

【综述】

新型冠状病毒疫苗研发与评价

刘昌孝^{1, 2*}, 伊秀林^{1, 2}, 崔涛^{1, 2}, 武卫党^{1, 2}, 闫凤英^{1, 2}

1. 天津药物研究院生物技术中心, 天津 300462

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462

摘要: 疫苗的预防接种对提高人群免疫力、降低人群易感性、控制某些传染病的发生和流行起着主导作用。在这次新型冠状病毒(SARS-CoV-2)疫情防控中, 我国政府高度关注疫苗的研发进展, 并在世界研发行业中成绩卓越。在简要回顾SARS-CoV-2疫苗的研究进展和从SARS-CoV-2特点再认识疫苗研发的科学问题的基础上, 从药物评价研究的角度, 就SARS-CoV-2疫苗研发进展与评价问题予以论述。冠状病毒疫苗开发成功的关键是产品的安全性和有效性。在其研发的系统工程中, 利用病毒结构的特性, 形成新的研发路径, 通过精心设计, 严格执行国内国际研发评价规范, 进行科学的临床前质量和稳定性试验、动物的安全性和有效性试验, 进行I、II、III期临床评价去实现研发目标。疫苗从研发到上市是一个漫长的过程, 期间需要解决众多的关键科学问题, 尤其是针对像SARS-CoV-2这样传播速度快、传播途径广的病毒, 可能会面临更多的风险与挑战。由于SARS-CoV-2流行范围广和变异速度快的特点, 为了获取更全面的病毒数据需要国际间的协调与合作, 以确保足够的信息和研究能力, 达到成果国际共享的目的。

关键词: 疫苗; 新型冠状病毒; 研究开发; 安全性; 有效性; 评价; 监管; 系统工程

中图分类号: R927.11

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)07-1421-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.07.042

Research development and evaluation of SARS-CoV-2 vaccines

LIU Changxiao^{1, 2}, YI Xiulin^{1, 2}, CUI Tao^{1, 2}, WU Weidang^{1, 2}, YAN Fengying^{1, 2}

1. Research Center of Bio-Technology, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

2. State Key Laboratory of Drug Release Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Pharmaceutical Research Institute, Tianjin 300462, China

Abstract: Vaccination plays a leading role in improving immunity, reducing susceptibility and controlling the occurrence and prevalence of some infectious diseases. In this epidemic prevention and control of SARS-COV-2, the Chinese government paid more attention to the development progress of vaccine and made outstanding achievements in the world's research and development (R&D) industry. Based on a brief review of the research progress of the novel vaccine and a new understanding of the scientific issues of vaccine R&D based on the characteristics of the novel vaccine, this paper discusses the research progress and evaluation of the novel vaccine from the perspective of drug evaluation. The key to the successful development of a vaccine is the safety and effectiveness of the product. In this system engineering of R&D, the use of virus structure characteristics, forming new development pathway, through elaborate design, strict domestic and international research and evaluation standard, the scientific quality of preclinical quality and stability tests, the safety and effectiveness in animal tests, phase I, II and III clinical evaluations to achieve development goals. From the research and development to the market of vaccine is a long process, during which many key scientific problems need to be solved. Especially for a SARS-COV-2 such as novel coronavirus that spreads quickly and widely, it may face more risks and challenges. Due to the virus' wide range of popularity and rapid mutation, international coordination and cooperation are needed to obtain more comprehensive virus data, so as to ensure sufficient information and research capacity for the purpose of international sharing of results.

Key words: vaccine; SARS-CoV-2; research and development; safety; effectiveness; evaluation; regulation; systems engineering

收稿日期: 2020-06-15

*通信作者: 刘昌孝, 中国工程院院士, 天津药物研究院学术委员会主任。E-mail: liuchangxiao@163.com

在流行过程中要控制和消灭传染病,必须针对传染源、传播途径和易感人群这3个环节采取综合措施才能收到最大效果。而疫苗的预防接种可以提高人群免疫力,降低人群易感性,对控制某些传染病的发病和流行起着主导作用,如天花、白喉、脊髓灰质炎、麻疹、百日咳、破伤风、结核病等;也可在某些传染病综合防治中起重要作用,如流行性乙型脑炎、流行性脑脊髓膜炎、流行性感、鼠疫、霍乱、伤寒、钩体病、狂犬病等;还有正在研究开发中的艾滋病疫苗和新型冠状病毒(SARS-CoV-2)结果等。

在这次 SARS-CoV-2 疫情防控中,我国政府高度关注疫苗的研发进展,并在世界疫苗研发中取得卓越成绩。目前,全球 115 个在研的候选疫苗中,72%来自私营或者企业开发者,28%来自学术机构、公共部门和其他非营利组织。从地区来看,36家(46%)开发者来自北美,14家(18%)来自中国,14家(18%)来自除中国外的亚太地区,另外14家(18%)来自欧洲。在简要回顾 SARS-CoV-2 疫苗的研究进展和从 SARS-CoV-2 特点再认识疫苗研发的科学问题的基础上,本文从药物评价研究的角度,就 SARS-CoV-2 疫苗研发进展与评价问题予以论述。

1 从 SARS-CoV-2 特点再认识疫苗研发的科学问题

1.1 SARS-CoV-2 疫苗的研究进展

进入 21 世纪以来,在短短的 20 年内,全球已经爆发了 3 次较大规模的冠状病毒感染肺炎事件。2003 年的重症急性呼吸综合征(SARS)、2015 年的中东呼吸综合征(MERS)与 2019 年的新型冠状病毒肺炎(COVID-19),多数相关研发主体都是仅为解决当下疫情问题而开展的,多数国家尚未形成良好的长效预防措施或紧急应对机制。此次 COVID-19 疫情,是人类历史上极其可怕的传染疾病大流行,它是联合国成立以来,也是世界卫生组织成立以来,传播和爆发范围最大(世界 200 多个国家和地区)的一次疫情。它有以下特点:一是传播力强,基本传染数(R_0)高达 2.70~3.77;二是攻击能力大,可以入侵多器官,不单单是病毒性肺炎;三是潜伏期难确定,出现了潜伏期超长病例;四是症状消失之后,还可以排毒;五是没有症状也可以高效传播。因此,SARS-CoV-2 堪称自本世纪以来 3 种冠状病毒中最“狡猾”的,多地研究机构对其特征、临床知识、治疗评价、临床管理、病毒病理、爆发期的控制等多方面进行了研究,并发表了大量论文^[1-6]。在此次治

疗中,要考虑病毒的特征因素,宿主因素、患者状况、药物作用靶点、药物与受体的关系等复杂情况,除了中西药物抗病毒治疗^[7-9]外,战胜疫情还需要防控手段,防止疾病蔓延对人体器官系统造成严重的危害。因此,SARS-CoV-2 疫苗的研发刻不容缓。

早在 1973 年,美国内布拉斯加大学开始了冠状病毒疫苗的研究,并申请了首个兽用疫苗发明专利。SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒,它的外壳上有刺突状的 S 蛋白,S 蛋白上存在受体结合域(Receptor Binding Domain, RBD)(图 1)。SARS-CoV-2 通过 RBD 与人体细胞表面受体血管紧张素转化酶 2(ACE2)结合,进入细胞大量复制^[10-12]。在疫苗设计时,考虑疫苗靶点 S1 的受体结合基序(RBM)和 RBD 区保守程度,以及发现 SARS-CoV S1 蛋白的多克隆抗体与 SARS-CoV-2 的交叉中和反应的特性。

