



3种平台Delta-Omicron嵌合RBD二聚体新型冠状病毒疫苗的免疫原性头对头比较

杨康吉^{1†}, 徐坤^{2†}, 张丽君^{3†}, 韩雨璇³, 周东明⁴, 夏乾峰¹, 戴连攀^{3*}, 高福^{2,3*}

1. 海南医学院热带医学院, 热带转化医学教育部重点实验室, 海口 571199;
2. 中国科学院北京生命科学研究院, 免疫与健康联合研究中心, 北京 100101;
3. 中国科学院微生物研究所, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;
4. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: dailp@im.ac.cn; gaof@im.ac.cn

2023-10-16 收稿, 2023-12-14 修回, 2023-12-15 接受, 2023-12-19 网络版发表

国家重点研发计划(2020YFA097100, 2021YFC2302600)、国家自然科学基金(81991494, 82122031)、比尔及梅琳达·盖茨基金会(INV-027420)、中国科学院稳定支持基础研究领域青年团队计划(YSBR-010)和中国科学院青年创新促进会(2018113)资助

摘要 新型冠状病毒(新冠病毒)在全球范围内流行,对公共卫生和人民生命健康造成了巨大威胁,新冠病毒疫苗的研发和使用对预防疾病和控制疫情起到了关键作用. 基于包括重组蛋白亚单位、病毒载体、mRNA脂纳米颗粒在内的多种技术平台开发的疫苗都获得了使用. 然而,由于抗原设计的差异、免疫剂量和注射间隔的差别,不同疫苗平台之间的免疫效果无法直接比较. 因此,本研究以Delta-Omicron嵌合RBD二聚体为免疫原,对广泛使用的3个疫苗平台(重组蛋白亚单位疫苗、腺病毒载体疫苗和mRNA疫苗)进行了免疫原性头对头比较,通过小鼠模型比较了它们同源接种和序贯接种所诱导的体液免疫和细胞免疫反应的差异. 结果显示,小鼠在免疫同源的两剂疫苗后,mRNA疫苗诱导的结合抗体和中和抗体滴度都最高,其次分别是重组蛋白亚单位疫苗和腺病毒载体疫苗;异源加强免疫的结果显示,不管是以重组蛋白亚单位疫苗、腺病毒载体疫苗或者mRNA疫苗初免,以mRNA疫苗作为第2针加强免疫均能诱导更强的体液免疫反应. 此外,在疫苗激发的细胞免疫方面,mRNA疫苗诱导了较强的CD4⁺ T细胞反应,腺病毒载体疫苗诱导了较强的CD8⁺ T细胞反应,而亚单位疫苗刺激的细胞免疫反应以CD4⁺ T细胞为主,但在强度上较弱. 本研究具有重要的应用价值,为未来新一代的新冠病毒疫苗研发和接种策略提供了指导.

关键词 新型冠状病毒, 亚单位疫苗, 腺病毒载体疫苗, mRNA疫苗, 抗体, T细胞

新型冠状病毒(新冠病毒, SARS-CoV-2)在全球范围内大流行,引起了超过7亿致病(COVID-19)病例,造成超过600万死亡病例(<https://covid19.who.int>),给人民生命健康和社会稳定发展带来了严重灾难. 多个国家或地区迅速开启了基于多种技术路线的新冠病毒疫苗研发,包括灭活疫苗、重组蛋白亚单位疫苗、病毒样

颗粒疫苗、病毒载体疫苗、mRNA疫苗和DNA疫苗^[1]. 经过临床实验研究,一批疫苗被证明在人体内安全有效,因此被各国或地区的监管部门批准紧急使用^[2,3].

在重组蛋白疫苗技术路线方面,我们前期与安徽智飞龙马生物制药有限公司联合开发了新冠病毒亚单位疫苗(ZF2001, 智克威得®). 该疫苗由串联重复的新

引用格式: 杨康吉, 徐坤, 张丽君, 等. 3种平台Delta-Omicron嵌合RBD二聚体新型冠状病毒疫苗的免疫原性头对头比较. 科学通报, 2024, 69: 1351–1360

Yang K J, Xu K, Zhang L J, et al. A head-to-head comparative study on the immunogenicity of three platforms of COVID-19 Delta-Omicron chimeric RBD-dimer vaccines (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 1351–1360, doi: [10.1360/TB-2023-1054](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1054)

冠病毒刺突蛋白(S)受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)二聚体免疫原蛋白和氢氧化铝佐剂组成^[4-6]。美国Novavax公司开发的NVX-CoV2373(Nuvax-ovid)疫苗含有维持融合前构象的S-2P蛋白(S蛋白含有K986P和V987P突变)和Matrix-M1佐剂^[7-9]。随后,有不少重组蛋白亚单位疫苗获得批准^[2]。在病毒载体疫苗方面,由中国军事医学科学院和康希诺生物联合开发的腺病毒载体疫苗Ad5-nCoV(Convidecia, 克威莎)使用了人5型腺病毒载体,表达新冠病毒全长S蛋白^[10-12]。英国牛津大学和AstraZeneca联合开发的腺病毒载体疫苗AZD1222疫苗使用的是黑猩猩腺病毒载体,同样表达新冠病毒全长S蛋白^[13,14]。美国Janssen/Johnson & Johnson开发的Ad26.COV2.S疫苗使用的是人26型腺病毒载体,插入的是新冠病毒S-2P蛋白基因,以表达具有融合前构象的S蛋白^[15,16]。到目前为止,全球范围内多个腺病毒载体疫苗获得批准^[2]。在mRNA技术路线方面,BioNTech和Pfizer联合开发的BNT162b2(Comirnaty)^[17]及Moderna开发的mRNA-1273(SpikeVax)^[18]被大范围接种,III期临床显示疫苗预防有症状的新冠病毒原型株的感染效果达到94%以上^[19,20]。新冠病毒mRNA疫苗是全球首次被批准使用的mRNA疫苗。BNT162b2和mRNA-1273均采用了表达融合前构象S-2P蛋白的基因设计,使用了脂质纳米颗粒包裹的mRNA的技术进行体内递送^[21,22]。

