

研究报告

人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白的构建和表达

姜文国¹, 熊冬生², 刘芳², 郭红星², 苏晔², 吕晶丽², 杨纯正²

1 滨州医学院, 滨州 256603

2 中国协和医科大学/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, 天津 300020

摘要: 研究共刺激分子 4-1BBL 在肿瘤靶向治疗方面的作用, 用 PCR 和 overlap PCR 方法构建人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白表达载体, 并用双脱氧终止法测定 DNA 序列; 采用亲和层析法纯化该产物, 并用 SDS-PAGE 和 HPLC 鉴定纯化产物; 采用玫瑰花环试验鉴定纯化产物与靶细胞的结合活性。DNA 序列测定结果表明: 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白已构建成功。表达可溶性产物的产量达 200 µg/L 以上, 纯度较高, 具有与激活的 Jurkat (4-1BBL⁺) 和 Raji 细胞(CD20⁺)结合的活性。这将为非何杰金氏淋巴瘤免疫治疗、靶向治疗提供新的思路。

关键词: 4-1BBL, CD20, 靶向治疗, 免疫治疗

Study on the Construction and Expression of the Human 4-1BBL Extracellular Domain/anti-CD20 Fab' Fusion Protein

Wenguo Jiang¹, Dongsheng Xiong², Fang Liu², Hongxing Guo², Ye Su², Jingli Lü², and Chunzheng Yang²

1 Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China

2 The State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Abstract: Several studies have demonstrated the role of 4-1BBL in T cell activation. Furthermore, enhanced 4-1BB/4-1BBL interaction has been shown to amplify T-cell-mediated antitumor immunity in several mouse models. However, when applied in humans, it was difficult to generate sufficient T cells ex vivo and whole cell vaccines to transfer back into patients. To overcome this difficulty, we have focused on producing the human 4-1BBL extracellular domain/anti-CD20 Fab' fusion protein. In this report, PCR and overlap PCR were used to construct the human 4-1BBL extracellular domain/anti-CD20 Fab' expression vector. DNA sequence was analyzed by the Terminus of Dideoxy Nucleotide. The product was purified by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE and HPLC; its antigen binding activity was examined by rosetting assay. The data of DNA sequence showed that the human 4-1BBL extracellular domain / anti-CD20 Fab' fusion protein was corrected. The fusion protein was recovered in high yield (up to 200 µg/mL) after E-taq purification. The fusion protein was capable of simultaneous binding to stimulated Jurkat cells and Raji cells as shown by cellular rosetting. In conclusion, the human 4-1BBL extracellular domain/anti-CD20 Fab' fusion protein was induced to express in *E. coli* 16C9. The results of some biological activity experiments indicated that the fusion protein could bind to stimulated Jurkat cells and Raji cells. Furthermore, 4-1BBL-negative tumors can be converted into 4-1BBL-positive tumors by the fusion protein without the need for 4-1BBL gene transfer to the malignant cells.

Keywords: 4-1BB ligand, CD20, targeting therapy, cancer immunotherapy

Received: June 19, 2007; **Accepted:** August 30, 2007

Supported by: the Nation High Technology Research and Development Program of China (863 program)(No. 2003AA215080) and Nature Science Foundation of Shandong Province (No. Q2006C02).

Corresponding author: Dongsheng Xiong. Tel: +86-22-27230740; Fax: +86-22-27230740; E-mail: dsxiong@public.tpt.tj.cn; jiangwg@gmail.com
国家高技术研究发展计划(863)资助 (No. 2003AA215080); 山东省自然科学基金资助(No. Q2006C02)。

常规化疗和放疗选择性差, 肿瘤细胞不能被完全清除。残存的肿瘤细胞, 即微小的残留灶, 会造成治疗失败或者肿瘤复发, 这将是免疫治疗的靶标。已经有许多表达在恶性细胞上的肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigens, TAA) 被证实, 并且一些抗-TAA 的抗体已经从实验室走向了临床。抗-TAA 的抗体不仅它们本身是靶向治疗药物, 而且还可以作为其他药物和效应细胞的靶向媒介。

