

人源抗滋养层细胞表面抗原-2 基因工程抗体 Fab 的制备及特性分析*

林 红¹⁾ 梁 洁¹⁾ 张慧林¹⁾ 唐 奇¹⁾ 苏亦平¹⁾ Brian Cao³⁾ 朱 进^{2)**} 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⁾ 南京军区军事医学研究所, 南京 210002;

³⁾ Van Andel Research Institute, Antibody Lab, MI 49503, USA)

摘要 应用噬菌体抗体库技术制备全人源抗滋养层细胞表面抗原-2(Trop-2)特异性 Fab 抗体片段。抗体库经细胞筛选和固相抗原筛选, 获得特异性的阳性克隆。阳性载体经核酸序列分析后, 构建工程菌, 经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 呈现 28 ku 和 32 ku 大小的两条蛋白质条带。Fab 分子经流式细胞术、细胞免疫荧光检测, 结果表明, Fab 能够与 BxPc3 细胞膜蛋白特异性结合, 而与 NIH3T3 细胞不结合。免疫共沉淀与质谱分析结果表明, 该 Fab 分子能够与 Trop-2 蛋白特异性结合。免疫组化显示, 该抗体可结合胰腺癌细胞膜蛋白, 在细胞培养液中加入 Fab, 能够抑制 BxPc3 细胞的生长。以上研究结果提示, 该抗体有望成为胰腺癌临床影像诊断或治疗的候选分子。

关键词 噬菌体抗体库, 胰腺癌, 人源抗 Trop-2 抗体

学科分类号 Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00211

胰腺癌是一种极其凶险的恶性肿瘤, 其发病率及死亡率在全世界范围内均呈明显的上升趋势, 2008 年, 胰腺癌分别占男性和女性癌症死因的第 4 和第 5 位, 其发病率和死亡率几乎相等。胰腺癌的诊治是世界级的医学难题, 恶性程度高、进展快、侵袭性强、转移早、预后极差、症状隐匿、难以早期诊断, 其容易发生浸润转移的生物学行为和胰腺的解剖学特点决定了外科手术难以达到根治性切除。随着手术方式的改进及放疗、化疗等综合措施的引进, 并发症和死亡率有所降低, 但 5 年生存率仍不到 5%^[1-2]。胰腺癌作为一种对现有治疗手段无满意疗效的高度恶性肿瘤, 寻找针对胰腺癌治疗新靶标的临床靶向药物是目前临床研究的热点。

文献报道针对钾离子通道的单克隆抗体对负荷有胰腺癌细胞 BxPc3 小鼠体内肿瘤的生长具有抑制作用, 其机制可能是影响钾离子通道在细胞生长中的重要转运作用^[3-4]。该研究表明, 选择性应用单克隆抗体阻滞细胞膜上离子通道可能为肿瘤免疫治疗提供一个全新的方向^[5-7]。人滋养层细胞表面抗原 2(trophoblast cell-surface antigens 2, Trop-2)是一种单次跨膜表面糖蛋白, 为细胞膜钙离子通道相关

蛋白, 与细胞内钙离子浓度的调控有关。同时, Trop-2 与细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)和磷酸激酶 C (PKC)有关, 具有调节肿瘤细胞的生长、促进肿瘤细胞的侵袭和转移的作用^[8-9]。因此, Trop-2 可成为肿瘤临床治疗的潜在分子靶点。

本研究以 Trop-2 抗原为靶向分子, 以噬菌体抗体库技术为平台, 通过肿瘤细胞筛选与固相抗原筛选相结合的方法, 制备特异性的抗 Trop-2 全人源基因工程抗体, 并对其特性进行了初步分析。该抗体的筛选为研制抗胰腺癌临床治疗靶向药物和肿瘤影像诊断试剂提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 菌株和细胞株

全人源噬菌体 Fab 抗体库由南京医科大学卫生

* 南京市医学科技发展重点项目(ZKX09015)和南京市科技发展项目(200901083)资助。

** 通讯联系人。Tel: 025-86863100

朱 进。E-mail: zjsimmons@yahoo.com.cn

管晓虹。E-mail: xhguan@163.com

收稿日期: 2010-04-18, 接受日期: 2010-05-17

部抗体技术重点实验室构建并保存; *E. coli*. XL1-Blue 购自 Invitrogen 公司; *E. coli*. TOP10 F' 为 Stratagene 公司产品; BxPc3 细胞和 NIH3T3 细胞均为南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室保存; BxPc-3 细胞为表达 Trop-2 蛋白的人胰腺癌细胞株; NIH3T3 为不表达 Trop-2 的小鼠成纤维上皮细胞株; 细胞培养液为 DMEM 加入 10% FBS, 培养条件为 37℃、5% CO₂.

