

## 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的构建和表达

高瀛岱 熊冬生 许元富 彭 晖 邵晓枫 杨纯正\* 朱祯平

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所 实验血液学国家重点实验室,天津 300020)

**摘 要** 构建和表达抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体,并测定该微型双功能抗体的生物学活性。采用 PCR 和 overlap PCR 方法构建抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体,并用双脱氧终止法测定 DNA 序列;采用亲和层析法纯化该产物,并用 Western blot 和分子排阻层析鉴定纯化产物,采用免疫荧光法、放射免疫分析法鉴定纯化产物与靶细胞的结合活性。DNA 序列测定结果表明,抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体已构建成功,表达可溶性产物的产量达 2mg/L 以上,纯化产物中二聚体的比例达 90%,具有与 Jurkat (CD3<sup>+</sup>) 和 K562/A02 细胞 (Pgp<sup>+</sup>) 结合的活性,与抗 CD3 ScFv 及抗 Pgp ScFv 的亲合常数相当。成功地构建了抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体,并获得高效表达,表达产物具有与相应二个靶抗原结合的活性。

**关键词** CD3, Pgp, 基因工程抗体, 双功能抗体

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0444-06

应用针对特异肿瘤抗原的单克隆抗体对肿瘤进行治疗是肿瘤免疫疗法的重要组成部分。与传统化疗相比,单抗具有针对性强的特点,因此避免了对正常组织的杀伤,特别对清除肿瘤的残留灶、转移灶具有良好应用前景。

单抗应用于肿瘤的治疗主要有两方面的困难:具有恒定区的大分子量单抗具有较长的半衰期且能介导 CDC 及 ADCC 作用,但很难穿透肿瘤发挥杀伤作用。而缺失恒定区的小型基因工程抗体虽然具有较好的穿透性,但半衰期短且本身细胞毒作用低。因此,抗体片段与放射性同位素、前药(Prodrug)、生物毒素及免疫效应细胞形成偶联物成为治疗肿瘤特别是实体瘤的首选方案。其中最具有临床应用前景的是利用双特异抗体使针对肿瘤抗原的单抗与效应细胞相连,共同作用于肿瘤细胞,实现肿瘤的靶向治疗。微型双功能抗体(Diabody)<sup>[1]</sup>是基因工程双功能抗体的一种形式。这类抗体片段通常是由一个启动子控制下的两个顺反子表达产物间反向配对而成,具有两个抗原结合位点的双特异抗体片段。它的基本原理是同一顺反子中 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 因 Linker 太短(通常只有 5~12 个氨基酸),产生空间位阻,不能配对,

只能与另一顺反子上的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 配对,从而形成二聚体。通常使用的效应细胞主要有 T 细胞(CD2, CD3), NK 细胞(CD16), 单核/巨噬细胞(CD64), 树突状细胞(CD64)和激活的髓系细胞(CD64, CD89),由于存在以下两方面的原因,使得以 T 细胞为效应细胞要比其它两类细胞为效应细胞来构建双特异抗体更为常见:1. T 细胞群中存在着免疫记忆细胞;2. 有证据表明在恶性肿瘤患者体内存在着肿瘤特异性的 T 细胞<sup>[2]</sup>。体内外生物学实验结果表明:微型双功能抗体能同时与 T 细胞和癌细胞结合,并通过激活 T 细胞,来靶向杀灭癌细胞<sup>[3,4]</sup>。

肿瘤细胞对一系列结构及作用机制不同的药物产生交叉耐药的现象称为多药耐药(Multidrug resistance, MDR)。产生 MDR 最主要的分子基础是细胞膜表面分子量为 170kD 的糖蛋白 Pgp。Pgp 是 ATP 依赖性的药物外排泵,可将各种不同的细胞毒药物泵出到细胞外,从而降低细胞内的药物浓度,阻止药物杀伤细胞的作用。我实验室应用阿霉素诱导人慢性白血病细胞系(K562)建立了高表达 Pgp 的多药耐药细胞系 K562/A02<sup>[7]</sup>。HIT3a<sup>[5]</sup>和 PHMA02<sup>[6]</sup>是我所研制的鼠源性抗 CD3 和抗 Pgp(P-glycoprotein)杂交

