

基因工程抗体

沈 波

(江苏省原子医学研究所,无锡 214063)

提 要

通过基因工程可以大规模地制备能与人相容的单克隆抗体或其片段,用于诊断、治疗以及抗体结构与功能的研究。基因工程抗体的制备过程是通过 PCR 技术获得抗体或其片段的基因,再与适当的载体重组后引入不同的宿主系统,如哺乳动物细胞、昆虫细胞、大肠杆菌和植物中进行表达、装配。较详细地介绍了基因工程抗体的背景、现状和进展。

关键词 基因工程,抗体,嵌合抗体,拟人抗体, F_v 片段

自从 1975 年单克隆抗体(McAb)问世^[1]以来, McAb 在实验室和临床诊断中的应用越来越广泛,但用作临床诊断和疾病治疗方面尚未产生象原来设想的巨大影响。例如 McAb 尚未常规地用于肿瘤的显像和治疗,尚未用于抗感染的被动免疫作用和器官移植后的免疫抑制。目前已批准作为药物上市的 McAb 仅有两种^[2]; OKT₃——抗 T 淋巴细胞抗原(CD₃)的鼠 McAb 和抗地高辛 McAb。造成这些问题的原因有多种,从抗体角度考虑,主要是: a. 目前制备的 McAb 大多是鼠 McAb,而人类对外源(鼠)抗体会产生免疫应答反应; b. 抗体和靶抗原之间的物理接触很困难; c. 在肿瘤发育中或由于突变而常常发生抗原结构的变化; d. 用于免疫治疗的抗体亲和力较低,体内半衰期较短; e. 难以产生足量的治疗用的抗体。用人源 McAb 取代鼠源 McAb 能解决异源抗体的免疫应答,但是人源 McAb 的制备较困难,目前尚未有突破性进展。

1983 年 Oi 等^[3]报道了淋巴细胞能表达克隆的、转导的免疫球蛋白(Ig)基因,这为通过基因工程来克隆和表达编码抗体的基因产生新的抗体分子提供了可能。已知抗体是由两条重链

(H)和两条轻链(L)通过二硫键连接起来的,每一条 H 和 L 链均由可变区(V)和恒定区(C)组成,C 区是种属特异性的,最具免疫原性。通过基因工程技术将人的 C 区连接到鼠的 V 区上而建成的基因工程抗体,称为嵌合抗体(chimeric antibody)^[4]。由于抗体的抗原结合位点位于 V 区内,因此嵌合抗体仍然保留了结合抗原的能力。基因工程抗体的产生不仅在一定程度上解决了异源抗体的问题,而且还可通过增删氨基酸来改善抗体在体内的半衰期,可以进行同型物转换,使抗体的亲和力提高,改变效应子的功能如 Fc 受体的结合或补体的激活。通过基因融合还可产生双特异性抗体^[5],产生既能结合抗原而又具有其它额外能力的分子,如 Neuberger 等^[6]将核酸酶基因插入到小鼠抗体 γ_2 链的 C_{H2} 处,产生了既能结合抗原、又有酶活性的嵌合抗体。

抗体基因工程的关键是克隆可变区(V)基因。利用聚合酶链反应(PCR)技术可以直接从杂交瘤^[7,8]、不稳定杂交瘤融合体(例如人-鼠杂交瘤)、单个杂交瘤细胞^[9,10]甚至单个人或鼠 B

淋巴细胞^[8,11]中获得V区基因。与抗体基因5'先导序列和3'恒定区特异结合的寡核苷酸、通用引物,可以从非常少量的细胞中扩增任何Ig的V区基因,这些片段可以直接进行序列分析和/或连接到表达载体上。Pastan等^[12]用这一方法成功地在大肠杆菌中表达了一个含抗体V区和绿脓杆菌外毒素片段的单链免疫毒素。

一旦分离到所要的V区基因,就可克隆到适宜于表达的载体中。若目的是为了改善抗体的免疫相容性,则要求表达载体中具有人的C区基因。目前已构建了含有不同的人类C区的表达载体^[13],也已有了在细菌^[4,15]、酵母^[16]、植物^[17]和哺乳动物细胞^[18]中表达的载体。

