

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738 (2006) 02 - 0193 - 04

人源化抗人肺癌单域抗体基因的构建、表达及活性分析

王阶平¹, 庄国洪², 杨桂旺¹, 王臻¹, 李文珠¹, 谢莲英¹, 颜江华^{2*}(厦门大学: ¹生命科学学院, ²医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

Gene's construction, expression and activity analysis of humanized single-domain antibody against human lung cancer

WANG Jie-ping¹, ZHUANG Guo-hong², YANG Gui-wang¹, WANG Zhen¹, LI Wen-zhu¹, XIE Lian-ying¹, YAN Jiang-hua^{2*}¹School of Life Science, Xiamen University; ²Cancer Research Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] **AM:** To construct the gene of humanized single-domain antibody hu3D3V_H against human lung cancer, to express it in *E. coli* and analyze its activity. **METHODS:** The mAb3D3V_H was humanized by using CDRs grafting technique. The hu3D3V_H gene was assembled by overlapping PCR. The expression vector pET22(b+) / hu3D3V_H was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and the hu3D3V_H protein was expressed under IPTG induction. After purification by Ni²⁺-affinity chromatographic column, the activity of hu3D3V_H protein was analyzed by indirect ELISA and competitive inhibition ELISA. **RESULTS:** The target gene with correct sequence was obtained by overlapping PCR. The hu3D3V_H protein was expressed as inclusion bodies with the yield of more than 30% of total bacterial proteins. After purification, the purity of hu3D3V_H was more than 95%. The reactivity of purified protein was the same as parent antibody, and could inhibit the binding of mAb3D3 to L342 cells. **CONCLUSION:** The hu3D3V_H still retains the reactivity and specificity of mAb3D3, which lays the foundation for its further clinical application.

[Keywords] humanization; single-domain antibody against human lung cancer; expression; activity analysis

[摘要] 目的: 构建人源化的抗人肺癌单域抗体 hu3D3V_H 基因, 在大肠杆菌中表达, 对其蛋白活性进行分析。方法: 采用 CDR 移植技术对 mAb3D3 的重链可变区进行人源化, 通过重叠 PCR 获得 hu3D3V_H 的基因。构建 pET22(b+) / hu3D3V_H 表达载体, 并转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 IPTG 诱导下表达。表达产物通过 Ni 亲和层析柱纯化。采用间接 ELISA 和竞争抑制 ELISA 法进行活性分析。结果: 通过重叠 PCR 获得序列正确的目的基因。目的蛋白以包涵体的形式表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。纯化后, 目的蛋白的纯度达 95% 以上。hu3D3V_H 具有与亲本抗体相同的抗原反应性, 并能抑制 mAb3D3 与 L342 细胞的结合。结论: 获得的人源化单域抗体 hu3D3V_H, 保留了与 mAb3D3 相同的反应性和特异性, 为进一步临床应用奠定了基础。

[关键词] 人源化; 抗人肺癌单域抗体; 表达; 活性分析

[中图分类号] Q342, Q786 **[文献标识码]** A

本室制备的鼠源抗人肺癌的单克隆抗体 (mAb) 3D3, 在一系列体内外研究中, 显示出其具有较理想的临床应用前景^[1-3]。免疫组化实验证实, mAb3D3 主要与人肺腺癌、鳞癌起反应; 与人肺巨细胞癌也有反应, 其靶抗原为细胞膜糖蛋白, 可内化入细胞。动物实验证实, mAb3D3-ADM 等有较好的靶向治疗效果; 放免实验显示, ¹³¹I-m3D3 的肿瘤/肺组织同位素放射性比大于 7 1、^{99m}Tc-m3D3 与人肺鳞癌和肺腺癌的结合率分别 69% 和 60%, 与肺泡癌的结合率为 38%。mAb 3D3 重链单域抗体的基因工程产品已建立^[4]。但鼠源性 mAb 存在 3 大缺点限制其临床应用^[5]: 即完整抗体的分子大, 不易穿透实体瘤; Fc 段的存在可使其与体内具有 Fc 受体的非特异组织和细胞结合, 影响其靶向效果; 在人体内反复使用可产生人抗鼠抗体 (HAMA) 反应。为了克服上述弊端, 推进 mAb 3D3 的临床应用, 本实验中采用 CDR 移植技术和基因工程技术, 制备了人源化的重链单域抗体 hu3D3V_H。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株及质粒 pET22(b+), 均购自 Novagen 公司。MGC-803 (人胃癌细胞株)、A549 和

