



猫 PD-L1 单克隆抗体及猫源化单链抗体的制备和初步应用

李 蒙^{1,2}, 苏思元^{1,2}, 李自盼^{1,2}, 徐昀眺^{1,2}, 黄紫贝^{1,2}, 罗健雅^{1,2}, 赵以恒^{1,2}, 郭 鑫^{1,2},
卞泓凯^{1,2}, 潘新语^{1,2}, 刘文博^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

摘 要: 旨在制备猫 PD-L1 抗原并筛选单抗, 探讨其在犬、猫肿瘤检测和诊断中的应用, 同时制备猫源化嵌合单链抗体, 为猫肿瘤的治疗提供基础。本研究通过 PCR 扩增猫 PD-L1 基因, 构建原核表达重组质粒 PET-MPD-L1, 通过在宿主 BL21(DE3) 中表达制备 PD-L1 抗原, 免疫小鼠后细胞融合, ELISA 方法进行杂交瘤细胞筛选, 3 次亚克隆后建立 MPD-L1 杂交瘤细胞系。测定杂交瘤细胞上清、腹水效价、抗体亚类、Western blot 和免疫组织化学(IHC)特性。扩增轻、重链可变区和猫 IgG1 Fc 基因, 降落 PCR 将重链可变区(Variable region of the Heavy chain, VH)和轻链可变区(Variable region of the Light chain, VL)拼接成 scFv, 进一步拼接出 scFv-ffFc, 构建 pFast-MPD-L1-scFv 和 pFast-MPD-L1-scFv-ffFc 重组质粒, 在昆虫杆状病毒表达系统中表达。结果表明, 猫 PD-L1 在上清中大量表达且纯度较好, 杂交瘤细胞 2A5A2F4D7 分泌的抗体属于 IgG 2a, 轻链为 κ 亚型, 细胞上清、腹水抗体效价分别为 1:3 200 和 1:102 400, Western blot 结果表明, 该单抗能与表达的猫 PD-L1 反应, IHC 结果显示, 该单抗可以识别犬猫肿瘤组织细胞表达的 PD-L1, 可以反映 PD-L1 在肿瘤组织中的表达情况。VH 和 VL 与 IMGT 数据库中相应基因序列相符, 具有 4 个框架区和 3 个高变区, 猫源化嵌合单链抗体在昆虫杆状病毒表达系统中成功表达。综上, 本研究制备的猫 PD-L1 单克隆抗体在犬猫肿瘤检测和预后中具有一定的价值, 猫源化单链抗体的成功制备为其在犬猫肿瘤病治疗中的应用打下了基础。

关键词: 犬猫肿瘤疾病; 猫 PD-L1; 单克隆抗体; scFv; scFv-ffFc; 昆虫杆状病毒表达

中图分类号: S856

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0401-13

Preparation and Application of Cat PD-L1 Monoclonal Antibody and Feline Derived Single Chain Antibody

LI Meng^{1,2}, SU Siyuan^{1,2}, LI Zipan^{1,2}, XU Yuntiao^{1,2}, HUANG Zibei^{1,2}, LUO Jianya^{1,2},
ZHAO Yiheng^{1,2}, GUO Xin^{1,2}, BIAN Hongkai^{1,2}, PAN Xinyu^{1,2}, LIU Wenbo^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Jiangsu Province Collaborative Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Diseases and Zoonotic Diseases, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The purpose of this study was to prepare feline PD-L1 antigen and screen monoclonal antibody, and preliminary application was carried out in detection and diagnosis of canine and feline oncology diseases. In addition, feline derived chimeric single chain variable Fragment-Feline Fragment crystallizable (scFv-ffFc) was prepared, which provided a tool for the treatment of cat

收稿日期: 2024-10-25

基金项目: 江苏省农科科技自主创新项目(CX(20)2012-1); 江苏省优势学科第四期(2021)

作者简介: 李 蒙, 博士生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: 2273797912@qq.com

* 通信作者: 刘文博, 主要从事动物疫病防控与兽医流行病学研究, E-mail: lwbo@yzu.edu.cn

tumor in future. The PD-L1 gene of feline was amplified by PCR and prokaryotic expression recombinant plasmid PET-MPD-L1 was constructed, and the antigen of PD-L1 was prepared by expression with host BL21(DE3). After immunization with mice, cell was fused, and an ELISA was established to screen antibody produced by hybridoma cells. After subcloning three times, the cell line of MPD-L1 hybridoma were established, subtypes were identified, and the ascites were prepared, and titer of the ascites was determined. Characteristics were determined by Western blot and immunohistochemistry (IHC). Total RNA was extracted from the hybridoma cells, and the heavy chain variable region (VH) and light chain variable region (VL) genes were amplified by RT-PCR, which were compared with the antibody light and heavy chain genes in the IMGT database for confirmation. RNA from peripheral blood of a cat in clinic was extracted, and the Fc gene of IgG1 was amplified by RT-PCR. The recombinant plasmids of pFast-MPD-L1-scFv and PFAST-MPD-L1-scFv-fFc were constructed by splicing VH and VL into scFv and scFv-Fc into scFv-fFc by landing PCR, then expressed in the baculovirus expression system. The results showed that feline PD-L1 was highly expressed in the supernatant of cultures and the purified protein could be used antigen for immunization. The monoclonal antibody of 2A5A2F4D7 belonged to IgG 2a subtype, and the light chain is subtype κ . The titer of the supernatant, ascites was 1:3200, 1:102400 respectively. Western-Blot results showed that monoclonal antibody 2A5A2F4D7 reacted with expressed feline PD-L1, and IHC results showed that the monoclonal antibody secreted by 2A5A2F4D7 hybridoma cells can recognize PD-L1 of tumor cells both canine and feline. The VH and VL genes amplified were consistent with genes in the IMGT database, with 4 framework regions and 3 hypervariable regions. The recombinant plasmids of pFast-MPD-L1-scFv and PFAST-MPD-L1-scFv-fFc were constructed successfully and expressed in the supernatants of insect baculovirus expression system. The prepared feline PD-L1 monoclonal antibody have certain value in the detection and prognosis of canine and feline tumors, while scFv-fFc might hold great potential for application in the treatment of tumors in canine and feline.

