

单克隆抗体

DAN KE LONG KANG

[英] K·西科拉 等

上海科学技术文献出版社

单克隆抗体

K. 西科拉 H. M. 史沫特莱 著

范培昌 秦德安 译

上海科学技术文献出版社

Monoclonal Antibodies
Karol Sikora & Howard M. Smedley
Blackwell Scientific Publications
Oxford London Edinburgh
Boston Melbourne
1984

单克隆抗体

K. 西科拉 H. M. 史沫特莱 著

范培昌 秦德安 译

*

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路2号)

新华书店经销 江苏南漕印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/32 印张 4.5 字数 130,000

1987年7月第1版 1987年7月第1次印刷

印数: 1—3,300

书号: 13192·97 定价: 1.00元

《科技新书目》135-249

前 言

自 1975 年发现单克隆抗体以来,单克隆抗体已成为当今生物技术学主要的研究工具,并正由它发展出许多生物学和临床医学研究的新领域。单克隆抗体具有非凡的特异性,这使它能以高精度度来鉴定复杂的生物分子。已经用它们测定出以前不能测定的物质,鉴定出新的细胞群,揭露出新的分化途径。单克隆抗体为彻底改革实验医学的所有分支学科铺平了道路,也因此有可能治疗癌症、传染病和自体免疫失调等疾病患者而使人兴奋。

本书阐述了单克隆抗体的发展背景并着重强调了近代已取得进展的各个领域。鉴于作者都是开业医生,带着对临床医学的某种偏爱著作此书。我们希望本书将对医学和生物学的学生们,以及对那些希望能和生物技术革命齐头并进的医生们有所帮助。

(下略)

Karol Sikora
Howard Smedley
1983 年于剑桥

序

这本小册子介绍了单克隆抗体在生物学与医学中的应用。它概括了建立单克隆抗体的必需步骤，所挑选的内容又适于各方面的应用。单克隆抗体的特异性和有效性，已使一些临床的和非临床的实验室把它们制成初步的试剂。作者力求阐明所有的潜在的应用领域，并对每一临床实验学科都作了分章介绍。单克隆抗体的应用势必彻底改革这些实验学科中近代所用费时的实验方法。在进行生物学上感兴趣物质的提纯中，在对分化起作用的分子的分析中，单克隆抗体将用作分子标志 (molecular flags)。这反过来，又将使我们思考癌症问题，而癌症则是当代生物学家和医生们都最为感兴趣的疾病。

本书运用了清晰的线条图象进行阐述。看懂此书，毋需具备免疫学方面的知识。各种年龄的学生，凡欲与分子生物学的新发展同步前进者阅后均将会有很大裨益。

César Milstein

目 录

序

前言

第一章	什么是单克隆抗体	(1)
第二章	单克隆抗体的制造	(13)
第三章	生物化学	(28)
第四章	组织学	(44)
第五章	微生物学	(53)
第六章	血液学	(67)
第七章	细胞生物学	(78)
第八章	癌的定位	(86)
第九章	癌的治疗	(99)
第十章	人单克隆抗体	(116)
术语汇编	(134)

第一章 什么是单克隆抗体

1975年，在剑桥分子生物学实验室工作的 G.Köhler 和 C.Milstein 介绍了一种技术，用它可以无限量地生产出能规定并可预言其特异性的抗体。这种技术已引起了免疫学研究和实践的彻底改革，也为生物学和医学的许多领域提供具有重大价值的工具。在本书的稍后几章，我们将概括这类抗体生产中，理论和实践及其应用诸方面需要考虑的事。开始我们必需理解：单克隆抗体类(MCA's)和天然条件下找到的其它抗体，在结构上并没有什么两样，只是人为制造的 MCA's 的特点是，任何专一制剂中所有分子全都相同。因此它们和任何限定抗原(免疫学基本反应中相反的配偶体谓之抗原)的反应，每次也必定完全一样。该制剂功效上的这种恒定性太有用了，在免疫学上像细胞表面那么复杂的表面结构，也可用它在分子水平下逐点剖析和研究。显然，由此获得的知识，必定会使我们理解许多疾病，从而在制定治疗方案中产生巨大影响。

免疫系统

所有高等动物都有能力识别异物分子和进入其躯体潜伏着的有害分子。为了分离或驱除这种异物分子人们曾作过不少努力。现在知道，免疫系统是针对侵入物质的主要防御机构。能刺激免疫系统产生这种反应的物质称为抗原。为了识别这种抗原，机体的反应是制造出一种称为抗体的蛋白质。一种抗体是

通过一系列化学键的连接来识别一种抗原的。虽说这些键的每一个都很弱,都不是共价键,但它们加在一起的总数就能克服这一弱点。一种抗体和其抗原的紧密衔接,有些像两大块拼板玩具的那种衔接。这两种分子的结合促使体内的一系列反应开始运转,最后结果则是把抗原从身体中驱逐出去。这些反应如表 1.1 所列。

抗体可在血液中循环着的蛋白质的球蛋白分部中找到,并称之为免疫球蛋白。根据它们的物理特性,如分子量,可被分为五种基本类型。每一类用一相关字母来称呼,如 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE (表 1.2)。某些亚类有着特殊的生理功能。

表 1.1 抗体-抗原相互作用的结果

相互作用	结果
免疫复合物之形成	除去抗原、血清病、病态
补体活化	细菌或细胞的胞溶
巨噬细胞活化	细胞胞溶
杀伤细胞(Killer cell)活化	细胞胞溶
免疫调节	免疫系统的控制

表 1.2

类别	重链	分子量	相对血清浓度(%)
IgG	γ	150,000	75
IgM	μ	900,000	8
IgA	α	160,000	16
IgD	δ	180,000	<1
IgE	ϵ	180,000	<1

例如, IgE 和变应性应答的免疫反应有关; IgA 是分泌出身体外(如泪液)的免疫球蛋白的主要成份。IgG 则是循环血浆中能找到的最普通的免疫球蛋白,它占球蛋白分部的 75%。

免疫系统除了生产抗体外，也可以对流经它的细胞组分作出应答。这种细胞免疫性对细胞移植的排斥、延迟变应性应答，以及移植物对宿主反应都负有重大责任。细胞免疫性的经典实例是皮下注射结核菌素(结核杆菌的外壳蛋白)*时的应答。在注射此药 48 小时后所出现的特有的红色浮肿区，即是由于活化了淋巴细胞，在淤积的蛋白质周围局部浸润之结果。对小鼠的实验也表明，细胞免疫性的展开取决于幼年期胸腺的存在。胸腺是上胸的腺体，幼年期一过它就缩小。处于胸腺中的淋巴细胞称为 T 淋巴细胞。

体液免疫性是由于组织液中存在着循环的免疫球蛋白而给予的称呼。鸟类中所产生的循环着的抗体的淋巴细胞，是靠结合于大肠的称为腔上囊的器官。虽然还不知道人类是否有类似的器官，但由这种不靠胸腺生产抗体的淋巴细胞被称之为 B 淋巴细胞。在实验室中，单克隆抗体的生产就是要用能生产抗体的 B 淋巴细胞来做，以便能不断地合成抗体。

抗体-抗原的相互作用

许多分子能引起免疫应答，因此它们都是抗原。每种分子各有其独特的形状，从而导致抗原-抗体反应的特异性。显然，较大、较复杂的分子可能有几个不同的区域，每一区域都能接纳一种抗体。这种区域通称为抗原决定簇，或抗原决定部位。一个抗原分子可能含有几个抗原决定部位。另一方面，较小的抗原可能只有一个抗原决定部位。抗体-抗原相互作用的基础是，两个互补形状分子正好能配成一对。抗原的形状是由分

* 用于迟发型过敏性的结核菌素试验。——译注

子的三维结构所决定的。所有的免疫球蛋白分子都具有一种相似的基本结构,都由两条重链和两条轻链所组成,并由二硫键把它们连结起来(图 1.1)。

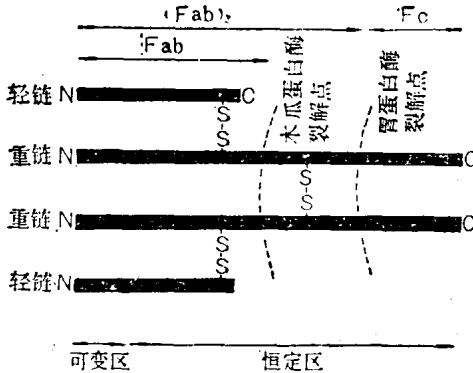


图 1.1 IgG 的结构。可变区以及结合抗原的部位在肽链的 N 末端处

在抗体的重链和轻链中有些区域称为可变区。在这些区域,不同抗体蛋白质链的氨基酸顺序有变化,彼此不同。这种变化发生在肽链的 N 末端处。因此,各种不同的抗体将有不同的氨基酸顺序和不同的空间排列。由此想象得出,由一种抗原所呈现的每一种可能的形状,都可能为免疫系统所产生的某种具有互补形状的抗体所接受(图 1.2)。近年来,颇受注意的机理是:一系列形形色色的蛋白质,都是由个体 DNA 所编码的有限信息中产生的。为免疫球蛋白不同链编码的基因,被定位在基因组的不同部位处。除此,在每条肽链内有着几个恒定区和不变区的结构区。它们是在淋巴细胞分化期间,在遗传水平下被剪接在一起的。每一个体都能制造出可和每种可能出现的抗原相结合的抗体,但是机体仅仅在适当的抗原侵入后,因受到刺激而制造出与其特异的抗体。当然,这也可以通过内脏吸收,细菌或

病毒的感染自然地发生，也可以在免疫过程期间人为地造成。一种抗体一旦被个体制造过，以后该个体就能比较容易地大量生产这种抗体。这种现象称为免疫系统的“记忆”。免疫记忆可以用下述观察来领会：当感染过某种疾病，例如得过风疹，那末机体将对这种疾病的再感染提供保护。

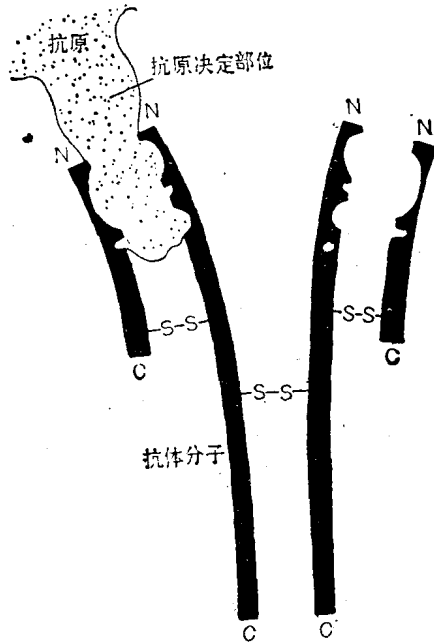


图 1.2 表示一抗原决定簇结合于一抗体分子 N 末端处结合部位的示意图

当发生抗体-抗原反应时将产生几种活动：首先，抗体和抗原的复合物可以形成一种大小可以增长的分子晶格，这种复合物最后将由吞噬细胞把它们从血液中除去。其次，这种分子组合可以引起补体的活化。在血液补体原以不活泼型存在，是

一类蛋白质的复杂的级联物。当它活化时可以引起异体细胞的胞溶。换句话说，网状内皮系统的游走巨噬细胞可被指引到身体的特定部位，从而增强对异体细胞的吞噬作用。

免疫学的一项基本原理是，每种 B 淋巴细胞仅能产生一种特异的免疫球蛋白。这是无性繁殖系选择理论所提出的著名概念。它为免疫记忆、自身和非自身免疫之间的差别、免疫耐受性，也对自身免疫疾病（此时，机体自身和非自身的识别发生故障）等性质提供了一种解释。无性繁殖系选择理论表明，如果把机体暴露给抗原，那末 B 淋巴细胞就能产生针对这种抗原的抗体，此时会在 B 淋巴细胞的无性繁殖系中出现一种增殖作用。这种无性繁殖系一旦发生增殖，若再继续暴露给同种抗原，那末将导致一种抗体的快速产生和大量释放，这也就解释了免疫系统“记忆”的原因。但是还存在着某种禁忌克隆系。此时，一些人分泌的抗体，因和正常人的组分相互作用而对宿主有害。在婴儿和幼年期，借助免疫学上恒定的刺激作用，会出现一系列可生产抗体的 B 细胞克隆系，从而形成个体抗体的全部技能。鉴于婴儿所暴露的抗原，在时间和数量上是不同的，所以个体间的各种技能也各不相同。

单克隆抗体的生产

为了在实验室中能无限制造针对某一抗原的特定抗体，要求从一种动物的 B 淋巴细胞中分离出相关克隆，并使之不灭。克隆，可在实验室条件下用细胞培养的方法来分离和使之增长。在此方式下，被克隆的 B 淋巴细胞将能连续地生产抗体，这些抗体又可以从细胞培养液的上清液中收集到。但是，人们想在实验室中增长 B 淋巴细胞克隆株的大多数尝试都失败了。

因此迫切要求开发出某种方法，使生产抗体的 B 淋巴细胞能在实验室培养中随意生长，很好地生长。

早在七十年代已能在这种条件下生长出几种类型的细胞。其中容易生长的一类细胞是称为骨髓瘤或浆细胞瘤的恶性 B 淋巴细胞。这些恶性细胞不象它们正常的非瘤细胞，它们有着使自身无限期繁殖的能力。而且，这种细胞可由克隆产生。也就是说，在活体外或当注入到合适的动物体时，单细胞将增长形成克隆系。如果这种活体外增长的性质，以及骨髓瘤细胞系可以克隆增殖的这种性质，能和 B 淋巴细胞制造抗体的性质结合起来，那末不灭的、特定的抗体生产将成为可能(图 1.3)。

1975 年, Köhler 和 Milstein 证明, 骨髓瘤细胞能和 B 淋巴细胞融合, 可得到能生产抗体的杂种(有关制造的技术细节和出现的问题将在后文阐述)。当融合过程完成时, 子细胞就称为杂种瘤。也就是说, 这是一种既继承了来自两亲本某些特性, 又能如恶性细胞那样快速增长的杂种细胞。为此要求努力筛选出具

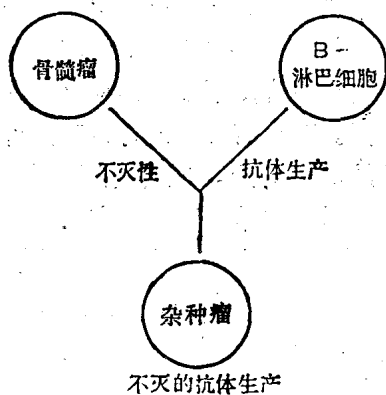


图 1.3 骨髓瘤和产生抗体的细胞融合
能产生一种生产不灭抗体的杂种瘤

有下述特性的杂种细胞：既有来自恶性肿瘤——骨髓瘤细胞的不灭性，又有来自 B 淋巴细胞能生产抗体的特性。这样一来，杂交技术就能生产出不灭的能产生免疫球蛋白的细胞。但是他们未能断定淋巴细胞是不灭的。为此目的，Köhler 和 Milstein 开发了用感兴趣的抗原免疫他们的实验动物这种有独创性的技术。在最初的实验中，他们用羊红细胞作为抗原，不时地注射小鼠使其免疫好几次。几星期后，小鼠的免疫系统打开了自己生就的 B 淋巴细胞克隆系，生产出能识别所试抗原的抗体。然后杀死小鼠，从脾脏收集淋巴细胞，以便把它用于和骨髓瘤系的融合。在此方式下融合的许多淋巴细胞象要分泌出针对我们感兴趣抗原的抗体。但是实际上即使使用了这种灌注动物使其生产特异性抗体的技术，被融合的许多淋巴细胞仍将会生产出毫不相干的抗体。尽管如此，它使我们认识到当骨髓瘤和 B 淋巴细胞杂交成功时，若建立起来的杂种瘤群体所生产的（或说单克隆的）全是一种抗体，那末这种抗体就称为单克隆。

虽然上面概括的融合技术能够无限量地产生所规定的特异性抗体，但从一开始我们就强调，对生产出的每一种成功的抗体而言，都将伴之出现许多不成功的融合细胞，它们将生产我们不需要的单克隆。现在实验室的许多时间都是花费在如何生产出单种有用的 MCA 上。其中有些原因是明显的。首先，什么才算一种“好的”单克隆，其定义是模糊的，它取决于研究者所要求的抗体具有何种功能。例如，某种抗体在识别病理学切片属某类淋巴细胞方面可能是非常好的，并可能对组织病理学家在诊断疑难疾病中有所帮助。但是，如果这种抗体要求切片的染色仅能在严格规定的条件下，例如要求使用新鲜组织的这种条件下才能成功，那末该组织只能在新鲜条件下收集和测定的情况，势必使该抗体的实际应用极为有限。因此

对一位研究者来说重要的是,在他决定生产哪一种抗体之前,先要了解这种抗体对他的要求是好还是不好的。其次,研究者还难于了解的是,他企图用来引起单克隆抗体的许多抗原常常是些很弱的免疫原。如果用了这样的抗原,动物的免疫系统应答就很差,以致于合用的单克隆的发生率很低,从而加大了工作量。

