

## 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 突变体在大肠杆菌中的高效分泌表达

熊冬生 郑梦杰 刘银星 许元富 王金红 杨纯正\*

(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** 构建抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 突变体,研究其在大肠杆菌中的高效表达及其表达产物的生物学活性。采用 PCR 法构建抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 突变体,并用双脱氧终止法测定 DNA 序列;采用 19L 发酵罐高密度发酵抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 突变体,采用亲和色谱和分子筛色谱法纯化表达产物,并用 SDS-PAGE 和薄层激光扫描鉴定纯化产物;采用活细胞间接免疫荧光法测定纯化产物与靶细胞的结合活性;MTT 法测定纯化产物对 Raji 细胞的生长抑制作用,并研究其作用机理。DNA 序列测定结果表明,抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 突变体已成功构建,表达可溶性产物的产量达 360 mg/L,具有与 Raji 细胞(CD20<sup>+</sup>)结合的活性,并抑制 Raji 细胞的生长,其作用机理为诱导 Raji 细胞凋亡。此突变体有望成为治疗非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤的药物。

**关键词** 嵌和抗体, 发酵, CD20, 凋亡, B 细胞淋巴瘤

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0673-06

B 细胞淋巴瘤是常见的恶性肿瘤之一,传统的治疗通常采用细胞毒药物,虽然能使大部分患者缓解和生存期延长,但治愈率仍很低,其原因在于细胞毒药物毒性大,选择性不强,在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常组织细胞也有毒害作用,尤其是骨髓造血细胞与胃肠道粘膜上皮细胞,这些副作用限制了临床采用足量的药物治疗,因此只杀伤肿瘤细胞而正常细胞不受损害的靶向治疗一直受到关注。单克隆抗体因其特异性高,本身具有细胞毒作用,可携带药物、毒物和放射性同位元素而成为靶向治疗的主要策略。

CD20 分子量为 35 kD,是非糖基化的四重跨膜磷蛋白<sup>[1]</sup>,95% 以上的 B 细胞淋巴瘤都有 CD20 的表达,更重要的是 CD20 只在前-B 淋巴细胞,未成熟 B 淋巴细胞,成熟 B 淋巴细胞,激活 B 淋巴细胞表达,而在其他组织以及多能 B 淋巴干细胞、浆细胞不表达。CD20 比较暴露,不为其它表面分子所掩盖,因而容易被接近。在人体血清中几乎无游离的 CD20 存在。因而 CD20 是治疗 B 细胞淋巴瘤的理想靶点<sup>[2]</sup>。1997 年美国 FDA 批准人鼠嵌合抗体

Rituximab 用于治疗非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤<sup>[3]</sup>,2001 年和 2003 年又相继批准<sup>90</sup>Y 和<sup>131</sup>I 标记的抗 CD20 抗体 Zevalin<sup>TM</sup> 和 Bexxar<sup>TM</sup> 用于临床,均获得较为理想的治疗效果。

HI47 是我所于 1990 研制成功的抗 CD20 鼠源性单克隆抗体,第四届国际人类白细胞分化抗原会议将 HI47 命名为 CD20 + X<sup>[4]</sup>。先前我们已从 HI47 成功克隆了抗 CD20 单抗轻、重链可变区基因,构建了抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab'<sup>[5]</sup>,在此基础上,利用随机突变获得了一个产量和活性均有所提高的突变基因<sup>[6]</sup>。由于 Fab' 是单价抗原结合活性片段,与抗原结合的表现亲和力较低;而且 Fab' 的分子量只有 48 kD,容易被肾小球过滤而从血液中清除<sup>[7]</sup>,因此血浆半衰期比较短,影响了它的疗效。本文利用抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab' 突变体,构建了抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub>,并在发酵罐中获得高效表达,纯化的表达产物具有良好的生物学活性,为临床应用奠定了基础。