当细胞检测到病毒入侵时,会释放干扰素启动免疫反应,而大多数免疫反应对宿主会造成不利影响。因为病毒导致的免疫性炎症反应以及产生的破坏性物质的破坏性极强,大多数 SARS-CoV-2 的患者死于并发症。临床实践发现肺是“归零地”,其损害范围可以延伸到许多器官^[13],包括心脏和血管、肾脏、肠道和大脑(图 2)。由此可见,SARS-CoV-2 的治疗过程非常艰难,做好预防措施、研发 SARS-CoV-2 疫苗就尤为重要。而阻断病毒表面受体结合域与细胞表面受体结合成为研发抗病毒药物的思路。中和抗体就是这样一种能够识别病毒表面蛋白并阻止其与细胞受体结合的抗体。原理上,它能够抢先细胞占据病毒表面受体结合域,使其无法与细胞结合。中和抗体治疗是直接注射的方式,其作用不同于疫苗,疫苗使用抗原诱导人体产生抗体。

在 2003 年 SARS 爆发后,多方面研究发现 SARS-CoV 疫苗研发面临巨大挑战。候选疫苗诱导产生的非中和抗体的 Fc 段可能与巨噬细胞 Fc 受体结合,使 SARS-CoV 感染表面无 ACE2 的巨噬细胞,引起抗体依赖感染增强效应(Antibody-dependent enhancement, ADE),加重感染^[14-18]。因 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 感染机制高度相似,因此研发 COVID-19 疫苗时应高度重视 ADE 问题,尽量选择能产生高滴度中和抗体而不产生非中和抗体的病毒序列制备疫苗^[19],这将是疫苗研发成功与否的关键。此外,在 COVID-19 的防治过程中,细胞免疫反应也起着至关重要的作用。因此,研发 COVID-19

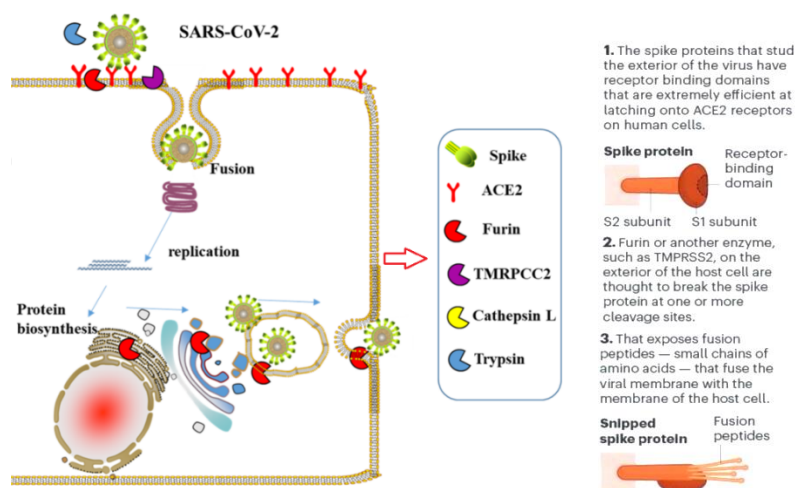


图1 SARS-CoV-2结构特点与其感染的关键因素

Fig. 1 Structural characteristics of SARS-COV-2 and key factors of its infection

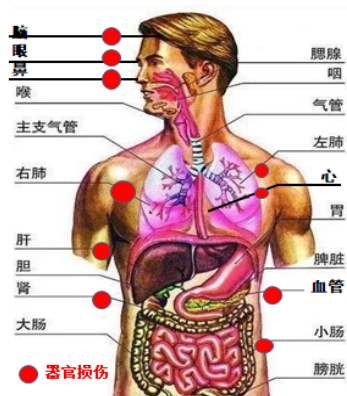


图2 病毒感染引起的器官损伤

Fig. 2 Organ damage caused by virus infection

疫苗还需要兼顾全身性免疫(体液和细胞免疫)和黏膜免疫。我国冠状病毒疫苗的研发起步较晚,但因SARS的暴发而发展迅速,多个疫苗研发平台应运而生。所以,我国的COVID-19疫苗有望研发成功^[20]。

1.2 高标准的疫苗研发

目前,SARS-CoV-2候选疫苗中使用的S蛋白的不同形式和/或变体之间如何相互关联的还不清楚,在不清楚疾病的基因组特征时,冠状病毒疫苗开发能否成功,更可能与今后疫苗产品的安全性和有效性有关。

1.2.1 安全性 一个药物或疫苗想要上市,需要通过临床试验证实两点:安全和有效。就安全性而言,疫苗要求非常严格,任何疫苗的I期临床试验的主要目的(“主要临床终点”)也是证明疫苗的安全性(短期和长期不良反应)。目前已有SARS-CoV-2疫苗成功通过I期甚至进入II期临床试验,无明显

不良反应。

1.2.2 有效性 SARS-CoV-2疫苗是否有效的关键是被接种人是否产生针对新冠S蛋白的抗体,因此必须重视两方面的研究:首先,如果SARS-CoV-2疫苗评价跳过临床前动物实验,就增加了失败的风险。正常药物和疫苗研发过程,都需要在临床前在疾病的动物模型中筛选多个候选物验证,找出在动物中效果最好、毒性可以接受的候选物来进行后续的临床试验。也就是说临床前实验很多时候是个“漏斗”,筛选出在人体中成功可能最大的候选物。因为这次新冠疫情在全球传播太快,动物模型的建立面临严重挑战,即要打破传统惯例做完整的动物实验,选择证明抗体效果金标准的灵长类动物实验来推进临床试验,否则必然还有失败的风险。其次,如果疫苗在临床I期未能产生足够抗体就可能失败。在临床前的动物实验中证明可以产生抗体并保护灵长类动物免受病毒感染,如果在临床I期试验中不能证明在人体内产生足够的抗体,就需要重新选择mRNA序列,重新进行I期临床试验。

1.2.3 规范性 我国政府和疾控部门一直重视不同类型疫苗的研究开发,同时对疫苗的监管也日趋严格。我国近几年上市的疫苗质量标准均达到世界卫生组织的要求,部分品种关键指标甚至高于欧美要求。我国疫苗监管体系从上市许可、上市后监管(包括接种后不良反应监测)、批签发、实验室管理到监管检查和临床试验监管,覆盖了疫苗研发到使用的各个环节。我国已建立起覆盖疫苗“研发-生产-流通-接种”全生命周期的监管体系,上市疫苗全部实行国家“批签发”管理。我国疫苗监管体系于

2011年就通过了WHO的国家监管体系评估。早在2013年WHO就肯定我国疫苗产品的质量、产能和价格优势,WHO总干事曾表示:“中国疫苗生产潜力巨大,我们希望能够看到越来越多的中国疫苗产品通过世界卫生组织的预认证,全世界都会因此而受益”。

