

# 特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的表达、纯化及生物学活性鉴定

别彩群, 杨冬华, 汤绍辉, 丁世华

别彩群, 广州医学院附属深圳沙井医院消化科 广东省深圳市 518104

杨冬华, 汤绍辉, 暨南大学附属第一医院消化科 广东省广州市 510630

丁世华, 深圳市第二人民医院消化科 广东省深圳市 518000  
广东省科技计划基金资助项目, No. 2006B19901014

作者贡献分布: 别彩群、杨冬华、汤绍辉及丁世华对此文所作贡献均等; 此课题由杨冬华与汤绍辉设计; 研究过程由别彩群与丁世华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杨冬华提供; 数据分析由别彩群与汤绍辉完成; 本论文写作由别彩群、杨冬华、汤绍辉及丁世华共同完成。

通讯作者: 别彩群, 主治医师, 518104, 广东省深圳市, 广州医学院附属深圳沙井医院消化科. looshy@yahoo.cn  
电话: 0755-27722241-3819

收稿日期: 2009-10-15 修回日期: 2009-11-16

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

## Expression, purification and biological activity assay of humanized single-chain Fv dimers against hepatocellular carcinoma in *Pichia pastoris*

Cai-Qun Bie, Dong-Hua Yang, Shao-Hui Tang, Shi-Hua Ding

Cai-Qun Bie, Department of Gastroenterology, Shenzhen Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Shenzhen 518104, Guangdong Province, China

Dong-Hua Yang, Shao-Hui Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Shi-Hua Ding, Department of Gastroenterology, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2006B19901014

Correspondence to: Cai-Qun Bie, Department of Gastroenterology, Shenzhen Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Shenzhen 518104, Guangdong Province, China. looshy@yahoo.cn

Received: 2009-10-15 Revised: 2009-11-16

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

## Abstract

**AIM:** To express the humanized single-chain Fv dimers against hepatocellular carcinoma (BDM diabody) in *Pichia pastoris* and assay their biological activity and function.

**METHODS:** The yeast expression plasmid pGAPZαA-BDM was constructed and trans-

formed into *Escherichia coli* (*E.coli*) strain DH5α. The recombinant vector plasmid was then amplified, sequenced and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 to express BDM diabody in yeast. The expression product was identified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Western blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry.

**RESULTS:** SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the BDM diabody was successfully expressed in *Pichia pastoris*. The yield of BDM was 30 mg/L, approximately 300 times as high as that in *E.coli*. The expression product showed significantly stronger binding to hepatocellular carcinoma cells than single-chain variable fragment (scFv) antibody. The purified diabody could specially bind to tumor antigens of hepatocellular carcinoma.

**CONCLUSION:** Biologically active humanized diabody against hepatocellular carcinoma is successfully prepared and can be used for targeted diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma.

**Key Words:** Diabody against hepatocellular carcinoma; *Pichia pastoris*; Binding activity; Specificity

Bie CQ, Yang DH, Tang SH, Ding SH. Expression, purification and biological activity assay of humanized single-chain Fv dimers against hepatocellular carcinoma in *Pichia pastoris*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3729-3733

## 摘要

**目的:** 实现特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中高效表达、纯化并鉴定其生物学活性。

**方法:** 构建酵母表达载体pGAPZαA-BDM, 转化感受态大肠杆菌DH5α, 选择测序正确的阳性克隆进行扩增后, 电转化酵母细胞, 表达抗体二聚体, 对表达抗体进行纯化、浓度检测, 并鉴定其对肝癌细胞的结合活性, 免疫组织化学检测二聚体对肝癌组织抗原的特异性。

## ■背景资料

肝癌是全球第5常见的癌症, 占有癌症的5.6%, 全球每年的新病例约为564 000例。他亦是我国癌症中的第二号杀手, 全球50%以上的肝癌发生在我国。但仅10%-30%肝癌患者能接受根治性切除手术, 整体预后差, 肝癌传统治疗手段包括手术治疗、肿瘤局部治疗、放化疗, 可是疗效并不理想, 因此, 探索更有效的诊断和治疗方法是目前肝癌研究亟待解决的问题之一。

