

抗人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗 E10 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体的构建和表达^{*}

王 臣¹, 侯利华², 张彦明¹, 李建民², 廖振林²,
杜桂鑫², 陈 薇², 童贻刚²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 军事医学科学院 微生物流行病研究所, 北京 100071)

[摘 要] 为构建抗人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗 E10 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体表达载体, 并在噬菌体表面表达, 采用 PCR 方法从整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗 E10ScFv 载体中, 扩增重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L 基因。将 V_H 基因与人重链恒定区 C_H1 基因连接, V_L 基因与人 C_K 基因连接, 分别构建了鼠/人嵌合重链 FD 基因和轻链基因, 将其克隆入 pComb3, 构建了鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体表达载体, 用辅助噬菌体 VCSM 13 超感染, 间接 ELISA 及竞争抑制 ELISA 检测鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体活性。结果成功构建了鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体表达载体, 并在噬菌体表面展示了可结合人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗原的鼠/人嵌合 Fab 抗体。

[关键词] 整合素 $\alpha_v\beta_3$; 嵌合抗体; 噬菌体展示

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)05-0009-05

肿瘤的生长、复发和转移均与血管形成密切相关。Folkman^[1,2]提出, 可通过抑制肿瘤血管生成来限制其氧气和养分的供给, 从而抑制肿瘤的生长, 这为肿瘤的治疗提供了新的策略。当前研究肿瘤血管导向治疗和肿瘤血管靶标分子已成为国内外的研究热点。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是细胞粘附分子超家族成员, 由于其在肿瘤血管生成和肿瘤转移上的作用, 近年来备受重视。本室获得的抗人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 杂交瘤细胞株 E10, 具有很好的中和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 而促进肿瘤血管生成的活性, 在体内、体外试验均能有效地抑制肿瘤的生长, 显示了其临床治疗肿瘤的良好前景。但目前由于鼠单抗应用于人体易产生人抗鼠(HAMA)反应, 故严重限制了其在临床上的应用。而鼠/人嵌合抗体保留了原鼠单抗的高亲和力, 其恒定区为人的免疫球蛋白 G(IgG), 使其在人体的 HAMA 反应大大降低, 可以满足临床应用的需要, 显著提高了鼠单抗在临床治疗中的应用价值。为此, 本室构建了鼠/人嵌合 Fab(抗原结合片段)噬菌体抗体表达载体, 利用噬菌体展示技术在噬菌体表面表达了具有特异结合活性的鼠/人嵌合 Fab 抗体, 为进一步表达其

他基因工程抗体和临床应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

噬菌粒 pComb3、大肠杆菌 XL1-Blue 及辅助噬菌体 VCSM 13 为本室保存; 抗人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 鼠源单抗由本室保存; 含鼠抗 E10 V_H , V_L 基因的 E10 ScFv 载体由杜桂鑫博士构建(另文发表); 含人 IgG 全分子 B7 载体由本室构建保存; 人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 购自美国 Chincor 公司; 限制性内切酶 *Xba*I, *Sac*I, *Xho*I 和 *Spe*I 均购自大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒及 DNA 片段回收试剂盒购自博大公司; 其他试剂为国产纯或进口纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 分别设计了 8 条引物扩增 E10 V_H , V_L 和人重链 C_H1 及人 C_K 基因。其中, 分别在扩增 E10 V_H , V_L 的上游引物 mVH5 和 mVL5 时, 设计了 *Xho*I 和 *Sac*I 酶切位点。在人重链 C_H1 和 C_K 的下游引物 HC_{H3} 和 HC_{K3}; 设计了 *Spe*I 和 *Xba*I 酶切位点。引物序列如下:

mVH5: 5'-CAG GTT CAG CTG CTC GAG TCT GGA

^{*} [收稿日期] 2003-12-01

[基金项目] 国家 863 计划项目资助(2001AA 5361)

[作者简介] 王 臣(1979-), 男, 安徽霍丘人, 硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail: wangchen2001@163.com

