

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-088

## 合成生物学在新冠病毒广谱疫苗研发中的应用

袁为锋, 赵永亮, 吴芷萱, 徐可

(武汉大学病毒学国家重点实验室, 泰康生命医学中心, 生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 自2019年底引发疫情至今, 已经变异出 Alpha、Beta、Delta 和 Omicron 等不同谱系。传统疫苗的抗原序列来源于某一自然分离株的原始序列, 疫苗迭代速度跟不上病毒变异的速度, 导致突破性感染的发生, 研发跨谱系的广谱疫苗是预防这类高变异呼吸道病毒的迫切需求。随着合成生物学技术的发展, 抗原的多价偶联、核心抗原模块的提取、抗原内部保守表位的工程化设计、抗原表位展示技术、计算指导的抗原重构等抗原“再设计”方案得以实现, 提高了抗原的免疫原性和广谱性。合成生物学还体现在疫苗产品的生产工艺环节, 基因工程表达的疫苗抗原以纳米颗粒、病毒载体、核酸、亚单位的形式, 借助细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞等表达平台进行规模化生产。本文综述了近年来合成生物技术在广谱疫苗 (尤其是广谱新冠病毒疫苗) 多种设计策略中的应用情况, 总结了合成生物技术如何通过反向疫苗学的设计展示全新的共性抗原表位和交叉抗原位点, 达到“以不变应万变”的广谱保护效果。本文还讨论了多种广谱疫苗设计策略的应用场景及面临的挑战。基于合成生物技术的马赛克设计策略、保守表位工程化设计策略、计算共识序列策略和新型佐剂策略, 结合不同的疫苗技术路线, 可提高疫苗的免疫原性、广谱保护性和安全性。这为高变异病毒的疫苗研发提供了合成生物学的新思路。

**关键词:** 合成生物学; 反向疫苗学; 新冠广谱疫苗

**中图分类号:** Q816 **文献标志码:** A

## Applications of synthetic biology in the development of SARS-CoV-2 broad-spectrum vaccines

YUAN Weifeng, ZHAO Yongliang, WU Zhixuan, XU Ke

(State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Taikang Center for Life and Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

**Abstract:** Since the outbreak of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) at the end of 2019, it has evolved into different lineages, including Alpha, Beta, Delta, and Omicron. The development of broad-spectrum vaccines has become a necessity for preventing the highly mutated respiratory viruses. Traditional vaccine

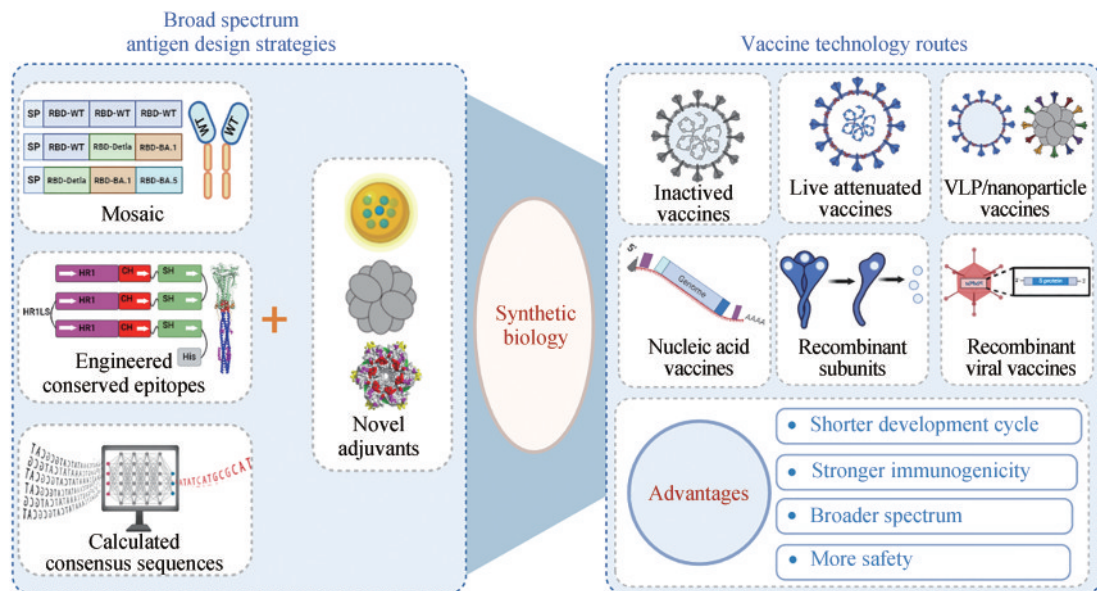
收稿日期: 2023-11-28 修回日期: 2024-02-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC2307800); 湖北省支持企业技术创新发展项目 (2021BAB117); 武汉大学示范课堂建设项目 (2022ZG090)

引用本文: 袁为锋, 赵永亮, 吴芷萱, 徐可. 合成生物学在新冠病毒广谱疫苗研发中的应用[J]. 合成生物学, 2024, 5(2): 369-384

Citation: YUAN Weifeng, ZHAO Yongliang, WU Zhixuan, XU Ke. Applications of synthetic biology in the development of SARS-CoV-2 broad-spectrum vaccines[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(2): 369-384

antigens, originating from prototype strains, cannot cover rapid mutations with these viruses, leading to breakthrough infections. With the development of synthetic biology, new technologies such as multivalent coupling of antigens, reconstructed dominant antigen modules, engineering design of conserved epitopes, epitope display, and computation-guided reconstruction have enabled redesigning antigens to achieve stronger immunogenicity with broader spectrum. The technology of synthetic biology is also applicable in the vaccine production process, such as antigen expression in nanoparticles, viral vectors, nucleic acids, and subunits. This article reviews the applications of synthetic biology technology in developing broad-spectrum vaccines in recent years, particularly for the broad-spectrum SARS-CoV-2 vaccines, and summarizes how to display common antigens and cross-antigenic sites by the reverse vaccinology for the activation of broad-spectrum immune responses against different mutant strains, achieving broad-spectrum vaccine protection effects through “remaining constant in response to ever-changing”. The article also provides a comprehensive comparison of the strengths and limitations of different broad-spectrum vaccine design strategies and discusses challenges to applying synthetic biology in the development of vaccines, offering valuable insights for universal against highly mutation viruses.



**Keywords:** synthetic biology; reverse vaccinology; broad-spectrum COVID-19 vaccines

新型冠状病毒（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2）的持续传播造成了巨大的公共卫生问题。随着病毒不断积累突变，SARS-CoV-2已由最初的原始毒株进化出多谱系的变异毒株，新冠疫苗的开发和应用凸显了疫苗在迅速应对新发传染病方面的关键作用。尽管已有多个新冠疫苗上市，但大部分疫苗仍以 SARS-CoV-2原型株为抗原，对后续出现突变株的中和能力均有不同程度的下降<sup>[1-2]</sup>，即便逐年更新也追不上病毒变异速度。为了实现针对不同变异株的广

谱保护效果，需进行抗原人工设计和工程化改造，合成一个具有广谱性和免疫激活能力的全新抗原。

合成生物学是结合生物学、生物工程、计算机科学和其他相关领域的原理和技术，设计、构建和改造生物系统，创造具有特定功能或特性的生物体或生物部件的学科。合成生物学的主要理念是将复杂性生物系统分解为各个更小的组件，然后重新组合实现所需的生物功能。在疫苗研发中，可将病毒蛋白模块化组合或细分成核心抗原结构域甚至每个氨基酸位点，通过工程化改造提

升疫苗的免疫原性和安全性。本文对新冠广谱疫苗的现状和研发进展进行了总结,阐述了合成生物学在广谱疫苗策略中的运用,提出了合成生物学在新冠广谱疫苗应用中面临的挑战。

## 1 六种疫苗技术路线及其涉及的合成生物技术

新冠病毒候选疫苗主要有六种技术路线,可以划分为三大类:第一类是将病原体培养后进行灭活或减毒处理的灭活疫苗和减毒活疫苗;第二类是在体外合成靶抗原,将其注射进人体后激活免疫反应的病毒样颗粒疫苗和亚单位疫苗;第三类是将编码病毒抗原的基因递送到宿主细胞内,

在受试者体内表达靶抗原的病毒载体疫苗和核酸疫苗<sup>[3]</sup>。表1总结了不同技术路线的SARS-CoV-2疫苗研究进展,并列出了每种疫苗的关键组分或技术。

### 1.1 灭活疫苗

灭活疫苗是在体外通过特殊物理或化学手段,在保持抗原颗粒完整性和抗原性的条件下将活病毒灭活,适当结合佐剂制备成的疫苗。灭活疫苗的免疫原为完全灭活的病毒粒子,不具备感染性,使用安全性高,保留了完整的病毒结构,具有良好的免疫原性<sup>[29]</sup>。在灭活疫苗技术路线中,合成生物学概念主要体现在疫苗毒株的获得方式上。传统的疫苗株通过自然分离株的传代培养,或者与疫苗生产用鸡胚适应株重组筛选获得。随着反

