

体内一旦产生 HAMA,在随后的显像中,将会引起标记抗体体内生物学分布的改变。抗体进入人体后,迅速被 HAMA 结合而形成 CIC,随后被机体消除。标记抗体在血中半排期缩短,游离抗体浓度降低,从而减少了与肿瘤细胞结合机会,而 CIC 被单核巨噬细胞吞噬后,又引起肝、脾本底增加,不利于肿瘤的检出^[20,21]。由此引起的临床症状虽不多见,但 HAMA 滴度较高者,可引发 III 型变态反应。

临床实践中,可从两方面避免或减轻 HAMA 反应。首先是避免 HAMA 的产生,措施主要有:① 使用抗体片段。鼠源抗体恒定区是引起 HAMA 的主要免疫原,可诱发人体产生抗同种型抗体,这是 HAMA 的主要成份。片段的免疫原性弱,但反复使用,亦可诱导产生抗独特型抗体。据报道,HAMA 中抗独特型抗体约占 20%~80%,平均为 40%^[22,23];② 注射鼠源抗体的同时,使用免疫抑制剂来降低免疫应答的强度;③ 研制人-鼠嵌合抗体。改型抗体、小分子单链抗体及人源单克隆抗体。其二是减轻 HAMA 的影响,目前已采用的方法有:① 由于 HAMA 多为针对 Fc 上的同种型抗原决定簇,可在注射标记抗体前,先注入同种型无关抗体结合 HAMA^[24];② 利用血浆清除术。DeNardo 等^[25]利用这一方法使接受放免治疗病人的 HAMA 滴度明显降低。

参 考 文 献

- 1 Mariani G et al. J Nucl Med Allied Sci, 1990; 34 Suppl 2-4
 - 2 Bowen JG et al. Nature, 1975; 258: 75
 - 3 Burraggi GL et al. J Nucl Med Allied Sci, 1985; 29: 261
 - 4 Frontira M et al. Clin Nucl Med, 1989; 4: 357
 - 5 Greiner JW et al. Science, 1987; 235: 895
 - 6 Rosenblum M J et al. J Natl Cancer Inst, 1988; 80: 165
 - 7 Blumenthal RD et al. Cancer Res, 1988; 48: 5403
 - 8 Cike M et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 68: 566
 - 9 Lechner PK et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1987; 14: 1033
 - 10 Carrisquillo JA et al. J Nucl Med, 1988; 29: 1022
 - 11 Mach JP et al. Immunol Today, 1991; 12: 239
 - 12 Ishii N et al. Proc Biol Fluids, 1983; 3: 305
 - 13 Rochoff SD et al. Cancer Res, 1980; 40: 3054
 - 14 Dvorak HF et al. Am J Pathol 1988; 133: 95
 - 15 Hori K et al. Jpn J Cancer Cell, 1991; 3: 77
 - 16 Babairan RJ. Semin Nucl Med, 1989; 19: 309
 - 17 Patt YZ et al. J Clin Oncol, 1990; 6: 1220
 - 18 Scro Schroff RW et al. Cancer Res, 1985; 45: 875
 - 19 Sear HFD et al. J Biol Response Mod, 1984; 3: 138
 - 20 Murray JL et al. Cancer Res, 1988; 48: 4417
 - 21 Pimm MV et al. J Nucl Med, 1985; 26: 1011
 - 22 Zimmer AM et al. J Nucl Med, 1989; 30: 827
 - 23 Herlyn D et al. J Immunol Methods, 1985; 85: 27
 - 24 Smith LM et al. J Nucl Med, 1986; 27: 942
 - 25 DeNardo SJ et al. J Nucl Med, 1989; 30: 827
- (收稿日期: 1996-03-05)

鼠-人嵌合抗体的研制及应用

上海第二医科大学附属瑞金医院(上海, 200025) 李彪综述 朱承谟 林汉^①审

摘 要:应用重组 DNA 技术,把人免疫球蛋白的恒定区基因与小鼠免疫球蛋白可变区基因相拼接,然后在真核生物细胞中进行表达,可生产出既能保持原有抗体的特异性,又能在人体内避免排斥反应的鼠-人嵌合抗体。嵌合抗体因含有人抗体的 Fc 段,所以能有效地与人效应细胞上的 Fc 受体结合,诱导细胞毒性效应,延长在人体内的半衰期。因此,它将进一步有可能成为我们大量获得新一代低成本的重要途径。

