

# 抗 H7N9 流感病毒神经氨酸酶嵌合抗体的制备及初步鉴定

阮菲儿<sup>1</sup> 陈玲玲<sup>1</sup> 秦堃<sup>2</sup> 刘明斌<sup>3,4</sup> 陈海婴<sup>4</sup> 周剑芳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>江西省预防医学重点实验室 南昌大学公共卫生学院 330006; <sup>2</sup>中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 中国国家流感中心, 北京 100052; <sup>3</sup>复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海 201508; <sup>4</sup>南昌市疾病预防控制中心 330038

通信作者: 周剑芳, Email: jfz@cnic.org.cn, 电话: 010-63580764; 刘明斌, Email: mingbinliu@126.com, 电话: 021-37990333-7337

**【摘要】 目的** 制备抗 H7N9 神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的嵌合抗体, 初步鉴定其活性与功能特点。**方法** 采用基因工程技术, 将小鼠杂交瘤技术获得的 2 株特异性靶向流感病毒 A/Anhui/1/2013(H7N9) NA 的单克隆抗体 VH、VL 基因分别克隆入嵌合抗体表达载体 VH Express 及 VL Express 中, 共转染 293T 细胞后, 表达纯化获得抗 H7N9 NA 的嵌合抗体, 对抗体活性及功能进行鉴定。**结果** 获得了两株特异性抗 H7N9 亚型流感病毒 N9 嵌合抗体 1E2 和 3E3, 这两株抗体识别抗原部位相似, 能抑制 NA 酶活性及耐药 N9 神经氨酸酶活性, 体外细胞实验中能抑制病毒释放, 阻止病毒进一步感染细胞。**结论** 本研究构建的两株嵌合抗体能特异性识别 A/Anhui/1/2013(H7N9)的 N9 蛋白,  $K_D$  值达 pM, 并能抑制 N9 酶活性, 为流感抗体制备以及 HAPI 禽流感治疗提供了一种可选择的方法。

**【关键词】** H7N9; 神经氨酸酶; 嵌合抗体

**基金项目:** 国家自然科学基金(81871638, 81660339)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.02.021

## Generation and preliminary characterization of chimeric antibodies against neuraminidase of H7N9 subtype influenza A virus

Ruan Feier<sup>1</sup>, Chen Lingling<sup>1</sup>, Qin Kun<sup>2</sup>, Liu Mingbin<sup>3,4</sup>, Chen Haiying<sup>4</sup>, Zhou Jianfang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jiangxi Provincial Key Laboratory of Preventive Medicine, School of Public Health, Nanchang University, Nanchang 330006, China; <sup>2</sup>Chinese National Influenza Center, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China; <sup>3</sup>Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China; <sup>4</sup>Nanchang Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330038, China

Corresponding author: Zhou Jianfang, Email: jfz@cnic.org.cn, 0086-10-63580764; Liu Mingbin, Email: mingbinliu@126.com, 0086-21-37990333-7337

**【Abstract】 Objective** To develop the chimeric antibodies against neuraminidase (NA) of H7N9 and to identify their biological activity and function. **Methods** The genes of variable regions of the light chain (VL) and heavy chain (VH) obtained by mouse hybridoma technology were cloned respectively into the expression VH and VL vectors bearing human-derived C $\gamma$ 1, and C $\kappa$ 1 and co-transfected into 293T cells. The chimeric antibodies were purified and their functions were investigated. **Results** Two chimeric antibodies, 1E2 and 3E3 against neuraminidase (NA) of H7N9 were obtained. Both antibodies recognized similar antigenic epitopes. MAb 1E2 and 3E3 could prevent the infectivity with H7N9 and H11N9 virus and reduce their size of viral plaque. **Conclusions** The chimeric antibodies specific for N9 could prevent the infection of N9 subtype influenza virus as well as the NAI-resistant mutants and could be a potential immunotherapy approach for H7N9 treatment.

