



## 专论与综述

## SARS-CoV-2 抗原表位分析及相关疫苗研发的进展与挑战

王康泓\* 丁崇正

深圳大学生命与海洋科学学院 广东 深圳 518060

**摘要:** 疫苗的接种被认为是阻止时下 2019 冠状病毒病(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)疫情进一步蔓延的最有效手段。目前,国内外多个研究团队采用了不同的技术路线开展严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)相关疫苗的研发。本文就 SARS-CoV-2 抗原表位分析、相关疫苗的研究进展以及疫苗接种潜在的风险等多个方面的研究进行综述。评价各研发路线疫苗安全性和有效性的同时,对疫苗发展应用所面临的困难进行讨论。

**关键词:** 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2, 抗原表位分析, 2019 冠状病毒病, 疫苗研发

## Epitope analysis and vaccine development of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: a review

WANG Kanghong\* DING Chongzheng

College of Life and Ocean Science, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

**Abstract:** Vaccination has been considered as the most effective method to prevent the further spread of the current corona virus disease 2019 (COVID-19). Nowadays, many research teams world wide have applied different technologies for the research on the vaccines of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). This article summarizes the research on multiple aspects, including epitope analysis of SARS-CoV-2, research progress of vaccines and potential risk of vaccination. It discusses the difficulties in the development and application of vaccines in the meantime of evaluating the safety and effectiveness of the vaccines in the respective research routes.

**Keywords:** severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, epitope analysis, COVID-19, vaccine research and development

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起的 2019 冠状病毒病(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)是 21 世纪世界范围内的第 3 次冠状病毒大流行。世界卫生组织 2020 年 10 月 13 日公布的统计数据显示,全球 200 多个国家和地区的 COVID-19 患者数为 37 423 660,死亡人数

达到 1 074 817<sup>[1]</sup>,全球的疫情防控形势依旧十分严峻。SARS-CoV-2 具有传染性强、潜伏期长、人群普遍易感、传播途径广泛、感染早期症状不明显且存在无症状感染者等特点<sup>[2-5]</sup>。这些特点赋予了该病毒在人群中高效、隐蔽传播的能力,加大了疫情防控的难度。

由于缺乏针对 COVID-19 的特效药物和疫苗,

\*Corresponding author: E-mail: 13500069277@163.com

Received: 25-08-2020; Accepted: 23-09-2020; Published online: 04-11-2020

\*通信作者: E-mail: 13500069277@163.com

收稿日期: 2020-08-25; 接受日期: 2020-09-23; 网络首发日期: 2020-11-04

目前只能采取核酸检测排查、隔离病患、佩戴医用外科口罩等手段切断病毒的传播。尽管这些方法在短期内能有效地遏止 SARS-CoV-2 的传播,但从长远来看,通过疫苗的接种使人群获得对 SARS-CoV-2 的特异性免疫才是阻止 COVID-19 蔓延的最有效手段。本文将基于不同来源抗体对模型动物的保护作用、SARS-CoV-2 抗原表位分析等基础研究探讨疫苗研发的可行性,对不同研发路线疫苗的优缺点进行分析并讨论相关疫苗发展应用中可能存在的风险与挑战。

## 1 疫苗研发的可行性及抗原表位分析

### 1.1 疫苗研发的可行性

冠状病毒疫苗的研发具有较大难度,至今仍未研制出针对某种冠状病毒的有效疫苗<sup>[6]</sup>,但许多研究表明,SARS-CoV-2 疫苗具备研发的可行性。

首先,绝大多数 COVID-19 患者体内产生了针对 SARS-CoV-2 的中和抗体,这些抗体具有临床治疗 COVID-19 和预防 SARS-CoV-2 入侵的能力。有研究利用中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)表达来源于恢复期患者血浆的重组抗体,对具有宽效价范围的 200 多种抗体进行进一步筛选,得到 9 种与 SARS-CoV-2 刺突蛋白(Spike Protein, S)受体结合域(Receptor Binding Domain, RBD)具有强结合能力的单克隆抗体,这些抗体通过与病毒 S 蛋白 RBD 区域的结合阻止病毒与受体血管紧张素转换酶 2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2, ACE2)的相互作用,使病毒无法入侵宿主细胞<sup>[7]</sup>。卫健委发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》(试行第 4 版)首次提出了恢复期血浆治疗的方案,该方案能在一定程度上缓解 COVID-19 患者的病情,说明恢复期患者血浆中的抗体具有治疗 COVID-19 的能力<sup>[8-9]</sup>。另一方面,多项体内实验证明,恢复期患者血浆的中和抗体可预防 SARS-CoV-2 的感染。利用高通量单细胞测序和 VDJ 测序技术对 COVID-19 患者产生的抗体进行高效筛选,发现靶向 RBD 区域的中和抗体 BD-368-2 在 SARS-CoV-2 暴露前后的接种

将对小鼠产生不同的影响<sup>[10]</sup>。提前接种可完全抑制病毒的感染,而感染后接种也有效降低了小鼠体内 SARS-CoV-2 的滴度并减轻小鼠因感染产生的病变,提示 COVID-19 患者血浆分离的抗体具有预防感染及临床治疗的双重功能<sup>[10]</sup>。此外, Rogers 等发现,针对 S 蛋白不同表位产生的中和抗体均具有上述功能,说明人体免疫系统可产生多种具有保护和治疗能力的中和抗体<sup>[11]</sup>。

其次, COVID-19 患者会出现与感染严重程度相关的 T 细胞减少、衰竭及 T 细胞多样性降低的现象,提示 SARS-CoV-2 可对 T 细胞介导的免疫应答产生影响<sup>[6,9]</sup>。

综上所述,天然 SARS-CoV-2 病毒拥有较强的免疫原性,其入侵可诱导人体产生强烈且特异的体液免疫和细胞免疫。多种针对不同抗原表位的中和抗体均具有预防病毒入侵及中和体内活病毒的能力,进一步揭示了人体免疫系统产生的特异性免疫具有潜在的保护作用。

### 1.2 SARS-CoV-2 抗原表位分析

表位是决定抗原分子特异性的特殊化学基团, B 细胞表位是特异性抗体识别的区域<sup>[12]</sup>。明确 SARS-CoV-2 的抗原表位不仅有助于病毒致病机理和抗原-抗体相互作用机制等理论研究的深入,而且能为疫苗的研发设计打下坚实的基础。

为保证筛选得到的抗原表位的可靠性和特异性,需根据抗原蛋白的理化性质、空间结构和潜在的翻译后修饰位点等信息对胞内区、跨膜区、蛋白三维空间结构内部等不易触及区域和拥有较大空间位阻的翻译后修饰位点进行排除,以获得易识别、可及性高且长度与天然抗体识别长度相匹配的抗原肽段<sup>[13-14]</sup>。利用信息学工具对抗原蛋白的理化性质和结构特征进行分析,并根据分析结果对抗原蛋白的潜在表位进行预测是目前研究 SARS-CoV-2 表位的主要手段。研究者通过 ProtParam、ExPASy、ProtScale 等工具分析抗原蛋白的消光系数、不稳定系数和极性等理化性质,再