1 基因工程抗体在哺乳动物细胞中的表达

鼠骨髓瘤细胞是最常用的表达宿主,它们由于突变已失去了产生内源性抗体的能力。用于骨髓瘤细胞的载体常常分别含有H和L链基因,它们可共同转染宿主。表达载体除了含有鼠的V区和人的C区外,还含有细菌的复制起点以及用于鉴定细胞是否摄取和表达的药物选择性标志。Ig基因通常由本身的启动子和增强子控制。

当抗体基因按要求重组到表达载体上后,就可通过电穿孔或原生质体融合转染进入骨髓瘤细胞。虽然含有H和L链的载体是分别选择的,但有趣的是常常发生共转染,这样就只需选择一种药物即可。转染频率大约为千分之一。抗药性克隆可以在培养基上生长,通过ELISA检测抗体的分泌,鉴定高产率的细胞系,通过组织培养或接种小鼠从腹水中收集抗体。在组织培养基中主要的污染物是血清中存在着牛抗体,通过蛋白A-Sepharose柱可以容易地将人/鼠嵌合抗体和牛抗体区别开来^[19]。在腹水中主要的污染物是鼠抗体,这可以依次通过蛋白A-Sepharose和Sepharose-抗鼠IgG柱有效地除去^[19]。这两个方法可适用于任何人/鼠嵌合抗体而不必考虑其抗原特异性。

用于免疫治疗的抗体均需通过临床试验,

由于这些试验的工作量和代价较大,因此通过各种抗体分析或动物实验来筛选所产生的抗体就显得非常重要,分析的内容则取决于抗体的特殊性。例如抗体B6.2是对人乳腺癌、结肠癌和肺癌特异的抗体^[20],比较鼠V/人C嵌合抗体的B6.2和鼠杂交瘤的B6.2的生化、生物学和免疫学性质,发现这两种抗体均可结合同样类型的细胞,更为重要的是用细胞分类器或体内标记抗体进行的研究证实,嵌合的和鼠的B6.2竞争结合抗原的能力相等。这一重要结果暗示人和鼠的V区的交换几乎不影响抗体结合抗原的能力。目前这种嵌合的B6.2已成功地用于接种了人类肿瘤的小鼠的免疫显像^[13]。

基因工程抗体用于临床的一个重要问题是大量生产的能力。由于许多免疫治疗剂要以相当大的剂量反复给药,因此这一问题显得很重要,遗憾的是转染真核宿主如骨髓瘤细胞的工程抗体的表达效率常常不高,大部分“转染瘤”中每 10^6 个细胞仅产生2-10pg抗体,只有最好的鼠杂交瘤生产水平的1%-10%。其原因可能是转染基因随机整合到宿主染色体上不宜表达的位点上。Dorai等^[21]通过将转染基因连接到能在不同药物浓度下缓慢扩增的基因上,使得抗体的表达水平提高。在药物作用下随着可扩增基因的拷贝数的增加,偶联的抗体基因的拷贝数也在增加,从而提高了基因表达的水平 and 抗体分泌的水平。常用的基因是二氢叶酸还原酶基因,可以在氨甲喋呤的作用下扩增。已经构建了具有这一基因的载体,可用于提高转染的Ig基因的表达水平。这种载体也正用于在骨髓瘤细胞中表达非免疫球蛋白的基因^[22]。

基因工程抗体的主要目标是产生免疫相容性的治疗抗体,但嵌合抗体含有鼠的V区,因而仍然有可能引起宿主的免疫应答。现已知道有时候决定大部分抗原特异性的位点位于V区的某一部分,这一部分称为超变区或互补决定区(CDRs)^[23]。在空间结构上,CDRs从V区向外成环突出^[11],构成结合抗原的位点。序列分析表明CDRs的序列变异远比V区上其它部分大得多,因此用鼠的CDRs来代替人的CDRs

应该是可行的,能够保持亲代鼠抗体的抗原特异性而又消除了宿主对V区的免疫应答。由于CDRs的变异很大,甚至在同一种属内也有很大变化,因此通过CDRs取代可以大大减少甚至消除宿主的免疫应答。通过全基因的人工合成可以获得用鼠CDRs取代的人的V区基因,这样表达的抗体比嵌合抗体更接近人,故称为“拟人抗体”(humanized antibody)^[24]。

