

应对新冠病毒新变种挑战: 病毒侵染机制 及纳米抗体进展

彭新宇 李欣 万方*

(内蒙古农业大学, 生命科学学院, 呼和浩特 010010)

摘要 SARS-CoV-2新变种的持续出现对中和抗体药物研发提出了挑战。组合多种抗体是保持抗体中和活性的一种可行策略。抗体的组合可采用多种特异性不同的抗体结构域融合形成一种多特异性抗体, 或应用多种抗体的混合物(鸡尾酒)。纳米抗体具有研发快速、生产成本低、稳定性好、适于做成多特异性抗体或鸡尾酒, 适于呼吸道局部给药等优点。为给新纳米抗体研发提供信息, 该文总结了SARS-CoV-2侵染过程中刺突蛋白的主要宿主细胞受体及受体辅助因子在其中的作用及研究进展。同时简介了SARS-CoV-2在侵染过程中对各种宿主蛋白酶的利用, 概述了其在病毒感染过程中的作用。最后, 总结了目前发表的中和SARS-CoV-2的纳米抗体。

关键词 新冠病毒; 蛋白酶; 受体辅助因子; 中和纳米抗体

Responding to the Challenge of New Variants of SARS-CoV-2: Virus Infection Mechanisms and Advances in Nanobodies

PENG Xinyu, LI Xin, WAN Fang*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China)

Abstract At present, the research and development of new SARS-CoV-2 drugs have focused on new mutants, and a cocktail of multivalent antibodies or several antibodies in neutralizing antibodies has a better probability of inhibiting the new mutants from infecting cells. In the research and development of multivalent antibodies, nanobodies have become one of the hot spots in research and development due to their advantages of rapid research and development, low production cost, good stability, and suitability for local administration in the respiratory tract. In order to provide information for the development of new antibodies, this article summarized the main receptors and receptor cofactors of the spike protein during SARS-CoV-2 infection. At the same time, this article introduced the utilization of various host proteases by SARS-CoV-2 during infection, describes their roles in the process of virus infection. Finally, this article summarized the currently published nanobodies that neutralize SARS-CoV-2, in order to provide a reference for new drug development and epidemic control of SARS-CoV-2.

Keywords SARS-CoV-2; protease; receptor cofactors; neutralizing nanobody

由严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)引起的冠状病毒肺炎疫情(COVID-19)导致了全球经济和健康受到前所未有的冲击。而RNA病

毒在复制过程中因为缺乏聚合酶等校对机制, 所以更容易发生突变。突变产生的变异毒株可能拥有更为广泛的传播及致病能力。SARS-CoV-2自传播流行以来历经数次突变, 世界卫生组织目前将突变株分为关切变异株(variants of concern, VOCs)、关注变异株(variants of interest, VOIs)两大类, 其中VOCs包括Alpha(B.1.1.7)、Beta(B.1.351)、Gamma(P.1)、

收稿日期: 2022-03-13 接受日期: 2022-04-17

内蒙古“草原英才”基金资助的课题

*通讯作者。Tel: 13404813212, E-mail: fwan@imau.edu.cn

Received: March 13, 2022 Accepted: April 17, 2022

This work was supported by the Inner Mongolia “Grassland Talents” Fund

*Corresponding author. Tel: +86-13404813212, E-mail: fwan@imau.edu.cn

Delta(B.1.617.2)以及最新出现的Omicron(B.1.1.529)五个变异株。这些变异株在全球多个国家导致重大社区传播或多个COVID-19集群,随着时间的推移病例数量不断增加,造成了严重的健康卫生危机。

自Omicron毒株在2021年11月在南非首次发现以来,由于其强传染性和免疫逃逸能力,目前已经成为全球主要流行毒株。研究发现,与D614G毒株相比,Omicron株的刺突蛋白上有32处突变,其中在受体结合域(receptor binding domain, RBD)上有15处突变,这些突变使现有的疫苗及治疗性抗体对Omicron株的有效性大打折扣。对于疫苗来说,接种两剂辉瑞或阿斯利康疫苗5个月后,个体的血清中和Delta株能力显著降低,这反映了体液免疫反应的减弱。但值得注意的是,这些血清对Omicron株几乎没有中和活性。在注射第三剂辉瑞加强针后一个月,接种个体的血清虽然能检测到对Delta及Omicron株的交叉中和活性,但与Delta株相比,对Omicron株的中和活性也下降了数倍。同时发现,感染后6或12个月恢复期个体的血清对Delta株的中和滴度保持稳定或略有下降,但几乎不中和Omicron。对感染12个月的恢复期个体补种辉瑞疫苗一个月后,其血清中对Delta株的中和抗体滴度显著提升,同时还能中和Omicron株,但与前者相比中和滴度下降了数十倍。这意味着曾感染过的患者以及接种两剂疫苗的个体都有感染Omicron的风险,即使是注射加强针也不能完全防止感染,但接种后仍会因为提高体内中和抗体滴度而受益^[1]。

研究人员通过对处于临床或研发阶段的20种单克隆抗体针对Omicron的研究表明,包括LY-CoV555(bamlanivimab)^[2]、CB6(etesevimab)^[3]、REGN10933(casirivimab)^[4]、REGN10987(imdevimab)^[4]、COV2-2196(tixagevimab)^[5]、COV2-2130(cilgavimab)^[5]、CT-P59(regdanvimab)^[6]、ADG20(adintrevimab)^[7]、Brii-196(amubarvimab)^[8]、910-30^[9]、DH1047^[10]、S2X259^[11]以及1-20、2-15、2-7、4-18、5-7和10-40^[12-14]在内的18种抗体对Omicron株部分或完全失去中和活性,只有葛兰素史克(GSK)与Vir Biotechnology公司合作开发S309(sotrovimab)^[15]和腾盛博药医药技术(北京)有限公司的BRII-198(romlusevimab)^[8]抗体对Omicron株保持着相对高效的中和活性。目前临床使用的四种联合单克隆抗体鸡尾酒疗法(REGN10933+REGN10987、COV2-2196+COV2-2130、LY-CoV555+CB6、Brii-

196+Brii-198)也都失去了实质性的中和能力^[16]。

在后续对Omicron的研究中,发现除了S309(sotrovimab)和BRII-198(romlusevimab)外,还有S2K146、S2X324、S2N28、S2X259和S2H97五种抗体也能在一定程度上中和Omicron。江西济民可信集团有限公司自主研发的广谱单抗JMB2002也展现出一定的中和活性^[17-18]。

上述研究结果表明,Omicron变异株通过刺突蛋白上的多位点突变极大地影响了疫苗和单克隆抗体的有效性。幸运的是,靶向更为保守病毒编码RNA聚合酶的小分子药物Molnupiravir以及靶向病毒编码蛋白酶的小分子Paxlovid仍然保持着抗病毒能力^[19],为抗击疫情提供了武器。由于RNA病毒的高突变速率,目前已出现BA.2 Omicron亚种,下一种SARS-CoV2突变株的出现几乎是必然的,对抗体药物开发提出了新的挑战。纳米抗体具有尺寸小、研发速度快、可吸入给药、稳定性好、亲和力高、易于构建多价体防止免疫逃逸的优势,是新抗体研发的热点之一。为给新药研发提供参考,本文介绍了有关SARS-CoV-2进入宿主细胞研究的最新发现,概括了病毒入胞途径的机制研究及相应蛋白酶利用过程,并对目前发表的中和SARS-CoV-2的纳米抗体相关信息进行归纳总结。

