



生物工程制药 研究与实践

Research & Practice on
Biotechnology Medicine

宋礼华 编著

生物工程制药研究与实践

宋礼华 编著

 安徽科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物工程制药研究与实践/宋礼华编著. —合肥:安徽科学技术出版社, 2009. 2

ISBN 978-7-5337-4303-1

I. 生… II. 宋… III. 生物制品: 药物-制造-研究 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 013452 号

生物工程制药研究与实践

宋礼华 编著

出 版 人: 黄和平

责任编辑: 徐浩瀚 陈 军 邵 梅

封面设计: 武 迪

出版发行: 安徽科学技术出版社(合肥市政务文化新区圣泉路 1118 号
出版传媒广场, 邮编: 230071)

电 话: (0551)3533330

网 址: www.ahstp.net

E - mail: yougoubu@sina.com

经 销: 新华书店

印 刷: 合肥远东印务有限公司

开 本: 787×1092 1/16

印 张: 25

字 数: 640 千

版 次: 2009 年 2 月第 1 版 2009 年 2 月第 1 次印刷

定 价: 78.00 元

(本书如有印装质量问题, 影响阅读, 请向本社市场营销部调换)

《生物工程制药研究与实践》编委会(按笔画排序)

马 宏	马雪玲	王云霞	王 兵	王 弦	王荣海	冯乙巳
冯艺戎	付永标	周业亭	周如娇	刘长暖	刘世芸	刘亚萍
刘 兵	刘海兵	刘晓燕	刘道芳	刘 兢	任克勤	庄建生
孙彦华	孙梦希	江春蕾	戎隆富	许 培	许 超	仲 哲
李卫平	李 旭	李名非	李 运	李艳萍	李家斌	汪飞鹏
陈 方	陈金武	陈宜章	陈 茵	邹文艺	杨少民	杨 杰
杨 玲	宋文成	宋 玉	宋社吾	张伍魁	张 兵	张 均
张 科	张志红	张玲玲	张 艳	张家驹	张 萍	杜卫东
杜贤宇	吴 虹	吴清发	吴 强	吴 锐	陆春燕	何晓淮
余鑫之	明 亮	林 峰	林新民	范清林	赵云利	赵丽红
姚 阳	姚红谊	姚建平	姚晓玲	郝吉庆	胡向阳	姜先荣
饶春明	洪桂云	洪素珍	柳晓燕	高 飞	秦风展	桂向东
袁 进	袁 敏	徐炳发	徐振山	徐 斌	徐 键	顾 静
黄汉华	曹 亮	康 勇	梁 俊	梅蔚德	彭万仁	谢小强
程 婷	傅惠英	鲍立宁	裴明军	魏 伟	魏练平	魏跃武
戴 敏	E. Marion Schneider					

作者简介

宋礼华,男,汉族,安徽当涂人,研究生学历,理学硕士,研究员,博士生导师。1957年1月生,1976年1月参加工作。现任安徽省生物研究所所长、安徽安科生物工程(集团)股份有限公司总裁。



1988年赴德国留学,主攻单克隆抗体技术。学成回国后,主持了多项生物技术领域重点科技攻关项目,先后发表论文、研究报告和专著70余篇(本)。担任硕士、博士研究生导师,培养硕士、博士研究生多人。

主持研制人 α 干扰素的单克隆抗体亲和层析胶,解决了我国 α 干扰素分离纯化的关键技术,实现了干扰素全国产化,全面代替进口。该产品创直接经济效益9000余万元,为国家节约外汇约5500万美元。主持研制二类新药注射用基因工程干扰素 $\alpha 2b$ 及四类新药干扰素 $\alpha 2b$ 乳膏、栓、滴眼液、水针等系列制剂,率先实现干扰素 $\alpha 2b$ 国产化,新创产值5.5亿元,利税2.4亿元;主持研制生产国家二类新药“注射用重组人生长激素”国产制剂,在多科室广泛应用,患者负担大大减轻;主持研制一类新药“重组葡激酶”已进入临床试验;主持一类新药“抗精子抗体诊断(MAR法)试剂盒”的研制,填补国内活动精子表面附着免疫球蛋白检测试剂的空白,被列为国家“863”计划项目,即将获得专利授权;主持抗艾滋病药物“PEG 天花粉蛋白”研发项目,被列为国家重点科技攻关项目,已获得国家发明专利授权。

为深化地方研究所体制改革,宋礼华创办安徽安科生物工程(集团)股份有限公司,实现科技成果产业化,已累计创利税5.5亿元,为推动科技、经济一体化做出了贡献。

1995年、2000年两次获安徽省政府贡献奖金奖,2004年获安徽省重大科技成就奖,并先后获国家科技进步三等奖1次,安徽省科技进步一等奖3次、二等奖1次,安徽省重大科技成就奖1次,是国家有突出贡献中青年专家(享受国务院特殊津贴),安徽省劳动模范,安徽省优秀留学回国人员,获首届展望奖,中国侨联科技进步带头人、科技创新人才奖。

宋礼华是十届、十一届全国人大代表。

序

新药研发周期长,短则几年,长则十几年。研发环节多,有药学、药理学、毒理学研究,有质量控制标准研究,还有 I、II、III 期临床研究。研发过程中,一直都面临着技术、资金、市场等多方面的风险。新药研发历来都是一项艰巨的工作,成功率很低。宋礼华教授留学回国后,从零起步,集选题、研发、产业化于一身,在不长的时间内,科研成果就获得了市场回报,此间的艰辛,难为外人所体会。