CD20 主要表达在前 B 细胞和成熟 B 细胞及 95% 以上的 NHL 淋巴瘤细胞, 是可以用来作为肿瘤靶向免疫治疗的抗原。HI47(IgG3) 是我所于 1990 年研制成功的抗 CD20 鼠源性单克隆抗体, 第四届国际人类白细胞分化抗原会议将 HI47 命名为 CD20+X。CD20 单抗本身难以穿透实体肿瘤发挥杀伤作用, 而缺失恒定区的小型基因工程抗体虽然具有较好的穿透性, 但半衰期短且本身细胞毒作用低。因此, 抗体片段与放射性同位素、前药(prodrug)、生物毒素及免疫效应细胞形成偶联物成为治疗肿瘤特别是实体瘤的首选方案。其中最具有临床应用前景的是利用双特异抗体使针对肿瘤抗原的抗体片段与免疫效应细胞相连, 共同作用于肿瘤细胞, 实现肿瘤的靶向治疗^[1-3]。

近来的研究表明, 经 4-1BB/4-1BBL 信号途径的协同刺激在许多模型显示出抗肿瘤效应, 同时应用 4-1BBL 和 CD3 单抗可代替专职抗原提呈细胞的刺激能力, 然而全身性的 T 细胞激活将导致临床副作用, 所以 CD3/4-1BB 信号必须严格定位在肿瘤位点。为了特异性定向肿瘤细胞, 我们已成功构建了抗 CD3/抗 CD20 Diabody 表达载体^[2], 并证实抗 CD3/抗 CD20 Diabody 具有明显的抑制肿瘤生长的活性。为了进一步提供肿瘤特异性的 4-1BB 协同刺激, 我们构建了人 4-1BBL 胞外区基因表达载体 pAYZ4-1BBL^[4], 生物学活性研究发现它能使激活的 T 细胞系 IL-2 的释放增加, 并使激活的 T 细胞系凋亡减少 1 倍以上, 在此基础上我们研究并构建了人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和载体

E. coli 16C9 由本室保存。Jurkat 细胞系由本室

保存, 培养在含 10% 小牛血清(本所科技开发公司)的 RPMI1640(GIBCOBRL)。表达载体 pAYZ4-1BBL 和 pAYZFC20 均由我室构建保存^[5], 分别用于表达带 E-tag 的人 4-1BBL 胞外区蛋白和抗 CD20 Fab'基因工程抗体。

1.1.2 酶和试剂

Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶购自上海申博生物公司, 限制性内切酶 *Apa* I, *Sph* I, *Sal* I 均购于大连宝生物公司; T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司; 鼠抗 E-tag 抗体, HRP 标记的鼠抗 E-tag 抗体及抗 E-tag 亲和层析柱均购自 Pharmacia 公司; 其它均为国产分析纯生化试剂。

1.1.3 PCR 引物

P1: 5'-GTC TCC TCA GCC TCC ACC AA-3';
P2: 5'-AGA GCC ACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC ACA GGG TGG GCA TGT GTG AG-3';
P3: 5'-GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT CTC CGC GAG GGT CCC GAG C-3';
P4: 5'-GCG CGG ATC CGC ATG CCT ATG CGG CAC GCG GTT CCA GCG GAT CCG-3' (*Sph* I); 下画线为括号内的限制性内切酶位点。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的酶切、连接、转化等常规分子生物学操作按文献[6]进行。

1.2.2 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白表达载体的构建

利用 PCR 法从 pAYZFC20 和 pAYZ4-1BBL 载体上分别采用 P1、P2、P3、P4, 扩增 CD20CH1, 4-1BBL 胞外区基因, 经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后, 利用 overlap PCR, 以 (Gly4Ser)₂ 作为连接肽, 将 CD20CH1 与 4-1BBL 胞外区基因连接形成 CD20CH1-(G4S)₂-4-1BBL DNA 片段。经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后, DNA 片段 CD20 CH1-(G4S)₂-4-1BBL 用 *Sal* I 和 *Sph* I 消化, 并与经 *Sal* I 和 *Sph* I 消化的表达载体 pAYZFC20 连接, 形成人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab'融合蛋白表达载体 pAYZ4-1BBL-CD20。

