

# 抗 HIV-1 中和抗体的研究进展

许四宏<sup>\*\*</sup>, 王佑春

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

## Progress in Neutralization Antibody against HIV-1

XU Si-hong<sup>\*\*</sup>, WANG You-chun

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

关键词: HIV-1; 中和抗体; 中和试验

中图分类号: S512.91

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)03-0329-06

自 1982 年美国疾病预防控制中心 (CDC) 对那些与免疫缺陷和卡氏肺囊虫肺炎等症状有关的病例命名为获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 以来, 研究者们对预防和治疗性 AIDS 疫苗的研究进行了不懈的努力, 实验中的疫苗包括 env 亚单位疫苗、减毒活疫苗、灭活疫苗、DNA 疫苗等等, 但至今尚没有一种疫苗能获得理想的免疫效果。最近研究者们对中和抗体 (Neutralization antibody, nAb.) 在 HIV-1 感染中的作用的研究结果让人们看到一些新的曙光。

尽管对 nAb 是否在预防 HIV-1 感染过程中具有保护作用存在争议, 但是仍然有不少的研究者在 nAb 方面展开了大量的工作, 以期获得不仅可以预防感染, 同时还可以控制已建立的感染的中和抗体。这些工作主要包括两个方面<sup>[1]</sup>: 一是分离出来了稀有的、针对 HIV-1 env 糖蛋白保守的中和表位并具有广泛中和作用的人源抗体 (如人源抗 HIV-1 单克隆抗体, mAb), 从而证明 HIV-1 感染者体内可以产生中和性抗体; 其二是证明了这些 mAbs 经被动免疫后可以保护随后对短尾猴进行的病原性 SHIV 的攻击, 可见中和抗体在 HIV-1 感染的过程中仍然具有重要的中和保护作用。

本文就近来有关抗 HIV-1 中和抗体方面的一些研究进展作一介绍。

## 1 当前中和抗体的研究现状

早期, 研究者发现用抗 HIV 抗体进行免疫的方法对预防或者控制 HIV-1 的感染是无效的, 随着单克隆抗体技术的发展, 包括杂交瘤技术、B 细胞转化和细胞融合技术、基因工程抗体技术等, 许多研究者

报道获得了抗 HIV-1 抗体株, 但是, 其中只有很少一部分抗体具有中和活性, 而且只对相应的病毒株发生中和作用或者中和作用很弱。目前比较公认的具有广泛中和活性的抗体主要有: IgG1b12, 2G12, 2F5, 4E10 和 447-52D 单抗, 下面作简单介绍。

### 1.1 IgG1b12 单抗

IgG1 b12 是第一个被证明具有广泛中和活性的 mAb, 它来源于噬菌体展示文库, 为人源 mAb, 其表位为 CD4 结合位点, 并受 V2 环的影响。CD4 结合域 (CD4 binding domain, CD4bd) 位于 GP120 上, 为一高度保守、复杂的区域, 具有构像依赖性, 负责病毒与 CD4 分子的相互作用。该区域包括四个不同的部分, 在折叠形成二级结构的过程中聚集在一起, 紧密相邻, 形成一个表位簇 (Epitope cluster)。目前已经分离出多株针对该区的单抗 (如: 559/64D, 15e), 但除 IgG1b12 外, 它们均不具有中和作用, 这可能是由于 IgG1b12 具有独特的空间结构。IgG1b12 的晶体结构<sup>[2]</sup> 显示, 它具有一个异常的伸展出的 CDR3 环, 该 CDR3 环可以很容易与 gp120 的 CD4 结合位点发生相互作用, 表现出中和作用。IgG1b12 可以中和大多数不同亚型的 HIV-1 PI 病毒株, 尤其是 B 亚型的 HIV-1 病毒株, 对大多数 HIV-1 PI 株而言, 该抗体中和效力的生理学浓度为 25 $\mu$ g/ml。对 35 株 PI 株 (其中包括来自于美国以外国家的 PI 株) 进行分析, 发现 IgG1b12 对这 35 株病毒均具有中和作用<sup>[3,4]</sup>; Burton 等<sup>[5]</sup> 用假病毒中和试验的方法研究了部分抗体对 33 株 HIV-1 B 亚型 PI 病毒株以及 90 株包括 HIV-1 所有亚型的 PI 株的中和作用, 发现 IgG1 b12 分别中和其中的 22