收稿日期:2004-02-12, 修回日期:2004-06-07。

基金项目:国家 863 计划项目资助(2001AA215341);天津市重大科技攻关项目资助(No.003119511)。

\* 通讯作者。 Tel:86-22-27230740; Fax:86-22-27230740; E-mail:czyang@public.tpt.tj.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 载体和细胞系:抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab' 突变体表达载体 pYZFcd20 由本室构建。*E. coli* 16C9 由本室保存。Raji 细胞系由本室保存,培养在含有 10% 小牛血清(本所科技开发公司)的 RPMI1640(GIBCOBRL)中。

1.1.2 酶和试剂:Tag DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶,限制酶 *Apa* I 和 *sph* I (GIBCOBRL),抗 CD20 单克隆抗体 HI47 由本所免疫室提供, FITC 标记的兔抗人  $\kappa$  链抗体(晶美生物工程有限公司), FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗(北京中山生物工程公司),蛋白 G 亲和层析凝胶和 S200-HR 分子筛凝胶(Pharmacia)。

1.1.3 引物 P1 5'-gtctcctcagcctccaccaa-3'; P2 5'-gcccgtcgcacgtcaccggfggggcaccggaggacagggfgggcatgtgtgagttttgtc-3'

下画线处为限制酶 *Sph* I 位点,黑体字为编码(CPP)<sub>3</sub> 序列。

### 1.2 方法

1.2.1 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 的构建:以 P1 和 P2 为引物,从 pYZFcd20 上扩增重链恒定区 CH1,扩增产物经分离纯化后,用 *Apa* I + *sph* I 消化,并与经 *Apa* I + *sph* I 消化的 pYZFcd20 连接,形成抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 表达载体 pYZcpp3。

1.2.2 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 的表达:

(1) 摇瓶培养:将含有表达载体 pYZcpp3 的 *E. coli* 16C9,接种于 5 mL 含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL 的 2YT 培养基(1.6% 胰蛋白胨,1% 酵母抽提物,0.5% NaCl)中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 8 h 后,转接于 200 mL 含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL 的 Ap5 培养基(0.15% 葡萄糖,1.1% 酸水解酪蛋白,0.06% 酵母抽提物,0.019% MgSO<sub>4</sub>,0.107% NH<sub>4</sub>Cl,0.373% KCl,0.12% NaCl,0.12 mol/L 三乙醇胺 pH7.4)中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h,4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体,将菌体于 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

(2) 发酵罐高密度培养<sup>[7]</sup>:将含有表达载体 pYZcpp3 的 *E. coli* 16C9,接种于 5 mL 含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL 的 2YT 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 8 h 后,转接于 500 mL 含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL 的 2YT 培养基中,37 $^{\circ}$ C 继续振荡培养 6~8 h,将摇瓶种子加入 19L 发酵罐(每升含酪蛋白水解物 12g,葡萄糖 3.36g,异亮氨酸 0.3 g,硫酸铵 6.2 g,磷酸二氢钠 1.3 g,磷

酸氢二钾 3.5 g,柠檬酸三钠 1.2 g,硫酸镁 2.9 g,消泡剂 1 mL,三氯化铁 125  $\mu$ mol,硫酸锌;硫酸锰;硫酸铜;氯化钴;硼酸;钼酸钠各 20  $\mu$ mol),30 $^{\circ}$ C 培养 32~38 h,4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体,将菌体于 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.3 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 的纯化:将冻存的菌体化冻后,加入细菌外周质腔蛋白提取液(三羟甲基氨基甲烷 25 mmol/L,乙二醇四乙酸 1 mmol/L,苯甲基磺酰氟(PMSF)0.1 mmol/L,蔗糖 20% (W/V),氯化钠 200 mmol/L,pH 7.5),于 4 $^{\circ}$ C 轻摇 1 h,离心收集上清液,透析后用蛋白 G 亲和层析柱纯化,洗脱液为 pH2.8 的甘氨酸溶液。蛋白 G 亲和层析纯化的产物再用 S200-HR 分子筛柱分离纯化,洗脱液为 PBS。

