

可内化的人源抗 Met 基因工程抗体 Fab 的亲合力成熟与特性分析

朱进^{1,3)} 赵萍^{1,2)} 焦永军¹⁾ 王昕¹⁾ 曹伯良^{1,2)*} 冯振卿¹⁾ 管晓虹^{1)*}

¹⁾南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 南京 210029;

²⁾Van Andel Research Institute, Antibody Laboratory, MI,49503, USA;

³⁾南京军区军事医学研究所, 南京 210002)

摘要 应用噬菌体展示技术制备抗 Met (HGF 受体, 一个与肿瘤发生、侵袭和转移相关原癌基因产物) 特异性、高亲和力的全人 Fab 片段. Fab 基因分三步合成, 以从错配 PCR 突变库中筛选出的 Fab 基因可变区为模板, 扩增 VH 和 VL 基因, 分别与 CH1、CL 基因融合, 合成 Fd 和 L 基因, 再拼接合成 Fab 基因, 克隆于 pComb3XSS 中, 构建 Fab 次级抗体库. 经细胞筛选和固相筛选, 获得高亲和力阳性克隆. 工程菌经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析, 在 25 ku 和 27 ku 出现预期大小蛋白质条带. Fab 分子经流式细胞术、免疫沉淀、细胞免疫荧光检测, 结果表明, Fab 能够与 S114 和 MKN45 细胞膜上的 Met 胞外区特异性结合, 而与阴性细胞 NIH3T3 不结合. 抗体内化分析显示, Fab 能够与标记肥皂草毒素(ZAP)的抗人 IgG 结合, 并进入细胞内, 抑制 Met 阳性细胞的生长, 揭示该抗体能够与 Met 特异性结合, 并且被细胞内化. 该抗体有望成为肿瘤临床诊断或治疗的候选分子.

关键词 肝细胞生长因子受体, 噬菌体抗体库, 亲和力成熟, 内化抗体

学科分类号 Q78

随着恶性肿瘤对人类健康威胁的加剧, 抗肿瘤研究已成为当今生命科学中极富挑战性且意义重大的领域. 研究发掘选择性作用于特定靶点的高效、低毒、特异性强的新型抗癌药物是当今抗肿瘤药物研究的重要方向. 而以酪氨酸激酶为靶点的药物研发已成为国际抗肿瘤药物研究的热点^[1,2]. 目前为止, 已有十多种蛋白酪氨酸激酶抑制剂和抗体进入临床或临床前试验阶段, 并取得了令人鼓舞的治疗效果, 如 1998 年美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准 Herceptin 用于治疗某些 HER2 阳性的转移性乳腺癌^[3]. 蛋白酪氨酸激酶有近 60 种, 分属 20 个家族, 其中包括 HGF 受体 Met 家族. 目前已开展针对 HGF/SF 和 Met 的肿瘤治疗, 包括应用 HGF/SF 受体的反义核酸分子、小分子 RNA、酪氨酸激酶抑制剂、HGF/SF 或 / 和 Met 拮抗剂以及抗 Met 或抗 HGF/SF 的抗体等^[4-6].

20 世纪 90 年代重组 DNA 技术促进了鼠源抗

体的临床应用, 有上百种抗体药物已进入临床或后期临床试验, 如抗肿瘤抗体药物 Herceptin、Rituxan 等在美国相继批准用于临床, 单抗治疗得到了迅速发展, 成为生物技术药物研究开发的热点^[7]. 为了克服单克隆抗体分子质量过大、免疫原性强等缺点, 科研人员发展了嵌合抗体、人源化抗体、天然全人抗体以及转基因小鼠等技术, 在此基础上开发出许多小分子抗体片段^[8]. 由于基因工程抗体自身的特点, 使其在肿瘤的导向治疗、抗病毒治疗、基因治疗及临床诊断等方面均得到发展, 具有广阔的应用前景.

本研究以 Met 为靶标、以噬菌体抗体展示技术为平台, 通过抗体重链与轻链互补决定区 (CDR-H 和 CDR-L) 部分基因的突变, 构建抗 Met

* 通讯联系人. Tel: 025-86663100, E-mail: zjsimmons@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-05-31, 接受日期: 2006-09-30

的次级抗体库, 筛选高亲和力、可内化的抗 Met 全人基因工程小分子抗体, 为研制抗肿瘤药物、肿瘤的诊断和临床治疗提供新的选择.