1.2.3 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab'融合蛋白的表达

将载体 pAYZ4-1BBL-CD20 转化 *E. coli* 16C9, 挑取单菌落接种于含氨苄青霉素(0.1 mg/mL)的 2YT 培养基(1.6%胰蛋白胨, 1%酵母提取物, 0.5% NaCl)中, 37°C 振荡培养 8 h 后, 按 1:2 的比例转接于含氨苄青霉素(0.1 mg/mL)的 Ap5 培养基(0.15%葡萄糖,

1.1% 酸水解酪蛋白, 0.06% 酵母提取物, 0.019% $MgSO_4$, 0.107% NH_4Cl , 0.373% KCl , 0.12% $NaCl$, 0.12 mol/L 三乙醇胺 (pH 7.4) 中, 25°C 振荡培养 24 h, 4°C 离心收集菌体, 冻融菌体沉淀后, 加入细菌周质腔提取液(三羟甲基氨基甲烷 25 mmol/L, 乙二醇四乙酸 1 mmol/L, 苯甲基磺酰氟(PMSF)0.1 mmol/L, 蔗糖 20%(W/V), $NaCl$ 200 mmol/L, pH 7.5), 于 4°C 轻摇 1 h, 12 000 r/min, 4°C 离心 10 min, 收集上清为表达产物的粗提物。

1.2.4 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab' 融合蛋白的纯化

应用抗 E-tag 亲和层析柱纯化人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab' 融合蛋白。10 mmol/L MES(pH 5.5), 1 mmol/L EDTA 平衡, 0.1 mmol/L 甘氨酸洗脱(pH 3.0), FPLC 收集洗脱峰。SDS-PAGE 和 HPLC 对纯化后的蛋白进行分析。

1.2.5 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白玫瑰花环形成实验

将纯化的人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白与 10^6 Raji 细胞, 4°C 共同孵育 2 h 后, 4°C 离心 (2000 r/min 10 min), 弃上清, PBS 洗细胞 3 次, 再加入 2×10^7 Jurkat 细胞, 4°C 共同孵育 2 h 后, 用光学显微镜观察玫瑰花环的形成。

2 结果

2.1 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白表达载体的构建

分别从人 4-1BBL 胞外区表达载体 pAYZ4-1BBL 及抗 CD20 Fab' 表达载体 pAYZCD20 上克隆 4-1BBL 胞外区和抗 CD20 CH1 基因, CD20 CH1 基因羧基端与 4-1BBL 胞外区基因的氨基端通过短肽 $(Gly4Ser)_2$ 相连构建成重组 4-1BBL-CD20 CH1 基因片段(图 1), 并分别在它们的 5' 端和 3' 端引入 *Sal* I 及 *Sph* I 限制性内切酶酶切位点。通过酶切、连接, 克隆入 pAYZFC20 载体, 构建 pAYZ4-1BBL-CD20 表达载体(图 2)。

以 LB 平板上转化的单菌落为模板, 以 P1 和 P4 为引物进行 PCR 扩增鉴定, 并且阳性克隆提取质粒采用 *Apa* I 酶切同时进行琼脂糖凝胶电泳, 观察有无目的条带出现及条带的分子量大小。PCR 扩增产物及重组质粒采用 *Apa* I 酶切消化后的产物(约 400 bp), 与预计分子量相同(图 3)。将提取的质粒测序, 结果

与已知的序列相同。

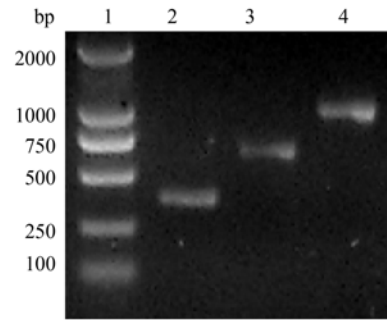


图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis
1: DNA marker(DL2000); 2: CD20 CH1; 3: 4-1BBL 4: 4-1BBL-CD20 CH1

