CD20F(ab′)$_2$ 抗体的发酵与纯化

王金宏 纪 庆 熊冬生 许元生 杨纯正*

(中国医学科学院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 转化了质粒 PYZcpp[3] 的 16C9 大肠杆菌可高水平地分泌表达可溶性 CD20 F(ab′)$_2$ 抗体;采用经优化的培养条件,在发酵罐上进行高密度培养 OD_{550} 值达 140;每升湿菌菌重 200g;抗体的产量每升为 241mg,其中 F(ab′)$_2$ 片段达 50%,F(ab′)$_2$ 可以特异性的识别 CD20$^+$ 细胞并与 CD20 相结合;F(ab′)$_2$ 对 *Raji* 细胞的 IC_{50} 值为 22.8μg/mL;而 Fab′对 *Raji* 细胞的 IC_{50} 值为 45.9μg/mL。

关键词 高密度培养,CD 20F(ab′)$_2$ 抗体,16C9 大肠杆菌

中图分类号:Q55 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2004)05-0654-04

CD20 是一个比较成熟的 B 细胞表面标记,分子量为 33 ~ 37kD,属于非糖基化Ⅲ型,4 次穿膜磷蛋白。CD20 特异性地表达在正常前 B 细胞以后的 B 细胞分化全过程(浆细胞时消失),以及相应的恶性 B 细胞肿瘤细胞上;在其它组织中均无 CD20 的表达[1~3],在人血清中也无游离 CD20 的存在[4],因此 CD20 可作为 B 淋巴细胞瘤治疗的一个很好的选择性治疗靶点。目前以 CD20 为靶点的嵌合抗 CD20 单克隆抗体 Rituxan 已获准应用于 B 淋巴细胞瘤临床治疗[5],这是单克隆抗体研究的又一个里程碑。本实验室已经构建、成功表达了基因工程嵌合抗体抗 CD20 单抗 HI47 的片段 Fab′[6],从 CD20Fab′抗体表达载体上利用 PCR 方法扩增并修饰其重链恒定区 CH1C-末端的 DNA 序列,然后将修饰后的 CH1DNA 序列重组到原 Fab′表达载体中,构建成抗 CD20 抗体片段 F(ab′)$_2$ 表达载体,实现了 CD20 抗体片段在 F(ab′)$_2$ 工程菌中的可溶性分泌表达[7]。研究 F(ab′)$_2$ 的目的是为了提高抗体与抗原之间的结合力,延长抗体在生物体内的半衰期,实现 CD20F(ab′)$_2$ 抗体在生物体内直接表达。本文将论述有关 CD20F(ab′)$_2$ 抗体工程菌通过高密度发酵大量制备 F(ab′)$_2$ 的工艺及其纯化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:表达 CD20F(ab′)$_2$ 抗体的质粒[7],16C9 感受态细菌和 Raji 细胞由本室保存。

1.1.2 培养基:2 × YT(每升溶液含胰化蛋白胨 16g,酵母抽提物 10g;氯化钠 5g,调整 pH 值为 7.0 后灭菌)培养基用于试管种子菌培养;半合成培养基用于发酵罐补料分批培养,每升含酪蛋白水解物 12g,葡萄糖 3.36g,异亮氨酸 0.3g,硫酸铵 6.2g,磷酸二氢钠 1.3g,磷酸氢二钾 3.5g,柠檬酸三钠 1.2g,硫酸镁 2.9g,消泡剂 1mL,125μmol 三氯化铁,硫酸锌、硫酸锰、硫酸铜、氯化钴、硼酸、钼酸钠各 20μmol,10L 培养基在 19L 发酵罐上灭菌后以氨水调 pH 为 7.0,加 1g 氨苄青霉素。

1.1.3 试剂:酪蛋白水解物和胰化蛋白胨以及酵母抽提物购自美国 Sigma 公司,其它购自天津化学试剂一厂。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 转化大肠杆菌:取 10μL 5 × KCM(0.5mol/L KCl,0.15mol/L $CaCl_2$,0.25mol/L $MgCl_2$)、10μL 质粒 DNA 和 30μL H_2O 混匀。加 40μL 感受态细菌,混匀。冰浴 20min,室温放置 10min,加 200μL 2 × YT培养基,37℃缓慢摇动培养 1h。取 50μL 或 100μL 转化细菌,均匀涂布于含 50μg/mL 氨苄青霉素的 2 × YT 琼脂平板上,液体晾干后于 37℃,倒置培养过夜。

