

抗体药物表达技术最新进展

张梦筱, 朱建伟, 路慧丽

上海交通大学 药学院 细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心, 上海 200240

张梦筱, 朱建伟, 路慧丽. 抗体药物表达技术最新进展. 生物工程学报, 2019, 35(2): 171-182.

Zhang MX, Zhu JW, Lu HL. Advances in antibody drug expression techniques. Chin J Biotech, 2019, 35(2): 171-182.

摘要: 生物技术药物是 21 世纪医药工业发展的中坚力量, 其中单克隆抗体类药物是生物技术药物的典型代表, 是恶性肿瘤、自身免疫病等领域全球销售额最高的药品种类。在抗体药物发展的几十年里, 随着基因工程、蛋白质工程等领域的发展, 抗体生产的宿主细胞建立、表达、纯化等各阶段的技术均不断取得突破, 文中综述和讨论了抗体药物生产所采用的真核哺乳动物细胞表达系统、原核大肠杆菌表达系统、转基因动物反应器、无细胞蛋白质合成系统以及相关的关键技术进展。

关键词: 抗体药物, 表达系统, 哺乳动物细胞, 生产, CRISPR

Advances in antibody drug expression techniques

Mengxiao Zhang, Jianwei Zhu, and Huili Lu

Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: The 21st century is regarded as the century of biotechnological drugs, among which monoclonal antibodies and their derived targeting drugs have established themselves as the leading modality of biopharmaceutical pharmaceuticals for a wide range of indications covering malignant tumors and autoimmune disorders. Since the manufacturing of the first antibody drug from hybridoma cells, the technologies have been intensely studied and there emerged numerous breakthroughs in recombinant cell line establishment, antibody expression and purification, quality control and other related areas. This article summarizes the critical progresses of antibody drugs expression technologies, especially of mammalian cell expression system, *Escherichia coli* expression system, the transgenic animal reactor and the cell free protein synthesis system, to give a detailed illustration of the recent advances in antibody drugs development.

Keywords: antibody drugs, expression system, mammalian cells, manufacturing, CRISPR

Received: May 11, 2018; **Accepted:** July 2, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81773621), Shanghai Scientific and Technological Innovation Project (No. 17431904500).

Corresponding author: Huili Lu. Tel: +86-21-34204631; E-mail: roadeer@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81773621), 上海市科委科技创新行动计划项目 (No. 17431904500) 资助。

网络出版时间: 2018-07-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180720.1006.003.html>

抗体药物是利用人体免疫系统,通过抗原抗体的特异性反应达到靶向阻断或消灭携带抗原的细胞或抗原本身、达到治疗疾病目的的大分子药物。2000年之后,随着肿瘤病理机制的研究不断深入,人们陆续发现大量的疾病治疗新靶标,例如 CTLA-4、PD-1/PD-L1^[1]、CD27^[2]、TNF^[3]和 IL-6^[4]等。针对这些靶点,以单克隆抗体为主的大分子药物用于临床,成为“精准医疗”的重要组成部分。在肿瘤研究领域,有多种特异性杀伤肿瘤细胞的经典抗体药物如 Trastuzumab injection (罗氏,商品名 Herceptin)^[5]、Bevacizumab (罗氏,商品名为 Avastin)^[6]等,以及近年获批的通过激活肿瘤免疫发挥作用的 PD-1 单克隆抗体 Nivolumab (百时美施贵宝,商品名 Opdivo)^[7]和 PD-L1 单克隆抗体 Atezolizumab (基因泰克,商品名 Tencentric)^[8]等。而在自身免疫性疾病治疗方面,以抗体为主的生物药物更是占主导地位。例如治疗类风湿性关节炎的阿达木单抗(艾伯维,商品名 Humira)^[9],从2012年开始,它连续多年蝉联世界上最畅销的药物榜首^[10]。由于出色的临床效果和市场占有率,较早上市的一批抗体药物的专利保护逐渐到期,抗体药物的类似药发展也如火如荼,使得越来越多的抗体药物加速涌入市场。

单克隆抗体技术是在1975年由英国科学家 Milstein 和 Kohler 所发明,并获得1984年诺贝尔医学奖^[11]。而在随后的短短40年内,抗体的工业生产得到了长足发展。目前的单克隆抗体主要分为鼠源性单克隆抗体,人鼠嵌合抗体(由鼠源的可变区和人源的恒定区组成)^[12],人源化单克隆抗体^[13],人源性单克隆抗体等^[14];从分子形式上又可分为全长抗体,抗原结合片段(Antigen-binding fragment, Fab)^[15],单链抗体(Single chain antibody fragment, scFv)^[16],单域抗体,最小识别单位等。此外,随着技术进步,出现了能够识别两个或多个靶点的双特异性抗体^[17]、多特异性抗体^[18],以及抗体偶联小分子药物^[19](Antibody-drug conjugates,

ADC)或免疫毒素^[20](Immunotoxin)等新型抗体药物。

机体分泌抗体的细胞是B细胞,将其与骨髓瘤细胞融合在一起就可获得既能够产生单克隆抗体又具有永生化能力的杂交瘤细胞,从而实现抗体的长期制备^[21-22]。然而,杂交瘤细胞基因组通常不稳定,且天然免疫动物产生的抗体注射到人体内易产生免疫原性^[23],目前杂交瘤技术所制备的抗体多用于诊断试剂类产品,而临床应用的抗体类药物则需采用稳定性较好的工程系统进行制备,包括哺乳动物细胞表达系统、大肠杆菌表达系统、转基因动物反应器与无细胞系统。而这些领域的关键技术在最近几年取得令人瞩目的进展,文中将对其进行综述和分析。

