

## 全人源抗狂犬病病毒糖蛋白抗体的制备及鉴定

王晓蕾<sup>1,2,3</sup>,朱进<sup>2,4\*</sup>,哈卓<sup>5,6</sup>,张晓萍<sup>5,6</sup>,杨岚<sup>5,6</sup>,杨晓明<sup>5,6</sup>,刘云成<sup>6</sup>,Mason Lu<sup>5,7</sup>,冯振卿<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学病理学系,<sup>2</sup>卫生部抗体技术重点实验室,江苏南京 210029;<sup>3</sup>南京医科大学附属南京医院病理科,江苏南京 210006;<sup>4</sup>南京军区军事医学研究所,江苏南京 210002;<sup>5</sup>东竺明生物技术有限公司,黑龙江大庆 163316;<sup>6</sup>福瑞邦生物科技有限公司,黑龙江大庆 163316;<sup>7</sup>University of Texas MD Anderson Cancer Center,Houston,Texas 77030)

**[摘要]** 目的:利用重组狂犬病病毒糖蛋白(RVG)免疫人源 IgM 转基因小鼠,制备全人源抗重组 RVG 蛋白单克隆抗体,并对其免疫学特性进行初步鉴定。方法:以重组 RVG 蛋白作为抗原免疫人源 IgM 转基因小鼠,采用杂交瘤技术制备筛选全人源抗重组 RVG 蛋白杂交瘤细胞株,双抗体夹心 ELISA 实验鉴定单抗的人源性及其抗体类型,并对其特异性及与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株的结合能力进行鉴定。结果:建立了 5 株稳定分泌抗重组 RVG 的全人源单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为 5D1、6H11、9A3、15D6、19E6,均为人源 IgM 免疫球蛋白,5 株单抗均能特异性识别重组 RVG 蛋白,其中 3 株能与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株特异性结合。结论:筛选制备了特异性全人源抗重组 RVG 蛋白的单克隆抗体,能与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株特异性结合,为进一步研制用于狂犬病防治的抗体药物奠定了基础。

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

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)02-160-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170205

## Generation and identification of fully human monoclonal antibodies against the rabies virus glycoprotein

Wang Xiaolei<sup>1,2,3</sup>, Zhu Jin<sup>2,4\*</sup>, Ha Zhuo<sup>5,6</sup>, Zhang Xiaoping<sup>5,6</sup>, Yang Lan<sup>5,6</sup>, Yang Xiaoming<sup>5,6</sup>, Liu Yuncheng<sup>6</sup>, Mason Lu<sup>5,7</sup>, Feng Zhenqing<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology,<sup>2</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health,NJMU,Nanjing 210029;<sup>3</sup>Department of Pathology,Nanjing Hospital Affiliated to NJMU,Nanjing 210006;<sup>4</sup>Huadong Medical Institute of Biotechniques,Nanjing 210002;<sup>5</sup>DZM Biotech Ltd,Daqing 163316;<sup>6</sup>Furuibang Biotech Co Ltd,Daqing 163316;<sup>7</sup>University of Texas MD Anderson Cancer Center,Houston,Texas 77030,USA)

**[Abstract]** **Objective:** To generate human monoclonal antibodies (mAbs) against the rabies virus glycoprotein (RVG) by immunizing the mice carrying human immunoglobulin transloci, and further to identify their characters. **Methods:** The human IgM transgenic mice were immunized with the rabies virus glycoprotein. The human anti-RVG hybridoma cell lines were screened and produced by using the classical hybridoma technique. The specificity and isotype of mAbs were determined by the double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Also, the binding properties with the inactivated rabies virus CVS-11 were analyzed. **Results:** Five hybridoma cell lines were established, they can stably produce human anti-rabies virus IgM monoclonal antibodies (5D1, 6H11, 9A3, 15D6, and 19E6). These mAbs specifically recognized the r-RVG and three human anti-r-RVG mAbs specifically combined with the inactivated rabies virus CVS-11 strain. **Conclusion:** Hybridoma cell lines were successfully established, and can stably produce human anti-rabies virus IgM monoclonal antibodies. Human anti-r-RVG mAbs could specifically combine with the inactivated rabies virus CVS-11 strain. This may be a foundation for further development of vaccine to prevent and control rabies.

