

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 9/00

C12N 15/52 C12N 15/63

C07K 16/00

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99104234.4

[43]公开日 2000 年 11 月 22 日

[11]公开号 CN 1274007A

[22]申请日 1999.5.13 [21]申请号 99104234.4  
 [71]申请人 中国科学院长春应用化学研究所  
 地址 130022 吉林省长春市人民大街 159 号  
 [72]发明人 赵大庆 王琳 丁兰  
 阎锡蕴 倪嘉纘

[74]专利代理机构 中国科学院长春专利事务所  
 代理人 曹桂珍

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 人源含硒抗体酶的制备方法

[57]摘要

本发明属于人源含硒抗体酶的制备方法。本发明利用 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二酯作为半抗原,从人源噬菌体展示的单链抗体库中筛选得到半抗原特异的单链抗体,化学修饰在大肠杆菌中利用突变引物高效表达的特异抗体,将催化基团引入到抗体的活性部位,成功获得了具有谷胱甘肽过氧化物酶活力的人源含硒抗体酶。本发明提供的人源含硒抗体酶制备方法具有技术先进,产量高,成本低的特点,有明显的临床应用潜力。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

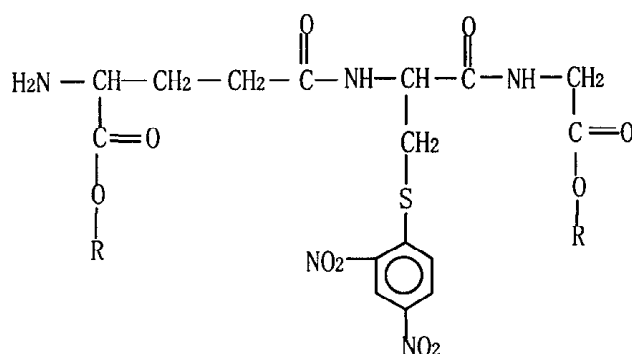
知识产权出版社出版

## 权力要求书

1. 一种人源含硒抗体酶的制备方法，其特征在于具体制备步骤有以下四步：

### I. 半抗原的设计与合成

系列半抗原结构如下：



$\text{R} = -\text{C}_4\text{H}_9, -\text{C}_6\text{H}_{11}, -\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5), -\text{CH}(\text{CH}_3)_2, -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

取 0.8-1.2g 谷胱甘肽与 2,4-二硝基氯苯在 10℃ 反应，得到 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽，将 0.1-0.5g S-二硝基苯取代的谷胱甘肽加入 2-5ml 相应的醇：正丁醇或异丙醇或苯醇或正己醇或异戊醇，冰浴，通入过量的干燥氯化氢至饱和，在 4-20℃ 放置 5-80hr，反应结束后，产物用乙醚洗涤，干燥，即为系列半抗原 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二酯；

### II. 半抗原特异的人单链抗体基因的筛选

用 10-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  半抗原包被免疫平皿，加入人噬菌体展示的单链抗体库，15-37℃ 温浴 2hr，0.05M，PH7.2 的磷酸钠缓冲液洗平皿，

## 权力要求书

---

加入 0.5-2.5ml, 20-150mmol/L 的三乙胺, 20-40°C 放置 8-15min, 用 0.4-1.0ml, 0.5-1.2mol/L, PH7.0-8.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液中和洗脱液, 洗脱下的噬菌体加入到 OD 值为 0.2-1.0 的 5-15ml 的大肠杆菌 TG1 中, 于 20-40°C 侵染 25-40min, 在含 100 $\mu$ g/ml 的氨苄青霉素和 1% 的葡萄糖的 2 $\times$ TY 中扩大培养 TG1, 利用野生的噬菌体 M13K07 捕获特异噬菌体, 重复以上过程 3-6 次, 酶联免疫法检测筛选得到的特异噬菌体抗体;

