

医学与免疫生物技术

利用转基因小鼠筛选全人源炭疽致死因子中和抗体

王潇霖, 迟象阳, 刘炬, 刘威岑, 刘树玲, 邱顺芳, 温中华, 范鹏飞, 刘坤, 宋小红, 付玲, 张军, 于长明

军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

王潇霖, 迟象阳, 刘炬, 等. 利用转基因小鼠筛选全人源炭疽致死因子中和抗体. 生物工程学报, 2016, 32(11): 1590-1599.

Wang XL, Chi XY, Liu J, et al. Screening of full human anthrax lethal factor neutralizing antibody in transgenic mice. Chin J Biotech, 2016, 32(11): 1590-1599.

摘要: 炭疽是由炭疽芽孢杆菌引起的严重威胁人类健康的传染病。炭疽毒素包括 3 种蛋白质成分: 保护性抗原 (PA)、致死因子 (LF) 和水肿因子 (EF)。PA 与 LF 形成致死毒素 (LT), 与 EF 形成水肿毒素 (ET)。由于致死毒素 (LT) 在感染者损伤及死亡中发挥主要作用, 因此在炭疽感染晚期单纯使用抗生素治疗难以发挥疗效, 治疗性中和抗体成为目前最有效的炭疽治疗药物。目前国外获得的炭疽毒素抗体多为炭疽 PA 抗体, 美国 FDA 已批准瑞西巴库 (人源 PA 单抗) 用于吸入性炭疽的治疗。一旦炭疽芽孢杆菌被人为改构或 PA 中和表位发生突变, 针对 PA 单一表位的抗体将可能失效, 因此针对 LF 的抗体将成为炭疽治疗的有效补充。目前国外已有的 LF 抗体多为鼠源抗体和嵌合抗体, 而全人源抗体可以避免鼠源抗体免疫原性高等缺点。本研究首先用 LF 抗原免疫人抗体转基因小鼠, 利用流式细胞仪从小鼠脾淋巴细胞中分选抗原特异的记忆 B 细胞, 通过单细胞 PCR 方法快速获得两株具有结合活性的抗 LF 单抗 1D7 和 2B9。瞬时转染 Expi 293F 细胞制备抗体, 通过毒素中和实验 (TNA) 发现 1D7 和 2B9 在细胞模型中均显示较好的中和活性, 并且与 PA 单抗联合使用时, 表现出较好的协同作用。总之, 本文利用转基因小鼠、流式分选技术和单细胞 PCR 技术的优势, 快速筛选到全人源 LF 抗体, 为快速筛选全人源单克隆抗体开辟了新的思路与方法。

关键词: 炭疽致死因子, 转基因小鼠, 流式分选, 记忆 B 细胞, 单细胞 PCR, 全人源单克隆抗体

Received: January 21, 2016; **Accepted:** March 23, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81172980), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021407).

Corresponding authors: Changming Yu. Tel: +86-10-66948692; E-mail: yuchangming@126.com

Jun Zhang. Tel: +86-10-66948864; E-mail: justforhere@126.com

国家自然科学基金 (No. 81172980), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA021407) 资助。

网络出版时间: 2016-04-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160425.0932.001.html>

Screening of full human anthrax lethal factor neutralizing antibody in transgenic mice

Xiaolin Wang, Xiangyang Chi, Ju Liu, Weicen Liu, Shuling Liu, Shunfang Qiu, Zhonghua Wen, Pengfei Fan, Kun Liu, Xiaohong Song, Ling Fu, Jun Zhang, and Changming Yu

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical, Beijing 100071, China

Abstract: Anthrax is a highly lethal infectious disease caused by the spore-forming bacterium *Bacillus anthracis*. The major virulence factor of *B. anthracis* consists of protective antigen (PA), lethal factor (LF) and edema factor (EF). PA binds with LF to form lethal toxin (LT), and PA binds with EF to form edema toxin (ET). Antibiotics is hard to work in advanced anthrax infections, because injuries and deaths of the infected are mainly caused by lethal toxin (LT). Thus, the therapeutic neutralizing antibody is the most effective treatment of anthrax. Currently most of the anthrax toxin antibodies are monoclonal antibodies (MAbs) for PA and US FDA has approved ABTHRAX humanized PA monoclonal antibody for the treatment of inhalational anthrax. Once *B. anthracis* was artificially reconstructed or PA had mutations within recognized neutralization epitopes, anti-PA MAbs would no longer be effective. Therefore, anti-LF MAbs is an important supplement for anthrax treatment. Most of the anti-LF antibodies are murine or chimeric antibodies. By contrast, fully human MAbs can avoid the high immunogenicity of murine antibodies. First, we used LF to immunize the transgenic mice and used fluorescent cell sorting to get antigen-specific memory B cells from transgenic mice spleen lymphocytes. By single cell PCR method, we quickly found two strains of anti-LF MAbs with binding activity, 1D7 and 2B9. Transiently transfected Expi 293F cells to obtain MAbs protein after purification. Both 1D7 and 2B9 efficiently neutralized LT *in vitro*, and had good synergistic effect when mixed with anti-PA MAbs. In summary, combining the advantages of transgenic mice, fluorescent cell sorting and single-cell PCR methods, this study shows new ideas and methods for the rapid screening of fully human monoclonal antibodies.