1.2.4 活细胞间接免疫荧光(FACS):将一定浓度的纯化抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 与 1  $\times$  10<sup>6</sup> Raji 细胞混合,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用 PBS 洗细胞 3 次后,加入 40  $\mu$ L FITC 标记的兔抗人  $\kappa$  链抗体,4 $^{\circ}$ C 放置 1 h,用 PBS 洗细胞 3 次,FACS 测定荧光强度。

1.2.5 竞争性免疫荧光抑制实验:将一定浓度的纯化抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 和 HI47 混合,再与 1  $\times$  10<sup>6</sup> Raji 细胞混合,4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,用 PBS 洗细胞 3 次后,加入 40  $\mu$ L FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多抗,4 $^{\circ}$ C 放置 1 h,用 PBS 洗细胞 3 次,FACS 测定荧光强度。

1.2.6 MTT 法测定抗体对 Raji 细胞的生长抑制作用:按 1  $\times$  10<sup>4</sup> 细胞/孔接种 96 孔培养板,分别加入不同浓度的抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>,培养 72 h,离心弃上清,每孔加入浓度为 0.2 mg/mL 新鲜配置的 MTT 200  $\mu$ L,继续培养 4 h,离心弃上清,每孔加 DMSO 200  $\mu$ L,振荡摇匀,测量 OD<sub>546</sub> 值。

1.2.7 DNA Ladder 的琼脂糖凝胶电泳:取对数生长期的 1  $\times$  10<sup>7</sup> Raji 细胞,加入抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>,浓度为 50  $\mu$ g/mL,作用 24 h 后,收集细胞,用 PBS 漂洗 2 次,加入 10 倍于沉淀细胞团的裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,10 mmol/L EDTA,150 mmol/L NaCl,0.4% SDS)和蛋白酶 K 液(50  $\mu$ g/mL),65 $^{\circ}$ C 保温 15 min,于 37 $^{\circ}$ C 轻摇过夜,次日酚,氯仿抽提,加入 1/10 体积的 3 mmol/L NaAc 和 2.5 倍体积的无水乙醇,沉淀,于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.8 细胞早期凋亡的检测:取对数生长期的 1  $\times$  10<sup>7</sup> Raji 细胞,加入抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>,浓度为 50  $\mu$ g/mL,作用 24 h 后,收集细胞,采用 Annexin-V FITC 染色试剂盒检测细胞凋亡,按照

说明书操作进行。

## 2 结果

### 2.1 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 的构建

利用 PCR 法从抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab' 表达载体 pYZFcD20 上扩增重链恒定区 CH1, 使其 C-末端连接上一段编码(CPP)<sub>3</sub> 的序列, 以此修饰的重链恒定区 CH1 替代 pYZFcD20 中的重链恒定区 CH1, 形成抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 表达载体 pYZcpp3 (图 1), 其核苷酸序列经测序与预期序列相同。该表达载体在低磷酸盐的培养条件下, 由一个称为 phoA 的启动子诱导合成带双顺反子的 mRNA, 并在该 mRNA 的两个含有 SD 序列的位置合成相应的多肽链, 在引导肽的作用下分泌到细菌外周质腔, 两条肽链折叠成 Fab', 由于 Fab' 重链的 CH1 羧基端具有 (CPP)<sub>3</sub> 结构, 富含 Cys 而且相邻的两个 Cys 之间由 Pro 隔开, 使这部分肽链充分伸展但不能自由旋转和弯曲, 不易形成链内二硫键, 并且使 Cys 残基不易被其他氨基酸残基所遮掩, 有利于两个 Fab' 重链羧基端的 Cys 残基形成链间二硫键, 形成 F(ab')<sub>2</sub>。