表1 五种技术路线SARS-CoV-2疫苗的研究进展  
Table 1 Research progress in SARS-CoV-2 vaccines

| 疫苗类型      | 产品名         | 关键组分或技术          | 保护率或临床阶段               | 研发团队或机构                   |
|-----------|-------------|------------------|------------------------|---------------------------|
| 灭活疫苗      | CoronaVac   | CZ02株            | 50.4% <sup>[4]</sup>   | 北京科兴中维生物                  |
|           | BBIBP-CorV  | HB02株            | 78.1% <sup>[5]</sup>   | 北京生物制品研究所                 |
|           | WIBP        | WIV04株           | 72.8% <sup>[5]</sup>   | 武汉生物制品研究所                 |
|           | BBV152      | NIV-2020-770株    | 77.8% <sup>[6]</sup>   | Bharat Biotech            |
|           | QazVac      | Wuhan-Hu-1株      | 90% <sup>[7]</sup>     | Kazakhstan RIBSP          |
| 纳米颗粒疫苗    | I53-50      | RBD              | Ⅲ期(原始株)                | 华盛顿大学 <sup>[8]</sup>      |
|           | 铁蛋白         | S                | I期(原始株)                | 斯坦福大学 <sup>[9]</sup>      |
|           | SC003-mi3   | RBD              | Ⅱ/Ⅲ期(原始株)              | 牛津大学 <sup>[10]</sup>      |
|           | 铁蛋白         | RBD              | 临床前(突变株)               | 中山大学 <sup>[11]</sup>      |
| 亚单位疫苗     | NVXCoV2373  | Matrix-M™佐剂      | 89.7% <sup>[12]</sup>  | Novavax                   |
|           | COVAX-19    | Advax-CpG55.2™佐剂 | 63.55% <sup>[13]</sup> | Vaxine Pty Ltd            |
|           | SCB-2019    | CpG 1018、铝佐剂     | 67% <sup>[14]</sup>    | 三叶草                       |
|           | ZF2001      | 氢氧化铝佐剂           | 75.7% <sup>[15]</sup>  | 中国科学院微生物研究所               |
|           | 威克欣         | MF59样佐剂          | 未公布 <sup>[16]</sup>    | 威斯克生物                     |
|           | SCTV01C     | 水包油佐剂            | 未公布 <sup>[17]</sup>    | 神州细胞                      |
|           | MVC-COV1901 | CpG1018、明矾佐剂     | 未公布 <sup>[18]</sup>    | Medigen Vaccine Biologics |
| 病毒载体疫苗    | Soberana    | 明矾、B群脑膜炎奈瑟氏菌外膜囊泡 | 未公布 <sup>[19]</sup>    | 古巴芬利疫苗研究所                 |
|           | Ad26.COV2.S | Ad26腺病毒载体        | 66.1% <sup>[20]</sup>  | Janssen                   |
|           | Sputnik V   | rAd26和rAd5腺病毒载体  | 91.6% <sup>[21]</sup>  | Gamaleya Center           |
|           | Ad5-nCoV    | Ad5腺病毒载体         | 57.5% <sup>[22]</sup>  | 康希诺生物、军事医学科学院             |
|           | AZD1222     | ChAdOx1腺病毒载体     | 76% <sup>[23]</sup>    | 阿斯利康、牛津大学                 |
|           | dNS1-RBD    | dNS1流感病毒载体       | 100% <sup>[24]</sup>   | 厦门大学、香港大学、万泰生物            |
|           | 核酸疫苗        | BNT162b2         | mRNA疫苗                 | 95% <sup>[25]</sup>       |
| mRNA-1273 |             | mRNA疫苗           | 94.1% <sup>[26]</sup>  | Moderna                   |
| ARCoV     |             | mRNA疫苗           | 83.75% <sup>[27]</sup> | 艾博生物                      |
| ZyCoV-D   |             | DNA疫苗            | 67% <sup>[28]</sup>    | ZyduS Cadila              |

向遗传学技术的发展,生产用适应株的基因片段可以直接与流行株的基因片段进行体外重配,以反向遗传学技术拯救出活疫苗株,这种方法常用于流感病毒灭活疫苗种子株的拯救<sup>[30]</sup>。由于冠状病毒反向遗传学操作的难度更大,也存在安全风险问题,目前尚未有采用反向遗传技术的冠状病毒灭活疫苗上市。表1总结并列出了已上市的SARS-CoV-2灭活疫苗,均采用自然分离株培养后直接灭活。

## 1.2 减毒活疫苗

减毒活疫苗是由减毒或自然界分离的弱毒、无毒株制备而成,保留了病毒粒子的完整性和复制能力。减毒活疫苗可通过非侵入性递送复现病毒感染的全过程,刺激机体产生黏膜、体液和细胞免疫的多维度免疫应答<sup>[31]</sup>。减毒活疫苗接种剂量小,接种后病毒在机体内低水平复制,可以减轻接种后的不良反应,维持免疫长效性。减毒活疫苗对储存和运输的要求较高,其弱毒性也需反复验证。在新冠病毒中,缺失病毒毒力基因(如ORF3、ORF6、ORF7和ORF8)的重组病毒在小鼠体内复制水平较低,并且可诱导更高的干扰素表达,可作为候选减毒株<sup>[32]</sup>。此外,去除新冠病毒基因组上的修饰也能降低病毒的复制水平,删除N7-甲基转移酶(NSP14)和2'-O-甲基转移酶(NSP16)的毒株能在小鼠中获得减毒效果<sup>[11, 33]</sup>。目前,新冠病毒减毒疫苗由于安全性考虑尚未应用。

## 1.3 病毒样颗粒/纳米颗粒疫苗

病毒样颗粒(virus like particle, VLP)是由病毒衣壳蛋白、核心蛋白或包膜蛋白自组装形成的生物纳米颗粒,具有病毒天然结构,但不含基因组。VLP可在酵母、大肠杆菌、哺乳动物或杆状病毒-昆虫细胞等不同宿主中大规模表达,借助细菌或细胞的生物机制使其折叠、自组装形成与天然病毒颗粒类似的空间立体结构。VLP疫苗可模拟活病毒的感染途径,激活B细胞和T细胞反应<sup>[34]</sup>。采用VLP技术平台研发SARS-CoV-2的疫苗相对较少,唯一一款上市的VLP疫苗是由加拿

大Medicago公司研发的植物源性重组疫苗CoVLP<sup>[35]</sup>。该疫苗设计原理是利用一种烟草植物*Nicotiana benthamiana*的病毒样颗粒展示三聚体形式的S蛋白,诱导较高滴度的中和抗体和持久的T细胞免疫应答,临床数据显示,CoVLP疫苗的有效性保护率为69.5%<sup>[35-36]</sup>。

纳米颗粒与VLP类似,也是自组装形成纳米结构,在疫苗中主要有三种表现形式:①作为包裹抗原的载体将抗原递送至靶器官,通过调节脂质体的理化性质实现与靶细胞膜的融合;②水、油、表面活性剂等自发形成的纳米乳液抗原混合后提高抗原溶解度,达到缓释和靶向效果;③作为抗原偶联中心,在颗粒表面展示抗原<sup>[37]</sup>。铁蛋白是最常见的非病毒自组装纳米颗粒,由24个亚基自组装形成铁内核和蛋白外壳,最高可装载24个抗原,诱导高滴度的中和抗体<sup>[38]</sup>。除铁蛋白外,核黄素合成酶、冠状病毒非结构蛋白10和二氢硫酰乙酰转移酶也可以形成稳定的纳米颗粒,有望应用于纳米颗粒疫苗开发<sup>[39-41]</sup>。

## 1.4 亚单位疫苗

亚单位疫苗是指借助细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞等表达系统,体外表达纯化病毒特定蛋白,以病毒特定蛋白作为抗原,配伍佐剂制成的疫苗<sup>[42-43]</sup>。亚单位疫苗的优势有:①安全性高,抗原来源于病毒的部分或特定结构蛋白,无感染风险;②稳定性好,抗原成分单一,有助于在生产、运输和储存过程中保持有效性;③设计性强,可对抗原进行科学设计和灵活改造,获得适配病原特征的抗原;④生产工艺清晰,抗原的表达纯化体系已相对成熟,经过条件优化可大规模表达高纯度的特定抗原;⑤免疫原性强,通常选用病毒表面膜蛋白作为抗原,具备丰富的抗原表位和保守位点,可诱导高滴度、长效、广谱中和抗体<sup>[44-45]</sup>。现已有多款SARS-CoV-2亚单位疫苗上市,见表1。

## 1.5 病毒载体疫苗

病毒载体疫苗是将工程化的病毒作为载体,插入SARS-CoV-2抗原基因制备而成,常用的基因工程病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、慢病毒和

流感病毒等<sup>[46]</sup>。基因工程载体贴近合成生物学中的底盘生物概念，以规模化生产的、低毒性的工具病毒作为底盘，将流行毒株的抗原基因装载在工具病毒内，形成重组病毒。病毒载体在宿主中能够被免疫细胞识别，具有天然佐剂的效果，能够有效诱导宿主先天免疫反应，增强免疫细胞应答<sup>[47-48]</sup>。在 SARS-CoV-2 疫苗研发中，常用的病毒载体为腺病毒载体和流感病毒载体，靶抗原大多选择 S 蛋白或 RBD 蛋白<sup>[49-50]</sup>。厦门大学、香港大学和万泰生物联合研制的鼻喷流感病毒载体新冠疫苗（dNS1-RBD），能够在呼吸道局部诱导多维度的免疫反应，其中细胞免疫、固有免疫和训练免疫均不易受到病毒变异的影响<sup>[24, 51]</sup>。表 1 总结了已上市的病毒载体 SARS-CoV-2 疫苗。