1.2 抗原、工具酶和酶标抗体

Trop-2 蛋白为 R&D 公司产品; HRP 标记的抗 M13 抗体购自 GE 公司; HRP 标记的羊抗人 Fab 抗体、Rhodamine 标记的抗人 Fab、FITC 标记的抗人 Fab 和 FITC 标记的抗羊 IgG 抗体购自 Jackson Immunoresearch 公司; 羊抗人 Trop-2 抗体购自 R&D 公司; 其他常规试剂均为 Invitrogen 和 Sigma 公司产品.

1.3 抗 Trop-2 抗体 Fab 的筛选

1.3.1 利用细胞表面抗原筛选抗 Trop-2 的克隆. 以稳定表达 Trop-2 的 BxPc3 细胞为靶标筛选抗体库, 以 NIH3T3 细胞作为阴性筛选细胞. 将新鲜制备的、约 1×10^{11} 噬菌体抗体库首先与 NIH3T3 细胞 (Trop-2⁻) 相混合并孵育一定时间, 以去除抗体库中能够与 NIH3T3 相结合的非特异性抗体. 孵育的上清再与 BxPc3 细胞 (Trop-2⁺) 共孵育, 用完全培养液洗涤细胞 10 次. 用甘氨酸缓冲液 (pH2.8) 洗脱结合细胞的噬菌体, 中和后感染大肠杆菌 XL1-blue, 进行下一轮的扩增和筛选.

1.3.2 真核表达的 Trop-2 蛋白筛选噬菌体抗体. 将经过 NIH3T3/BxPc-3 细胞 5 轮细胞筛选并富集的噬菌体次级抗体库, 用固相包被的 Trop-2 抗原筛选. 加入经细胞筛选的次级噬菌体抗体库于 Trop-2 抗原包被的免疫板中孵育, 37℃ 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.

1.4 phage ELISA 检测

以 2 轮抗原筛选后的单克隆噬菌体为一抗、HRP 标记的抗 M13 抗体为二抗, ELISA 方法筛选能够与 Trop-2 蛋白结合的特异性噬菌体克隆. 选取 $P/N > 5$ 的克隆, 测序分析阳性克隆的核酸序列.

1.5 Fab 的表达、纯化及 SDS-PAGE 分析

核酸序列正确的克隆转化 *E. coli*. TOP10, 构建 Fab 表达的工程菌. 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 rProtein L 结合的 Fab 分子, 经洗脱和透析处理后, SDS-PAGE 和 Western blot 分析后, 用于 Fab 的免疫学特性分析.

1.6 Fab 的特性分析

1.6.1 ELISA 分析. 用重组人 Trop-2 蛋白 0.2 mg/L 包被酶联板, 4℃ 过夜, 次日封闭液 37℃ 封闭 2 h 后洗板, 加入梯度稀释的 Fab 抗体, 37℃ 孵育 1 h 洗板, 加入 1:1 000 稀释 HRP 标记的羊抗人 Fab, 37℃ 孵育 1 h 后洗板, 显色, 酶标仪测吸光度值 (A_{450}).

1.6.2 流式细胞术分析. 用 3% BSA 封闭 BxPc3 细胞和 NIH3T3 细胞 30 min, 洗涤后加入抗 Trop-2 的 Fab, 4℃ 孵育 30 min, 加入 FITC 标记的羊抗人 Fab 4℃ 孵育 30 min. 细胞经 PBS 洗涤 2 次后, 用 FACS Calibur cytometer 检测, CellQuest 分析软件分析 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

1.6.3 免疫荧光检测. 将 BxPc3 细胞和 NIH3T3 细胞培养于细胞培养室中, 固定后用封闭液室温封闭 30 min, 同时加入人源抗 Trop-2 基因工程 Fab 抗体和鼠源抗人 Trop-2 抗体, 37℃ 孵育 1 h. 加入 Rhodamine 标记的抗人 Fab 抗体和 FITC 标记的抗鼠 IgG 抗体为二抗, 37℃ 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.

