

21世纪生物技术丛书

抗体理论与技术

(第二版)

主编 王廷华 李官成 Xin-Fu Zhou



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪生物技术丛书

抗体理论与技术

(第二版)

主 编 王廷华 李官成 Xin-Fu Zhou

科学出版社

北京

内 容 简 介

《抗体理论与技术》是《21 世纪生物技术丛书》的一个分册。本书于 2005 年出版,2009 年进行再版。随着当今生物技术的迅速发展和需求的日益扩大,现予以再版。第二版在第一版基础上主要增加了实验技术,从而使本书更具可操作性。

全书分上、下两篇,共 17 章,是国内生物科学领域中一本较全、较新,全面阐述抗原、抗体基本理论与实验技术的学术著作。上篇共 10 章,介绍了抗体的研究历史、现状与发展、抗原与抗原提呈、抗体的结构与功能、免疫应答等基本理论;此外,还介绍了抗体制备的相关技术。下篇重点围绕抗原抗体反应,用 7 章例证实验介绍了与抗原抗体相关的常用技术,包括免疫酶组织化学技术、免疫荧光化学技术、免疫印迹技术、ELISA 技术、抗体封闭技术等,从而使本书更全面和更具可操作性。

本书可供生物医学专业研究生、本科生以及从事与抗原抗体研究有关的科研人员阅读和实验时参考。

图书在版编目(CIP)数据

抗体理论与技术 / 王廷华, 李官成, (澳) 周 (Zhou, X. F.) 主编.

—2 版. —北京: 科学出版社, 2009

(21 世纪生物技术丛书)

ISBN 978-7-03-024224-2

I. 抗… II. ①王…②李…③周… III. 抗体—研究 IV. Q939.91

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 034556 号

策划编辑: 沈红芬 吴茵杰 / 责任编辑: 黄相刚 / 责任校对: 陈玉凤

责任印制: 刘士平 / 封面设计: 黄 超

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

骏 杰 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

2009 年 3 月第 二 版 印张: 15 3/4

2009 年 3 月第二次印刷 字数: 360 000

印数: 3 001—6 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

主 审 李云庆 蔡文琴
委 员 (按姓氏笔画为序)

王廷华	四川大学	特聘教授
方秀斌	中国医科大学基础医学院	教授
冯 华	第三军医大学西南医院	教授
冯忠堂	昆明医学院神经科学研究所	教授
齐建国	四川大学华西医学中心	教授
李云庆	第四军医大学基础医学院	教授
李成云	云南农业大学植物病理国家重点实验室	教授
李官成	中南大学湘雅医学院	教授
李建国	上海交通大学医学院	教授
吴良芳	四川大学华西医学中心	教授
吴承远	山东大学医学院	教授
应大君	第三军医大学	教授
沈馨亚	上海交通大学医学院	教授
周 东	四川大学华西医院	教授
赵春华	协和医科大学	教授
胡长林	重庆医科大学	教授
施 静	华中科技大学同济医学院	教授
姜保国	北京大学医学部	教授
顾晓松	南通大学医学院	教授
曾园山	中山大学中山医学院	教授
游 潮	四川大学华西医院	教授
蔡文琴	第三军医大学	教授
Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学	教授
John W. McDonald	美国霍普金斯大学医学院	教授
Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授
Pierre Dubus	法国波尔多第二大学	教授
Xin-Fu Zhou	澳大利亚阿德莱德大学	教授
Xiong-Zhong Ruan	英国伦敦大学	教授

《抗体理论与技术》(第二版)编写人员

主 编 王廷华 李官成 Xin-Fu Zhou

副主编 何小鹏 童永清 杨霄彦

编 委 (按姓氏笔画为序)

习杨彦彬 王廷华 王芙艳 王海燕

巴迎春 任彩萍 祁海军 孙伟伟

杨霄彦 李力燕 李官成 李 慧

何小鹏 张 丽 庞江霞 胡锦跃

郭西良 郭实士 童永清 Xin-Fu Zhou

第二版总序

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术和需求,科学出版社组织编写了这套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》。本套丛书共有八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。自 2005 年 3 月本套丛书问世以来,即得到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月即进行了重印。本套丛书对满足日益扩大的研究生实践需求,以及我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的促进作用。

