

# 单克隆抗体研究进展

刘萍,陈苗苗,刘学荣,牟克斌,黄银君

(中农威特生物科技股份有限公司,甘肃兰州 730046)

**摘要:**杂交瘤技术使鼠源单克隆抗体被广泛用于人类疾病的诊断和研究,建立了治疗性抗体的第一个里程碑。随着生物学技术的发展和抗体基因结构的阐明,应用 DNA 重组技术和抗体库技术对鼠单抗进行人源化改造,先后出现了嵌合抗体、人源化抗体和全人抗体,它们从不同角度克服了鼠单抗临床应用的不足,使抗体制备技术进入了一个全新的时代。

**关键词:**单克隆抗体;鼠源性单抗;人源性单抗

中图分类号:S859.79<sup>+</sup>7

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0067-04

1975 年 Koehler 和 Milstein 创立了体外杂交瘤技术(Kohler 等,1975),得到了鼠源性单克隆抗体,开始了多克隆抗体走向单克隆抗体的新时代。与多克隆抗体相比,单克隆抗体具有无可比拟的优越性,它具有特异性高、效价高、纯度高、理化性状均一、重复性强、成本低并可大量生产等优点。鼠源性单抗应用于人类有较强的免疫原性,但主要缺陷是诱发人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)

反应,其次是鼠单抗不能有效地激活人体的生物效应功能,因此限制了其临床应用(Dhar 等,2004)。减少或避免 HAMA 反应并提高疗效的主要途径是鼠源性单抗人源化,随着对各类抗体结构和氨基酸序列及其变异的种属和功能之间关系的深入了解,而能够利用抗体工程技术对抗体结构进行改造(胡春艳等,2008)。抗体的应用经历了非人源抗体、人鼠嵌合抗体、人源化抗体,最终到制备全人源单抗的转基因小鼠和噬菌体展示文库等不同的阶段。

## 1 鼠源性单抗

自单克隆抗体制备技术问世以来,制备单抗的一般程序基本相同,从超免疫的供体中即抗原免疫的小鼠获取脾细胞,再与骨髓瘤细胞融合,最后对单

修回日期:2011-05-11

作者简介:刘萍(1979—),女,山东人,研习员,研究方向:分子生物化学及病毒学。

基金项目:甘肃省科技计划资助(1008FCCA006);中农威特研发项目(YF20101007)。

9 Spithill T W, Piedrafita D, Smooker P M. Immunological approaches for the control of fasciolosis[J]. Int J Parasitol, 1997, 27

(10):1221~1235.

## Cloning and Sequence Analysing of *GST* Gene of *Fasciola hepatica* Isolated from Sheep

RAN Xu-hua<sup>1,2</sup>, WEN Xiao-bo<sup>1,2</sup>, WANG Chun-ren<sup>2</sup>, LIU Di<sup>1</sup>, SUN Zhong-wu<sup>1</sup>, LI Xiao-juan<sup>2</sup>, WANG Mi<sup>2</sup>

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Postdoctoral Programme, Northeast Forestry

University Postdoctoral Programme, Harbin 150030, China;

2. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

**Abstract:** The glutathione S-transferase gene of *Fasciola hepatica* was amplified and its homology was analyzed. According to the published genomic sequence of Fh GST in GenBank, a pair of primers was designed and the open reading frame of GST gene of *Fasciola hepatica* was amplified by RT-PCR. The homology of GST gene was analyzed by molecular biological soft. The PCR analysis results showed that the Fh GST gene was 682 bp, and encoded 218 amino acid. It indicated that the Fh GST gene was highly homologous with *Fasciola hepatica* isolated from Australia, *Fasciola gigantica* and *Paragonimus westermani*. Because of the high homology of the GST gene of different parasite, it could not be used in diagnosis assay with Fh GST protein, but could be used in gene vaccine. The clone of Fh GST gene had advantages to investigate the function and effect of GST protein.

**Key words:** *Fasciola hepatica*; GST gene; sequence analysis

个细胞进行克隆,培养出能分泌单抗的克隆细胞。目前生产的单抗大多是鼠源性的,但其在临床应用方面还存在着很大的弊端,主要是鼠源单抗与NK等免疫细胞表面Fc段受体亲和力弱,产生的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)较弱,而且它与补体成分结合能力低,对肿瘤细胞的杀伤能力较弱,并且鼠源性抗体在人血循环中的半衰期短,它发挥ADCC作用的时间较短;其次鼠单克隆抗体还具有免疫原性,易引起宿主过敏反应(Galun等,2007;Mavromatis等,2003)。这样一方面降低了单抗的效价,另一方面又会给病人带来严重的后果,因此鼠源性单克隆抗体还应改善才能应用于临床。

