

Anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的纯化与活性

徐舒怡¹, 李雅贤¹, 胡海¹, 张莉², 边延林¹, 朱建伟¹, 吴明媛^{1*}

(¹上海交通大学药学院细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心, 上海 200240;

²上海交通大学分析测试中心, 上海 200240)

摘要 针对细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)和CXC趋化因子受体4型(CXCR4)两个靶点,设计anti-PD-L1&CXCR4双特异性纳米抗体的基因序列,C末端连接组氨酸标签(6×His标签),通过pET-22b(+)重组表达质粒转化大肠埃希菌 *E. coli* BL21,经IPTG诱导表达,以可溶性形式存在于菌体裂解上清液。为了提高双特异性纳米抗体的产量和纯度,采用3种不同的方法进行样品制备和纯化。结果表明,通过机械裂菌并改进缓冲液的盐离子和咪唑浓度以及pH,经His Trap FF亲和色谱柱纯化后,对双特异性纳米抗体分离效果较好,目的蛋白产量超过1 mg/L,纯度可达到97%。同时,anti-PD-L1&CXCR4双特异性纳米抗体能够与细胞表面两个抗原特异性结合,增强IL-2活化的人外周血单个核细胞(PBMC)对胰腺癌细胞株AsPC-1的杀伤能力,为其后续体内药效学评价奠定了基础。

关键词 双特异性; 纳米抗体; 亲和色谱; 蛋白纯化; 生物学活性

中图分类号 R963 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)05-0622-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20210516

引用本文 徐舒怡,李雅贤,胡海,等.Anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的纯化与活性[J].中国药科大学学报,2021,52(5):622–629.

Cite this article as: XU Shuyi, LI Yaxian, HU Hai, et al. Purification and activity of anti-PD-L1&CXCR4 bispecific nanobody [J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(5):622–629.

Purification and activity of anti-PD-L1&CXCR4 bispecific nanobody

XU Shuyi¹, LI Yaxian¹, HU Hai¹, ZHANG Li², BIAN Yanlin¹, ZHU Jianwei¹, WU Mingyuan^{1*}

¹Engineering Research Center of Cell and Therapeutic Antibody (MOE), School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; ²Instrumental Analysis Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract Targeted programmed death-ligand 1 (PD-L1) and CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4), gene sequences encoding anti-PD-L1 nanobody and anti-CXCR4 nanobody were cloned into the pET-22b (+) vector to construct recombinant expression plasmid of anti-PD-L1&CXCR4 bispecific nanobody, which was connected with 6 × His tag and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The expressed proteins were then found to exist as a soluble form in the supernatant of bacterial lysate after induction of IPTG. Three purification methods were used to obtain the target protein in order to improve the yield and purity of the bispecific nanobody. The bacterial supernatant was separated and purified by His Trap FF affinity chromatographic column. The target protein output could exceed 1 mg/L, and the product purity could reach up to 97%. Besides, the anti-PD-L1&CXCR4 bispecific nanobody shows a specific binding ability to two antigens on the cell surface, enhancing the cytotoxicity of IL-2 activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to tumor cell line AsPC-1, which lays the foundation for further evaluation of its drug efficacy *in vivo*.

Key words bispecific; nanobody; affinity chromatography; protein purification; biological activity

This study was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 81773621) and the National Facility for Translational Medicine (Shanghai) Open Research Program (No. TMSK-2020-131)

收稿日期 2021-03-02 *通信作者 Tel:021-34204631 E-mail:wumingyuan@sjtu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81773621);转化医学国家重大科技基础设施(上海)开放课题基金资助项目(No. TMSK-2020-131)

纳米抗体(nanobody, Nb), 即重链单域抗体(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH), 是在骆驼体内发现的一种纳米尺寸的天然抗体, 相对分子质量约为 15 kD, 是常规抗体的十分之一^[1]。纳米抗体仅含有 3 个互补决定区(CDR), 其中 CDR3 区域呈明显的长环状结构, 有利于与隐蔽的抗原表位结合^[2]。纳米抗体的尺寸较小, 可以穿过机体组织生理屏障或者狭小区域到达靶器官; 具有良好的热稳定性和水溶性, 可在大肠埃希菌、酵母等表达系统中大规模生产^[3]; 同时, 纳米抗体制备简单, 可用于构建多种分子结构, 包括具有双特异性或双功能的抗体, 能够避免重链和轻链的错配, 从而简化分离、纯化步骤以提高质量和产率^[4], 已成为抗体药物研发领域的热点。2018 年, 第 1 个纳米抗体药物 Caplacizumab 获欧洲药物管理局批准上市, 由针对血管性血友病因子的 VHH 二聚体组成, 用于治疗成人获得性血栓性血小板减少性紫癜(aTTP)^[5]。

