

引用格式:蒙柳仙,魏振华,熊雪阳,等. 基于 NFAT 信号通路的抗 LAG3 抗体 8F-6 生物活性检测[J]. 北京化工大学学报(自然科学版),2021,48(6):40-47.

MENG LiuXian, WEI ZhenHua, XIONG XueYang, et al. Biological activity detection of the anti-LAG3 antibody 8F-6 based on a nuclear factor of activated T-cell (NFAT) signaling pathway[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2021,48(6):40-47.

# 基于 NFAT 信号通路的抗 LAG3 抗体 8F-6 生物活性检测

蒙柳仙<sup>#</sup> 魏振华<sup>#</sup> 熊雪阳 许立达 吴依昕 梁 蒙<sup>\*</sup> 喻长远<sup>\*</sup>

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘 要:** 淋巴细胞活化基因 3 (LAG3) 在 T 细胞活化和增殖过程中起负调控作用,通过单克隆抗体封闭 LAG3 分子可以增强 T 细胞对肿瘤的杀伤力,因此开发抗 LAG3 抗体的生物活性检测平台对免疫治疗具有重要意义。前期利用杂交瘤融合及抗体人源化改造技术,得到了一株全人源化的抗 LAG3 单克隆抗体 8F-6,并基于活化 T 细胞核因子(NFAT)信号通路构建了 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 和 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞。本文利用所构建的细胞,通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)和流式细胞技术对抗体 8F-6 进行亲和力及阻断效果检测。结果表明,抗体 8F-6 与 LAG3 分子具有良好的亲和力,可以阻断主要组织相容性复合体 II(MHC II)分子与 LAG3 分子的结合;在报告细胞检测平台中,抗体 8F-6 在 CHO-K1-FCGR1A 细胞的协助下可以激活 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞;在 Daudi/Raji 细胞、人金黄色葡萄球菌肠毒素 E(SEE)和 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞的反应体系中,相比于对照抗体 IgG1,抗体 8F-6 可以明显提高 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞的激活效果。

**关键词:** 抗 LAG3 抗体 8F-6; NFAT 信号通路; 流式细胞检测; 报告基因测定

**中图分类号:** R392; Q71 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2021.06.006

## 引 言

传统放化疗由于在癌症治疗过程中副反应严重且效果有限,因此免疫治疗越来越受到重视,成为目前癌症治疗中最热门的领域。以抗 CTLA-4 和抗 PD-1/PD-L1 为代表的免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 因具有良好的临床效果而成为免疫治疗领域的研究热点。应用于临床时,这些单克隆抗体具有治疗窗口广、疗效显著、不良反应小等优势<sup>[1]</sup>。与此同时,以淋巴细胞活化基因 3 (LAG3) (又称 CD223)、BTLA、TIM-3 等为代表的其

他免疫检查点也逐渐进入科学家的视野<sup>[2]</sup>。

作为免疫球蛋白超家族成员之一,LAG3 是一种由 470 个氨基酸组成的跨膜蛋白,在特征上与 CD4 分子有一定的相似性<sup>[3]</sup>。研究发现,LAG3 分子及 CD4 分子均可以与抗原肽-主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex II, MHC II) 分子结合,但是结合位点不同,而且 MHC II 分子与 LAG3 分子的结合能力显著大于与 CD4 分子的结合能力<sup>[4]</sup>。LAG3 在活化的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、DC 细胞和 NK 细胞中分子的表达量会上调,而在未活化的免疫细胞中基本没有表达<sup>[5]</sup>。LAG3 作为一种重要的免疫调节因子,是 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 的共抑制受体之一。因其与 MHC II 分子具有更强的亲和力,可抑制特异性 T 细胞增殖和细胞因子 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) 分泌,使 T 细胞的抗肿瘤免疫应答处于沉默状态<sup>[6-7]</sup>。与 PD-1 分子类似,LAG3 分子在 T 细胞活化和增殖过程中均起负调控作用,有利于肿瘤实现免疫逃逸。通过封闭 LAG3 分子介导的信号通路,可以使 T 细

收稿日期: 2021-05-13

基金项目: 国家自然科学基金(82174531)

