甲型流感病毒 H7N9 血凝素单克隆抗体的制备及保护性研究

丁亚红¹, 李梅¹, 舒祥², 杨月莲¹, 石玮¹, 陈则^{1*}

1. 上海生物制品研究所有限责任公司, 上海 200051;

2. 中国生物技术股份有限公司, 北京 100029

* 联系人, E-mail: chenze2005@263.net

2018-01-25 收稿, 2018-03-13 修回, 2018-03-13 接受, 2018-04-09 网络版发表

摘要 以H7N9甲型流感病毒(A/Shanghai/2/2013)全病毒灭活疫苗原液为免疫原免疫BALB/c小鼠, 采用杂交瘤技术制备抗甲型流感病毒H7N9血凝素(HA)的单克隆抗体. 通过ELISA和血凝抑制(HI)试验初步筛选单克隆抗体, 筛选后的IgG类单克隆抗体用中和试验检测其中和活性. 将有中和活性的单抗通过小鼠体内法大量制备腹水, 腹水经亲和层析柱纯化后进行特异性及稳定性检测. 同时在小鼠模型中进行了HA单克隆抗体抵抗同源流感病毒感染的预防性和治疗性实验, 通过观察小鼠的症状并统计小鼠的存活率、体重变化和肺部病毒滴度等指标发现单抗6A3在预防性和治疗性实验中都可以有效地抵抗H7N9流感病毒的感染. 显著降低肺部病毒滴度, 对小鼠提供100%的保护. 甲型流感病毒H7N9血凝素单克隆抗体的成功制备为进一步研究H7N9流感病毒血凝素的抗原表位及治疗诊断试剂的开发奠定了基础.

关键词 流感病毒, H7N9, 血凝素, 单克隆抗体

流行性感冒(influenza)简称流感, 是由流感病毒(influenza virus)引起的急性呼吸道传染病. 流感病毒属于正黏病毒科流感病毒属, 可引起人类和禽畜患病. H7N9亚型禽流感病毒是甲型流感病毒中的一种, 既往仅在禽间发现, 未发现过人的感染情况^[1]. 但自2013年3月底在上海和安徽两地相继发现人感染H7N9流感病毒的病例以来, 中国已出现五次季节性疫情. 2016年9月开始出现的一波流行具有开始较早、感染人数大幅增加以及家禽感染程度高的特点. 2017年1月开始的流行, 我国有16个省份出现人感染H7N9禽流感的病例.

经调查, H7N9禽流感病毒基因来自于东亚地区野鸟和中国上海、浙江、江苏鸡群的基因重配^[2]. 肺

炎为被该病毒感染患者的主要临床表现, 常出现发热、咳嗽、咳痰, 可伴有头痛、肌肉酸痛、腹泻或呕吐等症状. 重症患者病情发展迅速, 多在发病3~7 d出现重症肺炎, 体温大都持续在39℃以上, 出现呼吸困难, 常快速进展为急性呼吸窘迫综合征等, 导致较高的死亡率. 目前预防和控制人感染H7N9禽流感的策略仍非常有限. H7N9的疫苗研制尚处于临床研究阶段. 流感病毒血凝素HA是流感病毒最主要的表面抗原, 它能够诱导机体产生相应的中和抗体^[3]. 中和抗体可以有效地阻止病毒的感染. H7N9流感病毒HA单克隆抗体的制备可以为H7N9流感病毒诊断试剂和治疗制剂的开发提供基础, 也可以为H7N9流感病毒HA抗原表位的研究奠定基础^[4].

引用格式: 丁亚红, 李梅, 舒祥, 等. 甲型流感病毒 H7N9 血凝素单克隆抗体的制备及保护性研究. 科学通报, 2018, 63: 1024–1034

Ding Y H, Li M, Shu X, et al. Preparation and protection of monoclonal antibody against H7N9 influenza virus hemagglutinin (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 1024–1034, doi: 10.1360/N972018-00104

1 材料和方法

(i) 材料. 甲型流感病毒H7N9灭活疫苗原液(无佐剂), 由上海生物制品研究所有限责任公司生物技术中心流感组制备; NIBRG-267 (H7N9)鼠肺适应株, 由上海生物制品研究所有限责任公司第四研究室制备并保存; SPF级BALB/c小鼠, 雌性, 6~8周龄. 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司. MDCK细胞、骨髓瘤细胞SP2/0、293T细胞均为上海生物制品研究所有限责任公司第四研究室保存.

