



具有分子伴侣功能的抗体*

林景也¹⁾ 李 森^{1,2)**}⁽¹⁾ 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875; ⁽²⁾ 北京师范大学, 生命科学与技术国家级实验教学示范中心, 北京 100875)

摘要 蛋白质的折叠问题一直是生物学研究的前沿之一, 蛋白质稳态平衡的破坏与衰老及很多神经退行性疾病的发病机理密切相关, 而蛋白质的正确折叠与蛋白质稳态在很大程度上取决于分子伴侣参与构建的复杂网络。许多研究表明, 抗体可以作为分子伴侣促进蛋白质的正确折叠, 并阻止蛋白质的异常聚集, 抗体所具有的严格底物特异性使其具备了治疗特定蛋白质折叠病、帮助包涵体复性等应用潜力。本文简要介绍了分子伴侣的研究进展, 详细阐述了具有分子伴侣功能的抗体及单链抗体的研究进展, 最后重点讨论了可抑制蛋白质聚集的抗体的研究近况。

关键词 蛋白质折叠, 分子伴侣, 抗体, 神经退行性疾病

中图分类号 Q511, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0138

在生物体中, 即使是结构最复杂的大分子在正常情况下也能精确、保真地进行自组装, 蛋白质自发折叠成紧凑的三维结构是最普遍的例子。蛋白质折叠对于生命活动具有重大意义, 除了产生正常的生物活性外, 其还与许多生物进程密切相关, 包括将分子运输到特定的细胞位置以及调节细胞的生长与分化等^[1]。毫无疑问, 只有正确折叠的蛋白质才能在拥挤的生物环境中具有长期稳定性并承担正常的生理功能。蛋白质无法正确折叠或者无法维持正确折叠的结构是多种病理状况的根源^[2]。体外及体内的多肽链在某些情况下会产生缺乏生物学活性的错误折叠构象, 蛋白质的错误折叠常常伴随着蛋白质的异常聚集。这不仅给蛋白质的工业化生产带来了困难, 也是体内蛋白质错误折叠相关疾病的根源。

在蛋白质的折叠过程中, 分子伴侣发挥了重要作用, 一些分子伴侣与新生肽链相互作用, 另一些分子伴侣则会参与蛋白质折叠过程的后期阶段, 增强蛋白质的稳定性^[3-4]。天然的分子伴侣通常是多功能的, 具有非特异性。而近年来的研究发现, 一些抗体也具有分子伴侣功能, 这无疑是令人惊喜的, 因为抗体天然具备了对靶蛋白的高亲和力及高

特异性的优点。对这一类抗体的研制和应用将有助于在工业生产中提高包涵体等蛋白质产品的复性效率, 也有利于研发用于治疗蛋白质错误折叠疾病的生物药物。本文主要介绍了具有分子伴侣功能的抗体的发现、研究进展及具体应用。

1 分子伴侣的发现、概念与基本功能

分子伴侣 (molecular chaperone) 一词源于 1978 年, Laskey 等^[5] 首次在体外实验中发现一种核内酸性蛋白 (nucleoplasmin) 是组蛋白和 DNA 组装成核小体的必需物质, 他们将这种蛋白质命名为 “molecular chaperone”。后来 Ellis 等^[6] 在研究高等植物叶绿体中的核酮糖 1,5-二磷酸羧化/加氧酶 (Rubisco) 时也发现了类似现象, 在叶绿体中合成的 8 个大亚基与在细胞质中合成的 8 个小亚基必须先和一种蛋白质结合后, 才能在叶绿体内组装成活性酶分子。1987 年 Ellis^[7] 正式提出了 “molecular

* 国家自然科学基金 (30800188, 31570756, 32071222) 和北京市教育委员会共建项目资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-58802765, E-mail: lisen@bnu.edu.cn

收稿日期: 2023-04-10, 接受日期: 2023-04-17

chaperone”的概念, 经几度修正, 1993年Ellis^[8]给了“分子伴侣”更确切的定义: 即一大类相互之间没有关系的蛋白质, 它们具有的共同功能是帮助其他含多肽类结构的物质在体内进行正确的非共价组装, 但不是这些物质在发挥其正常的生物学功能时的永久组成成分。分子伴侣广泛存在于各类细胞和亚细胞结构当中, 并参与多个细胞进程, 包括帮助蛋白质从头折叠、防止错误折叠的蛋白质聚集、参与寡聚蛋白质的组装、变性蛋白质的重折叠、细胞内蛋白质的运输以及协助蛋白质的水解^[9]。

分子伴侣目前已被发现具有很多重要的生理功能与实用价值。首先, 其可用于预防和治疗蛋白质错误折叠相关疾病, 一方面通过帮助蛋白质正确折叠、防止错误折叠和聚集, 从根本上降低蛋白质错误折叠相关疾病的发病可能, 另一方面结合新生肽链并稳定其构象, 帮助蛋白质的转运, 避免因蛋白质无法正确转运而导致折叠病的发生。其次, 分子伴侣是一类具有重要生理意义的分子, 参与生物机体的应激反应、遗传物质的复制转录、生物信号转导、细胞周期与凋亡的调控、肿瘤细胞的增殖等过程。此外, 在工业与医药业生产中, 分子伴侣可用于帮助化学变性剂变性的包涵体蛋白进行正确折叠, 从而提高包涵体蛋白的复性效率^[10-11]。

2 分子伴侣范围的扩大

自分子伴侣的概念提出以来, 分子伴侣的范围实际上一一直在扩展。

王志珍院士对二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 进行了系统研究, 发现PDI既是酶又是分子伴侣, 其不仅可以催化天然二硫键的形成, 还可以作为分子伴侣来促进多肽链的正确折叠^[12]。一些研究也发现肽酰脯氨酰顺反异构酶 (peptidyl prolyl isomerase, PPI) 家族的部分成员同样具有一定的伴侣功能, 比如SlyD可作为融合伴侣以及溶解度增强剂, 在大肠杆菌的细胞质中促进蛋白质折叠, 显著增强了许多易于聚集的异源蛋白质的溶解性^[13]。大肠杆菌周质伴侣SurA同样也是一种肽酰脯氨酰顺反异构酶, 已有研究表明, 它可以促进外膜孔的正确折叠和成熟^[14], 且其自身结构可选择性地结合特定底物^[15]。本课题组研究了人亲环素18 (human cyclophilin 18, hCyp18, 一种分子质量为18 ku的肽酰脯氨酰顺反异构酶) 对人肌酸激酶 (human creatine kinase, HCK) 去折

叠的影响作用, 发现hCyp18能够抑制HCK的失活与构象变化, 并有效缓解其在变性过程中的聚集, 从而推断hCyp18具有针对HCK的分子伴侣功能^[16]。

随着研究的逐渐深入, 分子伴侣的范围也不再仅局限于蛋白质, 核糖体、RNA乃至一些磷脂都被鉴定出具有分子伴侣的活性。核糖体被认为是强大的伴侣, 可帮助其上蛋白质合成过程中多肽链的折叠^[17]。DNA和RNA在体外都表现出强的伴侣活性, 其抑制经典的伴侣底物聚集的效率被报道比蛋白质类分子伴侣GroEL高300倍^[18]。RNA在体外行使伴侣功能的研究实例表明, 传统伴侣以外的其他分子对于生物分子 (包括核酸) 的体内折叠可能具有重要作用^[19-20]。

