

统招研究生学术学位硕士学位论文

分 类 号: R392

单位代码: 10678

密 级:

学 号: 20211678

解密日期: 年 月 日

昆明医科大学

硕 士 学 位 论 文



制备具有中和活性的抗 CHIKV、 ZIKV 双特异性抗体

院 (系)、所 中国医学科学院医学生物学研究所

研究生姓名 张峰源

学 科 专 业 免疫学

学 位 类 型 学术学位

指 导 教 师 刘红旗 研究员

二〇二四年五月

昆明医科大学

硕士学位论文

制备具有中和活性的抗 CHIKV、 ZIKV 双特异性抗体

院（系）、所 中国医学科学院医学生物学研究所

姓 名 张峰源

学 科 专 业 免疫学

学 位 类 型 学术学位

指 导 教 师 刘红旗 研究员

指导小组成员 刘建生 主任技师

徐婧雯 副研究员

陈泓宇 助理研究员

丁开云 主管技师

完 成 日 期 二〇二四年五月

目 录

前言.....	11
1.蚊媒病毒的流行及研究.....	11
2.双特异性抗体平台的应用.....	12
3 本论文的研究目的和意义.....	14
4 本论文的研究思路.....	15
材料与方法.....	16
1 实验材料.....	16
1.1 抗体基因序列.....	16
1.2 哺乳动物细胞.....	16
1.3 感受态细胞.....	16
1.4 表达载体.....	16
1.5 主要实验试剂.....	16
1.6 主要仪器及耗材.....	18
2 实验方法.....	18
2.1 双特异性抗体 FIT(A-B)的构建策略.....	18
2.2 获取理想的单克隆抗体序列.....	20
2.3 重组抗体表达质粒的构建.....	20
2.4 重组抗体表达条件的优化.....	27
2.5 重组抗体的大量表达、纯化和鉴定.....	32
2.6 重组抗体的表征与功能分析.....	33
2.7 统计学方法与分析.....	38
结果.....	39
1 重组抗体表达质粒的构建.....	39
1.1 单抗轻重链片段表达质粒载体的构建.....	39
1.2 FIT-Ig 双抗轻重链片段表达质粒载体的构建.....	40
1.3 重组抗体表达质粒构建小结.....	41
2 重组抗体表达的条件优化.....	43
2.1 最佳重组抗体表达载体的确定.....	43
2.2 重组抗体表达的时间优化.....	44
2.3 重组抗体轻重链表达质粒配比的优化.....	45
2.4 重组抗体表达条件优化小结.....	46
3 重组抗体的大量表达、纯化和鉴定.....	47
3.1 重组抗体在 CHO-S 悬浮细胞中的大量表达.....	47
3.2 重组抗体的亲和纯化和 SDS-PAGE 分析.....	47

4 重组抗体的表征与功能分析	48
4.1 重组抗体的大小分析	48
4.2 重组抗体的抗原结合特异性分析	48
4.3 重组抗体的中和活性分析	50
4.4 重组抗体的稳定性分析	51
讨论	52
结论	55
参考文献	56
综述 双特异性抗体的研究进展	61
参考文献	68

缩 略 词 表

英文缩写	英文全称	中文全称
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
bp	Base Pair	碱基对
CHIKV	Chikungunya virus	基孔肯雅病毒
DENV	Dengue virus	登革病毒
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	基础培养基
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
IC50	Half maximal inhibitory concentration	半抑制浓度
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
kDa	kilo Dalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
OD	Optical density	吸光度
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBST	Phosphate Buffer Saline Tween	磷酸盐吐温缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
pH	Pondus Hydrogenii	酸碱度
RNA	Ribose Nucleic Acid	核糖核酸
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
ZIKV	Zika virus	寨卡病毒

制备具有中和活性的抗 CHIKV、ZIKV 双特异性抗体

研究生：张峰源

导师：刘红旗 研究员

中文摘要

【目的】随着病毒的进化、全球气温升高以及交通旅游业的发展，蚊媒传播的病毒已经在全球范围内传播，对全球的公共卫生构成了很大的威胁。基孔肯雅病毒（chikungunya virus, CHIKV）、登革病毒（dengue virus）和寨卡病毒（Zika virus, ZIKV）是目前自然界流行的三种主要蚊媒传播病毒，具有一些相似的特点，如：都通过同一种媒介——白纹伊蚊和埃及伊蚊传播；诱导产生相似的免疫反应，包括不同程度的炎症和免疫细胞激活；在疾病的早期阶段，引起的症状相似，往往难以区分，无法及时使用特异性抗病毒药物来控制疾病的发展；流行病学研究还发现，3 种病毒经常发生共感染。这些相似的特点给疾病的鉴别诊断和治疗带来了巨大挑战。因此，本论文将目光凝聚于 CHIKV 和 ZIKV 上，基于序列已发表的、具有高特异性的两株病毒的单克隆抗体，通过 FIT-Ig 双特异性抗体改造和表达技术制备能同时中和 CHIKV、ZIKV 的重组抗体，为研发部分蚊媒病毒的治疗方法和防控策略奠定一定的基础。

【方法】（1）通过查阅文献和公共数据库，获取具有分别中和 CHIKV 和 ZIKV 活性的单克隆抗体 VL（轻链可变区）和 VH（重链可变区）基因序列，经人工合成后克隆至合适的质粒载体以表达重组抗体。（2）构建重组抗体表达质粒的：选取 5 株单克隆抗体 CHK152、CHK166、CHK263、CHK265、ZIKA1004 的 VL 和 VH 基因序列，通过 In-Fusion 方法将其分别克隆至含有 CL（轻链恒定区）和 CH（重链恒定区）的 CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 三种质粒载体，构建单抗和基于 FIT-Ig 抗体平台的双特异性抗体表达质粒。（3）优化重组抗体表达条件：通过 Western Blot 分析和确定最佳表达载体、最佳表达时间和最佳质粒配比。（4）重组抗体的表达、纯化和鉴定：基于前面优化的条件，通过 CHO-S 悬浮细胞表

达系统进行重组抗体的表达，然后通过 Protein A 介质进行亲和纯化以获得纯化后的抗体，最后通过 Western Blot 和 SDS-PAGE 方法分析重组抗体及其纯度。(5) 重组抗体表征和功能分析：通过动态光散射 (DLS) 测量单抗和双抗的粒径大小；通过 ELISA 方法测定单抗和双抗的抗原特异性结合力；通过真病毒或假病毒测定单抗和双抗的中和活性；最后通过 ELISA 方法分析单抗和双抗的稳定性。

【结果】(1) 基于公共数据库的抗体序列和已发表文章的验证结果，我们筛选后获得了 5 个单抗的轻重链可变区序列：CHK152、CHK166、CHK263、CHK265 和 ZIKA1004。(2) 人工合成相应的基因片段后，通过 In-fusion 的方法将相应的抗体基因片段克隆至表达载体 CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 中，经测序验证成功构建了 30 个重组抗体表达质粒。(3) 通过比较分析重组抗体的不同表达条件，发现最佳表达载体为 CMVR，最佳表达时间为 96h，构建双抗的 3 个质粒（长链质粒、短链 1 质粒和短链 2 质粒）的最佳配比为 1:1:1。基于优化的表达条件，进一步筛选出能够高效表达的重组抗体质粒 CMVR-CHK265VH/VL 和 CMVR-ZIKA1004VH/VL 用于后续双特异性抗体研究。(4) 通过 CHO-S 成功表达了单抗 CHK265、ZIKA1004 和双抗 FIT(1004-265)，Western Blot 和 SDS-PAGE 分析结果表明，表达纯化获得的单抗 CHK265、ZIKA1004 和双抗 FIT(1004-265) 纯度均在 80% 以上，产量分别为 20mg/L、20mg/L 和 15mg/L。(5) 通过动态光散射 (DLS)、ELISA、中和实验方法对重组抗体的表征和功能进行了分析。DLS 结果表明，获得的两株单抗 CHK265、ZIKA1004 以及双抗 FIT(1004-265) 的粒径大小符合预期。ELISA 分析重组抗体的抗原特异性结合力结果表明，获得的单抗和双抗均能与相应的抗原特异性结合，ZIKV1004 单抗与文献报道的一致，不仅能与 ZIKV 的抗原结合，还能够结合 DENV 的抗原；CHK265 单抗对 CHK-E2 抗原的特异性结合力为 1.6nM；FIT(1004-265) 双抗对 CHK-E2 抗原、DENV-2/3 型抗原和 ZIKA-E 抗原都有结合。通过真病毒或假病毒中和实验分析结果表明，单抗和双抗均有预期的中和活性，ZIKA1004 单抗和 FIT(1004-265) 双抗对 DENV2 型病毒的中和效价 (IC₅₀) 分别为：80.12 μ M 和 78.65 μ M，对 DENV3 型病毒的中和效价 (IC₅₀) 分别为：20.36 μ M 和 28.66 μ M；ZIKA1004 单抗和 FIT(1004-265) 双抗对 ZIKV 的中和效价 (IC₅₀) 分别为：30.28 μ M 和 25.84 μ M；CHK265 单抗和 FIT(1004-265) 双抗对 CHIKV 假病毒均有一定中和效果，CHK265 单抗的中

和效果高于 FIT(1004-265)。抗体稳定性分析表明，所获得的重组单抗和双抗均有良好的稳定性，在不同条件处理：a) 4℃、25℃或 37℃放置三周；b) 反复冻融 3 次；c) 4℃-40℃温度循环变化后，与抗原特异性结合力无显著差异。

【结论】 本论文研究初步制备了一个能够同时中和 CHIKV 和 ZIKV 两种常见蚊媒病毒的双特异性抗体 FIT(1004-265)，为治疗难以鉴别诊断的部分蚊媒病毒感染提供了另一种思路；同时也初步建立了抗病毒 FIT-Ig 双特异性抗体表达平台，为快速制备其他具有中和活性的抗病毒双特异性抗体奠定了坚实的基础。

关键词 基孔肯雅病毒；登革病毒；寨卡病毒；双特异性抗体；中和活性

Preparation of bispecific antibodies with neutralizing activities to CHIKV and ZIKV

Postgraduate: Zhang Fengyuan

Supervisor: Prof. Liu Hongqi

ABSTRACT

Objective (s): With the evolution of viruses, rising global temperatures, and the development of transportation and tourism, mosquito-borne viruses have spread globally, posing a significant threat to global public health. Chikungunya virus (CHIKV), dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) are the three major mosquito-borne viruses currently endemic in nature, and share some similar characteristics. For example, they are all transmitted by the same vector, *Aedes aegypti*. They induce similar immune responses, including varying degrees of inflammation and immune cell activation. They cause similar symptoms at the early stage of the disease, which are often difficult to differentiate and prevent the timely use of specific antiviral medications to control the progression of the disease. Epidemiologic studies have also found that co-infections of two or three kinds of viruses frequently occur. Thus, these similarities pose a great challenge to the differential diagnosis and treatment of the disease. Therefore, this thesis focuses on CHIKV and ZIKV. Based on monoclonal antibodies to the two strains of viruses whose sequences have been published with high specificity, recombinant antibodies capable of neutralizing both CHIKV and ZIKV are prepared by FIT-Ig bispecific antibody modification and expression technology, which will provide a certain foundation for the development of therapeutic methods and prevention and control strategies for some mosquito-borne viruses.

Methods: (1) The gene sequences of monoclonal antibodies VL (light chain variable region) and VH (heavy chain variable region), which have activities of

neutralizing CHIKV and ZIKV respectively, were obtained through reviewing the literature and public databases, and were cloned into the suitable plasmid vectors to express recombinant antibodies after artificial synthesis. (2) Construction of recombinant antibody expression plasmids: The VL and VH gene sequences of five monoclonal antibodies CHK152, CHK166, CHK263, CHK265, and ZIKA1004 were selected, and cloned into CMVR, pMD2.G, which contains CL (light chain constant region) and CH (heavy chain constant region), respectively, by the In-Fusion method, G, and pcDNA3.1 plasmid vectors to construct monoclonal antibody and bispecific antibody expression plasmid based on FIT-Ig antibody platform. (3) Optimization of recombinant antibody expression conditions: the optimal expression vector, the optimal expression time and the optimal ratio of plasmids were determined by Western Blot analysis. (4) Expression, purification and identification of recombinant antibody: Based on the optimized conditions, recombinant antibody was expressed by CHO-S Suspension Cell Expression System, and then purified by Protein A medium to obtain the purified antibody, and finally the recombinant antibody and its purity were analyzed by Western Blot and SDS-PAGE. (5) Characterization and functional analysis of recombinant antibodies: Measure the particle size of monoclonal antibody and bispecific antibody by Dynamic Light Scattering (DLS); determine the antigen-binding affinity of monoclonal antibody and bispecific antibody by ELISA; determine the neutralizing activity of monoclonal antibody and bispecific antibody by authentic virus or pseudovirus; and finally analyze the stability of monoclonal antibody and bispecific antibody by ELISA.

Results: (1) Based on the antibody sequences from public databases and the validation results from published articles, we obtained the sequences of the light and heavy chain variable regions for five monoclonal antibodies: CHK152, CHK166, CHK263, CHK265, and ZIKA1004 after screening. (2) After artificially synthesizing the corresponding gene fragments, we cloned the corresponding gene fragments of antibodies by the In-fusion approach into the expression vectors CMVR, pMD2.G and pcDNA3.1, and 30 recombinant antibody expression plasmids were successfully

constructed and confirmed by sequencing. (3) By comparing and analyzing the different expression conditions of recombinant antibody, we found that the optimal expression vector was CMVR, the optimal expression time was 96 h, and the optimal ratio of the three plasmids (long-chain plasmid, short-chain 1 plasmid, and short-chain 2 plasmid) for constructing the double antibody was 1:1:1. Based on the optimized expression conditions, we further screened out the recombinant antibody plasmids that could be expressed efficiently, such as CMVR-CHK265VH/VL and CMVR-ZIK265VH/VL, and CMVR-ZIKA1004VH/VL. CMVR-CHK265VH/VL and CMVR-ZIKA1004VH/VL were further screened for highly efficient expression of recombinant antibody plasmids, which were used for subsequent bispecific antibody studies. (4) The monoclonal antibodies CHK265, ZIKA1004 and bispecific antibody FIT(1004-265) were successfully expressed by CHO-S cells. The results of Western blotting and SDS-PAGE analysis showed that the purities of monoclonal antibodies CHK265, ZIKA1004 and bis-antibody FIT(1004-265) were more than 80%, with the yields of 20 mg/L, 20 mg/L and 15 mg/L, respectively. (5) The characterization and functionality of the recombinant antibodies were analyzed by dynamic light scattering (DLS), ELISA, and neutralization assays. The DLS results showed that the particle sizes of the two monoclonal antibodies, CHK265 and ZIKA1004, as well as the bis-antibody, FIT(1004-265) were expected. ELISA analysis of the recombinant antibodies for their antigen-binding affinities showed that the mono- and bis-antibodies were able to bind specifically to the corresponding antigens. The ZIKV1004 mono-antibody was able to bind to the antigens of ZIKV and DENV, which is in agreement with those reported in the literature. The CHK265 mono-antibody had a binding affinity of 1.6 nM for the CHK-E2 antigen; and the FIT(1004-265) bis-antibody was able to bind to the CHK-E2 antigen, the DENV-2/3 type antigen, and the ZIKA-E antigen. The results of the neutralization assay by authentic virus or pseudovirus showed that both mono- and bis-antibodies had the expected neutralizing activity, and the neutralizing potency (IC₅₀) of ZIKA1004 mono- and FIT(1004-265) bispecific antibodies against DENV2 were 80.12 μM and 78.65 μM, and against DENV3 were 20.36 μM and 28.66 μM, respectively. The

neutralizing potency (IC₅₀) of ZIKA1004 monoclonal antibody and FIT(1004-265) bis-antibody against ZIKV was 30.28 μ M and 25.84 μ M, respectively; CHK265 monoclonal antibody and FIT(1004-265) bispecific antibody had certain neutralizing activities against CHIKV pseudovirus, and the neutralizing activity of CHK265 monoclonal antibody was higher than that of FIT(1004-265) bispecific antibody. FIT(1004-265). Antibody stability analysis showed that the recombinant monoclonal antibodies and bispecific antibody had good stability, and there was no significant difference in binding affinity to antigen after treatment under different conditions: a) at 4°C, 25°C or 37°C for three weeks; b) three times of repeated freezing and thawing; and c) temperature cycling changes from 4°C to 40°C.

Conclusion(s): In this dissertation, a bispecific antibody FIT(1004-265), which can simultaneously neutralize two common mosquito-borne viruses, CHIKV and ZIKV, was preliminarily prepared, which provides another way of thinking for the treatment of mosquito-borne viral infections that are difficult to be differentially diagnosed; meanwhile, an expression platform of antiviral FIT-Ig bispecific antibody was preliminarily established, which lays a solid foundation for the rapid preparation of other antiviral bispecific antibodies with neutralizing activity. It also laid a solid foundation for the rapid preparation of other antiviral bispecific antibodies with neutralizing activity.