<sup>#</sup>并列第一作者: 蒙柳仙,女,1996 年生,硕士生;魏振华,男,1995 年生,硕士生

<sup>\*</sup> 通信联系人

梁蒙, E-mail: liangmeng666@126.com

喻长远, E-mail: yucy@mail.buct.edu.cn

胞恢复至正常状态,进而杀伤肿瘤细胞<sup>[8-9]</sup>。

目前针对 LAG3 分子的单克隆抗体有多达几十种,且处于不同的临床阶段<sup>[10]</sup>。生物活性测定对抗体药物的临床前研发至关重要,报告基因检测法由于具有操作简单、快捷精确、结果稳定等优点,近年来被广泛用于各种抗体药物(如 PD-1/PD-L1、CLDN18.2、CTLA4 和 VISTA)的生物活性检测<sup>[11-12]</sup>。利用报告基因检测法测定抗 LAG3 抗体,使其与 LAG3 偶联从而阻断 LAG3 与 MHC II 的结合,以抗体剂量依赖的方式解除 T 细胞的抑制状态。活化 T 细胞核因子(NFAT)家族的第一个成员是在抗原刺激 T 淋巴细胞激活基因转录而导致 IL-2 等新的细胞因子合成时被发现的<sup>[13]</sup>。同时还发现,免疫细胞的激活可促使胞质钙离子水平的上升,从而导致体内 NFAT 的激活,促进随后对病原体感染的免疫反应,并且 NFAT 家族成员还可以调节多种癌症的发展和转移<sup>[2,14]</sup>。此外,当 MHC II 分子与 TCR 相互结合时,因为 T 细胞内钙水平升高,使得 NFAT 去磷酸化,再转运到细胞核中,形成协同转录复合物,促使 IL-2 产生。

本课题组前期利用杂交瘤融合及抗体人源化改造技术,得到了一株全人源化的抗 LAG3 单克隆抗体 8F-6;在 Jurkat 细胞上稳定转染 NFAT 控制的荧光素酶基因,得到 Jurkat-NFAT-Luc2,然后分别稳定转染人 LAG3 和 LAG3-CD3zeta,构建了 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 和 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞系。在本文中,由于 Daudi 细胞对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞有直接的激活作用,在二者的共混体系中加入抗体 8F-6,测试了 8F-6 对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞激活的阻断作用;在 APC 细胞(Daudi、Raji 细胞)和 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞的共混体系中加入人金黄色葡萄球菌肠毒素 E(SEE)作为免疫刺激剂,以确保 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞的激活效果,然后加入抗体 8F-6,检测了 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞激活效果的变化情况。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料与仪器

#### 1.1.1 实验材料

293T-LAG3、293T-cyno-LAG3、Jurkat-NFAT-Luc2、Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3、Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta、CHO-K1-FCGR1A(CD64)、

Daudi 及 Raji 细胞,抗体 8F-6、LAG3-His 蛋白、LAG3-hFc 蛋白、SEE 及 IgG1 抗体,均由康源博创生物科技有限公司提供;荧光检测试剂,BPS 公司;DMEM、RPMI-1640 培养基,Hyclone 公司;puromycin、胎牛血清(FBS),GBICO 公司;PE anti-human IgG Fc 抗体、抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体,BioLegend 公司;hygromycin B,Invitrogen 公司;酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,R&D 公司;Human CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit、96 孔透明平底黑壁板、96 孔化合物板、50 mL 离心管、15 mL 离心管、10 mL 移液管,Corning 公司;T75 细胞培养瓶,Thermo 公司。

#### 1.1.2 实验仪器

多功能酶标仪(Spectramax M3),北京富龙康泰公司;流式细胞仪(easyCyte),Guava 公司;离心机(Centrifuge 5804/5804 R),Eppendorf 公司;CO<sub>2</sub>培养箱(3100 Series)、生物安全柜(1300 Series A2),Thermo Scientific 公司;倒置显微镜(CKX41SF),Olympus 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 抗体 8F-6 与 LAG3 蛋白结合

在特定 ELISA 板中加入 100  $\mu$ L 经过磷酸盐缓冲液(PBS)稀释的 LAG3-His 蛋白,其最终质量浓度为 0.5  $\mu$ g/mL,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤细胞板后,每孔加入 300  $\mu$ L 封闭液,室温孵育 1.5 h。再次洗涤后加入 100  $\mu$ L 抗 LAG3 抗体 8F-6,其起始质量浓度为 20  $\mu$ g/mL,以 3.16 倍稀释,设置 10 个质量浓度梯度,对照组为相同浓度的 IgG1 抗体,室温孵育 2 h。洗涤后加入 100  $\mu$ L Streptavidin-HRP 工作液,室温孵育 20 min。再次洗涤后每孔加入 100  $\mu$ L Substrate Solution,室温孵育 20 min,此过程避光。最后每孔加入 50  $\mu$ L 终止液,轻敲细胞板以确保充分混匀。使用多功能酶标仪校准波长后于 450 nm 处测定吸光度  $A_{450}$ 。

#### 1.2.2 抗体 8F-6 与人活化 T 细胞结合

使用 Human CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit 从外周血单个核细胞(PBMC)中分选出 CD4<sup>+</sup> T 细胞。加入 10  $\mu$ g/mL 抗 CD3 抗体和 1  $\mu$ g/mL 抗 CD28 抗体,在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h 后加入 96 孔板中(每孔  $5 \times 10^5$  个细胞),加入 1  $\mu$ g/mL 抗体 8F-6,混合均匀,4  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后离心洗涤,重悬,再加入 2  $\mu$ L PE anti-human IgG Fc 抗体混合均匀,4  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后离心洗涤,重悬,使用流式细胞仪检测荧光强度。不加抗体为空白组,PE anti-human IgG Fc 抗体为对照组。