分别通过 SignalP 5.0、TMHMM2.0、NetPhos 3.1 等软件对抗原蛋白潜在的信号肽、跨膜区和磷酸化位点进行预测,进一步利用 PSIPRED、SWISS-MODEL 和 PyMOL 等软件预测其二级结构和三级结构,综合以上信息并通过 DNASTAR、ABCpred、Bepred、ElliPro、DiscoTope、SEPPA、IEDB 等工具预测抗原蛋白潜在的 B 细胞表位和 T 细胞表位<sup>[12,14-15]</sup>。

SARS-CoV-2 拥有典型的冠状病毒基因结构,该病毒基因组的开放阅读框依次(从 5'→3'的顺序)编码病毒的复制酶系(ORF 1ab)、S 蛋白、包膜蛋白(Envelope Protein, E)、膜蛋白(Membrane Protein, M)和核衣壳蛋白(Nucleoprotein, N)<sup>[3,16-17]</sup>。由于 S 蛋白具有较强的免疫原性且该蛋白 S1 亚基介导的受体结合过程和 S2 亚基介导的膜融合过程是 SARS-CoV-2 特异性入侵宿主细胞的关键<sup>[18-19]</sup>,针对 S 蛋白进行的表位分析是 SARS-CoV-2 抗原表位研究的热点。简春利等的研究结果显示, SARS-CoV-2 的 S 蛋白二级结构环区中存在以 QLPP 和 RARS 为代表的适合抗体识别的短肽表位<sup>[14]</sup>。朱珊珊等的研究指出, SARS-CoV-2 S 蛋白二级结构的柔性区域以无规则卷曲为主,该蛋白含有 8 个潜在的 B 细胞表位且由 437-445、454-471 位氨基酸残基构成的表位位于该蛋白的 RBD 区<sup>[20]</sup>。伦永志等的研究指出, SARS-CoV-2 S 蛋白的 B 细胞表位主要位于该蛋白的 S1 亚基,辅助 T 细胞表位主要位于 S2 亚基; SARS-CoV-2 及 SARS-CoV 的 S 蛋白氨基酸序列比对分析结果显示, 2 种病毒的 S 蛋白拥有相近的理化性质和结构特征,其中 SARS-CoV-2 的 S 蛋白 600-605、695-703 和 888-896 位氨基酸残基构成的抗原表位与 SARS-CoV 对应区域高度一致,提示了冠状病毒可能拥有保守的抗原表位<sup>[13]</sup>。许志强等结合多个软件的预测结果初步筛选出 31 个位于 S 蛋白的线性表位和 9 个构象表位,再根据 SARS-CoV 体内实验验证的具有中和抗体诱导能力的表位区域对初筛得到的结果进行进一步筛选,得到 11 个线性表位和 5 个构象表位<sup>[12]</sup>。

这些表位均位于 S 蛋白的 RBD 区且具有诱导免疫系统产生中和抗体的能力,以这些表位为靶点设计的疫苗可诱导免疫系统产生针对病毒 RBD 区域的中和抗体,通过抗体的中和作用阻断 S 蛋白与受体 ACE2 的结合,从而达到保护接种者的目的。

值得注意的是, SARS-CoV-2 存在大量的糖基化位点。SARS-CoV-2 的 S 蛋白糖基化测定结果显示,该蛋白至少存在 22 个 N 连接的糖基化位点<sup>[21-22]</sup>。病毒蛋白的糖基化修饰被认为是病毒逃避宿主免疫系统识别和攻击的一种逃逸机制<sup>[14,23]</sup>。一方面,糖链的空间位阻和糖链与抗原蛋白氨基酸残基内部的相互作用将改变抗原表位的空间结构和暴露方式,使宿主的免疫系统无法识别原有的抗原表位;另一方面,糖链可保护抗原肽段免受宿主蛋白酶的识别降解,导致宿主免疫系统无法对相关抗原产生有效的免疫应答<sup>[23]</sup>。因此, SARS-CoV-2 抗原表位预测的相关研究应充分考虑抗原糖基化修饰的影响。对上述研究得到的不含糖基化修饰的抗原表位进行汇总,发现 SARS-CoV-2 的 S 蛋白 525-540、674-689、806-818 位氨基酸残基构成的抗原肽段是公认的抗原表位<sup>[12-14,20]</sup>。这些肽段具有较强的免疫原性和可接触性,是理想的中和抗体结合位点。

此外,高度保守且功能多样的 3C 样蛋白酶同样受到了研究者的关注<sup>[24-25]</sup>。3C 样蛋白酶抗原表位的预测结果显示,该蛋白的 92-101、101-107、119-125、170-180、186-199 位氨基酸残基构成的肽段是潜在的 B 细胞表位<sup>[24-25]</sup>。冠状病毒的 3C 样蛋白酶具有裂解复制酶多肽(pp1a 或 pp1ab)为成熟蛋白、指导 RNA 复制转录和参与多种结构蛋白加工组装等生物学功能<sup>[24]</sup>。抗体与 3C 样蛋白酶的结合将直接干扰该蛋白生物学功能的行使,使病毒因无法正常进行复制和组装而失去感染力。此类针对 SARS-CoV-2 重要功能蛋白进行疫苗设计的思路十分值得尝试。

利用生物信息学手段对 SARS-CoV-2 抗原表位进行预测可降低相关实验研究的工作量,为疫苗的研发争取到宝贵的时间,但该方法也存在一定的

局限性：(1) 不同分析工具预测得到的结果因软件内部算法的差异而各不相同，难以得到一致的结论。(2) 基于少量样本得到的预测结果不能有效地反映 SARS-CoV-2 潜在表位的真实情况。SARS-CoV-2 基因组中至少存在 6 754 个单碱基多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)位点<sup>[26]</sup>，SNP 引起的核苷酸变化会改变其编码蛋白的氨基酸组成，进而影响抗原蛋白的理化性质和结构特征。以 D614G 为代表的氨基酸变异改变了 S 蛋白各亚基的接触方式并引起了相关抗原表位构象的变化<sup>[26]</sup>。因此，需要尽可能多地分析 SARS-CoV-2 基因组序列并明确关键位点 SNP 和突变对抗原蛋白结构的影响，再结合多个平台的预测和相关验证实验的结果对抗原表位进行筛选，以得到更全面、准确的结果。

## 2 时下疫苗研发主要路线的研究进展

### 2.1 灭活疫苗

灭活疫苗的研发路线相对成熟，只需得到具有免疫原性的易培养毒株便可实现疫苗的批量化生产<sup>[27]</sup>。但此类疫苗存在以下缺点：(1) 灭活疫苗的免疫原性较弱，需多次接种才能诱导有效的免疫应答<sup>[27-28]</sup>。早期研究表明，灭活 SARS-CoV 可诱导小鼠产生较强的体液免疫反应，但小鼠 CD<sup>4+</sup>、CD<sup>8+</sup> 细胞的活性无明显提升，提示灭活冠状病毒疫苗诱导的细胞免疫应答较弱<sup>[29]</sup>。(2) 灭活病毒的批量生产需先获得高浓度的活病毒，活病毒的培养存在较高的安全风险<sup>[29]</sup>。(3) 灭活病毒可能含有诱导非中和抗体产生的抗原决定簇，具有引起抗体依赖增强效应(Antibody-Dependent Enhancement, ADE)的风险<sup>[30]</sup>。