Keywords: Chikungunya virus; Dengue virus; Zika virus; Bispecific antibody; Neutralizing activity

制备具有中和活性的抗 CHIKV、ZIKV 双特异性抗体

前 言

1. 蚊媒病毒的流行及研究

蚊媒传播传染病是由蚊虫叮咬所引起的疾病,其中目前危害性较严重的蚊媒传染病有基孔肯雅热、登革热以及寨卡热等^[1]。由基孔肯雅热病毒(chikungunya virus, CHIKV)感染引起的基孔肯雅热,其特征是大多数患者出现的多关节痛、高热、头痛、呕吐、肌痛和皮疹^[3]。虽然急性发热期通常会在数日内消退,但多发性关节痛通常会持续数周或数月,造成严重的经济和社会影响^[4]。CHIKV 于 1953 年在非洲首次发现,并在非洲和东南亚以及南美洲流行,经常定期暴发^[2]。CHIKV 属于 Togaviridae 家族的甲病毒属,通过蚊子传播给人类。自 2004 年以来,包括欧洲、中美洲、南美洲和北美等非流行地区在内的近 40 个国家观察到的 CHIKV 感染发病率有所增加^[5-8]。登革热是由蚊媒传播的登革病毒(dengue virus, DENV)感染引起的一种多种临床症状发热性疾病,包括高热、头痛、虚弱、肌肉疼痛,有时还会伴有皮疹^[9,10]。DENV 属于黄病毒科的黄病毒属,存在 4 种不同的血清型,分别是 DENV-1、DENV-2、DENV-3 和 DENV-4^[11]。各种血清型的循环是周期性的,不同的血清型会周期性地重新成为优势血清型^[12]。因此,尽管登革热的死亡率很低,但在地方性流行环境中,造成的卫生服务、经济 and 资源负担仍然很大,且针对该病有效治疗方法的研发进展缓慢^[13]。由寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)病毒感染引起的寨卡热,最常见的症状包括斑丘疹、轻度发热、关节痛、非化脓性结膜炎、肌痛、头痛、眼眶后疼痛,以及较少见的呕吐和水肿^[16]。ZIKV 也属于蚊媒传播的黄病毒科黄病毒属成员,其结构呈现出包膜和二十面体,基因组长度约为 11 kb,为单链正义 RNA^[14]。寨卡病毒于 1947 年首次在乌干达寨卡森林中的一只哨兵恒河猴身上被发现^[15]。到目前为止,尚无针对寨卡病毒感染的特异性治疗方法。单纯性疾病的治疗包括休息、补液以及对发热和关节炎的对症治疗。

由此可见,这三种虫媒病毒主要临床表现均为发热、头痛以及关节痛^[17,18]。特别是在感染初期,两者几乎无任何可以区分的临床特征^[19]。这三种病毒经常

出现共感染现象^[20,21]。如果不及时干预治疗,合并感染就有可能出现致命的后果^[22]。目前针对单一病毒感染尚无特效抗病毒药物以及理想疫苗,而针对病毒共感染的研究也只停留在检测试剂盒的开发上,因此对于这些病毒共感染的干预研究迫在眉睫^[23,24]。在 CHIKV 的中和活性单克隆抗体研究中,需要针对的是三种 CHIKV 基因型的感染,其中大部分单抗针对的是 E1 和 E2 结构蛋白,目前已有 30 多个 CHIKV 单克隆抗体被证明具有中和活性,其中 CHK152、CHK166、CHK263、CHK265 是最具保护性的单克隆抗体,这些抗体的基因组序列则成为 CHIKV 单抗的研究关键;ZIKV 与 DENV 均属于黄病毒,文献记载两种病毒共感染的患者体内引发了针对 ZIKV 和 DENV 的有效交叉中和抗体,并分离并表征出多种抗体: MZ4、MZ1、MZ2、MZ20、MZ24、MZ54、MZ56,其中 MZ4 (又称 ZIKA1004) 在实验中保护小鼠免受病毒血症和 ZIKV 或 DENV-2 攻击后的病毒传播。在有 DENV 经历的个体中接种疫苗可以增强预先存在的黄病毒免疫力,并产生针对 ZIKV 和 DENV 的保护性反应。然而这些单抗研究仅仅是针对单个病毒的感染,并不涉及两种或者更多病毒的共感染,本研究希望利用抗体改造技术构建一个可以同时结合两种或更多蚊媒病毒的双特异性抗体平台^[25]。我们最终将关注点放在 FIT-Ig 抗体改造技术上,希望通过制备此类双抗,为该疾病的治疗提供一定的参考^[26]。

2. 双特异性抗体平台的应用

双特异性抗体的概念最早诞生于 1960 年,当时被认为是一种治疗癌症的新思路,随着技术的不断发展,在杂交瘤技术的应用中成功制备出双特异性抗体。此后双抗的应用越来越受到关注^[27-31]。迄今为止,开发具有明确结构、组成、生化、功能和药理学特性的双特异性抗体的方法越来越多^[32-35]。目前已知的双抗制备平台已超过 100 个,除广泛应用于癌症、炎症以外,也逐渐应用在病毒免疫治疗方面^[36-39]。接下来我们重点介绍以下 4 种主流的双抗制备平台,以选择最优者。

(1) TrioMabs 平台:

TrioMabs 意为保持 IgG 样形状的三功能双特异性抗体,其来源是将两种产生不同单克隆抗体的细胞系进行融合,期间介导这两种不同单抗的重链和轻链自由配对^[40]。此种方法的优点是产生的预期功能性双抗同时包含两种抗体的轻重链并且无人工修饰,保留了蛋白生成过程中的天然构象;缺点是本身由于在配对

过程中随机结合,则会产生各种非功能性抗体,不利于后续的纯化。Catumaxomab 是 2009 年获得欧洲药品管理批准,用于治疗恶性腹水的全球第一个上市的双特异性抗体。该抗体便是这种三功能双特异性抗体^[41]。

(2) KiH-Ig 平台:

KiH 全称为“Knobs-into-Holes”(杵臼结构),此种方法基于上述的 TrioMabs 技术,原理是将双抗重链上 CH3 区的氨基酸进行突变,从而在空间上分别形成“Knobs”型与“Holes”型结构,利用“KiH”结构的空位阻效应促进重链异源二聚化。其优点是利用该方法可将轻重链的正确装配率从野生型的 57%提高到 92%,大大提升了产量和后期的纯化工作;但缺点是突变后的抗体分子稳定性不如天然抗体,经常需要引入链间二硫键稳定抗体结构^[42,43]。CD4-IgG 免疫粘附素则是通过该平台产生,具体方法是将一条重链的 CH3 结构域的 T366Y 进行突变成较大氨基酸来获得“杵”结构;将另一重链的 CH3 结构域的 Y407T 进行突变成较小氨基酸来获得“臼”结构^[44-48]。

(3) DVD-Ig 平台:

DVD-Ig 是一种双特异性四价 IgG 样分子,是一种通过短肽连接器结合两种现有抗体的有效方法,具体是将一个 IgG 的 VH 结构域和 VL 结构域分别融合到另一个 IgG 的重链和轻链上,形成所谓的双可变结构域抗体(DVD-Ig)。最初生成的 DVD-Ig 用于靶向 IL-12 和 IL-18^[49]。这种形式已被应用于组合多种特异性抗体^[50]。该方法的优点是可以通过分子生物学技术对抗体序列进行改造从而获得预期的双抗,但在结构上存在一定的弊端:当结合位点位于内部时,由于空位阻的影响从而导致特异性结合力的显著降低,尽管在其结构中添加柔性肽来减少空位阻的影响,但理论上仍然存在特异性结合力降低的可能性^[51]。但这并不妨碍 DVD-Ig 成为主流的双抗制备技术,抗 EGFR 和抗 ErbB3 DVD-Ig 蛋白便是如此,表皮生长因子受体(EGFR)和酪氨酸蛋白激酶 3(ErbB3)是癌症治疗中两个公认的靶标,这两个受体与其他受体之间存在明显的串扰,而这种 DVD-Ig 蛋白则可以同时维持两种亲本抗体结合的功能^[52-54]。另一个例子是 ABT-165,这是一种靶向 DLL4 和 VEGF 的双可变域免疫球蛋白(DVD-Ig),所有获批的抗血管生成药物主要抑制 VEGF 通路,而 Delta 样配体 4(DLL4)已被确定为不依赖 VEGF 的血管生成和肿瘤起始细胞(TIC)存活的潜在药物靶标,目前 ABT-165 已在临床前模型中显示出卓越的疗效和良好的安全性^[55-57]。

(4) FIT-Ig 平台

FIT-Ig 全称为 “Fabs-In-Tandem-Ig”，是一项新型的双特异性抗体的技术平台，该技术平台能够通过简单的分子生物学手段将两个抗体串联在一起形成双抗，该双抗同时具备了两个原始抗体的功能，拥有双重活性和产业化优势^[26]。FIT-Ig 平台相较于 DVD-Ig 平台的优点是无空间位阻的影响和 Fab 结构域的改变，相较于 TrioMabs 平台和 KiH-Ig 平台的优点是易于抗体表达后续的纯化。已有研究利用 FIT-Ig 平台生成治疗病毒的双抗——ZIKA (FIT-1)：寨卡病毒 (ZIKV) 是一种蚊媒黄病毒，可导致严重的后遗症。该实验研究分离出均具有中和活性的人单克隆抗体 ZIKA185 与 ZKA190。其中 ZKA190 在核磁共振和冷冻电子显微镜下显示与 E 蛋白 DIII 区域上暴露的表位结合，而 ZIKA185 与 E 蛋白 DII 区域上暴露的表位结合。将两株单抗通过 FIT-Ig 改造为 ZIKA (FIT-1)，经验证，FIT-1 强有力地阻止了病毒逃逸，保证了其作为 ZIKV 免疫疗法的发展^[58]。

最终比较后我们选择 FIT-Ig 来进行后续抗体改造实验，双特异性抗体制备平台的比较见图 1。

技术平台	公司	结构	无空间位阻	无Fc突变	无多肽Liner	无Fab结构改变	易纯化
TrioMabs	TriOn Pharma FRESENIUS		✓	✓	✓	✓	✗
KiH-Ig	Genentech A Member of the Roche Group		✓	✗	✓	✓	✗
DVD-Ig	abbvie		✗	✓	✗	✗	✓
➡ FIT-Ig	EpimAb Biotherapeutics		✓	✓	✓	✓	✓

图 1 双特异性抗体制备平台的比较

3 本论文的研究目的和意义

目前，由蚊媒介导的 CHIKV、DENV 和 ZIKV 这三种病毒经常出现共感染现象，如果不及时干预治疗，则可能造成致命的后果。然而这三种病毒导致的疾病表征观察中，均出现发热、头痛以及关节痛等相似症状，不利于早期的诊断治疗。目前市场上尚未出现靶向的特效抗病毒药物。随着双特异性抗体技术的发展，其应用领域已逐渐从最初的癌症治疗、炎症治疗等扩展至病毒免疫治疗。

本研究将目光凝聚于 CHIKV 和 ZIKV 上，我们尝试通过改造已知的 CHIKV、

ZIKV 中和抗体，构建可以同时结合两种病毒的双特异性抗体。相较于单抗的联合免疫治疗，双抗具有两个主要优势：一是节省成本，包括生产和临床治疗中的成本；二是减轻机体负担，因为人的机体对于外来物质均有一定程度的免疫反应，相较于一个双抗，同时使用两个单抗在理论上可能会更加影响机体。因此，我们希望通过抗体改造技术，构建一个可以同时结合两种病毒的双特异性抗体平台，为促进此类疾病的治疗提供一些有意义的帮助，以期对双特异性抗体在治疗病毒方面提供一定的参考。

4 本论文的研究思路

为了获得具有较好中和活性的双特异性抗体，我们首先通过查阅文献和公共平台获取具有较好中和活性的单克隆抗体轻重链可变区基因序列，经人工化学合成相应基因片段后，选择合适的载体构建能够在真核表达系统中高效表达的抗体重组质粒。其次，通过 FIT-Ig 技术，改造单克隆抗体轻重链可变区基因序列，构建能够在真核表达系统中高效表达的双特异性抗体 FIT(A-B)重组质粒。接下来，对抗体表达系统进行优化，包括：表达载体、转染比例和表达时间，以获得最优的表达条件。然后，通过亲和方法纯化表达的单抗和双抗，并通过 SDS-PAGE、Western Blot 和 DLS 分析纯化后抗体分子大小。最后验证抗体的生物学活性：（1）以相应的病原蛋白作为包被抗原，通过 ELISA 定性和定量分析纯化后的单抗、双抗的抗原特异性结合力；（2）利用真病毒或假病毒进行中和实验，通过细胞病变或荧光素酶活性分析抗体的中和活性；（3）通过 ELISA 检测不同温度处理后抗体特异性结合力的变化，从而分析抗体的稳定性。该研究思路见图 2。

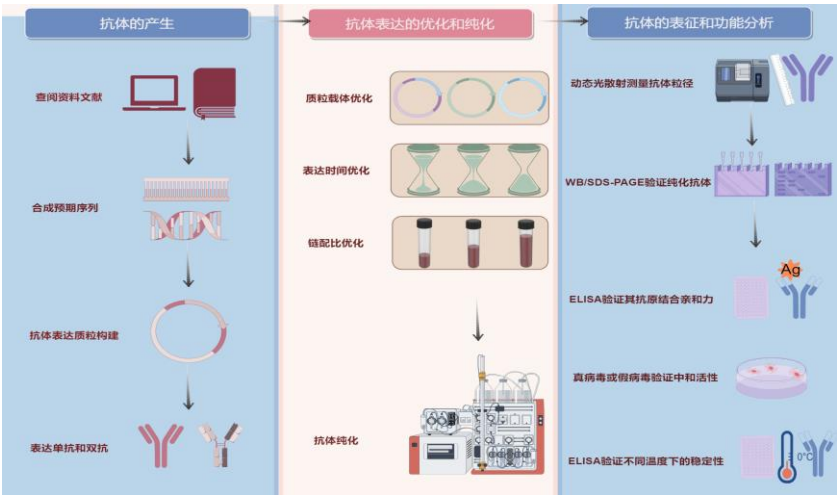


图 2 论文研究思路

材料与方法

1 实验材料

1.1 抗体基因序列

本研究用于表达的 CHK152VL、CHK152VH、CHK166VL、CHK166VH、CHK263VL、CHK263VH、CHK265VL、CHK265VH 基因序列来源于已被证明对 CHIKV 具有高中和活性的单克隆抗体文献 (Pal P, Dowd K A, Brien J D, et al. Development of a highly protective combination monoclonal antibody therapy against Chikungunya virus[J]. PLoS pathogens, 2013, 9(4): e1003312.); ZIKA1004VL、ZIKA1004VH 基因序列来源于 ZIKA 研究文献 (Dussupt V, Sankhala R S, Gromowski G D, et al. Potent Zika and dengue cross-neutralizing antibodies induced by Zika vaccination in a dengue-experienced donor[J]. Nature medicine, 2020, 26(2): 228-235.)。

1.2 哺乳动物细胞

CHO-S 细胞(由中国医学科学院医学生物学研究所孙明老师课题组惠赠);
HEK-293T 细胞 (实验室自存)。

1.3 感受态细胞

大肠杆菌感受态细胞 (*Escherichia coli* DH5a, 目录号: Cat#G6016)。

1.4 表达载体

CMVR 载体 (由中国医学科学院医学生物学研究所孙明老师课题组惠赠);
pMD2.G 载体 (实验室自存);
pcDNA3.1 载体 (实验室自存)。

1.5 主要实验试剂

表 1. 主要实验试剂

试剂	生产厂商	货号
DMEM 液体培养基	CORNING	10-013-CVRC
胎牛血清	GIBCO	10091-148
青链霉素	Biological Industries	03-031-1B
180kDa 蛋白电泳 Marker	ThermoFisher	26616
BCA 法蛋白定量分析试剂盒	ThermoFisher	23227
5×Tris-甘氨酸蛋白电泳缓冲液	Biosharp	BL603B
TMB 显色液	博奥龙生物科技有限公司	BF06007-1
BSA	MP Biomedicals 公司	180728
无菌 PBS 缓冲液	Solarbio 公司	B8291
Tween 20	Amresco 公司	0777
Glycine	美国 VWR 公司	0407C280
TRIS	美国 VWR 公司	77-86-1
Acrylamide, 40% solution	默克有限公司	V900848
TEMED	美国 VWR 公司	A80900761
CHK-E2 重组蛋白	Sino Biological 公司	40440-V08B
DENV-I型重组蛋白	Sino Biological 公司	40531-V08B
DENV-II型重组蛋白	Sino Biological 公司	40471-V08B
DENV-III型重组蛋白	Sino Biological 公司	40531-V08H1
DENV-IV型重组蛋白	Sino Biological 公司	40533-V08B2
ZIKA-E 重组蛋白	Sino Biological 公司	40543-V08B4
无内毒素质粒小提中量试剂盒	TIANGEN	DP118-02
Gibco™FreeStyle™ MAX 试剂	ThermoFisher	16447100
Opti-MEM 减血清培养基	GIBCO	31985-070
HRP 标记山羊抗人 IgG (H+L)	碧云天	A0201
考马斯亮蓝染色液	金斯瑞生物科技有限公司	M00625R
rProtien A Beads	Solarbio 公司	R8290

1.6 主要仪器及耗材

表 2. 主要仪器及耗材

名称	生产厂商	货号
生物安全柜	赛默飞世尔科技	1300MSC
动态光散射仪	Malvern	ZEN3600
超净工作台	苏州安泰空气技术公司	SW-CJ2F
PCR 仪器	北京东胜创新生物科技	ETC-811
核酸电泳系统	美国 BIO-RAD 公司	1645050
无菌无酶低吸附盒装吸头	武汉赛维尔生物科技	TP-1000-C
高精度酶免系统	帝肯(上海)贸易有限公司	1208007652
洗板机	美国伯腾仪器有限公司	50TS
微孔板恒温振荡器	杭州奥盛仪器有限公司	MB100-4A
精度 pH 计	德国梅特勒托利多公司	FE20K
凝胶成像系统	日本 UVP 公司	B110296
台式恒温摇床	上海雯泉仪器有限公司	MQD-B3R
高速离心机	贝克曼库尔特有限公司	JHY01B02
核酸蛋白检测仪	上海琪特有限公司	QT98

2 实验方法

2.1 双特异性抗体 FIT(A-B)的构建策略

FIT (A-B) 分子由单克隆抗 A 和 B 组成；长链的组成是单克隆抗体 A 的轻链（VLA-CL）直接串联融合到单克隆抗体 B 的重链（VHB-CH1-CH2-CH3）的 N 端。另外两条短链，即短链 1(VHA-CH1)和短链 2(VLB-CL)，在哺乳动物细胞中与长链共同表达，从而分泌出类似 IgG 的分子，保留了两个亲代 mAbs 的活性。构建策略见图 3。

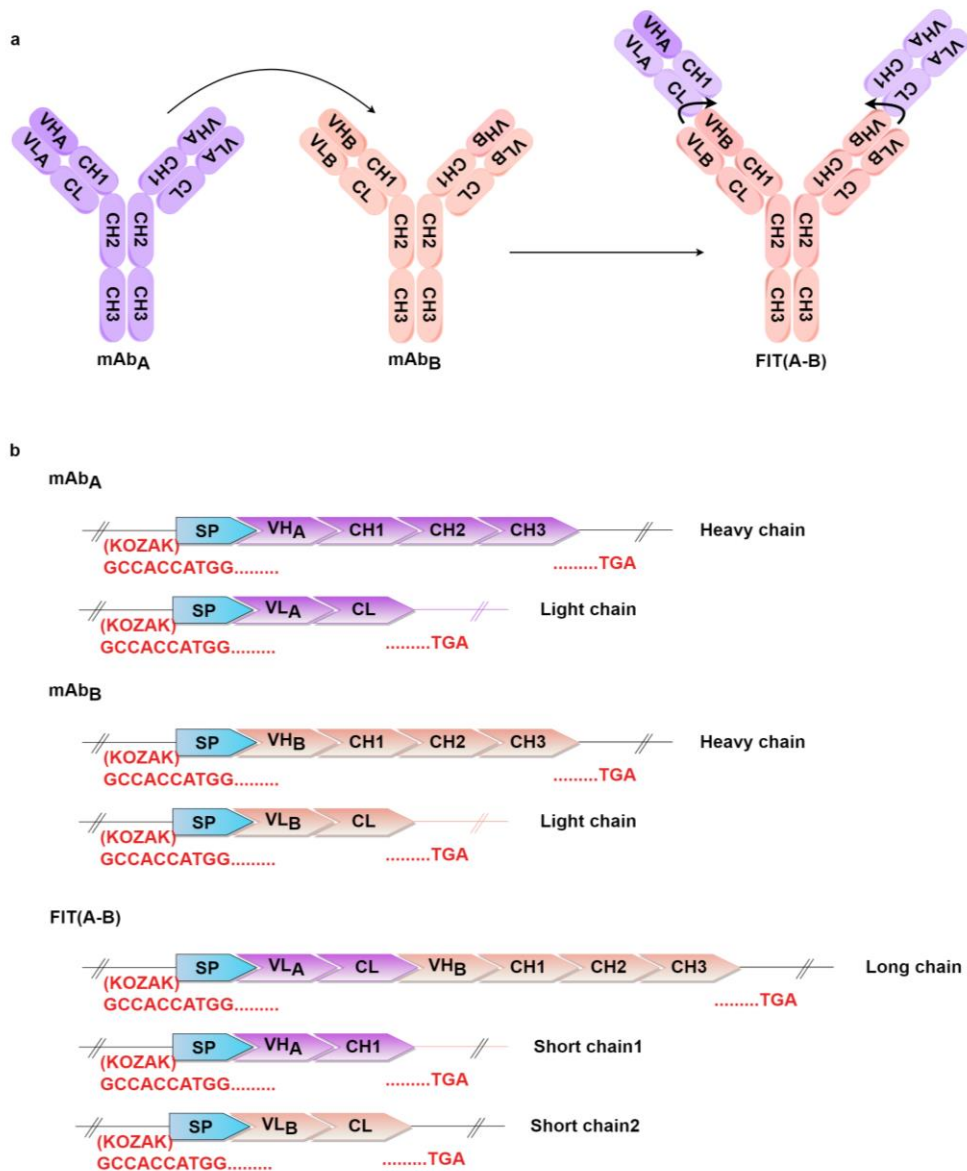


图 3 基于 FIT (A-B) 平台构建双特异性抗体策略

注：a) FIT (A-B)分子由单克隆抗体 A 和 B 组成；长链的组成是单克隆抗体 A 的轻链（VLA-CL）直接串联融合到单克隆抗体 B 的重链（VHB-CH1-CH2-CH3）的 N 端。另外两条短链，即短链 1（VHA-CH1）和短链 2（VLB-CL），在哺乳动物细胞中与长链共同表达，从而分泌出类似 IgG 的分子，保留了两个亲代 mAb 的活性。b) 设计基因构建体。在哺乳动物细胞中瞬时表达抗体设计的编码全长 IgG 和双特异性 FIT-Ig 的基因构建体示意图。Kozak 序列和 TGA 用红色标出。SP: 信号肽；TGA: 终止密码子。

