

· 新型冠状病毒肺炎研究 ·

冠状病毒疫苗研究进展及2019新型冠状病毒疫苗研发展望

张明顺^{1,2*}, 吉宁飞³

¹南京医科大学基础医学院免疫学系, ²国家卫生健康委员会抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南京 210029

[摘要] 2019新型冠状病毒传染性强,危重症发生率高,亟需有效的防控手段。疫苗接种是保护易感者,阻断传染性疾病传播的重要措施。文章总结了2002年SARS冠状病毒和2012年MERS冠状病毒疫苗灭活疫苗、亚单位疫苗和DNA疫苗研究进展。结合冠状病毒疫苗研究进展、牛痘苗的历史经验以及2019新型冠状病毒的特点,展望了2019新型冠状病毒疫苗研发的可能途径。

[关键词] 2019新型冠状病毒;灭活疫苗;亚单位疫苗;DNA疫苗

[中图分类号] R563.14

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)02-151-05

doi:10.7655/NYDXBNS20200201

Research and development of coronavirus vaccine and prospect of 2019 novel coronavirus vaccines

ZHANG Mingshun^{1,2*}, JI Ningfei³

¹Department of Immunology, ²Key Laboratory of Antibody Techniques, National Health Commission, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ³Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] The emergence and outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) have posed a great challenge. Vaccination is an effective way to protect the susceptible from the spread of infectious diseases. The purpose of this essay is to review the inactivated vaccine, subunit vaccine and DNA vaccine research progress of 2002 severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and 2012 middle east respiratory syndrome (MERS) coronavirus. Combined with the coronavirus vaccine progress, the history of vaccinia vaccine, and the characteristics of coronaviruses, we provide some potential approaches of vaccine development for 2019-nCoV.

[Key words] 2019 novel coronavirus; inactivated vaccine; subunit vaccine; DNA vaccine

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02): 151-154, 159]

2019年12月,新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)从武汉海鲜市场开始在人群中扩散^[1],截止2020年2月19日24时,2019-nCoV感染累计确诊74576例,死亡2118例(信息来自国家卫生健康委员会官方网站)。中国国家卫生健康委员会将2019-nCoV引起的疾病统称为新型冠状病毒肺炎。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81671563)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: mingshunzhang@njmu.edu.cn

。世界卫生组织(WHO)将2019-nCoV引起的疾病称为2019冠状病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)^[2]; 2019-nCoV可能不仅仅引起肺部损害,还可能引起消化道感染^[3]和其他脏器损伤。世界病毒分类委员会将2019-nCoV命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[4]。国内外对于将2019-nCoV命名为SARS-CoV-2尚有一定争议,建议修正为2019人类冠状病毒(human coronavirus 2019, HCoV-19)^[5]。本文用2019-nCoV指代2019新

型冠状病毒。

冠状病毒是单正链RNA包膜病毒,广泛存在于自然界中。人类冠状病毒如229E、OC43、NL63和HKU1等一般引起轻中度的呼吸道感染症状^[6]。2002年,严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)冠状病毒(SARS-CoV)在国内爆发^[7],WHO估计SARS确诊8098例,死亡774例,病死率近10%^[8]。2012年,中东呼吸综合征(middle east respiratory syndrome, MERS)冠状病毒(MERS-CoV)在沙特等地爆发^[9],WHO估计MERS确诊1879例,死亡659例,病死率高达35%^[10]。不同于SARS和MERS症状典型,2019-nCoV感染后部分感染者无症状,无症状感染者影响了对2019-nCoV病死率的估算。在1099例病原学确诊病例中,死亡15例,病死率1.4%^[11],低于SARS或者MERS。

传染性疾病的防控三原则是控制传染源、阻断传播途径和保护易感者。疫苗是保护易感者、阻断传染性传播的有效手段,疫苗的发展和应用是现代文明的重要特征。从疫苗的组成和工作原理区分,疫苗有多种类型:传统疫苗(灭活疫苗、减毒活疫苗)、亚单位疫苗、重组载体疫苗、DNA疫苗以及RNA疫苗等。本文旨在回顾SARS-CoV和MERS-CoV传统疫苗、亚单位疫苗和DNA疫苗研究进展,并以此展望2019-nCoV疫苗研究。

