

寻找中和抗体迎战新冠肺炎：直接阻断病毒入侵细胞

专题：《科学大家》聚焦新型冠状病毒

实时疫情入口

出品：新浪科技《科学大家》、未来论坛

主讲嘉宾：谢晓亮 北京大学李兆基讲席教授、北京未来基因诊断高精尖创新中心主任、北京大学生物医学前沿创新中心主任

新冠肺炎席卷全球，控制疫情涉及四个方面：检测、隔离、预防和治疗。根据过去几个月国内外疫情的发展，大家应该已经充分意识到了检测和隔离的重要性，我今天的演讲主要涉及预防和治疗。

谈到预防，人们纷纷把希望寄托在疫苗上。眼下全世界很多科学家正在研制疫苗，估计要年底才能出来。在疫苗出来之前，除了隔离，我们还能做什么呢？世界急需的是强有效的治疗方法，来降低死亡率，但是目前还没有特效药。

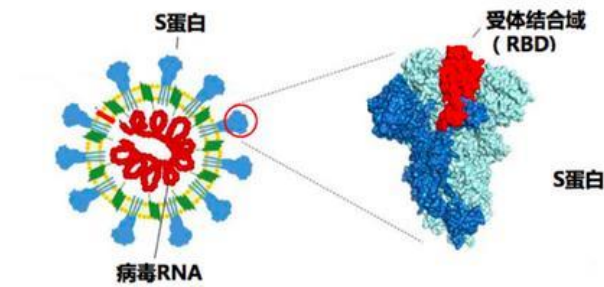
从上周中欧抗疫交流会上和前几天的临床结果，我们了解到，小分子药物氯奎和羟氯奎在轻症患者上有一定效果，现在美国也开始使用了。小分子药物，也就是化学合成药物，一般研制周期很长，比如说十年。所以目前都是旧药新用，药效有限。

除小分子药物外，血浆疗法也初见成效。血浆疗法就是把康复期病人的血浆离心，取上层清澈的血浆部分注射给病人。这是一种传统疗法，现在在美国等国家也开始使用。

血浆疗法虽好，但有一定风险，因为血浆因人而异，是一个复杂的混合物；而且血浆来源有限，不可能大规模使用。

康复期病人的血浆中的关键成分是免疫系统产生的某种抗体。抗体是一种蛋白质，它的分子量是氢原子的15万倍。所有抗体都有Y字形状的结构，像两把“钳子”，用来捕捉抗原。那对我们来说，抗原就是新冠病毒。

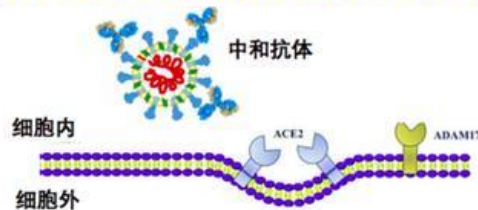
新冠病毒是一种RNA 病毒 外壳上是刺突状的S蛋白，其头部是受体结合域（RBD）



新冠病毒是一种 RNA 病毒，它的外壳上有刺突状的 S 蛋白。S 蛋白上面的红色的部分是冠状病毒的受体结合域（Receptor Binding Domain， RBD）。

新冠病毒入侵细胞时，S 蛋白与人体细胞的表面受体 ACE2 结合，随后病毒被内化，进入细胞，在细胞内被转录酶复制，重新组装成大量新的病毒，又去继续感染其他细胞。

中和抗体通过与病毒结合直接阻断病毒侵入细胞



**我们的目标是快速找到并制备高纯度中和抗体，
作为药物，代替血浆给病人注射。**

抗体有很多种，我们关心的是中和抗体。中和的意思就像酸来了，我们用碱来中和；病毒来了，细胞用抗体来中和。中和抗体的作用是牢牢地结合到病毒上，改变它的功能，阻止它侵入细胞。我们的目标是快速找到并制备高纯度中和抗体，作为药物，代替血浆给病人注射。

