

文章编号: 1004-0374(2013)09-0853-05

重链抗体的结构特点及其应用前景分析

蔡家麟^{1,2}, 夏立亮², 潘欣¹, 王颖^{2*}

(1 第二军医大学微生物学系, 上海 200433; 2 上海人类基因组研究中心/上海科学院, 上海市疾病与健康基因组重点实验室, 上海 201203)

摘要: 重链抗体 (heavy chain antibody, HcAb) 是存在于骆驼和鲨鱼类动物体内, 轻链天然缺失, 只有重链组成的新型抗体分子。重链抗体和普通的抗体相比虽然缺失了轻链, 但是依然保留结合抗原的能力。通过基因工程的改造获得仅有可变区, 但保留结合能力的新型工程抗体——单域抗体 (single-domain antibody), 也被称为纳米抗体 (nanobody), 具有相对分子质量小、稳定性高、易表达等优点; 同时, 克服了人源抗体改造后亲和力降低、易聚集等缺点, 成为抗体药物研究领域的新型抗体分子。

关键词: 重链抗体; 纳米抗体; 抗体药物

中图分类号: Q789; R392.11 **文献标志码:** A

Structure properties of heavy chain antibody and its future application

CAI Jia-Lin^{1,2}, XIA Li-Liang², PAN Xin¹, WANG Ying^{2*}

(1 Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2 Shanghai Key Laboratory of Health and Disease Genomics, Chinese National Human Genome Center at Shanghai/Shanghai Academy of Science and Technology, Shanghai 200433, China)

Abstract: Heavy-chain antibodies constitute a major fraction of the functional antibodies in the serum of camelids. They are devoid of light chains and maintain the specificity and affinity to antigens. Through genetic engineering techniques, single-domain antibody (also called nanobody) exhibits certain advantages such as low molecular weight, better stability as well as easy expression etc. In addition, through overcoming the limitations of low affinity and easy-to-aggregation, nanobody becomes one of the prestigious subtypes in the research and development of therapeutic antibodies.

Key words: heavy chain antibody; nanobody; therapeutic antibody

自从 Kohler 和 Milstein^[1] 发明杂交瘤技术制备单克隆抗体以来的几十年中, 抗体已被广泛应用于临床疾病的诊断和治疗。与传统的小分子药物相比, 虽然抗体药物的研发成本高达 13 亿美元左右 (传统小分子药物平均只有 9 亿美元), 但由于其靶向性好、副作用小, 抗体药物成为生物药物发展最为迅速的产业之一。自 1986 年第一个抗体药物——抗 CD3 抗体 (OKT3) 通过美国 FDA 的审查用于抑制移植排斥反应起, 到 2012 年底, 已有 36 个抗体药物正式上市, 25 个单抗和 5 个融合抗体进入临床 III 期试验, 150 种抗体药物正在进行临床前研究阶段。抗体药物对肿瘤、心血管、自身免疫性疾病等

的治疗有着极其广泛的应用前景。目前, 抗体药物年销售额占整个生物技术类产品的 1/3, 显示出该领域对生物医药产业的重要贡献。据 Reichert^[2] 统计, 2011 年抗体类药物的市值达到 480 亿美元, 领跑所有的生物类药物, 2012 年更将达到 500 亿美元以上。

回顾治疗性抗体的研究历程, 抗体的制备一直是整个产业的核心和瓶颈之一。抗体药物已经从早

收稿日期: 2013-04-07; 修回日期: 2013-05-09

基金项目: 卫生部“重大新药创制”科技重大专项课题(2011ZX09506-001)

*通信作者: E-mail: ywang@sibs.ac.cn

期鼠源性单克隆抗体进入了基因工程抗体阶段,为了克服鼠源抗体在临床应用产生人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HA-MA)反应而进行人源化改造(humanization)是目前市场上抗体类药物的主要形式^[3]。但是,传统抗体由于其相对分子质量大,造成抗体分子在肿瘤组织和血管屏障的穿透性差,尤其在实体肿瘤中的有效浓度更低,大大限制了抗体药物的有效性^[4]。在抗体药物的产业化过程中,常规抗体分子在哺乳动物细胞中表达量低,而在原核细胞体系中又容易出现聚集和无法糖基化等问题,从而使得抗体生产成本高,导致研发和使用费用高,就限制了其进一步的应用。