过去数十年中, 免疫检查点抑制剂改写了肿瘤治疗的历史, 将晚期肿瘤的药物治疗向前推进了一大步。免疫检查点疗法的靶点主要包括细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(CTLA-4)、程序性死亡蛋白-1 及其配体(PD-1/PD-L1)^[6]。PD-1 由活化 T 细胞表达, 而 PD-L1 常在肿瘤细胞上表达。肿瘤细胞会利用其表面过表达的 PD-L1, 抑制 T 细胞的活化, 引起 T 细胞凋亡, 从而躲避免疫监视和免疫攻击^[7]。拮抗负调控信号 PD-1/PD-L1, 有利于 T 细胞持续活化, 杀伤或抑制肿瘤细胞生长^[8-9]。目前, 抗 PD-1/PD-L1 免疫检查点疗法的响应率仍然较低, 其中肿瘤微环境中 T 淋巴细胞浸润不足是限制临床疗效的关键因素^[10], 肿瘤周围的免疫抑制性微环境也阻止了活化的淋巴细胞进入肿瘤部位^[11]。有证据表明, 肿瘤微环境中的趋化因子 CXCL12 能够支持肿瘤基质的生长, 募集肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、肿瘤相关成纤维细胞(CAF)等, 形成物理屏障, 保护肿瘤细胞免受药物和免疫系统的杀伤^[12]。其受体 CXCR4 在多种肿瘤中高表达, 如胰腺癌、乳腺癌和转移性结直肠癌等。CXCR4/CXCL12 信号轴在肿瘤的生长、血管生成、侵袭转移和化疗耐药中起到关键作用^[13], 而 CXCR4 拮抗剂以多种作用模式影响肿瘤微环境, 包括诱导免疫细胞迁移、增加效应 T 细胞的浸润、减少肿瘤微

环境中免疫抑制细胞, 提高了胰腺癌等恶性肿瘤对免疫检查点抑制剂和化疗药物的敏感性^[14-15]。因此, 拮抗 CXCR4/CXCL12 和 PD-1/PD-L1 的药物组合能够逆转免疫抑制性肿瘤微环境, 增强了免疫系统对肿瘤细胞的杀伤效果^[16]。

本研究针对 PD-L1 和 CXCR4 两个靶点, 设计并构建了 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的重组表达载体, 通过大肠埃希菌表达系统, 设计不同的纯化策略, 来获得纯度和产量较高的目的蛋白, 体外实验证明具有特异性的双抗原结合能力和生物学活性, 为进一步研究双特异性纳米抗体的抗肿瘤免疫治疗提供了依据。

1 材 料

1.1 试 剂

Ficoll-Paque PLUS 淋巴细胞分离液(美国 GE 公司); 重组人白细胞介素-2(IL-2, 上海华新生物高技术有限公司); 小鼠抗多组氨酸标签单克隆抗体(美国 Proteintech Group 公司); 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗多组氨酸标签单克隆抗体(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 小鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体(北京义翘神州科技有限公司); 重组兔抗人 CXCR4 单克隆抗体(美国 Abcam 公司); Alexa Fluor 488 标记的驴抗小鼠 IgG 第二抗体、Alexa Fluor 647 标记的羊抗兔 IgG 第二抗体、过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 第二抗体(上海翊圣生物科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 乳酸脱氢酶(LDH)杀伤活性检测试剂盒(美国 Promega 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

Tanon-5200Multi 凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司); Infinite M200 PRO 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Cytoflex 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); 蛋白分离纯化系统 ÄKTA Start、HisTrap FF 亲和色谱柱(美国 GE 公司)。

1.3 菌株和细胞株

感受态大肠埃希菌 BL21(DE3) 菌株(上海唯地生物技术有限公司); 人白血病 T 淋巴细胞株 Jurkat、人神经胶质瘤细胞株 U251-MG、人转移胰腺癌细胞株 AsPC-1 购自中科院上海生命科学研究院细胞资源中心; 健康志愿者外周血由上海长海

医院输血科提供。

2 方法

2.1 重组表达质粒的构建和转化

anti-PD-L1 和 anti-CXCR4 的纳米抗体基因序列均由文献获得^[17-18], 两部分由 linker(3个G₄S短肽)连接起来,C端加入多组氨酸标签(6×His标签), 组装为 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体(简称为BsNb PX4)的基因序列。将该基因序列转入到 pET-22b(+)载体中, 酶切位点为 *Nco* I 与 *Eco* R I, 构建 BsNb PX4 的重组质粒, 以上均由南京金斯瑞公司合成。

2.2 目的基因的诱导表达

将重组表达质粒 pET22b-BsNb PX4 转化 *E. coli* BL21(DE3), 筛选阳性克隆并抽提质粒, 经过 DNA 测序确认。接种于含氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基 5 mL 中, 37 °C, 220 r/min 摆床培养过夜后全部

转接至含 Amp 的 TB 培养基 500 mL, 继续培养至菌液 A_{600} 达到 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 25 °C 诱导 18 h 后收集菌液。

2.3 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的纯化

离心收集菌液 500 mL, 向菌体沉淀加入破菌缓冲液(PBS)25 mL, 冰浴超声重悬, 高压匀质仪多次循环充分破碎菌体, 即机械裂解法破菌; 或向菌体沉淀加入高浓度蔗糖-三羟甲基甲胺基乙磺酸(TES)溶液 25 mL, 冰上充分振摇 1 h 后, 再加入原浓度 1/4 的蔗糖-TES 溶液 50 mL, 继续冰浴振摇 45 min, 即低温渗透压休克法提取周质空间蛋白。菌体裂解后的样品 12 000 r/min, 4 °C, 离心 30 min, 收集上清液。菌体裂解后上清液通过亲和色谱纯化, 结合缓冲液(pH 7.4)平衡 HisTrap FF 柱, 上样结束后用洗脱缓冲液进行分部梯度洗脱, 收集洗脱峰。菌体裂解方式、裂解缓冲液、结合缓冲液和洗脱缓冲液如表 1 所示。