### 1.2.3 抗体 8F-6 与过表达 LAG3 细胞株结合

为了更好地反映 8F-6 与细胞膜表面 LAG3 的结合能力,分别构建了可在 293T 细胞膜表面上稳定表达人的 LAG3 抗原以及猕猴的 LAG3 抗原的工程细胞株 293T-LAG3 及 293T-cyno-LAG3,待细胞长至适宜密度时,使用 DMEM + 10% FBS + 1  $\mu\text{g/mL}$  puromycin 收取细胞,通过流式细胞仪检测荧光强度。其中,所加入的抗体 8F-6 的起始质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$ ,以 3.16 倍稀释,设置 10 个质量浓度,对照组为相同浓度的 IgG1 抗体。使用 GraphPad-Prism 7 软件对检测结果进行曲线拟合,得到半最大效应浓度 ( $\text{EC}_{50}$ )。对于构建的 LAG3 分子过表达细胞株 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 和 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta,前者在细胞膜表面过表达人的 LAG3 蛋白,后者在细胞膜表面过表达重组人 LAG3 和 CD3zeta 的融合蛋白,待细胞长至适宜密度时使用 RPMI-1640 + 10% FBS + 1  $\mu\text{g/mL}$  puromycin + 300  $\mu\text{g/mL}$  hygromycin B 收取细胞,实验组加入 1  $\mu\text{g/mL}$  抗体 8F-6,不加抗体为空白组,PE anti-human IgG Fc 抗体为对照组,使用流式细胞仪检测荧光强度。

### 1.2.4 报告基因细胞的激活作用

构建的 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 和 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞都是基于 NFAT 信号通路激活下引发荧光素酶基因表达的原理,因此不同反应体系检测的荧光值可反映 Jurkat 细胞的受激活程度。Daudi 和 Raji 细胞表面表达有 MHC II 分子,因此可用作激活体系中的配体细胞。计数后在 96 孔透明平底黑壁板中加入 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞悬液,每孔细胞数为 20 000 个,实验组分别加入 10  $\mu\text{g/mL}$  CD3 抗体 + 1  $\mu\text{g/mL}$  CD28 抗体、10  $\mu\text{g/mL}$  8F-6、10  $\mu\text{g/mL}$  IgG1 抗体、Daudi 细胞、Raji 细胞,其中每孔 Daudi 细胞和 Raji 细胞的数量均为  $2 \times 10^5$  个,设置复孔,同时空白孔只含有 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3。混合均匀,孵育 6 h 后,加入 100  $\mu\text{L}$  荧光检测试剂,避光震荡后使用多功能酶标仪检测荧光值。Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 的检测方法相同。使用 GraphPad-Prism 7 软件对检测结果进行分析,按照下式计算差异倍数(fold change)。

$$F_c = \frac{I_c}{I_b}$$

式中,  $F_c$  为差异倍数,  $I_c$  为实验孔的荧光值,  $I_b$  为空白

孔的荧光值。

### 1.2.5 抗体 8F-6 阻断 LAG3 与 MHC II 的结合

将 0.5  $\mu\text{g/mL}$  LAG3-hFc 蛋白与 Daudi 细胞混合后,加入抗体 8F-6,其起始质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$ ,以 3.16 倍稀释,设置 10 个质量浓度,混合均匀后共孵育 1 h,进行流式细胞检测。对照组为相同浓度的 IgG1 抗体,二抗为 PE anti-human IgG Fc 抗体,空白组不含抗体。检测结果使用 FlowJo 软件处理,使用 GraphPad-Prism 7 软件进行曲线拟合,按照下式计算抑制率  $R$ 。

$$R = \left(1 - \frac{I_c}{I_b}\right) \times 100\%$$

将构建的 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 与 Daudi 细胞共混,加入 96 孔透明平底黑壁板中,两种细胞数量之比为 1:1,均为 20 000 个/孔。然后加入梯度稀释的抗体 8F-6,其起始质量浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$ ,以 3.16 倍稀释,设置 9 个质量浓度。混合均匀后共孵育 6 h,反应体系体积为 200  $\mu\text{L}$ ,设置复孔,对照抗体为相同浓度的 IgG1 抗体。空白孔只含有 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞,作为激活结果的参考背景值。孵育 6 h 后,加入 100  $\mu\text{L}$  荧光检测试剂,避光震荡后使用多功能酶标仪检测荧光值,使用 GraphPad-Prism 7 软件对检测结果进行曲线拟合。

### 1.2.6 利用 CHO-K1-FCGRIA 实现抗体 8F-6 对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 的激活

将 CHO-K1-FCGRIA 细胞悬液加入 96 孔透明平底黑壁板中,细胞数量为 20 000 个/孔,然后加入抗 LAG3 抗体 8F-6 预混 30 min,抗体 8F-6 的起始质量浓度为 3.16  $\mu\text{g/mL}$ ,以 3.16 倍稀释,设置 9 个质量浓度。混合均匀后共孵育 6 h,反应体系体积为 200  $\mu\text{L}$ ,设置复孔,对照抗体为相同浓度的 IgG1 抗体。空白孔只含有 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 和 CHO-K1-FCGRIA 细胞,作为激活结果的参考背景值。孵育 6 h 后,加入 100  $\mu\text{L}$  荧光检测试剂,避光震荡后使用多功能酶标仪检测荧光值。使用 GraphPad-Prism 7 软件对检测结果进行曲线拟合。

