

靶向甲型流感病毒血凝素的人源单克隆抗体研究进展

王春颖¹, 李延柏², 尹哲², 霍珊珊^{2,3}, 于飞^{2,3}

(1. 保定市妇幼保健院, 河北 保定 071066; 2. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001; 3. 河北省人畜共患病原微生物分析与防控重点实验室, 河北 保定 071001)

摘要: 甲型流感病毒感染性强, 宿主广泛, 主要感染禽类, 其次为哺乳动物。当跨物种传染事件发生时, 有可能造成流感大流行, 因此, 对病毒实施及时有效的监控, 以及研发抗流感病毒药物刻不容缓。流感病毒表面的糖蛋白血凝素在病毒入侵宿主细胞的过程中发挥了关键的作用, 可作为单克隆抗体药物的主要靶点。针对血凝素的单克隆抗体能够有效抑制病毒传播, 保护宿主。因此, 本文综述了目前报道的针对甲型流感病毒血凝素糖蛋白的人单克隆抗体, 为后续抗流感药物的研发提供新的思路和展望。

关键词: 流感病毒; 呼吸道病毒; 血凝素; 单克隆抗体; 作用机制

中图分类号: S852.4, R392

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文献标志码: A



Recent advances in human monoclonal antibodies targeting influenza A virus hemagglutinin

WANG Chunying¹, LI Yanbai², YIN Zhe², HUO Shanshan^{2,3}, YU Fei^{2,3}

(1. Baoding Maternal and Child Health Hospital, Baoding 071066, China; 2. College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 3. Hebei Key Laboratory of Analysis and Control of Zoonotic Pathogenic Microorganism, Baoding 071001, China)

Abstract: Influenza A viruses are highly infectious and have a wide range of hosts, including mainly avian and, to a lesser extent, mammalian species. When cross-species transmission events occur, there is a possibility of an influenza pandemic outbreak, and therefore it is urgent to take timely and effective surveillance of the virus as well as develop anti-influenza virus drugs. Hemagglutinin, a glycoprotein on the surface of influenza viruses, plays a key role in the process of virus invasion into host cells and can serve as a stable drug target. Monoclonal antibodies against hemagglutinin can effectively inhibit virus transmission and protect the host. Therefore, this paper reviews the currently reported human monoclonal antibodies against the hemagglutinin glycoprotein of influenza A virus to provide new ideas and prospects for the subsequent development of anti-influenza drugs.

Keywords: Influenza virus; Respiratory virus; Hemagglutinin; Monoclonal antibody; Mechanism of action

呼吸道病毒始终是威胁人类健康的最主要元凶之一, 给公共卫生带来巨大挑战。2019 年底爆发的

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)已经造成全世界范围内 5.2 亿人感染, 约 630 万的人死亡, 引发巨大的人员

收稿日期: 2022-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81974302); 河北省杰出青年基金项目(H2021204001); 保定市科技计划项目(2172P008); 河北省教育厅科学技术研究项目(QN2021071)。

第一作者: 王春颖(1979—), 女, 河北保定人, 主治医师。E-mail: fywangchunying1979@163.com

通信作者: 于飞(1983—), 男, 河北辛集人, 教授, 主要从事病原微生物学研究。Email: shmyf@hebau.edu.cn

本刊网址: <http://hauxb.hebau.edu.cn>

经济损失,目前感染人数和死亡人数仍在增加^[1]。除此之外,具有高致病性和感染性的流感病毒(Influenza virus, IV)同样引人注目,其中就包括流感的大流行,季节性流感以及禽流感的跨种传播^[2]。虽然国家和政府每年都提倡按时接种相应年份的疫苗,但是根据世界卫生组织报道,流感季节性流行每年在全球依然可导致 300~500 万重症病例,29~65 万呼吸道疾病相关死亡^[3]。上个世纪以来,IV 经历了 4 次大流行,包括 1918 年的 H1N1,1957—1958 年的 H2N2,1968 年的 H3N2,以及 2009 年的 H1N1,均造成了大量的人员死亡^[4]。除此外,高致病性禽流感病毒 H5N1 和 H7N9 在人类中的爆发以及 H5N6 和 H5N8 的跨物种传播同样不容忽视^[5-8]。

IV 属于正粘病毒科,根据其核蛋白和基质蛋白抗原的不同分为甲、乙、丙、丁 4 种类型^[1-9]。其中甲型流感病毒(Influenza A virus, IAV)的致病性最强,其 RNA 具有 8 个片段,负责编码病毒的各个蛋白结构^[10]。IAV 表面存在 2 种糖蛋白,血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)。根据序列比较和结构特征的差异,HA 的 18 种亚型分为 2 组, I 组包括 H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17、H18, II 组包括 H3、H4、H7、H10、H14、H15^[11]。成熟的 HA 分为 Head(HA1)和 Stalk(HA1/HA2)2 部分,通过二硫键连接^[12]。前者帮助病毒识别宿主表面的唾液酸受体,后者在低 pH 的介导下促进病毒膜与宿主膜的融合释放病毒基因组^[11]。鉴于 HA 在病毒侵染过程中发挥的重要作用,常被作为单克隆抗体药物研发的靶点。

单克隆抗体药物是近年来药物研究的热点方向,这主要源于它的高亲和活性和生物活性,但还没有针对 IAV HA 的抗体药物获得上市批准。因此,本文就目前靶向 IAV HA 的单克隆抗体研究进行综述,旨在为抗 IV 药物的研发提供新的思路。

1 靶向 Head 的抗体

1.1 靶向受体结合区

由于受体结合区(Receptor binding domain, RBD)的特殊功能性,位于 HA Head 的 RBD 相对保守,其主要包含 130 环、150 环、190 螺旋以及 220 环,因此, RBD 常作为单克隆抗体的识别位点,