1 灭活疫苗

2002年11月,SARS爆发;2003年4月,分离得到SARS-CoV病毒株^[12]。2004年9月,暨南大学报道,福尔马林灭活疫苗接种Balb/c小鼠,诱导出高滴度SARS-CoV抗体^[13]。2005年5月,中国科学院武汉病毒所报道,应用福尔马林灭活的SARS-CoV疫苗接种猕猴,可以安全有效地诱导出中和抗体。但遗憾的是,SARS-CoV猕猴感染模型症状不典型,实验没有能够回答灭活疫苗是否有保护效果^[14]。2007年2月,北京中日友好医院报道, β -丙醇酸内酯灭活的SARS-CoV疫苗接种健康受试者后,可诱导有效的免疫应答^[15]。雪貂是流感病毒研究的模式动物,感染SARS-CoV后,雪貂出现发热、流鼻涕和喷嚏等SARS典型症状。在雪貂感染冠状病毒模型中,福尔马林灭活疫苗可以诱导出SARS-CoV抗体,疫苗接种动物的排毒时间缩短1周^[16]。与SARS-CoV疫苗研究历程类似,2012年MERS爆发,2016年MERS-CoV灭活疫苗接种小鼠^[17],虽然灭活疫苗成功诱导出中和抗体,但是灭活疫苗接种后的小鼠,

肺脏出现超敏反应损伤,提示灭活疫苗可能不是有效防控MERS的候选疫苗。2020年1月24日,浙江省疾病预防控制中心分离得到2019-nCoV病毒株。病毒株分离成功,给传统疫苗(灭活疫苗、减毒活疫苗)的制备带来了曙光。

虽然目前2019-nCoV的免疫发病机制尚不明确,但我国有SARS灭活疫苗研发的丰富经验。在分离出2019-nCoV病毒株的基础上,我们应该尝试2019-nCoV灭活疫苗方案,包括:(1)分离更多的2019-nCoV病毒株进而选择合适的病毒株作为疫苗株;(2)建立病毒的大规模培养及灭活方案;(3)免疫佐剂的使用及小鼠等动物实验以验证安全性和免疫原性。2019-nCoV灭活疫苗是否能够安全有效的诱导免疫应答,尚需临床实验进行评价。

2 亚单位疫苗

灭活疫苗成分复杂,含有病毒体的多种结构蛋白和非结构蛋白。亚单位疫苗组成简单,一般仅含有一种或者几种病毒蛋白,不需要病毒的培养与灭活,生物安全性相对更高。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)亚单位疫苗通过重组病毒蛋白乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)可诱导中和抗体,HBsAg亚单位疫苗接种有效阻断了HBV在中国的传播,证明了亚单位疫苗的免疫效果。

冠状病毒重要结构蛋白刺突蛋白(spike, S),与病毒进入易感细胞密切相关,其近N端的S1功能结构域含有受体结合区(receptor binding domain, RBD),与细胞表面的血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)结合,通过近C端的S2功能结构域与细胞膜融合,介导病毒进入细胞。与SARS-CoV比较,2019-nCoV的S蛋白尤其是RBD有4个氨基酸突变,但S蛋白仍可与ACE2有效结合^[18]。体外细胞实验证明,ACE2是2019-nCoV的识别受体^[19]。冷冻电镜观察发现,2019-nCoV的S蛋白胞外区结构与SARS-CoV高度相似^[20],但2019-nCoV的S蛋白与ACE2的结合力更高,这可能是2019-nCoV高传染性的原因之一。遗憾的是,SARS-CoV的中和抗体S230等不能有效结合2019-nCoV的S蛋白,提示解析2019-nCoV的S蛋白中和表位、研发S蛋白亚单位疫苗的必要性。

SARS-CoV主要有S蛋白、膜蛋白(membrane, M)、核衣壳蛋白(nuclear, N)和以及3a蛋白等结构蛋白^[21]。M蛋白和3a蛋白也可以诱导中和抗体,N蛋白可以通过交叉提呈诱导CD8⁺T细胞活化。需要

