



中国生物制品学杂志

Chinese Journal of Biologicals

ISSN 1004-5503, CN 22-1197/Q

《中国生物制品学杂志》网络首发论文

题目: SARS-CoV-2 疫苗不同动物模型攻毒试验常见问题及考虑
作者: 吴爽, 王寅, 孙涛
DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003907
收稿日期: 2023-01-18
网络首发日期: 2023-05-29
引用格式: 吴爽, 王寅, 孙涛. SARS-CoV-2 疫苗不同动物模型攻毒试验常见问题及考虑 [J/OL]. 中国生物制品学杂志. <https://doi.org/10.13200/j.cnki.cjb.003907>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

· 综 述 ·

SARS-CoV-2 疫苗不同动物模型攻毒试验 常见问题及考虑

吴爽, 王寅 综述, 孙涛 审校
国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022

摘要: 动物攻毒试验作为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory symptom coronavirus 2, SARS-CoV-2)疫苗有效性评价的有效手段, 选择合适的动物模型及合理试验设计对获取有效性、安全性信息及支持临床试验十分重要。目前, 非临床常用动物模型包括转基因小鼠、非人灵长类动物、仓鼠、雪貂等。本文就非临床试验中常用动物模型及其在应用中遇到的问题作一综述。

关键词: SARS-CoV-2疫苗; 攻毒试验; 动物模型

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A

Common problems and considerations in challenge tests of different animal models of SARS-CoV-2 vaccine

WU Shuang, WANG Yin, SUN Tao

Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China

Corresponding author: SUN Tao, E-mail: sunt@cde.org.cn

Abstract: Animal challenge test is an effective means to study the efficacy of severe acute respiratory symptom coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccine. The appropriate animal models and reasonable experimental design play an important role in obtaining efficacy and safety information, as well as supporting clinical trials. At present, common non-clinical animal models include transgenic mice, non-human primates, hamsters, ferrets and so on. This paper reviews the common animal models used in non-clinical trials and the problems encountered in their application.

Keywords: SARS-CoV-2 vaccine; Challenge test; Animal models

2019年新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19)暴发以来, 全球积极开展疫苗研发。动物攻毒试验作为评价疫苗保护效力的有力依据, 选取敏感、稳定的动物模型开展攻毒试验对评价疫苗非临床有效性具有重要作用。目前常用的动物模型有人血管紧张素酶2(human angiotensin converting enzyme 2, h-ACE2)转基因小鼠、恒河猴, 部分疫苗也在雪貂或仓鼠中开展攻毒试验。本文对常用动物模型的特点及其在攻毒试验中存在的问题进行分析、总结, 为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory symptom coronavirus 2, SARS-CoV-2)疫苗的研发提供参考。

1 动物模型

1.1 h-ACE2 转基因小鼠 引起 COVID-19 的病原体为 SARS-CoV-2, ACE2 是 SARS-CoV-2 的受体, SARS-
通信作者: 孙涛, E-mail: sunt@cde.org.cn

CoV-2 刺突蛋白(spike protein, S)可与 ACE2 结合进入细胞^[1-3]。h-ACE2 转基因小鼠将人 ACE2 基因置于选择的启动子控制下, 诱导小鼠在特定组织或细胞中表达。早在 2003 年 SARS 期间, 即发现人与小鼠 ACE2 蛋白之间存在结构差异, 导致小鼠感染 SARS 病毒概率降低, 因此, 国内外建立了多种 h-ACE2 转基因小鼠模型用于药物或疫苗研发, 不同转基因小鼠可能存在整合位点、背景品系差异^[4-7]。

HFH4-h-ACE2 转基因小鼠选择了 C3B6 品系小鼠, 在肺纤毛上皮细胞启动子 HFH4 启动人源 ACE2 在小鼠肺部表达, HFH4-h-ACE2 转基因小鼠在肺中表达高水平的 h-ACE2, 但在其他组织, 包括大脑、肝脏、肾脏和胃肠道中也可见表达。K18-h-ACE2 转基因小鼠是在细胞角蛋白 18(cytokeratin 18, CK18)编码基因的启动子驱动下表达 h-ACE2 的转基因小鼠模型, 将目的基因显微注射导入至受精过的(C57BL/6J× SJL/J)F2 卵母细胞中, 获得转基因胚胎。上述

