

• 综 述 •

单克隆抗体人源化技术研究进展

潘 阳^{1,2}综述,王露楠²审校

(1. 北京协和医学院研究生院, 北京 100730; 2. 卫生部临床检验中心, 北京 100730)

关键词: 细菌噬菌体; 人源化抗体; 嵌合抗体; CDR 移植抗体

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 13. 037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)13-1483-02

单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)是来自单个 B 淋巴细胞或一个杂交瘤细胞克隆的只识别某一种特定抗原表位(抗原决定簇)的抗体。1975 年 Kohler 和 Milstein^[1]共同创立了杂交瘤技术,首次获得了人工制备的单克隆抗体。单克隆抗体具有高度的特异性和均一性,且能大量制备,从而为抗体的研究和应用带来了突破,在疾病的预防、诊断及治疗方面显示出重要作用。然而,由该方法制备的 McAb 存在若干缺陷:(1)由于其多为鼠源性,具备免疫原性,被人免疫系统识别后可产生人抗鼠抗体(human antigen mouse antibody, HAMA),而造成免疫损伤;(2)该种 McAb 不能有效激活人体中补体和 Fc 受体相关的效应系统,且在体内半衰期较短^[2]。为了克服上述缺陷,研究人员根据抗体结构与功能之间的联系,利用不同的策略对鼠源性 McAb 进行了程度不同的人源化,将异源抗体中和抗原结合的相关残基与人抗体重新拼接构建了一系列具有不同特点的人源化抗体(humanized antibody)。本文即对目前应用较为广泛的几种 McAb 人源化技术的研究现状与发展做一综述。

对鼠源性 McAb 的人源化研究主要经历了三个发展阶段:将鼠源性 McAb 的可变区(variable region, VR)和人抗体的恒定区(constant region, CR)组装合成嵌合抗体;仅保留鼠源性 McAb VR 中与抗原结合的互补决定区(complementarity-determining region, CDR)制备 CDR 移植抗体或改型抗体;利用噬菌体抗体库合成全人源性抗体^[3]。

1 嵌合抗体

嵌合抗体技术的基本原理是应用基因重组技术,将小鼠抗体基因上的 VR 与人抗体基因的 CR 重组后导入骨髓瘤细胞中表达,分离纯化相应的抗体蛋白。1984 年首次应用上述方法重组制备了抗半抗原磷酸胆碱的全分子人-鼠嵌合抗体。

目前,嵌合抗体主要有三种应用形式:嵌合 IgG、嵌合 Fab 和嵌合 F(ab')₂。三类抗体各有其特点:嵌合 IgG 抗体因含有人抗体的 Fc 段,能有效地与补体及靶细胞上的 Fc 受体结合,介导补体及细胞对靶抗原的杀伤和吞噬作用,但鼠源性成分较多,免疫原性大且组织穿透力差^[4];嵌合 Fab 和嵌合 F(ab')₂ 抗体分子小、穿透力强,但两者均不具有 Fc 段,因而无抗体依赖细胞介导的细胞毒作用和补体依赖的细胞毒作用,因此这两种抗体不能作为药物直接发挥作用,但可充当小分子药物载体或用于诊断试验。

2 CDR 移植抗体

2.1 完全 CDR 移植抗体 由于鼠源性抗体 VR 中的骨架区(framework region, FR)仍残留一定的免疫原性,为最大限度的减少鼠源成分,用人 FR 替代鼠 FR 可形成更为完全的人源化抗体,即在此抗体中除了 3 个 CDR 是鼠源以外,其余全部是人源结构,这一类型的抗体称为 CDR 移植抗体或改型抗体。Nakano 等^[5]应用这一策略,将鼠源 McAb 的 CDR 区完全移

植,得到了抗磷脂酰肌醇(蛋白)聚糖嵌合抗体。但随后多项研究发现,简单的 CDR 移植往往明显降低抗原-抗体反应的亲和力,甚至丧失与抗原结合的能力。其原因在于 FR 不仅作为骨架对 CDR 起到支持作用,FR 中的某些非 CDR 区补充调控残基还为 CDR 的回折构象提供必要的支持,其形状和侧链大小协同决定 CDR 的基本结构,影响 CDR 与抗原结合的特异性和亲和力^[6-7]。

2.2 部分 CDR 移植抗体 在简单 CDR 移植的基础上又相继发展了部分 CDR 移植技术。研究发现,轻链的 CDR1、CDR2 和重链的 CDR3 对保证抗体与抗原特异性结合至关重要,其余三个 CDR 的作用则较低^[8]。因此只将抗体结合抗原必须的 CDR 移植到人抗体的 FR 骨架上即能获得对人免疫原性更小的嵌合抗体,这类抗体称为部分 CDR 移植抗体。