收稿日期 2002-12-30, 修回日期 2003-03-31。

基金项目 国家自然科学基金资助(No. 39900186) 国家高科技研究发展专项经费资助(No. 2001AA21515341)。

\* 通讯作者。Tel: 86-22-27307938-3070; E-mail: yz@public.tpt.tj.cn

参加本文工作的还有:徐晨、范冬梅、杨铭。

瘤细胞系,我们在克隆单克隆抗体 HIT3a 和 PHMA02 轻、重链可变区基因的基础上,构建和表达了抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体,并以多药耐药细胞系 K562 为模型研究了其生物学功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系和载体:** *E. coli* 16C9 由本室保存。多药耐药细胞系 K562/A02 由本室建立<sup>[7]</sup>。Jurkat 和 K562 细胞系由本室保存,培养在含 10% 小牛血清(本所科技开发公司)的 RPMI1640(GIBCOBRL)。抗 CD3 ScFv 表达载体<sup>[8]</sup>和抗 Pgp ScFv 表达载体本室构建。表达载体 pYZF 和克隆载体 pYZL 由我室保存。

**1.1.2 酶和试剂:** Tag DNA 聚合酶,限制酶 *Mlu* I、*Nhe* I、*Sph* I、*Not* I 均购自 GIBCOBRL 公司,抗 CD3 单克隆抗体 HIT3a 由本所协和科技公司提供,抗 Pgp 单克隆抗体 PHMA02 由本室制备。鼠抗 E-tag 抗体,HRP 标记的鼠抗 E-tag 抗体及抗 E-tag 亲和层析柱均购自 Pharmacia 公司。FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗购自北京中山生物工程公司。其它均为国产分析纯生化试剂。

### 1.1.3 PCR 引物:

P1 5' CTA GCG CAC GCG TAC GCT GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CC 3' (*Mlu* I)

P2 5' CGA CCC TCC GCC ACC CCG TTT CAG CTC CAG CTT G 3'

P3 5' GGT GGC GGA GGG TCG CAG GTC AAA CTG CAG CAG TC 3'

P4 5' GAG CTA GCT AGC TCA TGA GGA GAC GGT GAC CGT G 3' (*Nhe* I)

P5 5' CGA CCC TCC GCC ACC CCG TTT ATA TTC CAG CTT GGT 3'

P6 5' GGT GGC GGA GGG TCG CAG GTG CAG CTC CAG CAG T 3'

P7 5' GAA TAT CGC ATG CGG TGG TCA TGA GGA GAC GGT GAC CGT G 3' (*Sph* I)

P8 5' CTT CGA GCT AGC TAC CCG GGG ATC CTC TAG AG 3' (*Nhe* I)

P9 5' CGC ACC TGC GGC CGC TGA GGA GAC GGT GAC CGT G 3' (*Not* I)

下画线为括号内的限制酶位点。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的酶切、连接、转化等常规分子生物学操作按文献 [9] 进行。**

**1.2.2 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体表达载体的构建:** 利用 PCR 法从抗 CD3 ScFv 和抗 Pgp ScFv 表达载体上分别扩增 CD3V<sub>L</sub>、CD3V<sub>H</sub>、PgpV<sub>L</sub>、PgpV<sub>H</sub> 基因,经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后,利用 overlap PCR 以 G4S 作为连接肽,分别将 CD3V<sub>L</sub> 与 PgpV<sub>H</sub>,PgpV<sub>L</sub> 与 CD3V<sub>H</sub> 连接形成 DNA 片段 CD3V<sub>L</sub>-PgpV<sub>H</sub>、PgpV<sub>L</sub>-CD3V<sub>H</sub>。经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后,DNA 片段 CD3V<sub>L</sub>-PgpV<sub>H</sub> 用 *Mlu* I + *Sph* I 消化,并与经 *Mlu* I + *Sph* I 消化的克隆载体 pYZL 连接,经转化,鉴定后提取质粒,再用 PCR 扩增 DNA 片段 PgpV<sub>L</sub>-CD3V<sub>H</sub>,使其 5' 端加上引导肽,3' 端加上 *Not* I 识别位点,经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后,用 *Nhe* I + *Not* I 消化,将这两个酶切片段与经 *Mlu* I + *Not* I 消化的表达载体 pYZF 连接,形成抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体表达载体 pAYZDCP。

