

## 全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体的制备与鉴定

张夏玲<sup>1,2</sup>, 孙见宇<sup>2</sup>, 殷 珏<sup>2</sup>, 李 明<sup>1,2</sup>, 周亦凭<sup>2</sup>, 刘云成<sup>2,3</sup>, 李万波<sup>2</sup>, 朱 进<sup>1,4</sup>, 冯振卿<sup>1\*</sup>, Mason Lu<sup>2,5\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>上海麦柏星生物科技有限公司, 上海 201203; <sup>3</sup>福瑞邦生物科技有限公司, 黑龙江 大庆 163316; <sup>4</sup>南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002; <sup>5</sup>University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030)

**[摘要]** 目的: 利用人源 IgM 转基因小鼠制备全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体, 并对其进行初步鉴定。方法: 以灭活的狂犬病病毒 CTN 株作为抗原免疫人 IgM 转基因小鼠。采用杂交瘤技术结合酶联免疫吸附试验(ELISA)高通量交叉筛选技术(HTS)制备全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体。通过双抗体夹心 ELISA 鉴定单抗的人源性和抗体型, 间接 ELISA、斑点杂交(Dot Blot)实验及 Western blot 检测单抗的特异性, BiaCore X-100 测定单抗结合抗原的亲和力。结果: 建立了 2 株稳定分泌抗狂犬病病毒人源性单抗的杂交瘤细胞株, 分别命名为 9E3 和 9F2。双抗体夹心 ELISA 结果显示 2 株单抗均为人源性免疫球蛋白 IgM 型。间接 ELISA、斑点杂交实验结果表明 2 株单抗均能特异性识别灭活的狂犬病病毒 CTN 株。Western blot 结果显示 2 株单抗均能与狂犬病病毒糖蛋白特异性结合。2 株单抗与狂犬病病毒 CTN 株抗原结合的亲和力分别为  $2.62 \times 10^{-10}$  mol/L、 $4.06 \times 10^{-11}$  mol/L。结论: 筛选制备了 2 株特异性、高亲和力的全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体。本研究为进一步筛选人源抗狂犬病病毒免疫预防性中和抗体及其免疫治疗的应用奠定了基础。

**[关键词]** 人 IgM 转基因小鼠; 狂犬病病毒; 全人源单克隆抗体

**[中图分类号]** R512.99

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)06-739-06

## Generation and identification of human monoclonal antibodies to the rabies virus

ZHANG Xia-ling<sup>1,2</sup>, SUN Jian-yu<sup>2</sup>, YIN Jue<sup>2</sup>, LI Ming<sup>1,2</sup>, ZHOU Yi-ping<sup>2</sup>, LIU Yun-cheng<sup>2,3</sup>, LI Wan-bo<sup>2</sup>, ZHU Jin<sup>1,4</sup>, FENG Zhen-qing<sup>1\*</sup>, Mason Lu<sup>2,5\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup> Shanghai MabStar Inc, Shanghai 201203; <sup>3</sup> Furuibang Biotech Co Ltd, Daqing 163316; <sup>4</sup> Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China; <sup>5</sup> University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA)

**[Abstract]** **Objective:** To generate human monoclonal antibodies (mAbs) against the rabies virus (RV) by using the mice carrying human immunoglobulin transloci for immunization and further to identify their characters. **Methods:** The human IgM transgenic mice were immunized with the inactivated RV (CTN strain) as immunogen. The human anti-RV mAbs were screened and produced by using the classical hybridoma technique in a combinatory high throughput screening (HTS) strategy. The fully human mAbs were identified via the double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the specificity of mAbs was determined by the indirect ELISA, Dot Blot and Western Blot. In addition, the affinity of mAbs was detected by BiaCore X-100 system. **Results:** Two anti-RV hybridoma cell lines 9E3 and 9F2, which can produce human IgM mAbs and recognize the CTN strain of RV specifically in the indirect ELISA and the Dot Blot assays, have been established. The results of Western Blot demonstrated that the two prepared mAbs specifically recognize glycoprotein (G protein) of the rabies virus. The equilibrium dissociation constants (KD) of 9E3 and 9F2 were  $2.62 \times 10^{-10}$  mol/L and  $4.06 \times 10^{-11}$  mol/L, respectively. **Conclusion:** Two anti-RV fully human IgM mAbs with specificity and high affinity were generated. The first-phase preparations of mAbs could be the bases for the screening immunoprophylaxis neutralized monoclonal antibody and immunotherapy on the rabies.

