

- D. S., 1989, *Cancer Res.*, 49: 2525—2532.
- [31] Bonifer, C., Hecht, A., Saueressing, H., Winter, D. M., and Sippel, A. E., 1991, *J. Cellular Biochem.*, 47: 99—108.
- [32] Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C., and Kohwi-Shigematsu, T., 1992, *Science*, 255: 195—197.
- [33] Stief, A., Winter, D. M., Stratling, W. H. and Sippel, A. E., 1989, *Nature*, 341: 343—345.
- [34] Blasques, V. C., Xu, M., Moses, S. C. and Garrard, W. T., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 21183—21189.
- [35] Xu, M., Hammer, R. E., Blasquez, V. C., Jones, S. L., and Garrard, W. T., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 21190—21195.
- [36] Lichtenstein, A. V., Zaboikin, M. M., Osjakste, N. I., and Alechina, R. P., 1991, *J. Cell Sci.*, 99(3): 503—513.
- [37] Hakes, D. J., and Berezney, R., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266(17): 11131—11140.
- [38] Dickinson, L. A., Tadashi, J. H., Yoshinori, K., and Kohwi-Shigematsu, T., 1992, *Cell*, 70: 631—645.
- [39] Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U. K. and Weintraub, H., 1980, *Nucl. Acids Res.*, 8(1): 1—20.

## 基因工程抗体的获得

何明亮 李载平

(中国科学院上海生化所、中国科学院上海生命科学联合开放实验室 200031)

### 一、抗体结构和抗体基因

#### 1. 抗体结构

抗体分为五类,即 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE,其理化性质各不相同,在体内的比例、分布及代谢速率也很不一样。IgG 是最重要的血清免疫球蛋白,分为四种亚型; IgG 1 是主要的亚型(占 IgG 总量的 67%),其次是 IgG2、IgG3、IgG4。IgA 是主要的分泌型 Ig,分为 IgA1, IgA2 两个亚型。IgM 是一五聚体分子,由 10 条 H 链、10 条 L 链和一条 J 链通过二硫键连接而成。它是一个多价体。在 B 细胞膜上的 IgM 作为抗原受体与 B 细胞成熟、分化有关。

抗体均具 IgG 的基本四链结构: 两条相同的重链(H)和轻链(L),链间以二硫键相连(图 1)。分子头部的两个抗原结合片段(Fab)通过“绞链区”与抗体的效应物结合区 Fc 相连。

肽链的 N-端多变,分别称为 VH 和 VL,它们参与抗原的识别与结合。在 VH 和 VL 上各有

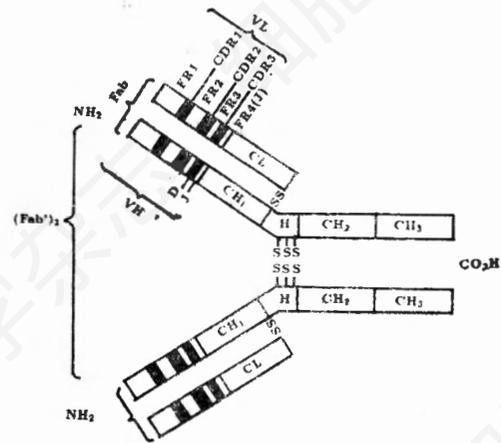


图 1 小鼠 IgG 分子基本结构

Ig 分子由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链组成,每条链由 N-端 V 区(VL 或 VH)和 C-端 C 区(CL 或 CH)组成, V 区氨基酸对抗原发生反应,集中体现于三个互补决定区 CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> 和 CDR<sub>3</sub>, V 区其余部分称为支架区: FR<sub>1</sub>, FR<sub>2</sub>, FR<sub>3</sub> 和 FR<sub>4</sub>, C 区有多种效应物功能。

三个高变区(HV)或称互补决定区(CDR)。在CDR侧翼是很少发生变化的支架区(FR)。支架区以 $\beta$ -折迭形成桶状的三明治结构支撑着6个CDR形成的 $\beta$ -环( $\beta$ -LOOP)。 $\beta$ -折迭片层通过二硫键与另一片层相连。因此CDR在序列和构象上发生很大变化也不会影响支架区的构象。在抗体的合成过程中,各个结构域独立折叠并行使生物学功能。

