

IV型胶原酶人基因工程抗体的研制*

汤 健 阎锡蕴** 刘元义*** 田华松 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 肿瘤组织内IV型胶原酶表达和活性升高与肿瘤转移密切相关。抑制IV型胶原酶活性的物质能够有效地抑制或降低肿瘤的转移。因此IV型胶原酶已成为恶性肿瘤辅助诊断和控制癌转移的标志分子之一。利用噬菌体抗体展示技术, 在人抗体库研究的基础上, 成功地研制出一种IV型胶原酶特异人源单链抗体 hCo4。该抗体主要是由抗体轻链可变区和重链可变区组成, 分子量约为27 ku。ELISA和免疫印迹均证明 hCo4 能够与IV型胶原酶特异结合, 是目前所报道的IV型胶原酶特异抗体中分子量最小的人基因工程抗体。该抗体的亲和力与从分泌抗IV型胶原酶单抗的杂交瘤细胞制备的鼠源单链抗体亲和力相同。它有可能成为一种研究IV型胶原酶与肿瘤转移相互关系的工具以及用于肿瘤免疫诊断和治疗。

关键词 IV型胶原酶 人单链抗体 肿瘤转移

侵袭和转移是恶性肿瘤的重要特征。IV型胶原酶在瘤组织中的过度表达和活性增高被认为是造成肿瘤转移的重要因素之一^[1]。由于IV型胶原酶活性增高, 降解基底膜中的主要成分为IV型胶原蛋白, 从而使肿瘤细胞穿过基底膜进入毛细血管, 随血流扩散到远隔部位形成继发瘤。

许多实验表明, 抑制IV型胶原酶活性的物质, 如金属蛋白酶抑制剂、特异抗体等, 均能够有效地抑制或降低肿瘤细胞的转移^[2]。因此研究IV型胶原酶抑制物已成为肿瘤治疗研究的策略之一。

IV型胶原酶抗体以其特异性与中和作用, 在研究肿瘤细胞转移与IV型胶原酶活性升高的相互关系方面发挥了重要作用^[3], 在某些恶性肿瘤的辅助诊断和预后推测方面也具有指导意义^[4]。然而, 已报道的IV型胶原酶抗体在肿瘤免疫治疗研究方面并未取得显著效果。其主要原因是由于这些抗体多是鼠源的, 多次重复应用后, 人体产生人抗鼠抗体(HAMA)反应。

在解决抗体免疫源性方面, 用基因工程手段研制人抗体已取代了传统的杂交瘤技术, 随着基因工程抗体技术的发展, 各种各样的抗体形式不断出现。其目的在于快速大规模地生产符

1997-04-14 收稿, 1997-11-26 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号:39470661)、国家教委留学回国人员启动基金及中国科学院留学经费择优支持回国工作基金资助项目

** 联系人

*** 本所客座教授, 现在美国 NIH 工作

合临床需要的免疫诊断和治疗制剂。

本文介绍一株Ⅳ型胶原酶特异人基因工程单链抗体。这是利用噬菌体抗体展示技术，在抗体库研究的基础上，成功研制出的一种Ⅳ型胶原酶特异单链抗体，命名为 hCo4。该抗体具有3个特点：(1)能够与Ⅳ型胶原酶特异结合；(2)人源抗体，将克服鼠抗体在体内应用时的免疫排斥反应；(3)分子量小，仅含有抗体轻链和重链可变区，分子量为27 ku，是完整抗体分子量的六分之一。抗体 hCo4 是目前唯一特异结合Ⅳ型胶原酶的小分子人基因工程抗体。

1 材料和方法

1.1 材料

人噬菌体半合成抗体库^[5]由英国剑桥大学 MRC 中心赠送；Ⅳ型胶原酶(来自溶组织梭状芽孢杆菌)、Ⅳ型胶原、硝酸纤维素膜购自 Sigma 公司；重组噬菌体抗体系统检测试剂盒、PCANTAB5 测序引物试剂盒、T7DNA 测序试剂盒、pCANTAB5E 载体、抗 E-tag 抗体均购自 Pharmacia Biotech 公司；[α -³²P] -dCTP 购自美国杜邦公司；Nunc-免疫管及 ELISA 板购自 Gibco BRL 公司；辣根过氧化物酶标羊抗鼠 IgG 购自北京中国预防医学科学院卫生科学研究所生物工程公司。一般试剂为市售分析纯(AR)。

