

Omicron 毒株全球流行趋势下减毒活疫苗的开发策略及研究进展



刘泽^{1,2}, 黄金海¹, 高辉^{2,*}

¹天津大学生命科学学院, 天津 300072

²中逸安科生物技术股份有限公司, 天津 300400

摘要: 新冠病毒的持续变异给疫苗研发和应用的全球抗疫进程带来新的挑战, 随着 Omicron 毒株已占主导地位的全球大流行的背景之下, 创新疫苗成为全球科研上新的征战。减毒活疫苗在全球消除脊灰、麻疹等重要传染病行动计划中发挥了重要作用, 且减毒活疫苗在动物冠状病毒的预防控制中具有先进的运用实践, 所以它在新冠疫情的防控中应当成为一条重要的研发管线。本文从冠状病毒血清型和流行病 R0 方面分析其必要性, 从动物减毒冠状病毒活疫苗的运用中分析其可行性。重点对 COVI-VAC、d16、CPD 和 VAS5 四种目前完成临床前研究的减毒活疫苗, 从设计原理、减毒株生长特性、动物安全性、免疫原性和交叉保护效果方面进行分析讨论。基于现代疫苗学和基因组学的深入研究, 新冠减毒活疫苗的开发具备理论和实践基础。

关键词: 新冠病毒; Omicron 株; 减毒活疫苗; 中和抗体; 交叉保护

DOI: [10.57237/j.mrf.2024.01.001](https://doi.org/10.57237/j.mrf.2024.01.001)

Reviewed the Research Strategy and Progress of SARS-CoV-2 Live Attenuated Vaccine Under the Global Omicron Epidemic Trend

Liu Ze^{1,2}, Huang Jinhai¹, Gao Hui^{2,*}

¹School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

²The Zhongyi Anke Biotech Co., Ltd, Tianjin 300400, China

Abstract: Since the continuous mutation of SARS-CoV-2, it became new challenges to the global COVID-19 epidemic, including vaccine prevention and treatment. Because of the global pandemic Omicron strain, which had been dominant epidemic strain, the new innovative vaccine had been improved into an important field, by global scientists. Live attenuated vaccines (LAV) had played a key role in the global action plan to eliminate polio, measles and other important infectious diseases. Additionally, LAV had advanced practical experience in the prevention and control of animal coronaviruses. So the LAV of SARS-CoV-2 should be seriously considered as a useful and important way. In this review, it analyzed its necessity from coronavirus serotype and epidemic R0 trend, and studied its feasibility from the application of animal coronavirus LAV. Herein, it focused on the four kinds of SARS-CoV-2 LAV that had completed their

基金项目: 云南省科技厅基础研究计划面上项目 (202201AT070243).

*通信作者: 高辉, gaohui86@126.com

收稿日期: 2023-11-30; 接受日期: 2023-12-27; 在线出版日期: 2024-01-20

<http://www.medresfront.com>

preclinical studies, COVI-VAC, d16, CPD and VAS5. Regarding their design principles, the growth characteristics of attenuated strains, their safety and immunogenicity in animal model and their cross-protection effects, these were all analyzed and discussed. So, the SARS-CoV-2 LAV had a solid theoretical and practical foundation, base on the modern vaccinology and genomics progress.

Keywords: SARS-CoV-2; Omicron Strain; Live Attenuated Vaccines; Neutralizing Antibody; Cross Protection

1 引言

在全球范围内,截至 2022 年 5 月 26 日,已向世卫组织报告了 524,878,064 例 COVID-19 确诊病例,其中 6,283,119 例死亡[1]。奥密克戎 (Omicron) BA.2 在 2021 年 11 月被发现以来在全球范围内迅速传播,给疫情防控带来压力。据美国疾病控制与预防中心 5 月 3 日发布的数据显示,BA.2.12 已占据 36.5% 的比例。在过去的两周里,这一增幅接近 100%。目前 BA.2.12 的病例呈指数级增长[2]。该变异毒株已于 2022 年 4 月 23 日在中国境内被发现[3]。另据世界卫生组织 (WHO) 总干事谭德塞于 5 月 4 日在日内瓦会议上表示,奥密克戎毒株的两种亚型 BA.4 和 BA.5 是南非最近病例激增的原因。通过比较 2021 年 11 月 26 日和 2022 年 1 月 26 日的当日新增病例数据,确诊病例由 662,354 激增至 4,034,367,增长率达到 509%。目前预防控制 COVID-19 疫情最经济有效的手段是接种疫苗。目前有多种疫苗在全球范围内被广泛使用,包括灭活疫苗、mRNA 疫苗、载体疫苗和重组蛋白疫苗等。在 Omicron 全球快速流行和 Delta 毒株进一步突变流行的趋势下,根据减毒活疫苗的性质特点,有必要开展相关管线的研发和应用。

2 新冠减毒活疫苗的血清学基础

冠状病毒 (coronavirus, CoV) 为有膜单股正链 RNA 病毒,壳病毒目,冠状病毒科,冠状病毒属,是目前所知的最大 RNA 病毒[4]。冠状病毒最早是 1937 年从鸡中分离出来,病毒颗粒的直径 60-200nm (平均 100nm),呈球形,病毒有包膜,包膜上存在棘突,形成冠状晕[5]。2012 年国际病毒分类命名委员会根据血清学特性和遗传学差异将冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 、 δ 4 个群,其中 β 群再分为 A、B、C 组[6]。目前共有 7 种冠状病毒能感染人,即 α 群中的 HCoV-229E 和 HCoV-NL63, β 群 A 组中的 HCoV-OC43 和 HCoV-HKU1, B 组中的非典型性肺炎病毒 (SARS-CoV) 和 2019 新