### 2. 抗体基因

抗体基因可变区和恒定区是分开的。小鼠 $\lambda$ 轻链由前导顺序(L)编码大约20个氨基酸的信号肽。 $V\lambda$ 编码1-7氨基酸;连接片段J编码可变区最后13个氨基酸, $C\lambda$ 编码恒定区。 $\kappa$ 轻链由几百个 $V\kappa$ 基因,5个 $J\kappa$ 和1个 $C\kappa$ 组成。重链基因也存在一个基因家族,由恒定区基因(每种免疫球蛋白和亚型都有一个,共8个),1个 $VH$ 基因家族,4个 $JH$ 片段和一个多样性片段(D片段,它为3-13氨基酸和CDR3大部分编码)组成。与 $CH$ 基因联结的是附带的外显子M,它与膜结合的免疫球蛋白的产生有关。 $CH$ 基因有一个终止密码子,结果产生分泌型的免疫球蛋白。如果这个密码子被拼接出,片段阅读便产生了膜结合的抗体。这些基因片段(V, D, J)是不连续的,在细胞分化和成熟过程中重组、易位、重排和突变。个体产生抗体的所有可变区基因在种——系中都能遗传, V 基因家族中高变区(CDR)比骨架区(FR)变化更多,在选择压力下将创造出更多的特性。新的V基因可以通过复制之后产生突变、转换和重组。从而形成抗体的多样性。

## 二、基因工程抗体的获得

人们按照标准程序生产了各种针对蛋白质、多糖、核酸和半抗原的具有单一抗原决定簇的单组分抗体。已广泛应用于免疫学、生物化学、临床诊断和某些特殊情况下的治疗。但是,杂交瘤技术生产单克隆抗体在制备和应用

上都有其本身无法克服的困难。鼠杂交瘤产生的单抗,由于其抗原性,在体内免疫治疗时会引起严重的免疫反应,而又很难或不可能生产人杂交瘤单抗用于体内的免疫治疗。

### 1. 抗体基因的获得

抗体(IgG)是Y型结构,其头部的臂与抗原结合。分子柄部与效应物接触以激发其清除抗原的功能。这样的分子结构,使有结合抗原功能的结构域Fv、Fab片段和效应功能的结构域Fc片段,可以作为片段分开使用,或者在抗体间进行交换<sup>[1]</sup>。V区折迭的支架结构支撑着结合抗原的 $\beta$ -环,可以使我们将抗体结合位点从一种抗体移到另一种抗体分子上。这些结构特征使人们设计出了一系列抗体:包括完整的抗体、通过效应机制破坏病原体和肿瘤细胞的抗体、抗原结合片段、抗原结合片段与

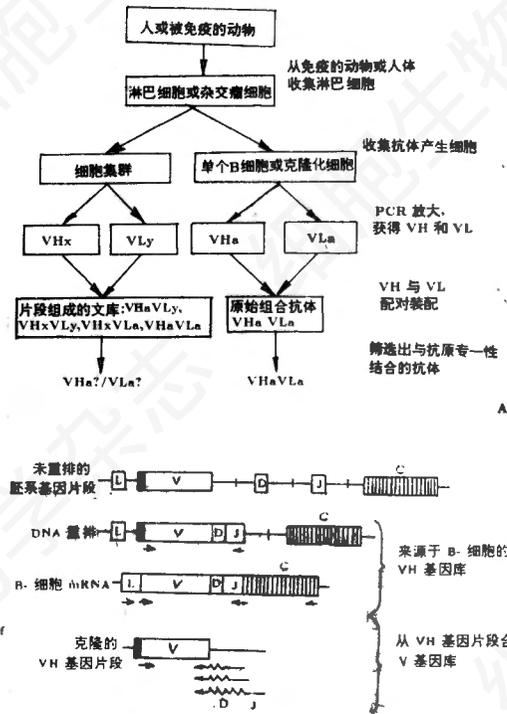


图2 抗体V基因的分离

A. 从杂交瘤细胞株, 人或动物的杂交瘤细胞以及直接从人或动物B-细胞中获得V基因。  
B. PCR放在VH基因的模式图。  
引自《Nature》1991, by winter, G & Milstein C)。

毒素结合的免疫毒素以及与同位素标记,用于诊断和治疗的抗体。

(1) 从杂交瘤细胞株中获得所需要的 V 基因 从我们现有的能产生单抗的杂交瘤细胞株中可以获得我们需要的 VH 和 VL 基因。首先我们从培养的杂交瘤细胞中提取总 mRNA, 然后用逆转录酶合成 cDNA, 利用 V 区 N 端相对保守的特点, 我们在 N 端和恒定区 CH1 合成兼用的“通用”引物, 经过 PCR 扩增, 就可以得到 VH 和 VL 基因<sup>[2]</sup>。

