

杂交瘤技术的胜利

杂交瘤抗体开发技术剖析

白皮书1

杂交瘤抗体开发

简介

1975年，Köhler和Milstein为了获得可以不断产生单克隆抗体的细胞开发了杂交瘤技术¹。这一发现使世界各地的研究人员能够相互分享他们的抗体，为生物研究释放了巨大的潜力。单克隆抗体 (Monoclonal antibodies, mAbs) 因其特异性而备受瞩目，与多克隆抗体不同，单克隆抗体只能识别一个特异性的抗原表位。这种高度的选择性使得单克隆抗体被广泛应用在研究、诊断和治疗应用中，这些应用往往涉及从复杂的生物混合物中识别、示踪、定量或药理靶向感兴趣的蛋白。

四十年来，杂交瘤技术仍然在单克隆抗体发现和开发过程中处于领先的位置，其重要性显而易见。因此，FDA批准的80种单抗治疗药物中，绝大多数是来自小鼠杂交瘤²。现在，随着人源化转基因动物、稳定免杂交瘤的发展，以及新开发的稀有物种单克隆抗体的人源化方法，预计未来几年还会继续增长³⁻⁵。

在这篇白皮书中，我们将为读者提供一些关于杂交瘤的基本知识，以及如何使用杂交瘤生产所需的单克隆抗体。

用于单克隆抗体生产的杂交瘤技术

杂交瘤细胞是由可产生特异性抗体但不可增殖的B淋巴细胞与具有无限增殖但不可产生抗体的骨髓瘤细胞融合后，形成的同时具备抗体分泌功能和保持细胞永生性两种特征的细胞。

利用宿主动物的亲和力成熟产生高特异性和高亲和力的单克隆抗体。杂交瘤的生产需要五个阶段，第一阶段：宿主动物免疫抗原的设计和优化。第二阶段：用免疫原免疫宿主动物，以引起免疫应答并促进B细胞成熟。第三阶段：从宿主动物的脾脏中分离B细胞，并将它们与无限增殖的骨髓瘤细胞融合，产生杂交瘤。第四阶段：对生成的杂交瘤进行多轮的筛选和选择，以确定为下游应用提供最佳单克隆抗体的杂交瘤。第五个阶段也就是最后阶段是扩增特异性杂交瘤以及抗体纯化。

