



评述

靶向PrP及A β 的治疗性抗体研究进展何金生^{①†*}, 张莹^{①†}, 洪涛^{①②*}

① 北京交通大学理学院生命科学与生物工程研究院, 北京 100044;

② 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所, 北京 100052

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn; hongt@cae.cn

收稿日期: 2010-05-03; 接受日期: 2010-06-04

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A247)和科技重大专项(批准号: 2009ZX10004-216)资助项目

摘要 朊病毒病与阿尔茨海默病具有蛋白质异常折叠的共同特征, 患者均有痴呆的症状, 但前者具有传染性, 而后者没有. 这引起人们的研究兴趣, 从不同角度开展了二者的比较研究. 近年来, 靶向其关键蛋白 PrP 和 A β 的免疫治疗研究进展很快. 本文结合实际研究工作, 着眼于治疗性抗体的疾病靶向性和构象特异性等主要特征, 综述了针对 PrP 和 A β 治疗性抗体研究中的新视点和新策略, 以期探索这两种疾病的共同机制及治疗方法提供参考.

关键词

朊病毒

阿尔茨海默病

免疫治疗

抗体

构象

朊病毒病(Prion disease)与阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases, AD)是两种典型的由蛋白质异常折叠、聚集所致的神经退行性疾病, 属于“构象病”的范畴. 其与人类健康和公共卫生密切相关, 除了朊病毒病具有感染性以外, 二者在许多方面具有一定的相似性. 近年来, 构象表位相关抗体在这类疾病的治疗和预防中显示了巨大的潜力. 自 1975 年, Köhler 与 Milstein^[1]发明单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb, 简称单抗)以来, 此项技术已经在很大程度上趋于成熟和稳定, 同时分子生物学与基因工程发展迅速, 人们修饰和操作单抗的能力极大增强. 由于抗体识别抗原的高度特异性和空间结构依赖性, 其逐渐成为“构象”相关疾病诊断、治疗以及发病机制研究的重要工具.

1999 年, Schenk 等人^[2]首次报道了 A β 靶向的 AD 免疫治疗. 此后, 朊病毒病免疫治疗也引起重视. 本文主要结合本实验室的一些工作, 对靶向于 PrP 和 A β 的新型治疗性抗体的种类、特性、研究和应用中

的新策略及新思路等进行综述.

1 研究的新视点

1.1 疾病/功能靶向性抗体

针对这两种疾病关键蛋白(PrP 和 A β)的抗体研究理念已经从最早的“拿到单抗”发展到“功能明确、并且具有特异用途的抗体”. 例如, 一般看来, A β 42 和 A β 40 特异性的抗体具有预防 AD 的作用, 而泛 A β 抗体则具有治疗 AD 的作用. 在 Prion 和 AD 领域, 越来越多的单抗被用于早期诊断或被动免疫治疗研究, 人们也非常期望能够从不断的临床试验中发现有价值的新抗体.

1.2 构象特异性抗体

蛋白质的聚集和构象转变是 Prion 和 AD 的核心事件, 以 α 螺旋含量减少以及 β 折叠含量增加为特征. 可溶性低分子量蛋白多聚体, 能够提供较多的由空

间构象形成的抗原决定基, 从而倾向于诱导产生构象特异性抗体. 对于淀粉样蛋白, 构象依赖性抗原决定基一般主要通过以下两种机制产生: (1) 分子内空间构象; (2) 分子间空间构象.

虽然泛 PrP 单抗(Pan anti-PrP MAb)的种类有很多, 但是 PrP^{Sc} 特异性单抗却是解密 Prion 不可缺少的关键工具. 常规鉴定 PrP^{Sc} 的方法通常需要用蛋白酶 K 把 PrP^C 消化殆尽, 然后用广谱 PrP 单抗检测保留下来的具有蛋白酶抗性的 PrP^{Sc}. 如果利用 PrP^{Sc} 特异的抗体, 则不需要对样本进行预处理, 就可以区分 PrP^{Sc} 和 PrP^C 两种异构体. 同时, PrP^{Sc} 特异的抗体也具有预防和治疗 Prion 疾病的重要意义.

