

抗 HEV 嵌合抗体的构建及在 CHO 细胞中的表达

罗文新, 李利峰, 许辰煜, 程通, 管宝全, 张军, 夏宁邵
(厦门大学 福建省医学分子病毒学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要:通过 RT-PCR 方法从分泌戊型肝炎(戊肝)病毒中和性鼠源单克隆抗体(单抗)8C11 的杂交瘤细胞中克隆出抗体基因的重链可变区(V_H)、轻链可变区(V_K)序列,并分别克隆到含有人 gamma 1 重链和 kappa 轻链恒定区序列的 pcDNA3.1/Hygro 和 pcDNA3.1(+) 质粒中,共转染中华仓鼠卵巢癌细胞(CHO)细胞。RT-PCR 结果表明,转染的 CHO 细胞转录了嵌合重链及轻链基因,间接 ELISA 及 Western blot 结果表明:翻译出的两种多肽在细胞内正确组装成嵌合抗体分子,并可分泌至细胞外,表达的嵌合抗体保留了原鼠单抗的抗原结合特异性及对 8H3 结合抗原的增强作用。8C11 嵌合抗体的成功表达可降低鼠源性,为探讨戊肝抗体治疗的可能性奠定了基础。

关键词:戊型肝炎病毒;嵌合抗体;真核表达

中图分类号:R373.21 文献标识码:A 文献编号:1000-8721(2004)04-0291-07

戊型肝炎(戊肝)流行于亚非大部分发展中国家及中美洲墨西哥等地,是这些国家临床急性肝炎的一个主要起因。中国的临床急性肝炎病例有 10%~15% 是由戊型肝炎病毒(HEV)引起的,印度则达 50% 左右,而尼泊尔加德满都谷地更是高达 60%^[1]。临床急性戊肝的死亡率与甲型肝炎相似或稍高,孕妇病死率高达 20%。戊肝的病原体是 HEV。最近,利用基因工程重组 HEV 衣壳蛋白,制备并鉴定出了 2 株抗 HEV 中和性鼠单克隆抗体(单抗 McAb)8C11 和 8H3。它们均能中和 HEV 对恒河猴的致病性,并有延迟排毒开始时间的趋势,对 HEV 感染猴不同时期血清有明显阻断作用,对戊肝患者急性期血清和恢复期血清同样具有显著的阻断作用。8C11 与 8H3 的协同作用可明显增强阻断作用,8C11 与 HEV 病毒的结合可以导致 8H3 与 HEV 病毒的结合得到明显增强^[2,3]。这些中和鼠单抗为研制 HEV 疫苗提供了重要帮助,也为戊肝抗体治疗研究奠定了基础。

长期以来,从免疫人体或恢复期病人血中提取的免疫球蛋白,一直被用来应急预防和治疗病毒感染引起的病毒性疾病。但是血制品的原材料来源有限、特异性抗体含量低、潜在的病原污染等问题限制

了其发展。而应用鼠源单抗治疗人体疾病会引起人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)反应。近年来,基于人源噬菌体抗体库技术和抗体工程平台技术^[4-6],抗病毒感染治疗性的人源或人源化基因工程抗体的研究已取得了很大进展,给各种病毒性传染病的特异性预防和治疗带来了新的希望。鼠单克隆抗体实现人源化在目前主要是通过基因工程技术生产嵌合抗体和改型抗体。相对而言,真核表达系统表达的嵌合抗体能更好地保留抗原结合特异性和亲和力。

本研究即在 HEV 鼠源中和性单抗 8C11 的基础上,进一步研制嵌合抗体以降低鼠源性,以期对戊肝的抗体治疗研究进行初步探索。

材料与amp;方法

1 菌株、细胞、质粒 大肠杆菌菌株 DH5 α 、ER2566 由本室保存。可分泌抗 HEV 单抗 8C11 的鼠杂交瘤细胞系由本实验室制备,中华仓鼠卵巢癌细胞系(CHO)为本室保存。质粒 pMD18T 购自大连 Takara 公司。表达载体 pAG4622 和 pAH4604 由美国 SL Morrison 教授惠赠。质粒 pcDNA3.1/Hygro 和 pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。