宋礼华教授早年在德国留学期间,就捕捉到中国干扰素单抗亲和层析市场的空白,回国后以自己的勤勉,攻克了许多技术难关,并及时把握住了中国生物制药行业难得的发展机遇,选择了以干扰素单抗为产业化突破口,成立了安科生物工程股份有限公司,有效地整合了当时安徽省内的科研资源,实现了该项目的产业化。接下来,以此为平台,又顺利地实现了干扰素、生长激素的科技成果产业化。同时,在新型药物制剂、免疫诊断试剂、天然药物等领域都有尝试,并均有一定的收获。

本书是宋礼华教授多年研究成果的汇编,由单克隆抗体篇、基因工程药物篇、新型药物制剂篇、免疫诊断试剂篇、天然药物篇五部分组成。单克隆抗体篇侧重介绍单克隆抗体的制备及其在工业化生产中的应用,特别是干扰素单克隆抗体的研发过程及其在干扰素生产实践中的应用;基因工程药物篇侧重介绍基因克隆和表达,工程菌筛选和发酵,蛋白的纯化和检测等,同时完整地收集了安科公司自主研发的干扰素、生长激素的临床疗效、安全性评价等研究论文;新型药物制剂篇侧重介绍长效和靶向蛋白质制剂的研制,主要是干扰素、生长激素两个已上市蛋白质药物长效和靶向制剂的开发,涉及的主要技术有 PEG 化技术、微球技术、脂质体技术等;免疫诊断试剂篇侧重介绍单克隆抗体在临床疾病诊断中的应用,主要有免疫性不孕症诊断试剂盒的开发,乳腺癌诊断试剂盒的开发,及蛋白质芯片研制等;天然药物篇侧重介绍中药现代化,传统中药复方制剂的开发,以及药用植物有效成分的分离和纯化等,主要内容有常用中药指纹图谱的鉴定和道地中药材产业化研究等。

本书内容涵盖了生物制药工艺、药学、药理学、毒理学研究,质量控制标准研究,临床研究,上市后不良反应监测研究等新药研发过程中每一个具体环节。基础研究部分的论文,在选题上能紧扣当前该行业的发展方向。应用研究部分的论文,许多都是来自于实际生产中的经验性总结,技术方法可操作性强,可以解决实验和生产中的具体问题,有很高的参考价值。对于从事新药研发的科研人员,如何选择合适的科研项目和技术,有一定的启发作用;对于有志于研究成果产业化的广大科技工作者,如何扬长避短,发挥自身优势,则具有很好的借鉴作用。

我和宋礼华教授相识多年,一直关注安科生物的发展。作为学界同仁,衷心祝愿宋礼华教授及其团队,再展宏图,为百姓做出更好的药,为学界写出更精彩的文章。

是为序。

中国工程院院士
中国工程院副院长
中国医学科学院院长
中国协和医科大学校长

刘德培

前 言

1866 年孟德尔遗传定律的发明,预示着人类对生物学的研究从分类学向遗传学、分子生物学的重大转变。1953 年 Watson 和 Crick 阐明了 DNA 双螺旋结构是生命科学研究领域重大研究成果,推动了生命科学研究进程。20 世纪 70 年代,限制性内切酶的发现和重组 DNA 技术的诞生加速了生物技术在生物制药研究领域中的应用。2001 年,人类基因草图序列测定顺利完成,揭示了 21 世纪是生命科学世纪,人们将不断发现具有生物学功能的新基因和功能蛋白,为开发出具有高度特异性的治疗、诊断和预防作用的新药打下坚实的理论基础。

自 1982 年世界第一个基因工程产品——重组人胰岛素投入市场,生物技术药物发展已近 30 年的历史,美国上市的生物技术药物已逾百种。我国生物技术药物在国家“863”计划的支持下,1992 年第一个基因工程药物注射用重组人干扰素 $\alpha 1b$ 上市,经过近 20 年的发展,取得了迅猛的发展,目前我国也已有 30 种基因工程药物上市,打破了国外同类产品垄断的历史。

随着人类基因组计划的完成,后基因组和蛋白质组计划的深入研究,人源化抗体技术、噬菌体展示技术、小分子 RNA 干扰技术、DNA 微阵列技术、干细胞培养技术、高通量筛选技术、基因敲除技术、组合化学技术、生物信息学技术和计算机辅助药物设计技术等新兴生物技术的不断应用,加快了生物技术药物的研究与开发,除了传统的基因重组蛋白的研究外,抗体工程药物、基因工程疫苗、肿瘤疫苗、反义核酸药物、基因治疗、干细胞治疗等临床研究取得了令人瞩目的成绩。

本书共分为四个篇章,均为我和我的同事从事生物工程制药以来的研究成果。第一部分为单克隆抗体与诊断试剂篇,系统地介绍了单克隆抗体的研制及其应用,并把单克隆抗体研究应用于生物工程制药的纯化工艺与疾病的临床诊断治疗;第二部分为基因工程药物篇,介绍了基因重组 DNA 技术在生物工程制药中的应用,多种细胞因子及相关蛋白的基因克隆表达,重组蛋白复性纯化工艺技术及药理效应作用等研究;第三部分为药物给药系统篇,主要介绍了蛋白质药物的长效制剂研究,包括蛋白质药物的脂质体、聚乙二醇化修饰、微囊化技术及其质控技术研究等;第四部分为中药与天然药物篇,介绍中药与天然药物的药理活性成分、制剂、药理作用及临床应用研究等内容。

