

新型冠状病毒亚单位疫苗研究进展及现状*

杨 依 张晴云 梅坤荣**

(天津大学药物科学与技术学院 天津 300072)

摘要 自新型冠状病毒肺炎在 2019 年年末暴发以来,如何高效防控疫情一直是紧急的全球公共安全事件。疫苗是有效阻止病毒感染人体、保护高危人群免于疾病快速进展以及遏制疫情进一步扩大的手段之一,其中亚单位疫苗的主要成分为特定的病毒抗原蛋白或多肽,通过加入疫苗佐剂提高抗原的免疫原性。由于机体仅针对重组蛋白表面的特定抗原表位进行识别并产生抗体,因此亚单位疫苗具有较高的保护能力和安全性。通过对目前已上市及处于临床阶段的各类新型冠状病毒亚单位疫苗进行梳理,介绍了各类亚单位疫苗的抗原设计策略和佐剂选择、整体保护能力及研究进展,并对亚单位疫苗的应用及技术优势进行分析,期望能为亚单位疫苗研发及全球疫情防控提供参考。

关键词 新型冠状病毒肺炎 新型冠状病毒 亚单位疫苗

中图分类号 Q819

2019 年年末,暴发了由新型冠状病毒(severe acute respiratory symptom coronavirus 2, SARS-CoV-2)引发的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)疫情。SARS-CoV-2 传播速度快、感染能力强、危险系数高,目前已造成全球范围的疫情大流行^[1-2]。安全有效的疫苗接种方案可以降低病毒的传播风险及其诱发疾病的严重程度,尤其对老年人等有并发症风险的高危人群具有重要的保护意义,因而是疫情防控的重要手段^[3-4]。在 2020 年年初 SARS-CoV-2 被分离并完成测序后,全球范围的疫苗研发工作就在持续展开。亚单位疫苗是一种包含特定病毒抗原的重组蛋白类疫苗,在疫苗佐剂的帮助下,免疫系统能够识别具有高免疫原性的抗原蛋白,针对其中免疫显性的抗原表位产生特异性抗体,具有较高安全性和免疫原性。

截至目前,全球范围内已有 12 款 SARS-CoV-2 亚单位疫苗获批上市或紧急使用,另有数十种亚单位疫苗处于临床试验阶段。本文将总结目前 SARS-CoV-2 亚单位疫苗的主要技术,并对已上市或紧急使用的 SARS-CoV-2 亚单位疫苗,以及具有代表性的处于临床

试验阶段的候选亚单位疫苗进行介绍。

1 SARS-CoV-2 介绍

SARS-CoV-2 是一种有包膜的单链正义 RNA 冠状病毒,与引起 2003 年暴发的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)及 2012 年暴发的中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)的冠状病毒同为高致病性 β 属冠状病毒^[5-7]。其基因组编码至少 29 种蛋白质,包括四种结构蛋白,分别为小囊膜蛋白(envelope protein, E 蛋白)、刺突蛋白(spike protein, S 蛋白)、膜蛋白(membrane protein, M 蛋白)和核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N 蛋白),其中 S 蛋白在受体识别和膜融合中起关键作用^[8-10]。天然状态下 SARS-CoV-2 的 S 蛋白为广泛分布于病毒囊膜的同源三聚体糖蛋白,每个单体包括 S1 和 S2 两个功能性亚基。当 S 蛋白处于融合前构象(pre-fusion conformation)时, S1 亚基通过受体结合域(receptor binding domain, RBD)完成与受体血管紧张素转化酶 2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的相互作用^[11-14]。随后通过宿主蛋白酶对包含 Furin 酶切位点在内的相关位点的识别, S 蛋白被进一步切割变构, S1 亚基脱落,激活 S2 亚基介

收稿日期:2022-02-28 修回日期:2022-04-18

* 天津市青年人才托举工程(TJSQNTJ-2020-19)资助项目

**通讯作者,电子信箱:kmei@tju.edu.cn

导的病毒与受体细胞膜的融合过程,最终 S 蛋白形成三股同轴缠绕螺旋的融合后构象 (post-fusion conformation)^[15-16]。

由于缺乏复制校验机制, RNA 病毒存在较高突变概率^[17]。随着在人群中广泛传播并引起大规模传染, SARS-CoV-2 也在不断变异。S 蛋白特定位点的突变可能会改变其与受体或中和抗体的结合亲和力,从而对病毒的感染及传播能力造成一定影响^[18-20]。曾经或当前流行的值得关注的 SARS-CoV-2 突变株主要有五种,均包括 S 蛋白关键氨基酸的突变^[21-24]。其中,突变株 B.1.1.7 (Alpha) 传播力更强, B.1.351 (Beta) 降低了疫苗的保护效率^[25-26]。P.1 (Gamma) 可能会使 COVID-19 康复者感染并产生更严重的症状, B.1.617.2 (Delta) 则增加了患者的死亡率^[27-28]。最近出现的 B.1.1.529 (Omicron) 仅在 S 蛋白上就存在 30 余处突变, 展现出极强的免疫逃逸能力, 严重影响疫苗效力^[29-30]。因此, 对流行毒株进行密切跟踪并制定相应的疫苗研发策略对全球疫情防控具有重要意义。

2 SARS-CoV-2 亚单位疫苗的抗原与佐剂

2.1 SARS-CoV-2 亚单位疫苗的抗原设计

亚单位疫苗的主要成分是能诱导机体产生抗体的病原体抗原。SARS-CoV-2 的全长 S 蛋白和 RBD 等部分 S 蛋白都可以作为亚单位疫苗的重要候选抗原 (图 1)。这些 S 相关蛋白表面存在众多免疫显性的抗原表位, 能够诱导机体产生保护性中和抗体, 直接或间接地避免病毒与其受体结合, 阻止病毒感染^[31-33]。

选取 S 蛋白胞外域作为抗原, 并在其 C 端引入三聚化标签, 可以得到天然状态的亚稳定的 S 蛋白三聚体。突变 Furin 酶切位点可以避免包含关键中和抗原表位的 S1 亚基脱落, 从而提高融合前 S 蛋白的稳定性^[11]。常用于稳定融合前 S 蛋白构象的方案还包括“S-2P”, 通过在 S2 亚基的 K986 和 V987 位点引入两个具有刚性结构的脯氨酸突变, 阻碍其所在柔性区间重新折叠。该区间是帮助 S 蛋白变构为融合后构象的关键区域, K986P/V987P 不仅能帮助 S 蛋白稳定在融合前构象, 还能大大提高 S 蛋白的表达量^[11, 34]。若选用全长 S 蛋白作为抗原, 则无须外源标签即可获得较稳定的 S 蛋白三聚体。在此基础上进一步对全长 S 蛋白进行 S-2P 突变及 Furin 酶切位点突变, 可以获得稳定在融合前构象的 S 蛋白三聚体。由于 S1 亚基负责结合受体, 其上包含关键的中和抗原表位, 因此仅将 S1

亚基作为亚单位疫苗抗原也是一种可使用的抗原设计策略。为了进一步提升抗原密度, 将大量 S 蛋白抗原展示在纳米颗粒表面, 可以诱导机体产生更强烈、更广泛的免疫反应^[35-36]。

与 S 蛋白三聚体相比, RBD 单体分子量较小, 引起的免疫反应较弱。为了提高免疫原性, RBD 可通过串联表达、二硫键组装或引入二聚化标签的方式形成二聚体。通过串联表达或引入三聚化标签的方式, RBD 也能形成三聚体抗原。此外, 通过引入脂质体或自组装载体蛋白, RBD 同样能以组装在纳米颗粒表面的形式递送给免疫系统。

基于特定抗原表位的多肽可以被设计成多肽疫苗。由于多肽的选择更具灵活性, 多种肽段组成的抗原成分可以诱导针对不同表位的免疫反应, 同时还能避免非中和抗体可能引起的抗体依赖性感染增强 (antibody-dependent enhancement, ADE) 现象, 因而也是一种可供选择的抗原设计方案^[37]。由于多肽抗原的尺寸较小, 可以引入载体蛋白以提高多肽的免疫原性。

SARS-CoV-2 的 S 蛋白是已知最大的 I 型融合蛋白之一, 每个 S 蛋白单体存在 22 个 N-糖链结构^[38]。这些糖链帮助稳定蛋白质构象, 并避免非特异蛋白质相互作用^[39-40]。覆盖的糖链会影响病毒抗原的免疫原性, 甚至提高病毒的免疫逃逸能力。由于对抗原蛋白结构及其翻译后修饰要求严格, 目前研发的 SARS-CoV-2 亚单位疫苗抗原大多选用昆虫细胞或哺乳动物细胞进行表达。酵母表达系统虽然具有高产率和低成本的优势, 但由于具有过糖基化能力, 且与哺乳动物细胞表达系统形成的糖型不同, 在进行抗原表达时应确认抗原结构与性质不会受酵母的过糖基化影响^[41]。此外, 植物细胞表达系统因为能够生产糖基化修饰的重组蛋白, 并通过植物糖工程实现不同糖基化模式, 也是一种可供选择的抗原蛋白生产方式^[42-43]。