由于不同的疫苗技术路线各具特点,诱导的免疫反应有所差异,为了比较不同平台新冠病毒疫苗诱导的免疫反应特征,本文设计了一项头对头的比较研究。我们前期基于ZF2001疫苗使用的RBD二聚体免疫原进一步改造,设计了嵌合RBD二聚体抗原,由2个不同毒株来源的RBD串联而成,能诱导更加广谱的免疫反应^[23]。基于Delta-Omicron RBD二聚体为免疫原,我们选择了重组蛋白亚单位、腺病毒载体和mRNA脂纳米颗粒这3种疫苗技术平台的疫苗进行同源和异源的初免-加强免疫方案进行头对头比较研究,通过小鼠动物实验分析其刺激体液免疫反应和细胞免疫反应的特征,为未来疫苗的研制和接种方案的实施提供了重要的参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

重组蛋白亚单位疫苗、腺病毒载体(AdC68)疫苗和mRNA疫苗都以Delta-Omicron RBD二聚体为免疫

原,其中Delta RBD(S蛋白残基319-537)的氨基酸详细信息可见GenBank: OK091006.1, Omicron RBD(S蛋白残基316-534)来源于BA.1毒株(GISAID: EPI_ISL_6795848)^[23]。

含有氢氧化铝佐剂的Delta-Omicron RBD二聚体蛋白疫苗由安徽智飞龙科马生物制药有限公司生产。黑猩猩腺病毒载体(AdC68)由天津医科大学周东明教授提供,表达Delta-Omicron RBD二聚体的AdC68疫苗由我们课题组制备纯化,方法可见前期研究论文^[24,25]。

表达Delta-Omicron RBD二聚体的mRNA疫苗制备方法是:使用线性化的DNA模板进行体外转录(T7 High Yield RNA Transcription Kit, novoprotein)和加帽(Cap 1 Capping System, novoprotein)。然后进行mRNA包装,使用DLin-MC3-DMA、胆固醇、DSPC和DMPE-PEG2000配制脂质体混合液,混合溶解于无水乙醇中,将mRNA用pH 4.3的乙酸盐缓冲液稀释,然后通过微流控芯片进行混合包装,利用4种脂质体成分在低pH环境中的自组装形成纳米脂质体颗粒,进一步经过PBS换液和浓缩得到mRNA疫苗。

1.2 小鼠实验

实验用到的小鼠购自维通利华公司,所有小鼠均为6~8周龄的BALB/c雌性小鼠,实验动物饲养在中国科学院微生物研究所,满足SPF条件的动物饲养设置内。所有动物实验均经中国科学院微生物研究所伦理委员会批准,并按照中国科学院微生物研究所动物实验与人类生物医学研究伦理审查办法《中国科学院微生物研究所动物实验管理条例》中的要求进行,动物伦理批准号APIMCAS2022011。

小鼠通过肌肉注射免疫两剂,定义接受第1剂免疫的时间为第0天,第2剂于第21天注射免疫,分别于第19和第35天采集血清,分离血清,第35天采集小鼠脾脏分离淋巴细胞。

1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

使用包被液(索莱宝)稀释Delta-Omicron(BA.1) RBD蛋白至3 $\mu\text{g/mL}$,在96孔板的每个孔中加入100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h,使用PBS洗涤之后用5%脱脂牛奶封闭,室温静置1 h,然后加入稀释后的小鼠血清,放37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育2 h, PBST洗涤后孵育作为二抗的偶联HRP的羊抗鼠抗体(金普莱),放37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱1.5 h, PBST洗涤后用50 μL TMB(碧云天)底物显色,之后加入50 μL

2 mol/L的盐酸终止显色,用酶标仪(PerkinElmer)在450 nm处测定吸光值. 滴定终点定义为血清的最高稀释度倒数,其吸光度大于背景值的2.5倍. 低于检测限的抗体滴度按检测限的50%计算,小鼠血清以20倍起始稀释,因此低于检测限的样品抗体滴度定义为10.

1.4 假病毒中和实验

本研究使用的新冠病毒假病毒是以水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)为骨架,表面展示新冠病毒S蛋白,其制备方法见前期研究报道^[26]. 假病毒中和实验使用Vero细胞进行检测. Vero细胞在添加10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,培养箱温度为37℃,含有浓度为5%的二氧化碳. 小鼠血清用培养基稀释,将稀释后的血清与假病毒等体积混匀,置于37℃培养箱孵育1 h,然后弃去细胞培养基,加入小鼠血清与病毒的混合物,在细胞培养箱中培养16 h后在CQ1共聚焦图像细胞仪(Yokogawa)上读取荧光细胞数. 采用Graph-Pad Prism拟合非线性回归曲线,计算假病毒中和抗体滴度(pVNT₅₀). 如pVNT₅₀低于检测限则定为检测限的50%,小鼠血清以40倍起始稀释,因此低于检测限的样品抗体滴度定义为20.

1.5 细胞内因子染色试验(ICS)

将第35天采集的小鼠脾脏用100 μm筛网(Falcon)研磨成单细胞,接着用1640培养基清洗,加入红细胞裂解液(碧云天)在室温裂解8 min,再使用1640培养基清洗,重悬细胞后用细胞计数仪器计数,将细胞加入96孔板中,每孔加入2×10⁶个细胞,加入新冠病毒原型毒株RBD和Omicron BA.1 RBD的混合多肽库进行刺激,每条多肽工作浓度是5 μg/mL,在刺激3 h后加入高尔基体阻断剂(BD Biosciences). 培养6 h后收集细胞进行染色,将细胞与抗CD3(PE-Cyanine7)、CD4(APC-Cyanine7)以及CD8(PerCP-Cyanine5.5)的抗体进行孵育,随后加入Fixation/Permeabilization Solution(赛默飞)进行细胞固定与通透,接着将细胞与抗IL-2(APC)、IL-4(BV605)、IFN γ (PE)、TNF α (FITC)(eBiosciences)的抗体进行孵育,之后重悬细胞,转移到流式管中,置于Fortessa流式细胞仪(BD Biosciences)上进行分析,使用FlowJo V10进行数据分析.