① 中国医学科学院放射医学研究所

关键词: 基因工程 嵌合抗体 单克隆抗体 杂交瘤

自从 1975年 Kohler和 Milstein^[1]创立杂交瘤技术并获得针对肿瘤标志物特异性的单克隆抗体后,对人肿瘤标志物进行肿瘤的体外诊断和体内治疗已有大量报道,但是,杂交瘤技术获得的单抗还存在许多问题,包括:

(1)鼠源性单抗的重复注射,可产生针对鼠源

抗体恒定区的人抗鼠抗体 (HAM A)反应;

(2)目前生产单抗的成本高,而治疗用的单抗以毫克计算,难以普及应用;

(3)人-人杂交瘤技术还存在难以克服的困难;建株难,建株后单抗产量低,稳定性差,亲和性差等,迄今尚无突破性进展^[2]。

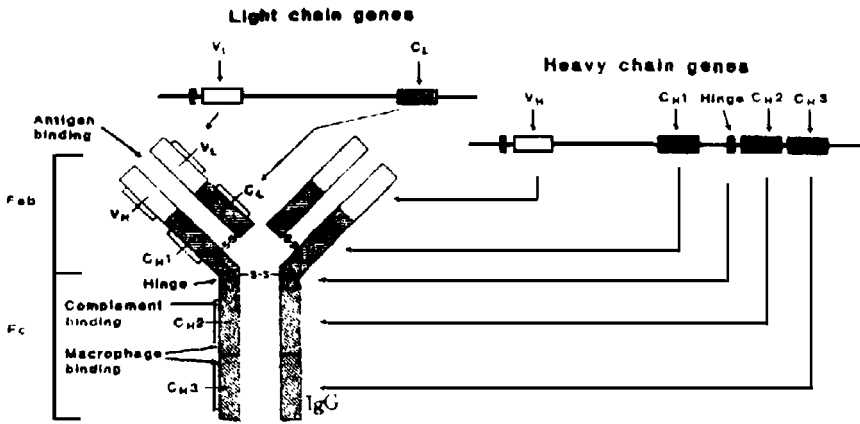


图 1 Ig分子的结构及其编码基因

为改进抗体的生物活性,一个构思新颖的分子生物学技术——基因的分子克隆被用于制备抗体。所谓分子克隆是指在体外将不同生物的基因或 DNA分子进行人工“剪接”、“组合”和“拼接”,使遗传物质重新构建,然后通过载体如细菌质粒、噬菌体和病毒等转入某些细胞内进行扩增,也可使目的基因在细胞内表达产生所需要的基因片段及其蛋白产物。该技术始于 1984年,而国内迄今尚处于初步研制阶段,本文就该技术在嵌合抗体研究应用现状及发展趋势作一简述。

1 免疫球蛋白 (Ig)和抗体分子的基本结构及其编码基因的结构

如图所示^[3], Ig或抗体为“Y”型分子,是由两条相同的重链和两条相同的轻链所组成。重链共有五个类型 $\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon$, 其中 γ 和 α 还有不同的亚型。轻链有两个类型, κ, λ 。重链和轻链均由可变区 (V)和恒定区 (C)的结构域所组成, Ig的 C区主要有固定补体与

多种细胞结合、参与变态反应、调理作用、介导细胞毒性反应等功能, V区是抗原结合的部位,其中还存在着三个高变区 (HVR), 又称互补性决定区域 (CDR), 直接决定着与抗原结合的特异性。

Ig分子由三个不连续的基因家族编码, 两条轻链基因 Kappa(κ)和 Lambda(λ)以及一条重链基因。重链的 V区 (V_H)是由三个彼此分开的基因片段编码: V_H, D_H (diversity) 和 J_H (joining), 重链的 C区 (C_H)是由 G_1, G_2, G_3 和 G_4 编码^[4]。

要获得鼠-人嵌合抗体,首先 V_H 和 V_L 基因必须从能分泌特异性单抗的杂交瘤细胞中克隆出来,然后通过 DNA重组技术与人类 C区基因相连接,从而获得所希望得到的具有生物活性的抗体。