在以大肠杆菌突变体为模型来改变膜磷脂的组成时, 缺乏磷脂酰乙醇胺 (PE) 会导致多聚膜蛋白乳糖通透酶LacY的错误折叠, PE可与部分变性的蛋白质在其重折叠时发生相互作用, 表明磷脂可以作为非蛋白质类分子伴侣起作用^[21-22]。变性的大肠杆菌外膜蛋白OmpA只在脂多糖 (LPS) 存在的情况下发生重折叠^[23-24], 大肠杆菌周质蛋白DegP会依赖于特定的磷脂酰甘油 (PG) 发生构象变化, 来防止未折叠蛋白质在低温下的自聚集^[25-26]。具有分子伴侣功能的脂分子被命名为脂伴侣 (lipochaperone)^[26]。

一些蛋白质稳定剂 (如甘油和其他多元醇) 可通过增加蛋白质的水化作用而稳定其结构, 从而提高蛋白质折叠的效率, 被称为“化学分子伴侣” (chemical chaperones), 它们作为小分子通常不直接与错误折叠的蛋白质相结合, 具有非特异性且在高浓度下发挥作用^[27-28]。化学分子伴侣一般可分为两类: 渗透剂和疏水化合物。真核生物体内的渗透剂主要包括游离的氨基酸及氨基酸衍生物 (例如甘氨酸、牛磺酸等)、多元醇 (例如甘油、蔗糖等) 和甲基胺 (例如三甲基胺N-氧化物等)^[27]。渗透剂通过结合水分子来增加蛋白质折叠态的稳定性^[29], 已在体外和体内被广泛用于神经退行性疾病相关蛋白质的错误折叠与聚集的研究中, 且具有一定的治疗效果^[30-31]。本课题组已有的研究表明, 蔗糖可在拥挤环境中抑制人肌酸激酶于折叠过程中产生的聚集, 促进其正确折叠^[32], 蔗糖也可在拥挤环境中提高肌酸激酶的稳定性^[33]。蔗糖或甘油的添加能够有效抑制阿尔茨海默病 (Alzheimer's

disease, AD) 相关的 Tau 蛋白在稀溶液和大分子拥挤环境中的聚集^[34]。毒性较低的疏水化合物也被作为治疗剂进行研究, 例如 4-苯基丁酸钠(PBA) 已被美国食品和药物管理局(FDA) 批准用于尿素循环障碍的治疗, PBA 可以作为口服补充剂使用且目前没有发现严重的副作用, 但服用所需的高剂量问题仍待解决^[27]。越来越多的研究表明, 化学分子伴侣可以减少内质网应激, 纠正抑癌蛋白 p53 的错误折叠并恢复葡萄糖稳态, 抑制蛋白质和肽淀粉样蛋白的形成并稳定错误折叠的酶^[28]。

一些蛋白水解酶的前导肽序列被称为“分子内分子伴侣”(intramolecular chaperone), 这些前导肽对于水解酶的折叠和成熟是必需的, 来自各种蛋白质的大量前导肽已被鉴定为分子内伴侣^[35-36]。根据对蛋白质折叠的作用, 分子内伴侣可分为两类: I 型分子内伴侣包括那些辅助蛋白质三级结构形成的分子伴侣, 大多由 N 端序列延伸产生; II 型分子内伴侣不直接参与三级结构的形成, 但引导四级结构的组装, 它们大多位于蛋白质的 C 端。与普通的分子伴侣相比, 这种分子内分子伴侣具有高度的专一性^[37]。

后来的研究发现, 分子伴侣帮助的对象不局限于蛋白质, 分子伴侣也可帮助其他生物大分子进行折叠。与 DNA 结合、帮助 DNA 分子进行预折叠或预扭曲, 从而把 DNA 稳定在一个适合与蛋白质结合的特定构象内的蛋白质, 被称为“DNA 分子伴侣”^[38]。帮助 RNA 分子折叠的蛋白质被称为“RNA 分子伴侣”, 这些蛋白质与 RNA 结合后可以防止 RNA 的错误折叠, 或消除它们的错误折叠, 从而促进 RNA 的正确折叠^[39]。

3 具有分子伴侣功能的抗体

分子伴侣行使伴侣功能的基础是与靶蛋白的结合, 而抗体通常对于抗原分子具有高度的亲和力, 缔合常数在 10^{-7} ~ 10^{-10} mol/L 范围内, 因此天然具备了行使分子伴侣功能的可能。

早在 1969 年就有研究发现, 从用乙酰胆碱酯酶作为抗原免疫的动物中获得的抗体在与热失活的酯酶相互作用后, 使其靶蛋白部分恢复了酶活性^[40], 这提示可以利用抗体来诱导其靶蛋白的变性构象向近似天然的构象转变, 从而使其复性。随着研究的深入, 人们发现一些蛋白质, 其中包括还原的 S-蛋白(核糖核酸酶 A 的片段)^[41]、羧肽酶

A^[42]、辣根过氧化物酶^[43-44]、萤火虫荧光素酶^[45]等在变性后, 可以被其抗体诱导, 发生重折叠。一些抗体被发现可以抑制靶蛋白的折叠, 如甘油醛-3-磷酸脱氢酶和肌酸激酶的部分单克隆抗体可以抑制它们在复性过程中的折叠^[46-47]。抗体对于蛋白质折叠的影响依赖于其表位特性和蛋白质特定的折叠途径, 并没有通用的机制。目前主要有三种假设的机制: a. 抗体稳定蛋白质的天然构象, 使其靶蛋白的去折叠构象和天然构象之间的平衡向天然构象方向移动; b. 抗体通过屏蔽疏水表面来抑制靶蛋白折叠中间体的聚集; c. 抗体通过稳定过渡态结构降低折叠的活化屏障^[48]。这些机制的确定需要根据具体情况来分析。

一些抗体在促进其靶蛋白正确折叠的同时还可以防止其聚集现象的发生^[49-50]。值得注意的是, 具有分子伴侣功能的抗体对于底物通常具有严格的特异性, 而这恰恰与天然分子伴侣相反, 这使其在蛋白质错误折叠相关疾病的治疗中具有更大的应用潜力。错误折叠或聚集的蛋白质是神经退行性疾病治疗中的重要靶点, 已有不少抗体被研发出来作为分子伴侣与错误折叠的蛋白质单体、寡聚体或聚集体相结合, 有效缓解了相关疾病的发病进程(将在下文中进行详细叙述)。这其中针对全长抗体的大量研究表明, 大尺寸的抗体不利于对血脑屏障的穿越及向组织的渗透, 且容易被人体免疫系统所识别清除^[51]。随着 DNA 重组技术的发展, 许多重组抗体的片段被开发出来, 其中最受青睐的是单链抗体。

4 具有分子伴侣功能的单链抗体

4.1 单链抗体

单链抗体(single-chain fragment variable, scFv)是具有抗体活性的最小结构功能单位, 由抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)通过一段柔性肽(linker)连接而成。单链抗体的主要优点在于分子质量小、穿透力强、特异性高等, 与完整抗体及相关 Fab 片段相比, scFv 能更好地穿透血脑屏障和渗透更大的实体肿瘤, scFv 的快速分布可加速其与靶位点的结合, 且因缺少抗体的恒定区而减少了与其他非靶位点的结合, 具有更小的免疫原性^[52]。此外, 由于 scFv 不需要糖基化, 它们可以在细菌表达系统中产生, 从而可以进行大规模的生产^[53]。近 10 年来, 单链抗体已经成为被动免

疫疗法的一种重要选择^[54], 其在靶向治疗、影像诊断、细胞免疫、生物检测方面都有着重要应用^[52]。

4.2 单链抗体的筛选方法

scFv可以根据其结合抗原的特异性从特定的文库中筛选出来, 然后在多种表达系统中进行表达。噬菌体展示文库和核糖体展示文库是目前常用的文库, 但每种文库都有其局限性, 可依据筛选所需要的抗原性质和预期抗体的亲和力及数量来选择不同的文库。