2.3 特异决定区(specificity determining, residue, SDR)移植抗体 正如并非所有的 CDR 在抗原抗体反应中具有同样的重要作用,X 射线晶体衍射实验提示具体到一个 CDR 中,不是所有的蛋白分子都参与抗原的特异性识别。执行抗原识别的 CDR 中的一些特定区域称为 SDR。由此又产生了 SDR 移植抗体。该抗体是将 McAb 中与抗原结合密切相关的 SDR 等少数残基移植到人抗体的相关部位,从而进一步提高抗体的人源化水平。根据目前的研究,抗体轻链的 SDR 多位于 27d、34、50、55、89、96 残基,而重链的 SDR 多位于 31、35b、50、58、95、101 残基^[9]。基于上述两种策略,部分 CDR 移植、SDR 移植的构建方法主要有:(1)模板替换,使用与鼠对应部分有较大同源性的人 FR 替换鼠 FR;(2)表面重塑,对鼠 CDR 和 FR 表面残基进行修饰或重塑,使其具有类似于人抗体 CDR 的轮廓或人 FR 的形式;(3)补偿交换,对起关键作用的残基进行改变以补偿完全的 CDR 移植;(4)定位保留,人源化 McAb 以人 FR 保守序列为模板,但保留了鼠源 McAb VR 中参与抗原结合的氨基酸残基,包括 CDR 和 FR 中的一些关键残基^[10]。例如 Kim 等^[11]对其构建的抗乙型肝炎病毒表面抗原完全 CDR 移植抗体进行人源化,用筛选出的 17 个人氨基酸残基代替了鼠 CDR 中的相应残基,该 SDR 移植抗体的亲和力与之前的 CDR 移植抗体相同,但 T 细胞表位分析显示免疫原性有很大程度的降低。

3 抗体库技术构建的人源化抗体

3.1 噬菌体抗体库技术 噬菌体抗体库技术也可以用于抗体的人源化。噬菌体抗体库技术结合了噬菌体展示与抗体组合文库技术,将抗体序列插入噬菌体编码基因中,使抗体和噬菌体外壳蛋白形成融合蛋白。因此该技术能够绕过免疫动物和细胞融合等过程,并能通过抗体片段的克隆选择,分离得到几乎所有抗原的人源性抗体^[12]。噬菌体展示技术包括噬菌体库的产生、结合抗原的展示抗体的筛选、展示有高亲和力抗体的噬菌体扩增、高亲和力抗体的分离和定性等步骤。如吴炜霖

等^[13]采用上述噬菌体展示技术制备的自身免疫性疾病噬菌体抗体库。以该方法制备抗体优点是实现了抗体基因型和表型的结合,可方便、迅速地获得完全人源化的、高亲和力的抗体,但缺点是从非免疫抗体库获得的抗体亲和力不高、受外源基因转化率限制、抗体库的库容不足以涵盖一些动物的抗体多样性等。因此大容量抗体库是获得高亲和力抗体和针对稀有抗原抗体的关键^[12]。

3.2 表位导向技术 将噬菌体抗体库技术与杂交瘤细胞技术结合,产生了一类新的以 McAb 为基础的抗体人源化方法,即表位导向选择法^[14]。这一方法的策略是首先构建相应的 McAb,通过保留异源抗体的轻链或重链,用保留的链与人源重(轻)链抗体库杂交,组成杂交抗体库,筛选得到最高亲和力的人源重(轻)链,再用该链与人源轻(重)链抗体库杂交,经第二次亲和力筛选即可得到具有原 McAb 特异性的完全人源抗体。该方法目前的技术瓶颈之一是经过两轮筛选,抗体的特异性和亲和力可能出现不同水平的下降。但 Kim 和 Hong^[15]采用该方法将鼠抗 TAG-72 McAb 重链与人轻链抗体库杂交筛选得到的 TAG-72 抗体轻链保持了与原 McAb 相同的亲和力。若能利用方法学的优化克服目前表位导向选择法存在的缺陷,通过该技术制备的抗体与嵌合抗体技术或 CDR 移植技术制备的抗体相比具有完全人源化的特征,具有广阔的应用前景。

