

# 抗 CD3 基因工程嵌合抗体 IgG 在哺乳动物细胞中的表达和活性测定

邵晓枫 徐 晨 许元富 熊冬生 刘银星 杨纯正\*

(中国医学科学院 中国协和医科大学血液学研究所 实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

**摘 要** 利用基因工程方法将鼠源性抗 CD3 抗体 HIT3a 的可变区和人源抗体(IgG)的完整的恒定区连接起来,构建全抗型抗 CD3 嵌合抗体,该型抗体具有较低的免疫源性可作为免疫抑制剂应用于器官移植,减少受体产生免疫排斥,提高移植器官的存活率。利用 PCR 方法从抗 CD3 ScFv 重组噬菌体表达载体 pCANTAB 5E 上扩增抗 CD3 抗体的轻链和重链可变区,将轻链和重链可变区组装到含有人抗体(IgG)恒定区的表达载体中,构建抗 CD3 嵌合抗体 IgG 的轻链和重链表达载体 PKN100 和 PG1D105,并用脂质体法共转染 CHO 细胞。结果证明,抗 CD3 嵌合抗体的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 与 HIT3a 抗体的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 完全相符,ELISA 和 Western blot 检测结果证实转染细胞的培养上清中含有抗 CD3 嵌合抗体 IgG 的表达,表达产物能与 Jurkat 细胞结合,并能竞争性抑制 HIT3a 抗体和 Jurkat 细胞结合活性,<sup>3</sup>H-TdR 掺入实验表明,抗 CD3 嵌合抗体与亲代抗体 HIT3a 一样,具有促进外周血单核细胞增殖的作用。我室构建的全抗型抗 CD3 嵌合抗体分子表达载体可在 CHO 细胞中稳定表达,表达产物有较好生物活性,具有潜在的临床应用价值。

**关键词** 基因工程抗体,抗 CD3 抗体,嵌合抗体

**中图分类号** R392 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)05-0527-05

单克隆抗体以其高度的抗原结合特异性而倍受研究者关注,但它自身的免疫原性又阻碍了在临床的大量应用。本实验研究目的在于利用基因工程方法将鼠源性抗 CD3 抗体 HIT3a 的可变区和人源抗体的完整的恒定区连接起来,构建成抗 CD3 嵌合抗体 IgG 全分子,以降低鼠源性抗体的免疫原性,发挥抗体分子 Fc 端的生物学效应,可诱导免疫耐受有效防止排斥反应,提高器官移植的存活时间和改善实验性自身免疫疾病的病情,近年来,许多实验证明小剂量 CD3 抗体在体内外具有活化 T 细胞的作用,生成的 CD3 AK 细胞在内外可有效杀伤肿瘤细胞<sup>[1,2,3]</sup>。HIT3a 是由我所免疫室制备的一株能分泌较高活性抗 CD3 鼠源单抗<sup>[4]</sup>,在此基础上我们设计构建了抗 CD3 嵌合抗体的不同片段<sup>[5]</sup>,本文构建的人源化抗 CD3 嵌合抗体载体,在 CHO(dhfr-)细胞中实现了稳定分泌表达,其表达产物可与 CD3<sup>+</sup> 的 Jurkat 细胞特异性结合,保持了亲代抗体与抗原特异结合的能力,在器官移植和肿瘤治疗上都具有良好的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

CHO(dhfr-)细胞由军事医学科学院微生物流行病研究所王海涛教授惠赠,培养在含有 HT 和 10% 的透析胎牛血清(Hyclone)的 IMDM 培养基(GIBCOBRL)中,Jurkat 细胞由本室保存,培养在 RPMI1640 培养基(GIBCOBRL)中。Plasmid Mini Kit(QIAGEN 公司),Lipofectamine plus reagent 试剂盒和 Trizol 试剂盒,PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity、M-MLV 逆转录酶、T4 DNA 连接酶、限制酶 BamH I、Hind III(GIBCOBRL),Nitrocellulose 膜(Pharmacia),Protein A(GIBCOBRL),羊抗人 Fc 抗体、HRP 标记的羊抗人 κ 链抗体(晶美生物工程公司),羊抗人 IgG-FITC(鼎国生物试剂公司),羊抗人 IgG-HRP(华美生物试剂公司),HRP-发光试剂盒(PIERCE),HRP 标记的羊抗鼠抗体和 HIT3a(中国医学科学院血液学研究所科技公司)。