GCT GAG CTG GCG-3 (*Xho*I);

mV_H3': 5'-TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA
GAC GGT GAC TGA GGT TCC-3';

mV_L5': 5'-GAA ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA
ACC-3' (*Sac*I);

mV_L3': 5'-AGC CCG CTT TAT TTC-3';

HC_H5': 5'-GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC-3';

HC_H3': 5'-GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA
TTT GGG-3' (*Spe*I);

HC_K5': 5'-ATA AAG CGG GCT ACT GTG GCT GCA
CCA-3';

HC_K3': 5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ATT CAC
TGT TGA AGC TCT T-3' (*Xba*I)。

1.2.2 PCR 扩增鼠 V_H, V_L 及人恒定区 C_H1, C_K 基因 以本室构建的 E10 ScFv 载体为模板, 根据上述引物 mV_H5', mV_H3' 和 mV_L5', mV_L3' 配对扩增 E10 V_H 和 V_L 基因; 以本室保存的 B7 载体为模板, 以 HC_H5', HC_H3' 和 HC_K5', HC_K3' 为引物分别扩增人恒定区 C_H1 和 C_K 基因。所扩增的 PCR 产物, 经琼脂

糖凝胶电泳, 切胶回收。

1.2.3 鼠/人嵌合 FD 基因的连接与克隆 取上述合成的 V_H, C_H1 基因作为模板, 加入 mV_H5 引物和恒定区引物 HC_H3' 各 1 μL, 通过融合 PCR E10 V_H 基因片段与人恒定区 C_H1 基因, 拼接成鼠/人嵌合 FD 基因。取扩增产物 2 μL 进行 1% 琼脂糖电泳, 以检测扩增效果, 并进行结果判定。其余经琼脂糖凝胶电泳纯化后, 经 *Xho*I 和 *Spe*I 双酶切, 与同样酶切的 pComb3 载体连接, 转化大肠杆菌 XL1-Blue 后, 挑选菌落提质粒后, 质粒再经酶切鉴定插入鼠/人嵌合 FD 基因的阳性克隆。

1.2.4 鼠/人嵌合 Fab 表达载体的构建 取上述合成的 V_K, C_K 基因作为模板, 加入 mV_L5 引物和恒定区引物 HC_K3'; 融合 PCR, 回收约 700 bp 的鼠/人嵌合轻链基因, PCR 产物经 *Sac*I 和 *Xba*I 酶切后, 与同样处理的 pComb3-FD 载体连接。转化大肠杆菌 XL1-Blue, 提取质粒经酶切鉴定, 筛选阳性克隆。鼠/人嵌合 Fab 表达载体的构建见图 1。

