

高致病性禽流感病毒广谱嵌合抗体的构建 表达及活性研究

夏琳^{1,2}, 罗文新^{1*}, 吴君¹, 刘彦宁¹, 傅雅娟¹,
陈毅歆¹, 陈鸿霖¹, 金鑫², 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 国家传染病诊断试剂及疫苗工程技术研究中心, 生命科学学院,

2. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 高致病性禽流感病毒高度变异且缺乏有效的治疗药物. 在前期研究工作中, 本课题组发现一株鼠源广谱中和单抗 13D4, 在动物实验中显示出对 H5N1 禽流感病毒具有广谱治疗效果. 在本研究中, 从分泌 13D4 单克隆抗体的杂交瘤细胞株中抽提总 RNA, 经 RT-PCR 扩增出轻重链可变区 DNA 序列, 并分别与人 IgG1 的轻重链恒定区基因序列拼接, 构建人-鼠嵌合抗体. 筛选出稳定表达嵌合抗体的 CHO 细胞株, 从培养上清中纯化出嵌合抗体. 竞争 Elisa 结果表明, 嵌合抗体与鼠源单抗能够识别同一个抗原表位并具有相似的亲和力. 血凝抑制反应和中和活性测定结果证明, 13D4 嵌合抗体保留了对不同亚型 H5N1 病毒的广谱反应性, 并且对两株 H5N1 病毒具有中和活性. 本研究获得的 13D4 嵌合抗体将具有潜在的治疗价值.

关键词: H5N1; 嵌合抗体; 广谱活性

中图分类号: Q 511

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)06-0845-05

大部分禽流感病毒只会引起人体的微弱感染^[1], 1997 年首次在香港出现的高致病性禽流感 H5N1 病毒则例外, 它具有显著的广谱宿主范围, 在小型大型猫科、啮齿类、灵长类动物等许多野生动物及家禽中引起致命性疾病^[2]. H5N1 病毒的持续感染使人类感染致死率超过了 60%^[3]. M2 离子通道抑制剂与神经氨酸酶抑制剂为病毒有效的预防制剂, 但并不能作为有效的治疗药物^[4].

由于抗体介导的主动免疫反应能够阻挡病毒与靶细胞结合而成为感染的治疗方法之一. 1918 年“西班牙流感”中输入康复病人的血清减少了 50% 的致死率^[5], 近来严重的 H5N1 病人从康复者的血清中也成功获得了免疫能力^[6]. 已有报道证明鼠源及人源单克隆抗体对 H5N1 病毒感染前后的动物具有保护效果^[7]. 针对病毒的高度变异性, 筛选特异识别 H5N1 病毒抗原保守表位的广谱交叉中和性单克隆抗体成为

研究者们目标^[8], 并试图将该类单抗人源化后用于人类的感染治疗, 避免鼠源单抗的免疫原性带来的副作用^[9].

我们已报道了一组广谱交叉反应的 H5 特异性抗体, 其中 13D4 为最有效的鼠源保护性抗体. 动物实验证实, 13D4 鼠单抗对 4 个 H5N1 禽流感病毒代表亚型 1, 2. 1, 2. 2, 2. 3 的感染均具有良好的治疗效果^[10]. 本研究中, 我们将构建表达 13D4 嵌合抗体, 旨在大幅度减弱鼠源单抗的免疫原性、延长抗体在体内的半衰期, 为治疗性抗体的研究和抵御高致病性禽流感 H5N1 对人类的危害奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中所用的大肠杆菌 DH5 α 为实验室保存; 真核表达载体 pcDNA5/FRT/TO、定点真核表达系统 Flp-InTM 及表达细胞株 Flp-In CHO 购自 Invitrogen 公司; 转染脂质体 Lipofect2000、筛选试剂潮霉素购自 Invitrogen 公司; 各种限制性内切酶、LA-Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶、pMD18-T 载体均购自大连 TaKaRa 公司; 无血清 SFM4 培养基购自 Hyclone 公司; 灭活 H5N1 病毒株由香港大学新发传染病国家重点实验室

收稿日期: 2010-04-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(30901077); 教育部科学技术研究重点项目(108157); 国家传染病重大专项(2008ZX10004-006); 福建省科技计划重点项目(2008Y0059, 2009YZ0002)

* 通讯作者: wxluo@xmu.edu.cn

提供; 13D4 鼠单抗, HRP 标记的 13D4 鼠单抗, 抗 HBV preS1 的 4D11 嵌合抗体, proteinA 和重组 HA1 由本实验室研制及纯化.