复合抗原

生物界很少会遇到只有单个抗原决定部位的分子。通常大多是一种复合结构。例如,一种异体细胞,其表面常含有几百、甚至几千个抗原决定簇。而且,并不是所有在细胞表面上的决定簇都始终能被表达。众所周知,许多抗原仅在细胞快速分化阶段,或者在某种物理条件下才表达。在癌细胞中,通常表达的抗原是正常细胞仅在胎体发育期间表达的那些抗原,故称为癌胎抗原(oncofetal antigen)。因此,如果把这样一种分子的复杂混合物注射入动物,那末每一种抗原决定簇都将引起宿主动物产生一种特异的抗体。如果过些时候测定,那末这种动物的血清将含有许多不同类型的抗体。也就是说,这是一种多克隆抗血清。虽说像这样的抗血清,过去也曾作为恶性肿瘤和传染病免疫应答的证据而被鉴定过,但显然,要想判别正常细胞和其恶性肿瘤细胞之间的差异,将是非常困难的。从实验室工作得到的许多证据表明,恶性细胞能刺激一种明确的,但是很弱的来自其宿主的免疫应答。这暗示,至少有某些抗原决定簇,恶性细胞不同于它的正常细胞。但是,如果我们使用单克隆抗体技术来生产针对同样复杂细胞表面的抗体,那末我们就能依次检查出每一种抗体。用此方式曾发现,极大多数的抗原决定簇是正常细

胞和其恶性细胞都有的，但也可能揭露出某种抗体只能识别存在于恶性细胞上的抗原，而不能识别存在其正常细胞上的抗原。这样一来，正常细胞和恶性细胞之间的细微差异就能鉴别出来，并被利用于诊断与治疗。但是实践表明，虽说这种差异可能存在于其它机体的组织上，例如，针对人的结肠直肠癌所激起的抗体，除了可以识别恶性肿瘤外，还能识别骨髓中的白细胞。一种类似的途径也可以用于判别引起传染病的不同类型的微生物。因此无论是细菌还是病毒性疾病，对它们进行快速而准确的诊断是可能实现的。

特 异 性

早已阐明，分子的空间排列或构象决定了抗体对抗原的识别。但是，如果可识别的形状很细微（指部分结构而不是整体结构），那末在另一些分子中找到其类似形状的机会就增加。显然，如果被抗体识别的这种形状相当小，那末出现这种混淆状态的可能性必然大大增加。因此一种高度特异的抗体，因其识别的特定形状已广泛分配在不同分子上而只有很少的用处。显然，必须存在一种由结合部位的构型和大小同时决定的最佳特异性才行。

抗 体 特 征

抗体结合于抗原的力称为亲和力。我们所要求的抗体亲和力取决于实际应用。例如，抗体强烈地结合于抗原，这可能是好的，也可能是不好的，需视不同情况而定。在正常情况下所发生的抗体-抗原相互作用，是为了机体可以消灭潜在的有害物质。

然而发生次级反应则是为了可以识别复合着的抗原。在临床实践中,正如将在后文中看到的,若能把一种抗体引入病人从而寻找出异常类型的细胞或组织,则是最令人想望的。但是,如果单克隆抗体对正常组织的结合特性却是发生了补体结合,以及抗体引起了某种组织的坏死等这类情况,显然就不能令人满意了。在另一些情况下,单克隆抗体注入病人可能是为了排除体内的药物或毒物。这时,要求抗体所具有的最基本特征是,抗体能保持住帮助排泄不需要抗原的能力。

用于抗体生产的动物挑选

抗体是通过使一种动物免疫来制造的,因此这是激发动物免疫系统来生产针对我们感兴趣抗原的抗体。在实验室中,小鼠和大鼠曾被广泛研究过。此时,实验动物每隔一星期用所研究的抗原使其免疫1次,共3或4周。最后杀死实验动物并取出淋巴细胞。实际上,这是摘取富含淋巴细胞的动物脾脏来做的。然后,从脾脏制得一种新鲜的单细胞悬液,再把淋巴细胞分离出来。与此类似,所用的骨髓瘤系也是用小鼠和大鼠作为来源,并在组织培养中建立起来的。早期的观察表明,种间杂交是靠不住的,因为所得第一代子细胞的遗传素质不稳定。因此小鼠淋巴细胞要用小鼠骨髓瘤系来融合;大鼠的淋巴细胞要用大鼠的骨髓瘤系来融合。

本书所涉及的单克隆抗体技术主要应用于医学实践,因此最理想的是能用人的单克隆抗体。也就是说,通过人的B淋巴细胞和人的骨髓瘤系的融合来制造MCA's。但直到最近仍未能提供这种可能性。首先,就伦理学而论,不可能用我们感兴趣的抗原,如像毒素、细菌或恶性肿瘤细胞来免疫人。其次,在

· H ·