

# 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体的表达、鉴定及活性分析

## Expression, Identification and Bioactivity Characterization of an anti-CD3/anti-CD20 Bispecific Single-chain Antibody

于蕊,李世崇,吴本传,刘红,叶玲玲,陈昭烈\*

YU Rui, LI Shi-Chong, WU Ben-Chuan, LIU Hong, YE Ling-Ling and CHEN Zhao-Lie\*

军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

**摘要** 设计并合成多个 60bp 左右的 DNA 小片段,经重叠延伸 PCR 扩增获得 1640bp 的抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体完整基因片段,将其克隆入真核定点表达载体 pcDNA5/FRT 中,脂质体法转染 Flp-In™ CHO 细胞,获得稳定表达细胞株,目的蛋白在上清中的表达量约为 300 $\mu$ g/L。采用 Ni-NTA 柱对其进行纯化,经 SDS-PAGE 蛋白电泳及 Western-blot 分析结果表明,含组氨酸标签的目的蛋白的分子量约为 70kD,与预期结果一致。活细胞间接免疫荧光实验和玫瑰花环实验证明抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体具有与 Ramous(CD20+)及 Jurkat(CD3+)细胞特异性结合的活性。光学显微镜下可以观察到抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体可以有效介导人外周血淋巴细胞裂解 B 淋巴瘤细胞 Ramous。以上工作为进一步了解抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体的体内体外生物学活性奠定了基础。

**关键词** 双特异性单链抗体,表达,鉴定,活性分析

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0289-05

**Abstract** The synthetic gene with 1640bp encoding for the anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody was designed and obtained by SOE (splicing by overlap extension) PCR. The cDNA was cloned into Flp-In™ expression vector pcDNA5/FRT and transfected into Flp-In™ CHO cells to generate a stable expression cell line with a capacity for expressing anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody at 300 $\mu$ g/L. The protein, which had a molecular weight of about 70 kD, was purified by Ni-NTA affinity chromatography and identified by SDS-PAGE and Western-blot analysis. Immunofluorescence assay and cellular rosetting showed that it can react specifically on Jurkat(CD3+) and Ramous(CD20+) cells. The lysis of human PBL against CD20-positive lymphoma Ramous cells in the presence of the anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody can be observed by microscope. All these results would lighten the further study of its biological functions *in vitro* and *in vivo*.

**Key words** bispecific single-chain antibody, expression, identification, bioactivity characterization

BiTEs (bispecific T cell engagers) 是以 T 细胞作为效应细胞的双特异性单链抗体,它采用单链抗体技术,将两个不同抗体的重链及轻链可变区连接在一条多肽链上,并作为活性蛋白在 CHO 细胞中进行

分泌表达。其基本的形式是 V<sub>L1</sub>-linker-V<sub>H1</sub>-linker-V<sub>H2</sub>-linker-V<sub>L2</sub>。BiTEs 具有两个抗原结合部位,可以同时和 T 细胞及病变细胞表面的抗原分子结合,从而有效地激活静止的 T 细胞来达到杀伤病变细胞的

Received: September 27, 2004; Accepted: December 21, 2004.

This work was supported by Grant from China International Science and Technology Cooperation Project(No.2001AA215461)

\* Corresponding author. Tel:86-10-63841526; E-mail: chenlz23@hotmail.com

国际科技合作重点项目计划资助(No.2001AA215461)。

目的<sup>[1,2]</sup>。抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体即是一种 BiTEs 形式的抗体,它可以和 T 细胞、B 细胞表面的特异性抗原分子 CD3、CD20 发生特异性结合,在 T 细胞和肿瘤细胞之间提供一个物理连接,从而有效地激活静止的 T 细胞杀伤病原细胞,达到治疗 B 细胞淋巴瘤的作用。本实验成功构建了抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体表达载体,并在 Flp-In™ CHO 细胞中实现了稳定表达,为其在 B 细胞淋巴瘤的临床治疗上的应用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、细胞与菌株:**定点整合表达载体 pcDNA5/FRT、Flp-In™ CHO 细胞购自 Invitrogen 公司; CD3 阳性细胞 Jurkat 和 CD20 阳性细胞 Ramos 购自中国协和医科大学基础医学细胞中心;大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自道普公司。