因此,为了克服上述这些问题,通过基因工程技术对抗体分子进行多种方式的改造,先后出现了人-鼠嵌合抗体、抗体可变区片段(fragment of antibody binding site, Fab)、单链抗体(single chain variable fragment, scFv)、微型抗体(minibody)等不同形式的基因工程抗体。通过基因工程技术改造的这些抗体分子,其优点是:可部分降低抗体的异源性,降低甚至消除长期使用形成的排斥反应;更加有利于穿透血管壁,进入病灶的核心部位;可根据疾病的类型和部位制备组织特异性抗体;采用原核细胞、真核细胞和植物等多种表达方式,大量表达抗体分子,降低生产成本。但在实际应用中,其缺点是:反复使用仍然会引起一定的人抗鼠抗体反应,如痤疮、皮疹;在药理学方面,难以控制抗体的体内分布,全抗体难以通过毛细血管到达主体肿瘤部位及在肿瘤组织中渗透性差。因此,抗体人源化、高效化及小型化均已成为抗体药物研究的主要趋势^[5]。1993年,Hamers-Casterman等^[6]在骆驼体内发现天然缺失轻链的重链抗体(heavy chain antibodies, HcAb);同年,Greenberg等^[7]又相继在美洲驼所属的骆驼科其他动物,如羊驼中发现相同类型的抗体以及银鳕、护士鲨等软骨鱼体内发现了类似结构的抗原受体(new antigen receptor, NAR)。从此,重链抗体成为制备小型化抗体的天然候选新型分子,并被广泛应用于基因工程抗体开发^[8]。

1 重链抗体的理化和结构特征

与具有重链和轻链4条多肽链组成的常规抗体分子不同,重链抗体由两条同源的重链肽段组成,重链分子只包含可变区、CH2区和CH3区,相对分子质量为90 kDa,远小于常规的IgG抗体分子(150 kDa)^[9]。虽然研究人员尝试用常规抗体可变区抑制

溶菌酶的活性并获得成功,但是随后的大量研究表明,如果将常规抗体的分子结构过度改造后,可以导致亲和力大幅下降、可溶性差等;而重链抗体在天然状态下就以单链的形式存在,可以克服人源与鼠源抗体无法解决的制备和相对分子质量过大等问题而成为抗体研发中的新分子形式^[10]。

X-射线晶体衍射分析发现,重链抗体可变区和人与小鼠抗体可变区的空间结构相似,都由片层结构组成^[11],但是存在两点不同:首先,重链抗体可变区的互补决定区3(complementarity determining region 3, CDR3)的氨基酸残基数量达16~18个,而人或小鼠的CDR3区一般为6~8个氨基酸残基组成,虽然在美洲驼中存在6个氨基酸残基的CDR3区,但是总体长度和变化要超过人的CDR3区^[11];其次,重链抗体的CDR1区和骨架区(framework region 2, FR2)存在半胱氨酸残基(Cys),可以和CDR3区中的Cys残基形成二硫桥,增加了可变区的稳定性和结构变化^[12]。

2 重链抗体可变区胚系基因特征

在骆驼体内存在3种不同相对分子质量的抗体分子,按照其结合蛋白G/A能力的不同及相对分子质量的大小将其分为:传统IgG1抗体分子和只有重链组成的IgG2/IgG3重链抗体,其含量在血液中各占了一半,骆驼体内的重链抗体在体液免疫中起着重要的作用^[13]。

目前的研究显示,单峰驼的免疫球蛋白胚系基因中共有52个可变区(variable domain, VH)基因、42个重链可变区(heavy chain variable domain, VHH)基因和9个恒定区(constant domain, CH)基因,重链抗体编码恒定区为5个,其中有两个和常规抗体是共用的,此外D区的基因也通用的^[14]。以上所有的重链抗体胚系基因序列中都存在CH1区序列,但在经过重组后的成熟重链抗体可变区mRNA中不存在,因此推测在基因重排的过程中发生CH1区的剪切^[15]。由于重链CH1区的氨基酸序列具有与内质网的免疫球蛋白结合蛋白(immunoglobulin-binding protein, BiP)结合的能力,从而调节抗体从内质网分泌,所以CH1区缺失的重链抗体在体内的分泌速度更快;同时,CH1区的缺失使重链抗体的可变区和恒定区直接由铰链区连接。

