

## 重组抗体技术简介

以编码抗体的基因作为起始材料，利用重组 DNA 技术，在体外生产的抗体，超出了免疫系统的限制。通过获得抗体的基因序列，构建表达载体，并将其转入至表达宿主中（如酵母、哺乳动物细胞或细菌中）。利用这种方式，生产的抗体为重组抗体。

单抗的出现及其显著的优越性（特异性高、蛋白类天然产物等特性）使其在疾病的研究、诊断和治疗中得到广泛应用，但也受到人体的强烈排斥。重组抗体抗体的产生在一定程度上解决了由于鼠单抗的异源性导致的排斥反应。

重组抗体药物包括传统鼠源性单克隆抗体的人源化和全人抗体。由于传统单抗诱发人抗鼠抗体反应，在此基础上的人源化抗体和全人抗体技术逐步兴起。针对鼠抗体人源化以及全人抗体构建和应用中的问题，改进抗体重组技术，缩小实验室成果和大规模生产要求的差距，不断完善重组抗体药物体系十分必要。

### 研究方法

重组抗体是使用重组 DNA 技术在体外构建，不受免疫系统限制而生产的单克隆抗体。因其克服了杂交瘤单抗的诸多缺陷，而成为研究的热门。重组抗体的开发是一项困难又复杂的任务。

重组抗体的开发主要可以通过三种途径：①通过噬菌体展示筛选；②已有杂交瘤细胞测序；③直接 B 细胞克隆。开发的目的不仅是为了获得抗体，而是可以测得抗体的基因序列，以便后续的抗体生产和改造。

噬菌体展示技术是将 scFv 单链抗体或 Fab 展示于噬菌体表面的抗体库（Antibody library）制备技术。抗体库结合固相化技术和高通量筛选，可以方便快捷地得到亲和力较高的抗体，并对噬菌体进行测序以获得抗体序列。

对已有的杂交瘤细胞测序，也是快速获得抗体序列的方法之一。杂交瘤细胞染色体易丢失，造成杂交瘤细胞退化，再次构建费时费力，通过对其测序，可以获得抗体基因序列，以便长期保存，并随时生产。

B 细胞克隆是另一种开发重组抗体的方法。噬菌体展示技术依赖于重链和轻链的体外重组，产生和筛选在体内未发现的抗体。而直接 B 细胞克隆则保留了原始的重链和轻链抗体对。但是 B 细胞克隆需要使用整个 B 细胞进行开发，从新分化的 B 细胞一直到完全分化的 B 细胞（完全分化的 B 细胞是经过抗原刺激产生的浆细胞），而浆细胞仅占 B 细胞的 0.1-1.0%，通过流式细胞术可以筛选获得分泌特异性抗体的浆细胞。

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

## 抗体纯化

亲和层析是常见的重组蛋白纯化方法，利用蛋白质结构的特异性，可以与对应的专一分子进行结合，并在特定条件下可以解离，只需一步就可以得到高纯度的蛋白，比如利用酶与底物的结合、受体和配体的结合、抗体和抗原的结合等这些特异结合就可以纯化对应的酶、受体、抗体等蛋白。还可以在重组蛋白表达时，加入标签，如 His、Flag、GST、HA、c-Myc、GFP、SUMO、MBP、Awi 等。

细菌亲和层析法，有些细菌能合成特异性识别并结合高等哺乳动物免疫球蛋白的蛋白质，如蛋白 A、B、G 和 L，其结合位点主要位于抗体分子的恒定区，只有极少数存在于可变区内，因此这种方法较适用于分离重组抗体完整分子以及单价和双价 FAB 片段，但对 FV 或 scFV 片段的分离无效。

抗体亲和层析法，以融合蛋白形式表达的抗体片段常可根据靶蛋白的特性选择合适的抗体亲和层析柱进行分离。目前常用的靶蛋白如碱性磷酸单酯酶、过氧化物酶以及一些毒素蛋白等均有相应的商品化抗体亲和层析介质，但是如果大肠杆菌本身也能合成这种靶蛋白或靶蛋白的同源蛋白，则这种方法的特异性就会受到影响。为了克服这一困难，pIG 载体中的 Flg 和 Myc TAG 标签序列也可作为抗 Flag 抗体和抗 Myc TAG 抗体的靶序列，含有这些序列的融合蛋白可经相应的抗体亲和层析柱进行分离。

抗原亲和层析，法如果与重组抗体或抗体片段相对应的特异性抗原容易获得，那么利用这种抗原亲和层析柱分离表达产物是较好选择，不仅具有很高的选择性，而且还能从任何非正确折叠的蛋白混合物中快速分离目标抗体或抗体片段。然而对于一些具有危害性的抗原（如肿瘤抗原等），一般不宜采取这种方法分离用于体内的抗体片段。