Table 1 Cell disruption techniques and buffers of 3 purification methods

Method	Cell disruption technique	Cell disruption buffer	Binding buffer	Elution buffer
1	Homogenization	PBS (pH 7.4)	PBS (pH 7.4)	50 mmol/L NaCl, 2 mol/L imidazole (pH 10.6)
2	Osmotic shock	TES solution (pH 8.0)	0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na ₂ HPO ₄ , 0.24 g/L KH ₂ PO ₄ , 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole (pH 7.4)	0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na ₂ HPO ₄ , 0.24 g/L KH ₂ PO ₄ , 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole (pH 9.0)
3	Homogenization	PBS (pH 7.4)	Same as Method 2	Same as Method 2

考马斯亮蓝 R-250 染色和 Western blot 对洗脱峰样品进行鉴定。将目的蛋白在 4 °C 透析 24 h, 去除咪唑; 使用超滤离心管, 4 000 r/min, 4 °C, 离心 30 min, 浓缩蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

2.4 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的抗原结合能力分析

分别取对数生长期的悬浮细胞 Jurkat 和贴壁细胞 U251-MG、AsPC-1, 用含 2% FBS 的 PBS 溶液重悬洗涤 2 次, 1 200 r/min 离心 5 min。吸弃上清液, 加入含 2% FBS 的 PBS 溶液 200 μL 重悬细胞, 分别在细胞样品中加入 BsNb PX4 1 μg 作为一抗, FITC 标记的小鼠抗多组氨酸标签单克隆抗体作为荧光二抗, 分别选用小鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体与重组兔抗人 CXCR4 单克隆抗体作为阳性对照的一抗, Alexa Fluor 488 标记的驴抗小鼠 IgG 第二抗体、Alexa Fluor 647 标记的羊抗兔 IgG 第二抗体作为对应的荧光二抗。4 °C 避光孵育 30 min 后, 用 PBST 洗涤 2 次, 重悬于 2% FBS 的 PBS 溶液, 终体积为 100 μL。

流式细胞仪检测肿瘤细胞 PD-L1 和 CXCR4 的抗原表达情况, 分析 BsNb PX4 的抗原结合能力。

2.5 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的生物活性检测

2.5.1 人外周血单核细胞(PBMC)的分离 取新鲜健康志愿者外周血, 与 DPBS 按 1:7 比例稀释混匀后, 加入到 Ficoll-Paque PLUS 淋巴细胞分离液, 1 200 r/min, 20 °C 梯度离心 30 min, 吸取中间白雾层, 分别用 DPBS 和含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基洗涤两次, 调整细胞浓度至每毫升 1×10^6 个细胞备用。

2.5.2 LDH 法检测 PBMC 对胰腺癌细胞的杀伤 将生长状态良好的胰腺癌细胞 AsPC-1 用 0.25% 的胰酶消化、计数, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬, 调整细胞浓度为每毫升 3×10^4 个细胞。将 AsPC-1 细胞均匀铺于 96 孔板, 每孔 100 μL, 置于 37 °C, 贴壁培养 12 h。取新鲜分离的人 PBMC 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬, 调整细胞密度, 铺于 96 孔板, 每孔 50 μL, 使效应细胞与靶细

胞的比例为 10:1 或 15:1, 共培养 24 h, 然后加入 IL-2(工作浓度 100 IU/mL), 置于 37 °C 培养箱, 继续培养 24 h。BsNb PX4 分别用含 2% FBS 的 RPMI 1640 培养基稀释, 每孔加入 50 μL, 终浓度为 0.5 μmol/L, 对照组加入等体积含 2% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 继续孵育 48 h。检测前, 在靶细胞最大释放组中添加 10% Triton X-100 裂解液, 每孔 20 μL, 置于 37 °C 培养箱继续孵育 20 min。水平离心后, 转移上清液 50 μL 至全新的 96 孔板中, 每孔加入 LDH 基质液 50 μL, 室温孵育 20 min, 每孔加入终止液 50 μL 终止反应并记录 A_{490} 。

杀伤率(%) = (实验组吸收度 - 效应细胞释放组吸收度 - 靶细胞释放组吸收度) / (靶细胞最大释放组吸收度 - 靶细胞释放组吸收度) × 100。

2.6 统计学处理

应用 SPSS 23.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间比较采用 Tukey 检验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

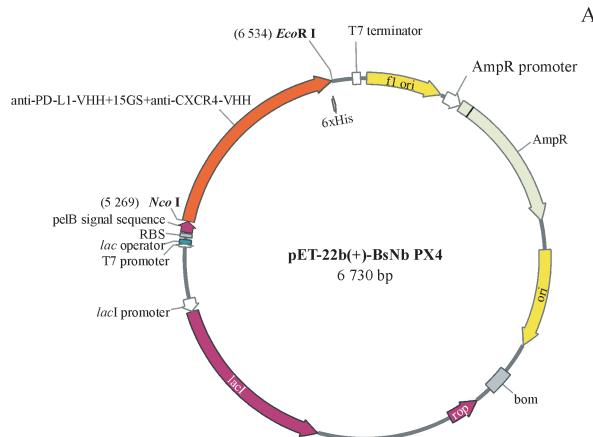


Figure 1 Construction and expression of recombinant protein

A: Schematic diagram of plasmid pET-22b-BsNb PX4; B: 10% SDS-PAGE analysis of the expression of BsNb PX4; C: Western blot analysis of the expression of BsNb PX4

