

用于新型冠状病毒肺炎防治的生物制品研究策略*

晏彩霞¹, 李佳¹, 沈鑫¹, 罗丽², 李燕^{1△}, 李明远³

1. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041);
2. 成都生物制品研究所(成都 610023); 3. 四川大学华西基础医学与法医学院 病原生物学系(成都 610041)

【摘要】 新型冠状病毒, 又称严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2), 它引起的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)目前已成为全球关注的突发公共卫生事件。SARS-CoV-2感染人数众多, 传播性极强, 病死率较高, 亟需寻求安全高效的特异制剂用于病毒感染的防治。目前在烈性传染病防治中广泛应用的生物制品, 在阻断SARS-CoV-2感染上同样极具潜力。本文根据严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)和中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)已有的防治策略及研发进展, 对干扰素、恢复期血浆、肠道微生态调节剂、疫苗、抗体等生物制品的应用经验和研发命运进行综述, 为早日攻克COVID-19提供依据。

【关键词】 新型冠状病毒 新型冠状病毒肺炎 严重急性呼吸综合征 中东呼吸综合征 生物制品

Biological Product Development Strategies for Prevention and Treatment of Coronavirus Disease 2019 YAN Cai-xia¹, LI Jia¹, SHEN Xin¹, LUO Li², LI Yan^{1△}, LI Ming-yuan³. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Institute of Biological Products, Chengdu 610023, China; 3. Department of Medical Microbiology, West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: feifeiliyan@163.com

【Abstract】 Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the novel coronavirus, also known as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-Cov-2), has become a Public Health Emergency of International Concern. Due to the large infection population, broad transmissibility and high mortality, it is urgent to find out the efficient and specific methods to prevent and treat COVID-19. As biological products have broadly applied in the prevention and treatment of severe epidemic diseases, they are promising in blocking novel coronavirus infection. According to the research advances of severe acute respiratory syndrome (SARS) and Middle East respiratory syndrome (MERS), we reviewed the potential application of biological products such as interferon, convalescent plasma, intestinal micro-ecological regulators, vaccines and therapeutic antibodies, etc., on prevention and treatment of COVID-19. May this review be helpful for conquering COVID-19 in the near future.

【Key words】 SARS-CoV-2 COVID-19 SARS MERS Biological products

根据2015版中国药典的定义,生物制品是指以微生物、细胞、动物或人源化组织和体液为原材料,应用生物学技术制备,用于预防、治疗和诊断人类疾病的制剂,如疫苗、血液制品、生物技术药物、微生态制剂、免疫调节剂、诊断制品等。国家卫健委发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》中指出^[1],将 α -干扰素雾化纳入一般抗病毒疗法,康复者血浆用于重型、危重型患者治疗,肠道微生态调节剂可用于辅助治疗措施,儿童重症、危重型病例可酌情考虑使用静脉滴注丙种球蛋白。针对病毒有可能长期存在的预期,最有效的预防方法就是研制特异性的疫苗,而中和性抗体将是特效治疗制剂。目前全国正在争分夺秒的研发特效生物制剂,期望通过疫苗的

主动免疫和特异性抗体的被动免疫,有效防治新型冠状病毒肺炎,尽快消除疫情。有效和特异——这两种优点将生物制品置于防控领域重点研发和潜在应用的焦点。本文以2003年暴发的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)和2012年暴发的中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)疫情为鉴,选择可能对新型冠状病毒肺炎具有防治作用的生物制品进行全面综述。

新型冠状病毒又名严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2),由其引起的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 19, COVID-19)自2019年12月起在湖北省武汉市暴发,随即迅速席卷全国,目前已在全球多个国家和地区陆续发现确诊病例。SARS-CoV-2属于 β 属冠状病毒^[2],与严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory

* 四川大学新型冠状病毒应急项目(No.0082604151014)资助

△ 通信作者, E-mail: feifeiliyan@163.com

syndrome coronavirus, SARS-CoV)同属 β 属谱系,在全基因组序列上有79%左右的相似性,受体结合域(receptor binding domain, RBD)同源性达到73%,是SARS-CoV的姊妹病毒,但两者编码的附属蛋白有差异,如SARS-CoV-2缺乏8a蛋白,编码的8b蛋白(121个氨基酸)的长度要长于SARS-Cov(84个氨基酸),3b蛋白也存在差异,总体上差异380个氨基酸位点^[3]。而且SARS-CoV-2编码的刺突蛋白(spike protein, S)与血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的平衡解离常数为14.7 nmol/L,提示其亲和力(与平衡解离常数呈反比)比SARS-CoV(325.8 nmol/L)高22倍左右。S蛋白及其辅助蛋白组成和功能的差异,部分解释了两病毒在传染强度、肺炎病症、致死率等方面明显不同的原因。中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)属于 β 属群,与SARS-Cov-2的全基因组序列相似性为50%左右,S蛋白及RBD区与SARS-CoV-2差异很大。目前认为3种冠状病毒的自然宿主均为蝙蝠,其中SARS-CoV的中间宿主为果子狸,MERS-CoV的中间宿主是骆驼,而SARS-CoV-2的潜在中间宿主为穿山甲。

