

DOI: 10.13376/j.cbils/2025044

文章编号: 1004-0374(2025)04-0437-13

重组蛋白疫苗在新型冠状病毒感染中的应用

任鑫鑫¹, 陈瑞¹, 周金虎², 许雁², Normand Jolicoeur², 汪洋¹, 刘滨磊^{1,2*}

(1 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 武汉 430068; 2 武汉滨会生物科技股份有限公司, 武汉 436030)

摘要: 新型冠状病毒感染 (COVID-19) 是一场全球性大流行病, 由二型严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV-2) 引发, 自 2019 年底暴发以来, 迅速成为全球性的公共卫生危机。随着 Beta、Gamma、Delta 以及 Omicron 等变异株的接连出现, 其传播能力不断增强, 对人类健康构成的潜在威胁依然不容忽视。研发广谱、高效的新冠疫苗已成为科学界与公共卫生机构共同面临的紧迫任务与重要目标。重组蛋白疫苗成分简单、产量高、生产安全, 是疫苗研发领域的一项创新策略, 在抗击新冠疫情中展现出广阔的应用前景。本文旨在探讨重组蛋白疫苗在预防和控制 COVID-19 中的应用和效果, 系统地剖析了新型冠状病毒的生物学特性, 包括其结构特点、宿主细胞入侵机制、变异株的传播特性及其在临床上的表现; 重点介绍了新型冠状病毒重组蛋白疫苗的设计策略, 深入探讨了免疫应答的作用机制、疫苗作用靶点的筛选与应用, 以及疫苗技术开发的新思路; 评估了重组蛋白疫苗的优势与挑战, 详细阐述了重组蛋白疫苗在制备流程方面的关键步骤, 包括蛋白表达系统的优化、纯化技术的提升, 以及配方的创新。此外, 文章还总结了国内外新型冠状病毒重组蛋白疫苗的研究进展, 包括国内研究现状和国际上已临床获批的候选疫苗, 展望了重组蛋白疫苗在公共卫生领域不同疾病中的前沿应用, 以及在预防和控制 COVID-19 及其他潜在传染病中的潜力。

关键词: 新型冠状病毒感染; 新型冠状病毒; 重组蛋白疫苗; 免疫应答; 疫苗设计; 公共卫生应用

中图分类号: Q819; R979.5 文献标志码: A

Application of recombinant protein vaccine in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

REN Xin-Xin¹, CHEN Rui¹, ZHOU Jin-Hu², XU Yan², Normand Jolicoeur², WANG Yang¹, LIU Bin-Lei^{1,2*}

(1 School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

2 Wuhan Binhui Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 436030, China)

Abstract: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a global pandemic, caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which has rapidly become a global public health crisis since its outbreak in late 2019. With the successive emergence of mutant strains such as Beta, Gamma, Delta, and Omicron, and their increasing ability to spread, the potential threat to human health still cannot be ignored, and the development of broad-spectrum, highly effective vaccines against the new coronavirus has become an urgent task and an important goal shared by both the scientific community and public health organizations. Recombinant protein vaccines are simple in composition, high in yield, and safe in production. They are an innovative strategy in the field of vaccine research and development and have shown broad application prospects in the fight against the COVID-19 pandemic. This review aims to explore the application and effectiveness of recombinant protein vaccines in the prevention and control of COVID-19. The biological characteristics of the novel coronaviruses were systematically analyzed, including their structural features, host cell invasion mechanisms, transmission characteristics of the mutant strains, and their efficacy in the clinical setting. The design strategy of the SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine is

收稿日期: 2024-09-19; 修回日期: 2024-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(32270969); 湖北省重大科技专项(2022ACA001)

*通信作者: E-mail: liubl@hbut.edu.cn

highlighted, and the mechanism of action of immune response, screening and application of vaccine targets, and new ideas of vaccine technology development are discussed in depth. The advantages and challenges of recombinant protein vaccines are assessed, and the key steps of recombinant protein vaccines in terms of the vaccine preparation process are elaborated in detail, including the optimization of the protein expression system, the improvement of purification technology, and the innovation of formulation. In addition, the article summarizes the research progress of SARS-CoV-2 recombinant protein vaccines in China and abroad, including the current status of research in China and clinically approved vaccine candidates internationally, and looks forward to the cutting-edge applications of recombinant protein vaccines in different diseases in public health, as well as their potential in the prevention and control of COVID-19 and other potential infectious diseases.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; recombinant protein vaccine; immune response; vaccine design; public health applications

根据北京市卫生健康大数据与政策研究中心^[1]最新发布的《全球疫情动态及应对追踪简报》，截至2024年7月7日，全球范围内新型冠状病毒(SARS-CoV-2)确诊病例已累计突破7.7亿人，累计死亡人数已超过705万。虽然每日新增感染病例已从先前疫情高峰时期的呈指数增长的态势中逐步趋于和缓，但是感染人数仍维持在较高水平^[2-4]。此次疫情的传播时间之长，范围之广，对公共卫生以及经济和社会领域都造成了不小的影响。近期，世界卫生组织(World Health Organization, WHO)^[5]发布了关于SARS-CoV-2病毒及其变种的演变、监测与应对措施的信息，明确指出所有新型冠状病毒都会随时间发生变异。SARS-CoV-2的Omicron(B.1.1529)变异株在不到两个月的时间内，迅速取代了先前的Delta变异株，发展成为全球最主要的流行病毒株^[6]。这种变异毒株一旦侵入人体保护屏障，会优先攻击呼吸系统，引起迅速的局部免疫应答，导致肾脏、肝脏、中枢神经系统及胃肠道系统等多个重要器官的功能受损，甚至导致多器官功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[7]。Omicron变异株之所以能够如此迅速传播，主要由于其刺突蛋白的突变逃逸了由自然感染所诱导的免疫应答机制，使得其传播能力增强且现有的中和抗体对其中和能力显著降低，降低了机体对病毒的免疫防御能力^[8]。

鉴于病毒不断进化的本质特性，可以确信新的SARS-CoV-2变种的出现是不可避免的，甚至可能有着比当前流行的Omicron变种更为严重的致病性^[9]。因此，为了有效控制新型冠状病毒在全世界的流行，有必要深入研究和开发针对新型冠状病毒的特定免疫调节的疫苗及治疗药物，更精准地靶向或调节免疫系统，以期达到更好的临床效果^[10]。目

前，针对SARS-CoV-2的疫苗研发有多种技术途径，包括重组蛋白质疫苗(recombinant protein vaccine)、mRNA疫苗(messenger RNA vaccines)、DNA疫苗(DNA vaccines)、灭活疫苗(inactivated vaccines)、病毒载体疫苗(viral vector vaccines)、减毒活疫苗(live-attenuated vaccines)以及病毒样颗粒疫苗(virus-like particle vaccines)。这些疫苗类型各具特点，旨在通过不同的机制激发宿主免疫系统对SARS-CoV-2的免疫应答，以期达到预防感染和减轻疾病严重程度的效果^[11]。其中，重组蛋白质疫苗是一种安全高效的疫苗，其生产工艺安全性高，能长期保持其免疫原性，且不含病原体核酸物质，疫苗毒性也相对较低^[12]。这种特性使得注射重组蛋白质疫苗成为一种非常有前景的疫苗接种策略，在控制新冠病毒疫情中起到了至关重要的作用，并有望在未来用于治疗癌症、疟疾、人类免疫缺陷病毒(HIV)和结核病等重大疾病，推动了从抗原选择与生产工艺优化到临床前模型评估以及保护性免疫相关机制研究的全面进展^[13]。本文旨在深入探讨重组蛋白疫苗在SARS-CoV-2防控中的应用现状，通过综合分析当前国内外重组蛋白疫苗的研发进展、临床试验结果以及实际应用情况，进一步阐明其在疫情防控中的重要作用。

1 新型冠状病毒简介

1.1 SARS-CoV-2的结构特点

2019年末，中国湖北省武汉市出现了原因不明的肺炎病例。2020年1月30日，WHO根据疾病的国际传播风险和对其他国家公共卫生产生的潜在影响，宣布该疫情构成“国际关注的突发公共卫生事件”(Public Health Emergency of International Concern, PHEIC)^[14]。2020年2月11日，国际病毒分类委员

