单克隆抗体技术的诞生、现状和展望

高吉^{1†}, 何娟^{2†}, 王庆文^{2*}, 刘万里^{1*}

1. 清华大学生命科学学院, 免疫学研究所, 清华-北大生命科学联合中心, 北京 100084;

2. 北京大学深圳医院风湿免疫科, 深圳 518036

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: wqw_sw@163.com; liulab@tsinghua.edu.cn

Nature 于 2019 年末选出了其创刊 150 年历史上出版过的最具有历史影响力的 10 篇论文, 其中包括剑桥大学的阿根廷生物学家 César Milstein(色萨·米尔斯坦)和德国生物学家 Georges J. F. Köhler(乔治斯·科勒)^[1]在 1975 年发表的文章. 他们提出的利用杂交瘤细胞生产单克隆抗体(monoclonal antibody)的方法, 为此后半世纪的免疫学以及癌症和自身免疫性疾病治疗的医学研究提供了重要的工具和思路. 此文一经发表, 就引发了领域内研究者的热切关注. 当时德国科隆大学(Universität zu Köln)的免疫学家 Rajewsky 在为 *Nature* 撰写的新闻稿中这么评论道: “我当时立刻意识到我们的研究领域迎来了一个转折点.”^[2]

1 抗体的发现

1890 年, 德国生理学家 Emil von Behring 和日本微生物学家 Shibasaburo Kitasato^[3]在暴露于白喉毒素和破伤风毒素的动物血液中发现一种可以中和毒素的物质, 并将其命名为抗体(antibody). 与他们合作的德国科学家 Paul Ehrlich^[4]受当时关于酶与底物结合的“锁钥学说”启发, 提出抗体与毒素抗原相结合也是基于类似的化学结构原理. 20 世纪 20 年代, 美国免疫化学家 Michael Heidelberger 和美国微生物学家 Oswald Avery^[5]发现抗原可以被抗体沉淀, 并揭示抗体的化学本质是蛋白质. 1948 年, 瑞典免疫学家 Astrid Fagreaus^[6]发现由 B 细胞分化而成的浆细胞是产生抗体的效应细胞.

自被发现开始, 抗体便成为了科学界一个经久不衰的研究热点. 人们发现, 抗体在适应性免疫(adaptive immunity)中发挥着不可替代的核心作用, 并惊讶于抗体对各类抗原(antigen)分子兼具高度亲和力及高度特异性的结合能力. 然而, 想要得到识别特定单一抗原的抗体十分困难. 以当时的技术, 人们希望获得可以特异性识别流感病毒的抗体, 就需要用灭活的流感病毒来免疫模式动物(例如小鼠或兔子), 一段时间后从被免疫动物的血清中分离抗体. 由于血清中大量不同抗体的存在, 这样获得的抗体成分中能够特异性结合流感病毒的一般只有 0.5%~5%, 不仅特异性低, 而且可重复性也难有保障^[7]. 即使使用亲和层析技术

王庆文 北京大学深圳医院风湿免疫科主任, 医学博士, 主任医师, 研究生导师, 博士后合作导师. 从事临床医疗工作近 30 年, 擅长强直性脊柱炎、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、痛风性关节炎、结缔组织病、血管炎等风湿免疫病的诊治.

刘万里 清华大学生命学院、免疫学研究所、清华-北大生命科学联合中心研究员、博士生导师. 整合了交叉学科平台聚焦 B 淋巴细胞免疫学研究, 拓展了对 B 细胞免疫活化及相关疾病致病机理方面的认识.

也无法纯化流感病毒特异性的抗体, 因为亲和层析无法分离针对同一抗原不同表位(epitope)的抗体. 这样纯化出来的抗体也会是成千上万种针对不同表位抗体的混合物, 也就是所谓的多克隆抗体(polyclonal antibody). 这种多克隆抗体在科研临床应用有限, 那么, 如何才能生产出大量高纯度的针对单一抗原表位的特异性抗体呢?