1 材料与amp;方法

1.1 载体和菌株

噬菌粒 pComb3XSS 和 pComb3XTT 由 Barbas laboratory, the Scripps Research Institute 惠赠, XL1-Blue 购自 Invitrogen 公司, TOP10 F' 为 Stratagene 公司产品.

1.2 工具酶、酶标抗体和引物

Taq 酶、T4DNA 连接酶为 Invitrogen 公司产品, *Sfi* I 内切酶为 Roche 公司产品. HRP 标记的抗 M13 抗体购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司, Rhodamine 标记的抗人 Fab 购自 Sigma 公司, FITC 标记的抗兔 IgG 标抗体购自 Jackson Immunoresearch 公司, 其他常规试剂均为 Invitrogen 和 Sigma 公司产品, Fc-Met 融合蛋白购自 R&D 公司. 实验中所用引物由 Invitrogen 公司合成.

1.3 细胞株

S114 细胞为稳定表达人 Met 蛋白的 NIH3T3 转化细胞株; MKN45 为过表达 Met 的人脑胶质瘤细胞株. 培养液为 DMEM 加入 10%FBS, 培养条件为 37 °C, 5% CO₂.

1.4 抗 Met Fab 抗体次级库的构建

1.4.1 根据实验室筛选出的全人抗 Met Fab 抗体重链和轻链基因的互补决定区序列和 Kobot 抗体库基因序列数据, 设计并合成数对寡核苷酸引物, 分别在 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L2 和 CDR-L3 引入有限突变和随机突变.

1.4.2 以经过错配 PCR 突变和亲和力初步成熟并筛选出的抗 Met Fab 抗体重链和轻链可变区基因为模板, 通过不同引物的配对组合, VL1/VL3、VL2/VL4 在轻链可变区 CDR-L2、CDR-L3 引进随机突变, VH2/VH6、VH1/VH4 (VH3/VH6)、VH1/VH5 在重链可变区的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 引入有限突变或随机突变, 合成高度多样性的重链可变区基因和轻链可变区基因, 经重叠延伸 PCR, 扩增并拼接合成 VH 和 VL 基因库.

1.4.3 pComb3XTT 重组载体为模板, 扩增重链、轻链恒定区基因. 重链与轻链可变区基因 VH、VL 和 IgG1 的 CH1、CL 为模板, 经重叠延伸 PCR 合成 Fd 和 L 基因, 将 Fd 和 L 基因融合, 经 3 轮

PCR 合成编码 Fab 基因.

1.4.4 Fab 基因和 pComb3XSS 载体分别经 *Sfi* I 酶切、纯化和连接后, 重组质粒用电转化法导入感受态大肠杆菌 XL1-Blue 中.

1.5 抗 Met 特异性内化抗体的筛选

1.5.1 基于活细胞表面受体的抗 Met Fab 抗体的筛选. 以转化并稳定表达 Met 基因的细胞系 S114 为阳性靶分子进行筛选, 以 NIH3T3 细胞作为阴性筛选细胞. 将新鲜制备的、约 10¹¹ 噬菌体抗体首先与 S114 的前体细胞 NIH3T3(Met⁻)相混合并孵育一定时间, 去除抗体库中能够与 NIH3T3 相结合的非特异性抗体. 孵育混合物的上清再与 S114 细胞(Met⁺)共同孵育, 用完全培养液洗涤细胞 10 次. 将细胞重悬于适量的培养液中, 置于细胞培养箱, 37°C 孵育 1 h, 让结合于细胞表面的噬菌体抗体内化. 用甘氨酸缓冲液 (pH 2.8) 洗涤细胞, 去除未内化但仍结合于细胞上的噬菌体抗体. 冻融并超声破碎细胞, 胰酶消化被内化的噬菌体, 感染大肠杆菌 XL1-blue, 进行下一轮的扩增和筛选.