型冠状病毒 (SARS-CoV-2), C 组中的中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV)。人冠状病毒之间有广泛的交叉反应,如王压娣等研究发现 α 群中的 HCoV-NL63 和 β 群 A 组中的 HCoV-OC43 具有较好的交叉保护作用,它是冠状病毒不同群之间的交叉保护[7],或可假设同属于 β 群的相同 B 组内的冠状病毒间可能存在交叉保护。但是,流行病学和疫苗学调查研究结果不支持这种假设,即 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 无交叉保护,甚至 SARS-CoV-2 中的 Alpha (B.1.1.7) 与 Omicron (B.1.1.529) 间的交叉保护也非常有限[9, 10]。

根据目前流行 Omicron 株及其血清型和进化特征,来自杜克-新加坡国立大学医学院新发传染病专家王林发提出,根据 Omicron 毒株的免疫学特征,建议将其定义为 SARS-CoV-3,即一种与 SARS-CoV-2 完全不同的病毒[8]。研究表明此前感染过 SARS 并完成新冠疫苗接种的受试者对于对早期的 SARS-CoV-2 变异株甚至一些相关的动物病毒都具有很强的保护作用,但是对 Omicron 变异株没有保护力[11-13]。传染病专家研究表明,BA.4 和 BA.5 两种亚型都可以逃避曾感染 BA.1 亚型患者建立的免疫力,引发了在南非比 BA.2 亚型更高的感染峰值。

所以亟需新的疫苗来应对 Omicron 毒株及其变异株的广泛流行和新的潜在的突变进化毒株,新冠减毒活疫苗成为解决这一困难的关键:①减毒活疫苗策略显著区别于灭活疫苗或 mRNA 疫苗的多次序灌,减毒活疫苗可以避免反复多次接种,避免因不停接种导致的加重抗体选择压力下,又促进病毒变异的恶性循环;②灭活疫苗、mRNA 疫苗或者其它载体疫苗往往是针对既往发生的毒株的抗原或者基因,减毒活疫苗既可以保护已经发生和流行的毒株,还可以保护潜在突变株;③减毒活疫苗的使用其显著特点是能够阻断人群对病毒的感染,同时减少重症率和死亡率。但是,目

前几乎所有已经或正在临床试验中评估的疫苗都是基于灭活病毒或亚单位病毒制剂以及核酸疫苗，减毒活疫苗的研究工作需要进一步加强。

3 减毒活疫苗阻断感染和传播的流行病学基础

R_0 指的是基本再生数 (basic reproduction number)，在传染病学经典的模型中， R_0 值常被用来描述疫情的传染速率，疫情暴发的潜力和严重程度。一般情况下疾病暴发的增长率很高， R_0 通常很高；潜伏期和传染期越长，估计的 R_0 越高[14]。

在 2019 年底暴发新冠疫情伊始，中国 CDC 等机构发表的早期动态的初步估计 R_0 为 2.2 (95% CI, 1.4-3.9)。到 2020 年 2 月 11 日中国 CDC 发表的大规模病例研究对于 R_0 值出现上调，估计新冠肺炎 R_0 达 3.77，高于 SARS (0.85-3)。在 2020 年 4 月 7 日，美国疾控中心评估新冠病毒 R_0 为 5.7，传播力高于预期 2 倍。在 2022 年 3 月 9 日，研究者通过建模估算 Omicron 变异株的平均 R_0 为 9.5，基于英国、丹麦等国家的流行数据，估算其 R_0 是 12 [15-17]。

同样是呼吸道传染病的麻疹，其 R_0 为 12-16。全球消除麻疹计划正在进一步实施，其中麻疹减毒活疫苗的作用已经被历史经验所证明。由于麻疹灭活疫苗可引发 ADE，且保护效果有限，刺激机体产生的中和抗体水平有限。对比下，麻疹减毒活疫苗则安全有效，疫苗保护率达 97%-98%，麻疹减毒活疫苗的广泛接种将有助于全球消灭麻疹[18, 19]。所以，可以寄希望于通过新冠减毒活疫苗的广泛接种，达到控制甚至消除新冠疫情的目的。

4 冠状病毒减毒活疫苗在动物中的运用

冠状病毒感染遍布世界各地，能够感染多种哺乳动物和鸟类，人类对其进行的研究也已经持续了近一个世纪，已有多种禽类和兽类的冠状病毒减毒疫苗得到广泛运用，并发挥了积极作用[20-22]。这对于人用新冠减毒活疫苗的研发和使用具有借鉴意义。

鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 是鸡传染性支气管炎的病原体，最早分离于 1937 年，也是最早分离到的

冠状病毒。目前 IBV 血清型已有几十种，常见的有 Mass、D207、B1648、4/91、Italy 02、LX4 型等，不同血清型之间在毒力、致病性和组织嗜性上存在很大差异，相互间没有或仅有部分交叉免疫性。目前用于预防传染性支气管炎的疫苗种类很多，主要是减毒活苗[23, 24]。崔言顺教授指出研制鸡传染性支气管炎活疫苗与疫苗配套的血清学对于防控该病至关重要[25]。

在预防猪传染性胃肠炎和流行性腹泻中，多种类型的疫苗被使用，但是由属于冠状病毒的猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 二联减毒活疫苗[26-28]或者联合猪轮状病毒 (RV) 组成三联疫苗目前被广泛运用，并发挥了重要的保护作用。

在科学研究上，武汉大学研究提出 N7-甲基转移酶是正向开发冠状病毒减毒活疫苗的理想靶点，且该靶点及机制在冠状病毒属中具有广泛的保守性[29]。对冠状病毒非结构蛋白 14 (nsp14) N7-甲基转移酶功能的研究显示：它参与 RNA 帽的形成。并且 N7-甲基转移酶在不同的冠状病毒中非常保守，是开发针对冠状病毒的抗病毒药物的通用靶标[30]。研究者选取了鼠肝炎病毒 (MHV，一种高致病性模式冠状病毒，与 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 同属于 β 冠状病毒亚属) 作为研究模型，利用反向遗传学系统[31]正向开发了 N7-甲基转移酶的关键活性位点突变的两株突变病毒 rMHV D330A 和 Y414A，并鉴定了这两株重组减毒病毒的致病性和免疫原性。

