

- 1 细胞工程制药概述
- 2 细胞融合技术
- ➔ ● 3 动物细胞融合技术（抗体制药）
 - 3.1 鼠源化单克隆抗体
 - 3.2 人源化单克隆抗体
 - 3.3 人源性单克隆抗体
- 4 适配子和肽配体
- 5 生物转化生产甾体药物

多选题 1分

细胞融合技术中，亲本细胞上的选择性标记一般有：

- ☒ A 酶缺失型标记
- ☐ B 放射性标记
- ☒ C 抗药性标记
- ☒ D 营养缺陷型标记

单选题 1分

在氨苄青霉素抗药性标记的亲本细胞和四环素抗药性标记的亲本细胞进行细胞融合后，以下哪一种培养基中能生长的就是我们需要的融合细胞：

- ☐ A 在含氨苄青霉素的培养基上
- ☐ B 在含四环素的培养基上
- ☐ C 在既不含氨苄青霉素又不含四环素的培养基上
- ☒ D 在既含氨苄青霉素又含四环素的培养基上

单选题 1分

在色氨酸营养缺陷型标记的亲本细胞和亮氨酸营养缺陷型标记的亲本细胞进行细胞融合后，以下哪一种培养基中能生长的就是我们需要的融合细胞：

- ☐ A 在含色氨酸的培养基上
- ☐ B 在含亮氨酸的培养基上
- ☒ C 在既不含色氨酸又不含亮氨酸的培养基上
- ☐ D 在既含色氨酸又含亮氨酸的培养基上

抗体研究领域的进展

- 多克隆抗体

- 1890年, 抗原免疫动物

- 单克隆抗体

- 1975年, 杂交瘤技术

- 基因工程抗体

- 1994年, 噬菌体抗体库技术

抗体工程制药技术

➔ ● 鼠源性单克隆抗体的制备

1. 杂交瘤技术

2. 应用

- 鼠源性单克隆抗体的改造

- 人源化单克隆抗体

乙型肝炎病毒的检测

抗血清

乙肝病毒表面抗原
(HBsAg)

乙肝病毒表面抗体
(HBsAb)

乙肝病毒e抗原
(HBeAg)

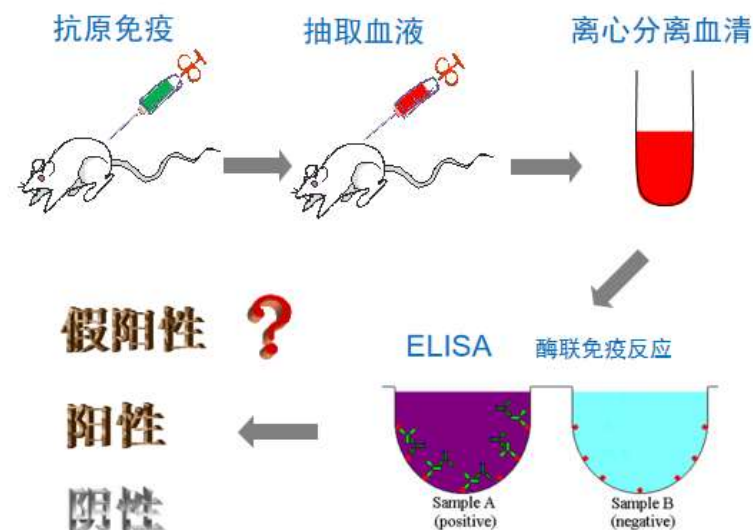
乙肝病毒e抗体
(HBeAb)

乙肝病毒核心抗体
(HBcAb)

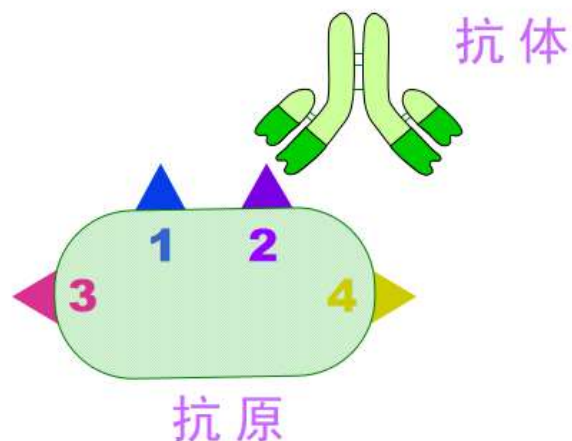
姓名	31岁	样本种类: 血清
民族	汉族	就诊类型: 门诊
No	检验项目	结果
1	乙肝病毒表面抗原	阳性(+)
2	乙肝病毒表面抗体	阴性(-)
3	乙肝病毒e抗原	阴性(-)
4	乙肝病毒e抗体	阴性(-)
5	乙肝病毒核心抗体	阳性(+)

项目名称	测定结果
乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)	阴性
乙型肝炎表面抗体 (HBsAb)	阳性
乙型肝炎e抗原 (HBeAg)	阴性
乙型肝炎e抗体 (HBeAb)	阴性
乙型肝炎核心抗体 (HBcAb)	阴性

传统上利用抗血清进行目标抗原的检测

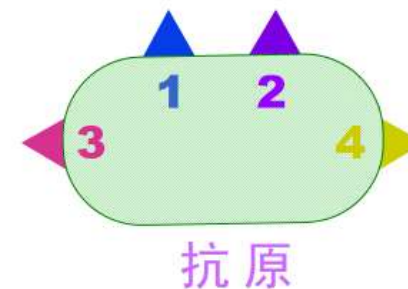


抗原和抗体



抗原决定簇

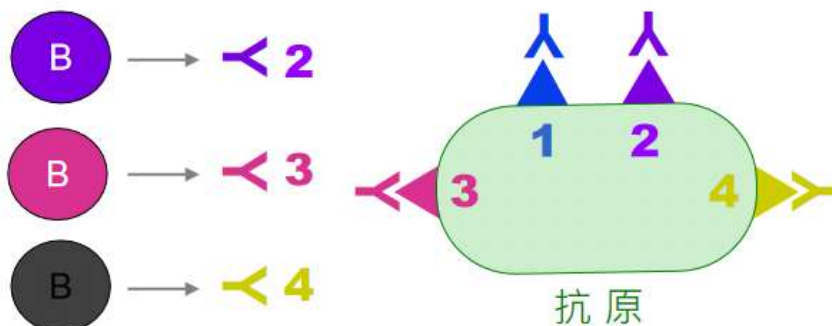
- 一个抗原分子上可能有数个 **抗原决定簇**
- 每个抗原决定簇至少诱生一种专一性抗体