1.2 方法

1.2.1 筛选Ⅳ型胶原酶特异性人噬菌体抗体 人噬菌体抗体库经过培养扩增后，用 M13KO7 辅助噬菌体超感染培养过夜。收集上清液并用 PEG 浓缩。将 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ⅳ型胶原酶包被 Nunc-免疫管于 4℃ 过夜。用 1% BSA 封闭后，加入 10¹³ PFU 重组噬菌体，温育 2 h。用含 0.05% Tween 20/PBS 及 PBS 各洗涤 20 次。用 100mmol/L 三乙胺洗脱与抗原结合的噬菌体抗体。洗脱液经 Tris 中和之后，再感染大肠杆菌 TG1 进行培养扩增。重复上述“吸附-洗脱-扩增”过程 3 次。

1.2.2 Ⅳ型胶原酶噬菌体抗体表达 把经过 3 轮筛选后的重组菌涂板，挑选单菌落并培养于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖的 2×TY 培养液中。经 M13KO7 超感染后，将培养基中的葡萄糖换为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素并培养过夜。离心，取上清液，待用于免疫活性检测。

1.2.3 可溶性单链抗体表达 按文献[6]方法，从表达Ⅳ型胶原酶特异性噬菌体抗体的菌株中提取质粒，经 Sfi I 和 Not I 双酶消化，获得单链抗体基因，并将该基因插入 pCANTAB5E 表达载体上，转化大肠杆菌 HB2151。经 1mmol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达后，所产生的可溶性单链抗体渗入培养上清液中。收集上清液并用 50% 硫酸铵浓缩。

1.2.4 Western blot 检测 诱导与未诱导 hCo4 克隆表达的培养上清液分别经过 50% (NH_4)₂SO₄ 浓缩和 SDS-PAGE 电泳分离。分离的蛋白分别用考马斯亮蓝染色或电转移至硝酸纤维素膜上。后者用 2% BSA 封闭后依次与抗 E-tag 抗体和辣根过氧化物酶标的羊抗鼠 IgG 反应，最后进行显色反应。

1.2.5 可溶性单链抗体免疫活性分析 在硝酸纤维素膜上分别点上 1 μg Ⅳ型胶原酶、I 型胶原酶、促血管内皮细胞生长因子和牛唾液腺粘液的溶液。膜晾干后封闭，然后与可溶性单链抗体(约 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)温育 2 h。膜洗涤后，再与抗 E-tag 抗体温育 1 h。最后加入过氧化物酶标记的抗体，用底物 3,3-二氨基联苯胺(DAB)进行显色反应。

ELISA: 用 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ IV型胶原酶包被 96 孔板, $100 \mu\text{L}$ /每孔。封闭后, 加入噬菌体抗体或可溶性单链抗体(约 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$)温育 2 h。用含 0.05% Tween 20/PBS 洗涤 6 次, 加入辣根过氧化物酶标记的抗噬菌体抗体(用于噬菌体抗体)或用抗 E-tag 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(用于可溶性单链抗体)分别温育 1 h, 最后用邻苯二胺(OPD)进行显色反应。

1.2.6 单链抗体基因序列分析 用 pCANTAB5 测序引物试剂盒及 T7DNA 测序试剂盒对 IV型胶原酶抗体基因进行序列测定。

2 结果

2.1 人抗IV型胶原酶噬菌体抗体

以 IV型胶原酶作为靶抗原, 从人噬菌体抗体文库中筛选相应的特异抗体。经过 3 轮“吸附-洗脱-扩增”后, 获得了几个阳性克隆。ELISA 显示这些噬菌体抗体均能够特异结合 IV型胶原酶。其中阳性值最高的 1 株命名为 hCo4。通过 ELISA 检测, 我们比较了 hCo4 噬菌体抗体和从分泌抗 IV型胶原酶单抗的杂交瘤细胞制备的鼠源噬菌体单链抗体的亲和力, 结果表明亲和力基本相同。

2.2 人单链抗体 hCo4 的基因分析

含单链抗体 hCo4 基因的重组质粒经 Sfi I 和 Not I 双酶切后, 用琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物。结果如图 1 所示, 单链抗体 hCo4 基因大约为 705bp, 与设计的 V_H -(Gly₄Ser)₃- V_L 单链抗体的分子量一致。