1.2.2 摇瓶培养:采用单因素考察法,对接种量、通气量、种子龄、培养基 pH 值、发酵温度、发酵周期等 6 项发酵工艺指标逐一进行考察对 CD20F(ab′)$_2$ 含

基金项目:国家 863 中试项目(中试基金国科生字 2000141);国家"863 计划"(2001 AA215341);天津重大基金资助项目(003119511)

* 通讯作者。Tel/Fax:86-22-27230740;E-mail:czyang@public.tpt.tj.cn

作者简介:王金宏(1974 –),男,安徽人,实习研究员,在职硕士研究生,主要研究方向为细菌的高密度培养等。

其他作者:王彩云,许元富,郑梦杰

收稿日期:2004-01-04,修回日期:2004-05-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

量的影响。

1.2.3　高密度细菌培养：种子菌摇瓶扩大培养：取 −20℃冻存菌 100μL 接于 500mL 2×YT 培养基中，37℃，200r/min 培养 9h。溶氧反馈-分批补料高密度发酵：将 500mL 发酵种子菌接种入 10L 发酵培养基中，在 NLF 19L 发酵罐上进行 CD20 F(ab′)$_2$ 工程菌高密度发酵，培养 40h。主要参数为温度：30℃；pH 值：自动流加分析级 25%氨水，将 pH 值控制在 7.4；溶氧值：溶解氧在整个发酵过程中保持在 20%左右；搅拌速度：下限 300r/min，上限 650r/min；补料流加：补料泵速度由当前溶氧值控制（速度在 5%～15%之间）。

1.2.4　提取和纯化：发酵液 10000r/min，4℃ 连续离心，弃上清，−20℃冻存 1h，化冻后，加 Shockate 液（1L 裂解液中含 200g 蔗糖，200mmol NaCl，PMSF 0.1mmol，EDTA 1mmol，Tris·Cl 25mmol，pH 7.5）将菌体打散，冰浴轻摇 1h，12000r/min 离心 20min，上清液过 0.45μm 膜，即发酵产物粗提液。用 Binding Buffer（0.01mol/L NaH_2PO_4，0.01mol/L Na_2HPO_4，0.05g/L NaN_3，pH7.0）平衡 Protein G 亲和层析柱后上样（发酵产物粗提液），再用 Binding Buffer 冲洗基线，至基线稳定后，用 Elution Buffer（0.1mmol/L Glycine，pH3.0）洗脱，洗脱液用 Neutralizing Buffer（1mol/L Tris·HCl，0.05g NaN_3，pH8.2）中和 pH 值得亲和层析产物。用 S100-HR 分子筛柱分离纯化 Protein G 亲和层析产物，流动相为 0.1mol/L PBS + 0.1mol/L NaCl；最后用 12% SDS-PAGE 分析纯化结果。

1.2.5　检测和分析方法：发酵液磷的含量采用磷钼酸铵法定磷；蛋白测定采用 Folin 酚测定抗体蛋白含量；发酵液中葡萄糖含量采用 YSI 2700 测定。

1.2.6　F(ab′)$_2$ 与 CD20$^+$ B 淋巴细胞的结合活性：取对数生长期的 Raji 细胞，按每孔 1×10^6 的密度将细胞接种于 40 孔板，控制细胞悬液的体积约 50μL。实验组每孔加 10μL 浓度为 400μg/mL 的 F(ab′)$_2$ 溶液，同时设空白对照组和阴性对照组，空白对照组加 PBS，阴性对照组加非相关抗体（抗 CD_3 抗体）。4℃放置 1h 后，2000r/min，4℃ 离心 10min，弃上清。用 PBS 洗涤细胞 3 次，加抗人 κ 链-FITC 抗体混匀后在 4℃避光放置 30min。用 PBS 洗涤细胞 3 次，向每个样品中加入 0.5mL 1%多聚甲醛固定细胞，用流式细胞仪测定。