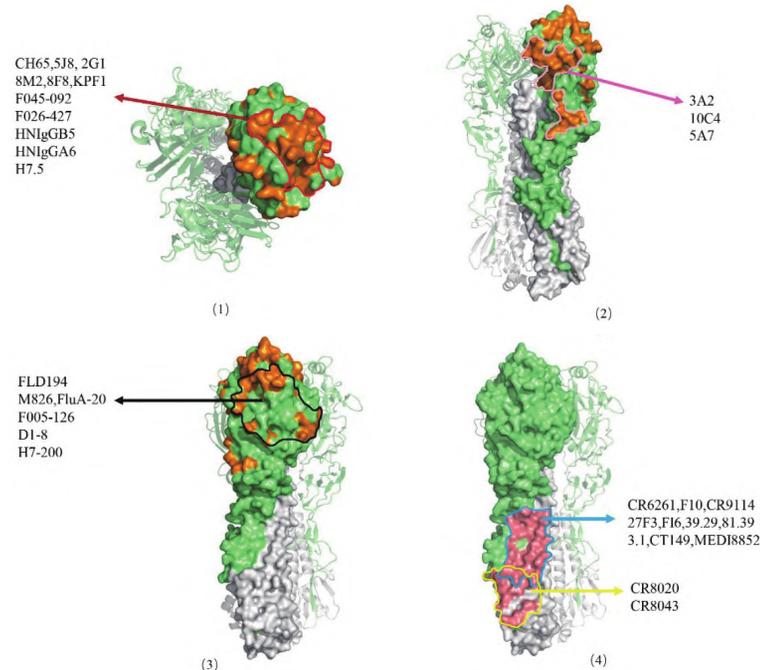
并通过与唾液酸的竞争性结合抑制 IV 的感染(图 1)。

CH65 是从分选的单个浆细胞中分离并通过重组重链和轻链得到的^[13],它模拟唾液酸,通过重链互补决定区 3(Heavy chains complementary determining region, HCDR3)与 H1 Head 的 RBD 结合,可中和 30 种 H1N1 病毒,有效抑制浓度低至 0.012 μg/mL(表 1)^[13]。CH67、641 I-9、H2526 和 5J8 是与 CH65 相似的几种单抗,它们从不同方向利用 HCDR3 上的一个关键二肽与 H1 RBD 结合,能够有效抑制病毒(表 1)^[14]。Xu 等从人的外周血中分离到 3 个 H2N2 特异性单抗 8F8、8M2 和 2G1。其中 8F8 通过 HCDR3 上的 Tyr100 与 RBD 结合,8M2 和 2G1 通过 HCDR2 上的 Phe54 与 RBD 结合,并以空间位阻的方式阻止病毒与唾液酸结合(表 1)^[15]。L4A-14、L3A-44 和 L4B-18 是从感染 H7N9 志愿者体内分离得到的,对多种 H7 均具有中和活性。晶体结构表明,L4A-14 靶向 HA 的 RBD 区域,而 L3A-44 和 L4B-18 识别 RBD 外周的氨基酸残基^[16]。在体内预防试验中,20 mg/kg 的 L4A-14 能够 100% 保护小鼠,且体重恢复相对较快,而 L3A-44 则需要 30 mg/kg 的剂量才能提供完全保护,L4B-18 不能帮助小鼠抵抗致命性的感染。除了预防效果以外,L4A-14 和 L3A-44 同样能够起到较好的治疗效果(表 1)^[16]。

1.2 靶向抗原位点

IV 感染或疫苗接种产生的中和抗体通常靶向位于 HA-Head 上的抗原。目前已经对 H1- 和 H3-Head 上的 5 个抗原位点进行了鉴定:Sa、Sb、Ca1、Ca2 和 Cb,或 A 到 E 位点(图 1)。

从利用噬菌体展示技术构建的抗体库中筛选出具有广泛交叉反应活性的单抗 F045-092 和 F026-427^[17]。这些靶向 HA-Head 的单抗可以通过抑制 HA 与唾液酸的结合来中和多种亚型,包括 H1、H2、H3 和 H5,此外,F045-092 与 H1 结合的晶体结构显示:结合位点位于抗原 A 和 B 附近(表 1)^[17]。F005-126 从噬菌体展示库中分离得到,能广泛中和 H3N2 病毒^[18]。F005-126 的表位穿过了 2 个 HA 单体的裂缝,其中一个对应于 Ca1 位点的多肽在 H3 亚型中相对保守,只有少量氨基酸差异,可以通过抑制低 pH 诱导的 HA 介导的膜融合来中和 H3N2 病毒(表 1)^[18]。



注: HA 为三聚体结构, 突出一个单体, 灰色部分代表 HA-Stalk, 绿色部分代表 HA-Head。其他颜色部分代表单克隆抗体识别的表位, 相似的表位用相同的颜色圈出表示。(1) IAV HA-Head 的俯视图。(2) IAV HA-Head 的侧视图。(3) IAV HA-Head 正视图。

