

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )24-2245-03

## 抗前列腺特异抗原/抗 CD3 双特异性单链抗体四聚体的活性研究

王 栋<sup>1</sup> 陈锦华<sup>2</sup> 武国军<sup>3</sup> 王 禾<sup>3</sup> 吴卫真<sup>1</sup> 杨顺良<sup>1</sup> 林文洪<sup>1</sup> 谭建明<sup>1</sup>(南京军区福州总医院: <sup>1</sup> 泌尿外科, <sup>2</sup> 统计室, 福建 福州 350025, <sup>3</sup> 第四军医大学西京医院泌尿外科 陕西 西安 710033)

### Biological activity of tetramer of bispecific single-chain antibody against human prostate-specific antigen and CD3 molecule

WANG Dong<sup>1</sup>, CHEN Jin-Hua<sup>2</sup>, WU Guo-Jun<sup>3</sup>, WANG He<sup>3</sup>, WU Wei-Zhen<sup>1</sup>, YANG Shun-Liang<sup>1</sup>, LIN Wen-Hong<sup>1</sup>, TAN Jian-Ming<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, <sup>2</sup>Statistic Room, Fuzhou General Hospital, Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China, <sup>3</sup>Department of Urology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To study the biological activity of tetramer of bispecific single-chain antibody against human prostate-specific antigen (PSA) and CD3 molecule. **METHODS:** Flow cytometry (FCM) was used to detect the binding activity of bispecific single-chain antibody to CD3-positive cell line Jurkat and prostate carcinoma cell line LNCaP. The efficacy of the antibody in mediating tumor cell lysis *in vitro* was determined by using the <sup>51</sup>Cr-release test. For *in vivo* evaluation of the antibody's activity, a nude mouse model was used. The mice were inoculated with LNCaP prostate cancer cells. **RESULTS:** It was demonstrated that the tetramer of bispecific single-chain antibody could bind to the Jurkat and LNCaP cells with high specificity. The percents of the cells bound by the antibody were 70.4% and 81%, respectively. *In vitro*, with activated CTLs as effector cells, a specific lysis of LNCaP cells mediated by the antibody was confirmed by <sup>51</sup>Cr-release assay. The specific lysis rate of LNCaP cells was positively correlated to tBsAb concentration or effector / target cell ratio. The highest specific lysis rates were (80.3 ± 5.2)% and (78.6 ± 5.5)% in fixed antibody concentration group and fixed effector/target cell ratio group, respectively. *In vivo*, the antibody could suppress the tumor growth in nude mice significantly as compared to the group treated only with CTLs and the untreated control group (P < 0.0001). **CONCLUSION:** The tetramer of bispecific single-chain antibody against human prostate-specific antigen and CD3 molecule has a good biological activity in binding

antigens, mediating lysis of LNCaP cells and inhibiting tumor growth.

**【Keywords】** prostatic neoplasms; antigens, CD3; antibody affinity; tetramer

**【摘要】**目的: 研究抗前列腺特异抗原(PSA)/抗 CD3 双特异性单链抗体四聚体的生物活性。方法: 利用流式细胞仪和 <sup>51</sup>Cr 释放试验评价双特异性单链抗体四聚体的抗原亲和力和活性和体外介导杀伤靶细胞的效果。利用裸鼠前列腺癌模型分析其在体内介导细胞毒 T 淋巴细胞对肿瘤细胞杀伤的能力。结果: 抗 PSA/抗 CD3 双特异性单链抗体四聚体可以特异性结合表达前列腺癌细胞和 CD3 阳性的淋巴瘤细胞, 阳性结合率分别为 70.4% 和 81%。在体外, 有细胞毒 T 淋巴细胞存在时该四聚体可引起前列腺癌细胞的裂解, 在抗体浓度固定组和效应细胞/靶细胞比例固定组, 靶细胞裂解率分别随着效应细胞/靶细胞比例和抗体浓度的增加而增加, 最高裂解率分别可以达到 (80.3 ± 5.2)% 和 (78.6 ± 5.5)%。与对照组比较, 接种前列腺癌细胞的裸鼠在体内注射激活的细胞毒 T 淋巴细胞的同时接受该四聚体的治疗后, 肿瘤生长明显受到抑制 (P < 0.0001)。结论: 抗 PSA/抗 CD3 双特异性单链抗体四聚体具有良好的生物学活性, 具有体外杀伤肿瘤细胞和体内抑制肿瘤生长的作用。