1 冠状病毒简介

冠状病毒是一类有囊膜包被的单股正链RNA病毒,属于套式病毒目(nidovirales)冠状病毒科(coronaviridae)冠状病毒属(coronavirus),可感染鸟类及哺乳动物。冠状病毒囊膜表面有三种糖蛋白:刺突糖蛋白(spike protein, S protein)、小包膜糖蛋白(envelope protein, E protein)、膜糖蛋白(membrane protein, M protein),少数种类还有血凝素糖蛋白(haemagglutinin-esterase protein, HE protein),囊膜内部有包裹着病毒RNA基因组的螺旋状核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N protein)。国际病毒分类委员会将冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 和 δ 四个种属。 α 和 β 属主要感染哺乳动物,而 γ 和 δ 属则主要感染禽鸟类。目前已知的能感染人体的七种冠状病毒均属于 α 和 β 属^[20]。其中包括会引起普通感冒的4种轻度致病性冠状病毒:人冠状病毒229E(human coronavirus 229e, HCoV 229E)、人冠状病毒NL63(human coronavirus nl63, HCoV NL63)、人冠状病毒OC43(human coronavirus oc43, HCoV

OC43)、人冠状病毒HKU1(human coronavirus hku1, HCoV HKU1); 还包括可引起严重的急性呼吸综合征并且有较高致死率的3种中高致病性冠状病毒: 严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome associated coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)以及新出现的严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[21]。

自2019年12月确定SARS-CoV-2为新冠肺炎疫情病原体以来^[22-24], 截止到2022年2月14日, 世界卫生组织累计报告了全球有超过4.1亿确诊病例, 导致了全球超过500万人死亡(<https://covid19.who.int/>)。当前, 新冠肺炎疫情仍在全球大流行, 且新冠病毒正在经历突变后的自然选择过程, 在人类治疗及防疫措施的影响下, 有更广泛传播能力的突变株已然成为疫情扩散的主要源头^[25]。

SARS-CoV-2进入宿主细胞的主要受体是血管紧张素转化酶II(angiotensin converting enzyme2, ACE2)^[26-27], 随后的研究逐渐揭示了SARS-CoV-2进入宿主的其他关键因素。这些均可能成为治疗和疫苗开发策略的新靶点。

2 SARS-CoV-2与宿主受体之间的相互作用

2.1 SARS-CoV-2 S蛋白结构

病毒颗粒与宿主细胞表面受体结合是非包膜病毒和包膜病毒侵染宿主细胞共同的第一步。这一感染的早期阶段主要是由几个糖基化蛋白进行调控, 这些蛋白可以识别宿主细胞表面受体并进行锚定。在可感染人类的七种冠状病毒中, 病毒是通过表面S蛋白识别并结合宿主细胞表面受体, 并介导后续的病毒侵染^[28]。S蛋白是同源三聚体结构, 包含S1和S2两个亚基。S1亚基是三聚体的头部区, 主要包括与宿主细胞表面受体结合的受体结合结构域(receptor-binding domain, RBD), RBD的铰链样运动产生了两种不同的“封闭”和“开放”构象状态。其中“开放”构象代表向上的可以结合受体状态, “封闭”构象代表向下的不可结合受体状态; S2亚基包括一部分头部区和全部的杆状区, 包含融合肽FP、肽重复序列(hepeat repeat region, HR)等负责膜融合过程的基本元件^[29]。

在不同种冠状病毒中, S1亚基的序列相似性

比较小, 特别RBD差异明显, 冠状病毒也正是通过RBD的不同来识别不同受体。相反, 冠状病毒的S2区高度保守, 包含融合肽FP、两个肽重复序列HR1(hepeat repeat region 1, HR1)和HR2、跨膜区TM以及胞内区CT等负责膜融合过程的基本元件。在对SARS-CoV和SARS-CoV-2的氨基酸序列进行的研究中也发现, 二者S蛋白的氨基酸序列同源性约为76%, 且RBD的保守型(64%)低于S2融合区(90%)^[27]。目前所开发的抗体多以RBD为靶, 而RBD突变率高因而易导致抗体对病毒突变株失活。如能靶向较为保守的S2区的HR1或HR2则可获得对多种冠状病毒有效的药物, 但限于这一区域的空间位阻, 经典抗体不能进入, 多肽药物已有靶向HR1的成功例子如EK1C4^[30]。

2.2 SARS-CoV-2结合的主要受体ACE2

尽管SARS-CoV和SARS-CoV-2使用相同的ACE2受体进行结合和进入宿主细胞, 但二者S蛋白对ACE2亲和力却不相同。SARS-CoV-2 S的RBD相对于SARS-CoV S的RBD对ACE2表现出了更高的亲和力($K_D=14.7$ nmol/L), Cryo-EM结构也表明前者RBD与ACE2的相互作用更为广泛^[27,31-32]。但随后的研究发现, 全长的SARS-CoV-2 S蛋白对比SARS-CoV S蛋白却表现出了类似或较弱的亲和力^[33]。Cryo-EM分析也表明, SARS-CoV-2 S相对于SARS-CoV S和MERS-CoV S具有更大比例的封闭构象^[34]。先前对SARS-CoV S和MERS-CoV S的结构分析发现两者RBD“封闭”和“开放”构象状态存在平衡^[35], 那么SARS-CoV-2 S的RBD与ACE2亲和力更高但全长S蛋白亲和力却相对降低的一种猜测就是其RBD可能隐藏在封闭构象中, 导致RBD从“封闭”构象状态变换为“开放”构象状态有更多的限制条件。随后在SARS-CoV-2 S蛋白的S1和S2亚基交界处发现了独特的酶切位点也证实了上述猜测, 这段数个碱性氨基酸序列被Furin酶等前蛋白转化酶家族成员切割后可以更好地暴露S蛋白的RBD并使S1、S2亚基分离, 使其转化为具有融合能力的状态^[36]。

Cryo-EM和晶体结构研究阐明了SARS-CoV-2高亲和力的机制。对比SARS-CoV-2 RBD-ACE2复合物与SARS-CoV RBD-ACE2复合物的晶体结构, 发现二者的RBD都与ACE2的肽酶结构域(peptidase domain, PD)相互结合使病毒颗粒锚定到宿主细胞上, 但SARS-CoV-2 RBD在与ACE2-PD的 $\alpha 1$ 螺旋区

结合处发生了多个氨基酸的突变。在ACE2-PD的 $\alpha 1$ 螺旋的N末端区发生了Arg⁴²⁶→Asn⁴³⁹、Tyr⁴⁸⁴→Gln⁴⁹⁸和Thr⁴⁸⁷→Asn⁵⁰¹替换；在螺旋的中间部分变化为Val⁴⁰⁴→Lys⁴¹⁷、Tyr⁴⁴²→Leu⁴⁵⁵、Leu⁴⁴³→Phe⁴⁵⁶、Phe⁴⁶⁰→Tyr⁴⁷³、Asn⁴⁷⁹→Gln⁴⁹³；在 $\alpha 1$ 的C末端，SARS-CoV-RBD中的Leu⁴⁷²被SARS-CoV-2-RBD中的Phe⁴⁸⁶取代。这些氨基酸的突变中一部分会增强RBD与ACE2的相互作用，例如Val⁴⁰⁴在突变成Lys⁴¹⁷以后会加强和ACE2的盐桥作用，而Leu⁴⁷²突变成Phe⁴⁸⁶后则会增强范德华作用。但其中有些氨基酸的改变也会降低两者的亲和力，例如Arg⁴²⁶被替换成Asn⁴³⁹以后则会损失ACE2的相关Asp³²⁹位点的盐桥作用^[37-38]。这些氨基酸残基的突变似乎导致了SARS-CoV-2的高亲和力以及SARS-CoV-2特异性的RBD抗体药物在应对SARS-CoV-2的感染治疗中几乎没有作用。

