

文章编号: 1001-098X(2005)06-0255-03

单链抗体研究进展及其在医学中的应用

秦丽莉 张春明

摘要 自英国和日本学者发现白喉抗毒素以来,人们对于抗体的研究经历了多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体3个阶段,其中单链抗体由于具有相对分子质量小、穿透力强、血中半衰期短、抗原结合特异性强、免疫原性弱和可在原核细胞中表达等特点而倍受人们关注。

关键词 单链抗体;免疫显像诊断;靶向治疗

中图分类号 Q511 **文献标识码** A

The research progress and medicine application of the ScFv antibody

QIN Li-li, ZHANG Chun-ming

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract Since the scholar of England and Japan had found the diphtheria antitoxin, the research of the antibody has experienced three phases: polyclonal antibodies, monoclonal antibodies and genetically engineered antibodies. In recent years, far more attention has been paid to single-chain antibody by researchers owing to its small molecular, strong ability of penetration, short half-lives in blood, high specificity to combine with the corresponding antibody, weak immunogenicity and possibility to be expressed in prokaryocyte.

Key Words single-chain antibody; immunoimage diagnose; targeted therapy

自从英国和日本学者发现了白喉抗毒素,并首次将免疫血清用于传染病的被动免疫治疗和血清学诊断以来,各国学者纷纷投入到抗体的研究工作中,并期望找到诊断和治疗疾病的有效方法。1975年, Kohler 和 Milstein 发现并利用杂交瘤技术,成功地制备出具有高特异性和亲和力的单克隆抗体,克服了多克隆抗体特异性差的缺点,但仍存在缺欠,其中最致命的是单克隆抗体作为一种异源蛋白注入体会引发抗鼠抗体的产生,这不仅影响了单抗疗效的发挥,还会干扰其在体内的正常分布,因而限制了临床应用。进入20世纪80年代后,分子生物学技术的快速发展促进了抗体研究的进展,基因工程抗体应运而生,其中以单链抗体最受人们关注。自从1988年 Bird 和 Huston 成功研制了第一个单链抗体以来,目前已研制成功并生产了多种单链抗体,除用于基础医学研究和疾病的体外诊断外,有一些已开始用于临床治疗。

1 单链抗体制备原理

首先用特异抗原免疫动物获得致敏淋巴细胞,再将致敏淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合,获得阳性杂交瘤细胞,从该阳性杂交瘤细胞中提取抗体轻、重链可变区 mRNA,用逆转录-聚合酶链反应技术将 mRNA 反转录成 cDNA 并进行克隆扩增,再将此 cDNA 克隆到表达载体中,即可在原核表达系统中表达出目的抗体。

2 单链抗体的特点^[1]

单链抗体是一种新型重组蛋白,是将抗体重链和轻链可变区片段用一条弹性短肽连接而成的小分子抗体片段。与完整抗体分子相比,它具有以下特点:①不含有抗体分子的恒定区片段,因而免疫原性弱,用于人体几乎不会产生抗鼠抗体;②对相应抗原具有较高的亲和力和特异性;③相对分子质量小,穿透力较强,在体内停留的时间较短,适用于疾病的免疫显像诊断和导向治疗;④由于相对分子质量较小,不需要进行糖基化修饰即可形

基金项目:天津市科技攻关培育项目资助(043102211)

作者单位:300192 天津,中国医学科学院 中国协和医科大学放射医学研究所

成有功能的抗体分子,因而可以在原核表达系统中进行表达并容易获得。

3 单链抗体的研究进展

单链抗体的历史虽然很短,但由于它具有多方面的优越性而备受关注,加之近年来分子生物学技术的快速发展,为单链抗体研究提供了条件,人们不断改进单链抗体的结构和特性,使它更符合人们的要求。单链抗体的研究经历了3个阶段:

(1) 单价单链抗体:即传统的单链抗体,是由一条长15~25个氨基酸残基的弹性短肽两端分别连接抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)构成,连接方向可以是 V_H -linker- V_L 或 V_L -linker- V_H 。连接肽(linker)的氨基酸组成通常为3个五氨基酸单位(Gly_4 -Ser)₃,具有一定的弹性。在单链抗体的折叠过程中, V_H 与 V_L 配对结合形成一个抗原结合部位,只能和一个抗原决定簇特异性结合,因此是单价的,其与抗原的结合能力相对于整个抗体分子较弱。