- 一个 B 细胞只能产生一种抗体，对付某一抗原决定簇。



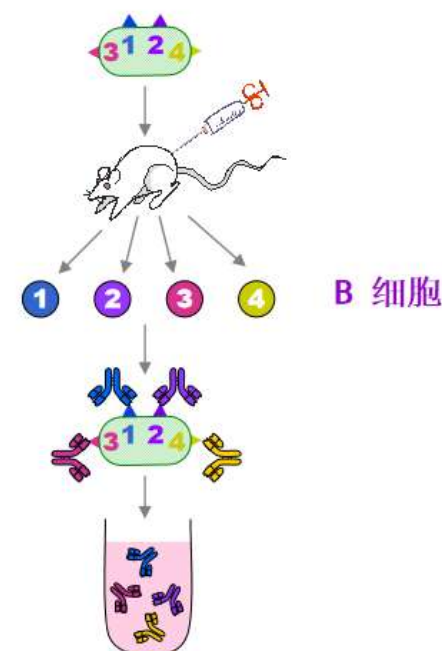
- 若有许多抗原决定簇，则需许多株 B 细胞分别产生许多抗体。



抗原

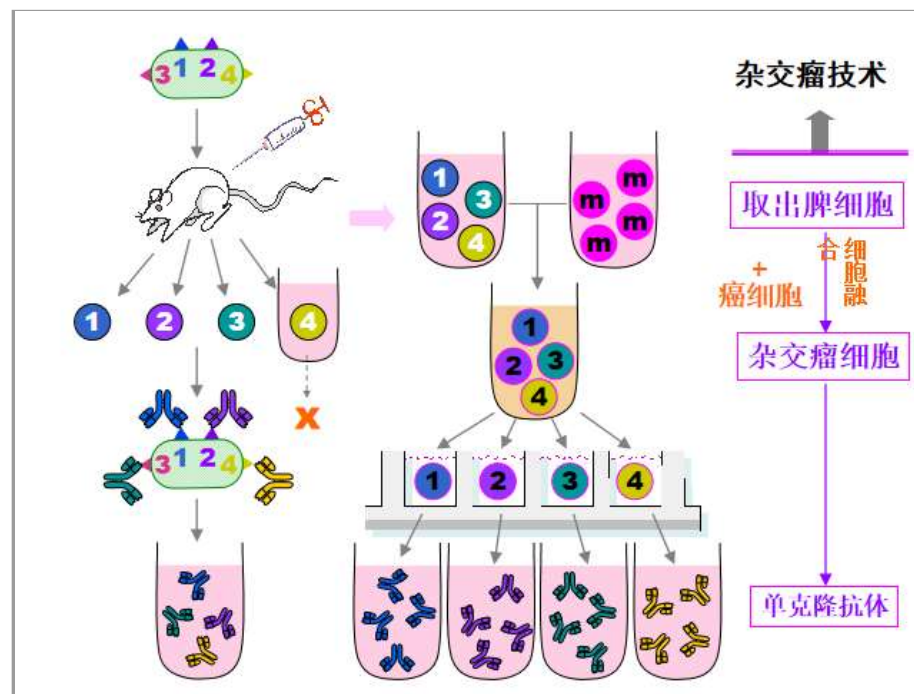
免疫

传统抗血清
多克隆抗体



传统抗血清（多克隆抗体）的交叉反应

由一个B细胞产生的，可以和一种抗原决定簇结合的单一特异性抗体即为单克隆抗体。



单克隆抗体制备的基本步骤



免疫动物

获得能产生抗体的B淋巴细胞

骨髓瘤细胞系的选择

获得本身不产生抗体、有遗传标记的骨髓瘤细胞

细胞融合

PEG法

杂交瘤培养物的早期鉴定和检测

ELISA法

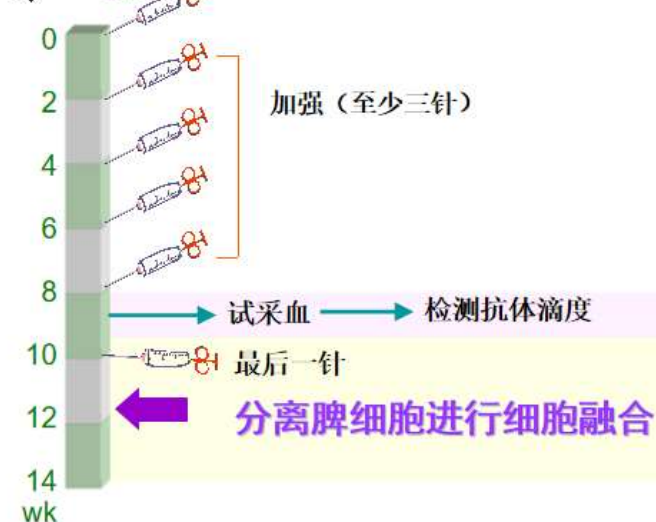
克隆化

有限稀释法

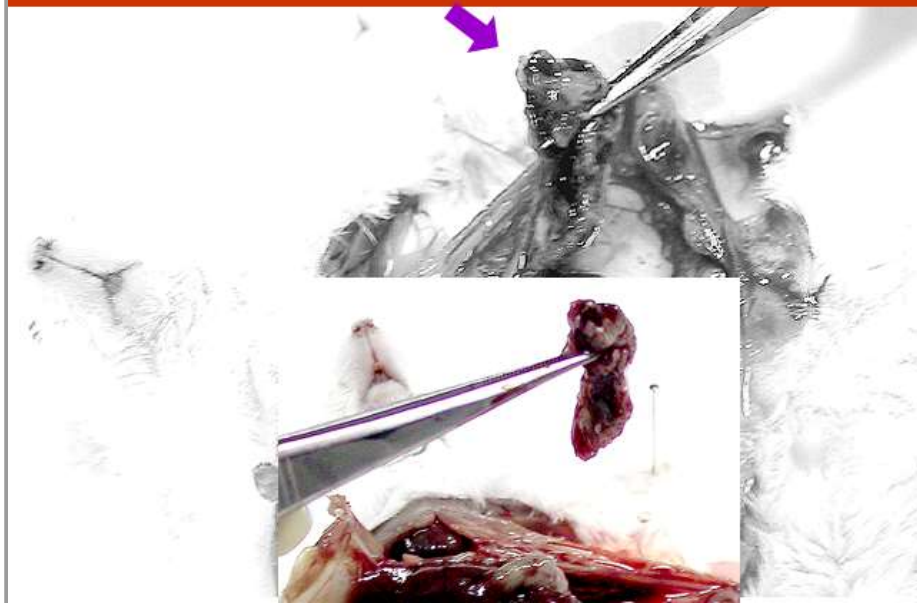
单克隆抗体的生产

腹水诱导、体外细胞培养

小白鼠免疫流程



免疫后取出脾脏



脾脏含有大量的B细胞

取出脾脏内细胞



单克隆抗体制备的基本步骤



□免疫动物

获得能产生抗体的B淋巴细胞