2.3 SARS-CoV-2结合的其他受体辅助因子

在冠状病毒的感染过程中，决定病毒感染和进入宿主细胞的并不是单一受体与S蛋白结合，而是需要靶细胞中的多个蛋白参与。这些蛋白在病毒传播过程中同样有着重要作用，例如增强病毒颗粒对宿主细胞的附着和进入能力。我们在定义病毒受体时的首要标准为是否可以在体外实验中与病毒蛋白直接发生相互作用且诱导病毒蛋白发生构象变化，但有些蛋白可能会帮助病毒定位和进入，却不在感染过程中发挥决定性作用，所以称为辅助受体(co-receptor)^[39]。目前，ACE2仍然被公认为是SARS-CoV-2的唯一主要受体。值得注意的是，SARS-CoV-2会造成严重的肺部感染，但ACE2在肺部的表达水平并不是很高。因此，研究人员猜测存在一些辅助受体帮助病毒颗粒进入宿主细胞。到目前为止，已被证实确有几种辅助受体促进病毒侵染。在这里，我们列举了几个重要的辅助受体并概述了它们在SARS-CoV-2感染过程中的作用。

2.3.1 CD147 在HCoV 229E、HCoV NL63和SARS-CoV等病毒的感染过程中，CD147已被证实可以促进病毒侵染宿主细胞，且CD147-拮抗肽-9对SARS-CoV侵染具有明显的抑制作用^[40-42]。随后对于CD147在SARS-CoV-2感染过程中的作用研究发现，CD147与SARS-CoV-2 S-RBD之间存在相互作用，敲低CD147的表达水平或加入CD147抑制剂可以显著抑制SARS-CoV-2入侵宿主细胞。同时CD147可以作为ACE2缺陷型细胞中SARS-CoV-2感染的替代

受体，SARS-CoV-2通过其介导的内吞作用进入宿主细胞。这些研究表明，CD147作为辅助受体为SARS-CoV-2感染提供了更多入口，并在病毒感染过程中发挥潜在作用，尤其是在ACE2缺陷细胞类型中^[43]。

2.3.2 NRP1 SARS-CoV-2同时还与一种名为神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1, NRP1)的细胞表面蛋白受体结合，这种受体在肺细胞和嗅觉细胞中都大量表达，在内皮细胞中表达水平最高。研究发现，在几乎没有内源表达ACE2和NRP1的HEK293T细胞中，过表达ACE2会显著增强SARS-CoV-2假病毒的感染能力，过表达NRP1几乎不影响SARS-CoV-2假病毒的感染程度，但NRP1与ACE2和跨膜丝氨酸蛋白酶2(transmembrane serine proteinase 2, TMPRSS2)共表达时却显著增强了病毒的感染能力。同时在内源性表达ACE2的Caco-2细胞中，NRP1的过表达增加了假病毒的感染程度。这些结果表明，NRP1虽然不是主要受体，但可以在其他宿主蛋白存在的条件下加强病毒的感染能力，NRP1的结合过程促进了SARS-CoV-2的进入以及病毒S蛋白和ACE2受体之间的关键联动。利用免疫共沉淀等方法发现，NRP1是直接与SARS-CoV-2 S蛋白相结合，通过小分子抑制剂或单克隆抗体阻断这种相互作用可以显著降低SARS-CoV-2感染程度。同时，这种相互作用也会随着SARS-CoV-2 S上多碱基位点的突变而消失，这表明NRP1增强SARS-CoV-2侵染的过程依赖于S蛋白上独特的多碱基水解位点^[44]。

此外，在对COVID-19死亡患者尸检中获得的嗅觉上皮的病理分析中也发现，SARS-CoV-2感染了鼻腔内表达NRP1的细胞，甚至在少突胶质细胞转录因子2(oligodendrocyte transcription factor 2, OLIG2)阳性的细胞中也观察到SARS-CoV-2感染。OLIG2主要由嗅觉神经元祖细胞表达，这些神经元祖细胞在我们丧失嗅觉时(例如SARS-CoV-2感染导致)可以重建鼻子和大脑的轴突，因此这个重建通路可能也可被SARS-CoV-2利用来入侵神经系统^[45]。

2.3.3 KIM1 在COVID-19患者肾脏中鉴定出SARS-CoV-2表明其具有肾组织嗜性。在肾损伤时显著上调的肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1, KIM1)与RBD的亲和力和ACE2相当，其Ig V域与SARS-CoV-2 S蛋白的RBD结合帮助病毒附着在细胞膜上。使用KIM1衍生的多肽、单克隆抗体等都可以有效抑制SARS-CoV-2的感染。KIM1和ACE2

在病毒RBD上具有不同的结合位点, 这表明KIM1可能与ACE2协同介导SARS-CoV-2的感染。一种猜测是, SARS-CoV-2感染初期ACE2成为病毒结合的主要目标, 但结合的ACE2可在多个组织中表达。在病毒诱导的急性肾损伤发作后, KIM1表达水平上调促进了由KIM1和ACE2共同介导的继发性病毒感染, 后者更具肾脏特异性, 从而以恶性循环的方式加剧肾脏损伤。ACE2是SARS-CoV-2研究最主要的受体, 但它不是COVID-19的理想治疗靶点, 因为它在多个器官中广泛表达, 并且在调节血压和预防心肾损伤方面起着至关重要的作用。相比之下, KIM1与肾功能的关联性更强, 由于KIM1仅在肾损伤后高表达, 这使得它更具特异性, 也可能成为COVID-19患者更安全的治疗靶点^[46-47]。

2.3.4 AXL 在对肺和支气管细胞中与SARS-CoV-2 S相互作用的蛋白质复合物进行研究时, 研究人员发现, 酪氨酸蛋白激酶受体UFO(AXL)与SARS-CoV-2的S蛋白存在特异性的相互作用, AXL结合SARS-CoV-2 S蛋白的N-端结构域而不是RBD。在HEK293T细胞中, AXL过表达与ACE2过表达同样可以促进SARS-CoV-2感染。下调AXL水平, 可以显著减少SARS-CoV-2对肺细胞的感染。在表达高水平AXL的细胞中, 可溶性人类重组AXL显著减弱了SARS-CoV-2感染。这些发现表明, AXL可能是肺和支气管上皮细胞中SARS-CoV-2的辅助受体, 因为AXL在人肺或气管中的表达水平远高于ACE2^[48]。

2.3.5 TfR 转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)也被证实是影响SARS-CoV-2进入的另一受体。通过免疫组化分析发现, TfR在感染SARS-CoV-2的猴子和人源化ACE2(hACE2)小鼠的肺组织中上调。同时发现TfR和SARS-CoV-2之间存在体外直接相互作用, 且SARS-CoV-2感染Vero E6细胞后, 在细胞膜和细胞质中观察到TfR和SARS-CoV-2的共定位信号^[49]。这表明TfR是SARS-CoV-2的一种膜受体。重要的是, 在被病毒感染的细胞中, 在细胞膜上观察到了TfR、ACE2和SARS-CoV-2的共定位, 但在细胞质中仅观察到TfR-SARS-CoV-2复合物的共定位和TfR-ACE2-SARS-CoV-2复合物的共定位, 未观察到ACE2-SARS-CoV-2复合物, 这表明SARS-CoV-2是被TfR从细胞膜转运到细胞质中的。加入根据TfR设计的抗体和多肽等在体外和体内均能阻断SARS-CoV-2感染。这些结果表明, TfR是SARS-CoV-2感

