

## 再循环抗体的研究进展

温灿<sup>1</sup>, 陈远志<sup>2</sup>, 罗文新<sup>2</sup>

1 厦门大学 生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

2 厦门大学 公共卫生学院, 福建 厦门 361102

温灿, 陈远志, 罗文新. 再循环抗体的研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(2): 183-194.

Wen C, Chen YZ, Luo WX. Advance in research on recycling antibody. Chin J Biotech, 2019, 35(2): 183-194.

**摘要:** 单克隆抗体因其与抗原结合具有高度特异性与强亲和力, 已成为抗体药物研发的主要类型。但随着天然单克隆抗体的深入研究, 它的诸多缺陷也浮出水面, 如与抗原结合次数有限、带来非预期的抗体清除效应和抗原累积效应。人们不再局限于天然抗体的筛选, 而是想通过改造提升抗体药物的药效。近年来, 一类新型再循环抗体的问世, 很好地解决了天然单克隆抗体发展的瓶颈。再循环抗体可以在胞外结合抗原, 在细胞内与抗原解离, 使抗体结合抗原次数最大化, 减少抗原介导的抗体清除效应和抗体介导的抗原累积效应, 并且再循环抗体可以通过进一步的 Fc 改造来加强与 Fc 受体的亲和力。文中综述了再循环抗体的研究进展, 包括其特点、改造方法及展望。

**关键词:** 单克隆抗体, 再循环抗体, 抗体改造

## Advance in research on recycling antibody

Can Wen<sup>1</sup>, Yuanzhi Chen<sup>2</sup>, and Wenxin Luo<sup>2</sup>

1 National Institute of Diagnostics Vaccine Development in Infectious Disease, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

2 School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

**Abstract:** Monoclonal antibodies have become the main type of antibody drug because of their high specificity and strong affinity to antigen. However, with the intensive study of the natural monoclonal antibody, many defects have faced, such as the limit times of binding to antigen, the unanticipated antibody clearance and antigen accumulation. Therefore, studies are no longer limited to the natural antibody screening, but rather to improve the efficiency of antibody drugs by engineering. In recent years, the bottlenecks in the development of conventional antibody have been solved effectively since the discovery of a novel recycling antibody. Recycling antibody binds to an antigen in plasma and dissociates from the antigen in endosome, thus maximizing the use of antibody and reducing antigen-mediated antibody clearance and antibody-mediated antigen accumulation. In addition, recycling antibodies can enhance the affinity with Fc receptors through further Fc modification. This paper reviews the research progress of circulating antibodies, including its

**Received:** May 11, 2018; **Accepted:** August 14, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31600748), Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2017J01066), Major Projects of Infectious Diseases (No. 2017ZX10202203-001-001).

**Corresponding author:** Wenxin Luo. Tel/Fax: +86-592-2184113; E-mail: wxluo@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31600748), 福建省自然科学基金 (No. 2017J01066), 传染病重大专项 (No. 2017ZX10202203-001-001) 资助。

characteristics, transformation methods and prospects.

**Keywords:** monoclonal antibodies, recycling antibody, antibody engineering

自 1975 年杂交瘤技术建立以来,单克隆抗体因其与抗原的结合具有高度特异性与强亲和力,已成为各大科研机构 and 药物研发公司的研究热点。单克隆抗体发展至今,已有超过 62 种抗体药物批准上市<sup>[1]</sup>,且超 300 种处于临床发展评估阶段。在抗体的 5 种类别中,IgG 类抗体在血清中含量最高<sup>[2]</sup>,具有 1-3 周的半衰期<sup>[3]</sup>,使其成为主流的治疗性抗体型别。IgG 类抗体较其他类别具有半衰期长的优势,它能特异地与新生儿受体(FcRn)进行 pH 依赖性结合,当其被非特异性清除作用内化进细胞时,在内涵体的酸性环境下,IgG 抗体会被 FcRn 捕获而循环到胞外,在胞外中性条件下被释放回血浆中,使其免受溶酶体降解<sup>[4-6]</sup>。

绝大多数处于临床研究阶段的抗体属 IgG 型,但作为医疗领域中举足轻重的一类药物,它的价格并不亲民,且频繁的给药频率给它的推广普及带来了很大的挑战。因此部分研究者的目光不再停留在高成本的新单克隆抗体的研发上,而是转向抗体的基因工程改造研究,其中包括改善与靶标抗原的亲合力与特异性、药物代谢动力学与药效学、调节抗体 Fc 区段介导的效应功能和改善与受体的亲合力等方面<sup>[7]</sup>。

20 世纪 90 年代,随着抗体 Fc 区段与小鼠 FcRn 复合物结构的解析<sup>[8]</sup>及 FcRn 在 IgG 类抗体体内代谢中的重要调控功能的发现<sup>[9]</sup>,研究者开始了 Fc 区段的改造来延长此类抗体在血液中的半衰期。1997 年,首次报道的 Fc 改造来源于鼠的 IgG1 类抗体,突变体较野生型在小鼠体内半衰期延长了约 1.6 倍<sup>[10]</sup>,但由于种属差异,Fc 区段的改造后来集中于人 IgG 类抗体及相关评价的动物模型的构建。2010 年,Zalevsky 团队改造了针对 VEGF 的人 IgG1 类抗体的 Fc 区段,突变体在酸性条件下与 FcRn 亲合力较野生型有 7 倍的提