## ■同行评议者

高英堂, 研究员, 天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

## ■研发前沿

抗体技术的发展主要经历了3个阶段,多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体。目前在临床诊断和治疗中,基因工程抗体的应用广泛,如何制备亲和力高、稳定性好、具有很好生物活性且产量高的基因工程抗体一直是抗体研究领域需要解决的关键问题。

**结果:**测序显示成功构建酵母表达载体pGAPZ $\alpha$ A-BDM,表达96 h抗体收获量最大,二聚体表达量为30 mg/L菌液,为大肠杆菌的300倍。抗肝癌单链抗体二聚体BDM与三种肝癌细胞结合,而与正常肝细胞不结合,结合效价为1:128。免疫组织化学显示二聚体与肝癌组织结合的阳性率比肝硬化、胃癌、正常肝组织高,差异有统计学意义。

**结论:**成功制备了高表达量、高特异性、较好的活性及稳定性的抗肝癌单链抗体二聚体BDM,为制备免疫纳米颗粒及开展肝癌的放射免疫诊断和靶向治疗奠定了基础。

**关键词:**肝癌抗体二聚体;毕赤酵母;结合活性;特异性

别彩群,杨冬华,汤绍辉,丁世华.特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的表达、纯化及生物学活性鉴定.世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3729-3733

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3729.asp>

## 0 引言

肝癌的分子靶向治疗是以肝癌细胞过度表达的某些标志性分子为靶点,选择针对性的阻断剂,有效地干预受该标志性分子调控和密切相关的信号传导通路,从而达到抑制肿瘤生长、进展及转移的效果。其中新型肝癌基因工程抗体作为载体的导向治疗是未来肝癌免疫治疗的研究热点<sup>[1]</sup>。2001年我们构建抗肝癌噬菌体单链抗体库<sup>[2]</sup>,筛选出一株抗肝癌特异性单链抗体,并对抗体进行亲和力成熟、人源化改造及二聚体构建,得到亲和力高、免疫原性低,具有很好生物活性的抗肝癌的人源化二聚体抗体BDM<sup>[3-5]</sup>。但由于大肠杆菌对抗体的分泌表达量低,不能满足研究及临床需要。毕赤酵母表达系统是20世纪80年代初期发展起来的一种新型的外源蛋白表达系统。他既具有原核表达系统操作简易、易于培养、生长速度快、表达量高、成本低等优点,还具有原核生物表达系统所不具有的对外源蛋白的翻译后修饰等特点,如糖基化、蛋白磷酸化等,该表达系统成为目前最优秀、应用最为广泛的外源基因表达系统之一。本研究重点为实现抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的高效表达、纯化、二聚体分离以及抗体的生物功能的检测。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 含有抗肝癌单链抗体基因的pCANTAB 5E-BDM重组质粒由本实验室构建;毕赤酵母