1 广谱抗病毒生物制品

1.1 干扰素

动物细胞受到某些病毒感染后会分泌具有抗病毒功能的宿主特异性蛋白质(主要为糖蛋白),称为干扰素(interferon, IFN)。IFN是广谱的抗病毒生物制剂,传统方法通过血源提取制备,现广泛应用基因工程技术进行生产。目前人体产生的已知IFN共有13种,分为IFN- α 、 β 、 γ 、 λ 等,其中IFN- α 由固有免疫细胞分泌,在病毒感染的早期即可控制病毒的生长和繁殖。在抗击SARS和MERS时期,IFN与其他药物的联合得到广泛应用。INF- α 联合利巴韦林已成功应用于SARS的初级预防和治疗,治疗MERS-CoV感染的动物模型同样有效^[4],但AL-TAWFIQ等^[5]进一步发现二者联用对MERS-CoV感染患者并没有达到理想的治疗效果,其推测可能与给药时间不同有关。根据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》推荐,可尝试将INF- α 雾化吸入,或与洛匹那韦/利托那韦联合应用于COVID-19的一般抗病毒治疗。也有人尝试进行INF- α 皮下注射给药。例如,陈岷等^[6]通过对SARS和MERS临床治疗相关的文献检索筛选,纳入3篇指南、8篇临床研究进行回顾性分析,评价皮下注射INF- α 在COVID-19治疗中的可能性,他们认为:①皮下注射IFN- α 应尽可能在确诊冠状病毒感染后48 h使用,因为随着用药时间与确诊时间的延长,有效率会降低。②各类型IFN的治疗效果

差异无统计学意义。③皮下注射IFN- α 与利巴韦林口服联合使用在个别研究中证实有效,但仍需要警惕其不良反应。

目前有报道,细胞因子如IFN- β 和IFN- γ 也可以刺激ACE2的表达,进一步促进(而不是对抗)病毒的感染和播散^[7]。针对这一报道,我们认为,首先,IFN的抗病毒作用肯定且经历了长时间的考验;其次,该研究通过体外细胞实验观察到了IFN刺激ACE2表达这一现象,但需要进一步证实,而且该研究也没有报道IFN- α 是否具有此作用。我们推测,IFN抗病毒作用在前,促受体表达在后。例如一篇研究^[8]报道了SARS-CoV感染小鼠引起炎症介质在肺中双相表达,与两波炎症细胞募集有关。感染第2—3天,被感染的肺泡细胞等分泌大量的因子IFN- α 等,pDC等固有免疫系统的激活似乎在控制SARS-CoV复制中起重要作用。但是在感染第7天,细胞因子IFN- γ 等增高,强烈的病毒特异性T细胞反应(尤其是CD4⁺T细胞)与之有关。因此在感染的晚期,白细胞介导的抗病毒反应可能有助于清除SARS-CoV,但也可能导致炎症风暴发生^[8]。这就提示IFN的种类和应用时期很重要。在冠状病毒感染早期,应用IFN- α 主要是诱导细胞进入抗病毒状态,对预防和紧急治疗感染更有价值。而IFN- γ 主要用于免疫调节而不是抗病毒作用。再者,通过揭示COVID-19患者“炎症风暴”发现与SARS和MERS不同,IFN- γ 这个指标在COVID-19轻、重症组并无显著差异^[9]。而IFN- β 在细胞中表达量少,且中国药典目前并未收录这一制剂。

基因工程重组人IFN- ω 最初是对IFN- α 不敏感的乙型和丙型肝炎的治疗用药,但经过重新实验和评价,认为它能够在一定程度上抑制SARS-CoV,因此在SARS期间制成鼻喷剂供部分医务人员预防使用,起到了有效阻断病毒感染的作用^[10]。