**【关键词】** 前列腺肿瘤; 抗原; CD3; 抗体亲和力; 四聚体

**【中图分类号】** Q789 **【文献标识码】** A

### 0 引言

免疫治疗因其可以调动机体自身的免疫力, 弥补患者免疫系统缺陷, 达到治疗肿瘤的目的而成为肿瘤治疗方法中的重要组成部分。其中可以激活细胞毒 T 淋巴细胞并使其在肿瘤局部聚集的抗 CD3/抗肿瘤特异性抗原双特异性抗体倍受研究者瞩目<sup>[1]</sup>。人 p53 基因表达产物以四聚体形式存在, 其四价功能域表达产物可自动装配成四聚体。我们在成功构建了人 IgG3 上游铰链区/p53 四价功能域融合基因<sup>[2]</sup>和制备抗前列腺特异抗原/抗 CD3 双特异性单链抗体 (BsAb) 的基础之上<sup>[3-4]</sup>, 将四价功能域融合基因与双特异性单链抗体基因拼接, 制备双特异性单链抗体的四聚体<sup>[5]</sup>, 明显提高了双特异性单链抗体的亲和力, 改善了其生物活性。

收稿日期 2006-05-30; 接受日期 2006-06-18

作者简介: 王 栋, 博士, 主治医师。Tel: 13860639240 Email: wangdong1202@medmail.com.cn

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 抗 PSA/抗人 CD3 双特异性单链抗体四聚体 (tBsAb)<sup>[5]</sup> 由本实验室制备并保存。前列腺癌细胞系 LNCaP 和 CD3 阳性的淋巴瘤细胞系 Jurkat 购买自美国标准培养收集所 (ATCC, USA); 健康纯种雌性 Balb/c 裸鼠 (6~9 wk) 购买自中科院上海实验动物中心。FITC 标记的抗 myc 单克隆抗体 (9E10) 为第四军医大学免疫教研室谢鑫博士惠赠; 其它常规试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 抗体亲和活性的鉴定** 前列腺癌细胞 LNCaP 和 CD3 阳性的淋巴瘤细胞 Jurkat 分别用含 100 g/L FCS 的 RPMI1640 调整细胞浓度为  $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ /L, 两种细胞悬液各取 2 份 40  $\mu$ L/份, 分别加入纯化后的抗体 (tBsAb), 调整抗体终浓度为 20 mg/L, 再加 50  $\mu$ L 1:20 (用 DPBS 稀释) 灭活正常兔血清, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次加洗涤液 2 mL, 离心 1000 r/min, 5 min, 弃上清, 加入 50  $\mu$ L 1:1500 的 FITC 标记的抗 myc 单克隆抗体, 充分振荡, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次加洗涤液 2 mL, 离心 1000 r/min, 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 固定液, 进行流式细胞仪 (FCM) 检测。用正常鼠 IgG 替代抗体, 按上述方法处理后作为阴性对照。

**1.2.2 效应细胞的制备** 利用密度梯度离心方法从正常人肝素化血液中提取外周血单核细胞 (PBMC), 加入低温 PBS 重悬后, 离心 1000 r/min, 10 min, 弃上清, 加入含有 100 g/L FCS, 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 重悬。PBMC 悬液移入 250 mL 细胞培养瓶, CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 1 d, 将非贴壁细胞移入新的培养瓶, 更换培养液, 并加入终浓度 150 U/mL 的 IL-2, 孵育 3 d, 再次更换培养液, 并将 IL-2 的终浓度调整为 100 U/mL。之后每 3 d 更换培养液, 连续培养 8 wk 后做为效应细胞。

**1.2.3 细胞毒实验** 利用 <sup>51</sup>Cr 释放试验鉴定双特异性抗体介导的效应细胞杀伤肿瘤细胞的效果。靶细胞的标记: 将  $5 \times 10^6$  LNCaP 细胞和 7 400 kBq (200  $\mu$ Ci) Na<sub>2</sub>[<sup>51</sup>Cr]O<sub>4</sub> 在 37 $^{\circ}$ C 的 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 1 d, RPMI 1640 洗涤 2 次后, 加入 96 孔培养板中 ( $1 \times 10^4$ /孔)。将靶细胞分为对照组和 tBsAb 组, 对照组中应用小鼠 IgG。每组再分为抗体浓度固定组和效应细胞/靶细胞比例固定组。另设仅含标记靶细胞的自然释放对照孔及含有标记靶细胞和 10 mL/L Triton X-100 的最大释放对照孔。抗体浓度固定组的抗体浓度为 30  $\mu$ g/L, 效应细胞/靶细胞比例从 0.5:1

