



2024

# 抗体的人源化改造

检验与生物技术学院

陈瑶



# 目录

**01 基因工程抗体的概述**

**02 鼠抗体的人源化改造**

**03 抗体库技术**

**04 小型化及功能改造**

# 制备基因工程抗体的目的

1

通过基因工程技术的改造，可以最大程度降低抗体的鼠源性，降低甚至消除人体对抗体的排斥反应。

2

基因工程抗体的分子较小，穿透力强，更易到达病灶的核心部位。

3

可以根据治疗的需要，制备多种用途的新型抗体。

4

- 可以采用原核细胞、真核细胞或植物等多种表达系统大量生产抗体分子，成本大大降低。

抗体的人源化是基因工程抗体用于体内的核心一步，也是第一步。

# 鼠源抗体临床应用的障碍

- 血清半衰期短
- 分子量大，达靶部位量不足
- 自身效应功能不强
- 人抗小鼠抗体（HAMA）
  - human anti-mouse antibody





## 鼠抗体的人源化

- 嵌合抗体
- 改形抗体
- 表面重塑抗体（镶面抗体）

## 人源化抗体技术

- 抗体库技术
- 转人Ig基因小鼠技术



# 鼠抗体的人源化改造

获取目的基因的两个思路：

1. 用RT-PCR方法从**杂交瘤细胞**的mRNA中扩增VH及VL基因。
  - ① 已经通过动物的免疫系统完成了亲和力成熟
2. 用探针或者PCR从**基因文库**中钓取；
  - ① 通过人工建立基因文库，涵盖尽可能多的抗体基因用于筛选

