

单克隆抗体的免疫学和药理学概念

Zuckier L S et al

提 要: 单克隆抗体问世13年来, 随着细胞融合和DNA重组技术的不断改进而长足发展, 为放射免疫诊断和治疗提供了一些免疫试剂。但产生抗体的融合细胞产率低, 难获得高亲合力的抗体, 特别是人单克隆抗体。本文讨论了它的免疫学和药理学特性, 借以澄清这些遗留问题。

杂交瘤技术

多年来, 医生们一直在寻找将诊断和治疗试剂导向肿瘤、脓肿和其他局部性疾病的方法。自从能生产针对几乎任何大分子的抗体以来, 为以抗原表达在性质或数量变化为标志的疾病提供了一个重要导向介质。图1给出了IgG抗体典型的叉状模型。它是由两个相同的多肽重链和两个相同的多肽轻链

形成分子的Fab部分。 C_{H2} 区和 C_{H3} 区一起被称为抗体的Fc区。 C_{H1} 和 C_{H2} 区之间的枢纽区提供了一个在分子抗原结合Fab部分和Fc区之间的柔软片段, 它也含有连结两个重链形成二硫键的半胱氨酸。不同的五个抗体型(IgM, IgD, IgG, IgE和IgA)及其亚型有不同的稳定区(C)基因编码, 并且其C区氨基酸排列顺序完整地保存在每种型和亚型中做为效应功能的不同结合媒介。

几乎任何大分子都可以生成具有一定特异性和亲合力的抗体。加之, 对被动免疫抗体的应用已积累了许多经验和对它们的药代动力学的重要性的了解。尽管这是十分有意义的, 但是由于免疫反应的许多特性, 使得生产适于非肠道给药的抗体特别用于对生命没有危险的疾病是困难的。也由于实践和伦理的原因, 免疫人并获得大量人抗体也是困难的。因此, 大多数抗血清是用动物制备的, 这些外源性的Ig反复给予病人引起了外源性抗体的迅速免疫消除和严重潜在性的过敏反应。除此而外, 如果相同的外源性抗体重复给药, 病人将产生抗特异基因型抗体, 那么这个抗体将结合到所给抗体的抗原结合点上, 防止了这个抗体与抗原决定簇的相互作用。

即使这些问题可以避免或克服, 那么免疫反应的固有特性使得大量生产预期的和均匀的血清试剂也是困难的。高等有机体为了预防他们自身的大量外部感染和环境中的潜在

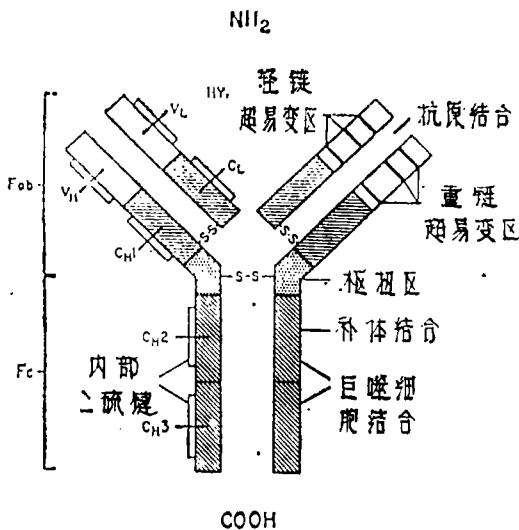


图1. Ig分子结构

用二硫键联接组成的不均匀二聚物。这个结构由重链和轻链易变(V)区折叠的残基(内部互相作用成互补形式)和抗原结合点的超易变(HV)区的残基而组成。轻链的(C_L)恒定区和重链的 C_{H1} 区与V区一起