**【Key words】** H7N9; Neuraminidase; Chimeric antibody

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China(81871638, 81660339)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.02.021

流感作为最常见的传染病,由于其高度传染性和快速传播性,通常会导致高发病率和死亡率高,因而对人类健康构成巨大威胁,禽流感则对农业和家禽养殖业造成了巨额的经济损失。2013 年人感染 H7N9 禽流感病毒首次在中国出现,至 2018 年全球共报告了 1 567 例确诊病例,病死率接近 40%。虽然目前尚无证据证明 A(H7N9)能够建立持续的人与人之间的传播机制,但有家庭聚集性病例报告<sup>[1]</sup>,由于其能够结合禽类和人类的  $\alpha 2,3$  和  $\alpha 2,6$  连接的唾液酸受体<sup>[2]</sup>,继而可能引发流感大流行的全球公共卫生问题,对人类健康造成严重的威胁。

流感病毒表面的两种糖蛋白突起,即血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA),是已知在流感疫苗接种或病毒感染时诱导保护性体液免疫反应的主要病毒成分<sup>[3]</sup>。NA 是流感治疗药物的作用靶点之一,针对甲型流感 H7N9 患者的治疗方案目前主要使用 NA 抑制剂(NAI)。然而,与其他流感病毒一样,甲型流感 H7N9 也可能对这些药物产生耐药性<sup>[4]</sup>。因此,单克隆抗体的使用成为目前控制流感病毒感染的一种快速发展的策略,在目前流感病毒的研究领域进展最快。针对 HA 的抗体往往是直接介导中和的,而针对 NA 的抗体则有可能通过阻断 NA 唾液酸酶的活性而降低病毒的复制效率,从而影响病毒的出芽和传播<sup>[5]</sup>。目前针对流感的广谱反应抗体主要靶向病毒 HA 蛋白,与 HA 相比针对 NA 的广谱反应性抗体不多<sup>[6]</sup>,而具有交叉反应性的 NA 抗体在体内也能发挥抗体介导的细胞毒效应。

单克隆抗体(MAb)具有生物相容性强、抗原特异性高、Fc 亚型特异性强等优点,是一类发展迅速的治疗蛋白,具有广泛的临床应用价值<sup>[5]</sup>。目前针对流感病毒的单抗多为鼠抗,且倾向于诊断检测,鼠源单抗的免疫原性反应弱化了临床疗效是其进入临床应用的障碍,尚未出现针对 group 2 NA 广谱反应的抗体,对人源化 NA 抗体研究也鲜有出现。而将鼠抗人源化,减少鼠源基因,能够减少甚至消除异源性反应,为抗体进入临床应用提供可能。本研究采用基因工程技术,从鼠源单抗杂交瘤细胞中克隆了 MAb 的抗体重链(VH)、轻链可变区(VL)基因,构建了人-鼠嵌合轻、重链表达载体,共转染于 293T 细胞中,纯化获得抗 N9 人-鼠嵌合抗体,同时对纯化后的嵌合抗体的特性做了初步鉴定。针对 NA 抗体的保护潜力的研究将有助于深入了解抗体介导的保护

机制,并有助于更好地理解甲型流感病毒感染防护的相关关系<sup>[7]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** Human kidney 293T 细胞及 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 细胞由本实验室保存。实验所用流感病毒为 A/Env/JX/44867 (H7N3) 和 A/Env/JX/28/2009 (H11N9), 重组病毒为 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)、RG A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)、A/Anhui/1/2013 (H7N9) (RG267H7N9)、A/Hongkong/33982/2009 (H9N2) 以及耐药的 H7N9(NA E115 V, R289 K) 病毒。重组 Influenza A H7N9 (A/Anhui/1/2013) Neuraminidase/NA (His Tag) 简称 AH1-N9 购买于北京义翘神州公司。1E2 和 3E3 抗 N9 抗体杂交瘤 1E2 和 3E3 来自文献<sup>[8]</sup>。