转基因小鼠感染 SARS-CoV-2 后出现病毒性肺炎,部分小鼠可表现为脑部感染,有一部分小鼠会因出现脑部感染而死亡。此外,K18-h-ACE2 小鼠感染早期可能出现嗅觉丧失,采用临床患者恢复期血浆可预防感染小鼠多数临床症状,但不能预防嗅觉丧失^[8-10]。CMV-h-ACE2 转基因小鼠是由巨细胞病毒(the cytomegalovirus, CMV)早期增强子(early enhancer element)和鸡 β -肌动蛋白(chicken beta-actin)启动子组合成复合启动子驱动表达 h-ACE2,以(C57BL/6J x XC3H/HeJ)为 F1 亲本,在 C57BL/6 或 BALB/c 背景小鼠上传代 2~3 次获得的转基因小鼠^[11]。

国内常用转基因小鼠以 C57BL/6 为背景小鼠,将鼠 ACE2 全长序列或胞外区原位替换为相应的人源序列。h-ACE2-KI/NIFDC 人源化小鼠模型于 2018 年由 中国食品药品检定研究院研发成功,采用 CRISPR/Cas9 技术构建,将 h-ACE2 基因插入小鼠 mACE2 基因启动子之下,并共表达特定荧光标记基因,外源基因单拷贝插入小鼠 X 染色体 GRC.m38.p6 位点。该模型对 SARS-CoV-2 易感,小鼠鼻内感染 SARS-CoV-2 后,肺、气管和脑中维持高病毒载量,表现为间质性肺炎和细胞因子升高^[12]。既往使用 h-ACE2-KI/NIFDC 人源化小鼠开展攻毒试验的结果显示,小鼠肺部病毒载量为 3~7 log,肺部病理表现为轻至重度间质性肺炎,死亡率低。江苏集萃药康生物科技有限公司构建的 B6/JGpt-Ace2^{em1Gin(h-ACE2)}[h-ACE2(全人源化)]也以 C57BL/6 为背景小鼠,表达全人源化 ACE2。根据相关文献报道,该模型小鼠经 SARS-COV-2 攻击后,肺部病毒载量可达 5 log,肺部组织病理表现为中度的肺泡间隔增厚和炎细胞浸润^[13]。H11-K18-h-ACE2 小鼠是通过人类 CK18 启动子驱动,在安全岛 H11 位点过表达 h-ACE2,用于模拟人类重度 COVID-19 表型。根据现有对申报资料的审评及沟通交流,采用 H11-K18-h-ACE2 转基因小鼠开展攻毒试验可见动物死亡增加,原始株、Beta、Delta 及 Omi-cron 变异株攻毒后小鼠表现相似,一般在攻毒后 3~7 d 动物死亡,肺部病毒载量在 9 log 以上,脑组织中病毒载量较高,肺部病理表现为中重度间质性肺炎。

1.2 腺病毒转导小鼠 除稳定表达人 ACE2 的小鼠模型外,还有使用腺病毒转导的人 ACE2 小鼠模型。有研究者利用腺病毒载体制备了 Ad5-h-ACE2 SARS-COV-2 小鼠模型,通过复制缺陷型腺病毒(Ad5-h-ACE2)将外源 h-ACE2 通过鼻内转导的方式递送入 C57BL/6 或 BALB/c 两种品系的小鼠中,对小鼠进行攻毒试验,通过免疫印迹和流式细胞术检测 h-ACE2 的表达。但由于现有文献对 Ad5-h-ACE2 转导小鼠

模型中 h-ACE2 在小鼠体内可靠性、稳定性尚未充分验证,保护力评价指标设计尚不完善,且研究显示,Ad5-h-ACE2 转基因小鼠不会发展成严重的疾病,也不会出现肺外疾病表现^[14-15]。对于急性呼吸窘迫综合征的研究需建立轻度和重度 COVID-19 的感染模型,可能需要“敲入”基因表达 h-ACE2 的小鼠模型,以及通过连续小鼠肺部细胞传代的病毒适应小鼠模型。因此,现有阶段仍不建议采用 Ad5-h-ACE2 转基因小鼠开展动物攻毒试验以评价疫苗的有效性。另有报道采用 AAV6 腺病毒转导的 h-ACE2 小鼠模型,与 Ad5-h-ACE2 转基因小鼠相似,不会出现呼吸道外疾病表现^[16]。

