



# 新型冠状病毒及泛 $\beta$ 冠状病毒广谱中和单抗的研究进展

黄紫妍<sup>1,2,3</sup>, 侯汪衡<sup>1,2,3\*</sup>, 袁权<sup>1,2,3\*</sup>

1 厦门大学公共卫生学院, 福建 厦门 361102

2 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心(厦门大学), 福建 厦门 361102

3 国家药品监督管理局传染性疾病预防检测技术研究及评价重点实验室, 福建 厦门 361102

黄紫妍, 侯汪衡, 袁权. 新型冠状病毒及泛  $\beta$  冠状病毒广谱中和单抗的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4081-4100.  
HUANG Ziyan, HOU Wangheng, YUAN Quan. Broad-spectrum neutralizing monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 and pan-beta-coronaviruses[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4081-4100.

**摘要:** 新型冠状病毒的全球大流行, 给人类的生命健康和社会秩序带来了巨大的危害。疫苗、小分子药物及各类抗体药物的研发在遏制新型冠状病毒感染传播、降低重症率和死亡风险上发挥了积极的作用。然而, 由于新冠病毒庞大的感染基数及自身易突变的特征, 当前已经演化出多种能逃逸疫苗及中和抗体的变异株, 显著削弱了抗体的保护效果。研发新型冠状病毒广谱甚至泛  $\beta$  冠状病毒广谱的中和抗体对于未来新冠变异株及其他高致病性  $\beta$  冠状病毒的防治具有重要意义。本文从新型冠状病毒中和抗体的筛选制备策略、作用机制、中和效果及广谱性等方面进行了系统综述, 并对当前面临的挑战和未来的发展方向进行了讨论和展望, 以期后续相关研究提供参考。

**关键词:** 新型冠状病毒; 广谱中和单抗; 突变株;  $\beta$  冠状病毒

资助项目: 国家自然科学基金(U1905205)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U1905205).

\*Corresponding authors. YUAN Quan, Tel: +86-592-2880627, Fax: +86-592-2181258, E-mail: yuanquan@xmu.edu.cn;

HOU Wangheng, E-mail: houwangheng@xmu.edu.cn

Received: 2023-02-14; Accepted: 2023-06-06; Published online: 2023-06-14

# Broad-spectrum neutralizing monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 and pan-beta-coronaviruses

HUANG Ziyang<sup>1,2,3</sup>, HOU Wangheng<sup>1,2,3\*</sup>, YUAN Quan<sup>1,2,3\*</sup>

1 School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

2 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases (Xiamen University), Xiamen 361102, Fujian, China

3 NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Infectious Disease Diagnostic Technology, Xiamen 361102, Fujian, China

**Abstract:** The COVID-19 pandemic caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) threatens human health and disturbs the social order. The development of vaccines, oral drugs, and antibodies against COVID-19 has played a positive role in controlling the spread of SARS-CoV-2 infections, reducing the disease severity and death risk. However, due to the large number of infected people and the rapid mutations of the virus, numerous variants that can evade the vaccines and neutralizing antibodies emerged and significantly weakened the protective effects of the vaccines and antibodies. Developing broad-spectrum neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 or even pan-beta-coronaviruses is of great importance for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 variants and other highly pathogenic beta-coronaviruses. This article systematically reviews the strategies for the screening and preparation, mechanisms of action, neutralization effects, and broad-spectrum properties of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2, and discusses the current challenges and future research directions, aiming to provide a reference for the future research in this field.

**Keywords:** severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; broad-spectrum neutralizing antibody; variants; beta-coronaviruses

新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)对全世界造成了沉重的公共卫生负担。据世界卫生组织报告,截至2022年12月15日,全球范围内新型冠状病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)确诊病例超过6.47亿,其中包括663万例死亡病例。作为COVID-19的重要治疗和预防药物之一,SARS-CoV-2单克隆抗体在预防疾病和降低重症率等方面展现出良好的效果<sup>[1-4]</sup>。2021年12月,我国药品监督管理局附条件批准腾盛博药的中和抗体联合治疗药物安巴韦单抗(amubarvimab)和罗米司韦单抗(romlusevimab)

上市<sup>[1]</sup>。同期,阿斯利康长效抗体组合evusheld(恩适得,tixagevimab与cilgavimab的组合)获得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),用于新冠感染暴露前预防。Evusheld作为全球唯一一款获批的新冠病毒暴露前预防药物,可在用药后6个月内降低约80%感染风险<sup>[2]</sup>。2022年2月,美国FDA宣布批准礼来新冠中和抗体bebtelovimab的紧急使用授权,在轻度至中度COVID-19患者中,使用bebtelovimab进行治疗可提高病毒清除率、缩短临床症状缓解的时间<sup>[4]</sup>。此外,还有若干种中和

抗体药物曾获得 EUA 或正在进行临床研究。总体上, 无论从临床试验数据还是真实世界紧急应用效果来看, 中和抗体药物对减轻 SARS-CoV-2 感染所致疾病伤害具有积极作用。

然而, 随着新冠疫情在全球范围内的持续进展, 具备免疫逃逸能力的变异株不断涌现并持续迭代。2020 年至今, 世界不同地区曾经或正在流行的主要关注变异株 (variants of concern, VOC) 包括 alpha (B.1.1.7 家系)、beta (B.1.351 家系)、gamma (P.1 家系)、delta (B.1.617.2 家系)、omicron (B.1.1.529 家系) 等。其中以 omicron 变异株的抗原性转变最为显著, 对中和抗体及疫苗诱导体液免疫的逃逸能力也最强<sup>[5-8]</sup>。体外病毒中和试验显示, 在授权用于临床的治疗性抗体中, 只有 bebtelovimab 对 omicron 亚系 BA.2.12.1 和 BA.4/5 保持相对完全效力<sup>[9]</sup>, 其他单抗对 omicron BA.1 到 BA.4/5 相关变异株的中和活性均存在较大幅度的降低甚至完全丧失。近期, BQ.1.1、XBB、CH.1.1 等具有更显著免疫逃逸能力的 omicron 亚系突变株在多个国家流行, 使大量上市或 EUA 的单抗药物失去中和效果<sup>[10-13]</sup>。因此, 包括 bebtelovimab 在内的多个抗体药物被 FDA 撤销 EUA。不断变异的 SARS-CoV-2 给新一代抗体药物的开发带来巨大挑战, 研发识别跨变异株高度保守表位的广谱中和抗体势必成为当前和未来研究的重要方向。此外, 由于 SARS-CoV-2、非典病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 等对人类具高致病性的冠状病毒均属于  $\beta$  冠状病毒亚属成员 (beta-coronavirus,  $\beta$ -CoVs), 开发针对泛  $\beta$ -CoVs (pan-beta-coronavirus, pan- $\beta$ -CoVs) 的广谱中和抗体, 对当前及未来可能流行的冠状病毒的防治具有重要意义。科学界和产业界相关研究者针对 SARS-CoV-2 及 pan- $\beta$ -CoVs 广谱中和单抗已经开展了大量研究, 本文较为系统地

汇总了截至 2022 年底已报道的 SARS-CoV-2 及 pan- $\beta$ -CoVs 数十种中和抗体及相关进展, 下文从中和抗体的检测方法及筛选制备策略、作用机制、广谱中和抗体的其他效应等方面进行系统介绍, 并对各区域抗体中和效果及广谱性, 以及广谱中和抗体的未来筛选评价策略进行讨论和展望。

## 1 中和抗体检测方法和筛选制备策略

抗体的中和活性检测是筛选制备 SARS-CoV-2 及 pan- $\beta$ -CoVs 中和抗体的关键步骤, 目前常用的方法包括真病毒中和试验、假病毒中和试验以及替代中和试验等。SARS-CoV-2 的真病毒中和试验需要在 3 级生物安全实验室进行, 主要采用空斑减少法 (plaque reduction neutralization test, PRNT) 或者细胞病变效应观察法<sup>[14]</sup>。由于这些方法需要使用活病毒, 操作复杂且耗时较长, 不适合高通量抗体筛选。假病毒中和试验是目前应用最为广泛的 SARS-CoV-2 中和抗体检测方法, 目前主要利用水疱性口炎病毒、慢病毒等载体包装携带 SARS-CoV-2 刺突 (spike, S) 蛋白的病毒颗粒并携带报告基因以替代活病毒进行中和测试<sup>[15-16]</sup>。由于 SARS-CoV-2 诱导产生的中和抗体主要针对 S 蛋白, 假病毒与真病毒方法之间存在较好的相关性。假病毒中和检测大大提高了中和抗体检测筛选的通量和便利性, 且较容易包装携带不同  $\beta$  冠状病毒的 S 蛋白, 可应用于 pan- $\beta$ -CoVs 广谱中和抗体筛选。由于 S 蛋白的受体结合区 (receptor-binding domain, RBD) 与主要细胞受体血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 间相互作用较强, 研究者们还开发了基于免疫化学方法 (如酶联免疫吸附试验) 的替代检测方法, 通过测量抗体对 S/RBD-ACE2 结合的阻断来评估中和能力, 也可用于检测筛选能直接阻断两者结合的抗体。

此外,本课题组开发了基于重组 S 蛋白的入胞可视化荧光探针,可用于高通量筛选具有高效入胞阻断作用的单抗,并解析单抗发挥中和作用的机制<sup>[17]</sup>。综上所述,上述方法均可用于 SARS-CoV-2 及 pan- $\beta$ -CoVs 中和抗体的筛选检测,但由于广谱中和抗体的评估筛选需要测量对多种不同毒株的活性,未来需进一步开发能实现不同病毒、毒株多通道检测的新方法,以提高研究效率。

在抗体制备的免疫策略方面,早期研究提示从 SARS-CoV 或 SARS-CoV-2 的感染者或免疫者中获得的抗体具有 SARS-CoV/SARS-CoV-2 交叉反应或交叉中和活性<sup>[18]</sup>,这是由于 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 及其他 SARS-CoV 相关病毒的 S 蛋白具有较高同源性,部分抗体识别表位在不同病毒间保守<sup>[19-20]</sup>。而许多 SARS-CoV/SARS-CoV-2 交叉中和抗体对 SARS-CoV-2 变异株也常具有较好活性<sup>[21-27]</sup>,尽管 omicron 变异株的多个亚系也能有效逃逸此类抗体。多项研究采用 SARS-CoV、SARS-CoV-2 以及其他冠状病毒抗原联合或序贯免疫的方式,诱导保守表位抗体应答的增强,以提高获得广谱中和抗体的效率<sup>[28]</sup>。冠状病毒广谱中和抗体的产生不仅依赖于病毒共有的保守表位的刺激,也受益于自然感染或接种疫苗过程中,不同  $\beta$  冠状病毒(或突变株)刺激免疫系统后,抗体细胞突变获得更强亲和力和交叉反应性。如单克隆抗体 S2P6 可能是由人冠状病毒(human coronavirus, HCoV) HCoV-OC43 感染所诱导的,并且通过后续自然感染 SARS-CoV-2 或 HCoV-HKU1 时的抗体细胞突变扩展了抗体的特异性<sup>[29]</sup>;类似的情况更多出现在鼠杂交瘤单克隆抗体筛选技术中,通过有计划的序贯免疫获得交叉中和抗体<sup>[24,30-32]</sup>。目前获得 SARS-CoV-2 及相关病毒中和抗体的技术策略主要包括:(1) 从早期 SARS-CoV 感染恢复者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear

cell, PBMC), 或者 SARS-CoV 抗体中筛选出可交叉中和 SARS-CoV-2 的抗体,如 S309<sup>[33]</sup>。(2) 利用恢复期 COVID-19 患者 PBMC 进行筛选。(3) 利用实验动物,如小鼠、羊驼、兔等进行免疫筛选。(4) 基于合成的抗体文库进行筛选。在制备技术方面,主要包括外周血单个记忆 B 细胞测序、杂交瘤筛选技术以及高通量体外筛选技术(如噬菌体展示技术)等。杂交瘤筛选技术较为成熟,通过对小鼠进行不同冠状病毒抗原联合或序贯免疫可以较方便地获得广谱中和抗体,但其制备周期较长,且获得的鼠源抗体还需进一步人源化改造。噬菌体展示技术的制备时间较杂交瘤技术短,可直接进行大规模人源化抗体制备,但其技术复杂,且受抗体库影响大。外周血单个记忆 B 细胞测序可以直接获取人源单克隆抗体,且开发周期相对较短,但应用于广谱中和抗体筛选时,还需考虑捐献者的感染情况或疫苗接种情况。有研究表明,接种疫苗且感染过新冠病毒的捐献者血清对不同冠状病毒茎螺旋(stem helix, SH)区域的交叉反应性较强,而仅感染或仅接种疫苗的捐献者血清对该区域则几乎不反应<sup>[34]</sup>,提示在疫情后期对“混合免疫者”使用外周血单个记忆 B 细胞测序进行筛选获得广谱中和抗体的可能性更大。