染的另一辅助受体^[49]。

2.3.6 HSPG 硫酸肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)也可促进病毒侵染宿主细胞^[50]。先前的研究表明, HCoV-NL63病毒附着和感染靶细胞需要病毒颗粒与硫酸乙酰肝素的结合, HSPG可作为HCoV-NL63的附着受体^[51]。同时HSPG在SARS-CoV早期附着阶段也为病毒入侵提供了结合位点^[52]。对于SARS-CoV-2, 最近基于表面等离子共振和圆二色性光谱等方法, 证实了SARS-CoV-2 S蛋白与HSPG存在相互作用, 且在结合后引起了S蛋白构象转变为有利于结合ACE2的“开放”构象, 进而增强了RBD与ACE2受体的结合能力^[53]。重要的是, SARS-CoV-2 S与宿主细胞进行结合需要HSPG和ACE2的共同参与。这些发现表明, HSPG是SARS-CoV-2感染过程中的必要辅助受体, 促进S蛋白与ACE2的相互作用^[54]。

2.3.7 C型凝集素DC-SIGN和L-SIGN DC-SIGN和L-SIGN是同源C型凝集素受体, DC-SIGN表达在树突状细胞表面, L-SIGN表达在肝窦和淋巴结的内皮细胞^[55]。前期研究表明, SARS-CoV S假病毒可以与DC-SIGN和L-SIGN结合, 二者虽然增强SARS-CoV S假病毒颗粒的感染程度但并不依赖于这些凝集素进入细胞, 提示其在SARS-CoV的感染过程中并不是主要受体^[56]。最近的研究发现, SARS-CoV-2 S蛋白RBD可以结合DC-SIGN和L-SIGN, 两者的外源性表达都可以增强SARS-CoV-2假病毒感染程度。这些结果表明, C型凝集素DC-SIGN和L-SIGN作为辅助受体在SARS-CoV-2感染过程中同样发挥着重要作用^[57]。

3 SARS-CoV-2进入宿主细胞途径及相应蛋白酶利用

SARS-CoV-2通过膜融合和内吞作用两种方式进入宿主细胞, 这两种途径都依赖于病毒结合受体后宿主蛋白酶的加工过程。首先在膜融合途径中, 不同于其他冠状病毒的是, SARS-CoV-2 S蛋白的S1亚基和S2亚基交界处存在一段独特P-R-R-A-R碱性氨基酸插入序列, 这段序列可被Furin酶等前蛋白转化酶(proprotein convertases, PCs)家族成员识别切割, 敲除这段序列或加入蛋白酶抑制剂后膜融合程度显著降低。这提示该段序列可能调控病毒的入胞。同时发现在S2亚基上存在TMPRSS2和其他胰蛋白酶(trypsin)类蛋白酶的切割位点, 这两个切割位点在SARS-CoV-2进入宿主细胞的过程中也发挥着重要

作用^[58-60]。目前认为膜融合途径中,首先发生的是在S蛋白与受体ACE2结合后S1/S2亚基交界处的启动切割,也就是Furin酶等前蛋白转化酶在P-R-R-A-R处所介导的水解作用,实现了S1亚基和S2亚基的解离并使S蛋白转换到具有融合能力的构象。然后TMPRSS2或其他蛋白酶在S2亚基位点上的切割活化了S蛋白并激活位于S2亚基上的融合肽FP使其插入到宿主细胞膜内,S2亚基上的两个七肽重复序列HR1和HR2发生结构重排,形成反向6螺旋束,最终介导了病毒囊膜和宿主细胞膜的膜融合过程。该途径更直接高效,被称为早期入胞途径^[61]。

在内吞途径中,SARS-CoV-2依赖网格蛋白介导的胞吞(clathrin-mediated endocytosis)进入细胞。S蛋白与受体ACE2结合后,ACE2分子发生磷酸化和构象改变,与连接蛋白2(adaptor protein 2, AP-2)形成复合物,进而结合网格蛋白(clathrin)和其他辅助蛋白分子形成网格蛋白包被外壳,随后复合物向膜凹陷处集中,在发动蛋白(dynamin)的帮助下,形成内部有完整病毒颗粒的闭合囊泡并通过内吞形成早期内体。待到晚期内体时,在酸性环境(pH5.0~6.0)和组织蛋白酶B/L(cathepsin B/L, CatB/L)作用下,启动病毒囊膜-晚期内体膜融合过程,释放病毒基因进入细胞质进行后续病毒复制,该途径更为依赖胞内CatB/L表达水平且相对滞后,故称晚期入胞途径^[33,62]。

SARS-CoV-2的早期和晚期入胞途径与细胞组织所表达蛋白酶水平有关,由此看来蛋白酶是导致新冠大流行的SARS-CoV-2感染过程的核心,抑制一种蛋白酶,甚至是TMPRSS2这样的优势蛋白酶,可能不足以阻止新冠病毒进入细胞。因此研究人员将目光转移至其他参与SARS-CoV-2感染过程的宿主蛋白酶。TANG等^[60]发现,S1/S2处切割对于随后S2亚基通过TMPRSS2进入Calu-3细胞(早期入胞途径模型肺上皮细胞系,表达TMPRSS2和非常低水平的组织蛋白酶L)至关重要,但对于S2通过组织蛋白酶进入Vero-E6细胞(晚期入胞途径模型细胞系,表达组织蛋白酶L但不表达TMPRSS2)不是必需的。同时在通过添加不同蛋白酶抑制剂作用比对照后发现Furin酶可能不是唯一负责切割S1/S2亚基的蛋白酶,切割过程还有其他前蛋白转化酶家族成员参与。LAPORTE等^[63]对18种人类II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP)在SARS-CoV-2感染过程中的作用进行了研究,发现除了TMPRSS2是一种高效且广泛的

S蛋白激活剂外,TMPRSS13也在其中发挥着一定作用,是TTSPs家族成员中第二种有效激活剂。另外,组织蛋白酶B和L已被证实与SARS-CoV-2 S蛋白的切割过程有关^[26],但BOLLAVARAM等^[64]的研究同时发现,组织蛋白酶K、S和V这三种与组织蛋白酶B/L有高度序列同源性的蛋白酶可能同样在这一切割过程中发挥着作用。由于多种蛋白酶参与了这一过程,抑制单一蛋白酶如TMPRSS2不具有足够抗病毒活性,我们认为或可通过在抗体药物中加入酶切割的S蛋白片段来起到竞争性抑制膜融合过程的作用。

4 针对新冠病毒的中和纳米抗体

病毒入侵人体后,会利用细胞大量复制,不断攻击人体各器官,触发免疫反应,甚至引起机体死亡。中和抗体指的是病毒侵染过程中,免疫系统受到外来病毒入侵刺激时产生的可以和病毒颗粒结合并阻止病毒继续感染细胞,把病毒“中和”掉的抗体。中和抗体可直接靶向病毒的中和表位,使病毒失去结合受体的能力。中和抗体可以通过从病人恢复期血浆中分离出单个B细胞,再利用基因工程技术在体外大量进行抗体表达。除了常规抗体外,骆驼科动物会产生一种缺失轻链的重链抗体(heavy chain antibody, hcAb),仅包含一个可变结构域(VHH)和两个常规的CH2和CH3区,是目前得到的可结合抗原且具有稳定、完整功能的最小抗体,相对分子质量只有12~15 kDa,是常规抗体的十分之一左右,也称为单结构域抗体、VHH或纳米抗体(nanobody)^[65]。VHH具有免疫原性低、水溶性高、亲和力高、稳定性强、人源化简单、易于生产和改造设计、给药方式多样等优点,结合了单克隆抗体的理想特性和小分子药物的一些特性^[66-67]。我们对目前发表的可高效中和新冠病毒的纳米抗体相关序列、亲和力以及中和活性进行总结,并在下文对其相关信息进行介绍,希望为SARS-CoV-2抗病毒制剂的研发提供参考(表1)。