噬菌体展示技术是用来筛选 scFv 最常用的方法, 根据抗体基因的来源, 展示文库可分为免疫、天然、合成三种。免疫库 (immune libraries) 由不同种类的动物或人类的 B 淋巴细胞抗体基因构建而成, 可以产生具有高亲和力和特异性的抗体, 富集的抗体偏向于用于预防接种的抗原, 其缺点是需要为每种新的抗原构建新的抗体库; 天然库 (native libraries) 不偏向于任何抗原, 单个库的容量若足够大且多样化便可以用于所有抗原, 其主要缺点是必须克隆更大的文库; 合成库 (synthetic libraries) 又称随机肽库 (random peptide libraries), 是将种系基因序列与负责结合抗原的随机互补决定区 (complementary determining regions, CDRs) 基因序列融合在一起, 在噬菌体表面表达出具有随机序列的短肽, 已被广泛用于生产高亲和力的单克隆抗体、鉴定线性抗原表位或具有各种结合能力的其他分子^[54-56]。噬菌体展示技术的关键优势在于实验表型 (展示的蛋白质) 与其封装的基因型 (编码蛋白质的 DNA) 之间存在直接联系^[57]。

核糖体展示技术也在逐渐成熟, 因其是一种体外转录/翻译系统, 克服了基于细胞方法的局限性, 可以创建更大的文库并避免表达偏差^[57-58]。核糖体展示技术在对一些具有聚集倾向的蛋白质筛选方面表现不佳, 分泌蛋白也通常通过噬菌体展示技术来筛选。但也存在将两种技术合并的替代方法, 例如在核糖体展示技术中从天然库或合成库中选择, 这种方法可以在几天内用无细胞系统模拟抗体的生成和亲和力成熟过程, 获得了比大多数天然抗体具有更高亲和力的分子^[59-60]。

除此之外, 微生物细胞展示技术也被用于 scFv

的筛选中, 该系统的展示水平为每个细胞 3×10^4 个 scFv, 并且通过荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 技术可以快速、定量地筛选及富集特异结合的蛋白质。与噬菌体和核糖体展示技术相比, FACS 消除了洗脱回收后紧密结合的克隆的不确定性, 并消除了噬菌体展示中可能发生的非特异性结合^[57]。酵母、大肠杆菌及苏云金芽孢杆菌孢子展示技术已被用于构建 scFv 文库^[61-63], 其中酵母展示系统应用得较为广泛^[57]。

4.3 具有伴侣功能的单链抗体的筛选与应用

重组的单链抗体已被广泛应用于生物技术及治疗诊断领域, 而具有分子伴侣功能的单链抗体可以帮助靶蛋白进行正确折叠, 这使其在蛋白质的生产纯化及蛋白质错误折叠相关疾病的药物开发等方面具有较好的应用前景。

本课题组利用一个大容量的人源噬菌体单链抗体库, 以人肌酸激酶为靶蛋白, 筛选出一株具有双重伴侣功能的单链抗体 (scFv A4), 该抗体能显著抑制肌酸激酶在折叠过程中的聚集, 并促进肌酸激酶天然构象的恢复, 该抗体同时能抑制天然肌酸激酶在热变性过程中的失活与聚集, 可视为针对肌酸激酶的专一性分子伴侣^[64]。我们采用计算机模拟方法构建了 scFv A4 与肌酸激酶的复合物模型, 探索了肌酸激酶可被 scFv A4 识别的表位和 scFv A4 的作用机制^[65]。在上述工作的基础上, 我们应用固相多肽膜筛选技术、表面等离子体共振技术与酶联免疫吸附测定技术, 获得了可与 scFv A4 特异结合的肌酸激酶多肽片段, 这些多肽片段作为竞争者, 可促使肌酸激酶-scFv A4 复合物解离, 释放肌酸激酶, 成功实现肌酸激酶的高效折叠与复性。分子机制研究表明, scFv A4 与筛选出的多肽可组成一套完整的伴侣体系, 先加入的 scFv A4 负责结合靶蛋白的折叠中间体, 阻止其聚集, 后加入的多肽促进靶蛋白的释放与复性 (图 1)。这种单链抗体-多肽体系是一种全新的分子伴侣体系, 其最大的优点是专一性强, 只帮助其靶蛋白进行折叠^[66]。应用该伴侣体系, 结合亲和层析技术, 我们设计了一套柱上复性的体系, 用于帮助人肌酸激酶包涵体的纯化与制备, 取得了较好的成效^[67]。

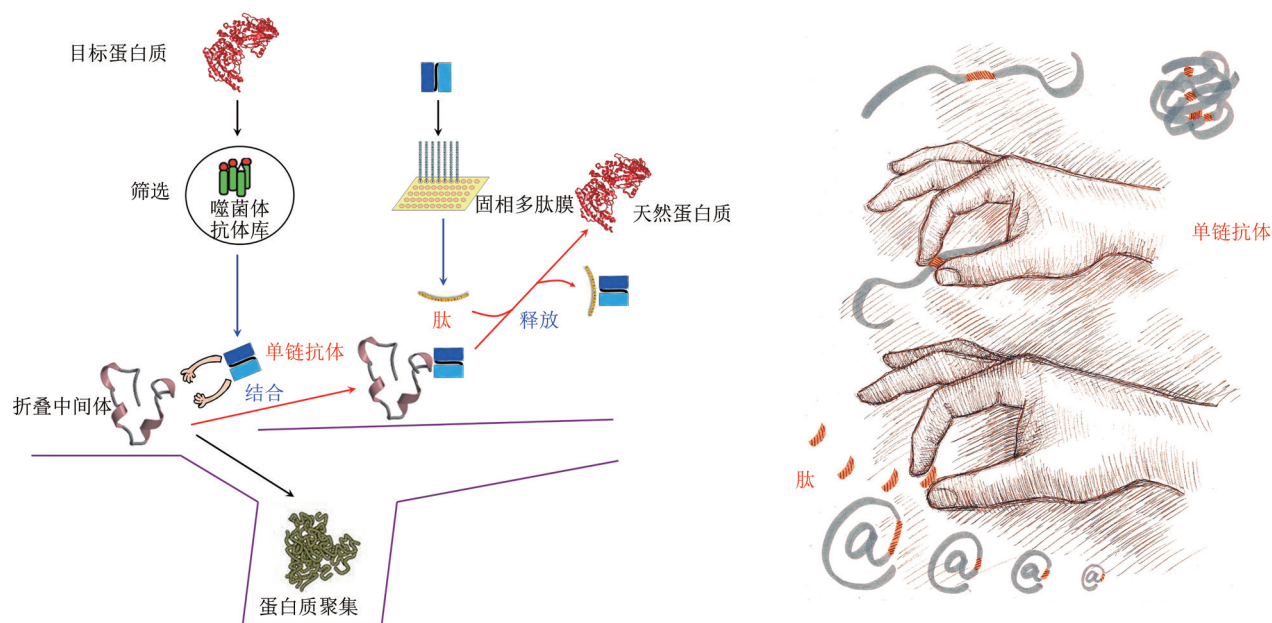


Fig. 1 Construction and mechanism of scFv A4-peptide chaperone system

图1 scFv A4-多肽伴侣体系的构建与作用机制

5 抑制蛋白质聚集的抗体的伴侣功能

基于广义的分子伴侣概念来说,能够抑制折叠病相关蛋白质聚集的抗体等生物分子也可以视为具有伴侣功能。错误折叠的蛋白质积累被认为是神经退行性疾病中的关键事件,这些疾病也被称为折叠病,比如帕金森病(Parkinson's disease, PD)被发现与 α 突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)的异常聚集有密切关联^[68], AD则与 β 淀粉样肽(amyloid β , A β)和Tau蛋白的聚集关系紧密^[69],肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)与Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD1)、TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)等蛋白质的聚集密切相关^[70-71]。异常聚集形成的淀粉样蛋白最开始是由富含天然 α 螺旋的可溶性蛋白质转变为富含致病性 β 折叠的蛋白质,通过成核和生长形成寡聚体、原纤维缠结等,最后形成淀粉样纤维聚集。寡聚体和原纤维是导致神经元功能障碍和死亡的毒性物质,目前折叠病的治疗目标主要针对于蛋白质单体、寡聚体和原纤维^[72]。针对上述蛋白质筛选出的抗体研究进展如下所述。