(4) IAV HA-Stalk 的正视图。

图 1 针对流感病毒 HA 的单克隆抗体表位概述

Fig. 1 Overview of monoclonal antibody epitopes against influenza virus HA

D1-8 是来自于人 B 细胞的一种独特的单抗, 它靶向 H3-Head 抗原位点 Ca2 近端新保守的表位^[19]。D1-8 对 H3 病毒具有广泛的中和活性。此外, 在剂量依赖的方式下, D1-8 被证明比奥司他韦治疗感染小鼠更有效 (表 1)^[19]。FLD194 对 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒具有较强的抑制作用, IC₅₀ 低至 0.007 μg/mL^[20]。在感染前注射 2.5 和 7.5 mg/kg 的 FLD194, 能够分别保护感染致死剂量的 H5N1 的小鼠和雪貂, 从而降低肺部病毒滴度。FLD194 通过 5 个 CDRs 与多个抗原位点结合, 并利用 Fc 片段阻断 HA 与唾液酸的结合抑制病毒 (表 1)^[20]。Nogales 等从接种疫苗的志愿者外周血细胞中分离出单抗 KPF1, 该单抗识别抗原位点 Ca 和 Cb 之间高度保守的氨基酸 (表 1), 具有广泛中和 H1 株的活性^[21]。体内试验显示, 1 或 10 mg/kg 的 KPF1 可保护小鼠免受 H1 病毒的致死剂量感染^[21]。随后, 研究小组利用烟草表达系统生产 KPF1, 它与哺乳动物细胞表达系统生产的 KPF1 在中和 H1N1 毒株时具有相同的活性, 剂量低至 0.271 μg/mL^[22]。20 mg/kg 烟草表达系统生产的 KPF1 既能预防感染, 又能治疗感染 H1N1 病毒的豚鼠, 防止病毒传播^[22]。这是首次报道植物表达系统生产的抗 IAV 人源单抗在体外

和体内均具有活性, 为产生新的单抗提供了一种新的免疫疗法 (表 1)。

1.3 其他

通过筛选 H7N9 康复患者的噬菌体抗体库, 获得 2 种单克隆抗体 HNIgGA6 和 HNIgGB5^[23]。186V 和 226L 2 个氨基酸是 2 种单抗识别 H7 HA 的关键, 对 H7N9 具有高的中和活性, 且呈剂量依赖性^[23]。在 HA 抑制试验中, HNIgGA6 和 HNIgGB5 的有效抑制浓度分别为 0.8 μg/mL 和 1.6 μg/mL。此外, HNIgGA6 和 HNIgGB5 能有效治疗感染致死剂量 H7N9 的 BALB/c 小鼠 (图 1, 表 1)^[23]。

在酸性 pH 条件下, 单抗 M826 与 H7N9 HA 具有纳摩尔以下的亲和力^[24]。晶体结构表明, 低 pH 诱导 HA 三聚体的构象发生变化时, M826 的结合位点能够完全暴露, 并且, 该位点是 H7 HA 中存在的一个独特的表位^[24]。该抗体通过介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 的方式保护 BALB/c 小鼠免受致死剂量 H7N9 的攻击 (表 1)^[24]。

单抗 FluA-20 能识别几乎所有 IAVs 亚型的 Head 区域, 其中和活性为 5-142 ng/mL^[25]。与其他单克隆抗体不同的是, FluA-20 靶向于 HA 三聚

体界面的一个新位点, 该位点与 RBD 相邻, 但不重叠, 并且在不同的 IAV 亚型中高度保守^[25]。该位点以前被认为是稳定的, 且抗体无法进入。FluA-20 通过与三聚体界面的短暂接触破坏 HA 的三聚体结构, 从而抑制病毒传播^[25]。试验证明, 10 mg/kg 的单抗可保护小鼠免受亚致死和致死剂量 H1N1、H3N2、H5N1 和 H7N9 毒株的感染^[25]。之后, Turner 等报道了 1 种类似的 H7 特异性单抗 H7.5, 其识别位点位于早期的 HA-Head^[26]。只要很少的

接触, 就可以诱导 HA 的三聚体解离, 防止 HA 完全暴露在唾液酸中, 从而阻止病毒融合(表 1)^[26]。H7-200 是识别 H7-HA1 的特异性单克隆抗体, 作用机制与 FluA-20 相似, 通过作用于 HA 三聚体的内部界面, 从而促使 HA 的三聚体构象发生解离^[27]。与 FluA-20 相比, H7-200 具有更高的亲和活性, 同时, 它还存在结合 H15 HA 的能力。体内预防实验显示, H7-200 能有效保护感染 H7N9 的小鼠并降低临床症状(表 1)^[27]。

表 1 靶向 HA-Head 的单克隆抗体

Table 1 Monoclonal antibodies targeting HA-Head

单抗名称	VH 基因	IC ₅₀	体内活性	临床	参考文献
CH65	1-2	0.012~6.25 μg/mL	-	-	[13]
5J8	4-b	-	-	-	[14]
CH67	1-2	0.0009 μg/mL	-	-	[14]
641 I-9	4-59	0.0018 μg/mL	-	-	[14]
H2526	1-69	-	-	-	[14]
8F8	3-33	-	-	-	[15]
8M2	1-69	-	-	-	[15]
2G1	1-69	-	-	-	[15]
L4A-14,	3-30	20 ng/mL~2 μg/mL	预防组: 20mg/kg:100% 保护 治疗组: 10mg/kg:100% 保护	-	[16]
L3A-44	4-34	20 ng/mL~30 μg/mL	预防组: 30mg/kg:100% 保护 治疗组: 20mg/kg:100% 保护	-	[16]
L4B-18	3-23	20 ng/mL~30 μg/mL	-	-	[16]
F045-092	1-69	0.6 pmol~1.6 μmol	-	-	[17]
F026-427	1-69	-	-	-	[17]
F005-126	1-18	0.12~71 nmol	-	-	[18]
D1-8	-	0.01~0.66 μg/mL	预防组: 0.5mg/kg:100% 保护 治疗组: 30mg/kg:90-100% 保护	-	[19]
FLD194	-	IC ₉₀ :0.007~0.131 μg/ mL	预防组: 2.5mg/kg:100% 保护小鼠 7.5 mg/kg:100% 保护雪貂	-	[20]
mammalian-produced KPF1	-	0.195~25 μg/mL	预防组: 1mg/kg:100% 保护 治疗组: 10mg/kg:80% 保护	-	[21-22]
tobacco-produced KPF1	-	0.195~12.5 μg/mL	预防组: 20mg/kg:100% 保护豚鼠 治疗组: 20mg/kg:100% 保护豚鼠	-	[22]
HNIgGA6	4-31	0.04 μg/mL	预防组: 1mg/kg:60% 保护 治疗组: 5mg/kg:50% 保护	-	[23]
HNIgGB5	4-31	0.04 μg/mL	预防组: 1mg/kg:100% 保护 治疗组: 5mg/kg:60% 保护	-	[23]
M826	1-69	-	预防组: 0.5mg/kg:80% 保护 治疗组: 0.5mg/kg:60% 保护	-	[24]
FluA-20	4-61	5~142 ng/mL	预防组: 1mg/kg:70% 保护 (H1) 治疗组: 10mg/kg:80% 保护 (H3) 10mg/kg:100% 保护 (H5)	-	[25]
H7.5	-	-	-	-	[26]
H7-200	4-61	-	预防组: 10mg/kg:100%(H7)	-	[27]

