

新冠病毒中和单克隆抗体及纳米抗体研究进展

陈玉磊¹, 林锦锦¹, 郑培义², 曹敏杰¹, 金腾川²

1 集美大学 海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

2 中国科学技术大学 基础医学院, 安徽 合肥 230027

陈玉磊, 林锦锦, 郑培义, 曹敏杰, 金腾川. 新冠病毒中和单克隆抗体及纳米抗体研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3173-3193.

CHEN YL, LIN JJ, ZHENG PY, CAO MJ, JIN TC. SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies and nanobodies: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3173-3193.

摘 要: 由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2) 引起的疾病被命名为新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19), 是一种具有强传染性、高易感性、长潜伏期的传染病。病毒刺突蛋白受体结合结构域 (receptor binding domain, RBD) 和细胞血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 之间的相互作用使得 SARS-CoV-2 顺利进入细胞。本文对 SARS-CoV-2 与 ACE2 的相关作用机制进行了简单概述, 对目前针对 SARS-CoV-2 中和单克隆抗体、纳米抗体的最新研究进展进行了总结, 探讨了新冠肺炎的发展过程和抗体药物的研究方向, 以期包括新冠肺炎在内的新发、突发传染病中和抗体药物的研发提供参考。

关键词: 新冠病毒; 新型冠状病毒肺炎; 受体结合结构域; 单克隆抗体; 纳米抗体

Received: April 21, 2022; **Accepted:** June 2, 2022; **Published online:** August 3, 2022

Supported by: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDB29030104); Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2021J01838); National Natural Science Foundation of China (31870731, 31772049); National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901004)

Corresponding author: JIN Tengchuan. E-mail: jint@ustc.edu.cn

基金项目: 中国科学院战略先导项目 (XDB29030104); 福建省自然科学基金 (2021J01838); 国家自然科学基金 (31870731, 31772049); 国家重点研发计划 (2018YFD0901004)

SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies and nanobodies: a review

CHEN Yulei¹, LIN Jinjin¹, ZHENG Peiyi², CAO Minjie¹, JIN Tengchuan²

¹ College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

² School of Basic Medical Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Anhui, China

Abstract: Coronavirus disease (COVID-19) is an infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), with strong contagiousness, high susceptibility and long incubation period. Cell entry by SARS-CoV-2 requires the binding between the receptor-binding domain of the viral spike protein and the cellular angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). Here, we briefly reviewed the mechanisms underlying the interaction between SARS-CoV-2 and ACE2, and summarized the latest research progress on SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies and nanobodies, so as to better understand the development process and drug research direction of COVID-19. This review may facilitate understanding the development of neutralizing antibody drugs for emerging infectious diseases, especially for COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; receptor binding domain; monoclonal antibody; nanobody

严重急性呼吸综合征冠状病毒2型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 目前仍在快速传播, 威胁着全球公共卫生秩序、社会的稳定和经济的发展, 同时也促使了以前所未有的速度开发有效的疫苗及抗体药物以对抗 2019 新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的流行。中和抗体能够结合病原体表面的抗原, 阻止病原体黏附宿主细胞受体从而抑制其感染。经过数十年的研究发展, 中和抗体在多种疾病的预防、治疗等领域得到了应用。本文总结了目前针对 SARS-CoV-2 中和单克隆抗体、纳米抗体药物的最新研究进展, 为新冠肺炎的预防与治疗提供参考。

1 抗体

1.1 单克隆抗体

1975 年, 德国学者 Köhler 和 Milstein 利用杂交瘤技术首次在小鼠身上产生了单克隆抗体^[1]。

单克隆抗体的出现彻底改变了包括癌症、自身免疫病和传染病等几种人类疾病的治疗方法。中和单克隆抗体通常来源于疫苗诱导或受感染的人群, 其可与病原体 (如病毒) 特异性结合并发挥中和作用, 从而消除病原体的感染能力。随着 1998 年第一个被批准用于对抗传染病的中和单抗——Palivizumab 的出现, 且其被证明可以保护高危婴儿免受呼吸道合胞病毒感染引起的严重疾病的影响^[2], 目前越来越多的中和单抗被应用于治疗或预防传染病。例如, 针对人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 的预防或治疗抗体药物正在研究当中, 在灵长类动物中的结果表明, 广谱中和单抗可以有效预防高度多样化的循环 HIV-1 毒株^[3]。这些结果为传染性疾病的单抗药物的开发提供了重要的经验。自 SARS-CoV-2 暴发以来, 陆续有 5 种单抗药物被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration,

FDA) 批准或授权紧急应用于新冠肺炎的治疗。这些抗体药物对于不断突变的 SARS-CoV-2 的有效性仍在进一步探索当中,下文详细描述了各单克隆抗体的研究进展。

1.2 纳米抗体

1993 年, Hamers-Casterman 等^[4]在骆驼血清中发现一种不含轻链、仅由重链组成的重链抗体 (heavy-chain antibodies, HcAbs)。其包含两个恒定区 (CH2 和 CH3)、1 个铰链区和 1 个重链可变区 (variable heavy chain domain, VHH)。1995 年, Greenberg 等^[5]在软骨鱼中也发现了仅含重链, 且每条重链由 5 个恒定区 (C1–C5)、1 个铰链区和 1 个可变新抗原受体区 (variable new antigen receptor, VNAR) 组成的重链抗体。将这类抗原结合位点 (VHH 和 VNAR) 仅为单一可变区的小分子抗体称为单域抗体 (single domain antibody, sdAb) (图 1)。因其分子质量只有单克隆抗体的 1/10, 是迄今为止获得的结构稳定且具有抗原结合活性的最小抗体单位, 也被称作纳米抗体 (nanobody, Nb)^[6]。

纳米抗体不仅可以作为亲和配体用于蛋白相互作用、生物大分子定位等研究,还能够作为治疗药物用于肿瘤、感染等疾病的治疗^[7]。结合各种标记技术, 纳米抗体在疾病诊断及治疗、食品安全检测等方面也发挥着重要的作用。例如, Sheng 等^[8]利用纳米抗体 HRP 融合蛋白作为检测探针来检测鸡血清中抗新城疫病毒抗体, 该 ELISA 检测方法比传统方法更灵敏、快速。除此之外, 纳米抗体通过与 Avi-Tag 融合, 可以作为检测探针快速检测谷物中的赭曲霉毒素 A^[9]。纳米抗体作为亲和试剂在结直肠癌早期初筛以及辅助诊断方面显示出优异的精确性, 可用于检测人类粪便样品中的血红蛋白, 作为早期结直肠癌的大规模群体筛查工具, 这克服了结肠镜检查前的饮食限制及检查时的侵入性, 提高了患者的可接受度^[10]。在疾病治疗方面, 赛诺菲公司的卡普赛珠单抗 Cablivi (Caplacizumab) 是首个获批上市的纳米抗体的治疗药物, 靶向血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF), 从而达到治疗获得性血栓性血小板减少性紫癜的效果^[11]。

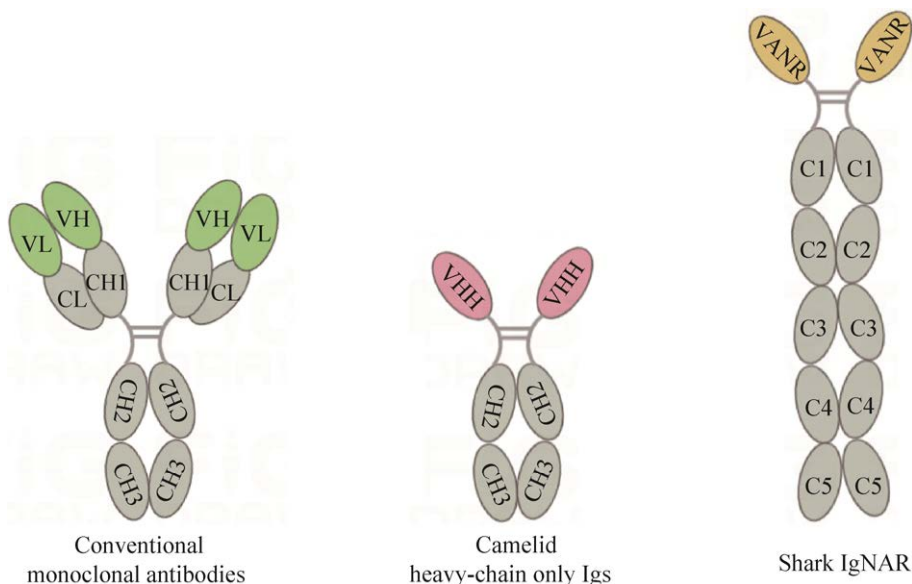


图 1 抗体结构特征图

Figure 1 Structural features of antibodies.

