

基因重组抗体研究的现状与未来

Present and Future of Gene Recombinant Antibody

白爱林

(北京医科大学免疫教研室, 硕士研究生 北京 100083)

谢蜀生

(北京医科大学免疫教研室, 教授 北京 100083)

一、抗体研究的历史

19 世纪后期,微生物学的发展推动了抗感染免疫的研究。1890 年,德国学者贝林和日本学者北里发现白喉毒素免疫动物的血清中存在一种能中和毒素的物质,称之为抗毒素。随后人们又相继发现免疫血清中有溶菌素、凝集素等可特异结合相应细胞或细菌的成份,后将这些物质统称为抗体。抗体一经发现,立即被用于临床,建立了人工被动免疫疗法和一系列血清学诊断方法,在传染病的防治上取得了巨大成功。1900 年贝林和北里由于对抗体发现所做出的贡献而获得诺贝尔医学生理学奖。本世纪 30 年代,免疫学进入了免疫化学时期。这一时期最重要的成果就是阐明了抗体分子的化学结构。首先,由于建立了血清蛋白电泳技术,人们发现抗体存在于血清的丙种球蛋白部分;其次,当费格雷伊斯(Fagraeas)发现浆细胞是抗体产生的细胞后,人们认识到骨髓瘤蛋白即为单克隆浆细胞大量增生而产生的均一的免疫球蛋白分子。这就为抗体的研究提供了理想的材料。在上述基础上,波特(Porter)和埃德尔曼(Edelman)用蛋白酶水解和化学还原法对抗体的肽链构成进行了深入的研究,阐明了抗体的四肽链结构,即抗体分子是由两条重链(H)和两条轻链(L)组成的。每条肽链都分为可变区(V)和稳定区(C),肽链中每 110 个氨基酸组成一个亚单位,由一个二硫键连结成环状功能区。可变区内又包括骨架区和数个互补决定区(Complementary Determining Region, CDR),其中 CDR 在不同抗体中氨基酸替换频率最高,又被称作高变区,它们直接构成抗体的抗原结合部位。波特和埃德尔曼的工作不仅为我们建立了经典的抗体结构模型,而且为抗体多样性的遗传基础的研究奠定了基础。他们因

此获得了 1972 年的诺贝尔医学奖。70 年代末 80 年代初,在瑞士巴塞尔免疫研究所工作的日本学者利根川进用核酸分子杂交技术研究了 B 细胞分化发育过程中抗体基因结构的变化,阐明了免疫球蛋白(Ig)V 区基因重排及突变形成了 V 区基因结构组合的无限可能性,从而解释了抗体多样性的起源,也为基因重组抗体的产生提供了理论依据。1987 年,利根川进因对抗体基因结构的研究获诺贝尔奖。在免疫学技术方面,1975 年科勒(Kohler)和米尔斯坦(Milstein)用淋巴细胞杂交瘤技术获得了针对指定抗原的单克隆抗体。此后,针对各种重要分子的单克隆抗体相继问世。单克隆抗体成份均一,特异性极高,并可以大量制备。因此,它的出现不但对生物和医学的发展产生了深远的影响,而且已发展成为一种效益极高的生物高技术产业。科勒和米尔斯坦因发明了单克隆抗体技术而获 1984 年诺贝尔奖。

从多克隆抗体(抗血清)到单克隆抗体,从抗体丙种球蛋白到抗体基因结构,在半个多世纪的时间里,投身于这个领域研究的科学家取得了丰硕的成果,共有 7 位科学家荣获诺贝尔奖,这是人类揭示自然奥秘的胜利进军。

二、基因重组抗体的研究现状

尽管单克隆抗体技术从根本上改变了抗体的质量和生产方式,但是目前鼠源单抗用于人体治疗时会产生人抗鼠抗体而降低疗效,甚至可能出现类似血清病的变态反应,从而限制了它的临床应用。而用杂交瘤技术生产人源性单克隆抗体,目前仍面临许多难以克服的问题。例如,用小鼠骨髓瘤细胞与人淋巴细胞融合,会导致人源染色体优先丢失,杂交瘤细胞极不稳定;现有的人骨髓瘤细胞还远不能令人满意;E-B 病毒永生化的入淋巴细胞抗体分泌量低且不稳定;某些有毒的化学物质、病原体、