2.2 SARS-CoV-2 亚单位疫苗的常用佐剂

由于重组抗原蛋白缺乏病原体相关分子模式, 在制备亚单位疫苗时需加入疫苗佐剂以增强抗原的免疫原性, 帮助抗原被抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 捕获。表 1 总结了 SARS-CoV-2 亚单位疫苗研发中常用的几款佐剂。其中铝佐剂是一种较为温和的疫苗佐剂, 可以诱导机体产生长效的中和抗体^[44-45]。CpG 佐剂能显著提高抗体水平, 但因其诱导产生的抗体半衰期较短, 常与铝佐剂共同使用, 可以诱导产生更持久的高水平抗体^[46]。Delta-菊粉颗粒能够诱导广泛

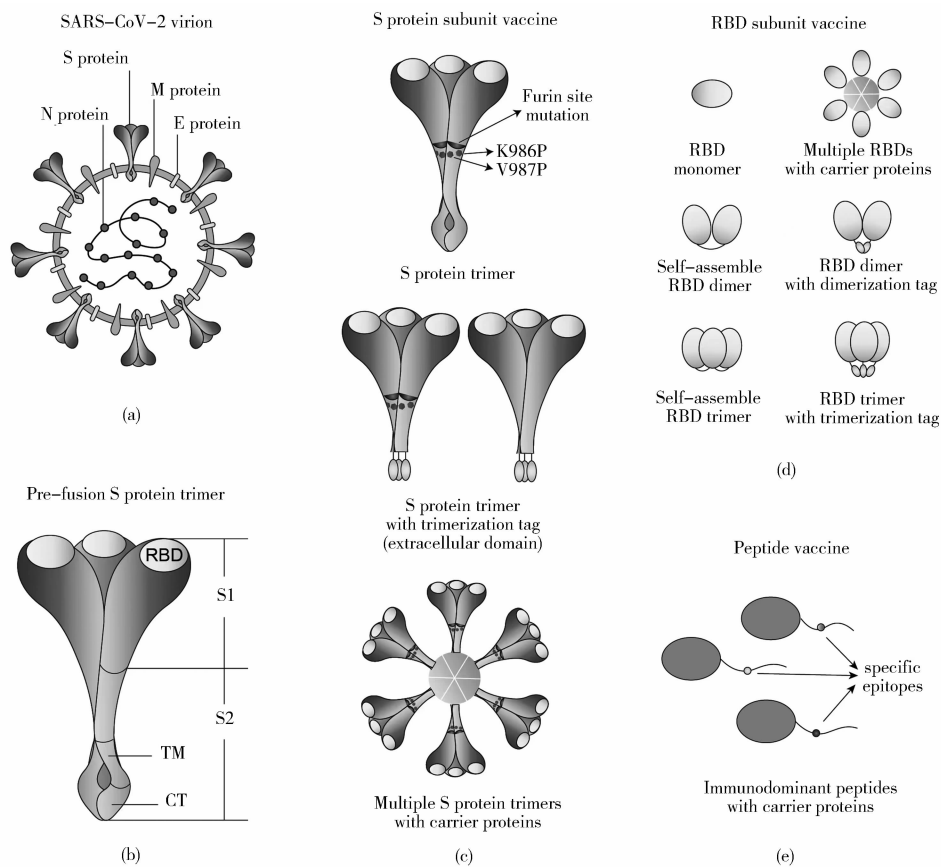


图 1 SARS-CoV-2 亚单位疫苗候选抗原的主要类型

Fig.1 Antigen candidates of SARS-CoV-2 subunit vaccine

(a) Schematic diagram of the SARS-CoV-2 virion (b) Schematic diagram of S protein trimer in the pre-fusion conformation. TM: Transmembrane region; CT: Cytoplasmic tail (c) Subunit vaccine antigenic design based on S protein (d) Subunit vaccine antigenic design based on RBD (e) Peptide vaccine antigenic design based on specific antigenic epitopes

且均衡的免疫反应,由 Delta-菊粉颗粒及 CpG 组成的 Advax-SM 佐剂可以显著提高抗体水平,已被用于流感疫苗及乙型肝炎疫苗^[47-48]。AS03 和 MF59 均为基于角鲨烯和聚山梨醇酯 80 的水包油型佐剂,并分别加入 α-生育酚和山梨醇三油酸酯。两款佐剂均被用于流感疫苗^[49-51]。由皂苷、胆固醇和磷脂组成的 Matrix-M 则是一类纳米颗粒佐剂,可以帮助大量抗原组装在颗粒表面并刺激机体产生强烈且持久的免疫反应^[52]。

表 1 SARS-CoV-2 亚单位疫苗常用佐剂

Table 1 Adjuvants commonly used in SARS-CoV-2 subunit vaccine development

佐剂	组成	应用	参考文献
铝佐剂	氢氧化铝	ZF2001/EpiVacCorona/Soberana 01/Soberana 02/Soberana Plus/ Abdala/NVSI-06-07/NVSI-06-08/V-01/GBP510/ Recombinant COVID-19 Vaccine (Sf9 cells)	[37,53-60]
CpG/铝佐剂	CpG 和氢氧化铝	SCB-2019/MVC-COV1901/Corbevax/202-CoV	[61-64]
Matrix-M	皂苷、胆固醇和磷脂	NVX-CoV2373/SII B. 1. 351/SII B. 1. 617. 2/SII Bivalent	[65]
AS03	α-生育酚、角鲨烯和聚山梨醇酯 80	CoV2 preS dTM/GBP510	[59,66]
MF59	山梨醇三油酸酯、角鲨烯和聚山梨醇酯 80	S-clamp	[67]
Advax-SM	Delta-菊粉颗粒和 CpG	COVAX-19® (Spikogen®)	[68]

3 已上市或进入临床研究的 SARS-CoV-2 亚单位疫苗

不同的抗原选择,对抗原的不同修饰和改造,以及不同佐剂的使用,使得 SARS-CoV-2 亚单位疫苗多种多

样,其中已上市或获批用于紧急使用的疫苗共有 12 种,另外进入临床研究阶段的候选疫苗也有数十种。表 2 和表 3 根据抗原组成分别对已上市和处于临床研究阶段的疫苗进行了总结,主要分为基于 S 蛋白、RBD 和其他特定表位设计的三大类亚单位疫苗。

表 2 已获批或用于紧急使用的 SARS-CoV-2 亚单位疫苗
Table 2 Approved/emergency used SARS-CoV-2 subunit vaccines

疫苗名称	序列及抗原优化	研发单位	佐剂	表达系统	获批情况	参考文献
基于 S 蛋白设计的亚单位疫苗						
MVC-COV1901	1 ~ 1208 a. a. R682G/R683S/R685S/K986P/V987P, C 端连接 T4 纤维蛋白三聚标签	基亚生物	CpG/铝佐剂	哺乳动物细胞	获批:巴拉圭,索马里兰,中国台湾	[69]
COVAX-19® (Spikogen®)	/ *	Vaxine/Cinnagen	Advax-SM	昆虫细胞	紧急使用:伊朗	[68]
基于 S 蛋白设计的纳米颗粒亚单位疫苗						
NVX-CoV2373	1 ~ 1273 a. a. R682Q/R683Q/R685Q/K986P/V987P	诺瓦瓦克斯	Matrix-M	昆虫细胞	获批:英国,澳大利亚,韩国等 36 个国家	[65,70-71]
Covovax	1 ~ 1273 a. a. R682Q/R683Q/R685Q/K986P/V987P	诺瓦瓦克斯/ 印度血清研究所	Matrix-M	昆虫细胞	紧急使用:印度,印度尼西亚,菲律宾	[72]
基于 RBD 单体设计的亚单位疫苗						
Corbevax	332 ~ 549 a. a.	Biological E	CpG/铝佐剂	酵母	紧急使用:印度	[63,73]
Abdala (CIGB-66)	331 ~ 529 a. a.	古巴基因工程与 生物技术中心	铝佐剂	酵母	获批:古巴,墨西哥,委内瑞拉等 6 个国家	[58]
基于 RBD 二聚体设计的亚单位疫苗						
ZF2001	319 ~ 537 a. a.	智飞龙科马/ 中国科学院微生物研究所	铝佐剂	哺乳动物细胞	获批:中国,哥伦比亚,印度尼西亚等 4 个国家	[53,74]
Soberana Plus	319 ~ 541 a. a.	古巴芬利疫苗 研究所	铝佐剂	哺乳动物细胞	获批:古巴	[60]
基于 RBD 三聚体设计的亚单位疫苗						
NVSI-06-07	319 ~ 537 a. a.	中国生物研究院	铝佐剂	哺乳动物细胞	紧急使用:阿联酋	[54]
NVSI-06-08	319 ~ 537 a. a. 野生型/Beta 突变株(K417N/E484K/N501Y)/Kappa 突变株(L452R/E484K)	中国生物研究院	铝佐剂	哺乳动物细胞	紧急使用:阿联酋	[75]
基于 RBD 设计的纳米颗粒亚单位疫苗						
Soberana 02	319 ~ 541 a. a. 连接 TT 蛋白 **	古巴芬利疫苗 研究所	铝佐剂	哺乳动物细胞	获批:伊朗,古巴,尼加拉瓜等 4 个国家	[76]
基于多肽设计的亚单位疫苗						
EpiVac Corona	连接 SARS-CoV-2 N 蛋白的多肽片段 *	俄罗斯矢量国家 病毒学与生物技术研究中心	铝佐剂	化学合成	获批:柬埔寨,俄罗斯,委内瑞拉等 4 个国家	[37]