PrP^{Sc} 特异的单克隆抗体具有中和朊病毒的治疗性应用潜力. Serbec 等人^[3-5]于 2004 年报道了以 PrP 的 C 端 α -螺旋区多肽(即 P1 肽段 CITQYERESQAYY 214~226 位氨基酸)免疫后筛选到的 PrP^{Sc} 特异的单克隆抗体 V5B2. Horiuchi 等人^[6]报道了一种可以区别 PrP^{Sc} 和 PrP^C 的构象表位特异性单克隆抗体. 他们采用另外一种形式的抗原, 即鼠脑中纯化的 Obihiro 株朊病毒来免疫 *Prnp*^{-/-} 小鼠, 得到只识别 PrP^{Sc} 而不识别 PrP^C 的单克隆抗体 6H10. 实验表明, 6H10 识别蛋白酶 K 处理过的 PrP^{Sc}, 不识别 3 mol/L 以上盐酸胍(GdnHCl)处理过的 PrP^{Sc} 和重组小鼠 PrP (recombinant mouse PrP, rMoPrP); 6H10 识别非变性状态下的组织印迹, 不识别变性后的组织. 表位分析发现, PrP 蛋白的 C 末端可能与构象表位有关. V5B2 和 6H10 都是 PrP^{Sc} 特异的单克隆抗体, 但是二者免疫原分别是多肽和组织提取的蛋白质成分. 分析这两种单抗的表位, 发现它们均和 PrP 的 C 末端相关. 如果预计获得构象特异性的单抗, 那么通常需要使用容易形成优势构象表位的抗原形式, 并且选用的抗原形式不限于多肽.

构象特异性的 A β 靶向性抗体也具有治疗 AD 的潜力. Lambert 等人^[7]利用一种叫 ADDLs(A β derived diffusible ligands)的 A β 寡聚体为抗原免疫动物, 制备得到一系列具有空间构象敏感性的 NU 系列单克隆抗体. NU 抗体能够区分 AD 病人与正常人脑组织可溶性抽提物. 这种抗体识别 A β 寡聚体和纤维而不是单体, 同时能够阻止 ADDLs 黏附在突触上面, 并且抑制 ADDLs 诱导的细胞毒性和氧化应激损伤. NU 抗体特异性结合 ADDLs 并阻断其细胞毒性的实验数据支持构象特异性抗体的说法. 另外, NAB61 特异性识

别 A β 40 寡聚体, 其治疗潜力表现在改善转基因小鼠的学习记忆能力^[8].

辨别构象特异性抗体的方法是综合性的: (1) 结合 SDS-PAGE 和非变性蛋白电泳免疫印迹结果; (2) 分析斑点印迹的动态变化情况; (3) 竞争 ELISA 和表位分析等. Lambert 等人结合以上方法为判定构象特异性抗体提供了经验. 首先通过免疫斑点印迹筛选分泌抗体的阳性克隆, 然后再结合变性和非变性蛋白电泳后免疫印迹来确定识别的特异性. 他们分别在 0 s, 30 s, 60 s, 10 min, 30 min, 1 h 和 2 h 的不同时间点分别从寡聚体的体外制备系统中取等质量的样品进行斑点印迹检测, 结果表明用构象依赖性抗体 W8, W9, W20 和 WC2 等可以显示随时间而不断增强的信号, 而 4G8 抗体则不能检测到这些. 分析原因发现, ADDLs 体外制备系统中其含量随时间延长而增加, 构象选择性抗体可以检测出这种变化; 4G8 仅仅识别线性表位, 则未能识别这种构象表位的增加^[9].

1.3 抗独特型抗体

抗独特型抗体(Ab2)是一套特殊的可以与抗体的独特型结合, 即特异性识别抗体可变区的抗体. Ab2 可以分为 3 组, 即 Ab2 α , β 和 γ , 其中 Ab2 β 识别的表位在抗原结合区, 因此又把 Ab2 β 称作是抗原决定簇在体内的“内影像”. 抗独特型抗体通常用于以下情形, 即保护性抗原是感染、有毒、难于分离或纯化的物质.

