

· 述 评 ·

## 人源治疗性抗体研发技术进展

冯健男\*, 乔春霞

军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所重大疫情应急防控药物研究室, 北京 100850

**[摘要]** 1986年美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了首个单抗药物。30多年来,抗体药物领域的发展日新月异,截至2019年12月,获得FDA批准上市单抗药物达79种,用于治疗癌症、自身免疫性疾病、传染病等多种疾病。人源抗体具有特异性强、不良反应小的优点,已经成为新药开发的主流,全球销售额排名前十的药物中,人源抗体药物占据了半壁江山。本文着重对近年来抗体药物研发技术进展,包括抗体人源化、噬菌体展示、转基因小鼠、单细胞PCR等进行述评。

**[关键词]** 治疗性抗体;抗体人源化;噬菌体展示;转基因小鼠;单细胞PCR

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)11-1571-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20201101

### Progression on research technology of human therapeutic antibody

FENG Jiannan\*, QIAO Chunxia

State key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China

**[Abstract]** The first monoclonal antibody was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 1986. Over the past 30 years, the antibody field has developed rapidly. By December 2019, 79 monoclonal antibodies have been approved by FDA for the treatment of cancer, autoimmune, infectious and other diseases. Antibodies have the advantages of high specificity and less side effects, and have become the mainstream of new drug development. Among the top ten biological drugs in the world, antibodies account for half of the total. This paper introduces the novel research technologies, including antibody humanization, phage display, transgenic mice, and single cell PCR, etc.

**[Key words]** therapeutic antibody; antibody humanization; phage display; transgenic mice; single cell PCR

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(11): 1571-1574]

单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb, 简称单抗)是由B细胞产生的、由两条相同的轻链和两条相同的重链组成的Y形结构蛋白。其中抗原结合片段(antigen binding fragments, Fab)由一条重链和一条轻链的6个互补决定区(complementarity-determining region, CDR)组成。Fab段决定了抗体结合抗原的特异性和亲和力;单抗的恒定区(Fc)通过结合细胞表面Fc受体来发挥抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、补体依赖的细胞毒性作用(comple-

ment dependent cytotoxicity, CDC)等功能。目前,治疗性单抗已成为癌症、自身免疫性疾病、传染病等多种疾病的主要治疗方式,其研发重要性日益明显。由于人抗鼠(human antimouse antibody, HAMA)反应的存在,抑制了鼠单抗的临床应用,因此涌现了一系列抗体工程技术,如抗体人源化、噬菌体展示、转基因小鼠、单细胞PCR等技术,可以实现鼠单抗人源化改造以及亲和力提高,或者直接筛选制备人源化/全人抗体,加速了单抗的临床转化和应用。本文将对治疗性抗体药物研发技术进行述评。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31771010)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengjiannan1970@qq.com

### 1 抗体人源化改造

全人、人源化和鼠源抗体分别占临床应用单抗

的51%、46%和3%,可见人源化和全人单抗已经成为治疗性抗体研发的主流。人源化抗体具有免疫原性低,体内半衰期长,有效诱导ADCC、CDC效应等优点。早期的人源化技术是将鼠单抗的可变区与人抗恒定区相连从而获得嵌合抗体。抗GP II b/II a单抗Abciximab于1994年被美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于抑制血小板聚集,成为第一个嵌合抗体药物,抗CD20嵌合抗体利妥昔单抗于1997年被美国FDA批准用于非霍奇金淋巴瘤患者,成为首个治疗肿瘤的嵌合抗体。为了提高抗体人源化程度,CDR移植技术应运而生,将除了CDR区以外的序列替换为人源(如果鼠抗FR框架中的某些氨基酸对维持抗原的识别至关重要,那么这些残基也需要保留),进一步降低免疫原性。1997年FDA批准了第一个人源化单抗——抗IL-2受体抗体Daclizumab,用于预防移植排斥反应,而最著名的人源化抗体当属1998年获批的抗HER2单抗Herceptin,从诞生以来连续登上十大药物畅销榜。目前,通过X线晶体学、冷冻电子显微镜和计算机辅助同源建模等方法可以分析抗原-抗体复合物的结构,了解直接作用的关键残基,从而指导抗体人源化改造<sup>[1]</sup>,许多网络服务平台可以提供信息学和抗体结构数据库,为人抗框架区选择、抗体建模等提供了技术支持<sup>[2]</sup>,多种量化单抗人源化程度的工具,例如Abhinandan和Martin设计的H-score、G-score、T20分析等,也可以清晰地将人类序列和小鼠序列以及其他物种分离开来<sup>[3]</sup>。

