

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810124160.1

[51] Int. Cl.
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 101298480A

[22] 申请日 2008.6.25

[21] 申请号 200810124160.1

[71] 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道
639 号

[72] 发明人 王 旻 张 弢 浦 迪 陈 卫
张 娟 李海鑫

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 3 页

[54] 发明名称

全人源抗人白介素 21 单链抗体

[57] 摘要

本发明属基因工程抗体技术领域，具体涉及基因工程设计、表达的与人白介素 21 有特异性亲和力的全人源多肽类单链抗体。此工程抗体多肽是由一条柔性连接肽将抗体的轻链和重链可变区首尾相连而形成的，轻链和重链可变区的骨架与互补决定区均来源于人。本发明通过“富集-洗脱-富集”的循环操作，筛选出对人白介素 21 具有特异亲和力的抗体，后通过分泌表达系统、亲和纯化系统获得全人源的可以特异性结合人白介素 21。本发明抗体可以应用于偶联于可检测物质和治疗剂。

-
1. 包含具有序列 1 的 IL-21 抗体，所述抗体免疫特异性结合于人 IL-21 多肽。
 2. 包含具有序列 1 的可变重链区的基因序列的 IL-21 抗体，所述抗体免疫特异性结合于人 IL-21 多肽。
 3. 包含具有序列 1 的可变轻链区的基因序列的 IL-21 抗体，所述抗体免疫特异性结合于人 IL-21 多肽。
 4. 权利要求 1、2 或 3 的抗体，其中所述抗体是全人源抗体。
 5. 权利要求 1、2 或 3 的抗体，其中所述抗体偶联于可检测物质和治疗剂。
 6. 包含权利要求 1、2 或 3 的抗体的诊断试剂盒。

全人源抗人白介素 21 单链抗体

所属技术领域

本发明属于生物工程领域，具体涉及一种可与人白介素 21 特异结合的单链抗体。

背景技术

人白细胞介素 21 (human interleukin-21, hIL-21) 是 2000 年发现的 γ 链 (γ_c) 家族中的一种细胞因子。hIL-21 能抑制 Th1 细胞分泌 IFN- γ ，抑制树突细胞 (dendritic cells, DCs) 抗原递呈功能，促 B 细胞分化为浆细胞，提高免疫球蛋白 γ (immunoglobulin gamma, IgG) 分泌，提高 CD8⁺T 细胞细胞毒性，提高自然杀伤细胞 (nature killer cells, NKs) 细胞杀伤活性，促 Th17 细胞分泌 IL-17 和 IL-21。由于 IL-21 提高体液免疫和细胞免疫活性，因此其在炎症与自身免疫性疾病中存在重要的促疾病发展作用。

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为特征，以慢性多发性关节炎为主要临床表现的一种自身免疫性疾病。研究表明，在类风湿性关节炎病人滑膜组织中，滑膜成纤维细胞与滑膜巨噬细胞表达 IL-21R，IL-21 参与其表型分化与 IL-1 β 、TNF α 分泌。研究发现，IL-21R 不仅在病人的滑膜组织中表达增加，外周血白细胞、滑液白细胞表面的 IL-21R 表达均显著增加。因此，阻断 IL-21/IL-21R 通路可能是治疗 RA 的新途径。胶原诱发关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 和佐剂诱发关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AIA) 是实验性 RA 的代表性模型，对 CIA 和 AIA 动物模型分别使用 IL-21R-Fc 可溶性蛋白 (IL-21R-Fc)，发现 CIA 明显好转而 AIA 症状完全消失，这一结果支持了 IL-21 阻断剂对于 RA 治疗的重要作用。进一步研究发现，在 IL-21R-Fc 剂量为 (100 μ g/ml) 时可以降低 50% TNF α 分泌量、57% IL-6 分泌量和 81% 的 IL-1 β 分泌量。

原发性干燥综合征 (primary Sjogren's syndrome, pSS) 是一种累及分泌腺体的自身免疫性疾病，病理上表现为唾液腺呈灶性 CD4⁺T 淋巴细胞浸润，而且 B 淋巴细胞高反应性成为其最突出的免疫学特征之一。研究发现 pSS 患者血清 IL-21 水平显著高于正常人水平，且与 γ -球蛋白、红细胞沉降率呈明显正相关，特别是自身抗体阳性者血清 IL-21 水平显著高于对照，表明 IL-21 在 pSS 患者体内是促进 B 细胞增殖的，并在调节免疫球蛋白的产生过程中起重要作用。而且 IL-21 在 pSS 伴腮腺肿痛者明显高于对照，推测在免疫紊乱的 pSS 患者体内，大量 CD4⁺T 细胞浸润唾液腺体，随着 IL-21 水平的升高，致使 B 细胞反应性增高，多克隆 B 淋巴细胞激活使体内产生大量器官特异性及非特异性自身抗体并可出现高 IgG 症，更加剧了自身免疫反应及腺体内外损伤。pSS 并甲状腺功能减退者血清 IL-21 水平显著高于非甲减。干燥综合征合并甲状腺病变以自身免疫性甲状腺功能异常为主，都存在异常的体液及细胞免疫。

甲状腺表现为慢性炎症过程大量 Th1 细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 等增多，而 pSS 患者腺体中 IL-2、IFN- α 表达增加提示亦有类似 Th1 反应。研究发现 IL-21 可以上调 T-bet 基因合成进而增强 Th1 细胞免疫反应。以往研究表明 pSS 患者体内 CD8⁺T 细胞数量减少，因而对 CD4⁺T 细胞的抑制功能减弱，表现为 CD4⁺T 细胞功能亢进，活化的 CD4⁺T 细胞产生的大量 IL-21 激活 T、B 细胞，促进免疫球蛋白的产生引起腺体及腺体外的损伤。