### 1.2.7 SEE 对 Daudi 和 Raji 细胞与报告基因细胞共混的激活

将 Daudi 及 Raji 细胞悬液分别加入 96 孔透明平底黑壁板中,细胞数量为 10 000 个/孔,然后加入梯度稀释的 SEE 悬液,SEE 悬液的起始质量浓度为



100 ng/mL,以 5 倍稀释,设置 8 个质量浓度。混合均匀后孵育过夜,反应体系体积为 100  $\mu$ L,设置复孔,对照组不含有 Daudi 及 Raji 细胞。第 2 天分别在各组中加入 Jurkat - NFAT - Luc2 细胞悬液,细胞数量为 20 000 个/孔,最终反应体系体积为 200  $\mu$ L,混合均匀后共孵育 6 h。空白孔只含有 Jurkat - NFAT - Luc2 细胞和 Daudi/Raji 细胞,作为激活结果的参考背景值。孵育 6 h 后,加入 100  $\mu$ L 荧光检测试剂,避光震荡后使用多功能酶标仪检测荧光值。Jurkat - NFAT - Luc2 - LAG3 的检测方法与 Jurkat - NFAT - Luc2 细胞相同。使用 GraphPad - Prism 7 软件对检测结果进行曲线拟合。

1.2.8 抗体 8F-6 对 SEE 激活效果的影响

将 Daudi 及 Raji 细胞悬液分别加入 96 孔透明平底黑壁板中,细胞数目为 10 000 个/孔,然后加入梯度稀释的 SEE 悬液,SEE 悬液的起始质量浓度为 0.8 ng/mL,以 5 倍稀释,设置 5 个质量浓度,混合均匀后孵育过夜,反应体系体积为 100  $\mu$ L,设置复孔。第 2 天分别在各孔中加入 Jurkat - NFAT - Luc2 - LAG3 细胞悬液,细胞数量为 20 000 个/孔,再加入 10  $\mu$ g/mL 抗体 8F-6,对照组为加入相同质量浓度的 IgG1 抗体。最终反应体系体积为 200  $\mu$ L,混合均匀后共孵育 6 h。空白孔只含有 Jurkat - NFAT - Luc2

细胞和 APC 细胞,作为激活结果的参考背景值。孵育 6 h 后,加入 100  $\mu$ L 荧光检测试剂,避光震荡后使用多功能酶标仪检测荧光值。使用 GraphPad - Prism 7 软件对检测结果进行分析。

2 结果与讨论

2.1 抗体 8F-6 的结合作用测试结果

图 1(a)为抗体 8F-6 与 LAG3 分子的结合能力测试结果,随着抗体 8F-6 的质量浓度增加, $A_{450}$  逐渐增大,表明二者的亲和力良好,而对照组抗体 IgG1 与 LAG3 分子无结合作用。为了更好地反映抗体 8F-6 与人体细胞表面的 LAG3 分子的结合,测试了抗体 8F-6 与抗 CD3/CD28 抗体激活后的 T 细胞的结合作用,结果如图 1(b)所示。结果显示激活后的 T 细胞与 8F-6 的结合有明显的高位峰移,表明 T 细胞表面的 LAG3 分子表达上调,并且与 8F-6 为阳性结合。为了在细胞水平上定量反映抗体浓度与 LAG3 分子亲和力的关系,分别利用构建的 293T - LAG3 及 293T - cyno - LAG3 细胞检测了它们与 8F-6 的结合情况,结果如图 1(c)和 1(d)所示。随着抗体 8F-6 的质量浓度增加,平均荧光强度逐渐增大,表明抗体 8F-6 在细胞水平上与人的 LAG3 分子及猕猴的 LAG3 分子均有结合能力,而阴性对照组抗

