

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.003

· 基础研究 ·

## 融合 PE38 的抗 CD70 纳米抗体免疫毒素的制备及其对肾透明细胞癌 786-O 细胞的杀伤作用

徐新兰, 刘畅, 张鑫, 胡倩倩, 李江伟(新疆大学 生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830046)

**[摘要]** **目的:** 构建靶向 CD70 分子的重组免疫毒素, 通过表达、纯化制备 PE38 与抗 CD70 纳米抗体重组蛋白, 体外抗肿瘤实验探究重组蛋白是否对高表达 CD70 分子的阳性肿瘤细胞具有杀伤活性。**方法:** 通过基因工程手段, 将 CD70 纳米抗体 Nb 2B3 基因片段通过一个连接子与 pET21a-PE38 基因片段相连, 获得重组表达载体 pET21a-Nb 2B3-PE38 并转入 BL21(DE3) 感受态细胞中进行表达、纯化与鉴定。用间接 ELISA 及 FACS 法检测 Nb 2B3-PE38 与 CD70 分子的结合活性, MTT 法检测 Nb 2B3-PE38 对高表达 CD70 分子的肾透明细胞癌 786-O 细胞的体外杀伤活性, Annexin V-FITC/PI 双染法检测 Nb 2B3-PE38 对 786-O 细胞凋亡的影响。**结果:** 成功构建抗 CD70 纳米抗体重组免疫毒素 Nb 2B3-PE38, 纯化获得纯度 >90% 的重组蛋白, SDS-PAGE 及 WB 检测结果表明目的蛋白正确表达, 分子量为 56 000。纯化后的 Nb 2B3-PE38 能与重组 CD70 抗原及 786-O 细胞表面的 CD70 分子特异性结合; 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Nb 2B3-PE38 即对 786-O 细胞产生极显著的杀伤作用 ( $P < 0.001$ ), 并且促进 786-O 细胞的细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ), 其杀伤效应强于阳性对照顺铂 ( $P < 0.01$ )。**结论:** 成功制备了特异性靶向 CD70 分子的免疫毒素 Nb 2B3-PE38, 其能够有效杀伤 786-O 细胞并诱导细胞凋亡且效果强于顺铂。

**[关键词]** CD70; 铜绿假单胞杆菌外毒素; 纳米抗体; PE38; 重组免疫毒素; 肾透明细胞癌; 786-O 细胞; 细胞毒性; 靶向治疗  
**[中图分类号]** R979.1; R730.54; R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0665-07

## Preparation of anti-CD70 nanobody immunotoxin fused with PE38 and its killing effect on renal clear cell carcinoma 786-O cells

XU Xinlan, LIU Chang, ZHANG Xin, HU Qianqian, LI Jiangwei (Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a recombinant immunotoxin targeting CD70 molecule, prepare PE38 and anti-CD70 nanobody recombinant proteins by expression and purification, and explore whether the recombinant proteins have killing activity on positive tumor cells with high expression of CD70 molecule through *in vitro* anti-tumor experiments. **Methods:** The CD70 nanobody Nb 2B3 gene fragment was ligated with the pET21a-PE38 gene fragment through a linker by genetic engineering, and the recombinant expression vector pET21a-Nb 2B3-PE38 was obtained and transformed into BL21 (DE3) competent cells for expression purification and identification. The binding activity of Nb 2B3-PE38 to CD70 molecule was detected by indirect ELISA and FACS. The *in vitro* killing activity of Nb 2B3-PE38 against renal clear cell carcinoma (786-O) with high expression of CD70 molecule was detected by MTT assay. The effect of Nb 2B3-PE38 on the apoptosis of 786-O cells was identified by Annexin V-FITC/PI double staining. **Results:** The recombinant immunotoxin Nb 2B3-PE38 against CD70 nanobody was successfully constructed, and the recombinant protein with a purity higher than 90% was purified. The results of SDS-PAGE and WB showed that the target protein was correctly expressed and the molecular weight was 56 000. The purified Nb 2B3-PE38 could specifically bind to the recombinant CD70 antigen and the CD70 molecule on the surface of 786-O cells. 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Nb 2B3-PE38 has a highly significant killing effect on 786-O cells ( $P < 0.001$ ), and promotes apoptosis of 786-O cells ( $P < 0.01$ ). Its killing effect was stronger than that of positive control cisplatin ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The immunotoxin Nb 2B3-PE38, which specifically targets CD70 molecules, was successfully prepared. This immunotoxin can effectively kill 786-O cells and induce apoptosis.