*The sequence of antigen is not available

**TT:Tetanus toxoid

3.1 基于 S 蛋白设计的亚单位疫苗

基于 S 蛋白设计抗原是目前应用较多的一种 SARS-CoV-2 亚单位疫苗研发策略,各类疫苗通过不同的设计方案将 S 蛋白稳定在融合前构象(表 2 和表 3)。

SCB-2019 是三叶草公司研发的基于野生型 S 蛋白和 CpG/铝组合佐剂的亚单位疫苗。该抗原在 S 蛋白胞外域 C 端引入一种来源于人 I 型前胶原蛋白 C 端的三聚化标签,获得处于融合前构象的野生型 S 蛋白三聚体^[77-78]。II/III 期临床试验结果显示,SCB-2019 对重度 COVID-19 的预防效率达 100%,对 Delta 突变株引起的任何严重程度患者的保护效率达 79%^[61]。昆士兰大学研发的 S-clamp 选用 S 蛋白胞外域作为抗原,并将 Furin 酶切位点所在的 680 ~ 690 氨基酸序列突变为 GSG,同时引入其自主研发的分子钳三聚标签稳定 S 蛋白三聚体,该标签是一种来自人免疫缺陷病毒 1 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1) 糖蛋白 gp41 的七次重复序列 1 和 2^[67]。在 I 期临床试验中,该抗原在 MF59 佐剂的帮助下展现出良好的免疫原性^[79]。但分子钳标签被发现同样刺激免疫反应,因而可能导致 HIV 诊断测试的假阳性结果。为了避免 HIV 诊断干扰的问题,昆士兰大学决定停止后续临床试验,改造分子钳序列并重启临床试验。

引入 S-2P 突变及 Furin 酶切位点突变(RRAR 突变为 GSAS 或 GGAS)以稳定融合前构象,并在 S 蛋白胞外域 C 端引入 T4 纤维蛋白三聚标签,是一种广泛使用的获得融合前 S 蛋白三聚体抗原的设计方式。赛诺菲和葛兰素史克共同研发的 CoV2 preS dTM、基亚生物研发的 MVC-COV1901、上海泽润生物及沃森生物研发的 202-CoV 和依生生物研发的 YS-SC2-010 均基于该方案构建抗原,其中 CoV2 preS dTM 使用 AS03 佐剂, MVC-COV1901 和 202-CoV 使用 CpG/铝组合佐剂,YS-SC2-010 则选用了一种高效的低成本佐剂 PIKA。CoV2 preS dTM 的 I/II 期临床数据验证了该疫苗对原始毒株具有中和能力,正在推进的 III 期临床试验将评估突变株循环背景下该疫苗的保护效率^[66]。MVC-COV1901 的 I 期临床试验结果显示其对 Alpha 突变株具有可观的中和能力,但对 Beta 突变株的中和能力显著降低^[62]。目前该疫苗已在中国台湾批准上市,针对 Omicron 突变株的 III 期临床试验也将开启。202-CoV 和 YS-SC2-010 目前处于 I 期临床试验阶段,临床前数据均验证了疫苗对 Alpha/Beta 突变株的中和能力,YS-

SC2-010 还进一步验证了针对 Gamma/Delta/Omicron 突变株的中和能力^[64,80-81]。

S 蛋白还能以组装在纳米颗粒表面的方式形成抗原。诺瓦瓦克斯研发的 NVX-CoV2373 使用全长 S 蛋白作为抗原,因此无须引入外源标签,仅通过引入 S-2P 突变和 Furin 酶切位点突变(RRAR 突变为 QQAQ)即可将 S 蛋白三聚体稳定在融合前构象。在 Matrix-M 佐剂的帮助下,S 蛋白三聚体被组装在纳米颗粒表面,诱导强烈的免疫反应^[65]。该疫苗对原始毒株的保护效率为 96.4%^[82]。对于 Beta 突变株,该疫苗对 HIV 阴性受试者的保护效率降低至 60%^[83]。在以 Alpha 突变株为主(79%),Beta 和 Gamma 突变株多重循环的背景下,该疫苗对任意严重程度患者的预防效果达 92.6%^[84]。目前该疫苗已在英国、澳大利亚等 36 个国家获批。另外,由印度血清研究所负责生产的该疫苗被称为 Covovax,已被印度、印度尼西亚和菲律宾授权紧急使用。美国沃尔特里德陆军研究所基于铁蛋白纳米颗粒自组装技术,通过在 S 蛋白胞外域 C 端引入一种来自幽门螺杆菌的铁蛋白,研发了一款表面组装 24 个 S 蛋白三聚体的蛋白质纳米颗粒疫苗 SpFN。SpFN 引入 S-2P 突变和 Furin 酶切位点突变(RRAR 突变为 GSAS),并优化 C 端序列以提高三聚体的稳定性^[85]。铁蛋白纳米颗粒的安全性已在两款处于临床试验阶段的流感疫苗中得到验证^[86-88]。在 QS-21 佐剂的帮助下,SpFN 的临床前数据显示该疫苗对原始毒株产生了高水平的中和抗体,且对 Alpha、Beta 突变株甚至 SARS-CoV 假病毒均展现出中和能力^[89-91]。目前该疫苗正在开展 I 期临床试验。

此外,Vaxine/Cinnagen 研发的 COVAX-19[®] 是基于 S 蛋白和 Advax-SM 佐剂的亚单位疫苗,该疫苗能够诱导机体产生针对 Alpha/Beta/Gamma/Delta 突变株的中和抗体^[68,92]。目前 COVAX-19[®] 已被伊朗紧急授权使用。由萨斯喀彻温大学研发的 COVAC-2 和 Farmacore 研发的 Versamune-CoV-2FC 则选用 S1 蛋白作为疫苗抗原,其中 COVAC-2 选用一种类似 MF59 佐剂的 SWE 佐剂,两款疫苗的相关临床试验均在进行中^[93-94]。

3.2 基于 RBD 设计的亚单位疫苗

SARS-CoV-2 亚单位疫苗的另一种常用抗原为 RBD(表 2 和表 3)。RBD 具有多个已知的中和抗体识别表位,恢复期患者的血清中有 90% 的中和抗体靶向 RBD,因此 RBD 是中和抗体的主要靶点^[32,95]。基于

RBD 设计的亚单位疫苗可以根据抗原的组装形式进行分类。

RBD 单体可以作为亚单位疫苗的候选抗原。古巴基因工程与生物技术中心研发的 Abdala 和 Biological E 研发的 Corbevax 使用酵母表达系统表达 RBD, 并分别选用铝佐剂及 CpG/铝组合佐剂^[58,96]。其中, Corbevax 通过突变 C538 位点阻断二硫键造成的分子间聚集, 避免关键抗原表位被遮盖。虽然酵母具有过糖基化修饰能力, 但两款疫苗的抗原结合受体能力均未受到影响。Abdala 对原始毒株的保护效率达 92%, 针对 Beta/Delta 突变株的中和能力将在 III 期临床试验中得到评估^[97]。Corbevax 的 I/II 期临床数据显示出该疫苗对 Beta 和 Delta 突变株具有中和能力^[73]。目前, Abdala 和 Corbevax 已分别在古巴和印度获批上市。另外, 四川大学华西医院研发了一款使用 RBD 单体和铝佐剂的亚单位疫苗, 其有效的免疫原性已在 I/II 期临床试验中得到证明, 目前该疫苗正在进行 III 期临床试验^[98-99]。