收稿日期: 2004-10-18, 修回日期: 2004-01-18

<sup>\*\*</sup> 通讯作者: 许四宏 (1972-), 男, 助理研究员, 湖北武汉籍, 从事 HIV-1 基因工程抗体的研究及相关试剂的评价。

Corresponding author. Tel: 010-67017755-360. E-mail: xush02@163.com

株和 45 株,提示此抗体具有广泛的中和作用。IgG1b12 通过与 CD4 结合位点的结合阻止 HIV-1 与靶细胞的结合与融合,但是 Fab 形式的 b12 单抗则可能抑制病毒与靶细胞融合后的某些过程<sup>[6]</sup>,提示同一抗体的不同形式,其中和机制可能不同。

### 1.2 2G12 单抗

2G12 来源于 EB 病毒转化后的 HIV-1 感染者 B 细胞,筛选所得阳性克隆与人鼠异源杂交瘤细胞 CB-F7 融合,所得的融合细胞可以表达产生 2G12。2G12 中和表位比较复杂,其表位具有甘露糖(Man)依赖性,主要由糖类组成,与 CD4 结合位点呈正交性,并与辅助受体结合面毗邻,该抗体也能广泛中和 PI 株。Souza 等<sup>[7]</sup>利用 PBMC p24 中和试验方法对 2G12 的中和作用进行评价发现,在浓度 25 $\mu$ g/mL 时,2G12 可以中和 9 株 HIV-1 PI 株中的至少 4 株;Burton 等<sup>[5]</sup>用假病毒中和试验的方法研究了其对 33 株 HIV-1 B 亚型 PI 病毒株和 90 株包括 HIV-1 所有亚型的 PI 株的中和作用,发现 2G12 分别中和其中的 22 株和 37 株,中和作用也相当广泛。晶体结构研究发现,2G12 以多价的形式与保守的一簇寡聚体甘露糖形式的糖类相互作用,但是该中和表位的抗原性极弱<sup>[3,7]</sup>。推测其可能通过抑制 gp120 与 CCR5 辅助受体的相互作用而发挥中和作用<sup>[8]</sup>。

### 1.3 2F5 单抗

目前已经分离了对 gp41 的人 2F5 单抗,具有广泛地中和活性,能中和多种不同的 HIV-1 PI 病毒株,其识别 gp41 C 末端的线性表位,序列为 EL-DKWA,然而该序列并不存在于所有的 HIV-1 PI 株中,其中和作用也不如 b12 和 2G12 广泛<sup>[3,7]</sup>。Souza 等利用 PBMC p24 中和试验对 2F5 的中和作用进行评价发现,在浓度 25 $\mu$ g/mL 时,2F5 也可以中和 9 株 HIV-1 PI 株中的至少 4 株。但是 Burton 等<sup>[5]</sup>用假病毒中和试验的方法研究了部分抗体对 33 株 HIV-1 B 亚型 PI 病毒株和 90 株包括 HIV-1 所有亚型的 PI 株的中和作用,发现 2F5 分别中和其中的 24 株和 60 株,其中和作用似乎比 IgG1b12 和 2G12 还高,原因尚未知。研究发现其中和表位 ELDKWA 为“过渡态表位”(transitional epitopes),只在病毒感染过程的某一特定时间暴露,在完整的病毒颗粒以及病毒感染的细胞膜上,该中和表位几乎不暴露,而且该表位的免疫原性极弱,并且只能在特定的分子构型下才能发挥功能,但这种分子构型同时又减弱了将抗原提呈给免疫系统的效率。2F5 抑制病毒颗粒与靶细胞的结合,提示 2F5 可能干扰融合过程中较晚的阶段,推测其中和机制可能是抑

