

用基因工程技术制备多价微型抗体的研究

上海第二医科大学瑞金医院核医学科(上海,200025) 杨卫东综述 朱承谟 吴祥甫* 审校

摘要:单链抗体(ScFv)是利用基因工程技术对抗体进行改造以降低分子量而有利于放免显像,在此基础上发展的多价微型抗体则进一步提高了抗体的特性。多价微型抗体基因工程的制备是利用DNA重组技术在ScFv基因后连接一段能自我折叠形成多聚体的肽段序列,融合基因经E. Coli表达,表达蛋白质由于自我折叠区的肽段相互组合形成多聚体,从而制备出多价微抗。目前已有从二价到四价微抗的成功制备,其主要区别是自我折叠区肽段的不同或者ScFv内V_H与V_L之间连接方式的不同。实验结果表明,多价微抗由于抗原结合位点数目的增加而有效地提高了其亲和性,所形成的抗原-抗体复合物更为稳定,更适宜于放免显像和放免治疗。

关键词:单克隆抗体 多价微型抗体 多聚体 基因工程 大肠杆菌

单克隆抗体在放免显像和放免治疗中已得到广泛研究,但由于完整抗体分子量较大,穿透性较差而一直未能得到理想结果。利用基因工程技术可进行抗体改造。如单链抗体(ScFv),它是抗体活性的最小单位,由重链可变区(V_H)与轻链可变区(V_L)经一段柔性肽段相连而成,其分子量仅为完整抗体分子的六分之一,血清清除快,因而更适合放免显像。但ScFv的缺点为只有一个抗原结合位点,其亲和力较亲本单抗低,因分子量较小而在靶组织滞留时间短,故不适宜放免治疗。近年来在ScFv基础上已设计多种方法将两个或两个以上的ScFv相连构成多价微型抗体(简称多价微抗),在保持较小分子量的同时增加抗原结合位点的数目,可有效提高亲和性。目前,多价微抗制备方法主要有三种:①杂交杂交瘤法;②化学合成法;③基因工程法。杂交杂交瘤法由于轻、重链的随机折叠易形成非均一性的产物,双特异性抗体或多价微抗只占很少一部分;化学合成法工艺复杂,且会降低抗体的活性;基因工程法用DNA重组技术形成融合基因制备多价微抗,方法成熟,在E. Coli(大肠杆菌)表达,可大量生产均一的多价微抗,产物易于提纯,成本较低,因而近年来日益受到重视。

多价微抗:即用一定的方法将两个或两个以上的单抗原结合位点的ScFv连接而成具有两个或两个以上抗原结合位点的抗体,其分子量较ScFv大,但较完整抗体分子小,而其抗原结合位点数目等于或多于一般完整抗体,因此在固有亲和性不变的情况下提高了功能亲和性。如在抗原密度较高时,双价抗体与单价抗体形成抗原-抗体复合物的固有亲和性相比,其功能亲和性可提高1000倍^[1],同时多价微抗与抗原结合形成的抗原-抗体复合物也比较稳定,因此,应用多价微抗的策略可以使一些亲和力一般的抗体也会变得非常有用。近年人们对用基因工程技术生产多价微抗已进行了大量的实验,并取得了迅速发展。现就基因工程技术制备多价微抗的方法综述如下。

1 双价微抗的制备

已有多种方法可进行双价微抗的制备,通常情况下是在ScFv的基因序列之后接一段折叠区基因序列,该区一般包括三部分:一段较长的柔韧的胶链序列;一段能自我折叠聚合形成二聚体结构的序列;最后一段是含有半胱氨酸序列的尾部。该折叠区分子量一般为2~5ku(kD),并已可制成药盒,很容易

* 中国科学院上海生物化学研究所(上海,200031)

与 ScFv 融合。在此方面, Pack 等^[2]做了大量工作,他们在 1992 年就设计出一种能在 *E. Coli* 表达双价抗体片段的方法:选择空间构象已知的 McPc603 单抗,在其羧基末端连接一段柔韧的鼠 IgG3 上段胶链区序列,一段双歧性螺旋构型的基因序列,其后再接一段半胱氨酸肽段。在该设计中,ScFv 后的自我折叠的寡聚区分子量非常小,该折叠区不影响抗体的正确折叠。