抗体药物是一种大分子药物，与小分子药物相比，它的特异性好，副作用小，近年来有不少成功的例子。

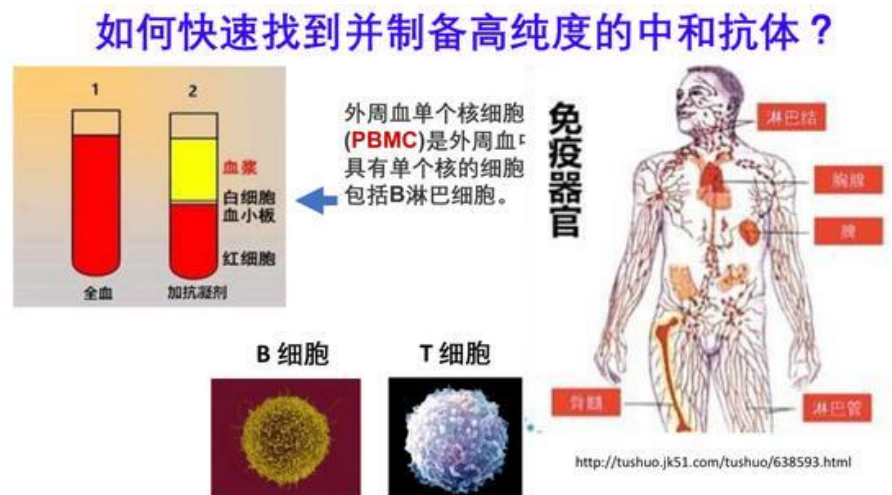
艾滋病原来是不治之症，2018 年以后美国 FDA 批准 HIV 的抗体药物，与其他抗病毒逆转录的药物联合使用。

埃博拉病毒，三种单克隆抗体已获美国 FDA 批准，目前正在临床开发中。2015 年，由军事医学科学院研发的抗体药物 MIL77 成功治愈 1 名确诊埃博拉病毒的感染者。

中东呼吸综合征（MERS），2018 年经过基因改造的牛生产的针对 MERS 病毒的人类抗体，在一期临床试验中表现良好。二期临床因为疫情消失无法继续。

以上这三种抗体药物都是中和抗体。但问题是找到这些抗体的时间太长。采用的是单细胞克隆放大的方法，需要几个月。我们现在就是要缩短这个时间。

我这里顺便提一下癌症。截止 2018 年，全球将近 500 个抗体新药进入临床试验。它们不是中和抗体，而是与 T 细胞有关的抗体。其中以 PD-1/PD-L1 为靶点的抗体是研究热点。



回到我们的课题：如何快速找到并制备高纯度的中和抗体？

血浆中的抗体不计其数，种类约有 10^{7-8} 次方之多。想在血浆中直接找到新冠病毒的中和抗体，犹如大海捞针，目前无法实现。反正我不知道怎么做。

我们需要走另外一个途径，那就是先找到产生抗体的细胞。离心后血浆下面的这层是白细胞，其中包括人体内两大免疫细胞，T 细胞和 B 细胞。我们今天只讲 B 细胞。

B 细胞是生产抗体的，它产生于骨髓，通过血液和淋巴液分布到全身的淋巴结。但是 B 细胞种类繁多，每个 B 细胞只生产某一种特定的抗体；而这种抗体是由 B 细胞的 DNA 序列决定的。所以我们采用的办法就是通过对 B 细胞进行 RNA 测序来找到我们想要的中和抗体。



曹云龙



北京佑安医院 (2020/2/2), 左起: 冯英梅、金荣华、谢晓亮、苏晓东、耿晨阳



北京大学(2020/2/9), 左起: 耿晨阳、曹云龙、谢晓亮、栗斌、郭向华



北京佑安医院(2020/2/10)

