

• 聚焦抗新冠病毒药物研究 •

经口途径 COVID-19 疫苗产品与技术分析

葛 华, 蒋丽勇, 刘 术, 刁天喜*

(军事科学院军事医学研究院卫生勤务与血液研究所, 北京 100850)

摘要: 新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 全球持续流行且变异株不断出现, 疫苗应用仍是疫情防控的重要手段。黏膜免疫对机体防御新冠病毒即严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 入侵十分重要。目前上市的注射用 COVID-19 疫苗主要激活体液免疫, 难以诱导有效的黏膜免疫, 无法在病毒感染早期阻止病原体入侵。与注射接种相比, 经鼻或口等黏膜途径接种 COVID-19 疫苗与病毒的自然感染途径相近, 可诱导机体产生全面的免疫应答, 具有使用简单方便、易于实现接种者的自我管理、减少对专业医务人员的需求等优点, 是快速和广泛接种疫苗的理想选择。本文总结分析了经口途径接种的 COVID-19 疫苗产品及技术平台, 为相关研究工作提供参考。

关键词: 黏膜免疫; 经口途径; COVID-19 疫苗; 技术分析

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-0845-09

Analysis of COVID-19 vaccine products and technologies by oral route

GE Hua, JIANG Li-yong, Liu Shu, Diao Tian-xi*

(Institute of Health Service and Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) continues to be prevalent all over the world and mutant strains are constantly appearing, the application of vaccine is still an important method of epidemic prevention and control. Mucosal immunity plays an important role in preventing severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) invasion. The currently marketed injectable COVID-19 vaccine mainly activates humoral immunity, but it is difficult to induce effective mucosal immunity, and it is unable to prevent pathogen invasion in the early stage of virus infection. Compared with injection vaccination, inoculation of the COVID-19 vaccine through mucosal routes such as nasal or oral can closely imitate the natural infection pathway of the virus and induce a comprehensive immune response. It is an ideal choice for rapid and extensive vaccination because it has the advantages of simple and convenient use, easy to achieve self-management of vaccinators, reduced demand for professional medical personnel and so on. In this paper, we summarized and analyzed the products and technical platforms of COVID-19 vaccine inoculated by oral route, in order to provide reference for related research work.

Key words: mucosal immunity; oral route; COVID-19 vaccine; technical analysis

许多传染病的病原体由呼吸道、肠道或生殖道的黏膜进入机体, 包括引发新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 大流行的新冠肺炎病毒即严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory

syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)。SARS-CoV-2 的主要感染路径为呼吸道^[1]、口腔黏膜^[2]和眼睛结膜表面^[3]。黏膜免疫对机体防御病毒入侵十分重要。通过鼻腔、口服、吸入、舌下途径接种疫苗与 SARS-CoV-2 的自然感染途径相近, 可切断病毒进入机体的黏膜入口途径, 并且可诱导全面的免疫应答, 从而提高疫苗的免疫效果。目前, 国内外有多款经口或鼻内途径接种

收稿日期: 2022-01-25; 修回日期: 2022-02-25.

*通讯作者 Tel: 86-10-66931118, E-mail: diaotx@263.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0104

的 COVID-19 疫苗处于研发阶段,已有文章综述了经鼻途径接种疫苗的研发概况^[4]。本文对经口途径[口服、舌下、经口(肺)吸入] COVID-19 疫苗产品及技术平台的研发动态进行扼要分析,为相关研究工作提供支持。

1 黏膜免疫概要

人体大部分病原体感染发生在黏膜表面。黏膜表面成为抗原侵入位点,易诱导免疫反应。黏膜免疫的基础是黏膜免疫系统(mucosal immune system, MIS)。MIS 主要由广泛分布于机体的黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)组成^[5],包括肠相关淋巴组织、鼻相关淋巴组织、支气管相关淋巴组织和泌尿生殖道相关淋巴组织等。虽然不同区域的 MALT 在解剖学上是分开的,但其在功能上有联系,被称为“共同黏膜免疫系统”。由于该系统的存在,疫苗在一处接种可诱导多个远位黏膜部位产生免疫应答^[6]。

黏膜表面的适应性免疫应答主要由分泌型 IgA (sIgA) 抗体介导。当抗原接触到呼吸道、肠道、泌尿道等部位的黏膜时,首先被黏膜表面专门的抗原识别细胞(M细胞)识别,然后 M 细胞内陷形成一个口袋形状,将识别过的抗原内吞到“口袋”内,再将其传递给抗原提呈细胞如巨噬细胞、树突状细胞等^[7]。抗原提呈细胞将这些抗原提呈给 MALT 中的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,产生特异性 B 淋巴母细胞,发生中心繁殖后通过血流迁移到远处的黏膜和腺体组织,并进一步分化成熟为浆细胞,分泌 sIgA。IgA 可通过结合抗原、细菌毒素或病毒阻止其附着并入侵黏膜。此外,抗原可在一定条件下诱导产生针对病原体的 IgG 和细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应^[8]。

2 黏膜免疫疫苗的优势与挑战

黏膜免疫已成为疫苗研究的重要方向。黏膜免疫最初以口服疫苗为主,然后是鼻腔疫苗。现在研究人员正在探索更多黏膜疫苗接种途径^[9],如吸入、直肠、舌下和阴道。这些接种途径在动物模型上效果显著,但迄今只有口服和鼻腔途径被获批用于人类疫苗接种。

黏膜屏障和免疫耐受是黏膜疫苗开发的主要挑战^[10],例如:黏膜部位的物理和化学屏障会降低抗原的递送效率,口服疫苗为了达到胃肠道的免疫部位必须穿过黏液层,胃肠道的酸性环境及各种蛋白酶又使口服疫苗的抗原很容易变性或被降解。目前主要通过抗原及其剂型的优化、开发高效的递送系统与黏膜佐剂等途径解决^[11]。理想的黏膜免疫疫苗应实现以下功能^[12]:① 保护抗原不被酶降解;② 设计高效的递送系统,把抗原递送到黏膜免疫的诱导位点;③ 促进胃肠道和呼吸道黏膜中的 M 细胞摄取抗原,以靶向抗原提呈

细胞;④ 促进抗原提呈细胞对抗原与佐剂的共摄取,以刺激适当的特异性免疫,如产生 sIgA 和/或 CTL 应答。

与传统注射疫苗相比,黏膜疫苗具有天然优势:同时诱导黏膜局部免疫和全身系统免疫反应;通过简单的摄入或吸入接种疫苗,避免因注射引起的感染或局部不良反应;在不同年龄的人群中依从性高,易于实现接种者的自我管理;接种方便,减少对专业医务人员的需求;一般无需冷链保存及运输,降低成本;适用于疫苗的大规模接种或紧急情况接种等。