□骨髓瘤细胞系的选择

获得本身不产生抗体、有遗传标记的骨髓瘤细胞

□细胞融合

PEG法

□杂交瘤培养物的早期鉴定和检测

ELISA法

□克隆化

有限稀释法

□单克隆抗体的生产

腹水诱导、体外细胞培养

癌细胞可以在体外培养基中大量繁殖

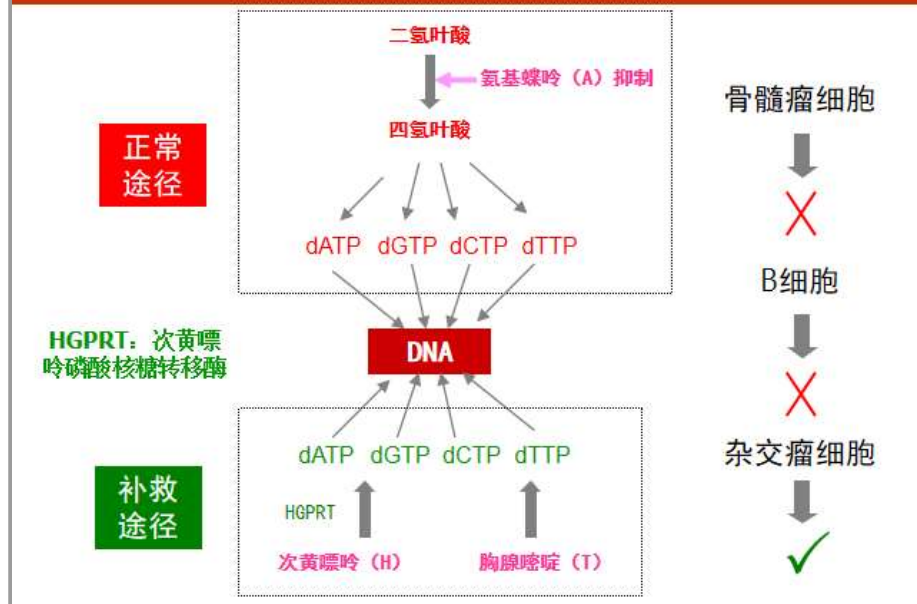
骨髓瘤细胞NS-1

但是
酶缺失型骨髓瘤细胞NS-1
无法在HAT培养基中生长

HAT筛选



细胞DNA合成途径及HAT筛选原理

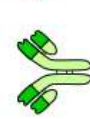


单克隆抗体制备的基本步骤



免疫动物

获得能产生抗体的B淋巴细胞



骨髓瘤细胞系的选择

获得本身不产生抗体、有遗传标记的骨髓瘤细胞



细胞融合

PEG法

杂交瘤培养物的早期鉴定和检测

ELISA法

克隆化

有限稀释法

单克隆抗体的生产

腹水诱导、体外细胞培养

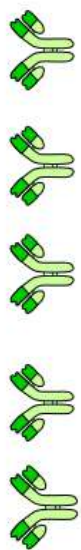
PEG法促进细胞融合



脾细胞与骨髓瘤细胞的融合



单克隆抗体制备的基本步骤



□免疫动物

获得能产生抗体的B淋巴细胞