(ii) 动物免疫及杂交瘤细胞株的筛选. 取6~8周龄的BALB/c雌性小鼠5只, 分别皮下多点注射H7N9全病毒灭活疫苗原液, 100 μ g/只(总蛋白含量). 间隔14 d后再次免疫, 剂量同首次免疫. 一共免疫3次. 三免14 d后取尾血用间接ELISA法测定血清抗体滴度. 滴度高于 10^5 的小鼠于融合前3 d尾静脉加强免疫一次, 免疫原和剂量同前3次免疫. 3 d后按常规技术进行细胞融合, HAT选择培养基筛选, 用间接ELISA法和血凝抑制(HI)两种方法检测细胞上清, 双阳性孔细胞用有限稀释法进行细胞克隆化. 经过2~3次克隆化, 直至单克隆孔100%阳性后建株.

(iii) 单抗腹水的制备及纯化. 稳定分泌单克隆抗体的细胞扩大培养, 用该培养细胞腹腔注射降殖烷致敏过的BALB/c小鼠, $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ cell/只, 7~10 d后收集腹水, 采用HiTrap Protein G HP亲和层析柱纯化, 纯化步骤详见说明书. 纯化后的腹水用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定抗体浓度.

(iv) 抗体亚类鉴定. 用Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma, ISO2-1KT)对单抗细胞株上清进行亚类鉴定, 方法按试剂盒说明书进行.

(v) 单抗亲和力的测定. 利用表面等离子共振 (SPR) 技术原理, 使用BIORAD公司的ProteOn™ XPR36对8株IgG亚类抗体进行抗体亲和力的测定.

(vi) 抗体分子量及纯度鉴定. 阳性细胞株扩大培养, 经小鼠体内法制备的腹水经纯化后进行SDS-PAGE, 确认抗体分子量的大小及纯化效果.

(vii) 单抗ELISA和HI效价的测定. 纯化腹水经10倍系列稀释后分别用ELISA和HI两种方法测定效价. 具体方法参照文献[5~7]进行.

(viii) 单抗中和效价的测定. 将0.25 mL 10倍系列稀释的抗体与0.25 mL 100TCID₅₀的H7N9病毒液相混, 室温放置1 h, 病毒对照孔用0.25 mL维持液替代抗体, 抗体对照孔用0.25 mL最低稀释度抗体加0.25

mL维持液. 接种MDCK细胞后将96孔板置37℃培养箱孵育, 72 h后观察结果. 以能保护50%的细胞培养孔不被感染的最高抗体稀释度的倒数为中和终点.

(ix) 单抗的HA特异性. 将重组质粒pCAGGS7-HA转染293T细胞, 转染48 h后轻轻将培养液吸出, 用预冷的4%多聚甲醛固定细胞30 min, PBS洗涤3次; 用0.1% Triton X-100处理细胞20 min, PBS洗涤3次; 用2% BSA进行封闭, 37℃放置30 min, PBS洗涤3次; 将抗体按1:50倍稀释至20 μ g/mL, 加入细胞培养板中, 置湿盒内37℃孵育1 h, PBS洗涤3次; 将Alexa Fluor 488羊抗鼠IgG抗体按1:500倍稀释, 加入细胞培养板中, 置湿盒内37℃避光孵育30 min, PBS洗涤3次; 将DAPI按1:10000倍稀释, 加入细胞培养板中, 室温放置5 min, PBS洗涤4次; 倒置荧光显微镜下观察荧光.

