

二硫键稳定的抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的构建、表达及活性测定

苏晔, 刘娟妮, 高瀛岱, 秦立, 杨铭, 王金宏, 许元富, 邵晓枫, 纪庆, 熊冬生, 杨纯正

中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所血液病医院 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

摘要: 向抗 CD3/抗 Pgp(P-glycoprotein)微型双功能抗体(Diabody)中引入二硫键, 使 diabody 两条链以共价键交联, 增强其稳定性。用重叠 PCR(Overlap PCR)和 PCR 方法, 将抗 CD3/抗 Pgp diabody 中抗 CD3 或抗 Pgp 轻重链可变区的适当部位定点突变成半胱氨酸, 进行原核表达。表达产物经阳离子层析柱和抗 Etag 亲和层析柱分离纯化, 还原性和非还原性 SDS-PAGE 电泳鉴定。应用间接免疫荧光和竞争性免疫荧光结合流式细胞分析技术(FCM)检测生物学活性。将改造前后的两种抗体分别置 37°C 含 0.2% 人血清白蛋白(Human serum albumin, HAS)的 PBS 中孵育, 取多个时间点比较两者与两种抗原的结合能力。基因重组质粒经测序证实序列正确。向抗 Pgp 轻重链引入突变的 diabody(dsPgp-diabody)在原核表达系统中, SDS-PAGE 显示纯化后的蛋白二硫键不能配对。而向抗 CD3 轻重链引入突变的 diabody(dsCD3-diabody)能够在原核表达系统中进行可溶性表达, 二硫键能够正确配对。并且与改造前的 diabody 相比, dsCD3-diabody 的抗原结合特异性没有改变, 抗原结合和竞争活性均无下降。改造前的 diabody 在 37°C PBS(0.2% HAS)中孵育 1 h 后活性即开始下降, 24 h 后活性完全丧失; 而 dsCD3-diabody 孵育 72 h 后活性并无明显下降。本实验成功构建了 dsCD3-diabody, 并且能够进行可溶性表达。向 diabody 抗 CD3 轻重链区引入的二硫键在宿主菌中可以正确配对, 抗原结合活性没有明显下降, 而稳定性大大增强。向 diabody 轻重链区引入二硫键, 以增强其稳定性的方法是可行的。

关键词: 基因工程抗体, diabody, 二硫键, 药物稳定性

Construction and expression of disulphide stabilized anti-CD3/anti-Pgp diabody

Ye Su, Juanni Liu, Yingdai Gao, Li Qin, Ming Yang, Jinhong Wang, Yuanfu Xu, Xiaofeng Shao, Qing Ji, Dongsheng Xiong, and Chunzheng Yang

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academic of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Abstract: We constructed and expressed an anti-CD3/anti-Pgp (P-glycoprotein) diabody previously. However, the two chains of diabody are associated non-covalently, resulting in being capable of dissociating. The aim of this study is to enhance the stability of the diabody. We introduced cysteine residues into the CD3 or Pgp V-domain to covalently lock the two chains together. The disulphide crosslinked diabody were expressed by *Escherichia coli* (*E. coli*) 16C9 and purified by a cation exchange column and an anti-Etag affinity chromatography. The purified proteins were verified through SDS-PAGE. Flow cytometry (FCM) was used to

Received: February 25, 2009; **Accepted:** May 6, 2009

Supported by: National Natural Sciences Foundation of China (No. 30400558), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 08ZCKFSH04100).

Corresponding author: Yingdai Gao. Tel: +86-22-2390-9070; Fax: +86-22-27230740; E-mail: gaoyingdai@hotmail.com

国家自然科学基金(No. 30400558), 天津市科技发展计划项目(No. 08ZCKFSH04100)资助。

analyse the binding properties, competitive binding capacity and stability *in vitro*. The dsPgp-diabody failed to form disulphide bond properly. The designed disulphide bridge between the different chains of dsCD3-diabody was formed correctly. FCM demonstrated the dsCD3-diabody has specific antigen binding activity, the same binding activity and competitive binding activity as its parent diabody. The dsCD3-diabody retained the full activity even after 72 h incubation at 37°C in human serum, in contrast, the parent diabody began to lose activity after only 1 h and lose all its activity 24 hours later. The induced disulphide bond in the CD3 V-domain effectively enhanced the stability of anti-CD3/anti-Pgp diabody. The method of stabilizing a diabody by introducing a disulphide bond into is practical.