1.6 统计学方法

采用GraphPad Prism 9软件进行作图以及统计学分

析. 统计学差异采用One-way ANOVA.

2 结果与分析

2.1 实验设计与动物免疫

为了以头对头方式比较研究不同平台的新冠病毒疫苗的免疫原性,我们选择了Delta-Omicron RBD二聚体为免疫原,使用腺病毒载体、重组蛋白和mRNA三种技术平台进行研究. 其中,重组蛋白亚单位疫苗含有Delta-Omicron RBD二聚体蛋白和氢氧化铝佐剂,腺病毒载体疫苗为表达Delta-Omicron RBD二聚体抗原的重组黑猩猩腺病毒AdC68, mRNA疫苗为含有表达Delta-Omicron RBD二聚体抗原的mRNA的脂质纳米颗粒(图1(a)). 动物试验使用的剂量参考人用剂量的1/5.

小鼠实验的分组如图1(a)所示,第1针免疫的疫苗设计为:第2~4组是AdC68疫苗,第5~7组是蛋白亚单位疫苗,第8~10组是mRNA疫苗. 第2针免疫的疫苗设计为:第2、5、8组是AdC68疫苗,第3、6、9组是蛋白疫苗,第4、7、10组是mRNA疫苗. 第1组免疫两次阴性对照试剂.

BALB/c小鼠分别在第0天和第21天免疫第1剂和第2剂疫苗,在第19天和第35天采集血液样本用于检测抗体滴度,在第35天采集小鼠脾脏用于检测疫苗诱导的T细胞免疫反应(图1(a)).

2.2 免疫小鼠血清的结合抗体滴度分析

使用第19天采集和分离的小鼠血清检测其结合Delta-Omicron(BA.1)RBD二聚体蛋白的IgG抗体滴度,我们将免疫相同的第1剂疫苗的三组合并展示,可见腺病毒载体疫苗、重组蛋白亚单位疫苗和mRNA疫苗免疫均刺激小鼠产生了结合抗原的IgG抗体,其抗体滴度分别是26008、22295和35391(图1(b)). 第2剂免疫进一步增强了抗体反应,结果显示,不论免疫的第1剂疫苗是AdC68疫苗、蛋白疫苗还是mRNA疫苗,使用mRNA疫苗进行第2剂免疫均具有优势,其诱导产生的结合抗原的IgG抗体滴度的几何平均值要高于使用腺病毒疫苗和蛋白亚单位疫苗作为第2剂的效果(图1(b)). 两针mRNA疫苗接种诱导了最高的结合抗体应答.

