

## 抗肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体死亡受体 5 嵌合抗体的构建及其真核表达

陈 凤<sup>1,2</sup>, 郭雅彬<sup>1</sup>, 刘士廉<sup>1</sup>, 郑德先<sup>1</sup>, 刘彦信<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

<sup>2</sup>北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤分子生物学实验室, 北京 100142

通信作者: 刘彦信 电话: 010-65296409, 传真: 010-65105102, 电子邮件: liuyx2000@tom.com

**摘要:** **目的** 构建以人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 受体死亡受体 5 (DR5) 为抗原的鼠/人重组嵌合抗体。**方法** 采用基因工程技术, 扩增和克隆抗 DR5 嵌合抗体的轻、重链表达载体, 共转染二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-dhfr<sup>-</sup>), 筛选稳定分泌表达抗 DR5 嵌合抗体的细胞株。采用 ELISA 和 Western blotting 法鉴定抗体的人源性和抗体-抗原结合活性, 四唑盐/吩嗪硫酸甲酯比色法检测抗体的生物学活性。**结果** 获得了稳定表达和分泌抗人 DR5 的嵌合抗体 (anti-DR5 mV-hH) 的重组细胞; 与人 DR5 蛋白具有高的特异性结合活性; 能使体外培养的人髓性白血病 Jurkat 细胞和人结肠癌 HCT116 细胞的存活率分别下降到 73.15% 和 77.30%。**结论** 抗 DR5 嵌合抗体 anti-DR5 mV-hH 具有抗肿瘤活性, 为发展人源化抗体药物的研究奠定了基础。

**关键词:** 抗死亡受体 5 嵌合抗体; 中国仓鼠卵巢细胞; 人 IgG 轻链; 人 IgG 重链

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2008)06-0690-06

**DOI:** 10.3881/j.issn.1000-503X.2008.06.014

## Construction and Expression of Anti-tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-inducing Ligand Receptor Death Receptor 5 Chimeric Antibody in Eukaryotic Cells

CHEN Feng<sup>1,2</sup>, GUO Ya-bin<sup>1</sup>, LIU Shi-lian<sup>1</sup>, ZHENG De-xian<sup>1</sup>, LIU Yan-xin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,  
CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Oncology, Peking University School of Oncology, Beijing Cancer  
Hospital & Institute, Beijing 100142, China

Corresponding author: LIU Yan-xin Tel: 010-65296409, Fax: 010-65105102, E-mail: liuyx2000@tom.com

**ABSTRACT: Objective** To construct the human/mouse chimeric antibody of a functional anti-death receptor 5 (DR5) antibody. **Methods** The viable region of light chain (VL) and viable region of heavy chain (VH) genes of anti-DR5 antibody were amplified and cloned into the light- and heavy-chain expression vectors respectively, then the recombinant plasmids were co-transfected into dihydrofolate reductase<sup>-</sup> Chinese hamster ovary cell (CHO-dhfr<sup>-</sup>) for expression. The positive clone was screened by the two selective genes (*neo* and *dhfr*). The humanization and specificity of chimeric antibody was identified by ELISA and Western blotting, and

the tumoricidal activity of the expressed chimeric antibody was detected by tetrazolium salt phenazine methosulfate assay. **Results** The expression vectors stably expressed chimeric antibody in CHO-dhfr<sup>-</sup>. In the cell supernatant of the F4' clone, the human IgG heavy constant region and light constant region were identified. Moreover, the secreted chimeric antibody retained the binding capacity to the antigen (DR5) and decreased the cell viability of Jurkat and HCT116 cells to 73.15% and 77.30% *in vitro* respectively. **Conclusion** The human/mouse anti-DR5 chimeric antibody has been successfully expressed in eukaryotic cells and shows tumoricidal activity, which establishes a foundation for the future research of humanized antibody medicine.