Keywords: diabody, disulphide bond, drug stability, engineering antibody

Diabody 是 2 个具有不同抗原结合位点的抗体可变区序列, 在同一个启动子控制下组成 2 个顺反子, 同一顺反子中 VH 和 VL 用一个短 Linker 连接。表达产物中同一顺反子上的 VH 和 VL 因 Linker 太短而存在空间位阻, 不能配对, 只能与另一顺反子上的 VH 和 VL 配对, 共价结合形成二聚体^[1]。Diabody 有 2 个抗原结合位点, 相向而对^[2], 可以构建成双特异性抗体或具有 2 个相同抗原结合位点的双价抗体。其中抗 CD3/抗 TAA(Tumor associated antigen) diabody 可以有效地将细胞毒性 T 细胞靶向到肿瘤细胞上, 发挥特异的肿瘤杀伤作用。Diabody 能够在原核表达系统中可溶性表达, 产量可高达 1 g/L^[3]。因此, diabody 具有广阔的临床肿瘤免疫治疗应用前景。

但是, diabody 两条肽链是非共价结合在一起, 可能解离成单体, 失去活性。使 diabody 变得更加稳定的方法主要有 2 种: 一是用一段柔性肽将 VH 和 VL 连接在一起, 形成单链双特异抗体(或单链双价抗体)^[4]; 另一种是向 diabody 引入二硫键, 使 2 条肽链共价结合在一起, 形成二硫键稳定的 diabody^[5]。实验证实通过引入二硫键, 可以大大增强抗体稳定性, 并且对抗体亲和力没有影响, 甚至亲和力增加^[6]。而且 diabody 在 2 条链是随机非共价配对, 可能形成没有功能的同源二聚体, 通过引入二硫键可以使 2 条肽链正确配对, 形成异源二聚体, 使 diabody 纯度更高。

本实验室已经构建了抗 CD3/抗 Pgp(P-glycoprotein) diabody, 可以在原核系统中可溶性表达, 能够特异性结合 Pgp 抗原, 体内外实验证实可以有效地介导 T 细胞杀伤 Pgp 高表达的耐药肿瘤细胞^[7]。但是, 抗 CD3/抗 Pgp diabody 治疗耐药肿瘤时, 停药 1 周后肿瘤复发, 而且抗体用量相对较高^[7]。本实验的主要目的是通过向抗 CD3/抗 Pgp diabody 引入二硫键, 增强其稳定性和异源二聚体的正确配对, 以期减少抗

体用量, 达到更好的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株和细胞

克隆载体 pBYZ11d2 和 pB11d1 均由本室构建^[8], 表达载体 pAYZ 和感受态 *E. coli* 16C9 由本室保存。多药耐药细胞株 K562/A02 由本室建立^[9], K562 和 Jurkat 细胞系由本室保存。细胞均用含 10% 胎牛血清(中国医学科学院血液学研究所科技开发公司)的 RPMI 1640(GIBCOBRL)常规培养。效应 T 细胞的制备参见文献描述^[7]。

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Mlu* I、*Nhe* I 和 *Sph* I 限制性核酸内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。抗 Pgp 单克隆抗体(mAb) PHMA02^[10]和抗 CD3 ScFv mAb^[11]均由本室制备, 抗 CD3 mAb HIT3a 由本所协和科技公司提供。羊抗鼠 IgG-FITC 购自北京中山生物工程公司。DNA 片段快速胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术公司。其他均为国产分析纯。抗 Etag 亲和层析柱、HRP 标记鼠抗 Etag 抗体和鼠抗 Etag 抗体均购自 GE 公司。FITC 标记的兔抗鼠 IgG 多克隆抗体由本所科技开发公司提供。Cyto Tox 96 非放射性细胞毒性分析试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.3 引物

引物由英骏(Invitrogen)生物技术有限公司合成。PCR 引物序列见表 1, 引物 1~9 下划线是括号内的限制性酶切位点, 引物 C1~C8 下划线是引入半胱氨酸的突变位点。

1.2 方法

1.2.1 载体的构建

参考文献^[12], 构建了 2 种 diabody, 分别在抗

CD3 和抗 Pgp 的 V_H 及 V_L 区各引入对二硫键。突变位点为: 抗 CD3 V_L -100 位 S C, V_H -44 位 G C; 抗 Pgp V_L -100 位 G C, V_H -44 位 R C。