## 2 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术是基于噬菌体表面蛋白(如PⅢ蛋白)的结构及包装特点,将外源抗体基因和外壳蛋白融合表达并展示在鞭毛表面,实现靶抗原特异性抗体的快速筛选。1985年,George P. Smith使用重组DNA技术,将外源肽与噬菌体M13的外壳蛋白PⅢ融合,在噬菌体表面展示肽。此后他创建了“抗体选择性噬菌体载体”,能够从 $1 \times 10^8$ 库容噬菌体池中筛选特异性抗体。噬菌体展示抗体的形式可以是单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)或Fab片段,scFv由VH和VL组成,二者之间由一个短而灵活的连接肽相连,而Fab具有相对较高的稳定性,其结合能力与完整的IgG抗体相当<sup>[4]</sup>。由于噬菌体颗粒小、容易扩增和富集,溶解度高( $1 \times 10^{13}$  pfu/mL),因此可以实现抗体的大容量展示。由于在噬菌体展示技术领域作出的卓越成就,George D. Smith与Gregory

P. Winter共同获得了2018年诺贝尔化学奖。

噬菌体展示文库的基因库可以从原始或免疫人类或动物中获得,也可以使用随机CDR合成法构建文库,只要库容足够大,都可以产生针对多种抗原靶点的高亲和力抗体(亲和力达纳摩尔级)。目前,几乎所有商业文库都是大容量非免疫库,从而允许针对不同的抗原进行抗体筛选。FDA已经批准了9种从噬菌体展示文库中获得的全人抗体。阿达木单抗(Humira)由巴斯夫生物研究公司和剑桥抗体技术公司开发,它不仅是第一个获得上市许可的噬菌体库来源抗体(2002年获批),而且也是第一个获得批准的全人单抗药物。阿达木单抗结合并抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ ,被批准用于治疗炎症性疾病如类风湿性关节炎等。阿达木单抗是世界上最畅销的药物,2019年销售额为196亿美元;剑桥抗体技术还研发了治疗系统性红斑狼疮的抗BLYS的全人抗体,命名为Belimumab(Benlysta, 2011年获批);Dyax公司拥有 $3.7 \times 10^{10}$ 库容的天然Fab库,筛到了针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体2(vascular endothelial growth factor 2, VEGFR2)、程序性死亡受体配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)等靶点的全人抗体Necitumumab(Portrazza)、Ramucirumab(Cyramza)和Avelumab(Bavencio);此外,Guselkumab(Tremfya)是Janssen开发的IL-23全人抗体,来自HuCAL抗体库。2017年,Guselkumab获得FDA批准,用于治疗银屑病。

## 3 转基因动物

转基因动物是全人抗体的又一重要来源,通过对细胞系进行基因改造,将人类免疫球蛋白(Ig)基因取代动物内源性Ig基因,使这些动物在免疫后能够合成人类抗体。首个转基因小鼠来源的全人抗体Panitumab是抗EGFR抗体,于2006年获得美国FDA批准。目前来源于转基因小鼠的全人抗体药物数量已达19种<sup>[5]</sup>。

1985年在转基因小鼠中产生人类抗体的想法首次被提出,1994年首个人Ig转基因小鼠株HuMab-Mouse被构建,实现了人IgH和IgK在Ig敲除小鼠中的表达,但引入小鼠的人Ig基因组小于80 kb;1997年更大的人IgK(~700 kb)或IgH(~1 Mb)酵母人工染色体(yeast artificial chromosomes, YAC)被导入小鼠,只表达人抗而不表达鼠抗。但由于缺乏小鼠恒定区,抗体生成、Ig类别转换和体细胞超突变的效率