制病毒/细胞膜的融合。

### 1.4 4E10 单抗

Zwick 等<sup>[9]</sup>报道,针对 gp41 的单抗中,除了 2F5,还有 4E10 和 Z13 也具有广泛中和活性。原始的 4E10 为 IgG3 抗体,来源于转化后的 PBMC 细胞与人鼠异源杂交瘤细胞融合后产生的融合细胞,在抗体血清学评价项目(antibody serological project, ASP)中发现 4E10 可以中和某些实验室病毒株,随后改型为 IgG1 表达,表达后的 IgG1 型的 4E10 明显升高其中和活性。尤其值得注意的是,改型后的 IgG1 4E10 可以中和来源于 2F5/2G12 I 期临床试验中的 HIV-1 感染者的病毒株。4E10 识别与 2F5 表位羧基末端相邻的区域,其表位为 NWFDTI。用外周血单个核细胞(PBMC) p24 中和试验比较了 4E10、2F5、2G12 和 IgG1b12 对包括 TCLA 和 PI 病毒株在内的 22 株病毒株的中和作用,发现与 2F5 和 2G12 相比,4E10 能以较低的浓度中和这些病毒。推测其中和机制可能是通过阻止 gp41 卷曲-卷曲(coiled-coil)的形成,或者阻止那些由 gp41 介导的可导致病毒/细胞膜融合的一些变化发挥作用。与 4E10 相类似,Z13 识别的表位也是针对 gp41,其表位和 2F5 表位相邻。另外,一些其他的抗 gp41 单抗也具有中和作用,包括识别表位跨过 gp41 末端免疫显性环的二硫键的 Clone3<sup>[4]</sup>、F105 等,但是中和作用远不如 2F5 和 4E10。

### 1.5 447-52D 单抗

长期以来,研究者们一直认为,gp120 V3 区是一个主要的含有中和决定簇的区域,但是,有关该区的中和抗体的报道却相对较少。1992 年 Gorny 等<sup>[10]</sup>报道了针对 V3 环的单抗 447-52D,来源于 EB 病毒转化的、HIV-1 感染者的 B 细胞,为 IgG3/ 型单抗,其中心表位为 GPXR(V3 环 312-315 残基)。与随后报道的一些抗 V3 单抗不同,447-52D 还可以中和 HIV-1 X4 和 R5 PI 病毒株。通过与其他抗 HIV-1 单抗比较,发现 447-52D 同样具有一个较长的 CDR H3(20aa),而 b12 为 18aa、2F5 为 22aa、X5 为 22aa、17b 为 19aa,推测长的 CDR H3 可能更好的与 gp120 上相应的表位发生作用。2002 年 Gorny 等<sup>[11]</sup>又报道了 6 个具有中和活性的抗 gp120 V3 环单抗。用 EB 病毒转化 HIV-1 感染者的 B 细胞后经 ELISA 检测筛选到这些单抗,筛选抗原为 V3 融合肽(V3-FP),阳性克隆随后与人鼠异源杂交瘤细胞 SHM-D33 融合,进行表达相应的抗体。竞争 ELISA 检测分析,发现其表位定位于 V3 环的顶端。病毒捕获实验证明它们可以和 HIV-1 A、B、C、

D、F 亚型病毒株结合。经 GHOST 细胞中和试验、PHA 刺激的 PBMC p24 中和试验以及 Luci 中和试验检测这些抗体对 16 株来源于 HIV-1 M 组 A ~ F 亚型的病毒株的中和作用,发现它们对 HIV-1 A、B、F 亚型病毒株具有较强的交叉中和作用,对 HIV-1 C、D 亚型病毒株的中和作用较弱,对 HIV-1 E 亚型的病毒株无中和作用。另外,报道抗 V3 环单抗 58.2 也具有中和作用<sup>[5]</sup>。

其他也有一些有关中和性单抗的报道<sup>[5]</sup>,如针对 CD4i 表位(CD4 诱导的表位)的 X5<sup>[12]</sup>、17b 和 E51 等。表 1 列出了目前研究的一些主要的中和性抗 HIV-1 单抗。有趣的是,17b 的 Fab 形式和 scFv 形式的片断比全抗体形式具有更有效的中和活性,提示某些抗体的小分子可能更易进入抗原分子并与相应的表位相互作用。Burton 等<sup>[5]</sup>用假病毒中和试验比较了部分单抗的中和作用,结果见下表(表 1):

