 按 2 倍梯度进行稀释, 阴性对照样品与待测样品进行相同倍数的稀释。PBST 洗涤酶标板 2 次, 将配制好的样品每孔加入 100 μL 于酶标板上, 置于 37 °C 恒温箱孵育 1 h。洗板 3 次, Goat Anti-Mouse IgG 抗体使用 PBS 按 1:7500 稀释, 每孔加入 100 μL 稀释的酶标抗体, 置于 37 °C 孵育 30 min。洗板 3 次, 每孔加入 100 μL TMB 显色液, 室温避光显色 10~30 min。加入终止液 (2 mol/L H₂SO₄), 在酶标仪上读取 A₄₅₀ 数值。

结果

1 基因的结构

通过对 Pre-F-GCN4t 和 mDS-Cav1 两条基因的氨基酸序列进行人源密码子优化, 基因结构见图 1。其中 F1 和 F2 为 RSV-F 的两个亚基; GCN4t 为酵母转录激活因子; HRC、HRA、HRB 为七肽重复区 A、B 和 C; TM 为跨膜结构域; CT 为胞质尾区; His tag 为添加的 6×His 标签区域。



A Pre-F-GCN4t 模式图 B mDS-Cav1 模式图

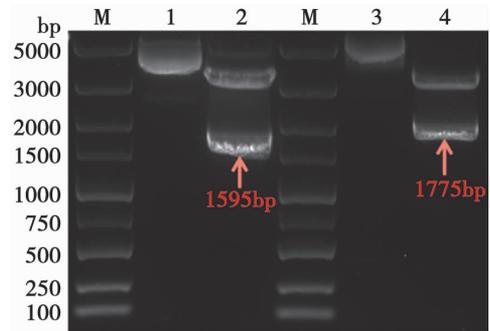
图 1 Pre-F-GCN4t 与 mDS-Cav1 模式图

A Pre-F-GCN4t Pattern diagram B mDS-Cav1 Pattern diagram

Fig. 1 Pre-F-GCN4t and mDS-Cav1 Pattern diagram

2 重组质粒的鉴定

2 种重组质粒经 PCR 扩增后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 与预期大小的目的基因片段 (*Cla*I-Pre-F-GCN4t-*Pac*I 为 1 595 bp, *Cla*I-mDS-Cav1-*Pac*I 为 1 775 bp) 大小相符。*Cla*I 和 *Pac*I 双酶切重组质粒, 得到与目的基因大小相符的片段和载体片段 (图 2)。重组质粒交由吉林省库美生物科技有限公司测序, 结果均正确。用 *Xho*I 进行质粒线性化处理, 结果如图 3。



M DNA 标志物 1 pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t 2 *Cla*I-pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t-*Pac*I 双酶切 3 pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1 4 *Cla*I-pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1-*Pac*I 双酶切

图 2 重组质粒双酶切鉴定

M DNA maker 1 pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t 2 Double digestion *Cla*I-pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t-*Pac*I 3 pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1 4 Double digestion *Cla*I-pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1-*Pac*I

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by double enzyme digestion

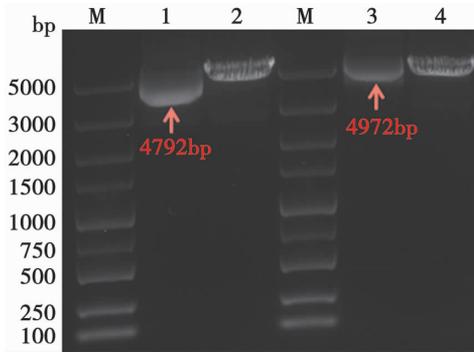
3 Western blot 验证 mRNA 的表达

在 2 组 mRNA 中, 分别以鼠源 His 和人源特异性抗体 D25 以及兔源 RSV-F 为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠、抗人及抗兔 IgG 抗体为二抗进行 Western blot 鉴定, 结果如图 4。mRNA 转染 293T 细胞 24 h 后均可检测到对应的目的蛋白, Pre-F-GCN4t 预期大小为 57.57 ku, mDS-Cav1 预期大小为 64.35 ku。试验结果均与预期大小相符。

4 IFA 验证目的蛋白的表达

重组质粒 mRNA 转染 293T 细胞 24 h 后固定细胞, 以鼠源 His 抗体为一抗, Cy3 标记的山羊抗鼠 Ig (H+L) 抗体为二抗进行间接免疫荧光验证试验, 结果

如图 5。mRNA 转染细胞后均检测到有目的蛋白的表达,荧光显微镜下显示红色荧光(Cy3),细胞核呈蓝色荧光(DAPI)而对对照组未检测到荧光。

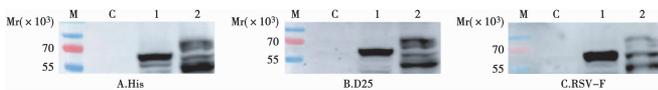


M DNA 标志物 1 pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t 2 pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t-Xho I 单酶切 3 pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1 4 pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1-Xho I 单酶切