Keywords: tumor diseases in canine and feline; feline PD-L1; monoclonal antibodies; scFv; scFv-fFc; insect baculovirus expression

* **Corresponding author:** LIU Wenbo, E-mail: lwb@yzu. edu. cn

国内犬猫伴侣动物饲养量剧增、犬猫寿命期望值越来越高,随着年龄增长及各种诱因,肿瘤的疾病率日益增高^[1]。犬猫常见的肿瘤类型有乳腺癌、软组织肉瘤、淋巴瘤、鳞状细胞癌和肥大细胞瘤^[2-3],肿瘤性疾病的诊断主要通过临床检查和影像学,治疗方法通常有化学疗法、放射治疗和手术切除^[4],但是,这些诊断和治疗方法有一定的局限性。因此,开发新的诊断和治疗方法,与现有方法联合使用至关重要。

近些年,免疫治疗在医学肿瘤学领域取得了显著进展,是人类癌症治疗的一个新突破^[5],免疫抑制性受体程序性死亡受体 1(programmed death 1, PD-1)与其配体-1(Programmed death ligand-1,

PD-L1)共同诱导抗原特异性淋巴细胞的“耗竭”状态,参与肿瘤细胞的免疫逃逸^[6-7]。PD-L1在不同动物多种肿瘤细胞上高量表达,可用于肿瘤病的诊疗,其表达水平也可作为免疫治疗预后的依据。抑制 PD-1/PD-L1 通路可恢复耗竭 T 细胞的效应功能,针对 PD-1 或 PD-L1 的抗体可增强或恢复 T 细胞效应功能,因而备受关注,在医学肿瘤病领域中,此类抗体得到了广泛应用^[8-9]。然而,在伴侣动物肿瘤方面的研究还处于起步阶段,在美国和日本,制备出了针对犬 PD-1/PD-L1 的单抗,日本研制出了猫 PD-1/PD-L1 的单抗^[10-12]、将其改造成犬源化和猫源化嵌合抗体^[13],在临床试验中显示出一定的治疗效果^[14-17]。然而,我国尚无猫 PD-1/PD-L1 的单

克隆抗体,也缺乏相应的免疫治疗制品。

鼠源抗体多次应用易引起过敏反应,因此对单克隆抗体进行异源化尤为重要。单链抗体(single-chain variable fragment-feline Fragment crystallizable, scFv)由抗体 VH 和 VL 通过一段连接肽(Linker)连接而成^[18],分子量为 27~30 ku,约为完整抗体分子的 1/6,能保持较完整的抗原结合位点,是亲代抗体全部抗原结合特异性的最小功能单位,具有较低的免疫原性,不易引起过敏反应,且分子量小,容易穿透血管壁、组织及实体瘤,能直接与肿瘤细胞表面上的抗原结合^[19]。不过,scFv 的最大缺点就是与靶点的单价结合,即便单价结合有着较高的亲和力,但是也会很快发生解离,这就导致体内不能长时间地在靶位停留^[20],此外,scFv 在体内的血液循环中,半衰期短,容易从血液循环中被排除。通过重组融合的方法将 scFv 与不同动物源抗体的 Fc 段结合,有助于形成二聚体,既可以延长 scFv-Fc 在体内的半衰期,又可以激活补体依赖细胞毒反应和 Fc 受体介导的抗体依赖细胞毒反应^[21-22]。

本研究通过杂交瘤技术筛选到 1 株单克隆抗体(2A5A2F4D7),该单抗在犬猫肿瘤组织 IHC 试验中呈阳性,通过基因工程技术扩增抗体 VH 和 VL 基因,将其拼接成 scFv,在 scFv 的基础上,对其进行猫源化改造,将鼠源性 scFv 与猫源性抗体的 Fc 段结合,形成 scFv-fFc,使其具有种属特异性,试验结果证明 scFv 和 scFv-fFc 能够在昆虫杆状病毒表达系统中的细胞上清中表达,可为犬猫肿瘤病的检测和免疫治疗提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 生物材料

SP2/0 细胞、Sf9 细胞、PET-32a 质粒和 pFastBac HT A 质粒均由本实验室保存;DH5a、BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司。猫外周血和犬猫肿瘤组织为扬州大学动物医院临床样本;雌性 BLAB/c 小鼠购自扬州大学比较与医学研究中心[SCXK(苏)2022-0009]。动物试验通过扬州大学动物福利伦理审批,审批号 202308121。

1.2 主要试剂与仪器

pMDTM19-T Vector Cloning Kit、DNA marker、PrimeScript IITM 1st Strand cDNA Synthesis Kit、限制性快切酶和 DNA Ligation Kit 购自 TaKaRa 公司;

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 购自诺唯赞生物科技公司;2×Taq PCR Mix II、RNAprep Pure 高效血液总 RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和胶回收纯化试剂盒购自天根科技(北京)有限公司;LipoInsectTM 转染试剂、杆状病毒穿梭载体 bacmid 小量抽提试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;HAT、HT 和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;SF-SFM 完全培养基购自苏州沃美生物有限公司;抗 His 鼠源单克隆抗体购自 Abbkine 公司;PEG 1500 购自 Roche 公司;高速冷冻离心机(5810 R、5430 R)购自 Eppendorf 公司;酶标仪(EPOCH-3)购自 BioTek 公司;倒置显微镜(TS-2)购自尼康公司(NIKON)产品。

1.3 PET-MPD-L1 的构建和抗原制备

猫 PD-L1 基因扩增:使用试剂盒提取猫外周血中总 RNA、逆转录、PCR 扩增(引物的上、下游引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点,上游扩增引物为 5'-ccggaattcatgaggatatttagtgtct-3',下游扩增引物为 5'-ccgctcgaggttacgtctcctcaaattgt-3')。产物与载体 PET-32a 质粒连接转化 DH5a,双酶切鉴定,阳性重组质粒送华大基因公司测序,将测序结果与 XM_006939039.3 进行比对。序列正确的 PET-MPD-L1 重组质粒转化 BL21(DE3),诱导表达,SDS-PAGE 鉴定后大量表达和纯化,按照试剂盒说明书纯化蛋白。

1.4 单克隆抗体的制备及亚类鉴定

小鼠免疫:按照常规方法进行免疫和细胞融合^[23]。ELISA 方法进行杂交瘤细胞的筛选,连续三次亚克隆后建株,试剂盒鉴定单克隆抗体亚类,制备腹水,纯化抗体鉴定,进行单克隆抗体 ELISA 效价测定。

1.5 单克隆抗体特异性鉴定

纯化的 PET-MPD-L1 和 PET-32a 空载体蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转印,膜用 100 g·L⁻¹脱脂奶粉 PBS 室温封闭 2 h, PBST 洗涤 3 遍, 1:100 稀释的杂交瘤细胞上清室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 遍, 1:10 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 遍,显影。

1.6 犬猫肿瘤组织的免疫组织化学检测

将肿瘤组织切片脱蜡、脱二甲苯、灭活内源性过氧化物、暴露抗原、封闭后,用制备的单克隆抗体孵育 1 h, PBST 洗涤 3 遍,加酶标山羊抗鼠抗体孵育 1 h, PBST 洗涤 3 遍,避光滴加 DAB 染色液,苏木素

衬染 1 min, 使用 1% 盐酸乙醇分化 3 s, 乙醇脱水, 将切片浸没在二甲苯中去除乙醇, 用中性树脂封片, 切片显微观察。

1.7 猫 PD-L1 抗体基因扩增和鉴定

复苏 2A5A2F4D7 杂交瘤细胞, 提取细胞总 RNA, 参考文献[24-25]的方法合成扩增轻、重链 16 个或 19 个基因片段的引物, 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收产物纯化连接 T 载体、转化 DH5a 感受态细胞, 37 °C 过夜培养后, 挑取白色单菌落摇菌, PCR 鉴定, 送至金唯智生物科奇有限公司测序, 测序结果进行 Ig Blast 比对。