1.3 仓鼠 h-ACE2 受体 在与病毒结合的关键区域的 29 个氨基酸中有 3~4 个与仓鼠 ACE2 不同。叙利亚仓鼠感染 SARS-CoV-2 后体重减轻,接种 SARS-CoV-2 后第 2 和 5 天,鼻黏膜、支气管上皮细胞和肺中均检出病毒抗原,感染后 7 d 肺部病毒基本清除,此外,十二指肠上皮细胞中也可见病毒抗原,并在粪便中检测到病毒 RNA。仓鼠在感染后 14 d 可恢复体重,并产生中和抗体。SARS-CoV-2 通过直接接触和气溶胶从接种的仓鼠传播给未接种的仓鼠,通过笼子中的污染物传播的效率不高^[17-18]。现阶段采用仓鼠开展攻毒试验的研究较少,获得的数据有限,仓鼠感染 SARS-CoV-2 后表现较轻微,对于能否达到中重度间质性肺炎损伤仍需探索。

1.4 雪貂 雪貂的上下呼吸道解剖比例、支气管壁黏膜下腺体的密度等均与人呼吸道状况接近。在病毒感染模型中,如流感病毒、呼吸道合胞病毒等多种呼吸道病毒感染雪貂后,均能有效进行复制并引起与人相似的症状,流感病毒感染的雪貂甚至会像人一样打喷嚏,且很易传染给其他雪貂。因此,有研究者开展雪貂攻毒模型研究,结果显示,SARS-CoV-2 可感染雪貂,并能在上呼吸道复制长达 8 d,但在肺中未检测到病毒复制。感染后的雪貂体温轻微升高,不会造成严重疾病或死亡^[19-20]。基于现阶段采用雪貂开展攻毒试验的疫苗产品较少,研究样本量较少,且雪貂在肺内很难形成间质性肺炎模型,建议如开展雪貂攻毒试验,应充分验证病毒在雪貂体内的复制情况,以期获得可评价的数据。

1.5 非人灵长类动物 非人灵长类动物与人类的免疫学和生理学具有相似性,使非人类灵长类动物模型在研究病毒发病机理、传播途径、疫苗保护力等方面具有重要价值,对研究人类病毒感染性疾病的治疗和预防发挥着重要作用^[21]。对比恒河猴、食蟹猴、狨猴感染 SARS-CoV-2 原始株后的表现,模型易感性

由高到低分别为恒河猴、食蟹猴、狨猴^[22]。目前,恒河猴作为常用的非人灵长类动物模型,研究显示,恒河猴在感染 SARS-CoV-2 后病情轻微,可见体质量稍有减轻,无发热现象,肺部 X 射线检查显示出与人类类似的肺炎症状^[23-24]。恒河猴可见呼吸道感染和结膜感染,结膜感染的猴在鼻咽系统中病毒载量和分布相对较高;与通过气道接种病毒的猴相比,肺部感染相对较轻微,两条途径均可能导致消化道的感染^[25]。

1.6 其他感染模型 有团队研究了 SARS-CoV-2 小鼠适应株,利用 SARS-CoV-2 在小鼠体内强制连续传代适应的方法,以期能够获得有效感染标准小鼠的 SARS-CoV-2 适应株,并在标准小鼠上建立感染模型。正常 BALB/c 小鼠鼻内攻毒小鼠适应株后,可见明显呼吸道症状,此外表现出皮毛皱褶、驼背、活动减少等症状,肺部病理检查可见严重肺损伤,诱发坏死性肺炎和广泛弥漫性肺泡损伤^[26-27]。但 SARS-CoV-2 快速鼠适应机制仍未明确,不同鼠适应株之间关键鼠适应性突变位点也存在差异,有的受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)上氨基酸位点突变并不能完全决定适应株的致病作用^[28-30]。基于目前小鼠适应株与临床 SARS-CoV-2 流行株间的差异尚不明确,采用该模型评价 SARS-CoV-2 疫苗的有效性尚未形成共识,仅能作为参考。

2 常见问题及考虑

2.1 试验设计 动物模型攻毒试验设计常见问题主要涉及免疫程序、免疫间隔及免疫途径。攻毒试验中免疫程序、免疫间隔及免疫途径应与临床试验拟用方式一致,攻毒试验免疫剂次不应多于临床免疫剂次。如攻毒试验增加免疫剂次或改变免疫间隔获得有效性信息,不能说明临床免疫剂次的有效性。不同免疫途径可能导致免疫原性应答不同,一般认为腹腔注射免疫原性高于肌肉注射,因此选择一致的免疫途径对提示临床免疫应答具有重要作用。