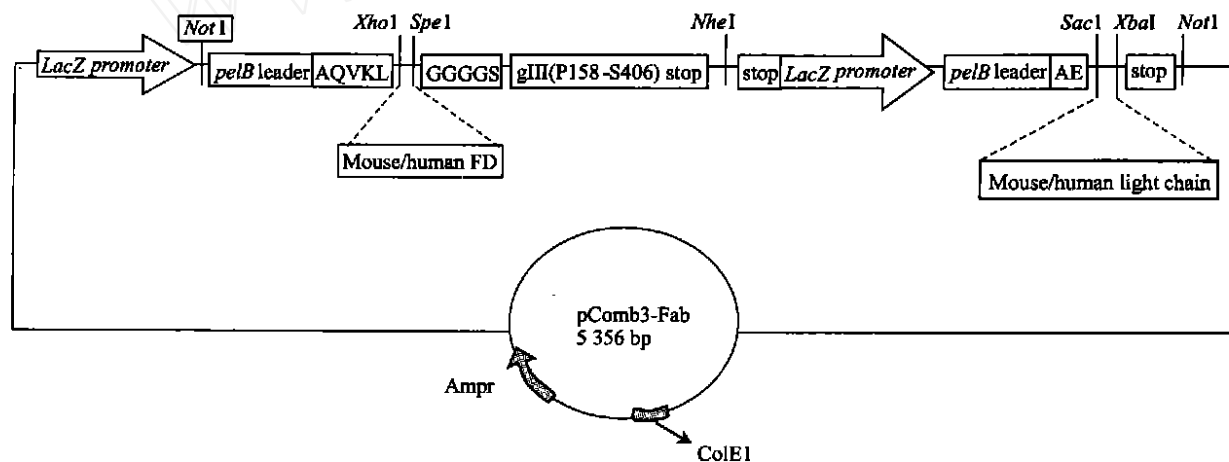


图 1 重组噬菌体载体 pComb3-Fab 的构建

Fig 1 Sketch map of phagemid pComb3-Fab

1.2.5 鼠/人嵌合 Fab 的表达 挑取阳性菌落, 接种于 2 mL SB 培养基中 (含 50 μg/mL 羧苄, 10 μg/mL 四环素), 37℃ 培养至 OD₆₀₀ = 0.5~0.6, 加入辅助噬菌体 VCSM 13 20 μL (10¹¹ Pfu), 37℃ 振荡 2 h 后补足卡那霉素至 70 μg/mL, 过夜培养。次日离心收集上清液, 即为鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体。

1.2.6 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体的鉴定 (1) 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体的抗原结合活性——间接 ELISA。将人整合素 α₅β₁ 抗原稀释至 1 μg/mL, 每孔 100 μL 包被酶联板, 4℃ 过夜。以 100 g/L 脱脂奶粉-PBS 封闭 2 h 后, 将上述鼠/人嵌合 Fab 抗体与等量 200 g/L 脱脂奶粉混合, 室温放置 30 min 后加入

到封闭的孔内, 每孔 100 μL, 37℃ 孵育 2 h。用 PBST 洗板 3 次, 加入辣根过氧化物酶 HRP-抗 M13 抗体, 37℃ 放置 1 h。PBST 洗板 3 次, 加 TMB 显色 10 min (先加 A 液后加 B 液, 各 1 滴), 用 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。酶标仪测 OD₄₅₀ 值, 并以辅助噬菌体 VCSM 13 作阴性噬菌体抗体对照。(2) 噬菌体抗体的交叉反应性。用鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体对不同抗原进行交叉结合活性鉴定, 所用抗原有牛血清白蛋白 (BSA)、乙型肝炎病毒表面抗原 (HbsAg)、木瓜蛋白酶、小鼠 IgG。将各种抗原包被酶联板进行 ELISA 检测。(3) 竞争抑制 ELISA。包被人整合素 α₅β₁ 抗原。用不同稀释度的鼠抗人整合

素 $\alpha\beta$ 单抗 E10 与鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体等体积混合, 加入酶联板中, 37 °C 孵育 2 h, 其余步骤同间接 ELISA, 按下式计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = ((\text{抑制前 OD}_{450} \text{ 值} - \text{抑制后 OD}_{450} \text{ 值}) / \text{抑制前 OD}_{450} \text{ 值}) \times 100\%。$$

抑制率 > 50% 为阳性。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 E10 V_H, V_L 及人恒定区 C_{H1}, C_K 基因

分别以上述引物配对扩增 E10 V_H, V_L 及人恒定区 C_{H1}, C_K 基因, 结果 4 个基因片段均能很好地扩增, 大小分别为 354, 330, 315 及 310 bp 左右, 与引物设计时理论推断大小一致。

2.2 鼠/人嵌合 FD 和轻链基因的连接

通过融合 PCR, E10 V_H, V_L 基因分别和人恒定区 C_{H1}, C_K 基因连接, 构建鼠/人嵌合 FD 和轻链基因, 融合 PCR 结果(图 2)表明, 构建了大小分别为 687 和 640 bp 左右的嵌合 FD 和轻链基因。