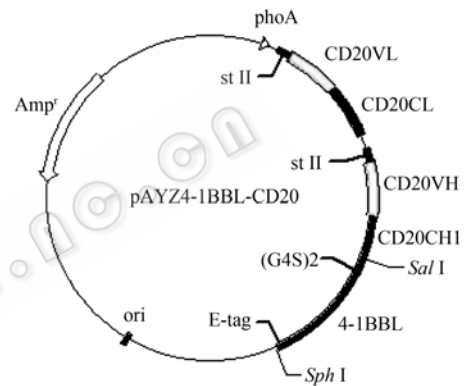


图 2 表达载体 pAYZ4-1BBL-CD20 的构建

Fig. 2 Construction of expression vector pAYZ4-1BBL-CD20

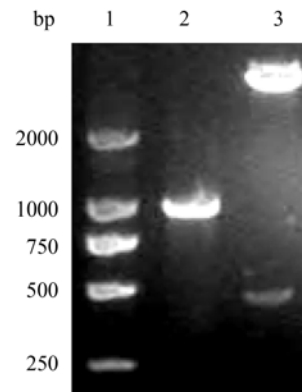


图 3 PCR 鉴定转化结果及酶切鉴定

Fig. 3 PCR and restriction analysis of recombinant plasmid
1: DNA marker 2: PCR product 3: pAYZ4-1BBL-CD20/*Apa* I

2.2 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白的表达和纯化

2.2.1 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白的初步表达

人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白表达

载体 pAYZ4-1BBL-CD20 转化 *E. coli* 16C9, 经低磷酸盐培养基 AP5 诱导表达, 由碱性磷酸酶启动子 (*phoA*) 诱导合成带双顺反子的 mRNA, 并在该 mRNA 的 2 个含有 SD 序列的位置合成两条相应的多肽链。表达产物主要以可溶性状态在信号肽 stII 引导下, 分泌进入细菌外周质腔, 在周质腔中折叠、交联为抗人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白。由于细菌周质腔是一个氧化的环境, 且在周质腔中有许多有助于蛋白质折叠的分子伴侣样分子以及二硫键异构酶存在, 从而有利于重组外源蛋白折叠成正确的空间构象。

2.2.2 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白的分离和纯化

离心收集菌体, 应用周质腔提取液提取细菌外周质腔表达产物, 然后采用抗 E-tag 亲和层析柱进行分离纯化, 纯化产物以可溶性状态存在。采用三角瓶摇瓶培养方式进行初步表达, 其中的可溶性分泌形式产物量约 200 $\mu\text{g/L}$ 。人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白经 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析表明, 在分子量约为 45 kD 和 22 kD 位置各有一条蛋白条带(图 4), 以分离范围为 2 万到 50 万的分子筛柱进行 HPLC 分析, 流动相为 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 根据峰面积可以得出其中 45 kD 蛋白含量 57.1%, 22 kD 蛋白含量 24.4%, 目的蛋白总量达 81.5%(图 5)。

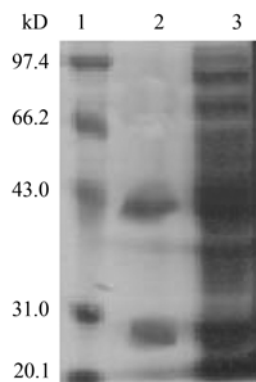


图 4 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of 4-1BBL/anti-CD20Fab' fusion protein

1: protein marker; 2: 4-1BBL/anti-CD20Fab' fusion protein purified by anti-E tag affinity column; 3: periplasmic extract of bacteria cells expressing 4-1BBL/anti-CD20Fab' fusion protein

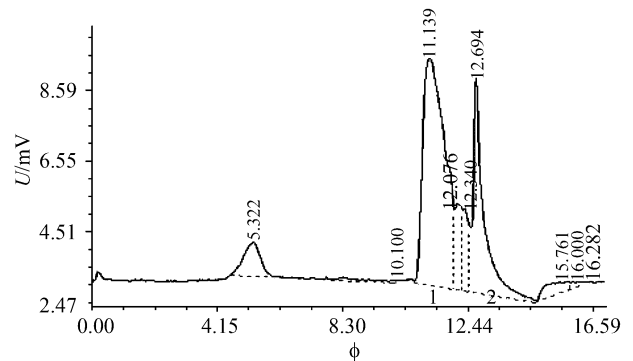


图 5 HPLC 分析纯化的人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab'融合蛋白

Fig. 5 HPLC analysis of 4-1BBL/anti-CD20Fab' fusion protein
1: 45 kD protein 2: 22 kD protein

