

基于核糖体展示技术进行抗狂犬病毒 人源抗体的制备*

赵小玲¹⁾ 陈伟强^{1)**} 冯红²⁾ 沈成凤³⁾ 纪艳³⁾ 李静梅⁴⁾ 张素娟⁴⁾ 杨志华¹⁾

¹⁾ 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050; ²⁾ 天津体育学院, 天津 300080;

³⁾ 天津市疾病预防控制中心, 天津 300151; ⁴⁾ 中国人民解放军二五四医院, 天津 300142)

摘要 构建了核糖体展示人源抗狂犬病毒单链抗体(scFv)库, 筛选制备特异抗狂犬病毒糖蛋白(RVGp)的稳定性人源抗体. 应用核糖体抗体库技术, 从经狂犬病毒 Vero 疫苗免疫的志愿者外周血淋巴细胞中分离、构建核糖体展示 scFv 基因库. 体外转录翻译后, 以 RVGp 重组蛋白作筛选抗原, 采用亲和富集法淘选 RVGp 特异性 scFv 抗体基因. 在原核系统 pET22b(+)/BL21(DE3)中实现 scFv 抗体片段的可溶性表达, ELISA 鉴定阳性克隆. 然后对筛选的 scFv 进行稳定性改构, 构建 VH-Lc-VK 稳定性抗体, 并对其生物学活性进行初步研究. 成功构建了库容量约为 6.2×10^{12} 的核糖体展示 scFv 抗体基因库. 在 180 个筛选克隆中, 克隆 RB24、RB71、RB109 和 RB156 显示出较高的 ELISA 值, 其基因序列分析结果显示, 它们是全新的人源抗 RVGp 抗体. 改构后的抗 RVGp VH-Lc-VK 抗体的稳定性明显改进, 可特异识别 RVGp 并有效中和狂犬病毒, 抑制狂犬病毒对靶细胞的感染. 以上结果表明, 人源抗 RVGp 特异性抗体的获得, 为狂犬病的有效预防、诊断和治疗提供了新的途径, 而且将为其他人源抗体的制备提供理论依据和技术基础.

关键词 核糖体展示, 人源抗体, 稳定性, 狂犬病毒糖蛋白

学科分类号 Q78, R392.11

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00521

狂犬病是由狂犬病毒引起的世界性人兽共患疾病, 人和动物一旦发病, 死亡率高达 100%. 我国狂犬病的发病和死亡人数一直居世界首位. 对于严重暴露者, 世界卫生组织建议应同时进行主动和被动免疫治疗^[1]. 人感染狂犬病毒的潜伏期一般为 1~3 个月, 但也可短至 1 周就发病. 因此, 对于免疫系统发育不成熟的儿童, 以及免疫力低下不能及时产生抗体的人群, 暴露后必须使用抗体进行防治. 抗狂犬病毒血清是最早应用于临床的抗体制剂, 如马抗狂犬病毒免疫球蛋白(equine rabies immune globulin, ERIG)和人抗狂犬病毒免疫球蛋白(human rabies immune globulin, HRIG). 然而由于 ERIG 注入人体后有较强的副反应, 所以美国 ACIP(Immunization Practices Advisory Committee)建议优先选用 HRIG 进行治疗. 但 HRIG 来源少, 价格高, 而且血液中存在其他病原体(如艾滋病病毒、肝炎病毒等)污染的可能, 因此大大限制了其在临床的推广应用. 单克隆抗体(McAb)是一种可供选

择的全分子免疫球蛋白. 用 McAb 治疗的优点是: 比多克隆抗体特异性高, 适于大规模生产, 而且降低了治疗过程中的血清污染^[2]. Devani 等首先采用杂交瘤技术制备了针对狂犬病毒血清 I 型的人单克隆抗体(WO 专利 8909789, 1989 年 10 月 19 日), 用于狂犬病的免疫学检测和治疗. Enssle 等制备了针对狂犬病毒糖蛋白表位的人抗狂犬病单克隆抗体(CA 专利 2037446, 1991 年 09 月 04 日), 这些单抗主要用于表位测定和免疫学实验, 也可用于暴露后的治疗. 但是人单抗在生产中存在几个问题, 如人杂交瘤系的稳定性差, 尤其是冻存后更不稳定, 在 McAb 制备过程中转化 B 细胞对 EB 病毒的应用有污染病毒的危险, 抗体产量低, 分子质量大而不

* 国家自然科学基金资助项目(30700748, 31070823).