1.2 方法

1.2.1 13D4 鼠单抗可变区基因的克隆

从 13D4 杂交瘤细胞株中抽提总 mRNA, oligo dT 引物反转录成 cDNA (Promega, Madison WI). 根据 Novagen 公司 Ig-Prime 试剂盒的引物序列合成 31 条上游引物和 4 条下游引物, 以 cDNA 为 PCR 扩增的模板, 扩增产物克隆入 pMD18-T 载体中, 测序并分析以确定分离出抗体可变区基因.

1.2.2 嵌合抗体表达载体的构建

在 pcDNA5/FRT/TO 定点整合载体基础上进行改造, 形成一个带有两个 pCMV 启动克隆位点及 BGH 终止子的真核表达载体 pcDNA5/FRT/PJ241. 利用 DNA 重组技术, 将人 gamma 重链恒定区及人 kappa 轻链恒定区, 分别插入两个 pCMV 启动子的下游. 将 13D4 VH 基因经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切插入重链恒定区上游, 再将 13D4 VK 基因经 *Bam*HI 和 *Eco*R V 双酶切插入轻链恒定区的上游. 经测序验证获得能表达嵌合抗体的重组质粒 pcDNA5/FRT/PJ241/13D4.

1.2.3 嵌合抗体在 CHO 细胞中的稳定表达

采用 Lipofect 2000 将 pOG44 质粒(Invitrogen, USA) 以及嵌合抗体表达质粒共转染入 FlpIn CHO 细胞中. 用潮霉素加压筛选 1 个月(终质量浓度为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 获得稳定分泌嵌合抗体的稳定细胞株.

1.2.4 嵌合抗体的表达及纯化

CHO 稳定细胞株在体积分数为 10% 的 FBS DMEM 培养基中生长至 $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 再直接换为无血清培养基 SFM4 培养 5~7 d 后收集上清. 用饱和硫酸铵初步纯化后, 再用 ProteinA 亲和层析柱分离纯化嵌合抗体, 收取特异性蛋白洗脱峰, SDS-PAGE 电泳确定纯度.

1.2.5 ELISA 检测嵌合抗体活性

酵母表达的重组 HA1 包被 96 孔板(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ED 液封闭, 纯化的 13D4 嵌合抗体作为一抗与之反应, 再与羊抗鼠酶标抗体(体积比为 1:2000) 反应后显色终止, 酶标仪读值.

1.2.6 竞争 ELISA 反应

3G4 抗体(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被 96 孔板捕获 H5N1 病毒(8HA) 后, 嵌合抗体以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 初始质量浓度倍

比稀释后与 HRP 标记的 13D4mA b 同时加入孔中竞争结合病毒. 抗 HBV preS1 的 4D11 嵌合抗体用作阴性对照, 13D4 鼠源单抗作为阳性对照. 显色终止后酶标仪读值.

1.2.7 血凝抑制反应

血凝抑制方法检测嵌合抗体的广谱反应性. 根据修改后世界卫生组织动物流感诊断与监督手册中的操作方法, 血凝抑制可得到与 H5N1 不同亚型的反应活性^[11-12]. 所用 H5N1 病毒均为灭活病毒, 测定病毒 HAU 值, 调至 8AD. 在血凝板中每孔加入 25 μL PBS, 第一孔中加 25 μL 嵌合抗体(0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 并混匀, 倍比稀释至最后一孔, 弃 25 μL . 与等体积病毒室温孵育 45 min, 加入 0.75% 鸡红细胞 50 μL , 室温孵育 30 min, 观察是否出现红细胞凝集以判断嵌合抗体的血凝抑制效应.