5.1 α 突触核蛋白

PD是仅次于AD的常见神经退行性疾病,目前暂无有效的治疗方法^[73]。 α -syn的聚集是PD

病理相关的路易体和路易神经突的主要成分,可溶性的 α -syn错误折叠并聚集成寡聚体,继而形成淀粉样原纤维,最后形成路易体。寡聚体形式是目前认为具有较强毒性的状态^[74],寡聚体已被证实可以通过多种方式产生细胞毒性,包括导致线粒体功能障碍、内质网应激、蛋白质平衡丧失、突触障碍、细胞凋亡和神经炎症^[75]。

之前针对 α -syn的研究主要集中在筛选能够抑制其单体聚集的抗体方面,在体外通过噬菌体展示或酵母表面展示技术筛选出与人重组单体 α -syn具有高亲和力的scFv D10、NAC32等单链抗体,其与 α -syn在哺乳动物细胞中的共表达可稳定 α -syn单体,防止其聚集并改善了 α -syn过表达引起的细胞毒性^[76-77]。

随着寡聚体的毒性被证实,以寡聚体为治疗目标的研究逐渐增多。Emadi等^[78]利用噬菌体展示技术和原子力显微镜(AFM)等技术分离出了与 α -syn的寡聚形式特异性结合的scFv D5,其可以有效抑制 α -syn的聚集并阻断聚集的 α -syn的细胞毒性。更多靶向 α -syn寡聚体的特异性单克隆抗体被研发,它们不识别线性表位,只识别具有特定构象的寡聚 α -syn^[79]。一种单链抗体scFv W20被发现可以识别A β 、 α -syn、淀粉样蛋白、朊病毒蛋白等蛋白质组装而成的各种寡聚体,抑制寡聚体诱导的

细胞毒性,同时改善AD、PD和亨廷顿病小鼠模型的运动和认知功能,并通过减少相应蛋白质的聚集负荷和防止突触变性来减弱许多神经病理学特征^[80-82]。特异性识别 α -syn原纤维和寡聚体的scFv-pF和scFv-pC可以抑制胞内 α -syn种子的毒性传播并阻断 α -syn的聚集^[83]。

5.2 β 淀粉样肽(A β)

AD作为最常见的神经退行性疾病,主要的病理特征为胞外的A β 沉积形成的斑块和胞内Tau蛋白过度磷酸化后形成的神经纤维缠结。被动免疫疗法是目前治疗AD的研究中常用的方法。针对A β 开发的抗体依据识别的抗原表位的位置可分为4类:a.靶向A β N端区域(氨基酸1~16)的抗体,其可以识别A β 形成过程中所有的结构形式,如单体、寡聚体、原纤维、淀粉样蛋白等;b.靶向A β 中间区域(氨基酸17~32)的抗体,只识别A β 单体;c.靶向A β C端区域(氨基酸33~42)的抗体,其可以进入中枢神经系统及在外周发挥作用,促进A β 的清除;d.靶向构象表位(寡聚物与原纤维)的抗体^[84-85]。

早期使用的常规单克隆抗体证实了免疫疗法的潜力,但也有很大的局限性,比如穿过血脑屏障的渗透性低,在鼠和人类中引起了一系列不良反应,包括脑膜炎、血管源性水肿、脑微出血等,而重组抗体因其结构的独特优势使其在AD模型鼠和灵长类动物的实验中表现良好^[84]。靶向A β 不同表位的scFv单链抗体在各种AD小鼠模型中都表现出了治疗功能,Fukuchi等^[86]将抗A β 的scFv59基因利用腺相关病毒(AAV)载入小鼠皮质海马区,发现scFv59可以在海马神经元中长期稳定表达并抑制了A β 的沉积。

ScFv因其较短的半衰期,具有较高的安全性,但同时也影响了治疗剂量,目前大部分scFv都是通过AAV载体注射进小鼠脑区。Ryan等^[87]用识别A β 单体和寡聚体的A β -scFv改善了3 $\times$ Tg-AD小鼠的认知障碍,Levites等^[88]将scFv9、scFv40.1、scFv42.2通过AAV注射进新生小鼠P0脑中,实现了永久稳定的表达,减少了A β 的沉积,且无毒副作用。Roda等^[89]证实了scFv-h3D6不仅可以减少3 $\times$ Tg-AD小鼠脑中的淀粉样斑块,还可以降低脑中病理Tau蛋白的水平。尽管AAV递送的方法在小鼠模型中取得了不错的成果,但在人类治疗中往往需要侵入性较小的给药途径,Wang等^[90]采用肌肉注射方式给药scFv到APP_{swc}/PS1dE9转基因小鼠

中,结果表明,scFv显著减弱了A β 斑块的形成积累、AD病理和认知障碍,并且发现,动物对肌肉注射有良好的耐受性,不会在表达位点及脑中引起炎症或微出血。

5.3 Tau蛋白

病理性Tau蛋白的聚集体是几种神经退行性疾病中神经纤维缠结的主要成分,这类神经退行性疾病统称为Tau蛋白病。根据AD的病理特征,Tau蛋白也是AD治疗的一个重要靶标,在目前的scFv被动免疫研究中主要靶向的是总Tau蛋白、磷酸化Tau蛋白(pTau)和Tau寡聚体。已有不少研究在疾病相关的动物模型中取得了不错的进展,Yanamandra等^[91]先是开发出了可以有效阻断Tau蛋白种子传播活性的、并能改善模型小鼠认知障碍的抗Tau抗体HJ8.5,随后Ising等^[92]基于HJ8.5筛选出了两种抗Tau scFv(SC1和SC3),结果发现两种scFv均可以显著降低P301S-tg小鼠病理性的Tau蛋白水平。Krishnaswamy等^[93]则证明了可以使用人类Tau蛋白病R406W突变的转基因果蝇来表征抗Tau scFv的治疗效果,scFv235的表达可以延长R406W模型果蝇的寿命,并有效阻止了病蝇翅膀和腹部表型的病情发展,同时减少了果蝇模型中病理性Tau蛋白的表达水平。

Tau蛋白根据其包含的重复序列数目可分为3RTau和4RTau两类^[94]。它们在Tau蛋白疾病中差异表达,其中AD与额颞叶痴呆病(FTDP-17T)患者脑内均有3RTau和4RTau的积累。目前大部分研究围绕4RTau展开,但Spencer等^[95]表明靶向3RTau的scFv也有不错的治疗效果,他们通过构建具有脑穿透序列(apoB)的重组3RTau scFv慢病毒载体来实现脑内递送,发现3RT- β scFv可以渗透到中枢神经系统,并有效减弱了3RTau tg模型小鼠中3RTau的积累和神经变性的发生,这在治疗富含3RTau的神经退行性疾病(如Pick病)方面具有一定的潜在应用价值。