1.5.2 噬菌体抗体的固相筛选. 将经过 NIH3T3/S114 细胞系 5 轮阴性 / 阳性细胞筛选并富集的噬菌体, 进一步用固相抗原筛选. 加入经细胞筛选的噬菌体抗体于 Met 抗原包被的免疫板中孵育, 37°C 1 h. 用不同的洗涤试剂如 PBST 或 NH₄SCN 经过多次不同强度的洗涤, 去除未结合或者亲和力比较弱的噬菌体, 胰酶消化结合在抗原上的噬菌体, 感染大肠杆菌 XL1-blue, 进行下一步分析.

1.6 Fab 的表达与纯化

取 Phage ELISA 值最高的克隆, 构建 TOP10 表达工程菌, 取单菌落过夜培养并经 IPTG 诱导表达. 表达上清与细菌沉淀高渗提取上清混合, 经 FPLC 纯化, 与 Protein L 结合的 Fab 经洗脱和透析处理后, 用于活性分析.

1.7 Fab 的免疫学特性分析

1.7.1 ELISA 分析. 用羊抗人 IgG 2 mg/L 包被酶联板, 4°C 过夜, 次日用封闭液 37°C 封闭 1 h 后洗板, 加入 Fc-Met 融合蛋白 4°C 过夜. 次日用封闭液 37°C 封闭 1 h 后洗板, 加入梯度稀释的 Fab 抗体, 37°C 孵育 1 h 洗板, 加入 1 : 1 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 Fab, 37°C 孵育 1 h 后洗板, 显色, 酶标仪测 A₄₅₀ 吸光度值.

1.7.2 免疫沉淀. 将 S114、MKN45 和 NIH3T3 细胞裂解液经冻融、超声和离心后, 分别取 1 ml 上

清夜加入 10 μg 的 Fab, 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 2 h, 加入洗涤后 rProtein G 50 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育过夜. 样品经 PBST 2 次洗涤后, 加入 50 μl 2 \times SDS-PAGE 电泳上样缓冲液处理, 蛋白质印迹检测.

1.7.3 流式细胞术分析. 用 S114 和 NIH3T3 细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 3% BSA 封闭 15min, 洗涤后加入 Fab, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入 FITC 标记的羊抗人 Fab, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min. 细胞经 PBS 洗涤两次后, 用 FACS Calibur cytometer 检测, CellQuest 分析软件分析 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

1.7.4 免疫荧光双染检测. 将 MKN45 和 NIH3T3 2 种细胞同时培养于同一细胞室中, 固定后用封闭液室温封闭 30 min, 同时加入 Fab 和兔抗人 Met 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h. 加入 Rhodamine 标记的抗人 Fab 和 FITC 标记的抗兔 IgG 2 种二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 洗涤后用 DAPI 染色, Leica TCS NT 激光共聚焦显微镜分析.

1.8 亲和力测定

参照文献[9], 用非竞争 ELISA 法测定抗体的亲和力.

1.9 Fab 内化特性分析

为分析 Fab 分子的内化, 用标记肥皂草毒素 (saporin) 的抗人 IgG 的 Hum-ZAP 间接标记 Fab 分子. 肥皂草毒素能够与细胞核糖体亚基结合, 抑制细胞蛋白的合成, 引发细胞的死亡. Hum-ZAP 为连接有肥皂草毒素的抗人 IgG, 能够与人源抗体分子 IgG 或 Fab 特异性结合, 被具有内化特性的抗体分子带入细胞内, 抑制细胞的蛋白质合成. Hum-ZAP 与抗 Met Fab 按比例混合后, 加入培养有 NIH3T3 和 S114 细胞的 96 孔培养板中, MTS/PMS 法检测.

2 结 果

2.1 抗 Met 次级抗体库的构建

Fab 基因合成分 3 步进行(图 1, 2). Fab 抗体基因和 pComb3XSS 载体分别用 *Sfi* I 酶切, 经胶回收并定量后, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 多次电转入感受态大肠杆菌 XL1-blue, 获得了库容为 8.96×10^8 全人抗 Met Fab 抗体库. 随机挑取转化克隆, 提取重组质粒. DNA 测序结果表明, 在 18 个 VH 和 16 个 VL 克隆中, 序列正确的克隆分别为 15 个和 13 个, 其正确率分别为 84.2% 和 83.3%.

