

· 平台与临床管理体系建设助力新冠肺炎疫情防控 ·

面向新冠肺炎疫情防控需求的应用基础研究

袁伦志^{1,2} 张天英^{1,2} 张 军^{1,2} 夏宁邵^{1,2*}

1. 厦门大学 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 厦门 361102
2. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361102

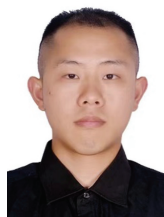
[摘 要] 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) 全球大流行导致的新冠肺炎疫情仍在持续, 不断进化的变异毒株谱系具有较强的免疫逃逸和突破性感染能力, 一系列新冠肺炎后遗症陆续被发现, 并可能在未来对人类社会造成严重的医疗负担。我国面临“外防输入、内防反弹”的巨大抗疫压力, 不仅需要全面统筹疫情防控和经济社会发展, 还需要积极为将来全面放开出入境限制做好科技储备。建立完备的疫情防控体系和群体免疫屏障, 研究和开发抗疫产品和科学技术, 进一步减少重症和死亡, 是保障人民生命健康、打赢抗疫“拉锯战”的法宝。厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心团队长期以来在国家自然科学基金项目的支持下, 形成了坚实的感染性疾病研究积累, 建立了系统的生物医药研究平台, 锻造了一支朝气蓬勃的科研创新团队; 面对复杂的疫情发展态势, 围绕“诊断、预防、治疗”三方面的防控产品需求, 在 SARS-CoV-2 检测技术体系、鼻喷流感病毒载体新冠疫苗和重组蛋白新冠疫苗、广谱中和抗体与小分子药物筛选、重症肺炎动物模型和致病机制等方面取得了一系列研究进展, 为我国疫情防控和公共卫生事业提供了重要的科技支撑。

[关键词] 新冠病毒; 新冠肺炎; 诊断; 创新疫苗; 治疗性抗体; 动物模型; 高通量药物筛选

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) 大流行引发的新型冠状病毒肺炎 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19; 简称新冠肺炎) 在全球肆虐已逾两年, 造成了难以估量的重大损失, 并将长期威胁人类健康。自新冠肺炎疫情暴发以来, 我国在疫情防控和保障人民生命健康上取得了举世瞩目的伟大成就。其中, 通过长期的基础研究积累形成的科技支撑力量在这次抗疫过程中发挥了重要的作用。SARS-CoV-2 是正链 RNA 病毒, 主要通过气溶胶形式传播, 具有广泛的宿主范围和组织嗜性, 除了感染人类, 还能感染猫、水貂、仓鼠、白尾鹿等动物, 在上下呼吸道均具有很高的易感性。突变毒株以及宿主的性别、年龄、人种、免疫状态、基础疾病等因素会影响 SARS-CoV-2 感染和 COVID-19 疾病严重程度, 病毒在人群中的突变进化规律、感染致病机制



夏宁邵 厦门大学教授、中国医学科学院学部委员、国家杰出青年科学基金获得者, 主要从事病毒学、疫苗学和分子诊断学研究以及疫苗、诊断试剂的研发, 主持研制并转化上市全球首个戊肝疫苗、首个国产 HPV 疫苗、全球首个艾滋抗体尿液自检试剂等创新产品。连续八年入选爱思唯尔 (Elsevier) 中国高被引学者, 曾获国家技术发明奖二等奖、国家科技进步奖二等奖、全国抗击新冠肺炎疫情先进集体、香港求是科技基金会“求是杰出科技成就集体奖”、转化医学杰出贡献奖, 两度入选 *Nature Biotechnology* 期刊评选出的全球转化研究人员前 20 榜单。



袁伦志 厦门大学助理教授, 主要从事人源化动物模型和感染性疾病动物模型创新研究, 主持研制肝脏和免疫系统双嵌合小鼠模型用于乙型肝炎病毒感染致病机制研究, 运用人肺嵌合小鼠模型和叙利亚金黄仓鼠模型开展新冠肺炎疫苗和治疗药物评价, 曾获全国抗击新冠肺炎疫情先进集体、浙江省科技进步奖一等奖。

收稿日期: 2022-06-30; 修回日期: 2022-08-01

* 通信作者, Email: nsxia@xmu.edu.cn

本文受到国家自然科学基金项目 (81991491) 的资助。

和宿主免疫应答及抗病毒模式也尚未完全阐明。开展系统深入的应用基础研究对于指导新冠肺炎的诊断、预防、治疗技术和药物的研发以及应用策略的制定具有重要意义。

厦门大学夏宁邵教授领衔的国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心团队(下文简称“厦大团队”)长期以来在国家自然科学基金委员会成体系支持下,在病毒学、疫苗学、医学检验技术、流行病学、免疫学、生物信息学、结构生物学等方面形成了坚实的研究积累,建立了以重大及新发突发感染性疾病动物模型、病原诊断、高通量药物筛选、疫苗和治疗药物研发为核心的生物医药研究平台,锻造了一支具有丰富的感染性疾病研究经验和实践技能的科研创新团队。厦大团队坚持面向新冠肺炎疫情防控需求开展应用基础研究,基于前期在感染性疾病研究领域的长期理论积累和技术平台,与香港大学、国家卫生健康委临床检验中心、深圳市第三人民医院、浙江大学医学院附属第一医院、厦门大学附属第一医院杏林分院、盐城市疾病预防控制中心、汕头大学等单位合作迅速开展科研攻关,在 SARS-CoV-2 检测技术体系、鼻喷流感病毒载体新冠疫苗、重组刺突蛋白新冠疫苗和新型佐剂、广谱中和抗体鸡尾酒疗法、重症肺炎动物模型和致病机制、基于细胞的可视化假病毒和刺突蛋白探针高通量药物筛选模型等方面取得了一系列研究进展(图 1),促进了新冠肺炎“诊断、预防、治疗”产品的研发,获“全国抗击新冠肺炎

