

ANTIBODY ENGINEERING

董志伟 王 琰 主编

抗体工程

Antibody
Engineering

(第二版)

北京医科大学出版社

抗 体 工 程

Antibody Engineering

(第二版)

主 编 董志伟 王 琰

北京医科大学出版社

KANGTI GONGCHENG

图书在版编目 (CIP) 数据

抗体工程/董志伟, 王琰主编. —2 版. —北京: 北京医科大学出版社, 2002.6
ISBN 7-81071-162-8

I. 抗… II. ①董…②王… III. 抗体-免疫工程学 IV. R392.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 026259 号

北京医科大学出版社出版发行

(100083 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内)

责任编辑: 白 玲 姜艾琳

责任校对: 焦 娟 李月英

责任印制: 郭桂兰

莱芜市圣龙印务书刊有限责任公司印刷 新华书店经销

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 23.5 字数: 561 千字

2002 年 6 月第 2 版 2002 年 6 月第 1 次 印数: 1-3000 册

定价: 99.80 元

版权所有 不得翻印

本书编写人员

(按章节作者先后排序)

董志伟	中国医学科学院肿瘤研究所
王 琰	中国人民解放军海军总医院
寿成超	北京大学临床肿瘤学院
许佐良	北京大学临床肿瘤学院
孙素莲	北京大学临床肿瘤学院
张青云	北京大学临床肿瘤学院
杨治华	中国医学科学院肿瘤研究所
冉宇靓	中国医学科学院肿瘤研究所
尹长城	中国科学院遗传研究所
黄华樑	中国科学院遗传研究所
刘国詮	中国科学院化学研究所
李振甫	北京大学临床肿瘤学院
赵 睿	中国科学院化学研究所
万文徽	北京大学临床肿瘤学院
储大同	中国医学科学院肿瘤研究所
魏淑敏	北京大学临床肿瘤学院

再 版 前 言

20 世纪 90 年代中期以来, 抗体工程蓬勃发展, 其突出的标志是用于体内治疗的抗体制剂纷纷上市, 成为当前生物技术药物的开发热点。究其原因, 首先是由于技术的发展, 继抗体工程技术及抗体库技术日臻完善之后, 转人 Ig 基因小鼠技术亦日渐成熟, 抗体的人源化及全人源抗体的产生已非难事。其次, 抗体的真核高效表达获得突破, 足敷大量生产之需。最后, 越来越重要的是各种分子靶部位及其功能的阐明, 为抗体的应用开拓了更为广阔的视野。这些进展使得《抗体工程》第一版的某些内容明显滞后, 与此同时, 从事抗体研究、开发及应用的专业人员正在迅速增加, 需要一本能反映抗体工程进展的书供入门及参考之用。这些考虑构成了《抗体工程》一书再版的初衷。

新书与初版比较, 内容有了不少变化。删去了与一般读者关系不大的《抗体酶》一章。增写了《抗体的表达》及《转人 Ig 基因小鼠》两章。关于抗体的应用, 新书重点介绍已上市或正在进行临床研究的用于治疗各种疾病的抗体, 相当于新的一章。其他章节亦有不少增减, 如关于抗体的亲和力测定就增加了不少新的内容。希望这些改动更能真实地反映抗体工程的进展, 对读者有所裨益。

生命科学及生物技术正处于一个非常发展时期, 其速度之快、信息量之大, 使人目不暇接。作者等虽多年从事抗体工程领域的研究工作, 编写过程中亦时有力不从心之感, 因而挂一漏万, 甚或有待纠正之处难免, 还希读者不吝赐教。

董志伟 王 琰

2001 年 11 月

初 版 前 言

抗体是机体内最奇妙的分子，它以巨大的多样性识别着外部世界纷繁的抗原结构，而且它们自身之间亦可互相识别，从而使得抗体分子在作为诸多抗原的互补结构的同时，又可作为别样抗原分子的类似结构，构成抗原-抗体及抗体相互间识别的巨大网络。惟其如此，近百年来抗体一直是生命科学家研究的热点，有关抗体认识的巨大进展，使其研究者可以在诺贝尔奖获得者的名单中独自行成。

抗体是机体免疫系统的重要效应分子，它的典型结构类似Y型，其Fab端具有双价的可与相应抗原契合的结构，Fc端则具有穿透胎盘、固定补体及与Fc受体结合的功能，从而可介导一系列的体液免疫及细胞免疫。事实上，早在本世纪初即已发现抗体中和细菌毒素的功能，之后抗体曾用于多种疾病的防治，但由于难以获得均质的人源抗体而使大规模的抗体应用受阻。