2 主要试剂 LipofectamineTM Reagent 购自 Invitrogen 公司。各种限制酶和 T4-DNA ligase 均购自大连 Takara 公司。Trizol 购自 Roche 公司。poly(T)、AMV、Rnasin 购自 Promega 公司。PCR 回收试剂盒购自上海华舜公司。NE2 抗原由本室表达纯化。8H3 HRP 酶标抗体抗 NE2 16D7 鼠单抗由本室制备。HEV-IgG 的 ELISA 试剂盒购自北京万泰生物药业有限公司。羊抗人 IgG Fab 购自华美公司。人 IgG1k 纯品和 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体购自 Sigma 公司。寡核苷酸

收稿日期:2004-02-11;修回日期:2004-06-28

基金项目:福建省科技重大项目(No.2002F013);国家十五创新药物博士基金(No.2003AA2Z3539);福建省自然科学基金(No.C0310005)。

作者简介:罗文新(1970-),女,副研究员。

通讯作者:夏宁邵,研究员,博士生导师。Tel:86-592-2184110; Fax:86-592-2181258; E-mail:nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

引物由上海博亚生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 引物的名称和序列

Table 1 Names and sequences of PCR primers

Primer	Sequence
MuI _g k V _L 5' - G3	5' - ATG GT(C/T) CT(C/T) AT(A/C/G)TT(A/G)CTG CTG CTA TGG- 3'
MuI _g k V _L 3' - 1	5' - CCC AAG CTT ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA- 3'
MuI _g V _H 5' - D1	5' - CGA CAT GAG G(A/G)C CCC TGC TCA G(A/T)T T(C/T)T TGG (A/TC/G)(A/T)T CTT- 3'
MFdR1	5' - ACT AGT ACA ATC CCT GGG CAC AAT- 3'
hKCF	5' - CTC GAG ACT GTG GCT GCA CCA TC- 3'
hKCR	5' - GGA TCC TCT AGA TTA ACA CTC TCC CCT GTT G- 3'
8C11hV _k F	5' - GAA TTC ATG AGT GTG CCC ACT CAG GTC CTG GGG TTG CTG CTG CTG TGG CTT ACA GAT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT CAG- 3'
8C11hV _k R	5' - CTC GAG CCG TTT GAT TTC CAG CTT GG- 3'
hHCF	5' - CTC GAG GCA AGC TTC AAG GGC C- 3'
hHCR	5' - GGA TCC TCT AGA TTA TTT ACC CGG AGA CAG G- 3'
8C11hV _H F	5' - GAA TTC AGA TCT ATG GGC AGG CTT ACT TCT TCA TTC CTG CTA CTG ATT GTC CCT GCA TAT GTC CTG TCC CAG GTT ACT CTG AAA GAG TC- 3'
8C11hV _H R	5' - CTC GAG TGA GGA GAC GGC GAC TG- 3'

3 高亲和力抗体 8C11 可变区基因的分离 半贴壁培养 10⁷ 个 8C11 鼠源杂交瘤细胞, Trizol 法提取总 RNA, 并以 poly(T) 为引物反转录成 cDNA。根据 Novagen 公司的 Ig-Prime 试剂盒的引物序列设计合成 33 条引物, 再根据重链恒定区序列设计合成一条下游引物 MFdR1, 采用 RT-PCR 法分离抗体可变区基因。用 MuI_gk V_L5' - G3/MuI_gk V_L3' - 1 引物对, 经以下条件的 PCR 扩增获得约 400bp 的单一一条带: 94℃ 5min, 94℃ 35s, 53℃ 1min, 72℃ 40s, 共 35 个循环, 再于 27℃ 延伸 15min。回收 PCR 产物并克隆至 pMD18- T 载体中, 送上海博亚公司测序。序列经 Blast 比对后, 确定为 McAb8C11V_k 序列。用 MuI_gV_H5' - D1/MFdR1 引物对经以下条件的 PCR 扩增获得约 700bp 的单一一条带: 94℃ 5min, 94℃ 40s, 57℃ 50s, 72℃ 50s, 共 35 个循环, 再于 72℃ 延伸 15min。经同样克隆并测序确定为 McAb8C11 重链 Fd 段序列。

4 人鼠嵌合抗体表达载体的构建 以 hKCF/hKCR 引物对从质粒 pAG4622 中扩增出人 kappa 轻链恒定区序列, 克隆至 XhoIv/XbaIv 双酶切的 pcDNA3.1- Neo 载体, 获得质粒 pcDNA3.1- Ak_κ。又以 8C11hV_kF/8C11hV_kR 引物对, 扩增出带信号肽的 8C11V_k 序列, 克隆至 EcoRIv/XhoIv 双酶切的 pcDNA3.1- Ak 质粒, 从而获得表达人鼠嵌合轻链的表达质粒 pcDNA3.1- Ak8C。