除了研发靶向Tau蛋白的抗体以外,以寡聚体和pTau蛋白为靶点的研究也在不断发展。Venkataraman等^[96]筛选出了只识别Tau寡聚体的三种scFv(F9T、D11C与H2A),并验证了它们可以将AD小鼠和AD患者脑组织与正常小鼠和人类脑组织区分开。Abskharon等^[97]则报告了一种能够特异性识别Tau寡聚体的M204-scFv,其可以有效抑制AD患者脑提取物中的Tau蛋白聚集,同时他们还表明该scFv本身可分为抑制播种的单体、

二聚体、三聚体形式，X射线晶体结构暗示了二聚体和三聚体可能具有更好的结合和抑制Tau寡聚体的能力。Zhang等^[98]获得一种靶向pTau蛋白的scFv，并证实通过AAV递送到小鼠脑中可以稳定表达至少22周。

本课题组以pTau蛋白为靶蛋白，利用大容量的人源噬菌体抗体库，筛选得到了一种scFv单链抗体，该抗体能特异性地抑制pTau蛋白的聚集，

促进pTau蛋白聚集体的解聚，并且能够降低pTau蛋白聚集体的细胞毒性，当其在AD模型果蝇眼睛中特异性地表达后，可以缓解hTauR406W导致的毒性，具有很好的用于治疗AD的潜在应用价值(图2)，目前正在进一步研究其作用机制，并利用多种细胞模型和AD模型小鼠验证其功能与活性^[99]。

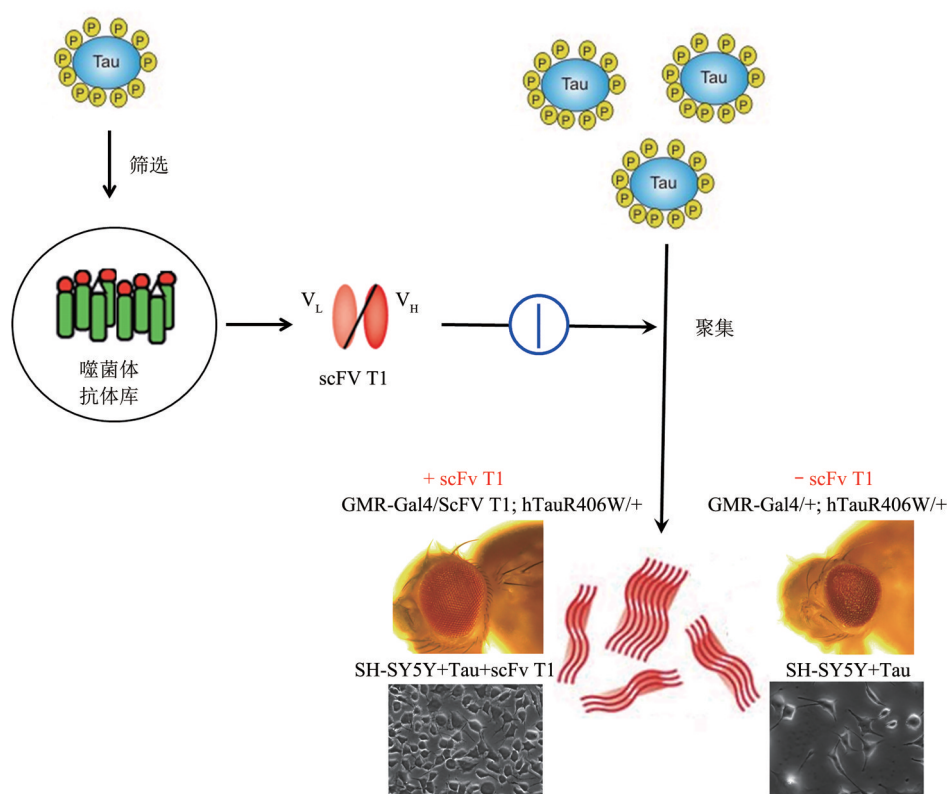


Fig. 2 Screening and application of scFv T1 inhibiting aggregation of pTau protein

图2 抑制pTau蛋白聚集的单链抗体scFv T1的筛选与应用

在抗体的递送方式上也有不同的选择，Vitale等^[100]先是选用了AAV将scFv-MC1递送至成年JNPL3小鼠海马中，scFv-MC1在皮质、海马和后脑都显著减少了可溶性、寡聚和不溶性Tau蛋白的表达水平。为了优化递送方法，他们进一步选用肌肉注射这种外周给药方式，发现肌肉注射AAV1-scFv-MC1可以持久产生抗Tau的scFv-MC1，并显著减少了大脑中的可溶性和不溶性Tau的水平，这为治疗AD以及其他神经退行性疾病提供了新的思路^[101]。除此之外，Guell-Bosch等^[102]使用先前所述的scFv-h3D6对3xTg-AD小鼠进行每月腹腔给药

治疗，在治疗期间他们采取了磁共振成像和光谱学(MRI/MRS)的手段来跨时间段监测小鼠的病情发展，这种非侵入性的方式为量化抗体的治疗效果提供了新的方法。最近的研究还显示了一项基于双特异性串联scFv(TaFv)的AD疗法，Qian等^[103]利用大肠杆菌表达系统获得了可以同时靶向A β 和p-Tau的TaFv，证实其可以与AD小鼠模型脑切片中的淀粉样斑块和神经元缠结相结合。但大多数免疫疗法对于清除胞质中的病理性Tau蛋白具有一定的局限性。最近，也有研究选用细胞内表达的抗体以期望更好地清除胞内Tau蛋白的病理形式。

Gallardo 等^[104] 基于抗 Tau scFv 开发了一种融合突变泛素的抗 Tau 嵌合胞内抗体 (intrabodies, iBs), 发现 iBs 与突变泛素的融合可以增强蛋白酶体的靶向作用, 经 AAV 递送后可以显著降低 P301S 转基因小鼠特定海马亚区病理性 Tau 的表达水平。随后, Goodwin 等^[105] 对 scFv 和 iBs 进行了功效的比较, 他们利用 pTau 蛋白和总 Tau 蛋白的特异性抗体生成特定的 scFv 和 iBs, 结果显示 pTau 特异性 iBs 和 scFv 的表达均可预防 JNPL3 小鼠中 Tau 病理的发生并延缓后肢瘫痪的进程, 但在 rTg4510 模型鼠中只有 pTau 特异性 iBs 有效减弱了病理 Tau 蛋白的积累。显然这些研究提供了一种新型的免疫治疗方法, 未来有必要进行更多的研究来优化靶向 Tau 蛋白的重组抗体片段和递送载体。

5.4 针对其他蛋白质的抗体

ALS 发病机制的关键基础也是蛋白质的错误折叠与聚集, 突变的超氧化物歧化酶 1 (SOD1) 和 TDP-43 分别是家族性和散发性 ALS 的主要致病蛋白质。单克隆抗体 D3H5 和 D3-1 都是突变蛋白 SOD1^{G93A} 的特异性抗体, 研究发现, 它们的重组 scFv 抗体具有更好的治疗效果, Patel 等^[106] 通过单次鞘内注射重组 AAV-scFvD3H5 至 SOD1^{G93A} 小鼠中, 发现 scFv D3H5 有效延迟了疾病发作的时间, 并减缓了神经胶质的增生和运动神经元的衰减。最近, Minamiyama 等^[107] 利用了少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) 作为 scFv D3-1 的药物递送载体, 发现鞘内单次注射表达 scFvD3-1 的 OPCs 可显著延迟 SOD1^{H46R} ALS 大鼠模型疾病发作并延长寿命, 这意味着使用 OPCs 作为治疗性抗体的递送载体是治疗 ALS 的一种新选择。

