

2020年新型冠状病毒分子病理学研究及其药物和疫苗研发热点回眸

叶盛

北京航空航天大学医工交叉创新研究院;北航-首医大数据精准医疗高精尖创新中心,北京 100191

摘要 新型冠状病毒于2019年12月被发现以来,引发了严重的呼吸系统传染病疫情,并波及世界所有主要国家和地区。全球科学界迅速行动起来,对该病毒及其引发的疾病进行了广泛而深入的研究。得益于此前在严重急性呼吸道综合征冠状病毒和中东呼吸综合征冠状病毒上的知识积累,针对新型冠状病毒的科研工作于2020年取得了丰硕的研究成果,特别是在分子病理学方面获得了很多透彻的认知,这些知识的获得又为针对新型冠状病毒的药物和疫苗研发奠定了基础。简要回顾了冠状病毒的研究历史,重点总结了新型冠状病毒的分子病理学研究要点,在药物研发方面兼顾现有药物的重定位和新型抗病毒药物的研发现状,在疫苗研发方面按类型总结各国目前比较成功的疫苗项目及其研发进展。

关键词 冠状病毒;新型冠状病毒;严重急性呼吸道综合征;中东呼吸综合征;疫苗

新型冠状病毒(新冠病毒)最初于2019年12月被发现,是导致不明原因传染性肺炎疫情的病原体。随着疫情的不断发展,新型冠状病毒通过人传人的途径逐步传播到全世界所有主要国家和地区。中国科学家迅速行动,在极短的时间内成功分离鉴定了该病原体,并很快完成了病毒的全基因组测序工作,证实该病毒在基因组上近似引发非典型性肺炎的严重急性呼吸道综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-

CoV),为此后的疾病临床检测、抗病毒药物研发和疫苗研发奠定了基础^[1]。世界卫生组织在2020年初将该病毒暂时命名为“2019新型冠状病毒”(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV),将该病毒引发的疾病正式命名为“2019冠状病毒病”(coronavirus disease 2019, COVID-19)。国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)将该病毒命名为“严重急性呼吸道综合征冠状病毒2型”(severe acute respiratory syndrome

收稿日期:2021-01-06;修回日期:2021-01-10

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31871287)

作者简介:叶盛,研究员,研究方向为病毒性传染病和癌症等重大疾病的分子病理机制,电子信箱:yesheng@buaa.edu.cn

引用格式:叶盛. 2020年新型冠状病毒分子病理学研究及其药物和疫苗研发热点回眸[J]. 科技导报, 2021, 39(1): 144-165; doi: 10.3981/j.

issn.1000-7857.2021.01.012

coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[2]。

据世界卫生组织统计,截至2020年12月20日,全球感染新冠病毒的确诊者总计达7511万人,病亡者达到168万人,已经构成了严重的公共健康危机^[3]。得益于中国政府施行的严格、高效的防疫制度,中国大陆地区的新冠疫情在2020年夏季已经得到了有效控制,仅余输入性病例和零星出现的本土病例。与之相对的是,欧、美、日、韩等世界其他主要经济体的新冠疫情始终未能得到控制,并在2020年秋冬季发生了严重反弹,特别是在美国等国家呈现愈演愈烈之势。要在全球范围内彻底控制新冠病毒所引发的疫情,必然需要有针对性的抗病毒药物和高效的疫苗。此外,虽然中国本土疫情已经基本得到了控制,但是防疫措施带来了较高的社会运行成本,而世界其他国家的疫情持续也极大地限制了中国对外的人员交流和货物流通。因此,中国同样迫切需要针对新冠病毒的药物和疫苗。

通常来讲,新型药物和新型疫苗的研发周期都很长,从几年到十几年不等,如艾滋病毒等病原体被人类发现几十年来也没有出现有效的疫苗。而今面对新冠疫情的肆虐,我们必然需要以新冠病毒的生物学和医学知识为基础,减少传统研发过程中的盲目尝试和大规模筛选,采用理性研发、理性设计的思路来加快药物和疫苗的研发进程。本文以新冠病毒的分子病理学特征为线索,总结其药物与疫苗研发现状。

1 冠状病毒的研究历史

1.1 冠状病毒的发现及早期研究

第一种被人类发现的冠状病毒是感染禽类的冠状病毒。20世纪20年代末,北美地区的养鸡场暴发了严重的家禽传染性支气管炎疫情,对肉鸡和蛋鸡的致死率可高达90%,因而对家禽养殖业构成了巨大的威胁^[4]。1935年,Beach和Schalm证明该疫情是由一种病毒导致的,并将之命名为禽类传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)^[5]。20世纪40年代,又有2种分别能够导致鼠类脑炎

和肝炎的冠状病毒被发现^[6]。但在当时,由于缺乏病毒形态方面的信息,人们并不知道这3种病毒之间有任何亲缘关系,也还没有冠状病毒这一称谓的出现。

20世纪60年代初,能够感染人类的冠状病毒在英国和美国分别被独立发现。英国的医学研究理事会(Medical Research Council, MRC)于1946年成立的普通感冒研究部(Common Cold Research Unit, CCRU)先后发现,导致普通感冒的病原体有鼻病毒和腺病毒。1961年,CCRU的Kendall等^[7]又发现了一种能够导致普通感冒的病毒,标记为B814。B814无法在鼻病毒或腺病毒的培养条件下进行培养,并且会在乙醚的处理下失活,证明其具有由脂分子构成的囊膜,而鼻病毒和腺病毒不具有囊膜。这些证据都表明,B814是一种新型病毒。1962年,美国芝加哥大学的Hamre和Procknow也分离得到了一种能够导致普通感冒的新病毒,并且同样会在乙醚处理下失活,命名为229E^[8]。

上述这些病毒之间的联系最终通过电子显微镜的观察得以明确。1964年,英国的Berry等^[9]研究了IBV经负染处理后在电镜下的形态,发现这种病毒呈不规则的球形,直径在80~120 nm左右,表面带有某种“突起”。1967年,发现B814病毒的Kendall等与英国病毒学家Almeida等合作,通过电镜观察证实,B814和229E都与最早发现的IBV有着同样的形态特征^[10]。他们还对这些病毒表面独特的“突起”进行了更细致的描述:长度约为20 nm,“头部”宽度约10 nm,而茎部很细,几乎处于电镜的分辨率极限(图1^[10])。与此同时,美国国立卫生研究院(National Institute of Health)的一组科学家也发现了一种能够导致普通感冒的新型病毒,命名为OC43,并通过负染电镜观察证实OC43也是一种冠状病毒^[11]。

1968年,Almeida和Berry等8位病毒学家共同发表论文指出,IBV、B814、229E、OC43等病毒有很多类似性,包括:以RNA为遗传物质,具备脂分子组成的囊膜,直径在80~160 nm之间,且在电镜下呈现了类似的形态特征。其中最主要的一点是病

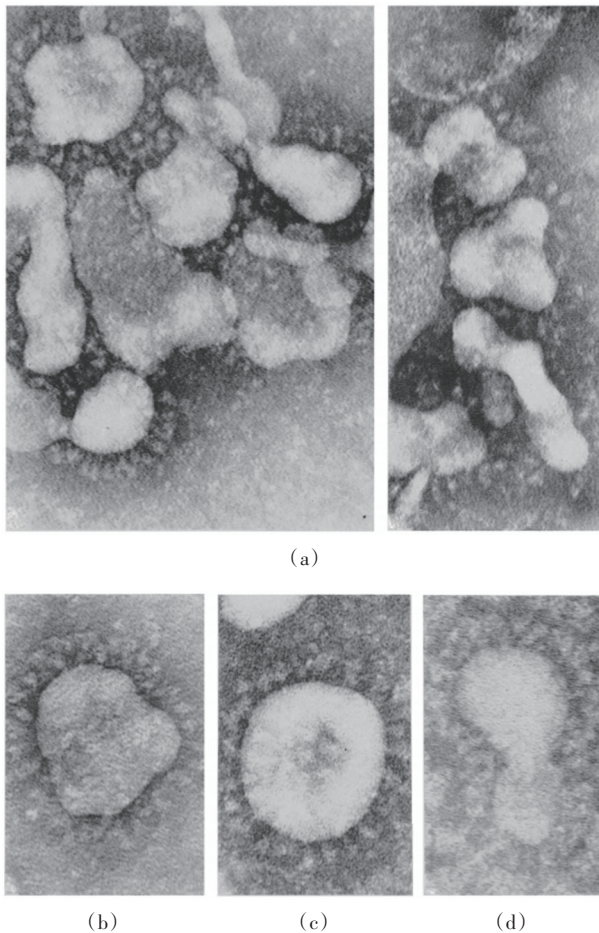


图1 June Almeida通过负染电镜拍摄的冠状病毒229E (a和b)及B814(c和d),病毒周围的一圈“突起”清晰可辨

毒边缘都分布着长度约20 nm的突起,形状类似于太阳周围的一圈日冕(solar corona)。这些突起的头部膨大,与黏液病毒科成员表面的刺状突起截然不同。因此,他们建议将这些病毒归为新的一类病毒,并命名为冠状病毒(coronavirus)^[12]。

至此,人类对于冠状病毒的早期研究告一段落,进入了一个相对低谷的时期。究其原因,主要是因为上述几种人类冠状病毒感染之后所导致的疾病仅仅是症状温和的普通感冒,属于自愈性疾病,因而不存在急迫的药物或疫苗开发需求。甚至由于研究者的疏忽,导致最初被发现的冠状病毒B814样本遗失,以致于后来无法对其进行基因组的测序和鉴定。相对而言,IBV的研究在禽类养殖业控制疫情的需求驱动下得以延续。在20世纪50年代至70年代间,一系列针对IBV的减毒疫苗和

灭活疫苗研发成功^[13],时至今日仍有广泛的应用。

1.2 SARS冠状病毒和MERS冠状病毒的研究

2002年底至2003年间发生的SARS疫情改变了冠状病毒的研究状况。

引发SARS的病原体被称为SARS冠状病毒,其感染会导致宿主产生严重的疾病症状,包括持续高烧、咳嗽、呼吸困难、肺部炎症,以及低氧症等等,并有可能直接导致宿主的死亡。全球SARS疫情结束后统计的病亡率高达11%^[14]。这些临床特征使得SARS冠状病毒迥异于早期发现的几种人类冠状病毒,因而引起了一部分科研人员的持续关注。很快,又有2种新的人类冠状病毒NL63^[15]和HKU1^[16]于2003年和2004年分别被发现,但它们并不会导致严重的呼吸道疾病。

2012年底,一种新的人类冠状病毒首先出现在中东地区,继而在2013年和2014年分别导致了沙特阿拉伯和韩国的两次中东呼吸综合征(Middle East Respiratory Syndrome, MERS)疫情,该病毒也被命名为MERS冠状病毒。与SARS冠状病毒相类似,MERS冠状病毒也会导致严重的呼吸系统疾病,甚至有着更高的病死率(据世界卫生组织统计,约为35%)。但两者不同的是,SARS冠状病毒从2004年起再未出现,而MERS冠状病毒至今仍会导致全球每年约100名感染者的出现^[17]。

尽管有越来越多的证据表明,新发传染病(emerging infectious diseases)的出现主要与全球人口聚居密度的持续提高有紧密的联系^[18-19],但是对相应病原体的溯源工作仍然是十分重要的,不仅有助于对病原体致病机制的深入理解以及药物和疫苗的研发,也有助于未来对类似新发传染病的防控。石正丽等^[20]通过十几年的野外调查研究发现,SARS冠状病毒很可能源自于十余种蝙蝠冠状病毒在蝙蝠群体中传播时发生的线性重组,此后又经由果子狸等中间宿主传染给人类。MERS冠状病毒的起源过程与此类似,但中间宿主变成了在中东地区较为常见的单峰骆驼^[21]。