近期研究利用 PrP^{Sc} 特异的单克隆抗体 V5B2 全抗体、以及 V5B2 的 Fab 片段和匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)偶联-V5B2-Fab 片段分别免疫小鼠和鸡通过同种(syngeneic)和异种(xenogeneic)实验系统来制备多克隆和单克隆抗体^[10]. 结果表明, V5B2-Fab 片段产生抗独特型抗体(5D12 和 4F8)的效果最佳. 这两株 Ab2 β 抗体与 V5B2 结合的亲和力较高, 同时能够以剂量依赖的方式竞争性抑制免疫原 P1 与 V5B2 结合. 结构生物学分子对接(molecular docking)分析提示, 抗独特型抗体的空间结构与 PrP^{Sc} 非常接近, 从结构或功能上看, 能够起到模拟抗原的作用.

因此, 免疫原的选择是诱导具有抗原竞争作用的 Ab2 的重要步骤. Hanoux 等人^[11]也证实了这一看法. 他们尝试采用两种不同的抗原制备人 PrP(hPrP)单抗 SAF61 的 Ab2: (1) 一段化学合成的含有 17 个氨基酸的多肽, 这段多肽涵盖 SAF61 轻链 CDR3 区域的

氨基酸序列, 与 PrP 的立体结构相反; (2) SAF61 全抗体. 结果表明只有后者免疫后产生的 Ab2 竞争性结合 hPrP, 发挥抗原“内影像”的作用.

2 抗体筛选的新策略

2.1 免疫原选择与设计

免疫原的分子结构在很大程度上决定了抗体筛选方法的选择. 通常根据拟获得抗体的功能表位来选择与设计免疫原或者抗体库的饵蛋白. 目前已经突破传统的多肽免疫原形式, 将修饰的多肽、蛋白质、蛋白聚集物、标本抽提物和特定病原体等作为免疫原的选择范畴. 这种设计方式突出了疾病靶向, 大大提高了获得功能表位的几率.

PrP 或 A β 的多肽片段、重组蛋白、特定聚合物(PrP^{Sc} 或 ADDLs)以及病人或模型动物脑组织抽提物都有可能作为免疫原或饵蛋白. 例如, 使用 ADDLs 作为免疫原, 通过杂交瘤技术已经筛选获得一系列 A β 寡聚体特异的单克隆抗体 NU 系列. 许多非经典

形式免疫原的效果很好, 利用纯化的 PrP^{Sc} 也已经筛选到空间构象依赖的、PrP^{Sc} 特异性单抗.

2.2 筛选谱的应用

建议单抗(尤其是构象选择性单抗)筛选和结果评判尽量结合多种方法, 避免漏选特殊的抗体. 常规使用的间接 ELISA 多适用于线形表位单抗检测, 通常把吸光值(A)读数偏低的克隆删除. 这种在 ELISA 检测中效果不好的抗体, 很可能涵盖了构象表位的因素. 如果筛选构象表位的抗体, 推荐使用免疫/竞争斑点印迹做初步筛选, 使用间接免疫荧光和非还原胶电泳免疫印迹做进一步确证.

3 抗体药物应用

在该领域, 已经有很多基于抗体的免疫治疗方法具有较好的靶向性, 甚至已经发展到各期临床试验(表 1). 将被验证具有治疗潜力的分别针对 PrP 或 AD 的单抗总结, 如表 2 和 3.

表 1 基于抗体的 AD 免疫治疗方法^{a)}

名称/发起单位	表位	临床试验情况
Bapineuzumab(AAB-001, ELN115727), 人源化抗体/JANSEN	A β N 末端	III 期临床试验
Solanezumab(LY2062430)人源化的抗 A β 单抗 m266/美国礼来公司(Eli Lilly and Company)	A β 16-23	III 期临床试验
静脉免疫球蛋白(Intravenous immunoglobulins, IVIg)/美国百特公司 Baxter Healthcare Corporation	/	III 期临床试验
PF-04360365/辉瑞(Pfizer)	/	II 期临床试验
CAD106/诺华(Novartis)	/	II 期临床试验
GSK933776A/葛兰素史克 GlaxoSmithKline	/	I 期临床试验