Keywords: anthrax lethal factor, transgenic mice, fluorescent cell sorting, memory B cells, single cell PCR, fully human MAbs

炭疽是由炭疽芽孢杆菌引起的严重威胁人类健康的乙类传染病^[1]。依据感染途径不同,将炭疽分为皮肤炭疽、胃肠炭疽和肺炭疽 3 种类型。肺炭疽致死率高达 90%^[2],我国将其按甲类传染病进行预防和控制。美军将炭疽芽孢杆菌列为 A 类生物剂^[3],因此炭疽防控是防生和反恐的重要研究目标。

炭疽毒素包括 3 种蛋白质成分:保护性抗原 PA、致死因子 LF 和水肿因子 EF。它们的作用机理是:PA 和细胞膜上的炭疽毒素受体结合

后被细胞膜上的 Furin 蛋白酶水解成 PA63, PA63 形成七聚体再与 LF 形成致死毒素 LT 或与 EF 结合形成水肿毒素 ET,通过受体介导的内吞进入细胞,从而发挥毒性作用^[4-5]。

炭疽的治疗策略主要有两类:一类是抗生素,但抗生素只对敏感的炭疽芽孢杆菌有效,对体内的炭疽毒素无效,因此必须早期使用。另一类是治疗性抗体,治疗性抗体对耐药的炭疽芽孢杆菌有效^[6],而且可以中和体内的炭疽毒素,在出现症状后能明显提高存活率;而且致

死毒素 (LT) 在炭疽感染者损伤甚至死亡中发挥着主要作用,这也是炭疽感染晚期单纯使用抗生素治疗难以发挥疗效的原因。因此,治疗性抗体是目前最有效的炭疽治疗药物^[7-8]。

目前国外获得的炭疽毒素抗体多为炭疽 PA 抗体^[9],美国 FDA 已批准瑞西巴库 (人源 PA 单抗) 用于吸入性炭疽的治疗^[10],但一旦炭疽芽孢杆菌被人为改构或 PA 中和表位发生突变,针对 PA 单一表位的抗体将可能失效。研究显示当炭疽 LF 抗体与 PA 抗体联合使用时会产生一定的协同作用^[16-18],抗体混合物可以识别多个毒素蛋白上的不同表位,提高治疗效果,这对“鸡尾酒疗法”也奠定了基础。

目前已有文献报道的 LF 抗体多为鼠抗和嵌合抗体^[11-15],由于鼠源性较高应用到人体易引起人抗鼠抗体反应 (HAMA) 从而很难应用于临床。因此,研究全人源炭疽 LF 抗体具有重要的军事意义和社会意义。

随着 PCR 技术、转基因技术和抗体库技术的不断发展,单克隆抗体由鼠源性单抗、嵌合型单抗逐渐被人源化单抗和全人源单抗取代^[19]。全人源抗体避免了鼠源抗体免疫原性高等缺点,因此得到了广泛的应用。由于 LF 抗原不是已批准的疫苗组分,因此不能直接用于免疫志愿者从而获得人抗体基因;而人抗体转基因小鼠克服了无疫苗免疫或病患血样等缺点,可用于抗原免疫后来筛选特异性的全人源单克隆抗体^[20],采用流式分选和单细胞 PCR 技术可以快速获得抗体基因^[21-22]。

本课题的创新点在于建立了基于转基因小鼠、流式分选技术和单细胞 PCR 技术相结合的人源抗体快速筛选体系,不仅快速获得了全人源炭疽 LF 单克隆抗体,也为快速筛选其他全人

源单克隆抗体开辟了新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK 293T 人胚肾细胞、Expi 293F 细胞、J774A.1 小鼠单核巨噬细胞由本实验室保存;pcDNA-H 质粒、pcDNA- κ 质粒、pcDNA3.4 载体、rLF 甘油冻存菌为实验室前期构建并保存;rPA 蛋白由本实验室前期制备并保存;6-8 周龄普通 C57BL/6 雄性小鼠由本院实验动物中心提供;6-8 周龄雄性 C57BL/6 转基因小鼠由山东国际生物科技园提供;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;MEM 培养基、RPMI1640 培养基、FBS、ExpiFectamine™293 Transfection Kit 购自 Gibco 公司;ELISA 板购自 Thermo Nunc 公司;细胞培养板购自 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 rLF 的制备