1.2.7　活性 CD20 F(ab′)$_2$ 抗体对 *Raji* 细胞的体外生长抑制实验：取 96 孔细胞培养板，每孔加 0.1mL 含 5×10^4 靶细胞 *Raji* 的培养液（含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液）。每孔分别加入一系列不同浓度的 F(ab′)$_2$ 或 Fab′溶液各 0.1mL（样品浓度按 2 倍递次稀释），阴性对照孔加 0.1mL RPMI-1640 培养液，在 37℃ 5% CO_2 的饱和水汽二氧化碳孵箱中培养 72h。离心弃上清，用 PBS 洗涤一次；每孔加 0.1mL PBS 和 10μL MTT，在 37℃ 5% CO_2 的饱和水蒸汽二氧化碳孵箱中培养 4h 后每孔加酸化异丙醇（异丙醇中含 0.04mol/L 盐酸），混匀，使还原产物（formazan 紫色结晶）充分溶解。置酶标仪（Bio-Rad 公司生产的 450 型）上测定光密度（*OD*）值，检测波长 570nm。

2　结果

2.1　工程菌的发酵

2.1.1　摇瓶培养：200mL 2×YT 培养基用 500mL 锥型瓶在 37℃，220r/min，摇瓶 4h 后，4℃、4000r/min 离心 10min，弃上清将菌体加入 400mL AP5 培养基 pH 值为 7.4，220r/min 在 500mL 锥型瓶中发酵温度为 25℃，发酵周期 32h。采用这种发酵工艺条件，发酵菌体经蛋白 G 亲和纯化后，抗体片段的产量可以达到 8.6mg/L，F(ab′)$_2$ 的含量 15%左右（图 1）。

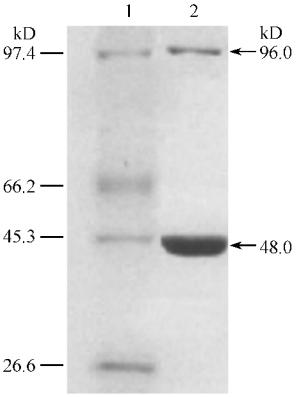

图 1　摇瓶发酵产物电泳图谱

Fig.1　The SDS-PAGE of CD20 antibody (non-reduced)

1. Marker；2. Protein G flow through.

2.1.2　工程菌的高密度培养：根据培养基中营养物质耗尽时，细菌有氧代谢减缓，培养基中溶解氧提高，当补充营养物质后，溶解氧又下降的规律，通过溶氧控制营养物质的加入，使各营养物质浓度保持在一定范围内，以减少有害物质的产生。基于以上原理进行抗 CD 20 F(ab′)$_2$ 工程菌的高密度发酵，发酵过程中发酵液 PH 控制在 7.4 左右，30℃生长，时间 40h，其中具有代表性的一批最终菌体密度 OD_{550}

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

达 140，湿菌体产量 200g/L（图 2）；发酵菌体经蛋白 G 亲和纯化后，测得抗 CD20 抗体片段产量达241mg/L，其中 $F(ab')_2$ 为 50%，其余为 Fab′。

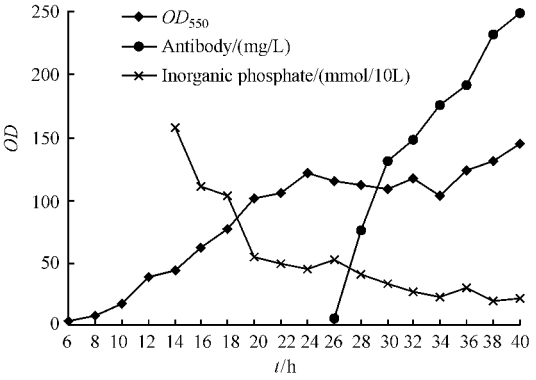

图 2 工程菌高密度发酵生长、抗体表达和发酵液中无机磷含量的时间曲线

Fig.2 The time curve of the growth of the recombinant bacteria, amounts of antibody and inorganic phosphate during high density culture

