

一种具有人 VEGF 结合活性的人源单一重链可变区的克隆与表达

刘珩^{1,2}, 刘思国², 武艺², 马梓力^{1,2}, 刘煜³, 张爱民², 陈建泉², 成国祥²

1 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

2 上海转基因研究中心, 上海 201210

3 中国药科大学 生化教研室, 南京 210009

摘要: 为避免一种来自五特征转基因小鼠的全人 VEGF 单克隆 IgM 抗体分子量大的不足, 本研究探讨了该抗体单一重链可变区的功能特性。首先, PCR 获得该抗体的重链可变区, 将该序列克隆至 pET28a 表达载体内, 在大肠杆菌中进行了诱导表达。通过变性纯化和复性等方法获得了具有生物学活性的 16 kDa 重组抗体片段——rhVVH。体外结合实验表明, rhVVH 保留有完整免疫球蛋白的人 VEGF 结合活性。人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 增殖抑制实验表明: rhVVH 可以剂量依赖性的抑制 HUVEC 的增殖。上述结果揭示了该抗体单一重链可变区保留有完整抗体的部分功能, 为进一步开展全人源 VEGF 单克隆 IgM 抗体小型化研究奠定了基础。

关键词: 全人抗体, VEGF, 单域抗体, 重链抗体

Cloning and expression of a single human immunoglobulin heavy-chain variable domain with vascular endothelial growth factor binding activity

Heng Liu^{1,2}, Siguo Liu², Yi Wu², Zili Ma^{1,2}, Yu Liu³, Aimin Zhang², Jianquan Chen², and Guoxiang Cheng²

1 School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

2 Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201210, China

3 Department of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: In the application of therapeutic antibodies, large molecular weight of antibodies is always a problem that prevents them from penetrating into tissues or binding to antigenic determinants. To overcome this problem, we investigated the function of the heavy chain variable domain of a monoclonal anti-VEGF human IgM antibody derived from the Five-Feature Translocus Mice. We cloned the cDNA of the heavy chain variable domain, which was then inserted into pET28a vector and expressed in *Escherichia coli*. After purification and renaturation of the denatured recombinant protein, we obtained a 16 kDa antibody fragment, which is named as rhVVH. By immunoassaying its VEGF-binding capability *in vitro*, we proved that rhVVH retains this activity as the complete IgM. Importantly, rhVVH is shown to inhibit the HUVEC cell proliferation in a concentration-dependent manner. Our

Received: February 10, 2010; **Accepted:** May 10, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30672478), Science and Technology Major Projects of Major New Drug Development of China (No. 2009ZX09103-654).

Corresponding author: Siguo Liu. Tel: +86-21-51380637; E-mail: lsg@cngenon.com

国家自然科学基金 (No. 30672478), 国家新药创制重大专项 (No. 2009ZX09103-654) 资助。

results indicate that the single heavy chain variable domain might inherit part of the biological function of the complete IgM antibody, which provided a valuable potential in further research on antibody miniaturisation.

Keywords: human antibody, vascular endothelial growth factor, sdAbs, heavy-chain antibody

血管内皮细胞生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 在肿瘤的血管发生过程中发挥极其重要的作用。抑制 VEGF 及其受体可有效地抑制肿瘤从无血管期向血管期转变, 从而抑制肿瘤生长, 并降低癌细胞转移的几率^[1]。FDA 目前已批准两种靶向 VEGF 的治疗性抗体上市, 即 Avastin 和 LUCENTIS^[2], 另有数种靶向 VEGF 的治疗性抗体正在不同阶段的临床实验。Avastin 自 2004 年上市以来被证明对于转移性直肠癌、非小细胞肺癌、乳腺癌等肿瘤均有显著的抑制效果。

目前几乎所有被 FDA 批准上市或正在进行临床实验的治疗性抗体都是人源化或嵌合 IgG1 抗体, 具有分子量大和鼠源性两方面的不足。大分子很难穿透组织或结合隐藏在抗原内部的抗原决定簇^[2]。抗体内的鼠源成分会引起 HAMA 反应 (Human anti-mouse antibody), 在临床应用时导致抗体被迅速降解和清除^[3]。目前克服这些不足的主要方法是制作全人抗体和对抗体进行小型化改造 (如 Fab 片段、单链抗体、单域抗体和 CDR 模拟抗体等)。其中, 由单一重链或重链可变区构成的单域抗体被证明具有出众的进入抗原分子表面空隙 (Cavity) 的能力, 同时还具有体积小、可溶性高、热稳定性好、重折叠能力强和体内组织穿透性好等优点, 能够较高水平保留完整抗体的抗原识别能力和亲和力^[4]。