N7-甲基转移酶缺陷型重组 MHV D330A 和 Y414A 在小鼠中高度减毒，并且在细胞培养物中表现出与野生型 (WT) 病毒相似的复制效率。此外，D330A 或 Y414A 的单剂量免疫可诱导长期体液免疫反应和强大的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞反应，这可以提供全面的保护来抵御致命剂量的 MHV-A59 的挑战。他们的研究提供了一种理想的策略，即通过删除病毒 RNA 的 N7-甲基转移酶活性来设计针对冠状病毒的减毒活疫苗，在鼠肝炎病毒中得到验证，可以为人用冠状病毒减毒活疫苗的制备提供参考。

不同物种冠状病毒共有的特点主要表现为：多具有相同的自然宿主；病毒感染产生的临床症状相似，以呼吸道感染为主，肠道感染为辅，冠状病毒侵袭的靶器官具有一定重叠；不同毒株间易产生重组突变，产生抗原性变异的新毒株，从而改变了病毒的细胞嗜性甚至宿主嗜性。这与 SARS-CoV-2 具有高度的相似性。国外采用传代减毒技术成功研发出了动物冠状病毒的减毒活疫苗，并避免减毒活疫苗毒株毒力返祖的

风险,同时减轻 ADE 效应。

5 新型冠状病毒减毒活疫苗的国内外研究进展

国家药品监督管理局药品审评中心早在 2020 年发布的《新型冠状病毒预防用疫苗研发技术指导原则(试行)》中,对减毒活疫苗做出了相应的规定。中国、印度和美国等采用基因重配、连续传代培养等多种方法开展了 SARS-CoV-2 减毒活疫苗开展了相关研究,并取得相应进展。

1、COVI-VAC [32]

COVI-VAC 是由英国的 Codagenix 和印度血清研究所合作开发的针对 SARS-CoV-2 的单次给药的鼻内减毒活疫苗。他们在编码病毒刺突蛋白的基因中引入了 283 个沉默突变,同时删除其 furin 裂解位点。获得的是一种完整的传染性 SARS-CoV-2 病毒颗粒,由 RNA 组成,被蛋白壳包围,但经过了修饰的活病毒。COVI-VAC 疫苗在传代过程中不发生回复突变,对基因的逆转具有抵抗力,能够在细胞培养中生长[32, 33]。

临床前结果表明,与野生型毒株比较,COVI-VAC 候选毒株高度减毒。且 COVI-VAC 促进的抗体反应 \geq 感染野生型病毒所引起的反应。与接种野生型病毒的叙利亚金仓鼠相比,在接种 COVI-VAC 的叙利亚金仓鼠中观察到较低的组织病毒载量和较轻的肺部病理学。

COVI-VAC 可能对所有 SARS-CoV-2 蛋白产生免疫力,而不仅仅是刺突表面蛋白,从而保护一系列 SARS-CoV-2 毒株。减毒活疫苗 COVI-VAC 可提供强大的免疫反应,并与持久的细胞免疫有关,并在体内对 COVID-19 感染提供了显著的保护[33, 34]。

用 COVI-VAC 接种仓鼠 27 天后,用野生型 SARS-CoV-2 Beta 变体对动物进行鼻内攻毒实验,结果表明该疫苗可以防止强毒株攻击后体重减轻,即 COVI-VAC 对 SARS-CoV-2 Beta 的异源攻击具有保护作用[35]。

2、d16 [36]

在新冠疫情之前,关于 SARS-CoV 的减毒活疫苗的研究已经得到深入研究,采用基因工程的手段,通过删除 E 或 ORF3a 基因[37, 38],对高度保守的非结构蛋白(NSP)的沉默和失活[39, 40]都可以使病毒减毒。由于 NSP 参与了转录复合物(RTC)的形成,它在病毒基因组 RNA 的复制和转录过程中发挥重要作用。其

中 RTC 的两个催化成分 NSP14 和 NSP16,它们参与了病毒 mRNA 的 5'帽甲基化,这一甲基化过程使病毒 RNA 与宿主 mRNA 无法区分,来逃避免疫监视[41]。其中 NSP14 帮助病毒 mRNA 上生成 Cap-0 结构,并发挥校对酶的作用,因其具有外切核糖核酸酶活性[42]。在 mRNA 加帽过程随后由 NSP16(一种 SAM 依赖性 2'-O-MTase)通过 RNA 转录本第一个核苷酸的核糖 2'-O 位置的进一步甲基化完成,从而产生 Cap-1 结构[43]。所以 NSP 对病毒生命周期产生直接影响。如将 SARS-CoV 中的 NSP14 或 NSP16 的失活会导致减毒[39, 40]。但是 NSP14 缺陷型 SARS-CoV-2 是不可行的[44]。若考虑到删除大片段可能使 SARS-CoV-2 基因组不稳定的风险,可以选择点突变。即在 SARS-CoV 的 NSP16 的 KDKE 基序中引入 D130A 突变会产生一种明显减毒效果,并保持了遗传稳定性,其减毒机制还包括对机体 I 型干扰素(IFN)诱导增强,但巨噬细胞中的病毒复制减弱。当这一方法运用到 SARS-CoV-2 时,也是可行的,将其中编码 2'-O-甲基转移酶的 NSP16 基因进行定点突变(D130A),减毒活疫苗命名为: d16。

d16 的减毒和生长特性分别在三种不同细胞系中研究,与野生型病毒相比, d16 在 48hpi 时在 VeroE6、A549-ACE2-TMPRSS2 和 Calu-3 细胞中的病毒载量降低了 100 倍。VeroE6 细胞缺乏 IFN,而 A549-ACE2-TMPRSS2 和 Calu-3 细胞是具有完整 IFN 反应的生理相关的细胞系。重要的是在 VeroE6 细胞中连续传代超过 10 次, d16 病毒表现出遗传稳定性,没有发生毒力逆转,安全性得到保证。