a) <http://www.clinicaltrials.gov>

表 2 靶向 PrP 的治疗性抗体

抗体	免疫原	表位	特异性		抗 Prion 活性	文献
			PrP ^C	PrP ^{Sc}		
V5B2	PrP ₂₁₄₋₂₂₆	/	/	/	/	[3~5]
6H10	被感染的脑组织	/	-	+	有	[6]
6H4	/	144~152	+	+	有	[12]
D13/D18(Fab)	/	95~103/132~156	+	-/+ (非变性/变性)	有	[13]
SAF34/SAF61	瘙痒因子相关纤维	59~89/144~152	+	/	有	[14]
110/31C6/44B1/72	纯化 PrP ^{Sc} 和重组 PrP	59~89/143~149/构象/构象	+	-/+	有	[15]
Sha31	感染 263K 株的仓鼠脑组织抽提物	145~152	+	+	有	[16]
3S9/2H9	重组人 PrP ₁₂₂₋₂₃₀ ; 重组仓鼠 PrP ₁₂₅₋₂₃₄	141~161	+	+	有	[17]
8B4/8H4	/	37~44/175~185	+	+	有	[18,19]
ICSM18/35	不同折叠状态的重组人 PrP	146~159/96~109	+	+	有	[20]
6D11	感染 139A 株的 CD1 小鼠脑组织抽提物	93~109	+	+	有	[21]
15B3	重组牛 PrP	12~148, 162~170, 214~226	-	+	/	[22]

表 3 靶向 Aβ 的治疗性抗体

抗体	免疫原	表位	特异性	抗 AD 活性	文献
m266	/	Aβ13~28	单体、寡聚体、纤维	有	[23]
6E10	/	Aβ3~8	单体、寡聚体、纤维	有	[24]
3D6/10D5	Aβ多肽片段	Aβ1~15/Aβ3~7	单体、寡聚体、纤维	有	[23]
NU 抗体	ADDLs	/	Aβ42 寡聚体	有	[7]
Nab61	Aβ ₄₀ 寡聚体	/	Aβ ₄₀ 寡聚体	有	[8]
抗-Aβ ₁₋₁₁	(Aβ ₁₋₁₁) ₂ -PADRE	/	单体、寡聚体、纤维		[25]
抗-Aβ42 寡聚体(单链抗体)	噬菌体库	/	寡聚体	有	[9]

近年来,在抗体药物应用的研发领域,基因工程抗体技术日臻完善.人们利用嵌合抗体、改型(complementarity determining region, CDR 移植)或表面重塑抗体和抗体库等技术,遵循保持抗体亲和力和特异性、降低抗体的免疫原性等原则,从改变抗体识别价、增强靶向性以及调节细胞杀伤作用等方面不断发展新的基因工程抗体.

在亲和力和特异性较高的鼠源单抗的基础上构建抗 PrP 的治疗性单链抗体(single chain variable fragment, scFv),近年报道较多^[26-28].这类抗体一般具有特异结合或抑制 PrP 在细胞内聚集的功能.另有报道^[29],通过抗体库技术筛选到识别人淋巴细胞瘤表面 PrP 的单链抗体,通过流式细胞仪检测呈现出直观的特异信号.如果将这种抗体和标记技术结合,或者进行组织特异性表达等都很有希望为 Prion 发病机制或预防治疗研究提供新型技术手段.

Meli 等多个研究小组^[30-32]报道了靶向 Aβ寡聚体的 scFv.这些抗体通常具有空间构象敏感性,特异性识别一定分子量范围的寡聚体,而不识别单体或者成熟的纤维结构.这种抗原-抗体结合的差异性,一方面表明了这些抗体的高度特异性,另一方面说明 Aβ寡聚体和纤维存在三维结构的差异.应用具有构象选择性的抗 Aβ单链抗体,有望进一步解析 Aβ体内/细胞内的代谢动力学以及结构并带来 AD 防治的重要意义^[33,34].

4 本实验室研究情况和展望

本实验室具有多年抗体研究的基础,并已经获得多株抗 PrP^[35]和抗 Aβ单抗^[36].其中,有一些具有治疗作用而另一些具有鉴别诊断作用.例如,单抗 A8^[34]主要结合 16~25 kD 的 Aβ寡聚体,具有中和 Aβ寡聚体细

胞毒性,抑制纤维成熟和改善 AD 模型小鼠学习记忆能力的作用,有一定的应用前景,已经完成人源化改造.此外,还应用噬菌体展示技术从健康人抗体库中筛选到抗 Aβ的单链抗体^[37],为进一步获得治疗性抗 Aβ寡聚体的基因工程抗体奠定基础.同时,逐步开始建立外周血或脑脊液 AD 相关生物标记物(Biomarker)的检测系统,用于治疗效果的监测与评价^[38].