在本白皮书中，我们将进一步探讨杂交瘤产生过程的各个阶段。

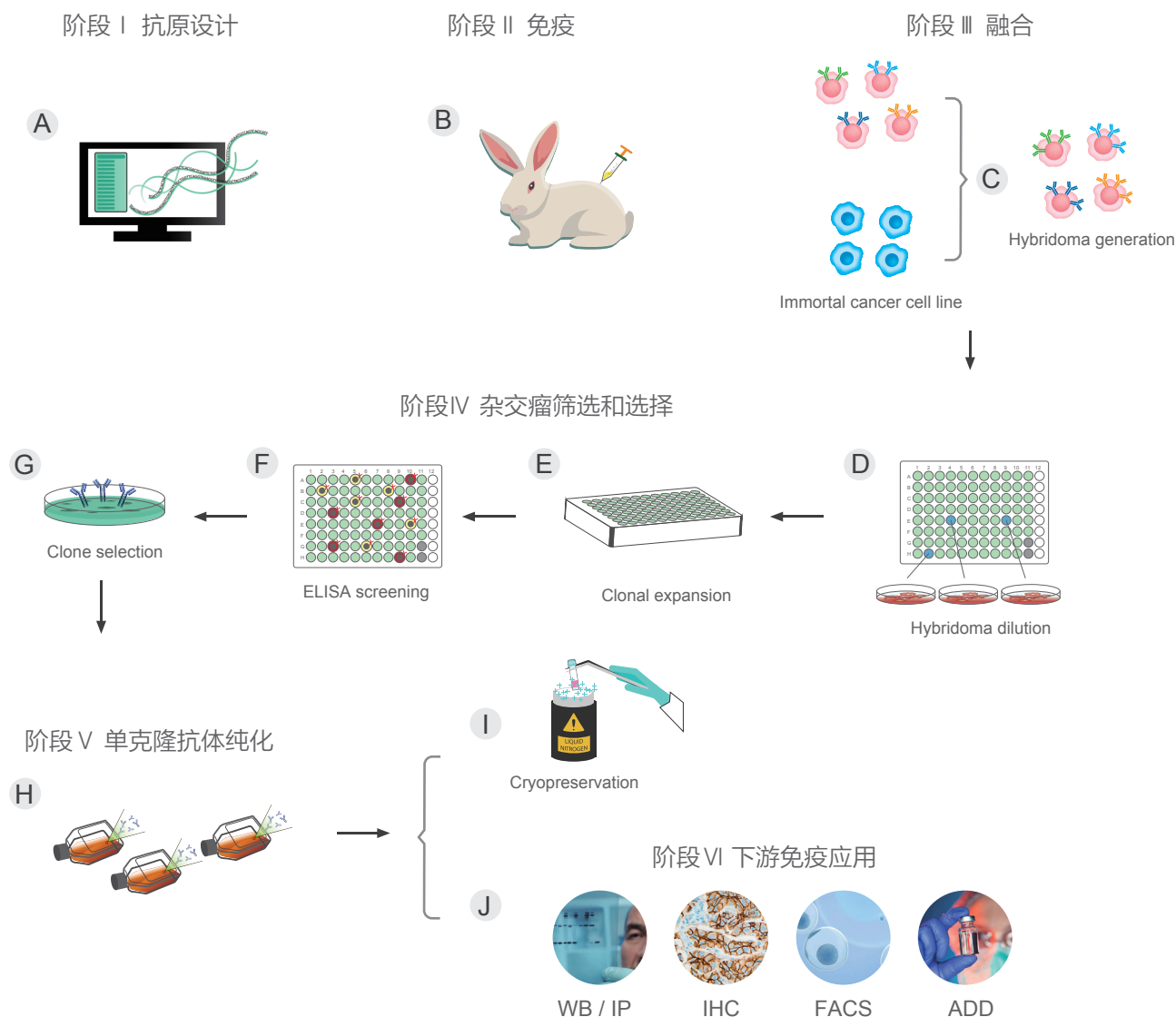


图1：基于杂交瘤技术生产单克隆抗体的不同阶段。

(A) 阶段 1: 设计和生产特定的抗原。(B) 阶段 2: 用抗原免疫宿主动物。(C) 阶段 3: 从动物脾脏中分离的B细胞和骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤 (D-G) 阶段 4: 将杂交瘤 (D) 稀释至选择性培养基中，置于多孔培养板 (1clone/孔) 中，(E) 单个杂交瘤克隆进行扩增，扩增后 (F) 采用ELISA法筛选含有单克隆抗体的培养上清，(G) 选择杂交瘤克隆进行第5阶段的筛选。(H I) 阶段 5: 所选择的杂交瘤克隆用于 (H) 单克隆抗体纯化，杂交瘤细胞系也可 (I) 低温保存以备将来的抗体生产。(J) 阶段 6: 纯化的单克隆抗体可用于多种下游免疫学应用，如Western blot (WB)、免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP)、免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC)、荧光活细胞分选 (Fluorescence activated cell sorter, FACS) 和抗体药物发现 (Antibody Drug Discovery, ADD)。

第一步：抗原设计

抗原 (Antigen, Ag) 或免疫原是能够诱导宿主动物免疫应答的外源分子，如蛋白、多肽、多糖、小分子、过表达细胞系、DNA片段、或者抗体药物。抗原设计是为了获得可分泌针对抗原特异性抗体的B细胞。

理想的抗原具有高的免疫原性和抗原性。抗原的免疫原性是指其诱导宿主免疫反应的能力，与抗原性密切相关，抗原性是指抗体与抗原表位 (即抗原决定簇) 上的特定位点结合的能力⁶。抗原表位的抗原性在很大程度上依赖于结构构象、氨基酸序列和易接近性等特征，这些特征都能显著影响抗体的结合。抗原选择有很大的挑战性，抗原性高的抗原可能具有较差的免疫原性。某些小分子，如脂类和核酸，它们往往无法达到激活免疫应答所需的分子量 (~10-20 kDa)。在这种情况下，这些小分子，也称为半抗原，必须交联或结合载体蛋白，如钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 或牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)，使其具有免疫原性^{7,8}。

