

抗体中和法治疗心血管疾病的研究进展

马琳 董玉 王雯

摘要 自身抗体在心血管疾病的发生、发展中起着十分重要的作用。临床研究表明,在扩张性心肌病、围生期心肌病、原发性高血压等多种疾病患者体内,均存在高滴度的受体自身抗体。自身抗体与受体结合,启动 G 蛋白偶联介导的信号转导通路。通过对受体的过度正性刺激,导致心肌耗损增加。目前,针对自身抗体阳性的心血管疾病患者的治疗手段主要有免疫吸附法和抗体中和法。其中,抗体中和法因其通用性强、侵入性小、治疗费用少等优点成为近些年自身抗体类疾病治疗的热点。本文就抗体中和法治疗心血管疾病的研究进展做一综述。

关键词 中和 自身抗体 心血管疾病 治疗

中图分类号 R392.32

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.005

自身抗体是指针对自身组织器官、细胞及细胞成分的抗体。正常人体血液中存在低水平的自身抗体,但若其效价超过某一水平,则会诱导自身免疫性疾病的发生。早在 20 年前, Magnusson 等^[1] 和 Fu 等^[2] 就发现抗 β_1 -肾上腺素受体自身抗体 (β_1 -adrenoceptor autoantibody, β_1 -AA) 是扩张性心肌病 (dilated cardiomyopathy, DCM) 的发病原因之一。之后陆续在围产期心肌病、原发性高血压、恰加斯性心肌病 (Chagas' cardiomyopathy) 等疾病患者体内,同样发现了针对 β_1 -肾上腺素受体 (β_1 -adrenoceptor, β_1 -AR) 细胞外第二环的自身抗体^[3-5]。在心力衰竭早期,自身抗体的持续存在,可使肾上腺素能受体功能亢进,导致心肌耗氧量增加,心肌能量供应相对缺乏,心脏结构和功能进行性恶化^[6,7]。因此,研究针对自身抗体的治疗方法,对临床防治心血管疾病具有很大意义。

一、抗体中和法概述

利用自身抗体的免疫原性、合成特异性中和自身抗体的物质,是治疗自身抗体疾病的重要方法之一。其机制主要是抗原抗体中和反应。自身抗体多为蛋白质,含有大量的氨基和羧基残基,这些残基在血浆中带有电荷^[8]。由于静电作用,在自身抗体周围出现了带相反电荷的电子云,从而形成亲水胶体。自身抗体与合成肽结合使表面电荷减少或消失、电子云消

失、水化层变薄,自身抗体由亲水胶体转化为疏水胶体。同时由于血浆中电解质的存在,疏水胶体物进一步相互靠拢,形成可见的抗原抗体复合物^[9]。此外,还有库伦吸引力、范德瓦耳斯力、氢键结合作用、疏水相互作用等分子间引力参与并促进中和反应^[10]。抗体中和法主要包括单链核苷酸序列和合成肽两种方法。

二、核苷酸序列中和法

短单链核苷酸序列可以系统性中和自身抗体^[11]。从适配子库中,根据亲和选择性和单步指数富集,可合成高亲和力的短单链核苷酸序列^[12]。适配子库一般包含 $10^{12} \sim 10^{18}$ 个、长度从 10 ~ 80nt 不等 [相对分子质量 (3.25 ~ 26.00) kDa] 的序列。中央序列区域约 10nt 左右,包括需扩增序列及其两侧的随机部分。这些随机短序列在分子合成过程中,承担引物作用,引导序列延长,在其完成作用后可被移除。之后采用不同缓冲液进行洗涤,洗脱柱与低亲和力的核苷酸序列结合,而高结合力的核苷酸序列则被洗脱。将经洗脱得到的核苷酸序列,通过 PCR 技术进行克隆、排序,并检测其对自身抗体的中和属性,最终即可筛选出拥有最高亲和力的目标核苷酸序列^[13]。

1. BC007:BC007 是对多种 G 蛋白偶联受体自身抗体 (G-protein-coupled receptor autoantibodies, GPCR-AABs) 具有高度亲和力的核苷酸序列。在体外试验中,该核苷酸序列可以特异中和 β_1 -AA,降低原发性高血压大鼠 β_1 -AA 的水平^[13]。有文献表明,在 β_1 -AA 阳性的原发性高血压大鼠模型中,实验组按每周 5 次、4mg/kg 的标准注射该单链核苷酸序列,对照组按同样间隔和剂量注射 0.9% 氯化钠溶

