

人源抗 H7N9 血凝素中和抗体 IgG 的制备及鉴定

陈 雅¹,熊四平¹,唐 奇¹,王怡雯²,耿以如¹,顾 慧²,徐亚如¹,周 荧³,仇镇宁¹,冯振卿^{1*},朱 进^{1,2*}

(¹南京医科大学病理学系, 卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166;²南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002;³南京医科大学第二附属医院耳鼻喉科, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:将从全人源 Fab 噬菌体抗体库筛选获得的抗 H7N9 血凝素 Fab 抗体基因进行基因工程改造,以表达全分子抗 H7N9 血凝素中和抗体 IgG,并验证其对 H7N9 型禽流感病毒的中和活性。方法:用 H7N9 型禽流感病毒血凝素筛选全人源 Fab 噬菌体抗体库,构建全分子 IgG 抗体重、轻链表达载体,共转染 293 FreeStyle(293F)细胞,表达并纯化 IgG 抗体。应用 ELISA 及 Western blot 实验检测抗体免疫学活性,微量中和实验及鸡胚预防保护实验检测其中和活性,血凝抑制试验判断其结合血凝素亚基。结果:成功筛选出 1 株全人源抗 H7N9 血凝素 Fab 抗体基因并构建 IgG 真核表达载体。获得的全分子 IgG 抗体重、轻链序列正确,并可特异性结合 H7N9 血凝素。微量中和实验证明其对 H7N9 型禽流感病毒有良好中和活性,中和滴度为 15.6 μg/mL。鸡胚预防保护实验显示抗体用量为 200 μg 时可达 100%保护率。血凝抑制试验表明其结合血凝素 HA2 亚基。结论:制备的重组全人源全分子抗 H7N9 血凝素 IgG 抗体可特异性识别 H7N9 型禽流感病毒血凝素,对 H7N9 型禽流感病毒有显著的中和作用,为进一步研发用于禽流感防治的抗体药物奠定基础。

[关键词] H7N9;全分子抗体;血凝素;中和抗体

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-874-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160723

Preparation and characterization of a full human neutralizing IgG antibody against H7N9 hemagglutinin

Chen Ya¹, Xiong Siping¹, Tang Qi¹, Wang Yiwen², Geng Yiru¹, Gu Hui², Xu Yaru¹, Zhou Ying³, Qiu Zhenning¹, Feng Zhenqing^{1*}, Zhu Jin^{1,2*}

(¹Department of Pathology, Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 211166;²Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002;³Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To genetically engineer an anti-H7N9 hemagglutinin Fab gene obtained by screening a full human Fab phage antibody library and to express it by antibody engineering, as well as verify its neutralizing activity to H7N9 avian influenza viruses. **Methods:** We screened a full human Fab phage antibody library using H7N9 avian influenza virus hemagglutinin and constructed IgG heavy and light chain expression vectors. Both vectors were transfected into 293 FreeStyle (293F) cells and the IgG antibody was expressed and purified. Then, the immunological activity was detected by ELISA assay and Western blotting assay, and the neutralizing activity was detected by microneutralization assay and prophylactic protection test in embryonated eggs. The hemagglutinin binding subunit was speculated by hemagglutination inhibition test. **Results:** A full human anti-H7N9 hemagglutinin Fab gene was successfully obtained and the IgG eukaryotic expression vectors were constructed. The sequences of both the heavy and the light chains of the antibody were correct and the antibody could bind to H7N9 hemagglutinin specifically. The antibody showed obvious neutralizing activity against H7N9 avian influenza viruses in microneutralization assay, and the neutralizing titer was 15.6 μg/mL. A dose of 200 μg IgG conferred a 100% survival rate in embryonated eggs. Hemagglutination inhibition test indicated that the IgG may bind the HA2 subunit of hemagglutinin. **Conclusion:** The reconstructed full human anti-H7N9 hemagglutinin IgG antibody could specifically recognize H7N9 avian influenza hemagglutinin and could obviously neutralize the virus, and laid a solid foundation for

[基金项目] 国家自然科学基金(81273325);江苏省自然科学基金(BK2012527);江苏省社会发展(BE2011842)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; zhujin1968@njmu.edu.cn

the further development of antibody drugs for the prophylaxis and treatment of avian influenza.