本书所涉及的产品研究体现了现代生物学技术在生物工程制药研究领域中的具体应用,反映了目前生物工程制药研究的发展趋势,目的是为广大从事生物工程制药研发的单位和人员提供参考。本书适合于生物工程制药相关领域(包括企业、医药研发机构和科研院所)的研究、生产、质控及产品开发人员学习使用,也可作为大专院校从事生物工程开发的教师、研究生、技术人员的参考书。

本书由全体编著者所贡献的辛勤劳动得以出版,在编写过程中非常荣幸地得到刘德培院士的指导和鼓励,他在百忙之中为本书欣然作序,谨代表全体编著者深表敬意。本人自 1990 年从德国归来后,一直致力于生物工程制药研究领域,在此对对我有过帮助、支持、鼓励的领导、学者和同仁表示衷心的感谢。另外,对本书有过贡献和承担编写任务的老师和同仁,在此一并表示感谢。

作者

2008 年盛夏于合肥

目 录

一、单克隆抗体与免疫诊断类篇	1
抗体工程研究与进展	2
两株抗人 α -干扰素单克隆抗体杂交瘤建株研究	11
抗人 IFN- α 单克隆抗体杂交瘤细胞的建株及应用研究	15
影响小鼠单克隆抗体腹水的几种因素的研究	18
单克隆抗体亲和层析纯化人白细胞干扰素的研究	21
单克隆抗体亲和层析法纯化 Namalva 细胞干扰素	23
抗重组人干扰素- α 2b 单克隆抗体的制备与应用	27
三种 α -干扰素亚型结构与功能的研究	29
三种 α 干扰素亚型单抗的特性鉴定	33
抗心肌肌钙蛋白 T 单抗杂交瘤细胞株的建立及鉴定	37
牛心肌钙蛋白 T 的纯化	40
抗人结肠癌相关抗原单克隆抗体的制备及初步研究	43
人肺癌相关单克隆抗体的制备及其抗原的纯化	48
A NOVEL TUMOR ANTIGEN EXPRESSED ON MEMBRANE OF COLON CANCER CELLS BY MONOCLONAL ANTIBODY TECHNIQUE	53
结肠癌相关抗原的制备及其临床意义	54
Biochip as a potential platform of serological interferon α 2b antibody assay	58
运用蛋白质芯片技术鉴定干扰素的亚型	71
免疫-PCR 法检测儿童尿中生长激素水平	77
组织芯片	81
蛋白质芯片技术的分类、研究与应用进展	85
应用组织芯片技术研究 CA125 和 EPCAM 联合检测卵巢癌的价值	89
抗体芯片技术及其在肿瘤研究中的进展	94
SELDI 蛋白质芯片在肿瘤标志物筛选中的应用进展	98
HER-2/neu 基因在乳腺癌中的研究进展	102
瘦素与乳腺癌相关性研究进展	106
二、基因工程药物类篇	110
基因工程药物研究进展及发展趋势	111
The Analgesic Domain of Interferon- α 2b Contains an Essential Proline ³⁹ Residue ...	118
重组人 α 2b 干扰素工程菌的发酵与表达	123

白蛋白融合 α -2b 干扰素在毕赤酵母中的表达	125
重组人干扰素 α -2b 的梯度凝胶色谱柱复性和同步纯化	131
影响干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效因素分析	136
干扰素治疗恶性胸水和腹水及肺癌的临床研究	140
干扰素合并氮烯咪胺治疗恶性黑色素瘤	143
分泌型重组人生长激素的研制	146
重组人生长激素的主要药效学研究	151
用重组大肠杆菌发酵生产人生长激素研究	154
Synergistic antitumor activity of TRAIL combined with chemotherapeutic agents in A549 cell lines in vitro and in vivo	158
人 sTRAIL 基因的克隆、表达纯化及对人 A549 细胞的抗肿瘤活性作用	169
重组人 RGD-sTRAIL 的表达、纯化及抗肿瘤活性研究	177
葡萄球菌激酶(Sak)的基因克隆和高效表达工程菌的构建	185
重组葡激酶中试工艺研究	189
hCu,Zn-SOD-TAT PTD 的融合表达及其跨膜转运性质的初步研究	194
PTD-BDNF 融合基因克隆、表达和纯化	200
重组人粒细胞集落刺激因子的表达、纯化以及 PEG 修饰	205
人血小板生成素氨基端功能区 cDNA 的克隆及其定点突变	210
白细胞干扰素的抗病毒作用	213
基因工程蛋白下游纯化技术研究进展	215
TRAIL 的诱导肿瘤细胞凋亡与临床	219
TRAIL 及其受体的研究进展	225
毕赤酵母表达系统在外源基因表达中的研究进展及应用	228
包涵体蛋白的层析复性技术研究进展	233
促血小板生成素的分子生物学研究进展	238
抗病毒药物治疗艾滋病研究的探讨	242
Cyanovirin-N:一种新型灭活 HIV-1 蛋白的研究进展	246
长效重组药物研究进展	249
 三、药物给药系统类篇	 253
多肽药物传递系统研究进展	254
重组人干扰素 α 2b 阴道泡腾片的研制	258
聚乙二醇修饰重组人生长激素的初步研究	261
聚乙二醇化重组人生长激素的性质及活性	265
聚乙二醇化重组人生长激素的免疫原性及药动学研究	269
ELISA 法研究聚乙二醇化重组人生长激素小鼠体内的药动学	274
高效液相色谱法检测 PEG-rhGH 注射液中 rhGH 残留	278
重组人生长激素长效缓释的研究进展	281
聚乙二醇修饰天花粉蛋白的初步研究	286