**[Key words]** humanized IgM transgenic mice; rabies virus glycoprotein (RVG); human monoclonal antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 160-164]

**[基金项目]** 江苏省社会发展项目 (BE2011842); 国家自然科学基金 (81273325)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhujin1968@njmu.edu.cn, fengzhenqing@njmu.edu.cn

我国狂犬病形势异常严峻,年发病数居世界第 2,仅次于印度<sup>[1]</sup>。目前临床上对于狂犬病三级暴露后的治疗包括接种狂犬病疫苗和注射抗狂犬病病毒免疫球蛋白(rabies immunoglobulin,RIG)。RIG 包括人抗狂犬病病毒免疫球蛋白(human rabies immunoglobulin,HRIG)和马抗狂犬病病毒免疫球蛋白(equine rabies immunoglobulin,ERIG),但 HRIG 价格昂贵,ERIG 存在异种蛋白引起过敏反应和潜在病毒感染的风险,且 HRIG 和 ERIG 均不易大量制备,因此急需研制其他血清替代品<sup>[2-4]</sup>。全人源单克隆抗体为狂犬病的防治提供了新的解决方案,已成为国内外研究的热点<sup>[5]</sup>。本研究从英国医学研究理事会(MRC)和剑桥大学引进转人 IgM 基因小鼠,利用真核细胞表达的重组狂犬病病毒糖蛋白(RVG)免疫转人 IgM 基因小鼠,结合杂交瘤技术制备特异性的全人源抗重组 RVG 单克隆抗体,为进一步筛选人源抗狂犬病病毒中和抗体奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

重组 RVG 由南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室制备<sup>[6-8]</sup>。6~8 周龄以 C57BL/6J 小鼠为背景的 SPF 级雄性人源 IgM 转基因小鼠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 购于美国 ATCC 公司并由东竺明生物技术有限公司驯化制备,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。灭活狂犬病病毒 CVS-11 株由武汉生物制品研究所馈赠。Multiskan Fc 3.0 酶标仪(Thermo 公司,美国);细胞培养板及 ELISA 酶标反应板(Costar 公司,美国);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、聚乙二醇(PEG)溶液、次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸腺嘧啶(HAT)、次黄嘌呤-胸腺嘧啶(HT)等(Sigma 公司,美国);培养基、胎牛血清(FBS)(Gibco 公司,美国);HRP 标记的二抗(Jackson Immunolab 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人源 IgM 转基因小鼠的免疫

选取 3 只 6~8 周龄雄性人源 IgM 转基因小鼠,将重组 RVG 蛋白与等体积弗氏完全佐剂混合,乳化后进行皮下多点及腹腔免疫注射,抗原用量为每次 150  $\mu\text{g}$ /只;后 2 次免疫改用弗氏不完全佐剂,分别于 2 周及 4 周后进行。第 3 次免疫后的第 10 天取小鼠尾静脉血,离心并留取血清,利用间接 ELISA 方法测定免疫小鼠血清中抗重组 RVG 人 IgM 抗体

效价。将重组 RVG 蛋白按 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被 ELISA 酶标反应板,1%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;将重组 RVG 蛋白免疫的转人 IgM 基因小鼠血清 1:100 稀释,再倍比稀释后加入对应包被孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,同时将未经免疫的转人 IgM 基因小鼠血清作为阴性对照;1 $\times$ PBST 洗板 1 次后,加入 1:3 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgM 抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;1 $\times$ PBST 洗板 3 次后加 TMB 单组份显色液显色,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 20 min 后,1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应;测定  $D(450\text{ nm})$  数值,根据间接 ELISA 结果选取血清效价最高的转人 IgM 基因小鼠,融合前 3 d 经腹腔注射加强免疫,重组 RVG 蛋白用量为 150  $\mu\text{g}/\text{只}$ ,不含佐剂。

#### 1.2.2 杂交瘤细胞的制备

无菌条件下取人源 IgM 转基因小鼠脾脏,碾磨制备脾脏细胞悬液,按 SP2/0 细胞与脾脏细胞 1:2 比例混合,1 000 r/min 离心 5 min;弃上清并打散混合细胞沉淀,30 s 内加完 1.0 mL 融合剂 PEG,将融合管用旋力旋转,于 45 s 时加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 30 mL DMEM 培养基终止反应;37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min;1 000 r/min 离心 3 min;弃上清,轻轻打散底部细胞沉淀,用 HAT 培养基(含 10%胎牛血清)稀释融合细胞,铺入已编号的 25 块 96 孔细胞培养板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置培养,融合后 7 d 补液 1 次,选择性培养 10 d。