2 单克隆抗体的诞生

20 世纪 60 年代, 多发性骨髓瘤(multiple myeloma)被人们发现. 作为一种浆细胞来源的肿瘤, 它在人体内可不受控制地无限增殖. 由于骨髓瘤细胞保持了浆细胞高效率分泌抗体的特性, 因此多发性骨髓瘤患者的血清和尿液中可以检测到大量被称为 paraprotein 的抗体和抗体片段(多为 IgA、IgG、 λ 轻链和 κ 轻链). 研究者利用骨髓瘤细胞的

这一特点对抗体进行了更深入的研究,虽然这些抗体还并非针对单一抗原表位的单克隆抗体,但是人们借此对抗体的生化基础有了更深的了解.肿瘤免疫学家 Michael Potter 发现,在特定品系的小鼠体内注射矿物油可以诱发小鼠产生骨髓瘤^[8],这为骨髓瘤和抗体研究提供了动物和细胞模型.

1974 年,毕业于瑞士巴塞尔免疫学研究所(Basel Institute for Immunology)的 Köhler 作为一名博士后加入了 Milstein 在剑桥大学的实验室.当时细胞融合技术正热门, Milstein 的团队尝试在一些小鼠骨髓瘤细胞系以及各种其他细胞(例如成纤维细胞)之间进行细胞融合^[9].然而细胞融合后杂交细胞分泌的抗体特异性不佳.恰好 Köhler 在巴塞尔免疫研究所攻读博士时了解到,当时的研究所所长 Niels Jerne 开发了一种可以筛选分泌单一抗体浆细胞的方法^[10],即通过含有绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC)的琼脂平板上的斑块(plaque)来筛选分泌针对 SRBC 单一抗原抗体的浆细胞.分泌识别 SRBC 抗体浆细胞团簇周围的红细胞会因为抗体结合后的作用而发生细胞裂解,从而形成一块肉眼可见的没有红色斑块的区域.但是由于缺乏永生性,这些能够分泌单一性抗体的浆细胞无法被培养,进而无法实现抗体的大规模生产.因此, Köhler 和 Milstein 想到,如果能够将分泌单一抗体的浆细胞和无限增殖的骨髓瘤细胞融合,就可以一举解决稳定持续大量地生产单一性抗体这一难题.

Köhler 和 Milstein 的实验(图 1)设计获得了成功——当他们把注射了 SRBC 的小鼠脾脏细胞取出,与 P3-X67Ag8 骨髓瘤细胞系融合,并在含有 SRBC 的琼脂平板上培养后,在没有红色斑块的区域分离出了大量既像浆细胞一样分泌抗 SRBC 抗体又像骨髓瘤细胞一样具有永生性的融合细胞.在他们使用的 HAT 培养基中,由于氨基蝶呤(aminopterin)阻断了 DNA 核苷酸的从头合成途径,细胞必须利用自己

的 DNA 核苷酸补救合成途径以及培养基中的次黄嘌呤(hypoxanthine)和胸腺嘧啶(thymidine)才可以生存.但是这里使用的骨髓瘤细胞系缺少 DNA 补救合成途径中的必要酶,即次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT),因此无法正常增殖,脾脏细胞则本身不具有永生性.这样,能够在他们设置的培养条件下正常增殖的细胞,必然是既拥有 HGPRT,可以正常合成 DNA,又具有无限分裂特性的融合细胞.当然他们这样设计的实验能够成功,有一定运气,后来人们知道骨髓瘤细胞明显倾向和脾脏细胞融合,而不是发生自体融合^[12].

Köhler 和 Milstein 培养出的融合细胞被称为第一代杂交瘤(hybridoma)细胞,可以进行无限的培养、增殖和抗体分泌.但是在技术层面,由于他们当时使用的 P3-X67Ag8 骨髓瘤细胞系会内在性地分泌自身基因组编码的抗体,因此第一代杂交瘤细胞分泌的浆细胞来源特异性抗体中会掺杂骨髓瘤来源的非特异性抗体.不过很快地,一类不会内在性地分泌骨髓瘤来源非特异性抗体的 X63-Ag8.653 骨髓瘤细胞系被免疫学家 Rajewsky 的研究团队成功分离.使用 X63-Ag8.653 骨髓瘤细胞跟来自脾脏的浆细胞进行融合,很好地解决了第一代杂交瘤细胞培养上清中两种抗体混杂的问题^[11,12].