本文以广谱性为主要选择依据,兼顾抗体中和效果,总结了截至 2022 年底已报道的数十个具备跨新冠变异株或跨  $\beta$ -CoVs 中和活性的 SARS-CoV-2 单克隆抗体(表 1)。根据抗体对不同冠状病毒或突变株的中和效果,我们大致将广谱中和抗体分为:(1) 新冠病毒突变株间广谱中和;(2)  $\beta$  冠状病毒(含 3 种严重致病性人类冠状病毒)亚属内及亚属间广谱中和;(3) 跨冠状病毒属间广谱中和 3 种不同类型。这些抗体的结合区域、已知可中和的病毒或变异株类型、制备获得的技术、诱导产生的免疫原总结展示于表 1。从

表 1 已报道新型冠状病毒及泛  $\beta/\alpha$  冠状病毒广谱中和单抗概览

Table 1 Broad-spectrum neutralizing monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 and pan-beta/alpha-coronaviruses

Class	Antibodies	Binding epitope	Viruses neutralized <sup>a</sup>	Isolation method	Immunogen	Reference
(1)	Brii-198 (romlusevimab)	RBD	SARS-CoV-2 (D614G, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.3)	PBMC	SARS-CoV-2	[1]
(1)	LY-CoV1404 (bebtelovimab)	RBM	SARS-CoV-2 (D614G, alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.3, BA.4/5, BQ.1.1)	PBMC	SARS-CoV-2	[9,35-38]
(1)	COV2-2196 (tixagevimab)	RBM	SARS-CoV-2 (D614G, alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.3, BA.4/5)	PBMC	SARS-CoV-2	[9,36-39]
(1)	COV2-2130 (cilgavimab)	RBM	SARS-CoV-2 (D614G, alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.3, BA.4/5)	PBMC	SARS-CoV-2	[9,36-39]
(1)	XGv347	RBM	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.4/5, BQ.1, BQ.1.1)	PBMC	SARS-CoV-2 (CoronaVac)	[40]
(1)	ZCB11	RBM	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.4/5)	PBMC	SARS-CoV-2 (BNT162b2)	[41]
(1)	C1520	NTD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.4/5, BQ.1, BQ.1.1)	PBMC	SARS-CoV-2	[42]
(1)	C1717	NTD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.4/5, BQ.1, BQ.1.1, XBB, XBB.1)	PBMC	SARS-CoV-2	[42]
(1)	S3H3	SD1	SARS-CoV-2 (alpha, beta, delta, BA.1, BA.2, BA.4/5, BQ.1, BQ.1.1, XBB, XBB.1)	Hybridoma technology	SARS-CoV-2 (RBD-mFc)	[43-44]
(1)	sd1.040	SD1	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.4/5)	PBMC	SARS-CoV-2	[45]
(2)	P008_60	SD1	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[46-47]
(2)	S2L28	NTD	SARS-CoV-2; RaTG13-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[48]
(2)	S2M28	NTD	SARS-CoV-2; RaTG13-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[48]
(2)	S2X28	NTD	SARS-CoV-2; RaTG13-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[48]
(2)	S2X333	NTD	SARS-CoV-2; RaTG13-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[48]
(2)	Brii-196 (amubarvimab)	RBM	SARS-CoV-2 (D614G, alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.3, BA.4/5); RaTG13-CoV; PCoV-GD	PBMC	SARS-CoV-2	[1,49]
(2)	CR3022	RBD	SARS-CoV-2; SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV	[22,50-51]
(2)	7D6	RBD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma); SARS-CoV	Hybridoma technology	SARS-CoV-2 (S)	[24]
(2)	6D6	RBD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma); SARS-CoV	Hybridoma technology	SARS-CoV-2 (S), SARS-CoV (S), MERS-CoV (RBD)	[24]
(2)	2B4	RBD	SARS-CoV-2; SARS-CoV	Hybridoma technology	SARS-CoV-2 (RBD)	[17]
(2)	S2H97	RBD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, BA.1); SARS-CoV; PCoV-GD	PBMC	SARS-CoV-2	[26,52]

(待续)

(续表 1)

Class	Antibodies	Binding epitope	Viruses neutralized <sup>a</sup>	Isolation method	Immunogen	Reference
(2)	ADI-55688, et al.	RBM	SARS-CoV-2; SARS-CoV; WIV1-CoV	PBMC	SARS-CoV	[53]
(2)	ADG-1	RBM	SARS-CoV-2; SARS-CoV; WIV1-CoV	Yeast surface display technology	SARS-CoV	[19]
(2)	ADG-2	RBM	SARS-CoV-2 (D614G, alpha, beta, gamma, delta, BA.1); SARS-CoV; WIV1-CoV; SHC014-CoV	Yeast surface display technology	SARS-CoV	[19,36]
(2)	ADG-3	RBM	SARS-CoV-2; SARS-CoV; WIV1-CoV; SHC014-CoV	Yeast surface display technology	SARS-CoV	[19]
(2)	7B11	RBM	SARS-CoV-2; SARS-CoV	Hybridoma technology	SARS-CoV (RBD)	[54]
(2)	CV2-71	RBM	SARS-CoV-2 (beta); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[21]
(2)	CV3-17	RBM	SARS-CoV-2 (beta); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[21]
(2)	S2K146	RBM	SARS-CoV-2 (alpha, beta, delta, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.3, BA.4/5, BQ.1, BQ.1.1, XBB, XBB.1); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[9,26,55]
(2)	16D8	RBM	SARS-CoV-2; SARS-CoV	Hybridoma technology	SARS-CoV-2 (S) SARS-CoV (S) MERS-CoV (RBD)	[24]
(2)	S2E12	RBM	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2); RaTG13-CoV; PCoV-GD; PCoV-GX	PBMC	SARS-CoV-2	[36,52,55]
(2)	SA55	RBD	SARS-CoV-2 (D614G, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.2.12.1, BA.4/BA.5, BQ.1, BQ.1.1, XBB, CH.1.1); SARS-CoV; PCoV-GD; RaTG13-CoV	PBMC	SARS-CoV SARS-CoV-2 (CoronaVac/ZF20 01)	[13,56-57]
(2)	SA58	RBD	SARS-CoV-2 (D614G, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.2.12.1, BA.4/BA.5, BQ.1, BQ.1.1, XBB, CH.1.1); SARS-CoV; PCoV-GD; RaTG13-CoV	PBMC	SARS-CoV SARS-CoV-2 (CoronaVac/ZF20 01)	[13,56-57]
(2)	DH1047	RBD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1); SARS-CoV; WIV1-CoV; SHC014-CoV	PBMC	SARS-CoV-2/S ARS-CoV	[9,23,58]
(2)	COVA1-16	RBD	SARS-CoV-2; SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[59-60]
(2)	2-36	RBD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, BA.1); SARS-CoV; PCoV-GD; PCoV-GX; RaTG13-CoV; WIV1-CoV; SHC014-CoV; LYRa11-CoV; Rs7327-CoV; Rs4231-CoV; Rs4084-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[22,37]
(2)	CV2-75	RBD	SARS-CoV-2 (beta); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[21]
(2)	H014	RBD	SARS-CoV-2; SARS-CoV	Phage display technique	SARS-CoV (RBD)	[61]
(2)	EY6A	RBD	SARS-CoV-2; SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[62]
(2)	S309	RBD	SARS-CoV-2 (D614G, alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.2.75, BA.3, BA.4/5, BQ.1, BQ.1.1, XBB, XBB.1, CH.1.1); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV	[22,33,36-37]
(2)	CV38-142	RBD	SARS-CoV-2 (alpha, beta); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[27,63]

(待续)

(续表 1)

Class	Antibodies	Binding epitope	Viruses neutralized <sup>a</sup>	Isolation method	Immunogen	Reference
(2)	S2X259	RBD	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, BA.1); SARS-CoV; PCoV-GD; PCoV-GX; RaTG13-CoV; WIV1-CoV; WIV16-Co; RsSHC014-CoV;	PBMC	SARS-CoV-2	[26,64]
(2)	h11B11	ACE2	SARS-CoV-2 (alpha, beta, BA.2, BA.2.75 BA.4/5, BQ.1, BQ.1.1, XBB, XBB.1); SARS-CoV	Hybridoma technology	hACE2 (19-615)[65]	
(2)	CV3-25	S2 stem-helix region	SARS-CoV-2 (beta); SARS-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[21]
(2)	28D9	S2 stem-helix region	HCoV-OC43; SARS-CoV-2; SARS-CoV	Hybridoma technology	HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV	[32]
(2)	CC40.8	S2 stem-helix region	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta); SARS-CoV; WIV1-CoV; Pang17; SHC014-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[66]
(2)	C77G12	S2' FP	SARS-CoV-2 (BA.1, BA.2); SARS-CoV; MERS-CoV; HCoV-NL63; HCoV-229; WIV1-CoV	PBMC	SARS-CoV-2	[67]
(2)	WS6	S2 stem-helix region	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1); SARS-CoV; RaTG13-CoV; PCoV-GD; PCoV-GX; Frankfurt1; Civet007-2004; WIV1-CoV; SHC014-CoV	Hybridoma technology	SARS-CoV-2 (mRNA vaccine)	[68]
(3)	B6	S2 stem-helix region	MERS-CoV; HCoV-HKU4; HCoV-OC43	Hybridoma technology	MERS-CoV SARS-CoV	[31]
(3)	S2P6	S2 stem-helix region	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta); SARS-CoV; PCoV-GD; MERS-CoV; HCoV-OC43	PBMC	SARS-CoV-2	[29,68]
(3)	VN01H1	S2' FP	SARS-CoV-2 (BA.1, BA.2); SARS-CoV; MERS-CoV; HCoV-NL63; HCoV-229E; WIV1-CoV; PDF-2180	PBMC	SARS-CoV-2 (BNT162b2)	[67]
(3)	VP12E7	S2' FP	SARS-CoV-2; SARS-CoV; MERS-CoV; HCoV-NL63; HCoV-229E; WIV1-CoV; PDF-2180	PBMC	SARS-CoV-2 (BNT162b2 with prior infection)	[67]
(3)	76E1	S2' FP	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1); SARS-CoV; HCoV-OC43; MERS-CoV; HCoV-NL63; HCoV-229E; HCoV-HKU1 (binding activity only)	PBMC	SARS-CoV-2	[69]
(3)	COV44-62	S2' FP	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.4/5); SARS-CoV; HCoV-OC43; MERS-CoV; HCoV-NL63; HCoV-229E	PBMC	SARS-CoV-2	[70]
(3)	COV44-79	S2' FP	SARS-CoV-2 (alpha, beta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.4/5); SARS-CoV; HCoV-OC43; HCoV-NL63; HCoV-229E	PBMC	SARS-CoV-2	[70]

The classification is based on the reported neutralizing breadth of monoclonal antibodies: (1) Broad-neutralization among SARS-CoV-2 VOCs; (2) Broad-neutralization within or among beta-coronaviruses sublineages; (3) Broad-neutralization among coronaviruses. <sup>a</sup>: Viruses neutralized were listed according to the data presented in the original articles, the VOCs neutralized were shown in parentheses.