**1.2.3 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的高效表达:** 将载体 pAYZDCP 转化 *E. coli* 16C9,挑取单菌落接种于含氨苄青霉素(0.1mg/mL)的 2YT 培养基(1.6% 胰蛋白胨,1% 酵母提取物,0.5% NaCl)中,37℃ 振荡培养 8h 后,按 1:2 的比例转接于含氨苄青霉素(0.1mg/mL)的 Ap5 培养基(0.15% 葡萄糖,1.1% 酸水解酪蛋白,0.06% 酵母提取物,0.019% MgSO<sub>4</sub>,0.107% NH<sub>4</sub>Cl,0.373% KCl,0.12% NaCl,0.12mol/L 三乙醇胺 pH 7.4)中,25℃ 振荡培养 24h,4℃ 离心收集菌体,冻融菌体沉淀后,加入细菌周质腔提取液(三羟甲基氨基甲烷 25mmol/L,乙二醇四乙酸 1mmol/L,苯甲基磺酰氟(PMSF) 0.1mmol/L,蔗糖 20% (W/V),NaCl 200mmol/L,pH 7.5),于 4℃ 轻摇 1h,12000r/min 4℃ 离心 10min,收集上清为表达产物的粗提物。

**1.2.4 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的纯化:** 应用抗 E-tag 亲和层析柱纯化抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体。10mmol/L MES(pH 5.5),1 mmol/L EDTA 平衡,0.1 mmol/L 甘氨酸洗脱(pH 2.7),FPLC 收集洗脱峰。15% SDS-PAGE 及 Western blot 对纯化后的蛋白进行分析。

**1.2.5 大小排阻层析:** 取 500μL 样品上样于 Superdex75(9/60)(Pharmacia)分子筛层析柱上,用 PBS 洗柱,流速为 0.25mL/min,其操作过程均在 FPLC(Pharmacia)上完成。

**1.2.6 应用活细胞间接免疫荧光法(FACS)进行抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体与 Jurkat 细胞及 K562 细胞**

A02 细胞的结合活性的测定:将一定浓度的纯化抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体与  $1 \times 10^6$  K562/A02 细胞或 Jurkat 细胞  $4^\circ\text{C}$  共同孵育 1h, 2000 r/min, 10min,  $4^\circ\text{C}$  离心, 弃上清, PBS 洗细胞, 重复 3 次。细胞再与鼠抗 E-tag 抗体 ( $30\mu\text{g}/\text{mL}$ , Pharmacia)  $4^\circ\text{C}$  共同孵育 1h, 2000 r/min, 10min,  $4^\circ\text{C}$  离心, 弃上清, PBS 洗细胞, 重复 3 次。将细胞重悬于  $20\mu\text{L}$  FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗  $4^\circ\text{C}$  共同孵育 40 min, FACS 测定荧光强度。

**1.2.7 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体亲和常数的测定** 应用放射免疫分析法测定抗 CD3/抗 Pgp Diabody 与 Jurkat 细胞( CD3 抗原)及 K562/A02 细胞( Pgp 抗原)的亲和常数。用  $^{125}\text{I}$  标记抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体( 氯胺 T 法 ), 分别与 Jurkat 细胞或 K562/A02 细胞  $37^\circ\text{C}$  共同孵育 1h, 2000 r/min, 10min,  $4^\circ\text{C}$  离心, 弃上清, PBS 洗细胞, 重复 4 次,  $\gamma$  记数仪测定 CPM 值。