成功的抗原设计是一个相当困难的过程，许多生物信息学工具已经开发了复杂的算法，来帮助设计免疫原性较好的抗原。金斯瑞的Optimum Antigen™设计程序计算了针对多个蛋白质数据库的每个多肽抗原，以确定所需的表位特异性，并避免针对未暴露的表位进行抗原设计。用户还可以指定他们想要的抗原交叉反应，并探索适合应用的抗原偶联和表达方法。

第二步：宿主动物免疫

注射：动物免疫有几种不同的免疫策略，但一般会选择6周龄的小鼠进行首次腹腔免疫，然后在第一次免疫之后的14天进行二免、21天进行三免，以增强免疫反应，并进一步促进分泌抗体B细胞的成熟。大多数免疫方法，会增加抗原免疫前的耐受实验⁹，如新生儿耐受、药物诱导消减免疫和掩蔽免疫，这些耐受原是包含多个免疫显性表位的细胞、质膜裂解物或蛋白。耐受性实验的目的是让宿主动物的免疫系统产生针对耐受原的抗体，为了最终识别出它们自我抗原。然后，当实际的实验抗原被使用时，只会产生针对这些抗原表位的单克隆抗体，而不会产生属于宿主动物本身的单克隆抗体。

除了在免疫方案中添加耐受原外，还可以利用佐剂与抗原的联合使用，来增强宿主免疫应答。有许多不同类型的佐剂可用于增强动物的自然免疫应答，从矿物油和角鲨烯等有机化合物到无机化合物，氢氧化铝等¹⁰。佐剂有多种作用。首先，它们有助于促进高滴度抗体的生成，通过在注射部位保留和延长抗原的释放，即所谓的储存效应，保持免疫系统不断受到刺激¹⁰。佐剂可以模拟微生物病原体相关的模式分子，即微生物上的小结构，激活宿主动物固有免疫应答¹¹。此外，微粒佐剂可以通过诱导细胞释放与组织损伤相关的分子信号 (如核酸、活性氧和细胞因子) 来刺激适应性免疫应答¹²。宿主动物固有免疫应答伴随着适应性免疫应答，使免疫系统以更快、更强的方式生产抗原特异性抗体。

制定动物的免疫策略需要科学知识、经验和运气之间的微妙平衡。许多不同的决定必须以正确的组合做出，以确保动物对抗原有较强的免疫应答。这些影响因素包括宿主动物的年龄、免疫途径、耐受方法、抗原浓度、抗原与佐剂的比例、免疫/增强计划、血清滴度等等。因此，不能单纯依靠抗原的生物信息学分析软件，更重要的是咨询抗体生产专家设计合适的免疫方案。

免疫应答：在给予抗原或抗原/佐剂组合后，宿主动物开始产生免疫应答。专职性的抗原提呈细胞 (Ag-presenting cells, APC) B细胞将抗原加工成抗原肽后，以抗原肽-MHCII类分子复合物的形式表达于细胞表面（组织相容性复合体major histocompatibility complex, MHC），提呈给Th (T Helper cell, Th)，APC-包括巨噬细胞、树突状细胞和B细胞^{13,14}。然后，被激活的TH细胞分化为Th1，以帮助巨噬细胞杀死病原体，或Th2，直接接触辅助B细胞活化或分泌细胞因子协助和促进B细胞的增殖和分化^{13,14}。

为了生产高特异性的抗体，Th2激活的B淋巴细胞将进行克隆选择并经历分化形成几种不同的细胞类型。首先，B细胞活化后形成 B淋巴母细胞，它通过向滤泡间区、边缘窦或T细胞区与红髓交界处迁移，在这些区域经过进一步增殖和分化，成为浆母细胞(未成熟的B细胞)¹⁵。浆母细胞产生的抗体对抗原只有中等程度的亲和力。然而，这些抗体为宿主提供了对外来抗原的即时保护。浆母细胞可以进一步成熟，它们迁移到次级淋巴滤泡，并迅速繁殖形成生发中心^{15,16}。在生发中心的微环境中，浆母细胞分化为浆细胞或记忆B细胞。浆细胞经历一个复杂的抗体成熟过程，可以分泌大量高异性、高亲和力的抗体；如果相同的抗原再次感染宿主时，记忆B细胞则负责协助免疫系统产生更快的免疫应答¹⁵。