针对 ALS 的另一种关键蛋白 TDP-43 错误定位或错误折叠的分子表位 E246 和 D247, Tamaki 等^[108] 开发出了 TDP-43 错误折叠特异性单克隆抗体 3B12A, 随后证实了 3B12A scFv 具有双重蛋白质水解信号, 可以加速 TDP-43 聚集体的降解, 并通过子宫内电穿孔的递送方式进行给药, 发现 3B12A scFv 可以减少胚胎小鼠大脑中的 TDP-43 聚集体, 且没有出现异常的产后脑部病理和发育异常。

朊蛋白相关折叠病的标志是正常细胞表达的朊蛋白 PrP^C 转化成了病理性构象 PrP^{Sc}, 多项研究使用 scFv 靶向 PrP^{Sc}, 抑制其聚集并降低了 PrP^{Sc} 的毒性^[72]。Filesil 等^[109] 用 PC12 细胞表达抗朊病

毒的 8H4-scFv, 发现其可以抑制细胞中 PrP^{Sc} 的积累。Fujita 等^[110] 建立了稳定表达抗 -PrP 3S9 scFv 的 Ra2 小胶质细胞系, 将其注射到小鼠脑区, 发现其显著延长了小鼠的寿命, 且未观察到自身免疫反应。这些结果同时也展现了真核细胞作为 scFv 递送途径的治疗潜力。

目前针对各种折叠病相关靶蛋白抗体的筛选和研究正在积极进行, 相信在这一领域, 将会出现具有重要应用价值的治疗性生物药物, 对具有伴侣功能的抗体的研究也将产生重要的理论研究和应用价值。

参 考 文 献

- [1] Radford S E, Dobson C M. From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell*, 1999, **97**(3): 291-298
- [2] Dobson C M. Protein folding and misfolding. *Nature*, 2003, **426**(6968): 884-890
- [3] Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998, **92**(3): 351-366
- [4] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 2002, **295**(5561): 1852-1858
- [5] Laskey R A, Honda B M, Mills A D, *et al.* Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 1978, **275**(5679): 416-420
- [6] Barraclough B R, Ellis R J. Protein synthesis in chloroplasts. IX. Assembly of newly synthesised large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 1980, **608**(1): 19-31
- [7] Ellis R J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 1987, **328**(6129): 378-379
- [8] Ellis R J. The general concept of molecular chaperones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993, **339**(1289): 257-261
- [9] Quan S, Bardwell J C. Chaperone discovery. *Bioessays*, 2012, **34**(11): 973-981
- [10] Yokota S I, Hirata D, Higashiyama T, *et al.* Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins. *Cell Stress Chaperones*, 2000, **5**(4): 337-346
- [11] Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci*, 2007, **32**(3): 517-530
- [12] Wang C C, Tsou C L. Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. *FASEB J*, 1993, **7**(15): 1515-1517
- [13] Han K Y, Song J A, Ahn K Y, *et al.* Solubilization of aggregation-prone heterologous proteins by covalent fusion of stress-responsive *Escherichia coli* protein, SlyD. *Protein Eng Des Sel*, 2007, **20**(11): 543-549
- [14] Lazar S W, Kolter R. SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J Bacteriol*, 1996, **178**(6): 1770-1773

- [15] Hennecke G, Nolte J, Volkmer-Engert R, *et al.* The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition. *J Biol Chem*, 2005, **280**(25): 23540-23548
- [16] 刘照蓬, 李森. 人亲环素 18 抑制肌酸激酶的去折叠. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, **28**(7): 653-658
Liu Z, Li S. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2012, **28**(7): 653-658
- [17] Lefèvre C T, Vilorio N, Schmidt M L, *et al.* Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the Gammaproteobacteria. *ISME J*, 2012, **6**(2): 440-450
- [18] Docter B E, Horowitz S, Gray M J, *et al.* Do nucleic acids moonlight as molecular chaperones?. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(10): 4835-4845
- [19] Scott Horowitz B, James C. RNAs as chaperones. *RNA Biol*, 2016, **13**(12): 1228-1231
- [20] Choi S I, Ryu K, Seong B L. RNA-mediated chaperone type for *de novo* protein folding. *RNA Biol*, 2009, **6**(1): 21-24
- [21] Bogdanov M, Dowhan W. Phosphatidylethanolamine is required for *in vivo* function of the membrane-associated lactose permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1995, **270**(2): 732-739
- [22] Ellis R J. Do molecular chaperones have to be proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238**(3): 687-692
- [23] Schweizer M, Hindennach I, Garten W, *et al.* Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. Interaction of protein II with lipopolysaccharide. *Eur J Biochem*, 1978, **82**(1): 211-217
- [24] De Cock H, Tommassen J. Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E. coli*. *EMBO J*, 1996, **15**(20): 5567-5573
- [25] Skorko-Glonek J, Lipinska B, Krzewski K, *et al.* HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem*, 1997, **272**(14): 8974-8982
- [26] Bogdanov M, Dowhan W. Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem*, 1999, **274**(52): 36827-36830
- [27] Cortez L, Sim V. The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion*, 2014, **8**(2): 197-202
- [28] Adsi H, Levkovich S A, Haimov E, *et al.* Chemical chaperones modulate the formation of metabolite assemblies. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(17): 9172
- [29] Kumar R. Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability. *Arch Biochem Biophys*, 2009, **491**(1-2): 1-6
- [30] Uversky V N, Li J, Fink A L. Trimethylamine-N-oxide-induced folding of alpha-synuclein. *FEBS Lett*, 2001, **509**(1): 31-35
- [31] Tanaka M, Machida Y, Niu S, *et al.* Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med*, 2004, **10**(2): 148-154
- [32] Lin Z M, Li S. Effect of mixed crowding on refolding of human muscle creatine kinase. *Protein Pept Lett*, 2010, **17**(11): 1426-1435
- [33] 林智敏, 李森. 混合拥挤试剂对人肌酸激酶稳定性的影响作用研究. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2010, **46**(4): 468-473
Lin Z, Li S. *J Beijing Norm Univ Nat Sci*, 2010, **46**(4): 468-473
- [34] Wu Y, Teng N, Li S. Effects of macromolecular crowding and osmolyte on human Tau fibrillation. *Int J Biol Macromol*, 2016, **90**: 27-36
- [35] Shinde U, Inouye M. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin Cell Dev Biol*, 2000, **11**(1): 35-44
- [36] Eder J, Fersht A R. Pro-sequence-assisted protein folding. *Mol Microbiol*, 1995, **16**(4): 609-614.
- [37] Chen Y J, Inouye M. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, **18**(6): 765-770
- [38] Travers A A, Ner S S, Churchill M E. DNA chaperones: a solution to a persistence problem?. *Cell*, 1994, **77**(2): 167-169
- [39] Kim J H, Lee J M, Lee H N, *et al.* RNA-binding properties and RNA chaperone activity of human peroxiredoxin 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, **425**(4): 730-734
- [40] Michaeli D, Pinto J D, Benjamini E. Immunoenzymology of acetylcholinesterase. II. Effect of antibody on the heat denatured enzyme. *Immunochemistry*, 1969, **6**(3): 371-378
- [41] Carlson J D, Yarmush M L. Antibody assisted protein refolding. *Biotechnology (NY)*, 1992, **10**(1): 86-91
- [42] Solomon B, Schwartz F. Chaperone-like effect of monoclonal antibodies on refolding of heat-denatured carboxypeptidase A. *J Mol Recognit*, 1995, **8**(1-2): 72-76
- [43] Ermolenko D N, Zherdev A V, Dzantiev B B, *et al.* Antiperoxidase antibodies enhance refolding of horseradish peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **291**(4): 959-965
- [44] Bezsudnova E, Zherdev A V, Ermolenko D N, *et al.* Peroxidase refolding in the presence of specific antibodies. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2003, **39**(5): 509-517
- [45] Xu Q, Xie Z, Ding J, *et al.* Monoclonal antibodies assisting refolding of firefly luciferase. *Protein Sci*, 2004, **13**(7): 1851-1858
- [46] Julia A. Grigorieva M B D A. Antibodies to the nonnative forms of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: identification, purification, and influence on the renaturation of the enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **369**(2): 252-260
- [47] Morris G E, Frost L C, Newport P A, *et al.* Monoclonal antibody studies of creatine kinase. Antibody-binding sites in the N-terminal region of creatine kinase and effects of antibody on enzyme refolding. *Biochem J*, 1987, **248**(1): 53-59
- [48] Ermolenko D N, Zherdev A V, Dzantiev B B. Antibodies as specific chaperones. *Biochemistry (Mosc)*, 2004, **69**(11): 1233-1238
- [49] Peretz D, Williamson R A, Kaneko K, *et al.* Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 2001, **412**(6848): 739-743
- [50] White A R, Enever P, Tayebi M, *et al.* Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature*, 2003, **422**(6927): 80-83
- [51] Kholodenko R V, Kalinsky D V, Doronin I I, *et al.* Antibody fragments as potential biopharmaceuticals for cancer therapy: success and limitations. *Curr Med Chem*, 2019, **26**(3): 396-426
- [52] Huston J S, McCartney J, Tai M S, *et al.* Medical applications of