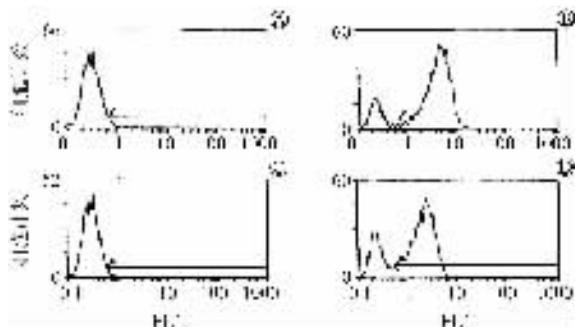
至 30:1 不等, 效应细胞/靶细胞 (E/T) 比例固定组中 E/T 为 20:1, 抗体浓度为 0.1~300  $\mu$ g/L, 相同实验条件重复 4 孔。50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱 37 $^{\circ}$ C 放置 4 h, 然后经过离心提取培养上清 (150  $\mu$ L),  $\gamma$  计数器测量每份上清的 cpm 值。计算特异性释放率: 特异性释放率 (%) = (实验孔 cpm - 自然释放对照孔 cpm) / (最大释放对照孔 cpm - 实验孔 cpm)  $\times$  100%。

**1.2.4 裸鼠动物模型** 四只健康裸鼠静脉注射 tBsAb 和效应细胞, 验证抗体及效应细胞毒副作用。将 36 只裸鼠随机分成 3 组: 非治疗组、对照组和 tBsAb 组。非治疗组不接受任何治疗, 对照组每日仅接受静脉注射效应细胞 ( $1 \times 10^7$ ), tBsAb 组静脉注射  $1 \times 10^7$  效应细胞和 200  $\mu$ g tBsAb。分别于裸鼠腹侧皮下注射  $1 \times 10^7$  LNCaP 细胞, 等肿瘤体积达到约 100 mm<sup>3</sup> 时, 开始各组治疗方案并计时, 肿瘤体积每周测量 1 次, 体积计算: 宽<sup>2</sup>  $\times$  长  $\times$  0.52。6 wk 后将裸鼠用 CO<sub>2</sub> 处死。

统计学处理: 利用 SAS 8.1 统计软件分析, 统计图利用 SPSS 13.0 制作, 采用重复测量方差分析,  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 流式细胞仪** FCM 显示双特异性抗体四聚体可以特异性结合前列腺癌细胞 LNCaP 和 CD3 阳性的淋巴瘤细胞 Jurkat, 与 LNCaP 细胞和 Jurkat 细胞的阳性结合率分别为 70.4% 和 81% (图 1)。

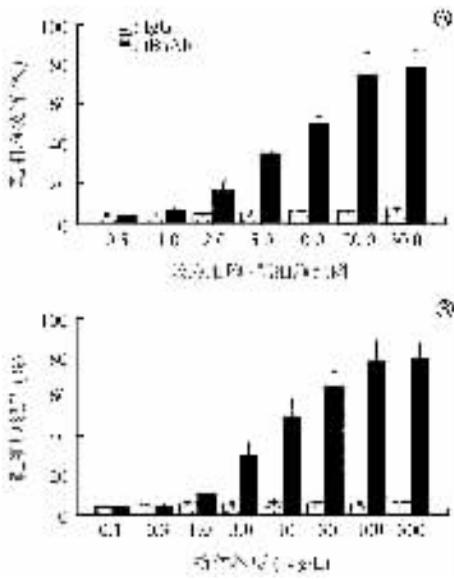


A: Jurkat 细胞阴性对照组; B: tBsAb 与 Jurkat 细胞的结合; C: LNCaP 细胞阴性对照组; D: tBsAb 与 LNCaP 细胞的结合。

图 1 FCM 分析 tBsAb 分别与 LNCaP 和 Jurkat 的结合活性

**2.2 体外介导的细胞毒作用** tBsAb 可以有效的介导效应细胞 (T 细胞) 对靶细胞 (LNCaP 细胞) 的杀伤, 靶细胞裂解百分比在实验组 (效应细胞/靶细胞比例固定组和抗体浓度固定组) 和对照组之间的差异均具有统计学意义 ( $P < 0.0001$ )。在效应细胞/靶细胞比例固定组, 随着 tBsAb 浓度的不断增加, 特异

性释放率显著增加 ( $P < 0.0001$ ); 同样, 在抗体浓度固定组, 随着效应细胞/靶细胞比例的逐渐增加, 特异性释放率显著增加 ( $P < 0.0001$ , 图2)。