聚乙二醇化天花粉蛋白抗生育活性及其过敏反应试验	291
聚乙二醇化天花粉蛋白注射液中天花粉蛋白的 HPLC 测定	296
高效液相色谱检测聚乙二醇化天花粉蛋白方法比较	299
不同方法测定聚乙二醇化天花粉蛋白的修饰度	303
白蛋白聚乳酸缓释微球的制备及体外释放研究	307
 四、中药与天然药物类篇	 312
中药、天然药物研发现状及其发展趋势	313
PROTECTIVE EFFECT OF PAEONIFLORIN ON IMMUNOLOGICAL LIVER INJURY INDUCED BY BACILLUS CALMETTE-GUERIN PLUS LIPOPOLYSACCHARIDE; MODULATION OF TUMOUR NECROSIS FACTOR- α AND INTERLEUKIN-6 mRNA	317
Upregulation of TNF- α and IL-6 mRNA in mouse liver induced by bacille Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide	328
Paeoniflorin induced immune tolerance of mesenteric lymph node lymphocytes via enhancing beta 2-adrenergic receptor desensitization in rats with adjuvant arthritis	340
化瘀汤对大鼠子宫内膜异位症的药效学研究	356
中药材蕲蛇及其常见混伪品的特异性 PCR 鉴别	362
蕲蛇药材及其市售混淆品的 Cyt <i>b</i> 基因序列与分析	366
丹皮药材及其伪品、混淆品 rDNA ITS2 的序列分析	372
TLRs 介导的免疫调节信号通路及其药物作用	376
与类风湿关节炎相关的 G 蛋白偶联受体及治疗药物作用靶点	380

一、单克隆抗体与 免疫诊断类篇

抗体工程研究与进展

抗体在生物医学领域中的应用极为广泛,其制备技术经历了从多克隆抗血清、单克隆抗体到基因工程抗体等 3 个发展阶段。1975 年, Kohler 和 Milstein 建立了体外细胞杂交融合的杂交瘤细胞,产生了仅针对某一特定抗原决定簇、纯度很高的单克隆抗体。由于单克隆抗体的高度特异性,使其在细胞生物学、基础医学、临床诊断及其他领域得到广泛应用。但同时单克隆抗体也存在一些缺陷,如完整抗体分子大,大部分抗体是鼠源性抗体,应用于人体会产生抗鼠抗体反应(HAMA)等,因而妨碍了其在临床上的应用。为了克服大分子单克隆抗体的缺点,人们利用基因工程技术制备了人鼠杂交和完全人源化的抗体,以生产更加有效的抗体诊断及治疗制剂,越来越多地被用于临床医学和临床研究,这类抗体被称为第三代抗体。

1. 第一代单克隆抗体(杂交瘤-单克隆抗体)

免疫反应是人类对疾病具有抵抗力的重要因素。当动物体受抗原刺激后可产生抗体。抗体的特异性取决于抗原分子的決定簇,各种抗原分子具有很多抗原決定簇。因此,免疫动物所产生的抗体实为多种抗体的混合物。用这种传统方法制备抗体效率低、产量有限,且动物抗体注入人体可产生严重的过敏反应。此外,要把这些不同的抗体分开也极困难。单克隆抗体技术的出现,是免疫学领域的重大突破。

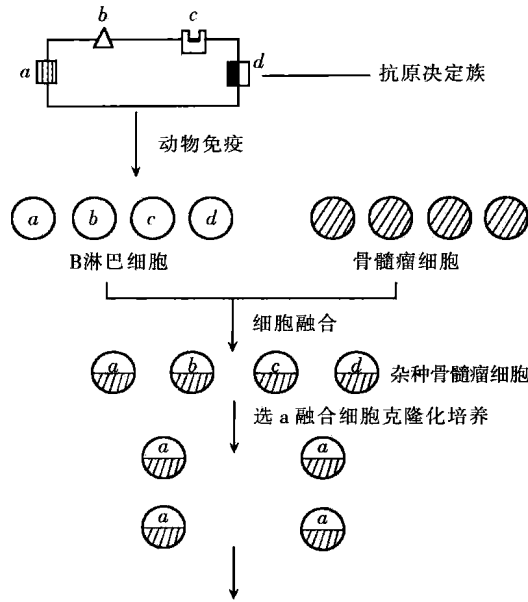
(1)单克隆抗体的基本概念。抗体主要由 B 淋巴细胞合成。每个 B 淋巴细胞有合成一种抗体的遗传基因。动物脾脏有上百万种不同的 B 淋巴细胞系,含遗传基因不同的 B 淋巴细胞合成不同的抗体。当机体受抗原刺激时,抗原分子上的许多決定簇分别激活各个具有不同基因的 B 细胞。被激活的 B 细胞分裂增殖形成该细胞的子孙,即克隆由许多个被激活 B 细胞的分裂增殖形成多克隆,并合成多种抗体。如果能选出一个制造一种专一抗体的细胞进行培养,就可得到由单细胞经分裂增殖而形成细胞群,即单克隆。单克隆细胞将合成一种決定簇的抗体,称为单克隆抗体。