**[Key words]** humanized IgM transgenic mice, rabies virus, human monoclonal antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 739-744]

**[基金项目]** 国家“863”计划资助(2007AA02Z418); 江苏省科技支撑计划资助(BE2011842); 上海市浦江人才计划资助(09PJ1431300)

\*通讯作者, E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; mlu2@mdanderson.org

流行病学调查显示,近年来我国被犬咬伤和死于狂犬病的患者逐年增加,已成为严重的公共卫生和社会问题<sup>[1]</sup>。WHO 建议三级暴露接触后的治疗包括注射抗狂犬病免疫球蛋白和接种疫苗。目前大多使用血源性免疫球蛋白,但血源性免疫球蛋白成本高且产量极低,难以满足预防用药需求,并且血源产品质量难以控制,存在潜在病毒感染的风险以及容易引起过敏反应。全人源或人源化治疗性单克隆抗体药物给狂犬病病毒接触后的预防和治疗提供了新的解决方法,以全人源治疗性单克隆抗体药物取代目前大量使用的血源性免疫球蛋白,已成为国内外临床医学和生物制药专家的共识。最近 Pruzina 等<sup>[2]</sup>合作研究并成功地利用人源 IgM 转基因小鼠制备出抗 HIV gp140 全人源单抗。本课题组在国内首次采用从英国医学研究理事会和剑桥大学引进的人源 IgM 转基因小鼠,结合杂交瘤技术及高通量酶联免疫吸附试验(ELISA)交叉筛选技术,制备了 2 株特异性、高亲和力的抗狂犬病病毒全人源单抗,为进一步筛选人源抗狂犬病病毒免疫预防性中和抗体及其免疫治疗的应用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

灭活狂犬病病毒 CTN 株由武汉生物制品研究所馈赠,6~8 周龄以 C57BL/6J 小鼠背景的雄性人源 IgM 转基因小鼠由上海麦柏星生物科技有限公司独家从英国医学研究理事会(MRC)和剑桥大学引进和授权繁殖,小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 来源于美国 ATCC 公司并由上海麦柏星公司驯化制备,BHK-21 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,狂犬病病毒糖蛋白由南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室保存;细胞培养板及 ELISA 酶标反应板(Coster 公司,美国),96 孔液体处理系统(Transtar-96 Well Liquid Transfer System, Corning 公司,美国),Ultrawash PLUS 96 孔全自动洗板机(Dynex 公司,美国),MicroFill 微孔板分液器(BioTek 公司,美国),酶标仪 Multiskan Fc 3.0(Thermo 公司,美国),Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Biorad 公司,美国),聚偏氟乙烯膜(PVDF, Millipore 公司,美国),完全和不完全弗氏佐剂、聚乙二醇(PEG)、次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶(HAT)和次黄嘌呤-胸腺嘧啶(HT)等(Sigma 公司,美国),培养基(Gibco 公司,美国),HRP 标记的二抗(Jackson Immunolab 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 转基因小鼠的免疫

选取 4 只 6~8 周龄雄性人 IgM 转基因小鼠,将灭活狂犬病病毒 CTN 株(BHK-21 细胞培养)与等体积的弗氏完全佐剂混合,充分乳化后同时进行皮下多点及腹腔免疫注射,抗原用量为 25  $\mu\text{g}$ /只。第 2 次和第 3 次免疫分别于 2 周后及 4 周后进行,改用弗氏不完全佐剂,抗原用量及注射途径不变。第 3 次免疫后的第 10 天取小鼠尾静脉血,采用间接 ELISA 方法测定小鼠血清中抗狂犬病病毒 IgM 抗体效价,将灭活狂犬病病毒 CTN 株和 BHK-21 细胞裂解物按 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  分别包板;洗板后 1.5% BSA 室温封闭 1 h;先将经灭活狂犬病病毒 CTN 株免疫后的转基因小鼠血清 1:100 稀释,再按 1:4 进行倍比稀释后加入对应包被板,室温孵育 1 h,未经免疫的转基因小鼠血清作为阴性对照;洗板后加入 1:3 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgM-Fc 抗体,室温孵育 1 h;洗板后加 TMB 显色,0.2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止;测定  $D(450 \text{ nm})$  吸光度值。根据间接 ELISA 结果选取效价最高的 1 只转基因小鼠,于融合前 3 d 经腹腔加强免疫 1 次,抗原用量为 25  $\mu\text{g}$ /只,不加佐剂。