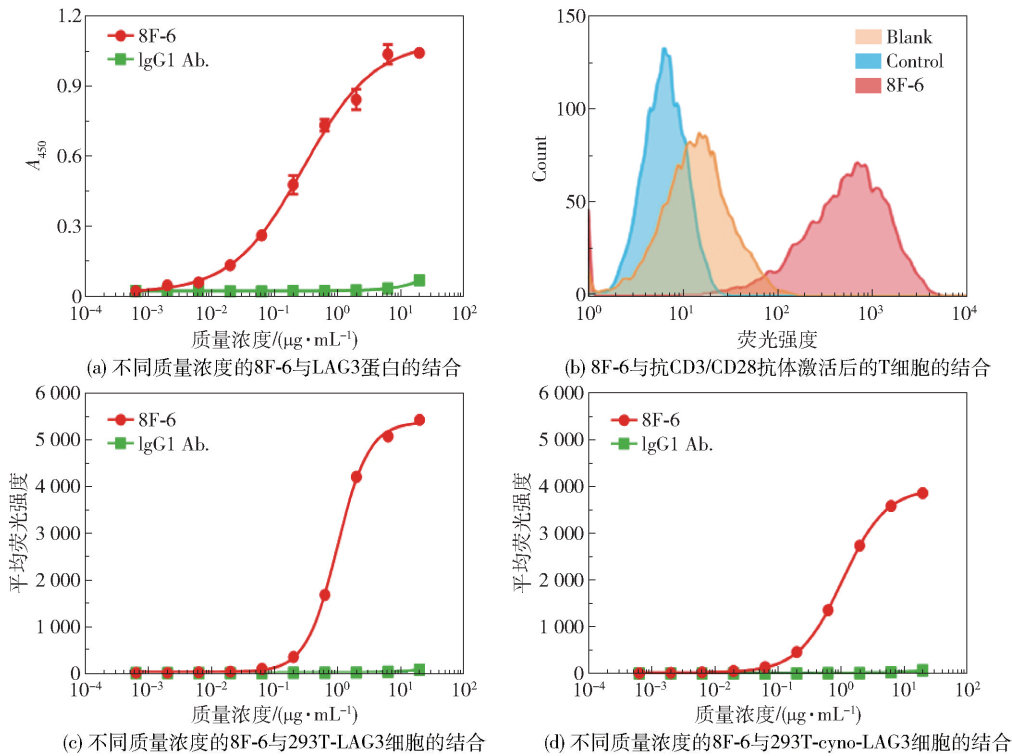


图 1 抗体 8F-6 的结合作用  
Fig. 1 Binding effect of the antibody 8F-6

体 IgG1 与它们无结合作用。

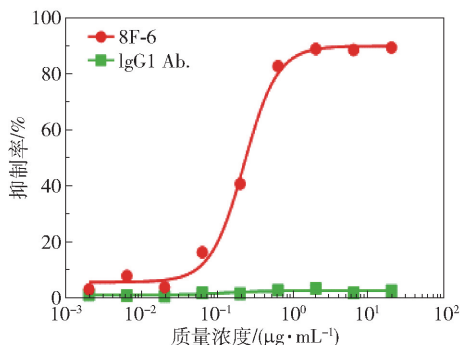
## 2.2 抗体 8F-6 的阻断作用测试结果

为了验证抗体 8F-6 对 LAG3 分子与 APC 细胞表面 MHC II 分子结合的影响,测定了不同质量浓度的抗体 8F-6 对 Daudi 细胞与 LAG3 蛋白结合的阻断作用,结果如图 2(a)所示。随着抗体 8F-6 的质量浓度增加,抑制率逐渐增大,表明抗体 8F-6 对二者的结合有明显的阻断效果,且这种效果与抗体浓度呈正相关,而对照组抗体 IgG1 则不具有阻断效果。为了开发出良好的报告基因检测平台并应用于抗体检测,利用 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞与抗体 8F-6 混合后进行流式细胞检测,结果如图 2(b)所示。加入抗体 8F-6 的荧光检测结果出现高位峰移,表明 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞有 LAG3 融合蛋白表达并且与 8F-6 为阳性结合,CD3zeta 具有转导 TCR 识别抗原所产生的活化信号的作用。图 2(c)为不同激活体系对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞的激活作用,阳性对照使用 CD3 抗体和 CD28 抗体刺激后,其荧光值明显升高,Raji 和 Daudi 细胞组也检测到荧光值升高,而 8F-6 和 IgG1 抗体组与空白细胞组无

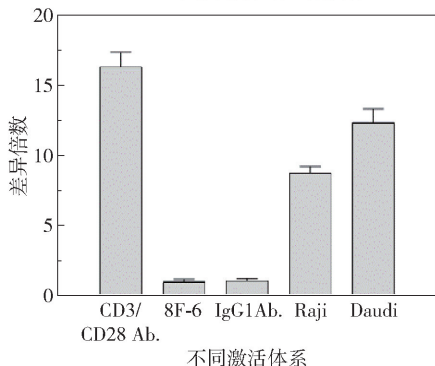
差异,结果表明除了 CD3/CD28 抗体对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞具有激活效果外,Raji 和 Daudi 细胞通过与 LAG3-CD3zeta 融合蛋白的结合也具有激活 Jurkat 细胞的作用;而抗体 8F-6 虽然也可以与 LAG3-CD3zeta 融合蛋白结合,但不具有激活效果,表明 APC 细胞与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 的结合方式和抗体 8F-6 有差异。鉴于 Daudi 细胞与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞的结合具有直接激活的效果,本文检测了抗体 8F-6 在此体系中的阻断作用,结果如图 2(d)所示。随着 8F-6 的质量浓度增加,荧光值变化的差异倍数明显下降,表明 8F-6 可以阻断 Daudi 细胞对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞的激活,并且这种阻断效果有明显的浓度依赖性,而对照组抗体 IgG1 则不能阻断这种激活作用,这说明该体系可用于 LAG3 抗体的阻断检测平台。

