

鼻咽癌人源抗独特型单链抗体的制备及筛选

何小鹏, 李官成, 朱建高, 李跃辉, 周国华

Construction and Screening of Human Anti-Idiotypic Single Chain Antibodies of Nasopharyngeal Carcinoma

He Xiao-Juan, Li Guan-Cheng, Zhu Jian-Gao, Li Yue-Hui, Zhou Guo-Hua

中南大学湘雅医学院
肿瘤研究所,
湖南长沙 410078
Cancer Research Institute,
Xiangya Medical School,
Central South University,
Changsha, Hunan, 410078,
P. R. China

通讯作者:李官成

Correspondence to: Li Guan-Cheng

Tel: 86-731-4805445

Fax: 86-731-2355042

E-mail: libsun@public.cs.hn.cn

基金项目:国家自然科学基金(No. 30270521);教育部留学回国人员科研启动基金;湖南省卫生厅基金(No. 9909);湖南省自然科学基金(No. 01JJY2021)

Fund: National Natural Science Foundation of China (No. 30270521); Ministry of Education Returned Student Fund; Hunan Public Health Fund (No. 9909); Hunan Scientific Fund (No. 01JJY2021)

收稿日期:2003-06-26

修回日期:2003-07-21

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: The potential of anti-idiotypic antibody as a surrogate of tumor antigen for cancer therapy has been demonstrated in clinical investigations. But at present, many anti-idiotypic antibodies are mouse-original antibodies, which can cause human anti-mouse antibody (HAMA) response and decrease the curative effect. The objective of this study was to construct phage human anti-idiotypic antibody library and select β type anti-idiotypic single chain antibodies bearing the internal image of the nasopharyngeal carcinoma (NPC) associated antigen to overcome human anti-mouse antibody response caused by application of mouse-original anti-idiotypic antibody. METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with NPC were immunized in vitro by anti-NPC monoclonal antibody FC2 and transformed by Epstein-Barr virus (EBV). V_H and V_L genes were amplified by RT-PCR and combined to single chain fragments of variable region (scFv) genes. ScFv genes were cloned into vector fUSE5 and transformed into E. coli MC1061 to construct the scFv-displaying phage library. After four rounds of panning with monoclonal antibody (mAb) FC2, the β type Ab2 scFv were selected by Sandwich ELISA and binding inhibition test. RESULTS: Of 10 NPC patients, 8 patients showed their B cells immunized by FC2 and transformed by EBV produced anti-idiotypic antibodies to NPC. Five types of V_H genes and 7 types of V_L genes were obtained by RT-PCR amplification and then connected to form 14 scFv genes. ScFv genes were transduced into E. coli MC1061. The library capacity was 1.5×10^8 clones. After panning, 270 phage clones were selected randomly and 91 FC2-positive clones were obtained by Sandwich ELISA, the positive ratio was 33.7%. Five clones, which might display β type Ab2 scFv, were selected by binding inhibition test. CONCLUSION: The strategy for preparing phage anti-idiotypic antibody library and selecting β type Ab2 scFv by immunization in vitro, EBV transformation, and phage display technique is feasible, which provide a way for preparing cancer vaccine using β type Ab2 scFv.

KEYWORDS: Nasopharyngeal carcinoma; Phage display technique; Anti-idiotypic antibody

【摘要】背景与目的:抗独特型抗体作为肿瘤抗原替代物可用于肿瘤治疗,这已在临床试验中得到证实。但由于目前所使用的抗独特型抗体多为鼠源性,用于人体可产生人抗鼠抗体反应,从而影响疗效。本实验拟构建噬菌体人源抗独特型抗体库,并从中筛选出能模拟鼻咽癌相关抗原的 β 型抗独特型单链抗体 scFv(Ab2 β scFv),以解决鼠源性抗独特型抗体用于临床所产生的人抗鼠抗体反应。方法:体外致敏并用EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)转化鼻咽癌患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用RT-PCR分别扩增 V_H 和 V_L 基因并连接成scFv基因,将scFv基因与载体fUSE5连接后,转化大肠杆菌MC1061,构建噬菌体呈现型