Gao 等的研究发现，灭活疫苗 PicoVacc 在多种模式生物体内均诱导出了具有广泛中和能力的特异性抗体，这些抗体主要针对 SARS-CoV-2 的 S 蛋白和 N 蛋白上的抗原表位<sup>[31]</sup>。进一步研究发现，针对 S 蛋白的特异性 IgG 抗体的浓度是针对 N 蛋白 IgG 抗体的 30 倍，说明灭活 SARS-CoV-2 病毒的有效表位主要集中在 S 蛋白<sup>[31]</sup>。值得注意的是，ADE 现象并未在接种该疫苗的模式生物中出现，

提示该疫苗在具备免疫原性的同时具有较高的安全性<sup>[31]</sup>。目前该疫苗已在巴西开展 III 期临床试验，在评估该疫苗的免疫原性和安全性的同时，将对疫苗的接种者进行长达一年的随访，以进一步评估该疫苗能否提供长效的保护<sup>[32-33]</sup>。此外，登记号为 ChiCTR2000031809 和 ChiCTR2000032459 的 SARS-CoV-2 灭活疫苗也将进入 I/II 期临床试验，相关试验的结果同样令人期待<sup>[34]</sup>。

### 2.2 减毒活疫苗

减毒毒株具有与野生型毒株高度相似的感染模式，单次接种即可诱导强烈且持久的免疫应答，所以此类疫苗已在多种传染病的预防中得到应用<sup>[9,27]</sup>。但是减毒活疫苗潜在的生物安全风险制约了此类疫苗在 SARS-CoV-2 防治中的应用：(1) 目前尚未建立 SARS-CoV-2 减毒毒株残余毒力评价的安全标准，难以评判某一毒株是否完全失去致病性<sup>[27]</sup>。(2) 冠状病毒减毒毒株具有回复突变的潜力。已有研究证实，接种至小鼠体内的 SARS-CoV 减毒毒株可重新表达具有致病力的毒蛋白，提示减毒冠状病毒仍具备感染接种者的能力<sup>[35]</sup>。

### 2.3 病毒载体疫苗

病毒载体疫苗具有天然的黏膜嗜性，在刺激机体产生体液免疫应答和细胞免疫应答的同时诱导强烈的黏膜免疫反应<sup>[29,36]</sup>。目前，以腺病毒载体疫苗 Ad5-CoV 和 ChAdOx1 nCoV-19 为代表的 SARS-CoV-2 病毒载体疫苗取得了一定的突破。I 期临床试验的结果显示，Ad5-CoV 可诱导大多数接种者产生有效的免疫应答，受试者体内特异性中和抗体的浓度在接种 14 d 显著上升并在接种后 28 d 达到峰值，特异性 T 细胞免疫应答也在接种后 2 周达到峰值<sup>[37]</sup>。尽管 I、II 期临床试验的结果表明 Ad5-CoV 具有较强的免疫原性和较高的安全性，但广泛存在的针对 Ad5 病毒的预存免疫是该疫苗发展应用所面临的首要障碍<sup>[36]</sup>。腺病毒广泛存在于自然界且不同血清型毒株之间存在广泛的免疫交叉反应，个体一旦受到天然腺病毒的感染，就极易产生针对疫苗载体的免疫记忆<sup>[36]</sup>。Ad5-CoV I、

II 期临床试验结果指出,约一半受试者体内存在较强的针对 Ad5 病毒载体的预存免疫,而且高浓度 Ad5 抗体的存在会对疫苗的免疫效果产生负面影响<sup>[37-38]</sup>。II 期临床试验的结果进一步发现,对于具有 Ad5 暴露史的人群,尤其是 55 岁以上人群,单次接种并不足以诱导足够高水平的体液免疫,提示了该疫苗在具有 Ad5 暴露史的人群中无法发挥最佳的免疫效果<sup>[37-38]</sup>。

为保证该疫苗的有效性,可通过以下手段降低预存免疫的影响:(1) 可对现有的病毒载体进行更换,利用如 Ad11 或 Ad35 等稀有血清型毒株作为替代载体,降低载体病毒被免疫系统清除的概率<sup>[39]</sup>。(2) 可提前检测接种者体内预存免疫的种类及强度,并根据检测的结果接种适合的疫苗。(3) 在疫苗接种后的 3-6 个月进行二次接种也是减轻预存免疫影响的潜在解决方案<sup>[38]</sup>。

另一种编码 S 蛋白的重组腺病毒载体疫苗 ChAdOx1 nCoV-19 同样进入了 III 期临床试验。该疫苗的临床前试验表明,ChAdOx1 nCoV-19 的接种可诱导小鼠和恒河猴产生特异性中和抗体及强烈的 Th1 型细胞免疫应答<sup>[40]</sup>。在 I/II 期临床试验中,ChAdOx1 nCoV-19 接种后 7 d 便诱导出了相应的 T 细胞免疫应答并在接种后的 14 d 达到峰值;特异性体液免疫水平在接种后的 28 d 出现显著增加且二次免疫有利于抗体水平的进一步提升<sup>[41]</sup>。值得注意的是,只有约 1% 的受试者体内含有较强的针对 ChAdOx1 载体的预存免疫,而且低水平的预存免疫并不会影响疫苗的免疫效果,提示该疫苗能在大多数人体内发挥最佳的免疫效果<sup>[41]</sup>。目前,尚未明确该疫苗对 55 岁以上的人群和 12 岁以下的儿童是否具有相同的保护作用,因此该疫苗的 III 期临床试验将招募 55 岁以上的老年人和 5-12 岁的儿童作为志愿者<sup>[42]</sup>。

## 2.4 核酸疫苗

目前,以 INO-4800 为代表的 SARS-CoV-2 DNA 疫苗的研发取得了一定进展。经体外转染实验验证具有 S 蛋白表达能力的 INO-4800 可诱导小鼠和豚

鼠产生针对 SARS-CoV-2 S 蛋白的特异性中和抗体和相应的 T 细胞应答,提示了 INO-4800 可利用宿主的细胞表达具有免疫原性的 S 抗原<sup>[18,43]</sup>。该疫苗 I 期临床试验的结果显示,INO-4800 不会引起明显的不良反应,接种 2 次后 94% 的受试者产生了有效的免疫应答,提示该疫苗具有保护大多数接种者免受 SARS-CoV-2 感染的潜力。此外,针对 S 蛋白设计的口服 DNA 疫苗 bacTRL-Spike 是首款口服 DNA 疫苗,该疫苗不但能有效解决 DNA 疫苗接种效果差、接种痛感高等问题,而且具备诱导粘膜免疫应答的潜力,其临床试验的结果值得期待<sup>[29,32]</sup>。

安全性问题是制约人用 DNA 疫苗发展的核心问题,此类疫苗主要存在 3 个方面的风险:(1) 部分 DNA 载体具有与宿主基因组整合的能力,外源 DNA 的插入可能会造成宿主原癌基因活化或抑癌基因失活,具有潜在的致癌风险<sup>[27,44]</sup>。(2) DNA 疫苗诱导宿主细胞持续少量地表达抗原蛋白,易造成免疫系统错误地将抗原蛋白识别为自身蛋白,从而形成免疫耐受<sup>[22]</sup>。(3) 用于载体阳性重组子筛选的抗生素抗性标记的导入可能会造成接种者产生针对此类抗生素的耐药性。因此,在明确疫苗保护效果和接种副作用的同时,还需对上述 DNA 疫苗接种可能引发的安全性问题进行深入研究。