肿瘤细胞不能用于致敏人体,体外致敏则难以获得高亲和力的抗体,而必须将人体免疫系统移植于免疫缺陷小鼠才能进行体内免疫。由于上述问题,通过人—鼠杂交瘤产生人源单抗的前景尚难预料。因此,寻求新的抗体生产方式或使鼠抗体人源化成为一种迫切需要。80年代,DNA重组技术得到很大发展,大批基因工程产品应运而生;蛋白质工程的发展使人们可以对天然蛋白的基因进行改造,从而可以根据人们的意愿制造出新型的更为有效的蛋白分子。在这种背景下,基因重组抗体的研究拉开了序幕,成为目前分子生物学研究中最令人瞩目的领域之一。

基因重组抗体的研制与重组的其它分子类似,也要经过目的基因的克隆,将目的基因进行重组、改造,然后插入适当的表达载体,导入某一表达系统表达并组装成功能性分子等步骤。但由于抗体分子结构的复杂性,上述每一步骤都有其独特的问题,所以这一领域的研究具有特殊的复杂性。近年来,基因重组抗体的研究取得了以下有重大意义的进展。

1. 抗体基因表达系统的研究

目前用于产生完整的功能性抗体分子的表达系统主要是小鼠骨髓瘤细胞。与杂交瘤技术相比,基因转染代替了细胞融合过程,使人们可以对抗体基因进行定向改造,但抗体基因表达调控系统被打乱,转染的Ig轻、重链基因的表达往往不平衡,轻链表达水平明显低于重链,限制了完整抗体分子的产量。此外,这一系统还存在转染率低、筛选繁琐、生长缓慢、成本高等缺点。另外一些表达系统,如酵母系统、杆状病毒—昆虫细胞系统、植物等用于抗体的表达都有许多成功的报道,但从操作的繁琐程度、费用、产量、稳定性几方面综合来看均不及骨髓瘤细胞系统。

大肠杆菌是目前重组分子比较理想的表达系统。用这一系统表达完整抗体分子的研究表明,由于抗体是多肽链、具有复杂、高级结构的蛋白分子,其产物往往不能正确折叠、组装而没有活性。1988年,用大肠杆菌表达抗体片段取得进展,研究人员获得了有活性的抗体Fv段和Fab段。他们通过在重链和轻链基因片段前加入信号肽的序列,使其表达产物能分泌到细菌的周质中,从而克服了肽链在菌体内不能正确组装的困难。此外,大肠杆菌在表达其他小分子抗体活性片段,特别在单链抗体中,有其独特的优越性。

2. 鼠抗体人源化的研究

抗体是一个能激发人们想象力的分子,它独特的分子结构,使其基因工程研究中出现了许多有创造性的设想。它根植于分子生物学,而其本身的某些研究又可作为分子生物学的范例。

嵌合抗体(Chimaeric antibody):鼠抗体人源化的要求促使人们研究用人抗体的部分结构来替换鼠抗体的结构。抗体分子的功能区结构模式便于其基因水平的拼接,易于实现这种替换。1984年,莫里森(Morrison)等首次将小鼠V区基因与人C区基因重组,导入骨髓瘤细胞,经筛选得到了分泌人—鼠嵌合抗体的转染瘤细胞。嵌合抗体的优点在于:第一,它保留了鼠抗体对抗原的特异性和亲和力,但大大降低了在人体内应用的免疫原性,使其在人体内的半衰期延长,从而提高了疗效,降低了发生过敏反应的可能;第二,根据所需介导效应的不同可选择不同类或亚类的C区,例如,当用于杀伤病原体或肿瘤细胞时,可用能有效结合补体并能介导细胞杀伤的人 γ_1 型C区,而活性较低的人 γ_2 型C区则可用于显像诊断,或通过竞争结合抗原而阻断有害抗体的作用。初步的临床实验已显示出嵌合抗体令人鼓舞的应用前景。

