

polymerase chain reaction or ligase chain reaction as the reaction vessels. The most attractive application is that the microchip immobilizing various oligonucleotide arrays can be used to detecting gene mutation. In addition, these compact arrays of probes may be used for ultra-

fast DNA sequencing. The fabrication, principle, characteristic and application of microchips were introduced.

Key words microchip, molecular diagnosis, sequencing by hybridization, mutation detection by hybridization

基因工程二硫键抗体*

毛春生 宋宏彬 王海涛

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 二硫键抗体(dsFv)的概念最早出现于1990年,它是将抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的各一个氨基酸残基突变为半胱氨酸,通过链间二硫键连接抗体可变区(Fv)的片段抗体.通用的突变位点是重链的44位和轻链的100位或重链的105位和轻链的43位.dsFv最显著的优点是生化性质稳定,能够耐受环境条件的剧烈作用,在血液中的半衰期长达14 d以上,符合临床给药要求.动物实验显示,dsFv毒素在不对动物造成毒副作用的情况下,可完全抑制肿瘤生长.

关键词 二硫键抗体, 基因工程, 分子设计

学科分类号 R392.11, Q78

二硫键抗体(disulfide-stabilized Fv, dsFv)是一类新型基因工程抗体,它是将抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的各一个氨基酸残基突变为半胱氨酸,通过链间二硫键连接V_H、V_L的可变区片段抗体.

二硫键抗体是在单链抗体基础上发展起来的.

1 单链抗体

单链抗体(single chain Fv, scFv)是由一条连接肽将抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)连接来形成的单链可变区片段抗体.该类基因工程抗体最早报道于1988年,迄今已构建了多种scFv.scFv具有与完整抗体或Fab相同的抗原结合特异性.连接肽的作用有两个,一是既使V_H、V_L连接起来,又保持一定的灵活性,二是增加片段抗体的稳定性^[1,2].特定scFv的稳定性仅与V_H和V_L的

性质,V_H、V_L间表面相互作用的强度有关.同完整的抗体相比,单链抗体具有以下优点:
a. 分子小,为完整单体免疫球蛋白分子的1/6,容易进入组织(包括肿瘤),因而可用于肿瘤的诊断和治疗;
b. 因其为单链,易于进行分子改造,如与毒素等拼接成为免疫毒素,可以直接杀伤靶细胞;
c. 可由大肠杆菌等发酵,进行大批量生产.

将scFv与毒素如绿脓杆菌外毒素A(PE40)等连接起来成为scFv-毒素,动物实验证明,scFv-毒素可以完全抑制肿瘤的生长,充分展示了scFv用于肿瘤治疗的可能性,对此,已有很多文献作了综述^[3~5].但是,scFv也有一些缺点,a. 稳定性仍然较低,这主要是由于scFv分子内V_H和V_L间相互作用力较弱,不足以抵消分子间的作用力,因而易凝集

* 国家863计划资助项目(Z18-01).

收稿日期:1997-09-04,修回日期:1998-01-12

形成 scFv 二聚体和多聚体^[6]. b. 虽然很多 scFv 具有较高的抗原结合活性, 但大多数与完整抗体或 Fab 段相比, 亲和力较低. 为了充分利用 scFv 的优点, 克服其缺点, 有必要改进连接 V_H、V_L 的方式. 这就出现了以二硫键代替连接肽的二硫键抗体.

2 二硫键的分子设计

早在 1990 年, Glockshuber 等^[7]研究比较 V_H、V_L 各种连接方式的优劣时, 即提出了用二硫键连接 V_H、V_L 的策略. 因为完整抗体的可变区间并不形成二硫键, 因此二硫键抗体分子设计要解决的首要问题就是确定二硫键的位置. Glockshuber 等^[7]根据磷酸胆碱结合抗体的三维结构信息, 运用计算机辅助设计, 选定 H108 (表示 108 位氨基酸, 余类推) ~ L55 和 H106~ L56 为靶位点, 将该位置的氨基酸突变为半胱氨酸. 结果表明, 他们构建的 dsFv 比相应的 scFv 稳定性大大提高, 而且, 虽然 L55 和 L56 均位于抗原决定簇互补区 (CDRs), 但突变对 dsFv 的抗原结合活性并没有影响.