#### 1.2.2 杂交瘤细胞的制备

按常规方法无菌条件下取转基因小鼠的脾脏,研磨制备脾细胞悬液,将脾细胞与 SP2/0 细胞以 1:1 的比例混合于融合管,1 450 r/min 离心 5 min,弃去上清,快速旋转式滴加 1.0 ml 融合剂 PEG,同时开始计时,将融合管置于手心并用力旋转,于第 1 min 时加入 50 ml DMEM 基础培养基终止反应,37 $^{\circ}\text{C}$  水浴中静置 10 min,1 450 r/min 离心 5 min,弃去上清,用 HAT 培养基(加入 10%小牛血清)适当稀释融合细胞,按  $2 \times 10^6$  个/板铺入 70 块 96 孔细胞培养板内,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5.0%  $\text{CO}_2$  培养箱中选择性培养 1 周<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.3 高通量交叉筛选及建立杂交瘤细胞株

灭活狂犬病病毒 CTN 株和 BHK-21 细胞裂解物按 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  分别包板;洗板后 1.5% BSA 室温封闭 1.0 h;采用 96 孔液体处理系统进行高通量交叉筛选,吸取杂交瘤细胞培养液上清作为一抗,同时以免疫小鼠血清做阳性对照、HAT 培养基做阴性对照、1.5% BSA 做空白对照,室温孵育 1.0 h;洗板后加入 1:3 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgM-Fc 抗体(二抗),室温孵育 1.0 h;洗板后加 TMB 显色,0.2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止; $D(450 \text{ nm})$  测定吸光度值。高通量交叉筛选出灭活狂犬病病毒 CTN 株包被孔阳性

且 BHK-21 细胞裂解物包被孔阴性者为阳性孔,将阳性孔内细胞用 HT 培养基选择性培养 3 d 后再次进行 ELISA 鉴定,选取稳定的阳性杂交瘤细胞采用有限稀释法进行多次亚克隆,至阳性率达到 100% 时即可定株。

#### 1.2.4 杂交瘤细胞株的扩大培养及单抗的纯化

将定株后最佳生长状态下的杂交瘤细胞置于直径 15 cm 细胞培养皿内扩大培养 20~25 d;待扩大培养的 95% 以上杂交瘤细胞死亡后,收集上清,4 500 r/min、4℃离心 30 min;先用 30%硫酸铵进行预沉淀,12 000 r/min、4℃离心 30 min,保留上清弃去沉淀,再将上清用 60%硫酸铵进行沉淀,12 000 r/min、4℃离心 30 min,弃去上清保留沉淀,将沉淀用 1 × PBS 溶解并透析 3 次至 1~2 ml,无菌过滤后 4℃保存。

#### 1.2.5 单抗人源性及类型鉴定

采用双抗体夹心 ELISA 法鉴定抗狂犬病病毒单抗的人源性及类型。用羊抗人 IgM、羊抗人 IgG、羊抗鼠 IgM、羊抗鼠 IgG 分别包板;洗板后 1.5% BSA 室温封闭 1 h;分别加入待测 1:4 000 稀释的抗狂犬病病毒单抗,阳性对照分别加入人 IgM、人 IgG、鼠 IgM、鼠 IgG,阴性对照用封闭液代替,室温孵育 1 h;洗板后分别加入 1:3 000 稀释的羊抗人 IgM-Fc-HRP、羊抗人 IgG-Fc-HRP、羊抗鼠 IgM-Fc-HRP、羊抗鼠 IgG-Fc-HRP 室温孵育 1 h;洗板后加 TMB 显色。