从此,可以高度特异性结合人们需要的各类抗原的单克隆抗体终于可以在体外被制造出来,并在实验室研究和医疗应用中得到了极大的应用.1984 年, Milstein、Köhler 和发现骨髓瘤诱导产生方法的 Potter 被授予生物学领域知名的拉斯克奖,同年的诺贝尔生理学或医学奖则被颁给 Milstein、Köhler 和发明平板筛选 SRBC 特异性抗体方法的 Jerne.

非常值得一提的是,剑桥大学 Milstein 实验室在单克隆抗体技术投入应用后毅然放弃了这些技术的专利权,使得全世界的研究者和病人不需要支付额外的专利费用就

图 1 (网络版彩色)Köhler-Milstein 实验中单克隆抗体的制备^[2]

Figure 1 (Color online) Generation of monoclonal antibody in Köhler-Milstein experiment^[2]

可以享受使用单克隆抗体技术生产的试剂和药品。为此, Milstein 曾说过, “只有当世界上真正穷苦的人们也能平等地分享科学带来的好处时, 科学才算是兑现了它的诺言”^[13]。Milstein 的义举, 在物质至上的社会, 也的确引起一些争议。后来有推测或许是因为 Milstein 出生于 1927 年社会动荡的阿根廷, 这些成长早期的社会经历使得 Milstein 真正理解并不宽裕的广大人民群众对科技进步带来的相关成果的急迫需求。

3 单克隆抗体在基础研究中的应用

Köhler 和 Milstein 的发现创立了具有划时代意义的单克隆抗体技术, 对生物医学的影响是巨大的。单克隆抗体在研究中主要用于两个方面: 第一, 用于研究抗体本身的性质及其产生的机理; 第二, 用于生产与特定蛋白质或其他特定分子结合的试剂。

在第一方面, 相比之前无法确保同质性和特异性的抗体制备, 使用新技术生产的高纯度、高浓度的单克隆抗体自然对抗体特异性的研究有更大的帮助。此后不久, 人们便发现抗体的可变区(V)和恒定区(C)是由不同的基因片段编码的。B 细胞将这些基因片段连接在一起, 便形成了识别不同抗原的抗体。其中具有结合抗原能力的抗体可变区, 其基因片段会进行高达 10^{12} 种可能性的重组, 抗体库的多样性由此产生。另外由于抗原刺激介导的体细胞超突变(somatic hypermutation)使得抗体应答进程中抗体亲和力不断提高, 也就是抗体亲和性成熟(affinity maturation)。单克隆抗体技术推动了在分子层面阐释抗体产生的分子机理。此外, 由于抗体在免疫系统中的核心地位, 单克隆抗体技术的出现, 也让人们对获得性免疫和体液免疫有了更进一步、更深层次的了解。

在第二方面, 单克隆抗体技术提供了对生物大分子(主要是蛋白质)进行准确定性、定量、定位的手段, 如今已经渗透到生物医学研究的各个方面, 诸如通过细胞表面蛋白标记对细胞进行分类筛选分析的荧光细胞分选技术、展示细胞内特定蛋白定位的高分辨率荧光显微镜、检测蛋白质混合物中特定蛋白表达量的蛋白印迹法(Western blot)、常用于血清中细胞因子表达量测定的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等, 这些技术的特异性和分辨率都离不开高质量的单克隆抗体试剂的助力。值得一提的是, 得益于荧光标记单抗的发展, 我们现在已经能够在单细胞水平对细胞表面的蛋白质标志物表达图谱进行高通量的绘制与分析^[14]。