## 2 嵌合抗体

20世纪80年代中期开始研制的第一代人源化抗体,即简单的嵌合抗体,是用人源基因代替鼠源单抗的恒定区。这样构建的嵌合抗体不仅保留了抗原抗体结合的特异性,又大大降低了鼠源单抗的免疫原性。美罗华(Rituximab)作为第一个用于肿瘤治疗的基因工程抗体,就是由鼠可变区和人恒定区组成的嵌合抗体。但由于嵌合抗体可变区(V)约占整个抗体的30%,鼠源性抗体V区中的框架区(FR)仍残留一定的免疫原性,可诱发HAMA反应(Leonard等,2004)。灵长目源抗体也是一类嵌合抗体,通过免疫短尾猿猴产生。由于短尾猿猴抗体的可变区几乎与人可变区无差异,这类嵌合抗体不需要作任何改变,而不致发生抗体反应(Dall等,2005)。Fab和F(ab')<sub>2</sub>嵌合抗体的制备原理是将功能性抗体轻、重链可变区基因分别与人抗体的κ链和重链CH1恒定区基因进行重组,克隆到表达载体中,构建成鼠-人嵌合的Fab基因表达载体,再转入宿主细胞表达。天然抗体分子重链CH1和CH2之间的一段铰链区结构,其中的2个Cys残基可以生成二硫键,将2条重链紧密地共价结合在一起(崔银珠等,2001)在Fab的C端额外连接一个Cys残基组成Fab',其表达产物中有痕量蛋白,是以二聚体F(ab')<sub>2</sub>的形式出现的。

## 3 人源化抗体

由于嵌合抗体异源性仍然很大,因此需要对鼠源抗体进行人源化改造,进一步人源化的方法很多,主要是重构抗体和表面重塑技术(Tsurushita等,2004)。重构抗体就是互补决定区(complementarity determining region,CDR)移植,将鼠抗体的CDR移植到人抗体的相应部位,这样人源化程度可达90%以上,目前该方法是人源化单抗最常用、最基本

的方法。而表面重塑技术,即将鼠抗体框架区表面氨基酸的残基(surface amino acid residues, SAR)进行人源化改造。该方法是仅替换与人抗体SAR差别明显的区域,在维持抗体活性并兼顾减少异源性基础上选用与人抗体表面残基相似的氨基酸替换。

## 4 人源性抗体

虽然人源化抗体解决了鼠抗体的免疫原性等问题,但生产人源化抗体仍有很大的困难;人源化过程需大量繁复、昂贵的电脑模拟,需取代不同的氨基酸以恢复选择性和亲和力,工作量非常大,并且它总还含有少量鼠源性成分(林芸等,2001)。完全的人源性抗体才是用于治疗的理想抗体,目前它主要通过3种途径来研制:噬菌体抗体库技术、核糖体展示技术和转基因小鼠制备人源性抗体。

**4.1 噬菌体抗体库技术** 噬菌体抗体库技术是迄今发展最成熟、应用最广泛的抗体库技术。其基本原理是将蛋白质分子或肽段的基因克隆到丝状噬菌体的基因组DNA中,与噬菌体的外壳蛋白形成融合蛋白,从而使该异源分子呈现于噬菌体表面。通过这种方式,形成了一个收藏上亿个以体外方式制得的不同抗体的基因数据库,使从任何真实的抗原中迅速分离高度相似的同族抗体成为可能(Roberto等,2002;Higo-Moriguchi等,2004)。分离得到的抗体可用于制备完全人源化的单克隆抗体产品。随着噬菌体表面展示技术的成熟与不断应用,其肽库的构建及筛选技术得到迅速发展和推广,已广泛应用于包括基因定位、分子识别、疫苗设计等许多领域。但该技术也存在一定的局限性,如库容量的有限性、密码子的偏爱性、氨基酸的修饰受宿主限制等,而且该技术依赖于细胞内基因的表达,所以一些对细胞有毒性的分子很难得到有效的表达。按噬菌体抗体库技术融合了丝状噬菌体展示和抗体组合文库技术。基本技术路线为:应用供体外周血或组织分离单个核细胞,抽取RNA,PCR扩增出编码抗体基因片段,经酶切后导入噬菌体,转化感受态细胞,制备噬菌体建立噬菌体组合文库。再通过“吸附—洗脱—扩增”的富集过程,筛选得到特异性的抗体基因。利用此技术,外源蛋白或多肽的基因与噬菌体外壳蛋白的基因融合,外源表达产物在噬菌体的表面,从而实现编码基因及相应的表达产物在统一体系中的完美结合。