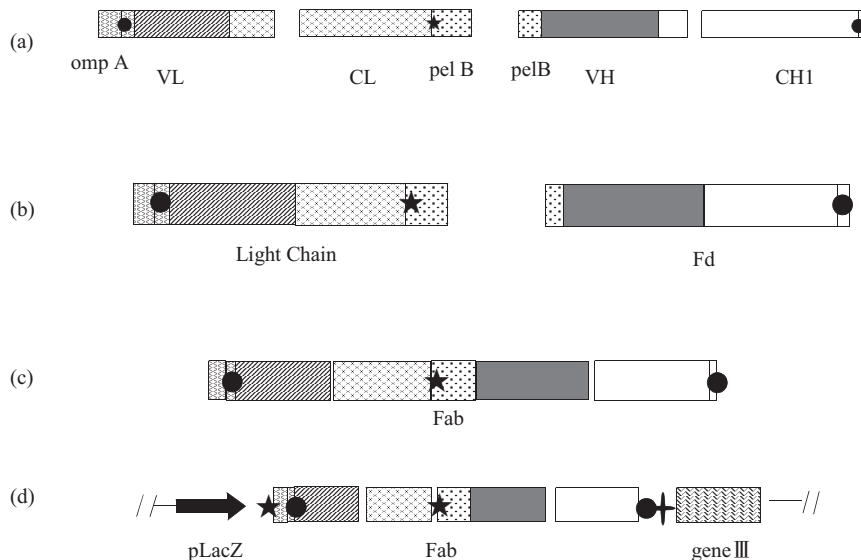


Fig. 1 Schematic outline of the approach used for Fab library construction

Light-chain and heavy-chain Fd fragment-encoding DNA sequences were amplified independently, fused by overlap-extension PCR, and cloned directionally by using two asymmetric sites of the rare cutter *Sfi* I. Fab was transcribed as a single dicistronic transcript under the control of one LacZ promoter. The amber stop codon (cross) between the antibody genes and bacteriophage gene III enables the production of soluble Fab fragments in a non-suppressor strain of *E. coli*. (a) The genes for the variable and constant regions were amplified separately. (b) Heavy-chain Fd and light chain DNAs were assembled by variable regions and their constant counterpart respectively using overlap PCR. (c) Fd and light chain were fused to form Fab-encoding sequences by overlap PCR. (d) Fab genes were directionally cloned into pComb3XSS phagemid by making use of the *Sfi* I site.

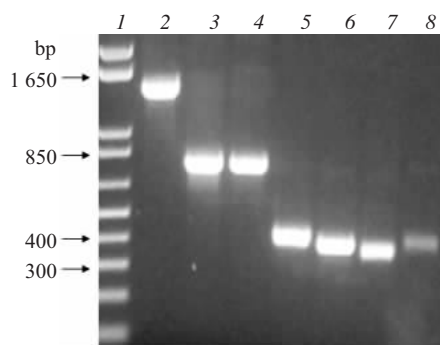


Fig. 2 Three rounds of PCR for Fab repertoire cloning

1: DNA ladder (bps); 2: Fab; 3: Fd fragment of heavy chain; 4: Light chain; 5: Constant region of light chain; 6: Constant region of heavy chain; 7: Variable region of light chain; 8: Variable region of heavy chain.

2.2 阳性噬菌体抗体克隆的筛选

经过 5 次 NIH3T3/S114 细胞筛选和 2 次固相筛选的噬菌体, 感染大肠杆菌 XL1-Blue, 随机挑取 80 个克隆, 以 phage ELISA 进行鉴定, 其中 66 个为阳性克隆, 阳性率为 82.5%. 选取 Phage ELISA 检测结果较高的阳性克隆, 过夜培养后提取质粒并测序. DNA 序列分析结果表明, 在 10 个正确序列中, 有 2 种不同的序列, 分别为 F1 和 F2. F1 为 8 个, F2 为 2 个. 重复 Phage ELISA 结果表明, F1 的 A_{450} 值最高且较稳定, 提示 F1 可能是亲和力较高的克隆.