**1.1.2 试剂:**高保真 Taq 酶 Pyrobest、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 *Bgl* II 购自宝生物工程(上海)有限公司;限制性内切酶 *Nhe* I、*Not* I 购自 Biolabs 公司;DNA marker III 购自天为时代生物有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA clean-up 试剂盒购自 Promega 公司;寡核苷酸片段合成及序列测定由上海博亚公司完成。转染试剂 Lipofectamine™ 2000、Anti-His (C-term)-HRP Antibody、Anti-His (C-term)-FITC Antibody 购自 Invitrogen 公司;带组氨酸标签的 IL-1Ra 由本所基因工程研究室杨志新博士惠赠;Ni<sup>2+</sup> 金属螯合填料购自安法玛西亚公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体核苷酸片段的设计与组装:**根据文献[3,4,5]报道的抗 CD3 和抗 CD20 重链可变区(V<sub>H</sub>)和轻链可变区(V<sub>L</sub>)的基因序列,采用(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>作为连接肽,设计合成多个约 60bp 的寡核苷酸片段,每相邻的两个片段有约 20bp 的碱基互补,通过重叠延伸 PCR (SOE PCR) 得到了全长为 1640bp 的抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体全基因序列,其中为了便于蛋白的纯化,在序列的 3'端加入组氨酸标签、*Not* I 酶切位点,并在组氨酸标签前加入凝血酶酶切位点,以便在最终除去组氨酸标签,在序列的 5'端加上 *Nhe* I 酶切位点、KOZAK 序列和前导序列。其全基因序列示意图如下:—KOZAK 序列—前导序列—V<sub>LCD3</sub>—(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>—V<sub>HCD3</sub>—(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>—V<sub>HCD20</sub>—(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>—V<sub>LCD20</sub>—凝血酶切

位点—(His)<sub>6</sub>—。扩增全基因所用引物为:上游引物:5'-CTAGCTAGCG CCGCCAGCC-3'。下游引物:5'-GTTTTTCCTTT TCGGCGCCGCC TA-3'。

**1.2.2 表达载体的构建:**将得到的抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体基因用 *Nhe* I 和 *Not* I 双酶切后,T4 连接酶连接到同样经 *Nhe* I 和 *Not* I 酶切过的真核定点表达载体 pcDNA5/FRT 中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆经菌落 PCR 和酶切初步鉴定后,送上海博亚公司测序。

**1.2.3 表达载体的稳定转染:**采用脂质体法将测序正确的连有目的基因的 pcDNA5/FRT 质粒与表达重组酶 Flp 的 pOG44 质粒共转染 Flp-In™ CHO 转染细胞,操作步骤按 Invitrogen 公司的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书进行,并用终浓度为 500 $\mu$ g/mL 的 Hyromycin B 筛选阳性克隆。

**1.2.4 直接竞争 ELISA 检测目的基因的表达:**待克隆长成后,细胞上清采用直接竞争法 ELISA 检测目的基因的表达,步骤如下:加入 200 $\mu$ L 培养上清(空白对照不加任何样品,阴性对照为转染 pcDNA5/FRT 空载体的 Flp-In™ CHO 细胞上清,阳性对照为含组氨酸标签的 IL-1Ra)包被 96 孔酶联板,4 $^{\circ}$ C 过夜。倒掉上清,PBST 洗涤 4 次,加入 200 $\mu$ L 3% BSA 封闭,37 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBST 洗涤 3 次,加入 3% BSA 稀释的 anti-His(C-term)-HRP 抗体,37 $^{\circ}$ C 1h。用 PBST 洗涤 4 次。加入 TMB 显色剂 A、B 液各 1 滴,37 $^{\circ}$ C 10~30min(避光)。加入 50 $\mu$ L 1mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,阳性呈现亮黄色。酶标仪 450nm 测量 OD 值。

**1.2.5 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体的纯化:**收集转染后的 Flp-In™ CHO 无血清培养上清,加入终浓度为 5mmol/L 的咪唑及 1mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>,以 1mL/min 的流速过 Ni-NTA 柱后,先用 PBS 平衡柱子,然后用含 0.5mol/L NaCl 的 PBS 洗杂蛋白,最后用咪唑浓度分别为 20mmol/L、100mmol/L、200mmol/L、400mmol/L 的 PBS 洗脱目的蛋白。

**1.2.6 SDS-PAGE 蛋白电泳检测及 Western-blot 分析:**收集各步洗脱液行 12% 的 SDS-PAGE 蛋白电泳,将表达产物转移到 PVDF 膜上,3% BSA 室温封闭 2h,基于表达产物末端的 6 $\times$  His 标签,用 anti-His(C-term)-HRP 作为检测抗体室温反应 1h,PBST 洗涤 4 $\times$ 4min,然后用二氨基联苯胺(DAB)显色。