** 通讯联系人.

Tel: 022-84655239, E-mail: tjchenwq@sohu.com

收稿日期: 2011-02-28, 接受日期: 2011-05-12

易纯化和推广应用, 制备成本也很高, 这些缺点均严重限制了人抗狂犬病毒 McAb 在临床上的应用. 抗狂犬病毒基因工程抗体的研制为解决这一问题提供了新的思路. 与单克隆抗体相比, 基因工程抗体具有如下优点: a. 基因工程抗体的分子质量较小, 有利于穿透血脑屏障, 清除进入中枢神经系统的病毒; b. 通过基因工程技术的改造, 可以根据治疗的需要, 制备新型抗体; c. 可采用原核细胞、真核细胞和植物系统等多种表达方式大量制备, 从而降低生产成本. 已经从几株杂交瘤和抗体中获得了基因, 并进行了抗原结合片段(fragment antigen binding, Fab)和单链抗体(single-chain Fv, scFv, 鼠源)的表达, 且表达产物具有和杂交瘤抗体同样的中和活性. 人源基因工程单克隆抗体具备优于多克隆抗体的特异性, 而且克服了鼠源性单抗因为其异源性引起的副作用, 因此是临床防治狂犬病理想的被动免疫制剂^[3-8].

抗体展示技术(display technology)是一种筛选蛋白质的强有力工具. 该技术将基因型和蛋白表型联系在一起, 利用目标蛋白的特异性配基, 从蛋白质展示文库中筛选出目标蛋白, 并找到相应的基因序列. 抗体展示技术允许我们不经机体免疫, 就可以筛选制备高亲和力人源抗体, 从而为特异人源基因工程抗体的筛选制备注入了新的活力, 这使得抗狂犬病毒人源抗体在临床上的普及应用成为可能. 过去, 噬菌体展示(phage display technology)是特异性人源抗体筛选制备应用最多的展示技术之一. 本课题组前期应用噬菌体展示技术, 筛选制备了人源抗狂犬病毒线性中和表位 G5 单链抗体(single chain variable fragments scFvs), G5 是狂犬病毒糖蛋白上的由 22 个氨基酸组成的一个线性中和表位, 但筛选获得的抗 G5 scFv 只能在体外与 G5 合成多肽特异性结合, 而其体内的病毒中和能力却不理想. 分析原因可能是由于 G5 线性中和表位的免疫源性较差, 而且, 所构建的噬菌体抗体库容量不足, 难以筛选到高亲和力抗体. 正如其他细胞依赖性抗体技术, 由于受细菌转化效率、噬菌体包装、跨膜分泌和蛋白酶降解等限制因素的影响, 噬菌体展示抗体库容量及其分子多样性都受到限制, 从而影响了特异、高亲和力抗体的筛选^[9-10]. 为克服以上缺点, 核糖体展示技术(ribosome display technology)应运而生, 由于该技术完全在体外进行, 弥补了细胞内展示的不足, 能显著增加库容量及分子多样性^[11-13]. 此外, 核糖体展示技术建

库简便、易于筛选, 为特异性人源抗体的制备提供了新的途径, 显示出了诱人的发展前景.

狂犬病毒表面糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RVGp)是狂犬病毒唯一暴露在衣壳表面的蛋白质, 是狂犬病毒的主要中和性抗原^[14]. 为制备特异、稳定的抗狂犬病毒中和性抗体, 本研究基于核糖体展示技术构建人源核糖体单链抗体库, 以纯化重组 RVGp 抗原为筛选靶标, 筛选针对 RVGp 的特异性抗体, 并对其稳定性进行改构. 基于核糖体展示技术进行人源狂犬病毒抗体的成功制备, 不仅可为狂犬病的有效预防提供新的途径, 而且将为其人源抗体的制备提供理论依据和技术基础.

1 材料与方法

1.1 材料

狂犬病毒 Vero 疫苗为法国里昂巴斯德梅里厄血清疫苗公司生产. Expressway™ Plus Expression System 购自 Invitrogen 公司. 淋巴细胞分离液购自中国协和医科大学血液研究所. 总 RNA 分离试剂盒购自 Promega 公司. RNA 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司. HRP 标记的抗人 IgG κ 链抗体购自 Sigma 公司. 引物扩增及抗体序列分析由 Invitrogen 公司合成.

1.2 方法

1.2.1 scFv 基因库的构建^[15]. 用狂犬病毒 Vero 疫苗对三名志愿者进行基础免疫, 2 周后, 再加强免疫一次. 抽取三名志愿者外周血 45 ml, 分离细胞总 RNA. 然后进行人源抗体不同家族 VH 和 VL 基因的 PCR 扩增, 纯化的 VH、VL 和 Linker DNA 进行拼接构建 scFv 基因库, 分子形式为 VL-linker-VH, Linker 为编码 15 个氨基酸(GlySer4)₃ 的合成寡核苷酸^[16], 其一端与轻链的 3'端相接, 另一端与重链的 5'端连接, 具体建库方法参见文献[17].

1.2.2 核糖体展示单链抗体基因库的构建^[17-18]. 核糖体展示单链抗体基因库的构建由组装 PCR 完成. 以构建的 scFv 抗体基因为模板, 以 RB/BACK 和 RB/FOR 为引物进行 PCR, 构建 T7 启动子、5'-茎环结构和 3'-茎环结构, 以及核糖体结合位点. 以噬菌体 M13 基因 III 的 211~299 氨基酸作为间隔子, 扩增引物为 S/BACK 和 S/FOR. 所需引物序列如下: RB/BACK, 5' ata cga aat taa tac gac tca cta tag gga tg(c/g) agg t(g/c)c a(g/c)c tcg ag(c/g) agt ctg g 3'; RB/FOR, 5' tgc agc cac agt acg ttt gat ctc ca 3'; S/BACK, 5' gct gat gct gca ggc ggt t 3'; S/FOR,

5' ccg cac acc agt aag gtg tgc ggt atc acc agt agc acc 3'.