我们使用人 VEGF₁₆₅ 免疫五特征小鼠 (Five-feature translocus mice), 得到了一种具有治疗效果的全人源 VEGF 单克隆 IgM 抗体 (HVmAb)^[5]。为进一步探索 HVmAb 的抗原结合特性, 降低抗体分子量, 本研究克隆并表达了该抗体的重链可变区 (VH), 获得了全人源 VEGF 抗体的小型片段, 并探索了其功能特性。

1 材料与方法

1.1 培养物与试剂

V75 杂交瘤细胞系为本实验室保存; pMD19-T

载体购自 TaKaRa 公司; pET28a 表达载体购自 Novagen 公司; DH5 α 大肠杆菌和 BL21 (DE3) 大肠杆菌为实验室自存; 人脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) CRL-1730 细胞株购自 ATCC。

限制性内切酶、LA Taq 聚合酶以及 RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver.1.1 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; DMEM (High glucose) 培养基、0.25% 胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司; RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自 PAA 公司; 凝胶回收试剂盒、质粒大提试剂盒购自 Qiagen 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; His 亲和层析纯化试剂盒购自 Novagen 公司; 鼠抗 His 抗体和 HRP 标记抗鼠第二抗体购自上海欣百诺生物科技有限公司; 人 VEGF 标准品购自 Sigma 公司; VEGF 多抗兔血清 (NB100-698) 购自 Novus 公司; HVmAb 单抗为本单位自制, 提取自 V75 杂交瘤; 鼠抗人 λ 链抗体购自 Santa Cruz 公司; Costar 96 孔酶标板购自 Corning 公司; 聚组氨酸标签蛋白 (6 \times His) (BS-0287P) 购自北京博奥森生物技术有限公司; CCK-8 活细胞计数试剂盒购自日本同仁化学研究所; PCR 引物合成和 DNA 测序由上海 Invitrogen 公司完成。

1.2 重链可变区的克隆

杂交瘤细胞 V75 的培养参照文献[5]进行。总 RNA 提取和反转录按照试剂盒说明书进行。参照文献[6]进行人免疫球蛋白重链可变区 (Heavy chain variable region, VH) 扩增, 所用 PCR 引物见表 1。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 69 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。预期大小的 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后回收, 克隆入 pMD19-T 载体中。

1.3 序列分析

获得的 VH 序列经 NCBI IgBLAST 和 IMGT 分析 VH 区的功能片段。

表 1 扩增 VH 所使用的通用引物

Table 1 Primers used to amplify VH region

Primer name	Primer sequence(5'-3')
VH5-1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH5-2	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
VH5-3	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH5-4	CAGGTGCAGCTGGAGGAGTCGGG
VH5-5	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
VH5-6	CAGGTAGAGCTGGAGCAGTCAGG
VH3-1	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
VH3-2	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
VH3-3	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC
VH3-4	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
VH-forward	<u>CCATATGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG</u> Nde I
VH-Back	<u>CAAGCTTTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC</u> Hind III

1.4 VH 重组蛋白的诱导表达

利用 *Hind* III 和 *Nde* I 酶切位点将 VH 片段定向插入 pET28a 表达载体中, 形成重组质粒 pET-VH。将 pET-VH 转入 BL21 受体菌, 摸索最佳诱导表达温度 (28℃、32℃ 和 37℃) 和诱导表达时间 (1 h、2 h 和 3 h)。

利用 SDS/PAGE 和 Western blotting 分析目的蛋白的表达情况和纯化结果。Western blotting 一抗为鼠抗 6×His 单抗, 二抗为 HRP 标记的抗鼠 IgG 抗体。

1.5 VH 的纯化

参照 Novagen HisBind 纯化试剂盒说明进行 rhVVH 重组蛋白的纯化。主要试剂配方为: 结合缓冲液为: 5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9); 洗涤缓冲液为: 60 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9); 洗脱液为: 1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9)。

rhVVH 的变性纯化方法为: 菌体经超声裂解

(强度 80, 间隔 2 s, 超声 30 s 后间隔 30 s, 重复 5 次), 5 000 ×g 离心收集包涵体沉淀。用含有 6 mol/L 尿素的结合缓冲液溶解包涵体, 0.45 μm 滤膜过滤后, 进行 Ni-NTA 色谱柱纯化。主要试剂配方为: 结合缓冲液为: 5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素 (pH 7.9); 洗涤缓冲液为: 60 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素 (pH 7.9); 洗脱液为: 1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素 (pH 7.9)。