scFv 库。在用单抗 FC2 对文库进行 4 轮筛选后,用 Sandwich ELISA 和结合抑制法从中筛选出 β 型 Ab2 scFv。结果:用单抗 FC2 体外致敏并经 EBV 转化的 10 例鼻咽癌患者的 PBMC 中,8 例有鼻咽癌抗独特型抗体产生。经 PCR 分别扩增出 5 种 $V_H(\gamma, \mu)$ 和 7 种 $V_L(\kappa, \lambda)$ 基因,经连接组成 14 种 scFv 基因。在与载体连接后,导入大肠杆菌 MC1061,得到库容为 1.5×10^8 的初级噬菌体抗独特型抗体库。经富集筛选后,从中随机挑取 270 个克隆进行 ELISA 筛选,得到 91 个 Ab2 scFv 单克隆,阳性率为 33.7%。再用结合抑制法从中初步筛选出 5 个可能为 β 型的 Ab2 scFv。结论:联合应用体外致敏、EBV 转化及噬菌体呈现技术构建噬菌体抗独特型抗体库,并从中筛选 β 型 Ab2 scFv 是可行的,这为进一步用 Ab2 β scFv 制备肿瘤疫苗奠定了基础。

关键词:鼻咽肿瘤;噬菌体呈现技术;抗独特型抗体

中图分类号:R739.63 **文献标识码:**A

文章编号:1000-467X(2004)02-0124-06

根据 Jerne^[1]的免疫网络学说和内影像理论,抗独特型抗体 (Ab2 β)能模拟抗原结构,作为抗原替代物发挥生物学效应,这引起了众多学者的浓厚兴趣。在肿瘤治疗领域,针对抗独特型抗体的研究已经成为热点之一^[2,3]。我室利用杂交瘤技术制备了两株鼻咽癌抗独特型单抗 (2H4 和 5D3),临床研究^[3]发现,在接受抗独特型抗体治疗的患者血清中均检测到抗抗独特型抗体 Ab3,抗肿瘤抗体 Ab1' 水平均有不同程度的提高,血清中 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 水平也有不同程度的升高。提示 Ab2 有可能作为一种辅助疗法,通过提高患者免疫系统的抗肿瘤活性而有助于抑制肿瘤进一步转移或早期复发。然而,由于目前所使用的抗独特型疫苗多为鼠源性,用于人体可产生人抗鼠抗体反应 (human anti-mouse antibody, HAMA),限制了其在临床上的广泛应用。为解决这一难题,本实验采用体外致敏法和 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 转化联合噬菌体呈现技术,构建了鼻咽癌全套人源抗独特型抗体库,以期用人源抗独特型单链抗体 (Ab2 β scFv) 解决鼠源性抗独特型疫苗引起的 HAMA,为鼻咽癌的主动免疫治疗提供新的候选分子。

1 材料和方法

1.1 材料

抗鼻咽癌单抗 FC2^[4]、绒猴淋巴母细胞样细胞系 B95.8 由本室保存。E. coli MC1061、E. coli K802、E. coli K91Kan 及丝状噬菌体 fUSE5 由美国 Yale 大学 Garen 教授惠赠。胎牛血清 (FCS) 及小牛血清 (NBS) 为杭州四季青公司产品。rhIL-2、谷氨酰胺、丙

酮酸钠及环孢素 A 均为 Sigma 公司产品。RPMI-1640 培养基、琼脂糖、细菌培养基均购自 Gibco/BRL 公司。Trizol 试剂为 Gibco/BRL 公司产品。Sephacryl S-300 及 mRNA 纯化试剂盒为 Pharmacia 公司产品。cDNA 合成试剂盒为 Invitrogen 公司产品。PCR 产物纯化试剂盒为 QIAGEN 公司产品。少量质粒抽提试剂盒购自上海华舜公司。Taq DNA 酶购自上海生物工程公司。Sfi I 限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶均为 New England Biolabs 公司产品。PCR 引物 (见表 1) 参照 Cai 等^[5]的设计由美国生命技术公司合成。HRP 标记的羊抗人 IgG/IgM 购自北京邦定公司。HRP 标记的 FC2 由本室制备。HRP 标记的羊抗 M13 单克隆抗体 (HRP-anti-M13) 购自 Pharmacia 公司。10 份鼻咽癌患者 (经病理检查确诊) 的外周血标本取自湖南省肿瘤医院 (放疗前 1 天采集)。