(x) 单抗的流感病毒特异性. 将生长状态良好的MDCK细胞接种于24孔细胞培养板, 37℃, 5% CO₂培养箱孵育过夜; 次日, 待MDCK细胞铺满孔底约95%的丰度时, 按MOI值=0.001接种H7N9流感病毒于细胞中, 37℃, 5%CO₂培养箱中孵育过夜; 24 h后吸掉培养基, 用预冷的4%多聚甲醛固定细胞30 min, PBS洗涤3次; 用0.1% Triton X-100处理细胞20 min, PBS洗涤3次; 用2% BSA进行封闭, 37℃放置30 min, PBS洗涤3次; 将抗体按1:50倍稀释至20 μ g/mL, 加入细胞培养板中, 置湿盒内37℃孵育1 h, PBS洗涤3次; 将Alexa Fluor 488羊抗鼠IgG抗体按1:500倍稀释, 加入细胞培养板中, 置湿盒内37℃避光孵育30 min; PBS洗涤3次, 倒置荧光显微镜下观察荧光.

(xi) HA单抗的小鼠保护性试验. 用制备的具有中和作用的4株单抗2H3, 4A11, 4G5, 6A3进行动物预防性试验和治疗性试验. 将8周龄的BALB/c雌性小鼠随机分组, 每组13只, 分别在攻毒前24 h和攻毒后24 h进行小鼠腹腔给药. 每株单抗分别设置3个剂量(3, 10, 30 mg/kg). 攻毒的剂量为 $10 \times LD_{50}$ 的H7N9鼠肺适应株. 攻毒后每天观察小鼠的发病症状, 记录小鼠的存活率和体重变化情况, 直至攻毒后第14 d. 为了统计小鼠在攻毒后的肺部病毒滴度, 每组小鼠在攻毒后第3 d各取3只小鼠进行支气管肺泡灌洗^[6,8,9].

2 结果

2.1 单抗亚类的鉴定

用免疫脾细胞与SP2/0细胞融合, 进行3次亚克隆

后,经ELISA和HI试验共筛选到28株单克隆抗体.用Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma, ISO2-1KT)对单抗细胞株上清进行亚类鉴定.结果显示,28株单抗中,1A3, 1A11, 1B10, 1E2, 2E10, 3C7, 3D8, 4C5, 5C8, 5C9, 5E6, 5G2, 6B7, 6D11, 7B6, 7C8, 7G7, 8A3, 8E6, 9H5均为IgM亚型;4C8, 4G5, 6A3, 7G2为IgG1亚型;2A12, 2H3, 4A11为IgG2a亚型;1A8为IgG3亚型.

2.2 腹水单抗的纯化

上述8株抗体亚型为IgG的单抗经小鼠腹腔制备腹水,收集的腹水采用HiTrap Protein G HP亲和层析柱纯化.经纯化、透析的抗体进行SDS-PAGE电泳,分析其大小和纯度.电泳结果可见,8株IgG抗体均含有重、轻链两条蛋白带,相对分子质量分别为重链55 kD左右、轻链带25 kD左右(图略).经纯化后抗体纯度较高,均达到95%以上.

2.3 单抗亲和力的测定

亲和力是抗体药物的一个关键参数,通常会影响到抗体的功能和药效.利用表面等离子共振(SPR)技术原理,使用BIORAD公司的ProteOn™ XPR36对8株IgG亚类抗体进行抗体亲和力的测定.测定结果如表1,图1所示.8株单抗的亲和力均能达到nmol/L级别,符合抗体药物亲和力的要求.其中4C8, 6A3, 2A12的亲和力常数比1A8, 2H3, 4A11, 4C8, 4G5还要高一个数量级,说明这3株单抗的亲和力更高.

2.4 8株IgG单抗的ELISA效价

1A8, 2A12, 2H3, 4A11, 4C8, 4G5, 6A3, 7G2小鼠

腹水纯化后的浓度均稀释至1 mg/mL,并经10倍系列稀释后进行ELISA试验.如表1所示,6A3, 4A11, 4C8, 2H3, 7G2这5株MAb的效价均为 10^6 ,表明这5株单抗与H7N9流感病毒的结合力相对较强;4G5效价为 10^5 ,2A12效价为 10^2 ,1A8效价为 10^3 ,表明2A12, 1A8与H7N9流感病毒的结合力相对较弱.