1.8 scFv 制备及猫源化

以“1.7”中获取的轻、重链基因为模板进行 PCR, 扩增引物为 VH5F: 5'-GAAGTGAAGCTGGTGGAGTC-3', MPD-L1 VH5 Linker: 5'-GTCAGAACACCACCACCAGAACACCACCACCAGAACACCACCACCTGAGGAGACGGT-3', VK8F: 5'-GACATTGTGATGTCACAGTCTCCA-3', VK8R: 5'-TTTGATTTCAGCTTGGTGCC-3', MPD-L1 VK8 Linker: 5'-TCAGGTGGTGGTGGTTC TGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGACATTGTGATGTCA-3', MPD-L1(SCFV-F): 5'-CCGGAATTCATGGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCT-3', MPD-L1(SCFV-R): 5'-CCGCTCGAGTCATTTGATTTCCAGCTTGGTGCC-3'。通过 Linker 串联成单链抗体, 重链基因的 C 端和轻链基因的 N 端带有 15 个氨基酸的 Linker, 通过重叠延伸 PCR 进行 scFv 的拼接, 扩增引物 MPD-L1(scFv-F): 5'-CCGGAATTCATGGAAGTGAA GCTGGTGGAGTCT-3', MPD-L1(scFv-RL): 5'-TTTGATTTCAGCTTGGTGCC-3', 获取 scFv 全长片段。从猫外周血中提取总 RNA、逆转录、使用扩增引物 feline-IgG(Fc-L): 5'-AAGCTG GAAATCAAACCCCTGAGATGCTT-3', feline-IgG(Fc-R): 5'-CCGCTCGAGTCATTTACCCG GAGACT-3' 进行扩增, 与 scFv 拼接, 引物使用 MPD-L1(scFv-F) 和 feline-IgG Fc-R, 获取 scFv-fFc 全长片段。

1.9 重组杆状病毒 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc 的拯救

将 scFv 与 scFv-fFc 的 PCR 产物进行胶回收纯化, *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 连接 pFastBac-HT A

载体, 转化 DH5a, 37 °C 培养, 提取质粒, 双酶切鉴定阳性的重组质粒并送华大基因公司测序, 序列进行 Blast, 命名为 pFastBac-MPD-L1-scFv, pFastBac-MPD-L1-scFv-fFc 的构建与 pFastBac-MPD-L1-scFv 的构建方法相同。

将重组 pFastBac-MPD-L1-scFv 质粒转化 DH10 Bac 感受态细胞, 培养 16 h 后使用引物 M13-F: 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3' 与 M13-R: 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCAC GAC-3' 和目的片段特异性引物进行菌液 PCR 鉴定及 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 验证正确后使用杆状病毒穿梭载体 bacmid 小量抽提试剂盒提取重组 bacmid。重组杆粒 rbacmid-scFv-fFc 的构建与 rbacmid-scFv 的构建方法相同。

SF9 细胞培养使用 SF-SFM 完全培养基, 28 °C 培养, 细胞状态良好时, 使用 LipoInsect™ 转染试剂将杆状病毒穿梭载体 bacmid 小量抽提试剂盒提取的重组杆粒 rbacmid-scFv 转染 SF9 细胞, 于 28 °C 培养 96 h 后收获上清, 获得 P1 代重组杆状病毒 rBV-scFv, MOI 为 0.1 连续传三代, 获得稳定的 P3 代病毒, 扩增的病毒 4 °C 避光保存。rBV-scFv-fFc 的拯救与 rbacmid-scFv 的拯救相同。

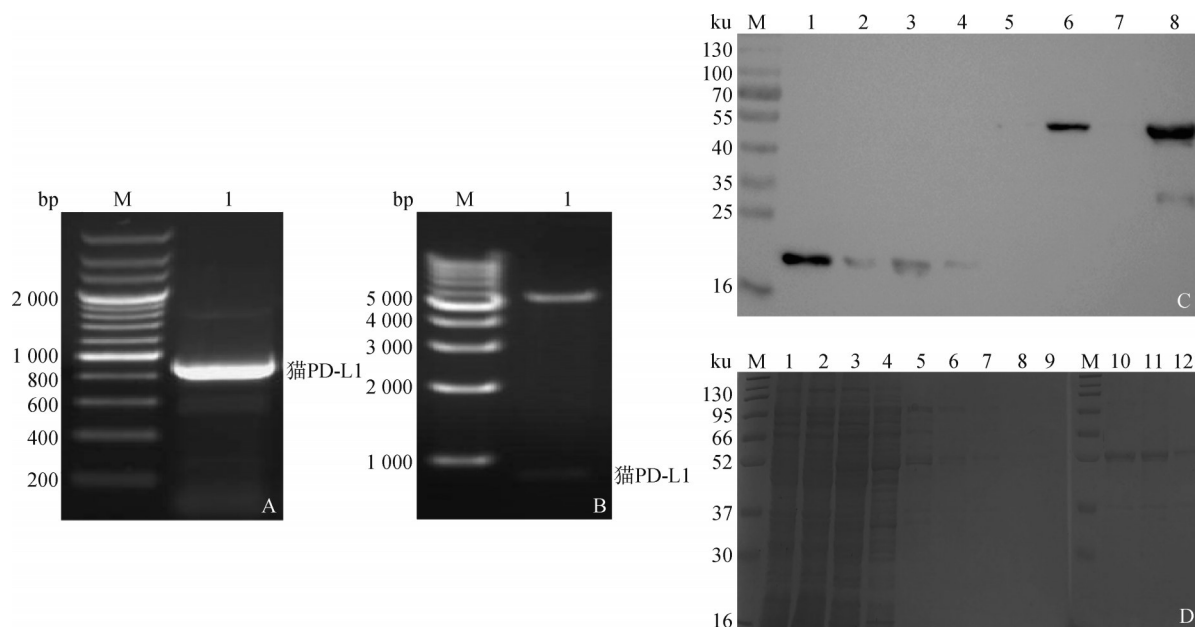
1.10 重组杆状病毒表达 scFv 和 scFv-fFc 及 Western blot 分析

P3 代病毒滴度为 2×10^8 pfu·mL⁻¹, 以 MOI 为 2, 感染 SF9 细胞, 28 °C 培养 72 h, 细胞超声破碎, 4 °C 10 000×g 离心 20 min。沉淀用等量 PBS 悬浮, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜、室温封闭 2 h, 加入抗 His 鼠源单克隆抗体, 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 遍, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 遍, 显影。

2 结 果

2.1 PET-MPD-L1 的构建和抗原制备

如图 1A 和 1B 所示, 成功构建 PET-MPD-L1, 测序结果与猫 PD-L1 基因比对, 结果 100% 一致, 质粒双酶切条带大小与预期一致。BL21(PET-MPD-L1) 经大量诱导表达后, 蛋白在上清大量表达如图 1C 所示, 经纯化后, 蛋白浓度为 1.95 mg·mL⁻¹, SDS-PAGE 结果显示, 蛋白条带较为单一, 如图 1D 所示。