Lane M: Molecular weight marker; Lane 1: uninduced BL21/pET-22b-BsNb PX4 lysate; Lane 2: IPTG induced BL21/pET-22b-BsNb PX4 lysate

3.2 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的亲和纯化

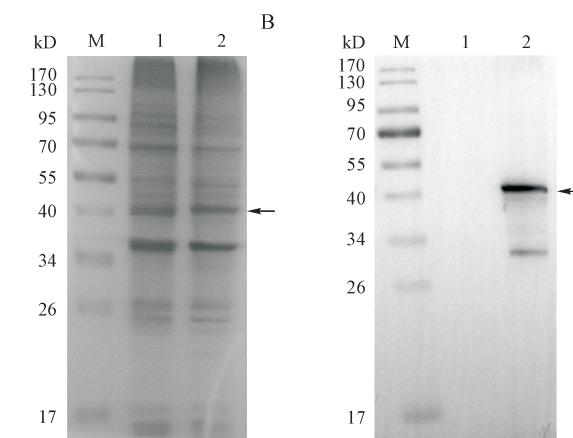
如图 2-A 所示, 采用方法(1)纯化后的色谱图谱共出现 6 个峰, 经 SDS-PAGE 证实前 4 个峰所得到的样品杂蛋白较多, 但在 50% 和 100% 洗脱缓冲液(图中以 50% B 和 100% B 表示)中, 得到相对分子质量约 44 kD 的目的条带, 纯度较高, 基本无杂质被洗脱。如图 2-B 所示, 含目的蛋白的上清液经

3 结果

3.1 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的构建和表达

如图 1-A 所示, 选取 pET-22b 载体, 构建 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的重组质粒, 由上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 序列正确。anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体基因序列全长 1 263 bp, 编码 421 个氨基酸, 相对分子质量为 43.8 kD。

将测序正确的重组表达质粒 pET22b-BsNb PX4 转化 *E. coli* BL21(DE3), TB 培养基用于菌体扩增和蛋白表达。当菌液 A_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时, 加入 IPTG 诱导目的蛋白表达。将诱导培养 18 h 的重组大肠埃希菌破碎处理, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测, 如图 1-A 和图 1-B 所示, 诱导后的全菌液在 44 kD 附近出现条带, 符合预期产物的相对分子质量大小, 并且能与抗多组氨酸标签单克隆抗体特异性的结合, 说明 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体能够在大肠埃希菌中经 IPTG 诱导表达。



方法(2)进行亲和色谱, 在用 20% 洗脱缓冲液洗脱时, BsNb PX4 被大量洗脱且洗脱峰独立, 杂蛋白含量较少。如图 2-C 所示, 方法(3)只出现一个洗脱峰, 但与方法(2)相比, 20% 洗脱缓冲液的洗脱峰显示有多个杂带。因此, 收集方法(1)的 50% 和 100% 洗脱缓冲液的洗脱峰, 分别合并方法(2)和方法(3)的 20% 洗脱缓冲液的洗脱峰各管样品, 透析去除咪唑, 超滤浓缩。