[Key words] H7N9; whole immunoglobulin; hemagglutinin; neutralizing antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07): 874-879, 982]

2013 年 3 月底中国疾病预防控制中心正式公布 3 例新型人感染 H7N9 型禽流感确诊病例^[1]。此后该病迅速蔓延,患者以高热、咳嗽、咳痰等流感样症状起病并迅速进展为重症肺炎、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),病死率超过 30%^[1-2]。禽流感一线药物包括 M2 蛋白阻滞剂和神经氨酸酶抑制剂,新型 H7N9 型禽流感病毒对二者均有不同程度耐药^[1,7]。

A 型禽流感病毒基因组共有 8 段单链 RNA,编码 11 种蛋白,其中血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)为病毒主要免疫原。病毒表面的 HA 可介导病毒与宿主细胞表面唾液酸聚糖受体结合以及膜融合,是病毒感染宿主的关键蛋白^[8]。针对 HA 的抗体可直接阻断禽流感病毒与宿主细胞表面唾液酸聚糖受体的结合,从而形成对抗禽流感的重要防线。本研究利用 H7N9 型禽流感病毒 HA 蛋白筛选全人源 Fab 噬菌体抗体库,采用基因工程技术和抗体工程技术制备及表达全人源抗 H7N9 型禽流感病毒 HA 全分子 IgG 抗体,并对制备的抗体进行免疫学活性鉴定及中和活性检测。本研究结果对进一步研发用于禽流感防治的抗体药物具有重要价值。

1 材料和方法

1.1 材料

293F 细胞购自美国 Invitrogen 公司,MDCK 细胞由本实验室保存,A/Shanghai2/2013(H7N9)禽流感病毒株及灭活 A/Shanghai2/2013(H7N9)禽流感病毒为南京军区军事医学科学院馈赠。

293F Expression 培养基、DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、293 Fectin、大肠杆菌 DH5 α (Invitrogen 公司,美国),抗体真核表达载体 pFUSE-CHIg-hG1、pFUSE-CHIg-h κ (InvivoGen 公司,美国),限制性内切酶 *Fsp* I、*Bmt* I (NEB 公司,美国),2 \times PCR master mix (北京优博奥公司),pMD 18-T vector、In-Fusion PCR Cloning Kit(Clontech 公司,日本),Agarose Gel DNA Purification Kit(TaKaRa 公司,日本),A/Shanghai2/2013(H7N9)禽流感病毒 HA 蛋白(军事医学科学院),鼠源抗流感病毒核蛋白单克隆抗体(Santa

Cruz Biotechnology 公司,美国)、HRP 标记兔抗人 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物有限公司)、HiTrap Protein A 预装柱(GE 公司,美国)、AK-TA 蛋白纯化系统(GE 公司,美国),30 kDa 超滤离心管(Millipore 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 全人源 Fab 噬菌体抗体库的筛选

本实验室已构建库容为 5.76×10^9 的全人源 Fab 噬菌体抗体库^[9],将 H7N9 型禽流感病毒 HA 蛋白包被 ELISA 板,经 6 轮“吸附-洗脱-扩增”对抗体库进行富集筛选,涂板培养过夜后,挑取单克隆并利用 phage-ELISA 鉴定,阳性克隆标准为 450 nm 处吸光度值阳性/阴性(OD 540 P/N 值) >2.0 。挑取阳性单克隆于 LB 培养基中培养过夜,离心收集沉淀,使用质粒抽提试剂盒回收质粒 DNA,采用 PCR 法分别扩增 Fab 抗体轻、重链序列,并将 PCR 胶回收产物送公司测序。将测序结果与人类免疫球蛋白序列数据库(PubMed)对比正确后,用作本研究的备用序列。