A. 猫 PD-L1 基因; M. 200 bp marker; 1. 猫 PD-L1 基因。B. PET-MPD-L1 双酶切鉴定; M. 1000 bp marker; 1. PET-MPD-L1 酶切结果。C. PET-MPD-L1 蛋白表达; M. 蛋白分子量 marker; 1. 诱导 PET-32a 破碎上清; 2. 诱导 PET-32a 破碎沉淀; 3. 未诱导 PET-32a 破碎上清; 4. 未诱导 PET-32a 破碎沉淀; 5. 未诱导 PET-MPD-L1 破碎沉淀; 6. 未诱导 PET-MPD-L1 破碎上清; 7. 诱导 PET-MPD-L1 破碎沉淀; 8. 诱导 PET-MPD-L1 破碎上清。D. PET-MPD-L1 蛋白纯化; M. 蛋白分子量 marker; 1. 细菌裂解液; 2. 穿流液; 3~9. 洗涤液; 10~12. 洗脱液

A. Feline PD-L1 gene; M. 200 bp marker; 1. Feline PD-L1 gene. B. Double digestion identification of PET-MPD-L1; M. 1000 bp marker; 1. PET-MPD-L1 digestion result. C. PET-MPD-L1 protein expression; M. Protein molecular weight marker; 1. Lysate supernatant of induced PET-32a; 2. Lysate precipitate of induced PET-32a; 3. Lysate supernatant of uninduced PET-32a; 4. Lysate precipitate of uninduced PET-32a; 5. Lysate precipitate of uninduced PET-MPD-L1; 6. Lysate supernatant of uninduced PET-MPD-L1; 7. Lysate precipitate of induced PET-MPD-L1; 8. Lysate supernatant of induced PET-MPD-L1. D. PET-MPD-L1 protein purification; M. Protein molecular weight marker; 1. Bacterial lysate; 2. Flow-through; 3-9. Wash fractions; 10-12. Elution fractions

图1 PET-MPD-L1的构建和抗原制备

Fig. 1 Construction of PET-MPD-L1 and antigen preparation

2.2 单克隆抗体的制备及亚类鉴定

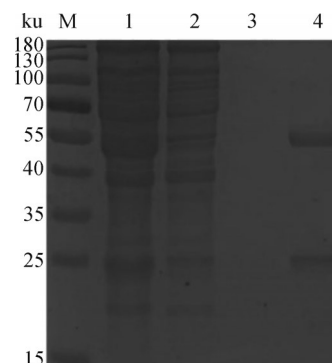
筛选间接 ELISA 条件为, 包被抗原 1:1 600 稀释, 阴、阳性血清分别为 1:1 600 和 1:51 200 稀释, HRP 标记羊抗鼠酶标抗体 1:10 000 稀释。三次亚克隆和筛选后, 获得了 1 株稳定分泌抗体的细胞株, 命名为 2A5A2F4D7。亚类鉴定 2A5A2F4D7 的重链为 IgG 2a, 轻链为 κ 链。抗体纯化结果如图 2 所示, 测定杂交瘤细胞上清效价为 1:3 200, 腹水效价 1:102 400。

2.3 单克隆抗体特异性鉴定

2A5A2F4D7 经 Western blot 验证, 识别猫 PD-L1, 而不识别 PET-32a 空载体, 如图 3 所示。

2.4 犬猫肿瘤组织免疫组化

2A5A2F4D7 可以识别犬猫肿瘤组织, 在犬恶性乳腺癌组织和犬良性乳腺癌组织中显示为强阳

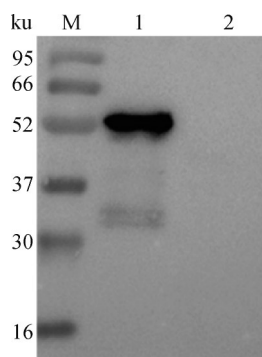


M. 蛋白分子量 marker; 1. 粗提腹水; 2. 穿流液; 3. 洗涤液; 4. 纯化抗体

M. Protein molecular weight marker; 1. Preliminary extraction of ascites; 2. Flowing fluid; 3. Washing solution; 4. Purification of antibodies

图2 SDS-PAGE 验证抗体纯化结果

Fig. 2 Results of SDS-PAGE validation antibody purification



M. 蛋白分子量 marker; 1. PET-MPD-L1 蛋白; 2. PET-32a
M. Protein molecular weight marker; 1. PET-MPD-L1 protein; 2. PET-32a

图3 Western blot 验证抗体识别猫 PD-L1

Fig. 3 Western blot result of McAb reacted with feline PD-L1

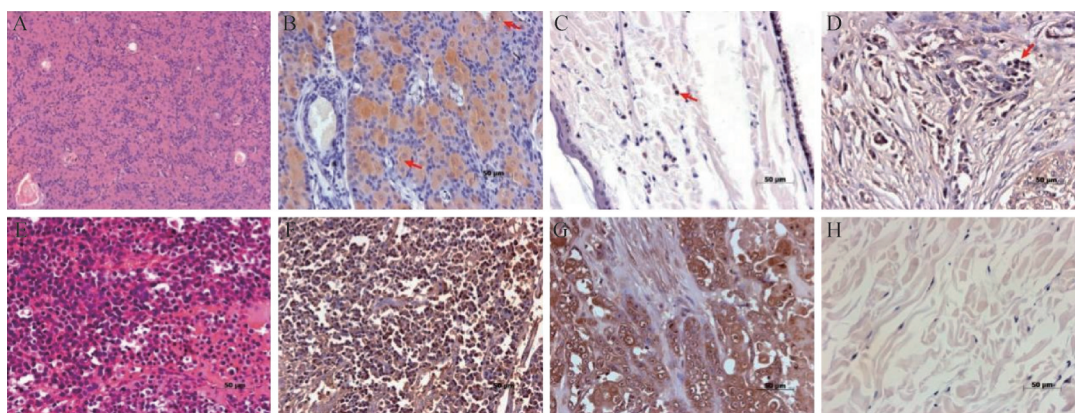
性和阳性,在橘猫恶性淋巴瘤中显示为阳性,如图4所示。

2.5 猫 PD-L1 抗体基因扩增和鉴定

抗体基因扩增如图5所示,选取可以扩增出疑似抗体基因大小的扩增引物继续后续试验。经TA克隆,测序与抗体基因比对后,确定第5对重链基因扩增引物和第8对轻链基因扩增引物扩增的抗体基因正确,如图7所示。

2.6 scFv 制备及猫源化

VH5 与 VK8 通过 Linker 连接成 scFv,经测序比对,氨基酸 100% 一致,如图8所示。scFv 与猫 IgG Fc 连接成 scFv-fFc,经测序比对,氨基酸 100% 一致,如图9所示。



A. 犬肛周上皮瘤 HE 染色(100×); B. 犬肛周上皮瘤 IHC; C. 犬毛发棘皮瘤 IHC; D. 犬乳腺纤维腺瘤 IHC; E. 猫淋巴瘤 HE 染色; F. 猫淋巴瘤 IHC; G. 犬乳腺癌 IHC; H. 犬乳腺癌旁组织 IHC。箭头所指的是阳性肿瘤细胞