表 1 单抗对 HIV-1 的交叉中和作用

Table 1 Cross-neutralizing properties of a panel of human mAbs to HIV-1

Virus	IgG1b12	2G12	2F5	4E10	B6	447-52D	58.2	X5
Clade B (total = 33)	22 (73 %)	22 (73 %)	24 (80 %)	30 (100 %)	5 <sup>5</sup> (17 %)	14 (47 %)	10 (33 %)	3 <sup>3</sup> (10 %)
All Clade (total = 90)	45 (50 %)	37 (41 %)	60 (67 %)	90 (100 %)	5 <sup>5</sup> (6 %)	17 (19 %)	10 (11 %)	3 <sup>3</sup> (3 %)

用假病毒中和试验(pseudovirus neutralization assay)在抗体浓度 < 50μg/mL 时达到 50%中和效果的即判定为阳性。  
By pseudovirus neutralization assay, neutralization is considered 50% neutralization is achieved at a mAb concentration of less than 50μg/mL.

## 2 抗体中和作用的体内评价

在研究被动免疫在 HIV-1 感染中的作用的过过程中,许多研究者都应用动物模型对抗体的中和作用进行了评价(见表 2),这些抗体(或者抗体联合)的被动免疫试验证明,某些抗体的联合免疫可以完全保护病毒的感染,或者预防、延迟机体免疫缺陷的发生(见表 2)。在被动免疫对母婴传播途径的预防试验中,单抗的联合使用可以使 10 只新生猴中的 7 只获得针对口服病毒的保护,2 只猴获得对疾病的保护作用,仅仅只有一只无保护作用,提示单抗在预防母婴传播中有重要保护作用。而且,应用 IgG1b12 被动免疫 hu-PBL-SCID 小鼠发现, IgG1b12 在高剂量(10mg/kg)时可以完全中和多种 HIV-1 TCLA 病毒株和 PI 病毒株,提示中和抗体对 HIV-1 感染的免疫保护具有重要作用。所有这些中和抗体的体内试验结果显示,在一定程度上,中和性单抗对预防 HIV-1 的感染具有重要的作用。与体外中和试验的结果一致的是,多种单抗联合使用一般会产生协同中和作用,其中和作用明显比单一单抗强。Lehman 等通过体外中和试验发现, IgG1b12 本身即使在高剂量也不能中和 SHIV89.6P,但是与 2F5/2G12 联合,可以有效的中和 SHIV89.6P; Xu 等<sup>[21]</sup>也通过体外中和试验发现, IgG1b12/2G12/2F5/4E10 联合使用能中和所有受试的 20 株 HIV-1 C 亚型 PI 病毒株,而且,对其中

表 2 部分中和性单抗的保护作用在非人灵长类动物中的试验

Table 2 Passive immunoprophylaxis with human nmAbs in primates

Route of challenge	Virus strain	NmAbs	Animal Species	Outcome of challenge	References
Intravenous	SHIV-vpu +	F105 + 2G12 + 2F5	Rhesus macaques	4/4, protectin from infection	13
	SHIV89.6PD	2F5	Rhesus macaques	1/3 protection from disease, 2/3 no protection	14
		2G12	Rhesus macaques	3/3 protection from disease	
		2G12 + 2F5 2G12 + 2F5 + HIVIG	Rhesus macaques	3/3 protection from disease 3/6 protectin from infection, 3/6 protection from disease	
	HIV-1 PI 5016	2F5	Chimpanzee	2/2 delay, low-level of infection	15
HIV-1 B	C 1	Chimpanzee	2/2 protectin from infection	16	
Oral	SHIV89.6PD	IgG1b12 + 2G12 + 2F5	Neonatal Rhesus macaques	1/4 protectin from infection, 2/4 protectin from disease, 1/4 no protection	17
	SHIV-vpu +	F105 + 2G12 + 2F5	Neonatal Rhesus macaques	2/2 protectin from infection; 4/4 protectin from infection protectin from disease	17 18
Intravaginal	SHIV <sub>162P4</sub>	IgG1b12	Rhesus macaques	Dose-dependent protection from infection:	19
		25mg/kg		4/4 protectin from infection	
		5mg/kg		2/4 protectin from infection, 2/4 reduced or delayed viremia	
	1mg/kg	4/4 no protection			
SHIV89.6PD	2G12	Rhesus macaques	2/4 protectin from infection, 2/4 protectin from disease	20	
G12 + 2F5 2G12 + 2F5 + HIVIG	Rhesus macaques		2/5 protectin from infection, 3/5 protectin from disease 4/5 protectin from infection, 1/5 protectin from disease		