### III. 人原单链抗体的高效表达、复性及纯化

提取特异抗体基因, 测序, 在保持氨基酸序列不变的前提下, 根据基因序列设计突变引物, 扩增抗体基因, 利用 NdeI/HindIII 酶切位点将抗体基因组装到 pET21a 表达载体上, 获得了以包含体形式高效表达的单链抗体, 将从 1L 培养物中收获的菌体重悬于 PH8.0, 含有 2mM  $\beta$ -巯基乙醇和 0.01% 溶菌酶的 50mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液中, 超声破碎菌体, 12000rpm 离心 20 分钟, 沉淀即为包含体, 包含体经 2M 氯化钠溶液, 0.5% Triton X-100 和 4M 尿素洗涤后, 溶于 3-12ml, 含 6M 盐酸胍, PH 为 7.0-9.0, 10-50mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐变性液中, 用 BIO-RAD 公司的蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度, 在 50ml 含 0.2-1.0M 精氨酸, 1-5mM 乙二胺四乙酸, 1-3M 盐酸胍的 0.1-0.8M 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐复性液中滴加变性蛋白溶液, 每隔 0.5-2.5hr 滴加一次, 共滴加 3-8 次, 0-12°C 放置过夜,

## 权力要求书

---

浓缩、透析除去盐酸胍，冻干，冻干的蛋白干粉溶于 PH7.0-9.0，10--50mM 的磷酸钠缓冲液中，经葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 分离纯化，收集主峰，即为单链抗体纯品；

### IV. 催化基团的引入

把  $0.4-1.2 \times 10^{-5}$  mmol/L 单链抗体纯品，溶于无氧水中，加入  $2.0-5.0 \times 10^{-5}$  mmol/L 苯甲基磺酰氟，15-30℃振荡 1-3hr，在氮气保护下加入  $0.5-2.5 \times 10^{-4}$  mol/L 硒氢化钠溶液，30-40℃保温 25-40hr，反应液经葡聚糖凝胶 Sephadex G-10 除盐后，即得具有谷胱甘肽过氧化物酶活力的人源抗体酶。

# 说明书

---

## 人源含硒抗体酶的制备方法

本发明属于人源含硒抗体酶的制备方法。

硒依赖型谷胱甘肽过氧化物酶是生物体内抗氧化应激酶系的重要成员，它的催化基团为硒代半胱氨酸。谷胱甘肽过氧化物酶通过催化谷胱甘肽氧化，还原过氧化氢及有机氢过氧化物分子以起到减少生物膜的损伤，保护机体的作用。谷胱甘肽过氧化物酶的缺乏与多种疾病的发生有关，如心脑血管疾病，癌症，帕金森氏症。

中国专利 94102481.4 和 96112628.0 公开了题目分别为“化学突变具有底物结合部位的单克隆抗体制备含硒抗体酶的方法”和“活力高于天然酶的含硒抗体酶的制备方法”，其中专利 94102481.4 的制备过程为：利用谷胱甘肽和 2,4-二硝基氯苯反应产物 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽作为半抗原，以戊二醛作为交联剂与载体蛋白牛血清白蛋白偶联制成全抗原，免疫小鼠，筛选得到对半抗原特异的单克隆抗体 4A4；用苯甲基磺酰氟活化单抗可变区丝氨酸残基上的羟基，再用硒化氢处理，将丝氨酸诱变为硒代半胱氨酸，成为具有谷胱甘肽过氧化物酶活性的抗体酶 Sec-4A4，活力为 1239 酶活力单位/微摩尔，为天然兔肝谷胱甘肽过氧化物酶活力的 0.21 倍。专利 96112628.0 的制备过程为：用系列疏水基团 $-C_2H_5$ 、 $-C_4H_9$ 、 $-C_3H_7$  修饰 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽，产物作为半抗原以戊二醛作为交联剂与牛血清白蛋白偶联制成全抗原，免疫小鼠，用苯甲基磺酰氟活