□骨髓瘤细胞系的选择

获得本身不产生抗体、有遗传标记的骨髓瘤细胞

□细胞融合

PEG法

□杂交瘤培养物的早期鉴定和检测

ELISA法

□克隆化

有限稀释法

□单克隆抗体的生产

腹水诱导、体外细胞培养

把融合后的细胞均匀分在多孔板的小槽内培养



细胞融合及融合后的生长情况

刚融合完成

一个癌细胞与两个脾细胞



经过数次分裂后

稳定的细胞群落

脾细胞

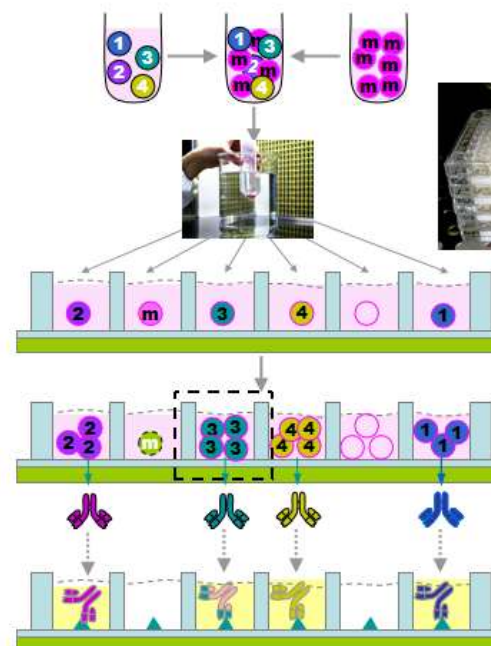
癌细胞

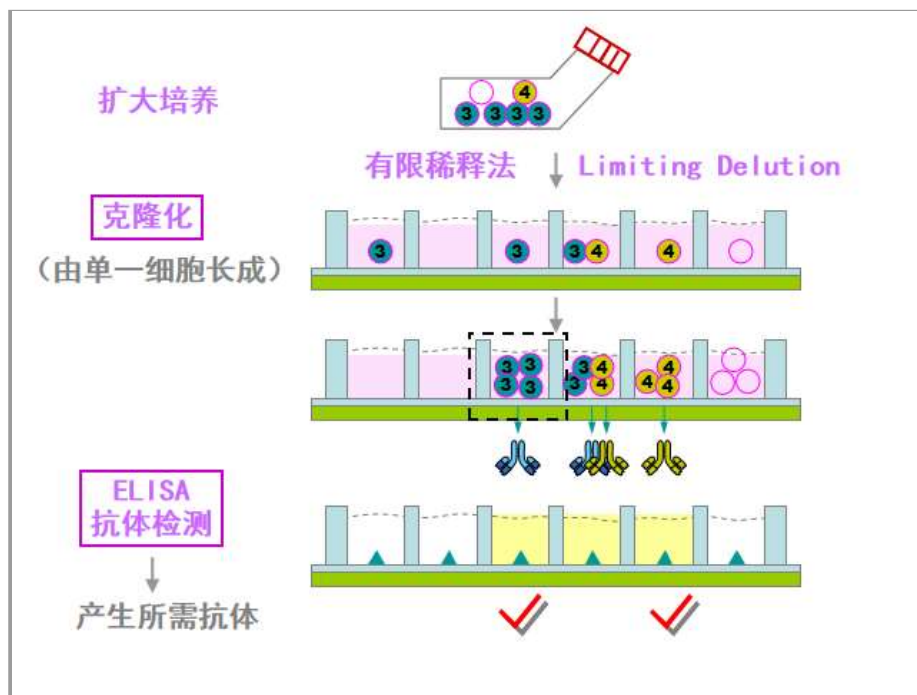
细胞融合

HAT
初步筛选

成功融合

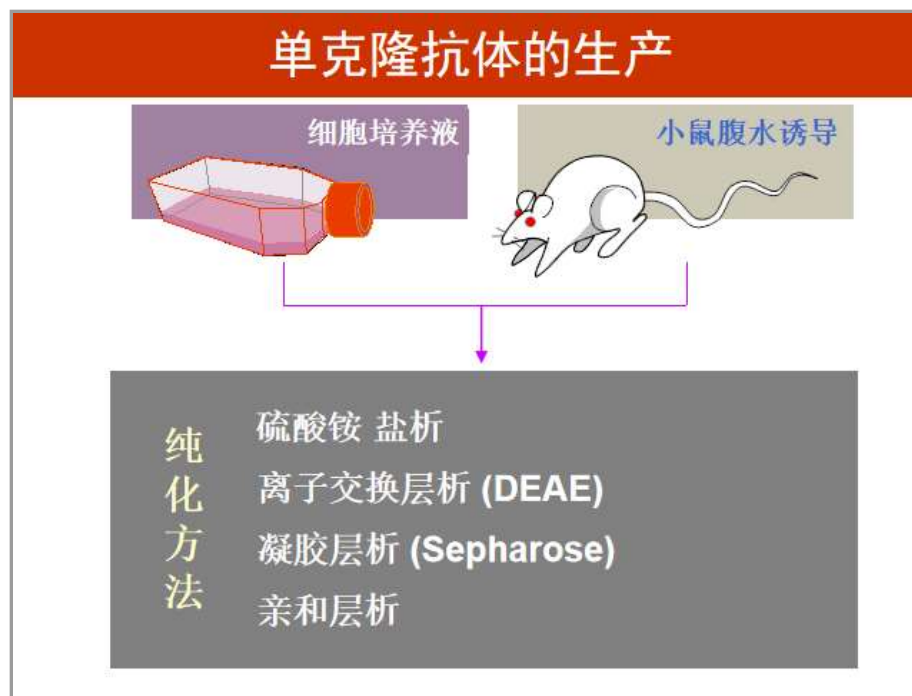
ELISA
抗体检测
产生所需抗体





单克隆抗体制备的基本步骤

- ☐ **免疫动物**
获得能产生抗体的B淋巴细胞
- ☐ **骨髓瘤细胞系的选择**
获得本身不产生抗体、有遗传标记的骨髓瘤细胞
- ☐ **细胞融合**
PEG法
- ☐ **杂交瘤培养物的早期鉴定和检测**
ELISA法
- ☐ **克隆化**
有限稀释法
- ☐ **单克隆抗体的生产**
腹水诱导、体外细胞培养