的 14 株还能产生完全的中和作用;Zwick 等<sup>[22]</sup>也证明对其他的一些 HIV-1 B 亚型 PI 株也存在相似的协同中和作用。用 2F5、2G12 以及 HIV 免疫球蛋白被动免疫猴,再用 SHIV 对 26 只猴(macaques)进行攻击,结果有 14 只可以完全保护其免受 SHIV 的感染。而人抗体 F105、2G12 和 2F5 的组合可以完全抑制粘膜 SHIV-1 的感染。这些实验提示中和抗体还是能够提供有效的保护作用,尽管目前抗体被动免疫的应用还受到一些条件的限制,但是 HIV 中和抗体还是具有诱人的前景的<sup>[23]</sup>。所有这些实验数据,都为进行人体单抗的临床试验提供了可靠的基础。

但是研究发现<sup>[24]</sup> F105/ IgG1b12/ 2G12/ 2F5 四联单抗对 SHIV89. 6P 的协同中和作用明显比 IgG1b12/ 2G12/ 2F5 三联单抗低,究其原因可能是 F105 和 IgG1b12 识别的表位相邻并部分重叠,使得它们产生竞争性抑制作用,从而降低了协同中和作用。由此可见,联合使用的抗体的识别表位不能有重叠。

Zwick 等<sup>[22]</sup>认为,产生协同作用的机制主要有两个:一是不同的抗体联合使用作用于同一个病毒颗粒,但作用于非重叠的表位,导致抗体对病毒颗粒的结合通力协调,或者使病毒颗粒产生构象变化,增加抗体对病毒颗粒的亲合力,进而增强抗体的中和作用;第二是抗体作用于不同的病毒颗粒,抗体的联合可以识别更大范围的 HIV-1 准种,产生强效的针对包含有多种不同 HIV-1 准种的异源 HIV-1 的中和作用。

1998 年,Cavacini 等<sup>[25]</sup>报道中和性单抗 F105 在 I 期临床试验中是安全的,2002 年,Armbruster 等<sup>[26]</sup>报道了它们完成的 2F5/ 2G12 联合使用进行 I 期人体临床试验的结果,这也是中和抗体联合使用首次在人体进行临床试验。结果证明该制剂对 HIV-1 感染者是安全的。随后,Stiegler 等<sup>[27]</sup>又评价了这些单抗在体内的抗病毒活性。研究发现,所有这些受试者经 ELISA 检测发现有强烈的补体激活,CD4<sup>+</sup> T 和 CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> 比率短暂升高,7 名受试者中 5 名病毒载量短暂减少,同时发现仅仅有针对 2G12 的中和逃逸作用。可见要想获得比较理想的免疫保护作用,可能还需要设计更合理的大规模临床试验,以便改进抗体的治疗方案获得最佳抗病毒效应。改进暴露后免疫的时间,或许也是获得完全保护作用的一个重要因素。据 2003 年 Nishimura 等<sup>[28]</sup>报道,他们比较了在短尾猴中静脉注射 SHIV 后不同时间被动免疫高滴度抗 HIV-1 中和

抗体对获得完全免疫保护作用的影响,发现在 4 只暴露后 6h 免疫抗体的短尾猴中,有 3 只获得完全免疫保护作用,而另外 2 只在感染后 24h 被动免疫,结果全部感染 SHIV,提示暴露后迅速获得高水平的中和抗体可能是获得完全免疫保护作用的一个重要因素。Stiegler 等<sup>[27]</sup>评价 2F5/ 2G12 在人体的抗病毒活性的实验中发现有对 2G12 的中和逃逸作用,提示仅仅有 2F5/ 2G12 可能还不足以获得最佳的抗病毒效应,还需要结合其他的一些中和抗体(如 4E10 或/和 IgG1b12 等)联合使用。体外中和试验发现,来自这 7 名受试者的病毒株中,4E10 可以中和 7 个,IgG1b12 可以中和 5 个,体外协同实验也证明 4E10/ 2F5/ 2G12 具有高度的协同中和作用。