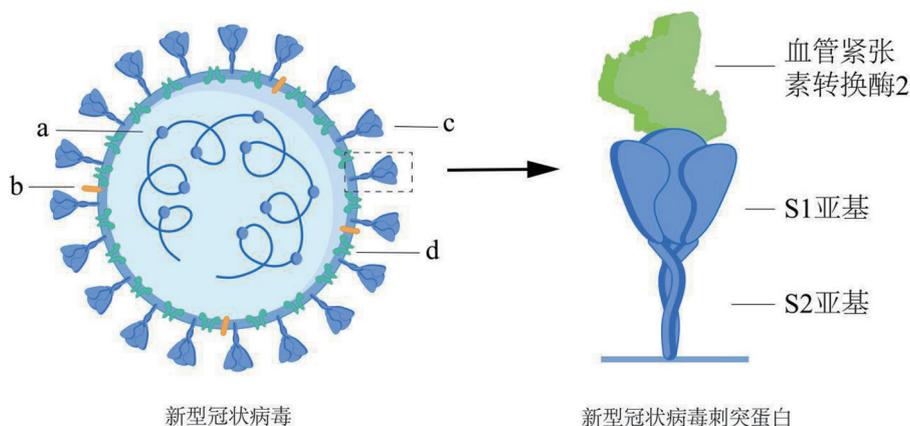
会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 正式将引发该疫情的病毒命名为 SARS-CoV-2。SARS-CoV-2 与 2003 年暴发的 SARS 冠状病毒均属于“严重急性呼吸综合征相关冠状病毒”(severe acute respiratory syndrome-related coronavirus), 是官方认可的“姐妹”病毒关系。通过对 SARS-CoV-2 感染者的病毒基因组序列进行综合分析, 发现 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 在核苷酸序列上存在 79.5% 的同源性。但在某些基因区域, 尤其是 S 蛋白区域, 两者的相似性可能更低, 这表明 SARS-CoV-2 在进化过程中经历了特定的变异, 是一种独立的、新型的人类冠状病毒^[15]。

SARS-CoV-2 具有冠状病毒科 (Coronaviridae) 的典型遗传和结构属性, 属于乙型冠状病毒 (Beta coronavirus) 亚群。它的基因组为正链单股 RNA, 长约 30 000 个核苷酸, 编码了 4 种关键的结构蛋白、16 种非结构蛋白以及 9 种辅助蛋白^[16-17]。这些结构蛋白包括刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白)、核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N 蛋白)、膜蛋白 (membrane protein, M 蛋白) 和包膜蛋白 (envelope protein, E 蛋白), 它们对病毒的组装以及形成完整的病毒颗粒起着至关重要的作用 (图 1)。其中, S 蛋白作为冠状病毒表面的主要抗原, 以同源三聚体形态呈现, 由两个功能上不同的亚基构成: S1 亚基和 S2 亚基^[18]。S1 亚基被进一步细分为 N 端结构域 (NTD) 和受体结合结构域 (RBD), 这两个部分在病毒识别并与宿主细胞受体结合的过程中发挥关键作用, 这种结合是病毒侵入宿主细胞的首要步骤^[19-20]。N 蛋白由 419 个氨基酸残基组成, 包括 N 端结构域 (NTD)、C 端结构域 (CTD) 以及连接这两个结构域

的无规则柔性区 (IDR), 能快速形成核糖核酸蛋白复合物 (RNP), 是构成病毒核衣壳的主要成分^[21]。NTD 和 CTD 通过 N 蛋白与 M 蛋白之间的复杂相互作用, 协同介导病毒核糖核酸蛋白复合物 (vRNP) 高效包装成成熟的病毒粒子, 对病毒 RNA 展现出高度的亲和力, 显著增强了病毒 RNA 的合成与翻译效率^[22]。M 蛋白是一种跨膜糖蛋白, 大部分结构嵌入病毒的膜内, 具有 3 个跨膜结构域和一个高度保守的胞质结构域, 通过与宿主内多种分子的相互作用来调节宿主的免疫反应。在病毒入侵过程中, M 蛋白与其他结构蛋白如 N 蛋白和 E 蛋白协同作用, 确保病毒 RNA 的包装和病毒颗粒的正确组装^[23]。E 蛋白包含一个亲水的氨基酸端和一个较大的疏水性跨膜区域, 其跨膜结构域中包含至少一个可预测的 α 螺旋, 以形成离子通道^[24]。该离子通道能够跨宿主细胞的内质网 - 高尔基体中间复合物 (ERGIC) 膜传导钙和其他阳离子, 从而触发严重的炎症反应, 对病毒的致病性和宿主的免疫逃逸具有显著影响。

1.2 SARS-CoV-2 进入宿主细胞的机制

SARS-CoV-2 进入宿主细胞是一个高度调控的多步骤的生物学级联反应, 主要依赖于 S 蛋白上的多个功能域与其宿主细胞膜上的特定受体及细胞蛋白酶间的相互作用, 从而使得病毒的膜与宿主的细胞膜融合, 注入病毒的基因组并进行自我复制^[25]。在 SARS-CoV-2 靠近宿主细胞时, 病毒 S 蛋白的 S1 亚基的 RBD 会识别宿主细胞表面的血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 并紧密结合, 此过程具有高度特异性, 能确保 SARS-CoV-2 精准地靶向并感染有相应受体的易感细胞。



(a)核衣壳蛋白; (b)包膜蛋白; (c)刺突蛋白; (d)膜蛋白

图1 新型冠状病毒的结构

此外, SARS-CoV-2 还可通过神经蛋白 1 (NRP1)、转铁蛋白受体 (TfR) 以及磷脂酰丝氨酸受体 (PSR) 等其他受体进入宿主细胞。例如, NRP1 被发现能够增强 SARS-CoV-2 的感染能力, 而 TfR 可以直接与 SARS-CoV-2 的 S 蛋白相互作用, 介导其进入宿主细胞。这些发现增加了病毒传播与感染路径的复杂性, 为开发新的抗病毒策略提供了潜在的靶点。当 SARS-CoV-2 与 ACE2 受体结合后, 宿主细胞中的跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane serine protease 2, TMPRSS2) 会对 S 蛋白进行切割, 这一过程称为“剪切”^[26-27]。TMPRSS2 不仅能在 S 糖蛋白的 S1 和 S2 亚基之间的连接位点催化蛋白水解反应, 还可与其他组织蛋白酶如 Furin 协同作用, 增强新冠病毒对细胞的入侵能力。Shapira 等^[28] 发现抑制 TMPRSS2 的活性可以有效地阻止 SARS-CoV-2 的融合和进入宿主细胞, 且这种方法在多种新冠病毒变异株上显示出了强大的抗感染效果。此项研究证实了 TMPRSS2 不仅是病毒入侵宿主细胞的关键因素, 也是潜在的抗病毒药物靶点^[29]。

剪切后 S 蛋白的构象会发生不可逆的变化, 被裂解为 S1 和 S2 两个亚基。其中, S2 亚基中的融合肽段 FP (fusion peptide) 能够促使宿主细胞的膜与病毒膜结合^[30]。这使得病毒的单链 RNA 基因组释放进宿主细胞的胞质里, 开始病毒的复制和翻译过程 (图 2)。SARS-CoV-2 的 RNA 基因组在 5' 端具有帽

子结构, 增强了 mRNA 的稳定性和翻译效率, 保护病毒 RNA 免受宿主细胞内核酸外切酶的降解以及逃避宿主的免疫识别^[31]。病毒的 mRNA 分子内的开放阅读框 (ORF) 1a 和 1b 通过核糖体框架移位 (ribosomal frame shifting) 机制实现读码框架的转换, 是翻译过程中一个核心环节^[32]。随后, mRNA 作为模板指导病毒 RNA 的合成。SARS-CoV-2 的关键蛋白酶 M pro (也称为 3CL pro) 负责切割多聚蛋白前体, 并生成 11 种非结构性蛋白^[33]。这些蛋白质在病毒的复制过程中是不可或缺的, 也是抗病毒药物研发中极具潜力的靶点。翻译成功的病毒蛋白和新的病毒 RNA 一起在宿主细胞内组装成新的病毒颗粒, 通过出芽的方式从宿主细胞释放出来, 从而继续感染其他细胞。这一过程类似于 SARS-CoV、HCoV-NL63 等其他冠状病毒的感染机制, 体现了它们在感染策略上的共通性, 为 SARS-CoV-2 疫苗开发、抗病毒治疗及策略制定提供了理论支撑。