1 哺乳动物细胞表达系统

重组蛋白生产系统分为原核表达系统和真核表达系统,真核表达系统包括昆虫细胞表达系统、植物细胞表达系统、酵母细胞表达系统和哺乳动物细胞表达系统等。哺乳动物细胞是临床抗体药物产品使用的主要的真核重组蛋白生产系统类型,与原核及其他真核表达系统相比具有以下优势:1)能够完成产物的翻译后修饰,可形成正确的二硫键和高级结构,且分泌表达便于下游纯化;2)生产过程无内毒素污染;3)技术成熟,单克隆抗体表达水平高,产量可达10-20 g/L^[24-25]。常用的哺乳动物细胞有中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cells, CHO),人类胚胎肾(Human embryonic kidney cell, HEK)293细胞,小鼠骨髓淋巴瘤细胞(NS0和Sp2/0-Ag14)等^[26]。

对于哺乳动物细胞表达系统,人们仍致力于提高产量及产品的质量稳定性,从各个方面不断进行研究,主要包括:1)通过基因编辑对细胞翻译修饰和分泌能力进行改进,包括靶向参与糖基化相关基因来提高抗体依赖性细胞毒性(Antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)等的

功能或整合目标基因至特定位点,提高细胞株稳定性;2) 延长细胞存活及生产时间,从而提高产量,如通过靶向促凋亡基因,改变细胞代谢和采用生产过程控制^[27];3) 在瞬时转染系统中优化表达载体,提高抗体工业生产中哺乳动物细胞的生产滴度,并研究瞬时表达系统的稳定性,实现快速临床前样品的制备和筛选^[28]。

1.1 基因编辑技术改造哺乳动物细胞

基因编辑技术是对基因组进行精确修饰的一种生物技术,通过 DNA 双链的断裂,引发 DNA 修复系统进行非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (Homologous recombination, HR)^[29]从而导致基因的定点突变、敲除和插入。常用的三大基因编辑技术包括锌指核酸酶技术 (Zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活效应因子核酸酶技术 (Transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 和规律成簇的间隔短回文重复 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 基因编辑技术^[30]。研究人员目前能够采用基因编辑技术高效地改造哺乳动物细胞基因组,从而使其获得理想的表达性能。

单个 ZFNs 单位是由 3-4 个锌指蛋白串联而成的 DNA 识别域与一个非特异性限制性内切酶单体融合产生的。两个锌指核酸酶单位通过结合 DNA 的两条相反链,使该非特异性限制性内切酶形成二聚体,从而对 DNA 链进行切割,再通过 DNA 修复系统进行修复,从而达到基因编辑的目的^[31]。但 ZFNs 容易形成同源二聚体,也存在单个 ZFNs 单位切割的现象。虽然研究人员对其特异性进行了相关改造,但还是存在脱靶现象和细胞毒性。单个 TALENs 单位由能特异性识别 DNA 序列的 TAL 效应子和核酸酶组成。其 DNA 识别域识别单个核苷酸,故在构建 TALENs 质粒载体时需要根据靶位点编码区构建 DNA 识别模块^[32]。TALENs 相比 ZFNs 有更长的识别区域,但其识别

区域模块化的组装复杂且昂贵,大多依靠相关公司进行构建和生产。在 2013 年,张锋团队开发出了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,是目前最简便高效的基因编辑系统^[30]。该技术利用一种来源于原核生物中的抵抗外源基因入侵的获得性免疫系统,由 RNA 指导的 Cas 蛋白对靶基因进行修饰^[29],可以实现多位点编辑。虽然 CRISPR/Cas9 伴随着不容忽视的脱靶效应,但它操作简便、成功率高,是至今为止最先进的基因编辑技术和生物医药领域的研究热点。

1.1.1 改善糖基化修饰提高抗体产品抗肿瘤活性

在免疫过程中,抗体常通过两种途径杀死靶细胞来执行其免疫功能:1) Fc 区被 C1q 结合,激活补体级联并形成膜攻击复合物的补体依赖性细胞毒性 (Complement dependent cytotoxicity, CDC);2) Fc 区与天然杀伤细胞 (Natural killer cell, NK) 的 Fc 受体 FcγR III 识别,并释放导致细胞溶解物质的 ADCC 作用^[33]。研究发现,人类 IgG1 抗体的 N-聚糖中去除核心岩藻糖,能够提高 Fc 与 FcγR III 受体的亲和力,从而可显著提高 ADCC^[34]。

核心岩藻糖通常由两个关键步骤合成:1) α-1.6-岩藻糖基转移酶 (Fucosyltransferase-8, FUT-8) 能将核心岩藻糖转移到抗体的 N-聚糖上^[35];2) *Slc35c1* 基因合成 GDP-岩藻糖转运蛋白,使 GDP-岩藻糖转运到高尔基体中,使其核心岩藻糖化^[33]。研究人员已成功使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 CHO 细胞中敲除合成 FUT-8 的基因^[34],并通过 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术来敲除 *Slc35c1* 基因,以产生去岩藻糖基化抗体。通过比较这 3 种基因编辑技术在敲除 *Slc35c1* 基因中的作用,研究人员发现 CRISPR/Cas9 基因编辑技术虽然具有脱靶现象,但具有最高的基因修饰活性。与之相比,ZFNs 由于受锌指之间的串扰和 3 bp 目标位点的重叠效应引起的锌指单元的上下依赖效应而变得复杂,