升,在食蟹猴中,半衰期是野生型的 2.5 倍<sup>[11]</sup>。虽然 Fc 的改造在非特异性清除上的补救效果较好,但此法延长半衰期的程度是有限的,并且抗体绝大部分的清除是抗原的特异性清除带来的,所以增加抗体“使用”次数的“再循环抗体”概念被提出。再循环抗体在胞外与抗原结合内化进细胞后,因内涵体的环境与胞外环境有很大的差异(pH、钙离子浓度等),再循环抗体会与抗原解离,之后通过 FcRn 循环回到血浆中,再结合别的靶标抗原。通过重复这个循环,再循环抗体可以实现与多个靶标抗原的结合,使抗体与抗原结合次数最大化。Igawa 团队首次于 2010 年改造出了 1 株 pH 依赖性抗原结合抗体(再循环妥珠单抗),在转基因小鼠中,再循环抗体的抗原清除效果和抗体半衰期均优于亲本抗体,5 年后,该团队也成功改造出了具有钙离子依赖的再循环抗体。随着进一步的研究,将 Fc 区段的改造和可变区的“再循环”改造结合起来的“清道夫抗体”概念被提出,旨在得到抗原清除效率和抗体半衰期的同步提升。

就天然抗体而言,虽然它与抗原结合具有高度特异性与强亲和力,但它只能与抗原结合一次,如果体内产生远大于抗体注射剂量的抗原,这就从根本上限制了它不能随后中和更多抗原。因此改善药物代谢动力学中的延长半衰期显得尤为重要。近年来再循环抗体的问世,很好地解决了传统抗体的这种限制<sup>[12-14]</sup>。文中综述了再循环抗体的研究进展,包括其特点、改造途径及发展潜力。

## 1 再循环抗体的作用机制

细胞外环境中的生物大分子以胞吞的形式形成囊泡进入细胞,随后与早期内涵体融合,其中一些内吞物被循环内涵体循环至胞外,在早期内

涵体的成熟过程中,囊泡以出芽的形式从内涵体上离开并成熟为晚期内涵体,晚期内涵体进一步融合溶酶体或进一步成熟为溶酶体而降解内含物<sup>[15]</sup>。因此再循环抗体在早期内涵体中,与抗原解离,被循环内涵体上的 FcRn 循环至胞外,解离的抗原随着内涵体的成熟最终被降解。再循环抗体主要有两类:pH 依赖性抗原结合再循环抗体和钙离子依赖性抗原结合再循环抗体。

### 1.1 pH 依赖性抗原结合再循环抗体

人血浆为中性,pH 7.4 左右,而胞内环境为酸性,pH 6.0 左右,pH 依赖性抗原结合再循环抗体能在血浆中结合抗原,抗原抗体复合物被内化进细胞后,在内涵体酸性的环境下,pH 依赖性抗原结合再循环抗体会与抗原解离,解离抗原的抗体被 FcRn 捕获循环到胞外,在胞外中性的环境下,FcRn 将抗体释放,回到血浆中的抗体可以再结合别的抗原,实现抗体的循环使用。

将天然抗体改造成再循环抗体的关键是组氨酸的引入。组氨酸为带正电的碱性氨基酸,是质子的供体和受体,图 1 为组氨酸的电子云密度图<sup>[16]</sup>,因为侧链咪唑基团的存在,其 pKa 为 6 左右。酸性条件下组氨酸会发生质子化,当组氨酸位于抗原抗体相互作用的交界面时,如果它是二者相互作用的关键氨基酸,质子化的发生会直接影响二者的结合作用;如果组氨酸是维持构象的

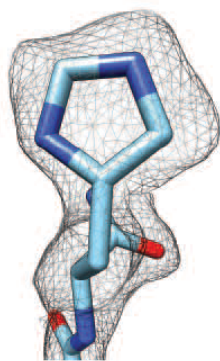


图 1 组氨酸电子云密度图<sup>[16]</sup>

Fig. 1 Electron density map of histidine<sup>[16]</sup>.

骨架氨基酸,质子化的发生会造成构象的变化而动摇二者的结合<sup>[17]</sup>。在抗体的适当表位引入适当数量的组氨酸,就可能赋予抗体 pH 依赖性抗原结合的特性。

目前获得 pH 依赖性抗原结合再循环抗体的方法有组氨酸突变法、天然抗体库筛选法、富含组氨酸的合成文库筛选法、重组组氨酸抗体文库筛选法<sup>[18-19]</sup>。组氨酸突变法通过在抗体的 CDR 或 FR 的某些位点引入组氨酸,来达到 pH 依赖性抗原结合的改造效果<sup>[12]</sup>。天然抗体库筛选方法是直接从天然的抗体库中筛选具有 pH 依赖性抗原结合特性的抗体,它可以是免疫过的动物体或者是人的抗体 cDNA 文库<sup>[20]</sup>,因为天然抗体 CDR 序列中组氨酸占比只有 0.5%–0.6%<sup>[17,20]</sup>,所以此法的 pH 依赖性抗原结合特性的抗体得率不到 5%<sup>[19]</sup>。重组组氨酸文库筛选方法是在富含组氨酸的文库基础上,通过噬菌体<sup>[20]</sup>或酵母展示<sup>[21]</sup>的方法,实现抗原结合和 pH 依赖结合特性的同步筛选。

### 1.2 钙离子依赖性抗原结合再循环抗体

人血浆环境和内涵体环境,除酸碱性有差异外,钙离子的浓度也有很大的不同。对于某些改造难度大的抗体(已在亲本的基础上进行了基因工程改造的抗体),或是靶向带负电或者是质子受体的抗原结合表位的抗体,组氨酸介导的 pH 依赖性抗原结合改造效果可能会受到限制,如果将抗体可变区改造成具有对钙离子浓度差异敏感的特性,来替代 pH 依赖性抗原结合的改造,也能达到再循环抗体的改造效果。

钙离子依赖性抗原结合再循环抗体较 pH 依赖性抗原结合类再循环抗体的优势主要体现在 3 个方面:1) 血浆中钙离子的浓度为 1.2–2 mmol/L,而内涵体中为 3–30  $\mu\text{mol/L}$ ,相差 650 倍,远远超过 50 倍的质子浓度差;2) 内涵体中抗体释放钙离子带来的静电位的差异远强于组氨酸的质子化;3) 钙离子较质子有更大的离子残基,在动摇内涵体中抗原抗体复合物上能发挥更大的作用<sup>[22]</sup>。