1.2 静脉注射人免疫球蛋白

静脉注射人免疫球蛋白简称静丙,生产原料主要来源于数千名健康捐献者所捐献的血浆,具有广泛的细菌和病毒抗体谱。大剂量的静丙应用可在短期将患者体内免疫球蛋白G(IgG)水平提高2~3倍,是临床广泛采用的一种广谱抗病毒方法,也是一种被动免疫疗法。SARS时期香港医院对12例重症患者使用了静丙治疗,6 d后患者影像学评分和需氧量均提高,10例患者经治疗后康复,且没有不良事件的报告^[11]。新加坡的一家医院采用甲泼尼龙(200 mg)和静丙(0.4 g/kg)联合用于16例重症SARS患者治疗,连用3 d后,与未用药组相比其调整死亡危险比为0.41(95% CI 0.14~1.23, P=0.11),而且病情有更早恢复的迹象^[12],但仍需要通过循证医学的金标准——设计大

样本的随机、双盲、对照并执行严格的研究参数标准来进行临床试验。静丙对MERS和COVID-19的治疗作用尚无文献报道。

2 恢复期患者血浆

对于传染病治疗,有一种非常传统而古老的方法,就是采用恢复期患者血浆进行输血疗法,是一种被动免疫治疗。基本原理是患者感染病原体后,通过自身免疫系统产生针对病原体的抗体,获取这些血浆抗体用于新患者,杀灭其体内病原体。这一治疗方法已在SARS-CoV和MERS-CoV感染患者中得到了应用。2005年, YEH等^[13]对3名感染了SARS-CoV的医务人员在发现病情后的第10或11 d采用了恢复期血浆疗法,在输注恢复期血浆24 h后,血液检测发现患者体内病毒低于检测限,且体温下降、肺部病变改善。MAIR-JENKINS等^[14]运用Meta分析,发现恢复期血浆疗法可降低SARS绝对病死率7%~23%,且在发病后14 d内接受治疗效果越好,没有不良反应事件或并发症相关的报告。KO等^[15]对3例MERS患者进行治疗,有2例表现出中和活性,建议在8~14 d内使用抗体滴度 $\geq 1:80$ 恢复期血浆治疗为好,这也为COVID-19恢复期血浆疗法提供了一个参考。但是这些研究因为缺乏对照组,被认为不能从患者共患其他疾病、疾病阶段或其他治疗的影响中辨别恢复期血浆的疗效。

恢复期患者特异性血浆抗体一般可以存留6个月、一年或更长时间,并可能对同类病毒具有交叉保护性。MARKUS等^[16]就发现,来自恢复期SARS患者的血清可交叉中和SARS-CoV-2,从而防止病毒对宿主细胞的侵入。针对COVID-19重症患者采用恢复期血浆进行治疗或许是一种行之有效的方法。目前已开展了康复患者免疫血浆制品和免疫球蛋白的制备,经过严格的血液生物安全性检测、病毒灭活、抗病毒活性检测等,已成功制备出用于临床治疗的免疫血浆。COVID-19康复者恢复期血浆临床治疗方案(试行第二版)建议检测新型冠状病毒血清IgG抗体定性呈反应性,定量抗体滴度不低于160, IgM抗体呈非反应性。适应症为病程不超过3周,且病情进展较快、重症、危重症COVID-19患者^[17]。有报道称^[18],截止2月底,全国已采集了544人次的血浆用于245例患者的临床治疗。对其中157例患者超过48 h的监测发现,91例患者的临床指标和症状都有一些改变,但其安全性仍是值得考量和权衡的问题。相关专家建议,有必要将恢复期血浆和某一种或几种细胞因子的拮抗剂形成协同治疗组合,比如抑制细胞因子风暴的妥珠单抗,已纳入试行第七版诊疗方案中。

3 肠道微生态调节剂

人体肠道微生物组是一个高度动态、深受环境影响并与人体生理状态互动的微生态系统。SARS-CoV-2通过细胞受体ACE2进入宿主细胞。ACE2不仅在肺部组织表达,而且在消化系统中表达,单细胞测序显示在回肠和结肠细胞表达最高,而胃部细胞的表达整体偏低^[19]。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》也明确指出,确诊患者粪便可检测出新型冠状病毒核酸。从目前收治的患者情况看,死亡病例多见于患有基础病的中老年患者。随着年龄的增加,老年人群肠道微生态稳定性和多样性下降,致病菌比例上升,益生菌比例下降,导致肠道代谢吸收功能减弱、黏膜修复屏障功能受损、免疫系统功能下降,全身性感染的风险增高。因此,对于病毒引起继发细菌感染或抗生素应用导致肠道菌群失调等情况,可尝试使用肠道微生态调节剂,维持肠道微生态平衡。QIN等^[20]通过宏基因组分析发现,抗病毒物质、益生菌及抗生素治疗可以提高H7N9患者肠道有益菌的微生物多样性及丰度。目前已有相关机构对益生菌制剂调控COVID-19肠道功能及菌群结构进行临床研究。常见的微生态制剂包括乳酸杆菌、双歧杆菌及益生菌合剂。值得注意的是在中国专家共识中,若需同时应用抗菌药物,应加大益生菌剂量或错开服药时间,或选用对抗菌药物不敏感的布拉氏酵母菌、酪酸菌和芽胞杆菌制剂^[21]。近年来呼声高涨的来自健康人群的粪菌移植可能对患者也有治疗潜力。