而 TALENs 技术由于不能在设计阶段预知其作用的效果以及发挥作用的部分而受到限制^[33]。

在 Fc 区的 Asn297 残基处的双触角 N-聚糖分支中的半乳糖对抗体功能也起着十分关键的作用, 研究报道在此位点半乳糖的增加同样可以提高 ADCC 和 CDC 的活性^[36]。在野生型 CHO 细胞中, IgG 的糖型主要是 G0F 和 G1F。最近的一项研究中, 研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 CHO 细胞中 Fc 区的两种 α -2,3-唾液酸转移酶位点, 使 Asn297 残基更容易接受糖基转移酶, 从而实现了 80% G2F 糖型的表达。但在后续敲除 FUT-8 后, 总体完全半乳糖基化聚糖的相对比例下降, 提示岩藻糖基转移酶与半乳糖基转移酶或 N-乙酰葡萄糖氨基转移酶的活性之间可能存在相关性^[37]。

除了对糖基化程度的改造, 研究人员还利用 CRISPR/Cas9 和 TALENs 技术进行糖链缺陷型细胞系的开发。CLEC-2 通过唾液酸结合其内源性受体 hPDPN, 从而参与血小板聚集和癌症转移。若 hPDPN 存在于癌细胞或者癌相关成纤维细胞, 则表明预后不良。该研究利用基因编辑技术, 建立了聚糖缺陷的 CHO-S 与 HEK293K 细胞系, 并通过该细胞系确定唾液酸是新型抗 hPDPN mAb LpMab-21 的表位之一^[38]。这为其他抗膜蛋白的

新型抗体的表位是否具有唾液酸和 N-聚糖研究提供了思路。

1.1.2 高产稳转细胞株的筛选和建立过程优化

经典方法建立高产稳定细胞株依赖于外源基因对宿主细胞基因组的随机整合, 因此很难保证插入位点表达水平以及细胞株生长特性的稳定。而采用 CRISPR/Cas9 等技术目前已经能够实现将感兴趣的基因 (Gene of interested, GOI) 定点整合到染色体基因组的特定位点。Grav 等介绍了确定靶向基因序列、构建 sgRNA 表达的质粒、进行转染、利用流式细胞荧光分选技术 (Fluorescence activated cell sorting, FACS) 进行阳性筛选、扩大克隆以及进行基因分析等一系列操作, 从而成功敲除 CHO 细胞中谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 的过程, 验证了这一可广泛使用的单基因敲除通用方案^[27]。

而通过定点整合获得高产的稳转细胞株, 其前提是能够插入到具有较高转录活性的位点。本实验室通过筛选不同位点, 最终确认 CHO-S 细胞 *C12orf35* 位点的定点整合能够获得产量及稳定性俱佳的重组细胞株, 而且采用 CRISPR/Cas9 介导该位点的定点整合, 能够使稳转细胞株的构建时间缩短到 2 个月^[39], 具体方法如图 1 所示。

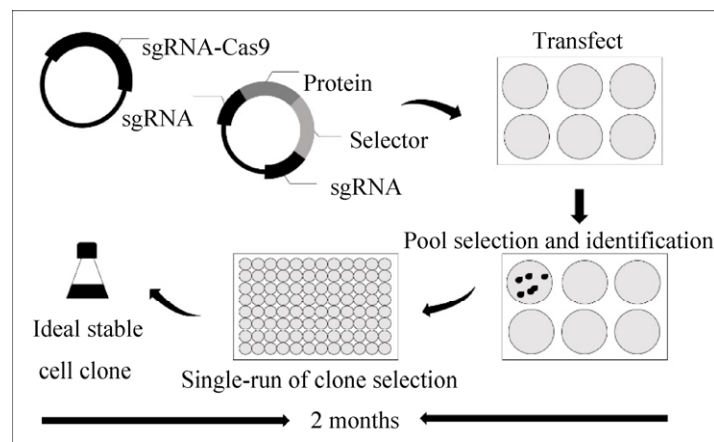


图 1 目的基因插入特异性位点流程图 (改编自 Zhao 等^[39])

Fig. 1 Site-specific integration flow chart (adapted from Zhao et al^[39]).

在 CRISPR/Cas9 技术实施过程中,合适的同源臂是介导成功整合的要素之一,日本的研究人员使用插入位点侧翼极短的微同源臂,将 ScFv-Fc 抗体基因靶向敲入 CHO 细胞的 *hprt* 基因座,获得了生产效率满意的细胞株^[40]。

为了能够对所产生的蛋白进行定量,有报道利用 CRISPR/Cas9 技术在导入 GOI 的同时导入一个蛋白定量报告基因 (Protein quantitatively reports genes, PQR),用荧光连续监测内源蛋白和重组蛋白的表达水平,从而实现蛋白产量荧光强度的量化^[41]。此外,建立稳转细胞系的经典过程一般采用携带重组抗体和选择标记基因质粒载体转染 CHO 细胞,然后利用选择标记进行筛选,只要成功转染并表达相应抗性蛋白的细胞都可以被加压筛选出来,但却很难筛选出目的蛋白高产的细胞系。一项研究对 CHO-K1 细胞中的 5 种抗生素抗性基因以及 CHO-DG44 细胞中的二氢叶酸还原酶 (Dihydrofolate reductase, DHFR) 基因进行优化,提出可以减弱选择标记蛋白的表达水平,以筛选出质粒整合到基因活性位点或者是具有高拷贝数的细胞系,从而筛选出高产细胞系^[42]。虽然存在选择标记过度弱化将导致细胞存活率下降的问题,但这给筛选高产细胞株提供了新思路。