二聚体形式的 RBD 是目前基于 RBD 进行亚单位疫苗研发使用最多的抗原设计形式。智飞龙科马与中国科学院微生物研究所共同研发的 ZF2001 由串联重复的 RBD 二聚体和铝佐剂组成^[53]。III 期临床数据显示, ZF2001 对任何严重程度的 COVID-19 患者的保护效率达 81.67%, 对 Alpha 和 Delta 突变株的保护效率分别是 92.93% 和 77.54%^[74,100]。目前 ZF2001 已在中国获批使用。古巴芬利疫苗研究所研发的 Soberana 01 和 Soberana Plus 均使用二聚 RBD 抗原和铝佐剂, 其 RBD 的二聚化通过二硫键实现^[60]。为了进一步增强抗原的免疫原性, Soberana 01 在佐剂中加入脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*, NM) 的外膜囊泡, 其免疫增强能力在 I 期临床试验中得到证明。Baiya Phytopharm 研发的 VAX1、格罗宁根大学医学中心和 Akston 研发的 AKS-452、丽珠医药研发的 V-01 和 Vaxxinity 研发的 UB-612 通过引入 IgG 的 Fc 结构域帮助 RBD 组成二聚体^[56,101-103]。其中, AKS-452 使用乳剂型佐剂 Montanide ISA 720 提高抗原的免疫原性; V-01 在 RBD-Fc 的 N 端引入 α 干扰素 (interferon- α , IFN- α), 并辅助以铝佐剂; UB-612 则添加 SARS-CoV-2 高保守性多肽和 Vaxxinity 的专利多肽 UBith® 1a, 在 CpG/磷酸铝组合佐剂的帮助下, 刺激更广泛的免疫反应。上述疫苗除 ZF2001 和 Soberana Plus 外, 均在相关临床试验。

三聚体形式的 RBD 也在目前的亚单位疫苗研发中用作候选抗原。中国生物研究院研发的 NVSI-06-07 基于计算生物学设计, 在不引入外源连接臂的前提下, 三个同源 RBD 通过自组装的方式形成稳定的三聚体^[55]。由瑞科生物研发的 ReCOV 疫苗的抗原包含 S 蛋白的 N 端结构域和 RBD, 通过 T4 纤维蛋白标签实现三聚体抗原的表达^[104]。该疫苗同时加入一种类似 AS03 佐剂的 BFA03 佐剂以增强免疫原性。临床前数据初步证明了两款疫苗对 Alpha/Beta/Gamma/Delta 突变株具有中和能力。

由于能够通过增加抗原密度的方式提高免疫原性, 将 RBD 组装在纳米颗粒表面在目前的疫苗设计中也得到广泛使用。古巴芬利疫苗研究所研发的 Soberana 02 将 RBD 偶联破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT), 通过 TT 的自组装形成一个表面携带多个 RBD 的大分子结构, 加入铝佐剂后, 可以诱导产生高水平的中和抗体^[76]。III 期临床数据显示, 在 Beta/Delta 突变株流行的背景下, Soberana 02 具有 71% 的交叉保护效率^[57]。目前该疫苗已在古巴获批使用, 同时针对包括 Omicron 突变株在内的临床试验正在进行中。在 RBD 抗原的基础上, 美国肯塔基州生物加工公司研发的 KBP-201 通过加入植物细胞表达的烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV), 得到携带大量 RBD 的 TMV 颗粒。该疫苗使用 CpG 佐剂^[105]。EuBiologics 研发的 EuCorVac-19 在抗原制备时, 通过加入脂质体的方式将大量 RBD 组装在脂质体颗粒表面, 并加入单磷酸酯 A/QS-21 混合佐剂^[106]。SK 和 CEPI 共同研发的 GBP510 则通过在抗原组分中加入计算机设计的 I53-50 蛋白, 形成一个表面嵌合 60 个 RBD 的纳米颗粒, 分别加入 AS03 佐剂或铝佐剂作为两种候选疫苗^[59]。目前 Soberana 02、KBP-201、EuCorVac-19 和 GBP510 的相关临床试验均在进行中。

3.3 基于特定抗原表位设计的多肽疫苗

俄罗斯矢量国家病毒与生物技术研究中心研发了一款基于合成多肽的亚单位疫苗 EpiVacCorona, 目前已被批准在俄罗斯本土使用。考虑到针对病毒突变株的保护效率, 该疫苗从 S 蛋白的保守区域选择能够诱导保护性中和抗体产生的特定抗原表位, 并合成到多肽片段中^[37]。为了提高多肽片段的免疫原性, 该疫苗选用高免疫原性的 N 蛋白作为载体蛋白, 并加入铝佐剂^[107]。俄国卫星通讯社称该疫苗的保护效率达

100%,对包括 Omicron 在内的所有流行突变株均有效,且不存在安全问题,但暂未公开临床数据^[108]。图宾根大学研发的 CoVac-1 从 S/N/E/M 结构蛋白及可读框 8 (open reading frame 8, ORF8) 中筛选抗原表位,设计能够诱导广泛免疫反应的多肽片段^[109]。该疫苗选用 XS15/Montanide ISA51 VG 组合佐剂以避免多肽在体内快速降解,从而诱导长效的免疫反应。目前该疫苗正在进行 I/II 期临床试验。

4 SARS-CoV-2 亚单位疫苗的现状与挑战

截至目前,疫苗仍然是预防 SARS-CoV-2 感染、降低 COVID-19 患者重症率的有效方法之一。但是,不断出现的病毒突变株也对疫苗的保护效率发起了挑战。为了解决疫苗对病毒突变株保护效率有限的问题,各研发单位正在评估注射加强针的接种方案。目前,中国已正式将 ZF2001 作为国药中生/科兴灭活病毒疫苗的加强针,阿联酋也紧急批准 NVSI-06-07 作为国药中生灭活病毒疫苗的加强针。这两类疫苗接种方案的临床数据均证明异源加强针能够诱导针对野生型毒株及 Alpha/Beta/Delta 三种突变株更高水平的中和抗体^[54,110-111]。NVSI-06-07 还展现出针对 Omicron 突变株的高中和抗体水平。古巴将 Soberana Plus 作为 Soberana 02 的异源加强针,该接种方案能够进一步增加中和抗体滴度和最终保护效率^[57]。NVX-CoV2373、MVC-COV1901 和 Soberana 02 正在开展 III/IV 期临床试验,评估 NVX-CoV2373 作为国药中生灭活病毒疫苗的加强针、MVC-COV1901 作为莫德纳 mRNA 疫苗的加强针、Soberana 02 作为国药中生灭活病毒疫苗或阿斯利康腺病毒疫苗的加强针的接种方案对流行突变株的保护能力。此外,COVAX-19[®] 也计划开展加强针相关的临床试验。亚单位疫苗异源加强针接种方案的有效性已由临床数据初步证明,该策略对突变株流行背景下的疫情控制起到一定的指导作用,但由于目前处于主导地位的是 Omicron 突变株,各类疫苗的临床试验均应评估针对该突变株的保护效率。

为了应对已出现及未来可能出现的新型突变株,突变株改良型及广谱型亚单位疫苗的研发工作也在持

续开展中。高免疫逃逸性的 Beta 突变株已被多个研发单位选为疫苗抗原并开启相关临床试验,如基于 Beta 突变株 S 蛋白的 SCB-2020S (三叶草) 和 SII B. 1. 351 (诺瓦瓦克斯),以及基于 Beta 突变株和野生型 S 蛋白的二价亚单位疫苗 SII Bivalent (诺瓦瓦克斯) 和 Bivalent (2-antigen) vaccine (赛诺菲/葛兰素史克)^[112-114]。其中诺瓦瓦克斯研发的疫苗沿用 Martix-M 佐剂,三叶草则使用自主研发的 CAS-1 佐剂。此外,由 Alpha/Beta 突变株 RBD 组成的二价疫苗 PHH-1V (Hipra),以及由野生型/Beta/Kappa 突变株 RBD 组成的三价疫苗 NVSI-06-08 (中国生物研究院) 均已进入临床试验阶段,临床前数据均证明疫苗对 Alpha/Beta/Gamma/Delta 突变株具有保护能力^[55,115]。NVSI-06-08 是在 NVSI-06-07 的基础上,根据突变株的免疫逃逸能力和进化规律进行抗原选择和设计的。Kappa 突变株由于也具有一定的免疫逃逸能力,被归类为感兴趣的突变株^[116]。与 NVSI-06-07 相比,NVSI-06-08 展现出对突变株更强的广谱中和能力。临床数据显示,与国药中生灭活病毒疫苗同源加强针及 NVSI-06-07 加强针相比,NVSI-06-08 可诱导更高水平的针对野生型及包括 Omicron 在内的所有需关注突变株的中和抗体^[75]。目前该疫苗已在阿联酋获批紧急使用,作为国药中生灭活病毒疫苗的异源加强针,评估其安全性和免疫原性的 III 期临床试验仍在进行中。诺瓦瓦克斯还研发了一款使用 Delta 突变株 S 蛋白作为抗原的 SII B. 1. 617. 2,该疫苗也正处于临床试验阶段^[112]。

