



## 细胞融合法制备抗人CD3-抗人IgM $\mu$ 链双特异性抗体

双特异性抗体(Bispecific antibody, BsAb)亦称双功能抗体(Bifunctional antibody, BFA),是指能结合两种特异性抗原的抗体分子。通过BsAb,既能将效应细胞与靶细胞有效地结合起来,启动效应细胞的生物学活性,也能够作为载体将毒素、核素、药物等定位于靶细胞,因此可望成为治疗肿瘤的新方法[1]。但针对不同肿瘤必须设计不同的双特异性抗体,使其临床应用受到很大限制。我们设计了抗人IgM-抗人CD3双功能抗体,以通过抗IgM[1]结合抗原冲击的B细胞(良好的APC),用抗CD3结合T细胞以期获得一个增强的抗原提呈活化效果,研究诱导的CTL是否同样具备特异性。为实现这一设想,本实验采用细胞工程法制备分泌抗人CD3-抗人IgM  $\mu$ 链双特异性抗体的四体瘤,并对建株的四体瘤的稳定性及活性进行了鉴定。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 抗人CD3小鼠杂交瘤细胞为第一军医大学分子免疫研究所提供,亚类为IgG1,分泌抗人CD3分子单克隆抗体(mAb)。抗人IgM $\mu$ 链杂交瘤细胞由第四军医大学金伯泉教授惠赠,亚类为IgG2b,分泌抗人IgM  $\mu$ 链mAb。人淋巴细胞性白血病细胞株Raji(sIgM<sup>+</sup>),人T细胞瘤细胞株Jurcat(CD3<sup>+</sup>),均由分子免疫研究所提供。

1.1.2 质粒、宿主菌 含neo基因质粒pCDaA3和宿主菌DH5 $\alpha$ 均由本校分子免疫研究所提供。

1.1.3 动物 清洁级BALB/C小鼠8~10周龄,雌性,体质量20 g,购自第一军医大学实验动物中心。

1.1.4 主要试剂 胎牛血清(美国Hyclone公司);新生牛血清(超级)购自杭州四季青生物制品研究所;8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)、次黄嘌呤-氨基嘌呤胸腺嘧啶核苷(HAT)、次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷(HT)、RPMI-1640培养基、PEG4000为GIBICO BRL Life Technologies产品;降植烷(prinstain)、MTT、福氏不完全佐剂、G418(新霉素)SIGMA公司产品;蛋白质相对质量标准 BioLabs公司产品(New England);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG为中国科学院血液病研究所产品; FITC标记的羊抗鼠IgG为北京市挚诚生物工程公司产品;FuGENE<sup>TM</sup>6 转染试剂为德国BOEHRIN- GER MANNHEIM公司产品。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 HAT敏感杂交瘤细胞株的建立 方法参照文献[2]。

1.2.2  $\alpha$ CD3 HAT<sup>S</sup> G418<sup>R</sup>亚系的建立 将保存的含neo基因质粒pCDaA3,经转化、鉴定、大量扩增、碱裂解法抽提和PEG纯化后,采用FuGENE<sup>TM</sup>6转染 $\alpha$ CD3 HAT<sup>S</sup>亚系,G418连续加压筛选。经流式细胞仪筛选出高分泌抗体克隆,有限稀释后再经HAT及G418选择培养液验证,确认具有双选择标记,命名为 $\alpha$ CD3 HAT<sup>S</sup> G418<sup>R</sup>亚系,扩大培养,冻存,以备细胞融合。

1.2.3 细胞融合 融合前一天取普通BALB/C小鼠脾细胞,接种于96孔板,每孔 $1 \times 10^5$ 个细胞,作为饲养细胞,以含20%胎牛血清完全培养液培养。融合当天将 $5 \times 10^6$ 对数生长期的 $\alpha$ CD3 HAT<sup>S</sup> G418<sup>R</sup>亚系细胞与相同数目的抗人IgM  $\mu$ 链杂交瘤细胞混合,在PEG<sub>4000</sub>作用下融合。移入20 ml含 $1 \times 10^4$  HAT 4 mg/ml G418双选择培