疫情先进集体”和“全国科技系统抗击新冠肺炎疫情先进集体”等荣誉称号。

1 快速研制 SARS-CoV-2 诊断试剂体系,支撑新冠多场景检测、免疫应答规律研究和流行病学调查工作

新冠肺炎疫情暴发后,厦大团队与合作企业迅速开展新冠检测试剂的科研攻关,基于全自动化学发光、酶联免疫、胶体金、荧光层析、T 细胞免疫检测和 RT-PCR 等平台成功研制包括全球首个双抗原夹心法总抗体检测试剂在内的新冠系列诊断试剂共 24 项,全面覆盖抗体、抗原、中和抗体、T 细胞免疫和核酸检测,满足不同应用场景的需求。目前,新冠系列诊断试剂在国内外共获得 48 项注册证,其中国内 2 项,分别为新型冠状病毒总抗体检测试剂盒(磁微粒化学发光法)和新型冠状病毒抗原检测试剂盒(胶体金法),另有美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)紧急使用授权(Emergency Use Authorization, EUA)3 项、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)紧急使用清单(Emergency Use Listing, EUL)认证 1 项、欧盟 CE 认证 16 项、澳大利亚注册证 3 项。截至目前,已在全球 90 多个国家和地区广泛使用,有效地支援了全球的抗疫工作。

疫情暴发早期,厦大团队即与深圳市第三人民医院合作,在国际上首次系统地揭示了新冠肺炎患

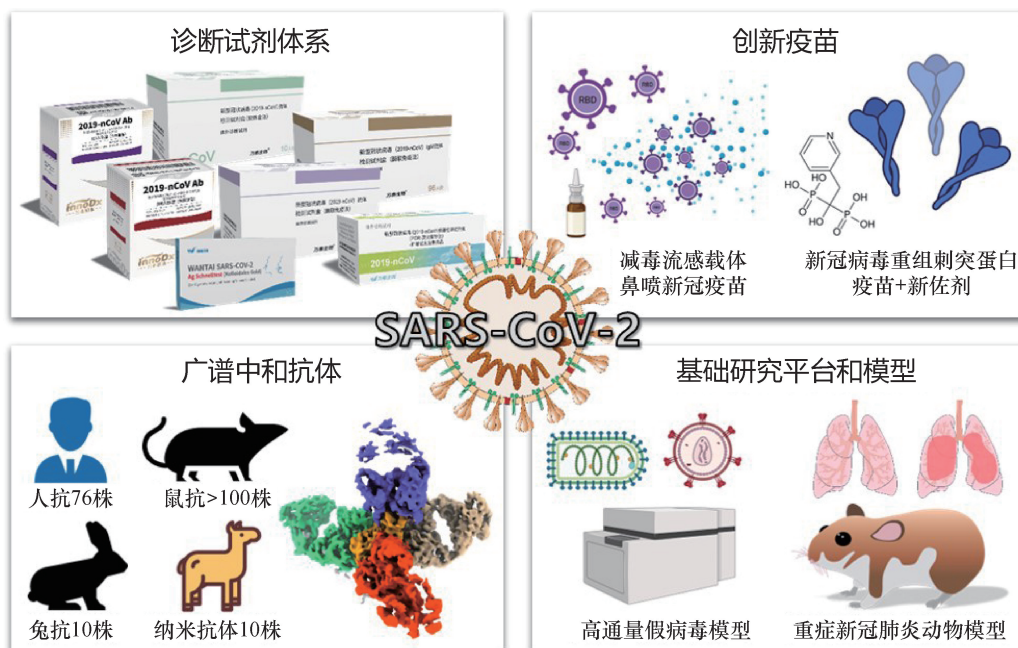


图 1 厦大团队面向新冠肺炎疫情防控需求建立的应用基础研究体系和相关研究成果

者发病后 IgM、IgG 和总抗体在疾病过程中的动态变化,证实抗体检测是核酸检测的重要补充^[1]。继而与浙江大学医学院附属第一医院合作发现总抗体检测的灵敏度和特异性优于单独的 IgM 和 IgG,并首次阐明了新冠患者从暴露开始后的抗体动态变化规律,总抗体、IgM 和 IgG 中位阳转时间分别为暴露后 15、18 和 20 天^[2]。随后,厦大团队研制的总抗体检测试剂在多个欧洲第三方研究机构组织的全球新冠抗体检测试剂评测中击败罗氏、雅培等国际巨头,呈现出最优检测性能^[3-9],被比利时媒体誉为新冠抗体检测试剂中的“劳斯莱斯”。

由于抗体检测与核酸检测的互补性,厦大团队与盐城市疾病预防控制中心合作,首次通过抗体检测阐明了密接人群中的感染者约 40% 为无症状感染者,发现无症状感染者的密接人群中发生感染的概率约为 2%~3%^[10]。该项研究还发现,总抗体检测可以为传染源的流调溯源提供依据^[10]。同时,厦大团队与厦门市疾病预防控制中心等单位合作,进一步阐明了“总抗体检测”在外防输入中的价值。在 2020 年 3 月至 12 月 31 日采样的厦门口岸入境人员中,采用核酸和总抗体联合筛查策略共拦截到 304 名最终符合核酸阳性标准的带毒者,其中核酸初测阴性而总抗阳性经重点筛查后核酸确证 155 例(占 51.0%),联合筛查的敏感性比核酸单检提高了约 1 倍^[11]。由于其高灵敏度和特异性,总抗体试剂也被 WHO 推荐用于“基于人群年龄分层的 COVID-19 感染血清流行病学调查方案”(2020 年 5 月 26 日发布)^[12]。厦大团队与国家卫生健康委临床检验中心、武汉血液中心等单位合作,运用总抗体初筛结合中和抗体确认的方法,对武汉、深圳、石家庄等三地 2020 年 1 月至 4 月期间的 38 144 名健康献血者进行血清学流调,发现武汉市最早出现新冠病毒血清阳性的献血者是在 2020 年 1 月 20 日^[13]。冰岛、荷兰等国也利用厦大团队研发的总抗体检测试剂开展了全国血清流行病学调查^[8, 9]。