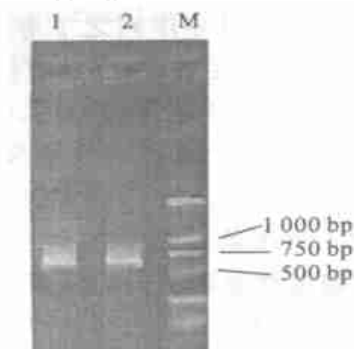


图 2 鼠/人嵌合 FD 和轻链基因的 PCR 构建

- 1 鼠/人嵌合轻链基因片段的扩增产物;
- 2 鼠/人嵌合 FD 基因片段的扩增产物;
- 3 相对分子质量标准 DL 2000

Fig 2 Construction of genes of mouse/human chimeric FD and light chain by overlap PCR

1. Genes of V_L-C_K; 2. Genes of V_H-C_{H1}; M. DL 2000 marker

2.3 鼠/人嵌合 Fab 表达载体的构建及酶切鉴定

构建的鼠/人嵌合 FD 基因经 *Xho*I 和 *Spe*I 酶切后, 与同样酶切的 pCom b3 连接, 转化大肠杆菌后, 挑选菌落经提取质粒酶切鉴定, 证明成功筛选到阳性重组子, 命名为 pCom b3-mhFD。pCom b3-mhFD 经载体 *Sac*I 和 *Xba*I 酶切后, 与同样酶切的鼠/人嵌合轻链基因连接, 转化, 挑选阳性克隆命

名为 pCom b3-Fab。阳性克隆 pCom b3-Fab 经 *Xho*I + *Spe*I 和 *Sac*I + *Xba*I 配对酶切鉴定, 分别切出 700 bp 左右的片段(图 3), 表明阳性克隆插入了鼠/人嵌合 FD 基因和轻链基因。

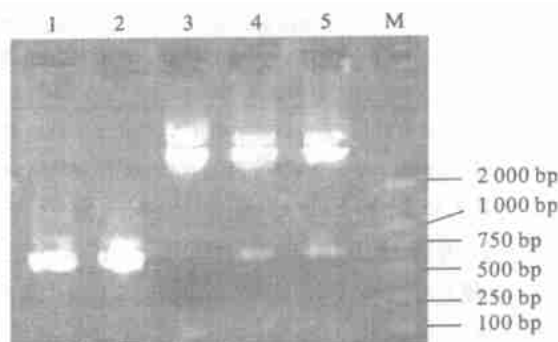


图 3 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体表达载体的酶切鉴定

- 1 鼠/人嵌合轻链基因片段; 2 鼠/人嵌合 FD 基因片段;
- 3 鼠/人嵌合 Fab 表达载体 pCom b3-Fab;
- 4 pCom b3-Fab 经 *Sac*I / *Xba*I 酶切;
- 5 pCom b3-Fab 经 *Xho*I / *Spe*I 酶切;
- M. 相对分子质量标准 DL 2000

Fig 3 Restriction enzyme identification of expression vector of mouse/human chimeric Fab

- 1 Mouse/human chimeric light chain genes;
- 2 Mouse/human chimeric FD genes; 3 pCom b3-Fab;
- 4 pCom b3-Fab digested by *Sac*I / *Xba*I ;
- 5 pCom b3-Fab digested by *Xho*I / *Spe*I ;
- M. DL 2000 marker

2.4 鼠/人嵌合 Fab 抗体的鉴定

2.4.1 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体抗原的结合活性——间接 ELISA 挑取阳性菌落, 辅助噬菌体超感染后, 培养上清液即为鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体。用间接 ELISA 检测其对整合素 $\alpha\beta$ 抗原的结合活性, 结果培养上清液 OD₄₅₀ = 0.760, 阳性对照鼠单抗 E10 为 1.02 (1/20 稀释), 阴性对照辅助噬菌体 VCSM 13 为 0.045。