以 hHCF/hHCR 引物对从质粒 pAH4604 中扩增出人 gamma 1 重链恒定区序列, 克隆至 XhoIv/XbaIv 双酶切的 pcDNA3.1- Hyg 载体, 获得质粒 pcDNA3.1- AH。以 8C11hV_HF/8C11hV_HR 引物对, 扩增出带信号肽的 8C11V_H 序列, 经 BglII/XhoIv 双酶切后, 克隆至 BamHIv/XhoIv 双酶切的 pcDNA3.1- AH 质粒, 从而获得表达人鼠嵌合重链的表达质粒 pcDNA3.1- AH8C。

5 CHO 细胞的转染 通过脂质体转染法^[7] 将两个质粒 pcDNA3.1- Ak8C 和 pcDNA3.1- AH8C 共转染至 CHO 细胞中。转染后的细胞在 24 孔细胞培养板中培养 2 天后, 转

移至 6 孔板中, 使每孔的细胞数少于 100 个, 在培养液中同时加入朝霉素和新霉素等抗生素进行筛选。培养约 2 周后取细胞培养上清及细胞测定抗体活性。选择高表达细胞进行克隆化培养, 保存稳定转染细胞系。

6 ELISA 检测嵌合抗体的活性 转染细胞在 6 孔细胞培养板中培养约 2 周后, 分别收集培养上清及细胞, 细胞重悬于与培养上清等体积的 PBS 缓冲液中, 经反复冻融 4 次, 离心得到上清即为细胞裂解液。用间接 ELISA 法测定培养上清和细胞裂解液中嵌合抗体的活性。同样处理未经转染的 CHO 细胞作为阴性对照。在 96 孔板中包被 NE2 抗原, 经 BSA 封闭后, 每孔加入 100μl 待测样品及阴性对照, 3 孔重复, 37℃ 反应 1h, 洗板后再每孔加入 100μl 1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体, 37℃ 反应 30min, 洗板后加入 A、B 显色液于 37℃ 显色 15min, 终止反应后测 OD_{450/620} 值。

7 RT-PCR 检测嵌合抗体在 CHO 细胞中的表达 收集转染后的细胞提取总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 8C11hV_kF/8C11hV_kR 引物对扩增鼠 V_k 基因, 以 8C11hV_HF/8C11hV_HR 引物对扩增鼠 V_H 基因, 以 hKCF/hKCR 引物对扩增人 kappa 轻链恒定区基因, 以 hHCF/hHCR 引物对扩增人 gamma 重链恒定区基因, 以 8C11hV_kF/hKCR 引物对扩增人鼠嵌合轻链基因, 以 8C11hV_HF/hHCR 引物对扩增人鼠嵌合重链基因。

8 Western blot 检测 8C11 嵌合抗体的抗原特异性 将纯化的 NE2 进行常规 SDS-PAGE, 电转移至硝酸纤维素膜, 以含 8C11 嵌合抗体的细胞培养上清与之反应, 以 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体为二抗进行显色。对照以 8C11 鼠单抗与 NE2 反应, 以 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体为二抗进行显色。

9 8C11 嵌合抗体表达的定量 脂质体转染后的 CHO 细胞在 6 孔板中培养 48h 后, 取培养上清用 ELISA 法进行 IgG 定量检测。2 倍梯度稀释的人 IgG 1k 纯品用于制作标准曲线。ELISA 板包被羊抗人 IgG Fab, 1% BSA 封闭后, 与待测

样品及人 IgG1k 于 37℃ 反应 1h 后, 再与 HRP 标记羊抗人 IgG 反应 30min, 显色并终止后测 OD_{450/620} 值。待测样品的 OD_{450/620} 值与人 IgG1k 标准曲线对比以计算嵌合抗体的浓度。

10 ELISA 检测 8C11 嵌合抗体对 8H3 抗体的增强效应

将 8C11 嵌合抗体、8C11 原鼠单抗进行倍比稀释, 在 NE2 包被的 96 孔板中分别加入 50 μ l 的各梯度稀释液, 分别以 PBS、抗 NE2 16D7 鼠单抗作为阴性对照, 在 37℃ 反应 30min 后, 再分别加入 50 μ l 1:10 000 稀释的 HRP 标记 8H3 酶标抗体, 继续反应 30min, 洗板后加入显色液于 37℃ 反应 15min, 反应终止后用酶标仪读数。