系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus, SLE）是一种自身免疫性结缔组织病，由于体内大量致病性自身抗体和免疫复合物造成组织损伤。其中 IgG1、IgG2 是在 SLE 中起关键致病作用的自身抗体，因此在很大程度上，那些影响 B 淋巴细胞功能的因素便在 SLE 中发挥重要作用。IL-21 可增强 IgG 分泌，对抗 IgE 的生成，并促进 B 细胞向浆细胞分化，因此 IL-21 可能参与 SLE 的致病过程。研究发现在 SLE 病患体内 IL-21 的表达水平远高于健康人，对于基因多态性分析也显示 IL-21 是 SLE 患病风险的候选指标之一。对狼疮性 MRL-Fas(lpr) 小鼠模型使用 IL-21R-Fc 阻断 IL-21 后，dsDNA 自身抗体和总 IgG 水平下降，特别是 IgG1 和 IgG2 量显著下降，并且 SLE 的症状如蛋白尿、IgG 肾小球沉淀、肾小球基底增厚、皮肤损伤都有所减少。可见 IL-21 是 SLE 一个重要的致病因素，其机制主要是通过影响 B 细胞的功能和调节致病性自身抗体数量在 SLE 中起到致病作用，因此可以推测 IL-21 阻断剂在治疗 SLE 方面具有一定潜力。

非肥胖型糖尿病（nonobese diabetic, NOD）为 T 淋巴细胞介导的自身免疫性疾病，NOD 小鼠是目前较为常用的糖尿病小鼠模型。研究者绘制出控制这种疾病的基因位点图谱，其中最重要的位点是 Idd3 位点，用 Idd3 保护性等位基因置换 NOD 小鼠 Idd3 易感性等位基因能使糖尿病发生几率下降 70%。IL-21 基因就定位于 Idd3，因此 IL-21 很可能是控制 NOD 的关键所在。研究表明和器官特异性自身免疫疾病一样，NOD 小鼠的自身免疫性疾病是淋巴细胞减少症和过量的 IL-21 导致的自身反应性 T 细胞代偿性增殖所引起的。实验数据表明 NOD 小鼠中表达 IL-21 受体的 T 细胞量明显多于含有抗病基因的 B6.Idd3.NOD 小鼠，特别是记忆型 T 细胞是 B6.Idd3.NOD 小鼠的 3-4 倍。NOD 小鼠 IL-21mRNA 的表达量也比 B6.Idd3.NOD 小鼠多出数倍，并且 IL-21 还能上调自身受体的表达，促进 IL-21R 表达型 T 细胞增殖，更增强了应答效应。然而 NOD 小鼠有大量 IL-21R 表达型 T 细胞似乎与淋巴细胞减少症相矛盾，但实际上尽管 IL-21 促使 T 细胞增殖，却并不促进其存活。在 NOD 小鼠，表达 IL-21R 的 T 细胞更倾向于死亡，存活下来的一部分破坏胰岛 β 细胞。

实验性变态反应性脑脊髓炎（experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE）是 T 细胞介导的中枢神经系统（central nervous system, CNS）脱髓鞘疾病，是人类脱髓鞘疾病——多发性硬化症（multiple sclerosis, MS）的经典动物模型。研究发现在神经抗原诱导 EAE 之

前使用 IL-21, 促进了 NK 细胞增殖和活性从而增强了 CNS 的炎症反应, EAE 加剧, 但在 EAE 产生后使用 IL-21 却无此效应, NK 细胞耗竭可以完全抑制 IL-21 诱导的病情加重。据此分析, IL-21 通过刺激 NK 细胞介导的炎症反应促 EAE 病情发展。IL-21 与 IL-21R 基因敲除小鼠中 IL-17 的水平低于对照 EAE 模型组 10 倍, 并且其病情发展缓慢, 显示 IL-21 除了通过刺激 NK 细胞介导的炎症反应还通过刺激 Th17 细胞分泌 IL-17 加剧病情发展。

综上所述, 此类疾病均出现 IL-21 异常表达, 使得 IL-21 拮抗剂存在应用于此类疾病的潜力。

抗体相对于化学小分子有其特殊的优势: (1) 抗体对靶标特异的高亲和力, 大大减少了脱靶所造成的副作用。(2) 抗体的半衰期平均为 10-21 天, 从而减少了使用次数, 易于被病患接受。(3) 如果靶标不适合使用化学方法处理, 抗体可以提供一种新的治疗方式。(4) 抗体有确定的序列, 可以通过工程手段更改序列, 获得更佳的疗效。

早期鼠源单抗临床试验发现注射鼠源抗体会产生人抗鼠抗体 (Human anti-mouse antibodies, HAMA) 显著降低药物体内半衰期, 还会增加患者后续应用的临床风险。因此, 鼠源抗体药物的应用受到了限制。随着分子生物学技术的进步, 1984 年出现了嵌合重组抗体技术, 但是由于嵌合抗体中依然存在 33% 的鼠源部分, 能诱发产生人抗嵌合抗体 (Human anti-chimeric antibodies, HACA) 反应。随后发展了抗原性更低的人源化抗体 (鼠源部分 5%—10%) ——通过基因工程手段将鼠源的抗原互补决定区 (CDR_S) 嵌入人抗体骨架中。随着噬菌体展示技术以及由此衍生的 *E.Coli* 展示技术、酵母展示技术的发展, 使人工合成全人源抗体成为可能, 全人源抗体较前几类抗体免疫原性更低, 更加安全。

发明内容

本发明的目的是提供具有潜在医学和药学价值的全人源抗人白介素 21 单链抗体序列。

全人源抗人白介素 21 单链抗体基因序列全长 750 个核苷酸其特征为可变重链区和可变轻链区组成:

可变重链区:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGCTATGGCATGCACTGGGTGCGCCAG

CDR1

GTCCATGCACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATTGGTGTGCCCTAGTGATGGCAGCACAAG

CDR2

CTATGCACAAAAGTTCCAGGCCAGAGTCACCATAACCAGGGACACATCCATGAGCACAG

CCTACATGGAGCTAAGCAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGA
GAGAATCCGTCTGATCAGCGTTGTGTTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTC

CDR3

可变轻链区:

AGTGCACCTTGAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGACCT

CDR1

ATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTATGAAGTTT
CCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTC

CDR2

ACACAGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAG
TATACAGCTTCTACAGACTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTGCGG

CDR3

CCGCA

本发明的目的还在于提供一个全人源抗人白介素 21 单链抗体的筛选方法。

上述发明通过以下技术方案实现。

本发明提供的全人源抗人白介素 21 单链抗体来源于人源单链抗体噬菌体抗体库，从库中筛选出与人 IL-21 有特异性亲和力的抗体序列。

本发明提供的人 IL-21 筛选方法为：

1、噬菌体抗体库扩增

通过发酵法扩增保存于菌株内的质粒，加入辅助噬菌体释放形成抗体库。

2、筛选抗人 IL-21 单链抗体

通过非特异性洗涤去除不与人 IL-21 作用的噬菌体，通过筛选-富集-筛选的循环获得与人 IL-21 具有高亲和力的抗体。

3、鉴定抗人 IL-21 单链抗体

使用 ELISA 鉴定单链抗体的亲和力，使用 PCR 鉴定插入抗体片段的完整性，使用测序鉴定抗体的核酸序列。

4、抗人 IL-21 单链抗体的可溶性表达

使用 HB2151 作为表达菌株，用噬菌体直接感染，诱导表达。使用 Ni²⁺亲和纯化获得可溶性单链抗体表达。

本发明提供了 1 株对人 IL-21 具有高亲和力的单链抗体。

本发明提供的抗人 IL-21 单链抗体可以直接与人 IL-21 特异性结合。

本发明的全人源抗人白介素 21 单链抗体有以下优点：①与人 IL-21 的亲和力高；②抗体序列为全人源，免疫原性低，具有直接开发成人用药物的潜力；③基因工程改造方便，可以根据 CDR 区直接合成 Fab 二价抗体或完整抗体。

附图说明

图 1 人 IL-21 对免疫细胞的作用。IL-21 由多种亚型细胞分泌，其中 Th17 细胞与 NKT 细胞分泌量远高于 Th1 和 Th2 细胞（图中红色箭头）。IL-21 可以通过自分泌作用于此类细胞，增强其正、负反馈作用。

图 2 亲和筛选每轮洗脱噬菌体滴度。以人 IL-21 为抗原，对单链噬菌体抗体库进行了四轮亲和筛选，每一轮筛选后噬菌体抗体收获率呈增长趋势。

图 3 亲和筛选每轮洗脱噬菌体对人 IL-21 亲和力 ELISA。

图 4 单克隆噬菌体对人 IL-21 亲和力 ELISA。

图 5 Ni^{2+} 亲和柱纯化电泳图。M，分子量 Marker；1，平衡缓冲液冲洗；2，20mM 咪唑冲洗；3，50mM 咪唑冲洗；4，100mM 咪唑冲洗；5，200mM 咪唑冲洗；6，500mM 咪唑冲洗。单链抗体在 100mM 咪唑洗脱。

图 6 可溶性 scFv 亲和力 ELISA。

具体实施方式

实施例 1 全人源抗 IL-21 单链抗体筛选

1.1 制备具有性纤毛的 TG1 和 HB2151

噬菌体通过结合大肠杆菌性纤毛进行感染，将 TG1 和 HB2151 从甘油冻存管内平板划线，接种于 M9 培养基平板，37℃倒置培养 36h。4℃保存，1 周内使用。

1.2 野生型 M13 噬菌体滴度测定

- (1) 挑取 M9 平板上的 TG1 单克隆，接种于 2×TY 培养基，37℃振荡培养过夜（8~16h）。
- (2) 取过夜培养的 TG1，按 1%(v/v)接种于 2×TY 培养基，37℃振荡培养至对数期($\text{OD}_{600} \approx 0.5$)。
- (3) 铺下层平板 TYE（1.5%琼脂粉）。
- (4) 将甘油冻存的野生型噬菌体按 100 倍比例梯度稀释至 10^{-12} ，取各个稀释梯度的野生型噬菌体 10 μl 加入 200 μl 对数期 TG1，37℃水浴感染 30min。
- (5) 将 3ml 融化后的上层培养基（0.7%琼脂粉）置于 42℃水浴中保温，加入感染后的 TG1，

颠倒混匀，迅速铺于下层平板上，等待上层培养基凝固后，将平板倒置于 37℃ 培养箱培养过夜。

(6) 计数每个平板上的噬菌斑个数，推算原始管内噬菌体的数量。

1.3 大量制备辅助噬菌体

(1) 挑取 1.2 中单个噬菌斑接种到 5ml 处于对数期的 TG1 培养物中，37℃ 摇床培养 2h。

(2) 转接到含有 500ml 2×TY 液体培养基的 2L 摇瓶中，继续培养 1h，然后加入 50mg/ml 卡那霉素水溶液，至终浓度 50~70μg/ml，继续培养 8~16h。

(3) 10800g，4℃ 离心 15min，收集上清，加入 1/5 体积 PEG/NaCl (20%PEG, 2.5mol/L NaCl)，冰上放置大于 30min。

(4) 再次 10800g，4℃ 离心 15min，沉淀重悬于 2ml TE 缓冲液中，0.45μm 膜过滤除菌。

(5) 按 1.2 中方法测定噬菌体滴度，将其稀释至 1×10^{12} p.f.u./ml。分装后置 4℃ 保存备用。

1.4 从噬菌体抗体库中筛选功能抗体分子

1.4.1 扩增噬菌体抗体库

(1) 取 1ml 保存的噬菌体抗体库 (大约 1×10^{10} p.f.u) 接种到 500ml 2×TY 培养基中 (含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖)。

(2) 37℃ 摇床培养到对数期 (OD_{600} 为 0.4~0.6)，大约用 1.5~2h。

(3) 取 25ml 培养液 (大约 1×10^{10} 个细菌)，用辅助噬菌体 VCS-M13 感染。感染比例为细菌数/辅助噬菌体数=1/20。其余 475ml 培养物按照操作 1.4.2 制作次级噬菌体抗体库。细菌计算方法为 1 OD_{600} 细菌培养液约为 8×10^8 个细菌/ml。

(4) 于 37℃ 水浴中，静置 30min。

(5) 3300g，4℃ 离心 10min，将沉淀重悬在 30ml 2×TY 培养基中 (含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 25μg/ml 卡那霉素)。