基于大量临床研究的反馈结果,厦大团队设计了评价 SARS-CoV-2 抗体检测试剂盒的详细方案,包括对研究对象、样本量评估、纳入及排除标准、盲法设计、实验标本、伦理、研究管理及质量控制、数据管理与统计分析、结果报告的具体内容和考量,旨在帮助使用者在大规模应用抗体检测试剂前系统地评估抗体检测试剂的灵敏度、特异性等关键临床性能,以根据各自的检测目的在不同抗体检测试剂中做出合理的选择^[14]。同时,厦大团队通过深入分析

SARS-CoV-2 感染血清学检测的临床特点、可应用场景,总结得到血清学检测可作为病毒核酸检测的重要补充,明显提高检测灵敏度,具有重要的临床和公共卫生价值^[15]。除此之外,厦大团队研制的新冠抗体和核酸检测试剂为 SARS-CoV-2 疫苗免疫原性和保护效果的研究提供了重要的检测方法^[16, 17]。

2 研制鼻喷流感病毒载体新冠疫苗和肌注重组蛋白新冠疫苗,诱导时空覆盖更全面的多维度保护性免疫

SARS-CoV-2 经上呼吸道感染、与受体亲和力高、容易产生逃逸突变等有助于其传播的特征,对新冠疫苗的效力、广谱性和持久性构成了巨大挑战。多种肌肉注射新冠疫苗已获批上市,此类疫苗诱导的中和抗体水平处于高峰期时表现出较好的保护效果,但由于呼吸道局部的抗体水平远低于外周血中的抗体水平,且免疫逃逸突变株层出不穷,使得当前疫苗效力的持久性和广谱性难以应对持续流行的新冠疫情。鼻腔是 SARS-CoV-2 突破人体的第一道屏障^[18],通过粘膜途径接种的疫苗可在上呼吸道和下呼吸道产生持久的多维度免疫反应以提供对 SARS-CoV-2 感染的高效保护^[19, 20]。呼吸道局部的细胞免疫、先天免疫和训练免疫被认为具有明显更优的广谱性,有助于应对新冠病毒变异带来的挑战。厦大团队基于鼻喷流感病毒载体和肌注重组蛋白两种技术路线开发候选新冠疫苗,两种疫苗可在解剖学空间和免疫应答类型上形成互补,以诱导时空覆盖更全面的多维度保护性免疫。

2.1 研制国际首创的鼻喷流感病毒载体新冠疫苗,促进基于粘膜免疫途径的广谱疫苗研究

作为我国新冠疫苗研发的“五条技术路线”之一,由厦门大学、香港大学和北京万泰生物药业股份有限公司联合研制的鼻喷流感病毒载体新冠疫苗(简称“鼻喷苗”)是基于双重减毒的流感病毒载体开发出的携带 SARS-CoV-2 刺突蛋白受体结合区(Receptor Binding Domain, RBD)基因的可经鼻腔喷雾方式接种的疫苗(简称 dNS1-RBD),也是全球首个进入人体临床试验的鼻喷给药新冠肺炎预防性疫苗。该疫苗在重症新冠肺炎仓鼠模型中对多种突变株表现出快速且持久的保护效果,经鼻接种 1 天后即可快速起效,两剂次经鼻接种后可提供 9 个月以上的长效保护,表现为疫苗组仓鼠的体重未见明显下降、肺组织病理无明显损伤^[21]。该疫苗对 Omicron 等各种新冠病毒关切突变株(Variants of

Concern, VOCs)均有广谱作用。另外,小鼠实验显示该疫苗还可广谱保护 H1N1 和 H5N1 流感病毒感染。与肌肉注射疫苗不同,该疫苗诱导的免疫应答以呼吸道局部细胞免疫及先天免疫为主,应答强度远高于外周血液应答,保护机制涉及呼吸道局部的先天免疫应答、T 细胞应答、粘膜 IgA 抗体应答和体液 IgG 抗体应答等。

鼻喷苗 I、II 期和拓展临床试验分别于 2020 年 9 月、2020 年 11 月以及 2021 年 7 月在江苏东台启动,均采用单中心、随机、双盲、安慰剂对照试验设计,受试对象为 18 岁及以上健康志愿者,全程接种为两剂次(间隔 14 天)。三项临床试验累计入组 1084 例既往无新冠疫苗接种史的 18—86 岁志愿者,其中 684 例接种鼻喷苗,400 例接种安慰剂,安全性评价结果均显示该鼻喷苗具有良好安全性;试验组总体不良反应发生率为 19%(国内外主流文献报道其他已上市新冠疫苗的总体不良反应发生率介于 29%~100%之间),其中局部和全身不良反应发生率分别为 8% 和 15%,主要症状包括流涕、鼻痒、鼻塞、发热、头痛、疲倦乏力等。绝大多数不良反应为轻度症状,且在短期内自行恢复^[22]。所有受试者研究期内均未报告与疫苗相关的严重不良事件。在此基础上,海外 III 期临床试验取得积极进展,在菲律宾、南非、越南和哥伦比亚等 4 个国家获准启动海外 III 期临床试验,截至 2022 年 6 月 28 日,累计入组逾 3 万人,均显示安全性良好,目前正在持续观察受试者的发病情况。