1.2.8 细胞微孔中和实验

梯度稀释的 13D4 嵌合抗体与半数组织培养感染量(TCID₅₀) 的 H5N1 病毒混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育培养 2 h 后, 加入 MDCK 细胞中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% (体积分数) CO₂ 培养箱孵育 1 h, 然后吸去上清, 用体积分数为 10% FBS 的 MEM 培养基培养 72 h. 取细胞上清用血凝方法判定中和滴度, 血凝活性呈现阴性孔对应的抗体最高稀释度即为此抗体的中和滴度. 该实验在香港大学新发传染病国家重点实验室的 P3 实验室中完成.

2 实验结果

2.1 13D4 嵌合抗体表达载体的构建

采用 RT-PCR 法从分泌 13D4 鼠单抗的杂交瘤细胞中克隆出抗体可变区核苷酸序列. 测序结果表明, 重链可变区长为 369 bp, 编码 123 个氨基酸, 轻链可变区为 324 bp, 编码 108 个氨基酸.

本研究运用 Invitrogen 公司的 FlpIn 定点整合系统来筛选表达嵌合抗体的 CHO 细胞株. 该系统在宿主细胞的染色体高转录活性位点上引入 FRT 序列, 在 pOG44 质粒表达的 Flp 重组酶作用下, 可将目的基因定点整合在 FRT 位点, 实现目的蛋白的定点高表达.

对 pcDNA5/FRT/TO 质粒进行改造, 使其带有两个 pCMV 启动的克隆位点及 BGH pA 终止序列, 再将人 gamma 重链恒定区和人 kappa 轻链恒定区分别插入两个 pCMV 启动子的下游, 并将 13D4 的 VH 片段经和 VK 序列分别克隆到人重链和轻链恒定区上游, 测序结果显示成功构建了表达嵌合抗体的质粒

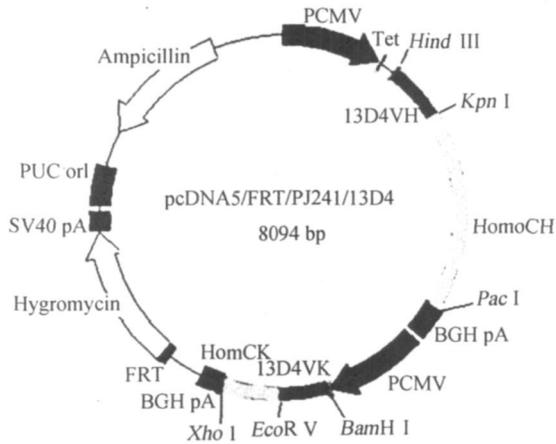


图 1 表达 13D4 嵌合抗体的 pcDNA5/FRT/PJ241/13D4 质粒图

Fig. 1 pcDNA5/FRT/PJ241/13D4 plasmid vector of 13D4cAb expression

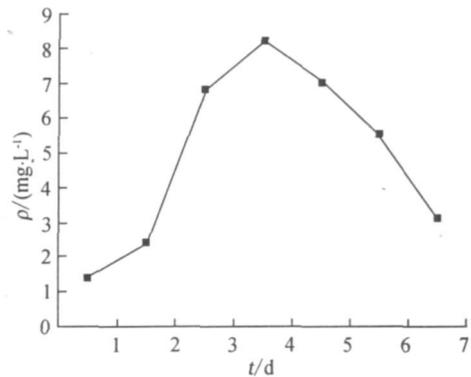


图 2 CHO 稳定细胞株在无血清培养基中表达嵌合抗体的产量变化

Fig. 2 The production curve of cAb expression form CHO stable cell line in serum free medium

pcDNA5/FRT/PJ241/13D4(图 1).

2.2 13D4 嵌合抗体的稳定表达及纯化

将 pOG44 质粒与嵌合抗体表达质粒共转染入 Flp-In CHO 细胞中. 用潮霉素加压筛选 1 个月后, 获得稳定分泌 13D4 嵌合抗体的稳定细胞株.