## 2.3 利用报告基因细胞对抗体 8F-6 生物活性的测定结果

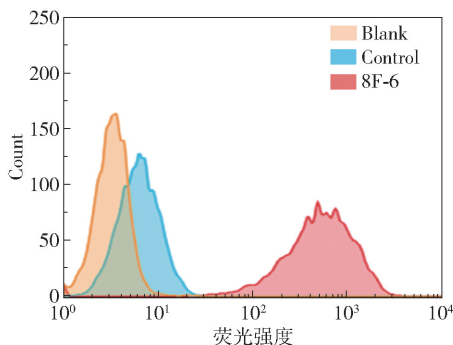
在图 2(c)实验结果的基础上构建了 CHO-K1-FCGRIA 细胞,该细胞可特异性结合抗体 8F-6 的 Fc 段。图 3(a)为不同质量浓度的抗体 8F-6 在



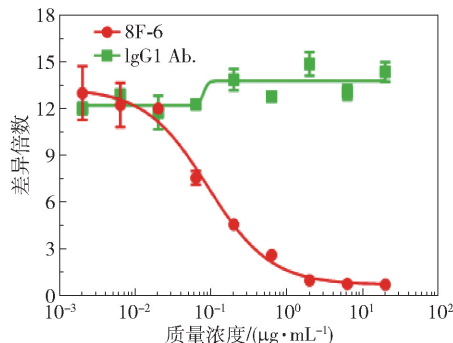
(a) 不同质量浓度的 8F-6 对 Daudi 细胞与 LAG3 蛋白结合的阻断作用



(c) 不同激活体系对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞的激活作用



(b) 8F-6 与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞的结合



(d) 不同质量浓度的 8F-6 在 Daudi 细胞与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞混体系中的阻断作用