(6) 将上述菌液添加到 470ml 已经 37℃ 预温的 2×TY 培养基中 (含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 25μg/ml 卡那霉素)，30℃ 摇床培养过夜。

(7) 10800g，4℃ 离心 10min 或 3300g，4℃ 离心 30min。

(8) 收集上清，加入 1/5 体积 PEG/NaCl (20%PEG, 2.5mol/L NaCl)，彻底混合后 4℃ 放置 1h。

(9) 再次 10800g，4℃ 离心 10min，沉淀重悬于 40ml 水和 8ml PEG/NaCl (20%PEG, 2.5mol/L NaCl)。

(10) 10800g，4℃ 离心 10min 或 3300g，4℃ 离心 30min，吸弃离心上清。

(11) 再次重悬沉淀，再次 10800g，4℃ 离心 10min，彻底吸弃上清。

(12) 将沉淀重悬于 5ml PBS 中, 11600g, 离心 10min, 去除细菌碎片(沉淀)。

(13) 噬菌体上清 4℃短期保存; 用含 15%甘油的 PBS 于-70℃长期保存。

(14) 测定噬菌体保存液的噬菌体滴度。取 1 μ l 噬菌体保存液稀释在 1ml PBS 中, 从中取 1 μ l 感染 1ml TG1 菌液(OD₆₀₀ 为 0.4~0.6)。将感染菌液梯度稀释后, 再分别取 50 μ l 感染菌液(原液、1/10² 稀释液、1/10⁴ 稀释液)铺 TYE 平板(含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖), 37℃培养过夜。噬菌体保存液的滴度应该在 10¹⁰~10¹²p.f.u/ml 之间。

1.4.2 制备次级噬菌体抗体库

(1) 将 1.4.1 (2) 步骤中, 剩余的 475ml 培养液继续在 37℃摇床培养 2h。

(2) 3300g, 4℃离心 30min, 弃沉淀, 将菌体沉淀重悬于 10ml 2×TY 培养基(含 15%甘油), 分装成 10 个小管(1ml/管)。

(3) 将次级噬菌体抗体库保存在-70℃。再次使用前, 以 PCR 方法鉴定阳性克隆率及测定噬菌体滴度。

1.4.3 固相亲和筛选

(1) 以包被缓冲液(PBS 或 50mmol/L NaHCO₃, pH9.6) 稀释人 IL-21 至 100 μ g/ml。取 4ml 加入到免疫管中, 室温包被过夜。

(2) 弃上清, 以 PBS 迅速洗管 3 次。

(3) 免疫管中注满 2% MPBS, 37℃封闭 2h。

(4) 弃封闭液, 用 PBS 迅速冲洗免疫管 3 次, 简单的将 PBS 倒入免疫管再迅速倒出, 以下洗涤操作相同。

(5) 将 1.4.1 (13) 步骤获得的噬菌体(10¹²~10¹³p.f.u) 悬浮于 4ml 2% MPBS(含有 2%脱脂牛奶的 PBS) 并加入到免疫管中。室温反复倒转 30min 后, 于室温静置 90min 以上, 弃上清。

(6) 在进行第一轮筛选时, 以含有 0.1% Tween-20 的 PBS 洗管 10 次, 再以 PBS 洗管 10 次去除去污剂。第二轮以后的筛选, 分别洗管 20 次。

(7) 将 PBS 吸干以后, 加入 1ml 100mmol/L 三乙胺[700 μ l 三乙胺(7.18mol/L) 加入到 50ml 水中], 室温反复倒转孵育 10min, 进行特异性洗脱。

(8) 在孵育过程中, 准备 0.5ml 1mol/L Tris (pH7.4) 用于迅速中和(7) 特异洗脱下来的噬菌体。中和后的噬菌体可以直接 4℃保存或用于(10) 感染 TG1 菌。

(9) 向免疫管中加入 200 μ l 1mol/L Tris (pH7.4) 中和残余的噬菌体。

(10) 取 9.25ml 处于对数期的 TG1 细菌培养物与 0.75ml 洗脱下来的噬菌体混合, 另外向免疫管中加入 4ml 处于对数期 TG1 细菌培养物。两者同时 37℃水浴静置 30min。

(11) 从两种已感染噬菌体的 TG1 细菌培养物中分别取 100 μ l, 并分别做 4~5 次 100 倍系列稀释, 然后将梯度稀释物的噬菌体涂布 TYE 平板 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

(12) 剩余的两种已感染噬菌体的 TG1 细菌培养物 3300g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 菌体沉淀重悬于 1ml 2 $\times$ TY 培养基中, 使用 Nunc Bio-Assay Dish 铺大型 TYE 平板 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖)。

(13) 30 $^{\circ}$ C 培养过夜或直至出现可见克隆。

1.4.4 进一步亲和筛选

(1) 向长满细菌克隆的 Nunc Bio-Assay Dish 平板中加入 5ml 含有 15%甘油 2 $\times$ TY 培养基并用玻璃涂布棒刮取细菌并收集菌体悬液。取 100 μ l 菌体悬液加入到 100ml 2 $\times$ TY 培养基中 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖), 检测其 OD₆₀₀≤0.1。其余的菌体悬液于-70 $^{\circ}$ C 保存。

(2) 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀≈0.5 (约 2h)。

(3) 加入辅助噬菌体 VCS-M13 感染, 感染比例数为细菌数/辅助噬菌体数=1/20。

(4) 37 $^{\circ}$ C 水浴静置 30min。

(5) 将菌液 3300g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 菌体沉淀重悬于 50ml 2 $\times$ TY 培养基中 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素)。30 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。

(6) 取 40ml 过夜培养物, 10800g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min 或 3300g, 4 $^{\circ}$ C 离心 30min。

(7) 收集上清, 加入 1/5 体积 PEG/NaCl (20%PEG, 2.5mol/L NaCl), 彻底混合后 4 $^{\circ}$ C 放置 1h 以上。

(8) 再次 10800g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 沉淀重悬于 40ml 水和 8ml PEG/NaCl。