2.4.2 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体的交叉反应性鉴定 为排除鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体与其他抗原的交叉反应, 将鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体对 BSA、HbsAg、木瓜蛋白酶 Papain、小鼠 IgG 等无关抗原进行间接 ELISA 检测(表 1), 结果 Fab 抗体只与人整合素 $\alpha\beta$ 抗原发生结合反应, 而与其他抗原均不发生反应, 说明 Fab 抗体具有与整合素 $\alpha\beta$ 的特异结合活性。

表 1 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体的交叉反应性鉴定

Table 1 Cross-reactivity of mouse/human chimeric antibody to a panel of solid-phase antigens by EL ISA

项目 Item	人整合素 $\alpha\beta$ Human integrin $\alpha\beta$	BSA	HbsA g	木瓜蛋白酶 Papain	m IgG
PBS	0.034 ± 0.01	0.043 ± 0.01	0.036 ± 0.01	0.041 ± 0.01	0.036 ± 0.01
VCSM 13	0.045 ± 0.01	0.048 ± 0.01	0.052 ± 0.01	0.042 ± 0.01	0.038 ± 0.01
Fab	0.760 ± 0.01	0.056 ± 0.01	0.054 ± 0.01	0.047 ± 0.01	0.052 ± 0.01
mAb E10	1.02 ± 0.01	ND	ND	ND	ND

注: 为 PBS 空白对照; 为辅助噬菌体 VCSM 13 阴性对照; ND 表示未做。

Note: PBS as blank control; Helper phage VCSM 13 as negative control; ND: Non done

2.4.3 鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体的竞争抑制 EL ISA 以稀释度为 1 20, 1 50, 1 100 的鼠单抗 E10 与鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体等体积混合, 对人整合素 $\alpha\beta$ 抗原竞争 EL ISA。结果抑制率在鼠单抗 E10 稀释度为 1 20 时为 75.13%, 1 50 时为 56.25%, 1 100 时为 45.42%, 即随鼠源单抗 E10 稀释度下降, 抑制率反而增加, 二者成反比关系。表明鼠源单抗 E10 对鼠/人嵌合 Fab 抗体具有抑制关系, 这进一步说明鼠/人嵌合 Fab 抗体与人整合素 $\alpha\beta$ 抗原具有特异的结合活性。

3 讨论

整合素 $\alpha\beta$ 是细胞粘附分子, 其主要存在于受生长因子刺激的内皮细胞或者肿瘤及周围的内皮细胞表面, 整合素 $\alpha\beta$ 不仅可以藉 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列与多种基质分子结合, 还可以通过非 RGD 依赖方式结合并激活基质金属硫蛋白 MMP-2, 导致细胞外基质分子降解, 使内皮细胞得以侵入并形成血管^[3,4]。试验同时表明, 抗 $\alpha\beta$ 单抗和小分子 $\alpha\beta$ 拮抗多肽均可以抑制 $\alpha\beta$ 与蛋白酶结合, 从而阻断新生血管发生。以 $\alpha\beta$ 拮抗剂阻断 $\alpha\beta$ 与 MMP-2 之间的结合, 可以阻断新生血管发生和肿瘤生长^[5,6]。近年来发现的新生血管发生抑制剂 endostatin 和 tumstatin 为胶原蛋白衍生而来的小分子蛋白成分, 它们通过与 $\alpha\beta$ 结合而抑制新生血管发生^[7], 同时 $\alpha\beta$ 在肿瘤转移中也发挥了重要作用^[8]。