2.3 抗 Met Fab 抗体的表达及纯化

Fab 诱导表达结果显示, 温度对 Fab 分泌性表达影响较大, 在 37°C 条件下, 培养上清未见 Fab 蛋白, 在 25°C 和 20°C 时, 上清中出现 Fab, 表达量较低. 在诱导表达前的培养液中加入 2% 葡萄糖抑制基础表达, 以新鲜培养液重悬细菌, 加入

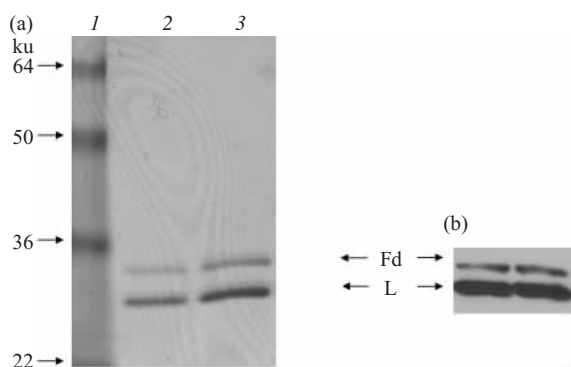


Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified Fab

(a) Fab coomassie blue staining, 1: Standard molecule mass marker, 2,3: Fab; (b) Western blot of Fab.

IPTG 在 25°C 条件下诱导表达, 明显提高 Fab 的分泌性表达量 (图 3).

2.4 抗 Met Fab 抗体免疫学特性分析

Fab ELISA 检测分析表明, 当 Fab 稀释滴度从 40 增加到 2 560 倍时, A_{450} Corr 值从 0.782 降低到 0.112 (Blank 0.078); 免疫沉淀结果显示, Fab 能够结合 S114 和 MKN45 细胞中的 Met 前体蛋白 (170 ku) 和 Met 功能蛋白 (140 ku) (图 4).

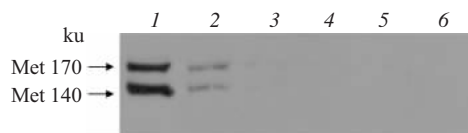


Fig. 4 Immunoprecipitation and Western blot analysis of Fab

Met protein from cell extracts was immunoprecipitated with Fab and detected by Western blot analysis. 1, 2, 4: MKN45, S114 and NIH3T3 cell lysate immunoprecipitated with Fab; 3: S114 lysate only; 5, 6: MKN45 and S114 cell lysate immunoprecipitated without Fab.

FACS 分析结果显示, 该 Fab 抗体能够与大量表达 Met 基因的 S114 细胞特异性结合, 与阴性对照细胞 NIH3T3 细胞没有明显的结合 (图 5).

荧光双染结果表明, Fab 抗体与阳性细胞 MKN45 的结合信号, 与抗 Met 的多克隆抗体信号重叠, 而阴性对照细胞 NIH3T3 基本没有信号 (图 6), 显示 Fab 抗体是特异性结合于细胞表面的 HGF 受体 Met 蛋白.

以上研究结果表明, Fab 分子具有与 Met 胞外区的天然构象结合的能力和特异性, 其亲和常数 K_d 为 4.763×10^{-8} mol/L, 与突变前抗体的亲和力 K_d 值 5.24×10^{-6} mol/L 相比, 提高约 90 倍.

2.5 抗 Met Fab 抗体内化特性分析

MTS/PMS 检测结果显示, 100 ng Fab/100 ng Hum-ZAP 能够有效抑制细胞的生长. 当加入的药物量增加时, 细胞生长抑制率也明显增高. 当加入的 Fab/Hum-ZAP 量从 100 ng 增加到 800 ng 时, 孵育 96 h 后, 细胞生长抑制率从 25.99% 提高到 73.38%, 而仅加入抗体或毒素的 S114 细胞和加入两者混合物的 NIH3T3 细胞的生长未受明显影响 (图 7). 该结果提示, Fab 分子能够与 S114 细胞表面的 Met 特异性结合, 并且形成的抗原-抗体复合物能够被转入细胞内. 因此该 Fab 分子可用于偶联抗肿瘤的毒素、化学药物或放射性物质, 作为肿瘤生物治疗的候选分子.

