

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-064

合成生物学与病毒疫苗研发

申赵铃, 吴艳玲, 应天雷

(复旦大学基础医学院, 上海 200032)

摘要: 病毒所致的传染性疾病严重危害公共卫生安全, 给全球人类健康与经济发展带来了巨大的威胁。疫苗是防治传染性疾病传播的一个关键且有效的手段, 包括全病毒疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗等。然而, 现有的疫苗开发策略面临研发周期、有效性、安全性等系列问题, 是当今应对新发传染病的难点和痛点。利用合成生物学技术, 比如密码子优化技术、可基因编码点击化学技术、生物偶联技术等, 可以克服以上问题, 在短时间内研发出安全且高效的病毒合成疫苗, 因此合成生物学技术在病毒合成疫苗研发中的应用越来越广泛。本文总结了传统病毒疫苗的现状与应用, 进而阐述了合成生物学技术在病毒疫苗研发中的应用与优势, 并提出了病毒合成疫苗将要面临的挑战, 为设计下一代新型病毒疫苗提供思路和方法。

关键词: 病毒疫苗; 合成生物学; 合成疫苗; 密码子优化疫苗

中图分类号: R373 **文献标志码:** A

Synthetic biology and viral vaccine development

SHEN Zhaoling, WU Yanling, YING Tianlei

(School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Infectious diseases caused by viruses seriously endanger public health, and thus pose a great impact on socioeconomic development. Vaccine development is a critical and effective strategy for preventing the spread of infectious diseases to control them effectively. Generally, viral vaccines can be divided into various categories, such as whole virus vaccines (e.g. inactivated virus vaccines, split inactivated vaccines, and live attenuated vaccines), nucleic acid vaccines (DNA and RNA vaccines), recombinant subunits vaccines, and viral vector-based vaccines. However, strategies for developing viral vaccines still face some challenges, such as time-consuming, limited efficacy, and safety concern, which hinder their development, especially for fighting emerging infectious diseases timely. With the rapid development of synthetic biology, novel vaccines, named as synthetic vaccines, including genomic codon-optimized vaccines, nucleic acid vaccines, viral vector vaccines, virus-particle-like vaccines, and cell-based vaccines, have been designed, which can elicit immune protection more effectively. Synthetic biology technologies, such as codon optimization/deoptimization, genetically encoded click chemistry, and bioconjugation, can overcome weaknesses of traditional vaccines, and in the meantime facilitate the development of safe and efficient virus synthetic vaccines, which have been

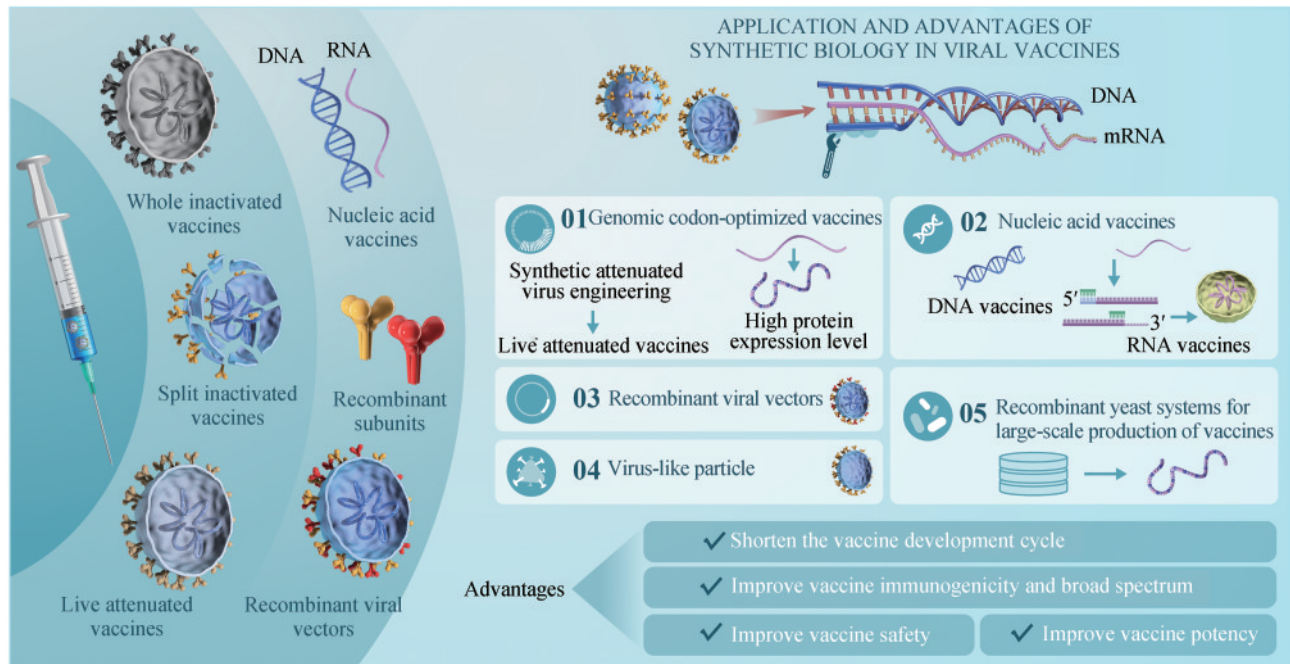
收稿日期: 2022-11-21 修回日期: 2022-12-29

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904400)

引用本文: 申赵铃, 吴艳玲, 应天雷. 合成生物学与病毒疫苗研发[J]. 合成生物学, 2023, 4(2): 333-346

Citation: SHEN Zhaoling, WU Yanling, YING Tianlei. Synthetic biology and viral vaccine development[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(2): 333-346

extensively explored. In this review, we summarize the current status of traditional vaccines, and also address the potential applications and advantages of synthetic biology technologies in the development of viral vaccines. At the end, we highlight the challenges of synthetic vaccines, which may provide insights and guidances for their design.



Keywords: viral vaccines; synthetic biology; synthetic vaccines; genomic codon-optimized vaccines

由病毒引起的传染性疾病严重威胁人类的健康和生命，尤其是某些病毒感染引起的传染病传播速度快、致死率高，一旦暴发，将对社会造成不可估量的危害。疫苗是预防传染性疾病最有效的手段之一，可使许多传染性疾病得到有效控制。但是近几十年，一些致命的新发突发病毒的出现，短时间内难以控制^[1-2]。例如，2003年，在我国爆发的严重急性呼吸系统综合征（severe acute respiratory syndrome, SARS）造成8000多人感染，其中大约800人死亡；2013年，在沙特阿拉伯爆发的中东呼吸综合征（Middle East respiratory syndrome, MERS），引起1000多人感染，死亡率高达38%；2014年，埃博拉病毒在沉浸多年后再次出现并席卷了西非多个国家，造成感染病例19 031例，其中7373人死亡；2016年，非洲安哥拉、刚果和乌干达等地集中爆发了黄热病，确诊970例，死亡130例，病死率为13.4%，两年之后，黄热病再次入侵了南

美洲，2018年巴西全国共确诊黄热病病例1257例，其中394人死亡；2019年，新冠病毒（severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2）肆虐全球，导致近十亿人感染（图1）。这些病毒持续向全球公共卫生安全系统发起挑战，因此及时研发高效广谱抗病毒疫苗和药物成为当务之急。

疫苗以有关病原体或生物合成抗原为主要成分，其目的是激发免疫反应，以保护机体免受感染，例如天花病毒疫苗^[3]、脊髓灰质炎疫苗、麻疹疫苗^[4]等，对于病毒性疾病的防治或消除具有十分重要的意义。因此，如何制备具有高度特异性且高活性的新型疫苗就成了当前研究热点之一。但是传统的疫苗策略，如灭活疫苗和减毒活疫苗，在某些长期慢性疾病或复发性感染的疾病上性能较差，这些疫苗不仅不能对患者提供持续有效的保护，甚至会引起严重不良反应。此外，由于传统疫苗研发过程周期较长，难以在短期内有效应

