

重组多克隆抗体:下一代抗体治疗药

赵文莉编译

(太原市妇幼保健院皮肤科,山西太原 030012)

摘要:抗体各种剂型用作治疗药已有一个世纪。传统的免疫球蛋白治疗具有反映自然免疫反应多样性的长处,但其临床应用很有限。然而,过去10年中已有30多个单克隆抗体成功进入药物市场。单克隆途径的长处是具特异性,但对复杂抗原引起的疾病无效。重组多克隆抗体是第3代抗体治疗药,能够处理复杂的和高突变性靶标,无疑为未来的商机提供了希望。

关键词:免疫球蛋白;单克隆抗体;重组多克隆抗体

中图分类号:R392.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0971(2006)06-0436-03

各种剂型的抗体使用已超过一个世纪。自从1890年以血清形式首次给药开始,相继开发了单克隆抗体(mAb)、片段抗体、域抗体和今天的多克隆抗体。免疫球蛋白有多种限制,包括合格血浆来源短缺、批次间变异大、生产价格昂贵、安全性也还有问题,妨碍了此种疗法的广泛应用。1975年开发的杂交瘤技术是抗体领域的革命。该技术允许在体外无限生产高特异纯mAb。这是重要的里程碑,随着一系列技术进步,导致极大的商业成功。但mAb有几个缺点,其中的缺点与单特异性有关。它们的效应与阻断或激活下游信号通路有关,不能覆盖自然免疫反应的所有效应器,因此对有复杂靶抗原的疾病疗效差。新近出现的第3代抗体治疗药对复杂的疾病,包括感染性疾病和难靶向癌有治疗反应。重组多克隆抗体对突变抗原也保持活性。

1 多克隆抗体和单克隆抗体的对比

1.1 历史里程碑

Roux和Yersin在1890年确定了对白喉棒杆菌内毒素的抗毒素反应,人类首次认识了抗体的重要性。Ehrlich在1908年提出了侧链抗体的免疫理论,认为抗原和抗体是化学结合,类似钥匙和锁的关系,且将抗体比作“魔术子弹”。Jerne和Burnet于1950年发展了抗体库和克隆选择理论。

1.2 免疫球蛋白疗法

从感染某种疾病恢复后产生与该病有关的高滴

度抗体的患者血浆中可提取高免疫力免疫球蛋白。今天高免疫力免疫球蛋白已用于预防或治疗感染性疾病,例如乙型肝炎病毒、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒和狂犬病毒引起的炎症,还用于破伤风、肉毒中毒和RhD因子同种异体免疫疾病的治疗。从动物中提取免疫球蛋白主要克服了由于人血浆来源较少造成的生产制约。抗胸腺细胞球蛋白是免用人T淋巴细胞免疫后,从血液中提取纯化的高免疫力免疫球蛋白,已成功用于治疗或预防移植器官引起的急性排斥现象。另外还有抗狂犬病毒或肉毒毒素的马免疫球蛋白也很有效。然而,这些动物来源产品均有潜在的危险(超敏、过敏、抗动物反应、传播感染性病原体,包括朊病毒等),故这些药物的临床应用有相当大的限制。

1.3 单克隆抗体

1980年诺贝尔奖得主Kohlor和Milstein研制了产生高特异抗体的mAb制备方法。该法用单一永生B淋巴细胞克隆,分泌有理想特性的抗体。理论上,mAb技术的主要优点是允许开发任一选择靶标的抗体。除了安全性较高外,mAb较血浆提取产品更便宜和更容易生产。

1.4 重组单克隆抗体的研制

在反复使用主要是鼠源杂交瘤mAb后,已发现非人源蛋白可引起不良免疫反应。通常遗传工程抗体,如嵌合人源抗体,只有实际结合区域的基因代码是动物源的,其他部分基因代码则是人源的。其后开发的新技术可产生人源mAb,例如噬菌体展示法和人源抗体转基因动物,已可避免非人源抗体。噬菌体法允许筛选巨大的抗体库,然后大量制造潜在的有效治疗药。噬菌体经遗传工程将特异的抗体融

收稿日期:2006-09-04

作者简介:赵文莉,女,医师,研究方向:皮肤疾病的治疗,Tel:

0351-5620813,E-mail:wenzhiao@sohu.com

入噬菌体包膜蛋白中,被展示的抗体基因代码就包含在噬菌体内。这些抗体包被的噬菌体一般含有上亿个不同抗体,其数量与人免疫系统相当。处理过程中能识别靶分子的抗体与噬菌体结合紧密而留下,而其他抗体则被洗脱。然后用这种噬菌体 DNA 转染细菌,产生更多可选抗体用于候选药物的开发研究。相反,转基因动物由遗传工程将人源抗体代码基因取代其内源性抗体基因。接着用适宜的靶抗原免疫,这些转基因动物发生特异靶标免疫反应,产生人源样抗体,即与人类抗体同源的蛋白链分子序列。自然的抗体介导的反应,涉及一系列直接和间接效应器机制,包括直接的中和反应、吞噬作用、补体介导的毁损和抗体依赖的细胞毒性。这些均由多重特异抗体数个表型的结合,协同作用引起,而单特异 mAb 不能产生这些反应。此外,在用 mAb 场合所有 mAb 组成中的分子均与同一抗原表型竞争,因而表型密度是一个制约因素。为改善效应,需要较高药物剂量,这就增加过度的未结合抗体与非靶组织结合所致副作用的危险。的确,mAb 药物现已成功引入临床治疗癌症(即利妥昔单抗和曲妥珠单抗)。利妥昔单抗与 B 细胞标记 CD20 结合,介入淋巴瘤的增殖、凋亡和杀伤过程,而曲妥珠单抗与 HER₂ 受体(一种乳腺癌上皮细胞上的受体)结合。此两种抗体均改善了抗癌药的临床治疗反应,但是药物耐药和复发率显著的问题依旧。因而,有人认为多种抗体的混合使用,可能改善疗效,作用于肿瘤细胞更多的抗原,减少了癌细胞免疫逃避的可能。

1.5 重组多克隆抗体

微生物入侵后机体的反应是 B 淋巴细胞激活抗原反应和克隆性扩张。一旦进入浆细胞(产生抗体的细胞),细胞的每一克隆将分泌其特异抗体,因此入侵的病原体将遇到能在其表面许多不同位点结合的一连串抗体分子。这种多克隆反应,其特异性及亲和力范围随时间而改变,对抗感染是理想的。第 3 代抗体治疗药,重组多克隆抗体,瞄准第 1、2 代抗体治疗药的缺点,模拟天然免疫方式,能与任一抗原的数种不同表型结合。因而重组多克隆抗体接近多靶点表型,相信能触发更多效应器功能,包括调理作用(加强抗原的内吞),位阻(抗原外包抗体防止与宿主细胞或粘膜表面接触),中和毒性,凝集或沉淀(抗体与数种可溶性抗原结合引起凝集和然后的消除),激活补体和抗体依赖性细胞毒性(使自然杀伤细胞和中性粒细胞杀死靶细胞)。mAb 丧失抗高突

变靶标的作用,包括发生随机突变的病毒,因而逃避免疫系统。而病原体逃避一个多克隆反应的可能性较小,故重组多克隆抗体可为感染疾病提供较好的治疗。另外,重组多克隆抗体技术在病毒毒株变异时仍能较好地保持治疗活性。重组多克隆抗体还有超过经典血浆提取免疫球蛋白的许多优点。传统免疫球蛋白中有靶特异治疗作用的抗体只占全部注射抗体的一小部分,浪费了大量的球蛋白,增加了组织交叉反应和副作用。重组多克隆抗体较纯、较特异,可以克服以上缺点。理论上,各种抗原靶标均可产生重组多克隆抗体,没有血清提取产品那样的限制。最后,新一代抗体不携带病毒,无转染危险,故改善了安全性。

2 重组多克隆抗体平台的开发

Sarantopoulos 等在 1994 年首次描述了分离和生产重组多克隆抗体的方法。其后发表了抗乳腺癌、结直肠癌和抗小球隐孢子虫病的重组多克隆抗体的开发研究报告。新的 SymplexTM 技术平台允许克隆、筛选和识别真正人源抗体,从呈现特异疾病抗体(通过疫苗注射或自然免疫)个体中找到药物的先导化合物。再从这些免疫个体血液中用单个细胞搜索法分离出抗体分泌细胞,然后由 PCR 将抗体的重链和轻链的 mRNA 逆转录、增殖和连接。不同于噬菌体展示途径,可缩短筛选的过程。另外,此技术精确地保存自然的抗体库的多样性、亲和力和特异性。这些抗体代码基因再克隆到哺乳类表达的 SympressTM 平台,制造全长、特异抗原的重组人源多克隆抗体。SympressTM 不同于普通表达技术,应用特异位点整合,确保一个质粒只有 1 个拷贝整合进 1 个细胞中。因而排除了基因组位置效应,保持了生产制造的一致性。其后将选择抗体的每个表达结构转染到中国仓鼠卵细胞中,选择稳定的整合入库。接着每 1 个克隆彼此混合构成多克隆细胞库。此法不改变主库中克隆的最终产物,并可大量生产。Symphogen 技术生产的人源重组多克隆抗体,已验证了对破伤风毒素和流感病毒的特异性,临床应用潜力很大。Symphogen 的领先产品 Sym001 是含 25 个不同抗-RbD 抗体的人源多克隆抗体,打算用于治疗原发性血小板减少性紫癜和新生儿溶血症,预期 2006 年进入临床。另外 2 个产品,抗 RSV 抗体(Sym003)和抗癌抗体(Sym004)也在研制中。