收稿日期: 2005 - 09 - 26; 修回日期: 2005 - 10 - 31

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (No. C0410004)

作者简介: 王阶平 (1973 -), 男, 湖北黄梅人, 硕士生。

* Corresponding author, Tel: (0592) 2186980

Email: jhyan@xmu.edu.cn

L342(人肺腺癌细胞株)、95D(人肺巨细胞癌细胞株),均由本室保存。mAb3D3由本室制备。引物由上海生工公司合成。限制性内切酶、T4连接酶及 *Pfu* 酶为 NEB 公司产品。质粒提取及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。Ni²⁺-HiTrap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。鼠抗 6xHis mAb 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自上海生工公司。

1.2 方法

1.2.1 单域抗体 hu3D3V_H 的人源化设计 参照文献 [6, 7] 设计, V 区氨基酸的编号及互补决定区 (CDR) 根据 Kabat 系统确定, 按最适匹配 (best fit) 策略选择人源骨架区 (FR) 模板 (运用 NCBI 的 BLAST 和 GenBank 的 FASTA 程序)。参考 "Humanization by design" (<http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>), 将 mAb3D3 的 CDR 移植到人源模板的相应区域, 并对 FR 区的重要氨基酸残基进行调整, 得到 hu3D3V_H 的氨基酸序列。

1.2.2 单域抗体 hu3D3V_H 基因的构建 根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则, 将 hu3D3V_H 的氨基酸序列转换成核苷酸序列。将其分成以下 6 个长引物片段分别合成: F1 CAGGTGCAACTTCAGGAA TCTGGCGCCGAAGTGGTTCTTCTGGTGCA TCTG; F2 TTCGCTCTGGTGCCTCTGTGAAGCTGAGCTGCA ACCACCA GCGGCTTTAA TATTAA TGA TACT TATTATCA TTGGGTGAAACAGCG; F3 TCA TTGGGTGAAACAGCGCCCGGAACA GGGTCTGGAA TGGA TTGGCCGCA TTGA TCCGCGCAATGCCAACACCAACTACGACCAAG; R1 AGAGCTCACGGTCA CGGTAGTG CCCTGGCCCCA GCAA TCAAACA GGGCGGTG; R2 CAA TCAAACA GGGCGGTGTA TCCCA GCGCGCGCAA TAA TACA CGGCA GTA TCTTCA GAGGTCA GGCTA GACA GCTGCA GA TACG; R3 TAGACA GCTGCA GA TACGCGGTA TTA GAA GA GGTA TCGCGG TCA TGGTGGCCTTA TCTTTAAA TTCTGGTTCGTA GTTGGTGT, 经重叠 PCR 拼接得到 hu3D3V_H 基因。利用引物 hu3D3V_HF: CTA GCCA TGGAACA GGTGCAACTTCA G 和 hu3D3V_HR: TATA CTCGAGGCTAGACACGGTAC, 扩增 hu3D3V_H 基因并引入 *Nco* 和 *Xho* 酶切位点。