将 rLF 甘油冻存菌复苏于 3 mL LB 中,37 °C、220 r/min 培养过夜,按 1 : 20 转接于新鲜 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 4 h,再按 1 : 100 转接于 1 L 新鲜 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 达 0.6 左右。加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,28 °C、220 r/min 诱导表达 5 h。4 °C、8 000×g 离心 10 min 收集菌体,沉淀用高渗溶液 (20%蔗糖,1 mmol/L EDTA,20 mmol/L Tris,pH 8.0) 重悬,冰上静置 5 min,4 °C、12 000×g 离心 10 min,收上清。再将沉淀用低渗溶液 (0.1 mmol/L $MgCl_2$) 重悬,冰上静置 10 min,12 000×g 离心 10 min,收上清,将两次上清混合。经过 CHT 柱和 Source 30Q 柱 (GE, Healthcare 公司) 两步纯化,用 10 kDa 的超滤管 (购自 Millipore 公司) 浓缩并换液至

PBS, pH 7.4。目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶成像系统拍照后用 Image J 软件分析蛋白纯度。

1.2.2 转基因小鼠的免疫

初次免疫, rLF 按 1:1 加入弗式完全佐剂混合, 搅拌乳化, 20 μ g/只腹腔皮下注射, 免疫 5 只转基因小鼠, 设置 C57BL/6 小鼠作为实验对照组。第二、三次免疫分别于第 2、4 周加强免疫, 20 μ g/只 rLF 按 1:1 加入弗式非完全佐剂混合。其中 3 只转基因小鼠和 3 只 C57BL/6 小鼠分别在免疫后 4、7、14、21、28、35、42、56、70、91 和 112 d 采血。剩下 2 只用于分选的转基因小鼠在免疫前及免疫后 7、14、28 和 42 d 采血。间接 ELISA 法检测血清抗体效价, TNA 法检测血清中和抗体水平。选择血清效价最高转基因小鼠进行分选。

1.2.3 流式分选及单细胞 PCR

第 3 次免疫 14 d 后取转基因小鼠脾脏, 研磨制备脾细胞悬液。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (购自 Thermo 公司) 标记 rLF, 根据说明书计算标记一定 rLF 时需要生物素的量, 将二者混匀后在冰上静置 2 h, 待用。脾细胞悬液中加入 PE-anti mouse CD3、FITC-anti mouse CD19、PE/cy7-anti mouse CD27 荧光标记抗体 (购自达科为生物技术有限公司) 以及生物素标记的抗原 LF。使用 MoFlo XDP 流式细胞仪分选单个抗原特异的记忆 B 细胞于 96 孔板中 (购自 Bio-rad 公司), 96 孔板中事先每孔加入 20 μ L 无 RNA 酶水 (购自北京全式金生物技术有限公司) 和 20 U RNA 酶抑制剂 (购自 Promega 公司)。单细胞打入 96 孔板后, 迅速放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

采用单细胞 PCR 技术扩增抗体基因 (具体步骤参考文献[23])。One-step 反转录 PCR 试剂盒 (购自 QIAGEN 公司) 进行 RT-PCR, 获取双

链 cDNA。以单细胞反转录 PCR 产物为模板, 采用 *TransStart Taq* DNA 聚合酶 (购自北京全式金生物技术有限公司) 分别对抗体的 VH 和 VL 进行单细胞巢式 PCR 扩增。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, VH/L 配对基因测序后, Vector NTI、IMGT/V-QUEST 对序列进行分析。

1.2.4 构建线性表达框快速表达抗体基因

以 H/K 链配对成功的单细胞巢式 PCR 产物为模板, 再次扩增可变区基因, 将可变区两端加入重叠延伸 PCR 所需的基因接头 (具体步骤参考文献[23])。 *TransStart Taq* DNA 聚合酶扩增启动子-前导序 (CMV-UP) 片段、恒定区-多聚 A 尾 (TK-POLYA) 片段。以 CMV-UP、TK-POLYA 和可变区片段为模板, 经重叠延伸 PCR 获得全长抗体重链和轻链的线性表达框基因。对目的片段进行切胶纯化 (胶回收试剂盒购自 Omega 公司), 使用 TurboFect 转染试剂 (购自 Thermo Fermentas 公司) 将配对的全长 IgH/L 链基因转染 293T 细胞, 培养上清贮存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.5 LF 结合单抗的 ELISA 筛选

LF、抗人 IgG 抗体 (购自 BD 公司) 2 μ g/mL 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。PBST 洗 96 孔酶标板, 3% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, PBST 洗 96 孔酶标板。加入线性表达框转染 293T 细胞上清表达液, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。PBST 洗 4 遍后, 加入二抗 HRP 标记的羊抗人 IgG (购自 Sigma 公司), 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。PBST 洗 4 遍, 加入显色液, 显色 15 min, 2 mol/L 硫酸终止。用酶标仪以 630 nm 为参考波长, 检测 450 nm 波长处的吸光值。

1.2.6 LF 单抗表达质粒的构建、表达与纯化

全长 IgH/L 链 PCR 产物和 pcDNA 载体用

EcoR I、*Not* I 限制性内切酶 (购自 NEB 公司) 酶切, 使用 T4 DNA 连接酶 (购自 NEB 公司), 将抗体重链和轻链抗体全长基因分别克隆至 pcDNA 载体上, 转化 DH5 α 感受态 (购自天根生化科技有限公司), 单菌落 PCR 鉴定阳性克隆。重、轻链 pcDNA 表达质粒瞬时转染 293F 细胞。8 000 \times g 离心 15 min 收细胞上清, Protein A 亲和层析柱纯化抗体蛋白 (购自 GE Healthcare 公司)。BCA protein assay kit (购自 Thermo 公司) 测定抗体浓度。