1.2.4 国际标准一致性 疫苗研发需要相对长的时间,其主要原因之一是要保证疫苗的安全性与有效性。国内外对于疫苗的上市应用具有严格的法律法规和技术标准要求。疫苗进入临床试验必须完成药性方面研究、有效性研究和安全性研究。国家对于疫苗研发的每个环节,都有相应的技术法规可以遵循,这些法规、技术要求和WHO等国际上的标准是一致的^[21-31]。推进疫苗的研发主要是考验各科研单位以及生物公司对疫情的敏感性和疫苗研制的执行速度。美国研发所用的技术相对较新,但所需时间也可能相对较长。全新的疫苗品种与普遍接种的疫苗都不一样,需要有专家和公众接受的过程,技术越新,可能存在的障碍也会更多。中国制度优势可以集中全国力量攻关,完全遵循现代医学的三大原则:一是伦理原则,是医学的最高目的,是救人生命伦理;二是医学理论原则,必须符合逻辑理性;三是效果原则,必在医学实践经受证实。目前我国SARS-CoV-2疫苗已按照国际的规范、国内的法规,做了安全、有效、质量可控、可大规模生产的前期准备工作,并取得阶段性的成果。

1.3 预防用疫苗临床前研发

预防用疫苗临床前研究技术指导原则规定由病毒、细菌或其他病原微生物为起始材料,经培养增殖制成的减毒、灭活的病原体,或再经纯化、裂解、亚单位(包括细菌类毒素)等方法处理制备的富含免疫原性,刺激机体产生特异性免疫学反应而达到预防某种疾病的产品。该指导原则适用于用病毒、细菌或其他病原微生物制备的预防用疫苗,其目的是为该类药物提供一个共同的原则,指导制定临床前研究的方案,和确定具体的研究内容。基本原则是:(1)应符合国家《药品管理法》等相关法律法规的要求;(2)对所预防的疾病的流行情况进行研究,包括疾病的危害程度、所涉及的人群及病原的型和亚型等;(3)对研制该类制品用于预防疾病的有效性、安全性及必要性进行分析;(4)应对该制品用于预防该疾病的利益风险比进行研究。根据该制品的预防方案可能达到的效果及可能出现的副作用或危害,对总体的利弊权衡进行评价,并提出

拟采取避免或减少其危害性或副作用的措施。这种评价将是该方案能否获得批准的重要依据之一。

1.4 疫苗临床试验

疫苗临床试验技术指导原则^[31]对预防用疫苗的临床试验的总要求指出,疫苗临床试验的全过程应严格按照《药品临床试验管理规范》(GCP)进行。GCP是有关临床试验的方案设计、组织实施、分析总结等全过程的基本要求,宗旨是保护受试者的权益并保障其安全,保证药品临床试验的过程规范可信,结果科学可靠,其一般原则也适用于疫苗。但疫苗因其具有其内在和应用特殊性,如来源于活生物体、其组成复杂,用于健康人群且以儿童为主要接种对象,因此在安全性和有效性方面有其特殊的要求,需要有特殊的检测方法以保证其批间质量的稳定和一致性。基本原则:(1)必须符合赫尔辛基宣言的伦理学准则,受试者的权益、安全和意志高于研究的需要。对特殊的受试者群体,尤其是需要采用安慰剂对照时,其伦理学方面必须予以充分的考虑。(2)为受试者保密,尊重隐私和伦理原则,防止歧视接种疫苗受试者。(3)临床前安全性、药效学研究结果支持进行临床试验。(4)疫苗接种的目标人群为健康人群和特殊人群(如婴幼儿),在疫苗各期临床试验的设计、实施等均应符合国家GCP的基本要求。人体临床试验分为I、II、III和IV期。I期重点观察安全性,观察对象应健康,一般为成人。II期试验目的是观察或者评价疫苗在目标人群能否获得预期的免疫原性效果和一般安全性信息。以全面评价疫苗的保护效果和安全性III期试验是获得注册批准的基础。IV期临床试验是疫苗注册上市后,对疫苗实际应用人群的安全性和有效性进行综合评价。

2 在研SARS-CoV-2疫苗

临床应用的疫苗主要分为病毒载体疫苗、mRNA疫苗、DNA疫苗、蛋白重组疫苗、减活/灭活疫苗5大类。截至2020年4月8日,全球共有115种SARS-CoV-2疫苗处于不同的开发阶段,其中78种处于活跃状态^[32]。虽然大多数进行中的项目仍处于探索或临床前阶段,但有6种候选疫苗(Ad5-nCoV腺病毒载体疫苗、RNA疫苗mRNA-1273、DNA疫苗INO-4800、LV-SMENP-PC疫苗、aAPC疫苗、SARS-CoV-2灭活疫苗)进入了临床试验阶段。

2.1 病毒载体疫苗

这类疫苗以科学家可以掌控的活病毒(比如腺病毒)为载体,将目标病原体(比如SARS-CoV-2)的

保护性抗原基因插入病毒的基因组中,并使之高效表达抗原蛋白,高纯度的无害病毒被注射到体内,会诱导抗体生成。如已经在应用的埃博拉病毒疫苗就属于这类。该类疫苗的研发技术路径长、耗时较多,对载体的选择、操作和生产的技術要求高,但成功研发证实了其疫苗有可靠的安全性和有效性。

目前,应用重组技术开发的腺病毒载体(Ad5-nCoV)疫苗由军事科学院军事医学研究院生物工程研究所与康希诺生联合开发,该疫苗采用基因工程方法制备,以复制缺陷型5型腺病毒为载体,将SARS-CoV-2S抗原基因重组到已灭活的腺病毒基因组中,使用能表达保护性抗原基因的重组腺病毒制成。现在Ad5-nCoV I期临床试验。Ad5-nCoV进行I期临床试验,招募了108名志愿者,设立低、中、高剂量3个组完成,但需要在随后的6个月中配合开展研究随访。相比I期临床试验,II期临床试验规模更大,且引入了安慰剂对照组,分为中剂量疫苗组(250例)、低剂量疫苗组(125例)和安慰剂对照组(125例)3个组别。预计整个试验过程最快也将持续数月甚至一年的时间。目前该项研究已经向加拿大卫生部提交了Ad5-nCoV的临床试验申请前的会议请求,加拿大卫生部也已经受理。公司计划在临床试验申请获得批准后,与加拿大的合作伙伴联合开展Ad5-nCoV临床试验。由于携带各种抗原的腺病毒载体能够刺激机体产生很强的体液免疫或细胞免疫,因此,需警惕病毒载体本身所引起的机体免疫反应,不仅如此,其对人体免疫系统的影响也比较复杂。

2.2 mRNA疫苗

由于mRNA疫苗的研发技术门槛相对较高,所以mRNA疫苗目前尚无产品上市,其产业成熟度还有待提高。该类疫苗的研发原理是将携带病毒特征蛋白遗传信息的mRNA递送入细胞,通过体内表达而激活免疫反应,进而产生有效抗体。mRNA疫苗具有免疫活性强、研发周期短、适用于突发性传染病预防等多重优势,被业界认为具有突破潜力,但是目前这类疫苗mRNA稳定性较差,容易被核酸酶破坏,对制剂和靶向递送技术要求高,大规模生产受到了限制。

在2020年1月,COVID-19暴发后不久,基于SARS-CoV-2的基因组测序工作已经完成,Moderna的mRNA-1273是一条合成的信使RNA链,编码SARS-CoV-2的关键表面抗原刺突蛋白,它被期望能特异性地诱导对SARS-CoV-2 S蛋白的抗病毒应

答。与传统疫苗不同的是,以脂质纳米颗粒包裹的mRNA疫苗则不需要病毒作为载体。因此它是相对安全的,可以进行测试,为正在临床试验中的COVID-19疫苗获得相似数据奠定基础^[33-35]。如果mRNA-1273对人类是安全的,并且通过了第一阶段的试验,它的有效性的后续评估将立即进行。

