·论　著·

基于高通量表面等离子体共振技术筛选与 TPBG 具有高亲和力的单克隆抗体研究*

江秀玲[1],王晓丽[1],胡有根[2],彭建明[1],严慧深[1△]
(1.扬州市职业大学医学院,江苏 扬州 225009;2.武警江苏总队医院,江苏 扬州 225009)

[摘　要]　**目的**　探讨从制备的单克隆抗体中快速筛选出与滋养层糖蛋白(TPBG)具有高亲和力的单克隆抗体的方法。**方法**　采用高通量表面等离子体共振技术(SPR),将不同种属的 TPBG 通过氨基偶联的方式固定在 GLC 传感器芯片上,梯度稀释的抗体作为流通相,筛选能高度亲和 TPBG 的单克隆抗体,并测定相互作用的动力学常数。抗体 1 结合人和食蟹猴 TPBG,亲和力分别为 65.0、31.6 nmol/L;抗体 6 结合人、小鼠、食蟹猴 TPBG,亲和力分别为 77.6、92.1、87.7 nmol/L。**结果**　该研究成功筛选出 2 种能与 TPBG 特异性结合的单克隆抗体。动力学图谱显示,这 2 种抗体与 TPBG 蛋白的特异性结合稳定。**结论**　采用 SPR 可筛选出与 TPBG 蛋白具有高亲和力的单克隆抗体,为开发出一些新型的抗肿瘤药物提供一种方法。

[关键词]　5T4 蛋白;　高通量;　表面等离子体共振;　亲和力;　单克隆抗体;　抗肿瘤药物
DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.14.003　　**中图法分类号**:R979.1
文章编号:1009-5519(2024)14-2349-04　　**文献标识码**:A

Screening study of monoclonal antibodies with high affinity to TPBG based on high-throughput surface plasmon resonance technology*

JIANG Xiuling[1],*WANG Xiaoli*[1],*HU Yougen*[2],*PENG Jianming*[1],*YAN Huishen*[1△]
(1.*College of Medicine*,*Yangzhou Polytechnic College*,*Yangzhou*,*Jiangsu* 225009,*China*;2.*Jiangsu Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force*,*Yangzhou*,*Jiangsu* 225009,*China*)

[**Abstract**]　**Objective**　To investigate a method of rapidly screen monoclonal antibodies with high affinity to trophoblastic glycoprotein (TPBG) from the prepared monoclonal antibodies. **Methods**　High-throughput surface plasmon resonance (SPR) technology was used to immobilize TPBG of different species on the GLC sensor chip by amino coupling. Gradient dilution of the antibody was used as the flow phase to screen monoclonal antibodies that can highly affinity TPBG,and the kinetic constants of the interaction were determined. Antibody 1 binds to human and cynomolgus monkey TPBG with affinity of 65.0 and 31.6 nmol/L,respectively. Antibody 6 binds to human,mouse and cynomolgus monkey TPBG with affinity of 77.6,92.1 and 87.7 nmol/L,respectively. **Results**　This study successfully screened two monoclonal antibodies that can specifically bind to TPBG. Meanwhile,the specific binding of these two antibodies to TPBG protein was stable by binding kinetic. **Conclusion**　The monoclonal antibodies with high affinity to TPBG protein are screened out by SPR,which provides a method for the development of some new anti-tumor drugs.

[**Key words**]　TPBG protein;　High-throughput;　Surface plasmon resonance;　Affinity;　Monoclonal antibodies;　Anti-tumor drug

胚胎滋养层糖蛋白(TPBG)是一种高度 N-糖基化的蛋白质[1-2],也称为 5T4,是相对分子质量为 72 kD 的一种细胞表面分子,可以在母体中的半同种异体移植物或宿主中的肿瘤存活[3],在胚胎发育时期的各种滋养层细胞中均有广泛表达。但对于成人来说,其在正常组织和肿瘤组织的表达中存在明显差异,正常组织中只有几种细胞有 TPBG 的表达,在肿瘤组织中如子宫癌、结肠癌等肿瘤组织中均检测到 TPBG 的表达,且其表达量与癌症的治愈率低存在相关性,甚至在有些肿瘤组织如非小细胞肺癌中 TPBG 的表达量高达 95%以上[4],同时 TPBG 表达有助于推动癌细胞扩散的过程[5]。因此,开发具有高亲和力 TPBG 抗体在肿瘤诊断和治疗上有广阔的应用前景。