由于生物技术发展迅速和需求日益扩大,本套丛书于 2009 年再版。第二版在第一版的基础上,主要对实验技术进行了全面增补和修订,新增内容 20 余章。补充了神经形态示踪、肿瘤干细胞培养、神经干细胞移植、转基因干细胞构建、抗体封闭、细胞凋亡染色、免疫荧光染色、蛋白质组和基因组等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调基本概念和理论的阐述,注重基本技术的实践,并提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。

本套丛书由我国神经科学青年专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本套丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅速,错误和不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础。感谢国内外一批知名专家教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅,感谢编者所付出的辛勤劳动。感谢中国解剖学会对本套丛书的组织工作给予的支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

2009 年 1 月

第一版总序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨,生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下,科学出版社组织编写了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面,力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述,基本反映了现阶段常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,错误、不足之处在所难免,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本套丛书提供了参考。感谢国内外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》

编审委员会

2004 年 12 月 8 日

目 录

上篇 抗原、抗体及其制备

第一章 概论	(1)
第一节 抗体研究的简史	(1)
第二节 抗体研究的现状与发展趋势	(4)
第二章 抗原与抗原提呈	(11)
第一节 概述	(11)
第二节 抗原提呈细胞	(19)
第三节 抗原提呈	(22)
第三章 抗体的结构与功能	(28)
第一节 抗体的分子结构	(28)
第二节 抗体的生物合成	(31)
第三节 抗体分子的基因结构和重排	(33)
第四节 抗体的生物学活性和特性	(36)
第四章 免疫应答与调节	(41)
第一节 概述	(41)
第二节 T 细胞介导的细胞免疫	(44)
第三节 B 细胞介导的体液免疫	(52)
第四节 免疫调节	(58)
第五章 抗原的制备技术	(64)
第一节 抗原的制备	(64)
第二节 载体蛋白的选择与连接	(74)
第三节 佐剂的制备与应用	(77)
第六章 多克隆抗体	(80)
第一节 动物选择	(80)
第二节 抗原的剂量与免疫途径	(82)
第三节 免疫程序	(84)
第四节 抗血清的效价测定与保存	(87)
第七章 单克隆抗体	(91)
第一节 产生的历史与原理	(91)
第二节 杂交瘤细胞系的建立和检定	(93)
第三节 单克隆抗体的制备	(103)

第四节 抗独特型单克隆抗体的制备	(105)
第八章 基因工程抗体	(110)
第一节 嵌合抗体	(110)
第二节 改型抗体	(112)
第三节 噬菌体抗体库技术	(116)
第四节 核糖体展示技术	(127)
第九章 转人 Ig 基因鼠	(135)
第一节 概述	(135)
第二节 酵母人工染色体技术	(137)
第三节 基因敲除技术	(143)
第四节 含人 Ig 转基因小鼠的构建	(159)
第十章 抗体的表达	(167)
第一节 概述	(167)
第二节 原核表达系统	(170)
第三节 真核表达系统	(175)
第四节 动植物表达系统	(181)

下篇 抗原-抗体反应相关的实验技术

第十一章 抗原-抗体反应中的免疫组织化学实验技术	(186)
第十二章 抗原-抗体反应中的抗体特异性	(193)
第一节 蛋白质的免疫特异性	(193)
第二节 抗体的特异性及对免疫组织化学实验的影响	(194)
第三节 鉴定抗体特异性的试验	(196)
第四节 订购抗体时的注意事项	(197)
第十三章 抗原-抗体反应中的免疫酶组化学技术——大鼠脊髓内 NTF 及其受体的定位	(199)
第一节 实验原理	(199)
第二节 实验所需设备、试剂及其配制	(199)
第三节 实验步骤	(201)
第四节 实验结果	(202)
第五节 结果分析与实验体会	(205)
第十四章 抗原-抗体反应中的免疫荧光化学技术——大鼠脊髓神经元与星形胶质细胞标记	(207)
第一节 实验原理	(207)
第二节 实验所需设备、试剂及其配制	(207)
第三节 实验步骤	(208)
第四节 实验结果	(209)
第五节 实验体会	(209)

第十五章	免疫印迹技术在检测脊髓 $\text{TGF-}\beta_1$ 中的应用	(211)
第一节	实验原理	(211)
第二节	实验所需设备、试剂及其配制	(212)
第三节	实验结果	(216)
第四节	实验体会	(216)
第五节	应用与展望	(217)
第十六章	抗原-抗体反应中的 ELISA 技术	(218)
第一节	ELISA 技术简介	(218)
第二节	ELISA 技术测定 CDK4 R24C 基因突变鼠血浆中 Tpo 水平——双抗体夹心法	(224)
第三节	ELISA 技术的操作要点	(226)
第十七章	抗体封闭技术在探讨脊髓内源性 BDNF 作用中的运用	(232)
第一节	实验原理	(232)
第二节	实验设备、仪器和方法	(233)
第三节	实验结果	(235)
第四节	结果分析与讨论	(236)
第五节	实验体会	(237)

上 篇 抗原、抗体及其制备

第一章 概 论

抗体是机体免疫系统最重要的效应分子,具有结合抗原、结合补体、中和毒素、介导细胞毒、促进吞噬和通过胎盘等功能,发挥抗感染、抗肿瘤、免疫调节与监视等作用。抗体的研究始于18世纪末,从其问世到目前广泛应用于临床,经历了一段曲折的发展历程,20世纪80年代迅猛发展,90年代初期又一度处于低谷。近年来,随着生物技术的发展,再度成为生物技术药物领域研究的热点。目前,抗体在同种异体免疫排斥、自身免疫反应抑制、抗血小板治疗、癌症治疗、感染性疾病治疗等方面应用最为广泛,展现了诱人的市场前景。据报道,目前处于临床前期、临床Ⅰ期与临床Ⅱ期研究与开发的各类生物技术药物中,单抗药物的品种数量位居前列。本章以抗体的发展为主线,主要介绍抗体研究的简史、研究现状及发展趋势等。

第一节 抗体研究的简史

一、抗体的发现及结构研究

在免疫学发展的早期,人们应用细菌或其外毒素给动物注射,经一定时期后用体外实验证明,在其血清中存在一种能特异中和外毒素的组分,称之为抗毒素,或能使细菌发生特异性凝集的组分,称之为凝集素。其后将血清中这种具有特异性反应的组分称为抗体(antibody, Ab),而将能刺激机体产生抗体的物质称为抗原(antigen, Ag),由此建立了抗原和抗体的概念。

20世纪30年代, Tiselius 和 Kabat 用电泳鉴定,证明抗体是 γ -球蛋白。动物在免疫后,血清中 γ -球蛋白显著增高,此部分有抗体活性,从而可将抗体从血清中分离出来,抗体主要存在于 γ -球蛋白中。

1959年, Porter 和 Edelman 对抗体结构进行了研究,证明它是由四肽链组成,借二硫键连接在一起。抗体的氨基端结合抗原,决定抗原结合的特异性,称 $F(ab')_2$ 段;抗体羧基端不能结合抗原,但具有抗体的其他功能,此段易产生结晶,称 Fc 段,从而在分子水平阐明了抗体的结构,不仅在应用上,经酶解获抗体的 $F(ab')_2$ 段,可减少使用中的超敏反应;而且在理论上,将抗体特异性的研究集中于分析 $F(ab')_2$ 段的氨基酸组成特点,导致以后的抗体可变区及其抗原结合部位的发现。

进入 20 世纪 60 年代,国际上统一了抗体的名称和分类:IgG、IgM、IgA,并发现了 IgD 和 IgE。

20 世纪 70 年代,日本的利根川进等应用分子杂交技术证明并克隆出 Ig 分子 V 区和 C 区基因;同时,应用克隆 cDNA 片段作为探针,证明了 B 细胞在分化发育过程中编码 Ig 的基因结构,阐明了 Ig 抗原结合部位多样性的起源,以及遗传和体细胞突变在抗体多样性形成中的作用,因此获得 1987 年诺贝尔生理学/医学奖。

此后,随着分子生物学的兴起,从基因水平揭示了抗体多样性产生的机制。基因重排现象被发现后,1978 年,Tonegawa 应用基因重排技术发现了免疫球蛋白编码基因的重排。重排后,形成由不同基因节段组成的功能基因编码不同氨基酸序列的蛋白,从而产生了不同特异性的抗体。

二、抗体相关理论研究

20 世纪上半叶,对抗体的分子结构及其功能的研究非常详尽,与此同时,对抗体的形成也提出了不少学说。1900 年,Ehrlich 提出抗体生成的侧链学说,他认为抗毒素分子是细胞表面的一种受体,外毒素进入机体后与之结合,刺激细胞产生更多的抗毒素分子,这些分子自细胞表面脱落进入血流,即是抗体。由于这一学说证据不足而长期被束之高阁。1930 年,Breinl 和 Haurowitz 提出模板学说,认为抗原分子是模板,抗体是直接按抗原分子的特点形成的。1940 年,Pauling 根据抗体是 γ -球蛋白的知识,提出可变折叠学说,即抗体是 γ -球蛋白多肽按抗原分子特点进行结构互补折叠形成。至 1955 年,Jerne 提出了天然抗体选择学说,认为在机体循环内存在着很低浓度的针对各种抗原的抗体,当机体接触某一抗原时,此抗原即与相应的特异抗体反应,形成的抗原-抗体复合物可刺激更多细胞产生针对该抗原的特异性抗体。

1957 年,澳大利亚的 Burnet 综合 Ehrlich 的侧链学说和 Jerne 的自然选择学说两学说的关键(细胞抗原受体和抗原抗体选择性结合),提出了抗体生成克隆选择学说。其要点是:①机体内存在识别多种抗原的细胞系,其细胞表面具有识别抗原的受体。②抗原进入体内后,选择相应受体的免疫细胞使之活化、增殖,形成抗体产生细胞及免疫记忆细胞。③胎儿期免疫细胞与自身抗原相接触则可被破坏,形成耐受状态。④免疫细胞系可突变,产生出同自身抗原发生反应的细胞因子,从而形成自身免疫。此学说不仅阐明了抗体产生的机制,同时对许多重要免疫生物学现象都做了解答,如对抗原的识别、免疫记忆的形成、自身耐受的建立以及自身免疫的发生等现象。但由于受当时科学水平的限制,尚未发现 T 细胞、B 细胞、组织相容性抗原(MHC)的自身限制等。

到了 20 世纪 70 年代,发现了抗体独特基因型。1974 年,Jerne 提出免疫网络学说,认为机体免疫系统是一个建立在识别自身抗原基础上而识别外来抗原的系统,抗体分子的可变区(V)结构域具有双重特性,它通过抗原结合部位与抗原结合,又借助于独特型决定簇引发免疫应答。其主要内容为:抗原刺激发生之前,机体处于一种相对的免疫稳定状态;抗原进入机体后,打破了这种平衡,产生特异性抗体分子;当抗体达到一定量时,将引起抗抗体分子独特型的免疫应答,即抗独特型抗体,使受增殖的克隆受到抑制,而不是无休止地增殖,借以

维持免疫应答的稳定平衡。这一学说把免疫应答看成是免疫细胞和抗体分子相互作用的网络调节的结果,从一个新的角度解释了免疫耐受、自身免疫和变态反应等免疫现象。

三、抗体技术的发展

抗体技术领域的进展大致可分为三个阶段:①以 1890 年 Behring 和 Kitasato 发现白喉抗毒素为代表,其特点是用抗原免疫动物来获得多克隆抗体。②以 1975 年 Kohler 和 Milstein 创建杂交瘤技术制备单克隆抗体为代表。③以 1994 年 Winter 以基因工程方法制备抗体为代表。这是抗体研究领域出现的又一次技术革命,在此基础上发展成为抗体工程。

(一) 多克隆抗体

1888 年,Emile Roux 和 Yersin 在研究白喉发病机制时,发现白喉菌能产生外毒素。在此基础上,1890 年,德国人 Behring 和日本人北里(Kitasato)将白喉外毒素注射给动物,发现在该动物血清中存在一种能中和白喉外毒素的物质,他们称之为抗毒素。将具有抗毒素的免疫血清注入正常动物体内,可使后者同样对白喉毒素有抵抗力。他们以同样的方法用这种免疫血清成功地治愈了一例患白喉病的女孩。这是第一次用人工被动免疫的方法治疗疾病的病例。由于他们开创了人工被动免疫治疗的方法而荣获 1901 年诺贝尔奖。

(二) 单克隆抗体

1975 年,英国剑桥的科学家 Kohler 和 Milstein 发明了杂交瘤技术。由于他们的这一卓越贡献,与丹麦人耶纳共获 1984 年诺贝尔生理学/医学奖。他们将小鼠骨髓瘤细胞和经绵羊红细胞(sheep red blood cell,SRBC)免疫的小鼠脾细胞在体外进行两种细胞融合,结果发现部分形成的杂交细胞既能继续在体外培养条件下生长繁殖,又能分泌抗 SRBC 抗体,称这种杂交细胞系为杂交瘤(hybridoma)。这种杂交瘤细胞既具有骨髓瘤细胞能大量无限生长繁殖的特性,又具有抗体形成细胞合成和分泌抗体的能力。它们是由识别一种抗原决定簇的细胞克隆所产生的均一性抗体,故称之为单克隆抗体。只要这种抗原能引起小鼠的抗体应答,应用杂交瘤技术可获得几乎所有抗原的单克隆抗体。与多克隆抗体相比,这种用杂交瘤技术制备的单克隆抗体可视为第二代抗体。

单克隆抗体由于纯度高、特异性强、可以提高各种血清学方法检测抗原的敏感性及特异性,其应用大大促进了对各种传染病和恶性肿瘤诊断的准确性。单克隆抗体亦可与核素(后来又称核酸)、各种毒素(如白喉外毒素或蓖麻毒素)或药物通过化学偶联或基因重组制备成导向药物用于肿瘤的治疗,是一种新型免疫治疗方法,有可能提高对肿瘤的疗效。此外,单克隆抗体亦可用于对各种免疫细胞及其他组织细胞表面分子的检测,这对免疫细胞的分离、鉴定、分类及研究各种膜表面分子的结构与功能都具有重要意义。

但美中不足的是,目前绝大多数单克隆抗体是鼠源的,临床重复给药时体内产生抗鼠抗体,使临床疗效减弱或消失。因此,临床应用理想的单克隆抗体应是人源的,但人-人杂交瘤技术目前尚未突破,即使研制成功,也还存在人-人杂交瘤体外传代不稳定、抗体亲和力低及

产量不高等问题。目前较好的解决办法是研制基因工程抗体以代替鼠源单克隆抗体用于临床。

(三) 基因工程抗体

基因工程抗体兴起于 20 世纪 80 年代早期。这一技术是将对 Ig 基因结构与功能的了解与 DNA 重组技术相结合,根据研究者的意图在基因水平对 Ig 分子进行切割、拼接或修饰,甚至是人工全合成后导入受体细胞表达,产生新型抗体,也称为第三代抗体。基因工程抗体包括嵌合抗体、改型抗体、单链抗体、单区抗体及抗体库等。

Winter 等在 1994 年创建了噬菌体抗体库技术,克服了人体不能随意免疫的缺点,而且不用人工免疫动物和细胞融合技术,完全用基因工程技术制备人源性抗体。该技术将抗体基因的克隆和表达融为一体,同在一个载体上进行。将抗体基因表达在噬菌体的表面,用固相化抗原对表达产物的载体进行淘筛,在数日内就可筛选出阳性克隆,从而能构建出大容量文库,囊括天然全套抗体基因。理论上,人们可以用基因工程的方法研制任何一种具有高度特异性的抗体,使抗体工程的设想成为现实。

噬菌体抗体库技术的特点:①方法简单易行,节省时间,可通过发酵生产大量制备。②选择范围广泛,可对百万至亿万个分子进行选择,获得高亲和力的人源化抗体。③可直接从未经免疫的人或小鼠的淋巴细胞中得到抗体基因或 Ig 的 V 区基因,因此可以获得完全人源化的抗体,克服了人杂交瘤细胞不稳定的缺点,避开了人工免疫和杂交瘤技术。④模拟了天然免疫系统亲和力的成熟过程,经过多轮突变、链置换和抗原选择可创造出高亲和力的抗体。

此后,由于对抗体结构功能认识的深入,发现七个重链可变区和七个轻链可变区(其中四个 κ 链、三个 λ 链)基因家族覆盖了人类抗体多样性的 95%。2000 年报道的第一个全合成抗体库,就是根据上述可变区基因家族设计的 14 个通用可变区序列作为构建全合成抗体库的基本骨架,所有互补决定区(CDR)都设计成很容易置换的盒式结构,并考虑和预留了构建多种抗体衍生物所需元件的插入位点,序列的设计均按大肠杆菌表达规律进行了优化。在此基础上又采用了三联核苷酸引导的诱变(trinucleotide-directed mutagenesis, TRIM)方法进行 CDR 区的突变和随机化,即预先合成编码所有氨基酸的三联碱基,再以这些三联碱基为基本单位合成随机化 CDR。该方法避免了碱基随机化造成的氨基酸偏移,保证了抗体的多样性。

噬菌体抗体库技术的建立是抗体技术领域的一项革命性进展,它解决了人源性单抗来源困难及鼠单抗的动物源性难题,对于肿瘤、自身免疫性疾病及感染性疾病发病机制的研究、诊断和治疗有极为重要的实验价值。虽然到目前为止已有不少成功的报道,但噬菌体技术的全面推广仍有赖于抗体库构建技术的进一步成熟和筛选方法的进一步完善。

第二节 抗体研究的现状与发展趋势

抗体作为治疗剂的研究经历了比较曲折的发展过程。第一个应用单克隆抗体(单抗)治疗是在 1982 年, Karr 将一株抗独特型单抗应用于 B 细胞淋巴瘤的治疗获得成功,治疗性抗体的研究很快成为生物制药的热点。1986 年,美国 FDA 批准抗 CD3 单抗 OKT3 进入市

场,用于器官移植时的抗排斥反应。然而,随着研究的广泛深入,大量的临床实验结果背离了人们的期望,许多单抗在临床应用中屡遭失败,抗体的应用一度陷入低谷。此后,随着分子生物学技术的发展,情况有了很大的改观。自 1994 年以来,已经有 13 株单克隆抗体通过 FDA 的批准在临床上应用于抗肿瘤、抗移植排斥、抗凝血反应以及治疗各种免疫系统疾病(表 1-1)。目前市场上销售的治疗性抗体绝大部分为人源化抗体(嵌合或 CDR 移植抗体),占现有制品的 80%。

表 1-1 已上市的治疗性抗体

商品名	抗原	应用范围	分子结构	注册时间
Orthoclone OKT3	CD3	抗急性肾移植排斥反应	鼠单抗	1986
ReoPro	GP II b/ III a	抗凝血	来自嵌合抗体的 Fab	1994
Panorex	17-1 a, EpCAM	结肠癌	鼠单抗	1995
Mabthera/Rituxan	CD20	非霍奇金淋巴瘤	嵌合抗体	1997
Zenapax	CD25	急性肾移植排斥	人源化单抗	1997
Herceptin	HER-2	高表达 HER-2 的转移性乳腺癌	人源化单抗	1998
Synagis	RSV	引起的幼儿呼吸道疾病	人源化单抗	1998
Simulect	CD25	急性肾移植排斥	嵌合抗体	1998
Remicade	TNF2 α	库鲁病,风湿性关节炎	嵌合抗体	1998,1999
Mylotarg	CD33	急性骨髓淋巴瘤	人源化单抗	2000
Campath	B 淋巴细胞	慢性 B 细胞淋巴瘤白血病	人源化单抗	2001
CroFab	蛇毒	响尾蛇解毒药	绵羊 Fab	2000
DigiFab	地高辛	地高辛过量	绵羊 Fab	2001
Zevalin	CD20	非霍奇金淋巴瘤	鼠单抗	2002

注:引自 van Dijk MA. 2001. Current Opinion in Chemical Biology; Hudson PJ, Souriau C. 2003. Nature Medicine.

我国在研究治疗性抗体方面也取得了阶段性的成果,许多实验室成功获得了针对各种抗原(如 VEGF、CEA、TNF- α 等)的人-鼠嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体和其他小分子抗体。有很多试剂抗体或诊断用抗体进入市场,而治疗用抗体只有少数进入临床试验。截至 2002 年,我国还没有人源化抗体上市,但是抗 CEA 嵌合抗体正在申报新药,另外人源化的抗人 VEGF 抗体和抗 CD3 嵌合抗体也取得了重要进展。

抗体人源化以及全人源抗体的制备已经成为当今治疗性抗体的发展趋势,同时,各种抗体衍生物也不断涌现,它们从不同角度克服了抗体本身的应用局限,也为治疗人类疾病提供了更多利器。

一、人源化抗体

人源化抗体的出现被誉为是继单克隆抗体之后,抗体研究领域的第二个里程碑,它使沉寂多年的治疗性抗体再次成为生物医药研究的热点。在疾病治疗中,人源化抗体之所以优于鼠抗体,不仅因为抗体中鼠源成分的减少降低了机体的免疫排斥反应,还在于人抗体中的

Fc 段能够诱发机体的效应功能——募集效应因子或效应细胞,后者对靶细胞具有杀伤作用。人抗体的另一大优点是它在体内的半衰期长。鼠抗的半衰期不到 20 小时,而人源化抗体可达数天甚至有时接近 21 天。

人源化抗体是从鼠源单抗到全人抗体的过渡形式。在鼠单抗的基础上,用人抗体恒定区置换鼠抗体的相应部位,形成人鼠嵌合抗体,其人源化程度达到 70% 左右,在抗原特异性和亲和力方面都较好地保留了亲代抗体的特征,而免疫原性降低至 12% 左右,在体内的半衰期和效应功能也更加接近于人抗体。现在已有五种嵌合抗体进入市场,用于治疗癌症、风湿性关节炎、心肌梗死和移植排斥。但由于其整个 V 区都是异源的,所以嵌合抗体的异源性还很明显,解决 HAMA 的效果并不理想。在嵌合抗体基础上进一步减少鼠源成分,仅保留鼠抗体 CDR 区,其余全部替换成人抗体相应部分,这种改型抗体的人源成分达 90%,即通常所指的人源化抗体。至今共有五种人源化抗体被批准上市。值得注意的是,CDR 移植常常导致亲和力下降,而且并非对每一种鼠抗体都适用。

二、全人源抗体

由于人源化抗体(嵌合或 CDR 移植抗体)内含有 10% ~ 30% 的鼠源蛋白,因而在临床应用时,或多或少地存在一些免疫排斥反应,所以治疗性抗体的发展目标是全人抗体。目前生产全人抗体的方法主要包括抗体库技术和转基因小鼠技术,这两种主要的人抗体制备技术竞争至今,孰优孰劣尚未可知。

(一) 抗体库技术

噬菌体抗体库技术的发展使体外不经过免疫获得抗体成为可能。由于它发生于体外,因此,不依赖体内抗原识别和提呈系统,在理论上它可以产生抗任何物质(包括生物体内没有免疫原性的靶)的抗体,它还特别适合于不需要完整抗体的用途。自 1989 年美国 Scripps 研究所 Lerner 实验室首次应用噬菌体表面呈现技术构建成功噬菌体抗体库以来,该技术在制备基因工程抗体方面发展迅速,国内外已有人源或鼠源抗 HBV、HIV、RSV、TNF、erbB2、gp120 等噬菌体抗体的报道。笔者的实验室也利用该技术构建了大肠癌噬菌体抗体库和鼻咽癌抗独特型抗体库,并从中筛选出全人源抗大肠癌单链抗体和鼻咽癌抗独特型单链抗体。目前世界上有四家专门从事全人源抗体开发的公司,其中英国剑桥抗体技术公司(CAT)采用的即是噬菌体显示技术。CAT 声称该公司生产的以 TNF- α 为目标的 D2E7 全人抗体已进入 III 期试验,这种抗体将用于治疗类风湿关节炎。

但目前噬菌体抗体库技术也存在不足之处:从未经免疫动物的抗体库获得的抗体亲和力不高;受外源基因转化率的限制,抗体库的库容不足以涵盖某种动物的抗体多样性。因此,大容量抗体库是获得高亲和力抗体和针对稀有抗原抗体的关键。

最近兴起的核糖体展示技术避开了上述不足,可制备大容量抗体库,代表了未来抗体工程的发展趋势。该技术依赖于 mRNA、核糖体和抗体蛋白(或多肽)通过非共价结合形成三联复合体,以类似噬菌体抗体库的筛选方式得到特异结合靶分子的复合物之后,分离 RNA 进行 PCR 扩增,在扩增的同时还能引入突变,刺激亲和力成熟过程并获得包含更高亲和力

的次级抗体库。1997年,Roberts和Szostak与Nemoto分别独立设计了另外一种与核糖体展示类似的方法,称为mRNA展示技术(mRNA display)或RNA-多肽融合技术(RNA-peptide fusion)。这个展示系统是利用嘌呤霉素分子将mRNA分子和其所编码的多肽共价结合起来,然后用固相化的靶分子将纯化的RNA-多肽复合物筛选出来。像核糖体展示系统那样,这个复合体可通过RT-PCR得到进一步的扩增。

其他体外筛选技术还有1999年Forrer等建立的体外筛选酶活性技术(selection for enzymatic activity in vitro)、1999年Doi和Yanagawa建立的STABLE技术以及Actinova公司的共价展示技术(covaeent display)等。

(二) 转基因小鼠技术

在转基因动物方面,有几种不同的途径生产人抗体,包括人外周血淋巴细胞-严重联合免疫缺陷小鼠(hu-PBL-SCID小鼠)、转基因小鼠和转染色体小鼠制备人抗体技术。

前者是将已产生一定免疫反应的供者或癌症患者的淋巴细胞导入严重联合免疫缺陷小鼠(SCID)或Trimera小鼠,作为暂时的人免疫系统发挥有限的功能,取鼠脾细胞与人骨髓瘤细胞杂交就可能获得分泌人抗体的杂交瘤。但是这种系统必须依赖已产生一定免疫反应的供体,而且不可能用预先选择的抗原进行免疫。所以,绝大部分人们感兴趣的针对治疗性靶标的抗体都无法用这种技术获得。

另一条生产人抗体的途径是通过基因敲除技术使小鼠自身的基因失活并导入新基因,创造出携带人抗体重、轻链基因簇而自身抗体基因失活的转基因小鼠。这种转人抗体基因小鼠(通常称为HuMab, Human antibody mouse)所带的人DNA片段具有完备的功能,可以有效地进行同种型转换和亲和力成熟。1994年,美国Cell Genesys公司和Genpharm国际公司几乎同时宣布,转基因小鼠作为生产全抗体的载体问世。其基本方法是抗体生成过程不是从普通小鼠开始,而是从鼠抗体生成基因被相应的人基因所取代的小鼠开始。Mendz等于1997年成功地建立了含编码人Ig基因位点区 10^6 bp的大片段DNA的人Ig转基因鼠(xenomouse),即将含1020kb人Ig重链和800kb的人Ig κ 轻链基因大片段克隆至酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YACs)内并导入已敲除Ig基因组的小鼠,经过三种抗原(IL-8、TNF- α 、EGFR)免疫后制备了具有特异性和高亲和力的人抗体。

转基因小鼠制备人抗体的优点是,其功效优于其他生产抗正常人体蛋白单抗技术。小鼠识别抗原和动员抗原的抗体系统仍保持完整,容易把人体蛋白识别为异物。此外,由于抗体是体内产生的,经历了正常装配和成熟过程,从而保证成品具有较高的靶结合亲和力。由Abgenix公司利用该技术开发的两种产品已进入临床开发阶段,即靶向白细胞介素-8(IL-8)的全人单抗,用于治疗自身免疫疾病(包括银屑病和类风湿关节炎),以及靶向表皮生长因子受体(EGFR)的全人单抗,用于治疗多种过度表达EGFR的肿瘤的治疗。但转基因小鼠也存在一些缺陷,即转基因通常有体细胞突变和其他独特的序列,导致不十分完全的人序列。而且,由于抗体是在小鼠体内装配,因而产生的单抗具有鼠糖基化的模式,所以这些单抗最终并不是全人的。

如前所述,转基因小鼠不能携带整套人抗体基因,因而限制了一系列免疫球蛋白的产生。Tomizuka等首先建立并利用染色体为载体成功培育了转染色体小鼠(transchromosomal)