GS115、大肠埃希菌-酵母穿梭质粒pGAPZ $\alpha$ A为Invitrogen公司产品;大肠杆菌DH5 $\alpha$ 由本室保存;Superdex 200 HR10/30色谱柱为Amershan公司产品;Primerstar DNA聚合酶、限制性内切酶、T4连接酶、蛋白质分子质量标准(低)及DNA MARK DL2000、标准蛋白为TaKaRa公司产品;Yeast DNA Kit试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、DNA纯化试剂盒为Omega公司产品;超滤管为Milipore公司产品;人肝癌细胞系(HepG2、Bel-7402、SMMC7721)、正常人胎肝细胞系(L-02)均为本实验室保存。组织标本为暨南大学附属第一医院病理科提供;其余常用试剂为国产或进口分析纯试剂。PCR引物由上海英俊公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组酵母表达质粒pGAPZ $\alpha$ A-BDM的构建:**以人源化单链抗体pCANTAB5E-BDM重组质粒为模板,使用Premier Primer 5.0软件上游引物:5'-ATAGAATTTCATGGCCCAGGTGAAGCTGCA-3',下游引物:5'-ATACTAGACCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGT-3',于引物5'端或3'端分别设计限制性内切酶EcoR I和Xba I的酶切位点,扩增出BDM基因片段。PCR条件:95℃预变性5 min,94℃变性30 s,64℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环,最后延伸10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,DNA凝胶回收试剂盒回收,其长度大约为750 bp。二聚体基因回收后分别与pGAPZ $\alpha$ A载体经EcoR I和Xba I内切酶双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收,T4连接酶连接,构建pGAPZ $\alpha$ A-BDM质粒,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,用LLBZ(含25 mg/L Zeocin)平板筛选阳性克隆,经酶切鉴定后送上海英俊和生工测序。

**1.2.2 电转化试验:**将重组成功的质粒pGAPZ $\alpha$ A-BDM大量扩增,予限制性内切酶Ava II酶切消化,使之线性化;常规培养毕赤酵母GS115至A<sub>600</sub>达到1.3-1.5,以冰预冷的1 mol/L山梨醇处理菌体,制备感受态细胞。将10  $\mu$ L线性化DNA(pGAPZ $\alpha$ A-BDM)与80  $\mu$ L新鲜感受态细胞混匀,在电压300 V,脉冲时间15 ms,1个脉冲,进行电击转化,同时以转染质粒pGAPZ $\alpha$ A为阴性对照。30℃温育1-2 h,将菌体悬液涂布于含100 mg/L Zeocin的YPDS平板上,30℃培养至单个菌落出现。

**1.2.3 重组转化酵母的PCR鉴定:**在YPD培养基中培养酵母工程菌种大约至A<sub>600</sub> = 6,提取毕赤酵母基因组DNA,以酵母基因组DNA为模板,以前面特异性引物进行PCR鉴定分析。

**1.2.4 二聚体抗体的大量表达和纯化:**挑选一株

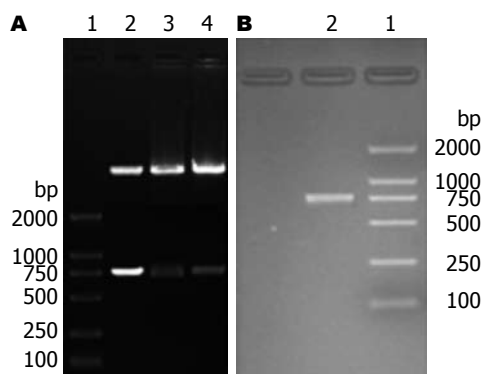


图1 重组质粒双酶切凝胶及PCR电泳图。

阳性克隆接种于YPD培养基中, 28℃-30℃、250-300 r/min连续培养2-4 d, 取1 L重组酵母菌培养物, 8000 r/min离心20 min, 除去沉淀, 上清用Millipore超滤管进行20倍浓缩。浓缩液予镍琼脂糖凝胶FF柱纯化, 分别用100、200、300、500 mmol/L咪唑的缓冲液进行阶段洗脱, 收集各阶段洗脱峰。

**1.2.5 表达产物的SDS-PAGE、Western blot及浓度的检测:** 按文献[6]的方法进行SDS-PAGE和Western blot检测, 按BCA蛋白测定试剂盒说明书测定所表达抗体的浓度。

**1.2.6 二聚体抗体的生物活性检测:** 将抗体进行生物活性检测, 一抗为纯化获得的BDM抗体, 二抗为HRP标记的抗-His单克隆抗体。结果判断: 比值 = (实验组 $A_{490}$ 值-空白对照 $A_{490}$ 值)/(阴性对照 $A_{490}$ 值-空白对照 $A_{490}$ 值); 该比值 $\geq 2$ 即为阳性, 以测定仍为阳性的最高倍数作为BDM的效价。