#### 1.2.6 单抗活性和特异性检测

间接 ELISA:灭活狂犬病病毒 CTN 株和 BHK-21 细胞裂解物按 0.2 μg/ml 分别包板;洗板后 1.5% BSA 室温封闭 1 h;将单抗稀释为 20 μg/ml,并按 1:4 倍比稀释,将稀释好的单抗加入对应包被板,室温孵育 1 h,SP2/0 上清作为阴性对照;洗板后加入 1:3 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgM-Fc 抗体,室温孵育 1 h;洗板后加 TMB 显色,0.2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止;测定 D(450 nm)吸光度值。

斑点杂交:PVDF 膜用甲醇活化后,分别滴加 2 μl 灭活狂犬病病毒 CTN 株、BHK-21 细胞裂解物 (50 ng/μl),室温干燥后 5%脱脂牛奶封闭 1 h;分别与 1:500 稀释的单抗以及 SP2/0 上清、5%脱脂奶粉孵育 2 h;1 × PBST 洗涤,加入 1:10 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgM-Fc 抗体孵育 1 h;DAB 显色。

Western blot:取 20 μl 重组表达的狂犬病病毒糖蛋白<sup>[4]</sup>和 pGEX-6P-1 载体菌蛋白(阴性对照)行 SDS-PAGE;300 mA 转膜 2 h;5%脱脂奶粉室温封闭

2 h;按 1.0 μg/ml 加入纯化后的全人源抗狂犬病病毒 IgM 单抗,4℃孵育过夜;1 × PBST 洗膜;按 1:5 000 比例加入 HRP 标记的羊抗人 IgM-Fc 抗体,室温下孵育 1 h;1 × PBST 洗膜后 ECL 化学发光检测。

#### 1.2.7 单抗亲和力测定

CM5 芯片偶联捕获分子:将羊抗人 IgM-Fc 多克隆抗体(25 μg/ml)作为捕获分子,用 10 mmol/L NaAc(pH 5.0)固定在 CM5 传感器芯片上,固定时的流速为 30 μl/min。按照 Biacore X-100 偶联试剂盒的操作,将其偶联到 CM5 芯片金薄膜表面上。用 EDC、NHS 活化芯片的葡聚糖表面,以进样时间(420 s)确定偶联量,最后用乙醇胺封闭表面残留的活化基团。CM5 芯片上捕获分子捕获配体:将制备的全人源抗狂犬病病毒单抗作为配体,以计算得到的信号值确定单抗的进样浓度为 19 μg/ml 及接触时间为 180 s。单抗与狂犬病病毒 CTN 株(抗原)结合的亲和力和动力学分析:狂犬病病毒 CTN 株用 HBS-EP 缓冲液稀释作为分析物,稀释浓度 1.23~100.00 nmol/L,分析物以逐渐增高的浓度依次流过芯片(30 μl/min),分别得到信号曲线。每个浓度作为 1 个循环,完成 1 次循环后用 10 mmol/L 的甘氨酸-盐酸再生芯片以回复到原始未结合抗原的状态。用 Biacore X-100 System 软件,分析实验结果,得到该 IgM 单抗的亲和力和动力学参数。

## 2 结果

### 2.1 转基因小鼠血清抗体效价测定及杂交瘤细胞的制备

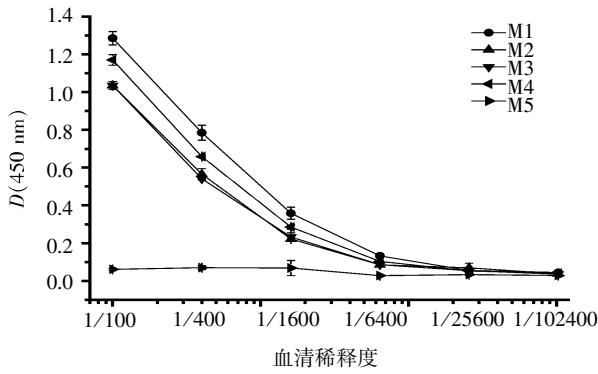
4 只转基因小鼠经 3 次灭活狂犬病病毒 CTN 株免疫,采用间接 ELISA 法检测免疫后转基因小鼠血清中抗狂犬病病毒 IgM 抗体效价(图 1)。根据图 1 所示,选取血清抗体效价最高的 M1 转基因小鼠的脾脏细胞与 SP2/0 细胞按 1:1 比例进行杂交瘤融合,按 2 × 10<sup>6</sup> 个/板铺入 96 孔细胞培养板,共计 70 块板,HAT 培养基选择性培养 1 周。