2.2 动物数量 部分攻毒试验采用多点剖杀设计,每个时间点选取 3~4 只动物,以期测定肺部病毒载量及肺部病理的持续变化。但对于轻症感染转基因小鼠模型,随着时间延长,肺部病理变化逐渐恢复,3~4 只动物无法达到统计学要求。对于重症小鼠攻毒后易出现死亡,模型组小鼠过早死亡,而疫苗组小鼠仍按计划分时间点剖杀采样,疫苗组小鼠肺部病毒载量的降低及肺部病理恢复不能明确是疫苗的保护效力还是由于随着感染时间延长而自愈。恒河猴攻毒试验也常见动物数较少,且每组动物分段解

剖,导致同一时间点可评价动物数少于 4 只,低于最低统计学要求,而猴鼻咽拭子病毒载量个体差异较大,且检测方法无法区分活病毒,因此对评价疫苗有效性的作用有限。

2.3 病理损伤程度 h-ACE2-KI/NIFDC 人源化小鼠模型为非致死性模型,因此在选用该模型开展攻毒试验时,受攻毒剂量、攻毒时间、攻毒方式或检测时间选择等原因的影响,一些试验中小鼠在攻毒后观察到较轻度的组织病理学改变,未造成中、重度间质性肺炎,且随着时间延长,肺部病理变化呈恢复趋势,部分轻度肺损伤模型接种疫苗后与对照组相比,未见组织病理变化的明显改善,无法充分提示疫苗的保护效力。动物模型建立成功的标准应达到中度或中度以上间质性肺炎和一定程度的肺部病理损伤。

2.4 动物死亡 H11-K18-h-ACE2 转基因小鼠攻毒后往往形成重度感染模型。小鼠感染 SARS-CoV-2 后死亡率高,较早者在感染后 3 d 死亡。在部分研究中,对模型组死亡动物肺部病毒载量及组织病理学检查结果的获得不及时、不充分,而疫苗组小鼠在相同时间点又未获取肺部病毒载量或组织病理学数据,无法提供小鼠肺部病毒载量和肺部组织病理的可评价数据。

2.5 其他考虑 攻毒剂量选择需考虑不同动物模型、拟攻毒病毒株(如原始株、Omicron 变异株等)致病能力等因素,如现阶段 Omicron 变异株攻毒剂量高于原始株或 Delta 变异株。应探讨动物模型合理的攻毒时间、攻毒途径、攻毒剂量及攻毒后观察时间,预期攻毒剂量应使模型动物达到中、重度肺部炎症。不建议攻毒后多点剖杀动物,尤其重症感染 h-ACE2 小鼠建议选择攻毒后 3~5 d 剖杀,或根据模型组小鼠存活情况,选择合适的时间点剖杀,尽可能获取死亡动物肺部病毒载量及组织病理结果。针对死亡率较高的动物模型,可适当增加试验动物数量,保证结果的可评价性。

部分疫苗以保护小鼠死亡作为评价疫苗有效性的指标,但根据目前已发布指导原则《新型冠状病毒预防用疫苗非临床有效性研究及评价技术要点》(试行)的要求,肺组织病毒载量和肺组织病理是评价疫苗有效性的关键证据。虽然 Omicron 株致病力较低,但仍适用以上评价标准。

3 小结

动物模型攻毒试验作为评价 SARS-CoV-2 疫苗有效性的主要依据,选择合适的动物模型并合理设计试验对获取有效性、安全性信息及支持临床试验

可发挥重要作用。应依据不同动物模型的特点,设计合适的动物数量、攻毒剂量、免疫程序、检测时间,尽可能获得可评价的数据,以提示疫苗的有效性并获得抗体依赖性增强(antibody-dependent enhancement, ADE)、疫苗相关疾病增强(vaccine-associated disease enhancement, VED)相关指标。