4 预防性疫苗

目前控制疾病流行最有效的方式是采用疫苗接种易感人群,因此研制一种安全有效的疫苗至关重要。随着新型冠状病毒基因组全序列提交至GenBank数据库,以及病毒分离株原始种子的筛选,多种疫苗如灭活疫苗、亚单位疫苗、病毒载体疫苗、核酸疫苗等均在紧急研发中。

4.1 灭活疫苗

病毒分离株经适应性培养,经过鉴定生物学特性、免疫原性和遗传稳定性后再通过灭活工艺(如使用甲醛、紫外线和 β -丙内酯)制成的全病毒疫苗^[22-23]。国内曾制备出甲醛灭活的SARS疫苗,免疫恒河猴后可诱导产生中和抗体, I期人体临床试验显示初步效果,36名受试者中有24名产生了抗体,但由于疫情结束未能开展 II期临床试验而搁浅^[24]。目前国内多家研究单位成功分离了病毒,并进行了种子毒株的筛选,正在进行动物免疫实验。灭

活疫苗的优势在于制备简单,疫苗表面含有多种抗原蛋白能够被免疫系统识别,能够产生和病毒感染相似的抗原性。但由于需要大量扩增病毒,制备过程有感染的风险,病毒的其他蛋白也可能引起其他有害的免疫和炎症反应。

4.2 亚单位病毒疫苗

采用重组基因技术制备亚单位疫苗,具有安全性更高、稳定性更好,可快速实现规模化生产等优势。冠状病毒S蛋白含有大量的抗原决定簇,在诱导中和抗体和T细胞免疫反应中起关键作用,因此S蛋白是SARS疫苗最有潜力的靶目标。S蛋白由两个亚基组成,S1亚基含有RBD,是主要的抗原表位,S2亚基可介导病毒与宿主细胞的融合^[25]。基于SARS-CoV S蛋白的疫苗已有多家报道^[26],发现全长S蛋白三聚体对小鼠或仓鼠进行疫苗接种可保护这些动物免受SARS-CoV的感染,S蛋白可诱导小鼠和非洲绿猴血清中中和抗体的产生。更进一步,ZHOU等^[27]采用S1亚基的485-625和S2亚基1029-1192的表位多肽作为疫苗,可以诱导中和反应,使抗体水平增加。对MERS-CoV而言,大部分疫苗策略多聚焦在S蛋白S1亚基和RBD上,通过RBD重组蛋白多肽或者与人抗体FC片段结合成融合蛋白来制备抗原^[28]。不过,由于SARS-CoV-2和SARS-CoV是姊妹病毒,结构相似性高但也存在编码蛋白的差异,因此基于两种病毒的S蛋白重组载体和生物信息学筛选的通用S抗原表位,研发可同时中和两种病毒的通用疫苗更有价值。

SARS病毒表达的其他蛋白如膜蛋白(membrane protein, M)、包膜蛋白(envelope protein, E)也能表达在病毒的表面,在患者血清中可以检测到相应的保护性抗体。核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N)与RNA结合位于病毒核心,相对保守,多用于SARS-CoV-2的检测,但也可以作为候选疫苗^[25]。虽然抗N抗体在体外没有病毒中和活性,但N蛋白能在体内诱导CD8⁺T细胞反应,给免疫动物提供保护。因此,除了S蛋白,SARS-CoV-2其他结构蛋白E、M和N均有潜力作为候选疫苗。

4.3 重组病毒载体疫苗

重组病毒载体疫苗是将外源保护性抗原基因插入到病毒基因组内获得重组蛋白表达的一类载体疫苗。重组病毒载体疫苗具有插入外源基因长、接种途径多及易生产制备等优点,已在疫苗研制中广泛开展。常用的病毒载体包括腺病毒、痘苗病毒、副流感病毒等^[29]。如将SARS病毒S和N编码基因与腺病毒载体重组后免疫猕猴,能分别产生针对S蛋白的中和抗体和针对N蛋白的T细胞反应,同时诱导IFN- γ 分泌增加。用减毒的副流感病毒作