**1.2.7 二聚体抗体的免疫组织化学检测:** 将抗体进行免疫组织化学检测, 一抗为纯化后获得的BDM抗体, 二抗为HRP标记的抗-His。结果判断: 根据组织切片中阳性细胞所占的比例, 将免疫组织化学结果分为4个等级, 即分为阴性(-): 阳性细胞小于1%; 阳性(+): 阳性细胞占1-29%; 阳性(++): 阳性细胞占30-49%; 阳性(+++): 阳性细胞占50%以上。计算各组的阳性率, 采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 重组酵母表达质粒的构建和鉴定** 提取筛选到的pGAPZ $\alpha$ A2-BDM质粒DNA, 分别进行EcoRI + XbaI双酶切及PCR扩增, 阳性重组质粒双酶切后可产生3100及750 bp两条带, 大小与目的DNA和载体片段长度相符, PCR扩增可获得与预期相符、大小约750 bp的单一一条带, 见下图1A; 测序结果进一步证明正确构建了酵母表达

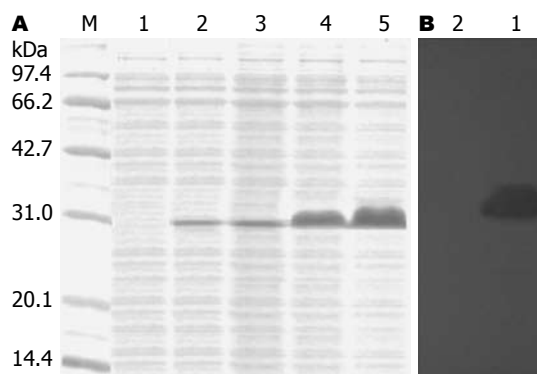


图2 酵母工程菌24、48、72、96 h各个时间点表达抗体的聚丙烯酰胺电泳和免疫印迹分析。

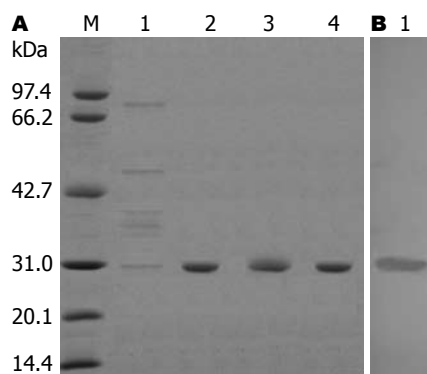


图3 抗体BDM的柱纯化及免疫印迹检测。

载体pGAPZ $\alpha$ A-BDM。

**2.2 重组酵母表达载体的转化、筛选与鉴定结果** 重组酵母载体pGAPZ $\alpha$ A-BDM和空白载体pGAPZ $\alpha$ A在被导入宿主菌后, 经YPD+Zeocin平板筛选阳性转化子, 初步判定这些转化子为重组转化子。提取酵母基因组DNA, 以酵母转化子基因组DNA为模板, 用扩增目的基因BDM的特异性引物按原条件进行PCR反应扩增, 产物为750 bp的特异性条带, 见图1B, 与预期结果一致。

**2.3 二聚体抗体表达及鉴定** 分别收取24、48、72、96 h各个时间点酵母悬浮液, 离心后取相同量样品进行SDS-PAGE分析, 在31 kDa处有各有一清晰蛋白条带, 大小与BDM变性条件下理论分子量相近, 其中72、96 h时间点条带较前两个时间点浓, 而pAGPZ $\alpha$ A空载体对照则无条带可见(图2A); 阳性重组转化子表达上清液经Western blot分析(图2B), 在31 kDa处都有一显色条带, 而作为阴性对照菌株无显色条带, 说明阳性重组转化子能够分泌表达目的蛋白。