近20年来，抗体生成技术有了飞速发展。70年代中期，细胞工程生成抗体的技术——B淋巴细胞杂交瘤技术问世，导致大量、多种鼠源单克隆抗体的制备，其应用渗透到生命科学的各个领域。80年代中期，为克服鼠源单克隆抗体在人体应用的异源性，开始采用基因工程技术改造抗体。80年代末至90年代初，基因工程生成抗体技术——抗体库技术问世，使抗体技术达到前所未有的高度，人们可以不经免疫制备人源抗体。抗体生成技术的两次革命（细胞工程抗体及基因工程抗体）为抗体的生物技术产业奠定了基础，鼠源性单克隆抗体已形成相当规模的产业，在疾病诊断及各种检测中发挥着巨大作用。有理由相信，人源基因工程抗体的出现将大大促进其在人体内治疗疾病的应用，前景诱人。

我和我的同事们从事抗体研究已有十余年，采用的技术，从免疫动物到细胞工程，直至基因工程；所制备的抗体从培养到动物实验，直至临床应用。在从实验室至临床的过程中，边研究边学习，有所心得。现奉献在读者面前的这本书，既是学习心得，又是工作总结。限于水平，难免挂一漏万，希读者不吝赐教。感谢北京市自然科学基金委员会的大力资助，使出版本书的愿望得以实现。

董志伟

1995年12月

目 录

第一章 概论	(1)
第一节 抗体研究的历史	(1)
一、抗体一词的由来	(1)
二、抗体生成的理论	(2)
三、抗体的结构及其多样性	(3)
四、抗体产生技术	(4)
五、抗体研究大事记	(5)
第二节 抗体生成的免疫学基础	(6)
一、免疫细胞	(6)
二、免疫系统	(8)
三、B淋巴细胞的成熟	(11)
四、B淋巴细胞的活化	(12)
五、抗体生成的反馈调节	(15)
第三节 抗原与抗体	(15)
一、抗原	(15)
二、抗原抗体反应	(16)
三、免疫网络学说	(17)
第二章 抗体的结构与功能	(19)
第一节 抗体的分子结构	(19)
一、抗体分子的基本结构	(19)
二、抗体分子的功能区结构	(21)
三、免疫球蛋白超家族	(23)
四、免疫球蛋白的不均一性	(24)
五、抗体分子的附属成分	(28)
第二节 抗体分子的基因结构和重排	(29)
一、抗体基因的基本结构	(30)
二、可变区基因的重组及其机制	(34)
三、抗体多样性的来源	(40)
四、重链恒定区基因的重组和表达	(41)
五、Ig基因重组与B细胞的个体发育	(44)
第三节 抗体的生物学功能	(46)
一、抗原结合	(46)
二、效应功能	(47)

第三章 鼠源单克隆抗体	(52)
第一节 鼠源单克隆抗体的产生历史与原理	(52)
一、鼠源单克隆抗体的产生历史	(52)
二、鼠源单克隆抗体的制备原理	(55)
第二节 鼠源单克隆抗体的制备	(56)
一、小鼠单克隆抗体的制备	(56)
二、大鼠单克隆抗体的制备	(71)
第三节 鼠源单克隆抗体的应用	(75)
一、单克隆抗体在基础研究中的应用	(75)
二、单克隆抗体在医学研究及疾病诊断中的应用	(79)
三、单克隆抗体在人体内的应用	(81)
第四章 基因工程抗体	(84)
第一节 鼠单抗人源化	(85)
一、鼠单抗恒定区的人源化——人-鼠嵌合抗体	(86)
二、鼠单抗可变区的人源化	(87)
三、关于鼠单抗人源化的评价	(91)
第二节 小分子抗体	(92)
一、Fab	(92)
二、Fv 和 ScFv	(93)
三、单区抗体及最小识别单位	(95)
第三节 双(多)价及双特异抗体分子	(96)
一、双价及多价抗体分子	(96)
二、双特异抗体	(99)
第四节 抗体融合蛋白	(101)
一、含 Fv 段的抗体融合蛋白	(101)
二、含 Fc 段的抗体融合蛋白	(103)
第五章 抗体库技术	(107)
第一节 初期的抗体库	(107)
一、背景	(107)
二、初期的抗体库	(108)
第二节 噬菌体抗体库技术	(109)
一、噬菌体展示技术	(110)
二、噬菌体抗体库	(111)
第三节 大容量抗体库	(117)
一、总抗体库的容量	(118)
二、总抗体库的多样性	(120)
第四节 抗体库技术的应用	(122)
一、制备人源抗体	(122)