# 改造对象与改造目的：



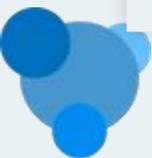
改谁？为什么改？

01

对象：对已有的高亲和力，高特异性鼠抗基因进行人源化改造！（来源于杂交瘤细胞）

02

目的：降低已有的高亲和力，高特异性鼠抗的免疫原性，提高其在人体内的半衰期和功能性



# 高亲和力鼠抗体进行人源化改造的技术策略

## 01 免疫小鼠

通过抗原刺激小鼠免疫器官，通过生物体内的免疫成熟来获得致敏B细胞克隆

免疫与杂交瘤的构建

## 02 钓取抗体基因

通过杂交瘤技术获取特异性单细胞克隆作为模板，钓取抗体基因。

抗体基因的钓取

## 03 人源化改造

在基因层面上进行人源化改造。

人源化改造

## 04 功能验证

验证改造后的抗体是否具有亲本抗体的亲和力和特异性。

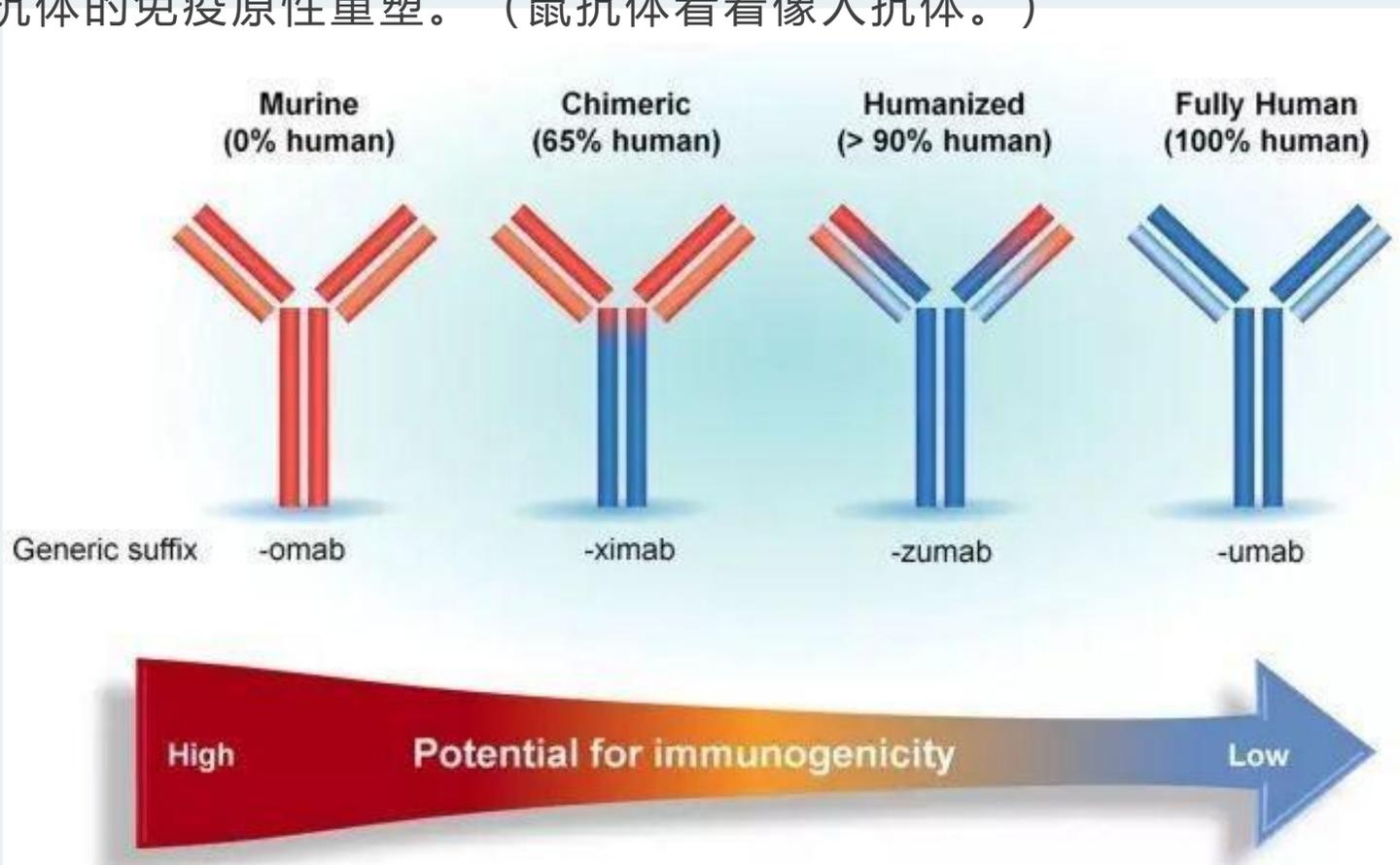
抗体的工程制备

