

细胞融合法制备抗人 CD3-抗人 IgM μ 链双特异性抗体

苏瑾¹,张亚莉²,郭志兵²,车小燕²,王小宁²(第一军医大学¹南方医院呼吸科,²分子免疫研究所,广东 广州 510515)

摘要:目的 制备抗人 CD3-抗人 IgM μ 链双特异性抗体 (Bispecific antibody, BsAb) 的细胞株,并对建株的杂交-杂交瘤的稳定性及活性进行鉴定。方法 将抗人 CD3 单克隆抗体细胞株采用 8-AG 诱变成 HAT 敏感杂交瘤细胞株,再通过 FuGENE™6 转染含 neo 基因质粒 pCDaA3,制备成具有双标记杂交瘤 CD3HAT^SG418^R 亚系,与抗人 IgM μ 链单克隆抗体细胞株融合,通过 ELISA 法及流式细胞仪筛选,制备分泌 BsAb 的细胞株。结果 融合 6 次,共接种 1080 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。结论 采取细胞融合法可成功制备分泌 BsAb 的杂交-杂交瘤,其稳定性及效价与亲本杂交瘤相似。

关键词: 双特异性抗体;细胞融合;抗人 CD3 抗体;抗人 IgM μ 链抗体;杂交-杂交瘤

中图分类号:R392.11 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2001)12-0902-04

Preparation of anti-CD3 and anti-IgM μ chain bispecific antibody by cell fusion

SU Jin¹,ZHANG Ya-li²,GUO Zhi-bing²,CHE Xiao-yan²,WANG Xiao-ning²

(¹Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital, ²Institute of Molecular Immunity, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Objective To prepare anti-CD3 and anti-IgM μ chain bispecific antibody (BsAb) by means of cell fusion and assess the stability and activity of the hybrid hybridoma. **Methods** Mouse hybridoma cell line secreting anti-human CD3 monoclonal antibody (mAb) was transformed into HAT-sensitive cells by 8-azaguanine, which was subsequently transfected by plasmid pCDaA3 containing neo^R marker gene via FuGENE™6. The resulted mutant phenotype, named CD3 HAT^SG418^R, was fused with the hybridoma producing anti-IgM μ chain mAb, and enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry were employed to identify the fusion cells producing the target BsAb. **Results** Six rounds of cell fusion was performed and a total of 1080 wells inoculated, yielding 5 hybrid hybridoma cell lines. Two of the 5 cell lines were subcloned and continuously cultured *in vitro* for 2 months without losing their capability to secrete BsAb. **Conclusion** Cell fusion technique can be utilized to prepare BsAb-producing hybrid hybridoma that has similar stability and activity to its parent hybridoma.

Key words bispecific antibody; cell fusion; anti-CD3 antibody; anti-IgM μ chain antibody; hybrid hybridoma

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 μ 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 μ 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 μ 链 mAb。人淋巴细胞性白血病细胞株 Raji (sIgM⁺), 人 T 细胞瘤细胞株 Jurcat (CD3⁺), 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 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;

收稿日期: 2001-06-26

基金项目: 全军九五医学科研基金 (98M069); 广东省卫生厅医学科研基金 (A1998314)。

作者简介: 苏瑾 (1973-), 女, 福建福州人, 1999 年毕业于第一军医大学, 硕士, 医师, 电话: 020-85141575, E-mail: sjycx@163.net

8-氮杂鸟嘌呤 (8-AG)、次黄嘌呤-氨基碟呤胸腺嘧啶核苷 (HAT)、次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷 (HT)、RP-MI-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; 蛋白质相对分子质量标准 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™6 转染试剂为德国 BOEHRIN-GERMANNHEIM 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 CD3HAT^S G418^R 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™6 转染 CD3HAT^S 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 CD3HATSG418^R 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 1×10^5 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 5×10^6 对数生长期的 CD3HAT^S G418^R 亚系细胞与相同数目的抗人 IgM μ 链杂交瘤细胞混合, 在 PEG₄₀₀₀ 作用下融合。移入 20ml 含 $1 \times \text{HAT}$ 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 μ l。第 4 天半量换液, 以 $0.5 \times \text{HAT}$ 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 $1 \times \text{HT}$ 培养液代替 HAT 培养液, 每隔 3~4d 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 1×10^5 个/管, 分别加入待测培养上清 100 μ 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 μ l, 冰浴 20 min。经 2 次洗涤, 细胞用 0.5ml 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。