(2) 从杂交瘤细胞或 B 淋巴细胞中获得 V 基因 为了获得能分泌高亲和力抗体的杂交瘤, 对动物进行免疫是必需的。在动物体内这些抗体的产生分为两个阶段。第一阶段是产生低亲和力抗体(IgM,  $k = 10^5 - 10^7 M^{-1}$ )和第二阶段产生高亲和力的抗体(IgG,  $k = 10^8 M^{-1}$ ), 它来源于第一阶段的抗体基因经过体细胞突变, 筛选得到。在这个过程中产生的记忆细胞可以在抗原存在的情形下反复突变和筛选。突变的频率大约是每个细胞内每碱基对  $10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ 。杂交瘤的优点是富集了那些对抗原专一性高的细胞, 缺点是有些融合是不稳定的, 在随后的筛选中丢失了抗体产生的能力, 比如人-鼠杂交瘤。而我们用“通用”引物经 PCR 放大就能从单个杂交瘤细胞或单个成熟的 B 细胞(不适合作融合)中直接拿到 V 基因<sup>[3]</sup>(图 2)。

(3) 直接从人淋巴组织或外周血中获得 V 基因 尽管一些来源于动物的抗体(特别是小鼠  $\gamma^{2a}$ , 大鼠  $\gamma^{2b}$  同位异型), 能够激发人的效应机制, 但它们在人体有免疫原性而不能用于治疗。将鼠抗体 V 区与人恒区连接制成嵌合抗体<sup>[1]</sup>, 在临床上降低了免疫原性, 但由于使用了外源的 V 区框架, 仍保留了部分抗原性。因此直接从人体中分离对抗原有高亲和力和专一性抗体的 V 基因是非常必要的。我们可以直接从人的外周血淋巴细胞和淋巴器官中获得 V 基因, 构建组合文库, 以制备纯人的单克隆抗体。

## 2. 抗体表达

(1) 利用骨髓瘤或杂交瘤表达抗体 早在 80 年代初, 人们就开始尝试用大肠杆菌表达抗体, 但并未取得较满意的效果。于是人们开始使用转染骨髓瘤或杂交瘤的办法表达抗体, 这主要是利用这些哺乳动物细胞有高表达内源性重链、轻链基因; 糖基化、正确的分子装配以及分泌抗体的能力。通常使用的表达载体是 pSV 2 系列, 它含有一个真核转录单位: 一个 SV 40 早期启动子, 剪接信号和 polyA 添加信号以及两个筛选标记: 细菌黄嘌呤-鸟苷酸核糖转移酶基因(gpt)或者氨基糖苷转移酶基因。磷酸钙转染法对骨髓瘤细胞效率较低, 通常用电转或与细菌原生质体融合。最早使用的骨髓瘤细胞株是 J 558 L, 为能使新生抗体分子正确装配, Ochi 等把重链和轻链基因同时加入到一个表达载体中而获得成功<sup>[4]</sup>。另一个办法是将轻链和重链分别克隆到含有 neo 标记和 gpt 标记的载体中, 先转染一种质粒, 分离稳定的转染细胞, 再用另一个质粒转染<sup>[5]</sup>。另外一条途径是将重链和轻链基因分别克隆在有不同来源的细菌复制原点的表达载体上, 然后将骨髓瘤细胞或淋巴细胞进行原生质体融合。人们已将各种重链 C 基因克隆到表达载体中, 因此一旦得到有价值的 V 基因, 马上就能获得具有各种同位异型的抗体(图 3)