1.2.7 BIACORE 测定抗体亲和力

Biacore T100 检测 rLF 与 LF 抗体之间相互作用, 采用直接偶联法, anti-human IgG Fc 偶联在 CM5 芯片上, 捕获抗 LF 抗体, LF 抗原为流动相, 检测二者的相互作用, 得出动力学亲和力数据。

1.2.8 LF 中和单抗的体外中和活性 TNA 测定

采用细胞模型的毒素中和实验 (TNA) 对抗体中和活性进行测定。J774A.1 小鼠单核巨噬细胞以每孔 4×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板, 37 °C 温箱培养过夜。终浓度 50 ng/mL 的 rPA 和 20 ng/mL 的 rLF 的毒素加入 96 孔细胞培养板, 首孔加入 100 μ g/mL 单抗, 对倍稀释, 每个样品设置 10 个稀释度, 设置死亡对照和存活对照孔, 37 °C 孵育 1 h。加入 96 孔 J774A.1 细胞培养板中, 37 °C 温箱培养 4 h。每孔 100 μ L 1 mg/mL MTT (购自 Sigma 公司) 替换细胞培养上清, 37 °C 温箱培养 1 h。弃去细胞培养上清, 每孔加入 100 μ L MTT 溶解液。待完全溶解后, 酶标仪以 630 nm 为参考波长, 检测 570 nm 波长处的吸光值。每个样品设置 2 个复孔, 计算细胞存活百分比, GraphPad Prism 5 拟合细胞存活曲线, 计算抗体的 IC_{50} 。

1.2.9 LF 中和性单抗与 PA 单抗体外协同作用的 TNA 测定

按照 1.2.8 的方法进行 TNA 测定, 但改变加入的抗体量。1D7 和 2B9 分别与炭疽 PA 单抗 2A6 组合, 每种组合设置 4 种浓度梯度的样品, 分别为: 1D7、2B9 抗体从 100 μ g/mL 二倍梯度稀释; 2A6 抗体从 1 μ g/mL 二倍梯度稀释; 1D7、2B9 抗体从 100 μ g/mL 二倍梯度稀释, 2A6 抗体浓度保持不变; 2A6 抗体从 1 μ g/mL 二倍梯度稀释, 1D7、2B9 抗体浓度保持不变, 其中抗体保持恒定的浓度低于每株中和单抗 IC_{50} 值。最后根据 TNA 测定结果, 拟合抗体浓度和细胞存活曲线。

2 结果与分析

2.1 rLF 抗原的纯度及活性测定

目的蛋白经过 CHT 柱和 Source 30Q 柱两层析纯化, 目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳 (图 1)。目的蛋白纯度约 96%, 可以用于动物免疫。细胞毒性试验测定 LF 的蛋白活性, 本试验固定

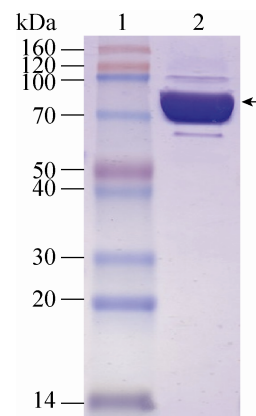


图 1 LF 纯化效果的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAEG analysis of LF purification. 1: marker; 2: the fraction collection of Source 30Q and CHT. The position of LF protein band was marked with an arrow.

PA 的浓度,把 LF 的浓度做二倍比例梯度稀释后一起作用于 J774A.1 细胞。当 PA 为 50 ng/mL 时,可导致 50%细胞死亡的 LF 浓度 (EC_{50}) 为 4.223 ng/mL (图 2)。以上结果表明本实验制备的 LF 在细胞模型上具有良好的生物学活性。

2.2 转基因小鼠免疫 LF 后的抗体反应研究

免疫后小鼠在不同天数采血,对比不同时间点两种小鼠血清中抗体效价水平的变化(图 3)。转基因小鼠抗体效价水平与 C57BL/6 小鼠存在差别,转基因小鼠免疫抗原后抗体效价

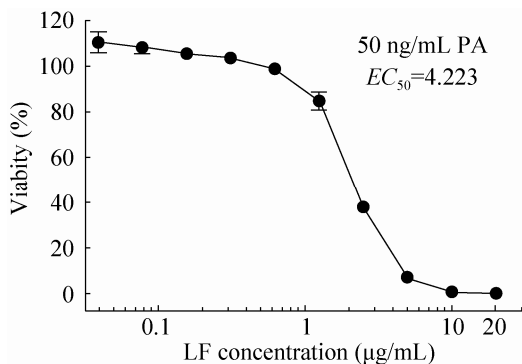


图 2 LF 的细胞毒活性

Fig. 2 Cytotoxicity of LF. J774 macrophages were incubated with 50 ng/mL PA and LF concentration were titrated 1:2 from 20 ng/mL.