A. Canine perianal epithelial tumor, HE staining (100×); B. Canine perianal epithelial tumor, IHC; C. Canine pilomatricoma, IHC; D. Canine mammary fibroadenoma, IHC; E. Feline lymphoma, HE staining; F. Feline lymphoma, (IHC); G. Canine mammary carcinoma, IHC; H. Peritumoral tissue of canine mammary carcinoma, IHC. Arrows point to the positive tumor cells

图4 HE 染色和 IHC 鉴定 2A5A2F4D7 识别犬猫肿瘤组织

Fig. 4 Identification of canine and feline tumor tissues using HE staining and IHC with 2A5A2F4D7

2.7 重组杆状病毒 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc 的拯救

重组杆粒 rbacmid-scFv 和 rbacmid-scFv-fFc 构建成功,经双酶切、M13 和特异性引物鉴定,目的条带大小与预期相符,如图10A~10C所示。制备出重组杆状病毒 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc,经 M13 和特异性引物 PCR 鉴定 P1-P3 代重组杆状病毒 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc,目的条带大小与预期相符,如图10D所示。

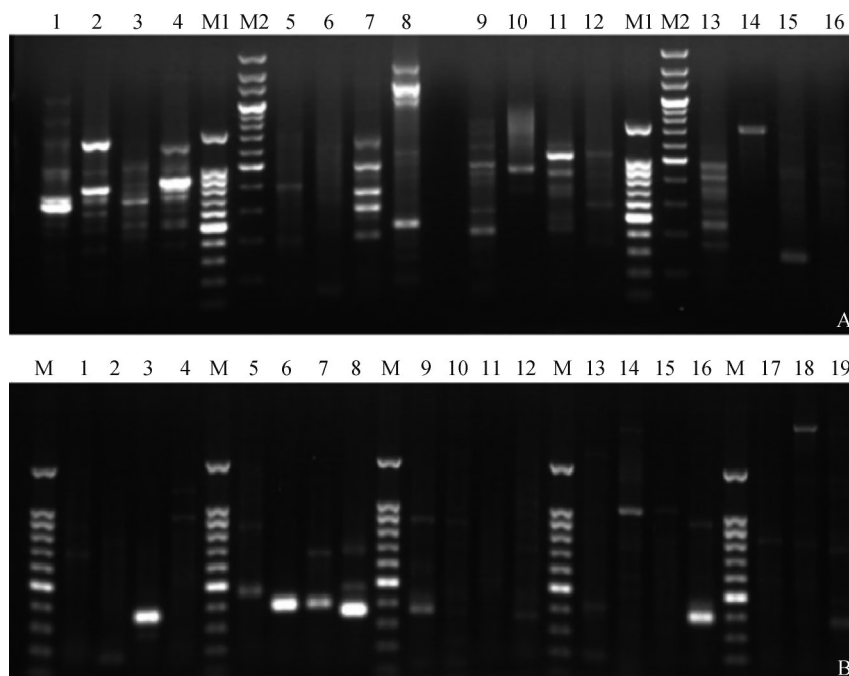
2.8 重组杆状病毒表达 scFv 和 scFv-fFc 及 Western blot 分析

scFv 和 scFv-fFc 在 SF9 细胞中表达且主要在

细胞沉淀中大量表达,在细胞上清中少量表达,如图11所示。

3 讨论

伴侣动物肿瘤的诊疗已成为兽医关注的重要问题,免疫治疗在人类癌症治疗中的突破,启发了该技术在兽医领域的应用^[26],由于各种原因,对伴侣动物癌症微环境,包括免疫检查点分子的研究还很少,国内外几家单位已研制出犬 PD-1 和 PD-L1 的单克隆抗体,而仅有日本四个大学联合研制出了猫 PD-L1 的单克隆抗体^[8-12]。有研究表明,用抗人 PD-L1 单抗 28-8 可以检测猫肥大细胞瘤 PD-L1 的

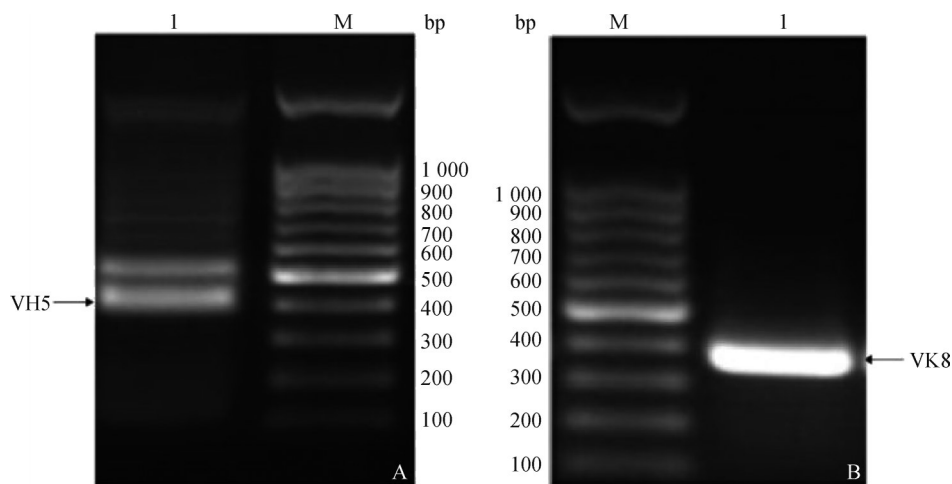


A. 抗体重链基因扩增:M1. 100 bp marker;M2. 200 bp marker;1~16. 第1对~第16对重链基因扩增。B. 抗体轻链基因扩增:M1. 100 bp marker;1~19. 第1对~第19对轻链基因扩增

A. Antibody heavy chain gene amplification: M1. 100 bp marker; M2. 200 bp marker; 1-16. The first to the 16th pairs of heavy chain gene amplification. B. Antibody light chain gene amplification: M1. 100 bp marker; 1-19. The first to the 19th pairs of light chain gene amplification

图5 抗体基因扩增

Fig. 5 Antibody gene amplification



A. 抗体重链基因扩增:M. 100 bp marker;1. 第5对重链基因扩增。B. 抗体轻链基因扩增:M. 100 bp marker;1. 第8对轻链基因扩增

A. Antibody heavy chain gene amplification: M. 100 bp marker; 1. The 5th pair of heavy chain gene amplification. B. Antibody light chain gene amplification: M. 100 bp marker; 1. The 8th pair of light chain gene amplification