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7151001)

作者单位:100069 北京,首都医科大学 2013 级七年制临床医学专业(马琳);首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系(董玉、王雯);代谢紊乱相关心血管疾病北京市重点实验室(董玉、王雯)

通讯作者:王雯,电子信箱:wangwen@ccmu.edu.cn

液,可观察到实验组大鼠体内的 β_1 -AA 效价低于最低检测限^[14]。同时,在体外试验中,患者体内的 IgG 可被 BC007 中和,且存在剂量依赖性,BC007 剂量越多,IgG 分数越小^[15]。因此可以推测,BC007 对于自身抗体阳性患者有很大治疗效果。此外,用 BC007 进行治疗,还可以使其他疾病也得到一定改善,如肺动脉高压患者^[16]。BC007 对自身抗体存在高度有效的结合力,可以中和目前所有其他已知 GPCR-AABs,缓解自身抗体阳性疾病的发展。

2. 适配子 110:适配子 110 的筛选使用了 Monolex 技术。将人和山羊 β_1 -AA 共价结合到了载体序列上,对含 21mer 两侧引物序列的 DNA 文库进行多次洗脱,最终得到的 N21 序列(5'-ACA GTA ACC GCG TGA GGT CGA-3')被称为适配子 110。它具有对 β_1 -AA 的高度亲和力。而适配子 109(N21:5'-AAA TTA AGT GTA TAA CGG TCA-3')则不具有 β_1 -AA 亲和性,可与适配子 110 竞争,是适配子 110 的拮抗剂。实验采用台盼蓝染色的方法显示细胞存活与死亡、用 FITC-Annexin V 结合来显示细胞凋亡。结果显示,使用适配子 110 可使新生大鼠心肌死亡数量明显减少、预防细胞凋亡。在体外实验中,适配子 110 可中和扩心病患者体内的 β_1 -AA,显著减少 β_1 -AA 引起的心率改变。体外实验将其加入到用 β_1 -AA 预处理的细胞中,也可观察到心率的显著改变。当适配子 110 剂量达到 100nmol/L 时,可完全抑制 β_1 -AA 引起的心率变化。实验中没有检测到该核苷酸序列存在细胞毒性。同时,适配子 110 也可以用于中和围生期心肌病和恰加斯心肌病中的 β_1 -AA^[17]。适配子是一类具有很大力潜力的药物,它对多种疾病均能产生良好治疗效果。在临床上,适配子已经可以用于治疗黄斑变性,用于重症肌无力的适配子也正在评估过程中^[18,19]。

三、合成肽中和法

除了核苷酸序列中和法之外,肽中和法也成为近年研究的重点。通过分析受体的分子结构,寻找自身抗体与其结合的抗原决定簇序列,进而获得自身抗体攻击的靶位点。肽中和法是通过模拟受体上自身抗体攻击的靶位序列,在体外合成肽,竞争性抑制自身抗体与受体结合,达到中和抗体、阻断受体信号转导的效果。肽类药物,特别是环肽,是近年新兴的治疗手段,在临床有着广泛的应用前景和研究价值^[20]。例如, β_1 -AA 的目标靶位是 β_1 肾上腺素受体细胞外第 2 环,可以通过模拟该表位合成稳定且无毒性不

良反应的短肽类药物,以中和外周血中的自身抗体,有效阻断 β_1 -AA 的效应,达到逆转心脏扩张、改善心功能,从而缓解或治疗心血管疾病的目的^[21]。现在模拟受体合成肽的研究比较广泛,其中部分已开始进行临床试验。

1. β_1 EC_{II}-CP: β_1 EC_{II}-CP 是最早研发的一类 β_1 -AA 中和肽,目前在多种模型中均已发现 β_1 EC_{II}-CP 对自身抗体疾病的治疗效果。先用合成的 β_1 -AR 细胞外第 2 环(即 HWWRAESDEAR-RCYNDPKCCDVTN)对大鼠进行免疫,之后体内注射 β_1 EC_{II}-CP,24h 后可观察到 cAMP 水平降低 60%。在原发性高血压大鼠模型中, β_1 EC_{II}-CP 可与大鼠 β_1 -AR 自身抗体结合、使其失效,从而阻断受体信号转导,并减少 β_1 AR 自身抗体诱导的超过 80% 的 cAMP^[22,23]。另外,长时间(每周 4 次、共 12 个月)注射可以逆转心肌扩张,中和 β_1 -AA 的心脏损伤作用。