2.3 DNA疫苗

DNA疫苗接种后蛋白抗原在宿主细胞内表达,加工呈递过程与减毒疫苗类似,主要采取主要组织相容性复合物(MHC)-I类分子结合的内源性抗原呈递途径,近似于病原体的自然感染过程,同时诱导机体产生细胞免疫和体液免疫。

DNA疫苗具有一些明显的优点。DNA疫苗没有减毒或灭活疫苗的潜在致病危险以及亚单位疫苗主要通过外源性抗原呈递途径激发不完全性体液免疫反应。质粒载体基本没有免疫原性^[36-38]。DNA疫苗制作工艺较简单,重组质粒在工程菌内大量扩增,纯化方法容易,生产成本也相对低,其理化性质比较稳定,便于贮存和运输,能够最大限度地节约人力、物力和财力,整体开发速度也相对较快,目前已有企业开始通过该技术路线开发SARS-CoV-2的疫苗,如合作开发的INO-4800基因疫苗,目前该疫苗正准备实验报告以及临床设计用于申请中国临床试验。

2.4 重组蛋白疫苗

重组蛋白疫苗是采用重组蛋白技术开发的產品。此类疫苗的开发技术比较成熟,如乙肝、流感和HPV疫苗等属于此类疫苗。运用基因工程重组技术,此类重组蛋白疫苗是通过细菌或酵母表达病毒外壳中免疫原性较强的蛋白,通过诱导机体的免疫反应来实现的,由于该技术也比较适合于规模化生产,因此是目前相对活跃的研发领域。

2.5 减活/灭活疫苗

减活/灭活疫苗是传统的疫苗研发路线,应用历史悠久,有大量成熟产品(如麻疹、腮腺炎、脊灰、甲肝、狂犬疫苗等)都属于此类疫苗。该技术需要通过不断传代找到遗传信息,获得稳定的抗原性毒株,所以其研发速度较为缓慢且周期较长。今年4月国家药品监督管理局批准了由中国医药集团中国生物技术股份有限公司武汉生物制品研究所和中国科学院武汉病毒研究所联合申请的SARS-CoV-2灭活疫苗的临床试验。几乎在同一时期内,国家药监局又批准了由北京科兴中维生物技术有限公司研制的灭活病毒疫苗的临床试验申请。

3 认识疫苗研发的系统工程特点

3.1 研发的基本过程

3.1.1 疫苗研发方案 小鼠细胞培养疫苗实验阶段:细胞培养疫苗有细胞培养灭活疫苗和细胞培养活疫苗两类,前者多以强毒毒株培养增殖获得,后者则通过弱毒毒株增殖进行制备,两者的制造程序既有相同之处,又有区别。由于病毒毒株与疫苗性质不同,所采用的细胞及细胞培养方法也有所不同。

种毒与毒种继代:用于制苗用的种毒应经毒力检测、最小免疫量测定、安全性评价、无菌检定合格等步骤,其通常为冻干品,由国家指定的苗毒种保藏部门检定分发。制苗用毒种应按规定控制在一定代数以内,或为湿毒毒种,或为冻干毒种。

细胞制备:制造疫苗用的细胞大体分为原代细胞和传代细胞两类,根据病毒种类、疫苗性质与工艺流程选择不同的细胞。主要的依据是病毒的适应性高、毒价高、细胞来源方便、制备简单、生命力强。培养细胞和增殖病毒用的营养液又称培养液,通常分为细胞培养用的生长液和病毒增殖用的维持液,维持液血清浓度为2%~5%。不同细胞所需的营养成分和生长条件不尽相同。目前常用静止培养和转瓶培养,或微载体培养和悬浮培养。

接毒与收获:病毒接种培养有同步与异步之分,前者在细胞分装的同时或不久后接种毒种,进行培养,如猫、犬传染性肠炎疫苗(细小病毒);后者在细胞形成单层后接种毒种,经吸附后加入维持液继续进行培养,待出现70%~85%以上细胞病变时即可收获。

病毒培养液收获时间和方法依疫苗性质而定,可将培养瓶冻融数次后收集,或加入EDTA-胰蛋白酶液消化分散收取,或在病毒增殖培养过程中收获毒液,细胞毒液经无菌检验、毒价测定合格后供配苗用。病毒在易感动物体内可大量增殖,但在各器官组织、部位中增殖病毒的量却有很大的差异,利用病毒增殖迅速、含毒量高的组织制造组织疫苗(tissue vaccine)。

动物选择:对疫苗的安全性和效力有着决定性影响的动物应满足以下两个条件:(1)应该是清洁级(二级)以上等级的实验动物;(2)应是对所接种病毒易感性高的动物。

种毒与接种:种毒既可用抗原性优良、致死力强的自然毒株脏器组织或强毒株增殖培养物,也可用弱毒株组织毒种。种毒都须经纯化、抗原性和免

疫原性检查合格后使用。接种途径依病毒性质和目的而异,例如猪瘟结晶疫苗,采取猪肌肉注射血液毒种;牛瘟兔化弱毒疫苗,以兔耳静脉注射脾淋毒种;狂犬病疫苗,用兔脑毒种接种,绵羊脑内途径感染几种动物常用的接种途径如下:脑内注射、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、腹腔注射等途径。

观察与收获:动物在接种感染后应每天观察和检查规定的各项指标,指标或项目因不同病毒而异。常规观察、检查的项目如食欲、精神和活动状态、体温、粪便、尿和血液变化等。根据观察的征象和检查的结果选出符合要求的发病动物按规定方式剖杀,采取收集含毒量高的器官组织。

3.1.2 制苗 组织灭活疫苗:采取收获的组织经无菌检验及毒价测定合格后,按规定比例加入平衡液和灭活剂(甲醛、酚、结晶紫等)制成匀浆,然后按不同病毒的灭活温度、时间进行灭活。

弱毒组织疫苗:在无菌操作下剔除脏器上的脂肪与结缔组织等,称重后剪碎,加入适量保护剂制成匀浆,然后滤过扣除残渣量,再按滤液中的实际组织量计算稀释倍数,冷暗处处理一定时间后作无菌检验与毒价测定。冷冻真空干燥制成冻干疫苗,然后测定有效性和安全性。

3.1.3 临床前研究 临床前及临床研究:新药开发阶段的临床前试验,动物研究,以观察化合物针对目标疾病的生物活性,同时对化合物进行安全性评估。这些试验大概需要3.5年的时间。研发中新药申请(Investigational New Application, IND):在临床前试验完成后,公司要向FDA提请一份IND,之后才能开始进行药物的人体试验。如果30 d内FDA没有发出不予批准的申明,此IND即为有效。提出的IND需包括以下内容:先期的试验结果,后续研究的方式、地点以及研究对象;化合物的化学结构;在体内的作用机制;动物研究中发现的任何毒副作用以及化合物的生产工艺。另外,IND必须得到制度审核部门(the Institutional Review Board)的审核和批准。同时,后续的临床研究需至少每年向FDA提交一份进展报告并得到准许。

3.1.4 临床试验 I期:指初步的临床药理学及人体安全性评价试验,主要是观察机体对新药的耐受情况和药动学行为,以确定给药方案。试验对象一般为健康志愿者。此阶段一般需要1年左右的时间,由20~80例正常健康志愿者参加。试验研究了药物的安全性方面的内容,包括安全剂量范围。此阶段的研究是为了明确药物在体内的吸收、分布、代