1.2.3 体外转录和翻译^[17]. 体外转录和翻译采用 Expressway™ Plus Expression System, 按操作手册进行. 终止反应后, 在上清液中加入预冷 1/5 体积的含有 10 % (w/v) BSA 的 WBT. 反应混合物在 4℃, 1 400 g 离心 5 min 后, 将上清液转移到预冷的 EP 管中.

1.2.4 核糖体复合物的亲和筛选^[17-18]. 用重组 Gp (军事医学科学院卫生学环境医学研究所制备)包被 96 孔板, 用 BSA-Scerevisiae RNA-PBS 封闭. 将翻译混合物转至包被的孔中, 微孔板在冷室中轻摇 1 h, 倾掉翻译反应液, 微孔板用 WBT 洗 5 次. 随后在孔中加入预冷的洗脱缓冲液, 冰上轻摇 5 min 以洗脱 mRNA. 洗脱下来的 mRNA 用 RNeasy kit 进行纯化. 以纯化的 mRNA 作为模板, 进行 RT-PCR, PCR 产物用作下一轮循环, 即转录 - 翻译 - 筛选. 为监测筛选效率, 每轮筛选后的转录翻译混合物, 以重组 Gp 为抗原, 抗人 IgG κ 链抗体为检测抗体, 用 Western-blot 法进行检测.

1.2.5 抗体基因的克隆表达. 将最后一轮筛选获得 mRNA 的 RT-PCR 基因产物两端插入 *Nco* I 和 *Not* I 位点, 双酶切后与经同样双酶切的表达载体 pET22b(+)用 T4 连接酶连接, 然后转化 *E. coli* BL21(DE3). 挑取 PCR 鉴定的阳性克隆接种于 10 ml 含 100 mg/L Amp 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜. 按 1:50 将过夜培养物接种于新鲜 2×YT-A(含 100 mg/L Amp)培养基, 37℃ 振荡培养至 $A_{600}=0.8$, 加 IPTG 诱导, 37℃ 振荡培养 3.5 h. 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体. 悬于裂解缓冲液, 超声破碎, 离心收集上清, 产物用于 ELISA 检测.

1.2.6 ELISA 鉴定阳性克隆并进行序列分析. 用重组 RVGp 包被 96 孔板, 湿盒中 4℃ 过夜. 3% BSA-PBS(pH 7.0)进行封闭, 37℃ 1 h. 加入上述制备抗体, 每孔 70 μ l, 37℃ 1 h. 加入 HRP 标记的抗人 IgG κ 链抗体, 每孔 50 μ l, 37℃ 1 h. A、B 液显色, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应后, 在 450 nm 波长下测定 A 值, 鉴定阳性克隆. 选择 10 个阳性克隆, 提取质粒, 送上海博亚生物技术有限公司测序, 将其与已知基因序列比较, 并用相关软件分析.

1.2.7 人源抗体的高效表达和纯化. 将阳性克隆抗体基因克隆入 pET22b(+)/BL21 (DE3)表达系统中,

LB 培养基中培养诱导表达, 培养上清用 Ni-NTA 柱进行纯化, 洗脱峰收集液进行 12% SDS-PAGE 分析.

1.2.8 人源抗体的特异性抗原结合活性检测. 将重组 RVGp 用包被液稀释成不同浓度, 96 孔板上每孔加 60 μ l, 重复 3 个孔, 用 TNF α 作为阴性对照, PBS 作空白对照, 湿盒中 4℃ 过夜. 3% BSA-PBS (pH 7.0)进行封闭, 37℃ 1 h. 加入用 PBS 稀释的纯化抗体(1 μ g, 每孔 50 μ l), 37℃ 1 h. 加入 HRP 标记的抗人 IgG κ 链抗体, 每孔 50 μ l, 37℃ 1 h. A、B 液显色, 用 H₂SO₄ 终止反应后, 在 450 nm 波长下测定 A 值.

1.2.9 抗 RVGp 人源抗体的稳定性改构. VH-Lc-VK 的制备: 以 ELISA 信号较高的特异 RB71 抗体为母本抗体, 应用人 IgG (CH1)5' 端 12 个氨基酸 (AKTTAPSVYPLA) (称之为 Lc)代替 scFv 的 Linker (Gly4Ser)₃, 构建 VH-Lc-VK 改构抗体基因. 以重组质粒 PET22b(+)-scFv 为模板, 分别扩增 VH、VL 基因, 应用 SOE PCR 组装 VH、VL、Lc 以构建三结构域 VH-Lc-VK71 抗体基因, 在原核系统中表达, 并制备纯化有活性的抗体片段, 具体方法见 1.2.5 和 1.2.7. 连接肽 Lc 基因引物如下: 5' tcc tca gcc aaa aca aca gcc cca tcg gtc tat cca atg gcc gat gtt 3'.