3 经口途径 COVID-19 疫苗产品与技术进展分析

3.1 经口途径疫苗产品研发概览

根据 Adis Insight 药物研发信息数据库及 WHO 官网的疫苗研发信息^[13],本文汇总了经口途径 COVID-19 疫苗产品及其研发概况(表 1)。截至 2021 年 12 月 7 日,在研经口途径疫苗的研发以口服疫苗为主(10 个),也有少数经口(肺)吸入(4 个)和舌下(1 个)给药;另有一款舌下/口服/皮下给药疫苗(将该疫苗暂时归入舌下接种疫苗)。产品类型包括病毒载体疫苗、蛋白亚单位疫苗、病毒样颗粒疫苗、DNA 疫苗、减毒活疫苗以及基于训练免疫(trained immunity)的疫苗。目前已有多款经口途径疫苗进入临床研究,进展最快的口服疫苗处于临床 II 期试验,是美国 Vaxart 公司的腺病毒载体疫苗 VXA-CoV2-1;进展最快的经口(肺)吸入与舌下产品已进入临床 III 期,分别是康希诺生物股份公司的 Ad5-nCoV 和西班牙 Immunotek 公司的 MV130。

3.2 口服接种 COVID-19 疫苗研发进展

3.2.1 Vaxart 公司研制的 VXA-CoV2-1 VXA-CoV2-1 的设计与开发是基于 Vaxart 公司的 VAAST™ 技术平台。VAAST™ 是一种由载体、抗原和佐剂组成的模块化通用疫苗研发技术平台,以复制缺陷型腺病毒(Ad5)作为载体,将编码特异性抗原和编码 Toll 样受体 3 (TLR-3) 激动剂(激活天然免疫系统的佐剂)的基因递送至小肠黏膜上皮细胞,诱导机体产生黏膜和全身性的免疫反应。VAAST™ 技术使疫苗研发模块化,加速疫苗研发的过程,提高疫苗的生产效率。Vaxart 公司利用该技术设计了针对诺如病毒、流感病毒、禽流感病毒等多种病原体的疫苗,并开展了相关研究,结果显示基于该技术的疫苗能够在人体内针对不同病原体产生可靠的中和抗体、黏膜免疫和 T 细胞免疫反应^[14-17]。

VXA-CoV2-1 是 Vaxart 公司采用 VAAST™ 技术开发的 5 型腺病毒载体(复制缺陷型) COVID-19 口服片剂疫苗。与目前大多数疫苗以刺突蛋白(spike protein, S 蛋白)为抗原不同, VXA-CoV2-1 的抗原同时包括 S 蛋白和核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N 蛋白)。N 蛋白是 SARS-CoV-2 的重要组成成分^[18],参与

Table 1 Summary of coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccine products by oral route

Route of administration	Vaccine name	Dose	Technology type	Developer	Country	Research progress
Oral	VXA-CoV2-1	2	Viral vector	Vaxart	USA	Phase II (NCT05067933)
	bacTRL-Spike	1	DNA	Symvivo	Canada	Phase I (NCT04334980)
	CoV2-OGEN1	1-2	Protein subunit	US Specialty Formulations/ Vaxform	USA	Phase I (NCT04893512)
	COVID-19 vaccine	3	BacAg-SpV	Dream Tec Research	Hong Kong, China	Clinical (NCT05057923), undisclosed research phase
	PRAK-03202	2	VLP	Oravax Medical	Israel/India	Pre-clinical
	COVID-19 vaccine	-	Live attenuated virus	AEterna Zentaris/Julius-Maximilians University	USA/Germany	Pre-clinical
	Phage-based vaccine	-	Viral vector	Adaptive Phage Therapeutics	USA	Pre-clinical
	S-only COVID-19 vaccines	-	Viral vector	Vaxart	USA	Pre-clinical
	OraPro-COVID-19	-	Viral vector	iosBio/Stabilitech Biopharma	UK	Pre-clinical
	MigVax-101	-	Protein subunit	MigVax	Israel	Pre-clinical
Sublingual	MV130	-	Based on trained immunity	Immunotek	Spain	Phase III (NCT04363814)
Sublingual/oral/ subcutaneous	hAd5 S+N	1-2	Viral vector	ImmunityBio	USA	Phase I/II (NCT04843722)
Orally inhaled	FLOVID-20	-	Protein subunit	Flow Pharma	USA	Pre-clinical
	COVID-19 vaccines	-	VLP	Immune System Regulation (ISR)	Sweden	Pre-clinical
	Ad5-nCoV-IH	-	Viral vector	CanSino BIO/Academy of Military Medical Sciences	China	Phase III (NCT05124561)
	PNB-V01	-	Viral vector	PhageNova Bio	USA	Pre-clinical

病毒基因组包装和病毒颗粒释放^[19], 其结构在不同冠状病毒中具有很高的相似性, 由于N蛋白自身的保守特性, 在新冠病毒的变异中仍然处于保守状态^[20], 为抗体药物和疫苗的研发提供了新思路。因此, 在设计原理上, 以S蛋白和N蛋白为抗原的VXA-CoV2-1应对病毒变异的能力会更强。在工艺方面, VXA-CoV2-1片剂外层有肠溶包衣, 可保护活性成分免受胃中酸性环境的影响, 将疫苗有效递送至小肠发挥作用。临床前研究显示: 在攻毒5天后, 与未接种的仓鼠相比, 通过口服或鼻腔途径接种了两剂VXA-CoV2-1疫苗的仓鼠体重未有明显下降, 肺部的炎症反应显著降低, 病毒载量减少了4~5个数量级, 在肺部未检测到传染性病毒^[21], 提示口服疫苗可为仓鼠提供针对SARS-CoV-2的保护作用且减少SARS-CoV-2在仓鼠模型中的传播, 这与杜克大学的研究结果一致^[22]。目前该疫苗已完成临床II期试验, 其结果尚未披露。