- single-chain antibodies. *Int Rev Immunol*, 1993, **10**(2-3): 195-217
- [53] Verma R, Boleti E, George A J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Methods*, 1998, **216**(1-2): 165-181
- [54] Ahmad Z A, Yeap S K, Ali A M, *et al.* scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*, 2012, **2012**: 980250
- [55] Griffiths A D, Duncan A R. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**(1): 102-108
- [56] Jaroszewicz W, Morcinek-Orlowska J, Pierzynowska K, *et al.* Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, **46**(2): fuab052
- [57] Weisser N E, Hall J C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**(4): 502-520
- [58] Kunamneni A, Ogaugwu C, Bradfute S, *et al.* Ribosome display technology: applications in disease diagnosis and control. *Antibodies (Basel)*, 2020, **9**(3):28
- [59] Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A, *et al.* Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(12): 1287-1292
- [60] Groves M A, Nickson A A. Affinity maturation of phage display antibody populations using ribosome display. *Methods Mol Biol*, 2012, **805**:163-190
- [61] Bowley D R, Labrijn A F, Zwick M B, *et al.* Antigen selection from an HIV-1 immune antibody library displayed on yeast yields many novel antibodies compared to selection from the same library displayed on phage. *Protein Eng Des Sel*, 2007, **20**(2): 81-90
- [62] Daugherty P S, Chen G, Olsen M J, *et al.* Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng*, 1998, **11**(9): 825-832
- [63] Du C, Chan W C, McKeithan T W, *et al.* Surface display of recombinant proteins on bacillus thuringiensis spores. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **3337**(71): 41
- [64] Li S, Sun C, Teng N, *et al.* Chaperone-like effects of a scFv antibody on the folding of human muscle creatine kinase. *Protein Eng Des Sel*, 2013, **26**(8): 523-531
- [65] Feng J, Guo H, Li S, *et al.* A study of the mechanism of the chaperone-like function of an scFv of human creatine kinase by computer simulation. *PLoS One*, 2013, **8**(4): e62147
- [66] Liu T, Sun C, Li C, *et al.* Designing an antibody-based chaperoning system through programming the binding and release of the folding intermediate. *ACS Chem Biol*, 2016, **11**(4): 1090-1097
- [67] Chang P, Li X, Lin J, *et al.* scFv-oligopeptide chaperoning system-assisted on-column refolding and purification of human muscle creatine kinase from inclusion bodies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, **1209**: 123410
- [68] Mehra S, Sahay S, Maji S K. Alpha-synuclein misfolding and aggregation: implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2019, **1867**(10): 890-908
- [69] Gulisano W, Maugeri D, Baltrons M A, *et al.* Role of amyloid-beta and tau proteins in Alzheimer's disease: confuting the amyloid cascade. *J Alzheimers Dis*, 2019, **68**(1): 415
- [70] Blokhuis A M, Groen E J, Koppers M, *et al.* Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 2013, **125**(6): 777-794
- [71] Ghadge G D, Pavlovic J D, Koduvayur S P, *et al.* Single chain variable fragment antibodies block aggregation and toxicity induced by familial ALS-linked mutant forms of SOD1. *Neurobiol Dis*, 2013, **56**: 74-78
- [72] Huang L, Su X, Federoff H J. Single-chain fragment variable passive immunotherapies for neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*, 2013, **14**(9): 19109-19127
- [73] De Lau L M, Breteler M M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2006, **5**(6): 525-535
- [74] Outeiro T F, Putcha P, Tetzlaff J E, *et al.* Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS One*, 2008, **3**(4): e1867
- [75] Du X Y, Xie X X, Liu R T. The role of alpha-synuclein oligomers in Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(22):8645
- [76] Lynch S M, Zhou C, Messer A. An scFv intrabody against the nonamyloid component of alpha-synuclein reduces intracellular aggregation and toxicity. *J Mol Biol*, 2008, **377**(1): 136-147
- [77] Zhou C, Emadi S, Sierks M R, *et al.* A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Mol Ther*, 2004, **10**(6): 1023-1031
- [78] Emadi S, Barkhordarian H, Wang M S, *et al.* Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity. *J Mol Biol*, 2007, **368**(4): 1132-1144
- [79] Vaikath N N, Majbour N K, Paleologou K E, *et al.* Generation and characterization of novel conformation-specific monoclonal antibodies for alpha-synuclein pathology. *Neurobiol Dis*, 2015, **79**: 81-99
- [80] 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**(3): 579-584
- [81] Zhang X, Sun X X, Xue D, *et al.* Conformation-dependent scFv antibodies specifically recognize the oligomers assembled from various amyloids and show colocalization of amyloid fibrils with oligomers in patients with amyloidoses. *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1814**(12): 1703-1712
- [82] Zhao M, Wang S W, Wang Y J, *et al.* Pan-amyloid oligomer specific scFv antibody attenuates memory deficits and brain amyloid burden in mice with Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2014, **11**(1): 69-78
- [83] Gupta V, Salim S, Hmila I, *et al.* Fibrillar form of alpha-synuclein-specific scFv antibody inhibits alpha-synuclein seeds induced aggregation and toxicity. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 8137
- [84] 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**(3): 199-208
- [85] 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**(4): 917-928
- [86] Fukuchi K, Tahara K, Kim H D, *et al.* Anti-Aβeta single-chain antibody delivery *via* adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 2006, **23**(3): 502-511
- [87] Ryan D A, Mastrangelo M A, Narrow W C, *et al.* Aβeta-directed single-chain antibody delivery *via* a serotype-1 AAV vector improves learning behavior and pathology in Alzheimer's disease mice. *Mol Ther*, 2010, **18**(8): 1471-1481
- [88] Levites Y, Jansen K, Smithson L A, *et al.* Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid βeta, amyloid βeta40, and amyloid βeta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice. *J Neurosci*, 2006, **26**(46): 11923-11928
- [89] Roda A R, Montoliu-Gaya L, Serra-Mir G, *et al.* Both amyloid-beta peptide and Tau protein are affected by an anti-amyloid-beta antibody fragment in elderly 3xTg-AD mice. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(18): 6630
- [90] Wang Y J, Gao C Y, Yang M, *et al.* Intramuscular delivery of a single chain antibody gene prevents brain Aβ deposition and cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*, 2010, **24**(8): 1281-1293
- [91] Yanamandra K, Kfoury N, Jiang H, *et al.* Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding *in vitro* markedly decrease pathology and improve cognition *in vivo*. *Neuron*, 2013, **80**(2): 402-414
- [92] Ising C, Gallardo G, Leyns C E G, *et al.* AAV-mediated expression of anti-tau scFvs decreases tau accumulation in a mouse model of tauopathy. *J Exp Med*, 2017, **214**(5): 1227-1238
- [93] Krishnaswamy S, Huang H W, Marchal I S, *et al.* Neuronally expressed anti-tau scFv prevents tauopathy-induced phenotypes in drosophila models. *Neurobiol Dis*, 2020, **137**: 104770
- [94] Goedert M. Tau filaments in neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 2018, **592**(14): 2383-2391
- [95] Spencer B, Bruschweiler S, Sealey-Cardona M, *et al.* Selective targeting of 3 repeat Tau with brain penetrating single chain antibodies for the treatment of neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol*, 2018, **136**(1): 69-87
- [96] Venkataraman L, He P, Khan G, *et al.* Isolation and characterization of antibody fragments selective for human FTD brain derived TDP-43 variants. *BMC Neurosci*, 2020, **21**(1): 36
- [97] Abskharon R, Seidler P M, Sawaya M R, *et al.* Crystal structure of a conformational antibody that binds tau oligomers and inhibits pathological seeding by extracts from donors with Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 2020, **295**(31): 10662-10676
- [98] Zhang Y, Qian L, Kuang Y, *et al.* An adeno-associated virus-mediated immunotherapy for Alzheimer's disease. *Mol Immunol*, 2022, **144**: 26-34
- [99] Li S, Yi Y, Cui K, *et al.* A single-chain variable fragment antibody inhibits aggregation of phosphorylated tau and ameliorates tau toxicity *in vitro* and *in vivo*. *J Alzheimers Dis*, 2021, **79**(4): 1613-1629
- [100] Vitale F, Giliberto L, Ruiz S, *et al.* Anti-tau conformational scFv MC1 antibody efficiently reduces pathological tau species in adult JNPL3 mice. *Acta Neuropathol Commun*, 2018, **6**(1): 82
- [101] Vitale F, Ortolan J, Volpe B T, *et al.* Intramuscular injection of vectorized-scFvMC1 reduces pathological tau in two different tau transgenic models. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, **8**(1): 126
- [102] Guell-Bosch J, Lope-Piedrafita S, Esquerda-Canals G, *et al.* Progression of Alzheimer's disease and effect of scFv-h3D6 immunotherapy in the 3xTg-AD mouse model: an *in vivo* longitudinal study using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *NMR Biomed*, 2020, **33**(5): e4263
- [103] Qian L, Bian W J, Wang D Q, *et al.* Adeno-associated virus-mediated immunotherapy based on bispecific tandem scFv for Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis*, 2023. doi: 10.3233/JAD-221088
- [104] Gallardo G, Wong C H, Ricardez S M, *et al.* Targeting tauopathy with engineered tau-degrading intrabodies. *Mol Neurodegener*, 2019, **14**(1): 38
- [105] Goodwin M S, Sinyavskaya O, Burg F, *et al.* Anti-tau scFvs targeted to the cytoplasm or secretory pathway variably modify pathology and neurodegenerative phenotypes. *Mol Ther*, 2021, **29**(2): 859-872
- [106] Patel P, Kriz J, Gravel M, *et al.* Adeno-associated virus-mediated delivery of a recombinant single-chain antibody against misfolded superoxide dismutase for treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Ther*, 2014, **22**(3): 498-510
- [107] Minamiyama S, Sakai M, Yamaguchi Y, *et al.* Efficacy of oligodendrocyte precursor cells as delivery vehicles for single-chain variable fragment to misfolded SOD1 in ALS rat model. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, **28**: 312-329
- [108] Tamaki Y, Shodai A, Morimura T, *et al.* Elimination of TDP-43 inclusions linked to amyotrophic lateral sclerosis by a misfolding-specific intrabody with dual proteolytic signals. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 6030
- [109] Filesi I, Cardinale A, Mattei S, *et al.* Selective re-routing of prion protein to proteasomes and alteration of its vesicular secretion prevent PrP(Sc) formation. *J Neurochem*, 2007, **101**(6): 1516-1526
- [110] Fujita K, Yamaguchi Y, Mori T, *et al.* Effects of a brain-engraftable microglial cell line expressing anti-prion scFv antibodies on survival times of mice infected with scrapie prions. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, **31**(7): 999-1008