2.5 8株IgG单抗的HI效价

8株纯化单抗、阳性及阴性血清均先1:10稀释,然后倍比稀释到1:20480,测定其血凝抑制效价.从表1可以看出,6A3, 2H3的HI效价较高,HI最高能达到1:20480以上.阳性血清的HI效价是1:640.

2.6 8株IgG单抗的中和效价

根据HI效价的高低,8株IgG类单抗从1:160开始稀释,之后一直倍比稀释到1:20480.最终中和试验观察结果如下:正常MDCK细胞以及抗体对照孔没有病变,流感病毒对照孔发生病变.8株单抗中6A3, 4G5, 4A11, 2H3有中和作用,其中6A3, 4A11中和效价较高,而7G2, 2A12, 1A8, 4C8在1:160稀释后均未出现中和作用.2H3, 4A11, 4G5, 6A3单抗的中和效价计算结果如表1.

2.7 单抗对流感病毒HA的结合作用

为验证制备的HA单克隆抗体能否与真核表达的H7N9流感病毒HA蛋白产生特异性反应,将重组质粒pCAGGS7-HA转染293T细胞,以HA单克隆抗体为一抗,以Alexa Fluor 488羊抗鼠IgG抗体为二抗进行间接免疫荧光检测($\times 400$).结果显示,制备的HA单

表1 单抗的亲和力常数和效价^{a)}

Table 1 The affinity constant and titer of MAbs

单抗株	亲和力常数(M)	ELISA效价	HI效价	中和效价
1A8	1.37×10^{-9}	10^3	480	ND
2A12	3.60×10^{-10}	10^2	320	ND
2H3	3.17×10^{-9}	10^6	≥ 20480	3548
4A11	1.23×10^{-9}	10^6	30	5956
4C8	6.33×10^{-10}	10^6	7860	ND
4G5	4.13×10^{-9}	10^5	960	1259
6A3	3.85×10^{-10}	10^6	≥ 20480	14125
7G2	1.63×10^{-9}	10^6	1280	ND

a) ND, 未检测到

图1 8株单抗的亲和力常数

Figure 1 The affinity constant of the eight MAbs

克隆抗体能与293T细胞中表达的HA蛋白特异性结合, 在荧光显微镜下呈现绿色荧光, 而对照组即用不

相关的IgG抗体作为一抗时则不产生荧光反应, 如图2所示。

图2 HA单克隆抗体与293T细胞表达的HA蛋白结合产生的特异性荧光

Figure 2 Immunofluorescence produced by HA MAbs binding to HA protein expressed in 293T cells

2.8 单抗对流感病毒的结合作用

为验证制备的HA单克隆抗体能否与H7N9流感病毒特异性结合,按MOI值=0.001接种H7N9流感病毒于MDCK细胞,以HA单克隆抗体为一抗,以Alexa Fluor 488羊抗鼠IgG抗体为二抗进行间接免疫荧光检测(X100).结果显示,制备的HA单克隆抗体能与感染MDCK细胞的H7N9病毒特异性结合,在荧光显微镜下呈现绿色荧光,而对照组即用不相关的IgG抗体作为一抗则不产生荧光反应,如图3所示.

2.9 单抗在小鼠体内的保护性效果

(i) HA单抗的预防性效果. 用制备的具有中和作用的4株单抗2H3, 4A11, 4G5, 6A3进行动物预防实验(图4),即在攻毒前24 h进行小鼠腹腔给药,给药后攻毒.攻毒后观察小鼠的临床症状并统计各组小鼠的存活率、体重变化和肺部病毒滴度.

