

单克隆抗体人源化技术研究进展

涂少华 陶嵘 沈江帆

【摘要】 随着分子生物学技术的发展,应用 DNA 重组技术、抗体库技术及转基因技术对鼠源性单抗进行人源化改造,先后出现了嵌合抗体、互补决定区移植抗体和全人源抗体,它们从不同角度克服了鼠源性单抗临床应用的不足,为单克隆抗体在临床诊断及治疗中的应用带来了新的曙光,该文对单克隆抗体人源化技术的研究进展作一综述。

【关键词】 单克隆抗体;噬菌体展示;人源化抗体;嵌合抗体;CDR 移植抗体;全人源单抗

Advances on humanized monoclonal antibody technology Tu Shaohua, Tao Rong, Shen Jiangfan. Department of Nuclear Medicine, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Corresponding author: Tao Rong, Email: brain_tao@hotmail.com

【Abstract】 With the development of molecular biology, people can humanize mouse monoclonal antibody with DNA recombination, antibody library and transgenic technology which developed antibody techniques from chimeric and grafted antibody to fully human antibody. The humanized monoclonal antibodies overcome the clinical shortage of mouse monoclonal antibody from different angles, also bring a new dawn to the diagnosis and treatment of human disease. This article will summarize the progress on the humanization of mouse monoclonal antibody.

【Key words】 Antibodies, monoclonal; Phage display; Humanized antibody; Chimeric antibody; Complementarity-determining region grafted antibody; Fully human antibody

单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)在疾病的预防、诊断及治疗方面显示出重要的作用。1975年, Köhler 和 Milstein^[1]共同创立了杂交瘤技术,首次获得了人工制备的 McAb,然而,由该方法制备的 McAb 存在以下缺陷:①由于其为鼠源性,被人免疫系统识别后可产生人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA);②鼠源性 McAb 不能有效激活人补体和 Fc 受体相关的效应系统,且在体内的半衰期较短^[2]。为了克服上述缺陷,利用基因工程技术对鼠源性 McAb 进行了不同程度的人源化,产生了各种人源化抗体。

McAb 的人源化研究主要经历了 3 个发展阶段:将鼠源性 McAb 的可变区和人抗体的恒定区组装成人-鼠嵌合抗体(human-mouse chimeric antibody);仅保留鼠源性 McAb 可变区中与抗原结合的互补决定区(complementarity-determining region, CDR),制备 CDR 移植抗体(grafted antibody)或改

型抗体(reshaped antibody);利用抗体库及转基因技术制备全人源抗体(fully human antibody)^[3]。

1 嵌合抗体(chimeric antibody)

利用 DNA 重组技术将鼠 McAb 的轻、重链可变区基因插入含有人抗体的恒定区表达载体中,转化哺乳动物细胞表达出人-鼠嵌合抗体。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^[4]。

1.1 嵌合抗体的种类

嵌合抗体主要有 3 种应用形式:嵌合免疫球蛋白 G、嵌合 Fab 和嵌合 F(ab')₂。嵌合免疫球蛋白 G 因含有人抗体的 Fc 段,能介导补体及细胞对靶抗原的杀伤和吞噬作用,但因鼠源性成分较多,免疫原性大且组织穿透力差^[5];嵌合 Fab 和嵌合 F(ab')₂ 抗体分子小、穿透力强,可充当小分子载体用于放射免疫显像及放射免疫治疗。

1.2 嵌合抗体的优缺点

嵌合抗体的优点包括:①在人体内的半衰期长,免疫原性低,与抗原结合的特异性和亲和力

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2014.05.012

作者单位:200062,上海中医药大学附属普陀医院核医学科

通信作者:陶嵘(Email: brain_tao@hotmail.com)

强,能参与人体免疫反应;②可根据需要更换免疫球蛋白恒定区基因的种类、型或亚型,从而改变抗体的类别、型或亚型。其缺点包括:嵌合抗体仍保留着30%左右的鼠源序列,可引起不同程度的人抗鼠免疫反应,提示有必要进一步降低其鼠源性。

