

单克隆抗体 在医学上的应用

章谷生 容秉培 主编



单克隆抗体在医学上的应用

主编 章谷生 容秉培

上海科学技术出版社

内 容 提 要

本书内容分两大部份，前十六章分别论述单克隆抗体在不同医学领域中的应用概况，包括基础免疫学、药理学、血液学、微生物学、妇产科以及神经病学学科等。后四章根据作者的实验室经验详细介绍淋巴细胞杂交瘤技术，特别是细胞融合、单克隆抗体的制备及其特性鉴定等。

本书可供从事免疫学工作的科研人员以及广大临床医务人员参考。

责任编辑 丁 震

单克隆抗体在医学上的应用

主编 章谷生 容秉培

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 祝桥新华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 13 字数 288,000

1987年4月第1版 1987年4月第1次印刷

印数：1—3,200

书号：14119·1904 定价：2.65元

序 言

抗体是机体免疫力的重要物质基础，也是医学中用于疾病诊断、治疗、预防和研究发病机理的极为重要的常用制剂。用体外法常规制备大量高度特异的均质性抗体，是免疫学家们多年来的宿愿和致力的目标，也是广大临床医务工作者迫切的要求。1975年8月7日，西德 Köhler 和阿根廷 Milstein 两位教授在自然杂志 (*Nature* 256:495) 发表题为“分泌预定特异性抗体的融合细胞持续培养”一文，报道用细胞融合技术使绵羊红细胞(SRBC)免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤相融合，建立能定向产生抗 SRBC 的单克隆抗体(McAb)，并指出在体外可将这些细胞大规模培养以提供特异性抗体，对医学和工业可能有应用价值。这篇经典的论文是人类第一次能按自己的意图在体外产生预定的针对某一抗原决定簇 McAb 的里程碑，从而把科学家们长期的梦想付诸实现。这个最基础的开创性的理论研究通过迄今十个年头的实践检验，充分显示它对生物学各个领域产生的巨大而深远的影响。迄今，全世界已研制成数以千计的 McAb，有的已投入市场，有的正在进行应用考核和深入观察。在医学领域中，这些 McAb 的出现正在对诊断、判断预后、治疗和预防以及疾病机理的研究等方面起着巨大的促进作用，显示出这项技术的最高成就——为社会创造经济效益，为人类健康造福，这确系医学史上所少见，以致被誉之为免疫学中的一次革命。1985年10月

用。

鉴于近年来有关 McAb 的文献浩瀚,我们不想,也不可能使本书内容包罗万象,为此在照顾临床应用的广大范围的同时,尽可能结合我国的具体情况,加以选择性介绍。在编写过程中,曾选择 McMichael A. J. 和 Fabre J. W 主编的《Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine》一书作为蓝本,其中有少数章节采用译述方式外,更多的章节是汇集文献重加编写。此外,为了能使对 McAb 研究有兴趣的读者窥见该技术的概貌,本书最后几章扼要叙述有关的技术,这部分的绝大多数内容是我室同事根据实践经验撰写的,愿以此与专业同道们交流。我期望本书问世之后,能达到我们预定的宗旨,并得到同道们的指教。

卫生部上海生物制品研究所

中日血液学免疫学研究中心

免疫研究室 章谷生

一九八五年七月

目 录

序 言	
第一章	人实体肿瘤的单克隆抗体及其应用……………(1)
第二章	人甲胎蛋白单克隆抗体的研究和应用……………(23)
第三章	T淋巴细胞及其他白细胞单克隆抗体的研究和应用……………(34)
第四章	单克隆抗体在 HLA 研究中的应用……………(54)
第五章	人免疫球蛋白的单克隆抗体及其应用……………(77)
第六章	药物的单克隆抗体: 新的诊断和治疗工具…(91)
第七章	单克隆抗体在免疫组织化学中的应用……………(110)
第八章	单克隆抗体在病毒学中的应用……………(125)
第九章	肝炎病毒单克隆抗体的研究和应用……………(147)
第十章	单克隆抗体在细菌学中的应用……………(162)
第十一章	单克隆抗体在寄生虫学中的应用……………(173)
第十二章	单克隆抗体在血液学中的应用……………(194)
第十三章	单克隆抗体在内分泌研究中的应用……………(218)
第十四章	单克隆抗体在神经病学研究中的应用……………(243)
第十五章	单克隆抗体在妇产科中的应用……………(265)
第十六章	B 淋巴细胞杂交瘤技术……………(281)
第十七章	单克隆抗体的制备……………(324)
第十八章	单克隆抗体的特性和纯化……………(335)
第十九章	筛选和鉴定单克隆抗体的方法……………(349)
第二十章	几种特殊的试验……………(384)