如图4所示,4A11和6A3单抗的3个剂量组都可以对小鼠提供保护,在致死量流感病毒的攻击时,最低

剂量组3 mg/kg也可以提供100%的保护.其中4A11的3个剂量组小鼠体重虽都有不同程度的丢失,但在第7天时体重开始恢复.与PBS对照组相比,高剂量组小鼠体重丢失较少.而6A3的3个剂量组与PBS对照组相比,整个感染过程中小鼠体重几乎没有降低,且无明显临床症状.综上,在预防性实验中,4A11和6A3单抗均可以较好地保护小鼠抵抗同源流感病毒的攻击.而2H3和4G5单抗对小鼠的保护作用相对较差,在致死量流感病毒的攻击时,高剂量组30 mg/kg只能分别提供60%和50%的保护,中剂量组10 mg/kg提供40%和30%的保护,低剂量组3 mg/kg几乎都不能提供保护,其中4G5的低剂量组小鼠全部死亡.与PBS对照组相比,各组小鼠体重丢失严重,临床症状明显,并且体重恢复缓慢.综上,在预防性实验中,2H3和4G5单抗只可以部分保护小鼠抵抗同源流感病毒的攻击,保护效果相对较差.

攻毒后72 h测定小鼠肺洗液中的病毒滴度.结果如表2.肺部病毒滴度用GraphPad Prism 5.00软件分析

图3 HA单克隆抗体与流感病毒结合产生的特异性荧光
Figure 3 Immunofluorescence produced by HA MABs binding to influenza virus

实验数据. 病毒滴度经对数转换后, 多组数据两两比较用one-way ANOVA with the Tukey multiple comparison检验, 两个样本的比较用Student *t*检验进行比较. 存活率数据用Log-rank (Mantel-Cox)分析.

结果显示, 6A3和4A11单抗组的肺部病毒滴度明显降低, 显著低于PBS组. 尤其是6A3, 3个剂量组均没有检测到肺部病毒. 2H3在高剂量时可以降低小鼠的肺部病毒滴度($P<0.05$), 但在低剂量时肺部病毒滴度较高, 与PBS组无明显差异. 4G5组的肺部病毒滴度均较高. 该实验结果与保护率相符. 综上, 在预防性实验中6A3, 4A11单抗能有效地减少病毒在小鼠的感染并且控制病毒复制. 而2H3, 4G5的保护效果相对较差, 不能有效地控制病毒的复制.

(ii) HA单抗的治疗性效果. 实验分组同预防性实验, 在攻毒24 h之后, 腹腔注射相应剂量的抗体, 观察小鼠攻毒后的临床症状并统计各组小鼠的存活率和体重变化情况, 具体结果如图5.

如图所示, 2H3和4G5单抗对小鼠的保护作用相

对较弱, 在致死量流感病毒的攻击时, 高剂量组只能分别提供50%和40%的保护, 中剂量组只能分别提供20%和10%的保护, 低剂量组小鼠均全部死亡. 而4A11和6A3单抗对小鼠的保护作用相对较强. 在致死量流感病毒的攻击时, 高剂量组均能提供100%的保护, 中剂量组分别提供70%和100%的保护, 低剂量组也均能提供40%的保护.

体重降低情况与保护效果一致. 与PBS对照组相比, 2H3和4G5单抗的各组小鼠体重丢失严重, 临床症状明显. 相比其他组, 高剂量组没有明显的保护优势. 4A11单抗的中、低剂量组小鼠体重丢失严重, 临床症状明显. 但高剂量组有明显的保护优势. 6A3单抗的中、高剂量组的小鼠体重丢失较少且恢复较快, 低剂量组小鼠体重丢失相对严重.