重构型抗体(Reshaped antibody):一个使鼠抗体人源化更为彻底的方法是将嵌合抗体V区的鼠源性进一步降低。X射线晶体衍射发现,抗体V区的肽链折叠成 β 片层,其末端折返处形成环状,即为结合抗原的CDR区。V区的免疫原性主要来源于 β 片层的骨架区,如果将鼠抗体的CDR区移植到人抗体的相应部位,那么除了维持抗体特异性的必需结构,抗体的其它部分则全部为人源性的。这就是所谓的重构型抗体(图1)。第一个重构型抗体的重链V区基因是用人工合成DNA的方法获得的。此后,科学家直接在人抗体V区基因上进行操作,将其全部6个CDR区置换为大鼠抗人淋巴细胞抗体的CDR区,得到了高亲和力的抗人淋巴细胞重构型抗体。重构型抗体最大限度地克服了鼠单抗在人体内的免疫原性,目前已试用于临床白血病的治疗,取得了较好的效果。嵌合抗体和重构型抗体的研究主要针对用杂交瘤生产人单抗的困难,它与杂交瘤技术形成一种互补,推动了抗体的应用。

3. 抗体分子活性片段基因表达的研究

基因重组抗体研究的另一个趋向就是向小分子的抗体活性片段发展,这方面的研究使抗体各个片段的功能得到充分的开发并得到扩展。

抗体分子在木瓜蛋白酶的作用下可以裂解为三个片段:两个Fab段和一个Fc段。同样我们可以在基因水平完成这种剪切,直接表达出具有抗原结合活性的Fab段和具有效应功能的Fc段。更重要的是我们可以将这些片段的基因与其它分子的基因重组,从而赋予它们特殊的功能。例如,将抗纤维蛋白抗体的Fab段与组织纤溶酶原激活物(TPA)重组的分子(图1)可使TPA定向作用于血凝块;CD₄分子与Fc段重组构成的CD₄免疫粘附素(CD₄ immunoadhesin)(图1)通过CD₄与HIV感染细胞

表面的 gp120 结合,可由 Fc 段介导 ADCC 作用来杀死 HIV 感染细胞。

Fab 段不是能起导向作用的最小分子,人们进而对 Fv 抗体进行了研究。作为一个更小的抗体活性片段,它是由 V_H 和 V_L 构成的异源二聚体(heterodimer)(图 1)。只靠比较弱的疏水力结合的两个功能区容易彼此分离,使得这个小分子抗体不太稳定,引入链间二硫键是解决问题的途径之一。而一个更有效的方法则是通过一个连接肽构建的单链抗体(scFv)(图 1)。蛋白质工程技术的发展使人们可以根据以往研究蛋白质的结构与功能关系的资料,用计算机设计具有预期功能的序列。连接肽就是在这种基础上合成的。它将 V_H 的羧基端与 V_L 的氨基端连接起来,并能使其折叠成类似天然 Fv 抗体的构型。scFv 完全避免了大肠杆菌中表达的组装问题,具有更好的开发前景。将 scFv 与绿脓杆菌外毒素片段 PE-40 融合产生新型的单链免疫毒素(图 1)也已获成功。

小分子抗体的优点在于:(1)由于去除了 Fc 段的干扰,用于显像或治疗特异性更高;(2)容易进入病变部位和实体瘤内部;(3)在血浆中清除比较快,可用于清除循环中的毒性药物如地高辛(digoxin)等;(4)作为外源性蛋白的免疫原性较低;(5)易于用大肠杆菌表达系统生产;(6)在基础研究中,由于排除了其它肽段的影响,利于用高分辨 X 射线晶体衍射来分析抗原结合位点的结构。

目前小分子抗体的研究还在深入,已发现单独 V_H 具有抗原结合活性,但由于它与 V_L 正常结合的疏水面暴露,使这种单功能区抗体(dAb)(图 1)变得很粘。目前设想通过引入亲水性氨基酸残基改善其性状,单独 V_H 有望成为新一代小分子抗体。最近单个 CDR 的抗原结合活性亦被证实,探索获取这种具有抗体活性的最小识别单位(m.r.u)(图 1)的产品已被列入基因重组抗体的研究计划。