**1.2.8 竞争性免疫荧光抑制实验** 将一定浓度的纯化抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体和单抗 PHMA02 或单抗 HIT3a 混合, 再与  $1 \times 10^6$  K562/A02 细胞或 Jurkat 细胞  $4^\circ\text{C}$  共同孵育 1h, 2000 r/min, 10min,  $4^\circ\text{C}$  离心, 弃上清, PBS 洗细胞, 重复 3 次。将细胞重悬于  $20\mu\text{L}$  FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗  $4^\circ\text{C}$  共同孵育 1h, 2000 r/min, 10min,  $4^\circ\text{C}$  离心, 弃上清, PBS 洗细胞, 重复 3 次, FACS 测定荧光强度。

## 2 结 果

### 2.1 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体表达载体的构建

为防止链内配对, CD3  $V_L$  基因羧基端与 Pgp  $V_H$  基因的氨基端通过短肽 G4S 相连。Pgp  $V_L$  基因的羧基端与 CD3  $V_H$  基因的氨基端也通过相同的短肽连接, 并经与克隆载体连接及随后的 PCR, 抗 Pgp  $V_L$  基因的氨基端加上与表达载体相同的 SD 序列和引导肽序列。最后将上述两片段与带有纯化标记 E-tag 短肽表达载体连接而构建成微型双功能抗体表达载体 pAYZDCP( 图 1 )。

经序列测定其核苷酸序列与原始序列相同。该表达载体在低磷酸盐的培养条件下, 由启动子 *phoA* 诱导合成带双顺反子的 mRNA, 并在该 mRNA 的 2 个含有 SD 序列的位置合成相应的多肽链, 在引导肽 *stII* 的作用下分泌到细菌周质腔, 形成微型双功能抗体。

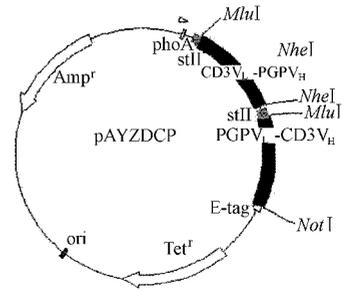


图 1 抗 CD3/抗 Pgp Diabody 表达载体 pAYZDCP 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pAYZDCP

**2.2 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的表达和纯化** 用抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体表达载体 pAYZDCP 转化 *E. coli* 16C9, 经低磷酸盐诱导表达, 在信号肽的引导下, 微型双功能抗体分泌进入细菌外周质腔。应用高渗溶液提取细菌外周质腔表达产物, 并用抗 E-tag 亲和层析柱纯化。纯化产物的产量约为  $2\text{mg}/\text{L}$ 。纯化的 Diabody 经 15% 的 SDS-PAGE 分析, 出现分子量为 28kD 和 26kD 两条蛋白带, 经扫描分析 28 kD 的蛋白占纯化产物的 62.97%, 26kD 的蛋白占纯化产物的 33.13%。Western blot 结果表明, 抗 E-tag 抗体只能与带有 E-tag 片段的分子量为 28kD 的蛋白带杂交, 而与分子量为 26 kD 的蛋白带无特异性反应( 图 2 )。

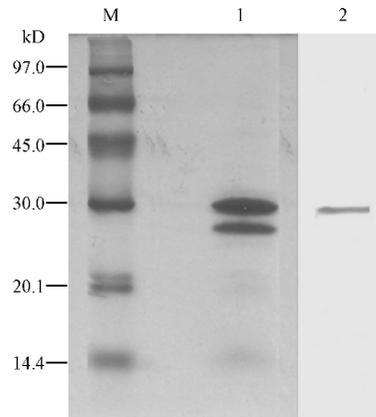


图 2 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体蛋白的 SDS-PAGE 分析和 Western-blot 结果

Fig 2 SDS-PAGE and Western-blot analysis of anti-CD3/anti-Pgp diabody

M. Low rang weight marker; 1. Anti-CD3/anti-Pgp diabody eluted from the anti-E-tag column analyzed by 15% SDS-PAGE; 2. Anti-CD3/anti-Pgp diabody eluted from the anti-E-tag column analyzed by immunoblot

