

· 新型冠状病毒肺炎研究 ·

新型冠状病毒肺炎的抗体应对策略

张 茜¹,冯振卿^{1,2}

¹南京医科大学国家卫健委抗体技术重点实验室,²病理学系,江苏 南京 211166

[摘要] 迅速蔓延中国并扩散至全球的新型冠状病毒肺炎,已证明具有明显的人传人特点,严重危害人类健康。新型冠状病毒传播性极强,由于人体内没有针对新型冠状病毒的特异性抗体,该病毒对人类健康和世界公共卫生安全已构成重大威胁。目前还没有疫苗和抗病毒特效药物用于新型冠状病毒肺炎的防治,因此,基于抗体的检测和临床治疗措施就显得尤为重要。文章从新型冠状病毒肺炎的抗体检测诊断、中和抗体及亚单位疫苗研发等方面进行综述评价,旨在聚焦新型冠状病毒肺炎的抗体应对策略,为新型冠状病毒肺炎的疫情防控提供新思路。

[关键词] 新型冠状病毒肺炎;抗体检测;中和抗体;亚单位疫苗

[中图分类号] R563.14

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)02-155-05

doi:10.7655/NYDXBNS20200202

Antibody strategies against the novel coronavirus pneumonia

ZHANG Qian¹, FENG Zhenqing^{1,2}

¹Key Laboratory of Antibody Techniques, National Health Commission, ²Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] The novel coronavirus pneumonia, which spread rapidly across China and other countries, has been proved the obvious infectivity and harm to human health. Since there is no specific antibody against the novel coronavirus in the body, it is highly spread after human infection, which threat to human health and public health security in the world. At present, there is no available vaccine and specific antiviral drugs for the novel coronavirus pneumonitis, so the antibody development mediated prevention and clinical treatment is particularly important. This review evaluates the research on antibody detection, neutralization antibody and subunit vaccine to the novel coronavirus pneumonia, which aimed to focus on the antibody strategies against the novel coronavirus, providing new ideas for the prevention and control of the novel coronavirus pneumonia.

[Key words] novel coronavirus pneumonia; antibody detection; neutralizing antibody; subunit vaccine

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02): 155-159]

新型冠状病毒肺炎是由2019新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)引起的肺炎,其病原体从未在人类中发现,且具有人传人的特点,严重危害人类健康^[1]。由该新型冠状病毒引起的肺炎疫情是继严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS)之后,给全球公共卫生安全带来的一个新的巨大挑战。目前我国新型冠状病毒肺炎疫情防控已处于I级应急响应,疫情不容乐观。到目前为止,还没有针对新型冠状病毒的化学合成药物、抗体药物及疫苗上市,一些广谱抗病毒药物已用于新型冠状病毒肺炎的

临床治疗,但疗效并不确切。因此,根据新型冠状病毒的结构特点、抗原表位等,寻找治疗该病毒的靶向、高效、低毒的抗体药物和疫苗,是目前国内外医学领域的当务之急。本文根据当前针对新型冠状病毒的抗体检测、中和抗体及疫苗研发策略等进行综述,以期对突发重大疫情防控抗体药物和疫苗的研发提供可供借鉴的思路。

1 对新型冠状病毒的认识

2019年12月,我国湖北省武汉市暴发不明原因的肺炎疫情,以发热、乏力、干咳、严重者并发急性

呼吸窘迫综合征为主要临床特征,对人类健康和世界公共卫生安全构成重大威胁^[2]。由该新型冠状病毒引起的肺炎,迅速传播至全国31个省、自治区、直辖市和港澳台地区,并向亚洲、澳洲、欧洲、美洲传播。截止2020年2月18日24时,全国临床确诊新型冠状病毒肺炎病例74185例,死亡2009例。相较于2002—2003年的SARS感染率明显升高,但死亡率有所下降^[3-4]。