目前已构建的噬菌体抗体有两种类型:免疫抗体库和非免疫抗体库(罗萍,2004)。免疫抗体库的

抗体基因来自经疫苗注射、微生物感染、肿瘤、自身免疫等途径免疫过的个体,这些个体的淋巴经抗原选择和亲和力成熟,在较小的库容量即可筛选到针对特定抗原的高亲和力的抗体,也可从羊、鸡、兔等免疫动物中获得抗体。但免疫抗体库在针对自身抗原、抗原性较弱及有毒性的抗原时,制备抗体较困难。非免疫抗体库包括 3 类:天然抗体库、半合成抗体库和全合成抗体库。天然抗体库的抗体基因来自于未经免疫的个体,可用于筛选多种抗原,但较小的库容只能得到中等亲和力的抗体。半合成抗体库则是由人工合成随机化的 V-CDR3 序列;全合成抗体库则是半合成抗体可变区序列全部人工合成。合成和半合成抗体的库容大,但亲和力较低,人工合成的免疫原性 CDR3 也可能增加抗体的免疫原性(Higo-Moriguchi 等,2004)。

作为迄今发展最成熟、应用最广泛的抗体库技术,噬菌体抗体库具有以下特点:①最大的特点是实现了基因型和表型的统一;②表达的是完全人源的抗体,且主要以活性片段 scFv、Fab 等形式表达,组织穿透性和抗原结合性都比完整抗体具有明显优势;③经过多次“吸附—洗脱—扩增”的富集过程,可以筛选得到特异性的抗体基因;④筛选容量大,杂交瘤技术的筛选能力一般在上千克隆以内,而采用抗体库技术可以达到  $10^6$  以上的克隆;⑤用途广泛,利用噬菌体展示技术筛选出的抗体具有特异性高、容易保存、生产周期短、易于大批量生产等特点,在大规模的工艺化生产中显示出明显优势。

**4.2 核糖体展示技术(ribosome display technology)** 该技术将基因型和表型联系在一起,编码蛋白的 DNA 在体外进行转录与翻译,由于对 DNA 进行了特殊的加工与修饰,如去掉 3' 末端终止密码子。核糖体翻译到 mRNA 末端时,由于缺乏终止密码子,停留在 mRNA 的 3' 末端不脱离,从而形成蛋白质—核糖—mRNA 三聚体,将目标蛋白特异性的配基固相化,然后进行筛选,对筛选分离得到的复合物进行分解,释放出的 mRNA 进行 RT-PCR,PCR 产物进入下一轮循环,多次循环后可使目标蛋白及其编码的基因序列得到富集和分离(Groo 等,2002)。目前抗体库技术还受两方面的因素影响:①从未经免疫动物的抗体库获得的抗体亲和力不高;②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。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。核糖体展示技术避开了上述不足,可制备大容量抗体库。

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,在无细胞体系中完成转录和翻译,实现了基因型和表型的偶联,翻译出来的抗体可用抗原进行筛选,由于不经过体内转化,构建的抗体库库容可达到甚至超过  $10^{11}$  (Weiner,2006)。利用核糖体展示技术可以获得特异的、高亲和力的抗体。总之,抗体库技术从根本上改变了单抗的制备流程,成为众所瞩目的生物技术研究及开发热点之一。2004 年,中国建成世界上第一个针对 SARS 的基因过程抗体库。

**4.3 转基因小鼠(transgenic mouse)** 在转基因动物方面,有几种不同的途径生产人抗体,其中一种方法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 Trimer 小鼠,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。另一个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链基因簇的转基因小鼠(葛彦,2004)。这种转人抗体基因小鼠所携带的人 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。任何靶抗原均可被用来免疫该小鼠,使其产生高亲和力的人抗体(吴永强等,2008)。Tomizuka 等(2000)首先以染色体为载体,成功培育了转染色体小鼠,并制备了高亲和力的人抗体。日本某公司用基因工程技术,使小鼠携带完整的人 14 号染色体,该染色体包含全部人抗体产生基因,但迄今尚无该技术生产的制品问世。

## 5 展望

单克隆抗体的这些特征使它成为未来治疗学上研究的热点。在过去的 30 年里,从鼠源性单抗到全人源性抗体,单抗在制备技术上取得了较大的进展。鼠源性单抗的免疫源性导致机体产生一系列的急性反应,使药物的功效降低。全人单克隆抗体是制备单克隆抗体的一种新技术。它减少了鼠基因序列及抗抗体反应,提高了单克隆抗体的功效和安全性。虽然单抗药物还存在一些尚未解决的问题,最突出的问题是如何降低单抗的免疫原性,单抗的异源性所引起的抗体反应,不但降低了单抗的效价,而且会给患者带来严重的后果。但是随着抗体疗效不断提高,生产工艺不断成熟,单抗类药物必将为全球疾病患者带来更大的希望。因此,对异源性单抗进行改造以及人源性单抗的研制成为单抗研究的重要方向。相信在未来的几年里,全人源性单抗将作为一种新的产物更多地用于疾病的诊断、治疗及研究。