为载体编码SARS-CoV S蛋白免疫非洲绿猴同样能诱导特异性中和抗体产生。将S基因导入减毒痘苗病毒载体,免疫小鼠、兔和猴以后,均能诱导高水平中和抗体,将动物血清稀释 $10^3 \sim 10^4$ 仍能抑制50%的病毒。而将其中免疫老鼠的血清被动免疫幼鼠,同样可以保护幼鼠抵抗病毒攻击。预防MERS感染的病毒载体疫苗设计与SARS病毒类似^[28]。不同的是,MERS冠状病毒S蛋白通过结合病毒天然受体(DPP4)感染宿主细胞,但普通的小鼠无该受体,因此需要在携带有人源DPP4基因的转基因小鼠验证其抗原性和免疫原性。借鉴于SARS和MERS疫苗研发经验,已有多团队正在开展SARS-Cov-2重组病毒载体疫苗研制。

4.4 核酸疫苗

核酸疫苗(DNA/mRNA)也称基因疫苗,是指将含有编码蛋白的基因序列直接构建重组载体,经肌肉注射或微弹轰击等方法导入宿主体内,通过宿主细胞表达抗原蛋白,诱导机体对该抗原蛋白的免疫应答,以达到预防疾病的目的。这种蛋白直接在体内合成,可以大大节约疫苗制备时间。YANG等^[30]开发的基于SARS病毒S蛋白的DNA疫苗也在动物实验取得了良好的效果,发现接种疫苗的小鼠肺部病毒的复制减少了 10^6 数量级以上。另外一项SARS的S、N、M蛋白的DNA疫苗比较研究显示,上述疫苗都能产生不同类别的免疫反应,其中S蛋白诱导的体液免疫较强,而M蛋白引起的细胞免疫更强。因此,有必要进一步评估M抗原及其他辅助蛋白的潜在作用^[31]。GLS-5300是首个进入临床试验基于MERS-CoV S蛋白全长序列的候选DNA疫苗,在小鼠、骆驼和恒河猴中都能诱导较强的细胞免疫和特异性中和抗体反应,在一定程度上保护恒河猴免受MERS-CoV的攻击,未出现临床和影像学上肺炎的特征。I期临床试验显示GLS-5300具有可耐受的安全性和稳健的免疫原性^[32]。与DNA疫苗相比,mRNA疫苗是一种新型核酸疫苗,可以向患者体内直接递送mRNA,利用患者细胞内相应元件直接翻译出蛋白片段。部分mRNA疫苗本身具有的疫苗佐剂特性,通过产生多种细胞因子等不同方式刺激免疫系统,加大抗体合成能力,在新型疫苗制备上具有极大的应用价值^[33]。

核酸疫苗制备时间短,但尚未有完成临床试验的成品疫苗,也未见文献报道对SARS-CoV-2的研发尝试,仍值得深入探索;传统灭活或减毒疫苗,制备时间长,但技术相对成熟,目前上市的疫苗多为此类。重组蛋白抗原在体外制备,安全可控,可以快速实现应急疫苗的量产。上述不同制备方式的疫苗,目前均在紧急研发中。

5 治疗性抗体

目前,全球治疗性抗体的销售市场以年均32%的速度增长,在生物类药物中增长最快^[34]。治疗性抗体的显著优势是相对安全,同时具有功能强大和靶向性高的特点,是烈性病毒感染防控的特效药物,例如已经研制出的针对埃博拉的抗体药物ZMapp就取得了很好的效果^[35]。

5.1 特异性IgG抗体

针对病毒的中和抗体IgG一旦产生,不但量大而且持久,从而能有效地阻断病毒再次进入机体内。一项针对SARS愈后的34名医务工作者前瞻性研究显示,此后的12年每年检测他们的抗SARS-CoV IgG滴度仍保持在很高的水平,提示IgG的存在可能提供针对该病毒再感染和其他 β 冠状病毒(如SARS-CoV-2)感染的保护能力^[36]。除了多克隆抗体外,单克隆抗体(简称单抗)也是该领域最受瞩目的发展方向和研究热点,常规用杂交瘤技术,可产生高度均一、特异性高的抗体。目前针对冠状病毒的单克隆抗体主要分为鼠源性单克隆抗体和人源化单克隆抗体,近期部分科研团队采用记忆B细胞单克隆抗体制备技术,也为快速制备人源化抗体带来了希望。

5.1.1 鼠源性单克隆抗体 目前的研究常用SARS-CoV病毒RBD抗原表位免疫小鼠,提取脾脏细胞与骨髓瘤细胞在聚乙二醇作用下进行细胞融合,采用选择培养基对融合细胞进行筛选和亚克隆化培养,经纯化制备IgG单抗。HE等^[37]制备了小鼠单克隆抗体1A5和2C5,其中2C5能够阻止RBD与ACE2的结合。RBD有6组构象依赖性表位,称为Conf I~VI,其中Conf VI和Conf V单克隆抗体显著阻断了RBD融合蛋白与ACE2的结合^[38]。上述小鼠单克隆抗体作为异源性蛋白,更常用于疾病诊断。