**[Key words]** CD70; pseudomonas aeruginosa exotoxin; nanoantibody; PE38; recombinant immunotoxin; renal clear cell carcinoma; 786-O cell; cytotoxicity; targeted therapy

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(8): 665-671. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.003]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 31570935)

**[作者简介]** 徐新兰(1997—), 女, 硕士生, 主要从事纳米抗体及肿瘤靶向治疗的研究, E-mail: 2878800513@qq.com

**[通信作者]** 李江伟, E-mail: jwli67@sina.com

CD70是肿瘤坏死因子受体超家族的一员,是一种II型穿膜糖蛋白。CD70在正常组织中呈低表达或不表达<sup>[1-2]</sup>,但在多种恶性血液肿瘤和实体瘤表面高表达<sup>[3-7]</sup>,因此成为肿瘤靶向治疗的理想靶点。免疫毒素,即通过构建抗体片段与毒素分子[铜绿假单胞杆菌外毒素(pseudomonas exotoxin, PE)、白喉毒素(diphtheriatoxin, DT)等]的重组蛋白,借助抗体的靶向性与毒素分子的细胞毒性发挥靶向抗肿瘤作用,是靶向治疗的方法之一<sup>[8-10]</sup>。PE38是在保证不影响内化后细胞毒性的前提下,将PE中具有结合功能的Ia及大部分Ib区域切除后获得的小分子细胞毒素。利用PE38合成的免疫毒素已进入临床试验并取得较好的效果<sup>[11]</sup>。目前,多利用单克隆抗体或单链抗体作为免疫毒素的靶向“弹头”,但单克隆抗体分子量大、制备成本高,可能存在脱靶效应及单链抗体存在稳定性低、亲和力低等缺点。纳米抗体,也称单域抗体(single-domain antibody, SdAb)或重链可变区单域抗体(variable domain of heavy chain of heavy chain antibody, VHH抗体)<sup>[12-13]</sup>,是一种天然存在于骆驼体内的重链抗体的可变域,具有分子量小、免疫原性低、容易进行基因改造等优点<sup>[14-15]</sup>,故基于纳米抗体的免疫毒素有可能克服上述抗体存在的缺点。本研究拟开发一种基于纳米抗体的特异性靶向CD70分子的免疫毒素,该免疫毒素将抗CD70的纳米抗体作为靶向配体,以失去结合能力的PE38毒素分子作为细胞毒效应因子,探究其对CD70阳性肿瘤细胞的杀伤作用,以期为高表达CD70分子肿瘤的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

DH5a-pET22b-Nb 2B3工程菌种、无关纳米抗体Nb CD16及pET32a空载体对照工程菌种均由本课题组保存,pET21a-Nb 7D12-PE38质粒由苏州金唯智生物科技有限公司合成并保存在DH5a感受态细胞中。抗CD70重组抗原及CD70 mAb购自北京义翘神州公司,抗His鼠单抗、山羊抗小鼠IgG-HRP均购自北京全式金生物技术有限公司,FLy Cut™ BamH I快切酶、FLy Cut™ EcoR I快切酶、FLy Cut™ Xho I快切酶均购自TaKaRa公司,质粒小量提取试剂盒、切胶回收试剂盒及纯化回收试剂盒均购自美国OMG生物公司,PVDF膜购自Minipore公司,WB检测试剂盒(ECL)购自武汉Boster生物工程有限公司,人肾透明细胞腺癌细胞786-O购自北京协和医学院(中国北京)国家细胞资源中心,胎牛血清(FBS)购自四季清生物公司,双抗(青霉素链霉素混合液)购自北京康维世纪生物公司,RPMI 1640基础培养基购自美国Gibco公司。

### 1.2 抗CD70重组免疫毒素Nb 2B3-PE38的构建、表

达及鉴定

CD70纳米抗体Nb 2B3由本团队从骆驼CD70免疫的VHH文库中筛选获得<sup>[16]</sup>。首先通过双酶切的方式分别获得CD70纳米抗体Nb 2B3及pET21a-PE38基因片段,在T4 DNA连接酶的作用下将两个片段通过一个短的KASGG连接子连接,得到pET21a-Nb 2B3-PE38重组载体,经酶切鉴定后将正确构建的重组载体转入BL21(DE3)感受态细胞中进行表达。挑取阳性单克隆并接种到含有100 μg/mL氨苄抗性的LB液体培养基中扩大培养至对数生长期,加入诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导培养8 h,对菌液进行超声处理(超声条件:300 W 9 s,间歇9 s,共25 min),收集包涵体沉淀,通过变复性处理获得重组免疫毒素Nb 2B3-PE38的包涵体蛋白。将PE38基因片段与pET32a空载体连接,得到pET32a-PE38重组载体,转染、诱导表达后以反复冻融方式获得PE38可溶性粗提取蛋白,通过Ni层析柱纯化得到纯度较高的PE38蛋白。用SDS-PAGE及WB对重组蛋白进行鉴定。

### 1.3 ELISA检测重组Nb 2B3-PE38与CD70重组抗原的结合活性

以1 μg/mL的CD70重组抗原包板,4 °C放置过夜,PBST洗板,每孔加入200 μL 5%脱脂奶粉封闭2 h,洗板后加入0.000 03~10 μg/mL范围内梯度稀释的Nb 2B3-PE38反应2 h,同时将1 μg/mL的Nb 2B3作为阳性对照,无关纳米抗体Nb CD16作为阴性对照。洗板后,每孔加入100 μL抗His鼠单抗(1:3 000稀释)反应1 h,洗板,每孔加入100 μL山羊抗鼠IgG-HRP(1:3 000)反应1 h,洗板后加入TMB显色液,避光显色10 min。每孔加入50 μL终止液终止显色,酶标仪检测各孔 $D_{450}$ 值。