(9) 10800g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min 或 3300g, 4 $^{\circ}$ C 离心 30min, 吸弃上清。

(10) 沉淀重悬于 2ml PBS 中, 11600g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 尽量去除细菌碎片。

(11) 取 1ml 噬菌体 4 $^{\circ}$ C 保存, 另 1ml 噬菌体用于下一轮亲和筛选。

(12) 重复 1.4.3、1.4.4, 进行 4 轮筛选。

结果 以人 IL-21 为抗原, 对单链噬菌体抗体库进行了四轮亲和筛选, 每一轮筛选后噬菌体抗体收获率呈增长趋势, 见图 2。

实施例 2 筛选鉴定

2.1 多克隆噬菌体 ELISA

(1) 将人 IL-21 用 PBS 稀释至 10 μ g/ml, 每孔添加 100 μ l, 室温包被过夜。

(2) 以 PBS 洗板 3 次, 用 200 μ l 3%BSA (PBS 配置) 封闭 2h。

(3) 以 PBS 洗板 3 次。每一轮筛选后, 取 10 μ l PEG/NaCl 沉淀获得的噬菌体, 用 3%BSA-PBS

稀释到 100 μ l, 加入酶标板。

(4) 室温孵育 90min, 以含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 再以 PBS 洗涤 3 次。

(5) 每孔加入 100 μ l 用 3% BSA 1:1000 稀释后的羊抗 M13 多克隆抗体, 室温孵育 90min。以含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 再以 PBS 洗涤 3 次。

(6) 加入 100 μ l 用 3% BSA 1:5000 稀释后的 HRP-兔抗羊 IgG 多克隆抗体, 室温孵育 90min。以含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 再以 PBS 洗涤 3 次。

(7) 配置底物液。100 μ g/ml TMB。底物缓冲液为 100mmol/L 乙酸钠, pH6.0, 每 50ml 缓冲液加入 10 μ l 30% 过氧化氢。

(8) 每孔加入 100 μ l 底物液, 室温孵育 10min。

(9) 每孔加入 50 μ l 稀硫酸 (0.1mol/L) 终止反应。

(10) 测定 OD₆₅₀ 和 OD₄₅₀, 并以 OD₄₅₀ 的值减去 OD₆₅₀ 的值, 作为最后检测结果。

结果 以样品孔的 OD₄₅₀ 值绘制柱状图, 每一轮筛选过后亲和力逐渐升高, 见图 3。

2.2 单克隆噬菌体 ELISA

(1) 将第 4 轮筛选获得的平板上挑取单克隆到 96 孔细菌培养板中, 每孔已经添加 100 μ l 2 $\times$ TY 培养基 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖), 37 $^{\circ}$ C 摇床 (300r/min) 培养过夜。

(2) 每孔取出 2 μ l 菌液, 加入到另一块新的 96 孔细菌培养板中, 每孔已经添加 200 μ l 2 $\times$ TY 培养基 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖), 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1h。向第一块 96 孔细菌培养板的各个孔中加入一定体积的甘油, 使甘油终浓度达到 15%, 然后密封-70 $^{\circ}$ C 保存。

(3) 向第二块 96 孔细菌培养板的各个孔中加入 25 μ l 2 $\times$ TY 培养基 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖) 和 10⁹p.f.u VCS-M13 辅助噬菌体。

(4) 将 96 孔板在 37 $^{\circ}$ C 静置 30min, 然后 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1h。1800g 离心 10min, 弃上清。

(5) 将菌体沉淀重悬于 200 μ l 2 $\times$ TY 培养基中 (含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素) 中。30 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。

(6) 1800g 离心 10min, 取 100 μ l 上清, 按照多克隆噬菌体 ELISA (参照 2.1) 的操作进行检测。

结果 以样品孔的 OD₄₅₀ 值绘制柱状图, 筛选出 4 个吸光值最高的克隆 C4、E1、G1、H9, 其吸光值均 $\geq$ OD_{空白}值的 10 倍, 见图 4。经过测序发现 C4、G1、E1、H9 序列相同。

实施例 3 抗体可溶性表达与亲和力测定

3.1 抗体可溶性表达与纯化

(1) 将单克隆 ELISA 值高于空白 3 倍以上的孔中的菌吸取 1 μ l 接种于 1ml 2 $\times$ TY 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ $\approx$ 0.5。

- (2) 加入辅助噬菌体 VCS-M13 37℃感染 30min, 感染比例数为细菌数/辅助噬菌体数=1/20。
- (3) 3300rpm 离心 10min 收集菌体, 将菌体沉淀重悬于 1ml 2×TY 培养基中 (含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 25μg/ml 卡那霉素) 中。30℃摇床培养过夜。
- (4) 12000rpm 离心 10min 去除菌体, 将离心获得的上清于 37℃感染 10ml 对数期的 HB2151 30min。
- (5) 将感染后的 HB2151 3300rpm 离心 10min 收集菌体, 加入 5ml 含有 15%甘油的 2×TY 培养基重悬, 取 10μl 涂布含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 1%葡萄糖的 TYE 平板, 37℃培养过夜, 剩余的悬液-70℃冻存。
- (6) 挑取 HB2151 单克隆接种于含有 100μg/ml 氨苄青霉素的 2×TY 培养基中, 培养至对数期 OD₆₀₀≈0.5, 加入终浓度为 1mM IPTG 30℃摇床培养过夜。
- (7) 12000rpm 离心 10min 收集菌体。
- (8) 收集的菌体按照每克 3ml 加入 PBS 重悬, 加入终浓度为 1mg/ml 的溶菌酶, 1mmol/L 的苯甲基磺酰氟化物 4 度裂解 2h, 12000rpm 离心 20min 收集上清。
- (9) 将(8)中收集上清 0.22μm 膜过滤, 上于 Ni²⁺亲和柱柱床, 分别用 20mM, 50mM, 100mM, 200mM, 500mM 咪唑洗脱。获得电泳纯的融合蛋白可溶性抗人 IL-21 单链抗体, 见图 5。