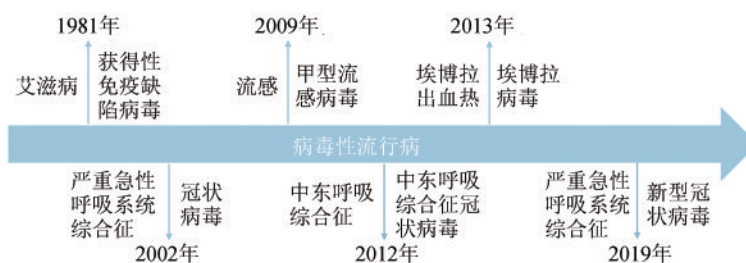


图1 病毒性流行病及相关病原体（近40年）

Fig. 1 Outbreaks of deadly viral epidemics caused by human immunodeficiency virus, SARS coronavirus, influenza A virus H1N1, MERS-CoV, Ebola virus and SARS-CoV-2, respectively, within the past four decades.

对埃博拉病毒、寨卡病毒和尼帕病毒等高致命病原体导致的爆发性大流行^[5]。因此，研发新型疫苗来替代传统疫苗尤为重要。

合成生物学是以工程化设计为思路，以构建标准化的元器件和模块为方法，改造已存在的天然系统或从头合成全新的人工生命体系为目的的一门生命科学，其发展到今天已有上百年的历史，且近20年来在疫苗的研发领域中取得了巨大的突破^[6-7]。特别是在新型传染病发现之初，利用更高效、更快速的技术助力疫苗的快速研发从而达到预防和治疗疾病的目的，尽量减小对公共卫生安全的冲击以及降低人群患病率与致死率。目前，基于合成生物学技术的研发疫苗主要包括基于基因组密码子优化疫苗、基于人工合成基因组的核酸疫苗、基于病毒载体的疫苗、类似病毒的颗粒疫苗以及基于重组酵母的疫苗^[8-9]，这些疫苗的研发周期相对较短，安全性以及免疫应答水平大大提升。

本综述对传统疫苗的现状和限制进行了总结，并对运用合成生物学技术的合成疫苗进行了分类阐述，从而进一步揭示其在病毒疫苗研发中的优势，提出了病毒合成疫苗下一步可能的研究方向与面临的挑战，为研发安全、高效的新型疫苗提供新思路和新方法。

1 传统疫苗的现状和限制

目前，用于病毒性疾病预防的疫苗可分为全病毒疫苗、核酸疫苗、亚单位疫苗、重组病毒载体疫苗^[10-11]等，不同种类的疫苗各有优劣（表1）。

全病毒疫苗包括灭活病毒疫苗和减毒活病毒疫苗两大类。相较于减毒活病毒疫苗，灭活病毒

疫苗更易研发且更加安全，对于某些特殊人群如孕妇、免疫功能低下者提倡选择使用灭活疫苗^[12]。但是灭活疫苗主要引起体液免疫，提供保护的时间也很短，而且需要佐剂以刺激先天免疫反应进而诱导适应性免疫反应。例如，批准使用的三价灭活裂解流感疫苗（IIV3）和四价灭活裂解流感疫苗（IIV4）^[13-14]需在高发季节每年接种。减毒活病毒疫苗（live attenuated vaccines, LAV）则会诱导强大、持久的体液和细胞免疫反应，同时还可以通过刺激黏膜免疫系统发挥抗感染功能。目前，该类疫苗投入临床使用的有麻疹疫苗、脊髓灰质炎疫苗等^[15-16]。但是多数病原体难以找到低毒性的病毒株，体外传代的培养方法虽能达到减毒的目的，但周期漫长且毒株的安全性仍有待商榷。因此，LAV面临的最重要的问题就是其安全性和有效性之间的权衡。

随着重组DNA技术的发展和蛋白生产的规模化，基于致病病原体抗原的亚单位疫苗快速发展^[17-18]。亚单位疫苗相对传统的全病毒疫苗更加安全，但其免疫原性较弱，难以刺激有效、持久的免疫反应^[19]。所以，亚单位疫苗一般与佐剂联合使用，从而有效地激活免疫反应^[20-21]。亚单位疫苗因其具有高稳定性、高安全性以及有效性等优势在病毒疫苗研发上得到了广泛使用^[19]。赛诺菲开发的针对人巨细胞病毒的gB亚单位疫苗以MF59为佐剂，在一项临床II期试验中显示能够降低50%原发性巨细胞病毒感染的发病率^[22-23]。

核酸疫苗是一类新型的基因工程生物制品，包括DNA疫苗和RNA疫苗，具有研发周期短、病毒载体简单、制备方便等特点，几乎能够表达任何蛋白^[24]。DNA疫苗具有热稳定性好、易于设计、生产迅速、低成本、较少的非特异性炎症等

表1 各类病毒疫苗的优缺点及其应用

Table 1 Advantages, disadvantages and the applications of different kinds of vaccines

类型	优势	局限性	应用
灭活病毒疫苗 inactivated vaccines	相对安全 热稳定性较好 免疫功能低下者和孕妇可考虑	免疫原性有限 需要佐剂 持续性短 诱导疾病进展	狂犬病 日本脑炎 甲型肝炎
减毒活病毒疫苗 live attenuated virus vaccines	模拟自然感染 同时诱导先天性和适应性免疫反应 1~2次剂量后可获得终身免疫	热稳定性较差 免疫功能低下者禁用 有逆转为野生型病毒的可能性	麻疹 腮腺炎 流感 脊髓灰质炎
亚单位疫苗 subunit vaccines	无传染性 高稳定性 高安全性	免疫原性有限 需要佐剂	乙型肝炎 新冠肺炎
DNA疫苗 DNA vaccines	热稳定性好 刺激先天免疫反应 诱导T细胞和B细胞免疫反应	潜在基因组整合风险 免疫原性较弱 需要电穿孔等方式递送	埃博拉出血热
RNA疫苗 RNA vaccines	无传染性 不存在潜在基因组整合风险	稳定性差 易降解性 过度产生炎症反应	新冠肺炎
病毒载体疫苗 viral vector vaccines	应用广泛 同时诱导体液和细胞免疫反应 研发周期短	可能致病性	埃博拉出血热

特征。这对于通常在缺少制冷设备的偏远地区流行的丝状病毒等病毒引起的传染性疾病来说，或是最佳的选择。另外，DNA疫苗还具有可组合的特点，例如埃博拉病毒和马尔堡病毒等的密码子优化糖蛋白基因组合可以控制同类别中多种病毒的感染^[25]，这些优势使得其成为研究开发新型疫苗中不可或缺的手段。但是，DNA疫苗在早期临床试验中因免疫原性较弱而受到了限制，且需要借助体内电穿孔才能促进核内传递。此外，因DNA疫苗存在不良基因组整合事件的风险^[26]，且有研究证实电穿孔增加了DNA疫苗发生不良整合事件的概率^[27]，从而推动了核酸疫苗的研究偏向RNA疫苗。RNA疫苗不存在潜在的基因组整合风险，也不需要体内电穿孔等繁杂的过程，所以具有更佳的安全性，现今以mRNA为主。迄今为止，已有20多种基于mRNA的候选药物进入临床试验阶段^[28-30]。但与此同时，RNA疫苗也存在许多潜在的缺点，例如低稳定性、易降解性、体内输送效率低下以及过度产生炎症反应等，使研发过程面临着巨大挑战^[31-32]。