### 1.4 FACS检测Nb 2B3-PE38与CD70阳性肿瘤细胞的结合活性

将生长状态良好的786-O细胞用胰酶消化后计数,15 mL离心管中每管收集 $1 \times 10^6$ 个细胞,单细胞悬液与质量浓度10 μg/mL的Nb 2B3及10、25、50 μg/mL Nb 2B3-PE38充分混合后,在冰上放置30 min,然后加入抗His鼠单抗(1:1 000稀释)反应30 min,再加入山羊抗鼠IgG-FITC荧光抗体(1:1 000稀释)避光冰浴45 min,洗涤细胞后加入300 μL PBS重悬细胞,过铜网,使用FACS检测并采集数据。

### 1.5 MTT法检测Nb 2B3-PE38对786-O细胞的毒性

将生长至第三代的786-O细胞用胰酶消化并计数,在96孔板上每孔接种100 μL( $5 \times 10^3$ 个细胞),培养24 h,细胞贴壁后弃去旧培养基。加入质量浓度为10、25及50 μg/mL的Nb 2B3-PE38处理24 h,同时设置相应空白

组、对照组 Nb 2B3 和 PE38 及阳性对照组 (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顺铂), 每组 6 个复孔。培养结束后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  0.5  $\text{mg}/\text{mL}$  的 MTT 溶液, 避光培养 4 h, 弃去上清液并加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 将结晶完全溶解, 测定  $D_{490}$  值。细胞生存率 =  $(D_{490} \text{ 实验组} / D_{490} \text{ 对照组}) \times 100\%$ 。

### 1.6 流式细胞术分析 Nb 2B3-PE38 对 786-O 细胞凋亡的影响

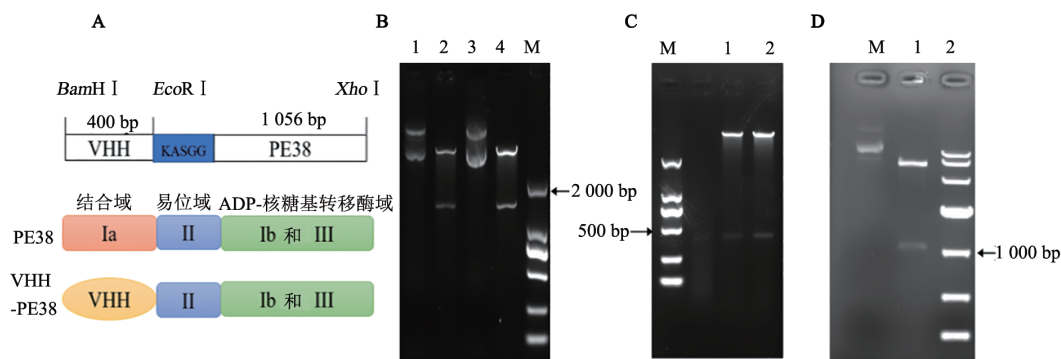
786-O 细胞以  $2.5 \times 10^5$  个/孔接种到 6 孔板上, 培养 24 h 后, 用 10、25 及 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Nb 2B3-PE38 处理细胞, 对照组加入 Nb 2B3 及 PE38 蛋白, 阳性对照组为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的顺铂, 空白组更换新培养基。无 EDTA 的胰酶消化后收集单细胞悬液, 并用 Annexin V -FITC 和 PI 避光染色后, 使用流式细胞仪检测 Nb 2B3-PE38 对肿瘤细胞凋亡的影响。

### 1.7 统计学处理

以上实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism 9 软件进行数据统计分析, 符合正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异的分析采用 One-Way ANOVA。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

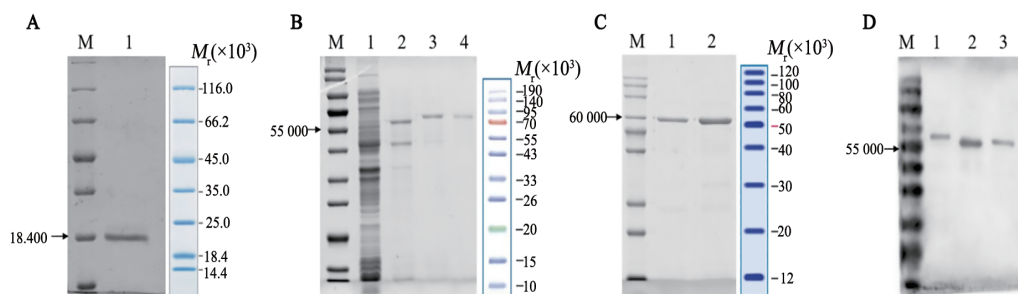
## 2 结果

### 2.1 成功构建抗 CD70 纳米抗体融合免疫毒素表达载体



A: pET21a-Nb 2B3-PE38 的构建示意图; B: 双酶切鉴定 pET21a-Nb 2B3-PE38 重组载体 (1、3 泳道: pET21a-Nb 2B3-PE38 质粒; 2、4 泳道: BamHI / XhoI 双酶切 pET21a-Nb 2B3-PE38 质粒; M: 2 000 DNA Marker); C: 双酶切鉴定 pET21a-Nb 2B3-PE38 重组载体 (1、2 泳道: BamHI / EcoRI 双酶切 pET21a-Nb 2B3-PE38 质粒; M: 2000 DNA Marker); D: 双酶切鉴定 pET32a-PE38 重组载体 (1: pET32a-PE38 质粒; 2: EcoRI / XhoI 双酶切 pET32a-PE38 质粒; M: 10 000 DNA Marker)。