1.2.3 hu3D3V_H 表达载体的构建、表达及纯化 (1) 表达载体的构建: PCR 扩增产物及质粒分别用 *Nco* 和 *Xho* I 消化, 胶分离纯化和回收。在 T4 DNA 连接酶催化下, 将 hu3D3V_H 基因克隆至质粒 pET22 (b+) 中, 构建成重组质粒 pET22 (b+) /hu3D3V_H, 并转化 *E. coli* BL21 (DE3)。对重组子进行菌液 PCR 鉴定, 阳性克隆送上海博亚公司测序。(2) 表达和纯化: 挑取含测序正确的重组质粒 pET22/hu3D3V_H 的 *E. coli* BL21 (DE3) 单菌落, 于 37 振荡培养过夜。按 1:100 稀释加入到 2-YT 培养液中, 于 37 振荡培养至 A₆₀₀ 值约为 0.5 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5 h。目的蛋白的纯化参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的 Ni 亲和层析柱蛋白纯化操作手册进行。采用透析法复性后, 用 120 g/L 的 SDS-PAGE 及 B D-RAD 凝胶成像系统 (Quantity One-4.6) 分析表达量与纯度。

1.2.4 活性分析 (1) 细胞培养: 取对数生长期的 MGC-803、95-D、A549 和 L342 细胞, 接种于 96 孔细胞培养板中 (2 × 10⁴ 个细胞/孔)。待贴满底壁, 用甲醇固定后, 于 4 保存, 作为抗体活性分析的抗原用。(2) 抗原反应活性及特异性分析: 间接 ELISA: 将上述处理的 4 种细胞培养板经封闭后, 分别加入倍比稀释的单域抗体 (100 ~ 3.125 mg/L), 阳性对照加完整抗体 (4 mg/L), 阴性对照加空载体表达产物, 于 4 过夜。加入鼠抗 6xHis mAb (阳性孔不加), 于 37 温育 1 h; 再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 于 37 温育 30 min。以 TMD 显色后, 加 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 A₄₀₅ 值。每步骤间用 PBST 洗 5 次, 每次 3 min。竞争抑制实验: 上述处理的包被有 L342 细胞的培养板, 经含 100 mL/L 羊血清的 PBS 封闭后, 先加入倍比稀释的单域抗体 (浓度同上), 于 37 温育 30 min, 再加入完整抗体 (4 mg/L), 阳性对照只加完整抗体, 阴性对照加空载体表达产物, 于 37 温育 1 h; 最后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 于 37 温育 30 min。以 TMD 显色后, 加 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。测定 A₄₀₅ 值, 计算竞争抑制率。
竞争抑制率 = (1 - A₄₀₅ 样本 / A₄₀₅ 阳性对照) × 100%。

2 结果

2.1 单域抗体 hu3D3V_H 的人源化设计 从人抗体基因库中搜寻到的与 mAb3D3V_H 的同源性为 66% ~ 73% 的人源抗体模板有 8 条, 其中 Pab421V_H^[10] 的同源性为 73%, 且 FR 区的同源性最高, 故被选作模板。以此模板构建的人源化单域抗体 hu3D3V_H 的氨基酸序列为: QVQLQESGAE LVRSGASVKL SCTTS GFN NDTYHWV KQRPEQGLEW IGR DPANANTNYDQKFKD KA TM TAD TSSN TA YLQL SSL TSED TAV YYCA RWD TTALFDCW QGGTIV TVSS。其中划线部分为 CDR 区, 斜体字部分为所调整的 FR 区氨基酸残基: 39 位 (V 区氨基酸的编号, 下同) 和 93 位回变为鼠源残基 Q 和 A (链间包埋残基); 1~4 位补加入抗体 VH1 亚类基因的前 4 个氨基酸 QVQL (人源抗体模板在这些位点缺少残基); 94 位插入鼠源残基 R (人源抗体模板在该位点缺少残基)。

2.2 单域抗体 hu3D3V_H 基因的构建 经重叠 PCR 将 6 个长引物片段拼接成完整的 hu3D3V_H 基因序列。第 1 步 PCR: F3 + R3 生成产物; 第 2 步 PCR 反应: F2 + R2 + 生成产物; 第 3 步 PCR 反应: F1 + R1 + 生成产物。反应条件均为: 95 预变性 2 min; 95 变性 30 s, 55 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环数 5; 95 变性 30 s, 72 退火并延伸 1.5 min, 循环数 25; 72 延伸 5 min。最后以 hu3D3V_HF 和 hu3D3V_HR 为引物, 以产物为模板, 扩增 hu3D3V_H 基因。图 1 的 2~5 泳道中, 分别可见 376 bp、354 bp、286 bp 和 152 bp 左右的产物带, 均与理论计算的片段的大小相一致。