(2)单克隆抗体技术的基本原理。要制备单克隆抗体需先获得能合成专一性抗体的单克隆 B 淋巴细胞,但这种 B 淋巴细胞不能在体外生长。而实验发现骨髓瘤细胞可在体外生长繁殖,应用细胞杂交技术使骨髓瘤细胞与免疫的淋巴细胞二者合二为一,得到杂种的骨髓瘤细胞。这种杂种细胞继承两种亲代细胞的特性,它既具有 B 淋巴细胞合成专一抗体的特性,也有骨髓瘤细胞能在体外培养增殖永存的特性,用这种来源于单个融合细胞培养增殖的细胞群,可制备抗一种抗原決定簇的特异单克隆抗体。其制备原理示意如下:

(3)基本方法

①抗原提纯与动物免疫。对抗原的要求是纯度越高越好,尤其是初次免疫所用的抗原。如为细胞抗原,可取 1×10^7 个细胞作腹腔免疫。可溶性抗原需加完全福氏佐剂并经充分乳化,如为聚丙烯酰胺电泳纯化的抗原,可将抗原所在的电泳条带切下,研磨后直接用以动物免疫。

选择与所用骨髓瘤细胞同源的 BALB/c 健康小鼠,鼠龄在 8~12 周,雌雄不限。为避免小鼠反应而不佳或免疫过程中死亡,可同时免疫 3~4 只小鼠。



免疫过程和方法与多克隆抗血清制备基本相同,因动物、抗原形式、免疫途径不同而异,以获得高效价抗体为最终目的。免疫间隔一般 2~3 周。一般被免疫动物的血清抗体效价越高,融合后细胞产生高效价特异抗体的可能性越大,而且单克隆抗体的质量(如抗体的浓度和亲和力)也与免疫过程中小鼠血清抗体的效价和亲和力密切相关。末次免疫后 3~4 天,分离脾细胞融合。

②骨髓瘤细胞及饲养细胞的制备。选择瘤细胞株的最重要的一点是与待融合的 B 细胞同源。如待融合的是脾细胞,各种骨髓瘤细胞株均可应用,但应用最多的是 Sp2/0 细胞株。该细胞株生长及融合效率均佳,此外,该细胞株本身不分泌任何免疫球蛋白重链或轻链。细胞的最高生长刻度为 9×10^5 个/ml,倍增时间通常为 10~15 h。融合细胞应选择处于对数生长期、细胞形态和活性佳的细胞(活性应大于 95%)。骨髓瘤细胞株在融合前应先用含 8-氮鸟嘌呤的培养基作适应培养,在细胞融合的前一天用新鲜培养基调细胞浓度为 2×10^5 个/ml,次日一般即为对数生长期细胞。

在体外培养条件下,细胞的生长依赖适当的细胞密度,因而,在培养融合细胞或细胞克隆化培养时,还需加入其他饲养细胞(feeder cell)。常用的饲养细胞为小鼠的腹腔细胞,制备方法为用冷冻果糖液注入小鼠腹腔,轻揉腹部数次,吸出后的液体中即含小鼠腹腔细胞,其中在巨噬细胞和其他细胞。亦有用小鼠的脾细胞、大鼠或豚鼠的腹腔细胞作为饲养细胞的。

在制备饲养细胞时,切忌针头刺破动物的消化器官,否则所获细胞会有严重污染。饲养细胞调至 1×10^5 个/ml,提前一天或当天置板孔中培养。

③细胞融合。细胞融合是杂交瘤技术的中心环节,基本步骤是将两种细胞混合后加入 PEG,使细胞彼此融合。其后用培养液稀释 PEG,消除 PEG 的作用。将融合后的细胞适当稀释,分置培养板孔中培养。融合过程中有几个问题应特别注意。

细胞比例:骨髓瘤细胞与脾细胞的比值可从 1:2 到 1:10 不等,常用 1:4 的比例。应保证两种细胞在融合前都具有较高活性。

反应时间:在两种细胞的混合细胞悬液中,第 1 min 滴加 4.5 ml 培养液,间隔 2 min 滴加

5 ml 培养液,尔后加培养液 50 ml。

培养液的成分:对融合细胞,良好的培养液尤其重要,其中的小牛血清、各种离子和营养成分均需严格配制。如融合效率降低,应随时核查培养基情况。

④有限稀释法。筛选阳性株一般选用的骨髓瘤细胞为 HAT 敏感细胞株,所以只有融合的细胞才能待续存活一周以上。融合细胞呈克隆生长,经有限稀释后(一般稀释至 0.8 个细胞/孔)。按 Poisson 法计算,应有 36% 的孔为 1 个细胞/孔。细胞培养至覆盖 0%~20% 孔底时,吸取培养上清用 ELISA 检测抗体含量。首先依抗体的分泌情况筛选出高抗体分泌孔,将孔中细胞再行克隆化,尔后进行抗原特异的 ELISA 测定,选高分泌特异性细胞株扩大培养或冻存。

⑤单克隆抗体的制备和冻存。筛选出的阳性细胞株应及早进行抗体制备,因为融合细胞随培养时间延长,发生污染、染包体丢失和细胞死亡的机率增加。抗体制备有两种方法。一是增量培养法,即将杂交瘤细胞在体外培养,在培养液中分离单克隆抗体。该法需用特殊的仪器设备,一般应用无血清培养基,以利于单克隆抗体的浓缩和纯化。最普遍采用的是小鼠腹腔接种法。选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,先用降植烷或液体石蜡行小鼠腹腔注射,一周后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中去。通常在接种一周后即有明显的腹水产生,每只小鼠可收集 5~10 ml 的腹水,有时甚至超过 40 ml。该法制备的腹水抗体含量高,每毫升可达数毫克甚至数十毫克水平。此外,腹水中的杂蛋白也较少,便于抗体的纯化。接种细胞的数量应适当,一般为每只鼠 5×10^5 个,可根据腹水生长情况适当增减。