2 SARS-CoV-2

2019 年底出现了一种新的 β 冠状病毒属病毒, 即“严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型”(SARS-CoV-2), 病毒导致的疾病被命名为 2019 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19)^[12]。SARS-CoV-2 基因型与蝙蝠中鉴定出的 β 冠状病毒谱系 C 病毒密切相关, 与严重急性呼吸系统综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 冠状病毒 (Bat-SL-CoVZC45) 高度同源, 属于 SARS 样冠状病毒和中东呼吸系统综合征 (middle east respiratory syndrome, MERS) 冠状病毒的病毒群。新冠肺炎的传播无论是在感染人数上, 还是在空间范围上, 都压倒性地超过了 SARS 和 MERS, 新冠肺炎的持续暴发对全球公共卫生构成了非同寻常的威胁^[13]。

2.1 SARS-CoV-2 的结构特征

如图 2 所示, SARS-CoV-2 由 4 种主要的结构蛋白构成, 分别为刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白)、核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N 蛋白)、膜蛋白 (membrane protein, M 蛋白) 和包膜蛋白 (envelope protein, E 蛋白)^[14-15]。其中, S 蛋白介导病毒与细胞膜的融合, 是与病毒入侵毒力相关的重要蛋白, 因此是目前研究 SARS-CoV-2 致病机制最热门的靶点^[16]。

S 蛋白包含 S1 亚基和 S2 亚基。如图 3 所示,

受体结合结构域 (receptor-binding domain, RBD) 和 N-末端结构域 (N-terminal domain, NTD) 构成 S1 亚基, 其中 RBD 能与宿主细胞受体血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 相互作用^[17]。S2 亚基主要介导病毒与宿主细胞膜的融合, 并将病毒 RNA 释放到细胞质中进行复制^[18]。S 蛋白刺突中隐藏的 RBD 可使 SARS-CoV-2 在逃避免疫监视的同时还能够有效进入细胞^[19]。研究表明, S 蛋白的免疫原性及其与 ACE2 受体的相互结合不受 SARS-CoV-2 其他结构蛋白缺失的影响^[20]。因此, 靶向 S 蛋白所制备的疫苗能够诱导机体产生抗体并有效阻断病毒与受体结合。虽然 N 蛋白在 SARS-CoV-2 中含量丰富并且参与基因组复制和细胞信号通路调节, 但 N 蛋白具有高度免疫原性, 针对 N 蛋白产生的抗体不具有中和活性^[21]。S 蛋白和 N 蛋白是 SARS-CoV-2 免疫检测的主要靶抗原, 对 SARS-CoV-2 病毒的诊断和排查具有重要价值, 而 S 蛋白则是疫苗、抗体药物等开发的重要靶点。

2.2 SARS-CoV-2 的突变

自 2019 年底暴发以来, SARS-CoV-2 不断发生突变, 导致突变株的传播性增强, 逃逸治疗性抗体, 并在接种疫苗的个体中突破性感染。对于新冠肺炎大流行的控制、疫苗的效力、疗效和病毒的监测均构成威胁^[22]。2020 年底, 世

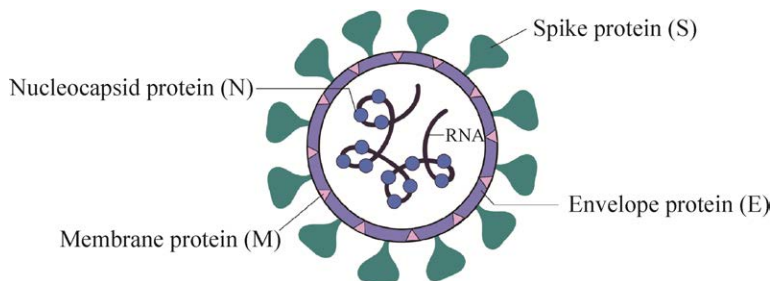


图 2 新冠病毒结构示意图

Figure 2 Structural representation of SARS-CoV-2.

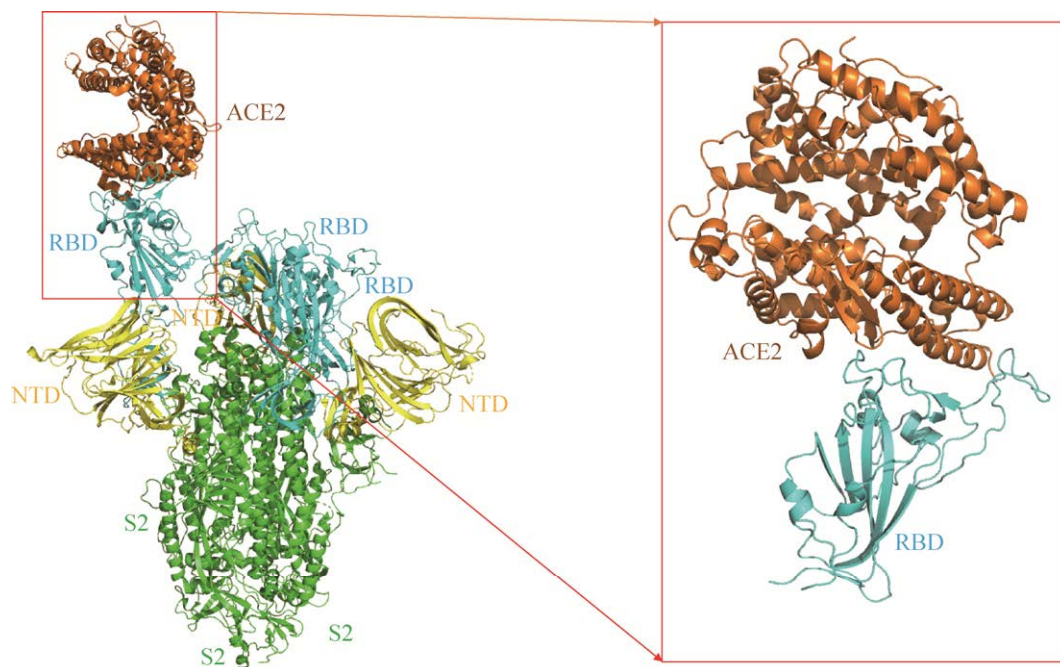


图3 SARS-CoV-2 S蛋白与ACE2复合物结构示意图

Figure 3 Diagram of SARS-CoV-2 S protein-ACE2 complex (PDB: 7A94). S protein is a homologous trimer. S2 subunit, NTD domain, RBD domain and ACE2 are displayed in green, yellow, cyan and orange, respectively.

界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 将对全球公共卫生构成更大风险的突变体分为“需要关注的突变株” (variants of concern, VOC) 和“需要留意的突变株” (variants of interest, VOI) 两类, 以确定全球检测和研究的优先次序, 并最终为当前应对新冠肺炎大流行提供信息。其中 VOCs 包括 Alpha (B.1.1.7)、Beta (B.1.351)、Gamma (P.1)、Delta (B.1.617.2) 和 Omicron (B.1.1.529), VOIs 包括 ETA (B.1.525)、IOTA (B.1.1.7)、Kappa (B.1.617.1) 和 Lambda (C.37)。

Alpha 突变株于 2020 年 2 月 7 日在英国首次发现, 随后在世界许多地区占据主导地位, Alpha 共含有 31 个突变位点, 其中 10 个存在于 S 蛋白中, 包括 N501Y、D641G 等^[22]。Beta 突变株于 2020 年 2 月 15 日首次出现在南非, 并成为南非的主要流行株^[23], Beta 共含有 24 个突变位点, 其中 11 个存在于 S 蛋白中, 包括

N501Y、D641G、E484K 等^[24]。接着, Delta 于 2020 年 3 月 27 日在印度被发现, 并蔓延至 119 个国家和地区, 在全球范围内取代了 Alpha。2021 年 5 月至 8 月, Delta 在美国的传播从 1.3% 上升到 94.4%, 而 Alpha 的患病率则从 70.0% 下降到 2.4%。Delta 共有 27 个突变位点, 其中 9 个位于 S 蛋白, 包括 D614G、P681R 等^[25]。而 2021 年底首次在南非被发现的 Omicron 目前存在多个不同的亚系, 共有 46 个 S 蛋白突变, 包括 N501Y、D641G、K417N 等。BA.1 拥有 14 个独特突变, 目前在全球传播的比例稳步下降; BA.3 具有 R346K 突变 (BA.1+R346K, 也称为 BA.3); 而 BA.2 包含 9 个独特突变, 该亚系不仅在我国造成了大范围的传播, 也是目前主导全球疫情主要的 SARS-CoV-2 突变株^[26]。目前 BA.2 亚型进一步发生分支内的突变, 由此已形成了 21 个子亚型, 这些子亚型

的病毒学特征与 BA.2 类似, 其中 BA.2.12.1 由于具有 S704L 和 L452Q 两个新突变使其获得巨大关注。2022 年 4 月初, BA.2.12.1 在美国的检出率由 3 月初的 1% 上升至 18%。而 BA.4 和 BA.5 不仅拥有与 Delta 完全一致的突变 L452R, 还具有 F486V 和 Q493R 突变。BA.4 与 BA.5 的增长速度与 BA.2.12.1 大致相同, 可见 L452 突变对于这 3 种亚型在分子流行上的影响具有相似性, 有可能会成为今后的主要流行突变株^[27]。

S 蛋白的广泛突变可能威胁到目前疫苗和治疗性单克隆抗体的疗效^[24]。在上述 VOCs 中主要包括 N501Y、D614G、E484K 等突变位点(图 4), 研究发现 D614G 是目前 S 蛋白上突变频率最高的氨基酸位点, 增加了 SARS-CoV-2 的感染可能性^[28]。E484K 突变使病毒具有免疫逃避的特点, 在抗体中和活性的丧失中发挥关

键作用。N501Y 在除 Delta 外的 4 个 VOCs 中均存在, 该突变相对于野生型 RBD 以“开放”构象促进 RBD 与 ACE2 受体的结合, 导致病毒进一步传播^[29]。全球所有国家和地区都将面对与 SARS-CoV-2 的长期共存和抗争, 疫苗的预防及抗体药物的治疗是人类战胜 SARS-CoV-2 的希望。

3 靶向 SARS-CoV-2 单克隆抗体

截至 2022 年 5 月中旬, 新冠肺炎大流行在全球范围内确诊病例超过 5.2 亿例, 死亡 620 多万人。疾病的迅速传播促使了以前所未有的速度开发有效的单抗以对抗新冠肺炎的流行。目前新冠肺炎的单抗制备来源主要包括: SARS-CoV-2 恢复期患者血浆、免疫人源化小鼠或野生型小鼠。本文对目前主要的 SARS-CoV-2 中和单克隆抗体进行了概述。