表格及文献的汇总分析来看,识别 S1 亚基尤其是 RBD 区的单抗相较于识别 S2 亚基的单抗具有更高的体外中和效力,高中和单抗  $IC_{50}$  可达到 1–10 ng/mL;已报道的部分 S2 抗体,如 S2P6、76E1 和 COV44-62 等除对 SARS-CoV-2、SARS-CoV 具有中和活性,同时对 MERS-CoV、HCoV-OC43 甚至  $\alpha$ -CoVs 的 HCoV-NL63、HCoV-229E 展现出交叉中和活性,这些特点与抗体中和机制和不同病毒 S 蛋白序列的相对保守性有关。

## 2 抗体中和机制

以 SARS-CoV-2 为代表的  $\beta$  冠状病毒的 S 蛋白在结合靶细胞表面受体 ACE2 及介导随后的病毒入胞中起到关键作用,是中和抗体的主要结合靶标,也是疫苗和抗病毒药物研发的关注重点<sup>[71]</sup>。RBD 是 S 蛋白的 S1 亚基上负责结合受体的区域,也是恢复患者血清中和抗体的主要识别靶标<sup>[72]</sup>,而受体结合基序(receptor-binding motif, RBM)是 RBD 结构域近羧基末端中的一个区域,包含与宿主受体直接相互作用的最小结构域<sup>[73]</sup>。经胞外途径进入时,病毒通过 RBD 与 ACE2 结

合,弗林蛋白酶在 S1/S2 酶切位点将 S 蛋白切割为仅有限接触的 S1 和 S2 两个亚基,并暴露 S2' 位点<sup>[74]</sup>。细胞表面跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2)在 S2'位点切割 S 蛋白并激活 S2 结构域<sup>[75]</sup>。S2 由融合前构象转为融合后构象,七肽重复结构 (heptad repeat, HR) HR1 和 HR2 形成六螺旋束融合核心,释放基因组<sup>[76-78]</sup>。通过内吞途径进入时,病毒被内吞到内体中,在内体低 pH 环境下组织蛋白酶 L 切割激活 S2,通过内体膜融合途径释放病毒基因组<sup>[79]</sup>。理论上,能抑制或阻止上述病毒感染过程中任一步骤的抗体均可能表现出对病毒的中和活性。根据现有研究,已报道的中和抗体主要作用机制可分为 3 类(图 1),其一是某些抗体结合病毒粒子后可能诱导 S 蛋白的结构和功能改变,在病毒粒子结合接触细胞前降低病毒感染能力(图 1A);其二是抗体结合 S1 亚基阻断或抑制病毒与细胞受体 ACE2 的相互作用,此机制也是大多数抗体,尤其是针对 RBM 区抗体的中和效应机制(图 1B);其三是抑制病毒膜融合过程(图 1C)。

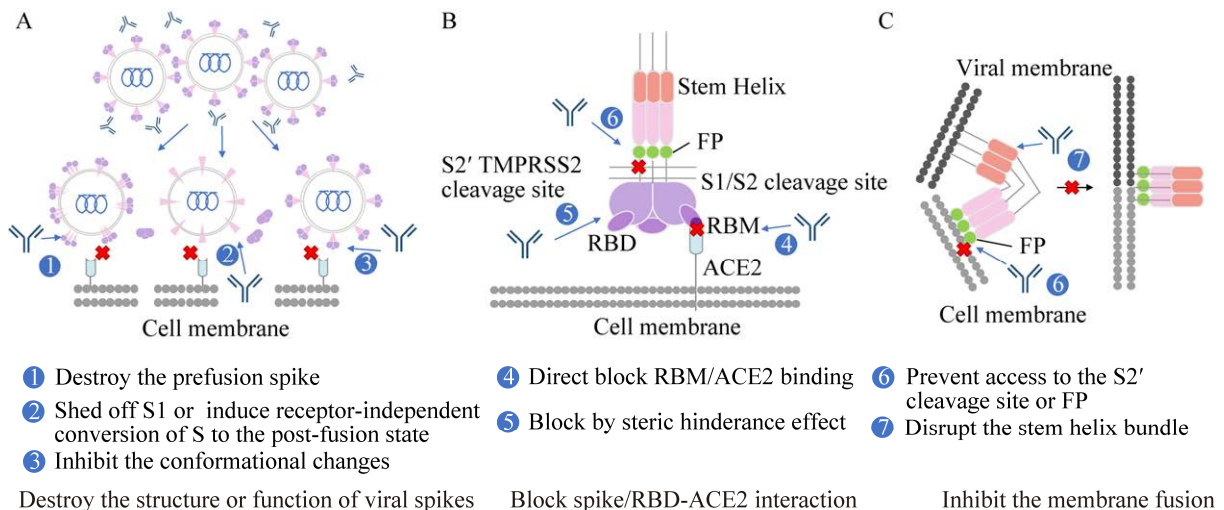


图 1 新型冠状病毒及泛  $\beta$  冠状病毒广谱中和单抗作用机制分类

Figure 1 Mechanisms of broad-spectrum neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and pan-beta-coronaviruses. A: Destroy the structure or function of viral spikes. B: Block spike/RBD-ACE2 interaction. C: Inhibit the membrane fusion.



## 2.1 抗体诱导病毒刺突蛋白的结构或功能破坏

S 蛋白三聚体融合前的构象完整性, 以及融合过程中构象的不可逆改变是病毒成功感染宿主细胞的关键要素。如图 1A 所示, 若 S 蛋白在接触受体前构象发生改变, 如失去稳定性、S1/S2 提前解离、直接重排为融合后构象、构象改变受阻等, 将导致病毒无法正常感染宿主细胞。

### 2.1.1 诱导融合前构象失去稳定性或部分解离

此类抗体可能并不直接抑制 S 蛋白与受体的相互作用, 但可诱导 S 蛋白去稳定化或使病毒解离影响病毒的感染活性, 其中以 CR3022、7D6 和 6D6 等最具代表性。CR3022 是 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 RBD 的交叉反应性抗体<sup>[80]</sup>, 通过冷冻电镜观察, CR3022 破坏了融合前 S 蛋白构象的完整性<sup>[51]</sup>。对于 CR3022 的交叉中和效果存在争议, Wu 等<sup>[50]</sup>提出 CR3022 抗体不中和野生型 SARS-CoV-2, 仅中和 SARS-CoV 或 SARS-CoV-2 P384A 突变体,  $IC_{50}$  分别为 5.2  $\mu\text{g/mL}$  和 3.2  $\mu\text{g/mL}$ 。而 Huo 等<sup>[51]</sup>经 PRNT 试验验证了 CR3022 可以中和 SARS-CoV-2, 抗体对 SARS-CoV-2 中和效果的差异可能源于抗体来源、折叠度等不同。本实验室前期筛选获得的抗体 7D6 和 6D6 可中和 SARS-CoV 及 SARS-CoV-2 ( $IC_{50}$  1.67–10.11  $\mu\text{g/mL}$ ), 在与表达 S 蛋白的 293T 细胞共孵育后可触发高达 63% 的 S 蛋白脱落, 以及电镜观察显示抗体结合破坏了 S 蛋白三聚体完整性, 推测抗体通过使 S1 提前脱落以中和病毒<sup>[24]</sup>。上述几种抗体均为非 ACE2 竞争性抗体, 靶向 RBD 上远离 RBM 的保守区域, 对 SARS-CoV-2 病毒突变具有一定耐受性。该类广谱抗体的中和广谱性主要局限在 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2, 对于 2 类病毒的中和效果  $IC_{50}$  达  $\mu\text{g/mL}$  水平。

### 2.1.2 诱导非受体依赖性 S 蛋白构象向融合转变

除诱导融合前构象失去稳定性或部分解离

外, 部分抗体可能通过诱导非受体依赖性 S 蛋白构象向融合转变发挥作用。单抗 S2H97 靶向 RBD V 类表位, 该表位远离 RBM 并且需要 RBD 处于“向上”状态才可以结合交叉中和抗体。S2H97 也可以同时中和 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2,  $IC_{50}$  分别约为 2  $\mu\text{g/mL}$  和 0.352  $\mu\text{g/mL}$ , 对突变株中和活性下降小于 3 倍, 并且不干扰 RBD 与 ACE2 受体的结合<sup>[26,52]</sup>。不同于 CR3022 类抗体, 在电镜下可以观察到 S2H97 的结合诱导加速了 S 蛋白重排到融合后状态<sup>[52]</sup>, 而非仅 S1 脱落或三聚体构象的破坏。该种中和机制涉及 S 蛋白向融合后构象的非受体依赖性转化, 从而抑制病毒的人胞。由于在 ACE2 受体或抗体诱导的 S 蛋白构象转变中, S1/S2、S2' 位点的水解或 S1 亚基脱落并不是严格必需的<sup>[81]</sup>, 因而将该类中和机制的抗体单独划分为一小类。

### 2.1.3 阻碍 S 蛋白构象转变

亚结构域 1 (subdomain 1, SD1) 位于 S1 亚基的 C 末端, 该区域在 VOCs 中氨基酸突变位点极少, 因此 SD1 区域中和抗体, 如 S3H3、sd1.040 和 P008\_60 等展现出了良好的广谱性, 其中 P008\_60 可中和 SARS-CoV<sup>[44-45,47]</sup>。鼠单克隆抗体 S3H3 与 S 蛋白三聚体的结合可以起到“锁”的作用, 阻止 S1 从 S2 中释放, 从而抑制病毒进入<sup>[44]</sup>。抗体 sd1.040 可干扰 ACE2 诱导的重排<sup>[45]</sup>。同样, P008\_60 与 S 蛋白的结合并不导致 S1 亚基脱落, 反而可以稳定 RBD 的“向上”状态构象, 减少靶向 RBD 的“向下”构象抗体与 S 蛋白的结合<sup>[47]</sup>。通过氢氘交换质谱分析, P008\_60 结合后, S2 亚基上多个位点不稳定性增加, 亦可能诱导 S 蛋白三聚体解离或失活<sup>[47]</sup>。SD1 处于 S1 和 S2 亚基之间, 因此靶向该区域的抗体可能对两者均产生影响。SD1 被掩埋在重组 S 蛋白三聚体内部, 鉴于该表位抗体在真病毒上具有中和效果, 推测该表位在体内瞬时