1.2 细胞生长和生产过程的优化

哺乳动物细胞对抗体的表达是一个整体的过程,在整个细胞培养和生产过程中,细胞生长代谢直接决定产品产量和质量,过程控制也影响到细胞的生理活动,从而间接影响抗体工业生产。培养工艺的开发通常涉及到培养的温度^[43]、pH^[44]、培养介质、培养基配方^[45]以及氧的摄取与氨基酸的消耗^[46]、渗透压、乳酸生成等代谢产物的变化^[47]并以此为基础进行各类优化,最终实现抗体产量和质量提高。

1.2.1 细胞代谢优化

对于细胞而言摄食不足会导致胞内营养物质消耗和生产力下降,而过度摄食就会导致代谢副

产物的不良积累和高渗透压。为了在哺乳动物细胞系统中实现有效的合成代谢, Gupta 等发现工程细胞中的丙酮酸盐通量改变可减少细胞培养物中的乳酸积累。其在 CHO 细胞中过度表达酵母细胞质丙酮酸羧化酶 2 (Pyruvate carboxylase 2, PYC2) 以增加丙酮酸流向三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA) 的通量,发现随着酵母细胞质 PYC2 表达量的增加,丙酮酸通量增加,乳酸积累可减少达 4 倍,细胞密度和寿命都有显著增加。与亲本相比,该工程细胞将抗体产量提高了 70%^[36]。此外,细胞内外的氧化环境对于细胞的氧化应激^[48]、未折叠蛋白反应途径 (Unfolded protein response, UPR) 的活化^[49]、蛋白质二硫键异构酶 (Protein disulfide isomerase, PDI) 表达^[50]以及 mRNA 的水平^[51]都是至关重要的。研究人员通过在细胞中引入氧化还原修饰剂,使得哺乳动物细胞增加了对培养基中胱氨酸的摄取,从而合成更多的谷胱甘肽,细胞在第 14 天培养结束时仍然保持氧化状态,并且在表达抗体方面减少了 20% 的聚体生成^[52]。

为了改善细胞生长状况,可在培养过程中采用瞬时表达导入需要表达的基因,或者是导入改善细胞生长的基因对细胞生长状况进行调控。其中,抑制细胞凋亡是延长细胞寿命、增加产量的最显著的策略。有报道在生产人源化抗 TNF- α Ab 的 CHO 稳定细胞中瞬时表达抗凋亡蛋白 Bcl-XL,显著提高了 TNF- α Ab 的产量^[53]。有望用于大规模抗体生产,节约成本、提高生产效率。

1.2.2 生产过程的优化

除了对细胞的代谢调控,对温度、氧含量、渗透压等过程参数的控制是大规模生产中重要的优化策略。Lee 等在生产过程中探究不同培养温度对细胞生存状况和产物的影响。该研究利用 CHO 细胞在转染后比较了在生理温度下 (36.5 °C) 和转染 24 h 中温度由 36.5 °C 变为 32 °C 的特异性

单克隆抗体生产力和糖基化程度,结果表明在 32 °C 培养过程中,糖基化产物通过 N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 II 表达增加从而促进聚糖结构的产生。在比较每种条件下半乳糖基化单克隆抗体的特定生产速率时,32 °C 下的半乳糖基化程度更高,但其对培养基中葡萄糖的消耗率比在 36.5 °C 下培养高出 60%^[54]。相关研究人员通过监测在线培养物的氧吸收并将该生理参数与产物形成速率联系起来获得关于细胞生理学的实时信息,并定量测定每个细胞和时间单位的蛋白表达速率。在该项研究中,开发出一种控制策略,其中包括特定的生产力作为参数,并研究特定生产力与重组产物的糖基化模式之间的相互作用。研究表明酪氨酸消耗可导致细胞代谢活性和生产力下降,且观察到当 pH 从 7.2 变为 6.9 时,高甘露糖化糖型增加^[55]。该项研究为开发新的控制策略,以及控制产品质量属性方面提供了新方法。此外,重组蛋白的最终浓度受细胞密度、存活细胞培养寿命和重组蛋白的特定生产速率的影响。渗透压对这 3 个重要参数有强烈作用。超渗透压抑制细胞生长。为了减少高渗透压对于细胞生产的负面影响,研究人员在超渗透压下传代培养 CHO 细胞,开发了高渗透抗性的 CHO 细胞系,其最大存活细胞密度是野生型细胞的 132%^[56]。

1.3 瞬时表达系统的应用

瞬时转染 (Transient transfection) 通常利用质粒载体将 GOI 转入宿主细胞,而基因不整合入宿主细胞染色体,在短时间内就能使宿主细胞产生所需的性状表达。该表达系统从操作到收获时间周期短,不用对细胞进行长期的筛选和克隆^[57]。虽然在临床上还未有利用瞬时转染技术在 HEK293 细胞表达重组抗体药物的先例,但其在未来的工业生产中具有很大的发展空间。本实验室利用瞬时转染技术在 HEK293 细胞表达 9 批重组 IgG 抗体,证明利用该方法生产的抗体在活细胞密度、存活力、凋亡状态、抗体产量的可再现

性以及物理性质和不同批次的糖基化程度上都具有高度一致性^[28],证实瞬时转染系统可为抗体生产提供快速可靠的策略,节约稳转细胞株构建的成本,对需要进行多个产品验证和筛选的情况尤为合适。