SARS冠状病毒和MERS冠状病毒对人类健康的严重威胁引起了科学界对冠状病毒的广泛重视。关于冠状病毒的基因组构成、蛋白质结构、宿主细

胞表面受体、在宿主细胞内的复制周期,以及人类冠状病毒溯源等信息在近20年间不断丰富。

1.3 冠状病毒的基本生物学特征

冠状病毒的遗传物质是一条正义单链RNA分子,承载的基因组大小在2.7万~3.2万对碱基之间,是已知RNA病毒中最大的基因组。2011年,国际病毒分类委员会依据基因组序列的比对结果,将冠状病毒科进一步划分为甲型冠状病毒属(Alphacoronavirus)、乙型冠状病毒属(Betacoronavirus)、丙型冠状病毒属(Gammacoronavirus)和丁型冠状病毒属(Deltacoronavirus)^[22]。

冠状病毒庞大的基因组编码了4种重要的结构蛋白,以及十余种非结构蛋白。结构蛋白包括:囊膜内缠绕着病毒基因组RNA的核衣壳蛋白(nucleocapsid protein),以及镶嵌在囊膜上的膜蛋白(membrane protein)、刺突蛋白(spike protein)和囊膜蛋白(envelope protein)^[23]。其中,带有严重糖基化修饰的刺突蛋白就是冠状病毒在电镜下所呈现的“突起”,同时也是冠状病毒表面负责识别并结合宿主细胞受体的关键蛋白质。这4种结构蛋白是所有冠状病毒所共有的,序列比较保守,且在基因组上有着各自独立的开放读码框(open reading frame, ORF)。

相对于较为一致的结构蛋白而言,非结构蛋白(non-structural protein, NSP)的构成情况在不同冠状病毒之间有着一定的差异性。绝大部分非结构蛋白是编码在同一个开放读码框中的,即ORF1,且存在2种翻译方式(ORF1a和ORF1b),两者之间存在一位移码。ORF1翻译而成的2条长多肽称为pp11a和pp11ab,共包含了十余种非结构蛋白。其中的主蛋白酶(main protease)和木瓜蛋白酶样蛋白酶(papain-like protease)负责将这两条长多肽进一步水解,切断成独立的各个非结构蛋白。除这些蛋白酶外,冠状病毒的非结构蛋白还包括复制转录复合物(replication and transcription complex, RTC)的各个亚基和其他辅助蛋白质,用以完成冠状病毒所独有的物质代谢过程,以及对抗、逃避细胞内的天然免疫机制^[24]。

2 2020年新冠病毒分子病理学研究进展

2.1 新冠病毒基因组

2019年12月,不明病原体引发的肺炎疫情在武汉市出现^[25]。中国疾控中心派出工作组赴武汉,对导致疫情的病毒进行了分离鉴定和初步研究。疾控中心高福等^[1]在报道相关研究成果的论文中指出:基因组测序结果和透射电镜观察结果均证实,导致不明原因肺炎疫情的病毒为一种冠状病毒,且属于乙型冠状病毒属,即新冠病毒。

石正丽等^[26]对新冠病毒进行了详细的基因组测序研究,发现其含有29881对碱基。通过与其他冠状病毒的基因组进行比对发现,新冠病毒与SARS冠状病毒有着极高的同源性(79.6%的一致性)。与新冠病毒全基因组同源性最高的是以中菊头蝠(*Rhinolophus affinis*)为宿主的蝙蝠冠状病毒RaTG13,两者的一致性高达96.2%,提示新冠病毒很可能也是起源于蝙蝠冠状病毒,但是并没有证据显示曾经发生过病毒基因组的线性重组^[26]。

新冠病毒基因组序列信息的及早公开共享,使得针对新冠病毒的PCR检测成为可能,为世界各国的医疗机构和防疫部门快速筛查新冠病毒携带者创造了条件。

2.2 新冠病毒受体结合结构域与其受体蛋白

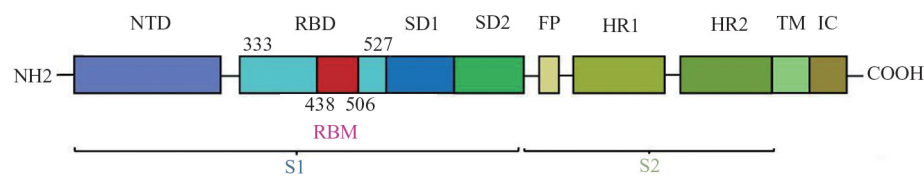
在2020年以前对于其他冠状病毒的研究已经发现,SARS冠状病毒和人类冠状病毒NL63在宿主细胞表面的受体蛋白是血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)^[27]。ACE2是位于细胞表面的一种膜蛋白,具有特异性的蛋白酶活性,能够水解血管紧张素,产生具有进一步调控功能的肽段,达到降低血压等目的。ACE2广泛分布于血管等组织的上皮细胞表面、多种脏器的平滑肌细胞表面,以及呼吸道的鼻腔、口腔和肺部。特别是在肺泡所特有的II型肺泡细胞(alveolar type II cell)表面,ACE2的含量非常高。正因为如此,SARS冠状病毒能够高效感染II型肺泡细胞,从而导致严重的肺部炎症^[28]。

石正丽等^[26]在新冠疫情初期的研究表明,新冠病毒在宿主细胞表面的受体蛋白也是ACE2。新冠病毒借助其刺突蛋白不仅能够识别并结合人源ACE2,还能够与中菊头蝠、果子狸、猪等物种来源的ACE2结合,但是不能与小鼠源的ACE2结合,也不能与MERS冠状病毒的受体蛋白二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4)相结合。

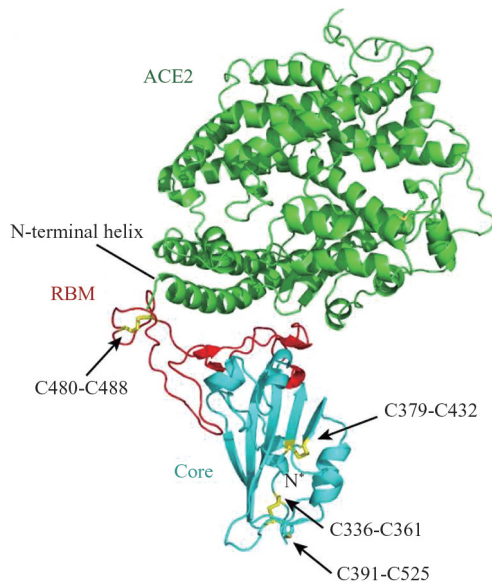
冠状病毒刺突蛋白的受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)负责对宿主细胞表面受体蛋白的识别与结合,是冠状病毒分子病理学研究的重点,对药物设计和疫苗开发都有重要意义。在新冠疫情初期,世界上多个研究组几乎同时解析得到了新冠病毒刺突蛋白RBD与人源ACE2形成的

复合物结构(图2),展示了两者之间精确的结合模式^[29-31](图2(b)^[29])。该结合模式与SARS冠状病毒刺突蛋白与人源ACE2的结合模式(图2(c)^[32])非常类似。

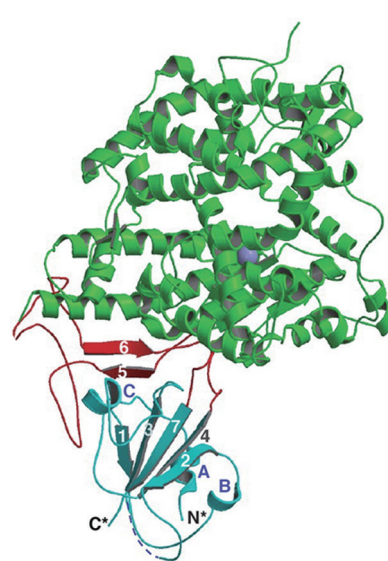
有必要指出的是,新冠病毒也许还存在ACE2之外的受体蛋白。第四军医大学的陈志南团队报道了新冠病毒的另一种受体蛋白,即人类免疫细胞和上皮细胞表面的膜蛋白CD147^[33]。一方面,CD147在体外实验中能够与新冠病毒刺突蛋白结合;另一方面,在天然不表达CD147或ACE2的BE-AS-2B细胞系内过表达CD147之后,这种细胞也变得能够被新冠病毒感染。这些结果都证明了CD147作为新冠病毒受体的功能。



(a) 新冠病毒刺突蛋白结构域构成



(b) 新冠病毒刺突蛋白RBD与人源ACE2的复合物晶体结构



(c) SARS冠状病毒刺突蛋白RBD与人源ACE2的复合物晶体结构

ACE2以绿色飘带表示,RBD以红色和蓝色飘带表示。

图2 冠状病毒刺突蛋白RBD与人源ACE2的复合物晶体结构

2.3 新冠病毒刺突蛋白

新冠病毒的刺突蛋白是一个较大的蛋白质,由一条 1273 个氨基酸残基的肽链折叠而成,计算分子量为 141 kDa,在真核细胞内表达时带有严重的糖基化,分子量可显著提高至 180 kDa 以上。新冠病毒的刺突蛋白可以分为 S1 和 S2 两个亚基,除去 N 端信号肽以外,S1 为残基 14-685,S2 为残基 686-1273。如图 2(a)^[29]所示,S1 包括了 N 端结构域(N-terminal domain, NTD)和 RBD; S2 包括了融合肽(fusion peptide, FP)、七肽重复序列 1(heptapeptide repeat sequence 1, HR1)、七肽重复序列 2(heptapeptide repeat sequence 2, HR2)、穿膜结构域(transmembrane domain, TM),以及胞内结构域(intracellular domain, IC)^[34]。

基于对 SARS 等其他冠状病毒的知识已经知道,刺突蛋白在冠状病毒表面以同源三聚体的形式存在,一旦其 RBD 识别并结合了细胞表面受体之后会诱发所谓的“膜融合”过程,即病毒囊膜与宿主细胞膜的融合,从而打开通道,令病毒内部的遗传物质分子可以进入宿主细胞的细胞质内,实现对宿主细胞的侵染。在这个过程中,含有 RBD 的 S1 主要负责与受体的识别与结合,而 S2 则含有完成膜融合所需的分子机器。刺突蛋白整体在膜融合过程中会发生剧烈的构象变化,因此可以分为“融合

前”与“融合后”两种状态。要详细了解膜融合过程的分子机制,就必须对这两种状态分别进行结构生物学的研究。

2.4 新冠病毒刺突蛋白的融合前构象状态

新冠病毒刺突蛋白在融合前状态下的整体结构首先得到了解析。Wrapp 等^[35]采用冷冻电镜方法分析了重组表达获得的新冠病毒刺突蛋白胞外区,获得了整体分辨率为 3.5 埃的结构(图 3)。该结构显示,虽然 RBD 不是刺突蛋白上的第一个结构域,但是它仍旧通过两段柔性较强的区域形成了一种铰链连接,因而获得了相对较高的空间自由度,便于与受体蛋白的识别和结合。这一特性与 SARS 冠状病毒的刺突蛋白相一致。两者不同的是,在 SARS 冠状病毒刺突蛋白的三聚体中,当没有与受体结合时,3 个 RBD 均是向下折叠的,相对稳定;当与受体结合后,3 个 RBD 会向上抬起,导致结构失稳,进而是 S1 与 S2 的剥离,以及后续的膜融合过程。而在新冠病毒的刺突蛋白三聚体中,没有与受体结合的融合前状态下只有 2 个 RBD 是向下折叠的,另一个 RBD 则向上抬起。这一结构特性或许进一步增强了新冠病毒寻找并结合宿主细胞表面受体的机率^[35]。