2.3 人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab'融合蛋白介导的 Raji 细胞与 Juakat 细胞间玫瑰花环的形成

在人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab'融合蛋白存在的情况下 Raji 细胞与激活的 Juakat 细胞间可形成玫瑰花环, 而在只有 PBS 存在的情况下, 二者之间不能形成玫瑰花环(图 6)。表明人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20Fab'融合蛋白具有同时与 Raji 细胞和激活 Jurkat 细胞特异性结合的活性, 为进一步要进行的体外杀伤实验及体内实验奠定了实验基础。

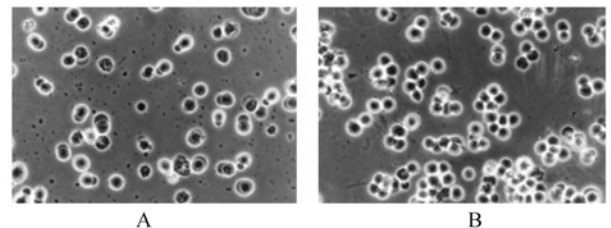


图 6 Raji 与 Jurkat 细胞之间玫瑰花环的形成

Fig. 6 Rosetting of Jurkat cells (4-1BB⁺) around Raji cells (CD20⁺) in the presence of PBS (A) and 4-1BBL/anti-CD20Fab' fusion protein (B)

3 讨论

B 淋巴瘤是常见的血液系统疾病, CD20 是 B 淋巴细胞表面膜蛋白, 是目前作为生物治疗 B 淋巴瘤的主要靶点, 原因在于: CD20 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他组织均无 CD20 的表达。CD20 和抗 CD20 抗体结合后不发生内吞作用, 因此细胞表面 CD20 的数量并不因为抗 CD20 抗体的结合而减少。

CD20 抗原比较暴露,不为其他蛋白所掩盖。在体内血清中无游离的 CD20 的存在。1997 年美国 FDA 批准 IDEC Pharmaceuticals 公司生产的抗 CD20 抗体 Rituxan 应用于 B 淋巴瘤的临床治疗,疗效显著,且毒性较小。抗 CD20 抗体的研究具有广阔的应用和经济前景。

抗 CD20 抗体不仅本身是靶向治疗药物,而且还可以作为其他药物和效应细胞的靶向媒介。为了特异的定向肿瘤细胞,本室已成功构建了抗 CD3/抗 CD20 Diabody,并进行了体内外生物活性测定,证实抗 CD3/抗 CD20 Diabody 具有明显的抑制肿瘤生长的活性,有望成为一种新的治疗 B 细胞恶性肿瘤的方法。

人 4-1BBL 包含 254 个氨基酸,是存在于细胞膜表面的 II 型膜蛋白。研究发现,4-1BBL 的功能主要在于通过胞外区和 4-1BB 结合,传导信号来发挥协同刺激作用,动物试验显示增强了 T 细胞介导的抗肿瘤免疫性。更为重要的是,4-1BBL 能够协同刺激 CD28⁺T 细胞,导致细胞分裂,细胞因子的释放以及增加穿孔素水平和增强细胞毒性效应器功能^[7]。同时,4-1BB/4-1BBL 是对已存在协同刺激的放大器,它具有增强 CD8⁺T 细胞克隆扩增和存活能力,以及发展一些依赖于细胞因子的效应器功能^[8]。