与 DNA 疫苗相比,编码抗原的 mRNA 无需进入宿主细胞的细胞核,保证了疫苗的安全性<sup>[45]</sup>。以全长 S 蛋白为靶抗原的 mRNA-1273 可诱导接种者产生具有剂量相关性的免疫应答;该疫苗二次接种后的 2 周,接种剂量为 25  $\mu\text{g}$  的低剂量接种者的体内可产生与恢复期患者相当的抗体水平,说明 mRNA-1273 可诱导人体产生较强的体液免疫应答<sup>[34,45]</sup>。该疫苗利用脂质纳米颗粒作为 mRNA 的递送载体,在减轻 mRNA 与细胞膜磷脂双分子层静电排斥的同时增加了 mRNA 的稳定性,提高了疫苗的递送效率<sup>[27,34]</sup>。ShaCoVacc 研发的针对 SARS-CoV-2 不同抗原的 mRNA 疫苗可诱导小鼠产生具有高效中和作用的特异性抗体,此类针对多

个抗原靶点设计的 mRNA 疫苗能有效防止 SARS-CoV-2 逃逸突变体的产生,具有更为稳定的保护能力<sup>[34,46]</sup>。疫苗稳定性差、缺乏长效保护力和难以引起有效的 T 细胞免疫应答是 mRNA 疫苗的主要缺点,因此, mRNA-1273 的 III 期临床试验将对该疫苗的有效性和安全性进行长达 2 年的深入评估,以确保疫苗具有长效保护力<sup>[47-48]</sup>。

## 2.5 重组蛋白疫苗

选择合适的蛋白表达系统生产目的抗原,再对得到的表达产物进行分离纯化是重组蛋白疫苗研发的基本步骤<sup>[27]</sup>。天然 SARS-CoV-2 抗原蛋白存在较多的糖基化位点,为保证表达产物的三维空间结构尽可能地与天然抗原相似,通常利用 CHO 细胞或昆虫细胞作为 SARS-CoV-2 抗原的表达系统<sup>[18,27]</sup>。徐铮昊等利用 CHO 细胞对抗原 S1 和人 IgG1 Fc 段的融合蛋白(S1-hFc)进行表达,并对 S1-hFc 和 DNA 疫苗 PVRC-RBD-mFc (编码 RBD 区域和小鼠 IgG1 Fc 融合蛋白的质粒)接种的免疫效果进行比较,发现 S1-hFc 诱导的特异性体液免疫应答水平较 PVRC-RBD-mFc 更高,而且该疫苗产生的抗体具有更强的中和能力<sup>[49]</sup>。Yang 等利用昆虫杆状病毒表达载体 Bac-to-bac 对 S 蛋白的 319-545 位残基构成的片段进行了表达,该重组蛋白能诱导小鼠、兔子和恒河猴等多种模式生物产生有效的体液免疫应答,免疫动物的血清能阻断病毒与受体 ACE 2 的结合并中和 SARS-CoV-2 活病毒<sup>[50]</sup>。

尽管体内实验的结果显示了重组蛋白疫苗具有良好的免疫原性和较高的安全性,但 CHO 细胞和昆虫细胞为代表的真核动物细胞表达系统大多存在细胞培养成本高、蛋白表达效率低、产物纯化繁琐等缺点,限制了重组蛋白的工业化生产<sup>[51-52]</sup>。分泌型毕赤酵母表达系统可在诱导型启动子 P<sub>AOX1</sub> 的严格调控下稳定高效地分泌具有真核细胞翻译后修饰的重组蛋白。毕赤酵母表达系统具有广泛的适应性,多种不同来源的蛋白质在该系统中得到成功表达,提示该系统具有批量化生产 SARS-CoV-2 抗原蛋白的潜力。

## 2.6 基于 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 交叉表位设计的疫苗

SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 同为  $\beta$ -冠状病毒且二者基因组的相似性高达 79%,提示这 2 种病毒大概率存在较多的交叉表位<sup>[53-54]</sup>。因此,在 SARS-CoV 早期研究筛选得到的中和抗体库中寻找具有 SARS-CoV-2 中和能力的抗体,并根据这些抗体结合的抗原表位设计疫苗被认为是 SARS-CoV-2 疫苗开发最快捷有效的策略。此类疫苗不但具有开发成本低、研发周期短等优势,而且具有保护接种者免受今后可能出现的其他冠状病毒感染的潜力,对时下 COVID-19 蔓延的阻止和今后可能出现的冠状病毒疫情的防控均体现出较高的应用价值。

这 2 种病毒对应表位关键氨基酸残基的差异程度决定了针对这些位点产生的中和抗体能否产生有效的交叉反应。多项研究指出,大多数针对 SARS-CoV 的 S 蛋白及其 RBD 区域产生的中和抗体(如 CR3014、m396、S230、80R)对 SARS-CoV-2 无明显的交叉作用及中和活性<sup>[18,55-56]</sup>。该现象可能与二者 RBD 区域的 6 个关键氨基酸残基有 5 个不同相关<sup>[54,57]</sup>。Yi 等根据 SARS-CoV 对应位点的氨基酸信息分别对 SARS-CoV-2 的 RBD 区域内与 ACE2 相互作用的关键残基进行突变,发现这种替换将对 SARS-CoV-2 与 ACE2 的结合能力产生巨大影响<sup>[58]</sup>。该结果验证了 S 蛋白 RBD 区域关键氨基酸残基的差异是大部分抗体无法产生交叉反应的关键,而另一方面,针对保守程度较高位点产生的抗体则表现出更好的交叉反应能力<sup>[59]</sup>。来源于康复 SARS-CoV 患者血浆的中和抗体 CR3022 能与 SARS-CoV-2 的 S 蛋白 RBD 区域发生交叉反应;进一步分析发现,该抗体识别的 28 个氨基酸残基中的 24 个在两种病毒间保守,但非保守位点和翻译后修饰的差异使得该抗体与 SARS-CoV-2 的亲合力远低于 SARS-CoV<sup>[53]</sup>。Tai 等从 SARS-CoV RBD 特异性中和抗体库中筛选出 6 个与 SARS-CoV-2 S 蛋白发生交叉反应的单克隆抗体,

其中 7B11 和 18F3 具有中和 SARS-CoV-2 的能力, 它们识别的表位也都具有较高的保守性<sup>[60]</sup>。

具有交叉中和能力的抗体大多作用于病毒的保守表位。但要注意的是, 能与 S 蛋白发生交叉反应并不等同于该抗体对全病毒具有中和作用。有研究指出, SARS 和 COVID-19 康复患者的血浆中均存在能与不同病毒 S 蛋白发生交叉反应的抗体, 但这些抗体无法中和另一种全病毒<sup>[56]</sup>。该现象说明尽管某些抗原蛋白在离体条件下具有相似的空间结构和抗原性, 但当它们分别位于不同病毒颗粒的时候, 这种相似的性质会因为抗原与病毒颗粒其他成分的相互作用或受到不同的翻译后修饰而改变。因此, 针对不同病毒颗粒的交叉中和能力才是衡量筛选得到的交叉抗体及其对应保守表位是否具有疫苗设计潜力的金标准。