### 2.3 大小排阻层析

抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体, 抗 PgpScFv 的滞留时间分别为 77.29min、90.10 min。抗 CD3/抗 Pgp Diabody 主峰含量 90%, 而分子量为 66 kD,

45kD, 25kD 的蛋白质标准品(Sigma)的滞留时间分别为 75.16 min、79.39 min、90.18min。上述实验结果表明抗 CD3/抗 Pgp Diabody 主要以二聚体的形式存在。

## 2.4 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体与 Jurket 细胞及 K562/A02 细胞的结合活性

间接免疫荧光测定结果经流式细胞仪分析计算表明,抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体能与 Jurket 细胞及 K562/A02 细胞特异性结合(图 3-1, 2, 4, 5),表

明抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体具有与 CD3 及 Pgp 靶抗原特异结合的能力。

## 2.5 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体亲合常数的测定

以放射免疫分析法测定抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体与 CD3 及 Pgp 靶抗原的亲合力,并应用 Scatchard 作图法计算亲和力常数。抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的亲合常数与抗 CD3ScFv 及抗 Pgp ScFv 的亲合常数相当(表 1)。

表 1 单抗 PHMA02、HIT3a 单链抗体抗 PgpScFv、抗 CD3ScFv 抗 CD3/抗 Pgp Diabody 亲合力的测定

Table 1 Affinities of MAb and antibody fragments

Antibody	Jurkat cells			K562/A02 cells		
	HIT3a	Anti-CD3ScFv	Diabody	PHMA02	Anti-PgpScFv	Diabody
Ka	$2.7 \times 10^9$	$3.2 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$4.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$

## 2.6 竞争性免疫荧光抑制实验

单抗 HIT3a 单独与 Jurkat 细胞共同孵育,再与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗共同孵育,经流式细胞仪分析计算结合的阳性率为 95.50%,而单抗 HIT3a 与抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体混合后与 Jurkat 细胞共同孵育,再与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗共同孵育,结合的阳性率仅为 25.20%。单抗 PHMA02 单

独与 K562/A02 细胞共同孵育,再与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗共同孵育,结合的阳性率为 94.56%,而单抗 PHMA02 与抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体混合后与 K562/A02 细胞共同孵育,再与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗共同孵育,结合的阳性率仅为 30.68%(图 3-3, 6)。