表面等离子体共振(SPR)是一种具有极强的快速性、灵敏度和实时性的一种技术,可以准确地捕捉到生物分子之间的复杂相互作用[6],其可用于鉴定并

* **基金项目**:江苏省自然科学基金面上项目(18KJD36003);扬州市职业大学校级自然科学基金项目(2018ZR28)。
作者简介:江秀玲(1980—),硕士研究生,讲师,主要从事基础医学研究和教学工作。　△ **通信作者**,E-mail:343503030@qq.com。

量化分子相互作用，如蛋白质与其他物质分子相互作用的结合亲和力[7-9]。ProteOnXPR36 的 SPR 技术具有独特的 6×6 结构，能够将 6 种不同的抗原固定到一起，并且通过 6 种不同浓度的抗体将其进行循环，从而能够完整地捕捉到 36 种物质之间的相互作用的反应曲线，同时记录和分析。其优点就是一次进样就可以分析一种抗体和不同靶抗原之间相互作用的动力学参数及亲和力常数，大大提高了分析速度和通量。本研究旨在开发一种利用 ProteOnXPR36 高通量 SPR 技术快速筛选高亲和力 TPBG 抗体的方法，并对所得到的抗体进行初步的特性分析。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验试剂　二甲基亚砜(DMSO，美国 Sigma 公司)；1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基卡巴朴胺/N-羟基丁二酰亚胺(EDC/NHS，美国 GE 公司)；胰酶(美国 Gibco 公司)；DMEM 培养基(美国 Corning 公司)；胎牛血清(美国 Gibco 公司)；细胞裂解液、蛋白酶抑制剂(PMSF)、30%丙烯酰胺溶液、1MTris-HCl(pH 7.4)、10%十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、BCA 试剂盒(美国 Gibco 公司)；真核表达质粒 pIRES(美国 Clontech 公司)；转染试剂；HEK293-F(美国 Life Technologies 公司)、FreeStyle 293-F(美国 Life Technologies 公司)；HisTrap HP(美国 GE Healthcare 公司)；Triethylamine(美国 Sigma-Aldrich 公司)；商业化抗体(美国 Invitrogen 公司)。

1.1.2　实验仪器　电子天平(上海天平仪器厂)；CO_2 细胞培养箱(德国 Thermo 公司)；离心管(美国 Corning 公司)；低温高速台式离心机(德国 Thermo 公司)；移液枪(德国 Eppendorf 公司)；HiLoad 16/60Superdex 200 制备级(美国 GE Healthcare 公司)；Amicon Ultra 滤器(德国 Merck Millipore 公司)；ProteOn XPR36(美国 BioRad 公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　TPBG 抗原的制备及鉴定　编码人 TPBG 胞外段(第 25 位丝氨酸-第 355 位丝氨酸)的核苷酸(genebank 参考序列为 AAH37161.1)被克隆至真核表达质粒 pIRES 中，并在其末端添加 His 标签。类似地，将编码小鼠 TPBG 胞外段(第 32 位丝氨酸-第 361 位丝氨酸)的核苷酸(genebank 参考序列为 AJ012160.1)，食蟹猴 TPBG 胞外段(第 32 位丝氨酸-第 361 位丝氨酸)的核苷酸(genebank 参考序列为 NM_001319624.1)分别克隆至真核表达质粒 pIRES。

在 HEK293F 细胞中瞬时转染含有 TPBG 的胞外域的质粒。简而言之，在 FreeStyle 293-F 表达培养基中培养细胞。转染前 1 d，以 1×10^6 mL^{-1} 培养基的密度接种细胞。第 2 天，每毫升培养基使用 1 μg 质粒 DNA。使用 293Free (Life Technologies)转染试剂进行瞬时转染。将经转染细胞在 Erlenmeyer 烧瓶中于 37 ℃和 8%CO_2 温育 4～5 d，同时以 125～130 r/min 摇动。4～5 d 后收获上清液用于纯化。使用 HisTrap HP 柱自细胞培养物上清液纯化含有 Avi-His6 标签的重组 TPBG。洗脱以咪唑分阶梯度发生。随后在 HiLoad 16/60Superdex 200 制备级大小排阻柱上加载亲和纯化的蛋白质。收集产物峰并用 Amicon Ultra 滤器通过超速离心调节体积。最终的贮存缓冲液由 20 mol/mL 组氨酸、140 mol/mL NaCl、pH 5.5 组成。