在仓鼠和转基因小鼠中验证 d16 的减毒特征,仅引起无症状和非致病性感染。WT 组的仓鼠在感染后 2dpi 开始出现嗜睡、皱褶毛皮、驼背姿势和呼吸急促的临床症状[45],而在 d16 疫苗组的仓鼠中未观察到这些临床表现。在 WT 仓鼠中观察到大约 10%的体重减轻,而在 d16 组在感染后 14 天的过程中记录到>10%的稳定增加。研究显示 d16 病毒在仓鼠体内减毒,病毒复制减少,组织损伤减轻,并引起免疫调节细胞因子的表达增强[36]。主要促炎细胞因子和趋化因子的 mRNA 表达水平,包括 IL-4、IL-6、IL-10 和 CCL17,其中 FOXP3 是调节性 T 细胞的关键调节因子[46]。

单剂量的 d16 鼻内给药可在仓鼠的上呼吸道和下呼吸道产生抗病毒免疫,从而防止病毒在基于接触水平的传播模型中传播。它还强烈刺激了体液和细胞介导的免疫反应,从而在转基因小鼠模型中提供了针对 SARS-CoV-2 致命挑战的全面保护。d16 引发的中和抗

体有效地与几种 SARS-CoV-2 突变株（包括 α 、 β 、 θ 和 κ 变体）发生交叉反应。且在接种疫苗的小鼠的血液和鼻腔冲洗液中检测到分泌型免疫球蛋白 A。

3、去密码子优化（CPD）疫苗[47]

与大多数正在开发的疫苗相比，研究者通过密码子对去优化（CPD）对 SARS-CoV 基因组进行基因修饰，产生了减毒但可复制的 SARS-CoV 候选疫苗[48]。CPD 方法是合成生物学的一个方向和减毒策略，该方法可对多种病毒进行快速高效地减毒。CPD 可以重新排列一个或几个病毒基因中存在的同义密码子，去优化过的密码子并不改变所编码的蛋白质和氨基酸组成。但是会使其产生蛋白质的效率不如亲本，并且表现为复制适应性缺陷。所以保守的抗原特性和复制潜力使减毒株能够刺激机体产生免疫反应，从而机体能够通过先天性和适应性免疫反应抗野生型病毒感染。

在 CPD 工程中 SARS-CoV-2 反向遗传学[49]是一项重要方法。该系统依赖于 SARS-CoV-2 基因组的 12 个亚基因组片段，这些片段通过酿酒酵母中的转化相关重组（TAR）克隆组装成单个酵母/细菌人工染色体（YAC/BAC），亚基因组片段长约 3,000 bp，相邻片段彼此重叠约 300 bp，从而能够通过同源重组组装 SARS-CoV-2 感染性克隆。德国柏林自由大学的研究者通过 DNA 转染拯救出四种突变减毒病毒：sCPD3、sCPD4、sCPD9 和 sCPD10 [47]。

与亲本病毒相比，减毒病毒 CPD4、sCPD3、sCPD9 和 sCPD10 形成的感染细胞病灶明显更小。在 Vero E6 细胞中的多步生长动力学表明：sCPD3 和 sCPD4 病毒的复制动力学与亲本病毒的复制动力学相当，但是 sCPD9 和 sCPD10 病毒在所有评估时间点的复制水平显著降低，感染性滴度在 24hpi 时比亲本病毒低 100-1000 倍，在 48hpi 时低 10-100 倍。进而筛选出 sCPD9 和 sCPD10 是减毒程度最优的重组病毒。以 0.1 的感染复数(MOI)在 Vero E6 细胞中连续传代 10 次，病毒没有发生显著的表型变化，仍然保持 Vero E6 细胞上产生小病灶，并且在 7 hpi 内没有产生容易观察到的 CPE，保持减毒遗传稳定性。

在免疫原性上，虽然通过密码子对去优化进行重新编码，虽然不会影响编码蛋白质的氨基酸序列，但它会广泛地改变潜在的基因组序列。次优密码子会降低重新编码的密码子对去优化基因的 mRNA 稳定性和翻译效率[50]。这又反过来会减少蛋白质的产生并导致病毒减毒。另一方面，重新编码基因的蛋白质

产量减少也是其减毒的一个原性，通过检测野生型（WT）、sCPD9 或 sCPD10 病毒 Vero E6 细胞中刺突蛋白和核衣壳蛋白的产生。进而筛选出感染 sCPD10 病毒在细胞中产生刺突蛋白的产生比 WT 或 sCPD9 病毒要少，表明 CPD 降低了靶基因的蛋白质产生，并归因于 sCPD10 病毒携带了一个去密码子优化（CPD）的刺突基因。

利用叙利亚仓鼠评价减毒活疫苗 sCPD10 安全性和有效性。使用单次接种病毒对动物进行疫苗接种，并在 21 天后进行攻击。病毒减毒株不会引起临床症状，但具有高度免疫原性并诱导强大的保护性免疫。减毒病毒在上呼吸道有效复制，但在下呼吸道不复制，仅引起轻微的肺组织病理学改变。在野毒株攻击后，仓鼠没有出现疾病表现并能迅速清除攻击病毒。感染性的 sCPD10 病毒未在感染动物的肺中被发现。

4、VAS5 [51]

将新冠病毒的连续传代培养，筛选出减毒活疫苗候选株同样也是行之有效的方法，新冠病毒是正链 RNA 病毒，具有较强的基因突变的基础，在传代过程中的选择压力条件下，可以筛选获得减毒活疫苗候选株。军事医学科学院的秦成峰教授通过在 Vero 细胞中连续传代 SARS-CoV-2 临床分离株，产生了一种减毒活候选疫苗株（命名为 VAS5）。经过深度测序发现 SARS-CoV-2 在 Vero 细胞中的动态适应，导致在 S 蛋白的 S1/S2 连接处缺失七个氨基酸(N679SPRRAR685)的稳定克隆。

尽管 SARS-CoV-2 中切割位点的功能尚未全部揭示，但在 S1/S2 位点插入 furin-like 蛋白酶样裂解位点可以增强 SARS-CoV 的细胞-细胞融合[52]。Hoffmann 教授报道，高度可切割的 S1/S2 位点对于 S 蛋白介导的细胞-细胞融合和进入人肺细胞至关重要[53]。通过临床样本中检测到 S1/S2 位点缺失的 SARS-CoV-2 突变株研究表明，可以在 Vero 细胞中传代后选择这些突变株。