4 单克隆抗体在医药领域的成功

尽管早期对抗体的产生和作用机制了解得并不透彻, 但是自从被发现以来, 抗体就被医学界和工业界应用于早期的血清疗法、疾病诊断等多个方面。单克隆抗体技术的出

现, 更为抗体类药物的发展插上了腾飞的翅膀。1986 年, 仅在单克隆抗体制备技术诞生 10 年后, 美国 FDA 就批准了全球首个治疗性鼠源单抗, 一种名为 muromonab-CD3 的抗 CD3 抗体, 用于治疗器官移植后同种异体排斥反应^[15]。随后几十年, 单克隆抗体类药物在生物医药领域得到了飞跃式发展, 如今已经有约千亿美元的巨大市场, 并且在可预见的未来仍将继续增长, 再加上抗体在疾病诊断上难以替代的地位, 单克隆抗体在医药领域的应用可谓是公认的成功。

最初, 把来源于小鼠的单克隆抗体用于人类疾病治疗, 但在人体内半衰期短且引发免疫排斥风险等问题, 效果并不好。这是因为人体的免疫系统会把小鼠的抗体蛋白识别为“异己”成分, 并产生针对小鼠抗体的抗体; 但小鼠抗体的恒定区段无法和人类细胞的新生 Fc 段受体(FcRn, 也被翻译为滋养层细胞表面相应受体)结合, 从而难以在人体循环系统中稳定存在^[16]。为解决这个问题, 1988 年, Greg Winter 团队首先发展了人源化嵌合单克隆抗体。他们将抗体基因中与特异性无关的恒定区替换为人类抗体的同源区段, 在没有丧失特异性的前提下提高了单克隆抗体药物在人体内的稳定性, 这是单抗临床应用领域的重要进步^[17]。人源化嵌合单克隆抗体并不完美, 因为对人体的免疫系统来说, 毕竟嵌合的抗体分子中仍有非人源成分, 人体强大的免疫系统依然能够识别它们并产生针对嵌合抗体的抗体。为了进一步减少单克隆抗体中的鼠源成分, 研究者们索性将鼠抗体上的超变区氨基酸结构域直接移植至人源的抗体分子, 从而改良出比嵌合抗体更进一步的、分子结构同源性达到 95%的人源化抗体。即使如此, 鼠源抗体的 Frame Region 还是无法彻底的人源化, 但是人类追求卓越的脚步并未停止。随后不久, 借助分子生物学及基因工程技术等的快速进步, 噬菌体抗体库技术、核糖体展示技术、RNA-多肽融合技术和人类抗体库转基因小鼠制备技术的发展最终实现了全人源化抗体的飞跃^[18](图 2)。

在肿瘤与自身免疫性疾病治疗方面, 单克隆抗体获得成功尤其令人瞩目。现在临床上使用的利妥昔单抗(Rituximab)就是一种抗 CD20 人-鼠嵌合性单克隆抗体, 也是第一个被批准用于肿瘤治疗的单克隆抗体, 主要应用于 B 细胞非霍奇金淋巴瘤。利妥昔单抗能够显著延长肿瘤患者的无进展生存和 5 年总生存率, 在肿瘤内科治疗史上具有划时代的意义^[19]。而单抗类药物中的“明星产品”——阿达木单抗(Adalimumab/Humira)则是一种抗 TNF- α 全人源化单克隆抗体, 自 2003 年美国 FDA 批准以来已经在全球 90 多个国家获批治疗类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病关节炎、克罗恩病等 15 个适应症, 相关系列产品的年销售额近 200 亿美元, 位列全球抗体类药物销量首位, 其疗效及安全性得到了广泛验证与认可^[20,21]。近年来更是诞生了抗体-偶联药物、双特异性及多特异性抗体、抗体融合蛋白、小分子抗体等多种新型单克隆抗体, 使得单抗类药物具有更大的生命力及发展前途^[21-23]。

图2 利用转基因小鼠进行全人源单克隆抗体生产的流程

Figure 2 Process of human monoclonal antibody production utilizing transgenic mice