收稿日期 2003-04-17,修回日期 2003-06-30。

基金项目 863 计划(中试基金国科生字 2000141 和 2001AA215341)和天津重大基金(No.003119511)。

\* 通讯作者。 Tel 86-22-27230740; Fax 86-22-27230740; E-mail:czyang@public.tpt.tj.cn

参加本工作的还有:彭 晖,杨 铭,朱桢平

## 1.2 载体与菌体

抗 CD<sub>3</sub> ScFv 重组噬菌体表达载体 pCANTAB 5E 由本室构建。含有人的轻链  $\kappa$  恒定区( $C_L$ )的轻链表达载体 pKN100 和含有人的重链  $\gamma$  恒定区( $C_H$ )的重链表达载体 PG1D105,由朱桢平教授馈赠。大肠杆菌 16C9 由本室保存。

## 1.3 引物

P<sub>1</sub> 5'-CTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCA-GACATCGAGCT-3'

P<sub>2</sub> 5'-GATCTAGAA GGATCC ACTCACGGGTCCCCG-AGCC -3'( *Bam*H I )

P<sub>3</sub> 5'-CTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCA-CAGGTGAGCTG-3'

P<sub>4</sub> 5'-TCGAAGGATCC ACTCACCTGATGAGGAGAC-GGT-3'( *Bam*H I )

P<sub>5</sub> 5'-GGTCAAAAGCTTATGGGATGGTCATGTATC-ATCCTTTTCTAGTAGCAACT-3'( *Hind*III )

下划线为酶切位点。

## 1.4 抗 CD<sub>3</sub> 抗体可变区的克隆及其表达载体的构建

以抗 CD<sub>3</sub> ScFv 重组噬菌体表达载体 pCANTAB 5E 为模板,以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 为引物进行 PCR 扩增抗 CD<sub>3</sub> 抗体 V<sub>L</sub> 基因片段,以 P<sub>3</sub> 和 P<sub>4</sub> 为引物进行 PCR 扩增抗 CD<sub>3</sub> 抗体 V<sub>H</sub> 基因片段,哺乳动物分泌蛋白的信号肽序列由引物 P<sub>5</sub> 和 P<sub>2</sub>,P<sub>5</sub> 和 P<sub>4</sub>,再次利用 PCR 方法,分别加在 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 的 5'端。扩增产物 V<sub>L</sub> 和 pKN100 载体用 *Bam*H I 和 *Hind*III 进行酶切、连接,构建成抗 CD<sub>3</sub> 抗体的轻链表达载体 pKC<sub>3</sub>L,扩增产物 V<sub>H</sub> 和 pG1D105 载体用 *Bam*H I 和 *Hind*III 进行酶切、连接,构建成抗 CD<sub>3</sub> 抗体的重链表达载体 pGC<sub>3</sub>H。

## 1.5 CHO 细胞的转染及阳性克隆的筛选

CHO( dhfr<sup>-</sup> )细胞的转染采用脂质体转染法,按试剂使用说明所推荐的方法进行。将载体 pKN100-V<sub>L</sub> 和 pG1D105-V<sub>H</sub> 共转染 CHO( dhfr<sup>-</sup> )细胞,细胞被转染 24h 后换新鲜的 IMDM 选择培养基(含 10% 的透析胎牛血清,500mg/L 的 G418),每 4 天换一次液,直至细胞克隆形成。

## 1.6 药物氨基嘌呤(MTX)的加压培养

将生长稳定的转染细胞系,在选择培养基中加入 10<sup>-8</sup>mol/L MTX,培养 2~3 周后继续以 10 倍的 MTX 浓度梯度加压培养,MTX 浓度达到 10<sup>-4</sup>mol/L,血清浓度逐渐减少,直至用无血清培养基培养。

## 1.7 RT-PCR

参照 Trizol 试剂盒说明书,提取细胞克隆的总 mRNA,在逆转录酶作用下反转录获得 cDNA 第一链,以 cDNA 为模板,分别以 P<sub>5</sub> 和 P<sub>2</sub>,P<sub>5</sub> 和 P<sub>4</sub> 为引物进行 PCR 扩增 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 片段,并进行酶切鉴定,以验证在 CHO 细胞克隆中存在抗 CD<sub>3</sub> 抗体 IgG 的轻链和重链 mRNA 表达。