**Key words:** anti-death receptor 5 chimeric antibody; Chinese hamster ovary cell; human IgG light chain; human IgG heavy chain

*Acta Acad Med Sin*, 2008,30(6):690-695

死亡受体 5 (death receptor 5, DR5) 是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 的功能性受体, 凋亡因素诱导的二者相互结合作用, 能有效地激活细胞内的凋亡信号分子和一系列天冬蛋白酶的级联反应, 最终导致细胞发生凋亡<sup>[1]</sup>。TRAIL/DR5 系统诱导的凋亡作用能选择性地杀死肿瘤细胞, 抑制多种小鼠体内移植瘤的生长和形成, 对正常细胞无影响<sup>[2-4]</sup>。本实验室早期研究中, 筛选到一个功能性抗 DR5 单克隆抗体, 定名为 AD5-10, 其能诱导体外培养的多种肿瘤细胞死亡, 体内实验也证明其具有强烈地抑制肿瘤生长的活性并对正常组织无影响<sup>[5]</sup>。另有研究显示在小鼠体内, 腺相关病毒介导 AD5-10 单链抗体 (single chain variable fragment, scFv) 的表达可以诱导肿瘤细胞发生凋亡以及抑制移植瘤的生长<sup>[6]</sup>。然而在临床治疗中, 单克隆抗体因自身的免疫原性可能引起人抗鼠抗体 (human anti-mouse antibody, HAMA) 反应<sup>[7]</sup>。本研究利用基因工程技术将鼠源性抗 DR5 抗体 AD5-10 的可变区和人源抗体的完整恒定区连接起来, 组建成抗 DR5 人鼠嵌合抗体, 以减少 HAMA 反应并发挥抗体分子依赖的细胞毒作用。

## 材料和方法

**材料** 二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢细胞 (dihydrofolate reductase<sup>-</sup> Chinese hamster ovary cell, CHO-dhfr<sup>-</sup>) 为本室保存, 培养在含有次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷与 10% 透析胎牛血清 (Hyclone, 美国) 的 IMDM 培养基 (GIBCOBRL, 美国) 中。Jurkat 细胞由本室保存, 培养在 RPMR1640 培养基 (GIBCOBRL, 美国) 中。抗 DR5-scFv 原核表达载体 pET15b-scFv 由本室构建。含有人的轻链  $\kappa$  恒定区的

轻链表达载体 pKN100 和含有人的重链  $\gamma$  恒定区的重链表达载体 pG1D105<sup>[8]</sup> 由中国医学科学院血液学研究所实验血液学国家重点实验室杨纯正教授馈赠。高保真 Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制酶 BamH I、Hind III 均购自 TakaRa 公司。Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 购自 Invitrogen 公司。聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自 PALL 公司。羊抗人 IgG (H+L) 抗体购自 KPL 公司, 人 IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG Fc 段抗体、羊抗人  $\kappa$  链抗体购自 Sigma 公司。HRP 标记的兔抗羊二抗购自北京中杉金桥公司。蛋白免疫杂交检测试剂盒购自 GE healthcare 公司。

引物序列: PH<sub>1</sub> 为 5'CTAGTAGCAACTGCAACTG-GAGTACATTCACAGATCCAGTTGG 3', PH<sub>2</sub> 为 5'GGA-TCCACTCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTG3', PL<sub>3</sub> 为 5'CTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATGTTG-TGATGACC 3', PL<sub>4</sub> 为 5'GGATCCACTCACGTTTTATT-TCCAGCTTGG 3', P<sub>5</sub> 为 5'AAGCTTATGGGATGGTCAT-GTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACT 3', 下划线为酶切位点。以上引物均由上海生工生物公司合成。