图 2 抗体 8F-6 的阻断作用

Fig. 2 Blocking effect of the antibody 8F-6

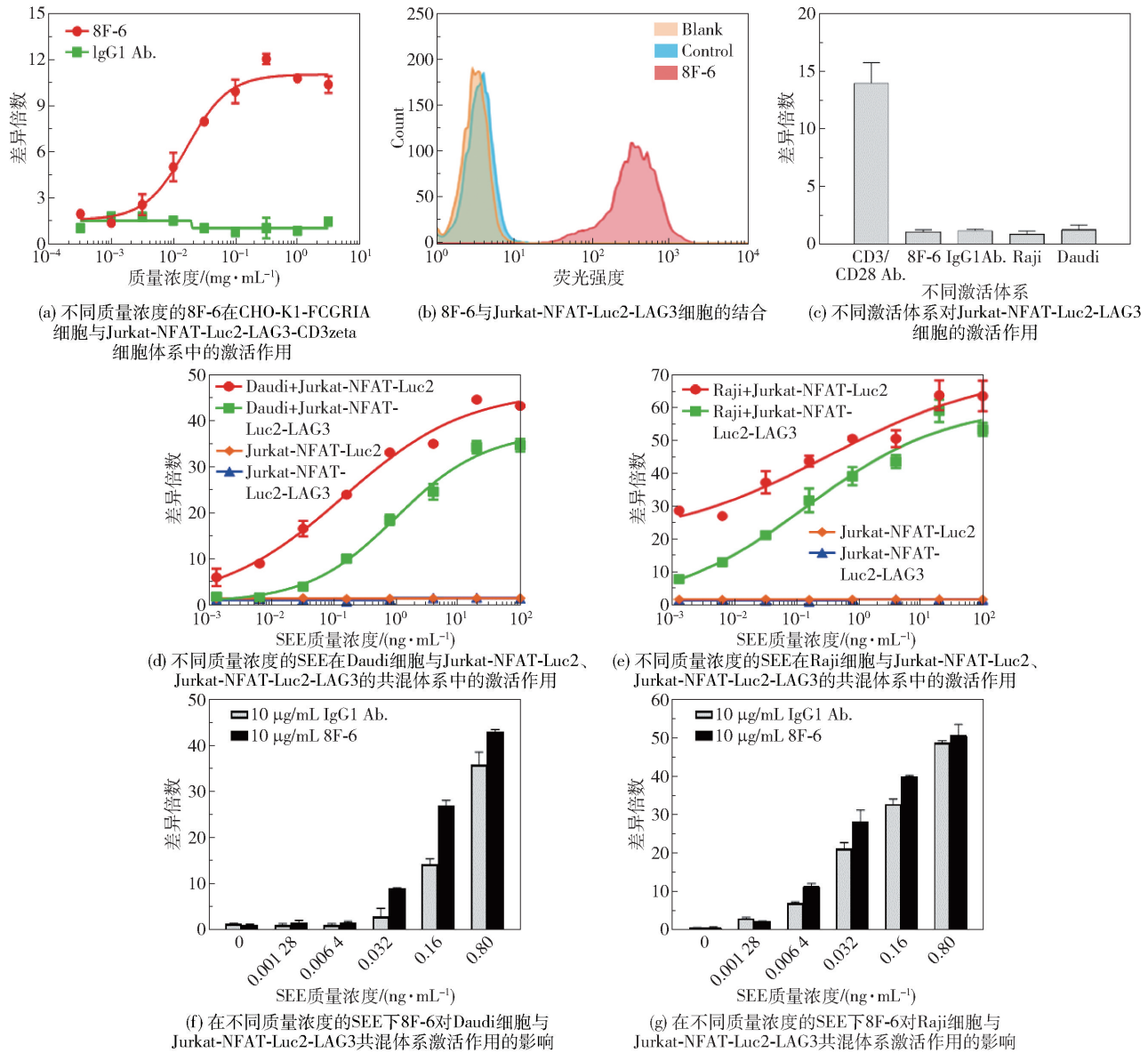


图 3 报告基因细胞检测抗体 8F-6 活性的结果

Fig. 3 Assay results of the antibody 8F-6 activity based on reporter gene cells

CHO-K1-FCGR1A 细胞与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞体系中的激活作用。当通过 CHO-K1-FCGR1A 细胞与抗体 Fc 段的结合将 8F-6 聚集起来后,再与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞表面的 LAG3-CD3zeta 融合蛋白结合,就可以使 Jurkat 细胞得到激活,且激活效果与抗体浓度呈正相关。为了更好地模拟体内 LAG3 分子的结合环境,将 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞与抗体 8F-6 混合后进行流式细胞检测,荧光检测结果显示高位峰移明显(图 3(b)),表明 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 表面有 LAG3 分子的表达并且与 8F-6 为阳性结合。图 3(c) 为不同激活体系对 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 细胞的激活作用。由于细胞表面没有 CD3zeta 蛋白,所以 8F-6、Raji 和 Daudi 细胞都不具有直接激活作用。基于这种情况,利用不同质量浓度的 SEE 先分别与 Raji 和 Daudi 细胞共混过夜,然后再分别与 Jurkat-NFAT-Luc2、Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 共混孵育后进行检测,结果如图 3(d) 和 3(e) 所示。在 SEE 与 Raji/Daudi 细胞同时存在下,Jurkat-NFAT-Luc2、Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 均被明显激活,并且这种激活作用具有 SEE 浓度依赖性;在 SEE 质量浓度相同的情况下,Daudi 细胞和 Raji 细胞对 Jurkat-NFAT-Luc2 的激活效果大于 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3,推测这种差异是由

Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 表面有 LAG3 分子存在造成的。因为存在这种激活差异并且考虑到 LAG3 分子的影响,在差异最大的 SEE 浓度区间内,将不同质量浓度的 SEE 分别与 Daudi 细胞和 Raji 细胞共混过夜后,再与 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 共混并加入 10  $\mu\text{g/mL}$  8F-6 抗体进行检测,结果如图 3(f)和 3(g)所示。结果表明,在抗体 8F-6 的作用下,整体上 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 被激活的效果相对于抗体 IgG1 有不同程度的提升,这也说明图 3(d)和 3(e)反映的激活差异确实是因为 LAG3 分子的存在造成的,而这种检测体系更好地模拟了相关作用机制,可用于 LAG3 抗体生物活性的体外检测。

通过经典杂交瘤技术获得的单克隆抗体在许多应用领域中都是非常有价值的工具,但其在临床中的应用因其异种来源而受到影响。而在蛋白水平及细胞水平上,人源化的抗 LAG3 抗体 8F-6 与 LAG3 分子均有良好的亲和力表现,同时可阻断 LAG3 分子与 MHC II 分子结合。基于抗体产生的不同免疫调节结构可能在识别治疗方面发挥重要的作用,LAG3 肯定是最吸引人的新兴靶点之一<sup>[15]</sup>。

此外,SEE 可同时结合 MHC II 分子和 TCR 的特定 V  $\beta$  区域,缩短二者的空间距离,实现 TCR-CD3 复合体激活,诱导 NFAT 相关信号传导<sup>[16]</sup>。LAG3-MHC II 复合物与 TCR-CD3 复合物结合,导致 NFAT 驱动的荧光素酶表达被抑制。抗 LAG3 抗体 8F-6 阻断了 LAG3 和 MHC II 分子之间的相互作用,从而使荧光素酶的表达得到释放。正是通过对荧光素酶的测定,从而体现了抗体对反应体系的影响。尽管 LAG3 的具体信号转导途径仍未清楚,但是在 T 细胞活化过程中的影响已被实验证实<sup>[17]</sup>。为了将 NFAT 报告细胞株应用于生物活性检测,我们在前期优化了多种试验参数,包括抗体的浓度、稀释倍差、体系内不同细胞的比例、SEE 工作浓度和孵育时间等。检测结果发现在不同的体系中,检测响应度足够准确且稳定。LAG3 在活化的人 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[18]</sup>、浆细胞样树突状细胞和 NK 细胞<sup>[7]</sup>上表达,MHC II 分子、纤维蛋白原相关蛋白 1 (FGL1)、半乳糖凝集素-3、LSEctin 和  $\alpha$ -synuclein 与 LAG3 分子有显著关联。目前临床实验中所有单克隆抗体的设计均基于阻断 MHC II 分子和 LAG3 之间的相互作用,这表明已建立的报告基因检测体系与当前的 LAG3 单抗在生物学上具有一定的相关性。