## 1.6 核酸疫苗

核酸疫苗分为 DNA 疫苗和 mRNA 疫苗两种类型，是将编码在表达载体上或 mRNA 基序上的靶抗原基因序列，通过肌内注射、基因枪注射或递送系统等手段导入机体内表达靶抗原<sup>[52-53]</sup>。新冠病毒核酸疫苗的抗原大多选择 S 蛋白或 RBD 蛋白，表 1 总结并列出了已上市的新核酸疫苗。合成生物学在 mRNA 疫苗中的应用主要体现在表达元件的优化和核苷酸修饰等方面。在 mRNA 的 5' 端添加帽子结构模拟宿主 mRNA，可逃避机体先天免疫识别，保护 mRNA 不被外切酶降解<sup>[54]</sup>；进行密码子优化可以提高 mRNA 疫苗的翻译水平<sup>[55]</sup>；核苷酸修饰也是 mRNA 设计中的重要步骤，含有 N1-甲基假尿苷修饰（m1Ψ）的 mRNA 可逃逸 TLR 受体识别，降低机体 TNF- $\alpha$  的表达量，解决了 mRNA 易被免疫系统识别而被清除的问题<sup>[56-57]</sup>，辉瑞公司和 Moderna 两家公司基于假尿苷修饰策略开发的新冠 mRNA 疫苗对新冠病毒感染保护率均高于 94%<sup>[58]</sup>。环状 RNA（circRNA）疫苗也是利用合成生物技术增加 mRNA 稳定性的手段，利用酶促反应或自剪接内含子将 mRNA 环化为 circRNA，以弥补 mRNA 稳定性差和半衰期短的劣势，相比于等效剂量的线性 mRNA 疫苗，含有 RBD 的 circRNA 疫苗能够诱导更有效和更持久的免疫反应，并且可在室温环境中储存两周<sup>[59]</sup>。

## 2 合成生物学在抗原广谱设计中的应用

病毒的高变异特征对疫苗的广谱性和长效性提出了新的挑战，如疫苗抗原采用的是原型株序列，不论是哪种技术路线，仍然无法获得对变异株的广谱保护。因此，必须对抗原进行科学的“再设计”，增加抗原的广谱性和长效性。广谱的新冠疫苗需要具备 3 个特征：①由于大多数人在幼儿期会多次感染呼吸道病毒，因此，针对这些病毒的广谱疫苗必须克服抗原反应的复杂性，特别是避免以前接触过的非中和表位；②广谱疫苗要对已知毒株产生免疫应答，还必须对抗原不断变异的未知毒株产生中和反应；③广谱疫苗还需要具备高效性、长效性，以实现广谱疫苗对抗未来变异株的长期需求。

合成生物学为广谱疫苗抗原的“再设计”提供了可能性，通过模块串联、工程化改造、计算得到的免疫原经体外合成和规模化生产以及临床试验验证，可申请上市（如图 1 所示）。抗原的“再设计”主要包括：马赛克法、保守表位法和共识序列法。马赛克法是将包含多种突变株的核心抗原直接混合或进行模块化拼接，克隆到高效表达载体中获得可覆盖多种突变株的混合抗原。以马赛克法设计的抗原通常需要结合纳米载体、抗原串联、二聚体化等展示手段才能发挥最佳效果<sup>[60-61]</sup>。保守表位法是将病毒膜蛋白的保守区域作为免疫原，但这些区域在体外往往不稳定，需要对结构进行重构和工程化改造才能得到稳定的蛋白质，以保守表位法设计的亚单位疫苗可以抵御病毒变异对疫苗效果的影响。共识序列法是通过计算病毒的进化方向，将相同进化分支的病毒序列聚类到一起，得到一条共识序列（含有该分支中频率最高的共识性的位点），再将不同分支的共识序列计算得到总共识序列<sup>[62]</sup>。以共识序列作为氨基酸模板，需要设计最佳的密码子优化方案，再将优化后的核酸在体外表达系统中表达出蛋白质。共识序列疫苗可在保留抗原天然完整结构的情况下，覆盖病毒适应性变异的共性位点，对未来突变株具有很强的预见性。下文将详述 3 种广谱疫苗抗原设计策略及其中的合成生物学技术。

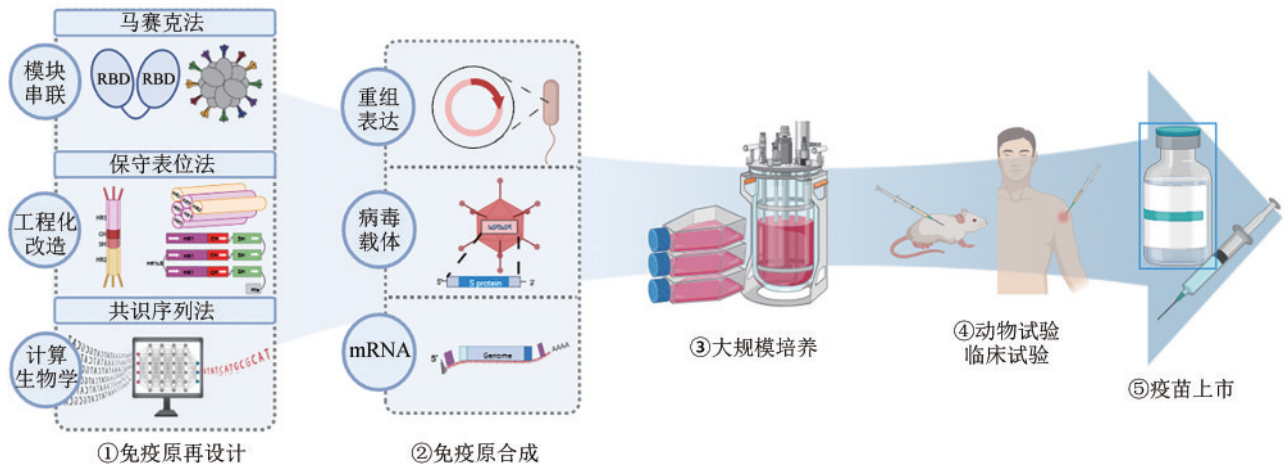


图1 合成生物学在抗原（疫苗）“再设计”中的应用

Fig. 1 Applications of synthetic biology in the reverse design of vaccines

## 2.1 马赛克策略

马赛克策略借用了传统“多价疫苗”的概念，将新冠病毒不同突变株的核心抗原视为不同元件，在高表达的载体底盘上模块化装载元件，分别组建单体、二聚体和多聚体等元件串联形式，结合纳米展示技术、结构生物学手段筛选稳定的广谱抗原。该策略的优势在于将多个流行突变株的抗原组合到一个疫苗中，获得比原始毒株或单价突变株的疫苗更丰富的抗原表位，诱导产生针对多种突变株的中和抗体，提升疫苗的广谱性<sup>[63-65]</sup>。马赛克策略还能根据流行株变化情况快速替换疫苗抗原，可实现抗原的快速迭代，拓展疫苗对新发突变株的保护能力。利用冠状病毒S蛋白RBD结构域组装而成的二聚体疫苗，通过将原型株RBD替换为Omicron BA.1和BA.2 RBD的异源二聚体组合，相比原型株疫苗获得了对Omicron突变株更佳的保护效果<sup>[66-67]</sup>。表2中总结了采用马赛克策略的

新冠疫苗。尽管马赛克策略具有实用性和快速构建的特点，但冠状病毒和流感病毒变异快、亚型众多，此策略无法实现对更多突变株的无限加和，价次提高对抗原的表达纯化也带来很大的难度。由于只能在已经出现的突变株上增加价次，该策略也缺乏对未来突变株的保护能力。

## 2.2 病毒保守表位策略

病毒保守表位策略体现了“以不变应万变”的疫苗设计理念，此策略以病毒不易突变的保守区域为抗原，不受变异株的影响，能对不同变异株中恒定不变的抗原区域产生保守的免疫保护效应。新冠病毒S蛋白由S1和S2两个亚基组成，S1亚基与宿主细胞表面受体结合，介导病毒入侵，包括NTD和RBD两个区域<sup>[73]</sup>。相比于RBD，NTD变异率低，是S1中的保守表位<sup>[73]</sup>。S2亚基可促进病毒膜与宿主细胞膜融合，包含七肽重复区

表2 马赛克策略的SARS-CoV-2疫苗研究进展

Table 2 Research progress in developing the SARS-CoV-2 vaccine with the Mosaic strategy

| 疫苗产品                      | 疫苗类型 | 抗原                            | 临床阶段 | 研发机构          |
|---------------------------|------|-------------------------------|------|---------------|
| SpFN <sup>[68]</sup>      | 亚单位  | 多种突变株的S蛋白                     | I    | 美国沃尔特-里德陆军研究所 |
| RBD-scNP <sup>[60]</sup>  | 亚单位  | 多种突变株的RBD蛋白                   | 临床前  | 杜克大学          |
| 复必泰 <sup>[69]</sup>       | mRNA | WT和BA.4/5的S蛋白                 | I    | 复星医药          |
| RBD-sc <sup>[70]</sup>    | 亚单位  | 不同突变株的RBD二聚体                  | 临床前  | 中国科学院微生物研究所   |
| V-01D-351 <sup>[61]</sup> | 亚单位  | Beta和Delta株的RBD二聚体            | I    | 丽珠集团          |
| SCTV01C <sup>[71]</sup>   | 亚单位  | Alpha和Beta株的S蛋白               | III  | 神州细胞          |
| SCTV01E <sup>[72]</sup>   | 亚单位  | Alpha、Beta、Delta和Omicron株的S蛋白 | III  | 神州细胞          |