Pack 等人还选择了两种双歧性螺旋结构进行研究,一种是螺旋束:早在 1986 年, Esiberg D 等人即已设计合成了螺旋束并进行了广泛的研究,螺旋束在自然状态下以反平行方向排列而形成束状结构,螺旋束可以是单个螺旋分子,也可由两个或两个以上的分子聚合而成。为研究融合蛋白是否也可形成二聚体, Pack 等人于 ScFv 后分别依次连接一段柔韧的胶链区和一个单独螺旋分子形成 scHLX,在其后再接一段亲水性的半胱氨酸尾部,以增强其细胞穿膜能力,形成 scHLXc。在该设计中,柔韧的胶链区选自鼠 IgG3 的上段胶链区。虽然鼠 IgG2 α 或 IgG2b 胶链区柔韧性较鼠 IgG3 更好,但鼠 IgG3 亲水性较强,因而更易于使融合蛋白在 *E. Coli* 穿膜转运进入胞质,实现功能表达。另一种螺旋结构是可二聚化的亮氨酸拉链:通过对亮氨酸拉链晶体结构的研究认为,亮氨酸拉链分子结构是平行的环状螺旋结构,为 α 螺旋。Pack 等用酵母真核转染因子 GCN4 的亮氨酸拉链作为二聚体, ScFv 与鼠 IgG3 连接后再与亮氨酸拉链相连构成 scZIP,其后若接半胱氨酸肽段则形成 scZIPc。总之,以上双价抗体制备的形式都是: ScFv+ 鼠 IgG3 上段胶链区+ 双歧性螺旋结构(螺旋束或亮氨酸拉链)+ (或不加)半胱氨酸肽段。该复合物在 *E. Coli* 内表达,表达物进入胞质后通过二聚体结构的相互聚合形成二聚体复合物,最终生成双价微抗。用 ELISA(酶联免疫吸附测定)同时对四种产物的亲和性进行比

较,结果:含半胱氨酸肽段的 scHLXc 较相应不含半胱氨酸肽段的 scHLX 亲和性高。这可能是由于 scHLX 在由单价向双价组装的平衡式中产生较多的单价,因为折叠区单个螺旋束的能量较小,而其后连接一段半胱氨酸的亲水性肽段可在分子内形成二硫键,使多聚体较为稳定,说明半胱氨酸肽段在二聚体中起到一定的促进作用;但是,不含半胱氨酸肽段 scZIP 与含半胱氨酸肽段的 scZIPc 的亲和性相似,原因尚不清楚。该研究表明,二聚 ScFv 片段能在菌体内进行组装,选用双歧性螺旋结构作为二聚区能在 *E. Coli* 进行适宜的表达、穿膜转运并折叠,同时二聚体几乎是同时发生,在一些适当位置含有半胱氨酸肽段还可形成二硫键结构。

为了进一步提高亲和性, Pack 等人^[3]又进行实验:将自我折叠区的单螺旋束改为双螺旋束(该双螺旋束是由两个相同的单螺旋束中间经一段旋转序列相连,形成 Helix-turn-Helix),其复合物序列为 ScFv-鼠 IgG3 上段胶链区-Helix-turn-Helix 其后连接两个便于克隆的氨基酸,形成 scdHLX,该复合物在 *E. Coli* 表达,每两个分子聚合形成较稳定的 4-螺旋束结构,产生更多的二聚体。ELISA 分析结果表明,该法所获得的双价微抗的亲和性与完整 IgA McPc603 没有区别,亲和力的提高一方面是二聚体生成增加,另一方面是由于折叠区序列长度增加,使得两个抗原结合位点可以在更长距离与抗原结合。

