

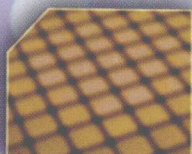
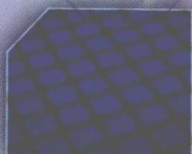
国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

KANGTI

抗体技术

JISHU

主编◎汪世华



内容简介

国家“十一五”重点图书出版项目——生物医学实验技术系列丛书

本书是生物医学实验技术系列丛书之一，主要介绍抗体的制备、鉴定、应用及检测技术。全书共分5章，第一章介绍抗体的基本概念、分类及特性；第二章介绍抗体的制备原理及方法；第三章介绍抗体的鉴定方法；第四章介绍抗体的应用；第五章介绍抗体的检测技术。本书可作为生物医学专业及相关专业的教材，也可供从事生物医学实验技术工作的技术人员参考。

抗体技术

ISBN 7-80231-242-5

主 编 汪世华

中国医学科学院图书馆

中国医学科学院图书馆

中国医学科学院图书馆

军事医学科学出版社

军事医学科学出版社

军事医学科学出版社

北京市东城区东直门内大街163号

北京市东城区东直门内大街163号

北京市东城区东直门内大街163号

邮 政 编 号 100850

邮 政 编 号 100850

邮 政 编 号 100850

电 话 010-66931051

电 话 010-66931051

电 话 010-66931051

8133133

网 址 <http://www.mmp.com.cn>

网 址 <http://www.mmp.com.cn>

网 址 <http://www.mmp.com.cn>

发 行 所 北京军区总医院

发 行 所 北京军区总医院

发 行 所 北京军区总医院

电 子 邮 箱 mmp@vip.sina.com

电 子 邮 箱 mmp@vip.sina.com

电 子 邮 箱 mmp@vip.sina.com

印 刷 厂 北京军区总医院

印 刷 厂 北京军区总医院

印 刷 厂 北京军区总医院

定 价 38.00元

定 价 38.00元

定 价 38.00元

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 14.5

字 数 344千字

版 次 2009年1月第1版

印 次 2009年1月第1次

定 价 38.00元

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

内 容 简 介

全书共分10章,包括抗体技术发展简史,抗体分子的结构功能及其生成机制,细胞工程抗体,基因工程抗体,抗体库的构建与筛选,抗体改造,抗体的表达与分离纯化,抗体性质的测定与分析,免疫检测技术,抗体标记技术等内容。本书适合生物、医学相关专业的研究、教学人员参考阅读,同时也适合于生物工程、生命科学等专业的本科生参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

抗体技术/汪世华主编.—北京:军事医学科学出版社,2008

(生物医学实验技术系列丛书)

ISBN 978-7-80245-241-1

I. 抗… II. 汪… III. 抗体 IV. Q939.91

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第177118号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路27号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049

81858195

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038,

86702759,86703183

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmisp.cn>

印 装:北京冶金大业印刷有限公司

发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:14.875

字 数:247千字

版 次:2009年3月第1版

印 次:2009年3月第1次

定 价:30.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

《抗体技术》 编委会

主编:汪世华

编委:(福建农林大学,以姓氏拼音为序)

刁 苗	焦航宇	连惠芴	刘丽华
刘晓雷	王 磊	汪世华	杨 新
张 成	张 峰	张 薇	张晓鹏
郑嘉熙			

前 言

抗体技术始于 19 世纪末期,以多克隆抗体的出现和应用为标志。1975 年,单克隆抗体技术的出现,标志着第二代抗体工程的诞生。伴随着生命科学的不断进步,抗体技术在肿瘤治疗、疾病检测以及推动与生产、生活密切相关科学的发展方面有着不可估量的前景。但是由于这些抗体是异源的,在临床应用中会产生人抗鼠抗体反应(HAMA),所以在实际应用中存在很大的局限性。

20 世纪 70 年代基因工程的诞生,以及 80 年代分子生物学和分子遗传学的发展为基因的修饰和改造提供了重要的工具。与此同时,对抗体基因结构功能的认识也达到了一个较高的水平,这一切都为基因工程抗体技术的产生铺平了道路。人们利用基因工程手段可以对抗体基因进行适当的改造并转入合适的表达载体,以获得适合实际应用理想抗体分子。从此,抗体技术的发展翻开了崭新的一页,即进入了第三代抗体工程——基因工程抗体时代。

抗体生产的最终目的是为了应用,而在应用中积累的经验反过来又促进抗体生产技术的不断革新进步。抗体技术在自身不断发展的同时,作为一种强有力的研究工具在生命科学的各个领域也起到了极大的促进作用,推动生命科学与技术取得了一个又一个突破,将一个全新的生物科学世纪展现在我们面前。特别是在临床医学、环境保护学、基因组学、生物信息学等学科领域发挥了巨大的作用。时至今日,抗体技术已成为生命科学研究中不可缺少的一环,它将在维护人类健康、保障环境安全、增进对基本生物学问题的认识等方面,发挥越来越重要的作用。

本书在介绍抗体技术基本内容的同时,兼顾学科发展动向,涉及当今抗体技术的应用。内容不仅包括细胞工程抗体、基因工程抗体、抗体库的构建和筛选、抗体改造、抗体表达与分离纯化、抗体标记技术,还对免疫检测技术、抗体性质测定及抗原表位分析做了介绍。旨在使读者了解现代抗体技术的进展,并为相关学科提供知识和技术。全书共 10 章,由汪世华编写,王磊、张薇、张晓鹏、刘晓雷、杨新、刘丽华、张峰、刁苗、连惠芾、张成、焦航宇、郑嘉熙在图表的绘制、文字的校对和排版方面作了大量的工作。

本书的出版得到了“高校教材出版基金”和福建农林大学教务处的资助,在此表示感谢。感谢“全国高校素质教育教材研究编审委员会”对本书的审定。

由于抗体技术发展势头异常迅猛、日新月异,一些内容尚无统一的结论,以及编者水平有限,难免挂一漏万,敬请广大读者批评指正。

编 者

2008 年 8 月于福州

目 录

第一章 概论	(1)
1 抗体技术研究简史	(1)
2 抗体技术研究现状	(6)
3 抗体技术发展趋势	(12)
第二章 抗体分子的结构及其生成机制	(16)
1 抗体的分子结构	(16)
2 抗体分子的产生和生物合成	(20)
3 抗体分子的基因结构和重排	(27)
4 抗体的生物学特性及功能	(33)
第三章 细胞工程抗体	(38)
1 抗原制备	(38)
2 多克隆抗体	(44)
3 单克隆抗体	(48)
第四章 基因工程抗体	(66)
1 人源化抗体	(66)
2 小分子抗体	(74)
3 特殊基因工程抗体	(79)
第五章 抗体库的构建与筛选	(86)
1 抗体库种类	(87)
2 抗体库构建	(94)
3 抗体库筛选	(97)
4 抗体库构建和筛选抗体实例	(101)
第六章 抗体的改造	(116)
1 抗体亲和力成熟	(116)
2 抗体人源化改造	(128)
3 抗体稳定性改造	(134)

第七章 抗体的表达与分离纯化	(140)
1 抗体表达	(140)
2 抗体的分离纯化	(149)
第八章 抗体标记技术	(160)
1 放射性核素标记	(160)
2 酶标记	(164)
3 生物素标记	(168)
4 免疫荧光标记	(172)
5 免疫胶体金标记	(174)
第九章 免疫检测技术	(179)
1 酶联免疫检测技术	(179)
2 免疫印迹技术	(190)
3 免疫荧光技术	(195)
4 补体结合反应技术	(198)
5 免疫复合物的测定	(202)
6 其他检测技术	(205)
第十章 抗体性质测定与抗原表位分析	(213)
1 抗体亚类及类别	(213)
2 抗体结合性能的测定	(216)
3 抗体的亲和力测定	(220)
4 抗体的抗原表位分析	(223)
5 抗体结构模建	(226)
6	(226)
7	(226)
8	(226)
9	(226)
10	(226)
11	(226)
12	(226)
13	(226)
14	(226)
15	(226)
16	(226)
17	(226)
18	(226)
19	(226)
20	(226)
21	(226)
22	(226)
23	(226)
24	(226)
25	(226)
26	(226)
27	(226)
28	(226)
29	(226)
30	(226)
31	(226)
32	(226)
33	(226)
34	(226)
35	(226)
36	(226)
37	(226)
38	(226)
39	(226)
40	(226)
41	(226)
42	(226)
43	(226)
44	(226)
45	(226)
46	(226)
47	(226)
48	(226)
49	(226)
50	(226)
51	(226)
52	(226)
53	(226)
54	(226)
55	(226)
56	(226)
57	(226)
58	(226)
59	(226)
60	(226)
61	(226)
62	(226)
63	(226)
64	(226)
65	(226)
66	(226)
67	(226)
68	(226)
69	(226)
70	(226)
71	(226)
72	(226)
73	(226)
74	(226)
75	(226)
76	(226)
77	(226)
78	(226)
79	(226)
80	(226)
81	(226)
82	(226)
83	(226)
84	(226)
85	(226)
86	(226)
87	(226)
88	(226)
89	(226)
90	(226)
91	(226)
92	(226)
93	(226)
94	(226)
95	(226)
96	(226)
97	(226)
98	(226)
99	(226)
100	(226)

第 ● 章

概 论

抗体是高等动物机体免疫系统在抗原物刺激下产生的具有高度特异性的效应分子,它在体液免疫中具有十分重要的作用。通过结合抗原、介导细胞毒效应等方式参与机体的免疫防御、免疫监视和免疫稳定等功能的执行。

抗体的研究历史可上溯至 19 世纪末期,至今已有百余年的历史。抗体的产生是由生物自身遗传性质及其后天抗原刺激两者共同作用的结果。遗传决定了抗体的多样性,抗原刺激则促使抗体特异亲和力的形成以及类别的转换,两者缺一不可。

抗体及其相关应用技术的研究虽然开展较早,但直到 20 世纪后半叶才进入了快速发展时期,80 年代之后更是在抗体生产技术和应用技术领域产生了许多革命性的变化。单克隆抗体、基因工程抗体和全人源化抗体等一系列突破性的成果,使抗体技术成为生物技术特别是生物技术医药领域研究的热点。

1 抗体技术研究简史

抗体技术研究是伴随抗体的发现开始的,伴随着对抗体认识的不断加深而得到拓展。在抗体技术百余年的研究历史中,人类对于抗体技术各方面应用的需求,推动抗体技术研究不断前进,取得了许多令人振奋的成果。广义上的抗体技术包括与抗体生产和应用相关的所有技术,狭义的抗体技术则是指与抗体生产相关的技术。本节将对抗体技术研究简史加以概述。

1.1 抗体的发现

早在 1000 多年前,人们就发现了免疫现象,并由此开展对传染病的免疫预防。北宋时期,中国民间就出现了一种预防治疗天花的方法,将已患天花

的人身上干缩脱落的痂碾碎,吹到正患天花病症的人的鼻孔里。这种治疗天花的方法在 15 世纪中后期得到了较大改进,并被广泛应用。后来,这一发明先后传播到日本、朝鲜和俄罗斯等许多国家。

1796 年,英国医生 Jenner 研究出用牛痘菌预防天花的方法,推动了免疫学前期的快速发展。19 世纪末,法国的巴斯德发明了用减毒狂犬病毒株制成狂犬病疫苗,预防人类的狂犬病;用减毒炭疽杆菌菌株制成炭疽病疫苗,预防动物的炭疽病。

1890 年,德国的 Behring 发现用白喉毒素免疫动物后获得的免疫血清中有一种能够中和白喉毒素的物质存在,日本细菌学家 Kitasato 也发现用破伤风毒素免疫动物之后获得的免疫血清中存在类似的物质。两人将获得的免疫血清用于治疗白喉和破伤风患者,取得了良好治疗效果。这种能够中和毒素的物质被称为抗毒素(antitoxin)。不久,抗体(antibody, Ab)的概念就被引入,用来指代与抗毒素类似的物质。相应的,能够刺激机体产生抗体并能与相应抗体发生特异性反应的物质被称为抗原(antigen, Ag)。

20 世纪 30 年代末, Tiselius 和 Kabat 发现,免疫后的动物血清中 γ -球蛋白的含量明显增加,而当血清与相应的抗原反应之后血清中 γ -球蛋白的含量恢复到免疫前的水平。据此,在相当长的一段时间内人们认定 γ -球蛋白即是抗体。事实上,具有抗体活性的球蛋白并不都是 γ -球蛋白,并且也并非所有 γ -球蛋白都具有抗体活性。后来国际上统一了抗体的分类和名称,世界卫生组织和国际免疫学组织辖属的专门委员会先后决定,把具有抗体活性或与抗体化学结构类似的球蛋白统称为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。共分为 5 类,分别是 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

1.2 抗体结构研究

早在 19 世纪末抗体就已被发现,但是由于技术条件等多方面因素的制约,人们对其结构并没有太多的了解。直到 20 世纪中叶才对其结构逐渐有了深入的认识。

1.2.1 抗体化学结构

1959 年,Porter 发表论文阐述了构成抗体分子的 3 个片段。与此同时,洛克菲勒大学的 Edelman 研究了骨髓瘤患者的免疫球蛋白后发现,其分子由四条肽链组成,包括两条轻链(L 链)和两条重链(H 链)。它们彼此通过二硫键连接到一起,组成完整的抗体分子(单体)。1962 年,Porter 把自己的研

究与 Edelman 的研究相结合,建立了抗体的分子结构模型。第二年,Porter 首先提出 IgG 的化学结构模式图。1972 年,Porter 与 Edelman 因发现抗体化学结构共同获得了诺贝尔生理学或医学奖。

1969 年 Edelman 及其同事成功地测定了 Ig 的一级序列,随后不久,抗体可变区以及抗原结合部位相继被发现。他们的研究表明,抗体分子两条 H 链和两条 L 链上都可分为两个部分:恒定区(C 区)和可变区(V 区)。抗体的多样性正是源于 V 区的多变性,抗体之所以能够与各种不同的抗原物质结合,主要是由抗体分子的 V 区决定的。

1.2.2 抗体基因结构

1965 年,Dreyer 和 Bennet 首先提出了抗体基因结构假说,认为 Ig 的 V 区和 C 区是由分隔存在的基因所编码,在淋巴细胞发育过程中这两个基因发生易位而重排在一起。1976 年,日本学者 Tonegawa 应用 DNA 重组技术进行了一系列实验,实验结果支持了这一假说,并阐明了 Ig 分子抗原结合区多样性的成因以及遗传和体细胞突变对抗体多样性形成的作用,因此获得了 1987 年的诺贝尔生理学或医学奖。

研究表明,人类 Ig 分子是由 3 个不连锁的 $Ig\kappa$ 、 $Ig\lambda$ 和 IgH 基因库编码的。3 种基因库分别位于第 2 号、第 22 号和第 14 号染色体。

2008 年,美国科学家已成功建立了人体抗体基因的 3D 图像。加利福尼亚州立大学圣地亚哥分校生物学教授 Murre 和该分校超级计算机中心资深科学家 Cutchin 领导的研究小组,首次展示了抗体基因的 3D 空间结构。他们对可以表现抗体多样性的免疫球蛋白 H 链基因座进行了基因解码,进而展示其基因的结构。在《细胞》杂志上,他们发表了标题为“免疫球蛋白 H 链基因座 3D 结构:远程基因交互作用”的研究报告,展示了 B 细胞中免疫球蛋白基因座的 3D 结构。为了测量基因不同部分之间的距离,他们首次将几何学应用于探测基因结构,这不仅是抗体基因结构研究中的重大突破,这种方法还将用于说明整个人体基因结构。

1.3 抗体功能研究

在结构研究的基础上,人们进一步研究了抗体的功能。研究表明,抗体 V 区与 C 区具有不同的生理功能。

1.3.1 V 区的功能

抗体 V 区的功能是识别并特异性结合抗原。与病原体中特异性抗原结

合后,可以阻止病原体对机体细胞的黏附和感染;与毒素结合能够中和其毒性。Ig 单体分子为 2 价,可结合 2 个抗原表位;分泌型 IgA 为 4 价,可结合 4 个抗原表位;五聚体 IgM 理论上为 10 价,但实际上只有 5 价,这是由抗原表位结合之后产生的空间位阻造成的。

1.3.2 C 区的功能

抗体 C 区的功能主要有三个方面:一是激活补体系统,抗原抗体结合形成复合物可激活补体经典途径和旁路途径。二是介导免疫细胞活性,包括介导超敏反应、抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和抗体的调理作用。三是黏膜免疫和穿过胎盘,分泌型 IgA 合成和主要作用部位在黏膜,是黏膜局部抗感染的重要免疫分子;IgG 是唯一能够从母体通过胎盘转运到胎儿体内的 Ig,对新生儿抗感染具有重要作用。

1.4 抗体生成理论的发展

抗体生产技术的不断进步离不开对抗体生成过程认知的不断加深。为了揭示抗体生成的真实过程,研究者提出了一系列原理、假说,逐步发展了抗体生成理论,使之成为一个较为完备的体系。

1.4.1 侧链学说

1900 年,Ehrlich 提出了侧链学说,他认为细胞表面存在天然的抗体分子,这些抗体分子具有“受体”的功能。抗原物质通过化学互补与其发生特异性结合能够刺激细胞产生更多的抗体分子,并使其从细胞表面脱落进入血液。后人的研究证明了该理论关于细胞表面抗体作为“受体”观点的正确性。但此后的几十年间,由于免疫学已由微生物时代逐渐转入免疫化学时代,抗体生成的生物学机制遭到忽视,人们更多地从化学和结构方面着手寻求解释,抗体生成理论研究一度进展缓慢。

1.4.2 模板学说

1930 年,Breml 和 Hauowitz 提出了模板学说,他们认为抗体分子是以抗原分子为模板,按其分子特点直接合成产生的。1940 年,Pauling 提出了折叠可变学说,认为抗原物质类似于铸模,已经合成的抗体围绕其进行折叠形成相应的三维结构。1941 年,Burnet 认为抗原通过诱导合成 Ig 过程中所需酶的适应性修饰,从而决定抗体的特异性。1949 年,Burnet 及 Fenner 修改了这一理论,在认识到核酸在遗传中起重要作用的基础上,指出抗原有可能通过与遗传物质作用,间接调控抗体的合成。

1.4.3 自然选择学说

1955年,Jerne提出了抗体自然选择学说,认为机体内天然存在着低浓度的多种不同的抗体,当某一抗原进入机体后能够和相应的抗体特异性结合,形成抗原-抗体复合物并运转到体内特定部位,刺激产生更多的针对该抗原的特异性抗体。该学说使抗体生成理论研究由化学及结构观点回归到生物学观点。

1.4.4 克隆选择学说

1957年,澳大利亚学者 Burnet 综合 Ehrlich 侧链学说和 Jerne 自然选择学说中合理部分提出了著名的克隆选择学说。该学说在阐明抗体生成机制的基础之上,还对抗原识别、免疫记忆和自身耐受等重要免疫学现象作出了解答。随后,该学说逐步被实验证据所证实,并得到了学术界的广泛承认。

1.4.5 免疫网络学说

1974年,Jerne又提出了免疫网络学说。该学说认为机体免疫系统在识别自身抗原的基础上识别外来抗原,抗体分子V区结构域具有双重特性,一方面它通过抗原结合部位与抗体结合,另一方面又借助于独特型决定簇引发免疫应答。免疫应答过程处于抗体分子和免疫细胞相互作用的网络调控之下。这样就从一个全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。

1.5 抗体技术发展

目前,一般以抗体生产技术的变革来对抗体技术的发展历史进行划分,大致可以分成3个阶段,即多克隆抗体阶段,单克隆抗体阶段和基因工程抗体阶段。

1.5.1 多克隆抗体技术

多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb)技术出现于19世纪末。前面提到的能够中和白喉毒素的抗血清即是一种多克隆抗体。当抗原注射入动物体内之后就会产生针对该抗原的抗体。大多数抗原表面的抗原成分复杂,具有多种不同的抗原表位,因而免疫血清中产生的抗体不是针对某个单一抗原成分或抗原表位的,而是针对多种抗原成分或抗原表位,是复杂的、不均一的,即为多克隆抗体。

1.5.2 单克隆抗体技术

单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb,简称单抗)技术出现于20世纪

70年代,是继多克隆抗体之后的第二代抗体生产技术。1975年,英国科学家Kohler和Milstein将能够产生抗体的B淋巴细胞与肿瘤细胞融合,从而成功地建立了单克隆抗体技术,他们也因此于1984年获得诺贝尔生理学或医学奖。

单克隆抗体的制备原理大致如下:动物机体受到外界抗原物质刺激后可诱发免疫反应,产生与该抗原相对应的抗体,这一职能由B淋巴细胞承担。体外培养的B淋巴细胞能够产生抗体但不能长期存活,肿瘤细胞可以无限繁殖。融合后的子代细胞同时具有两者的特征,即产生抗体和无限传代。

随着研究的不断深入,单克隆抗体在人源化程度不断提高、负作用减少的同时,疗效得到了显著增强,其在疾病治疗中的作用越来越受到人们的重视。凭借其自身在医疗、检测方面的应用优势,单克隆抗体技术目前已成为生物技术开发热点和全球生物技术界最为关注的焦点。

1.5.3 基因工程抗体技术

基因工程抗体(gene engineering antibody, GEAb)技术出现于20世纪80年代早期,1984年Morrison等首次报道鼠-人嵌合抗体。基因工程抗体是通过PCR技术获得抗体基因或抗体基因片段,重新组装的新型抗体分子。它在保留天然抗体的特异性及生物学活性的同时,降低甚至基本消除抗体的免疫原性。基因工程抗体也称为第三代抗体,其生产简单,价格低廉,在医疗领域具有广阔的应用前景。

20多年来,基因工程抗体的研究取得了巨大的进展,先后成功构建了人源化抗体、小分子抗体、某些特殊类型抗体及抗体融合蛋白等,在不久的将来更有可能取代杂交瘤单克隆抗体成为占主导地位的抗体。噬菌体抗体库、核糖体展示文库等技术的出现,使不经免疫即可获得任何一种动物的特异性抗体成为可能,推动研究和应用向此方面发展。

从多克隆抗体到单克隆抗体,再到基因工程抗体;从不均质异源抗体到均质异源抗体,再到人源抗体,100年的时间里抗体生产技术跨过了三个时代,这是生命科学不断发展的结果,反过来它也在一定程度上推动了生命科学,特别是与医药相关学科的发展。

2 抗体技术研究现状

抗体制剂目前最大的用途是用于疾病的检测与治疗。早期,由于多克隆抗体中抗体纯度低、特异性不高等原因未能得到广泛应用。抗体在医学

上真正得到广泛应用是在单克隆抗体出现之后。自 1982 年, Karr 第一次应用一株抗独特型单克隆抗体治疗 B 细胞淋巴瘤获得成功之后, 医用抗体研究成为研究热点。

由传统方法产生的单克隆抗体是纯粹的小鼠单克隆抗体, 它使患者产生免疫排斥反应, 即使机体产生人抗鼠抗体 (human antigen mouse antibody, HAMA) 反应, 导致鼠抗体在人体内被快速清除而使治疗效果不佳; 另一方面, 鼠抗体可能引起严重过敏反应, 因此需考虑去除 McAb 的免疫原性而保留其免疫反应性。人源化抗体和全人源抗体是当前研究的热点, 也是今后医疗用抗体发展的趋势。

基因组和蛋白组的结合催生了一系列新兴学科的诞生, 抗体组学 (antibodomics) 就是在这种前提下产生的。抗体组学是以基因组学和蛋白组学研究为基础, 结合传统的杂交瘤技术及基因工程抗体技术产生的一门新兴学科。抗体组学一出现, 就以其在抗体药物筛选方面高通量、整体化、信息化和系统化等优势向传统的方法提出了强有力的挑战。

2.1 异源抗体的人源化改造

为了解决异源抗体在临床应用中的不足, 人源化抗体应运而生。这是抗体研究领域的又一个里程碑。人源化改造主要有两种方式, 即嵌合抗体和 CDR 移植的人源化抗体。

嵌合抗体出现于 20 世纪 80 年代。1984 年, Jones 等构建了世界上第一个嵌合抗体, 他们用小鼠抗体基因中编码重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 的序列和来自与鼠抗 4-羟基-3-硝基苯乙酰基己酸 (NP) 单抗的骨架区 (FR) 同源程度较高的人骨髓瘤蛋白的 FR 序列, 构建了一个小鼠抗 NP 的免疫球蛋白 V_H 基因。再借助人抗 NP 的 V_H 将该基因连接到含有人 C_H 序列的表达载体上, 再转染到小鼠杂交瘤细胞中, 得到了可特异结合 NP 的抗体。这种应用基因重组技术将人抗体基因的 V 区与小鼠抗体基因上的 C 区重组后导入骨髓瘤细胞中, 筛选出的细胞株产生的抗体就是嵌合抗体。嵌合抗体是单纯通过部分 CDR 移植构建的第一代人源化抗体, 在检测、医疗等方面有着广泛的应用前景。

以嵌合抗体为代表的第一代人源化抗体中鼠源 V 区中的 FR 仍具有一定的免疫原性, 有时甚至能够引起强烈的抗独特型反应。为了得到更为理想的人源化抗体, 人们在嵌合抗体的基础上用人的 FR 取代了鼠 FR, 进一步

降低了抗体中的鼠源成分,形成更为完全的人源化抗体。重新构建的这种抗体被称为 CDR 移植抗体或改型抗体,其大部分结构为人源,仅保留了 3 个鼠源的 CDR 结构。

现在通过抗体 C 区置换获得的人鼠嵌合抗体的人源化程度达到 70% 左右,其免疫原性降低到 10% 左右。但嵌合抗体、CDR 移植抗体等人源化抗体还远不是全人抗体,还会引起一定程度的免疫排斥反应。因此,人源化抗体只能作为一种过渡型抗体应用于临床,抗体完全人源化势在必行。

2.2 全人源抗体的研制

20 世纪 80 ~ 90 年代,由于抗体库技术和转基因小鼠技术的建立,拉开了全人源化抗体研制的序幕。这两种制备技术自建立以来取得了长足的发展,保持了旺盛的活力。

2.2.1 抗体库技术

噬菌体抗体库是目前应用最为普遍的抗体库技术,它的产生依赖于 3 项实验技术的发展。这三项技术是噬菌体展示技术、PCR 技术、从大肠杆菌分泌表达有结合功能的免疫球蛋白分子片段技术。1989 年, Huse 等首次报道了噬菌体抗体组合库的构建。

1997 年, Hanes 等建立了核糖体展示(ribosome display)技术,运用该技术可在体外筛选或改造功能蛋白。同一年, Roberts、Szostak 与 Nemoto 分别独立设计了另一种与核糖体展示类似的方法,称为 mRNA 展示(mRNA display)技术,也称 RNA-多肽融合技术或体外病毒技术。核糖体展示和 mRNA 展示技术弥补了噬菌体抗体库技术存在的缺陷。它们被认为是下一代在体外生成抗体的展示技术,是不依赖细胞系统的离体筛选蛋白质和多肽的方法。

除了上述几种抗体库筛选技术之外,还有 1998 年 Arnold 等, 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,在油包水乳剂中模拟活细胞区域化进行翻译和筛选等。

2.2.2 转基因小鼠技术

转基因小鼠是目前治疗性抗体生产中应用最为广泛的转基因动物。能够生产人源化抗体转基因小鼠的途径主要有四种:①人外周血淋巴细胞-严重联合免疫缺陷(hu-PBL-SCID)转基因小鼠;②通过基因敲除技术,使小鼠

自身基因失活,再导入外源基因,创造出自身抗体基因失活,同时携带人体抗体 H、L 链基因簇的转基因小鼠;③通过转染的方式获得转基因小鼠;④直接移植人体免疫系统成分到小鼠体内。

转基因小鼠自身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。经历了正常装配和成熟过程,产生的抗体具有较高的亲和力,其功效优于其他技术生产的抗正常人体蛋白单抗。

2.2.3 其他人抗体生产方法

2.2.3.1 转人染色体牛

产生人 Ig 转染色体牛的构建过程是利用微细胞介导法(MMCT法),将构建的含有人 Ig 基因片段的人工染色体(HAC)导入牛胚胎成纤维细胞,进一步发育成转染色体牛。产生人 Ig 转染色体牛的构建特点在于,牛胚胎干细胞不能成功建系,因此将人工染色体导入牛胚胎成纤维细胞,转染色体牛用核移植的方法来建立。转染色体牛生产人多抗,可以在短时间内大量获得。因此,转染色体牛获得的人多抗可以在一定程度上弥补转染色体小鼠的不足。

2.2.3.2 利用鸡蛋

美国奥利基因治疗公司首次用鸡蛋生产出全功能人单克隆抗体,这种抗体仅在鸡输卵管中表达。用这种新方法生产的抗体,有比传统方法生产抗体大 10 至 100 倍的杀伤癌细胞能力。研究人员首先在鸡胚胎干细胞中插入人抗体编码的基因,然后该干细胞被导入鸡胚胎内。该转基因鸡所产的蛋会含有抗体,将这些抗体分离提纯,便可得到相应的人单克隆抗体。鸡体内产生的抗体没有糖残余物——岩藻糖,因此具有增强杀灭癌细胞活力的特性。与现有的细胞培育法相比,采用以鸡为基础的生产技术不仅能够满足需求,还可以缩短生产时间、降低成本,将会实现工业化生产。此外,鸡蛋是无菌和稳定的,对分离和提纯提供了良好的起始材料。

2.2.3.3 利用植物

美国科学家尝试利用烟草制备能定向杀死癌细胞的单克隆抗体,该项技术将来有望应用在人身上。研究者将编码直肠癌抗体的 DNA 插入烟草中,使植物能够产生抗体。首先,他们证明从烟草叶中纯化的单克隆抗体能识别并结合到人直肠癌细胞上;然后他们将人直肠癌细胞移植到基因敲除小鼠的背上,再注射从植物制备的抗体,观察肿瘤的生长状况,结果发现肿瘤的生长受到了抑制。这表明植物生物技术是一种更为安全、可行的单克隆抗体生产方法。

2.3 抗体组学与抗体组药物兴起

抗体组学涉及建立大规模抗体库、大规模高通量筛选,应用于研究、诊断及治疗等方面。抗体组药物则是通过抗体组学相关技术筛选研发得到的抗体药物。

以单克隆抗体药物和基因工程抗体药物为主要的传统抗体药物的研发,通常是在单个基因、单个抗体水平上进行的。它的研究周期长,能够获得的抗体药物靶标的数量十分有限。为了有效地应对生物医药产业所面临的巨大挑战,就必须要建立一套高通量、快速筛查及鉴定高亲和力抗体分子的研究体系。抗体组学及抗体组药物因此应运而生,它以生物信息学、分子生物学、蛋白组学、功能基因组学及计算机科学等现代生命科学前沿学科为基础;以高通量基因筛选技术、生物芯片技术、基因组数据库及分析软件、高通量药物筛选技术为依托。向人类展示了抗体药物研究的美好前景。

近年来,我国投入大量的人力物力,建立了抗体组药物靶标筛选平台、高效抗体组药抗体库制备技术平台、抗体组药物优化平台等高水平平台,提供与抗体组及抗体组药物研究相关的公共服务。

2.4 抗体衍生物

为了使抗体的作用得到更好的发挥,需要人为地对抗体分子进行适当的改造,通过融合连接制成抗体融合蛋白、免疫毒素等。这些经过改造的抗体就是抗体衍生物。

利用抗原结合片段(fragment antigen binding, Fab)的靶向识别功能,将毒素、酶、放射性元素及其他效应物分子与抗体分子偶联制成的抗体衍生物,能够搭载效应分子到达特定的部位发挥功能。目前, FDA 已经认证通过了多种抗体靶向识别药物。例如,用于急性骨髓瘤白血病治疗的用抗 CD133 抗体和 calicheamicin(加利车霉素)偶联制成的 Gemtuzumab(Mylotarg)。

在临床应用上,许多研究者偏向于使用完整抗体。但完整抗体分子分子量大、免疫原性高、不易通过血管壁;同时,并不是任何时候都需要大分子的抗体。这种情况下,通过偶联延长了半衰期的小分子抗体更适用于临床治疗的需要,例如,利用基因工程方法,由抗 CD146 抗体改造而来的单链抗体,具有分子量小、稳定性高等特点。它既能识别肿瘤组织血管,又能抑制血管活性,具有极高的潜在应用价值。