**抗 DR5 嵌合抗体可变区的克隆及其表达载体的构建和鉴定** 以抗 DR5-scFv 原核表达载体 pET15b-scFv 为模板, 以 PH<sub>1</sub> 和 PH<sub>2</sub> 为引物进行 PCR; 扩增抗 DR5 嵌合抗体的重链可变区 (viable region of light chain, VH) 基因片段, 以 PL<sub>3</sub> 和 PL<sub>4</sub> 为引物进行 PCR; 扩增抗 DR5 嵌合抗体的轻链可变区 (viable region of heavy chain, VL) 基因片段, 由引物 P<sub>5</sub> 和 PH<sub>2</sub>、P<sub>5</sub> 和 PL<sub>4</sub>, 利用融合 PCR 方法将哺乳动物分泌蛋白的信号肽序列分别加在 VH 和 VL 的 5'端。扩增产物 VL 和 pKN100 载体用 BamH I 和 Hind III 进行酶切、连接, 构建成抗 DR5 嵌合抗体的轻链表达载体 pKN100VL; 扩增产物 VH 和 pG1D105 载体用 BamH

I 和 HindⅢ 进行酶切、连接，构建成抗 DR5 嵌合抗体的重链表达载体 pG1D105VH。利用双酶切法 (BamH I 和 HindⅢ) 以及测序鉴定阳性轻、重链表达载体中插入片段的大小和序列的正确性。

**CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞的转染及阳性克隆的筛选** 将  $1 \times 10^5$  个 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞铺于 24 孔细胞培养板中，用含 10% 透析胎牛血清、0.03 mmol/L 次黄嘌呤、0.003 mmol/L 胸腺嘧啶脱氧核苷的完全培养基培养。利用 Lipofectamine™ 2000 将等量的 pKN100VL 和 pG1D105VH 质粒共转染 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞，24 h 后换成选择性培养基 (不含黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷)，并加入 800 μg/ml 的 G418。以后每 4 天换 1 次液，直至细胞克隆形成。将筛选 2 周左右的细胞消化后，稀释到每孔 1 个细胞的浓度，转入 96 孔培养板中培养形成单细胞克隆。

**ELISA 测定抗 DR5 嵌合抗体的人源性和抗原结合特异性** 以 2 μg/ml 的羊抗人 IgG (H + L) 抗体包被酶标板，封闭后，加入待测克隆的细胞上清和人 IgG，4℃ 过夜，PBS 洗 3 次后，加入羊抗人 IgG Fc-HRP，室温孵育 2 h，加入邻苯二胺显色后，读取 490 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值。以 2 μg/ml DR5 蛋白包被酶标板，加入克隆的细胞培养上清及羊抗人 IgG Fc-HRP 孵育，显色后，读取 OD490 的值，以测定抗原结合特异性。

**Western blotting 法鉴定抗 DR5 嵌合抗体的人源性和抗原结合特异性** 分别取 40 μl 待测克隆和未转染质粒的 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞的培养上清，与 5 × SDS-PAGE 样品缓冲液混合，100℃ 变性 5 min 后，进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕，利用半干转膜仪将蛋白转移到 PVDF 膜上，用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h，加入封闭液稀释的羊抗人 IgG Fc-HRP 抗体或羊抗人 κ 链抗体，室温孵育 2 h 后，前者可直接显影；后者经 TBST 洗涤 3 遍后，加入 HRP 标记的兔抗羊二抗，室温孵育 2 h，以 TBST 洗涤 3 遍后，ECL 显色液中避光反应 1 min，X-光胶片显影。为鉴定抗原结合活性，将 0.5 ~ 2 μg 的 DR5 蛋白与 5 × SDS-PAGE 样品缓冲液混合，100℃ 变性 5 min 后，进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕，将蛋白转移到 PVDF 膜上，分别以未转染 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞上清和待测克隆的细胞上清为一抗，4℃ 过夜，TBST 洗涤 3 遍，然后加入羊抗人 IgG Fc-HRP 抗体室温 2 h，TBST 洗涤 3 遍，加底物反应，X-光胶片显影。