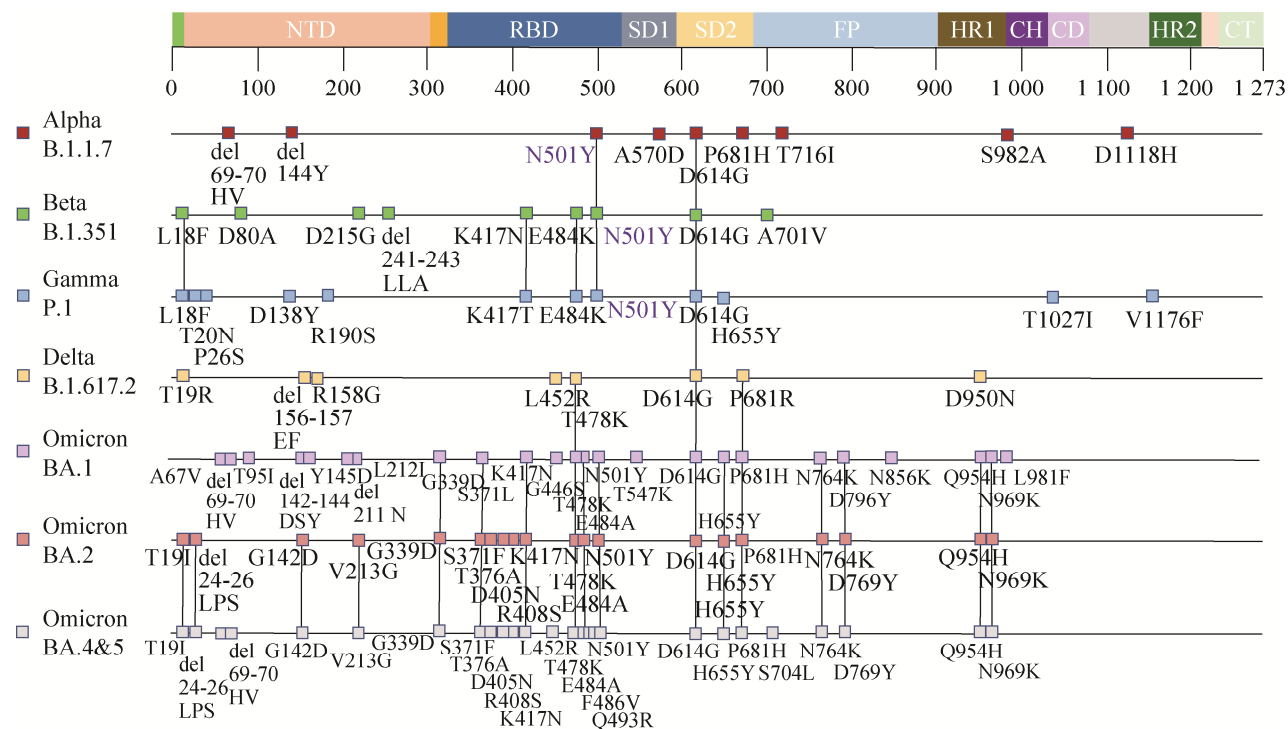


图 4 新冠病毒突变株相关突变位点

Figure 4 Mutation sites related to SARS-CoV-2 mutants. Only the important mutation sites are marked.

3.1 国外工作进展

Bamlanivimab (LY-CoV555) 是由加拿大 AbCellera 生物公司和美国国家过敏症和传染病研究所疫苗研究中心发现的, 并与美国 Lilly 公司联合开发的一种针对新冠肺炎患者恢复期血浆中 S 蛋白的中和抗体 (具有未修饰 Fc 区的 IgG1)^[30], 其结合 S 蛋白的 RBD (图 5A), 在暴露于 SARS-CoV-2 的巨噬细胞和免疫细胞系中进行的中和反应证明其能阻断病毒感染。对猕猴在病毒感染前 24 h 给予 Bamlanivimab 进行预防效果的测试, 结果表明感染后的症状总体上是轻微的, 该预防显著减少了感染后呼吸道的病毒载量和复制, 证明了其抗病毒效果^[31]。Etesevimab (LY-CoV016) 由上海君实生物公司与中国科学院微生物研究所共同开发并被美国 Lilly 公司引进的一种重组全人源单克隆中和抗体, 以高亲和力特异性结合 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD, 并能有效阻断 RBD 与 ACE2 的结合。研发团队在天然的人类 IgG1 抗体中引入了点突变以去除组织损伤等不良效应。一项在恒河猴中进行的新冠病毒攻毒试验结果显示, Etesevimab 在预防及治疗新冠病毒感染方面均具有良好疗效。2020 年 7 月启动的 BLAZE-1 III 期临床试验 (NCT04634409) 数据表明, 接受 Bamlanivimab 与 Etesevimab 联合治疗后第 3 天到第 11 天显著降低了患者体内的病毒载量, 且明显优于 Bamlanivimab 单药。在 1 035 名患者接受治疗的 29 d 内, 患者住院率和死亡率减少了 70%^[32-33]。2020 年 11 月, 美国 FDA 批准 Bamlanivimab 的紧急使用授权, 被授权用于治疗轻到中度新冠肺炎患者, 这也是 FDA 授权使用的第一个单克隆抗体药物。2021 年 2 月, Bamlanivimab 与 Etesevimab 的“鸡尾酒”疗法也获得 FDA 批准。由于 Bamlanivimab 单药对

于 SARS-CoV-2 突变株的疗效不佳, FDA 于 2021 年 4 月撤销了该单药的 EUA, 但是其与 Etesevimab 的“鸡尾酒”疗法仍可正常使用。

“鸡尾酒”药物 REGN-COV2 是 Casirivimab (REGN10933) 和 Imdevimab (REGN10987) 两种中和性单抗的结合, 由美国 Regeneron 制药公司发现, 并与罗氏制药联合开发的带有未修饰 Fc 区的单抗。它们是通过使用人源化小鼠和新冠肺炎康复患者的血清, 从最初分离的数以千计的抗体中挑选出来的^[34-35]。两个抗体结合 RBD 上两个不同的表位 (图 5B), 直接中和病毒。与其他单抗“鸡尾酒”相比, Omicron 的突变对 REGN-COV2 的影响较小, 体外实验表明该抗体“鸡尾酒”对于 S 蛋白中常见的突变位点 E417K、E484K、Q493K 等均保持良好的中和能力^[36]。2020 年 9 月, 针对 REGN-COV2 的临床试验 (NCT04426695) 表明 REGN-COV2 降低了患者的病毒载量, 并减轻了未住院患者的症状, 且对于新冠肺炎患者发展为危重症及死亡的风险下降了 70%^[34]。2020 年 11 月, 再生元制药公司宣布“鸡尾酒”中和抗体 REGN-COV2 (Casirivimab 和 Imdevimab) 获得 FDA 批准, 用于治疗 12 岁以上成人和儿童轻中度的高风险新冠患者, 成为首个治疗新冠的抗体“鸡尾酒”药物。进一步研究显示, 皮下注射 REGEN-COV (前称为 REGN-COV2) 能降低未感染者暴露于病毒后的感染风险, 也再次证明了 REGEN-COV 能缩短症状持续时间和高病毒载量的持续时间^[37]。2021 年 7 月, FDA 扩大了对 REGEN-COV 的紧急授权范围, 允许 REGEN-COV 用于有高风险发展为严重新冠肺炎的人群进行暴露后预防性治疗。REGEN-COV 是美国目前唯一可同时用于新冠肺炎治疗与预防的抗体疗法。

AZD7442 是来自 SARS-CoV-2 患者恢复期血浆两种单抗 Tixagevimab (AZD8895) 和 Cilgavimab (AZD1061) 的组合, 由美国范德比尔特大学医学中心发现并授权英国 AstraZeneca 生物制药公司。研究表明, 它们识别不重叠的 RBD 表位, 提供了更高的防止病毒逃避中和的阈值, 且该抗体可以阻断 SARS-CoV-2 与 ACE2 的结合 (图 5C), 从而阻止病毒进入细胞。在恒河猴动物模型中, 预防性应用 AZD7442 可预防 SARS-CoV-2 感染, 而治疗性应用可加速肺中病毒的清除。对血清 AZD7442 浓度的时间过程的推断表明, AZD7442 能够提供长达 12 个月的保护, 使新冠肺炎高危患者受益^[38]。III 期临床研究 (NCT04723394) 发现, 903 名感染病毒 3 d 内的患者在肌肉注射 600 mg AZD7442 后, 其转化为重症及死亡的风险降低了 88%, 且该抗体组合疗法将新冠肺炎的感染风险降低了 77%^[39]。AZD7442 对 Omicron 在内的 VOCs 均具有较好的中和效力, 其 IC_{50} 值在 1.79–255.86 ng/mL 之间^[40]。2021 年 12 月, FDA 批准 AZD7442 的紧急使用授权, 用于严重免疫受损的成人和 12 岁以上青少年, 以及不宜接种新冠疫苗或对新冠疫苗免疫响应不足人群的暴露前预防, 是首个用于新冠肺炎暴露前预防的抗体疗法。

Sotrovimab 是由英国 GlaxoSmithKline 公司和美国 Vir Biotechnology 合作开发的新冠抗体药物, 来自 2003 年 SARS-CoV 患者的记忆 B 细胞中分离的亲本抗体 S309, 可以在体外有效中和除 Omicron BA.2 突变株外的其他 VOCs 活病毒 (IC_{50} 值 51.3–169.2 ng/mL)。在小鼠模型中, 感染 SARS-CoV-2 野生型后接受 Sotrovimab 治疗的动物体重减轻较少, 肺部总病毒载量和感染病毒水平显著降低^[41]。基于 III 期临床试验

(NCT04913675) 的结果, 对 1 057 名患者主要疗效的分析表明, 与安慰剂相比, 接受 Sotrovimab 治疗的患者住院 (超过 24 h) 或死亡风险降低了 79%, 达到试验的主要终点^[42]。2021 年 5 月, FDA 正式授予抗体药物 Sotrovimab 紧急使用许可。而由于 Omicron BA.2 突变株引起的新冠病例的增加, 而 Sotrovimab 对其效用欠佳, FDA 于 2022 年 4 月撤回了 Sotrovimab 用于新冠治疗的批准。

Regdanvimab 是由韩国 Celltrion 公司研发的一种重组人单抗, 2021 年 11 月, 欧盟批准其用于治疗新冠肺炎轻度症状的老年患者以及中度症状的成人患者。Regdanvimab 在细胞中保持了对 Gamma、Delta 突变株的抗病毒活性, 并在 Gamma 和 Delta 突变株感染的小鼠中显示出显著的保护作用, 这表明 Regdanvimab 可能是感染这些突变株和具有相同突变位点 (L452R、T478K、D614G) 的其他潜在突变株患者的一种潜在的治疗选择^[43]。III 期临床试验 (NCT04593641) 表明, 在 1 315 名患者中, 与安慰剂相比, 患者发展为重症或死亡的风险显著降低了 72%^[44]。