2.2 获取理想的单克隆抗体序列

根据上述所述数据库和文献获取序列,再由苏州金唯智生物科技有限公司合成并插入载体。

2.3 重组抗体表达质粒的构建

2.3.1 单抗表达质粒的构建

2.3.1.1 设计引物

通过 Snapgene 软件设计引物序列,将单抗轻重链可变区序列作为目的基因通过引物分别结合到 CMVR-H、CMVR-L 质粒载体上,构建能够进行转染表达的重组质粒。以单抗 CHK152 为例,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,名称以及碱基序列如下:

CMVR-H(R)-F: GCGTCGACCAAGGGCCCATC

CMVR-H(R)-R: GGAATGTACACCGGTTGCAG

CHK-152-VH-F: ACCGGTGTACATTCCATGGGATGGAGCTGT

CHK-152-VH-R: GCCCTTGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGAC

CMVR-L(R)-F: CGTACGGTGGCTGCACCATC

CMVR-L(R)-R: TGAATGTACACCGGTTGCAG

CHK-152-VL-F: ACCGGTGTACATTCAATGGAGACAGACACA

CHK-152-VL-R: TGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCAGCTT

2.3.1.2 获取目的基因以及线性化载体

(1) 从-20℃ 冰箱取出 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (宝日生物工程有限公司, Cat# R045Q)、相关引物、质粒和无酶水置于冰上解冻。

(2) 依据表 3-6 所示的 PCR 体系,依次加入解冻后的试剂和引物,加完后振荡混匀再瞬时离心。

表 3. CHK152VH 目的基因扩增 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
CHK-152-VH-F	10μM	1μL	10μmol
CHK-152-VH-R	10μM	1μL	10μmol
pUC57-152VH	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

表 4. CHK152VL 目的基因扩增 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
CHK-152-VL-F	10μM	1μL	10μmol
CHK-152-VL-R	10μM	1μL	10μmol
PUC57-152VL	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

表 5. CMVR-H 载体线性化 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
CMVR-H(R)-F	10μM	1μL	10μmol
CMVR-H(R)-R	10μM	1μL	10μmol
CMVR-H	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

表 6. CMVR-L 载体线性化 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
CMVR-L(R)-F	10μM	1μL	10μmol
CMVR-L(R)-R	10μM	1μL	10μmol
CMVR-L	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

(3) 依据表 7 所示的 PCR 程序，将 PCR 体系置于 PCR 仪器中进行扩增。

表 7. PCR 扩增程序

步骤	温度	时间
1	98 °C	2min
2	98 °C	10sec
3	55 °C	15sec
4	72°C	--sec (5s/1kb)
5	重复步骤 2~4	共 35 个循环
6	72 °C	5min

(4)完成 PCR 扩增后向 25 μ LPCR 产物中加入 5 μ L 10 $\times$ Loading Buffer 振荡混匀，再瞬时离心。配制 0.8%琼脂糖凝胶，取 PCR 产物进行电泳，电泳后挖取含目的基因的胶块，利用 Mini BEST Agarose Gel 试剂盒提取凝胶中的目的基因，测定核酸浓度后备用。

2.3.1.3 融合克隆——目的基因与线性化载体的连接

依据 In-Fusion HD Cloning Kit 说明书，线性化载体与目的基因按照适当比例进行连接。根据测定的回收片段的浓度和长度，按照本公司网站公式计算所需用量。按照表 8、9 依次加入各组分后用枪头轻轻吹打混匀体系，随后瞬时离心。连接体系置于 50 $^{\circ}$ C 恒温连接 15min。连接完成后，按照 DH5 α 细胞说明书操作，取 3-5 μ L 连接体系转化 50 μ L DH5 α 感受态细胞，取适量菌液涂布至 LB-卡那霉素（50 μ g/ml）固体培养基，置于 37 $^{\circ}$ C 培养 14-16h。

表 8. 线性化 CMVR-H 与 CHK152VH 连接体系（10 μ l）

组分	浓度	体积
In-Fusion HD Enzyme Premix	5 $\times$	2 μ L
线性化 CMVR-H（5500bp）	30ng/ μ l	4 μ l
CHK152VH（417bp）	50ng/ μ l	1 μ l
无酶水		3 μ L

表 9. 线性化 CMVR-L 与 CHK152VL 连接体系（10 μ l）

组分	浓度	体积
In-Fusion HD Enzyme Premix	5 $\times$	2 μ L
线性化 CMVR-L（5000bp）	30ng/ μ l	4 μ l
CHK152VL（393bp）	35ng/ μ l	1.5 μ l
无酶水		2.5 μ L

2.3.1.4 菌液 PCR 鉴定

挑取 3 个克隆菌落分别至 1ml LB-卡那霉素(50 µg/ml)液体培养基中, 37°C, 220rpm/min 培养 4-6h。按照表 3、表 4 所含目的基因 PCR 体系配制, 其中 PCR 模板用菌液替代且取 1µl 即可, 振荡混匀后瞬时离心。再按照表 8PCR 程序进行 PCR 扩增。PCR 完成后的产物进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶经 UVP 紫外仪捕获图像, 鉴定 CHK152VH、CHK152VL 目的条带。

2.3.1.5 基因测序鉴定

取菌液 PCR 鉴定阳性的菌液, 联系生工生物工程(上海)股份有限公司测序部进行 DNA 测序鉴定。

2.3.1.6 菌种保存

鉴定正确的菌液与 50%甘油以 1:1 混合, 分装 1.5mlEP 管, 于-80°C 保存。

小结: 单抗表达质粒构建方法均按照上述步骤进行, 因此省略 CHK166、CHK265、ZIKA1004 等单抗的构建过程。

2.3.2 双特异性抗体 FIT(1004-265)表达质粒的构建

2.3.2.1 设计引物

通过 Snapgene 软件设计引物序列, 通过如前所述的 FIT(A-B)双特异性抗体改造方法, 在表达单抗的质粒 CMVR-265VH、CMVR-265VL、CMVR-1004VH、CMVR-1004VL 的序列基础上进行改造, 构建出 CMVR(265-1004)LONG、CMVR(265-1004)SHORT、CMVR-265VL 三质粒系统来表达所期望的双特异性抗体。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 名称以及碱基序列如下:

265-1004(R)-F: CAGATTCAGCTGGTGCAGAG

265-1004(R)-R: GGAATGTACACCGGTTGCAG

265-1004long-F: ACCGGTGTACATTCAGCCTGTGCTGACT

265-1004long-R: CACCAGCTGAATCTGGCATTCTCCTCTGTT

ZIKA-1004-VH-F: ACCGGTGTACATTCAGGTGCATCTGCAG

CMVR△CH2CH3-R: AGCAGATCTGGATCCTCATCAAACCTTCTTGTCAC

CMVR(STYX)-F: GGATCCAGATCTGCTGTGCC

CMVR-H(R)-R: GGAATGTACACCGGTTGCAG

2.3.2.2 获取目的基因以及线性化载体

(1) 从-20℃冰箱取出 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (宝日生物工程有限公司, Cat#R045Q)、相关引物、质粒和无酶水置于冰上解冻。

(2) 依据表 10、11 所示的 PCR 体系扩增 CMVR(265-1004)SHORT 的目的基因以及线性化载体, 依据表 12、13 所示的 PCR 体系扩增 CMVR(265-1004)LONG 的目的基因以及线性化载体。之后依次加入解冻后的试剂和引物, 加完后振荡混匀再瞬时离心。

表 10. 目的基因扩增 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
ZIKA-1004-VH-F	10μM	1μL	10μmol
CMVR△CH2CH3-R	10μM	1μL	10μmol
CMVR-1004VH	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

表 11. 载体线性化 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
CMVR(STYX)-F	10μM	1μL	10μmol
CMVR-H(R)-R	10μM	1μL	10μmol
CMVR-1004VH	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

表 12. CMVR(265-1004)LONG 目的基因扩增 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
265-1004long-F	10μM	1μL	10μmol
265-1004long-R	10μM	1μL	10μmol
CMVR-1004VL	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

表 13. CMVR(265-1004)LONG 载体线性化 PCR 反应体系 (25μl)

组分	浓度	体积	总量
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	2×	12.5μL	1×
265-1004(R)-F	10μM	1μL	10μmol
265-1004(R)-R	10μM	1μL	10μmol
CMVR-265VH	100ng/μl	1μL	100ng
无酶水		补至 25μL	

(3) 依据上述表 7 所示的 PCR 程序，将 PCR 体系置于 PCR 仪器中进行扩增。

(4)完成 PCR 扩增后向 25μLPCR 产物中加入 5μL 10×Loading Buffer 振荡混匀，再瞬时离心。配制 0.8%琼脂糖凝胶，取 PCR 产物进行电泳，电泳后挖取含目的基因的胶块，利用 Mini BEST Agarose Gel 试剂盒提取凝胶中的目的基因，测定核酸浓度后备用。

2.3.2.3 融合克隆——目的基因与线性化载体的连接

依据 In-Fusion HD Cloning Kit 说明书，线性化载体与目的基因按照适当比例进行连接。根据测定的回收片段的浓度和长度，按照本公司网站公式计算所需用量。按照表 14、15 依次加入各组分后用枪头轻轻吹打混匀体系，随后瞬时离心。连接体系置于 50℃ 恒温连接 15min。连接完成后，按照 DH5α 细胞说明书操作，取 3-5μL 连接体系转化 50μLDH5α 感受态细胞，取适量菌液涂布至 LB-卡那霉素 (50 μg/ml)固体培养基，置于 37℃ 培养 14-16h。

表 14. CMVR(265-1004)SHORT 连接体系 (10μl)

组分	浓度	体积
In-Fusion HD Enzyme Premix	5×	2μL
CMVR(265-1004)SHORT 线性化载体	42ng/μl	3.5μl
CMVR(265-1004) SHORT 目的基因	35ng/μl	1.5μl
无酶水		3μL

表 15. CMVR(265-1004)LONG 连接体系 (10 μ l)

组分	浓度	体积
In-Fusion HD Enzyme Premix	5 $\times$	2 μ L
CMVR(265-1004)LONG 线性化载体	70ng/ μ l	1 μ l
CMVR(265-1004) LONG 目的基因	10ng/ μ l	5 μ l
无酶水		2 μ L

2.3.2.4 菌液 PCR 鉴定

挑取 3 个克隆菌落分别至 1ml LB-卡那霉素(50 μ g/ml)液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm/min 培养 4-6h。按照表 10、12 所含目的基因 PCR 体系配制, 其中 PCR 模板用菌液替代且取 1 μ l 即可, 振荡混匀后瞬时离心。再按照表 7 PCR 程序进行 PCR 扩增。PCR 完成后的产物进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶经 UVP 紫外仪捕获图像, 鉴定预期目的条带。

2.3.2.5 基因测序鉴定

取菌液 PCR 鉴定阳性的菌液, 联系生工生物工程(上海)股份有限公司测序部进行 DNA 测序鉴定。

2.3.2.6 菌种保存

鉴定正确的菌液与 50%甘油以 1:1 混合, 分装 1.5mlEP 管, 于-80 $^{\circ}$ C 保存。

注: 此次质粒构建过程中 CMVR-265VL 不做改变, 但仍为双抗三质粒系统中其一。

为了提高后续蛋白表达的成功率以及选择表达效率较优的重组质粒, 我们同时构建了备选的不同载体重组质粒, 构建方法如上所述, 质粒命名如下: CMVR(152-1004)LONG 、 CMVR(152-1004)SHORT 、 PMD2.G-152VL 、 PMD2.G-152VH 、 pMD2.G-166VL 、 pMD2.G-166VH 、 pMD2.G-1004VL 、 pMD2.G-1004VH 、 pMD2.G(152-1004)LONG 、 pMD2.G(152-1004)SHORT 、 pcDNA3.1-152VL、 pcDNA3.1-152VH、 pcDNA3.1-166VL、 pcDNA3.1-166VH、 pcDNA3.1-1004VL 、 pcDNA3.1-1004VH 、 pcDNA3.1(152-1004)LONG 、 pcDNA3.1(152-1004)SHORT。

2.4 重组抗体表达条件的优化

2.4.1 重组抗体表达质粒的扩增提取

2.4.1.1 提前过夜摇菌(含有目的质粒的甘油菌液)，试剂盒：无内毒素小提中量试剂盒（北京天根生化科技有限公司，货号 Cat# DP118）。

2.4.1.2 溶液 P1 使用前加入 RNaseA（试剂盒提供），混匀，在 4℃ 冰箱保存；

2.4.1.3 漂洗液 PW 加入指定体积的无水乙醇；

2.4.1.4 将过夜培养的菌液加入离心管，12000rpm 离心 1min，尽量吸除上清；

2.4.1.5 向含有细菌沉淀的离心管中加入 500μl 溶液 P1，使用移液枪吹打悬浮细菌沉淀；

2.4.1.6 向上述离心管中加入溶液 P2 500μl，温和地上下翻转 6-8 次，使菌体充分裂解（不宜超过 5min）；

2.4.1.7 向上述离心管中加入溶液 P4 500μl，立即温和地上下翻转 6-8 次使液体充分混匀，直到出现紧实的白色絮状沉淀，然后室温放置 10-20min，12000rpm 离心 20min，将沉淀离至离心管底部（注意 P4 加入后要立即混匀，避免产生局部沉淀，如果上清还有小块白色沉淀，可延长离心时间）；

2.4.1.8 将上一步离心得到的上清液加入过滤柱 CS 当中，过滤柱 CS 移至收集管，12000rpm 离心 2min，将滤液收集到干净的 2ml 离心管中；

2.4.1.9 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积量的异丙醇（多加易导致 RNA 污染），上下颠倒混匀；

2.4.1.10 将吸附柱放入收集管，然后加入 500μl 平衡液 BL，12000rpm 离心 1min，倒掉废液，将吸附柱重新放回收集管中；

2.4.1.11 将混合液加到已活化的吸附柱 CP4 当中；

2.4.1.12 室温 12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放回收集管；

2.4.1.13 向吸附柱 CP4 中加入 500μl 去蛋白液 PD，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放回收集管；

2.4.1.14 向吸附柱 CP4 加入 600μl 漂洗液 PW，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放回收集管（加入漂洗液 PW 后，室温静置 5min，更有助于去除杂质）；

2.4.1.15 向吸附柱 CP4 加入 600μl 漂洗液 PW，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放回收集管；

2.4.1.16 将吸附柱 CP4 放回收集管中，12000rpm 离心 2min，去除吸附柱中残余的漂洗液；

2.4.1.17 打开吸附柱 CP4 的盖子，室温放置 5min，彻底晾干吸附膜中残留的漂洗液；

2.4.1.18 提前将洗脱缓冲液 TB 放入 65℃水浴锅预热；

2.4.1.19 将吸附柱 CP4 置于干净的 1.5ml 离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 150μl 洗脱缓冲液 TB，室温静置 2min，12000rpm 离心 1min，将离心得到的质粒溶液收集到离心管中；

2.4.1.20 分光光度计检测质粒浓度，送上海生工生物测序。

2.4.2 重组抗体在 293T-17 贴壁细胞中的表达

2.4.2.1 转染前准备

提前一天将长满的 293T-17 细胞（细胞来自 pro-cell 公司，细胞代次：13；以下简称 293T 细胞），按照每孔 1×10^6 个细胞的比例传至六孔板（体积：2ml/孔），使其 24h 后细胞密度达到 70%-80%；

2.4.2.2 转染操作

2.4.2.2.1 以六孔板配置为例，配置转染复合物体系（参照《Lipofectamine™ 3000 试剂实验方案》厂家：thermofisher 公司，目录号：L3000015）

2.4.2.2.2 接种细胞至 70–80% 汇合度时转染；

2.4.2.2.3 使用 Opti-MEM™ 培养基（125μl）（产家：thermofisher 公司；目录号：11058021）稀释 Lipofectamine™ 3000 试剂（5μl）——充分混匀；

2.4.2.2.4 使用 Opti-MEM™ 培养基（125μl）稀释 DNA（2.5μg），制备 DNA 预混液，然后添加 P3000™ 试剂（5μl）——充分混匀，完成后静置 3min；

注：这里的 DNA(2.5μg)为转染质粒的总量，由于该实验的目的是表达单克隆抗体以及双特异性抗体，转染系统为双质粒系统（表达单抗）以及三质粒系统（表达双抗），故要求的总量为 2.5μg 即可。转染质粒以及比例方案如下表所示

表 16. 转染质粒以及比例方案

质粒名称	比例(2.5ug 总量)
CMVR-152VH:CMVR-152VL	1:1
CMVR-166VH:CMVR-166VL	1:1
CMVR-263VH:CMVR-263VL	1:1
CMVR-265VH:CMVR-265VL	1:1
CMVR-1004VH:CMVR-1004VL	1:1
pMD2.G-152VH:pMD2.G -152VL	1:1
pMD2.G -166VH:pMD2.G -166VL	1:1
pMD2.G -1004VH:pMD2.G -1004VL	1:1
pcDNA3.1-152VH:pCDNA3.1 -152VL	1:1
pcDNA3.1 -166VH:pCDNA3.1 -166VL	1:1
pcDNA3.1 -1004VH:pCDNA3.1 -1004VL	1:1
CMVR 系列 FIT(1004-152) LONG:SHORT1:SHORT2	1:1:1
CMVR 系列 FIT(1004-152) LONG:SHORT1:SHORT2	1:2:2
CMVR 系列 FIT(1004-152) LONG:SHORT1:SHORT2	1:3:3
CMVR 系列 FIT(1004-152) LONG:SHORT1:SHORT2	1:4:4
pMD2.G 系列 FIT(1004-152)LONG:SHORT1:SHORT2	1:1:1
pcDNA3.1 系列 FIT(1004-152)LONG:SHORT1:SHORT2	1:1:1
CMVR 系列 FIT(1004-265)LONG:SHORT1:SHORT2	1:1:1

2.4.2.2.5 在已稀释的 Lipofectamine™ 3000 试剂中加入稀释的 DNA (1:1 比例);

2.4.2.2.6 于恒温培养箱 21°C 孵育 10–15 分钟;

2.4.2.2.7 加入 DNA- 脂质复合物(250μl)至六孔板细胞中（分不同的点，一滴一滴地加，边加边 上下左右十字混匀）;