1.3 新型冠状病毒变异株传播特性的演变

自 2019 年至今, 新型冠状病毒的传播特性发生了显著的变化, 主要体现为多个变异株的相继涌现以及传播能力的增强。世界卫生组织把这些 SARS-CoV-2 的变种归类为“存疑变异株” (variant of interest, VOI) 和“关切变异株” (variant of concern, VOC), 以确保全球监测和研究工作的有序进行, 实现对疫情应对措施及时调整和优化^[5]。VOC 指

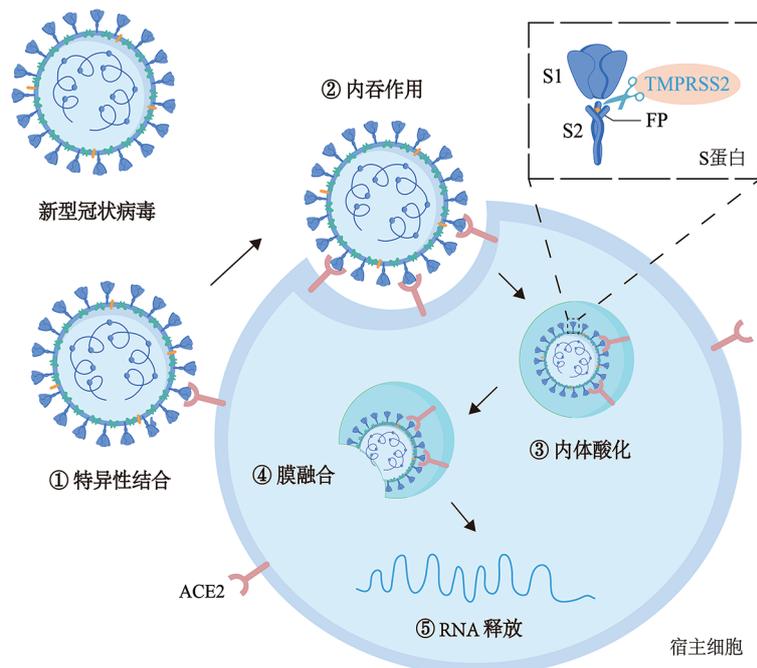


图2 新型冠状病毒进入宿主细胞的机制

的是有明显增强的传播力、致病性或免疫逃逸能力的 SARS-CoV-2 变异株, 主要包括 Alpha (B.1.1.7)、Beta (B.1.351)、Gamma (P.1)、Delta (B.1.617.2) 以及 Omicron (B.1.1.529) 等^[34]。Alpha 变异株是首个被归类为 VOC 的新冠病毒变种, 它最初在英国被发现, 比早期的毒株的传播能力高 43%~90%^[35]。这导致了 COVID-19 的病例数与死亡率的急剧上升, 尤其是在未能及时采取严格的非药物干预措施和疫苗接种计划的地区。与 Alpha 变异株相比, Delta 变异株的传播速度更为迅速且潜伏期也更短, Hart 等^[36] 的调查数据表明, Delta 变异株的平均世代间隔时间 (即感染者之间的平均间隔时间) 为 4.6 d, 而 Alpha 变异株为 5.5 d。此外, Delta 变异株在家庭间传播的平均世代间隔时间也比 Alpha 变异株短, 两者分别为 3.2 d 和 4.5 d。Park 等^[37] 的研究显示, Omicron 变异株的平均世代间隔时间仅为 3.0 d, 这一传播速率超过了之前的变异株。Omicron 变异株凭借其迅速的传播能力以及相对较轻的临床症状, 受到了全球的广泛关注, 给公共卫生和疾病控制带来了一系列新的挑战^[38]。另一方面, 这些变异株对现有疫苗诱导的免疫应答以及自然感染触发的免疫反应也产生了多样化的影响。特别是 Omicron 变异株, 因其在刺突蛋白上携带了大量独特的突变, 具有比原始病毒株和 Delta 变异株更为显著的免疫逃逸能力^[39-40]。

VOI 是指在特定地区或群体中发现的携带某些基因突变的病毒变种, 这些变种被认定为可能对公共卫生构成潜在风险, 但目前尚未满足被归类为 VOC 的标准。N.9 谱系是一种在巴西发现的 VOI 变异株, 具有四个非同义的谱系定义突变: NSP3: A1711V、NSP6:F36L、S:E484K 和 NS7b:E33A, 这些突变使得 N.9 谱系主要在巴西的多个州内传播^[41]。中国疾控中心^[42] 在 2024 年 6 月发表的《全国新型冠状病毒感染疫情报告》, 首次对外宣布了 XDV 变异株这一最新发现的新冠病毒变种。报告中指出即使在高温环境下, XDV 变异株仍能保持其流行趋势, 并且引起的症状相对较为轻微, 在传播能力和免疫逃逸方面与现有变种相比并未表现出明显差异。这一现象深刻揭示了新型冠状病毒显著的生物学适应性与持续进化的趋势, 凸显了全球公共卫生体系所面临的长久且复杂的挑战。因此, 国际社会亟需加强合作, 共同深化对病毒变异机制的科学研究, 制定和实施更精准有效的防控策略与干预措施, 以应对未来可能出现的疫情挑战。

1.4 SARS-CoV-2 在临床上的表现

SARS-CoV-2 感染在临床上呈现出一系列多样化的症状, 如咳嗽、乏力、肌痛、头痛、腹泻和恶心, 甚至嗅觉功能受损^[43]。这些症状可能单独出现, 也可能多症并发, 其具体表现受到病毒变异株的生物学特性和患者个体差异的影响。在 SARS-CoV-2 感染的早期阶段, 患者通常会经历一系列非特异性的前驱症状, 包括发热、无痰干咳和全身性疲乏^[44]。随着病情发展, 疾病进入更为严重的阶段, 主要表现为双侧肺部的间质性肺炎, 伴有呼吸困难、咽痛和食欲减退, 甚至严重时会引起呼吸衰竭^[45]。

接种 COVID-19 疫苗后, 少数个体可能会出现轻度的不良反应, 如疼痛、发烧或疲劳等。由于重组蛋白疫苗中不包含活病毒的成分, 通常不会引发疾病。然而, 某些 mRNA 疫苗通过在人体内表达病毒的 S 蛋白来引发免疫应答, 可能会使免疫系统误将与 S 蛋白结构相似的自体组织当作目标, 从而引发心肌炎和心包炎^[46]。Schreckenber 等^[47] 发现, mRNA-1273 与 BNT162b2 疫苗在心室肌细胞上可能引发心脏毒性反应, 这与心肌炎和心包炎的病理生理学相关, 会增加急性心脏病发生的风险。根据韩国的一项全国调查研究, 在接种 mRNA 疫苗或腺病毒载体疫苗后的 4 周内, 出现了新的肺部浸润症状, 表现为罕见的肺炎病例^[48]。这些研究所涉及的案例数量有限, 但接种疫苗的益处通常远超过其潜在的风险。疫苗接种预防 COVID-19 重症和死亡的效果显著, 如 BNT162b2 疫苗预防 COVID-19 的效果高达 95%^[49]。

2 新型冠状病毒重组蛋白疫苗的设计策略

2.1 免疫应答的作用机制

重组蛋白疫苗是一种利用基因工程技术, 通过精心设计的特定蛋白质分子来激活活主体内免疫防御机制的疫苗。重组蛋白疫苗设计的核心在于精确模拟病原体抗原的天然结构, 以维持构象性表位的完整性, 从而诱导产生中和抗体。疫苗注入人体后, 抗原呈递细胞 (antigen presenting cells, APCs) 如树突状细胞 (dendritic cells, DCs)、巨噬细胞迅速识别并摄取抗原蛋白, 处理后将抗原肽呈递给 T 细胞, 从而启动免疫应答。在此过程中, 辅助 T 细胞 (T helper cells, Th 细胞) 被激活, 并通过分泌细胞因子促进 B 细胞的增殖与分化, 最终形成浆细胞 (plasma cells) (图 3)^[50]。