二、应用抗体库技术改良抗体性能	(123)
第六章 转人-Ig 基因小鼠	(130)
第一节 概述	(130)
第二节 酵母人工染色体技术	(133)
一、酵母人工染色体	(133)
二、YAC 常用载体的基本特点	(134)
三、免疫球蛋白-YAC (Ig-YAC) 基因组文库的构建及筛选	(136)
第三节 小鼠胚胎干细胞	(137)
第四节 基因敲除技术	(140)
一、制备基因敲除小鼠的主要步骤	(140)
二、小鼠免疫球蛋白基因敲除小鼠的制备	(143)
第五节 含人免疫球蛋白转基因小鼠的构建	(143)
一、人类免疫球蛋白基因的克隆和人 Ig-YACs 的构建	(144)
二、准备小鼠 ES 细胞	(145)
三、含人 Ig-YACs 酵母与鼠 ES 细胞的融合及克隆	(145)
四、人 Ig-YACs-ES 细胞导入鼠卵母细胞	(145)
五、含人 Ig-YACs-ES 细胞的胚胎向小鼠体内送还和子代鼠的生成	(147)
第六节 转基因小鼠的应用	(149)
第七章 抗体的表达	(153)
第一节 哺乳动物细胞表达系统	(153)
一、淋巴类细胞	(154)
二、非淋巴类细胞	(155)
三、抗体的高效表达	(155)
第二节 大肠杆菌表达系统	(166)
一、大肠杆菌表达系统的特点	(166)
二、重组抗体片段的可溶表达	(167)
三、以包涵体方式表达抗体片段	(169)
第三节 抗体在酵母及昆虫细胞中的表达	(170)
一、昆虫表达系统及其在基因工程抗体中的应用	(170)
二、酵母表达系统	(172)
第四节 动植物表达系统	(174)
一、植物表达系统	(174)
二、转基因动物表达系统	(178)
第八章 抗体的分离、纯化及测定	(184)
第一节 抗体的分离纯化	(184)
一、盐析法	(185)
二、膜分离技术	(185)
三、色谱法	(188)

第二节 抗体的测定	(208)
一、抗体特异性的测定	(209)
二、抗体含量及免疫活性的测定	(214)
三、抗体亲和力的测定	(218)
四、抗体测定的新方法	(226)
第九章 抗体在疾病治疗中的应用	(238)
第一节 概述	(238)
一、历史回顾及现状	(238)
二、抗体治疗的机制	(243)
第二节 肿瘤治疗	(246)
一、概述	(246)
二、已上市单抗简介	(247)
三、临床试用中的治疗性单抗	(251)
第三节 免疫系统相关疾病的治疗	(254)
一、自身免疫性疾病	(254)
二、变态反应性疾病	(257)
第四节 器官移植	(258)
第五节 其它	(259)
一、心血管疾病的治​​疗	(259)
二、感染性疾病的治​​疗	(260)
第十章 抗体相关技术	(264)
第一节 动物免疫	(264)
一、实验材料	(264)
二、动物免疫	(264)
三、技术要点及注意事项	(265)
第二节 抗体的分离纯化	(267)
一、盐析法	(267)
二、凝胶过滤	(268)
三、离子交换	(268)
四、亲和层析	(269)
第三节 抗体的鉴定与分析	(270)
一、抗体的亚类测定	(270)
二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	(273)
三、高效液相色谱与毛细管电泳分析	(275)
四、抗体亲和力测定	(280)
第四节 抗体标记	(282)
一、抗体的放射性碘标记	(282)
二、酶标记抗体	(284)