图 3 重组质粒单酶切鉴定

M DNA maker 1 pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t 2 Single digestion pGEM-3Zf-N3-Pre-F-GCN4t-Xho I 3 pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1 4 Single digestion pGEM-3Zf-N3-mDS-Cav1-Xho I

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by single enzyme digestion



M 蛋白分子质量标准 1 Pre-F-GCN4t 2 mDS-Cav1 C 对照

图 4 表达蛋白的 Western Blot 检测

M Protein maker 1 Pre-F-GCN4t 2 mDS-Cav1 C Control

Fig. 4 Western blot analysis of expression protein

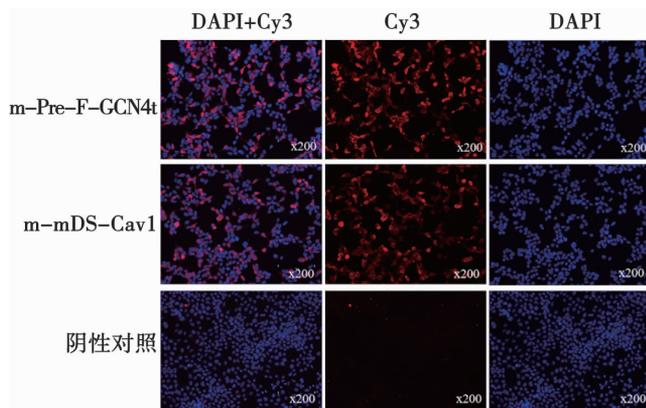


图 5 间接免疫荧光法验证目的蛋白的表达

Fig. 5 Parallel verification of indirect immune of luorescence

5 小鼠免疫实验

免疫程序如图 6 所示。在首免后 14、28、42 和 84 d 分离小鼠血清,并测定血清中针对 F 蛋白的特异性抗体 IgG 抗体。结果如图 7 所示,在 2 次免疫后免疫组抗体水平均有明显提升,A 组疫苗见效较快,于 28 d 时效价有明显提升,虽于 84 d 后抗体水平有所下降,但最高可测得有效数值约为 $1 : 4 \times 10^4$;B 组免疫效价逐渐升高,免疫效果较为持久。综上所述,A 组,

即 Pre-F-GCN4t 的 LNP-mRNA 疫苗效果更佳。



图 6 小鼠免疫程序

Fig. 6 Mouse immune program

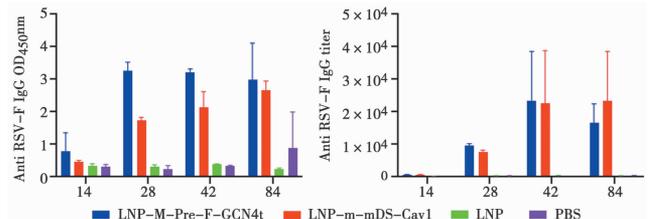


图 7 特异性抗体 IgG 效价检测

Fig. 7 Titer detection of specific antibody IgG

讨论

RSV 疫苗开发中的一个重大挑战是需要证明疫苗的安全性。相比之下,在疫苗中,mRNA 疫苗是相对安全的,与 DNA 疫苗不同,其不会整合到宿主基因组中,从而排除了对插入突变的担忧^[3]。新型 mRNA 疫苗的快速发展为 RSV 疫苗研发领域带来了希望^[24]。至今,在 mRNA 设计和核酸传递技术方面的进展,加上新型抗原靶点的发现^[21],使 mRNA 疫苗成为防治新的大流行病和现有传染病的一个重要工具。

为抗击 RSV 而以革命性的速度开发的前两种 mRNA 疫苗(mRNA-1345 和 mRNA-1777)已经超过了预期,并可能实现 RSV 感染的完全控制。在自然 RSV 感染中,G 蛋白和 F 蛋白都是抗体的重要靶标,但抗体水平通常较低,免疫反应也很短暂^[27-30]。

本研究构建了 2 种重组质粒,通过线性化体外转录、纯化、加帽,获得 2 种基因的功能性 mRNA,并且在 Western blot 和间接免疫荧光实验中验证了目的蛋白的表达,制备 LNP-mRNA 疫苗,通过对小鼠的 3 次免疫并检测其特异性抗体 IgG,比较两种设计形式的免疫差异,筛选出 Pre-F-GCN4t 免疫效果更佳,并可维持较长时间,于 84 d 后,免疫效果有所下降,但仍可维持在较高水平,为后续呼吸道合胞病毒 mRNA 疫苗的优化设计提供数据理论基础。

【参考文献】

[1] Li J,Liu Q,Liu J,et al. An mRNA-based rabies vaccine induces strong protective immune responses in mice and dogs[J]. *Virology*, 2022,19(1):184.