**1.2 单克隆抗体的制备及纯化** 共裂解 8 株杂交瘤细胞,提取 mRNA,根据参考文献<sup>[9]</sup>构建。将获得的抗体可变区 VH、VL 基因分别克隆入含人源抗体恒定区 C $\gamma$ 1、C $\kappa$ 1 表达载体中,共转染 293T 细胞后,按已报道的文献<sup>[10]</sup>,纯化抗体。

### 1.3 单克隆抗体的功能鉴定

**1.3.1 抗体结合活性检测:**用间接 ELISA 法测定了抗体的 EC<sub>50</sub> 值,即以重组甲型流感 H7N9 NA 蛋白 1  $\mu$ g/ml,50 ng/孔,4 度过夜,加入梯度稀释好的抗体,室温孵育 1 h。洗涤后加入 HRP 标记山羊抗人 IgG,室温孵育 1 h 后加入 TMB 显色并读取 OD 值。使用流式荧光细胞分选技术(FACS)检测与终浓度为 2.5  $\mu$ g/ml 的嵌合抗体 37 度共同孵育 1 h 后感染流感病毒的 MDCK 细胞。同时使用生物膜干涉技术(BLI)测定了两株抗体亲和力,抗体亲和力的大小可以用亲和力常数 KD 表示。

**1.3.2 NA 酶活抑制实验:**为了明确嵌合抗体是否具有 NA 酶活抑制,用 ELISA 测定嵌合抗体的 IC<sub>50</sub> 的值。96 孔酶标板以 2.5  $\mu$ g/孔包被胎球蛋白,4  $^{\circ}$ C 过夜,不同稀释度的嵌合抗体与稀释好的病毒等体积混合后每孔加入 100  $\mu$ l,置于 37  $^{\circ}$ C 下 16 h,每孔加入 100 ng HRP 标记的花生四烯酸,避光室温下静置 2 h,洗涤后 TMB 显色并读取 OD 值,使用 GraphPad Prism5 进行分析。

**1.3.3 空斑实验:**将 MDCK 细胞接种于 96 孔细胞板中,3 $\times 10^4$  个/孔,待细胞贴壁时接种 JX-H11N9 或 RG 267-H7N9 或 HKH9N2 病毒,在 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 浓

度下孵育 1 h 后,弃去病毒液,PBS 洗两次,每孔加入 100  $\mu$ l 梯度稀释嵌合抗体 1E2 或 3E3。培养 20 h 后,对流感 NP 蛋白染色。室温下 1 h,加入 HRP 标记的抗小鼠抗体染色。室温下 1 h 后,加入含有 0.03% 去内毒素  $H_2O_2$  的 TrueBlue 试剂,显色 30 min,弃去染色液,流水冲洗。每孔随机选取 10 个斑块测量其平均大小,每个斑块随机选取 3 个方向使用 Image J 软件测量平均直径,使用 GraphPad Prism5 进行分析。

1.3.4 竞争 ELISA 鉴定抗体结合部位:对嵌合抗体 1E2 进行生物素标记,根据参考文献[8]进行标记。使用 Nanodrop 定量生物素标记抗体浓度,命名为 BIO-1E2,ELISA 检测获得  $EC_{50}$  值。将未标记的 1E2 或 3E3 从 100  $\mu$ g/ml 开始做 2 倍比稀释与  $EC_{50}$  浓度的 BIO-1E2 等体积混合后加入以重组甲型流感 H7N9 NA 蛋白包被的酶标板。室温避光静置 1 h 后,加入 HRP 标记的链霉亲和素,室温避光静置 1 h 后,TMB 显色并读取 OD 值。

## 2 结果

### 2.1 人源化抗体的遗传信息和部分鼠单抗信息

共挑选 8 株杂交瘤细胞构建抗体基因文库。初筛结果显示 1E2 和 3E3 克隆孔为 AH1-N9 阳性,两孔扩

增各获得一对重链和轻链,其基因信息如表 1 所示。

2.2 抗体结合活性检测结果 使用间接 ELISA 鉴定嵌合抗体对抗原的结合活性,获得其  $EC_{50}$  值。FACS 结果显示,两株嵌合抗体只与 N9 亚型的流感病毒感染的 MDCK 细胞结合。生物膜干涉技术 (BLI) 结果显示两株嵌合抗体具有非常强的亲和力 (见表 2)。