2.3 免疫小鼠血清的中和抗体滴度分析

我们使用了基于VSV载体的假病毒系统制备了一系列展示新冠病毒S蛋白的假病毒,包括原型、Delta以

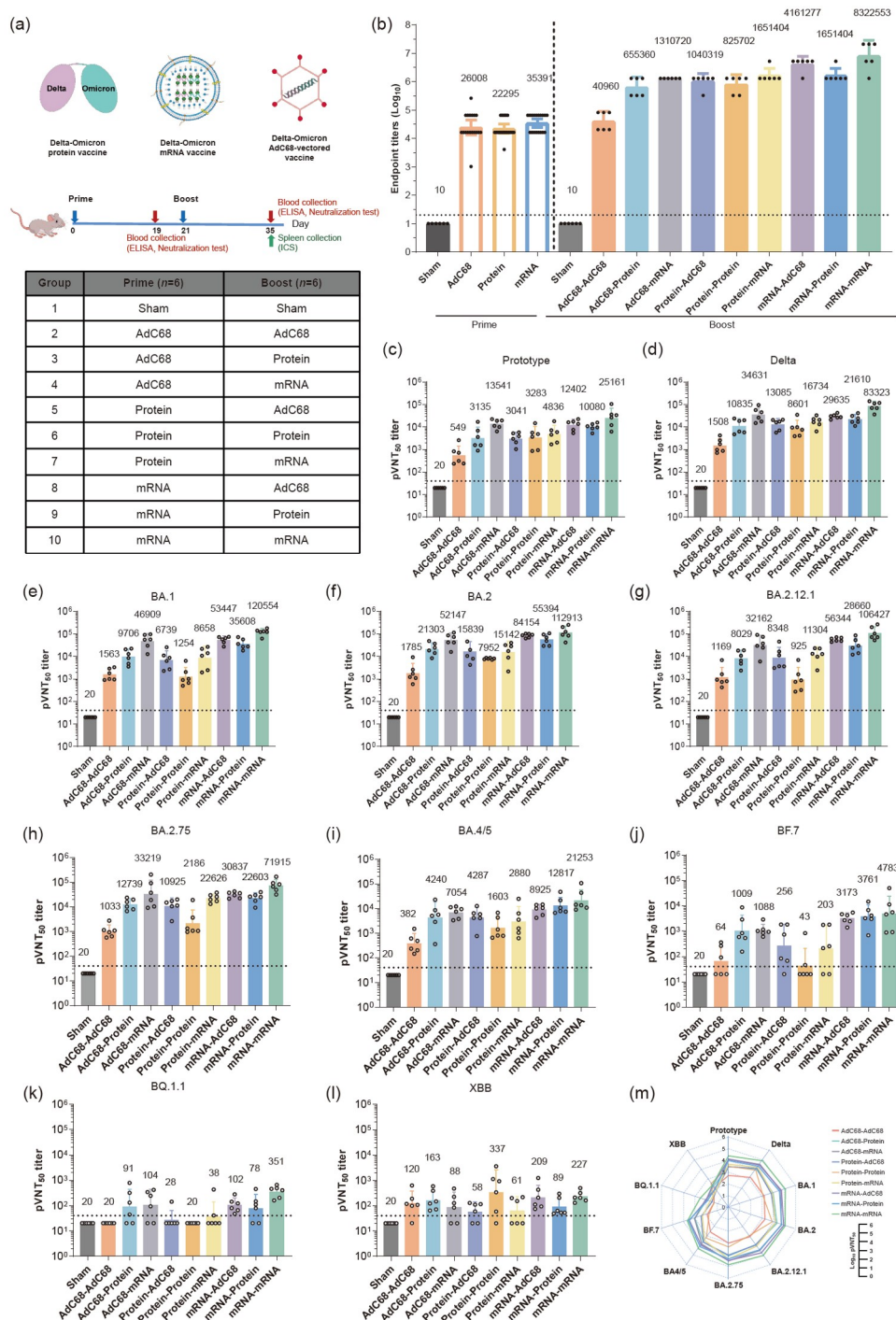


图 1 方案设计与疫苗诱导的体液免疫反应。(a) 分组设计与免疫流程图；(b) ELISA检测小鼠血清结合Delta-Omicron(BA.1)RBD二聚体的IgG抗体滴度。水平虚线为检测限；(c-l) 新冠病毒假病毒中和实验检测第35天小鼠血清的中和抗体滴度。新冠病毒毒株包括原型(c)、Delta(d)、Omicron BA.1(e)、BA.2(f)、BA.2.12.1(g)、BA.2.75(h)、BA.4/5(i)、BF.7(j)、BQ.1.1(k)和XBB(l)。柱图顶端的数字为95%置信区的几何平均值，水平虚线为检测限。(m) 雷达图展示各组的中和抗体滴度95%置信区的几何平均值

Figure 1 Experiment design and vaccine-induced humoral immune response. (a) Immunization groups design and vaccination schedule. (b) ELISA shows Delta-Omicron (BA.1) RBD dimer-binding IgG endpoint titers in the sera of mice. The dashed line indicates the limit of detection. (c-l) The neutralization titers of serum collected 35 days post-vaccination measured by pseudovirus expressing SARS-CoV-2 prototype (c) and VoCs including Delta (d), BA.1 (e), BA.2 (f), BA.2.12.1 (g), BA.2.75 (h), BA.4/5 (i), BF.7 (j), BQ.1.1 (k) and XBB (l). The values on the top of columns are geometric mean with 95% CI. The dashed line indicates the limit of detection. (m) The radar plot shows the geometric mean with 95% CI of each group

及Omicron多个变异株,使用第35天采集和分离的小鼠血清检测其对新冠病毒假病毒的中和抗体滴度,结果如图1(c~l)所示,进行统计学差异分析的结果如图S1所示.所有疫苗组均显著诱导了中和抗体产生,但对各个新冠毒株假病毒的中和抗体滴度存在差异,对BQ.1.1和XBB变异株的交叉中和效果较弱.我们发现,两剂疫苗免疫后,mRNA诱导的中和抗体滴度最高,显著大于蛋白亚单位疫苗和腺病毒载体疫苗,蛋白亚单位疫苗诱导的中和抗体滴度均值大多高于腺病毒载体疫苗(图1(c~l)和图S1).

分析第1剂免疫腺病毒载体疫苗组发现(第2~4组),第2剂免疫mRNA疫苗诱导的中和抗体反应最强,优于腺病毒载体疫苗和蛋白亚单位疫苗作为第2剂免疫刺激的中和反应;而且,第2次免疫蛋白亚单位疫苗诱导的中和抗体滴度显著高于两剂腺病毒载体疫苗(图S1).分析第1剂免疫蛋白亚单位疫苗组发现(第5~7组),第2剂免疫腺病毒载体疫苗和mRNA疫苗诱导的中和抗体滴度相似(没有统计学差异),但是均高于两剂蛋白亚单位疫苗组.分析第1剂免疫mRNA疫苗的组(第8~10组)发现,第2剂免疫腺病毒载体疫苗和mRNA疫苗诱导的中和抗体滴度相似,两组之间没有统计学差异(图1(c~l),图S1和表S1).

综合比较显示诱导中和抗体滴度均值最高的是两剂mRNA疫苗组,其对10种新冠病毒假病毒毒株原型、Delta、BA.1、BA.2、BA.2.12.1、BA.2.75、BA.4/5、BF.7、BQ.1.1和XBB的中和抗体滴度几何平均值分别是25161、83323、120554、112913、106427、71915、21253、4783、351和227,从雷达图可以直观看到两剂mRNA疫苗组诱导最广的中和抗体谱(图1(m)).

2.4 疫苗免疫刺激的细胞免疫反应分析

新冠病毒疫苗免疫诱导的细胞免疫反应在抗病毒和预防疾病中具有重要作用^[27-29],我们通过ICS评估了各个疫苗组诱导产生的细胞免疫反应发现,两剂腺病毒载体疫苗显著诱导了分泌IL-2和TNF α 的CD4⁺ T细胞反应以及显著的IFN γ 和TNF α 的CD8⁺ T细胞反应,其中分泌IFN γ 的CD8⁺ T细胞较高比例预示着强烈的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应(图2).两剂亚单位疫苗和mRNA疫苗均主要刺激CD4⁺ T细胞免疫反应,其中亚单位疫苗主要诱导了分泌IL-2和TNF α 的CD4⁺ T细胞免疫反应,mRNA疫苗则诱导了分泌IFN γ 、IL-2和TNF α

的CD4⁺ T细胞免疫反应,且在细胞比例上mRNA疫苗组要高于亚单位疫苗组(图2).