4 抗体基因库的研究

PCR 技术的出现使人们可以根据抗体基因中的一些保守序列设计一些通用的引物,在体外扩增抗体基因的不同片段,改进了传统的抗体基因克隆的途径。用这种方法可以构建一个抗体基因库,从中直接筛选出所需的抗体基因并予以表达,从而可以取代杂交瘤技术。如果用胚系基因进行随机组合,则可以构建比体内更大的抗体基因库,获得天然不存在的抗体,这为基因重组抗体的研究开辟了一个崭新的领域(图 2)。但是,完全在体外完成体内抗体的产生过程决非易事。除了庞大的抗体基因总库的构建和随机组合的 V_H 、 V_L 联合文库的表达,其后的筛选—突变—筛选过程是更富于挑战性的课题,它必须依赖于新的具有极高效率和相当的敏感

性的筛选方法的出现。机体能够很顺利地完成这一过程,但用人工方法模仿这一过程却是困难重重。因此,在目前条件下这一设想还处于初步探索中,但其潜在的意义显然是十分重大的。

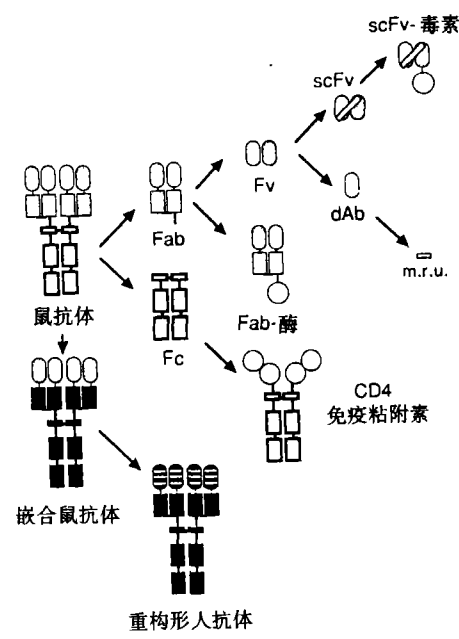


图 1 基因重组抗体及片段

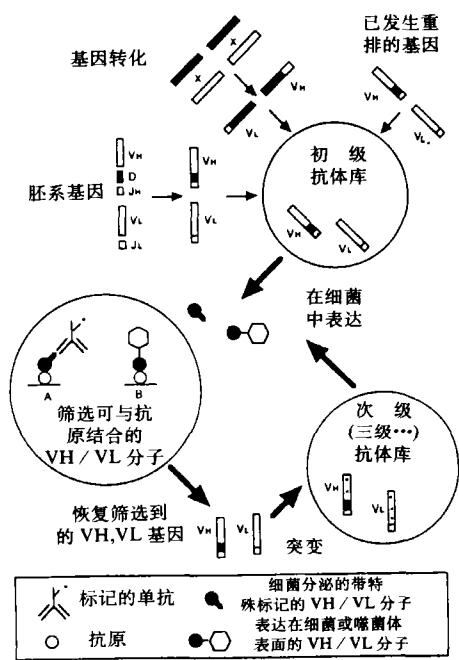


图 2 通过抗体基因库生产抗体 (下转第 60 页)

列为日常工作的一项重要内容,常抓不懈。要积极支持和鼓励编外人员自谋职业,并在经济上给予一定的过渡期,使之逐步独立。教育行政部门和学校也可以兴办经济实体,安排编外人员就业。这样做既可以腾出大量经费,用于发展教育,同时又可以为发展教育积累更多的资金。其次是解决留得住的问题,即要使一大批热爱教育事业并在教育工作中表现出卓越才华的优秀分子安下心来,扎根教育。这就必须彻底改变我国普教战线吃“大锅饭”、端“铁饭碗”的浑沌状况,真正建立起能者多劳,劳者多得,不劳者不得的利益分配机制。目前一些地方采取了定岗定编,大幅度提高岗位待遇的办法。大批优秀分子被推上了岗位,不适应教育工作的人员从岗位上退了下来,社会上部分优秀青年被吸引到了教育队伍的行列。

3. 充分发挥竞争机制的能动作用

竞争机制有两个重要特征。一是机会均等,二是待遇向优胜者重度倾斜。把竞争机制引入教育管理,可以促进学校之间的质量竞争和校内教职员工的业务竞争,从而达到提高整体教育质量的目的。