有趣的是,Cavacini 等<sup>[29]</sup>研究发现,在体外中和试验中,非中和性抗 gp41 单抗 F240 在与 HIV-1 R5X4 病毒株预孵育后可以明显增强 CD4i 单抗 2F5 对 R5X4 病毒株的结合和中和作用,相似的结果在 HIV-1 R5 病毒株中也得以证实,提示非中和性单抗在免疫预防中也是一个不可忽视的重要因素。

### 3 体外中和试验<sup>[7,30~35]</sup>

随着免疫学、组织化学、分子生物学等技术的发展,多种不同的 HIV-1 体外中和试验方法相继建立,表 3 对目前一些主要的中和试验方法进行了比较。

表 3 当前主要中和试验方法的比较

Table 3 Features of HIV-1 neutralization assay

	Single/ multi	Reproducible	Sensitivity	Physiologic	Flexibility	Speed	Ease
PBMC P24	M	+	+	++	+	+	+
TCLA P24	M	++	++	+	+	+	++
Intrap24	S/M	++	++	++	+	++	+
Plaque(U87)	S	?	+	+	+	++	+
GHOST	S/M	++	+	+	+	++	+
Luciferase	S	++	++	+	++	++	+

Single/ multi 中 S 和 M 分别代表单轮和多轮感染

Single/ multi shows single round or multiple round of infection respectively.

早期的中和试验依赖于 TCLA 病毒株感染靶细胞系并形成多核巨细胞或者合胞体的能力,通过定量合胞体的数目对感染进行定量。此方法最大的缺点是仅仅适于那些具有 SI 特性的 TCLA 病毒株。随后,利用 PI 病毒株可以感染 PBMC 这一更能反应生理学状况的特点,建立了利用 ELISA 法检 p24 抗原减少的中和试验。此方法利用 HIV-1 阴性供体的 PBMC,经 PHA 刺激后在添加 IL-2 的条件下培养,一定的时间后,用 ELISA 法检测 p24 抗

原。此方法虽然适用于 SI 和 NSI 病毒株,但也有明显的缺点:通常需要进行几轮感染(通常 7d),耗时也较长,并需要充分洗涤细胞以尽可能去除病毒抗原以及血清中存在的抗 p24 抗体对实验结果的影响,同时病毒生长条件的变化、细胞死亡后 p24 抗原的释放以及 PBMC 细胞本身存在的差异等因素使此方法重复性较差。Shi 等报道了基于 U87 细胞(U87. CD4-CCR5 和 U87. CD4-CXCR4)蚀斑形成的中和试验,此方法利用感染细胞可以形成合胞体(蚀斑, plaque)这一特点,将血清/抗体和病毒共孵育,加入到长成单层的 U87 细胞,3~4d 后中止培养,通过一定的方法对细胞内 p24 抗原染色,可以在光学显微镜下定量蚀斑的数目,由此定量抗体的中和能力。与 PBMC p24 中和试验相比,此方法重复性较高,许多情况下也更敏感。

为了克服上述的一些的缺点,有些研究者建立了基于细胞内(intracellular, IC)p24 流式细胞术的、评价 PI 病毒株中和作用的 IC p24 中和试验。多轮感染(一般 4d) IC p24 中和试验利用 CD8 缺失的 PBMC,经透化作用(permeabilization)处理细胞并对细胞内抗原染色(在培养过程中需维持抗体),由此可通过流式细胞仪准确计数实际感染细胞的数目。此方法灵敏度虽高,但是费用比较昂贵。Mascola 等报道了一种单轮感染 IC p24 实验,与多轮感染 IC p24 实验相比,其费用比较低廉、快速(1-2d)、灵敏度也高。

