

# 单克隆抗体人源化研究进展

厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 (361005)

顾颖综述 张军 夏宁邵审校

**摘要** 目前单克隆抗体大多数是鼠源的,在临床重复给药的治疗过程中有许多副作用。由于技术限制,最好的解决方法就是研制人源化抗体,以代替鼠源单抗用于临床。本文概述了几种常用的异源单抗人源化的方法。

**关键词** 单克隆抗体人源化 嵌合抗体 表面重塑 重构抗体 链替换

百年前抗体被动免疫的创立开辟了疾病治疗的新途径,1975年单克隆抗体(以下简称单抗)技术的问世加速了这一治疗方法的广泛应用。但鼠源单抗应用于人体治疗时存在许多问题:首先,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;其次,鼠源单抗用于人体时常被人免疫系统所识别,产生人抗鼠抗体(HAMA);再次,外源抗体在人体循环系统中很快被清除。因此,根据抗体结构与功能之间的联系,在保持原单抗对特异抗原表位的高亲和力的基础上对其进行体外人源化改造,减少异源抗体的免疫原性成为改进单抗治疗的重点。目前报道的人源化方法主要有:嵌合、表面重塑(resurfacing)、重构(reshaping)以及链替换(chain shuffling)。

## 嵌合抗体

Morrison等<sup>[1]</sup>从杂交瘤细胞中获得抗体 V 区 cDNA,克隆到重组了人抗体 C 区的载体中,转化哺乳动物细胞表达出人鼠嵌合抗体。改造后的抗体保留了原单抗特异结合抗原的 V 区,去除了非人源序列(C区);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。嵌合抗体完整地保留了异源单抗的

V 区,最大限度地保持了其亲和活性,可作进一步改造的亲和力参照体,也是进一步提高补体活化及细胞毒作用等的基础对照。

## 表面重塑

通常认为,抗原上的抗原决定簇应具残基的运动性和溶剂的可及性,多集中在抗原表面,因此可推测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的表面上溶液可及的残基。免疫球蛋白 F<sub>v</sub> 区中表面可及残基(SAR)通常是指 30% 氨基酸暴露在溶液中的区段<sup>[2]</sup>。Pedersen等<sup>[2]</sup>对 12 个株鼠单抗的 V 区晶体结构进行了比对,找到顺序校正后的 45 个 SAR,其中 98% 不同,具有明显的物种特异倾向性。Padlan等<sup>[3]</sup>对非人源抗体的 F<sub>v</sub> SAR 中与人抗体明显不同的区域进行了相应的替换,建立了表面重塑法。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(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 HAM A 产生反应的报道<sup>[4]</sup>。

## 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。

### 抗原结合位点的重构

**CDR移植** 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。目前该方法是人源化单抗最常用、最基本的方法,很多 CDR 移植抗体在临床实验中取得了较好效果<sup>[5,6]</sup>。

部分 CDR 移植 通过突变、X 射线分析、三维结构的模拟以及 CDR 移植抗体的应用,证实外源 CDR 仍具有潜在免疫原性,会引起动物及人体抗独特型 (anti-Id) 免疫反应,因此在 CDR 移植中应减少不必要 CDR 的引入<sup>[7]</sup>。同时, Iwahashi 等<sup>[8]</sup>通过对 CC49 单抗的研究发现部分 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 都参与与抗原的特异性识别结合,而是由一些特定的区域 (特定决定区, SDR) 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。其涉及的序列包括: CDR 中暴露在外与抗原结合密切相关 SDR 残基;维持抗体 V 区四级结构的相关残基 (稳定 CDR 回折和结合位点的正确构象);轻、重链的第 71 位氨基酸 (L71 和

H71,与 CDR 之间的联系有关);抗体 N 末端的残基 (与抗原-抗体结合相关<sup>[9,10]</sup>)。SDR 的确定可依据对抗原-抗体复合物的分析,也可根据与已知近似复合物的类比或分子结构模拟,还可依据 SDR 常位于抗体高变区的特点推测一些序列或结构高变的位点作为转移的对象。在蛋白质数据库中已可获知一些抗原-抗体复合物的原子坐标,分析这些数据后认为轻链的 SDR 多定位于 27d 和 34、50 和 55、89 和 96;重链的 SDR 多定位于 31 和 35b、50 和 58、95 和 101<sup>[10,11]</sup>。用诸如偶氮苯腙酸盐特异替换<sup>[7]</sup>、密码子扫描诱变<sup>[12]</sup>、体外扫描饱和诱变<sup>[13]</sup>、抗地高辛单链 Fv 确证实验等验证选定 SDR 的功能。选择人抗体 FR 时建议使用种系序列,但 HCDR3 情况较特殊,它源于 V-D-J 重排,无法直接从种系序列中获得,可以其重排模板 VH 区为来源。

### FR 重构

**FR 的选择** 人抗体 FR 区可以是人体序列,人体保守序列或人体种系序列<sup>[14]</sup>。在保持 CDR 正确折叠, V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> 正确包装,抗原-抗体结合活性,减少抗原决定簇的基础上,人源化中选择 FR 的方法通常有如下几种:

(1) 一致化法: 该法不考虑原抗体 FR 的序列,用统一的人抗体 FR 作人源化模板,如人抗体中一致性较好的第 I 亚类 V<sub>LK</sub> 链 (V<sub>LK</sub>I) 和第 II 亚类 V<sub>H</sub> 链 (V<sub>H</sub>II), 所得抗体框架部分在人体中最常见,异源性很小,并已证实 V<sub>LK</sub>I-V<sub>H</sub>IIIFR 的设计可在大肠杆菌及真核系统中高效表达<sup>[15]</sup>。

(2) 最佳同源法: 通过序列比对、序列分析或分子模拟在不同亚型人抗体 FR 序列中找出与原抗体 FR 相似的亚型;再从该亚型已知抗体中找出与原抗体 FR 序列空间结构相似的人抗体 FR 作为移植的框架<sup>[8,14,16]</sup>。此法选出的人抗体 FR 与鼠 FR 的差别很小,保持了 V 区结构,从而对抗原结合位点的影响也小。

虽然上述两种方法看起来差异很大,但

Kolbinger<sup>[17]</sup>通过实验比较,结果认为它们的效果相似,都可以很好地维持抗体的亲和力。

FR改造 通常用表位作图法确定单抗所结合的抗原的特定表位,以此为筛选依据进行人源化改造,获得相应的人源单抗。

(1) 回复突变: CDR是抗原结合的主要相关位点,但多数情况下 FR对结合位点构象的影响明显<sup>[10]</sup>,如 CDR临近残基(结合位点结构的主要维护者)、V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>接触相关的残基(可影响整个 CDR的结构,并间接影响结合位点的结构和功能)、与构象变化有关的 FR残基。寻找 FR中重要残基的方法有:规范结构法、分子模拟<sup>[19]</sup>、随机突变法<sup>[10]</sup>、序列分析以及直接法等<sup>[4]</sup>,此外对已知抗体三维结构的分析也可提供一些重要 FR区的信息。为获得高亲和力的人源化抗体,相关 FR残基需回复为原鼠源氨基酸或其他作用相同的人中可见的氨基酸。目前在 CDR移植基础上结合 FR回复突变已经成为最常用、最有效的人源化方法<sup>[14,18]</sup>。

(2) 与噬菌体展示技术相结合的 FR回复突变: Rosok<sup>[20]</sup>、Manuel<sup>[21]</sup>等将噬菌体展示技术应用于 FR改造中:根据已知实验结果,确定 FR中通常影响抗体亲和力的氨基酸,随机组合各种可能的突变后,用噬菌体展示抗体的亲和力进行筛选,获得最高亲和力的突变株。但在具体操作上有不同:Rosok是在选择最优化的人抗体 FR的基础上,建立表面暴露的残基突变体库;而 Manuel则按共同序列法选择人抗体框架,然后对其中影响抗体活性的残基建库。

(3) 完善抗体生物学活性的相关 FR改造:有研究表明 V区构象的变化会影响 Fc区段的效应子功能及 Fc段与 Fcγ受体(FcγR)的结合,在对人源化抗体的优化过程中可尝试改变特定 FR残基来提高人源化后抗体的 Fc段的功能。如对 IgM单抗 GM2人源化优化过程中,分析表明 V<sub>L</sub>上 L60和 V<sub>H</sub>上的 H38、H40三个位点的氨基酸影响

补体依赖性细胞毒作用(CDC),对该三位点进行改造后不但提高了抗体的 CDC功能,其抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)也得到了明显提高<sup>[19]</sup>。此外,Landolfi等<sup>[22]</sup>在对抗人干扰素(IFN)单抗人源化的过程中,发现 V区与 C区的结构性连接对抗体生物学活性有重要影响,优化与这种结构性连接相关的残基后获得有效的抗 IFN人源化单抗。

(4) 两步设计法:上述方法人源化的抗体中 FR区都会残留一些异源氨基酸,为了避免这一缺憾,Ono等<sup>[23]</sup>将 CDR转移、嵌合抗体及 FR改造结合发展为两步设计法:第一步 CDR移植,获得低免疫学活性、高亲和力及具有抗体的其他生物学活性的人源化抗体;第二步,进一步增强抗体人源性的基因工程操作。在对多发性骨髓瘤表面抗原 HM1.24的鼠源单抗人源化改造及优化中:首先进行 CDR移植,用最佳同源法比对,轻链以人抗体 RE1,重链的 FR1、FR2和 FR3段以人抗体 HG3的相应序列为框架,FR4以人抗体 JH6的相应序列为框架,移植后抗体的亲和力下降;为寻找 FR中重要残基,将 V<sub>H</sub>用 PCR切割的方法分为两段(FR1至 CDR2为一段,CDR2至 FR4为一段),同样的分割原鼠单抗的 V<sub>H</sub>段,将四个分割片段交叉嵌合,得到两种 V<sub>H</sub>段:HM-RMH(人源化 V<sub>H</sub>上的 FR1至 CDR2与鼠 V<sub>H</sub>上的 CDR2至 FR4连接)和 MH-RMH(鼠 V<sub>H</sub>上的 FR1至 CDR2与人源化的 V<sub>H</sub>上的 CDR2至 FR4连接),证实 HM-RMH亲和力高,它与人源化的 V<sub>H</sub>只有 FR3段是不同的,可见 FR3在维持抗体活性中起重要作用;通过结构分析认为是 FR3中暴露在外的第 73、78位氨基酸起作用,回复突变后抗体的亲和力恢复。但是抗体重链第 73和 78位氨基酸仍为鼠的氨基酸。第二步,通过序列比对发现将突变后的序列与很多人抗体重链只有第 67位氨基酸不同,实验证实该位氨基酸对抗原结合没有不利影响后突变该位点,获得了一个 FR完全来源于人并保持高亲和力