2.4.2.2.8 加入转染复合物后，37°C、5%CO₂ 培养 24-96h。在相应的时间点，收获细胞和上清进行蛋白表达鉴定。

注：本实验进行了收样时间的优化，故而在 12h、24h、48h、72h、96h、120h、144h、168h 均进行收样，以便后续实验筛选最优。

2.4.3 重组抗体 Western blotting 分析

2.4.3.1 细胞上清与沉淀处理

上清处理：用细胞刮子，将细胞连带培养液全部刮下来，转移至 1.5mlEP 管，于 1000g 离心 5min，将上清转移至新管。

沉淀处理：细胞沉淀用预冷的 PBS 悬浮，于 1000g 离心 5min，去上清，用适当体积的 RIPA 悬浮细胞后（一般 100 μ l）；置于冰上 30min，用适当功能的超声处理打碎 DNA；于 4°C 和 10000rcf 离心 10min，（提前开离心机预冷），将离心后的上清转移至另一 1.5ml 的 EP 管。

2.4.3.2 Western blotting

2.4.3.2.1 WB 胶的制备——选择试剂盒《One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (10%)》（公司：诺唯赞，目录号：E303-01）

2.4.3.2.1.1 以制备一块 0.75/1.0/1.5 mm 的 mini 胶为例。

表 17. 下层胶配方

凝胶厚度	ResolverA	ResolverB	APS
0.75mm	2.0ml	2.0ml	40ul
1.0mm	2.7ml	2.7ml	60ul
1.5mm	4.0ml	4.0ml	80ul

表 18. 上层胶配方

凝胶厚度	StackerA	StackerB	APS
0.75mm	0.5ml	0.5ml	10ul
1.0mm	0.75ml	0.75ml	15ul
1.5mm	1.0ml	1.0ml	20ul

2.4.3.2.1.2 各组分在使用前请颠倒混匀 6 - 8 次；

2.4.3.2.1.3 下层胶配制：取等体积 Resolver A 和 Resolver B，各 2.0/2.7/4.0 ml，混匀；

2.4.3.2.1.4 上层胶配制：取等体积 Stacker A 和 Stacker B，各 0.5/0.75/1.0 ml，混匀；

2.4.3.2.1.5 向下层胶的混合溶液中加入 40/60/80 μl 的 APS，立即充分混匀，然后注入制胶玻璃板中，使液面距短玻璃板上沿约 1.5 cm；

2.4.3.2.1.6 向上层胶的混合溶液中加入 10/15/20 μl 的 APS，立即充分混匀，无需等待下层胶凝固，即可将混匀后的溶液轻缓注入制胶玻璃板中，轻轻 插入梳齿；

2.4.3.2.1.7 待胶凝固后(室温约 15 min)，拔去梳齿即可用于电泳。推荐电泳电压为 150 - 200 V，待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时，即可停止电泳。

2.4.3.2.2 加样：小心拔出梳子，加入电泳液密封，取等体积（20 μl /孔，50 μg ）已处理的样品上样；

2.4.3.2.2 上样顺序：根据具体实验内容而定，结果部分展示；

2.4.3.2.3 电泳电压以及时间：80V30min；150V45min。

2.4.3.2.4 转膜(产家：Bio-Rad 公司；Trans-Blot® Turbo™ 全能型蛋白转印系统)：取下电泳结束后的凝胶，切除浓缩胶部分。先利用甲醇浸泡 PVDF 膜 30s 左右，取上 7 层，下 7 层滤纸用转膜液浸泡，以滤纸-PVDF 膜-胶-滤纸自下往上铺盖，注意不要产生气泡；转膜程序设置为 2.5A，10Min；

2.4.3.2.5 蛋白封闭：配制 5%的脱脂奶封闭液（0.5g 脱脂奶粉加入到 10ml PBST 溶液中）， 容器中加入 10ml 封闭液，将切好的膜浸泡在封闭液中。置于水平摇床上，转速 45rpm，室温封闭 1h；

2.4.3.2.6 一抗孵育：用 PBST 配制 2.5% BSA，根据 1:1000 的比例稀释一抗，并按 1:1000 的比例加入叠氮钠（防止长菌，一抗循环使用），封闭结束后，4℃过夜孵育一抗，孵育结束后，将一抗回收至原 15ml 管。用 PBST 洗涤一抗，每次 10min，洗 3 次；

注：由于本课题验证的蛋白为抗体，所以免去一抗孵育过程，直接进行二抗孵育

2.4.3.2.7 二抗孵育：含 2.5%脱脂牛奶的 PBST 为溶剂稀释二抗，稀释比例 1000:1（厂家：碧云天，CatNo.A2010, goat anti-human IgG（H+L））；

2.4.3.2.8 二抗孵育结束后，用 PBST 洗涤二抗，每次 10min，洗 3 次；

2.4.3.2.9 显色:按照 1:1 比例配制显色液，混匀，取适量体积铺满 PVDF 膜，避光孵育 5min，沥干 PVDF 膜表面的显色液，置于凝胶成像系统中，自动曝光模式拍摄照片显色。

2.5 重组抗体的大量表达、纯化和鉴定

2.5.1 重组抗体在 CHO-S 悬浮细胞中的表达

转染试剂：Freestyle 试剂（厂家：赛默飞世尔科技；目录号：16447100）

注：转染从贴壁细胞更换为悬浮细胞，是因为悬浮细胞表达量性价比更高，更利于后续纯化，转染过程参照试剂说明书，转染总量固定，单抗比例 1:1，双抗比例 1:1:1。

2.5.2 重组抗体的纯化

2.5.2.1 实验材料准备

注：提前一天准备好所有的试剂和检查仪器是否正常

2.5.2.1.1 rProtein A beads 填料（厂家：Solarbio，货号：R8290）

2.5.2.1.2 Buffer 准备

2.5.2.1.2.1 洗脱 Buffer: 0.1M 甘氨酸, pH3.0 ;

2.5.2.1.2.2 中和 Buffer: 1MTris-HCl, pH8.5;

2.5.2.1.2.3 结合/洗杂 Buffer: 0.15MNaCl, 20mMNa₂HPO₄, pH7.0;

2.5.2.1.2.4 所用水和 Buffer 在使用之前建议用 0.22μm 或 0.45μm 滤膜过滤;

2.5.2.1.3 恒流泵: LongerPump 公司, 货号 BT100-2J (纯化时, 转速为 6rpm) ;

2.5.2.1.4 核酸蛋白检测仪: 上海 QiTe 公司, 货号 QT98;

2.5.2.1.5 容量大小合适的层析柱、EP 管、50ml 离心管等

2.5.2.2 样品准备

2.5.2.2.1 细胞悬液于 4800rpm、4°C、离心 30 分钟;

2.5.2.2.2 将离心后的上清转移至新管; 用 0.45μm 的滤器过滤细胞上清至新管;

2.5.2.2.3 颠倒混匀 beads 后, 按待纯化液: beads=2000:1 的体积, 取 beads 加入到待纯化液中, (如: 200ml 待纯化液加 100ul 的混匀的 beads 悬液), 然后再待纯化液: 结合/洗杂 Buffer=10:1 的体积加入结合/洗杂 Buffer 以调节离子强度和 pH 值 (如: 100ml 待纯化液加 10ml 的结合/洗杂 Buffer) ;

2.5.2.2.4 放置摇床 4°C 于 50rpm 孵育 1.5-2h (至少孵 1 小时) ;

2.5.2.3 样品纯化

2.5.2.3.1 根据 beads 的载量和待纯化上清中蛋白的量估算所需 beads 的体积, 由

于 beads 是保存在等体积的 20%乙醇 PBS 中，因此，计算柱体积时，应该按 2 倍体积的 beads 悬液来取，如：2ml 的柱体积应该取 4ml 混匀的 beads 悬液；

2.5.2.3.2 装柱：1) 将 beads 悬液混匀后，取计算好体积的 beads 加入到适当大小的柱子中，通过重力的作用让保存液流穿；2) 用 5 倍柱体积的结合/洗杂 Buffer 进行平衡（流速：6rpm）；

2.5.2.3.3 通过蠕动泵以 6rpm 的流速将样本加到平衡好的柱子中（为了保证 rProtein A Beads 能最大限度地吸附目的蛋白抗体，可重复操作一次），收集流出液；

2.5.2.3.4 使用 10-15 倍柱体积的结合/洗杂 Buffer 进行清洗（去除非特异性吸附的杂蛋白），收集洗杂液；

2.5.2.3.5 使用 5 倍柱体积的洗脱 Buffer，收集洗脱液（即目的蛋白组分）：以（800 μ l/EP 管）为单位，洗脱过程中以峰值进行洗脱液收集，共收集 10 管，收集后应立即用中和液中和至 PH7.0 左右；

2.5.2.3.6 依次使用 3 倍柱体积的结合/洗杂 Buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡柱子，最后再用 5 倍柱体积的 20%的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20%乙醇 PBS 中，置于 4 $^{\circ}$ C 保存，防止填料被细菌污染；

2.5.3 重组抗体的纯度分析

注：纯化后样品同 WB 样品上样操作一致，待电泳结束后直接进行考染液过夜孵育，次日洗脱，等待结果。

2.6 重组抗体的表征与功能分析

2.6.1 重组抗体的大小分析

用 PBS 将各纯化后抗体稀释至浓度为 10 μ M，吸取 800 μ l 加入到 Zetasizer Nano ZS（马尔文）的比色皿中，通过动态光散射检测各抗体的粒径大小。

2.6.2 重组抗体的特异性结合力分析

2.6.2.1 实验材料

2.6.2.1.1 仪器：96 孔酶标板、移液枪、加样槽、酶标仪、洗板仪、恒温振荡器；

2.6.2.1.2 待检测样品（一抗）：已制备纯化的单抗以及双抗；

2.6.2.1.3 包被抗原：CHK-E2 抗原、DENV1/2/3/4 型抗原、ZIKA-E 抗原（相关信息表 2 附上）；

2.6.2.1.4 酶标二抗：goat anti-human IgG（H+L）（与上述 WB 二抗一致）

2.6.2.2 溶液以及溶液配置

2.6.2.2.1 包被稀释液（0.05M 碳酸盐缓冲液 pH9.6）：Na₂CO₃ 0.795g, NaHCO₃ 1.465g, 溶于 500ml 蒸馏水中（pH 计测量溶液 pH 正好为 9.6）

2.6.2.2.2 洗液（PBST）：1L PBS 中加入 500 μ l Tween-20 混匀

2.6.2.2.3 封闭液：含有 5%脱脂奶粉的 PBST

2.6.2.2.4 抗体稀释液：含有 1%BSA 的 PBST

2.6.2.2.5 显色液：博奥龙 TMB 单组分显色液（Cat:BF06007）

2.6.2.2.6 显色终止液（0.3M 硫酸）：8.15ml H₂SO₄+500ml 蒸馏水

2.6.2.3 实验步骤

2.6.2.3.1 包被抗原

本实验包被抗原量均为 0.5 μ g/ml，取定量抗原与定量包被稀释液混匀，100 μ l/孔；包被完毕后，4 $^{\circ}$ C 过夜；

2.6.2.3.2 洗板

设定洗板机程序为洗板 3 次，每次 300 μ L/孔 PBST 洗液洗涤酶标板，最后一次洗板后，将板在纸巾上轻拍酶标板去除残余液体；

2.6.2.3.3 封闭

酶标板中加入封闭液 200 μ L/孔，用封板膜封住板在 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器中 200rpm 孵育 1h；

2.6.2.3.4 洗板

步骤同 2.7.1.3.2

2.6.2.3.5 添加一抗

方法：酶标板中加入用抗体稀释液稀释好的待检血清 100 μ L/孔，用封板膜封住板在 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器 200rpm 中孵育 1h；

注：由于本实验初次检测抗体功能，稀释倍数没有明确要求，只能在不浪费样品的前提下进行探索，具体稀释倍数以及方法描述于结果部分，此处不多赘述；

2.6.2.3.6 洗板

步骤同 2.7.1.3.2

2.6.2.3.7 添加二抗

本次检测采用二抗为辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG（与上述 WB 二抗一致），用抗体稀释液做 250:1 稀释（现用现配），100 μ l/孔；酶标板用封板膜封住在 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器中 200rpm 孵育 1 小时；

2.6.2.3.8 洗板

步骤同 2.7.1.3.2

2.6.2.3.9 显色

酶标板中加入 100 μ L/孔 TMB 溶液，37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器中孵育 15 分钟；

2.6.2.3.10 终止

酶标板中加入 100 μ L/孔 0.3M H₂SO₄ 终止显示；

2.6.2.3.11 读板

终止后 5 分钟之内检测，在酶标仪上检测 OD₄₅₀。

2.6.3 重组抗体的中和活性分析

2.6.3.1 DENV1 型/2 型/3 型的中和活性测定

2.6.3.1.1 通过病毒滴度测定实验可得 DENV1 型：TCID₅₀=10^{2.5}/ml；DENV2 型：TCID₅₀=10^{2.5}/ml；DENV3 型：TCID₅₀=10^{5.5}/ml；

2.6.3.1.2 用 DMEM 不完全培养基稀释抗体 ZIKA1004 与 FIT(1004-265)，每株抗体最终稀释 8 个浓度梯度（分别为 200 μ M、100 μ M、50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.5625 μ M），每个浓度梯度 50 μ l；用 DMEM 不完全培养基稀释病毒液，稀释度根据 TCID₅₀ 值计算，在此选择 10TCID₅₀ 作为稀释倍数（由于病毒稀释的总体积为 50 μ l，后续形成病毒-抗体复合物的终体积为 100 μ l，因此在本身稀释阶段则需要考虑到浓缩 2 倍）；

2.6.3.1.3 将 50 μ l DENV1/2/3 型病毒稀释液加入到 50 μ l 的抗体稀释液中。此时抗体与病毒液总体积为 100 μ l，混合液中抗体的终浓度分别为 100 μ M、50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.5625 μ M、0.78125 μ M；

2.6.3.1.4 接种 2 个复孔，以便后续分析统计；取培养瓶里的 vero-E6 细胞，经胰酶消化后，加适量的完全培养基中和胰酶，计数得到总的细胞数量，离心后，根

据细胞总量用适量的 4%FBS 培养基悬浮细胞，使得细胞浓度为 2×10^5 个/ml；

2.6.3.1.5 向加了病毒-抗体复合物的 96 孔板的每孔中加入 100 μ l 细胞，将培养板置于 CO₂ 培养箱，培养温度 37℃，从 48h 起，每隔 24h 取出培养板，显微镜下观察细胞病变。一般需要观察 5-7 天；

2.6.3.1.6 时间结束后，对其进行结晶紫染色，首先吸弃 96 孔板中剩余的培养液，每孔加入 100 μ l 结晶紫-1%甲醛复合液，静置 30min 后用水温和冲洗（以冲掉以坏死脱落的细胞）；随后采用 1%冰醋酸进行溶解，在 570nm 处测定其 OD 值；
保护率=（测试抗体孔 OD 值-病毒感染孔 OD 值）/（正常对照孔 OD 值-病毒感染孔 OD 值） $\times 100\%$

2.6.3.2 基孔肯雅假病毒的微中和测定

2.6.3.2.1 通过荧光素酶检测分析 CHIKV 假病毒，通过荧光值分析用 DMEM 不完全培养基将其稀释 8 倍以用作中和实验；

2.6.3.2.2 用 DMEM 不完全培养基稀释抗体 CHK265 与 FIT(1004-265)，每株抗体最终稀释 8 个浓度梯度（分别为 200 μ M、100 μ M、50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.5625 μ M），每个浓度梯度 50 μ l；

2.6.3.2.3 将 50 μ l 假病毒稀释液加入到 50 μ l 的抗体稀释液中。此时抗体与假病毒液总体积为 100 μ l，混合液中抗体的终浓度分别为 100 μ M、50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.5625 μ M、0.78125 μ M；

2.6.3.2.4 接种 2 个复孔，以便后续分析统计；取培养瓶里的 293T-17 细胞，经胰酶消化后，加适量的完全培养基中和胰酶，计数得到总的细胞数量，离心后，根据细胞总量用适量的 4%FBS 培养基悬浮细胞，使得细胞浓度为 5×10^5 个/ml；

2.6.3.2.5 向加了假病毒-抗体复合物的 96 孔板的每孔中加入 100 μ l 细胞，将培养板置于 CO₂ 培养箱，培养温度 37℃，48h 后进行荧光素酶检测；

2.6.3.2.6 提前将荧光素酶试剂取出平衡至室温，将 A/B 液混合后充分溶解混匀再使用；调试酶标仪，设置好检测程序，检测无孔板时的荧光素酶背景读值；细胞培养 48 h 后，吸弃上清，然后加入 120 μ l Bright-Glo™ 荧光素酶检测试剂，室温避光反应 2min 后，反复吹打，转移 100 μ l 液体至白板中，酶标仪读取荧光值；

2.6.3.2.7 实验结果计算：中和抑制率（Neutralization activity，%）=（无抗体阴

性对照组发光值-样品组发光值)/无抗体阴性对照组发光值 $\times 100\%$ ，Graphpad 软件绘制中和抑制率曲线，选择非线性拟合，系统计算出 ID₅₀ 的值即为抗体的中和效价。

2.6.3.3 ZIKV 的中和活性测定

2.6.3.3.1 通过病毒滴度测定实验计算，将原病毒液稀释 5 倍以用作中和实验；

2.6.3.3.2 用 DMEM 不完全培养基稀释抗体 ZIKA1004 与 FIT(1004-265)，每株抗体最终稀释 8 个浓度梯度(分别为 200 μ M、100 μ M、50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.5625 μ M)，每个浓度梯度 50 μ l；

2.6.3.3.3 将 50 μ l ZIKA 病毒稀释液加入到 50 μ l 的抗体稀释液中。此时抗体与病毒液总体积为 100 μ l,混合液中抗体的终浓度分别为 100 μ M、50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.5625 μ M、0.78125 μ M；

2.6.3.3.4 接种 2 个复孔，以便后续分析统计；取培养瓶里的 vero-E6 细胞，经胰酶消化后，加适量的完全培养基中和胰酶，计数得到总的细胞数量，离心后，根据细胞总量用适量的 4%FBS 培养基悬浮细胞，使得细胞浓度为 2×10^5 个/ml；

2.6.3.3.5 向加了病毒-抗体复合物的 96 孔板的每孔中加入 100 μ l 细胞，将培养板置于 CO₂ 培养箱，培养温度 37 $^{\circ}$ C，72h 取出培养板，显微镜下观察细胞病变；

2.6.3.3.6 时间结束后，对其进行结晶紫染色，首先吸弃 96 孔板中剩余的培养液，每孔加入 100 μ l 结晶紫-1%甲醛复合液，静置 30min 后用水温和冲洗（以冲掉以坏死脱落的细胞）；随后采用 1%冰醋酸进行溶解，在 570nm 处测定其 OD 值；
保护率=（测试抗体孔 OD 值-病毒感染孔 OD 值）/（正常对照孔 OD 值-病毒感染孔 OD 值） $\times 100\%$

2.6.4 重组抗体的稳定性分析

2.6.4.1 样品处理

处理方法 1 为 4 $^{\circ}$ C 放置，持续时间分别为 D1/D3/D5；

处理方法 2 为 25 $^{\circ}$ C 放置，持续时间分别为 D1/D3/D5；

处理方法 3 为 37 $^{\circ}$ C 放置，持续时间分别为 D1/D3/D5；

处理方法 4 为反复冻融，持续循环次数分别为 1/2/3；

处理方法 5 为使用 PCR 仪（温度循环范围 4 $^{\circ}$ C -40 $^{\circ}$ C ， 2h），持续循环次数分别为 1/2/3；

2.6.4.2 处理后验证

验证部分与上述 ELISA 检测部分一致，通过 ELISA 结果数据分析处理后样品与初始样品的特异性结合力是否存在差异。

2.7 统计学方法与分析

所有图形和数据均使用 GraphPad Prism 8.0 软件 (GraphPad, San Diego, CA) 生成和分析。结果以平均值和标准差 (SD) 表示，每个实验至少独立重复三次。采用非参数单因素方差分析或 Student t 检验进行统计学分析。“ns”表示 $p > 0.05$ ，“*”代表 $p < 0.05$ ，“**”代表 $p < 0.01$ ，“***”代表 $p < 0.001$ ，“****”代表 $p < 0.0001$ ， p 的数值越小事实上表示两者之间的差异越大。