许多地方的教育行政部门对竞争机制的能动作用认识不足,对学校的管理运用竞争机制少,而行政干预多。例如,招生采取划片、论单双数和甲、乙、丙、丁录取的办法,经费分配按教工人数拨发等。这些作法既压抑了高质量学校优势的发挥,挫伤了其教育积极性,同时也给低质量学校提供了一个避风港,助长了其惰性。教育的宏观管理过程引入竞争机制,首先必须下放招生权,允许学校和学生作双向选择。这样,教育质量高的学校将会招到

较多的优秀学生,学校的教学优势、设备优势将会得到充分发挥和利用;质量差的学校招生不足,便有了一种紧迫感和危机感。经费分配,必须改变按教工人数拨发的传统做法,应与学校在校学生数、巩固率和提高率联系起来。优秀学校学生基础较好,应侧重于巩固率的考评,质量差的学校学生素质较差,应侧重于提高率的考评,并把提高率作为这类学校从教育行政部门获得教育经费和奖金的主要渠道。对提高快的学校,应予重奖。对长期不能提高教育质量的学校应追究其领导的责任。许多学校教育质量长期不高,一个重要原因就是在学校内部管理方面缺乏竞争机制。一些学校的毕业班教学工作长期被少数“把关教师”所垄断。这样做不能充分发挥竞争的能动作用,一大批青年教师得不到锻炼和培养。

4. 建立教职员工轮修制度

社会在不断发展,科学技术在不断进步,而教育工作者在长期教育工作中会出现知识老化、思维僵化、教学方法单一等现象。如果不经常注意提高自身的业务素质,优势也会逐渐丧失。教工轮修制度是不断提高教工队伍业务素质,使之跟上时代发展步伐的重要途径。一所学校每年应保证有 10~20% 的教工脱产进修,一个教育工作者每 3~5 年脱产进修一次是必要的。在这期间,进修内容包括知识更新、经验总结、问题探讨、教材研究、政治和教育理论等项。进修期以半年至一年为宜。教育行政部门应积极办好教师进修学校,使之真正成为培养和提高教工队伍业务素质的基地。

(责任编辑 肖庆山)

(上接第 48 页)

三、前景与展望

基因重组抗体属于生物高技术,其产品将直接产生很高的效益,在基础研究和临床疾病诊断和治疗中都具有极其重大的意义。这一技术还将进一步拓宽抗体应用的领域。

由具有特异识别功能的抗体或其片段与具有高效杀伤功能的毒素分子融合而成的免疫毒素是肿瘤生物治疗的一个强有力的手段。但传统的化学偶联方法使免疫毒素的制备和纯化过程繁琐而昂贵;免疫毒素体内应用的异源性限制了其疗效。重组抗体的出现为免疫毒素的研究注入了生机。抗原结合片段的基因与毒素基因拼接而表达出的重组免疫毒素解决了免疫毒素大量生产的问题,加速了其商品化进程;嵌合抗体和重构型抗体降低了免疫毒素在人体内的异源性;单链免疫毒素可以更容易进入实体瘤内部。有理由相信,重组免疫毒素将会

获得更好的疗效并成为导向药物研制和生产的主要方式。

基因重组抗体的研究也加速了抗体酶(Catalytic antibody)的进展。抗体酶的设想早在 80 年代初就提出来了,但直到 1986 年,第一个抗体酶才问世。原因之一是用杂交瘤技术生产抗体酶首先须获得过渡态的模拟物,用它来免疫小鼠制备杂交瘤,再筛选可能具有催化作用的单抗。这样,一方面对过渡态的模拟物要求很高,另一方面要制备许多过渡态模拟物的单抗。这一过程相当繁琐,而且盲目性大,筛选效率不高。基因重组抗体改变了这一局面,人们可以用 DNA 合成、定点或随机突变技术将具有催化活性的基因引入抗体的抗原结合区,也可对已筛选到的抗体酶进行改造,提高其催化活性。抗体基因库在抗体酶的研究中更显示出其优越性。人们可以用一系列的过渡态模拟物直接从基因库中筛选抗体酶。它不仅扩大了筛选范围,而且筛选效率也大大提高了。

(责任编辑 肖庆山)