(heptad repeat, HR) HR1 和 HR2<sup>[74]</sup>。HR1 和 HR2 紧密结合形成六螺旋构象，介导病毒与宿主细胞的膜融合，在 Sarbecovirus 中保守性均高达 90%<sup>[74]</sup>。以保守的 HR1 和 HR2 形成的融合中间态为抗原，可诱导机体产生抑制病毒膜融合的抗体（图2）<sup>[75]</sup>。但保守表位通常较短、免疫原性弱，无法在体外高表达，需要工程化改造。为了提高 HR1、HR2 抗原的免疫原性和表达水平，研究者开发了多种抗原改造策略。Pang 等<sup>[76]</sup>将 HR1 和 HR2 拆解为元件，通过异构 HR1 和 HR2 形成重组蛋白 HR121 (HR1-linker1-HR2-linker2-HR1)，还原 S2 亚基融合中间态的构象和功能 [图3(a)]，接种 HR121 的

叙利亚黄金仓鼠获得了抵抗原型株和 Omicron BA.2 感染的能力。另一种策略是将 S2 亚基的 HR1、CH 和 SH 三个功能区反向平行排列构建重组蛋白 HR1LS，还原 HR1 融合中间态的三聚体构象，暴露 HR1 与 HR2 结合的疏水槽 [图3(b)]<sup>[77]</sup>。在病毒感染时，HR1LS 通过竞争性结合 S2 亚基的 HR2 区域抑制膜融合过程，因此，HR1LS 既可作为抑制剂，也可作为免疫原使用<sup>[77]</sup>。当 HR1LS 作为抑制剂时，可产生对 Delta、Omicron 突变株假病毒和 HCoV-OC43 活病毒感染的高效抑制活性；当 HR1LS 作为免疫原时，可诱导小鼠产生针对 SARS-CoV-2 和其他 HCoVs 的交叉中和抗体反

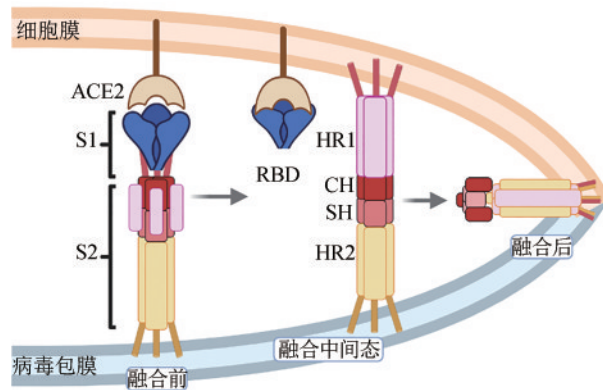


图2 以保守表位 HR1、HR2 作为广谱疫苗抗原的示意图

(新冠病毒 S2 亚基介导膜融合过程。当新冠病毒结合 ACE2 受体后，S1 与 S2 解离，S2 被宿主蛋白酶切割后发生构象变化，HR1 延伸将融合肽 FP 插入细胞膜，形成融合中间态。随后，HR2 折叠结合至 HR1 三聚体螺旋疏水凹槽中，与 HR1 形成 6 螺旋结构，实现病毒包膜与细胞膜融合)

Fig. 2 Schematic diagram for engineering conserved epitopes HR1 and HR2 to develop broad-spectrum vaccine antigens

(Membrane fusion mediated by the SARS-CoV-2 S2 subunit. Initially, the standing RBD engages with ACE2, and subsequently, the S1 subunit dissociates from S2, followed by the exposure of the S2 site and the cleavage of S2 by the host proteases. HR1 undergoes a “jack-knife” refolding change to allow the insertion of FP into the host cell membrane. The folding back of the extended SH-HR2 element packs against the long central CH-HR1 coiled-coil, inducing the binding of SH onto the outer region of CH and HR2 to the HR1 groove. Subsequently, membrane fusion occurs between the viral particles and host cells.)

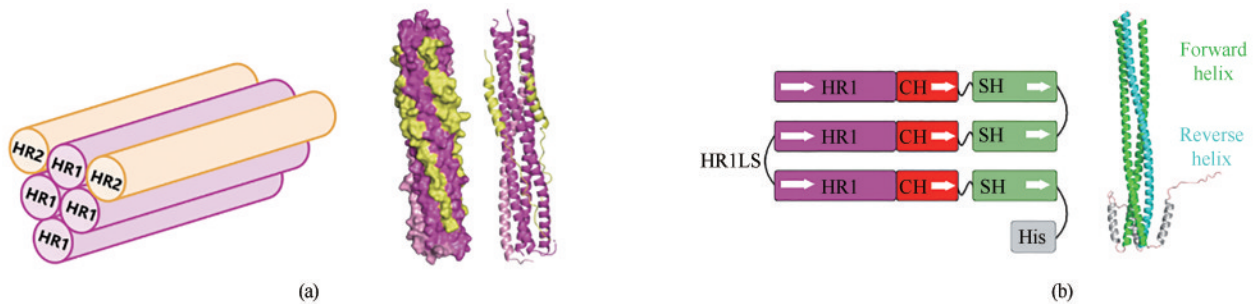


图3 重组蛋白 HR121 的模式图、3D 结构 (a) 以及重组蛋白 HR1LS 的模式图、3D 结构 (b)

Fig. 3 Schematic diagrams of the dimer protein HR121 and predicted structures (a) and the trimeric protein HR1LS and predicted structures (b)

应<sup>[77]</sup>。HIV-1、流感病毒与新冠病毒的外膜蛋白都是I型膜蛋白,膜融合机制相似,均可通过模拟融合中间态的保守表位合成免疫原<sup>[78-80]</sup>。表3中总结并列出了采用靶向SARS-CoV-2保守表位策略的疫苗研究进展。

### 2.3 共识序列设计策略

病毒作为寄生物,是向着更加适应宿主的方向变异的。因此,利用病毒进化遗传学研究手段,可以计算得到病毒定向进化的共识性位点。这些共识性位点是在所有进化分支上病毒的趋同变异位点或保守位点,含有这些共识性位点的全长抗原序列称为共识序列<sup>[84]</sup>。共识序列设计的底层逻辑是病毒进化的方向性,将基因型具有相似亲缘关系的变异株序列聚类为同一系统分支,计算每一分支的代表性毒株序列,最终获得能够位于进化中心、具有共识性的抗原蛋白序列,如图4所示。共识序列代表的是病毒进化的共性和趋同性,

可以覆盖未来毒株的变异位点,延长疫苗的保护周期。共识序列的设计首先需要计算病毒序列的进化关系和进化树,需要预先建立一个完整、多样的病毒序列数据库。新冠病毒和流感病毒这类高变异呼吸道病毒都有开源的、持续监测和更新毒株序列的全球数据库共享机制,使得这类病毒的共识序列计算方法成为可能。在疫情爆发初期,病毒变异尚未形成丰富的多样性时,计算出来的共识序列可能对未来变异株的代表性仍然不足。当呼吸道病毒在人群中完成定殖时,突变方向逐渐固定,这时计算得到的共识序列就更有代表性和准确性。当病毒发生跨种传播导致抗原完全变异成新的亚型时,共识序列也需要重新计算或多个共识序列进行组合。

共识序列设计策略已应用于包括新冠病毒在内的多种病毒广谱疫苗设计中<sup>[85-86]</sup>。以甲型H5N1流感病毒HA蛋白共识序列为抗原的疫苗可产生针对clade 1、clade 2.1、clade 2.2、clade 2.3.2和clade 2.3.4亚类的H5N1高致病性毒株的中和抗体

表3 SARS-CoV-2靶向病毒保守表位策略的疫苗研究进展

Table 3 Research progress in vaccines against the conserved epitope of SARS-CoV-2

| 疫苗产品                                 | 疫苗类型 | 抗原                       | 临床阶段 | 研发机构         |
|--------------------------------------|------|--------------------------|------|--------------|
| HR121 <sup>[76]</sup>                | 亚单位  | HR1-HR2-HR1 串联           | 临床前  | 中国科学院昆明动物研究所 |
| HR1LS <sup>[77]</sup>                | 亚单位  | HR1-CH-SH 串联             | 临床前  | 复旦大学         |
| MigVax-101 <sup>[81]</sup>           | 亚单位  | RBD和N蛋白                  | 临床前  | MigVax       |
| STFK1628x/y <sup>[82]</sup>          | 亚单位  | B.1.620-NTD和Gamma-RBD-S2 | 临床前  | 厦门大学         |
| hAd5 S-Fusion+N-ETSD <sup>[83]</sup> | 病毒载体 | S和N蛋白                    | II   | ImmunityBio  |

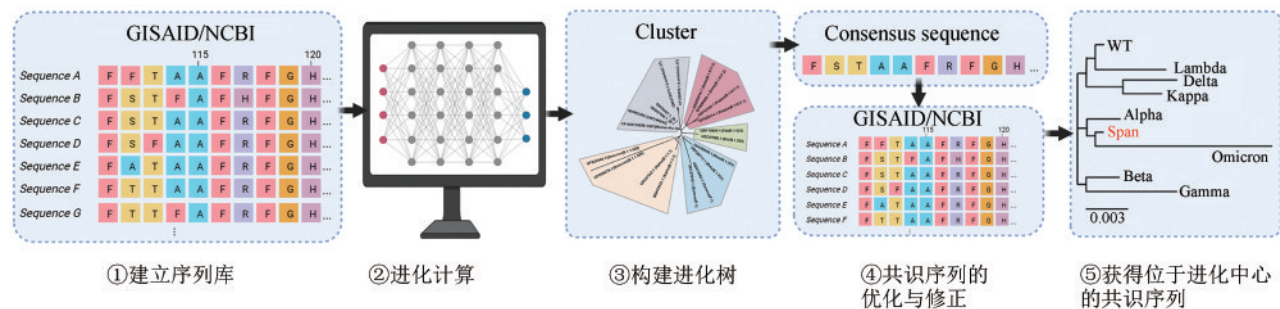


图4 共识序列设计策略示意图<sup>[62]</sup>

(以新冠病毒共识序列Span为例。①建立序列库;②将序列库中所有毒株序列进行进化计算;③构建毒株进化树,得到每个分支的代表性毒株;④使用代表性毒株计算得到共识序列,并带回数据库进行优化与修正;⑤得到位于进化中心的共识序列)

Fig. 4 Schematic diagram of strategy for designing consensus sequences<sup>[62]</sup>

(Taking the SARS-CoV-2 consensus sequence Span as an example. ① Establishing the whole sequences library; ② Evolutionary calculations of the viruses; ③ Constructing an evolutionary tree for the viral strains to obtain representative ones for each branch; ④ Utilizing representative strains to calculate the consensus sequences, and refining and optimizing them by incorporating back into the database; ⑤ Obtaining the consensus sequences located at the evolutionary center.)

