DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.034

[9] Ehrenfeld M. Nursing and home care in Europe[J]. Int Nurs Rev, 1998, 45(2): 61-64.
[10] 胡 靖, 郭苏珍. 护理服务新趋势——家庭护理[J]. 山西护理杂志, 1995, 9(3): 109-110.
[11] Takasuna H. The role of home visiting nurse in the terminal care of cancer from cooperation with other social resources[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 1998, 25(Suppl 4): 631-639.
[12] Massimo L. Home care services and the role of "caregivers"[J]. Minerva Pediatr, 2001, 53(3): 161-169.
[13] Cheryl S. Community nursing organization[J]. Am J Nurs, 1997, 97(1): 63-65.
[14] 肖瑞桃, 何绣文. 家庭护理热线电话咨询[J]. 实用护理杂志, 1997, 13(10): 558.
[15] McEnroe L E. Role of the oncology nurse in home care: family-centered practice[J]. Semin Oncol Nurs, 1996, 12(3): 188-192.
[16] Aranda S K, Hayman-White K. Home caregivers of the person with advanced cancer: an Australian perspective[J]. Cancer Nurs, 2001, 24(4): 300-307.
[17] Pickett M, Barg F K, Lynch M P. Development of a home-based family caregiver cancer education program[J]. Hosp J, 2001, 15(4): 19-40.
[18] Nibert A T. Incorporating critical care oncology nursing in a baccalaureate of science in nursing curriculum[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2000, 12(3): 391-395.
[19] Howell D, Pelton B. Advancing the quality of oncology nursing care: Interlink Community Cancer Nurses' model for reflective practice[J]. Can Oncol Nurs J, 2001, 11(4): 182-191.
[20] Bakas T, Lewis R R, Parsons J E. Caregiving tasks among family caregivers of patients with lung cancer[J]. Oncol Nurs Forum, 2001, 28(5): 847-854.
[21] 吕立珍, 王海涛. 家庭病床科病人的流行特性研究[J]. 实用护理杂志, 1999, 15(1): 56-57.
[22] 吴小玉. 日本国的护理教育和护理管理[J]. 当代护士, 1999, 2: 34-35.

(编辑 刘洪娥)

综述

文章编号: 1000-5404(2004)05-0454-03

治疗性单克隆抗体研究进展及临床应用现状

Progress in research and clinical application of therapeutic monoclonal antibody

罗 萍 综述, 邹全明, 毛旭虎 审校 (第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室, 重庆 400038)

19世纪末, 动物来源的抗血清用于肺炎、白喉、麻疹等传染病的早期治疗, 显示了一定效果, 但毒副作用大, 特别是异源蛋白易产生过敏反应。1975年杂交瘤技术问世, 开创了抗体技术的新时代。单克隆抗体(以下称单抗)高度的特异性和均一性使其在实验研究和临床检测中得到了广泛应用。自1982年单抗首次应用于人体治疗以来, 应用单抗治疗肿瘤、自身免疫疾病, 组织器官移植排斥反应等疾病的报道渐多, 同时鼠单抗用于人体的毒副作用也越来越明显, 使单抗在人体治疗中的应用受到很大限制。随着分子生物学技术的发展, 尤其是抗体库技术、鼠抗体人源化改造技术以及近年利用转基因技术研制完全人抗体的突破, 为单抗进入临床治疗提供了良好的应用前景。本文就单克隆抗体人源化改造、抗体库技术、转基因小鼠技术研究进展及目前单抗在临床治疗中的应用现状予以综述。

1 鼠抗体的人源化改造

鼠单抗用于人体治疗存在的主要问题有: 诱发人抗小鼠反应(human anti-mouse antibody response, HAMA)或超敏反应, 可降低抗体效果甚至造成人体损伤; 半衰期较短, 可较快被清除而影响疗效; 虽然鼠源单抗能特异识别抗原, 但在人体中常不能有效激活补体和Fc受体相关的效应系统。目前解决上述问题应用最多的技术就是鼠抗体的人源化改造, 主要方法包括嵌合抗体(chimeric antibody)、表面重塑抗体(resurfacing antibody)、重构抗体(reshaping antibody)以及链替换(chain shuffling)。