**2.4 抗体的纯化及浓度检测** 将大量表达96 h的菌液离心, 收集的上清液超滤至20 mL, 0.22  $\mu$ m滤膜过滤后, 使用Ni-柱亲和层析纯化, 使用不同的咪唑浓度洗脱, 洗脱液取样进行SDS-PAGE检测。

### ■创新盘点

本研究首次将该课题组构建的具有较好的抗肿瘤潜力的特异性抗肝癌二聚体抗体在毕赤酵母中表达, 并进行抗体生物学活性检测, 成功获得高产量具有良好生物学活性的二聚体抗体, 为抗肝癌抗体在后续研究及临床应用奠定了基础。

### ■同行评价

本文对特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的表达、纯化及生物学活性鉴定进行研究,具有一定的学术价值和可读性.

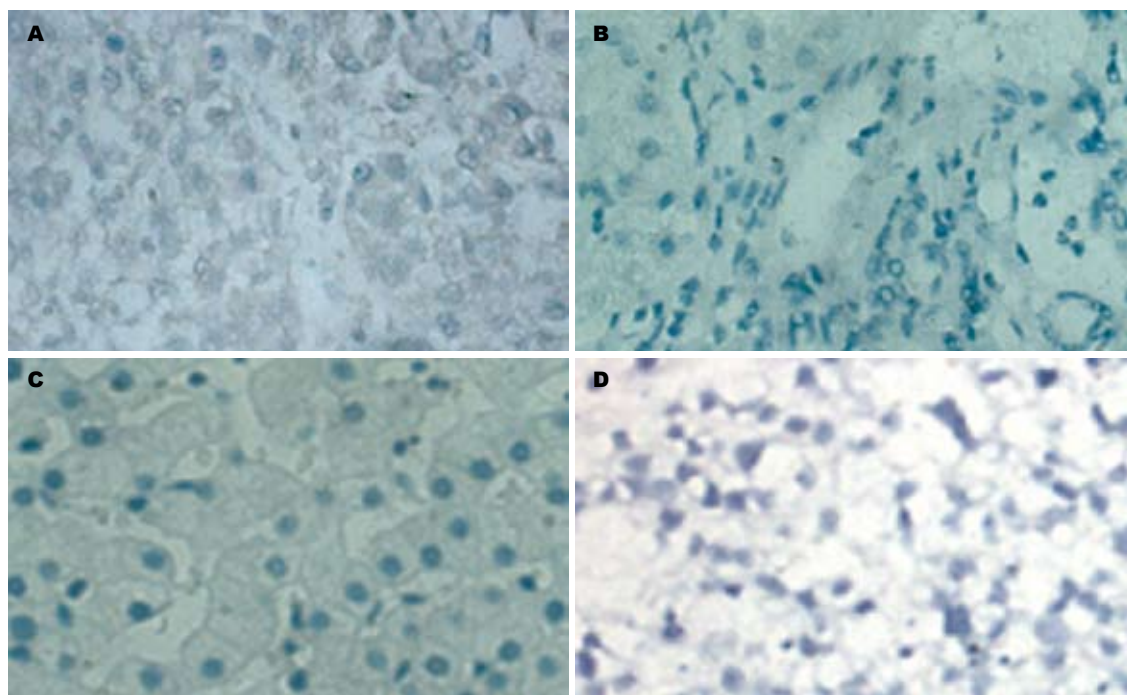


图4 二聚体抗体BDM分别与肝癌、肝硬化、正常肝组织、胃癌等组织免疫组织化学反应. A: 抗体与肝癌组织反应; B: 抗体与肝硬化反应; C: 抗体与正常肝组织反应; D: 抗体与胃癌组织反应.