结 果

1 8C11 抗体可变区基因的分离

抗体可变区基因的分离采用聚合酶链式反应 (PCR) 法。根据 Novagen 公司的 Ig-Prime 试剂盒的引物序列及重链恒定区序列, 合成了 15 条 V_H 特异的兼并上游引物, 16 条 V_L 特异的兼并上游引物, 2 条重链恒定区特异的下游引物, 1 条轻链恒定区特异的下游引物。从半贴壁培养的 8C11 鼠源杂交瘤

细胞中提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 以此 cDNA 为 PCR 扩增的模板。结果获得编码 8C11 单克隆抗体可变区的核苷酸序列 (图 1)。V_H 长 372bp, 编码 124 个氨基酸; V_k 长 324bp, 编码 108 个氨基酸。此外, 在 V_H 前有 57bp 的信号肽序列, 编码 19 个氨基酸; 在 V_k 前有 60bp 的信号肽序列, 编码 20 个氨基酸。

2 8C11 人鼠嵌合抗体表达载体的构建

将带有信号肽序列的 8C11 V_k 和 V_H 基因分别与人的 kappa 轻链和 gamma 1 重链恒定区基因重组, 可表达出完整的人鼠嵌合抗体。其中所用的表达载体为 pcDNA3.1 \ Hygro 和 pcDNA3.1 (+) 两种质粒。

将带信号肽的 8C11 V_k 基因和人 kappa 轻链恒定区基因, 同时克隆至 pcDNA3.1 (+) 载体, 从而获得表达嵌合轻链的质粒 pcDNA3.1- Ak8C。将带信号肽的 8C11 V_H 基因和人 gamma 1 重链恒定区基因, 同时克隆至 pcDNA3.1 \ Hygro 载体, 从而获得表达嵌合重链的质粒 pcDNA3.1- AH8C (图 2)。

8C11-V_H

ATG GGC AGG CTT ACT TCT TCA TTC CTG CTA CTG ATT GTC CCT GCA TAT GTC CTG TCC CAG 60
Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr Val Leu Ser Gln 20

signal peptide

GTT ACT CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA TTG CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT 120
Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr 40

TGT TCT TTC TCT GGG TTT TCA CTG AGC ACT TCT GGT ATG GGT GTA GGC TGG ATT CGT CAG 180
Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln 60

CCA TCA GGG AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TGG TGG GAT GAT GTC AAG CGC TAT 240
Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr 80

AGC CCA GCC CTG AAG AGC CGA CTG ACT ATC TCC AAG GAT ACC TCC AGC AGC CAG CTA TTC 300
Ser Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Leu Phe 100

CTC AAG ATC GCC AGT GTG GAC ACT GCA GAT ACT GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA ATC AAG 360
Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Lys 120

AGT GTG ATT ACG ACG GGG GAC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC GCC 420
Ser Val Ile Thr Thr Gly Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ala 140

GTC TCC TCA 429
Val Ser Ser 143

8C11-Vk

```

ATG AGT GTG CCC ACT CAG GTC CTG GGG TTG CTG CTG CTG TGG CTT ACA GAT GCC AGA TGT 60
Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys 20
                                     signal peptide
GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA GCC TCC CTA TCT GTA TCT GTG GGA GAA ACT GTC ACC 120
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr 40

ATC ACA TGT CGA GCA AGT GAG ATT ATT TAC AGT AAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAA CAG 180
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln 60

GGA AAA TCT CCT CAG CTC CTG GTC TAT TCT GCA ACA AAC TTA GCT GAA GGT GTG CCA TCA 240
Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Ser Ala Thr Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser 80

AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA CAG TAT TCC CTC AAG ATC AAC AGC CTG CAG TCT 300
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser 100

GAA GAT TTT GGG AGT TAT TAC TGT CAA CAT TTT TGG GGT AAT CCG TGG ACG TTC GGT GGA 360
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly 120

GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG 384
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 128

```

图 1 8C11 鼠单抗基因的 V_H、V_k 核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Figure 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of V_H and V_k of McAb 8C11 gene