病毒载体疫苗是指利用基因工程技术，把病毒特定抗原基因序列整合到不同种类病毒载体的基因组中，一旦重组病毒进入体内，通过感染宿

主细胞表达病毒特定抗原，由此诱导特定的抗病毒先天免疫反应和适应性免疫反应^[33-34]。该类疫苗具有能在机体内表达任何外来抗原，并且允许受感染细胞合成新蛋白质，促使内源性抗原的表达和呈递作用，同时诱导体液和细胞免疫反应，在较短的时间诱发强大而持久的免疫反应等优势。此外，病毒载体疫苗还可以用于进一步构建多价疫苗或多组分疫苗，从而缩短疫苗产品开发时间，简化疫苗接种过程，并改善不同基因型病毒株之间的交叉保护作用。目前，已有多种病毒载体疫苗作为潜在的候选疫苗，在应对流感、乙型肝炎、艾滋病、新冠肺炎、埃博拉出血热等疫情中发挥至关重要的作用^[35-37]。由于大多数病毒本身具有致病性或在人体内存在预存抗体，因此该类疫苗有致病性和有效性欠佳的风险。

2 合成生物技术在疫苗研发中的应用

当今社会，为预防病毒性疾病传播和蔓延，在健康人体内接种疫苗是重要的防治手段，因此，它的安全性和有效性之间的权衡是研究者研发疫

苗的关键。由于传统疫苗制备周期长，为应对突如其来的疫情，迫切需要替代方法来实现安全高效又周期短的疫苗研发工作。合成生物技术的出现对于疫苗研发的发展做出了重大贡献。合成生物学在疫苗研发领域中的应用包括基于基因组密码子优化疫苗、基于人工合成基因组的核酸疫苗、基于病毒载体的疫苗、基于病毒样颗粒疫苗^[15, 38]以及基于重组酵母表达的疫苗（图2）。

2.1 基于基因组密码子优化疫苗

利用合成生物技术能够通过基因组密码子优化疫苗，以更快的速度生成安全高效的疫苗。在蛋白质合成过程中，同义密码子的使用频率不同，

但一个物种或基因通常偏好使用一个或多个称为最佳密码子的特定同义密码子，这种现象被称为密码子使用偏差^[39-40]。此外，不同功能之间的基因密码子使用偏差显著不同。当重组蛋白异源表达时，密码子使用偏差对蛋白质表达水平有复杂影响。研究发现，DNA序列中密码子的频率与一个物种中的转运RNA（transfer RNA, tRNA）含量呈正相关，即tRNA浓度决定了可用于蛋白质翻译扩展的氨基酸数量，进而影响了蛋白质合成效率^[41-43]。因此，蛋白质的表达水平与密码子使用偏差密切相关。稀有密码子通常会使翻译率降低，甚至导致翻译错误。因此，密码子优化是提升蛋白质表达水平的关键应用^[44]。

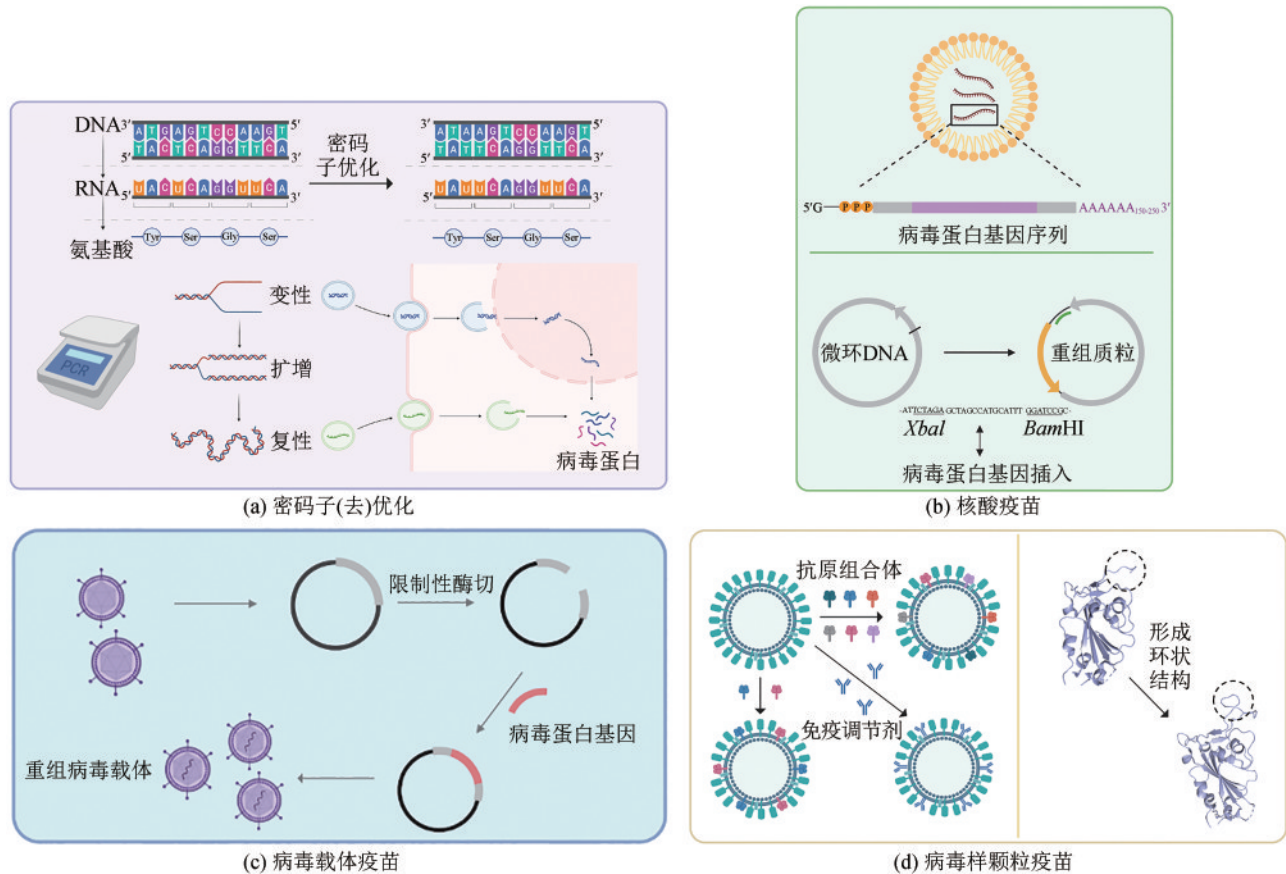


图2 合成生物学在病毒疫苗中的应用

Fig. 2 Synthetic biology technologies for developing viral vaccines

(a) Codon optimization/deoptimization: The expression level of viral protein can be increased through codon optimization, but codon deoptimization can result in the production of live attenuated vaccines. (b) Nucleic acid vaccines: mRNA is modified with intact 5' cap structure and 3' polytail structure for stable expression, and microcyclic DNA is inserted into viral protein coding sequences and exogenous promoter sequences through restriction digestion sites to construct recombinant plasmids. (c) Viral vectors vaccines: viral protein coding sequences are inserted into viral vector sequences to generate recombinant viral vectors. (d) Virus-like particle (VLP) vaccines: multi-antigen VLP vaccines are developed based on GECC generation, and VLP vaccines include immunomodulators, and ring structures to accommodate antigen peptides for recognition