1.7 免疫沉淀与质谱分析

将 BxPc3 细胞裂解液经冻融、超声和离心后, 分别取 1 ml 上清液加入 10 μg 的抗 Trop-2 Fab, 4℃ 旋转孵育 2 h, 加入洗涤后免疫磁珠 rProtein G 50 μl, 4℃ 旋转孵育过夜. 样品经 PBST 2 次洗涤后, 加入 50 μl 2× SDS-PAGE 电泳上样缓冲液处理, 电泳后考马斯亮蓝染色, 取蛋白质条带进行质谱分析, 采用 SWISS-PROT 数据库和 MASCOT 查询软件分析结果.

1.8 Fab 亲和力测定

将商品化的重组人 Trop-2 蛋白以 5 mg/L 的浓度固定在 Biacore T100 的 CM5 芯片上, 将浓度梯度为 31.25 至 1 000 nmol/L 纯化的抗体注入芯片, 在恒温 25℃ 进行, 用 HBS-EP 缓冲液, 流速为 30 μl/min. 抗体结合时间为 180 s, 解离时间为 10 min. 用 10 mmol/L Glycine-HCl 溶液进行再生, 最后用 Biacore T100 分析抗体亲和力.

1.9 胰腺癌组织的免疫组化检测

以抗 Trop-2 Fab 为一抗检测临床胰腺癌组织, 常规免疫组化检测. 结果判断: 免疫组化单染阳性

反应为棕黄色, 对免疫标记物的表达以在细胞相应部位(胞膜、胞质、胞核)出现棕黄色反应为阳性, 观察切片中部分无反应为阴性。

1.10 抗 Trop-2 抗体的胰腺癌细胞生长的抑制作用

以 DMEM 培养液稀释抗 Trop-2 Fab 抗体, 配制 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 和 400 mg/L 不同浓度的抗体, 分别加入培养有 BxPc3 细胞和 NIH3T3 细胞的 96 孔培养板中, 培养 5 天后, MTS/PMS 法检测。

2 结 果

2.1 阳性噬菌体抗体克隆的筛选

经过 5 轮 BxPc3/ NIH3T3 细胞筛选和 2 轮 Trop-2 抗原的固相筛选, 随机挑取 60 个克隆制备噬菌体, 以 phage ELISA 进行鉴定, 其中 49 个为阳性克隆, 阳性率为 81.7%。选取 Phage ELISA 检测结果较高的 8 个阳性克隆, 过夜培养后提取质粒并测序。DNA 序列分析结果表明, 在 8 个正确序列中, 仅有 1 种单一的核酸序列 TP1。重复 Phage ELISA 结果表明, TP1 的 A_{450} 值最高且较稳定, 提示该克隆可能是亲和力较高的克隆。

2.2 抗 Trop-2 Fab 抗体的表达及纯化

Fab 诱导表达后的检测结果显示, 温度对 Fab 分泌性表达影响较大, 在 37℃ 条件下, 培养上清未见 Fab 蛋白, 在 30℃ 和 25℃ 时, 上清中出现 Fab, 但表达量较低。在诱导表达前的培养液中加入 2% 葡萄糖抑制基础表达, 以新培养液重悬细菌, 加入 IPTG 在 30℃ 条件下诱导表达, 明显提高 Fab 的分泌性表达量, 呈现 28 ku 和 32 ku 大小的 2 条蛋白质条带(图 1)。

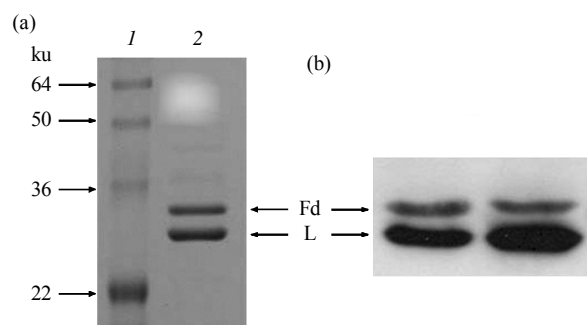


Fig. 1 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified Fab

(a) Fab coomassie staining. 1: Standard molecular mass marker; 2: Fab.
(b) Western blot of Fab.