1.1 嵌合抗体

是利用DNA重组技术将鼠单抗的轻、重链可变区基因插入含有人抗体恒定区的表达载体中, 转化哺乳动物细胞表达出人鼠嵌合抗体, 其人源化程度达到70%左右[1]。嵌合抗体完整地保留了异源单抗的可变区, 最大限度地保持了其亲和活性, 降低了免疫原性, FDA批准的抗体药物中有4个是嵌合抗体(reoPro, rituxan, simulect, remicade)。但由于其整个V区都是异源的, 所以嵌合抗体的异源性还很明显, 解决HAMA的效果并不理想。

1.2 表面重塑抗体

由于人鼠嵌合抗体仍然保留了30%的鼠源性, 可诱发HAMA。为了解决这一问题, 人们建立了表面重塑抗体和重构抗体技术。异源抗体在人体内引起免疫反应的主要抗原决定簇应是该抗体表面上溶液可及的残基。表面重塑是对鼠抗体表面氨基酸残基(surface amino acid residues, SAR)进行人源化改造。该方法的原则是仅替换与人抗体SAR差别明显的区域, 在维持抗体活性并兼顾减少异源性基础上选用与人抗体表面残基相似的氨基酸替换; 另外, 所替换的区段不应过多, 对于影响侧链大小、电荷、疏水性, 或可能形成氢键从而影响到抗体互补决定区(complementary determinant region, CDR)构象的残基尽量不替换。但也有相反的理论认为, 内部的残基会因为抗原在递呈过程中的加工暴露出来, 表现出免疫原性。虽然如此, 至今还没有表面重塑的人源化抗体在体内实验中引起HAMA的报道[2]。

作者简介: 罗 萍(1972-), 女, 湖北省荆州市人, 硕士研究生, 实验师, 主要从事抗体工程方面的研究。电话: (023)68753590

收稿日期: 2003-10-29; 修回日期: 2003-12-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　重构抗体

重构抗体是由异源抗体中与抗原结合相关的残基与人抗体重新拼接构建的。包括 CDR 区移植, 部分 CDR 移植和特定决定区(specific determinant region, SDR)转移。

CDR 区移植, 是将异源单抗上六个 CDR 通过 PCR 等方法克隆到人抗体相应的框架区(FR)上构建成新抗体。与嵌合抗体相比, CDR 移植进一步减少了抗体中异源序列的含量, 降低了抗体异源性, 其人源性可达 90% 以上。目前该方法是人源化单抗最常用、最基本的方法。

部分 CDR 移植, Iwahashi 等[3] 发现部分 CDR(重链的 CDR1、CDR3 及轻链的 CDR3)是抗原结合所必须的, 而其他 CDR 的作用较小。根据对 CDR 性质的研究进行部分 CDR 移植, 找出抗体中结合抗原必须的 CDR, 并将这些 CDR 移植到人抗体 FR 上, 可比经典 CDR 移植抗体的免疫原性更小。

SDR 转移　用 X 射线晶体衍射检测不同物种抗体与抗原结合的特征后, 发现并不是整个 CDR 都参与抗原的特异性识别、结合, 而是由一些特定区域执行该功能, 据此提出了 SDR 转移法: 将异源抗体中与抗原结合密切相关的 SDR 等少数残基移植到人抗体相应位置上, 进一步降低了抗体的异源性[4]。与嵌合抗体相比, 嵌合抗体的亲和力高, 同时异源性也较高, 而重塑、重构抗体异源性大大降低, 但亲和力也有所下降。

1.4　链替换

实验发现一些抗体中轻、重链 V 区在结合抗原中起的作用不同, 对于作用较弱的链进行链替换, 同样可以获得高亲和力的抗体。Park 等[5] 成功地制备了人源化抗乙型肝炎病毒(HBV)前 S1 的单抗, 所得抗体保持了抗体活性, 同时免疫原性明显降低。