## 说 明 书

---

化得到的单抗可变区上的丝氨酸残基上的羟基，再用液体硒氢化钠作为亲核试剂与活化的羟基反应，在每一个抗体分子的疏水腔中引入一个硒代半胱氨酸，制成具有谷胱甘肽过氧化物酶活性的抗体酶，活力为天然谷胱甘肽过氧化物酶的 1.6 倍到 10 倍。

以上报道的具有谷胱甘肽过氧化物酶活力的抗体酶的制备方法虽然活力较高，但由于这两种方法使用的抗体均为鼠的单克隆抗体，制备成本高，技术要求复杂，而且应用于人体治疗时必然产生人抗鼠反应，因此不是临床治疗的理想选择，而人源抗体酶由于对人体没有免疫原性，必将成为临床应用的最佳选择。

目前世界上唯一一例有报道的人源化抗体酶是将鼠源单抗的互补决定区嫁接到人抗体的框架区得到的，这样制备的抗体酶虽然已有部分人抗体的特征，却由于保留了鼠源抗体中仍然对人体具有免疫原性的互补决定区，影响治疗效果，因此需要发展新的人源抗体酶制备方法，满足未来医学要求。

本发明的目的是提供一种新的人源抗体酶的制备方法，最大限度降低抗体酶应用于人体产生的免疫原性，采用基因工程手段提高抗体酶的产量，降低抗体酶的制备成本。

本发明是利用根据疏水腔修饰法设计合成的半抗原作为抗原，从噬菌体展示的人单链抗体库中筛选得到半抗原特异的单链抗体基因，利用突变引物构建了高效表达单链抗体的载体，通过化学方法

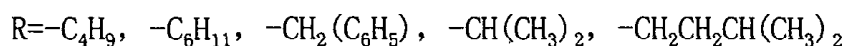
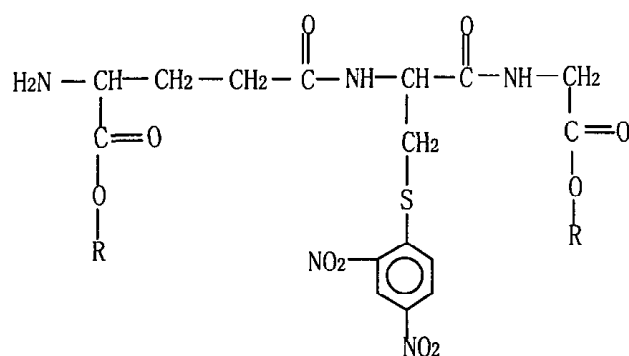
# 说明书

把催化基团硒代半胱氨酸引入到由大肠杆菌高效表达的特异抗体中，最后获得了具有谷胱甘肽过氧化物酶活性的人源含硒抗体酶。

本发明的具体制备步骤：

## I. 半抗原的设计与合成

系列半抗原结构如下：



取 0.8-1.2g 谷胱甘肽与 2,4-二硝基氯苯在 10℃ 反应，得到 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽；将 0.1-0.5g S-二硝基苯取代的谷胱甘肽加入 2-5ml 相应的醇：正丁醇或异丙醇或苄醇或正己醇或异戊醇，冰浴，通入过量的干燥氯化氢至饱和，在 4-20℃ 放置 5-80hr，反应结束后，产物用乙醚洗涤，干燥，即为系列半抗原 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二酯。

## II. 半抗原特异的人单链抗体基因的筛选

## 说 明 书

---

用 10-40 $\mu$ g/ml 半抗原包被免疫平皿，加入人噬菌体展示的单链抗体库，15-37 $^{\circ}$ C 温浴 2hr；0.05M，PH7.2 的磷酸钠缓冲液洗平皿；加入 0.5-2.5ml，20-150mmol/L 的三乙胺，20-40 $^{\circ}$ C 放置 8-15min；用 0.4-1.0ml，0.5-1.2mol/L，PH7.0-8.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液中和洗脱液；洗脱下的噬菌体加入到 OD 值为 0.2-1.0 的 5-15ml 的大肠杆菌 TG1 中，于 20-40 $^{\circ}$ C 侵染 25-40min；在含 100 $\mu$ g/ml 的氨苄青霉素和 1% 的葡萄糖的 2 $\times$ TY 中扩大培养 TG1，利用野生的噬菌体 M13K07 捕获特异噬菌体；重复以上过程 3-6 次，酶联免疫法检测筛选得到的特异噬菌体抗体。