1.2.2 全人源抗 H7N9 HA IgG 抗体真核表达系统的构建

将筛选出的抗体可变区序列与人类抗体基因组序列数据库(www.imgt.org)进行比对,FR1 起始处及 FR4 结尾处因抗体库筛选发生的基因突变根据基因同源性进行修复。根据 In-Fusion PCR 原理设计抗 H7N9 血凝素 IgG 抗体重、轻链 PCR 引物(表 1)。以筛库得到的 Fab 基因为模板,使用上述引物扩增获得插入片段。用限制性内切酶 *Fsp* I 和 *Bmt* I 分别酶切抗体真核表达载体 pFUSE-CHIg-hG1 和 pFUSE-CHIg-h κ 使其线性化。按照 In-Fusion PCR 标准程序将重、轻链可变区基因分别克隆到重、轻链线性化载体中。转化大肠杆菌 DH5 α 后,挑取阳性单克隆送测序。

1.2.3 全人源抗 H7N9 HA IgG 抗体的表达及纯化

于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、8% CO $_2$ 、120 r/min 条件下培养 293F 细胞至细胞活力 $>95\%$ 。分别将 pFUSE-CHIg-hG1-H7N9H 和 pFUSE-CHIg-h κ -H7N9 κ 质粒各 50 μg 加入终体积为 3 mL 的 Opti-MEM 培养基中,将 100 μL 293 Fectin Transfection Reagent 加入终体积为 3 mL

表1 In-Fusion PCR 引物序列
Table 1 In-Fusion PCR primer sequences

目的基因	引物序列(5'→3')
抗体重链	F:GGTGTCCTCACTCGCTACAGGTGCAGCTGGTG R:GCCCTTGCTGGATGCTGAGGAGACGGTGAC
抗体轻链	F:ACAGACGCTCGCTGCGACATCGTGATGACC R:TGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCCACCTT

的 Opti-MEM 培养基中,5 min 后将二者混匀并静置 20 min。293F 细胞离心后使用 293F Expression Medium 重悬,将 1×10^8 个细胞加入培养瓶,并用培养基定容至 94 mL,再加入 6 mL DNA-293fectin 混合物。继续培养至 120 h 后收集细胞培养上清。

用 0.22 μm 滤膜过滤细胞培养上清后,在 AK-TA 蛋白纯化系统中使用 HiTrap Protein A 亲和层析柱按标准操作步骤纯化抗 H7N9 IgG 抗体。分两步使用截留分子量为 30 kDa 的超滤离心管将溶剂置换为 PBS,再用 0.22 μm 滤膜过滤,使用 One Drop 分光光度计测定抗体浓度并将其定容为 1.0 mg/mL,置于 -70°C 保存。

1.2.4 抗 H7N9 HA IgG 抗体免疫学特性分析

ELISA:H7N9 型禽流感灭活病毒包被 96 孔板 4°C 过夜,450 ng/孔。PBS-T 洗板后加入 5% 脱脂奶粉, 37°C 封闭 2 h。加入 1:1 000 抗 H7N9 IgG 抗体并做倍比稀释, 37°C 孵育 1 h。洗板后加入 1:1 000 HRP 标记羊抗人 IgG 二抗 37°C 孵育 1 h。用酶标仪读取 450 nm 吸光度值,并作图以检测抗 H7N9 IgG 抗体与 H7N9 型禽流感灭活病毒结合的量效关系。以无关抗体(抗 TLR4 IgG 抗体本实验室制备)为阴参。

Western blot:H7N9 型禽流感灭活病毒与上样缓冲液混合后煮样 10 min,将样品加入 SDS-PAGE 凝胶上样孔,电泳后转硝酸纤维素膜。封闭后加浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗 H7N9 IgG 抗体 4°C 过夜,洗膜后加 1:2 000 HRP 标记羊抗人 IgG 二抗, 37°C 孵育 1 h 后洗膜,加 ECL 发光液曝光。使用 5% 脱脂奶粉封闭及稀释抗体。