1.2.10 抗 RVGp 人源 VH-Lc-VK71 抗体的亲和力测定. 抗体的亲和力应用基于表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技术的 Biacore 3000(瑞士 BIAcore AB 公司)进行测定. 10 mg/L 重组 RVGp 耦联固化于 CM5 传感芯片上(10 mmol/L NaAc, pH 4.5), 抗原反应值预设 3 000 RU. 不同浓度的纯化抗体依次上样, 流经耦联重组 RVGp 的 CM5 传感芯片, 流速 20 μ l/min, 流动相为 HBS-EP(pH 7.4). 抗原抗体结合动力学结果用 BIA evaluation4.1 软件进行分析计算.

1.2.11 抗 RVGp 人源 VH-Lc-VK71 抗体的相对稳定性研究^[19-20]. 稳定性是影响抗体功能最重要的生物学特性之一. 用 PBS 与纯化抗体在不同温度共同孵育, 人血清与纯化抗体在 37℃ 共同孵育, 重组 RVGp 包板, ELISA 法分别检测抗体的热稳定性和其在血清中的相对稳定性.

1.2.12 抗 RVGp 人源 VH-Lc-VK71 抗体中和活性的初步评价^[21]. 将制备的抗体片段用 MEM 培养基调整为 400 mg/L, 并用 MEM 培养基作梯度稀释. 取一定量各稀释度的抗体加入 24 孔细胞培养板内,

再加入等量中和用病毒悬液, 狂犬病毒(狂犬病毒固定毒株 CVS- II) 10^{-2} pfu/ml, 用抗狂犬病毒鼠 McAb 抗体作阳性对照, anti-TNF α scFv 作阴性对照. 每稀释度接种 4 孔, 放置 37°C 水浴 1 h. 再将准备好的 Vero 细胞悬液接种于上述 24 孔细胞培养板内, 每孔接种 1 ml. 置于 5% CO₂、34°C 温箱内静置培养 8 天, 去培养液后用含 0.1% 结晶紫的 10% 甲醛蒸馏水染色 5 min, 流水冲洗后于低倍光学显微镜下计数空斑.

2 结 果

2.1 核糖体展示人源 scFv 抗体基因库的构建

从经狂犬病毒 Vero 疫苗免疫志愿者的外周血淋巴细胞中提取的总 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA, 扩增了全套抗体 VH 和 VL 基因. 然后将序列分析正确的不同家族的 VH 和 VL 基因两两组装, 由此成功构建了人源 scFv 抗体基因库. 以噬菌体 M13 基因 III 的 211~299 氨基酸作为间隔子融合于 scFv 的羧基端, 并加上 T7 启动子、5'-茎环结构和 3'-茎环结构, 构建了库容量约为 6.2×10^{12} 的核糖体 scFv 基因库(图 1).

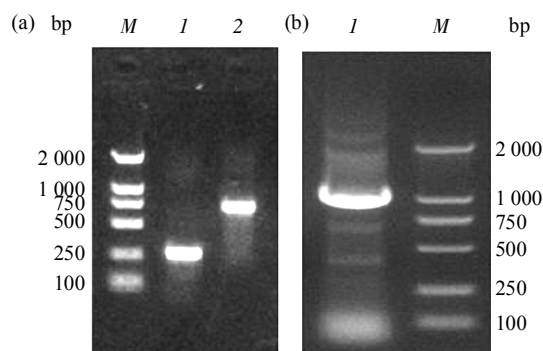


Fig. 1 PCR products of scFv DNA, spacer DNA(a) and assembled scFv-spacer DNA(b)

(a) I: Spacer DNA; 2: scFv DNA. (b) I: Assembled scFv-spacer DNA; M: DL2000.

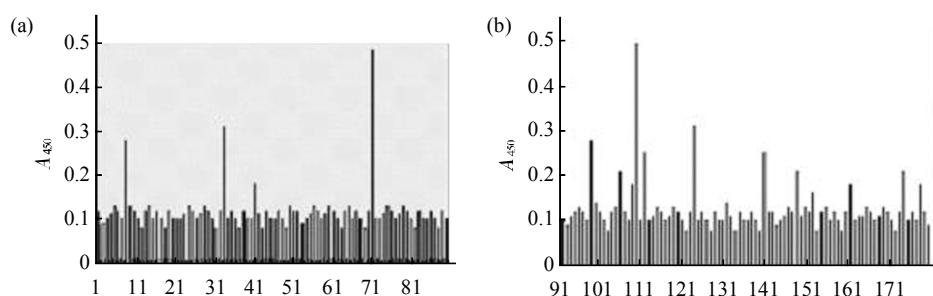


Fig. 3 (a) and (b) are ELISA analysis of clones from the selected antibody library

2.2 核糖体复合物的亲和筛选

10 μ g 纯化的 scFv DNA 加入体外转录和翻译系统, 反应混合物离心收集的上清用于亲和筛选. 用纯化重组 RVGp 作筛选抗原进行体外亲和筛选. 以每次筛选后纯化的 mRNA 作为模板, 进行 RT-PCR, PCR 产物用作下一轮循环, 即: 转录 - 翻译 - 筛选, 共进行 5 轮筛选. 筛选后的转录翻译混合物进行 Western-blot 检测, 结果显示(图 2), 用重组 Gp 作筛选抗原的结果是阳性, 而以对照 BSA 作筛选抗原的结果是阴性, 表明针对 RVGp 的克隆得到了有效富集.