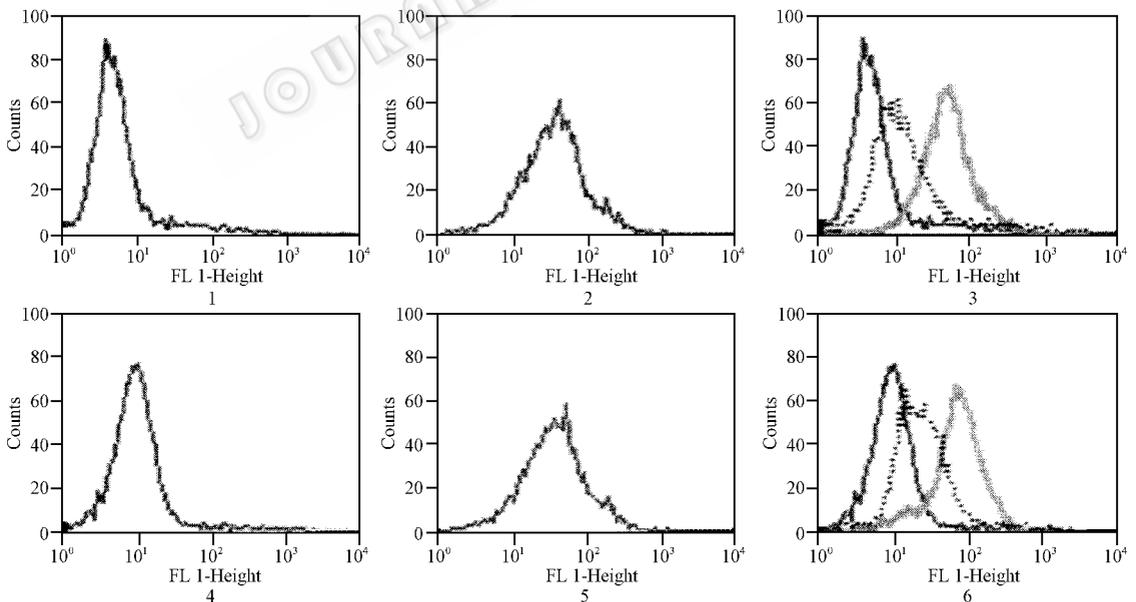


图 3 FACS 分析抗 CD3/抗 Pgp Diabody 与 Jurkat 细胞和 K562/A02 细胞的结合活性

Fig.3 FACS analysis of anti-CD3/anti-Pgp diabody binding to both CD3-positive Jurkat cells and Pgp-positive K562/A02 cells

1. Jurkat cells incubated with PBS ; 2. Jurkat cells incubated with anti-CD3/anti-Pgp diabody ; 3. Left peak :Jurkat cells incubated with PBS ; right peak :Jurkat cells incubated with HIT3a ; middle peak :Jurkat cells incubated with HIT3a and anti-CD3/anti-Pgp diabody ; 4. K562/A02 cells incubated with PBS ; 5. K562/A02 cells incubated with anti-CD3/anti-Pgp diabody ; 6. left peak :K562/A02 cells incubated with PBS ; right peak :K562/A02 cells incubated with PHMA02 ; middle peak :K562/A02 cells incubated with PHMA02 and anti-CD3/anti-Pgp diabody

实验结果表明抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体能与全抗原竞争靶抗原的结合位点,但由于微型双功能抗体为单价,而全抗为双价,所以尽管使用较高浓度的微型双功能抗体也不能完全抑制全抗与靶抗原的结合。

### 3 讨 论

肿瘤细胞对抗癌药物的耐受是导致临床化疗失败的主要原因。肿瘤细胞对一系列结构及作用机制不同的药物产生交叉耐药的现象称为多药耐药(Multidrug resistance, MDR)。产生 MDR 最主要的分子基础是细胞膜表面分子量为 170kD 的糖蛋白 Pgp。Pgp 是 ATP 依赖性的药物外排泵,可将各种不同的细胞毒药物泵出到细胞外,从而降低细胞内的药物浓度,阻止药物杀伤细胞的作用。

通过对 Pgp 蛋白的深入研究发现,Pgp 不仅与耐药相关,还与肿瘤的侵袭、转移等生物学特性相关<sup>[10]</sup>。国内外相关资料表明,消化系统肿瘤、乳腺癌等恶性肿瘤细胞的 Pgp 及其 *mdr-1* 基因 mRNA 的水平与肿瘤细胞的侵袭、转移密切相关。国外发现肺癌、结肠癌转移淋巴结有 Pgp 阳性高表达,我们初步实验也证实,乳腺癌转移灶亦有 Pgp 高表达。在白血病、淋巴瘤、神经母细胞瘤、Pgp 的高表达与疗效差是高度相关的。由此可见 Pgp 既可作为肿瘤恶性进展的诊断学标志,也可作为新型的治疗靶点。而且在多种耐药的实体瘤及白血病细胞系均有 Pgp 的高表达,所以针对 Pgp 这一广谱肿瘤抗原的治疗具有广泛的应用前景。在所有正常人类组织中均可检测到 Pgp 及 *mdr-1* 基因的 mRNA,不同器官中的 Pgp 及 *mdr-1* 基因 mRNA 的水平相差很大,在肾脏、肝、消化道、肺等器官 Pgp 及 *mdr-1* 基因 mRNA 的水平较高,而在睾丸、卵巢、子宫、皮肤等器官处于较低水平<sup>[11]</sup>。这些研究提示 Pgp 与正常细胞的分泌功能密切相关。而且,越来越多的研究表明 Pgp 是人体保护正常细胞免受毒物损害的机制之一。例如,在血脑屏障和胎盘组织均有 Pgp 的高表达。目前,抗体应用于人体发挥靶向治疗作用主要通过携带细胞毒药物或标记同位素来实现,这就势必造成对 Pgp 高表达的正常细胞的杀伤。而双功能抗体通过激活人体内的效应细胞发挥杀伤肿瘤细胞的作用,为抗 Pgp 抗体应用于耐药肿瘤的治疗提供了新的策略。