三、生物素标记抗体	(286)
四、荧光染料标记抗体	(286)
五、胶体金标记抗体	(287)
第五节 抗原抗体反应测定	(290)
一、放射免疫法	(290)
二、酶联免疫吸附测定 (ELISA)	(291)
三、免疫荧光法	(294)
四、免疫组织化学技术	(295)
五、免疫沉淀	(298)
六、免疫印迹	(300)
七、免疫-多聚酶链反应	(303)
第六节 小鼠杂交瘤单克隆抗体制备	(304)
一、融合前的准备及动物免疫	(305)
二、细胞融合和杂交瘤筛选	(305)
三、技术要点及注意事项	(307)
第七节 基因工程抗体技术	(308)
一、逆转录-PCR法 (RT-PCR) 克隆 Ig 可变区基因	(309)
二、人-鼠嵌合抗体的构建	(316)
三、抗体分子在大肠杆菌中的表达	(319)
四、噬菌体抗体库技术	(321)
五、基因工程抗体在真核细胞中的表达	(326)
附录I 常用数据及缓冲液配制	(330)
一、常用缓冲液的配制	(330)
二、氨基酸特性	(333)
三、遗传密码	(334)
四、氨基酸密码子的使用率	(334)
五、常用换算数据	(335)
六、常用放射性核素特性	(336)
附录II CD 分子表	(337)
索引	(352)

第一章

概 论

提要 本章概述抗体研究的历史, 抗体生成的免疫学基础及抗原抗体反应。抗体研究已有百余年历史, 关于抗体形成是由遗传决定的还是后天获得的曾有过激烈的争论。现代研究证明, 在接受抗原刺激以前机体所具有的抗体多样性是由遗传决定的, 但抗体的亲和力成熟及类别转换则是在抗原刺激之后发生的, 因而片面强调遗传的决定性或抗原的关键作用均有失偏颇。抗体产生技术在 20 世纪的最后 25 年内发生了革命性的变化, 由单克隆抗体, 基因工程改造的抗体, 直至全人源抗体, 从一个侧面反映了生命科学由整体水平、细胞水平到基因水平的进展, 同时也为抗体作为生物技术产业的重要支柱奠定了基础。

抗体是由 B 淋巴细胞产生的。B 淋巴细胞来源于骨髓的干细胞并在骨髓中成熟。抗原经血或淋巴进入周缘淋巴组织与成熟的 B 淋巴细胞相遇并使后者活化, 导致其进一步增殖及分化, 最终成为抗体分泌细胞。

抗原依其性质可分为小分子的半抗原及大分子抗原, 后者又可分为依赖于 T 细胞的蛋白性抗原及非 T 依赖性的非蛋白性抗原, 如多糖及核酸等。抗体与抗原表面决定簇之间的反应为非共价键结合, 其维系力包括静电、氢键、范德华力及疏水反应等。抗原抗体结合前后, 构象有明显变化, 称为诱导契合。抗体的 V 区结构具有独特型, 可诱导抗抗体产生, 从而形成网络性调节。众多抗体分子不仅是外部世界诸多抗原的互补结构, 而且其独特型也是外部抗原表位的类似结构 (抗原的内影像)。

第一节 抗体研究的历史

一、抗体一词的由来

抗体的实验研究始于 19 世纪末。1888 年 Emile Roux 及 Alexander Yersin 由白喉杆菌的培养上清中分离到可溶性毒素, 后者注入动物体内可引起典型的白喉发病症状。von Behring 及其同事 Kitasato (北里) 报告, 以白喉或破伤风毒素免疫动物后, 其血中可产生一种中和毒素的物质, 能阻止毒素引发的疾病。来自实验动物的抗毒素血清用于感染的患儿, 获得明显的治疗效果, 尤其是在发病的早期。于是将能中和毒素的物质称为抗毒素 (antitoxin), 随后引入抗体 (antibody) 一词, 泛指抗毒素一类的物质, 而将引起相应抗体产生的物质称为抗原 (antigen)。1896 年 Gruber 和 Durham 发现了凝集细菌的特异性抗体, 称为凝集素。1897 年