在 4℃ 条件下, 将变性纯化获得的 rhVVH 依次经含 4、2、1、0 mol/L 尿素的 50 倍体积 PBS 透析复性。最后将复性好的 rhVVH 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4℃ 保存。

1.6 VEGF 结合能力检测

rhVVH 的 VEGF 结合能力参考文献[7]进行, 具体为: 用 0.5 μg/mL 的人 VEGF 标准品包被酶标板, 每孔 100 μL。将 rhVVH 做倍比稀释, 以 HVmAb 和 VEGF 多抗作为阳性对照组, pET28a 空载体提取物作为阴性对照组。各组稀释浓度、所用抗体情况如表 2, 每组 3 个重复。最后以 OPD 显色, 测定各样品在 490 nm 处的光吸收值, 计算平均值和方差。

1.7 HUVEC 细胞的增殖抑制检测

复苏 HUVEC 细胞至 100 mm 培养皿, 以含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基培养至 90% 密度, 0.25% 胰酶消化后计数, 按照每孔 6×10^3 个细胞铺至 24 孔板。待 8 h 细胞贴壁后, 分别加入不同浓度 rhVVH。阳性对照为兔抗人 VEGF 多抗, 6×His 聚组氨酸标签蛋白和 PBS 作为阴性对照, 每组 3 个重复。2~4 d 后使用 CCK-8 试剂盒测定活细胞数量, 测定 450 nm 处吸光度。

表 2 样品稀释和抗体使用情况

Table 2 Sample Concentration and antibodies used in ELISA

	Sample concentration (μg/mL)	First antibodies	HRP-antibodies
rhVVH	480.000, 160.000, 53.333, 17.778, 5.926	Anti-6×His mAb (1:1 000)	Goat anti mouse (1:1 000)
HVmAb	500.000, 166.667, 55.556, 18.519, 6.173	Anti-human λ chain mAb (1:1 000)	Goat anti mouse (1:1 000)
NC*	487.000, 162.333, 54.111, 18.037, 6.012	Anti-6×His mAb (1:1 000)	Goat anti mouse (1:1 000)
VEGF-pAb	25.000, 8.333, 2.778, 0.926, 0.309	PBS	Goat anti rabbit (1:1 000)

2 结果与分析

2.1 重链可变区的克隆和序列分析

经引物配对尝试确定, 引物 VH5-1 和引物 VH3-3 配对可高效扩增出约 350 bp 的 VH 片段 (图 1A)。将该片段插入到 pMD19-T 载体中, 酶切鉴定正确 (图 1B)。

经测序表明, 所克隆的片段属于人抗体重链基

因家族。经 IgBLAST 和 IMGT/V-QUEST 分析, 得到了 VH 区中的功能区域划分 (图 2)。该片段属于人 VH1 家族, 其中 FR1 到 FR3 区的 296 个碱基与 IGHV1-2*02 基因 100% 同源。

2.2 重组抗体片段的诱导表达和纯化

pET-VH 转入大肠杆菌 BL21 菌株, 经过尝试后发现 rhVvH 在 BL21 表达系统中主要以包涵体形式

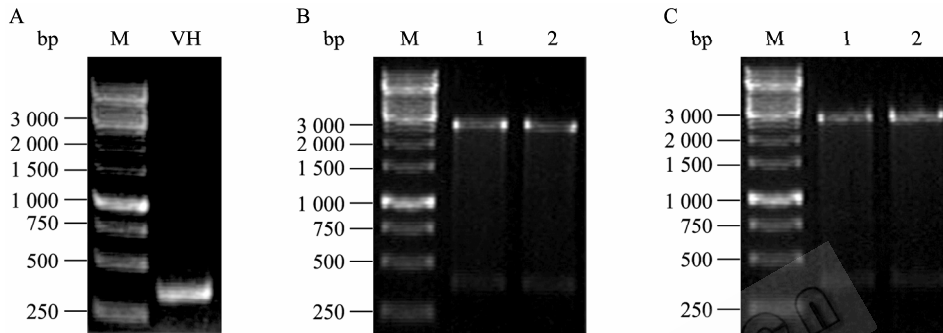


图 1 VH 片段琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Agarose electrophoresis of cloned VH segment. (A) specific band of VH observed in PCR product at the predicted position (about 350 bp). (B) ampicillin selected T-Vector clones indentified with *Bam*H I-*Hind* III. 1: clone I digested with *Bam*H I-*Hind* III; 2: clone II digested with *Bam*H I-*Hind* III. (C) ampicillin selected T-Vector clones indentified with *Xba*I-*Xho*I. 1: clone I digested with *Xba*I-*Xho*I; 2: clone II digested with *Xba*I-*Xho*I.

CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	CCT	GGG	GCC	TCA
Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S
<hr/>																
FR1																
GTG	AAG	GTC	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACC	TTC	ACC	GGC	TAC	TAT	ATG
V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	G	Y	Y	M
<hr/>																
													CDR1			
CAC	TGG	GTG	CGA	CAG	GCC	CCT	GGA	CAA	GGG	CTT	GAG	TGG	ATG	GGA	TGG	ATC
H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I
<hr/>																
												FR2			CDR2	
AAC	CCT	AAC	AGT	GGT	GGC	ACA	AAC	TAT	GCA	CAG	AAG	TTT	CAG	GGC	AGG	GTC
N	P	N	S	G	G	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V
<hr/>																
															FR3	
ACC	ATG	ACC	AGG	GAC	ACG	TCC	ATC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC	AGG
T	M	T	R	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R
<hr/>																
CTG	AGA	TCT	GAC	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GAT	CAC	GGT	CCC
L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	H	G	P
<hr/>																
													CDR3			
TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA			
F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S			
<hr/>																
FR4																

图 2 VH 片段序列分析和功能区划分

Fig. 2 Sequence and domains analysis of VH.

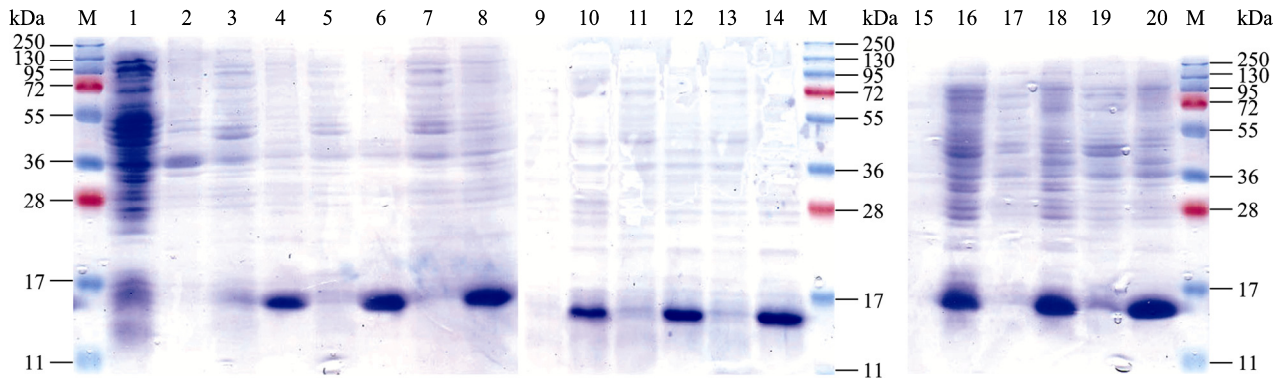


图3 rhVVH 在 BL21 大肠杆菌中诱导表达条件的摸索

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the induction conditions of the expression of rhVVH in BL21 *E. coli*. Proteins were separated by 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. 1–2: lysis supernatant and debris of BL21 cell with no transferred plasmid induced at 37°C for 3 hours, as negative control; 3–8: lysis of BL21 cell harbouring the recombinant plasmid induced at 37°C; 9–14: lysis of BL21 cell harbouring the recombinant plasmid induced at 28°C; 15–20: lysis of BL21 cell harbouring the recombinant plasmid induced at 32°C. 3,4,9,10,15,16 indicate BL21 induced for one hour; 5,6,11,12,17,18 indicate BL21 induced for two hours; 7,8,13,14,19,20 indicate BL21 induced for three hours; 3,5,7,9,11,13,15,17,19 indicate lysis supernatant of BL21 cells; 4,6,8,10,12,14,16,18,20 indicate lysis debris of BL21 cells.