分析异源加强免疫的小鼠T细胞免疫反应发现,所有免疫了一剂腺病毒载体疫苗的小鼠均刺激产生了分泌IFN γ 的CD8⁺ T细胞免疫反应,且细胞比例相似,这些分组包括AdC68-protein、AdC68-mRNA、protein-AdC68和mRNA-AdC68,说明AdC68作为第1剂免疫或者第2剂加强免疫均可激活分泌IFN γ 的CD8⁺ T细胞免疫反应(图2b).

此外,我们发现,mRNA-AdC68分组刺激的CD4 T⁺细胞免疫反应与两剂mRNA疫苗组相似,主要是分泌IFN γ 、IL-2和TNF α 的CD4⁺ T细胞,且细胞比例亦相近(图2(a)),但是mRNA-AdC68组比两剂mRNA疫苗组诱导了更高的分泌IFN γ 的CD8⁺ T细胞反应(图2(b)),说明mRNA-AdC68异源的初免-加强方案可以诱导更加多功能的T细胞免疫反应.

3 讨论

本研究以头对头的方式比较研究了3种技术平台的新冠病毒疫苗(腺病毒载体疫苗、重组蛋白亚单位疫苗和mRNA疫苗)同源免疫加强和异源免疫加强诱导的体液免疫和细胞免疫反应,在所有实验分析的分组中,两剂mRNA疫苗免疫诱导的结合抗体和中和抗体滴度均为最高.此外,异源的初免-加强的研究分析结果表明,不论是以蛋白疫苗、腺病毒载体疫苗或者mRNA疫苗初免,以mRNA疫苗作为第2针加强免疫均能诱导相对更强的体液免疫反应.在疫苗诱导的细胞免疫方面,腺病毒载体疫苗倾向于刺激CD8⁺ T细胞反应;mRNA疫苗主要激活了CD4⁺ T细胞反应;蛋白疫苗刺激了CD4⁺ T细胞反应,但其反应强度相对较弱;mRNA-AdC68的免疫方案刺激了更加多功能的T细胞免疫反应.此外,我们团队之前的研究证明,新冠病毒变异株RBD二聚体mRNA疫苗具有广谱的免疫原性^[30].

在重组蛋白疫苗中,由于抗原本身刺激免疫反应的能力有限,需要有佐剂的配合使用.本研究中的蛋白疫苗使用的Sepivac SWETM是一种水包油型佐剂,相对于传统的铝佐剂,能够大幅提高体液免疫应答,这在我们前期的研究中有报道^[31],但对细胞免疫水平也有一定的提高.提高细胞免疫的佐剂,如三叶草生物新冠病毒重组蛋白疫苗佐剂TLR9激动剂CpG 1018,显著提高了疫苗的细胞免疫应答^[32].此外,还有一些能够强效激