钙离子依赖性抗原结合再循环抗体,在钙离子浓度高的血浆中结合抗原,在钙离子浓度低的内涵体中释放抗原,游离的抗原随后被溶酶体降解,改造抗体则被 FcRn 捕获再循环到胞外,释放回血液中。因为人血浆环境和内涵体环境中钙离子浓度巨大的差异,成功改造的钙离子依赖性抗原结合再循环抗体能够产生更大的亲和力落差,更有利于内涵体中抗原抗体复合物的分离,达到更好的抗体循环效果<sup>[17]</sup>。

相较于较早问世的钙离子依赖性抗原结合抗体(抗体识别由钙离子浓度差引起的抗原构象变化)<sup>[23-25]</sup>,针对抗体可变区的改造,使抗体具有钙离子依赖性抗原结合特性的方法,可以突破绝大多数抗原表位不具钙离子结合特性的局限,有更大的应用空间<sup>[22]</sup>。

## 2 再循环抗体的研究进展

单克隆抗体的靶标抗原可以分为两类:膜抗原和可溶性抗原。针对这两种不同的抗原,再循环抗体有相似的作用机制。

### 2.1 针对膜抗原

图 2A 显示了传统抗体与膜抗原的结合情况。膜抗原表达在细胞膜表面,像 IL-6R、EGFR、CD4、CD40 等都是表达在膜上的抗原。天然抗体和膜抗原结合后被内化进细胞,在分拣内涵体作用下,抗原抗体复合物被转运到溶酶体,最终二者因蛋白酶分解作用而降解。这就意味着传统抗体只与抗原结合一次。并且靶向膜抗原的抗体因抗原介导的抗体清除作用,使其在体内呈现非线性的清除效果<sup>[26-29]</sup>。如果靶向的膜抗原在机体有很高的表达水平,抗体在血液中又快速被清除,这就造成在很长一段时间内需要高剂量的抗体去中和该抗原。

图 2B 展示了 pH 依赖性抗体结合膜抗原的情况。再循环抗体在细胞膜表面结合膜抗原后,被

内化进细胞,在分拣内涵体的酸性内环境下,再循环抗体与抗原解离,抗原被分拣呈递至溶酶体而被降解,“自由”的抗体被内涵体中的 FcRn 捕获而循环到胞外,在血浆的中性环境下,FcRn 将抗体释放,使其回流到血液中。通过重复这个循环,再循环抗体克服了传统抗体只能与抗原结合一次的限制,实现多个抗原的结合,并且再循环抗体避免了抗原介导带来的抗体清除,实现了更长的药物代谢。

Igawa 团队首次于 2010 年利用组氨酸突变的方法将抗 IL-6R 的抗体(妥珠单抗)改造成了 pH 依赖性抗原结合抗体(循环妥珠单抗 SA237),改造体保留了亲本 pH 7.4 下的抗原亲和力,增加了 pH 6.0 下与抗原快速解离的能力,在正常小鼠中,二者的药物代谢相似,表明改造不会影响抗体的非特异性清除;在转基因小鼠中,再循环抗体的抗原清除效果和抗体半衰期均优于亲本抗体<sup>[12]</sup>。该临床研究结果进一步证实了再循环抗体的功效。

钙离子依赖性抗原结合类再循环抗体膜抗原的结合情况见图 2C。再循环抗体在血浆中的高钙离子环境下结合膜抗原,随后被内化进细胞,在内涵体低钙离子浓度环境下,再循环抗体与抗原解离,抗原被分拣呈递至溶酶体而被降解,“自由”的抗体被内涵体中的 FcRn 捕获而循环到胞外,在血浆的中性环境下,FcRn 将抗体释放,使其回流到血液中,再结合下一个抗原。

Igawa 团队于 2015 年通过噬菌体展示的方法从人的天然抗体库中筛选得到 1 株抗 IL-6R 的钙离子依赖性抗原结合再循环抗体 6RL#9,该抗体在 3  $\mu\text{mol/L}$  CaCl<sub>2</sub> 的环境中基本不与抗原结合,且共聚焦免疫荧光和小鼠动物实验结果进一步证实该抗体可以在内涵体中解离抗原并能加速血浆中抗原的清除;通过对 6RL#9-Fab 和钙离子复合物的结构解析,他们还发现了一个新的连接钙离子的氨基酸组合(D, D, E)<sup>[22]</sup>。