# 鼠抗体的人源化改造策略

基本原则：

替代原则：抗体的人源化改造就是指抗体的鼠源性部分由人类抗体基因所编码。（从鼠源换成人源）

重塑原则：鼠抗体的免疫原性重塑。（鼠抗体看着像人抗体。）



# 鼠抗体人源化改造的类型



## 一. 恒定区人源化

——人-鼠嵌合抗体

## 二. 可变区人源化

- ——改形抗体
- ——镶面抗体

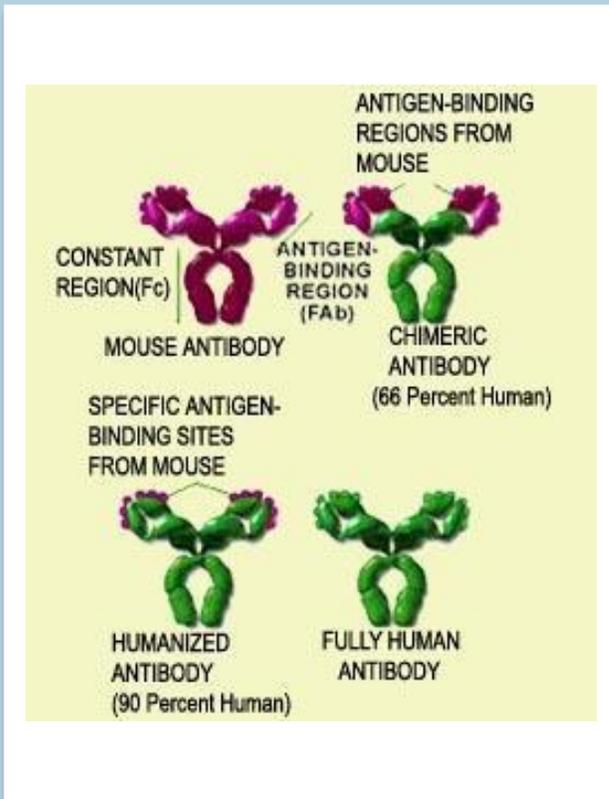
# 一、恒定区的人源化改造

---人鼠嵌合抗体

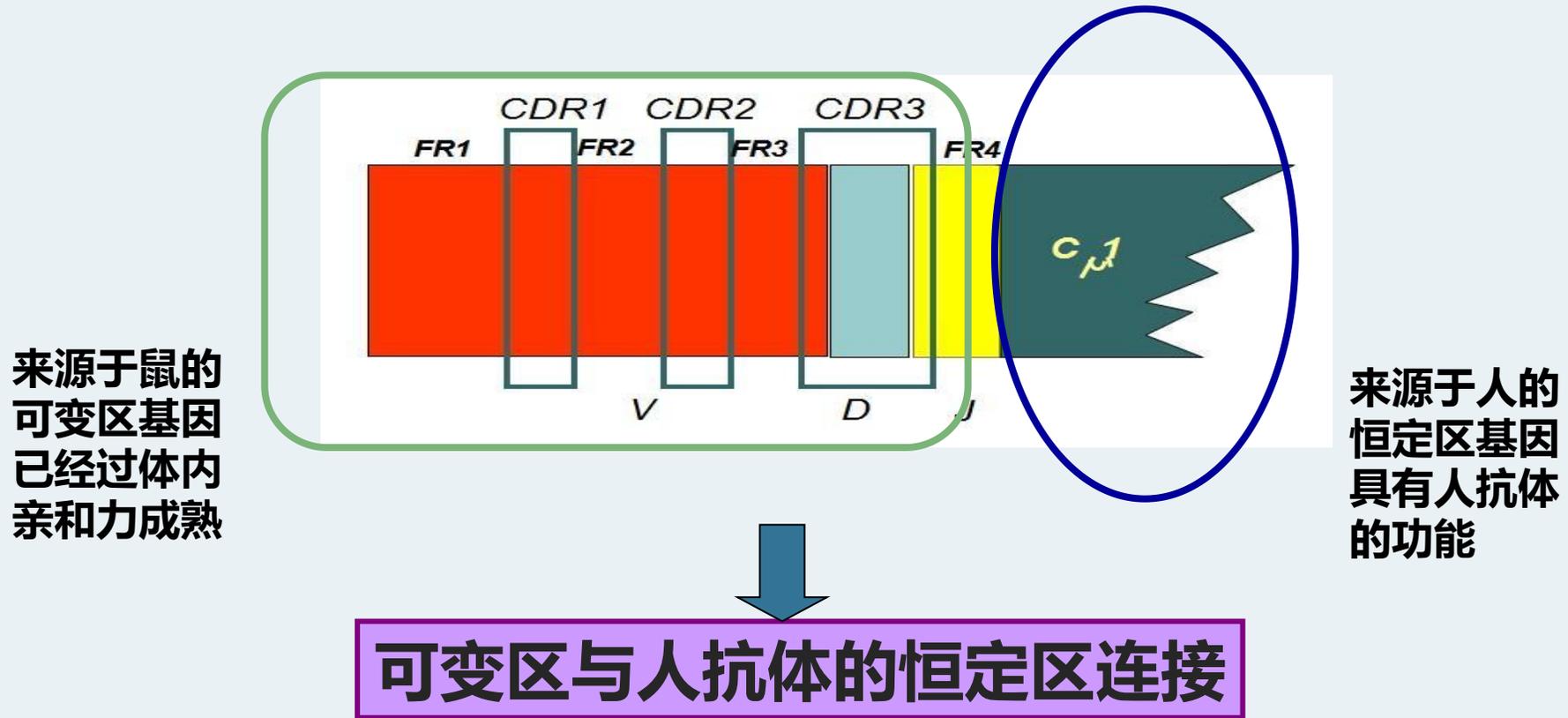
# 人-鼠嵌合抗体

## 一. 嵌合抗体(Chimeric Antibodies)

- 定义：人-鼠嵌合抗体是通过基因工程将鼠源单抗的可变区与人抗体的恒定区连接起来并在合适的宿主细胞中表达而得到的抗体。