2.3 抗 Trop-2 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 100 增加到 6 400 倍时, A_{450} Corr 值从 1.384 降低到 0.305 (Blank 0.132), 该 Fab 抗体的亲和力为 6.27×10^{-8} mol/L; FACS 检测结果显示, Fab 能够与 Trop-2 阳性细胞 BxPc3 特异性结合, 但不结合未表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞(图 2)。

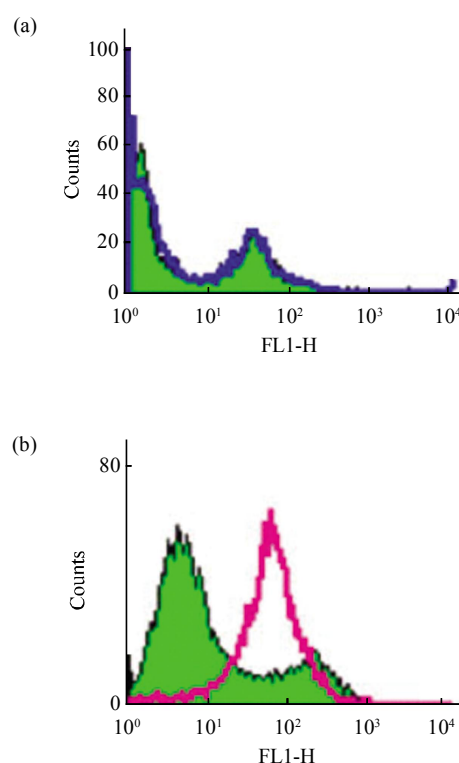


Fig. 2 The binding ability of Fab was tested by FACS analysis

(a) NIH3T3 cells were incubated with Fab and FITC-conjugated anti-human Fab antibody (blue line), or without Fab (green line). (b) BxPc3 cells were incubated with Fab and FITC-conjugated anti-human Fab antibody (red line), or without Fab (green line).

荧光染色结果表明, 抗 Trop-2 抗体 Fab 能够与阳性细胞 BxPc3 结合(红色), 阳性信号主要显示在细胞膜上, 该信号与鼠源抗 Trop-2 的商业化抗体信号(绿色)重叠(图 3), 而阴性对照细胞 NIH3T3 基本没有信号。结果表明抗 Trop-2 的 Fab 抗体能够特异性结合于 BxPc3 细胞表面的天然构象 Trop-2 蛋白。

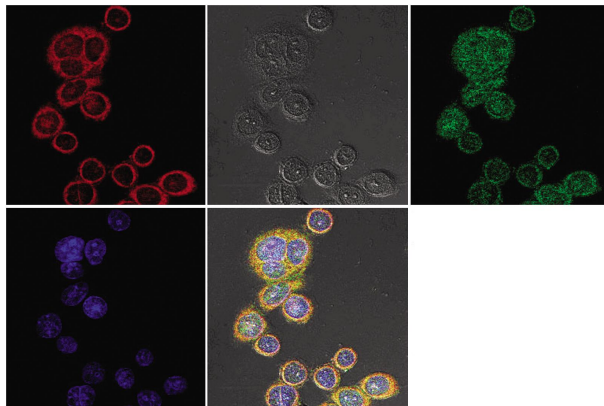


Fig. 3 Co-localization detection of BxPc3 cells staining with Fab and goat anti-Trop-2 antibody, and Rhodamin-conjugated anti-Fab antibody and FITC-conjugated anti-goat antibody

抗 Trop-2 Fab 抗体与 BxPc3 细胞裂解蛋白免疫共沉淀后, 将 SDS-PAGE 检测的蛋白质条带经质谱分析(图 4)后, 采用 SWISS-PROT 数据库和 MASCOT 查询软件分析, 结果显示该 Fab 结合的蛋白为 Trop-2(图 5).