2. COR-I:COR-I 是一种根据 β_1 -AR 的结构合成的环肽。在 I 期临床试验中,50 名志愿者接受 COR-I 或安慰剂的药物治疗。实验对象均适应良好,给药 60min 后的时效曲线较理想,没有药物不良反应产生。药代动力学结果表明高剂量组 β_1 -AA 的清除效果是正常给药组的两倍。给药 43 天后,没有检测到抗 COR-I 自身抗体和其他免疫系统成分(如细胞因子)。COR-I 的体内试验表明其对 β_1 -AA 具有特异性中和作用,且安全、没有相关不良反应产生。环肽生物活性高、半衰期长、受体选择性高、分子内不存在游离的氨基端和羧基端,使得对氨基肽酶和羧基肽酶的敏感度大大降低,具有限制性构象的特点。与相应线性肽相比,环肽具有更好的抗酶解和抗化学降解的能力^[24,25]。所以,环肽中和自身抗体具有很大的应用和研究前景。

3. RID 肽(d-QSEYHFA):七肽序列 AFHYESQ 是妊娠毒血症患者体内抗血管紧张素 II 型 1 受体自身抗体(angiotensin II type 1 receptor autoantibodies, AT1-AA)的结合表位。Li 等用包括此表位序列在内的多种抗原免疫家兔,得到了由 AT1-AA 诱导的高血压动物模型,以此来研究 RID 肽(retro-Inverso d-amino acid peptide)对 AT1-AA 特异性治疗的效果。RID 肽是根据抗血管紧张素 II 型 1 受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1-AR)功能表位序列 AFHYESQ 设计,以 D-氨基酸为原料、反向编码合成的多肽序列,即 d-QSEYHFA。通过设计侧链的拓扑

异构,达到既模拟了原多肽序列的结构和抗原性、又较 L-氨基酸多肽序列更耐受蛋白酶的目的。AF-HYESQ 在 45min 内能够快速降解失去稳定性,而 RID 肽能够在 2h 内保持 100% 完整、在 24h 内保持 80% 完整。家兔接受 AFHYESQ 免疫后,其平均动脉压有明显升高、心率也有明显升高;在注射 RID 肽 6 周后,家兔的平均动脉压得到了有效降低。注射 12 周后也出现了相似的血压降低现象,且没有出现其他干预或血液成分改变。

4. RI 肽(d-DCCKPDNYCR):RI 肽(retro-inverso peptide)是一种抗心律失常、能特异结合 β_1 -AA 的合成肽。该肽是模拟 β_1 -AR 细胞外第 2 环的功能表位 RCYNDPKCCD 研发,使用 D-氨基酸合成的反向编码多肽序列,即 d-DCCKPDNYCR。将 β_1 -AR 细胞外第 2 环肽段注入新西兰白兔体内,使其产生 β_1 -AA 来建立免疫模型。在免疫前后及 RI 肽治疗的前后,分别记录电生理学参数,来得到每只家兔的前后对照。结果表明,免疫 6 周后,动物出现持续性心率加快(主要是窦性心动过速)。 β_1 -AA 水平与心房有效不应期呈负相关。 β_1 -AA 诱导产生的心律失常能被 RI 肽明显抑制。与动物免疫前相比,免疫后的心房有效不应期显著缩短,RI 肽可以延长心房有效不应期,逆转这一过程。在体外实验中,给予转染 β_1 -AR 的细胞免疫后血清,其受体的激活可以被 RI 肽抑制。在此模型中, β_1 -AA 促进心律失常与其对心房有效不应期的缩短有关。在自身抗体所致疾病中,RI 肽的逆转心房有效不应期的作用可能会有很大的治疗潜力。