在瞬时转染系统中,为获得蛋白的高效表达可对转入的质粒载体进行修饰。表达载体多采用单顺反子、多顺反子或者是反式互补策略来对 GOI 进行优化,同时也对启动子、终止子、增强子等调控表达的载体功能元件的功能进行提高^[58]。在哺乳动物表达系统中使用的质粒载体通常由两部分组成,即细菌骨架和真核表达盒。研究表明细菌骨架可能由于炎性非甲基化 CpG 基序与多种细胞因子相互作用,从而导致相关基因沉默。针对该现象,研究人员利用噬菌体 Φ C31 整合酶介导的重组效应在大肠杆菌中构建了携带增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 报告基因的新型微环 DNA 载体,不但可以避免基因沉默,且其在 CHO-K1 细胞与 HEK 细胞中瞬转可表达至 14 代^[59]。另一项研究开发了一种含有恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的 *cumate* 基因诱导的 CHO BRI/rcTA 细胞系,该细胞系携带反式激活子诱导系统的组分,当利用瞬转系统转染 *cumate* 基因开关启动子的质粒载体,就可驱动该质粒载体 DNA 的表达^[60]。

2 原核大肠杆菌表达系统

从 1973 年左右质粒 DNA 技术开始得到发展^[61]。这使得人们能够将目的基因插入质粒转入大肠杆菌中使其进行扩增,并利用热诱导或化学诱导控制基因表达启动子使其进行表达^[62]。20 世纪 80 年代, FDA 批准了由大肠杆菌生产的胰岛素用于治疗糖尿病。目前, FDA 批准的包括抗体片段、细胞因子等近 30% 的治疗性蛋白是在大肠杆菌中生产的,例如利尿素钠、白介素-2、白介素-11、白介素-I R α 、甲状腺激素 (1-34) 以及干扰素 α 、 β

和 γ 等^[63]。

大肠杆菌原核表达系统缺乏翻译后修饰所需的酶,因此较适合无需糖基化的抗体片段类药物的生产,例如 scFv、Fab 等。此外,大多数抗体产品含有二硫键,对维持其空间结构和生物学活性非常重要,而大肠杆菌胞内的氧化还原环境难以满足二硫键折叠的需要,因此大多数情况下以包涵体形式进行产品的表达,并需要对包涵体进行变复性处理,或者采用分泌型信号肽,将其运输到周质进行折叠,实现可溶性的表达,并形成正确的二硫键结构^[64]。研究人员将靶向卵巢上皮癌 CA125 位点的 scFv 基因亚克隆至 pET-22b (+) 载体中,利用 Pel B 前导肽进行周质定位,通过优化密码子使 scFv 抗体可溶表达增加了 14 倍^[65]。大肠杆菌表达系统具有低成本、易放大以及生产周期短等优点,在不需复杂修饰的抗体片段类产品的生产中具有很大潜力。

3 转基因动物反应器

转基因动物反应器是利用转基因技术改造动物基因,使其在特定器官产生所需生物药物的动物。目前可在转基因动物的血液、尿液、精液、乳汁或者是蛋清甚至是蚕茧中得到所需的生物药物^[66]。

早在 20 世纪 90 年代初,研究人员就研制成功利用转基因动物的乳腺大规模生产供人类疾病治疗的生物活性物质和药用蛋白^[67]。其生产的外源蛋白种类广泛,从小分子肽到大分子复杂蛋白质,从生物活性酶到抗体、病毒抗原蛋白均可有效生产,通常用于生产重组人蛋白和单克隆抗体^[68]。该技术通常使用显微注射技术直接注射线性化的 DNA 到成熟的卵细胞中^[69],而在反刍动物中,使体外培养的受精卵发育到囊泡期再进行显微注射^[70]。2006 年由 EMA 批准的第一个转基因动物生物制药产品重组抗凝血酶 Atryn[®]被批准用于人类医疗用途,并于 2009 年被 FDA 批准。在 2014 年,

一种重组人 C1 酯酶抑制剂蛋白药物 Ruconest[®]得到 FDA 的批准^[71]。这验证了转基因动物反应器的动物平台,增加了重组蛋白生产系统的可靠性。

该技术生产的药物产量和活性一般都较高。有报道称在其构建的转基因奶牛中生产人重组白蛋白产量可达到 1–5 mg/mL^[72],产物无污染、成本低廉。但也存在一些问题,如显微注射难度大,不便于普及,且需要通过进一步完善表达载体来提高表达量。除转基因动物反应器适宜于单克隆抗体的生产,也出现了乳腺瞬时表达系统,但下游纯化等开发过程十分昂贵^[71],且不同个体的动物所产生的药物在质量均一性上可能存在差异,不便于对药物质量进行控制。此外,对于大动物来说,待其能够生产药物需要几年时间,且存在动物伦理方面和基因污染的问题,因此该系统仍需进一步研究和完善。

4 无细胞蛋白质合成系统

近年来,无细胞蛋白质合成系统 (The cell-free protein synthesis system, CFPS) 已经成为一个强大的技术平台,以满足日益增长的简单和高效制备蛋白质生产的需求。CFPS 技术是指在进行蛋白表达时将 DNA 或所需要的基因作为模板加入由 RNA 聚合酶、核糖体等其他细胞提取物组成的反应混合物中,添加能量源与需要的氨基酸、一些辅助因子和提高原核无细胞体系的生产力的翻译延伸因子和转录因子^[73]。该系统表达迅速,表达时间通常为数小时到数天。有研究利用 Hela 细胞与 CHO 细胞提取物进行反应,以利用 CFPS 系统进行绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 与链激酶 (Streptokinase, SK) 的表达,并使用自切割内含子技术对链激酶产物进行纯化^[74]。该系统在生产结构简单的蛋白产物方面的确具有十分迅速、高产以及产品无差异的优点,但是其在具有二硫键和高级结构的复杂蛋白生产方面还具有较大缺陷,目前主要应用于科学研究。近年来,