稳定表达 13D4 嵌合抗体的 CHO 细胞株在 10 cm 细胞培养板中, 用体积分数为 10% FBS 的 DMEM 培养基培养至 $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 后, 培养液更换为 SFM4 无血清培养基, 继续培养, 对 7 d 内的培养上清进行表达产量监测. 由图 2 的结果可知, 表达产量在第 4 天达到最高峰为 8 mg/L, 而后逐步降低. 推测随着细胞的逐渐凋亡, 产量下降, 同时培养液中的抗体也被逐渐降解. 因此收集第 4 天的细胞培养上清进行纯化, 经 ProteinA 亲和层析后得到纯度超过 95% 的嵌合抗体(图 3).

2.3 13D4 嵌合抗体的活性检测

以间接 ELISA 法检测经梯度稀释后的纯化 13D4 嵌合抗体与酵母表达的重组 HA1 的结合活性. 由图 4 的结果可知, 13D4 嵌合抗体与重组 HA1 的反应呈剂量依存性关系(图 4).

进一步用竞争 ELSIA 法检测 13D4 嵌合抗体的活性. H5N1 病毒被包被在板上的特异抗体捕获, 以梯度稀释的 13D4 嵌合抗体与 HRP 标记的 13D4 鼠单抗竞争结合 H5N1 病毒. 以未标记的 13D4 鼠单抗作为阳性对照, 抗 HBV preS1 的 4D11 嵌合抗体作为阴性对照. 结果如图 5 所示, 13D4 嵌合抗体及亲本 13D4 鼠单抗的竞争曲线相似, 说明二者能有效竞争 HRP 标记的 13D4 鼠单抗与 H5N1 病毒的结合, 亲和力相

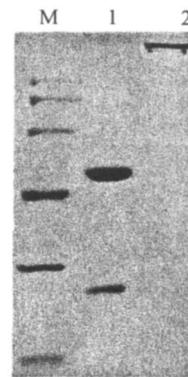


图 3 13D4 嵌合抗体 SDS-PAGE 电泳结果
M. 蛋白 Marker; 1. 还原型; 2. 非还原型

Fig. 3 SDS-PAGE of purified 13D4 chimeric antibody

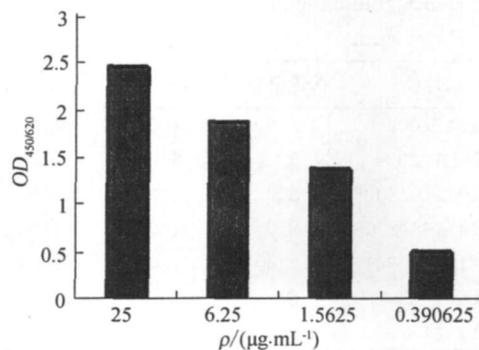


图 4 13D4 嵌合抗体与重组 HA1 反应的剂量依存关系

Fig. 4 The dose dependency of 13D4 chimeric antibody binding to recombinant HA1

似并且有一致的特异结合表位.

2.4 13D4 嵌合抗体的广谱血凝抑制活性和中和活性测定

选取具有代表性的 7 株 H5N1 病毒株, 分别分布

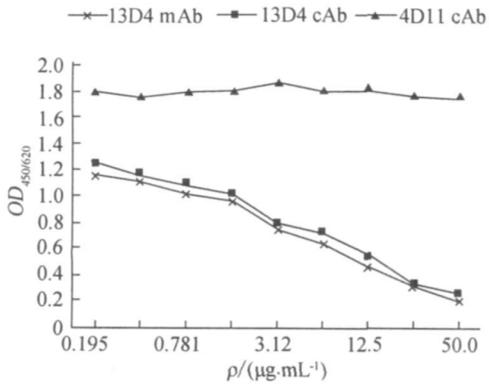


图5 竞争 ELISA 检测 13D4 嵌合抗体与 H5N1 病毒的特异性反应

Fig. 5 The specific reaction of 13D4 chimeric antibody with H5N1 virus detected by competitive ELISA