2.3 重组质粒的鉴定 重组子先用载体 pET22 的通用引物 T7 promoter 和 T7 terminator 进行菌液 PCR 初筛。阳性克隆的

PCR产物,再用 hu3D3V_HF和 hu3D3V_HR进行 PCR鉴定。两次均为阳性的克隆送上海博亚公司测序,即获得一正确序列的重组子。

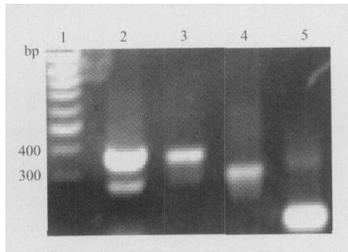


图 1 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products

1: DNA marker; 2: Amplified hu3D3V_H; 3: Product ; 4: Product ; 5: Product .

2.4 单域抗体在大肠杆菌中的表达及纯化 含重组质粒 pET22/hu3D3V_H的 *E. coli* BL21 (DE3)经 IPTG诱导后,目的蛋白主要以包涵体的形式表达,表达量占菌体总蛋白的 30%以上。包涵体经尿素洗涤和溶解后,通过 Ni亲和层析柱纯化。图 2所示,在相对分子质量 (M_r) 14 400附近有一特异条带,符合目的蛋白的理论推算 (M_r 约为 14 800),其纯度达 95%以上 (Quantity One-4 6)。

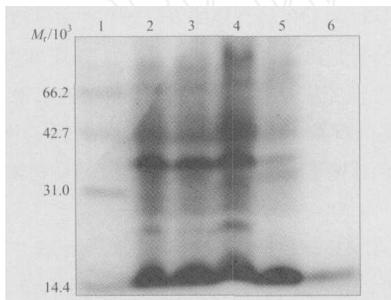


图 2 hu3D3V_H表达及纯化产物的 SDS-PAGE分析

Fig 2 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of hu3D3V_H protein

1: Protein marker; 2: Cell extract without IPTG induction; 3: Cell extract with IPTG induction; 4, 5: Supernatant and precipitate after ultrasonication, respectively; 6: Purified protein

2.5 hu3D3V_H的活性分析 hu3D3V_H是以 C末端融合 6 × His tag的形式表达,因此,可利用鼠抗 6 ×His mAb检测与细胞抗原结合的 hu3D3V_H。间接 ELISA表明,纯化后的单域抗体 hu3D3V_H与人肺腺癌细胞 L342有较强的反应性,与人肺腺癌细胞 A549和人肺巨细胞癌细胞 95-D也有反应,与人胃癌细胞 MGC-803不起反应。其中 hu3D3V_H与人肺腺癌细胞 L342反应孔的 A_{405} 值为 0.359 ~ 0.673,阴性对照为 0.103,阳性对照为 1.025,待测值高于阴性对照 3.5倍以上 (图 3)。竞争抑制试验表明,单域抗体 hu3D3V_H可抑制 mAb3D3与 L342细胞的结合,其抑制率达 43.25% ~ 18.74% (图 4)。