3.2.2 Symvivo公司研制的 bacTRL-Spike bacTRL-Spike的研发基于bacTRL技术平台。bacTRL是利用人体共生细菌进行基因递送的技术平台, 其产品通过口服和静脉注射两种方式给药。采用bacTRL技术平台可实现疫苗的快速研发, 且具有基因载量大、组织靶向性强、产品室温下稳定等优点^[23]。

bacTRL-Spike是一款室温下稳定的口服DNA疫苗, 其原理与腺病毒载体疫苗相似, 都是利用载体将靶

向S蛋白基因序列的质粒递送到体内进行免疫, 不同的是将载体换成了被称为长双歧杆菌的益生菌, 具有较高的安全性。目前该产品正在开展临床I期试验研究。

3.2.3 Oravax Medical公司研制的 PRAK-03202 PRAK-03202的研发采用Oramed Pharmaceuticals公司的口服蛋白质给药技术 (protein oral delivery, POD) 和Premas Biotech公司的蛋白质表达技术 (D-Crypt)。POD技术将活性蛋白封装在具有保护涂层的胶囊中, 使其经过胃肠道酸性环境后依然完好。此前, Oramed Pharmaceuticals公司已将该技术用于口服胰岛素ORMD-0801的研发, 临床研究显示其安全有效^[24], 证明了POD技术用于药物递送的可行性。D-Crypt是利用优化的酵母系统大量生产“难表达蛋白 (difficult-to-express proteins, DTE-Ps)”的技术平台, Premas Biotech公司设计了蛋白酶缺陷型酿酒酵母表达宿主, 并将其与20多种经修饰的定制表达载体相结合, 可表达多种重组蛋白并确保其功能性, 已利用D-Crypt技术成功表达了包括3类膜蛋白在内的多种DTE-Ps^[25]。该技术可实现蛋白的快速表达, 具有良好的可扩展性及成本效益。

PRAK-03202是由Oravax Medical公司 (Oramed Pharmaceuticals公司和Premas Biotech公司的合资公司) 开发, 以S蛋白、包膜蛋白 (envelope, E) 和膜 (membrane, M) 蛋白为靶点的三抗原病毒样颗粒 (VLP) 疫苗。临床前研究显示, PRAK-03202在BALB/c小鼠中诱导

SARS-CoV-2 特异性中和抗体, 使用 3 种不同剂量的 PRAK-03202 进行免疫, 诱发了抗原特异性 (S、E 和 M 蛋白) 体液反应和中和潜力^[26], 这些研究结果支持该疫苗进一步的临床研发。

3.2.4 Adaptive Phage Therapeutics 公司研制的 Phage-based vaccine

Adaptive Phage Therapeutics 公司开发的是基于噬菌体的口服疫苗, 其基本原理是将编码新冠病毒抗原蛋白的 DNA 片段插入噬菌体编码外膜蛋白的基因中, 使新冠病毒抗原蛋白以融合形式与噬菌体表面蛋白共同表达于噬菌体表面^[27]。噬菌体作为新型的病毒载体, 其自身具有佐剂功能和良好的免疫原性^[28]。该疫苗对噬菌体进行了工程化改造, 具备安全可靠、免疫效果好、高温下稳定、研发周期短、成本低等优势。

3.2.5 MigVax 公司研制的 MigVax-101

MigVax-101 是 MigVax 公司基于禽类冠状病毒 IBV 疫苗平台开发, 用于预防 SARS-CoV-2 感染的口服亚单位疫苗。MigVax-101 由蛋白与一种黏膜免疫佐剂组成, 即新冠病毒 S 蛋白的受体结合域 (receptor binding domain, RBD)、N 蛋白的 2 个结构域和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin, LT(B)). MigVax 公司疫苗的技术优势在于其搭建的 IBV 疫苗平台具有通用性, 能快速应对突变株对疫苗的影响; 采用口服给药, 可诱导体液免疫、细胞免疫以及黏膜免疫; 安全性高; 易于实现大规模生产且成本较低^[29]。临床前研究证实了口服接种 MigVax-101 可诱导机体产生体液免疫、细胞免疫与黏膜免疫^[30]。2021 年 11 月, MigVax 公司获 CEPI 430 万美元的资助以开发新型口服亚单位疫苗, 旨在为“抗变异”疫苗的临床前验证提供支持^[31]。

3.3 舌下接种 COVID-19 疫苗研发进展

3.3.1 Immunotek 公司研制的 MV130

MV130 是基于训练免疫理念研发的黏膜免疫疗法。越来越多的研究显示, 天然免疫细胞如巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等在受到病原微生物及其产物刺激后, 当再次感染时, 可产生对原刺激或异源刺激的非特异性强化免疫的记忆特征, 这一现象被称为训练免疫, 其过程不依赖经典的 T 细胞或 B 细胞适应性免疫, 而是由表观遗传修饰和免疫代谢驱动。训练免疫激活的树突状细胞能够增强 T 细胞对特异性抗原的反应^[32], 这种机制可作为适应性免疫和先天免疫结合性疫苗研发的桥梁。此外, 训练免疫可增强非特异性的先天免疫, 实现“一苗多防”的目标^[33], 如队列研究显示, 卡介苗的接种与 COVID-19 发病率降低有一定相关性^[34]。

MV130 又称 BACTEK-R, 是全细胞灭活的细菌混合物组成的舌下制剂, 包括金葡菌、表皮葡萄球菌、肺

炎链球菌、肺炎克雷伯杆菌、卡他莫拉菌、流感嗜血杆菌。最新研究显示, MV130 可诱导机体产生训练免疫反应, 有效预防不同类型的复发性呼吸道感染^[35,36]; 还可用于预防儿童气喘发作, 临床 III 期研究结果显示其安全有效^[37]。目前, Immunotek 公司正在评估 MV130 经舌下给药后对 COVID-19 的异源性防护作用, 处于临床 III 期研究阶段。前期经鼻给药的研究结果初步显示其可预防 SARS-CoV-2 感染并提高 COVID-19 疫苗 MVA-S (一种基于 MVA 的重组疫苗) 的免疫原性^[38], 具有较好的应用前景。