1.2.5 微量中和实验

用 Reed-Muench 两氏法计算 H7N9 禽流感病毒对 MDCK 细胞的半数细胞培养物感染量(TCID₅₀)。抗 H7N9 IgG 抗体按 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128 稀释后与 100 TCID₅₀ 的病毒液混合, 37°C 孵育 2 h 后加入 MDCK 单层细胞中并置于 37°C 、5% CO₂ 温箱培养 3 d 后弃上清,PBS 洗涤后用 80% 冷丙酮固定。加入鼠源抗流感病毒核蛋白单克隆抗体,室温作用 1 h 后弃上清、洗板。加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG

抗体,室温作用 1 h 后弃上清、洗板。使用酶标仪读取 450 nm 吸光度值,计算半数感染域值 $X=(\text{细胞阳性对照孔平均吸光度值}-\text{细胞阴性对照孔平均吸光度值})/2+\text{细胞阴性对照孔平均吸光度值}$ 。平均值低于 X 的中和反应阳性孔的抗体最低稀释浓度为抗体中和滴度。以抗 TLR4 IgG 抗体为阴参。

1.2.6 血凝试验及血凝抑制试验

血凝实验:在 96 孔血凝板上每孔加 50 μL 生理盐水,于左侧第 1 孔加 50 μL H7N9 型禽流感病毒贮存液,起始浓度为 2^{-1} ,作 $2^{-1}\sim 2^{-11}$ 系列倍比稀释,以最后 1 孔为对照,共做 3 组复孔。每孔加 1% 鸡红细胞 50 μL 充分混合后置 37°C 孵育 30 min。以 100% 凝集的病毒最大稀释孔为该病毒血凝价,即 1 个凝集单位。

血凝抑制(HI)实验:在 96 孔血凝板上每孔加 50 μL 稀释液,抗 H7N9 IgG 抗体起始浓度为 2^{-1} ,用稀释液作 $2^{-1}\sim 2^{-11}$ 系列倍比稀释,第 12 孔为 4 单位病毒液,共做 3 组复孔。自第 1 孔至 11 孔各加 50 μL 4 个血凝单位病毒溶液并混匀,第 12 孔加入 50 μL 稀释液,置 37°C 作用 30 min。自第 1 孔至 12 孔加 1% 鸡红细胞 100 μL ,混匀后置 37°C 作用 30 min。以 100% 抑制凝集的最大稀释度为该抗体的 HI 滴度,即血清抑制效价。以马血清抗 H7N9 型禽流感病毒 HA 多克隆抗体(本实验室制备)为阳参,抗 TLR4 IgG 抗体为阴参。

1.2.7 鸡胚预防保护实验

选取均重 50 g 的 10 日龄 SPF 级鸡胚,分别给抗体治疗组鸡胚注射 50、100、200 μg 抗 H7N9 IgG 抗体,阴性对照组注射 100 μL PBS,每个浓度注射 8 只鸡胚。30 min 后,再分别给鸡胚注射与 5 倍半致死剂量(5LD₅₀)的 H7N9 型禽流感病毒。记录 8 日内鸡胚的存活和死亡率,计算不同用量的抗体对病毒感染的预防保护率。