养液中，加入预先制备的96孔铺有饲养细胞的培养板，每孔100  $\mu$ l。第4 天半量换液，以0.5 $\times$ HAT培养液代替双选择培养液，并添加饲养细胞。第7天半量换液，以1 $\times$ HT培养液代替HAT培养液，每隔3~4 d换液1次，直至克隆出现。当克隆铺满四分之一孔底时，开始检测。

1.2.4 双特异性抗体的筛选 间接ELISA方法筛选抗人IgM阳性孔，将阳性克隆移入24孔，再进一步采用流式细胞仪测定抗CD3活性，简言之，取Jurcat细胞1 $\times$ 10<sup>5</sup>个/管，分别加入待测培养上清100  $\mu$ l，以抗CD3单抗细胞株培养上清和非相关抗体作为对照。洗涤后加入荧光标记的羊抗鼠-FITC(第2抗体)5  $\mu$ l，冰浴20 min。经2次洗涤，细胞用0.5 ml生理盐水悬浮，采用流式细胞仪测定细胞标记率，以百分率超过60%为阳性(图1)。将双阳性孔细胞移入12孔板，采用有限稀释法3次克隆化，筛选保持双分泌阳性克隆株，进一步鉴定后扩大培养，冻存并进行腹水诱生。

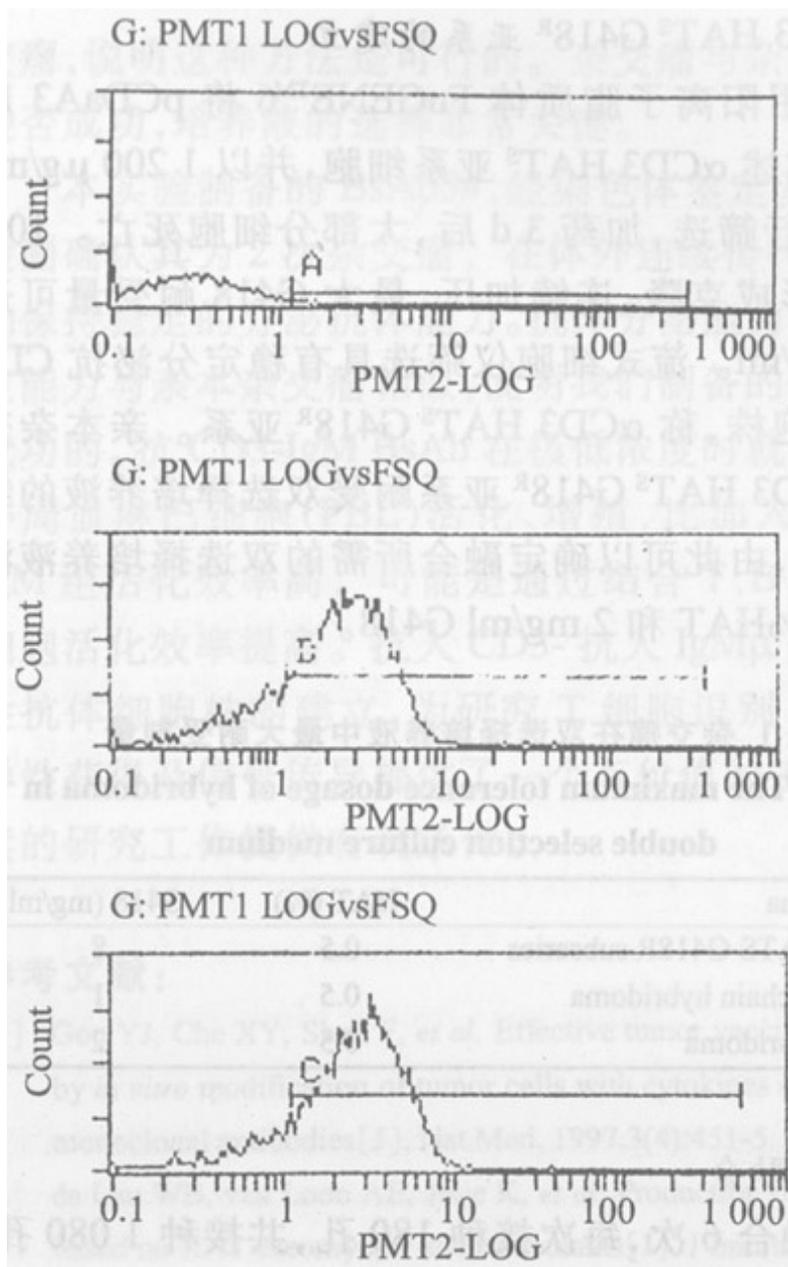


图1 流式细胞仪检测BsAb5#和CD3 mAb抗体活性

Fig.1 Immunoreactivity of the BsAb5# and of the parental CD3 mAb tested on the T cell line Jurcat by FACS

The x-axis represents fluorescence intensity and the y-axis the relative number of cells

A: Control; B: CD3 mAb; C: BsAb5#

1.2.5 腹水诱生 方法见文献[3]。

1.2.6 单克隆抗体鼠Ig亚类测定 采用双向免疫扩散法, 方法见文献[4]。

1.2.7 杂交瘤细胞染色体分析 方法见文献[5]。

1.2.8 淋巴细胞活化实验 取96孔板, 按 $1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ 细胞浓度加入PBLs, 并辅以 $200 \text{ U/ml}$  rIL-2, 加入倍比浓度稀释的纯化BsAb  $10 \mu\text{l}$ , 起始浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ , 对照组加入相同浓度稀释的抗CD3 mAb、抗IgM mAb及抗CD3 mAb+抗IgM mAb, 空白对照组不加抗体, 置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱中培养3 d。加MTT( $5 \text{ g/l}$ )  $10 \mu\text{l}$ , 继续培养4 h后, 小心吸去上清, 加入二甲基亚砷 $100 \mu\text{l}$ , 充分振荡溶解后, 测 $D_{570}$ 。