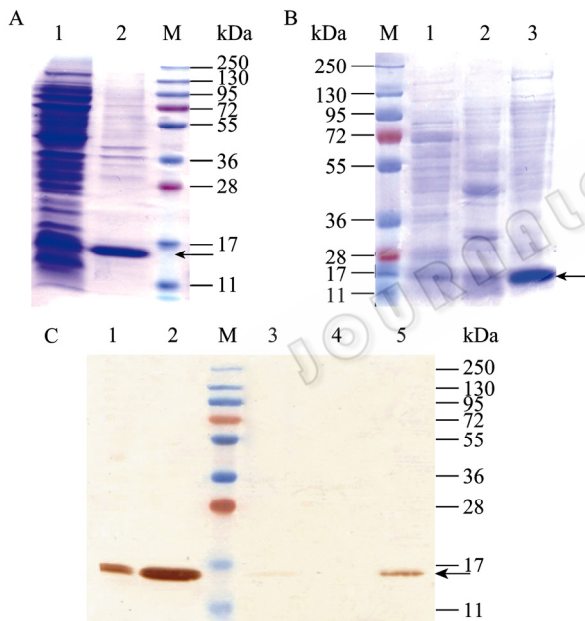


图4 rhVVH 表达和纯化结果的鉴定

Fig. 4 SDS-PAGE (A/B) and Western blotting (C) analysis of expressed and purified rhVVH. (A) 1: lysis supernatant of rhVVH expression BL21 cell; 2: lysis debris of rhVVH expression BL21 cell. (B) Samples collected in denatured purification. 1: flow through; 2: wash; 3: eluted rhVVH. (C) Samples identified by an Anti-6×His tag Western blotting. 1: lysis supernatant of rhVVH expression BL21 cell; 2: lysis debris of rhVVH expression BL21 cell, as positive control; 3: flow through; 4: wash; 5: eluted rhVVH.

表达(图 4A)。 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 32°C 诱导 3 h (图 3 样品 19)。Western blotting 实验(图 4C 样品 1、2) 验证了约 16 kDa 大小的特异条带

确为 pET-28a 中所带片段表达的重组蛋白, 大小亦符合预期。在非变性条件下, 在多次尝试诱导条件(图 3) 后, 仍难以得到较大的可溶目的蛋白, 而且非变性 rhVVH 的纯化效果比较差(数据未显示), 因此决定采用变性纯化(图 4B)。经蛋白定量计算, 每升菌液可获得 4.8 mg 的 rhVVH 纯品。

2.3 重组抗体结合实验

将复性好的 rhVVH 纯品与包被在 ELISA 板上的人 VEGF 进行反应, 然后通过 6×His 标签单抗进行 ELISA 检测。尽管实验各组所用一抗和酶标抗体不一致, 抗原抗体反应效果不尽相同, 但从图 5 可见: 与来源于 V75 杂交瘤的完整 IgM 单抗 (HVmAb 组) 相比, rhVVH 仍有较好的 VEGF 结合能力, OD_{490} 呈现有较好的浓度梯度。

2.4 HUVEC 细胞体外抑制实验

加入 rhVVH 后 48 h 观察细胞, 细胞数量可见明显差异(图 6), 75 ng/mL rhVVH 实验组显示了与阳性对照接近的抑制 HUVEC 细胞增殖的效果, 并在与加 VEGF 组的对比中显示了与 VEGF 的拮抗作用。

放大给药浓度重复实验, 在培养 120 h 后使用 CCK-8 试剂盒对活细胞数进行测定(图 7), 结果显示 rhVVH 对 HUVEC 细胞有一定抑制作用, 且抑制作用与浓度正相关。