**1.2.7 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体与 Ramos 及 Jurkat 细胞的结合活性的测定:**

**活细胞免疫荧光实验:**将一定浓度的纯化抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体与 1 $\times$ 10<sup>6</sup> Ramos 或

Jurkat 细胞 4℃ 共同孵育 1h, 3000r/min 4℃ 离心 3min, PBS 洗 3 次。加入 50μL 1:500 稀释的 anti-His (C-term)-FITC antibody, 4℃ 避光反应 1h, 3000r/min 4℃ 离心 3min, PBS 洗 4 次, 荧光显微镜下观察并照相。

**玫瑰花环实验:** 将一定浓度的纯化抗体与 1 × 10<sup>6</sup> Ramos 细胞混合, 4℃ 孵育 4h。4℃ 离心, 弃上清, PBS 洗细胞 3 次。加入 1 × 10<sup>7</sup> Jurkat 细胞, 混合, 4℃ 孵育 4h。光学显微镜下观察玫瑰花环的形成。

**1.2.8 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体介导的人外周血淋巴细胞(PBL)杀伤 B 淋巴瘤细胞 Ramos 的形态学观察:** 新鲜分离的人外周血淋巴细胞, 用含 160u/mL 的 IL-2 和 5% 胎牛血清的 1640 培养基培养 4d 后, 与 Ramos 细胞以 10:1 的比例加入 96 孔板中, 并加入 0.8μg/mL 的抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体, 37℃ 反应 48h, 光学显微镜下观察细胞形态。

## 2 结果

### 2.1 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体基因的获得

设计合成多个约 60 bp 的寡核苷酸片段, 每相邻的两个片段有约 20bp 的碱基互补, 通过 4 次重叠延伸 PCR, 得到了全长为 1640bp 的抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体全基因序列(见图 1), 该基因序列的 5' 端含有 *Nhe* I 酶切位点、Kozak 序列和前导序列, 在 3' 端含 *Not* I 酶切位点、组氨酸标签。

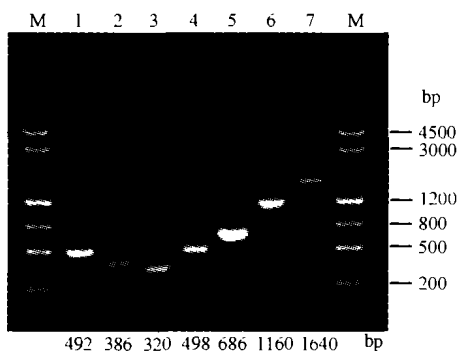


图 1 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体基因合成的 PCR 分步产物

Fig.1 Step PCR products during the progress of the assembly cDNA of anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody  
M: DNA marker III; 1~4: the four fragments (1, 2, 3 and 4) obtained by the first PCR; 5: fragments 5 obtained by PCR from fragments 2 and 3; 6: fragments 6 obtained by PCR from fragments 1 and 5; 7: complete cDNA assembled (obtained by PCR from fragments 4 and 6).

### 2.2 表达载体的构建

连有目的基因的重组质粒 pcDNA5/FRT-CD3/CD20 经限制酶 *Nhe* I、*Not* I 双酶切后, 1.5% 琼脂

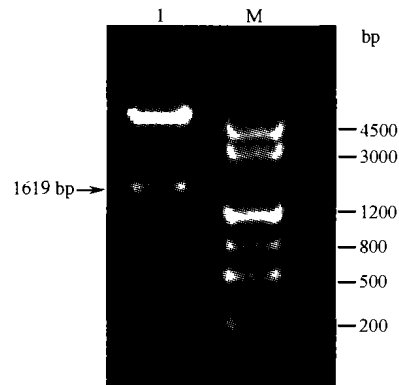


图 2 重组质粒 pcDNA5/FRT-antiCD3/antiCD20 酶切鉴定  
Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid pcDNA5/FRT-antiCD3/antiCD20  
M: DNA marker III.