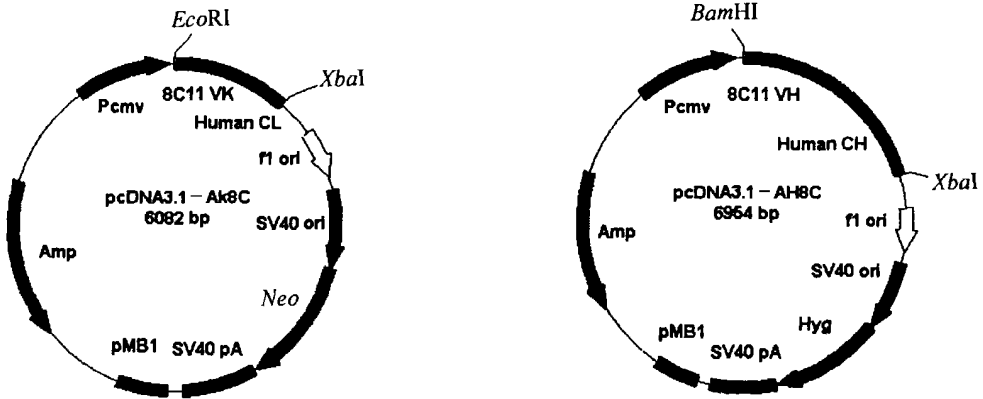


图 2 表达质粒 pcDNA3.1-Ak8C、pcDNA3.1-AH8C

Figure 2 Expression plasmids of pcDNA3.1-Ak8C and pcDNA3.1-AH8C

3 8C11 嵌合抗体在 CHO 细胞中的表达

转染后的 CHO 细胞在 6 孔细胞培养板中培养约 2 周后, 获得培养上清及细胞经反复冻融并离心得到的细胞裂解液, 用间接 ELISA 法测定嵌合抗体的活性, 以 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体为二抗, 以同样处理未转染的 CHO 细胞作为阴性对照。结果得到 3 个有较好活性的细胞株(表 2)。其中, A 细胞株培养上清的 OD 值达到 3.88, 细胞裂解液的 OD_{450/620} 值达到 3.55, 说明此细胞株能很好地表达嵌合的重链和轻链, 并且能正确组装成有活性的嵌合抗体, 进一步很好地分泌到细胞外。而 B、C 细胞

株同样能很好地表达有活性的嵌合抗体, 但其分泌到培养上清的嵌合抗体较少。

表 2 嵌合抗体的间接法 ELISA 检测结果

Table 2 Indirect ELISA detection results of the chimeric antibody

Sample tested	CHO cell strain		
	A	B	C
Cell culture supernatant	3.888	0.735	0.727
Cell extract	3.555	2.448	3.010
Negative control	0.079	0.078	0.081
Blank	0.170	0.168	0.169

图 3 表明, 用 RT-PCR 法可从 CHO 细胞中扩

增出特异的鼠 V_k 和 V_H 基因、人轻链和重链的恒定区基因, 以及完整的嵌合轻链和重链。表明所表达的嵌合抗体在 mRNA 水平上含有原鼠单抗的可变区基因, 及人抗体轻、重链恒定区。

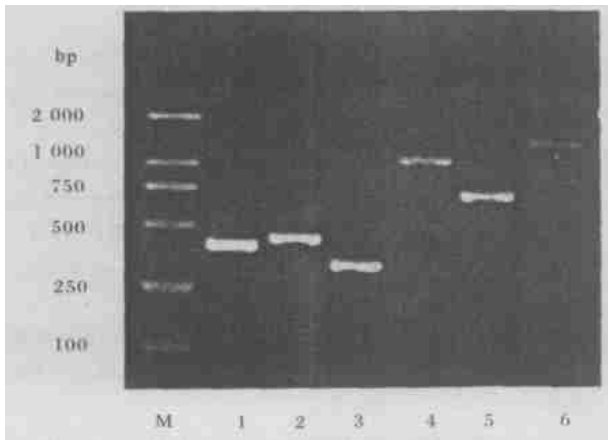


图 3 8C11 嵌合抗体在 CHO 细胞中表达的 RT-PCR 检测

Figure 3 RT-PCR detection of the expression of 8C11 chimeric antibody in CHO cells

- M: M molecular marker; 1. V_k ; 2. V_H ;
- 3. Constant region of human kappa chain;
- 4. Constant region of human gamma heavy chain;
- 5. Chimeric light chain; 6. Chimeric heavy chain.