## 2 结果

### 2.1 HAT敏感杂交瘤细胞株的建立

当8-AG浓度达到 $20 \mu\text{g/ml}$ , 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱中培养3 d的抗CD3杂交瘤细胞已成为次黄嘌呤鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶(HGPRT)缺失细胞株, 在 $0.2\% \text{ HAT}$ 培养基中已完全不能成长, 3 d内全部死亡, 称 $\alpha\text{CD3 HATS}$ 亚系。

### 2.2 $\alpha\text{CD3 HAT}^S \text{ G418}^R$ 亚系的建立

采用阳离子脂质体FuGENE<sup>TM</sup>6将pCDaA3质粒转染前述 $\alpha\text{CD3 HAT}^S$ 亚系细胞, 并以 $1 \text{ } 200 \mu\text{g/ml}$  G418进行筛选, 加药3 d后, 大部分细胞死亡。10 d后可见形成克隆, 连续加压, 最大G418耐受量可达 $8 \text{ } 000 \mu\text{g/ml}$ 。流式细胞仪筛选具有稳定分泌抗CD3 mAb细胞株, 称 $\alpha\text{CD3 HAT}^S \text{ G418}^R$ 亚系。亲本杂交瘤及 $\alpha\text{CD3 HAT}^S \text{ G418}^R$ 亚系耐受双选择培养液的结果见表1, 由此可以确定融合所需的双选择培养液浓度为 $0.5\% \text{ HAT}$ 和 $2 \text{ mg/ml}$  G418。

**表 1 杂交瘤在双选择培养液中最大耐受剂量**  
**Tab.1 The maximum tolerance dosage of hybridoma in double selection culture medium**

Hybridoma	HAT (%)	G418 (mg/ml)
$\alpha\text{CD3 HATS G418R}$ subseries	0.5	8
$\alpha\text{IgM } \mu \text{ chain hybridoma}$	0.5	1
Hybri-hybridoma	0.5	2