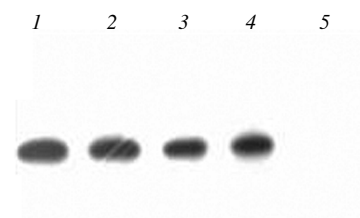


Fig. 2 Assay of accumulation of specific complexes by Western-blot

1~4: Scanning antigens are Gp (1~4 lanes are translation complexes of mRNA accumulated from 5th, 4th, 3rd and 2nd rounds selection); 5: Scanning antigens are BSA.

2.3 阳性克隆鉴定及序列分析

将每轮筛选富集获得 mRNA 的 RT-PCR 基因产物克隆入 pET22b(+)/BL21 (DE3). 挑取 180 个阳性重组子诱导表达制备抗体, 用 ELISA 检测鉴定阳性克隆. 结果表明, 克隆 RB24、RB71、RB109 和 RB156 显示出较高的 ELISA 值(图 3). 对阳性克隆提取质粒, 送上海博亚生物技术有限公司测序, 将其与已知基因序列比较, 并用相关软件分析, 结果表明它们均具有全新的人源抗体可变区基因序列.

2.4 人源抗体的特异性抗原结合活性检测

结果表明, 人源抗体 RB24、RB71、RB109 和 RB156 均可以与 Gp 结合, 而不能与 TNF α 和 BSA 结合, 表明筛选抗体是特异针对狂犬病毒糖蛋白的人源基因工程抗体(图 4)。

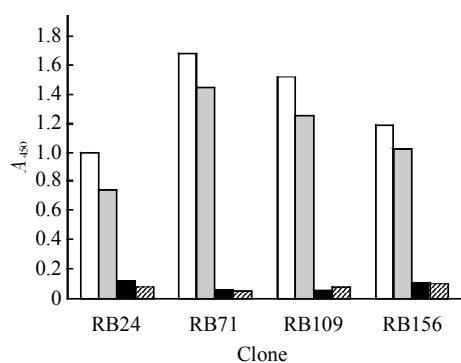


Fig. 4 Specific binding of scFvs to antigen

□: Rabies virus; ▒: Gp; ■: TNF α ; ▨: BSA.

2.5 VH-Lc-VK71 稳定性抗体的制备

以 ELISA 信号较高的特异性抗体 RB71 为母本抗体(称之为 scFv71, 其重链可变区基因序列和轻链可变区基因序列在 GenBank 中的序号分别是 FJ773246 和 FJ773247), 以人 IgG (CH1) 5'端 12 个氨基酸 (AKTTAPSVYPLA) 代替 scFv 的 Linker (Gly4Ser)₃ 成功构建了 VH-Lc-VK71 改构抗体, 并

采用 pET22b(+)/BL21 (DE3) 系统表达制备了纯化的 VH-Lc-VK71 抗体片段(图 5)。

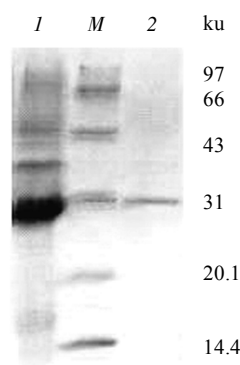


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expressed VH-Lc-VK71

1: Soluble fractions of VH-Lc-VK71 expressed; 2: Purified VH-Lc-VK71 fragments; M: Protein molecular mass markers.

2.6 抗 RVGp 人源 VH-Lc-VK71 抗体的亲和力测定

应用 Biacore3000 对人源抗 RVGp VH-Lc-VK71 的亲和力进行测定. 结果表明 VH-Lc-VK71 的亲和力指数达 0.35 nmol/L, 比其母本抗体 scFv71(K_D , 0.558 nmol/L)的亲和力指数略高, 而其解离常数相对有所增加, 其原因可能是改构后的抗体稳定性有所改进所致(表 1)。

Table 1 The dissociation constants and CDR3 sequences of scFv71 and VH-Lc-VK71

Antibodies	$K_a^{1)}/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_d^{2)}/\text{s}^{-1}$	$K_D^{3)}/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	VHCDR3	VLCDR3
scFv71	3.29×10^5	1.84×10^{-4}	0.558	DWGFYGDIWARGFGI	QSYDSSLNGHV
VH-Lc-VK71	3.60×10^5	1.26×10^{-4}	0.350	DWGFYGDIWARGFGI	QSYDSSLNGHV

¹⁾ K_a is the association constant; ²⁾ K_d is the dissociation constant; $K_D = K_d/K_a$.