2 CDR 移植抗体

由于鼠源性抗体可变区中的骨架区仍残留一定的免疫原性,为了最大限度地减少鼠源成分,用人骨架区替代鼠骨架区可形成更为完全的人源化抗体,即在此抗体中除了CDR是鼠源以外,其余全部是人源结构。这一类型的抗体被称为CDR移植抗体或改型抗体,包括完全CDR移植、部分CDR移植和特异决定区(specific determining region, SDR)移植抗体。

2.1 完全 CDR 移植抗体

将异源性McAb上的6个CDR通过PCR等方法克隆到人抗体相应的骨架区上构建成新的抗体,这一类型的抗体被称为完全CDR移植抗体^[6]。这种移植仅9%的序列来源于鼠McAb,最大限度地降低了异源性^[7-8]。

2.2 部分 CDR 移植抗体

研究发现,轻链的CDR1、CDR2和重链的CDR3对保证抗体与抗原的特异性结合至关重要,其余3个CDR的作用则较低^[9]。因此,只将抗体结合抗原必须的CDR移植到人抗体的骨架区上即能获得对人免疫原性更小的抗体,这类抗体被称为部分CDR移植抗体。

2.3 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了抗原的特异性识别。执行抗原识别的CDR中的一些特定区域被称为SDR,由此又产生了SDR移植抗体。这类抗体是将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,从而进一步提高了抗体的人源化水平。

2.4 移植抗体的构建方法

根据目前的研究,抗体轻链的SDR多位于27d、34、50、55、89、96位残基,而重链的SDR多位于31、35b、50、58、95、101位残基^[10]。基于上述两种策略,部分CDR移植、SDR移植的构

建方法主要包括:①模板替换;②表面重塑;③补偿变换;④定位保留^[11-12]。

2.5 CDR 移植抗体的优缺点

CDR移植抗体的优点包括:与嵌合抗体相比,其免疫原性更低,与抗原结合的特异性和亲和性更好,能更好地参与人体免疫反应。其缺点包括:CDR移植抗体仍保留着10%左右的鼠源序列,仍可引起不同程度的人抗鼠免疫反应。

上述方法构建的人源化抗体仍具有10%~30%的异源蛋白,在临床应用中还是受到不同程度地限制,因而有待于进一步研制免疫源性更小的抗体——全人源单抗。

3 全人源单抗

全人源单抗是指单抗的基因序列完全来源于人抗体基因序列,是诊断及治疗性抗体的发展趋势。目前生产全人源单抗的技术已比较成熟,主要包括抗体库技术和基因工程小鼠技术^[13]。

3.1 抗体库技术

抗体库技术最大的优点是使McAb的制备可在体外模拟抗体的生成,达到不经免疫和细胞杂交融合制备特异、稳定抗体的目的,因此成为研制全人源单抗的有效、可靠手段^[14-16]。抗体库技术主要包括噬菌体抗体库技术、合成抗体库技术和核糖体体外展示技术。

3.1.1 噬菌体抗体库技术

噬菌体抗体库技术的出现开创了一条简便快速的基因工程抗体生产路线,为人源化抗体的制备提供了新途径。1985年,Smith^[17]第一次将外源基因插入丝状噬菌体f1的基因Ⅲ中,使目的基因编码的多肽以融合蛋白的形式展示在噬菌体表面,从而创建了噬菌体展示技术。

该技术的基本路线是用PCR扩增人抗体全套可变区基因,重组到噬菌体载体中,并通过与单链噬菌体外壳蛋白形成融合蛋白,使Fab、单链Fv抗体及二硫链稳定性Fv抗体等形式的小分子人源抗体表达在噬菌体表面,形成噬菌体抗体库,采用亲和层析筛选出特异性噬菌体抗体。1989年,美国Lerner实验室首次应用噬菌体表面展示技术构建了噬菌体抗体库^[18]。Vitaliti等^[19]利用噬菌体抗体库技术制备了抗血管内皮生长因子的单链Fv抗体,能明显减慢肿瘤的生长。何小鹏等^[20]和朱建高等^[21]利

用该技术成功构建了大肠癌噬菌体抗体库和鼻咽癌抗独特性抗体库,并从中筛选出全人源单链抗体。

噬菌体抗体库技术具有明显的优点:不经免疫和杂交、操作简单、筛选容量大、生产成本低等。其缺点是:从非免疫抗体库获得的抗体亲和力不高、受外源基因转化率的限制、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的关键。