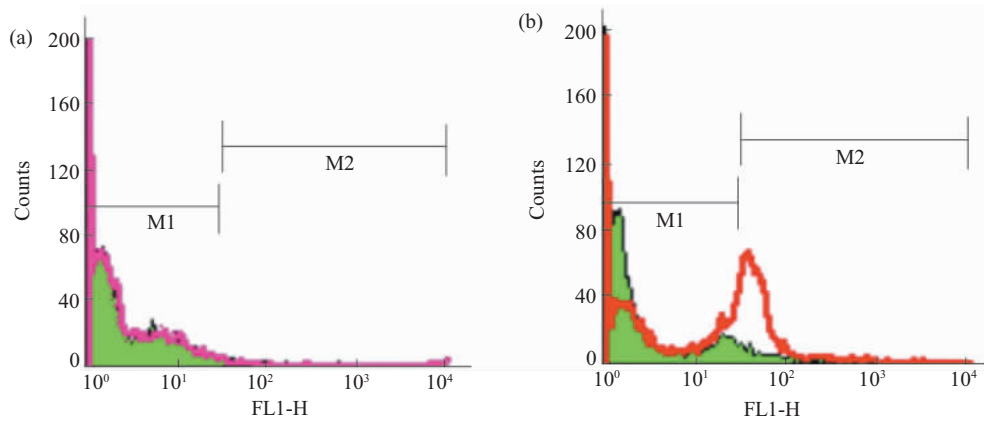


Fig. 5 The binding ability of Fab was tested by FACS analysis

(a) NIH3T3 cells were incubated with Fab and FITC-conjugated anti-human Fab antibody (red line), or without Fab (green line); (b) S114 cells were incubated with Fab and FITC-conjugated anti-human Fab antibody (red line), or without Fab (green line).

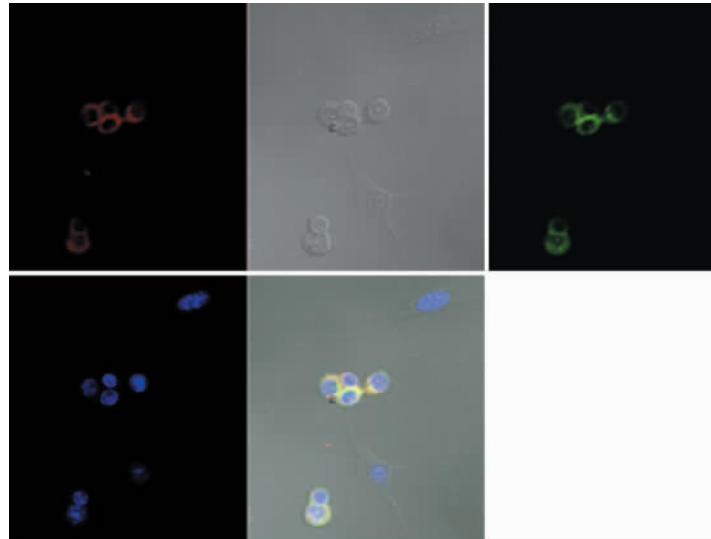


Fig. 6 Co-localization detection of MKN45 and NIH3T3 cells staining with Fab and rabbit anti-Met antibody, and Rhodamin-conjugated anti-Fab antibody and FITC-conjugated anti-rabbit antibody

MKN45 and NIH3T3 cells were cultured in the same chamber.

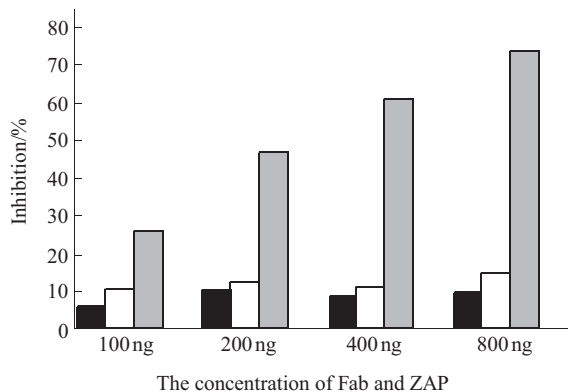


Fig. 7 Inhibition ratio on S114 cell of varying concentration Fab and Hun-ZAP in 96 h

■: Fab; □: ZAP; ▒: Fab+ZAP.