配体亲和层析法，早期用于分离完整抗体分子的磷酸胆碱亲和层析柱也可直接用来从大肠杆菌蛋白粗提液中纯化重组 FAB、FV、SCFV 片段以及各种二价迷你抗体，其前提条件是所有的重组抗体片段必须具有良好的折叠结构。由于重金属离子亲和层析介质价格低廉，因此这种方法更适用于重组抗体片段的大规模生产。

## 相关问题

重组抗体的操作必须遵循两个基本原则：

- 保持抗体亲和力和特异性，尤其不能丧失抗体特异结合抗原的能力；
- 应当降低或消除抗体的免疫原性。

如何提高重组抗体的稳定性：

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

优化洗脱条件，可以从高的 PH 逐渐降低；

纯化的样品要及时中和，甚至一边纯化一边中和；

纯化实验过程中样品低温制备和保存；

添加蛋白保护剂比如甘油、吐温；

抗体浓度较高时需要及时稀释，避免高浓度聚沉的风险。

同时，重组抗体的高效表达有赖于高效表达载体的构建、抗体基因序列的优化、抗体稳定细胞株的筛选、表达宿主细胞的改造及细胞培养工艺的优化等。

哺乳体系表达细胞的选择：

CHO 细胞即中国仓鼠卵巢细胞，是目前表达外源蛋白成功的细胞之一。该细胞属于成纤维细胞，是一种非分泌型细胞自身很少分泌内源蛋白，因此有利于目的蛋白的纯化分离；相较于其他细胞类型，CHO 细胞能在化学成分限定和无血清悬浮培养中稳定生长，且基因组信息明确，在人类致病病毒应答方面表现出合理的安全性，并能够表达与人相似的翻译后修饰。重要优势之一是能够容易的得到基因改造的细胞。但因为糖基化模式与人类不完全相同，导致 CHO 细胞产生的重组蛋白在某些时候仍然表现出免疫原性。

HEK293 细胞是真核蛋白表达常用的细胞之一，它具有以下优势：更快的生长速度，更高的生长密度、转染效率高，表达后修饰更接近人体蛋白的结构，但可能会有潜在的人病毒污染。

抗体免疫原性问题：

除了人源化改造及选择合适的表达系统以避免抗体分子恒定区和可变区序列及异常糖基化引起的 HAHA 外，给药方式、频率、剂量，疾病情况，病人的免疫状态，MHC 的单体型，抗体的特异性，抗原抗体复合物，抗体介导的补体激活，抗体与 Fc 受体的结合以及炎症与细胞因子的释放等也都会影响抗体的免疫原性

重组抗体亲和力问题：

这是重组抗体改造后抗体效应功能发挥的重要条件，也是目前存在的主要瓶颈之一。一般来说，人源化抗体只能达到鼠源抗体结合能力的 33%~50%。同一种构建方法并不适用于所有的抗体，因此在抗体分子表面修饰方面，需要结合分子预测和分子设计的内容多多积累经验。

规模化培养问题：

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 010-5365 2239 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

要确保通过动物细胞规模化培养生产的重组抗体的活性,需保证蛋白质折叠与二硫键的正确形成。此外,还要完善灌流培养技术,解决涵盖 CHO(中国仓鼠卵巢细胞)、杂交瘤、HEK293(人胚肾细胞)、VERO(非洲绿猴肾细胞)、和 BHK(金黄地鼠肾细胞)等工程细胞大规模批次、流加、灌流培养中的关键问题。

### 参考文献

- [1] 邝贞结. 基因工程重组抗体技术的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2010, 35(5):4.
- [2] 胡迪超, 张爱华, 杨晓明. 重组抗体高效表达的研究进展(II)[J]. 中国生物制品学杂志, 2013.
- [3] 李艳梅, 田政伟, 徐丹华, 等. CHO 细胞重组抗体表达载体的构建策略及进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2018.
- [4] 刘伯宁. 用于重组抗体生产的细胞大规模培养技术[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7):103-111.
- [5] 邓宁, 陈文吟, 向军俭, 等. 亲和层析纯化重组人源性抗 HBsAg Fab 抗体[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(5):3.
- [6] 陈志南. 基于抗体的中国生物制药产业化前景. 中国医药生物技术, 2007, 2(1): 2-5.
- [7] 刘伯宁. 用于重组抗体生产的细胞大规模培养技术[J]. 中国生物工程杂志, 2013(7):9.
- [8] Kashmiri S V, De Pascalis R, Gonzales N R, et al. SDR grafting—a new approach to antibody humanization. *Methods*, 2005, 36(1): 25-34.
- [9] Expression and purification of a single-chain variable fragment antibody derived from a polyol-responsive monoclonal antibody[J]. Jennifer A. Lamberski, Nancy E. Thompson, Richard R. Burgess. *Protein Expression and Purification*. 2005(1).
- [10] Hwang W Y, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, 2005, 36(1): 3-10.