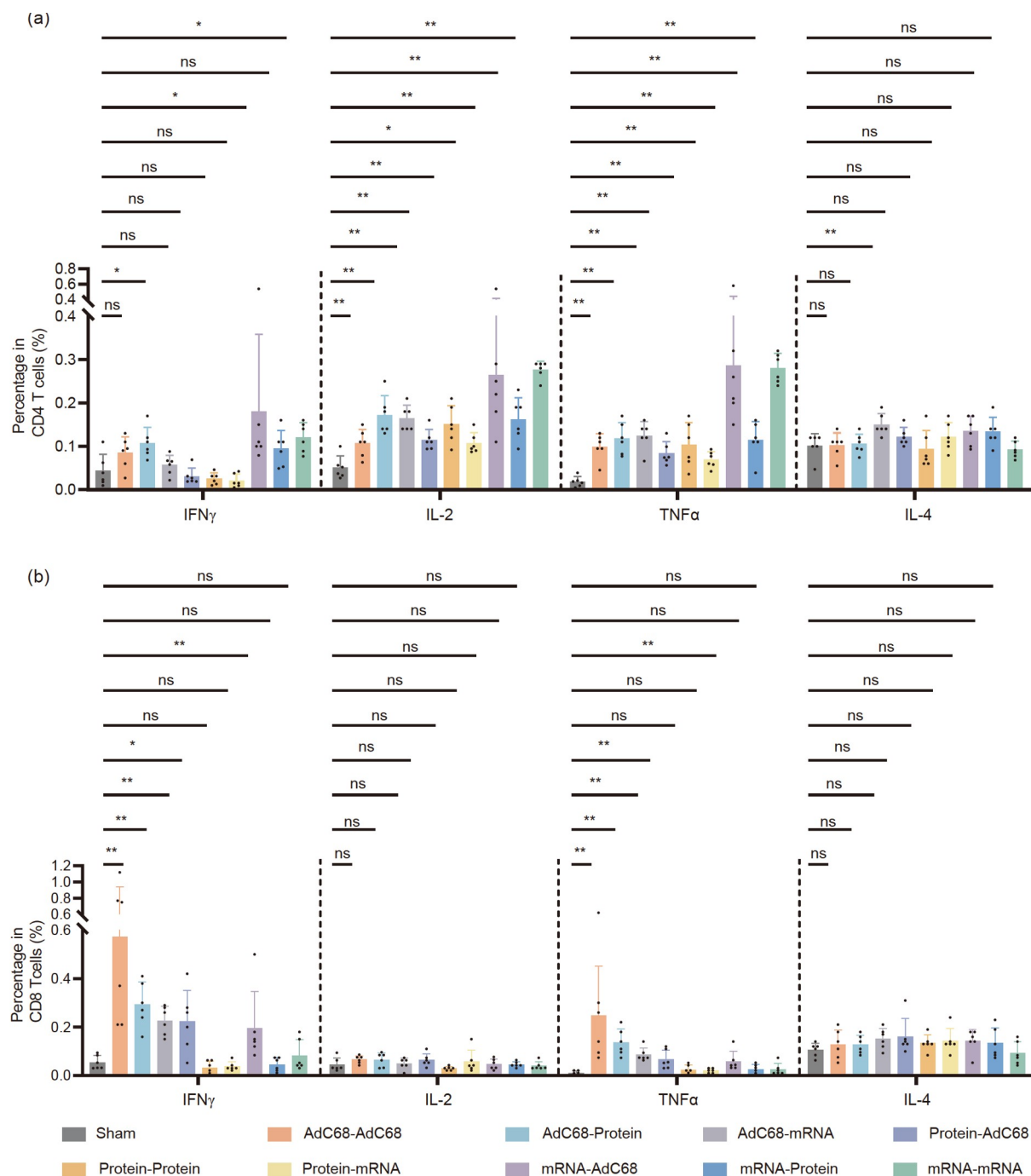


图 2 疫苗诱导的细胞免疫反应分析。通过ICS研究分析了疫苗免疫小鼠的细胞免疫反应，分别计算分泌IFN γ 、IL-2、TNF α 和IL-4的特异性CD4(a)和CD8(b)T细胞比例。采用t-test进行统计：ns, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$

Figure 2 Analysis of vaccine-induced cellular immune response. Measurement of the IFN γ , IL-2, TNF α and IL-4 secretion of mice splenocytes after stimulation with peptide pool by intracellular cytokine staining (ICS). Percentage of four cytokines in total CD4 T cells (a) or CD8 T cells (b). P values were analyzed with a t -test (ns, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)

活体液和细胞免疫的新型佐剂，如复合佐剂^[33]、纳米颗粒^[34]和多孔PLGA微球^[35]等也正在研究阶段。因此，佐剂对于蛋白亚单位疫苗的效果有着重要的影响。而

病毒载体疫苗和mRNA疫苗具有自身佐剂效应，不需要额外的佐剂帮助。

新冠病毒在世界范围内持续流行，接种疫苗后的

突破性感染不断出现, 主要原因既包括接种疫苗诱导的免疫反应随时间逐渐降低, 也包括新流行的变异株具有免疫逃逸, 进一步增加了病毒突破感染的能力, 真实世界的新冠病毒疫苗保护效力逐渐下降, 开发新一代的新冠病毒疫苗作为加强针十分必要。本项研究对于指导真实世界的疫苗加强接种具有重要意义。我们发现, mRNA疫苗作为第2针加强免疫相对于蛋白亚单位疫苗和腺病毒载体疫苗可以刺激更强的中和抗体反应, 因此, 选用mRNA疫苗加强具有优势, 但是其在人体内的加强作用效果仍有待通过临床实验研究。

研究发现, 不同技术路线的新冠病毒疫苗在小鼠体内刺激的T细胞反应具有明显不同的特征, 这也与临床试验报道的结果相近。腺病毒疫苗AZD1222和Ad26.COV2.S在人体内强烈刺激了T-helper 1(Th1)型细胞免疫反应, 分泌IFN γ 的CD8 $^{+}$ 和CD4 $^{+}$ T细胞均被激活, 没有检测到诱导特异性的IL-4 T细胞^[36,37]。mRNA疫苗BNT162b2在健康成年人体内可以同时刺激Th1倾向的分泌IFN γ 和IL-2的CD4和CD8 T细胞反应, 诱导的CD8 $^{+}$ T细胞比例要高于CD4 $^{+}$ T细胞, 且在9周的研究周期内疫苗刺激的T细胞免疫反应都可以被检测到^[38]。重组蛋白疫苗ZF2001在人体内诱导Th1和T-helper 2(Th2)平衡的细胞免疫反应, 免疫后的人PBMC经免疫原刺激后可以检测到IFN γ 、IL-2、IL-4和IL-5细胞因子的分泌, 说明本研究在小鼠模型上得到的结果可以较好地模拟人体内的免疫反应。

在黏膜免疫应答方面, 腺病毒载体新冠病毒疫苗的表现良好。通过特殊递送系统如免疫沉默聚合物包装的mRNA同样能够有效激活黏膜免疫应答^[39]。在不同序贯接种中, 2针灭活新冠病毒疫苗之后1针腺病毒载体的新冠病毒疫苗加强免疫, 表现较好的黏膜免疫^[40]; 且2针的mRNA疫苗之后1针腺病毒载体疫苗的加强免疫, 也能诱导产生较好的黏膜免疫^[41]。在有系统性免疫应答的背景下, 蛋白亚单位疫苗通过滴鼻途径, 也可诱导保护性的黏膜免疫应答^[42]。本研究主要评价和比较了不同平台在系统免疫应答上的效果, 而对于呼吸道黏膜免疫应答的作用需要进一步研究。

本研究使用的是Delta-Omicron BA.1免疫原, 新冠病毒的流行株更替较快, Omicron主要流行毒株还包括BA.2、BA.5、BA.5.2、BF.7、BQ.1、BQ.1.1、XBB、XBB.1.5等, 早期流行的BA.1诱导的抗体反应对BQ.1.1和XBB等部分Omicron毒株的交叉中和能力不强。本研究是一项概念验证研究, 使用Delta-Omicron BA.1免疫原为模型, 头对头地比较了不同技术平台的新冠病毒疫苗的免疫原性, 为新冠病毒疫苗接种应用提供理论基础, 在将来的应用中需要进一步根据流行株的变化进行抗原更新。