结 果

1 重组抗体表达质粒的构建

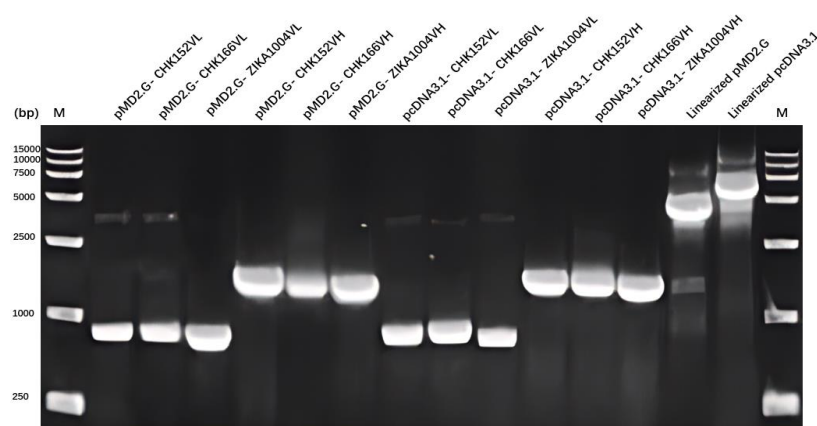
通过查阅文献和数据库，我们获得了 5 株分别对 CHIKV、DENV、ZIKV 三个常见蚊媒病毒具有中和活性且序列已公开的单克隆抗体：CHK152、CHK166、CHK263、CHK265、ZIKA1004。本论文将以这 5 个单克隆抗体序列为基础，开展相关的研究。为此，我们首先基于 5 个单克隆抗体序列构建了一系列单克隆抗体和双特异性抗体的表达质粒。

1.1 单抗轻重链片段表达质粒载体的构建

以单克隆抗体为例，将单抗轻重链通过 In-fusion 方法克隆至 CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 载体。根据 In-fusion 方法的原理，使用 SnapGene 软件设计引物，通过 PCR 扩增可以 In-fusion 克隆的单抗轻重链片段。琼脂糖凝胶电泳后，纯化和回收 PCR 产物。CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 载体也通过设计引物和 PCR 扩增进行线性化（图 4A）。

将线性化后的载体与扩增获得的目的基因通过 In-fusion 方法连接，转化感受态细胞，挑选单克隆菌落进行培养扩增后提取质粒。测序结果表明，5 个抗体的轻重链成功克隆到 CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 载体，获得了 24 个单抗表达质粒（表 19），代表性质粒图谱如图 4B 所示。

A



B

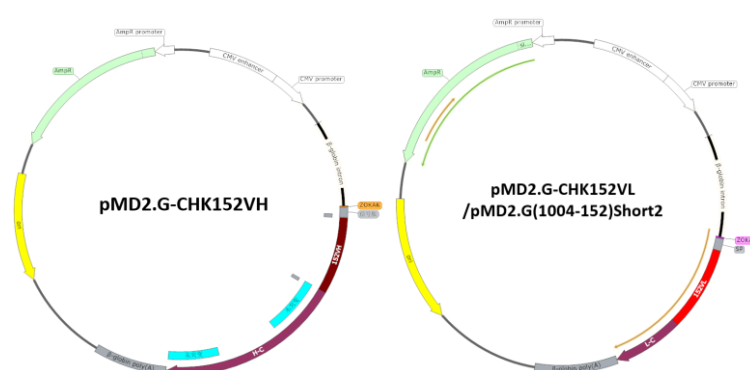


图 4 单抗轻重链片段表达质粒构建的代表性图

注：A：1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增的基因片段和线性化载体；M：marker；

B：以 pMD2.G 为骨架构建的 CHK152 单抗轻重链双质粒系统图谱。

1.2 FIT-Ig 双抗轻重链片段表达质粒载体的构建

结合 FIT(A-B)双特异性抗体改造方法，将 CHK152 与 ZIKA1004 单抗轻重链通过 In-fusion 方法改造成组成 FIT-Ig 表达质粒的长链、短链 1 和短链 2 序列并克隆至 CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 载体。根据 In-fusion 方法的原理，使用 SnapGene 软件设计引物，通过 PCR 扩增可以 In-fusion 克隆的目的基因和线性化载体。将线性化后的载体与扩增获得的目的基因通过 In-fusion 方法连接，转化感受态细胞，挑选单克隆菌落进行培养扩增后提取质粒。琼脂糖凝胶电泳分析构建好的完整质粒（图 5A）。

测序结果也表明，分别将改造后的基因序列成功克隆至 CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 载体，获得了 15 个双抗表达质粒（表 19），代表性结果如图 5B。

(bp) M CMVR (100A-152)Long CMVR (100A-152)Short1 CMVR (100A-152)Short2 PMD2.G (100A-152)Long PMD2.G (100A-152)Short1 PMD2.G (100A-152)Short2 pCDNA3.1 (100A-152)Long pCDNA3.1 (100A-152)Short1 pCDNA3.1 (100A-152)Short2 M

10000
7000
4000
2000
1000
500
250

1% Agarose

注：A：1%琼脂糖凝胶电泳分析不同载体构建的双抗表达质粒；M：marker；
B：以 pMD2.G 为骨架构建的 FIT(1004-152)的三质粒系统图谱。

通过上述表达单抗和双抗的重组质粒构建方法,对本研究所构建的全部质粒进行总结,汇总见下表 19。

表 19. 重组抗体表达质粒构建汇总表

质粒名称	抗体名称	针对抗原
CMVR-263VL CMVR-263VH	CHK263	CHIKV-E2 抗原
CMVR-265VL CMVR-265VH	CHK265	CHIKV-E2 抗原
CMVR-152VL CMVR-152VH	CHK152	CHIKV-E2 抗原
CMVR-166VL CMVR-166VH	CHK166	CHIKV-E1 抗原
CMVR-1004VL CMVR-1004VH	ZIKA1004	ZIKA-E,DENV 抗原
pMD2.G-152VL pMD2.G-152VH	CHK152	CHIKV-E2 抗原
pMD2.G-166VL pMD2.G-166VH	CHK166	CHIKV-E1 抗原
pMD2.G-1004VL pMD2.G-1004VH	ZIKA1004	ZIKA-E,DENV 抗原
pcDNA3.1-152VL pcDNA3.1-152VH	CHK152	CHIKV-E2 抗原
pcDNA3.1-166VL pcDNA3.1-166VH	CHK166	CHIKV-E1 抗原
pcDNA3.1-1004VL pcDNA3.1-1004VH	ZIKA1004	ZIKA-E,DENV 抗原
CMVR(152-1004)LONG CMVR(152-1004)SHORT1 CMVR(152-1004)SHORT2/[CMVR-152 VL]	FIT(152-1004)	CHIKV-E2,ZIKA-E, DENV 抗原

续表 19. 重组抗体表达质粒构建汇总表

质粒名称	抗体名称	针对抗原
pMD2.G(152-1004)LONG		
pMD2.G(152-1004)SHORT1	FIT(152-1004)	CHIKV-E2,ZIKA-E,
pMD2.G(152-1004)SHORT2/[pMD2.G- 152VL]		DENV 抗原
pcDNA3.1(152-1004)LONG		
pcDNA3.1(152-1004)SHORT1	FIT(152-1004)	CHIKV-E2,ZIKA-E,
pcDNA3.1(152-1004)SHORT2/[pcDNA3 .1-152VL]		DENV 抗原
CMVR(263-1004)LONG		
CMVR(263-1004)SHORT1	FIT(263-1004)	CHIKV-E2,ZIKA-E,
CMVR(263-1004)SHORT2/[CMVR-265 3L]		DENV 抗原
CMVR(265-1004)LONG		
CMVR(265-1004)SHORT1	FIT(265-1004)	CHIKV-E2,ZIKA-E,
CMVR(265-1004)SHORT2/[CMVR-265 VL]		DENV 抗原

注：[]中代表的是同一重组质粒的不同命名。

2 重组抗体表达的条件优化

2.1 最佳重组抗体表达载体的确定

为了确定最优抗体基因片段表达载体，本研究使用 CMVR、pMD2.G、pcDNA3.1 三种不同的质粒载体进行比较。重组质粒转染 293T-17 细胞系 96h 后，收集细胞上清以及细胞裂解物进行 WB 表达分析表明，三种不同载体之间存在着表达量的差异（CMVR 载体与 pMD2.G 载体在单抗表达中相似，而在双抗表达中 CMVR 载体更优），其中表达量较优的为 CMVR 质粒载体（图 6）。

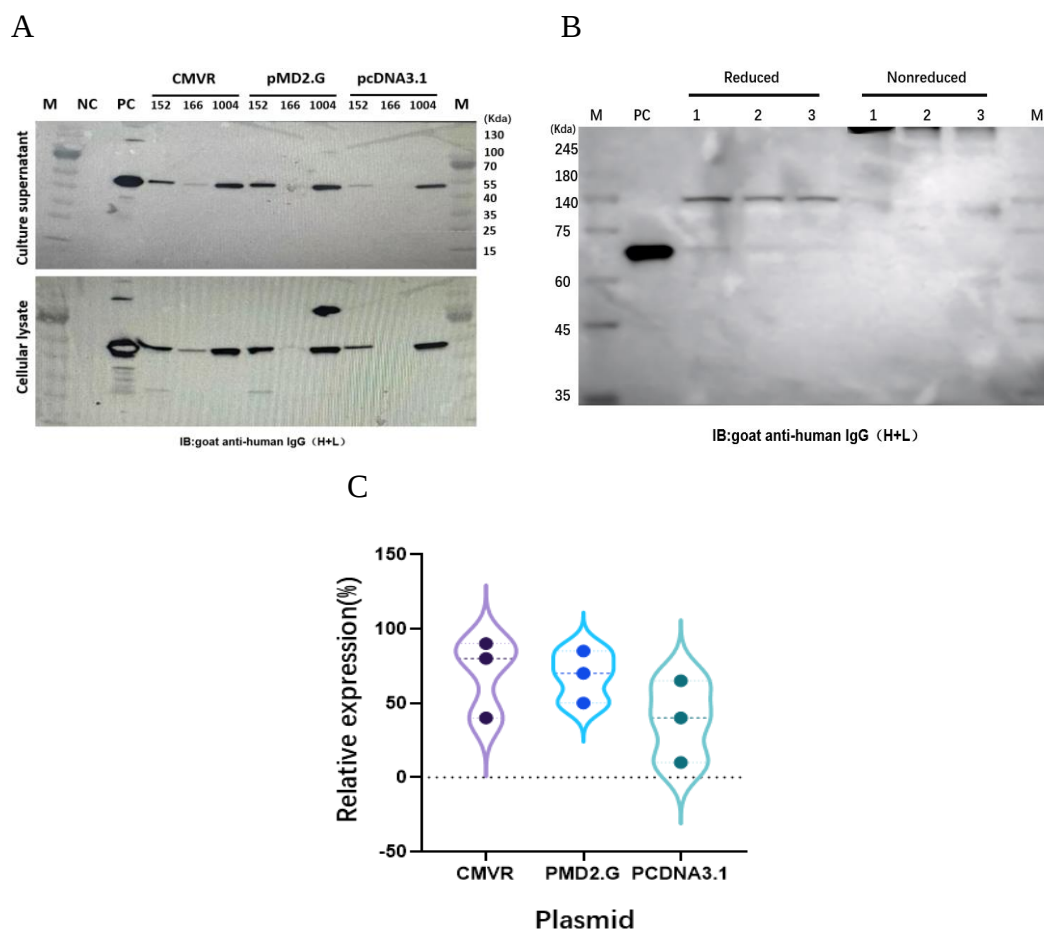


图 6 不同载体表达单抗的比较

注：A、B：Western-Blotting 分析图；SDS-PAGE 胶浓度 10%； M：marker；上样量均为 20 μ l/lane，二抗为 goat anti-human IgG（H+L）；

B： 1:CMVR-FIT(1004-152); 2:pMD2.G-FIT(1004-152); 3:pcDNA3.1-FIT(1004-152);

C：为图 A 的灰度量化的 Graphpad 软件分析结果。

2.2 重组抗体表达的时间优化

为了确定抗体表达的最佳收样时间，本研究在重组质粒转染 293T-17 细胞系后的不同时间进行收样比较，在不同时间节点收集细胞上清进行 WB 表达分析表明，不同时间收样存在着表达量的差异，其中表达量最佳的时间节点为 96h（图 7）。

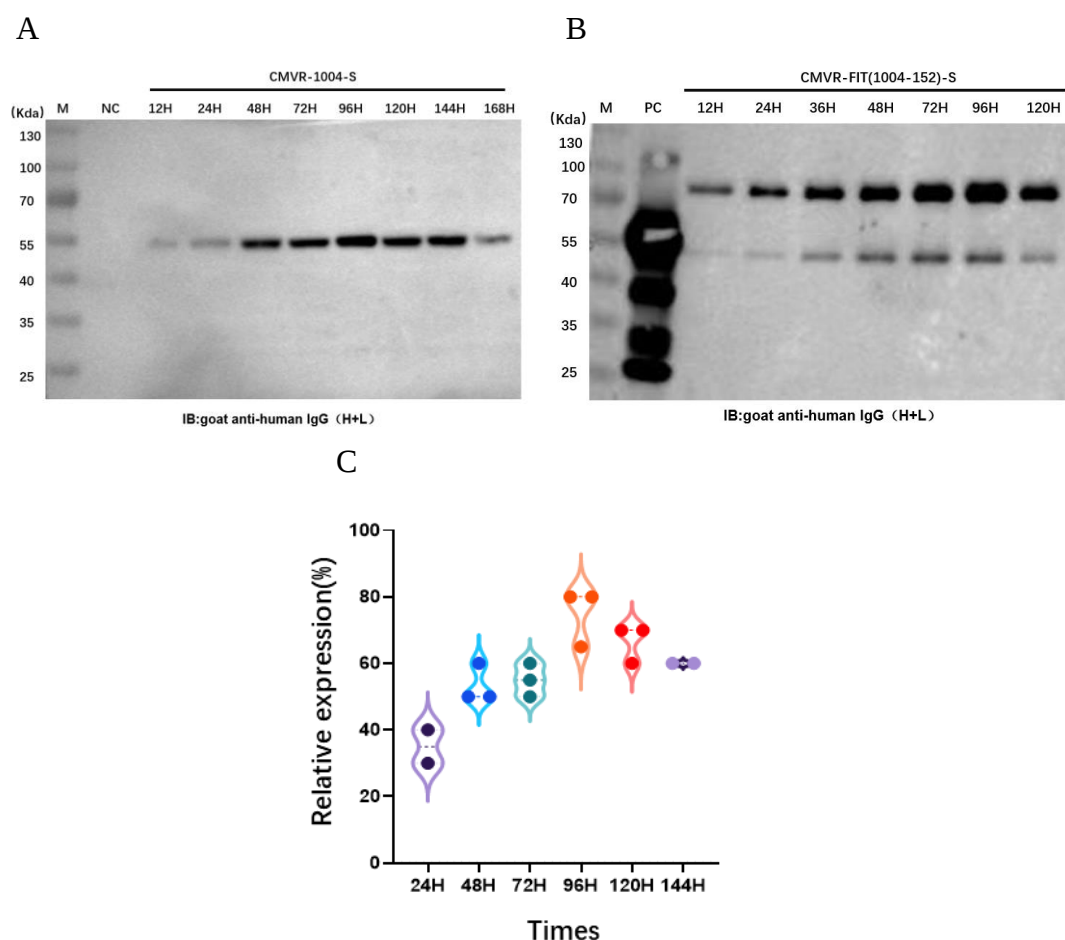


图 7 不同时间抗体表达的比较

注：A、B：Western-Blotting 分析图；SDS-PAGE 胶浓度 10%；M：marker；上样量均为 20 μ l/lane，二抗为 goat anti-human IgG (H+L)；

C：为图 A 的灰度量化 Graphpad 软件分析结果。

2.3 重组抗体轻重链表达质粒配比的优化

单抗轻重链的质粒配比已从文献中知晓为 1:1 最优，然而 FIT-Ig 双抗的三质粒系统长链、短链 1 和短链 2 的比例尚未知晓，为了确定抗体表达的最佳质粒配比，本研究通过不同配比的重组质粒进行转染 293T-17 细胞系，96h 收样比较，对细胞上清进行 WB 表达分析表明，不同质粒配比存在着表达量的差异，其中表达量最佳的质粒配比为 1:1:1（图 8）。

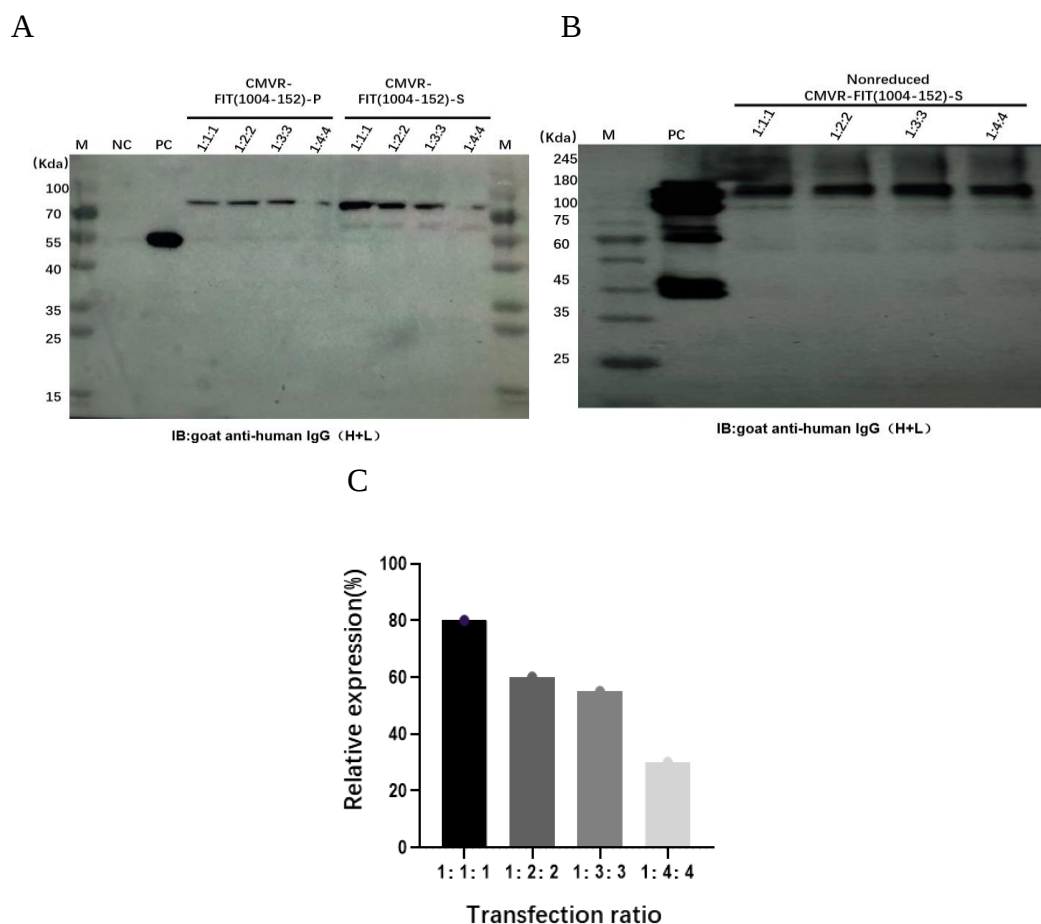


图 8 不同质粒配比表达双抗的比较

注：A、B：Western-Blotting 图示；SDS-PAGE 胶浓度 10%；M：marker；上样量均为 20μl/lane，二抗为 goat anti-human IgG (H+L)；(A)还原状态，(B)非还原状态；