注意的是,病毒蛋白具有多种生物学功能,如3a蛋白可以下调I型IFN通路降低抗病毒免疫^[22],活化炎症小体增强炎症性损伤。根据基因组测序信息,2019-nCoV可能包括S蛋白、M蛋白、N蛋白、E蛋白以及1ab/3/7/8/9/10b/13/14等12种结构蛋白^[23]。针对这些结构蛋白功能与免疫原性进一步分析,将有助于2019-nCoV亚单位疫苗的研发。

3 DNA疫苗

相较于亚单位疫苗,DNA疫苗在体内表达病毒蛋白抗原,模拟了病毒蛋白在宿主细胞内的表达,可以更好地保持病毒蛋白的天然构象表位。DNA疫苗在宿主细胞中表达病毒蛋白,可以诱导相对平衡的细胞免疫应答和体液免疫应答。传统疫苗需要培养完整的病毒颗粒,亚单位疫苗则需要表达和纯化目的蛋白,而DNA疫苗只需要制备含有抗原基因序列的表达质粒,制备工艺简单。早于SARS-CoV灭活疫苗(2004年9月)^[13],2004年4月已有研究报道,编码SARS-CoV S蛋白的DNA疫苗在小鼠体内可诱导细胞免疫应答和中和抗体^[24]。更重要的是,在SARS-CoV攻毒实验中,接种DNA疫苗小鼠体内的SARS-CoV基本被完全清除,显示DNA疫苗具有强大的保护效果。2008年11月,SARS-CoV S蛋白DNA疫苗在I期临床实验中诱导保护性细胞免疫应答和中和抗体^[25]。SARS-CoV的结构蛋白,如N蛋白和M蛋白等,在DNA疫苗研究也有报道^[8]。有趣的是,M蛋白能比S蛋白更有效地诱导中和抗体和细胞免疫应答。MERS-CoV S蛋白DNA疫苗是首个进入I期临床的MERS疫苗,研究结果显示其在小鼠、骆驼和猕猴中具有较好的免疫原性,并在肺部感染模型中能够保护猕猴不受MERS病毒感染的影响^[26]。I期临床实验结果显示,大部分受试者能够检测到疫苗诱导的体液免疫和细胞免疫反应,不良反应轻微且自限^[27]。

制备2019-nCoV DNA疫苗需有两个重要前提:第一是基因组信息,尤其是病毒蛋白基因编码序列;第二是病毒的生物学特征和疾病的发病机制。2019-nCoV病毒的生物学特征和疾病发病机制的阐明,有助于指导选择病毒蛋白作为适合的DNA疫苗抗原。随着2019-nCoV的生物学特征和疾病发病机制研究的深入,同时参考SARS-CoV和MERS-CoV疫苗的研究经验,我们可以优先选择S蛋白和(或)M蛋白、N蛋白等制备单价或者多价DNA疫苗。目前分离得到的2019-nCoV不同病毒株的基因组序列

高度一致。随着感染在人群中的不断扩散和可能发生的病毒免疫逃逸,2019-nCoV是否会发生突变进而改变靶抗原的免疫原性?参考HIV-1 DNA疫苗研究经验^[28],可以考虑在2019-nCoV DNA疫苗中包括多个冠状病毒株的S蛋白编码序列从而更好地诱导广谱中和抗体。

4 对2019新型冠状病毒疫苗研发的思考与展望

4.1 安全性和有效性

对疫苗接种安全性的担忧,首先来自于疫苗本身。灭活疫苗,接种剂量大,可能会引起发热等;减毒活疫苗,在接种体内复制,可能在免疫功能异常个体引起严重后果。在I期临床实验中,健康志愿者可以耐受SARS-CoV灭活疫苗^[15],提示冠状病毒灭活疫苗是安全的。2019-nCoV与SARS-CoV亲缘关系近,即便如此,在获得2019-nCoV灭活疫苗安全有效的直接证据之前必须时刻谨慎。亚单位疫苗是在体外表达、纯化的病毒蛋白,不利于保持蛋白的构象表位;且亚单位疫苗一般免疫原性比较弱。对于DNA疫苗安全性最大的担忧,来自于其可能随机整合到宿主基因组上。近30年的DNA疫苗研究已经充分证明了DNA疫苗人群接种的安全性。DNA疫苗在人体内的免疫效果比较弱,采用DNA疫苗初次免疫、蛋白质疫苗加强免疫等免疫策略,可以有效增强DNA疫苗的免疫效果^[28]。DNA疫苗与亚单位疫苗的联合应用,或许是2019-nCoV疫苗的研究方向之一。