1.2 方法

1.2.1 抗鼻咽癌单抗 FC2 的制备 按常规方法制备含单抗的小鼠腹水,依次经硫酸铵盐沉淀及 Sephacryl S-300 柱层析纯化,以间接 ELISA 确定具有抗体活性的层析组分。

1.2.2 鼻咽癌患者外周血单个核细胞的分离与致敏 无菌抽取 10 例鼻咽癌患者外周血各 5 ml,采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。将鼻咽癌患者的 PBMC 分成两组:一组用抗鼻咽癌 mAb FC2 (Ab1) 致敏,Ab1 按 20 mg/L 加入到培养的 PBMC 中,6~8 天后用 EBV 转化;另一组不用 Ab1 致敏,于 37℃ 条件下培养,第 2 天直接用 EBV 转化。两组所用培养基均为含 100 ml/L FCS 的 RPMI-1640 完全培养基 (含 2×10^4 U/L rhIL-2 及 2 mg/L 环孢素 A)。

1.2.3 EBV 转化 培养 B95.8 细胞至对数生长期,3 000 r/min 离心 5 min,取上清,经 0.22 μ m 滤膜过滤后,收集滤液,保存于 -70℃。按每 4×10^6 个 PBMC 加入 1 ml EBV 培养上清,于 37℃ 孵育 2 h。弃去上清,加入含 100 ml/L FCS 的 RPMI-1640 完全培养基,培养 2 周后,换用含 200 ml/L NBS 的 RPMI-1640 完全培养基。

1.2.4 转化细胞培养上清的筛选 采用 Sandwich ELISA 法。以纯化的单抗 FC2 (30 mg/L) 包被 96 孔板,4℃ 过夜。用 2% BSA 37℃ 封闭 2 h 后,分别加入收集的 B 细胞培养上清,37℃ 孵育 2 h 或 4℃ 过夜,以 PBST 洗板 5 次;再加入 HRP 标记的羊抗人 IgG/IgM (HRP-GAH-IgG/IgM),37℃ 作用 2 h 后,用 ABTS 显色,于波长 405 nm 处测定吸光度值 (A_{405})。阴性对

表 1 扩增人免疫球蛋白基因的引物
Table 1 The Primers Employed in Amplifying Human Ig Genes

(A) Constant region forward-primers	
IgG	5'-GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT-3';
IgM	5'-TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT-3';
κ	5'-AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT-3';
λ	5'-TGA AGA TTC TGT AGG GGC CAC TGT CTT-3'.
(B) V _H back-primers with Sfi I site	
V _H 1, 4, 6	5'-ATG GCT CAG GGT TCG GCC GAC GTG GCC CAG GTR CAG CTG SWG SAG TCK GG-3';
V _H 2	5'-ATG GCT CAG GGT TCG GCC GAC GTG GCC CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG-3';
V _H 3, 5	5'-ATG GCT CAG GGT TCG GCC GAC GTG GCC GAG GTG CAG CTG KTG SAG TCT GS-3'.
(C) V _κ back-primers with linker	
V _κ 1, 4	5'-GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC SWG ATG ACC CAG TCT CC-3';
V _κ 2, 3, 6	5'-GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCA GAW RTT GTG MTG ACK CAG TCT CC-3';
V _κ 5	5'-GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCA GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'.
(D) V _λ back-primers with linker	
V _λ 1, 2	5'-GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCA CAG TCT GYS YTG ACK CAG CCG CC-3';
V _λ 3a, 3b	5'-GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCA TCY TMT GWG CTG ACT CAG SMA CC-3';
V _λ 4, 5	5'-GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCA CAS GYT RTA CTG ACT CAA CCG YC-3'.
(E) J _H forward-primers with linker	
	5'-GCC ACC CGA CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC TGA RGA GAC GGT GAC CRK KGT YCC-3'.
(F) J _L forward-primers with Sfi I site	
J _L 1	5'-AGT CTA ACG TTC GGC CCC AGC GGC CCC ACG TTT GAT YTC CAS CTT GGT CCC-3';
J _L 2	5'-AGT CTA ACG TTC GGC CCC AGC GGC CCC ACG TTT KAT MTC CAS YYK KGT CCC-3';
J _L	5'-AGT CTA ACG TTC GGC CCC AGC GGC CCC ACC TAR RAC GGT SAS CTK GGT CCC-3'.