## 2. 人-鼠嵌合抗体设计思路



将在保留鼠抗体的亲和力和特异性的基础上，极大的降低鼠源抗体的免疫原性。

## 并不一定需要完整的FC段

### 恒定区

恒定区基因的获取：  
RT-PCR钓取人B细胞中表达特异性抗体的恒定区基因

$C_H2(IgG)$ 、 $C_H3(IgM)$

$C_H2 \sim C_H3(IgG)$

$C_H3(IgG)$

$C_H4(IgE)$

$C1q$ 结合部位

结合并通过胎盘

$Fc\gamma R$ 结合部位

$Fc\epsilon R$ 结合部位

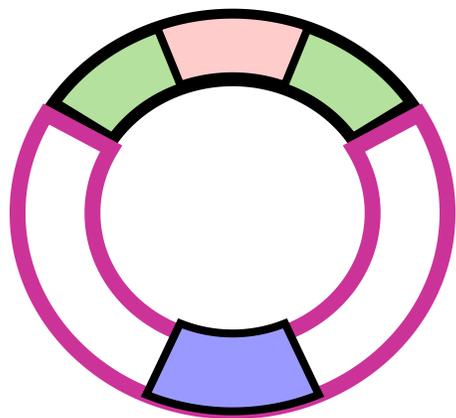
人抗体FC区可根据需要选择，不同的FC区会带给嵌合抗体不同功能。



## 可变区的模板：验证过的杂交瘤细胞

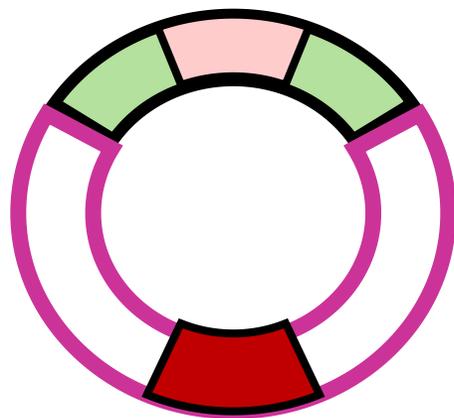
恒定区的模板：任何B细胞都可以，并可以制备相应的表达载体，适应插入针对不同抗原的抗体基因。