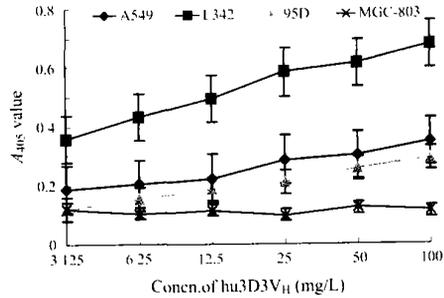


图 3 hu3D3V_H与不同细胞株的反应性

Fig 3 The reactivities of hu3D3V_H to different cell lines

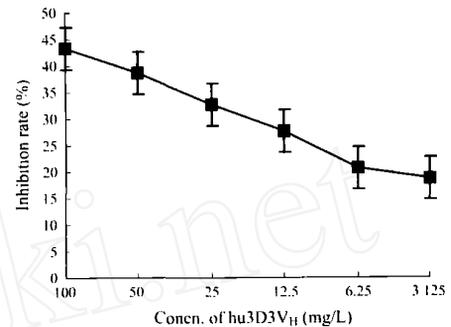


图 4 hu3D3V_H对 mAb3D3与细胞膜抗原结合的竞争抑制

Fig 4 Competitive inhibition of hu3D3V_H on binding of mAb3D3 to the membrane antigen on L342 cells

3 讨论

肺癌是发病率和病死率增长最快、对人类健康和生命威胁最大的肿瘤之一。除传统三大治疗手段外,以 mAb为载体,荷载放射性核素、细胞因子或毒素蛋白等的靶向治疗为肺癌的诊治开辟了又一途径。本室制备的 mAb3D3具有较好的选择性、亲和力等特点,有望成为一种分子靶向治疗的良好载体^[1-4]。为了克服鼠源 mAb在临床应用中的弊端,我们采用 CDR移植并结合对 FR区重要氨基酸残基进行调整的策略,对 mAb3D3V_H进行了人源化改造。从人抗体基因库中搜寻到的人源抗体模板与 mAb3D3V_H的同源性最高为 73%,比一般报道的同源性低^[7],这可能与 mAb3D3V_H的氨基酸序列是少见序列有关。但活性分析显示,使用同源性为 73%的人源抗体模板构建的人源化单域抗体 hu3D3V_H,与人肺腺癌细胞 L342有较强的结合反应性,与人肺腺癌细胞 A549和人肺巨细胞癌细胞 95-D也有结合反应,而与人胃癌细胞 MGC-803不起反应,其抗原反应性与亲本 mAb3D3相一致^[11]。同时, hu3D3V_H能显著抑制亲本 mAb3D3与靶抗原的结合,其抑制

(下转 199页)

基因引物^[3, 4], 构建了库容量一般 (1.2×10^7 CFU) 但重组率与多样性均较好的一个人鼠杂合 Fab 抗体库, 仅通过一个循环的快速导向筛选, 便成功得到抗 α -sm 的特异性人源化轻链。这提示, 如将库构建的重点放在提高基因重组率与多样性上可能更有利于高效筛选。

以往有报道称 pComb3 载体构建的 Fab 噬菌体抗体库存在目的基因的重组丢失现象, 利用 pComb3X 作为展示载体并在 30 条件下进行培养可缓解此现象^[6, 7]。从本实验看来, 这种缓解似乎只是部分的。另外, 随着筛选强度增加出现的基因丢失现象, 也可能与筛选用抗原的包被浓度有关。我们分析, 抗原包被浓度降低过快会产生过大的筛选压力。虽然强的筛选压力会使特异性克隆得到了有效富集, 但由于每轮洗脱出的结合克隆实际是由特异结合克隆和非特异性吸附的噬菌体两部分组成的, 所以强的筛选压力可能会使这种特异性克隆的富集程度要小于无效克隆的富集, 此时出现基因重组率下降也就可以理解了。当然, 具体原因还须下一步筛选人源化重链时比较抗原浓度降低与不降低来进一步验证。

本实验中通过构建多样性好的人鼠杂合的噬菌体 Fab 抗体库, 以鼠源抗 α -sm 抗体重链 Fd 片段为

模板, 成功导向筛选到特异性抗 α -sm 的人源化 Lc 基因, 为进一步获得全人源化 Fab 抗体提供了良好的条件。

参考文献:

- [1] 郝晓柯, 张盈华, 舒博学, 等. 前列腺癌放射免疫治疗的实验研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 1998, 19(10): 609 - 612
- [2] 杨洁, 郝晓柯, 张盈华, 等. 抗人精浆蛋白单抗重链 Fd 段基因的克隆及其在 HeLa 细胞的表达 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(17): 1551 - 1554
- [3] 包国强, 马庆久, 邢金良, 等. 人源噬菌体 Fab 抗体库构建过程中引物的优化和初步鉴定 [J]. 免疫学杂志, 2004, 20(3): 220 - 223
- [4] 包国强, 马庆久, 邢金良, 等. 用导向选择链更替技术建立抗肝癌抗原 HAbl8G 的人源性 Fab 基因库 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(4): 437 - 440
- [5] Beiboer SH, Reurs A, Roovers RC, et al. Guided selection of a pan carcinoma specific antibody reveals similar binding characteristics yet structural divergence between the original murine antibody and its human equivalent [J]. *J Mol Biol*, 2000, 296(3): 833 - 849
- [6] 张思河. HAbl8G/CD147 免疫噬菌体抗体库的构建及筛选 [D]. 西安: 第四军医大学研究生院, 2004, 82 - 86
- [7] Soltes G, Barker H, Mamai K, et al. A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 274(1 - 2): 233 - 244

(上接 195 页)

率高达 43%, 与同类报道相似^[5]。这些结果证明, hu3D3V_H 保留了亲本 mA b3D3 的抗原反应性和特异性, 人源化达到了预期目的。单域抗体分子小, 且能较好地保留完整抗体的抗原反应性和特异性, 在制备和应用上具有自身优点。尽管单域抗体存在亲和力比完整抗体低的缺点, 但通过构建单域抗体与人 p53 四价功能域或与 Vero 细胞毒素蛋白的 B 亚基 (VT1B) 的融合蛋白, 可获得单域抗体的同源四聚体或五聚体而显著提高单域抗体的亲和力, 为制备高亲和力的小分子抗体提供了新的途径^[9, 10]。本实验中成功地制备了人源化的抗人肺癌单域抗体 hu3D3V_H, 为其进一步分子改造及研制新型的肺癌细胞靶向药物奠定了基础。

参考文献:

- [1] 颜江华, 杨善民, 孙亚敏, 等. 抗人肺癌单克隆抗体 (3D3) 的研制及其特性鉴定 [J]. 单克隆抗体通讯, 1992, 8(3): 22 - 24
- [2] 颜江华, 杨善民, 郑耘, 等. ¹³¹I 标记抗人肺癌单克隆抗体 3D3 对裸鼠载瘤肺癌的放射免疫显像研究 [J]. 北京实验动物科学,

1993, 10(4): 15 - 17.

- [3] 颜江华, 苏金华, 郑耘, 等. 阿霉素与肺癌单克隆抗体交联物的制备及其生物活性 [J]. 厦门大学学报 (自然科学), 1995, 34(1): 116 - 120
- [4] 史依仁, 郭先健, 颜江华. 单克隆抗体 3D3 重链可变区基因结构分析 [J]. 中国免疫学杂志, 1999, 15: 264
- [5] 刘广芝, 冯捷, 周萍, 等. 抗人卵巢癌单域抗体 V_H 基因的克隆、表达及放射免疫显像 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(3): 350 - 355
- [6] Martin ACR. Accessing the kabat antibody sequence database by computer [J]. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 1996, 25: 130 - 133
- [7] Son JH, Lee UH, Lee JJ, et al. Humanization of agonistic anti-human 4-1BB monoclonal antibody using a phage-displayed combinatorial library [J]. *J Immunol Meth*, 2004, 286: 187 - 201
- [8] Jannot CB, Hynes NE. Characterization of scFv-421, a single-chain antibody targeted to p53 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 230(2): 242 - 246
- [9] 武国军, 白玉洁, 王栋, 等. 抗人 CD3 单链抗体 /p53 四聚功能域融合基因的构建及表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(5): 560 - 567
- [10] Zhang JB, Li QG, Nguyen TD, et al. A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents [J]. *J Mol Biol*, 2004, 341: 161 - 169