## 1.8 ELISA 测定抗 CD<sub>3</sub> 抗体 IgG 的表达

待细胞形成克隆后,收集细胞上清,用夹心 ELISA 检测细胞上清中的抗 CD<sub>3</sub> 抗体 IgG 的表达。以羊抗人 Fc 抗体为包被抗体,经 1% 脱脂奶封闭后,加入细胞培养上清和不同浓度的标准人 IgG,4℃ 过夜, PBS 洗 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗人  $\kappa$  链抗体,室温孵育 2 h, PBS 洗 3 次后,加入 OPD 底物液显色,测 A<sub>490</sub> 值。

## 1.9 抗 CD<sub>3</sub> 嵌合抗体 IgG 与抗原结合活性的测定

将浓度为 20μg/mL 的 HIT3a 溶液和所收集的 CHO 细胞培养上清,加入 1 × 10<sup>6</sup> Jurkat 细胞 4℃ 下孵育 1h,2000r/min 4℃ 离心 10min,弃上清, PBS 洗细胞 3 次,将细胞重悬于 30μL 按效价稀释好的羊抗鼠 IgG-FITC 溶液,4℃ 放置 1h,2000r/min,4℃ 离心 10min,弃上清, PBS 洗细胞 3 次, FACS 测定 HIT3a 结合 Jurkat 细胞的阳性率。

## 1.10 Western-blot 免疫印迹法鉴定抗 CD<sub>3</sub> 嵌合抗体 IgG

采用免疫共沉淀的方法,在培养上清中加入 Protein-A 使其产生沉淀,用 PBS 离心洗 3 次,进行 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 免疫印迹。并采用 Folin 酚法测定蛋白含量。

## 1.11 <sup>3</sup>H-TdR 掺入促周血单个核细胞增殖试验

分离新鲜正常人外周血单个核细胞,用 RPMI1640 完全培养基调整细胞浓度为 2 × 10<sup>4</sup>/mL,将抗 CD<sub>3</sub> 嵌合抗体 IgG、HIT3a 分别配成 2ng/μL、20ng/μL 溶液,加入 96 孔细胞培养板中,每孔 50μL,每个浓度设 3 个平行孔,4℃ 孵育 3h,阴性对照加 50μL 培养基。每孔加入细胞悬液 1 × 10<sup>6</sup>/50μL,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 40h,加入 <sup>3</sup>H-TdR(5μCi/mL),每孔 0.5μCi 继续培养 8h,用细胞收集器将细胞吸附在玻璃纤维纸上,烘干,依次放入盛有 2 mL 闪烁液的测量瓶内,液体闪烁仪自动测定样品的放射性,计算 SI,抗 CD<sub>3</sub> 嵌合抗体刺激管 cpm 均值/对照管 cpm 均值。

2 结 果

2.1 抗 CD3 抗体可变区的克隆及其表达载体的构建和鉴定

以抗 CD3 ScFv 重组噬菌体表达载体 pCANTAB 5E 为模板,用相应的引物进行 PCR 扩增反应,扩增产物和载体经过酶切、连接后,构建成抗 CD3 抗体 IgG 轻重链表达载体 pKN100-V<sub>L</sub> 和 pG1D105-V<sub>H</sub>(图 1)。双脱氧终止法测定显示,克隆的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 与亲代抗 CD3 抗体的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 完全相符。