2020年1月,中国科研人员通过对肺炎患者样本进行基因测序分析,发现其为一种从未出现过的 β 冠状病毒属病毒,将其命名为2019-nCoV,该病毒被认为与SARS病毒(SARS coronavirus, SARS-CoV)和中东呼吸综合征病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)不同,是一种可以感染人的冠状病毒科新成员^[5]。近日,国际病毒分类委员会正式将2019-nCoV命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2),WHO将SARS-CoV-2引起的新型冠状病毒肺炎命名为2019-冠状病毒病(corona virus disease 2019, COVID-19)^[6]。这一命名表明从分类学上,新型冠状病毒与SARS病毒具有同科同属不同种的亲缘关系。

根据冠状病毒基因组结构与系统发生学分析,冠状病毒科分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4个属, α 、 β 属的冠状病毒可感染哺乳动物和人。SARS-CoV-2属于 β 属的新型冠状病毒,圆形或椭圆形,直径60~140 nm,电镜下呈皇冠样形状^[7]。蛋白序列分析发现,SARS-CoV-2与SARS-CoV的7个保守非结构蛋白氨基酸相似度为94.6%^[8]。经病毒序列比对分析,SARS-CoV-2与蝙蝠SARS样冠状病毒(bat-SL-CoVZC45)同源性达85%以上,推测SARS-CoV-2自然宿主可能是蝙蝠,但该冠状病毒感染的肺炎是由蝙蝠直接传播还是通过中间宿主传播,尚未被证实^[9]。最近华南农业大学提出穿山甲很可能是新型冠状病毒的潜在中间宿主,其研究结果有待进一步验证。目前多个实验室已成功在Vero-E6细胞中分离获得该病毒。

2 针对新型冠状病毒的抗体诊断技术

机体在受到病毒感染时,免疫细胞会分泌产生一类特异性免疫球蛋白,保护机体免受病毒感染,检测针对病毒产生的这类特异性抗体可用于监测机体的免疫状态。SARS-CoV-2核酸检测,主要采用实时荧光定量PCR检测SARS-CoV-2核酸基因,由

于不同部位病毒载量不同,取样部位不佳,实验室检测操作规程不一致,实际灵敏度差异,样本可能污染以及病毒RNA易降解等原因,其阳性率仅为30%~50%,假阴性率较高。因此,针对SARS-CoV-2的快速诊断和现场检测的产品开发尤为重要,其中采用胶体金技术和酶联免疫技术建立的抗体检测试剂及SARS-CoV-2抗原检测试剂已经研发并用于临床。

不同于病毒核酸检测技术,SARS-CoV-2抗体检测技术是通过检测感染者血液中SARS-CoV-2特异性IgM/IgG抗体,在30 min内完成对SARS-CoV-2感染的快速诊断^[10]。目前SARS-CoV-2抗体检测试剂盒已在深圳完成了新型冠状病毒肺炎患者血液样本的检测,结果显示IgM临床符合率>90%,IgG临床符合率>95%,明显高于核酸检测结果。相比于核酸检测使用样本多为上呼吸道样本(咽拭子为主),采集过程中医护人员感染风险较大,而SARS-CoV-2的IgM和IgG抗体检测试剂盒采用血清或血浆作为检测样本,为疑似患者排查和无症状感染者筛查提供了不依赖于设备、更快速的现场检测手段。由于血液样本采集便捷,且血液样本含病毒量低或不含病毒,大大降低了医护人员被感染的风险。另外抗体检测时间短,操作简单,检测灵敏度高,在保护医护人员安全的同时也极大提高了临床检测的效率。

