

• 特约专稿 •

针对中东呼吸综合征冠状病毒的全人源单克隆抗体的研究进展

王丽丽, 应天雷

复旦大学基础医学院教育部/卫生部医学分子病毒学重点实验室, 上海 200032

摘要: 中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)是继严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)之后发现的一种能引起人类严重急性呼吸道疾病、具有高致死率的新型冠状病毒。该病毒已从主要流行的中东地区逐渐蔓延至多个国家, 具有全球流行的潜在趋势, 引起世界各国的极大关注。本文对近期抗 MERS-CoV 人中和单克隆抗体的研究进展进行总结, 描述这些抗体的作用机制, 分析其防治 MERS 的潜在能力, 并探讨抗体类抗病毒药物用于新发传染病防治的应用前景和发展方向。

关键词: 中东呼吸综合征冠状病毒; 新型冠状病毒; 人中和单克隆抗体

Research progress on human neutralizing monoclonal antibodies against Middle East respiratory syndrome coronavirus

WANG Li-Li, YING Tian-Lei

Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministries of Education and Health, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) is a novel coronavirus, which can cause severe acute respiratory disease with a high mortality rate. Currently, MERS-CoV has spread from the main epidemic area, the Middle East Region, to many other countries including the United States of America, Republic of Korea and China. MERS-CoV has raised global public health concerns regarding the current situation and future evolution. This review will mainly summarize the recent progress on developing human neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) against MERS-CoV, describe the action mechanisms, and discuss their potential for prophylaxis and treatment of MERS. The future strategies for the rapid development of antibody-based antiviral options to combat emerging viruses and diseases in an outbreak setting are also discussed.

Key words: Middle East respiratory syndrome coronavirus; Novel coronavirus; Human neutralizing monoclonal antibody

中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 是一种新型冠状病毒, 于 2012 年 6 月由沙特阿拉伯病毒学家 Ali Moh Zaki 在一例死于急性肺炎和急

性肾功能衰竭的 60 岁男性患者的呼吸道上皮细胞中分离出来^[1]。2012 年 9 月 23 日, 英国向世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 报告了一例 49 岁男性患者出现该新型冠状病毒的感染

基金项目: 国家自然科学基金(31570936), 上海市浦江人才计划(15PJ1400800)

通信作者: 应天雷

Corresponding author. YING Tian-Lei, E-mail: tlying@fudan.edu.cn

症状,且该患者有到沙特阿拉伯和卡塔尔的旅行史(http://www.who.int/csr/don/2012_09_23/en)。2012年11月,该病毒被确定为新的 β 属冠状病毒,由于该研究由荷兰鹿特丹的伊拉兹马丝医学中心(Erasmus Medical Center)的Ron Fouchier研究小组进行,当时该病毒被命名为“hCoV-EMC”^[2]。2013年5月15日,国际病毒分类委员会决定将此新型冠状病毒命名为“中东呼吸综合征冠状病毒”,随后该命名被WHO采用^[3]。

MERS的临床表现与严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome,SARS)非常相似,初期曾被称为“类SARS病毒”。其主要症状有发热、咳嗽、呼吸急促,并伴有较高比率的急性肾衰竭,致死率超过30%,远高于SARS流行期间约10%的致死率^[4,5]。该病毒主要在中东地区流行,但目前在欧洲、北美和亚洲等地先后出现感染病例^[6]。截至2015年7月21日,WHO报道全球范围内已有1 368例MERS-CoV感染确诊病例,其中死亡至少490例(<http://www.who.int/csr/don/21-july-2015-mers-korea/en>)。目前MERS已波及25个国家,最近一波在韩国暴发的疫情发展十分迅速,自2015年5月21日以来至少有186例感染者(包括一例旅行至中国的患者),死亡36例,并出现了第4代感染者。MERS暴发对全球公共卫生构成了严重威胁,到目前为止,还没有针对MERS-CoV的疫苗或特异性防治药物,因此人们迫切需要开发一种有效的抗病毒药物来对抗这一新兴的全球性威胁。