2　人源性抗体

虽然人源化抗体解决了最重要的问题-鼠抗体的免疫原性, 但它有本身难以克服的困难: 人源化过程繁复、昂贵, 需大量的电脑模拟, 需取代不同的氨基酸以恢复选择性和亲和力, 因此工作量非常大, 而且它总还含有少量鼠源性成分。目前最热门的是完全的人源性抗体, 它主要通过两种途径来研制, 即抗体库筛选人抗体和基因工程小鼠制备全人抗体。这两种主要的人抗体制备技术竞争至今, 孰优孰劣尚未可知。

2.1　抗体库筛选技术

包括噬菌体抗体库、合成抗体库和核糖体展示技术。

2.1.1　噬菌体抗体库　　20 世纪 90 年代噬菌体表面展示技术(phagedisplay)被用于抗体的表达, 利用该技术可有效地表达 Fab、单链抗体(single chain Fv, ScFv)、dsFv 及双特异抗体(diabody)。该技术可从人外周血淋巴细胞中建立起人抗体库, 从人抗体库中可以得到完全是人源的单抗。现有一些已进入临床 II/III 期研究, 如 Cambridge Antibody Technology(CAT)的 D2E7 和 CAT-152, 分别用于治疗风湿性关节炎和青光眼[6,7]。

2.1.2　合成抗体库　　由于对抗体结构功能认识的深入, 发现 7 个重链可变区和 7 个轻链可变区(其中 4 个 κ 链, 3 个 λ 链)基因家族覆盖了人类抗体多样性的 95%, 2000 年报道的第 1 个全合成抗体库, 就是根据上述可变区基因家族设计的 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 区都设计成很容易置换的盒式结构, 并考虑和预留了构建多种抗体衍生物所需元件的插入位点, 序列的设计均按大肠杆菌表达规律进行了优化。在此基础上又采用了三联核苷酸(trinucleotide-directedmutagenesis, TRIM)方法进行 CDR 区的突变和随机化, 即预先合成编码所有氨基酸的三联碱基, 再以这些三联碱基为基本单位合成随机化 CDR。该方法避免了碱基随机化造成的氨基酸偏移, 保证了抗体的多样性[8]。

2.1.3　核糖体展示技术[9]　　目前抗体库技术还受两方面的因素影响: 从未经免疫动物的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某种动物的抗体多样性。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。核糖体展示技术避开了上述不足, 可制备大容量抗体库。该技术依赖于 mRNA, 核糖体和抗体蛋白(或多肽)通过非共价结合形成三联复合体, 在无细胞体系中完成转录和翻译, 实现了基因型和表型的偶联, 翻译出来的抗体可用抗原进行筛选, 由于不经过体内转化, 构建的抗体库库容可达 10^3。利用核糖体展示技术可以获得特异的, 高亲和力的抗体。

2.2　工程小鼠技术

包括人外周血淋巴细胞-严重联合免疫缺陷小鼠(hu-PBL-SCID 小鼠)、转基因小鼠和转染色体小鼠制备人抗体技术。前者制备人抗体仍存在不少问题, 后两者始于 20 世纪末期, 技术难度较大, 但因可制备整分子高亲和力的完全人抗体, 故倍受关注, 发展极为迅速。

2.2.1　hu-PBL-SCID 小鼠　　hu-PBL-SCID 小鼠制备人源抗体的方法是: 将人的外周血淋巴细胞移植于严重联合免疫缺陷小鼠(SCID), 经抗原免疫后可获得人源抗体。若干研究报告表明, 移植的人外周血淋巴细胞需来自抗原致敏的个体, 以相同抗原再次免疫 SCID 小鼠后可检测到相应的人源抗体。进一步的研究表明, 通常将人的外周血淋巴细胞移植于 SCID 小鼠, 抗原免疫后难于产生抗体是由于移植的人外周血淋巴细胞中 B 淋巴细胞数量不足的缘故。

2.2.2　转基因小鼠　　1994 年, 美国 Cell Genesys 公司和 Genpharm 国际公司几乎同时宣布, 转基因小鼠作为生产全抗体的载体问世。其抗体生成过程不是从普通小鼠开始, 而是从鼠抗体生成基因被相应的人基因所取代的小鼠开始。Mendz 等[10] 1997 年成功的建立了含编码人 Ig 基因位点区 10^6 bp 的大片段 DNA 的人 Ig 转基因鼠(Xenomouse)即将含 1 020 kb 人 Ig 重链和 800 kb 的人 Igκ 轻链基因大片段克隆至酵母人工染色体(yeastartificialchromosme, YACs)内并导入已敲除 Ig 基因组的小鼠, 经过 3 种抗原(IL-8, TNFα, EGFR)免疫后制备了具有特异性和高亲和力的人抗体。