ScFv 是由重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 之间经柔性肽段连接而成 (V_H -linker- V_L)。目前,多用 $(Gly_4Ser)_3$ 作为柔性肽段,该连接物具有一定柔韧性和长度,可使 V_H 与 V_L 相互结合成具有活性作用的抗体片段。研究表明, ScFv 的活性不仅依赖于 V_H 与 V_L 的表面结构,还与连接物的长度有关: V_H 与 V_L 之间经不同长度的肽段连接可形成不同价态的微抗,当连接物的长度大于 12

个氨基酸时,可形成稳定的单价 ScFv^[4,5],当连接物长度小于 12个氨基酸时,两个 ScFv 聚合形成双聚体,生成双价微抗^[6]。这主要是因为当连接物长度较小时 V_H与 V_L之间距离较近,无法进行旋转、折叠、组合成具有一定空间构象的 ScFv而需借助另一分子。分子模型与晶体结构的研究也都证明了这一点。因此,用较小的连接物连接 V_H与 V_L可直接获得双价微抗。

此外,McGregor等^[7]报道,在制备 ScFv 时用整个 K链代替 V_L(V_H-Linker-Cl),则可通过 G 间的相互作用进行连接,获得二聚体。另外,在 ScFv 片段后连接一段半胱氨酸肽段^[8]、一个 Gly⁴Cys 尾部^[9]、一段胶链肽^[10]或 Cys-Ile, His5 尾部^[11]等均可获得双价微抗。

2 三价微抗的制备

如前所述,制备单链抗体时,V_H与 V_L之间连接肽段长度的不同可产生不同价态的微抗,当连接物长度小于 12个氨基酸时产生双价微抗,直接将 V_H与 V_L相连其结果也是双价。而 Kortt 等人^[4]在将抗体 NC10的 V_H的 C端与 V_L的 N端直接相连构成 ScFv-0 时却得到三聚体。最初,他们认为可能是该抗体的特有现象,但进一步将鼠单抗 11-1G10的 V_H与 V_L直接相连,结果也可形成稳定的三聚体。Kortt 等人^[4]对单抗 NC10的 ScFv-0 ScFv-5(V_H与 V_L之间由 5个氨基酸连接)、ScFv-10(V_H与 V_L之间由 10个氨基酸连接)进行了对比研究,结果 ScFv-5、ScFv-10均形成稳定的二聚体,而 ScFv-0形成三聚体。同样,单抗 11-1G10的 ScFv-15形成稳定的单价而 ScFv-0形成三聚体,且 ScFv-0的亲和力得到进一步提高,其与抗原结合比较牢固,解离速度慢。ScFv-0三聚体与 NC-41结合形成的复合物的解离率 $K_d \approx 8.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$,而 ScFv-15与 NC-41结合形成的复合物的解离率 $K_d \approx 3.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,前

者较后者慢 4倍。根据以上研究,Iliades 等人^[12]认为,将 V_H与 V_L直接相连所产生的最佳复合物是三聚体,较 V_H与 V_L经 5~10个氨基酸肽段相连要优越,其亲和力进一步提高,所形成的复合物更稳定。同时他们也推测,这一方法可能也适宜于其它抗体进行三价微抗的制备。

3 四价微抗的制备

微型抗体的价态主要取决于折叠区连接肽段所形成的聚合物的特性,因此连接肽段的不同可形成各种不同价态的微抗。用四价肽段进行连接可形成四价微抗。目前已报道有数种四价肽段。

一种是修饰的亮氨酸拉链:将转染因子 GCN4进行修饰,使其表面的 α 位的 Val 变成 Leu, d 位的 Leu 变成 Ile,结果形成的肽段能自我组合成四价稳定复合物。Pack 等人^[13]用修饰的 GCN4成功地进行了四价微抗的制备,他们将 ScFv 与柔性胶链(鼠 Ig G3上段胶链区)相连,其后接修饰的可形成四聚体的 GCN4,将其在 E. Coli 中表达,表达物在胞周质中聚合成四价复合物,结果与未修饰的 GCN4制备的双价微抗进行比较,修饰的 GCN4所制成的四价微抗的功能亲和性较二价微抗高,所形成复合物更为稳定。