鼻喷苗具有快速起效、原位粘膜免疫应答、持久保护、广谱抗变异、接种方便、安全性好等特点,是对现有肌注新冠疫苗的有效补充,可为快速建立免疫屏障、提升人群免疫水平贡献力量。

2.2 研制新型佐剂 SARS-CoV-2 重组刺突蛋白疫苗,可诱导高水平中和抗体与 T 细胞应答,为新冠疫苗的升级换代奠定基础

在重组蛋白疫苗的技术路线方面,厦大团队研发了一种基于新型佐剂的重组 SARS-CoV-2 刺突蛋白疫苗,并在小鼠、仓鼠和食蟹猴等多种动物模型中验证了该疫苗的免疫原性和有效性,为新冠肺炎疫情的防控提供了一种新的候选疫苗分子^[23]。该新型冠状病毒重组刺突蛋白疫苗 StriFK-FH002C 包括基于 CHO 细胞表达的 SARS-CoV-2 重组刺突蛋白的免疫原 StriFK 和强效新型利塞磷酸盐佐剂 FH002C。该疫苗在小鼠、仓鼠和食蟹猴中均诱导

产生了高滴度的中和抗体,比新冠肺炎患者恢复期血浆的中和抗体滴度高 30 至 250 倍,在中和抗体产生速度和强度方面均比传统铝佐剂疫苗具有显著优势。同时,候选疫苗 StriFK-FH002C 在小鼠体内能够快速诱导强烈的生发中心免疫反应,包括比铝佐剂组更高比例的生发中心 B 细胞(Germinal Center B cell, GCB)、滤泡辅助性 T 细胞(Follicular Helper T cells, Tfh)和浆细胞,从而促进抗体的快速产生。此外, γ 干扰素酶联免疫斑点检测和胞内细胞因子染色实验证明 StriFK-FH002C 疫苗在小鼠体内能够诱导强烈的 T 细胞免疫反应,克服了传统铝佐剂诱导 T 细胞免疫应答能力不足的弱点。在保护性试验中,厦大团队使用模拟人类中、重症新冠肺炎的仓鼠动物模型,采用直接滴鼻攻毒和同笼密切接触传播两种攻毒模式证明了 StriFK-FH002C 免疫能赋予仓鼠良好的抵御新冠病毒的保护效果:显著降低鼻甲、气管和肺等呼吸道组织的病毒载量,使受试动物免于新冠感染所致肺组织病变。更为重要的是,该研究采用空气传播实验表明 StriFK-FH002C 疫苗接种不仅能保护接种疫苗的动物,也能有效降低病毒从疫苗接种后个体传播至未接种疫苗个体并导致疾病的风险。通过对比分析攻毒前后的抗体应答变化,研究证实至少在部分动物中,StriFK-FH002C 疫苗免疫能够赋予动物针对新冠病毒的消除性免疫(Sterilizing Immunity)。该重组新冠疫苗使用了厦大团队开发的具有自主知识产权、增强免疫反应效果好、安全性较高的新型佐剂,推动该佐剂和疫苗的临床应用有望填补我国在创新佐剂领域的空白。

3 探索靶向保守抗原表位的广谱中和抗体组合,建立应对 SARS-CoV-2 突变株和其他冠状病毒流行的关键技术储备库

中和抗体可精准靶向 SARS-CoV-2 的特异性抗原表位,被认为是最具治疗潜力的抗病毒疗法之一。迄今已有多款抗体疗法获批上市或获得紧急使用授权,在新冠肺炎疫情防控中发挥重要作用。厦大团队在新冠肺炎疫情初期启动 SARS-CoV-2 中和抗体的筛选工作,涵盖两大技术体系共五个技术平台:传统的杂交瘤细胞系制备技术,包括小鼠单抗平台、大鼠单抗平台;基于单细胞克隆的抗体制备技术,包括人源抗体平台、兔源抗体平台及羊驼(纳米)抗体平台。利用以上抗体筛选平台,共获得 SARS-CoV-2 中和抗体超过 200 株,包括人源抗体 76 株、小鼠单

克隆抗体 120 余株、兔单克隆抗体 10 株及纳米抗体 10 株。这些抗体中共发现超过 40 株 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 交叉中和抗体,并有 40 多株抗体对 SARS-CoV-2 关切突变株(VOCs)和值得注意的变异株(Variants of Interest, VOIs)表现出广谱中和活性。

大部分已报道的新冠中和抗体靶向 SARS-CoV-2 表面刺突蛋白的 RBD 结构域。截至目前至少有 5 类 RBD 中和抗体(Class 1-5)已被鉴定。通过冷冻电镜及 X 射线晶体学技术,厦大团队解析了超过 20 株代表性中和抗体与 SARS-CoV-2 Spike 蛋白或 RBD 的高分辨率复合物结构,结构分析显示所筛选的中和抗体涵盖所有五种已报道的中和抗体类型。尽管不同抗体的反应谱存在差异,厦大团队在 RBD 的五个不同表位区(对应上述五类抗体)均发现对应的广谱中和抗体。通过序贯免疫策略,获得多个能够交叉 SARS-CoV-2 和严重急性呼吸综合征冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, SARS-CoV)的广谱中和抗体。晶体结构显示其中两株代表性抗体 6D6 和 7D6 识别 RBD 上隐蔽的第 5 类表位(Class 5),该表位为冠状病毒科(Coronaviridae)Sarbecovirus 冠状病毒亚属(Sarbecovirus)高度保守表位,曾经流行的突变株 Alpha、Beta、Gamma、Delta、Kappa、Iota、Lambda 以及目前流行的 Omicron 及其变种 BA. 2 的 RBD 突变位点均位于该表位区之外(图 2A)。两株抗体结合该隐蔽表位后会与相邻的 N 端结构域(NTD)发生碰撞,从而导致刺突蛋白的解聚及其 S1 亚基脱落,提示该类抗体的独特中和机制,其所识别的广谱中和表位可作为新一代广谱 Sarbecovirus 疫苗理性设计的良好靶标^[24]。