Kraus 发现可与相应抗原形成沉淀反应的抗体,称为沉淀素。于是认识到毒素及细菌之外的众多蛋白质均可诱导相应抗体的生成,是一种广义的免疫现象。

事实上,直至 20 世纪 30 年代,“抗体”一词才得以通用。1939 年 Tiselius 和 Kabat 采用电泳方法证实抗体的活性存在于泳动速度最慢的血清组分,称为 γ 球蛋白 (gammaglobulin, 丙种球蛋白)。免疫后抗血清的电泳图中, γ 球蛋白明显增高,抗血清经相应抗原吸收后再电泳,其 γ 球蛋白水平又恢复到与正常血清图形相同。在之后相当长的一段时期内,人们曾将抗体与 γ 球蛋白作为同义词互用。但事实上,具有抗体活性的球蛋白并不都泳动至 γ 组分;反之在 γ 组分的球蛋白亦不都具有抗体活性。在 1968 年和 1972 年世界卫生组织和国际免疫学会所属专门委员会先后决定,将具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白统称为免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig)。由此可见,抗体是一个生物学的和功能的概念,理解为能与相应抗原特异结合的具有免疫功能的球蛋白;免疫球蛋白则主要是一个结构概念,除抗体外,它尚包括正常个体中天然存在的免疫球蛋白及病理情况下(如骨髓瘤、巨球蛋白血症及冷球蛋白血症等)患者血清中的免疫球蛋白及其亚单位等。因此,抗体是免疫球蛋白,但免疫球蛋白不一定都具有抗体活性,至少目前尚不了解某些天然的或病理的免疫球蛋白的免疫功能。

二、抗体生成的理论^[1]

抗毒素中和活性的证实及其在被动免疫治疗中的作用自然提出一个问题:它们是如何形成的?早在 1897 年 Paul Ehrlich^[2]即提出侧链学说,试图回答这一问题。该学说认为,抗体是大分子物质,其与相应抗原的特异性反应依赖于互补的化学结构。抗体是天然存在于机体中的物质,它们以侧链的形式位于细胞表面,其功能类似“受体”,当抗体受体被适当抗原选择后,抗体即由细胞表面脱落,并大量产生进入血循环。该学说关于抗体是大分子,抗体天然存在以及抗体以受体的形式位于细胞表面并被相应抗原选择的观点是极具天才的预见,可惜当时的科学技术水平尚不足以证实。之后的 20 年间,相继发现各种动植物组分,甚至化学合成的半抗原与蛋白质偶联后均可刺激机体产生相应抗体。在当时,很难设想机体内天然存在如此众多的抗体,它们甚至可以针对机体从未接触过的人工合成的化学结构。此外,免疫学的发展已由微生物时代逐步进入免疫化学时代,化学的、侧重于结构的思维方式忽略了抗体生成的生物学机制,终至抗体生成的理论误入歧途。

1930 年 Breinl 与 Haurowitz 提出模板学说,认为抗原是抗体合成的模板,前者指导后者特异氨基酸顺序的组合。随后物理化学家 Linus Pauling 对此学说加以发展,认为抗原类似铸模,已经形成的多肽链环绕其卷曲形成适当的三维构形,后者决定抗原抗体间的特异反应。由于这一学说的核心思想是抗体的信息直接来源于抗原,因此称之为直接模板学说。这一学说显然不能够解释当抗原消失后抗体仍可持续生成,此外,同一抗原引起的二次免疫反应快速且增强以及多次免疫后抗体的性质可能发生变化等亦均不能得到满意的解答。为此,1941 年病毒学家 Macfarlane Burnet 提出间接模板学说,认为抗原可能诱导合成球蛋白所需酶的适应性修饰,从而导致特异性抗体的生成。随着对核酸在遗传中的重要作用的了解,1949 年 Burnet 及 Frank Fenner 进而修改了这一理论,认为抗原可能通过对遗传物质的作用,间接指导抗体的合成。模板学说曾统治抗体生成的理论约 30 年之久,但随着 DNA 双螺旋结构的发

表, 中心法则的建立及蛋白质生物合成机制的阐明, 人们最终认识到遗传信息流动的方向是由核酸到蛋白质, 蛋白质的高级结构亦是由这一遗传信息严格控制的, 以抗原为模板指导抗体合成的学说显然是错误的。