2 结果

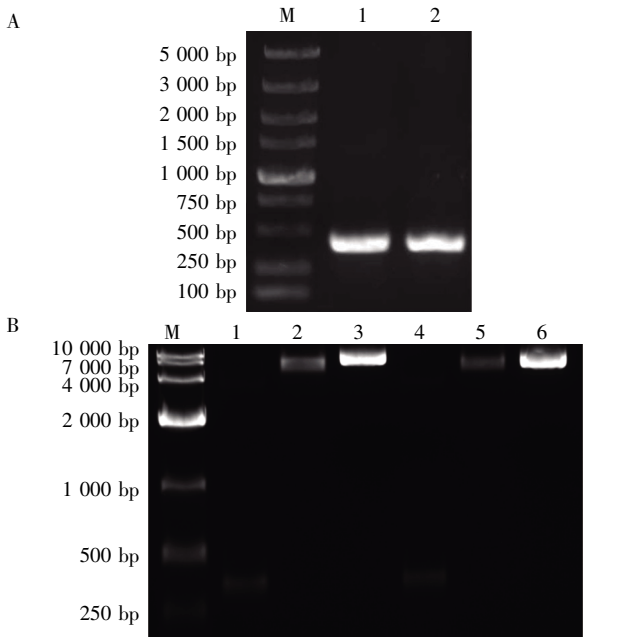
2.1 全人源 Fab 噬菌体抗体库的筛选

采用 phage-ELISA 筛选、鉴定获得 1 株 OD450 P/N 值 > 2.0 的抗 H7N9 Fab 抗体阳性克隆,经克隆化培养后,获取质粒 DNA,使用 PCR 方法扩增 Fab 抗体重、轻链序列并送测序。测序结果与 PubMed 数据库比对后,确定其为人源抗体重、轻链序列。

2.2 全人源抗 H7N9 血凝素 IgG 抗体真核表达系统的构建

用 In-Fusion PCR 引物重新扩增获得 351 bp 的

V_H 基因和 339 bp 的 V_K 基因(图 1A),切胶回收后将其分别克隆到双酶切处理过的线性化 pFUSE-CHIg-hG1 和 pFUSE-CLIg-hK 真核表达载体中,核酸电泳显示分子量与预期相符(图 1B)。重组后的质粒转入感受态大肠杆菌 DH5 α ,挑选单克隆菌株行菌液 PCR 后选择阳性克隆送测序,测序结果与预期一致。



A: V_H , V_K 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图;M:DL5000 Marker;1:H 链;2:K 链;B: V_H , V_K 与线性化真核表达载体重组产物电泳图;M: DL10000 Marker;1: V_H ;2:pFUSE-CHIg-hG1 质粒;3:pFUSE-CHIg-hG1 质粒+ V_H ;4: V_K ;5:pFUSE-CLIg-hK 质粒;6:pFUSE-CLIg-hK 质粒+ V_K 。

图 1 重组抗 H7N9 IgG 抗体重、轻链表达质粒的构建及鉴定
Figure 1 Construction and identification of the recombinant expression plasmids with anti-H7N9 IgG antibody V_H/V_K

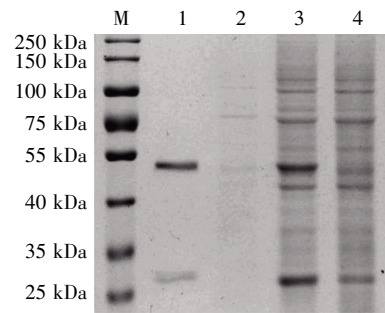
2.3 全人源抗 H7N9 血凝素 IgG 抗体的表达及纯化

利用 293F 细胞真核表达系统瞬时表达抗 H7N9 IgG 抗体,于质粒转染 120 h 后收集细胞培养上清。通过 AKTA 蛋白纯化系统和 HiTrap Protein A 亲和层析柱纯化抗体,SDS-PAGE 检测表明该抗体重、轻链分子量分别为 51 及 28 kDa(图 2)。

2.4 抗 H7N9 血凝素 IgG 抗体免疫学特性分析

ELISA: 将用包被液稀释的 H7N9 型禽流感灭活病毒包被 96 孔板,利用间接 ELISA 法检测抗体效价。检测结果表明抗 H7N9 IgG 抗体与 H7N9 型禽流感灭活病毒可特异性结合,并具有良好的量效关系,当抗体浓度为 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时仍可有效识别 H7N9 抗原表位(图 3)。

Western blot: 用抗 H7N9 抗体对 H7N9 型禽流感灭活病毒做 Western blot 检测,H7N9 型禽流感病



M:蛋白 Marker;1:纯化后的 H7N9 IgG 抗体;2:流穿液;3:转染 DNA 的 293F 细胞上清;4:未转染的 293F 细胞上清。

图 2 纯化后抗 H7N9 IgG 抗体的 SDS-PAGE 检测
Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified anti-H7N9 IgG antibody

毒 HA 分子量为 62 kDa,结果显示 H7N9 型禽流感灭活病毒对应分子量处有条带(图 4),表明本研究制备的抗 H7N9 IgG 抗体对 H7N9 型禽流感病毒 HA 有特异性结合能力。