针对传染病的单克隆抗体也有其发展前景,正如百多年前 Berhing 和 Kitasato 所期待的那样。新临床研究显示,两种治疗埃博拉出血热的单抗类药物 MAb114 和 REGN-EB3 可有效降低感染者的死亡率,其疗效均优于既往被寄予厚望的其他药物^[24]。MAb114 是一种从 1995 年刚果埃博拉幸存者的血液中提取筛选的单克隆抗体。REGN-EB3 则是再生元公司开发的 3 个全人源化抗埃博拉病毒单克隆抗体组合而成的“鸡尾酒”。这两种单抗类药物为战胜埃博拉病毒带来了新的希望和曙光。同时,MAb114 的成功也再次将康复病人血清抗体的治疗作用推向了研究的“风口浪尖”,更让人们想起了 2003 年 SARS(severe acute respiratory syndrome)时期,将病愈个体的血清注入 SARS 患者体内从而治愈病患的情况^[25]。

当前新型冠状病毒正在全球横行肆虐,其传染性之强、致病率之高让人措手不及,而常规临床“特效药”的缺乏更是阻碍了疫情的防控及治疗。那么此时新型冠状病毒病愈患者的血清抗体是否可以成为临床治疗的一种选择,研究者们是否能够从康复患者血清抗体中筛选出如 MAb114 一样有治疗前途的抗新型冠状病毒单克隆抗体呢?为了寻找新冠肺炎(COVID-19)的有效疗法,深圳市第三人民医院的研究者们评估了将恢复期患者血浆用于 5 例危重患者后的效果,发现有 4 例患者的炎症指标 IL-6、C 反应蛋白和降钙素原下降,全部 5 例患者的病毒载量在输入血浆后下降且均在 12 d 内转阴^[26]。另外一项对 10 例危重患者给予恢复期患者血浆的国内研究也显示该方案耐受性较好,恢复期血浆可显著增加或维持患者体内高水平的中和抗体,使得病毒载量在治疗后 7 d 内转阴,患者症状 3 d

内得到明显改善^[27]。这些临床研究虽然病例数很少,但仍然预示了恢复期患者血浆在新冠肺炎治疗中的潜在作用。国家卫生与健康委员会发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)》也将康复者血浆治疗增加到了治疗方案之中。虽然迄今为止还没有针对 COVID-19 的治疗用单克隆抗体,但是已经有研究者发现某些针对 SARS 病毒的单克隆抗体对 COVID-19 病毒有较好的交叉中和活性^[28],甚至在细胞水平观察到了抗感染活性^[29]。我们相信,不久科学家们一定能攻破难关,给人类带来更多的希望。

疟疾、流感以及 AIDS 等常见传染病的猖獗还催生了广谱中和单克隆抗体(broadly neutralizing antibodies)的概念。这类单克隆抗体的联合使用与 AIDS 治疗领域传统化学药物“鸡尾酒”疗法可能有着异曲同工之意,人们期望这类药物的应用可以针对传染性疾病提供广泛的预防和保护作用^[30]。单抗在生物医药领域内更具创新性的尝试还有许多,例如利用非抗体类受体的配体结合结构域来替代抗体可变区段的抗体工程技术^[31]。然而,研究发现,天然的免疫系统有时也会使用类似的花招^[32],但总体上来说,至少在目前,人工设计抗体的手段还无法在效率和特异性上与历经千万年进化历程考验的免疫系统相比^[33]。

尤其值得一提的是,免疫检查点抑制剂药物 anti-PD-1(如已在国内上市的施贵宝公司的纳武单抗 Opdivo 及默沙东公司的派姆单抗 Keytruda)和 anti-CTLA-4(如施贵宝公司的易普单抗 Yervoy)就是单抗类药物家族中的重要成果代表。免疫疗法背后的详细作用机制虽然仍未完全阐明,但大量基础和临床层面的研究正在如火如荼地进行,这些研究势必将会提供新的挑战 and 视角,并将继续推动针对其他靶点的单克隆抗体药物的发展。

现在单克隆抗体的制备已经不再依靠杂交瘤技术,而是直接从免疫过后的动物或病人体内分离细胞,再将这些细胞内编码特定抗体的基因转入合适的细胞系中,来制备我们需要的单克隆抗体^[34-36]。随着技术的不断发展与完善,单克隆抗体已经渗透在人们生活的方方面面。尤其是在生物医药领域,单克隆抗体已当之无愧地成为主流新秀。科技的发展、人们的需求以及广阔的前景促使着单克隆抗体研究不断深入,我们期待着将来会不断有更优化的单克隆抗体产品问世,守护健康,造福人类。

“问渠哪得清如许,为有源头活水来”。值得我们铭记的是,单克隆抗体过去、现在和明天的传奇是从 1975 年 Köhler 和 Milstein 在实验室里制作的那几个涂上了绵羊红细胞的琼脂平板这样最基础的科学研究开始的!