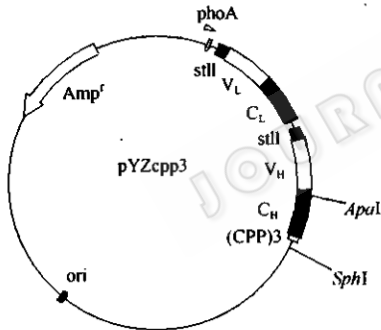


图 1 嵌合抗 CD20 抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 表达载体 pYZcyp3

Fig.1 The expression pYZcyp3 vector of the anti-CD20 chimeric antibody fragment

### 2.2 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 的表达和纯化

用抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 表达载体 pYZcyp3 转化大肠杆菌 16C9, 经摇瓶或发酵罐培养后, 表达产物分泌进入细菌外周质腔, 发酵液经离心、高渗溶液处理, 表达产物从细菌外周质腔释放出来, 然后用蛋白 G 亲和柱纯化, 纯化产物以可溶性状态存在, 摇瓶培养的产量达 6 mg/L, 发酵罐培养的产量达 360 mg/L。纯化产物经 12% 的 SDS-PAGE 分析显示, 在分子量约 48 kD 和 96 kD 处各有一条蛋白质带, 分别为 Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub>, 无其他蛋白质带(图 2A), 薄层激光扫描显示 F(ab')<sub>2</sub> 的含量达 45%。将

蛋白 G 亲和纯化的产物再用 S200 分子筛柱纯化, 获得两个蛋白峰, 分别为 Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub>, 纯化的 F(ab')<sub>2</sub> 经 12% 的 SDS-PAGE 分析, 只在分子量约 96 kD 处有一条蛋白质带, 无其他蛋白质带(图 2B), 薄层激光扫描显示 F(ab')<sub>2</sub> 的含量达到 90% 以上; 而且纯化的 F(ab')<sub>2</sub> 经 15% 的还原 SDS-PAGE 分析, 在分子量约 23 kD 和 25 kD 处分别有抗体片段轻链和重链的两条蛋白质带, 无其他蛋白质带(图 2C)。

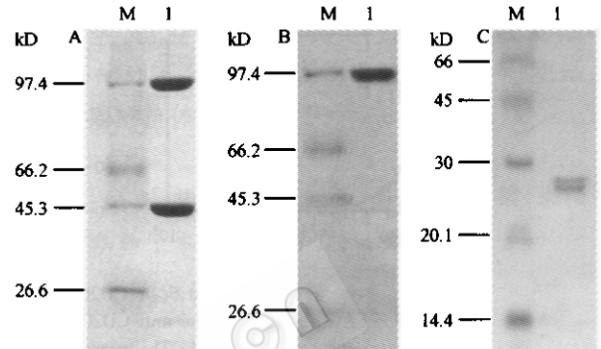


图 2 SDS-PAGE 分析抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub>

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the anti-CD20 chimeric antibody fragment F(ab')<sub>2</sub>

A: after the purification of protein G affinity chromatography (Non-reduced);

B: after the purification of S200 size exclusion chromatography (Non-reduced)

C: after the purification of S200 size exclusion chromatography (Reduced)

### 2.3 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 与 Raji 细胞的结合活性

活细胞间接免疫荧光检测表明, 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 具有与 Raji 细胞结合活性(图 3A)。同时, 竞争性免疫荧光抑制试验证实, 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 具有竞争性抑制亲代鼠源性抗体 HI47 与 Raji 细胞结合的活性, HI47 与 Raji 细胞结合的阳性率由 84.64% 降低为 45.72%(图 3B)。以上结果证明抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 保留了与靶抗原的特异性结合能力。

### 2.4 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 对 Raji 细胞生长的抑制作用

MTT 实验结果表明, Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 对 Raji 细胞的生长具有明显的抑制作用, 且显剂量依赖关系(图 4)。经计算, Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 对 Raji 细胞的 IC<sub>50</sub> 值分别为 45.9 μg/mL 和 22.8 μg/mL, 表明 F(ab')<sub>2</sub> 具有更强的抑制 Raji 细胞生长的活性。