3.1.2 合成抗体库技术

Knappik 等^[22]在 2000 年报道了第一个全合成抗体库,基于对抗体结构和功能认识的深入,发现 7 个 V_H 和 7 个 V_L 基因家族覆盖了人类抗体多样性的 95%。据此设计的 14 个通用可变区序列作为构建全合成抗体库的基本骨架,所有 CDR 都设计成很容易置换的盒式结构,预留了构建多种抗体衍生物所需元件的插入位点,并对序列的设计进行了优化。在此基础上又采用三联核苷酸方法进行 CDR 的突变和随机化,保证了抗体的多样性。

3.1.3 核糖体体外展示技术

近年来,一种新的完全不依赖细胞的体外展示技术日趋成熟,其文库容量不受细胞转染效率的影响,文库的多样性和筛选效率得到很大的提高,显示出诱人的应用前景。其基本原理是:首先利用 PCR 技术构建抗体的 DNA 文库(此文库无 3'末端的终止密码子),再将此文库进行体外表达,由于缺少 3'端终止密码子,在翻译到 mRNA 末端时,mRNA 不会从核糖体上脱落下来从而形成“抗体蛋白-核糖体-mRNA”三联复合体,使抗体展示在核糖体的表面,翻译出来的抗体可用抗原进行筛选,由于不经过体内转化,构建的抗体库库容超过 10^{11} ^[23]。利用该技术可以获得高亲和力的特异性抗体。核糖体展示技术具有如下优点:建库快(一般 1~2 d)、库容量大(10^{11} ~ 10^{15})、抗体的表达不依赖细胞、可对半抗原等物质的抗体进行筛选。但也存在如下缺点:体外表达系统的稳定性稍差、完整大分子抗体还不能在核糖体上展示。总之,抗体库筛选技术改变了单抗的制备流程,成为众所瞩目的生物技术及开发热点之一。

3.2 基因工程小鼠技术

20 世纪末,转基因技术应用于人源单抗的制备,可获得完整抗体分子和高亲和力的全人源抗体,因此备受关注,且发展极为迅速。

3.2.1 转基因小鼠技术

1994 年,美国 Cell Genesys 公司和 Gerrpharm 公司几乎同时宣布了转基因小鼠作为生产全抗体的载体的问世,其抗体生成过程是从鼠抗体生成基因被相应的人基因所取代的小鼠开始的。转基因小鼠制备的基本原理是:先将小鼠胚胎干细胞免疫球蛋白基因敲除,再将人的免疫球蛋白基因片段导入,然后将此干细胞植入假性受孕雌鼠子宫中,使其发育成携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠,利用鼠体内抗体亲和力自然成熟的机理,能产生一系列高亲和力的全人源单抗。

转基因小鼠技术具有功效高、亲和力强等优点。但也存在一些缺陷,如通过该技术生成的抗体具有鼠糖基化模式。

3.2.2 转染色体小鼠技术

由于转基因小鼠不能携带完整的人抗体基因,限制了一系列免疫球蛋白的制备。Tomizuka 等^[24]首先建立以染色体为载体的转染色体小鼠,且用该技术制备了高亲和力的全人源单抗。该技术是基因工程小鼠领域的新进展。

4 小分子抗体

完整抗体分子具有体积大(相对分子质量约为 150×10^3)、组织穿透能力差等不足,促进了抗体分子的小型化。小分子抗体具有组织穿透能力强、免疫原性弱、结构稳定、制备简单和表达效率高等优点,是基因工程中制备人源单抗的主要产物,目前小分子抗体主要用于放射免疫显像或治疗等方面^[25]。其缺点是与抗原的结合力弱、半衰期短等。

小分子抗体主要包括:①单价小分子抗体,如 Fab 片段、Fv 片段最小识别单位等;②多价小分子抗体,如双链、三链抗体等;③比利时 Ablynx 公司甚至还提出了纳米抗体的概念^[26],即只有一个重链可变区组成的单域抗体,其相对分子质量只有单克隆抗体的 1/10,是最小的具有完整功能的抗原结合片段。

5 人源化抗体的临床应用与发展前景

人源化抗体的研究在近 30 年得到了极大的发展,应用范围也不断扩大。从疾病的体外诊断到疾病的治疗,从恶性肿瘤治疗到移植免疫排斥,从自身免疫性疾病到感染性疾病,人源化抗体都发挥着重要的作用。人源性单抗在核医学领域中的应用主