它的应用扩大到了 IgGs 和抗体衍生物的生产,以及抗体-药物共轭物、疫苗、膜蛋白、金属蛋白和病毒蛋白的研究型制备^[75],虽然生产类型广泛,但其试剂昂贵,难以规模放大。

5 其他表达系统

除了传统的表达系统,在抗体生产方面还有一些比较有特色的表达系统,例如枯草芽孢杆菌系统,由于其生产蛋白不形成包涵体、分泌能力强、产物易纯化,被认为是大肠杆菌表达系统的理想替代品^[76]。在真核表达系统中植物表达系统由于其不会感染人源病毒,在抗体制备中具有很高的安全性,具有十分广阔的发展空间^[77]。但植物和哺乳动物在 O 型糖基化水平及多糖结构上有所不同^[78],有研究报道其产生的抗体可产生致敏作用^[79]。另一个常用的系统是酵母表达系统,其表达水平一般经过 5 d 发酵可以达到 2–5 g/L,且表达产物不含内毒素。虽然酵母具有一定的糖基化能力,但糖基化模式与人类细胞不同,阻碍了其在抗体生产领域的应用^[80]。而在昆虫表达系统中,应用最广泛的是昆虫细胞-杆状病毒表达载体系统。该表达系统表达蛋白可以从细菌到人体组织等任何有机体表达任何细胞位置的基因产品,且杆状病毒对脊椎动物的非传染性保证了该表达系统的安全性。该系统的特点是依赖于工程载体的优化,而不是宿主细胞系的建立,且其工程载体可以容纳长达 20 kb 的外源 DNA 片段^[81]。

6 总结与展望

抗体药物特异性强,快速准确,具有良好的治疗效果。抗体生产技术发展了几十年,根据不同的需求,开发了不同的生产模式,包括文中所总结的各类表达系统的使用。临床上主要采用哺乳动物细胞和原核细胞发酵技术来获得抗体药物。由于哺乳动物细胞表达系统的复杂性,工业

上针对该系统开展的工作较多,主要通过改变细胞代谢和采用生产过程控制以延长细胞生长和生产的有效时间,从而提高抗体产量。近年来,以 CRISPR/Cas9 为代表的新兴技术正广泛用于工程细胞株的开发,且该技术本身正经历不断更新和优化。有研究人员开发出新的 Cas 蛋白表达系统 xCas9,不但能够识别更为广泛地候选识别位点的毗邻序列 (Protospacer adjacent motif, PAM) 序列^[82],扩大 CRISPR/Cas9 适用范围,同时极大减少脱靶效应。各类新技术的发展将大大推动抗体药物生产水平及产品质量的提高。

抗体工业蓬勃发展的同时仍存在一些尚未解决的问题,例如抗体分子结构上存在多种翻译后修饰形式、具有显著的“非均一性”、高产细胞株的筛选困难等问题,产生了各种针对高产稳定细胞株筛选的组学研究,并带动了相关基础研究的发展^[83]。随着抗体药物相关种类被纳入中国医保目录,在将来的一段时间内,抗体药物在国内将会有更好的市场和发展前景。同时这也对抗体药物生产发展、工艺优化、质量检测等提出了更高的要求。

REFERENCES

- [1] McGary CS, Deleage C, Harper J, et al. CTLA-4⁺ PD-1⁻ Memory CD4⁺ T cells critically contribute to viral persistence in antiretroviral therapy-suppressed, SIV-infected rhesus macaques. *Immunity*, 2017, 47(4): 776–788.e5.
- [2] Riether C, Schürch CM, Bühner ED, et al. CD70/CD27 signaling promotes blast stemness and is a viable therapeutic target in acute myeloid leukemia. *J Exp Med*, 2017, 214(2): 359–380.
- [3] Doss GP, Agoramoorthy G, Chakraborty C. TNF/TNFR: drug target for autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory diseases. *Front Biosci: Landmark Ed*, 2014, 19(7): 1028–1040.
- [4] Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Richardson DR, et al. Gene of the month: interleukin 6 (IL-6). *J Clin Pathol*,