2.3 抗体 NI 功能性检测结果 使用 ELISA 检测嵌合抗体对 NA 酶活性抑制情况<sup>[11]</sup>。两株嵌合抗体均能抑制病毒神经氨酸活性,且都能抑制对 NA1 耐药的 H7N9 (NA E115 V, R289 K) 病毒的 NA 酶活<sup>[12-13]</sup> (见表 3)。

2.4 空斑实验结果 抗 NA 抗体通常不能减少噬斑数量但是会限制病毒释放,因此本研究测量了经病毒感染后的 MDCK 细胞与抗体孵育后斑块大小减少百分比<sup>[7]</sup>。本研究发现感染 RG267-H7N9 和 JX-H11N9 病毒的 MDCK 细胞与嵌合抗体 1E2 和 3E3 共同孵育后的斑块显著减小,对病毒释放进一步感染细胞具有显著的抑制作用。1E2 和 3E3 对 RG267-H7N9 的  $IC_{50}$  分别为 0.872  $\mu$ g/ml, 0.012  $\mu$ g/ml。1E2 对 JX-H11N9 病毒的  $IC_{50}$  分别为 0.381  $\mu$ g/ml, 当 3E3 的浓度低于 0.01  $\mu$ g/ml 时,对 JX-H11N9 病毒仍有较强的抑制作用 (图 1)。

表 1 部分鼠单抗信息和人源化抗体的基因信息

Tab.1 The genetic information of murine monoclonal antibodies and chemiric antibodies

抗体克隆号	鼠单抗信息		人源化抗体基因信息					CDR 残基数
	AH1-N9 -binding	RGH6N9-NI ( $IC_{50}$ , $\mu$ g/ml)	V 片段	V 片段变异度 (%)	D 片段	J 片段	J 片段变异度 (%)	
1E2	+	3	VH3-2 * 02 F	4.51	DH2-4 * 01 F	JH4 * 01 F	5.46	9.7.18
			V $\kappa$ 12-44 * 01 F	1.43	-	J $\kappa$ 4 * 01 F	8.57	6.3.9
			VH1S34 * 01 F	3.46	-	JH2 * 01 F	4.17	8.8.10
3E3	+	5	V $\kappa$ 5-39 * 01 F	4.66	-	J $\kappa$ 2 * 01 F, or J $\kappa$ 5 * 01 F	10.53	6.3.9

表 2 嵌合抗体的结合特异性

Tab.2 Binding specificity of chemiric antibodies

抗体克隆号	AH1-N9 间接 Elisa ( $EC_{50}$ , $\mu$ g/ml)	流式细胞仪检测						AH1-N9 亲和力常数		
		PR8	JX-	GD003-	RG267-	HK2009-	JX-	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
		H1N1	H7N3	H7N9	H7N9	H9N2	H11N9			
1E2	0.048	-	-	+++	+++	-	++	3.73E+5	<1.0E-07	<1.0E-12
3E3	0.028	-	-	+++	+++	-	+++	3.73E+5	<1.0E-07	<1.0E-12

注:“-”表示结合率在 5% 以下,“+”表示结合率为 5%-10%，“++”表示结合率为 10%-50%，“+++”表示结合率为 50% 以上。 $K_a$ : 平衡常数; $K_d$ : 平衡解离常数; $K_D$ : 亲和力常数 ( $K_D = K_d / K_a$ ), 亲和力常数越小说明其抗体结合能力越强

Note: “-” indicates that the binding ratio is under 5%; “+” means that the binding ratio is 5%-10%; “++” means that the binding ratio is 10%-50%, and “+++” means that the binding ratio is 50% or more.  $K_a$ : Equilibrium Constant;  $K_d$ : Equilibrium Dissociation Constant;  $K_D$ : Affinity Constant, the lower the affinity constant, the stronger the antibody binding ability