单克隆抗体(monoclonal antibody,mAb)如今已成为一大类重要的临床药物,广泛应用于治疗自身免疫性疾病、癌症、心血管疾病等。全球有数十种mAb已获批并用于临床,数百种抗体正处于临床试验阶段^[7]。在SARS暴发期间,针对SARS-CoV的mAb被证明在体外及动物模型中具有极好的抗病毒效果,表明其具有作为冠状病毒防治药物的巨大潜力^[8-13]。本文对近期抗MERS-CoV人中和mAb的研究进展进行总结,描述这些抗体的作用机制,分析其防治MERS的潜在能力,并探讨抗体类抗病毒药物用于新发传染病防治的应用前景和发展方向。

1 MERS-CoV的结构、传播方式及致病机制

2003年以前,人类冠状病毒(human coronavirus,hCoV)一直被认为对人类的致病性较弱,如1960年从普通感冒患者体内分离出的hCoV-229E和

hCoV-OC43,只是引起轻度呼吸道感染^[2,14-16]。但2002~2003年,SARS-CoV给人类带来了致命性的疾病,其传染性极强,在短时期(2002年11月~2003年7月)内就播及全球30个国家,导致8 096例感染者,774例死亡(病死率为9.6%)。其中仅中国大陆就有5 327例感染者,349例死亡(病死率为6.6%)(http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21)。此后,2004年荷兰发现hCoV-NL63引起儿童呼吸道感染,2005年香港大学发现hCoV-HKU1等引起呼吸道感染,但临床表现均不十分严重^[17,18]。至2012年6月,在中东发现新型冠状病毒MERS-CoV,其来势凶猛,临床表现与SARS相似,病死率极高。

研究发现,在亲缘关系上MERS-CoV与SARS-CoV相似度仅为54.9%,与同属 β 类C谱系的扁颅蝠冠状病毒HKU4和伏翼蝙蝠冠状病毒HKU5的亲缘关系更相近,基因相似度可达70.1%,初步认为MERS-CoV来源于蝙蝠的可能性最大^[19-21]。然而,人类与蝙蝠的接触非常有限,因此病毒在蝙蝠与人之间的传播往往存在中间宿主。人们发现,很多MERS患者曾有与骆驼、山羊等农场动物的接触史,因此对MERS-CoV潜在来源的怀疑集中在阿拉伯半岛地区常见的家畜,如山羊、绵羊、单峰骆驼和牛中。随后,MERS-CoV的中和抗体在单峰骆驼中被检测到,但在鸡、羊和牛中未检测到。人们进一步证实,从单峰骆驼中分离到的MERS-CoV基因组与从人类感染病例中分离到的MERS-CoV几乎完全相同(相似度为99%),这些证据表明单峰骆驼与人类MERS-CoV之间存在密切联系,中东地区的单峰骆驼很可能就是MERS-CoV的潜在来源^[22,23]。蝙蝠也可能是MERS-CoV的天然宿主之一,但其传播流行模式还不完全清楚。

MERS-CoV表面的刺突蛋白(spike protein,S蛋白)是由1 353个氨基酸组成的I型跨膜糖蛋白,在病毒包膜表面呈三聚体状态,包含两个功能性亚基,其中S1亚基负责与受体结合,近膜端的S2亚基负责介导膜融合^[24]。研究发现,MERS-CoV的S蛋白具有一个受体结合域(receptor binding domain, RBD)^[25]。与SARS-CoV不同的是,SARS-CoV以血管紧张素转化酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)作为细胞受体^[26,27],而目前研究表明MERS-CoV S1蛋白的功能受体是二肽基肽酶4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4;亦称为CD26)。DPP4能特异性地结合S1蛋白上的

RBD 区,且阻断 DPP4 的酶活性并不影响 MERS-CoV 对细胞的易感性^[28-30]。DPP4 是一种Ⅱ型跨膜糖蛋白,广泛表达于肾、肺、小肠、肝、腮腺、脾等上皮细胞组织及活化的白细胞表面^[31]。由于 DPP4 在哺乳动物不同种间相对保守,MERS-CoV 可同时感染蝙蝠和人类。MERS-CoV S1 蛋白上的 RBD 区与细胞表面 DPP4 受体结合,介导病毒进入宿主细胞内引发感染。对 RBD 与 DPP4 受体的结合与相互作用进行深入研究,可为开发新型中和抗体药物及疫苗提供非常重要的参考。