值得注意的是,Wrapp 等重组表达的新冠病毒刺突蛋白中含有两处突变,其中之一是将 HR1 与

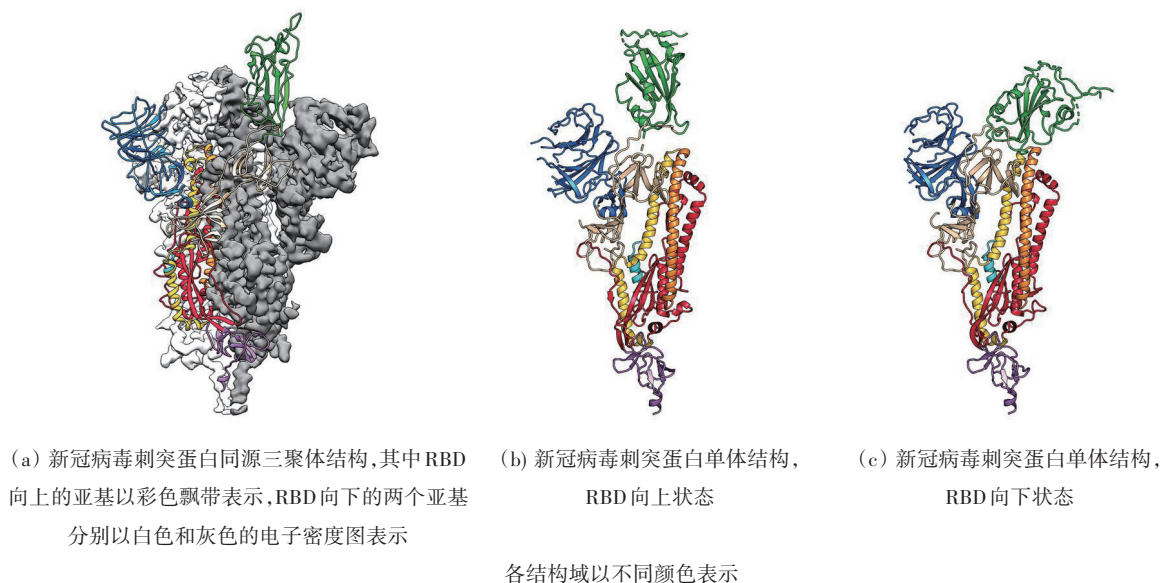


图3 新冠病毒刺突蛋白融合前状态的冷冻电镜结构

HR2之间的986位和987位残基替换为2个脯氨酸残基,使得刺突蛋白三聚体能够稳定在融合前的状态下^[35]。这种双脯氨酸替换的策略此前已经在MERS等其他冠状病毒的研究中被证明是有效的^[36]。这一替换对于新冠病毒而言尤其必要,因为有证据显示新冠病毒刺突蛋白的融合前状态并不稳定,似乎有自发转变为融合后状态的趋势^[37]。导致这一现象的原因,或许正是因为其三聚体中总有一个亚基的RBD处于向上的状态。

Wrapp等设计的另一处突变是将位于S1与S2连接处的682~685位残基从“RRAR”替换为“GSAS”,阻止了两个亚基在蛋白酶作用下的解离^[35]。“RRAR”是一种人体内广泛存在的丝氨酸蛋白酶furin所识别的酶切位点。当RBD与宿主细胞受体结合后,触发构象变化,将该位点暴露出来接受furin催化的水解,从而让S1亚基与S2亚基剥

离^[38]。令人意想不到的是,与新冠病毒高度同源的SARS冠状病毒的刺突蛋白上并不具备“RRAR”这一酶切位点,反而是MERS冠状病毒的刺突蛋白上具备该切点。这或许也是新冠病毒和MERS冠状病毒具有更高毒力的原因之一,因为S1的彻底剥离更有利于S2达成融合后的构象状态^[39]。

2.5 新冠病毒刺突蛋白的融合后构象状态

新冠病毒刺突蛋白融合后的结构也是通过冷冻电镜方法解析得到的。章新政等^[40]对重组表达获得的新冠病毒刺突蛋白胞外区进行了胰蛋白酶处理,人为模仿furin酶切的过程,获得了融合后状态下的S2亚基,并进行了冷冻电镜的分析,通过分类和筛选,对其中4万余个颗粒进行了三维重构,获得了新冠病毒刺突蛋白S2亚基融合后的结构(图4^[40])。

S2亚基在融合后的一个显著结构变化就是所

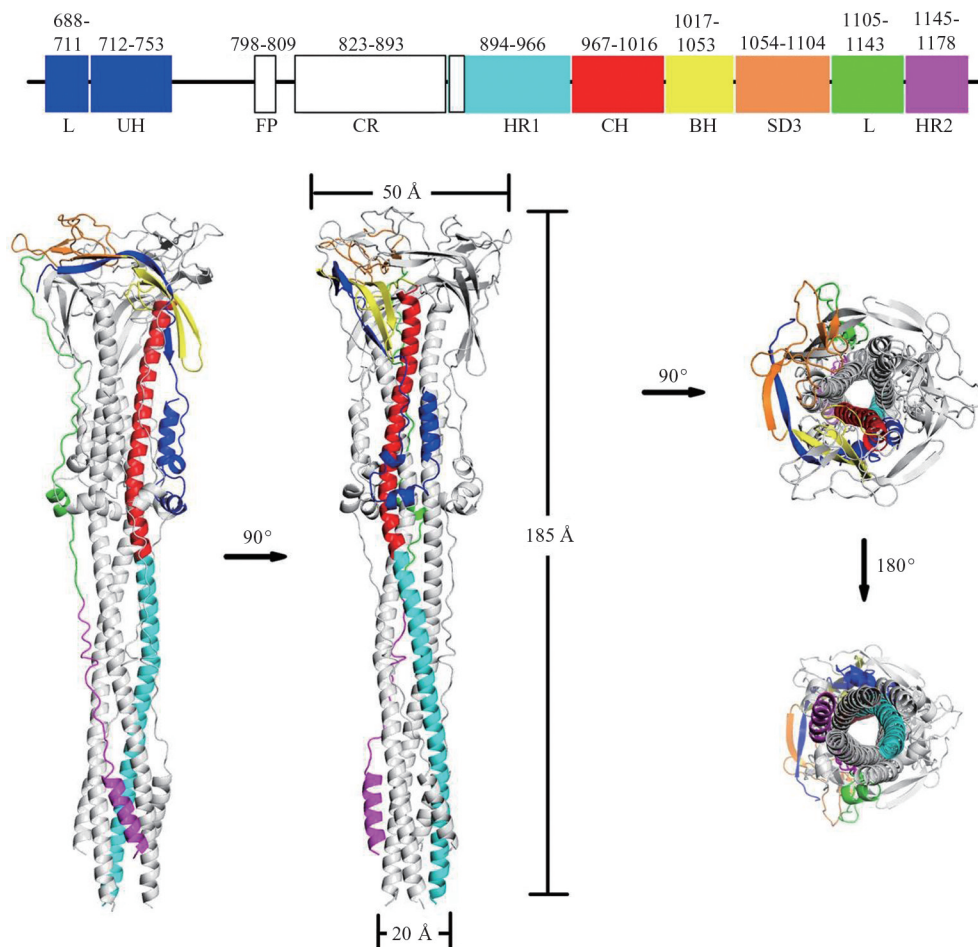


图4 新冠病毒刺突蛋白S2亚基在融合后状态下的三聚体冷冻电镜结构

谓“六螺旋融合核心”(6 helix-bundle fusion core)的形成。S2的HR1区域在三聚体中位于中心位置,形成了扭曲的平行三螺旋束。在融合后状态下,3个HR2区域也形成了螺旋结构,并反向折叠,贴在中心三螺旋束周边的三道沟槽中,组成六螺旋束,称为融合核心。刺突蛋白融合核心的形成是病毒囊膜与细胞膜融合的必要条件,因而成为冠状病毒进入细胞的关键。除冠状病毒外,艾滋病等其他很多具有囊膜的病毒也有类似的膜融合机制。

就融合后状态的刺突蛋白结构而言,新冠病毒与SARS和MERS冠状病毒有所差异的是,位于HR2上游的连接区域在新冠病毒中紧密地结合在了中央三螺旋束上,如同HR2的结合一样^[40]。而在SARS和MERS冠状病毒中,这个连接区域的结合比较松散,在最终的结构中不能完全观察到^[36,41]。新冠病毒在融合核心区域这种更紧密的结合意味着更强的结合力,很可能也提高了它完成膜融合并进入宿主细胞的效率。

2.6 新冠病毒整体结构

冷冻电镜技术不仅有助于刺突蛋白的结构研究,也让新冠病毒整体结构的研究成为可能。传统的冷冻电镜单颗粒三维重构技术建立在一个前提下,即所有颗粒的结构应该是基本一致的,才能进行有效的分类和平均。对于腺病毒等非囊膜病毒而言,其由蛋白质组成的衣壳往往是具备高度对称性的正多面体几何形态,非常利于三维重构的计算。而囊膜病毒由脂分子构成的囊膜是不定形的,因此在电镜下呈现的形态非常不均一(图1),难以通过传统的单颗粒三维重构方法获得整体结构。

为了研究新冠病毒的整体结构,李赛团队等多个研究组采用了新的方法,即冷冻电子断层三维重构技术(cryo-electron tomography, cryo-ET)。他们首先利用冷冻电镜单颗粒三维重构技术解析灭活新冠病毒表面刺突蛋白在不同状态下的结构,再选取一个形态相对完整规则的新冠病毒颗粒进行冷冻电镜断层扫描重构,最后将不同状态的刺突蛋白结构装配到单一新冠病毒颗粒的结构中去,从而获得了新冠病毒完整的结构形态^[42-44](图5^[42])。这既是新冠病毒研究中的重大突破,也是病毒结构生物

学研究方法上的重大突破。

这些利用灭活新冠病毒获得的全病毒结构显示,刺突蛋白在新冠病毒表面同时存在融合前和融合后的结构状态(图5(b)^[42])。虽然有证据显示新冠病毒的刺突蛋白有自发进入融合后状态的趋势,但目前还不清楚在病毒表面观察到的融合后状态确切是由何种原因造成的。由于灭活过程中采用了化学试剂处理的方法,有可能会影响到刺突蛋白的结构状态。另外,新冠病毒在体外培养的过程中,肯定会接触到培养所用宿主细胞表面的ACE2受体蛋白,也有可能触发部分刺突蛋白的构象变化。

灭活新冠病毒表面的刺突蛋白是由宿主细胞生产并装配到病毒颗粒中的,呈现了天然的结构状态,并与此前通过重组表达获得的刺突蛋白的结构相一致^[37]。其中,处于融合前状态下的刺突蛋白三聚体呈现了极大的空间自由度,几乎可以与囊膜表面平行,而最常见的角度是与囊膜法线方向成40°左右的夹角(图5(d)^[42]);与之相对,处于融合后状态下的新冠病毒刺突蛋白则与囊膜表面完全垂直(图5(c)^[42])。这一差异很可能是由于HR2在融合前未能形成融合核心,因而处于一种松散的柔性状态所导致的。

除了表面的刺突蛋白以外,李赛等^[42]还在灭活新冠病毒的整体结构中观察到了核衣壳蛋白被病毒RNA链缠绕之后形成的核糖核蛋白复合体(ribonucleoprotein, RNP, 图5(b)中黄色的球体)。这也是冠状病毒的RNP第一次被测定得到结构,但是其分辨率仍旧很低,难以提示核衣壳蛋白与RNA的确切结合模式。

2.7 新冠病毒非结构蛋白

新冠病毒的ORF1共编码16种非结构蛋白,其中包括主蛋白酶nsp5(也称为3C样蛋白酶,3C-like protease)、木瓜蛋白酶样蛋白酶nsp3、RNA依赖性RNA聚合酶nsp12(RNA-dependent RNA-polymerase, RdRP)、解旋酶nsp13(helicase)^[34]。众所周知,酶是较为常见的药物靶标,易于通过传统的药物筛选和设计方法获得高效的抑制剂,从而阻断酶的功能。因此,新冠病毒非结构蛋白中的酶类也受到较多的关注,特别是深入的结构生物学研究。