暴露时可被抗体识别并结合。此类隐蔽的非优势表位免疫选择压力较小，通常较为保守，在筛选广谱单抗时更具有研究价值。

## 2.2 阻断 RBD 与宿主受体 ACE2 结合

直接阻断 RBD 与宿主受体 ACE2 结合是 SARS-CoV-2 中和作用的主要模式之一。如图 1B 所示，在阻断 ACE2 受体结合的抗体中，一部分直接与 RBM 结合进行封锁；另一部分结合非 RBM 区域，通过空间位阻效应进行阻断<sup>[72,82-83]</sup>。

### 2.2.1 直接结合 RBM

该类抗体属于 piccoli 分类中的 Ia 和 Ib 类抗体，主要通过阻断 RBM 与 ACE2 受体结合阻止病毒入胞。这类抗体具有很高的中和效力，可以在低至 1–10 ng/mL 的浓度发挥中和作用。例如，以 ADI 56046 为代表的 8 个可阻断或部分阻断 ACE2 结合的抗体在假病毒中和试验中对 SARS-CoV-2 的  $IC_{50}$  为 0.05–1.4  $\mu\text{g/mL}$ ，对 SARS-CoV 的  $IC_{50}$  为 0.004–0.06  $\mu\text{g/mL}$ ，在真病毒中和试验中观察到的  $IC_{50}$  更优<sup>[53]</sup>。对 ADI-55688、ADI-55689 和 ADI-56046 的重链和轻链基因进行改造，获得各自谱系中和效果相对最优的 ADG-1、ADG-2 和 ADG-3，ADG-2 对 SARS-CoV 和另外两种蝙蝠来源冠状病毒表现出高中和效力， $IC_{50}$  介于 4–8 ng/mL 之间，且对常见的 36 种 RBD 突变点具有 50% 以上的结合力，对 B.1.1.7 突变株在 RBD 上唯一的突变点 N501Y 仍具有较高结合活性<sup>[19]</sup>。而与 ADG-2 结合相似表位的 SA55 单抗对包含 BQ.1、XBB、CH.1.1 在内的 omicron 亚突变株的  $IC_{50}$  介于 2–8 ng/mL 之间，表现出很高的突变耐受性<sup>[57]</sup>。此外，7B11<sup>[54]</sup>、CV2-71 和 CV3-17<sup>[21]</sup>、S2K146<sup>[55]</sup>、16D8<sup>[24]</sup>和 S2E12<sup>[52]</sup>等抗体也属于该类抗体。DH1047 抗体轻链、7D6 和 6D6 也部分接触 RBM (488-492、466-471、457-471)<sup>[23-24]</sup>，可能存在一定的阻断受体结合作用。

### 2.2.2 通过空间位阻阻断

抗体还可通过结合远离 RBM 的区域，或是在“向上”构象中才能触及的 RBD 内部核心区的表位，通过轻重链上除互补决定区以外的部分产生空间位阻，使 RBD 无法接近和结合 ACE2 受体而发挥中和作用。例如，COVA1-16<sup>[59]</sup>和 2-36<sup>[23,58]</sup>通过轻链，CV2-75 通过重链与 ACE2 发生位置冲突<sup>[21]</sup>，从而竞争病毒与 ACE2 的结合。H014 剂量依赖性地阻止了 SARS-CoV-2 附着在细胞表面，且已结合到细胞表面的病毒颗粒可以被 H014 部分剥离。H014 阻断 SARS-CoV-2 附着在宿主细胞上的能力可归因于与 ACE2 的空间位阻冲突<sup>[61]</sup>。EY6A 可能与 ACE2 糖基化位点上的糖链发生空间冲突<sup>[62]</sup>。与 CR3022 等同样结合非 RBM 区域的抗体不同的是，这些抗体在空间位置上与 RBM 较为接近，因而可以干扰病毒与受体之间的相互作用。

## 2.3 抑制 S2 亚基重排

S2 主要负责膜融合，冠状病毒的 S2 中包含融合肽(fusion peptide, FP)、连接域、2 个七肽重复结构 HR1 和 HR2 等区域，是 S 蛋白的融合核心。如图 1C 所示，S2 区域抗体主要通过抑制 S2 重排阻止 S 蛋白形成融合后构象<sup>[21]</sup>。

### 2.3.1 抑制 S2' 位点酶切及融合肽暴露

S 蛋白与 ACE2 结合过程促进了 S2' 酶切位点和融合肽的暴露。抗体 76E1 通过结合该表位，从而抑制 S2' 酶切，阻断病毒与宿主细胞的膜融合过程，最终抑制病毒进入宿主细胞。该抗体可结合并中和所有 7 种感染人类的冠状病毒及全部 5 种 SARS-CoV-2 VOCs，对 SARS-CoV-2 真病毒的体外中和  $IC_{50}$  可达到 0.373  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[69]</sup>。抗体 76E1 是少有的交叉中和覆盖至  $\alpha$  冠状病毒的 S 蛋白中和抗体。COV44-62 和 COV44-79 靶向与 S2' 裂解位点相邻的保守融合肽区域，广泛中和  $\alpha$  与  $\beta$  冠状病毒，以及包含 omicron BA.2 和 BA.4/5 在

内的突变株, 基于成像测定与定量测定证实其能够抑制 S 蛋白介导的膜融合, 但中和效果稍弱,  $IC_{50}$  基本大于  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[70]</sup>。

文献报道针对 SARS-CoV-2 S 蛋白的 N-端结构域(N-terminal domain, NTD)的中和单抗在 NTD 上的表位主要为保守性较低的抗原“超级位点(supersite)”<sup>[48,84-85]</sup>。该类抗体无法阻断 S 蛋白与 ACE2 结合, 但影响细胞间融合, 推测此类抗体通过阻碍 S 蛋白与辅助受体的相互作用, 影响 S2'位点酶切, 阻止蛋白解离等机制实现中和。抗体 S2L28、S2M28、S2X28 和 S2X333 对 SARS-CoV-2 和 RaTG13 假病毒有中和效果, 但无法中和进化距离更远的 SARS-CoV 等病毒; 且多种 SARS-CoV-2 突变株部分或完全逃脱该类抗体介导的中和<sup>[48]</sup>。另有靶向其他位点的 NTD 抗体, 如 C1717 结合 NTD 近膜端, 接近 ( $<12 \text{ \AA}$ ) S2 融合肽区域, 可能影响 S2 亚基的膜融合功能<sup>[42]</sup>。

### 2.3.2 破坏茎螺旋束结构

茎螺旋区域位于连接域和七肽重复结构 HR2 之间, MERS-CoV S 蛋白 1230–1240 处, 折叠为两亲性  $\alpha$  螺旋<sup>[31]</sup>。该区域在  $\beta$  冠状病毒中高度保守, 多数报道的 S2 广谱中和抗体皆靶向该表位。部分抗体作用机制可能为与茎螺旋束的疏水核心结合并破坏其结构, 使 S2 亚基无法从融合前态重构到融合后态, 阻止病毒进入, 抑制膜融合<sup>[29]</sup>。B6 单抗和 28D9 单抗是通过杂交瘤技术筛选得到的, 免疫原分别为 MERS-CoV、SARS-CoV 和 HCoV-OC43、SARS-CoV 和 MERS-CoV 的 S 蛋白<sup>[31-32]</sup>。B6 单抗广谱中和 MERS-CoV、HKU4 和 OC43 等 Embecovirus 亚属和 Merbecovirus 亚属的  $\beta$  冠状病毒, 而无法中和 SARS-CoV-2 所属的 Sarbecovirus 亚属病毒<sup>[31]</sup>。28D9 单抗广谱中和 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2、HCoV-OC43 等  $\beta$  冠状病毒<sup>[32]</sup>。

CV3-25<sup>[21]</sup>、S2P6<sup>[29]</sup>、CC40.8<sup>[66,86]</sup> 以及含 CC9.104 在内的 40 株茎螺旋广谱单抗<sup>[34]</sup>均通过单个 B 细胞分选获得。CV3-25 结合位点更靠近茎螺旋 C 端(残基 1153–1165), 而其他 S2 茎螺旋抗体 B6、CC40.8 和 S2P6 主要与 N 端  $\alpha$  螺旋(残基 1147–1157)相互作用, 与 C 端几乎不接触<sup>[34]</sup>。鼠单抗 WS6 能够以  $IC_{50}$  为  $2.46\text{--}26.52 \mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度中和包含 omicron 在内的新冠突变株, 以及 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 相关分支的 Sarbecovirus 亚属病毒, 拥有比同样靶向茎螺旋区域的 S2P6 更好的中和效果(除 MERS-CoV)。WS6 可以中和预先结合 ACE2 的病毒, 表明其可能通过参与病毒附着 ACE2 后的步骤来中和 SARS-CoV-2<sup>[68]</sup>。

由于表位的保守性, S2 抗体常常可以广泛中和多种  $\beta$  冠状病毒, 但体外中和效果普遍弱于 RBD 区域的单抗, 本文所列出的该区域广谱中和单抗针对各种病毒的  $IC_{50}$  普遍大于  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 有的抗体  $IC_{50}$  甚至达到  $40\text{--}60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。值得关注的是, 在动物模型中, 针对 S2 的广谱中和单抗, 如  $IC_{50}$  值较高的 CC40.8, 可以在相对低的血清浓度下体现良好的感染保护效果<sup>[66]</sup>; 在使用相同小鼠感染模型<sup>[87]</sup>的两个研究中, 给予 RBD 区域抗体 ADG-2 ( $IC_{50}$   $1\text{--}8 \text{ ng}/\text{mL}$ )  $200 \mu\text{g}/\text{只}$ <sup>[19]</sup>和两个 S2 茎螺旋抗体 CC68.109 和 CC99.103 ( $IC_{50}$   $4.4\text{--}14 \mu\text{g}/\text{mL}$ )  $300 \mu\text{g}/\text{只}$ <sup>[34]</sup>均可预防 SARS-CoV 及 SARS-CoV-2 感染小鼠。虽然无法排除 ADG-2 是否能够以更低的抗体剂量产生上述效果, 但两者  $IC_{50}$  之间的巨大差距提示了 S2 区域抗体在体内可能涉及更多的抗体可结晶片段(fragment crystallizable, Fc)效应、膜融合抑制等抗病毒步骤, 在比较 S 蛋白不同区域抗体性能时, 体外中和效果或仅作为参考的指标之一。

## 2.4 靶向宿主受体

除了靶向病毒 S 蛋白的抗体外, 寻找细胞受

体的单克隆抗体也是拓宽广谱中和抗体库的一种思路。包含 SARS-CoV-2、SARS-CoV、WIV1-CoV 和 SHC014-CoV 等在内的  $\beta$  属 Sarbecovirus 亚属冠状病毒可利用 ACE2 受体进入宿主细胞。Du 等筛选的针对 ACE2 的抗体 h11B11, 对 3 种突变株假病毒(D614G、alpha 和 beta)表现出不错的抑制活性, 其  $IC_{50}$  分别为 0.61、0.56 和 1.59  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在动物试验中也表现出较高的安全性<sup>[65]</sup>。除了靶向 ACE2 的抗体外, 以可溶性重组 hACE2 蛋白<sup>[88-89]</sup>、hACE2-Fc 融合蛋白<sup>[90]</sup>作为陷阱受体也是抗病毒的有效手段。ACE2 作为 SARS-CoV-2 的关键受体, 在人体内广泛分布, 具有调节血管紧张素浓度等正常生理作用<sup>[91]</sup>。使用 ACE2 作为靶标应格外注意抗体是否影响 ACE2 表达水平及酶活性, 以及输注外源性重组 ACE2 蛋白是否会诱导交叉反应抗体等问题, 全面充分地进行安全性评估。