2 针对 MERS-CoV 的全人源 mAb 研究进展

MERS-CoV 的持续传播及高致病性,迫使人们急需开发出有效的 MERS 预防及治疗方案。科研人员正在努力寻找抗 MERS-CoV 药物,已有一些可能有效的潜在药物被筛选出来。例如,核苷类抗病毒药利巴韦林及免疫调节剂干扰素 α 2b (interferon α 2b, IFN- α 2b),两者均能有效抑制 MERS-CoV 在细胞内的复制,且具有协同作用^[32]。然而,临床观察结果表明,该联合疗法对具有严重感染并含有多个并发症的晚期患者没有很好的治疗效果,只对某些早期患者有效^[33]。有研究团队发现一种衍生于 MERS-CoV S2 蛋白的多肽 HR2P,能与 S2 蛋白相互作用,并产生螺旋状的六螺旋束(6-helix bundle,6-HB)复合物,具有与 S2 蛋白竞争形成 6-HB 的能力,从而抑制病毒复制。进一步发现,HR2P 能有效抑制 S 蛋白介导的细胞与细胞融合及 MERS-CoV 对 Vero 细胞的感染^[34,35]。HR2P 多肽正被进一步优化并改善其抑制活性,这些 HR2P 类似物很有可能发展为有效治疗 MERS 的病毒融合抑制剂。

mAb 药物在临幊上已取得巨大成功,并被广泛应用。在抗感染性疾病领域,各大制药公司也逐渐认识到 mAb 药物的重要性,开发了大量抗病毒 mAb,有些已上市或进入临床试验阶段^[36-38]。SARS 暴发期间,在 SARS 患者或感染 SARS-CoV 动物体內均能检测到 SARS-CoV 中和抗体,此抗体可有效保护未感染动物不被 SARS-CoV 感染^[39,40]。多个研究小组也在体外筛选出能特异性结合 SARS-CoV 的 mAb,部分抗体的有效性在动物模型中得到确认^[8,13]。与 SARS 情况类似,研究人员在 MERS 患者或康复患者的血清内也检测到了高水平的抗 MERS-CoV 抗体^[41]。这些结果显示,针对 MERS-CoV 的 mAb 可能具有很强的抗病毒中和能

力,有被开发为 MERS 防治药物的潜力而用于疫情控制。

2014 年 4 月,多个课题组几乎同时报道了抗 MERS-CoV 的全人源中和抗体。这些中和抗体均从未被从人免疫抗体库中筛选出,均作用于 MERS-CoV S1 蛋白的 RBD。例如,本课题组从噬菌体展示的超大型 Fab 抗体库中筛选到十几种高亲和力的全人源 mAb,其中 3 种抗体 m336、m337 和 m338 被证明具有极高的抗病毒中和活性,对 MERS-CoV 假病毒的半抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC50)为 $0.005 \sim 0.017 \mu\text{g}/\text{ml}$ ^[42]。有意思的是,这 3 个抗体的重链可变区(heavy chain variable region VH)均属于 VH 1-69 家族,而人的很多抗病毒抗体均属于该 VH 家族。其中 m336 抗体的中和活性最强,在浓度低达 $0.039 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时对 MERS-CoV 假病毒感染 Huh-7 细胞的抑制率高达 90%。同样,m336 对 MERS-CoV 活病毒感染 Vero E6 细胞诱导产生的细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)表现出有效抑制,其 IC50 为 $0.07 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。此外,清华大学研究团队分离到 2 株针对 MERS-CoV RBD 的高效中和抗体 MERS-4 和 MERS-27^[43],其中 MERS-4 中和 MERS-CoV 假病毒感染 Huh-7 细胞的 IC50 为 $0.056 \mu\text{g}/\text{ml}$,抑制 MERS-CoV 活病毒感染 Vero E6 诱导产生 CPE 的 IC50 为 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。MERS-4 和 MERS-27 具有协同作用,联合使用可发挥更好的抑制效果。美国哈佛大学医学院研究人员也筛选出数种针对 MERS-CoV RBD 的特异性抗体,其中一种抗体 3B11 表现出了较高的抗病毒中和活性^[44]。