我们寻找新冠病毒中和抗体之路开始于大年初三，曹云龙在几个月前刚从哈佛拿到博士学位，他是我的哈佛实验室里唯一一个跟我回国的。我们不是专门搞病毒或者免疫学的，单细胞基因组学是我们的专长。一开始我们只是想为抗疫做点事情，当意识到单细胞基因组学也许有可能帮助找到中和抗体的时候，我们非常兴奋，立马开始读文献，制定实验方案，四处寻找仪器和试剂。北大和北京市各单位的同事十分给力，所以很快就万事俱备。

2月2号，我和我们中心的苏晓东教授，测序平台负责人耿晨阳去了佑安医院。在这里见到金院长和冯处长，他们当即就同意合作，要提供康复期病人的血样。紧接着医院的栗斌和郭向华研究员来到我们中心，完成单细胞测序技术的培训后就回到医院的P2+实验室，类似于P3实验室，所以他们会穿防护服等装备。按理每天只应该工作5个小时，但他们经常超时工作，还被隔离了整整两个月。

在进一步解释之前，我需要先给大家一些背景知识。

谈到测序，大家知道这次疫情爆发后，中国科学家在一个月内就测出新冠病毒的完整序列，并在第一时间向全球公布，为新冠肺炎的检测和研究奠定了基础。相比之下03年SARS爆发时，最早的序列用了5个月的时间才测出来，是由加拿大的团队最先公布的。

就在SARS发生的同一年，人类基因组计划完成了，这是人类历史上的一个里程碑。当时一家美国的私人公司和美国组织的国际团队激烈竞争。私人队的队长Craig Venter测的是他自己的基因组。而美国领导的国际团队耗资30亿美金，测的是6、7个人的组合。

在人体细胞的细胞核里有46条染色体，23条来自于父亲，23条来自于母亲，染色体的主要成分是遗传物质DNA。大家知道，二十世纪最伟大的生物学发现是Waston和Crick的DNA双螺旋结构。DNA有四种碱基A、T、C、G，A与T配

对，C 与 G 配对。简单地说，碱基排列的序列，像这里，GTGACAG，决定了遗传信息，也就是基因。人类基因组有 60 亿对碱基，共有两万多个基因，对应两万多个蛋白质。人与人相比，绝大部分的碱基都是相同的，只有千分之一碱基序列的差别决定了我们之间的不同。比如说这里，这一个人体细胞里，来自父亲和母亲的 DNA，他们的差别只是千分之一的碱基。

按照分子生物学的中心法则，DNA 携带的遗传信息，即基因序列，用来在转录过程中由转录酶产生信使 RNA，接着在翻译过程中由核糖体生成蛋白质。蛋白质是以氨基酸为基本单位的生物大分子，一共有二十种氨基酸，它们手拉手得接起来形成链状大分子，然后再折叠起来成为蛋白质，比如说 Y 字型的抗体蛋白。

蛋白质的合成遵循遗传密码。三个的 DNA 碱基决定一个氨基酸。这里是二十个氨基酸对应的碱基序列。所以 DNA 的序列和蛋白质的序列有一一对应的关系。

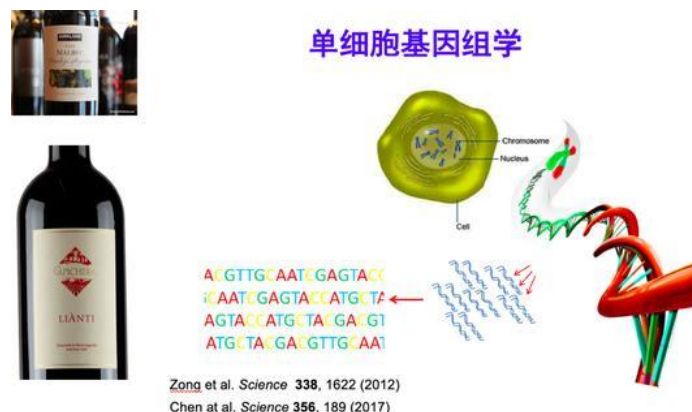
其实转录和翻译并不一定要在人体内进行，有了基因序列，我们可以利用转录酶和核糖体在体外生产抗体蛋白。

