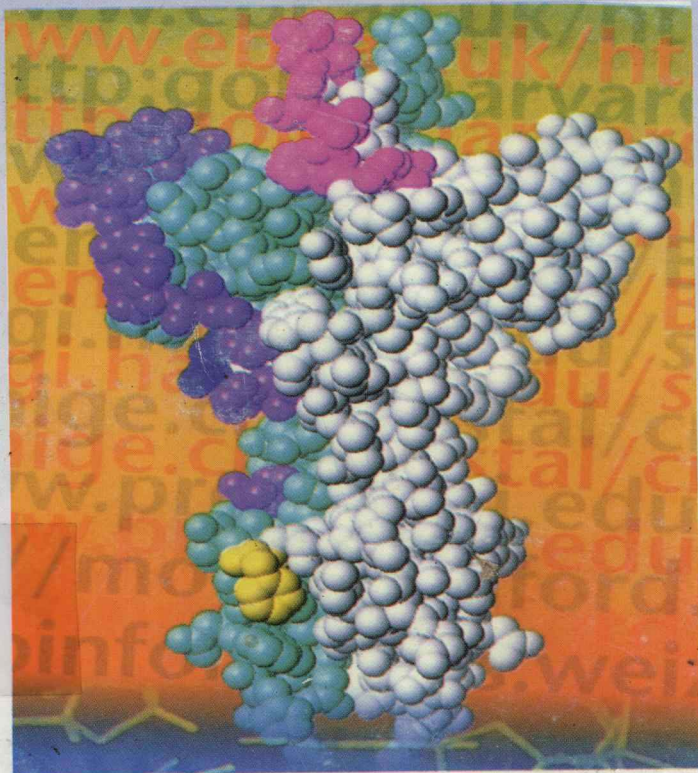


基因工程抗体

主 编 黄建生 郭明秋

副主编 陈爱社 林元凯

GENETIC ENGINEERING ANTIBODY



华南理工大学出版社

基因工程抗体

主 编 黄建生 郭明秋

副主编 陈爱社 林元凯

华南理工大学出版社

• 广州 •

内 容 提 要

本书共分十五章,首次系统阐述了各类基因工程抗体的原理、构建、表达、应用等;详细分析了噬菌体抗体库技术及定点突变对抗体亲和力的影响;介绍了三种行之有效的基因工程表达系统及抗体的亲和层析纯化法;综述了我国基因工程抗体的研究现状并展望基因工程抗体的研究前景。

本书可供免疫学、分子生物学、细胞生物学、临床医学等领域研究人员参考,也可作为研究生专题讲座教材。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程抗体/黄建生,郭明秋主编. —广州:华南理工大学出版社,1997.12

ISBN 7-5623-1183-8

I. 基…

II. ①黄…②郭…

III. 基因-遗传工程-技术

IV. Q78

华南理工大学出版社出版发行

(广州五山 邮编 510641)

责任编辑 潘宜玲

广东佛冈印刷厂印装

开本:850×1168 1/32 印张:7.75 字数:198千

1997年12月第1版 1997年12月第1次印刷

印数:1—1100

定价:18.00元

序

特异性免疫应答可以以抗原抗体专一性的结合为代表。它的出现,是免疫系统进化的高级形式。人类对抗体的认识和应用,突出地表现在用抗血清制备疫苗。这些疫苗在人类与疾病的斗争中起了很大的作用。随后是免疫球蛋白分子结构、编码基因及抗体多样性产生机理的阐明和研制了单克隆抗体。成功地获取单抗,在理论上,是以免疫学的进展例证了生命科学发展中极为重要的突变和选择学说。而且,单抗作为医学生物学中最精细的探针之一,大大推动了诸如抗原表位分析等基础研究的发展。在另一方面,单抗又被十分广泛地应用于人体疾病的免疫诊断和免疫治疗。