**表 3** 嵌合抗体对流感病毒的神经氨酸酶抑制能力  
**Tab.3** Neuraminidase inhibitory effect against NA subtype influenza virus

抗体克隆号	流感病毒亚型							
	RG267	GD003	JX	ZJ	E115 V	R289 K	PR8	HK
	H7N9	H7N9	H11N9	H7N9	H7N9	H7N9	H1N1	H9N2
1E2	1.769	7.030	2.222	2.041	1.361	4.513	>100	>100
3E3	0.055	0.118	0.069	0.045	5.740	0.440	>100	>100

注:表中数值为 IC<sub>50</sub>(μg/ml);;E115 V, R289 K 为 N9 变异

Note: The values in the table are IC<sub>50</sub>; the NAI-resistant H7N9 viruses with aa substitutions in NA, E115 V and R289 K are listed

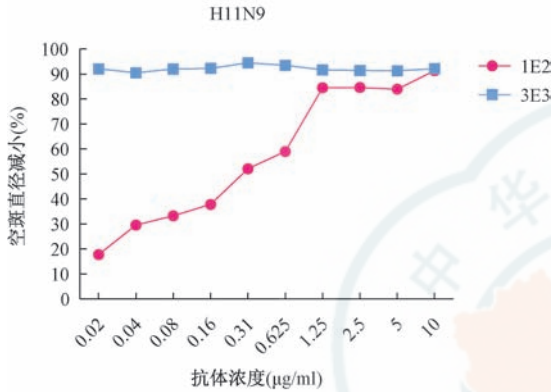


图 1 两株嵌合抗体空斑减小百分比

Fig.1 Activity of two chimeric antibodies in plaque assay.

**2.5 抗体结合表位检测结果** 我们采用了竞争 ELISA 法鉴定两株嵌合抗体的抗原识别表位是否一致<sup>[14]</sup>。1E2 与 3E3 存在较强的竞争抑制作用,以饱和浓度 1E2、3E3 同生物素标记的抗体 BIO-1E2,抑制率达 95% 以上,因此嵌合抗体 1E2 与 3E3 的抗原识别相似的表位。(见图 2)结合 NI 实验的结果,两株抗体都能抑制对 NAI 耐药的 H7N9 (NA E115 V, R289 K)<sup>[12-13]</sup>,推测 1E2 和 3E3 的抗原识别表位可能在 NA 的 115 和 289 位点上。