C：为图 A 的灰度量化 Graphpad 软件分析结果。

2.4 重组抗体表达条件优化小结

总结：在重组抗体表达的条件优化实验中，最终确定出表达量相对较优载体、最佳的收样时间以及最佳转染比例；接下来我们需要对表达的抗体进行纯化实验，由于考虑到 FIT-Ig 双特异性抗体改造基于两种亲本单抗，为了便于纯化，我们最终确定了两株表达量较优的单克隆抗体 CHK265 和 ZIKV1004，并基于这两株亲本单抗构建出双特异性抗体 FIT(1004-265)，后续实验均基于这三株抗体进行验证。

3 重组抗体的大量表达、纯化和鉴定

3.1 重组抗体在 CHO-S 悬浮细胞中的大量表达

为了便于后续纯化，本研究将 293T-17 贴壁细胞系更换为 CHO-S 悬浮细胞。转染过程参照试剂说明书，转染总量固定，单抗比例 1:1，双抗比例 1:1:1

3.2 重组抗体的亲和纯化和 SDS-PAGE 分析

本研究采用 ProteinA 介质进行 CHK265、ZIKA1004 和 FIT(1004-265)的纯化，峰图见图 9A（ProteinA 介质能够与抗体 Fc 端特异性结合，FIT-Ig 双抗改造并不存在 Fc 端的改变）。

接下来通过 SDS-PAGE 分析纯化后样品，并同时添加 BSA（蛋白标准品）进行浓度测量。条带预期大小已有相关文献报道（单抗重链大小约为 55KDa，单抗轻链大小约为 25KDa，FIT-Ig 长链大小约为 75KDa，FIT-Ig 短链 1 和短链 2 大小约为 20-25KDa），SDS-PAGE 考染分析见图 9B，图中可见抗体纯度较高，CHK265、ZIKA1004 和双抗 FIT(1004-265)均在 80%以上，产量分别为 20mg/L、20mg/L 和 15mg/L。

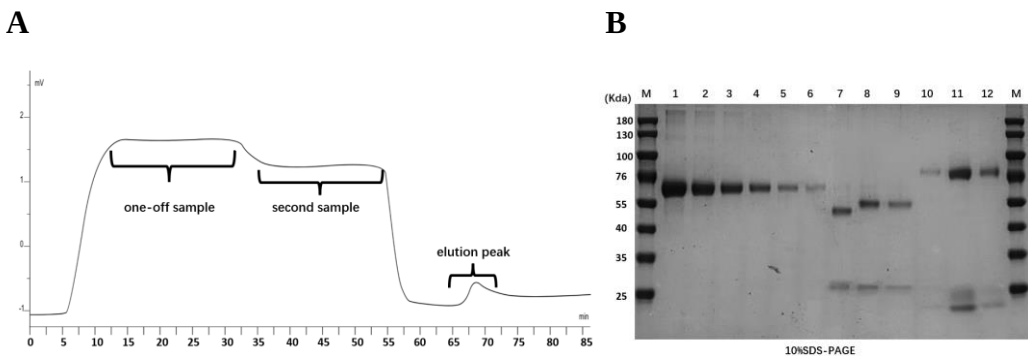


图 9 重组抗体的纯化和分析

注：A：纯化样本收集峰图；one-off sample：抗体表达上清的第一次上样；second sample：相同抗体表达上清的第二次上样（目的为提高纯化柱吸附效率）；elution peak：目的蛋白洗脱峰；

B：SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色分析抗体纯度；M：Marker；上样量 20μl/lane；1-6: BSA（5-0.15μg），分别进行 2 倍倍比稀释；7: ZIKA1004；8-9: CHK265，分别为两次不同实验的样本；10-12: FIT(1004-265)，分别为 3 次不同实验的样本。

4 重组抗体的表征与功能分析

4.1 重组抗体的大小分析

为了验证单抗与双抗的表征是否存在差异，本研究通过 DLS（动态光散射）方法测量抗体粒径。见图 10，结果表明：获得的两株单抗 CHK265 和 ZIKA1004 与双抗 FIT(1004-265)的粒径大小符合预期。

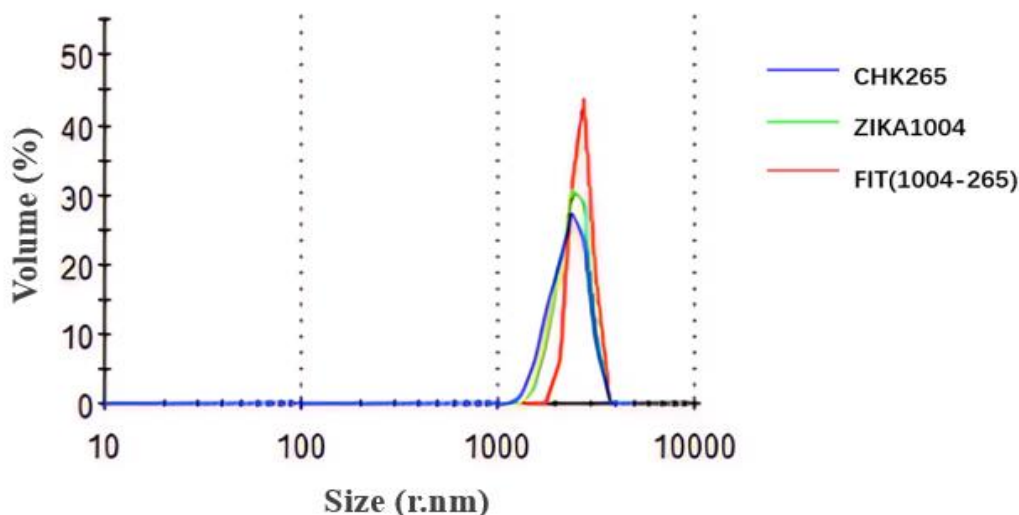


图 10 单抗以及双特异性抗体的粒径分析

注：通过 DLS 检测抗体的尺寸分布图，纵坐标为体积百分比。

4.2 重组抗体的抗原结合特异性分析

为了验证纯化后的 CHK265 单抗、ZIKA1004 单抗以及 FIT(1004-265)双抗对于抗原的特异性，本研究首先使用间接 ELISA 方法，包被定量的 CHK-E2 抗原、DENV-2 型抗原、DENV4 型抗原以及 ZIKA-E 抗原，通过计算 OD 值，来定量分析并且比较单抗以及双抗的特异性结合力。结果表明：获得的单抗和双抗均能与相应的抗原特异性结合，ZIKV1004 单抗与文献报道的一致，能与 ZIKV、DENV 的抗原结合；CHK265 单抗对 CHK-E2 抗原的特异性结合力较强；FIT(1004-265)双抗对 CHK-E2 抗原、DENV-2/3 型抗原和 ZIKA-E 抗原都有结合，见图 11。

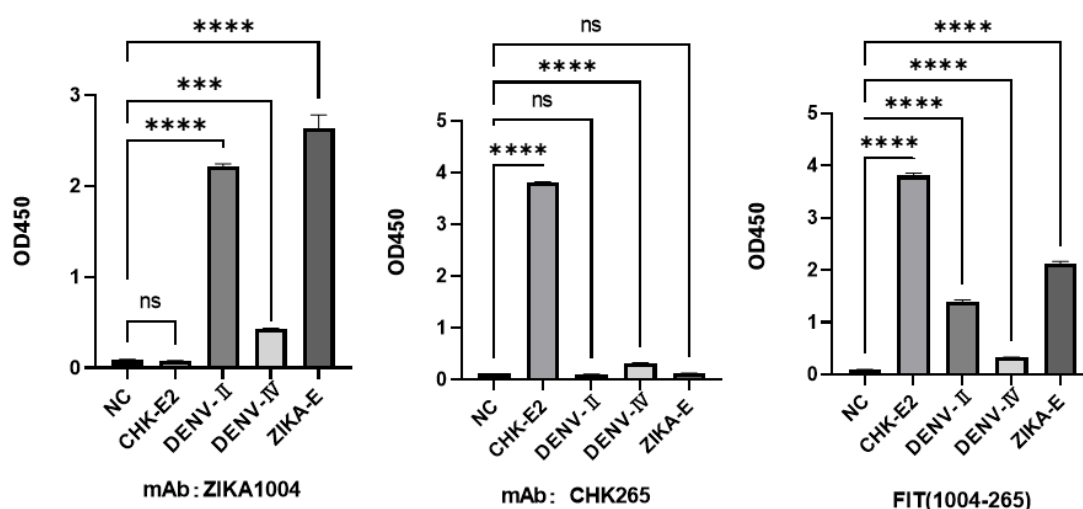


图 11 重组单抗以及双抗的抗原结合特异性

注：通过病毒特异抗原和 ELISA 分析抗体对抗原结合的特异性。

接下来，为了确定纯化后的 CHK265 和 ZIKA1004 和 FIT(1004-265)的抗原特异性结合力的大小，使用梯度 ELISA 方法定量分析。结果表明：ZIKA1004 单抗对 ZIKA-E、DENV-型抗原的特异性结合力为 6.3nM；CHK265 单抗对 CHK-E2 抗原的特异性结合力为 1.6nM；FIT(1004-265)双抗对 CHK-E2 抗原、DENV-2/3 型抗原和 ZIKA-E 抗原的特异性结合力均较弱于两株亲本单抗，见图 12。

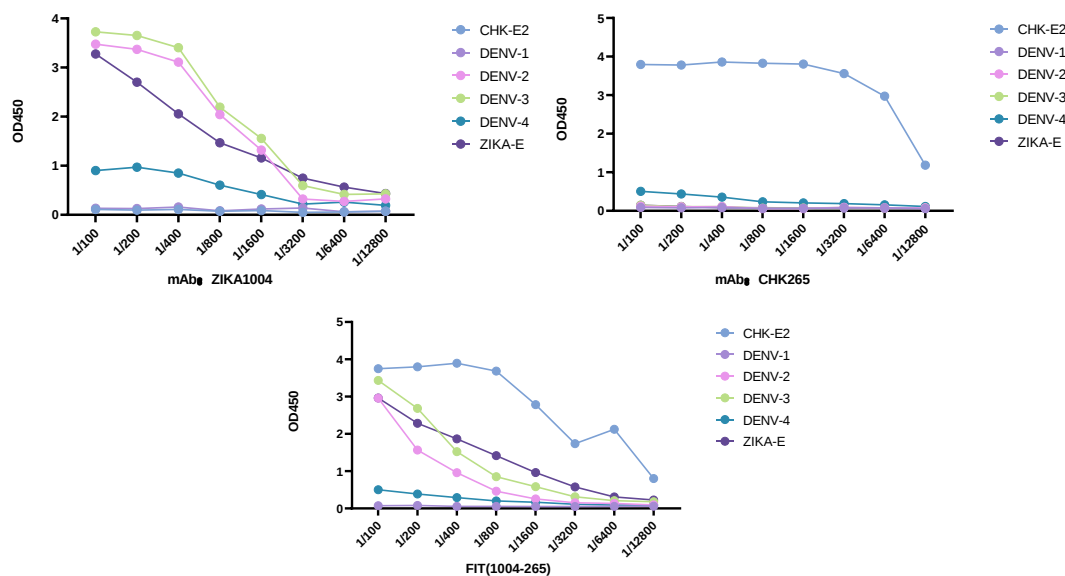


图 12 定量分析单抗以及双抗的抗原特异性结合力

注：抗体经系列稀释后，通过病毒特异抗原和 ELISA 定量分析其抗原特异性结合力。

4.3 重组抗体的中和活性分析

在完成特异性结合力的分析之后,接下来进一步分析单抗以及双抗是否具有中和亲本抗原的活性。我们分析了: 1) ZIKA1004 单抗对 DENV1/2/3 型病毒、ZIKA 病毒的中和活性; 2) CHK265 单抗对 CHIKV 假病毒的中和活性; 3) FIT(1004-265)双抗对 DENV1/2/3 型病毒、ZIKA 病毒以及 CHIKV 假病毒的中和活性。结果表明: 单抗和双抗均有预期的中和活性, ZIKA1004 单抗和 FIT(1004-265)双抗对 DENV2 型病毒的中和效价(IC_{50})分别为: $80.12\mu M$ 和 $78.65\mu M$, 对 DENV3 型病毒的中和效价(IC_{50})分别为: $20.36\mu M$ 和 $28.66\mu M$; ZIKA1004 单抗和 FIT(1004-265)双抗对 ZIKV 的中和效价(IC_{50})分别为: $30.28\mu M$ 和 $25.84\mu M$; CHK265 单抗和 FIT(1004-265) 双抗对 CHIKV 假病毒均有一定中和效果, 且 CHK265 单抗的中和效果高于 FIT(1004-265), 见图 13。

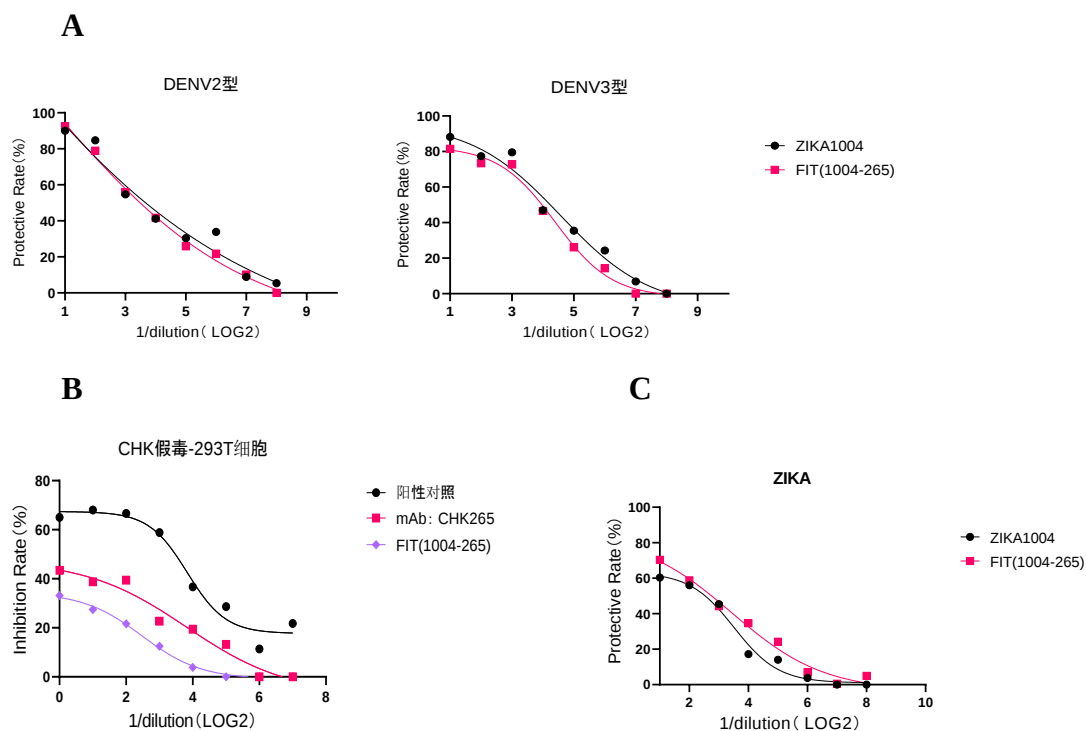


图 13 CHK265、ZIKA1004 以及 FIT(1004-265)的中和活性分析

注: A、B、C 中的单抗 CHK265、ZIKA1004 以及双抗 FIT(1004-265)均为 8 个浓度梯度, 从 $100\mu M$ 开始 2 倍系列倍比稀释;

A 为 ZIKA1004 以及 FIT(1004-265)对 DENV2 型 3 型病毒的中和活性验证;

B 为 CHK265 以及 FIT(1004-265)对 CHIKV 假病毒的中和活性验证;

C 为 ZIKA1004 以及 FIT(1004-265)对 ZIKA 病毒的中和活性验证。

4.4 重组抗体的稳定性分析

为了验证抗体的稳定性，本研究选择 ELISA 方法检测不同温度处理下抗体的抗原特异性结合力来进行抗体稳定性分析（稳定性研究一般采用 ELISA、Western blotting 和亲和性分析来评估生产和后续储存期间抗体的功能，其中 ELISA 方法最节约样本）。结果表明：所获得的重组单抗和双抗均有良好的稳定性，在不同条件处理：a) 4℃、25℃或 37℃放置三周；b) 反复冻融 3 次；c) 4℃-40℃温度循环变化后，与抗原特异性结合力无显著差异，见图 14。

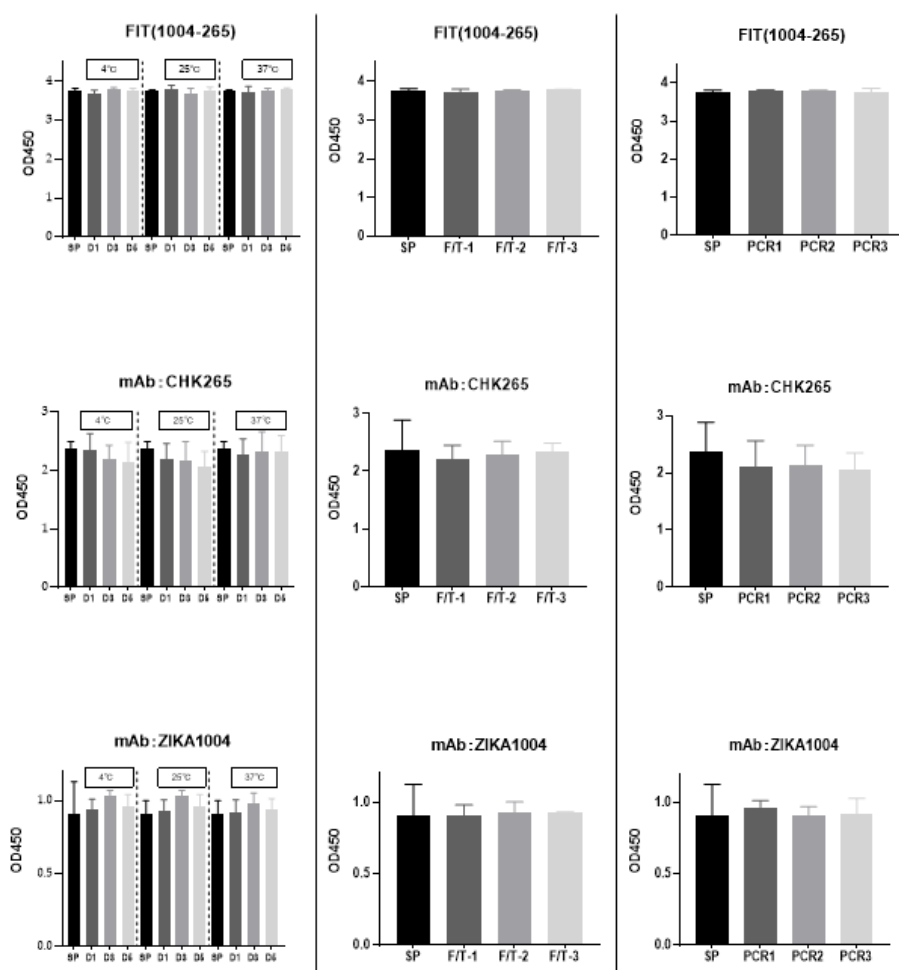


图 14 抗体稳定性分析

注：左边列为三个单克隆抗体在 4℃、25℃或 37℃放置三周后的稳定性分析；中间列为三个单克隆抗体经反复冻融 3 次（F/T1:冰冻/解冻一次）后的稳定性分析；右边列为三个单克隆抗体经 4℃-40℃温度循环变化后（PCR1:PCR 程序处理一次）的稳定性分析。图为 ELISA 方法检测后量化 Graphpad 软件分析结果；单抗 CHK265 检测抗原为 CHIKV-E2 抗原；单抗 ZIKA1004 检测抗原为 DENV2-E 抗原；双抗 FIT(1004-265)检测抗原为 DENV2-E 抗原。SP: 标准纯化蛋白样品。