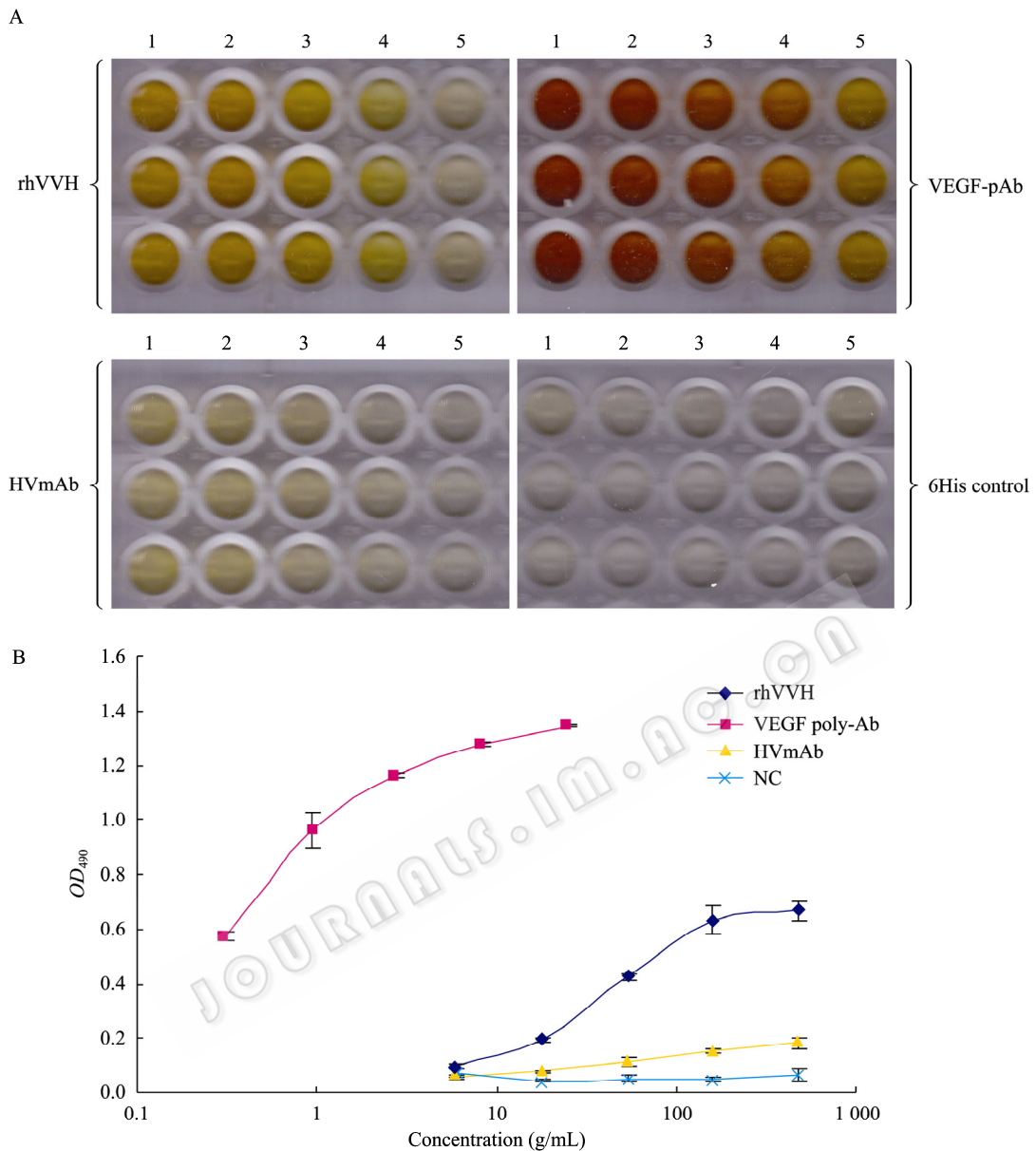


图5 rhVVH 结合 VEGF 活性实验浓度曲线

Fig. 5 VEGF-binding activity assay of rhVVH. (A) ELISA results of rhVVH, HVmAb, VEGF-pAb and NC. Lane 1 to lane 5 of each sample were added following the concentrations shown in Table 2. (B) Statistics of OD_{490} for ELISA. 50 ng per well VEGF was coated; rhVVH with concentration ranged from 5.926 $\mu\text{g/mL}$ to 480 $\mu\text{g/mL}$ (1:3 dilution for 4 times); polyclonal rabbit VEGF antibody (VEGF-pAb) with concentration ranged from 0.309 $\mu\text{g/mL}$ to 25 $\mu\text{g/mL}$ (1:3 dilution for 4 times) as positive control; HVmAb with concentration ranged from 6.173 $\mu\text{g/mL}$ to 500 $\mu\text{g/mL}$ (1:3 dilution for 4 times) as another control; Empty pET28a vector 6His-tagged expression extract with concentration ranged from 6.173 $\mu\text{g/mL}$ to 500 $\mu\text{g/mL}$ (1:3 dilution for 4 times) as negative control; OPD working solution added to VEGF coated well as blank.

3 讨论

通过 IgBlast 和 IMGT 比对所得的 VH 序列, 发现 VH 属于人免疫球蛋白 VH1 家族, FR1 到 FR3 的 296 个碱基与 IGHV1-2*02 有 100% 同源性。1987 年, Schroeder 等^[8]在研究人死亡 B 细胞的过程

中发现了 IGHV1-2*02, 具体功能不详。本研究揭示该基因编码的重链可变区多肽具有人 VEGF 的结合活性。ELISA 结合实验表明, 与完整抗体相比, rhVVH 保留了体外 VEGF 结合活性, 符合通常认为的: 重链在结合抗原过程中起主要作用, 轻链的缺失会降低抗体与抗原的亲合力^[10]。