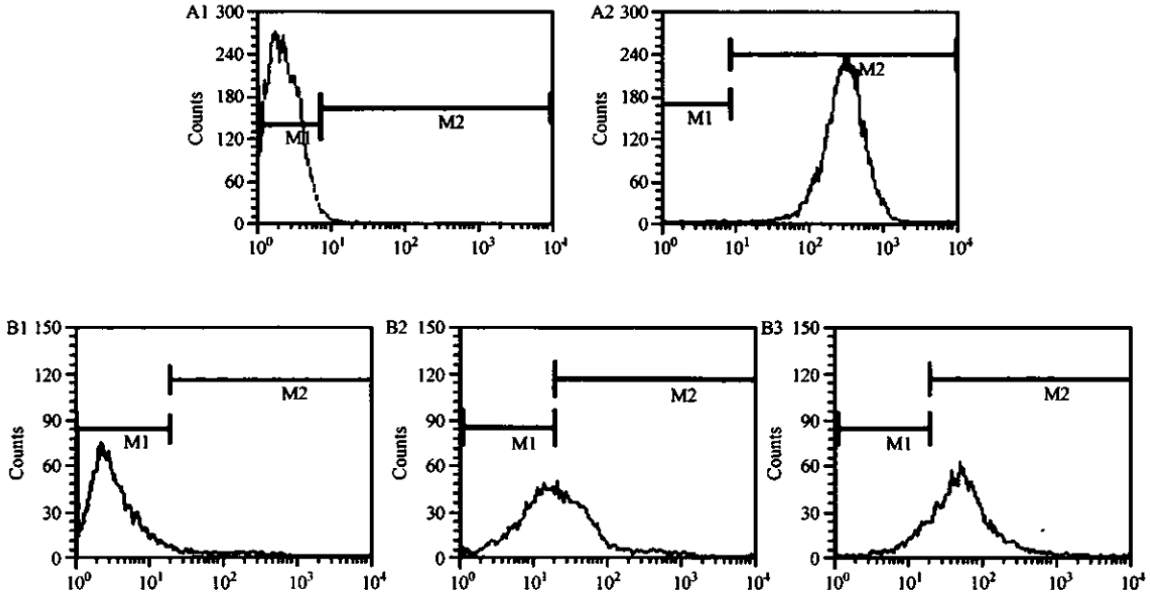


图3 FACS分析抗CD20嵌合抗体片段F(ab')<sub>2</sub>与Raji细胞的结合活性  
 Fig.3 FACS analysis of the anti-CD20 chimeric antibody fragment F(ab')<sub>2</sub> binding to CD20-positive Raji  
 A: The immunofluorescence assay A1: PBS; A2: F(ab')<sub>2</sub>  
 B: The competitive immunofluorescence inhibition assay B1: PBS; B2: HI47 + F(ab')<sub>2</sub>; B3: HI47

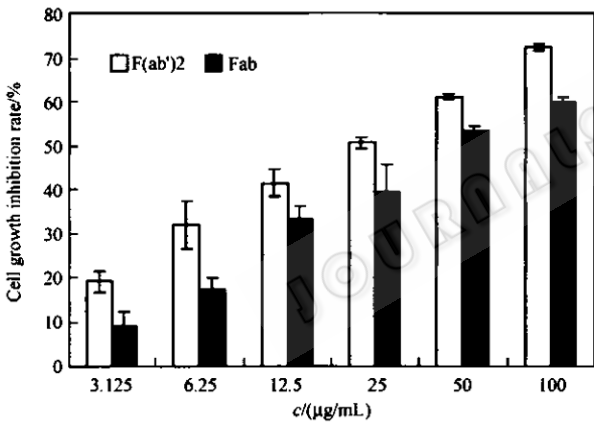


图4 抗CD20嵌合抗体片段Fab'和F(ab')<sub>2</sub>对细胞生长的抑制作用

Fig.4 Effect of the anti-CD20 chimeric antibody fragment Fab' and F(ab')<sub>2</sub> on proliferation of Raji cells

2.5 抗CD20嵌合抗体片段F(ab')<sub>2</sub>抑制Raji细胞生长的作用机理

用HI47、抗CD20嵌合抗体片段Fab和F(ab')<sub>2</sub>处理Raji细胞24h后,提取细胞DNA进行琼脂糖凝胶电泳,能检测到细胞发生凋亡时由于核染色体有规律地降解而形成的梯状带(图5A)。细胞早期凋亡检测结果同样显示,HI47、抗CD20嵌合抗体片段Fab和F(ab')<sub>2</sub>均可诱导Raji细胞凋亡,早期凋亡率分别为23.5%、14.6%和20.8%(图5B)。以上结果表明,抗CD20嵌合抗体片段Fab和F(ab')<sub>2</sub>通过诱导Raji细胞凋亡途径抑制其生长,且F(ab')<sub>2</sub>诱导Raji细胞凋亡的强度大于Fab。