参考文献

- [1] 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.
- [2] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367 (6483): 1260-1263.
- [3] REN L, WANG YM, WU ZQ, *et al.* Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study [J]. *Chin Med J (Enl)*, 2020, 133 (9): 1015-1024.
- [4] YANG X H, DENG W, TONG Z, *et al.* Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection [J]. *Comp Med*, 2007, 57 (5): 450-459.
- [5] MCCRAY P B J, PEWE L, WOHLFORD-LENANE C, *et al.* Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Virol*, 2007, 81 (2): 813-821.
- [6] LIU Z G, WU X J, ZHOU Y R, *et al.* Establishment of transgenic mice which express SARS coronavirus functional receptor human ACE2 [J]. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2008, 32 (3): 4. (in Chinese)
刘珠果, 吴晓洁, 周艳荣, 等. 表达 SARS 冠状病毒受体人 ACE2 转基因小鼠的建立 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2008, 32 (3): 4.
- [7] NETLAND J, MEYERHOLE D K, MOORE S, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2 [J]. *J Virol*, 2008, 82 (15): 7264-7275.
- [8] JIANG R D, LIU M Q, CHEN Y, *et al.* Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell*, 2020, 182 (1): 50-58.
- [9] ZHENG J, LOK-YIN ROY W, LI K, *et al.* COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice [J]. *Nature*, 2021, 589 (1): 603-607.
- [10] YINDA C K, PORT J R, BUSHMAKER T J, *et al.* K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19 [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17 (1): 1-21.
- [11] JIA H P, YUE X P, LAZARTIGUES E. ACE2 mouse models: a toolbox for cardiovascular and pulmonary research [J]. *Nat Communications*, 2020, 11 (1): 1-11.
- [12] SUN S H, CHEN Q I, GU H J, *et al.* A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28 (1): 124-133.
- [13] QIAO J, LI Y S, ZENG R, *et al.* SARS-CoV-2 Mpro inhibitors with antiviral activity in a transgenic mouse model [J]. *Science*, 2021, 371 (6536): 1374-1378.
- [14] SUN J, ZHUANG Z, ZHENG J, *et al.* Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. *Cell*, 2020, 182 (3): 734-743.
- [15] HASSAN A O, CASE J B, EMMA S W, *et al.* A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies [J]. *Cell*, 2020, 182 (3): 744-753.
- [16] GARY E N, WARNER B M, PARZYCH E M, *et al.* A novel mouse AAV6 hACE2 transduction model of wild-type SARS-CoV-2 infection studied using synDNA immunogens [J]. *iScience*, 2021, 24: 102699. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102699.
- [17] CHAN J, ZHANG A J, YUAN S, *et al.* Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71 (9): 2428-2446.
- [18] SIA S F, YAN L M, CHIN A W H, *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters [J]. *Nature*, 2020, 583 (7818): 834-838.
- [19] SHI J, WEN Z, ZHONG G, *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2 [J]. *Science*, 2020, 368 (6494): 1016-1020.
- [20] KIM Y I, KIM S G, KIM S M, *et al.* Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets [J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27 (5): 704.
- [21] ROCKX B, KUIKEN T, HERFST S, *et al.* Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model [J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2020, 368 (6494): 1012-1015.
- [22] LU S Y, ZHAO Y, YU W H, *et al.* Comparison of SARS-CoV-2 infections among 3 species of non-human primates [J]. *BioRxiv*, 2020, 4 (8): 1-27.
- [23] SHAN C, YAO Y F, YANG X L, *et al.* Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques [J]. *Cell Res*, 2020, 30 (8): 670-677.
- [24] MUNSTER V J, FELDMANN F, WILLIAMSON B N, *et al.* Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 585 (9): 268-272.
- [25] DENG W, BAO L, GAO H, *et al.* Ocular conjunctival inoculation of SARS-CoV-2 can cause mild COVID-19 in rhesus macaques [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 4400.
- [26] GU H J, CHEN Q, Yang G, *et al.* Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy [J]. *Science*, 2020, 369 (6511): 1603-1607.
- [27] SUN S H, GU H J, CAO L, *et al.* Characterization and structural basis of a lethal mouse-adapted SARS-CoV-2 [J]. *Nat Communications*, 2021, 12 (1): 5654.
- [28] YAN F H, LI E T, WANG T C, *et al.* Characterization of two heterogeneous lethal mouse-adapted SARS-CoV-2 variants recapitulating representative aspects of human COVID-19 [J]. *Frontiers Immunol*, 2022, 13: 821664. DOI: 10.3389/fimmu.2022.821664.
- [29] IWATA Y N, SHIWA N, SEKIZUKA T, *et al.* A lethal mouse model for evaluating vaccine-associated enhanced respiratory disease during SARS-CoV-2 infection [J]. *Science Advances*, 2022, 8 (1): 3827.
- [30] ZHANG Y F, HUANG K, WANG T, *et al.* SARS-CoV-2 rapidly adapts in aged BALB/c mice and induces typical pneumonia [J]. *J Virol*, 2021, 95 (11): 1-19.