**四唑盐/吩嗪硫酸甲酯 (tetrazolium salt phenazine methosulfate, MTS-PMS)**

**比色法检测细胞生存活性** 分别取人 T 淋巴细胞白血病细胞 Jurkat 和人结肠癌细胞 HCT116，按  $1 \times 10^4$  个细胞/孔铺于 96 孔细胞培养板中，用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h 后，加入 PBS (对照组)、未转染质粒的 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞上清或待测克隆的细胞上清，同时取 100 ng/ml AD5-10 做为阳性对照。继续培养 24 h 后，每孔加入 20 μl MTS-PMS 溶液 (2 mg/ml MTS, 15 μmol/L PMS)，培养箱中继续培养 3 h，酶标测定仪在 490 nm 波长处测定 OD 值。同时利用冷冻干燥浓缩法将待测克隆的细胞上清浓缩 2 倍和稀释 1 倍后检测其杀伤肿瘤活性。实验组和对照组均设 3 个平行孔，每个实验重复 3 次以上。细胞存活率 = (实验组 OD 平均值/对照组 OD 平均值) × 100%。

**统计学处理** 采用 Excel 软件，运用 *t* 检验分析实验数据。*P* < 0.05 表示差异具有显著性。

## 结 果

**抗 DR5 抗体可变区的克隆及其嵌合抗体表达载体的构建和鉴定** 抗 DR5 嵌合抗体 IgG 轻重链表达载体 pKN100VL 和 pG1D105VH 的 PCR 产物及酶切鉴定图谱显示，酶切片段和 PCR 产物大小与预期的大小一致 (图 1)。测序结果显示克隆的 VL 和 VH 与亲代抗 DR5 单抗 AD5-10 的 VL 和 VH 序列完全相符。

**抗 DR5 嵌合抗体在 CHO 细胞中的表达及阳性克隆的筛选与鉴定结果** 经过 G418 筛选，共得到 49 个单细胞克隆。ELISA 检测得到 4 个表达人 IgG 轻重链恒定区的阳性克隆，其中表达人 IgG 恒定区量最高的为 F4' 和 G10'，F4' 克隆与未转染质粒的 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞上清相比差异具有显著性 (*P* < 0.01)。每个克隆与抗原结合活性的检测显示：F4' 和 G10' 两个克隆的抗原结合活性最高，其中 F4' 显著高于阴性对照 (*P* < 0.01) (表 1)。ELISA 检测结果证实 F4' 克隆细胞的培养上清中含有抗 DR5 嵌合抗体 IgG 的表达，初步估计其表达嵌合抗体的产量约为 86.1 ng/ml。

**阳性克隆 F4' 上清中表达的嵌合抗体的人源性及其抗原结合特异性** 阳性克隆 F4' 的细胞上清中有能被抗人 IgG Fc-HRP 抗体和抗人 IgG κ 抗体特异性识别的条带 (图 2A)，而未转染质粒的 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞上清中无此识别带。在阳性克隆 F4' 细胞上清中，

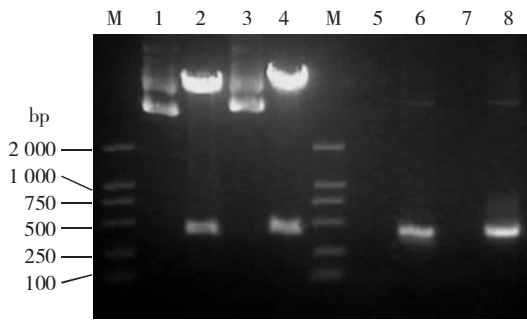


图 1 轻链可变区 PCR 扩增结果和嵌合抗体表达质粒酶切鉴定图谱

Fig 1 PCR amplification of variable region of heavy chain and light chain and restriction map of the two chimeric antibody expression vector pG1D105VH and pKN100VL

M. DL2000 marker; 1. pG1D105VH 质粒; 2. BamH I 和 Hind III 双酶切 pG1D105VH 质粒; 3. pKN100VL 质粒; 4. BamH I 和 Hind III 双酶切 pKN100VL 质粒; 5. 重链可变区 PCR 扩增阴性对照; 6. 重链可变区 PCR 扩增产物; 7. 轻链可变区 PCR 扩增阴性对照; 8. 轻链可变区 PCR 扩增产物