通过深度测序研究从 P1 到 P5 的病毒全长基因组。在不同代次的 SARS-CoV-2 中可检测到具有不同长度和位置缺失的突变。 $\Delta 679-685$ 的突变首先发生在 P3，并在 P4 迅速增加，最终成为 P5 的主要突变体（99.119%）。在 Vero 细胞中进一步传代的 P5 的 Sanger 测序证实了其良好的遗传稳定性，带有 7 个氨基酸缺失（ $\Delta 679-685$ ）的 P5 病毒被命名为 VAS5。

VAS5 的表型特征为用 VAS5 和野生型感染不同细胞系，包括 Vero、Huh7 和 Caco-2 细胞。VAS5 在 Vero

细胞中显示出与 WT 相似的复制能力,而在 Huh7 或 Caco-2 细胞中未检测到 VAS5 病毒 RNA 或病毒蛋白表达的增加。但是 WT 病毒在所有三种类型的细胞中复制良好。这些结果表明 VAS5 失去了感染人类细胞的能力,具备减毒活疫苗的潜质。同样地在肺上皮类器官感染模型中,也获得相同的结论。

结构生物学研究发现带有 7 个氨基酸缺失对于 SARS-CoV-2 刺突结构的结构造成影响。通过冷冻电镜研究发现, VAS5 S 三聚体采用两种不同的构象状态: 3 个 RBD 处于关闭状态, 1 个 RBD 处于打开状态。这种突变成更封闭的构象,从而使得 VAS5 在人类呼吸道上皮细胞中的感染性和适应性显著降低,并且在 hACE2 小鼠中显著减弱。具备减毒的生物物理特性。检测 VAS5S 三聚体结构发现: 7 个氨基酸的缺失缩短了 WT 中高度无序的环,但并不破坏 S 构象,也不干扰 RBD/N 末端结构域(NTD)上的关键表位。VAS5S 三聚体没有疏水口袋或亚油酸(LA)。亚油酸是一种在 RBD 中发现的多不饱和脂肪酸,它被认为稳定 RBD-down 状态,从而锁定 S 三聚体的构象[54]。相反 VAS5S 三聚体结构更加紧凑且被牢牢锁定,但是这种锁定又不是通过亚油酸,而是通过 3 个关闭状态的 RBD。且亚基间有着更加紧密地相互作用。也就是说 VAS5S 三聚体在维持其融合前构象方面表现出更高的稳定性。

VAS5 在多种人类细胞系、人类气道上皮类器官和 hACE2 小鼠中的复制显著减弱,病毒适应性测定表明,与亲本病毒相比, VAS5 对 Vero 细胞具有特异性,但在人类细胞中的适应性降低。

单次鼻内注射 VAS5 可引发高水平的中和抗体,使用毒株 MASCP6 进行攻毒后,在动物鼻甲、气管和肺组织中,与对照组比较病毒载量具有显著下降,且不造成肺部感染。并防止小鼠及仓鼠感染 SARS-CoV-2 的密切接触传播。

6 总结

新冠病毒成为了二十一世纪最重要的一种传染病,对全球人口、经济都产生了深刻影响,当然疫情形势严峻,伴随着 Omicron 突变株在全球范围内的广泛流行,传播力进一步增强。迫切需要安全、高效的疫苗以全球供应。新冠病毒减毒活疫苗作为一种可及性的疫苗,应当与其它疫苗研发管线一起加快研究。基于现代疫苗学和基因组学的深入研究,新冠减毒活疫苗的开发具备理论和实践基础。

参考文献

- [1] Hannah E Davis, Lisa McCorkell, Julia Moore Vogel, Eric J Topol. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations [J]. Nat Rev Microbiol 2023; 21(3): 133-146.
- [2] Kawaoka Y, Uraki R, Kiso M, Iida S, Imai M, Takashita E, Kuroda M, Halfmann P, Loeber S, Maemura T, Yamayoshi S, Fujisaki S, Wang Z, Ito M, Ujie M, Iwatsuki-Horimoto K, Furusawa Y, Wright R, Chong Z, Ozono S, Yasuhara A, Ueki H, Sakai Y, Li R, Liu Y, Larson D, Koga M, Tsutsumi T, Adachi E, Saito M, Yamamoto S, Matsubara S, Hagihara M, Mitamura K, Sato T, Hojo M, Hattori SI, Maeda K, Okuda M, Murakami J, Duong C, Godbole S, Douek D, Watanabe S, Ohmagari N, Yotsuyanagi H, Diamond M, Hasegawa H, Mitsuya H, Suzuki T. Characterization and antiviral susceptibility of SARS-CoV-2 Omicron/BA.2 [J]. Nature, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04856-1>
- [3] Lijun Liang, Xiang Zhao, Aiping Deng, Kuibiao Li, Jiajun Liu, Fangzhu Ouyang, Qianfang Guo, Jing Xu, Shen Huang, Lirong Zou, Yang Song, Kai Nie, Baisheng Li. First Imported Case of SARS-CoV-2 Omicron Subvariant BA.2.12.1-Guangdong Province, China, April 30, 2022 [J]. China CDC Weekly. doi: 10.46234/ccdcw2022.094.
- [4] Edward C Holmes, Stephen A Goldstein, Angela L Rasmussen, David L Robertson, Alexander Crits-Christoph, Joel O Wertheim, Simon J Anthony, Wendy S Barclay, Maciej F Boni, Peter C Doherty, Jeremy Farrar, Jemma L Geoghegan, Xiaowei Jiang, Julian L Leibowitz, Stuart J D Neil, Tim Skern, Susan R Weiss, Michael Worobey, Kristian G Andersen, Robert F Garry, Andrew Rambaut. The origins of SARS-CoV-2: A critical review [J]. Cell, 2021, 184(19): 4848-4856.
- [5] Iryna V Goraichuk, Vasiliy Arefiev, Borys T Stegnyy, Anton P Gerilovych. Zoonotic and Reverse Zoonotic Transmissibility of SARS-CoV-2 [J]. Virus Res, 2021,; 302: 198473.
- [6] Mahmoud Kandeel, Maged E M Mohamed, Hany M Abd El-Lateef, Katharigatta N Venugopala, Hossam S El-Beltagi. Omicron variant genome evolution and phylogenetics [J]. J Med Virol, 2022, 94(4): 1627-1632.
- [7] 王压娣, 丘立文, 廖志勇, 梅亚波, 车小燕. 人冠状病毒 229E、OC43 与 SARS-CoV 血清学相关性的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(8): 747-751.
- [8] Cithe as: <https://www.science.org/content/article/new-versions-omicron-are-masters-immune-evasion>