的毒物逐渐形成了免疫反应。每种正常的高等有机体能够产生几十亿的不同抗体，这是因为每种抗体的V区，特别是HV区的氨基酸排列顺序不同所致(见图1)。每个抗体分子具有它特殊的V区氨基酸排列顺序，存在于抗体形成的淋巴细胞表面。每个细胞只产生一种抗体，当一种抗原进入此系统时将同抗体受体库的信号器起作用，刺激B淋巴细胞的信号器增殖、识别、合成和分泌大量的抗体分子，在任何特定时间内，病人能够对外源性物质应答，有限地产生寡克隆反应，在它的受体库中只产生少数几种不同抗体，这个免疫反应很难预测。对一个病人或另一个病人，在不同时间内可产生一系列不同的抗体。因此用常规的免疫很难生产出大量的均匀抗体或相似的抗体，当需要提供新的抗体时，实际上不可能准确重复抗体反应。

单克隆抗体生产

1975年，Kohler和Milstein建立了杂交瘤技术，这个技术潜在的效益是巨大的。其一是纯抗体可以用相对不纯的和甚至未知的抗原来制备。例如，可用含有正常细胞与瘤胚抗原的恶性细胞免疫小鼠。从免疫的动物中得到免疫细胞与骨髓细胞融合，筛选出产生单克隆抗体的杂交瘤细胞，它与肿瘤细胞起反应，而不与同一个病人的正常细胞反应。这些单克隆抗体的分离有两个含意，其一是恶性细胞中存在肿瘤抗原，其二是它可提供从细胞中识别恶性细胞的试剂，即使肿瘤抗原未曾通过任何方法表示出它的特征。

杂交瘤技术的另一个重要效益是可以大量生产单一的抗体分子。即可在组织培养中生产大量的细胞，也可将这种细胞再注入动物，可获得多达10mg/ml单克隆抗体的腹水。更重要的是由于杂交瘤细胞在冰冻下能安全保存，每种特殊的抗体可以根据需要随时提供，保证了这一特殊试剂永远可以得到。这些成绩鼓舞了研究者和药物厂商来研究和生产用于诊断和治疗的单克隆抗体。

杂交瘤技术的进一步效益是满足特殊任务而筛选新的抗体。过去由于免疫反应的非均一性和不可预见性所限，预想目标仅仅是获得适宜的特异性抗体。由于杂交瘤技术的有用价值，现在我们能够生产出高或低亲合力的抗体、特异的或有交叉反应的抗体或携带特殊效应功能的抗体。除此而外，由于可利用细胞制备单一抗体分子，使之某一基因编码的克隆抗体和用重组DNA技术控制分子的各种性质成为可能。最后，或许是最重要的，杂交瘤技术提供了从由于其他原因免疫了的病人中获得抗体形成细胞而制备人的单克隆抗体。

存在的问题

以上这些效益极大地刺激了科研和临床积极性，但创立杂交瘤技术十三年来，仅有几种单克隆抗体获准用于常规非肠道给药。多种原因阻碍了杂交瘤技术有效地应用到人疾病上，因为这一技术仍然处于实验研究阶段，与当初Kohler和Milstein创立的技术没有多大进展，并且为了获得有用抗体，仍然取决于盲目筛选成千上万的杂交克隆，融合的效率很低；即使融合成功，抗体形成细胞变成能活存的杂交瘤细胞并在培养其中生长不断产生抗体者仅有1/2万的可能，而其原因只有部分被搞清楚。重要的是生产与弱免疫原反应的单克隆抗体仍然是十分困难的。具有高度保守性的抗原、只能少量得到的抗原或具有使它们产生弱免疫原的化学结构的抗原，都不能刺激抗体生成细胞大量地增殖和分化。因此，它们不能生产可用于融合过程的许多细胞。因为产生高亲合力的细胞仅占能产生与特殊抗原起反应的抗体的细胞很少一部分，也因融合效率低，许多目前用于临床试验的单克隆抗体都只有较低的亲合力。而且，由于许多抗原能诱导出明显的型或亚型，因此获得能够携带效应功能的单克隆抗体是极为困难的。因为单克隆抗体是均一试剂，常规的实验操作能使它失活。即

便获得了有用的单克隆抗体,也不一定易于纯化和贮存。所有这些问题的结果,使许多单克隆抗体一般只能用做第一代试剂。在许多情况下,对临床应用有价值的抗体不是生产新的就是用基因或DNA重组技术改造现有的。