A: 效应细胞与靶细胞比例固定组; B: 抗体浓度固定组。  
图2 tBsAb 介导的特异性杀伤

**2.3 裸鼠动物模型** 4 只接受静脉注射 tBsAb 和效应细胞的健康裸鼠无明显异常表现, 证实 tBsAb 和效应细胞无明显毒副作用, 裸鼠可以耐受。36 只入组裸鼠中, 共 33 只完成 6 wk 治疗, 3 只死亡, 其中 1 只死于感染, 2 只死亡原因不明, 将死亡裸鼠实验资料剔除, 最终每组实验裸鼠数目为非治疗组 ( $n = 12$ ), 对照组 ( $n = 11$ ) 和 tBsAb 组 ( $n = 10$ )。重复测量方差分析结果显示: 非治疗组和对照组肿瘤体积逐渐增大, tBsAb 组肿瘤生长明显受到抑制, 三组之间差异具有统计学意义 ( $P < 0.0001$ , 图3)。

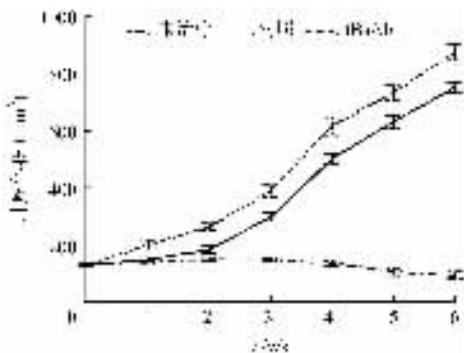


图3 tBsAb 的治疗作用

### 3 讨论

免疫治疗因其可以调动机体自身的免疫力, 弥补

患者免疫系统缺陷, 达到治疗肿瘤的目的而成为肿瘤治疗方法中的重要组成部分。近年来, 越来越多的研究结果显示, 肿瘤免疫治疗是一种具有广阔应用前景的治疗方法。由于抗免疫效应细胞表面标志物, 如 CD3, CD2, CD16 和 CD64 等抗体可以有效激活效应细胞, 因此利用同时能识别免疫效应细胞及肿瘤相关抗原的双特异性抗体可以增加肿瘤部位效应细胞的数量并激活效应细胞, 使其发挥细胞毒功能。

本实验室利用分子克隆的方法成功构建了抗 PSA/抗人 CD3 双特异性单链抗体, 试图增加并活化前列腺癌组织周围的细胞毒 T 淋巴细胞, 介导 T 淋巴细胞对前列腺癌细胞的杀伤, 达到治疗前列腺癌的目的。但是, 其亲和力和肿瘤杀伤活性不理想<sup>[4]</sup>。之后我们利用 p53 四价功能域可以将 P53 分子自动组装成四聚体的特性, 构建了人 IgG3 上游铰链区/p53 四价功能域融合基因<sup>[2]</sup>, 将其融合在 BsAb 基因的 3' 端, 构建了抗 PSA/抗人 CD3 双特异性单链抗体的四聚体基因, 并获得真核表达, 明显提高了原双特异性单链抗体的亲和力<sup>[5]</sup>。

我们研究表明, tBsAb 可以特异性识别靶细胞, 与靶细胞的亲和力明显高于原双特异性单链抗体 (BsAb)。体外杀伤实验结果显示 tBsAb 可以介导细胞毒 T 淋巴细胞对靶细胞的杀伤, 介导杀伤效率明显优于 BsAb<sup>[4]</sup>。同时, 这一结果在裸鼠前列腺癌模型体内实验中得到进一步证实, tBsAb 基本可以达到抑制肿瘤生长的目的。当然从实验结果中还可以看出: 只有当效应细胞成倍于靶细胞, 并且抗体浓度达到一定水平时, 抗体介导细胞毒 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的能力才能得到发挥, 并且这种能力的大小与效应细胞/靶细胞比例和抗体浓度成正比相关。

### 【参考文献】

- [1] Kontermann RE. Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(1): 1-9.
- [2] 王 栋, 王 禾, 武国军, 等. 人 IgG3 上游铰链区/p53 四价功能域融合基因的构建及空间构象分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(4): 381-383.
- [3] 武国军, 郝晓柯, 白玉杰, 等. 抗人精浆蛋白单克隆抗体轻、重链可变区基因的克隆及序列分析 [J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(5): 484-487.
- [4] 王 栋, 武国军, 王 禾, 等. 抗前列腺癌/抗 CD3 双特异性单链抗体的构建及表达 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83(15): 1292-1295.
- [5] 王 栋, 武国军, 谭建明, 等. 人 p53 四价功能域用于提高抗体功能亲和力的研究 [J]. 中华医学杂志, 2005, 85(7): 479-482.