早在2020年4月,WRAPP等^[68]发表了一篇关于新冠病毒纳米抗体研发的重要论文。他们在羊驼体内找到了多种可在体外实验中有效中和SARS-CoV、Mers-CoV以及新冠病毒的纳米抗体,其中的VHH72可与SARS-CoV、WIV1-CoV和SARS-CoV-2的RBD发生交叉反应,它可广泛地结合

表1 纳米抗体总结
Table 1 Nanobody summary

名称 Name	序列 Sequence	亲和力及抗病毒能力 Affinity and antiviral ability
VHH-72	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEYAMGWFRQAPGKEREFVA-TISWSGGSTYYTDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPDDTAVYYCAAA-GLGTVVSEWDYDYDYWGQGTQVTVSSGS	$K_D=39$ nmol/L; $IC_{50}=0.2$ μ g/mL (VHH-72-Fc)
n3088		$K_D=3.7$ nmol/L; $IC_{50}=2.6$ μ g/mL
n3130		$K_D=56.4$ nmol/L; $IC_{50}=4.0$ μ g/mL
H11-D4	QVQLVESGGGLMQAGGSLRLSCAVSGRTFSTAAMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGSSAYYADSVKGRFTISRDKAKNTVYLLQMNLSLKYEDTAVYY-CARTENVRSLSDYATWPYDYWGQGTQVTVSSKHHHHHHH	$K_D=39$ nmol/L; $IC_{50}=18$ nmol/L (H11-D4-Fc)
H11-H4	QVQLVESGGGLMQAGGSLRLSCAVSGRTFSTAAMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGSSAYYADSVKGRFTISRDKAKNTVYLLQMNLSLKYEDTAVYY-CAQTHYVSYLLSDYATWPYDYWGQGTQVTVSSKHHHHHHH	$K_D=12$ nmol/L; $IC_{50}=4-6$ nmol/L (H11-D4-Fc)
Ty1	QVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVYMNWVRQAPGKGPWEVWS-RISPNSGNIGYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTALYY-CAIGLNLSSSSVRGQGTQVTVSS	$K_D=5-10$ nmol/L; $IC_{50}=54$ nmol/L
sb23	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFPVESENMHWYRQAPG-KEREWVAIYSTGGWTLYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNLSLKPED-TAVYYCAVQVGYWYEGQGTQVTVS	$K_D=10.6$ nmol/L; $IC_{50}=0.6$ μ g/mL
nb21	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGLGAHRVGVFRAPGKEREFVAAL-GANGGNTNYLDSVKGRFTISRDNKNTIYLQMNLSLKPQDTAVYYCAARDI-ETAETTYWGQGTQVTVSS	$K_D<1$ pmol/L; $IC_{50}=0.022$ nmol/L
nb6	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIFGRNAMGWYRQAPGKERELVA-GITRRGSITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNLSLKPEDTAVYYCAAD-PASPAPGDYWGQGTQVTVSS	$K_D=41$ nmol/L; $IC_{50}=2$ μ mol/L
NIH-CoVnb-112	DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTLDYYAIGWFRQAPG-KEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNLSLKPED-TAVYYCAAYPSTYYSGTYYYTCHPGGMDYWGKGTQVTVSS	$K_D=2-5$ nmol/L; $EC_{50}=0.323$ μ g/mL
Nb11-59	CDR3: APSQTYGGSWYWDPIGD	$K_D=21.6$ nmol/L; $ND_{50}=0.55$ μ g/mL
Nb16-68	CDR3: AAPAGGTCSHSRAFGY	$K_D=36.3$ nmol/L; $ND_{50}=2.2$ μ g/mL
MR3	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFPVNAHFMYWYRQAPG-KEREWVAIYSYGRITLYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNLSLKPED-TAVYYCNVKDYGAASWEYDYWGQGTQVTVS	$K_D=1$ nmol/L; $IC_{50}=0.4$ μ g/mL
C5	QVQLVESGGGSVQAGGSLTSCVASGVTLGRHAIGWFRQAPGKERERV-SCIRTFDGTISYVESTKGRFTISSNNAMNTVYLLQMNLSLKPEDTAVYFCAL-GVTAACSDNPYFWGQGTQVTVSSKHHHHHHH	$K_D=99$ pmol/L; C5 trimer: $NT_{50}=0.02$ nmol/L (for Victoria-BVIC01); $NT_{50}=0.025$ nmol/L (for Alpha-B.1.1.7)
H3	MAQVQLVESGGGLVKTGGSLRLSCAASGRTFSTYSMGWFRQAPGKEREFVAGMRWTGSSTFYSDSVKGRFTVSRNNAKDTVYLLHMNSLKPEDTAVYY-CAITIVRAYYTEYTEADFGSWGQGTQVTVSSKHHHHHHH	$K_D=25$ pmol/L; H3 trimer: $NT_{50}=0.4$ nmol/L (for Victoria-BVIC01); $NT_{50}=0.61$ nmol/L (for Alpha-B.1.1.7)
C1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNDFYSIAWFRQAPG-KEREGVSWLSVSDNTPTYVDVSKDRFTISRHNANNTVYLLQMNMLKPED-TAIYYCAAGRFAGRDTWPSSYDYWGQGTQVTVSSKHHHHHHH	$K_D=615$ pmol/L; C1 trimer: $NT_{50}=4.9$ nmol/L (for Victoria-BVIC01); $NT_{50}=8.2$ nmol/L (for Alpha-B.1.1.7); $NT_{50}=4.5$ nmol/L (for Beta-B.1.351)

续表1

名称 Name	序列 Sequence	亲和力及抗病毒能力 Affinity and antiviral ability
F2	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLACIASGRTFHSHYVMAWFRQAPGKERE- FVAAISWSSTPTYYGESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNRLKPEDTAVYF- CAADRGESYYYTRPTEYEFWQGQTQVTVSSKHHHHHHH	$K_D=40$ pmol/L
Nb1	CDR1: GRIFEVTWM CDR2: ISRGGGT CDR3: HQTVLTSVEWEGYD	Nb1-Nb2-Fc: $K_D < 1 \times 10^{-12}$ mol/L (for Omicron); $IC_{50}=1.46$ μ g/mL (for Omicron)
Nb2	CDR1: GRILAVFVM CDR2: ITHGGTT CDR3: DLDYNVYFHPYWQLYD	

SARS-CoV样病毒并阻断受体结合界面。但VHH72与SARS-CoV-2 RBD解离常数过高因而中和能力偏低,在改造成二价Fc融合蛋白后,可高效中和SARS-CoV-2假病毒。由于这一抗体是用SARS-CoV、MERS-CoV作为抗原产生的,其所结合的表位或在多个病毒中具有保守性,因此可能对多种病毒变种均有结合力。

WU等^[69]从天然人源抗体库(健康成人血液捐献所构建)中克隆出重链互补决定区域CDR1、CDR2和CDR3,对其骨架区进行筛选重构后设计出了基于天然胚系基因的全人源纳米抗体库,进而筛选出靶向SARS-CoV-2 S蛋白RBD的多株纳米抗体。值得关注的是,其中两株抗体n3088和n3130,它们可结合SARS-CoV-2 S RBD的隐藏表位,对SARS-CoV-2有高效的中和活性且可与其他抗体联用进一步增强中和能力。随后该团队报道的全人源单抗CR3022也被证实可结合这类隐藏表位^[70]。CR3022是迄今为止发现的最广谱的冠状病毒单抗之一。这提示该表位有可能在新冠病毒的感染过程中发挥着至关重要的作用,靶向该表位的中和纳米抗体也可能具有较好的广谱性。