M. DL2000 marker; 1. pG1D105VH plasmid; 2. pG1D105VH plasmid digested with BamH I and Hind III; 3. pKN100VL plasmid; 4. pKN100VL plasmid digested with BamH I and Hind III; 5. negative control of PCR amplification of variable region of heavy chain; 6. PCR amplification of variable region of heavy chain; 7. negative control of PCR amplification of variable region of light chain; 8. PCR amplification of variable region of light chain

抗人轻链恒定区抗体识别的条带大小与阳性对照人 IgG 组几乎一致 (相对分子质量 30 000), 而抗人重链 Fc 抗体识别的条带稍小于阳性对照人 IgG, 与预期的大小一致。本研究设计的嵌合抗体 (命名为 anti-DR5 mV-hH) 的重链相对分子质量约为 49 000 (鼠 VH 相对分子质量 13 750 + 人抗体重链恒定区中  $\lambda$ -1 相对分子质量 36 000), 而人 IgG 重链大小相对分子质量为 53 000。即所构建嵌合抗体的 C 区得以成功表达, 并具有入源性。图 2B 显示, 只有阳性克隆 F4' 的细胞上清与 DR5 杂交才能显示条带, 即 F4' 克隆表达的产物能特异与 DR5 结合。

表 1 ELISA 法检测抗 DR5 嵌合抗体阳性克隆的抗原结合活性和人恒定区的结果

Table 1 ELISA detection results of antigen binding specificity and human constant region of anti-DR5 chimeric antibody

样本 Sample	OD <sub>490</sub> <sup>a</sup>	OD <sub>490</sub> <sup>b</sup>
PBS	0.496 ± 0.042	0.265 ± 0.034
CHO-dhfr <sup>-</sup> 上清 CHO-dhfr <sup>-</sup> supernatant	0.541 ± 0.048	0.188 ± 0.076
人 IgG Human IgG (50 ng/ml)	1.326 ± 0.069	0.200 ± 0.027
F4' 上清 F4' supernatant	2.284 ± 0.047*	0.684 ± 0.051*
G10' 上清 G10' supernatant	0.717 ± 0.104	0.340 ± 0.035

PBS: 磷酸盐缓冲液; CHO-dhfr<sup>-</sup>: 二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢巢细胞; OD: 光密度; DR5: 死亡受体 5; a. 以羊抗人 IgG (H + L) 抗体包被; b. 以 DR5 蛋白包被; 与 CHO-dhfr<sup>-</sup> 上清比较, \* P < 0.01  
 PBS: phosphate buffered solution; CHO-dhfr<sup>-</sup>: dihydrofolate reductase<sup>-</sup> Chinese hamster ovary cell; OD: optical density; DR5: death receptor 5; a. coated with goat anti-human IgG (H + L); b. coated with DR5; \* P < 0.01 compared with CHO-dhfr<sup>-</sup> supernatant

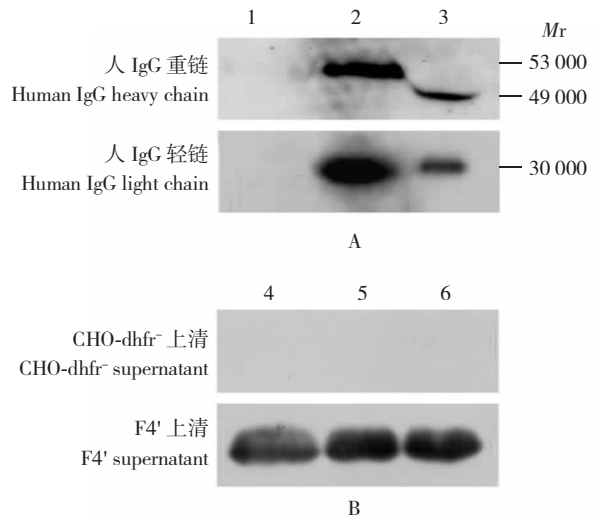


图 2 Western blotting 分析 F4' 上清中表达的嵌合抗体的人源性及其抗原结合特异性

Fig 2 Western blotting analysis of humanization and specificity of chimeric antibody