2 靶向 Stalk 的抗体

2.1 VH1-69 基因编码的单克隆抗体

VH1-69 基因是人类唯一编码 HCDR2 环末端 2 个疏水残基的重链基因, VH1-69 类单克隆抗体可以通过自身的重链识别 Stalk 上的疏水沟槽结构, 从而发挥抑制作用^[28-29]。目前, 多种 VH1-69 基因编码的单克隆抗体被报道, 这些抗体通常能够针对 HA 的多种亚型, 具有高度的广谱性(图 1)^[28-30]。

CR6261 单抗是从接种流感疫苗的志愿者记忆 B 细胞构建的噬菌体抗体库中分离出来的^[31-32], 该单抗对 H1、H3、H5、H6、H8、H9 亚型具有中和活性, 其浓度范围是 0.12 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[31]。CR6261 的作用机制是结合 HA-Stalk 的保守疏水口袋^[31-33]。此外, 5 mg/kg 的单抗可以保护小鼠免受 H5N1 和 H1N1 病毒的致命攻击(表 2)^[31]。此外, 另外一种具有广谱中和活性的单抗 CR8020 也被筛选出来, 该单抗能够中和 H1、H3、H4、H5、H7、H9 和 H10 亚型的流感病毒, 其活性低至 1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[34]。晶体结构表明, CR8020 识别了靠近病毒膜的 HA-Stalk 高度保守的位点^[34]。在体内, 3 mg/kg 的 CR8020 能有效预防和保护致死剂量 H3N2 和 H7N7 的小鼠感染(表 2)^[34]。CR8043 通过不同的残基和角度作用于 CR8020 相似的表位, 在体外与 H3 和 H10 具有较高的亲和力^[35], 高于 3 mg/kg 剂量的 CR8043 可保护小鼠免受 H3N2 和 H7N7 感染(表 2)^[35]。单抗 F10 可以中和所有的 I 组 IAVs, 包括 H5N1, 它通过结合 HA-Stalk 的保守的疏水槽来阻止病毒膜与核内体膜的融合^[36], 10 mg/kg 的 F10 可预防感染并治疗 H5N1 感染小鼠(表 2)^[36]。CR9114 是从接种过季节性流感疫苗的志愿者的 B 细胞组合展示库中分离得到的^[33], 它通过结合 HA-Stalk 高度保守的位点, 阻断 pH 诱导的 HA 与膜融合相关的构象变化^[33]。CR9114 与 H1、H3、H7、H9 和 IBV HA 具有良好的交叉反应性。研究表明高于 1.7 mg/kg 剂量的单抗 CR9114 可以保护小鼠免受几种不同亚型 IAVs 的致命攻击(表 2)^[33]。SUN 等从感染 H5N1 的患者体内分离出了 2 种广泛中和抗体 2-12D5 和 3-37G7.1, 对试验测试的 H1、H5 和 H6 均有较好的中和活性和 ADCC 活性。其中 2-12D5 由 VH1-69 编码, 3-37G7.1 由 VH1-2 编码, 它们靶向与 CR6261 相似的位点, 位于 HA2 上的氨基酸残基 I45 是关键的氨基酸结合位点(表 2)^[37]。

单抗 27F3 经噬菌体展示库分离得到, 它主要通过 HCDR2 结合 HA-Stalk 的疏水槽, HCDR1 与

HA2 形成 2 个氢键, 其有效抑制浓度为 0.008 ~ 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可广泛识别 I 组和 II 组的 IAVs 亚型(表 2)^[30]。从人外周血浆细胞中分离出一种广泛中和的单抗 FI6^[38], 该单抗可识别 16 种亚型(H1-16)的 HA, 并中和 I 组和 II 组的 IAVs^[38]。X 射线晶体学分析表明, FI6 的 HCDR3 环结合在 HA-Stalk 的融合肽子域的一个保守位点上^[38]。4 和 15 mg/kg 的 FI6 分别能预防和治疗感染 H1N1 的 BALB/c 小鼠, 另有试验表明, 该单抗能保护雪貂抵抗高致病性禽流感 H5N1(表 2)^[38]。从噬菌体展示库中分离出的单抗 3.1 能有效中和 H1、H2、H5、H6 亚型 IAVs^[39], 该单抗由 VH3-30 编码, 并通过 HCDR1 和 HCDR3 环与疏水沟槽结合^[39]。单次注射 10 mg/kg 的单抗 3.1 可提供完全的保护并防止体重下降(表 2)^[39]。CT149 是从 2009 年 H1N1 大流行患者体内分离出来的一种具有广泛中和活性的单抗^[40]。晶体结构表明, CT149 的表位位于 Stalk 融合肽中, 它通过抑制低 pH 诱导的 HA 介导的膜融合过程, 能够中和 I 组和 II 组(H1、H2、H3、H7、H9)中所有测试的 IAVs^[40]。此外, 它还可以介导 ADCC 和 CDC 促进感染细胞凋亡^[40]。在体内中和实验中, 该单抗对感染多种 IAVs 亚型的小鼠提供有效保护(表 2)^[40]。