### 2.3 细胞融合

共融合6次, 每次接种180孔, 共接种1 080孔, 同时设亲本细胞为对照。经HAT及G418双选择培养, 46孔有细胞生长, 第14~18天取上清进行筛选, ELISA测定抗IgM阳性有21株, 再经流式细胞仪筛选抗CD3-抗IgM双阳性孔, 共得5株抗CD3-抗IgM杂交-杂交瘤。经亚克隆后, 其中2株体外连续传代培养2月仍保持良好的分泌BsAb功能, 命名为BsAb5#及BsAb7#。将BsAb5#扩大培养, 在BALB/C小鼠体内诱生腹水以大量制备BsAb。

### 2.4 BsAb5#的稳定性及效价

BsAb5#体外连续传代培养两个月仍保持稳定的分泌双特异性抗体能力, 与融合前亲本细胞相比较, 其分泌抗体及产生腹水的能力并未下降, 说明BsAb5#可用于制备BsAb(表2)。

表 2 BsAb 与亲本杂交瘤分泌抗体效价比较

Tab. 2 Comparison of the titer between BsAb and parent hybridoma

Hybridoma	Cell suspension		Anti-ascites	
	IgM	CD3	IgM	CD3
BsAb5#	1:64	1:4	1:100 000	-
BsAb7#	1:32	1:4	-	-
Anti-IgM McAb	1:128	-	1:100 000	-
Anti-CD3 McAb	-	1:16	-	1:100 000

### 2.5 BsAb5# Ig亚类测定

采用免疫双扩法测定BsAb5#亚类, 结果显示BsAb5#分泌上清可同时与抗IgG1及IgG2b抗体产生免疫沉淀线, 对照抗CD3 mAb及抗IgM mAb只与其相应的抗亚类抗体产生免疫沉淀线, 提示BsAb5#是分泌抗CD3-IgM BsAb的杂交-杂交瘤。

### 2.6 杂交瘤细胞染色体分析

结果显示杂交-杂交瘤的染色体分布区间为152(146~167), 而其亲代杂交瘤抗CD3及抗IgM  $\mu$ 链杂交瘤细胞分别为93(86~98)、82(71~88), 相当于二者之和, 进一步证明BsAb5#是杂交-杂交瘤。

### 2.7 BsAb对淋巴细胞活化的作用

见图2, BsAb组与抗CD3+IgM组及抗CD3组对淋巴细胞增殖均有明显的促进作用, 但BsAb组活化效率更高, 在极低浓度时(0.05 ng/ml)就可诱导T细胞的活化。

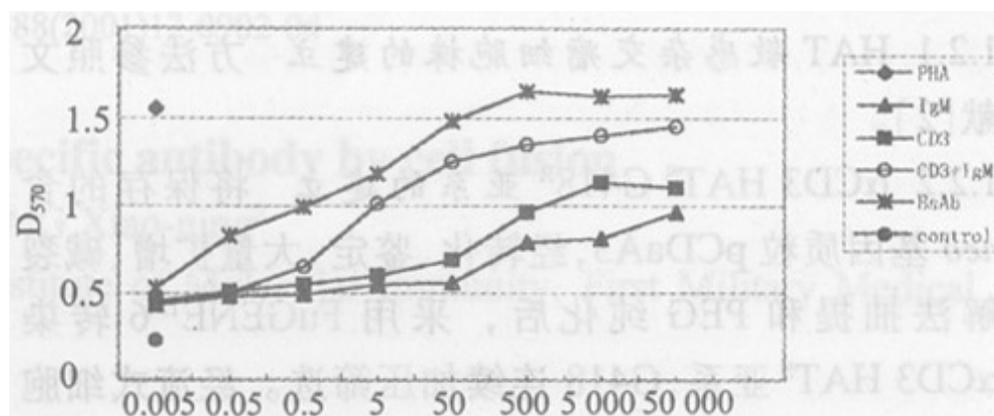


图2 BsAb对淋巴细胞活化的作用

Fig.2 Lymphocyte transformation test for BsAb

## 3 讨论

BsAb的制备目前可采取化学交联法、细胞工程法及基因工程法。化学交联法在交联制备BsAb过程中, 由于还原解链及交联等化学反应, 常降低抗体亲和活性, 其产物亦难以保证均质性[6]。目前, 化学交联方法已渐被细胞工程方法所取代。细胞工程法即通过细胞融合的方法, 将分泌mAb的杂交瘤与经免疫的脾细胞融合, 或将两种分泌不同mAb的杂交瘤彼此融合。前者的融合后代有约3倍于正常细胞的染色体数目, 故称之为三体瘤(trioma); 后者的融合后代含有约4倍于正常细胞的染色体数目, 故称之为四体瘤(quadroma)。两者通称