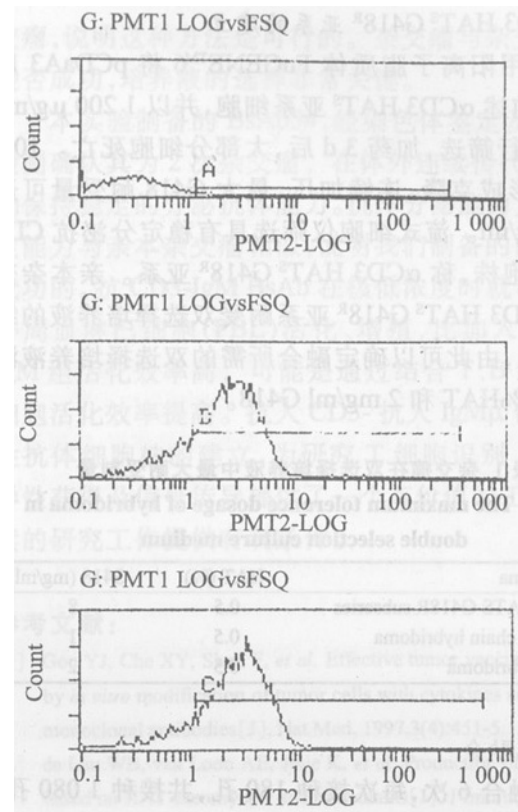


图 1 流式细胞仪检测 BsAb5# 和 CD3mAb 抗体活性
Fig.1 Immunoreactivity of theBsAb5# and of the parental CD3mAb tested on theT cell lineJurcatbyFACS
The x-axis represents fluorescence intensity and the y-axis the relative number of cells
A: Control; B: CD3mAb; C: BsAb5#

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 $1 \times 10^5/200$ μ l 细胞浓度加入 PBLS, 并辅以 200U/ml rIL-2, 加入倍比浓度稀释的纯化 BsAb10 μ l, 起始浓度为 1 μ 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 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 3d, 加 MTT (5g/l) 10 μ l, 继续培养 4h 后, 小心吸去上清, 加入二甲基亚砷 100 μ l, 充分振荡溶解后, 测 D₅₇₀。

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 μ g/ml, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 3d 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% HAT 培养基中已完全不能成长, 3d 内全部死亡, 称 CD3HAT^S 亚系。

2.2 CD3 HAT^S G418^R亚系的建立

采用阳离子脂质体 FuGENE™6 将 pCDaA3 质粒转染前述 CD3HAT^S 亚系细胞,并以 1200 μg/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 8 000 μg/ml。流式细胞仪筛选具有稳定分泌抗 CD3 mAb 细胞株,称 CD3HAT^S G418^R亚系。亲本杂交瘤及 CD3HAT^S 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% HAT 和 2mg/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)
CD3HATSG418Rsubseries	0.5	8
IgM μ 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 1080 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	Cellsuspension		Anti-ascites	
	IgM	CD3	IgM	CD3
BsAb5#	1 64	1 4	1 100 000	-
BsAb7#	1 32	1 4	-	-
Anti-IgMMcAb	1 128	-	1 100 000	-
Anti-CD3McAb	-	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 CD3mAb 及抗 IgMmAb 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-IgMBsAb 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 μ 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 (0.05ng/ml) 就可诱导 T 细胞的活化。

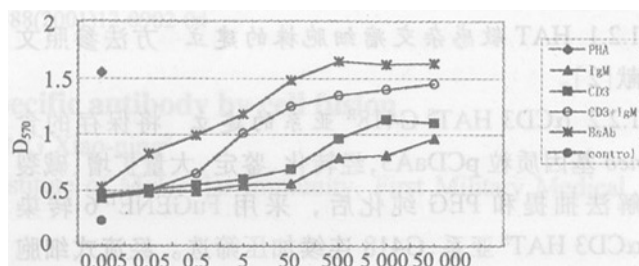


图 2 BsAb 对淋巴细胞活化的作用

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体和层析柱,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 CD3HATSG418R 亚系杂交瘤细胞,并保持稳定、高效分泌抗 CD3mAb 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 CD3 HATSG418R 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-IgMBsAb 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 μ 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 Effectivetumorvaccines generated by *in vitro* modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies [J]. *Nat Med*, 1997, 3(4):451-5.
- [2] deLau WB, vanLoon AE, Jeije K, et al Production of hybridomas based on HATs neomycin double mutants [J]. *J Immunol Methods*, 1989, 117(1):1-8.
- [3] Harlow ED, David L. *Antibodies—alaboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 271-7.
- [4] Harlow ED, David L. *Antibodies—alaboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 232-3.
- [5] 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, Morganeli PM, Guyre PM, et al Bispecific antibodies [J]. *Crit Rev Immunol*, 1992, 12(3,4):101-24.
- [8] deGast GC, Haagen IA, vanHouten AA, et al CD8 T cell activation after intravenous administration of CD3 \times 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 CD3⁺ neoplastic cells to gelonin delivered by anti-CD30/anti-gelonin bispecific antibodies [J]. *Br J Haematol*, 1995, 90(3):572-7.