要集中在肿瘤的放射免疫显像及治疗中：放射性核素与抗肿瘤人源性抗体偶联物能在体内对肿瘤进行定位，并通过放射免疫显像技术用于肿瘤定位的诊断；另一方面，偶联物对肿瘤的定位性能为肿瘤的药物治疗提供了新的思路——生物导弹，它是以识别肿瘤抗原的抗体为载体，与放射性核素连接而成的抗体导向药物，能增强肿瘤药物的靶向性及对靶细胞的杀伤能力，从而减少因放、化疗导致的正常组织损伤。总之，抗体人源化技术自创立至今，经历了一系列的发展与完善，从嵌合抗体到 CDR 移植抗体，再发展到全人源抗体，在尽量保留与抗原的高亲和力、高特异性结合能力的基础上降低了免疫原性。特别是小分子抗体的制备，由于其分子量小、免疫原性低、穿透性强，更易通过血管到达靶标，是制备分子探针用于分子影像学诊断及治疗最理想的单抗片段^[27-28]。未来单克隆抗体将朝着人源化、微型化、规模化及智能化的方向发展，进一步克服鼠源单抗的临床应用缺陷，为人类疾病的诊断及治疗创造了更美好的前景。

参 考 文 献

- [1] Köhler 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] Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody[J]. *Nature*, 1984, 312(5995): 643-646.
- [5] Siddiqui MZ. Monoclonal antibodies as diagnostics: an appraisal [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72(1): 12-17.
- [6] Nakano K, Ishiguro T, Konishi H, et al. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization [J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(10): 907-916.
- [7] 孙梦梅, 靳彦文, 李平, 等. 新型抗 uPAR 人源化抗体的表达和活性检测[J]. *军事医学*, 2011, 35(4): 258-261.
- [8] 孙思凡, 张部昌, 靳彦文. 治疗性单克隆抗体研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(2): 258-262.
- [9] 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.
- [10] Kashmiri SV, De Pascalis R, Gonzales NR, et al. SDR grafting—a new approach to antibody humanization[J]. *Methods*, 2005, 36(1): 25-34.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 夏红利, 谭晨, 陈德杰, 等. 从 scFv 噬菌体库分离特异性的人源化抗 D-dimer 抗体[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(2): 168-172.
- [16] 胡占东, 公倩, 朱铁虹, 等. 人源 Fab 段噬菌体抗体库的构建及抗 IL-4 抗体的初步筛选[J]. *天津医药*, 2011, 39(6): 493-495.
- [17] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [18] Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1275-1281.
- [19] Vitaliti A, Wittmer M, Steiner R, et al. Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth-factor[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(16): 4311-4314.
- [20] 何小鹏, 李官成, 朱建高, 等. 鼻咽癌人源抗独特型单链抗体的制备及筛选[J]. *癌症*, 2004, 23(2): 124-129.
- [21] 朱建高, 李官成, 李跃辉, 等. 全人源化抗结肠癌单链抗体基因的克隆和表达[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(5): 526-530.
- [22] Knappik A, Ge L, Honegger A, et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides[J]. *J Mol Biol*, 2000, 296(1): 57-86.
- [23] Lamla T, Erdmann VA. Searching sequence space for high-affinity binding peptides using ribosome display[J]. *J Mol Biol*, 2003, 329(2): 381-388.
- [24] Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, et al. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(2): 722-727.
- [25] 潘阳, 王露楠. 单克隆抗体人源化技术研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(13): 1483-1484.
- [26] Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2853-2857.
- [27] Nakajima T, Mitsunaga M, Bander NH, et al. Targeted, activatable, in vivo fluorescence imaging of prostate-specific membrane antigen (PSMA) positive tumors using the quenched humanized J591 antibody-indocyanine green (ICG) conjugate[J]. *Bioconjug Chem*, 2011, 22(8): 1700-1705.
- [28] Osborne JR, Akhtar NH, Vallabhajosula S, et al. Prostate-specific membrane antigen-based imaging[J]. *Urol Oncol*, 2013, 31(2): 144-154.

(收稿日期: 2013-11-08)