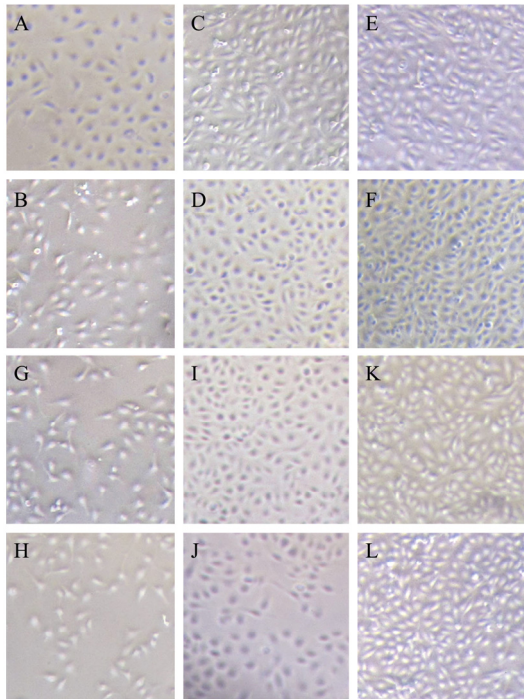


图 6 HUVEC 细胞典型密度

Fig. 6 Typical HUVEC cell density. (A) 100 ng/mL polyclonal rabbit anti-VEGF antibody with 3 ng/mL VEGF. (B) 100 ng/mL polyclonal rabbit anti-VEGF antibody. (C) 75 ng/mL 6xHis with 3 ng/mL VEGF. (D) 75 ng/mL 6xHis. (E) 0.1% (V/V) PBS with 3 ng/mL VEGF. (F) 0.1% (V/V) PBS. (G) 75 ng/mL rhVVH with 3 ng/mL VEGF. (H) 75 ng/mL rhVVH. (I) 15 ng/mL rhVVH with 3 ng/mL VEGF. (J) 15 ng/mL rhVVH. (K) 3 ng/mL rhVVH with 3 ng/mL VEGF. (L) 3 ng/mL rhVVH.

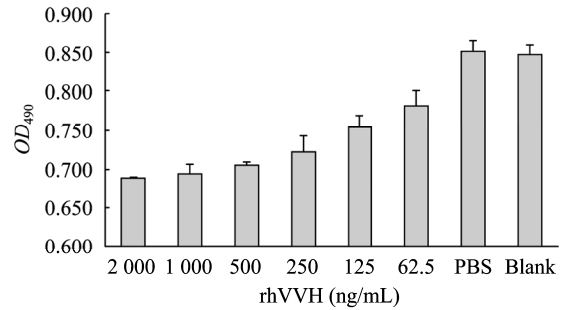


图 7 HUVEC 细胞抑制实验

Fig. 7 HUVEC inhibition result. HUVEC cell cultured with different concentration (ranged from 62.5 ng/mL to 2 000 ng/mL) of rhVVH added in medium. Equal volume of PBS were added as negative control.

在细胞增殖抑制实验中, rhVVH 显示出了抑制 HUVEC CRL-1730 细胞的增殖活性。前期研究已表明, HVmAb 所识别的 VEGF 表位可以有效阻断 VEGF 的血管促生活性, 并抑制肿瘤生长^[5]。可见, rhVVH 抗体片段可被应用于筛选和生产高亲和力的工程抗体, 这种筛选过程可通过近年来发展起来的丙氨酸替换、胚系基因热点突变等技术实现^[11-12]。

将抗体的 CDR 区独立拼装组成的 CDR 多肽也能够保留原抗体的抗原结合活性^[13]。笔者在尝试相关研究过程中 (结果未发表), 克隆出了一条无义 HVmAb 轻链 (图 8) 和一条有义 HVmAb 轻链可变

CAG	CCT	GCC	TCA	GTG	TCA	GTG	TCA	CCA	GGA	CAG	GCA	GCC	ATG	ATC	ACC	TGC
Q	P	A	S	V	S	V	S	P	G	Q	A	A	M	I	T	C
FR1																
TCT	TGA	GAT	AAC	CTC	AAA	GAT	GAG	TAT	GTT	TAC	TGG	TTC	TGG	CAG	AAG	CCA
S	&	D	N	L	K	D	E	Y	V	Y	W	F	W	Q	K	P
CDR1										FR2						
GAC	CAG	GCC	CAT	ACT	GGT	GAT	ATA	TGA	AGG	CAG	CAA	GCG	GCC	CTC	AGG	AAT
D	Q	A	H	T	G	D	I	&	R	Q	Q	A	A	L	R	N
CDR2										FR3						
TTC	TGA	TTT	TCT	GAG	TCC	AGC	TCA	GGG	AAC	ATG	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AGC
F	&	F	S	E	S	S	S	G	N	M	A	T	L	T	I	S
AGG GCT CAG ACT GAG GAC GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAC AGG TAC AAT AGA																
R	A	Q	T	E	D	E	A	D	Y	Y	C	H	R	Y	N	R
AAC AGT GAT GAT GGT ATT CGG CGG AGG GAC CAA GCT GAC CGT CCT																
N	S	D	D	G	I	R	R	R	D	Q	A	D	R	P		