高亲和力抗体是在生发中心通过亲和力成熟的过程发展起来的。体细胞高频突变 (somatic hypermutation, SHM) 是抗体亲和力成熟的主要机制之一，在免疫球蛋白基因组的可变区片段中发生一系列随机突变和基因重排^{17,18}。这种重排的目的是产生针对B细胞活化抗原表位的高亲和力抗体。除了体细胞高频突变，抗体还经历类别转换 (class-switch recombination, CSR) 过程，通过重链恒定区的DNA 重排表达不同类型的抗体 (IgG、IgM、IgE、IgD 或IgA)¹⁹。一旦抗体序列得到优化，未成熟的浆细胞分化为可分泌大量成熟抗体的成熟浆细胞，或者分化为静息记忆B细胞，直到抗原再次暴露导致它们的激活并分化为浆细胞¹⁵。

由于脾脏是宿主动物体内B细胞成熟和抗体生成的关键部位，它是动物免疫后获得成熟浆细胞的主要器官。

第三步：细胞融合产生杂交瘤

分离之后，B细胞与可无限增殖的癌细胞融合形成杂交瘤。细胞融合有两种方法，一种是聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 介导的，另一种方法是电融合。PEG介导细胞融合的作用机制尚不清楚，但有人认为，PEG作为一种亲水性分子，会导致细胞聚集和细胞膜脱水²⁰⁻²²。在此过程中，PEG增加了局部细胞的浓度，使两细胞接触点处质膜的脂类分子发生疏散和重组，由于两细胞接口处双分子层质膜的相互亲和以及彼此的表面张力作用，使细胞发生融合²⁰。另一方面，电融合是一个高度优化和可靠的过程，使得每单位脾细胞形成的杂交瘤数目较多（至少是PEG融合效率的4倍），成为杂交瘤细胞生产的首选方法²³⁻²⁷。在电融合过程中，B细胞和癌细胞混合并暴露在不同电压和频率的脉冲电场中。第一个电脉冲是将细胞拉近并对齐的一个交流波形，第二个脉冲是一种使细胞融合的直流波形，第三个交流脉冲维持并促进细胞融合过程的完成²⁷。

第四步 杂交瘤筛选&选择

融合之后，通过HAT培养基（次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶培养基）筛选融合的杂交瘤¹。通过HAT培养基进行筛选是因为只有成功融合的杂交瘤细胞在HAT培养基中才能存活几天以上。这是因为未融合的癌细胞的前体发生了突变，使得它们没有编码次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶的基因 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT)。由于这个突变，未融合的癌细胞无法通过核苷酸从头合成途径和补救合成途径生产核苷酸，并在融合后几天内迅速死亡。同样的，未被融合的B细胞由于没有合适的培养基和生长因子，无法存活一两天以上。因此，几天后，融合杂交瘤将是唯一存活下来的细胞系进入筛选。将杂交瘤细胞稀释到多孔板中，经过严格的筛选过程来选择针对免疫原的高特异性和高亲和力的抗体。在整个免疫过程中有几个不同的阶段，可进行杂交瘤的筛选，并最终从杂交瘤中纯化所需抗体。酶联免疫反应 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是从杂交瘤上清中筛选抗体抗原结合的常用方法^{28,29}。目前有多种ELISA方法（如直接ELISA、间接ELISA、夹心ELISA和竞争ELISA）用来评估和选择抗体的结合能力和亲和力³⁰。通过使用Biacore™表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)、荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 和微流体等技术开发了高通量、自动化的杂交瘤筛选方法³¹⁻³⁴。这些技术大大提高了筛选高抗原特异性抗体的效率和准确性 (表1)。

表1：高通量杂交瘤筛选技术

技术	筛选方法	原理	效率
Biacore™	利用生物传感器进行表面等离子体共振抗体筛选	将单克隆抗体从杂交瘤上清液中固定到流动细胞上，测定抗体与抗原的结合/解离结合率	可以得到~200抗体上清/天的结合动力学
荧光活化细胞分选 (FACS)	流式细胞分析仪	用荧光标签的抗原标记杂交瘤细胞并筛选（细胞内及细胞表面结合单克隆抗体检测）	可以筛选>300,000个杂交瘤克隆/天
微流体荧光活化液滴分选 (FADS)	流式细胞分析仪	杂交瘤细胞用荧光标记抗原包裹在液滴中进行筛选（细胞内、细胞表面结合和分泌单克隆抗体的检测）	可以筛选>300,000个杂交瘤克隆/天