3.3.2 ImmunityBio 公司研制的 hAd5 S+N

该疫苗的研发基于 ImmunityBio 公司的第二代腺病毒载体 (Ad5[E1-/E2B-/E3-]) 技术。与其他正在开发的腺病毒载体技术平台不同^[39,40], 第二代腺病毒载体技术删除了 Ad5 中的早期基因 E1、E2B 和 E3, 以避免预存免疫的影响^[41,42]。基于该技术平台已开发了针对流感、HIV-1、拉沙热等病毒的疫苗, 可诱导产生体液和细胞免疫反应^[43-45]。在制剂方面, ImmunityBio 公司获英国 iosBio 公司授权使用其“即插即用”式口服疫苗专利技术平台 OraproTM, 该技术通过改变编码抗原 DNA 的片段, 便可用于不同病毒载体疫苗的研发, 其将药物封装在带有肠溶衣的胶囊中, 使带有抗原基因的病毒载体穿过胃到达小肠发挥作用^[46]。

hAd5 S+N 是双抗原设计的腺病毒载体疫苗^[47], 编码经修饰的 SARS-CoV-2 S 蛋白 (S-fusion) 基因和带有增强型 T 细胞刺激域的 N 蛋白 (nucleocapsid protein with an enhanced T-cell stimulation domain, N-ETSD) 基因^[48], N-ETSD 具有提高主要组织相容性复合体 (MHC) I/II 类分子反应的潜力。临床前研究显示, 该疫苗 (皮下初免 + 口服增强) 在恒河猴体内诱导产生 SARS-CoV-2 中和抗体、S 和 N 蛋白的特异性 T 细胞反应, 从而为恒河猴提供保护作用。值得注意的是, SARS-CoV-2 攻毒试验后的第 1 天, 与安慰剂组对比, 疫苗组恒河猴模型肺部与鼻内的病毒复制受到抑制且 7 天内未检测到感染^[49], 鼻内快速的病毒抑制结果提示其可能产生了更加广泛的免疫反应。该疫苗在小鼠模型中 (皮下初免 + 鼻内增强) 也显示了相似的研究结果^[50]。ImmunityBio 公司报道的临床 Ib 期初步试验数据展示了其具有对新冠病毒的变异株 (B.1.351、B.1.1.7、B.1.492 和 P.1) 提供持续免疫保护的潜力^[51]。目前正在开展临床 I/II 期试验, 评价该疫苗作为加强免疫的方法经皮下、舌下和口服 (胶囊) 接种后的安全性、有效性、反应原性及免疫原性。

3.4 吸入式 COVID-19 疫苗研发进展

3.4.1 Flow Pharma 公司研制的 FLOVID-20

FLOVID-20

20 是以 SARS-CoV-2 N 蛋白为靶点的 CTL 表位肽疫苗。Flow Pharma 公司将 FlowVax 技术平台用于 FLOVID-20 的设计与递送, 其技术核心主要包括两部分: 首先, 把传统生物细胞学和生物信息学相结合, 利用人工智能筛选出与 HLA-I 类分子具有高度体外亲和力的 N 蛋白表位肽, 大大提高了筛选效率; 其次, 疫苗的递送采用之前构建的递送系统^[52], 将表位肽和佐剂 TLR-9 激动剂 CpG 寡核苷酸共包载于同一载体—聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(L-lactide-co-glycolide), PLGA] 微球进行递送; 与之前递送系统不同的是, 在载体溶液中加入另一种佐剂 TLR-4 激动剂单磷酸脂质 A (monophosphoryl lipid A, MPLA)。这种递送载体、两种佐剂的组装和设计可充分发挥各组分的功能, 引发并进一步强化 T 细胞免疫反应。FlowVax 技术具有安全、有效、低成本和广泛应用的特点, Flow Pharma 公司已利用该技术开发了基于 T 细胞免疫的埃博拉疫苗, 初步证实了技术的可行性^[53], 为 COVID-19 T 细胞疫苗的研发奠定基础。

FLOVID-20 的临床前研究结果显示^[54], 采用鼻腔黏膜雾化和气管内滴注的方式对恒河猴模型进行疫苗接种后, 对感染 SARS-CoV-2 的恒河猴模型具有保护作用; 由于 N 蛋白较 S 蛋白具有较高的保守性, 该疫苗可作为重组蛋白疫苗、mRNA 疫苗或腺病毒载体疫苗之后的加强疫苗。此外, FLOVID-20 在室温下稳定, 还可通过雾化吸入到呼吸道黏膜进行免疫接种。

3.4.2 ISR 公司研制的 COVID-19 vaccine 该疫苗是由 SARS-CoV-2 表面蛋白及佐剂组成的粉末状疫苗, 依托 Iconovo 公司的 ICOone 平台进行接种。ICOone 是一款单剂量一次性干粉吸入器, 由于使用者的吸入驱动实现疫苗的接种。该单剂量装置虽然没有多剂量装置载药的优势, 但对药物保护效果好、结构简单、使用方便且成本低。目前已完成体内的毒理学研究, 研究结果显示其具有良好的安全性^[55]。

3.4.3 康希诺生物研制的吸入式 Ad5-nCoV 吸入式 Ad5-nCoV 是已获批上市重组腺病毒载体疫苗 Ad5-nCoV (商品名: 克威莎) 的吸入式产品, 其研发基于腺病毒载体疫苗技术, 由康希诺生物和军事医学研究院联合研发。腺病毒载体疫苗的原理是利用基因工程技术将保护性抗原基因插入安全的腺病毒载体中, 转染细胞后获得重组病毒, 主要诱导机体产生液体免疫和涉及 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的细胞免疫反应。Ad5-nCoV 和吸入式 Ad5-nCoV 的技术原理、制剂工艺、制剂配方等均相同, 只是给药方式由肌肉注射改为雾化吸入。吸入式 Ad5-nCoV 采用 Aerogen 专有的振动网筛气雾剂给药技术实现吸入给药^[56]。疫苗通过振动网雾化后

进入小的气溶胶室, 经呼吸直接进入呼吸道, 70% 以上的雾化颗粒粒径小于 5.4 μm , 较小的雾化颗粒使其可沉积于下呼吸道、末梢支气管及肺泡。这种吸入给药技术成熟且简单可控, 但是同时也存在装置内部制剂残留、呼吸过程中出现制剂泄露等问题。