以含 Pgp V_L -CD3 V_H 基因的重组质粒 pBYZ11d2 和含 CD3 V_L -Pgp V_H 基因的重组质粒 pB11d1 为模板, 通过 Overlap PCR 和 PCR, 分别获得定点突变的 CD3 V_L -Pgp V_H 片段和 Pgp V_L -CD3 V_H 片段。分别利用酶切位点 *Mlu* I/*Nhe* I 和 *Nhe* I/*Sph* I 将突变后的片段克隆到克隆载体中, 转化 *E. coli* 16C9, 鉴定后送宝生物工程(大连)有限公司测序。继续用 PCR 扩增 Pgp V_L -CD3 V_H 片段, 使其 5'端加上引导肽 St , 3'端加上 *Not* I 酶切位点。最后利用酶切位点 *Mlu* I/*Nhe* I 和 *Nhe* I/*Not* I 将 CD3 V_L -Pgp V_H 片段和 St -Pgp V_L -CD3 V_H 片段克隆到表达载体 pAYZ 中。

1.2.2 Diabody 的表达和纯化鉴定

抗 CD3/抗 Pgp diabody 表达方法见文献[7]。挑取含有 ds-diabody 重组质粒的单菌落接种到含氨苄青霉素(0.1 mg/mL)的 2YT 培养基中(19 g/L 胰蛋白胍, 10 g/L 酵母提取物, 5 g/L NaCl), 37°C 振荡培养 6~7 h 后, 按 1:1 的比例转接于含氨苄青霉素(0.1 mg/mL)的 Ap5 培养基中(0.6 g/L 酵母提取物,

11 g/L 酸水解酪蛋白, 1.5 g/L 葡萄糖, 1.2 g/L NaCl, 3.73 g/L KCl, 1.07 g/L NH_4Cl , 0.19 g/L $MgSO_4$, 0.12 mol/L 三乙醇胺, pH 7.4), 25°C 振荡培养 30 h, 4°C 离心收集菌体。冻融菌体沉淀后, 加入细菌外周质腔提取液(三羟甲基氨基甲烷 25 mmol/L, 乙二胺四乙酸 1 mmol/L, 苯甲基磺酰氟(PMSF) 0.1 mmol/L, 蔗糖 200 g/L(W/V), NaCl 200 mmol/L, pH 7.5), 4°C 搅拌裂解 1 h, 12 000 r/min、4°C 离心 10 min, 收集上清即表达产物的粗提物。

将表达产物的粗提物先后经阳离子层析柱和抗 Etag 亲和层析柱进行纯化。纯化后的产物行 12% SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.3 间接免疫荧光法检测 diabody 的结合活性

一定浓度的纯化 diabody 或 ds-diabody 分别与 1×10^6 K562/A02 细胞或 Jurkat 细胞 4°C 孵育 1 h, 2000 r/min、4°C 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗细胞, 重复 3 次。再将细胞与鼠抗 Etag 抗体 4°C 孵育 1 h, 2000 r/min、4°C 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗细胞, 重复 3 次。最后将细胞与 20 μ L FITC 标记的兔抗鼠 IgG 多克隆抗体 4°C 孵育 40 min、2000 r/min、4°C 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗细胞, 重复 2 次。FCM 检测荧光强度。设同型对照。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primer 1	CTAGCGC <u>ACGCGT</u> TACGCTGACATCGAGCTCACTCAGTCTCC (<i>Mlu</i> I)
Primer 2	CGACCTCCGCCACCCCGTTTCAGCTCCAGCTTG
Primer 3	GGTGGCGGAGGGTCGCAGGTCAAACCTGCAGCAGTC
Primer 4	GAGCTAGCTAGCTCATGAGGAGACGGTGACCGTG (<i>Nhe</i> I)
Primer 5	CGACCTCCGCCACCCCGTTTTATTTCAGCTTGGT
Primer 6	GGTGGCGGAGGGTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGT
Primer 7	GAATATCGCATGCGGTGGTCATGAGGAGACGGTGACCGTG (<i>Sph</i> I)
Primer 8	CTTCGAGCTAGCTACCCGGGATCCTCTAGAG (<i>Nhe</i> I)
Primer 9	CGCACCTGCGCCGCTGAGGAGACGGTGACCGTG (<i>Not</i> I)
Primer C1	TGGTCCC <u>ACAGCC</u> GAACG
Primer C2	CGTTCGGCTGTGGGACCA
Primer C3	CACTCCAGACACTTCTCCG
Primer C4	CGGAGAAGTGTCTGGAGTG
Primer C5	TTGGTCCC <u>ACAACCG</u> AACG
Primer C6	CGTTCGGT <u>TGTGGG</u> ACCAA
Primer C7	CATTCCAGGC <u>ACTGTCC</u> AG
Primer C8	CTGGACAGT <u>GCC</u> TGGAATG