B 细胞的激活涉及两个阶段: 初步激活和亲和

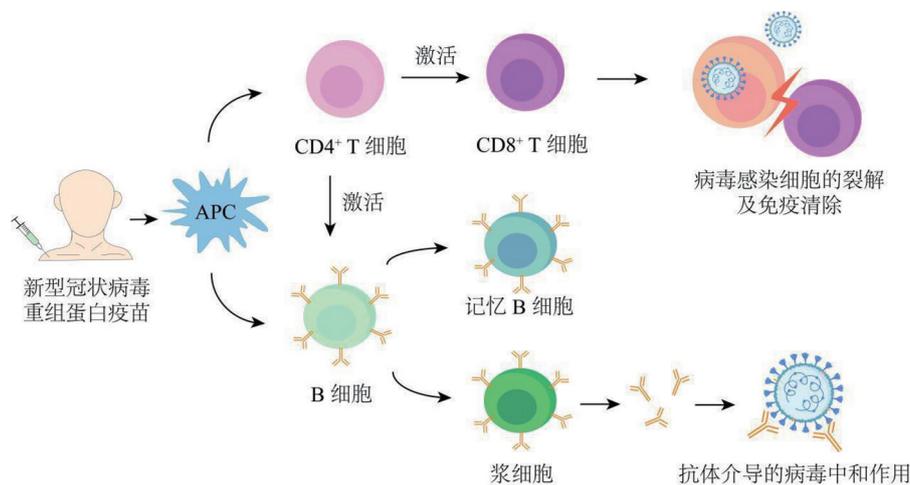


图3 免疫应答的作用机制

力成熟。在初步激活阶段，B 细胞直接通过其表面的 B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) 识别抗原表位，包括构象性表位，从而直接被激活。随后，B 细胞进入亲和力成熟阶段，此时 B 细胞须通过 BCR 再次识别 DC 细胞递呈的抗原，并利用自身的主要组织相容性复合体 II 类分子 (major histocompatibility complex class II, MHC-II) 递呈抗原片段给 Th 细胞，激活 Th 细胞。这一连续的识别和递呈过程确保了 B 细胞的彻底激活，使其能够分化为产生特异性中和抗体的浆细胞，为宿主提供针对病原体的免疫保护。因此，维持 SARS-CoV-2 S 蛋白的融合前构象对疫苗设计至关重要，其 RBD 的暴露状态是诱导产生中和抗体的关键。Rajewsky 等^[51]采用 LDH-III (一种由 AAB 亚基组合而成的复合酶) 作为免疫原接种兔子，成功诱导产生了针对 LDH-A 和 LDH-B 亚基的特异性抗体。这一成果证实了重组蛋白疫苗能激活相应的免疫反应，并促进针对特定蛋白质的抗体产生。重组蛋白疫苗的设计和生产过程展现了高度的灵活性与迅捷性，使得其在面对新发或流行病原体的挑战时，能够迅速制定并实施相应的预防策略，为个体健康和公共卫生安全提供有力的保障。

2.2 新型冠状病毒重组蛋白疫苗作用靶点的筛选与应用

SARS-CoV-2 病毒表面 S 蛋白的 RBD 主要识别宿主细胞受体 ACE2，是新型冠状病毒重组蛋白疫苗研发的重要靶点。通过刺激机体产生的抗体可以有效中和病毒，阻断其感染路径^[52]。这种针对 RBD 的疫苗设计策略能有效规避抗体依赖增强作用 (ADE) 的风险，具有明确的功能特异性。为了进一步增强免疫应答的广度和持久性，采取将 SARS-

CoV-2 的 S1 域及 RBD 域与 N 蛋白等多种相关抗原融合的方式，诱导更强烈的 T 细胞和 B 细胞应答^[53]。在重组蛋白疫苗的设计中，通常使用 S 蛋白的不同片段乃至整个蛋白作为抗原。Keech 等^[54]研发的 NVX-CoV2373 重组蛋白疫苗采用了含 Matrix-M1 佐剂的 SARS-CoV-2 全长刺突三聚体糖蛋白作为抗原，激发的免疫反应甚至超越了 COVID-19 恢复期血清的水平。Özcengiz 等^[55]开发了一种由 S1 片段蛋白 P1、S2 片段蛋白 P2 及核衣壳蛋白组成的 COVID-19 重组蛋白疫苗候选物，使用氢氧化铝或氢氧化铝加单磷酸酯 A 作为佐剂，在小鼠模型中诱导了强烈的免疫反应。特别是氢氧化铝加单磷酸酯 A 的配方，在促进 Th1 型免疫反应方面的表现尤为突出，对老年人和免疫功能低下的人群具有潜在的优势。这些疫苗的设计策略旨在更真实地模拟病毒结构，从而激发人体免疫系统产生针对特定抗原的免疫反应。

重组蛋白疫苗的研发依赖于稳定的蛋白表达，新兴的载体和表达系统有助于提升蛋白的生产效率及其溶解性。枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 作为一种 GRAS (一般公认为安全的) 微生物，凭借其高效的外源 DNA 整合能力，成为表达异源生物活性物质的理想宿主。这种菌株具有独特的基因与操纵子网络，有助于提高分泌蛋白的表达效率^[56]。Webster 等^[57]将结核分枝杆菌的关键抗原 Ag85B 与免疫球蛋白 (pIg) 的 γ -链片段融合，成功构建了一种新型融合蛋白，在植物表达系统中能够与补体蛋白 C1q 及 Fc γ Rs 有效结合，并自组装成具有 IgM 结构特征的聚合物。这一过程通过改变 N-糖基化模式，增强了融合蛋白与低亲和力 Fc γ Rs 之间的相互作用强

度, 验证了聚合物免疫球蛋白-抗原融合蛋白策略在提升疫苗免疫原性方面的有效性, 为未来开发具有更强免疫应答能力的新型蛋白疫苗提供了一种潜在的方法。

2.3 重组蛋白疫苗技术开发的新思路

在 21 世纪, 免疫原设计的革新与递送技术的突破性进展, 共同推动了重组蛋白疫苗技术的显著飞跃, 涵盖了纳米技术的应用、合成肽疫苗的构建、递送系统的优化以及新型疫苗概念的探索等多个前沿领域^[58-59]。其中, 合成肽疫苗设计领域取得了突破性的进展, 通过构建多抗原肽系统、脂质多赖氨酸核心肽系统以及肽聚合多价免疫原, 实现了对特定免疫应答的精准诱导^[60]。在遗传和新型疫苗递送系统的研究领域, 取得了有效保护疫苗成分、增强免疫原性、精准靶向递送、控制抗原的持续释放, 以及选择性激活针对特定抗原的体液和细胞免疫反应的技术突破^[61]。例如, 利用生物降解性与生物相容性材料 DL-乳酸-共聚乙二醇 (DL-PLG) 制备的微球载体, 保障疫苗成分的稳定传输和释放速率的精确控制, 从而提升了疫苗的特异性和安全性^[62]。这些技术革新为疫苗科学的发展开辟了新路径, 预示着未来疫苗在特异性、敏感性与安全性方面的全面提升。

2.4 优势与面临的挑战

2.4.1 优势

新型冠状病毒重组蛋白疫苗具有研发周期短、安全性高、储存运输便捷、广谱保护和广泛适应证的优势。利用转基因技术, 该疫苗能够高效地在体外表达病毒 S 蛋白的关键受体结合域, 加速了针对新兴的 COVID-19 变异株的疫苗研发与生产流程。与传统疫苗相比, 重组蛋白疫苗在短短一年内就完成了从临床前评估到 III 期临床试验的过程, 明显缩短了通常需耗时十年的漫长周期。由于重组蛋白疫苗中不含任何活病毒或细菌成分, 不容易引发病原体感染, 具有比活病毒疫苗和减毒病毒疫苗更高的安全性和稳定性^[63]。此外, 新型冠状病毒重组蛋白疫苗在储存和运输时对温度条件的要求相对较为宽松, 特别适合在资源匮乏的地区使用。对于 Omicron、Delta 等多种变异株, 重组蛋白疫苗展现出了独特的交叉中和活性, 通过采用多价疫苗设计策略, 可以进一步提升其免疫保护效力。重组蛋白疫苗还能通过调整表达蛋白质的种类和数量, 灵活调控免疫原的设计, 已在乙型肝炎、HPV 等多种传染病的预防中取得了显著成效, 并逐步拓展至其他疾病领域。

2.4.2 面临的挑战

新型冠状病毒重组蛋白疫苗在激发强烈的免疫应答时, 通常需要添加佐剂来提高其免疫原性, 较传统疫苗存在一定的局限性。尽管该疫苗中含有大量抗原, 但其对诱导保护性免疫反应的作用可能有限, 并且存在引发过敏性反应或非特异性免疫应答的潜在风险^[64]。重组蛋白疫苗的生产涉及复杂的基因工程技术和蛋白质纯化步骤, 导致在研发初期和大规模生产阶段的研发成本较高。对于需要翻译后修饰的抗原, 需要使用哺乳动物或昆虫细胞表达系统, 这些系统能够提供更接近天然状态的蛋白质, 但其开发过程更为复杂且需要投入更多的时间和资源。因此, 对于重组蛋白疫苗的长期稳定性和保护效力, 必须进行持续的研究和严格的验证, 以确保其在不断变化的病原体环境中的有效性。这些研究对于指导未来的疫苗开发策略具有重要意义。