然而,人体内引入鼠源性单抗所涉及的异种分子免疫原性问题,成了应用上的重大障碍。90年代,随着分子生物学和基因工程建设的迅猛发展和对免疫学的渗透,以改造鼠源性单抗为主要目标的基因工程抗体的研制迅速兴起。多种新型制剂相继出现,大大拓宽了抗体的应用范围,提高了应用效果,其进展令人鼓舞。不仅如此,抗体库,特别是噬菌体抗体库的构建和应用,有可能逐步取代传统的杂交瘤技术,展示了不经过免疫而直接获取特异性人源抗体的新途径。这些都是生物技术发展中革命性

的突破,是基础理论研究转化为实际应用的典范,具有良好的产业化前景。

基因工程抗体的研究在国际上方兴未艾,我国已开始急起直追,每年有不少的学术论文和综述问世,但还没有一本能够全面而系统地介绍基因工程抗体的专著。广州第一军医大学的黄建生等中青年研究人员,在王昌才教授和任大明教授的指导下,面对挑战,不畏艰难,结合他们在分子生物学领域中的研究经历和实践,尽心竭力,终于将这本专著在较短的时间内奉献给读者。

这本书在综合了大量文献报告的基础上,认真取舍,合理编排,反映了基因工程抗体研究的发展、基本原理和最新进展,并十分详尽地介绍了有关的实验技术。这对于该领域的研究人员是一本很好的参考书,其他领域的读者也可以从中了解到基因工程抗体的研究状况。希望本书的出版能对我国基因工程抗体和分子免疫学的研究有所推动,并激励更多的青年学者深入地探索生命科学的奥秘,以新的成果服务于发展的医学、工业和农业。

周光炎 教授

上海第二医科大学

上海市免疫学研究所

1997年1月

前 言

1975年,Kohler及Milstein通过杂交瘤技术成功制备出单克隆抗体,成为免疫学乃至生命科学中划时代的伟大进展之一,为此这两位科学家获得了1984年诺贝尔医学与生理学奖。与多克隆抗体相比,单克隆抗体由于具有特异性好、亲和力强、效价高、血清交叉反应少等优点,已经在基础研究、临床诊断及治疗、免疫预防等领域中发挥了极为重要的作用。

然而单克隆抗体本身也存在一些难以解决的问题,包括生产复杂、耗时长、筛选困难、价格昂贵、具有较强的免疫原性、靶部位吸收较差、半衰期较短、人单克隆抗体建株困难、难以获得稀有抗体等,因此单克隆抗体难以获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准,大大限制了其在临床上的推广应用。

近十几年来,随着分子生物学、分子免疫学的飞速发展,人们已经可以利用基因工程等手段对抗体基因进行改造,制备新型的抗体,即基因工程抗体(genetic engineering antibody)。1984年Morrison首次报道了鼠/人嵌合抗体以来,基因工程抗体的研究发展迅猛。这不仅使抗体的制备更为简单有效,而且大大拓宽了抗体的应用范围。基因工程抗体在很大程度上弥补了杂交瘤单克隆抗体的不足,已成为获得人源化抗体的重要途径,因此该领域的研究被公认为当今生命科学、生物技术领域中的重大突破,并大有取代杂交瘤单克隆抗体之势。

基因工程抗体将抗体基因置于人工操纵之下,抗体分子的大小、亲和力高低、细胞毒性强弱、抗体片段是否接上有用的效应分

子、抗体是否具有催化功能等都可根据治疗、诊断的需要进行设计与操作,这是杂交瘤技术及化学合成方法所不能比拟的。人抗体组合文库的构建,使获得针对任何一种抗原决定簇的特异性抗体成为可能,将有希望结束长期以来依靠抗原免疫来获得抗体的局面,而且可以解决人体不能被随意免疫的难题。体外模拟抗体亲和力成熟以及抗体库模拟自身抗体生产过程的成功,将可在基因水平上研究免疫系统的本质及自身免疫性疾病的发病机理。因此有理由认为,基因工程抗体有着强大的生命力,在未来的疾病诊断及治疗中(特别是肿瘤的导向诊断及治疗)将发挥极其重要的作用。