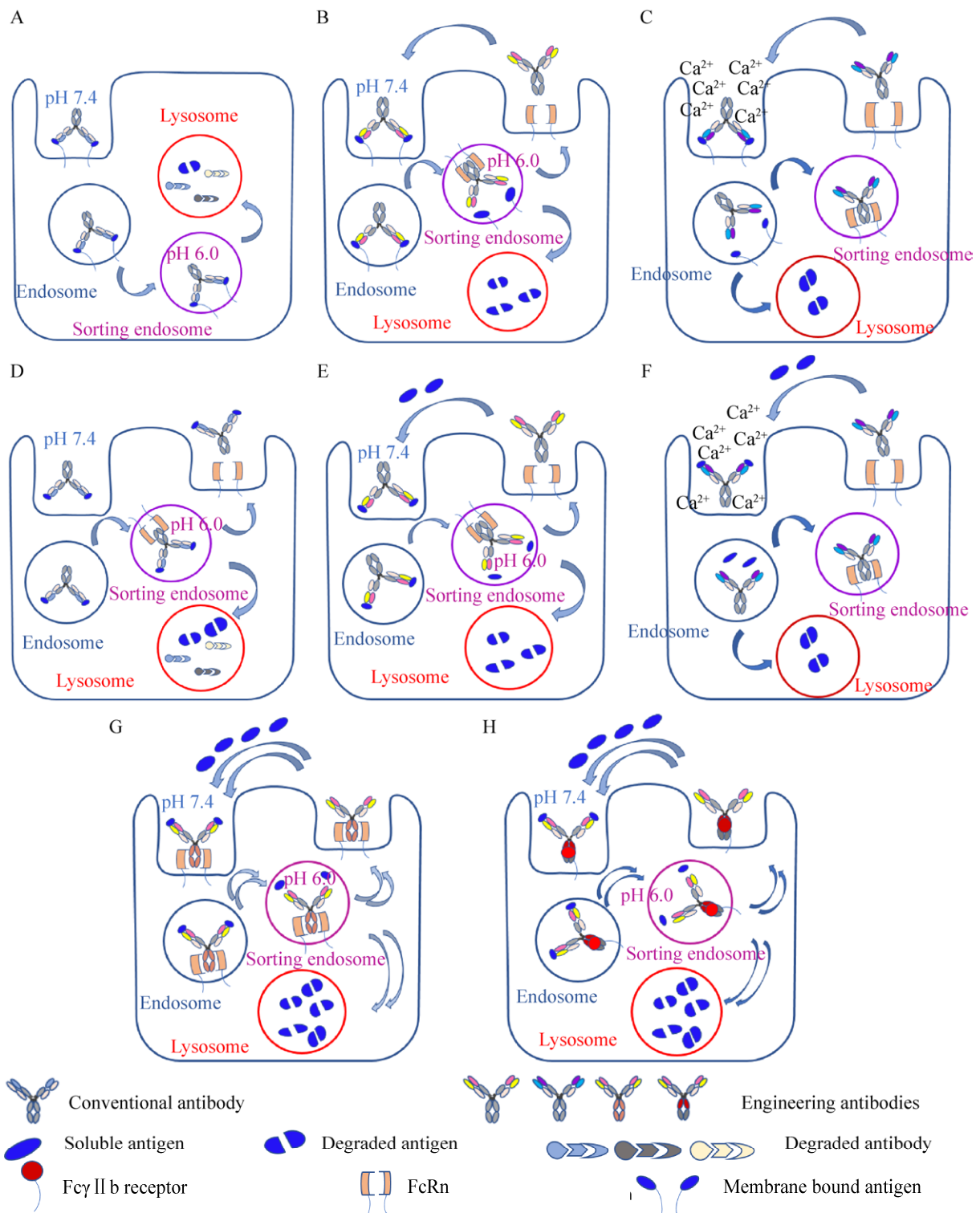


图 2 抗体改造原理图

Fig. 2 Engineering principles of antibody. Bound to a membrane-bound antigen: (A) Conventional antibody; (B) pH-dependent antigen binding antibody; (C) Calcium-dependent antigen binding antibody. Bound to a soluble antigen: (D) Conventional antibody; (E) pH-dependent antigen binding antibody; (F) Calcium-dependent antigen binding antibody. Sweeping antibody bound to: (G) FcRn; (H) Fc $\gamma$ IIb.

## 2.2 抗可溶性抗原

天然抗体结合到可溶性抗原上的情况如图 2D 所示。天然抗体在血液中与可溶性抗原结合后通过非特异性胞吞或胞饮进入细胞, 抗原抗体复合物被转运到分拣内涵体, 在分拣内涵体的酸性条件下, 抗体的 Fc 区段会与 FcRn 结合, 随后 FcRn 将抗原抗体复合物循环到细胞表面, 在血液的中性 pH 下, 复合物与 FcRn 分离回到血液中。在这个过程中抗体以抗原抗体复合物的形式被循环, 所以循环出去的抗体不能与下一个抗原结合, 和针对膜抗原一样, 抗体也只能结合抗原一次。并且严重的是, 大多数靶抗原不会与 FcRn 结合 (只有 IgG 和白蛋白会与 FcRn 结合), 在没有抗体的情况下, 可溶性抗原一般会被转运至溶酶体被降解, 但与抗体结合后, 抗体会抑制这条降解途径, 所以这种循环会造成抗体介导的抗原浓度累积效应, 这种效应在 IL-6、MCP1、 $\beta$ -淀粉样蛋白、铁调素等其他抗原中也有报道<sup>[30-35]</sup>。当机体内的可溶性抗原大量存在时, 抗原的累积会导致抗原抗体结合位点的快速饱和, 使可与抗原结合的抗体消失。

图 2E 和图 2F 分别显示了 pH 依赖性抗原结合再循环抗体和钙离子依赖性抗原结合再循环抗体结合可溶性抗原的情况。在分拣内涵体的酸性环境中, 抗原抗体复合物中的再循环抗体会与可溶性抗原解离, 使抗原转运到溶酶体被蛋白水解作用降解, 与此同时, “自由”的再循环抗体通过 FcRn 而回到血液中。通过重复在血液中结合、内涵体中解离、回流至血液这个循环, 再循环抗体可以实现与多个可溶性抗原的结合, 从而克服天然抗体的限制。再循环抗体形成的复合物能够以非特异吞噬作用的速度, 进行抗原的降解, 达到比天然抗体更有效的降解效果, 而在体内呈现减少的抗原累积和延长的抗体半衰期<sup>[19]</sup>。