谢和排泄,以及药物的作用持续时间等项目。

II期:此阶段需要约100~300名志愿患者参与进行一些控制研究,其目的是初步评价药物对目标适应症患者的治疗作用和安全性,以评价药物的疗效。这个阶段大约需要2年时间。

III期:此阶段持续约3年时间,通常需要诊所和医院的1000~3000名患者参与。医师通过对病患的监测以确定疗效和不良反应。

如果以上各阶段开发顺利,就可以进入产业化试验、放大试验和批量制备,全部完成就可以进入新产品申报、审评、审批程序。整个研发过程如图3所示。疫苗作为一种特殊的药品,它的研发必须是一个渐进的研发、系统过程的研究、规范的研发,也是一个具有重大风险的研发。



图3 新疫苗的研发过程

Fig. 3 Development process of new vaccine

在开发SARS-CoV-2疫苗的早期,图4显示其基础工作是设计一条合理的科学开发技术路线,其中毒株选择是基础,在此基础上确定设计的技术手段,才能达到产品的最终目标。

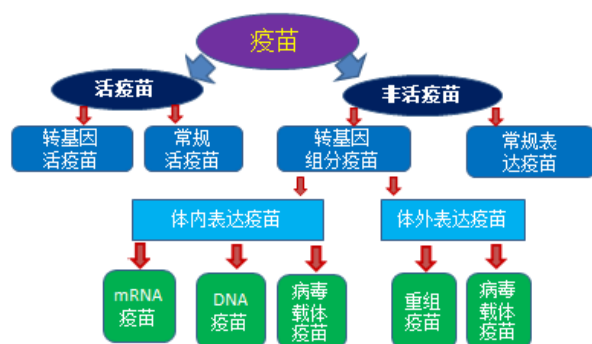


图4 SARS-CoV-2疫苗设计路线

Fig. 4 Design route of SARS-CoV-2 vaccine

疫苗的研发对于从根本上预防冠状病毒的传播至关重要。病毒疫苗主要包括全细胞灭活疫苗和减毒活疫苗、亚单位疫苗、mRNA疫苗、DNA疫苗、活载体疫苗以及合成肽或表位疫苗等多种形式。

由于冠状病毒的S蛋白在介导受体结合以及进入宿主中起着主要作用,是中和抗体的主要靶点,因此除灭活/减毒活疫苗设计针对病毒整体以及合成肽或表位疫苗设计针对病毒4种结构蛋白的多个抗原表位外,其他形式疫苗设计主要针对S蛋白。基于SARS-CoV-2结构蛋白,其疫苗设计主要针对病毒的结构蛋白中的S蛋白。在设计时考虑以下几个因素:

(1)针对S蛋白的疫苗:据报道,目前已有一种针对SARS-CoV-2 S蛋白的合成DNA疫苗INO-4800,通过基因工程构建的INO-4800在体外诱导了S蛋白的大量表达,并在小鼠和豚鼠中单次免疫后产生抗体和T细胞反应^[39],这一数据初步确定S蛋白的DNA疫苗INO-4800可作为COVID-19的一种潜在候选疫苗。为更好的设计针对S蛋白的相关疫苗,有研究团队分别利用免疫信息学方法鉴定了S蛋白的抗原表位和通过电镜分析SARS-CoV S蛋白的冷冻电镜结构^[40],以及用同源性建模获得了SARS-CoV和SARS-CoV-2刺突蛋白的表面线性表位暴露列表^[41],为疫苗的研发提供了重要的信息。

(2)重视有效的中和抗体的作用:对SARS-CoV感染有效的中和抗体对加快疫苗研发有重要的影响。对比发现两种病毒高度可变区的残基位于关键的疫苗靶点S1的受体结合基序(RBM),在排除RBM区后的SARS-CoV-2 RBD区高度保守。研究发现SARS-CoV S1蛋白的多克隆抗体与SARS-CoV-2仅显示有限的交叉中和反应^[42],因此很有必要研发针对SARS-CoV-2的特异性中和抗体。除了S1蛋白,疫苗研发也可以考虑S2蛋白,由于S2蛋白在SARS-CoV-2病毒间具有很好的保守性,因此基于S2蛋白的疫苗设计可以增强广谱抗病毒效果,值得在动物模型中进行试验^[43]。

(3)结构蛋白的抗原表位研究:除针对S蛋白外,研究其他结构蛋白的抗原表位有助于构建合成肽或表位疫苗。有研究发现SARS-CoV抗原表位与SARS-CoV-2完全相同,而且表位大量位于S蛋白和N蛋白,并具有潜在的交叉反应,此信息为指导开发SARS-CoV-2疫苗提供了重要参考^[44]。有研究利用反向疫苗学和免疫信息学的方法分别预测了S蛋白和N蛋白的有效抗原表位,并使用不同的佐剂和接头构建了3种可能的疫苗结构,用相同方法在S蛋白、M蛋白和E蛋白中确定了潜在的B细胞和T细胞表位,这些研究可能为未来COVID-19

疫苗开发提供初步表位序列^[45]。因此,可以利用这些抗原位点设计出安全性和免疫原性都更高的多表位疫苗^[46]。

(4)必须重视多种可能影响因素:由于疫苗作用的特殊性,在研发疫苗时必须考虑多种可能影响因素。自 SARS-CoV-2 发现以来,其序列已在不断变化,有可能会使病毒毒力表现出差异^[47],还必须在设计疫苗过程中考虑到疫苗可能引发的抗体依赖性增强作用。当抗体促进病毒进入宿主细胞并增强这些细胞中的病毒感染时,就会增强抗体依赖性^[48]。由于抗体依赖性与抗体量、病毒和抗体的 Fc 受体的组织特异性表达等有关,如果病毒 S 蛋白的中和单抗不会触发刺突蛋白的构象变化,那么就不太可能介导抗体依赖性增强^[49]。研究还发现,使用非人灵长类动物模型发现 SARS-CoV-2 感染后的恒河猴不会出现再次感染^[50],可认为最初 SARS-CoV-2 感染对后续的暴露有保护作用。

(5)病毒株的分离:SARS-CoV-2 病毒株的成功分离以及对该病毒了解程度的不断加深也很重要。目前已有报道显示,我国以腺病毒为载体可表达 SARS-CoV-2 S 抗原的疫苗以及 Moderna 公司研制的编码 S 蛋白的 mRNA 疫苗 mRNA-1273 等多项疫苗已进入临床试验阶段。由于疫苗的特殊作用方式,疫苗的研发需要考虑适当的动物模型、抗体依赖性增强作用、DNA 疫苗是否可能会与其他病毒重组、自身免疫系统是否影响疫苗作用等多种因素以确保疫苗的安全性和有效性。

总之,基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的相关诊疗技术,病毒的疫苗研发主要针对 S 蛋白,因为 S 蛋白是中和抗体的主要靶点,可诱导高度有效的中和抗体反应。总之,结构蛋白与冠状病毒致病性密切相关,SARS-CoV-2 结构蛋白的结构和功能的确定对进一步利用合适药物靶点研发高效疫苗以及推动疫苗研发技术的发展是有价值的^[51]。

3.2 对 SARS-CoV-2 研发的艰巨性的认识

研发首先要确认疫苗的靶点,选择抗原(即所研究的病毒),但是不能用有活性的全病毒,否则就会让人感染,因此需要选取 SARS-CoV-2 上的某一个分子或多个分子,或基因片段,这些分子和基因片段就是抗原。用它们来制成疫苗注射到人体,可以刺激人体免疫系统产生抗体来中和(抑制、抗御和灭活)病毒,从而起到避免感染和发病的目的。迄今,人类针对其他疾病的疫苗研发方式主要有两种,一种是传统的灭活疫苗,需要在足够安全级别