转染后的 CHO 细胞在 6 孔板中培养 48h 后, 取培养上清用 ELISA 法检测 IgG 瞬时表达的水平, 结果表达水平约为 $400\text{ng}/(10^6 \cdot 48\text{h})$ 。

4 8C11 嵌合抗体的抗原特异性检测

将纯化的 NE2 抗原进行 SDS-PAGE 电泳, 并电转移至硝酸纤维素膜上, 以含 8C11 嵌合抗体的细胞培养上清与之反应, 以 HRP 标记羊抗人 IgG 抗

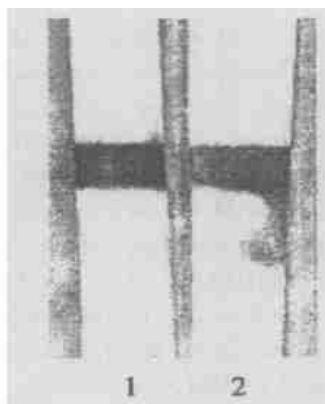


图 4 8C11 嵌合抗体与 NE2 特异性结合的 Western blot 检测

Figure 4 Western blot analysis of the specific binding of 8C11 chimeric antibody to NE2

- 1. 8C11 McAb as control; 2. 8C11 chimeric antibody.

体为二抗进行显色。图 4 表明, 表达的 8C11 嵌合抗体可特异性地与 NE2 反应。

5 8C11 嵌合抗体对 8H3 的增强效应

8H3 是本实验室制备的、可特异性结合 HEV 开放阅读框(ORF)2 编码多肽 NE2 的另一个单克隆抗体。我们的研究已表明, 8C11 可使 8H3 与 HEV 或类似物的结合明显增强, 即结合量提高, 且结合稳定。推测 8C11 与抗原的结合造成了抗原空间结构的某种变化, 使抗原上 8H3 表位暴露得更为充分。

将嵌合抗体、原鼠单抗进行倍比稀释, 分别与包被的 NE2 反应 30min 后, 再与 $50\mu\text{L}$ $10\ 000$ 稀释的 HRP 标记 8H3 酶标抗体继续反应 30min。结果由图 5 可知, 随着 8C11 嵌合抗体浓度的提高, 8H3 与 NE2 抗原的结合量也提高。以 PBS 及另一抗 NE2 鼠单抗 16D7 为对照时, 8H3 酶标抗体与 NE2 反应的 $\text{OD}_{450/620}$ 值为 $0.47\sim 0.48$, 而以未稀释的嵌合抗体与 NE2 先反应 30min, 8H3 酶标抗体与 NE2 反应的 $\text{OD}_{450/620}$ 值达到了 3.23。表明 8C11 嵌合抗体对 8H3 结合抗原有明显的增强作用, 与原鼠单抗的增强效应一致。

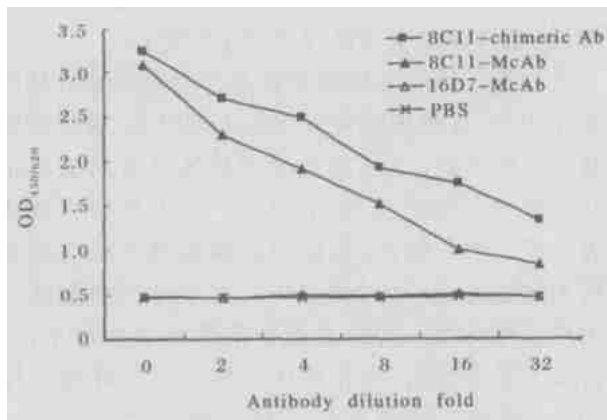


图 5 8C11 嵌合抗体对 8H3 与 NE2 抗原结合反应的增强作用

Figure 5 The enhancement effect of 8C11 chimeric antibody on the binding reaction of 8H3 to NE2

讨 论

本研究为了降低 HEV 中和抗体 8C11 的鼠源性, 在 CHO 细胞表达了人鼠嵌合抗体, 保留了原鼠单抗的抗原结合特异性及对 8H3 结合抗原的增强作用, 为戊肝的抗体治疗研究奠定了基础。