将生产所需要的抗体细胞富集的技术,可能克服杂交瘤技术的一些限制,从而增加有用抗体的产率,减少用于鉴定它们的筛选手续,其中最有成功希望的技术叫做抗原聚焦融合,它提高了选择性的结合和产生高亲合力及所需特异性抗体的细胞融合。这一技术已用于少数几种典型的例子,但其原理可以推广到更大的范围来增加生产优化抗体的产率。

也许更重要的问题是很难制备出有用的人单克隆抗体,其确切的原因并不完全清楚。首先难以确定人细胞融合的配对细胞,甚至连小鼠单克隆抗体产生中那样低的融合效率也不易得到。建立人融合配对细胞是必要的,因为人-鼠杂交迅速除去大部分人的染色体,包括重肽链和轻肽链的编码,这是不容怀疑的事实。以后的研究表明,用限量的亚克隆和反复筛选,能够比较容易地得到稳定的人-鼠杂交瘤。在体外用人抗体生成细胞与Epstein-Barr (EB病毒)作用也能生产人单克隆抗体,用除去人抑制性T细胞的方案,可将每50个人抗体形成细胞的一个转化成能继续培养的细胞系。这细胞系同骨髓瘤细胞融合增加了它们的克隆化程度,而且这些EB-转化细胞也可稳定传代。遗憾的是,EB病毒受体仅在未成熟抗体形成细胞上表达,转化细胞系一般只产生相当低亲合力的IgM抗体。

制备人单克隆抗体目前出现的主要障碍是在于获得含有产生所需抗体的一定量人淋巴细胞群。外周血淋巴细胞很容易从人B细胞中获得,少量的细胞仅在免疫反应的短暂阶段产生需要的抗体。为了鉴定和利用此难

得的机会,必须有目的地进行免疫,但只在少数情况下才行得通。免疫过的病人脾和淋巴结比外周血更难得到,它们也仅在免疫后的短暂阶段含有大量的增殖B细胞。甚至没有证实从肿瘤病人引流的淋巴结是产生抗瘤胚抗原抗体B细胞的有来源。

人单克隆抗体的生产问题几乎难以克服,直到最近报告严重免疫缺陷型(SCID)小鼠能与人类淋巴细胞重组并能够在常规免疫后产生人抗体。尽管这些结果是初步的,但是它提供了用标准鼠免疫的方案和融合方法生产人单克隆抗体的可能性。一旦能这样做,杂交瘤技术的一些其他现存问题也解决了,高亲合力和高特异性的人单克隆抗体将与鼠单克隆抗体一样可以进行常规生产。

重组DNA技术的发展使得生产嵌合抗体成为可能。即用鼠单克隆抗体的V区与人类单克隆抗体的C区结合(图2)以产生嵌合分子。这些重组基因转移到鼠骨髓瘤细胞系或者其他培养细胞中,它们编码合成和分泌相当大量的抗体,人单克隆抗体的免疫原性有望比鼠的低。例如鼠V区与人类C区嵌合保留过渡的免疫性,鼠抗体的HV区(见图1)能够插入到人类抗体的结构中,结果用于人的免疫原分子潜在的减少;此外,用同样的技术能够制造出Fc区的全部和部分被作为靶传递物的毒物、化疗剂、酶或另外分子所代替的分子。这样,嵌合抗体将形成完全新的分子,它从未在体内存在过,至少不能作为单个分子。

在能够有效利用杂交瘤和重组DNA技术生产免疫试剂的新发展之前,我们必须懂得并有效地使用现有的各种单克隆抗体。此外,对这些现有试剂的代谢和生物学分布的彻底了解,将有助于认识改造过的单克隆抗体应具有何种结构和性质。