### 2.2 建立杂交瘤细胞株

采用 96 孔液体处理系统及全自动洗板、分液系统进行间接 ELISA 高通量交叉筛选,选取稳定阳性杂交瘤细胞进行 3 次亚克隆后阳性率达到 100%,共获得 15 株稳定分泌全人源抗狂犬病病毒单抗的杂交瘤细胞株(表 1),从中选取抗体活性最高的 2 株细胞进行进一步鉴定,分别命名为 9E3 和 9F2。

### 2.3 单抗人源性及类型鉴定

采用双抗体夹心 ELISA 法鉴定抗狂犬病病毒



M1~M4: 4 只经灭活狂犬病病毒免疫的转基因小鼠; M5: 未免疫转基因小鼠。

图 1 间接 ELISA 法检测人 IgM 转基因小鼠血清中抗狂犬病病毒 IgM 抗体效价

Figure 1 The human IgM titer of anti-RV sera from human IgM transgenic mice immunized by CTN in an indirect ELISA

表 1 M1 转基因小鼠杂交瘤融合后筛选结果

Table 1 The selected fusion experiment result of anti-RV hybridomas generation from the human IgM transgenic mice

融合板编号	融合率	阳性孔	D(450 nm)	稳定阳性细胞株
3	85%	2	1.881 ~ 1.907	0
7	87%	5	1.857 ~ 2.483	1
9	91%	3	1.779 ~ 2.670	1(9E3)
12	88%	2	1.792 ~ 1.891	0
14	85%	4	1.968 ~ 2.646	1
19	90%	7	1.682 ~ 2.906	2
23	92%	4	1.763 ~ 2.858	1
24	88%	2	1.757 ~ 2.013	0
29	87%	1	1.912	0
36	86%	2	1.702 ~ 1.864	0
37	92%	3	1.670 ~ 2.126	0
39	95%	4	1.962 ~ 2.671	1(9F2)
40	89%	2	2.005 ~ 2.165	1
43	88%	2	1.608 ~ 1.749	0
46	90%	1	1.748	0
47	90%	4	1.543 ~ 2.186	0
51	88%	6	1.861 ~ 2.443	1
57	84%	8	1.920 ~ 2.794	3
61	82%	6	1.778 ~ 2.240	1
64	89%	3	1.643 ~ 2.693	1
69	93%	6	1.749 ~ 2.568	1
70	90%	1	1.693	0

单抗 9E3 和 9F2 的人源性及 Ig 类型, 结果显示, 2 株单抗均为人源性 IgM 免疫球蛋白, 相同实验条件下阴、阳性对照均成立。

2.4 ELISA 检测单抗活性和特异性

采用间接 ELISA 法鉴定纯化后的 2 株单抗与灭活狂犬病病毒 CTN 株的反应情况(图 2), 以 BHK-21 细胞裂解物作为对照, 抗原包被浓度均为 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果显示, 单抗 9E3 和 9F2 稀释至浓度为  $1.22 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$  均能特异性识别灭活狂犬病病毒 CTN 株, 而与培养该病毒的 BHK-21 细胞成分不反应。

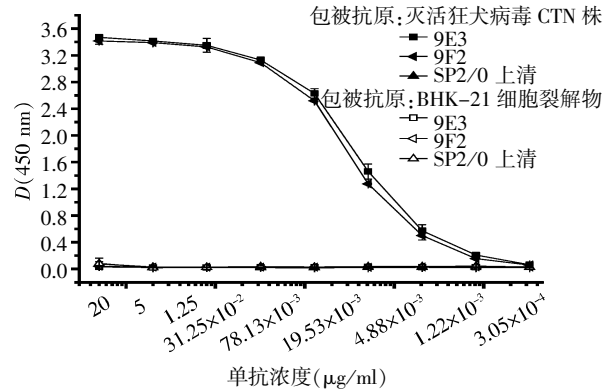
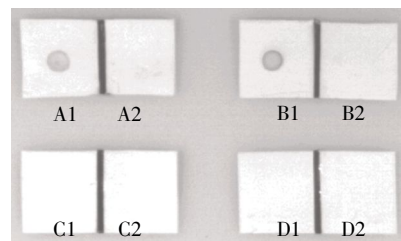