HUO等^[71]利用天然的羊驼抗体库和PCR技术获得了两个纳米抗体H11-D4和H11-H4,它们都可与SARS-CoV-2 S蛋白结合,靶向的RBD表位与ACE2结合区域紧密相邻且有部分重叠。这种表位重叠使其可以在细胞实验中阻断SARS-CoV-2 S蛋白与受体ACE2结合。两种纳米抗体与人IgG1的Fc片段融合后对于SARS-CoV-2都有显著的中和能力,与CR3022单抗联用还可以进一步增强中和能力。

HANKE等^[72]用SARS-CoV-2 S1-Fc和RBD免疫羊驼后筛选分离出一种纳米抗体Ty1,在利用SARS-

CoV-2假病毒进行的体外中和实验中,Ty1及构建的Ty1-Fc融合蛋白都有高效的中和活性。同时Ty1可结合RBD的“向上”和“向下”两种构象,可有效阻断RBD与ACE2的结合。其在细菌培养物中可以高产量(超过30 mg/L培养物)获得的特性也使其可成为低成本、可扩展研究的优秀抗SARS-CoV-2制剂候选者。

纳米抗体传统上是从免疫过的骆驼身上分离出来的,CUSTODIO等^[73]考虑到获得抗体的时效性和成本性,采用了更为快速、成本更低的合成纳米抗体库(sybodyes),筛选出几种可与ACE2竞争结合SARS-CoV-2 S蛋白RBD且可体外中和SARS-CoV-2假病毒的纳米抗体。其中Sb23展现出对RBD的高亲和力和高中和效力。低温冷冻电镜结果显示,在RBD的“向上”和“向下”两种构象中,Sb23结合在RBD与ACE2相互作用界面的内边缘,从而有效阻碍RBD与ACE2的结合。

美国匹兹堡大学医学院时毅教授团队^[74]用SARS-CoV-2 S蛋白免疫羊驼Wally后,利用自主研发的基于骆驼科动物免疫和全新的蛋白质组学纳米抗体平台技术,鉴定出大量对SARS-CoV-2 S蛋白RBD具有高亲和力的纳米抗体。通过进一步筛选、纯化和测试,发现了一些具有超级抗病毒能力的中和纳米抗体。其中Nb21与RBD结合亲和力为皮摩尔级,中和病毒的能力也极强。为了克服耐药性等影响对纳米抗体多聚化后展现出了更为优秀的抗病毒能力。重要的是,这些纳米抗体还具有极高的热稳定性,可用微生物大量生产,在经过冻干雾化后仍具有同等抗病毒能力,基于此抗体开发的吸入式雾化剂PiN-21(pittsburgh inhalable nanobody-21)在仓鼠体外病毒感染实验中被证明可有效防治SARS-CoV-2感染引起的重症^[75]。

SCHOOF等^[76]报道了超强纳米抗体Nb6, 它可破坏 SARS-CoV-2 S蛋白RBD和ACE2的相互作用。Cryo-EM结果显示, 单个Nb6结合后使S蛋白两个相邻的RBD稳定在“向下”状态, 并可能预先组织第二个和第三个Nb6分子的结合位点, 以稳定RBD的闭合构象, 使之不可结合ACE2受体。Nb6的亲力和中和能力在进行二聚化和三聚化后进一步提升, 尤其是三聚化后对 SARS-CoV-2 S蛋白RBD有着飞摩尔级的亲和力和皮摩尔级的中和作用, 且在雾化、冻干和热处理后仍保持高效的中和活性。

美国国立卫生研究院研究人员利用 SARS-CoV-2 S蛋白免疫羊驼后筛选出了13种纳米抗体, NIH-CoVnb-112在其中脱颖而出, 最具开发潜力。除了高亲和力外, 雾化前后的NIH-CoVnb-112在体外中和实验中都展现出结构完整性和高中和活性, 可为SARS-CoV-2的吸入式纳米抗体制剂开发提供重要参考^[77]。

GAI等^[78]利用噬菌体展示文库筛选出数十种具有阻断ACE2与RBD相互作用能力的纳米抗体, 然后通过对各项参数的综合评估缩小范围至7个候选Nbs, 分别为: Nb4-43、Nb11-59、Nb14-33、Nb15-61、Nb16-52、Nb16-68和Nb16-75, 它们不仅亲和力和中和能力优秀, 且产率高于20 mg/L, 可快速大量生产。而在这其中表现最好的是Nb16-68和Nb11-59, 它们在Vero-E6细胞中以剂量依赖性的方式中和SARS-CoV-2假病毒。在对表现出最好中和活性的Nb11-59进行人源化改造后发现, 其产量、稳定性和抗病毒能力没有降低, 雾化前后也依然保持稳定。基于Nb11-59研发的LQ050中和纳米抗体药物也已进入最后开发阶段, 为新冠病毒可吸入式的中和纳米抗体药物研发提供支持。

LI等^[79]所报道的纳米抗体MR3以高亲和力结合SARS-CoV-2 S RBD, 利用结晶实验和低温冷冻电镜等结构生物学方法发现RBD与ACE2的相互作用被其竞争性抑制。构建的融合体以及多价抗体可为仓鼠提供针对SARS-CoV-2的预防性保护并降低感染后的临床症状, 还可以降低感染组织中病毒RNA载量。

HUO等^[80]报道了四种纳米抗体C5、H3、C1、F2, 通过表面等离子共振技术分析它们与SARS-CoV-2 S蛋白RBD的结合动力学发现四种纳米抗体的 K_D 值均在皮摩尔范围内。其中C5和H3靶向RBD

上与H11-H4等纳米抗体相似的表位, 通过直接与ACE2竞争RBD结合位点来中和新冠病毒。而C1和F2会破坏S蛋白的稳定性从而阻止受体结合并中和新冠病毒。在体外中和实验中, 分别构建的C5、H3、C1三聚体和融合Fc片段后也同样展现出了皮摩尔级的中和能力, 最重要的是这种中和活性在仓鼠模型中可转化为显著的治疗效果。

2021年11月, 上海之江生物科技股份有限公司开发的大分子双抗药物SYZJ001完成全部临床前研究。SYZJ001由靶向SARS-CoV-2 S蛋白RBD的全人源IgG抗体分子和人源化纳米抗体分子P14-F8构成, 他们可分别结合RBD的不同抗原表位且互不竞争, 共同阻断RBD与ACE2受体的结合, 因而提升了中和效力且针对突变株可防止免疫逃逸。在多种抗体的比较研究中, P14-F8的数据表明其对几种新冠病毒突变株及其相应突变位点都未发生免疫逃逸(不包括omicron), 甚至对Delta毒株和Epsilon毒株的中和活性相比于原始野生株还有增强^[81]。

上述纳米抗体由于开发时间较早, Omicron毒株还未出现或还未开始全球大流行, 所以针对最新Omicron毒株的中和效果如何暂时没有数据公开表明。但在2022年2月, CHI等^[82]利用合成纳米抗体文库及噬菌体展示技术筛选出了共18个纳米抗体。其中三种纳米抗体Nb1、Nb2和Nb15在体外中和Alpha(B.1.1.7)、Beta(B.1.351)、Gamma(P.1)、Delta(B.1.617.2)等突变株假病毒实验时, 在0.33 $\mu\text{mol/L}$ 时表现出了交叉中和活性。构建的异源二聚体Nb1-Nb2对包括上述四种VOI突变株加上三种VOI突变株Lambda(C.37)、Kappa(B.617.1)、Mu(B.621)在内的共7种突变株RBD具有高亲和力和广泛的中和作用, IC_{50} 从0.003到0.0865 nmol/L不等。双互补位的Nb1-Nb2二聚体可以靶向两个不同的RBD表位并最大程度地减少病毒免疫逃逸。通过进一步将人IgG1 Fc区与二价Nb1-Nb2优化设计的四价Nb1-Nb2-Fc抗体在体外中和Omicron假病毒和Omicron真病毒实验中依然展现了强效的中和效力。这表明Nb1-Nb2-Fc是一种很有前途的临床开发候选药物, 可为优化COVID-19预防性和治疗性抗病毒药物提供替代方案。