### 3 结论

本文通过对筛选得到的抗 LAG3 抗体 8F-6 进行亲和力及阻断效果检测,得到一株效果良好的抗 LAG3 抗体 8F-6。利用基于 NFAT 信号通路构建的 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 和 Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta 细胞,建立了一种抗 LAG3 单抗生物活性的测定方法。结果表明得到的抗体 8F-6 具有良好的生物活性,可充分阻断 MHC II 分子与 LAG3 分子的结合,证实利用以 NFAT 报告基因为基础的抗体检测平台具有较大的应用价值,可以为单克隆抗体的研究和开发提供新的思路。

### 参考文献:

- [1] BROWN K E, FREEMAN G J, WHERRY E J, et al. Role of PD-1 in regulating acute infections[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2010, 22(3): 397-401.
- [2] NGUYEN L T, OHASHI P S. Clinical blockade of PD1 and LAG3-potential mechanisms of action[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(1): 45-56.
- [3] ANDREWS L P, MARCISCANO A E, DRAKE C G, et al. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target[J]. *Immunological Reviews*, 2017, 276(1): 80-96.
- [4] TRIEBEL F, JITSUKAWA S, BAIXERAS E, et al. LAG3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1990, 171(5): 1393-1405.
- [5] XIAO T W, ZHANG L, CHEN L, et al. Tim-3 expression is increased on peripheral T cells from diffuse large B cell lymphoma[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(8): 7951-7956.
- [6] MATSUZAKI J, GNJATIC S, MHAWECH-FAUCEGLIA P, et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup>T cells are negatively regulated by LAG3 and PD-1 in human ovarian cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(17): 7875-7880.
- [7] ANDERSON A C, JOLLER N, KUCHARO V K. Lag3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation[J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 989-1004.
- [8] CHIHARA N, MADI A, KONDO T, et al. Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells[J]. *Nature*, 2018, 558(7710): 454-459.
- [9] LI N Y, WANG Y, FORBES K, et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG3[J]. *The EMBO Journal*, 2007, 26(2): 494-



- 504.
- [10] WOO S R, TURNIS M E, GOLDBERG M V, et al. Immune inhibitory molecules LAG3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(4): 917–927.
- [11] TAUBE J M, YOUNG G D, MCMILLER T L, et al. Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma: implications for PD-1 pathway blockade[J]. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(17): 3969–3976.
- [12] KOYAMA S, AKBAY E A, LI Y Y, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 10501.
- [13] HUANG R Y, FRANCOIS A, MCGRAY A R, et al. Compensatory upregulation of PD-1, LAG3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(1): e1249561.
- [14] WANG L, YU C F, WANG K Q, et al. A reporter gene assay for measuring the bioactivity of anti-LAG-3 therapeutic antibodies[J]. *Luminescence*, 2020, 35(8): 1408–1415.
- [15] BAITSCH L, BAUMGAERTNER P, DEVÈVRE E, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in metastases from melanoma patients[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(6): 2350–2360.
- [16] HUANG C T, WORKMAN C J, FLIES D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells[J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 503–513.
- [17] SHARMA P, ALLISON J P. The future of immune checkpoint therapy[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 56–61.
- [18] MILLER B C, SEN D R, AL ABOSY R, et al. Subsets of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(3): 326–336.

## Biological activity detection of the anti-LAG3 antibody 8F-6 based on a nuclear factor of activated T-cell (NFAT) signaling pathway

MENG LiuXian<sup>#</sup> WEI ZhenHua<sup>#</sup> XIONG XueYang XU LiDa WU YiXin  
LIANG Meng<sup>\*</sup> YU ChangYuan<sup>\*</sup>

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Lymphocyte activation gene-3 (LAG3) plays a negative regulatory role in T cell activation and proliferation. Blocking LAG3 molecules with monoclonal antibodies can enhance the cytotoxicity of T cells toward tumors. Bioactivity detection platforms for anti-LAG3 antibody are therefore of great significance for immunotherapy. In our earlier work, a fully humanized anti-LAG3 monoclonal antibody 8F-6 was obtained by hybridoma fusion and antibody humanization technology. Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 and Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta cells were constructed based on a nuclear factor of activated T-cell (NFAT) signaling pathway. In this study, the affinity and blocking effect of antibody 8F-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry using the previously constructed cells. The results showed that antibody 8F-6 had good affinity for the LAG3 molecule, and could block the binding of major histocompatibility complex II (MHC II) to LAG3. In the reporter cell detection platform, antibody 8F-6 could activate Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3-CD3zeta cells with the assistance of CHO-K1-FCGR1A cells. In the reaction system containing Daudi/Raji cells, human *Staphylococcus aureus* enterotoxin E (SEE) and Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 cells, antibody 8F-6 significantly improved the activation effect of Jurkat-NFAT-Luc2-LAG3 cells compared with the control antibody IgG1.

**Key words:** anti-LAG3 antibody 8F-6; NFAT signaling pathway; flow cytometry; reporter gene assay

(责任编辑: 于少云)