ADG20 是由美国 Adagio 公司研发的中和抗体, 2022 年 4 月, ADG20 最新的临床数据 (NCT04840459) 显示, 该抗体在 SARS-CoV-2 暴露前的预防和暴露后的治疗中达到主要终点且具有统计学意义。症状性新冠肺炎的风险在暴露前的预防中降低了 71%, 在感染后的治疗中则降低了 75%。但 ADG20 对除 Omicron 外的所有 VOCs 以及其他 SARS 相关冠状病毒 (SARS-CoV-1) 保持较高中和活性 (IC_{50} =9–15 ng/mL)^[45]。Adagio 公司计划在 2022 年第二季度向 FDA 提交将 ADG20 用于预防和治疗新冠肺炎的申请。

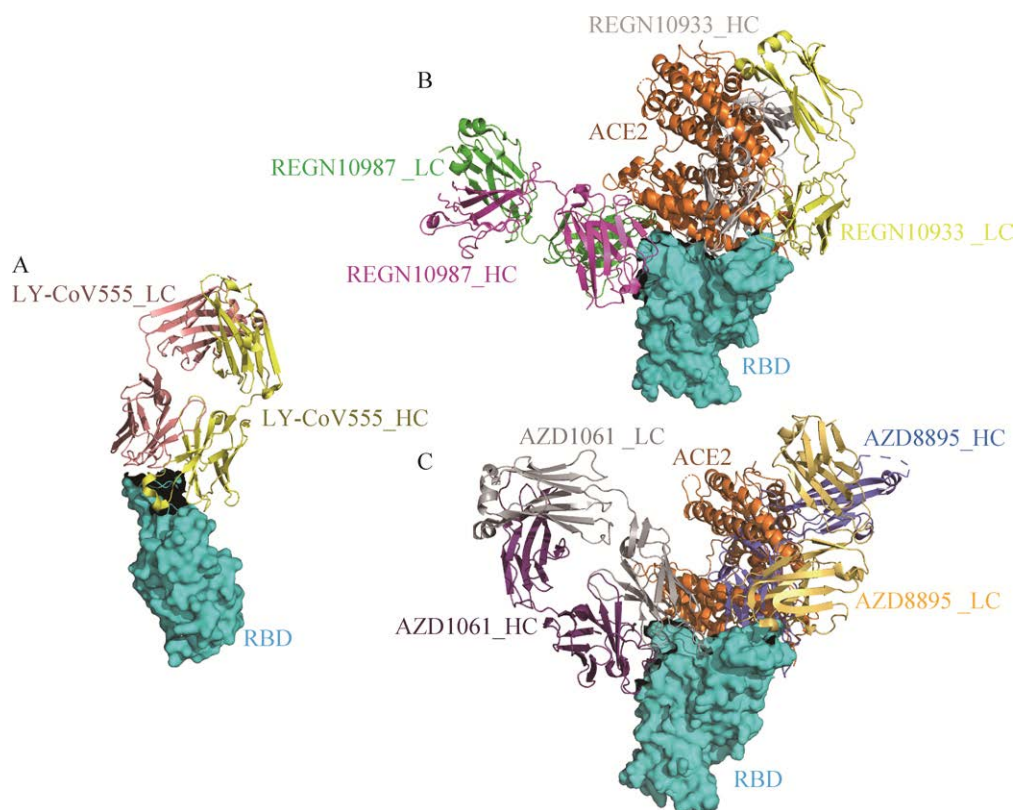


图5 国外部分代表性中和抗体与RBD结合表位分析

Figure 5 RBD-binding epitope analysis of representative neutralizing antibodies developed in foreign countries. (A) Structure of LY-CoV555 and RBD complex (PDB: 7KMG). (B) Structural superposition of ACE2/RBD (PDB: 6M0J) and REGN10987/REGN10933/RBD (PDB: 6XDG) complex. (C) Structural superposition of ACE2/RBD and AZD1061/AZD8895/RBD (PDB: 7L7E) complex. The surface of the RBD structure is shown in cyan. ACE2 is shown in orange. The heavy chain and light chain of LY-CoV555, REGN10987, REGN10933, AZD1061 and AZD8895 are shown in bright yellow, pink, magenta, green, gray, chartreuse, purple, dark gray, blue and yellow, respectively.

日本国家传染病研究所评估了上述几种单克隆抗体对于突变株的中和效果变化(表1)^[25,46],研究发现,Etesevimab对Delta有抑制作用,对Beta、Gamma、Omicron无中和活性;Bamlanivimab单药对Beta和Omicron几乎完全失去活性,对Gamma和Delta的中和活性降低;Bamlanivimab与Etesevimab联合使用后对Gamma的中和活性显著降低,对Beta和Omicron的中和活性丧失。Casirivimab保持了对Gamma和Delta的活性,对Omicron BA.2的中和活性降低,对Omicron BA.1完全失去活

性;Imdevimab单独使用或Imdevimab和Casirivimab联合使用(REGN-COV2)对除Omicron BA.1以外的其他突变株均保持较高活性。Tixagevimab对Omicron突变株的中和活性降低;Cilgavimab对Omicron BA.1抑制活性降低,对Omicron BA.2有极好的中和活性;Tixagevimab和Cilgavimab联用(AZD7442)显示出对Omicron BA.2较好的中和活性。Sotrovimab对Omicron BA.2突变株的抑制活性显著降低。研究显示,病毒的突变促进了其与ACE2受体的结合,并削弱了单抗的作用以逃逸

免疫反应^[47]。Omicron S 蛋白与 ACE2 复合物的结构显示, RBD 中的 Q493R、G496S 和 Q498R 氨基酸残基与 ACE2 形成了新的盐桥和氢键^[48]。Shah 等^[49]证实 Omicron 中存在的 3 个突变 T478K、Q493R 和 Q498R 使得 Omicron RBD 与 ACE2 的结合能力比野生型 SARS-CoV-2 强 2–2.5 倍,并使 Omicron RBD-ACE2 复合物的静电势几乎增加了一倍。另外, T478K、Q493K、Q498R 和 E484A 突变共同导致 Omicron RBD 与单抗之间的静电势显著下降,导致 Etesevimab、Bamlanivimab 和 Regdanvimab 单抗药物失效。因而,针对 RBD 保守表位单抗药物的开发对于 Omicron 及未来突变株的治疗具有重要意义。

新冠疫苗接种者受到 Omicron 突破性感染后,患者血清不仅对 Omicron 突变株具有很强的中和活性,还能广泛地中和多种 VOCs 和 SARS-CoV-1^[50]。在 Omicron 突破性感染早期,患者体内迅速产生大量 S 蛋白抗体和特异性 B 细胞应答,表明急性感染激活了疫苗接种后诱导的记忆 B 细胞应答。记忆 B 细胞主要识别相对保守的 S2 亚基,但在 Omicron 突破性感染后,抗体识别的主导抗原转变为 S1 上的 RBD^[51]。Nutalai 等^[52]从 Omicron BA.1 突破性感染患者体内分离出了 27 种 RBD 单抗,其中最主要一类抗体结合在 RBD 右侧,这类抗体的重链和轻链均具有高度体细胞突变,可以识别突变的 RBD 表位,因此可以有效中和多个 VOCs 突变株。以上结果提示我们可以从 Omicron 突破性感染患者体内筛选具有广谱中和活性的单抗药物,这是应对还在不断突变的病毒的有效手段。

3.2 国内工作进展

由中国科学院微生物研究所 Shi 等^[33]发现的人源单克隆中和抗体对 SARS-CoV-2 具有较强特异性和中和活性;研究发现, CB6 通过识别 RBD 中与 ACE2 结合位点重叠的表位从而阻

断病毒与受体的相互作用;且在恒河猴动物实验中,也证明了 CB6 能够显著阻止病毒感染。由于其具有较好的预防和治疗 SARS-CoV-2 的潜力,中国科学院微生物研究所授权上海君实生物公司对 CB6 进行产业化研发,随后被美国 Lilly 公司引进,即上文中的 Etesevimab (LY-CoV016)。这标志着具有我国自主知识产权的新冠病毒特异性抗体药物的安全性和有效性获得世界性认可,也是中国创新药物走向全球市场的有益尝试。Ying 等^[53]研究了一系列抗 SARS-CoV-2 的全人源单克隆抗体,从中发现 CR3022 可与 RBD 有效结合,并且其表位与 RBD 中的 ACE2 结合位点没有重叠,表明 CR3022 具有治疗新冠肺炎的可能性(图 6A)。由清华大学、深圳市第三人民医院及腾盛博药生物公司联合研发的抗 SARS-CoV-2 的联合治疗药物安巴韦单抗注射液(BRII-196)及罗米司韦单抗注射液(BRII-198),是从抗 SARS-CoV-2 人源单克隆抗体中筛选得到的一对活性较高、具有互补作用的中和抗体^[54]。研究发现 BRII-196 单抗(前称为 P2C-1F11)结合 RBD 时的表位和角度与 ACE2 结合 RBD 基本一致,说明 P2C-1F11 竞争 ACE2 结合 RBD 的表位,阻断了 RBD 与 ACE2 的结合,从而使病毒无法进入细胞^[55]。Liu 等^[56]测试了 BRII-196 对目前存在的几种突变株的中和活性, BRII-196 对除 Omicron 外的突变株均保持强中和活性,并且发现 BRII-196 与 BRII-198 联用后对 Delta、Omicron 等突变株均显示出较好的中和活性。2021 年 8 月, II 期临床试验(NCT04787211)数据表明在 847 例患者中,与安慰剂相比,其对住院率与死亡率降低了 78%^[57]。2021 年 10 月,腾盛博药向 FDA 提交 BRII-196/BRII-198 联合疗法紧急使用授权申请。同年 12 月,中国国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)