转基因小鼠制备人抗体的优点是, 其功效优于其它生产抗人体蛋白单抗技术。小鼠识别抗原和动员抗原的抗体系统仍保持完整, 容易把人体蛋白识别为异物; 由于抗体是体内产生的, 经历正常装配和成熟过程, 从而保证成品具有较高的靶结合亲和力。但转基因小鼠也存在一些缺陷。转基因通常有体细胞突变和其它独特的序列, 导致不十分完全的人序列, 此外, 由于抗体是在小鼠体内装配, 因而产生的单抗具有鼠糖基化模式, 所以这些单抗最终并不是全人的。由 Abgenix 公司利用该技术开发的两种产品已进入临床开发阶段, 即靶向白细胞介素 8(IL-8)的全人单抗, 用于治疗自身免疫疾病(包括牛皮癣和类风湿关节炎); 靶向表皮生长

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

因子受体(EGFR)的全人单抗, 用于治疗多种过度表达 EGFR 的肿瘤的治疗; ABX-CBL 用于移植物抗宿主反应; Medarex 的 MDX-33 用于治疗自身免疫性血液病[11]。

2.2.3 转染色体小鼠 如前所述, 转基因小鼠不能携带整套人抗体基因, 因而限制了一系列免疫球蛋白的产生, Tomizuka 等[12] 首先建立并利用染色体为载体成功培育了转染色体小鼠(transchromosomicmice)并制备了高亲和力的人抗体, 日本麒麟公司用基因工程技术使小鼠携带完整的人 14 号染色体, 该染色体包含全部人抗体产生基因。但迄今尚无该技术生产的制品问世。

2.2.4 其他全人单抗制备方法 XTL 生物制药公司用一种类似于人骨髓移植的方法, 先用放射线破坏动物骨髓, 消除其对移植物的排斥反应, 然后注入人抗体生成细胞, 在其体内产生全人单抗, 该动物起到生物反应器的作用。该公司已用此法生产出一种人单抗, 正在进行乙型肝炎治疗的临床试验[11]。

3 治疗性单克隆抗体临床应用现状

由于鼠单抗逐渐表现出来的毒副作用, 使得单抗的治疗应用一度陷入低谷。自 1986 年, 美国 FDA 批准抗 CD3 单抗 OKT3 进入市场, 用于治疗器官移植时的排斥反应以后, OKT3 是唯一能持续成功应用的单抗。然而近年来, 随着分子生物学的发展, 鼠抗体人源化改造技术及全人抗体制备技术的出现, 为单抗的治疗应用迎来了新的曙光。2000 年抗体市场的收益达 21 亿美元, 2005 年预计将达到 40 亿美元。在近年美国 FDA 批准的新药中, 16 个治疗用抗体上市, 其中 2 个鼠源抗体, 4 个鼠-人嵌合抗体其均为人源化抗体。目前已有 130 多种人源化单抗处于不同的临床试验, 其中有 1/3 用于肿瘤治疗, 1/2 用于过敏症、自身免疫性疾病、炎症和感染性疾病的治疗, 其余是用于心血管疾病治疗和抗移植排斥。还有 300 多个抗体处于临床前研究的不同阶段。实验证明人源化单抗的靶亲和力几乎总是比鼠源性单抗弱, 但是为减弱免疫原性做出这种牺牲通常是值得的。目前, 人源化单抗已主宰治疗性单抗商品市场, 占现有制品的 80%。目前成功的人源化单抗例子有[13~18]: Rituxan: 小鼠抗 CD20 抗体, 含人 IgG1κ 恒定区, 用于治疗 B 淋巴瘤; 它的抗淋巴瘤作用主要可能来自于补体作用、ADCC 和诱导肿瘤细胞凋亡; Remicade: 抗 TNF-α 抗体, 用于治疗风湿性关节炎和节段性回肠炎; Simulect: 抗 CD25 抗体, 用于抗移植排斥; Herceptin: 抗 HER2/neu 抗体, 用于治疗乳腺癌; Synsgis: 抗 F 抗体, 用于治疗呼吸道病毒感染; Zenapax: 抗 CD25 抗体, 用于抗移植排斥。