2 基因工程抗体在大肠杆菌中的表达

大肠杆菌作为基因工程抗体表达的宿主^[25]的优点是大肠杆菌易于操作,转化和转导频率高,可进行随机诱变和构建文库;大肠杆菌生长迅速,易于发酵,因此可以快速大量地生产抗体蛋白;而利用大肠杆菌的代谢特点可以容易地将同位素标记到抗体上,并且还可设计代谢筛选方案来筛选结合的或催化的抗体。

利用大肠杆菌可以建立抗体基因文库。PCR技术的问世提供了一种快速扩增和克隆抗体基因家族的方法,因为这些基因在可变区、骨架区和恒定区的5'和3'端均具有保守序列,可用于设计寡核苷酸引物。构建文库的载体是 λ 噬菌体,从免疫的动物中提取抗体H和L链的mRNA,分别经PCR扩增,再将扩增产物重组至 λ 噬菌体中。虽然噬菌体可能不是好的表达载体,但可以通过标记抗原的“反向”免疫筛选选择有结合能力的抗体。

建立抗体基因文库的真正难题是筛选。虽然常规的筛选技术对于较小的文库(例如从免疫动物的高度富集的mRNA建立的文库)是有用的,但是要在所有设计的抗体(即非免疫动物)中筛选出具有高度亲和力和狭隘专一性的能结合抗原的抗体实际上难以做到。表达抗体的滴度越高,所需抗体的基因文库就越大,而筛选的工作量也越大^[21]。因此用大肠杆菌来取代McAb技术可能主要取决于发展筛选和富集狭隘专一性的系统。最近报道了^[26]将抗体片段在噬菌体的表面表达,从而可通过抗原的结合作用来直接选择携带V区基因的噬菌体。作者证实在fd噬菌体表面可表达完整抗体V区,这

种噬菌体可与抗原特异性结合,经亲和层析得到富集。

目前主要是利用大肠杆菌系统来表达抗体片段如Fv片段。抗体的完整分子量约150kD,而保留了抗原结合能力的抗体片段的分子量仅12—50kD,这些小片段用放射性同位素标记后特别适用于肿瘤的显像和治疗,因为它们能更有效地穿透致密的肿瘤屏障,在组织和血液中的清除率更快,有效地提高了信噪比。Fv片段是具有完全的抗原结合位点的可以克隆表达的最小片段,用蛋白水解酶来制备Fv片段几乎是不可能的,因此在用基因工程技术制备Fv片段前对它的性质几乎没有了解。通过将构建成Fv片段的H和L链基因片段重组、克隆和在大肠杆菌中表达并装配,可以获得Fv片段^[25]。但是Fv片段具有一种在稀释时解离成V_H和V_L的趋势,其解离平衡常数随着抗体的不同而变化,例如对于抗磷酸胆碱酯酶抗体McPC603的Fv片段的解离常数大约是 10^{-6} mol/L。虽然某些Fv片段要比其它Fv片段的解离倾向要小^[23],但也已建立了几种方法来克服这种解离。首先,这两条链可以通过戊二醛共价交联起来,用该法来处理McPC603时没有丢失任何结合亲和力。其次,可以形成分子间的二硫键。已经发现在氧化大肠杆菌胞外质时生成正常二硫键的同时也生成了额外的二硫键,因此可以在大肠杆菌表达的有功能的产物中获得这种分子,其抗原结合力几乎不受影响。第三,这两种片段可以通过连接肽来连接,作为不溶性内含物以前曾获得了这种单链Fv片段,其结合亲和力也基本不变。与正常的Fv片段相比,以单链形态分泌的Fv片段的产率并无明显改变,因此在大肠杆菌中V_H和V_L的结合可能不是一个动力学难题,这两个结构域的连接是可以任意选择的,而不是必需的,尚不清楚连接是否抑制在McPC603中没有的其它抗原结合位点。