致谢 感谢并致歉未被列入参考文献的相关科学论文。感谢深圳市医疗卫生“三名工程”(SZSM201612009)和国家自然科学基金(81621002, 31811540397, 81974253, 81901641)资助。

推荐阅读文献

- 1 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495–497
- 2 Rajewsky K. The advent and rise of monoclonal antibodies. *Nature*, 2019, 575: 47–49
- 3 von Behring E, Kitasato S. Ueber das zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. *Sonderdr Aus Dtsch Med Wochenschr*, 1890, 49: 1113–1114
- 4 Winau F, Westphal O, Winau R. Paul Ehrlich—In search of the magic bullet. *Microbes Infect*, 2004, 6: 786–789
- 5 van Epps H L. Michael Heidelberger and the demystification of antibodies. *J Exp Med*, 2006, 203: 5
- 6 Silverstein A M. Labeled antigens and antibodies: The evolution of magic markers and magic bullets. *Nat Immunol*, 2004, 5: 1211–1217
- 7 Bradbury A, Plückthun A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature*, 2015, 518: 27–29
- 8 Potter M, Boyce C R. Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature*, 1962, 193: 1086–1087
- 9 Cotton R G H, Milstein C. Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature*, 1973, 244: 42–43
- 10 Jerne N K, Nordin A A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 1963, 140: 405
- 11 Galfre G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Methods Enzymol*, 1981, 73: 3–46
- 12 Kearney J F, Radbruch A, Liesegang B, et al. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol Baltim Md*, 1979, 123: 1548–1550
- 13 César M. César Milstein (1927–2002). *Scand J Immunol*, 2002, 56: 108–109
- 14 Todorovic V. Single-cell RNA-seq—Now with protein. *Nat Methods*, 2017, 14: 1028–1029
- 15 Smith S. Ten years of orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): A review. *J Transpl Coord*, 1996, 6: 109–121
- 16 Ober R J, Radu C G, Ghetie V, et al. Differences in promiscuity for antibody–FcRn interactions across species: Implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol*, 2001, 13: 1551–1559
- 17 Riechmann L, Clark M, Waldmann H, et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*, 1988, 332: 323–327
- 18 Rodgers K R, Chou R C. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions. *Biotechnol Adv*, 2016, 34: 1149–1158
- 19 Keating G M. Rituximab: A review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs*, 2010, 70: 1445–1476
- 20 Burmester G R, Panaccione R, Gordon K B, et al. Adalimumab: Long-term safety in 23458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72: 517–524
- 21 Gao Q, Jiang H. Current status and trend of R&D of monoclonal antibodies (in Chinese). *China Biotech*, 2019, 39: 111–119 [高倩, 江洪. 全球单克隆抗体药物研发现状及发展趋势. *中国生物工程杂志*, 2019, 39: 111–119]
- 22 Schmid A S, Neri D. Advances in antibody engineering for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15: 197–207
- 23 Suurs F V, Lub-de Hooge M N, de Vries E G E, et al. A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges. *Pharmacol Ther*, 2019, 201: 103–119
- 24 Mulangu S, Dodd L E, Davey R T, et al. A randomized, controlled trial of ebola virus disease therapeutics. *N Engl J Med*, 2019, 381: 2293–2303
- 25 Tsang K, Zhong N S. SARS: Pharmacotherapy. *Respirology*, 2003, 8: S25–S30
- 26 Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA*, 2020, 323: 1582–1589
- 27 Duan K, Liu B, Li C, et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 9490–9496
- 28 Tian X, Li C, Huang A, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 382–385
- 29 Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, 2020, 11: 2251
- 30 Walker L M, Phogat S K, Chan-Hui P Y, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*, 2009, 326: 285–289
- 31 Gardner M R, Kattenhorn L M, Kondur H R, et al. AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature*, 2015, 519: 87–91
- 32 Tan J, Pieper K, Piccoli L, et al. A LAIR1 insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens. *Nature*, 2016, 529: 105–109
- 33 Verkoczy L, Alt F W, Tian M. Human Ig knockin mice to study the development and regulation of HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Immunol Rev*, 2017, 275: 89–107
- 34 Scheid J F, Mouquet H, Feldhahn N, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature*, 2009, 458: 636–640
- 35 Traggiai E, Becker S, Subbarao K, et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: Potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*, 2004, 10: 871–875
- 36 Steinitz M, Klein G, Koskimies S, et al. EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, 1977, 269: 420–422