Rheinnecker 等人^[14]用人 P53蛋白同样制备了四价微抗。通过对人 P53四聚晶体结构分析表明,该四聚体是由两个二聚体经 α -螺旋和 β 片层内部疏水性结合而成,每个二聚体都是由两个反向平行的单体结合而成,整个四聚体形似蜘蛛网。在制备四价微抗时,他们用人 Ig G3上段胶链区代替常用的鼠 Ig G3上段胶链区,因此该四聚体可降低免疫反应,其表达产物经 ELISA 和 BIACore 分析亲和性较单价微抗明显提高。

此外,Kipriyanov 等人^[15]将 ScFv 与链霉亲和素融合后进行表达,结果也形成四聚体。当前进行的许多预定位实验研究多将抗

体与链霉亲和素经化学法相连,而 Sc Fv 与链霉亲和素融合表达,不仅提高了亲和性且方法简单,因此可以想象该法将更为优越

4 小结

为获取亲和力更高、分子量较小的更理想抗体,可利用基因工程技术对抗体进行改造而制备多价微型抗体。可以推断多价微抗也是放免显像和放免治疗中的一个发展方向,近年来已制备了从二价到四价的微抗,且方法多种多样,其总的目的是提高抗体的亲和性,并使形成的抗原抗体复合物更为稳定,更适宜放免显像和放免治疗。因而,积极进行这方面的研究将有助于放免显像和放免治疗的发展。

参 考 文 献

- 1 Lee RT et al. Arch Biochem Biophys, 1992; 129: 299
- 2 Pack P et al. Biochemistry, 1992; 31: 1579~1584

- 3 Pack P et al. Biotechnology, 1993; 11: 1271~1277
- 4 Kortt AA et al. Eur J Biochem, 1994; 221: 151~157
- 5 Whitlow M et al. Protein Eng, 1994; 7: 1017~1026
- 6 Holliger R et al. Protein Eng, 1996; 9: 299~305
- 7 McGregor DP et al. Mol Immunol, 1994; 31: 219~226
- 8 Cumber AJ et al. J Immunol, 1992; 149: 120~126
- 9 Adams GP et al. Cancer Res, 1993; 53: 4026~4034
- 10 King DJ et al. Cancer Res, 1994; 54: 6176~6185
- 11 Kipriyanov SM et al. Mol Immunol, 1994; 31: 1047~1058
- 12 Iliades P et al. FEBS Letter, 1997; 409: 437~441
- 13 Pack P et al. J Mol Biol, 1995; 246: 28~34
- 14 Rheinnecker M et al. J Immunol, 1996; 157: 2989~2997
- 15 Kipriyanov SM et al. Protein Eng, 1996; 9: 203~211

(收稿日期: 1998-12-10)

多巴胺受体显像剂的研究概况

华西医科大学第一附属医院核医学科(成都, 610041) 曹国祥综述 谭天秩审校

摘 要:多巴胺受体的表达及功能与多种精神和神经性疾病的病理相关联,多巴胺受体显像是目前分子核医学的研究热点,其显像剂的研究有着极为重要的意义。本文对最近几年来研制和应用的多巴胺 D₁受体显像剂和 D₂受体显像剂进行了简要的综述。

关键词:多巴胺受体 显像剂 SPECT PET

多巴胺受体显像剂是多巴胺受体的激动剂或拮抗剂,是通过适当的结构修饰或改造,再标记上可供体外探测的放射性核素后所得的化合物。临床上根据配体与受体结合的选择性,可将多巴胺受体显像剂分为 D₁和 D₂受体显像剂,又根据放射性核素的物理学性质的不同,按适用的仪器分为 PET 和 SPECT 多巴胺受体显像剂

1 多巴胺 D₁受体显像剂

在多巴胺 D₁受体显像剂的研究中,较为成功的是适用于 PET 显像用的 D₁受体显像剂。如:用 ¹¹C 标记的 SCH 23390 NNC 756^[1]和 SKF 82957^[2],其中以 ¹¹C-SCH 23390 在临床应用较为广泛。另外,¹¹C-SCH 39166^[1]、¹¹C-NNC 687、¹¹C-SKF 75670^[1]、¹¹C-