纯化后的抗原通过酶联免疫吸附试验(ELISA)方法鉴定其活性，简单描述如下，将抗原用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成 1 μg/mL，包被在酶标板里剂量为每孔 100 μL，4 ℃过夜；第 2 天加入脱脂奶粉封闭剂，浓度为 5%，每孔剂量为 200 μL 在 37 ℃环境中封闭 1 h；然后加入梯度稀释的商业化抗体起始浓度 10 μg/mL，3 倍稀释，7 个梯度，每孔 100 μL，放在 37 ℃的环境中封闭 1 h；清洗后，加入 3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)显色液，显色 10 min；最后加入终止液，上机检测。

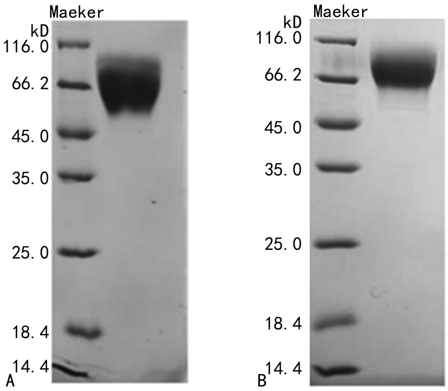
1.2.2　TPBG 抗体的筛选　本研究使用噬菌体文库筛选的方法得到多个靶向 TPBG 的抗体。其中噬菌体展示文库为库容为 1E+11。筛选方法简单描述如下：包被 10 μg/mL 抗原 TPBG 于免疫管，4 ℃过夜。第 2 天，用 2% MPBS(脱脂奶粉溶于 PBS)封闭 2 h，然后将噬菌体文库加入包被了抗原的免疫管中结合 1.5 h。接着使用 PBS 进行 5～10 遍的清洗，以去除非特异性的噬菌体。最后，使用 Triethylamine 进行洗脱，并将其与 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4)的溶液进行中和，以感染对数生长期的大肠杆菌 TG1。将洗脱下来的噬菌体扩大培养，并将 PEG/NaCl 沉淀纯化扩大后的噬菌体文库被用于下一轮的筛选。此步骤进行 3～4 个循环后，用于富集与 TPBG 特异性结合的 scFv 噬菌体克隆。通过 ELISA 初步筛选培养上清液，将信号值高的克隆进行原核表达纯化，并用于 ProteOnXPR36 高通量 SPR 系统进行亲和力检测。

1.2.3　ProteOnXPR36 高通量 SPR 系统亲和力测定　在 25 ℃环境下，PBST 被作为运行缓冲液，利用 ProteOn XPR36 仪器，对 3 种不同物种(人、小鼠和食蟹猴)的 TPBG 及无关对照蛋白，通过表面等离子共振技术来测量抗体的动力学速率常数[结合速率(kon)和解离速率(koff)及亲和力平衡解离常数(kD)]。以高水平(直到约 5.000 RU)和以 30 μL/min 的速度，通过氨基偶联的方式将不同抗原固定到 GLM 芯片不同的垂直通道上，所述固定过程包括活化-包被-封闭 3 个步骤。首先用新鲜制备的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(sNHS)混合物将所有通道进行活化；随后将 10 μg/mL 不同抗原溶于 pH 为 4.5 的 10 mol/mL 乙酸钠缓冲液中进行包被，180 s 后进行注射；最后利用注射的乙醇胺封闭通道，时间为 5 min。在动力学测

定法设置(OSK)中,以 100 μL/min 流速沿着水平通道注射梯度稀释的抗体(起始浓度 100 nmol/L,3 倍稀释,5 个梯度)进行亲和力检测,其中结合阶段记录 160 s,解离阶段记录 240 s,在第 6 通道上将注射运行缓冲液(PBST)用来作为空白参照物。通过同时拟合结合和解离传感图并使用简单 1∶1 朗格缪尔(Langmuir)结合模型(Prote On Manager Software Version 2.1)计算 kon 和 koff。以比率 koff/kon 计算 kD。最后将 50 mol/mL 的 NaOH 以 100 μL/min 的速度对水平通道注射 30 s 进行再生,接着进行下一个抗体的亲和力检测。

2　结　　果

2.1　TPBG 的抗原制备及活性鉴定　将纯化的人 TPGB 及鼠 TPBG 抗原通过 SDS 凝胶电泳分析分子量及纯度。结果如图 1A、B 所示,人 TPBG 和鼠 TPBG 的相对分子质量大小分别在 66 kD 及 70 kD。使用商业化抗体,通过 ELISA 鉴定人 TPBG 的活性,见图 2。重组表达的人 TPBG 与商业化抗体具有梯度依赖的结合活性,可用于候选筛选。