- [9] Rahul K Suryawanshi, Irene P Chen, Tongcui Ma, Abdullah M Syed, Noah Brazer, Prachi Saldhi, Camille R Simoneau, Alison Ciling, Mir M Khalid, Bharath Sreekumar, Pei-Yi Chen, G Renuka Kumar, Mauricio Montano, Miguel A Garcia-Knight, Alicia Sotomayor-Gonzalez, Venice Servellita, Amelia Gliwa, Jenny Nguyen, Ines Silva, Bilal Milbes, Noah Kojima, Victoria Hess, Maria Shacreaw, Lauren Lopez, Matthew Brobeck, Fred Turner, Frank W Soveg, Ashley F George, Xiaohui Fang, Mazharul Maishan, Michael Matthey, Warner C Greene, Raul Andino, Lee Spraggon, Nadia R Roan, Charles Y Chiu, Jennifer Doudna, Melanie Ott. Limited Cross-Variant Immunity after Infection with the SARS-CoV-2 Omicron Variant Without Vaccination [J]. medRxiv, 2022, 2022.01.13.22269243.
- [10] Thomas Lechmere, Luke B Snell, Carl Graham, Jeffrey Seow, Zayed A Shalim, Themoula Charalampous, Adela Alcolea-Medina, Rahul Batra, Gaia Nebbia, Jonathan D Edgeworth, Michael H Malim, Katie J Doores. Broad Neutralization of SARS-CoV-2 Variants, Including Omicron, following Breakthrough Infection with Delta in COVID-19-Vaccinated Individuals [J]. mBio, 2022, 13(2): e0379821.
- [11] Rahul K Suryawanshi, Irene P Chen, Tongcui Ma, Abdullah M Syed, Noah Brazer, Prachi Saldhi, Camille R Simoneau, Alison Ciling, Mir M Khalid, Bharath Sreekumar, Pei-Yi Chen, G Renuka Kumar, Mauricio Montano, Ronne Gascon, Chia-Lin Tsou, Miguel A Garcia-Knight, Alicia Sotomayor-Gonzalez, Venice Servellita, Amelia Gliwa, Jenny Nguyen, Ines Silva, Bilal Milbes, Noah Kojima, Victoria Hess, Maria Shacreaw, Lauren Lopez, Matthew Brobeck, Fred Turner, Frank W Soveg, Ashley F George, Xiaohui Fang, Mazharul Maishan, Michael Matthey, Mary Kate Morris, Debra Wadford, Carl Hanson, Warner C Greene, Raul Andino, Lee Spraggon, Nadia R Roan, Charles Y Chiu, Jennifer A Doudna, Melanie Ott. Limited cross-variant immunity from SARS-CoV-2 Omicron without vaccination [J]. Nature, 2022. doi: 10.1038/s41586-022-04865-0. Online ahead of print.
- [12] Tobias V Lanz, R Camille Brewer, Shaghayegh Jahanbani, William H Robinson. Limited Neutralization of Omicron by Antibodies from the BNT162b2 Vaccination against SARS-CoV-2 [J]. Res Sq, 2022, rs.3.rs-1518378. doi: 10.21203/rs.3.rs-1518378/v1. Preprint.
- [13] Hangtian Guo, Yan Gao Tinghan Li, Tingting Li, Yuchi Lu, Le Zheng, Yue Liu, Tingting Yang, Feiyang Luo, Shuyi Song, Wei Wang, Xiuna Yang, Henry C Nguyen, Hongkai Zhang, Ailong Huang, Aishun Jin, Haitao Yang, Zihe Rao, Xiaoyun Ji. Structures of Omicron spike complexes and implications for neutralizing antibody development [J]. Cell Rep, 2022, 39(5): 110770.
- [14] Shi-Yan Ren, Wen-Biao Wang, Rong-Ding Gao, Ai-Mei Zhou. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance [J]. World J Clin Cases, 2022, 10(1): 1-11.
- [15] Dominika Sikora, Piotr Rzymiski. COVID-19 Vaccination and Rates of Infections, Hospitalizations, ICU Admissions, and Deaths in the European Economic Area during Autumn 2021 Wave of SARS-CoV-2 [J]. Vaccines (Basel), 2022, 10(3): 437.
- [16] Yusha Araf, Fariya Akter, Yan-Dong Tang, Rabeya Fatemi, Md Sorwer Alam Parvez, Chunfu Zheng, Md Golzar Hossain. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines [J]. J Med Virol, 2022, 94(5): 1825-1832.
- [17] Rui Dong, Taojun Hu, Yunjun Zhang, Yang Li, Xiao-Hua Zhou. Assessing the Transmissibility of the New SARS-CoV-2 Variants: From Delta to Omicron [J]. Vaccines (Basel), 2022, 10(4): 496.
- [18] Philip D Minor. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges [J]. Virology, 2015, 479-480: 379-92.
- [19] Yashavantha L Vishweshwaraiah, Nikolay V Dokholyan. Toward rational vaccine engineering [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 183: 114142.
- [20] Uddab Poudel, Deepak Subedi, Saurav Pantha, Santosh Dhakal. Animal coronaviruses and coronavirus disease 2019: Lesson for One Health approach [J]. Open Vet J, 2020, 10(3): 239-251.
- [21] Nicola Decaro, Alessio Lorusso. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses [J]. Vet Microbiol, 2020, 244: 108693.
- [22] Chao-Nan Lin, Kuan Rong Chan, Eng Eong Ooi, Ming-Tang Chiou, Minh Hoang, Po-Ren Hsueh, Peck Toung Ooi. Animal Coronavirus Diseases: Parallels with COVID-19 in Humans [J]. Viruses, 2021, 13(8): 1507.
- [23] Mohammad A Abdel-Sabour, Mohammed A Rohaim, Owais J A Salman, Samah E Abodalal, Faten F Mohammad, Mohammad S Madkour, Nabil A Abdel-Wanis, Muhammad Munir. Immunogenicity and efficacy of a bivalent vaccine against infectious bronchitis virus [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2021, 77: 101670.
- [24] Zongxi Han, Xiaochen Xu, Huixin Li, Lili Zhang, Yutong Hou, Shengwang Liu. Replication and vaccine protection of multiple infectious bronchitis virus strains in pheasants (*Phasianus colchicus*) [J]. Infect Genet Evol, 2021, 93: 104980.
- [25] 霍亚飞. QX 型鸡传染性支气管炎弱毒苗的制备及其安全性与免疫效力初步评价 [D]. 山东农业大学, 2015.
- [26] Hanna Turlewicz-Podbielska, Małgorzata Pomorska-M. Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art [J]. Virol Sin, 2021, 36(5): 833-851.