尽管这些人中和抗体在体外表现出很强的抗 MERS-CoV 中和活性,但 MERS 动物模型的缺乏影响了抗体的体内有效性评估。与 SARS-CoV 不同,MERS-CoV 不能感染小实验动物,如老鼠、仓鼠或雪貂,且只能导致恒河猴轻度至中度症状^[45-47]。动物细胞表面受体 DPP4 被认为是决定 MERS-CoV 易感性的关键。因此,研究人员通过使用腺病毒表达人 DPP4 感染小鼠,使小鼠更易感染 MERS-CoV,从而构建了一种小鼠模型^[48]。该方法可用于初步、快速评价抗 MERS-CoV 疫苗和抗病毒药物的效果。最近,科研人员发现绒猴 DPP4 的氨基酸序列与人类 DPP4 的氨基酸序列几乎完全相同,因此感染 MERS-CoV 的绒猴表现出与人类感染 MERS-CoV 相类似的肺炎症状^[46]。这些结果表明,绒猴模型很可能是目前用于评估 MERS-CoV

感染干预治疗策略的最有效的动物模型。上述多个 mAb 已经或正在绒猴模型中进行预临床评价。

体外实验表明,这些抗体均能通过阻断 RBD 与细胞表面受体 DPP4 的作用,进而特异地抑制病毒感染。另外,抗体还可通过其 Fc 区诱发抗体介导细胞依赖的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)、抗体介导的细胞吞噬作用(antibody-dependent cellular phagocytosis,ADCP)、补体依赖的细胞毒作用(complement-dependent cytotoxicity,CDC)等,这些作用也可能是抗体发挥其治疗效果的重要机制。

最近,本课题组利用蛋白质晶体学对目前具有最强抗 MERS-CoV 中和活性的 mAb m336 与其 DPP4 受体复合物的结构进行解析^[49]。结果发现,m336 抗体和病毒两者的结合面与病毒天然受体 DPP4 和病毒两者的结合面重叠面积达 90% 以上。这解释了 m336 抗体为什么具有超强的抗病毒中和活性;另一方面表明病毒若逃逸与这种抗体的结合,其与天然宿主表面受体的结合活性也相应降低,因此病毒针对 m336 这种高活性抗体的逃逸突变在理论上很难发生。进一步研究发现,m336 抗体的序列非常接近天然的胚系(germline)抗体序列,其 VH 相比胚系序列仅有 1 个氨基酸突变,且将该氨基酸突变回胚系序列对应的氨基酸后,抗体与 RBD 的亲和力及对 MERS-CoV 的中和活性均没有降低。胚系抗体通常具有更低的免疫原性和更好的成药性,因此 m336 具有开发为高效 MERS 防治药物的巨大潜力。

3 未来发展方向

新生病毒、新发传染病正对人类健康构成持续的严重威胁。在无法预测下一种新发传染病会何时、何地、以何种形式出现的前提下,开发一种平台技术,迅速筛选对抗新病毒、新发传染病的高效防治药物,是防控疫情蔓延的最有效措施之一。

多克隆免疫球蛋白应用于治疗病毒性疾病已有一个多世纪,且取得了不同程度的成功。一些多克隆免疫球蛋白仍在临床使用,如治疗乙型肝炎、狂犬病、巨细胞病毒感染、麻疹和牛痘等。但多克隆抗体常会产生一定的毒副作用,包括过敏反应等;另外,多克隆抗体中只有非常小的部分发挥中和作用,其余部分不仅无效,还会产生免疫原性甚至不良反应^[50]。人 mAb 的应用克服了这些不足。mAb 具有特异性强、疗效显著及安全性高的特点,被誉为

“魔法导弹”,在治疗病毒性疾病方面具有非常广阔的应用前景。

然而,对新发传染病来说,最主要的障碍是如何在短时间内开发出高度有效的中和 mAb 并迅速推向临床。本文对近期不同实验室研发的抗 MERS-CoV 人中和 mAb 的研究进展进行了总结。这些研究表明,随着抗体工程技术的快速发展,全人源抗体的研发时间轴大大缩短,有望能在新病毒疫情暴发之初即研发出有效的抗体药物,用于疫情控制。另外,虽然许多抗体仅依靠其与病毒高亲和力结合的阻断作用机制已足以达到良好的治疗效果,但由于生产成本高、价格昂贵,限制了其在临床上的应用。因此,研发更高效、更安全、给药更方便的抗体是未来抗病毒抗体药物的发展方向。