DNA 序列分析(图 2)进一步表明, 人抗IV型胶原酶单链抗体 hCo4 基因是由 705 个核苷酸组成, 其中重链可变区(V_H)为 336 个核苷酸, 轻链可变区(V_L)为 324 个核苷酸, 连接肽为 45 个核苷酸。另外, 在 hCo4 基因的尾部有一个由 39 个核苷酸组成的 E-tag 基因片段, 它所表达的 E-tag 作为单链抗体的标志物用于检测单链抗体。hCo4 核苷酸序列已通过 DDBJ 在 DNA 数据库中注册, 注册号为 AB001733。

2.3 可溶性单链抗体的表达与分析

为了获得可溶性单链抗体, 根据本实验室的条件, 把 hCo4 基因亚克隆到 pCANTAB5E 表达载体上, 然后转入到大肠杆菌 HB2151 中。由于 HB2151 不带琥珀抑制基因, 使 hCo4 的基因表达终止在单链抗体的 3' 末端, 与噬菌体外壳蛋白 g3p 分离, 因此在该宿主细胞中, hCo4 基因在 IPTG 诱导下以可溶性单链抗体的形式表达并渗入到培养上清液中。培养上清液通过 SDS-PAGE 分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上。Western 印迹(图 3)证明, 经诱导的 hCo4 上清液中含有单链抗体, 其分子量约为 27 ku。从考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶上分析, 可溶性单链抗体的表达量约为 2mg/L。

2.4 可溶性单链抗体 hCo4 的免疫活性分析

将含有可溶性单链抗体 hCo4 的培养上清液与多种抗原一起温育, 用抗 E-tag 抗体检测可溶性单链抗体。ELISA(图 4)和免疫印迹实验都证明了单链抗体 hCo4 能够与 IV型胶原酶特异结合。这种识别是特异性的, 因为单链抗体 hCo4 不与 I型胶原酶、血管内皮生长因子和牛唾液腺粘液等抗原发生交叉反应(图 5)。

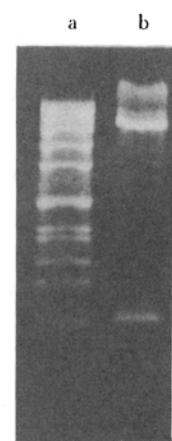


图 1 人抗 IV型胶原酶 单链抗体基因的酶切图谱

a 为 DNA 标准分子量 Spp I /EcoR I , b 为重组质粒双酶切(Sfi I /Not I)产物

V_H

GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

E V Q L V E S G G G L I Q P G G S L

AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGG TTC ACC GTC AGT AGC AAC TAC ATG AGC TGG

R L S C A A S G F T V S S N Y M S W

CDR1

GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT TAT AGC GGT

V R Q A P G K G L E W V S V I Y S G

GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D

CDR2

AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG

N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T

GCC GTA TTA CTG TGC AAG AGA GAC TTG TGT GAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC

A V L L C K R D L C D W G Q G T L V

CDR3

ACC GTG TCG AGA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA

T V S R G G G S G G G G S G G G G G

 V_L

连接物

TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC

S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V

AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC AGC TCT AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC CAG

R I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q

CDR1

CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC

Q K P G Q A P V L V I Y G K N N R P

CDR2

TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG

S G I P D R F S G S S S G N T A S L

ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG

T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S R

GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAC AGT CTG ACC GTC CTA

D S S G N H V V F G G G G T K L T V L

CDR3

GGT

G

图 2 人抗IV型胶原酶单链抗体核苷酸及由此推导的氨基酸序列

划线部分为互补性决定区(CDRs)

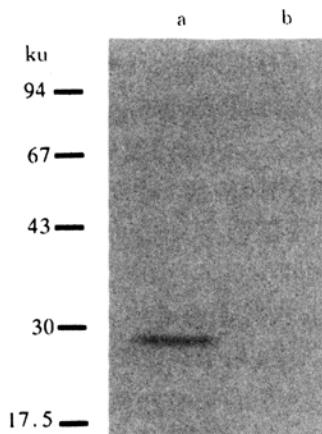


图3 Western印迹示IV型胶原酶可溶性单链抗体表达

a为诱导表达培养上清液，b为未诱导表达培养上清液。左边数字示标准蛋白分子量

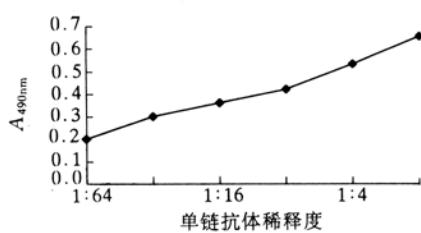


图4 ELISA示人单链抗体 hCo4 特异结合IV型胶原酶

纵坐标为 $A_{490\text{nm}}$ 处的吸收值，横坐标为单链抗体 hCo4 不同稀释度

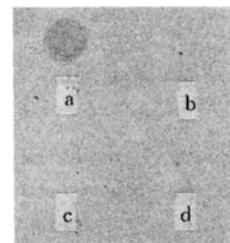


图5 点免疫印迹示人单链抗体 hCo4 与IV型胶原酶的特异性反应

a为IV型胶原酶，b为I型胶原酶，c为血管内皮生长因子，d为牛唾液腺粘液

3 讨论

本研究是利用噬菌体抗体表面展示技术^[7]，从半合成人抗体文库中成功克隆了人抗IV型胶原酶单链抗体。该抗体是由轻链和重链可变区通过15个氨基酸(Gly₄Ser)₃短肽连接而成的单链分子，其中重链可变区的CDR1和CDR2来自于人抗体基因组，CDR3是人工合成的，由4~12个氨基酸组成。轻链可变区来自于Vλ3家族。我们把抗体hCo4的重链可变区核苷酸序列与人的抗体种系基因序列进行比较^[8]，发现hCo4抗体的重链可变区属于V_{H3}家族，与V_{H3}家族中的DP-42和8-1B³同源性最大。其意义在于已有实验证明V_{H3}家族的抗体与Protein A特异结合^[5]，因此抗体hCo4将可能通过Protein A亲和层析柱而得到纯化。

目前能够表达可溶性单链抗体的表达载体有许多，例如pHEN1和pCANTAB 5E。两者的主要区别在于所表达的可溶性抗体末端带有不同的标志肽。pHEN1表达的可溶性抗体末端带有c-myc，而pCANTAB 5E表达的可溶性抗体末端带E-tag，它们均可通过相应的特异抗

体检测。在本研究中, 我们把IV型胶原酶抗体基因从pHEN1亚克隆到pCANTAB 5E表达载体上, 主要是为了适应本实验室检测条件的需要, 利用抗 E-tag 抗体鉴定可溶性单链抗体。

本文介绍的单链抗体 hCo4 与 IV 型胶原酶单克隆抗体相比, 亲和力较低。这也是目前单链抗体所面临的一个普遍问题。解决这一问题的主要方法有以下几种:(1) 提高抗体库的质量, 即增加抗体库亲和力的成熟度和多样性;(2) 链替换, 通过 V_L 和 V_H 基因片段的替换和重组以提高抗体的亲和力;(3) 抗体可变区的点突变或随机突变。在这些方面已有些成功的报道, 可使抗体的亲和力提高 100~1 000 倍^[9]。

本研究获得了两种不同形式的IV型胶原酶抗体, 一种是噬菌体单链抗体, 另一种是可溶性单链抗体。前者可能作为一种研究工具, 用于IV型胶原酶结构与功能以及与肿瘤转移的研究, 后者具有分子量小的特点, 有可能作为肿瘤靶向药物的载体用于恶性肿瘤的辅助治疗。目前将 hCo4 单链抗体与抗肿瘤抗生素 C1027 的基因重组的研究正在进行中, 可望 hCo4 在肿瘤治疗中获得应用。

参 考 文 献

- 1 Reich R, Thompson E W, Iwamoto Y, et al. Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Research*, 1988, 48: 3 307
- 2 Hoyer M, Hujanen E, Turpeenniemi-Hujanen T, et al. Modulation of type-IV collagenase activity and invasion behavior of metastatic human melanoma (A2058) cells in vitro by monoclonal antibodies to type-IV collagenase. *Int J Cancer*, 1990, 46: 282
- 3 Azzam H S, Arand G, Lippman M E, et al. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85: 1 758
- 4 Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, et al. Matrix metalloproteinase-2(72 ku type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumor progression and may have prognostic value. *J Pathol*, 1996, 180: 283
- 5 Nissim A, Hoogenboom H R, Tomlinson I M, et al. Antibody fragments from a "single pot" phage display library as immunochemical reagents. *The EMBO Journal*, 1994, 13: 692
- 6 Yan X Y, Li L, Po Tien, et al. Cloning, expression and characterization of a single-chain antibody PS-9 targeted to pancreatic cancer. *Science in China, Series B*, 1994, 38(11): 1 230
- 7 McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, 348: 552
- 8 Tomlinson I M, Walter G, Marks J D, et al. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about fifty groups of V_H segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol*, 1992, 227: 776
- 9 Low N M, Holliger P, Winter G, et al. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J mol Biol*, 1996, 260: 359