5.1.2 人源化单克隆抗体 人源性抗体可以弥补异源性抗体的不足。人源化单克隆抗体可通过EBV转化B细胞克隆技术、噬菌体展示技术、转基因人源化小鼠技术等来实现。LANZAVECCHIA团队从一名SARS患者恢复期的血液中用EB病毒转化B细胞克隆技术筛选针对不同病毒结构蛋白的单克隆抗体,其中有35种在体外具有中和活性,命名S3.1的单克隆抗体注射小鼠,攻毒实验显示可抑制上呼吸道病毒复制、下呼吸道免受病毒感染^[39]。SUI等^[40]利用噬菌体展示技术,筛选出了靶向S蛋白名为80R的单克隆抗体,注射老鼠可减少 10^4 的病毒增殖。用同样的方法,筛选到m396和CR3014。利用现有的SARS病毒单抗,评估对SARS-CoV-2交叉反应性发现,某些单抗如CR3022可以与SARS-CoV-2 RBD有效结合,虽然抗原决定簇并不完全重叠。另外一些如m396、CR3014却

不能结合^[41]。MERS的单克隆抗体也有多种,分离自MERS康复患者的单抗MCA1, 0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度就能够完全中和Vero E6细胞中的MERS病毒^[42]。YING等^[43]通过酵母展示技术制备了MERS-4和MERS-27,细胞水平具有非常强的抑制病毒效果,其机制是抗体与RBD结合导致其中一段loop的构象发生变化,进而破坏受体识别关键区域,间接行使抗病毒功能。ZHANG等^[44]开发的超强活性抗体m336,与MERS冠状病毒的结合亲和力常数达到“皮摩尔”级别,已经在狨猴和兔子动物实验中显示有效。该抗体在与MERS病毒结合时,其结合面与DPP4的重叠面积高达90%以上,这一发现解释了m336抗体为什么具有超强杀伤力。

将人类编码抗体的基因转移至基因工程改造的抗体基因缺失的动物中,使动物表达人类抗体,达到抗体全人源化的目的是一项新技术,具有十分明显的优势,可针对不同抗原开发不同抗体,并且周期大大缩短。目前,国内已有研究单位开展人源化抗体转基因小鼠制备抗SARS-COV-2抗体的工作,有望成为疫情防控的应急抗体制剂^[45]。

5.1.3 单个B细胞抗体 恢复期患者产生特异性抗体的细胞是B细胞,利用最新技术,可以实现对其中少量有中和作用、特异性的记忆B细胞进行抗体基因克隆后,获得单克隆抗体,称为单个B细胞克隆抗体,保证了轻重链可变区的天然配对,相较于传统的抗体制备技术具有效率高、全人源、基因多样性更丰富等优势^[46]。借鉴寨卡病毒单个B细胞抗体的技术路线,首先通过流式细胞分选从恢复期患者外周血分离B淋巴细胞,以病毒抗原E蛋白为诱饵,用荧光标记抗原分选到特异结合E蛋白的单个B细胞,体外反转录PCR扩增抗体基因,扩增产物测序分析,再将扩增抗体基因片段与IgG1的恒定区片段融合以生成全长单克隆抗体,在真核表达细胞如HEK293中进行抗体的表达。纯化后用常规方法进一步测定抗体与抗原的特异性、亲和力以及中和活性等生物学特性^[47]。

单个B细胞抗体实际上就是基因工程抗体技术,可以选择与病毒中和性最好的抗体。相比血浆,抗体特异单一、保险、确定,将该技术也应用在H7N9和埃博拉抗体的制备中。近期有团队采用COVID-19康复期患者B细胞单细胞测序的方法,尝试体外抗体表达生产。

5.2 特异性IgY抗体

卵黄抗体(immunoglobulinyolk, IgY)又称卵黄免疫球蛋白,是指用特定的抗原免疫产蛋禽类后,从免疫禽蛋中获得的针对免疫抗原产生的特异性抗体。胡国柱等^[48]用灭活SARS-CoV免疫产蛋鸡,制备得到特异性IgY,可用

于SARS-CoV的预防及阻断其传播。KAMMILA等^[49]利用SARS病毒的N抗原免疫产蛋鸡,制备N特异性IgY,开发了一种快速检测病毒感染的方法。由于IgY具有安全高效、快速制备、成本低廉特点,针对目前SARS-CoV-2的流行特征,可以制备其IgY,生产口服制剂用于杀灭消化系统病毒,也可制备成抗体喷剂用于手、口腔、鼻腔等进行黏膜病毒阻断。