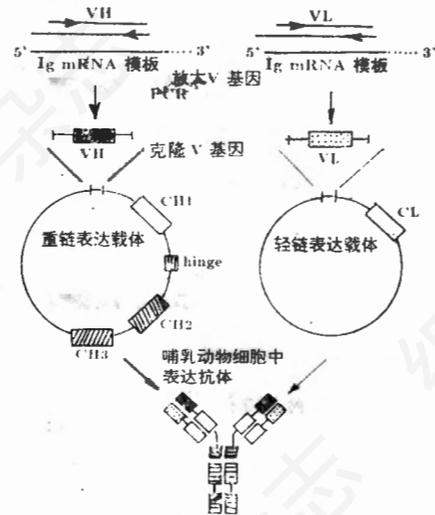


图 3 在哺乳动物细胞中表达抗体

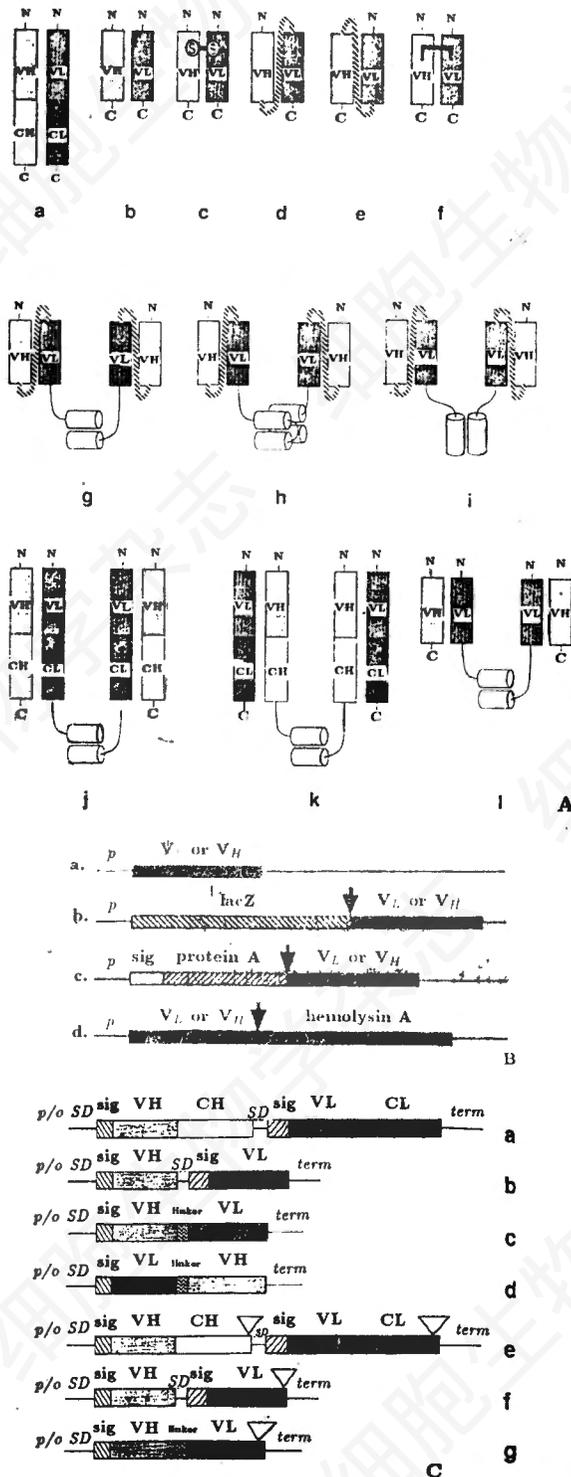


图4 抗体片段在 *E. Coli* 中的功能性表达

A. 分子设计, B, C. 遗传操作示意图。  
A, a-f, 单价抗体片段

g-i, 小抗体

j-l, 改造的小抗体

B: a. 胞质中直接表达  
b. 胞质融合蛋白表达  
c,d. 分泌型融合蛋白表达  
C: 分泌型功能性表达

a. Fab 片段

b. Fv 片段

c. ScFv 片段(VH 连接 VL)

d. ScFv 片段(VL 连接 VH)

e-f. 双价抗体片段, 并可以插入其它有效应功能的结构域。

(A, C, 引自 *Immunol.Rev.*, 1992, by Plückthun, B, 引自 *Bio/Technology*, 1991, by Plückthun)

如果一个骨髓瘤细胞株失去了合成轻链的能力, 将适当的轻链基因通过基因转染进该细胞株, 就会恢复轻链合成能力并分泌有抗原专一性的抗体; 重链的情况也是如此, 并且重链是糖基化的。当重链基因和轻链基因同时共转染, 则可以分泌出完整的、糖基化并正确装配的具有抗原结合专一性的抗体分子。存在的问题是表达水平低, 轻链的表达尤其如此。

(2) 抗体片段在大肠杆菌中的表达 大肠杆菌没有糖基化功能, 因此主要用来表达有抗原结合特性的 Fab、Fv、ScFv(Single chain Fv Fragment)等抗体片段(图4), 所有在大肠杆菌中表达异源基因的操作程序都适合于表达抗体的操作<sup>[9]</sup>。然而只有同时分泌两条链或使用分泌单链的办法才能使抗体片段正确折迭成天然的, 有功能的分子。