Ad5-nCoV 是编码 S 蛋白的复制缺陷型腺病毒载体疫苗, 在临床 I/II 期试验中具有良好的安全性和免疫原性^[57,58]。Ad5-nCoV 的全球多中心临床试验数据显示^[59], 单剂量接种 28 天后, 该疫苗对有症状新冠感染的保护效力为 57.5%, 对重症新冠的保护效力为 91.7%, 没有发生与疫苗相关的严重不良反应。为评价吸入式 Ad5-nCoV 疫苗的安全性和免疫原性, 研究人员在肌肉注射 Ad5-nCoV 28 天后的健康人群 (18 岁及以上) 进行雾化吸入加强免疫。结果显示^[60], 雾化接种 1 剂相当于肌肉注射 1/5 剂量的 Ad5-nCoV, 雾化接种 2 剂即可诱导产生与肌肉注射 1 剂该疫苗相似的 SARS-CoV-2 中和抗体滴度, 且未引起任何与疫苗相关的严重不良反应事件。同时, 研究人员在已完成 2 剂灭活疫苗基础免疫的 18 岁及以上成年人中开展了随机、非盲、平行对照的临床研究, 以评价吸入式 Ad5-nCoV 异源加强的安全性和免疫原性。结果显示^[61], 在已完成 2 剂灭活疫苗基础免疫的 18 岁及以上成年人中, 以 1 剂吸入式 Ad5-nCoV 进行异源加强, 可激发强烈的黏膜免疫反应, 比用灭活疫苗同源加强可诱导更高水平的中和抗体且不良反应率更低。上述结果表明, 对于已接种 2 剂 COVID-19 灭活疫苗的成人, 使用吸入式 Ad5-nCoV 进行异源加强免疫是安全有效的, 目前该吸入疫苗处于临床 III 期阶段。

3.4.4 PhageNova Bio 公司/美国新泽西 Rutgers 癌症研究所研制的 PNB-V01 PNB-V01 是以噬菌体展示技术为基础开发的配体靶向肺接种疫苗。新泽西 Rutgers 癌症研究所通过噬菌体随机展示肽库筛选了一种多肽配体 (CAKSMGDIVC), 该配体能特异性地与肺上皮细胞受体 $\alpha 3\beta 1$ 相结合, 展示该配体的噬菌体颗粒经该配体/受体介导进入体循环, 并在小鼠和非人灵长类动物中诱导持续的局部和全身免疫反应^[62,63]。基于结构导向的抗原设计原则, 研究人员把噬菌体的主要衣壳蛋白 pVIII 展示载体和次要衣壳蛋白 pIII 展示载体整合在一起, 构建了一种可在 pVIII 和 pIII 蛋白上同时展示外源多肽的双展示噬菌体载体。一方面, 将筛选的 6 个 SARS-CoV-2 S 蛋白表位展示于 pVIII 上; 另一方面, 将多肽配体 (CAKSMGDIVC) 展示于 pIII 上, 这种双展示的设计使疫苗具有针对 S 蛋白的免疫反应和高效的肺靶向递送功能, 将其以气溶胶的形式经肺接种到小鼠体内后, 诱导了特异性和系统性的免疫反应^[64]。

4 总结与展望

不同的免疫途径诱导不同的保护机制,即便同一疫苗也会因免疫途径的不同产生免疫效果的差异^[65],确定合适的免疫途径是疫苗研发中不可缺少的环节。目前疫苗的接种途径主要包括肌肉注射、皮下注射、皮内注射、口服接种和鼻内接种等^[66]。肌肉注射、皮下注射、皮内注射是较为常见且使用广泛的疫苗接种方式,在疾病的预防中发挥了重要作用,但注射的接种方式需专业人员操作,注射时使用的针头和注射器亦会引起疼痛不适以及感染的风险。更重要的是,注射给药的疫苗不能诱导有效的黏膜免疫,其所激活的体液免疫与全身免疫力密切相关,无法在感染早期阶段阻止病原体入侵^[67],包括已上市的注射用 mRNA 疫苗 BNT162b2。BNT162b2 可诱导强大的全身免疫反应,但不能诱导产生黏膜 IgA 反应^[68]。而 SARS-CoV-2 是一种黏膜病毒,很少在血液中检测到^[69,70],主要通过上呼吸道感染机体,与宿主免疫系统的第 1 次相互作用发生在鼻腔和口咽黏膜上,黏膜免疫系统最先对病毒做出反应,产生分泌型抗体应对感染^[71]。理想的 COVID-19 疫苗需诱导产生黏膜免疫、细胞免疫和体液免疫三重防护,以发挥全面的免疫效果。因此,除了选择合适的抗原以产生高效的中和抗体,疫苗的设计还需考虑其诱导机体产生黏膜免疫的能力。从本文总结的口服、吸入及舌下疫苗的研究进展可看出,在研疫苗产品可在小鼠、恒河猴等多种动物模型中诱导产生中和抗体、T 细胞免疫、黏膜免疫等较为广泛、全面的免疫反应,具有进一步开发的潜力。

疫苗的接种显著降低了 COVID-19 的发病率与死亡率,但新冠病毒的不断变异(如德尔塔、奥密克戎等)与迅速传播引起了人们对于已上市单抗原疫苗有效性降低的关注。S 蛋白已被证实是 COVID-19 疫苗或药物的有效靶点,目前很多已上市疫苗(如 mRNA-1273、BNT162b2 等)都只提供 S 蛋白抗原,但 S 蛋白中和表位与非中和表位之间的竞争会降低宿主的免疫反应^[72],且 S 蛋白的 RBD 序列出现了多种突变^[73,74],这些因素都会降低单抗原疫苗的保护效力。为了提供更广泛的免疫反应,hAd5 S+N、VXA-CoV2-1、PRAK-03202 和 MigVax-101 等多款经口服途径的候选疫苗在设计上增加了其他结构蛋白,如 N 蛋白、E 蛋白、M 蛋白等,以减少免疫逃逸,对当前和未来变异病毒都具有潜在的预防效果。最新研究显示,N 蛋白的添加可能诱导机体产生强烈的 T 细胞反应^[75,76],而 E 蛋白和 M 蛋白亦具有作为 SARS-CoV-2 疫苗靶点的重要潜力^[77,78],多抗原设计疫苗的临床前及部分临床试验数据也证实了这些研究结果,显示了其对变异株的保护潜力。

目前开展经口服途径 COVID-19 疫苗研发的企业或研究机构主要集中于美国(表 1)。在 COVID-19 疫情之前,已有多家公司搭建了经黏膜途径给药的疫苗或药物开发平台,如 Vaxart 公司的口服疫苗平台 VAASTTM、iosBio 公司口服疫苗技术 OraProTM、Oravax Medical 公司的口服蛋白质给药技术 PODTM 以及 PhageNova Bio 公司的气溶胶疫苗技术。这些技术集中于抗原的设计、佐剂技术以及递送载体优化等,多用于传染病和肿瘤的疫苗或药物开发,经口服途径 COVID-19 疫苗的开发亦是基于上述技术平台,运用基因工程手段进行改造后用于 COVID-19 疫苗研发,平台技术的通用性、可扩展性较好,适用于应急状态下疫苗的快速开发。希望通过优化的技术平台,早日研发出起效快、保护时间长且更具广谱性的经口服途径 COVID-19 疫苗。