第一章 人实体肿瘤的单克隆 抗体及其应用

单克隆抗体(McAb)的问世,使肿瘤免疫学家突破了长期用常规抗血清作研究的局限性,并使抗体的应用范围愈益广泛,特别是用于诊断和治疗肿瘤方面更为显著。据不完全统计,1980—1984年间有关 McAb 临床应用的 153 篇文献中,肿瘤研究达 97 篇,占 63%(戴顺志,1985)。理论研究更是引人注目,以至有人预言,不久的将来必将揭开人体肿瘤抗原的本质(Lennox & Sikora, 1982)。

一般来说,用人体肿瘤组织免疫动物,会使动物对肿瘤特异性抗原的应答湮没在对瘤细胞携带的大量正常抗原的应答之中,即使获得可识别瘤细胞的异种常规抗血清,也是许多抗体的混合物,具有广泛的交叉反应性。肿瘤患者对肿瘤抗原的免疫应答一般很弱,因而从患者血清中分离的抗体也难以鉴别肿瘤抗原。研制对肿瘤抗原具有高亲和力和高特异性的 McAb,有可能解决上述各种困难。近年来,抗肿瘤 McAb 的数目快速增加,因而有可能对肿瘤抗原和正常细胞抗原进行比较,为弄清肿瘤抗原的特异性程度,以及其与正常组织成份的关系等根本性问题提供了条件。

抗肿瘤 McAb 还可用作肿瘤的诊断、定位、监管和治疗。如果恶性细胞确实具有正常细胞所没有的抗原,即肿瘤特异性移植抗原(TSTA),则可用 TSTA 的 McAb 作临床诊断而

减少误诊,或作免疫治疗而避免引起正常组织的损伤。当然,情况并非如此简单,而且也不一定要求 McAb 有绝对的特异性才能应用。如果肿瘤抗原只是一种相关抗原(TAA),即在某些正常组织中也有少量类似的成份,这类具有相对特异性的 McAb 在实际工作中也有一定的应用价值。

一、研制人体肿瘤单克隆抗体的策略

(一) 杂交瘤系统和免疫原的选择

现有五种系统可产生抗肿瘤 McAb,亦即小鼠-小鼠,大鼠-大鼠,大鼠-小鼠,鼠-人和人-人细胞杂交瘤。但目前大多的肿瘤 McAb 由小鼠-小鼠系统产生。一般用已建立的肿瘤细胞株、肿瘤细胞抗原,甚至新鲜的肿瘤组织免疫小鼠,取其脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,从中筛选能分泌所需 McAb 的瘤株。大鼠-大鼠系统杂交瘤株的优点是比较稳定,分泌的 McAb 能与人补体有较高结合能力(Clark 等,1983),这在治疗上有重要意义。此外,还有大鼠-小鼠系统杂交瘤。用大鼠或小鼠系统建立杂交瘤有其有利条件,因有各种不同的纯系可供选择。例如,有人经过实验发现,用 HT₉ 结肠癌细胞免疫 C₃H 小鼠,取鼠脾细胞制得杂交瘤株产生的 McAb,主要是针对血型物质的,与寻找结肠癌特异性抗体无关。因此,要制备有用的 McAb,可用不与血型 A 或 B 抗原起反应的大鼠品系作免疫对象。以人体材料免疫大、小鼠,通过杂交瘤技术获得 McAb 的一个困难之处,是针对某一决定簇的 McAb 常会占优势。为使动物产生对其他免疫原的应答,并增加发现肿瘤特异性抗原的机会,可预先制取抗优势决定簇