图6 抗体轻重链基因扩增

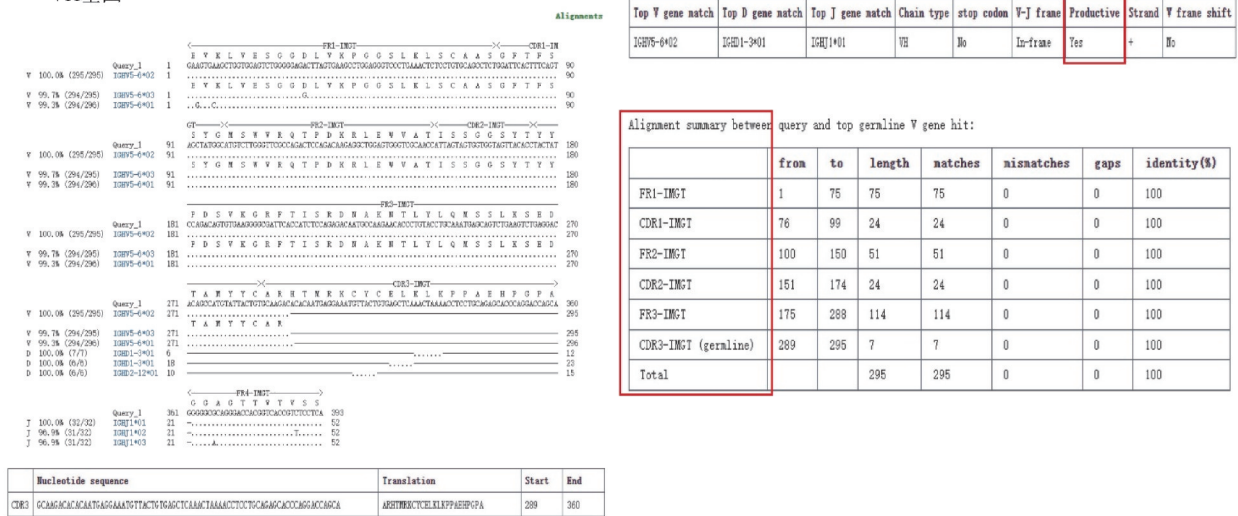
Fig. 6 Amplification of antibody light and heavy chain genes

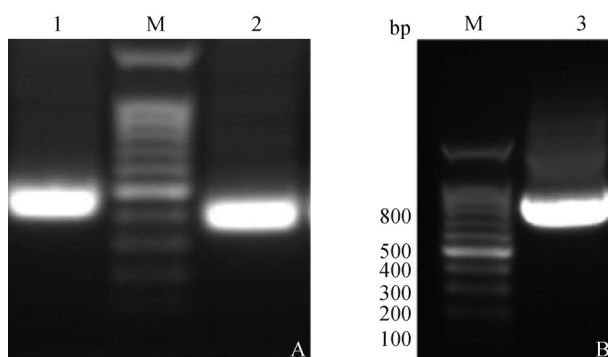
表达,证明了28-8抗体是检测猫PD-L1的一个有价值的工具,未来有望对猫肿瘤组织进行进一步分

析^[27]。因为目前尚无商品化针对猫PD-L1单克隆抗体,有必要制备能够特异性识别猫PD-L1分子的

A

VH基因



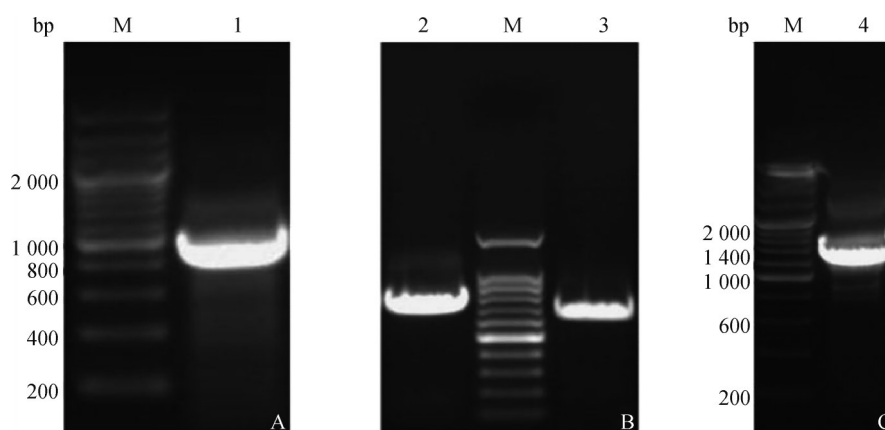


A. 抗体轻重链基因扩增:M. 100 bp marker;1. VH5 Linker;2. VK8 Linker;B. scFv 拼接:M. 100 bp marker;3. scFv

A. Antibody light and heavy chain gene amplification: M. 100 bp marker; 1. VH5 Linker; 2. VK8 Linker. B. ScFv splicing: M. 100 bp marker;3. scFv

图8 VH5与VK8的扩增及其scFv的拼接

Fig. 8 Amplification of VH5 and VK8 and splicing of their scFv

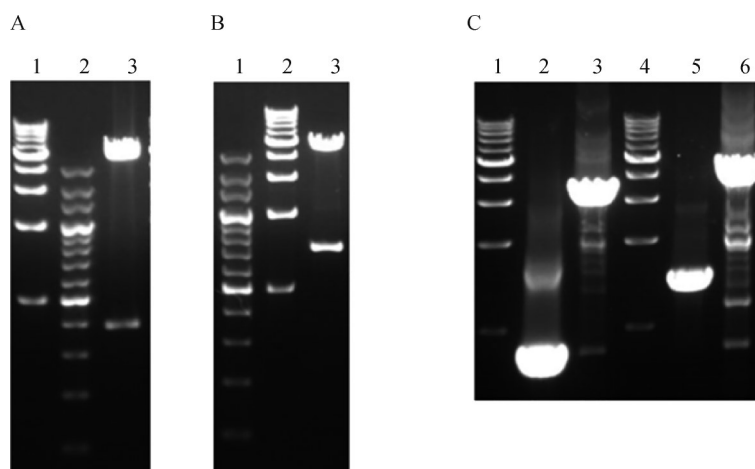


A. 猫恒定区抗体基因扩增:M. 200 bp marker;1. 猫恒定区抗体基因。B. scFv与猫 IgG-Fc 基因扩增:M. 100 bp marker;2. scFv;3. 猫 IgG-Fc。C. 猫源化嵌合单链抗体基因:M. 200 bp marker;4. scFv-fFc

A. Amplification of the feline constant region antibody gene: M. 200 bp marker; 1. Feline constant region antibody gene. B. Amplification of scFv and feline IgG-Fc genes: M. 100 bp marker; 2. scFv; 3. Feline IgG-Fc. C. Feline-derived chimeric single-chain antibody gene: M. 200 bp marker; 4. scFv-fFc