### 3 广谱中和抗体其他效应

前文基于病毒侵染细胞的不同阶段及广谱中和抗体的阻断情况进行了归纳。抗原表位的保守性对抗体广谱中和突变株以及不同冠状病毒起到了关键作用, 而抗体本身或结合部位的性质如 Fc 段介导的效应器作用、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 的二价性、水介导的相互作用等也对抗体的广谱性和中和效果有一定贡献。

#### 3.1 Fc 的免疫调理效应

除了抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)的干扰受体结合作用, 抗体 Fc 段在体内巨噬细胞、自然杀伤细胞等协助下可通过抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP)等效应抑

制病毒感染。S309 能够以  $IC_{50}$  为 79 ng/mL 及 120–180 ng/mL 中和 SARS-CoV-2 真病毒与 SARS-CoV 假病毒<sup>[33]</sup>, 且广泛结合 13 种 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 相关  $\beta$  冠状病毒<sup>[19]</sup>; 与 S309 竞争结合 RBD 的 CV38-142 能够以  $IC_{50}$  为 23.2 ng/mL 及 1.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$  中和 SARS-CoV-2 真病毒与 SARS-CoV 假病毒<sup>[27,63]</sup>; 基于 S309 进行 Fc 效应增强改造开发的 VIR-7831 (sotrovimab)抗体也是首先应用于临床治疗中的可交叉中和  $\beta$  冠状病毒的抗体<sup>[92]</sup>。S2P6 同样可以在体外触发 Fc 介导的 ADCC 和 ADCP, 并且其体内抗病毒活性可能依赖于中和及效应器功能<sup>[29]</sup>。

#### 3.2 IgG 二价性对广谱活性的贡献

单一 Fab 片段与拥有 2 个 Fab 片段的 IgG 的中和能力存在差异。将 S309 Fab 与 S309 IgG 对 SARS-CoV-2 假病毒的中和效果进行比较, 相同条件下, S309 IgG 介导的中和达到 100%, 而 S309 Fab 介导的中和稳定在 80%左右<sup>[33]</sup>。一种或多种 IgG 特异性二价机制。例如, S 蛋白三聚体交联, 空间位阻或病毒颗粒聚集等可能有助于抗体完全中和病毒。在冷冻电镜下观察到 CV38-142 IgG 可以结合二聚体 S 蛋白, 并可以有效中和 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV,  $IC_{50}$  分别为 3.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而单个 Fab 片段的抑制作用则非常微弱( $IC_{50}>100 \mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>[27]</sup>, 说明了 IgG 的二价性在中和病毒感染方面具有一定贡献。

#### 3.3 水介导的相互作用

在抗原-抗体结合界面上, 水分子可以通过氢键形成介导不完美的表面互补性<sup>[93]</sup>。CV38-142 所识别的表位在 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 中具有 10 个残基差异, 通过大量水分子介导的相互作用补偿抗体与不同病毒抗原氨基酸残基之间的直接作用<sup>[27]</sup>。这种作用同时

也可能成为适应 SARS-CoV-2 病毒突变的潜在机制。

### 3.4 结合角度避开糖链

S2X259 在 Sarbecovirus 亚属(包括所有关注的 SARS-CoV-2 突变株)内具有出色的广谱中和活性( $IC_{50} < 0.22 \mu\text{g/mL}$ ), 其广谱中和的基础除了表位保守性以外, 还有赖于其结合 RBD 的接近角规避了糖链。该聚糖糖链位于 SARS-CoV N357 位置, 在除 SARS-CoV-2 之外所有 Sarbecovirus 亚属病毒 RBD 中广泛存在<sup>[64]</sup>。

## 4 讨论与展望

作为 RNA 病毒, 冠状病毒的高变异性为开发具有广谱保护作用的单抗疗法或疫苗带来阻碍, 随群体免疫产生的选择压力等问题也使抗体疗法难以毕其功于一役。经由各种筛选手段得到的针对冠状病毒 S 蛋白的广谱中和抗体表位主要集中在 RBD 上的保守区域和 S2 区域。RBD 区域抗体主要通过使 S 蛋白构象发生改变或阻断 RBD 与宿主受体结合发挥作用, S2 区域抗体主要通过抑制 S2 重排阻断膜融合进程。在动物感染模型中, 各类抗体均具有治疗或预防效果。对 SARS-CoV-2 中和效果最佳的抗体集中在 RBD 区域, 但该区域的高度可变性使抗体应对不同突变株的中和效果存在差异, 其中和广谱性主要局限于 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2。S2 区域抗体可中和系统进化相距更远的 Embecovirus 和 Merbecovirus 亚属, 甚至  $\alpha$  冠状病毒, 对 SARS-CoV-2 变异株也具有普遍中和效应, 但体外中和能力较弱。SD1 区域抗体对 omicron 变异株具有较为良好的中和活性, 目前对于该区域抗体的研究较少, 但由于其表位免疫选择压力较小, 有望开发出具有较强中和广谱性的抗体。NTD 区域中和抗体识别表位较为单一, 且表位容易突变和缺失, 中和广谱性有限。使用宿主受

体作为靶标可有效绕过病毒突变问题实现广谱中和, 但需要慎重评估其安全性。

在当前病毒与机体免疫应答动态发展的背景下, 筛选评价冠状病毒广谱中和抗体或可通过下述几种策略进行探索: (1) 寻找表位覆盖面更广泛、中和机制更全面的不同广谱中和抗体组成鸡尾酒疗法, 最大化发挥抗体的协同作用; (2) 针对性地应用基因工程等手段对广谱抗体进行改造, 提高其中和效力; (3) 揭示结合、融合过程中出现的保守且非优势的中间态构象表位, 进行针对性抗体筛选; (4) 转换思路, 从宿主受体着手, 探索受体陷阱重组蛋白或靶向抗体; (5) 参考现有广谱中和抗体产生规律, 对免疫剂次、免疫原使用与组合等进行改进。随着冠状病毒广谱中和抗体研究的不断深入, 抗体疗法未来可能在 SARS-CoV-2 和其他高致病性冠状病毒防治中发挥更重要的作用。

## 参考文献

- [1] HOY SM. Amubarvimab/romlusevimab: first approval[J]. *Drugs*, 2022, 82(12): 1327-1331.
- [2] LEVIN MJ, USTIANOWSKI A, de WIT S, LAUNAY O, AVILA M, TEMPLETON A, YUAN Y, SEGOBIN S, ELLERY A, LEVINSON DJ, AMBERY P, ARENDS RH, BEAVON R, DEY K, GARBES P, KELLY EJ, KOH GCKW, NEAR KA, PADILLA KW, PSACHOULIA K, et al. Intramuscular AZD7442 (tixagevimab-cilgavimab) for prevention of covid-19[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2022, 386(23): 2188-2200.
- [3] LEVIN MJ, USTIANOWSKI A, THOMAS S, TEMPLETON A, YUAN Y, SEGOBIN S, HOULIHAN CF, MENENDEZ-PEREZ I, POLLETT S, ARENDS RH, BEAVON R, DEY K, GARBES P, KELLY EJ, KOH GCKW, IVANOV S, NEAR KA, SHARBAUGH A, STREICHER K, PANGALOS MN, et al. The COVID-19 Study to Optimally Reduce Morbidity in CareHomes and Sites with Enhanced Risk (STORMCHASER) Study Group. AZD7442 (tixagevimab/cilgavimab) for post-exposure prophylaxis

- of symptomatic coronavirus disease 2019[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2023, 76(7): 1247-1256.
- [4] DOUGAN M, AZIZAD M, CHEN P, FELDMAN B, FRIEMAN M, IGBINADOLOR A, KUMAR P, MORRIS J, POTTS J, BARACCO L, MACPHERSON L, KALLEWAARD NL, PATEL DR, HUFFORD MM, WIETecha L, CHIGUTSA E, DEMMON SL, JONES BE, NIRULA A, SKOVRONSKY DM, et al. Bebtelovimab, alone or together with bamlanivimab and etesevimab, as a broadly neutralizing monoclonal antibody treatment for mild to moderate, ambulatory COVID-19[J]. *medRxiv*, 2022. DOI: 10.1101/2022.03.10.22272100.
- [5] VANSHYLLA K, Di CRISTANZIANO V, KLEIPASS F, DEWALD F, SCHOMMERS P, GIESELMANN L, GRUELL H, SCHLOTZ M, ERCANOGLU MS, STUMPF R, MAYER P, ZEHNER M, HEGER E, JOHANNIS W, HORN C, SUÁREZ I, JUNG N, SALOMON S, EBERHARDT KA, GATHOF B, et al. Kinetics and correlates of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(6): 917-929.e4.
- [6] LEGROS V, DENOLLY S, VOGRIG M, BOSON B, SIRET E, RIGAILL J, PILLET S, GRATARD F, GONZALO S, VERHOEVEN P, ALLATIF O, BERTHELOT P, PÉLISSIER C, THIERY G, BOTELHO-NEVERS E, MILLET G, MOREL J, PAUL S, WALZER T, COSSET FL. A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021, 18(2): 318-327.
- [7] VIDAL SJ, COLLIER AR Y, YU JY, McMAHAN K, TOSTANOSKI LH, VENTURA JD, AID M, PETER L, JACOB-DOLAN C, ANIOKE T, CHANG AQ, WAN HH, AGUAYO R, NGO D, GERSZTEN RE, SEAMAN MS, BAROUCH DH. Correlates of neutralization against SARS-CoV-2 variants of concern by early pandemic sera[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(14): e0040421.
- [8] DUPONT L, SNELL LB, GRAHAM C, SEOW J, MERRICK B, LECHMERE T, MAGUIRE TJA, HALLETT SR, PICKERING S, CHARALAMPOUS T, ALCOLEA-MEDINA A, HUETTNER I, JIMENEZ-GUARDEÑO JM, ACORS S, ALMEIDA N, COX D, DICKENSON RE, GALAO RP, KOUPOUN N, LISTA MJ, et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(11): 1433-1442.
- [9] WANG Q, GUO YC, IKETANI S, NAIR MS, LI ZT, MOHRI H, WANG M, YU J, BOWEN AD, CHANG JY, SHAH JG, NGUYEN N, CHEN ZW, MEYERS K, YIN MT, SOBIESZCZYK ME, SHENG ZZ, HUANG YX, LIU LH, HO DD. Antibody evasion by SARS-CoV-2 omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5[J]. *Nature*, 2022, 608(7923): 603-608.
- [10] URAKI R, ITO M, FURUSAWA Y, YAMAYOSHI S, IWATSUKI-HORIMOTO K, ADACHI E, SAITO M, KOGA M, TSUTSUMI T, YAMAMOTO S, OTANI A, KISO M, SAKAI-TAGAWA Y, UEKI H, YOTSUYANAGI H, IMAI M, KAWAOKA Y. Humoral immune evasion of the omicron subvariants BQ.1.1 and XBB[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2023, 23(1): 30-32.
- [11] WANG Q, IKETANI S, LI ZT, LIU LY, GUO YC, HUANG YM, BOWEN AD, LIU M, WANG M, YU J, VALDEZ R, LAURING AS, SHENG ZZ, WANG HH, GORDON A, LIU LH, HO DD. Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants[J]. *Cell*, 2023, 186(2): 279-286.e8.
- [12] ZHANG XJ, CHEN LL, IP JD, CHAN WM, HUNG IFN, YUEN KY, LI X, TO KKW. Omicron sublineage recombinant XBB evades neutralising antibodies in recipients of BNT162b2 or CoronaVac vaccines[J]. *The Lancet Microbe*, 2023, 4(3): e131.
- [13] CAO YL, JIAN FC, WANG J, YU YL, SONG WL, YISIMAYI A, WANG J, AN R, CHEN XS, ZHANG N, WANG Y, WANG P, ZHAO LJ, SUN HY, YU LL, YANG SJ, NIU X, XIAO TH, GU QQ, SHAO F, et al. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent omicron RBD evolution[J]. *Nature*, 2023, 614(7948): 521-529.
- [14] WÖLFEL R, CORMAN VM, GUGGEMOS W, SEILMAIER M, ZANGE S, MÜLLER MA, NIEMEYER D, JONES TC, VOLLMAR P, ROTHE C, HOELSCHER M, BLEICKER T, BRÜNINK S, SCHNEIDER J, EHMANN R, ZWIRGLMAIER K, DROSTEN C, WENDTNER C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019[J]. *Nature*, 2020, 581(7809): 465-469.
- [15] XIONG HL, WU YT, CAO JL, YANG R, LIU YX, MA J, QIAO XY, YAO XY, ZHANG BH, ZHANG YL, HOU WH, SHI Y, XU JJ, ZHANG L, WANG SJ, FU BR, YANG T, GE SX, ZHANG J, YUAN Q, et al. Robust neutralization assay based on SARS-CoV-2 S-protein-bearing vesicular stomatitis virus (VSV) pseudovirus and ACE2-overexpressing BHK21 cells[J].

- Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 2105-2113.
- [16] BANGA NDZOUBOUKOU JL, ZHANG YD, FAN XL. Recent developments in SARS-CoV-2 neutralizing antibody detection methods[J]. *Current Medical Science*, 2021, 41(6): 1052-1064.
- [17] ZHANG YL, WANG SJ, WU YT, HOU WH, YUAN LZ, SHEN CG, WANG J, YE JH, ZHENG QB, MA J, XU JJ, WEI M, LI ZL, NIAN S, XIONG HL, ZHANG L, SHI Y, FU BR, CAO JL, YANG CL, et al. Virus-free and live-cell visualizing SARS-CoV-2 cell entry for studies of neutralizing antibodies and compound inhibitors[J]. *Small Methods*, 2021, 5(2): 2001031.
- [18] ZHANG J, WU Q, LIU ZY, WANG QJ, WU JJ, HU YB, BAI TT, XIE T, HUANG MC, WU TT, PENG DH, HUANG WJ, JIN K, NIU L, GUO WY, LUO DX, LEI DZ, WU ZJ, LI GC, HUANG RB, et al. Spike-specific circulating T follicular helper cell and cross-neutralizing antibody responses in COVID-19-convalescent individuals[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(1): 51-58.
- [19] RAPPAZZO CG, TSE LV, KAKU CI, WRAPP D, SAKHARKAR M, HUANG DL, DEVEAU LM, YOCKACHONIS TJ, HERBERT AS, BATTLES MB, O'BRIEN CM, BROWN ME, GEOGHEGAN JC, BELK J, PENG LH, YANG LL, HOU YX, SCOBEY TD, BURTON DR, NEMAZEE D, et al. Broad and potent activity against SARS-like viruses by an engineered human monoclonal antibody[J]. *Science*, 2021, 371(6531): 823-829.
- [20] XIONG HL, SUN H, WANG SL, YUAN LZ, LIU LQ, ZHU YH, ZHANG JL, HUANG Y, QI RY, JIANG Y, MA J, ZHOU M, MA Y, FU R, YAN SP, YUE MX, WU YT, WEI M, WANG YZ, LI TT, et al. The neutralizing breadth of antibodies targeting diverse conserved epitopes between SARS-CoV and SARS-CoV-2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(34): e2204256119.
- [21] JENNEWEIN MF, MacCAMY AJ, AKINS NR, FENG JL, HOMAD LJ, HURLBURT NK, SEYDOUX E, WAN YH, STUART AB, EDARA VV, FLOYD K, VANDERHEIDEN A, MASCOLA JR, DORIA-ROSE N, WANG LS, YANG ES, CHU HY, TORRES JL, OZOROWSKI G, WARD AB, et al. Isolation and characterization of cross-neutralizing coronavirus antibodies from COVID-19<sup>+</sup> subjects[J]. *Cell Reports*, 2021, 36(2): 109353.
- [22] WANG PF, CASNER RG, NAIR MS, YU J, GUO YC, WANG M, CHAN JFW, CERUTTI G, IKETANI S, LIU LH, SHENG ZZ, CHEN ZW, YUEN KY, KWONG PD, HUANG YX, SHAPIRO L, HO DD. A monoclonal antibody that neutralizes SARS-CoV-2 variants, SARS-CoV, and other sarbecoviruses[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2022, 11(1): 147-157.
- [23] MARTINEZ DR, SCHÄFER A, GOBEIL S, LI DP, de LA CRUZ G, PARKS R, LU XZ, BARR M, STALLS V, JANOWSKA K, BEAUDOIN E, MANNE K, MANSOURI K, EDWARDS RJ, CRONIN K, YOUNT B, ANASTI K, MONTGOMERY SA, TANG JJ, GOLDING H, et al. A broadly cross-reactive antibody neutralizes and protects against sarbecovirus challenge in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(629): eabj7125.
- [24] LI TT, XUE WH, ZHENG QB, SONG S, YANG CL, XIONG HL, ZHANG SB, HONG MQ, ZHANG YL, YU H, ZHANG YY, SUN H, HUANG Y, DENG TT, CHI X, LI JJ, WANG SJ, ZHOU LZ, CHEN TT, WANG YB, et al. Cross-neutralizing antibodies bind a SARS-CoV-2 cryptic site and resist circulating variants[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5652.
- [25] JIANG W, WANG JC, JIAO SS, GU CJ, XU W, CHEN B, WANG RJ, CHEN HL, XIE YH, WANG A, LI G, ZENG DD, ZHANG JC, ZHANG M, WANG S, WANG MZ, GUI X. Characterization of MW06, a human monoclonal antibody with cross-neutralization activity against both SARS-CoV-2 and SARS-CoV[J]. *mAbs*, 2021, 13(1): 1953683.
- [26] CAMERONI E, BOWEN JE, ROSEN LE, SALIBA C, ZEPEDA SK, CULAP K, PINTO D, van BLARGAN LA, de MARCO A, DI IULIO J, ZATTA F, KAISER H, NOACK J, FARHAT N, CZUDNOCHOWSKI N, HAVENAR-DAUGHTON C, SPROUSE KR, DILLEN JR, POWELL AE, CHEN A, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 omicron antigenic shift[J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 664-670.
- [27] LIU HJ, YUAN M, HUANG DL, BANGARU S, ZHAO FZ, LEE CC D, PENG LH, BARMAN S, ZHU XY, NEMAZEE D, BURTON DR, van GILS MJ, SANDERS RW, KORNAU HC, REINCKE SM, PRÜSS H, KREYE J, WU NC, WARD AB, WILSON IA. A combination of cross-neutralizing antibodies synergizes to prevent SARS-CoV-2 and SARS-CoV pseudovirus infection[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(5): 806-818.e6.
- [28] WANG SL, WU DH, XIONG HL, WANG J, TANG ZM, CHEN ZH, WANG YZ, ZHANG YL, YING D, LIN X, LIU C, GUO SQ, TIAN WK, LIN YJ, ZHANG

- XP, YUAN Q, YU H, ZHANG TY, ZHENG ZZ, XIA NS. Potential of conserved antigenic sites in development of universal SARS-like coronavirus vaccines[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 952650.
- [29] PINTO D, SAUER MM, CZUDNOCHOWSKI N, LOW JS, HOUSLEY MP, NOACK J, WALLS AC, BOWEN JE, GUARINO B, ROSEN LE, Di IULIO J, JERAK J, KAISER H, ISLAM S, JACONI S, SPRUGASCI N, CULAP K, ABDELNABI R, FOO C, COELMONT L, et al. Broad betacoronavirus neutralization by a stem helix-specific human antibody[J]. *Science*, 2021, 373(6559): 1109-1116.
- [30] WANG CY, LI WT, DRABEK D, OKBA NMA, van HAPEREN R, OSTERHAUS ADME, van KUPPEVELD FJM, HAAGMANS BL, GROSVELD F, BOSCH BJ. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2251.
- [31] SAUER MM, ALEJANDRA TORTORICI M, PARK YJ, WALLS AC, HOMAD L, ACTON OJ, BOWEN JE, WANG CY, XIONG XL, de van der SCHUEREN W, QUISPE J, HOFFSTROM BG, BOSCH BJ, McGUIRE AT, VEESLER D. Structural basis for broad coronavirus neutralization[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2021, 28(6): 478-486.
- [32] WANG CY, van HAPEREN R, GUTIÉRREZ-ÁLVAREZ J, LI WT, OKBA NMA, ALBULESCU I, WIDJAJA I, van DIEREN B, FERNANDEZ-DELGADO R, SOLA I, HURDISS DL, DARAMOLA O, GROSVELD F, van KUPPEVELD FJM, HAAGMANS BL, ENJUANES L, DRABEK D, BOSCH BJ. A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1715.
- [33] PINTO D, PARK YJ, BELTRAMELLO M, WALLS AC, ALEJANDRA TORTORICI M, BIANCHI S, JACONI S, CULAP K, ZATTA F, de MARCO A, PETER A, GUARINO B, SPREAFICO R, CAMERONI E, CASE JB, CHEN RE, HAVENAR-DAUGHTON C, SNELL G, TELENTI A, VIRGIN HW, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody[J]. *Nature*, 2020, 583(7815): 290-295.
- [34] ZHOU PP, SONG G, LIU HJ, YUAN M, HE WT, BEUTLER N, ZHU XY, TSE LV, MARTINEZ DR, SCHÄFER A, ANZANELLO F, YONG P, PENG LH, DUEKER K, MUSHARRAFIEH R, CALLAGHAN S, CAPOZZOLA T, LIMBO O, PARREN M, GARCIA E, et al. Broadly neutralizing anti-S2 antibodies protect against all three human betacoronaviruses that cause deadly disease[J]. *Immunity*, 2023, 56(3): 669-686.e7.
- [35] WESTENDORF K, ŽENTELIS S, WANG LS, FOSTER D, VAILLANCOURT P, WIGGIN M, LOVETT E, van der LEE R, HENDLE J, PUSTILNIK A, SAUDER JM, KRAFT L, HWANG Y, SIEGEL RW, CHEN JB, HEINZ BA, HIGGS RE, KALLEWAARD NL, JEPSON K, GOYA R, et al. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants[J]. *Cell Reports*, 2022, 39(7): 110812.
- [36] ZHOU TQ, WANG LS, MISASI J, PEGU A, ZHANG Y, HARRIS DR, OLIA AS, TALANA CA, YANG ES, CHEN M, CHOE M, SHI W, TENG IT, CREANGA A, JENKINS C, LEUNG K, LIU T, STANCOFSKI ES D, STEPHENS T, ZHANG BS, et al. Structural basis for potent antibody neutralization of SARS-CoV-2 variants including B.1.1.529[J]. *Science*, 2022, 376(6591): eabn8897.
- [37] AI JW, WANG X, HE XY, ZHAO XY, ZHANG Y, JIANG YC, LI MH, CUI YC, CHEN YJ, QIAO R, LI L, YANG LL, LI Y, HU ZX, ZHANG WH, WANG PF. Antibody evasion of SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.1.1, BA.2, and BA.3 sub-lineages[J]. *Cell Host & Microbe*, 2022, 30(8): 1077-1083.e4.
- [38] CAO YL, SONG WL, WANG L, LIU P, YUE C, JIAN FC, YU YL, YISIMAYI A, WANG P, WANG Y, ZHU QH, DENG J, FU WJ, YU LL, ZHANG N, WANG J, XIAO TH, AN R, WANG J, LIU L, et al. Characterization of the enhanced infectivity and antibody evasion of Omicron BA.2.75[J]. *Cell Host & Microbe*, 2022, 30(11): 1527-1539.e5.
- [39] ZOST SJ, GILCHUK P, CASE JB, BINSHTAIN E, CHEN RE, NKOLOLA JP, SCHÄFER A, REIDY JX, TRIVETTE A, NARGI RS, SUTTON RE, SURYADEVARA N, MARTINEZ DR, WILLIAMSON LE, CHEN EC, JONES T, DAY S, MYERS L, HASSAN AO, KAFAI NM, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2020, 584: 443-449.
- [40] WANG K, JIA ZJ, BAO L, WANG L, CAO L, CHI H, HU YL, LI QQ, ZHOU YJ, JIANG YN, ZHU QH, DENG YQ, LIU P, WANG N, WANG L, LIU M, LI YR, ZHU BL, FAN KY, FU WJ, et al. Memory B cell repertoire from triple vaccinees against diverse SARS-CoV-2 variants[J]. *Nature*, 2022, 603(7903): 919-925.
- [41] ZHOU B, ZHOU RH, TANG BJ, CHAN JFW, LUO MX, PENG QL, YUAN SF, LIU H, MOK BWY,