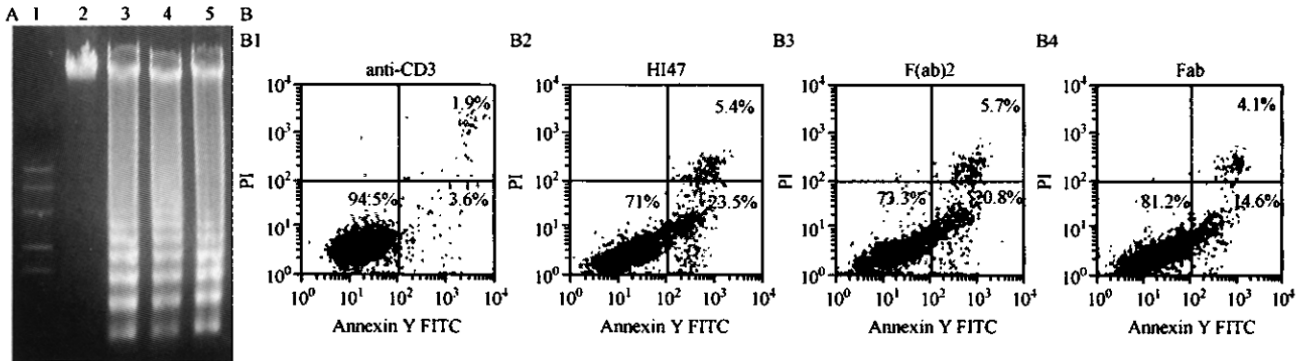


图5 抗CD20嵌合抗体片段F(ab')<sub>2</sub>对细胞生长抑制的作用机理  
 Fig.5 Inhibitory mechanism of the anti-CD20 chimeric antibody fragment F(ab')<sub>2</sub> on proliferation of Raji Cells

A: DNA ladder analysis of Raji cells 1. Marker; 2: Control (HIT3a); 3: HI47; 4: F(ab')<sub>2</sub>; 5: Fab  
 B: Annexin V assay of early stage apoptosis of Raji cells B1: Control (HIT3a); B2: HI47; B3: F(ab')<sub>2</sub>; B4: Fab

### 3 讨论

作为单独的治疗剂,抗 CD20 抗体主要是通过抗体依赖的细胞毒作用、补体依赖的细胞毒作用和诱导肿瘤细胞凋亡等机制来杀伤肿瘤细胞,但其确切的作用机理还有待阐明<sup>[8]</sup>。我们先前构建了抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab 和 Fab',并在国内外首次证明单价抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab 和 Fab'具有特异性杀伤表达 CD20 的 Raji 细胞作用,其作用机理为诱导 Raji 细胞<sup>[9]</sup>,且伴有 bcl-2<sup>[10]</sup>和活性氧自由基的变化<sup>[11]</sup>,是一个有开发前景的抗 CD20 抗体。

抗体的亲和力对抗体的临床效果具有一定的影响,一般来说,抗体的亲和力越高,特异性越高,和抗原结合的时间越长,治疗效果越好。先前我们利用随机突变技术,获得了一个抗 CD20 嵌合抗体片段 Fab'突变体,虽然其亲和力常数是亲代 Fab'的 2 倍<sup>[6]</sup>,但由于 Fab'仅有一个抗原结合位点,且分子量较小,导致 Fab'与抗原的表观亲和力较弱,体内半衰期较短。F(ab')<sub>2</sub> 由于其分子量适中,静脉注射 24 h 后,在肿瘤部位和血液中分布的比例比 Fab、ScFv 和 IgG 高<sup>[12]</sup>,而且由于 F(ab')<sub>2</sub> 不需要糖基化,可在大肠杆菌中表达,因此 F(ab')<sub>2</sub> 是较为理想的肿瘤导向治疗抗体形式。