3 新型冠状病毒重组蛋白疫苗的应用

3.1 新型冠状病毒重组蛋白疫苗的制备流程

新型冠状病毒重组蛋白疫苗通过化学合成或 PCR 扩增等分子生物学技术, 制备编码重组新型冠状病毒蛋白或融合蛋白的核酸, 把这些核酸分子嵌入到表达载体中, 再转化或转染至酵母、293F 细胞、CHO 细胞或昆虫细胞等宿主细胞内。在特定情况下, 还可以使用化学诱导剂如 IPTG 和乳糖来激活表达系统, 从而加速目标蛋白的合成。宿主细胞完成蛋白表达后, 离心收获细胞上清悬液以去除细胞碎片和其他杂质, 使用离子交换层析、亲和层析和超滤等技术从上清液中分离和纯化病原蛋白。最后, 可通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和双缩脲 (BCA) 蛋白定量法来验证蛋白的纯度和浓度。对于 Omicron、Delta、Alpha 等不同变异株, 可以分别整合其 RBD 蛋白的关键突变位点, 增强重组蛋白疫苗对新冠变异株的交叉保护能力。为了维持生物活性并确保疫苗的有效性, 纯化的重组蛋白通常需要经过稳定化处理, 并加入佐剂以提高免疫效果。Peek 等^[65]通过光谱分析确定了 rRTA 蛋白在 pH 6.0 时最为稳定, 并使用稳定剂甘油和佐剂 Alhydrogel, 显著加快了疫苗的临床评估进程。

2023 年, 本课题组研发了针对 SARS-CoV-2 的 Delta 变异株的重组蛋白疫苗, 通过与三聚体结构域 (trimer domain, TD) 融合, 形成了稳定的三聚体结构, 揭示了以 S 蛋白作为抗原的疫苗设计策略。该 PF-D-Trimer 疫苗在多种动物模型中都诱导了强

烈的免疫反应, 凸显了 TD 平台在疫苗设计中的重要潜力和实际应用价值^[66]。制备完成的疫苗经过动物临床试验, 在临床前研究阶段验证疫苗的安全性, 评估疫苗是否能诱导机体产生针对 SARS-CoV-2 的特异性免疫反应。动物临床试验完成并取得效果后, 疫苗将提交给监管机构进行严格的质量控制和安全性评估, 包括微生物限度检查、血凝滴度检查以及细菌内毒素含量检测等, 并最终获得批准用于人类接种。整个制备过程需要严格遵循良好的生产规范 (GMP) 和生物安全标准, 以确保疫苗产品的安全性、有效性以及质量标准的一致性。

3.2 重组蛋白疫苗的工艺优化

在疫苗的生产过程中, 针对实际的应用需求, 重组蛋白疫苗的配方和生产工艺须经过精细的设计与优化, 以期达到最佳的性能。Nielsen 等^[67]采用系统性的序列变异分析, 对 140 个关键序列位点实施了定点突变, 显著增强了膜蛋白的整合效率及其在宿主细胞中的表达水平。考虑到宿主细胞在代谢特性和蛋白质表达能力上存在的差异, 选择最合适的宿主细胞是提高生产效率的关键步骤。特别是 Namalwa KJM-1 细胞, 因其卓越的密度生长能力和缺乏内源性蛋白酶活性的特性, 已被证实为生产稳定目标蛋白的高效宿主系统^[68]。对于生物活性依赖于复杂的翻译后修饰的蛋白质, 哺乳动物细胞系能够模拟体内的环境并促进蛋白质的正确折叠与修饰, 成为了蛋白质生产的核心平台^[69]。培养基的选择同样关键, Xu 等^[70]开发了一种新型培养基复合物自动诱导介质 (CAI), 专门用于大肠杆菌中异源蛋白质的表达, 其诱导表达水平较传统的 Luria-Bertani 培养基高出了四倍。此外, 通过精细调控培养条件, 如温度、pH 值、溶氧量及营养物质的供应, 可以进一步优化蛋白质的产量和整个生物技术生产流程的效能^[71]。哺乳动物细胞的诱导表达系统能够有效调控蛋白质的表达, 避免因蛋白质过量表达而引起的细胞毒性问题。Ong 等^[72]在 CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞中成功构建了一种四环素调控的表达系统, 该系统通过降低细胞在筛选过程中的代谢压力, 大幅提高了生产效率和最终产量, 为生物制品的工业化生产提供了强有力的技术支持。

3.3 新型冠状病毒重组蛋白疫苗的研究进展

3.3.1 国内新型冠状病毒重组蛋白疫苗的研发现状

在 COVID-19 全球大流行的压力下, 疫苗的研发和普及接种工作以前所未有的速度推进。在中国, 中国科学院微生物研究所的高福院士及合作团队^[73]

成功开发了新型的嵌合 RBD 二聚体的重组蛋白疫苗, 能够有效地适应 SARS-CoV-2 病毒的 Delta 和 Omicron 变异株, 为全球疫情防控提供了重要的科学依据。中国生物研究院^[74]设计了一种名为 NVSI-06-08 的新型三聚体重组蛋白疫苗, 该疫苗融合了 SARS-CoV-2 各变异株的关键突变点, 能够广泛防护原始及多个变异病毒株。同时, 由中国生物研究院研制的另一种重组蛋白新冠疫苗 NVSI-06-07 已成功获批在国内开展临床试验, 并且在阿联酋开展的临床试验中显示出了良好的安全性和免疫原性。近日, 病毒学国家重点实验室崔宗强研究员团队^[75]研制了一种基于铁蛋白纳米颗粒的广谱新型冠状病毒重组蛋白疫苗, 通过呈现病毒上较为保守区域的抗原表位, 在小鼠体内引发了强烈的细胞免疫、体液免疫和黏膜免疫反应, 并诱导产生了长期的免疫记忆。该疫苗已被证实具备多种新冠病毒变异株的交叉保护潜力, 能够显著降低 Delta 毒株、WIV04 毒株和 Omicron 毒株的感染性和致病力, 能广泛抵御新冠病毒的多种变异株。这些研究成果开辟了疫苗设计的新途径, 为全球范围内的疫情防控工作贡献出宝贵的科学成果, 展现了我国科研人员在应对公共卫生紧急事件时的创新精神和责任感。

3.3.2 国际上已临床获批的新型冠状病毒重组蛋白候选疫苗

在抗击 SARS-CoV-2 的全球战役中, 已有多款基于重组蛋白技术的新型冠状病毒疫苗获得了临床批准。这些研究的主要靶点集中在 SARS-CoV-2 的 S 蛋白上, 标志着人类在对抗这一全球性病原体的斗争中取得了一个新的里程碑。值得注意的是, 面对 SARS-CoV-2 病毒变异株的持续涌现, 疫苗研发人员正在不断地对重组蛋白疫苗进行迭代升级, 以适应新的疫情挑战。通过整合变异株的特异性抗原序列, 新一代重组蛋白疫苗得以更有效地激活机体对这些变异株的免疫反应, 为全球疫情防控工作注入新的活力。表 1 概述了近年来在国际上已临床获批的新型冠状病毒重组蛋白候选疫苗的研究进展。

3.4 重组蛋白疫苗在公共卫生领域不同疾病中的前沿应用

重组蛋白疫苗在预防多种疾病方面展现出巨大的潜力和实践成效, 且随着疫苗研发技术的持续进步, 其影响力在传染病防控领域日益增强。Rerks-Ngarm 等^[94]开展了一项 HIV-1 感染预防的试验, 使用重组糖蛋白 120 亚单位疫苗 (AIDSVAX B/E) 和重组黄蜂痘病毒载体疫苗 (ALVAC-HIV [vCP1521]),