2 DNA重组体的构建

为了构建 DNA重组体,需要制备目的

基因,选择载体,将目的基因和载体相连接,形成重组 DNA,然后将 DNA重组体引入受体细胞,筛选阳性菌和鉴定重组体

由于哺乳动物细胞基因组约有 10^9 碱基 DNA,然而我们要研究的目的基因或 DNA片段仅有数百至数千碱基,要从巨大的基因组中提取所要的目的基因或 DNA,需要通过限制酶对基因组 DNA进行部分消化,通过密度梯度离心或制备型凝胶电泳进行分离,以选择适于插进载体的片段^[5]。

载体是运载外源 DNA有效地进入细胞内的工具,常用的有:质粒、 γ 噬菌体、粘性质粒和单链丝状噬菌体。嵌合抗体的重组基因主要采用哺乳动物细胞表达载体,最常用者为 pSV2-gpt^[6]和 pSVneo^[7],其功能原件既含有原核基因序列,以便在细菌中自我增殖,又带有只能在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单位。其中,原核序列包括:在大肠杆菌中能够工作的复制子,便于挑选带重组质粒细菌的抗生素抗性基因,以及便于把真核序列插入质粒非必需区的少数单一限制酶切位点,目前采用的哺乳动物细胞表达载体大都带有来自 PBR332衍生质粒的原核序列。最基本的真核表达组件包含可转录外源 DNA序列的启动子原件和转录产物有效地加上 poly(A)所必需的信号。组件的另外一些附加元件包括增强子,以及带有剪接供体和剪接受体功能位点的内含子^[8]。

为了从杂交瘤细胞中获得 V_H 和 V_L 基因,以及人类 Ig的 C区基因,构建重组 DNA,大量的文献报道^[9-22]是使用不同的限制性内切酶对基因组 DNA进行酶解,采用 Southern印迹分析法^[23]对酶解片段进行分析,从而获得目的基因,在体外相连接,插入到合适的载体中。Nishimura等^[12]使用能分泌抗急性淋巴细胞性白血病抗原(cALLA)的抗体杂交瘤(NL-1),通过酶解获得 EcoRI-BamHI片段即重链可变区基因;轻链可变区基因是经 HindIII单酶切后,再经

BamHI EcoRI双酶切而得到的 EcoRI-BamHI片段,人类 Ig的 C区基因来源于人浆细胞性白血病细胞 ARH77^[24],经酶解获得的 21-KbEcoRI和 2.6-KbEcoRI片段分别为人重链恒定区和轻链恒定区基因,重链可变区与人重链恒定区基因,以及轻链可变区与人轻链恒定区基因相连接,分别插入到 pSV2gpt和 pSV2neo载体中去,这些目的基因均已经放射性标记探针加以鉴定。

由于分子生物学技术的发展,一些学者^[25-31]采用 PCR技术克隆 V_H 或 V_L 基因,Orlandi等^[26]使用能分泌抗乳腺癌抗体的杂交瘤 MBrL,通过抽提其 mRNA,合成可变区两个引物 V_H FOR [5'-d(TGAGGAG-ACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCA-G)]或 V_L FOR [5'-d(GTTAGATCT-CCAGCTTGGTCCC)], V_H BACK [5'-d(AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG)]或 V_L FOR [5'-d(GACATTCAGCTGACC-CAGTCTCCA)],而合成 cDNA。此 cDNA经 PCR扩增,用限制性内切酶 PstI和 BstEII以及 PvuII和 BglII酶解获得 V_H 和 V_L 基因。此外,吴文书^[30]、刘健^[31]等在以上方法基础上进一步改进,使用抗人小细胞肺癌杂交瘤细胞 2F7的染色体总 DNA,合成可变区基因 FR1骨架区和 FR4骨架区的通用引物 V_{FR1} JFR4,利用 PCR技术直接扩增出可变区基因,直接克隆到装有人免疫球蛋白重链恒定区和轻链恒定区的质粒载体 PSV2AHgpt-Hur3和 PGEM-7Zf中,从而更进一步加快了嵌合抗体基因的构建进程

3 DNA重组体基因在受体细胞中的表达

一些真核蛋白在原核宿主细胞中表达不但行之有效,而且成本低廉。然而,许多在细菌中合成的真核蛋白或因折叠的方式不正确,或因折叠的效率低下,结果活性都很低^[8]。此外,要通过 DNA重组体基因生产名符其实的真核生物活性蛋白(如嵌合抗体),

