

抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab' 突变体的表达和活性研究

刘银星 熊冬生 范冬梅 邵晓枫 许元富 朱祯平 杨纯正*

(中国医学科学院 中国协和医科大学血液学研究所 实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

摘 要 利用 PCR 方法从抗 CD20 单链抗体(ScFv)表达载体上扩增抗 CD20 抗体轻链可变区基因(V_L)重链可变区基因(V_H),同时在抗体的可变区引入突变,然后将 V_H 、 V_L 基因重组到 Fab' 表达载体 pYZF1 中,构建抗 CD20 嵌合抗体 Fab' 片段表达载体,并在大肠杆菌 16c9 中进行高效可溶性分泌表达。经大量的筛选,获得一个产量和活性均有所提高的突变克隆。其突变位点在轻链可变区的 CDR1 区,即 G77→A(Ser→Asn)。突变的抗体的表达量为每克干菌 3.8 mg,而未突变抗体的表达量为每克干菌 1.3 mg。突变体的亲和力常数 K_a 为 2.2×10^9 L/mol,约为突变前的 2 倍。竞争性免疫荧光抑制实验表明,突变的 Fab' 片段能竞争性抑制鼠源性抗 CD20 抗体 HI₄₇ 和 CD20 表达细胞 Raji 细胞的结合,使 HI₄₇ 的结合阳性率由 98% 下降至 37.55%,体外细胞生长抑制试验亦证明突变的 Fab' 片段的抑制活性明显高于未突变的抗体。

关键词 单克隆抗体,嵌合抗体 Fab' 片段,CD20,随机突变

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0272-05

单克隆抗体是理想的抗血液肿瘤的药物。B 淋巴细胞的增殖和分化与细胞表面的膜蛋白 CD20 分子有关。CD20 分子仅在前 B 淋巴细胞、未成熟 B 淋巴细胞、成熟 B 淋巴细胞、激活 B 淋巴细胞中表达,而在浆细胞、淋巴多能干细胞以及其它组织均无 CD20 的表达,在人体血清中亦无游离 CD20 的存在^[1]。CD20 在 B 淋巴细胞中的表达特点为靶向治疗 B 淋巴细胞瘤提供了一个理想的靶点。目前抗 CD20 的抗体主要有 Rituximab、IF5、Anti-B1 和 HI₄₇, Rituximab 在治疗 B 淋巴细胞瘤方面已表现出显著的临床效果^[2]。鼠源性单克隆抗 CD20 抗体 HI₄₇ (IgG₃) 在第四届国际人类白细胞分化抗原会议上被正式命名为 CD20 + X^[3]。我们曾经成功地将 HI₄₇ 的可变区与人的恒定区连接起来,构建并在大肠杆菌中表达了嵌合的抗 CD20 抗体的 Fab' 片段,体外实验亦证实它具有抑制 B 淋巴肿瘤细胞生长的活性^[4,5],这预示抗 CD20 抗体 Fab' 片段在治疗 B 淋巴瘤中有潜在的应用价值。抗体与靶点的亲和力和抗体的产量决定了临床应用的可能性。本研究的目的在于在嵌合的抗 CD20 抗体的可变区中引入突变,降低 HI₄₇ 的免疫源性的同时,增强抗体与靶抗原

的亲和力,提高抗体的表达量,降低生产成本,满足临床的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和蛋白 人 B 淋巴细胞 Raji 细胞由本室保存,用含 10% 的小牛血清的 RPMI1640,于 5% CO₂, 37℃ 下培养。抗 CD20 单克隆抗体 HI₄₇ 和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 由我所免疫室提供。

1.1.2 载体与菌种 抗 CD20ScFv 表达载体 pCANT-AB5E CD20ScFv, pYZL, pYZH, pAYZKDR 以及表达载体 pYZF 为我室构建,大肠杆菌菌株 16c9 由我室保存。

1.1.3 培养基 2 × YT 培养基; AP₅ 培养基:每 1000 mL 含葡萄糖 15 g,酪氨酸蛋白水解物 11 g,酵母提取物 0.6 g,硫酸镁 0.19 g,氯化铵 1.07 g,氯化钾 3.73 g,氯化钠 1.2 g,1 mol/L 三乙醇胺 120 mL, pH 7.4。