通过分析特定生物体使用密码子的偏好，可以优化基因表达，使病毒与人类之间的基因序列相互适应以增强病毒抗原在机体内的表达。在疫苗设计的过程中，识别并替换低频密码子为高频密码子，同时不改变氨基酸序列，可以促进重组病毒基因序列在机体中的表达。在新冠病毒疫情中，有研究团队利用密码子优化的方法优化S蛋白的编码序列，使S蛋白在人类细胞中的表达显著升高，从而生成了一种新型冠状病毒的候选疫苗Ad5-S-nb2^[45]。另外，开放阅读框（open reading frame, ORF）区域作为mRNA的编码区域，其翻译速率至关重要。因此，在该区域选择合适的密码子可以优化mRNA的整体翻译效率，并且优化mRNA的非编码区域也可以提升mRNA在体内的表达水平。但是，mRNA的高转化率并非全是有益的，由于部分蛋白质需要低转化率才能正确、稳定、有效地折叠，可在ORF中使用低频密码子产生正确的蛋白质^[46]。因此，针对不同的抗原，我们应该使用不同的密码子优化策略来提高mRNA翻译率，同时确保表达的抗原水平。

由此，还可以通过密码子去优化的方法，即将高频密码子替换为罕见密码子，能让野生型病毒生成减毒病毒，该过程被称为“合成减毒病毒工程”，具有4个关键特征^[47-49]，包括：①产生减毒活病毒，与野生型病毒编码相同的蛋白质，在体内引起相同的免疫反应；②适用于不同的病毒，且无需完全了解特定病毒功能^[50]；③衰减不会因为突变数量改变而恢复；④可与其他衰减变化的策略共存。另外，该项技术在疫苗研发过程中所需周期短，为应对突发传染病提供了新思路。

该方法最初应用于脊髓灰质炎病毒疫苗株中，将衣壳蛋白区域内的9种氨基酸进行同义密码子的替换，结果发现病毒产量显著下降^[51]，毒力被严重削弱。紧接着进行数百种突变，研究发现在小鼠模型中该病毒毒力大大衰减，且编码的蛋白质与野生型完全相同，能够引起有效的免疫反应^[47]。目前，创新性合成减毒病毒工程广泛应用于各类病毒疫苗的研发中^[52]。另外，研究表明多碱基弗林蛋白裂解位（polybasic furin cleavage site, FCS）的删除与密码子去优化相结合的方法可能是提高衰减程度的理想选择^[53-54]。COVI-VAC是目前唯一一种

SARS-CoV-2活病毒疫苗，是根据SAVE算法对SARS-CoV-2基因组进行重新编码，系统地引入283个沉默突变并删除其FCS而生成的^[55]。临床前结果表明，相对于野生型菌株，COVI-VAC候选菌株毒力大幅度减弱，但在体内诱导的抗体反应却与感染野生型病毒所引起的反应相当。在季节性H1N1流感病毒的基因组中引入了300多个无义突变，由此产生的突变体在哺乳动物细胞和小鼠中毒力明显衰减，单剂量鼻内疫苗接种即可诱发强大免疫反应，研究证明通过该方法研发的减毒活疫苗具有安全性和有效性^[56]。

基于密码子优化或是去优化的疫苗仍存在局限性，例如，该项技术的内在机制尚不明确。此外，密码子优化生成的减毒活疫苗对于免疫缺陷的患者来说仍是对机体健康的极大挑战。这些将是今后更好地利用密码子优化疫苗所需解决的难题。

2.2 基于人工合成基因组的核酸疫苗

除了优化减毒活疫苗外，合成生物技术已被广泛用于核酸疫苗的设计和进步，如提高疫苗稳定性、降低细胞毒性以及提高蛋白质产量等。

mRNA疫苗随着新冠疫情横空出世，显示出了比传统疫苗的显著优势——安全性好、保护率高、研发周期短等。但是mRNA疫苗的稳定性和翻译效率、递送载体仍然是很棘手的问题。目前，通过优化RNA结构和碱基组成可以提高mRNA疫苗稳定性和翻译效率。最常见的方法是在RNA体外转录时添加完整的5'帽结构和3'多聚尾结构，避免先天性免疫识别无帽的5'-三磷酸，同时通过加入磷酸酶、高通量功能筛选识别以及简化非翻译区域等方法也能够使稳定性与翻译效率进一步提升^[57-59]。另外，对mRNA碱基进行修饰能够抑制先天免疫识别，降低细胞毒性，促进抗原的产生^[60]。提高mRNA疫苗外源蛋白产量的方法是使用自放大mRNA，其是从正链RNA病毒基因组中提取出来的mRNA，不仅能够编码抗原，还能够编码细胞内mRNA扩增所需的病毒复制机制，从而产生更高水平的抗原表达，引起更强的免疫反应^[61]。当前，全球有数十种mRNA疫苗在研发，包括新冠病毒疫苗、流感病毒疫苗、寨卡病毒疫苗等。其中

已获批的两款 mRNA 疫苗分别是 Moderna 公司的 mRNA-1273 和辉瑞/BioNTech 研发的 BNT162b2^[62-64]，均是用于新冠病毒的预防性疫苗，在人群中显示了非常好的免疫应答率和保护效率，大大降低了新冠肺炎重症患者的比例。

DNA 疫苗作为另一种核酸疫苗，通过密码子优化、简化质粒、抗双链 DNA 设计等方式提高疫苗的免疫原性。INO-4800，是由 INOVIO 针对新冠肺炎研发的一款预防性 DNA 疫苗，由优化的 DNA 质粒组成，其序列设计是通过 Inovio 优化算法中生成的，然后通过专有技术智能装置直接递送到体内细胞，产生强大、安全、可耐受的免疫反应^[65-67]。唯一获批上市的新冠肺炎 DNA 疫苗是由印度 Zydus Cadila 研发的 ZyCov-D，但其免疫效果并不突出，在 2.77 万名受试者中得出的保护效果数据为 66.6%^[68-69]。近年来，微环 DNA (minicircle DNA, mcDNA) 疫苗技术逐渐成熟，具有更高的表达水平。mcDNA 是从亲本质粒的重组过程中获得的，仅包含真核表达的必需成分，主要用作基因载体，旨在递送目的基因片段进入机体诱导免疫反应^[70-71]。有研究团队将此种方法应用到新冠肺炎疫苗研发当中，通过亲本质粒重组得到 mcDNA，构建了重组 mcDNA-RBD 质粒，以此产生了 SARS-CoV-2 的 mcDNA 疫苗，且证明了具有更高的表达效率和生物安全性^[72]。

2.3 基于病毒载体的疫苗

设计用于表达外源蛋白的病毒载体是开发新型疫苗的常用工具。目前，病毒载体的研究大多以腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体为主。其中，腺病毒载体被较多地应用于疫苗研发中^[73-74]。另外，通过慢病毒载体将体内基因转移到树突细胞也是疫苗研发的新策略^[75]。由于大多数病毒本身具有致病性，病毒载体通常被设计为复制缺陷型，同时要保持感染细胞和表达编码抗原的能力。缺失复制能力的病毒载体不会产生体内感染的情况，相比于存在复制能力的病毒更加安全且更易研发。例如，匹茨堡大学研究团队开发了一种重组的 5 型腺病毒载体，首先删除了腺病毒载体早期复制区 1 和 3，构建了复制缺陷的病毒载

体，再使用 UpGene 算法对 SARS-CoV-2 的 S1 亚基和核衣壳的基因序列进行了密码子优化后，构建到改造的腺病毒载体上，可诱导广谱的免疫反应，有可能对新出现的 SARS-CoV-2 突变株具有保护效力^[37]。而具有复制能力的载体有效性更高，与减毒活疫苗类似，是模拟自然感染的方式激活特异性免疫反应。其中以囊泡口炎病毒为载体的埃博拉疫苗，携带编码埃博拉病毒表面糖蛋白的基因，是具有复制能力的病毒载体疫苗的一个例子。该疫苗于 2019 年 12 月获得 FDA 批准，作为疫苗接种策略的一部分预防埃博拉疫情^[75]。