SARS-CoV-2 的高度变异性导致疫苗及中和抗体的效力受到挑战,单一抗体疗法容易受 RBD 上突变的影响,鸡尾酒疗法(Antibody Cocktail)则可以弥补单一抗体作用的不足,实现更广谱的抗病毒治疗作用。除了上述的识别 Class 5 广谱抗体外,厦大团队在 Class 1-4 表位上均筛选获得交叉广谱中和抗体,并在动物水平上验证了不同表位抗体组合的鸡尾酒疗法的优异性能。其中三个人源广谱中和抗体组合 XMA01、XMA04 及 XMA09(图 2B),能够同时结合 RBD 上三个非交叉的广谱中和表位,从而协同增强对 Omicron 突变株的中和能力,三抗体组合疗法在仓鼠模型上表现出对 Beta 和 Omicron 的良好治疗效果^[25]。鼠源三抗体组合 X01、X10 及 X17(图 2C)识别 RBD 上三个非重叠的保守表位区并表现出对 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 的交叉中和活性。三株抗体在大部分 SARS-CoV-2 突变株出现之前筛选获得,仍能保持对大部分 VOCs 和 VOIs 的中和活性。尽管 X01 及 X10 对 Omicron 的中和活性极大削弱,X17 仍能保持对 Omicron 的中和,证实了抗体组合在抵御新冠病毒突变方面的优越性。此外,本研究团队也发现了一组能同时结合 SARS-CoV-2 RBD 的四抗体组合(2B4/36H6/85H7/83H6)(图 2D),四抗体中和机制及阻断 SARS-CoV-2 受体蛋白血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE2)的能力各不相同,其同时结合能最大限度遮蔽 RBD 表面功能区域,在抵御病毒感染方面可能具有更优越的潜能。上述抗体组合的发现与鉴定在应对未来潜在的 SARS-CoV-2 新突变株以及其他冠状病毒大流行方面具有重要的战略储备价值。

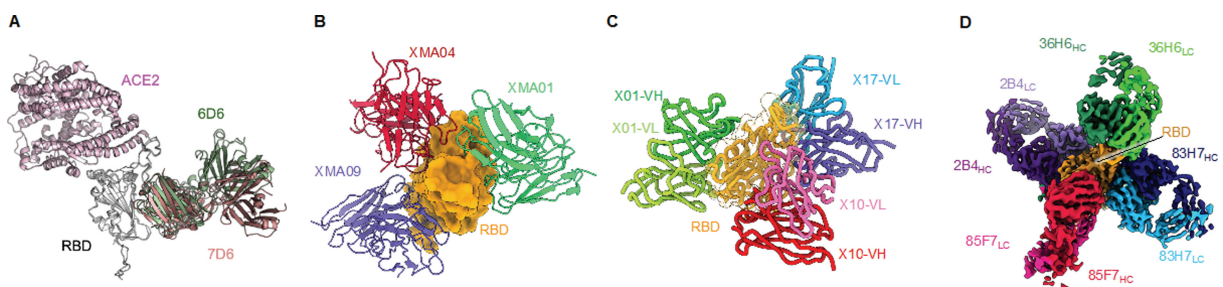


图 2 代表性中和抗体与新冠 RBD 的复合物结构揭示抗体不同的结合模式:

- A. SARS-CoV-2/SARS-CoV 交叉中和抗体 6D6/7D6 识别一个远离 ACE2 结合域的广谱隐性表位^[24],
- B. 人源三抗体组合 XMA01/XMA04/XMA09 同时结合 RBD 的冷冻电镜结构^[25],
- C. 鼠源三抗体组合 X01/X10/X17 同时结合 RBD 的冷冻电镜结构^[26],
- D. 鼠源四抗体组合 2B4/36H6/85H7/83H6 同时结合 RBD 的冷冻电镜结构。

4 发展 SARS-CoV-2 研究的多样化模型体系,服务于应用基础研究和防治产品转化评估工作

目前,SARS-CoV-2 大流行仍然在持续,国内外新冠肺炎疫情此起彼伏,呈现胶着对垒的态势,层出不穷的新型突变病毒株对我国现有的疫苗、药物和公共卫生政策形成了巨大的冲击和挑战,抗击新冠肺炎疫情的科研攻关是科研人员和 SARS-CoV-2 的一场马拉松赛跑。为支撑应用研究高质量快速推进和抗疫产品转化落地,厦大团队发展了 SARS-CoV-2 感染与疾病动物模型和 SARS-CoV-2 高通量药物筛选评价细胞模型等基础研究平台体系,并阐释了新冠肺炎重症化、SARS-CoV-2 突变和跨种属传播等机制。