(2) 单链抗体多聚体:当 V_H 与 V_L 之间的弹性短肽长度不足12个氨基酸残基时,同一单链抗体分子的 V_H 和 V_L 之间无法配对,这时两个甚至数个分子之间相互配对,形成两个或两个以上抗原结合位点,可结合多个抗原决定簇,因此被称为单链抗体多聚体。它具有多个抗原结合位点,大大增强了抗原结合能力,因而在一定程度上克服了传统单链抗体亲和力和弱的缺点,并且与抗原结合形成的复合物更加稳定,更有利于用于体内。

(3) 双特异性单链抗体:1993年,Holliger P等^[2]将两种不同抗体的 V_H 和 V_L 基因混合于同一表达体系,在表达过程中,两种抗体的 V_H 、 V_L 基因发生重新组合,表达出两种分子,即 V_{H1} -linker- V_{L2} 和 V_{H2} -linker- V_{L1} 。这两种分子互相配对,形成的单链抗体可以同时与两种不同特异性抗原结合,因此被称为双特异性单链抗体。双特异性抗体可以与放射性核素、药物等分子结合,作为“生物导弹”用于疾病的诊断和治疗,具有广泛的应用前景。

4 单链抗体在医学中的应用

自从单链抗体问世以来,不仅为临床疾病的诊断和治疗开辟了一条新道路,而且也为基础医学研

究提供了一种新方法。

单链抗体尤其是双特异性单链抗体由于相对分子质量小,具有很强的穿透力,常被作为靶向载体连接放射性核素、生物素和酶形成融合蛋白,借助于抗原抗体相互作用的特异性进行病灶的免疫显像诊断,具有较高的特异性和敏感性。目前已有多种单链抗体用于肿瘤、心血管疾病及各种感染性疾病的临床检测,均取得了较满意的效果。单链抗体也可以连接放射性核素、免疫毒素和药物,将其靶向运输到病灶部位,不仅能使病灶部位达到较高的药物浓度,更好的发挥药效,而且减少药物对正常组织的毒副作用,因而具有广泛的应用前景。

4.1 肿瘤的诊断和治疗

Buchsbaum DJ^[3]用基因转染方法诱导肿瘤细胞表达生长激素受体,再用放射性标记的多肽和单链抗体进行肿瘤的显像和治疗。我国学者Wang Xiang-Bin等^[4]最近研制出一种抗肿瘤相关抗原、CD3、CD28的三功能单链抗体,体外实验证明,能够有效地激活T细胞,使活化的T细胞趋向并杀伤癌胚抗原阳性肿瘤细胞。

4.2 心血管疾病的诊断和治疗

Hagemeyer CE等^[5]将抗凝血多肽与纤维蛋白特异性单链抗体相连,成功制备了一种双特异性抗体,它具有特异性结合纤维蛋白和纤维蛋白溶酶原催化剂的双重活性,可有效地提高抗凝肽对凝血因子Xa的抑制作用,增强病灶局部抗凝血作用,同时减少了出血并发症的发生。Ritsch A等^[6]研制出抗胆固醇酯转运蛋白(cholesteryl ester transfer protein, CETP)的单链抗体,与CETP特异性结合,影响其对脂类代谢的调节,可作为研究CETP在动脉粥样硬化中作用的有力工具。

4.3 感染性疾病的诊断和治疗

Devadas K等^[7]发现,抗gp41单链抗体和白细胞介素-16转染的T细胞能长期明显抑制人免疫缺陷病毒-1的复制周期,从而抑制艾滋病发病。Yoshida S等^[8]报道一种双特异抗体,能特异性结合人恶性疟表面蛋白和人T细胞CD3抗原,有效活化T细胞,诱导噬菌作用和疟原虫生长抑制,并诱导产生细胞因子,从而杀伤寄生虫。酶联免疫吸附分析和免疫组化分析结果表明,抗乙肝表面抗原单链抗体具有特异性结合乙肝表面抗原的特性,且