和免疫保护<sup>[87]</sup>。以H3N2流感病毒HA蛋白共识序列设计的DNA疫苗,可保护小鼠免受多种H3N2毒株的感染<sup>[88]</sup>。本课题组前期设计的甲型H1N1流感病毒HA蛋白共识序列抗原也可诱导机体对不同进化分支上H1N1病毒产生广泛的T细胞和B细胞免疫反应<sup>[89]</sup>。在新冠病毒方面,通过分析NCBI数据库中的2675条新冠病毒S蛋白序列,计算所有突变位点发生频率,找到了位于新冠病毒进化中点的共识序列Span<sup>[62]</sup>。相比原型株免疫原,以Span作为抗原的疫苗具有更明显的广谱中和优势,无论常规的primer-boost接种策略还是作为加强针,均可诱导针对多种变异株的中和抗体,提供跨谱系的交叉免疫保护<sup>[62]</sup>。共识序列设计的Span免疫原对其后出现的新冠Delta和Omicron突变株同样具有保护效果<sup>[62]</sup>,表明共识序列抗原具有覆盖未来突变株的能力。

## 2.4 多种抗原设计策略的比较与应用

马赛克设计策略从“多价混合”角度出发,选择关键毒株的抗原表位或突变位点,增加突变毒株的覆盖范围,但马赛克策略选择的抗原来自现有突变株且由设计者主观选择,难以实现对所有突变株的“大广谱”保护。保守表位设计策略则从“保守”角度出发,找到病毒关键蛋白的保守表位,借助抗原反向设计和合成生物技术,获得“保守抗原”。保守表位疫苗具有对同一家族病毒“大广谱”的保护能力,但由于保守表位往往针对病毒膜蛋白的茎杆区或病毒内部蛋白,诱导的抗体中和活性不如针对头部抗原的抗体活性强。共识序列设计策略从“追踪进化方向-覆盖趋同突变”的角度出发,计算获得位于进化中点的“共识序列”。共识序列由每个位置上出现最高频率的氨基酸组成,可最大程度实现对所有进化分支的覆盖。由于共识序列抗原的设计过程遵循病毒进化规律,排除了主观因素影响,对未来出现的突变株也具有一定的预见性。当病毒亚型间进化距离过远(例如流感病毒H1和H3亚型),共识序列策略也无法通过一条序列覆盖所有进化分支,需要分别计算不同亚型的共识序列并进行组合。上述多种抗原设计策略需在不同阶段运用,发挥不

同策略的优势。在疫情流行初期可采用马赛克策略快速迭代;随着病毒的长期流行和变异,数据库逐渐丰富后,可采用保守表位和共识序列策略。

## 3 合成生物学在新型佐剂策略中的应用

除抗原设计外,还可以使用强效佐剂增加疫苗的广谱性。SARS-CoV-2新型佐剂疫苗策略是指在原型株疫苗的基础上加入新型高效佐剂联合使用,从而使原型株疫苗诱导出高效的广谱中和抗体。新型佐剂可分为分子内佐剂和分子外佐剂。

分子内佐剂是在抗原分子内融合表达抗体骨架或免疫激活蛋白,通过融合表达的分子内佐剂,促进抗原的提呈,延长抗原半衰期或激活免疫细胞。例如,以IgG Fc片段为支架,将新冠RBD蛋白串联形成的多聚体RBD-Fc蛋白,相比RBD单体蛋白,其能诱导更高效、长期的中和抗体反应<sup>[90]</sup>。此外,Sun等<sup>[91]</sup>在RBD-Fc的RBD蛋白N端添加IFN- $\alpha$ 蛋白为分子内佐剂,增强了将RBD-Fc靶向递送至抗原提呈细胞的能力,此方法制备的抗原在低剂量或在没有其他佐剂的情况下也具有较高的免疫原性。

分子外佐剂是在抗原分子外单独表达免疫增强剂或纳米载体,与抗原预混后制备成苗,通过激活抗原提呈细胞或促进炎症反应等方式增强机体免疫反应。常见的分子外佐剂包括铝盐、油乳剂、天然或合成的多糖类物质等,随着合成生物技术的发展,出现了多种新型分子外佐剂。Liu等<sup>[92]</sup>研究发现,基于STING激动剂cGAMP设计的肺部仿生纳米颗粒CF501可作为广谱疫苗的黏膜分子外佐剂,诱导针对Sarbecovirus亚属冠状病毒的高滴度交叉中和抗体反应以及T细胞免疫应答。这种肺部仿生纳米颗粒(PS-GAMP)佐剂在不破坏肺部表面活性和肺泡上皮屏障情况下,激活肺泡细胞中STING信号通路,促进流感疫苗产生高效的细胞免疫和体液免疫应答,可抵抗多亚型流感病毒感染,有望作为“通用”流感疫苗黏膜佐剂<sup>[93]</sup>。表4中总结并列出了采用新型佐剂策略的疫苗研究进展。新型佐剂在扩大人群接种范围时需持续观察副反应。

表4 SARS-CoV-2新型佐剂策略的疫苗研究进展

Table 4 Research progress of the SARS-CoV-2 vaccines developed based on novel adjuvant strategies

| 疫苗产品                           | 疫苗类型 | 抗原     | 佐剂           | 临床阶段 | 研发机构       |
|--------------------------------|------|--------|--------------|------|------------|
| $\beta$ -CoV-B <sup>[94]</sup> | 亚单位  | WT-RBD | CF501        | 临床前  | 复旦大学       |
| NVX-CoV2373 <sup>[95]</sup>    | 亚单位  | S      | Matrix-M     | 已上市  | Novavax    |
| VLA2001 <sup>[96]</sup>        | 灭活疫苗 | WT毒株   | 铝佐剂和CpG 1018 | 已上市  | Valneva SE |
| YS-SC2-010 <sup>[97]</sup>     | 亚单位  | WT-S   | 皮卡佐剂         | I    | 依生生物       |

## 4 合成生物学在疫苗生产工艺优化中的应用

合成生物学技术推动了广谱疫苗的工业化进程，主要体现在生产工艺中提升表达元件和表达基质的效率，包括：①改造表达载体，插入性能更强的基因调控表达元件，可降低杂蛋白表达量，提高抗原蛋白表达纯度<sup>[98]</sup>；②改造目的抗原元件，优化抗原密码子，提高抗原蛋白表达量和活性<sup>[99]</sup>；③改造表达基质，使用基因编辑构建高效表达抗原的工程菌或细胞工厂，提高抗原蛋白的产能<sup>[100]</sup>；④改造抗原病毒载体，递送抗原至靶细胞，诱导多维度免疫应答<sup>[101]</sup>；⑤修饰抗原mRNA，改造抗原mRNA，添加核苷酸修饰，逃逸机体免疫识别，提高抗原蛋白翻译效率<sup>[102]</sup>。随着合成生物技术的广泛应用，抗原表达系统逐步规模化和产业化。但不同类型抗原的纯化和放大工艺需要定制，尚缺少统一标准，如何避免表达介质的蛋白残留也是值得关注的风险。

## 5 合成生物学在新冠广谱疫苗研发中面临的挑战

新冠疫苗研发速度飞快，几年时间已经研发出多达百款SARS-CoV-2候选疫苗<sup>[103]</sup>。但一款好的疫苗必须同时具备高效、持久、广谱和安全等特征，因此如何利用合成生物技术开发出安全高效的SARS-CoV-2疫苗仍然存在挑战。

### 5.1 突破性感染的挑战

自2019年末起，新冠病毒已在人群中传播数年，病毒积累了大量突变，进化出多种突变株。

Alpha株和Delta株获得了D614G突变，其感染性相较原型株提升3倍以上<sup>[104]</sup>。Beta和Gamma株获得了E484K突变，其对原型株疫苗的免疫逃逸能力分别提升4.5倍和34.5倍<sup>[105]</sup>。而Omicron株及其亚型的Spike蛋白则积累了更多的突变（33个以上），使Spike的免疫原性发生较大改变，原型株疫苗对Omicron突变株的中和抗体滴度下降至原来的1/40<sup>[1, 106]</sup>。在原型株疫苗逐渐失效的背景下，急需结合疫苗抗原反向设计与合成生物学理念，通过科学设计抗原提升疫苗的广谱性和持久性，以解决突变株突破性感染问题。