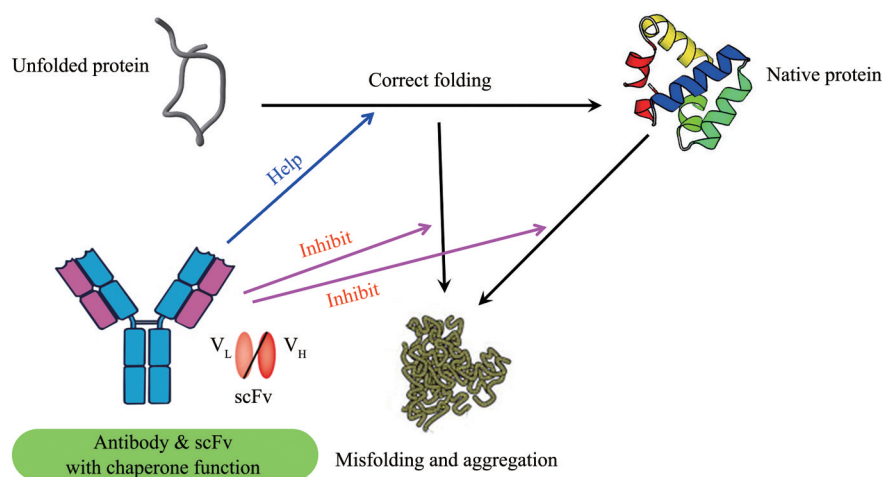
Antibodies With Chaperone Function*

LIN Jing-Ye¹⁾, LI Sen^{1,2)**}

(¹⁾College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

²⁾National Demonstration Center for Experimental Life Sciences & Biotechnology Education, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Graphical abstract



Abstract The problem of protein folding has been one of the frontiers of biological research. Disruption of proteostasis is closely related to ageing and the pathogenesis of many neurodegenerative diseases. The correct folding of proteins and proteostasis largely depend on the complex network including molecular chaperones. Many studies have shown that antibodies can act as molecular chaperones to promote proper protein folding and prevent abnormal protein aggregation. The strict substrate specificity gives them the potential to be used to treat specific protein-misfolding diseases and to help refolding of inclusion bodies. This paper briefly introduces the progress of research on molecular chaperones, elaborates the research progress of antibodies and single-chain fragment variable antibodies with chaperone function, and discusses on the recent research status of antibodies which can inhibit protein aggregation.

Key words protein folding, molecular chaperones, antibodies, neurodegenerative diseases

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0138

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30800188, 31570756, 32071222) and the Special Funds for Coconstruction Project of Beijing Municipal Commission of Education.

** Corresponding author.

Tel: 86-10-58802765, E-mail: lisen@bnu.edu.cn

Received: April 10, 2023 Accepted: April 17, 2023