- CHEN BH, WANG P, POON VKM, CHU H, CHAN CCS, TSANG JOL, CHAN CCY, AU KK, MAN HO, LU L, TO KKW, et al. A broadly neutralizing antibody protects Syrian hamsters against SARS-CoV-2 Omicron challenge[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3589.
- [42] WANG ZJ, MUECKSCH F, CHO A, GAEBLER C, HOFFMANN HH, RAMOS V, ZONG S, CIPOLLA M, JOHNSON B, SCHMIDT F, DaSILVA J, BEDNARSKI E, BEN TANFOUS T, RASPE R, YAO KH, LEE YE, CHEN T, TURROJA M, MILARD KG, DIZON J, et al. Analysis of memory B cells identifies conserved neutralizing epitopes on the N-terminal domain of variant SARS-Cov-2 spike proteins[J]. *Immunity*, 2022, 55(6): 998-1012.e8.
- [43] XU SQ, WANG YF, WANG YX, ZHANG C, HONG Q, GU CJ, XU R, WANG TF, YANG Y, ZANG JK, ZHOU Y, LI ZY, LIU QX, ZHOU BJ, BAI LL, ZHU YF, DENG Q, WANG HK, LAVILLETTE D, WONG G, et al. Mapping cross-variant neutralizing sites on the SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 351-367.
- [44] HONG Q, HAN WY, LI JW, XU SQ, WANG YF, XU C, LI ZY, WANG YX, ZHANG C, HUANG Z, CONG Y. Molecular basis of receptor binding and antibody neutralization of Omicron[J]. *Nature*, 2022, 604(7906): 546-552.
- [45] BIANCHINI F, CRIVELLI V, ABERNATHY ME, GUERRA C, PALUS M, MURI J, MARCOTTE H, PIRALLA A, PEDOTTI M, de GASPARO R, SIMONELLI L, MATKOVIC M, TOSCANO C, BIGGIOGERO M, CALVARUSO V, SVOBODA P, RINCÓN TC, FAVA T, PODEŠVOVÁ L, SHANBHAG AA, et al. Human neutralizing antibodies to cold linear epitopes and subdomain 1 of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. *Science Immunology*, 2023, 8(81): eade0958.
- [46] GRAHAM C, SEOW J, HUETTNER I, KHAN H, KOUPHOU N, ACORS S, WINSTONE H, PICKERING S, GALAO RP, DUPONT L, LISTA MJ, JIMENEZ-GUARDEÑO JM, LAING AG, WU Y, JOSEPH M, MUIR L, van GILS MJ, NG WM, DUYVESTYEN HME, ZHAO YG, et al. Neutralization potency of monoclonal antibodies recognizing dominant and subdominant epitopes on SARS-CoV-2 Spike is impacted by the B.1.1.7 variant[J]. *Immunity*, 2021, 54(6): 1276-1289.e6.
- [47] SEOW J, KHAN H, ROSA A, CALVARESI V, GRAHAM C, PICKERING S, PYE VE, CRONIN NB, HUETTNER I, MALIM MH, POLITIS A, CHEREPANOV P, DOORES KJ. A neutralizing epitope on the SD1 domain of SARS-CoV-2 spike targeted following infection and vaccination[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(8): 111276.
- [48] MCCALLUM M, de MARCO A, LEMPP FA, PINTO D, WALLS AC, BELTRAMELLO M, CHEN A, LIU ZM, ZATTA F, ZEPEDA S, Di IULIO J, BOWEN JE, MONTIEL-RUIZ M, ZHOU JY, ROSEN LE, BIANCHI S, GUARINO B, FREGNI CS, ABDELNABI R, FOO SY C, et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2[J]. *Cell*, 2021, 184(9): 2332-2347.e16.
- [49] GE JW, WANG RK, JU B, ZHANG Q, SUN J, CHEN P, ZHANG SY, TIAN YL, SHAN SS, CHENG L, ZHOU B, SONG S, ZHAO JJ, WANG HY, SHI XL, DING Q, LIU L, ZHAO JC, ZHANG Z, WANG XQ, et al. Antibody neutralization of SARS-CoV-2 through ACE2 receptor mimicry[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 250.
- [50] WU NC, YUAN M, BANGARU S, HUANG DL, ZHU XY, LEE CC D, TURNER HL, PENG LH, YANG LL, NEMAZEE D, WARD AB, WILSON IA. A natural mutation between SARS-CoV-2 and SARS-CoV determines neutralization by a cross-reactive antibody[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(12): e1009089.
- [51] HUO JD, ZHAO YG, REN JS, ZHOU DM, DUYVESTYEN HME, GINN HM, CARRIQUE L, MALINAUSKAS T, RUZA RR, SHAH PNM, TAN TK, RIJAL P, COOMBES N, BEWLEY KR, TREE JA, RADECKE J, PATERSON NG, SUPASA P, MONGKOLSAPAYA J, SCREATON GR, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by destruction of the prefusion spike[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(3): 445-454.e6.
- [52] STARR TN, CZUDNOCHOWSKI N, LIU ZM, ZATTA F, PARK YJ, ADDETIA A, PINTO D, BELTRAMELLO M, HERNANDEZ P, GREANEY AJ, MARZI R, GLASS WG, ZHANG I, DINGENS AS, BOWEN JE, ALEJANDRA TORTORICI M, WALLS AC, WOJCECHOWSKYJ JA, et al. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape[J]. *Nature*, 2021, 597(7874): 97-102.
- [53] WEC AZ, WRAPP D, HERBERT AS, MAURER DP, HASLWANTER D, SAKHARKAR M, JANGRA RK, LILOV A, HUANG DL, TSE LV, JOHNSON NV, HSIEH CL, WANG NS, NETT JH, CHAMPNEY E,

- BURNINA I, BROWN M, LIN S, SINCLAIR M, JOHNSON C, et al. Broad neutralization of SARS-related viruses by human monoclonal antibodies[J]. *Science*, 2020, 369(6504): 731-736.
- [54] TAI WB, ZHANG XJ, HE YX, JIANG SB, DU LY. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2[J]. *Antiviral Research*, 2020, 179: 104820.
- [55] PARK YJ, de MARCO A, STARR TN, LIU ZM, PINTO D, WALLS AC, ZATTA F, ZEPEDA SK, BOWEN JE, SPROUSE KR, JOSHI A, GIURDANELLA M, GUARINO B, NOACK J, ABDELNABI R, FOO SY C, ROSEN LE, LEMPP FA, BENIGNI F, SNELL G, et al. Antibody-mediated broad sarbecovirus neutralization through ACE2 molecular mimicry[J]. *Science*, 2022, 375(6579): 449-454.
- [56] CAO YL, YISIMAYI A, JIAN FC, SONG WL, XIAO TH, WANG L, DU S, WANG J, LI QQ, CHEN XS, YU YL, WANG P, ZHANG ZY, LIU PL, AN R, HAO XH, WANG Y, WANG J, FENG R, SUN HY, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by omicron infection[J]. *Nature*, 2022, 608: 593-602.
- [57] CAO YL, JIAN FC, ZHANG ZY, YISIMAYI A, HAO XH, BAO LL, YUAN F, YU YL, DU S, WANG J, XIAO TH, SONG WL, ZHANG Y, LIU PL, AN R, WANG P, WANG Y, YANG SJ, NIU X, ZHANG YH, et al. Rational identification of potent and broad sarbecovirus-neutralizing antibody cocktails from SARS convalescents[J]. *Cell Reports*, 2022, 41(12): 111845.
- [58] LI DP, EDWARDS RJ, MANNE K, MARTINEZ DR, SCHÄFER A, ALAM SM, WIEHE K, LU XZ, PARKS R, SUTHERLAND LL, OGUIN TH 3rd, McDANAL C, PEREZ LG, MANSOURI K, GOBEIL SMC, JANOWSKA K, STALLS V, KOPP M, CAI FP, LEE E, et al. *In vitro* and *in vivo* functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies[J]. *Cell*, 2021, 184(16): 4203-4219.e32.
- [59] BROUWER PJM, CANIELS TG, van der STRATEN K, SNITSELAAR JL, ALDON Y, BANGARU S, TORRES JL, OKBA NMA, CLAIREAUX M, KERSTER G, BENTLAGE AEH, van HAAREN MM, GUERRA D, BURGER JA, SCHERMER EE, VERHEUL KD, van der VELDE N, van der KOOI A, van SCHOOTEN J, van BREEMEN MJ, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability[J]. *Science*, 2020, 369(6504): 643-650.
- [60] LIU HJ, WU NC, YUAN M, BANGARU S, TORRES JL, CANIELS TG, van SCHOOTEN J, ZHU XY, LEE CC D, BROUWER PJM, van GILS MJ, SANDERS RW, WARD AB, WILSON IA. Cross-neutralization of a SARS-CoV-2 antibody to a functionally conserved site is mediated by avidity[J]. *Immunity*, 2020, 53(6): 1272-1280.e5.
- [61] LÜ Z, DENG YQ, YE Q, CAO L, SUN CY, FAN CF, HUANG WJ, SUN SH, SUN Y, ZHU L, CHEN Q, WANG N, NIE JH, CUI Z, ZHU DD, SHAW N, LI XF, LI QQ, XIE LZ, WANG YC, et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody[J]. *Science*, 2020, 369(6510): 1505-1509.
- [62] ZHOU DM, DUYVESTEYN HME, CHEN CP, HUANG CG, CHEN TH, SHIH SR, LIN YC, CHENG CY, CHENG SH, HUANG YC, LIN TY, MA C, HUO JD, CARRIQUE L, MALINAUSKAS T, RUZA RR, SHAH PNM, TAN TK, RIJAL P, DONAT RF, et al. Structural basis for the neutralization of SARS-CoV-2 by an antibody from a convalescent patient[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27(10): 950-958.
- [63] KREYE J, KORNAU HC, SÁNCHEZ-SENDIN E, CORMAN VM, LIU HJ, YUAN M, WU NC, ZHU XY, LEE CC D, TRIMPERT J, HÖLTJE M, DIETERT K, STÖFFLER L, von WARDENBURG N, van HOOFF S, HOMEYER MA, HOFFMANN J, ABDELGAWAD A, GRUBER AD, BERTZBACH LD, et al. A therapeutic non-self-reactive SARS-CoV-2 antibody protects from lung pathology in a COVID-19 Hamster model[J]. *Cell*, 2020, 183(4): 1058-1069.e19.
- [64] TORTORICI MA, CZUDNOCHOWSKI N, STARR TN, MARZI R, WALLS AC, ZATTA F, BOWEN JE, JACONI S, DI IULIO J, WANG ZQ, de MARCO A, ZEPEDA SK, PINTO D, LIU ZM, BELTRAMELLO M, BARTHA I, HOUSLEY MP, LEMPP FA, ROSEN LE, DELLOTA E, et al. Broad sarbecovirus neutralization by a human monoclonal antibody[J]. *Nature*, 2021, 597(7874): 103-108.
- [65] DU YY, SHI R, ZHANG Y, DUAN XM, LI L, ZHANG J, WANG FZ, ZHANG RX, SHEN H, WANG Y, WU Z, PENG QW, PAN T, SUN WW, HUANG WJ, FENG Y, FENG H, XIAO JY, TAN WJ, WANG YC, WANG CH, YAN JH. A broadly neutralizing humanized ACE2-targeting antibody against SARS-CoV-2 variants[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5000.