十七年过去了，生物基因检测技术有了突飞猛进的发展。今天我就是想讲怎么利用最新技术解决当下的问题。

2007 年发生了新一代 DNA 测序仪的革命，使得测序价格的下降速度比半导体工业的指数衰减还快。现在只要 1000 美元，在一天之内就可以完成个人基因组的测序。新一代测序仪使得个体化医疗成为可能。也就是说通过个人基因组的信息来了解病因，为治疗和预防疾病提供个性化方案。

人类基因组和新一代测序仪之后的另一个革命是单细胞基因组学。也就是说你给我一个单个的人体细胞，我就可以告诉你它整个的基因组。这是怎么实现的呢？现在还没有一种技术可以把一个细胞里的 46 根染色体每根从头读到尾，我们需要把单细胞里的微量 DNA 扩增，然后用新一代测序仪来测序。

大家可能听说过 PCR，是 30 多年前的一个 DNA 放大技术，对生物学、医学有很大贡献，得了诺奖。PCR 非常灵敏，在犯罪现场有一个 DNA 分子，PCR 就可以把它放大，测出信号。但是 PCR 有很大偏差，有些基因被放大的倍数很高，有些很低。用它来放大整个的基因组，覆盖率只有 5%。



2012年我的哈佛实验室发明了一种单细胞扩增技术叫MALBAC。它的名字很像红酒MALBEC。它大大提高了单细胞基因组扩增的均匀度、覆盖率和测序的精准度。后来我们又发明了一个更精准的扩增方法叫LIANTI，也是一个红酒的名字。

那我们为什么要做单细胞测序呢？我给大家举一个实际应用的例子。我们团队和北医三院的乔杰团队、北京大学的汤富酬团队合作，把这个技术用到生殖医学。在试管婴儿的过程中筛选没有遗传缺陷的受精卵，以避免父母的遗传疾病遗传到下一代。这是2014年在北医三院诞生的首个“MALBAC婴儿”，一个非常漂亮的女婴。我们去看她的时候，一声都没哭，还一个劲冲我笑。迄今为止，在国内也有多于一千对夫妇成功地避免了单基因遗传疾病的后代传递。

单细胞的测序不仅可以是基因组，而且可以是转录组，也就是所有被表达的信使RNA的序列。我们中心的汤富酬教授十年前在英国做博士后的时候，首次用新一代测序仪测出了单细胞的转录组。转录组很重要，因为它决定了细胞的功能。一般来讲，不同种类的体细胞，它们的基因组都一样，但转录组不同，因此功能不同。

这是我们最近和富酬等北大同事一起合作的数据。每个点代表一个单细胞，点的位置不一样，因为它们的转录组不一样，表达量不一样。同一种细胞型的细胞会形成一个点簇，我们用不同颜色标记不同细胞种类。单细胞转录组已经被广泛用于细胞分型。

我们现在就是用这种单细胞转录组的实验给康复期病人血液中成千上万的B细胞分型。我们先把单个B细胞从血液里分离出来，然后测定每个细胞的转录组。同样这里每个点代表一个B细胞，不同的颜色代表不同的B细胞种类。

人们知道B细胞是由骨髓产生的，从造血干细胞开始逐渐成熟，然后活化，最后变成浆细胞和记忆B细胞。这些不同的细胞种类我们都能看到。我们最关注的是记忆B细胞。

我刚说过，一般来讲，在一个人身上，不同器官的细胞都有同样的基因组和不同的转录组。但是B细胞在成熟过程中，它的基因组是可以被重组的。为了这个发现，日本科学家 Tonegawa 在1987年获得了诺贝尔奖。在第14号染色体上，有V、D、J三个区域。V区域有40个相似但不同的DNA序列，D有23个，J有6个序列。