1955 年 Niels Jerne 提出了自然选择学说, 该学说继承了 Paul Ehrlich 的部分观点, 认为机体能够合成少量的众多特异性不同的抗体, 它们进入血液循环即成为“天然抗体”。这些抗体的作用在于可选择性地与相应抗原发生反应, 进而将抗原转运至机体某处的细胞, 从而诱发特异性相同的抗体的大量合成。加强免疫时, 由于血循环中存在着较多的抗体“载体”, 而且抗原可能优先选择亲和力较高的抗体, 这就可能解释二次免疫反应的快速及抗体质量的变化。至于免疫耐受则可能是由于针对自身抗原的天然抗体一旦合成即被自身组织所吸附, 从而不能介导自家抗体的形成。这一学说的重要意义在于经过半个世纪的徘徊, 抗体生成理论又回到生物学观点。早在 Burnet 倡导间接模板学说时, 即认为增殖的细胞群体在抗体形成过程中有着重要作用。后来 Burnet 与 Fenner 强调, 任何抗体生成学说在解释抗体生成现象时还必须解释免疫耐受。1958 年 Burnet、David Talmadge 与 Joshua Lederberg 提出了著名的克隆选择学说。其中心思想为, 抗体是天然产物, 以受体的形式存在于细胞表面, 抗原可与之选择性地反应。抗原与相应抗体受体的反应可导致细胞克隆性增殖, 该群体具有相同的抗体特异性, 其中某些细胞克隆分化为抗体生成细胞, 另一些形成免疫记忆细胞以参加之后的二次免疫反应。此外, 该学说认为, 免疫耐受是由于自身抗原或胚胎成熟过程中引入的抗原所致的“克隆流产”。随后数年间, 克隆选择学说逐步被实验所证实, 并得到学术界的广泛承认。

关于抗体生成理论的焦点是: 抗体生成能力是由遗传决定的, 还是由于抗原刺激后天获得的。事实上, 抗体的生成大体可分为两个阶段, 在未受抗原刺激之前, 机体所具有的多样性抗体生成细胞群体可看作一个初级库 (repertoire), 其所包含的信息是由亿万年进化及遗传决定的。当受到抗原刺激后, 具有相应抗体 (受体) 的细胞群体被选择并发生克隆性增殖, 在抗原的反复刺激下, 抗体的 V 区发生高频率的突变, 具有高亲和力抗体的细胞群体选择性增殖, 抗体进行类别转换 (class swith), 终至抗体成熟。因此, 在抗体生成过程中, 片面强调遗传的决定性或抗原的关键作用均有失偏颇。

三、抗体的结构及其多样性

由上述可知, 30 年代末期人们即已认识到抗体为大分子的免疫球蛋白, 通过研究还表明抗体为双功能分子, 既能与相应抗原特异地结合, 又具有固定补体、穿透胎盘等功能, 但有关其精确的化学结构却所知甚少。1958 年牛津大学的 Rodney R. Porter 以木瓜蛋白酶水解抗体分子, 获得两个 Fab 和一个 Fc 片段, 前者具有与相应抗原结合的功能, 后者则具有其他生物学功能。洛克菲勒大学的 Gerald M. Edelman 采用来自骨髓瘤患者的均质免疫球蛋白, 经还原后证实其含有轻链及重链, 并指出骨髓瘤患者尿中的本周蛋白类似抗体的轻链。Porter 及其同事进一步证实免疫球蛋白含有两条重链及两条轻链。在此基础上 Porter、Edelman 及众多实验室均致力于免疫球蛋白氨基酸序列的阐明。1969 年, Edelman 及其同事最终成功地解出了免疫球蛋白的一级序列, 并发现免疫球蛋白是由若干功能区 (domain) 所构成的, 与抗原结合的功能区具有较高的变异性, 其他功能区则相对保守。

免疫球蛋白化学结构的阐明虽然为抗体的多样性 (diversity) 提供了物质基础, 但并不

能解释其形成的机制。根据推算,抗体的多样性可达 $10^9 \sim 10^{11}$,一个结构基因编码一条肽链的经典概念显然与之相悖。70 年代末至 80 年代初,日本学者利根川进 (Tonegawa) 用核酸分子杂交技术研究了 B 细胞分化发育过程中抗体基因结构的变化,阐明了免疫球蛋白的 V 区基因的重排与突变构成其无限组合的可能性,从而解释了抗体多样性的来源。