Degenerate nucleotides: Y = C or T, R = A or G, W = A or T, S = C or G, K = T or G, M = A or C.

Note: Primer sequences are written 5 to 3 forward primers are complementary to the sense stran, and back primers are complementary to the antisense strand.

照为含 100 ml/L FCS 的 RPMI-1640 培养基。阳性阈值为阴性对照孔的 A₄₀₅ 值(均值)与 3 倍标准差之和 ($\bar{x} + 3s$)。将阳性孔的细胞扩大培养至 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个。

1.2.5 scFv 的构建 其主要步骤如下: (1) 用 Trizol 试剂分别提取鼻咽癌患者扩大培养的 B 细胞

中的总 RNA, 全部混合, 用 mRNA 纯化试剂盒纯化 mRNA, 以 oligo(dT)₁₈ 为引物, 用 cDNA 合成试剂盒反转录为 cDNA(第一链合成); (2) 以 cDNA(第一链)为模板, 进行 PCR(94℃ 1 min, 54℃ 1.5 min, 72℃ 2.5 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min) 扩增 IgG/IgM 的 V_H-C_{H1} 及 V_L-C_L 基因; (3) 以上述产物为模板, 选择 J 区前向引物和 V_H 后向引物进行 PCR (94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min) 扩增 V_H 和 V_L 基因, 并在 V_H 基因的羧基末端和 V_L 基因的氨基末端加上编码连接肽 (Gly₄Ser)₃ 的互补序列; (4) 将 V_H 和 V_L 等摩尔混合, 采用 PCR(94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 7 个循环) 使两者借编码连接肽连接到一起, 形成 scFv DNA。在加入 V_H 后向引物和 J_L 前向引物后进行 PCR(94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2min, 25 个循环), 使聚合的 scFv DNA 得到扩增。

1.2.6 噬菌体抗独特型抗体库的构建 用小量质粒抽提纯化试剂盒从含 fUSE5 的 K802 细菌中提取并纯化 fUSE5 RF, 用 Sfi I 分别酶切 fUSE5 RF 和 scFv, 取酶切后的 fUSE5 RF 和 scFv 及 T4 DNA 连接酶, 于 16℃ 作用 13 h。连接产物用酚/氯仿抽提、乙醇沉淀后, 溶于 20 μl ddH₂O 中。将此连接产物用电穿孔法转化新鲜制备的感受态细菌 MC1061。每次转化后, 用 1 ml SOC 洗下细菌, 共 12 次。将转化的细菌收集至锥形瓶中, 于 37℃ 以 220 r/min 摇动 1 h, 涂于含 15 mg/L 四环素的 2 × YT 琼脂糖平皿上, 37℃ 过夜, 根据长出的克隆数计算库容量。并向平皿中加入含 20 mg/L 四环素的 LB 培养基, 刮下平皿上所有菌落, 于 37℃ 以 220 r/min 摇动 1 h。再以 5 000 × g 离心 20 min。取上清, 用 0.45 μm 的滤膜过滤后, 滤液即为噬菌体抗独特型抗体库(初级抗体库)。将初级抗体库经 20% PEG 8000、2.5 mol/L NaCl 沉淀 2 次后, 溶解于 PBS 中。

1.2.7 以 FC2 单抗亲和筛选噬菌体抗体 scFv 库 将噬菌体抗体与等体积 2% BSA 混合后, 加入到包被有 FC2 并经 2% BSA 封闭过的酶标板中, 每孔 100 μl, 于 37℃ 孵育 2 h 或 4℃ 过夜。以 PBST 洗板 5 次, 除去未结合噬菌体抗体, 再于各孔中分别加入 100 μl 洗脱缓冲液 (0.1 mol/L HCl-Glycine, pH 2.2, 含 0.1% BSA), 37℃ 孵育 30 min, 以洗脱与 FC2 结合的噬菌体抗体。洗脱后, 立即加入 75 μl 的中和缓冲液 (1 mol/L Tris-HCl, pH 9.6) 中和至 pH 8.0 左右。将洗脱的噬菌体抗体与 3 ml 对数生长期的大肠杆菌 K91Kan 于 37℃ 静止感染 30 min 后, 将细菌