当B细胞从不成熟到成熟状态转变的过程中，基因组开始重组，就像从V、D、J三套牌各抽出一张。这样转录和翻译产生的抗体就有很多种。有多少种呢？ $40 \times 23 \times 6 = 5520$ 种，但这还不是全部。因为这个14号染色体只是合成重链（蓝色），而轻链（白色）是由在第2号或22号染色体上产生的。它们有V和J，但是没有D。除了V(D)J重组，还有碱基的随机突变，都加在一起使得最后DNA序列的种类达到107-108种，为免疫系统提供了多样性。

抗体是用 Y 字型结构上的两把“钳子”，来捕捉抗原。这钳子嘴的形状以及与抗原结合的强度，取决于它氨基酸的序列。这里我要强调，我们特别需要单细胞的测序技术，因为每个 B 细胞通过 V (D) J 重组只产生某个特定的抗体蛋白。

神奇的是，这 107-108 种产生不同抗体的 B 细胞，在抗原还没有来的时候，已经在血液和淋巴液里产生了。而当某一种抗原到来后，与它结合的抗体是怎么被发现和富集的呢？

在 B 细胞在未成熟到成熟的过程中，这些抗体分子 IgM 被放在细胞的表面作为 B 细胞的受体。这些细胞一直不分裂，直到某个抗原，比如 S 蛋白，结合到 BCR 上，给这个 B 细胞一个信号，它就被激活了，开始细胞分裂，一变二，二变四，这种 B 细胞就被富集了。

然后被富集的 B 细胞演化成浆细胞和记忆 B 细胞。浆细胞分泌 IgG 抗体到血液和淋巴结。而记忆 B 细胞留在骨髓和淋巴结很长一段时间。

因为记忆 B 细胞表面上有 BCR 也就是 B 细胞受体。我们可以用新冠抗原把记忆 B 细胞从康复期病人的血里分离出来测序。

记忆 B 细胞的 IgG 抗体和浆细胞分泌的 IgG 抗体，接受同样的抗原，因为它们两对钳子可变区的序列和结构都是一样的，只是固定区的序列和结构不同 - - - 在 V (D) J 区域后用的是不同的 C 区域序列。

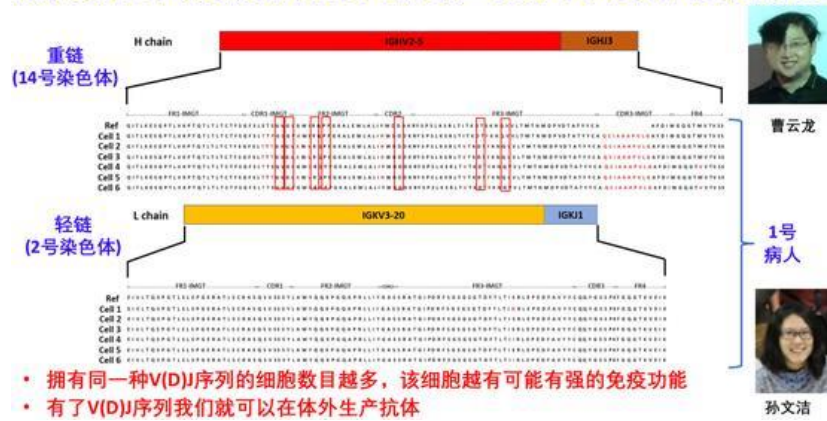
让我们看 IgM 和 IgG 抗体随着时间的变化，第一次感染后，3 天内出现 IgM 抗体，量不是太大，保留时间不长。

顺便说一下，钟南山院士的团队的抗体检测就是检测 IgM 抗体。这方法很方便，只用手指上取一滴血就可以了。但是感染后必须要等几天才能知道。

我们想找的 IgG 一两个星期以后才出来。持续 3、4 周，之后会减少。所以我们需要回访的出院病人需要在这个时间段，如果康复时间太久了，IgG 的量会越来越来少。人类的免疫系统可以保证，如果第二次感染再发生的时候，免疫反应可以产生大量的 IgG。