2.5 微量中和实验

倍比稀释的抗 H7N9 IgG 抗体与 100TCID₅₀ H7N9 型禽流感病毒混合,固定后做 ELISA 检测,每孔测得吸光度值低于细胞半数感染域值时表明该孔中和反应阳性计算半数感染域值 $X=(1.914-0.081)/2+0.081=0.998$,抗 H7N9 IgG 抗体稀释倍数最低为 1:64,即该抗体的中和滴度为 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 5)。

2.6 血凝试验及血凝抑制试验

H7N9 型禽流感病毒株血凝效价为 1:256,以完全抑制 4 倍血凝效价病毒量的抗体最高稀释倍数作为 HI 滴度。抗 H7N9 抗体对 H7N9 型禽流感病毒株 HI 实验结果为阴性,而马血清抗 H7N9 型禽流感病毒 HA 多克隆抗体阳参组实验结果为阳性,HI 滴度为 1×2^8 。阴参组 HI 实验结果为阴性。

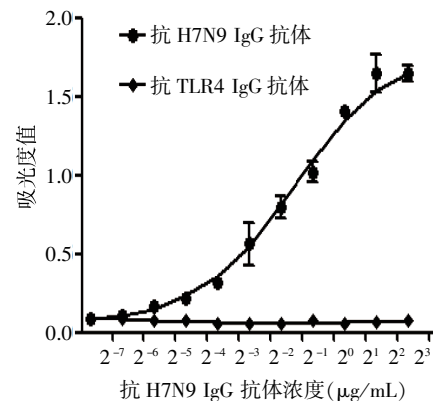
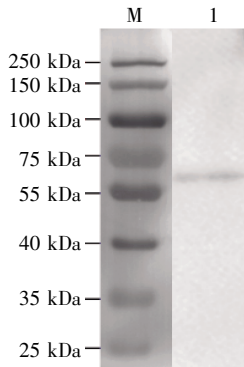


图 3 ELISA 检测抗 H7N9 抗体与 H7N9 型禽流感灭活病毒的结合活性

Figure 3 ELISA analysis of the binding ability of anti-H7N9 IgG antibody with H7N9 inactivated avian influenza viruses

2.7 鸡胚预防保护实验

实验结果显示,8 d 后抗体治疗组鸡胚存活率分别为 12.5%(1 只)、37.5%(3 只)、100.0%(8 只),而 3 d 后只注射 PBS 的阴性对照组鸡胚已全部死亡。随着抗体用量的增加,抗体对 H7N9 型禽流感病毒感染鸡胚的预防保护率呈上升趋势,当抗体用量为 200 μg 时可达 100%保护率(图 6)。