铺到含 20 mg/L 四环素的 LB 琼脂糖平皿上,以扩增噬菌体抗体。第 2 天将长出的菌落用含 40 mg/L 四环素的 LB 培养基刮下,37℃ 摇菌 1 h。5 000 × g 离心 20 min,取上清,经 0.45 μm 滤膜过滤除菌后,用 PEG/NaCl 沉淀噬菌体抗体,将沉淀溶解于 PBS 中。如此进行 4 轮筛选和富集。

1.2.8 Sandwich ELISA 筛选针对 FC2 的噬菌体抗独特型 scFv 单克隆 从第 4 轮筛选后涂布的 LB 平皿上挑取单克隆至 2 ml 含 40 mg/L 四环素的 LB 培养基中,37℃ 摇菌过夜。离心、取上清,分别加入到包被有 FC2 单抗并经 2% BSA 封闭的酶标板中,每孔 100 μl,于 37℃ 作用 2 h。以 PBST 洗板 5 次后,按每孔 100 μl 加入 HRP 标记的抗 M13 单克隆抗体 (HRP-anti-M13),37℃ 作用 1 h。用 PBST 充分洗涤后,以 ABTS 显色,于波长 405 nm 处测定吸光度值 (A_{405})。以空白噬菌体 fUSE5 作为阴性对照。阳性阈值为阴性对照 A 值的均值与其 3 倍标准差之和 ($\bar{x} + 3s$)。

1.2.9 结合抑制法筛选针对 FC2 的 β 型噬菌体抗独特型 scFv 单克隆 培养人鼻咽癌 HNE2 细胞,铺 96 孔细胞抗原板,0.15% 戊二醛室温固定 10 min,2% BSA 于 37℃ 封闭 2 h,以除去非特异性蛋白结合位点。将步骤 1.2.8 筛选出的阳性克隆的噬菌体上清按不同稀释度稀释后,各取 50 μl 与 50 μl 酶标 FC2 混合,加入到抗原板中,37℃ 作用 2 h。以 PBST 洗板 5 次后,用 ABTS 显色,测 A_{405} 值。以空白噬菌体 fUSE5 和 PBS 为对照。噬菌体抗体抑制单抗与细胞结合的程度按下式计算:抑制率 = $1 - (\text{实验孔 } A_{405} \text{ 值} / \text{对照孔 } A_{405} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 淋巴细胞的 EBV 转化

用 Ab1 体外致敏的 PBMC 培养至 6~8 天时,可见集落样淋巴母细胞化。两组 PBMC 在加入 EBV 上清后,细胞的形态表现相似,开始可见大量淋巴细胞死亡。2 周左右时,可见 Ab1 致敏组有少量克隆生成,主要分布于孔周围,并逐渐长成团。4 周左右时,将细胞加于 25 cm² 的一次性塑料瓶中扩大培养,再过 4~6 周左右收集细胞。

2.2 抗独特型抗体的检测

未用 Ab1 致敏的人鼻咽癌 PBMC 培养 6~8 天后,检测其上清均呈阴性。经 EBV 转化的 10 例鼻咽癌患者的 PBMC 中,除 2 例呈阴性外,其余 8 例均可检测出有抗独特型抗体的产生。

2.3 Ig 基因扩增产物的鉴定

以 cDNA (第一链) 为模板进行 PCR,分别扩增出 3 种 V_H-C_{H1}(γ)、3 种 V_H-C_{H1}(μ)、2 种 V_κ-C_κ、3 种 V_λ-C_λ 基因,其分子大小均为 700 bp 左右(见图 1)。以上述产物为模板,再次进行 PCR 扩增出 3 种 V_H-J_H(γ)、2 种 V_H-J_H(μ)、4 种 V_κ-J_κ 和 3 种 V_λ-J_λ 基因,分子大小为 400 bp 左右(见图 2)。5 种 V_H 基因和 7 种 V_L 基因经连接组成 14 种 scFv 基因,其分子大小为 800 bp 左右(见图 3)。