的实验室来做病毒培养、灭活。另一种是基因工程疫苗。因此,抗 SARS-CoV-2 的疫苗也可以采用灭活疫苗和基因工程疫苗这两种方式来研制。

SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒,由病毒遗传物质(RNA)和蛋白质外壳组成的。只有完整的蛋白质外壳形成后,才能包裹住病毒 RNA 并由受感染的细胞分泌出来,随后“侵染”新的健康细胞。SARS-CoV-2 疫苗在研发上存在很大的难度,如 SARS-CoV-2 的“高度糖基化现象”,是疫苗研发困难的重要原因。

糖基化(Glycosylation)学术上指的是蛋白质或脂质在酶的作用下被链接上糖链的过程。是生物体内最为重要的蛋白质翻译后修饰形式之一,糖基化调控了蛋白质在组织和细胞中的定位、功能、活性、寿命和多样性^[52-54]。

细胞内超过 50% 的蛋白质都修饰有糖链,它们参与了包括细胞识别、细胞分化、发育、信号转导、免疫应答等在内的各种重要的生命活动。在多种疾病,如肿瘤、神经退行性疾病、心血管病、代谢性疾病、免疫性疾病及感染性疾病的发生发展。换言之,病毒的复制和对宿主的入侵与自身结构蛋白的糖基化修饰密切相关。科学家最早发现了病毒形成蛋白质外壳中的“糖基化现象”,因此创立了糖生物学的概念,并将糖生物学推向生命科学前沿。

SARS-CoV-2 是高度糖基化的球形颗粒,有着庞大的结构,至少有 66 个糖基化位点(N-linked glycan sites)。SARS-CoV-2 和 2003 年的 SARS 病毒有许多相似指出。研究显示,SARS 病毒有 69 个糖基化位点,其中与 SARS-CoV-2 的位点有 54 个相似。

这些糖基化位点,对病毒有重要作用,比如流感病毒蛋白糖基化修饰对于维持病毒生命周期十分重要,丙型肝炎病毒的 E1 和 E2 蛋白的糖基化位点可能直接参与了病毒与细胞受体的结合,这种结合对病毒粒子的入侵产生重要的影响。如果 E1 和 E2 蛋白缺失后,病毒粒子入侵细胞的效率就会明显降低。而 SARS-CoV-2 的糖基化位点至少是 HIV 病毒的 2 倍。研究指出,SARS-CoV-2 这种非比寻常的糖基化程度,会让病毒容易产生多种突变,也就是这种结构的存在会让我们疫苗开发变得非常困难。

3.3 SARS-CoV-2 疫苗制备的关键技术

SARS-CoV-2 疫苗的研制可以通过两类技术手段实现,第一类是仿照灭活疫苗或减毒疫苗的方式研发 SARS-CoV-2 疫苗,第二类是利用基因工程或

分子克隆技术研发 SARS-CoV-2 疫苗。

3.3.1 仿照灭活疫苗的研发 灭活疫苗能够保留病毒的免疫原结构, 但又不具备感染性, 因此安全性好, 被认为是最有效的传统制备技术。如现行的流感疫苗分为全病毒灭活疫苗、裂解疫苗和亚单位疫苗。每种疫苗均含有甲 1 亚型、甲 3 亚型和乙型 3 种流感灭活病毒或抗原组分, 并且这 3 种疫苗的免疫原性(免疫刺激作用)和副作用差别也不大。上世纪七八十年代, 在裂解疫苗的基础上, 又研制出了毒粒亚单位和表面抗原, 即糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)。通过选择合适的裂解剂、裂解条件和纯化方法, 制备得到纯化的 HA 和 NA。这两种蛋白是流感病毒入侵人体呼吸道细胞, 导致发病的关键蛋白, 同时也是流感病毒的关键抗原, 能刺激机体产生抗体, 以它为抗原制备的疫苗, 可以刺激人体产生针对整个流感病毒的抗体, 中和流感病毒。

SARS-CoV-2 或 SARS-CoV-2 的一部分, 如 SARS-CoV-2 的 S-蛋白, 作为与人体肺泡和呼吸道上皮细胞表面血管紧张素转化酶 2(ACE2)结合的关键蛋白, 可作为抗原用于人体免疫。

3.3.2 利用基因工程方法研发基因工程疫苗 基因工程疫苗是用基因工程方法或分子克隆技术, 分离病原体的保护性抗原基因, 并将其转入原核或真核细胞表达体系, 如酵母、细菌、昆虫细胞或哺乳动物细胞等, 通过产生的病毒保护性抗原, 制成疫苗。

基因工程疫苗可以分为基因工程重组亚单位(亚基)疫苗、重组活载体疫苗、基因缺失或突变疫苗、基因(核酸)疫苗、合成肽疫苗、单克隆抗体疫苗, 以及转基因植物疫苗等多种类型。杆状病毒-昆虫细胞表达系统被普遍认为是用于表达异源基因的最佳表达系统之一, 在该系统中表达的人乙型肝炎病毒表面抗原蛋白已经与乙型肝炎病毒表面相应的天然蛋白结构非常类似, 而且产量也相当理想。

对于 SARS-CoV-2, 可从病毒基因组中分离编码 S-蛋白的基因, 插入到大肠杆菌质粒 DNA 的表达位点上, 经大量增殖后, 获取纯化的 S-蛋白作为抗原, 并辅以佐剂, 生产出抗 SARS-CoV-2 的基因工程疫苗(亚基疫苗)。该方法成本低, 安全性好, 效果可靠, 且生产工艺简单, 适合于大规模生产。但从战略角度考虑, 针对 SARS-CoV-2 的安全、有效的疫苗研发仍然存在挑战^[55]。

3.3.3 疫苗产品基因复制技术 mRNA 疫苗是一

种较新颖的疫苗制备方案, 与传统疫苗制备需要灭活病毒或重组抗原蛋白不同, 由于 RNA 在生物体内负责蛋白质的合成, 研究人员只要知道病毒 RNA 序列, 就可以直接对 RNA 进行修饰和编辑, 跳过合成重组蛋白或病毒步骤。这种技术制备的疫苗与传统制备方法相比时间更短, 成本更低。目前的 mRNA 疫苗主要包括非复制型 mRNA 和自我扩增型 mRNA。mRNA 疫苗既可作为预防性疫苗预防流感等感染性疾病, 也可作为治疗性疫苗治疗如癌症等重大疾病。

3.3.4 疫苗质量因素 疫苗质量是保证临床前研究、临床研究和产品上市的基础, 国家对疫苗的上市和应用, 有严格的法律、法规和技术标准的要求。目前我国正在按照 5 种技术路线开展新冠疫苗的紧急研制, 各类疫苗在临床前研究的过程、技术特点和要求都有所不同。但是疫苗进入临床试验之前, 必须完成药学研究、有效性研究和安全性研究。用一句话概括, 要生产出合格的疫苗产品, 必须首先在动物实验中证明它的安全有效以后才能进入临床试验。