图 1 pET21a-Nb 2B3-PE38 和 pET32a-PE38 重组载体的构建及鉴定



A: SDS-PAGE 鉴定 Nb 2B3 纯化蛋白 (M: 蛋白质 Marker; 1: 纯化后的 Nb 2B3 蛋白); B: SDS-PAGE 鉴定 Nb 2B3-PE38 纯化蛋白 (1: 超声处理后上清液; 2: 超声沉淀; 3、4: 纯化后的 Nb 2B3-PE38 蛋白); C: SDS-PAGE 鉴定 PE38 纯化蛋白 (1、2: PE38 纯化蛋白); D: WB 法鉴定纯化的 PE38 及 Nb 2B3-PE38 重组蛋白 (1: PE38 纯化蛋白; 2、3: Nb 2B3-PE38 纯化重组蛋白)。

图 2 SDS-PAGE 和 WB 鉴定 Nb2B3、Nb2B3-PE38 和 PE38 的纯化蛋白

将纳米抗体 Nb 2B3 与毒素分子 PE38 通过 KASGG 连接子进行分子融合, 构建一种基于纳米抗体靶向的新型免疫毒素 (图 1A)。另外, 将 PE38 单独构建到 pET32a 载体上。对构建的重组质粒进行酶切分别获得 1 456 bp 的 Nb 2B3-PE38 片段 (图 1B)、400 bp 的 Nb 2B3 (图 1C) 和 1 056 bp 的 PE38 (图 1D) 目的片段, 符合目标插入片段预期大小。通过 DNA 测序, 证实重组载体构建成功。

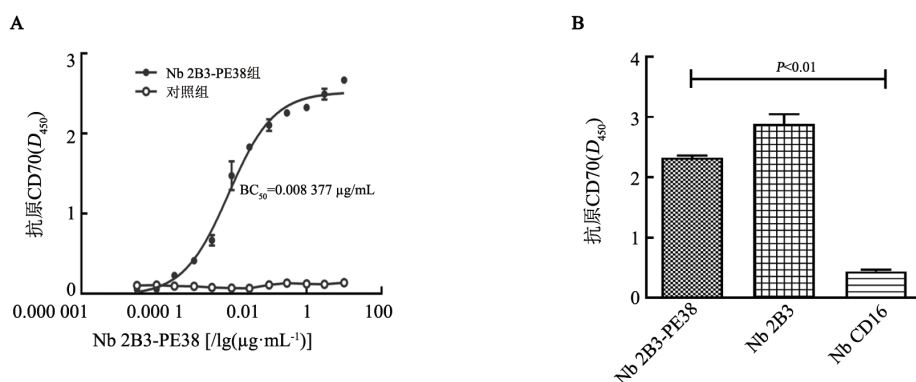
### 2.2 抗 CD70 纳米抗体免疫毒素的表达及纯化

将鉴定正确构建的重组质粒转入 BL21 (DE3) 中诱导表达。通过超声和透析的方式获得纯度较高的重组蛋白。SDS-PAGE 检测结果 (图 1A-C) 显示, 在分子量为 18 000、56 000 及 60 000 处分别显示条带单一的纳米抗体 Nb 2B3、免疫毒素 Nb 2B3-PE38 和毒素分子 PE38, 与预期蛋白大小一致。PE38 在 pET32a 上表达, 其融合了一段 109 个氨基酸的硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 肽序列, 故其分子量增大为 60 000。进一步通过 WB 实验对重组蛋白进行验证, 结果 (图 1D) 显示, 在分子量 60 000 及 56 000 处各有单一的条带, 说明得到了纯度较高的 Nb 2B3-PE38 以及 PE38 蛋白, 重组蛋白分子量与预期的大小一致, 且蛋白的纯度估计超过 90%。

### 2.3 Nb 2B3-PE38 能够与 CD70 抗原靶向结合

ELISA 检测结果(图 3A)显示,Nb 2B3-PE38 能够与抗原 CD70 相结合,且结合能力呈现质量浓度依赖性,随着抗体质量浓度的升高,结合能力也逐渐增强,半数结合浓度(BC<sub>50</sub>)为 0.008 377 μg/mL,而 Nb 2B3-PE38 与 BSA 不结合。结合特异性验证实验中,

使用 1 μg/mL 无关纳米抗体 Nb CD16 及纳米抗体 Nb 2B3 作为对照,结果(图 3B)显示,Nb 2B3-PE38 与 CD70 抗原结合的数量(D<sub>450</sub>)值较 Nb CD16 显著升高(P<0.01),但较 Nb 2B3 有降低趋势(差异无统计学意义),说明 Nb 2B3-PE38 与 CD70 抗原的结合有很强的特异性。