亚单位疫苗依据抗原蛋白的特定功能及抗原表位进行抗原的挑选和优化,限定了免疫细胞的识别范围,未在临床试验中发现严重副作用。在实际应用当中,亚单位疫苗抗原的生产基于成熟的蛋白质表达工业体系,能够保证疫苗的 stable 供应。此外,亚单位疫苗对保存和运输温度没有苛刻要求,在价格和成本上均具有一定优势,对中低收入国家更为友好。在提供安全性、有效性的同时,亚单位疫苗也能够满足生产、运输、供应等多个环节的需求,成为对突发疾病蔓延和大流行做出快速反应的重要候选疫苗体系。

表 3 处于临床研究阶段的主要 SARS-CoV-2 亚单位疫苗
Table 3 Major SARS-CoV-2 subunit vaccines in clinical study

候选疫苗名称	序列及抗原优化	研发单位	佐剂	临床进展	表达系统	参考文献
基于 S 蛋白设计的亚单位疫苗						
COVAC-2	S1 *	萨斯喀彻温大学	SWE	2, NCT05209009	/	[93]
Versamune-CoV-2FC	S1 *	Farmacore	/	1/2, NCT05016934	/	[94]
SCB-2019	1 ~ 1211 a. a. C 端引入三聚化标签	三叶草生物制药/ 德纳维制药	CpG/ 铝佐剂	3, NCT05012787	哺乳动物细胞	[61,78]
S-clamp	1 ~ 1204 a. a. 将 680 ~ 690 a. a. 替换为 GSG, C 端引入 clamp 三聚标签	CSL/Seqirus/ 昆士兰大学	MF59	2/3, NCT04806529	哺乳动物细胞	[67]
CoV2 preS dTM	1 ~ 1208 a. a. R682G/R683S/R685S/K986P/V987P, C 端连接 T4 纤维蛋白三聚标签	赛诺菲/ 葛兰素史克	AS03	3, NCT05124171 PACTR202011523101903	昆虫细胞	[66]
MVC-COV1901 **	1 ~ 1208 a. a. R682G/R683S/R685S/K986P/V987P, C 端连接 T4 纤维蛋白三聚标签	基亚生物	CpG/ 铝佐剂	4, NCT05079633	哺乳动物细胞	[62,69,117]
202-CoV	R682G/R683G/A684S/R685G/K986P/V987P, C 端连接 T4 纤维蛋白三聚标签 *	上海泽润生物/ 沃森生物	CpG/ 铝佐剂	1, NCT04982068	哺乳动物细胞	[64]
YS-SC2-010	1 ~ 1208 a. a. R682G/R683S/R685S/K986P/V987P, C 端连接 T4 纤维蛋白三聚标签	依生生物	PIKA	1, ACTRN12621001009808	哺乳动物细胞	[80-81,118]
COVAX-19® (Spikogen®) **	/ *	Vaxine/Cinnagen	Advax-SM	3, IRCT 20150303021315N24	昆虫细胞	[68,119]
SCB-2020S	Beta 突变株 *	三叶草生物制药	CAS-1	2, NCT04950751	哺乳动物细胞	[114]
Bivalent (2-antigen) vaccine	野生型及 Beta 突变株 *	赛诺菲/ 葛兰素史克	/	3, NCT04904549	昆虫细胞	[113]
基于 S 蛋白设计的纳米颗粒亚单位疫苗						
NVX-CoV2373 **	1 ~ 1273 a. a. R682Q/R683Q/R685Q/K986P/V987P	诺瓦瓦克斯	Matrix-M	3, NCT04611802	昆虫细胞	[65,71,120]
SpFN	12 ~ 1158 a. a. R682G/R683S/R685S/K986P/V987P, C 端突变修饰并连接铁蛋白	美国沃尔特里德 陆军研究所	QS-21	1, NCT04784767	哺乳动物细胞	[85,91]
SII B. 1. 351	Beta 突变株 *	诺瓦瓦克斯	Matrix-M	1/2, NCT05029856	昆虫细胞	[112]
SII B. 1. 617. 2	Delta 突变株 *	诺瓦瓦克斯	Matrix-M	1/2, NCT05029858	昆虫细胞	[112]
SII Bivalent	野生型及 Beta 突变株 *	诺瓦瓦克斯	Matrix-M	1/2, NCT05029857	昆虫细胞	[112]
基于 RBD 单体设计的亚单位疫苗						
Recombinant COVID-19 Vaccine (Sf9 cells)	319 ~ 545 a. a.	中国四川大学 华西医院	铝佐剂	3, NCT04887207	昆虫细胞	[98-99]
Abdala (CIGB-66) **	331 ~ 529 a. a.	古巴基因工程与 生物技术中心	铝佐剂	3, RPCEC00000359	酵母	[58,97,121]
Corbevax **	332 ~ 549 a. a. C538A	Biological E	CpG/ 铝佐剂	3, CTRI/2021/ 08/036074	酵母	[63,122]

(续表 3)

候选疫苗名称	序列及抗原优化	研发单位	佐剂	临床进展	表达系统	参考文献
基于 RBD 二聚体设计的亚单位疫苗						
Soberana 01	319 ~ 541 a. a.	古巴芬利疫苗研究所	铝佐剂/脑膜炎奈瑟菌外膜囊泡	2, RPCEC00000366	哺乳动物细胞	[60]
VAX1	C 端连接 Fc 蛋白 *	Baiya Phytopharm	/	1, NCT04953078	植物细胞	[103]
AKS-452	C 端连接 Fc 蛋白 *	格罗宁根大学医学中心/Akston	Montanide ISA 720	2, NCT05124483	哺乳动物细胞	[102]
V-01	319 ~ 541 a. a. N 端连接 IFN- α , C 端连接 Fc 蛋白	丽珠医药	铝佐剂	3, NCT05096832	哺乳动物细胞	[56]
UB-612	340 ~ 359 a. a. C 端连接 Fc 蛋白, 并加入 SARS-CoV-2 高保守性多肽和公司专利多肽 UBITH [®] 1a	Vaxxinity	CpG/AlPO ₄	2/3, NCT04683224	哺乳动物细胞	[101]
PHH-1V	333 ~ 526 a. a. Alpha 突变株 (N501Y) 和 Beta 突变株 (K417N/E484K/N501Y)	Hipra	/	3, NCT05246137	哺乳动物细胞	[115]
基于 RBD 三聚体设计的亚单位疫苗						
ReCOV	N 端连接 S 蛋白 N 端结构域, C 端连接 T4 纤维蛋白标签 *	瑞科生物	BFA03	2/3, NCT05084989	哺乳动物细胞	[104]
NVSI-06-08 **	319 ~ 537 a. a. 野生型, Beta 突变株 (K417N/E484K/N501Y) 及 Kappa 突变株 (L452R/E484K)	中国生物研究院	铝佐剂	1/2, NCT05069129	哺乳动物细胞	[55, 123]
基于 RBD 设计的纳米颗粒亚单位疫苗						
Soberana 02 **	319 ~ 541 a. a. C 端连接 TT 蛋白	古巴芬利疫苗研究所	铝佐剂	3, RPCEC00000354	哺乳动物细胞	[76, 124]
KBP-201	加入 TMV *	美国肯塔基州生物加工公司	CpG	1/2, NCT04473690	烟草植物细胞	[125]
EuCorVac-19	319 ~ 541 a. a. 加入脂质体	EuBiologics	单磷酸酯 A/QS-21	1/2, NCT04783311	哺乳动物细胞	[106]
GBP510	328 ~ 531 a. a. 加入 I53-50 蛋白	SK/CEPI	AS03 或铝佐剂	3, NCT05007951	哺乳动物细胞	[59]
基于多肽设计的亚单位疫苗						
CoVac-1	S ^{235 ~ 249} /N ^{50 ~ 64, 221 ~ 235} / E ^{56 ~ 70} /M ^{176 ~ 190} /ORF8 ^{43 ~ 57}	图宾根大学	XS15/ Montanide ISA51 VG	1/2, NCT04954469	化学合成	[109]

*The sequence of antigen is not available
**SARS-CoV-2 subunit vaccine that has been marketed or approved for emergency use

参考文献

[1] Zhu N, Zhang D Y, Wang W L, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(8) : 727-733.