早前 Devanaboyina 等将噬菌体展示筛选得到抗 IL-6 的抗体 (0218), 进行组氨酸定点突变, 成

功改造得到 1 株抗 IL-6 的 pH 依赖抗体 (VH4)。动物实验分 3 组进行, 比较抗原清除的效果, 分别是单独注射可溶性抗原、0218 和可溶性抗原、VH4 和可溶性抗原, 结果显示: 对比与单独注射抗原组, 0218 显著降低了 IL-6 的清除速率, VH4 加速了血液中 IL-6 的清除速率<sup>[14]</sup>。Igawa 团队也用抗原抗体共注射的方法评估 IL-6 的清除是否被再循环抗体加速, 结果与 Devanaboyina 相似<sup>[12]</sup>, 但是考虑到这种共注射模型并不能很好地模拟抗体注射时, 机体内抗原浓度已经很高的状况, Igawa 团队对动物实验进行了改进: 给小鼠植入一个抗原填充的灌流泵, 使其持续不断地向血液中输入抗原, 使血液中抗原浓度维持一个稳定的水平。实验结果显示: 相比于基线抗原水平, 妥珠单抗的注射导致了近 20 倍的血液抗原浓度增加, 而循环妥珠单抗只带来了 2 倍的增加, 显著减少了抗体介导的抗原累积效应<sup>[36]</sup>。Chaparro-Riggers 等用组氨酸扫描的方法成功改造了一株抗 PCSK9 (一种可溶性抗原, 可以抑制 LDL 受体的降解从而减少 LDL 胆固醇在血液中的水平) 的抗体 (J10)。改造突变体 (J17) 在野生型的小鼠中有明显延长的半衰期, 达 14.4 d, 而亲本抗体只有 2.9 d, 在食蟹猴的实验中, 突变体有 7.4 d 的半衰期, 而亲本只有 0.9 d<sup>[13]</sup>。最近 Henne 等将弱 pH 依赖的抗 PCSK9 的抗体改造成再循环抗体, 在野生小鼠实验中, 抗体半衰期有 2.6 倍的延长, 并且在 FcRn 敲除的小鼠中, 亲本和突变体有一样的 0.7 d 的半衰期, 说明再循环抗体的回流需要 FcRn 的参与<sup>[37]</sup>。不同于在抗体可变区中引入组氨酸达到改造效果的突变方法, Fukuzawa 团队得到 1 株能特异地与酸性条件下结构发生改变的 C5 分子进行 pH 依赖性抗原结合的再循环抗体 SKY59, 在食蟹猴的效果评估中, SKY59 单针注射可达到 8 周的抑制效果, 而无该 pH 依赖结合特性的抗体在静脉和皮下结合的注射方式摸索结果显示 SKY59



能有效地抑制 PNH 病人中溶血因子的活性<sup>[38]</sup>。

单独的组氨酸突变或组氨酸扫描的方法得到的再循环抗体, 有很大的可能性会“牺牲”掉中性 pH 下与抗原的结合能力, 而结合噬菌体展示或酵母展示可实现抗原高亲和力和 pH 依赖性的同步筛选, 减轻中性条件下抗原结合能力降低的程度。Mur-taugh 等以抗 RNase A 的单域抗体 VHH 与抗原复合物的结构模拟为指导, 对其 CDR1 和 CDR3 的所有氨基酸进行了简并组氨酸突变, 构建了一个噬菌体库, 从这个库中筛得的再循环抗体 (V#24) 在中性条件下与抗原的亲和力是亲本的 5 倍, 在酸性条件下的解离常数比亲本大约 3 倍, 并在对比亲本与突变体分别与抗原的复合物结构中发现: 酸性环境下组氨酸的质子化使其与抗原形成的氢键断裂, 且组氨酸附近正电基团的微环境对改造成功很关键<sup>[20]</sup>。Bonvin 等从头合成了一个重链 CDR3 富含组氨酸的抗 CXCL10 的 pH 依赖抗体的噬菌体库, 从中筛选得到的突变体在中性条件下与抗原的亲和力能达到 nmol/L 级, 但酸性条件下基本上不与抗原结合, 两个 pH 下解离常数的比值为 22 倍<sup>[39]</sup>。Schroter 等以一株抗 TNF 的抗体为亲本, 通过对其 CDR 区进行简并突变构建了一个组合库, 并用酵母展示的方法进行了 3 轮筛选, 得到了 pH 依赖突变体, 在亲和力的检测结果中, 突变体在两个 pH 值下解离常数的比值为 785 倍, 而亲本抗体只有 9 倍<sup>[21]</sup>。

这些研究证实了针对可溶性抗原的再循环抗体能更快地清除抗原, 且能减少抗体介导的抗原累积效应, 因此降低了抗体的注射剂量。

### 3 再循环抗体的进一步改造

针对可溶性抗原的再循环抗体可进行进一步的改造, 达到抗原清除和抗体半衰期进一步改善。

#### 3.1 增强 pH 6.0 下与 FcRn 的亲和力

IgG 型抗体在酸性环境的内涵体中, 能被

FcRn 捕获而循环到胞外, 这也是此类型抗体免受非特异性清除的主要原因。已有研究针对增强与 FcRn 亲和力的 Fc 改造, 旨在使抗体的补救更有效, 结果证实改造突变体能延长抗体的半衰期<sup>[40]</sup>。本研究团队前期针对 HBV 的人源化 IgG 抗体, 设计了 5 种突变组合来增强酸性条件下抗体与 FcRn 的亲和力, 经过体外亲和力的检测后, 选取 YTE 进行动物模型效果评估, 突变体 YTE 在食蟹猴和转 HBV 小鼠中的抗体血清半衰期较亲本有 2.5 倍和 1.5 倍的延长<sup>[41]</sup>。但是同样也引起了后续的抗原清除速率变慢、抗原累积的现象, 本团队后续也进行了进一步的 pH 依赖及清道夫抗体的改造。如前文所述, 在 FcRn 敲除鼠或者非 FcRn 结合突变体的动物实验中, 再循环抗体较亲本在半衰期上并没有展现较大的优势, 说明再循环抗体的回流需要 FcRn 的参与<sup>[12,37]</sup>。所以将再循环抗体的 Fc 区段进行改造, 增强与 FcRn 的亲和力, 给抗体的循环加上“双保险”, 这无疑能更大地延长半衰期。

Henne 等将改造得到的抗 PCSK9 的再循环抗体的 Fc 区段进行改造, 在与 FcRn 亲和力的检测中, 突变体是亲本的 7 倍, 且在食蟹猴中的半衰期是亲本的 2 倍, 说明 Fc 针对增强酸性条件与 FcRn 亲和力的改造能改善抗体半衰期<sup>[32]</sup>。

但这种改造需要注意的是, 在针对膜抗原的再循环抗体上, 酸性 pH 下亲和力的提升带来的中性 pH 下的亲和力提升, 这就会使抗体不能被释放, 而限制了再循环抗体与别的膜抗原结合。