### 5.2 疫苗效果评价的挑战

评价新冠疫苗保护效果的两个重要指标分别是预防感染效率和预防重症效率，国内外对这两个指标的定义是一致的。疫苗接种后接种者如出现新冠核酸诊断阳性或抗原阳性定义为感染，疫苗接种后接种者仍出现《新冠肺炎诊疗方案》中重症症状则定义为重症。我国两款灭活疫苗WIBP和BBIBP-CorV预防感染的效率分别为72.8%和78.1%，预防重症效率均为100%<sup>[5]</sup>。辉瑞公司mRNA疫苗BNT162b2预防感染的效率高达95%，预防重症效率为96.7%<sup>[25]</sup>。疫苗诱导的中和抗体滴度也是评价疫苗保护效果的另一个指标，据报道，接种第二针WIBP或BBIBP-CorV灭活疫苗2周后的中和抗体的几何平均滴度（geometric mean titer, GMT）分别为94.5和156.0<sup>[5]</sup>，低于56~85岁人群接种BNT162b2的GMT值（GMT=255.0）<sup>[25]</sup>。由于mRNA疫苗使用的是新冠病毒的S抗原，而不是全病毒，可能有利于针对S蛋白产生抗体，排除其他病毒蛋白的干扰。以病毒外膜蛋白作为免疫原的核酸疫苗和亚单位疫苗都可以通过抗原的“再设计”进一步增加免疫原性和广谱

性, 或者将靶抗原装载至工程化病毒载体, 通过鼻喷等接种途径激活呼吸道黏膜免疫, 有利于阻断病毒在呼吸道部位的感染。因此, 不同类型疫苗接种后的效果评价因疫苗免疫原特性、接种途径不同会存在差异, 如何建立一套标准化的多维度指标针对不同技术路线的疫苗进行公平的评价仍存在挑战。

### 5.3 动物模型的挑战

开发出能够反映 COVID-19 患者疾病发生进程和严重程度的动物模型对疫苗评价极为关键。冠状病毒研究领域中的小型动物模型包括小鼠、仓鼠、雪貂等<sup>[107-108]</sup>。SARS-CoV-2 不能利用野生型小鼠 ACE2 受体入侵, 研究人员开发了多种遗传背景的 hACE2 基因编辑小鼠建立 SARS-CoV-2 感染模型, 但此种小鼠的感染症状仍与人体有较大差距<sup>[109-112]</sup>。雪貂 ACE2 与人类 ACE2 同源性高, 与 S 蛋白结合区域结构相似, 无需基因编辑即可支持 SARS-CoV-2 的感染<sup>[113]</sup>。雪貂模型相对基因编辑小鼠模型的优势是具备空气传播途径, 可用于评价疫苗控制病毒传播的效果, 是 SARS-CoV-2 疫苗研发评价中最具有潜力的动物模型, 但雪貂的饲养较为困难, 高昂的价格也限制了该模型的广泛应用<sup>[113]</sup>。非人灵长类动物实验模型 (non-human primates, NHP) 与人类最为接近, 常被用于疫苗评价的 NHP 包括恒河猴和食蟹猴, 但该动物模型常受限于生物安全三级实验室配套设施和成本等因素的制约<sup>[114-115]</sup>。

### 5.4 安全性挑战

由于新冠疫情的急迫性, 多款上市新冠疫苗是紧急获批使用。研发机构常常在较小样本群体中进行短期安全性临床实验, 因此很多副反应只能在上市后观察。随着疫苗的大规模接种, 疫苗的各种不良反应开始出现。有研究报道, 部分人群接种 mRNA-1273 和 BNT162b2 两种 mRNA 疫苗后, 产生了过敏性休克、面瘫和急性心肌炎等不良反应, 表明 mRNA 疫苗的安全性仍需持续关注<sup>[116]</sup>。最近的一项研究发现, 辉瑞和 Moderna 的 COVID-19 疫苗中使用的假尿苷修饰 mRNA 容易诱

发密码子读码错误<sup>[117]</sup>。此外, 接种腺病毒载体疫苗 Ad26-CoV2-S 的部分人群出现格林-巴利综合征和血栓等症状的风险增加<sup>[118-119]</sup>。在合成生物技术的深度参与下, 反向疫苗学可以精确地进行疫苗设计, 有利于进一步去除上述致病因素的干扰, 最大程度减少潜在的不良反应问题。

## 6 总结

合成生物学在新冠病毒广谱疫苗的研发中具有广泛的应用潜力, 在设计广谱抗原、开发新型佐剂、优化疫苗生产工艺等环节中应用合成生物技术将有助于提高疫苗的免疫原性、广谱性和长效性, 丰富高变异病毒疫苗的研发手段。同时, 合成生物技术应用于广谱疫苗研发仍有较大的提升空间, 在未来更合理地将合成生物学与反向疫苗学等多学科技术交叉融合, 解决新冠广谱疫苗研发中面临的突破性感染、疫苗效果评价、动物模型、安全性等挑战, 有望建立更完善的广谱疫苗开发模式, 促成更好的广谱疫苗的诞生。

### 参 考 文 献

- [1] WILHELM A, WIDERA M, GRIKSCHKEIT K, et al. Limited neutralisation of the SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2 by convalescent and vaccine serum and monoclonal antibodies[J]. EBioMedicine, 2022, 82: 104158.
- [2] CAO Y L, YISIMAYI A, JIAN F C, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection[J]. Nature, 2022, 608(7923): 593-602.
- [3] DAI L P, GAO G F. Viral targets for vaccines against COVID-19[J]. Nature Reviews Immunology, 2021, 21(2): 73-82.
- [4] COSTA CLEMENS S A, WECKX L, CLEMENS R, et al. Heterologous versus homologous COVID-19 booster vaccination in previous recipients of two doses of CoronaVac COVID-19 vaccine in Brazil (RHH-001): a phase 4, non-inferiority, single blind, randomised study[J]. Lancet, 2022, 399(10324): 521-529.
- [5] KAABI N A, ZHANG Y T, XIA S L, et al. Effect of 2 inactivated SARS-CoV-2 vaccines on symptomatic COVID-19 infection in adults: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2021, 326(1): 35-45.
- [6] ELLA R, REDDY S, BLACKWELDER W, et al. Efficacy, safety, and lot-to-lot immunogenicity of an inactivated SARS-

- CoV-2 vaccine (BBV152): interim results of a randomised, double-blind, controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2021, 398(10317): 2173-2184.
- [7] KHAIRULLIN B, ZAKARYA K, ORYNBAYEV M, et al. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion vaccine against COVID-19, QazCovid-in<sup>®</sup>, in healthy adults: a multicentre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 3 clinical trial with a 6-month follow-up[J]. *EClinicalMedicine*, 2022, 50: 101526.
- [8] WALLS A C, FIALA B, SCHÄFER A, et al. Elicitation of potent neutralizing antibody responses by designed protein nanoparticle vaccines for SARS-CoV-2[EB/OL]. *BioRxiv*, 2020: 2020.08.11.247395[2023-08-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.11.247395v1>.
- [9] WEIDENBACHER P A, SANYAL M, FRIEDLAND N, et al. A ferritin-based COVID-19 nanoparticle vaccine that elicits robust, durable, broad-spectrum neutralizing antisera in non-human primates[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2149.
- [10] RAHIKAINEN R, RIJAL P, TAN T K, et al. Overcoming symmetry mismatch in vaccine nanoassembly through spontaneous amidation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(1): 321-330.
- [11] KANG Y F, SUN C, ZHUANG Z, et al. Rapid development of SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(2): 2738-2752.
- [12] ÁÑEZ G, DUNKLE L M, GAY C L, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of the NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine in adolescents: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Network Open*, 2023, 6(4): e239135.
- [13] LI L, HONDA-OKUBO Y, BALDWIN J, et al. Covax-19/Spikogen<sup>®</sup> vaccine based on recombinant spike protein extracellular domain with Advax-CpG55.2 adjuvant provides single dose protection against SARS-CoV-2 infection in hamsters[J]. *Vaccine*, 2022, 40(23): 3182-3192.
- [14] BRAVO L, SMOLENOV I, HAN H H, et al. Efficacy of the adjuvanted subunit protein COVID-19 vaccine, SCB-2019: a phase 2 and 3 multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2022, 399(10323): 461-472.
- [15] ZHAO X, ZHANG R, QIAO S T, et al. Omicron SARS-CoV-2 neutralization from inactivated and ZF2001 vaccines[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2022, 387(3): 277-280.
- [16] CHAPPELL K J, MORDANT F L, LI Z Y, et al. Safety and immunogenicity of an MF59-adjuvanted spike glycoprotein-clamp vaccine for SARS-CoV-2: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2021, 21(10): 1383-1394.
- [17] WANG G Q, ZHAO K X, HAN J, et al. Safety and immunogenicity of a bivalent SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine, SCTV01C in unvaccinated adults: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, phase I clinical trial[J]. *The Journal of Infection*, 2023, 86(2): 154-225.
- [18] HSIEH S M, LIU M C, CHEN Y H, et al. Safety and immunogenicity of CpG 1018 and aluminium hydroxide-adjuvanted SARS-CoV-2 S-2P protein vaccine MVC-COV1901: interim results of a large-scale, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial in Taiwan[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2021, 9(12): 1396-1406.
- [19] EUGENIA-TOLEDO-ROMANÍ M, VERDECIA-SÁNCHEZ L, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ M, et al. Safety and immunogenicity of anti-SARS CoV-2 vaccine SOBERANA 02 in homologous or heterologous scheme: open label phase I and phase II a clinical trials[J]. *Vaccine*, 2022, 40(31): 4220-4230.
- [20] SADOFF J, GRAY G, VANDEBOSCH A, et al. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COVS vaccine against covid-19 [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(23): 2187-2201.
- [21] SOLTANI S, MATIN B K, GOUYA M M, et al. A prospective cohort study protocol: monitoring and surveillance of adverse events following heterologous booster doses of Oxford AstraZeneca COVID-19 vaccine in previous recipients of two doses of Sinopharm or Sputnik V vaccines in Iran[J]. *BMC Public Health*, 2023, 23(1): 1415.
- [22] LI J X, WU S P, GUO X L, et al. Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: a randomised, open-label, single-centre trial[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2022, 10(8): 739-748.
- [23] RAMASAMY M N, KELLY E J, SEGOBIN S, et al. Immunogenicity and safety of AZD2816, a beta (B.1.351) variant COVID-19 vaccine, and AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) as third-dose boosters for previously vaccinated adults: a multicentre, randomised, partly double-blinded, phase 2/3 non-inferiority immunobridging study in the UK and Poland[J]. *The Lancet Microbe*, 2023, 4(11): e863-e874.
- [24] ZHU F C, HUANG S J, LIU X H, et al. Safety and efficacy of the intranasal spray SARS-CoV-2 vaccine dNS1-RBD: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2023, 11(12): 1075-1088.
- [25] THOMAS S J, MOREIRA E D, KITCHIN N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine through 6 months[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(19): 1761-1773.
- [26] TSENG H F, ACKERSON B K, SY L S, et al. mRNA-1273