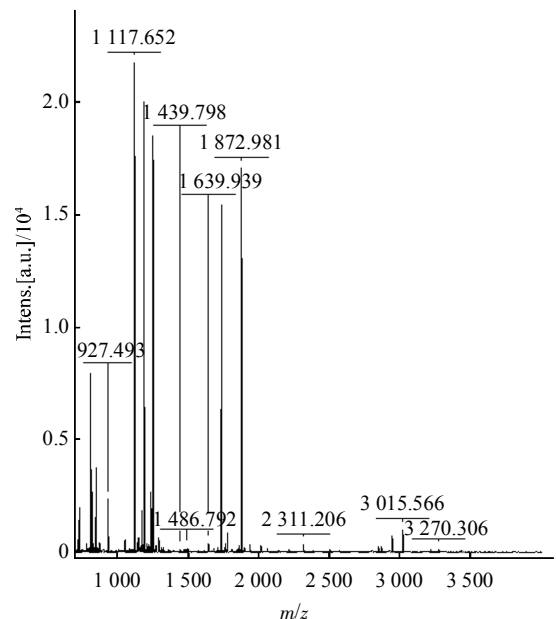


Fig. 4 Peptide mapping fingerprint of anti-Trop-2 binding protein

Top Score: 100 for gi166795236, tumor-associated calcium signal transducer 2 precursor [Homo sapiens]. Protein scores greater than 66 are significant ($P < 0.05$).

```

1 MARGPLAPP PLRLPLLLL LAAVTGHTAA QDNCTCPTNK MTVCSPDGPG
51 GRCQCRALGS GMAVDCSTLT SKCLLLKARM SAPKNARTLV RPSEHALVDN
101 DGLYDPDCDP EGRFKARQCNQTSVCWCVNS VGVRRTDKGD LSLRCDELVR
151 THHILIDLRH RPTAGAFNHS DLDAELRRLF RERYRLHPKF VAAVHYEQPT
201 IQIELRQNTS QKAAGDVDIG DAAYYFERDI KGESLFQGRG GLDLRVRGEP
251 LQVERTLIYY LDEIPPKFSM KRLTAGLIAV IVVVVVALVA GMAVLVITNR
301 RKSGKYKKVE IKELGELRKE PSL
  
```

Fig. 5 Sequence blast of anti-Trop-2 binding protein

Matched peptides shown in Bold Red.

2.4 免疫组化检测

免疫组化检测结果显示, Fab 能够与胰腺癌细胞结合, 阳性信号主要分布于胰腺癌的细胞膜上, 胞质中表达较弱(图 6). 癌旁组织和高分化的胰腺癌组织中表达率较高, 而低分化的胰腺癌组织表达率则较低.

2.5 细胞生长抑制分析

MTS/PMS 检测结果显示, 抗 Trop-2 抗体 Fab 与 BxPc3 细胞共同培养, 抗体对细胞生长具有一定的抑制作用. 当培养液中的抗体剂量增加时, 细

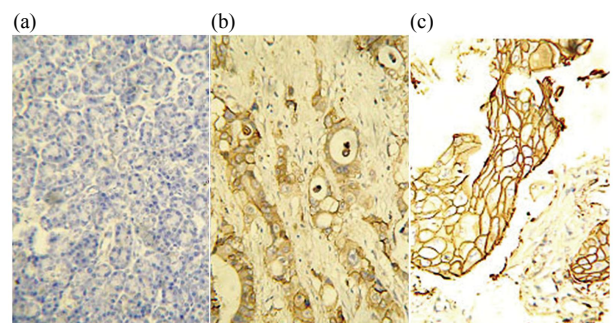


Fig. 6 Immunohistochemistry of pancreas and pancreatic carcinoma tissue

(a) Pancreas tissue. (b, c) Pancreatic carcinoma tissue.

胞生长抑制率也明显增高. 当 Fab 为 400 mg/L 时, 细胞生长的抑制率达 30% 以上, 而随着 Fab 抗体浓度的增加, 抗体对未表达 Trop-2 的 NIH3T3 细胞增殖的抑制未见显著的变化(图 7).

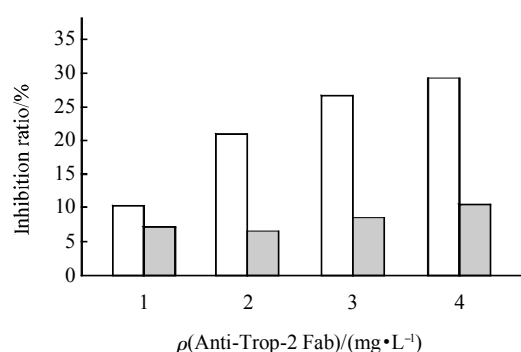


Fig. 7 Inhibition ratio on BxPc3 cell of varying concentration of Fab

□: BxPc3; ■: NIH3T3.