选出的阳性细胞株应及早冻存。冻存的温度越低越好,冻存于液氮的细胞株活性仅有轻微的降低,而冻存在 -70°C 冰箱则活性改变较快。细胞不同于菌种,冻存过程中需格外小心。二甲亚砜(DMSO)是普遍应用的冻存保护剂。冻存细胞复苏后的活性多在 50%~95%。如果低于 50%,则说明冻存复苏过程有问题。

⑥单克隆抗体的纯化。单克隆抗体的纯化方法同多克隆抗体的纯化,腹水特异性抗体的浓度较抗血清中的多克隆抗体高,纯化效果好。按所要求的纯度不同采用相应的纯化方法。一般采用盐析、凝胶过滤和离子交换层析等步骤达到纯化目的,也有采用较简单的酸沉淀方法。目前最有效的单克隆抗体纯化方法为亲和纯化法,多用葡萄球菌 A 蛋白或抗小鼠球蛋白抗体与载体(最常用 Sepharose)交联,制备亲和层析柱将抗体结合后洗脱,回收率可达 90% 以上。蛋白可与 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 结合,同时还结合少量的 IgM。洗脱液中的抗体浓度可用紫外光吸收法粗测,小鼠 IgG 单克隆抗体溶液在 $A_{280\text{ nm}}$ 时,1.44(吸光单位)相当于 1 mg/ml。经低 pH 洗脱后在收集管内预置中和液或速加中和液,对保持纯化抗体的活性至关重要。

2. 第二代单克隆抗体(经过基因重组的嵌合或人源化单克隆抗体)

抗体是机体内最复杂的分子,以其特有的基因结构和重组形成了巨大的多样性,可结合任何一种抗原,不仅为机体提供了有效的保护,也成为科学研究、生物技术及临床诊疗的重要工具,在生物试剂产品中,抗体类占了最大份额,因此抗体工程的发展一直是人们关心的热点。从 20 世纪 80 年代中期,随着 DNA 重组技术的进展和人们对 Ig 分子认识的深化,抗体技术由细胞工程抗体(杂交瘤—单克隆抗体)发展到了基因工程抗体。鼠单抗作为异源性蛋白在人体内可诱发抗鼠抗体的生成(HAMA),而用细胞融合—杂交瘤方法制备人单抗未能取得突破性进展。因此尽管单抗在诸多领域得到广泛的应用,但在体内治疗应用却明显滞后。为解决这一难题,鼠单抗人源化成为最早出现的基因工程抗体。从 80 年代初期发展

到现在,鼠单抗人源化经历了如下历程:恒定区人源化→可变区人源化;为保证抗体亲和力而保留某些鼠源残基→利用抗体库技术获得完全人源序列基因工程抗体,即应用基因工程技术将抗体的基因重组并克隆到表达载体中,在适当的宿主中表达并折叠成有功能的一种抗体分子。基因工程抗体具有分子小、免疫原性低、可塑性强及成本低等优点。此技术的基本原理是,首先从杂交瘤或免疫脾细胞、外周血淋巴细胞等中提取 mRNA,逆转录成 cDNA,再经 PCR 分别扩增出抗体的重链及轻链基因,按一定的方式将两者连接克隆到表达载体中,并在适当的细胞(如大肠杆菌、CHO 细胞、酵母细胞、植物细胞及昆虫细胞等)中表达并折叠成有功能的抗体分子,筛选出高表达的细胞株,再用亲和层析等手段纯化抗体片段。基因工程抗体技术的着眼点在于尽量减少鼠源成分,保留原有抗体的亲和力和特异性。借助于基因工程技术,既可以对完整抗体,又可以对抗体片段进行改造。抗体是“Y”字型的四肽链结构,由 2 条相同的重链(H 链)和 2 条相同的轻链(L 链)借助二硫键连接而成。分析不同的免疫球蛋白的重链和轻链氨基酸序列时发现,在多肽链 N 端,占轻链的约 1/2(含 107~130 个氨基酸残基)或重链的约 1/4(含 107~130 个氨基酸残基)的区域,氨基酸排列顺序随抗体特异性的不同而有所变化,称为可变区(V 区)。V 区中的高变区(HVR)是抗体与抗原(表位)特异性结合的位置,因 HVR 序列与抗原表位互补,故亦称互补决定区(CDR)。V 区中氨基酸组成和排列顺序变化小的部分为骨架区(FR)。V 区的 3 个 CDR 分别被 4 个 FR(1~4)所隔开。多肽链的 C 端,占轻链的 1/2 和重链的 3/4 的区域,其氨基酸数量、种类、排列顺序及含糖量均较稳定,故称为恒定区(C 区)。基因工程抗体主要是相对这些区域进行改造所得。