#### 1.2.3 杂交瘤细胞筛选及杂交瘤细胞株的建立

将重组 RVG 蛋白按 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被 ELISA 酶标反应板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;洗板后,1%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;96 孔细胞融合板内杂交瘤细胞培养上清作为一抗,同时以免疫小鼠血清做阳性对照、HAT 培养基做阴性对照、1% BSA 做空白对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;洗板后加入 1:5 000 稀释的羊抗人 IgM-HRP 抗体(二抗),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h;洗板后加 TMB 单组份显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 20 min,用 1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止;测定  $D(450\text{ nm})$  值。将阳性孔内融合细胞用 HT 培养基培养 3 d 后再次进行 ELISA 鉴定,随后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,阳性率达 100%时即可定株。

#### 1.2.4 抗重组 RVG 蛋白单抗人源性及类型鉴定

采用双抗体夹心 ELISA 法鉴定抗重组 RVG 单抗的人源性及类型;用羊抗人 IgM、羊抗人 IgG、羊抗人 IgA、羊抗鼠 IgM、羊抗鼠 IgG、羊抗鼠 IgA 分别包被 ELISA 酶标反应板,洗板后 1%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;分别加入待测的分泌抗重组 RVG 单抗的细胞上清液,阳性对照分别加入人 IgM、人 IgG、人 IgA、

鼠 IgM、鼠 IgG、鼠 IgA, 阴性对照分别用 SP2/0 细胞上清液及 1% BSA 代替, 37°C 孵育 1 h; 洗板后分别加入 1:2 000 稀释的羊抗人 IgM-HRP、羊抗人 IgG-HRP、羊抗人 IgA-HRP、羊抗鼠 IgM-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗鼠 IgA-HRP, 室温孵育 1 h; 洗板后加入 TMB 显色。

### 1.2.5 全人源抗重组 RVG 蛋白单抗的特异性鉴定

采用间接 ELISA 方法, 将重组 RVG 蛋白按 1.2 μg/mL 包被 ELISA 酶标反应板, 洗板后, 1% BSA 37°C 封闭 2 h; 分别将单抗细胞上清液加入对应包被板孔内, 每孔 50 μL, 并按 1:2 倍比稀释, 37°C 孵育 1 h, SP2/0 细胞上清作为阴性对照, 1% BSA 作为空白对照; 洗板后加入 1:3 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgM 抗体, 37°C 孵育 1 h; 洗板后加 TMB 单组份显色液, 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 观察并记录结果。

### 1.2.6 间接 ELISA 分析全人源抗重组 RVG 单抗与狂犬病病毒的结合特性

将重组 RVG 蛋白、灭活狂犬病病毒 CVS-11 株、BHK-21 细胞蛋白按 1.2 μg/mL 浓度分别包被 ELISA 酶标反应板; 洗板后 1% BSA 37°C 封闭 2 h; 分别将待测的分泌抗重组 RVG 单抗的细胞上清液加入对应包被板孔内, 每孔 50 μL, 室温孵育 1 h, SP2/0 细胞上清作为阴性对照, 1% BSA 作为空白对照; 洗板后加入 1:3 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgM 抗体, 37°C 孵育 1 h; 洗板后加 TMB 单组份显色液, 37°C 避光显色 20 min 后, 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 观察并记录结果。

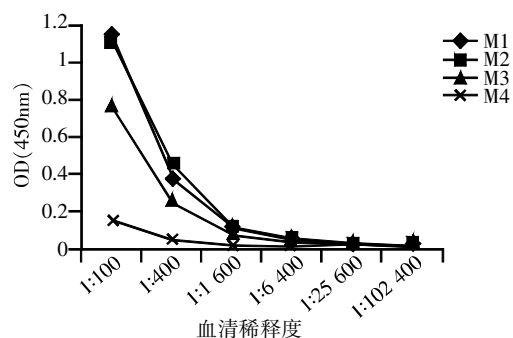
## 2 结果

### 2.1 转人 IgM 基因小鼠血清抗体效价测定及杂交瘤细胞制备

3 只转人 IgM 基因小鼠经 3 次重组 RVG 免疫, 用间接 ELISA 法检测免疫后转人 IgM 基因小鼠血清中抗重组 RVG 人 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, 脾脏细胞与 SP2/0 细胞按 2:1 比例进行细胞融合, 铺入已编号的 25 块 96 孔细胞培养板中, HAT 培养基选择性培养 1 周。