4.1 SARS-CoV-2 感染与疾病动物模型

感染性疾病动物模型在研究病原特性、致病机制、宿主组织器官病理变化和免疫应答等方面都起到至关重要的作用。稳定、特异、数量充足、方便易用的 SARS-CoV-2 动物模型在疫苗和药物研发中起到了不可替代的作用。厦大团队通过回顾高致病性冠状病毒的动物实验研究结果^[27, 28],推测仓鼠可能是一种对 SARS-CoV-2 易感的动物品系。因此,厦大团队与香港大学合作尝试使用 SARS-CoV-2 直接滴鼻感染仓鼠,建立了一种能够模拟 SARS-CoV-2 感染、传播、致死性重症肺炎和后遗症的疾病动物模型。仓鼠在 SARS-CoV-2 感染第 3—7 天可出现体重下降、虚弱、竖毛、弓背、腹式呼吸等病理生理学表征,与新冠重症患者的部分临床表征相似^[29]。感染 3~7 天的仓鼠肺部可观察到大面积肺泡实质性病变、炎性免疫细胞募集和浸润等典型的新冠肺炎病理学特征。感染第 7—14 天仓鼠体重逐渐恢复,症状和肺部病理学改变减轻,提示疾病由急性期转入恢复期。除直接滴鼻途径之外,SARS-CoV-2 还能够通过同笼密切接触、同笼空气传播(非密接)等方式在仓鼠群体中传播。厦大团队基于对大量实验动物的长期观察结果发现,部分恢复期仓鼠体重长期低于基线水平,鼻洗液样本核酸检测结果阴转数天之后开始呈现持续阳性或间断性阳性,与临床上发现的新冠肺炎恢复期患者核酸检测结果“长阳”和“复阳”等特殊情况高度相似。后续动物实验证明,肺部残留的病毒可能是恢复期患者/动物出现后遗症的重要原因,提示通过接种疫苗维持较高水平的血清中和抗体有助于降低后遗症发生的风险^[30]。

新冠肺炎的感染、发病和重症化机制十分复杂,目前尚未完全明确。全球临床数据显示,性别是影响新冠肺炎预后的重要因素之一,男性感染新冠病毒后的重症率和死亡率明显高于女性。厦大团队与香港大学合作首次证实 SARS-CoV-2 在仓鼠模型中的致病性和易感性存在较明显的与人类临床特征相似的性别差异:雄性仓鼠相比雌性仓鼠在感染后可表现出更高的病毒载量、更为严重的疾病生理学特征和肺部病理学改变以及更低的血清 SARS-CoV-2 中和抗体水平,提示性别因素可能通过影响宿主在病毒感染后的免疫应答模式来调控疾病严重程度。厦大团队发现孕酮(一种主要的雌性激素)是保护雌性仓鼠免于 SARS-CoV-2 感染导致重症肺炎的关键因素之一^[31]。同时,在仓鼠模型中使用临床常用抗炎药物地塞米松治疗重症 COVID-19,也有与孕酮治疗类似的抑制细胞因子风暴和缓解肺部损伤的效果^[32]。此外,厦大团队还参与研制了人肺嵌合小鼠模型和雪貂模型等多种具有特色的 SARS-CoV-2 动物模型,其中基于 SCID 免疫缺陷小鼠皮下移植人肺组织块建立的人肺嵌合小鼠模型具有完整的人肺泡组织结构^[33],可支持 SARS-CoV-2 持续感染、复制以及干扰素等高度种属特异性药物的治疗效果评价,是研究人类宿主免疫应答的重要模型,与目前常用的非人源 SARS-CoV-2 动物模型形成了良好的互补。

综上所述,厦大团队通过系统性比较研究揭示动物模型性别因素与 SARS-CoV-2 感染性、致病性以及不同性别宿主免疫应答模式的关系,对于指导新冠肺炎的临床治疗、支持疫苗保护效果评价、开发特异性抗病毒药物和抗炎症药物具有重要意义。

4.2 SARS-CoV-2 高通量药物筛选评价细胞模型

目前,SARS-CoV-2 动物模型资源依然相对紧缺,实验规模和周期受到诸多限制,因此在开展 SARS-CoV-2 攻毒保护和治疗动物实验之前有必要全面快速地评价 SARS-CoV-2 疫苗和治疗药物候选分子库,优选出 3~5 种高效的候选分子。由于 SARS-CoV-2 的高度传染性,采用传统的病毒感染细胞模型进行疫苗免疫血清、中和抗体及小分子抑制剂的药效评估需要在高等级生物安全实验室中进行,常需要数天时间才能完成检测,且实验规模受到实验室设施和熟练操作人员数量的严格限制,严重阻碍了疫苗评估和药物筛选的效率。因此,发展能够在生物安全二级实验室进行的快速、可视、可自动化定量分析、不依赖于活病毒的替代检测方法对于加速疫苗和抗 SARS-CoV-2 药物的研究有重要

意义。

假病毒是指一类具有活病毒感染入胞能力,但不具有复制能力或复制能力可控的多功能病毒学工具,具有安全、高效、可编辑等特点。对于需要在生物安全三级及以上级别实验室操作的新发和再发的病毒,发展能够在生物安全二级实验室操作的假病毒模型有利于降低整体实验风险,提高工作效率,在全国范围内快速推广形成可观的检测和研究能力,弥补当前我国高等级生物安全实验室数量不足和地域分布不均衡的短板。

厦大团队使用慢病毒系统和水泡型口炎病毒系统构建了携带 SARS-CoV-2 全长刺突蛋白和 EGFP 报告子的假病毒颗粒和基于人 ACE2 过表达细胞的高通量假病毒中和检测系统(ppNAT),可通过高内涵筛选系统检测到稳定的 EGFP 信号,从而实现基于荧光信号的高通量定量化检测,其结果与经典的活病毒滴定方法具有高度相关性^[13, 34, 35]。厦大团队与国家卫生健康委临床检验中心合作使用 ppNAT 方法证明我国大多数人口在新冠肺炎疫情早期流行中未被感染,我国的防疫政策有效地阻断了 SARS-CoV-2 传播链^[13]。为了进一步缩减假病毒包装所需的准备时间、减小不同批次实验的误差、提高实验效率,厦大团队通过 CHO 真核表达系统高效表达制备出 C 端融合抗酸荧光蛋白 Gamillus 的重组 SARS-CoV-2 刺突蛋白探针 STG 用于模拟 SARS-CoV-2 入胞的过程^[36]。该研究发展的方法可拓展应用于建立 SARS-CoV、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)等其他冠状病毒的可视化入胞模型。