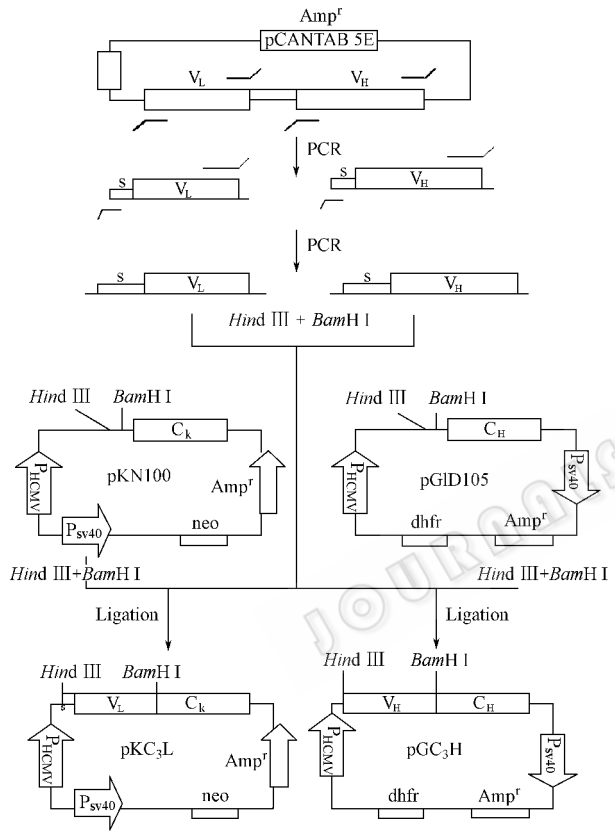


图 1 抗 CD3 嵌合抗体表达载体构建流程图  
Fig.1 Construction of expression vector of anti-CD3 antibody

2.2 抗 CD3 嵌合抗体 IgG 在 CHO 细胞中的表达

将纯化的轻、重链表达载体 pKN100-V<sub>L</sub> 和 pG1D105-V<sub>H</sub> 用脂质体法共转染 CHO( dhfr<sup>-</sup>)细胞,以 G418( 500mg/L)作为选择药物,由于无血清培养基不含次黄嘌呤和胸腺嘧啶( HT),所以只有同时含有二氢叶酸还原酶 dhfr 与 neo<sup>R</sup> 两种基因的细胞才能存活。经 2~3 周的培养,细胞形成克隆,RT-PCR 的实验显示,在 650bp 的 CL 区和 1000bp 完整的 k 链,750~800bp 之间的 Fd 段,1000bp 的 Fc 区,1700 的完整的重链,结果表明转染的 CHO 细胞中存在抗 CD3 抗体 IgG 轻链和重链的 mRNA(图 2),扩增的片段经过

酶切得到的片段大小与预期相符。ELISA 检测结果亦证实细胞培养的上清中含有抗 CD3 抗体 IgG 的表达。

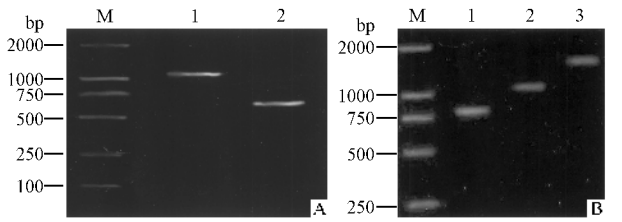


图 2 抗 CD3 嵌合抗体 mRNA 的 RT-PCR 检测  
Fig.2 Assay of mRNA PCR of anti-CD3 antibody  
A1. Whole K chain ;A2. Light chain CL  
B1. Heavy chain Fd ;B2. Fc ;B3. Whole H chain

2.3 竞争性免疫荧光抑制实验

FACS 测定结果显示,在无嵌合抗 CD<sub>3</sub> 抗体存在的条件下,HIT3a 结合 Jurkat 细胞的阳性率为 90.92%,而在嵌合抗 CD<sub>3</sub> 抗体存在的条件下,HIT3a 结合 Jurkat 细胞的阳性率仅为 4.96%(图 3A),表明表达产物能抑制 HIT3a 和 Jurkat 细胞表面 CD3 抗原结合,并具有 CD3 结合特异性。同时为了进一步检验抗 CD3 嵌合抗体结合活性,用抗 CD3 嵌合抗体与 Jurkat 细胞直接反应,FACS 测定结合阳性率为 88.97%(图 3B),表明表达产物与亲代抗体 HIT3a 具有一样的结合活性。

2.4 抗 CD3 嵌合抗体 IgG 的鉴定

将培养上清做免疫共沉淀后,进行 SDS-PAGE 电泳及 Westren-blot 免疫印迹后,结果显示,用羊抗人 IgG-HRP 反应后,放射显像即得到一条识别带,同时用人 IgG 作为阳性对照,在相同位置也有识别带,而无血清培养基没有此识别带(图 4)。其表达量为 0.6μg/mL 培养上清。