### 2.2 建立杂交瘤细胞株

通过间接 ELISA 方法筛选得到稳定的阳性杂交瘤细胞, 经 3 次亚克隆后阳性率达 100%, 共获得 5 株稳定分泌抗重组 RVG 蛋白单抗的杂交瘤细胞株, 分别命名为 5D1、6H11、9A3、15D6、19E6 (表 1)。



M1~M3: 3 只经重组 RVG 免疫的转人 IgM 基因小鼠; M4: 未经免疫的转人 IgM 基因小鼠。

图 1 间接 ELISA 法检测人源 IgM 转基因小鼠血清中抗重组 RVG IgM 抗体效价

Figure 1 ELISA analysis of human IgM titer of human IgM transgenic mice anti-r-RVG antibody

表 1 M1 转基因小鼠杂交瘤细胞融合后的筛选结果

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

融合板编号	融合率 (%)	阳性孔数	D(450 nm)	稳定阳性细胞株
2	85	4	0.312~0.513	0
3	81	1	0.367	0
4	78	2	0.416	0
5	89	2	0.329~0.594	1(5D1)
6	91	2	0.621~0.791	1(6H11)
7	82	1	0.98	0
8	78	4	0.35~0.882	0
9	97	5	0.408~0.92	1(9A3)
10	84	2	0.495~0.567	0
11	91	4	0.417~0.521	0
12	94	2	0.403~0.512	0
14	89	2	0.59~0.94	0
15	91	2	0.405~0.519	1(15D6)
18	74	2	0.84~0.863	0
19	88	6	0.348~0.479	1(19E6)
20	88	2	0.311~0.558	0
21	97	2	0.416~0.449	0
22	83	1	0.337	0
23	87	1	0.401	0
24	86	1	0.332	0
25	81	1	0.544	0

### 2.3 单抗人源性及类型鉴定

用双抗体夹心 ELISA 法鉴定抗重组 RVG 蛋白单抗的人源性及 Ig 类型, 结果如表 2 所示, 所获得的 5 株单抗均为人源性 IgM 免疫球蛋白, 相同实验条件下阳性及阴性对照均成立。

### 2.4 全人源抗重组 RVG 蛋白 IgM 单抗特异性检测

以重组 RVG 蛋白按 1.2 μg/mL 包板, 用间接

表 2 双抗体夹心 ELISA 法鉴定抗重组 RVG 单抗的人源性及 Ig 类型

Table 2 Specificity and isotype of mAbs was determined by the double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

一抗	包被:羊抗人 IgM	包被:羊抗人 IgA	包被:羊抗人 IgG	包被:羊抗鼠 IgM	包被:羊抗鼠 IgA	包被:羊抗鼠 IgG
	二抗:羊抗人 IgM-HRP	二抗:羊抗人 IgA-HRP	二抗:羊抗人 IgG-HRP	二抗:羊抗鼠 IgM-HRP	二抗:羊抗鼠 IgA-HRP	二抗:羊抗鼠 gG-HRP
5D1	+	-	-	-	-	-
6H11	+	-	-	-	-	-
9A3	+	-	-	-	-	-
15D6	+	-	-	-	-	-
19E6	+	-	-	-	-	-
人 IgM	+	-	-	-	-	-
人 IgA	-	+	-	-	-	-
人 IgG	-	-	+	-	-	-
鼠 IgM	-	-	-	+	-	-
鼠 IgA	-	-	-	-	+	-
鼠 IgG	-	-	-	-	-	+
SP2/0 细胞上清	-	-	-	-	-	-
1% BSA	-	-	-	-	-	-

ELISA 法鉴定 5 株全人源抗重组 RVG IgM 单抗与重组 RVG 蛋白的结合特异性,上清起始体积均为 50  $\mu$ L。结果显示,9A3 单抗在 1:32 稀释度时仍可与重组 RVG 特异性结合,其余 4 株单抗在 1:16 稀释度时仍可与重组 RVG 蛋白特异性结合(图 2)。