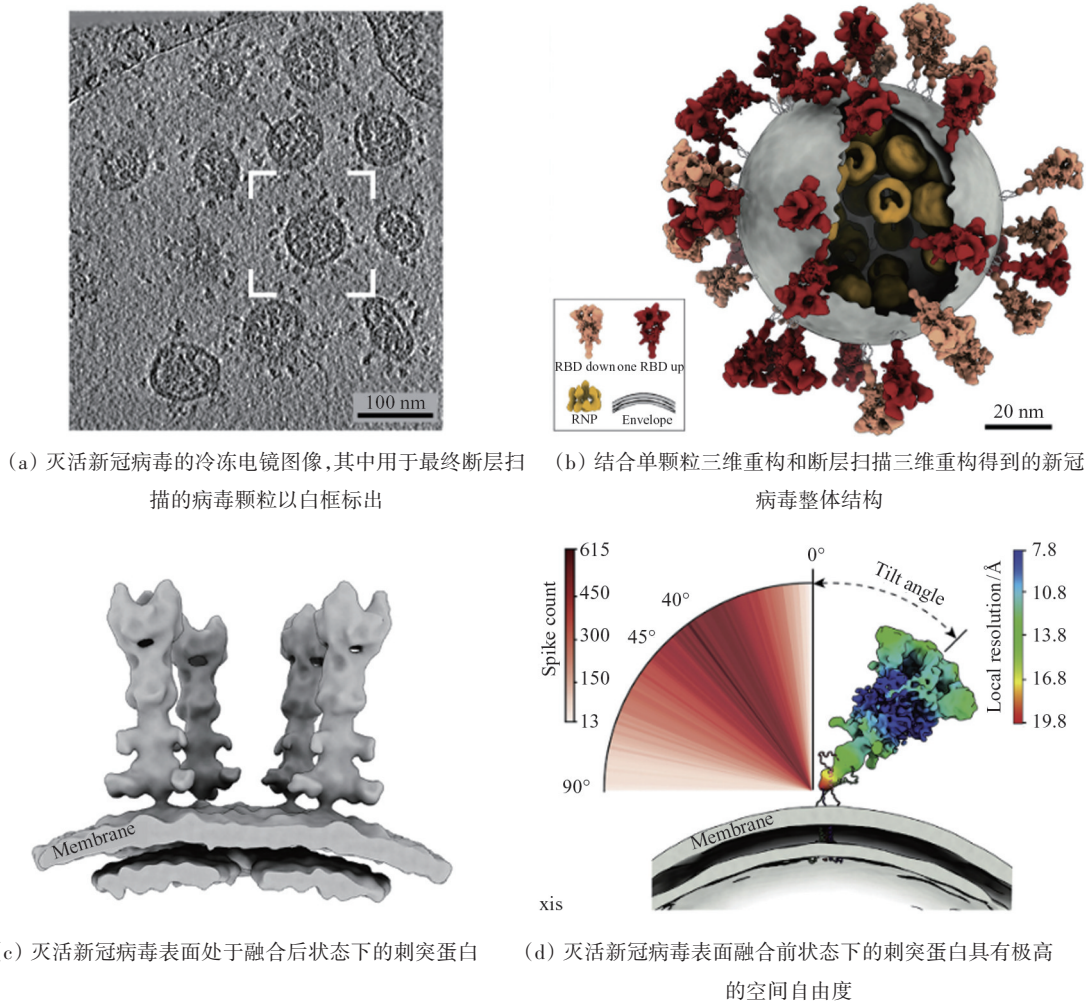


图5 新冠病毒整体结构

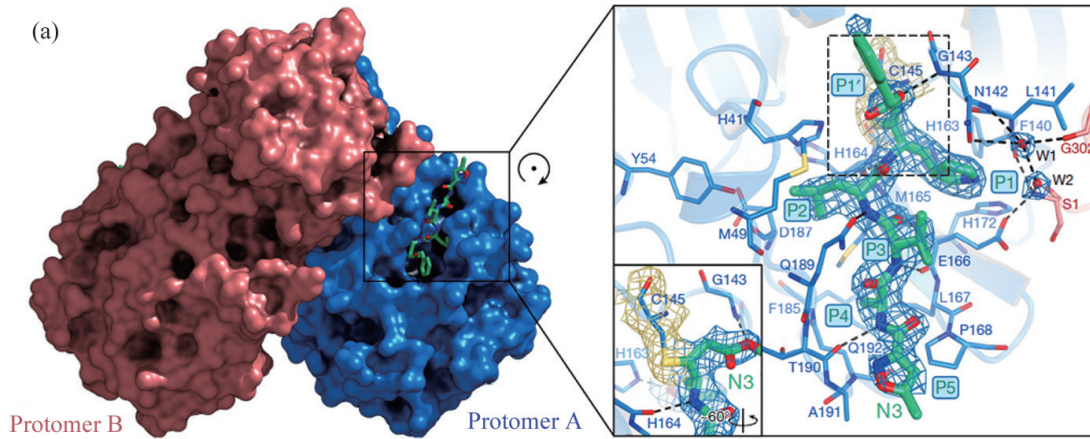
冠状病毒的主蛋白酶尚且处于ORF1直接翻译产生的长多肽上时就完成了自身的折叠,从而具备了蛋白酶活性,并将自身与两端相邻的nsp4和nsp6切开,再进一步将其他非结构蛋白从长多肽上切下来。此后,这些非结构蛋白中的一部分组装成了以RdRP为核心的复制转录复合物,完成冠状病毒基因组的分段转录和基因组复制,产生其他ORF对应的mRNA,才能进行结构蛋白等蛋白质的大量生产。因此,主蛋白酶的催化是冠状病毒在细胞内复制生产的起点,其活性对于冠状病毒极为关键的。

清华大学饶子和研究组在2003年SARS疫情期间解析得到了SARS冠状病毒的主蛋白酶晶体结构^[45],这也是SARS冠状病毒被解析得到的第一种蛋白质结构。得益于在冠状病毒结构生物学研

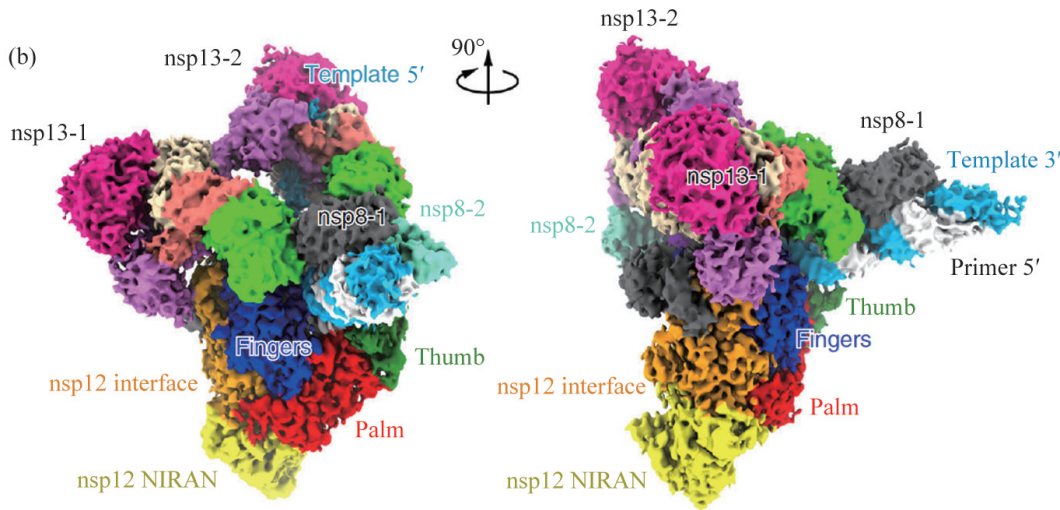
究方面的长年积累,饶子和研究组与杨海涛研究组等合作者于2020年1月就解析得到了新冠病毒主蛋白酶的晶体结构^[46]。该结构显示,与SARS冠状病毒的主蛋白酶相类似,新冠病毒主蛋白酶也是以同源二聚体形式存在的(图6(a)^[46])。

由于人体细胞内不存在与主蛋白酶具有高度同源性的蛋白酶,因此针对主蛋白酶的药物治疗将有很大的可能性不会影响到宿主细胞自身酶类的正常活性。这为其成药提供了便利。饶子和等^[46]报道的新冠病毒主蛋白酶结构中结合了一个筛选得到的抑制剂小分子N3,并与主蛋白酶催化中心的关键残基Cys145的巯基之间形成了不可逆的共价键连接,具有极强的抑制活性。

与主蛋白酶类似,RdRP以RNA为模板合成新



(a) 新冠病毒主蛋白酶同源二聚体的晶体结构,及其与小分子抑制剂的结合模式



(b) 新冠病毒复制转录复合体的冷冻电镜结构

图6 新冠病毒非结构蛋白的结构

RNA链的过程也是人体细胞内所不具有的,因此RdRP的活性对于冠状病毒的复制极其重要,并且其特异性抑制剂将不太可能影响到人体细胞正常酶类的功能。这使得RdRP也成为了非常合适的药物靶标,因而得到了广泛研究。

饶子和研究组在新冠疫情期间先后解析了新冠病毒RdRP与nsp7、nsp8形成的复合物结构^[47];在此基础上又进一步添加了解旋酶和模板-引物RNA的复合物结构^[48];并基于不同状态的RdRP复合物结构分析了它的工作机制和抑制剂的作用机制^[49]。研究表明,nsp7和nsp8虽然不直接参与RNA链的合成,但是对RdRP的RNA聚合酶活性有着至关重要的影响。特别是nsp8,确保了RdRP与

RNA链的紧密结合,不会在合成完成之前提早脱离。另外,解旋酶nsp13也参与了复制转录复合物的装配,并对该复合物的稳定性有着重要贡献(图6(b)^[48])。

需要指出的是,作为冠状病毒生命周期的核心,主蛋白酶和RdRP等相关蛋白都是高度保守的。然而此前对SARS冠状病毒和MERS冠状病毒的RdRP进行的结构生物学研究没有取得很大进展。同样是得益于冷冻电镜相关技术在近年来的迅速发展,新冠病毒RdRP及其相关蛋白的复合物才能够解析获得结构。这些成果为针对新冠病毒的药物设计奠定基础,提供至关重要的结构信息。

3 2020年抗新冠病毒药物研发进展

抗病毒药物的作用机理与抗菌药物有着本质区别。细菌细胞是“活的”生命,具备能量代谢和物质代谢的能力,抗菌药物的作用目标是通过阻断细菌细胞的代谢来杀死细菌。而病毒本身不是活的生命,内部没有能量或物质的代谢,因而也就不可能阻断这些过程来“杀死”病毒。抗病毒药物作用的目标是阻止病毒进入细胞、阻止病毒在细胞内的复制和装配,或阻止装配好的病毒脱离细胞,其最终目的都是降低病毒在宿主体内的传播和复制速度。但是体内已有病毒颗粒的清除只能由宿主自身的免疫系统来完成。目前针对新冠病毒的药物主要集中在阻止病毒进入细胞,以及阻止病毒在细胞内的复制这两方面。

此外,新冠病毒所引发的疫情的严峻性也对其药物研发提出了新的挑战。通常来讲,一种新型药物的开发需要10年左右的时间,而且成功率非常低^[50]。因此,科研人员一方面在各个环节加速针对新冠病毒的新药研发,与此同时也在积极研究已有药物对新冠病毒的作用,也就是“老药新用”。

除了抗病毒药物以外,新冠肺炎的临床治疗还需要炎症相关药物、免疫系统相关药物等其他药物和治疗手段的共同配合。由于这些药物与新冠病毒没有直接相互作用,本文不作过多讨论。

3.1 针对新冠病毒的现有药物重定位

在新冠疫情初期,最有可能快速获得有效药物的方式就是筛选已有药物对新冠病毒的抑制作用,也就是寻求已有药物的重定位(repurposed drugs),也被通俗地称为“老药新用”。

虽然人类对冠状病毒的研究已经有半个多世纪的历史了,并且发生过SARS和MERS的严重疫情,但是此前并没有任何一种专门针对冠状病毒的药物进入人体临床实验阶段。因此也就没有成熟的抗冠状病毒药物可用于针对新冠病毒的研究。

考虑到新冠病毒也是一种RNA病毒,其生命周期中涉及到以RNA为模板合成RNA的生理过程,因此针对RNA聚合酶的现有抑制剂是非常有

可能起效的抗新冠病毒药物,比如瑞德西韦(remdesivir)、利巴韦林(rivavirin)、法匹拉韦(favipiravir)等。

瑞德西韦是由美国吉利德公司(Gilead)开发的一种RNA聚合酶抑制剂药物,目标本来是对抗同属RNA病毒的埃博拉病毒(Ebola virus)。该药物在进入人体细胞后会接受酯化酶和核苷磷酸激酶等酶的催化,从而生成最终的活性物质——一种类似核糖核酸的小分子。这种类似物能够被RNA聚合酶捕捉,进入催化中心,但是不能完成RNA聚合反应,从而阻断RNA聚合酶的功能。这一点已经通过结构生物学的研究得以证实^[49]。