的 McAb, 用它做成亲和层析柱, 除去混合物占优势的抗原 (Springer 等, 1982)。

鼠-人系统是用小鼠或大鼠骨髓瘤细胞与肿瘤患者的淋巴细胞融合, 获取分泌人源性 McAb 的种族混合型杂交瘤 (Schlom 等, 1980; Sikora & Wright, 1981; Teramoto 等, 1982)。与鼠-鼠系统融合相比, 种间杂交瘤的杂交率及人源性 Ig 的分泌数量要低得多。而且这类杂交瘤中的人源性染色体易丢失, 往往引起分泌人 Ig 能力的不稳定, 甚至丧失。

人-人杂交瘤系统是用骨髓瘤细胞株与肿瘤患者的淋巴细胞融合。近年来已建立一批适用于人-人杂交瘤的骨髓瘤株和淋巴母细胞株, 如 U₂₆₆ARI、GM₁₅₀₀ 6TGA₁₂、LUD-LON Hu、My₂、GM₄₆₇₂、LICR-LON-HMY₂U-266、Uc₇₂₉-6 和 RPMI₂₂₂₆等 (Lennox & Sikora, 1982; Sikora 等, 1982)。癌症患者的致敏淋巴细胞有几种来源, 其中有肿瘤宿主本身的淋巴细胞如脾细胞, 外周血淋巴细胞和肿瘤引流部位淋巴结细胞及经自身瘤细胞在体外致敏的淋巴细胞。外周血容易采取, 但肿瘤特异性淋巴细胞不多。引流于肿瘤部位淋巴结的淋巴细胞较有可能参与抗肿瘤反应, 而且不少肿瘤如乳腺癌、肺癌和结肠、直肠癌, 往往可以收集到大量的引流淋巴结细胞。此外, 有些肿瘤如神经胶质瘤组织本身常为淋巴细胞所严重浸润, 故易从瘤组织分离出淋巴细胞。

人-人杂交瘤与鼠-人系统一样, 可减少产生对正常人组织成份的反应, 并可获得人源性 McAb, 但它不象鼠-人系统那样容易丧失分泌 Ig 能力, 是比较理想的系统。不过, 上述用于融合的人体骨髓瘤细胞株尚不理想, 且人-人杂交瘤技术难度较高, 在制得人-人杂交瘤后如何获得大量 McAb 也存在问题。另外, 并非人-人杂交瘤产生的 McAb 就必然具

有对肿瘤的特异性,因为,不仅如克隆选择学说那样,通过细胞克隆的删除而部份地实现对自身抗原的耐受状态,而且这种耐受状态也通过复杂的抑制网络维持。而在癌症患者中,这种耐受状态的平衡可能已被打乱,其原因是,大量正常的、可能属于自身抗原性的物质经常从患者肿瘤细胞表面脱落下来,进入血循环,结果患者会产生对正常抗原的致敏反应,因此,利用取自肿瘤患者体内的淋巴细胞进行融合所得的 McAb,也可能只针对正常成份。但是,一旦获得人-人杂交瘤,如能分泌特异性 McAb,因其属于人 Ig 类型,可多次注入人体,以满足治疗的需要。当然,人源性 McAb 还可能存在抗个体基因型抗体。但预计人-人杂交瘤分泌的 McAb 将是临床最感兴趣的 McAb 试剂。

免疫原的选择决定所产生 McAb 的性质,但采用何种最佳方案以期获得肿瘤特异性 McAb,却很少为人所知。因此,不同的实验室往往采取不同做法。用于免疫小鼠的肿瘤材料,有体外生长的肿瘤细胞株、新鲜瘤组织块、新鲜瘤组织的细胞膜成份,以及经过组分的新鲜瘤细胞膜可溶性成份。细胞系具有明显的优点,材料均一,来源容易掌握。不过大多数细胞系都经过人为选择,其抗原缺乏普遍的代表性。此外,这类细胞在组织培养液中快速生长,可能出现与快速生长有关的细胞表面分子,而这类分子在体内生长的瘤细胞上并不大量存在。

(二) 筛选方法

抗人体肿瘤 McAb 的筛选,不外乎几种常用筛选法。其中最常见的,是用选定的肿瘤细胞系免疫后,再用该细胞系进行间接结合试验(包括放射免疫法 RIA、酶免疫法 EIA 和荧