- bivalent (original and *Omicron*) COVID-19 vaccine effectiveness against COVID-19 outcomes in the United States [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5851.
- [27] CHEN G L, LI X F, DAI X H, et al. Safety and immunogenicity of the SARS-CoV-2 ARCoV mRNA vaccine in Chinese adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial[J]. *The Lancet Microbe*, 2022, 3(3): e193-e202.
- [28] KHOBRAGADE 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]. *Lancet*, 2022, 399(10332): 1313-1321.
- [29] QU D, ZHENG B J, YAO X, et al. Intranasal immunization with inactivated SARS-CoV (SARS-associated coronavirus) induced local and serum antibodies in mice[J]. *Vaccine*, 2005, 23(7): 924-931.
- [30] NEUMANN G, FUJII K, KINO Y, et al. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(46): 16825-16829.
- [31] TLAXCA J L, ELLIS S, REMMELE R L JR. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 93: 56-78.
- [32] LIU Y, ZHANG X W, LIU J Y, et al. A live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate with accessory protein deletions[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 4337.
- [33] YE Z W, ONG C P, TANG K M, et al. Intranasal administration of a single dose of a candidate live attenuated vaccine derived from an NSP16-deficient SARS-CoV-2 strain confers sterilizing immunity in animals[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2022, 19(5): 588-601.
- [34] JEYANATHANM, AFKHAMIS, SMAILLF, et al. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(10): 615-632.
- [35] WARD B J, GOBEIL P, SÉGUIN A, et al. Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(6): 1071-1078.
- [36] HAGER K J, PÉREZ MARC G, GOBEIL P, et al. Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted COVID-19 vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2022, 386(22): 2084-2096.
- [37] LI M C, WANG H, TIAN L L, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 146.
- [38] GEORGIEV I S, JOYCE M G, CHEN R E, et al. Two-component ferritin nanoparticles for multimerization of diverse trimeric antigens[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2018, 4(5): 788-796.
- [39] ZHANG X, MEINING W, FISCHER M, et al. X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 306(5): 1099-1114.
- [40] IZARD T, AEVARSSON A, ALLEN M D, et al. Principles of quasi-equivalence and Euclidean geometry govern the assembly of cubic and dodecahedral cores of pyruvate dehydrogenase complexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1240-1245.
- [41] CARTER DANIEL C, BRENDA W, GRAY J W, et al. A unique protein self-assembling nanoparticle with significant advantages in vaccine development and production[J]. *Journal of Nanomaterials*, 2020, 2020: 4297937.
- [42] KARPIŃSKI T M, OŻAROWSKI M, SEREMAK-MROZIKIEWICZ A, et al. The 2020 race towards SARS-CoV-2 specific vaccines[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1690-1702.
- [43] LI Y D, CHI W Y, SU J H, et al. Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2020, 27(1): 104.
- [44] BHAT E A, KHAN J, SAJJAD N, et al. SARS-CoV-2: insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis — an updated review[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 95: 107493.
- [45] WU Y, WANG F R, SHEN C G, 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.
- [46] HUMPHREYS I R, SEBASTIAN S. Novel viral vectors in infectious diseases[J]. *Immunology*, 2018, 153(1): 1-9.
- [47] LIU X, LIU C, LIU G, et al. COVID-19: progress in diagnostics, therapy and vaccination[J]. *Theranostics*, 2020, 10(17): 7821-7835.
- [48] WANG J L, PENG Y, XU H Y, et al. The COVID-19 vaccine race: challenges and opportunities in vaccine formulation[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21(6): 225.
- [49] MERCADO N B, ZAHN R, WEGMANN F, et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques[J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 583-588.
- [50] FOLEGATTI P M, EWER K J, ALEY P K, 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]. *Lancet*, 2020, 396(10249): 467-478.
- [51] CHEN J Y, WANG P, YUAN L Z, et al. A live attenuated virus-based intranasal COVID-19 vaccine provides rapid, prolonged,

- and broad protection against SARS-CoV-2[J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(13): 1372-1387.
- [52] KUTZLERM A, WEINERD B. DNA vaccines: ready for prime time? [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(10): 776-788.
- [53] PARDI N, HOGAN M J, PORTER F W, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(4): 261-279.
- [54] WANG Z Y, JACOBUS E J, STIRLING D C, et al. Reducing cell intrinsic immunity to mRNA vaccine alters adaptive immune responses in mice[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2023, 34: 102045.
- [55] RAUCH S, ROTH N, SCHWENDT K, et al. mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus-neutralising antibodies and mediates protection in rodents[J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6(1): 57.
- [56] KARIKÓ K, BUCKSTEIN M, NI H P, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA [J]. *Immunity*, 2005, 23(2): 165-175.
- [57] KARIKÓ K, MURAMATSU H, WELSH F A, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability[J]. *Molecular Therapy*, 2008, 16(11): 1833-1840.
- [58] XIA X H. Detailed dissection and critical evaluation of the pfizer/BioNTech and moderna mRNA vaccines[J]. *Vaccines*, 2021, 9(7): 734.
- [59] QU L, YI Z Y, SHEN Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1728-1744.e16.
- [60] LI D P, MARTINEZ D R, SCHÄFER A, et al. Breadth of SARS-CoV-2 neutralization and protection induced by a nanoparticle vaccine[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6309.
- [61] ZHANG Z R, HE Q R, ZHAO W, et al. A heterologous V-01 or variant-matched bivalent V-01D-351 booster following primary series of inactivated vaccine enhances the neutralizing capacity against SARS-CoV-2 Delta and Omicron strains[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11(14): 4164.
- [62] ZHAO Y L, NI W J, LIANG S M, et al. Vaccination with S<sub>pan</sub>, an antigen guided by SARS-CoV-2 S protein evolution, protects against challenge with viral variants in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2023, 15(677): eabo3332.
- [63] KANG Y F, SUN C, SUN J, et al. Quadrivalent mosaic HexaPro-bearing nanoparticle vaccine protects against infection of SARS-CoV-2 variants[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2674.
- [64] JOYCE M G, KING H A D, ELAKHAL-NAOUAR I, et al. A SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine elicits protective immune responses in nonhuman primates[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(632): eabi5735.
- [65] TAI W B, CHAI B J, FENG S Y, et al. Development of a ferritin-based nanoparticle vaccine against the SARS-CoV-2 Omicron variant[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 173.
- [66] PAN X Y, SHI J, HU X, et al. RBD-homodimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, elicits immunogenicity and protection in rodents and nonhuman primates[J]. *Cell Discovery*, 2021, 7(1): 82.
- [67] DAI L P, DUAN H X, LIU X Y, et al. Omicron neutralisation: RBD-dimer booster versus BF. 7 and BA. 5.2 breakthrough infection[J]. *Lancet*, 2023, 402(10403): 687-689.
- [68] JOYCE M G, CHEN W H, SANKHALA R S, et al. SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccines elicit broad SARS coronavirus immunogenicity[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(12): 110143.
- [69] MOREIRA E D Jr, KITCHIN N, XU X, et al. Safety and efficacy of a third dose of BNT162b2 COVID-19 vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2022, 386(20): 1910-1921.
- [70] DAI L P, ZHENG T Y, XU K, et al. A universal design of betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 722-733.e11.
- [71] WANG R, HUANG X, CAO T S, et al. Development of a thermostable SARS-CoV-2 variant-based bivalent protein vaccine with cross-neutralizing potency against Omicron subvariants[J]. *Virology*, 2022, 576: 61-68.
- [72] WANG R, HUANG H P, YU C L, et al. A spike-trimer protein-based tetravalent COVID-19 vaccine elicits enhanced breadth of neutralization against SARS-CoV-2 Omicron subvariants and other variants[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(8): 1818-1830.
- [73] WRAPP D, WANG N S, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [74] SUN X Y, YI C Y, ZHU Y F, et al. Neutralization mechanism of a human antibody with pan-coronavirus reactivity including SARS-CoV-2[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(7): 1063-1074.
- [75] MA X C, ZOU F, YU F, et al. Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain (RBD) and heptad repeat (HR) of SARS-CoV-2 elicit robust protective immune responses[J]. *Immunity*, 2020, 53(6): 1315-1330.e9.
- [76] PANG W, LU Y, ZHAO Y B, et al. A variant-proof SARS-CoV-2 vaccine targeting HR1 domain in S2 subunit of spike protein [J]. *Cell Research*, 2022, 32(12): 1068-1085.
- [77] WANG X L, SUN L J, LIU Z Z, et al. An engineered recombinant protein containing three structural domains in SARS-CoV-2 S2 protein has potential to act as a pan-human