人抗鼠抗体免疫反应主要是针对鼠单抗的恒定

区^[8],将鼠的重链和轻链可变区与人的恒定区相连,从而将约 70% 的鼠抗体分子替换成人的序列,得到的是人源化的嵌合抗体。许多临床应用研究已经证明,大多数嵌合抗体在人体内只引起极弱的、甚至未引起 HAMA 反应^[9,10]。与原鼠单抗相比,人源化抗体能介导强的效应功能,其血清半衰期长,免疫原性低。自 1986 年以来, FDA 已批准 11 种单克隆抗体药物上市,其中 2 种鼠单抗、4 种嵌合抗体、5 种改型抗体。有一种改型抗体 Synagis 用于抗 RSV 病毒治疗,是目前抗病毒工程抗体中最为成功的一种。目前世界上至少有 400 种单克隆抗体正在进行临床实验^[11]。

用于生产抗体及抗体片段的表达系统有细菌、酵母、植物、昆虫细胞和哺乳动物细胞,各有优缺点^[12-14]。细菌不能组装完整的糖基化抗体,但适于生产抗体片段。酵母用于表达完整抗体,但表达出的抗体带有高甘露糖、多分枝低聚糖,在诸如补体介导的细胞裂解等效应功能方面有所欠缺。通过杆状病毒在昆虫细胞中生产抗体的水平较高,用植物生产抗体则是另一个更为经济的途径。但昆虫细胞只带有 N 相连的糖基化,且最后一个糖是甘露糖;植物细胞则在末端添加与哺乳动物细胞不同的糖基。这些糖基化差异可能影响抗体的生物分布、半衰期、抗原性和效应功能等体内生物特性。

全功能抗体在骨髓瘤细胞及非骨髓瘤哺乳动物细胞中表达,这些细胞拥有抗体正确组装、翻译后修饰及分泌的机制,表达的全分子抗体具有与天然抗体几乎完全一致的生物活性^[15,16]。但是嵌合抗体的表达量一般比较低,在鼠骨髓瘤细胞系的表达量一般不超过几微克/($10^6 \cdot 24h$),在非淋巴细胞体系的表达量则更低。为提高嵌合抗体的表达水平,人们尝试了很多方法,如将抗体基因与二氢叶酸还原酶(dhfr)或腺苷脱氨酶等一起扩增^[17,18]。利用二氢叶酸还原酶(dhfr)扩增系统,已成功地在 CHO 细胞中将抗体的表达量提高到了 $100\mu g/(10^6 \cdot 24h)$,抗体仍能介导补体依赖的细胞毒(CDC)和抗体依赖的、细胞介导的细胞效应(ADCC)^[17,19]。在本研究中,采用哺乳动物表达质粒 pcDNA3.1 \ Hygro 和 pcDNA3.1(+) 在普通 CHO 细胞中表达嵌合抗体,得到的表达量较低,难以进行纯化及相关性质研究。因此正在尝试采用昆虫杆状表达系统进行表达,并将采用二氢叶酸还原酶(dhfr)扩增系统在 CHO 细胞中表达,以期提高表达产量。

参考文献:

- [1] Smith J L. A review of hepatitis E virus[J]. J Food Protection, 2001, 4: 572- 586.
- [2] 顾颖,葛胜祥,黄果勇,等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定[J]. 病毒学报, 2003, 19(3): 217- 223.
- [3] 顾颖,张军,夏宁邵,等. 生物传感器对戊型肝炎病毒单克隆抗体部分特性的研究[J]. 细胞和分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 617 - 620.
- [4] Hoogenboom H R, de Bruyne A P, Hufton S E, et al. Antibody phage display technology and its applications [J]. Immunotechnology, 1998, 4: 1- 20.
- [5] Bruggemann M, Williams G T, Bindon C I, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies[J]. J Exp Med, 1987, 166(5): 1351- 1361.
- [6] Kipriyanov S M, Little M. Generation of recombinant antibodies[J]. Mol Biotechnol, 1999, 12: 173- 201.
- [7] 程通,许辰煜,夏宁邵,等. 杆状病毒用于哺乳动物细胞快速高效表达外源基因的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 581 - 586.
- [7] Bruggemann M, Winter G, Waldmann H, et al. The immunogenicity of chimeric antibodies[J]. J Exp Med, 1989, 170: 2153- 2157.
- [8] Denardo S J, Richman C M, Goldstein D S, et al. Yttrium - 90/ indium - 90m - DOTA - peptide chimeric L6: Pharmacokinetics, dosimetry and initial results in patients with incurable breast cancer [J]. Anticancer Res, 1997, 17(3B): 1735- 1744.
- [9] Maloney D G, Liles T M, Czerwinski D K, et al. Phase I clinical trial using escalating single - dose infusion of chimeric anti - CD20 monoclonal antibody (IDEC - C2B8) in patients with recurrent B - cell lymphoma [J]. Blood, 1994, 84(8): 2457- 2466.
- [10] Gura T. Therapeutic antibodies: Magic bullets hit the target [J]. Nature, 2002, 417: 584- 586.
- [11] Verma R, Boleti E, George A J T. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems [J]. J Immunol Meth, 1998, 216: 165- 181.
- [12] Little M, Kipriyanov S M, Le Gall F, et al. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies [J]. Immunology Today, 2000, 21(8): 364- 370.
- [13] Joosten V, Lokman C, van den Hondel C A M J J, et al. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi [J]. Microbial Cell Factories, 2003, 2 (1): 1.
- [14] Yoo E M, Chintalacheruvu K R, Penichet M L, et al. M yeloma expression systems [J]. J Immunol Methods, 2002, 261: 1- 20.
- [15] Cattaneo A, Neuberger M S. Polymeric immunoglobulin M is secreted by transfectants of non - lymphoid cells in the absence of immunoglobulin J chain [J]. EMBO J, 1987, 6: 2753- 2758.
- [16] Page M J, Sydenham M A. High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath - 1H in Chinese hamster ovary cells [J]. Biotechnology (NY), 1991, 9: 64- 68.
- [17] Wood C R, Dorner A J, Morris G E, et al. High level synthesis of immunoglobulins in Chinese hamster ovary cells [J]. J Immunol,

1990, 145: 3011- 3016.

[18] Crowe J S, Hall V S, Smith M A, et al Humanized monoclonal antibody CAMPATH- 1H: myeloma cell expression of genomic

constructs, nucleotide sequence of cDNA constructs and comparison of effector mechanisms of myeloma and Chinese hamster ovary cell-derived material[J]. Clin Exp Immunol, 1992, 87: 105- 110.

Construction and Expression of a Mouse-human Chimeric Antibody against Hepatitis E Virus

LUO Wen-xin, LI Li-feng, XU Chen-Yu, CHENG Tong, GUAN Bao-quan,
ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(Research Center for Molecular Medical Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A neutralizing mouse anti- HEV monoclonal antibody (McAb), designated as 8C11, has previously been produced and characterized by our laboratory. We reported here the construction and the expression of mouse-human chimeric antibody derived from the McAb. cDNAs encoding variable regions of heavy and light chains were isolated from 8C11 cells by RT- PCR, and introduced into mammalian expression vectors pcDNA3. 1/Hygro and pcDNA3. 1(+) containing cDNA of human gamma 1 and kappa constant regions, respectively. The vectors were cotransfected into CHO cells. The result of RT- PCR showed that the introduced genes for chimeric heavy and light chains were transcribed. Indirect ELISA and Western blot indicated that the peptides were assembled correctly to form native IgG molecule, which could be secreted outside the cells. The expressed chimeric antibody held the binding specificity of its original McAb to HEV and enhanced the binding activity of 8H3 to antigen. The chimeric antibody described here is expected to be less immunogenic and thus more suitable for possible antibody therapy for hepatitis E.

Key words: HEV; chimeric antibody; eukaryotic expression

欢迎您在《病毒学报》刊登广告

《病毒学报》是病毒学专业学术期刊, 创刊于 1985 年, 主办单位是中国微生物学会, 承办单位是中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

本刊在国外是 MEDLINE、CA、BA 的来源刊。国内是自然科学、基础医学、生物医学的核心期刊, 是中国科学引文数据库、中国科技论文统计源数据库、中文生物医学期刊文献数据库、中国生物医学文献数据库、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国学术期刊文摘》等的来源刊。

本刊的主要读者对象为病毒学、微生物学、免疫学、生物学等的科研和教学工作者。

欢迎刊登内容为单位简介及有关科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等方面的图片与文字宣传资料。黑白版: 1000 元/页, 彩色版: 3000~ 5000 元/页。

广告联系地址: 北京市宣武区迎新街 100 号

《病毒学报》编辑部 邮编: 100052

联系人: 陈彤彤 联系电话: (010) 63578298, 63536460 E-mail: bdx@chinajournal.net.cn