3.2 可溶性 scFv 的 ELISA 鉴定

- (1) 将人 IL-21 用 PBS 稀释至 10μg/ml, 5μg/ml 每孔添加 100μl, 室温包被过夜。
- (2) 以 PBS 洗板 3 次, 用 200μl 3%BSA (PBS 配置) 封闭 2h。
- (3) 以 PBS 洗板 3 次。取 3.1 (9) 中获得的可溶性抗人 IL-21 单链抗体 2 倍梯度稀释 7 次, 每孔加入 100μl。
- (4) 室温孵育 90min, 以含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 再以 PBS 洗涤 3 次。
- (5) 每孔加入 100μl 用 3% BSA 1:5000 稀释后的 anti-cmyc tag 抗体, 室温孵育 90min。以含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 再以 PBS 洗涤 3 次。
- (6) 加入 100μl 用 3% BSA 1:5000 稀释后的 HRP-偶联 IgG 多克隆抗体, 室温孵育 90min。以含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 再以 PBS 洗涤 3 次。
- (7) 配置底物液。100μg/ml TMB。底物缓冲液为 100mmol/L 乙酸钠, pH6.0, 每 50ml 缓冲液加入 10μl 30% 过氧化氢。
- (8) 每孔加入 100μl 底物液, 室温孵育 10min。
- (9) 每孔加入 50μl 稀硫酸 (0.1mol/L) 终止反应。
- (10) 测定 OD₆₅₀ 和 OD₄₅₀, 并以 OD₄₅₀ 的值减去 OD₆₅₀ 的值, 作为最后检测结果。

3.3 实施实例所用试剂

3.3.1 菌株

1) Griffin 合成噬菌体抗体库

2) E. coli. TG1: supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F' [traD36proAB+ lacIq lacZ Δ M15]

3) E. coli. HB2151: K12 ara thi Δ (lac-proAB) F' [proAB+ lacIq lacZ Δ M15]

4) Wild Type VCS-M13

3.3.2 培养基与缓冲液

1) 2 $\times$ TY: 16g Typtone, 10g Yeast Extract, 5g NaCl, 定容至 1L, 高压灭菌。

2) TYE: 2 $\times$ TY 添加 1.5%琼脂粉, 高压灭菌。

3) PBS: 称取 NaCl 5.84g, Na₂HPO₄·12H₂O 11.9g, NaH₂PO₄·2H₂O 2.64g, 溶解于 800ml 蒸馏水, NaOH 调 pH7.2, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20min。室温保存, 备用。

4) PEG/NaCl: 称取 PEG 20g, NaCl 14.6g, 溶解于蒸馏水定容至 100ml, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20min。室温保存, 备用。

5) 1mol/L Tris-Cl: 称取 Tris 碱 1.21g, 溶解于 8ml 蒸馏水, HCl 调 pH7.4 定容至 10ml, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20min。室温保存, 备用。

 序列表

<110>中国药科大学

<120>全人源抗人白介素 21 单链抗体

<160>1

<210>1

<212> DNA

<211>750

<213>智人 (Homo Sapiens)

<400>1

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaact agctatggca tgcactgggt gcgccaggtc	120
catgcacaag ggcttgagtg gatgggattg gtgtgcccta gtgatggcag cacaagctat	180
gcacaaaagt tccaggccag agtcaccata accagggaca catccatgag cacagcctac	240
atggagctaa gcagtctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagagaat	300
ccgtctgata agcgttgtgt ttggggccaa ggtaccctgg tcaccgtctc gagtgggtga	360
ggcgggtcag gcggagggtg ctctggcgggt agtgcacttg agattgtgat gaccagact	420
ccactctctc tgtccgtcac ccctggacag cgggcctcca tctcctgcaa gtctagtcag	480
agcctcctgc atagtgatgg aaagacctat ttgtattggt acctgcagaa gccaggccag	540
cctccacagc tcctgatcta tgaagttcc aaccggttct ctggagtgcc agataggttc	600
agtggcagcg ggtcagggtg agatttcaca cagaaaatca gccgggtgga ggctgaggat	660
gttgggggtt attactgcat gcaaagtata cagcttctac agactacgtt cggccaaggg	720
accaagctgg aaatcaaacg tgcggccgca	750