在采用报告基因蛋白的检测进行的中和试验中,荧光素酶(Luciferase, Luc)是一种重要的报告蛋白。这种中和试验主要有两种:CEM · NKR-CCR5-Luc 细胞系中和试验,此细胞系同时表达 CCR5 和 CXCR4,在 HIV-2 LTR 的转录控制下细胞所含的荧光素酶报告基因表达,用荧光计数仪可以准确计数病毒感染细胞的数目。此方法优点在于包括 O 组在内的 HIV-1、HIV-2 和 SIV 的 Tat 蛋白均能活化 HIV-2 LTR 表达荧光素酶,适应范围更广,特别适于评价 AIDS 疫苗在灵长类动物试验中的中和抗体应答。另外一种比较先进的荧光素酶中和试验是将 HIV-1 env 基因片断构建的质粒和包含荧光素酶报告基因的 pNL-Luc-E R 质粒共转染于 293 T 细胞,培养后收获含假病毒的上清,上清和血清/抗体共培养后在 PM1 细胞上再培养约 3d 后, PBS 洗涤细胞,裂解细胞后检测荧光素酶含量。

目前比较流行也是广泛接受的中和试验是 GHOST 细胞中和试验。此方法利用基因工程方法构建一个可以表达 CD4 受体和一个辅助受体

(CCR1、CCR2、CCR3、CCR5、CXCR4、Bob/ gpr15 或者 Bonzo/ STRL33)及 GFP 报告基因的 GHOST 细胞,GHOST 细胞与病毒、抗体/血清培养过夜后,洗涤细胞,继续培养 3~4d,用流式细胞术检测 GFP 标志从而计数感染细胞数目的减少,评价中和能力。其主要优点是降低了因 PBMC 细胞的差异引起的中和试验结果的变异,重复性较好,因此在 HIV-1 的体外中和试验中被认为极有发展前景。

通过对抗 HIV-1 中和抗体的研究,发现抗 HIV-1 中和抗体对预防和控制 HIV-1 感染确实有一定的作用。但是,仅用单一的中和性单抗预防或者控制 HIV-1 的感染可能是不现实的;要想预防或者控制 HIV-1 的感染,可能需要多种针对不同表位的中和抗体的协同作用;而且某些非中和性单抗和中和性单抗联合使用,可以明显增强中和抗体对 HIV-1 的中和作用。中和作用的评价离不开实验室中和试验以及动物试验,因此建立敏感、有效、重复性高的中和作用评价方法是评价 HIV-1 中和抗体的免疫效果所必需的。

## 参考文献

- [1] Kahn P. Cent gardes vaccine meeting highlights roles of antibody in protection[J]. IAVI Report, 2002, 6(6): 1-2.
- [2] Saphire E O, Paul W H, Parren I, et al. Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design[J]. Science, 2001, 293: 1155-1159.
- [3] Lynn M. Neutralizing antibody responses to HIV-1 infection[J]. IUBMB Life, 2002, 53: 197-199.
- [4] Susan Zollar-Pazner. Identifying epitope of HIV-1 that induce protective antibodies[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(3): 199-210.
- [5] Burton D R, Desrosiers R C, Doms R W, et al. HIV Vaccine design and the neutralizing antibody problem[J]. Nat Med, 2004, 5(3): 233-236.
- [6] Cinerney T L, McLain L, Armstrong S J, et al. A human IgG1 (b12) specific for the CD4 binding site of HIV-1 neutralizes by inhibiting the virus fusion entry process, but b12 Fab neutralizes by inhibiting a postfusion event[J]. Virology, 1997, 233: 313-326.
- [7] Parker C E, Deterding L J, Christine Hager-Braun, et al. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5[J]. J Virol, 2001, 75: 10906-10911.
- [8] Stiehl G, Kunert R, Purtscher M, et al. A potent cross-clade neutralizing antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus 1[J]. AIDS Res Hum Retrovirus, 2001, 17: 1757-1765.
- [9] Zwick M B, Labrijn A F, Meng Wang, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external re-