总之, 单抗是特异性很强的药物, 如果能很好地解决免疫原性等问题, 它应用于治疗肿瘤或其他疾病应比其他药物的副作用低得多。所以, 长远地说, 作为治疗用品, 单抗有着广阔的前景, 从商业的角度来讲, 治疗性抗体的市场也将是巨大的。随着基因组学和蛋白组学的发展, 越来越多的基因及其相关蛋白的发掘, 与肿瘤和其他疾病相关的抗原就成为了治疗性抗体研究的主要靶标, 治疗性单抗将在人类疾病治疗中扮演重要角色。

关键词: 单克隆抗体; 人源化抗体; 人源性抗体; 临床应用
中图法分类号: R392.11 文献标识码: A

参考文献:

[1] 陈志南, 刘民培. 抗体分子与肿瘤[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 160—163.
[2] Morea V, Lesk A M, Tramontano A, *et al*. Antibody modeling: implications for engineering and design[J]. Methods, 2000, 20(3): 267—279.
[3] Iwahashi M, Milenic D E, Padlan E A *et al*. CDR substitutions of a humanized monoclonal antibody (CC49): contributions of individual CDRs to antigen binding and immunogenicity[J]. Mol Immunol, 1999, 36(15—16): 1079—1091.
[4] Sompuram S R, Den W, Sharon J. Analysis of antigen binding and idiotypic expression by antibodies with polyglycine-replaced complementarity-determining regions[J]. Immunol, 1996, 156(3): 1071—1081.
[5] Park S G, Lee J S, Je E Y, *et al*. Affinity maturation of natural antibody using a chain shuffling technique and the expression of recombinant antibodies in *Escherichia coli*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 275(2): 553—555.
[6] Wormstone I M, Tamiva S, Anderson I, *et al*. TGF-beta 2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(7): 2301—2308.
[7] Kempeni J, Update on D2E7: a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody[J]. Ann Rheum Dis, 2000, 59(Suppl. 1): i44—i45.
[8] 沈倍奋. 抗体药物研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(10): 1047—1049.
[9] Schaffitzel C, Hanes J, Jermutus L, *et al*. Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries[J]. J Immunol Methods, 1999: 119—135.
[10] Mendez M J, Green L I, Jose R F, *et al*. Functinal transplant of megabase human immunoglobuin loci recapitulates human antibody response in mice[J]. Nat genet, 1997, 15(2): 146—156.
[11] 史久华. 全人单克隆抗体与人源化单克隆抗体[J]. 国外医学预防诊断治疗用生物制品分册, 2002, 25(1): 28—32.
[12] Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, *et al*. Double transchromosomic 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 USA, 2000, 97(2): 72—727.
[13] Sacchi S, Federico M, Dastoli G, *et al*. Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2001, 37(1): 13—25.
[14] KobElt G, Jonsson L, Young A, *et al*. The cost-effectiveness of infliximab (Remicade) in the treatment of rheumatoid arthritis in Sweden and the United Kingdom based on the ATTRACT study[J]. Rheumatology (Oxford), 2003, 42(2): 326—335.
[15] Henry M L, Rajab A. The use of basiliximab in solid organ transplantation[J]. Expert Opin Pharmacother, 2002, 3(11): 1657—1663.
[16] Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, *et al*. Assessment of HER—2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice[J]? APMIS, 2003, 111(3): 444—450.
[17] Haynes L M, Tonkin J, Anderson L J, *et al*. Neutralizing anti-F glycoprotein and anti-substance P antibody treatment effectively reduces infection and inflammation associated with respiratory syncytial virus infection[J]. I Virol, 2002, 76(14): 6873—6881.
[18] Niemeyer G, Koch M, Light S, *et al*. Long-term safety, tolerability and efficacy of daclizumab (Zenapax) in a two-dose regimen in liver transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2002, 2(5): 454—460.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net