3 基因工程抗体在植物中的表达

毫无疑问应用异种系统来表达哺乳动物抗

体将大大提高人们分离处理抗体的能力。最新的用于表达抗体的异种宿主系统就是植物^[27]。产生转基因植物的技术已相当完善,能将外源蛋白导向到所选择的器官或亚细胞分室。通过植物产生抗体,为植物生物学的基础研究以及应用于治疗、诊断和亲和结合的抗体的大规模生产提供了广泛的可能性。

在植物中表达抗体的载体是一种土壤杆菌,它在转化许多类型的植物细胞方面很有用。将编码H和L链的cDNA插入到载体中,这种重组的土壤杆菌可以转化烟草的叶片细胞,并整合到烟草细胞基因组中,转化的烟草细胞可再生出分别表达H和L链的植株,这些植株再通过性交联产生能表达具有功能的抗体。虽然抗体表达的水平变化很大,但通常大于组成具有功能的抗体的总蛋白的1%。有理由相信这种表达水平可通过提高转录水平的启动子元件来提高。这种表达的抗体很容易从叶的匀浆液中用亲和分离法一步纯化。由于植物不含有唾液酸转移酶活性,因此H链上的末端碳水化合物残基与哺乳动物的H链不同,可能是由木糖、岩藻糖和(或)N-乙酰葡萄糖胺组成。因此尚需评价植物来源的抗体对动物体的免疫原性,另外碳水化合物组成的变异对抗体的生物分布和血液清除率的影响程度尚需进一步研究。

虽然烟草已作为主要研究工具用于植物产生抗体的研究,但还有许多适合抗体生产的植物,许多常见的农作物如苜蓿、大豆、番茄和土豆就可作为生产的宿主,可以通过无性繁殖或从种子繁殖获得大面积的多年生饲料作物,在一个生长季节里收获多次。农业规模生产抗体的成本可能要大大低于从杂交瘤细胞或腹水生产的成本,例如如果抗体在大豆中表达,占大豆总蛋白的1%,那么理论上每生产1kg抗体的成本不足100美元。这一推断是基于目前大豆生产的成本而没有考虑许多潜在成本,比如建立和繁殖一个足够大的经过遗传鉴定的种子库的成本。此外抗体在特化器官如种子或果实中产生的效率尚属未知。

4. 基因工程抗体在昆虫细胞中的表达

最近,Hasemann等^[26]用杆状病毒表达系统成功地在昆虫细胞中表达了完整的抗体分子。他们通过两种途径进行表达均获成功。一种途径是用两种重组病毒感染昆虫细胞,两种病毒分别含有免疫球蛋白的H和L链基因;另一种是用同时含有H和L链基因的同种重组病毒感染昆虫细胞,从每毫升单层细胞培养液中可纯化得到5 μ g的纯抗体。由于这一表达系统表达的重组蛋白最高可达细胞总蛋白的50—75%,因此他们认为可望获得大大高于杂交瘤细胞的表达量。

抗体的免疫原性和大规模生产是目前抗体基因工程要解决的首要问题。目前已建立了多种方法来改善异源抗体的免疫原性,如嵌合抗体、拟人抗体和Fv片段等。用于诊断、治疗和结构与功能的基础研究均需大量的抗体。基因工程抗体在不同宿主系统中的表达各具优点,但要获得最大生产规模、最经济便宜而又符合临床要求的表达系统,尚需作大量深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Kohler G, Milstein C. *Nature*, 1975; 256: 495
- 2 Larrick J W *et al.* *Pharmacological Reviews*, 1989; 41: 539
- 3 Oi T V, Morrison S L, Herzenberg L A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 825
- 4 Morrison S L, Herzenberg L A *et al.* *Adv Immunol*, 1989; 44: 65
- 5 Reading C L. In: Tom B H *et al.* eds, *Proceeding of a National Symposium*, New York: Plenum Press, 1981: 235
- 6 Neuberger M S, Williams G T, Fox R O. *Nature*, 1985; 314: 268
- 7 Orlandi R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 3833
- 8 McCafferty J, Griffiths A D, Winter G *et al.* *Nature*, 1990; 348: 552
- 9 Larrick J W *et al.* *Biotechnology*, 1989; 7: 934
- 10 Larrick J W *et al.* *ICSU Short Rep*, 1990; 10: 93
- 11 Winter G, Milstein C. *Nature*, 1991; 349: 293
- 12 Chanhary V K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 1066
- 13 Moore C P. *Clin Chem*, 1989; 35: 1849