M:蛋白 Marker; 1:H7N9 型禽流感灭活病毒。

图 4 纯化后 anti-H7N9 IgG 抗体 Western blot 检测

Figure 4 Western blot assay of purified anti-H7N9 IgG antibody

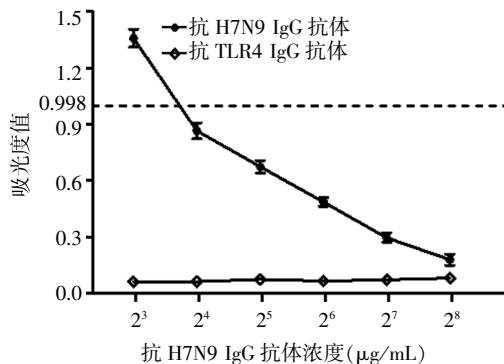


图 5 MDCK 细胞中抗 H7N9 IgG 抗体中和能力检测

Figure 5 Evaluation of anti-H7N9 IgG antibody neutralizing ability in MDCK cells

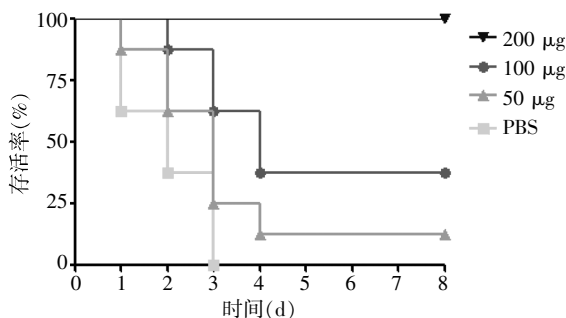


图 6 抗 H7N9 IgG 抗体对鸡胚的预防保护作用

Figure 6 Prophylactic protection of anti-H7N9 IgG antibody to embryonated eggs

3 讨论

禽流感 HA 是流感病毒表面的一种钉状突起的同源三聚体蛋白,可介导病毒与宿主细胞表面受体结合及病毒与宿主细胞膜融合,是禽流感病毒感染宿主的起始及关键步骤^[10]。单体 HA 包括 2 个亚基,HA1 和 HA2,二者由二硫键连接。球状的 HA1 亚基包含受体结合位点及绝大多数易变异的抗体结合位点;杆状的 HA2 亚基包含较保守的抗体结合位点^[11]。HA1 亚基可介导病毒识别及结合宿主细胞膜表面唾液酸聚糖受体,HA2 亚基的氨基酸末端融合序列暴露后激活溶解多肽,病毒与宿主细胞膜融合后病毒核酸进入宿主细胞^[12-13]。目前治疗禽流感的一线化学药物包括 M2 蛋白阻滞剂(金刚烷胺、金刚乙胺等)和神经氨酸酶抑制剂(奥司他韦、扎那米韦等)。禽流感病毒为单股负链 RNA 病毒,其高突变率易导致耐药性的产生。现证实 S31N 突变已导致 H7N9 型禽流感病毒对 M2 蛋白阻滞剂产生耐药^[14]。虽然目前神经氨酸酶抑制剂仍为 H7N9 型禽流感一线用药,但 R292K 突变已导致约 10%的 H7N9 病毒株对神经氨酸酶抑制剂耐药^[15]。此外,禽流感季节性疫苗研发具有不确定性及滞后性。因此寻找有效的替代防治措施迫在眉睫。抗体可通过阻断病毒颗粒与其受体的结合、激活巨噬细胞与自然杀伤细胞(NK 细胞)及激活补体等多种机制杀伤、清除病毒及受感染宿主细胞,在禽流感治疗及紧急被动免疫中具有重要应用价值^[16]。

全人源噬菌体抗体库筛选技术可有效避免人-人杂交技术造成的细胞传代不稳定现象^[17]、传统鼠源抗体在人体中诱发的人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)反应及超敏反应。本实验室前期已通过噬菌体抗体库技术筛选出全人源抗 H5N1 型禽流感病毒 scFv 抗体,经验证对多个禽流感病毒株具有良好的广谱中和活性^[18]。近期也有研究小组通过筛选人源抗 H7N9 噬菌体 Fab 抗体库获得全人源抗 H7N9 型禽流感病毒 HA Fab 抗体^[19]。小分子抗体虽然具有穿透力强的特点,但缺乏 Fc 段造成其结构的不完整性,往往表现出半衰期较全分子抗体短,亲和力及中和活性较全分子抗体低,无法介导抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)和补体介导的细胞裂解作用等不足^[20]。全分子 IgG 抗体具有完整抗体分子的构象与功能,能够有效弥补上述不足,更好地发挥阻止感染及清除病毒的效用。

本研究通过筛选人源噬菌体 Fab 抗体库获得了高亲和力 Fab 抗体基因,利用 In-Fusion PCR 技术重组构建 IgG 抗体真核表达质粒,通过 293F 细胞真核表达系统成功表达全人源抗 H7N9 HA IgG 抗体。ELISA 实验表明该抗体可与 H7N9 型禽流感病毒特异性结合,并具有良好的量效关系。Western blot 实验证明抗 H7N9 HA IgG 抗体能特异性结合 H7N9 型禽流感病毒 HA 蛋白。微量中和实验中 0.1 TCID₅₀ 应不引起细胞病变,且 100 TCID₅₀ 必须引起细胞病变,否则该试验不能成立,实验结果表明该抗体在体外对 H7N9 禽流感病毒具有显著的中和作用。鸡胚预防保护实验表明该抗体对鸡胚具有良好的保护作用,且保护率与抗体的浓度呈正相关。本文研究结果提示制备的重组全人源抗 H7N9 HA IgG 抗体能特异性识别 H7N9 型禽流感病毒 HA,并对 H7N9 型禽流感病毒有显著的中和作用。