4 人源化抗体的临床应用与发展前景

人源化抗体研究在近 30 年得到了极大的发展,应用范围也不断扩展。在疾病的体外诊断方面,人源化抗体不仅用于细菌、病毒、原虫等所致感染性疾病的诊断,同样用于淋巴瘤、骨髓瘤的鉴别和组织分型等^[16]。目前已批准使用的单克隆/人源化抗体类诊断试剂包括用于结肠癌的 Votomab 和 Arcilumomab,用于卵巢癌的 Igovomab,用于黑色素瘤的 Tecnemab K-1 等。作为检测试剂,人源化抗体的优势在于保持了来源 McAb 的特异性,减少了交叉反应发生的概率,同时具有基质和生物活性的均一性,便于大规模生产,便于制备过程中的质量控制,提高了标准化和规范化水平^[17]。

人源化抗体更重要的应用在于疾病治疗。截至 2007 年全球已有 500 余种诊断和治疗用的 McAb 投放市场,100 多种处于各期临床研究^[2]。Roche 公司生产的抗 CD25 的人源化单抗 Zenapax 预防同种异体肾脏移植患者的器官排斥反应效果良好且无严重不良反应;用于治疗人类获得性免疫缺陷综合症的人源化单抗 hu5A8 目前正处于临床 II 期试验阶段。由此可见,从恶性肿瘤到移植免疫排斥,从自身免疫性疾病到感染性疾病,人源化抗体都在治疗方面发挥着重要的作用。但目前的人源化抗体用于治疗也存在一定的困难。首先,来源 McAb 经人源化后,其结合能力会出现不同程度的下降,一般的人源化抗体只能保留抗原抗体结合能力的 33%~50%。这就需要采用定点突变或链交换的方法提高抗体亲和力。另一方面,肿瘤、自身免疫性疾病或重症感染的治疗需要长时间、大剂量重复给药,尽管人源化抗体免疫原性已大大降低,但采用上述给药方式仍可能出现 HAMA 反应。因此,采用基因工程技术或转基因技术发展完全人源抗体是目前研究的趋势。

抗体人源化技术自开创至今,从简单的嵌合抗体改进到 CDR 移植抗体,再发展到全人源化抗体,在尽量保留与抗原高亲和力、高特异性结合能力的基础上降低了免疫原性。但影响抗体免疫原性和亲和力的因素很多,如抗原递呈方式、次级信号系统及患者的个体差异等,而目前所制备的人源化抗体只解

决了其中的部分问题。因此,对抗体效应机制及机体免疫系统调节机制应进行更加细致深入的研究,为抗体人源化技术的发展提供理论指导。随着相关技术的发展,抗体人源化技术一定会越来越丰富,越来越完善,更多的人源化抗体也一定会在基础研究和临床应用领域发挥重要的作用。

参考文献

- [1] Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [2] Demarest SJ, Glaser SM. Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability[J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2008, 11(5): 675-687.
- [3] Schneider CK. Monoclonal antibodies-regulatory challenges[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(6): 431-438.
- [4] Bebbington C, Yarranton G. Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(6): 613-619.
- [5] Nakano K, Ishiguro T, Konishi H. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization[J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(10): 907-916.
- [6] Almagro JC, Fransson J. Humanization of antibodies[J]. *Front Biosci*, 2008, 1(13): 1619-1633.
- [7] 沈倍奋, 陈志南, 刘民培, 等. 重组抗体[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 88-90.
- [8] Harding FA, Stickler MM, Razo J, et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions[J]. *MAbs*, 2010, 2(3): 256-265.
- [9] Kashmiri SV, De Pascalis R, Gonzales NR, et al. SDR grafting—a new approach to antibody humanization[J]. *J Methods*, 2005, 36(1): 25-34.
- [10] Sehlin D, Hedlund M, Lord A, et al. Heavy-chain complementarity-determining regions determine conformation selectivity of anti- $\alpha\beta$ antibodies[J]. *Neurodegener Dis*, 2011, 8(3): 117-123.
- [11] Kim KS, Kim HJ, Han BW, et al. Construction of a humanized antibody to hepatitis B surface antigen by specificity-determining residues(SDR)-grafting and de-immunization[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 231-237.
- [12] Schirrmann T, Hust M. Construction of human antibody gene libraries and selection of antibodies by phage display[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 651(2): 177-209.
- [13] 吴炜霖, 夏维, 陆慧琦, 等. 自身免疫性疾病噬菌体抗体库的构建和初步鉴定[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(7): 625-626.
- [14] Jespers LS, Roberts A, Mahler SM, et al. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen[J]. *Biotechnology*, 1994, 12(9): 899-903.
- [15] Kim SJ, Hong HJ. Guided selection of human antibody light chains against TAG-72 using a phage display chain shuffling approach. [J] *J Microbiol*, 2007, 45(6): 572-577.
- [16] Siddiqui MZ. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal[J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72(1): 12-17.
- [17] 杜春红, 宋志忠, 于国林. 单克隆抗体大量生产技术及研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(3): 248-249.