2.2 其他基因编码的单克隆抗体

从接种 H1N1 流感疫苗的志愿者血浆细胞中分离到 3 株单克隆抗体, 分别为 05-2G02、09-2A06 和 09-3A01, 经竞争性 ELISA 和序列同源性分析证明, 抗体与 HA-Stalk 结合^[41]。这 3 种单抗均能中和所有检测到的 H1N1 毒株, 其中 05-2G02 对 H3N2 和 H5N1 也有广泛的中和活性(表 2)^[41]。同样, Nakamura 等^[42]分离出 39.29 和 81.39 2 个单抗, 可以中和 H1、H2 和 H3 亚型, 抑制活性分别为 1.3 ~ 45.1 nmol 和 0.65 ~ 26.3 nmol。晶体结构表明, 39.29 的表位位于 HA2 螺旋 A 的顶部^[42]。竞争 ELISA 结果显示, 81.39 与 39.29 在 H3 Stalk 上的位点存在重叠^[42]。与奥司他韦相比, 45 mg/kg 的 39.29 对 H1N1 和 H3N2 病毒感染的小鼠和雪貂的治疗效果更好。此外, 39.29 与奥司他韦联合使用具有协同作用(表 2)^[42]。在 II 期临床试验中, 虽然 39.29 (MHAA4549A) 被证明具有良好的耐受性, 并显著降低了流感相关症状, 但在二期临床评估后, 终止了单抗和奥司他韦联合治疗住院的严重流感患者的相关实验^[43-44]。单抗 81.39a 是亲本 81.39 的衍生物, 可有效中和 16 个亚型, 活性浓度为 0.01 ~ 4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[45]。在小鼠模型中, 用 15 或 45 mg/kg 的 81.39a 单次注射治疗感染 H5Nx、H6N1 或 H7N9 病

毒的小鼠,证明其能抑制病毒复制和阻止体重减轻^[45]。此外,25 mg/kg 的 81.39a 可有效降低 H1N1 感染雪貂的病毒滴度,减轻肺部病变(表 2)^[45]。

VIS410 靶向 HA-Stalk,可广泛中和 H1、H3 和 H5 亚型,抑制活性为 0.3 ~ 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[46]。在体内试验中,VIS410 能够有效保护感染 H3N2 和 H7N9 的 BALB/c 小鼠,且与奥司他韦联用具有协同作用(表 2)^[46]。之后的临床试验旨在评价使用 VIS410 治疗是否会降低高危人群的发病率,减少严重疾病的发生,并建立了流行微观模拟模型^[47]。结果表明,VIS410 总体上是安全的,具有降低疾病发生率的潜力,可大大降低 65 岁以上人群的住院率,可推荐作为治疗或预防 IAVs 的药物^[47]。近期,又在非住院感染 IAVs 患者中评估了 VIS410 的安全性和耐受性,证明了该单抗能够有效缓解症状,抑制病毒复制^[48]。

这为开发治疗和预防严重流感感染的疫苗提供了有力支持^[48]。

MEDI8852 是一种广谱性人源单抗,可有效对抗所有 HA 亚型 IAVs,抑制活性为 0.41 ~ 4.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[49]。它是通过将 CDRs 中的低频突变位点与框架中不必要的体细胞恢复突变相结合来优化供体记忆 B 细胞 FY1 的效力、广度和低体细胞突变而产生的^[49-50]。MEDI8852 通过 CDRs 与融合区域的疏水槽和大部分融合肽结合^[49]。与其他单克隆抗体相比,它具有更高的抗体中和广度和效价,在小鼠和雪貂模型中,25 mg/kg 的 MEDI8852 治疗效果优于奥司他韦(表 2)^[49-51]。然而,在随后的临床试验中,MEDI8852 产生了不良反应,而与奥司他韦联合用药治疗单一流感的研究由于受试者人数较少,无法证实有效的临床意义。因此,没有进入 II 期试验^[52-53]。

表 2 靶向 HA-Stalk 的单克隆抗体
Table 2 Monoclonal antibodies targeting HA-Stalk

单抗名称	VH 基因	IC ₅₀	体内活性	临床	参考文献
CR6261	1-69	0.55~14.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$	预防组: 5mg/kg:100% 保护 (H1,H5) 治疗组: 15mg/kg:100% 保护 (H5)	I, II	[31-33]
CR8020	1-18	1.1~13.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	预防组: 3mg/kg:100% 保护 (H3,H7) 治疗组: 15mg/kg:100% 保护 (H3,H7)	I, II	[34]
CR8043	1-3	<10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	预防组: 3mg/kg:100% 保护 (H3) 30mg/kg:100% 保护 (H7)	-	[35]
F10	1-69	-	预防组: 2.5mg/kg:100% 保护 (H5) 治疗组: 15mg/kg:100% 保护 (H5)	-	[36]
CR9114	1-69	2.5~28.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	预防组: 1.7mg/kg:100% 保护 (H1) 5mg/kg:100% 保护 (H3) 5mg/kg:100% 保护 (B NA)	-	[33]
2-12D5	1-69	5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	-	[37]
3-37G7.1	1-2	2.5~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	-	[37]
27F3	1-69	0.008~4.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	-	[30]
FI6	3-30	-	预防组: 4mg/kg:100% 保护 (H1) 20mg/kg:100% 保护 (H5) 治疗组: 15mg/kg:100% 保护 (H1)	-	[38]
3.1	3-30	~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	预防组: 3mg/kg:100% 保护 (H1)	-	[39]
CT149	1-8	0.078~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	预防组: 10mg/kg:100% 保护 (H1) 治疗组: 30mg/kg:100% 保护 (H1) 7.5mg/kg:100% 保护 (H5) 10mg/kg:100% 保护 (H3) 30mg/kg:70% 保护 (H7)	-	[40]
05-2G02	1-18	-	-	-	[41]
09-2A06	1-69	-	-	-	[41]
09-3A01	4-39	-	-	-	[41]
39.29	3-30	1.3~45.1 nmol	治疗组: 900 μg :100% 保护 (H1) 100 μg :70~100% 保护 (H3)	I, II	[42-44]
81.39	3-30	0.65~26.3 nmol	-	-	[42]
81.39a	3-30	0.1~4.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$	治疗组: 15mg/kg:60~100% 保护	-	[45]
VIS410	-	0.3~11 $\mu\text{g}/\text{mL}$	治疗组: 2.5mg/kg:60~100% 保护 (H3)	I, II	[46-48]
MEDI8852	6-1	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	预防组: 1mg/kg: 100% 保护 (H1) 治疗组: 10mg/kg: 100% 保护 (H1) 10mg/kg: 100% 保护 (H3) 25mg/kg: 100% 保护 (H5)	I, II	[49-53]