3 讨 论

HGF受体 (Met) 家族以异二聚体的形式存在, 包括一个 50 ku 的 α 亚基和一个 145 ku 的 β 亚基. α 、 β 二个亚基以二硫键相连, α 亚基位于胞外, β 亚基由胞外区、跨膜区和胞内区 3 部分组成, 胞内区具有酪氨酸激酶活性. Met 的配体为肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF), 又名分散因子 (scatter factor, SF). Met 与 HGF/SF 在胃癌、肝癌、肺癌、甲状腺癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌和脑胶质瘤等多种肿瘤中过表达^[10~12], 因此 Met 已成为肿瘤生物治疗的靶标, 人源抗 Met 基因

工程抗体成为较好的“导弹”。

本实验室从天然抗体库中筛选出抗 Met Fab 分子,但其亲和力较低,需进行亲和力成熟,而抗体库的筛选是抗体亲和力成熟的重要步骤.抗体库的筛选策略直接影响筛选的结果.目前,有固相筛选、液相筛选和活细胞筛选等方法,不同的方法各有优缺点,需要结合实验目标进行选择和优化组合.在本研究中,首先选用 Met 过表达细胞 S114 和阴性细胞 NIH3T3 进行 5 轮消减筛选,再用 Met 包被的免疫板筛选 2 轮.细胞筛选的优势是,细胞表面膜蛋白多经过翻译后修饰,具有特定的空间构象,筛选出的抗体能够高效、特异地结合靶标,可以直接用于体外或体内的研究.固相筛选可以提高筛选的特异性和筛选效率^[13].实验结果表明,利用该方法获得的随机克隆的阳性率为 82.5%.

在抗体筛选过程中,洗涤的严谨性和洗涤强度对实验结果同样有着明显影响.洗涤强度过弱,出现较高的假阳性,超过 85%的克隆含空载体或截短的抗体基因片段.因为噬菌粒较小的噬菌体,包装速度相对要快,外源蛋白的毒性也影响着噬菌体的增殖.在宽松的洗脱条件下,经过几轮扩增,这些非特异的噬菌体会迅速增加^[14,15].

在抗体免疫学特性分析中,采用酶联免疫、免疫沉淀、流式细胞术、细胞双染等方法,从多个方面验证该抗体的特异性.在 ELISA 检测中,采用真核表达的 Met 抗原包板,使筛选和鉴定抗原尽可能与细胞表面的抗原结构相一致,细胞筛选和固相筛选相结合,提高了筛选的效率.在 IP 和 FACS 中,用 S114 细胞(Met 转化的 NIH3T3 细胞)和 NIH3T3 细胞作对照研究,提高了实验结果的准确性,用两种荧光染料和抗 Met 特异性单抗 scFv,同时检测培养在同一培养室中的 MKN45 和 NIH3T3,保证了实验结果的可靠性.

基因工程抗体具有免疫原性弱,组织穿透能力强,便于大规模生产等优点,但抗体的亲和力仍然是人源基因工程抗体临床应用的瓶颈.已有的文献表明,大量的研究工作致力于高亲和力抗体的筛选.Weinstein 等的研究认为,过高的亲和力抗体导致位阻效应的产生,影响抗体的穿透力,尤其是针对实体瘤的抗体.抗体的亲和常数达到 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 具有较好的临床应用价值^[16,17].在本研究中,抗体的亲和力从 K_d 值 5.24×10^{-6} mol/L,增加到 4.763×10^{-8} mol/L,提高约 90 倍,同时保持与 Met 胞外区

结构域的结合特异性,通过与特定抗肿瘤药物偶连,可强化临床治疗效果^[18],从而为肿瘤的临床治疗提供候选药物.