1.1.4 周间质提取液 三羟甲基氨基甲烷 25 mmol/L, 乙二醇甲乙酸 1 mmol/L, 苯甲基磺酰氟 0.1 mmol/L, 蔗糖 20% (W/V), 氯化钠 200 mmol/L, 过滤灭菌。

收稿日期 2002-12-09, 修回日期 2003-02-28。

基金项目 国家高技术研究发展专项经费基金资助 (No. 2000141 和 20001AA215341); 天津重大基金资助 (No. 003119511)。

* 通讯作者。Tel 86-22-27307938-3070; Fax 86-22-27230740; E-mail czya@public.ty.cn.cn 中国医学科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应随机突变率的测定^[6]: 通过普通的 *Taq* DNA 聚合酶进行多聚酶链反应(PCR), 随机引入突变。简而言之, PCR 的反应体积为 25 μ L, 体系如下: 10 mmol/L Tris-HCl (pH9.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 0.01% (W/V) gelatin, 1.5 mmol/L MnCl₂, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.25 mmol/L dATP, 0.25 mmol/L dCTP, 0.25 mmol/L dGTP, 0.25 mmol/L dTTP; 含有 VEGF 受体 1-3 区片段 (KDR1-3, 971 bp) 的载体 pAYZKDR 为模板, 1 ng; 上游引物 (5'-AAAAA-GAATATCGCATTTCTTCTTG-3') 和下游引物 (5'-CCG-CATGCCG CGTATGCGGCACGCGTTCCAG-3'), 各 20 pmol 2 u 的 *Taq* DNA 聚合酶。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 51 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 15 个循环。对 PCR 产物测序, 计算该反应条件下的随机突变率。

1.2.2 抗 CD20 抗体 Fab' 突变库的建立: 抗 CD20 抗体 Fab' 表达载体的构建参见文献 [4]。简而言之, 以抗 CD20scFv 表达载体 pCANTAB5ECD20 为模板, 分别以 P1 和 P2, P3 和 P4 为引物扩增 V_L 和 V_H 片段, 反应条件与上述相同。分别以 *Mlu*I + *Apa*I、*Mlu*I + *Sty*I 消化 V_L 和 V_H, 然后重组到带有人免疫球蛋白相应 CH₁、C_L 的 pYZH1、pYZL 载体相应的内切酶位点中, 构建成 pYZH1cd20 和 pYZLcd20 载体。将载体 pYZH1cd20 和 pYZLcd20 分别电转化 16c9 菌株后, 收集所有的生长菌落, 提取 pYZLcd20、pYZH1cd20 质粒。分别以 *Mlu*I + *Nhe*I、*Spe*I + *Sph*I 消化 pYZLcd20 和 pYZH1cd20, 琼脂糖电泳分离纯化含 V_L、V_H 的相应 DNA 片段, 利用 *Nhe*I、*Spe*I 同裂酶的特点, 将这两个片段和经 *Mlu*I + *Sph*I 消化所得的 pYZF 载体片段连接成抗 CD20 Fab' 表达载体 pYZF1cd20, 电转化 16c9 菌株后构建成抗 CD20 Fab' 抗体库。

引物 1: 5'-GCTACAAACGCGTACGCTGACATCGAGCTC-3' (*Mlu*I)

引物 2: 5'-TTTCAGCTCCACCTTGGTCC-3' (*Sty* I)

引物 3: 5'-GCTACAAACGCGTACGCTCAGGTGAAGCTG-3' (*Mlu*I)

引物 4: 5'-GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGG-AGACGGT-3' (*Apa*I)

引物均由上海生工生物工程公司合成。画线部分为酶切位点。

1.2.3 抗 CD20 Fab' 片段的表达筛选: 随机挑取单菌落, 于 1 mL 2 \times YT 培养基中(含 50 μ g/mL 氨苄青

霉素), 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养过夜; 离心收集菌体, 将菌体重悬于 4 mL AP₅ 培养基(含 50 μ g/mL 氨苄青霉素), 30 $^{\circ}$ C, 振荡培养 24 h; 离心收集菌体, 将菌体于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻 1 h, 化冻后, 加 1 mL 周间质提取液, 将菌体打散, 4 $^{\circ}$ C 轻摇 1 h, 22000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 收集上清。以同样的样品量进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测。

1.2.4 抗 CD20 Fab' 片段的分离纯化: 将表达较高的克隆进行扩大培养, 收集菌体裂解液上清并经 Protein G Agarose (GIBCOBRL 公司) 亲和层析柱分离。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测: 表达产物经 SDS-PAGE 电泳后, 将其转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶溶液 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 加一抗兔抗人 IgG (Fab')₂ 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 加二抗辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG, 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, Tween-Tris 缓冲液 (TBST) 洗 3 次, 每次 10 min, 然后用二氨基联苯胺 (DAB) 进行显色。

1.2.6 亲和力的测定: 利用直接饱和分析法。

1.2.7 竞争免疫荧光结合实验: 将浓度为 4 μ g/ μ L 的 HI47 溶液与 1 \times 10⁶ Raji 细胞在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h, 2000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃上清液, PBS 洗 3 次, 将细胞重悬于含有 20 μ g 抗 CD20 Fab' 片段的 30 μ L 的 PBS 溶液中, 4 $^{\circ}$ C 放置 1 h, 2000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃上清液, PBS 洗 3 次, 将细胞重悬于 30 μ L 的工作液羊抗鼠 IgG-FITC 溶液, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 2000 g 离心 10 min, 弃上清液, PBS 洗 3 次, FACS 测定 HI₄₇ 结合 Raji 细胞的阳性率。

1.2.8 抗体对 Raji 细胞的生长抑制作用: 按 1 \times 10⁴ 细胞/孔接种 96 孔培养板, 分别加入不同浓度的 Fab' 溶液, 每个浓度做 3 个平行孔, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 72 h, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入浓度为 0.2 mg/mL 新鲜配置的 MTT 200 μ L, 继续培养 4 h, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加 DMSO 200 μ L, 振荡摇匀, 546nm 测量 OD 值。

2 结果

2.1 PCR 反应的随机突变率的测定

KDR1-3 片段的 PCR 产物的测序结果表明, 长为 971bp 的 KDR1-3 片段平均有 2 个突变, 因此该反应条件下的突变率约为 0.2%。

2.2 抗 CD20 Fab' 片段突变库的构建和筛选

利用 PCR 法从抗 CD20scFv 表达载体上扩增 V_L、V_H 基因, 将 V_L、V_H 基因分别重组到 pYZH1、pYZL

ZL 载体中,构建成 pYZH1cd20 和 pYZLcd20 载体。将载体 pYZH1cd20 和 pYZLcd20 分别电转化 16c9 菌株后,收集所有的生长菌落,提取的 pYZLcd20、pYZH1cd20 质粒为多克隆。酶切 pYZLcd20 和 pYZH1cd20 得到 $V_L + C_L$ 、 $V_H + CH1$ 相应的 DNA 片段,轻链为 642bp,重链为 771bp。将这两个片段重组到表达载体 pYZF 中,构建成抗 CD20 Fab' 表达载体 pYZF1cd20(图 1),电转化 16c9 菌株后,构建成抗 CD20 Fab' 抗体库。

经过 10^3 的筛选,筛选到一株产量明显高于原克隆 *E. coli* 16c9(pYZF1cd20-2)的克隆。经过测序鉴定发现 *E. coli* 16c9(pYZF1cd20-7)克隆的轻链的第 77 位碱基 G 突变为 A(CDR1 区),即 Ser 26 Asn。

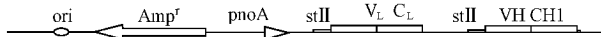


图 1 抗 CD20 抗体 Fab' 片段表达载体示意图

Fig.1 The expression pYZF1cd20 vector of the anti-CD20 Fab' fragment

2.3 CD20-7 的表达及分离纯化

将 *E. coli* 16c9(pYZF1cd20-7)和 *E. coli* 16c9(pYZF1cd20-2)分别进行扩大培养,表达产物用周质腔提取液提取,用 protein G 纯化,15% SDS-PAGE 电泳分析结果显示纯化后的产物约为 45kD(图 2 a 和 b),与预期的分子量相同,还原后轻重链的二硫键断裂,分子量约为 25kD。在抗 CD20 抗体 Fab' 的表达产物中,还含有一些未装配的轻重链。*E. coli* 16c9(pYZF1cd20-7)和 *E. coli* 16c9(pYZF1cd20-2)的表达产物 CD20-7 和 CD20-2 有明显的差异(图 2 c),经激光薄层扫描 CD20-7 和 CD20-2 分别约占菌体总蛋白的 25%和 12%。蛋白测定证实 CD20-7 表达量为每克干菌 3.8 mg,CD20-2 表达量为每克干菌 1.3 mg。