3 讨论和展望

IBV 与 IAV 共同构成了流感的季节性流行, 其主要在儿童和老人等群体之间传播。为了更好的预防流感, 可以通过建立足够大的抗体库, 提高筛选更具广谱性的单克隆抗体的可能性。同时为预防交叉感染, 降低 IV 的影响力, 研究靶向 IBV 的单克隆抗体也是具有重要意义的。在 IBV RBD 和 Stalk 之间的残留酯酶结构域相对保守, 可以作为单抗识别位点^[33]。有研究证明, CR8071 与该位点结合, 保护感染 Victoria 和 Yamagata 2 种谱系的 IBVs 的小鼠接受致死剂量的挑战, 尽管效力较小, 但已经为后续更多针对 IBVs 特异性抗体的研发提供了范例^[33]。

目前, 研发利用中和活性抑制 IV 的单克隆抗体是抗体药物研究的主要方向, 但也可以同时开发具有其他作用机制的抗体, 例如通过介导 ADCC 发挥作用, 目前有多种单克隆抗体可以实现这一功能。如 Yu 等开发的 M826, 它通过介导 ADCC 保护感染 H7 IAV 的小鼠正常存活^[24]; 靶向 IBV 的特异性单抗 46B8 和 C12G6 同样可以介导 ADCC^[54-55]。

在通常情况下, 单一抗体所结合的流感亚型通常是有限的, 多种单克隆抗体的综合使用可能会提高药物的治疗效率。例如 CR8020 与 CR6261 识别位点不同, 但 2 种单抗协同治疗能够中和大多数 IAV 亚型^[34]。

综上所述, 应用能中和多种亚型的人单抗是预防和治疗流感最有效的方法, 也是未来研究的一个主要方向。然而, 由于 HA 的抗原漂移, 单抗治疗往往不能达到预期的效果。这就需要进一步探索 HA 上保守位点及其作用机制。

参考文献:

- [1] WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [EB/OL] . [2022-05-02] . <https://www.who.int/zh/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [2] Long J S, Mistry B, Haslam S M, et al. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity [J] . *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(2): 67-81.
- [3] WHO. Influenza (Seasonal) [EB/OL] . (2018-06-02) [2022-05-02] . [https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
- [4] CDC. Past pandemics of influenza [EB/OL] . [2022-05-02] . <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/basics/past-pandemics.html>.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans—Hong Kong, may–December 1997 [J] . *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1997, 46(50): 1204–1207.
- [6] Bi Y H, Chen Q J, Wang Q L, et al. Genesis, evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China [J] . *Cell Host & Microbe*, 2016, 20(6): 810–821.
- [7] Shi W F, Gao G F. Emerging H5N8 avian influenza viruses [J] . *Science*, 2021, 372(6544): 784–786.
- [8] Yin X, Deng G H, Zeng X Y, et al. Genetic and biological properties of H7N9 avian influenza viruses detected after application of the H7N9 poultry vaccine in China [J] . *PLoS Pathogens*, 2021, 17(4): e1009561.
- [9] Collin E A, Sheng Z Z, Lang Y K, et al. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle [J] . *Journal of Virology*, 2015, 89(2): 1036–1042.
- [10] te Velthuis A J W, Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis [J] . *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(8): 479–493.
- [11] Byrd-Leotis L, Cummings R D, Steinhauer D A. The interplay between the host receptor and influenza virus hemagglutinin and neuraminidase [J] . *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7): 1541.
- [12] Dadonaite B, Gilbertson B, Knight M L, et al. The structure of the influenza A virus genome [J] . *Nature Microbiology*, 2019, 4(11): 1781–1789.
- [13] Whittle J R R, Zhang R J, Khurana S, et al. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin [J] . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(34): 14216–14221.
- [14] Schmidt A G, Therkelsen M D, Stewart S, et al. Viral receptor-binding site antibodies with diverse germline origins [J] . *Cell*, 2015, 161(5): 1026–1034.
- [15] Xu R, Krause J C, McBride R, et al. A recurring motif for antibody recognition of the receptor-binding site of influenza hemagglutinin [J] . *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(3): 363–370.
- [16] Huang K Y A, Rijal P, Jiang H H, et al. Structure-function analysis of neutralizing antibodies to H7N9 influenza from naturally infected humans [J] . *Nature Microbiology*, 2019, 4(2): 306–315.
- [17] Ohshima N, Iba Y, Kubota-Koketsu R, et al. Naturally occurring antibodies in humans can neutralize a variety