综上, 在治疗性实验中, 2H3和4G5单抗可以部分保护小鼠抵抗同源流感病毒的攻击, 但保护效果较差. 4A11单抗在高剂量时可以有效地保护小鼠抵抗同源流感毒的攻击, 中、低剂量时只能提供部分保

图4 (网络版彩色) 攻毒后小鼠的体重变化和存活率情况。(a) 2H3; (b) 4A11; (c) 4G5; (d) 6A3

Figure 4 (Color online) The body weight change and survival rate of mice after challenge. (a) 2H3; (b) 4A11; (c) 4G5; (d) 6A3

护。6A3单抗在中、高剂量时可以有效地保护小鼠抵抗同源流感病毒的攻击, 而低剂量时只能提供部分保护。

攻毒后72 h测定小鼠肺洗液中的病毒滴度。结果如表3, 肺部病毒滴度用GraphPad Prism 5.00软件分

析实验数据。病毒滴度经对数转换后, 多组数据两两比较用One-Way ANOVA with the Tukey multiple comparison检验, 两个样本的比较用Student *t*检验进行比较。存活率数据用Log-rank (Mantel-Cox) 分析。

结果显示, 6A3单抗高剂量及中剂量组肺部病毒

表 2 预防组小鼠在致死量病毒攻击后的肺部病毒滴度^{a)}

Table 2 The lung virus titers of mice after lethal challenge in the prophylactic experiment groups

单抗	给药剂量(mg/kg)	肺部病毒滴度(Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	存活率(%)
2H3	30	5.28±0.53*	60
	10	6.10±0.48	40
	3	6.50±0.17	10
4A11	30	2.66±0.94***	100
	10	3.80±0.39***	100
	3	4.92±0.13**	100
4G5	30	6.22±0.34	50
	10	6.47±0.38	30
	3	6.7±0.16	0
6A3	30	undetected***	100
	10	undetected***	100
	3	undetected***	100
PBS	—	7.15±0.66	0

a) $P < 0.05$ 认为有统计学差异, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。“—”, 无给药剂量

滴度明显降低, 显著低于PBS组。但低剂量组肺部病毒滴度和PBS组相比, 无明显差异。4A11单抗只有在高剂量时才可以降低小鼠的肺部病毒滴度, 中、低剂量组肺部病毒滴度均较高。2H3, 4G5单抗组的肺部病毒滴度较高, 与PBS组相比无明显差异。综上, 6A3单抗在高、中剂量注射小鼠时能有效地减少病毒感染并且控制病毒复制。但2H3, 4G5的保护效果较差, 不能有效地保护小鼠抵抗流感病毒的感染。

3 讨论与结论

本研究通过ELISA和HI实验共筛选到8株亚型为IgG的HA单克隆抗体。8株单抗中, 2H3, 4A11, 4C8, 6A3, 7G2的ELISA效价较高, 达 10^6 。其中2H3, 4A11, 4G5, 6A3具有较强的病毒中和能力, 中和效价最高能达到1:14125。间接免疫荧光实验表明8株单抗都能与293T细胞表达的HA蛋白产生特异性反应, 并且能和流感病毒特异性结合。动物实验结果表明, 6A3单抗在预防性和治疗性实验中都可以有效地保护小鼠抵抗H7N9流感病毒的致死性感染, 显著降低其肺部病毒滴度。

实验中, 我们共筛选到特异性单抗28株, 其中8株抗体为IgG亚型, 其余的均为IgM亚型。IgM抗体是初次免疫应答中最早出现的抗体, 血清中含量较低。IgG抗体是再次体液免疫应答产生的主要抗体, 亲和力高, 具有重要的免疫效应。因IgM抗体纯化困难, 本实验选取8株亚型为IgG的抗体进行生物学鉴定及

功能性研究。8株抗体中2A12, 2H3, 4A11为IgG2a亚型, 4C8, 4G5, 7G2, 6A3为IgG1亚型, 1A8为IgG3亚型。虽然结构相似, 但不同亚类IgG的抗病毒生物学活性有一定差异。有实验显示, 经裂解疫苗和亚单位疫苗免疫的BALB/c小鼠, 其免疫应答偏向于Th2型, 产生的抗体以IgG1为主。而经全病毒免疫或者经病毒攻毒后幸存的小鼠, 其血清中主要的抗体亚型是IgG2a, 免疫应答偏向于Th1型。另外IgG1在体内、外均能较好地中和病毒颗粒, 而IgG2a的中和能力较弱。但IgG2a在体内能广泛地与所有类型的FcγRs结合, 从而诱导效应T细胞发挥清除病毒的作用。IgG1却只能结合FcγR III, IgG3结合FcγRs的能力则更弱^[10,11]。这一实验结果与我们的实验结果基本一致。