为杂交-杂交瘤 (hybrid-hybridoma)。采用三体瘤的技术路线制备BsAb, 其原理及步骤类似B淋巴细胞杂交瘤, 只是其中不分泌Ig的骨髓瘤细胞为分泌特定mAb的杂交瘤所替代。这一方法的优点是较易获得稳定的融合后代, 融合率高, 缺点是由于脾细胞分泌的抗体性状未经限定, 增加了筛选的工作量及难度, 当纯净抗原难于获得时更是如此。且由于用细胞工程方法产生的2次杂交瘤, 其分泌上清并非均一产物[7]。常含有来自亲本细胞的2种双价的单特异性抗体和单价的双特异性抗体。如果两种亲本杂交瘤亚类一致, 则由于物理性质极为相似, 很难分开, 必须分别制作两种抗原的亲亲和层析柱, 两次洗脱才可分离[8]。在实际工作中由于工作量大和复杂, 且常常因为抗原量不足或抗原难以纯化而不能应用于实际。本实验制备的双特异性抗体一端为抗CD3, 是细胞表面抗原, 也无法制备亲和层析柱, 而且两亲本杂交瘤已通过鉴定, 分别具有激活T、B细胞功能, 而且IgG重链亚类不同。因此, 我们采取四体杂交瘤路线, 制备分泌BsAb的四体杂交瘤。利用其重链亚类不同, 融合后产生的BsAb与来自亲本的mAb所带的电荷不同, 可以采用离子交换层析法进行纯化, 为后续工作打下基础。

本实验通过8-Ag药物诱变及neo基因转导, 成功制备具有双选择标记的 $\alpha$ CD3 HAT<sup>S</sup> G418<sup>R</sup>亚系杂交瘤细胞, 并保持稳定、高效分泌抗CD3 mAb能力。实验结果显示此诱导方法及基因转移方法是成功的。据文献报道[9][10], 亦可分别诱变两个杂交瘤使其具有不同的选择标志, 或采用药物分别阻断两个杂交瘤的代谢途径, 或采用不同的荧光素分别标记两种杂交瘤细胞, 经融合后以流式细胞计分离双标记细胞进行筛选。与这些方法比较, 在一个亲本细胞中诱导双选择标记更具有通用性。许多双特异性抗体都采取T细胞为效应细胞, 因此我们制备的 $\alpha$ CD3 HAT<sup>S</sup> G418<sup>R</sup>亚系具有通用性, 可以和任何野生型的杂交瘤融合制备双功能抗体。

在融合过程中我们发现HAT对亲本杂交瘤也有毒性, 造成几次融合失败, 这在文献中未见报道。亲本杂交瘤是经HAT选择培养而来, 为何会对HAT敏感, 其原因不清, 可能是这些杂交瘤在长期的无HAT选择培养液中传代培养, 某些染色体发生了变异之故。我们通过适当降低HAT浓度(一半), 解决了这一问题。这是在制备四体瘤时应该注意的。应对亲本细胞在选择培养液中耐受性进行仔细鉴定, 才可保证融合的成功。我们选择的另一个筛选标志为neo基因, 以G418进行筛选。因G418对大多数哺乳动物细胞具有毒性, 对饲养细胞发挥作用产生影响。饲养细胞由于含多种细胞生长因子, 在杂交瘤的成长中起非常关键的作用。考虑到这些因素, 我们采取融合前一天制作饲养细胞, 以产生条件培养基, 促进融合后细胞成长, 缩短使用双选择培养液时间(3 d), 第4天以单纯HAT选择培养(此时亲本的抗IgM杂交瘤已全部死亡), 再添加饲养细胞培养, 成功制备了四体杂交瘤, 说明这种方法是可行的。杂交瘤与杂交瘤融合是否成功, 培养液的选择非常关键。