### III. 人原单链抗体的高效表达、复性及纯化

提取特异抗体基因，测序，在保持氨基酸序列不变的前提下，根据基因序列设计突变引物，扩增抗体基因，利用 NdeI/HindIII 酶切位点将抗体基因组装到 pET21a 表达载体上，获得了以包含体形式高效表达的单链抗体。将从 1L 培养物中收获的菌体重悬于 PH8.0，含有 2mM  $\beta$ -巯基乙醇和 0.01% 溶菌酶的 50mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液中，超声破碎菌体，12000rpm 离心 20 分钟，沉淀即为包含体。包含体经 2M 氯化钠溶液，0.5% Triton X-100 和 4M 尿素洗涤后，溶于 3-12ml，含 6M 盐酸胍，PH 为 7.0-9.0，10-50mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐变性液中，用 BIO-RAD 公司的蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。在 50ml 含 0.2-1.0M 精氨酸，1-5mM 乙二胺四乙酸，1-3M



## 说 明 书

---

盐酸胍的 0.1-0.8M 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐复性液中滴加变性蛋白溶液，每隔 0.5-2.5hr 滴加一次，共滴加 3-8 次，0-12℃放置过夜。浓缩、透析除去盐酸胍，冻干。冻干的蛋白干粉溶于 PH7.0-9.0，10--50mM 的磷酸钠缓冲液中，经葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 分离纯化，收集主峰，即为单链抗体纯品。

#### IV. 催化基团的引入

把  $0.4-1.2 \times 10^{-5}$  mmol/L 单链抗体纯品，溶于无氧水中，加入  $2.0-5.0 \times 10^{-5}$  mmol/L 苯甲基磺酰氟，15-30℃振荡 1-3hr，在氮气保护下加入  $0.5-2.5 \times 10^{-4}$  mol/L 硒氢化钠溶液，30-40℃保温 25-40hr，反应液经葡聚糖凝胶 Sephadex G-10 除盐后，即得具有谷胱甘肽过氧化物酶活力的人源抗体酶。活力达到天然酶的 0.03-0.8 倍。

本发明使用的人源抗体库的构建原料来自于未经免疫的正常人外周血淋巴细胞，单链抗体除重链可变区的第三个互补决定区是人工合成的，由 4-12 个氨基酸组成，其余部分全部来自于人抗体家族，因此化学修饰从该抗体库中筛得的单链抗体获得的人源抗体酶，理论上将极大限度的降低对人体的免疫原性，具有分子量小，组织穿透力强，有利于亲和标记，突变等优点，是直接应用于临床治疗的理想选择。而且与制备单克隆抗体相比，从抗体库中筛选抗体方法简便、实验条件要求低，不需要复杂的实验技术，只需要几周就可

# 说明书

---

以得到特异抗体，时间上远远少于制备单克隆抗体所需要的 6 个月或更长时间。

本发明使用突变引物扩增抗体基因，使原来不表达单链抗体的大肠杆菌高效表达了单链抗体，这一技术上的突破，为在大肠杆菌中表达目的蛋白提供了有益的经验。

本发明使用的大肠杆菌表达系统成本低，繁殖速度快，所获得的单链抗体复性率高，复性后的蛋白易于纯化，而且已被证实对过氧化氢损伤的心肌细胞具有防护作用，这些特点十分有利于大规模生产，为今后的实际应用打下了坚实的基础。

本发明提供的实施例如下：

实施例 1：

把溶于 40ml 乙醇的 1.3675g S-二硝基苯取代的谷胱甘肽滴加到溶于 25ml 1mol/L 的氢氧化钠溶液的 2.5g 谷胱甘肽中，在 10℃ 反应 10min 后，用盐酸调 PH 值到 2.5 左右，有黄色固体析出，抽滤，热水重结晶，55℃ 烘干，得到 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽，产率 93%。