光免疫法 FIA), 筛选融合细胞的产物。筛得的阳性的培养上清液, 可用其他同类和不同类肿瘤细胞系以及正常细胞系作进一步对比检测, 以确定所得 McAb 的特异性、反应范围及其区分恶性细胞与正常细胞的能力。这种筛选法意味着 McAb 特异性的鉴定取决于测试方法和所用靶细胞数目及其变异性。采用细胞系筛选与采用细胞系免疫一样, 材料来源可得到保证, 材料性质也较稳定。但由于选用某种细胞系, 以及该细胞系生长的特定条件, 筛选结果同样会产生偏向。此外, 通常没有与该细胞系相对应的现成正常细胞可资对比。

现有一种替代方案, 亦即用原发性肿瘤细胞膜成份以及肿瘤相关抗原, 既作免疫原, 又作抗原结合于塑料板微孔表面, 进行固相 RIA 试验或酶联免疫吸附法 ELISA 试验, 筛选融合细胞产生的 McAb 的活性。我们采用自制生物素-亲和素系统 (biotin-avidin system, BAS) 试剂, 结合 ELISA 技术, 检测杂交瘤上清液、腹水和血清中的抗 AFP McAb, 灵敏度超过被动血凝法和常规 ELISA。另一种筛选方案是在正常和肿瘤材料组织切片上作免疫组织化学观察。切片经适当处理后, 相继加入融合细胞培养上清液和荧光素或过氧化物酶标记的第二抗体, 即可测定 McAb 的结合作用。组织切片分冰冻和石蜡包片两种。用石蜡切片筛选, 可对医院病理室现成材料作回顾性分析, 并可与正常成人和胎儿组织作广泛比较。但细胞表面抗原结构有可能因切片处理而改变。免疫组织学技术可快速显示某些用简单的结合试验检测不出的 McAb 特异性上的细致差别。通过对患不同组织肿瘤的病人, 或患同种组织肿瘤的不同病人的瘤组织切片的比较, 可进一步确定 McAb 的特异性。此外, 还可能测到肿瘤部位邻近的正常材料中含量极微的抗原。免疫组织学技术的缺点是操作

繁复,且无法定量。

近年来,免疫组织学技术有新的突破,出现了酶抗酶免疫复合物法(PAP法)和亲和素-生物素-酶复合体法(ABC法),前者组成一种酶-抗酶抗体复合物,即 PAP,使酶免疫染色灵敏度显著提高;后者利用亲和素(Avidin)与生物素(Biotin)衍生物即生物素化辣根过氧化物酶(b-HRP)之间的强亲和作用,形成亲和素-生物素-酶复合体(ABC),再用生物素化抗体桥联免疫系统与 ABC 法(Hsu 等,1981)。

在抗原量小、或抗体亲和力弱而导致所得 McAb 较差的情况下,不容易测出 McAb 的结合作用。这在检验人源性 McAb,并以瘤组织作靶时更为严重,因为瘤组织中人 Ig 的存在会起干扰作用。在这种情况下,可先将杂交瘤细胞在一种放射性氨基酸中生长,使 McAb 获得标记,然后进行结合试验。

用荧光激活细胞分离器(FACS)检测 McAb,既能定性、定量,又可分离出 McAb 所对应的细胞。但该仪器价格昂贵,难以推广应用。

补体依赖性细胞毒试验(CDC)也是常用筛选方法之一,其优点是可以通过筛选确定 McAb 分别对肿瘤细胞和正常细胞有无杀伤作用。但此法筛得的 McAb 只局限于细胞毒类型。为了筛选缺乏固定补体能力的 McAb,可在筛选过程中添加第二抗体(抗鼠 IgG)。