我们用Protein™ XPR36检测了8株抗体的亲和力。抗体的亲和力取决于抗体与所作用的抗原表位之间的配合程度, 亲和力越高, 抗原抗体的结合力越强。其中4C8, 2A12, 6A3的抗体亲和力较强。通过分析发现, 抗体的亲和力与抗体的ELISA效价、HI效价和中和效价没有明显的相关性。

另外, 我们以制备的8株单抗为一抗, 通过Western Blot实验鉴定8株单抗在H7N9病毒抗原上的作用部位。结果8株单抗都显示阴性结果。分析其原因, 可能是因为这8株单抗识别的表位是通过远距离相互作用而形成的构象表位, 不是线性表位。单克隆抗体作为研究抗原表位的重要工具, 我们需要进一步研究这

图5 (网络版彩色) 攻毒后小鼠的体重变化和存活率情况。(a) 2H3; (b) 4A11; (c) 4G5; (d) 6A3

Figure 5 (Color online) The body weight change and survival rate of mice after challenge. (a) 2H3; (b) 4A11; (c) 4G5; (d) 6A3

8株单克隆抗体,特别是单抗6A3所识别的抗原表位,确定单抗所针对的表位在抗原结构上的位置。同时进一步分析这些表位的差异,以正确评价单抗的特

异性和交叉反应性。此外,还可以用这些保守表位来设计通用性流感疫苗^[12],用来抵抗流感病毒的感染和流行。

表 3 治疗组小鼠在致死量病毒攻击后的肺部病毒滴度^{a)}

Table 3 The lung virus titers of mice after lethal challenge in the therapeutic experiment groups

单抗	给药剂量(mg/kg)	肺部病毒滴度(Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	存活率(%)
2H3	30	6.74±0.72	50
	10	6.97±0.50	20
	3	7.00±0.71	0
4A11	30	5.58±0.12*	100
	10	6.22±1.10	70
	3	6.39±0.67	40
4G5	30	6.91±0.58	40
	10	7.09±0.50	10
	3	7.12±0.66	0
6A3	30	3.16±0.47***	100
	10	4.14±0.32**	100
	3	5.89±0.38	40
PBS	—	7.16±1.18	0

a) $P<0.05$ 认为有统计学差异, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$. “—”, 无给药剂量

参考文献

- 1 Poovorawan Y, Pyungporn S, Prachayangprecha S, et al. Global alert to avian influenza virus infection: From H5N1 to H7N9. *Pathog Glob Health*, 2013, 107: 217–223
- 2 Lam T T, Wang J, Shen Y, et al. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China. *Nature*, 2013, 502: 241–244
- 3 Air G M. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7639–7643
- 4 Natali A, Oxford J S, Schild G C. Frequency of naturally occurring antibody to influenza virus antigenic variants selected *in vitro* with monoclonal antibody. *J Hyg (Lond)*, 1981, 87: 185–190
- 5 Zheng M, Qu D, Wang H, et al. Intranasal administration of chitosan against influenza A (H7N9) virus infection in a mouse model. *Sci Rep*, 2016, 6: 28729
- 6 Zheng M, Liu F, Shen Y, et al. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of nucleoprotein-based vaccine with compound 48/80 adjuvant. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11: 397–406
- 7 Xu W, Zheng M, Zhou F, et al. Long-term immunogenicity of an inactivated split-virion 2009 pandemic influenza A H1N1 virus vaccine with or without aluminum adjuvant in mice. *Clin Vaccin Immunol*, 2015, 22: 327–335
- 8 Wang X, Zhang W, Liu F, et al. Intranasal immunization with live attenuated influenza vaccine plus chitosan as an adjuvant protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Arch Virol*, 2012, 157: 1451–1461
- 9 Guo L, Zheng M, Ding Y, et al. Protection against multiple influenza A virus subtypes by intranasal administration of recombinant nucleoprotein. *Arch Virol*, 2010, 155: 1765–1775
- 10 Huber V C, McKeon R M, Brackin M N, et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin Vaccin Immunol*, 2006, 13: 981–990
- 11 Albert H, Collin M, Dudziak D, et al. *In vivo* enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 15005–15009
- 12 Krammer F. Emerging influenza viruses and the prospect of a universal influenza virus vaccine. *Biotechnol J*, 2015, 10: 690–701