图9 猫源化嵌合单链抗体基因的拼接

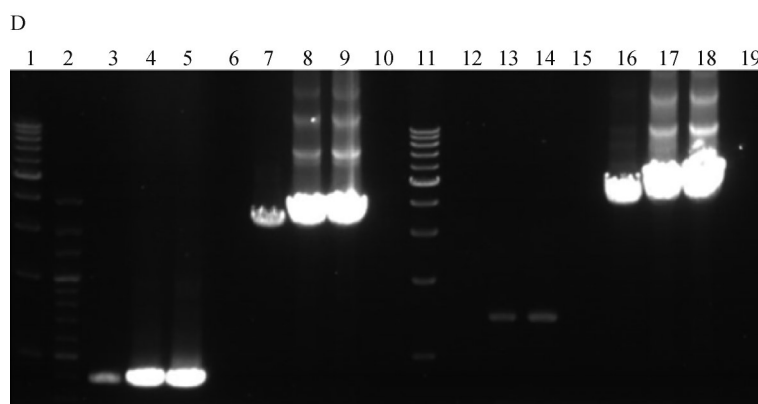
Fig. 9 Assembly of the feline-derived chimeric single-chain antibody gene



(图10 Fig.10)

(转下页 Carried forward)

(续图 10 Continued)

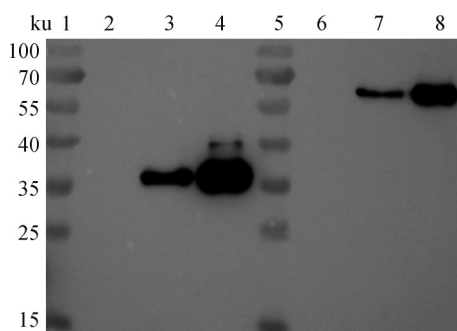


A. rBacmid-scFv 的双酶切鉴定: 1. 1 kb marker; 2. 200 bp marker; 3. rBacmid-scFv 双酶切。B. rBacmid-scFv-fFc 的双酶切鉴定: 1. 1 kb marker; 2. 200 bp marker; 3. rBacmid-scFv-fFc 双酶切。C. M13 引物和特异性引物 PCR 鉴定 rBacmid-scFv 和 rBacmid-scFv-fFc: 1、4. 1 kb marker; 2. scFv 引物鉴定 rBacmid-scFv; 3、6. M13 引物鉴定 rBacmid-scFv 和 rBacmid-scFv-fFc; 5. scFv-fFc 引物鉴定 rBacmid-scFv-fFc。D. M13 引物和特异性引物 PCR 鉴定 P1-P3 代重组杆状病毒 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc: 1、11. 1 kb marker; 2. 200 bp marker; 3~5. scFv 引物鉴定 P1-P3 代 rBV-scFv; 7~9、16~18. M13 引物鉴定 P1-P3 代 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc; 6、10、15、19. 未接毒对照; 12~14. scFv-fFc 引物鉴定 P1-P3 代 rBV-scFv-fFc

A. Double enzyme digestion production of rBacmid-scFv: 1. 1 kb marker; 2. 200 bp marker; 3. Double enzyme digestion of rBacmid-scFv. B. Double enzyme digestion production of rBacmid-scFv-fFc: 1. 1 kb marker; 2. 200 bp marker; 3. Double enzyme digestion of rBacmid-scFv-fFc. C. PCR production of rBacmid-scFv and rBacmid-scFv-fFc using M13 primers and specific primers: 1, 4. 1 kb marker; 2. Identification of rBacmid-scFv using scFv primers; 3, 6. Identification of rBacmid-scFv and rBacmid-scFv-fFc using M13 primers; 5. Identification of rBacmid-scFv-fFc using scFv-fFc primers. D. PCR production of P1-P3 generations of recombinant baculovirus rBV-scFv and rBV-scFv-fFc using M13 primers and specific primers: 1, 11. 1 kb marker; 2. 200 bp marker; 3-5. Identification of P1-P3 generations of rBV-scFv using scFv primers; 7-9, 16-18. Identification of P1-P3 generations of rBV-scFv and rBV-scFv-fFc using M13 primers; 6, 10, 15, 19. Non-infected controls; 12-14. Identification of P1-P3 generations of rBV-scFv-fFc using scFv-fFc primers

图 10 重组杆状病毒 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc 的拯救

Fig. 10 Rescue of recombinant baculoviruses rBV-scFv and rBV-scFv-fFc



1、5. Marker; 2~4、6~8. 分别为 P3 代 rBV-scFv 和 rBV-scFv-fFc 感染 SF9 细胞培养基、细胞破碎上清、细胞破碎沉淀 1、5. Marker; 2-4 和 6-8: Represent the P3 generation rBV-scFv- and rBV-scFv-fFc-infected SF9 cell culture medium, cell lysate supernatant, and cell lysate pellet, respectively

图 11 Western blot 鉴定 scFv 和 scFv-fFc 的表达

Fig. 11 Western blot analysis of scFv and scFv-fFc expression

据。然而猫肿瘤及其标识分子相关研究较少,本试验中抗体的研制有望未来对 PD-L1 在多种猫科动物肿瘤中的表达和分析及深入研究提供必要的工具。然而,在本研究中,样本数量有限,将来需要做更多的犬猫肿瘤切片,分析 PD-L1 在猫肿瘤组织标本中的表达情况,探讨 PD-1/PD-L1 免疫治疗在犬猫肿瘤中的潜在疗效。此外,肿瘤组织分级和肿瘤亚型也会影响 PD-L1 的表达分析,有些肿瘤组织不表达 PD-L1 可能也与肿瘤分级和肿瘤亚型有关。有研究表明诱导肿瘤细胞 PD-L1 表达的机制之一是对 IFN- γ 的反应^[6],这很可能是在抗肿瘤免疫反应过程中肿瘤微环境中的免疫细胞产生的。由于犬肿瘤细胞系中 PD-L1 的表达可被犬 IFN- γ 诱导或增强^[12],因此这种机制也很可能参与了犬 PD-L1 的调控。另一种机制与致癌信号有关;据报道,在

胶质瘤和三阴性乳腺癌细胞中,磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)功能的丧失可上调 PD-L1 的表达^[28-29]。尽管有时候 PD-L1 的表达存在不清楚性,但是 PD-L1 的表达分析对 PD-1/PD-L1 抑制剂在犬猫中的临床应用具有重要意义,因为在抗 PD-1 抗体的人体临床试验中,PD-L1 的表达被报道与治疗结果相关。PD-L1 阳性肿瘤患者的客观缓解率为 36%,而 PD-L1 阴性肿瘤患者均无客观缓解^[30]。由于抗 PD-L1 抗体被证明对犬癌症具有治疗潜力^[12],因此抗 PD-L1 抗体的临床应用值得进一步研究。

尽管预测的猫 PD-L1 的分子量分别为 33.4 ku,但使用 G11-6 的免疫沉淀结果显示,猫 PD-L1 的分子量约为 60 ku^[13],可能猫 PD-L1 具有糖基化和泛素化,影响了分子量大小,人 PD-L1 存在广泛的 N-糖基化修饰。有研究表明,全长 PD-L1 的晶体结构产生了同源二聚体^[31]。在本试验中采取了原核系统表达猫 PD-L1,原核表达不涉及翻译后的修饰,蛋白大小与预测的大小相符合。原核蛋白不具有像真核蛋白那样的纯天然的构象,所以未来探究猫 PD-L1 分子的作用机制,还是需要采用真核表达系统。