- coronavirus entry inhibitor or vaccine antigen[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12(2): 2244084.
- [78] YU D W, ZHU Y M, YAN H X, et al. Pan-coronavirus fusion inhibitors possess potent inhibitory activity against HIV-1, HIV-2, and Simian immunodeficiency virus[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 810-821.
- [79] BENHAIM M A, MANGALA PRASAD V, GARCIA N K, et al. Structural monitoring of a transient intermediate in the hemagglutinin fusion machinery on influenza virions[J]. *Science Advances*, 2020, 6(18): eaaz8822.
- [80] LADINSKY M S, GNANAPRAGASAM P N, YANG Z, et al. Electron tomography visualization of HIV-1 fusion with target cells using fusion inhibitors to trap the pre-hairpin intermediate [J]. *eLife*, 2020, 9: e58411.
- [81] DOLGIN E. Pan-coronavirus vaccine pipeline takes form[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2022, 21(5): 324-326.
- [82] WU Y T, WANG S J, ZHANG Y L, et al. Lineage-mosaic and mutation-patched spike proteins for broad-spectrum COVID-19 vaccine[J]. *Cell Host & Microbe*, 2022, 30(12): 1732-1744.e7.
- [83] RICE A, VERMA M, SHIN A, et al. Intranasal plus subcutaneous prime vaccination with a dual antigen COVID-19 vaccine elicits T-cell and antibody responses in mice[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 14917.
- [84] STERNKE M, TRIPP K W, BARRICK D. Consensus sequence design as a general strategy to create hyperstable, biologically active proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(23): 11275-11284.
- [85] TEBAS P, ROBERTS C C, MUTHUMANI K, et al. Safety and immunogenicity of an anti-Zika virus DNA vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(12): e35.
- [86] WANG R, ZHENG X Y, SUN J, et al. Vaccination with a single consensus envelope protein ectodomain sequence administered in a heterologous regimen induces tetravalent immune responses and protection against dengue viruses in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1113.
- [87] CHEN M W, CHENG T J, HUANG Y X, et al. A consensus-hemagglutinin-based DNA vaccine that protects mice against divergent H5N1 influenza viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(36): 13538-13543.
- [88] ELLIOTT S T C, KEATON A A, CHU J D, et al. A synthetic micro-consensus DNA vaccine generates comprehensive influenza A H3N2 immunity and protects mice against lethal challenge by multiple H3N2 viruses[J]. *Human Gene Therapy*, 2018, 29(9): 1044-1055.
- [89] PING X Q, HU W B, XIONG R, et al. Generation of a broadly reactive influenza H1 antigen using a consensus HA sequence [J]. *Vaccine*, 2018, 36(32 Pt B): 4837-4845.
- [90] LIU Z Z, XU W, XIA S, et al. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1): 282.
- [91] SUN S Y, CAI Y Q, SONG T Z, et al. Interferon-armed RBD dimer enhances the immunogenicity of RBD for sterilizing immunity against SARS-CoV-2[J]. *Cell Research*, 2021, 31(9): 1011-1023.
- [92] LIU Z Z, ZHOU J, XU W, et al. A novel STING agonist-adjuvanted pan-sarbecovirus vaccine elicits potent and durable neutralizing antibody and T cell responses in mice, rabbits and NHPs[J]. *Cell Research*, 2022, 32(3): 269-287.
- [93] WANG J, LI P Y, YU Y, et al. Pulmonary surfactant-biomimetic nanoparticles potentiate heterosubtypic influenza immunity[J]. *Science*, 2020, 367(6480): eaau0810.
- [94] LIU Z Z, XU W, CHEN Z G, et al. An ultrapotent pan- $\beta$ -coronavirus lineage B ( $\beta$ -CoV-B) neutralizing antibody locks the receptor-binding domain in closed conformation by targeting its conserved epitope[J]. *Protein & Cell*, 2022, 13(9): 655-675.
- [95] HEATH P T, GALIZA E P, BAXTER D N, et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(13): 1172-1183.
- [96] LAZARUS R, QUERTON B, CORBIC RAMLJAK I, et al. Immunogenicity and safety of an inactivated whole-virus COVID-19 vaccine (VLA2001) compared with the adenoviral vector vaccine ChAdOx1-S in adults in the UK (COV-COMPARE): interim analysis of a randomised, controlled, phase 3, immunobridging trial[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022, 22(12): 1716-1727.
- [97] LIU Y, DAI L P, FENG X L, et al. Fast and long-lasting immune response to S-trimer COVID-19 vaccine adjuvanted by PIKA[J]. *Molecular Biomedicine*, 2021, 2(1): 29.
- [98] XU K J, YU S Y, WANG K, et al. AI and knowledge-based method for rational design of *Escherichia coli* Sigma70 promoters[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(1): 402-407.
- [99] LAI C J, KIM D, KANG S, et al. Viral codon optimization on SARS-CoV-2 spike boosts immunity in the development of COVID-19 mRNA vaccines[J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(10): e29183.
- [100] BEUKERS M W, KLAASSEN C H, DE GRIP W J, et al. Heterologous expression of rat epitope-tagged histamine H<sub>2</sub> receptors in insect Sf9 cells[J]. *British Journal of Pharmacology*, 1997, 122(5): 867-874.
- [101] DENG S F, LIU Y, TAM R C, et al. An intranasal influenza virus-vectored vaccine prevents SARS-CoV-2 replication in respiratory tissues of mice and hamsters[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2081.

- [102] ZHANG H, ZHANG L, LIN A, et al. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity[J]. *Nature*, 2023, 621(7978): 396-403.
- [103] SADEGHALVAD M, MANSOURABADI A H, NOORI M, et al. Recent developments in SARS-CoV-2 vaccines: a systematic review of the current studies[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2023, 33(1): e2359.
- [104] KORBER B, FISCHER W M, GNANAKARAN S, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 812-827.e19.
- [105] GARCIA-BELTRAN W F, LAM E C, DENIS K S, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity[J]. *Cell*, 2021, 184(9): 2523.
- [106] CELE S, JACKSON L, KHOURY D S, et al. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization[J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 654-656.
- [107] GRETEBECK L M, SUBBARAO K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses[J]. *Current Opinion in Virology*, 2015, 13: 123-129.
- [108] VAN DOREMALEN N, MUNSTER V J. Animal models of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection[J]. *Antiviral Research*, 2015, 122: 28-38.
- [109] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280.e8.
- [110] BAO L L, DENG W, HUANG B Y, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice[J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 830-833.
- [111] SILVAS J A, VASQUEZ D M, PARK J G, et al. Contribution of SARS-CoV-2 accessory proteins to viral pathogenicity in K18 human ACE2 transgenic mice[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(17): e0040221.
- [112] SUN J, ZHUANG Z, ZHENG J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 734-743.e5.
- [113] KIM Y I, KIM S G, KIM S M, et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27(5): 704-709.e2.
- [114] LI D P, EDWARDS R J, MANNE K, et al. The functions of SARS-CoV-2 neutralizing and infection-enhancing antibodies *in vitro* and in mice and nonhuman Primates[EB/OL]. *bioRxiv*, 2021: 2020.12.31.424729[2023-11-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.31.424729v2>.
- [115] CHANDRASHEKAR A, LIU J Y, MARTINOT A J, et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques[J]. *Science*, 2020, 369(6505): 812-817.
- [116] BUTT A A, GUERRERO M D, CANLAS E B, et al. Evaluation of mortality attributable to SARS-CoV-2 vaccine administration using national level data from Qatar[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 24.
- [117] MULRONEY T E, PÖYRY T, YAM-PUC J C, et al. N<sup>1</sup>-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting[J]. *Nature*, 2024, 625(7993): 189-194.
- [118] WOO E J, MBA-JONAS A, DIMOVA R B, et al. Association of receipt of the Ad26. COV2. S COVID-19 vaccine with presumptive guillain-barré syndrome, february-july 2021[J]. *JAMA*, 2021, 326(16): 1606-1613.
- [119] GREINACHER A, THIELE T, WARKENTIN T E, et al. Thrombotic thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 vaccination[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(22): 2092-2101.



**通讯作者:** 徐可(1982—),女,教授,博士生导师。研究方向为呼吸道RNA病毒分子致病机制、呼吸道病毒共感染、抗呼吸道RNA病毒广谱药物靶标发现、广谱疫苗研发等。

E-mail: xuke03@whu.edu.cn



**第一作者:** 袁为锋(1995—),男,博士后。研究方向为病毒宿主相互作用与抗病毒药物的靶点发现、新型流感/冠状病毒疫苗研发。

E-mail: ywf519@whu.edu.cn