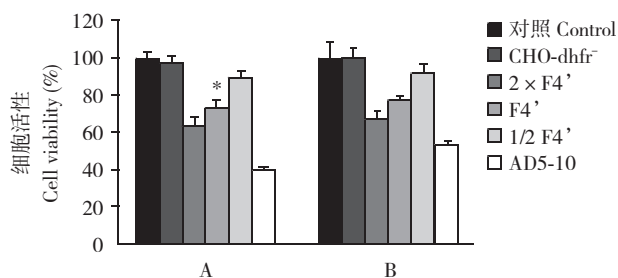
A. 用辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG Fc 段抗体作为鉴定抗体检测人 IgG 重链, 用羊抗人  $\kappa$  链抗体作为一抗检测人 IgG 轻链; B. DR5 蛋白作为抗原

1. CHO-dhfr<sup>-</sup> 上清; 2. 人 IgG; 3. F4' 上清; 4. 加入 DR5 0.5  $\mu$ g; 5. 加入 DR5 1  $\mu$ g; 6. 加入 DR5 2  $\mu$ g; Mr: 相对分子质量

A. The anti-human IgG Fc horseradish peroxidase antibody was used as the detection antibody for the identification of human IgG heavy chain, and anti-human  $\kappa$  chain antibody was used as the primary antibody for the checking of the human IgG light chain, and horseradish peroxidase linked anti-goat IgG was used as the second antibody; B. Purified DR5 protein were used as antigen

1. CHO-dhfr<sup>-</sup> supernatant; 2. human IgG; 3. F4' supernatant; 4. DR5 0.5  $\mu$ g; 5. DR5 1  $\mu$ g; 6. DR5 2  $\mu$ g; Mr: relative molecular mass

**抗 DR5 嵌合抗体体外杀伤肿瘤细胞活性** 人 T 淋巴细胞白血病细胞 Jurkat 和人结肠癌细胞 HCT116 经过阳性克隆 F4' 的细胞上清和阳性对照 100 ng/ml AD5-10 作用 24 h 后, Jurkat 细胞的存活率分别为 73.15% 和 40.05%, HCT116 细胞的存活率分别为 77.30% 和 53.62%。其中 F4' 上清处理后 Jurkat 细胞的存活率显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。细胞经浓缩 2 倍的 F4' 上清处理细胞后, Jurkat 和 HCT116 细胞的存活率分别为 62.56% 和 66.90%。经稀释 1 倍的 F4' 上清处理后, Jurkat 和 HCT116 细胞的存活率分别为 90.10% 和 91.90%, 稀释后的 F4' 上清对肿瘤细胞的杀伤活性降低 (图 3)。



**图 3** 阳性克隆 F4' 的细胞上清对肿瘤细胞生存活性的影响  
**Fig 3** Effect of F4' supernatant on the cell death of human cancer cells

A. Jurkat 细胞; B. HCT116 细胞

分别用未转染质粒的 CHO-dhfr<sup>-</sup> 上清、浓缩 2 倍的阳性克隆 F4' 上清 (2 × F4')、F4' 上清、稀释 1 倍的 F4' 上清 (1/2 F4') 或 100 ng/ml AD5-10 处理细胞 24 h 后检测细胞存活率; 与 CHO-dhfr<sup>-</sup> 组比较, \*  $P < 0.01$

A. cell Jurkat; B. cell HCT116

Cancer cells were treated with CHO-dhfr<sup>-</sup> supernatant, 2 fold concentrated F4' supernatant (2 × F4'), F4' supernatant, diluted F4' supernatant (1/2 F4') or 100 ng/ml AD5-10 for 24 hours; \*  $P < 0.01$  compared with CHO-dhfr<sup>-</sup> supernatant