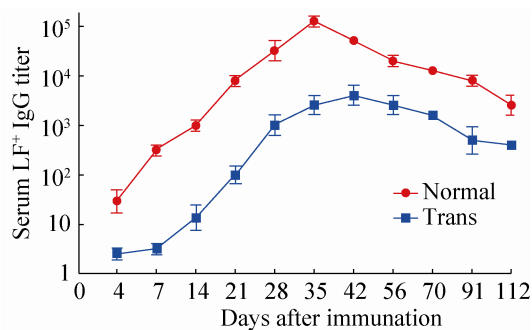


图 3 抗体效价时间变化对比图

Fig. 3 Serum antibody titers comparison at different time points. Mice were immunized with LF on day 0, 14 and 28. The horizontal axis represents the blood sampling time. Normal: C57BL/6 mice; Trans: transgenic mice.

上升速度比 C57BL/6 小鼠缓慢;C57BL/6 小鼠三免后,血清中抗体效价达到 1 10 000 以上,转基因小鼠三免后,抗体效价只达到 1 6 000 左右,低于 C57BL/6 小鼠效价水平。TNA 检测 2 只转基因小鼠血清中 LF 中和抗体水平 (图 4)。选择效价相对较高的转基因小鼠进行分选。

2.3 LF 特异性单克隆抗体的筛选及鉴定

取第三次免疫后 14 d 的转基因小鼠脾脏,研磨获取脾淋巴细胞。荧光抗体染色后,使用流式细胞仪从脾淋巴细胞中分选出 288 个抗原特异的记忆 B 细胞。经单细胞 PCR,从 288 个记忆 B 细胞中获得 48 对重、轻链配对的抗体可变区基因。通过重叠延伸 PCR,构建线性表达框,将 48 对全长抗体基因转染 293T 细胞进行快速表达。转染上清用于 ELISA 检测,获得结合单抗 2 株,分别为 1D7 和 2B9。通过 Vector NTI、IMGT/V-QUEST 对其基因序列分析,两对基因序列均为人源抗体,与胚系基因相似性达 98%以上 (表 1)。

构建 LF 单克隆抗体表达质粒,瞬转 293F 细胞,目的蛋白经过 Protein A 亲和层析柱纯化。

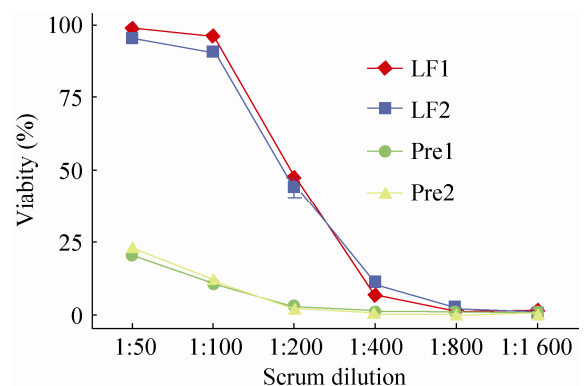


图 4 免疫六周血清中 LF 中和抗体效价

Fig. 4 MTT cell viability assay to measure protective ability of 6-week sera on J774 macrophage cells against LeTx. LF: transgenic mice immunized with LF; Pre: preimmune transgenic mice.

表 1 2 株 LF 结合单抗的特性

Table 1 Characteristics of the 2 LF-specific human monoclonal antibodies

Clone	VH ^a	JH ^b	DH ^c	HCDR3 ^d	VL ^e	JL ^f	LCDR3 ^g
1D7	HV3-30-3	HJ5	HD6-13	CARGRMAAAGSLYNWFDPW	KV4-1	KJ1	CQQYYSTPRTF
2B9	HV3-30-3	HJ5	HD6-13	CARGRMAAAGGLYNWFDPW	KV4-1	KJ1	CQQYYSIPQTF

a: H-chain V-region gene usage; b: H-chain J-region gene usage; c: H-chain D-region gene usage; d: amino acid sequence of the heavy-chain third complementarity-determining region; e: L-chain V-region gene usage; f: L-chain J-region gene usage; g: amino acid sequence of the light-chain third complementarity-determining region.