2.2 纯化

样品经 S100-HR 分子筛纯化，再进行 SDS-PAGE 分析（图 3），而后薄层扫描分析表明 $F(ab')_2$ 百分含量可达 95%。

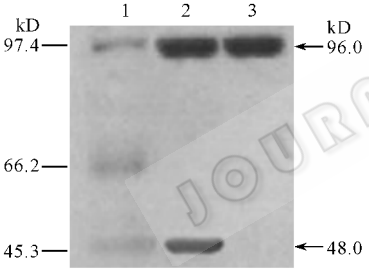

图 3 S-100 纯化产物电泳图谱

Fig.3 The SDS-PAGE of CD20 antibody (non-reduced)

1. Marker；2. Protein G flow through；3. S-100 flow through.

2.3 $F(ab')_2$ 与 $CD20^+$ B 淋巴细胞的结合活性

$F(ab')_2$ 与 *Raji* 细胞结合实验的 FACS 测定结果表明，$F(ab')_2$ 与 *Raji* 的结合阳性率可达 95% 以上，远远大于非相关抗体（抗 CD_3 抗体）与 *Raji* 细胞的结合阳性率，也远大于空白对照组的阳性率。以上结果说明，我们表达的 $F(ab')_2$ 可以特异性的识别 $CD20^+$ 细胞并与 CD20 相结合。

2.4 MTT 法检测抗 CD20 嵌和抗体片段对 *Raji* 细胞的生长抑制作用

实验结果表明，$F(ab')_2$ 和 Fab′对 *Raji* 细胞的生长都具有剂量依赖性的生长抑制作用，与 Fab′相比，$F(ab')_2$ 对 *Raji* 细胞的生长抑制作用更强。经计算，$F(ab')_2$ 对 *Raji* 细胞的 IC_{50} 值为 22.8μg/mL；Fab′对 *Raji* 细胞的 IC_{50} 值为 45.9μg/mL（图 4）。

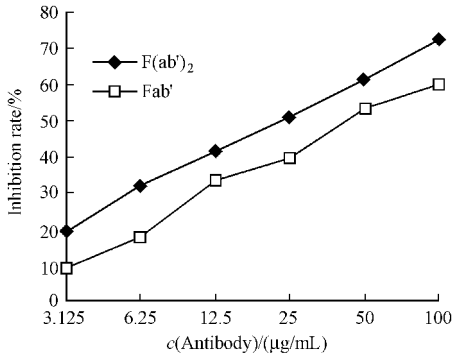

图 4 $F(ab')_2$ 和 Fab′对体外培养 *Raji* 细胞的生长抑制作用

Fig.4 Inhibition on proliferation of *Raji* cells by CD20 $F(ab')_2$ and Fab′

3 讨论

当大肠杆菌生长在厌氧或限氧条件时可产生乙酸盐；在高密度发酵中，高浓度乙酸盐使生长速率，菌体得率和最大可达细胞密度均下降，另外乙酸盐对重组细胞的毒害作用比非重组细胞大，乙酸盐的积累使重组蛋白产量明显下降，虽然这种有害作用的确切机制尚不清楚，但乙酸盐抑制 DNA、RNA，蛋白及脂质的合成是可能的，同时乙酸盐毒害作用可因调控 pH 的酸性或碱性盐的积累而加重，在补料-分批培养中采用限制碳源或氮源等必需营养物和降低培养的温度以（这是本文细菌未采用 37℃而采用 30℃培养的原因）控制生长速率，以达到降低乙酸盐目的[8]。

CD20 $F(ab')_2$ 抗体的分子量是 Fab′的 2 倍，延长了抗体片段在生物体内半衰期；同时由于其具有两个抗原结合位点，因此表观亲合力与 Fab′相比明显提高，有利该抗体片段发挥药效。Fab′可以通过化学偶联方法制备 $F(ab')_2$，但产率将受到偶联效率和分离纯化效率的影响，且产物活性也将下降；如能在体内直接表达，将极大地简化生产工艺，有利于大规模工业生产，因此我们通过对 Fab′进行改造，可在细菌周质腔内自发形成可溶性 CD20 $F(ab')_2$ 抗体。