往往需要进行翻译后加工,例如二硫键的精确形成、糖基、磷酸化、寡聚体的形成或者由特异性蛋白酶进行的裂解等等,而这些加工,细菌都不能进行^[3]。因此,大多数学者都采用哺乳动物培养细胞进行鼠-人嵌合抗体的 DNA重组体基因的表达。最常用的培养细胞为杂交瘤 J558L,其优点是使转入的嵌合免疫球蛋白重链基因在骨髓瘤中表达后能与其内源免疫球蛋白λ轻链装配成完整的抗体分子,经糖基化等加工过程,分泌到细胞外,如选择载体合适,转染的效率最高可达 10^{-3} ^[32],有许多方法可将 DNA重组体基因导入细胞,主要包括:①磷酸钙或 DEAE-葡萄糖介导的转染;②聚季铵盐;③原生质体融合;④电穿孔;⑤脂质体;⑥细胞核的直接微注射。具体应用过程,则因外源基因特性和细胞类型等因素影响,转移效率存在明显差异,但大多数学者都采用电穿孔,因其转染效率较高,效果比较理想^[33]。

4 DNA重组体基因所表达产物的检测与分析

4.1 表达产物——嵌合抗体的纯化

尽管已发展了许多纯化抗体分子的技术,但首选的方案仍是以 A蛋白包被的小珠通过吸附和解吸过程来纯化抗体,这种 A蛋白可牢固地结合于免疫球蛋白重链 Fc段第二和第三恒定区。在纯化嵌合抗体时大多数学者采用此法。但是,并非所有免疫球蛋白对 A蛋白的亲合力都相同。由于嵌合抗体的 Fc段均来源于人 Ig,因此在纯化抗体前,必须采用商品化的抗 Fc段同种型免疫学试剂先行测定其重链所属的类型,如抗体属于对 A蛋白亲和力弱的一类(如人的 IgG3),就必须使用其他方法(如硫酸铵沉淀后再用 DEAE纤维素层析)加以纯化^[7]。纯化后取适量样品进行 SDS-PAGE

4.2 嵌合抗体检测

最常用的方法为 ELLSA Arakawa

等^[19]报道,嵌合抗体 ChF11-35和 ChF11-39分别用 CEA及 CEA相关抗原包被与各自的亲本单抗 F11-35和 F11-39比较,结果两种嵌合抗体和亲本单抗一样能与 CEA发生特异性结合反应,而不与任何 CEA相关抗原发生反应,并且竞争抑制曲线显示两种嵌合抗体与其亲本单抗相似。

此外,Western印迹法也是检测抗体的常用方法。此种技术是把电泳分离的蛋白组分从凝胶转移至一种固相支持体,并以针对特定的氨基酸序列的特异性试剂检测之。对于嵌合抗体来说,通常使用的探针为抗体 Yarnold等^[22]用 Western印迹法对嵌合抗体 BR96 IgG₁k进行检测,显示其只能与羊抗人的抗体发生特异性免疫反应,而与羊抗鼠 IgG₃或羊抗鼠 G₂的抗体不发生反应。

除了以上二种方法外,RIA以及间接荧光免疫分析法等也在某些报道^[10, 16, 18, 19, 29]中使用。

4.3 嵌合抗体免疫学作用

通常通过测定嵌合抗体 CDC和 ADCC以及体内抗肿瘤的作用而获得。嵌合抗体的 CDC和 ADCC活性与相应亲本单抗比较各家报道并不一致, Mulligan^[6]、Liu^[11]和 Nishimura^[12]报道嵌合抗体的 CDC和 ADCC活性高于亲本单抗,而 Nakamura^[28]报道使用不同浓度,嵌合抗体可影响 CDC和 ADCC的活性。因此,在今后嵌合抗体用于治疗肿瘤病人时,必须探索嵌合抗体的用量以获得理想的 CDC和 ADCC活性。

5 嵌合抗体的生物学分布以及在荷人肿瘤裸鼠模型中的显像

纯化后的嵌合抗体和单抗原用氩胺-T或 Iodogen法标记¹³¹或¹²⁵I,尾静脉注射,观察其在荷人肿瘤裸鼠模型体内分布情况。Batra等^[21]报道,标记嵌合抗体 chMe1-14在肿瘤% ID/g随时间有增加趋势,4小时为 $11.7 \pm 1.87\%$ ID/g,至24小时达 $38.3 \pm 9.9\%$ ID/g,并保持到注射后7天,而亲本单抗