$C_H2(IgG)$ 、 $C_H3(IgM)$



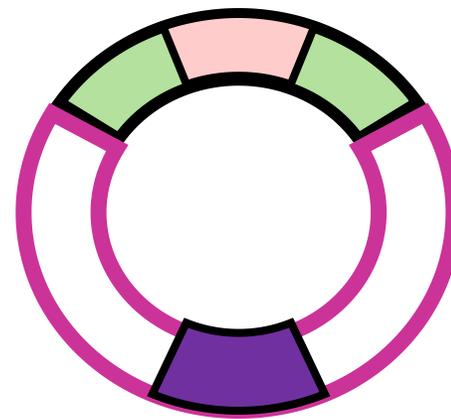
补体激活

$C_H3(IgG)$



激活效应淋巴细胞

$C_H2 \sim C_H3(IgG)$

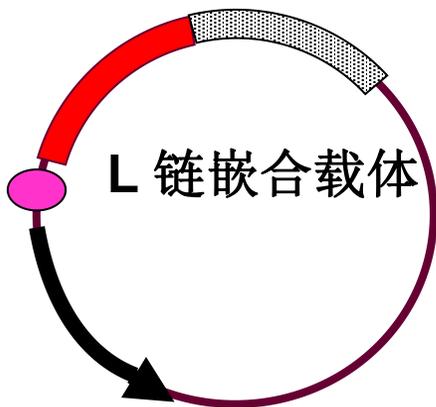
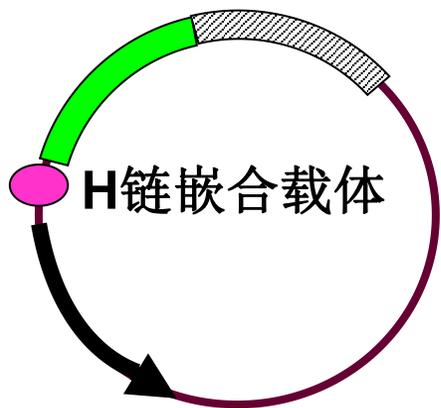