综上所述,获得预防及治疗作用是抗 PrP 及 Aβ抗体药物研究的目标,而空间构象表位选择性则是其特色.最近 10 多年来,构象特异性抗体研究进展较快,不断有新的设计出现,为神经退行性疾病的诊断和治疗提供了新的思路.从已经获得的资料来看,构象性抗体更有利于疾病预防和早期治疗.

并且,据报道已经有同时识别多种可溶性寡聚体的抗体产生^[39],这类抗体的治疗作用也将进一步明确.这就为解决“构象病”的共同机制和治疗方法提供依据.因此,鼓励研发具有新表位(或构象表位)的抗体药物.为了发现这类疾病诊断和治疗的新靶点,必须结合生物大分子超微形态学和结构生物学的知识技能,实现分子对接,为其提供数据;结合分子生物学和现代生物信息学分析技术,完成分子建模,预测基因工程抗体改造和优化的方案;结合细胞信号转导和抗体阻断技术,发现 PrP/Aβ以外的新的靶分子;结合各类(基因、蛋白及代谢)组学技术和免疫学分析原理,开发实用可行的体液检测方法,为这类疾病生前监测带来新的突破.

此前,中国第一个基因重组人源化单克隆抗体药物——泰欣生,人源化程度达 95%,主要针对肿瘤组织过度表达的表皮生长因子受体,为中国重组抗体药物发展提供了一定的经验^[40,41].中国抗 Prion 和抗 AD 抗体药物研究虽然尚处于起步阶段,但是应正

确面对机遇与挑战, 全力以赴, 加强抗体药物的源头创新, 提高抗体中下游关键技术, 为缩小与国际水平的差距, 最终获得自主知识产权的理想抗体药物而不断努力.

参考文献

- 1 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495—497
- 2 Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 1999, 400: 173—177
- 3 Ulrigh N P, Skrt M, Veranic P, et al. Oligomeric forms of peptide fragment PrP (214~226) in solution are preferentially recognized by PrP (Sc)-specific antibody. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 1320—1326
- 4 Skrlj N, Serbec V C, Dolinar M. Single-chain Fv antibody fragments retain binding properties of the monoclonal antibody raised against Peptide P1 of the human prion protein. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160: 1808—1821
- 5 Serbec V C, Bresjanac M, Popovic M, et al. Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue. *J Biol Chem*, 2004, 279: 3694—3698
- 6 Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, et al. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. *Virology*, 2009, 394: 200—207
- 7 Lambert M P, Velasco P T, Chang L, et al. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . *J Neurochem*, 2007, 100: 23—35
- 8 Lee E B, Leng L Z, Zhang B, et al. Targeting amyloid-beta peptide (A β) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in A β precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem*, 2006, 281: 4292—4299
- 9 Wang X P, Zhang J H, Wang Y J, et al. Conformation-dependent single-chain variable fragment antibodies specifically recognize beta-amyloid oligomers. *FEBS Lett*, 2009, 583: 579—584
- 10 Colja Venturini A, Bresjanac M, Vranac T, et al. Anti-idiotypic antibodies: a new approach in prion research. *BMC Immunol*, 2009, 10: 16
- 11 Hanoux V, Wijkhuisen A, Alexandrenne C, et al. Polyclonal anti-idiotypic antibodies which mimic an epitope of the human prion protein. *Mol Immunol*, 2009, 46: 1076—1083
- 12 Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, et al. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat Med*, 2003, 9: 893—899
- 13 Novitskaya V, Makarava N, Bellon A, et al. Probing the conformation of the prion protein within a single amyloid fibril using a novel immunoconformational assay. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15536—15545
- 14 Perrier V, Solassol J, Crozet C, et al. Anti-PrP antibodies block PrP^{Sc} replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrP^C degradation. *J Neurochem*, 2004, 89: 454—463
- 15 Kim C L, Umetani A, Matsui T, et al. Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology*, 2004, 320: 40—51
- 16 Féraudet C, Morel N, Simon S, et al. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP^{Sc} replication in infected cells. *J Biol Chem*, 2005, 280: 11247—11258
- 17 Miyamoto K, Nakamura N, Aosasa M, et al. Inhibition of prion propagation in scrapie-infected mouse neuroblastoma cell lines using mouse monoclonal antibodies against prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335: 197—204
- 18 Cardinale A, Filesi I, Vetrugno V, et al. Trapping prion protein in the endoplasmic reticulum impairs PrP^C maturation and prevents PrP^{Sc} accumulation. *J Biol Chem*, 2005, 280: 685—694
- 19 Vetrugno V, Cardinale A, Filesi I, et al. KDEL-tagged anti-prion intrabodies impair PrP lysosomal degradation and inhibit scrapie infectivity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338: 1791—1797
- 20 Beringue V, Vilette D, Mallinson G, et al. PrP^{Sc} binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. *J Biol Chem*, 2004, 279: 39671—39676
- 21 Pankiewicz J, Prelli F, Sy M S, et al. Clearance and prevention of prion infection in cell culture by anti-PrP antibodies. *Eur J Neurosci*, 2006, 23: 2635—2647
- 22 Korth C, Stierli B, Streit P, et al. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 1997, 390: 74—77
- 23 Bard F, Barbour R, Cannon C, et al. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2023—2028