重链抗体的进化来源很长一段时间存在争议。直到2002年,Nguyen等^[16]比较单峰驼和美洲驼VHH的胚系基因,建立相应的进化树,证明重链

抗体是来自于传统抗体基因结构的改变, 而非休眠基因的复苏; 同时, 通过 V-D-J 基因重排和核苷酸插入/缺失等方法, 使重链抗体 VHH 区获得更为丰富的多样性。进一步比较发现, VH 和 VHH 的胚系基因有部分同源, 在成熟的可变区基因中包含有部分相同的胚系基因的 D 区基因, 这部分同源基因在成熟抗体分子中均由参与抗原结合的重要氨基酸残基组成, 所以通过建立免疫噬菌体库可筛选获得更高亲和力的抗体分子^[17]。

3 重链抗体可变区的氨基酸组成特征

普通抗体可变区重链 FR2 区中 Val⁴²、Gly⁴⁹、Leu⁵⁰ 和 Trp⁵² 等 4 个氨基酸残基可以与轻链相互作用, 起到稳定双链结构的作用。而在重链抗体的胚系基因序列中最大的特点是, 上述氨基酸残基为亲水性的 Phe/Tyr⁴²、Glx⁴⁹、Arg/Cys⁵⁰、Leu/Gly⁵²^[18](在 Kabat 数据库中, 这几个氨基酸残基的编号相应为 37、44、45、47)^[19]。上述 4 个氨基酸的改变使得重链抗体在缺少轻链的情况下, 依旧可以保持结构稳定, 并且亲水性得到了一定程度的提高。

Leu⁵⁰ 是常规抗体中对重链 CH1 结构域与轻链结合起作用的关键氨基酸残基, 由于 CH1 结构域在重链抗体中的缺失, 所以该残基即使被 Arg 或 Cys 替代, 也不会影响重链抗体结构的稳定性, 还可能与重链抗体的可溶性增加有关。重链抗体可变区结构域中 CDR3 区的长度为 16~18 个氨基酸残基, 明显长于常规 IgG 的 6~8 个氨基酸残基组成的 CDR3 区, 在氨基酸组成中虽然缺少 Arg⁹⁴ 和 Asp¹⁰¹ 间的离子键, 但是在 CDR1 和 CDR3 区中的多个 Cys 残基可形成结构域间的二硫键, 从而稳定可变区的空间构象。氨基酸残基组成分析结果显示, 重链抗体可变区的 CDRs 区氨基酸残基具有更广泛的分布和种类, 从而大大丰富了抗原结合能力, 也为重链抗体可变区独特的空间构象提供分子基础^[17]。

通过对单峰驼与美洲驼 VHH 胚系基因序列测序, 发现 VHH 胚系基因表现出更为丰富的多样性, 从而使得重链抗体能够形成足够与不同抗原结合的大量抗原结合部位。同时, 通过比较人类 VH3 基因序列与骆驼的 VHH 胚系基因序列, 发现两者有高度的同源性^[20]。因此, 对人源抗体可变区结构域 FR2 的第 42、49、50 和 52 位点氨基酸残基根据重链抗体中相对应氨基酸进行骆驼化 (camlization) 改造, 所得到的骆驼化人源抗体不仅保持原有抗体的

特异性和亲和力, 且溶解性和稳定性都比原来有了提高^[20]; 同样, 将重链抗体进行人源化, 获得的抗体也保留了本身的抗原结合能力^[21]。

4 重链抗体来源的纳米抗体的研发优势

重链抗体作为天然缺失轻链的抗体分子, 在基因工程改造中相对于传统 IgG 抗体分子具有更大的优势。由重链抗体改造而来的单域抗体 (single-domain antibody) 在天然状态下具有与抗原结合的能力, 与人源或鼠源的单域抗体相比, 其亲和力保留得更好^[22], 由于其相对分子质量远远小于传统抗体, 又被称为纳米抗体 (nanobody)。纳米抗体更容易在各种表达系统中进行表达和纯化, 如在 *E. coli* 表达系统中, 其表达量在培养基中可以达到 1~10 mg/L, 并且在酵母、植物、昆虫和哺乳动物细胞中的表达效率也非常高^[23]。