4 结论

本研究采用Delta-Omicron RBD二聚体为免疫原, 通过头对头的方式比较腺病毒载体(AdC68)疫苗、重组蛋白亚单位疫苗和mRNA疫苗3种技术平台在小鼠模型中的免疫效果。在体液免疫方面, 我们发现, 所有实验分析的分组中, 两剂mRNA疫苗免疫诱导的结合抗体和中和抗体滴度均为最高。此外, 不论是以亚单位疫苗、AdC68载体疫苗或者mRNA疫苗初免, 以mRNA疫苗作为第2针加强免疫均能诱导相对更强的体液免疫反应。在细胞免疫方面, 我们发现AdC68载体疫苗能强烈诱导CD8 $^{+}$ T细胞反应, mRNA疫苗主要激活了CD4 $^{+}$ T细胞反应, 重组蛋白亚单位疫苗刺激了CD4 $^{+}$ T细胞反应但强度较弱, mRNA-AdC68的初免-加强免疫方案刺激了更加多功能的T细胞免疫反应。这些发现对未来疫苗设计和接种策略具有重要意义, 可能更专注于mRNA技术的疫苗设计会有望带来更广泛的体液免疫保护。不同疫苗技术平台有着不同的T细胞免疫优势, 为平衡和增强CD4 $^{+}$ T细胞和CD8 $^{+}$ T细胞免疫反应的疫苗提供了指导意见, 有望获得更全面和有效的细胞免疫保护。此外, mRNA疫苗作为第二剂加强免疫能引发更强的免疫反应, 可能会促进我们在接种策略上进行优化, 探索更多异源或同源的接种方式, 以提高免疫效果性。鉴于新冠病毒不断变异, 未来研发新一代疫苗时需要及时更新抗原。

参考文献

- 1 Dai L, Gao G F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*, 2020, 21: 73–82
- 2 Xu K, Fan C, Han Y, et al. Immunogenicity, efficacy and safety of COVID-19 vaccines: An update of data published by 31 December 2021. *Int Immunol*, 2022, 34: 595–607

- 3 Xu K, Dai L, Gao G F. Humoral and cellular immunity and the safety of COVID-19 vaccines: A summary of data published by 21 May 2021. *Int Immunol*, 2021, 33: 529–540
- 4 Dai L, Zheng T, Xu K, et al. A universal design of betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*, 2020, 182: 722–733.e11
- 5 Yang S, Li Y, Dai L, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: Two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21: 1107–1119
- 6 Dai L, Gao L, Tao L, et al. Efficacy and safety of the RBD-dimer-based COVID-19 vaccine ZF2001 in adults. *N Engl J Med*, 2022, 386: 2097–2111
- 7 Guebre-Xabier M, Patel N, Tian J H, et al. NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against SARS-CoV-2 challenge. *Vaccine*, 2020, 38: 7892–7896
- 8 Keech C, Albert G, Cho I, et al. Phase 1–2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2320–2332
- 9 Heath P T, Galiza E P, Baxter D N, et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 385: 1172–1183
- 10 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. *Lancet*, 2020, 395: 1845–1854
- 11 Zhu F C, Guan X H, Li Y H, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*, 2020, 396: 479–488
- 12 Halperin S A, Ye L, MacKinnon-Cameron D, et al. Final efficacy analysis, interim safety analysis, and immunogenicity of a single dose of recombinant novel coronavirus vaccine (adenovirus type 5 vector) in adults 18 years and older: an international, multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, 2022, 399: 237–248
- 13 Falsey A R, Sobieszczyk M E, Hirsch I, et al. Phase 3 safety and efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 385: 2348–2360
- 14 van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*, 2020, 586: 578–582
- 15 Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, et al. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against COVID-19. *N Engl J Med*, 2021, 384: 2187–2201
- 16 Mercado N B, Zahn R, Wegmann F, et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 2020, 586: 583–588
- 17 Thomas S J, Moreira Jr. E D, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine through 6 months. *N Engl J Med*, 2021, 385: 1761–1773
- 18 El Sahly H M, Baden L R, Essink B, et al. Efficacy of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine at completion of blinded phase. *N Engl J Med*, 2021, 385: 1774–1785
- 19 Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383: 2603–2615
- 20 Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*, 2021, 384: 403–416
- 21 Vogel A B, Kanevsky I, Che Y, et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature*, 2021, 592: 283–289
- 22 Corbett K S, Edwards D K, Leist S R, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 2020, 586: 567–571
- 23 Xu K, Gao P, Liu S, et al. Protective prototype-Beta and Delta-Omicron chimeric RBD-dimer vaccines against SARS-CoV-2. *Cell*, 2022, 185: 2265–2278.e14
- 24 Xu K, An Y, Li Q, et al. Recombinant chimpanzee adenovirus AdC7 expressing dimeric tandem-repeat spike protein RBD protects mice against COVID-19. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10: 1574–1588
- 25 Liu J, Xu K, Xing M, et al. Heterologous prime-boost immunizations with chimpanzee adenoviral vectors elicit potent and protective immunity against SARS-CoV-2 infection. *Cell Discov*, 2021, 7: 123
- 26 Zhao X, Zheng A, Li D, et al. Neutralisation of ZF2001-elicited antisera to SARS-CoV-2 variants. *Lancet Microbe*, 2021, 2: e494
- 27 Tarke A, Coelho C H, Zhang Z, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell*, 2022, 185: 847–859.e11
- 28 Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*, 2022, 23: 186–193
- 29 Nelde A, Bilich T, Heitmann J S, et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol*, 2021, 22: 74–85
- 30 Zhao X, Wu X K, Du P, et al. Evaluation of the broad-spectrum immunogenicity of RBD dimer mRNA vaccines against SARS-CoV-2 variants (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2023, doi: 10.1360/TB-2023-0629 [赵旭, 吴鑫凯, 杜沛, 等. 新冠病毒变异株RBD二聚体mRNA疫苗广谱免疫原性研究. 科学通报, 2023, doi: 10.1360/TB-2023-0629]
- 31 Xu S, Duan H, An Y, et al. Effect of adjuvanting RBD-dimer-based subunit COVID-19 vaccines with Sepivac SWE™. *Vaccine*, 2023, 41: 2793–