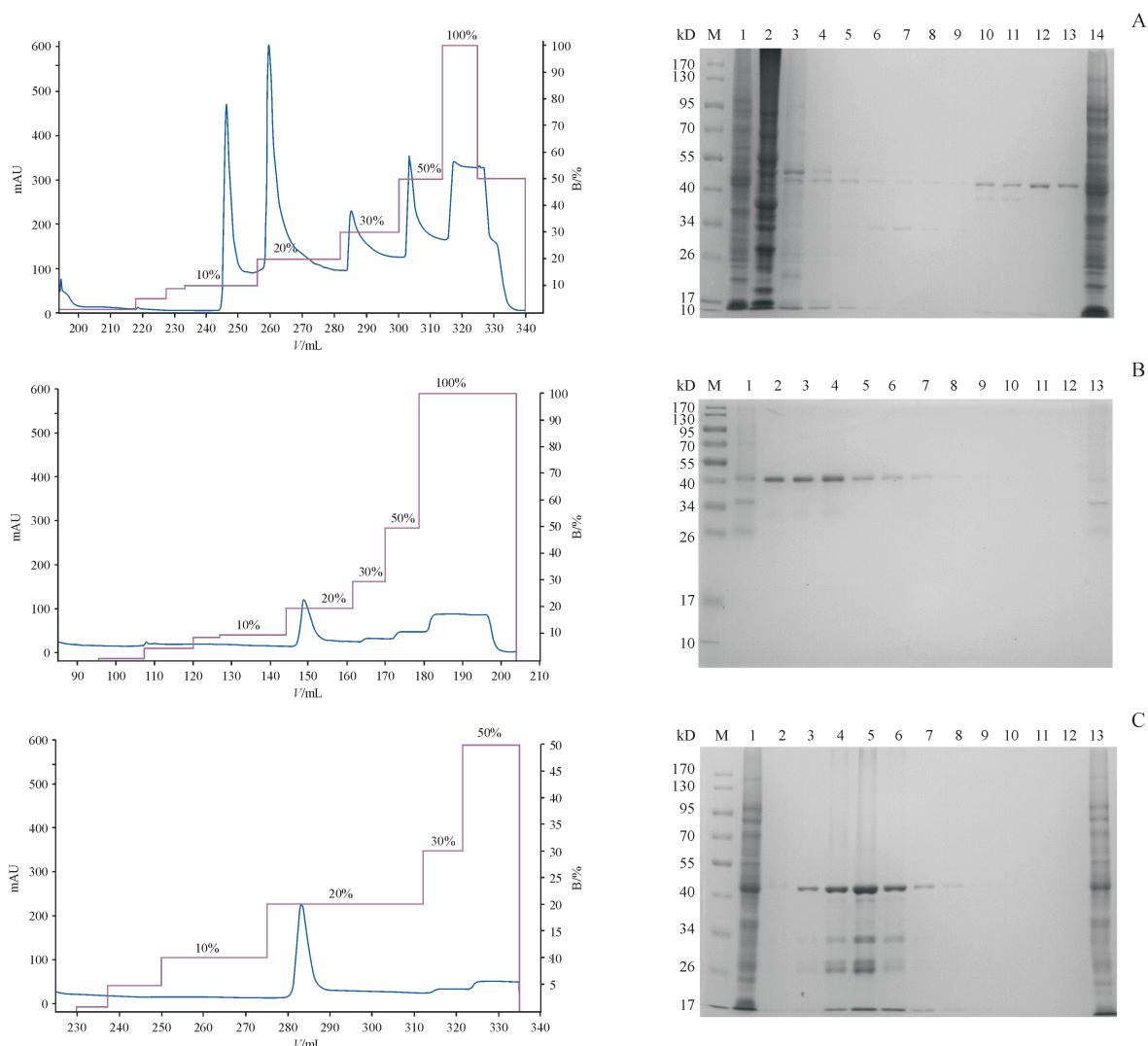


Figure 2 Affinity purification process of BsNb PX4

A: Purification process and 10% SDS PAGE gel graph of Method 1; B: Purification process and 10% SDS PAGE gel graph of Method 2; C: Purification process and 10% SDS PAGE gel graph of Method 3

Lane M: Molecular weight marker; Lane 1: Supernatant before purification. (A) Lane 2: 0% buffer B elution; Lane 3-5: 10% buffer B elution peak; Lane 6-9: 20% buffer B elution peak; Lane 10-11: 30% buffer B elution peak; Lane 12: 50% buffer B elution peak; Lane 13: 100% buffer B elution peak; Lane 14: flow-through solution; (B) Lane 2-9: 20% buffer B elution peak; Lane 13: flow-through solution; (C) Lane 2-9: 20% buffer B elution peak; Lane 13: flow-through solution

SDS-PAGE 和 Western blot 检测透析后得到的目的蛋白相对分子质量和特异性,如图3所示,在44 kD出现特异性条带,与预期的双特异性纳米抗体相对分子质量相符。但是在30 kD左右存在一条杂带,推测其为C端带有多组氨酸标签的anti-CX-CR4-VHH(二价纳米抗体),可能是双特异性纳米抗体表达分泌过程中由宿主蛋白酶降解得到的产物。

用BCA法对3种目的蛋白进行定量分析,结果如表2所示,方法(1)获得的BsNb PX4产量约1.12 mg/L,凝胶成像系统扫描显示目的蛋白纯度

在97%以上;方法(2)获得的BsNb PX4产量约1.34 mg/L,纯度接近90%;方法(3)获得的BsNb PX4产量约7.0 mg/L,但样品中仍含有较多的杂蛋白。因此,后续选择方法(1)制备得到纯度最高的BsNb PX4进行抗原结合和体外生物学活性检测。

3.3 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的抗原结合能力

流式分析双特异性纳米抗体结合抗原的能力,如图4所示,U251-MG细胞株针对PD-L1抗原显示出明显的荧光信号偏移,呈高阳性表达,而免

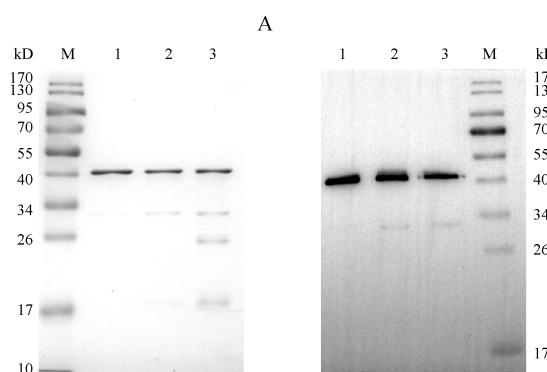


Figure 3 SDS-PAGE and Western blot detection of the dialyzed main elution peak sample

A: 10% SDS-PAGE detection of the dialyzed main elution peak sample;
B: Western blot detection of the dialyzed main elution peak sample
Lane M: Molecular weight marker; Lane 1: Main elution peak sample of Method 1 after dialysis; Lane 2: Main elution peak sample of Method 2 after dialysis; Lane 3: Main elution peak sample of Method 3 after dialysis