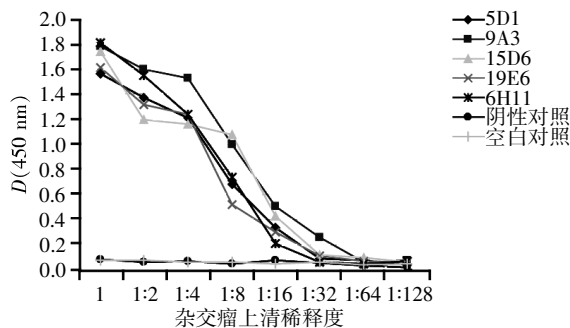


图 2 人源抗重组 RVG 抗体 IgM 特异性检测

Figure 2 Analysis of antibody titer of human anti-r-RVG IgM antibody

### 2.5 全人源抗重组 RVG 蛋白 IgM 单抗与灭活狂犬病病毒的结合特性

间接 ELISA 分析结果如图 3 所示,6H11、15D6、9A3 可与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株特异性结合,其余 5D1、19E6 与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株无反应,5 株单抗与 BHK-21 细胞裂解物均无反应。

### 3 讨论

全人源或人源化单克隆抗体药物给狂犬病病毒接触后的防治提供了新的解决方案<sup>[9]</sup>。基于基因工程技术制备的多种人源化抗狂犬病病毒糖蛋白抗体排除了鼠源单抗引发的 HAMA 反应,并且亲和

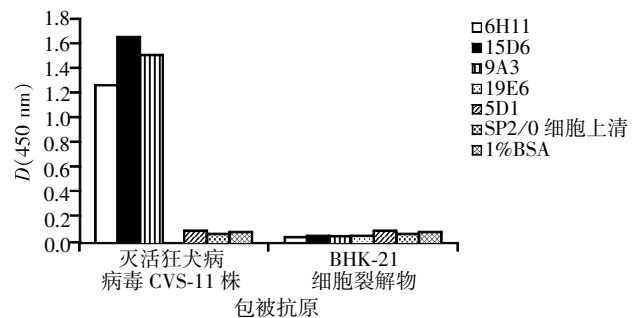


图 3 间接 ELISA 法分析全人源抗重组 RVG IgM 单抗与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株的结合特性

Figure 3 Analyze human anti-r-RVG IgM antibody the binding properties with rabies virus CVS-11 in ELISA

力高、无需进一步改造,显示出了较好的应用前景,并经体外及动物实验均证实具有中和保护作用<sup>[10-11]</sup>。虽然通过噬菌体展示技术筛选到的人源抗狂犬病病毒糖蛋白抗体具有与 HRIG 相同程度的中和保护作用,但小分子抗体血浆半衰期短而不利于疾病治疗,另外还存在抗体制备过程繁琐、干扰因素多的缺点,因此在抗体药物产业化以及临床实践中将面临诸多难题<sup>[12-14]</sup>。本研究借助人源 IgM 转基因小鼠,采用杂交瘤技术获得的全人源单克隆抗体,不但能够有效降低外源性病毒潜在感染的风险,还为将来抗体药物产业化提供了技术储备。

本研究从英国医学研究理事会(MRC)和剑桥大学引进转人 IgM 基因小鼠,利用重组 RVG 蛋白免疫转人 IgM 基因小鼠,结合杂交瘤技术经 3 次亚克隆后获得 5 株全人源抗重组 RVG 的单克隆抗体,分别命名为 5D1、9A3、6H11、15D6、19E6。通过

双抗体夹心 ELISA 证明 5 株单抗均为人源性免疫球蛋白, IgM 类型抗体。间接 ELISA 检测单抗的特异性及与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株结合能力, 结果表明 5 株单抗均能特异性结合重组 RVG 蛋白, 其中 6H11、15D6、9A3 能与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株特异性结合。对于能特异性识别重组 RVG 蛋白, 但与灭活狂犬病病毒 CVS-11 株不反应的 2 株单抗 19E6、5D1, 初步分析可能是由于重组 RVG 蛋白与天然狂犬病病毒糖蛋白抗原表位不尽相同所致。本研究利用转基因小鼠通过杂交瘤技术成功制备获得了全人源抗狂犬病病毒糖蛋白的 IgM 单克隆抗体, 为进一步研制用于狂犬病防治的抗体药物奠定了基础。