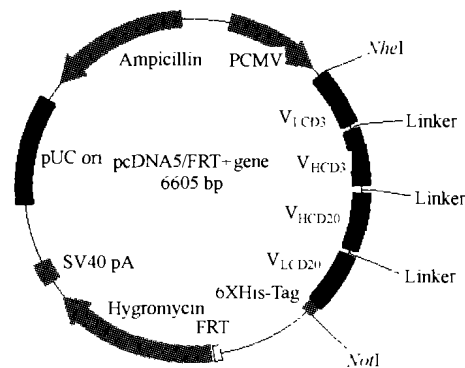


图 3 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体表达载体 pcDNA5/FRT-antiCD3/antiCD20 的构建  
Fig.3 Construction of expression vector pcDNA5/FRT-antiCD3/antiCD20

糖凝胶电泳结果显示酶切片段与预期结果相符, 切下了长度为 1619bp 的目的基因(见图 2)。此外 DNA 序列分析结果显示得到的克隆基因序列与预期完全一致, 说明已成功构建了抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体稳定表达载体(见图 3)。

### 2.3 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体基因在 Flp-In™ CHO 细胞中的表达的检测

用 500μg/mL 的 Hyromycin B 筛选转染后的阳性克隆, 细胞瓶中培养 48h, 收获无血清上清, 直接竞争法 ELISA 检测表达, 每组设 3 个平行孔, 取平均值, 设空白对照孔 OD<sub>450nm</sub> 为 0, 测量结果见图 4, 结果表明 Flp-In™ CHO 细胞表达了含组氨酸标签的目的蛋白。以精确定量的含组氨酸标签的 IL-1Ra 作参照, 含组氨酸标签的目的蛋白表达量约为 300μg/L。

### 2.4 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体的 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 分析

12% 的 SDS-PAGE 蛋白电泳结果显示, 在咪唑

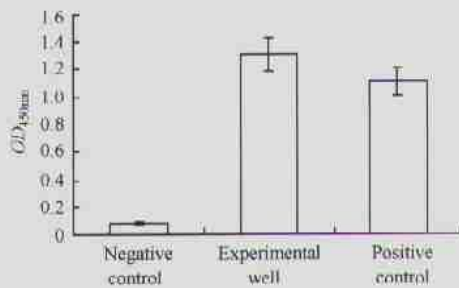


图4 直接竞争 ELISA 检测抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体的表达

Fig.4 The expression of the anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody detected by ELISA

浓度为 100mmol/L 和 250mmol/L 时均洗脱下了目的蛋白,其分子量约为 70kD, Western-blot 分析证明 anti-His(C-term)-HRP 抗体能与该蛋白发生特异性结合(见图 5)。

### 2.5 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体与 Ramous 及 Jurkat 细胞的结合活性

活细胞间接免疫荧光检测结果显示, Ramous 和 Jurkat 细胞与抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体作用一段时间后,经 anti-His(C-term)-FITC 抗体的作用,在荧光显微镜下可见绿色荧光(见图 6A、B),且主要分布在细胞膜周围,说明抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体具有分别与 Ramous 和 Jurkat 细胞结合的活性,保留了与靶抗原的特异性结合能力。玫瑰花环实验结果证明,该抗体可以同时和 Ramous 和 Jurkat 细胞结合,在细胞间形成连接。

### 2.6 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体介导的人外周血淋巴细胞(PBL)杀伤 B 淋巴瘤细胞 Ramous 的形态学观察

光学显微镜下观察可以看到,与对照组相比,实验组的 Ramous 细胞明显破碎死亡(见图 7),说明抗

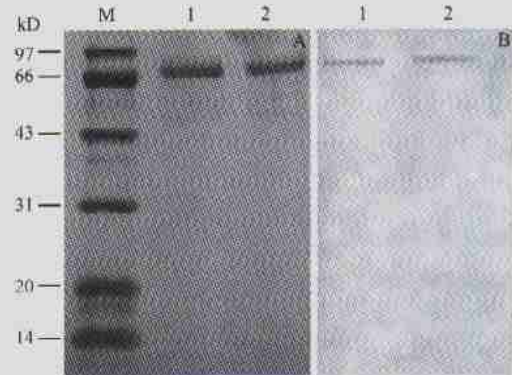


图5 抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体的 SDS-PAGE(A)与 Western-blot 分析(B)

Fig.5 SDS-PAGE(A) and Western-blot analysis(B) of the anti-CD3/anti-CD20 bispecific single chain antibody  
M: low molecular protein standards; 1: proteins eluted by 100mmol/L imidazol; 2: proteins eluted by 250mmol/L imidazol.

CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体可有效介导人外周血淋巴细胞(PBL)裂解 B 淋巴瘤细胞 Ramous。

## 3 讨论

B 细胞淋巴瘤是由淋巴组织系统细胞增生所引起的恶性肿瘤,我国淋巴瘤的死亡率约为 1.5/10 万,占有恶性肿瘤死亡位数的 11~13 位,城市发病率高于农村,发病年龄以 29~40 为多见,约占 50%。CD20 是一种非糖基化的 III 型跨膜蛋白,具高度的保守性。CD20 仅在前 B 淋巴细胞、未成熟 B 淋巴细胞、成熟 B 淋巴细胞及激活的 B 淋巴细胞中表达,而在浆细胞、淋巴多能干细胞以及其它组织中均无表达,超过 95% 的 B 细胞淋巴瘤上都有 CD20 的表达且没有显著的内吞和脱落,这些特征使得 CD20 成为治疗 B 细胞淋巴瘤的理想靶抗原<sup>[6,7]</sup>。

BiTEs 作为一种基因工程双特异性单链抗体,在设计中充分挖掘了人体内丰富的细胞毒性 T 细胞

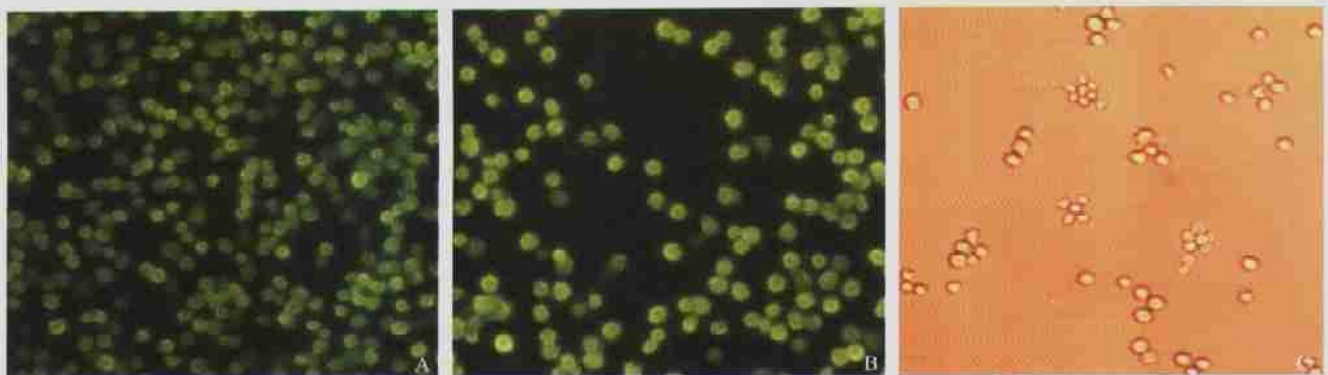


图6 活细胞免疫荧光检测抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体与 Ramous(A)和 Jurkat(B)细胞的结合活性及玫瑰花环实验(C)  
Fig.6 Binding activity of the anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody to Ramous(A) and Jurkat(B) detected by Immunofluoreacence analysis and cellular rosetting(C)



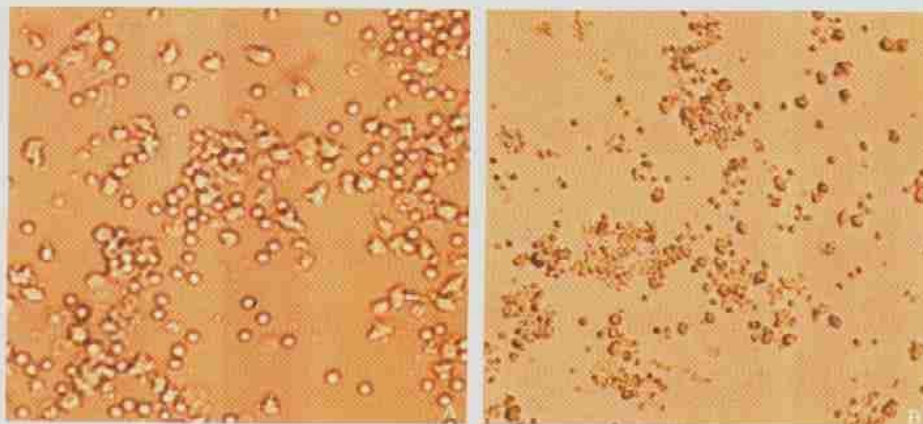


图7 光学显微镜下观察抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体介导的人外周血淋巴细胞(PBL)杀伤 B 淋巴瘤细胞 Ramous  
Fig.7 Lysis of human PBL against CD20-positive lymphoma Ramous cells in the presence of the anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody

A: negative control; B: anti-CD3/anti-CD20 bispecific single-chain antibody treatment.