在实际临床应用中,研究者进一步发现,改造抗体 Fc 区所介导的各种功能,可能非常有助于提高抗体药物的安全性和疗效^[51]。Fc 的改造途径主要是通过基因突变改变其氨基酸序列,或对 Fc 进行糖基化修饰等。在某些特定临床应用中,可通过降低 Fc 与 FcγR 的结合等减弱 Fc 介导的功效,从而减少这些功效引起的不良反应,同时降低其免疫原性。减弱 Fc 介导的功效也可通过一些缺乏 Fc 的抗体片段(antibody fragment)来实现。值得注意的是,缺乏 Fc 的抗体片段,如 Fab、scFv、VH、VL 等,往往可在大肠埃希菌中高表达,因此生产成本非常低^[52];但它们半衰期较短,不适合临床应用。本课题组最近基于 IgG Fc 片段,构建了一些具有高稳定性、长半衰期等特性的新型抗体片段(mFc、mCH3 等),它们与 VH 等抗体片段融合后,仍可在大肠埃希菌中高度可溶性表达。这些新结构抗体兼具相对分子质量小、组织渗透能力强、半衰期长、生产成本低等特点,在未来有望替代部分现有 mAb 药物并扩展抗体药物的临床应用范围,突破抗病毒抗体药物的发展瓶颈^[53-58]。另一方面,对 Fc 进行改造可增强抗体与 FcγR 的结合力,从而增强 ADCC、ADCP、CDC 等作用。Fc 的 Ser239Asp、Glu330Leu、Ile332Glu 等突变可使抗体的 ADCC 作用大大提高。Fc 的 Gly236Ala 突变可使激活的受体选择性提高,增强巨噬细胞对靶细胞的吞噬作用。增强抗体的 CDC 作用也可通过铰链区突变等来实现。

此外,延长血浆半衰期成为目前抗病毒抗体药物的另一重要发展方向。通过改造 Fc 进而调节其与新生 Fc 受体(neonatal Fc receptor, FcRn)的相

互作用可达到延长体内血浆半衰期的效果^[59]。FcRn 依赖细胞胞饮作用,从胞外酸性环境中吸收 IgG,在血管内皮细胞内参与循环中 IgG 水平的稳态调节,这也符合 FcRn 在酸性 pH 6.0~6.5 的条件下与 IgG Fc 结合,而在 pH 7.4 时不与 IgG 结合的特性。因此,通过对 IgG Fc 区进行氨基酸突变,调节其与 FcRn 的相互作用能维持血液循环中高水平的抗体浓度,有效延长抗体的血浆半衰期并增强抗体的体内功效^[60]。

4 结语

本文对近期抗 MERS-CoV 全人源中和 mAb 的研究进展进行了总结。如上所述,这些以 MERS-CoV S1 蛋白 RBD 为靶点的抗体均具有很强的抗病毒中和活性,有开发为高效 MERS 防治药物的潜力。目前,这些抗体的研发仍停留在体外实验和动物实验阶段,尚无针对人类的临床研究。值得一提的是,多种实验室生产的抗病毒抗体,如针对亨德拉病毒、尼帕病毒的 m102.4 抗体,针对埃博拉病毒的 ZMapp 抗体等都在未进行临床试验的情况下作为应急药物在人类直接用于治疗。因此,在紧急情况下这些 MERS-CoV 的高活性全人源抗体也有可能作为实验性药物用于 MERS 患者的治疗。更重要的是,如果国家有关部门、企业和研究单位能有效结合,尽快推动抗体药物进入临床,可为应对今后可能出现的 MERS 疫情暴发提供重要保障。