5. JNJ-54452840:JNJ-54452840 是一种治疗慢性心力衰竭的新型肽。其机制是中和并降低 β_1 -AA 水平,以减缓对心肌细胞上 β_1 -AR 的持续性刺激。在随机、单中心、双盲、安慰剂对照、四路交叉的研究中,32 名日本人种和高加索人种的男性分别接受了静脉注射单剂量 20、80、240mg 的 JNJ-54452840 或安慰剂,每组清除期均 ≥ 7 天。在每天某一特定时刻,监控 β_1 -AA 初始计量来对药代动力学和安全性进行评估。JNJ-54452840 血浆浓度平均最大值和时量曲线的曲线下面积均随剂量线性上升、消除快速。20、240mg 剂量的研究群体并不满足标准剂量比例,达峰时间从 1~5min 不等。各组的静脉注射后平均血浆清除率(plasma clearance, PC)、稳态表观分布容积(verifiable secret sharing, Vss)、平均滞留时间(mean residence time, MRT)以及半衰期均较为相似。

平均半衰期范围按照剂量依赖方式从 5.9~26.1min 不等。免疫前自身抗体疾病的患病率为 9.4%。与前期对照相比,不同人种的参与者自身抗体情况都没有进一步发展。

JNJ-54452840 表现出了可能具有免疫原性的特点。两名参与者报道了急性血栓栓塞事件,其中 1 名参与者出现过严重的血栓栓塞事件(肺栓塞、缺血性脑卒中),但自身抗体与这些事件的关系仍不清楚。

四、展 望

由于进行 1 次免疫吸附后机体会再次产生自身抗体,只能用作短期治疗方法;并且由于其侵入性、复杂性和治疗费用昂贵等原因,在一定程度上限制了免疫吸附法的临床应用。受体阻断剂法则由于作用时间较短,不能完全阻断自身抗体对受体的激活效应,临床应用也比较有限。相较于前两者,抗体中和法通用性强,能够有效中和循环血中的自身抗体,达到逆转心脏功能的目的;同时侵入性低、创伤小,治疗费用相对较少,不必反复住院进行手术。这些优点预示着今后肽类药物和核苷酸序列,将可能会成为此类疾病治疗的热门手段之一。

目前抗体中和法的前期基础研究尚未完善,仍需要继续深入研究,其临床研究也需要大量志愿者参与。治疗过程中需要及时跟踪和随访,这无疑给临床阶段研究增大了难度。肽类药物的整个研发过程包括药理、毒理以及临床试验研究需研究人员和志愿者长时间参与,对其临床疗效及其不良反应的评价也需要大量研究加以明确。

自身抗体在心血管疾病的发生、发展中起着十分重要的作用,全面深入研究针对自身抗体的治疗方法是非常有必要的。虽然目前肽类药物的应用还存在着许多问题,需要大量基础和临床研究来进一步分析明确,但作为一种高效、经济且无创的治疗手段,其研究前景广泛、应用价值巨大,未来有望成为自身抗体类心血管疾病治疗的热门手段之一。

参考文献

- 1 Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, *et al.* Mapping of a functional epitope on the β_1 -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. J Clin Invest, 1990, 86: 1658-1663
- 2 Fu LX, Magnusson Y, Bergh CM, *et al.* Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. J Clin Invest, 1993, 91: 1964-1968
- 3 Arany Z, Elkayam U. Peripartum cardiomyopathy[J]. Circulation,