- 14 Boss M A, Kenten J H, Wood C R *et al. Nucl Acids Res*, 1984; 12: 3791
- 15 Pluckthum A. *Nature*, 1990; 347: 497
- 16 Wood C R, Boss M A, Kenten J H *et al. Nature*, 1985; 314: 446
- 17 Hiatt A. *Nature*, 1990; 344: 469
- 18 Beidler C B, Ludwig T R, Cardenas H J *et al. J Immunol*, 1988; 141: 4053
- 19 Brown B A, Davis G L, Saltzgaber-Muller J *et al. Cancer Res*, 1987; 47: 3577
- 20 Sahagan B G, Dorai H, Saltzgaber-Muller J *et al. J Immunol*, 1986; 137: 1066
- 21 Dorai H, Moore G P. *J Immunol*, 1987; 139: 4232
- 22 Hendricks M B, Banker M J, McLaughlin H. *Gene*, 1988; 64: 43
- 23 Kabat E A, Wu T T. *Ann NY Acad Sci*, 1971; 190: 382
- 24 Riechman L, Clark M, Waldman H *et al. Nature*, 1988; 332: 323
- 25 Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I *et al. Biochemistry*, 1990; 29: 1362
- 26 Hasemann C A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 3942

钙调素依赖性蛋白激酶 II

张光毅 赵升皓

(徐州医学院细胞调控研究室, 徐州 221002)

提 要

钙调素依赖性蛋白激酶 II 是钙调素的重要靶酶之一。文章综述了此酶的研究进展, 重点介绍其结构与功能的关系以及在神经组织中的生理功能。

关键词 钙调素依赖性蛋白激酶 II, 亚基结构, 酶活性的调控, 生理功能

激素等胞外信号分子与膜受体的相互作用常导致胞内第二信使分子的升高。在胞内信使的信息传递过程中, 蛋白激酶起着至关重要的作用。70年代初钙调素 (calmodulin, CaM) 发现不久, 人们立刻认识到 Ca^{2+} 信使主要是通过激活钙调素来调节靶酶的。在这些靶酶中, 钙调素依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /CaM-dependent-protein kinase II, CaM-PKII) 在哺乳动物组织中的生理功能颇受关注。七十年代末该酶分别由几个实验室独立发现, 因其能催化突触蛋白 I (synapsin I) 位点 II 的磷酸化, 故称作 CaM-PKII; 许多酶或蛋白质可作为它的底物, 因此又称为多功能钙调素依赖性蛋白激酶。

1 分 布

在神经组织中 CaM-PKII 含量极为丰富, 约占其总蛋白的 0.4%^[1], 在哺乳动物脑组织的某些区域, 例如大鼠海马高达 2%^[2]。近几年对

大鼠脑 CaM-PKII 进行最为详尽的研究。在哺乳动物的其它组织中, 也存在 CaM-PKII 同工酶。目前, 已从哺乳动物脑、肝、骨骼肌、心肌、胎盘、肺、视网膜、乳腺、甲状旁腺和小肠刷状缘, 以及电鳗、乌贼和果蝇的神经组织中, 将该酶提纯。肽谱分析表明, 大鼠脑 CaM-PKII 与兔肝和兔骨骼肌既有同源性, 也有某些结构差异。大鼠的骨骼肌、小肠、肝、睾丸和垂体中的 mRNA, 与脑 cDNA 具有某种同源性, 但其基因表达水平却低于脑组织^[3]。

CaM-PKII 的亚细胞分布也因组织而异。在大鼠脑和睾丸中, 主要存在于颗粒部分, 而在肝、心和肾等组织中, 则主要存在于胞浆可溶部分。脑中 CaM-PKII, 由两类亚基, 即 α (50kD) 和 β (60kD) 或 β' (58kD) 组成。随脑组织的发育, 酶的分布和亚基组成发生变化^[3]: 大鼠