2.7 抗 RVGp 人源 VH-Lc-VK71 抗体的稳定性检测

热稳定性检测结果显示: VH-Lc-VK71 在 PBS 中 37℃ 2.5 h 后, 活性稍有降低, 以后一直较稳定, 到 40℃ 时仍然具有活性, 而 scFv 在 PBS 中 37℃ 2 h 后其活性就开始降低; VH-Lc-VK71 在 37℃ 血清中较稳定, 在 13 h 时活性开始稍有降低, 但其活性于第 3 天还可检测到(A_{450} 值仍达 0.6), scFv 在血清中 1 h 时其活性就急速降低(图 6)。

2.8 抗 RVGp 人源 VH-Lc-VK71 抗体的体外中和活性研究

应用噬斑减少中和试验初步评价筛选抗体的中和活性. 结果表明, 人源抗体 VH-Lc-VK71 和抗狂犬病毒鼠 McAb 抗体相似, 可以完全抑制形成蚀斑的活病毒颗粒, 且抑制程度与抗体片段的浓度成正比. 而 anti-TNF α scFv 对狂犬病毒蚀斑形成无抑制作用(图 7). 这说明所制备的抗 Gp 人源抗体能特异中和狂犬病毒, 阻止狂犬病毒对 Vero 细胞的吸

附, 抑制了狂犬病毒对靶细胞的感染, 证明人源抗体 VH-Lc-VK71 是一株特异针对狂犬病毒的稳定性较好的中和抗体。

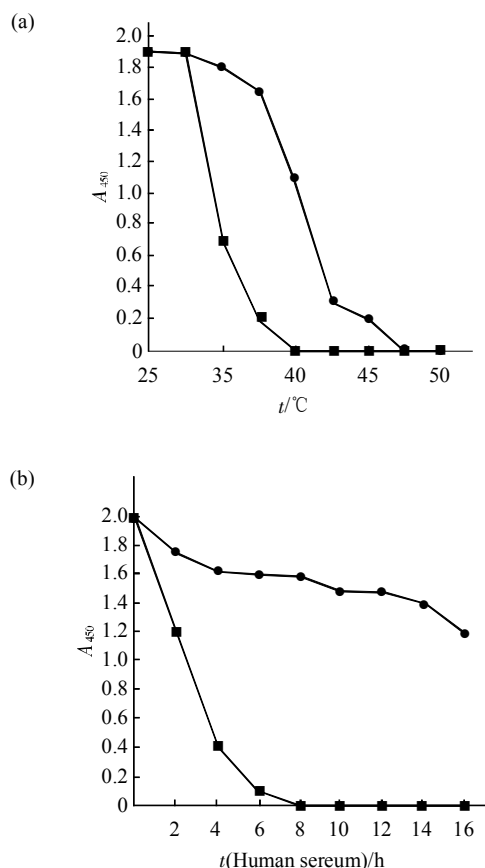


Fig. 6 The stability of humanVH-Lc-VK71 and scFv71

(a) Thermostability of antibody fragments in PBS at various temperature.
(b) Stability of antibody fragments in human serum at 37°C. ●—●: VH-Lc-VK71; ■—■: scFv71.

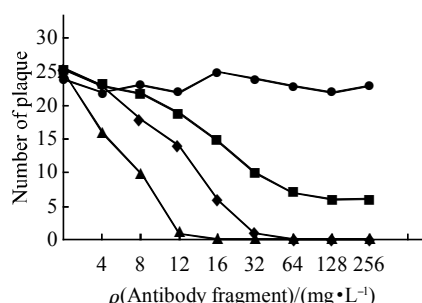


Fig. 7 Plaque reduction assay of human VH-Lc-VK71 against RVGp

●—●: Anti-TNF α -scFv; ◆—◆: VH-Lc-VK71; ■—■: scFv71; ▲—▲: McAb.

3 讨 论

抗体由于对抗原具有高特异性和高亲和力的特性, 使其在科学研究、疾病诊断和治疗中显示出无可比拟的优越性。目前, 市场对抗体的需求飞速增长, 人源抗体制备研究正处于快速发展阶段。抗体工程技术随着现代生物技术的发展而不断完善, 已经成为生物技术产业化的主力军, 而且抗体类药物已成为其中最重要的大类之一。美国食品和药物管理局(FDA)已经批准了大约 20 种抗体治疗药物, 同时, 有超过上百种抗体治疗药物处于临床研究阶段, 超过 500 种处于临床前研究阶段^[22]。但是, 越来越多的应用对抗体的人源化程度及其亲和力提出了更高的要求, 抗体工程研究正面临着严峻的挑战^[23]。