2019-nCoV患者的血清中含有能阻断病毒感染的中和抗体^[19];康复期患者血浆能够快速降低2019-nCoV患者病毒载量,有效缓解临床症状。但是,疫苗接种后引起的免疫应答也是双刃剑,抗体既可能结合病毒受体阻断病毒传播,也可能结合Fc受体促进病毒感染,如SARS-CoV的S蛋白单克隆抗体可促进巨噬细胞感染^[29];猫传染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV,猫冠状病毒)S蛋白的单克隆抗体可能促进病毒巨噬细胞感染^[30];MERS-CoV灭活疫苗诱导超敏反应而加重肺部损害^[17]。随着对2019-nCoV致病机制的进一步了解,将有助于选择更安全有效的疫苗株和靶抗原。

4.2 牛痘苗是否有助于2019新型冠状病毒疫苗的研究

历史上最成功的疫苗是牛痘苗,消除了人间天花病毒的传播。牛痘苗的本质是感染牛的天花病毒,具有种属特异性。牛痘苗诱导交叉性保护免疫

应答,受试者获得抵抗天花病毒感染的免疫保护力。在动物中,也有各种冠状病毒^[31],如FIPV、血凝性脑脊髓炎病毒(hemagglutinating encephalomyelitis virus, HEV,猪冠状病毒)、传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV,禽冠状病毒)以及小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV,鼠冠状病毒)。这些动物冠状病毒也有种属特异性。人类与猫/猪等共存了千年,FIPV/HEV等的安全性是否与牛痘苗相当?更关键的是,FIPV/HEV是否可能会诱导交叉性保护应答?目前动物冠状病毒减毒疫苗已经在畜牧业中得到了有效应用,这些冠状病毒减毒疫苗是否有助于对阻断2019-nCoV传播?这些问题值得进一步探讨。

4.3 2019-nCoV疫苗何时问世

虽然2019-nCoV尚未构成世界疫情大流行,但是其传播性已经远远超过了SARS-CoV。2004年之后,SARS仅有新加坡的实验室感染报道^[32]。SARS“消失”了,完成了I期临床实验的SARS-CoV灭活疫苗因此也失去了历史使命。鉴于2019-nCoV与SARS-CoV的亲缘关系,尘封已久的SARS-CoV灭活疫苗是否可以诱导出针对2019-nCoV的交叉免疫保护还有待进一步研究。如果直接使用SARS-CoV灭活疫苗来预防2019-nCoV,那么疫苗的研制和临床应用将是最快捷的。否则,从SARS和MERS疫苗的研究历史来看,2019-nCoV疫苗必须历经动物实验和临床实验,不可能一蹴而就。从2002年SARS爆发近20年来,中国的科研能力已得到长足发展,相信并期待科研工作者能早日成功研制出2019-nCoV疫苗,为我们战胜2019-nCoV传播提供战略性武器。

[参考文献]