将病毒基因序列进行模块化拆分与设计到改造的病毒载体上，使之能够同时表达多个特定表位的抗原基因组合到病毒载体上，从而获得更高效和更广谱的保护。Mvabea[®]，于 2020 年 6 月获得欧盟批准的埃博拉疫苗，是一种基于改良的减毒安卡拉痘苗病毒的埃博拉疫苗，这个疫苗包含扎伊尔型埃博拉、苏丹型埃博拉以及马尔堡病毒和大森林埃博拉病毒的 G 蛋白，以刺激针对这些病毒的广泛免疫反应^[76]。此外，研究者利用合成生物技术建立了一套新的分子克隆技术“BioBricks”，每一个 BioBrick 都是一段上下游包含特定酶切位点、启动子、终止子的 DNA 序列^[77]。因此，利用该技术能够通过酶切连接反应将标准化的 BioBrick 组件插入到其他 BioBrick 组件的上游或下游位置^[78]。

2.4 基于病毒样颗粒技术的疫苗

病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 是一种自组装的生物纳米颗粒，类似于抗原，可以在其表面高度有组织地呈现多个表位。此外，VLPs 不包含任何病毒遗传物质，不具有病毒的传染性，与传统疫苗相比具有显著的优势^[79]。将抗原优势表位连接到 VLP 时，可产生比传统技术递送抗原蛋白更强的反应。一般来说，VLP 可分为两类：非包膜型和包膜型^[79]。对于非包膜型 VLP，病毒结构蛋白通过基因工程与外来抗原融合，然后在合适的宿主系统（如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母、细菌或无细胞系统）中表达嵌合蛋白，而不获得任何宿主成分。此外，非包膜型 VLP 也可以通过双功能化学交联剂（如 sulfo-SMCC 或纳米

胶)与靶抗原进行化学偶联,这样就不用做任何的基因修饰即可产生嵌合VLP,克服了VLP形成的限制。而包膜型VLP则是利用部分宿主细胞膜将其作为脂质包膜,将抗原整合进该脂膜中并展示在其表面,或者利用蛋白质转移技术展示异种表位。通常可以利用糖基肌醇(GPI)锚定蛋白,也可以通过简单的孵育将一些免疫刺激分子包被于VLP的脂膜中^[80]。此外,基于可基因编码点击化学(genetically encoded click chemistry, GECC)的VLP,能够呈递多种表位的异源蛋白,将多功能性和模块化设计相结合,可设计和构建出多抗原的VLP疫苗,具有广泛的免疫原性^[81-82],这种基于GECC的多抗原展示平台有望为防御病毒性疫病提供更加有效的疫苗^[83]。

基于整合生物数据和计算分析结果,研究者对于一些隐藏的表位或免疫原性不足的抗原,可通过合成生物学技术重新设计为表面暴露的环状结构(暴露环表面突出,更容易接近免疫细胞),再将抗原肽插入环中,并辅以免疫调节剂或以聚体的形式增强免疫原性,从而获得更特异的免疫反应^[84]。比如在人类乳头瘤病毒16(human papillomavirus 16, HPV16)中设计了L1 VLP表面形成螺旋结构以完整呈现抗原,并在体内产生能够识别HPV F蛋白的抗体。

2.5 基于重组酵母的疫苗

酵母具有高稳定性、低成本、易培养性、短周期性、非致病性等特征,因此重组酵母表达病毒蛋白是一种关键且新兴的策略,成为了疫苗大规模化生产的理想模型^[85-86],例如针对新冠肺炎的亚单位疫苗RBD219-N1C1就是以酵母为底盘细胞进行生产的^[87-88]。通过基因编辑等合成生物学技术改造酵母菌,使其能够生产抗生素、抗癌药等多种化合物,实现药物的可控生产。例如,乙型肝炎病毒疫苗(Recombivax HB[®])是在酵母系统中生产的VLP疫苗^[89],以及基于酵母中主要衣壳抗原L1的重组表达来生产VLP的HPV疫苗(Gardasil[®])已获得许可,用于预防宫颈癌^[90]。

酵母除了作为疫苗的生产工厂,近年来发展了以重组酵母为载体的新型疫苗技术。该技术通过利用基因工程和分子克隆技术对酵母细胞进行

改造,使其易于克隆目的基因和进行不同氨基酸缺陷型的筛选,并在体内递呈该抗原被机体识别,从而激起强效的免疫反应。而且可以在疫苗设计之初,将T细胞生长因子也构建到重组酵母中,从而解决疫苗的低反应性。研究表明,基于重组酵母为载体的新型疫苗诱导强烈的细胞免疫,表现为CD8⁺T淋巴细胞的功能增强。因为酵母细胞本身就是一种真核表达系统,所以非常适合作为疫苗载体,并且具有独特的优势,例如:作为一种非免疫原性和非致病性载体,安全性很好;易于改造,可同时携带多个病原体的蛋白制备多价联合疫苗激发广泛免疫反应等。随着合成生物学技术的迅速发展,重组酵母疫苗有望在传染病的防治中发挥重要作用。

3 合成生物技术在疫苗研发中的优势

3.1 缩短疫苗研发周期

面对很多突发疫情,及时研发出具有保护效力的疫苗尤为关键,可为疫情的防控提供强有力的保障,比如2020年初的新冠疫情。利用合成生物学技术,可以显著缩短病毒疫苗的研发周期。当疫情来临时,对病原体基因组序列进行迅速分析后,快速设计和合成病毒编码基因组以及特定抗原基因序列并组装成新疫苗,比如病毒颗粒样疫苗、病毒载体类疫苗等,此过程现在可以压缩至几天以内,从而能够在最短的时间内获得可接种的新发突发传染病疫苗。

2009年,H1N1流感病毒引起了近60年以来全球最为严重的流感大流行,具有高发病率和致死率。诺华公司联合多家机构应用合成生物学技术开发了H1N1基因组快速合成的方法^[91],并加快对其分析,从而能够在最快的时间内研发该病毒的疫苗,以此来应对季节性流感的抗原变化。此外,在2013年H7N9禽流感病毒流行时,该团队仅仅用了8天的时间就研制了抗H7N9禽流感病毒的候选疫苗^[92]。

3.2 提升疫苗安全性

疫苗的安全性是群众考虑接种疫苗的首要因素之一。利用合成生物学技术,通过基因组密码子

去优化,产生更低毒性的减毒活疫苗,以提升有效疫苗的安全性^[35, 93-94]。对于安全性欠佳但有效率好的复制性病毒载体类疫苗,可引入控制系统启动或关闭病毒的体内复制。在一项研究中,使用多西环素诱导基因表达系统允许病毒在多西环素存在的情况下复制和使用非天然氨基酸来介导抑制琥珀无义密码子,以生成有条件复制的HIV-1变异^[9]。此外,此技术可以提升疫苗的免疫原性与持久性,因而减少疫苗接种剂量,进一步提高其安全性。

3.3 提高疫苗免疫原性与广谱性

首先,灵活的抗原设计对于提高疫苗免疫原性和广谱性具有非常重要的作用。有的病原体变异频繁,针对某一种变异体设计的疫苗无法提供广泛的保护效力,如HIV-1、流感病毒等。因此,如要诱发强大、广谱的体液免疫可根据中和抗体的靶向表位设计并合成相对应的保护性抗原,也可以将多个免疫表位整合到同一合成蛋白编码基因中,或者合成多个病毒抗原表位的合成抗原,以此提供广谱免疫保护的可能^[95-98]。例如,基于VLP