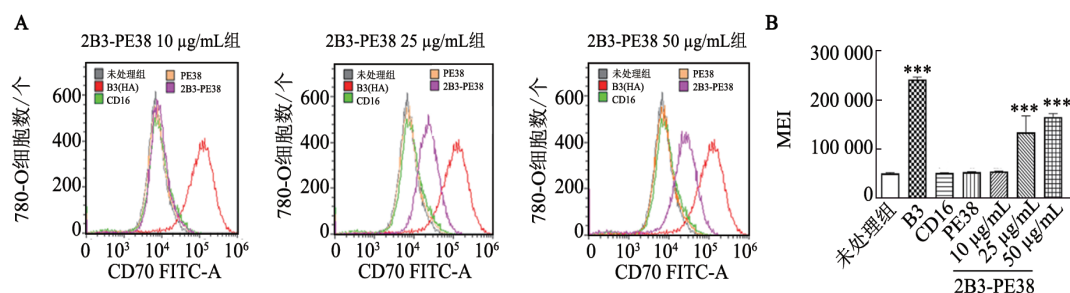
A: 梯度质量浓度 Nb 2B3-PE38 蛋白与 CD70 抗原的结合情况; B: 同浓度下 Nb 2B3-PE38、Nb 2B3 及 Nb CD16 蛋白与 CD70 抗原的结合情况; Nb 2B3: CD70 纳米抗体; Nb CD16: 无关纳米抗体。

图 3 ELISA 检测 Nb 2B3-PE38 与 CD70 重组抗原的结合

### 2.4 Nb 2B3-PE38 能够与表达 CD70 的 786-O 细胞靶向结合

采用 FACS 测定在 10、25 及 50 μg/mL 质量浓度下, Nb 2B3-PE38 与 786-O 肿瘤细胞的结合水平。并用 10 μg/mL Nb 2B3 作为阳性对照<sup>[6]</sup>。从图 4A 可知, Nb 2B3-PE38 与未处理组峰相比明显向右偏移,且随着蛋白质量浓度的增加, Nb 2B3-PE38 峰向右偏移越

多。而无关纳米抗体 Nb CD16 及单独毒素分子 PE38 与未处理组峰相比无明显偏移。图 4B 中可知,随着 Nb 2B3-PE38 蛋白质量浓度的增加,其平均荧光强度 MFI 也在增加,与以上结合关系保持一致。由此可知 Nb 2B3-PE38 与 786-O 细胞特异性结合,且结合能力呈浓度依赖关系,而 Nb 2B3-PE38 特异性靶向 786-O 细胞的能力依赖于纳米抗体 Nb 2B3。



A: 不同浓度 Nb 2B3-PE38 与 786-O 细胞结合的流式图; B: 根据 MFI 值绘制的 Nb 2B3-PE38 与 786-O 细胞结合的柱状图。与未处理组相比,\*\*\*P<0.001。

图 4 FACS 测定重组纳米抗体免疫毒素与 CD70 阳性肿瘤细胞 786-O 结合

### 2.5 Nb 2B3-PE38 能够靶向杀伤 786-O 细胞

MTT 法检测结果(图 5)显示, Nb 2B3-PE38 对 786-O 肿瘤细胞有极强的细胞毒效应,在质量浓度达到 25 μg/mL 时,对 786-O 细胞的杀伤活性达到近 50%,显著高于未处理的对照组(P<0.001);随着 Nb 2B3-PE38 质量浓度的增加,786-O 细胞的存活率明显降低,呈剂量依赖性。而 PE38 及 Nb 2B3 对 786-O 细

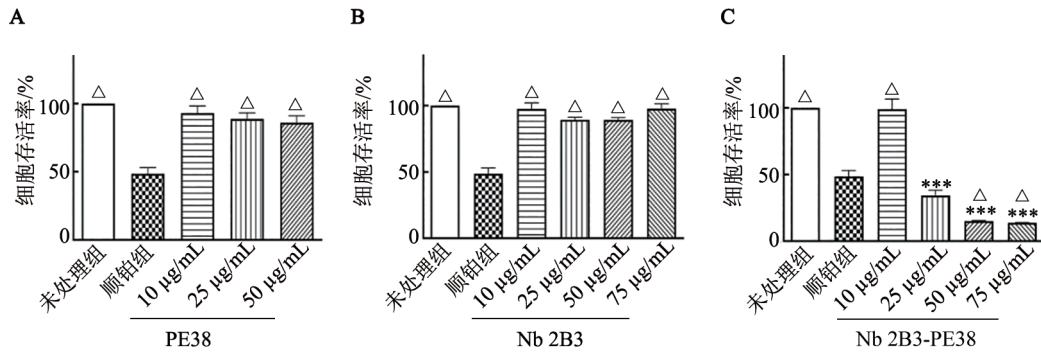
胞没有明显的细胞毒性,进一步证实了重组免疫毒素特异性靶向杀伤 CD70 阳性肿瘤细胞。并用, 50、75 μg/mL Nb2B3-PE38 对 786-O 细胞的杀伤效力显著强于顺铂(均 P<0.05)。