5 总结与展望

本文首先综述了新型冠状病毒与宿主细胞相互作用的分子机制, 特别是宿主细胞表面受体、蛋

白酶与病毒间的相互作用。目前已知SARS-CoV-2的感染过程包括病毒结合细胞表面受体后, S蛋白被宿主细胞表面蛋白酶水解或是内吞后被细胞内部组织蛋白酶水解, 暴露了S蛋白上的融合肽, 融合肽形成6螺旋束(6-HB)后促使宿主细胞膜与病毒囊膜进行膜融合, 最后将病毒的RNA释放到宿主细胞的胞质内。尽管这一过程的复杂性使其看似低效, 然而通过结构生物学以及分子细胞生物学技术揭示了其高传染性的原因: RBD与ACE2受体之间的高度亲和力、SARS-CoV-2受体和蛋白酶利用的多样性以及S蛋白上独特的蛋白水解位点。

考虑到新冠病毒首先引起的呼吸道感染以及生产成本、药物生物利用度、给药方式等情况, 我们将目光放在了纳米抗体VHH上, 综述了我们检索到的所有优秀中和纳米抗体。这些抗体都靶向新冠病毒S蛋白的RBD, 阻断其与受体ACE2的结合, 从而起到中和病毒的作用, 这种中和方式靶向了病毒感染的第一步即病毒进入宿主细胞。然而, RBD是CoVs中区别最大的部分且极易突变, 虽然Nb的多聚化策略可以显著提高亲和力及中和效力, 但开发高效持久的广谱抗病毒制剂依然面临挑战。因此, 除了这种抑制病毒结合宿主细胞受体的方式外, 阻断病毒结合靶细胞后的膜融合过程成为另一种治疗方式。靶向这一过程中的宿主细胞蛋白酶(如TMRRSS2、组织蛋白酶等)以及S蛋白上负责膜融合元件的小分子化合物、抗体、多肽抑制剂等多种治疗方法也已被提出并在深入研究中。

通过对病毒进入宿主细胞的复杂性以及受体和蛋白酶利用多样性的了解, 我们认为仅仅使用一种药物来完全抑制感染似乎并不可行。更为重要的是, 世界各地新冠病毒突变株的出现也意味着有效的治疗手段需要更广泛的临床试验和监测。因此, 针对新冠病毒及其变种的抗病毒药物开发显然需要一个长期的策略。我们认为纳米抗体由于其分子量小、稳定性高、生产成本低、可做成气雾剂等优点, 是非常合适的抗新冠病毒新药形式。更为重要的是, 纳米抗体容易设计为靶向多个抗原表位的数种单域抗体的复合物, 令其有较高概率对新突变株仍能保持中和活性。基于纳米抗体的组合稳定性、有效性、抗原表位结合多样性等特点, 使其可为COVID-19的持续流行提供独特的潜在预防和治疗策略。

参考文献 (References)

- [1] PLANAS D, SAUNDERS N, MAES P, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 omicron to antibody neutralization [J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 671-5.
- [2] JONES B E, BROWN-AUGSBURGER P L, CORBETT K S, et al. The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(593): eabf1906.
- [3] SHI R, SHAN C, DUAN X, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 120-4.
- [4] HANSEN J, BAUM A, PASCAL K E, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail [J]. *Science*, 2020, 369(6506): 1010-4.
- [5] ZOST S J, GILCHUK P, CASE J B, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 443-9.
- [6] KIM C, RYU D K, LEE J, et al. A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 288.
- [7] RAPPAZZO C G, TSE L V, KAKU C I, et al. Broad and potent activity against SARS-like viruses by an engineered human monoclonal antibody [J]. *Science*, 2021, 371(6531): 823-9.
- [8] JU B, ZHANG Q, GE J, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection [J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 115-9.
- [9] BANACH B B, CERUTTI G, FAHAD A S, et al. Paired heavy- and light-chain signatures contribute to potent SARS-CoV-2 neutralization in public antibody responses [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(1): 109771.
- [10] LI D, EDWARDS R J, MANNE K, et al. *In vitro* and *in vivo* functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies [J]. *Cell*, 2021, 184(16): 4203-19.
- [11] TORTORICI M A, CZUDNOCHOWSKI N, STARR T N, et al. Broad sarbecovirus neutralization by a human monoclonal antibody [J]. *Nature*, 2021, 597(7874): 103-8.
- [12] LIU L, WANG P, NAIR M S, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike [J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 450-6.
- [13] CERUTTI G, GUO Y, WANG P, et al. Neutralizing antibody 5-7 defines a distinct site of vulnerability in SARS-CoV-2 spike N-terminal domain [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(5): 109928.
- [14] LIU L, IKETANI S, GUO Y, et al. Isolation and comparative analysis of antibodies that broadly neutralize sarbecoviruses [J]. *bioRxiv*, 2021, doi: 10.1101/2021.12.11.472236.
- [15] PINTO D, PARK Y J, BELTRAMELLO M, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-cov antibody [J]. *Nature*, 2020, 583(7815): 290-5.
- [16] LIU L, IKETANI S, GUO Y, et al. Striking antibody evasion manifested by the omicron variant of SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 676-81.
- [17] CAMERONI E, BOWEN J E, ROSEN L E, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 omicron antigenic shift [J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 664-70.
- [18] YIN W, XU Y, XU P, et al. Structures of the Omicron spike trimer with ACE2 and an anti-Omicron antibody [J]. *Science*, 2022, 375(6584): 1048-53.