- [27] Volker Gerdts, Alexander Zakhartchouk. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 206: 45-51.
- [28] Chun-Ming Lin, Xiang Gao, Tomoichiro Oka, Anastasia N Vlasova, Malak A Esseili, Qihong Wang, Linda J Saif. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains [J]. *J Virol*, 2015; 89(6): 3332-42.
- [29] Zhen Zhang, Qianyun Liu, Ying Sun, Jiali Li, Jiejie Liu, Ruangan Pan, Liu Cao, Xianying Chen, Yingjian Li, Yuzhen Zhang, Ke Xu, Deyin Guo, Li Zhou, Ke Lan, Yu Chen. Live attenuated coronavirus vaccines deficient in N7-Methyltransferase activity induce both humoral and cellular immune responses in mice [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1): 1626-1637.
- [30] Ruangan Pan, Eveline Kindler, Liu Cao, Yu Zhou, Zhen Zhang, Qianyun Liu, Nadine Ebert, Roland Züst, Ying Sun, Alexander E Gorbalenya, Stanley Perlman, Volker Thiel, Yu Chen, Deyin Guo. N7-Methylation of the Coronavirus RNA Cap Is Required for Maximal Virulence by Preventing Innate Immune Recognition [J]. *mBio*, 2022, 13(1): e0366221.
- [31] Ursino Pacheco-García, Jeanet Serafín-López. Indirect Dispersion of SARS-CoV-2 Live-Attenuated Vaccine and Its Contribution to Herd Immunity. *Vaccines (Basel)* 2023; 11(3): 655.
- [32] Ying Wang, Chen Yang, Yutong Song, J Robert Coleman, Marcin Stawowczyk, Juliana Tafrova, Sybil Tasker, David Boltz, Robert Baker, Liliana Garcia, Olivia Seale, Anna Kushnir, Eckard Wimmer, Steffen Mueller. Scalable live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate demonstrates preclinical safety and efficacy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(29): e2102775118.
- [33] Saeed Khoshnood, Maniya Arshadi, Sousan Akrami, Maryam Koupaei, Hossein Ghahramanpour, Aref Shariati, Nourkhoda Sadeghifard, Mohsen Heidary. An overview on inactivated and live-attenuated SARS-CoV-2 vaccines [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(5): e24418. doi: 10.1002/jcla.24418.
- [34] Josephine Wambani, Patrick Okoth. Scope of SARS-CoV-2 variants, mutations, and vaccine technologies [J]. *Egypt J Intern Med*, 2022, 34(1): 34.
- [35] Sam H Shen, Charles B Stauff, Oleksandr Gorbatsvych, Yutong Song, Charles B Ward, Alisa Yurovsky, Steffen Mueller, Bruce Fitcher, Eckard Wimmer. Large-scale recoding of an arbovirus genome to rebalance its insect versus mammalian preference [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(15): 4749-54.
- [36] Zi-Wei Ye, Chon Phin Ong, Kaiming Tang, Yilan Fan, Cuiting Luo, Runhong Zhou, Peng Luo, Yun Cheng, Victor Sebastien Gray, Pui Wang, Hin Chu, Jasper Fuk-Woo Chan, Kelvin Kai-Wang To, Honglin Chen, Zhiwei Chen, Kwok-Yung Yuen, Guang Sheng Ling Shuofeng Yuan, Dong-Yan Jin. Intranasal administration of a single dose of a candidate live attenuated vaccine derived from an NSP16-deficient SARS-CoV-2 strain confers sterilizing immunity in animals [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(5): 588-601.
- [37] Marta L DeDiego, Enrique Alvarez, Fernando Almazán, María Teresa Rejas, Elaine Lamirande, Anjeanette Roberts, Wun-Ju Shieh, Sherif R Zaki, Kanta Subbarao, Luis Enjuanes. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo [J]. *J Virol*, 2007, 81(4): 1701-13.
- [38] Kam-Leung Siu, Kit-San Yuen, Carlos Castaño-Rodríguez, Zi-Wei Ye, Man-Lung Yeung, Sin-Yee Fung, Shuofeng Yuan, Chi-Ping Chan, Kwok-Yung Yuen, Luis Enjuanes, Dong-Yan Jin. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC [J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 8865-8877.
- [39] Vineet D Menachery, Boyd L Yount Jr, Laurence Josset, Lisa E Gralinski, Trevor Scobey, Sudhakar Agnihothram, Michael G Katze, Ralph S Baric. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-o-methyltransferase activity [J]. *J Virol*, 2014, 88(8): 4251-64.
- [40] Vineet D Menachery, Lisa E Gralinski, Hugh D Mitchell, Kenneth H Dinno 3rd, Sarah R Leist, Boyd L Yount Jr, Eileen T McAnarney, Rachel L Graham, Katrina M Waters, Ralph S Baric. Combination Attenuation Offers Strategy for Live Attenuated Coronavirus Vaccines [J]. *J Virol*, 2018, 92(17): e00710-18.
- [41] Georgia Mandilara, Marianna A Koutsis, Marios Agelopoulos, Georgios Sourvinos, Apostolos Beloukas, Theodoros Rampias. The Role of Coronavirus RNA-Processing Enzymes in Innate Immune Evasion [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(6): 571.
- [42] Lorenzo Subissi, Clara C Posthuma, Axelle Collet, Jessika C Zevenhoven-Dobbe, Alexander E Gorbalenya, Etienne Decroly, Eric J Snijder, Bruno Canard, Isabelle Imbert. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(37): E3900-9.
- [43] Anand Ramanathan, G Brett Robb, Siu-Hong Chan. mRNA capping: biological functions and applications [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(16): 7511-26.
- [44] Natacha S Ogando, Jessika C Zevenhoven-Dobbe, Yvonne van der Meer, Peter J Bredenbeek, Clara C Posthuma, Eric J Snijder. The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2 [J]. *J Virol*, 2020, 94(23): e01246-20.