### 2.6 Nb 2B3-PE38 促进 786-O 细胞的凋亡

流式细胞术(Annexin V-FITC/PI 染色)检测结果(图 6)显示, Nb 2B3-PE38 对 786-O 细胞凋亡有影响,在浓

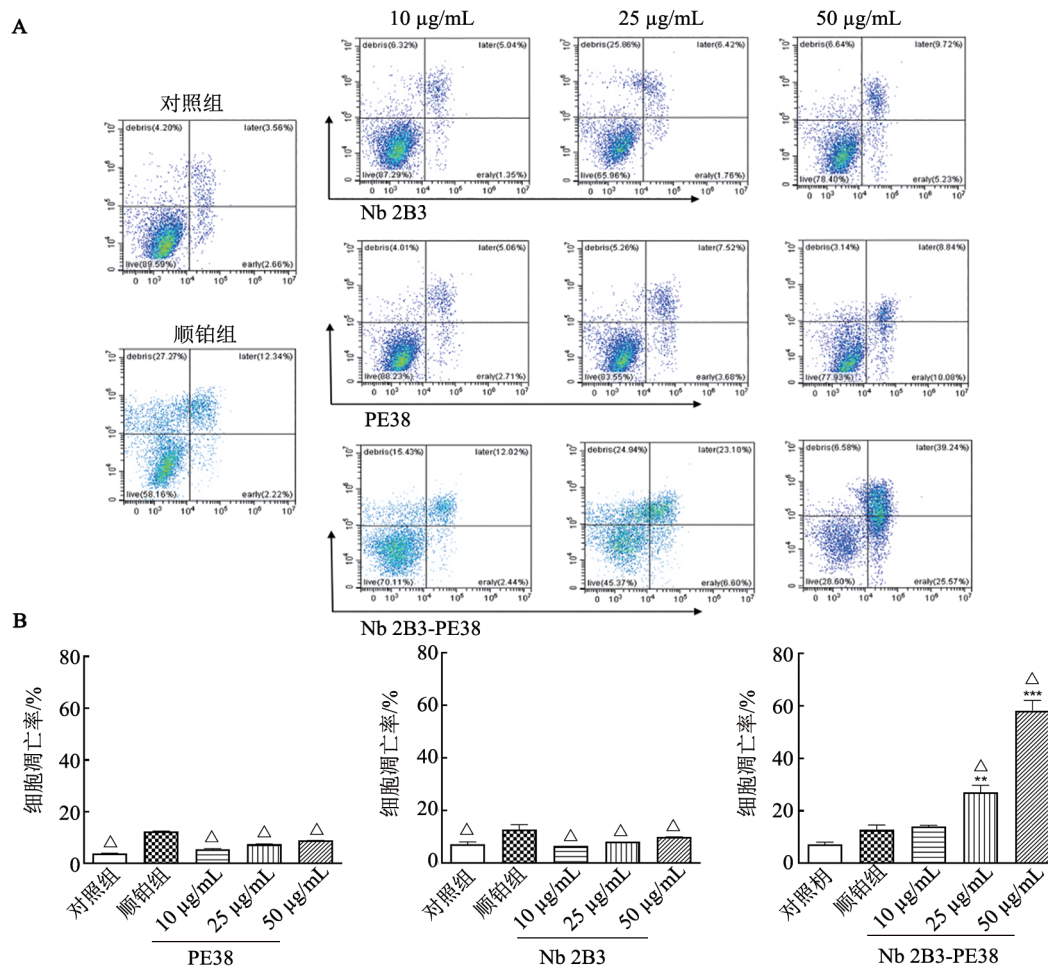
度达到 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上时, Nb 2B3-PE38 处理的 786-O 肿瘤细胞的凋亡率显著高于对照组(均  $P < 0.01$ ); 而

与对照组相比, 单独的毒素分子 PE38 组及纳米抗体 Nb 2B3 组均没有发生明显的细胞凋亡( $P > 0.05$ )。



A: PE38; B: Nb 2B3; C: Nb 2B3-PE38 对 786-O 细胞增殖的影响。与未处理组相比,  $***P < 0.001$ ; 与顺铂组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图5 Nb 2B3-PE38 抑制 786-O 细胞的增殖



A: 流式细胞术测定 Nb 2B3-PE38、Nb 2B3、PE38 对 786-O 细胞凋亡的影响; B: 统计分析 Nb 2B3-PE38、Nb 2B3、PE38 对 786-O 细胞凋亡的影响。与对照组相比,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ; 与顺铂组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图6 Nb 2B3-PE38 促进 786-O 细胞的凋亡

### 3 讨论

免疫毒素是被开发用于治疗病毒与癌症的新型治疗剂, 与传统的化疗药物相比, 重组免疫毒素既具有特异性靶向功能, 又具有毒性杀伤作用, 这种特异

性的杀伤避免了对正常组织和细胞的非特异性损伤, 这一优势使其在癌症治疗中得到广泛应用<sup>[17-18]</sup>。纳米抗体也因其独特优势在药物开发和疾病诊断、治疗中广泛使用<sup>[19-21]</sup>。本研究用铜绿假单胞菌外毒素的衍生物 PE38 作为毒素分子, 与抗 CD70 的纳米