- 24 Thakker D R, Weatherspoon M R, Harrison J, et al. Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4501—4506
- 25 Movsesyan N, Mkrtichyan M, Petrushina I, et al. DNA epitope vaccine containing complement component C3d enhances anti-amyloid-beta antibody production and polarizes the immune response towards a Th2 phenotype. *J Neuroimmunol*, 2008, 205: 57—63
- 26 Shimizu Y, Kaku-Ushiki Y, Iwamaru Y, et al. A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. *Microbiol Immunol*, 2010, 54: 112—121
- 27 Skrlj N, Serbec V C, Dolinar M. Single-chain Fv antibody fragments retain binding properties of the monoclonal antibody raised against peptide P1 of the human prion protein. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160: 1808—1821
- 28 Donofrio G, Heppner F L, Polymenidou M, et al. Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. *J Virol*, 2005, 79: 8330—8338
- 29 Flego M, Ascione A, Zamboni S, et al. Generation of human scFvs antibodies recognizing a prion protein epitope expressed on the surface of human lymphoblastoid cells. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 38
- 30 Meli G, Visintin M, Cannistraci I, et al. Direct *in vivo* intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *J Mol Biol*, 2009, 387: 584—606
- 31 Robert R, Dolezal O, Waddington L, et al. Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. *Protein Eng Des Sel*, 2009, 22: 199—208
- 32 Zameer A, Kasturirangan S, Emadi S, et al. Anti-oligomeric Abeta single-chain variable domain antibody blocks Abeta-induced toxicity against human neuroblastoma cells. *J Mol Biol*, 2008, 384: 917—928
- 33 Robert R, Streltsov V A, Newman J, et al. Germline humanization of a murine Abeta antibody and crystal structure of the humanized recombinant Fab fragment. *Protein Sci*, 2010, 19: 299—308
- 34 Medecigo M, Manoutcharian K, Vasilevko V, et al. Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries. *J Neuroimmunol*, 2010, 223: 104—114
- 35 赵丽, 侯星生, 计融, 等. 抗牛 PrP 多肽单克隆抗体的制备及其在牛 PrP 检测中的应用. *中国科学: 生命科学*, 2009, 39: 542—548
- 36 Zhang Y, Wang X, He J, et al. Preparation and Characterization of a Monoclonal Antibody with High Affinity for Soluble A β Oligomers. *Hybridoma*, 2009, 28: 349—354
- 37 包福祥, 何金生, 曹贵方, 等. 人源性天然抗体库的构建及淀粉样蛋白 A β 1-42 寡聚体单链抗体的筛选和鉴定. *生物工程学报*, 2009, 25: 1195—1203
- 38 郑妍鹏, 何金生, 洪涛. 阿尔茨海默病体液生物学标记物研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2010, 53: 490—496
- 39 Kaye R, Head E, Thompson J L, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003, 300: 486—489
- 40 中国首个基因重组人源化单克隆抗体药物上市. *中国医药生物技术*, 2008, 3: 384
- 41 张莹, 何金生, 洪涛. 重组抗体药物研究进展及应用. *中国生物工程杂志*, 2009, 29: 102—106