## 讨 论

近 20 年来, 应用于临床治疗的治疗性单克隆抗体的数量在迅速增加。目前, 已上市的治疗性单克隆抗体有 10 余种, 处于临床试用阶段的有 200 多种。治疗性单克隆抗体的主要用途之一是治疗癌症。单克隆抗体用于肿瘤治疗具有特异性高、副作用较低、稳定性较好等优势。抗体分子可以通过其 Fc 区激活机体的免疫系统, 提高抗肿瘤治疗效果。Take-

da 等<sup>[9]</sup> 报道一个特异性针对鼠 DR5 的单克隆抗体 MD5-1 不仅能杀伤对 TRAIL 敏感的细胞, 还能通过激活肿瘤特异的 T 细胞免疫功能, 杀伤那些对 TRAIL 有抗性的细胞, 达到长期预防肿瘤复发的效果。然而, 小鼠单克隆抗体直接应用于人体肿瘤治疗会使机体产生 HAMA, 引起严重的免疫反应, 因此对鼠抗体的基因工程改造是鼠源性抗体走向临床治疗的必经之路。嵌合抗体是用人源抗体的恒定区替换鼠源性抗体的恒定区, 它既可保持鼠源抗体的特异性, 又能较大程度地降低抗体对人体的免疫原性。

多数研究在多种动物移植肿瘤模型和临床试验中均证实抗 DR4、DR5 抗体具有较强的抗肿瘤活性, 是未来最有希望的新一代肿瘤坏死因子家族相关的抗肿瘤药物<sup>[2,4]</sup>。目前已经报道的有抗人 DR5 单克隆抗体 TRA-8<sup>[3]</sup> 和 HGS-ETR2<sup>[10-14]</sup> 等多种抗体。2001 年, Ichikawa 等<sup>[3]</sup> 报道一个新的抗人 DR5 单克隆抗体, TRA-8, 在体外和体内均可诱导大部分 TRAIL 敏感的肿瘤细胞凋亡, TRA-8 在正常人肝细胞中不会诱导大量的细胞死亡。2007 年, 人源化的 TRA-8 对人前列腺癌的杀伤活性已得到证实 (US Patent 7244429)。2004 年, Mori 等<sup>[15]</sup> 制备了与 DR4 和 DR5 特异性结合的完整人单克隆抗体, 这两种单克隆抗体均可以在体外诱导几株 TRAIL 敏感的癌细胞系发生死亡。2005 年, Georgakis 等<sup>[10]</sup> 制备了两个完整的抗人 TRAIL 受体 DR4 (HGS-ETR1) 和 DR5 (HGS-ETR2) 的选择竞争性单克隆抗体, 它们可以诱导许多培养和原代淋巴瘤细胞死亡, 可能对淋巴瘤具有治疗价值。人类基因组科学和剑桥抗体技术公司正在英国进行 HGS-ETR2 的临床试验。本研究对抗 DR5 单克隆抗体 AD5-10 的嵌合抗体的构建和表达做了初步探索, 这对于鼠源性抗体 AD5-10 未来应用于临床治疗具有理论和实践意义。

本研究采用的表达体系是双载体表达系统, 其中重链表达载体 pG1D105 含有 *neo* 基因, 轻链表达载体含有 *dhfr* 基因, 利用 G418 和不含次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷 (针对 *dhfr* 基因) 的选择培养基筛选阳性克隆, 只有同时携带二氢叶酸还原酶 *dhfr* 与 *neo* 两种基因的细胞才能存活形成克隆, 这样可以较为方便地筛选出稳定表达的阳性细胞克隆。但这种轻重链分别表达的载体系统也有不足之处, 即两者的表达量可能存在差别, 这样会造成轻重链的不匹配<sup>[16]</sup>。因此, 在筛选克隆时, 要注意两者表达量是否匹配。Fang 等<sup>[17]</sup> 利用 2A 肽段表达体系实现了完

整抗体分子在小鼠体内的稳定表达, 该体系可以保证轻重链以完全匹配的方式表达。2A 是一种起源于口蹄疫病毒具有自我切割活性的肽段, 利用 2A 将抗体的轻重链连接起来形成一个完整的阅读框, 这样表达的蛋白在体外切割形成等量的轻重链, 相互之间再通过二硫键形成完整的抗体分子。这种表达体系可能代表了未来抗体表达研究的新方向。