参考文献

- [1] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [J]. *New Engl J Med*, 2012, 367(19): 1814-1820.
- [2] van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, Osterhaus AD, Haagmans BL, Gorbatenya AE, Snijder EJ, Fouchier RA. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans [J]. *MBio*, 2012, 3(6). pii: e00473-12.
- [3] de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, Fouchier RA, Galiano M, Gorbatenya AE, Memish ZA, Perlman S, Poon LL, Snijder EJ, Stephens GM, Woo PC, Zaki AM, Zambon M, Ziebuhr J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group [J]. *J Virol*, 2013, 87(14): 7790-7792.
- [4] Chan JF, Lau SK, To KK, Cheng VC, Woo PC, Yuen KY. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(2): 465-522.
- [5] Chan JF, Li KS, To KK, Cheng VC, Chen H, Yuen KY. Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic [J]? *J Infect*, 2012, 65(6): 477-489.
- [6] Hui DS, Peiris M. Middle East respiratory syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(3): 278-279.
- [7] Scolnik PA. mAbs: a business perspective [J]. *MAbs*, 2010, 1(2): 179-184.
- [8] Zhang MY, Choudhry V, Xiao X, Dimitrov DS. Human monoclonal antibodies to the S glycoprotein and related proteins as potential therapeutics for SARS [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2005, 7(2): 151-156.
- [9] ter Meulen J, Bakker AB, van den Brink EN, Weverling GJ, Martina BE, Haagmans BL, Kuiken T, de Kruif J, Preiser W, Spaan W, Gelderblom HR, Goudsmit J, Osterhaus AD. Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets [J]. *Lancet*, 2004, 363(9427): 2139-2141.
- [10] Sui J, Li W, Murakami A, Tamin A, Matthews LJ, Wong SK, Moore MJ, Tallarico AS, Olurinde M, Choe H, Anderson LJ, Bellini WJ, Farzan M, Marasco WA. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(8): 2536-2541.
- [11] Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (8): 871-875.
- [12] ter Meulen J, van den Brink EN, Poon LL, Marissen WE, Leung CS, Cox F, Cheung CY, Bakker AQ, Bogaards JA, van Deventer E, Preiser W, Doerr HW, Chow VT, de Kruif J, Peiris JS, Goudsmit J. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants [J]. *PLoS Med*, 2006, 3 (7): e237.
- [13] Zhu Z, Chakraborti S, He Y, Roberts A, Sheahan T, Xiao X, Hensley LE, Prabakaran P, Rockx B, Sidorov IA, Corti D, Vogel L, Feng Y, Kim JO, Wang LF, Baric R, Lanzavecchia A, Curtis KM, Nabel GJ, Subbarao K, Jiang S, Dimitrov DS. Potent cross-reactive neutralization of SARS coronavirus isolates by human monoclonal antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (29): 12123-12128.
- [14] Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1966, 121(1): 190-193.
- [15] McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock

- RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1967, 57(4): 933-940.
- [16] Bradburne AF, Somerset BA. Coronative antibody tides in sera of healthy adults and experimentally infected volunteers [J]. J Hyg (Lond), 1972, 70(2): 235-244.
- [17] van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkout B. Identification of a new human coronavirus [J]. Nat Med, 2004, 10 (4): 368-373.
- [18] Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsui HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia [J]. J Virol, 2005, 79(2): 884-895.
- [19] Vijaykrishna D, Smith GJ, Zhang JX, Peiris JS, Chen H, Guan Y. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses [J]. J Virol, 2007, 81(8): 4012-4020.
- [20] Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(10): 1117-1127.