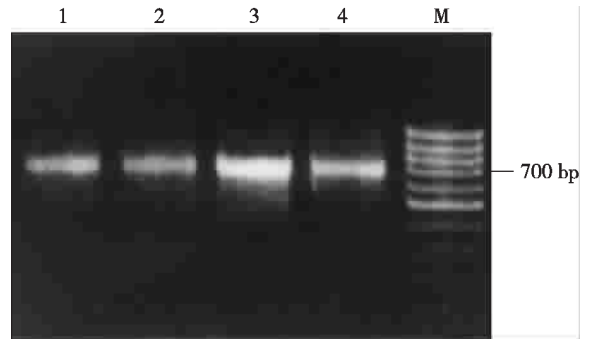


图 1 PCR 扩增 V_H-C_{H1} 和 V_L-C_L 基因的电泳结果

Figure 1 V_H-C_{H1} and V_L-C_L genes amplified by PCR
1: IgG_{V_H}-C_{H1}; 2: IgG_{V_L}-C_L; 3: IgM_{V_H}-C_{H1}; 4: IgM_{V_L}-C_L; M: 100 bp marker

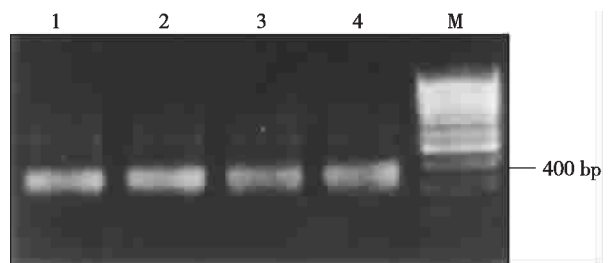


图 2 PCR 扩增 V_H 和 V_L 基因的电泳结果

Figure 2 V_H and V_L genes amplified by PCR
M: 100 bp marker; 1: IgG-V_H; 2: IgM-V_H; 3: V_L-λ; 4: V_L-κ

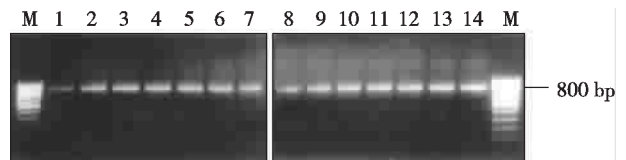


图 3 PCR 扩增 14 种 scFv 基因的电泳结果

Figure 3 Fourteen types of single chain Fv genes amplified by PCR
M: 100 bp marker; 1-14: 14 scFv genes

2.4 噬菌体抗独特型抗体的筛选

根据转化产物在 LB 平皿上长出的克隆数,计算所构建的重组噬菌体抗独特型抗体的库容量约为 1.5×10^8 个克隆。以 FC2 单抗对重组噬菌体抗体库进行 4 轮筛选和富集后,任意挑取 270 个单克隆进

行 Sandwich ELISA 鉴定。得到抗 FC2 单抗的单克隆 91 个,阳性率为 33.7%。

2.5 阳性噬菌体抗独特型抗体 β 型的鉴定

对筛选出的 91 个阳性克隆进行结合抑制 ELISA 分析。结果发现有 15 个在原浓度时能抑制 FC2 单抗与细胞的结合,抑制率为 $(48.47 \pm 9.30)\%$ (见图 4)。且有 5 个 A_{405} 值随稀释倍数的增加而上升,抑制百分率也逐渐下降,呈剂量依赖关系(见图 5)。表明这 5 个克隆呈现的抗独特型 scFv 可能为 β 型。

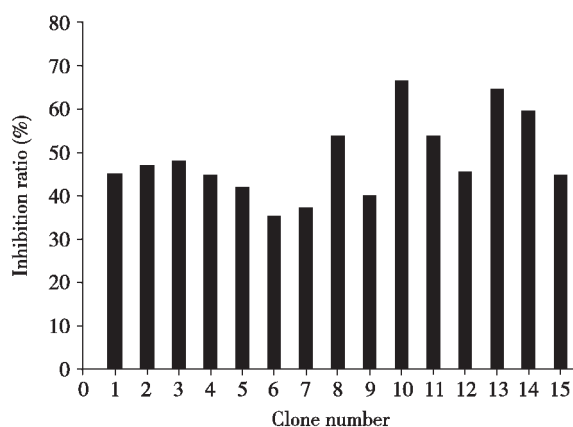


图 4 15 个阳性噬菌体抗独特型 scFv 的结合抑制实验结果
Figure 4 Results of binding inhibition test of 15-positive phage anti-idiotypic scFv