嵌合抗体的表达量一直是嵌合抗体真核表达研究中比较受关注的问题, 本研究筛选到的阳性克隆 F4' 的表达产量较低, 给进一步的大规模表达及纯化带来一定困难。有研究利用氨甲喋呤逐渐增强 dhfr 及外源目的基因的表达, 从而达到增加嵌合抗体表达产量的目的。但是本研究逐渐增加甲氨蝶呤的浓度, 并未显著提高目的蛋白的表达量。因此本实验室也在尝试一些其他高效的表达体系, 如病毒载体表达体系表达抗 DR5 的嵌合抗体。

本研究通过基因工程技术, 成功构建了抗 DR5 嵌合抗体轻重链表达载体, 共转染 CHO-dhfr<sup>-</sup>细胞后, 筛选得到稳定分泌表达抗 DR5 嵌合抗体的 F4' 细胞株。ELISA 与 Western blotting 方法均证实其表达的嵌合抗体具有人源性和抗原结合特异性, 同时该嵌合抗体具有一定的肿瘤细胞杀伤活性, 为进一步研究 DR5 介导的肿瘤杀伤作用在临床肿瘤治疗中的应用奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Carlo-Stella C, Lavazza C, Locatelli A, *et al.* Targeting TRAIL agonistic receptors for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(8):2313-2317.
- [2] Shankar S, Chen X, Srivastava RK. Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Prostate*, 2005, 62(2):165-186.
- [3] Ichikawa K, Liu W, Zhao L, *et al.* Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity [J]. *Nat Med*, 2001, 7(8):954-960.
- [4] Walczak H, Miller RE, Ariail K, *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo* [J]. *Nat Med*, 1999, 5(2):157-163.
- [5] Guo YB, Chen CF, Zheng Y, *et al.* A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(51):41940-41952.
- [6] Shi J, Liu YX, Zheng Y, *et al.* Therapeutic expression of an anti-death receptor 5 single-chain fixed-variable region prevents tumor growth in mice [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24):11946-11953.
- [7] Levy R, Miller RA. Biological and clinical implication of lymphocytes hybridomas; tumor therapy with monoclonal antibodies [J]. *Annu Rev Med*, 1983, 34:107-116.
- [8] 邵晓枫, 徐晨, 许元富, 等. 抗 CD<sub>3</sub> 基因工程嵌合抗体 IgG 在哺乳动物细胞中的表达和活性测定 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(5):527-531.
- [9] Takeda K, Yamaguchi N, Akiba H, *et al.* Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(4):437-448.
- [10] Georgakis GV, Li Y, Humphreys R, *et al.* Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death [J]. *Br J Haematol*, 2005, 130(4):501-510.
- [11] Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, *et al.* Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1 and TRAIL-R2 mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAb in myeloma cells [J]. *Blood*, 2006, 108(4):1346-1352.
- [12] Zeng Y, Wu XX, Fiscella M, *et al.* Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2) induces apoptosis in primary renal cell carcinoma cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(2):421-430.
- [13] Wang J, Lin Z, Qiao CX, *et al.* Characterization of a novel anti-DR5 monoclonal antibody WD1 with the potential to induce tumor cell apoptosis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2008, 5(1):55-60.
- [14] Yada A, Yazawa M, Ishida S, *et al.* A novel humanized anti-human death receptor 5 antibody CS-1008 induces apoptosis in tumor cells without toxicity in hepatocytes [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(6):1060-1067.
- [15] Mori E, Thomas M, Motoki K, *et al.* Human normal hepatocytes are susceptible to apoptosis signal mediated by both TRAIL-R1 and TRAIL-R2 [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(2):203-207.
- [16] 向军俭, 李洪庆, 邓宁, 等. 抗 rh-bFGF 嵌合抗体真核表达载体的构建与表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(2):163-167.
- [17] Fang JM, Qian JJ, Yi SL, *et al.* Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5):584-590.

(2008-04-17 收稿)