- of influenza virus strains, including H3, H1, H2, and H5 [J] . *Journal of Virology*, 2011, 85(21): 11048–11057.
- [18] Iba Y, Fujii Y, Ohshima N, et al. Conserved neutralizing epitope at globular head of hemagglutinin in H3N2 influenza viruses [J] . *Journal of Virology*, 2014, 88(13): 7130–7144.
- [19] Benjamin E, Wang W J, McAuliffe J M, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody directed against a novel conserved epitope on the influenza virus H3 hemagglutinin globular head [J] . *Journal of Virology*, 2014, 88(12): 6743–6750.
- [20] Xiong X, Corti D, Liu J, et al. Structures of complexes formed by H5 influenza hemagglutinin with a potent broadly neutralizing human monoclonal antibody [J] . *PNAS*, 2015, 112(30): 9430–9435.
- [21] Nogales A, Piepenbrink M S, Wang J, et al. A highly potent and broadly neutralizing H1 influenza-specific human monoclonal antibody [J] . *Scientific Reports*, 2018, 8: 4374.
- [22] Park J G, Ye C J, Piepenbrink M S, et al. A broad and potent H1-specific human monoclonal antibody produced in plants prevents influenza virus infection and transmission in Guinea pigs [J] . *Viruses*, 2020, 12(2): 167.
- [23] Chen Z, Wang J M, Bao L L, et al. Human monoclonal antibodies targeting the haemagglutinin glycoprotein can neutralize H7N9 influenza virus [J] . *Nature Communications*, 2015, 6: 6714.
- [24] Yu F, Song H, Wu Y L, et al. A potent germline-like human monoclonal antibody targets a pH-sensitive epitope on H7N9 influenza hemagglutinin [J] . *Cell Host & Microbe*, 2017, 22(4): 471–483.e5.
- [25] Bangaru S, Lang S S, Schotsaert M, et al. A site of vulnerability on the influenza virus hemagglutinin head domain trimer interface [J] . *Cell*, 2019, 177(5): 1136–1152.e18.
- [26] Turner H L, Pallesen J, Lang S S, et al. Potent anti-influenza H7 human monoclonal antibody induces separation of hemagglutinin receptor-binding head domains [J] . *PLoS Biology*, 2019, 17(2): e3000139.
- [27] Dong J H, Gilchuk I, Li S, et al. Anti-influenza H7 human antibody targets antigenic site in hemagglutinin head domain interface [J] . *The Journal of Clinical Investigation*, 2020, 130(9): 4734–4739.
- [28] Avnir Y, Watson C T, Glanville J, et al. IGHV1–69 polymorphism modulates anti-influenza antibody repertoires, correlates with IGHV utilization shifts and varies by ethnicity [J] . *Scientific Reports*, 2016, 6: 20842.
- [29] Huang C C, Venturi M, Majeed S, et al. Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120 [J] . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(9): 2706–2711.
- [30] Lang S S, Xie J, Zhu X Y, et al. Antibody 27F3 broadly targets influenza A group 1 and 2 hemagglutinins through a further variation in V H1–69 antibody orientation on the HA stem [J] . *Cell Reports*, 2017, 20(12): 2935–2943.
- [31] Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, et al. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells [J] . *PLoS One*, 2008, 3(12): e3942.
- [32] Ekiert D C, Bhabha G, Elsliger M A, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope [J] . *Science*, 2009, 324(5924): 246–251.
- [33] Dreyfus C, Laursen N S, Kwaks T, et al. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses [J] . *Science*, 2012, 337(6100): 1343–1348.
- [34] Ekiert D C, Friesen R H E, Bhabha G, et al. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses [J] . *Science*, 2011, 333(6044): 843–850.
- [35] Friesen R H E, Lee P S, Stoop E J M, et al. A common solution to group 2 influenza virus neutralization [J] . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(1): 445–450.
- [36] Sui J H, Hwang W C, Perez S, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses [J] . *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(3): 265–273.
- [37] Sun Y, Cao Y, Li Z, et al. Cross-neutralizing anti-hemagglutinin antibodies isolated from patients infected with avian influenza A (H5N1) virus [J] . *Biomedical and Environmental Sciences*, 2020, 33(2): 103–113.
- [38] Corti D, Voss J, Gamblin S J, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins [J] . *Science*, 2011, 333(6044): 850–856.
- [39] Wyrzucki A, Dreyfus C, Kohler I, et al. Alternative recognition of the conserved stem epitope in influenza A virus hemagglutinin by a VH3–30–encoded heterosubtypic antibody [J] . *Journal of Virology*, 2014, 88(12): 7083–7092.
- [40] Wu Y, Cho M, Shore D, et al. A potent broad-spectrum protective human monoclonal antibody crosslinking two haemagglutinin monomers of influenza A virus [J] . *Nature Communications*, 2015, 6: 7708.