- [45] Jasper Fuk-Woo Chan, Anna Jinxia Zhang, Shuofeng Yuan, Vincent Kwok-Man Poon, Chris Chung-Sing Chan, Andrew Chak-Yiu Lee, Wan-Mui Chan, Zhimeng Fan, Hoi-Wah Tsoi, Lei Wen, Ronghui Liang, Jianli Cao, Yanxia Chen, Kaiming Tang, Cuiting Luo, Jian-Piao Cai, Kin-Hang Kok, Hin Chu, Kwok-Hung Chan, Siddharth Sridhar, Zhiwei Chen, Honglin Chen, Kelvin Kai-Wang To, Kwok-Yung Yuen. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility [J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(9): 2428-2446.
- [46] Zhiyuan Li, Dan Li, Andy Tsun, Bin Li. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation [J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12(5): 558-65.
- [47] Jakob Trimpert, Kristina Dietert, Theresa C Firsching, Nadine Ebert, Tran Thi Nhu Thao, Daria Vladimirova, Susanne Kaufer, Fabien Labrousseau, Azza Abdelgawad, Anel   Conradie, Thomas H  fler, Julia M Adler, Luca D Bertzbach, Joerg Jores, Achim D Gruber, Volker Thiel, Nikolaus Osterrieder, Dusan Kunec. Development of safe and highly protective live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidates by genome recoding [J]. Cell Rep, 2021, 36(5): 109493.
- [48] J Robert Coleman, Dimitris Papamichail, Steven Skiena, Bruce Futcher, Eckard Wimmer, Steffen Mueller. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias [J]. Science, 2008, 320(5884): 1784-7.
- [49] Tran Thi Nhu Thao, Fabien Labrousseau, Nadine Ebert, Philip V'kovski, Hanspeter Stalder, Jasmine Portmann, Jenna Kelly, Silvio Steiner, Melle Holwerda, Annika Kratzel, Mitra Gultom, Kimberly Schmied, Laura Laloli, Linda H  sser, Manon Wider, Stephanie Pfaender, Dagny Hirt, Valentina Cipp   Silvia Crespo-Pomar, Simon Schr  der, Doreen Muth, Daniela Niemeyer, Victor M Corman, Marcel A M  ller, Christian Drosten, Ronald Dijkman, Joerg Jores, Volker Thiel. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform [J]. Nature, 2020, 582(7813): 561-565.
- [50] Nicole Groenke, Jakob Trimpert, Sophie Merz, Anel   M Conradie, Emanuel Wyler, Hongwei Zhang, Orsalia-Georgia Hazapis, Sebastian Rausch, Markus Landthaler, Nikolaus Osterrieder, Dusan Kunec. Mechanism of Virus Attenuation by Codon Pair Deoptimization [J]. Cell Rep, 2020, 31(4): 107586.
- [51] Xiao-Feng Li, Zhen Cui, Hang Fan, Qi Chen, Lei Cao, Hong-Ying Qiu, Na-Na Zhang, Yan-Peng Xu, Rong-Rong Zhang, Chao Zhou, Qing Ye, Yong-Qiang Deng, Yan Guo, Si Qin, Kaiyue Fan, Lei Wang, Zijing Jia, Yujun Cui, Xiangxi Wang, Cheng-Feng Qin. A highly immunogenic live-attenuated vaccine candidate prevents SARS-CoV-2 infection and transmission in hamsters [J]. Innovation (Camb), 2022, 3(2): 100221.
- [52] Kathryn E Follis, Joanne York, Jack H Nunberg. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry [J]. Virology, 2006, 350(2): 358-69.
- [53] Markus Hoffmann, Hannah Kleine-Weber, Stefan P  hlmann. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells [J]. Mol Cell, 2020, 78(4): 779-784.e5.
- [54] Christine Toelzer, Kapil Gupta, Sathish K N Yadav, Ufuk Borucu, Andrew D Davidson, Maia Kavanagh Williamson, Deborah K Shoemark, Frederic Garzoni, Oskar Staufer, Rachel Milligan, Julien Capin, Adrian J Mulholland, Joachim Spatz, Daniel Fitzgerald, Imre Berger, Christiane Schaffitzel. Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein [J]. Science, 2020, 370(6517): 725-730.

作者简介

刘泽

1983 年生, 制药正高级工程师。研究方向为新型流感疫苗的开发和应用研究。

E-mail: mybelieve05@126.com

高辉

1962 年生, 制药正高级工程师。研究方向为病毒学疫苗的开发研究。

E-mail: gaohui86@126.com