抗人 CXCR4 IgG 抗体和羊抗兔 IgG-FITC 荧光抗体组合相较于单染羊抗兔 IgG-FITC 荧光抗体的阴性对照并无变化; Jurkat 细胞株为 CXCR4 阳性细胞

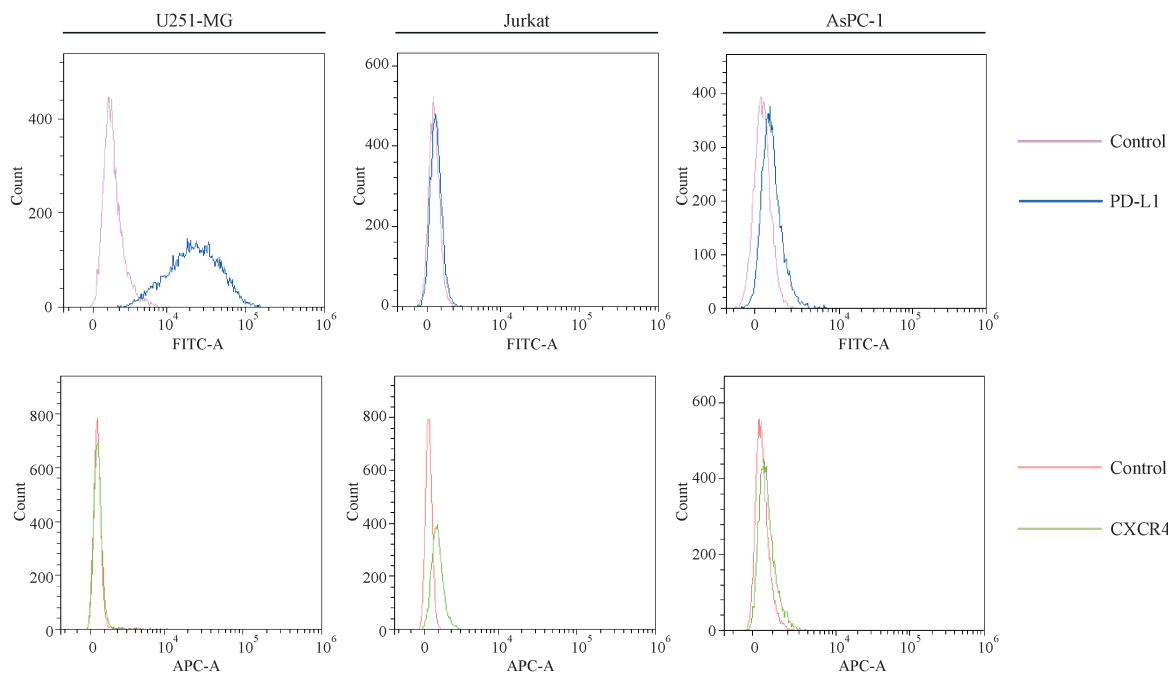


Figure 4 Detection of PD-L1 or CXCR4 expression in tumor cell line by flow cytometry

Control line: Donkey anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488 antibody or goat anti rabbit IgG-Alexa Fluor 647 antibody; PD-L1 line: Mouse anti-human PD-L1 IgG + donkey anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488 antibody; CXCR4 line: Rabbit anti-human CXCR4 IgG + goat anti rabbit IgG-Alexa Fluor 647 antibody

3.4 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体的抗肿瘤活性

在 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, PBMC 与靶细胞 AsPC-1 继续孵育 48 h 后进行 LDH 释放检测, 分析 PBMC 对 AsPC-1

Table 2 Yield and purity of products obtained by 3 purification methods

Method	Volume of bacteria lysate/mL	Total protein/mg	BsNb PX4/mg	Purity/%
1	500	61.38	0.56	97.45
2	500	8.79	0.67	87.14
3	500	72.18	3.50	49.63

株, 在静息条件下其细胞膜表面 PD-L1 抗原无表达, 实验结果与文献报道一致^[19]。

由于双特异性纳米抗体带有 6 × His 标签, 可用 FITC 偶联的 anti-6 × His 标签抗体作为荧光标记。如图 5 所示, BsNb PX4 在 U251-MG 细胞上 (PD-L1⁺、CXCR4⁻) 均能够检测到与 PD-L1 分子结合后产生的荧光信号偏移; 在 Jurkat 细胞上 (PD-L1⁻、CXCR4⁺) 也具有与 CXCR4 抗原的结合能力, 证实了纯化得到的双特异性纳米抗体对两个靶点均具有结合活性。此外, BsNb PX4 与同时表达 PD-L1 和 CXCR4 抗原的 AsPC-1 细胞也有较为明显的结合。

细胞的杀伤效应。如图 6 所示, 与空白对照组相比, BsNb PX4 单独作用于共孵育体系, PBMC 的杀伤活性有所增强, 推测可能是双特异性纳米抗体识别了 PBMC 中 T 细胞表面的 CXCR4, 同时与 AsPC-1 细胞上的 PD-L1 结合, 可以将效应 T 细胞募