- 2014, 67(11): 932–937.
- [5] Martin M, Holmes FA, Ejlertsen B, et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2-positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2017, 18(12): 1688–1700.
- [6] Wick W, Gorlia T, Bendszus M, et al. Lomustine and bevacizumab in progressive glioblastoma. *N Engl J Med*, 2017, 377(20): 1954–1963.
- [7] Armand P, Engert A, Younes A, et al. Nivolumab for relapsed/refractory classic hodgkin lymphoma after failure of autologous hematopoietic cell transplantation: extended follow-up of the multicohort single-arm phase II CheckMate 205 Trial. *J Clin Oncol*, 2018, 36(14): 1428–1439.
- [8] Peters S, Gettinger S, Johnson ML, et al. Phase II trial of atezolizumab as first-line or subsequent therapy for patients with programmed death-ligand 1-selected advanced non-small-cell lung cancer (BIRCH). *J Clin Oncol*, 2017, 35(24): 2781–2789.
- [9] Keystone EC, Taylor PC, Tanaka Y, et al. Patient-reported outcomes from a phase 3 study of baricitinib versus placebo or adalimumab in rheumatoid arthritis: secondary analyses from the RA-BEAM study. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(11): 1853–1861.
- [10] Norman P. Humira: the impending patent battles over adalimumab biosimilars. *Pharm Pat Anal*, 2016, 5(3): 141–145.
- [11] Steinitz M. Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments. *Hum Antibod*, 2009, 18(1/2): 1–10.
- [12] Takeda SI, Naito T, Hama K, et al. Construction of chimaeric processed immunoglobulin genes containing mouse variable and human constant region sequences. *Nature*, 1985, 314(6010): 452–454.
- [13] Jones PT, Dear PH, Foote J, et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986, 321(6069): 522–525.
- [14] Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1117–1125.
- [15] R thlisberger D, Honegger A, Pl ckthun A. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol*, 2005, 347(4): 773–789.
- [16] Gilliland LK, Norris NA, Marquardt H, et al. Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments. *Tissue Antig*, 1996, 47(1): 1–20.
- [17] Fan GW, Wang ZJ, Hao MJ, et al. Bispecific antibodies and their applications. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 130.
- [18] Willis JR, Briney BS, DeLuca SL, et al. Human germline antibody gene segments encode polyspecific antibodies. *PLoS Comput Biol*, 2013, 9(4): e1003045.
- [19] Shen BQ, Xu KY, Liu LN, et al. Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(2): 184–189.
- [20] Ducry L, Stump B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug Chem*, 2010, 21(1): 5–13.
- [21] Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, 2011, 3(3): 371–380.
- [22] Torres AR, Healey MC, Johnston AV, et al. Growth of hybridoma cells and antibody production in agamma calf serum. *Hum Antibod*, 1992, 3(4): 206–211.
- [23] Orii H, Yamaguchi T, Watanabe K. Single-step cloning of a hybridoma producing a monoclonal antibody against a target protein. *Anal Biochem*, 2013, 434(1): 52–53.
- [24] Aricescu AR, Lu WX, Jones EY. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Cryst*, 2006, 62(10): 1243–1250.
- [25] Zhu JW. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1158–1170.
- [26] Heffner KM, Wang Q, Hizal DB, et al. Glycoengineering of mammalian expression systems on a cellular level. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2018.
- [27] Grav LM, La Cour Karottki KJ, Lee JS, et al. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to improve recombinant protein production in CHO cells. *Methods Mol Biol*, 2017, 1603: 101–118.
- [28] Ding K, Han L, Zong HF, et al. Production process reproducibility and product quality consistency of transient gene expression in HEK293 cells with anti-PD1 antibody as the model protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(5): 1889–1898.
- [29] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11):

- 2281–2308.
- [30] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [31] Dutta S, Madan S, Sundar D. Exploiting the recognition code for elucidating the mechanism of zinc finger protein-DNA interactions. *BMC Genomics*, 2016, 17(S1): 1037.
- [32] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148.
- [33] Chan KF, Shahreel W, Wan C, et al. Inactivation of GDP-fucose transporter gene (*Slc35c1*) in CHO cells by ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 for production of fucose-free antibodies. *Biotechnol J*, 2016, 11(3): 399–414.
- [34] Sun T, Li CD, Han L, et al. Functional knockout of FUT8 in Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 to produce a defucosylated antibody. *Eng Life Sci*, 2015, 15(6): 660–666.
- [35] Yan S, Jin CS, Wilson IBH, et al. Comparisons of *Caenorhabditis* fucosyltransferase mutants reveal a multiplicity of isomeric N-glycan structures. *J Proteome Res*, 2015, 14(12): 5291–5305.
- [36] Gupta SK, Srivastava SK, Sharma A, et al. Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PLoS ONE*, 2017, 12(8): e0181455.
- [37] Chung CY, Wang Q, Yang S, et al. Combinatorial genome and protein engineering yields monoclonal antibodies with hypergalactosylation from CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(12): 2848–2856.
- [38] Kaneko MK, Nakamura T, Honma R, et al. Development and characterization of anti-glycopeptide monoclonal antibodies against human podoplanin, using glycan-deficient cell lines generated by CRISPR/Cas9 and TALEN. *Cancer Medicine*, 2017, 6(2): 382–396.
- [39] Zhao M, Wang J, Luo M, et al. Rapid development of stable transgene CHO cell lines by CRISPR/Cas9-mediated site-specific integration into *C12orf35*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(14): 6105–6117.
- [40] Kawabe Y, Komatsu S, Komatsu S, et al. Targeted knock-in of an scFv-Fc antibody gene into the *hprt* locus of Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 and CRIS-PITCh systems. *J Biosci Bioeng*, 2017, 125(5): 599–605.
- [41] Lo CA, Greben AW, Chen BE. Generating stable cell lines with quantifiable protein production using CRISPR/Cas9-mediated knock-in. *Biotechniques*, 2017, 62(4): 165–174.
- [42] Yeo JHM, Ho SCL, Mariati M, et al. Optimized selection marker and CHO host cell combinations for generating high monoclonal antibody producing cell lines. *Biotechnol J*, 2017, 12(12), doi: 10.1002/biot.201700175.
- [43] Sou SN, Sellick C, Lee K, et al. How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation? *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(6): 1165–1176.
- [44] Seo JS, Kim YJ, Cho JM, et al. Effect of culture pH on recombinant antibody production by a new human cell line, F2N78, grown in suspension at 33.0 °C and 37.0 °C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(12): 5283–5291.
- [45] Kishishita S, Katayama S, Kodaira K, et al. Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng*, 2015, 120(1): 78–84.
- [46] Ozturk SS, Palsson BO. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnol Prog*, 1991, 7(6): 481–494.
- [47] Altamirano C, Cairó JJ, Godia F. Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 76(4): 351–360.
- [48] Gille JJ, Joenje H. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat Res*, 1992, 275(3/6): 405–414.
- [49] Young CL, Yuraszek T, Robinson AS. Decreased secretion and unfolded protein response upregulation. *Methods Enzymol*, 2011, 491: 235–260.
- [50] Davis R, Schooley K, Rasmussen B, et al. Effect of PDI overexpression on recombinant protein secretion in CHO cells. *Biotechnol Prog*, 2000, 16(5): 736–743.
- [51] Dorai H, Csirke B, Scallan B, et al. Correlation of heavy and light chain mRNA copy numbers to antibody productivity in mouse myeloma production cell lines. *Hybridoma (Larchmt)*, 2006, 25(1): 1–9.
- [52] Handlogten MW, Lee-O'Brien A, Roy G, et al.