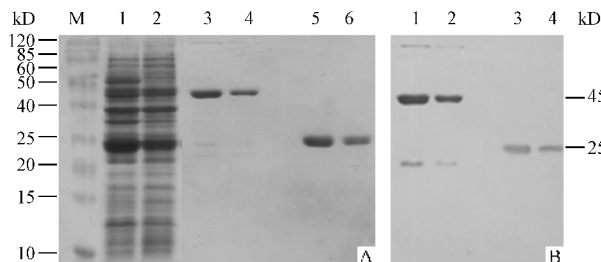


图 2 SDS-PAGE 电泳和 Western-blotting 分析

Fig.2 SDS-PAGE and western-blotting analysis of anti-CD20 Fab' expression and purification

a. 15% SDS-PAGE 1. Extract of CD20-7 (reduced); 2. Extract of CD20-2 (reduced); 3. Purified CD20-7 (non-reduced); 4. Purified CD20-2 (non-reduced); 5. Purified CD20-7 (reduced); 6. Purified CD20-2 (reduced) b. Western-blotting 1. Purified CD20-7 (non-reduced); 2. Purified CD20-2 (non-reduced); 3. Purified CD20-7 (reduced); 4. Purified CD20-2 (reduced)

2.4 抗体亲和力常数 K_a 的测定

利用直接饱和和分析法测定 CD20-2 和 CD20-7 的亲合力,经 Scatch 作图(图 3)计算表明,CD20-2 和 CD20-7 的 K_a 分别约为 1×10^9 L/mol 和 2.2×10^9 L/mol。因此,CD20-7 与 Raji 细胞的亲合力高于 CD20-2。

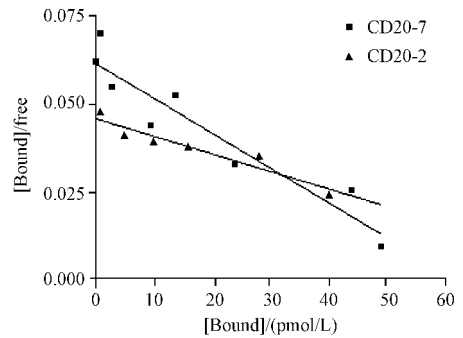


图 3 抗 CD20 抗体 Fab' 亲和力的测定

Fig.3 Determination of K_a for chimeric anti-CD20 antibody fragments by Scatch plots

2.5 竞争免疫荧光结合实验

为了检验 CD20-7 结合特异性,我们进行了 CD20-7 和 HL_{47} 竞争性免疫荧光抑制实验。结果显示,Raji 细胞结合 HL_{47} 的阳性率为 98%(图 4d),而在 CD20-2 片段存在的条件下,Raji 细胞结合 HL_{47} 的阳性率为 70.86%(图 4c),在 CD20-7 片段存在的条件下,Raji 细胞结合 HL_{47} 的阳性率为 37.55%(图 4b)。结果表明 CD20-7 片段与 CD20-2 片段均具有 CD20 结合活性,都能够竞争性抑制 HL_{47} 与 Raji 细胞结合,CD20-7 的抑制 HL_{47} 结合 Raji 细胞的活性强于 CD20-2。

2.6 Raji 细胞体外生长抑制试验

MTT 法检测抗 CD20 抗体 Fab' 片段对 Raji 细胞生长的抑制试验的结果说明,CD20-7 和 CD20-2 对 Raji 细胞的生长均具有抑制作用(图 5),前者的生物活性明显高于后者,这与亲和力的实验结果相符合。

3 讨 论

近年来,一系列的研究表明抗 CD20 单克隆抗体治疗 B 细胞淋巴瘤有着较好的疗效。抗 CD20 单克隆抗体不仅可以有效的降低 B 细胞淋巴瘤的复发,还可以与化疗药合用时降低化疗药的 IC_{50} 值,减轻毒副作用。这就为其在今后肿瘤免疫治疗中的广泛应用奠定了基础。但鼠源性的单克隆抗体具有较强的免疫源性,在用于人体时会导致体内产生强