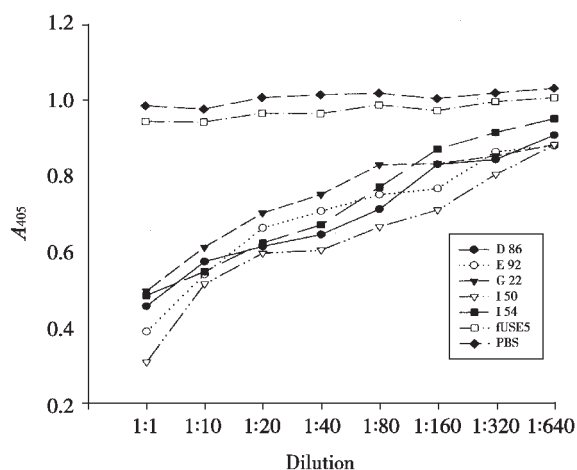


图 5 结合抑制实验结果

Figure 5 The binding inhibition of Ab2 scFv with FC2

3 讨论

抗独特型疫苗是免疫网络理论的直接应用,其模拟抗原的功能在肿瘤免疫治疗领域已展现出诱人的前景。应用抗独特型疫苗进行肿瘤防治有许多优

点:(1)不含有病毒等传染性致癌物质;(2)可在体外大量制备;(3)能去除机体免疫耐受状态;(4)无抗原调变。但由于目前所使用的抗独特型疫苗多为鼠源性,用于人体可产生 HAMA 反应,影响疗效,因而有必要对其进行改进。Durrant 等^[6]用人鼠杂交瘤细胞制备了人源性大肠癌抗独特型单抗 105AD7,临床试验显示出较好的抗癌效应。但该法制备人源性抗独特型单抗十分困难,难以大规模用于临床。此后,Tripathi 等^[7]和 Reinartz 等^[8]采用基因工程技术,把鼠源性杂交瘤抗体改成小分子单链抗体,分别制备了大肠癌和卵巢癌抗独特型抗体的单链抗体,动物实验显示这些抗体具有良好的抗肿瘤作用。但由于其来源终究为鼠源性,难以从根本上解决 HAMA 反应。因此,真正具有实用前途的是用基因工程技术制备全人源化的抗独特型抗体。

自从 McCafferty 等^[9]首先在丝状噬菌体表面成功显示有抗原结合特性的抗体片段以来,噬菌体抗体库技术已成为筛选特异抗体的强有力工具。将 B 细胞全套可变区基因克隆出来,组装成噬菌体抗体的群体,即为噬菌体抗体库。理论上,包括各种抗原特异性的抗体的库容量须达到 1×10^{14} 以上。但目前由于细菌转化效率的限制,所构建的抗体库容量一般在 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 之间,这样基本上不可能得到一个抗体基因原始的 V_H 与 V_L 结构亚单位的配对^[10],从而增加了筛选特异性抗体的难度。为此,本研究采用体外致敏与 EBV 转化相结合的方法,通过前者使 B 细胞内抗体可变区基因发生高突变,从而产生具有不同亲和力的抗体^[11];而 EBV 则通过病毒表面蛋白 gp350/220 与细胞表面的补体受体 (CR2/CD21) 结合而进入被感染的细胞,使 B 细胞在体外连续传代,从而可使数量较少的抗原特异性 B 细胞得到增殖,增加筛选的阳性率^[12]。通过联合使用以上方法,我们构建了一个库容量为 1.5×10^8 的噬菌体抗独特型抗体库。在对文库进行 4 轮亲和筛选和富集后,筛选出 91 个针对 FC2 的噬菌体抗独特型抗体克隆,阳性率为 33.7%。这表明本抗体库的构建基本上是成功的。

由免疫网络理论可知:Ab2 有 α 、 β 、 γ 、 δ 四种类型,其中只有 β 型能模拟肿瘤抗原,诱导机体产生抗肿瘤免疫。本研究通过采用结合抑制法进行筛选,得到 5 个阳性克隆。它们能抑制 FC2 与鼻咽癌细胞的结合,且呈剂量依赖关系。因此,初步判断这 5 个克隆为 β 型 Ab2 scFv。但与本室以前制备的鼠源性鼻咽癌抗独特型单抗 (2H4 和 5D3) 相比^[13],其亲和