讨 论

基孔肯雅病毒 (CHIKV)、登革热病毒 (DENV) 和寨卡病毒 (ZIKV) 是医学界三种较为重要的蚊媒病毒, 均由伊蚊进行传播。除了传播媒介相似外, 这三种病毒引起的免疫反应也相似, 感染人体后可引起高热、关节疼痛、炎症等症状。起初在非洲以及部分热带地区传播, 但是本世纪以来开始在全球多个纬度蔓延, 覆盖了包括中国西南部分地区在内的多个国家。目前这些病毒已导致数百万人感染, 数万人甚至更多人的死亡。并且在疾病的早期阶段, 它们往往难以区分, 因此无法及时使用抗病毒药物来延缓疾病的发展。目前尚无特效抗病毒药物以及理想疫苗。本论文将目光凝聚在 CHIKV 和 ZIKV 上, 通过文献和数据库获得两株病毒的亲本单抗序列, 构建了一系列表达抗体载体, 优化获得最佳表达条件, 通过 FIT-Ig 平台表达获得具有中和 CHIKV、ZIKV 的双特异性抗体, 在验证中证明此双抗对 DENV 也有一定的结合力和中和活性。

双特异性抗体的概念最早诞生于 1960 年, 当时被认为是一种治疗癌症的新思路, 随着技术的不断发展, 在杂交瘤技术的应用中成功制备出双特异性抗体。此后双抗的构建平台日益多样化, 目前已知的平台超过 100 个, 我们分析了 4 种主流的双抗制备平台, 其中 TrioMabs 平台和 KiH-Ig 平台的优点是产生的预期功能性双抗同时包含两种抗体的轻重链并且无人工修饰, 保留了蛋白生成过程中的天然构象; 缺点是本身由于在配对过程中随机结合, 则会产生各种非功能性抗体, 不利于后续的纯化; DVD-Ig 平台则是存在空间位阻的影响从而导致特异性结合力的显著降低; 而 FIT-Ig 平台能够通过简单的分子生物学手段将两个抗体串联在一起形成双抗, 该双抗同时具备了两个原始抗体的功能, 可以通过 Fc 端与 ProteinA 介质结合进行纯化, 更利于本研究的后续实验进展。

综上所述, 本研究选择 FIT-Ig 制备技术来构建所期望的双抗。由于考虑到 FIT-Ig 双特异性抗体改造基于两种亲本单抗, 理论上要求亲本单抗的表达量相对较高, 以满足改造后双抗的表达量符合预期的要求。在此过程中, 本研究确定了两株表达量更为理想的单克隆抗体 CHK265 和 ZIKV1004, 以及基于这两株亲本单抗所构建的 FIT(1004-265), 后续实验均基于这三株抗体进行验证。

接下来在重组抗体表达的条件优化实验中, 最终确定出最优的转染比例 (单

抗轻重链比例 1:1; 双抗长链、短链 1 以及短链 2 比例 1:1:1)、收样时间(96h-120h) 以及表达量相对较高载体 (CMVR 质粒载体); 此优化过程的最终目的是提高蛋白表达量, 便于后续纯化。而上述三种优化因素则是影响蛋白表达的关键因素。其中 CMVR 质粒载体据文献报道也是表达抗体的常用载体。

本研究采用 Protein A 介质进行抗体的纯化, 因其能够与抗体 Fc 端特异性结合。在单抗改造为 FIT-Ig 双抗的过程中并不涉及 Fc 端的改变, 因此 Protein A 介质可以对 CHK265、ZIKA1004 以及 FIT(1004-265)进行纯化, 纯化后对其进行 SDS-PAGE 分析, 获得预期的条带 (单抗重链大小约为 55KDa, 单抗轻链大小约为 25KDa, FIT-Ig 长链大小约为 75KDa, FIT-Ig 短链 1 和短链 2 大小约为 20-25KDa)。

最后在进行纯化后抗体的表征与功能性验证中, 我们首先通过 DLS (动态光散射) 检测到单抗和双抗的粒径大小差异, 再次确定双抗构建成功。

然后, 通过间接 ELISA 方法以及梯度 ELISA 方法验证纯化后的 CHK265 单抗、ZIKA1004 单抗以及 FIT(1004-265)双抗与对应抗原的特异性结合力, 该实验结果中 ZIKA1004 单抗并非如文献报道的那样, 可以同时结合 DENV1-4 型抗原, 这可能与抗体表达的策略不同和对应抗原的基因序列不同有关; 此外 FIT(1004-265)双抗虽然同时具备两种亲本单抗的抗原特异性结合力, 但是均低于亲本单抗, 我们分析认为双抗的基因序列改造所造成的复杂结果有可能会降低特异性结合力的降低。

更进一步验证单抗以及双抗是否具有中和亲本抗原的活性, 该实验结果显示相较于抗原特异性结合力的分析: ZIKA1004 对于 DENV-2 型、ZIKV 的抗原特异性结合力均强于 FIT(1004-265), 而在中和验证中恰恰相反, 这里我们认为中和活性的结果可能还需进行大量验证, 由于考虑到本研究纯化抗体的样本量, 将在后续进行相关方面的验证; 在中和实验中, CHIKV 属于 P3 病原体, 无操作权限, 因此我们选择了 CHIKV 假病毒进行中和分析, 通过假病毒上携带的荧光标签对荧光素酶活性进行分析, 该实验结果部分在荧光数值上显示了抗体对于细胞一定程度的保护率, 但并未出现 IC50 值, 同时结合阳性对照的保护率, 我们分析认为 CHIKV 假病毒与真毒仍存在一定的差异, 可能导致 CHK265 单抗和 FIT(1004-265)双抗的保护效果降低。

随后对单抗以及双抗抗体进行稳定性验证, 通常评估生产和后续储存期间抗

体功能的方法包括：ELISA、Western Blotting 和亲和性分析，由于考虑到纯化后抗体样本的数量,我们选择了较为节约成本的 ELISA 方法进行了分析，数据证明他们均具有良好的稳定性，与相关文献报道一致。

本论文研究初步制备了一个能够同时中和 CHIKV 和 ZIKV 两种常见蚊媒病毒的双特异性抗体 FIT(1004-265)，此外本双抗在验证部分还显示对 DENV 有一定的抗原特异性结合力和中和活性，为治疗难以鉴别诊断的部分蚊媒病毒感染提供了另一种思路；同时也初步建立了抗病毒 FIT-Ig 双特异性抗体表达平台，为快速制备其他具有中和活性的抗病毒双特异性抗体奠定了一定的基础。然而研究中的不足之处在于虽然验证了抗体的特异性结合力、细胞层面的中和活性以及稳定性，但中和活性分析与特异性结合力的结果未能保持一致，其中，特异性结合力的分析与原文献报道一致，而中和活性分析还需进行更多的验证，比如动物的模型验证以及抗体灵敏度的验证，否则无法全面评估抗体的中和活性。

结 论

本研究通过查阅文献和数据库获取合适的单抗序列,利用 FIT-Ig 双特异性抗体改造技术,成功表达以及纯化出 CHK265、ZIKA1004、FIT(1004-265)三株抗体,并且对其进行了表达的优化以及功能性验证。本研究总结如下:

- 1、制备了能够表达具有中和活性的单抗以及双抗的一系列重组质粒,建立了基因工程技术制备抗体的平台。
- 2、在重组抗体表达的条件优化实验中,最终确定出最优的转染比例(单抗轻重链比例 1: 1; 双抗长链、短链 1 以及短链 2 比例 1: 1: 1)、收样时间(96h-120h)以及表达量相对较高载体(CMVR 质粒载体)。
- 3、成功纯化出 CHK265、ZIKA1004、FIT(1004-265)三株抗体,并计算出表达纯化的最佳产量。
- 4、通过 ELISA 方法验证,改造后的 FIT(1004-265)双抗同时具有两个亲本单抗的抗原特异性结合力。
- 5、通过抗体-病毒复合物感染细胞实验以及假病毒的微中和荧光检测实验,证明单抗 CHK265 具有对 CHIKV 的中和活性; 单抗 ZIKA1004 具有对 DENV2/3 型病毒和 ZIKA 病毒的中和活性; 双抗 FIT(1004-265)具有对 DENV2/3 型病毒、ZIKA 病毒以及 CHIKV 的中和活性。
- 6、通过不同的处理方法验证两个亲本单抗以及改造后的双抗均具有良好的稳定性。

总而言之,本研究成功制备了一个能够同时中和 CHIKV、DENV、ZIKV 这三种蚊媒病毒的双特异性抗体 FIT(1004-265),为治疗难以诊断的蚊媒病毒提供了另一种思路;同时也成功建立了治疗病毒感染的 FIT-Ig 双特异性抗体表达平台,为快速制备其他具有中和活性的双抗奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Ketkar H, Herman D, Wang P. Genetic determinants of the re-emergence of arboviral diseases[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 150.
- [2] Robinson M C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953[J]. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 1955, 49(1): 28-32.
- [3] Schwartz O, Albert M L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(7): 491-500.
- [4] Powers A M, Logue C H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(9): 2363-2377.
- [5] Suhrbier A, Jaffar-Bandjee M C, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses—an overview[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2012, 8(7): 420-429.
- [6] Borgherini G, Poubeau P, Staikowsky F, et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients[J]. *Clinical infectious diseases*, 2007, 44(11): 1401-1407.
- [7] Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region[J]. *The Lancet*, 2007, 370(9602): 1840-1846.
- [8] Schuffenecker I, Itman I, Michault A, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak[J]. *PLoS medicine*, 2006, 3(7): e263.
- [9] Pouliot S H, **ong X, Harville E, et al. Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review[J]. *Obstetrical & gynecological survey*, 2010, 65(2): 107-118.
- [10] Guzman M G, Halstead S B, Artsob H, et al. Dengue: a continuing global threat[J]. *Nature reviews microbiology*, 2010, 8(Suppl 12): S7-S16.
- [11] Holmes E C, Twiddy S S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus[J]. *Infection, genetics and evolution*, 2003, 3(1): 19-28.
- [12] Messina J P, Brady O J, Scott T W, et al. Global spread of dengue virus types: map** the 70 year history[J]. *Trends in microbiology*, 2014, 22(3): 138-146.
- [13] Wilder-Smith A, Ooi E E, Horstick O, et al. Dengue[J]. *The Lancet*, 2019, 393(10169): 350-363.

- [14] Atif M, Azeem M, Sarwar M R, et al. Zika virus disease: a current review of the literature[J]. *Infection*, 2016, 44: 695-705.
- [15] Macnamara F N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria[J]. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 1954, 48(2): 139-145.
- [16] Duffy M R, Chen T H, Hancock W T, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(24): 2536-2543.
- [17] Ferede G, Tiruneh M, Abate E, et al. Evidence of chikungunya virus infection among febrile patients in northwest Ethiopia[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2021, 104: 183-188.
- [18] Sahak M N. Dengue fever as an emerging disease in Afghanistan: Epidemiology of the first reported cases[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 99: 23-27.
- [19] Colombo T E, Estofolete C F, Reis A F N, et al. Clinical, laboratory and virological data from suspected ZIKV patients in an endemic arbovirus area[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2017, 96: 20-25.
- [20] Ghildiyal R, Gabrani R. Computational analysis of human host binding partners of chikungunya and dengue viruses during coinfection[J]. *Pathogens and Disease*, 2021, 79(8): ftab046.
- [21] Siqueira C, Féres V, Coutinho L, et al. Six Cases of Zika/Dengue Coinfection in a Brazilian Cohort, 2015–2019[J]. *Viruses*, 2020, 12(10): 1201.
- [22] Mercado M, Acosta-Reyes J, Parra E, et al. Clinical and histopathological features of fatal cases with dengue and chikungunya virus co-infection in Colombia, 2014 to 2015[J]. *Eurosurveillance*, 2016, 21(22): 30244.
- [23] Kato F, Hishiki T. Dengue virus reporter replicon is a valuable tool for antiviral drug discovery and analysis of virus replication mechanisms[J]. *Viruses*, 2016, 8(5): 122.
- [24] Kril V, Aïqui-Reboul-Paviet O, Briant L, et al. New insights into chikungunya virus infection and pathogenesis[J]. *Annual review of virology*, 2021, 8: 327-347.
- [25] Brinkmann U, Kontermann R E. The making of bispecific antibodies[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2017, 9(2): 182-212.
- [26] Gong S, Wu C. Generation of Fabs-in-tandem immunoglobulin molecules for dual-specific

- targeting[J]. *Methods*, 2019, 154: 87-92.
- [27] Dhimolea E, Reichert J M. World bispecific antibody summit, September 27–28, 2011, Boston, MA[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2012, 4(1): 4-13.
- [28] Garber K. Bispecific antibodies rise again: Amgen's blinatumomab is setting the stage for a bispecific-antibody revival, enabled by new formats that may solve the field's long-standing problems[J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2014, 13(11): 799-802.
- [29] Nisonoff A, MM R. Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1961, 93: 460-462.
- [30] Milstein C, Cuello A C. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry[J]. *Nature*, 1983, 305(5934): 537-540.
- [31] Nyakatura E K, Soare A Y, Lai J R. Bispecific antibodies for viral immunotherapy[J]. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 2017, 13(4): 836-842.
- [32] Carter P. Bispecific human IgG by design[J]. *Journal of immunological methods*, 2001, 248(1-2): 7-15.
- [33] Kontermann R E. Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 26(1): 1-9.
- [34] Tiller K E, Tessier P M. Advances in antibody design[J]. *Annual review of biomedical engineering*, 2015, 17: 191-216.
- [35] Zhukovsky E A, Morse R J, Maus M V. Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection[J]. *Current opinion in immunology*, 2016, 40: 24-35.
- [36] Chames P, Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel?[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2009, 1(6): 539-547.
- [37] Müller D, Kontermann R E. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives[J]. *BioDrugs*, 2010, 24: 89-98.
- [38] Byrne H, Conroy P J, Whisstock J C, et al. A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications[J]. *Trends in biotechnology*, 2013, 31(11): 621-632.
- [39] Weidle U H, Kontermann R E, Brinkmann U. Tumor-antigen-binding bispecific antibodies for cancer treatment[C]//Seminars in oncology. WB Saunders, 2014, 41(5): 653-660.

- [40] Suresh M R, Cuello A C, Milstein C. [17] Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas[M]//Methods in enzymology. Academic Press, 1986, 121: 210-228.
- [41] Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, et al. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies[J]. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1995, 155(1): 219-225.
- [42] Ridgway J B B, Presta L G, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1996, 9(7): 617-621.
- [43] Dall'Acqua W, Simon A L, Mulkerrin M G, et al. Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers[J]. Biochemistry, 1998, 37(26): 9266-9273.
- [44] Shatz W, Chung S, Li B, et al. Knobs-into-holes antibody production in mammalian cell lines reveals that asymmetric afucosylation is sufficient for full antibody-dependent cellular cytotoxicity[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2013, 5(6): 872-881.
- [45] Sampei Z, Igawa T, Soeda T, et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity[J]. PloS one, 2013, 8(2): e57479.
- [46] Spiess C, Merchant M, Huang A, et al. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies[J]. Nature biotechnology, 2013, 31(8): 753-758.
- [47] Junttila T T, Li J, Johnston J, et al. Antitumor efficacy of a bispecific antibody that targets HER2 and activates T cells[J]. Cancer research, 2014, 74(19): 5561-5571.
- [48] Sung J A M, Pickeral J, Liu L, et al. Dual-Affinity Re-Targeting proteins direct T cell-mediated cytotoxicity of latently HIV-infected cells[J]. The Journal of clinical investigation, 2015, 125(11): 4077-4090.
- [49] Gupta P, Goldenberg D M, Rossi E A, et al. Multiple signaling pathways induced by hexavalent, monospecific, anti-CD20 and hexavalent, bispecific, anti-CD20/CD22 humanized antibodies correlate with enhanced toxicity to B-cell lymphomas and leukemias[J]. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2010, 116(17): 3258-3267.

- [50] Wu C, Ying H, Grinnell C, et al. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin[J]. *Nature biotechnology*, 2007, 25(11): 1290-1297.
- [51] Lacy S E, Wu C, Ambrosi D J, et al. Generation and characterization of ABT-981, a dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecule that specifically and potently neutralizes both IL-1 α and IL-1 β [C]//MAbs. Taylor & Francis, 2015, 7(3): 605-619.
- [52] Craig R B, Summa C M, Corti M, et al. Anti-HIV double variable domain immunoglobulins binding both gp41 and gp120 for targeted delivery of immunoconjugates[J]. 2012.
- [53] Piccione E C, Juarez S, Liu J, et al. A bispecific antibody targeting CD47 and CD20 selectively binds and eliminates dual antigen expressing lymphoma cells[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2015, 7(5): 946-956.
- [54] Gu J, Yang J, Chang Q, et al. Identification of anti-EGFR and anti-ErbB3 dual variable domains immunoglobulin (DVD-Ig) proteins with unique activities[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0124135.
- [55] Gu J, Yang J, Chang Q, et al. Identification of anti-ErbB2 dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) proteins with unique activities[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97292.
- [56] DiGiammarino E L, Harlan J E, Walter K A, et al. Ligand association rates to the inner-variable-domain of a dual-variable-domain immunoglobulin are significantly impacted by linker design[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2011, 3(5): 487-494.
- [57] Correia I, Sung J, Burton R, et al. The structure of dual-variable-domain immunoglobulin molecules alone and bound to antigen[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2013, 5(3): 364-372.
- [58] Wang J, Bardelli M, Espinosa D A, et al. A human bi-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential[J]. *Cell*, 2017, 171(1): 229-241. e15.