注:A. 人 TPBG 抗原;B. 鼠 TPBG 抗原。

图 1　人 TPBG(A)及鼠 TPBG(B)SDS 凝胶电泳图

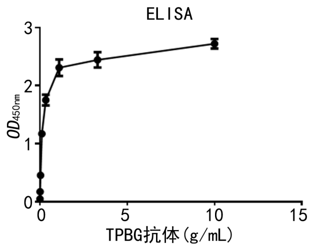


图 2　人 TPBG 与商业化抗体的结合试验

2.2　TPBG 抗体的初筛鉴定　通过 ELISA 法鉴定噬菌体文库筛选的上清,得到多个阳性克隆,挑取其中 10 个最好的克隆单独作图,结果如图 3 所示。其中大部分克隆只结合人、猴 TPBG,只有克隆 6 与人、鼠、猴 TPBG 均结合。

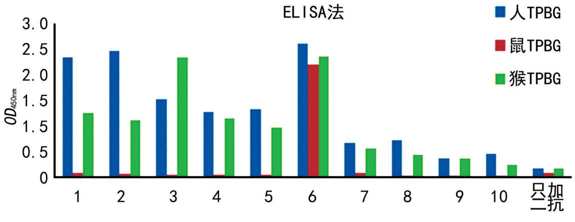


图 3　噬菌体筛选上清与 TPBG 抗原的结合

2.3　TPBG 抗体的亲和力测定　通过氨基偶联的方式在 GLM 芯片的垂直通道 L1 和 L2 上包被人 TPBG,L3 和 L4 上包被小鼠 TPBG,L5 上包被食蟹猴 TPBG,L6 上包被无关对照蛋白。见图 4。

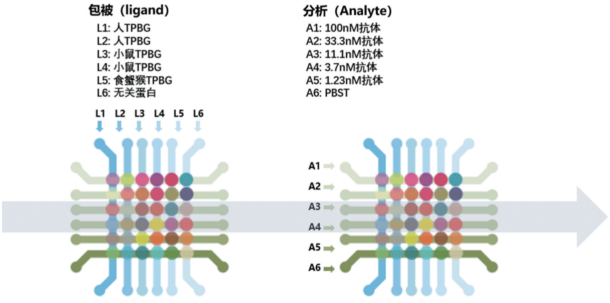


图 4　高通量 SPR 技术分析检测流程示意图

利用 ProteOnXPR36 高通量 SPR 技术对 TPBG 抗体进行筛选,快速检测了不同抗体与不同种属 TPBG 的亲和力(表 1),并获得了一个亲和力低于 10 nmol/L 的与人、食蟹猴结合的 TPBG 抗体和一个与人、小鼠、食蟹猴 TPBG 均结合的抗体。抗体 1 结合人和食蟹猴 TPBG,亲和力分别为 65.0、31.6 nmol/L;抗体 6 结合人、小鼠、食蟹猴 TPBG,亲和力分别为 77.6、92.1、87.7 nmol/L。

表 1　不同抗体与不同种属 TPBG 的亲和力检测结果

抗体	亲和力 kD(M)		
	人 TPBG	小鼠 TPBG	食蟹猴 TPBG
1	6.50E-09	—	3.16E-09
2	2.80E-08	—	3.25E-08
3	4.11E-08	—	4.76E-08
4	4.73E-08	—	4.87E-08
5	6.17E-08	—	6.29E-08
6	7.76E-08	9.21E-08	8.77E-08
7	1.06E-07	—	8.98E-08
8	1.66E-07	—	1.38E-07
9	2.89E-07	—	4.44E-07
10	3.79E-07	—	4.99E-07

注:—表示无此项。

3　讨　　论

TPBG 作为一种肿瘤相关膜蛋白,在多种恶性肿瘤中高表达,并且与肿瘤侵袭、转移等生物学行为密切相关。靶向 TPBG 的抗体用于癌症的治疗最早被 SHAW 等[10]发现。目前,抗体偶联药物作为新型抗癌药物,是通过连接分子,将小分子细胞毒素与单克隆抗体分子,偶联结合所形成的药物,具有靶向性和杀伤性作用,正在引领靶向癌症治疗的新时代[11]。靶向 TPBG 的抗体偶联药物及双特异性抗体处于临床或者临床前研究中[12-13],但抗体偶联药物中选择合适的抗体也很重要,同时对疗效、药代动力学/药效学特征和治疗指数产生重大影响。抗体偶联药物中理想

单克隆抗体应具有靶特异性及较强的靶结合亲和力。本研究提供了一种基于高通量 SPR 技术,快速筛选亲和力高、特异性强的 TPBG 抗体的方法,并且成功从抗体库中筛选到 2 个高亲和力的靶向 TPBG 抗体,该抗体可作为治疗 TPBG 阳性癌症的潜在治疗药物中的偶联抗体,为下一步的药物研发提供了一些高特异性、高亲和力的单克隆抗体。