表 1 抗新冠病毒突变株单克隆抗体的体外疗效及获批情况

Table 1 *In vitro* efficacy and approval of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 variants

mAb	<i>IC</i> ₅₀ values for SARS-CoV-2 and its variants (ng/mL)							Clinical trial	Developer	Status
	Ancestral strain	Alpha/B.1.1.7	Beta/B.1.351	Gamma/P.1	Delta/B.1.617.2	Omicron/BA.1	Omicron/BA.2			
Bamlanivimab (LY-CoV555)	4.69±1.43	2.65±1.30	9 554.88±926.53	1 601.65±896.02	641.73±324.79	>50 000	>50 000	NCT04411628		FDA EUA (Revoked)
Etesevimab (LY-CoV016)	18.19±9.10	150.38±83.51	>50 000	>50 000	15.37±9.78	>50 000	>50 000	NCT04780321	Lilly	—
LY-CoV555 +LY-CoV016	12.60±1.91	15.26±3.98	>10 000	2 545.04±625.72	10.28±3.33	>10 000	>10 000	NCT04634409		FDA EUA
Imdevimab (REGN10987)	3.05±0.93	1.87±1.60	2.17±1.30	1.04±0.68	3.95±1.78	>50 000	68.65±8.84	—		—
Castirivimab (REGN10933)	2.79±1.87	2.74±1.84	757.13±287.91	187.69±128.88	2.89±1.78	>10 000	1 666.19±771.77	—	Regeneron	—
REGN-COV2	3.53±0.66	1.55±0.78	5.18±1.45	2.11±0.48	1.91±0.79	>10 000	222.59±64.47	NCT04426695		FDA EUA
Tixagevimab (AZD8895)	1.92±0.28	1.34±0.67	18.98±1.42	6.56±1.56	4.05±2.60	1 299.94±406.58	395.78±62.37	—		—
Cilgavimab (AZD1061)	7.70±2.20	3.60±1.62	10.03±3.05	4.00±2.70	12.76±2.93	443.87±167.96	4.44±2.72	—	AstraZeneca	—
AZD7442	3.42±0.92	1.94±0.34	10.30±1.17	1.79±0.87	5.50±2.75	255.86±45.31	14.48±2.04	NCT04723394		FDA EUA
Sotrovimab	60.00±5.78	187.20±20.45	71.90±16.51	73.11±10.21	51.30±8.21	169.20±23.21	972.80±36.21	NCT04913675	GlaxoSmithKline	FDA EUA (Revoked)
Regdanvimab	6.76±0.34	—	—	275.75±41.21	1 237.00±210.21	>10 000	—	NCT04593641	Celltrion	FDA EUA
ADG20*	12.00±0.19	9.00±1.03	15.00±2.31	13.00±5.12	14.00±1.21	1 203.00±212.32	—	NCT04840459	Adagio	—
BR11-196	15.00±5.00	5.77±1.92	7.50±2.50	6.82±2.28	12.50±4.17	2 010.00±670.00	1 455.00±485.00	NCT04787211	Brii biosciences	—
IBI314	2.42±0.22	0.79±0.36	7.14±0.42	—	8.67±0.51	—	—	—	Innovent	—

*: except for ADG which is tested by using pseudovirus, all other monoclonal antibodies were tested with live viruses; "—" means not available.

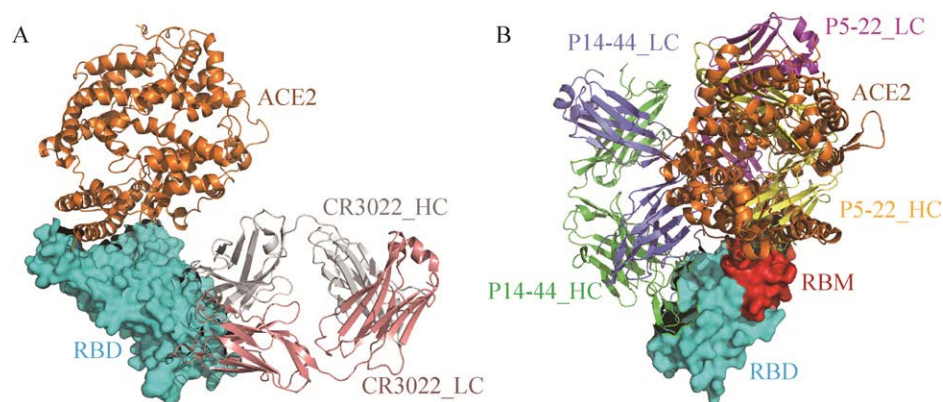


图6 中和抗体 CR3022、P5-22 和 P14-44 与 RBD 结合表位分析

Figure 6 RBD-binding epitope analysis of neutralizing antibodies CR3022, P5-22 and P14-44. (A) Structural superposition of ACE2/RBD (PDB: 6M0J) and CR3022/RBD (PDB: 7JN5) complex. (B) Structural superposition of ACE2/RBD (PDB: 6M0J) and P14-44/P5-22/RBD (PDB: 7FCP). The surface of the RBD and RBM structure are colored in cyan and red, respectively. ACE2 is colored in orange. The heavy chain and light chain of CR3022, P14-44 and P5-22 antibody are colored in gray, pink, green, blue, yellow and magenta, respectively.

也紧急批准其上市，该药物将可能满足我国新冠肺炎患者的临床需求以及作为预防 SARS-CoV-2 感染的候选药物。

广州实验室和信达生物制药（苏州）有限公司等对 44 名 SARS-CoV-2 恢复期患者的中和抗体进行筛选与鉴定^[58]。在筛选的 240 个克隆子中得到 8 个具有病毒中和活性的抗体，其中 P5-22 的 IC_{50} 值为 7.2 ng/mL，仅为 LY-CoV016 的 1/30。P5-22/P14-44 抗体“鸡尾酒”（IBI314）的效果最佳，表现出比 LY-CoV016/LY-CoV555 更好的 VOCs 中和活性（ IC_{50} =0.79–8.7 ng/mL），并在小鼠体内显示出低剂量的保护作用。笔者团队成员对 P5-22 和 P14-44 与 SARS-CoV-2 RBD 的复合物晶体结构进行了解析（图 6B），发现其分别结合在受体结合基序（receptor-binding motif, RBM）表位和 RBD 隐藏表位，其中该 RBM 表位与 ACE2 结合位点几乎完全重叠，赋予 P5-22 极佳的病毒中和活性。鉴于礼来公司和再生元制药公司的“鸡尾酒”未能有效

保护 Omicron 突变株的侵染，而 Omicron 所有的突变位点均不与 P5-22 和 P14-44 的热点残基重叠，我们推测 IBI314“鸡尾酒”仍能有效中和 Omicron 突变株，有望将其应用于临床研究，以对抗当前和未来变体的严重威胁。

区别于传统的中和抗体，Deng 等^[59]提出了一种快速且经济有效的脂质纳米颗粒（lipid nanoparticle, LNP）包裹的 mRNA 平台，用于体内传递 SARS-CoV-2 中和抗体。将两个编码 SARS-CoV-2 中和单抗 HB27 的轻链和重链的 mRNA 包裹于 LNP 中（mRNA-HB27-LNP），与原始 HB27 抗体（0.309 nmol/L）相比，其靶向 SARS-CoV-2 RBD 的亲和力常数提高了 3 倍（0.156 nmol/L）。体内表征表明，相对于原始 HB27 抗体，静脉注射 mRNA-HB27-LNP 可导致更长的循环半衰期（约为 2 倍）。在对小鼠进行一次预防性注射给药后 1 d、7 d 甚至 63 d，皆可保护小鼠免受 SARS-CoV-2 的攻击。且在密切接触传播模型中，mRNA-HB27-LNP 能够以剂量依赖的方式

预防 SARS-CoV-2 在仓鼠之间的感染。该结果突显了基于单抗的 mRNA 通用平台对于新冠肺炎以及其他各种传染病的预防和治疗潜力。

Lu 等^[60]利用鼻腔给药的方式评估了两种广谱中和抗体 (F61 和 H121) 对野生型及多种突变株感染小鼠的保护效果。结果显示 F61 的有效作用浓度为 200 TCID₅₀, 而 F61/H121 抗体“鸡尾酒”为 1 000 TCID₅₀。此外, 低剂量抗体治疗对 Delta 和 Omicron 突变株的致死率具有显著预防性保护作用, 同时 F61/H121 抗体“鸡尾酒”对 Omicron 的感染显示出良好的中和效果。Zhang 等^[61]在恢复期患者血浆中筛选到了能同时与野生型 SARS-CoV-2、Omicron BA.1 和 BA.2 结合的抗体组合 (58G6 和 55A8)。体外实验证明该抗体“鸡尾酒”表现出协同中和活性, 通过鼻腔给药的方式, 可有效阻断小鼠体内 Omicron 突变株的复制。鼻喷式中和抗体药物可用于 Omicron 突变株以及未来可能出现的突变株的防治, 具有广阔的临床应用前景。

4 靶向 SARS-CoV-2 纳米抗体

通过构建和筛选纳米抗体文库是目前获得纳米抗体的主要方式。纳米抗体文库包括天然纳米抗体文库、合成/半合成纳米抗体文库以及免疫纳米抗体文库, 其中免疫纳米抗体文库最常见^[62]。基于骆驼科动物的纳米抗体是病毒中和和抗体的重要候选对象之一, 驼源纳米抗体文库分为羊驼纳米抗体文库和骆驼纳米抗体文库。软骨鱼类, 尤其是鲨鱼, 目前也有用于制备靶向 SARS-CoV-2 纳米抗体的报道。由于纳米抗体强大的物理化学性质, 使其可以实现吸入给药, 在对抗呼吸道病毒方面具有应用前景^[6]。对目前正在研究靶向 SARS-CoV-2 的纳米抗体进行了归纳分类 (表 2)。

4.1 天然纳米抗体文库

为了能够筛选到高亲和力的纳米抗体, 要求天然抗体文库的大小一般要达到 10^9 – 10^{10} CFU。结合体外抗体技术, 如 DNA 重组、PCR 和随机突变, 可以增加互补决定区 (complementarity determining regions, CDRs) 的多样性, 以及纳米抗体的特异性和亲和力。