Pastan 研究小组认为, 突变抗体 CDR 区的氨基酸, 很可能影响抗体的抗原结合活性, 而突变骨架区 (FRs) 的氨基酸则没有此顾虑. 因此, 他们先后选择 H101 ~ L46^[8,9], H101~ L55^[10], H44~ L101, H111~ L48^[6] 位点突变, 虽然所制备的 dsFv 均比 scFv 稳定, 但抗原结合活性有高有低, 如 B3 (dsFv) H44~ L101 的活性就比 B3 (dsFv) H111~ L48 高 2~ 3 倍. 直到 1994 年, Jung 等^[11]通过人工计算和比较, 结合分子模拟技术, 才选定 V_H 的 44 位 (位于 FR2 区) 和 V_L 的 100 位 (位于 FR4 区), 或 V_H 的 105 位 (位于 FR4 区) 和 V_L 的 43 位 (位于 FR2 区) 为突变位点. 实验结果证明, 在这些位置突变产生的 dsFv 不影响其抗原结合活性, 并且具有很高的稳定性^[11]. 为了证实该突变位点的可靠性, 他们还构建了一系列的 dsFv-毒素融合蛋白, 都取得了理想的结果^[9,10,12,13]. 根据 Kabat 的

资料, H105~ L43 和 H44~ L100 的氨基酸很保守, 因此 Pastan 等^[14]认为, 这两对位点是构建鼠源和人源 dsFv 的通用位点.

3 二硫键抗体的构建和表达

文献报道的 dsFv 都是在大肠杆菌中表达的, 其构建和表达过程为: a. 获取 V_H 和 V_L 基因, 文献报道的 dsFv 都来源于鼠源单克隆抗体, 其基因由相应的杂交瘤细胞 mRNA 反转录而来. 毫无疑问, 如欲构建人源 dsFv, 通过筛选噬菌体抗体库, 即可获得人源抗体的基因; b. 点突变产生 V_H-Cys 和 V_L-Cys 基因; c. 将 V_H-Cys 和 V_L-Cys 基因分别克隆于表达质粒; d. 诱导表达; e. 分别收获包涵体; f. 包涵体溶解和复性, 将 V_L-Cys 和 V_H-Cys 包涵体按等摩尔混合, 在还原型谷胱甘肽 (GSH) 溶液中溶解包涵体, 然后在氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 溶液中复性, V_H-Cys 和 V_L-Cys 可通过二硫键, 自动折叠为异源二聚体的二硫键抗体.

4 二硫键抗体的特性

二硫键抗体最有意义的生化特性是其稳定性和亲和力, 幸运的是, 已经制备的 dsFv 在这两方面的都令人满意, 而且有些 dsFv 的最终产量也较相应的 scFv 高.

4.1 稳定性

为了详细比较 scFv 和 dsFv 的稳定性, Reiter 等^[15~17]构建和制备了 dsFv-PE38 和 scFv-PE38, 二者在不同环境条件下的稳定性见表 1.

环境条件	稳定性	
	dsFv-PE38	dsFv-PE38
PBS(pH 7.2, 37℃)	1 h	> 7 d
血清 (37℃)	2 h	> 14 d
尿素 (10℃, 3 h)	< 0.5 mol/L	> 7 mol/L
温度 (3 h)	37.5~ 38℃	42.5℃

可见, 在多种条件下, dsfv 均比 scFv 稳定. 在 37℃, 血清中 dsFv-PE38 经 14 d, 仍保持 90% 以上的活性, 这一点对 dsFv 的临床应用很有价值. dsFv 能耐受高达 7 mol/L 尿素的作用, 显然有利于下游工作中包涵体的溶解和蛋白质复性.

其他学者也报道, 他们各自构建的 dsFv 也很稳定^[7~10]. 最近, Brinkmann 等^[18]又比较了抗 CD25 分子的 dsFv 和 scFv 噬菌体抗体的稳定性, 结果发现, 与可溶性形式一样, 噬菌体表面呈现的 scFv 在 20℃ 或 37℃ 经 4 h, 活性很快下降达 50%, 在随后的 20~ 30 h 内, 活性又进一步下降 30%~ 40%, 而 dsFv 在同样条件下活性降低很少一点. 究其原因, Reiter 等^[14]认为, 因为引入了链间二硫键, 使

V_L 和 V_H 的联系更加紧密, 从而大大降低了自凝集能力, 使 dsFv 稳定性得以提高. 由于 dsFv 对热、尿素等的稳定性强, 并且不易自身凝集, 所以表达形成的包涵体, 在溶解、复性等处理过程中损失较少, 因此其最终产率高于相应的 scFv. Reiter 等^[15]的实验也证实了这一点, 他们表达 dsFv-毒素的包涵体产量为 350 mg/L 左右, 并不比 scFv 高, 但用 Mono Q 柱或 Sepharose 柱纯化, dsFv-毒素的最终产率均约为 scFv-毒素的 3 倍.