经口服途径 COVID-19 疫苗产品的技术类型较为丰富,不仅包括病毒载体疫苗、蛋白亚单位疫苗、核酸疫苗等主流疫苗技术,还包括目前应用较少的与训练免疫相关的疫苗和噬菌体疫苗。基于训练免疫的疗法缺少抗原依赖性,不仅可用于 SARS-CoV-2 的防护,亦可作为未来新型传染病疫情中的早期干预手段。噬菌体疫苗作为新型病毒载体疫苗,兼具重组蛋白疫苗和 DNA 疫苗的优点^[79]:较其他病毒载体更安全方便;较一般重组蛋白疫苗易于制备纯化;较 DNA 疫苗更加安全可靠。目前两款基于噬菌体的疫苗都处于临床前阶段,其研究数据是基于动物实验,还需更多研究验证其可行性。

随着新冠病毒变异株的不断出现,每天感染、住院和死亡的人数不断增加^[80],而治疗的选择仍然有限,接种疫苗仍是应对 COVID-19 疫情有效的防护措施。截至 2022 年 1 月 14 日,全球已有超过 30 种疫苗获准紧急使用或上市^[81],各国都在积极推进 COVID-19 疫苗的接种。加大疫苗的供给、加快疫苗的分配和接种对建立群体免疫屏障、控制 COVID-19 疫情的流行极其重要。

经口服途径疫苗最明显的优势是无需冷链保存和运输。口服疫苗可制成片剂^[82,83],吸入式疫苗可制成吸入干粉或液体制剂^[84],室温条件下的热稳定性好,在储存、配送和使用过程中不需冷链,再加上其易于实现接种者的自我管理,大大增强了免疫过程中的安全性与便捷性,快速提升疫苗的接种效率,实现在大规模人群中的快速免疫。这正是目前已上市注射型 COVID-19 疫苗所欠缺的。此外,吸入疫苗可用较少的抗原量引发与注射疫苗同等的免疫效果,降低每剂的成本,具备更好的经济性和安全性,康希诺生物 Ad5-nCoV 疫苗的临床试验数据也证实了此观点。经口(肺)吸入给药通常需借助特殊给药装置,在制剂、吸入器械和临床研究等方面均面临比其他疫苗更多的挑战^[85,86]。

作者贡献: 刁天喜负责文章的选题与审阅; 葛华负责文献调研与文章撰写; 蒋丽勇和刘术参与文章架构讨论, 并对本文提出重要修改意见。

利益冲突: 本文作者和研究内容不涉及任何利益冲突。

References

- [1] Froberg J, Diavatopoulos DA. Mucosal immunity to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2021, 34: 181-186.
- [2] Huang N, Pérez P, Kato T, et al. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva [J]. *Nat Med*, 2021, 27: 892-903.
- [3] Azzolini C, Donati S, Premi E, et al. SARS-CoV-2 on ocular surfaces in a cohort of patients with COVID-19 from the lombardy region, Italy [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2021, 139: 956-963.
- [4] Chavda VP, Vora LK, Pandya AK, et al. Intranasal vaccines for SARS-CoV-2: from challenges to potential in COVID-19 management [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26: 2619-2636.
- [5] Feng JX. Characterization of the Immuno-protection of Plague Vaccine and Q Fever Vaccine *via* Aerosolized Intratracheal Inoculation (鼠疫疫苗和 Q 热疫苗液体气溶胶肺递送免疫保护特性研究) [D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2020.
- [6] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines [J]. *Nat Med*, 2005, 11: S45-S53.
- [7] Liu LS, Liu W, Li Y, et al. The role of secretory immunoglobulin A in mucosal immune [J]. *Med Recapit (医学综述)*, 2015, 21: 1927-1929.
- [8] Yuki Y, Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity [J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13: 293-310.
- [9] Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12: 592-605.
- [10] Li M, Wang Y, Sun Y, et al. Mucosal vaccines: strategies and challenges [J]. *Immunol Lett*, 2020, 217: 116-125.
- [11] Tang W, Zhang Y, Zhu G. Pulmonary delivery of mucosal nano-vaccines [J]. *Nanoscale*, 2022, 14: 263-276.
- [12] Pavot V, Rochereau N, Genin C, et al. New insights in mucosal vaccine development [J]. *Vaccine*, 2012, 30: 142-154.
- [13] World Health Organization. COVID-19 vaccine tracker and landscape [EB/OL]. Geneva: WHO Press, 2021-12-7 [2021-12-9]. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
- [14] Kim L, Liebowitz D, Lin K, et al. Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial [J]. *JCI Insight*, 2018, 3: e121077.
- [15] Liebowitz D, Gottlieb K, Kolhatkar NS, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of an oral influenza vaccine: a placebo-controlled and active-controlled phase 2 human challenge study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20: 435-444.
- [16] Kim L, Martinez CJ, Hodgson KA, et al. Systemic and mucosal immune responses following oral adenoviral delivery of influenza vaccine to the human intestine by radio controlled capsule [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37295.
- [17] Liebowitz D, Lindbloom JD, Brandl JR, et al. High titre neutralizing antibodies to influenza after oral tablet immunisation: a phase 1, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15: 1041-1048.
- [18] Gordon DE, Hiatt J, Bouhaddou M, et al. Comparative host-coronavirus protein interaction networks reveal pan-viral disease mechanisms [J]. *Science*, 2020, 370: eabe9403.
- [19] Zeng W, Liu G, Ma H, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527: 618-623.
- [20] Kang S, Yang M, He S, et al. A SARS-CoV-2 antibody curbs viral nucleocapsid protein-induced complement hyperactivation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 2697.
- [21] Johnson S, Martinez CI, Tedjakusuma SN, et al. Oral vaccination protects against SARS-CoV-2 in a Syrian hamster challenge model [J]. *J Infect Dis*, 2022, 225: 34-41.
- [22] Langel SN, Johnson S, Martinez, et al. Oral and intranasal Ad5 SARS-CoV-2 vaccines decrease disease and viral transmission in a golden hamster model [J]. *bioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.10.03.462919.
- [23] Symvivo. bacTRL™ Technology [EB/OL]. Burnaby: Symvivo Press, 2021-12-7 [2021-12-14]. <https://www.symvivo.com/>.
- [24] Eldor R, Neutel J, Homer K, et al. Efficacy and safety of 28-day treatment with oral insulin (ORMD-0801) in patients with type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled trial [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2021, 23: 2529-2538.
- [25] Biotech Premas. Overcoming expression challenges for 'difficult-to-express' proteins (DTE-Ps) [EB/OL]. Gurugram: Premas Biotech Press [2021-12-17]. <https://www.premasbiotech.com/technologies/d-crypt>.
- [26] Mazumder S, Rastogi R, Undale A, et al. PRAK-03202: a triple antigen virus-like particle vaccine candidate against SARS CoV-2 [J]. *Heliyon*, 2021, 7: e08124.
- [27] Adaptive Phage Therapeutics. Phage-based vaccines [EB/OL]. Gaithersburg: Adaptive Phage Therapeutics Press [2021-12-17]. <https://www.aphage.com/science/vaccines/>.
- [28] González-Mora A, Hernández-Pérez J, Iqbal HMN, et al. Bacteriophage-based vaccines: a potent approach for antigen delivery [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8: 504.
- [29] MigVax. Advantages of the MigVax vaccine [EB/OL]. Hazafon: MigVax Press [2021-12-22]. <https://www.migvax.com/>.
- [30] Pitcovski J, Gruzdev N, Abzach A, et al. Oral subunit SARS-CoV-2 vaccine induces systemic neutralizing IgG, IgA and cellular immune responses and can boost neutralizing antibody responses primed by an injected vaccine [J]. *bioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.06.09.447656.
- [31] CEPI. CEPI announces first funding awards in quest to develop 'variant-proof' COVID-19 vaccines [EB/OL]. Oslo: CEPI Press, 2021-11-4 [2021-12-21]. https://cepi.net/news_cepi/cepi-announces-