1.2.4 竞争性免疫荧光抑制实验

将一定浓度纯化的 diabody 或 ds-diabody 分别与 PHMA02 或 HIT3a 混合, 再与 1×10^6 K562/A02 细胞或 Jurkat 细胞 4°C 孵育 1 h, 2000 r/min、 4°C 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗细胞, 重复 3 次。加入鼠抗 Etag 抗体, 4°C 孵育 1 h, 2000 r/min、 4°C 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗细胞, 重复 3 次。最后加入 $20 \mu\text{L}$ FITC 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体, 4°C 孵育 40 min, 2000 r/min、 4°C 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗细胞, 重复 2 次。FCM 检测荧光强度。阳性对照组在第一步孵育时只加入 PHMA0 或 HIT3a, 余步骤同前。设同型对照。

1.2.5 抗体稳定性的检测

将纯化的 diabody 或 ds-diabody 分别置 37°C 含 0.2% 人血清白蛋白(HSA)的 PBS 中, 37°C 孵育 0 h、0.5 h、1 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h。于各时间点取孵育后的抗体, 用间接免疫荧光法检测其与 CD3 和 Pgp 抗原的结合活性(方法同 1.2.3)。

2 结果

2.1 ds-diabody 的构建

重叠 PCR 和 PCR 将 CD3 V_L -100 和 CD3 V_H -44 及 Pgp V_L -100 和 Pgp V_H -44 定点突变为半胱氨酸, 分别酶切连接到克隆载体, 并通过随后的 PCR, 在抗 Pgp V_L 基因的氨基端加上与表达载体相同的 SD 序列和 St 引导肽序列。最后将突变后的 CD3 V_L -Pgp V_H 和 Pgp V_L -CD3 V_H 片段连接到带纯化标签 Ettag 短肽的表达载体上, 构建获得 2 个重组质粒: pAYZDCP-C 和 pAYZDCP-P。前者在 CD3 V_L -100 和 CD3 V_H -44 位点定点突变为半胱氨酸, 后者在 Pgp V_L -100 和 Pgp V_H -44 位点突变为半胱氨酸。测序证实定点突变成功, 其余核苷酸与原始序列相同。

2.2 ds-diabody 的表达和纯化及鉴定

将构建成功的重组质粒转化 *E. coli* 16C9, 经低磷酸盐诱导表达, 表达产物是 2 条肽链: 一条是 CD3 V_L -Pgp V_H , 另一条是 Pgp V_L -CD3 V_H 。2 条肽链在引导肽的作用下, 定向分泌到细菌周质腔中。由于细菌周质腔是一个相对氧化性的环境, 并含有蛋白质折叠相关的折叠酶、分子伴侣和二硫键异构酶, 有利于肽链正确折叠和二硫键的配对。用高渗

溶液提取细菌周质腔表达产物, 经阴离子交换层析和抗 Ettag 亲和层析纯化。在抗 Pgp 可变区引入二硫键后, 还原性和非还原性 SDS-PAGE 显示引入的二硫键没有配对(图 1a); 而在抗 CD3 可变区引入二硫键后, 纯化的 dsCD3-diabody 经还原性 SDS-PAGE 分析, 还原后的 2 条肽链位置正确, 在分子量为 26 kD 和 28 kD 处各有一条蛋白带; 非还原性 SDS-PAGE 显示, dsCD3-diabody 比理论分子量 54 kD 小, 这是由于 2 条肽链经二硫键结合后形成一定的空间构象造成的(图 1b)。dsCD3-diabody 的产量为 0.5~0.8 mg/L。