#### 3.2 进一步改造成清道夫抗体

抗体的 pH 依赖抗原结合改造和再循环抗体针对酸性条件下增强与 FcRn 亲和力的改造, 都是在抗原抗体复合物内化进细胞时发挥作用, 而细胞非特异性地吞噬抗原抗体复合物的速率很慢, 即抗原清除受限的关键原因是复合物的捕获, 如果能将再循环抗体进一步改造 (即清道夫抗

体),使其锚定在细胞表面,当抗体一抓到抗原后,复合物即刻被内化进细胞,无疑能更进一步地加快抗原的清除和延长抗体的半衰期。

### 3.2.1 增强中性 pH 下与 FcRn 的亲合力

野生型 IgG1 在 pH 7.4 与 FcRn 的结合很微弱,通过改造增强中性环境下抗体与 FcRn 的亲合力,使其成为清道夫抗体而锚定在胞外,达到抗原清除效果和抗体半衰期的进一步提升(图 2G)。Igawa 团队得到了一株经过 Fc 改造的再循环抗体,适度增强在中性条件下与 FcRn 的亲合力,突变体较亲本有约 700 倍的增强,其形成的抗原抗体复合物能在 FcRn 的介导下快速地进入细胞,因此较再循环抗体能降解更多的抗原。在人 FcRn 转基因鼠的体内研究显示,突变体的可溶性抗原清除速率较亲本加快了近 50 倍,同时抗体能维持野生型 IgG1 抗体相近的药代。但是他们发现,与适度增强与 FcRn 亲和力的清道夫抗体相比,另一个在中性 pH 下显著增强与 FcRn 亲和力的清道夫突变体(2 500 倍增强),有更快的抗原清除,但也伴随抗体清除的增加<sup>[36]</sup>。早年 Vaccaro 就有报道发现,对 IgG1 型抗体的 Fc 区段进行改造,增强中性条件下与 FcRn 亲合力,会改变内涵体中抗体的浓度<sup>[42]</sup>。所以中性条件下与 FcRn 的亲合力并不是越大越好,还取决于不同靶标可溶性抗原的特性。

### 3.2.2 增强与 Fcγ II b 的亲合力

既然 FcRn 的清道夫抗体能极大地降低血液中抗原的浓度,那么其他受体介导的再循环 IgG 抗体可能也有这个功效(图 2H)。研究发现 IgG 抗体的 Fc 区段能与 FcγRs 结合<sup>[43]</sup>,人的 FcγRs 分为 6 个亚类:Fcγ I、Fcγ II a、Fcγ II b、Fcγ II c、Fcγ III a、Fcγ III b<sup>[44]</sup>,其中 Fcγ II b 有一个免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM),是抑制型受体,在人的 B 细胞、肥大细胞、肝细胞上都有表达<sup>[35-46]</sup>,它在激活 B 细胞、移除免疫复合物中发挥关键作用<sup>[17]</sup>。

鼠的 FcγRs 分为 4 类:Fcγ I、Fcγ II、Fcγ III、Fcγ IV,其中 Fcγ II 是抑制型受体<sup>[17,47]</sup>。

Igawa 团队针对这类受体的抗可溶性 IL-6R 的再循环抗体展开研究,他们首先构建了针对鼠 FcγRs 的突变体,这个突变体就 Fcγ II 和 Fcγ III 两个受体有 100 倍的亲合力提升,且显著地降低了 IL-6R 的浓度,在这两个受体分别敲除的鼠实验中发现,Fcγ II 为免疫复合物捕获的主要受体,基于这个结果,该团队随后构建了针对人 Fcγ II b 的抗可溶性 IL-6R 的再循环抗体(V12),在人 Fcγ II b 转基因鼠的实验结果显示,V12 突变体在维持与再循环抗体相当的药物代谢动力学同时,有更快的抗原清除效果<sup>[48]</sup>。

## 4 总结与展望

靶标机体内高基线浓度或合成速率的膜抗原或可溶性抗原的抗体,高的皮下注射剂量及频繁的给药频率才能中和靶标分子,而再循环抗体的“循环特性”使抗体分子能多次结合抗原,从而达到天然抗体无法达到的长半衰期,因此可以在一定程度上降低注射剂量,减少给药频率,给患者的治疗带来便利。

需要注意的是再循环抗体改造的是抗体的可变区,改造很有可能会造成中性条件下与抗原亲和力的缺失或下降,并且可变区的改造难度大,适应性不强,抗体蛋白的性质(如产量、稳定性、表达水平、表达宿主等)很可能也会受到影响,还可能增加免疫原性等诸多非预期“副作用”,变体要既能维持与亲本相当的抗原结合能力,又要具有再循环特性,这就对改造方法提出了很高的要求。此外,再循环抗体临床前动物实验评估阶段,因为动物模型的稀缺与评价手段的不完善,外来抗原的异源性会对抗体改造效果的评估带来很大干扰<sup>[19]</sup>。

再循环抗体经过 Fc 改造的清道夫抗体,在维



持与亲本相当的半衰期的同时能有更快的抗原清除速率。虽然 Fc 的改造适用性强,基本不会带来严重的免疫原性,但是针对不同可变区的同一有效突变改造,也可能存在改造效果的差异。并且近年来的研究表明,抗体的带电性质(如表面电荷的分布、等电点的大小)及抗体的亲疏水性等性质对抗体的半衰期也有很明显的影[49-51]。因此,在再循环抗体的可变区改造和在再循环抗体基础上进行 Fc 的清道夫抗体的改造前,对候选分子的理化性质分析,及改造后分子理化性质的综合评估,使其在抗体天然特征的正常水平范围内,无疑更能确保改造的成功性[50]。所以清道夫抗体的改造要求更高,难度更大,临床前评估更难。