### 3 疫苗应用潜在的有效性问题 and 安全性问题

#### 3.1 病毒变异对现有疫苗有效性的影响

SARS-CoV-2 较高的变异速率是相关疫苗研发的一个巨大挑战, 病毒核苷酸序列的变异将造成相关编码蛋白的一级结构发生变化, 进而影响蛋白质的空间结构和生物学功能<sup>[61-62]</sup>。当变异累积到一定程度后, 早期研发的疫苗便可能无法保护接种者免受新生代毒株的感染<sup>[18]</sup>。目前已有研究指出, SARS-CoV-2 基因组特定位点的突变将引起病毒进化。Tang 等根据 SARS-CoV-2 基因组的 8 782 位和 28 192 位关联性 SNP 将毒株分为 S 和 L 这 2 个亚型, 并通过突变前后基因表达产物的功能性分析得到新出现的 L 型毒株具有更强传播能力的结论<sup>[54]</sup>。另一项研究指出, 2020 年 1 月下旬首次发现的 D614G 毒株的分离频率在逐步上升, 目前该毒株占全球新分离毒株的 97% 以上, 提示 D614G 已成为全球范围内的主要流行毒株<sup>[26]</sup>。对该突变位点的分析发现, D614G 变异可提升 SARS-CoV-2 的感染力和病毒载量, 更利于病毒在人群的传播<sup>[26]</sup>。尽管早期筛选得到的 SARS-CoV-2 单克隆抗体仍能有效中和 D614G 突变株, 但今后可能出现的位

于疫苗作用位点的突变应值得警惕<sup>[26]</sup>。此外, 病毒在不同中间宿主体内发生的遗传重组也是毒株变异进化的重要手段<sup>[13]</sup>。COVID-19 的全球大流行将不可避免地造成大量动物充当 SARS-CoV-2 中间宿主的角色, 更为复杂、多变的传播网络将进一步提升毒株进化速率, 为疫苗的研发带来新的挑战<sup>[17,62-64]</sup>。

为保证疫苗的有效性, 必须加强不同生物来源毒株的序列分析, 明确当下流行毒株和其他生物体内毒株的差别并对病毒的进化方向作出判断, 做到对未知表型毒株的提前防范。

#### 3.2 疫苗接种后可能出现的逃逸突变和回复突变

疫苗诱导产生的中和抗体对接种者具有保护作用, 但中和抗体的存在也可能会增加 SARS-CoV-2 逃逸突变概率<sup>[65]</sup>。有研究指出, 单一抗体或竞争性抗体(结合同一位点的不同抗体)的存在无法阻止逃逸突变体的产生, 而非竞争性抗体能很好地保护细胞免受 SARS-CoV-2 的感染<sup>[46]</sup>。以上结果表明, 抗体带来的选择压力会驱动病毒产生相应的逃逸突变, 针对单一表位设计的疫苗仅能提供有限的保护力。多项研究证实, 同时作用于 SARS-CoV-2 多个关键表位的混合抗体能有效阻止病毒的逃逸, 根据这些抗体对应表位设计的疫苗拥有更加稳定的保护能力<sup>[45-46,66]</sup>。

回复突变等生物安全问题制约了冠状病毒减毒活疫苗的发展。早期关于 SARS-CoV 回复突变潜力的研究发现, 全长 E 基因删除的 SARS-CoV 减毒毒株可在体内外传代的过程中恢复毒力<sup>[67]</sup>。研究者对 SARS-CoV 的 E 基因进行了不同程度的缺失突变, 发现该病毒主要通过插入新型嵌合蛋白或将 PBM 基序(E 蛋白 C 末端关键部分)插入 8a 蛋白、E 蛋白(部分缺失)等原有编码等方式恢复毒力<sup>[67]</sup>。在 E 基因仅出现 PBM 基序缺失的情况下, SARS-CoV 倾向于通过在编码自身蛋白的基因中插入编码 PBM 基序序列的方式恢复 PBM 的生物学功能; 当 E 基因完全缺失或无法恢复时, 缺陷型 SARS-CoV 毒株则通过具有补偿 E 基因生物学



功能的新型嵌合蛋白的产生来恢复自身毒力<sup>[67]</sup>。值得注意的是,SARS-CoV 减毒株在不同细胞系中产生的嵌合蛋白有所不同,提示了冠状病毒的逃逸机制具有宿主特异性<sup>[67]</sup>。尽管可以通过多个抗原基因同时突变的方式降低减毒毒株回复突变的概率,但鉴于 SARS-CoV-2 在人体内的逃逸机制尚未明确,减毒活疫苗的接种仍具有较高的安全风险。

### 3.3 疫苗接种引发的 ADE 现象

ADE 现象指的是抗体与病毒颗粒结合形成的免疫复合物被表达 Fc 受体或补体受体的靶细胞识别结合,使病毒颗粒能感染此类不含天然病毒受体的细胞,进而加重宿主的感染<sup>[28,30,68]</sup>。多项研究已经证实,包括 SARS-CoV 和 MERS-CoV 在内的多种病毒存在 ADE 现象<sup>[34,50,68-69]</sup>。

对表达 Fc $\gamma$  受体细胞的增强作用和对表达补体受体细胞的增强作用是 ADE 引发感染加剧的主要机制。一方面,免疫复合物抗体的 Fc 区域与免疫细胞 Fc $\gamma$  受体的结合会导致病毒颗粒进入免疫细胞,通过 IL-2、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\gamma$ 、INF- $\alpha$  等细胞因子下调和 STAT 通路的抑制破坏宿主的免疫应答;另一方面,免疫复合物与 C1q 的结合将活化补体系统,通过 C2a、C4b 的招募产生具有活性的 C3 转移酶并水解 C3,水解产物 C3b 进一步与病毒结合形成病毒-C3b 复合物,该复合物被补体受体识别后将引发细胞裂解,从而加重感染<sup>[68]</sup>。

免疫复合物的形成是以上过程发生的共同起始步骤,非中和抗体与抗原的结合被认为是此类引发 ADE 效应的免疫复合物形成的基础<sup>[6,28,49]</sup>。因此,选择仅诱导中和抗体产生的抗原表位进行疫苗设计可有效防止 ADE 的发生<sup>[49]</sup>。多项研究表明,SARS-CoV-2 全长 N 蛋白、S 蛋白等抗原蛋白具有诱导非中和抗体产生的潜力;S1 蛋白、RBD 蛋白等含有优势中和表位的抗原片段能高效诱导中和抗体产生,但这些片段的高变异率限制了相关疫苗的发展<sup>[6,10-11,55]</sup>。因此,可以结合生物信息学分析及中和实验的结果对现有的 SARS-CoV-2 单克隆抗体