[2] Li J,Liu Q,Liu J,et al. Development of bivalent mRNA vaccines against SARS-CoV-2 variants[J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10 (11):1807.

- [3] 肖俊杰,侯风萍,李雄雄. 呼吸道合胞病毒 mRNA 疫苗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2023,51(3):57-63.
- [4] 李江龙,龙海艳,刘琪,等. 呼吸道合胞病毒融合蛋白(RSV-F) mRNA 疫苗设计及其在小鼠中细胞和体液免疫应答评估[J]. 中国疫苗和免疫,2023,29(2):180-185.
- [5] 孙宇宸,傅生芳,朱传凤. 基于融合前 F 蛋白呼吸道合胞病毒疫苗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2022,50(6):58-64.
- [6] 李海,任虎,张燕,等. 人呼吸道合胞病毒疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2022,35(10):1261-1267,1273.
- [7] 杨筱萌,罗语思,郭名扬,等. 人呼吸道合胞病毒感染致小鼠急性肺损伤动物模型的建立[J]. 中国病原生物学杂志,2022,17(9):993-998,1004.
- [8] 刘建东,张静飞,刘建凯,等. 人呼吸道合胞体病毒疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2021,34(2):244-248.
- [9] Nair H, Nokes DJ, Gessner BD. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet, 2010, 375(9725):1545-1555.
- [10] Iwane MK, Farnon EC, Gerber SI. Importance of global surveillance for respiratory syncytial virus[J]. J Infect Dis, 2013, 208(Suppl 3):S165-166.
- [11] Ferolla FM, Hijano DR, Acosta PL. Macronutrients during pregnancy and life-threatening respiratory syncytial virus infections in children[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(9):983-990.
- [12] Paramore LC, Ciuryla V, Ciesla G. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US: an analysis of national databases[J]. Pharmacoeconom, 2004, 22(5):275-284.
- [13] Neemann K, Freifeld A. Respiratory syncytial virus in hematopoietic stem cell transplantation and solid-organ transplantation[J]. Curr Infect Dis Rep, 2015, 17(7):490.
- [14] Connor E, Top F, Kramer A. Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis [J]. Pediatrics, 1997, 99(1):93-99.
- [15] Brady MT, Byington CL, Davies HD. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection[J]. Pediatrics, 2014, 134(2):415-420.
- [16] Weisman LE. Motavizumab, a second-generation humanized mAb for the prevention of respiratory syncytial virus infection in high-risk populations[J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11(3):346-347.
- [17] O'Brien K L, Chandran A, Weatherholtz R. Efficacy of motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus disease in healthy Native American infants: a phase 3 randomised double-blind placebo-controlled trial [J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(12):1398-1408.
- [18] Liu Z, Chen O, Wall JBJ, et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. Sci Rep 2017, 7:1-9.
- [19] McLellan JS, Chen M, Leung S. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody[J]. Science, 2013, 340(6136):1113-1117.
- [20] Sun Z, Pan Y, Jiang S. Respiratory syncytial virus entry inhibitors targeting the F protein[J]. Viruses, 2013, 5(1):211-225.
- [21] Fang E, Liu X, Li M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development [J/OL]. Sig Transduct Target Ther, 2022, 7(1):94.
- [22] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation [J/OL]. Nat Rev Drug Discov, 2021:817-838.
- [23] McLellan JS, Yang Y, Graham BS, et al. Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes [J/OL]. J Virol, 2011, 85(15):7788-7796.
- [24] Swanson KA, Settembre EC, Shaw CA, et al. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers [J/OL]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(23):9619-9624.
- [25] Sastre P, Melero J, Garcíabarrero B, et al. Comparison of antibodies directed against human respiratory syncytial virus antigens present in two commercial preparations of human immunoglobulins with different neutralizing activities[J/OL]. Vaccine, 2004, 23(4):435-443.
- [26] Glezen WP. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus [J/OL]. Am J Dis Child, 1986, 140(6):543-546.
- [27] Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, et al. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children[J/OL]. N Engl J Med, 1979, 300(10):530-534.
- [28] Power UF. Respiratory syncytial virus (RSV) vaccines—two steps back for one leap forward[J/OL]. J Clin Virol, 2008:38-44.
- [29] Hall CB, Walsh EE, Long CE, et al. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus [J/OL]. J Infect Dis, 1991, 163(4):693-698.
- [30] McLellan JS, Chen M, Leung S, et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody [J/OL]. Science, 2013, 340(6136):1113-1117.

【收稿日期】 2023-11-23 【修回日期】 2024-02-20