Huo 等^[63]利用天然羊驼抗体文库筛选得到 2 个能够与 RBD 结合并阻断 RBD 与 ACE2 相互作用的纳米抗体 (H11-D4 和 H11-H4, 图 7), 并发现它们与 IgG-Fc 结构域融合后可以提高其中和 SARS-CoV-2 病毒的能力, H11-H4-Fc 和 H11-D4-Fc 的 IC_{50} 分别为 61 nmol/L 和 161 nmol/L。成功建立了一种从天然抗体文库筛选到亲和成熟并且成功鉴定的快速途径, 为应对 SARS-CoV-2 病毒逃逸提供了新的可能性。Lu 等^[64]通过筛选天然纳米抗体文库, 得到 2 个靶向 S 蛋白 (Nb82-hFc 和 Nb91-hFc)、2 个靶向 RBD (Nb91-hFc 和 Nb3-hFc)、1 个既能靶向 S 蛋白又能靶向 RBD (Nb35-hFc) 的纳米抗体。假病毒中和实验表明 Nb91-hFc 和 Nb3-hFc 中和 SARS-CoV-2 的 IC_{50} 分别为 54.07 nmol/L 和 32.36 nmol/L。与单价纳米抗体相比, 三价 Nb91-hFc 和 Nb3-hFc 的 IC_{50} 值分别为 4.89 nmol/L 和 4.70 nmol/L, 较单价抗体分别提高了 11.06 倍和 6.88 倍, 证明了多价纳米抗体的中和能力更强。该研究同样证明了天然抗体文库可以作为一种潜在的资源, 用于快速获得和开发抗病毒纳米抗体。

4.2 合成/半合成纳米抗体文库

合成/半合成文库不需要动物免疫或大量血液样本, 但抗体文库的大小及多样性会影响纳米抗体的开发。由于没有传统 IgG 中可变重链/可变轻链配对的多样性, 骆驼的亲合成熟在

更大程度上依赖于体细胞的高突变性。合成/半合成文库利用精确调整 CDR 区以识别任何特

定的抗原,产生足够多样化的文库,能够产生针对任何特定抗原的纳米抗体。

表 2 抗新冠病毒纳米抗体

Table 2 Nanobodies against SARS-CoV-2

Library types	Nanobodies	Binding affinity(nmol/L)	IC_{50} (nmol/L)	Types of virus	References
Native nanobody library	H11-H4	12.00	N.A.	—	[63]
	H11-D4	39.00	N.A.		
	H11-H4-Fc	5.00	N.A.		
	H11-D4-Fc	18.00	N.A.		
	Nb3-hFc	N.A.	32.36	Pseudovirus	
	Tri-Nb3-hFc	N.A.	4.70	SARS-CoV-2 WT	
	Nb91-hFc	N.A.	54.07		
	Tri-Nb91-hFc	N.A.	4.89		
Synthesis/semi-synthesis nanobody library	Nb6	0.45	3 300.00	Live virus	[65]
	Nb6-tri	<0.001	0.16	SARS-CoV-2 WT	
	mNb6-tri	<0.001	0.054		
	1B-3F-2A-Fc	0.095	3.00	Pseudovirus	
	3F-1B-2A-Fc	0.047	6.44	SARS-CoV-2 WT	
Immune nanobody library (camel-derived)	Ty1	9.00	54.00	Pseudovirus	[68]
	Ty1-Fc	N.A.	0.84	SARS-CoV-2 WT	
	VHH E	1.86	48.00	Live virus	[69]
	VHH U	21.40	185.00	SARS-CoV-2 WT	
	VHH V	8.92	142.00		[70]
	VHH W	22.20	81.00		
	MR3	1.00	26.67	Pseudovirus	[72]
	Nb21	<0.10	0.02	SARS-CoV-2 WT	
	Nb89	0.11	0.15	Live virus	[73]
	Nb105	N.A.	5.07	SARS-CoV-2 WT	
	Nb17	5.59	0.60	Pseudovirus	[74-75]
	Bi-Nb17	<0.10	0.08	Live virus	
	Tri-Nb17	N.A.	0.02	Omicron	[77]
	aRBD-2-Fc	7.96	2.68		
	aRBD-5-Fc	N.A.	N.A.		
	aRBD-7-Fc	N.A.	N.A.		
	aRBD-2-5-Fc	0.17	6.45		
	aRBD-2-7-Fc	<0.10	28.95		
Immune nanobody library (shark-derived)	3B4	17.20	11.50	Live virus	[77]
	2C02	63.00	0.84	SARS-CoV-2 WT	
	4C10	49.50	0.61		

N.A. means no experimental data.

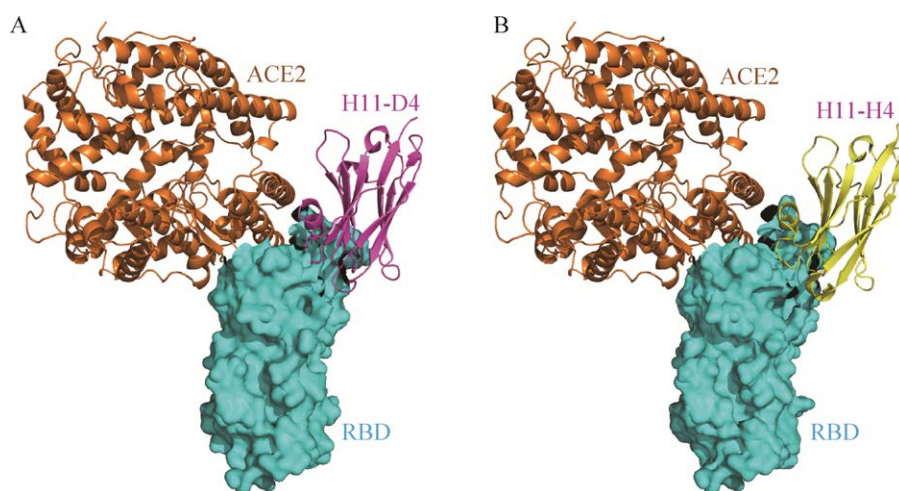


图7 H11-D4 和 H11-H4 与 RBD 结合表位分析

Figure 7 RBD-binding epitope analysis of H11-D4 and H11-H4 with RBD. (A) Structural superposition of H11-D4/RBD (PDB: 6YZ5) and ACE2/RBD (PDB: 6M0J) complex. (B) Structural superposition of H11-H4/RBD (PDB: 6ZBP) and ACE2/RBD (PDB: 6M0J) complex. The surface of the RBD structure is shown in cyan. ACE2 is shown in orange. H11-D4 and H11-H4 are shown in magenta and chartreuse, respectively.

Schoof 等^[65]通过酵母表面展示技术,在人工合成的抗体文库中鉴定出可阻断 S 蛋白与 ACE2 相互作用的纳米抗体,并在此基础上设计了二价和三价的纳米抗体,发现与单价抗体相比,多价抗体显著提高了对 SARS-CoV-2 的抑制作用。三价纳米抗体 (mNb6-tri) 通过与 S 蛋白结合,直接封闭结合部位和将 RBD 锁定为非活性构象来阻止 ACE2 结合 (图 8)。尽管到目前为止已经发现了许多其他抗 SARS-CoV-2 S 蛋白的单克隆抗体和纳米抗体,但很少有比 mNb6-tri 更加稳定和高效的。因此,高稳定性、有效性和多样化的表位结合提供了一种独特的潜在预防和治疗策略,可以有效限制新冠肺炎大流行的持续伤亡。Dong 等^[66-67]利用天然文库构建了合成抗体文库,筛选得到抗 SARS-CoV-2 人源化驼源纳米抗体。通过与 SARS-CoV-2 S 蛋白的结合实验筛选出了 69 个特异性纳米抗体,发现这些纳米抗体不仅可以与 S 蛋白结合,其中 15 个纳米抗体还可以阻止 S 蛋白与细胞表面 ACE2 受体结合,有效抑制了 SARS-CoV-2

的感染。将这些纳米抗体与人 IgG-Fc 结合后,显著提高了其抑制 SARS-CoV-2 感染细胞的作用。该研究证明使用人源化纳米抗体可以克服传统多克隆抗体和单克隆抗体联合治疗的局限性。

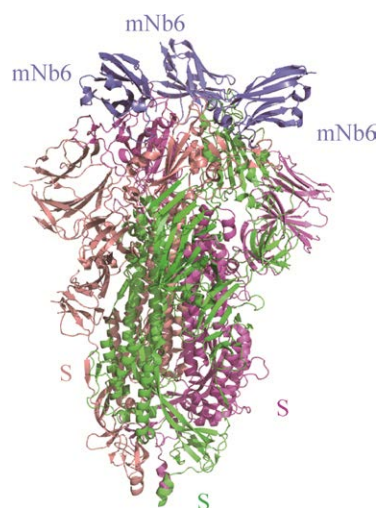


图8 SARS-CoV-2 S 蛋白与 mNb6 复合物结构图
Figure 8 Diagram of SARS-CoV-2 S protein-mNb6 complex (PDB: 7KKK). S protein trimers are shown in green, magenta, and pink, respectively. mNb6 antibody is shown in blue.

4.3 免疫纳米抗体文库

免疫抗体文库通常是对数个免疫对象进行数次免疫后利用噬菌体展示等技术建立的抗体文库。免疫文库的大小通常为 10^7 CFU 左右, 从中筛选到的纳米抗体具有特异性和高亲和力, 亲和力可以达到 nmol/L 甚至 pmol/L 水平^[62]。但是对于免疫对象在免疫过程中患病和死亡的风险, 以及个体之间免疫的自然差异等都将使构建免疫抗体文库进一步复杂化。

4.3.1 免疫驼源纳米抗体文库

Hanke 等^[68]利用 SARS-CoV-2 的 S 蛋白和 RBD 对羊驼进行免疫, 成功筛选并鉴定了 1 个来自羊驼的纳米抗体 Ty1。Ty1 特异性靶向 RBD 并以高亲和力结合 RBD, 阻断了 RBD 与 ACE2 的结合, 起到了封闭 ACE2 的作用 (图 9A)。病毒中和实验表明 Ty1 中和 SARS-CoV-2 的 IC_{50} 为 54 nmol/L。同时 Ty1 可以在细菌中大量表达, 为大规模生产提供了机会。因此, Ty1 是干预新冠肺炎的一个很好的候选者。Koenig 等^[69]用 SARS-CoV-2 RBD 和 SARS-CoV-2 的灭活病毒分别对羊驼和骆驼进行免疫, 成功构建了驼源纳米抗体文库。通过噬菌体展示技术筛选到 23 个纳米抗体, 通过 ELISA 技术发现其中 10 个可以与 RBD 相结合, 通过 X 射线衍射和冷冻电子显微镜分析确定了 RBD 上与纳米抗体的结合位点, 证明了多价纳米抗体可以增强对 SARS-CoV-2 的中和作用。Li 等^[70]从驼源纳米文库中得到的纳米抗体 MR3 与 RBD 的亲和力常数低至 1.0 nmol/L, 且对于 SARS-CoV-2 假病毒有较高的中和活性 (IC_{50} =0.40 μ g/mL)。研究发现通过连接序列将单价纳米抗体聚合转换成多价或多特异性的纳米抗体可以进一步改善纳米抗体活性 (IC_{50} =12 ng/mL), 比如提高亲和力、延长半衰期等^[71]。Xiang 等^[72]通过蛋白质组学等手段鉴定出大量针对 SARS-