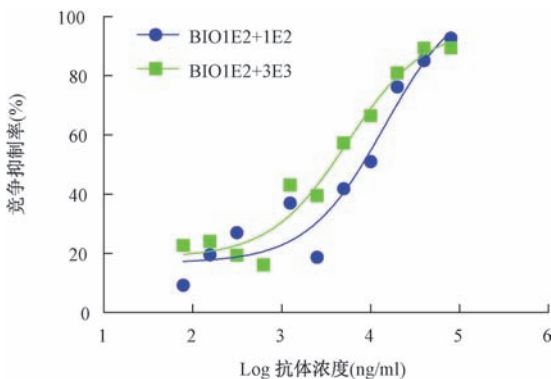


图 2 抗体 1E2 与 3E3 竞争 ELISA 结果

Fig.3 Competition of 1E2 and 3E3 antibodies binding by ELISA

### 3 讨论

针对 NA 活性部位的抗流感药物已经使用了 10 多年,但 HAPI H7N9 的出现对 NAI 的多种药物产生了耐药。尽管一些研究表明 NA 抗体能够降低疾病的严重程度并诱导长期和交叉保护性免疫,但国内外针对 NA 抗体的研究普遍较少。目前国内针对 H7N9 病毒治疗药物的研究多集中于 HA 蛋白,像已报道的江苏省疾控等机构的专利研究都是识别并结合 H7N9 的 HA 蛋白的抗体,而于悦洋等<sup>[8]</sup>研究的针对 H7N9-NA 的抗体也侧重于诊断检测。关于 NA 抗体的研究多集中于国外,如抗 NA 单克隆抗体 3c10-3 能保护小鼠抵御甲型流感 H7N9 的攻击,并能降低已经感染 H7N9 小鼠的发病率和死亡率,具有治疗该感染的潜力,可替代目前的 NA 抗病毒抑制剂,也可与目前的 NA 抗病毒抑制剂联合使用,这是第一株有治疗活性的抗 N9 MAbs<sup>[5]</sup>。但国外针对 NA 蛋白的抗体多来源于鼠源单抗,人源单抗较少见,对于人源化的单抗也未见报道。而有趣的是,越来越多的研究表明 NA 是未来流感疫苗的有希望的目标。

在临床治疗中,鼠源性单抗可能产生抗鼠源免疫球蛋白的抗体从而降低了其临床应用价值。相关研究表明,在保留鼠抗功能的同时,对其进行人源化改造,将保留鼠抗的可变区,将其 Fc 段替换为人的,从而降低其在应用于临床治疗时引起的人抗鼠抗体反应 (HAHA) 反应,减弱了其免疫原性,而且更加安全高效,在临床应用中具有极大的潜力<sup>[15]</sup>。本研究获得了两株抗 N9 人-鼠嵌合抗体,两株抗体均能对多种亚型流感病毒的 N9 有较强的结合活性,具有非常强的亲和力,并均能抑制病毒 NA 活性,且都能抑制对 NA 抑制剂耐药的 H7N9 病毒的 NA 酶活性。

ELISA 结果显示,嵌合抗体 1E2 及 3E3 结合 N9 抗原的 EC<sub>50</sub> 分别为 0.048 μg/ml、0.028 μg/ml,流式

细胞术结果显示两株嵌合抗体只与 N9 亚型的流感病毒感染的 MDCK 细胞结合,表明 1E2 和 3E3 为 N9 特异性结合抗体。抗体功能检测结果表明,两株嵌合抗体均能抑制病毒 NA 活性,对 NA 抑制剂耐药的 H7N9(NA E115 V, R289 K) 病毒也具有较强的 NA 酶活性<sup>[12-13]</sup>, IC<sub>50</sub> 的浓度值均处于较低的水平。两株嵌合抗体结合表位的初步研究发现,3E3 和 1E2 之间存在竞争抑制,表明两株抗体的结合部位基本相似。同时空斑实验结果表明,两株抗体均能够抑制 H7N9 病毒释放,阻止病毒进一步感染细胞。这些结果间接说明 3E3 和 1E2 的功能相似,因而结合 NA 的部位相似。但无论是在抑制 NA 活性上还是空斑实验的结果,3E3 均表现出更强的功能作用,但二者均表现很强的亲和力没有差异。本实验室将对二者产生功能差异的原因做更进一步的研究,研究鉴定 1E2 和 3E3 的具体结合表位以及二者是否具有体内保护作用 and ADE 功能,探索抗 NA 抗体宿主选择压力作用下的逃逸突变找出其关键作用位点。

对症支持治疗和 NA 抑制剂是目前针对人感染 H7N9 病毒的主要治疗方案。随着对 NA 抑制剂耐药的 HAPI 流感病毒的出现,研究制备安全、高效的抗 NA 抗体是今后流感科研工作的重中之重。本实验室构建了抗 N9 嵌合抗体基因表达载体,并在 293T 细胞中转染表达抗 N9 嵌合抗体。纯化后的抗 N9 抗体能够特异性识别 N9 抗原,且具有较好地抑制 N9NA 活性,体外细胞实验中能够抑制病毒释放,阻止病毒进一步感染细胞。同时,嵌合抗体既保留了鼠抗的功能特性,又减弱了其对人体的异源性,为流感抗体制备以及 HAPI 禽流感治疗发展提供了一种可选择的方法,也为其临床应用提供了一定的依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 阮菲儿:参与设计实验,实施研究,收集、分析、解释数据并进行文章撰写;陈玲玲、秦堃、陈海婴:文章修改;周剑芳、刘明斌:设计实验,指导写作,提供研究经费