HIT3a 是我所研制的鼠源性抗 CD3 的单克隆抗体,并已经过国际人类白细胞分化抗原协作组会议

正式命名。PHMA02 为我室自行研制的抗 Pgp 的鼠源性单克隆抗体,只有针对 Pgp 抗原的识别功能,并无 Pgp 功能的抑制作用,因此应用于人体后不会干扰正常细胞的排泄分泌功能。我室已成功构建了抗 CD3/抗 CD20 微型双功能抗体,并进行了体外、体内活性的测定,实验证实抗 CD3/抗 CD20 双特异双链抗体具有明显的抑制肿瘤生长的活性,有望成为一种新的治疗 B 细胞恶性肿瘤的方法<sup>[12]</sup>。与 CD20 相比,Pgp 作为一种广谱的耐药肿瘤抗原具有更为重要的临床价值。

我们在克隆单克隆抗体 HIT3a 和 PHMA02 轻、重链可变区基因的基础上构建、表达了抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体。纯化的抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体具有与 Jurkat 和 K562/A02 细胞结合的能力。说明抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体具有亲代抗体的免疫学活性,具备将肿瘤细胞和免疫效应细胞连接在一起,使免疫细胞在肿瘤细胞周围富集,从而更有效的杀伤肿瘤细胞的作用。已进行的细胞毒实验也表明,抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体具有介导激活 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的作用,且杀伤作用的强弱呈剂量依赖关系(另文发表)。以上实验结果表明抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体具有抑制肿瘤细胞生长的活性,有可能为耐药肿瘤的治疗提供新的途径。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Holliger P, Prospero T, Winter G. " Diabodies " Small bivalent antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** :6444 - 6448
- [ 2 ] Xu Y F, Yang C Z, Zhu Z P. Bispecific antibody and its clinical application in cancer. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46**( 5 ) :353 - 358
- [ 3 ] Holliger P, Winter G. " Diabodies " : Small bivalent antibody fragment. *Cancer Immunol Immunother*, 1997, **45** :128 - 130
- [ 4 ] Zhu Z P, Zapata G, Shalaby R *et al.* High level secretion of a humanized bispecific diabody from *Escherichia coli*. *Bio/technology*, 1996, **14** :192 - 196
- [ 5 ] SHEN D C( 沈德诚 ), YANG X R( 杨希峰 ), YANG C Y( 杨春瑛 ) *et al.* Generation and characterization of monoclonal antibody against HIT3a. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* ( 中国医学科学院学报 ), 1993, **15** :157 - 162
- [ 6 ] XIONG D S( 熊冬生 ), YANG C Z( 杨纯正 ), SHAO X R( 邵晓枫 ) *et al.* Generation and characterization of monoclonal antibodies against P-glycoprotein( Pgp ). *Chin J Hematol*( 中国血液学杂志 ), 1999, **20**( 6 ) :326 - 327
- [ 7 ] Yang C Z, Luan F J, Xiong D S *et al.* Multidrug resistance in leukemic cell line K562/A02 induced by doxorubicin. *Acta Pharmaco-*

- [ 8 ] XU Y F ( 许元富 ), XIONG D S ( 熊冬生 ), YANG C Z ( 杨纯正 ) *et al.* The mutation of anti-CD3 antibody ( HIT3a ) gene and its expression. *Chin J Hematol* ( 中国血液学杂志 ), 2001, **22** ( 5 ): 252 - 255
- [ 9 ] Campbell A M. Fusion procedures. In : *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology : Monoclonal Antibody Technology*. Burden RH and Knippenberg PH ( Eds ). Elsevier , Amsterdam , 1984 , pp. 120 - 134
- [ 10 ] Fidler I J. Critical determinants of cancer metastasis : rationale for therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* , 1999, **A3** ( Suppl ) S3 - S10
- [ 11 ] Bradley G , Sharma R , Rajalakshmi S *et al.* P-glycoprotein expression during tumor progression in the rat liver. *Cancer Res* , 1992 , **52** ( 10 ) 5154 - 5161
- [ 12 ] Xiong D S , Xu Y F , Liu H Z *et al.* Efficient inhibition of human B-cell lymphoma xenografts with an anti-CD20 × anti-CD3 bispecific diabody. *Cancer Letter* , 2002, **177** 29 - 39