本实验制备的BsAb5#, 经染色体鉴定及Ig亚类检测确认其为2次杂交瘤, 在体外连续传代2个月, 仍保持稳定的分泌抗体能力。抗体分泌能力及腹水产生能力与亲本杂交瘤相似, 说明我们制备的四体瘤是成功的。抗CD3-IgM BsAb在极低浓度时就可以诱导外周血淋巴细胞(PBL)活化、增殖, 比加入抗CD3+ IgM组活化效率高, 可能是通过结合T、B细胞使T细胞活化效率提高。抗人CD3-抗人IgM $\mu$ 链双特异性抗体细胞株的建立, 为研究T细胞识别、活化, 特异性获得及信号传导提供了一个有价值的工具, 为后续的研究工作提供有利条件。

#### 参考文献:

[1] Gou YJ, Che XY, Shen F, et al. Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies[J]. Nat Med, 1997, 3(4):451-5.

de Lau WB, van Loon AE, Jeije K, et al. Production of hybridomas based on HAT-sneomycin double mutants[J]. J Immunol Methods, 1989, 117(1):1-8.

Harlow ED, David L. Antibodies——a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 271-7.

Harlow ED, David L. Antibodies——a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 232-3.

孙瑛勋. 双特异性抗体的制备与应用[J]. 免疫学杂志, 1994, 10(3):206-9.

[6] Brennan M, Davison PF, Paulus H, et al. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin fragments[J]. Science, 1985, 229:81-3.

[7] Fanger MW, Morganelli PM, Guyre PM, et al. Bispecific antibodies[J]. Crit Rev

Immunol, 1992, 12(3, 4):101-24.

[8] de Gast GC, Haagen IA, van Houten AA, et al. CD8 T cell activation after intravenous administration of CD3×CD19 bispecific antibody in patients with non-hodgkin lymphoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 1995, 40(6):1840-6.

[9] Ferrini S, Cambiaggi A, Sforzini S, et al. Use of anti-CD3 and anti-CD16 bispecific monoclonal antibodies for the targeting of T and NK cells against tumor cells [J]. Cancer Detect Prev, 1993, 17(2):295-300.

[10] Sforzini S, Bolognesi A, Meazza R, et al. Differential sensitivity of CD30+ neoplastic cells to gelonin delivered by anti-CD30/anti-gelonin bispecific antibodies[J]. Br J Haematol, 1995, 90(3):572-7.

#### 参考文献:

[1] Gou YJ, Che XY, Shen F, et al. Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies[J]. Nat Med, 1997, 3(4):451-5.

de Lau WB, van Loon AE, Jeije K, et al. Production of hybridomas based on HAT sneomycin double mutants[J]. J Immunol Methods, 1989, 117(1):1-8.

Harlow ED, David L. Antibodies—a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 271-7.

Harlow ED, David L. Antibodies—a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 232-3.

孙璞勋. 双特异性抗体的制备与应用[J]. 免疫学杂志, 1994, 10(3):206-9.

[6] Brennan M, Davison PF, Paulus H, et al. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin fragments[J]. Science, 1985, 229:81-3.

[7] Fanger MW, Morganelli PM, Guyre PM, et al. Bispecific antibodies[J]. Crit Rev Immunol, 1992, 12(3, 4):101-24.

[8] de Gast GC, Haagen IA, van Houten AA, et al. CD8 T cell activation after intravenous administration of CD3×CD19 bispecific antibody in patients with non-hodgkin lymphoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 1995, 40(6):1840-6.

[9] Ferrini S, Cambiaggi A, Sforzini S, et al. Use of anti-CD3 and anti-CD16 bispecific monoclonal antibodies for the targeting of T and NK cells against tumor cells [J]. Cancer Detect Prev, 1993, 17(2):295-300.

[10] Sforzini S, Bolognesi A, Meazza R, et al. Differential sensitivity of CD30+ neoplastic cells to gelonin delivered by anti-CD30/anti-gelonin bispecific antibodies[J]. Br J Haematol, 1995, 90(3):572-7.