- [21] Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie YA, Kalko EK, Lina PH, Godlevska EV, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(3): 456-459.
- [22] Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus [J]. N Engl J Med, 2014, 370(26): 2499-2505.
- [23] Reusken CB, Haagmans BL, Müller MA, Gutierrez C, Godeke GJ, Meyer B, Muth D, Raj VS, Smits-De Vries L, Corman VM, Drexler JF, Smits SL, El Tahir YE, De Sousa R, van Beek J, Nowotny N, van Maanen K, Hidalgo-Hermoso E, Bosch BJ, Rottier P, Osterhaus A, Gortázar-Schmidt C, Drosten C, Koopmans MP. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels; a comparative serological study [J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(10): 859-866.
- [24] Ruch TR, Machamer CE. The coronavirus E protein: assembly and beyond [J]. Viruses, 2012, 4(3): 363-382.
- [25] Jiang S, Lu L, Du L, Debnath AK. A predicted receptor-binding and critical neutralizing domain in S protein of the novel human coronavirus HCoV-EMC [J]. J Infect, 2013, 66(5): 464-466.
- [26] Du L, Ma C, Jiang S. Antibodies induced by receptor-binding domain in spike protein of SARS-CoV do not cross-neutralize the novel human coronavirus hCoV-EMC [J]. J Infect, 2013, 67(4): 348-350.
- [27] Müller MA, Raj VS, Muth D, Meyer B, Kallies S, Smits SL, Wollny R, Bestebroer TM, Specht S, Suliman T, Zimmermann K, Binger T, Eckerle I, Tschapka M, Zaki AM, Osterhaus AD, Fouchier RA, Haagmans BL, Drosten C. Human coronavirus EMC does not require the SARS-coronavirus receptor and maintains broad replicative capability in mammalian cell lines [J]. MBio, 2012, 3(6). pii: e00515-12.
- [28] Raj VS, Mou HH, Smits SL, Dekkers DH, Mueller MA, Dijkman R, Muth DA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ, Haagmans BL. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC [J]. Nature, 2013, 495 (7440): 251-254.
- [29] Cui J, Eden JS, Holmes EC, Wang LF. Adaptive evolution of bat dipeptidyl peptidase 4 (dpp4): implications for the origin and emergence of Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. Virol J, 2013, 10: 304.
- [30] Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV [J]. Eur J Cell Biol, 2003, 82(2): 53-73.
- [31] Yang Y, Du L, Liu C, Wang L, Ma C, Tang J, Baric RS, Jiang S, Li F. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(34): 12516-12521.
- [32] Falzarano D, de Wit E, Martellaro C, Callison J, Munster VJ, Feldmann H. Inhibition of novel β coronavirus replication by a combination of interferon- α 2b and ribavirin [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1686.
- [33] Al-Tawfiq JA, Momattin H, Dib J, Memish ZA. Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study [J]. Int J Infect Dis, 2014, 20: 42-46.
- [34] Lu L, Liu Q, Zhu Y, Chan KH, Qin L, Li Y, Wang Q, Chan JF, Du L, Yu F, Ma C, Ye S, Yuen KY, Zhang R, Jiang S. Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor [J]. Nat Commun, 2014, 5: 3067.
- [35] Gao J, Lu G, Qi J, Li Y, Wu Y, Deng Y, Geng H, Li H, Wang Q, Xiao H, Tan W, Yan J, Gao GF. Structure of the fusion core and inhibition of fusion by a heptad repeat peptide derived from the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. J Virol, 2013, 87 (24): 13134-13140.
- [36] Zhu Z, Dimitrov AS, Bossart KN, Crameri G, Bishop KA, Choudhry V, Mungall BA, Feng YR, Choudhary A, Zhang MY, Feng Y, Wang LF, Xiao X, Eaton BT, Broder CC, Dimitrov DS. Potent neutralization of Hendra and Nipah viruses by human monoclonal antibodies [J]. J Virol, 2006,