仍然很低。

为了克服以上缺点,需要保留原鼠抗恒定区,从而实现抗体亲和力成熟、发挥抗体介导的体内效应、调节体细胞突变等<sup>[6-7]</sup>。2014年,利用Cre/loxP重组,建立了直接插入小鼠C $\mu$ 和C $\kappa$ 区上游的人VH-D-JH和VK-J $\kappa$ 的转基因小鼠KyMouse,可以进行体细胞超突变,产生高亲和力的人鼠嵌合抗体;此外,利用细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosomes, BAC)组装人Ig基因,并连续微注射到小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)细胞中,构建了人IgH和IgL基因靶向并取代小鼠IgH和IgL的Velocimune小鼠。

8家公司拥有转基因小鼠并实现了抗体药物开发: Abgenix公司的XenoMouse、Medarex公司的HuMabMouse、Ligand公司的OmniRat、Kymab公司的KyMouse、Regeneron公司的Velocimune Mouse、Harbour抗体公司H2L2 Mouse、Trianni公司的Trianni Mouse以及Ablexis公司的AlivaMab等。2006年,第一种药物Panitumumab被批准用于RAS野生型转移性结直肠癌;同样来源于XenoMouse平台的还有2种用于自身免疫性皮肤病的人抗: IL-17 $\alpha$ 抗体Secukinumab以及IL-17R抗体Brodalumab,分别于2015年和2017年获得美国FDA批准用于银屑病治疗;HuMabMouse开发的两种抗体Ipilimumab(CTLA-4抗体)和Nivolumab(PD-1抗体)被用于黑色素瘤治疗,分别于2011年和2014年获批。其中Nivolumab还于2018年被批准用于非小细胞肺癌;此外, Ustekinumab与细胞因子如IL-12和IL-23的p40亚单位结合,阻断促炎信号以减轻炎症,该药于2009年被批准用于严重斑块状银屑病,2016年被批准用于克罗恩病; Velocimune小鼠是第二代鼠恒定区嵌合的人源化小鼠,辅助开发了IL-4R抗体Dupilumab和IL-6R抗体Sarilumab,分别用于湿疹和类风湿性关节炎的治疗,这两种药物均于2017年获得批准。有研究认为在新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)治疗中Sarilumab可能具有缓解由病毒引起的炎症因子风暴的作用。此外,近来H2L2转基因小鼠平台筛选出1株有效抵抗严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染的人源广谱抗体47D11,靶向严重急性呼吸综合征病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)和SARS-CoV-2受体结合区(receptor binding domain, RBD)的保守表位,真毒细胞模型中IC<sub>50</sub>值分别为0.19  $\mu$ g/mL和0.57  $\mu$ g/mL,提示可对二者同时发挥防治作用。

由于该抗体识别的表位不同于其他中和抗体,因此有望参与形成组合抗体药物形成“鸡尾酒抗体”,发挥协同抗病毒作用并避免表位逃逸<sup>[8]</sup>。

#### 4 单B细胞抗体技术

使用传统的杂交瘤技术、抗体库或转基因小鼠技术生产治疗性人类抗体往往需要长期的免疫程序和多轮筛选,而单细胞抗体技术可以从外周血中直接进行阳性细胞分选和抗体基因克隆,直接进入哺乳动物细胞表达步骤,因此在突发传染病等紧急情况下,单B细胞抗体技术的优势尤为明显。目前针对炭疽杆菌、登革热、巨细胞病毒pp65抗原、轮状病毒VP6、寨卡病毒NS1等靶点的抗体均有报道,多个病毒单抗如人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)包膜蛋白抗体以及抗呼吸道合胞体病毒(respiratory syncytial virus, RSV)抗体MEDI8897等均正在进行II期临床试验。从流感病毒免疫接种者浆细胞中获得的抗甲流血凝素(H)的MHAA4549A已经完成了II期临床试验<sup>[9]</sup>。埃博拉病毒是一种高致死性病原体,人类感染后病死率25%~90%,人抗mAb114是从扎伊尔埃博拉病毒感染者记忆B细胞中筛出来的中和抗体,猕猴感染病毒5d后给药还可以发挥保护效应<sup>[10]</sup>,该药物也已经进入临床试验。在2020年新冠疫情期间,利用单细胞PCR技术鉴定了3160个抗原阳性的B细胞,从中获得了2株识别RBD表位的中和抗体CC6.29和CC6.30,对SARS-CoV-2的中和IC<sub>50</sub>值分别为2 ng/mL和1 ng/mL,仓鼠体内数据也证实了抗体的保护效应<sup>[11]</sup>。有研究经单细胞分选获得了几十个亲和力达到皮摩尔级的单抗,其中9种最有效的单抗中和效价为7~99  $\mu$ mol/L,都可结合SARS-CoV-2的RBD区,阻断其与血管紧张素转换酶2的相互作用。其中2株结合在RBD不同区域的非竞争性单抗REGN10987和REGN10933有望组成抗体鸡尾酒,增强疗效<sup>[12]</sup>。