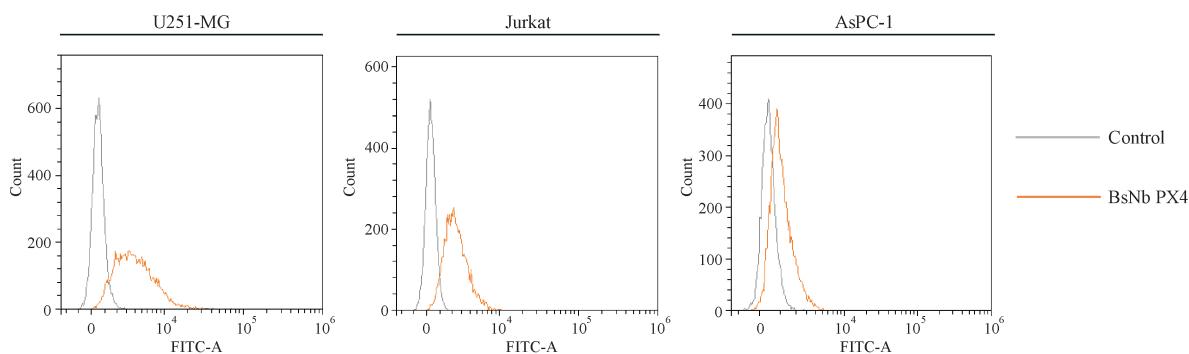


Figure 5 FACS analysis of BsNb PX4 binding to tumor cells

Control line: Anti-6×His tag-FITC antibody; BsNb PX4 line: BsNb PX4 + anti-6×His tag-FITC antibody

集到肿瘤细胞周围，增强其细胞毒性^[20]。另一方面，当PBMC与AsPC-1细胞数之比为10:1和15:1时，BsNb PX4联合IL-2能够显著提高PBMC对肿瘤细胞的杀伤，与IL-2组相比有统计学差异，具有协同效应。这些结果与文献结论是相符的，IL-2可刺激CD8⁺T细胞、NK细胞等扩增，同时细胞表面的PD-L1表达增高，证明其与PD-L1抑制剂具有潜在协同作用机制^[21]；而通过抑制CXCR4可以导致CD8⁺T细胞迁移到癌细胞富集的区域，然后阻断PD-1/PD-L1通路能够重新激活对癌细胞的杀伤作用，以上表明PD-1/PD-L1和CXCR4/CXCL12轴的联合阻断有望成为胰腺癌的新型治疗策略^[22]。

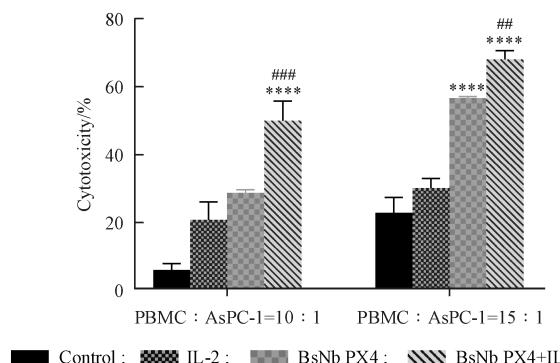


Figure 6 *In vitro* cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with IL-2 and BsNb PX4 treatment using lactate dehydrogenase (LDH) released assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Control: PBMC were incubated with AsPC-1 cells for 96 h; IL-2: 100 IU/mL of IL-2 was added to well after 24 h co-culture of PBMC with AsPC-1 cells, then the mixture was cultured for 72 h; BsNb PX4: 0.5 μmol/L of BsNb PX4 was added to well after 48 h co-culture of PBMC with AsPC-1 cells, then the mixture was cultured for 48 h; BsNb PX4+IL-2: PBMC was pre-cultured with AsPC-1 cells for 24 h, followed by incubation for 24 h with IL-2 (100 IU/mL), then the mixture was cultured for 48 h in presence of BsNb PX4 (0.5 μmol/L).

****P < 0.0001 vs IL-2 group; ##P < 0.01, ###P < 0.001 vs BsNb PX4 group

4 讨 论

在本研究中设计的anti-PD-L1&CXCR4双特异性纳米抗体基因上游含有编码细菌pelB蛋白的信号肽序列，可引导融合蛋白分泌至大肠埃希菌的周质空间中，并以可溶形式存在；通过改变破菌提取蛋白的方法，调整纯化缓冲溶液中盐离子浓度和咪唑浓度，使用3种不同方法对BsNb PX4进行纯化，以纯度为判断标准，确定了合适的纳米抗体制备方案。治疗性抗体的工艺相关杂质（宿主细胞蛋白质等）不仅影响药物的稳定性和活性，而且还可能导致有害的免疫反应^[23]。因此，抗体的纯化条件必须优化，例如采用分部或者线性梯度洗脱、确定结合和洗脱过程中合适的盐离子浓度和pH。在用亲和色谱纯化His标记的蛋白质时，通常将咪唑添加到结合缓冲液中以调节非特异性结合。但是，在分析亲和色谱图和洗脱峰的SDS-PAGE电泳结果后，发现方法(1)将结合缓冲液更换成不含咪唑的低浓度NaCl溶液，同时在洗脱缓冲液中增加咪唑的含量并提高溶液的pH，通过分部梯度洗脱可以将目的蛋白和杂质几乎完全分开，BsNb PX4的最终纯度达到97%以上。对比同样使用机械裂解法提取蛋白的方法(3)，降低结合缓冲液中的咪唑和盐离子浓度可能提高了目的蛋白的挂柱率，而洗脱液的pH和咪唑浓度影响了目的蛋白的洗脱效果，导致不同方法获得的BsNb PX4纯度有明显区别。方法(2)中高浓度蔗糖-TES溶液介导的低温渗透压休克法提取蛋白，虽然出峰过程简单，产量相近，但目的蛋白的纯度下降至87%，后续仍需增加离子交换或分子筛色谱处理，过程相对繁琐。