清道夫抗体较再循环抗体,如抗 IgE 的抗体[52]、抗 C5 的抗体[53-54],它的注射剂量需求进一步下降,可能改变某些静脉给药的抗体为皮下注射,极大地便利了患者的治疗,且缓解了医院床位的压力。某些病变组织或癌症组织中高表达的可溶性抗原也是清道夫抗体的潜在靶标,如胶质母细胞瘤囊液中的 VEGF[55]、肿瘤中高浓度的 IL-6[56]、MIF[57]、类肝素表皮生长因子的生长因子[58]、类风湿关节炎患者滑液中高浓度的核因子  $\kappa$ B 配体[59]、哮喘患者支气管肺泡灌洗液中高浓度的 IL-13[60]、阿兹海默症患者脑中聚集的  $\beta$ -淀粉样蛋白[17]。并且清道夫可以靶向非中和表位,通过直接从血液中移除可溶性抗原,达到抑制抗原活性的效果[28]。针对具有多中和表位的可溶性抗原,单一天然抗体只能中和其中一个表位,其余中和表位仍在,“空”表位的信号增强可能给机体带来不良反应,清道夫抗体能很好地阻断这种效应的发生。同样的策略可以应用于不具功能的表位、不能通过天然抗体靶向治疗的毒性抗原上,如 LDL 和脱唾液酸糖蛋白,功效类似于 LDL 受体和脱唾液酸糖蛋白受体从血浆中移除毒性抗原,从而减缓病症[61-62]。因此,清道夫抗体也许

能拓宽针对靶向抗原的抗体治疗的空间,给抗体治疗带来新纪元。

## REFERENCES

- [1] Liu HY, Saxena A, Sidhu SS, et al. Fc engineering for developing therapeutic bispecific antibodies and novel scaffolds. *Front Immunol*, 2017, 8: 38.
- [2] Morell A, Skvaril F, Barandun S. Serum concentrations of IgG. *Clinical Immunobiol*, 1976, 3: 37-56.
- [3] Morell A, Terry WD, Waldmann TA. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest*, 1970, 49(4): 673-680.
- [4] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 715-725.
- [5] Popov S, Hubbard JG, Kim JK, et al. The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. *Mol Immunol*, 1996, 33(6): 521-530.
- [6] Ober RJ, Martinez C, Lai XM, et al. Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(30): 11076-11081.
- [7] Igawa T, Tsunoda H, Kuramochi T, et al. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *mAbs*, 2011, 3(3): 243-252.
- [8] Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature*, 1994, 372(6504): 379-383.
- [9] Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(11): 5512-5516.
- [10] Ghetie V, Popov S, Borvak J, et al. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(7): 637-640.
- [11] Zalevsky J, Chamberlain AK, Horton HM, et al. Enhanced antibody half-life improves *in vivo* activity. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(2): 157-159.
- [12] Igawa T, Ishii S, Tachibana T, et al. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(11): 1203-1207.
- [13] Chaparro-Riggers J, Liang H, Devay RM, et al.

- Increasing serum half-life and extending cholesterol lowering *in vivo* by engineering antibody with pH-sensitive binding to PCSK9. *J Biol Chem*, 2012, 287(14): 11090–11097.
- [14] Devanaboyina SC, Lynch SM, Ober RJ, et al. The effect of pH dependence of antibody-antigen interactions on subcellular trafficking dynamics. *mAbs*, 2013, 5(6): 851–859.
- [15] Kaur G, Lakkaraju A. Early endosome morphology in health and disease//Ash J, Anderson R, LaVail M, et al, Eds. *Retinal Degenerative Diseases*. Cham: Springer, 2018, 1074: 335–343.
- [16] Bartesaghi A, Merk A, Banerjee S, et al. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of  $\beta$ -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. *Science*, 2015, 348(6239): 1147–1151.
- [17] Igawa T, Haraya K, Hattori K. Sweeping antibody as a novel therapeutic antibody modality capable of eliminating soluble antigens from circulation. *Immunol Rev*, 2016, 270(1): 132–151.
- [18] Chen J, Kang CM, Luo WX. Advance in research on antibody half-life related engineering. *Chin J Biotech*, 2017, 37(5): 87–96 (in Chinese).  
陈静, 康赐明, 罗文新. 治疗性抗体半衰期改造研究进展. *生物工程学报*, 2017, 37(5): 87–96.
- [19] Igawa T, Mimoto F, Hattori K. pH-dependent antigen-binding antibodies as a novel therapeutic modality. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(11): 1943–1950.
- [20] Murtaugh ML, Fanning SW, Sharma TM, et al. A combinatorial histidine scanning library approach to engineer highly pH-dependent protein switches. *Protein Sci*, 2011, 20(9): 1619–1631.
- [21] Schröter C, Günther R, Rhiel L, et al. A generic approach to engineer antibody pH-switches using combinatorial histidine scanning libraries and yeast display. *mAbs*, 2015, 7(1): 138–151.
- [22] Hironiwa N, Ishii S, Kadono S, et al. Calcium-dependent antigen binding as a novel modality for antibody recycling by endosomal antigen dissociation. *mAbs*, 2015, 8(1): 65–73.
- [23] Slootstra JW, Puijk WC, Ligtoet GJ, et al. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. *Mol Divers*, 1996, 1(2): 87–96.
- [24] Ohlin AK, Stenflo J. Calcium-dependent interaction between the epidermal growth factor precursor-like region of human protein C and a monoclonal antibody. *J Biol Chem*, 1987, 262(28): 13798–13804.
- [25] Dixit VM, Galvin NJ, O'Rourke KM, et al. Monoclonal antibodies that recognize calcium-dependent structures of human thrombospondin. Characterization and mapping of their epitopes. *J Biol Chem*, 1986, 261(4): 1962–1968.
- [26] Ohsugi Y, Kishimoto T. The recombinant humanized anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab, an innovative drug for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(5): 669–681.
- [27] Tabrizi MA, Tseng CM, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov Today*, 2001, 11(1/2): 81–88.
- [28] Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *AAPS J*, 2010, 12(1): 33–43.
- [29] Kelley SK, Gelzleichter T, Xie D, et al. Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, and activity of a humanized anti-CD40 antibody (SGN-40) in rodents and non-human primates. *Br J Pharmacol*, 2006, 148(8): 1116–1123.
- [30] Xiao JJ, Krzyzanski W, Wang YM, et al. Pharmacokinetics of anti-hepcidin monoclonal antibody Ab 12B9m and hepcidin in cynomolgus monkeys. *AAPS J*, 2010, 12(4): 646–657.
- [31] Davda JP, Hansen RJ. Properties of a general PK/PD model of antibody-ligand interactions for therapeutic antibodies that bind to soluble endogenous targets. *mAbs*, 2010, 2(5): 576–588.
- [32] Haringman J, Gerlag DM, Smeets TJM, et al. A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemoattractant protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8): 2387–2392.
- [33] Martin PL, Cornacoff J, Prabhakar U, et al. Reviews preclinical safety and immune-modulating effects of therapeutic monoclonal antibodies to interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in cynomolgus macaques. *J Immunotoxicol*, 2005, 1(3): 131–139.
- [34] Byrd JC, O'Brien S, Flinn IW, et al. Phase 1 study of lumiliximab with detailed pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements in patients with

- relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15): 4448–4455.
- [35] Jayson GC, Mulatero C, Ranson M, et al. Phase 1 investigation of recombinant anti-human vascular endothelial growth factor antibody in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer*, 2005, 41(4): 555–563.
- [36] Igawa T, Maeda A, Haraya K, et al. Engineered monoclonal antibody with novel antigen-sweeping activity *in vivo*. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e63236.
- [37] Henne KR, Ason B, Howard M, et al. Anti-PCSK9 antibody pharmacokinetics and low-density lipoprotein-cholesterol pharmacodynamics in nonhuman primates are antigen affinity-dependent and exhibit limited sensitivity to neonatal Fc receptor-binding enhancement. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 353(1): 119–131.
- [38] Fukuzawa T, Sampei Z, Haraya K, et al. Long lasting neutralization of C5 by SKY59, a novel recycling antibody, is a potential therapy for complement-mediated diseases. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1080.
- [39] Bonvin P, Venet S, Fontaine G, et al. *De novo* isolation of antibodies with pH-dependent binding properties. *mAbs*, 2015, 7(2): 294–302.
- [40] Datta-Mannan A, Witcher DR, Tang Y, et al. Humanized IgG<sub>1</sub> variants with differential binding properties to the neonatal Fc receptor: relationship to pharmacokinetics in mice and primates. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(1): 86–94.
- [41] Kang CM, Xia L, Chen YZ, et al. A novel therapeutic anti-HBV antibody with increased binding to human FcRn improves *in vivo* PK in mice and monkeys. *Protein Cell*, 2018, 9(1): 130–134.
- [42] Vaccaro C, Zhou JC, Ober RJ, et al. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate *in vivo* antibody levels. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(10): 1283–1288.
- [43] Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 2009, 113(16): 3716–3725.
- [44] van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JGJ. Fcγ<sub>1</sub> polymorphisms: implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*, 2003, 61(3): 189–202.
- [45] Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8): 580–592.
- [46] Ganesan LP, Kim J, Wu Y, et al. FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *J Immunol*, 2012, 189(10): 4981–4988.
- [47] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 2012, 119(24): 5640–5649.
- [48] Iwayanagi Y, Igawa T, Maeda A, et al. Inhibitory FcγRIIb mediated soluble antigen clearance from plasma by a pH-dependent antigen-binding antibody and its enhancement by Fc engineering. *J Immunol*, 2015, 195(7): 3198–3205.
- [49] Li B, Tesar D, Boswell CA, et al. Framework selection can influence pharmacokinetics of a humanized therapeutic antibody through differences in molecule charge. *mAbs*, 2014, 6(5): 1255–1264.
- [50] Datta-Mannan A, Lu JR, Witcher DR, et al. The interplay of non-specific binding, target-mediated clearance and FcRn interactions on the pharmacokinetics of humanized antibodies. *mAbs*, 2015, 7(6): 1084–1093.
- [51] Kelly RL, Yu Y, Sun TW, et al. Target-independent variable region mediated effects on antibody clearance can be FcRn independent. *mAbs*, 2016, 8(7): 1269–1275.
- [52] Hayashi N, Tsukamoto Y, Sallas WM, et al. A mechanism-based binding model for the population pharmacokinetics and pharmacodynamics of omalizumab. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 63(5): 548–561.
- [53] Reiss UM, Schwartz J, Sakamoto KM, et al. Efficacy and safety of eculizumab in children and adolescents with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(9): 1544–1550.
- [54] Fukuzawa T, Sampei Z, Haraya K, et al. Long lasting neutralization of C5 by SKY59, a novel recycling antibody, is a potential therapy for complement-mediated diseases. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1080.
- [55] Takano S, Yoshii Y, Kondo S, et al. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res*, 1996, 56(9): 2185–2190.
- [56] Esfandi F, Ghobadloo SM, Basati G. Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2006,

244(1): 76–78.

- [57] White ES, Flaherty KR, Carskadon S, et al. Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 853–860.
- [58] Yotsumoto F, Oki E, Tokunaga E, et al. HB-EGF orchestrates the complex signals involved in triple-negative and trastuzumab-resistant breast cancer. *Int J Cancer*, 2010, 127(11): 2707–2717.
- [59] Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(7): 1744–1753.
- [60] Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, et al. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol*, 1995, 155(5): 2688–2694.
- [61] Feinberg H, Torgersen D, Drickamer K, et al. Mechanism of pH-dependent *N*-acetylgalactosamine binding by a functional mimic of the hepatocyte asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem*, 2000, 275(45): 35176–35184.
- [62] Yamaoto T, Chen HC, Guigard E, et al. Molecular studies of pH-dependent ligand interactions with the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry*, 2008, 47(44): 11647–11652.

(本文责编 郝丽芳)