3.3.5 影响安全和有效的因素 安全性和有效性是影响 SARS-CoV-2 疫苗研发成功与否的重要因素, 伴随着疫苗制备工艺的差异, 会导致不同的安全性问题。如疫苗本身的生物学特征可诱发人体免疫系统不良反应和意外感染, 疫苗的纯度和均一性可引起局部炎症和过敏反应, 制备工艺的稳定性、佐剂的添加, 甚至制备工程中灭活不完全、毒性逆转等因素都可能影响临床使用的安全性。

为了评估疫苗的安全性和有效性, 科学家正在开发针对 COVID-19 的特异性动物模型, 包括 ACE2 转基因小鼠、仓鼠、雪貂和非人类灵长类动物, 并通过临床前动物试验筛选毒性低, 免疫效果好的候选分子, 为后续的临床试验提供临床前数据, 降低临床风险。

3.4 研发全过程科学监管保证

我国对疫苗的监管贯穿研发、生产、上市前和上市后等全过程, 并逐步建立了一整套完善的从疫苗研究、生产到使用的系列技术规范、技术指标和符合世界卫生组织(WHO)标准的疫苗国家监管体系, 实现了从源头到终端的质量控制和监管。

4 讨论和结论

在半年时间里, 针对 SARS-CoV-2 的疫苗研发, 获得了可喜的进展, 据世界卫生组织公布的数据显示多种疫苗正在试验之中。有成功, 也有失败。今

年5月22日, The Lancet 杂志在线发表首个国产新冠疫苗I期临床试验结果, 研究团队来自军事科学院军事医学研究院等, 研究结果表明该疫苗是安全的, 具有良好的耐受性, 能够在人体内诱导产生针对 SARS-CoV-2 的免疫应答^[56], 该疫苗成功迈出了关键的一步。也注意到作者在文中指出的不足, 该试验的主要局限性是样本量还不足、观察持续时间相对较短以及缺乏随机对照组, 这限制了研究团队发现该疫苗更罕见的不良反应的能力, 或者限制了该疫苗在产生免疫应答能力方面提供更为充足的证据。研究者认为, 该疫苗在上市前试验, 还需要进一步的研究。牛津疫苗曾在猴子身上显示出希望, 但动物试验失败了^[57]。该疫苗名为 AZD1222, 由牛津大学研发、阿斯利康获得生产授权。5月21日牛津大学公布的动物实验数据显示, 这款疫苗的效果并不理想。参与疫苗注射的恒河猴均感染了 SARS-CoV-2, 其中3只猴子感染后呼吸加速, 症状明显。在结束此文之前, 作者认为还有下列情况值得注意。

4.1 疫苗研发面临的风险和挑战

疫苗从研发到上市是一个漫长的过程, 期间需要解决众多的关键科学问题, 并获取与安全性和有效性相关的广泛信息。尤其是针对像 SARS-CoV-2 这样传播速度快、传播途径广的病毒, 可能会面临更多的风险与挑战。

(1) 疫苗对遏制 SARS-CoV-2 大流行的重要性: 疫苗能够使人类或动物对特定的传染病产生免疫力, 大规模接种疫苗将有助于建立所谓的“群体免疫”(herd immunity), 进而实现对传染病传播的控制。这种免疫不仅将保护个人免受病毒感染, 而且还将保护整个社会, 甚至高危群体免受病毒的侵害, 遏制病毒流行。

(2) SARS-CoV-2 疫苗开发的特殊性: 与流感疫苗不同, 目前人类还没有发现针对任何冠状病毒的疫苗。近年, 人类针对流感病毒免疫, 已建立了流感疫苗平台, 而且证明是安全和有效的疫苗生产平台。但针对冠状病毒, 如 SARS-CoV-1 (2003) 和 MERS-CoV (2013) 设计的实验疫苗的数据仍然有限, 基本上停留在实验室阶段, 即便进入临床研究, 也仅仅在 I 期临床试验中。因此, 开发安全有效的 SARS-CoV-2 疫苗将会在技术上面临重大的挑战。

4.2 “群体免疫”不能代替疫苗

对于 SARS-CoV-2 这一新发病毒, 各国都在寻找不同策略进行防控。今年3月, 有的国家提出“群

体免疫”而受到广泛关注。关于“群体免疫”是否具有可行性, 一直是流行病学关注的课题。一般的理解, 实现“群体免疫”的方法, 主要是通过疫苗预防接种来实现。但目前人类尚无 SARS-CoV-2 疫苗的情况下, 要实现群体免疫, 只能是自然感染后自我形成免疫能力, 或感染后自愈(形成抗体)。自然感染获得免疫是一自然发展过程, 依此来应对疫情, 还是难以应对的^[58]。从整个传染病预防过程来看, 获得免疫最合适的方式是接种疫苗。

4.3 疫苗-抗体-免疫力的关系

免疫功能就是人体外来病原体的“防御”能力, 人体自动防御机制, 能识别病毒, 在其入侵时, 人体就会产生相应的抗体或免疫物质来保护机体, 清除“病毒”。SARS-CoV-2 作为一个单正链 RNA 病毒, 其结构可能无时无刻都在发生变异, 因此加大了疫苗研究开发的难度, 同时也提高了失败的风险。

4.4 研发需要合作

疫情暴发以来, 针对 COVID-19 的全球疫苗研发工作是前所未有的。由于 SARS-CoV-2 流行范围广泛, 变异速度快, 为了获取更全面的病毒数据需要国际间的协调与合作, 以确保足够的信息和研究能力。

4.5 结论

本文以提高 SARS-CoV-2 疫苗研发的科学性为根本, 从研发全过程中的科学监管、质量控制、法规和技术要求、国际标准、临床前研究以及临床研究等方面认识疫苗研发的系统工程特点。还就疫苗研发的风险和挑战、“群体免疫”与疫苗免疫、疫苗—抗体—免疫力的关系和国际合作等方面进行了讨论。总之, 控制和消灭传染病的传播, 必须针对传染源、传播途径和易感人群进行防控, 疫苗对控制感染、发病和流行起着重要作用。

参考文献

- [1] Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, et al. et al. *Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19)* [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- [2] Lake M A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research [J]. Clin Med (London), 2020, 20(2): 124-127.
- [3] Adhikari S P, Meng S, Wu Y J, et al. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review [J]. Infect Dis