mMe1-14在肿瘤积累,至 12小时达 19.4±15.4% ID/g,以后迅速下降,放射性标记的嵌合抗体 chMe1-14注射后 72小时在肝脏中的积聚明显低于放射性标记的单抗 mMe1-14至 24小时,标记单抗 mMe1-14在甲状腺积聚为标记嵌合抗体 chMe1-14的 2倍,并随时间推移达到 2~3倍,标记 chMe1-14和 mMe1-14的血液动力学也并不相同,注射后 24小时, chMe1-14在血液中水平高于 mMe1-14,并随时间推移达到 2~3倍,因此 chMe1-14在血中清除低于 mMe1-14 Kanda等^[20]报道,¹²⁵I 标记嵌合抗体 196-14和亲本单抗注入荷人卵巢癌裸鼠模型,4天后处死,对正常组织和肿瘤称重,计算放射性活力,从每克湿重% ID/g中得到肿瘤 正常组织的放射性活力之比,结果显示嵌合抗体和亲本单抗没有明显差异。用¹³¹I 标记嵌合抗体 196-14,于 96小时进行显像,可见在肿瘤部位有明显的放射性浓聚。

6 小结

随着分子生物学技术的不断发展,以及与免疫学科的相互渗透,嵌合抗体技术为肿瘤疾病的免疫治疗展现了新的前景。

由于嵌合抗体保留了完整的鼠抗体的 V区结构,所以同时也就保留了一定程度的抗原性^[34]。任何单抗的可变区都有超变区或称互补决定区(CDRs),这是抗体分子与抗原分子结合的关键部位,而可变区中其它部分变化较小,称为框架区,框架区不与抗原分子直接结合,仅对维持 CDRs空间构型起着重要作用^[35]。由此,我们需要进一步研究鼠源单抗的 CDRs区,并将 CDRs区移植到人抗体框架上;建立嵌合抗体的基因库;探索嵌合抗体使用的最佳剂量,以达到最大的 CDG ADCC活力;解决嵌合抗体的大量制备问题……。所有这些,都是我们将要做的复杂工作。

参 考 文 献

1 Kohler G and Milstein C. Nature, 1975; 256: 495

2 Winter G and Milstein C. Nature, 1991; 349: 293
 3 Morrison SL. Science, 1985; 229: 1202
 4 钱关祥,陈诗书. 国外医学分子生物学分册, 1991, 13(6): 267
 5 Maniatis T et al. Cell, 1978; 15: 687
 6 Mulligan RC et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78: 2072
 7 Southern PJ and Berg P. J Mol Appl Genet, 1982; 1: 327
 8 Sambrook J et al. Molecular cloning Ined. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 766
 9 Kudo A et al. J Immunol, 1985; 135: 642
 10 Sahagan BG et al. J Immunol, 1986; 137: 1066
 11 Liu AY et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 3439
 12 Nishimura Y et al. Cancer Res, 1987; 47: 999
 13 Steplewski Z et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 85: 4852
 14 Beidler CB et al. J Immunol, 1988; 141: 4053
 15 Komori S et al. Clin Exp Immunol, 1988; 71: 508
 16 Hardman N et al. Int J Cancer, 1989; 44: 424
 17 Neumaier M et al. Cancer Res, 1990; 50: 2128
 18 Koga H et al. Hybridoma, 1990; 9: 43
 19 Arakawa F et al. Hybridoma, 1993; 12: 365
 20 Kanda H et al. Hybridoma, 1994; 13: 359
 21 Batra SK et al. Hybridoma, 1994; 13: 87
 22 Yarnold S and Fell HP. Cancer Res, 1994; 54: 506
 23 Southern EM. J Med Biol, 1975; 98: 502
 24 Kudo A et al. Gene(Amst), 1985; 33: 181
 25 Sun LK et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 214
 26 Orlandi R et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 3833
 27 Huse WD et al. Science, 1989; 246: 1275
 28 Nakamura K et al. Cancer Res, 1994; 54: 1511
 29 Velders MP et al. Cancer Res., 1994; 54: 1753
 30 吴文书等. 中国免疫学杂志, 1992; 8: 161
 31 刘健等. 生物化学杂志, 1993; 9(1): 70
 32 Neuberger MS et al. Nature, 1984; 312: 604
 33 郭虹汾等. 中国免疫学杂志, 1995; 10: 138
 34 赵洪礼等. 国外医学免疫学分册, 1992; 15: 295
 35 Co MS et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 2869