- [41] Li G M, Chiu C, Wrammert J, et al. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(23): 9047–9052.
- [42] Nakamura G, Chai N, Park S, et al. An *in vivo* human-plasmablast enrichment technique allows rapid identification of therapeutic influenza A antibodies [J]. Cell Host & Microbe, 2013, 14(1): 93–103.
- [43] McBride J M, Lim J J, Burgess T, et al. Phase 2 randomized trial of the safety and efficacy of MHAA4549A, a broadly neutralizing monoclonal antibody, in a human influenza A virus challenge model [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(11): e01154–e01117.
- [44] Lim J J, Deng R, Derby M A, et al. Two phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled, single-ascending-dose studies to investigate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of an anti-influenza A virus monoclonal antibody, MHAA4549A, in healthy volunteers [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(9): 5437–5444.
- [45] Marjuki H, Mishin V P, Chai N, et al. Human monoclonal antibody 81.39a effectively neutralizes emerging influenza A viruses of group 1 and 2 hemagglutinins [J]. Journal of Virology, 2016, 90(23): 10446–10458.
- [46] Tharakaraman K, Subramanian V, Viswanathan K, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody is effective against H7N9 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(35): 10890–10895.
- [47] Wollacott A M, Boni M F, Szretter K J, et al. Safety and upper respiratory pharmacokinetics of the hemagglutinin stalk-binding antibody VIS410 support treatment and prophylaxis based on population modeling of seasonal influenza A outbreaks [J]. EBioMedicine, 2016, 5: 147–155.
- [48] Hershberger E, Sloan S, Narayan K, et al. Safety and efficacy of monoclonal antibody VIS410 in adults with uncomplicated influenza A infection: results from a randomized, double-blind, phase-2, placebo-controlled study [J]. EBioMedicine, 2019, 40: 574–582.
- [49] Kallewaard N L, Corti D, Collins P J, et al. Structure and function analysis of an antibody recognizing all influenza A subtypes [J]. Cell, 2016, 166(3): 596–608.
- [50] Pappas L, Foglierini M, Piccoli L, et al. Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations [J]. Nature, 2014, 516(7531): 418–422.
- [51] Paules C I, Lakdawala S, McAuliffe J M, et al. The hemagglutinin A stem antibody MEDI8852 prevents and controls disease and limits transmission of pandemic influenza viruses [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2017, 216(3): 356–365.
- [52] Mallory R M, Ali S O, Takas T, et al. A phase 1 study to evaluate the safety and pharmacokinetics of MEDI8852, an anti-influenza A monoclonal antibody, in healthy adult volunteers [J]. Biologicals, 2017, 50: 81–86.
- [53] Ali S O, Takas T, Nyborg A, et al. Evaluation of MEDI8852, an anti-influenza A monoclonal antibody, in treating acute uncomplicated influenza [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(11): e00694–e00618.
- [54] Chai N, Swem L R, Park S, et al. A broadly protective therapeutic antibody against influenza B virus with two mechanisms of action [J]. Nature Communications, 2017, 8: 14234.
- [55] Shen C, Chen J, Li R, et al. A multimechanistic antibody targeting the receptor binding site potently cross-protects against influenza B viruses [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(412): eaam5752.

(责任编辑: 王雅娇)

《河北农业大学学报》青年编委专刊作者简介



于飞 (1983-) 河北辛集人, 博士, 教授, 博士生导师, 现任河北农业大学生命科学学院生物医药系主任。南方医科大学/美国纽约血液中心联合培养博士, 复旦大学博士后。河北省“杰青”, 河北省“三三三”人才, 兼任中国微生物学会医学微生物学与免疫学分会病毒学组委员。获保定市青年五四奖章荣誉称号。从事 I 型包膜病毒防治策略的研究。主持或主研国家自然科学基金青年、面上、重点、国际合作等 20 余项课题, 在《Cell Host & Microbe》《Signal Transduction and Targeted Therapy》等发表高水平 SCI 论文 70 余篇 (含 3 篇 ESI 高被引论文)。担任《Trends in immunology》《Frontiers in Pharmacology》等 30 多个国际期刊的编委或审稿人。



王文秀 (1989-) 河北邢台人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现任河北农业大学食品科技学院食品科学与工程系主任。研究方向为基于光谱技术的食品品质快速检测技术及装备研发。在研国家自然科学基金等 8 项课题。参与完成了公益性行业 (农业) 科研专项、国家科技支撑计划项目等。在《Meat science》《Journal of food engineering》等期刊发表学术论文 40 余篇, 授权发明专利 5 件, 实用新型专利 4 件, 登记软件著作权版权 6 项, 参编学术著作 4 部, 获全国商业科技进步奖二等奖 (第 2 名)。



王海燕 (1977-) 河北遵化人, 博士, 教授, 博士生导师, 河北农业大学植物保护学院教师, 植物保护专业负责人, 普通植物病理学教育教学团队负责人, 小麦病害及生物防治创新团队成员。主持国家自然科学基金 2 项, 获得省级二等奖 1 项, 三等奖 1 项。在国内外学术期刊发表科研论文 60 余篇。《Frontiers in Plant Science》《Communications Biology》《分子植物育种》《麦类作物学报》等期刊审稿人。



邢继红 (1977-) 河北东光人, 博士, 教授, 博士生导师, 河北农业大学青年学术带头人, 河北省植物生理与分子生物学会副理事长、省微生物学会常务理事。主要从事植物与病原物互作的分子机制研究。主持国家自然科学基金、教育部博士点专项基金等 10 余项。获省自然科学二等奖 1 项、教育部科技进步二等奖 1 项、省技术发明三等奖 1 项。在《Plant Physiology》《The Crop Journal》等国内外学术期刊上发表学术论文 90 余篇; 获得国家发明专利 5 项。



刘宏权 (1979-) 河北邢台人, 博士, 教授, 硕士生导师, 河北农业大学教学标兵, 水利硕士点学术带头人, 水利系副主任, 学院党委委员。国家现代农业产业技术体系岗位科学家, 国家级科技特派员, 河北省绿色种养循环农业专家组成员, 河北省“三三三人才工程”人选, 河北省水利青年科技带头人。发表相关学术论文 30 余篇, 获批国家专利 30 多项, 获省级科技奖励 5 项。



孙鑫博 (1986-) 河北石家庄人, 博士, 副教授, 博士生导师, 河北省优秀青年基金获得者, 兼任中国草学会草坪专业委员会理事。主要研究方向为草类植物生物技术与分子育种。先后参与国家 863 计划、国家自然科学基金等课题, 目前主持国家自然科学基金、河北省自然科学基金优秀青年项目等。在《Plant Cell & Environment》《BMC Plant biology》等国内外著名期刊上发表学术论文 20 余篇, 其中 SCI 收录 10 余篇。获得发明专利 3 项。《草地学报》编委, 《Frontiers in Plant Science》《Genetics And Molecular Biology》等期刊审稿人。



李国杰 (1983-) 河北张家口人, 河北农业大学校聘教授, 主要研究方向为食用菌种质资源多样性, 遗传育种和驯化栽培。在《Fungal Diversity》《Mycosphere》《Mycological Progress》和《菌物学报》等国内外期刊发表论文 20 余篇, 发表大型真菌新种 21 个, 完成国家自然科学基金青年项目 1 项。