① 直接在胞质中表达 表达抗体最直接的途径是在胞质中直接表达没有信号肽序列的抗体片段。不同的抗体链, 抗体片段和不同的构成成分, 表达结果有很大的差异<sup>[7]</sup>, 这主要取决于翻译起始位点的设计, 片段对蛋白水解酶的敏感性和受体菌。通常的办法是高表达, 抗体片段以包含体的形式存在, 可以防止宿主对抗体片段的降解, 随后在体外对这些包含体进行处理, 包括复性、去掉N-端甲酰甲硫氨酸或甲硫氨酸, 而这些处理是非常复杂而不稳定的。尽管目前已开始对重新折迭进行系

统化研究,但并不知道它是否通用。

② 作为胞质融合蛋白表达 将抗体片段与大肠杆菌高表达的胞质蛋白 N-端连接,作为在体外容易裂解的融合蛋白表达可以解决上述的一些问题,这样可以使翻译效率提高;N-端部分可以帮助蛋白质在胞质内沉淀,从而避免了蛋白水解酶的攻击;融合蛋白可在体外精确裂解出所需要的 N-端, Baldwin 和 Schultz 将 VL 融合到  $\lambda$  噬菌体拟制因子 CII 上表达,再将融合蛋白用凝血因子 Xa 降解后,再与来源于抗体的 VH 重组获得成功<sup>[8]</sup>。Glockshuber 将 VH 和 VL 融合到  $\beta$ -半乳糖苷酶基因上。用 Xa 水解,重新折迭后再用半抗原亲和层析纯化了所需要的有功能的抗体片段<sup>[9]</sup>。这种策略适合表达体内不稳定的单结构域,例如: VH, Fc, CH1 等。

c. 作为分泌型融合蛋白表达<sup>[10]</sup> 将抗体片段融合到一些分泌蛋白的 N-端或 C-端表达可以得到分泌的含有这些抗体片段的融合蛋白<sup>[11]</sup>。可以将 VH、VL 或 ScFv 与金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 N-端或溶血酶 A (hemolysin A) 的 C 端融合。融合位点由一段可以用 Xa 裂解的序列相连,蛋白 A 融合蛋白分泌在周质,部分裂解外膜后进入培养基,可以用 IgG 亲和层析纯化。溶血酶 A 融合蛋白分泌依赖溶血酶的转运系统,分泌到基质。

③ 有功能的分泌表达 在大肠杆菌中同时表达、分泌出抗体的两条链而又不需要在体外进行折迭,是一项非常有吸引力的工作。Plückthum 等成功地表达获得了 Fv 和 Fab 片段。首先需要在大肠杆菌内产生一个真核细胞中抗体折迭和装配的通路。在抗体产生细胞,两条链均作为前体分别表达被转送到内质网(ER)。经切去信号肽、蛋白质折迭、二硫键形成,重链和轻链装配成完整的抗体分子。将抗体分泌到 E. coli 周质的过程与上述过程相似,而许多异源表达的分泌蛋白当被运输到 E. coli 周质中可以正确折迭。因此只要注意了以下几个关键步骤,表达的 Fv 或 Fab 就能

正确折迭并分泌:(1) 两条链必需以化学计量合成。为此 VL 和 VH 需置于同一操纵元下控制,两个基因需放在同一个启动子后面,编码区都放在 SD 序列的后面。(2) 两条链必需被转移到周质,这可以把一条链融合到外膜蛋白 A(omPA)上,另一条链融合到碱性磷酸酯酶(phoA)上;或者将两条链融合到同一信号肽上。(3) 融合点在被断裂后必需能产生正确的 N-端。(4) 二硫键正确形成并能装配成异聚体。

大肠杆菌周质蛋白水解酶较少,而抗体片段能折迭成球状结构域以及二硫键正确形成,有效防止了有功能的抗体片段的降解。有时发现大肠杆菌表达的异源蛋白泄漏到培养基中,为了避免未成熟泄露,可以使用可诱导的操纵元(lac)表达抗体片段。在低温培养时不会发生泄露,而提高温度,很快细胞外膜渗透性增加。功能抗体片段进入培养基,可直接用 ELISA 测活筛选。