综上所述,厦大团队通过不断优化实验体系和参数,建立了一系列具有自主知识产权的、能够在生物安全二级实验室进行的快速、可视、可自动化定量分析、不依赖于活病毒的替代检测方法及配套试剂,为新冠相关基础医学研究、流行病学调查、疫苗和药物研发工作提供了关键的评价工具和策略指引。

5 总结与展望

新冠肺炎疫情在全球范围内的大流行将在此后相当长的一段时间内存在,国内持续面临着境外病例输入导致本土疫情此起彼伏、延绵不断的局面。新冠病毒还在不断变异,奥密克戎(Omicron)及其他潜在的变异病毒株具有较强的免疫逃逸能力且仍在持续进化,在完成多针疫苗接种的人群中依然具

备突破性感染的可能,对疫情早期基于原型毒株设计的第一代新冠疫苗和抗体类药物的预防和治疗效果形成巨大挑战。此外,肺纤维化、心脏衰竭、肌无力、嗅觉味觉减退、脑血栓、代谢失调、认知障碍、生殖器官萎缩、衰老加速等一系列新冠肺炎后遗症陆续被发现,并将在未来对整个人类社会造成严重的医疗负担。因此,我国将长期面临“外防输入、内防反弹”的巨大抗疫压力。在我国“疫情要防住、经济要稳住、发展要安全”的基础上和世界各国正在逐步开放的大趋势下,我国不仅需要全面统筹疫情防控 and 经济社会发展,还需要积极为将来全面放开出入境限制做好科技储备。

建立完备的疫情防控体系和群体免疫屏障,研究和发展抗疫产品及相关科学技术,是保障人民生命健康、打赢这场抗疫“拉锯战”的法宝,也是我国“开放国门”的重要前提。面对当前复杂的疫情态势,厦大团队将结合长期发展的平台体系,继续围绕“诊断、预防、治疗”三个方面开展应用基础研究。诊断方面,旨在开发更加快速、精准、便利的病原诊断方法、试剂和仪器,进一步提升新冠病毒相关的检测能力、扩展检测覆盖面和应用场景。预防方面,聚焦于广谱免疫原设计和免疫增强载体策略的发展,通过广谱表位的发现与免疫聚焦技术、抗原谱系嵌合技术、新型重组类病毒颗粒技术、鼻喷减毒流感病毒载体技术、水泡性口炎病毒载体技术等多种技术路线并行,以期实现广谱新冠疫苗相关关键技术和产品突破;此外,应加强对呼吸道感染的广谱保护机制研究,以促进新概念疫苗研发。在治疗方面,除了筛选超广谱抗体,还应加强 SARS-CoV-2 导致疾病发生和发展的机制研究,以期获得新型靶点和干预策略。

参 考 文 献

- [1] Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, 2020, 71(16): 2027—2034.
- [2] Lou B, Li TD, Zheng SF, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since exposure and post symptom onset. *European Respiratory Journal*, 2020, 56(2): 2000763.
- [3] GeurtsvanKessel CH, Okba NMA, Igloi Z, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nature Communications*, 2020, 11: 3436.
- [4] Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(18): 1724—1734.