因此,方法(1)得到的 anti-PD-L1&CXCR4 双特异性纳米抗体纯度满足了临床前的研发要求,流式检测证明其与细胞表面的两个靶抗原特异性结合,说明该结构的双特异性纳米抗体能够正确折叠形成抗原结合域并保持分子完整性。同时,生物学活性结果也表明洗脱条件温和,不会导致目的蛋白失活。该方案的设计是一步纯化法,具有操作简单,成本低等优点,也适用于含 His 标签等多种类型的蛋白质纯化,具有广泛的应用价值。

当然,在纳米抗体的纯化过程中也存在诸多问题,如产量和回收率还相对较低。如何在保证高纯度的前提下实现抗体产量的最大化,一直是生物制药领域的难题,需要进一步摸索和优化工艺。此外,双特异性纳米抗体增强 PBMC 对肿瘤细胞杀伤效应的机制也亟待深入探究和验证。

References

- [1] Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, et al. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, **10**(1):161-174.
- [2] Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, **5**(1):111-124.
- [3] Fernandes JC. Therapeutic application of antibody fragments in autoimmune diseases: current state and prospects [J]. *Drug Discov Today*, 2018, **23**(12):1996-2002.
- [4] Roovers RC, Vosjan MJ, Laeremans T, et al. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth [J]. *Int J Cancer*, 2011, **129**(8):2013-2024.
- [5] Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic Purpura [J]. *N Engl J Med*, 2016, **374**(6):511-522.
- [6] Xing XY, Wang XC, He W. Advances in research on tumor immunotherapy and its drug development [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2021, **52**(1):10-19.
- [7] Yang J, Hu LQ. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: from antibodies to small molecules [J]. *Med Res Rev*, 2019, **39**(1):265-301.
- [8] Asano T, Meguri Y, Yoshioka T, et al. PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy [J]. *Blood*, 2017, **129**(15):2186-2197.
- [9] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations [J]. *Sci Transl Med*, 2016, **8**(328):328rv4.
- [10] Nowicki TS, Hu-Lieskovan S, Ribas A. Mechanisms of resistance to PD-1 and PD-L1 blockade [J]. *Cancer J*, 2018, **24**(1):47-53.
- [11] Anderson KG, Stromnes IM, Greenberg PD. Obstacles posed by the tumor microenvironment to T cell activity: a case for synergistic therapies [J]. *Cancer Cell*, 2017, **31**(3):311-325.
- [12] Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide [J]. *Eur J Cancer*, 2013, **49**(1):219-230.
- [13] Scala S. Molecular pathways: targeting the CXCR4-CXCL12 axis: untapped potential in the tumor microenvironment [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, **21**(19):4278-4285.
- [14] Bockorny B, Semenisty V, Macarulla T, et al. BL-8040, a CXCR4 antagonist, in combination with pembrolizumab and chemotherapy for pancreatic cancer: the COMBAT trial [J]. *Nat Med*, 2020, **26**(6):878-885.
- [15] Abraham M, Mishalian I, Harel Y, et al. Effect of BL-8040, high-affinity CXCR4 antagonist, on T-cell infiltration, tumor growth, and synergy with immunomodulatory agents [J]. *J Clin Oncol*, 2017, **35**(15_suppl):e14544.
- [16] Li ZT, Wang YX, Shen YX, et al. Targeting pulmonary tumor microenvironment with CXCR4-inhibiting nanocomplex to enhance anti-PD-L1 immunotherapy [J]. *Sci Adv*, 2020, **6**(20):eaaz9240.
- [17] Zhang F, Wei HD, Wang XX, et al. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade [J]. *Cell Discov*, 2017, **3**:17004.
- [18] Jähnichen S, Blanchetot C, Maussang D, et al. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells [J]. *PNAS*, 2010, **107**(47):20565-20570.
- [19] Yang WH, Chen PW, Li HC, et al. PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells *in vitro* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, **49**(6):2518-2525.
- [20] Suurs FV, Lub-de Hooge MN, de Vries EGE, et al. A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, **201**:103-119.
- [21] Qin WT, Hu LP, Zhang XL, et al. The diverse function of PD-1/PD-L pathway beyond cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, **10**:2298.
- [22] Seo YD, Jiang XY, Sullivan KM, et al. Mobilization of CD8⁺ T cells via CXCR4 blockade facilitates PD-1 checkpoint therapy in human pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(13):3934-3945.
- [23] Decrop W, Swart R, Gendeh G. Development of an automated method for monoclonal antibodies purification and analysis [J]. *J Biomol Tech*, 2010, **21**(3 suppl):S34-S35.