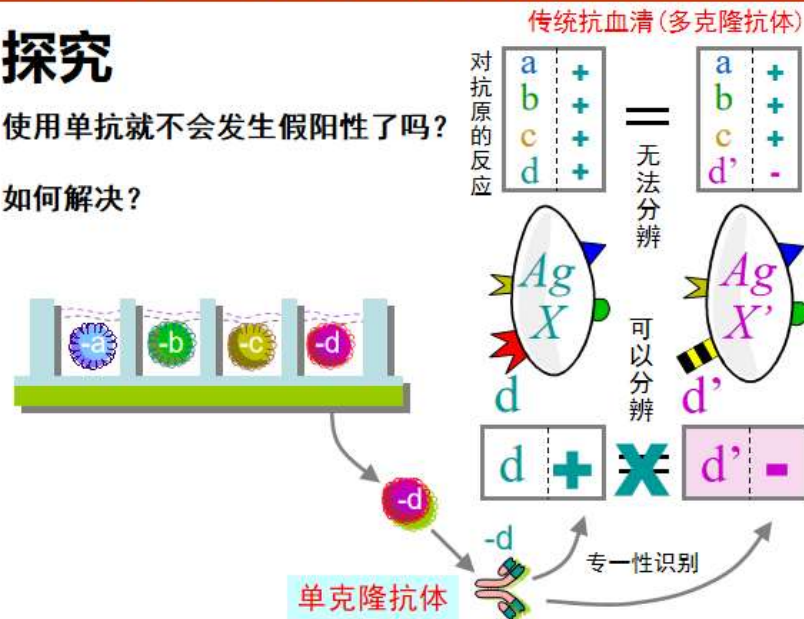


单克隆抗体和传统抗血清在抗原检测方面的区别

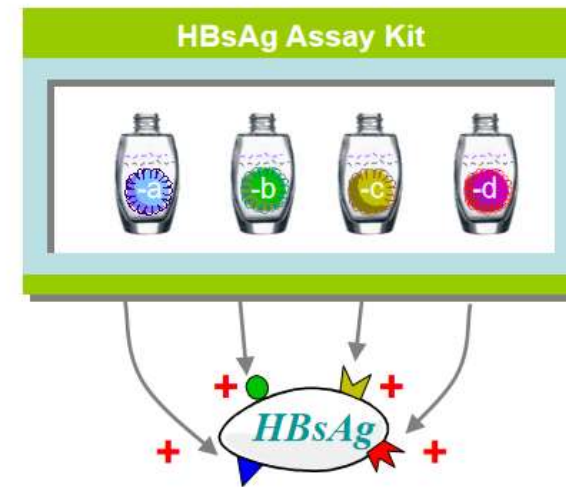
探究

使用单抗就不会发生假阳性了吗？

如何解决？



单克隆抗体试剂盒



单克隆抗体的应用

■ 诊断

- 早早孕试剂；**癌症诊断**；体内肿瘤定位诊断；传染病诊断；药物测定（**酶联免疫**ELISA、荧光免疫FAT、放射性免疫RIA、**Western免疫印迹**）