- [19] LI P, WANG Y, LAVRIJSEN M, et al. SARS-CoV-2 omicron variant is highly sensitive to molnupiravir, nirmatrelvir, and the combination [J]. *Cell Res*, 2022, 32(3): 322-4.
- [20] CUI J, LI F, SHI Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-92.
- [21] YE Z W, YUAN S, YUEN K S, et al. Zoonotic origins of human coronaviruses [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(10): 1686-97.
- [22] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-33.
- [23] WU F, ZHAO S, YU B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in china [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-9.
- [24] CHAN J F, YUAN S, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 514-23.
- [25] TANG X, WU C, LI X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2 [J]. *Natl Sci Rev*, 2020, 7(6): 1012-23.
- [26] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ace2 and tmprss2 and is blocked by a clinically proven protease Inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-80.
- [27] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-em structure of the 2019-ncov spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-3.
- [28] WEISS S R, NAVAS-MARTIN S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(4): 635-64.
- [29] BELOUZARD S, MILLET J K, LICITRA B N, et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein [J]. *Viruses*, 2012, 4(6): 1011-33.
- [30] XIA S, LIU M, WANG C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-ncov) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion [J]. *Cell Res*, 2020, 30(4): 343-55.
- [31] TAI W, HE L, ZHANG X, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(6): 613-20.
- [32] SHANG J, YE G, SHI K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 581(7807): 221-4.
- [33] OU X, LIU Y, LEI X, et al. Author correction: characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-cov [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2144.
- [34] ZHOU T, TSYBOVSKY Y, GORMAN J, et al. Cryo-em structures of SARS-CoV-2 spike without and with ace2 reveal a ph-dependent Switch to mediate endosomal positioning of receptor-binding domains [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(6): 867-79.
- [35] YUAN Y, CAO D, ZHANG Y, et al. Cryo-em structures of, mers-cov and SARS-cov spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15092.
- [36] COUTARD B, VALLE C, de LAMBALLERIE X, et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-ncov contains a furin-like cleavage site absent in cov of the same clade [J]. *Anti-viral Res*, 2020, 176: 104742.
- [37] YAN R, ZHANG Y, LI Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ace2 [J]. *Science*, 2020, 367(6485): 1444-8.
- [38] LI F, LI W, FARZAN M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor [J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1864-8.
- [39] EVANS J P, LIU S L. Multifaceted roles of tim-family proteins in virus-host interactions [J]. *Trends Microbiol*, 2020, 28(3): 224-35.
- [40] VON BRUNN A, CIESEK S, VON BRUNN B, et al. Genetic deficiency and polymorphisms of cyclophilin a reveal its essential role for human coronavirus 229e replication [J]. *Curr Opin Virol*, 2015, 14: 56-61.
- [41] CARBAJO-LOZOYA J, MA-LAUER Y, MALESEVIC M, et al. Human coronavirus nl63 replication is cyclophilin a-dependent and inhibited by non-immunosuppressive cyclosporine a-derivatives including alisporivir [J]. *Virus Res*, 2014, 184: 44-53.
- [42] PFEFFERLE S, SCHOPF J, KOGL M, et al. The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(10): e1002331.
- [43] WANG K, CHEN W, ZHANG Z, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 283.
- [44] DALY J L, SIMONETTI B, KLEIN K, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection [J]. *Science*, 2020, 370(6518): 861-5.
- [45] YANG C, ZHANG Y, ZENG X, et al. Kidney injury molecule-1 is a potential receptor for SARS-CoV-2 [J]. *J Mol Cell Biol*, 2021, 13(3): 185-96.
- [46] MORI Y, FINK C, ICHIMURA T, et al. Kim-1/tim-1 is a receptor for SARS-CoV-2 in Lung and kidney [J]. *medRxiv*, 2022, doi: 10.1101/2020.09.16.20190694.
- [47] WANG S, QIU Z, HOU Y, et al. Axl is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 126-40.
- [48] TANG X, YANG M, DUAN Z, et al. Transferrin receptor is another receptor for SARS-CoV-2 entry [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.23.350348>.
- [49] CAGNO V, TSELIGKA E D, JONES S T, et al. Heparan sulfate proteoglycans and viral attachment: true receptors or adaptation bias [J]? *Viruses*, 2019, 11(7): 596.
- [50] MILEWSKA A, ZAREBSKI M, NOWAK P, et al. Human coronavirus nl63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells [J]. *J Virol*, 2014, 88(22): 13221-30.
- [51] LANG J, YANG N, DENG J, et al. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23710.
- [52] MYCROFT-WEST C, SU D, ELLI S, et al. The 2019 coronavirus (SARS-CoV-2) surface protein (spike) s1 receptor binding domain undergoes conformational change upon heparin binding [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.02.29.971093.
- [53] CLAUSEN T M, SANDOVAL D R, SPLIID C B, et al. SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2 [J]. *Cell*, 2020, 183(4): 1043-57.
- [54] CORMIER E G, DURSO R J, TSAMIS F, et al. L-sign (cd209l)

- and dc-sign (cd209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis c virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(39): 14067-72.
- [55] HAN D P, LOHANI M, CHO M W. Specific asparagine-linked glycosylation sites are critical for dc-sign and l-sign mediated severe acute respiratory syndrome coronavirus entry [J]. *J Virol*, 2007, 81(21): 12029-39.
- [56] AMRAEI R, YIN W, NAPOLEON M A, et al. Cd209/l-sign and cd209/dc-sign act as receptors for SARS-CoV-2 [J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(7): 1156-65.
- [57] JAIMES J A, ANDRE N M, CHAPPIE J S, et al. Phylogenetic analysis and structural modeling of SARS-CoV-2 spike protein reveals an evolutionary distinct and proteolytically sensitive activation loop [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(10): 3309-25.
- [58] EVANS J P, LIU S L. Role of host factors in SARS-CoV-2 entry [J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(1): 100847.
- [59] TANG T, JAIMES J A, BIDON M K, et al. Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike at the s1/s2 boundary: potential role of proteases beyond furin [J]. *ACS Infect Dis*, 2021, 7(2): 264-72.
- [60] HO M. Perspectives on the development of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 [J]. *Antib Ther*, 2020, 3(2): 109-14.
- [61] HEALD-SARGENT T, GALLAGHER T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence [J]. *Viruses*, 2012, 4(4): 557-80.
- [62] LAPORTE M, RAEYMAEKERS V, VAN BERWAER R, et al. The SARS-CoV-2 and other human coronavirus spike proteins are fine-tuned towards temperature and proteases of the human airways [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(4): e1009500.
- [63] BOLLAVARAM K, LEEMAN T H, LEE M W, et al. Multiple sites on SARS-CoV-2 spike protein are susceptible to proteolysis by cathepsins b, k, l, s, and v [J]. *Protein Sci*, 2021, 30(6): 1131-43.
- [64] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-8.
- [65] De VLIEGER D, BALLEGEER M, ROSSEY I, et al. Single-domain antibodies and their formatting to combat viral infections [J]. *Antibodies*, 2018, 8(1): 1.
- [66] DETALLE L, STOHR T, PALOMO C, et al. Generation and characterization of alx-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(1): 6-13.
- [67] WRAPP D, De VLIEGER D, CORBETT K S, et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies [J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1004-15.
- [68] WU Y, LI C, XIA S, et al. Identification of human single-domain antibodies against SARS-CoV-2 [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(6): 891-8.
- [69] 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): 382-5.
- [70] HUO J, LE BAS A, RUZA R R, et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike rbd and block interaction with ace2 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(9): 846-54.
- [71] HANKE L, VIDAKOVICS P L, SHEWARD D J, et al. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4420.
- [72] CUSTODIO T F, DAS H, SHEWARD D J, et al. Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5588.
- [73] XIANG Y, NAMBULLI S, XIAO Z, et al. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 [J]. *Science*, 2020, 370(6523): 1479-84.
- [74] NAMBULLI S, XIANG Y, TILSTON-LUNEL N L, et al. Inhalable nanobody (pin-21) prevents and treats SARS-CoV-2 infections in syrian hamsters at ultra-low doses [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(22): eabh0319.
- [75] SCHOOF M, FAUST B, SAUNDERS R A, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive spike [J]. *Science*, 2020, 370(6523): 1473-79.
- [76] ESPARZA T J, MARTIN N P, ANDERSON G P, et al. High affinity nanobodies block SARS-CoV-2 spike receptor binding domain interaction with human angiotensin converting enzyme [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 22370.
- [77] GAI J, MA L, LI G, et al. A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential [J]. *MedComm*, 2021, 2(1): 101-13.
- [78] LI T, CAI H, YAO H, et al. A synthetic nanobody targeting rbd protects hamsters from SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4635.
- [79] HUO J, MIKOLAJEK H, Le BAS A, et al. A potent SARS-CoV-2 neutralising nanobody shows therapeutic efficacy in the syrian golden hamster model of covid-19 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5469.
- [80] HASTIE K M, LI H, BEDINGER D, et al. Defining variant-resistant epitopes targeted by SARS-CoV-2 antibodies: a global consortium study [J]. *Science*, 2021, 374(6566): 472-8.
- [81] CHI X, ZHANG X, PAN S, et al. An ultrapotent rbd-targeted biparatopic nanobody neutralizes broad SARS-CoV-2 variants [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 44.