- 80(2): 891-899.
- [37] Bossart KN, Geisbert TW, Feldmann H, Zhu Z, Feldmann F, Geisbert JB, Yan L, Feng YR, Brining D, Scott D, Wang Y, Dimitrov AS, Callison J, Chan YP, Hickey AC, Dimitrov DS, Broder CC, Rockx B. A neutralizing human monoclonal antibody protects African green monkeys from hendra virus challenge [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3 (105): 105ra103.
- [38] Qiu X, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, Fausther-Bovendo H, Wei H, Aviles J, Hiatt E, Johnson A, Morton J, Swope K, Bohorov O, Bohorova N, Goodman C, Kim D, Pauly MH, Velasco J, Pettitt J, Olinger GG, Whaley K, Xu B, Strong JE, Zeitlin L, Kobinger GP. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp [J]. *Nature*, 2014, 514 (7520): 47-53.
- [39] Hsueh PR, Huang LM, Chen PJ, Kao CL, Yang PC. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10 (12): 1062-1066.
- [40] Nie Y, Wang G, Shi X, Zhang H, Qiu Y, He Z, Wang W, Lian G, Yin X, Du L, Ren L, Wang J, He X, Li T, Deng H, Ding M. Neutralizing antibodies in patients with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection [J]. *J Infect Dis*, 2004, 190(6): 1119-1126.
- [41] Buchholz U, Müller MA, Nitsche A, Sanewski A, Wevering N, Bauer-Balci T, Bonin F, Drosten C, Schweiger B, Wolff T, Muth D, Meyer B, Buda S, Krause G, Schaade L, Haas W. Contact investigation of a case of human novel coronavirus infection treated in a German hospital, October-November 2012 [J/OL]. *Euro Surveill*, 2013. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20406>.
- [42] Ying T, Du L, Ju TW, Prabakaran P, Lau CC, Lu L, Liu Q, Wang L, Feng Y, Wang Y, Zheng BJ, Yuen KY, Jiang S, Dimitrov DS. Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies [J]. *J Virol*, 2014, 88 (14): 7796-7805.
- [43] Jiang L, Wang N, Zuo T, Shi X, Poon KM, Wu Y, Gao F, Li D, Wang R, Guo J, Fu L, Yuen KY, Zheng BJ, Wang X, Zhang L. Potent neutralization of MERS-CoV by human neutralizing monoclonal antibodies to the viral spike glycoprotein [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(234): 234ra259.
- [44] Tang XC, Agnihothram SS, Jiao Y, Stanhope J, Graham RL, Peterson EC, Avnir Y, Tallarico AS, Sheehan J, Zhu Q, Baric RS, Marasco WA. Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(19): E2018-E2026.
- [45] de Wit E, Prescott J, Baseler L, Bushmaker T, Thomas T, Lackemeyer MG, Martellaro C, Milne-Price S, Haddock E, Haagmans BL, Feldmann H, Munster VJ. The Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) does not replicate in Syrian hamsters [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (7): e69127.
- [46] Falzarano D, de Wit E, Feldmann F, Rasmussen AL, Okumura A, Peng X, Thomas MJ, van Doremale N, Haddock E, Nagy L, LaCasse R, Liu T, Zhu J, McLellan JS, Scott DP, Katze MG, Feldmann H, Munster VJ. Infection with MERS-CoV causes lethal pneumonia in the common marmoset [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10 (8): e1004250.
- [47] de Wit ED, Rasmussen AL, Falzarano D, Bushmaker T, Feldmann F, Brining DL, Fischer ER, Martellaro C, Okumura A, Chang J, Scott D, Benecke AG, Katze MG, Feldmann H, Munster VJ. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) causes transient lower respiratory tract infection in rhesus macaques [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(41): 16598-16603.
- [48] Zhao J, Li K, Wohlford-Lenane C, Agnihothram SS, Fett C, Zhao J, Gale MJ, Baric RS, Enjuanes L, Gallagher T, McCray PB, Perlman S. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(13): 4970-4975.
- [49] Ying T, Prabakaran P, Du L, Shi W, Feng Y, Wang Y, Wang L, Li W, Jiang S, Dimitrov DS, Zhou T. Junctional and allele-specific residues are critical for MERS-CoV neutralization by an exceptionally potent germline-like antibody [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8223.
- [50] Bregenholt S, Jensen A, Lantto J, Hyldig S, Haurum JS. Recombinant human polyclonal antibodies: A new class of therapeutic antibodies against viral infections [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(16): 2007-2015.
- [51] Presta LG. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies [J]. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(4): 460-470.
- [52] Nelson AL, Reichert JM. Development trends for therapeutic antibody fragments [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(4): 331-337.
- [53] Ying T, Gong R, Ju TW, Prabakaran P, Dimitrov DS. Engineered Fc based antibody domains and fragments as novel scaffolds [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844 (11): 1977-1982.
- [54] Ying T, Wang Y, Feng Y, Prabakaran P, Gong R, Wang L, Crowder K, Dimitrov DS. Engineered antibody domains with significantly increased transcytosis and half-life in macaques mediated by FcRn [J]. *MAbs*, 2015, 7 (5): 922-930.
- [55] Ying T, Feng Y, Wang Y, Chen W, Dimitrov DS. Monomeric IgG1 Fc molecules displaying unique Fc receptor interactions that are exploitable to treat inflammation-mediated diseases [J]. *MAbs*, 2014, 6(5): 1201-1210.
- [56] Ying T, Ju TW, Wang Y, Prabakaran P, Dimitrov DS.

- Interactions of IgG1 CH2 and CH3 domains with FcRn [J].
Front Immunol, 2014, 5: 146.
- [57] Ying T, Chen W, Feng Y, Wang Y, Gong R, Dimitrov DS. Engineered soluble monomeric IgG1 CH3 domain: generation, mechanisms of function, and implications for design of biological therapeutics [J]. J Biol Chem, 2013, 288(35): 25154-25164.
- [58] Ying T, Chen W, Gong R, Feng Y, Dimitrov DS. Soluble monomeric IgG1 Fc [J]. J Biol Chem, 2012, 287(23): 19399-19408.
- [59] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7 (9):715-725.
- [60] Zalevsky J, Chamberlain AK, Horton HM, Karki S, Leung IW, Sproule TJ, Lazar GA, Roopenian DC, Desjarlais JR. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28 (2):157-159.

(收稿日期:2015-07-29)