综 述

双特异性抗体的研究进展

张峰源 综述, 刘红旗 审校

摘要

随着基因工程抗体的快速发展, 双特异性抗体技术也日趋成熟。双特异性抗体能够同时结合两个以上不同的抗原表位, 相较于单克隆抗体, 可以大大提高免疫治疗特性, 具有独特的优势。双特异性抗体已经广泛应用于肿瘤以及病毒免疫方面的治疗中。尤其是在肿瘤方面应用广泛, 相较之下病毒免疫治疗方面的双特异性抗体研究还有很大的潜力。本文通过论述目前成熟的双特异性抗体平台, 分别为用于肿瘤以及病毒免疫治疗的双特异性抗体药物开发与研究提供一定的参考。

关键词: 双特异性抗体, 肿瘤, 病毒, 免疫治疗

1. 双特异性抗体

1.1 双特异性抗体的发展

双特异性抗体是一种能够同时对两种不同的抗原进行识别并与之结合的抗体, 因此可以发挥特殊的功能, 因此在诊断和治疗中应用广泛^[1,2]。自 1960 年, Nisonoff 等将两个不同的抗体片段进行连接并证明可以募集两种不同的抗原, 首次提出双特异性抗体的概念^[3]。随后, 1975 年杂交瘤技术出现^[4], 可以通过两种产生抗体分子的杂交瘤细胞相融合而产生相对应的双特异性抗体^[5,6]。然后, 双特异性抗体进行了迅速的发展, 目前已有超过 100 多种不同的双特异性抗体平台, 这些平台使得具有明确结构、生物功能以及药理学特性的双特异性抗体的生产成为可能^[7,8]。

1.2 双特异性抗体在肿瘤治疗方面的发展

癌症是一种严重威胁着人们身体健康的疾病, 传统的癌症治疗手段很难完全治愈, 甚至会引起癌症的复发与发展^[9,10]。肿瘤免疫治疗是近年来兴起的一种新

型癌症治疗手段,而双特异性抗体则是这种具有广阔应用前景的新型抗肿瘤药物^[11,12]。在癌症治疗中,双特异性抗体能够与肿瘤细胞特异性的结合,从而提高其对肿瘤的杀伤效果;将双特异性抗体与肿瘤细胞表面的两种抗原偶联,可以阻断双信号途径,减少肿瘤耐药,从而提高其敏感性和特异性,因此,双特异性抗体的应用前景更加广泛。

1.3 双特异性抗体在病毒免疫治疗方面的发展

病毒可导致许多人类疾病,包括常见的流感、水痘、疱疹以及严重的登革、艾滋、埃博拉等^[13]。其中有些病毒也是引发肿瘤的重要因素^[14]。由于病毒可以利用宿主细胞进行复制且容易发现突变,因此为抗病毒药物的设计造成很大困难^[15]。抗体类药物的优点是特异性高,安全性好,血清半衰期长,其中抗病毒单抗(mAb)仅能作用于单一病毒表面抗原,而在很多病毒中,同种物种间或毒株间存在着较高的序列变异,因此单克隆抗体并不会对同个病毒的所有株型都有效果^[16,17]。而同时具备“双靶”和“多靶”作用的双特异性抗体能够同时靶向非单一的靶点,比如同一病毒的两个不同抗原表位,两个不同病毒的抗原表位以及病毒抗原表位与T细胞表位等^[7]。从理论上讲,该双特异性抗体还可以用于抗病毒药物的研发,实现多途径的协同增效。

2. 双特异性抗体的结构类型

双特异性抗体可以粗略地分成两种:一种是含有Fc片段的双特异性抗体,另一种是不含有Fc片段的^[18]。相较之下,保留Fc端的活性则仍存在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)^[19-21]。并且因其粒径更大以及Fc受体介导的循环,其血清半衰期一般更长。而无Fc片段的双特异性抗体由于体积小、易于制备、无需链交反应等缺点,可以通过在真核细胞和原核细胞中同时表达两条多肽,从而实现双特异性抗体的制备,并能够提高其组织渗透性能^[22]。双特异性抗体是一种针对多个抗原决定簇的药物,不同于2个或多个传统单抗联合疗法,具有单个分子靶向多个表位的优势。在双特异性抗体研究中,双特异性抗体的设计方法各有优劣,下面将对其进行详细的阐述。

2.1 C-C 融合双特异性抗体

Wagner 等利用点击化学反应，将两种抗流感病毒的 IgG 抗体进行 C 端连接，使其不需对抗体进行结构改造，并保留 Fc 受体结合能力，同时保持两种抗体的活性，且对 H3N2 和 H1N1 流感病毒都表现出良好的特异性结合力。但是，C-C 融合是否也有一定的免疫原性，有待于进一步的研究^[23]。

2.2 TrioMabs

德国的 Fresenius 和 Trion 制药公司（Trion Pharma）共同研发了 TrioMabs 双特异性抗体技术平台^[24]。TrioMabs 是一种双特异性的单抗，它可以同时识别 T 细胞表面的 CD3 和 T 细胞表面的抗原，Fc 段招募具有 Fc 受体的效应细胞，从而激活 T 细胞的免疫反应，从而发挥抗肿瘤作用^[25]。TrioMabs 因其兼具三种作用：靶向肿瘤细胞，靶向 T 细胞，募集 Fc 受体的效应细胞，故又称为三功能抗体。

2.3 DART-IgG 抗体

DART-IgG 抗体由两条 Fc 端组成，一个抗体的轻链可变区(VL)和另一个抗体的重链可变区 (VH)之间以 Gly-Ser linker 相连于一条多肽链，另一条则含互补可变区。DART 是由 2 条链异源二聚体形成的，可生成双特异性、四价单抗体。在动物实验中，我们发现了一种新的抗流感病毒 DART-IgG，它对两个亲本单抗均显示出较强的免疫保护作用。此外，DART IgG 对雪貂有 100%的免疫保护作用。结论：DART-IgG 是一种有效的抗 H5N1 型 AIV 药物^[26]。

在肿瘤治疗方面，Flotetuzumab 是一种 DART 结构的双特异性抗体，以 CD123 及 CD3 为靶点，可诱导 T 细胞对急性髓性白血病细胞的杀伤。

2.4 BiTE

双特异性 T 细胞衔接器（BiTE）是一种不含有 Fc 段的双特异性抗体，通过一条短肽将两条单链抗体（scFv）相连，只保留两个抗原位点，从而发挥其作用。1995 年，Mack 等人成功研制出首个能靶向 T 细胞表面 CD3 和上皮细胞表面 17-1 A 抗原的 BiTE，能招募 T 细胞并活化 T 细胞，杀死肿瘤细胞^[27]。Blinatumomab

(AMG103/MT103)是国际上第一个获批的 BiTE 用药,可与 ALL 病人异常增生的 CD19 特异性结合,从而有效缓解 ALL 的发生^[28]。

2.5 Diabodies

二价抗体二聚体 (Diabodies) 是一类由两条单链抗体 (ScFv) 构成的二价抗体,通过一条短肽链将两条重链分开,仅能形成二聚体。研究显示,与亲本相比,二聚物抗体具有接近 10 倍的亲和性^[29]。

2.6 CrossMab

Asokan 等利用 CrossMab 技术,制备了一种不对称双特异性抗体,该抗体可有效中和 206 种 HIV 病毒,且双特异性中和抗体在恒河猴体内表现出类似于母体抗体的药动学特征^[30]。Bournazos 等人也发现了针对 HIV-1 Env 的双特异性抗体,IgG3 铰链区的长度及柔性使其能与 HIV-1 两个邻近的糖蛋白形成异源二价结合,既提高了抗体的亲和性,又降低了靶标的活性。相对于未经改造的非对称双特异性分子,含铰链区分子的抗病毒效果更好,同时也更具优势^[31]。

2.7 DVD-Ig

由美国 AbbVie 公司开发的 DVD-Ig 结构是在抗体轻、重链可变区的 N 末端,分别与另一抗体的轻、重链可变区相连,构成一种带有双重可变区抗原结合位点的抗体,从而达到双重特异作用^[32]。Tan 等通过对乙肝表面抗原 (HBsAg) 的两个单抗进行了改造,得到了双特异性的 C4D2-BsAb,并对其进行了初步研究。该结构使其对 HBV 的中和作用优于其亲本抗体,其作用机制可能为位阻效应或引起 HBsAg 构象变化^[33]。

Shi 等研发出双特异性抗体 DVD-1A1D-2A10,其原理是通过 DVD-Ig 平台将抗登革病毒单抗 1A1D-2 和 2A10G6 结合,其中的 1A1D-2 抗体可以与 E-DIII 结合,防止病毒粘附到细胞膜上,而 2A10G6 抗体可以与 E-DII 结合,防止病毒与内涵体融合。双特异性抗体 DVD-1A1D-2A10 不仅保持了双亲抗体的结合能力,而且在体内外也表现出较强的中和作用^[34]。

2.8 Knobs-into-holes

Genentech 公司开发的“杵-臼”双特异性抗体技术，其基本原理是：在亲本抗体中，将某一抗体 CH3 区域 366 号位的小苏氨酸突变成更大的酪氨酸，同时将另一抗体的 CH3 区域 407 号位酪氨酸突变为小苏氨酸，并在此基础上进一步通过“杵臼结构”的空间互补作用，实现两种抗体在结构上的高效组装，从而达到“杵-臼”型双特异性的目的^[35]。JB Ridgway 等在这种方法中，首先通过在 CD4-IgG 免疫粘附素：T366Y 的 CH3 域中用较大的氨基酸替换小的氨基酸来获得“旋钮”变体。该旋钮设计为插入人源化抗 CD3 抗体 CH3 域的“孔”中，该孔是通过用较小的一个残基（Y407T）明智地替换而产生的。在这两个不同的重链与抗 CD3 轻链共同表达后，抗 CD3 / CD4-IgG 杂合体占蛋白 A 纯化蛋白池的 92%。相反，在共表达后，其中重链包含野生型 CH3 结构域，仅回收了高达 57% 的抗 CD3 / CD4-IgG 杂种。因此，多入孔工程促进了抗体/免疫粘附素杂合体以及可能的其他包含 Fc 的双功能疗法的构建，包括双特异性免疫粘附素和双特异性抗体。

2.9 FIT-Ig

将来自 2 个亲本 mAb 的天然抗原结合片段（Fab 段）的完整结构以独特的纵横交错的方向组合在一起，没有任何突变或肽接头，使其成为一种用于广泛应用的双特异性生成的通用方法，该分子具有 2 组 VH/VL 对的正确结合，并且可以通过基础分子生物学技术从 2 种现有的单克隆抗体中制备^[36]。2017 年，Wang 等人首次报道了抗寨卡病毒（ZIKV）双特异性抗体 FIT-1，该研究基于能靶向该病毒 E 蛋白 DII 结构域的单抗 ZIKA190 和 DIII 结构域的单抗 ZIKA185。FIT-1 不仅具有良好的体内外抗病毒活性，而且具有阻断病毒逃逸的能力，有望成为寨卡疫苗的新型治疗手段^[37]。

2.10 HPs

双特异性的抗体分子还可以被用来募集机体的免疫反应。据此，Hahn 等研制出一种双特异性抗登革病毒复合物（HPs, Heteropolymers），其原理是将灵长类 E 补体受体 1 特异性的单克隆抗体与抗登革病毒单克隆抗体进行二硫键交联，制备出一种既能与登革病毒结合又能同时识别人、猴的红血球及其对应的抗原。

另外，对被感染的食蟹猴使用登革病毒特异型 HPs 后，还证明了其对登革病毒血症的疗效^[38,39]。

3 双特异性抗体的研发趋势

3.1 双特异性抗体在肿瘤免疫治疗中的研发趋势

双特异性抗体能够实现对两种抗原的同时识别，其敏感性、特异性均优于单抗，且能降低脱靶等不良反应，具有较好的抗肿瘤疗效。目前，双特异性抗体已陆续上市，一些已进入临床研究阶段，如非小细胞肺癌，胃癌，非霍奇金淋巴瘤，白血病等相关抗体药物^[40]。双特异性抗体介导的双重靶向可实现两个特定靶标在时空上的对接，有望成为一种新的治疗手段，但其走向临床尚存在诸多问题。比如，世界上第一个双特异性单抗（Catumaxomab）能特异性地识别肿瘤上皮粘附分子 EpCAM 及 T 细胞表面的 CD3 分子，II / III 期临床试验效果有效，但是在受试者中却出现了因急性肝衰竭而导致的死亡^[41]。因此，双特异性抗体药物还有待于进一步的研究，以期降低毒副作用，取得更好的临床效果。

3.2 双特异性抗体在病毒免疫治疗中的研发趋势

双特异性和多特异性抗体的生物学活性是成药性研究中的关键科学问题，尤其是免疫原性。一方面由于融合分子本身的特性，在特定的组合中会发生构象的改变，进而对 IgG 免疫偶联物的药动学产生影响^[42]。另一方面，由于双特异性抗体本身具有大分子量，再加上它有可能聚合，因此存在免疫原性的危险^[43]，如果和免疫增强剂一起服用，则会引起机体产生较强的免疫力。总而言之双特异性治疗性抗体的研发还需可靠的实验理论和依据推动此种药物进入临床试验甚至治疗，并且希望相关领域进一步完善我国在免疫原性和药动学方面的研究。

4 双特异性抗体总结

迄今为止，已有大量双特异性抗体形式可用于研究以及生产，主要用于治疗恶性肿瘤和炎症性疾病。同时研究强调，双特异性抗体也提供了许多可用于病毒免疫治疗的功能和靶向机制。尽管存在潜在的局限性，但双特异性抗体工程仍然

可用于提高病毒免疫疗法的有效性。由于单个表位在单独靶向时可能无法提供足够的治疗益处，因此可以从双特异性分子的叠加性或协同效应中获得这些靶点的显着治疗益处。此外，当利用 2 种特异性之一将第二种特异性递送至其靶位点时，双特异性抗体工程也可能会开辟新的治疗场所。因此，将此类方法应用于其他病毒和肿瘤方面来开发下一代疗法具有很大的潜力。

参考文献

- [1] Dhimolea E, Reichert J M. World bispecific antibody summit, September 27–28, 2011, Boston, MA[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2012, 4(1): 4-13.
- [2] Sheridan C. Amgen's bispecific antibody puffs across finish line[J]. Nature biotechnology, 2015, 33(3): 219-222.
- [3] Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. Science, 1960, 132(3441): 1770-1771.
- [4] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975, 256(5517): 495-497.
- [5] Brennan M, Davison P F, Paulus H. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments[J]. Science, 1985, 229(4708): 81-83.
- [6] Milstein C, Cuello A C. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry[J]. Nature, 1983, 305(5934): 537-540.
- [7] Kontermann R E. Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(1): 1-9.
- [8] Zhukovsky E A, Morse R J, Maus M V. Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection[J]. Current opinion in immunology, 2016, 40: 24-35.
- [9] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [10] Wanat M, Boulton M, Watson E. Patients' experience with cancer recurrence: a meta-ethnography. Psycho-Oncology, 2016, 25(3): 242-252.
- [11] Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. Br J Pharmacol, 2009, 157(2): 220-233.
- [12] Zhou GY, Sprengers D, Boor PPC, et al. Antibodies against immune checkpoint molecules restore functions of tumor-infiltrating T cells in hepatocellular carcinomas. Gastroenterology,

2017, 153(4): 1107-1119.e10.

- [13] Reperant LA, Osterhaus ADME. AIDS, Avian flu, SARS, MERS, Ebola, Zika... what next? Vaccine, 2017, 35(35): 4470–4474.
- [14] Ringehan M, McKeating JA, Protzer U. Viral hepatitis and liver cancer. Philos Trans Roy Soc B: Biol Sci, 2017, 372(1732): 20160274.
- [15] de Clercq E, Li GD. Approved antiviral drugs over the past 50 years. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(3): 695–747.
- [16] Graham BS, Ambrosino DM. History of passive antibody administration for prevention and treatment of infectious diseases. Curr Opin HIV AIDS, 2015, 10(3): 129–134.
- [17] Pierce BG, Keck ZY, Lau P, et al. Global mapping of antibody recognition of the hepatitis C virus E2 glycoprotein: implications for vaccine design. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(45): E6946–E6954.
- [18] Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, et al. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 195–208.
- [19] Kline JB, Kennedy RP, Albone E, et al. Tumor antigen CA125 suppresses antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) via direct antibody binding and suppressed Fc- γ receptor engagement. Oncotarget, 2017, 8(32): 52045–52060.
- [20] Kellner C, Derer S, Klausz K, et al. Fc glyco- and Fc protein-engineering: design of antibody variants with improved ADCC and CDC activity//Nevoltris D, Chames P, Eds. Antibody Engineering: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press, 2018: 381–397.
- [21] Kang TH, Lee CH, Delidakis G, et al. An engineered human Fc variant with exquisite selectivity for Fc γ RIIIaV158 reveals that ligation of Fc γ RIIIa mediates potent antibody dependent cellular phagocytosis with GM-CSF-differentiated macrophages. Front Immunol, 2019, 10: 562.
- [22] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol, 2007, 7(9): 715–725.
- [23] Wagner K, Kwakkenbos MJ, Claassen YB, et al. Bispecific antibody generated with sortase and click chemistry has broad antiinfluenza virus activity. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(47): 16820–16825.
- [24] Ruf P, Gires O, Jäger M, et al. Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3:

- implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer*, 2007, 97(3): 315-321.
- [25] Buhmann R, Michael S, Juergen H, et al. Immunotherapy with FBTA05 (Bi20), a trifunctional bispecific anti-CD3×anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion (DLI) in relapsed or refractory B-cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation: study protocol of an investigator-driven, open-label, non-randomized, uncontrolled, dose-escalating Phase I/II-trial. *J Transl Med*, 2013, 11: 160.
- [26] Zanin M, Keck ZY, Rainey GJ, et al. An anti-H5N1 influenza virus FcDART antibody is a highly efficacious therapeutic agent and prophylactic against H5N1 influenza virus infection. *J Virol*, 2015, 89(8): 4549–4561.
- [27] Mack M, Riethmüller G, Kufer P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 7021-7025.
- [28] Przepiorka D, Ko CW, Deisseroth A, et al. FDA Approval: blinatumomab. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4035-4039.
- [29] Holliger P, Prospero T, Winter G. “Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(14): 6444-6448.
- [30] Mouquet H, Warncke M, Scheid JF, et al. Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(3): 875–880.
- [31] Bournazos S, Gazumyan A, Seaman MS, et al. Bispecific anti-HIV-1 antibodies with enhanced breadth and potency. *Cell*, 2016, 165(7): 1609–1620.
- [32] Gu JM, Yang JS, Chang Q, et al. Identification of anti-ErbB2 dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig™) proteins with unique activities. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97292.
- [33] Tan WL, Meng YC, Li H, et al. A bispecific antibody against two different epitopes on hepatitis B surface antigen has potent hepatitis B virus neutralizing activity. *mAbs*, 2013, 5(6): 946–955.
- [34] Shi X, Deng YQ, Wang HJ, et al. A bispecific antibody effectively neutralizes all four serotypes of dengue virus by simultaneous blocking virus attachment and fusion. *mAbs*, 2016, 8(3): 574–584.

- [35] Ridgway JBB, Presta LG, Carter P, et al. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng*, 1996, 9(7): 617-621.
- [36] Gong S, Wu C. Generation of Fabs-in-tandem immunoglobulin molecules for dual-specific targeting[J]. *Methods*, 2019, 154: 87-92.
- [37] Wang JQ, Bardelli M, Espinosa DA, et al. A human bi-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. *Cell*, 2017, 171(1): 229–241.e15.
- [38] Hahn CS, French OG, Foley P, et al. Bispecific monoclonal antibodies mediate binding of dengue virus to erythrocytes in a monkey model of passive viremia. *J Immunol*, 2001, 166(2): 1057–1065.
- [39] Nardin A, Sutherland WM, Hevey M, et al. Quantitative studies of heteropolymer-mediated binding of inactivated Marburg virus to the complement receptor on primate erythrocytes. *J Immunol Methods*, 1998, 211(1/2): 21–31.
- [40] Liu DL, Zhao JJ, Song YP, et al. Clinical trial update on bispecific antibodies, antibody-drug conjugates, and antibody-containing regimens for acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 15.
- [41] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*, 2018, 24(6): 739-748.
- [42] Rossi EA, Chang CH, Cardillo TM, et al. Optimization of multivalent bispecific antibodies and immunocytokines with improved in vivo properties. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(1): 63–71.
- [43] Runcie K, Budman DR, John V, et al. Bi-specific and tri-specific antibodies- the next big thing in solid tumor therapeutics. *Mol Med*, 2018, 24(1): 50.