将 0.5g S-二硝基苯取代的谷胱甘肽加入 5ml 正丁醇中，冰浴，通入过量的干燥氯化氢至饱和，在 20℃ 放置 25hr。反应结束后，浅黄色产物用乙醚洗涤，干燥，即为半抗原 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二丁酯，产率 85%。

用 10 $\mu$ g/ml 半抗原包被免疫平皿，加入人噬菌体展示的单链抗

## 说 明 书

---

体库，37℃温浴 2hr；磷酸钠缓冲液洗平皿；加入 150mmol/L 三乙胺 0.5ml，20℃放置 8min；用 1.2mol/L，PH7.0 的 0.4ml 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液中和洗脱液；洗脱下的噬菌体加入到 15ml OD 值为 0.2 的 TG1 中，于 37℃侵染 30min；在含 100μg/ml 的氨苄青霉素和 1%的葡萄糖的 2×TY 中扩大培养 TG1，利用野生的噬菌体 M13K07 捕获特异噬菌体；重复以上过程 3 次，酶联免疫法检测筛选得到的特异噬菌体抗体 3B10。

在保持氨基酸序列不变的前提下，根据 3B10 基因序列设计 5' 端突变引物，利用 NdeI/HindIII 酶切位点将抗体基因组装到 pET21a 表达载体上；收获菌体，提取并洗涤包含体；包含体溶于 12ml 含 6M 盐酸胍，PH 为 9.0，50mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐变性液中，用 BIO-RAD 公司的蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。在 50ml 含 0.2M 精氨酸，1mM 乙二胺四乙酸，1M 盐酸胍的 0.1M 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐复性液中滴加变性蛋白溶液，每隔 0.5hr 滴加一次，共滴加 8 次，12℃放置过夜。浓缩、透析除去盐酸胍，冻干。冻干的蛋白干粉溶于 10mM，PH9.0 的磷酸钠缓冲液中，经葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 分离纯化，收集主峰，电泳检验为一条带，分子量为 31.4kD。

把  $0.4 \times 10^{-5}$ mmol/L 单链抗体纯品，溶于无氧水中，加入  $2.0 \times 10^{-5}$ mmol/L 苯甲基磺酰氟，15℃振荡 3hr，在氮气保护下加入  $0.5 \times 10^{-4}$ mol/L 硒氢化钠溶液，30℃保温 40hr，反应液经葡聚糖凝胶 Sephadex

## 说 明 书

---

G-10 除盐后, 即得具有谷胱甘肽过氧化物酶活力的人源抗体酶 Sec-3B10, 活力为  $72.2\text{U}/\mu\text{mol}$ , 是天然酶的  $1.2 \times 10^{-2}$  倍。

### 实施例 2:

将  $0.4\text{g}$  S-二硝基苯取代的谷胱甘肽加入  $4\text{ml}$  正苯醇中, 冰浴, 通入过量的干燥氯化氢至饱和, 在  $15^\circ\text{C}$  放置  $80\text{hr}$ 。反应结束后, 产物用乙醚洗涤, 干燥, 即为半抗原 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二苯酯, 产率  $47\%$ 。

用  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  半抗原包被免疫平皿, 加入人噬菌体抗体库进行筛选, 重复吸附、洗涤、洗脱、富集步骤三次, 酶联免疫法检测, 得到的特异噬菌体抗体 4F4。在保持氨基酸序列不变的前提下, 根据 4F4 的基因序列设计 5' 端突变引物, 利用 NdeI/HindIII 酶切位点将 4F4 基因组装到 pET21a 表达载体上, 表达的单链抗体包含体的提取洗涤方法与实施例 1 相同。在  $50\text{ml}$  含  $1.0\text{M}$  精氨酸,  $5\text{mM}$  乙二胺四乙酸,  $3\text{M}$  盐酸胍的  $0.8\text{M}$  三羟甲基氨基甲烷盐酸盐复性液中滴加变性蛋白溶液, 每隔  $2.5\text{hr}$  滴加一次, 共滴加 3 次,  $0^\circ\text{C}$  放置过夜。浓缩、透析除去盐酸胍, 冻干。冻干的蛋白干粉溶于  $50\text{mM}$ ,  $\text{pH}7.0$  的磷酸钠缓冲液中, 经葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 分离纯化, 收集主峰,