的人源化单抗

## 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。应用重链链替换 Park 等<sup>[24]</sup>成功地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。

近年来随着噬菌体展示技术的发展,用噬菌体来完成链替换的筛选成为一种快速、简便的方法 Jespers 等<sup>[25]</sup>依靠噬菌体展示技术完全选择性地人源化单抗:首先保留异源单抗的轻(重)链,用特定的抗原体外筛选它与人抗体重(轻)链抗体库组合成的杂合抗体库,从中找到维持原抗体活性的人抗体重(轻)链;然后再以选出的重(轻)链为基础,同样从人抗体轻(重)链库里筛选出合适的轻(重)链,并组合成具有原单抗活性的完全人源化的单抗。但与 CDR 移植相比,此方法不确定性明显,且属一系列链替换反应,通常会导致识别特异性的变化。

很多实验表明 LCDR3 以及 VL 上的细小差别会影响抗体的特异性,可导致抗体结合到同一抗原的其他表位上。Christoph<sup>[26]</sup>将上述展示筛选链替代的范围缩小到 CDR 以外的 FR,在 V 基因展示库基础上建立了设计组合 V 区文库法,即保留异源 CDR(实验中保留了 HCDR3 和 LCDR3),其他部分从人的噬菌体抗体库中筛选获得。这种方法可快速获得携带异源高变 CDR 区的特异性高亲和力抗体;并可同时获得多种突变株,以利于后期治疗性应用,免疫原性筛选,及挑选适于大量表达的单抗株。

在近年美国 FDA 批准的新药中,工程抗体占很大比例,目前已有 100 多种人源化单抗进行了临床试验,其中数十种抗体相关新药得到了应用<sup>[27]</sup>。人源化方法还在不断发

展。综合、合理应用上述各种方法,提高抗体亲和力,减低抗体异源性,同时兼顾抗体的免疫学活化作用,针对不同的异源抗体选择合适的人源化途径,构建更适于临床应用的人源化抗体,将为新药的开发和一些顽固疾病的治疗开辟蹊径。

## 参 考 文 献

- Morrison S et al. In Rosenberg SA ed. Important Advances in Oncology. Philadelphia: Lippincott, 1989: 3-18
- Pedersen JT et al. J Mol Biol, 1994; 235(3): 959-973
- Padlan EA et al. Mol Immunol, 1991; 28: 489-498
- Morea V et al. Methods, 2000; 20: 267-279
- Riechmann L et al. Nature, 1988; 332: 323-327
- Hale G et al. Lancet, 1988; 2: 1394-1399
- Sompuram SR et al. J Immunol, 1996; 156: 1071-1081
- Iwahashi M et al. Mol Immunol, 1999; 36: 1079-1091
- Chothia C et al. Nature, 1989; 337: 501-502
- Foot J et al. J Mol Biol, 1992; 224: 487-499
- Padlan EA et al. FASEB J, 1995; 9: 133-139
- Rosok MJ et al. J Immunol, 1998; 160: 2353-2359
- Chen G et al. Protein Eng, 1999; 12: 349-356
- Saldanha JW et al. Mol Immunol, 1999; 36(11-12): 709-719
- Werther WA et al. J Immunol, 1996; 157: 4986-4995
- Cristina M et al. Immunotechnology, 1997; 3: 71-81
- Kolbinger F et al. J Biol Chem, 1993; 268: 1433-1447
- Kazuhiro N et al. J Immunol Methods, 1999; 222: 83-92
- Kashmiri SV S et al. Oncol Hematol, 2001; 38: 3-16
- Rosok MJ et al. J Biol Chem, 1996; 271(37): 22611-22618
- Hoogenboom HR et al. Immunotechnology, 1998; 4: 1-20
- Landolfi NF et al. J Immunol, 2001; 166(3): 1748-1754
- Ono K et al. Mol Immunol, 1999; 36: 387-395
- Park SG et al. Biochem Biophys Res Commun, 2000; 275: 553-557
- Jespers LS et al. BioTechnology, 1994; 12: 899-903
- Christoph R et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95: 8910-8915
- Paul C et al. Curr Opin Biotechnol, 1997; 8: 449-454

(2001-12-14 收稿 2002-03-08 修回)