单克隆抗体已成为现代生物技术产业的支柱之一，单克隆抗体药物在生物技术制药中占有重要地位，并逐渐成为生物医药领域发展的主要方向。随着生物技术的发展，单克隆抗体制备技术的不断完善，将会研制出更多亲和力更高、疗效更好、不良反应更少、免疫原性更低的单克隆抗体，为医学界带来更大希望。

#### 参 考 文 献

- 1 许保疆,游一,郭成留,等. 单克隆抗体在农业和医学上的应用[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(7):86~88.
- 2 吴永强,董关木. 人源化单克隆抗体研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2008,36(2):73~77.
- 3 林芸,阎锡蕴. 人源化抗体研究进程及发展趋势[J]. 生物工程学报,2004,20(1):1~5.
- 4 罗萍. 治疗性单克隆抗体研究进展及临床应用现状[J]. 第三军医大学学报,2004,26(5):454~456.
- 5 胡春艳,等. 单克隆抗体制备技术及应用的研究进展[J]. 安徽预防医学杂志,2008,14(3):116~118.
- 6 崔银珠. 单克隆抗体的临床应用[J]. 国外医药,2001,22(1):5~7.
- 7 葛彦. 人源化抗体研制策略分析及应用研究[J]. 国外医学免疫学分册,2004,27(5):271~274.
- 8 Dall'acqua W F. Antibody humanization by framework shuffling[J]. Methods,2005,36:43~60.
- 9 Dhar R,Kamakar S,Sriraman R, et al. Efficacy of a recombinant chimeric anti-hCG antibody to prevent human cytotrophoblast fusion and block progesterone synthesis[J]. Am J Reprod Immunol,2004,51:358~363.
- 10 Galun E,Terrault N A,Eren R, et al. Clinical evaluation of a human monoclonal antibody against hepatitis C virus: safety and antiviral activity[J]. Hepatology,2007,46:37~44.
- 11 Groo T I, Jessie R. Prevention of respiratory syncytial virus infections in high risk infants by monoclonal antibody (palivizumab)[J]. Pediatrics International,2002,44(3):235~241.
- 12 Higo-Moriguchi K, Akahori Y, Iba Y, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus[J]. Virol, 2004,78(7):3325~3332.
- 13 Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature,1975,256:495~497.
- 14 Leonard J P, Coleman M, Ketas J C, et al. Epratuzumab, a humanized anti-CD220 antibody, in aggressive Non-Hodgkin's lymphoma[J]. Clin Cancer Res,2004,10(16):5327~5334.
- 15 Mavromatis B, Cheson B D. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia[J]. J Clin Oncol,2003,21(9):1874~1881.
- 16 Roberto D P, Makoto I, Midori T, et al. Grafting of "Abbreviated" complementarity-determining regions containing specificity-determining residues essential for ligand contact to engineer a less immunogenic humanized monoclonal antibody[J]. The Journal of Immunology,2002,169:3076~3084.
- 17 Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, et al. Double transchromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97:722~727.
- 18 Tsurushita N, Park M, Pakabunto K, et al. Humanization of a chicken anti-IL-12 monoclonal antibody[J]. Journal of Immunological Methods,2004,295:9~19.
- 19 Weiner. Fully human therapeutic monoclonal antibodies [J]. Journal of Immunotherapy, 2006,19(29):1~9.

## Research Progress in Monoclonal Antibodies

LIU Ping, CHEN Miao-miao, LIU Xue-rong, MU Ke-bin, HUANG Yin-jun

(China Agricultural Veterinary Biological Science and Technology Co. Ltd., Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** Hybridization techniques have made mouse monoclonal antibody widely use in diagnosis and research of human disease, and established the first milestone of therapeutic antibody. With the biology development and antibody genetic structure clarification, people can humanize mouse antibody with DNA recombination and antibody library which developed antibody techniques from chimeric and reshaped to human antibody. Both humanized monoclonal antibody and its derivative overcome the clinical shortage of mouse antibody from different angles, also bring a new dawn to made antibody.

**Key words:** monoclonal antibody; mouse monoclonal antibody; human monoclonal antibody

## 书 讯

2010、2009、2008年合订本(每册128元),并有少量2004、2005年合订本(每册70元),1999、2000、2001、2002、2003年合订本(每册40元)。如有订购者,请汇款到:100193 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 《中国畜牧兽医》编辑部收。