(1)恒定区人源化——人-鼠嵌合抗体。这一最早出现的方法是将鼠单抗可变区与人抗体恒定区拼接形成人-鼠嵌合抗体。相对于其他人源化方法较易于操作,由于保留了完整的鼠单抗可变区,其亲和力和特异性均得到了保证,但也保留了鼠可变区的异源性,仍可能引起 HAMA 为其不足。由于不同鼠单抗可变区序列与人可变区序列的同源性不尽相同,它们在人体内引起的 HAMA 可有很大差别。迄今已研制出很多人-鼠嵌合抗体,有些已陆续进入临床应用,主要用于恶性肿瘤的诊疗。1998 年 8 月美国 FDA 正式批准了一抗 TNF- α 人-鼠嵌合抗体用于炎症性肠病,这是首例人-鼠嵌合抗体作为慢性病治疗药品上市,使人-鼠嵌合抗体应用于人体的前景更为乐观。国内从 20 世纪 80 年代中期开始这方面的研究,已有多株人-鼠嵌合抗体构建成功的报道,有关技术已日臻成熟。

(2)可变区的人源化。由于人-鼠嵌合抗体保留了鼠可变区,仍可引起 HAMA,有必要将可变区也人源化,最早是通过 CDR 移植构建“改型抗体”,抗体分子上的抗原结合部位是由 VH 和 VL 的 6 个 CDR 构成,其他部位(骨架区)的作用是维持特定的立体构象,因此用鼠单抗的 CDR 替换人可变区中的 CDR,所形成的改型抗体应具有亲本鼠单抗的特异性。但实际上改型抗体的构建远非“CDR 移植”那么简单,由于骨架区氨基酸残基可影响 CDR 平面的构象,构建一个理想的“改型抗体”往往涉及一系列的分析、设计、改建工作。总结 27 个有亲和力测定数据的改型抗体,63% 的亲和力有 10%~87% 的降低。有人从另一个角度提出了表面残基人源化的路线:鉴于抗原抗体反应仅涉及分子表面,仅改动鼠可变区的表面残基,使其“外表”与人可变区相似,以期消除 HAMA。目前只见到经此方法人源化后仍保留亲本鼠单抗特异性和亲和力的报道,未有其消除异源性效果的资料。上面两种方法中,前者最大限度的减少了鼠源序列,可能影响抗体的结合性能,后者最大限度地保留了鼠源序列,可能会更好的维持亲本鼠单抗的抗体结合性能,但其消除异源性的效果将受到影响。目

前,这种基于 CDR 移植的人源化路线是上述两种思路的综合:通过数据库检索、计算机分子模建等寻找有最大同源性的人抗体可变区模板,综合考虑表面残基、与 CDR 有相互作用或对空间结构有重要影响的残基,确定需要保留和改变的关键残基,再通过分子模建、基因合成、表达检测实际效果,进行必要的修正。这是一个较为复杂的系统工程。迄今国外已构建了相当数量的改型抗体,已有超过 20 个人源抗体进入临床试用,并取得较好效果。目前,这种方法是鼠单抗人源化所采取的主要途径,其缺点是具有一定的难度和不确定性(即亲和力可能降低,仍保留不等的鼠源序列)

(3)小分子抗体和抗体融合蛋白。小分子抗体因其分子量小、穿透性强、抗原性低、可在原核系统表达以及易于进行基因工程操作等优点而受到人们重视。小分子抗体种类较多,且不断有不同形式的小分子抗体出现,但目前研究较多或实用前景较明确的有以下几种:Fab 段、Fv 段、单链抗体(ScFv)、二硫键固定的 Fv 段、Diabody、Minibody 等。Fab 段是异二聚体,较适于分泌型表达,不适于通过包体大量表达;ScFv 是研究最多的小分子抗体,其优越性在于可通过包含体大量表达、易于基因工程操作,尤其易于构建抗体融合蛋白。近来在 ScFv 的基础上发展了几种性能较好的小分子抗体:DsFv 是在轻链可变区和重链可变区适当部位各引入一个半胱氨酸,形成以二硫键固定的 Fv 段,经证实其结合能力及稳定性均优于 ScFv,用 DsFv 构建的免疫毒素已进入临床试用前期。Diabody 将 ScFv 中两个可变区之间的接头缩短,迫使两个分子间 VH 和 VL 配对形成双价小分子抗体,其结合性能优于单价分子。如将两种不同特异性的可变区基因交叉配对,则可得到双特异性 Diabody。与化学交联法和三体、四体杂交瘤方法制备双特异性抗体相比具备制备简便、稳定、高效、分子量小等优点,有较为广泛的应用前景。较典型的一个例子,是最近研制的抗 CD19/抗 CD3 双特异性 Diabody 可介导 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。除此以外,人们还设计了多种方案构建双价或双特异性小分子抗体,其基本思路是在 ScFv 的一端加上一个双聚化结构,其中效果较好并已进行了体内应用研究的有 Minibody。这是将 Ig 分子中的 CH3 拼接在 ScFv 的羧基端,通过 CH3 形成双价分子,有人在荷瘤小鼠比较完整 Ig、F(ab')₂、ScFv、Diabody 及 Minibody 的免疫显像效果和治疗效果,结果发现 Minibody 和 Diabody 的显像效果最好,而在治疗效果中以完整 Ig 和 Minibody 为佳。

将抗体分子片段与其他蛋白融合可得到具有多种生物学功能的融合蛋白,可将其分为两大类。一类是将 Fv 段与其他生物活性蛋白结合,利用抗体的特异性识别功能将某些生物活性引导于特定部位。导向治疗是其主要应用领域,尤其是肿瘤,将抗肿瘤相关抗体与毒素、酶、细胞因子等融合达到杀伤肿瘤细胞的目的。迄今导向治疗在体外实验及动物实验效果较好,人体内的应用较少,尚待进一步评价,目前应用绿脓杆菌外毒和蓖麻毒素的抗体融合蛋白已进入 II 期临床试用。