四、抗体产生技术

自 19 世纪末,以抗原免疫动物获得抗血清的途径一直是获得抗体的经典方法。1975 年 Köhler 及 Milstein^[3]建立了 B 淋巴细胞杂交瘤技术,这是抗体产生的重大技术革命。该技术的普及使得众多科学家通过细胞工程可以在体外定向地制备各种单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)。由于 McAb 特异性强,性质均一,易于大量生产,在生命科学研究及医学实践方面做出了杰出的贡献,并形成产业,成为生物技术的重要支柱之一。然而 McAb 多为鼠源性,采用类似的原理制备人源 McAb 迟迟未获进展,极大地限制了 McAb 作为治疗制剂在人体内的应用。为克服鼠源 McAb 的异源性反应,80 年代中期人们开始尝试以基因工程方法改造鼠源性 McAb,亦即所谓 McAb 的“人源化”(humanized antibody),包括鼠 Ig 的 V 区与人 Ig 的 C 区拼接而成的嵌合抗体 (chimeric antibody)^[4],或将鼠 Ig V 区的 CDR 区移植到人 Ig 序列中所形成的改型抗体 (reshaping antibody)。同时,考虑到完整抗体的分子过大,不利于发挥“药物”作用,从而采用基因工程方法使之“小型化”,如单链抗体 (single chain antibody),为 VH 与 VL 以接头相连,分子量仅为完整抗体的 1/6。但真正以基因操作的方式制备人源抗体,却始于 1989 年底英国剑桥 Winter 小组与 Scripps 研究所 Lerner 小组创造性的工作^[5]。他们采用 PCR 方法克隆机体全部的抗体基因 (repertoire) 并重组于原核表达载体中,以标记抗原即可筛选到相应抗体,当时称为组合抗体库技术。90 年代初期,这一技术有了进一步的发展,即将抗体基因 (VH 或 Fd) 与单链噬菌体的外壳蛋白融合并表达于噬菌体表面,以固相化的抗原吸附相对应的噬菌体抗体,经多次“吸附-洗脱-扩增”即可获得所需抗体。这是抗体产生的又一次重大技术革命。首先该技术将抗体的基因型及表型密切联系起来,表达的噬菌体抗体 (亦可为分泌型) 可供功能检测,扩增噬菌体并抽提 DNA 即可获得相应抗体基因,便于测序或进一步的基因操作。其次该技术容量大,效率高,一般建库可达 10^8 以上,基本包容了抗体多样性的信息。第三,“吸附-洗脱-扩增”过程将抗体的选择与再次扩增有机地结合起来,每轮操作可使特异性抗体富集 $10^2 \sim 10^3$ 。噬菌体抗体库技术不仅摆脱了细胞融合等繁杂的操作,而且可不经免疫制备抗体,为制备人源抗体开辟了新途径,这一点已为实验所证实。然而由一个未经免疫的初级抗体库中筛出理想的抗体肯定不是一件轻松的事情。由于人体不能随意免疫,转入 Ig 基因小鼠的尝试 80 年代后期即有进行,免疫后约 4% 的抗体为人源。新近这一技术有了重大突破^[6],首先采用同源重组技术将小鼠胚胎干细胞 (ES) 中的鼠 Ig 基因敲除 (knock out),而后采用融合技术将 YAC 库中的大片段人 Ig 基因 (200Mb) 导入,筛选后代即可获得免疫后仅产生人抗体的转基因小鼠。1997 年 Aya Jakobovits 所在的 Abgenix 公司将免疫后产生人源抗体的转基因小鼠,称为 XenoMouse,并证实其抗体免疫反应非常类似人体。基因工程抗体技术、抗体库技术及转基因小鼠技术的进展以及抗体真核表达技术的日臻成熟,最终推动了抗体作为体内应用制剂的产业形成,而产业的发展亦将推动抗体技术朝着“高效、低耗”的方向继续前进。

由多克隆抗体到单克隆抗体,直至基因工程抗体,由不均质的异源抗体到均质的异源性抗体,直至人源抗体,是抗体产生技术的三个时代,从一个侧面反映了生命科学由整体水平、细胞水平到基因水平的进展,同时也为抗体作为医药生物技术产业的一个重要支柱奠定了基础。