克隆展示技术的出现是人源抗体制备史上的里程碑。该技术最大优点在于将基因型和蛋白质表型联系在一起, 利用目标蛋白的特异性配基可从蛋白质展示文库中筛选出目标蛋白, 并找到相应的基因序列, 是一种高效的蛋白质筛选工具。克隆展示技术允许研究者不经机体免疫, 就可以筛选制备高亲和力全人源抗体。过去, 应用较多的展示技术有噬菌体展示(phage display)、细菌表面展示(bacterial surface display)、酵母展示(yeast display)等。但这些技术必须依赖细胞, 由于受细菌转化效率、噬菌体包装、跨膜分泌和蛋白酶降解等限制因素的影响, 其库容量及分子多样性都受到限制。本研究克服细胞依赖性克隆展示技术的不足, 首次应用核糖体展示技术, 用三名经狂犬病毒疫苗免疫的志愿者外周血中分离淋巴细胞, 构建人源核糖体展示抗体库, 库容量达到了 6.7×10^{12} 。用纯化的重组 RVGp 作为筛选抗原, 对抗体库进行亲和筛选, 结果成功地获得高亲和力、稳定性较好、可以特异中和狂犬病毒的人源基因工程抗体。核糖体展示技术的最大优点在于蛋白质的全程展示及筛选均在体外完成, 无需细菌转化和胞内蛋白质表达, 易于构建大库容量的抗体库, 保证了抗体库分子的有效多样性。此外, 随机突变可以通过核糖体展示技术过程中每轮 PCR 引入, 无需选择压力, 无需构建次级库, 就可通过引入突变和重组技术来提高靶标蛋白质的亲和力, 在筛选过程中同时实现抗体的体外亲和力成熟^[24-25]。因此, 核糖体展示技术是一种筛选大型文库和实现分子进化强有力的方法, 更适用于特

异、高亲和力人源抗体的筛选。

scFv 是目前报道最多的基因工程抗体之一, 许多 scFv 在多种疾病的诊断中作出了很大贡献, 但是由于其空间结构的不稳定性极大地限制了其在临床中的应用。VH-Lc-VK 抗体可以明显改进 scFv 的稳定性, 其改构策略是应用人 IgG(CH1) 5'端 12 个氨基酸代替 scFv 的 Linker(Gly4Ser)₃, 改构以后的抗体稳定性有明显改进, 分析原因可能由于 CH1 可以提供并维持抗体分子的有效空间构象^[26]。而且, VH-Lc-VK 同时具有 scFv 的优点: 结构简单, 易于构建; 易于在原核系统中制备可溶性有活性的抗体。本研究筛选制备的特异抗 RVGP 人源 VH-Lc-VK 新型基因工程抗体, 不仅可以发挥小分子工程抗体可进入血脑屏障的优势, 使进入中枢神经系统中狂犬病毒的清除成为可能。更重要的是 VH-Lc-VK 特有的稳定性克服了最常见的小分子单链抗体不稳定的弊端, 为其成为临床抗狂犬病毒预防和治疗的特异性抗体药物奠定了分子基础。本研究实现了其在原核系统中的高效表达, 克服了大多数人源基因工程抗体难以在真核表达系统中大规模发酵的技术瓶颈, 因此, VH-Lc-VK 抗体可能会成为一种很有前景的预防和治疗狂犬病的临床用小分子抗体。

综上所述, 基于核糖体展示技术进行人源抗狂犬病毒抗体的成功筛选制备, 不仅为狂犬病的预防、诊断和治疗提供了新的途径, 而且将为其他人源抗体的制备提供理论依据和技术基础。