- Poverty, 2020, 9(1): 29.
- [4] Li T S, Lu H Z, Zhang W H. Clinical observation and management of COVID-19 patients [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 687-690.
 - [5] Jin Y, Yang H, Ji W, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19 [J]. Viruses, 2020, 12(4): E372.
 - [6] Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [J]. Lancet, 2020, 395(10229): 1054-1062.
 - [7] 刘昌孝, 王玉丽, 闫凤英. 认识新型冠状病毒肺炎, 关注疫情防控药物研发 [J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(2): 93-102.
 - [8] 刘昌孝, 伊秀林, 王玉丽, 等. 认识新冠病毒(SARS-CoV-2), 探讨抗病毒药物研发策略 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 361-371.
 - [9] 刘昌孝, 王玉丽, 张洪兵, 等. 应用"房室模型"动力学认识新型冠状病毒肺炎(COVID-19)爆发期的传播规律[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(4): 597-606.
 - [10] Song W F, Gui M, Wang X Q, et al. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2 [J]. PLoS Pathog, 2018, 14(8): e1007236.
 - [11] Markus H, Hanah K W, Nadine K, et al. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells [J]. BioRxiv, 2020: 1-23.
 - [12] Wrapp D, Wang N S, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. BioRxiv, 2020: 2020.02.11.944462.
 - [13] Wadman M, Couzin-Frankel J, Kaiser J, et al. How does coronavirus kill? Clinicians trace a ferocious rampage through the body, from brain to toes [J]. Science, 2020. Doi:10.1126/science.abc3208
 - [14] Weingartl H, Czub M, Czub S, et al. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets [J]. J Virol, 2004, 78(22): 12672-12676.
 - [15] Yip M S, Leung N H, Cheung C Y, et al. Antibody-dependent infection of human macrophages by severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. Virol J, 2014, 11: 82.
 - [16] Czub M, Weingartl H, Czub S, et al. Evaluation of modified vaccinia virus Ankara based recombinant SARS vaccine in ferrets [J]. Vaccine, 2005, 23(17/18): 2273-2279.
 - [17] Jaume M, Yip M S, Kam Y W, et al. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralization and enhancement [J]. Hong Kong Med J, 2012, 18 Suppl 2: 31-36.
 - [18] Wang S F, Tseng S P, Yen C H, et al. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 451(2): 208-214.
 - [19] Du L Y, Tai W B, Yang Y, et al. Introduction of neutralizing immunogenicity index to the rational design of MERS coronavirus subunit vaccines [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13473.
 - [20] 杨利敏, 田德雨, 刘文军. 新型冠状病毒疫苗研究策略分析 [J]. 生物工程学报, 2020, 36(4): 593-604.
 - [21] 全国人大常委会. 中华人民共和国药品管理法 [S]. 2019-08-26.
 - [22] 全国人大常委会. 中华人民共和国疫苗管理法 [S]. 2019-06-29
 - [23] 国务院. 中华人民共和国药品管理法实施条例 [S]. 2019-03-02.
 - [24] 国家市场监督管理总局. 药品注册管理办法 [S]. 2020-03-31.
 - [25] 国家食品药品监督管理局. 预防用疫苗临床前研究技术指导原则 [S]. 2015-03-03.
 - [26] 国家食品药品监督管理局. 生物制品生产工艺过程变更管理技术指导原则 [S]. 2018-07-02.
 - [27] 国家食品药品监督管理局. 联合疫苗临床前和临床研究技术指导原则 [S]. 2019-05-23.
 - [28] 国家食品药品监督管理局. 多肽疫苗生产及质控技术指导原则 [S]. 20-03-23.
 - [29] 国家食品药品监督管理局. 结合疫苗质量控制和临床研究技术指导原则 [S]. 2016-12-31.
 - [30] 国家食品药品监督管理局. 预防用疫苗临床试验不良反应分级标准指导原则 [S]. 2019-12-31.
 - [31] 国家食品药品监督管理局. 疫苗临床试验技术指导原则 [S]. 2005-10-14.
 - [32] Tung T L, Zacharias A, Arun K, et al. The COVID-19 vaccine development landscape [J]. Nat Rev Drug Dis, 2020, 19: 305-306.
 - [33] Shailendra K. Saxena. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* [M]. 2020, Centre for Advanced Research, King George's Medical University, Lucknow, India, doi: 10.1007/978-981-15-4814-7_1.
 - [34] Tu Y F, Chien C S, Aliaksandr A. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2657.
 - [35] Zhang J C, Xie B, Hashimoto K. Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis [J]. Brain Behav Immun, 2020: S0889-S1591(20) 30589-4.

- [36] Dowd K A, Ko S Y, Morabito K M, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus [J]. *Science*, 2016, 354(6309): 237-240.
- [37] Kibuuka H, Berkowitz N M, Millard M, et al. Safety and immunogenicity of Ebola virus and Marburg virus glycoprotein DNA vaccines assessed separately and concomitantly in healthy Ugandan adults: a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Lancet*, 2015, 385(9977): 1545-1554.
- [38] Gaudinski M R, Houser K V, Morabito K M, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials [J]. *Lancet*, 2018, 391(10120): 552-562.
- [39] Trevor R F, Patel A, Ramos S, et al. Rapid development of a synthetic DNA vaccine for COVID-19 [J]. *Nat Res*, 2020, Doi: 10.21203/rs.3.rs-16261/v1.
- [40] Li L, Sun T, He Y, et al. Epitope-based peptide vaccine design and target site characterization against novel coronavirus disease caused by SARS-CoV-2 [J]. *BioRxiv*, 2020, Doi.org/10.1101/2020.02.25.965434.
- [41] Zhou D, Tian X, Qi R, et al. Identification of 22 N-glycosites on spike glycoprotein of SARS-CoV-2 and accessible surface glycopeptide motifs: implications on vaccination and antibody therapeutics [J]. *Glycobiology*, 2020. Doi: 10.1093/glycob/cwaa052.
- [42] Ou X, Liu Y, Lei X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-12.
- [43] Shang W L, Yang Y, Rao Y F, et al. The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines [J]. *NPJ Vaccines*, 2020, 5: 18.
- [44] Ahmed S F, Quadeer A A, McKay M R. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies [J]. *Viruses*, 2020, 12(3): 254.
- [45] Sarkar B, Ullah M A, Johora F T, et al. The Essential Facts of Wuhan Novel Coronavirus Outbreak in China and Epitope-based Vaccine Designing against 2019-nCoV [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.05.935072>.
- [46] Cicala C, Nawaz F, Jelicic K, et al. HIV-1 gp120: a target for therapeutics and vaccine design [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 17(1): 122-135.
- [47] Li Y, Liu B, Cui J, et al. COVID-19 evolves in human hosts [EB/OL]. (2020-03-20)[2020-05-20]. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3562070>.
- [48] Tirado S M, Yoon K J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease [J]. *Viral Immunol*, 2003, 16(1): 69-86.
- [49] Wan Y S, Shang J, Sun S H, et al. Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry [J]. *J Virol*, 2019, 94(5): 2015-2019. Doi: 10.1128/jvi.02015-19.
- [50] Bao L, Deng W, Gao H, et al. Lack of reinfection in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2 [J]. *bioRxiv*, 2020, Doi: [org/10.1101/2020.03.13.990226](https://doi.org/10.1101/2020.03.13.990226). 13:35:38.
- [51] 杨田田, 薛松, 秦蒙. 基于新型冠状病毒结构蛋白的诊疗技术的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(5): 1015-1023.
- [52] Zhou L, Gu J X. N-glycosylation sites analysis and nonconsensus N-glycosylated sequences [J]. *Life Sci*, 2011, 23(6): 606-611.
- [53] Vigerust D J, Shepherd V L. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions [J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15(5): 211-218.
- [54] Xiang T, Zhang X L. Glycosylation modification and related functions of virus and host cells [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2017, 44(10): 898-907.
- [55] Shang W L, Yang Y, Rao Y F, et al. The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines [J]. *NPJ*, 2020. Doi: [org/10.1038/s41541-020-0170-0](https://doi.org/10.1038/s41541-020-0170-0).
- [56] Zhu F C, Li Y H, Guan X H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial [J]. *The Lancet*, 2020, 389(10069): 621-628.
- [57] Pragativadi News Service. Oxford varsity's COVID-19 vaccine fails to prevent infection in animal trials [EB/OL]. (2020-05-20)[2020-05-25]. <https://pragativadi.com/oxford-varsitys-covid-19-vaccine-fails-to-prevent-infection-in-animal-trials/>
- [58] Liu C X. Pay attention to situation of SARS-CoV-2 and TCM advantages in treatment of novel coronavirus infection [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(2): 97-103.