4.2 亲和力

亲和力代表了抗体和抗原结合的牢固程度, 是评价任何一类抗体活性的主要指标. 学者们在研制出 dsFv 后, 都没有忘记测定其亲和力, 表 2 是文献报道的各种 dsFv 的亲和力.

表 2 dsFv 的亲合常数

抗 体	特异性	结 构	亲和常数 (nmol•L ⁻¹)	文 献
B3	lewis ^Y	IgG	200	[14, 16]
		Fab	1400	
		scFv-PE38	1300	
		dsFv-PE38	24000	
B1	lewis ^Y	IgG	100~ 200	[12, 19]
		scFv-PE38	1000	
		dsFv-PE38	4000	
Anti-Tac	IL2 受体 IgG	1. 2	18	
		scFv-PE38K	1. 4	
		dsFv-PE38K	1. 1	
e23	elbB2	IgG	3	[17, 20]
		Fab	8	
		scFv-PE38K	40	
		dsFv-PE38k	10	
55. 1	粘蛋白	IgG	3	[21]
		scFv-PE38	120	
		dsFv-PE38	80	
HB21	转铁蛋白受体	IgG	20~ 25	[14]
		scFv-PE38KDEL	20~ 25	
		dsFv-PE38KDEL	25~ 30	
Y10	突变型 EGFR	IgG	10	[22]
		scFv-PE38K	450	
		dsFv-PE38K	150	
RFB4	CD22	IgG	10	[20]
		scFv-PE38	90	
		dsFv-PE38	10	

注: lewis^Y elbB2 为肿瘤抗原

表 2 列出的数据指出, 虽然 dsFv 的亲合力也低于亲本 IgG 以及 Fab, 但一半以上 dsFv 的亲合力高于 scFv, 最高可达 9 倍 (表 2 的 FRB4 组), 有些与相应的 scFv 差不多, 个别比相应 scFv 低, 但低得并不多. 总的说来, dsFv 的亲合力还是令人满意的.

5 二硫键抗体在肿瘤治疗中的应用前景

从理论上讲, 二硫键抗体比单链抗体的分子更小 (少 15 个氨基酸残基), 因而更容易进入实体组织, 因此可用于肿瘤等的诊断和治疗. 不过如果用于放射免疫显像诊断肿瘤, 由于 dsFv 在体内的半衰期长, 就需要考虑安全性问题, 这一点反而不及 scFv. dsFv 用于治疗肿瘤, 已经取得了很好的实验效果. 目前报道的 dsFv 都有活性, 它们与 PE40 等连接制备的免疫毒素, 有的活性高于相应的 scFv, 如 e23 (dsFv) -PE38KDEL 的活性就比相应的 scFv 高得多, 在不同的细胞系上, 其活性可比相应的 scFv 高 4~10 倍^[15, 23]. 动物实验中, 该 dsFv-毒素在不对小鼠产生任何毒性作用的剂量时, 即可完全抵制移植肿瘤的生长, 而同样剂量的 scFv-毒素则不能完全抑制肿瘤的生长.

有些 dsFv 的亲合力虽然没有提高, 甚至还比相应 scFv 有所降低, 但由于其性质稳定, 其抗肿瘤活性仍比后者高. 55.1 (dsFv) -PE38^[21] 和 B1 (dsFv) -PE38^[12, 19] 就是很好的例子. 其实, B1 (dsFv) -PE38 的亲合力比 B1 (scFv) 还低 4 倍 (表 2), 但前者的抗肿瘤活性却高于后者. B3 (dsFv) -PE38 的亲合力比 B3 (scFv) -PE38 低 20 倍, 但体内外实验都说明, 二者的抗肿瘤活性却没有差别, 从以上例子可见, dsFv 稳定性的提高可补偿因亲和力的下降而引起的活性下降.

6 小 结

dsFv 具有 scFv 的优点, 同时比较稳定, 在血液中的半衰期可达 14 d 以上, 符合临床的用药要求, 动物实验结果也显示, dsFv-毒

素在不对动物造成毒副作用的情况下, 可完全抑制肿瘤的生长, 说明 dsFv 用于肿瘤治疗的前景十分光明.