相对分子质量的减小使得纳米抗体不仅易于表达, 同时使其组织渗透性优于普通抗体, 可以穿过普通抗体无法通过的物理屏障。例如, Muruganandam 等^[24]就在研究中发现, 纳米抗体可以在动物病理模型的脑组织出现, 因此推测纳米抗体具有穿透血脑屏障的能力; 同时, 纳米抗体也可以结合普通抗体无法结合的隐蔽表位和特殊表位^[25]。

同时, 由于纳米抗体 FR2 区中特殊的亲水性氨基酸残基的改变和 CDR3 区二硫键的存在, 使得其稳定性和亲水性也远远优于传统的 IgG 抗体。纳米抗体在 90℃ 的高温下依旧可以与目标抗原结合^[23], 其可溶性也更高, 并且不容易产生聚集, 在极端环境下保持结构和性能稳定^[9]。

5 纳米抗体的制备和应用

5.1 纳米抗体的抗体库建立和筛选

重链抗体来源的纳米抗体由于结构简单, 相对于 Fab、scFv 等片段更容易正确折叠, 所以在进行噬菌体抗体库的构建和筛选方面也更加具有优势^[23]。目前, 纳米抗体的制备和应用日益广泛。Dolk 等^[26]使用洗发水作为固相富集的环境, 筛选获得可以在洗发水中稳定存在并特异性结合头皮真菌的抗体。Harmsen 等^[27]使用唾液和胃酸作为固相富集的环境, 筛选出的纳米抗体表达在乳酸菌的表面, 可用于口服制剂中。此外, 有实验室依据纳米抗体表达稳定、相对分子质量小的特点, 结合酵母双杂交的技术, 开发出在酵母细胞内进行胞内抗体筛选的技术^[28]。

5.2 纳米抗体的应用

纳米抗体与传统抗体不同, 拥有优于传统抗体的稳定性、细胞/血管穿透性和抗原结合能力, 可被应用于许多传统抗体较难到达的特殊领域。Hmila 等^[29]筛选到了针对蝎子毒素 Aahl 的高亲和力纳米抗体, 并证明该纳米抗体针对常规抗体较难识别的隐藏表位。使用非免疫抗体库获得的针对肉毒素 β 和葡萄球菌肠毒素 β 的纳米抗体分子, 用以中和并清除多种细菌毒素^[30-31]。

纳米抗体在实体肿瘤部位的渗透优势, 使抗体药物研发人员针对现有的靶点分子进行纳米抗体的再开发, 如针对表皮生长因子受体 (EGFR) 的特异性纳米抗体可以更为有效地到达实体瘤内部, 通过与 EGF 竞争结合 EGFR 位点, 起到抑制实体肿瘤细胞生长的目的, 并在动物体内得到证实^[32]。同时, 利用纳米抗体易组装和易于在胞内表达的特点, 将其应用到胞内抗病毒的治疗, 如抗 HBV 胞内抗体在小鼠模型中都得到了证实^[33]。

此外, 利用纳米抗体易于基因工程操作的优势, 根据不同需求开发的功能型纳米抗体也应运而生。如为了减少成像检测中背景过深的问题, Groeve 等^[34]将可以识别骨髓来源细胞的纳米抗体的 loop 区转移到了一个背景较浅的纳米抗体骨架上, 动物体内试验中在成功降低背景的同时保留了抗原识别能力; 而 Coppieters 等^[35]将筛选到的抗肿瘤坏死因子 (TNF) 抗体改造成为 2 价抗体分子后, 不仅亲和力提高 500 倍, 同时延长抗体分子体内半衰期, 并在动物试验中得到有效性验证, 目前已进入临床试验阶段。

6 纳米抗体的不足与改进

纳米抗体与传统抗体相比, 前者虽然拥有众多优势, 但仍存在一些不足, 主要是半衰期较短。与常规抗体相比, 纳米抗体具有更快的血清清除速度, 使得其在体内成像方面大展身手的同时, 也限制了其在治疗领域的应用。人们为了能够延长纳米抗体在血液中的半衰期进行了许多不同的尝试, 比较成功的有 Coppieters 等^[35]通过构建双特异性抗体 (bispecific antibody, BsAb) 的方法, 将特异性抗肿瘤坏死因子纳米抗体和抗血清白蛋白纳米抗体偶联, 以延长在血清中的半衰期; Harmsen 等^[36]使用聚乙二醇化的方法也成功延长了中和手足口病的纳米抗体的半衰期; 此外, Hmila 等^[29]则将 VHH 片段和人 Fc 段连接在一起, 同样有效延长了抗体在体