用 Fab'制备 F(ab')<sub>2</sub> 传统的方法是化学偶联,一般使用邻苯二马来酰亚胺(O-PDM)、N-琥珀酰-3-(2-吡啶二硫基)丙酸盐(SPDP)和二硫代硝基苯甲酸(DTNB)等化学偶联剂,通过一系列氧化还原反应将抗体片段 Fab'通过二硫键或硫醚键连成一个双价 F(ab')<sub>2</sub>,但由于其偶联率较低、在偶联过程中不可避免地造成一部分抗体蛋白变性失活和引入的外源性化学偶联剂存在潜在的免疫原性危险,目前已很少采用。我们通过模拟天然免疫球蛋白的绞链区结构,在 Fab'重链恒定区 CH1 羧基端连接上一段编码(CPP)3 的序列,采用原核分泌型表达系统成功构建了抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 表达载体 pYZpp3,在摇瓶培养条件下获得表达,表达产物在引导肽 st II 引导下,分泌进入细菌周质腔,在周质腔中折叠成正确的空间构象,并以有活性的可溶状态存在。相对包涵体而言,避免了对包涵体所进行的变性和复性中客观条件所造成的活性丧失,尤其对四条多肽组成的 F(ab')<sub>2</sub> 来说,变性和复性是非常困难的。

抗体产量和质量是制约其临床应用的重要因素

之一,我们在摇瓶培养的基础上,利用发酵罐研究抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab)<sub>2</sub> 的表达。实验结果表明,经发酵罐高密度培养,抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')<sub>2</sub> 的产量达 360 mg/L,表达产物中 F(ab')<sub>2</sub> 的含量达 45%。蛋白 G 亲和柱和 S200 分子筛柱纯化后,纯化产物中 F(ab')<sub>2</sub> 的含量达到 90% 以上。生物学活性研究证明,纯化产物保留了与靶抗原的特异性结合和通过诱导 Raji 细胞凋亡抑制其生长的能力,与 Fab 相比,F(ab')<sub>2</sub> 通过诱导 Raji 细胞凋亡抑制其生长的强度明显大于 Fab,CH1 羧基端的(CPP)3 序列不会影响其生物学活性,是一种更适于临床应用的抗体片段。

致谢:纪庆、范冬梅、许元生、高斌岱、杨铭、朱祯平等同志参加了本文的工作,特此致谢。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF *et al.* Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**:208-212
- [2] Chang KL, Arber DA, Weiss LM *et al.* CD20: A review. *Applied Immunohistochem*, 1996, **4**:123-225
- [3] Dillman R O. Magic Bullets at last: Finally-Approval of a Monoclonal Antibody for the Treatment of Cancer. *Cancer Biother Radiopharm*, 1997, **12**(4):223-225
- [4] Yang XF(杨希峰), Shen DC(沈德诚), Jin YG(金光) *et al.* Preparation, identification and biological characteristics of a monoclonal antibody, HI47 against mature human B cells. *Shanghai Journal of immunology* (上海免疫学杂志), 1990, **10**(2):65-68
- [5] Lai ZZ, Xiong DS, Fan DM *et al.* Efficacy of anti-CD20 chimeric Fab' fragment on proliferation of B lymphoma cells. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46**(14):1182-1186
- [6] Liu YX(刘银星), Xiong DS(熊冬生), Fan DM(范冬梅) *et al.* One amino acid mutation in an anti-CD20 antibody fragment that affects the yield bacterial secretion and the affinity. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19**(3):272-276
- [7] Zhu Z, Zapata G, Shalaby R *et al.* High level secretion of a humanized bispecific diabody from *Escherichia coli*. *Bio/Technology* (N. Y.), 1996, **14**:192-196
- [8] Michell R Smith. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogen*, 2003, **22**:7359-7368
- [9] Yinxing Liu, Dongsheng Xiong, Dongmei Fan *et al.* Apoptosis of Raji cells by an anti-CD20 antibody HI47 and its fragments. *Leukemia Research*, 2004, **28**:209-211
- [10] Fan DM(范冬梅), Liu YX(刘银星), Xiong DS(熊冬生) *et al.* Anti-Tumor Mechanism of Anti-CD20 Antibody in vitro: B Lymphoma Cell Apoptosis Induced by Chimeric Antibody Fragment Fab'. *Chin J Cancer Biother* (中国肿瘤生物治疗杂志), 2003, **10**(3):166-169
- [11] Fan DM(范冬梅), Liu YX(刘银星), Yang M(杨铭) *et al.* ROS