杂交瘤经过抗体-抗原结合特异性和亲和力的筛选之后，许多研究者还进一步对其单克隆抗体进行鉴定。最常检测的抗体属性包括抗体浓度、效价、亚型、表位和可变区序列。将这些特性与亲和力和特异性分析的结果相结合，来确定用于单克隆抗体生产的杂交瘤。

第五步：单克隆抗体纯化

有几种方法可以从一个特定的杂交瘤克隆来扩大和纯化单克隆抗体。表2和表3列出了一些纯化方法，如体外杂交瘤培养上清纯化、体外重组抗体表达纯化和体内腹水制备纯化³⁵。通过上述方法纯化的单克隆抗体可用于多种免

疫学检测，如Western blotting、免疫沉淀、ELISA、免疫组化(IHC)、流式细胞术、FACS等。然而，如果抗体需要在一段时间后生产，杂交瘤细胞系可以在液氮中长期低温保存以便后续的使用。

表2：抗体纯化的方法

生产方法		预估的单克隆抗体产量	生产详情
体外	杂交瘤培养上清	1~3 mg/ml	- 杂交瘤的扩大培养：旋转瓶或摇瓶(最常见)，37°C培养2周 - 分离出含有单克隆抗体的细胞培养上清 - 使用亲和纯化方法(如protein A或G亲和柱)浓缩和纯化单克隆抗体
体外	重组抗体表达	从1~100 mg/ml不等 浓度随单抗、表达系统和 方法的不同而变化很大	- 对杂交瘤进行测序，确定抗体可变区的DNA序列 - 设计DNA结构，合成并克隆进合适的单克隆抗体表达载体 - 重组单克隆抗体表达载体被瞬时或稳定地转染到所需的表达系统中表达 - 采用亲和纯化方法对单克隆抗体进行收集、浓缩和纯化
体内	腹水	2.5~10 mg/ml	- 杂交瘤细胞被直接注射到小鼠或大鼠的腹腔 - 从动物腹部的高浓度腹水中生产单克隆抗体 - 抽出含有单克隆抗体的腹水 - 利用亲和纯化方法对单克隆抗体进行浓缩纯化

表3：不同单克隆抗体生产方法的优缺点

生产方法		优点	缺点
体外	杂交瘤培养上清	- 简单、经济、高效的工艺流程 (单抗仅需3周) - 最小批量生产流程 - 杂交瘤细胞系可低温保存，以备将来提供相同的单克隆抗体	- 可能需要大量的培养上清生产足够的高浓度单克隆抗体用于研究应用 (0.1-10 mg/ml)
体外	重组抗体表达	- 生产的单克隆抗体表达载体后期可用于单克隆抗体生产 - 可能高产量取决于表达系统、生长速率和纯化条件	- 需要昂贵的启动成本和技术经验 - 需要确定正确的表达载体&表达系统 - 必须建立和优化单克隆抗体表达方案 - 人力成本高，易受设计和生产重组DNA相关技术错误的影响
体内	腹水	- 从杂交瘤制备单克隆抗体的替代方法不适合体外生长条件 - 高效、简便的方法在体内产生高浓度单克隆抗体 (单抗仅需3周)	- 需要动物处理 - 单克隆抗体可能含有内源性小鼠免疫球蛋白，可被小鼠病原体污染