- Intracellular response to process optimization and impact on productivity and product aggregates for a high-titer CHO cell process. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(1): 126–138.
- [53] Iz SG, Inevi MA, Metiner PS, et al. A BioDesign approach to obtain high yields of biosimilars by anti-apoptotic cell engineering: a case study to increase the production yield of Anti-TNF Alpha producing recombinant CHO cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 184(1): 303–322.
- [54] Sou SN, Lee K, Nayyar K, et al. Exploring cellular behavior under transient gene expression and its impact on mAb productivity and Fc-glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(2): 512–518.
- [55] Zalai D, Hevér H, Lovász K, et al. A control strategy to investigate the relationship between specific productivity and high-mannose glycoforms in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(16): 7011–7024.
- [56] Kamachi Y, Omasa T. Development of hyper osmotic resistant CHO host cells for enhanced antibody production. *J Biosci Bioeng*, 2018, 125(4): 470–478.
- [57] Longo PA, Kavran JM, Kim MS, et al. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*, 2013, 529: 227–240.
- [58] Rocha-Pizaña MD, Ascencio-Favela G, Soto-García BM, et al. Evaluation of changes in promoters, use of UCOES and chain order to improve the antibody production in CHO cells. *Protein Expr Purif*, 2017, 132: 108–115.
- [59] Ata-Abadi NS, Dormiani K, Khazaie Y, et al. Construction of a new minicircle DNA carrying an enhanced green fluorescent protein reporter gene for efficient expression into mammalian cell lines. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(7): 1175–1185.
- [60] Poulain A, Perret S, Malenfant F, et al. Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. *J Biotechnol*, 2017, 255: 16–27.
- [61] Wells EA, Robinson AS. Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. *Biotechnol J*, 2017, 12(1). doi: 10.1002/biot.201600105.
- [62] Seo JW, Hong WK, Rairakhwada D, et al. An efficient plasmid vector for constitutive high-level expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(6): 877–881.
- [63] Huang C Jr, Lin H, Yang XM. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(3): 383–399.
- [64] Sun XW, Wang XH, Yao YB. Co-expression of Dsb proteins enables soluble expression of a single-chain variable fragment (scFv) against human type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) in *E. coli*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(12): 3221–3227.
- [65] Sharma SK, Suresh MR, Wuest FR. Improved soluble expression of a single-chain antibody fragment in *E. coli* for targeting CA125 in epithelial ovarian cancer. *Protein Expr Purif*, 2014, 102: 27–37.
- [66] Houdebine LM. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*, 2000, 9(4/5): 305–320.
- [67] Gordon K, Lee E, Vitale JA, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. 1987. *Biotechnology*, 1992, 24: 425–428.
- [68] Maksimenko OG, Deykin AV, Khodarovich YM, et al. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta Naturae*, 2013, 5(1): 33–46.
- [69] Wei JJ, Yang XM, Zheng M, et al. The recombinant chimeric antibody chHAb18 against hepatocellular carcinoma can be produced in milk of transgenic mice. *Transgenic Res*, 2011, 20(2): 321–330.
- [70] Wang YL, Zhao SH, Bai L, et al. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 580463.
- [71] Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR, et al. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Res*, 2016, 25(3): 329–343.
- [72] Huang YJ, Huang Y, Baldassarre H, et al. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(34): 13603–13608.
- [73] Guarino C, DeLisa MP. A prokaryote-based cell-free translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. *Glycobiology*, 2012, 22(5): 596–601.
- [74] Tran K, Gurramkonda C, Cooper MA, et al. Cell-free production of a therapeutic protein: expression, purification, and characterization of recombinant streptokinase using a CHO lysate. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(1): 92–102.

-
- [75] Xu YR, Lee J, Tran C, et al. Production of bispecific antibodies in “knobs-into-holes” using a cell-free expression system. *mAbs*, 2015, 7(1): 231–242.
- [76] Jeong DE, So Y, Park SY, et al. Random knock-in expression system for high yield production of heterologous protein in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol*, 2018, 266: 50–58.
- [77] Gecchele E, Schillberg S, Merlin M, et al. A downstream process allowing the efficient isolation of a recombinant amphiphilic protein from tobacco leaves. *J Chromatogr B*, 2014, 960: 34–42.
- [78] Yusibov V, Kushnir N, Streatfield SJ. Antibody production in plants and green algae. *Annu Rev Plant Biol*, 2016, 67(1): 669–701.
- [79] Landry N, Ward BJ, Trépanier S, et al. Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e15559.
- [80] Lebozec K, Jandrot-Perrus M, Avenard G, et al. Quality and cost assessment of a recombinant antibody fragment produced from mammalian, yeast and prokaryotic host cells: a case study prior to pharmaceutical development. *Nat Biotechnol*, 2018, 44: 31–40.
- [81] Drugmand JC, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1140–1157.
- [82] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63.
- [83] Datta P, Linhardt RJ, Sharfstein ST. An 'omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(5): 1255–1271.

(本文责编 陈宏宇)