表1 抗肝癌单链抗体二聚体BDM效价的测定 ( $A_{490}$ )

克隆	空白	阴性	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
HDM	0.006	0.113	0.718	0.653	0.556	0.407	0.325	0.272	0.227	0.161	0.105
BDM	0.013	0.121	0.892	0.823	0.729	0.625	0.582	0.482	0.318	0.251	0.158

表2 免疫组织化学检测抗肝癌单链抗体二聚体BDM组织反应的阳性率

疾病	<i>n</i>	阳性( <i>n</i> )	阴性( <i>n</i> )	阳性率(%)	$\chi^2$ 值 <sup>1</sup>	<i>P</i> 值
肝癌	30	12	18	40.0		
肝硬化	18	2	16	11.1	4.81	<0.05
胃癌	15	1	14	6.7	6.22	<0.01
正常肝组织	10	0	10	0.0	10.11	<0.001

<sup>1</sup>: 肝癌组织分别与其他组织比较的 $\chi^2$ .

结果表明: 在100 mmol/L咪唑浓度下洗去主要杂蛋白, 而目的蛋白主要在200-500 mmol/L咪唑浓度下被洗脱(图3A). Western blot检测确证了纯化的蛋白为带有6 His Tag的目的蛋白, 结果如图3B. BCA法测得抗体浓度为30 mg/L菌液, 为大肠杆菌表达量的300倍.

**2.5 表达产物的生物活性及组织特异性** 为了测定二聚体抗体与肝癌细胞结合的活性, 分别以不同稀释度的BDM与肝癌细胞(三株肝癌细胞HepG2、Bel-7402、SMMC7721按1:1:1比例混匀)进行ELISA检测, 结果表明二聚体抗体

BDM在稀释度为1:128时的 $A_{490}$ 值仍为阴性对照 $A_{490}$ 值的2倍以上, 具有与肝癌细胞结合的活性(表1). 而亲本单链抗体HDM与肝癌细胞的结合活性为1:64. 抗肝癌单链抗体二聚体BDM与肝癌、肝硬化、胃癌、正常肝组织反应的阳性率分别为40.0%(12/30)、11.0%(2/18)、6.7%(1/15)、0(0/10). 肝癌组织的阳性率比正常肝、肝硬化、胃癌组织的阳性率高, 差异均有统计学意义(表2). 提示: 抗肝癌特异性单链抗体二聚体BDM对人肝癌组织的特异性高于其他组织, 即对肝癌组织有特异性. 组织切片见图4.

### 3 讨论

人类运用抗体进行疾病的诊治大致经历了多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体3个阶段,其中以单克隆抗体和基因工程抗体的应用为主.如何制备出亲和力高、稳定性好、产量大的人源化基因工程抗体是抗体工程需要解决的关键问题.国外研究显示,抗体分子量大小与肿瘤穿透力、肿瘤靶向性及药物代谢动力学关系密切,分子量太小容易在肾脏被迅速清除,分子量过大,组织穿透性差,都会影响抗肿瘤效应的发挥,而单链抗体二聚体,即二价抗体显示出良好的组织穿透力、肿瘤靶向和血清清除率,极可能成为肿瘤免疫治疗最具潜力的载体<sup>[7]</sup>.

大肠杆菌虽具有遗传背景清楚、生产成本低、对某些蛋白表达产量高、表达周期短等优点,但其为原核表达,所表达的抗体无法糖基化及进行正确的分子装配,并且分泌表达量很低.哺乳动物细胞、昆虫细胞虽具有表达重轻链基因、糖基化、正确的分子装配以及分泌抗体的能力,但操作复杂,表达水平低,产业化生产造价昂贵,目前难以普遍推广使用.毕赤酵母是一个新兴的重组蛋白表达系统,兼具原核细胞和真核细胞表达系统的优点,具有高效分泌表达、高密度发酵(菌体湿质量大于500 g/L)及一定的糖基化能力等优势,现已广泛应用于多种重组蛋白的表达. Freyre *et al*<sup>[8]</sup>用毕赤酵母分泌表达抗癌胚抗原单链抗体,表达量高达1.2 g/L,采用IMAC纯化,获得到0.44 g scFv蛋白,纯度约为93%. ELISA检测到的专一性比来自细菌周质腔的同种scFv的专一性高3倍.