二、已研制的主要肿瘤单克隆抗体

(一) 胃肠道肿瘤

胃肠道肿瘤包括常见的胃癌和结肠、直肠癌。如不及早

诊断和手术，预后不良。国内董志伟等(1983)用胃癌细胞系 MGC₈₀₃ 细胞免疫 Balb/c 小鼠，取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 NS-1 融合，得到一株能稳定地分泌抗 MGC₈₀₃ 细胞系的杂交瘤 PC₁。经 RIA 检测，PC₁ 分泌的抗体与淋巴细胞和 ABO 型红细胞均无反应，提示该种 McAb 所对应的抗原与 HLA 和血型物质无关。ELISA 检测表明，PC₁ 抗体与 MGC₈₀₃ 的反应不被糖蛋白癌胚抗原 (CEA) 抑制，提示该种 McAb 不是抗 CEA 抗体。取各种肿瘤细胞系与 PC₁ 上清共温后，加¹²⁵I 标记的兔抗鼠 IgG 的 F(ab')₂ 组份进行免疫放射结合试验，以结合比表示 PC₁ 上清与各种细胞系的结合能力。结果发现，PC₁ 上清仅选择性地与胃癌细胞系 MGC₈₀₃、SG₇₉₀₁ 和 Kato III 以及肝癌细胞系 7402 有较高的结合反应，与其他许多肿瘤细胞系无反应或反应较弱，因而认为 PC₁ 抗体所针对的抗原可能是消化道肿瘤的相关抗原。

现已发现消化道肿瘤组织往往伴有分子量 180000 的糖蛋白癌胚抗原 (CEA)，而且患者血清中 CEA 水平显著上升，血清 CEA 量的多少往往与患者的肿瘤负载大小有相关性。临床上正在寻求一种特异性较高的检测血清 CEA 方法，作为监视病情进展的指标。但某些肺癌和乳腺癌本身以及正常胎儿结肠组织中也见有 CEA。且有不少类似的糖蛋白与 CEA 有共同性抗原决定簇，故易造成血清学分析的混乱。此外，用不同方法制备的抗血清，其特异性有所差别，使得各实验室结果难以比较。研究抗 CEA McAb 将有助于较精细地确定与常规血清有交叉反应性的细胞表面组份之间的相互关系，从而建立更有选择性、更加灵敏的检测 CEA 的方法，也许最终会找到能区分 CEA 与其他肿瘤抗原以及正常组织抗原的 McAb。

目前已有几个研究小组用纯 CEA 制品或结肠直肠癌细胞系免疫小鼠,通过杂交瘤技术,制备成抗 CEA 或抗结肠直肠癌其他抗原的 McAb。Accolla 等(1980)用纯 CEA 免疫小鼠,获得 400 株杂交瘤,其中有 2 株分泌的 McAb 能与 CEA 分子的不同决定簇起特异性反应,其亲和力很高,可用以纯化 CEA。Rogers 等(1981)比较了从肿瘤组织抽提的 CEA 与带瘤病人血清中用沉淀法提取的 CEA,发现后者更能结合 McAb,其差别可能是由 CEA 从血清中提取时产生化学改变,或血清 CEA 曾经过肝脏降解或改变所致。有人用肿瘤膜成份和纯 CEA 免疫动物,利用杂交瘤技术制得的 McAb 与正常结肠粘膜均有弱反应。另据报道,抗 CEA McAb 还能抑制结肠癌细胞在裸鼠体内生成。Herlyn 等(1983, 1984)建立了使用多种 McAb 检测胃肠癌病人的双抗原决定簇放射免疫测定法(DDIA),并使用 6 种抗 CEA McAb 检测 311 例不同胃肠癌病人及正常献血者,发现假阳性率比常规抗 CEA 多克隆抗体检测法低。

除 CEA McAb 外,抗结肠癌其他抗原的 McAb 也早已问世。Herlyn 等(1979)用体外生长的结肠癌细胞免疫小鼠,并用 RIA、混合血吸附试验和免疫荧光法筛选,建立 2 株能分泌对结肠癌细胞系和病人瘤组织有特异性结合能力的 McAb 的杂交瘤。这些 McAb 与结肠粘膜,其他恶性细胞如黑色素瘤、成骨肉瘤和骨髓瘤,以及纯 CEA 均不能反应。在 32 份结肠直肠癌患者血清中,24 份有封阻 McAb 的活性,而 38 份健康人和 36 份其他肿瘤患者血清均无此种活性(Koprowski 等,1981)。Thompson (1983)用结肠癌细胞株 HT-29 作免疫原,获得 3 种 McAb,其中一种只与 HT-2S 反应,另一种同时还与其他瘤株起反应,尚有一种可对各种结肠癌