参 考 文 献

- 1 Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, *et al.* Protein kinase as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther*, 2002, **93** (2~3): 79~98
- 2 Shawver L K, Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer cell*, 2002, **1** (2): 117~123
- 3 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, 2001, **7** (10): 2958~2970
- 4 Matsumoto K, Nakamura T. NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci*, 2003, **94** (4): 321~327
- 5 Cao B, Su Y L, Oskarsson M, *et al.* Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (13): 7443~7448
- 6 Borowiak M. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (29): 10608~10613
- 7 Popkov M, Jendreyko N, McGavern D B, *et al.* Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody. *Cancer Res*, 2005, **65** (3): 972~981
- 8 Rothlisberger D, Honegger A, Pluchthun A. Domain interaction in the fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol*, 2005, **347**(4): 773~789
- 9 Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*, 1987, **100** (1): 173~179
- 10 Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, *et al.* Essential role for the c-Met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, 1995, **373** (6543): 768~771
- 11 Shinomiya N, Vande Woude G F. Suppression of Met expression: a possible cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 2003, **9**(14): 5085~5090
- 12 Zhang Y W, Vande Woude G F. HGF/SF-Met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem*, 2003, **88** (2): 408~417
- 13 Souriau C, Rothacker J, Henner R, *et al.* Human antibody fragments specific for epidermal growth factor receptor selected from large non-immunised phage display libraries. *Growth Factor*, 2004, **22** (3): 185~194
- 14 Leclerc E, Liemann S, Wildegger G, *et al.* Selection and characterization of single chain Fv fragments against murine recombinant prion protein from a synthetic human antibody phage display library. *Hum Antibodies*, 2000, **9** (4): 207~214
- 15 Weiner L M, Carter P. Tunable antibodies. *Nature Biotech*, 2005, **23** (5): 556~557

- 16 Osdol W, Fujimori K, Weinstein J N. An analysis of monoclonal antibody distribution in microscopic tumor nodules: consequences of a "binding site barrier". *Cancer Res*, 1991, **51**(18): 4776~4784
- 17 Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 2001, **1** (2): 118~129
- 18 Gura T. Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target. *Nature*, 2002, **417** (6889): 584~586

Affinity Maturation and Characterization of Internalized Human Anti-Met Recombinant Antibody Fab

ZHU Jin^{1,3}, ZHAO Ping^{1,2}, JIAO Yong-Jun¹, WANG Xin¹,
CAO Bo-Liang^{1,2}*, FENG Zhen-Qing¹, GUAN Xiao-Hong¹*

¹Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

²Van Andel Research Institute, Antibody Laboratory, MI 49503, USA;

³Huadong Medical Institute of Biotechniques Nanjing 210002, China)

Abstract High affinity, fully human antibody fragment Fab that specifically bind to HGF receptor, Met (a proto-oncogene product and a key molecule on tumorigenesis, invasion and metastasis), was selected from phage display antibody library. To construct antibody library, the Fab gene fragment was constructed in 3 steps. The variable region genes were amplified from VH and VL of anti-Met Fab selected from error-prone PCR mutation library. Fab gene was assembled by overlap PCR and purified and digested with *Sfi* I, and inserted into pComb3XSS. Positive phage-displayed antibody clones were selected on live cell lines and immobilized protein. The purified Fab was verified by SDS-PAGE and Western blot, which showed two bands at about 25 ku and 27 ku at the expected sizes. To analyze the immunological characters of Fab for Met binding, flow cytometry and immunoprecipitation assays were set up and carried out with S114, MKN45 and NIH3T3 cell lines. The results demonstrated Fab could bind native Met specifically on the S114 and MKN45 cell surface. *In vitro* cytotoxic assay showed that only Hum-ZAP/anti-Met Fab complex could inhibit the Met positive cell growth, it illuminated that anti-Met Fab bound the Met on Met positive cell surface and were internalized. For Met negative cell line NIH3T3, no significant inhibition among the different dosages of Fab and Hum-ZAP. The results showed that anti-Met Fab antibody fragments could recognize Met extracellular domain in native conformation with relatively high affinity. Importantly, these antibody fragments were able to be internalized into Met over-expressed tumor cell lines through binding to the Met receptor, and could be applied as a potential powerful reagents for clinical therapy.

Key words hepatocyte growth factor receptor (Met), phage-displayed antibody library, affinity maturation, internalized antibody

*Corresponding author. Tel: 86-25-86663100, E-mail: zjsimmons@yahoo.com.cn

Received: May 31, 2006 Accepted: September 30, 2006