3 讨 论

人滋养层细胞表面抗原-2 由 323 个氨基酸构成, 其中信号肽 26 个氨基酸, 胞外区 248 个氨基酸, 跨膜区 23 个氨基酸, 胞质区 26 个氨基酸, 分子质量大约为 35 ku, 由 Tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2) 基因编码. 意大利 Chieti 大学的科学家对多种肿瘤的分析结果显示, Trop-2 在 65%~90% 肿瘤中都有大量表达, 其中包括乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌和胰腺癌等, 但正常人体组织中仅在滋养层等少部分上皮组织表达, 它在肿瘤的发生中扮演着不容忽视的角色^[10-13]. 该研究小组制备的鼠源抗 Trop-2 单克隆抗体 AR002, 能够明显抑制前列腺癌细胞的生长和提高移植瘤小鼠的生存率.

本课题组在前期的胰腺癌临床免疫组化研究中发现, 胰腺癌肿瘤组织中 Trop-2 的阳性率高达 71%, 它主要表达于胰腺癌细胞的胞膜, 胞质中表达较弱; 癌旁组织和高分化的胰腺癌组织中表达率较高, 而低分化的胰腺癌组织表达率则较低. 在多个 Trop-2 高表达胰腺癌细胞系中, cyclinD1 同时高表达; 在 Trop-2 的转化细胞细胞系中, MMP-2 的表达量也增加. 针对该靶标, 我们从全人源噬菌体抗体库中筛选出抗 Trop-2 的抗体片段 Fab, 结果表明, 该抗体片段能够特异性结合细胞表面的

Trop-2 分子, 诱导 BxPc3 细胞的凋亡, 明显抑制胰腺癌细胞的生长. 该研究结果提示, 全人源抗 Trop-2 的 Fab 抗体片段具有胰腺癌临床治疗的潜能, 为研制全分子抗 Trop-2 基因工程抗体 IgG 分子和胰腺癌的靶向治疗奠定了基础.

在抗体库的筛选过程中, 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, 选用 Trop-2 过表达细胞 BxPc3 和阴性细胞 NIH3T3 进行 5 轮消减筛选, 再用真核表达的 Trop-2 蛋白包被的免疫板筛选 2 轮. 在细胞筛选中, 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^[14]. 实验结果表明, 利用该方法获得的随机克隆的阳性率为 81.7%. 在抗体筛选过程中, 洗涤条件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^[15].

在抗体免疫学特性分析中, 采用酶联免疫、流式细胞术、荧光染色等方法, 同时结合免疫沉淀与质谱分析等方法, 从多个方面验证该抗体的抗原结合特异性. 在 ELISA 检测中, 采用真核表达的 Trop-2 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. 在免疫共沉淀和流式细胞术检测中, 用 BxPc3 细胞和 NIH3T3 细胞作阴性对照研究, 提高了实验结果的准确性. 用两种荧光染料和商业化抗 Trop-2 抗体同时检测, 保证了实验结果的可靠性.

肿瘤的分子靶向治疗是一种有异于传统手术、放疗、化疗的新的治疗模式, 其优越性在于药物通常仅与相应的靶位结合, 通过直接影响其靶位分子的功能, 或本身带有的物理或化学效应分子来达到杀伤或抑制目标细胞的药效. 由于作用靶位明确, 药物通常具有很高的选择性, 即可以有效地杀伤或抑制靶细胞, 而对正常组织细胞不产生或仅产生较小的毒副作用^[16-17]. 本研究的结果提示, 通过噬菌体抗体库筛选的全人源抗 Trop-2 抗体, 具有较好的抗原结合特异性, 经过进一步的全分子抗体改