#### 参考文献

[ 1 ] Cowling BJ, Jin L, Lau EH, et al. Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases [J]. *Lancet*, 2013, 382 (9887): 129-137. DOI: 10.1016/

- S0140-6736(13)61171-X.
- [ 2 ] Shi Y, Wu Y, Song H, et al. Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses [J]. *Science*, 2013, 342 (6155): 243-7. DOI: 10.1126/science.1242917.
- [ 3 ] Toshi PK, Jacobson RM, Poland GA. Influenza vaccines: From surveillance through production to protection [J]. *Mayo Clin Proc*, 2010, 85(3): 257-273. DOI: 10.4065/mcp.2009.0615.
- [ 4 ] Cheng PKC, Leung TWC, Ho ECM, et al. Oseltamivir and Amantadine resistant influenza viruses A (H1N1) [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15 (6): 966-968. DOI: 10.3201/eid1506.081357.
- [ 5 ] Wilson JR, Guo Z, Reber AK, et al. An influenza A virus (H7N9) anti-neuraminidase monoclonal antibody with prophylactic and therapeutic activity in vivo [J]. *Antivir Res*, 2016, 135: 48-55. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.10.001.
- [ 6 ] Wohlbold TJ, Kira AC, Veronika K, et al. Broadly protective murine monoclonal antibodies against influenza B virus target highly conserved neuraminidase epitopes [J]. *Nat Micro Bio*, 2017, 2(10): 1415-1424. DOI: 10.1038/s41564-017-0011-8.
- [ 7 ] Wohlbold TJ, Veronika T, Gene SM, et al. Hemagglutinin Stalk- and Neuraminidase-specific monoclonal antibodies protect against lethal H10N8 influenza virus infection in mice [J]. *J Virol*, 2015, 90(2): 851-861. DOI: 10.1128/JVI.02275-15.
- [ 8 ] 于悦洋, 谢怡然, 陈迎株, 等. H7N9 流感病毒神经氨酸酶特异性单克隆抗体的制备及其应用研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2017, 31 (1): 66-70. DOI: 10.3760/cma. i. issn. 1003-9279. 2017. 01. 014.
- [ 9 ] Tiller T, Busse CE, Wardemann H. Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells [J]. *J Immunol Methods*, 2009, 350(1-2): 183-193. DOI: 10.1016/j.jim.2009.08.009.
- [ 10 ] 孙颖, 白天, 李梓, 等. 来源于 H5N1 患者的 VHI-2 编码广谱抗体的筛选与功能研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2018, 32 (2): 136-139. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1003-9279.2018.02.006.
- [ 11 ] Couzens L, Gao J, Westgeest K, et al. An optimized enzyme-linked lectin assay to measure influenza A virus neuraminidase inhibition antibody titers in human sera [J]. *J Virol Methods*, 2014, 210: 7-14. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.09.003.
- [ 12 ] Hu YW, Lu SH, Song ZG, 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: 2273 - 79. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61125-3.
- [ 13 ] Sleeman K, Guo Z, Barnes J, et al. R292K substitution and drug susceptibility of influenza A (H7N9) viruses [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19 (9): 1521-1524. DOI: 10.3201/eid1909.130724.
- [ 14 ] Wang L, Shi W, Chappell J D, et al. Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the middle east respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape [J]. *J Virol*, 2018, 92 (10). DOI: 10.1128/JVI.02002-1.7.
- [ 15 ] Kondro W, Sibbald B. Patient demand and politics push Herceptin forward [J]. *CMAJ*, 2005, 173 (4): 347-348. DOI: 10.1503/cmaj.050883.

(收稿日期:2019-01-21)

(本文编辑:唐浏英)