■ 治疗

- 被动免疫（**中和病原**、**双功能抗体**）；**生物导弹**

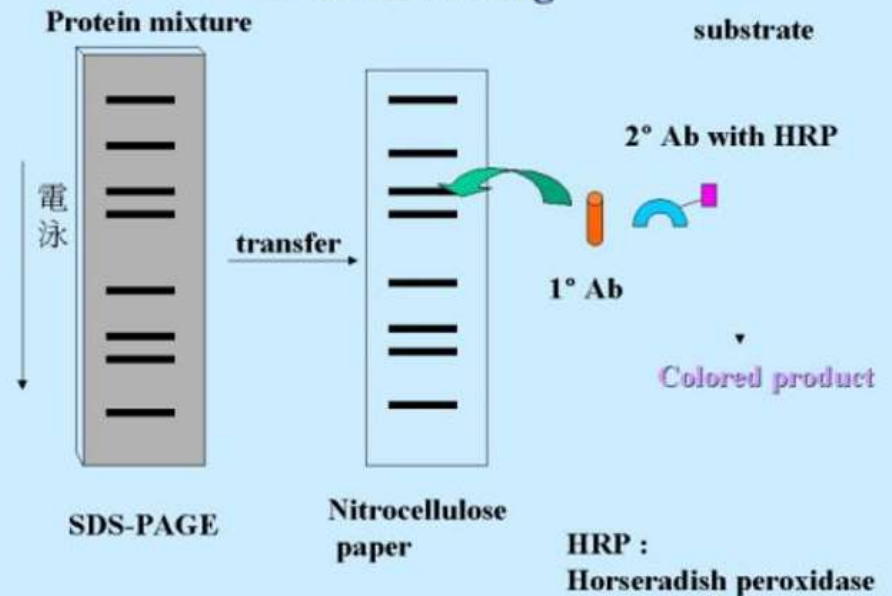
■ 骨髓和器官移植

■ 蛋白质提纯

- 免疫亲和层析**



Western blotting



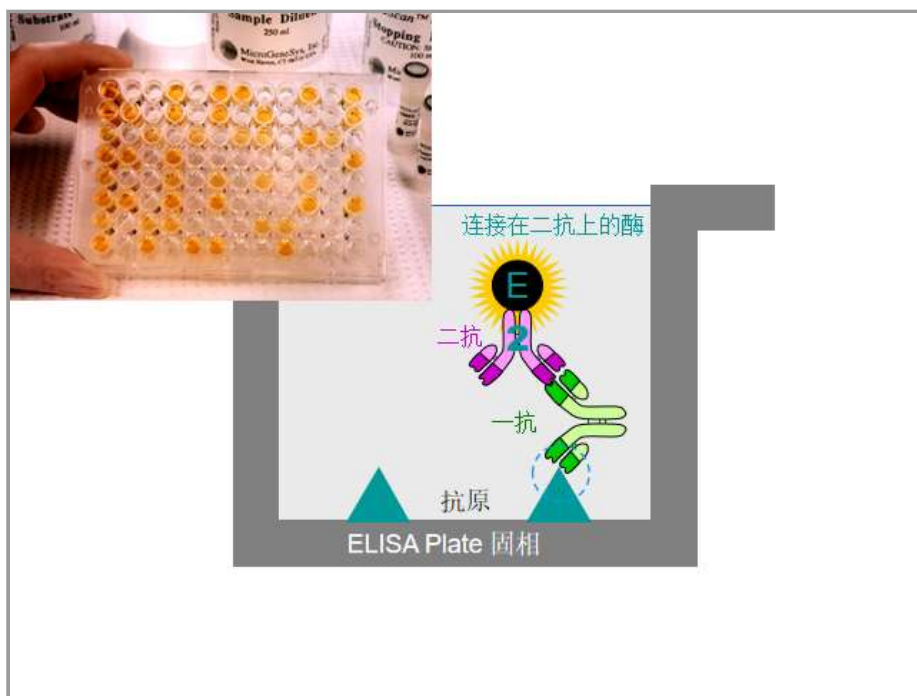
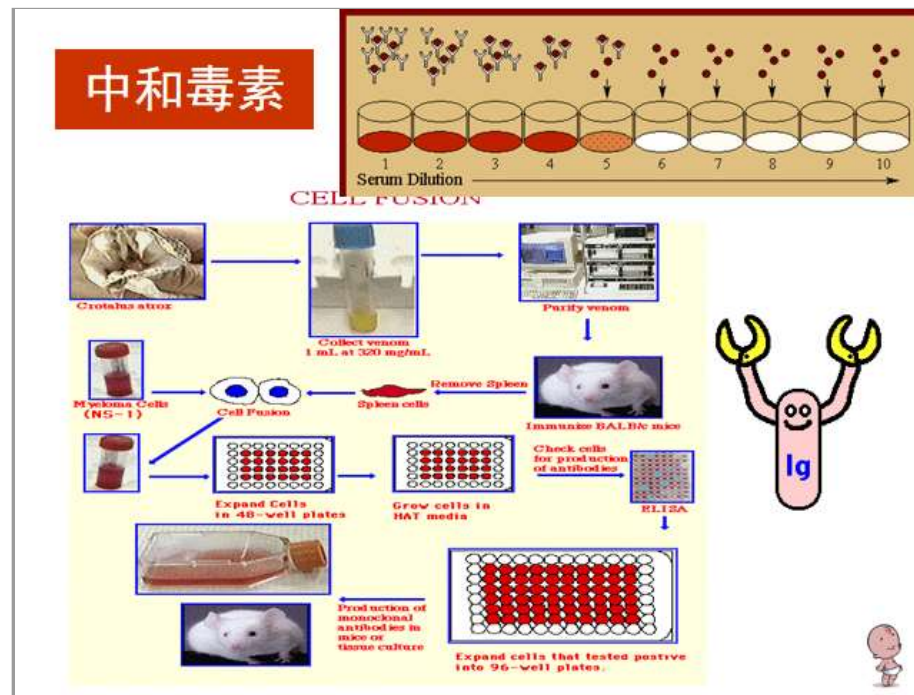
Invading bacteria

Macrophage

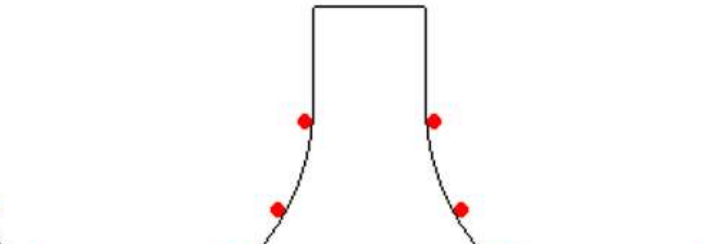
B-cell

Plasma cell

Antibodies upon bacteria



Add patient's serum, containing antibodies, to antigen-coated wells

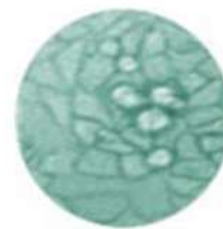


Sample A
(positive)

Sample B
(negative)