6 结语

通过对冠状病毒SARS和MERS感染有关的生物制品的研究和应用的回顾,对目前COVID-19疫情防控具有重要的借鉴意义。IFN、生态制剂、恢复期血浆在对症治疗中发挥重要作用,疫苗研发和治疗性抗体制备当然更被寄予厚望。期望通过应急攻关,在科学家和生物企业等多方合作下,制备出相应的主动免疫和被动免疫制剂,尽快打赢这场SARS-CoV-2病毒歼灭战。

参 考 文 献

- [1] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知. (2020-03-04)[2020-03-05]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [2] CHENG Z J, SHAN J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*, 2020[2020-02-18]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s15010-020-01401-y>. doi: 10.1007/s15010-020-01401-y.
- [3] WU A, PENG Y, HUANG B, *et al.* Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, pii: S1931-3128(20)30072-X[2020-02-29]. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001.
- [4] KHALID M, AL RABIAH F, KHAN B, *et al.* Ribavirin and interferon- α 2b as primary and preventive treatment for Middle East respiratory syndrome coronavirus: a preliminary report of two cases. *Antivir Ther (Lond)*, 2015, 20(1): 87-91.
- [5] AL-TAWFIHQ J A, MOMATTIN H, DIB J, *et al.* Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study. *Int J Infect Dis*, 2014, 20: 42-46.
- [6] 陈岷,童荣生,边原,等. 皮下注射 α -干扰素治疗2019年新型冠状病毒的循证快速评估. *医药导报*: 1-19[2020-02-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1293.R.20200210.1759.002.html>.
- [7] WANG P H, CHENG Y. Increasing host cellular receptor-angiotensin-converting enzyme 2(ACE2) expression by coronavirus may facilitate 2019-nCoV infection. *Biorxiv*, 2020. 02. 24. 963348[2020-02-29]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.24.963348v1>.
- [8] CHEN J, LAU Y F, LAMIRANDE E W, *et al.* Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4⁺ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *J Virol*, 2010, 84(3): 1289-1301.
- [9] WAN S X, YI Q J, FAN S B, *et al.* Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *MedRxiv*, 2020.02.10. 20021832[2020-02-29]. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.10.20021832v1>.
- [10] 周小平. 重组人干扰素 ω 喷鼻剂预防SARS感染的现场流行病学效果评价研究项目通过专家评审. *北京大学学报(医学版)*, 2003(5): 475.
- [11] HO J C, WU A Y, LAM B, *et al.* Pentaglobin in steroid-resistant severe acute respiratory syndrome. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8(10): 1173-1179.
- [12] LEW T W, KWEK T K, TAI D, *et al.* Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA*, 2003, 290(3): 374-380.
- [13] YE H K M, CHIUEH T S, SIU L K, *et al.* Experience of using convalescent plasma for severe acute respiratory syndrome among healthcare workers in a Taiwan hospital. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56(5): 919-922.
- [14] MAIR-JENKINS J, SAAVEDRA-CAMPOS M, BAILLIE J K, *et al.* The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis*, 2015, 211(1): 80-90.
- [15] KO J H, SEOK H, CHO S Y, *et al.* Challenges of convalescent plasma infusion therapy in Middle East respiratory coronavirus infection: a single centre experience. *Antivir Ther*, 2018, 23(7): 617-622.
- [16] MARKUS H, HANNAH K W, NADINE K, *et al.* The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *Biorxiv*, 2020.01.31.929042[2020-02-29]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.31.929042v1>.
- [17] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 新冠肺炎康复者恢复期血浆临床治疗方案(试行第一版). (2020-03-04)[2020-03-05]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7658/202003/61d608a7e8bf49fca418a6074c2bf5a2.shtml>.
- [18] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 2020年2月28日新闻发布会文字实录. (2020-02-28)[2020-03-05]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/s3574/202002/2a1d9d8569c549e7a5d5737751c74480.shtml>.
- [19] 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. *Biorxiv*, 2020.01.30.927806[2020-02-29]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.30.927806v1>. doi:10.1101/2020.01.30.927806.
- [20] QIN N, ZHENG B, YAO J, *et al.* Influence of H7N9 virus infection and associated treatment on human gut microbiota. *Sci Rep*, 2015, 5: 14771[2020-03-04]. <https://www.nature.com/articles/srep14771>.
- [21] 归崎峰,杨云梅,张发明. 肠道生态制剂老年人临床应用中国专家共识(2019). *中华危重症医学杂志(电子版)*, 2019, 12(2): 73-79.
- [22] PIOT P, LARSON H J, O'BRIEN K L, *et al.* Immunization: vital