- [66] ZHOU PP, YUAN M, SONG G, BEUTLER N, SHAABANI N, HUANG DL, HE WT, ZHU XY, CALLAGHAN S, YONG P, ANZANELLO F, PENG LH, RICKETTS J, PARREN M, GARCIA E, RAWLINGS SA, SMITH DM, NEMAZEE D, TEIJARO JR, ROGERS TF, et al. A human antibody reveals a conserved site on beta-coronavirus spike proteins and confers protection against SARS-CoV-2 infection[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(637): eabi9215.
- [67] LOW JS, JERAK J, McCALLUM M, PINTO D, CASSOTTA A, FOGlierINI M, MELE F, ABDELNABI R, WEYNAND B, NOACK J, MONTIEL-RUIZ M, BIANCHI S, BENIGNI F, SPRUGASCI N, JOSHI A, BOWEN JE, STEWART C, REXHEPAJ M, WALLS AC, JARROSSAY D, et al. ACE2-binding exposes the SARS-CoV-2 fusion peptide to broadly neutralizing coronavirus antibodies[J]. *Science*, 2022, 377(6607): 735-742.
- [68] SHI W, WANG LS, ZHOU TQ, SASTRY M, YANG ES, ZHANG Y, CHEN M, CHEN XJ, CHOE M, CREANGA A, LEUNG K, OLIA AS, PEGU A, RAWI R, SCHÖN A, SHEN CH, STANCOFSKI ES D, TALANA CA, TENG IT, WANG SS, et al. Vaccine-elicited murine antibody WS6 neutralizes diverse beta-coronaviruses by recognizing a helical stem supersite of vulnerability[J]. *Structure (London, England: 1993)*, 2022, 30(9): 1233-1244.e7.
- [69] SUN XY, YI CY, ZHU YF, DING LF, XIA S, CHEN XC, LIU M, GU CJ, LU X, FU YD, CHEN SF, ZHANG TL, ZHANG YG, YANG Z, MA LY, GU WP, HU GW, DU SJ, YAN RH, FU WH, et al. Neutralization mechanism of a human antibody with pan-coronavirus reactivity including SARS-CoV-2[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(7): 1063-1074.
- [70] DACON C, TUCKER C, PENG LH, LEE CC D, LIN TH, YUAN M, CONG Y, WANG LS, PURSER L, WILLIAMS JK, PYO CW, KOSIK I, HU Z, ZHAO M, MOHAN D, COOPER AJR, PETERSON M, SKINNER J, DIXIT S, KOLLINS E, et al. Broadly neutralizing antibodies target the coronavirus fusion peptide[J]. *Science*, 2022, 377(6607): 728-735.
- [71] TORTORICI MA, VEESLER D. Structural insights into coronavirus entry[J]. *Advances in Virus Research*, 2019, 105: 93-116.
- [72] PICCOLI L, PARK YJ, CZUDNOCHOWSKI N, WALLS AC, BELTRAMELLO M, SILACCI-FREGNI C, PINTO D, ROSEN LE, BOWEN JE, ACTON OJ, JACONI S, GUARINO B, MINOLA A, ZATTA F, SPRUGASCI N, BASSI J, PETER A, de MARCO A, NIX JC, MELE F, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology[J]. *Cell*, 2020, 183(4): 1024-1042.e21.
- [73] LI F, LI WH, FARZAN M, HARRISON SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor[J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1864-1868.
- [74] SHANG J, WAN YS, LUO CM, YE G, GENG QB, AUERBACH A, LI F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2[J]. *PNAS*, 2020, 117(21): 11727-11734.
- [75] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, KRÜGER N, HERRLER T, ERICHSEN S, SCHIERGENS TS, HERRLER G, WU NH, NITSCHKE A, MÜLLER MA, DROSTEN C, PÖHLMANN S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280.e8.
- [76] LU L, LIU Q, ZHU Y, CHAN KH, QIN LL, LI Y, WANG Q, CHAN JFW, DU LY, YU F, MA CQ, YE S, YUEN KY, ZHANG RG, JIANG SB. Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3067.
- [77] LIU SW, XIAO GF, CHEN YB, HE YX, NIU JK, ESCALANTE CR, XIONG HB, FARMAR J, DEBNATH AK, PO TE, JIANG SB. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors[J]. *Lancet (London, England)*, 2004, 363(9413): 938-947.
- [78] XIA S, ZHU Y, LIU MQ, LAN QS, XU W, WU YL, YING TL, LIU SW, SHI ZL, JIANG SB, LU L. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 17(7): 765-767.
- [79] CAI YF, ZHANG J, XIAO TS, PENG HQ, STERLING SM, WALSH RM Jr, RAWSON S, RITS-VOLLOCH S, CHEN B. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Science*, 2020, 369(6511): 1586-1592.
- [80] TIAN XL, LI C, HUANG AL, XIA S, LU SC, SHI ZL, LU L, JIANG SB, YANG ZL, WU YL, YING TL. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal

- antibody[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 382-385.
- [81] WALLS AC, XIONG XL, PARK YJ, TORTORICI MA, SNIJDER J, QUISPE J, CAMERONI E, GOPAL R, DAI M, LANZAVECCHIA A, ZAMBON M, REY FA, CORTI D, VEESLER D. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion[J]. *Cell*, 2019, 176(5): 1026-1039.e15.
- [82] BARNES CO, JETTE CA, ABERNATHY ME, DAM KM A, ESSWEIN SR, GRISTICK HB, MALYUTIN AG, SHARAF NG, HUEY-TUBMAN KE, LEE YE, ROBBIANI DF, NUSSENZWEIG MC, WEST AP, BJORKMAN PJ. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies[J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 682-687.
- [83] BARNES CO, WEST AP Jr, HUEY-TUBMAN KE, HOFFMANN MAG, SHARAF NG, HOFFMAN PR, KORANDA N, GRISTICK HB, GAEBLER C, MUECKSCH F, CETRULO LORENZI JC, FINKIN S, HAGGLOF T, HURLEY A, MILLARD KG, WEISBLUM Y, SCHMIDT F, HATZIOANNOU T, BIENIASZ PD, CASKEY M, et al. Structures of human antibodies bound to SARS-CoV-2 spike reveal common epitopes and recurrent features of antibodies[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 828-842.e16.
- [84] YUAN M, HUANG DL, LEE CC D, WU NC, JACKSON AM, ZHU XY, LIU HJ, PENG LH, van GILS MJ, SANDERS RW, BURTON DR, REINCKE SM, PRÜSS H, KREYE J, NEMAZEE D, WARD AB, WILSON IA. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants[J]. *Science*, 2021, 373(6556): 818-823.
- [85] CHI XY, YAN RH, ZHANG J, ZHANG GY, ZHANG YY, HAO M, ZHANG Z, FAN PF, DONG YZ, YANG YL, CHEN ZS, GUO YY, ZHANG JL, LI YN, SONG XH, CHEN Y, XIA L, FU L, HOU LH, XU JJ, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2[J]. *Science*, 2020, 369(6504): 650-655.
- [86] SONG G, HE WT, CALLAGHAN S, ANZANELLO F, HUANG DL, RICKETTS J, TORRES JL, BEUTLER N, PENG LH, VARGAS S, CASSELL J, PARREN M, YANG LL, IGNACIO C, SMITH DM, VOSS JE, NEMAZEE D, WARD AB, ROGERS T, BURTON DR, et al. Cross-reactive serum and memory B-cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2938.
- [87] LEIST SR, DINNON KH III, SCHÄFER A, TSE LV, OKUDA K, HOU YJ, WEST A, EDWARDS CE, SANDERS W, FRITCH EJ, GULLY KL, SCOBAY T, BROWN AJ, SHEAHAN TP, MOORMAN NJ, BOUCHER RC, GRALINSKI LE, MONTGOMERY SA, BARIC RS. A mouse-adapted SARS-CoV-2 induces acute lung injury and mortality in standard laboratory mice[J]. *Cell*, 2020, 183(4): 1070-1085.e12.
- [88] KUBA K, IMAI Y, RAO S, GAO H, GUO F, GUAN B, HUAN Y, YANG P, ZHANG YL, DENG W, BAO LL, ZHANG BL, LIU G, WANG Z, CHAPPELL M, LIU YX, ZHENG DX, LEIBBRANDT A, WADA T, SLUTSKY AS, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury[J]. *Nature Medicine*, 2005, 11(8): 875-879.
- [89] ZOUFALY A, POGLITSCH M, ABERLE JH, HOEPLER W, SEITZ T, TRAUOGOTT M, GRIEB A, PAWELKA E, LAFERL H, WENISCH C, NEUHOLD S, HAIDER D, STIASNY K, BERGTHALER A, PUCHHAMMER-STOECKL E, MIRAZIMI A, MONTSERRAT N, ZHANG HB, SLUTSKY AS, PENNINGER JM. Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2020, 8(11): 1154-1158.
- [90] ZHANG ZY, ZENG E, ZHANG L, WANG WM, JIN YK, SUN JY, HUANG SX, YIN WG, DAI J, ZHUANG Z, CHEN Z, SUN J, ZHU AR, LI F, CAO WT, LI XB, SHI YX, GAN M, ZHANG SN, WEI PL, et al. Potent prophylactic and therapeutic efficacy of recombinant human ACE2-Fc against SARS-CoV-2 infection *in vivo*[J]. *Cell Discovery*, 2021, 7: 65.
- [91] VERDECCHIA P, CAVALLINI C, SPANEVELLO A, ANGELI F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection[J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2020, 76: 14-20.
- [92] SUN YP, HO M. Emerging antibody-based therapeutics against SARS-CoV-2 during the global pandemic[J]. *Antibody Therapeutics*, 2020, 3(4): 246-256.
- [93] YOKOTA A, TSUMOTO K, SHIROISHI M, KONDO H, KUMAGAI I. The role of hydrogen bonding via interfacial water molecules in antigen-antibody complexation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(7): 5410-5418.