研发的HPV九价疫苗,包含了9种密切相关的HPV毒株,使机体得到广泛保护效力。进一步,通过改进将多个HPV型别的L1蛋白利用环交换技术做成嵌合VLP疫苗,在小鼠和非人类灵长类动物中产生的中和抗体,与单独型别VLP混合产生的中和抗体滴度相当,能有效预防各个型别病毒的感染^[99]。此外,抗原中包含的人类白细胞抗原配体和T细胞表位的水平越高,它诱发的免疫反应越大^[100]。

其次,密码子去优化技术不仅能提升减毒活疫苗的安全性,还能够提高免疫原性与持久性^[101]。以这种技术生成的天花疫苗,研究证明可以提供长达75年的体液免疫保护和8~15年的细胞免疫保护^[102],足以见得其激活机体免疫系统的持久性。

图3对合成生物学在病毒疫苗中的应用与优势进行了总结。

4 挑战与展望

合成生物学为下一代新型疫苗的研究提供了全新的设计和合成技术,因为它不仅能够快速设

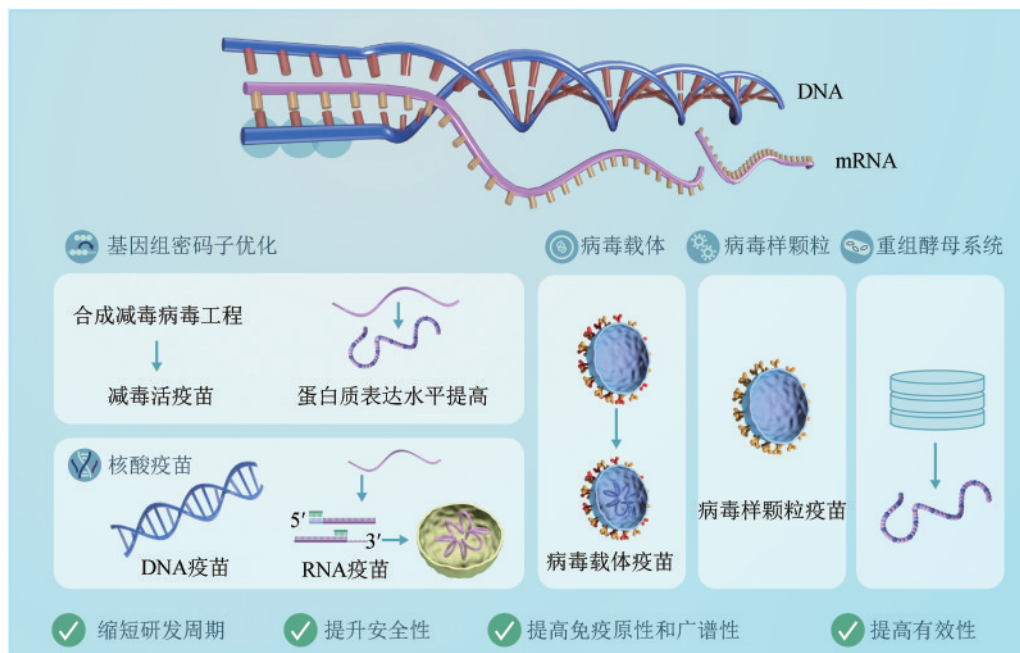


图3 合成生物学在病毒疫苗中的应用与优势总结

Fig. 3 Applications and advantages of synthetic biotechnologies in the development of synthetic vaccines

(Synthetic vaccines include genomic codon-optimized vaccines, synthetic genome-based nucleic acid vaccines, viral vector-based vaccines, and virus-like particle vaccines, which can be produced on large-scale production in recombinant yeasts to shorten time for vaccine development with advantages in enhancing immunogenicity, and broadening spectrum, and improving safety and efficacy)

计和构建合成基因，而且能够合成病毒基因组，这种能力促进了重组亚单位和核酸疫苗基因的高通量生产以及病毒反向遗传学系统的构建，促进了新型合成疫苗的研发。当前合成生物技术（密码子优化技术、可基因编码点击化学技术、生物偶联技术等）在新型疫苗研发中的应用非常广泛，主要包括基于基因组密码子优化疫苗、基于人工合成基因组的核酸疫苗、基于病毒载体的疫苗以及类似病毒的颗粒疫苗以及重组酵母系统，从而使研究人员能够在短时间内研发出更加安全、高效、广谱的病毒疫苗。

然而，在这些目标完全实现之前，仍存在着不少挑战。首先，对于免疫力低下者和老年人，甚至是对于免疫缺陷者的安全有效疫苗是今后疫苗研发的重要方向之一。如何更好地利用密码子优化技术，并对疫苗相关佐剂、免疫调节剂等进行优质筛选，促进针对老年人和免疫功能低下（缺陷）者研发高效、安全的疫苗，仍是值得思考的问题。其次，当未知且突发的病毒疫情来临时，我们对该病毒的认识、病毒与人体免疫系统之间的关系以及哪种类型的免疫反应最适合诱发长期有效的机体免疫反应等都是不了解的。即使我们可以利用合成生物技术快速了解该病毒的特征或者设计其序列，仍需要临床迅速识别新型传染病、了解免疫系统与病毒或病毒某种抗原间的相互作用，因此临床医学诊断技术与基础医学理论科学亟待更上一层楼，以此辅助疫苗研发的进展。再者，对于一种新兴形式的新型疫苗，疫苗的配方和递送方式多处于研究阶段，尚未形成成熟的体系，需要通过大量的临床试验测试其有效性和安全性。

总而言之，尽管合成生物学已经拥有了基因调控和合成病毒基因序列的丰富手段，但其作为一个新兴领域，特别是与病毒疫苗相关的部分，还处于起步阶段。对于解决突发的病毒性传染病的挑战，合成生物技术应用于疫苗研发仍有着较大的进步与提升空间。我们相信随着合成生物学和多学科研究的不断发展与深入，通过更加合理地运用合成生物技术，并与其他工程技术的发展交叉融合，有望在未来建立更加快速、更加有效的新型疫苗研发模式，推动疫苗研发领域的突破进展。

参 考 文 献

- [1] ROYCHOUDHURY S, DAS A, SENGUPTA P, et al. Viral pandemics of the last four decades: pathophysiology, health impacts and perspectives[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(24): 9411.
- [2] AKIN L, GÖZEL M G. Understanding dynamics of pandemics[J]. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2020, 50(SI-1): 515-519.
- [3] MEYER H, EHMANN R, SMITH G L. Smallpox in the post-eradication era[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 138.
- [4] AHMED R, BURTON D R. Viral vaccines: past successes and future challenges[J]. *Current Opinion in Virology*, 2013, 3(3): 307-308.
- [5] BRISSE M, VRBA S M, KIRK N, et al. Emerging concepts and technologies in vaccine development[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 583077.
- [6] MENG F K, ELLIS T. The second decade of synthetic biology: 2010—2020[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5174.
- [7] HO C, MORSUT L. Novel synthetic biology approaches for developmental systems[J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(5): 1051-1064.
- [8] TAN X, LETENDRE J H, COLLINS J J, et al. Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics[J]. *Cell*, 2021, 184(4): 881-898.
- [9] WANG N X, YUAN Z, NIU W, et al. Synthetic biology approach for the development of conditionally replicating HIV-1 vaccine[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2017, 92(3): 455-462.
- [10] GHATTAS M, DWIVEDI G, LAVERTU M, et al. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: current progress, challenges, and opportunities[J]. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1490.
- [11] AWADASSEID A, WU Y L, TANAKA Y, et al. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(1): 8-19.
- [12] ARORA M, LAKSHMI R. Vaccines-safety in pregnancy[J]. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2021, 76: 23-40.
- [13] CURRAN M P, LEROUX-ROELS I. Inactivated split-virion seasonal influenza vaccine (Fluarix): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in adults and the elderly[J]. *Drugs*, 2010, 70(12): 1519-1543.
- [14] CHEN H P, HUANG Z Y, CHANG S Y, et al. Immunogenicity and safety of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (Sinopharm BBIBP-CorV) coadministered with quadrivalent split-virion inactivated influenza vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in China: a multicentre, non-inferiority, open-label, randomised, controlled, phase 4 trial[J]. *Vaccine*,