总结

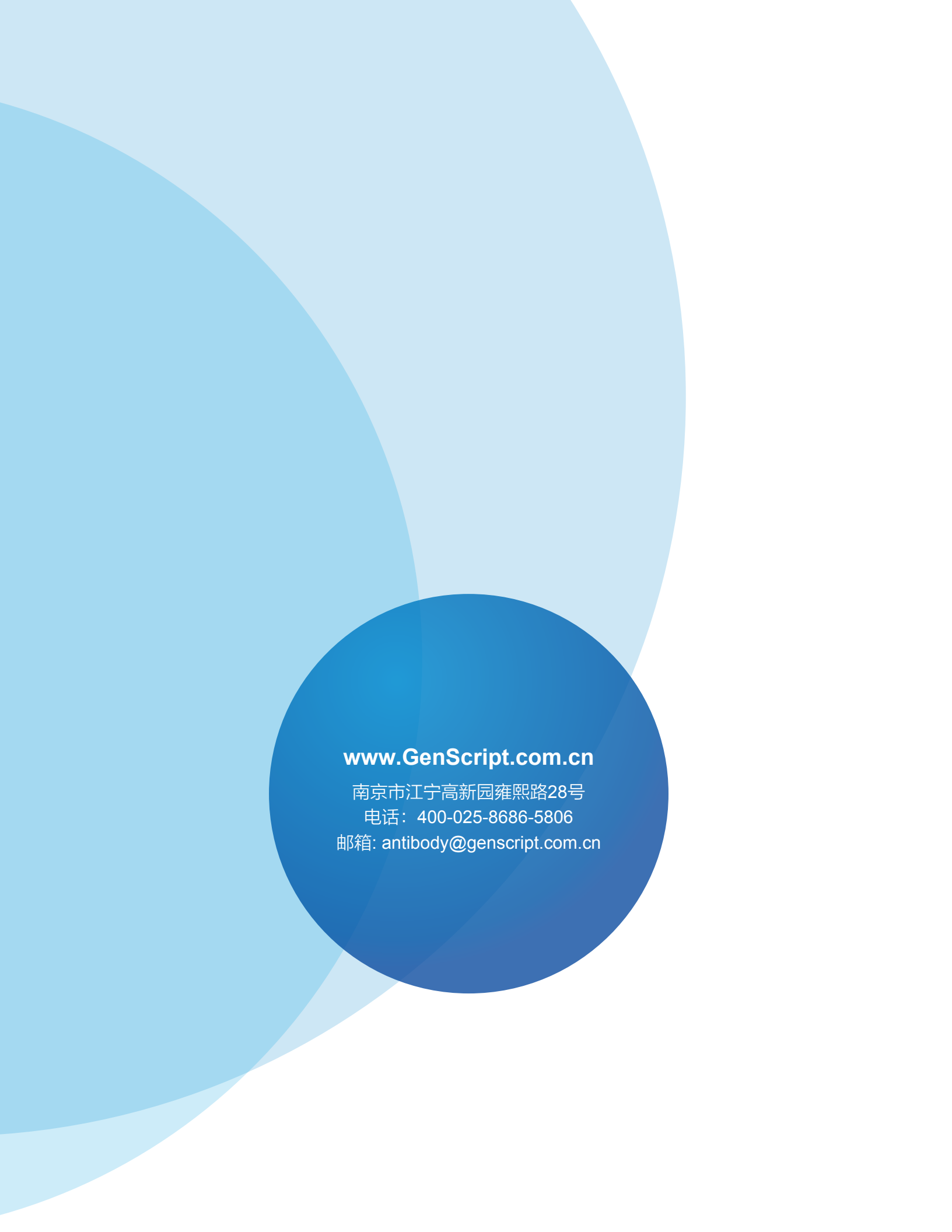
在本白皮书中，我们已经介绍了浆细胞成熟的基本原理，以及杂交瘤技术如何用于生产单克隆抗体。杂交瘤技术是一种高度优化、有价值 and 成本效益的体内单抗生成平台。我们相信，基于您的应用，金斯瑞杂交瘤技术平台能为您生产定制化的抗体。更多详细信息，请访问：