2016,133(14):1397-1409

- 4 Li H, Kem DC, Reim S, Khan M, *et al.* Agonistic autoantibodies as vasodilators in orthostatic hypotension: a new mechanism[J]. *Hypertension*,2012,59(2):402-408
- 5 Munoz Saravia SG, Haberland A, Wallukat G. Chronic Chagas' heart disease - from pathogenesis to treatment regimes[J]. *Appl Cardiopulm Pathophysiol*,2012,16:55-81
- 6 Holthoff HP, Zeisig S, Jahns Boivin V, *et al.* Detection of anti β_1 - AR autoantibodies in heart failure by a cell - based competition ELISA [J]. *Circ Res*,2012,111:675-684
- 7 Haberland A, Wallukat G, Schimke I. The patent situation concerning the treatment of diseases associated with autoantibodies directed against G - protein - coupled receptors[J]. *Pharm Pat Anal*,2013,2(2):231-248
- 8 Liles C, Li H, Veitla V, *et al.* AT2R autoantibodies block angiotensin II and AT1R autoantibody - induced vasoconstriction[J]. *Hypertension*,2015,66(4):830-835
- 9 Esfandiary R, Parupudi A, Casas Finet J, *et al.* Mechanism of reversible self - association of a monoclonal antibody: role of electrostatic and hydrophobic interactions[J]. *J Pharm Sci*,2015,104(2):577-586
- 10 Osajima T, Suzuki M, Neya S, *et al.* Computational and statistical study on the molecular interaction between antigen and antibody[J]. *J Mol Graph Model*,2014,53:128-139
- 11 Vorobjeva MA, Krasitskaya VV, Fokina AA, *et al.* RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent detection probe on its basis[J]. *Anal Chem*,2014,86(5):2590-2594
- 12 Haberland A, Wallukat G, Dahmen C, *et al.* Aptamer neutralization of β_1 - adrenoceptor autoantibodies isolated from patients with cardiomyopathies[J]. *Circ Res*,2011,109:986-992
- 13 Annekathrin H, Gerd W, Ingolf S. Aptamer binding and neutralization of 1 - adrenoceptor autoantibodies: basics and a vision of its future in cardiomyopathy treatment [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21: 177-182
- 14 Haberland A, Wallukat G, Berg S, *et al.* Neutralization of pathogenic beta1 - receptor autoantibodies by aptamers in vivo: the first successful proof of principle in spontaneously hypertensive rats[J]. *Mol Cell Biochem*,2014,393:177-180
- 15 Wallukat G, Müller J, Haberland A, *et al.* Aptamer BC007 for neutralization of pathogenic autoantibodies directed against G - protein cou-

pled receptors: A vision of future treatment of patients with cardiomyopathies and positivity for those autoantibodies[J]. *Atherosclerosis*, 2016,244:44-47

- 16 Haberland A, Holtzhauer M, Schlichtiger A, *et al.* Aptamer BC 007 - A broad spectrum neutralizer of pathogenic autoantibodies against G - protein - coupled receptors[J]. *Eur J Pharmacol*,2016,789:37-45
- 17 Annekathrin Haberland, Gerd Wallukat, Claudia Dahmen, *et al.* Aptamer Neutralization of Beta1 - Adrenoceptor Autoantibodies Isolated From Patients With Cardiomyopathies [J]. *Circ Res*,2011,109:986-992
- 18 VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (VISION.) Clinical Trial Group, Chakravarthy U, Adamis AP, *et al.* Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular agerelated macular degeneration[J]. *Ophthalmology*,2006,113:1508,e1-e25
- 19 Hwang B, Han K, Lee SW. Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by an in vitro selected RNA aptamer[J]. *FEBS Lett*,2003,548:85-89
- 20 Bornholz B, Roggenbuck D, Jahns R, *et al.* Diagnostic and therapeutic aspects of β_1 - adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease[J]. *Autoimmunity Rev*,2014,13:954-962
- 21 Priyesh AP, Adrian FH. Targeting anti - β_1 - adrenergic receptor antibodies for dilated cardiomyopathy [J]. *Eur J Heart Failure*,2013,15:724-729
- 22 Christ T, Schindelbauer S, Wettwer E, *et al.* Interaction between autoantibodies against the β_1 - adrenoceptor and isoprenaline in enhancing L - type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2006,41:716-723
- 23 Munch G, Boivin Jahns V, Holthoff HP, *et al.* Administration of the cyclic peptide COR - 1 in humans (phase I study): ex vivo measurements of anti - β_1 - adrenergic receptor antibody neutralization and of immune parameters[J]. *Eur J Heart Fail*,2012,11:1230-1239
- 24 Menegatti S, Hussain M, Naik AD, *et al.* mRNA display selection and solid - phase synthesis of Fc - binding cyclic peptide affinity ligands[J]. *Biotechnol Bioeng*,2013,110:857-870
- 25 Liskamp RM, Rijkers DT, Kruijtz JA, *et al.* Peptides and proteins as a continuing exciting source of inspiration for peptidomimetics[J]. *ChemBiochem*,2011,12:1626-1653

(收稿日期:2016-10-10)

(修回日期:2016-11-01)

(上接第3页)

- 6 O' Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST - elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians and Society for Cardiovascular Angiography and Interventions [J]. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 2013, 82(1): E1-27

- 7 Kolh P, Windecker S, Alfonso F, *et al.* 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio - Thoracic Surgery (EACTS). Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) [J]. *Eur J Cardio thorac Surg*, 2014, 46(4): 517-592

(收稿日期:2017-05-31)

(修回日期:2017-06-07)