CoV-2 RBD 的高效中和性纳米抗体, 并通过将纳米抗体进行串联, 发现二价、三价纳米抗体与单价抗体相比能够更高效地抵抗病毒。通过 Schoof 和 Xiang 的两项研究发现, 三价纳米抗体经过冻干和雾化后仍具有同等的抗病毒活性, 使其可以制备成喷雾剂, 临床上通过吸入即可抵抗病毒。相对于传统的注射药物, 鼻吸入的方式具有极大的便利性。Xu 等^[73]从美洲骆驼中分离出抗 RBD 的纳米抗体, 从羊驼、单峰骆驼和双峰骆驼中通过设计、克隆得到类似纳米抗体, 得到了两组具有高度中和活性的纳米抗体。其中一组通过识别高度保守且很少被人源抗体靶向的 RBD 区域来抑制病毒突变; 另一组则针对 RBD-ACE2 交界面表位, 对于携带 E484K 或 N501Y 位点突变的病毒株不具有中和作用, 但该同源三聚体纳米抗体则保持了对所有突变株良好的中和活性。该研究表明了多价纳米抗体可以通过两种不同的机制克服 SARS-CoV-2 的突变, 即增加对 ACE2 的亲和力以及识别人类抗体无法识别的保守表位。

笔者团队利用 RBD 免疫羊驼, 用噬菌体展示技术鉴定了 7 个具有高稳定性的 RBD 特异性纳米抗体, 与 RBD 的亲和力 K_D 为 2.6–113 nmol/L, 其中 6 个能够阻断 RBD-ACE2 相互作用。通过与人 IgG-Fc 融合后显著提高了与 RBD 结合的亲和力以及对 RBD-ACE2 的阻断能力。此外, 构建的两个非重叠表位的二价纳米抗体 (aRBD-2-5、aRBD-2-7) 具有比单价纳米抗体更好地与 RBD 的结合亲和力 (K_D 值分别为 0.059 nmol/L 和 0.250 nmol/L)^[74]。aRBD-2-5-Fc 和 aRBD-2-7-Fc 对 5 种 VOCs 均表现出极佳的中和活性, 其中 aRBD-2-5-Fc 中和 Beta、Delta 和 Omicron 突变株的 IC_{50} 约为 5.98–9.65 ng/mL。晶体结构解析结果显示 (图 9B), aRBD-2 抗体结合在 RBM 上一保守表位, 使其与包括 Omicron 突变株在

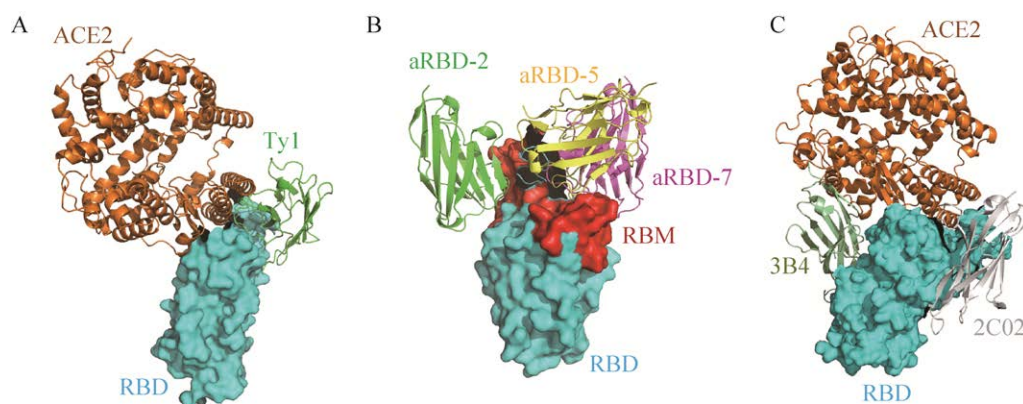


图9 部分免疫纳米抗体与 RBD 结合表位分析

Figure 9 RBD-binding epitope analysis of representative immune nanobodies with RBD. (A) Structural superposition of Ty1/RBD (PDB: 6ZXN) and ACE2/RBD (PDB: 6M0J) complex. (B) Structural superposition of aRBD-2, aRBD-5, aRBD-7 nanobodies with RBD complex. (C) Structural superposition of 3B4/RBD (PDB: 7SPO) and 2C02/RBD (PDB: 7SPP) with ACE2/RBD (PDB: 6M0J) complex. The surface of the RBD structure is shown in cyan. ACE2 is shown in orange. Ty1, aRBD-2, aRBD-5, aRBD-7, 3B4 and 2C02 are shown in green, bright green, yellow, magenta, light green and gray, respectively.

内的所有 VOCs 均具有结合活性。基于这种良好的中和活性，利用小鼠动物模型评价了 aRBD-2-5-Fc 的抗病毒能力。在 1 mg/kg 剂量下，aRBD-2-5-Fc 完全抑制了 SARS-CoV-2 原始株感染小鼠的体重下降和死亡，对于感染 Omicron 突变株同样具有保护作用^[75]。综上所述，与 RBD 保守表位结合的二价纳米抗体对所有测试的 SARS-CoV-2 突变株呈现广谱的中和活性，有望将其应用于新冠肺炎的预防与治疗。尽管新的 SARS-CoV-2 突变株可能将继续出现，但纳米抗体是在疫苗失效时预防新冠肺炎导致的危重症甚至死亡的有力工具。

4.3.2 免疫鲨源纳米抗体文库

在当前的新冠肺炎大流行中，鲨鱼可变区 VNAR 可以提供一种可行的替代传统单抗用于治疗新冠肺炎的方法。Gauhar 等^[76]利用噬菌体展示技术从护士鲨免疫抗体文库中鉴定到 56 个对 SARS-CoV-2 S 蛋白表现出高亲和力和

特异性的纳米抗体，其中 10 个能够阻断 SARS-CoV-2 RBD 和 N501Y 突变株 RBD 与 ACE2 的相互作用。体外细胞感染实验也证实了这 10 个纳米抗体具有中和 SARS-CoV-2 活病毒的能力（其中 6ID10_5、6ID10_6、3ID10_99 等 6 个对病毒的中和效率超过 90%），为鲨源纳米抗体作为现有抗体用于治疗新冠肺炎的辅助手段提供了理论依据。Ubah 等^[77]从噬菌体展示文库中筛选鉴定了 3 个针对 SARS-CoV-2 RBD 的鲨源纳米抗体（3B4、2C02 和 4C10），皆能够有效中和假病毒以及 SARS-CoV-2 活病毒，其有效性可与二价、多价驼源纳米抗体以及传统的单克隆抗体相媲美。如图 9C，3B4 和 2C02 的晶体 X 射线衍射分辨率分别为 1.92 Å 和 1.96 Å，显示它们识别 RBD 的不同表位，且都不与 ACE2 受体界面重叠，具有不同的病毒中和机制，并强调了鲨源纳米抗体中和 SARS-CoV-2 突变株的可能性。该研究支持了鲨源纳

米抗体针对已知疾病和未来可能新发疾病的潜在应用。

5 总结与展望

从 2019 年底至今, 新冠肺炎的迅速传播已造成全球超 620 万人死亡。不仅导致了全球性的卫生健康危机, 还严重影响了全球经济的持续发展, 所有国家和地区的人们都将面对与 SARS-CoV-2 长期共存和抗争的客观事实。目前单克隆抗体药物主要适用于轻症和普通型患者, 而对于重症和危重症患者的疗效并不明显, 因此需要在感染早期用药。另外单克隆抗体药物使用剂量大, 生产成本低, 也将成为下一步需要考虑的问题。病毒的不断突变也使目前的抗体药物面临着诸多挑战, 例如多个处于临床试验的单抗药物对 Omicron 等突变株均失去不同程度的中和活性。因此应加快广谱性中和抗体药物的研发, 这是应对还在不断突变的病毒的有效手段。

对目前的研究进展整理发现, 靶向 SARS-CoV-2 的纳米抗体大多来源于免疫动物为羊驼、骆驼的驼源纳米抗体文库。驼源纳米抗体分子量小 (约 15 kDa), 可以与抗原发生特异性反应, 溶解力强且具备极强的稳定性和重折叠能力, 可以识别传统抗体通常无法获得的表位从而避免病毒免疫逃逸。笔者团队针对保守表位制备的广谱性中和纳米抗体对包括 Omicron 在内的突变株均具有较好中和活性, 有望应用于新冠肺炎的预防与治疗, 对于全球范围内抵抗此次疫情具有重大意义。

REFERENCES

- [1] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [2] Corti D, Purcell LA, Snell G, et al. Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. *Cell*, 2021, 184(12): 3086-3108.
- [3] Corey L, Gilbert PB, Juraska M, et al. Two randomized trials of neutralizing antibodies to prevent HIV-1 acquisition. *N Engl J Med*, 2021, 384(11): 1003-1014.
- [4] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [5] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-173.
- [6] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 775-797.
- [7] 严昊, 冯建远, 张子仪, 等. 纳米抗体的制备与临床应用研究进展. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(2): 685-694. Yan H, Feng JY, Zhang ZY, et al. Progress in preparation and clinical application of nanobody. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2021, 48(2): 685-694(in Chinese).
- [8] Sheng YM, Wang K, Lu QZ, et al. Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 35.
- [9] Sun ZC, Lv JW, Liu X, et al. Development of a nanobody-AviTag fusion protein and its application in a streptavidin-biotin-amplified enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A in cereal. *Anal Chem*, 2018, 90(17): 10628-10634.
- [10] Delfin-Riela T, Rossotti MA, Echaides C, et al. A nanobody-based test for highly sensitive detection of hemoglobin in fecal samples. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(2): 389-396.
- [11] Muyldermans S. Applications of nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci*, 2021, 9: 401-421.
- [12] 陆湛, 符兆胤, 黄志卫, 等. SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 冠状病毒研究进展. *分子影像学杂志*, 2020, 43(1): 174-178. Lu Z, Fu ZY, Huang ZW, et al. Research progress of SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2. *J Mol Imaging*, 2020, 43(1): 174-178 (in Chinese).
- [13] Xu XT, Chen P, Wang JF, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 457-460.
- [14] Wu AP, Peng YS, Huang BY, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus

- (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(3): 325-328.
- [15] Dai LP, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(2): 73-82.
- [16] Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221-236.
- [17] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 2020, 181(2): 281-292.e6.
- [18] Du LY, He YX, Zhou YS, et al. The spike protein of SARS-CoV—a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(3): 226-236.
- [19] Shang J, Wan YS, Luo CM, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *PNAS*, 2020, 117(21): 11727-11734.
- [20] Kim MH, Kim HJ, Chang J. Superior immune responses induced by intranasal immunization with recombinant adenovirus-based vaccine expressing full-length spike protein of middle east respiratory syndrome coronavirus. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0220196.
- [21] Peng Y, Du N, Lei YQ, et al. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *EMBO J*, 2020, 39(20): e105938.
- [22] Chen RE, Zhang XW, Case JB, et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nat Med*, 2021, 27(4): 717-726.
- [23] Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in south Africa. *Nature*, 2021, 592(7854): 438-443.
- [24] Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by south African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*, 2021, 27(4): 622-625.
- [25] Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, 2021, 596(7871): 276-280.
- [26] Iketani S, Liu LH, Guo YC, et al. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature*, 2022, 604(7906): 553-556.
- [27] Cao YL, Yisimayi A, Jian FC, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature*. 2022, 608(7923): 593-602.
- [28] Zhang LZ, Jackson CB, Mou HH, et al. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6013.
- [29] Wan YS, Shang J, Graham R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol*, 2020, 94(7): e00127-e00120.
- [30] Chen P, Nirula A, Heller B, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with covid-19. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 229-237.
- [31] Jones BE, Brown-Augsburger PL, Corbett KS, et al. The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 2021, 13(593): eabf1906.
- [32] Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2021, 325(7): 632-644.
- [33] Shi R, Shan C, Duan XM, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, 584(7819): 120-124.
- [34] Baum A, Fulton BO, Wloga E, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*, 2020, 369(6506): 1014-1018.
- [35] Hansen J, Baum A, Pascal KE, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science*, 2020, 369(6506): 1010-1014.
- [36] Haskologlu IC, Erdag E, Sayiner S, et al. Melatonin and REGN-CoV2 combination as a vaccine adjuvant for Omicron variant of SARS-CoV-2. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(5): 4061-4068.
- [37] Merison T, Goldman A, Bomze D. Subcutaneous REGN-COV antibody combination to prevent Covid-19. *N Engl J Med*, 2021, 385(20): e70.
- [38] Loo YM, McTamney PM, Arends RH, et al. The SARS-CoV-2 monoclonal antibody combination, AZD7442, is protective in nonhuman primates and has an extended half-life in humans. *Sci Transl Med*, 2022, 14(635): eabl8124.
- [39] Dong JH, Zost SJ, Greaney AJ, et al. Genetic and structural basis for SARS-CoV-2 variant neutralization by a two-antibody cocktail. *Nat Microbiol*, 2021, 6(10): 1233-1244.
- [40] VanBlargan LA, Errico JM, Halfmann PJ, et al. An

- infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat Med*, 2022, 28(3): 490-495.
- [41] Cathcart AL, Havenar-Daughton C, Lempp FA, et al. The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent *in vitro* and *in vivo* activity against SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2021, DOI:10.1101/2021.03.09.434607.
- [42] Kreuzberger N, Hirsch C, Chai KL, et al. SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021: 9(9): CD013825.
- [43] Ryu DK, Kang BB, Noh H, et al. The *in vitro* and *in vivo* efficacy of CT-P59 against Gamma, Delta and its associated variants of SARS-CoV-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 578: 91-96.
- [44] Ryu DK, Song RN, Kim M, et al. Therapeutic effect of CT-P59 against SARS-CoV-2 south African variant. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 566: 135-140.
- [45] Yuan M, Zhu X, He WT, et al. A broad and potent neutralization epitope in SARS-related coronaviruses. *PNAS*, 2022, 119(29): e2205784119.
- [46] Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, et al. Efficacy of antibodies and antiviral drugs against covid-19 Omicron variant. *N Engl J Med*, 2022, 386(10): 995-998.
- [47] Cameroni E, Bowen JE, Rosen LE, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature*, 2022, 602(7898): 664-670.
- [48] Mannar D, Saville JW, Zhu X, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant: antibody evasion and cryo-EM structure of spike protein-ACE2 complex. *Science*, 2022, 375(6582): 760-764.
- [49] Shah M, Woo HG. Omicron: a heavily mutated SARS-CoV-2 variant exhibits stronger binding to ACE2 and potentially escapes approved COVID-19 therapeutic antibodies. *Front Immunol*, 2022, 12: 830527.
- [50] Quandt J, Muik A, Salisch N, et al. Omicron BA.1 breakthrough infection drives cross-variant neutralization and memory B cell formation against conserved epitopes. *Sci Immunol*, 2022 Jun 2; eabq2427.
- [51] Kaku CI, Bergeron AJ, Ahlm C, et al. Recall of pre-existing cross-reactive B cell memory following Omicron BA.1 breakthrough infection. *Sci Immunol*, 2022: 2022May12; eabq3511.
- [52] Nuralai R, Zhou DM, Tuekprakhon A, et al. Potent cross-reactive antibodies following Omicron breakthrough in vaccinees. *Cell*, 2022, 185(12): 2116-2131.e18.
- [53] Tian XL, Li C, Huang AL, 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.
- [54] Ju B, Zhang Q, Ge JW, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 2020, 584(7819): 115-119.
- [55] Ge JW, Wang RK, Ju B, et al. Antibody neutralization of SARS-CoV-2 through ACE2 receptor mimicry. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 250.
- [56] Liu LH, Iketani S, Guo YC, et al. Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*, 2022, 602(7898): 676-681.
- [57] 单思思, 王若珂, 张绮, 等. 安巴韦单抗注射液 (BRII-196) 及罗米司韦单抗注射液 (BRII-198) ——中国首个自主知识产权新冠病毒中和抗体联合治疗药物. *中国医药导刊*, 2022, 24(1): 2-8.
- Shan SS, Wang RK, Zhang Q, et al. China's first approved novel neutralizing antibody combination therapy against SARS-CoV-2——BRII-196/BRII-198. *Chin J Med Guide*, 2022, 24(1): 2-8(in Chinese).
- [58] Zou J, Li L, Zheng PY, et al. Ultrapotent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 with a high degree of mutation resistance. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e154987.
- [59] Deng YQ, Zhang NN, Zhang YF, et al. Lipid nanoparticle-encapsulated mRNA antibody provides long-term protection against SARS-CoV-2 in mice and hamsters. *Cell Res*, 2022, 32(4): 375-382.
- [60] Lu J, Yin QL, Pei RJ, et al. Nasal delivery of broadly neutralizing antibodies protects mice from lethal challenge with SARS-CoV-2 delta and Omicron variants. *Virology*, 2022, 37(2): 238-247.
- [61] Zhang XH, Luo FY, Zhang HJ, et al. A cocktail containing two synergetic antibodies broadly neutralizes SARS-CoV-2 and its variants including Omicron BA.1 and BA.2. *bioRxiv*, 2022, DOI:10.1101/2022.04.26.489529.
- [62] Liu WS, Song HP, Chen Q, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol*, 2018, 96: 37-47.
- [63] Huo JD, Le Bas A, Ruza RR, et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(9): 846-854.

- [64] Lu QZ, Zhang ZL, Li HX, et al. Development of multivalent nanobodies blocking SARS-CoV-2 infection by targeting RBD of spike protein. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 33.
- [65] Schoof M, Faust B, Saunders RA, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive spike. *Science*, 2020, 370(6523): 1473-1479.
- [66] Dong JB, Huang B, Wang B, et al. Development of humanized tri-specific nanobodies with potent neutralization for SARS-CoV-2. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17806.
- [67] Dong JB, Huang B, Jia ZJ, et al. Development of multi-specific humanized llama antibodies blocking SARS-CoV-2/ACE2 interaction with high affinity and avidity. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 1034-1036.
- [68] Hanke L, Vidakovics Perez L, Sheward DJ, et al. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4420.
- [69] Koenig PA, Das H, Liu HJ, et al. Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. *Science*, 2021, 371(6530): eabe6230.
- [70] Li TT, Cai HM, Yao HB, et al. A synthetic nanobody targeting RBD protects hamsters from SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4635.
- [71] Hultberg A, Temperton NJ, Rosseels V, et al. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. *PLoS One*, 2011, 6(4): e17665.
- [72] Xiang YF, Nambulli S, Xiao ZY, et al. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. *Science*, 2020, 370(6523): 1479-1484.
- [73] Xu JL, Xu K, Jung S, et al. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. *Nature*, 2021, 595(7866): 278-282.
- [74] Ma H, Zeng WH, Meng XZ, et al. Potent neutralization of SARS-CoV-2 by hetero-bivalent alpaca nanobodies targeting the spike receptor-binding domain. *J Virol*, 2021, 95(10): e02438-20.
- [75] Ma H, Zhang XH, Zheng PY, et al. Hetero-bivalent nanobodies provide broad-spectrum protection against SARS-CoV-2 variants of concern including Omicron. *Cell Res*, 2022, DOI:10.1038/s41422-022-00700-3.
- [76] Gauhar A, Privezentzev CV, Demydchuk M, et al. Single domain shark VNAR antibodies neutralize SARS-CoV-2 infection *in vitro*. *FASEB J*, 2021, 35(11): e21970.
- [77] Ubah OC, Lake EW, Gunaratne GS, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 neutralization by shark variable new antigen receptors elucidated through X-ray crystallography. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7325.

(本文责编 郝丽芳)