change in apoptosis of B lymphoma cell induced by chimeric anti-CD20 antibody fragment Fab'. *Chinese Pharmacological Bulletin* (中国药理学通报), 2003, 19(7): 751 - 754

of intact monoclonal antibody, its F(ab')<sub>2</sub> and Fab fragment and recombinant single chain Fv in a human tumor xenograft model. *Tumor Targeting*, 1996, 2: 37 - 48

[12] Rowlinson-Busza G, Deonarain MP, Epenetos AA *et al*. Comparison

## High Level Expression of Chimeric Antibody Fragment F(ab')<sub>2</sub> Directed Against CD20 in *Escherichia coli*

XIONG Dong-Sheng ZHENG Meng-Jie LIU Yin-Xing XU Yuan-Fu WANG Jin-Hong YANG Chun-Zheng\*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China)

**Abstract** The use of tumor antigen specific antibody for the delivery of therapeutic agents offers the possibility of targeting therapy with reduced toxicity to normal tissues compared to conventional treatments. In previous work, the human-mouse chimeric antibody fragment Fab' directed against CD20 was constructed from the new anti-CD20 antibody HI47 (a mouse IgG3,  $\kappa$ ). The chimeric antibody fragment Fab' could reduce its antigenicity, but the yield, quality and affinity of chimeric antibody fragment Fab' restrict its use. To improve affinity of chimeric antibody fragment Fab', a new phasmid pYZcpp3, which expresses chimeric antibody fragment F(ab')<sub>2</sub>, was constructed by adding a sequence encoding a small peptide, (CPP)<sub>3</sub>, to C-terminus of heavy chain constant region of chimeric antibody fragment Fab'. Using the pYZcpp3 to transform *E. coli*. 16c9, the genetically engineered bacteria 10916 # was obtained. 10916 # can secrete the soluble chimeric antibody fragment Fab' and F(ab')<sub>2</sub> into periplasmic. The yield was up to 360 mg/L with the percent of F(ab')<sub>2</sub> up to 45% in 19L fermentor by the high density fermentation technology. Without denaturation and renaturation, the F(ab')<sub>2</sub> has possessed the native three-dimensional structure. The purity of F(ab')<sub>2</sub> was more than 90% after the purification of protein G affinity chromatography and S200 size exclusion chromatography. The F(ab')<sub>2</sub> could distinguish and bind to Raji cells (CD20<sup>+</sup>) by FACS. F(ab')<sub>2</sub> could inhibit the proliferation of Raji cells in vitro by MTT, IC50 was 22.8  $\mu$ g/mL. HI47 and its chimeric fragments F(ab')<sub>2</sub> induced a significant level of apoptosis (23.5%, 20.8%, respectively), independent of any cross-linking agents, in Raji cells after 24 h incubation. The chimeric antibody fragment F(ab')<sub>2</sub> directed against CD20 is possible to apply to tumor therapy in clinic in the future.

**Key words** chimeric antibody, fermentation, CD20, apoptosis, B lymphoma

Received: 02-12-2004

This work was supported by Grant from the State High Technology Research and Development Program of the Chinese Government (No. 2001AA215341) and Key fund of Tianjin City Government (No. 003119511).

\* Corresponding author. Tel: 86-22-27230740; Fax: 86-22-27230740; E-mail: czys@public.tj.cn 天津医药生物技术研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>