参 考 文 献

- Huston J S, Muagett-Huntar M, Tai M S, *et al.* Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol*, 1991, **203**: 46~88
- Whitlow M, Fipula D. Single chain Fv proteins and their fusion proteins. *Methods: A Companion to Methods Enzymol*, 1991, **2** (1): 97~105
- Frankel A E. Immunotoxin therapy of cancer. *Oncology*, 1993, **7** (5): 69~86
- Pastan I, Chaudhary V, FitzGerald D J. Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem*, 1992, **61**: 331~354
- Barbas C S. Synthetic human antibodies. *Nature Medicine*, 1995, **1** (8): 837~839
- Reiter Y, Brinkmann U, Webber K, *et al.* Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide stabilized Fv. *Protein Eng*, 1994, **7** (15): 697~704
- Glockshuber R, Malia M, Pfftzinger I, *et al.* A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, 1990, **29** (6): 1362~1367
- Carter P, Presta L, Goman C M, *et al.* Humanization of an anti-p185Her2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (10): 4285~4289
- Rodrigues M L, Presta L G, Kotts C E, *et al.* Development of a humanized disulfide-stabilized anti-p185HER2 Fv-beta-lactamase fusion protein for activation of a cephalosporin doxorubicin prodrug. *Cancer Res*, 1995, **55** (1): 63~70
- Young N M, Mackenzie C R, Narang S A, *et al.* Thermal stabilization of a single-chain Fv antibody fragment by introduction of a disulfide bond. *FEBS Lett*, 1995, **377** (2): 135~139
- Jung S-H, Pastan I, Lee B K. Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv of the monoclonal antibody B3. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 1994, **19** (1): 35~47
- Benhar I, Pastan I. Characterization of B1 (Fv) -PE38 and B1 (dsFv) -PE38: single chain and disulfide Fv-immunotoxins with increased activity which cause complete remissions of established human carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res*, 1995, **53** (3): 334~339
- Brinkmann U, Pastan I. Recombinant immunotoxins: therapeutic agents for cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, **758**: 345~354
- Reiter Y, Brinkmann U, Lee B K, *et al.* Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: Disulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotechnology*, 1996, **14** (10): 1239~1245
- Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman A J, *et al.* Stabilization

- of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry*, 1994, **33** (18): 5451~ 5459
- 16 Reiter Y, Pail H, 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
- 17 Reiter Y, Kuruca I, Brinkmann U, *et al.* Construction of disulfide stabilized TCR Fv indicates mature antibody and TCR Fv frameworks are very similar in structure. *Immunity*, 1995, **2** (3): 281~ 287
- 18 Brinkmann U, Chowdhury P S, Roscoe R, *et al.* Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. *J Immunol Method*, 1995, **182** (1): 41~ 50
- 19 Bannar I, Pastan I. Cloning expression and characterization of the Fv fragments of the anticarbohydrate monoclonal antibodies B1 and B5 as single-chain immunotoxins. *Protein Eng*, 1995, **7** (12): 1509~ 1515
- 20 Batra J K, Kasprzyk P G, Bird R, *et al.* Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (13): 5887~ 5871
- 21 Reiter Y, Wnght A F, Tomge D W, *et al.* Recombinant single chain and disulfide-stabilized Fv immunotoxins that cause complete regression of human colon cancer xenograft in nude mice. *Int J Cancer*, 1995, **67** (1): 113~ 123
- 22 Batra J K, FitzGerald D J, Chaudhary V K, *et al.* Single chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing *Pseudomonas* exotoxin A of diphtheria

toxin: anti-TFR (Fv) -PE40 and DT388-anti-TFR (Fv). *Mol Cell Biol*, 1991, **11** (4): 2200~ 2205

- 23 Reiter Y, Brinkmann U, Jung S H, *et al.* Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Mol Chem*, 1994, **269** (28): 18327~ 18331

Disulfide-stabilized Fv Fragments (dsFv): a New Type of Engineering Antibody Fragments.

MAO Chun-Sheng, SONG Hong-Bin, WANG Hai-Tao (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*).

Abstract Disulfide-stabilized Fv (dsFv) fragments are new type of engineering antibody, in which variable regions of heavy chain (V_H) and light chain (V_L) are stabilized by an interchain disulfide bond. dsFv is more stable, an important biochemical feature for the preparation and handling of these proteins in clinical setting.

Key words disulfide-stabilized Fv fragment, engineering, molecular design

中国生物化学与分子生物学会通知

“生物化学、生物物理和分子生物学杰出研究奖”实行以来，已评出三篇优秀论文，对鼓励我国生物化学、生物物理和分子生物学领域内优秀论文在国际上高档刊物发表起了一定的作用。为了使更多有优秀论文参与评奖，不会使得有些非常优秀的论文因为发表时间或其他原因失去参与评奖的机会，现将“生物化学、生物物理和分子生物学杰出研究奖”的评奖办法作如下变更：

- 1 设奖名称改为“生物化学、生物物理和分子生物学杰出论文奖”。
- 2 “根据前一年发表的论文”改为“根据前三年发表的论文”，但已获奖的论文不得再次申请。
- 3 本变更从1998年度开始实施。(1998年度将接受1996、1997、1998年在国际高档刊物上发表的论文)。

中国生物化学与分子生物学会
1998年3月21日