结合内皮细胞，穿越胎盘

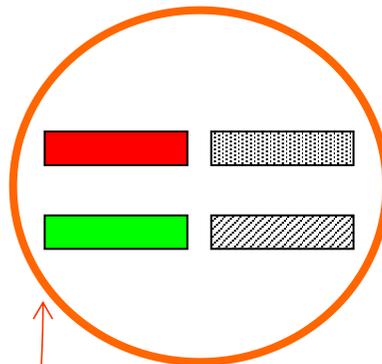
# 人-鼠嵌合抗体基因工程设计



免疫球蛋白  
基因载体的构建

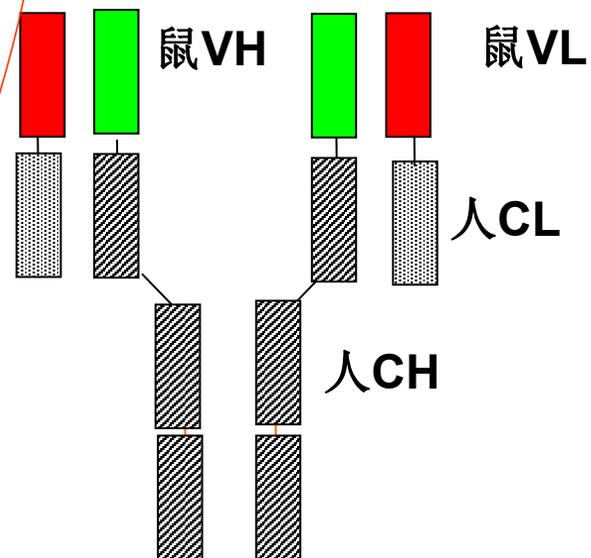


共转染细胞



SP20  
CHO  
大肠杆菌

抗体分泌细胞

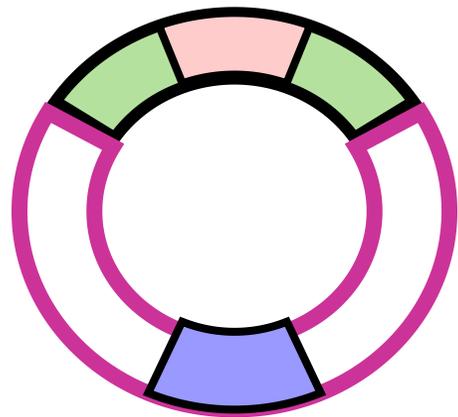


人-鼠嵌合基因工程抗体

### 3. 构建嵌合抗体的大致过程：

1) 将鼠源单抗的可变区基因克隆出来；

2) 构建的包含有人抗体恒定区基因及表达所需的其它组件(如启动子、增强子、选择标记等)的表达载体



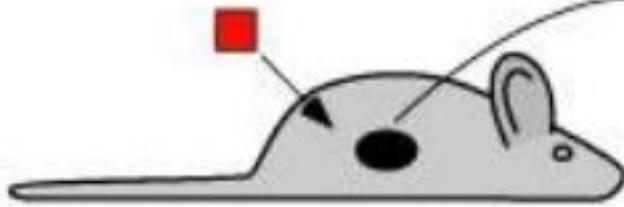
构建重组表达载体

3) 将可变区基因克隆入包含恒定区的表达载体

4) 在哺乳动物细胞(如骨髓瘤细胞、CHO细胞)中表达。

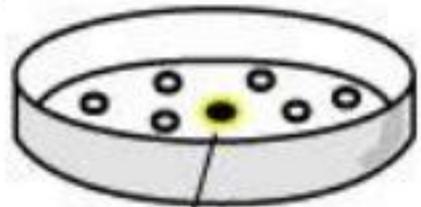
①

Human recombinant TNF



②

Spleen cells are isolated



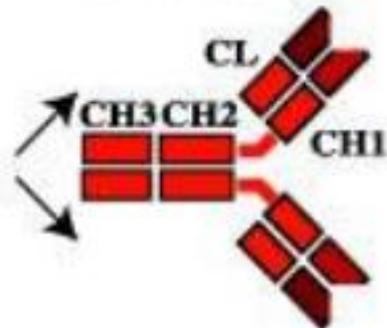
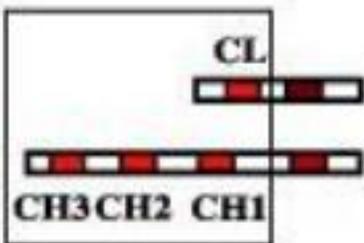
Anti-TNF Ab-producing plasma cell is isolated and the Ab-coding DNA sequence is purified

③

Antibody-producing human plasmacelle

Genes

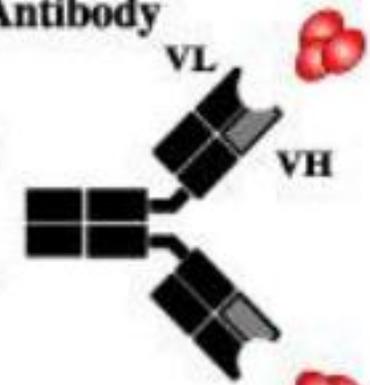
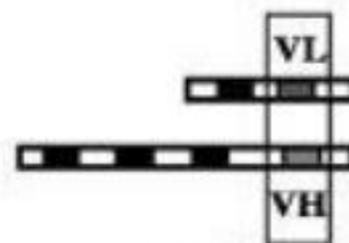
Antibody