在新冠疫情初期,瑞德西韦的实验室开发已经完成,但还没有进行临床实验,因此也没有获批上市销售。随着疫情的不断恶化,瑞德西韦开始应用于新冠肺炎的临床治疗中,并被认为取得了一定的疗效^[51]。然而最近的一项由世界卫生组织主导的涉及30个国家11330名成年新冠病人的大型双盲临床实验表明,瑞德西韦对于抑制新冠肺炎病情的发展并没有显著效果^[52]。

利巴韦林开发于20世纪70年代,是一种成熟的抗病毒药物,用于丙型肝炎病毒和人类呼吸道合胞病毒等RNA病毒感染的治疗,也曾经被用于治疗MERS病人^[53]。由于该药物分子也是一种核苷类似物,所以其作用机理可能是对RNA聚合酶的抑制,但是确切机制仍不清楚。考虑到利巴韦林对RNA病毒的广谱性,这种药物在新冠疫情期间也被用于对病人的治疗^[54],但是近期的临床实验表明利巴韦林对新冠病毒并没有显著的效果^[55]。

与利巴韦林类似,法匹拉韦也是一种针对RNA病毒的成熟药物,最早由日本一家药物公司开发用于对抗流感病毒,并于2014年在日本获批上市。与利巴韦林和瑞德西韦不同的是,法匹拉韦的药物分子中不包含核糖基团,而仅仅是核苷碱基的含氟类似物,在细胞内经过一系列酶促反应之后才会形成核苷酸类似物,从而抑制病毒的RNA聚合酶。在疫情早期,法匹拉韦也被应用于新冠肺炎的临床治疗,并且有动物试验表明其对新冠病毒有

明确的抑制作用^[56]。多个国家的双盲研究均指出法匹拉韦在新冠肺炎的临床治疗中是有效的^[57],因此该药物也得到了进一步的推广应用。

除了RNA聚合酶之外,新冠病毒的主蛋白酶和木瓜蛋白酶样蛋白酶也是在“老药新用”研究中得到广泛关注的药物靶点。因此,蛋白酶抑制剂类的已有药物在新冠疫情初期也被寄予了厚望,其中就包括洛匹那韦/利托那韦(lopinavir/ritonavir),以及卡莫氟(carmofur)。洛匹那韦/利托那韦是一种成熟的抗艾滋病病毒组合药物,属于“鸡尾酒疗法”的一部分。虽然有研究认为该药物有对抗新冠病毒的可能^[58],但是已有的临床研究并不支持这一结论^[59]。卡莫氟是一种抗肿瘤的化疗药物,带有一个活性较强的羰基。体外试验和结构研究均表明,该羰基能够与新冠病毒主蛋白酶的关键催化残基Cys145形成不可逆的共价键连接,从而将主蛋白酶的活性中心“锁死”^[60]。

虽然ACE2是新冠病毒的主要受体蛋白,但是针对其用药有可能影响正常生理功能。相对而言,新冠病毒的另一种受体CD147则是更合适的药靶选择。由于CD147在肝癌等癌症中扮演了重要的角色,并据此开发出了特异性的CD147抗体药物美妥昔单抗(metuximab)、美珀珠单抗(meplazumab)等,因此这些药物就有可能用于阻断新冠病毒刺突蛋白与CD147的识别和结合。陈志南团队的研究证实,美珀珠单抗的确能够在体外试验中阻断新冠病毒对宿主细胞的感染^[33]。

除作用机制较为明确的现有药物之外,还有一些作用机制不明的药物也在新冠疫情初期被应用于新冠肺炎的临床治疗,并得到了较为广泛的关注和研究,比如氯喹(chloroquine)和氢氯喹(hydroxychloroquine)。这两种药物均是应用超过半个世纪的抗疟疾药物,并且氢氯喹还可以治疗一些寄生于人体细胞内的致病细菌,但是它们的具体作用机制至今不明确。体外试验显示,氯喹和氢氯喹能够高效抑制新冠病毒的复制^[61]。这2种药物也在很多国家被用于新冠肺炎的临床治疗,但是大型的临床试验显示氯喹和氢氯喹对于控制新冠病人的

病情并无明显的效果^[62]。甚至,考虑到这两种药物较为强烈的毒副作用,世界卫生组织已经在其大规模的双盲临床试验中暂停了氯喹和氢氯喹的使用和相关研究^[52]。

3.2 新冠病毒主蛋白酶抑制剂类药物研发

针对病毒所独有的蛋白酶寻找一种小分子抑制剂,这是已经被证明行之有效的一种抗病毒药物思路,在艾滋病毒、丙肝病毒等病毒的药物研发中已有成功案例。由于主蛋白酶是冠状病毒所特有的蛋白酶,在人体细胞中不存在较高同源性的蛋白酶,因此成为一种合适的药物靶标。早在新冠病毒出现之前,针对SARS冠状病毒和MERS冠状病毒的主蛋白酶抑制剂就已经在研究之中,但是并没有获批上市的药物^[63-64]。然而这些已有研究为此次针对新冠病毒主蛋白酶的抑制剂开发奠定了基础,在2020年初的几个月中就有多种抑制剂被报道。下文讨论其中6种,依图7^[65]分别称为化合物1~6。

新冠病毒主蛋白酶催化中心的关键氨基酸残基是含有巯基的半胱氨酸Cys145。由于巯基具有较强的化学活性,因此大部分针对主蛋白酶的抑制剂都是通过与巯基形成不可逆的共价键连接来彻底阻断酶的催化活性。

化合物1~3均有相似的结构,其中的关键功能基团,也就是与半胱氨酸形成共价键的是 α -酮酰胺。而 α -酮酰胺正是抗丙型肝炎病毒的蛋白酶抑制剂药物telaprevir和boceprevir的主要活性基团。这3种化合物与新冠病毒主蛋白酶的复合物晶体结构显示,它们均能很好地结合到酶的活性口袋中,并与Cys145形成共价键连接^[66]。与之相一致的是,3种化合物对新冠病毒主蛋白酶均有较强的抑制力,其中化合物1和3的 IC_{50} 超过了微摩尔量级。另外,小鼠的药物代谢研究显示,化合物2和3还存在很好的肺部趋向性,有利于成药^[60]。

饶子和等^[60]率先报道新冠病毒主蛋白酶晶体结构时,也展示了该酶结合化合物4的复合物结构。该化合物源于饶子和团队此前针对SARS冠状病毒的药物研发成果^[67]。与 α -酮酰胺类抑制剂不同,化合物4利用了共扼加成反应,让自身的一

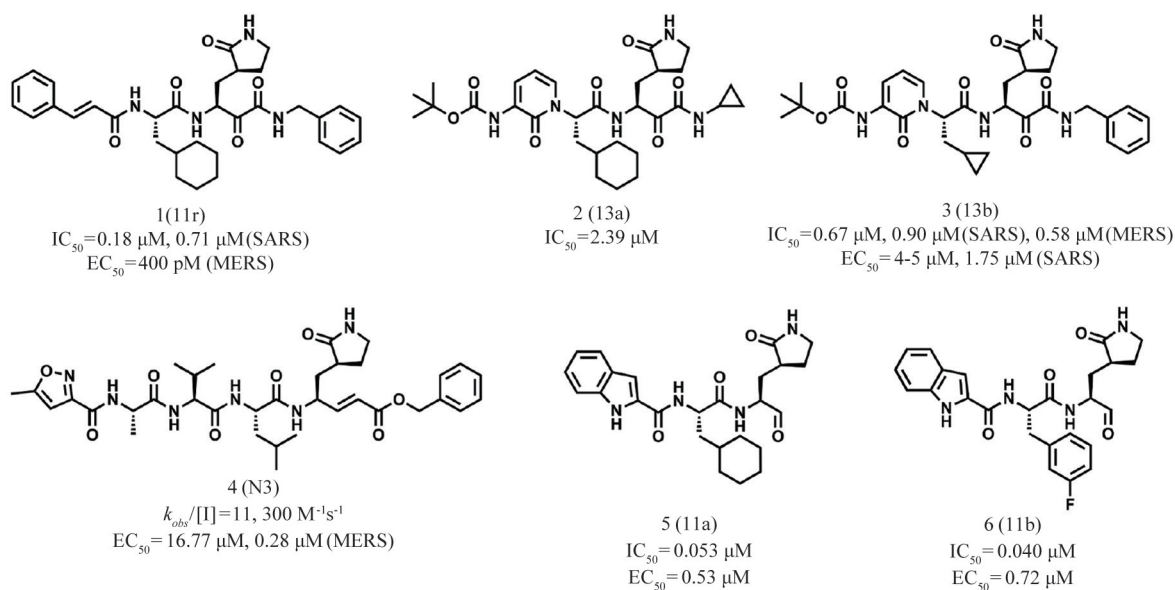


图7 部分已报道的新冠病毒主蛋白酶抑制剂

个碳与 Cys145 形成共价键连接。此外,化合物 4 对于 SARS 冠状病毒和 MERS 冠状病毒等其他冠状病毒的主蛋白酶也有广谱的抑制性。

化合物 5 和 6 比前 4 种化合物都小,对新冠病毒主蛋白酶的抑制活性却是最强的, IC_{50} 均小于 $0.1 \mu mol$ 。2 种化合物与新冠病毒主蛋白酶的复合物晶体结构显示,与 Cys145 形成共价键连接的是化合物上的醛基氧^[68]。化合物 5 的整体结构与化合物 1 和 2 非常类似,只是在 α -酮酰胺的位置替换为醛基,同时也就缺失该位置连接的另外一半。但是化合物 5 的抑制活性却比化合物 1 和 2 提高了 1 个数量级,可能是醛基氧更强的亲电性所致。有趣的是,化合物 5 虽然带有这样一个活跃的醛基,但是并未在模型动物身上显示出很强的毒性^[68]。

3.3 新冠病毒刺突蛋白抗体药物研发

在新冠病毒被鉴定之后,多个研究组都确认其在人体细胞表面的受体与 SARS 冠状病毒的受体一致,同为 ACE2 蛋白的胞外区,并解析了两者的复合物结构。一个直接的药物研发思路就是,通过抗体结合新冠病毒刺突蛋白的 RBD 区域,从而阻断刺突蛋白对受体的识别与结合,令病毒无法进入宿主细胞。

实际上,人体的免疫系统在病毒等外来病原体

的激发下,就会产生能够与之结合的中和抗体,其作用机制正是利用抗体-抗原的紧密结合来阻断抗原蛋白本来的生物学功能。因此,新冠病毒感染者体内产生的中和抗体即有可能成为靶向刺突蛋白 RBD 的抗体药物。在相应的功能研究中被证明具有较强中和活性的抗体包括 S230^[69]、F26G18/F26G19^[70]、CR3014/CR3022^[71]、M396^[72]、S230.15^[73] 等。其中,F26G18 和 F26G19 识别新冠病毒刺突蛋白上的不同表位,被人为构建成嵌合抗体,即抗体的两个可变区分别为 F26G18 和 F26G19 的可变区,以此提高其与刺突蛋白的结合力^[70]。CR3014 和 CR3022 也是结合不同表位的中和抗体,用药时采取了联合使用的方式,这样可以避免病毒对单一中和抗体的逃逸^[71]。上述中和抗体在新冠病毒刺突蛋白 RBD 上识别的表位并不完全相同,但它们与 RBD 的结合力都很强,解离常数甚至可以达到纳摩尔量级,可以有效阻断 RBD 与 ACE2 的结合,具备成药的潜力。由于新冠疫情发展迅速,所以在疫情初期就已经有中和抗体被应用于新冠肺炎的临床治疗,包括多种中和抗体的联合使用,并且已有多种中和抗体进入了药物的临床试验阶段。

虽然中和抗体天然就是来自人体的抗体蛋白,可以直接作为抗体药物使用,但是其识别的表位是

随机的,不一定能完全覆盖 ACE2 的结合位置,因此很可能在病毒突变后失效。要想获得专一性靶向 RBD 表面特定位点的结合抗体,就需要通过人工方法来进行制备。常规的抗体制备方法是使用 RBD 上的目标表位肽段来免疫动物,使后者产生所需抗体。为了让产生的抗体可以成为人类可用的药物,一般被免疫的动物是经过基因改造的,其产生的抗体是人源化的,例如 47D11^[74]。再生元制药公司(Regeneron)还将免疫动物产生的抗体与病人体内产生的中和抗体进行联合使用,利用两者的协同作用来强化抗体对 RBD 的结合^[75]。