因此, 当前以整合素 $\alpha\beta$ 为靶标, 研究其抗肿瘤血管生成的作用, 就具有重要的实际意义。

本室保存的抗人整合素 $\alpha\beta$ 杂交瘤细胞株 E10, 具有很好的中和活性, 为扩宽其临床应用, 本试验构建了鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体表达载体。选用的 pComb3 载体是美国加州 Scripps 研究所构建的一套可用于 Fab 克隆与表达的噬菌体载体系统, 可有效表达 Fab 抗体分子, 抗体的 FD 片段 C 端可与噬菌体外壳蛋白 III C 端 198~406 的 AA 片段通过 5 肽 GGGGS 相互连接形成融合蛋白, 共同展示在噬菌体表面, 而轻链和 FD 片段被置于 2 个 LacZ 启动子和 peB 引导序列之下等量表达, 表达产物在 peB 信号肽作用下, 被分泌至细菌外周质空间, 在外周质空间的氧化还原环境中, 抗体 FD 片段与轻链片段通过链间二硫键自发组装成功能性的 Fab 蛋白^[9,10]。1985 年, Smith 等^[11]发现, 将一基因片段与噬菌体 fd-tet 的基因 III 连接, 则该基因编码的多肽可以与噬菌体基因 III 编码的蛋白以融合形式出现在噬菌体表面。至此, 噬菌体展示技术得到了广泛的应用, 目前已有多种分子表达在噬菌体表面。本室从已构建的 E10 ScFv 载体中扩增 E10 V_H 及 V_L 基因, 分别与人恒定区 C_H1 及 C_K 基因连接, 构建了鼠/人嵌合 Fab 噬菌体抗体表达载体。经辅助噬菌体超感染后, EL ISA 及竞争抑制 EL ISA 结果表明, 在噬菌体表面成功展示了与人整合素 $\alpha\beta$ 抗原有特异结合活性的鼠/人嵌合 Fab。

[参考文献]

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182- 1186

[2] Folkman J. Tumor angiogenesis[A]. Holland J F. Cancer medicine Vol 1. [C]. 4th ed Baltimore: Williams and Wilkins, 1997. 181- 204

[3] Brooks P C, Montgomery A M, Rosenfeld M. Integrin alpha v beta 3 antagonist promote tumor progression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels[J]. Cell, 1994, 79(7): 1157- 1164

[4] Brooks P C, Stromblad S, Sanders L C, et al Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3[J]. Cell, 1996, 85(5): 683- 693

[5] Brooks P C, Stromblad S, Klenke R, et al Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human



- skin[J]. J Clin Invest, 1995, 96(4): 1815- 1822
- [6] Silletti S, Kessler T, Goldberg J, et al Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin α v β 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(1): 119- 124
- [7] Rehn M, Veikkala T, Kukk-Valladre E, et al Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(3): 1024- 1029
- [8] Lapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrin α V β 3 expression by bone-residing breast cancer metastases[J]. Diagn Mol Pathol, 1996, 5(2): 127- 135
- [9] Barbas C F 3rd, Kang A S, Lenner R A, et al Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surface: the gene III site[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7978- 7982
- [10] Kang A S, Barbas C F, Janda K D, et al Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 4363- 4366
- [11] Smith G P, Petrenko V A. Phage display[J]. Chem Rev, 1997, 97(2): 391- 410

Construction and expression of mouse/human chimeric Fab of mAb E10 against integrin $\alpha\beta$ on phage

WANG Chen¹, HOU Lihua², ZHANG Yanming¹, LI Jianmin²,
LIAO Zhenlin², DU Guixin², CHEN Wei², TONG Yigang²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071, China)

Abstract: To construct and express the mouse/human chimeric Fab antibodies on phage, the genes of the variable region of the heavy chain (V_H) and light chain (V_L) were amplified by PCR from expression vector of anti-human integrin $\alpha\beta$ ScFv, and then V_H and V_L genes of mAb E10 were ligated with human heavy chain C_H1 and human C_K genes. The chimeric Fab expression vector was constructed by cloning the chimeric heavy chain FD and light chain genes into pComb3. Fab antibodies were expressed on phage by superinfection with the helper phage VCSM 13, and the binding activity of antibody was detected by indirect ELISA and competitive inhibition ELISA. Mouse/human chimeric Fab expression vector was constructed and expressed on phage successfully. The Fab antibodies had binding activity with human integrin $\alpha\beta$.

Key words: integrin $\alpha\beta$; chimeric antibody; phage display