我国自 90 年代以来,才陆续开展了基因工程抗体的研究工作,起步较晚。但该领域的研究已经受到充分重视,得到国家“863”计划、国家自然科学基金等的资助,近两年来发展较快。目前已经有 10 多家研究单位开展了此项工作,涉及到嵌合抗体、小分子抗体、双特异性抗体、催化抗体以及抗体库的构建等内容。

本书旨在对该领域的研究作一粗浅的归纳总结,希望能为我国基因工程抗体的研究提供一点有用的信息。本书在编著过程中,得到上海第二医科大学免疫学研究所所长周光炎教授、中国科学院上海细胞生物研究所叶敏研究员的指导,复旦大学遗传学研究所任大明教授及第一军医大学分子生物化学研究所王昌才研究员为本书的出版也花费了不少心血,中国科学院上海生物化学研究所陈锦辉博士、第一军医大学热带医学研究所董文其副教授及 Pharmacia 公司赵迎经理提供了部分材料,复旦大学遗传学研究所张伯生等老师,姬毅、吴敏等同学也参与了该书的部分编写工作,在此一并表示我们最衷心的感谢!囿于我们的知识及能力水平,书中难免会有错漏、疏忽等不足之处,恳请各位专家及读者批评指正。

编 者

1996 年 11 月

目 录

第一章 抗体总论	1
一、抗体分子的基本结构与功能	1
二、多克隆抗体	3
三、单克隆抗体	3
四、单克隆抗体与多克隆抗体的比较	6
五、人/人杂交瘤	7
六、单克隆抗体的局限性	8
七、基因工程抗体	9
第二章 嵌合抗体	12
一、原理	12
二、表达载体的构建	13
三、抗体基因转染宿主细胞	17
四、表达	18
五、药物动力学	20
六、应用	21
七、结语	25
第三章 人源化抗体	32
一、原理	32
二、人源化抗体的设计	32
三、人源化抗体的表达	39
四、应用	41
五、结语	44

第四章 小分子抗体	50
第一节 Fab 抗体	50
一、原理	50
二、表达载体的构建	50
三、表达	52
四、晶体结构	53
五、应用	54
第二节 单链抗体	56
一、原理	56
二、抗体设计	56
三、表达	61
四、药物动力学	67
五、应用	69
六、结语	70
第三节 单域抗体	71
第四节 超变区多肽	72
第五章 双特异性抗体	79
一、原理	79
二、构建	81
三、双特异性抗体及其靶细胞	84
四、双特异性抗体作用方式	87
五、双特异性抗体的体外研究	91
六、双特异性抗体研究的动物模型	95
七、双特异性抗体的应用	96
八、结语	105
第六章 免疫粘连素	111
一、原理	111
二、构建	111

三、表达	113
四、药物动力学	115
五、应用	115
六、结语	120
第七章 催化抗体	123
一、原理	123
二、抗体酶的构建	125
三、抗体酶催化的反应	130
四、表达	136
五、应用	137
六、结语	139
第八章 噬菌体抗体库	142
一、原理	142
二、构建	144
三、从噬菌体抗体库筛选特异性抗体	150
四、天然抗体库	154
五、半合成抗体库	155
六、抗体库抗体的体外亲和成熟	155
七、抗体库的应用	159
八、结语	160
第九章 基因工程抗体在大肠杆菌中的表达	165
一、表达形式	165
二、表达抗体片段的关键步骤	167
三、表达抗体的类型	169
四、抗体的纯化	170
五、筛选抗体库	171
六、抗体糖基化问题	171
七、结语	172