抗体代谢和生物学分布

目前,鼠及鼠-人嵌合抗体在人体中的应用和人克隆的潜在应用重新引起了人们对Ig

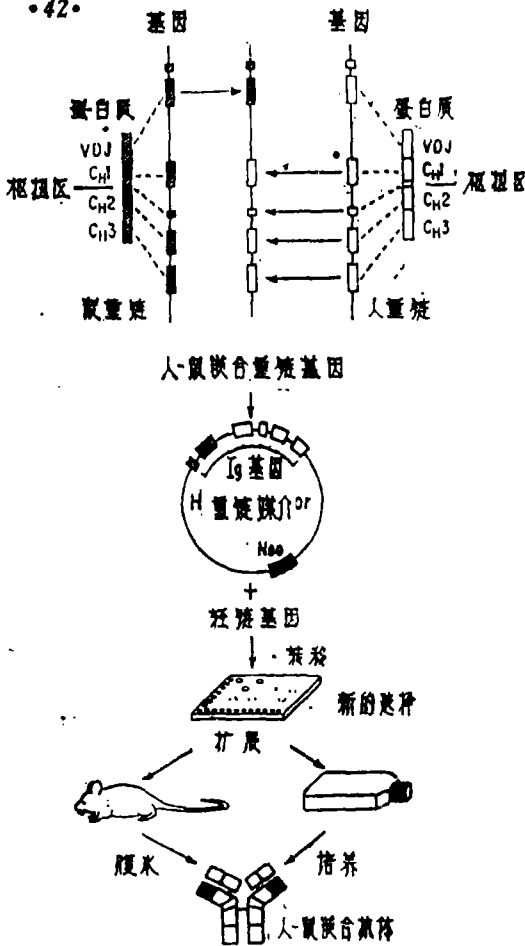


图2.人-鼠嵌合抗体的生产

药物动力学的兴趣。由于可用DNA重组技术来创造任何抗体结构，假如我们能识别Ig分子决定性区域，从而改变血内半减期($T_{1/2}$)和生物学分布，就可创造这些性质改变了的抗体。在考虑这项工作的时候，有三个决定性的因素必须考虑：所研究的Ig性质；接受者的种属；以及抗体提纯、标记和分析方法。

研究的Ig可以是多克隆的和不均一的，也可以是单克隆的和均一的，它们可能来源于许多种动物。杂交瘤技术问世之前，大量的单克隆Ig是由病人骨髓瘤或动物得到的，许多早期的研究都是用这种材料。引入体内的Ig分子可用完整的或由蛋白酶水解或化学分解的Fab的 $F(ab')_2$ 片段，少数情况下研究的是含有特定区域的片段。近来也研究了从

不同稳定区基因用缺失或重组的方法得到的单克隆抗体。虽然抗体经常以示踪剂量腹腔注射(iv)，大体上并没有增加血管内Ig的水平，目前也出现用大剂量Ig进行研究的。

被动接受Ig的动物种属是一个重要的因素。Ig从一个种属引入到另一个种属(异源接受者)的许多研究已经实现，例如人的Ig给鼠或兔，或者鼠抗体给灵长类。这些研究极难解释，因为一种动物本身的同源Ig的 $T_{1/2}$ 与种类大小成反比，即鼠的Ig在鼠内的 $T_{1/2}$ 比人的Ig在人体内短得多，这些通常是由动物种属固有的代谢特性所决定的。Ig的结构特性可能也是重要的，跨种属的研究可能导致错误的结果。加之，通常大部分动物产生少量的自身抗体，这些抗体与恒定的(风湿因子)和变化的(抗遗传型)自身Ig区反应，一般亲和力很低影响或不影响血管内物质代谢。然而一个种属的Ig注入另一个种属，这对于接受者种属来说确实是得到一个外部抗原，引起预先存在的抗体交叉反应和影响血管内物质代谢的明显免疫反应。

假如一个荷瘤或其他靶抗原的动物，其种属大小和引入抗体的稀释，将是与靶反应的决定因素。例如，如果将抗体给入一个体重70公斤荷1克肿瘤的病人，那么肿瘤接受血量的多少与肿瘤大小成比例，静脉注射抗体分子49天才通过肿瘤一次而一个荷1克肿瘤的实验动物的稀释作用却十分低，给入的抗体将频繁地通过肿瘤。稀释因素是重要的，因为一些显像实验研究是用鼠单克隆抗体给于荷人肿瘤的裸鼠。它虽提供了研究人恶性肿瘤的方便模型，但这个模型与临床实际有很大的差别。