为了降低抗猫 PD-1 单抗临床应用的免疫原性,有研究将克隆 1A1-2 的可变区与猫 IgG1 的恒定区融合,制备了鼠-猫嵌合单抗(Ch-1A1-2),发现 Ch-1A1-2 也能增加激活猫外周血淋巴细胞中 IFN- γ 的产生,认为 1A1-2 是首个具有抑制猫 PD-1 和 PD-L1 相互作用能力的抗猫 PD-1 单克隆抗体,而嵌合抗体 ch-1A1-2 将是治疗猫肿瘤的有益抗体^[27]。本试验制备的猫 PD-L1 单抗只验证了单抗识别犬猫肿瘤组织表面的 PD-L1,至于能否阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合,还需要进一步验证。此外,本研究扩增了 2A5A2F4D7 杂交瘤细胞的抗体基因,制备了 scFv,并且将 scFv 和猫 IgG1 恒定区相连,制备出猫源化嵌合单链抗体,但是,scFv 和 scFc-fFc 是否具备结合 PD-L1 的特性以及通过阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合而实现治疗犬猫肿瘤,也需要进一步在临床上开展试验。

目前单链抗体常用的表达系统有:细菌、酵母、动物细胞(昆虫细胞、CHO 细胞等),本试验采用昆虫杆状病毒表达系统进行 scFv 和 scFc-fFc 的表达,在表达过程中,由于采取的是贴壁培养,所以表达量不大,经纯化后蛋白浓度为 0.05 mg·mL⁻¹,后续

拟采取悬浮培养,进行大量表达。

4 结 论

本研究制备的猫 PD-L1 单克隆抗体,在 IHC 中能识别犬、猫肿瘤组织中 PD-L1 的表达情况,通过对已鉴定为肿瘤的组织进行 IHC 验证,表明 PD-L1 的表达与肿瘤的恶性程度之间有一定的相关性,可以应用于犬猫肿瘤的诊疗中。

参考文献(References):

- [1] 黄琳娜. 广东省犬猫肿瘤流行病学调查及加味柴胡疏肝散治疗恶性乳腺肿瘤的临床疗效[D]. 广州:华南农业大学,2023.
- [2] HUANG L N. Epidemiological investigation of canine and cat tumors in Guangdong province and clinical efficacy of modified chaihu shugan powder in the treatment of malignant breast tumors[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [3] BLACKWOOD L. Cats with cancer: where to start [J]. *J Feline Med Surg*, 2013, 15(5): 366-377.
- [4] BRØNDEN L B, NIELSEN S S, TOFT N, et al. Data from the danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in denmark [J]. *Vet Rec*, 2010, 166(19): 586-590.
- [5] 罗盈滢. 犬猫肿瘤性疾病的临床诊疗方法[J]. 湖北畜牧兽医, 2017, 38(5): 23-24.
- [6] LUO Y Y. Clinical diagnosis and treatment methods for canine and feline tumor diseases[J]. *Hubei Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 38(5): 23-24. (in Chinese)
- [7] HE X, XU C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy [J]. *Cell Res*, 2020, 30(8): 660-669.
- [8] DONG H, STROME S E, SALOMAO D R, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion [J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 793-800.
- [9] SZNOL M, CHEN L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(5): 1021-1034.
- [10] WONG R M, SCOTLAND R R, LAU R L, et al.

- Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs [J]. *Int Immunol*, 2007, 19(10): 1223-1234.
- [9] THOMPSON R H, KUNTZ S M, LEIBOVICH B C, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3381-3385.
- [10] COY J, CALDWELL A, CHOW L, et al. PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade [J]. *Vet Comp Oncol*, 2017, 15(4): 1487-1502.
- [11] NEMOTO Y, SHOSU K, OKUDA M, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1 [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2018, 198: 19-25.
- [12] MAEKAWA N, KONNAI S, IKEBUCHI R, et al. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98415.
- [13] NISHIBORI S, KANEKO M K, NAKAGAWA T, et al. Development of anti-feline PD-1 antibody and its functional analysis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 6420.
- [14] IGASE M, NEMOTO Y, ITAMOTO K, et al. A pilot clinical study of the therapeutic antibody against canine PD-1 for advanced spontaneous cancers in dogs [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18311.
- [15] MAEKAWA N, KONNAI S, NISHIMURA M, et al. PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2021, 5(1): 10.
- [16] MAEKAWA N, KONNAI S, TAKAGI S, et al. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8951.
- [17] IGASE M, INANAGA S, TANI K, et al. Long-term survival of dogs with stage 4 oral malignant melanoma treated with anti-canine PD-1 therapeutic antibody: A follow-up case report [J]. *Vet Comp Oncol*, 2022, 20(4): 901-905.
- [18] BLAZEK D, CELER V. The production and application of single-chain antibody fragments [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2003, 48(5): 687-698.
- [19] 任 锐, 王艳伟, 吕雪峰. 单链抗体在兽医上的应用前景 [J]. 兽医导刊, 2010(12): 39-40
- REN R, WANG Y W, LÜ X F. Application prospects of single chain antibodies in veterinary medicine [J]. *Veterinary Guide*, 2010(12): 39-40. (in Chinese)
- [20] HOLLIGER P, HUDSON P J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1126-1136.
- [21] WEISSER N E, HALL J C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(4): 502-520.
- [22] STONE C A, SPILLER B W, SMITH S A. Engineering therapeutic monoclonal antibodies [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2024, 153(3): 539-548.
- [23] 郭 鑫. 抗不同物种动物 IgG 单克隆抗体的制备及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- GUO X. Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies against IgG of different species of animals[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023. (in Chinese)
- [24] ROHATGI S, GANJU P, SEHGAL D. Systematic design and testing of nested (RT-) PCR primers for specific amplification of mouse rearranged/expressed immunoglobulin variable region genes from small number of B cells [J]. *J Immunol Methods*, 2008, 339(2): 205-219.
- [25] YU Y, WANG G, LI Q, et al. Single-chain anti-idiotypic antibody retains its specificity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 [J]. *Immunol Lett*, 2015, 163(1): 8-13.
- [26] CANNON C. Cats, Cancer and comparative oncology [J]. *Vet Sci*, 2015, 2(3): 111-126.
- [27] NISHIBORI S, SAKURAI M, KAGAWA Y, et al. Cross-reactivity of anti-human programmed cell death

- ligand 1 (PD-L1) monoclonal antibody, clone 28-8 against feline PD-L1[J]. *J Vet Med Sci*, 2023, 85(6): 592-600.
- [28] MITTENDORF E A, PHILIPS A V, MERIC-BERNSTAM F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(4):361-370.
- [29] PARSA A T, WALDRON J S, PANNER A, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma [J]. *Nat Med*, 2007, 13(1):84-88.
- [30] TOPALIAN S L, HODI F S, BRAHMER J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2443-2454.
- [31] ZAK K M, GRUDNIK P, MAGIERA K, et al. Structural biology of the immune checkpoint receptor PD-1 and its ligands PD-L1/PD-L2 [J]. *Structure*, 2017, 25(8):1163-1174.
- (编辑 范子娟)