建、特异性分析及体内外的实验研究, 该抗体在胰腺癌的临床影像诊断与靶向治疗中将具有较好的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Cascinu S, Berardi R, Labianca R, *et al.* Cetuximab plus gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomised, multicentre, phase II trial. *Lancet Oncol*, 2008, **9**(1): 39–44
- [2] Iacobuzio-Donahue C A, Maitra A, Shen-Ong G L, *et al.* Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol*, 2002, **160**(4): 1239–1249
- [3] Larbouret C, Robert B, Navarro-Teulon I, *et al.* *In vivo* therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(11): 3356–3362
- [4] Gómez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Kntgen H, *et al.* Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res*, 2007, **67**(15): 7343–7349
- [5] Ripani E, Sacchetti A, Corda D, *et al.* Human TROP-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Int J Cancer*, 1998, **76**: 671–676
- [6] Villablanca E J, Renucci A, Sapede D, *et al.* Control of cell migration in the zebrafish lateral line: implication of the gene 'tumour-associated calcium signal transducer,' *tacstd*. *Dev Dyn*, 2006, **235**(3): 1578–1588
- [7] Guerra E, Trerotola M, Arciprete R D, *et al.* A bicistronic cyclin D1-TROP2 mRNA chimera demonstrates a novel oncogenic mechanism in human cancer. *Cancer Res*, 2008, **68**(19): 8113–8121
- [8] Alberti S, Vacca G, Trerotola M, *et al.* Trop-2 is a novel PKC-dependent growth-stimulator trans-membrane molecule and a metastasis marker in human cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 2006, **47**: 2483
- [9] Alberti S, Trerotola M, Vacca G, *et al.* Novel role of TROP2 in breast cancer growth and metastatization. *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I*, 2007, **25**(18S): 10510
- [10] Fong D, Spizzo G, Gostner J M, *et al.* TROP2: A novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Modern Pathology*, 2008, **21**(12): 186–191
- [11] Nakashima K, Shimada H, Ochiai T. Serological identification of TROP2 by recombinant cDNA expression cloning using sera of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 2004, **112**(6): 1029–1035
- [12] Fong D, Moser P, Krammel C, *et al.* High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *British J Cancer*, 2008, **99**(8): 1290–1295
- [13] Varga M, Obrist P, Schneeberger S, *et al.* Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(5): 3131–3136
- [14] Weiner L M, Carter P. Tunable antibodies. *Nature Biotech*, 2005, **23**(5): 556–557
- [15] 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
- [16] Dornh'fer N, Spong S, Bennewith K, *et al.* Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, 2006, **66**(11): 5816–5827
- [17] Kindler H L, Friberg G, Stadler W M, *et al.* Bevacizumab (B) plus gemcitabine (G) in patient (pts) with advanced pancreatic cancer (PC): updated results of a multi-center phase II trial. *J Clin Oncol*, 2004, **22**(14S): 4009

Preparation and Characterization of Human Anti-Trop-2 Engineering Antibody Fab*

LIN Hong¹⁾, LIANG Jie¹⁾, ZHANG Hui-Lin¹⁾, TANG Qi¹⁾, SU Yi-Ping¹⁾,
CAO Brian³⁾, ZHU Jin^{1,2)**}, GUAN Xiao-Hong^{1)**}

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

²⁾ Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002; ³⁾ Van Andel Research Institute, Antibody Lab, MI 49503, USA)

Abstract Fully human antibody fragment Fab that specifically binding to Trop-2 (trophoblast cell-surface antigens 2, Trop-2), was selected from phage display antibody library. 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 28 ku and 32 ku at the expected sizes. To analyze the immunological characters of Fab for Trop-2 binding, flow cytometry, immunoprecipitation assays and mass spectrometry were set up and carried out with BxPc3 and NIH3T3 cell lines. The results demonstrated Fab could bind native Trop-2 specifically on the BxPc3 cell surface. Peptide mapping fingerprint showed that the protein which bound is Trop-2 protein. Immunohistochemistry detection illuminated Fab could bind the membrane protein of pancreatic cancer tissue. *In vitro* cell growth inhibition assay showed that anti-Trop-2 Fab could inhibit the Trop-2 positive cell BxPc3 growth, it illuminated that anti-Trop-2 Fab bound the Trop-2 on Trop-2 positive cell surface. For Trop-2 negative cell line NIH3T3, no significant inhibition among the different dosages of Fab. The results showed that anti-Trop-2 Fab antibody fragments could recognize Trop-2 extracellular domain in native conformation, making them as potential powerful reagents for clinical therapeutic application.

Key words phage-displayed antibody library, pancreatic carcinoma, human anti-Trop-2 antibody fragment Fab

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00211

*This work was supported by grants from Key Projects of Nanjing Medical Technology Development(ZKX09015) and Projects of Nanjing Technology Development(200901083)

**Corresponding author. Tel: 86-25-86863100

Zhu Jin. E-mail: zjsimmons@yahoo.com.cn

Guan Xiao-Hong. E-mail: xhguan@163.com

Received: April 18, 2010 Accepted: May 17, 2010