我室已成功构建人源化抗肝癌单链抗体二聚体,与其亲本抗体相比亲和力高及稳定性好,具有很好的抗肿瘤潜力<sup>[5]</sup>.但由于大肠杆菌对抗体的分泌表达量低,无法满足后续临床需要.本研究将二聚体抗体基因克隆至酵母表达载体,成功构建了pGAPZ $\alpha$ A-BDM酵母表达载体,载体pGAPZ $\alpha$ A是组成型表达载体,在AOX1 5'端启动子序列下游,有供外源基因插入的多克隆位点,多克隆位点下游AOX1 3'端终止序列,以毕赤酵母中磷酸甘油酸脱氢酶(GAP)基因启动子作为外源基因的启动子,可组成性表达外源基因而不需要甲醇诱导、更换碳源,工艺简单,表达量较诱导型载体高,更适合药品和食品的生产.酵母分泌表达的最大特点就是表达产物直接分泌到培养基中,不需复杂的破菌过程,且自身分泌内源性蛋白很少,加之培养基中无蛋白成分,故分泌到胞外的蛋白很容易纯化<sup>[9]</sup>.本研究

中毕赤酵母在96 h时间点最大量表达抗体,表达产物经纯化后获得高纯度二聚体抗体,其浓度为30 mg/L,为大肠杆菌表达量的300倍,表达量完全能满足后续研究需要.纯化后的抗体活性检测结果为:抗肝癌单链抗体二聚体BDM与3种肝癌细胞结合,结合效价为1:128,而与正常肝细胞不结合.而抗体单体与3种肝癌细胞的结合效价为1:64,远低于二聚体活性.纯化的抗肝癌单链抗体二聚体BDM与肝癌组织反应阳性率为40.0%;高于与正常肝组织、肝硬化、胃癌组织的阳性率,差异均有统计学意义.该结果证实毕赤酵母表达系统能高效表达单链抗体二聚体,所表达抗体具有较好的生物活性,他可成为表达基因工程抗体的适宜宿主.

抗体研究的目的是最终使其能够在生物学或医学领域中广泛应用,本研究成功实现了亲和力高和特异性好的人源化抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中高效表达,为后续制备免疫纳米颗粒及开展肝癌的放射免疫诊断和靶向治疗奠定了基础.

### 4 参考文献

- 1 Yang DH. [Current status and progress of immunotherapy for hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 757
- 2 毕向军, 杨冬华, 崔俊, 李鹏, 宁晓燕, 范子荣, 覃汉荣. 抗肝癌单链抗体的构建及其结合特性. *上海免疫学杂志* 2001; 21: 289-292
- 3 Lu XH, Yang DH, Zhou M, Tang SH. [Affinity maturation of a single-chain antibody against hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 192-195
- 4 叶刚, 杨冬华, 汤绍辉, 黄卫, 丁世华, 罗静兰. 抗体库优化策略对特异性抗肝癌单链抗体的人源化. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1144-1150
- 5 Bie CQ, Yang DH, Liu L. [Construction, expression and characterization of humanized single-chain Fv dimers for hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2009; 17: 466-467
- 6 J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔. 分子克隆. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 96-98, 1713-1720
- 7 Adams GP, Tai MS, McCartney JE, Marks JD, Stafford WF 3rd, Houston LL, Huston JS, Weiner LM. Avidity-mediated enhancement of in vivo tumor targeting by single-chain Fv dimers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1599-1605
- 8 Freyre FM, Vázquez JE, Ayala M, Canaán-Haden L, Bell H, Rodríguez I, González A, Cintado A, Gaviñondo JV. Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2000; 76: 157-163
- 9 Weiss HM, Haase W, Michel H, Reiländer H. Expression of functional mouse 5-HT<sub>5A</sub> serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett* 1995; 377: 451-456