实验证明:用这种方法制备的 Fab, Fv 片段的亲和力与将抗体经蛋白酶水解所得到的 Fab 与半抗原反应有相同的化学计量。

(3) 抗体片段在噬菌体中的表达 丝状噬菌体衣壳蛋白由两种蛋白构成,由 2800 个基因 VIII 编码的主要衣壳蛋白构成外壳的主体,而在尾部有三个由基因 III 编码的蛋白,将抗体基因插入到基因 III 的 5'-端,产生的抗体融合蛋白被装配到噬菌体表面。这些 Fv, ScFv, Fab 片段保持天然的抗原结合能力。若在抗体基因和基因 III 之间插入终止密码子,就可以得到可溶性抗体<sup>[12]</sup>。Kang 等将 Fab 片段与 M13 基因 VIII 融合表达也获得了成功<sup>[13]</sup>。

(4) 抗体库的制备 能产生不同抗体的细胞库是非常大的( $10^{10}$ , 1986)。但是在任何给定的时间,仅有限的细胞克隆( $10^7$ - $10^8$ )能表达抗体。由于抗原的刺激下,不断发生体细胞突变,因此体内的抗体库(repertoire)是一个动态变化着的库。通过对不同发育时期的抗体库进行比较、研究,不仅能帮助我们了解免

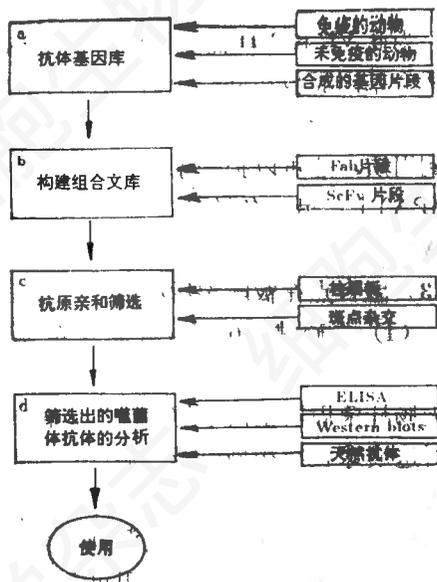


图5 噬菌体抗体的制备  
用噬菌体构建抗体组合文库

免疫系统的分化、发育过程，还可以直接拿到有实际应用价值的抗体。用噬菌体表达载体具有独特的优越性：只要我们将抗原制成亲和层析柱，就可以直接筛到能表达该种抗原抗体的噬菌体，再将该噬菌体培养就可以得到工程化抗体(图5)。McCafferty等从 $10^7$ 噬菌体中很方便地拿到了单个具有抗原专一性抗体的噬菌体<sup>[14]</sup>。最近 Zebedee 等人利用这种抗体库克隆技术用 $\lambda$ 噬菌体成功地表达了有极高价值的对人乙型肝炎病毒(adw亚型)表面抗原高度专一的纯人的Fab功能抗体片段<sup>[15]</sup>。

5. 抗体改造 至今已制备了多种有潜在价值的单克隆抗体，但由于免疫原性等原因

而不能广泛用于免疫治疗，一种有效的途径是将这些来源于鼠的单克隆抗体进行改造，包括制成Fab、Fv、ScFv、ScFv连接的免疫毒素、放射标记的ScFv、与酶连结的Fab、在Fc上接上功能蛋白分子或者将CDR嫁接在人的Fv支架上，最后接上人Fc而得到人源化抗体等。

### 参 考 文 献

- [1] Nuberger, M. S. et al., 1984, *Nature*, 312: 606.
- [2] Sauki, R. K. et al., 1986, *Science*, 239: 487.
- [3] Winter, G. & Milstein, C., 1991, *Nature*, 349: 293.
- [4] Ochi, A. et al., 1986, *J. Immunol.*, 136: 2705.
- [5] Morrison, S. L. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81: 8095.
- [6] Plückthum, A., 1991, *Biotech.*, 9: 545.
- [7] Chaudary, V. K. et al., 1989, *Nature*, 339: 394.
- [8] Baldwin, E. et al., 1990, *Science*, 245: 1104.
- [9] Glockshuber, R. et al., 1990, *Biochemistry*, 29: 1362.
- [10] Pluchthun, A. 1992, *Immunol. Rev.*, 130: 151.
- [11] Tai, M. et al., 1990, *Biochemistry*, 29: 8024.
- [12] Marks, J. D. et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222: 581.
- [13] Kang, A. S. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 4363.
- [14] McCafferty, J. et al., 1991, *Protein Eng.*, 4: 955.
- [15] Zebedee, S. L. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89: 3175.

本刊《名词讨论》专栏欢迎读者  
踊跃来稿。