图 8 获得的无义轻链可变区序列

Fig. 8 Sequence and domains analysis of VL.

区的基因, 该无义轻链基因来源于 λ 链基因所在的 22 号染色体, 与 V2-4P 序列 99.2% 同源。造成两种轻链基因共存的原因, 笔者认为可能与五特征小鼠中人和小鼠的内源抗体基因共存有关。五特征小鼠携带有人重链、 κ 链和 λ 链基因, 小鼠的内源重链和 κ 链基因被抑制, 而 λ 链基因仍处于激活状态^[14]。Ren 等^[15]也曾报道过这种异源抗体基因共存引发抗体基因异常表达的现象, 他们发现两种源于 SP2/0 的杂交瘤细胞中都存在 κ 链基因的异常重排和表达。不过, 目前关于 V_{λ} 家族中的假基因在 B 细胞成熟过程中如何影响抗体序列的重排尚无定论, 也不排除假基因在抗体形成过程中发挥有重要功能 (如鸡的抗体形成^[16])。由此看来, 五特征小鼠可作为研究人免疫球蛋白 λ 链重排机制的模型动物。

IgM 是免疫球蛋白各个亚型中较早被发现的一类, 并很快应用于短期感染的检测。但是由于 IgM 分子量巨大, 很难被用于体内免疫治疗。本研究, 证实了来源于全人源 VEGF 单克隆 IgM 抗体的重链可变区仍保留有完整抗体的部分功能, 这为进一步开展抗体小型化和功能特性分析奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995, **1**(1): 27-31.
- [2] Dimitrov DS, Marks JD. Therapeutic antibodies: current state and future trends—is a paradigm change coming soon? *Methods Mol Biol*, 2009, **525**: 1-27.
- [3] Carter P, Merchant AM. Engineering antibodies for imaging and therapy. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, **8**: 449-454.
- [4] Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*, 2009, **198**(3): 157-74.
- [5] Liu Y, Yun DJ, Chen JQ, et al. Isolation and characterization of human anti-VEGF165 monoclonal antibody with anti-tumor efficacy from transgenic mice expressing human immunoglobulin loci. *Cancer Lett*, 2009, **273**: 28-34.
- [6] Goding JW. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. 3rd ed. London: Academic Press, 1988: 43-434.
- [7] Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol*, 1977, **34**: 475-483.
- [8] Schroeder HW Jr, Hillson JL, Perlmutter RM. Early restriction of the human antibody repertoire. *Science*, 1987, **238**: 791-793.
- [9] Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *E. coli*. *Nature*, 1989, **341**: 544-546.
- [10] Riechmann L, Muyldermans S. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods*, 1999, **231**: 25-38.
- [11] Heap CJ, Wang Y, Pinheiro TJJ, et al. Analysis of a 17-amino acid residue, virus-neutralizing microantibody. *J Gen Virol*, 2005, **86**: 1791-1800.
- [12] Ho M, Kreitman RJ, Onda M, et al. *In vitro* antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *J Biol Chem*, 2005, **280**(1): 607-617.
- [13] Qiu XQ, Wang H, Cai B, et al. Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(8): 921-929.
- [14] Nicholson IC, Zou X, Popov AV, et al. Antibody repertoires of four and five feature translocus mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes. *J Immunol*, 1999, **163**: 6898-6906.
- [15] Ren J, Bai J, Si XM, et al. Effect of disproportional expression of the aberrant and correct kappa chain transcripts on antibody secretion of SP2/0 derived-CEA and AFP hybridomas. *Int J Mod Cancer Ther*, 1999, **2**(2): 65-70.
- [16] Carlson LM, McCormack WT, Postema CE, et al. Templated insertions in the rearranged chicken IgL V gene segment arise by intrachromosomal gene conversion. *Genes Dev*, 1990, **4**: 536-547.