## Construction and Expression of Anti-CD3/ Anti-Pgp Diabody

GAO Ying-Dai XIONG Dong-Sheng XU Yuan-Fu PENG Hui SHAO Xiao-Feng YANG Chun-Zheng ZHU Zhen-Ping

( *The State Key Laboratory of Experimental Hematology , Institute of Hematology , Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College , Tianjin 300020 , China* )

**Abstract** The use of tumor antigen specific antibodies for the delivery of therapeutic agents offers the possibility of targeting therapy with reduced toxicity to normal tissues compared to conventional treatments. However , several factors restrict the use of anti-PGP monoclonal antibodies ( Mabs ). First , Pgp is expressed in normal tissues , particularly in epithelial and endothelial cells of the gastrointestinal tract , liver , kidney , blood brain barrier , choroids plexus and other organs. It plays a significant role to transport drugs and toxins in these organs. Therefore , anti-PGP antibodies in combination with cytotoxic compounds or radiolabelled antibodies should neither inhibit the activity of PGP , nor harm the cells which expressed PGP normally. BiMab exploit the specificity of Mab and ensures activation of cellular cytotoxic mechanisms which kill tumor cells only , but not harm normal cells. It will provide a strategy for resistant cancer therapy using anti-PGP antibodies. Second , Repeated administration of murine antibodies generates a strong human anti-mouse immune ( HAMA ) response in up to 50% of patients after the first dose , and approximately 90% following a second treatment. In an effort to reduce the toxicity and antigenicity , we focus to produce anti-PGP antibodies which have the binding activity only , but not inhibit the function of the "pump" , and to construct a small and partially humanized recombinant molecule with dual specificity for both PGP and CD3 complex to activate the host immune response toward the tumour. PCR and overlap PCR were used to construct anti-CD3/ anti-Pgp Diabody. DNA sequence was analyzed by the Terminus of Dideoxy Nucleotide. The product was purified by affinity chromatography and analyzed by both the detection of western blot and size exclusion chromatography ; its antigen-binding activity was examined by FACS , cellular RIA. Plasmid pAYZDCP which expressed the anti-CD3/anti-Pgp Diabody was constructed correctly. The diabody was recovered in high yield ( up to 2mg/L ) after E-taq purification and predominantly ( 90% ) as a dimer. The diabody can bind to Jurkat cells ( CD3<sup>+</sup> ) and K562/A02 cells ( Pgp<sup>+</sup> ). The affinities of the diabody were similar with the anti-CD3 ScFv or anti-Pgp ScFv , respectively. The anti-CD3/anti-Pgp Bs ( ab' )<sub>2</sub> was first recast into the diabody format and succeeded to obtain high level expression. The results of some biological activity experiments indicated that the diabody could bind to Jurkat cells and K562/A02 cells. Multidrug resistance can be reversed experimentally by a variety of drugs , among which the best known are verapamil and trifluoperazine , which unfortunately are of limited use in practice due to severe collateral cardiac toxicity. Anti-PGP × anti-CD3 diabody will provide another therapeutic strategy against multidrug resistance cancer.

**Key words** CD3 , Pgp , engineering antibody , bispecific antibody

Received : 12-30-2002

This work was supported by grants from NSFC General Project of the Chinese Government ( No. 39900186 ) and from The 863 High-Tech Projects of the Chinese Government ( No. 2001AA215341 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-22-27307938-3070 ; E-mail : cyz@public.tpt.tj.cn

XU Chen , FAN Dong-Mei , YANG Ming also joined this work.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>