ELISA 法对两株 LF 单抗结合能力进行测定 (图 5), 1D7 结合能力大于 2B9。为进一步研究两株抗体的结合特性, 采用 SPR 技术测定抗体亲和力大小 (表 2)。

细胞毒性试验 (TNA) 对 LF 单抗中和活性进行测定 (图 6)。1D7 和 2B9 的 IC_{50} 值为别为: 11.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 49.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1D7 比 2B9 中和活性要强。

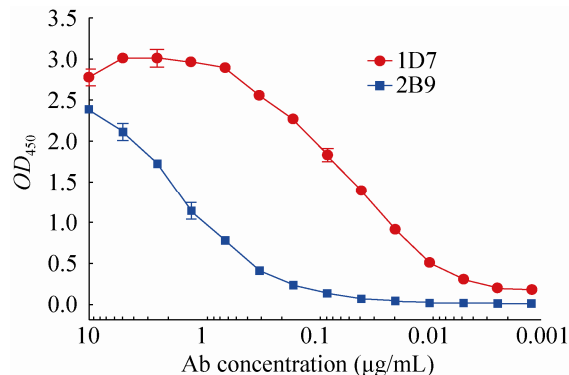


图 5 ELISA 测定 LF 单克隆抗体结合能力

Fig. 5 Relative binding capacity of IgG MAbs to LF as determined by ELISA. The ELISA plate was coated with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LF, and MAbs concentration were titrated 1:2 from 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

表 2 两株 LF 人源单抗亲和力测定

Table 2 Binding affinities of the 2 LF-specific human monoclonal antibodies

MAb	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1D7	6.44e4	6.75e-3	1.05e7
2B9	1.35e4	5.39e-3	3.98e7

Ka: binding affinity constant; Kd: dissociation constant; KD: equilibrium constant.

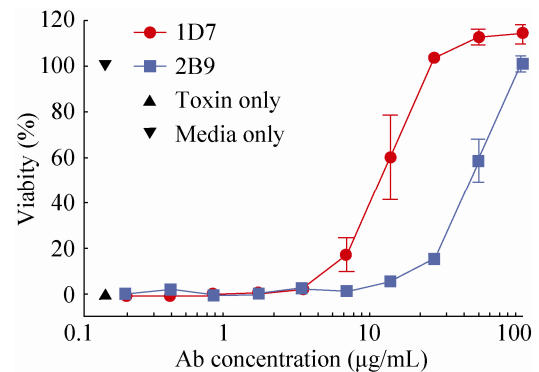


图 6 TNA 法测定 LF 单克隆抗体中和活性

Fig. 6 Protective efficacy of LF-specific MAbs by TNA. *In vitro* cytotoxicity assay to measure MAB-mediated toxin protection. J774 macrophages were incubated with 50 ng/mL PA and 20 ng/mL LF with or without MAbs at various concentrations. Cells were incubated with toxin alone or toxin-free medium as negative and positive controls, respectively, for viability.

2.4 LF 中和性单抗与 PA 中和性单抗的协同作用研究

在 50 ng/mL PA 和 20 ng/mL LF 下测定炭疽 PA 单克隆抗体 2A6 的 IC_{50} 值是 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 保持毒素浓度不变情况下, 测定 1D7、2B9 分别与 2A6 联合使用在 TNA 实验中的细胞保护效果 (图 7), 使用药效学参数分级抑制浓度指数 (FIC index) 进行评价 (表 3)。当 $FIC < 1$ 时, 为协同作用; $FIC = 1$ 时, 为相加作用; $1 < FIC < 2$ 时, 为无关作用; $FIC > 2$ 时, 为拮抗作用。结果显示, 1D7 和 2A6 的 FIC 指数为 0.67, 2B9 和 2A6 的