第十章 基因工程抗体在植物中的表达	174
一、植物的转化	174
二、表达抗体的策略	175
三、植物中稳定表达抗体的特点	177
四、影响植物中抗体表达的因素	178
五、植物基因工程抗体的应用	180
六、结语	181
第十一章 基因工程抗体杆状病毒表达系统	183
一、转移载体	183
二、宿主细胞	184
三、转染	185
四、表达	185
五、结语	188
第十二章 定点突变对抗体亲和力的影响	190
第一节 寡核苷酸定点突变	190
一、抗磷酸盐抗体模型系统	191
二、经典结合位点——半抗原接触残基	191
三、体细胞超突变增加抗体亲和力	194
四、提高抗体亲和力与抗体结构	197
五、外源互补决定区的移植	198
六、结语	199
第二节 密码子定点突变	199
一、原理	200
二、密码子序列选择	200
三、抗体的筛选	202
四、多个突变的引入	204
五、结语	206
第十三章 抗体的亲和层析纯化法	207

第一节 亲和层析原理	207
一、原理	207
二、配体	207
三、结合凝胶	209
第二节 蛋白质 G 及蛋白质 A 吸附剂	210
一、蛋白质 G 及蛋白质 A 与各种属 IgG 的结合能力	211
二、固定蛋白质 G 的一般策略	211
三、固定蛋白质 A 的一般策略	212
四、从细胞培养上清中纯化鼠 IgG 的标准方法	213
第三节 金属螯合亲和层析	214
一、HiTrap 螯合	215
二、螯合 Sepharose fast flow	215
三、螯合 Superose HR 10/2 及螯合 Superose HR 16/5	215
四、金属螯合层析过程	216
第十四章 我国基因工程抗体的研究概况	219
一、嵌合抗体	219
二、单链抗体	221
三、双特异性抗体	222
四、催化抗体	224
五、噬菌体抗体库	224
六、结语	227
第十五章 基因工程抗体的研究展望	232

第一章 抗体总论

抗体(antibody, Ab)的研究已经有 100 多年的历史。传统的抗体都是经抗原免疫动物体获得的,称为多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb),这是第一代抗体。1975 年, Kohler 及 Milstein 等通过杂交瘤技术制备出了仅针对一种抗原决定簇的单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb),这是免疫学上划时代的伟大进展之一。近十几年来,随着分子生物学、分子免疫学的飞速发展,采用基因工程等手段进一步研究抗体的结构与功能的关系,并对抗体基因进行改造,由此制备出了第三代抗体——基因工程抗体(genetic engineering antibody, GeAb),不仅使抗体的制备更加简单有效,而且大大拓宽了抗体的应用范围。

一、抗体分子的基本结构与功能

抗体分子单体的基本结构是由 4 条肽链组成的四聚体,包括 2 条完全相同的重链(heavy chain, H 链)及 2 条完全相同的轻链(light chain, L 链),轻、重链间及 2 条重链间以二硫键相连,形成一“Y”字型结构。重链由约 450 个氨基酸(IgG、IgA、IgD)或 570 个氨基酸(IgM、IgE)组成,轻链由约 214 个氨基酸组成。完整抗体的相对分子质量约为 150kDa。

重链及轻链 N-端部分(约占重链 $1/4 \sim 1/5$ 及轻链 $1/2$)的氨基酸组成及排列变化多端,称为抗体可变区(variable region, V 区);V 区以外的结构氨基酸组成、数量、排列则相对恒定,称为抗体恒定区(constant region, C 区),该区主要发挥抗体分子的效应

功能。其中V区中某些特异位置上的氨基酸残基随抗体特异性不同而出现极大的变异,这些区域称为超变区(hypervariable region, HV 区)或互补决定区(complementarity determining region, CDR),是V区中特异结合抗原的部位。重链、轻链上各有3对CDR(CDR₁、CDR₂、CDR₃),每个CDR长约5~16个氨基酸。V区中CDR以外的部分称为框架区/framework region, FR),FR区为 β -片层(β -sheet)结构。氨基酸组成相对保守,不与抗原分子直接结合,但对维持CDR的空间构型起着极为重要的作用。