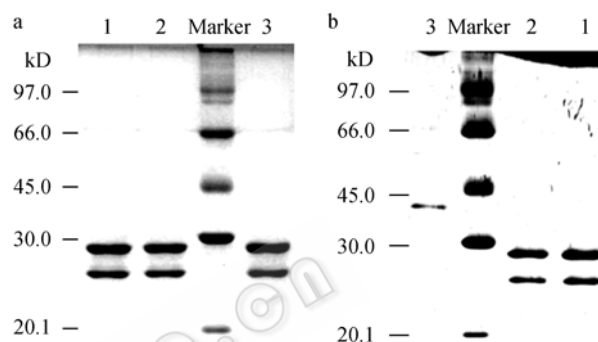


图 1 dsPgp-diabody (a) 和 dsCD3-diabody (b) SDS-PAGE 电泳分析结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of dsPgp-diabody (a) and dsCD3-diabody (b). 1: parent diabody in reducing loading buffer; 2: ds-diabody in reducing loading buffer; 3: ds-diabody in non-reducing loading buffer.

2.3 dsCD3-diabody 与 K562/A02 和 Jurkat 细胞的结合活性

K562/A02 细胞株是本室建立的一株多药耐药的细胞株, 其细胞表面高表达 Pgp 蛋白, 而无 CD3 表达^[9]。Jurkat 细胞表面表达 CD3 而不表达 Pgp。K562 细胞表面两者均无表达。间接免疫荧光测定结合流式细胞分析技术显示, dsCD3-diabody 能与 K562/A02 和 Jurkat 细胞特异性结合, 与 K562 细胞没有明显结合。与改造前的 diabody 相比, dsCD3-diabody 与 CD3 和 Pgp 抗原的结合能力没有显著区别(图 2)。

2.4 dsCD3-diabody 的竞争结合能力

PHMA02 与 K562/A02 细胞结合的阳性率为 96.53%, 改造前 diabody 与 PHMA02 混合后竞争结合 K562/A02 细胞的阳性率为 62.13%, dsCD3-diabody 与 PHMA02 混合后竞争结合 K562/A02 细胞的阳性率为 63.4%。HIT3a 与 Jurkat 细胞结合的阳性