内的半衰期。

7 小结

重链抗体由于其结构和理化特征上的独特性, 在抗体药物的研发中具有更多的优势, 由此衍生出的纳米抗体作为新型抗体分子虽然存在体内半衰期过短, 以及亲和力有待于进一步提高等缺点, 但是仍然不失为基因工程抗体药物未来的抗体形式之一。随着多个重链抗体药物进入临床试验阶段, 人们有理由相信, 纳米抗体从实验室走入临床将成为可能。

[参 考 文 献]

- [1] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-7
- [2] Reichert JM. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs*, 2011, 3(1): 76-99
- [3] Legouffe E, Liautard J, Gaillard JP, et al. Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clin Exp Immunol*, 1994, 98(2): 323-9
- [4] Gebauer M, Skerra A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biolol*, 2009, 13(3): 245-55
- [5] Holt L J, Herring C, Jespers LS, et al. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(11): 484-90
- [6] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-8
- [7] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1993, 374(6518): 168-73
- [8] Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*, 2009, 198(3): 157-74
- [9] Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 1989, 341(6242): 544-6
- [10] Hendershot L, Bole D, Kohler G, et al. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Cell Biol*, 1987, 104(3): 761-7
- [11] Spinelli S, Frenken L, Bourgeois D, et al. The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. *Nat Struct Biol*, 1996, 3(9): 752-7
- [12] Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, et al. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*, 1997, 34(16-17): 1121-31

- [13] Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*, 2009, 198(3): 157-74
- [14] Conrath, KE, Wernery U, Muyltermans S, et al. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in *Camelidae*. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(2): 87-103
- [15] Nguyen VK, Muyltermans S, Hamers R. The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J Mol Biol*, 1998, 275(3): 413-41
- [16] Nguyen VK, Hamers R, Wyns LL, et al. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol*, 1999, 36(8): 515-24
- [17] Nguyen VK, Su C, Muyltermans S, et al. Heavy-chain antibodies in *Camelidae*; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*, 2002, 54(1): 39-47
- [18] Deschacht N, De Groeve K, Vincke C, et al. A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *J Immunol*, 2010, 184(10): 5696-704
- [19] Muyltermans S, Atarhouch T, Saldanha J, et al. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng*, 1994, 7(9): 1129-35
- [20] Vincke C, Loris R, Saerens D, et al. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3273-84
- [21] Riechmann L, Muyltermans S. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods*, 1999, 231(1-2): 25-38
- [22] Decanniere K, Muyltermans S, Wyns L. Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? *J Mol Biol*, 2000, 300(1): 83-91
- [23] Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(1): 13-22
- [24] Muruganandam A, Tanha J, Narang S, et al. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*, 2002, 16(2): 240-2
- [25] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1126-36
- [26] Dolk, E, van der Vaart M, Lutje Hulsik D, et al. Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(1): 442-50
- [27] Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bemme AM, et al. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(3): 544-51
- [28] Tanaka, T, Rabbitts TH. Protocol for the selection of single-domain antibody fragments by third generation intracellular antibody capture. *Nat Protoc*, 2010, 5(1): 67-92
- [29] Hmila I, Abdallah R BA, Saerens D, et al. VHH, bivalent domains and chimeric heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin Aah1. *Mol Immunol*, 2008, 45(14): 3847-56
- [30] Goldman ER, Anderson GP, Liu JL, et al. Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem*, 2006, 78(24): 8245-55
- [31] Goldman ER, Anderson GP, Conway J, et al. Thermostable llama single domain antibodies for detection of botulinum a neurotoxin complex. *Anal Chem*, 2008, 80(22): 8583-91
- [32] Roovers RC, Laeremans T, Huang L, et al. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EFGR nanobodies. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(3): 303-17
- [33] Serruys B, Van Houtte F, Verbrugghe P, et al. Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. *Hepatology*, 2009, 49(1): 39-49
- [34] De Groeve K, Deschacht N, De Koninck C, et al. Nanobodies as tools for *in vivo* imaging of specific immune cell types. *J Nucl Med*, 2010, 51(5): 782-9
- [35] Coppieters K, Dreier T, Silence K, et al. Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(6): 1856-66
- [36] Harmsen MM, van Solt CB, Fijten PH, et al. Passive immunization of guinea pigs with llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease. *Vet Microbiol*, 2007, 120(3-4): 193-206