好，原理是这样的，实验怎么样？这是云龙和文洁，孙文洁是我们中心的生物信息专家，他们拿到的一号病人数据。

某康复病人中富集的六个记忆B细胞有一致的V(D)J序列和随机点突变



这里的六个记忆 B 细胞, 它们的重链和轻链都有同样的 V (D) J 序列, 他们来自同一个母细胞, 也有随机的点突变。我们的假设是拥有同一种 V (D) J 序列的细胞数目越多, 该细胞越有可能有好的免疫功能。这成为我们的第一筛选标准。这个选择标准用传统的单细胞克隆方法难以实现。因为我们有高通量的单细胞测序, 就可以利用这个假设来高效得筛选。

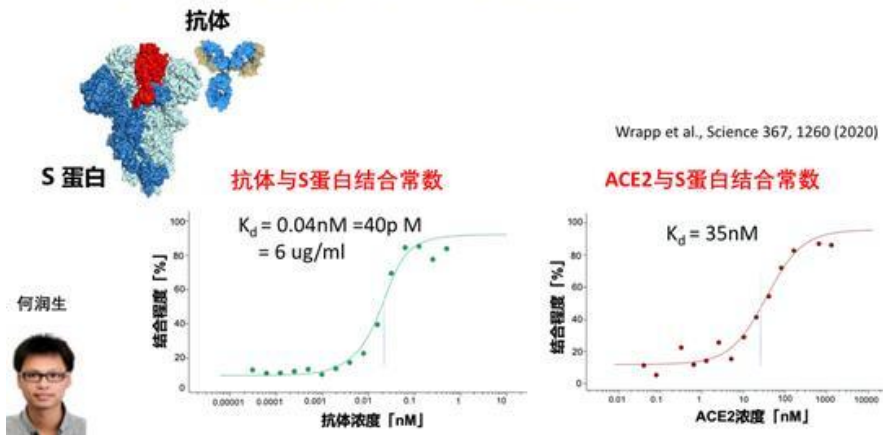
另外我们拿到这个 V (D) J 序列, 就可以在体外生产这个抗体。利用这个生物学的中心法则, 我们可以交给一个公司来做。

用这种方法我们找到了一些与 S 蛋白有很强结合力的抗体, 也找到了几个中和抗体。但是这种方法的效率还是不够高, 因为抗体的种类还是太多了。

后来我以前哈佛的博士生张旭加入了我们。她把小磁珠跟 S 蛋白或 RBD 连接起来, 用这块磁铁把能和 S 蛋白或 RBD 结合的记忆 B 细胞从血液中分离出来。这样一来效率就大大提高了。

找到抗体后我们首先就测它的结合强度。抗体与 S 蛋白结合强弱是以结合常数来衡量的。左图横轴代表抗体在溶液中的浓度, 竖轴代表与 S 蛋白的结合程度。抗体的浓度越高, 结合程度就越高。当结合程度达到 50%, 抗体的浓度就是它与 S 蛋白的结合常数, 这个抗体是 40pM。这个数越低, 表明结合强度越高。虽然听起来抽象, 但这 40pM 对应每升血液里只需要打入 6 毫克抗体, 当然是越低越好。