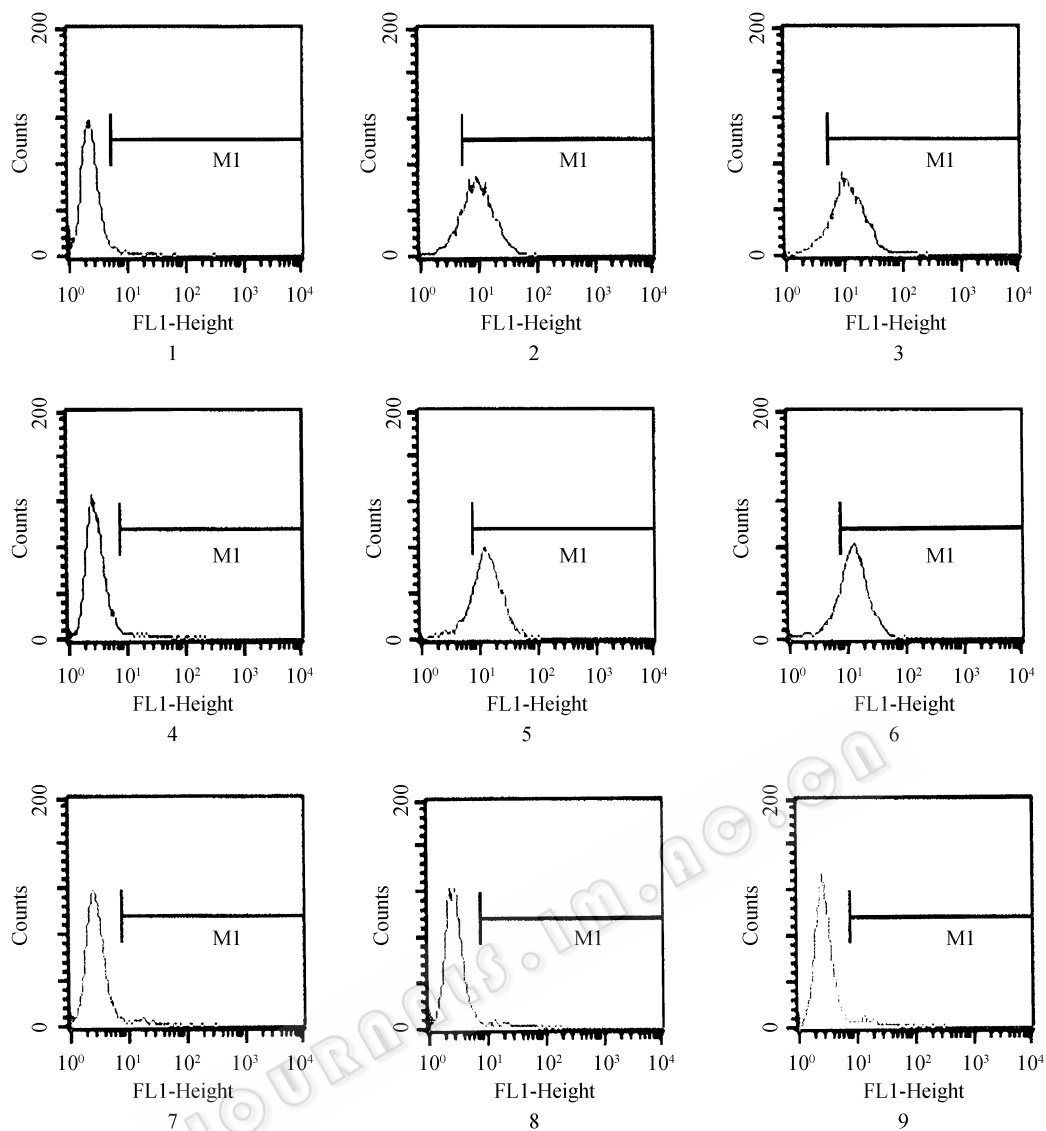


图 2 FCM 分析 dsCD3-diabody 与靶抗原的特异性结合活性

Fig. 2 Analysis of the specificity binding ability of dsCD3-diabody. (Left) Isotype control. 1: Jurkat; 4: K562/A02; 7: K562. (Middle) Cells incubated with parent diabody. 2: Jurkat; 5: K562/A02; 8: K562. (Right) Cells incubated with dsCD3-diabody. 3: Jurkat; 6: K562/A02; 9: K562.

率为 96.01%，改造前 diabody 与 HIT3a 混合后竞争结合 Jurkat 细胞的阳性率为 52.56%，dsCD3-diabody 与 HIT3a 混合后竞争结合 Jurkat 细胞的阳性率为 47.67% (图 3)。

2.5 ds-diabody 的稳定性

将改造前后的 2 种 diabody 分别于 37°C 含 0.2% HSA 的 PBS 中孵育，取不同时间点检测孵育后抗体对 K562/A02 细胞的结合活性。改造前的 diabody 在 37°C 含 0.2% HSA 的 PBS 中孵育 1 h 后活性开始下降，4 h 后活性仅剩约 1/2，24 h 后则活性完全丧失。而 dsCD3-diabody 在 37°C 含 0.2% HSA 的 PBS 中孵育 72 h 后细胞杀伤活性无明显下降 (图 4)。

3 讨论

抗体的稳定性是影响其临床疗效的一个重要因素。Diabody 虽然分子量小，仅 55~60 kD，肿瘤穿透力强^[13]，但是它与单链抗体 (Single chain Fv, ScFv) 一样，其 2 条肽链是通过非共价键配对形成，容易解离失去活性，稳定性较差，有必要被进一步改造，增强其稳定性。大量实验证实，在 V_L 和 V_H 适当位置引入二硫键，使两者通过共价键结合，可以大大增强 diabody 和 ScFv 的稳定性^[12,14,15]，有的 ScFv 在 37°C 人血清中孵育 2 周后仍保留 80%~90% 的生物学活性^[16]。而且二硫键的引入对抗体的亲和力没有影