另一种获得目标表位对应抗体的方法是对已有的抗体库进行筛选,寻找可以与 RBD 结合的抗体。可供筛选的抗体库包括人源的单链抗体库、单域抗体库,以及新冠疫情前即已建立的抗体库。单域抗体,又称纳米抗体(nanobody)是一种近年来备受瞩目的抗体,天然存在于大羊驼(*Lama glama*)等动物体内。由于缺少 Fc 段,单域抗体作为抗体药物使用反而具有一些优势,比如不容易引发病人强烈的免疫反应等等。研究者也用 RBD 对单域抗体库进行了筛选,找到了能够有效抑制新冠病毒的单域抗体,其与 RBD 的解离常数甚至超过了纳摩尔量级^[76]。

值得一提的是,除了抗体蛋白以外,也可以通过其他蛋白与新冠病毒刺突蛋白 RBD 相结合,抑制其对受体 ACE2 的识别与结合。一种方法是直接使用重组表达获得的人源 ACE2 蛋白胞外区^[77],或经过残基替换改善了可溶性的突变体 ACE2^[78]。另一种方法则是从头设计一个全新的人工蛋白,使之能够与 RBD 结合,以替代抗体的作用^[79]。这些方法都已经被证明是有效的,可以获得结合力接近抗体水平的 RBD 结合蛋白。

目前,靶向新冠病毒刺突蛋白 RBD 的抗体类药物已经大量进入临床试验阶段,数量多达 30 余种,但其中仅有少数进入了三期临床试验^[80]。因此,现在评估此类药物对新冠肺炎的疗效还为时尚早,缺乏充足的数据支撑。

3.4 新冠病毒融合抑制剂药物研发

进入抑制剂(entry inhibitor)类药物是在抗艾

滋病毒的药物研究中产生的,泛指所有能够阻止病毒进入宿主细胞的药物,包括前述的中和抗体类药物。但实际应用中,进入抑制剂一般指通过抑制艾滋病毒表面蛋白 gp41 形成融合核心,从而阻断病毒囊膜与宿主细胞膜的融合过程的药物,因此又称为融合抑制剂(fusion inhibitor)。其代表药物是 T20,商品名为恩夫韦地(Enfuvirtide)。

艾滋病毒所形成的六螺旋融合核心并不是该病毒所独有的。冠状病毒的刺突蛋白也具备这一功能,并通过该融合核心完成进入宿主细胞的膜融合过程。融合抑制剂通常是融合核心当中 HR2 的一部分,因此会竞争性结合到 HR1 中央三螺旋束的沟槽中,从而抑制刺突蛋白自身 HR2 的结合,导致融合核心无法形成,从而中断了病毒进入宿主细胞的过程。

参照 T20 的成功经验,直接应用病毒的 HR2 就可以当作融合抑制剂使用,但是需要通过试验确定最合适的截取区段。中国医学科学院的何玉先研究组发现,HR2 从 1169 至 1204 位残基组成的多肽 IPB02 具有最好的抑制效果^[81]。另外,很多成药多肽都会在 C 端连接胆固醇等疏水基团以增强靶向性。该研究证实 IPB02 连接胆固醇之后也具备更强的抑制活性^[81]。

复旦大学姜世勃研究组与笔者的研究组合作,曾经在 2013 年 MERS 疫情暴发时解析了 MERS 冠状病毒融合核心的晶体结构,并据此研发了一种多肽,能够在体外试验中有效抑制 MERS 冠状病毒的膜融合过程^[82]。在此基础上,姜世勃等于 2019 年报道了一种广谱性的抗冠状病毒进入抑制剂 EK1^[83],并且在此次疫情初期证明 EK1 对新冠病毒同样具有抑制效果^[84]。笔者的研究组则研发了一种专一性靶向新冠病毒融合核心的抑制多肽,虽然对其他冠状病毒无效,但与新冠病毒的融合核心有更紧密的结合能力。

融合抑制剂所靶向的 HR1 区域是冠状病毒进入细胞所需的关键环节,因此高度保守,不像刺突蛋白上的其他区域那样会在病毒传播过程中迅速突变。因此,融合抑制剂类药物能够较好地避免冠状病毒通过突变产生抗药性。作为治疗性药物,融

合抑制剂可以大大减缓病毒在病人体内的扩散速度,从而为其他药物治疗以及病人自身免疫系统杀灭病毒争取时间。此外,融合抑制剂也可以成为防护性药物,为健康人群提供抵抗新冠病毒的细胞表面防护手段。

4 2020年新冠病毒疫苗研发进展

由于病毒并不能被药物“杀死”,所以在与病毒的对抗中,疫苗起着至关重要的作用。人类目前唯一在野外彻底清除掉的病毒——天花病毒,正是通过世界各国广泛的牛痘疫苗接种来消灭的。为了抗击此次新冠疫情,疫苗的研发也是重中之重。

通俗地讲,疫苗的作用就是“训练”受种者的免疫系统,使之能够产生相应的抗体,识别目标病原

体,并形成免疫记忆,在未来目标病原体真正侵入身体时迅速做出响应。因此,传统的疫苗必须与病原体相像才行,比如可以是减弱毒性或灭活的目标病毒本身,也可以是病毒的某一个组成部分,甚至是与目标病毒相近的其他种类病毒,比如消灭天花病毒的牛痘疫苗用的就是以牛为宿主的痘病毒。此外,近年来还出现了重组病毒载体疫苗和核酸疫苗等新型疫苗。

由于减毒疫苗在实际使用中存在着各种各样的问题,通常不会是现代新型疫苗研发的首选。除减毒疫苗以外,上述其他类型的技术路线都出现在了世界各国的新冠病毒疫苗研发之中(图8^[85]),各类项目总计达到214种^[86]。目前,已经有十余种新冠病毒疫苗进入或完成三期临床试验,有少数几种疫苗已经得到了紧急授权,开始了大规模接种。

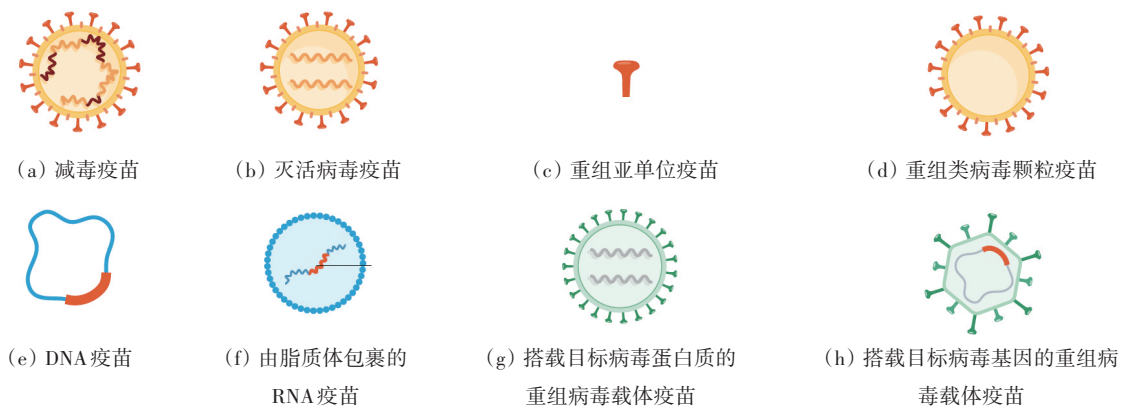


图8 新冠病毒疫苗类型示意

4.1 新冠病毒疫苗的安全性

新冠病毒疫苗的安全性与有效性是人们普遍关注的问题,其中又尤以安全性为甚。由于新冠疫情发展迅猛,形势严峻,世界各国的审批机构均适当放宽了对新冠病毒疫苗的评估流程要求,以期推动新冠病毒疫苗的尽快投入使用。但是这些举措并不会削弱新冠疫苗的安全性,相关评估过程仍然是科学的、严谨的,其结果是可信的。

一种新型疫苗的研发与新药研发类似,一方面成功率较低,另一方面需要较长的时间,仅仅是在临床试验阶段就需要花费5~10年的时间。其中,以安全性评估为主的一期临床试验通常需要1~2年,以初步有效性评估为主的二期临床试验通常需

要2年,而对临床有效性进行全面评估的多中心大规模三期临床试验则需要2~3年时间。通常,上述3种临床试验要依次开展,对上一阶段的试验结果充分评估之后再开展下一阶段试验。

为了加速新冠病毒疫苗的研发,在各国审批机构的允许下,一些疫苗的一期和二期临床试验周期有部分重叠,三期临床评估则与疫苗的工业化生产同步开展^[85]。这些流程上的改变能够大大缩短临床试验周期,但是并不意味着对试验数据的评估标准有所降低,因而不会影响到疫苗的安全性。

疫苗除自身的毒副作用外,还可能导致所谓的疫苗增强性病变(vaccine-enhanced disease),这也是疫苗安全性评估中的一个重要问题。此前针对

SARS冠状病毒和MERS冠状病毒的一部分疫苗研究中发现,某些试验动物接受了疫苗注射后再暴露于真实病毒中时,反而会导致病情的加重,也即疫苗增强性病变^[87-88]。

导致这种情况的一个可能机制是抗体依赖性增强作用(antibody-dependent enhancement, ADE)。当病毒在宿主体内激发了结合力并不强的非中和性抗体时,它们无法起到中和病毒的作用,却有可能成为免疫细胞表面接受病毒识别的受体,为病毒入侵免疫细胞提供了通道,从而加重了感染者的病情。ADE在登革热病毒和艾滋病毒的感染者身上都曾经被观察到。然而冠状病毒疫苗的增强性病变并不能完全用ADE来解释,比如有些实验动物在接种疫苗后并没有产生抗体,但同样出现了病情的加重^[88]。因此,这一现象的确切原因还不清楚,相关的研究证据也仅限于试验动物,甚至存在矛盾之处。

值得注意的是,在目前已经开展的新冠病毒疫苗临床研究中,并无疫苗增强性病变的报道。

4.2 灭活新冠病毒疫苗研发

面对新冠疫情的紧迫性,最为迅速直接的疫苗研发方式就是灭活病毒疫苗。这种方法通过体外人工培养来大量获得目标病毒,然后对收获的病毒采用物理或化学的方法灭活,使之仅保留主要的分子形式,但失去了感染宿主细胞的能力(图8(b))。灭活病毒疫苗的优势在于,并不需要对该病毒免疫人体的具体分子机制有非常透彻的了解,因此可以快速推进相关研发工作。在新冠疫情初期,病毒相关的科学研究工作尚在进行之中,灭活病毒疫苗的研发就已经在中国等很多国家同步开始了。

得益于此前对其他冠状病毒进行体外培养的成功经验,新冠病毒具备了人工培养的技术基础,使灭活疫苗的研发成为可能。目前的新冠病毒主要是在Vero细胞(一种染色体异常的非非洲绿猴肾细胞系)中培养制备的^[89]。制备过程本身的难度不大,主要挑战性在两方面:一是考虑到新冠病毒的危险性,相关制备流程需要在3级生物安全实验室内完成;二是病毒在细胞内的复制数量通常由病毒自身及细胞的特性所决定,往往意味着病毒的得率

不会很高,限制了疫苗的产能。

中国有多家机构进行灭活新冠病毒疫苗的研发,并取得了成功。国药集团下属的武汉生物制品研究所和北京生物制品研究所的2种灭活新冠病毒疫苗已在阿联酋、秘鲁、埃及等多个国家进行了大规模三期临床试验,展示了较强的免疫效果,并已在国内获批开展疫苗接种^[90-91]。而科兴生物公司(Sinovac)的灭活疫苗已经在巴西、土耳其等国完成了三期临床实验^[92],并将在印尼、菲律宾等国家正式开始大规模接种。

4.3 新冠病毒亚单位疫苗研发

由于病毒进入宿主体内后主要以完整病毒颗粒的形式出现在体液环境中,只有进入细胞之后才会解体,所以人体免疫系统产生的抗体往往识别的是病毒颗粒表面的分子结构。相应的,如果我们确切知道被抗体识别的抗原表位是病毒上的哪些区域,就可以将这些区域对应的分子进行体外制备之后直接作为疫苗使用。这种方法获得的就是所谓的亚单位疫苗(图8(c))。