- 2022, 40(36): 5322-5332.
- [15] STANFIELD B A, KOUSOULAS K G, FERNANDEZ A, et al. Rational design of live-attenuated vaccines against herpes simplex viruses[J]. *Viruses*, 2021, 13(8): 1637.
- [16] MOK D Z L, CHAN K R. The effects of pre-existing antibodies on live-attenuated viral vaccines[J]. *Viruses*, 2020, 12(5): 520.
- [17] VETTER V, DENIZER G, FRIEDLAND L R, et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know[J]. *Annals of Medicine*, 2018, 50(2): 110-120.
- [18] MOYLE P M, TOTH I. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities[J]. *ChemMedChem*, 2013, 8(3): 360-376.
- [19] HANSSON M, NYGREN P A, STÅHL S. Design and production of recombinant subunit vaccines[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 32(2): 95-107.
- [20] ZHANG N R, ZHENG B J, LU L, et al. Advancements in the development of subunit influenza vaccines[J]. *Microbes and Infection*, 2015, 17(2): 123-134.
- [21] AZMI F, AL HADI AHMAD FUAAD A, SKWARCZYNSKI M, et al. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(3): 778-796.
- [22] MCVOY M A. Cytomegalovirus vaccines[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2013, 57(suppl_4): S196-S199.
- [23] PASS R F, ZHANG C P, EVANS A, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360(12): 1191-1199.
- [24] TOMBÁČZ I, WEISSMAN D, PARDI N. Vaccination with messenger RNA: a promising alternative to DNA vaccination[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2197: 13-31.
- [25] GRANT-KLEIN R J, ALTAMURA L A, BADGER C V, et al. Codon-optimized filovirus DNA vaccines delivered by intramuscular electroporation protect cynomolgus macaques from lethal Ebola and Marburg virus challenges[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2015, 11(8): 1991-2004.
- [26] LEDWITH B J, MANAM S, TROILO P J, et al. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice[J]. *Intervirology*, 2000, 43(4/5/6): 258-272.
- [27] WANG Z, TROILO P J, WANG X, et al. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation[J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(8): 711-721.
- [28] SZABÓ G T, MAHINY A J, VLATKOVIC I. COVID-19 mRNA vaccines: platforms and current developments[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(5): 1850-1868.
- [29] KARIKÓ K. Developing mRNA for therapy[J]. *The Keio Journal of Medicine*, 2022, 71(1): 31.
- [30] LI M Y, WANG Z N, XIE C Y, et al. Advances in mRNA vaccines[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2022, 372: 295-316.
- [31] WANG Y, ZHANG Z Q, LUO J W, et al. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 33.
- [32] FANG E Y, LIU X H, LI M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7: 94.
- [33] MCCANN N, O'CONNOR D, LAMBE T, et al. Viral vector vaccines[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2022, 77: 102210.
- [34] EWER K J, LAMBE T, ROLLIER C S, et al. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2016, 41: 47-54.
- [35] CHEN J D, WANG J H, ZHANG J P, et al. Advances in development and application of influenza vaccines[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 711997.
- [36] DE VRIES R D, RIMMELZWAAN G F. Viral vector-based influenza vaccines[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016, 12(11): 2881-2901.
- [37] KHAN M S, KIM E, MCPHERSON A, et al. Adenovirus-vec-tored SARS-CoV-2 vaccine expressing S1-N fusion protein[J]. *Antibody Therapeutics*, 2022, 5(3): 177-191.
- [38] TOURNIER J N, KONONCHIK J. Virus eradication and synthetic biology: changes with SARS-CoV-2?[J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 569.
- [39] PARVATHY S T, UDAYASURIYAN V, BHADANA V. Codon usage bias[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(1): 539-565.
- [40] XU Y C, LIU K S, HAN Y, et al. Codon usage bias regulates gene expression and protein conformation in yeast expression system *P. pastoris*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 91.
- [41] NOVOA E M, PAVON-ETERNOD M, PAN T, et al. A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage[J]. *Cell*, 2012, 149(1): 202-213.
- [42] NOVOA E M, RIBAS DE POUPLANA L. Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes[J]. *Trends in Genetics*, 2012, 28(11): 574-581.
- [43] GUIMARAES J C, MITTAL N, GNANN A, et al. A rare codon-based translational program of cell proliferation[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 44.
- [44] FU H G, LIANG Y B, ZHONG X Q, et al. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 17617.

- [45] FENG L Q, WANG Q, SHAN C, et al. An adenovirus-vectored COVID-19 vaccine confers protection from SARS-CoV-2 challenge in rhesus macaques[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4207.
- [46] XU S Q, YANG K P, LI R, et al. mRNA vaccine era-mechanisms, drug platform and clinical prospect[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6582.
- [47] COLEMAN J R, PAPAMICHAIL D, SKIENA S, et al. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias[J]. *Science*, 2008, 320(5884): 1784-1787.
- [48] BROADBENT A J, SANTOS C P, ANAFU A, et al. Evaluation of the attenuation, immunogenicity, and efficacy of a live virus vaccine generated by codon-pair bias de-optimization of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus, in ferrets[J]. *Vaccine*, 2016, 34(4): 563-570.
- [49] KAPLAN B S, SOUZA C K, GAUGER P C, et al. Vaccination of pigs with a codon-pair bias de-optimized live attenuated influenza vaccine protects from homologous challenge[J]. *Vaccine*, 2018, 36(8): 1101-1107.
- [50] MARUGGI G, ZHANG C L, LI J W, et al. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(4): 757-772.
- [51] BURNS C C, SHAW J, CAMPAGNOLI R, et al. Modulation of poliovirus replicative fitness in HeLa cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(7): 3259-3272.
- [52] SI L L, XU H, ZHOU X Y, et al. Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines[J]. *Science*, 2016, 354(6316): 1170-1173.
- [53] JOHNSON B A, XIE X P, BAILEY A L, et al. Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis[J]. *Nature*, 2021, 591(7849): 293-299.
- [54] GOŁAWSKI M, LEWANDOWSKI P, JABŁOŃSKA I, et al. The reassessed potential of SARS-CoV-2 attenuation for COVID-19 vaccine development - a systematic review[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 991.
- [55] WANG Y, YANG C, SONG Y T, et al. Scalable live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate demonstrates preclinical safety and efficacy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(29): e2102775118.
- [56] FAN R L Y, VALKENBURG S A, WONG C K S, et al. Generation of live attenuated influenza virus by using codon usage bias[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(21): 10762-10773.
- [57] ASRANI K H, FARELLI J D, STAHLEY M R, et al. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(6): 756-762.
- [58] TREPOTEC Z, ANEJA M K, GEIGER J, et al. Maximizing the translational yield of mRNA therapeutics by minimizing 5'-UTRs[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2019, 25(1/2): 69-79.
- [59] VON NIESSEN A G O, POLEGANOV M A, RECHNER C, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(4): 824-836.
- [60] PARDI N, HOGAN M J, WEISSMAN D. Recent advances in mRNA vaccine technology[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2020, 65: 14-20.
- [61] LEE S, RYU J H. Influenza viruses: innate immunity and mRNA vaccines[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 710647.
- [62] NOORI M, NEJADGHADERI S A, ARSHI S, et al. Potency of BNT162b2 and mRNA-1273 vaccine-induced neutralizing antibodies against severe acute respiratory syndrome-CoV-2 variants of concern: a systematic review of *in vitro* studies[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2022, 32(2): e2277.
- [63] FEIKIN D R, HIGDON M M, ABU-RADDAD L J, et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression[J]. *The Lancet*, 2022, 399(10328): 924-944.
- [64] XI J X, LEI L R, ZOUZAS W, et al. Nasally inhaled therapeutics and vaccination for COVID-19: developments and challenges[J]. *MedComm*, 2021, 2(4): 569-586.
- [65] ANDRADE V M, CHRISTENSEN-QUICK A, AGNES J, et al. INO-4800 DNA vaccine induces neutralizing antibodies and T cell activity against global SARS-CoV-2 variants[J]. *Npj Vaccines*, 2021, 6: 121.
- [66] SMITH T R F, PATEL A, RAMOS S, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2601.
- [67] WALTERS J N, SCHOUDEST B, PATEL A, et al. Prime-boost vaccination regimens with INO-4800 and INO-4802 augment and broaden immune responses against SARS-CoV-2 in nonhuman primates[J]. *Vaccine*, 2022, 40(21): 2960-2969.
- [68] DEY A, CHOZHAVEL RAJANATHAN T M, CHANDRA H, et al. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models[J]. *Vaccine*, 2021, 39(30): 4108-4116.
- [69] KHOBRADE A, BHATE S, RAMAIAH V, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India[J].