烈的人抗鼠(HAMA)反应,杂交瘤技术难以提供临床治疗所需要的抗体。基因工程抗体的发展为解决

这一难题提供了一条新途径。

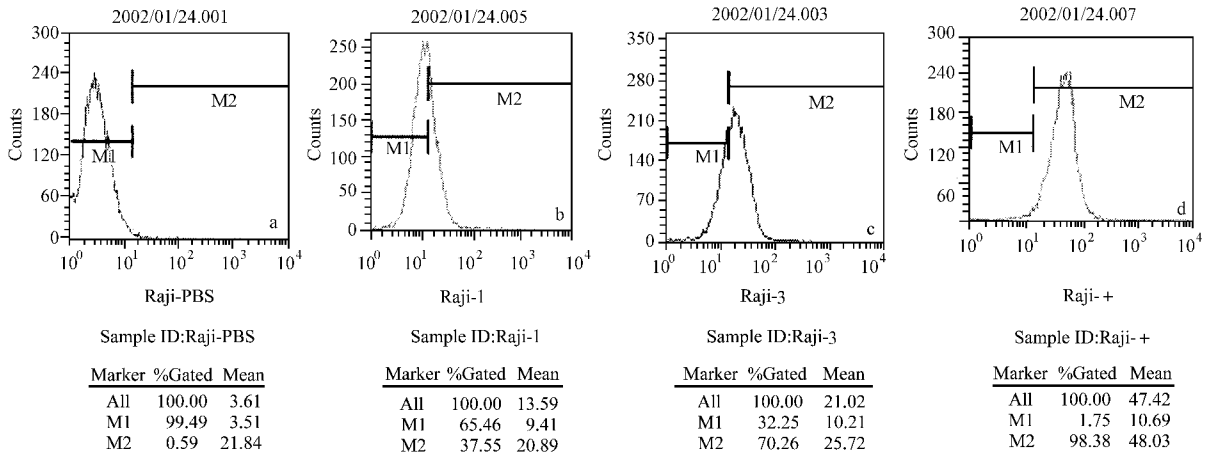


图4 竞争免疫荧光结合实验

Fig.4 The competitive immunofluorescence inhibition assays of anti-CD20 antibody fragments by FACS

a. PBS ; b. HI₄₇ + CD20-7 ; c. HI₄₇ + CD20-2 ; d. HI₄₇

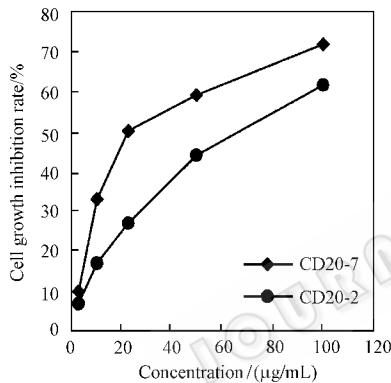


图5 抗 CD20 抗体对 Raji 细胞生长的抑制作用

Fig.5 Effect of anti-CD20 antibody fragments on proliferation of Raji cells

在抗体中引入少量的突变可改变抗体的表达和活性。例如,Horwitz 等对轻链可变区的 FR1 进行改造后,原来表达量低的轻链的表达量可提高 7 倍^[7]。Sergey 等发现抗 CD3 抗体的重链(Glu 66 Gln)和(Cys 105 Ser)两个位点发生突变可影响抗体 CD3 ScFv 片段的表达量,且抗体与抗原的结合活性保持不变^[8]。CD20-7 的突变位置处于轻链高可变区 CDR1 区(L26),我们用计算机分子模拟(Insight II/MSI)的结果证实,轻链的 CDR1 区的 24-33 位氨基酸为抗原结合区之一,但轻链 L26 的突变(Ser→Asn)对抗体高可变区(CDRs)的构象没有任何显著影响,几乎与 CD20-2 相同^[9],但它有可能对抗体局部的氨基酸极性有影响,增强了抗体与抗原的结合能力,表现为亲和力的增加。L26S-N 的突变影响了抗 CD20 Fab' 片