就新冠病毒而言,对病毒感染者血清的研究显示,人体产生的新冠病毒抗体识别的主要是刺突蛋白^[93],尤其是刺突蛋白上的RBD区域^[94]。因此,相应的亚单位疫苗开发主要以重组表达的刺突蛋白或重组表达的刺突蛋白RBD为主。由于刺突蛋白是一个巨大的膜蛋白,因此其重组表达并不容易,得率也并不高。相对而言,单独的RBD是一个可溶蛋白,甚至可以在大肠杆菌的细胞中进行表达,得率较高。

新冠病毒重组亚单位疫苗所面临的挑战之一是刺突蛋白表面严重的糖基化修饰问题。真核生物细胞表面的大部分膜蛋白以及分泌蛋白都会发生糖基化修饰。由于天然的新冠病毒刺突蛋白是在人体细胞中生产出来的,所以也带有糖基化修饰。这层添加在蛋白质表面的糖基如同是不定形的“糖衣”,改变蛋白质原本的表面特性,让抗体的识别变得困难,有利于病毒逃避人体的免疫系统。相应的,以非糖基化的重组蛋白作为疫苗所激发出来的抗体,也很难识别带有糖基化的天然病毒。

由于RBD的功能是与受体ACE2识别并结合,

所以其糖基化程度较低,适合作为重组亚单位疫苗使用。但是RBD的缺陷在于,缺少巨大刺突蛋白上的其他抗原表位,也就无法在受种者体内激发出能够识别其他抗原表位的抗体,因此对受种者的保护作用要弱于完整的重组刺突蛋白疫苗。

新冠病毒亚单位疫苗的另一个挑战在于其刺突蛋白独特的变构特性。如果直接重组表达天然的新冠病毒刺突蛋白,它似乎在体外环境中易于自发转变成融合后状态。以这样的结构状态作为疫苗去激发出来的抗体,将无法识别天然新冠病毒表面那些处于融合前结构状态下的刺突蛋白。基于此前对MERS冠状病毒^[96]和SARS冠状病毒^[95]的研究发现,将HR1末端的2个连续残基替换为2个脯氨酸残基之后,即可导致刺突蛋白锁定在融合前的结构状态下。这一策略已经被部分重组刺突蛋白疫苗的开发所采用,以确保生产得到的疫苗刺突蛋白处于融合前状态^[96]。

除上述传统的亚单位疫苗外,还存在一种病毒颗粒(virus-like particle, VLP)亚单位疫苗(图8(d))。VLP实际上就是一层病毒的外壳,拥有病毒表面所有该具备的蛋白质,因此可以在受种者体内引发真实病毒能够引发的免疫反应,激发抗体,但是由于缺少病毒内部的遗传物质,因此不会在细胞内复制,也就不会危害健康。此前,针对乙型肝炎病毒,以及能够引发女性宫颈癌的人类乳头瘤病毒等病毒的VLP疫苗都在开发之中。此次针对新冠病毒,也有机构在研发VLP亚单位疫苗^[96]。

亚单位疫苗由于不涉及完整病毒的操作,因此安全性较高,但是其制备工艺复杂,而且免疫原性相对于减毒和灭活病毒疫苗来说要弱一些,往往需要配合一些佐剂的使用。这就导致相应的研发周期大大加长,也给接下来的临床试验带来了更多的不确定性。目前世界上仅有美国诺瓦瓦克斯(Novavax)公司的亚单位新冠病毒疫苗进入了三期临床试验阶段^[97]。中国多家机构研发的新冠病毒亚单位疫苗仍处于临床前的实验室研究阶段。

4.4 新冠病毒核酸疫苗研发

由于病毒的蛋白质都是由宿主细胞来表达产生的,如果能够将编码病毒蛋白的核酸直接导入人

体细胞,那么就可以由细胞生产出目标病毒蛋白质,并继而引发免疫反应。这一思路对应的就是核酸疫苗。

核酸疫苗又分为DNA疫苗(图8(e))和RNA疫苗(图8(f))两类。DNA分子相对比较稳定,可以直接注射进入人体,而RNA分子非常容易被体内的各种RNA酶分解破坏,因此需要以脂质体等形式将其包裹起来,以保证RNA能够被完整地递送到受种者的细胞内部。另外,RNA分子的不稳定性也给疫苗的储存带来了难题,往往需要全程低温冷链运输和保存,既提高了成本,也增加了不当操作导致疫苗失效的风险。

核酸疫苗的技术思路新颖,研究历史短,成功的经验并不多。但是这种方法相对比较迅捷,易于快速制备和实现,此前已经在寨卡病毒(Zika virus)和埃博拉病毒的疫苗研究中取得了一定的突破。因此,这种新方法在新冠病毒的疫苗研究中得到了较多的关注,以期能够尽快获得对抗严峻新冠疫情的疫苗。

目前DNA疫苗受限于接种方式复杂,正在开展的新冠病毒疫苗研究项目较少,而RNA疫苗的研究项目较多,并且在临床前的实验室研究中展现了较好的免疫效果。美国莫德纳公司(Moderna)的信使RNA疫苗在三期临床实验中显示了高达94%的有效性^[98],而美国辉瑞制药公司(Pfizer)和德国生物新技术公司(BioNTech)联合研发的信使RNA疫苗在三期临床试验中更是达到了95%的有效性^[99]。由于新冠疫情的紧迫性,美、英等国家采用紧急批准的流程,已经允许这两种核酸疫苗在本国内进行大规模接种。

4.5 重组病毒载体疫苗研发

重组病毒载体疫苗是将腺病毒、减毒流感病毒、仙台病毒(Sendai virus)等人类病毒作为载体,搭载目标病毒的蛋白质或编码目标病毒蛋白质的核酸进入受种者体内,甚至是细胞内,从而达成免疫的目标。这种思路利用了载体病毒对人体天然感染能力,又不具备目标病毒对人体健康的侵害力,可以克服亚单位疫苗和核酸疫苗所面临的一些难题。

典型重组病毒载体疫苗选择的腺病毒及腺相关病毒是人类体内常见的一大类病毒,也是引发一部分普通感冒的病原体,其成员众多,但对人类几乎没有健康威胁。去除了部分毒力因子的减毒流感病毒也是病毒载体的一种常见选择。作为载体的病毒往往都对大多数人群有较强的感染性,能够确保病毒载体在受种者体内完成免疫目标。

如果重组载体病毒搭载的是目标病毒的蛋白质,其效果与VLP重组疫苗非常类似,只是抗原蛋白的载体从目标病毒的外壳换成了其他种类病毒的外壳(图8(g))。按这一思路研发的新冠病毒疫苗主要搭载的是刺突蛋白,而使用的载体病毒包括新城病毒(Newcastle disease virus)、流感病毒,以及狂犬病病毒(rabies virus)等。这些项目暂时还未进入临床试验阶段^[86]。

如果重组载体病毒搭载的是目标病毒蛋白的编码核酸,载体病毒感染受种者的细胞后,就会将这些核酸带入细胞内,令其生产出目标病毒的蛋白(图8(h))。也就是说,载体病毒实际上充当了核酸疫苗的载体,替换了脂质体的角色。这类疫苗又分为复制型和非复制型两类,前者像正常病毒一样,能够在受种者细胞内复制自己,从而感染更多的细胞,生产出更多的免疫抗原,强化了接种效果;而后者去除了复制相关的必要基因,导致病毒载体不会在细胞内自我复制。目前仅有的2种在售埃博拉病毒疫苗,都是携带埃博拉病毒基因的重组病毒载体疫苗,于2019年和2020年先后在欧洲获批上市,并显示了很好的免疫效果,同时也证明了这种新疫苗技术的可行性^[100]。

重组病毒载体疫苗主要的一点劣势在于,其所使用的载体病毒如果此前曾经感染过受种者,那么受种者体内将会存在针对该病毒的抗体,因此会将疫苗病毒迅速中和并清除掉,阻止其完成递送任务。出于同样的原因,此类疫苗也无法重复接种,因此如果需要强化接种,就要选用与首次接种疫苗不同的载体病毒。通常,载体病毒虽然是常见的病毒种类,但具体的毒株不能是人群中常见的,或者必须是经过改造设计的病毒株。

目前已经有4种搭载新冠病毒核酸的重组腺

病毒载体疫苗进入了三期临床试验阶段,其中包括军事科学院陈薇研究组与康希诺生物技术公司(CanSino)合作研发的一款重组腺病毒载体疫苗。该疫苗在二期临床试验中的血清抗体转阳率超过了95%,也就是令95%以上的受种者体内产生了抗体,显示了较强的免疫效果^[101]。

5 结论

冠状病毒的研究历史已经有近百年时间,但是这类病毒一直都没有引起科学界充分的重视。21世纪以来,SARS、MERS和此次新冠疫情的相继爆发提示我们:冠状病毒是人类健康的切实威胁,并很有可能在未来再次卷土重来。所幸的是,2020年科学界在面对新冠病毒时所做出的快速响应表明,人类在生命科学领域的知识储备与研究能力已经有了巨大的进步,这为我们未来应对新的传染病威胁提供了有力的保障。更为重要的是,随着对新冠病毒分子病理机制研究的不断深入,越来越多的证据表明:这种病毒与其他已知病毒相比并没有什么特别之处。另一方面,针对艾滋病毒等RNA病毒的药物研发经验,以及20世纪初对于IBV疫苗的成功开发都令我们相信:只要假以时日,一定也能通过药物、疫苗以及恰当的防疫措施战胜新冠病毒。

参考文献(References)

- [1] Zhu N, Zhang D, China Novel Coronavirus Investigating and Research Team, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382 (8): 727-733.
- [2] Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Gorbalenya A E, Baker S C, et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5: 536-544.
- [3] World Health Organization. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard[EB/OL]. (2019-03-11)[2020-12-21]. <https://covid19.who.int/>.
- [4] Estola T. Coronaviruses, a new group of animal RNA viruses[J]. *Avian Disease*, 1970, 14 (2): 330-336.
- [5] Beach J R, Schalm O W. A filtrable virus distinct from

- that of laryngotracheitis: the cause of a respiratory disease of chicks[J]. *Poultry Science*, 1936, 15: 199–206.
- [6] Lalchandama K. The chronicles of coronaviruses: The bronchitis, the hepatitis and the common cold[J]. *Science Vision*, 2020, 20 (1): 43–53.
- [7] Kendall E J, Bynoe M L, Tyrrell D A. Virus isolations from common colds occurring in a residential school[J]. *British Medical Journal*, 1962, 2(5297): 82–86.
- [8] Hamre D, Procknow J J. A new virus isolated from the human respiratory tract[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1966, 121 (1): 190–193.
- [9] Berry D M, Cruickshank J G, Chu H P, et al. The structure of infectious bronchitis virus[J]. *Virology*, 1964, 23: 403–407.
- [10] Almeida J D, Tyrrell D A. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture[J]. *Journal of General Virology*, 1967, 1(2): 175–178.
- [11] McIntosh K, Dees J H, Becker W B, et al. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1967, 57(4): 933–940.
- [12] Almeida J D, Berry D M, Cunningham C H, et al. *Virology: Coronaviruses*[J]. *Nature*, 1968, 220(5168): 650.
- [13] Cavanagh D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: Experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus[J]. *Avian Pathology*, 2003, 32: 567–582.
- [14] Chan–Yeung M, Xu R H. SARS: Epidemiology[J]. *Respirology*, 2003, 8(S1): 9–14.
- [15] van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink M F, et al. Identification of a new human coronavirus[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(4): 368–373.
- [16] Woo P C, Lau S K, Chu C M, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(2): 884–895.
- [17] World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)[EB/OL]. (2019–03–11) [2020–12–21]. <https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers>.
- [18] Neiderud C J. How urbanization affects the epidemiology of emerging infectious diseases[J]. *Infection Ecology & Epidemiology*, 2015, 5: 27060.
- [19] Jones K, Patel N, Levy M et al. Global trends in emerging infectious diseases[J]. *Nature*, 2008, 451: 990–993.
- [20] Hu B, Zeng L P, Yang X L, et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(11): e1006698.
- [21] Müller M A, Corman V M, Jores J, et al. MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983–1997[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20 (12): 2093–2095.
- [22] King A M Q, Adams M J, Carstens E B, et al. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*[R]. London: the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011.
- [23] Brian D A, Baric R S. Coronavirus genome structure and replication[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2005, 287: 1–30.
- [24] Ziebuhr J. Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(4): 412–419.
- [25] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *The Lancet*, 2020, 395 (10223): 497–506.
- [26] Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579 (7798): 270–273.
- [27] Li W, Moore M, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus[J]. *Nature*, 2003, 426: 450–454.
- [28] Mossel E C, Wang J, Jeffers S, et al. SARS-CoV replicates in primary human alveolar type II cell cultures but not in type I-like cells[J]. *Virology*, 2008, 372(1): 127–135.
- [29] Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor[J]. *Nature*, 2020, 581: 215–220.
- [30] Shang J, Ye G, Shi K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2020, 581: 221–224.
- [31] 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: 1444–1448.
- [32] Li F, Li W, Farzan M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor[J]. *Science*, 2005, 309: 1864–1868.
- [33] 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 Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5: 283.
- [34] Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(4): 418–423.
- [35] Wrapp D, Wang N, Corbett K S, et al. Cryo-EM struc-