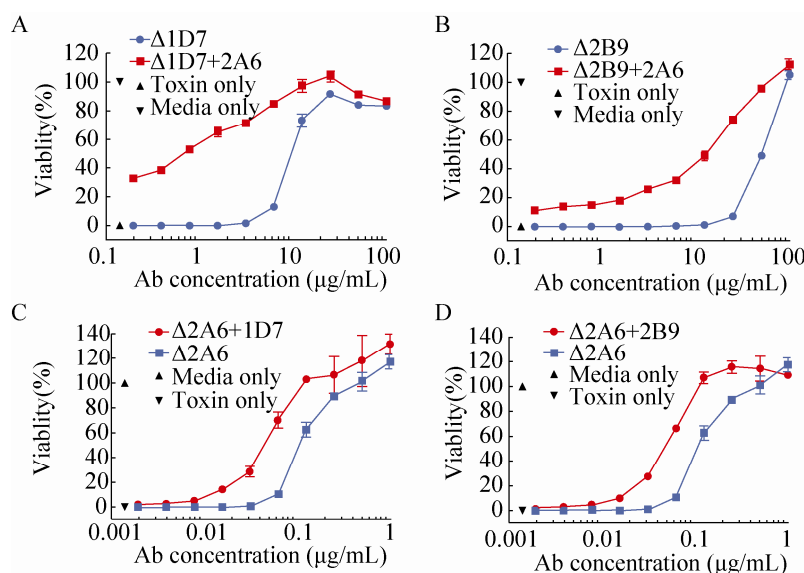


图 7 中和抗体联合使用的细胞保护效果

Fig. 7 Combinatory effects of protective MABs in TNA. (A) Cell survival assay of 1D7 and 2A6 in combination. Cells were incubated with 50 ng/mL PA and 20 ng/mL LF and 0.05 µg/mL of the 2A6 MAB and titrated 1:2 with the 1D7 starting with 100 µg/mL. (B) Cell survival assay of 2B9 and 2A6 in combination. Cells were incubated with 50 ng/mL PA and 20 ng/mL LF and 0.05 µg/mL of the 2A6 MAB and titrated 1:2 with the 2B9 starting with 100 µg/mL. (C) Cell survival assay of 1D7 and 2A6 in combination. Cells were incubated with 50 ng/mL PA and 20 ng/mL LF and 10 µg/mL of the 1D7 MAB and titrated 1:2 with the 2A6 starting with 1 µg/mL. (D) Cell survival assay of 2B9 and 2A6 in combination. Cells were incubated with 50 ng/mL PA and 20 ng/mL LF and 40 µg/mL of the 2B9 MAB and titrated 1:2 with the 2A6 starting with 1 µg/mL.

表 3 中和抗体联合使用的 FIC 指数

Table 3 FIC indices for multiple Mab interactions

MAB(s) ^a	Survival (%)			Ab concn (µg/mL)		
	Maximum	Minimum	50%	for 50% survival	FIC ^b	FIC index ^c
△1D7	92.02	0.03	46.02	9.06		
△2A6	117.35	0.06	58.71	0.13		
△1D7+2A6	103.89	32.85	68.37	1.93	0.21	
△2A6+1D7	131.63	1.83	66.73	0.06	0.46	0.67
△2B9	105.09	0.06	52.57	51.83		
△2A6	117.35	0.06	58.71	0.13		
△2B9+2A6	112.62	11.32	61.97	18.02	0.35	
△2A6+2B9	115.67	1.21	58.44	0.05	0.38	0.73

a: MABs preceded by a Greek capital delta (△) are “variable antibodies,” i.e., used at various concentrations (see Fig. 7); b: FIC was calculated as follows: Ab concentration of the variable antibody A that yields 50% of maximum cell survival when in combination with a constant concentration of antibody B divided by the Ab concentration at 50% of maximum cell survival with antibody A alone; c: the FIC index was defined as the sum of the FICs for each antibody pair. An interaction is defined as synergistic at an FIC index of <1, additive at an FIC index of 1, indifferent at an FIC index between 1 and 2, and antagonistic at an FIC index of >2.

FIC 指数为 0.73。表明两种抗体存在一定的协同作用，且 1D7 和 2A6 的组合协同作用更强。

3 讨论

随着分子生物学技术的发展，治疗性单抗得到广泛应用。单克隆抗体根据人源化程度分为鼠源性单克隆抗体、嵌合型单克隆抗体、人源化单克隆抗体和全人单克隆抗体。伴随 PCR 技术、转基因技术和抗体库技术的发展，使治疗性单克隆抗体最终实现了全人源抗体的制备。本文将人抗体转基因小鼠与单细胞 PCR 技术相结合，用于快速筛选全人源单克隆抗体，此研究内容为日后进行单克隆抗体的筛选工作提供了新的方法和思路。该方法的优势在于获得的全人源抗体避免了鼠源抗体免疫原性高等特点、克服了无疫苗免疫和病患血样的缺点、并且可以快速获得抗体基因。但转基因小鼠目前也存在一些问题：转基因小鼠对免疫应答能力较差，对于一些抗原较难获得高亲和力抗体；未转入人类全部抗体基因座，抗体在体内的成熟过程还不太理想^[24]。因此，本文对转基因小鼠的免疫特点进行了研究，为获得较好的免疫效果，可以增加转基因小鼠的免疫剂量、免疫次数并延长免疫周期。

虽然两株抗体亲和力不高，但经过序列比对，无论 1D7 还是 2B9 均为全人源单克隆抗体，避免了鼠源抗体免疫原性高等特点。在下一阶段研究中，可以通过人为突变提高抗体亲和力，完善抗体在体外亲和力的成熟过程。

目前，针对炭疽毒素的单克隆抗体多为炭疽 PA 抗体，而 LF 直接导致感染者损伤和死亡。PA 本身是没有毒性的，它主要是将 LF 带入细胞，发挥毒性作用。一旦 PA 中和表位人为突变，

针对 PA 单一表位的抗体将不再有效，因此有必要对炭疽 LF 抗体进行筛选与研究。

在炭疽“鸡尾酒”疗法中提到炭疽 PA 单抗与 LF 单抗联合使用时可以发挥一定的协同作用。当 1D7、2B9 分别与 2A6 联合使用时，其 FIC 指数均在 0.5-1 之间。虽然协同作用较弱，但却比单独使用某一抗体起到的保护效果更强。单抗在治疗和预防感染性疾病中虽发挥着重要作用，但当病原体抗原突变概率高或毒性机制较为复杂时，单抗混合物可以识别多个毒素蛋白上的不同表位，发挥出显著地治疗效果，这也为进一步研究单抗“鸡尾酒疗法”奠定了基础。