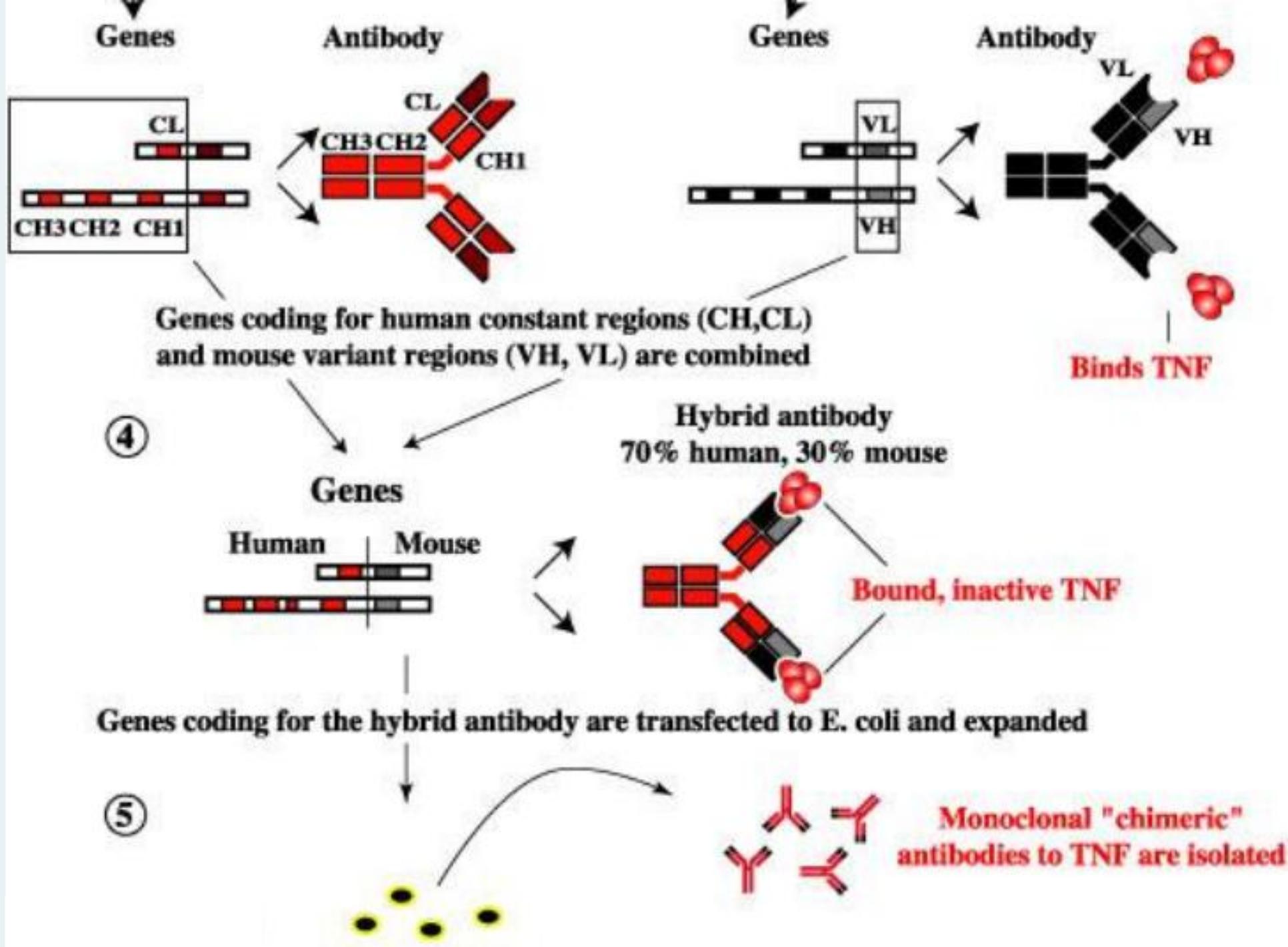
Genes coding for human constant regions (CH,CL) and mouse variant regions (VH, VL) are combined

Genes

Antibody



Binds TNF



# 4. 嵌合抗体的鉴定

## 一. 核酸水平

利用PCR或者RT-PCR的方法从转染后的大肠杆菌或CHO细胞中检测目的基因的插入。

## 二. 蛋白水平

WB检测相应细胞是否均有表达产物。

## 三. 免疫水平

用不同抗原包被ELISA板,检测克隆所表达的嵌合抗体与抗原的结合活性。

ELISA 鉴定该嵌合抗体是否能与抗人Fc抗体相结合。

“

## 5. 嵌合抗体的优缺点

### 抗体性能优点：

- 保持较完整的亲和力和特异性。（抗体特异性）
- 降低HAMA反应，延长半衰期，（改善药代动力学特性）。
- 含人抗体Fc段，介导CDC及ADCC（有效功能性）。

”

## 5. 嵌合抗体的优缺点



### ◎ 制备方式的优点：

- ◎ 制备简单，特异性好（直接选用单抗生产细胞株为模板）
- ◎ 由高效真核表达载体和人抗体恒定区组成的嵌合抗体表达“盒子”可以容许插入不同的鼠单克隆抗体的可变区，缩短操作和研制周期；
- ◎ 可自由选择抗体的型，亚型，亚类以及糖基化的位点，可以进一步的进行亲和力的改进和功能性的选择。
- ◎ 可根据实际需要选择FC片段，制备特异性IgG1或者IgG3,更好的发挥补体的调理作用和ADCC效应（可控的工程编辑）。