现有的研究报告中，最后一个重要因素是提纯和标记Ig的方法以及Ig的给药剂量。由于放射性标记的抗体易于定量，经常用于生物学分布的研究。 ^{35}S -蛋氨酸的放射性部分在生物合成中掺入到Ig分子上而抗体结构不发生变化。因为生物合成标记抗体是

一个繁琐的过程，一般是采用化学方法将放射性核素标记到抗体上。粗糙的分离和提纯抗体的方法可能引起抗体结构的损伤和加速分解代谢。事实上，最近对小鼠单克隆抗体的研究表明，用常规的实验步骤，像冰冻、融化、加热到56℃、盐析或离子交换层析等，有40%的抗体变性。当每个抗体分子的放射性基因取代数目小于1个时，不引起抗体变性，而大于1个时则变性的危险增加。在某些分子中，结合的部位刚好是抗原结合的部位，则抑制同抗原的结合。另外，如结合在分子C区的部位上，则影响效应功能，例如，代谢和生物学分布。

不管是生物学的或技术的，这些因素在以前Ig代谢研究都清楚地表明，血浆Ig水平受到严密的调控。大部分情况下是受血浆中Ig的浓度和血管内代谢速率调节的，提示存在着某些受体调节这些变化。IgG的调节作用研究得最多，如果病人的IgG水平缓慢或迅速升高，那么，它们在血管内的代谢率增加；而在丙种球蛋白减少的病人中，IgG在血管内的代谢率明显减少。血浆IgG水平的识别和血管内代谢的调节机制完全未知。

静脉注射抗体，血清半减期

($T^{1/2}$) 和分解代谢率

完整抗体

用许多种动物研究了同源性Ig的血管内存活率。一般说来，Ig的代谢率与宿主动物大小和它们的代谢率成反比。因为通常使用鼠类的单克隆抗体，而人的抗体在理论上更可取，我们的讨论将集中在这两种来源的Ig。

Ig生物学分布的初期研究是在同源性Ig分离和碘化之后完成的，常由于难以觉察的

损伤而结果不可靠，后来研究者采用温和的技术获得了重复性好的可靠资料。图3中的曲线表示出血清消失两个阶段，在初始阶段，血清中抗体浓度迅速降低，接着血管内的缓慢消除被认为是真正的分解代谢。最初阶段的血管内迅速消除不能单独归因于损伤的蛋白质的清除，因为用生物合成标记或未标记抗体的免疫实验也有同样的现象，至少一部分原因是Ig在血管内外区域之间含量的平衡。对代谢率的测定，许多研究者有的忽略初期阶段的变化，有的描述早期和晚期两个阶段的清除，有的也求出单个的数字来拟合所有的数据点，由于这些技术的差异而得到了血清清除的各种不同报告。

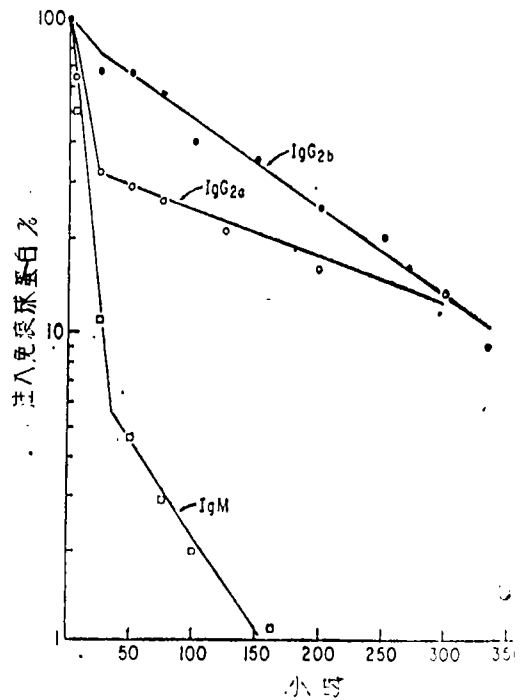


图3. 鼠Ig的血管内代谢
(未完, 待续)