本文采用 phoA 启动子，将重链 FD 基因和轻链基因的 5′端连接上细菌内毒素的信号序列，使所表达的蛋白在信号肽的引导下分泌到周质腔，在类似伴侣蛋白的协同作用下，形成完全正确的立体折叠和连间二硫键，表达产物为可溶性 CD20 $F(ab')_2$ 抗体，产量达 241mg/L。我们采用该系统表达具有以下特点：(1) 可避免产物被细胞内蛋白酶降解，(2) 表

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

达产物可按正确方式进行折叠，具有良好生物活性，可避免形成大量无活性的包涵体，简化了分离纯化的步骤，(3)由于蛋白被分泌到细菌周质腔内，因而降低了外源蛋白对宿主细胞的毒害作用。本文采用的表达系统为分泌型，通常表达抗体的产量较低，仅有每升数毫克左右，但我们应用高密度发酵技术达到了每升数百毫克水平，使其大规模生产成为可能，而且其活性与摇瓶培养的抗体生物活性基本一致[7]。

参 考 文 献

[1] Stashenke P, Nadier L M, Hardy R, *et al*. Characterization of a human B lymphocyte specific antigen. *J Immunol*, 1980, **125**: 1678 – 1685.

[2] Naddoer L M, Korsmeyer S J, Anderson K C, *et al*. B cell origin of non T cell acute lymphoblastic leukemia a model for discrete stages of neoplastic and normal pre B cell differentiation. *J Clin Invest*, 1984, **74**: 332 – 340.

[3] Chang K L, Arber D A, Weiss L M, *et al*. CD20: a review. *Applied Immunohistochem*, 1996, **4**: 1 – 15.

[4] Einfeld D A, Broen J P, Valentine M A, *et al*. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J*, 1988, **7**: 711 – 717.

[5] Magic B. Finally approval of a monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Cancer Biotherapy & Radio Pharmaceuticals*, 1997, **14**(4): 223 – 233.

[6] 赖增祖，熊冬生，许元富，等. 抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab′在大肠杆菌中高效表达. 高技术通讯，2000，**10**(4): 9 – 14.

[7] 郑梦杰，范冬梅，熊冬生. 新型基因工程抗 CD20 抗体片段的构建、表达和活性. 高技术通讯，2001，**11**(9): 13 – 17.

[8] Sang Y L. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tibtech*, 1996, **14**: 98 – 105.

Ferment and Purification of CD20F(ab′)$_2$ Antibody

WANG Jin-Hong　JI Qing　XIONG Dong-Sheng　XU Yuan-Sheng　YANG Chun-Zheng*

(*State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Uion Medical College, Tianjin* 300020, *China*)

Abstract: The pYZcpp3 was introduced to *E. coli* 16C9, in which could be expressed at high level. By using optimize the ferment parameters, during high density culture the final cell density OD_{550} reaches 140(200g wet cell weigh/L). After the CD20F(ab′)$_2$ antibody was extracted from *E. coli* and then purified by FPLC. The yield of soluble CD20F(ab′)$_2$ antibody was 241mg/L and 50% of it is bivalent. The antigen -binding activity of F(ab′)$_2$ was analysed by FACS using *Raji* cells as target cells, the result showed that F(ab′)$_2$ specifically binds to CD 20$^+$ cells. The activity of F(ab′)$_2$ inhibiting the growth of cell Raji *in vitro* was examined using MTT, which showed that the IC_{50} of CD20 F(ab′)$_2$ and Fab′ were 22.9μg/mL and 42.8μg/mL respectively.

Key words: High density culture, CD 20 F(ab′)$_2$ antibody, *Escherichia coli* 16C9

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2000141, 2001 AA215341); Tianjin's Important Foundation Item (003119511)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-22-27230740; E-mail: czyang@ public.tpt.tj.cn

Other authors: WANG Cai-Yun, XU Yuan-Fu, ZHENG Meng-Jie

Received date: 01-02-2004

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn