

单克隆抗体制备技术及临床应用的研究进展

张 华¹ 胡成进²

(1 泰山医学院免疫学教研室, 山东 泰安 271016 2 济南军区总医院实验诊断科, 山东 济南 250031)

关键词: 抗体; 单克隆抗体; 制备

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 1004-7115(2010)11-0890-03

1975年 Kohle和 Milstein建立了杂交瘤技术, 将小鼠骨髓瘤细胞与产生绵羊红细胞抗体的小鼠脾细胞融合, 形成的杂交瘤细胞既能产生抗体又能进行分裂繁殖, 且产生的抗体只能识别一种抗原决定簇, 称为单克隆抗体, 单克隆抗体经历了鼠源性、人源性和全人化抗体三个阶段。迄今为止世界上已研制出数以千计的单克隆抗体, 并广泛应用于生物学、医学领域, 在疾病的发病机制、诊断和治疗方面发挥重要作用。本文从单克隆抗体的制备技术和临床应用方面进行综述。

1 单克隆抗体制备技术

1.1 杂交瘤技术

该技术主要包括免疫动物、细胞融合和杂交瘤细胞的筛选三个环节。

1.1.1 免疫动物 目前常用 BALB/C小鼠, 也可用 SCID 小鼠 (severe combined immunodeficiency mice)、转基因小鼠、转染色体小鼠, 用特定的外来抗原一次或多次免疫动物, 刺激 B淋巴细胞增殖形成浆细胞, 分泌针对该抗原的抗体。

1.1.2 细胞融合 常用骨髓瘤细胞和小鼠脾细胞融合, 通常采用 PEG法或 PEG电融合法, 该法稳定, 安全简单; 也有报道用小鼠的胸腺淋巴结细胞和骨髓瘤细胞融合, 5周内成功产生抗病毒的小鼠单抗。

1.1.3 杂交瘤细胞筛选 HAT选择培养基有 3种关键成分: 次黄嘌呤 (hypoxanthine, H)、甲氨蝶呤

(aminopterin, A)和胸腺嘧啶核苷 (thymidine, T), A是二氢叶酸还原酶抑制剂, 可阻断核酸合成的主要途径。B淋巴细胞可通过补救途径, 由胸腺嘧啶激酶 (thymidine kinase, TK)和次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT)利用 T和 H合成核酸, 但不能在体外长期生存; 骨髓瘤细胞缺乏 HGPRT, 不能在该培养基中生长; 杂交瘤细胞具有 B淋巴细胞和骨髓瘤细胞的双重特性, 在 HAT培养基中长期生存又可产生抗体, 成为制造单克隆抗体的细胞源。

杂交瘤技术所产生的抗体特异性高、纯度高, 可大规模生产, 但实验程序复杂且鼠源性单抗具有免疫原性, 促使人体产生特异性抗体, 引起过敏反应, 另外在人体内半衰期比较短, 常不能有效激活抗体依赖细胞介导的细胞毒反应和补体依赖的细胞毒反应。

1.2 基因工程抗体技术

1.2.1 嵌合抗体 将小鼠抗体的可变区基因与人免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 恒定区基因重组, 构建人鼠嵌合重链、轻链基因, 在原核或真核细胞中表达。该抗体减少了鼠单抗的免疫原性, 恒定区可有效发挥补体激活和与 FC受体结合的生物学活性。

1.2.2 重构抗体 将编码小鼠单抗决定簇互补区基因序列移植到编码人 Ig可变区的骨架区, 构建新的抗体。该方法与嵌合抗体相比, 虽减少了人抗鼠

* 基金项目: 全军“十一五”面上项目 (06MA101)。
作者简介: 张华 (1982-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向: 临床免疫与免疫学检验。
通讯作者: 胡成进 (1963-), 男, 山东济南人, 教授, 博士, 研究方向: 肿瘤分子诊断与免疫学检测。E-mail: hc6289@163.com

抗体反应,但仍然保持着鼠源性抗体的特异性。

1.2.3 小分子抗体 常用的小分子抗体有单链抗体、重组 Fab片段、单域结构、双特异性抗体、免疫粘连素、催化抗体等。单链抗体由一段编码连接肽基因连接抗体的重、轻链的可变区基因 (variable region heavy chain VH variable region light chain VL)表达形成的重组蛋白;双特异性抗体是由氨基酸残基连接起来的两个不同小分子抗体,能够结合两种抗原,介导标记物与靶抗原的结合或某些效应因子定位于靶细胞;免疫粘连素是由恒定区基因连接人细胞受体或粘附分子基因,在真核细胞中表达的融合蛋白。小分子抗体分子量小、穿透性强、抗原性低、半衰期短,可在原核系统表达,易于进行基因工程操作,因此受到广泛重视。

1.2.4 展示技术

1.2.4.1 噬菌体展示技术 该技术属于体内展示技术,其原理是通过 RT-PCR克隆扩增人淋巴细胞谱中的 VH和 VL基因片段,导入噬粒,转化细胞,建立噬菌体抗体文库,此时噬菌体核心 DNA中有编码人抗体 VH VL基因片段,所编码蛋白与噬菌体膜蛋白相连,分布于噬菌体表面。可通过多次“吸附——洗脱——扩增”,筛选出特异性的全人化抗体可变区基因。具体制备方法如下:将抗原包被在固相介质上,特异性的噬菌体与抗原结合,洗脱未结合的噬菌体,筛选出针对特定抗原的抗体可变区基因,再用此噬菌体感染宿主菌,扩增该噬菌体颗粒,制备出全人化抗体。该方法简单,所需时间短,但由于表达系统的限制,一些稀有抗体不易制备,且对噬菌体生长或功能产生抑制作用的抗体也难以获得。

1.2.4.2 核糖体展示技术 1997年, Hanes和 Plukthun建立了核糖体展示技术,该技术属于无细胞转化技术,不受细胞转染和表达系统的限制。其原理是形成抗体核糖体-mRNA复合体,具体方法如下:先构建目的抗体基因 DNA文库,引入 T₇启动子、核糖体结合位点,转录成 mRNA,在体外无细胞翻译系统中形成 mRNA核糖体-抗体复合物;通过多次的“吸附——洗脱——扩增”,筛选出特异性的 mRNA。该技术完全在体外进行,可改变无细胞翻译系统环境,确保抗体分子的正确折叠,且抗体库容量可达 10¹⁵,还可联合使用一些特殊的 PCR技术,如性别 PCR 错配 PCR,获得更广的遗传多样性。

1.2.4.3 mRNA体外展示技术 一种新兴的高效多肽选择技术,其原理是将抗体库中 DNA转录成 mRNA,含嘌呤霉素寡核苷酸的 Linker将其与它所编码的肽或蛋白共价结合,形成 mRNA嘌呤霉素-蛋白复合物。与 mRNA核糖体-蛋白复合物相比,该复合物更为稳定,在 4℃可完整保存 10天左右,筛选到的抗体亲和性也比较高。

2 单克隆抗体的临床应用

2.1 疾病发病机制的应用

Salah Ate等^[1]应用流式细胞术和单克隆抗体特异性俘获血小板抗原技术检测丙型肝炎病毒感染引起的血小板减少症病人血清中抗血小板抗体 (antiplatelet antibodies, PA),结果显示总 PA IgG、IgM、IgA的阳性率分别达到 86.7%、83.3%、46.7%和 33.3%,且 86.7%的病人有 PA Ig推断 PA Ig可诱导丙型肝炎病毒感染病人血小板减少症的发生。Linlin Qu等^[2]观察阿仑单抗对小鼠肠上皮淋巴细胞 (intestinal intraepithelial lymphocytes, IELs)的影响,取阿仑单抗处理小鼠的回肠和结肠做组织病理和免疫组化,并用流式细胞仪检测 IELs与正常组作比较,发现处理组小鼠的 IELs数量和活力明显降低,凋亡细胞数量明显增高,推断阿仑单抗可破坏小肠上皮内屏障作用,引起细菌感染。也有报道^[3-4]称莫罗单抗与移植后的淋巴细胞增多症有关。

2.2 疾病诊断方面的应用

以单克隆抗体为基础建立起来的方法,如 ELISA、胶体金、流式细胞术、电化学发光、免疫荧光法等,有效提高了检测方法的灵敏度、特异性,在疾病诊断中发挥着重要作用。Shangjin Cu等^[5]建立胶体金的方法检测抗禽流感病毒 H5亚型抗体,选取 830例鸡血清,结果该方法简单快速,且敏感度达 88.8%,特异度达 97.6%。佟海侠等^[6]应用流式细胞术对 192例急性髓系白血病 (acute myeloblastic leukaemia, AML)患者进行免疫分型,发现免疫分型对 AML的诊断和分型至关重要。Na Young J等^[7]应用 ELISA方法检测肝细胞癌病人血清中的膜连蛋白 II (Annexin A2, ANXA2),发现 ANXA2可作为肝细胞癌的血清标志,ANXA2的过量表达有助于肝细胞癌的诊断。