17 选择最适宜的锚定工具

目前所有锚定工具仍然远离完美无缺的要求。近来,大众化锚定工具 DOCK 和 FlexX 开始启用,其特点是锚定已有的药效基团或特性分布。Autodock 程序预先安排的格子中计算锚定,贮存任一相互作用域的潜值。对多个配体作用的鉴别,排序能力很强。

18 VS 锚定结果的评分,排序和验证

实际应用的 VS 策略外,锚定和其后的评分是 VS 中关键的决定因素。评分的鉴别力对排序特别重要,有希望充实前位排名。过去几年已开发较好的评分函数,不限于回答单个函数,而是几个评分项目的综合结果。

19 计算结合亲和力的第一原则方法

最有力的,理论上更坚实的途径是第一原则法。使用量子机制或计算需要较少的力场,计算系统的分配函数和确定结合与非结合态的自由能的差别,随着计算机运算速度的提高,此法变得更精确,与评分关系更紧密。

20 由回归分析衍生的经验评分函数

新近基于已知亲和力结合配体晶体结构的大样本计算得到一种新回归评分函数,依靠一套训练程序,发现与分析有关的许多新项目。此种经验评分函数与训练项目有关者的符合性最佳,但通用性不大。

21 估算结合亲和力的精确度

为了估算结合常数,回归和基于认知的评分函数两者均需要试验亲和力数据作为内标。因此,它

们预测的精确度从未大于能测定的结合亲和力的精确度。根据经验,认知评分函数能较好地提取由锚定程序产生的结合位点的几何结构,最接近试验证实的结合模式。相反,回归评分函数在预测实际亲和力上较好,提供较真实的结合位点的几何结构。

22 结合亲和力: 1 个充分理解的性质

任何评分和排序的讨论必定要问如何理解 Gibbs 自由能的靶值。考虑到 1 个配体与 1 个蛋白的结合,焓(ΔH)和熵($-T\Delta S$)较 Gibbs 自由能(ΔG)分布大 3~4 倍的范围。在紧密相关的分子间可以发现焓和熵的相互补偿。此外,结合过程中许多物化现象还没有完全理解,因此也未能把它们正确地用于评分函数中。尽管理解结合过程中的物理变化存在缺陷,评分仍然进行得很满意,因为在只考虑配体和蛋白结合的相对比较下,任何分析中不确切现象,均可忽略不计。

23 结语

VS 已成为对 HTS 有力的替代和补充方法。当优化运行时,已有印象深刻的命中率报告,较 HTS 明显高 100~1 000 倍。HTS 和 VS 的比较研究表明,VS 法能捕获替代的和补充的配体。值得注意的是有经验的药物化学家经常能指出一个特别的结合袋可能是成药性的,将这些数据输入计算机运算,使这些多因素标准更明确。锚定和评分均属于多因素性质。经验和人为介入对 VS 运行中各种筛选步骤保持控制力最重要。考虑到相似性的概念,高差异分子仍然有漏筛危险。然而,可能使搜索更简单,因为许多在 VS 中遇到的参数,在相对比较时可忽略不计。此外,要把 VS 作为常规发现先导化合物的工具,仍有一段相当长的路要走。

(上接第 437 页)

3 结语

各种抗体制剂用作疾病的治疗已超过一个世纪,首先使用的是从合格供血者血浆中提取的免疫球蛋白。这第 1 代抗体药物虽然理想地反映自然免疫反应的多样性,但存在几个缺点,包括安全性差,缺乏特异性和临床应用有限。第 2 代是 mAb 药物,

具有许多优点,包括安全性较高、生产成本低、可重复性好和特异性较强。开发中有希望的 mAb 已超过 100 个。但这些药物的单特异性使其不能用于复杂抗原引起的疾病。第 3 代重组多克隆抗体回答了前 2 代抗体治疗中存在的问题,技术上精细调整后,将很快拓宽其临床使用潜力,在未来的抗体治疗药物市场中将占上风。