[2] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature, 2020, 579 (7798) : 265-269.

[3] Doherty M, Schmidt-Ott R, Santos J I, et al. Vaccination of special populations: protecting the vulnerable. Vaccine, 2016, 34(52) : 6681-6690.

[4] Lee A R Y B, Wong S Y, Chai L Y A, et al. Efficacy of COVID-19 vaccines in immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis. BMJ (Clinical Research Ed), 2022, 376: e068632.

[5] Cui J, Li F, Shi Z L. Origin and evolution of pathogenic

- coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17 (3): 181-192.
- [6] Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 2003, 348 (20): 1967-1976.
- [7] Zaki A M, van Boheemen S, Bestebroer T M, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England Journal of Medicine*, 2012, 367 (19): 1814-1820.
- [8] Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579 (7798): 270-273.
- [9] Yao H P, Song Y T, Chen Y, et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, 2020, 183(3): 730-738. e13.
- [10] 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. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280. e8.
- [11] Wrapp D, Wang N S, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [12] Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020, 581 (7807): 215-220.
- [13] Shang J, Ye G, Shi K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, 581 (7807): 221-224.
- [14] Wang Q H, Zhang Y F, Wu L L, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 2020, 181(4): 894-904. e9.
- [15] Cai Y F, Zhang J, Xiao T S, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, 2020, 369 (6511): 1586-1592.
- [16] Ke Z, Oton J, Qu K, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, 2020, 588 (7838): 498-502.
- [17] Lauring A S, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(7): e1001005.
- [18] Li Q Q, Wu J J, Nie J H, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell*, 2020, 182(5): 1284-1294. e9.
- [19] Volz E, Hill V, McCrone J T, et al. Evaluating the effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity. *Cell*, 2021, 184(1): 64-75. e11.
- [20] Garcia-Beltran W F, Lam E C, St Denis K, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*, 2021, 184(9): 2372-2383. e9.
- [21] Faria N R, Mellan T A, Whittaker C, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*, 2021, 372(6544): 815-821.
- [22] Dhar M S, Marwal R, Vs R, et al. Genomic characterization and epidemiology of an emerging SARS-CoV-2 variant in Delhi, India. *Science*, 2021, 374(6570): 995-999.
- [23] Tegally H, Wilkinson E, Lessells R J, et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa. *Nature Medicine*, 2021, 27 (3): 440-446.
- [24] Yadav P D, Gupta N, Potdar V, et al. Isolation and genomic characterization of SARS-CoV-2 Omicron variant obtained from human clinical specimens. *Viruses*, 2022, 14(3): 461.
- [25] Davies N G, Abbott S, Barnard R C, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, 2021, 372(6538): eabg3055.
- [26] Wang P, Nair M S, Liu L, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*, 2021, 593 (7857): 130-135.
- [27] Wang P F, Casner R G, Nair M S, et al. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(5): 747-751. e4.
- [28] Li B, Deng A, Li K, et al. Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. *Nature Communications*, 2022, 13: 460.
- [29] Cele S, Jackson L, Khoury D S, et al. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature*, 2022, 602 (7898): 654-656.
- [30] Liu L, Iketani S, Guo Y, et al. Striking antibody evasion manifested by the *Omicron variant* of SARS-CoV-2. *Nature*, 2022, 602 (7898): 676-681.
- [31] Ge J, Wang R, Ju B, et al. Antibody neutralization of SARS-CoV-2 through ACE2 receptor mimicry. *Nature Communications*, 2021, 12: 250.
- [32] Piccoli L, Park Y J, Tortorici M A, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell*, 2020, 183(4): 1024-1042. e21.
- [33] Barnes C O, West A P Jr, Huey-Tubman K E, et al. Structures of human antibodies bound to SARS-CoV-2 spike reveal common epitopes and recurrent features of antibodies. *Cell*, 2020, 182 (4): 828-842. e16.
- [34] Pallesen J, Wang N S, Corbett K S, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(35): E7348-E7357.
- [35] Chattopadhyay S, Chen J Y, Chen H W, et al. Nanoparticle

- vaccines adopting virus-like features for enhanced immune potentiation. *Nanotheranostics*, 2017, 1(3): 244-260.
- [36] Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 2014, 32(3): 327-337.
- [37] Ryzhikov A B, Ryzhikov E A, Bogryantseva M P, et al. Immunogenicity and protectivity of the peptide candidate vaccine against SARS-CoV-2. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2021, 76(1): 5-19.
- [38] Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith J A, et al. Beyond shielding: the roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Central Science*, 2020, 6(10): 1722-1734.
- [39] Walls A C, Tortorici M A, Frenz B, et al. Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(10): 899-905.
- [40] Walls A C, Xiong X L, Park Y J, et al. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion. *Cell*, 2019, 176(5): 1026-1039. e15.
- [41] Çelik E, Çalı P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(5): 1108-1118.
- [42] Shanmugaraj B, Bulaon C J I, Phoolcharoen W. Plant molecular farming: a viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(7): 842.
- [43] 郝宇婷, 陆琳, 杨志红. 转基因植物疫苗的研究进展. *核农学报*, 2020, 34(12): 2708-2724.
- Hao Y P, Lu L, Yang Z H. Progress on transgenic plants vaccines. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(12): 2708-2724.
- [44] Luo M, Shao B, Yu J Y, et al. Simultaneous enhancement of cellular and humoral immunity by the high salt formulation of Al (OH)₃ adjuvant. *Cell Research*, 2017, 27(4): 586-589.
- [45] 张林焱, 周旭. 疫苗用氢氧化铝佐剂的研究现状. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(2): 213-215, 221.
- Zhang L Y, Zhou X. Research status of aluminum hydroxide adjuvant for vaccine. *Chinese Journal of Biologicals*, 2020, 33(2): 213-215, 221.
- [46] Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 2011, 10(4): 499-511.
- [47] Gordon D L, Sajkov D, Honda-Okubo Y, et al. Human phase 1 trial of low-dose inactivated seasonal influenza vaccine formulated with Advax? delta inulin adjuvant. *Vaccine*, 2016, 34(33): 3780-3786.
- [48] Gordon D, Kelley P, Heinzel S, et al. Immunogenicity and safety of Advax™, a novel polysaccharide adjuvant based on delta inulin, when formulated with hepatitis B surface antigen: a randomized controlled phase 1 study. *Vaccine*, 2014, 32(48): 6469-6477.
- [49] Garçon N, Vaughn D W, Didierlaurent A M. Development and evaluation of AS03, an adjuvant system containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Review of Vaccines*, 2012, 11(3): 349-366.
- [50] Cohet C, van der Most R, Bauchau V, et al. Safety of AS03-adjuvanted influenza vaccines: a review of the evidence. *Vaccine*, 2019, 37(23): 3006-3021.
- [51] Black S, Della Cioppa G, Malfroot A, et al. Safety of MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines in children and adolescents: an integrated analysis. *Vaccine*, 2010, 28(45): 7331-7336.
- [52] Bengtsson K L, Song H F, Stertman L, et al. Matrix-M adjuvant enhances antibody, cellular and protective immune responses of a Zaire Ebola/Makona virus glycoprotein (GP) nanoparticle vaccine in mice. *Vaccine*, 2016, 34(16): 1927-1935.
- [53] Dai L P, Zheng T Y, Xu K, et al. A universal design of *Betacoronavirus* vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*, 2020, 182(3): 722-733. e11.
- [54] AlKaabi N, Yang Y K, Zhang J, et al. Safety and immunogenicity of a heterologous boost with a recombinant vaccine, NVSI-06-07, in the inactivated vaccine recipients from UAE: a phase 2 randomised, double-blinded, controlled clinical trial. *medRxiv*, 2022. DOI:10.1101/2021.12.29.21268499.
- [55] Liang Y, Zhang J, Yuan R Y, et al. Design of a mutation-integrated trimeric RBD with broad protection against SARS-CoV-2. *Cell Discovery*, 2022, 8: 17.
- [56] Sun S, Cai Y, Song T Z, et al. Interferon-armed RBD dimer enhances the immunogenicity of RBD for sterilizing immunity against SARS-CoV-2. *Cell Research*, 2021, 31(9): 1011-1023.
- [57] Toledo-Romani M E, Garcia-Carmenate M, Silva C V, et al. Efficacy and safety of Soberana 02, a COVID-19 conjugate vaccine in heterologous three-dose combination. *medRxiv*, 2021. DOI:10.1101/2021.10.31.21265703.
- [58] Limonta-Fernández M, Chinea-Santiago G, Martín-Dunn A M, et al. The SARS-CoV-2 receptor-binding domain expressed in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. *medRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.06.29.21259605.
- [59] Walls A C, Fiala B, Schäfer A, et al. Elicitation of potent neutralizing antibody responses by designed protein nanoparticle vaccines for SARS-CoV-2. *Cell*, 2020, 183(5): 1367-1382. e17.
- [60] Pérez-Rodríguez S, de la Caridad Rodríguez-González M, Ochoa-Azce R, et al. A randomized, double-blind phase I clinical trial of two recombinant dimeric RBD COVID-19 vaccine candidates: safety, reactogenicity and immunogenicity. *Vaccine*, 2022, 40(13): 2068-2075.