2 3 疾病治疗方面的应用

单克隆抗体作为一种新型药物广泛应用于临床,该类药物靶向性强、特异性高、毒副作用低,在抗肿瘤和自身免疫系统疾病治疗领域得到了有力推广。在抗肿瘤治疗中,单克隆抗体与放射性核素、毒素、药物等连接,发挥针对肿瘤细胞的靶向治疗,从分子水平逆转肿瘤细胞的恶性生物学行为,因而有“生物导弹”之称。Hong Song等^[8]报道用放射性核素 225Ac偶联抗体治疗小鼠转移性乳腺癌,也有报道用 213Bi标记单克隆抗体治疗前列腺癌^[9]、卵巢癌^[10]、结肠癌^[11]。众所周知莫罗单抗可用于肾移植病人的免疫排斥反应,D. Desa等^[12]也发现抗细胞因子抗体可用于治疗严重哮喘。

3 未来展望

单克隆抗体是未来治疗学上的一大研究热点,有报道^[13]称单克隆抗体药物将成为生物医药研究的主旋律。虽然单克隆抗体还存在一些问题,如需降低抗体的免疫原性,但随着噬菌体展示技术、核糖体展示技术以及 mRNA体外展示技术的发展,单克隆抗体朝着全人化的方向发展,且制备时间大大缩短、成本大大降低,更有利于各种诊断试剂盒和各种疾病治疗药物的研制,因此我们相信单克隆抗体具有更广阔的前景。

参考文献:

[1] Sakthi Aref Tarek Sleem, Nadia ElMenshawý et al Antiplatelet antibodies contribute to thrombocytopenia associated with chronic hepatitis C virus infection[J]. Hematology, 2009, 14(5): 277-281
[2] Linlin Qu, Qirong Li, Haitao Jiang, et al Effect of Anti-Mouse CD52 Monoclonal Antibody on Mouse Intestinal Intraepithelial Lymphocytes[J]. Transplantation, 2009, 88: 766 - 772
[3] Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, et al Increased in-

cidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with monoclonal antibody OKT3 in cardiac transplant recipients [J]. N Eng J Med, 1990, 323: 1723-1728
[4] Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: A Collaborative Transplant Study report[J]. Am J Transplant, 2003, 4: 222-230
[5] Shangjin Cui, Changnu Chen, Guangzhi Tong, et al. A simple and rapid immunochromatographic strip test for monitoring antibodies to H5 subtype A/Han Influenza Virus[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 152: 102 - 105
[6] 佟海侠,王慧涵,张继红,等. 192例急性髓系白血病的免疫表型、细胞遗传学及临床特征的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(5): 1174-1178
[7] Na Young Ji, Mi Young Park, Yun Hee Kang, et al. Evaluation of annexin II as a potential serum marker for hepatocellular carcinoma using a developed sandwich ELISA method[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2009, 24: 765-771
[8] Hong Song, Robert F Hobbs, Raviv Vajavaj, et al. Radioimmunotherapy of Breast Cancer Metastases with α -Particle Emitter 225Ac: Comparing Efficacy with 213Bi and 90Y[J]. Cancer Research, 2009, 69(23): 8941-8948
[9] M Devitt MR, Barendsward E. An α -Particle emitting bismuth-213 labeled antibody (²¹³Bi) to the external domain of prostate specific membrane antigen[J]. Cancer Research, 2000, 60: 6095-6100
[10] Song EY, Qu CF, Rizvi SM, et al. Bismuth-213 radioimmunotherapy with C595 anti-MUC monoclonal antibody in an ovarian cancer ascites model[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7: 76-80
[11] Miljenic DE, Gameson K, Brady ED, et al. Targeting of HER2 antigen for the treatment of disseminated peritoneal disease[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10: 7834-7841
[12] Desai D, Brightling C. Cytokine and anti-cytokine therapy in asthma: ready for the clinic[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2009, 158: 10-19
[13] 吴卫星,杨宁,张毓,等. 单克隆抗体药物风雨飘摇 20年[J]. 生物技术通讯, 2006, 17: 764-766

(收稿日期 2010-07-15)