参 考 文 献

- [1] Sun B, Auslander M, Conti L, *et al.* Compendium of animal rabies prevention and control. J Am Vet Med Assoc, 2007, **230**(6): 833-834
- [2] World Health Organization. Monoclonal antibody combination for rabies post exposure treatment: Report of a WHO consultation, 2002-05-23
- [3] Dietzschold B M, Gore P, Casali Y, *et al.* Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus. J Virol, 1990, **64**(6): 3087-3090
- [4] Dorfman N, Dietzschold B, Kajiyama W, *et al.* Development of human monoclonal antibodies to rabies. Hybridoma, 1994, **13**(5): 397-402
- [5] Hanlon C A, DeMattos C A, DeMattos C C, *et al.* Experimental utility of rabies virus-neutralizing human monoclonal antibodies in post-exposure prophylaxis. Vaccine, 2001, **19**(28-29): 3834-3842
- [6] Muller B H, Lafay F, Demangel C, *et al.* Phage-displayed and soluble mouse scFv fragments neutralizes rabies virus. J Virol Methods, 1997, **67**(2): 221-233
- [7] Kramer R A, Marissen W E, Goudsmit J. The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries. Eur J Immunol, 2005, **35**(7): 2131-2145
- [8] Ray K, Embleton M J, Jaikhani B L, *et al.* Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1. Clin Exp Immunol, 2001, **125** (1): 94-101
- [9] Zhao X L, Yin J, Chen W Q, *et al.* Generation and characterization of human monoclonal antibodies to G5, a linear neutralization epitope on glycoprotein of rabies virus, by phage display technology. Microbiol Immunol, 2008, **52**(2): 89-93
- [10] Benmansour A H, Leblouis H, Coulon P. Anti-genicity of rabies virus glycoprotein. Virol, 1991, **65**(8): 4198-4203
- [11] He M, Taussig M J. Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. Nucleic Acids Res, 1997, **25**(24): 5132-5134
- [12] Rothe A, Nathanielsz A, Oberhäuser F, *et al.* Ribosome display and selection of human anti-CD22 scFvs derived from an acute lymphocytic leukemia patient. Biol Chem, 2008, **389**(4): 433-439
- [13] Hanes J, Jermutus L, Weber-Bornhauser S, *et al.* Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(24): 14130-14135
- [14] Lafon M, Wiktor T J, Macfarrian R I. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: Analysis with monoclonal antibodies. J Gen Virol, 1983, **64**(Pt 4): 843-851
- [15] James D M, Hennie R H, Timethy P B, *et al.* By-passing immunization human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol, 1991, **222**(3): 581-597
- [16] 赵小玲, 王 亮, 田露芳, 等. 应用核糖体展示技术进行人源抗 TNF α 抗体的筛选制备. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, **25**(2): 145-149
- [17] Zhao X L, Wang L, Tian L F, *et al.* Chin J Cell Mol Immunol, 2009, **25**(2): 145-149
- [18] Hiroyuki O, Yoshihiro S, Ying B W, *et al.* Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components. Biochem Biophys Res Commun, 2007, **352**(1): 270-276
- [19] He M, Menges M, Groves M A, *et al.* Selection of a human anti-progesterone antibody fragment from a transgenic mouse library by ARM ribosome display. J Immunol Methods, 1999, **231**(1-2): 105-117
- [20] Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, *et al.* Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: Disulfide-stabilized Fv fragments. Nature Biotech, 1996, **14**(10): 1239-1245
- [21] Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman R J, *et al.* Stabilization of the Fv fragment in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. Biochemistry, 1994, **33**(18): 5451-5459
- [22] Price C P D, Newman P J. Principles and Practice of Immunoassay.

- 2nd. USA: Grove Dictionaries Inc, 1996
- [22] Adams G P, Weiner L M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnology*, 2005, **23**(9): 1147–1157
- [23] Foote J, Elisen H N. Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(5): 1257–1261
- [24] Groves M, Lane L, Douthwaite J, *et al.* Affinity maturation of phage display antibody populations using ribosome display. *J Immunol Methods*, 2006, **313**(1–2): 129–139
- [25] Jung S, Honegger A, Pluckthun A. Selection for improved protein stability by phage display. *J Mol Biol*, 1999, **294**(1): 163–180
- [26] He M, Kang A S, Hamon M, *et al.* Characterization of a progesterone-binding, three-domain antibody fragment (VH/VK) expressed in *Escherichia coli*. *Immunology*, 1995, **84**(4): 662–668

Preparation of Human Antibody Fragments Against Rabies Virus Based on Ribosome Display Technology*

ZHAO Xiao-Ling¹⁾, CHEN Wei-Qiang^{1)**}, FENG Hong²⁾, SHEN Cheng-Feng³⁾,

JI Yan³⁾, LI Jing-Mei⁴⁾, ZHANG Su-Juan⁴⁾, YANG Zhi-Hua¹⁾

¹⁾ Institute of Health and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China;

²⁾ Tianjin College of Physical Education, Tianjin 300080, China;

³⁾ Tianjin Center for Disease Control and Prevention, Tianjin 300151, China;

⁴⁾ 254th Hospital of PLA, Tianjin 300142, China)

Abstract To prepare human antibody to rabies virus with high neutralizing potency using ribosome display technology. The immunoglobulin heavy and light chain variable (VH, VL) genes were prepared with the peripheral blood lymphocytes from three volunteers immunized with rabies virus vaccine by PCR. The genes encoding scFv fragments were prepared by randomly combining VH and VL genes by SOE PCR. Rabies virus glycoprotein (RVGp) specific scFv genes were selected over five cycles of ribosome display. The isolated scFv genes were cloned into pET22b(+)/BL21(DE3), from which soluble scFv fragments were prepared. The expressed products of selected clones were analyzed by ELISA for isolating the positive clones. To improve the stability of obtained scFvs, VH-Lc-VK were constructed and characterized. A human scFv gene library with 6.2×10^{12} numbers used for ribosome display was constructed. Among the 180 selected clones, four clones RB24, RB71, RB109 and RB156 which exhibited the highest ELISA signals were isolated. The analysis of their sequences showed that they were new human immunoglobulin V genes to RVGp. And the reconstructed VH-Lc-VK antibody fragments can recognize RVGp specifically and antagonize the cytolytic effect of rabies virus on Vero cells. The prepared VH-Lc-VK fragments to RVGp will be useful for preparing engineering antibodies with high affinity against rabies virus. Ribosome display is a rapid means of generating fully human antibody fragments *in vitro*.

Key words ribosome display, human antibody, stability, RVGp

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00521

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30700748, 31070823).

**Corresponding author.

Tel: 86-22-84655239, E-mail: tjchenwq@sohu.com

Received: February 28, 2011 Accepted: May 12, 2011