把  $1.2 \times 10^{-5}\text{mmol}/\text{L}$  单链抗体纯品, 溶于无氧水中, 加入  $5.0 \times 10^{-5}\text{mmol}/\text{L}$  苯甲基磺酰氟,  $30^\circ\text{C}$  振荡  $1\text{hr}$ , 在氮气保护下加入  $2.5 \times 10^{-4}\text{mol}/\text{L}$  硒氢化钠溶液,  $40^\circ\text{C}$  保温  $25\text{hr}$ , 反应液经葡聚糖凝胶 Sephadex

## 说 明 书

---

G-10 除盐后，得到的人源抗体酶 Sec-4F4 活力为 28.8 U/ $\mu\text{mol}$ ，是天然酶的  $4 \times 10^{-3}$  倍。

### 实施例 3:

3ml 正己醇加入到 0.4g S-二硝基苯取代的谷胱甘肽中，冰浴，通入过量的干燥氯化氢至饱和，在 10℃放置 30hr。反应结束后，产物用乙醚洗涤，干燥，即为半抗原 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二己酯，产率 72%。

用 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  半抗原包被免疫平皿，加入人噬菌体抗体库进行筛选，重复吸附、洗涤、洗脱、富集步骤三次，酶联免疫法检测，得到的特异噬菌体抗体 5A8。在保持氨基酸序列不变的前提下，根据 5A8 的基因序列设计 5' 端突变引物，利用 NdeI/HindIII 酶切位点将 5A8 基因组装到 pET21a 表达载体上，表达的单链抗体包含体的处理方法与实施例 1 相同。得到的人源抗体酶 Sec-5A8 活力 126U/ $\mu\text{mol}$ ，是天然酶的  $2.7 \times 10^{-2}$  倍。

### 实施例 4:

2ml 异丙醇加入 0.1g S-二硝基苯取代的谷胱甘肽中，冰浴，通入过量的干燥氯化氢至饱和，在 10℃放置 20hr。反应结束后，产物用乙醚洗涤，干燥，即为半抗原 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二异丙酯，产率 60%。

筛选步骤同实施例 3，得到特异噬菌体抗体 2D7。在保持氨基酸

## 说 明 书

---

序列不变的前提下，根据 2D7 的基因序列设计 5' 端突变引物，利用 NdeI/HindIII 酶切位点将 2D7 基因组装到 pET21a 表达载体上，表达的单链抗体包含体的处理方法与实施例 2 相同。得到的人源抗体酶 Sec-2D7 活力  $194\text{U}/\mu\text{mol}$ 。

### 实施例 5:

4ml 异戊醇加入 0.2g S-二硝基苯取代的谷胱甘肽中，冰浴，通入过量的干燥氯化氢至饱和，在  $4^{\circ}\text{C}$  放置 10hr。反应结束后，产物用乙醚洗涤，干燥，即为半抗原 S-二硝基苯取代的谷胱甘肽二异戊酯，产率 65%。

筛选步骤同实施例 3，得到的特异噬菌体抗体 6C5。在保持氨基酸序列不变的前提下，根据 6C5 的基因序列设计 5' 端突变引物，利用 NdeI/HindIII 酶切位点将 6C5 基因组装到 pET21b 表达载体上，表达的单链抗体包含体的处理方法与实施例 2 相同。得到的人源抗体酶 Sec-6C5 活力  $256\text{U}/\mu\text{mol}$ 。