禽流感病毒 HA 可致宿主红细胞凝集,相应 HA 抗体可与 HA 结合并抑制血凝反应。有文献报道,抗体结合表位位于 HA1 亚基时可引起血凝抑制,而抗体结合表位位于 HA2 亚基时血凝抑制实验为阴性^[21-22]。本实验制备的抗 H7N9 抗体血凝抑制实验为阴性,结合微量中和实验的结果,推测抗体与血凝素的结合表位位于 HA2 亚基。HA2 亚基抗原表位大多保守,基因突变率显著低于 HA1 亚基,可有效避免因抗原漂移和抗原转换带来的抗原表位的改变,因而针对该亚基的抗体具有发挥广谱中和活性的潜在价值^[11-23]。

本研究制备的全人源抗 H7N9 型禽流感病毒 HA IgG 抗体,经验证能特异性结合相应 HA 蛋白 HA2 亚基,对 H7N9 型禽流感病毒有较好的中和活性,并具有潜在的广谱中和活性,为进一步研发用于禽流感防治的抗体药物奠定了基础。

[参考文献]

[1] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A(H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20): 1888-1897

[2] Yu H, Cowling BJ, Feng L, et al. Human infection with avian influenza A H7N9 virus: an assessment of clinical severity[J]. *Lancet*, 2013, 382(9887): 138-145

[3] 许 可, 鲍倡俊. 人感染 H7N9 禽流感流行病学研究进展[J]. *江苏预防医学*, 2015, 26(1): 43-47

[4] Jie Z, Xie J, He Z, et al. Family outbreak of severe pneumonia induced by H7N9 infection[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188(1): 114-115

[5] Chen Y, Liang W, Yang S, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome[J]. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1916-1925

[6] Richard M, Schrauwen EJ, De Graaf M, et al. Limited airborne transmission of H7N9 influenza A virus between ferrets[J]. *Nature*, 2013, 501(7468): 560-563

[7] Hu Y, Lu S, Song Z, et al. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance[J]. *Lancet*, 2013, 381(9885): 2273-2279

[8] Air GM. Influenza virus-glycan interactions[J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 7(8): 128-133

[9] 杨 瑾, 唐 奇, 熊四平, 等. 人源抗 TLR4 抗体 IgG 的制备及其中和特性分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(6): 777-781, 786

[10] Cushing A, Kamali A, Winters M, et al. Emergence of hemagglutinin mutations during the course of influenza infection[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(12): 16178

[11] Fan X, Hashem AM, Chen Z, et al. Targeting the HA2 subunit of influenza A virus hemagglutinin via CD40L provides Universal protection against diverse subtypes[J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(1): 211-220

[12] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin[J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69(7): 531-569

[13] Xiong X, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 496-499

[14] Yu L, Wang Z, Chen Y, et al. Clinical, virological, and histopathological manifestations of fatal human infections by avian influenza A(H7N9) virus[J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57(10): 1449-1457

[15] Yen HL, Zhou J, Choy KT, et al. The R292K mutation that confers resistance to neuraminidase inhibitors leads to competitive fitness loss of A/Shanghai/1/2013 (H7N9) influenza virus in ferrets[J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(12): 1900-1908

[16] 董志伟, 王 琰. 抗体工程[M]. 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2002: 46-51

[17] 李官成, 王廷华. 抗体理论与技术[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2013: 108

[18] Zhang X, Qi X, Zhang Q, et al. Human 4F5 single-chain Fv antibody recognizing a conserved HA1 epitope has broad neutralizing potency against H5N1 influenza A viruses of different clades[J]. *Antiviral Res*, 2013, 99(2): 91-99