在印尼及我国香港、青海等地,是从鸡、鸭及数种野生鸟类中分离所得,通过血凝抑制法来检测嵌合抗体的广谱反应活性。

13D4 嵌合抗体与亲本鼠单抗均以 2 mg/mL 质量浓度进行广谱血凝抑制测定,结果显示嵌合抗体与亲本鼠抗的广谱活性基本一致,表明嵌合抗体保留了原鼠单抗的广谱反应活性及亲和力(表 1)。

进一步测定 13D4 嵌合抗体对两株 H5N1 病毒的中和活性,结果显示 13D4 嵌合抗体对两种病毒均有中和活性,且中和滴度与亲本鼠单抗相似(表 2)。

表 1 13D4 嵌合抗体对 H5N1 病毒的广谱血凝抑制活性测定
Tab. 1 Hemagglutinin inhibition activity of 13D4 cAb to H5N1 virus

H5N1 病毒株	病毒分枝	13D4 嵌合抗体	13D4 鼠单抗
VNM/1194/2004	1	400	400
CK/IDN/2A/2004	2.1	6400	6400
BHGS/QH/15/2005	2.2	1600	1600
CK/VNM/568/2005	2.3	1600	1600
CK/YN/115/2004	2.4	1600	800
A/CK/HKYU22/2002	8	800	800
MDK/JX/1653/2005	9	800	400

表 2 13D4 嵌合抗体对 H5N1 病毒的中和活性测定
Tab. 2 Neutralizing activity of 13D4 cAb to H5N1 virus

H5N1 病毒株	病毒分枝	13D4 嵌合抗体	13D4 鼠单抗
SZ/1	2.1	1: 1280	1: 1280
BH/Goose/QH/15C/05	2.2	1: 1280	1: 1280

3 讨论

血凝素(HA)为病毒表面负责与宿主细胞受体结合的蛋白,能通过胞吞作用及随后的膜融合进入细胞体内^[13]. HA 为中和抗体的主要靶位因而成为药物及疫苗研究中重要的抗原表位.由于 HA 基因的抗原漂移使禽流感病毒持续突变^[14]而使其具有种间传染及在宿主体内免疫逃逸的能力^[15].面对禽流感病毒高变异性、发病症状难辨别、任何诊断和治疗的延误都可能导致患者死亡的特点,传统的疫苗和药物很难有效解决禽流感疫情的大规模爆发.近年来,治疗性抗体在感染性疾病领域迅猛发展,在过去的 10 年中,超过 20 株抗体药物通过 FDA 批准应用于人类疾病的治疗,100 多株治疗性抗体正在临床试验中。

鼠源性抗体在人类的治疗中会产生很多副作用如 HAMA 反应,为了使鼠源单抗能够用于人的治疗,可以对鼠单抗进行人源化改造,即将鼠抗体可变区与人抗体恒定区相嵌合,不仅能大大降低其免疫原性,保持鼠抗体结合抗原的特异性及产生人抗体恒定区 Fc 介导的效应功能,而且也能延长抗体在人体内的半衰期.近期,运用嵌合抗体成功治疗感染 H5N1 病毒小鼠模型的研究已有报道^[16].本研究对 13D4 鼠单抗进行人源化改造,构建人-鼠嵌合抗体,也为后期更高层次的 CDR 区移植打好基础。

我们研制的高致病性禽流感病毒广谱嵌合抗体 13D4 是将轻、重链表达基因与筛选扩增基因构建在同一个表达载体上,使轻、重链能在筛选与表达中保持均衡扩增,所表达的嵌合抗体能正确折叠并成功分泌至细胞外.目前 CHO 细胞被较多用于表达抗体分子,也是较成功的表达体系,它能够较准确地完成抗体链的装配、翻译后修饰、分泌等机制,产生完整的具备正常效应功能的抗体分子^[17]. 13D4 嵌合抗体在竞争 ELISA 中与亲本抗体识别同一个抗原表位;在血凝抑制实验中保持了与 H5N1 病毒不同亚型的广谱活性;在中和测定中表现出与亲本抗体相似的病毒中和活性. 13D4 嵌合抗体的成功构建将为禽流感病毒抗体治疗药物的研发提供一种选择。

参考文献:

[1] Beare A S, Webster R G. Replication of avian influenza viruses in humans[J]. Arch Virol, 1991, 119(1/2): 37-42.
[2] Papaioanou M. Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus: cause of the next pandemic[J]. Comp Immunol Mi

- crobiol Infect Dis, 2009, 32(4): 287-300.
- [3] Abdel Ghafar A N, Chotpitayasunondh T, Gao Z, et al. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans[J]. N Engl J Med, 2008, 358(3): 261-273.
- [4] Pielak R M, Schnell J R, Chou J J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(18): 7379-7384.
- [5] Luke T C, Kilbane E M, Jackson J L, et al. Meta-analysis: convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment[J]. Ann Intern Med, 2006, 145(8): 599-609.
- [6] Zhou B, Zhong N, Guan Y. Treatment with convalescent plasma for influenza A (H5N1) infection[J]. N Engl J Med, 2007, 357(14): 1450-1451.
- [7] Hanson B J, Boon A C, Lim A P, et al. Passive immunoprophylaxis and therapy with humanized monoclonal antibody specific for influenza A H5 hemagglutinin in mice[J]. Respir Res, 2006, 7: 126.
- [8] Chen H, Smith G J, Li K S, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(8): 2845-2850.
- [9] Leslie M. Immunology: flu antibodies stir new hope for treatment, vaccine[J]. Science, 2009, 323(5918): 1160.
- [10] Chen Y, Qin K, Wu W L, et al. Broad cross protection against H5N1 avian influenza virus infection by means of monoclonal antibodies that map to conserved viral epitopes[J]. J Infect Dis, 2009, 199(1): 49-58.
- [11] Wu W L, Chen Y, Wang P, et al. Antigenic profile of avian H5N1 viruses in Asia from 2002 to 2007[J]. J Virol, 2008, 82(4): 1798-1807.
- [12] World Health Organization (WHO). Manual on animal influenza diagnosis and surveillance[R/OL]. 2008-10-23. Geneva, Switzerland: WHO, 2002. Available at <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whoedscsrncs20025rev.pdf>.
- [13] Stevens J, Blixt O, Tumpey T M, et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus[J]. Science, 2006, 312(5772): 404-410.
- [14] Malik P J S, de Jong M D, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(2): 243-267.
- [15] Duan L, Bahl J, Smith G J, et al. The development and genetic diversity of H5N1 influenza virus in China, 1996-2006[J]. Virology, 2008, 380(2): 243-254.
- [16] Prabakaran M, Prabhu N, He F, et al. Combination therapy using chimeric monoclonal antibodies protects mice from lethal H5N1 infection and prevents formation of escape mutants[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5672.
- [17] Nam J H, Zhang F, Ermonval M, et al. The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 100(6): 1178-1192.

Construction and Identification of Chimeric Antibody with Broad-spectrum Neutralization to Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus

XIA Lin^{1,2}, LUO Werrxin^{1*}, WU Jun¹, LIU Yanning¹, FU Yajuan¹
CHEN Yixin¹, CHEN Honglin¹, JIN-Xin², XIA Ningshao¹

(1. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, School of Life Sciences, Xiamen University,
2. Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Highly pathogenic Avian Influenza Virus has persistent mutation and is lack of efficient therapeutic drugs. In the early research, a murine broad spectrum neutralization monoclonal antibody 13D4 had been found that it had broad spectrum therapeutic effectiveness directly to H5N1 avian Influenza virus in animal protection experiment. In the present study, the genes encoding variable sequences of heavy and light chain were obtained from 13D4 murine hybridoma cells by RT-PCR. Then these genes were combined with human gamma and kappa constant regions separately to construct chimeric antibody(cAbs). Chimeric antibody was purified from serum free supernatants of stable CHO cell line. The competitive Elisa results indicated that chimeric antibody could recognize the same epitope as parent antibody with similar affinity. 13D4 chimeric antibody was further confirmed that retained broad spectrum activity to different subtypes of H5N1 viruses in hemoagglutination inhibition assay. It also showed neutralizing activity to two H5N1 virus strains. In summary, 13D4 chimeric antibody developed in the research would be valuable in the treatment.

Key words: H5N1; chimeric antibody; broad spectrum activity