- [61] 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. *The Lancet*, 2022, 399(10323): 461-472.
- [62] Lien C E, Kuo T Y, Lin Y J, et al. Evaluating the neutralizing ability of a CpG-adjuvanted S-2P subunit vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants of concern. *Clinical Infectious Diseases; an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2021, 2021Nov5: ciab711.
- [63] Nanishi E, Borriello F, O' Meara T R, et al. An aluminum hydroxide; CpG adjuvant enhances protection elicited by a SARS-CoV-2 receptor binding domain vaccine in aged mice. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(629): eabj5305.
- [64] Liu H T, Zhou C L, An J, et al. Development of recombinant COVID-19 vaccine based on CHO-produced, prefusion spike trimer and alum/CpG adjuvants. *Vaccine*, 2021, 39(48): 7001-7011.
- [65] Tian J H, Patel N, Haupt R, et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nature Communications*, 2021, 12: 372.
- [66] Sridhar S, Joaquin A, Bonaparte M I, et al. Safety and immunogenicity of an AS03-adjuvanted SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine (CoV2 preS dTM) in healthy adults: interim findings from a phase 2, randomised, dose-finding, multicentre study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022, S1473- (21)00764-7.
- [67] Watterson D, Wijesundara D K, Modhiran N, et al. Preclinical development of a molecular clamp-stabilised subunit vaccine for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Clinical & Translational Immunology*, 2021, 10(4): e1269.
- [68] Li L, Honda-Okubo Y, Huang Y, et al. Immunisation of ferrets and mice with recombinant SARS-CoV-2 spike protein formulated with Advax-SM adjuvant protects against COVID-19 infection. *Vaccine*, 2021, 39(40): 5940-5953.
- [69] 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. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2021, 9(12): 1396-1406.
- [70] Keech C, Albert G, Cho I, et al. Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(24): 2320-2332.
- [71] Novavax. The registered clinical trials of Nuvaxovid. [2022-04-18]. <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/25/>.
- [72] Serum Institute of India. The registered clinical trials of COVOVAX (Novavax formulation). [2022-04-18]. <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/123/>.
- [73] Thuluv S, Paradkar V, Turaga K, et al. Selection of optimum formulation of RBD-based protein sub-unit COVID-19 vaccine (Corbevax) based on safety and immunogenicity in an open-label, randomized phase-1 and 2 clinical studies. *medRxiv*, 2022. DOI:10.1101/2022.03.08.22271822.
- [74] Zhao X, Zheng A Q, Li D D, et al. Neutralization of recombinant RBD-subunit vaccine ZF2001-elicited antisera to SARS-CoV-2 variants including Delta. *bioRxiv*, 2021. DOI:10.1101/2021.07.15.452504.
- [75] Kaabi N A, Yang Y K, Du L F, et al. Safety and immunogenicity of a hybrid-type vaccine booster in BBIBP-CorV recipients; a randomized controlled phase 2 trial. *medRxiv*, 2022. DOI:10.1101/2022.03.08.22272062.
- [76] Valdes-Balbin Y, Santana-Mederos D, Quintero L, et al. SARS-CoV-2 RBD-tetanus toxoid conjugate vaccine induces a strong neutralizing immunity in preclinical studies. *ACS Chemical Biology*, 2021, 16(7): 1223-1233.
- [77] Liu H, Su D, Zhang J, et al. Improvement of pharmacokinetic profile of TRAIL via trimer-tag enhances its antitumor activity *in vivo*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 8953.
- [78] Liang J G, Su D, Song T Z, et al. S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates. *Nature Communications*, 2021, 12: 1346.
- [79] 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. *The Lancet Infectious Diseases*, 2021, 21(10): 1383-1394.
- [80] Liu Y, Zhang N, Wang B, et al. Broad and long-lasting immune response against SARS-CoV-2 Omicron and other variants by PIKA-adjuvanted recombinant SARS-CoV-2 spike (S) protein subunit vaccine (YS-SC2-010). *bioRxiv*, 2021. DOI:10.1101/2021.12.22.473615.
- [81] Tong J, Zhu C X, Lai H Y, et al. Potent neutralization antibodies induced by a recombinant trimeric spike protein vaccine candidate containing PIKA adjuvant for COVID-19. *Vaccines*, 2021, 9(3): 296.
- [82] Heath P T, Galiza E P, Baxter D N, et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(13): 1172-1183.
- [83] Shinde V, Bhikha S, Hoosain Z, et al. Efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine against the B.1.351 variant. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(20): 1899-1909.
- [84] Dunkle L M, Kotloff K L, Gay C L, et al. Efficacy and safety of

- NVX-CoV2373 in adults in the United States and Mexico. The New England Journal of Medicine, 2022, 386(6): 531-543.
- [85] Powell A E, Zhang K M, Sanyal M, et al. A single immunization with spike-functionalized ferritin vaccines elicits neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in mice. ACS Central Science, 2021, 7(1): 183-199.
- [86] Kanekiyo M, Wei C J, Yassine H M, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. Nature, 2013, 499 (7456): 102-106.
- [87] Yassine H M, Boyington J C, McTamney P M, et al. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. Nature Medicine, 2015, 21 (9): 1065-1070.
- [88] 李志鹏, 刘庆友, 石德顺. 铁蛋白纳米颗粒应用于生物医疗领域的研究进展. 生物技术通报, 2015, 31(10): 38-47.
- Li Z P, Liu Q Y, Shi D S. Research progress on application of ferritin nanoparticles in the field of biomedicine. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(10): 38-47.
- [89] Joyce M G, Chen W H, Sankhala R S, et al. SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccines elicit broad SARS coronavirus immunogenicity. Cell Reports, 2021, 37(12): 110143.
- [90] Joyce M G, King H A D, Naouar I E, et al. Efficacy of a broadly neutralizing SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine in nonhuman Primates. bioRxiv, 2021. DOI:10.1101/2021.03.24.436523.
- [91] Carmen J M, Shrivastava S, Lu Z, et al. SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine induces robust innate immune activity driving polyfunctional spike-specific T cell responses. NPJ Vaccines, 2021, 6(1): 151.
- [92] Vaxine. COVAX-19[®] vaccine project of Vaxine. [2022-04-18]. <https://vaxine.net/projects/>.
- [93] University of Saskatchewan. A clinical trial of COVAC-2 in adults. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05209009>.
- [94] Hospital do Coracao. Evaluation of safety and immunogenicity of a novel vaccine for prevention of COVID-19 in adults previously immunized. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05016934>.
- [95] Renn A, Fu Y, Hu X, et al. Fruitful neutralizing antibody pipeline brings hope to defeat SARS-CoV-2. Trends in Pharmacological Sciences, 2020, 41(11): 815-829.
- [96] 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. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2021, 17(8): 2356-2366.
- [97] Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Phase III clinical study of Abdala. [2022-04-18]. <https://www.cigb.edu.cu/en/product/abdala-cigb-66-2/>.
- [98] Meng F Y, Gao F, Jia S Y, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant COVID-19 vaccine (Sf9 cells) in healthy population aged 18 years or older: two single-center, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and phase 2 trials. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6: 271.
- [99] Yang J, Wang W, Chen Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. Nature, 2020, 586 (7830): 572-577.
- [100] Huang B Y, Dai L P, Wang H, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 VOC 501Y. V2 by human antisera elicited by both inactivated BBIBP-CorV and recombinant dimeric RBD ZF2001 vaccines. bioRxiv, 2021. DOI:10.1101/2021.02.01.429069.
- [101] Guirakhoo F, Kuo L, Peng J, et al. A novel SARS-CoV-2 multipeptide protein/peptide vaccine candidate is highly immunogenic and prevents lung infection in an adeno associated virus human angiotensin-converting enzyme 2 (AAV hACE2) mouse model. bioRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.11.30.399154.
- [102] University Medical Center Groningen. Combinatorial phase I/II safety, tolerability and immunogenicity single center open-label clinical study of AKS-452 COVID-19 vaccination study. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04681092>.
- [103] Baiya Phytopharm. A study to evaluate safety, tolerability, and reactogenicity of an RBD-Fc-based vaccine to prevent COVID-19. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04953078>.
- [104] Yu J P, Yao W R, Hu Y S, et al. A trimeric NTD and RBD SARS-CoV-2 subunit vaccine induced protective immunity in CAG-hACE2 transgenic mice and rhesus macaques. bioRxiv, 2021. DOI:10.1101/2021.11.03.467182.
- [105] Maharjan P M, Choe S. Plant-based COVID-19 vaccines: current status, design, and development strategies of candidate vaccines. Vaccines, 2021, 9(9): 992.
- [106] Huang W C, Zhou S Q, He X D, et al. SARS-CoV-2 RBD neutralizing antibody induction is enhanced by particulate vaccination. Advanced Materials, 2020, 32(50): 2005637.
- [107] Zheng N Y, Xia R, Yang C P, et al. Boosted expression of the SARS-CoV nucleocapsid protein in tobacco and its immunogenicity in mice. Vaccine, 2009, 27(36): 5001-5007.
- [108] Interfax. EpiVacCorona vaccine to be efficacious against Omicron variant. [2022-04-18]. <https://interfax.com/newsroom/top-stories/73354/>.
- [109] Heitmann J S, Bilich T, Tandler C, et al. A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. Nature, 2022, 601 (7894): 617-622.