目前, 全世界已有十几家制药以及生物技术公司, 借助于携带有人免疫球蛋白基因位点的转基因小鼠研发新的治疗性全人源单抗药物<sup>[15]</sup>。在美国利用转人 Ig 基因小鼠制备的多个全人源治疗性单抗已进入临床试验和临床应用阶段, 如抗 CLA4 抗体可靶向性杀灭瘤细胞, 抗 RANKL 抗体能够与细胞核因子 KappaB 的受体结合从而有助于治疗骨质疏松等疾病。国内华北制药集团研发出了重组人源抗狂犬病毒单抗, 其抗体基因序列全部来源于人, 经细胞表达后分离提取得到高纯度单抗注射液, 打破了国外对全人源抗体开发技术的垄断, 这也是我国第一个具有自主知识产权的重组人源抗体的临床试验批件, 目前人体临床试验正在进行中<sup>[16-17]</sup>。本研究利用转人 IgM 基因小鼠制备的单抗是全人源的, 制备方法简单, 无需改造, 因此研制出具有中和活性的全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体有着非常广阔的发展前景, 将为临床狂犬病的防治带来新希望。

本课题组将进一步研究能同时特异性识别重组 RVG 蛋白和灭活狂犬病病毒 CVS-11 株的全人源单抗 6H11、15D6、9A3 所针对的具体中和抗原表位序列及其空间构象, 并对以上单抗的中和活性等问题展开深入研究, 为进一步研制具有保护力的全人源抗狂犬病病毒糖蛋白单抗药物提供技术贮备, 最终实现对狂犬病抗体药物的“鸡尾酒”疗法。

#### [参考文献]

[1] Bagcchi S. India fights rabies [J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(2): 156-157

[2] Liu X, Liu Q, Feng X, et al. Rabbit anti-rabies immunoglobulins production and evaluation [J]. *Trop Biomed*, 2011, 28(1): 138-148

[3] Inder Ma, Ketan Va, Bhavesh P, et al. State of globe: rabies: the lethality since antiquity [J]. *J Glob Infect Dis*, 2015, 7(1): 1-2

[4] Lafon M. Rabies virus receptors [J]. *J Neurovirol*, 2005, 11(1): 82-87

[5] 张夏玲, 孙见宇, 殷 珏, 等. 全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(6): 739-744

[6] 冯晓敏, 卞颖华, 徐 伟, 等. 狂犬病病毒 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

[7] Zhang X, Qi X, Zhang Q, et al. Human 4F5 single-chain Fv antibody recognizing a conserved HA1 epitope has broad neutralizing potency against H5N1 influenza A viruses of different clades [J]. *Antiviral Res*, 2013, 99(2): 91-99

[8] 王晓蕾, 陈芳芳, 袁 伟, 等. 狂犬病病毒糖蛋白在昆虫细胞中的表达及其免疫学特性分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(6): 772-777

[9] 陈 哲, 孙丽娜, 李 川, 等. 人源中和性抗狂犬病病毒基因工程抗体的研制 [J]. *病毒学报*, 2010, 26(4): 271-275

[10] Cheng Y, Li Z, Xi H, et al. A VL-linker-VH orientation dependent single chain variable antibody fragment against rabies virus G protein with enhanced neutralizing potency *in vivo* [J]. *Protein Pept Lett*, 2016, 23(1): 24-32

[11] Matsumoto T, Yamada K, Noguchi K, et al. Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus [J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(11): 673-683

[12] 李 琛, 林 红, 刘新建, 等. 人源抗狂犬病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

[13] 张倩倩, 赵 茜, 张 晓, 等. 全人源抗狂犬病病毒 G 蛋白单链抗体制备及中和活性鉴定 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(7): 927-931

[14] 高 畅, 张倩倩, 熊四平, 等. 全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体的制备及活性分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(6): 741-744

[15] 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

[16] Chai Q, She R, Huang Y, et al. Expression of neuronal CXCL10 induced by rabies virus infection initiates infiltration of inflammatory cells, production of chemokines and cytokines, and enhancement of blood-brain barrier permeability [J]. *J Virol*, 2015, 89(1): 870-876

[17] 王美霞, 贾 敏, 金 铭, 等. 不同剂量重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体注射液人体单次给药的安全性 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(7): 986-990

[收稿日期] 2016-04-13