- [1] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-733
- [2] SMITH N, FRASER M. Straining the system: novel coronavirus (covid-19) and preparedness for concomitant disasters [J]. *Am J Public Health*, 2020; e1 - e2, doi: 10.2105/AJPH.2020.305618
- [3] ZHANG H, KANG Z J, GONG H Y, et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCoV infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.01.30.927806
- [4] GORBALENYA A E, BAKER S C, BARIC R S, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses - a statement of the Coronavirus Study Group [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.07.937862
- [5] JIANG S B, SHI Z L, SHU Y L, et al. A distinct name is needed for the new coronavirus [J]. *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30419-0
- [6] FIELDING B C. Human coronavirus NL63: a clinically important virus? [J]. *Future Microbiol*, 2011, 6(2): 153-159
- [7] PEIRIS J S, GUAN Y, YUEN K Y. Severe acute respiratory syndrome [J]. *Nat Med*, 2004, 10(12 Suppl): S88-S97
- [8] ROPER R L, REHM K E. SARS vaccines: where are we? [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(7): 887-898
- [9] ZAKI A M, BOHEEMENS V A N, BESTEBROER T M, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(19): 1814-1820
- [10] ARABI Y M, BALKHY H H, HAYDEN F G, et al. Middle east respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(6): 584-594
- [11] GUAN W, NI Z, HU Y, et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China [J]. *MedRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.06.20020974
- [12] KSIAZEK T G, ERDMAN D, GOLDSMITH C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1953-1966
- [13] XIONG S, WANG Y, ZHANG M, et al. Immunogenicity of SARS inactivated vaccine in BALB/c mice [J]. *Immunol Lett*, 2004, 95(2): 139-143
- [14] ZHOU J, WANG W, ZHONG Q, et al. Immunogenicity, safety, and protective efficacy of an inactivated SARS-associated coronavirus vaccine in rhesus monkeys [J]. *Vaccine*, 2005, 23(24): 3202-3209
- [15] LIN J, ZHANG J, SU N, et al. Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine [J]. *Antivir Ther*, 2007, 12(7): 1107-1113
- [16] DARNELL M E, PLANT E P, WATANABE H, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vaccinated ferrets [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(9): 1329-1338
- [17] AGRAWAL A S, TAO X, ALGAISSI A, et al. Immunization with inactivated middle east respiratory syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(9): 2351-2356
- [18] WAN Y, SHANG J, GRAHAM R, et al. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS [J]. *J Virol*, 2020, doi: 10.1128/JVI.00127-20
- [19] ZHOU P, YANG X, WANG X, et al. A pneumonia out- (下转第159页)

- mation [J]. *BioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.944462>
- [22] ZHOU P, YANG X, WANG X, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin [J] [J]. *BBioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914952>
- [23] ZHANG X, QI X, ZHANG Q, et al. Human 4F5 single-chain Fv antibody recognizing a conserved HA1 epitope has broad neutralizing potency against H5N1 influenza A viruses of different clades [J]. *Antiviral Res*, 2013, 99 (2):91-99
- [24] ZHANG X, ZHANG C, LIU Y, et al. Construction of scFv phage display library with hapten-specific repertoires and characterization of anti-ivermectin fragment isolated from the library [J]. *Eur Food Res Technol*, 2010, 231 (3) : 423-430
- [收稿日期] 2020-02-18

(上接第 154 页)

- break associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
- [20] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, doi: 10.1126/science.abb2507
- [21] ENJUANES L, DEDIEGO M L, ALVAREZ E, et al. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease [J]. *Virus Res*, 2008, 133(1):45-62
- [22] MINAKSHI R, PADHAN K, RANI M, et al. The SARS coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type I interferon receptor [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (12):e8342
- [23] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- [24] YANG Z Y, KONG W P, HUANG Y, et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice [J]. *Nature*, 2004, 428 (6982) : 561-564
- [25] MARTIN J E, LOUDER M K, HOLMAN L A, et al. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a phase I clinical trial [J]. *Vaccine*, 2008, 26(50):6338-6343
- [26] MUTHUMANI K, FALZARANO D, REUSCHEL E L, et al. A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(301):301ra132
- [27] MODJARRAD K, ROBERTS C C, MILLS K T, et al. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(9):1013-1022
- [28] FYNAN E F, LU S, ROBINSON H L, et al. One group's historical reflections on dna vaccine development [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(9):966-970
- [29] 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 (1):82
- [30] OLSEN C W, NGICHABE C K, BAINES J D, et al. Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages [J]. *J Virol*, 1992, 66(2):956-965
- [31] HOLMES K V. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111 (11) : 1605-1609
- [32] LIM P L, KURUP A, GOPALAKRISHNA G, et al. Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(17):1740-1745
- [收稿日期] 2020-02-20