- [110] Cao Y, Hao X, Wang X, et al. Humoral immunogenicity and reactogenicity of CoronaVac or ZF2001 booster after two doses of inactivated vaccine. *Cell Research*, 2022, 32 (1): 107-109.
- [111] Ai J, Zhang H, Zhang Q, et al. Recombinant protein subunit vaccine booster following two-dose inactivated vaccines dramatically enhanced anti-RBD responses and neutralizing titers against SARS-CoV-2 and variants of concern. *Cell Research*, 2022, 32 (1): 103-106.
- [112] Novavax. Evaluation of the safety and immunogenicity of SII Vaccine constructs based on the SARS-CoV-2 (COVID-19) variant in adults. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05029856>.
- [113] Sanofi. Sanofi and GSK announce positive preliminary booster data for their COVID-19 vaccine candidate and continuation of phase 3 trial per independent monitoring board recommendation. [2022-04-18]. <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2021/2021-12-15-07-30-00-2352255>.
- [114] Clover Biopharmaceuticals. Immunogenicity and safety of adjuvanted SCB-2020S vaccines in adults. [2022-04-18]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04950751>.
- [115] Barreiro A, Prenafeta A, Bech-Sabat G, et al. Preclinical efficacy, safety, and immunogenicity of PHH-1V, a second-generation COVID-19 vaccine candidate based on a novel recombinant RBD fusion heterodimer of SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2021. DOI:10.1101/2021.11.22.469117.
- [116] Saville J W, Mannar D, Zhu X, et al. Structural and biochemical rationale for enhanced spike protein fitness in delta and kappa SARS-CoV-2 variants. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 742.
- [117] National Taiwan University Hospital. A heterologous prime-boost study to evaluate immunogenicity and safety of mRNA-1273 with MVC-COV1901 in adults. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05079633>.
- [118] Yisheng Biopharma. To evaluate the safety, tolerability, and immunogenicity of a PIKA-adjuvanted recombinant SARS-CoV-2 spike (S) protein subunit vaccine in healthy individuals. [2022-04-18]. <https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=382358&isReview=true>.
- [119] CinnaGen Company. A phase III, randomized, two-armed, double-blind, placebo controlled trial to evaluate efficacy and safety of an adjuvanted recombinant SARS-CoV-2 spike (S) protein subunit vaccine (Spikogen® produced by CinnaGen Co. [2022-04-18]. <https://en.irct.ir/trial/57559>.
- [120] Novavax. A study to evaluate the efficacy, immune response, and safety of a COVID-19 vaccine in adults ≥ 18 years with a pediatric expansion in adolescents (12 to < 18 years) at risk for SARS-CoV-2. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04611802>.
- [121] Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial for the evaluation in adults of the efficacy, safety and immunogenicity of the vaccine candidate CIGB-66 against SARS-CoV-2. [2022-04-18]. <https://rpcec.sld.cu/trials/RPCEC00000359-En>.
- [122] Biological E Limited. A prospective, single-blind, randomized, active-controlled phase III clinical study to evaluate the immunogenicity and safety of Biological E's Corbevax vaccine for protection against COVID-19 disease when administered to RT-PCR negative adult subjects. [2022-04-18]. <http://www.ctri.nic.in/Clinicaltrials/pmaindet2.php?trialid=59772>.
- [123] National Vaccine and Serum Institute, China. Clinical trial on sequential immunization of recombinant COVID-19 vaccine (CHO cells, NVSI-06-08) and inactivated COVID-19 vaccine (Vero cells) in population aged 18 years and above. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05069129>.
- [124] Finlay Vaccine Institute. Phase III clinical trial, multicenter, adaptive, parallel-group, randomized, placebo-controlled, double-blind study to evaluate the efficacy, safety and immunogenicity of vaccination against SARS-CoV-2 with 2 doses of FINLAY-FR-2 and a heterologous scheme with 2 doses of FINLAY-FR-2 and a booster dose with FINLAY-FR-1A (COVID-19). [2022-04-18]. <http://rpcec.sld.cu/en/trials/RPCEC00000354-En>.
- [125] Kentucky BioProcessing. KBP-201 COVID-19 vaccine trial in healthy volunteers. [2022-04-18]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04473690>.

Progress and Current Situation of SARS-CoV-2
Subunit Vaccine Development

YANG Yi ZHANG Qing-yun MEI Kun-rong

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Since the outbreak of novel coronavirus disease in late 2019, it has been a global public safety emergency to efficiently prevent and control the epidemic. Vaccine is one of the means to effectively prevent the virus from infecting humans, protect high-risk groups from rapid disease progression and minimize further spread of the virus-caused epidemic. Subunit vaccine is a safe and effective strategy that contains recombinant protein antigens of specific viral components and vaccine adjuvant that helps increasing the immunogenicity of the antigen. Since the specific immunogenic viral antigen can activate the immune system, which thus produces antibodies against immunodominant epitopes on the surface of the protein antigen, it offers subunit vaccine a high degree of protection and safety. The major severe acute respiratory symptom coronavirus 2 (SARS-CoV-2) subunit vaccines that have been marketed and are currently in the clinical stage are reviewed. The design concepts of various antigens and types of vaccine adjuvants, the protective capacity, and the research progress of subunit vaccine candidates are introduced. The applications and technical advantages of subunit vaccine are analyzed. This review is expected to provide suggestions for subunit vaccine development and global epidemic prevention and control.

Keywords COVID-19 SARS-CoV-2 Subunit vaccine

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按拼音首字母排列):

- | | | | | | | | | | |
|------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|
| 白 硕 | 白云飞 | 蔡燕宁 | 曹旭鹏 | 岑 山 | 曾凡锁 | 陈爱亮 | 陈 业 | 陈永灿 | 崔云前 |
| 邓 涛 | 丁 卫 | 范建华 | 高海春 | 葛高翔 | 郭 清 | 果春青 | 何秀萍 | 侯 健 | 侯 进 |
| 姜 岷 | 赖道万 | 乐 园 | 李成浩 | 李善刚 | 李 爽 | 李小平 | 李 寅 | 梁前进 | 刘 龙 |
| 刘文斌 | 刘喜朋 | 刘允军 | 卢大儒 | 卢 元 | 缪 鹏 | 阮长顺 | 史训龙 | 宋 敏 | 孙 博 |
| 孙莉萍 | 田新贵 | 王海宽 | 王海龙 | 王金成 | 王士安 | 王小明 | 魏 炜 | 吴 斌 | 夏伟梁 |
| 徐 勇 | 许文涛 | 薛 华 | 杨艳萍 | 叶海峰 | 叶 丽 | 尹焕才 | 尹艳慧 | 俞亚东 | 张 兵 |
| 张宏宇 | 张京钟 | 张延平 | 章文明 | 赵权宇 | 郑高伟 | 朱蕾蕾 | | | |