与正常组织及丙肝病毒不发生反应,因此可用于乙肝的特异诊断指标⁹。

4.4 辐射损伤的防护

机体受到射线照射时, Ras 被激活, 诱导产生核因子- κ B 并使之活化, 调节细胞凋亡。Russell JS 等¹⁰报道, 抗 Ras 单链抗体与 Ras 特异性结合, 能有效抑制辐射诱导的核因子- κ B 活化, 防止辐射造成的机体损伤。

5 结语

由于单链抗体克服了完整抗体的缺欠, 同时又具有众多完整抗体所不具有的优点, 近年来吸引了大量学者对其进行研究, 其制备技术已趋于成熟。随着抗体库技术的兴起和逐渐成熟, 单链抗体的制备由传统的细胞克隆向细菌克隆转变, 直接从人抗体基因库中获得轻、重链可变区基因进行重组、克隆和表达, 摆脱了细胞融合的繁琐过程和动物免疫的限制, 大大提高了工作效率。而近年出现的噬菌体展示技术、核糖体展示技术以及 mRNA 展示技术更明显地提高了抗体及抗体基因的筛选效率^{11,12}, 并可同时用体外进化法对抗体特性进行定向改造, 单链抗体将在疾病的诊断和治疗方面发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Luo D, Geng M, Noujaim T, et al. An engineered bivalent single-chain antibody fragment that increases antibody binding activity[J]. *Biochemistry*, 1997, 121(5): 831-834.
- 2 Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabody": Small bivalent and bispecific antibody fragments[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(14): 6444-6448.
- 3 Buchsbaum DJ. Imaging and therapy of tumors induced to express somatostatin receptor by gene transfer using radiolabeled peptides and single chain antibody constructs[J]. *Semin Nucl Med*, 2004, 34(1): 32-46.
- 4 Wang XB, Zhao BF, Zhao Q, et al. A new recombinant single chain trispecific antibody recruits T lymphocytes to kill CEA positive tumor cells in vitro efficiently[J]. *J Biochem*, 2004, 135(4): 555-565.
- 5 Hagemeyer CE, Tomic I, Jaminet P, et al. Fibrin-targeted direct factor Xa inhibition: construction and characterization of a recombinant factor Xa inhibitor composed of an anti-fibrin single-chain antibody and tick anticoagulant peptide [J]. *Thromb Haemost*. 2004, 92(1): 47-53.
- 6 Ritsch A, Ebenbichler C, Naschberger E, et al. Phage displayed recombinant single-chain antibody fragments with high affinity for cholesteryl ester transfer protein (CETP): cDNA cloning, characterization and CETP quantification [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(3): 247-255.
- 7 Devadas K, Zhou P, Tewari D, et al. Inhibition of HIV-1 replication by the combined action of anti-gp41 single chain antibody and IL-16 [J]. *Antiviral Res*, 2003, 59(1): 67-70.
- 8 Yoshida S, Kobayashi T, Matsuoka H, et al. T-cell activation and cytokine production via a bispecific single-chain antibody fragment targeted to blood-stage malaria parasites [J]. *Blood*, 2003, 101(6): 2300-2306.
- 9 Zhong Y, Cheng J, Shi S, et al. Screening and application of human-derived HBsAg bacteriophage single chain antibody in clinical diagnosis[J]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2002, 16(3): 223-225.
- 10 Russell JS, Raju U, Gumin CJ, et al. Inhibition of radiation-induced nuclear factor- κ B activation by an anti-Ras single-chain antibody fragment [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(8): 2318-2326.
- 11 Hanes J, Pluckthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(10): 4937-4942.
- 12 Lipovsek D, Pluckthun A. In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 290(1-2): 51-67.

(收稿日期: 2005-01-28)

本刊编辑部电子邮箱更名启事

因本刊自 2006 年起更名为《国际放射医学核医学杂志》, 原电子邮箱作废, 启用新的电子邮箱, 请读者和作者发送邮件时注意改用新的 Email: gjfh2006@sina.com

本刊编辑部