表1 国际上已临床获批的新冠病毒重组蛋白候选疫苗的研究进展

疫苗名称	临床试验阶段	研发机构	国家	临床试验注册号	参考文献
NVX-CoV2373	I/II期	Novavax	美国	NCT04368988	[76]
ZF2001	III期	智飞生物	中国	NCT04646590	[77]
SCB-2019	II/III期	三叶草生物制药有限公司	中国	NCT04672395	[78]
Janssen	III期	Janssen Pharmaceuticals, Inc.	美国	NCT04505722	[79]
MVC-COV1901	II期	Medigen Vaccine Biologics Corporation	中国	NCT04822025	[80]
COVIFENZ	III期	Medicago Inc.	加拿大	NCT04636697	[81]
UQ-CSL v451	I期	University of Queensland/CSL	澳大利亚	NCT04806529	[82]
KBP-201	I/II期	Kentucky BioProcessing, Inc.	美国	NCT04473690	[83]
NVX-CoV2515	III期	Novavax	美国	NCT04583995	[84]
SpikoGen	III期	Vaxine Pty Ltd./CinnaGen Co.	澳大利亚/ 伊朗	NCT05175625	[85]
AdimrSC-2f	I期	Adimmune Corporation	中国	NCT04522089	[86]
CIGB-66	III期	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)	古巴	RPCEC00000359	[87]
Nanocovax	I/II期	Nanogen Pharmaceutical Biotechnology	越南	NCT04683484	[88]
AKS-452	II期	Akston Biosciences	美国	NCT05124483	[89]
GBP510	III期	SK bioscience and GlaxoSmithKline (GSK)	韩国	NCT05007951	[90]
RAZI Cov Pars (RCP)	II期	Razi Vaccine and Serum Research Institute	伊朗	IRCT20201214049709N2	[91]
Spike Ferritin Nanoparticle (SpFN)	I期	Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)	美国	NCT04784767	[92]
EuCorVac-19	I/II期	POP Biotechnologies and EuBiologics Co., Ltd	美国/韩国	NCT04783311	[93]

在受试者中达到了 26.4% 的 HIV-1 感染预防效率, 有力证明了重组蛋白疫苗在降低 HIV 感染风险方面的有效性。重组蛋白疫苗在免疫治疗领域的应用也在不断扩大, rBCG (重组卡介苗) 技术除了用于传统结核病的预防, 在非侵袭性膀胱癌的免疫治疗中也彰显了广阔的前景, 为癌症治疗的创新研究开辟新的道路^[95]。Zhang 等^[96] 研发的新型 rBCG 疫苗进一步推动了这一趋势, 通过在 BCG 表面表达 FimH 蛋白, 增强了对膀胱肿瘤细胞的靶向黏附能力。这种方法增强了疫苗的肿瘤特异性并激发了更为强烈的免疫反应, 在抗肿瘤的临床试验中表现出杰出的疗效与良好的安全性。重组蛋白疫苗作为现代生物技术的璀璨成果, 正日益成为公共卫生领域应对新兴和重大传染病威胁的关键工具之一。表 2 汇总了近年来重组蛋白疫苗在公共卫生领域不同疾病中的前沿应用实例。

4 总结与展望

综上所述, 新型冠状病毒的形状为球形或椭圆形, 直径大约在 60~220 nm 之间, 外层有膜覆盖, 表面有刺状蛋白结构。SARS-CoV-2 病毒通过特异

性地与宿主细胞表面的 ACE2 受体结合, 借此机制侵入宿主细胞内部。在开发新型冠状病毒蛋白疫苗的过程中, 通常采用 SARS-COV-2 的 S 蛋白作为主要作用靶点。近期, 不断涌现的变异株对病毒的传播模式和公共卫生应对措施产生了深远影响。因此, 在重组蛋白疫苗的设计中, 最需要解决的问题是如何实现疫苗的长期保护效力, 并有效应对病毒突变可能引发的免疫逃逸问题。在重组蛋白疫苗领域, 针对其作用靶点的深入研究已经推动了一系列创新性疫苗设计策略的产生。这种新型冠状病毒重组蛋白疫苗具备生产速率快和安全性高的优势。然而, 面对病毒变异株的挑战, 该疫苗仍需在适应性及免疫原性方面进行深入的优化, 以确保其长期有效性。新型冠状病毒重组蛋白疫苗的制备和工艺优化是一个复杂的过程, 涵盖了从蛋白表达、纯化至包装等的关键步骤。在此过程中, 科研前辈们在提升疫苗的产量、质量和稳定性方面做出了卓越的贡献, 为疫苗的研发和生产奠定了坚实的基础。最后, 本文全面回顾了全球范围内新型冠状病毒重组蛋白疫苗的研究进展, 包括国内的研究现状以及国际上已临床获批的候选疫苗, 体现了全球科研人员在应对疫

表2 重组蛋白疫苗在公共卫生领域不同疾病中的前沿应用

疫苗名称	研发机构	国家	针对病毒	作用靶点	参考文献
Shingrix	GSK Plc	英国	带状疱疹病毒	gE糖蛋白	[97]
Abrysvo	Pfizer	美国	呼吸道合胞病毒	F蛋白	[98]
Arexvy	GSK Plc	英国	呼吸道合胞病毒	F蛋白	[99]
DAM	中国科学院微生物研究所	中国	猴痘病毒	M1和A35抗原	[100]
Flublok	Sanofi Pasteur	美国	流感病毒	血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原蛋白	[101]
MVA-BN-RSV	Bavarian Nordic	丹麦	呼吸道合胞病毒	F、G(A和B亚型)、M2和N蛋白	[102]
Engerix-B	Smith-Kline-RIT	比利时	乙型肝炎病毒	HBsAg蛋白	[103]
Recombivax HB	National Institutes of Health	美国	乙型肝炎病毒	HBsAg蛋白	[104]
SCTV01C	北京神州细胞生物技术集团股份公司	中国	新冠病毒	Alpha/Beta变异株S三聚体蛋白	[105]
ZF2001	中国科学院微生物研究所与智飞龙科马联合研发	中国	新冠病毒	S三聚体蛋白的RBD受体结合区	[106]

情挑战中的团结协作和突出贡献。

根据预测,全球重组蛋白疫苗市场将在未来五年保持持续的增长态势。中国作为新冠疫苗研发的领先国家,将面临前所未有的市场机遇。未来,具备迅速研发和生产能力的重组蛋白疫苗有望在新病原体出现时迅速占据优势,极大扩展了全球公共卫生领域应对各类疾病的应用范围,为人类健康构建更为坚实的防线。同时,人们需要持续研发和更新具备跨变异株的广谱保护效力的多价重组蛋白疫苗,并优化生产工艺、提高生产效率、降低成本及确保疫苗的公平分配,这将是今后重组蛋白疫苗研发的工作重心。总而言之,新型冠状病毒重组蛋白疫苗将在技术进步、市场扩展和政策支持等方面继续发展和完善,其安全性、有效性和生产质量的控制仍是未来研究和应用的关键考量因素。

[参 考 文 献]

- [1] 北京市卫生健康大数据与政策研究中心,北京市医院管理研究所. 全球疫情动态及应对追踪简报(第六十三期)[EB/OL]. [2024-07-23]. <http://www.phic.org.cn/gzdt/hydt/202407/P020240723460281380317.pdf>
- [2] Huang J, Zhang L, Liu X, et al. Global prediction system for COVID-19 pandemic. *Sci Bull (Beijing)*, 2020, 65: 1884-7
- [3] Kucharski AJ, Russell TW, Diamond C, et al. Early dynamics of transmission and control of COVID-19: a mathematical modelling study. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20: 553-8
- [4] Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*, 2020, 395: 689-97
- [5] World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. [EB/OL]. [2024-09-25]. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- [6] Guo Y, Han J, Zhang Y, et al. SARS-CoV-2 omicron variant: epidemiological features, biological characteristics, and clinical significance. *Front Immunol*, 2022, 13: 877101
- [7] Thakur S, Mayank, Sarkar B, et al. Exploring the magic bullets to identify Achilles' heel in SARS-CoV-2: delving deeper into the sea of possible therapeutic options in Covid-19 disease: an update. *Food Chem Toxicol*, 2021, 147: 111887
- [8] Farrar J. COVID-19 - 2021: a new, less predictable phase of the pandemic. *China CDC Wkly*, 2021, 3: 125-7
- [9] Murray CJL. COVID-19 will continue but the end of the pandemic is near. *Lancet*, 2022, 399: 417-9
- [10] Joshi G, Borah P, Thakur S, et al. Exploring the COVID-19 vaccine candidates against SARS-CoV-2 and its variants: where do we stand and where do we go? *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17: 4714-40
- [11] Li M, Wang H, Tian L, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 146
- [12] Yu J, Fan X, Luan X, et al. A novel multi-component protein vaccine ECP001 containing a protein polypeptide antigen nPstS1 riching in T-cell epitopes showed good immunogenicity and protection in mice. *Front Immunol*, 2023, 14: 1138818
- [13] Kayser V, Ramzan I. Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17: 5255-68
- [14] Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 141-54
- [15] Wang MY, Zhao R, Gao LJ, et al. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 587269
- [16] Yamayoshi S, Kawaoka Y. Emergence of SARS-CoV-2 and its outlook. *Glob Health Med*, 2020, 2: 1-2
- [17] Arya R, Kumari S, Pandey B, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*, 2021, 433: 166725