2803

- 32 Richmond P, Hatchuel L, Dong M, et al. Safety and immunogenicity of S-Trimer (SCB-2019), a protein subunit vaccine candidate for COVID-19 in healthy adults: A phase I, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. [Lancet](#), 2021, 397: 682–694
- 33 Noh J Y, Jeong H W, Kim J H, et al. T cell-oriented strategies for controlling the COVID-19 pandemic. [Nat Rev Immunol](#), 2021, 21: 687–688
- 34 Toback S, Galiza E, Cosgrove C, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a COVID-19 vaccine (NVX-CoV2373) co-administered with seasonal influenza vaccines: An exploratory substudy of a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. [Lancet Respir Med](#), 2022, 10: 167–179
- 35 Zou L Q, Zhang Y, Yue H, et al. Porous PLGA microsphere as a vaccine adjuvant against COVID-19 (in Chinese). *Chin J Process Eng*, 2023, 23: 1–11 [邹龄娇, 张瑜, 岳华, 等. 多孔PLGA微球作为新型冠状病毒疫苗佐剂的研究. *过程工程学报*, 2023, 23: 1–11]
- 36 Stephenson K E, Le Gars M, Sadoff J, et al. Immunogenicity of the Ad26.COV2.S vaccine for COVID-19. [JAMA](#), 2021, 325: 1535–1544
- 37 Ewer K J, Barrett J R, Belij-Rammerstorfer S, et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. [Nat Med](#), 2021, 27: 270–278
- 38 Sahin U, Muik A, Vogler I, et al. BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. [Nature](#), 2021, 595: 572–577
- 39 Baldeon Vaca G, Meyer M, Cadete A, et al. Intranasal mRNA-LNP vaccination protects hamsters from SARS-CoV-2 infection. [Sci Adv](#), 2023, 9: e1655
- 40 Li J X, Wu S P, Guo X L, et al. Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: A randomised, open-label, single-centre trial. [Lancet Respir Med](#), 2022, 10: 739–748
- 41 Tang J, Zeng C, Cox T M, et al. Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 after mRNA vaccination. [Sci Immunol](#), 2022, 7: e4853
- 42 Mao T, Israelow B, Peña-Hernández M A, et al. Unadjuvanted intranasal spike vaccine elicits protective mucosal immunity against sarbecoviruses. [Science](#), 2022, 378: e2523

补充材料

图S1 疫苗诱导的中和抗体滴度的统计学差异分析

表S1 mRNA-mRNA组与其他疫苗组免疫后诱导的中和抗体滴度比值

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “3种平台Delta-Omicron嵌合RBD二聚体新冠病毒疫苗的免疫原性头对头比较”

A head-to-head comparative study on the immunogenicity of three platforms of COVID-19 Delta-Omicron chimeric RBD-dimer vaccines

Kangji Yang^{1†}, Kun Xu^{2†}, Lijun Zhang^{3†}, Yuxuan Han³, Dongming Zhou⁴, Qianfeng Xia¹, Lianpan Dai^{3*} & George F. Gao^{2,3*}

¹ Key Laboratory of Tropical Translational Medicine of Ministry of Education, Hainan Medical University, Haikou 571199, China;

² Research Network of Immunity and Health, Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³ CAS Key Laboratory of Pathogen Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China;

⁴ School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: dailp@im.ac.cn; gaof@im.ac.cn

The novel coronavirus (SARS-CoV-2) caused a global pandemic, with significant distress to human health, society stability, and development. COVID-19 vaccination has played a pivotal role to control the pandemic, with multiple vaccine approaches approved globally, including inactivated recombinant protein subunits, virus-like particles, viral vectors, mRNA, and DNA vaccines. Notably, we collaborated with Anhui Zhifei longcom Biopharmaceutical Co., Ltd. to develop a COVID-19 vaccine (ZF2001) based on recombinant protein subunit platform, using a tandem-repeat dimeric form of receptor-binding domain (RBD) of the spike protein of SARS-CoV-2 as immunogen. Besides, the adenovirus vector vaccine, Ad5-nCoV (Convidecia, CanSino), developed jointly by the Chinese Academy of Military Medical Sciences and CanSino Biologics, employs a human adenovirus type 5 vector to express the full-length S protein of SARS-CoV-2. mRNA vaccines BNT162b2 (Comirnaty), developed by BioNTech and Pfizer, and mRNA-1273 (SpikeVax), developed by Moderna, have been widely administered over the world. In phase III clinical trials, these vaccines have shown an efficacy of over 94% in preventing symptomatic infections caused by a prototype strain of the SARS-CoV-2. COVID-19 mRNA vaccines were the first globally approved mRNA vaccines. Both BNT162b2 and mRNA-1273 use gene encoding the prefusion-stabilized S-2P protein and employ lipid nanoparticles as the delivery system.

Owing to the distinct characteristics of the different vaccine platforms, there are variations in the vaccine-induced immune responses. To compare the characteristics of the immune response elicited by various COVID-19 vaccine platforms, we designed a head-to-head comparative study. We modified the RBD dimer immunogen used in the ZF2001 vaccine, to design a chimeric RBD dimer antigen composed of tandem RBDs from two different viral strains; which could induce a broader spectrum of immune responses. Using the Delta-Omicron RBD dimer as an immunogen, we selected vaccines from three platforms including recombinant protein subunit, adenovirus vector, and mRNA vaccines for a homologous and heterologous prime-boost immunization regimen in a head-to-head comparative study. We found that two doses of mRNA vaccine induced the highest antibody titers of specific IgG and neutralizing antibodies in mice, followed by the protein vaccine and AdC68 vaccine. The heterologous prime-boost studies showed that boosting with the mRNA vaccine as the second dose induced a stronger humoral immunity response, compared with protein subunit and AdC68 vaccines. In addition, the mRNA vaccine induced a strong CD4⁺ T cell responses, and the AdC68 vaccine induced a strong CD8⁺ T cell responses. In contrast, the protein subunit vaccine elicited a relatively weak cellular immune response. This study provides guidance for the next-generation of COVID-19 vaccine development and optimization of inoculation strategy in the real world.

SARS-CoV-2, protein subunit vaccine, adenovirus-vectored vaccine, mRNA vaccine, antibody, T cell response

doi: [10.1360/TB-2023-1054](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1054)