Summary for “单克隆抗体技术的诞生、现状和展望”

Monoclonal antibodies: Emergence, present and outlook

Ji Gao^{1†}, Juan He^{2†}, Qingwen Wang^{2*} & Wanli Liu^{1*}

¹ Institute for Immunology, School of Life Sciences, Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

² Department of Rheumatism and Immunology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: wqw_sw@163.com; liulab@tsinghua.edu.cn

Monoclonal antibodies are of great use in research and clinic. The first monoclonal antibody production method, hybridoma technology, was marked in the paper “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity” by Milstein and Köhler in 1975 in *Nature*. Based on that paper, we took a retrospective and forward look of this technique. In the early research of antibodies and B cells, the low specificity and bad reproductivity of polyclonal antibodies called for new methods to produce highly specific antibodies. Fortunately, the scientists encountered the key prerequisites of the hybridoma method: (1) Mouse multiple myeloma cell lines, which can secrete antibodies and infinitely reproduce *in vitro*; (2) SRBC (sheep red blood cell) plates that can screen the cells secreting anti-SRBC antibodies; (3) proper cell fusion methods like Sendai virus and PEG. Based on all these materials and methods, Milstein and Köhler fused spleen cells of immunized mice with mouse myeloma cell line P3-X67Ag8 by inactivated Sendai virus and screened to clone the fused cells that can secrete anti-SRBC antibodies. They also used HAT medium to ensure that only fused cells from spleen cells and myeloma cells can survive. In this way, they obtained the immortal cells that can produce a single type of antibody with a predefined antigen-specificity, or say, hybridoma cells that can produce monoclonal antibodies. This powerful tool of hybridoma was quickly applied and improved. Milstein and Köhler were awarded the Nobel prize and Lasker award in 1984. Despite the great commercial potential of hybridoma in medication and science research, Milstein and Köhler did not patent the method, making it free to use by anyone in the world. The monoclonal antibodies produced by hybridoma were proved highly versatile in the laboratory. Besides great insights provided to us in basic immunology research, they become the indispensable tool to precisely qualify, quantify, and localize macromolecule in all fields of research. Fluorescence imaging, Western blotting, flow cytometry and microarray methods all make use of monoclonal antibodies. Upon chimera, humanized and human monoclonal antibody development, the application and success of monoclonal antibodies on the biopharma market are even greater. Monoclonal antibody medicines to treat cancer and autoimmune diseases are making billions of dollars every year. Notably, among these medicines, anti-PD-1 and anti-CTLA-4 are awarded Nobel prize in 2018 as anti-tumor immune checkpoint inhibitors. Monoclonal antibody medicines for contagious diseases like Ebola also shows advantages over others. For the new outbreak of COVID-19 around the world, monoclonal antibodies are also promising in offering new cures. Presently, the production of monoclonal antibodies is no longer solely dependent on hybridoma technology. Transgenic and recombinant DNA technology are creating new possibilities in this ever-growing field.

monoclonal antibody, immunology, science history, hybridoma, monoclonal antibody medicine

doi: 10.1360/TB-2020-0490