- [18] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 2020, 181: 281-92
- [19] Yuan HW, Wen HL. Research progress on coronavirus S proteins and their receptors. *Arch Virol*, 2021, 166: 1811-7
- [20] Tortorici MA, Veesler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res*, 2019, 105: 93-116
- [21] Wu W, Cheng Y, Zhou H, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virol J*, 2023, 20: 6
- [22] Lu S, Ye Q, Singh D, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nat Commun*, 2021, 12: 502
- [23] Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun*, 2022, 13: 4399
- [24] Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci China Life Sci*, 2022, 65: 280-94
- [25] Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 3-20
- [26] Strobel R, Adler J, Shaul Y. The transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) non-protease domains regulating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike-mediated virus entry. *Viruses*, 2023, 15: 2124
- [27] Hempel T, Raich L, Olsson S, et al. Molecular mechanism of inhibiting the SARS-CoV-2 cell entry facilitator TMPRSS2 with camostat and nafamostat. *Chem Sci*, 2020, 12: 983-92
- [28] Shapira T, Monreal IA, Dion SP, et al. ATMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature*, 2022, 605: 340-8
- [29] Mahoney M, Damalanka VC, Tartell MA, et al. A novel class of TMPRSS2 inhibitors potently block SARS-CoV-2 and MERS-CoV viral entry and protect human epithelial lung cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2108728118
- [30] Olmedillas E, Rajamanickam RR, Avalos RD, et al. Structure of a SARS-CoV-2 spike S2 subunit in a pre-fusion, open conformation. *bioRxiv*, 2023, 12.14.571764
- [31] Park GJ, Osinski A, Hernandez G, et al. The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2. *Nature*, 2022, 609: 793-800
- [32] Bhatt PR, Scaiola A, Loughran G, et al. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*, 2021, 372: 1306-13
- [33] Li X, Song Y. Structure and function of SARS-CoV and SARS-CoV-2 main proteases and their inhibition: a comprehensive review. *Eur J Med Chem*, 2023, 260: 115772
- [34] Sarkar M, Madabhavi I. SARS-CoV-2 variants of concern: a review. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2022, 93. doi: 10.4081/monaldi.2022.2337
- [35] Davies NG, Abbott S, Barnard RC, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, 2021, 372: eabg3055
- [36] Hart WS, Miller E, Andrews NJ, et al. Generation time of the α and δ SARS-CoV-2 variants: an epidemiological analysis. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22: 603-10
- [37] Park SW, Sun K, Abbott S, et al. Inferring the differences in incubation-period and generation-interval distributions of the Delta and Omicron variants of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120: e2221887120
- [38] Tian D, Sun Y, Xu H, et al. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol*, 2022, 94: 2376-83
- [39] Gao SJ, Guo H, Luo G. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert! *J Med Virol*, 2022, 94: 1255-6
- [40] Chen J, Wang R, Gilby NB, et al. Omicron (B.1.1.529): infectivity, vaccine breakthrough, and antibody resistance. *ArXiv*, 2021, arXiv: 2112.01318v1
- [41] Resende PC, Gräf T, Paixão ACD, et al. A potential SARS-CoV-2 variant of interest (VOI) harboring mutation E484K in the spike protein was identified within lineage B.1.1.33 circulating in Brazil. *Viruses*, 2021, 13: 724
- [42] 中国疾病预防控制中心. 全国新冠病毒感染重症和死亡病例报告情况[EB/OL]. [2024-06-11]. https://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/zl/szkb_11803/jszl_13141/202406/t20240611_283576.html
- [43] Lipman M, Chambers RC, Singer M, et al. SARS-CoV-2 pandemic: clinical picture of COVID-19 and implications for research. *Thorax*, 2020, 75: 614-6
- [44] Mercaldo F, Belfiore MP, Reginelli A, et al. Coronavirus Covid-19 detection by means of explainable deep learning. *Sci Rep*, 2023, 13: 462
- [45] Palmucci S, Di Mari A, Cancemi G, et al. Clinical and radiological features of interstitial lung diseases associated with polymyositis and dermatomyositis. *Medicina (Kaunas)*, 2022, 58: 1757
- [46] Bozkurt B, Kamat I, Hotez PJ. Myocarditis with COVID-19 mRNA vaccines. *Circulation*, 2021, 144: 471-84
- [47] Schreckenber R, Woitasky N, Itani N, et al. Cardiac side effects of RNA-based SARS-CoV-2 vaccines: hidden cardiotoxic effects of mRNA-1273 and BNT162b2 on ventricular myocyte function and structure. *Br J Pharmacol*, 2024, 181: 345-61
- [48] Yoo H, Kim SY, Park MS, et al. COVID-19 vaccine-associated pneumonitis in the Republic of Korea: a nationwide multicenter survey. *J Korean Med Sci*, 2023, 38: e106
- [49] Skowronski DM, De Serres G. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 384: 1576-7
- [50] Clarke ET, Williams NA, Findlow J, et al. Polysaccharide-specific memory B cells generated by conjugate vaccines in humans conform to the CD27⁺IgG⁺ isotype-switched memory B Cell phenotype and require contact-dependent