近十年来,通过单细胞PCR技术获取单抗变得越来越有吸引力。然而,目前为止FDA还没有批准此方法开发的抗体药物,但是结合下一代测序技术,单细胞技术获取单抗应该可以成为一个强有力的抗体研发工具。虽然该技术具有不可替代的优势,但仍有许多瓶颈技术需要改进,例如抗原标记、引物设计、高通量筛选等关键环节,值得关注和研究。

#### 5 展望

总体而言,治疗性抗体领域发展迅速,拥有巨大

的发展潜力。目前,抗体药物的作用机制主要包括抗体直接作用、ADCC/CDC、靶向免疫检查点分子进行免疫调节、抑制受体-配体结合及调理作用等<sup>[13]</sup>。同时,双特异性抗体、纳米抗体以及嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)等新型抗体技术均被证实应用前景光明<sup>[14-15]</sup>。基于已有的单抗研发技术,结合下一代测序技术、高通量筛选、抗体恒定区改造技术<sup>[16]</sup>,借鉴新型支架蛋白、修饰抗体以及抗体分子设计等经验,可以最大限度地提高抗体药物的疗效和安全性,展现最优药效、药代及药理特性。

#### [参考文献]

- [1] CHOI Y, HUA C, SENTMAN C L, et al. Antibody humanization by structure-based computational protein design [J]. *MAbs*, 2015, 7(6):1045-1057
- [2] OLIMPIERI PP, MARCATILI P, TRAMONTANO A. Tabhu: tools for antibody humanization [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31:434-435
- [3] GAO S H, HUANG K, TU H, et al. Monoclonal antibody humanness score and its applications [J]. *BMC Biotechnol*, 2013, 13:55
- [4] LERNER R A. Combinatorial antibody libraries: new advances, new immunological insights [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(8):498-508
- [5] LU R M, YC H, LIU I J, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1):1
- [6] HICKMAN-DAVIS J M, DAVIS I C. Transgenic mice [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2006, 7(1):49-53
- [7] BABINET C, MORELLO D, RENARD J P. Transgenic mice [J]. *Genome*, 1989, 31(2):938-949
- [8] WANG C Y, LI W T, DRABEK D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):2251
- [9] NAKAMURA G, CHAI N, PARK S, et al. An *in vivo* human-plasmablast enrichment technique allows rapid identification of therapeutic influenza A antibodies [J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 14(1):93-103
- [10] RIJAL P, ELIAS S C, MACHADO S R, et al. Therapeutic monoclonal antibodies for Ebola virus infection derived from vaccinated humans [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(1):172-186.e7
- [11] ROGERS T F, ZHAO F, HUANG D, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model [J]. *Science*, 2020, 369(656):956-963
- [12] HANSEN J, BAUM A, PASCAL K E, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail [J]. *Science*, 2020, 369(656):1010-1014
- [13] LI B, CHAN H L, CHEN P. Immune checkpoint inhibitors: basics and challenges [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(17):3009-3025
- [14] JUNE C H, SADELAIN M. Chimeric antigen receptor therapy [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(1):64-73
- [15] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, 359(6382):1361-1365
- [16] KANG T H, JUNG S T. Reprogramming the constant region of immunoglobulin G subclasses for enhanced therapeutic potency against cancer [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3):382

[收稿日期] 2020-10-27