2.5 抗 CD3 嵌合抗体 IgG 体外促外周血单个核细胞增殖作用

<sup>3</sup>H-TdR 掺入实验表明,抗 CD3 嵌合抗体与亲代抗体 HIT3a 一样,具有促进外周血单核细胞增殖的作用(图 5)。

3 讨 论

近年来,随着基因工程技术的发展,国内外许多实验室纷纷对鼠源抗体进行改造,构建小分子抗体或人-鼠嵌合抗体<sup>[6,7,8]</sup>。通过基因工程抗体的研制、开发和应用,嵌合抗体可保持鼠源抗体的特异性,又降低了对人体的免疫原性。嵌合抗体是用入源抗体的恒定区取代鼠源性抗体的恒定区而得来的一种组



which is not secreted in mammalian cell is expressed as a soluble mono-and bivalent scFv derivative in insect cells. *Immunotechnology* ,1997 **3** :173 – 178

[ 3 ] Kitchin K , Lin G , Shelver W L. Cloning expression and purification of an anti-desipramine sigle chain antibody in NS/O myeloma cells. *J Pharm Sci* ,1995 **84** :1184 – 1189

[ 4 ] SHEN D ( 沈德诚 ) , YANG X ( 杨希峰 ) , YANG C ( 杨春瑛 ) *et al.* Anti-CD<sub>3</sub> monoclonal antibody HIT3a :I. Preparation and speciality identification. *Acta Acad Med Sin*( 中国医学科学院学报 ) , 1993 **15** ( 15 ) :157 – 162

[ 5 ] XU ( 徐晨 ) , XIONG D ( 熊冬生 ) , XU Y ( 许元富 ) *et al.* Construction and expression of anti-CD3 chimeric antibody Fab ,fragment in ecoil. *High Technology Letter* ( 高技术通讯 ) ,2000 , **7** :28 – 30

[ 6 ] Boulianne G L , Hoznmi N , shulman M J. Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* ,1984 , **312** :643 – 649

[ 7 ] SU ( 苏娜 ) , SHEN G ( 沈关心 ) . Antibody Engineering , Beijing : Science Technology Publishing Company( 科学技术出版社 ) . 1996

[ 8 ] Kohoer G , Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* , 1975 **256** :495

[ 9 ] Narayan P , Pandey R , Yadav V S. Inhibition of anti-CD3 and interleukin-2 stimulated T lymphocyte proliferation by peptidomimetic opioid compound. *Immunopharmacol Immunotoxicol* , 2003 **25** ( 2 ) :225 – 233

[ 10 ] Yaqub S , Solhaug V , Vang T. A human whole blood model of LPS-mediated suppression of T cell activation. *Med Sci Monit* , 2003 , **9** ( 3 ) :B120-126

[ 11 ] Trickett A , Kwan Y L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods* ,2003 **275** ( 1 – 2 ) :251 – 255

Expression of Chimeric Anti-CD3 IgG Antibody in Mammalian Cells  
and Analysis of Its Biological Activity

SHAO Xiao-Feng   XU Chen   XU Yuan-Fu   XIONG Dong-Sheng   LIU Yin-Xing   YANG Chun-Zheng\*  
( The National Laboratory of Experimental Hematology , Institute of Hematology , Chinese Academy of Medical  
Sciences & Peking Union Medical College , Tianjin 300020 , China )

**Abstract**   The anti-CD3 antibody can improve success rate of organs transplant . HIT3a , a mouse anti-CD3 antibody , was chim-erized by using gene engineering methods to decrease its immunogenity . The anti-CD3 genes , heavy chain and light chain , were cloned using PCR from the vector pCANTAB 5E containing anti-CD3 scFv gene fragment , and two PCR fragments were recom-bined into the expression vector pKN100 with human antibody light constant domain and pG1D105 with human antibody heavy constant domain , respectively . The two vectors were co-transfected into CHO cells using liposome . The anti-CD3 antibody was detected by ELISA and Western blot assay in supernatant of transfected CHO cells culture . The primary results of competitive as-says by FACS showed that anti-CD3 antibody could partially block the sites through which parent antibody( HIT3a ) bind to CD3<sup>+</sup> Jurkat cells . The result of <sup>3</sup>H-TdR incorporation showed that the chimeric anti-CD3 antibody could stimulated proliferation of pe-ripheral blood mononuclear cells( PBMC ) as the parent antibody . In this thesis , the results of some experiments indicated that the chimeric anti-CD3 antibody expressed in CHO cells was an antibody with native biological activity , and it is possible to apply to in clinic in the future .

**Key words**   anti-CD3 antibody , chimeric antibody , gene expression