抗体进行连接,构建了靶向CD70的免疫毒素,其在体外对高表达CD70分子的肾透明细胞癌显示出良好的细胞毒性作用。

当前,靶向肿瘤的细胞毒药物主要包括抗体-药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC)和免疫毒素两种。ADC是通过化学链将具有生物活性的小分子药物与单抗相连接<sup>[22]</sup>。相较于传统的给药模式,ADC的靶向性大大提高,但由于肿瘤细胞对药物会产生固有耐药或获得性耐药,使药物不能够充分发挥抗癌作用,即使大多数肿瘤细胞被杀死,但少部分的耐药细胞会继续生长,造成肿瘤复发<sup>[23]</sup>。同时,化学偶联的方法复杂、稳定性差,会造成ADC的脱靶效应。并且,构建ADC时多选择将细胞毒性药物连接在抗体的Fc区域,不适合应用于缺少Fc区域的纳米抗体,因此纳米抗体很少被用于ADC药物的开发。由于纳米抗体具有较大的改造空间,可以与多种毒素蛋白或肽进行分子融合,其产物均一性更好,较少产生脱靶效应。重组免疫毒素对ADC耐药细胞也具有潜在的毒性杀伤能力,且以毒素为基础的治疗方式不会产生交叉耐药,能对肿瘤细胞进行更彻底的杀伤。

本研究所构建的Nb 2B3-PE38发挥细胞毒性主要依赖于起靶向作用的抗体分子,抗体分子与细胞表面的抗原特异性结合后,介导细胞发生内吞,Nb 2B3-PE38通过内吞小泡进入细胞,在转移至内质网前,被弗林蛋白酶切割二硫键,使抗体片段与毒素分子分开,PE38分子被释放并从内质网进入细胞胞质中,与延伸因子2(EF-2)结合,使其发生ADP核糖基化,从而抑制蛋白质合成导致细胞死亡,还可以激活caspase级联反应造成靶细胞凋亡<sup>[24-26]</sup>。

本研究成功构建了CD70纳米抗体和PE38的重组免疫毒素Nb 2B3-PE38,其可以包涵体的方式在大肠杆菌中大量表达,由于包涵体中杂化蛋白含量低且能避免了蛋白水解酶类的破坏,因此,经过复性后能获得纯度较高且有活性的重组蛋白<sup>[27]</sup>。Nb 2B3和Nb 2B3-PE38与CD70重组抗原在低浓度范围内具有相似结合活性,且两者都能与表达CD70分子的786-O细胞结合,而Nb 2B3-PE38对786-O细胞的结合能力弱于Nb 2B3,这可能是引入了连接子从而影响了整个蛋白的结构及结合活性。连接子是将抗体与细胞毒分子连接并发挥功能的关键成分,故在今后考虑采用柔性连接子以提高重组免疫毒素的细胞结合能力<sup>[28-30]</sup>。本研究发现,Nb 2B3-PE38能有效地抑制CD70阳性肿瘤细胞的生长并促进细胞凋亡,而单独的PE38及Nb 2B3组对细胞凋亡无明显影响。值得注意的是,Nb 2B3-PE38在高质量浓度下,对CD70阳性肿瘤细胞的杀伤效能强于阳性对照组顺铂。

综上所述,本课题首次制备了基于CD70纳米抗体构建的免疫毒素Nb 2B3-PE38,其能够与786-O细胞表面的CD70分子特异性结合,并有效杀伤786-O细胞,表现出对CD70阳性肿瘤治疗的潜力,可能成为肿瘤治疗领域的理想工具。

## [参考文献]

- [1] 吴媛. CD70在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 肿瘤, 2013, 33(2): 197-201. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2013.02.015.
- [2] WU G Q, GUO S S, LUO Q, *et al.* Preclinical evaluation of CD70-specific CAR T cells targeting acute myeloid leukemia[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1093750[2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36845088/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1093750.
- [3] PANOWSKI S H, SRINIVASAN S, TAN N, *et al.* Preclinical development and evaluation of allogeneic CAR T cells targeting CD70 for the treatment of renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(14): 2610-2624. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-2931.
- [4] JACOBS J, DESCHOOLMEESTER V, ZWAENEPOEL K, *et al.* CD70: an emerging target in cancer immunotherapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 155: 1-10. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.07.007.
- [5] SEYFRID M, MAICH W T, SHAIKH V M, *et al.* CD70 as an actionable immunotherapeutic target in recurrent glioblastoma and its microenvironment[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(1): e003289[2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35017149/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-003289.
- [6] HIMBERT D, ZEUSCHNER P, AYOUBIAN H, *et al.* Characterization of CD147, CA9, and CD70 as tumor-specific markers on extracellular vesicles in clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(12): 1034 [2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7761541/>. DOI: 10.3390/diagnostics10121034.
- [7] ORTIZ-CUARAN S, SWALDUZ A, FOY J P, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition promotes immune escape by inducing CD70 in non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2022, 169: 106-122. DOI: 10.1016/j.ejca.2022.03.038.
- [8] 毛春燕, 安钢力, 王祥岭, 等. 靶向EGFR免疫毒素BI7D12-PE38KDEL的制备及其体外活性测定[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(4): 558-562, 573. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2017.04.017.
- [9] 毛春燕, 安钢力, 王祥岭, 等. 靶向EGFR免疫毒素BI7D12-PE38KDEL的制备及其体外活性测定[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(4): 558-562, 573. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2017.04.017.
- [10] FLEMING B D, HO M. Generation of single-domain antibody-based recombinant immunotoxins[M]//*Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2022: 489-512. DOI: 10.1007/978-1-0716-2075-5\_25.
- [11] GUO R, YANG Y, ZHANG D, *et al.* A bispecific immunotoxin (IHPP) with a long half-life targeting HER2 and PDGFR $\beta$  exhibited improved efficacy against HER2-positive tumors in a mouse xenograft model[J/OL]. *Int J Pharm*, 2021, 592: 120037[2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33161038/>. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120037.
- [12] DHILLON S. Moxetumomab pasudotox: first global approval[J]. *Drugs*, 2018, 78(16): 1763-1767. DOI: 10.1007/s40265-018-1000-9.
- [13] LIU M M, LI L, JIN D, *et al.* Nanobody-a versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics[J/OL]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed*