细胞株起反应,而与其他瘤株无交叉反应性,从而具有较大的应用价值。

(二) 黑色素瘤

黑色素瘤是研究得较多的瘤种之一。Herlyn 等(1980)曾获得 6 株杂交瘤,其中 3 株分泌的 McAb 可结合大多数黑色素瘤细胞系细胞、星形细胞瘤细胞和所有正常外周血淋巴细胞及 EB 病毒转化的淋巴细胞,这与 HLA-DR 抗原的分布相平行。另 2 种 McAb 只与前 2 种瘤细胞起反应。Dippold 等(1980)用黑色素瘤细胞系 SK-MEL28 免疫小鼠,获得 18 种 McAb。用放射性标记细胞抽提物的免疫沉淀分析,以及用可溶性抗原作抗体抑制试验,证明这些抗体可鉴别 6 种抗原分子,其中 2 种是糖蛋白,在还原凝胶中的分子大小分别为 95000 和 150000,2 种具有糖脂抗原的特征;另 2 种生化本质未明。Schule 等(1983)使用抗人黑色素瘤细胞上软骨素硫酸蛋白多糖的 McAb,通过聚乙烯二醇与小鼠效应细胞结合,在体内外均能选择性地溶解人黑色素瘤细胞,因而认为该 McAb 对黑色素瘤有特异性。Woodbury 等(1980)得到一种 McAb,可识别在还原凝胶中分子量为 97000 的蛋白(P97)。结合试验表明它有黑色素瘤特异性,与正常组织无交叉反应。但后来利用能识别同一分子上不同抗原决定簇的两种 McAb,进行 DDIA 测定后,发现它们与几种正常人体组织如结肠、膀胱、肌肉和肺组织有交叉反应。但有些肿瘤细胞,尤其是黑色素瘤细胞中,P97 的含量要高 100 倍左右。这指示 P97 虽然不是肿瘤特异性抗原,但它对肿瘤的诊断和(或)治疗仍具有潜在意义(Hellström 等,1981)。

(三) 乳腺癌

在临床上有应用价值的与乳腺癌有关的 McAb 首推抗人雌激素受体 McAb (Greene 等, 1980)。现知若在乳腺癌组织中出现雌激素受体,提示激素治疗可能奏效。因此,用上述 McAb 进行检测,可提供判断患者预后的资料。

Schlom 等(1980)利用鼠-人杂交瘤系统,亦即取乳腺癌病人腋窝淋巴细胞与小鼠骨髓瘤融合,获得分泌人 IgM 型 McAb 的杂交瘤,可借助间接免疫组织学方法鉴别乳房癌细胞和正常乳房上皮细胞。此外,在用 PAP 法染色的组织切片中,可见 80%原发性乳腺癌及全部转移性乳腺癌均为阳性反应,而正常淋巴细胞或同一淋巴结的基质不着色。因此,用于检测肿瘤对淋巴结的浸润上具有良好的特异性。但值得注意的是,该 McAb 与肺癌仍有一定的交叉反应。

(四) 肺癌

人体肺癌 McAb 研制工作已获一定进展 (Lennox & Sikora, 1982; Brown & Moore, 1982)。Sikora 和 Wright (1981) 用肺癌病人淋巴结细胞与小鼠或大鼠骨髓瘤细胞融合,筛得 9 株杂交瘤,其分泌的 McAb 不与正常的肺组织细胞膜结合,而与肺癌细胞膜有反应。Kasai 等获得 3 种肺癌 McAb,曾认为其中的一种对肺腺癌呈特异性,但后来发现这是抗正常的 Lewis 血型抗原的 McAb。Jothy 等筛到一种 McAb,不与小细胞肺癌起反应,而对肺鳞癌和腺癌呈阳性结合。Cuttita 等也制得一种能区分小细胞肺癌与大细胞肺癌的 McAb。但据报道, Jothy 和 Cuttita 的 McAb 与某些其他肿瘤也有交叉反应(洪锦心,1984)。另有一种 IgM 型 McAb