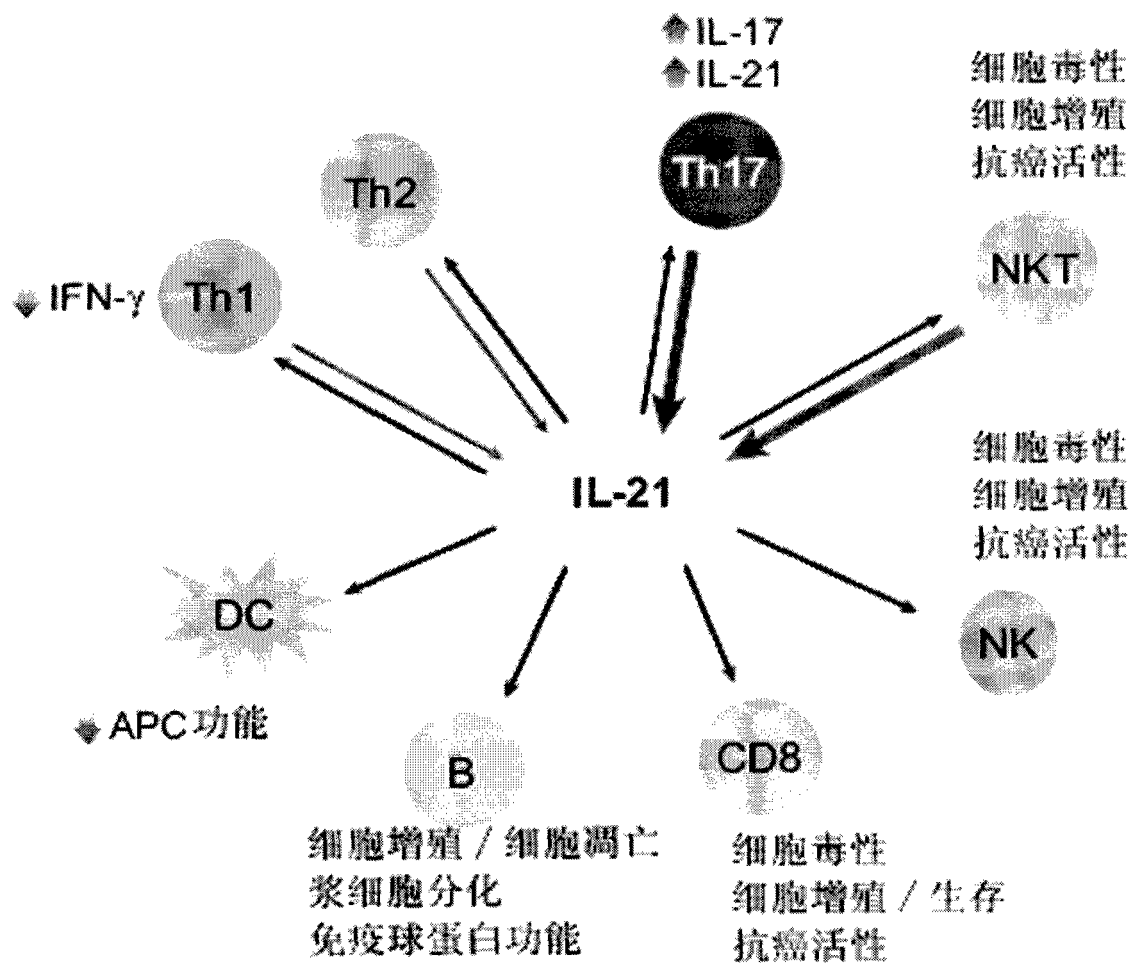


图 1

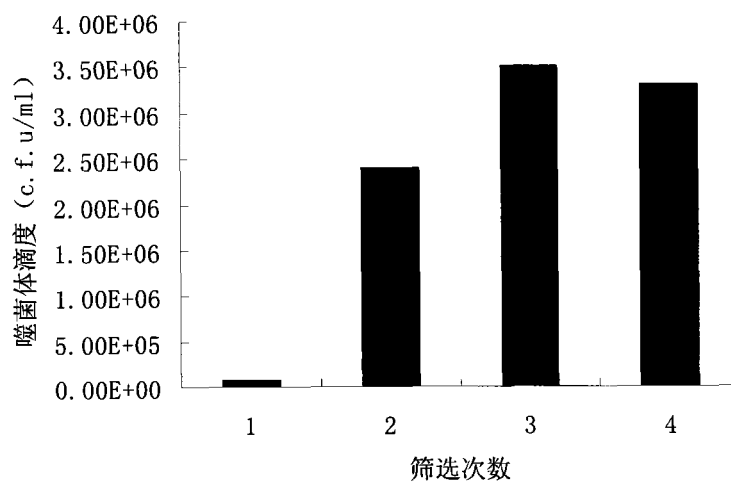


图 2

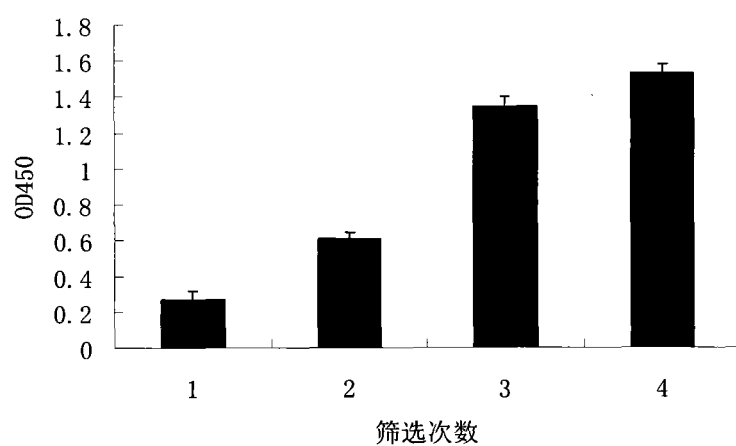


图 3

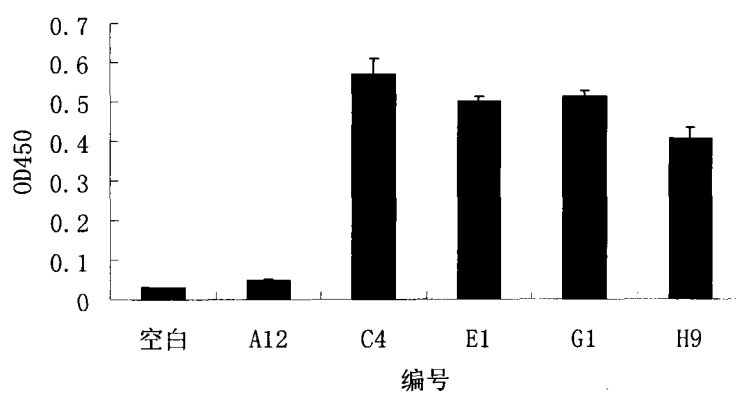


图 4

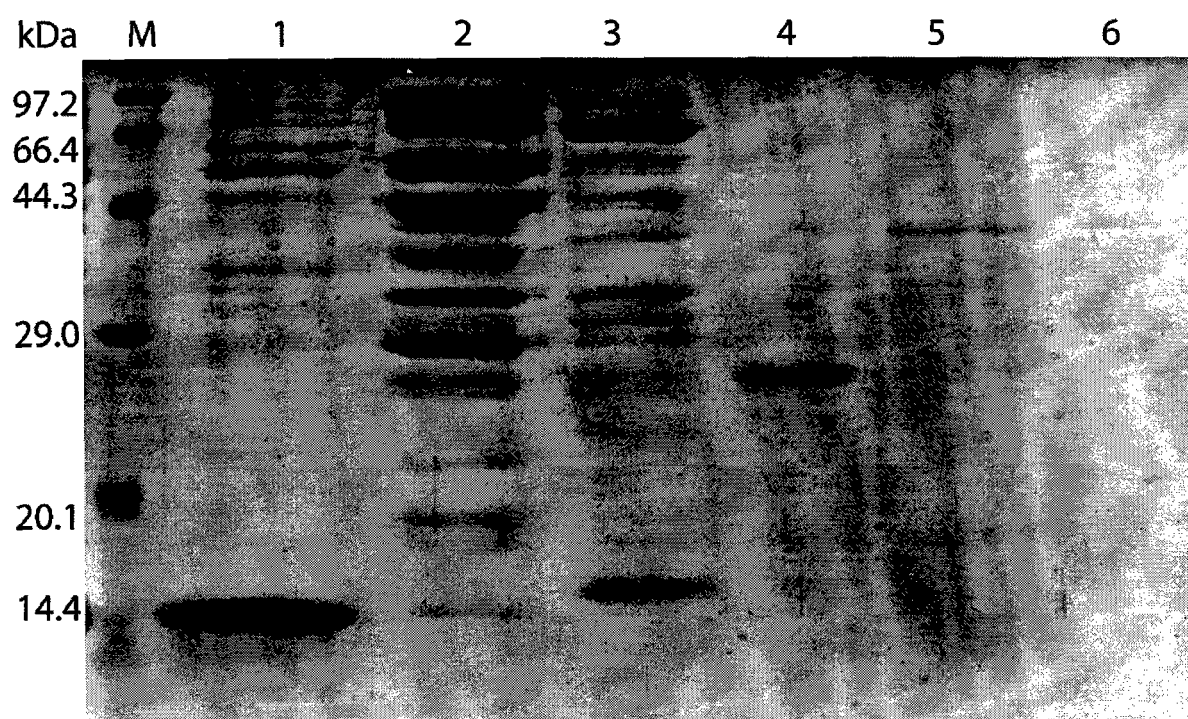


图 5

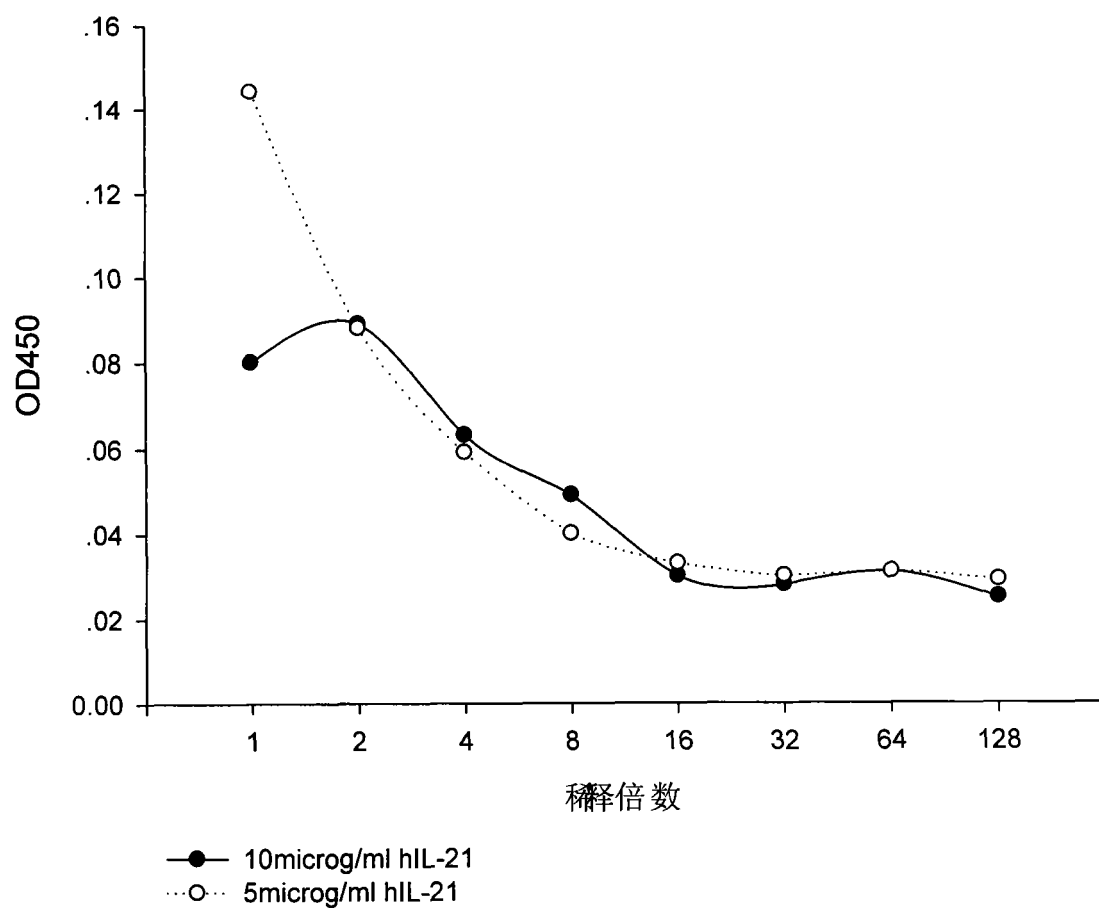


图 6

专利名称(译)	全人源抗人白介素21单链抗体		
公开(公告)号	CN101298480A	公开(公告)日	2008-11-05
申请号	CN200810124160.1	申请日	2008-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国药科大学		
申请(专利权)人(译)	中国药科大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国药科大学		
[标]发明人	王旻 张弢 浦迪 陈卫 张娟 李海鑫		
发明人	王旻 张弢 浦迪 陈卫 张娟 李海鑫		
IPC分类号	C07K16/24 C12N15/13 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属基因工程抗体技术领域，具体涉及基因工程设计、表达的与人白介素21有特异性亲和力的全人源多肽类单链抗体。此工程抗体多肽是由一条柔性连接肽将抗体的轻链和重链可变区首尾相连而形成的，轻链和重链可变区的骨架与互补决定区均来源于人。本发明通过“富集 - 洗脱 - 富集”的循环操作，筛选出对人白介素21具有特异亲和力的抗体，后通过分泌表达系统、亲和纯化系统获得全人源的可以特异性结合人白介素21。本发明抗体可以应用于偶联于可检测物质和治疗剂。