图 2 间接 ELISA 法检测全人源抗狂犬病病毒单抗的活性  
Figure 2 The activity of anti-RV fully human IgM mAbs in the indirect ELISA

2.5 斑点杂交实验鉴定特异性

将 2  $\mu\text{l}$  (50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) 灭活狂犬病病毒 CTN 株及 BHK-21 细胞裂解物分别滴加于活化后的 PVDF 膜上, 封闭后分别与稀释的单抗以及 SP2/0 上清、5% 脱脂牛奶孵育; HRP 标记的羊抗人 IgM-Fc 孵育后 DAB 显色(图 3)。结果表明, 2 株单抗 9E3、9F2 均能与灭活狂犬病病毒 CTN 株特异性结合, 而与培养该狂犬病病毒的 BHK-21 细胞裂解物无反应, 相同实验条件下对照均成立。



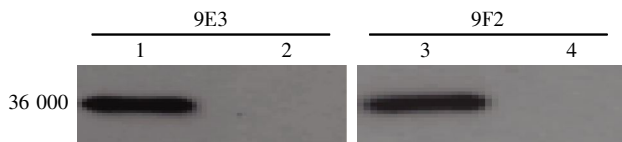
A1、B1、C1、D1: 抗原为灭活狂犬病病毒 (CTN 株); A2、B2、C2、D2: 抗原为 BHK-21 细胞裂解物; A1、A2: 一抗为 9E3; B1、B2: 一抗为 9F2; C1、C2: SP2/0 上清; D1、D2: 5% 脱脂奶粉。

图 3 斑点杂交实验鉴定单抗的特异性  
Figure 3 Identification of anti-RV mAbs specificity in Dot-Blot assay

2.6 Western blot 分析特异性

将狂犬病病毒糖蛋白行 SDS-PAGE, 同时以 pGEX-6P-1 载体菌蛋白为阴性对照, 转膜后分别用

纯化后的全人源抗狂犬病病毒 IgM 单抗 9E3、9F2 进行 Western blot 分析,HRP 标记的羊抗人 IgM-Fc 抗体作为二抗。如图 4 所示,2 株全人源抗狂犬病病毒 IgM 单抗均能与本实验室前期研究制备的狂犬病病毒糖蛋白特异性结合(36 000 条带处),而与表达该糖蛋白的 pGEX-6P-1 载体菌蛋白无反应。



1,3:抗原为狂犬病病毒糖蛋白;2,4:抗原为 pGEX-6P-1 载体菌蛋白;一抗分别为 9E3、9F2。

图 4 Western blot 分析单抗的特异性

Figure 4 Identification of anti-RV mAbs specificity in Western blot

### 2.7 单抗亲和力测定

借助 GE 公司的 Biacore X-100 分析系统及 CM5 芯片,通过捕获法进行单抗与狂犬病病毒 CTN 株(抗原)结合的亲和力和动力学分析(图 5),抗原分析物浓度分别采用 1.23、3.70、11.11、33.33、100.00 nmol/L。结果显示,2 株单抗 9E3 和 9F2 的平衡解离常数 ( $K_D$ )分别为  $2.62 \times 10^{-10}$  mol/L、 $4.06 \times 10^{-11}$  mol/L。