单克隆抗体药物因其明显的特异性强、不良反应少等优点逐步成为各种疾病的理想治疗药物[14-17],是目前生物医药领域发展的最热门方向之一[18]。由于抗体在生物医学研究和临床应用中扮演着非常重要的角色,其药效和安全性评价均要求抗体具有种属交叉属性。因在某些情况下,需在多个物种中进行药效或者毒理研究,种属交叉抗体可以降低抗体开发的成本和时间,只需研究和开发一种抗体即可满足多种物种的需要。因此,具有种属交叉属性的抗体对于生物医学研究和临床应用非常重要,可以实现多种物种共用一种抗体,以提高实验效率和可行性。本研究提供的筛选方法,不仅可以高通量筛选高亲和力的结合 TPBG 的抗体,还可以同时进行结合不同种属 TPBG 的抗体,也为靶向 TPBG 的抗体在小鼠和食蟹猴中进行药效、安全性评价提供了可能。

参考文献

[1] STERN P L,HARROP R. 5T4 oncofoetal antigen:an attractive target for immune intervention in cancer[J]. Cancer Immunology Immunotherapy,2017,66(4):415-426.

[2] ALAM S M K,JASTI S,KSHIRSAGAR S K,et al. Trophoblast glycoprotein (TPGB/5T4) in human placenta: expression, regulation, and presence in extracellular microvesicles and exosomes[J]. Reprod Sci,2018,25(2):185-197.

[3] SHIM H. Bispecific antibodies and Antibody-Drug conjugates for cancer therapy:technological considerations[J]. Biomolecules, 2020, 10(3):360.

[4] STERN P L,HARROP R. 5T4 oncofoetal antigen:an attractive target for immune intervention in cancer[J]. Cancer Immunol Immunother,2017,66(4):415-426.

[5] ALAM S M K,JASTI S,KSHIRSAGAR S K,et al. Trophoblast glycoprotein (TPGB/5T4) in human placenta: expression, regulation, and presence in extracellular microvesicles and exosomes[J]. Reprod Sci,2018,25(2):185-197.

[6] NIRSCHL M,REUTER F,VÖRÖS J. Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis[J]. Biosensors Basel,2011,1(3):70-92.

[7] GREEN R J,FRAZIER R A,SHAKESHEFF K M,et al. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials[J]. Biomaterials, 2000, 21(18): 1823-1835.

[8] MISONO T S, KUMAR P K R. Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance[J]. Anal Biochem,2005,342(2):312-317.

[9] POPE M E,SOSTE M V,EYFORD B A,et al. Anti-peptide antibody screening: selection of high affinity monoclonal reagents by a refined surface plasmon resonance technique[J]. J Immunol Methods,2009,341(1/2):86-96.

[10] SHAW D M, EMBLETON M J, WESTWATER C,et al. Isolation of a high affinity scFv from a monoclonal antibody recognising the oncofoetal antigen 5T4[J]. Biochim Biophys Acta,2000,1524(2/3):238-246.

[11] CHAU C H,STEEG P S,FIGG W D. Antibody-drug conjugates for cancer[J]. Lancet,2019,394(10200):793-804.

[12] SHAPIRO G I, VAISHAMPAYAN U N, LORUSSO P,et al. First-in-human trial of an anti-5T4 antibody-monomethylauristatin conjugate, PF-06263507, in patients with advanced solid tumors[J]. Invest New Drugs,2017,35(3):315-323.

[13] KEMPER K,GIELEN E,BOROSS P,et al. Mechanistic and pharmacodynamic studies of DuoBody-CD3x5T4 in preclinical tumor models[J]. Life Sci Alliance,2022,5(11):e202201481.

[14] 甄永苏,苗庆芳. 抗体药物与肿瘤靶向治疗[J]. 中国医药生物技术,2006,1(1):55-57.

[15] 罗拥政,顾蕴尔. 单克隆抗体技术及其在治疗自身免疫性疾病方面的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(增 1):233.

[16] 张世雄. 抗肿瘤抗体药物研究现状与前景[J]. 化工管理,2017(35):108.

[17] 张天民. 单克隆抗体药物的研究进展[J]. 医药导报,2005,24(6):494-498.

[18] 陈泓序,屈锋. 毛细管电泳技术在单克隆抗体药物分析中的应用[J]. 色谱,2018,36(3):195-208.

(收稿日期:2023-12-20　修回日期:2024-03-29)