- signals from bystander T cells activated by bacterial proteins to differentiate into plasma cells. *J Immunol*, 2013, 191: 6071-83
- [51] Rajewsky K, Rotzländer E, Peltre G, et al. The immune response to a hybrid protein molecule; specificity of secondary stimulation and of tolerance induction. *J Exp Med*, 1967, 126: 581-606
- [52] Abdalla M, El-Arabey AA, Jiang X. Progress in research on the S protein as the target of COVID-19 vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2021, 20: 769-72
- [53] Mendoza-Ramírez NJ, García-Cordero J, Martínez-Frías SP, et al. Combination of recombinant proteins S1/N and RBD/N as potential vaccine candidates. *Vaccines (Basel)*, 2023, 11: 864
- [54] Keech C, Albert G, Cho I, et al. Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2320-32
- [55] Özcengiz E, Keser D, Özcengiz G, et al. Two formulations of coronavirus disease-19 recombinant subunit vaccine candidate made up of S1 fragment protein P1, S2 fragment protein P2, and nucleocapsid protein elicit strong immunogenicity in mice. *Immun Inflamm Dis*, 2022, 10: e748
- [56] Souza CC, Guimarães JM, Pereira SDS, et al. The multifunctionality of expression systems in *Bacillus subtilis*: emerging devices for the production of recombinant proteins. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246: 2443-53
- [57] Webster GR, van Dolleweerd C, Guerra T, et al. A polymeric immunoglobulin-antigen fusion protein strategy for enhancing vaccine immunogenicity. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1983-96
- [58] Kanekiyo M, Ellis D, King NP. New vaccine design and delivery technologies. *J Infect Dis*, 2019, 219: S88-96
- [59] Liao W, Zhang TT, Gao L, et al. Integration of novel materials and advanced genomic technologies into new vaccine design. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17: 2286-301
- [60] Olive C, Toth I, Jackson D. Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine developmental strategies. *Mini Rev Med Chem*, 2001, 1: 429-38
- [61] Huang S, Zhu Y, Zhang L, et al. Recent advances in delivery systems for genetic and other novel vaccines. *Adv Mater*, 2022, 34: e2107946
- [62] Eldridge JH, Staas JK, Chen D, et al. New advances in vaccine delivery systems. *Semin Hematol*, 1993, 30: 16-25
- [63] Pollet J, Chen WH, Strych U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 170: 71-82
- [64] Li W, Joshi MD, Singhania S, et al. Peptide vaccine: progress and challenges. *Vaccines (Basel)*, 2014, 2: 515-36
- [65] Peek LJ, Brey RN, Middaugh CR. A rapid, three-step process for the preformulation of a recombinant ricin toxin A-chain vaccine. *J Pharm Sci*, 2007, 96: 44-60
- [66] Zhang Z, Zhou J, Ni P, et al. PF-D-Trimer, a protective SARS-CoV-2 subunit vaccine: immunogenicity and application. *NPJ Vaccines*, 2023, 8: 38
- [67] Niesen MJM, Marshall SS, Miller TF 3rd, et al. Improving membrane protein expression by optimizing integration efficiency. *J Biol Chem*, 2017, 292: 19537-45
- [68] Hosoi S, Miyaji H, Satoh M, et al. Optimization of cell culture conditions for production of biologically active proteins. *Cytotechnology*, 1991, 5: 17-34
- [69] Hunter M, Yuan P, Vavilala D, et al. Optimization of protein expression in mammalian cells. *Curr Protoc Protein Sci*, 2019, 95: e77
- [70] Xu L, Shi X, Wang Y, et al. Culture optimization for protein expression in *Escherichia coli*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2009, 49: 128-34
- [71] Krupnova OF, Sizova NI, Smolianitskii AG. Increase in the yield of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as a result of optimizing their culture conditions. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 1995, 31: 311-5
- [72] Ong EC, Smidt P, McGrew JT. Limiting the metabolic burden of recombinant protein expression during selection yields pools with higher expression levels. *Biotechnol Prog*, 2019, 35: e2839
- [73] Xu K, Gao P, Liu S, et al. Protective prototype-β and δ-Omicron chimeric RBD-dimer vaccines against SARS-CoV-2. *Cell*, 2022, 185: 2265-78
- [74] Liang Y, Zhang J, Yuan RY, et al. Design of a mutation-integrated trimeric RBD with broad protection against SARS-CoV-2. *Cell Discov*, 2022, 8: 17
- [75] Wu X, Li W, Rong H, et al. A nanoparticle vaccine displaying conserved epitopes of the preexisting neutralizing antibody confers broad protection against SARS-CoV-2 variants. *ACS Nano*, 2024, 18: 17749-63
- [76] Fries L, Formica N, Mallory RM, et al. Strong CD4⁺ T-cell responses to ancestral and variant spike proteins are established by NVX-CoV2373 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 primary vaccination. *J Infect Dis*, 2023, 228: 734-41
- [77] Dai L, Gao L, Tao L, et al. Efficacy and safety of the RBD-dimer-based Covid-19 vaccine ZF2001 in adults. *N Engl J Med*, 2022, 386: 2097-111
- [78] Bravo L, Smolenov I, Han HH, 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. *Lancet*, 2022, 399: 461-72
- [79] Sadoff J, Struyf F, Douoguih M. A plain language summary of how well the single-dose Janssen vaccine works and how safe it is. *Future Virol*, 2021, 16: 725-39
- [80] Waits A, Chen JY, Cheng WH, et al. Safety and immunogenicity of MVC-COV1901 vaccine in older adults: phase 2 randomized dose-comparison trial. *Int J Infect Dis*, 2022, 124: 21-6
- [81] Hager KJ, Pérez Marc G, Gobeil P, et al. Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2022, 386: 2084-96
- [82] University of Queensland & CSL. Update on the university of Queensland COVID-19 vaccine. [EB/OL].

- [2020-12-11]. <https://newsroom.csl.com/2020-12-11-Update-on-The-University-of-Queensland-COVID-19-vaccine>
- [83] Maharjan PM, Choe S. Plant-based COVID-19 vaccines: current status, design, and development strategies of candidate vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9: 992
- [84] Novavax. (n.d.). Initiates phase 3 trial of its COVID-19 omicron strain vaccine as a booster[EB/OL]. [2022-05-31]. <https://ir.novavax.com/press-releases/Novavax-Initiates-Phase-3-Trial-of-its-COVID-19-Omicron-Strain-Vaccine-as-a-Booster>
- [85] Tabarsi P, Anjidani N, Shahpari R, et al. Evaluating the efficacy and safety of SpikoGen®, an Advax-CpG55.2- adjuvanted severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike protein vaccine: a phase 3 randomized placebo-controlled trial. *Clin Microbiol Infect*, 2023, 29: 215-20
- [86] AdimrSC-2f COVID-19 Vaccine Study Investigators. A study to evaluate the safety and immunogenicity of COVID-19 (AdimrSC-2f) Vaccine. [EB/OL]. [2022-05-23]. <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT04522089>
- [87] Zambrana JV, Saenz C, Maier HE, et al. Comparative analysis of SARS-CoV-2 antibody responses across global and lesser-studied vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2024, 12: 326
- [88] Nguyen TP, Do Q, Phan LT, et al. Safety and immunogenicity of Nanocovax, a SARS-CoV-2 recombinant spike protein vaccine: interim results of a double-blind, randomised controlled phase 1 and 2 trial. *Lancet Reg Health West Pac*, 2022, 24: 100474
- [89] Alleva DG, Delpero AR, Scully MM, et al. Development of an IgG-Fc fusion COVID-19 subunit vaccine, AKS-452. *Vaccine*, 2021, 39: 6601-13
- [90] Song JY, Choi WS, Cheong HJ, et al. Immunogenicity and safety of SARS-CoV-2 recombinant protein nanoparticle vaccine GBP510 adjuvanted with AS03: interim results of a randomised, active-controlled, observer-blinded, phase 3 trial. *EClinicalMedicine*, 2023, 64: 102140
- [91] Mohazzab A, Fallah Mehrabadi MH, Es-Haghi A, et al. Phase II, safety and immunogenicity of RAZI Cov Pars (RCP) SARS Cov-2 vaccine in adults aged 18-70 years; a randomized, double-blind clinical trial. *J Pharm Sci*, 2023, 112: 3012-21
- [92] Johnston SC, Ricks KM, Lakhali-Naouar I, et al. A SARS-CoV-2 spike ferritin nanoparticle vaccine is protective and promotes a strong immunological response in the *Cynomolgus macaque* coronavirus disease 2019 (COVID-19) model. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10: 717
- [93] Lovell JF, Baik YO, Choi SK, et al. Interim analysis from a phase 2 randomized trial of EuCorVac-19: a recombinant protein SARS-CoV-2 RBD nanoliposome vaccine. *BMC Med*, 2022, 20: 462
- [94] Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*, 2009, 361: 2209-20
- [95] Marques-Neto LM, Piwowarska Z, Kanno AI, et al. Thirty years of recombinant BCG: new trends for a centenary vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 2021, 20: 1001-11
- [96] Zhang Y, Huo F, Cao Q, et al. FimH confers mannose-targeting ability to *Bacillus Calmette-Guerin* for improved immunotherapy in bladder cancer. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e003939
- [97] Hesse EM, Shimabukuro TT, Su JR, et al. Postlicensure safety surveillance of recombinant zoster vaccine (Shingrix) - United States, October 2017-June 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019, 68: 91-4
- [98] Two vaccines (Arexvy and Abrysvo) for prevention of RSV disease. *Med Lett Drugs Ther*, 2023, 65: 155-6
- [99] Swathi M. Arexvy: a comprehensive review of the respiratory syncytial virus vaccine for revolutionary protection. *Viral Immunol*, 2024, 37: 12-5
- [100] Wang H, Yin P, Zheng T, et al. Rational design of a 'two-in-one' immunogen DAM drives potent immune response against mpox virus. *Nat Immunol*, 2024, 25: 307-15
- [101] Cox MM, Patriarca PA, Treanor J. FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine. *Influenza Other Respir Viruses*, 2008, 2: 211-9
- [102] Samy N, Reichhardt D, Schmidt D, et al. Safety and immunogenicity of novel modified vaccinia Ankara-vectored RSV vaccine: a randomized phase I clinical trial. *Vaccine*, 2020, 38: 2608-19
- [103] André FE, Safary A. Summary of clinical findings on Engerix-B, a genetically engineered yeast derived hepatitis B vaccine. *Postgrad Med J*, 1987, 63: 169-77
- [104] Tron F, Degos F, Bréchet C, et al. Randomized dose range study of a recombinant hepatitis B vaccine produced in mammalian cells and containing the S and PreS2 sequences. *J Infect Dis*, 1989, 160: 199-204
- [105] Hannawi S, Saf Eldin L, Abuquta A, et al. Safety and immunogenicity of a bivalent SARS-CoV-2 protein booster vaccine, SCTV01C in adults previously vaccinated with inactivated vaccine: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1/2 clinical trial. *J Infect*, 2023, 86: 154-225
- [106] Yang H, Pan W, Chen G, et al. Preclinical toxicity and immunogenicity of a COVID-19 vaccine (ZF2001) in *Cynomolgus* monkeys. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10: 2080