库进行筛选,寻找与含有优势中和表位的保守抗原片段结合的抗体并根据这些抗体设计无 ADE 风险的疫苗。

此外,有研究发现稀释倍数较低的恢复期 SARS 患者血清可有效中和 SARS-CoV,但高稀释倍数的同一血清却会引起更高水平的细胞凋亡<sup>[69]</sup>。该结果提示 ADE 的发生可能与中和抗体的保护能力有关,当中和抗体达到或高于有效保护浓度时,非中和抗体引发的 ADE 感染将被中和抗体的强中和作用消除。也就是说,尽管接种某些疫苗有诱导 ADE 发生的风险,但这种风险会因为中和抗体的存在而大幅降低。

### 3.4 针对冠状病毒的长效免疫记忆的缺乏

SARS 康复患者的回顾性研究指出,康复患者体内缺乏针对 SARS-CoV 的长效免疫记忆<sup>[35,70-71]</sup>。特异性抗体的平均维持时间为 2 年,从第 3 年开始抗体的效价及阳性率出现显著降低,第 6 年的检出率低于 10%<sup>[70-71]</sup>。该结果说明 SARS-CoV 自然感染诱导的免疫应答仅能维持 3 年,此后仍有再次感染的风险。因此,需要对 COVID-19 患者体内的免疫应答水平进行长期追踪,明确人体免疫系统是否缺乏针对 SARS-CoV-2 的长效免疫记忆,为疫苗接种策略的制定打下坚实的基础。

## 4 结语

疫苗的接种被认为是阻止时下 COVID-19 疫情进一步蔓延的最有效手段。基于生物信息学手段进行的抗原表位预测是疫苗研发的基础,随着 SARS-CoV-2 基因组序列研究的深入,更多位于 SARS-CoV-2 不同基因的潜在表位将被发现,寻找保守性高且仅诱导中和抗体产生表位将是今后相关研究的重点。

多条技术路线同时开展并在研发的过程中评估疫苗的安全性和有效性,可为 SARS-CoV-2 疫苗的研制争取到宝贵的时间。目前,多条疫苗研发的技术路线均取得了一定的进展,它们各自的优缺点也在研发的过程中得到体现。病毒变异及



免疫系统引起的疫苗有效性和疫苗接种潜在的安全性问题制约了相关疫苗的应用。为了提高相关疫苗的有效性和安全性,我们还需要对以下问题进行深入研究:(1) 对不同国家地区及不同生物来源的 SARS-CoV-2 毒株的序列进行分析对比,明确此前设计的疫苗能否保护接种者免受当下流行毒株及潜在流行毒株的感染。(2) 进一步明确 SARS-CoV-2 在人体内的逃逸机制和 ADE 引发机制,并探究作用于多个抗原表位的“鸡尾酒抗体”和针对保守表位产生的中和抗体能否有效阻止病毒的逃逸及 ADE 的产生。(3) 需要对疫苗接种者和 COVID-19 康复者体内的免疫应答水平进行长期追踪,明确疫苗的保护时长并根据免疫记忆的特点制定合适的疫苗接种策略。

## REFERENCES

- [1] World Health Organization. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard[EB/OL]. (2020-10-21). <https://covid19.who.int/>
- [2] Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, Spitters C, Ericson K, Wilkerson S, Tural A, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 382(10): 929-936
- [3] Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269
- [4] Li Q, Guan XH, Wu P, Wang XY, Zhou L, Tong YQ, Ren RQ, Leung KSM, Lau EHY, Wong JY, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 382(13): 1199-1207
- [5] Wu ZY, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for disease control and prevention[J]. *JAMA*, 2020, 323(13): 1239-1242
- [6] Li WH, Li YM. Design principle and research progress of COVID-19 vaccine[J/OL]. *University Chemistry*, 2020[2020-07-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1815.O6.20200714.1346.004.html> (in Chinese)  
李文浩, 李艳梅. 新型冠状病毒疫苗设计原理与研究进展[J/OL]. *大学化学*, 2020[2020-07-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1815.O6.20200714.1346.004.html>
- [7] Hansen J, Baum A, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Wloga E, Fulton BO, Yan Y, Koon K, Patel K, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail[J]. *Science*, 2020, 369(6506): 1010-1014
- [8] National Health Commission of the People's Republic of China, the office of National Administration of Traditional Chinese Medicine. Notification on print and distribute the diagnosis and treatment protocol of COVID-19 (trial 4<sup>th</sup> edition)[EB/OL]. (2020-01-27). <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/4294563ed35b43209b31739bd0785e67.shtml> (in Chinese)  
国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第四版)的通知[EB/OL]. (2020-01-27). <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/4294563ed35b43209b31739bd0785e67.shtml>
- [9] Li KY, Zhou YL, Zhao XH, Yuan YM, Hao ZH. Pathogenesis process and vaccine-design strategies for severe acute respiratory syndromes coronavirus 2[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2020, 36(4): 703-708 (in Chinese)  
李珂颖, 周艳琳, 赵晓会, 袁铁铭, 郝振华. 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的致病过程及疫苗设计策略[J]. *病毒学报*, 2020, 36(4): 703-708
- [10] Cao YL, Su B, Guo XH, Sun WJ, Deng YQ, Bao LL, Zhu QY, Zhang X, Zheng YH, Geng CY, et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells[J]. *Cell*, 2020, 182(1): 73-84.e16
- [11] Rogers TF, Zhao FZ, Huang DL, Beutler N, Burns A, He WT, Limbo O, Smith C, Song G, Woehl J, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model[J]. *Science*, 2020, 369(6506): 956-963
- [12] Xu ZQ, Lu C, Hu XJ, Guo Y, Hu QL, Zhu Y. Epitope-based peptide vaccine design and immunogenicity analysis of the spike protein from SARS-CoV-2[J]. *Journal of Gannan Medical University*, 2020, 40(3): 217-224 (in Chinese)  
许志强, 鲁陈, 胡晓军, 郭有, 胡巧丽, 朱颖. 新型冠状病毒棘突蛋白免疫原性分析及其多肽疫苗设计研究[J]. *赣南医学院学报*, 2020, 40(3): 217-224
- [13] Lun YZ, Liu B, Dong W, Sun J, Pan LH. Comparative analysis of structural characteristics and epitopes in S proteins between SARS-CoV-2 and SARS-CoV[J]. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 2020, 49(3): 315-323 (in Chinese)  
伦永志, 刘奔, 董雯, 孙杰, 潘凌鸿. 两种严重急性呼吸综合征冠状病毒 S 蛋白结构特征及抗原表位比较[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2020, 49(3): 315-323
- [14] Jian CL, Wang JQ, Zhang LY, Yu Y, Liao F. Mining of B cell linear epitopes of SARS-CoV-2 spike protein[J/OL]. *Journal of Chongqing University of Technology (Natural Science)*, 2020[2020-07-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/>