抗体的结构模式图见图 1-1。

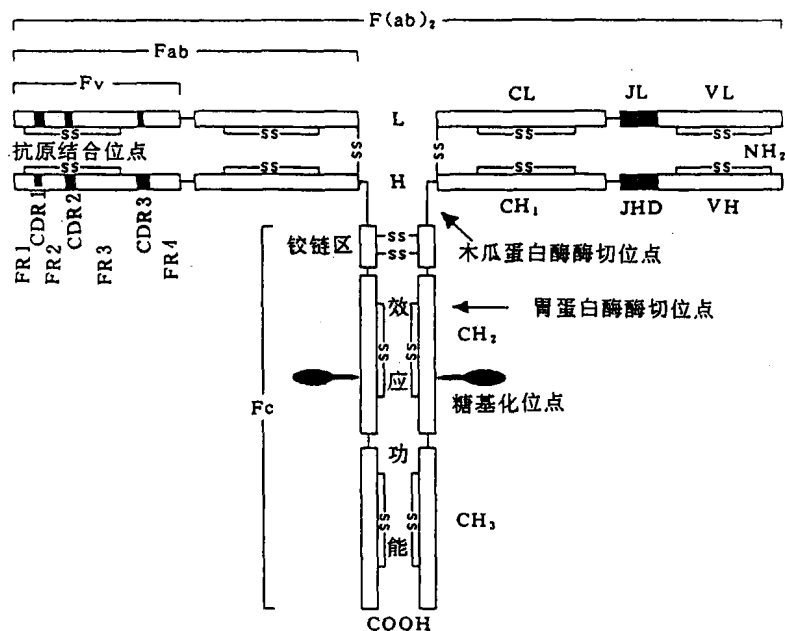


图 1-1 IgG 抗体单体的基本结构

抗体分子上含有多个功能区,其中轻链上有一个轻链易变区(VL)及一个轻链恒定区(CL);重链有一个重链易变区(VH)及3~4个重链恒定区($CH_1 \sim CH_4$)。在抗体的亲和成熟过程中,编码重链、轻链的基因分别经过VDJ、VJ基因重排,才能产生出有功能的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)分子,而且保证Ig分子的特异性及多样性。抗体分子的各种功能区分别发挥不同的生物学效应(表1-1)。

表 1-1 抗体结构与功能区的关系

酶解片段	功能区	主要作用
Fab 段	VH+VL CL+CH ₁	结合抗原 遗传标记
Fc 段	CH ₂	结合补体
	CH ₃	结合 Fc 受体
	CH ₄	结合肥大细胞

二、多克隆抗体

免疫学的理论认为,每一个B细胞克隆只能产生一种独特型抗体(idiotype antibody),而传统的抗原由于都含有许多抗原决定簇,免疫后会被许多B细胞克隆所识别,因此可产生许多独特型抗体,称为多克隆抗体。抗原免疫后所获得的抗血清称作多克隆抗血清。多克隆抗体可用于一般的抗原检测以及被动免疫治疗等。

三、单克隆抗体

1. 杂交瘤技术原理

根据B细胞可以分泌抗体,但不能无限增殖传代,而骨髓瘤细胞不能分泌抗体,但可以在体内、外无限增殖的特点,设法使这两种细胞融合,所获得的“杂交”细胞既可以分泌抗体,又能无限增

殖,使抗体的制备更为简单、有效,这就是杂交瘤技术(hybridoma technology)的基本原理。

由于每一种抗原决定簇只能被一个 B 细胞克隆所识别,产生一种特异性抗体,因此经过选择培养后的杂交瘤细胞就只分泌一种独特型抗体,称为单克隆抗体。图 1-2 显示了单克隆抗体和多克隆抗体制备过程的不同。