- progress, unfinished agenda. *Nature*, 2019, 575(7781): 119–129.
- [23] WIT E, DOREMALEN N, FALZARANO D, *et al.* SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(8): 523–534.
- [24] LIN J T, ZHANG J S, SU N, *et al.* Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. *Antivir Ther*, 2007, 12(7): 1107–1113.
- [25] ROPER R L, REHM K E. SARS vaccines: where are we? *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(7): 887–898.
- [26] KAM Y W, KIEN F, ROBERTS A, *et al.* Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells *in vitro*. *Vaccine*, 2007, 25(4): 729–740.
- [27] ZHOU T, WANG H, LUO D, *et al.* An exposed domain in the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein induces neutralizing antibodies. *J Virol*, 2004, 78(13): 7217–7226.
- [28] MODJARRAD K. MERS-CoV vaccine candidates in development: the current landscape. *Vaccine*, 2016, 34(26): 2982–2987.
- [29] DU L, HE Y, ZHOU Y, *et al.* The spike protein of SARS-CoV—a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(3): 226–236.
- [30] YANG Z Y, KONG W P, HUANG Y, *et al.* A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*, 2004, 428(6982): 561–564.
- [31] WANG Z, YUAN Z, MATSUMOTO M, *et al.* Immune responses with DNA vaccines encoded different gene fragments of severe acute respiratory syndrome coronavirus in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(1): 130–135.
- [32] 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. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(9): 1013–1022.
- [33] MASCOLA J R, FAUCI A S. Novel vaccine technologies for the 21st century. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(2): 87–88.
- [34] 张银川, 潘勇兵, 张爱华. 单克隆抗体药物国内外研发进展. *国际生物制品学杂志*, 2016, 39(3): 105–111.
- [35] QIU X, WONG G, AUDET J, *et al.* Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 2014, 514(7520): 47–53.
- [36] GUO X, GUO Z, DUAN C, *et al.* Long-term persistence of IgG antibodies in SARS-CoV infected healthcare workers. MedRxiv, 2020, 2020.02.12.20021386[2020-02-29]. <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.20021386>.
- [37] HE Y, ZHU Q, LIU S, *et al.* Identification of a critical neutralization determinant of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus: importance for designing SARS vaccines. *Virology*, 2005, 334(1): 74–82.
- [38] HE Y, LU H, SIDDIQUI P, *et al.* Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J Immunol*, 2005, 174(8): 4908–4915.
- [39] TRAGGIAI E, BECKER S, SUBBARAO K, *et al.* An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*, 2004, 10(8): 871–875.
- [40] SUI J, LI W, ROBERTS A, *et al.* Evaluation of human monoclonal antibody 80R for immunoprophylaxis of severe acute respiratory syndrome by an animal study, epitope mapping, and analysis of spike variants. *J Virol*, 2005, 79(10): 5900–5906.
- [41] TIAN X, LI C, HUANG A, *et al.* Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 382–385.
- [42] CHEN Z, BAO L, CHEN C, *et al.* Human neutralizing monoclonal antibody inhibition of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in the common marmoset. *J Infect Dis*, 2017, 215(12): 1807–1815.
- [43] YING T, PRABAKARAN P, DU L, *et al.* Junctional and allele-specific residues are critical for MERS-CoV neutralization by an exceptionally potent germline-like antibody. *Nat Commun*, 2015, 6: 8223[2020-03-04].<https://www.nature.com/articles/ncomms9223>.
- [44] ZHANG S, ZHOU P, WANG P, *et al.* Structural definition of a unique neutralization epitope on the receptor-binding domain of MERS-CoV spike glycoprotein. *Cell Rep*, 2018, 24(2): 441–452.
- [45] 葛良鹏, 邹贤刚, 刘作华. 人源化抗体转基因动物的研究进展与趋势. *生物产业技术*, 2016(6): 52–56.
- [46] 迟象阳, 于长明, 陈薇. 单个B细胞抗体制备技术及应用. *生物工程学报*, 2012, 28(6): 651–660.
- [47] BORNHOLDT Z A, TURNER H L, MURIN C D, *et al.* Isolation of potent neutralizing antibodies from a survivor of the 2014 Ebola virus outbreak. *Science*, 2016, 351(6277): 1078.
- [48] 胡国柱, 聂荣庆, 张进, 等. 特异性鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)抗SARS-CoV作用的研究. *微生物学杂志*, 2004(5): 123–125.
- [49] KAMMILA S, DAS D, BHATNAGAR P K, *et al.* A rapid point of care immunoswab assay for SARS-CoV detection. *J Virol Methods*, 2008, 152(1/2): 77–84.

(2020-02-24收稿, 2020-03-05修回)

编辑 汤洁