- 50.1205.T.20200708.1153.002.html (in Chinese)  
简春利, 汪佳琪, 张露瑶, 余瑛, 廖飞. 新冠病毒刺突蛋白 B 细胞线性表位发掘[J/OL]. 重庆理工大学学报: 自然科学, 2020[2020-07-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1205.T.20200708.1153.002.html>
- [15] Tan YJ, Tang B. Analysis of the structure and function of S protein of 2019 novel corona virus[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(3): 41-50 (in Chinese)  
谭玉靓, 唐标. 2019 新型冠状病毒 S 蛋白的结构和功能分析[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(3): 41-50
- [16] Wu AP, Peng YS, Huang BY, Ding X, Wang XY, Niu PH, Meng J, Zhu ZZ, Zhang Z, Wang JY, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China[J]. Cell Host & Microbe, 2020, 27(3): 325-328
- [17] Yang YS, Peng FJ, Wang RS, Guan K, Jiang TJ, Xu GG, Sun J, Chang C. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China[J]. Journal of Autoimmunity, 2020, 109: 102434
- [18] Chen J, Li B, Shen S, Fan YF. Research progress on COVID-19 vaccine[J]. Chinese Journal of Virology, 2020, 36(4): 685-691 (in Chinese)  
陈静, 李波, 申硕, 范亚飞. COVID-19 疫苗的研究进展[J]. 病毒学报, 2020, 36(4): 685-691
- [19] Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2020, 79: 104212
- [20] Zhu SL, Ding N, Xiang D, Dong HY, Xue XY, Zhang LF. Prediction and analysis of B-cell epitopes of SARS-CoV-2 S protein[J]. Journal of Wenzhou Medical University, 2020, 50(3): 173-176 (in Chinese)  
朱珊珊, 丁宁, 项丹, 董海艳, 薛向阳, 张丽芳. 新型冠状病毒 S 蛋白 B 细胞表位的预测与分析[J]. 温州医科大学学报, 2020, 50(3): 173-176
- [21] Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike[J]. Science, 2020, 369(6501): 330-333
- [22] Liu CX, Yi XL, Cui T, Wu WD, Yan FY. Research development and evaluation of SARS-CoV-2 vaccines[J]. Drug Evaluation Research, 2020, 43(7): 1421-1432 (in Chinese)  
刘昌孝, 伊秀林, 崔涛, 武卫党, 闫凤英. 新型冠状病毒疫苗研发与评价[J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1421-1432
- [23] Yang YL, Wu J. Advances in the relationship between immune and glycosylation of viral antigen[J]. Letters in Biotechnology, 2008, 19(5): 728-730 (in Chinese)  
杨依丽, 吴军. 病毒抗原糖基化与免疫关系的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 728-730
- [24] Wang D, Peng L. Analysis of structural features and potential epitopein 3C-like protease (3CLpro) of SARS-CoV-2[J]. Life Science Research, 2020, 24(5): 345-353,346 (in Chinese)  
王道, 彭亮. 新型冠状病毒 3CL 水解酶的结构特征及其抗原表位分析[J]. 生命科学研究, 2020, 24(5): 345-353,346
- [25] Dai ZW, Tang B. Structural and functional characteristics analysis of SARS-CoV-2 3CLpro via bioinformatics[J/OL]. Journal of Microbiology, 2020[2020-07-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.Q.20200703.1224.002.html> (in Chinese)  
戴姿薇, 唐标. 新型冠状病毒 3C 样蛋白酶结构和功能特征分析[J/OL]. 微生物学杂志, 2020[2020-07-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.Q.20200703.1224.002.html>
- [26] Yurkovetskiy L, Pascal KE, Tompkins-Tinch C, Nyalile T, Wang Y, Baum A, Diehl WE, Dauphin A, Carbone C, Veinotte K, et al. SARS-CoV-2 spike protein variant D614G increases infectivity and retains sensitivity to antibodies that target the receptor binding domain[J/OL]. The Preprint Server for Biology, 2020 (2020-07-04). <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.04.187757v1>
- [27] Kang Z, Tang M. Progress and analysis on the development of 2019-nCoV vaccine[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2020, 37(3): 373-379 (in Chinese)  
康庄, 唐梅. 新型冠状病毒疫苗的研发进展及分析[J]. 生物医学工程学杂志, 2020, 37(3): 373-379
- [28] Yang LM, Tian DY, Liu WJ. Strategies for vaccine development of COVID-19[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(4): 593-604 (in Chinese)  
杨利敏, 田德雨, 刘文军. 新型冠状病毒疫苗研究策略分析[J]. 生物工程学报, 2020, 36(4): 593-604
- [29] Xiong S, Wang YF, Liu XJ, Zhang MY, Zhang CH, Liu SS, Ran YC, Yang HY, Li JX, Lu JH, et al. Early immunoresponse of BALB/C mice to inactivated SARS vaccines prepared with different adjuvants[J]. Chinese Journal of Immunology, 2004, 20(6): 413-417 (in Chinese)  
熊盛, 王一飞, 刘新建, 张美英, 张传海, 刘石生, 冉延超, 杨红宇, 李久香, 陆家海, 等. BALB/C 小鼠对不同佐剂 SARS 灭活疫苗的早期免疫反应[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(6): 413-417
- [30] Meng TT, Kong QF, Wang FZ, Li YQ, Zhang GM. Progress on the research and development of inactivated novel coronavirus vaccines[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2020, 26(5): 590-596 (in Chinese)  
孟彤彤, 孔庆福, 王富珍, 李媛秋, 张国民. 新型冠状病毒灭活疫苗研究进展[J]. 中国疫苗和免疫, 2020, 26(5): 590-596
- [31] Gao Q, Bao LL, Mao HY, Wang L, Xu KW, Yang MN, Li YJ, Zhu L, Wang N, Lv Z, et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2[J]. Science,