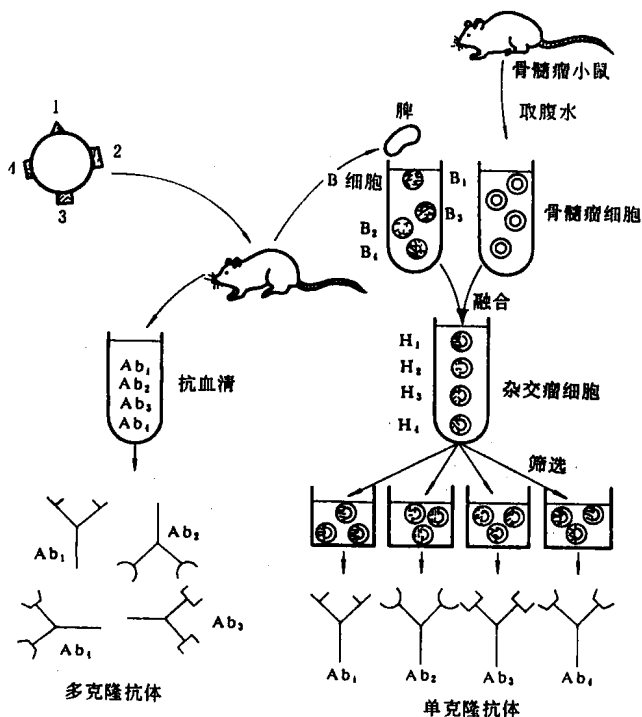


图 1-2 单克隆抗体和多克隆抗体制备过程示意图

2. 单克隆抗体的应用

单克隆抗体由于具有特异性高、亲和力强、效价高、血清交叉

反应少等优点,已经在基础研究、临床诊断及治疗、免疫预防等领域中发挥了重要作用。Kohler 及 Milstein 也由于发明了杂交瘤技术,于 1984 年获得了诺贝尔医学与生理学奖。

(1) 免疫诊断

目前已能生产可靠性及重复性很好的单克隆抗体,在实验研究及体外诊断上,可用于检测各种抗原,包括感染性病原体抗原、血清肿瘤可溶性抗原、细胞表面抗原、受体、激素、神经递质、细胞因子等。绒毛膜促性腺激素和促黄体酮激素间仅有微小的侧链差异,借助单克隆抗体也能避免出现交叉反应。在体内肿瘤检测方面,同位素标记的单克隆抗体可与肿瘤组织表面的抗原结合,起到免疫扫描、免疫成像的作用,效果优于超声波和核磁共振。

(2) 免疫治疗

单克隆抗体主要用于抗肿瘤、抗器官移植排斥反应、抗感染、解毒等。单克隆抗体与药物、毒素或放射性物质偶联,成为一种全新的“生物导弹”,可用于导向诊断及治疗,现在已越来越受到重视。

在肿瘤应用方面,单克隆抗体可用于鉴定肿瘤抗原,探讨肿瘤抗原的生物学特征,还可用于肿瘤的特异性免疫诊断及被动免疫治疗白血病及淋巴瘤等疾病。1978 年, Koprowski 等成功制备了第一株分泌黑色素瘤抗体的杂交瘤细胞,随后相继出现了抗胃肠道癌、肺癌、乳腺癌、白血病、淋巴瘤、胰腺癌、神经胶质瘤等的单克隆抗体,并于 1980 年首次在美国开展了单克隆抗体肿瘤治疗的临床试验。1983 年 Miller 等报道了一例经单克隆抗体治疗的淋巴瘤患者,在放疗、化疗及干扰素治疗后,使用单克隆抗体治疗存活超过了 4 年。

单克隆抗体杀伤肿瘤细胞的机理可能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒效应(ADCC)及补体依赖性细胞溶解作用(CDC)。由于效应细胞表达较多的 IgG_{2a} 及 IgG₃ 亚类 Fc 受体,因此这两类单