免疫毒素对人卵巢癌细胞的杀伤作用



未加免疫毒素的SKOV3

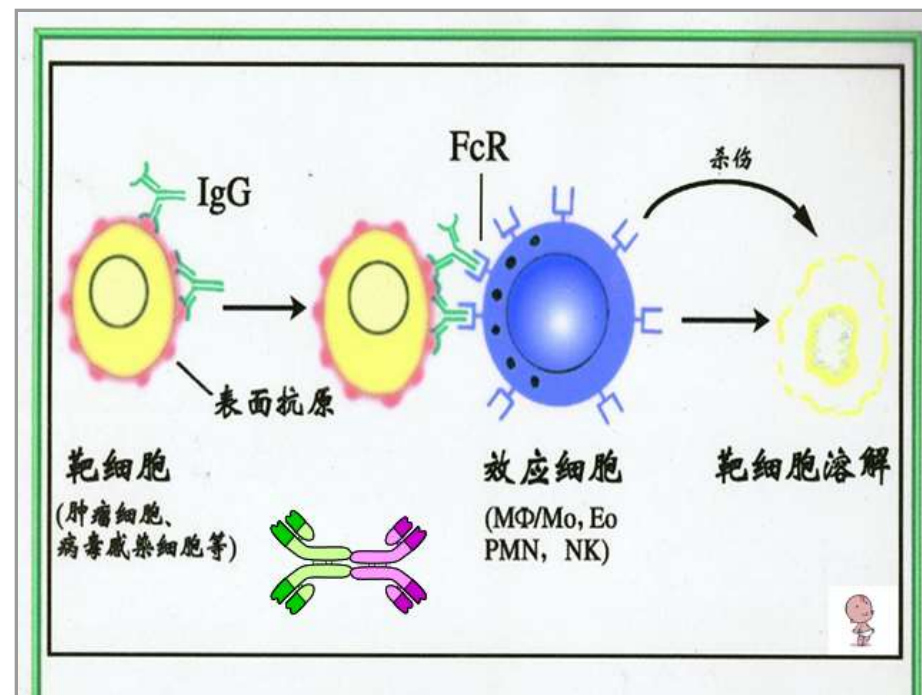


加入免疫毒素24小时后SKOV3的形态变化

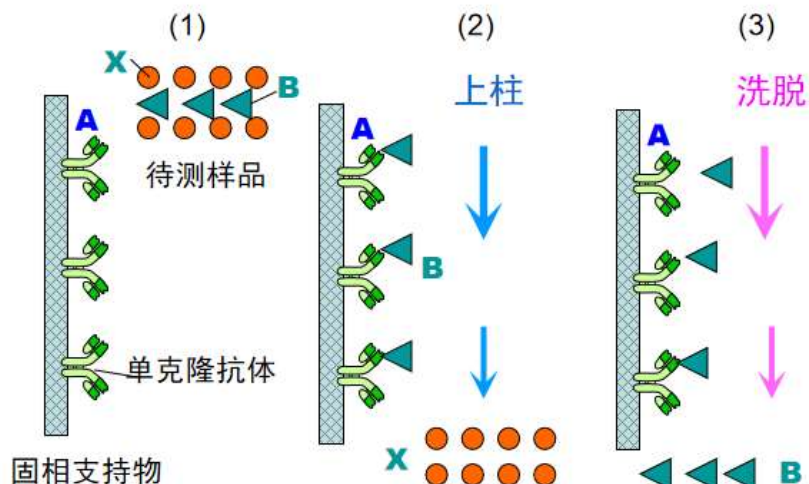


甲胎球蛋白浓度

- 正常浓度: <20 ng/ml
- 异常浓度
 - 100-350 有可能是肝细胞癌
 - 350-500 有可能是肝细胞癌
 - 500-1000 可能是肝细胞癌
 - >1000 肝细胞癌



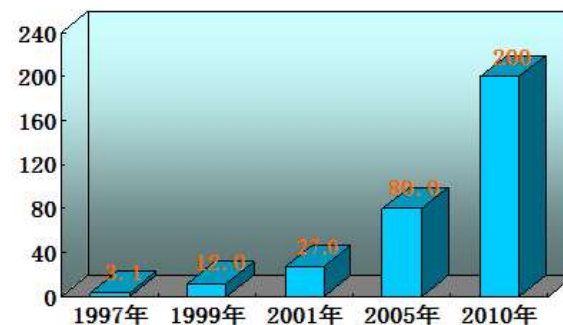
免疫亲和层析



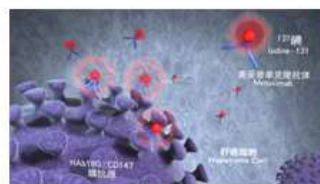
单克隆抗体的研究方向与发展前景

- 新型单克隆抗体 (如人源化抗体、双功能抗体)
- 肿瘤及癌症治疗
- 市场潜力巨大

全球McAb销售额增长情况 (单位: 亿美元)



华神集团——利卡汀



华神集团属于生物医药类企业，他的生物药品主要包括利卡汀单抗注射液、EGF冻干滴眼液、LXM氧化底密度脂蛋白监测试剂盒三个国家一类新生物制剂。其明星产品利卡汀作为国家一类创新新药，是全球第一个运用单克隆抗体靶向治疗肝癌的基因药品，一直为市场关注。

利卡汀是一种用于导向放射治疗肝癌的碘¹³¹I标记的新型单抗。由第四军医大学细胞工程研究中心研制，2007年12月上市。美妥昔单抗—HAb18 F(ab')₂可与分布在肝癌细胞膜蛋白中的HAb18G抗原结合，将其荷载的放射性碘¹³¹I输送到肿瘤部位，从而产生抗肿瘤作用。

Genentech Co. 基因泰克

基因泰克(Genentech)公司是美国历史最久的生物技术公司，1976年4月7日，科莱勒·帕金斯(Kleiner Perkins)公司(一家风险投资公司)的合伙人、27岁的罗伯特·斯万森与加州大学的生物化学家、DNA重组领域的奠基人、1976年诺贝尔奖金获得者赫伯·玻伊尔(Herbert Boyer)教授创建了基因泰克。公司最初的启动资金是斯万森的私人积蓄2.6万美元。斯万森从科莱勒·帕金斯公司争取了10万美元作为公司研究开发启动经费，作为回报，科莱勒·帕金斯公司将持有基因泰克25%的股份。9个月以后，另一家风险资本公司向基因泰克投资85万美元，持股25%。与上一次注资相比，每股价格从12.5美分上涨到78美分，公司估价上涨至337万美元。此时基因泰克的产品还在试验之中，人们对它能否取得成功普遍持怀疑态度。

在20世纪80年代末，基因泰克由于大量投入研发纤溶酶原激活剂，公司现金流出现了“身无分文”的窘况。1990年，瑞士的罗氏向基因泰克伸出橄榄枝，出资21亿美元，回报是60%的股份。没有这笔钱，基因泰克对新产品的投资很难继续下去。之后罗氏继续购买基因泰克的股票并获得在欧洲销售该产品的权利。将产品卖给罗氏加强了基因泰克的研发战略。罗氏从这些交易中得到了巨大的收益，得到的远比付出的多。

1995年, 圣地亚哥IDEC医药公司的研究人员开发了一种名叫Rituxan的新药, 这是第一种成功瞄准癌细胞蛋白质的单克隆抗体药物。Rituxan是单克隆抗体, 它可以挑选出癌细胞交给免疫系统摧毁。苦于资金瓶颈, Rituxan的研发工作遇到了困难, 这时基因泰克决定出资5700万美元帮助IDEC继续研发, 条件是获得Rituxan65%的股份。

由于具备了技术优势, 解决了资金的后顾之忧, 基因泰克又研发出用于治疗晚期乳腺癌的贺喜汀(Herceptin, 群司珠单抗), 并于1998年获得FDA批准。贺喜汀可以阻止生长因子为乳腺癌细胞提供养分。在2001年基因泰克22亿美元的销售额中, 贺喜汀占了3.47亿美元。