3 关于新型冠状病毒中和抗体的研制

对于突发重大传染性疾病的防治,中和抗体治疗是有效预防和治疗的一个重要策略。抗体分子能够通过阻断病毒颗粒与其受体结合,激活巨噬细胞、NK细胞等免疫细胞和补体等多种机制来杀伤、清除病毒颗粒以及受感染细胞^[11]。抗体制剂不但可用于流行区的高危易感人群的紧急被动免疫,而且对于临床患者也具有较好的治疗作用。据2月13日最新报道,应用康复期新型冠状病毒肺炎患者血浆制备的特免血浆制品可有效治疗新型冠状病毒肺炎,患者在接受血浆治疗12~24 h后,患者炎症相关指标明显下降,淋巴细胞比例上升,血氧饱和度、病毒载量等重点指标全面提升,患者体征和症状明显好转。从临床免疫机制来看,大部分新型冠状病毒肺炎患者康复后,机体内会产生针对SARS-CoV-2的特异性抗体,能有效清除病毒。在目前缺乏疫苗和特效治疗药物的特殊情况下,采用特免血浆制品治疗SARS-CoV-2感染是最为有效的方法之一,能明显降低危重患者的病死率。但特免血浆制品面

临床来源受限、供受体血型不匹配和潜在的传染风险等限制^[12-13],因此研发可用于临床治疗的抗 SARS-CoV-2 中和抗体对于新型冠状病毒肺炎的治疗和疫情控制具有重要的临床应用价值。

目前治疗性抗体主要有鼠源抗体、人源化抗体、全人抗体和小分子抗体等4种形式。鼠源单克隆抗体具有较强的免疫原性,人体易产生人抗鼠抗体(human anti-mouse antibodies, HAMA)反应及超敏反应,且分子量大,难以穿膜、半衰期短等,其在疾病治疗领域应用受到限制。随着分子遗传学、分子免疫学技术和发酵工程技术及噬菌体抗体表面展示技术的进展,应用基因工程方法建立的噬菌体抗体库技术开始出现^[14]。目前制备人源化或全人抗体的方法包括:通过基因工程技术对鼠源抗体进行人源化改造;构建噬菌体抗体库,制备全人抗体;免疫转人抗体基因小鼠制备人源杂交瘤抗体等^[15]。其中噬菌体抗体库技术较为成熟,并于2018年获诺贝尔化学奖。全人抗体可消除鼠源单抗的免疫原性,避免HAMA反应和超敏反应^[16],在临床疾病治疗中得到广泛应用。

中和抗体具有识别病毒表面蛋白、阻断其与细胞表面特异性受体结合的功能,从而发挥抗病毒作用。SARS-CoV-2是具有包膜的正链RNA病毒,其表面棘突S蛋白(spike protein)是冠状病毒表面重要的受体结合位点,具有与细胞表面病毒特异性受体结合、介导病毒外膜与细胞融合、病毒吸附及穿膜等作用。研究表明,冠状病毒S蛋白受体结合域(receptor binding domain, RBD)在病毒与宿主细胞表面的血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)结合、进入宿主细胞过程中发挥重要作用^[17]。据研究报道,SARS-CoV-2与SARS-CoV相似,都是通过与ACE2结合进入人体细胞,二者S蛋白S1亚基RBD有高度相似性^[18]。因此,制备针对新型冠状病毒S蛋白的抗体,可与病毒表面S蛋白RBD结合,阻断S蛋白RBD与ACE2结合,从而阻断病毒入侵,这是中和抗体发挥抗病毒效应的重要保护方式。研究发现,SARS-CoV特异性单克隆抗体CR3022可与SARS-CoV-2RBD有效结合^[19]。此外,可通过采集新型冠状病毒肺炎康复者的外周血分离外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC),构建免疫型噬菌体抗体库,筛选针对SARS-CoV-2的S蛋白或RBD的特异性中和抗体,研发用于治疗新型冠状病毒肺炎的抗体药物。

但需要注意的是,在SARS-CoV抗S蛋白中和抗

体研究过程中,发现机体产生的中和或非中和抗体可能是诱发急性肺部炎症因子风暴的原因之一,实验数据显示,SARS死亡患者体内的抗S蛋白抗体滴度显著高于恢复期患者,提示冠状病毒对机体造成的巨噬细胞炎症反应很可能加剧了肺部炎症^[20]。因此,在针对SARS-CoV-2中和抗体研发与临床应用过程中,病毒感染引起的急性炎症因子风暴亦需足够重视。