我们研究也发现人 4-1BBL 胞外区蛋白能使激活的 T 细胞系 IL-2 的释放增加,并且使激活的 T 细胞系凋亡减少一倍以上^[4]。然而人 4-1BBL 胞外区蛋白直接临床应用来参与全身 T 细胞的激活反应,必然会导致一些副作用,所以这种作用必须严格定位在肿瘤位点^[9]。为了特异的定向肿瘤细胞,本实验进一步采用(Gly4Ser)₂ 柔性短肽将 4-1BBL 胞外区与抗 CD20 CH1 连接起来,插入表达抗 CD20 Fab' 基因工程抗体的载体,构建了人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白表达载体。表达产物在信号肽 stII 的引导下,分泌进入细菌外周质腔中。由于细菌周质腔是一个氧化的环境,且在周质腔中有许多有助于蛋白质折叠交联的分子伴侣样分子以及二硫键异构酶存在,从而有利于人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白折叠成正确的空间构象。应用周质腔提取液提取细菌外周质腔表达产物,经抗 E-tag 柱亲和层析纯化,获得纯度较高的表达产物,为进一步研究人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 Fab' 融合蛋白生物学活性奠定了基础。由于人 4-1BBL 和抗 CD3 抗体分别

模拟抗原提呈细胞的双信号系统^[10],可以代替专职抗原提呈细胞的能力,我们认为人 4-1BBL 胞外区/抗 CD20 融合蛋白将能改善抗 CD3/抗 CD20 diabody 的抗肿瘤活性。另外,通过 4-1BBL/抗肿瘤相关抗原融合蛋白,4-1BBL 阴性的肿瘤能够转变为 4-1BBL 阳性的肿瘤,比以往基因转染的方法更简便可行,这为协同刺激分子的临床应用提供了新思路和新途径。

REFERENCES

- [1] Cochlovius B, Kipriyanov SM, Stassar MJ, *et al.* Treatment of human B cell lymphoma xenografts with a CD3 × CD19 diabody and T cells. *J Immunol*, 2000, **165**(2): 888–895.
- [2] Xiong D, Xu Y, Liu H, *et al.* Efficient inhibition of human B-cell lymphoma xenografts with an anti-CD20 × anti-CD3 bispecific diabody. *Cancer Lett*, 2002, **177**(1): 29–39.
- [3] Gao Y, Xiong D, Yang M, *et al.* Efficient inhibition of multidrug-resistant human tumors with a recombinant bispecific anti-P-glycoprotein × anti-CD3 diabody. *Leukemia*, 2004, **18**(3): 513–520.
- [4] Jiang WG, Xiong DS, Shao XF, *et al.* Cloning and expression of the extracellular domain of 4-1BBL. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(5): 703–707.
姜文国,熊冬生,邵晓枫,等.人 4-1BBL 胞外区基因的克隆与表达研究. *生物工程学报*, 2005, **21**(5): 703–707.
- [5] Liu YX, Xiong DS, Fan DM, *et al.* One amino acid mutation in an anti-CD20 antibody fragement that affects the yield bacterial secretion and affinity. *Chinese Journal of Biotechnology*(*生物工程学报*), 2003, **19**(3): 272–276.
刘银星,熊冬生,范冬梅,等.抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab 突变体的表达和活性研究. *生物工程学报*, 2003, **19**(3): 272–276.
- [6] Campbell AM. Fusion procedures. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Monoclonal Antibody Technology*. Burden RH and Knippenberg PH(Eds). Elsevier, Amsterdam, 1984, 120–134.
- [7] Bukczynski J, Wen T, Watts TH. Costimulation of human CD28-T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol*, 2003, **33**(2): 446–454.
- [8] Cooper D, Bansal Pakala P, Croft M. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8⁺T cells *in vivo* but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur J Immunol*, 2002, **32**(2): 521–529.
- [9] Holliger P, Manzke O, Span M, *et al.* Carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell activation in colon carcinoma induced by anti-CD3 × anti-CEA bispecific diabodies and B7 × anti-CEA bispecific fusion proteins. *Cancer Res*, 1999, **59**(12): 2909–2916.
- [10] Cochlovius B, Kipriyanov SM, Stassar MJ, *et al.* Cure of Burkitt's lymphoma in severe combined immunodeficiency mice by T cells, tetravalent CD3 × CD19 tandem diabody, and CD28 costimulation. *Cancer Res*, 2000, **60**(16): 4336–4341.