- ture of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260–1263.
- [36] Pallesen J, Wang N, Corbett K S, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(35): 7348–7357.
- [37] Cai Y, Zhang J, Xiao T, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Science*, 2020, 369(6511): 1586–1592.
- [38] Walls A C, Park Y J, Tortorici M A, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 281–292.
- [39] Sternberg A, Naujokat C. Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination [J]. *Life Science*, 2020, 257: 118056.
- [40] Fan X, Cao D, Kong L, et al. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3618.
- [41] Walls A C, Xiong X, Park Y J, et al. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion[J]. *Cell*, 2019, 176: 1026–1039.
- [42] Yao H, Song Y, Chen Y, et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus[J]. *Cell*, 2020, 183(3): 730–738.
- [43] Ke Z, Oton J, Qu K, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions[J]. *Nature*, 2020, 588: 498–502.
- [44] Liu C, Mendonça L, Yang Y, et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET[J]. *Structure*, 2020, 28(11): 1218–1224.
- [45] Yang H, Yang M, Ding Y, et al. The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(23): 13190–13195.
- [46] Jin Z, Du X, Xu Y, et al. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors[J]. *Nature*, 2020, 582: 289–293.
- [47] Gao Y, Yan L, Huang Y, et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus[J]. *Science*, 2020, 368(6492): 779–782.
- [48] Yan L, Zhang Y, Ge J, et al. Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5874.
- [49] Wang Q, Wu J, Wang H, et al. Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 polymerase[J]. *Cell*, 2020, 182(2): 417–428.
- [50] The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. *Biopharmaceutical R&D: The process behind new medicines*[R]. Washington DC: PhRMA, 2015.
- [51] Beigel J H, Tomashek K M, Dodd L E. Remdesivir for the treatment of Covid-19—Final report[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 383: 1813–1826.
- [52] WHO Solidarity Trial Consortium. Repurposed antiviral drugs for Covid-19—Interim WHO solidarity trial results [J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2023184.
- [53] Omrani A S, Saad M M, Baig K, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14: 1090–1095.
- [54] Khalili J S, Zhu H, Mak N S A, et al. Novel coronavirus treatment with ribavirin: Groundwork for an evaluation concerning COVID-19[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(7): 740–746.
- [55] Tong S, Su Y, Yu Y, et al. Ribavirin therapy for severe COVID-19: A retrospective cohort study[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 56(3): 106114.
- [56] Kaptein S J F, Jacobs S, Langendries L, et al. Favipiravir at high doses has potent antiviral activity in SARS-CoV-2-infected hamsters, whereas hydroxychloroquine lacks activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(43): 26955–26965.
- [57] Shrestha D B, Budhathoki P, Khadka S, et al. Favipiravir versus other antiviral or standard of care for COVID-19 treatment: A rapid systematic review and meta-analysis[J]. *Virology Journal*, 2020, 17: 141.
- [58] Muralidharan N, Sakthivel R, Velmurugan D, et al. Computational studies of drug repurposing and synergism of lopinavir, oseltamivir and ritonavir binding with SARS-CoV-2 protease against COVID-19[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2020, 16: 1–6.
- [59] Cao B, Wang Y, Wen D, et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe COVID-19[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382(19): 1787–1799.
- [60] Jin Z, Zhao Y, Sun Y, et al. Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27: 529–532.
- [61] Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro[J]. *Cell Research*, 2020, 30(3): 269–271.
- [62] Sun J, Chen Y, Fan X, et al. Advances in the use of chloroquine and hydroxychloroquine for the treatment of COVID-19[J]. *Postgraduate Medicine*, 2020, 132(7):

- 604–613.
- [63] Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V, et al. An overview of severe acute respiratory syndrome–coronavirus(SARS–CoV) 3CL protease inhibitors: peptidomimetics and small molecule chemotherapy[J]. *Journal of Medicine Chemistry*, 2016, 59(14): 6595–6628.
- [64] Liang R, Wang L, Zhang N, et al. Development of small-molecule MERS–CoV inhibitors[J]. *Viruses*, 2018, 10(12): 721.
- [65] Ullrich S, Nitsche C. The SARS–CoV–2 main protease as drug target[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 30(17): 127377.
- [66] Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal structure of SARS–CoV–2 main protease provides a basis for design of improved α –ketoamide inhibitors[J]. *Science*, 2020, 368(6489): 409–412.
- [67] Yang H, Xie W, Xue X, et al. Design of wide–spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(10): e324.
- [68] Dai W, Zhang B, Su H, et al. Structure–based design of antiviral drug candidates targeting the SARS–CoV–2 main protease[J]. *Science*, 2020, 368(6497): 1331–1335.
- [69] Walls A C, Xiong X, Park Y J, et al. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion[J]. *Cell*, 2019, 176(5): 1026–1039.
- [70] Berry J D, Hay K, Rini J M, et al. Neutralizing epitopes of the SARS–CoV S–protein cluster independent of repertoire, antigen structure or mAb technology[J]. *mAbs*, 2010, 2(1): 53–66.
- [71] Ter Meulen J, van den Brink E N, Poon L L M, et al. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants[J]. *PLoS Medicine*, 2006, 3(7): e237.
- [72] Prabakaran P, Gan J, Feng Y, et al. Structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor–binding domain complexed with neutralizing antibody[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(23): 15829–15836.
- [73] Zhu Z, Chakraborti S, He Y, et al. Potent cross–reactive neutralization of SARS coronavirus isolates by human monoclonal antibodies[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(29): 12123–12128.
- [74] Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS–CoV–2 infection[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2251.
- [75] Barnes C O, Jette C A, Abernathy M E, et al. SARS–CoV–2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies[J]. *Nature*, 2020, 588: 682–687
- [76] Huo J, Le Bas A, Ruza R R, et al. Neutralizing nanobodies bind SARS–CoV–2 spike RBD and block interaction with ACE2[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27: 846–854.
- [77] Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS–CoV–2 infections in engineered human tissues using clinical–grade soluble human ACE2[J]. *Cell*, 2020, 181: 905–913.
- [78] Chan K K, Dorosky D, Sharma P, et al. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2[J]. *Science*, 2020, 369: 1261–1265.
- [79] Cao L, Goresnik I, Coventry B, et al. De novo design of picomolar SARS–CoV–2 miniprotein inhibitors[J]. *Science*, 2020, 370(6515): 426–431.
- [80] Shi X J, Li Y, Yan L, et al. Neutralizing antibodies targeting SARS–CoV–2 spike protein[J]. *Stem Cell Research*, 2020, 50: 102125.
- [81] Zhu Y, Yu D, Yan H, et al. Design of potent membrane fusion inhibitors against SARS–CoV–2, an emerging coronavirus with high fusogenic activity[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(14): e00635–20.
- [82] Lu L, Liu Q, Zhu Y, et al. Structure–based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3067.
- [83] Xia S, Yan L, Xu W, et al. A pan–coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike[J]. *Science Advances*, 2019, 5(4): eaav4580.
- [84] 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 Research*, 2020, 30(4): 343–355.
- [85] Krammer F. SARS–CoV–2 vaccines in development[J]. *Nature*, 2020, 586: 516–527.
- [86] World Health Organization. DRAFT landscape of COVID–19 candidate vaccines[R]. Geneva: WHO, 2020.
- [87] Tseng C T, Sbrana E, Iwata–Yoshikawa N, et al. Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e35421.
- [88] Houser K V, Broadbent A J, Gretebeck L, et al. Enhanced inflammation in New Zealand white rabbits when MERS–CoV reinfection occurs in the absence of neutralizing antibody[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(8): e1006565.
- [89] Gao Q, Bao L, Mao H, et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS–CoV–2[J]. *Science*, 2020, 369(6499): 77–81.
- [90] Xia S, Duan K, Zhang Y, et al. Effect of an inactivated vaccine against SARS–CoV–2 on safety and immunogenicity outcomes: Interim analysis of 2 randomized clinical trials[J]. *The Journal of the American Medical Association*

- ciation, 2020, 324(10): 951–960.
- [91] Wang H, Zhang Y, Huang B, et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CoV, with potent protection against SARS-CoV-2[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 713–721.
- [92] Palacios R, Patiño E G, de Oliveira Piorelli R, et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled phase III clinical trial to evaluate the efficacy and safety of treating healthcare professionals with the adsorbed COVID-19 (Inactivated) vaccine manufactured by sinovac-PRO-FISCOV: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial[J]. *Trials*, 2020, 21(1): 853.
- [93] Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(7): 1033–1036.
- [94] 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): 450–456.
- [95] Kirchdoerfer R N, Wang N, Pallesen J, et al. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 15701.
- [96] Hsieh C L, Goldsmith J A, Schaub J M, et al. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes[J]. *Science*, 2020, 369(6510): 1501–1505.
- [97] Keech C, Albert G, Cho I, et al. Phase 1–2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 383(24): 2320–2332.
- [98] Moderna Inc. Moderna announces primary efficacy analysis in phase 3 COVE study for its COVID-19 vaccine candidate and filing today with U.S. FDA for emergency use authorization[EB/OL]. (2020–11–30) [2020–12–21]. <https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-announces-primary-efficacy-analysis-phase-3-cove-study>.
- [99] Pfizer Inc. Pfizer and biontech conclude phase 3 study of COVID-19 vaccine candidate, meeting all primary efficacy endpoints[EB/OL]. (2020–11–18) [2020–12–21]. <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-biontech-conclude-phase-3-study-covid-19-vaccine>.
- [100] Marzi A, Robertson S J, Haddock E, et al. Ebola Vaccine. VSV-EBOV rapidly protects macaques against infection with the 2014/15 Ebola virus outbreak strain[J]. *Science*, 2015, 349(6249): 739–42.
- [101] Zhu F C, Guan X H, Li Y H, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet*, 2020, 396(10249): 479–488.

A review of SARS-CoV-2 in 2020: Molecular pathology and drugs and vaccines in development

YE Sheng

Interdisciplinary Innovation Institute of Medicine & Engineering, Beijing Advanced Innovation Center for Big Data-Based Precision Medicine, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China

Abstract Since SARS-CoV-2 was discovered in December 2019, the coronavirus has caused a serious pandemic of severe respiratory infectious disease, which subsequently spread globally. The scientific community reacted immediately to perform comprehensive and exhaustive studies on SARS-CoV-2 and the diseases it caused. Benefited from the knowledge accumulated in previous studies of SARS-CoV and MERS-CoV, the research work of SARS-CoV-2 got extensive achievements in 2020, especially in molecular pathology. Mastering the knowledge has built a solid foundation for the drug and vaccine development against SARS-CoV-2. In this review, the research history of coronaviruses is briefly reviewed, followed by a summary of molecular pathological studies on SARS-CoV-2 in 2020, as well as the progress of drug and vaccine development against SARS-CoV-2.

Keywords coronavirus; SARS-CoV-2; SARS; MERS; vaccine ●



(责任编辑 徐丽娇)