另一类是含 Fc 段的抗体融合蛋白。利用 Fc 段所特有的生物学功能与某些有粘附或结合功能的蛋白融合,又被称为免疫粘附素(immunoadhesin),Fc 段可赋予免疫粘附素以下功能:通过与抗 Ig 或蛋白 A 结合用于检测或纯化;Fc 段介导的抗体效应功能,如 ADCC、固定补体及调理作用等;增加该蛋白在血液中的半衰期。

3. 第三代单克隆抗体(噬菌体抗体库技术)

用于构建基因工程抗体的抗体基因最初来源于杂交瘤细胞,因此同样必须经过动物免疫、细胞融合及克隆筛选这样一个长期、复杂的工艺流程,但仍然不能制备针对稀有抗原的抗体和人源性抗体,无法改善抗体的亲和力。这些缺点限制了基因工程抗体更为广泛的应

用。组合化学方法应用到抗体工程领域产生的抗体库技术,使人们找到了解决这些问题的有效途径。噬菌体抗体库是应用最为普遍的抗体库技术。采用噬菌体抗体库技术筛选抗体不必进行动物免疫,易于制备稀有抗原的抗体、筛选全人源性抗体和高亲和力抗体。噬菌体抗体库技术是生命科学研究的突破性进展之一,同时也将抗体工程的研究推向了一个新的高潮。

尽管从抗体库中可筛选到多种抗体,但其亲和力往往不够高,因而不能满足用于免疫治疗、中和病毒以及灵敏诊断的需求。亲和力是抗体的重要生物学参数,亲和力高的抗体有更高的使用价值。体内初次免疫应答所产生的抗体一般亲和力都较低,在随后的抗原刺激下,抗体可变区基因发生体细胞突变,造成亲和力改变,最后形成产生高亲和力抗体的 B 细胞克隆,即“亲和力成熟”过程。在体外可以利用抗体库技术模拟体内的亲和力成熟过程,提高抗体的亲和力。主要包括 3 个步骤:向 V 基因中引入突变,建立次级库,筛选高亲和力的突变株。其中第一步最为关键复杂。向 V 基因中引入突变通常有两种策略:在基因的各部位随机引入突变;在基因的特定区域定点引入突变。

(1) 引入突变的策略

①利用致突变株大肠杆菌在细胞内进行突变。有数种大肠杆菌突变株可以用来进行基因突变,其中最常用的是大肠杆菌 mutD52F_{IT} 株,它可随机引起以点突变为主的基因突变。原理是其 DNA 复制中的错配修复功能缺陷以及聚合酶 III 缺乏 3'→5'校正性外切酶活性。其突变率可通过调节生长条件来控制,DNA 在高浓度培养基中的突变率是其在低浓度培养基中突变率的 5 倍。另外,当细菌处于对数生长期时,DNA 突变率最高。将含有重组抗体基因的菌粒或质粒转化成 mutD5 菌株,DNA 复制过程中形成突变,将所获噬菌体抗体库经固相抗原筛选获得亲和力较高的噬菌体后将其亚克隆至合适的表达载体进行表达。

②PCR 错配。Taq DNA 多聚酶由于缺乏 3'→5'的外切酶活性,在诱导 DNA 复制中无校对功能,因而可使 DNA 产生错配。错配类型最多的是将 T 变为 C,其他类型的错配也会产生。TaqDNA 多聚酶的错配通常被视为 PCR 中的一大难题,因为它会造成许多克隆的突变,但是当实验目的变为将突变引入 DNA 时,它却成为一大优势。通过选择适当的 PCR 条件,可以很容易地控制 TaqDNA 多聚酶的错配率以及所产生的突变。控制的主要条件为:双价阳离子浓度(如提高 Mg^{2+} 浓度或加入 Mn^{2+} 等),dNTP 浓度以及 PCR 循环数等。

③链替换(Chain shuffling)。将来源于噬菌体抗体库的抗原结合特异性轻链或重链与另一条链的不同序列重新组合,构建抗体库,筛选亲和力高的克隆。对于 ScFv 的链替换,其基本步骤为:扩增从噬菌体中筛选到的抗体克隆 VH(VL)片段,同时扩增从人外周血或其他来源的 B 细胞群体的另一条链抗体 VL(VH),通过重叠延伸 PCR(SOE),将两者拼接并扩增,酶切后克隆入噬菌体载体,转化 E. coli 构建次级抗体库,从中筛选高亲和力克隆。

④DNA 替换(DNA shuffling)。DNA 替换不同于链替换之处在于抗体基因在随机部位重新组合,反复优化后可从噬菌体抗体库中筛选到高亲和力抗体。

⑤CDR 步移(CDR walking)。CDR 步移技术的宗旨是利用 PCR 将抗体的 CDR 区进行随机化突变。最成功的报道是,美籍华人杨卫平利用 CDR 步移技术将一株人抗 HIV21 抗体的亲和力由 nmol/L 级提高到 pmol/L 级。

(2)通过改变筛选方法进行抗体体外亲和力成熟。与体内 B 细胞选择过程类似,通过逐步降低抗原浓度,经数轮筛选后可使具有较高亲和力的噬菌体抗体得到富集。按照实验需要选择以亲和力参数或根据抗体结合 2 解离动力学参数来进行筛选,当从次级噬菌体抗体