4 新型冠状病毒中和表位对亚单位疫苗研发的应用价值

疫苗是预防传染性疾病的有效方法之一。疫苗种类包括灭活疫苗、减毒活疫苗和亚单位疫苗。由于当前SARS-CoV-2生物安全要求级别高,前两类传统疫苗毒力返强或灭活不完全的安全性问题不容忽视。因此,利用基因重组技术的亚单位疫苗是当前新型冠状病毒疫苗研发的重要方向。

SARS-CoV-2的S蛋白含有病毒抗原的中和表位,其氨基酸序列改变将对病毒的毒力强弱产生影响,也可使人群原有的特异性免疫力丧失。若找到针对多个不同亚型病毒株的抗原保守中和表位,将对后期可能发生流行及变异的新发冠状病毒的预防和临床治疗具有重要意义。SARS-CoV-2跨物种传播人在很大程度上是由于其具有与SARS-CoV类似的受体结合表位。研究表明,SARS-CoV-2与SARS-CoV的S蛋白比较,虽然5个关键氨基酸位点有4个发生突变,但SARS-CoV-2仍能保持其核心结构与ACE2分子相互作用,二者RBD结构域的3D结构几乎相同^[18]。Wrapp等^[21]分析发现,SARS-CoV-2 S蛋白与ACE2的亲合力是SARS-CoV的10~20倍,COVID-19基本传染数(R0)高达3.77,这表明SARS-CoV-2是通过S蛋白与人ACE2相互作用而感染人呼吸道上皮细胞,且其传染性强于SARS-CoV。Zhou等^[22]研究发现,SARS-CoV-2可结合人、蝙蝠、果子狸和猪来源的ACE2受体,并且无法感染不含ACE2的细胞;同时还证实SARS-CoV-2不能结合冠状病毒其他常见受体(如APN和DPP4)。因此,对SARS-CoV-2 S蛋白的抗原表位和RBD进行鉴定和研究,可为SARS-CoV-2亚单位疫苗的研发及抗病毒免疫策略设计提供理论依据。

鉴定病毒中和表位能促进亚单位疫苗的研制,有助于阐明抗体与病毒的作用机制。通过构建全人源SARS-CoV-2免疫型噬菌体抗体库,筛选具有中和活性的抗SARS-CoV-2抗体,利用噬菌体随机肽

库,结合蛋白3D模型软件与点突变检测技术,可预测鉴定针对新型冠状病毒S蛋白的中和表位^[23-24]。

目前科研工作者已经对SARS-CoV-2基因组序列、蛋白晶体结构等进行了研究,这对疫苗的研发提供了很大帮助。自中国疾控中心首发第1株SARS-CoV-2毒株信息后,浙江、广州、上海等地相继报道成功分离出SARS-CoV-2毒株以及相关病毒位点突变信息,这为SARS-CoV-2的变异监测、药物筛选、致病机制研究以及疫苗研发等提供了重要依据。

5 展 望

SARS-CoV-2抗体检测试剂的应用,显著提高了当前新型冠状病毒肺炎的筛查效率,有效降低了医护人员感染的风险。基于SARS-CoV-2 S蛋白的中和抗体和亚单位疫苗的研发受到国内外瞩目,其可能产生的急性炎症因子风暴也应引起关注,所以中和抗体和疫苗的研发需兼顾有效性和安全性。相信通过全球科研人员的协同合作,SARS-CoV-2抗体药物和疫苗的研发将会取得突破性进展,将对新型冠状病毒肺炎疫情的防控起到决定性作用。

[参考文献]