<https://www.genscript.com.cn/custom-antibody-production-services.html>

参考文献：

1. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497 (1975).
2. Nelson, A. L., Dhimoalea, E. & Reichert, J. M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 767 (2010).
3. Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology* (2005). doi:10.1038/nbt1135
4. Brüggemann, M. *et al.* Human Antibody Production in Transgenic Animals. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (2015). doi:10.1007/s00005-014-0322-x
5. Little, M., Kipriyanov, S. ., Le Gall, F. & Moldenhauer, G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol. Today* 21, 364–370 (2000).
6. Ilinskaya, A. N. & Dobrovolskaia, M. A. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 299, 70–77 (2016).
7. Timmerman, J. M. & Levy, R. Linkage of Foreign Carrier Protein to a Self-Tumor Antigen Enhances the Immunogenicity of a Pulsed Dendritic Cell Vaccine. *J. Immunol.* 164, 4797 LP-4803 (2000).
8. Erlanger, B. F., Borek, F., Beiser, S. M. & Lieberman, S. Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J. Biol. Chem.* (1957).
9. de Almeida, R. *et al.* Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. *mAbs* (2018). doi:10.1080/19420862.2017.1331804
10. Awate, S., Babiuk, L. A. & Mutwiri, G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front. Immunol.* 4, 114 (2013).
11. McKee, A. S., Munks, M. W. & Marrack, P. How Do Adjuvants Work? Important Considerations for New Generation Adjuvants. *Immunity* 27, 687–690 (2007).
12. Kuroda, E., Coban, C. & Ishii, K. J. Particulate Adjuvant and Innate Immunity: Past Achievements, Present Findings, and Future Prospects. *Int. Rev. Immunol.* 32, 209–220 (2013).
13. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3–S23 (2010).
14. Yatim, K. M. & Lakkis, F. G. A Brief Journey through the Immune System. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1274 LP-1281 (2015).
15. Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* (2015). doi:10.1038/nri3795
16. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–S40 (2010).
17. Di Noia, J. M. & Neuberger, M. S. Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* (2007). doi:10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740

18. Peled, J. U. . J. U. *et al.* The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* (2008). doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090236
19. Stavnezer, J., Guikema, J. E. J. & Schrader, C. E. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu. Rev. Immunol.* (2008). doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248
20. Lee, J. & Lentz, B. R. Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release. *Mol. Membr. Biol.* 16, 279–296 (1999).
21. Croce, C. M., Linnenbach, A., Hall, W., Steplewski, Z. & Koprowski, H. Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus. *Nature* 288, 488–489 (1980).
22. Olsson, L. & Kaplan, H. S. Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 5429 LP-5431 (1980).
23. Bischoff, R., Eisert, R. M., Schedel, I., Vienken, J. & Zimmerman, U. Human hybridoma cells produced by electro - fusion. *FEBS Lett.* 147, 64–68 (1982).
24. Karsten, U. *et al.* Monoclonal anti-cytokeratin antibody from a hybridoma clone generated by electrofusion. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 21, 733–740 (1985).
25. Kazuo Ohnishi, Joe Chiba, Yoji Goto & Tohru Tokunaga. Improvement in the basic technology of electrofusion for generation of antibody-producing hybridomas. *J. Immunol. Methods* 100, 181–189 (1987).
26. Karsten, U. *et al.* Direct comparison of electric field-mediated and PEG-mediated cell fusion for the generation of antibody producing hybridomas. *Hybridoma* (1988). doi:10.1089/hyb.1988.7.627
27. Schmitt, J. J., Zimmermann, U. & Neil, G. A. Efficient Generation of Stable Antibody Forming Hybridoma Cells by Electrofusion. *Hybridoma* 8, (1989).
28. Zhang, C. Hybridoma Technology for the Generation of Monoclonal Antibodies. in *Antibody Methods and Protocols* (eds. Proetzel, G. & Ebersbach, H.) 117–135 (Humana Press, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-931-0_7
29. Suter, L., Brügggen, J. & Sorg, C. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigens. *J. Immunol. Methods* 39, 407–411 (1980).
30. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72, 4–15 (2015).
31. Canziani, G. A., Klakamp, S. & Myszka, D. G. Kinetic screening of antibodies from crude hybridoma samples using Biacore. *Anal. Biochem.* 325, 301–307 (2004).
32. Parks, D. R., Bryan, V. M., Oi, V. T. & Herzenberg, L. A. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.76.4.1962
33. Debs, B. El, Utharala, R., Balyasnikova, I. V, Griffiths, A. D. & Merten, C. A. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11570 LP-11575 (2012).
34. Akagi, S., Nakajima, C., Tanaka, Y. & Kurihara, Y. Flow cytometry-based method for rapid and high-throughput screening of hybridoma cells secreting monoclonal antibody. *J. Biosci. Bioeng.* 125, 464–469 (2018).
35. Institute for Laboratory Animal Research & National Research Council. Monoclonal Antibody Production. (National Academy Press, 1999).



www.GenScript.com.cn

南京市江宁高新园雍熙路28号

电话: 400-025-8686-5806

邮箱: antibody@genscript.com.cn