- The Lancet, 2022, 399(10332): 1313-1321.
- [70] ALMEIDA A M, EUSÉBIO D, QUEIROZ J A, et al. Minicircle DNA vaccine purification and E7 antigen expression assessment[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2197: 207-222.
- [71] JIANG Y L, GAO X, XU K, et al. A novel cre recombinase-mediated *in vivo* minicircle DNA (CRIM) vaccine provides partial protection against Newcastle disease virus[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(14): e00407-e00419.
- [72] ZHOU X W, JIANG X, QU M Y, et al. Engineering antiviral vaccines[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 12370-12389.
- [73] TATSIS N, ERTL H C J. Adenoviruses as vaccine vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2004, 10(4): 616-629.
- [74] SAKURAI F, TACHIBANA M, MIZUGUCHI H. Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases[J]. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2022, 42: 100432.
- [75] SHIRLEY J L, DE JONG Y P, TERHORST C, et al. Immune responses to viral gene therapy vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2020, 28(3): 709-722.
- [76] TOMORI O, KOLAWOLE M O. Ebola virus disease: current vaccine solutions[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2021, 71: 27-33.
- [77] YAMAZAKI K I, DE MORA K, SAITOH K. BioBrick-based 'quick gene assembly' *in vitro*[J]. *Synthetic Biology*, 2017, 2(1): ysx003.
- [78] SHETTY R P, ENDY D, KNIGHT T F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2008, 2: 5.
- [79] NOORAEI S, BAHRULOLUM H, HOSEINI Z S, et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 59.
- [80] PATEL J M, KIM M C, VARTABEDIAN V F, et al. Protein transfer-mediated surface engineering to adjuvantate virus-like nanoparticles for enhanced anti-viral immune responses[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015, 11(5): 1097-1107.
- [81] MOHSEN M O, ZHA L S, CABRAL-MIRANDA G, et al. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines[J]. *Seminars in Immunology*, 2017, 34: 123-132.
- [82] LAMPINEN V, HEINIMÄKI S, LAITINEN O H, et al. Modular vaccine platform based on the norovirus-like particle[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 25.
- [83] COHEN A A, GNANAPRAGASAM P N P, LEE Y E, et al. Mosaic nanoparticles elicit cross-reactive immune responses to zoonotic coronaviruses in mice[J]. *Science*, 2021, 371(6530): 735-741.
- [84] CHARLTON HUME H K, VIDIGAL J, CARRONDO M J T, et al. Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(4): 919-935.
- [85] TEYMENNET-RAMÍREZ K V, MARTÍNEZ-MORALES F, TREJO-HERNÁNDEZ M R. Yeast surface display system: strategies for improvement and biotechnological applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 794742.
- [86] KUMAR R, KUMAR P. Yeast-based vaccines: new perspective in vaccine development and application[J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(2): foz007.
- [87] POLLET J, CHEN W H, VERSTEEG L, et al. SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: a yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2021, 17(8): 2356-2366.
- [88] LEE J, LIU Z Y, CHEN W H, et al. Process development and scale-up optimization of the SARS-CoV-2 receptor binding domain-based vaccine candidate, RBD219-N1C1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(10): 4153-4165.
- [89] ZHAO Q J, TOWNE V, BROWN M, et al. In-depth process understanding of RECOMBIVAX HB[®] maturation and potential epitope improvements with redox treatment: multifaceted biochemical and immunochemical characterization[J]. *Vaccine*, 2011, 29(45): 7936-7941.
- [90] WANG J W, RODEN R B. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2013, 12(2): 129-141.
- [91] VENTER J C, GLASS J I, HUTCHISON C A III, et al. Synthetic chromosomes, genomes, viruses, and cells[J]. *Cell*, 2022, 185(15): 2708-2724.
- [92] WANG W H, ERAZO E M, ISHCOL M R C, et al. Virus-induced pathogenesis, vaccine development, and diagnosis of novel H7N9 avian influenza A virus in humans: a systemic literature review[J]. *The Journal of International Medical Research*, 2020, 48(1): 300060519845488.
- [93] TRIPATHI N K, SHRIVASTAVA A. Recent developments in recombinant protein-based dengue vaccines[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1919.
- [94] PENG X L, CHENG J S Y, GONG H L, et al. Advances in the design and development of SARS-CoV-2 vaccines[J]. *Military Medical Research*, 2021, 8(1): 67.
- [95] CALZAS C, CHEVALIER C. Innovative mucosal vaccine formulations against influenza A virus infections[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1605.

- [96] NAGY G, EMODY L, PÁL T. Strategies for the development of vaccines conferring broad-spectrum protection[J]. International Journal of Medical Microbiology: IJMM, 2008, 298(5/6): 379-395.
- [97] SÁNCHEZ-SAMPEDRO L, PERDIGUERO B, MEJÍAS-PÉREZ E, et al. The evolution of poxvirus vaccines[J]. Viruses, 2015, 7(4): 1726-1803.
- [98] CUNNINGHAM A L, GARÇON N, LEO O, et al. Vaccine development: from concept to early clinical testing[J]. Vaccine, 2016, 34(52): 6655-6664.
- [99] LI Z H, SONG S, HE M Z, et al. Rational design of a triple-type human papillomavirus vaccine by compromising viral-type specificity[J]. Nature Communications, 2018, 9: 5360.
- [100] DE GROOT A S, MOISE L, TERRY F, et al. Better epitope discovery, precision immune engineering, and accelerated vaccine design using immunoinformatics tools[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 442.
- [101] ANTIA R, AHMED H, BULL J J. Directed attenuation to enhance vaccine immunity[J]. PLoS Computational Biology, 2021, 17(2): e1008602.

- [102] HAMMARLUND E, LEWIS M W, HANSEN S G, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination[J]. Nature Medicine, 2003, 9(9): 1131-1137.



通讯作者: 应天雷(1984—),男,博士,教授。研究方向为合成免疫学。
E-mail: tlying@fudan.edu.cn



第一作者: 申赵铃(1999—),女,博士研究生。研究方向为病原微生物的防治新策略与跨脑药物的研发。
E-mail: 22111010074@m.fudan.edu.cn