(CTL) 的肿瘤杀伤效应,它克服了传统的化学偶联法、双杂交瘤融合法制备抗体所存在的免疫源性高、产量较低、纯度较差等缺点<sup>[8]</sup>,以其更高的灵活性、更强的特异性和亲和力,在肿瘤的临床治疗上具有潜在的应用前景。用 BiTEs 参与的 T 细胞清除 B 细胞淋巴瘤的体外实验证明其半数裂解靶细胞的剂量仅为 10 ~ 50pg/mL<sup>[9]</sup>,和  $\alpha$ -CD20 嵌合抗体药物 rituximab 相比, Micromet 公司的  $\alpha$ -CD19-BiTE 至少 100 000 倍的高效作用于靶细胞的裂解,这将大大降低药物的生产成本。

此外,体内试验也证明了 BiTEs 在治疗肿瘤过程中的显著疗效。Jan De Jonge<sup>[10]</sup>等建立了人类非何杰金氏淋巴瘤的小鼠模型来证明 BiTEs 形式的重组单链抗体 anti-CD3/anti-Idiotypic 在治疗 B 细胞淋巴瘤中的疗效。结果表明,用重组单链抗体并结合了葡萄球菌肠毒素 B 超抗原及人或鼠 rIL-2 来治疗的小鼠能够长期存活,肿瘤彻底被清除,而没有经过治疗的小鼠则全部死亡。

目前国内外已有很多关于 BiTEs 形式的双特异性单链抗体的报道。其中,德国 Micromet 公司研制的针对 B 细胞表面 CD19 抗原的 BiTEs 药物 MT103 是第一个被批准进入临床试验的 BiTEs 抗体药物,目前正应用了治疗非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤(NHL) 临床 I 期的研究,并即将进入 NHL 和慢性淋巴细胞性白血病临床 I/II 期的研究,但针对 CD20 抗原的 BiTEs 国内外还未见报道。

我们以(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>为连接肽,将 CD3、CD20 的轻重链可变区连接在一条多肽链上,并在其 3'端引入组氨酸标签,成功地构建了抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体,并实现了其在 Flp-In<sup>TM</sup>-CHO 细胞中的稳定表达,经 Ni-NTA 柱纯化后的抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体具有和 Ramous 及 Jurkat 细胞结合的

能力并能有效介导人外周血淋巴细胞裂解 B 淋巴瘤细胞 Ramous。以上结果为进一步分析抗 CD3/抗 CD20 双特异性单链抗体的生物学活性及体外体内杀伤作用奠定了基础。

#### REFERENCES(参考文献)

- [1] Dreier T, Lorenzowski G, Brandl C *et al.* Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer*, 2002, **100**:690 - 697
- [2] Kuffer P, Mack M, Gruber R *et al.* Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 1997, **45**:193 - 197
- [3] Cole MS, Stellrecht KE, Shi JD *et al.* HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, is immunosuppressive to T cells while exhibiting reduced mitogenicity *in vitro*. *Transplantation*, 1999, **68**:563 - 571
- [4] Woodle ES, Thistlethwaite JR, Jolliffe LK *et al.* Humanized OKT3 antibodies: successful transfer of immune modulating properties and idiotype express. *J Immunol*, 1992, **148**:2756 - 2763
- [5] Shan D, Press OW, Tsu TT *et al.* Characterization of scFv-Ig constructs generated from the Anti-CD20 mAb 1F5 using linker peptides of varying lengths. *J Immunol*, 1999, **162**:6589 - 6595
- [6] Press OW, Farr AG, Borroz KI *et al.* Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res*, 1989, **49**:4906 - 4912
- [7] Press OW, Howell-Clark J, Anderson S *et al.* Retention of B-cell specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells. *Blood*, 1994, **83**:1390 - 1397
- [8] Peipp M, Valerius T. Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, 2002, **30**:507 - 511
- [9] Dreier T, Baeuerle PA, Fichtner J *et al.* T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *J Immunol*, 2003, **170**:4397 - 4402
- [10] Jan DJ, Carlo H, Marijke de V *et al.* *In vivo* re-targeting of T cell effector function by recombinant bispecific single chain Fv (anti-CD3(anti-idiotype) induces long-term survival in the murine BCL1 lymphoma model. *J Immunol*, 1998, **161**:1454 - 1461