段在大肠杆菌中的高表达,分析其原因,可能是 L26 S-N 突变后,改变了抗体片断 N 端紧随信号肽后的 20~30 个残基组成的局部跨膜构象,使得信号肽穿膜效率和穿膜后的被切割效率提高,从而大大提高了抗体片段被可溶性释放到外周质中的产量。生物学活性实验结果初步显示突变前后抗 CD20 抗体 Fab' 片段的结合活性有一定的差异,二者均能与 CD20⁺ 的 Raji 细胞特异性结合,但这两种抗体片段的亲合活性均低于亲代鼠源性抗体,主要原因是亲代鼠源性抗体是双价的,Fab' 抗体片段是单价的,因此后者不能完全竞争和取代前者与 Raji 细胞的结合。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Chang K L, Arber D A, Weiss L M *et al.* CD20: A review. *Applied Immunohistochem*, 1996, **4**: 123-225
- [2] Dillman R O. Magic Bullets at Last: Finally-Approval of a Monoclonal Antibody for the Treatment of Cancer. *Cancer Biother Radiopharm*, 1997, **12**(4): 223-225
- [3] YANG X F (杨希峰), SHEN D C (沈德诚), JIN Y C (金宇光) *et al.* Preparation, identification and biological characteristics of a monoclonal antibody, HI47 against mature human B cells. *Shanghai Immunity J* (上海免疫学杂志), 1990, **10**(2): 65-68
- [4] ZHENG M J (郑梦杰), XIONG D S (熊冬生), PENG H (彭晖) *et al.* Expression and activity of anti-CD20 chimeric antibody fragment (Fab')₂. *China Immunity J* (中国免疫学杂志), 2002, **18**(10): 596-599
- [5] Patrick S, Daugherty, Gang Chen *et al.* Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single

2034

- [6] Yang Horwitz AH , Nadell R , Preugschat F *et al.* Chimeric immunoglobulin light chains are secreted at different levels : influence framework-1 amino acids. *Molecular Immunology* , 1994 **31**(9) 683 - 692
- [7] Sergey M. Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single

chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Engineering* , 1997 **10**(4) : 445 - 453

- [8] PENG H (彭晖) , YANG C Z (杨纯正) , FAN D M (范冬梅) *et al.* Homology modeling of anti-CD20 chimeric antibody Fab' fragment. *High Tech Lett* (高技术通讯) 2001 **11**(12) 4 - 8

One Amino Acid Mutation in an Anti-CD20 Antibody Fragment That Affects the Yield Bacterial Secretion and the Affinity

LIU Yin-Xing XIONG Dong-Sheng FAN Dong-Mei SHAO Xiao-Feng

XU Yuan-Fu ZHU Zhen-Ping YANG Chun-Zheng*

(*The National Laboratory of Experimental Hematology , Institute of Hematology , Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College , Tianjin 300020 , China*)

Abstract Monoclonal antibodies (mAb) directed against CD20 , either unmodified or in radiolabeled forms , have been successfully exploited in clinic as effective therapeutic agents in the management of non-Hodgkin 's B-cell lymphoma . The antibody fragment is a potential agent in image and therapy of tumor . To further improve the soluble expression of anti-CD20 antibody Fab' fragment , PCR was used to mutate the anti-CD20 VL and VH genes and its biological activity was identified . The expression vector of chimeric antibody Fab' was constructed and expressed in *E. coli* . The data of mutant clone DNA sequence showed that the amino acid of light chain gene of the parent anti-CD20 antibody (HL₄₇) was successful mutated as Ser (GAG)-Asn (CAG) . The soluble expression of mutated anti-CD20 Fab' (CD20-7) was 3.8 mg/g dry cell weight , while the parent (CD20-2) was 1.3 mg/g dry cell weight . The affinity constant K_a of CD20-7 was 2.2×10^9 L/mol . The primary results of competitive assays by FACS showed that CD20-7 could partially block the sites through which parent antibody (HL₄₇) bind to Raji cells . There was difference in the Raji cells (CD20 +)-binding activity between the mutant CD20-7 and parent CD20-2 . The site mutation of anti-CD20 Fab' gene make it possible that the anti-CD20 antibody fragment was succeeded to obtain higher expression . In this thesis , we succeeded in completing mutation and expression of anti-CD20 Fab' genes , distinguishing its biological activity , and obtaining its highly expression . These period results will lay a foundation for development of other kind of anti-CD20 engineering antibody (for instance : Fab 'Diabody and miniantibody) , and make it possible for anti-CD20 antibody to be applied to tumor therapy in civil in the future .

Key words anti-CD20 antibody Fab' , gene mutation , CD20

Received : 12-09-2002

This work was supported by Grants from the State High Technology Research and Development Program (863 Program) of the Chinese Government (No. 2000141 and 20001AA215341) and Key Fund of Tianjin City Government (No.003119511) .

* Corresponding author. Tel : 86-22-27307938-3070 ; Fax : 86-22-27230740 ; © 中国生物工程学会 联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>