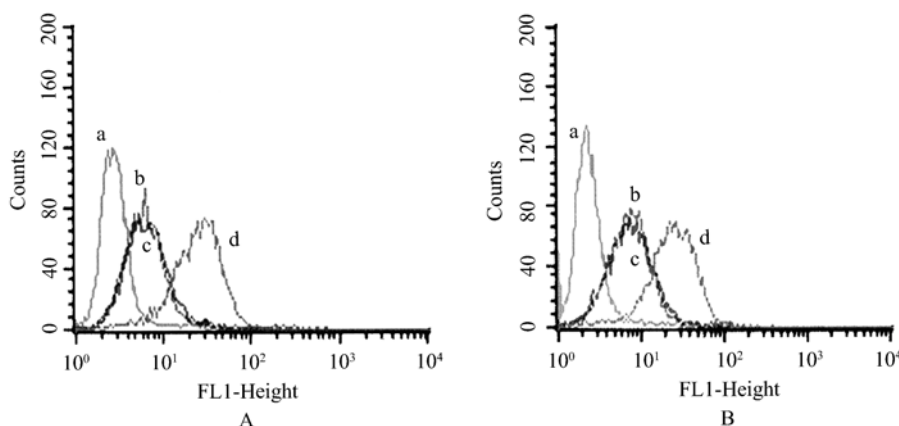


图 3 FCM 分析 dsCD3-diabody 与 CD3 和 Pgp 竞争结合活性

Fig. 3 Analysis of competitive binding activity of dsCD3-diabody against CD3 or Pgp by FCM. (A) Competitive binding activity against CD3 antigen. a: incubated with PHMA02; b: incubated with HIT3a and parent diabody; c: incubated with HIT3a and dsCD3-diabody; d: incubated with HIT3a. (B) Competitive binding activity against Pgp antigen. a: incubated with HIT3a; b: incubated with PHMA02 and parent diabody; c: incubated with PHMA02 and dsCD3-diabody; d: incubated with PHMA02.

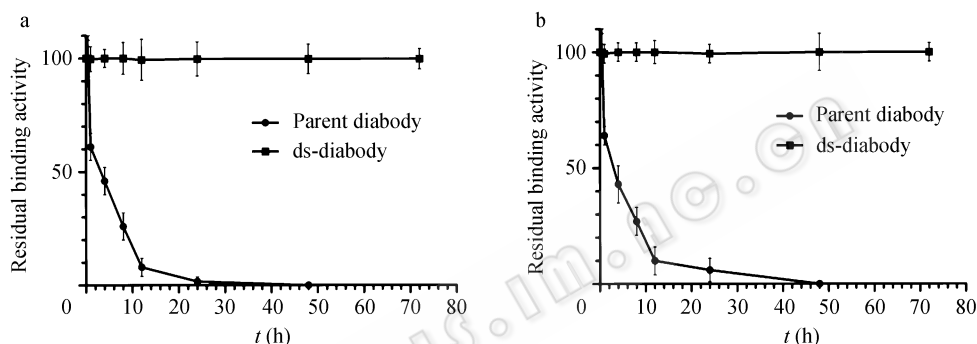


图 4 dsCD3-diabody 与改造前 diabody 稳定性比较

Fig. 4 Serum stability of the dsCD3-diabody in comparison with the parent diabody. (a) Stability of the anti-Pgp-scFv component in the dsCD3-diabody and the parent diabody. (b) Stability of the anti-CD3-scFv component in the dsCD3-diabody and the parent diabody.

响,甚至亲和力可以得到明显提高^[15],当然也有引入二硫键后抗体亲和力降低的情况,如 B3(dsFv)-PE38 亲和力较改造前下降约 20 倍,但是其稳定性的大大提高弥补了这一损失,使得该抗体在体内外对肿瘤细胞的杀伤作用并未受到影响^[17]。

二硫键引入位点的选择主要遵循以下原则:位于 V_L 和 V_H 保守的骨架区、 V_L 和 V_H 突变位点之间的距离要足够近,以利于二硫键形成,避免张力产生以及突变位点和 CDR 区必须保持一定的距离,以免影响抗原结合; V_L -100、 V_H -44 就是符合上述原则的突变位点^[12]。本研究选择 V_L -100、 V_H -44 作为二硫键引入位点。

本实验向抗 CD3/抗 Pgp diabody 抗 CD3 或抗 Pgp 的 V_L -100 和 V_H -44 位点分别引入二硫键,结果 dsPgp-diabody 二硫键不能形成,而 dsCD3-diabody 二硫键能够正确配对。dsPgp-diabody 失败的原因可