- [1] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *N Engl J Med*, 2020: 1-7
- [2] HOLSHUE M L, DEBOLT C, LINDQUIST S, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States[J]. *N Engl J Med*, 2020: 1-9
- [3] ZHAO S, LIN Q, RAN J, et al. Preliminary estimation of the basic reproduction number of novel coronavirus (2019-nCoV) in China, From 2019 to 2020: A data-driven analysis in the early phase of the outbreak[J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 92: 214-217
- [4] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *New PubMed*, 2020, 395(10223): 497-506
- [5] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A Novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *N Engl J Med*, 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001017
- [6] SMITH N, FRASER M. Straining the system: novel coronavirus (COVID-19) and preparedness for concomitant disasters[J]. *Am J Public Health*, 2020, 13: e1-e2
- [7] CHEN Y, LIU Q, GUO D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis[J]. *J Med Virol*, 2020: 1-6
- [8] PARASKEVIS D, KOSTAKI E G, MAGIORKINIS G, et al. Full-genome evolutionary analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event[J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 79: 104212
- [9] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic Characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- [10] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. *Euro Surveill*, 2020, 25(3): 1-8
- [11] WAN Y, SHANG J, SUN S, et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry[J]. *J Virol*, 2020, 94(5): e02015-19
- [12] ARABI Y M, HAJEER A H, LUKE T, et al. Feasibility of using convalescent plasma immunotherapy for MERS-CoV infection, Saudi Arabia[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(9): 1554-1561
- [13] MORA-RILLO M, ARSUAGA M, RAMÍREZ-OLIVENCIA G, et al. Acute respiratory distress syndrome after convalescent plasma use: treatment of a patient with Ebola virus disease contracted in Madrid, Spain[J]. *Lancet Respir Med*, 2015, 3(7): 554-562
- [14] 王晓蕾,朱进,哈卓,等. 全人源抗狂犬病病毒糖蛋白抗体的制备及鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(2): 160-164
- [15] 白璐月,刘金荣,唐奇,等. 人源全分子抗c-Met抗体的制备及对鼻咽癌细胞生物学特性的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(6): 687-692
- [16] 陈雅,熊四平,唐奇,等. 人源抗H7N9血凝素中和抗体IgG的制备及鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7): 874-879
- [17] SONG W, GUI M, WANG X, et al. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(8): e1007236
- [18] 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[J]. *BioRxiv*, 2020: 1-23
- [19] TIAN X, LI C, HUANG A, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 382-385
- [20] LI L, WEI Q, LIN Q, et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(4): e123158
- [21] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion confor-

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

(上接第 154 页)

- break associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
- [20] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, doi: 10.1126/science.abb2507
- [21] ENJUANES L, DEDIEGO M L, ALVAREZ E, et al. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease [J]. *Virus Res*, 2008, 133(1):45-62
- [22] MINAKSHI R, PADHAN K, RANI M, et al. The SARS coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type I interferon receptor [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (12):e8342
- [23] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- [24] YANG Z Y, KONG W P, HUANG Y, et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice [J]. *Nature*, 2004, 428 (6982) : 561-564
- [25] MARTIN J E, LOUDER M K, HOLMAN L A, et al. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a phase I clinical trial [J]. *Vaccine*, 2008, 26(50):6338-6343
- [26] MUTHUMANI K, FALZARANO D, REUSCHEL E L, et al. A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(301):301ra132
- [27] MODJARRAD K, ROBERTS C C, MILLS K T, et al. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(9):1013-1022
- [28] FYNAN E F, LU S, ROBINSON H L, et al. One group's historical reflections on dna vaccine development [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(9):966-970
- [29] YIP M S, LEUNG N H, CHEUNG C Y, et al. Antibody-dependent infection of human macrophages by severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Virol J*, 2014, 11 (1):82
- [30] OLSEN C W, NGICHABE C K, BAINES J D, et al. Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages [J]. *J Virol*, 1992, 66(2):956-965
- [31] HOLMES K V. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111 (11) : 1605-1609
- [32] LIM P L, KURUP A, GOPALAKRISHNA G, et al. Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(17):1740-1745
- [收稿日期] 2020-02-20