- first-funding-awards-in-quest-to-develop-variant-proof-covid-19-vaccines/.
- [32] Sánchez-Ramón S, Conejero L, Netea MG, et al. Trained immunity-based vaccines: a new paradigm for the development of broad-spectrum anti-infectious formulations [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2936.
- [33] Zhang X, Wu XL, Deng GC. Training immunity: a newly discovered immune model [J]. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2019, 35: 367-372.
- [34] SJCFM Moorlag, van Deuren RC, van Werkhoven CH, et al. Safety and COVID-19 symptoms in individuals recently vaccinated with BCG: a retrospective cohort study [J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1: 100073.
- [35] García González LA, Arrutia Díez F. Mucosal bacterial immunotherapy with MV130 highly reduces the need of tonsillectomy in adults with recurrent tonsillitis [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15: 2150-2153.
- [36] Ochoa-Grullón J, Benavente Cuesta C, González Fernández A, et al. Trained immunity-based vaccine in B cell hematological malignancies with recurrent infections: a new therapeutic approach [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 611566.
- [37] Nieto A, Mazón A, Nieto M, et al. Bacterial mucosal immunotherapy with MV130 prevents recurrent wheezing in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 204: 462-472.
- [38] Del Fresno C, García-Arriaza J, Martínez-Cano S, et al. The bacterial mucosal immunotherapy MV130 protects against SARS-CoV-2 infection and improves COVID-19 vaccines immunogenicity [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 748103.
- [39] Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques [J]. *Nature*, 2020, 586: 583-588.
- [40] van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques [J]. *Nature*, 2020, 586: 578-582.
- [41] Balint JP, Gabitzsch ES, Rice A, et al. Extended evaluation of a phase 1/2 trial on dosing, safety, immunogenicity, and overall survival after immunizations with an advanced-generation Ad5 [E1-, E2b-]-CEA(6D) vaccine in late-stage colorectal cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64: 977-987.
- [42] Morse MA, Chaudhry A, Gabitzsch ES, et al. Novel adenoviral vector induces T-cell responses despite anti-adenoviral neutralizing antibodies in colorectal cancer patients [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62: 1293-1301.
- [43] Gabitzsch ES, Xu Y, Yoshida LH, et al. Novel adenovirus type 5 vaccine platform induces cellular immunity against HIV-1 Gag, Pol, Nef despite the presence of Ad5 immunity [J]. *Vaccine*, 2009, 27: 6394-6398.
- [44] Gabitzsch ES, Xu Y, Balint JP, et al. Induction and comparison of SIV immunity in Ad5 naïve and Ad5 immune non-human primates using an Ad5 [E1-, E2b-] based vaccine [J]. *Vaccine*, 2011, 29: 8101-8107.
- [45] Maruyama J, Mateer EJ, Manning JT, et al. Adenoviral vector-based vaccine is fully protective against lethal Lassa fever challenge in Hartley guinea pigs [J]. *Vaccine*, 2019, 37: 6824-6831.
- [46] isoBio. OraPro-how it works [EB/OL]. Sussex: iosBio Press [2021-12-23]. <https://iosbio.com/>.
- [47] Rice A, Verma M, Shin A, et al. The dual-antigen Ad5 COVID-19 vaccine delivered as an intranasal plus subcutaneous prime elicits Th1 dominant T-cell and humoral responses in CD-1 mice [J]. *bioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2021.03.22.436476.
- [48] Rice A, Verma M, Shin A, et al. A next generation bivalent human Ad5 COVID-19 vaccine delivering both spike and nucleocapsid antigens elicits Th1 dominant CD4⁺, CD8⁺ T-cell and neutralizing antibody responses [J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.07.29.227595.
- [49] Gabitzsch E, Safrit JT, Verma M, et al. Complete protection of nasal and lung airways against SARS-CoV-2 challenge by antibody plus Th1 dominant N- and S-specific T-cell responses to subcutaneous prime and thermally-stable oral boost bivalent hAd5 vaccination in an NHP study [J]. *bioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2020.12.08.416297.
- [50] Rice A, Verma M, Shin A, et al. Intranasal plus subcutaneous prime vaccination with a dual antigen COVID-19 vaccine elicits T-cell and antibody responses in mice [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 14917.
- [51] Sieling P, King T, Wong R, et al. Prime hAd5 spike + nucleocapsid vaccination induces ten-fold increases in mean T-cell responses in phase 1 subjects that are sustained against spike variants [J]. *medRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2021.04.05.21254940.
- [52] Rubsamen RM, Herst CV, Lloyd PM, et al. Eliciting cytotoxic T-lymphocyte responses from synthetic vectors containing one or two epitopes in a C57BL/6 mouse model using peptide-containing biodegradable microspheres and adjuvants [J]. *Vaccine*, 2014, 32: 4111-4116.
- [53] Herst CV, Burkholz S, Sidney J, et al. An effective CTL peptide vaccine for Ebola Zaire based on survivors' CD8⁺ targeting of a particular nucleocapsid protein epitope with potential implications for COVID-19 vaccine design [J]. *Vaccine*, 2020, 38: 4464-4475.
- [54] Harris PE, Brasel T, Massey C, et al. A synthetic peptide CTL vaccine targeting nucleocapsid confers protection from SARS-CoV-2 challenge in rhesus macaques [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9: 520.
- [55] ISR. ISR Vaccine AB has now completed the *in vivo* part of the toxicology study for the SARS-CoV-2 vaccine [EB/OL]. Solna: ISR Press, 2021-11-22 [2022-1-14]. <https://mb.cision.com/Main/15466/3458358/1499844.pdf>.
- [56] Aerogen. Aerogen and CanSinoBIO agree on landmark development and commercial supply partnership for world's first inhaled Covid-19 vaccine delivery [EB/OL]. Galway: Aerogen Press, 2021-12-9 [2022-1-14]. <https://www.aerogen.com/inhaled-covid-vaccine/>.
- [57] Zhu FC, Li YH, Guan XH, et al. Safety, tolerability, and immu-

- nogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial [J]. *Lancet*, 2020, 395: 1845-1854.
- [58] Zhu FC, Guan XH, Li YH, 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 [J]. *Lancet*, 2020, 396: 479-488.
- [59] Halperin SA, 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 [J]. *Lancet*, 2022, 399: 237-248.
- [60] Wu S, Huang J, Zhang Z, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an aerosolised adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine (Ad5-nCoV) in adults: preliminary report of an open-label and randomised phase 1 clinical trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21: 1654-1664.
- [61] Li JX, Wu SP, Guo XL et al. Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an aerosolized Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine coronovac in adults: a randomised, open-label, parallel-control trial [J]. *SSRN*, 2022. DOI: 10.2139/ssrn.4000565.
- [62] Staquicini DI, Barbu EM, Zemans RL, et al. Targeted phage display-based pulmonary vaccination in mice and non-human primates [J]. *Med (N Y)*, 2021, 2: 321-342.
- [63] Pecetta S, Rappuoli R. Bacteriophages, a multi-tool to fight infectious disease [J]. *Med*, 2021, 2: 209-210.
- [64] Staquicini DI, Tang FHF, Markosian C, et al. Design and proof of concept for targeted phage-based COVID-19 vaccination strategies with a streamlined cold-free supply chain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2105739118.
- [65] Foged C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems [J]. *Ther Deliv*, 2011, 2: 1057-1077.
- [66] Du HY, Shen GX, Zhang LB, et al. Administration routes for the delivery of vaccines [J]. *Dermatol Bull (皮肤科学通报)*, 2020, 37: 346-354.
- [67] Wang Z, Li XL, Liu JG. Recent advances on the oral delivery mechanism of transgenic plant vaccines [J]. *J Zunyi Med Univ (遵义医科大学学报)*, 2021, 44: 132-136, 140.
- [68] Azzi L, Dalla Gasperina D, Veronesi G, et al. Mucosal immune response in BNT162b2 COVID-19 vaccine recipients [J]. *EBioMedicine*, 2021, 75: 103788.
- [69] Gallo O, Locatello LG, Mazzoni A, et al. The central role of the nasal microenvironment in the transmission, modulation, and clinical progression of SARS-CoV-2 infection [J]. *Mucosal Immunol*, 2021, 14: 305-316.
- [70] Yu HQ, Sun BQ, Fang ZF, et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients [J]. *Eur Respir J*, 2020, 56: 2001526.
- [71] Guerrieri M, Francavilla B, Fiorelli D, et al. Nasal and salivary mucosal humoral immune response elicited by mRNA BNT162b2 COVID-19 vaccine compared to SARS-CoV-2 natural infection [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9: 1499.
- [72] Du LY, Tai WB, Yang Y, et al. Introduction of neutralizing immunogenicity index to the rational design of MERS coronavirus subunit vaccines [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13473.
- [73] Zhang WJ, Davis BD, Chen SS, et al. Emergence of a novel SARS-CoV-2 variant in Southern California [J]. *JAMA*, 2021, 325: 1324-1326.
- [74] Tegally H, Wilkinson E, Lessells RJ, et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa [J]. *Nat Med*, 2021, 27: 440-446.
- [75] Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls [J]. *Nature*, 2020, 584: 457-462.
- [76] Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals [J]. *Cell*, 2020, 181: 1489-1501.e15.
- [77] Bhattacharya S, Banerjee A, Ray S. Development of new vaccine target against SARS-CoV2 using envelope (E) protein: an evolutionary, molecular modeling and docking based study [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 172: 74-81.
- [78] Lopandić Z, Protić-Rosić I, Todorović A, et al. IgM and IgG immunoreactivity of SARS-CoV-2 recombinant M protein [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 4951.
- [79] Zhu YC, Zeng YH. Application and progress of phage display technology in the vaccine research [J]. *Prog Microbiol Immunol (微生物学免疫学进展)*, 2014, 42: 51-55.
- [80] World Health Organization. WHO coronavirus (COVID-19) dashboard [EB/OL]. Geneva: WHO Press, 2022-1-14 [2022-1-15]. <https://covid19.who.int/>.
- [81] COVID-19 Vaccine Tracker. Vaccines candidates in clinical trials [EB/OL]. Montreal: COVID-19 Vaccine Tracker Press, 2022-1-14 [2022-1-15]. <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines>.
- [82] Committee on Infectious Diseases. Poliomyelitis prevention: recommendations for use of inactivated poliovirus vaccine and live oral poliovirus vaccine [J]. *Pediatrics*, 1997, 99: 300-305.
- [83] Qadri F, Wierzb TF, Ali M, et al. Efficacy of a single-dose, inactivated oral cholera vaccine in Bangladesh [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374: 1723-1732.
- [84] Wan N, Chen B, Li H, et al. Research progress in pulmonary inhalation drug delivery system [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2021, 30: 1386-1395.
- [85] Chen WY, Yang FF, Liao YH. The application of prodrug technology in inhaled medicines [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 2597-2611.
- [86] Geng Y, Yang Q, Zhang J, et al. Statistical evaluation methods of *in vitro* studies for bioequivalence for orally inhaled and nasal drug products [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 2630-2641.