- gion of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41[J]. *J Virol*,2001,75:10892-10905.
- [10] Stanfield R L, Gorny M K, Williams C, *et al.* Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D[J]. *Structure*,2004,12:193-204
- [11] Gorny M K, Williams C, Volsky B, *et al.* Human monoclonal antibodies specific for conformation-sensitive epitopes of V3 neutralize human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from various clades[J]. *J Virol*,2002,76(18):9035-9045
- [12] Moulard M, Phogat S K, Shi Y, *et al.* Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes[J]. *PNAS*,2002,99(10):6913-6918.
- [13] Baba T W, Liska V, Lehmann R H, *et al.* Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection[J]. *Nat Med*,2000,6(2):200-206.
- [14] Mascola J R, Lewis M G, Stiegler G, *et al.* Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies[J]. *J Virol*,1999,73:4009-4018.
- [15] Conly A J, II Kessler J A, Boots L J, *et al.* The consequence of passive administration of an anti-human immunodeficiency virus type 1 neutralizing monoclonal antibody before challenge of chimpanzees with a primary isolate[J]. *J Virol*,1996,70:6751-6758.
- [16] Emini E A, Schleif W A, Nunberg J H, *et al.* Prevention of HIV-1 infection in chimpanzee by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody[J]. *Nature*,1992,355(6362):728-730.
- [17] Lehman H R, Vlasak J, Rasmussen R A, *et al.* Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge[J]. *J Virol*,2001,75:7470-7480
- [18] Sanders R W, Venturi M, Schiffner L, *et al.* The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120[J]. *J Virol*,2002,76:7293-7305.
- [19] Parren P W, Marx P A, Hessel A J, *et al.* Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian-human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro[J]. *J Virol*,2001,75:8340-8347.
- [20] Mascola J R, Stiegler G, VanCott T C, *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies[J]. *Nat Med*,2000,6(2):207-210.
- [21] Xu W, Smith-Franklin B A, Li P L, *et al.* Potent neutralization of primary human immunodeficiency virus clade C isolates with a synergistic combination of human monoclonal antibodies raised against Clade B[J]. *J Hum Virol*,2001,4:55-61.
- [22] Zwick M B, Wang M, Poignard P, *et al.* Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies[J]. *J Virol*,2001,75:12198-12208.
- [23] Xiao Y, Dong X, Chen Y H. Neutralizing antibodies mechanism of neutralization and protective activity against HIV-1[J]. *Immunol Res*,2002,25(3):193-200.
- [24] Lehman H R, Vlasak J, Rasmussen R A, *et al.* Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge[J]. *J Virol*,2001,75:7470-7480
- [25] Cavacini L A, Samore M H, Gambertoglio J, *et al.* Phase I study of a human monoclonal antibody directed against the CD4-binding site of HIV-1 glycoprotein 120[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*,1998,14:545-550.
- [26] Armbruster C, Stiegler G M, Vcelar B A, *et al.* A phase I trial with human monoclonal antibodies (hMAb 2F5, 2G12) against HIV-1[J]. *AIDS*,2002,16:227-233
- [27] Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, *et al.* Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1 infected humans: a phase I evaluation[J]. *AIDS*,2002,16(15):2019-2025.
- [28] Nishimura Y, Igarashi T, Haigwood N L, *et al.* Transfer of neutralizing IgG to macaques 6 h but not 24h after SHIV infection confers sterilizing protection: implications for HIV-1 vaccine development[J]. *PNAS*,2003,100(25):15131-15136.
- [29] Cavacini L A, Duval M, Robinson J, *et al.* Interactions of human antibodies, epitope exposure, antibody binding and neutralization of primary isolate HIV-1 virions[J]. *AIDS*,2002,16(18):2409-2417.
- [30] Holmes H, Osmenov O, Knezevic I, *et al.* Report of a WHO-UNAIDS workshop on progress in the development and standardization of methods to measure HIV-1 neutralizing antibodies in HIV vaccine research and clinical trials[R]. Milan, Italy, 7-8 Aug, 2003.
- [31] Mascola J R, Louder M K, Winter C, *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Neutralization Measured by Flow Cytometric Quantitation of Single-Round Infection of Primary Human T Cells[J]. *J Virol*,2002,76:4810-4821.
- [32] Spenlehauer C, Gordon C A, Trkola A, *et al.* A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type 1[J]. *J Virol*,2001,75(2):292-300.
- [33] Dong M, Zhang P F, Grieder F, *et al.* Induction of primary virus-cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies in small animals by using an alphavirus-derived in vivo expression system[J]. *J Virol*,2003,77:3119-3130.
- [34] 黑发欣. HIV 中和抗体的免疫机制、诱导和检测[J]. *国外医学病毒学分册*,2004,11:6-9.
- [35] Shi Y, Albert J, Francis G, *et al.* A new cell-based neutralization assay for primary HIV type 1 isolates[J]. *AIDS Res Hum Retrovirus*,2002,18(13):957-967.