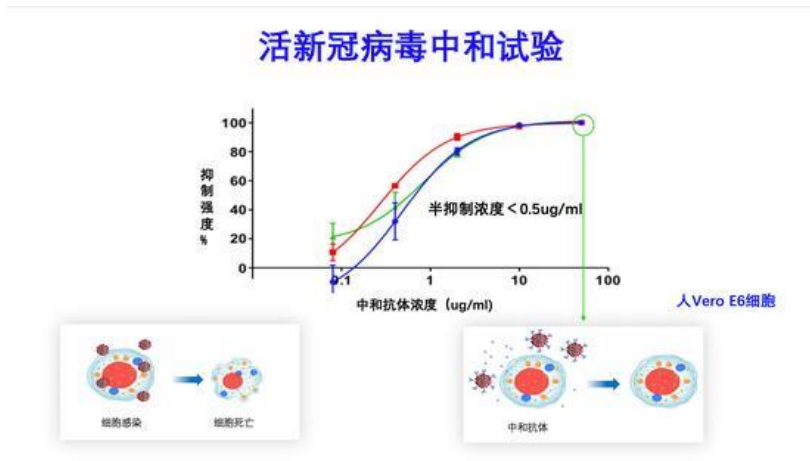
与S蛋白的结合强度：抗体与ACE2对比



中和抗体需与 ACE2 竞争。根据近来文献报道，ACE2 与 S 蛋白结合常数是 35nM，如右图，比抗体与 S 蛋白的结合常数高得多，所以结合强度低得多。

但我想强调，抗体结合力强不一定有中和能力，还要看结合的是不是 S 蛋白上关键部位。所以我们必须要做病毒的中和实验。

郑英慧是我们实验室做中和实验的能手。我们先做的是假病毒实验，因为不需要 P3 实验室。这个横轴还是中和抗体的浓度。当抗体浓度特别高的时候，在细胞培养液里的病毒与抗体结合，而不进入细胞，当抗体浓度低的时候可以看到它进去，病毒进入细胞通过荧光指示。当抑制强度达到 50% 的时候抗体的浓度被称作半抑制浓度，对于这个抗体我们当时看到的是 50pM，0.008 微克/毫升，假病毒实验成功后，下一步就是到 P3 实验室看真病毒被抗体抑制的情况。



这是最近从 P3 实验室得到的体外实验数据，让我们非常高兴。这 3 个抗体的半抑制浓度都小于 $1 \mu\text{g/mL}$ (1-10nM)。这个实验主要是看细胞的死亡。左图中，

抗体浓度较低时，细胞受感染而凋亡。右图中，在中和高抗体浓度的时候，病毒感染被有效抑制。

总结一下，我们已经从 70 个康复期病人血浆里的三十万个 B 细胞中，筛选出 300 个富集度最高的 IgG 抗体序列。

根据这些序列已经生产出 300 个抗体蛋白，正在测试，目前已筛出一大批高结合强度的抗体（ $kD=10\text{ pM}-10\text{ nM}$ ）和多个有出色中和活性的抗体。

高通量单细胞转录组和 V(D)J 测序，可直接检测 B 细胞的富集程度，使得我们可以快速精准地筛选出大量优质的中和抗体。

后续的动物实验已在筹划中，临床实验是下一步。

筛选出的中和抗体有两个应用。一是可以用于新冠肺炎的中和抗体治疗，更安全且针对性强。

二是用于短期预防，保护我们的医护人员和病人家属，有效期大概 3 周，经过抗体改造有可能延长至 3 个月。

国内另外几个团队也一直在寻找中和抗体。我们的目标都是一致的，希望找到最好的抗体，尽早成药！

我们的工作为将来可能出现的疫情做好了准备。用我们的新方法，对病毒有良好中和活性的抗体应该在十天之内就可以找到。



最后我想说，去年八月，在中美贸易战，以及我与美国科学家的合作受阻的背景下，我在 Cell 杂志发表了这篇文章《Disease Has No Borders, Neither Should

Research》。果然如此，这次疫情使人们自觉或不自觉地认识到，病毒没有国界，抗疫也应如此！目前中国住院的病人已经越来越少，我们的临床试验也将要在疫情更为严峻的地方来进行。如果成药，我们不会命名它为“中国抗体”，因为它的使用应该是没有国界的。

今晚我之所以能在这里跟大家分享，是因为我身边这些并肩作战的伙伴，我的团队，还有合作者，很多都是疫情之后认识的。我也非常感谢北京市政府、北京市教委的大力支持和北京市科委的协调推动！

注：（本文根据谢晓亮教授在《理解未来》科学讲座：病毒与人类健康-专题科普第四期演讲整理而成，有删减。）