基因泰克研发的抗癌新药Avastin(bevacizumab)是一种单克隆抗体, 主要通过抑制能够刺激新血管形成的血管内皮生长因子令癌细胞无法获得养分而被“饿死”。该药是基因泰克的骄傲, 自2004年2月26日在美国上市以来, 在药物市场和资本市场刮起了一阵旋风。该药二季度的销售额高达1.33亿美元, 远远超出诸多分析家估计的8500万美元, 使基因泰克二季度总收入出现41%的暴涨, 公司季度销售额冲破了10亿美元的历史大关, 总收入达11亿美元。预计Avastin2004年的销售额将达4亿~5亿美元, 2005年可望进入重磅炸弹药物之列。

跨国制药巨头掀起水平并购潮

<http://www.sina.com.cn> 2009年03月19日 14:10 南方日报

●罗氏468亿美元收购基因泰克●默克411亿美元并购先灵葆雅●辉瑞680亿美元收购惠氏
经济寒冬下, 各个行业充满了裁员、减产、减薪的消息。医药行业却成了例外, 在其它行业纷纷奉行“减肥过冬”逻辑时, 国际制药巨头们近来却频频掀起罕见的并购大战, 一时间硝烟弥漫。1月26日, 全球制药老大辉瑞制药宣布斥资680亿美元吞下另一位列世界500强的制药巨头惠氏, 令当下人人自危的金融界为之一震。

3月9日, 美国默克公司(默沙东)同意以411亿的价格收购其长期的合作伙伴先灵葆雅公司, 预计交易将在今年第四季度完成。

3月12日, 瑞士罗氏制药紧跟其后, 宣布以468亿美元的现金收购基因泰克剩余的44%的股份, 从而拥有了这家生物技术公司的全部股权。

这一次不再是近年来医药界奉行的垂直并购做法——一家大型制药公司购并一家小型生物制药公司, 而是“大吃新”式的“水平并购”。对于普遍面临“明星”专利药过期的制药巨头而言, 新药研发能力强的生物制药公司已成群雄逐鹿的目标。

专利药过期拖累公司业绩

对于辉瑞、罗氏这些制药巨头而言, “明星”产品专利保护过期是促成此次并购大潮的主要原因。“就专利到期的问题来说, 辉瑞的危机可以说是整个行业中最深重的。”标准普尔公司分析师萨福特拉斯说。据标准普尔测算, 2008年, 辉瑞因世界处方量最大的高血压和心绞痛药物络活喜、过敏治疗药物仙特明和抗癌药物伊立替康这三个重磅专利药的专利到期带来的损失高达26亿美元。但问题不仅仅于此, 辉瑞的明星药物立普妥也将于2010年3月份到期, 这是全球最畅销的降胆固醇药, 销售额占辉瑞总收入的1/4。分析师认为, 立普妥到期之后的2010年至2012年, 辉瑞将可能失去目前销售收入的41%。由于处方药投入大、研发周期长, 失败率高, 以及受到各国日益严格的审核制度影响, 辉瑞在主要盈利产品的补充上出现了断链。

不仅如此, 罗氏也面临着同样的问题。在完成并购前, 罗氏已占有基因泰克的55.8%的股份, 并拥有基因泰克产品在美国以外的销售权, 基因泰克旗下的Avastin和Herceptin抗癌药物, 使罗氏成为世界上最大的抗癌药物销售公司。然而, 如果2015年合约终止, 虽然罗氏还可以拥有这些老产品的销售权, 但是需要对所有新产品重新谈判。于是收购基因泰克可以确保罗氏在2015年之后获得基因泰克新产品的销售权, 同时避免出现专利到期的问题。

而默克早在2003年的万络事件(当时其新药万络因产生副作用而被迫实施全面召回)就遭受重创, 此后新药审批被卡得很严。其降胆固醇新药Cordaptive的上市请求迟迟未能获得美国FDA批准。同样由于新药研发受制, 2008年默克一些主要产品销量都出现大幅滑坡, 去年公司股价总共下跌了48%。

期望以并购降低生产成本

通过并购, 辉瑞在规模上已远远超过其竞争对手法国赛诺菲安万特、日本武田制药公司等, 进一步巩固了其霸主地位。默克也将成为全美第二大制药公司, 罗氏也将跃升全美第七大制药商。目前这三大制药巨头都对并购后的前景信心满满。

辉瑞对外表示, 由于惠氏在处方药品、非处方健康保健产品和营养品领域都具有领先优势。通过收购, 辉瑞不仅可以得到惠氏2008年新上市的抑郁治疗药物Pristiq, 以及肾脏恶性肿瘤治疗药物Torisel、新型抗菌药物Tygacil、关节炎治疗药物Enbrel、全球销量最大的肺炎疫苗Prevnar等名牌产品, 而且可以利用惠氏的研发力量, 拓展生物制药和疫苗业务。

辉瑞CEO杰弗里·金德勒称, 并购为产业转型提供了绝好的机会, 合并产生的世界第一大生物制药公司将其独特、多样和规模化的优势屹立于全球医疗市场。辉瑞和惠氏合并后将裁员15%, 关闭5家工厂, 并提出2012年前要在营销、研发和制造方面削减约40亿美元成本的目标。

而对罗氏而言, 大药厂和生物技术公司的企业文化融合将困难重重, 毕竟至今没有一家大药厂成功完成对生物技术公司的全资收购和整合。上述经理表示, 正是由于人才、创新和扁平化管理, 生物技术公司这几年才发展迅猛。并购后, 基因泰克的独立性、创新效率和人才可能将受到严重影响。

有分析师则指责, 基因泰克一直在为罗氏下金蛋, 现在的做法无异于“杀鸡取卵”, 是在毁灭价值而不是创造价值。