Summary for “甲型流感病毒 H7N9 血凝素单克隆抗体的制备及保护性研究”

Preparation and protection of monoclonal antibody against H7N9 influenza virus hemagglutinin

Yahong Ding¹, Mei Li¹, Xiang Shu², Yuelian Yang¹, Wei Shi¹ & Ze Chen^{1*}

¹ Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200051, China;

² China National Biotec Group Company Limited, Beijing 100029, China

* Corresponding author, E-mail: chenze2005@263.net

The first human infection with novel H7N9 influenza virus was reported in March 2013 in China. To date, the H7N9 influenza viruses possess a potential pandemic threat to public health worldwide and have caused severe infection and high mortality in humans in China. The latent period of human infection of H7N9 influenza virus is generally within 7 days. Patients usually show flu like symptoms, such as runny nose, sore throat, fever, cough, headache and muscle pain. Severe patients have rapid development, characterized by severe pneumonia and dyspnea.

Antibodies play a major role in protective immunity against the influenza virus infection, and passive immunization with monoclonal antibodies (MAbs) specific to viral proteins might be a potential option for humans against lethal infection of the influenza viruses. It is known that hemagglutinin (HA), is the major viral antigenic protein on the influenza virus particle and the primary target of neutralizing antibodies against influenza virus.

In this study, in order to obtain the HA MAbs of influenza virus H7N9 (A/Shanghai/2/2013), study their biology characteristics, and evaluate the prophylactic and therapeutic efficacy of the HA MAbs in mouse model. The BALB/c mice were immunized with inactivated H7N9 vaccine by subcutaneous administration for three times, and boosted with inactivated H7N9 vaccine by the tail vein three days before fusion. Finally, 28 MAbs were obtained and identified by ELISA and hemagglutination inhibition test (HI). Eight IgG subtype MAbs (1A8, 2A12, 2H3, 4A11, 4C8, 4G5, 6A3, 7G2) were selected to identify their biology characteristics. The ELISA titers of ascites of the eight MAbs were 10^2 – 10^6 . The eight MAbs exhibited high affinity which can reach nmol/L level and meet the requirement of affinity for monoclonal antibody drug. The immunofluorescence assay indicated that the eight MAbs had excellent specificity for HA protein expressed in 293T cell and were able to recognize the H7N9 influenza virus particles. In addition, all the eight MAbs could inhibit HA activity and the MAbs 2H3, 4A11, 4G5 and 6A3 can also present neutralization activity against the H7N9 live virus. The highest neutralizing titer was up to 1:14125. At the same time, we evaluated the prophylactic and therapeutic efficacy of these MAbs against the homologous H7N9 strain. The activity against H7N9 virus was evaluated by clinical syndromes, survival rates and lung viral titers. The results showed that in the prophylactic and therapeutic experiments, MAbs 6A3 can inhibit effectively H7N9 influenza virus infection, provided 100% protection and remarkably reduced the lung viral titers in mouse model.

The HA monoclonal antibodies against influenza virus H7N9 were successfully obtained. The HA MAbs not only may be as a prophylactic and therapeutic measure to prevent H7N9 influenza virus infection, but also laid the foundation for us to research the H7N9 HA antigen epitope and develop diagnostic reagents.

influenza virus, H7N9, hemagglutinin, monoclonal antibody

doi: 10.1360/N972018-00104