在分选脾淋巴细胞时，为了避免分选浆细胞而增加后期的筛选量。考虑到记忆 B 细胞表面存在 BCR 受体这一特性，尝试分选抗原特异的记忆 B 细胞，抗原特异的记忆 B 细胞在 B 淋巴细胞中的比例很少^[25]。查阅相关文献可知，记忆 B 细胞在最后一次免疫第 14 天到 21 天之间，抗原特异的记忆 B 细胞数量相对较多，适合进行分选。为提高抗体分选的阳性率，可进一步研究 B 细胞表面特异 BCR 随时间的表达情况，进而探索记忆 B 细胞的最佳分选时间。

总之，本课题旨在探究一种新的单抗筛选方法，结合转基因小鼠与单细胞 PCR 技术的优势，为快速获得全人源单克隆抗体开辟了新的思路与方法。

REFERENCES

- [1] Leppla SH, Robbins JB, Schneerson R, et al. Development of an improved vaccine for anthrax. *J Clin Invest*, 2002, 110(2): 141-144.
- [2] Holty JEC, Bravata DM, Liu H, et al. Systematic review: a century of inhalational anthrax cases from 1900 to 2005. *Ann Intern Med*, 2006, 144(4): 270-280.

- [3] Workgroup P. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *MMWR*, 2000, 49: 1–14.
- [4] Liu S, Crown D, Miller-Randolph S, et al. Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 12424–12429.
- [5] Hicks CW, Cui X, Sweeney DA, et al. The potential contributions of lethal and edema toxins to the pathogenesis of anthrax associated shock. *Toxins*, 2011, 3(9): 1185–1202.
- [6] Chen Z, Moayeri M, Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins*, 2011, 3(8): 1004–1019.
- [7] Saylor C, Dadachova E, Casadevall A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. *Vaccine*, 2009, 27: G38–G46.
- [8] Chow SK, Casadevall A. Monoclonal antibodies and toxins—a perspective on function and isotype. *Toxins*, 2012, 4(6): 430–454.
- [9] Peterson JW, Comer JE, Noffsinger DM, et al. Human monoclonal anti-protective antigen antibody completely protects rabbits and is synergistic with ciprofloxacin in protecting mice and guinea pigs against inhalation anthrax. *Infect Immun*, 2006, 74(2): 1016–1024.
- [10] Migone TS, Subramanian GM, Zhong J, et al. Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *New Engl J Med*, 2009, 361(2): 135–144.
- [11] Lim NK, Kim JH, Oh MS, et al. An anthrax lethal factor-neutralizing monoclonal antibody protects rats before and after challenge with anthrax toxin. *Infect Immun*, 2005, 73(10): 6547–6551.
- [12] Little SF, Leppla SH, Friedlander AM. Production and characterization of monoclonal antibodies against the lethal factor component of *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect Immun*, 1990, 58(6): 1606–1613.
- [13] Staats HF, Alam SM, Searce RM, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of anthrax anti-protective antigen and anti-lethal factor monoclonal antibodies after passive transfer in a mouse lethal toxin challenge model to define correlates of immunity. *Infect Immun*, 2007, 75(11): 5443–5452.
- [14] Zhao P, Liang X, Kalbfleisch J, et al. Neutralizing monoclonal antibody against anthrax lethal factor inhibits intoxication in a mouse model. *Hum Antibodies*, 2002, 12(4): 129–135.
- [15] Kulshreshtha P, Bhatnagar R. Inhibition of anthrax toxins with a bispecific monoclonal antibody that cross reacts with edema factor as well as lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Mol Immunol*, 2011, 48(15): 1958–1965.
- [16] Brossier F, Lévy M, Landier A, et al. Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 2004, 72(11): 6313–6317.
- [17] Chen Z, Moayeri M, Crown D, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun*, 2009, 77(9): 3902–3908.
- [18] Pohl MA, Rivera J, Nakouzi A, et al. Combinations of monoclonal antibodies to anthrax toxin manifest new properties in neutralization assays. *Infect Immun*, 2013, 81(6): 1880–1888.
- [19] Steinitz M. Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments. *Hum Antibodies*, 2008, 18(1-2): 1–10.
- [20] Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, et al. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and κ loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 722–727.
- [21] Smith K, Garman L, Wrammert J, et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat Protoc*, 2009, 4(3): 372–384.
- [22] Liao HX, Levesque MC, Nagel A, et al. High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *J Virol Methods*, 2009, 158(1): 171–179.
- [23] Chi X, Li J, Liu W, et al. Generation and characterization of human monoclonal antibodies targeting anthrax protective antigen following vaccination with a recombinant protective antigen vaccine. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22(5): 553–560.
- [24] Sun ZW, Wang S, Chen HP. Application of transgenic mice in the antibody drug development. *Biotechnol Busin*, 2013(6): 21–25(in Chinese). 孙志伟, 王双, 陈惠鹏. 转基因小鼠在抗体药物研发中的应用. *生物产业技术*, 2013(6): 21–25.
- [25] Morris L, Chen X, Alam M, et al. Isolation of a human anti-HIV gp41 membrane proximal region neutralizing antibody by antigen-specific single B cell sorting. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e23532.

(本文责编 陈宏宇)