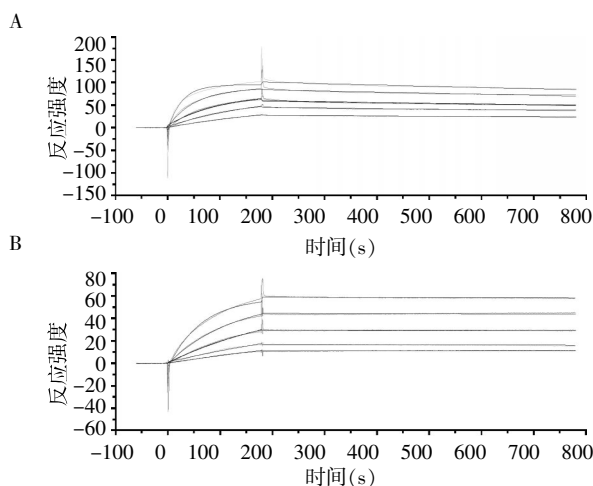


图 5 Biacore X-100 系统测定 9E3(A)及 9F2(B)的亲和力及动力学参数

Figure 5 The affinity assay and the kinetics analysis for anti-RV human IgM mAbs of 9E3 (A) and 9F2 (B) in Biacore X-100 system

### 3 讨论

目前,基于基因工程技术制备的多种人源化抗狂犬病病毒抗体显示出了较好的应用前景,并经体外实验及动物实验证实具有中和保护作用<sup>[5-8]</sup>。随着

基因工程技术的不断进步,通过噬菌体展示技术筛选到的人源化抗狂犬病病毒抗体具有与人抗狂犬病免疫球蛋白(HRIG)相同程度的中和保护作用,从而成为一种制备全人源特异性抗狂犬病病毒抗体的全新技术<sup>[9-11]</sup>。但是,通过基因工程技术制备的小分子抗体与全分子抗体相比,其血浆半衰期明显缩短;同时基因工程技术制备抗狂犬病病毒抗体的过程较繁琐,干扰因素较多,因此在抗体药物产业化以及临床实践中可能会面临很多问题。近年来,采用转基因动物建立的全人源抗体技术平台,可与基因工程技术实现良好互补。研究表明通过人工染色体工程学技术构建的转基因小鼠可以稳定携带人免疫球蛋白基因位点<sup>[12-13]</sup>,因此可以借助转基因小鼠通过杂交瘤技术直接制备全人源单克隆抗体。Pruzina 等<sup>[2]</sup>采用携带基于酵母人工染色体人免疫球蛋白基因位点的转基因小鼠,通过杂交瘤技术成功制备了特异性抗 HIV gp140 全人源 IgM 型单抗,并对获得的 IgM 单抗进行了 IgG 转化。

本研究利用了国内首个引进和建立的全人源 IgM 抗体转基因小鼠实验平台,证明经灭活狂犬病病毒 CTN 株免疫后的转基因小鼠可产生较高效价的抗狂犬病病毒抗体。采用杂交瘤技术融合后大量铺板(70 块)以构建丰富的杂交瘤“单克隆抗体库”,并结合高通量交叉筛选技术以提高研究效率、降低实验误差,从而降低假阳性率,大大提高了特异性、高亲和力全人源抗狂犬病病毒单抗的获得机率。本文研究结果表明,双抗体夹心 ELISA 鉴定获得的 2 株单抗均为人 IgM,间接 ELISA 结果显示单抗 9E3 和 9F2 稀释至浓度为  $1.22 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  均能特异性识别灭活狂犬病病毒 CTN 株,斑点杂交实验证实 2 株单抗均能特异性识别灭活狂犬病病毒 CTN 株,Western blot 结果证明 2 株单抗均能与狂犬病病毒糖蛋白特异性结合,显示出较高的抗体结合活性和特异性。抗体亲和力测定结果表明,相对于本实验室前期研究制备的抗狂犬病病毒鼠源单抗(IgG2a)及小分子 Fab 抗体亲和力范围  $10^{-7} \sim 10^{-10}$  mol/L 而言<sup>[14-15]</sup>,2 株单抗均显示出较高的亲和力(分别为  $2.62 \times 10^{-10}$  mol/L、 $4.06 \times 10^{-11}$  mol/L)。提示本研究借助转基因小鼠通过杂交瘤结合高通量交叉筛选技术制备出 2 株特异性、高亲和力的全人源抗狂犬病病毒单抗,为进一步进行狂犬病免疫预防和免疫治疗的研究奠定了基础。