- Nanobiotechnol, 2021, 13(4): e1697 [2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33470555/>. DOI: 10.1002/wnan.1697.
- [14] YANG E Y, SHAH K. Nanobodies: next generation of cancer diagnostics and therapeutics[J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1182 [2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32793488/>. DOI: 10.3389/fonc.2020.01182.
- [15] HIRAO A, NAGATOISHI S, IKEUCHI E, *et al.* Design of single-domain VHH antibodies to increase the binding activity in SPR amine coupling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 663: 54-60. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.04.048.
- [16] LIU Y K, HUANG H. Expression of single-domain antibody in different systems[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(2): 539-551. DOI: 10.1007/s00253-017-8644-3.
- [17] ZHANG X, LIU C, XIE Y, *et al.* Identification and characterization of blocking nanobodies against human CD70[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2022, 54(10): 1518-1527. DOI: 10.3724/abbs.2022141.
- [18] GUPTA P, HARE D L, WOOKEY P J. Strategic development of an immunotoxin for the treatment of glioblastoma and other tumours expressing the calcitonin receptor[J/OL]. *Cells*, 2021, 10(9): 2347 [2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34571996/>. DOI: 10.3390/cells10092347.
- [19] MA J B, XU X L, FU C J, *et al.* CDH17 nanobodies facilitate rapid imaging of gastric cancer and efficient delivery of immunotoxin [J/OL]. *Biomater Res*, 2022, 26(1): 64 [2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36435809/>. DOI: 10.1186/s40824-022-00312-3.
- [20] RUIZ-LÓPEZ E, SCHUHMACHER A J. Transportation of single-domain antibodies through the blood-brain barrier[J/OL]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1131 [2023-04-09]. <https://doi.org/10.3390/biom11081131>. DOI: 10.3390/biom11081131.
- [21] MORALES-YÁNEZ F, TRASHIN S, HERMY M, *et al.* Fast one-step ultrasensitive detection of *Toxocara canis* antigens by a nanobody-based electrochemical magnetosensor[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(18): 11582-11588. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01687.
- [22] NIE J, MA X, HU F, *et al.* Designing and constructing a phage display synthesized single domain antibodies library based on camel VHHs frame for screening and identifying humanized TNF- $\alpha$ -specific nanobody[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111328 [2023-04-09]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111328>. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111328.
- [23] 曹刚, 黄祚刚, 程杰飞, 等. 抗体药物偶联物[J]. *化学进展*, 2014, 26(2): 467-477. DOI:10.7536/PC130650.
- [24] 朱小影, 陶崑, 李身锋, 等. 抗 CML 单链免疫毒素载体的构建、表达及活性鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(12): 1306-1311. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2013.12.018.
- [25] WELDON J E, SKARZYNSKI M, THERRES J A, *et al.* Designing the furin-cleavable linker in recombinant immunotoxins based on *Pseudomonas* exotoxin A[J]. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26(6): 1120-1128. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00190.
- [26] MORADIAN C, RAHBARIZADEH F. PE38-based gene therapy of HER2-positive breast cancer stem cells via VHH-redirected polyamidoamine dendrimers[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11: 15517 [2023-04-09]. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-93972-5>. DOI: 10.1038/s41598-021-93972-5.
- [27] DIEFFENBACH M, PASTAN I. Mechanisms of resistance to immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A in cancer therapy[J/OL]. *Biomolecules*, 2020, 10(7): 979 [2023-04-09]. <https://doi.org/10.3390/biom10070979>. DOI: 10.3390/biom10070979.
- [28] 赵强子, 刘彦仿, 窦科峰, 等. 抗肝癌单链抗体融合 PE38 重组免疫毒素的构建、表达及纯化[J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(9): 809-812. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-2790.2003.09.013.
- [29] SU Z, XIAO D, XIE F, *et al.* Antibody-drug conjugates: recent advances in linker chemistry[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3889-3907. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.03.042.
- [30] SHEYI R, DE LA TORRE B G, ALBERICIO F. Linkers: an assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate[J/OL]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 396 [2023-04-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35214128/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics14020396.

[收稿日期] 2023-04-11

[修回日期] 2023-07-12

[本文编辑] 黄静怡