- 2020, 369(6499): 77-81
- [32] Rego GNA, Nucci MP, Alves AH, Oliveira FA, Marti LC, Nucci LP, Mamani JB, Gamarra LF. Current clinical trials protocols and the global effort for immunization against SARS-CoV-2[J]. *Vaccines*, 2020, 8(3): 474
- [33] NCT04456595. Clinical trial of efficacy and safety of sinovac's adsorbed COVID-19 (Inactivated) vaccine in Healthcare Professionals (PROFISCOV)[EB/OL]. (2020-08-04). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04456595>
- [34] Koirala A, Joo YJ, Khatami A, Chiu C, Britton PN. Vaccines for COVID-19: The current state of play[J]. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2020, 35: 43-49
- [35] Liang YW, Lai LL, Wang H. Pathogenic mechanism and related vaccine development of novel coronavirus[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2020, 48(4): 68-73 (in Chinese)  
梁育玮, 赖玲玲, 王航. 新型冠状病毒致病机理及其疫苗的研发进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2020, 48(4): 68-73
- [36] Zhang Q, Hu QQ, Wang FZ, Sun XJ, Yin ZD. Research and development of adenovirus vectored vaccines[J]. *Chinese Journal of Vaccines and Immunization*, 2020, 26(4): 484-492 (in Chinese)  
张倩, 胡倩倩, 王富珍, 孙校金, 尹遵栋. 腺病毒载体疫苗研发进展[J]. *中国疫苗和免疫*, 2020, 26(4): 484-492
- [37] Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, Wu SP, Wang BS, Wang Z, Wang L, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10240): 1845-1854
- [38] Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH, Li JX, Yang BF, Wang L, Wang WJ, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *The Lancet*, 2020, 396(10249): 479-488
- [39] Vogels R, Zuijdgheest D, van Rijnsoever R, Hartkoorn E, Damen I, de Béthune MP, Kostense S, Penders G, Helmus N, Koudstaal W, et al. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(15): 8263-8271
- [40] van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR, Avanzato VA, Bushmaker T, Flaxman A, Ulaszewska M, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 578-582
- [41] Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, Bellamy D, Bibi S, Bittaye M, Clutterbuck EA, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial[J]. *The Lancet*, 2020, 396(10249): 467-478
- [42] NCT04400838. Investigating a vaccine against COVID-19[EB/OL]. (2020-10-14). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04400838>
- [43] Smith TRF, Patel A, Ramos S, Elwood D, Zhu XZ, Yan J, Gary EN, Walker SN, Schultheis K, Purwar M, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2601
- [44] Zhang L, Li Y, An ZJ. Progress toward development of DNA vaccines for coronavirus disease 2019[J/OL]. *Chinese Journal of Vaccines and Immunization*, 2020[2020-07-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5517.R.20200730.1111.002.html> (in Chinese)  
张琳, 李燕, 安志杰. 新型冠状病毒 DNA 疫苗研发进展[J/OL]. *中国疫苗和免疫*, 2020[2020-07-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5517.R.20200730.1111.002.html>
- [45] Zhang L, Li Y, An ZJ. Progress toward development of novel coronavirus mRNA vaccines[J]. *Chinese Journal of Vaccines and Immunization*, 2020, 26(3): 349-356 (in Chinese)  
张琳, 李燕, 安志杰. 新型冠状病毒 mRNA 疫苗研发进展[J]. *中国疫苗和免疫*, 2020, 26(3): 349-356
- [46] Baum A, Fulton BO, Wloga E, Copin R, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Lanza K, Negron N, Ni M, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies[J]. *Science*, 2020, 369(6506): 1014-1018
- [47] Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, Flach B, O'Connell S, Bock KW, Minai M, et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(16): 1544-1555
- [48] NCT04470427. A study to evaluate efficacy, safety, and immunogenicity of mRNA-1273 vaccine in adults aged 18 years and older to prevent COVID-19[EB/OL]. (2020-09-28). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04470427>
- [49] Xu ZH, Wang C, Yu RZ, Ding CL, He YH, Jiang LL, Peng HR, Wu JJ, Zhao P, Qi ZT. Efficacy analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 DNA vaccine and recombinant subunit vaccine inducing neutralizing antibodies in mice[J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2020, 41(5): 474-480 (in Chinese)  
徐铮昊, 王诚, 余润芷, 丁翠玲, 何燕华, 江亮亮, 彭浩然, 吴俊杰, 赵平, 戚中田. 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 DNA 疫苗与重组亚单位疫苗在小鼠中诱导中和抗体的效力分析[J]. *第二军医大学学报*, 2020, 41(5): 474-480
- [50] Yang JY, Wang W, Chen ZM, Lu SY, Yang FL, Bi ZF, Bao LL, Mo F, Li X, Huang Y, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 572-577
- [51] Kam YW, Kien F, Roberts A, Cheung YC, Lamirande EW, Vogel L, Chu SL, Tse J, Guarner J, Zaki SR, et al.

- Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells *in vitro*[J]. Vaccine, 2007, 25(4): 729-740
- [52] Yan ZX, Yang R, Li XT. Advances in microbial expression system[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 126-135 (in Chinese)  
闫子祥, 杨然, 李秀婷. 微生物表达系统研究进展[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 126-135
- [53] Yuan M, Wu NC, Zhu XY, Lee CCD, So RTY, Lv H, Mok CKP, Wilson IA. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV[J]. Science, 2020, 368(6491): 630-633
- [54] Tang XL, Wu CC, Li X, Song YH, Yao XM, Wu XK, Duan YG, Zhang H, Wang YR, Qian ZH, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2[J]. National Science Review, 2020, 7(6): 1012-1023
- [55] Tian XL, Li C, Huang AL, Xia S, Lu SC, Shi ZL, Lu L, Jiang SB, Yang ZL, Wu YL, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody[J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 382-385
- [56] Lv HB, Wu NC, Tsang OTY, Yuan M, Perera RAPM, Leung WS, So RTY, Chan JMC, Yip GK, Chik TSH, et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-COV infections[J]. Cell Reports, 2020, 31(9): 107725
- [57] Wan YS, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus[J]. Journal of Virology, 2020, 94(7): e00127-20
- [58] Yi CY, Sun XY, Ye J, Ding LF, Liu MQ, Yang Z, Lu X, Zhang YG, Ma LY, Gu WP, et al. Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(6): 621-630
- [59] Tai WB, He L, Zhang XJ, Pu J, Voronin D, Jiang SB, Zhou YS, Du LY. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(6): 613-620
- [60] Tai WB, Zhang XJ, He YX, Jiang SB, Du LY. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2[J]. Antiviral Research, 2020, 179: 104820
- [61] Li XG, Zai JJ, Zhao Q, Nie Q, Li Y, Foley BT, Chaillon A. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2[J]. Journal of Medical Virology, 2020, 92(6): 602-611
- [62] Su JL, Wang KH, Du CL. Genomic sequence analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and search for possible medicines[J]. West China Medical Journal, 2020, 35(3): 269-273 (in Chinese)  
苏嘉洛, 王康泓, 杜成林. 2019 新型冠状病毒基因组序列分析比对及其可能药物的寻找[J]. 华西医学, 2020, 35(3): 269-273
- [63] Wang KH. Research progress of SARS-CoV-2 infection mechanism and COVID-19 therapeutic medicine[J/OL]. Life Science Research, 2020[2020-06-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1266.Q.20200618.1608.012.html> (in Chinese)  
王康泓. SARS-CoV-2 感染机制分析与 COVID-19 治疗药物研究进展[J/OL]. 生命科学研究, 2020[2020-06-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1266.Q.20200618.1608.012.html>
- [64] Su S, Wong G, Shi WF, Liu J, Lai ACK, Zhou JY, Liu WJ, Bi YH, Gao GF. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses[J]. Trends in Microbiology, 2016, 24(6): 490-502
- [65] Walker LM, Burton DR. Passive immunotherapy of viral infections: 'super-antibodies' enter the fray[J]. Nature Reviews Immunology, 2018, 18(5): 297-308
- [66] Wu Y, Wang FR, Shen CG, Peng WY, Li DL, Zhao C, Li ZH, Li SH, Bi YH, Yang Y, et al. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2[J]. Science, 2020, 368(6496): 1274-1278
- [67] Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Castaño-Rodríguez C, Fernandez-Delgado R, Perlman S, Enjuanes L. Identification of the mechanisms causing reversion to virulence in an attenuated SARS-CoV for the design of a genetically stable vaccine[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(10): e1005215
- [68] Smatti MK, Al Thani AA, Yassine HM. Viral-induced enhanced disease illness[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2991
- [69] Wang SF, Tseng SP, Yen CH, Yang JY, Tsao CH, Shen CW, Chen KH, Liu FT, Liu WT, Chen YMA, et al. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 451(2): 208-214
- [70] Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrammert J, Ma MJ, Lv H, Wang TB, Yang H, Richardus JH, Liu W, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study[J]. Journal of Immunology, 2011, 186(12): 7264-7268
- [71] Wu LP, Wang NC, Chang YH, Tian XY, Na DY, Zhang LY, Zheng L, Lan T, Wang LF, Liang GD. Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome[J]. Emerging Infectious Diseases, 2007, 13(10): 1562-1564