本实验室前期研究已制备了抗狂犬病病毒鼠源单抗及兔源多抗,研究证实具有潜在的狂犬病病

毒暴露后的诊疗价值<sup>[14,16]</sup>;进一步通过噬菌体展示技术表达了抗狂犬病病毒单链抗体(scFv)<sup>[17]</sup>,制备了多株具有中和活性的抗狂犬病病毒人源化 Fab 抗体<sup>[15,18]</sup>。本研究制备的全人源、全分子单抗与其相比,显示出了同等程度的特异性,采用的高通量交叉筛选技术简化了抗体筛选制备流程,使获得目的抗体的成功率得到了显著提高。因此,基于人源转基因小鼠制备全人源抗狂犬病病毒单抗将是基因工程技术路径的重要补充,同时也将为诸如噬菌体展示技术提供更为多样性的抗体基因库。本研究组将进一步鉴定获得的全人源抗狂犬病病毒 IgM 单抗的中和活性,为研制具有中和保护力的全人源抗狂犬病病毒单抗药物提供技术储备。

#### [参考文献]

- [1] Song M, Tang Q, Wang DM, et al. Epidemiological investigations of human rabies in China [J]. BMC Infect Dis, 2009, 9: 210-217
- [2] Pruzina S, Williams GT, Kaneva G, et al. Human monoclonal antibodies to HIV-1 gp140 from mice bearing YAC-based human immunoglobulin transloci [J]. Protein Eng Des Sel, 2011, 24(10): 791-799
- [3] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-497
- [4] 冯晓敏, 卞颖华, 徐伟, 等. 狂犬病毒 G 蛋白基因的克隆、表达及生物学活性鉴定[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(7): 986-990
- [5] Enssle K, Kurre R, Köhler R, et al. A rabies-specific human monoclonal antibody that protects mice against lethal rabies[J]. Hybridoma, 1991, 10(5): 547-556
- [6] Champion JM, Kean RB, Rupprecht CE, et al. The development of monoclonal human rabies virus-neutralizing antibodies as a substitute for pooled human immune globulin in the prophylactic treatment of rabies virus exposure[J]. J Immunol Methods, 2000, 235(1-2): 81-90
- [7] Hanlon CA, Niezgoda M, Rupprecht CE. Postexposure prophylaxis for prevention of rabies in dogs [J]. Am J Vet Res, 2002, 63(8): 1096-1100
- [8] Nel LH, Niezgoda M, Hanlon CA, et al. A comparison of DNA vaccines for the rabies-related virus, Mokola [J]. Vaccine, 2003, 21(19-20): 2598-2606
- [9] Bakker AB, Marissen WE, Kramer RA, et al. Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escapemutants [J]. J Virol, 2005, 79(14): 9062-9068
- [10] Ando T, Yamashiro T, Takita-Sonoda Y, et al. Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus-neutralizing ability [J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(4): 311-322
- [11] Houimel M, Dellagi K. Isolation and characterization of human neutralizing antibodies to rabies virus derive from a recombinant immune antibody library [J]. J Virol Methods, 2009, 161(2): 205-215
- [12] Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(9): 1117-1125
- [13] Lonberg N. Human monoclonal antibodies from transgenic mice[J]. Handb Exp Pharmacol, 2008(181): 69-97
- [14] Xinjian Liu, Xiaomin Feng, Qi Tang, et al. Characterization and potential diagnostic application of monoclonal antibodies specific to rabies virus [J]. Journal of Biomedical Research, 2010, 24(5): 395-403
- [15] Li C, Zhang F, Lin H, et al. Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(3): 329-337
- [16] Liu X, Liu Q, Feng X, et al. Rabbit anti-rabies immunoglobulins production and evaluation [J]. Tropical Biomedicine, 2011, 28(1): 138-148
- [17] 李琛, 林红, 刘新建, 等. 人源抗狂犬病毒免疫型抗体库的构建及特异性抗体筛选与鉴定[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(5): 575-578
- [18] Liu X, Lin H, Tang Q, et al. Characterization of a human antibody fragment Fab and its calcium phosphate nanoparticles that inhibit rabies virus infection with vaccine[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19848

[收稿日期] 2012-01-13