五、抗体研究大事记

年份	作者	进展
1888	E Roux, A Yersin	白喉毒素
1890	E Von Behring [#] , S Kitasato (北里)	抗毒素
1896	M Von Gruber, HE Durham	凝集素
1897	R Kraus	沉淀素
1890	P Ehrlich [#]	抗体形成侧链学说
1917	K Landsteiner	半抗原
1923	M Heidelberger, CT Avery	多糖抗原
1926	LD Felton, GH Bailey	提纯抗体
1929	M Heidelberger, FE Kendall	定量化学血清学
1930	F Breinl, F Haurowitz	抗体形成模板学说
1934 ~ 1938	JR Marrack	抗原抗体反应格子学说
1939	AW Tiselius, EA Kabat	抗体是丙种球蛋白
1941	AH Coons	免疫荧光技术
1942	JT Freund, K McDermott	佐剂
1945	RRA Coombs, AE Mourant, RR Race	测定不完全抗体的抗球蛋白试验
1946	J Oudin	凝胶中沉淀反应
1948 ~ 1949	O Ouchterlony, SD Elek	免疫双扩散技术
1948	AE Fagraeus	浆细胞形成抗体
1952	OC Bruton	无丙种球蛋白血症
1955	P Grabar, CA Williams Jr	免疫电泳
1955 ~ 1959	NK Jerne, DW Talmage, FM Burnet [#]	自然选择与克隆选择学说
1956	J Oudin, R Grubb	Ig 同种异型
1956	B Glick, TS Chang, RG Jaap	法氏囊参与抗体生成
1957	HH Fudenberg, HG Kundel	类风湿因子
1959 ~ 1962	RR Porter, [#] GM Edelman [#]	抗体结构
1961 ~ 1962	NL Warner, A Szenberg, FM Burnet	细胞免疫与体液免疫
1965	TB Tomasi	IgA
1967	K Ishizaka, T Ishizaka	IgE
1969	P Perlmann, G Holm	ADCC
1970	NA Mitchison, K Rajewsky, RB Taylor	载体效应
1972	H Cosenza, H Köhler	独特型抗体的调节作用

1974	NK Jerne [#]	免疫网络学说
1975	G Köhler [#] , C Milstein [#]	B 淋巴细胞杂交瘤技术
1980	S Tonegawa [#] (利根川进)	Ig 的基因结构
1984	SL Morrison	基因工程抗体
1989 ~ 1991	G Winter, RA Lerner	抗体库技术
1997	A Jakobovits	转基因小鼠产生人源抗体

[#] 为诺贝尔奖获得者

第二节 抗体生成的免疫学基础

机体的免疫反应可区分为天然免疫 (innate immunity) 及适应性免疫 (adaptive immunity)。前者先天存在, 对微生物的入侵可快速反应, 特异性差, 也不能形成记忆反应, 如上皮细胞的屏障作用, 粒细胞和巨噬细胞的吞噬作用以及 NK 细胞的杀伤作用等。后者感染后发生, 以特异性及记忆性为其特点, 如抗体及杀伤性 T 细胞等。任何免疫反应均是由各种免疫细胞及其为主形成的免疫系统行使的。

一、免疫细胞^[7]

免疫学反应涉及诸多细胞, 这些细胞来源于骨髓中的多能干细胞。进一步分化为淋系及髓系, 前者形成淋巴细胞, 后者形成单核细胞、巨噬细胞及粒细胞等 (图 1-1)。

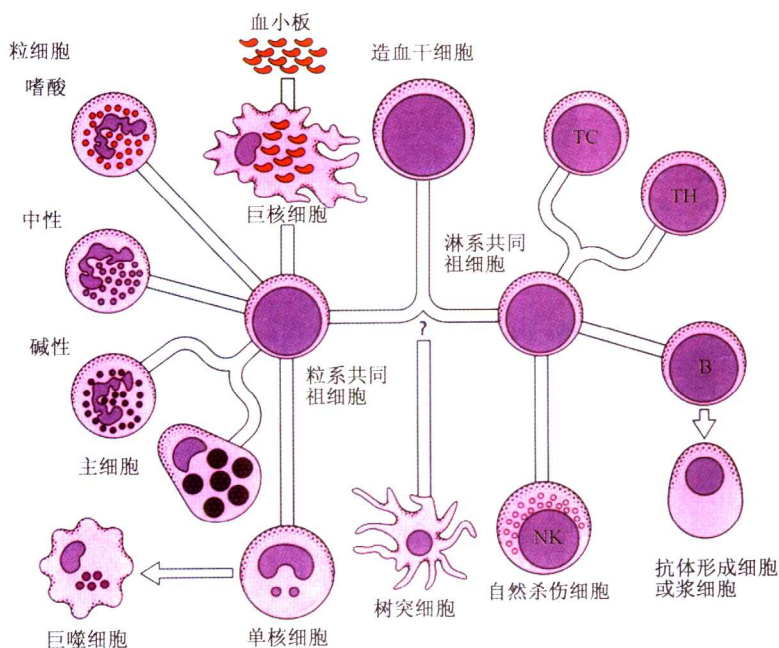


图 1-1 各种免疫细胞的分化途径