力均有不同程度的降低。分析其原因可能是由于在基因操作中丢失了通过免疫系统最初已选择的高亲和力和 V_H 与 V_L 的原始配对^[14],也可能是因为单抗为双价,而 scFv 为单价所致。

综上所述,联合应用体外致敏、EBV 转化及噬菌体呈现技术构建抗独特型抗体库并筛选能模拟肿瘤抗原的 β 型 Ab2 scFv 是可行的。鼻咽癌抗独特型抗体库的构建及 β 型 Ab2 scFv 的获得,为进一步制备抗鼻咽癌的肿瘤疫苗奠定了坚实的基础。

[参 考 文 献]

- [1] Jerne NK. Towards a network theory of the immune system [J]. Ann Immunol(Paris), 1974, 125C(1-2): 373-389.
- [2] Foon KA, Lutzky J, Baral RN, et al. Clinical and immune response in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking disialoganglioside GD2 [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(2): 376-384.
- [3] Li G, Xie L, Zhou G, et al. A clinical trail of active immunotherapy with anti-idiotypic vaccine in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. Chin Med J, 2002, 115(4): 567-570.
- [4] 孙去病,郭敏,李小玲,等. 鼻咽癌的单克隆抗体研究:杂交瘤细胞系的建立及初步鉴定 [J]. 湖南医学院学报, 1987, 12(1):1-3.
- [5] Cai X, Garen A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(14): 6537-6541.
- [6] Durrant LG, Buckley DJ, Spendlove I, et al. Low dose of 105AD7 cancer vaccine preferentially stimulate anti-tumor T-cell immunity [J]. Hybridoma, 1997, 16(1): 23-26.
- [7] Tripathi PK, Qin H, Deng S, et al. Antigen mimicry by an anti-idiotypic antibody single chain variable fragment [J]. Mol Immunol, 1998, 35(13): 853-863.
- [8] Reinartz S, Wagner U, Giffels P, et al. Immunological properties of a single-chain fragment of the anti-idiotypic antibody ACA125 [J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 49(4-5): 186-192.
- [9] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. Nature, 1990, 349(6301): 552-554.
- [10] Cai X, Garen A. A melanoma-specific V_H antibody cloned from a fusion phage library of a vaccinated melanoma patient [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6280-6285.
- [11] Allen D, Cumano A, Dildrop R, et al. Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development [J]. Immunol Rev, 1987, 96: 5-22.
- [12] Duenas M, Chin LT, Malmborg AC, et al. In vitro immunization of naive human B cells yields high affinity immunoglobulin G antibodies as illustrated by phage display [J]. Immunology, 1996, 89(1): 1-7.
- [13] Li G, Hu J, Zhou G, et al. Monoclonal anti-idiotypic antibody bearing the internal image of nasopharyngeal carcinoma associated antigen [J]. Chin Med J, 2001, 114(9): 962-966.
- [14] Winter G, Milstein C. Man-made antibodies [J]. Nature, 1991, 349(6307): 293-299.

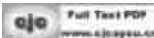
[编辑:刘玮;校对:甘可建]

· 简 讯 ·

《癌症》实现在 MEDLINE“实时点击”浏览 PDF 全文

《癌症》杂志网站(<http://www.cjcsysu.cn>)开通后,编辑部及时与美国国立医学图书馆联系,按 PubMed 检索系统的要求提供相关电子文档,现已顺利通过测试,读者可通过在 MEDLINE 检索到的《癌症》引文“实时点击”浏览 PDF 格式全文,大大方便了读者,促进了作者与读者的广泛交流。欢迎广大读者浏览和利用本刊网站。

程序:

1. 登录 PubMed 系统(可通过本刊网站 <http://www.cjcsysu.cn> 上的“MEDLINE”栏目直接链接);
2. 检索到《癌症》引文后点击作者项进入摘要页(要检索《癌症》全部引文可用“ai zheng[jour]”检索词);
3. 点击  图标即可浏览到与该引文对应的 PDF 全文。