- [5] Traugott M, Aberle SW, Aberle JH, et al. Performance of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody assays in different stages of infection: comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and rapid tests. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020, 222(3): 362—366.
- [6] Pflüger LS, Bannasch JH, Brehm TT, et al. Clinical evaluation of five different automated SARS-CoV-2 serology assays in a cohort of hospitalized COVID-19 patients. *Journal of Clinical Virology*, 2020, 130: 104549.
- [7] Harritshøj LH, Gybel-Brask M, Afzal S, et al. Comparison of 16 serological SARS-CoV-2 immunoassays in 16 clinical laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(5): e02596—e02520.
- [8] Bal A, Pozzetto B, Trabaud MA, et al. Evaluation of high-throughput SARS-CoV-2 serological assays in a longitudinal cohort of patients with mild COVID-19: clinical sensitivity, specificity, and association with virus neutralization test. *Clinical Chemistry*, 2021, 67(5): 742—752.
- [9] Slot E, Hogema BM, Reusken CBEM, et al. Low SARS-CoV-2 seroprevalence in blood donors in the early COVID-19 epidemic in the Netherlands. *Nature Communications*, 2020, 11: 5744.
- [10] Zhang HJ, Su YY, Xu SL, et al. Asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 infections in close contacts of COVID-19 patients: a seroepidemiological study. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, 73(3): 553—554.
- [11] 沈理通, 段振华, 陈泽辉, 等. 厦门市实施“14+7 隔离”与“核酸+总抗体筛查”策略对发现境外输入性新型冠状病毒感染者的作用分析. *中华流行病学杂志*. 2021, 42(6): 1002—1007.
- [12] World Health Organization. Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for coronavirus 2019 (COVID-19) infection. (2022-05-26)/[2022-07-01]. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.2>
- [13] Chang L, Hou WH, Zhao L, et al. The prevalence of antibodies to SARS-CoV-2 among blood donors in China. *Nature Communications*, 2021, 12: 1383.
- [14] 黄悦, 吴婷, 杜珩, 等. 新型冠状病毒抗体检测试剂的临床性能评估方案. *病毒学报*, 2020, 36(4): 541—548.
- [15] 黄悦, 庄春兰, 葛胜祥, 等. 2019 新型冠状病毒感染血清学检测的临床和公共卫生意义探讨. *病毒学报*, 2020, 36(3): 537—540.
- [16] Zhu FC, Li YH, Guan XH, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*, 2020, 395(10240): 1845—1854.
- [17] Kamar N, Abravanel F, Marion O, et al. Three doses of an mRNA covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(7): 661—662.
- [18] Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*, 2020, 370(6518): 856—860.
- [19] Lund FE, Randall TD. Scent of a vaccine. *Science*, 2021, 373(6553): 397—399.
- [20] Hassan AO, Kafai NM, Dmitriev IP, et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell*, 2020, 183(1): 169—184. e13.
- [21] Chen JY, Wang P, Yuan LZ, et al. A live attenuated virus-based intranasal COVID-19 vaccine provides rapid, prolonged, and broad protection against SARS-CoV-2. *Science Bulletin*, 2022, 67(13): 1372—1387.
- [22] Zhu FC, Zhuang CL, Chu K, et al. Safety and immunogenicity of a live-attenuated influenza virus vector-based intranasal SARS-CoV-2 vaccine in adults: randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2022, 10(8): 749—760.
- [23] Wu YT, Huang XF, Yuan LZ, et al. A recombinant spike protein subunit vaccine confers protective immunity against SARS-CoV-2 infection and transmission in hamsters. *Science Translational Medicine*, 2021, 13(606): eabg1143.
- [24] Li TT, Xue WH, Zheng QB, et al. Cross-neutralizing antibodies bind a SARS-CoV-2 cryptic site and resist circulating variants. *Nature Communications*, 2021, 12: 5652.
- [25] Wang SL, Sun H, Zhang YL, et al. Three SARS-CoV-2 antibodies provide broad and synergistic neutralization against variants of concern, including *Omicron*. *Cell Reports*, 2022, 39(8): 110862.
- [26] Xiong HL, Sun H, Wang SL, et al. The neutralizing breadth of antibodies targeting diverse conserved epitopes between SARS-CoV and SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(34): e2204256119.
- [27] Yuan LZ, Tang QY, Cheng T, et al. Animal models for emerging coronavirus: progress and new insights. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 949—961.
- [28] Yuan LZ, Tang QY, Zhu HC, et al. SARS-CoV-2 infection and disease outcomes in non-human primate models: advances and implications. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 1881—1889.
- [29] Yuan LZ, Zhu HC, Zhou M, et al. Gender associates with both susceptibility to infection and pathogenesis of SARS-CoV-2 in Syrian hamster. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 136.
- [30] Yuan LZ, Zhu HC, Zhou M, et al. Persisting lung pathogenesis and minimum residual virus in hamster after acute COVID-19. *Protein & Cell*, 2022, 13(1): 72—77.
- [31] Yuan LZ, Zhu HC, Wu K, et al. Female sex hormone, progesterone, ameliorates the severity of SARS-CoV-2-caused pneumonia in the Syrian hamster model. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7: 47.

- [32] Yuan LZ, Zhou M, Ma J, et al. Dexamethasone ameliorates severe pneumonia but slightly enhances viral replication in the lungs of SARS-CoV-2-infected Syrian hamsters. *Cellular & Molecular Immunology*, 2022, 19(2): 290–292.
- [33] Fu WK, Wang W, Yuan LZ, et al. A SCID mouse-human lung xenograft model of SARS-CoV-2 infection. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6607–6615.
- [34] Xiong HL, Wu YT, Cao JL, et al. Robust neutralization assay based on SARS-CoV-2 S-protein-bearing vesicular stomatitis virus (VSV) *Pseudovirus* and ACE2-overexpressing BHK21 cells. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 2105–2113.
- [35] Zhang YL, Wang SJ, Wu YT, et al. Virus-free and live-cell visualizing SARS-CoV-2 cell entry for studies of neutralizing antibodies and compound inhibitors. *Small Methods*, 2021, 5(2): 2001031.
- [36] Zhang YL, Wei M, Wu YT, et al. Cross-species tropism and antigenic landscapes of circulating SARS-CoV-2 variants. *Cell Reports*, 2022, 38(12): 110558.

Applied Basic Research to Meet the Needs of COVID-19 Pandemic Prevention and Control

Lunzhi Yuan^{1,2} Tianying Zhang^{1,2} Jun Zhang^{1,2} Ningshao Xia^{1,2*}

1. State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, Xiamen University, Xiamen 361102

2. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361102

Abstract Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by the spreading of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is still ongoing. The evolving mutant strain lineage has strong immune escape and breakthrough infection capabilities. A series of COVID-19 sequelae have been discovered, and may cause a serious medical burden to human society in the future. Our country is still facing the tough battle of “external defense import and internal defense rebound”, it is not only necessary to comprehensively coordinate epidemic prevention and control and economic and social development, but also to actively prepare scientific and technological reserves. Establishing a strong epidemic prevention and control system and herd immunity barrier, developing products and technologies that can be used to prevent and control the epidemic, and further reducing severe illness and death are the magic weapons to protect people’s lives and health and win the “tug-of-war” against the pandemic. With the continuous support of the National Natural Science Foundation of China, the team of the National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases (Xiamen University) has formed a solid accumulation in the field of infectious disease research, established a systematic biomedical research platform, and cultivated a team of scientists full of innovation and vitality. In the face of the complex situation of the COVID-19 pandemic, we focus on the research and development of the product for “diagnosis, prevention and treatment”. A series of research progress has been made in SARS-CoV-2 detection technology, intranasal spray influenza virus vector COVID-19 vaccine and recombinant protein COVID-19 vaccine, broad-spectrum neutralizing antibody and small molecule drug screening, severe COVID-19 animal model and pathogenic mechanism, etc. These achievements have provided important scientific and technological support for prevention and control of COVID-19 and also contribute to public health.

Keywords severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); coronavirus disease 2019 (COVID-19); diagnosis; innovative vaccine; therapeutic antibody; animal model; high-throughput screening

(责任编辑 姜钧译)

* Corresponding Author, Email: nsxia@xmu.edu.cn