能是半胱氨酸引入位点不符合前述原则。不同的抗体之间存在一定的结构差异性,因此,在引入二硫键时,最好能够对目的抗体进行计算机结构模拟后,根据具体结构来确定位点,增加成功的几率。dsCD3-diabody 在细菌周质腔中可以正确配对形成二硫键,以可溶性形式分泌表达。能特异性结合 CD3 和 Pgp 抗原,抗原结合与竞争结合能力没有下降,而稳定性大大提高了。体内实验证实,与改造前 diabody 相比,dsCD3-diabody 对耐药实体瘤具有更好的抑制作用,并且使用剂量可以减半;小动物活体成像证实 dsCD3-diabody 在肿瘤部位停留时间明显延长(另文发表)。

本实验成功地向抗 CD3/抗 Pgp diabody 抗 CD3 的可变区引入了二硫键,在不影响其活性的前提下改善了抗体稳定性,为进一步走向临床应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": Small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(14): 6444-6448.
- [2] Perisic O, Webb PA, Holliger P, *et al.* Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment. *Structure*, 1994, **2**(12): 1217-1226.
- [3] Zhu Z, Zapata G, Shalaby R, *et al.* High level secretion of a humanized bispecific diabody from *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)*, 1996, **14**(2): 192-196.
- [4] Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Schuhmacher J, *et al.* Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *J Mol Biol*, 1999, **293**(1): 41-56.
- [5] Fitzgerald K, Holliger P, Winter G. Improved tumour targeting by disulphide stabilized diabodies expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng*, 1997, **10**(10): 1221-1225.
- [6] Reiter Y, Brinkmann U, Jung SH, *et al.* Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Biol Chem*, 1994, **269**(28): 18327-18331.
- [7] Gao Y, Xiong D, Yang M, *et al.* Efficient inhibition of multidrug-resistant human tumors with a recombinant bispecific anti-P-glycoprotein x anti-CD3 diabody. *Leukemia*, 2004, **18**(3): 513-520.
- [8] Gao YD, Xiong DS, Xu YF, *et al.* Construction and expression of anti-CD3/anti-Pgp diabody. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(4): 444-449.
高瀛岱, 熊冬生, 许元富, 等. 抗 CD3/抗 Pgp 微型双功能抗体的构建和表达. *生物工程学报*, 2003, **19**(4): 444-449.
- [9] Yang CZ, Luan FJ, Xiong DS, *et al.* Multidrug resistance in leukemic cell line K562/A02 induced by doxorubicin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1995, **16**(4): 333-337.
杨纯正, 栾凤君, 熊冬生, 等. 阿霉素诱导的人白血病细胞系 K562/A02 多药抗药性. *中国药理学报*, 1995, **16**(4): 333-337.
- [10] Xiong DS, Yang CZ. Generation and characterization of monoclonal antibodies against P-glycoprotein (Pgp). *Clin J Hematol*, 1999, **20**(6): 326-327.
熊冬生, 杨纯正. 抗 P-gp 单克隆抗体的制备和鉴定. *中华血液学杂志*, 1999, **20**(6): 326-327.
- [11] Shao XF, Xiong DS, Gao YD, *et al.* Production of monoclonal antibody against anti-CD3 scFv. *Chin J Immunol*, 2007, **23**(2): 142-145.
邵晓枫, 熊冬生, 高瀛岱, 等. 抗抗 CD3 ScFv 单克隆抗体的制备及鉴定. *中国免疫学杂志*, 2007, **23**(2): 142-145.
- [12] Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH, *et al.* A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(16): 7538-7542.
- [13] Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, *et al.* Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*, 1992, **52**(12): 3402-3408.
- [14] Bera TK, Williams-Gould J, Beers R, *et al.* Bivalent disulfide-stabilized fragment variable immunotoxin directed against mesotheliomas and ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, 2001, **1**(2): 79-84.
- [15] Bera TK, Onda M, Brinkmann U, *et al.* A bivalent disulfide-stabilized Fv with improved antigen binding to erbB2. *J Mol Biol*, 1998, **281**(3): 475-483.
- [16] Benhar I, Reiter Y, Pai LH, *et al.* Administration of disulfide-stabilized Fv-immunotoxins B1(dsFv)-PE38 and B3(dsFv)-PE38 by continuous infusion increases their efficacy in curing large tumor xenografts in nude mice. *Int J Cancer*, 1995, **62**(3): 351-355.
- [17] Reiter Y, Pai LH, Brinkmann U, *et al.* Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of a recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Cancer Res*, 1994, **54**(10): 2714-2718.