# 5.嵌合抗体的优缺点

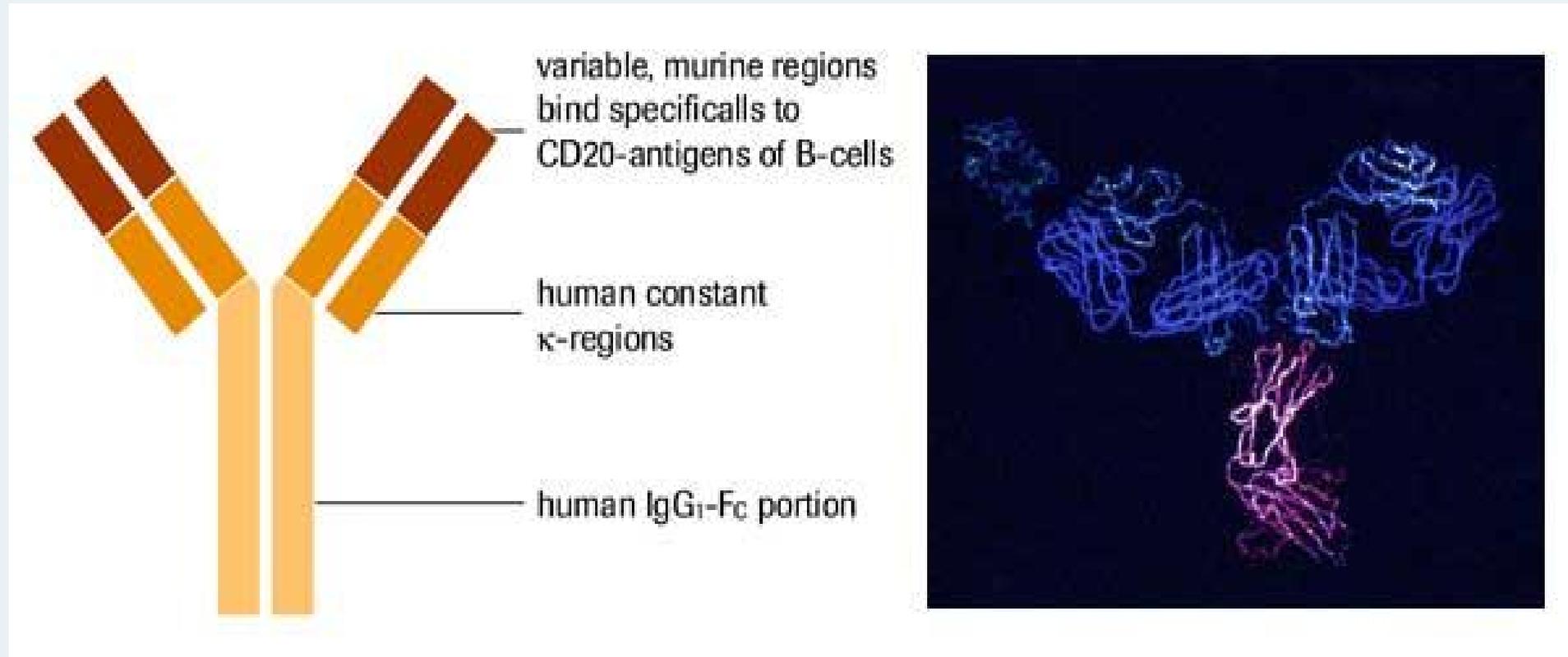
## 缺点

- 保留鼠抗体完整可变区，仍有一定免疫原性。
- 尤其是其鼠源性可变区易于引发强烈的抗独特型抗体反应。甚至引发超敏反应，对机体造成损伤。导向诊断和治疗受限。
- 分子量依旧比较大，难于进行靶向治疗

# 已批准上市的治疗性嵌合体单抗

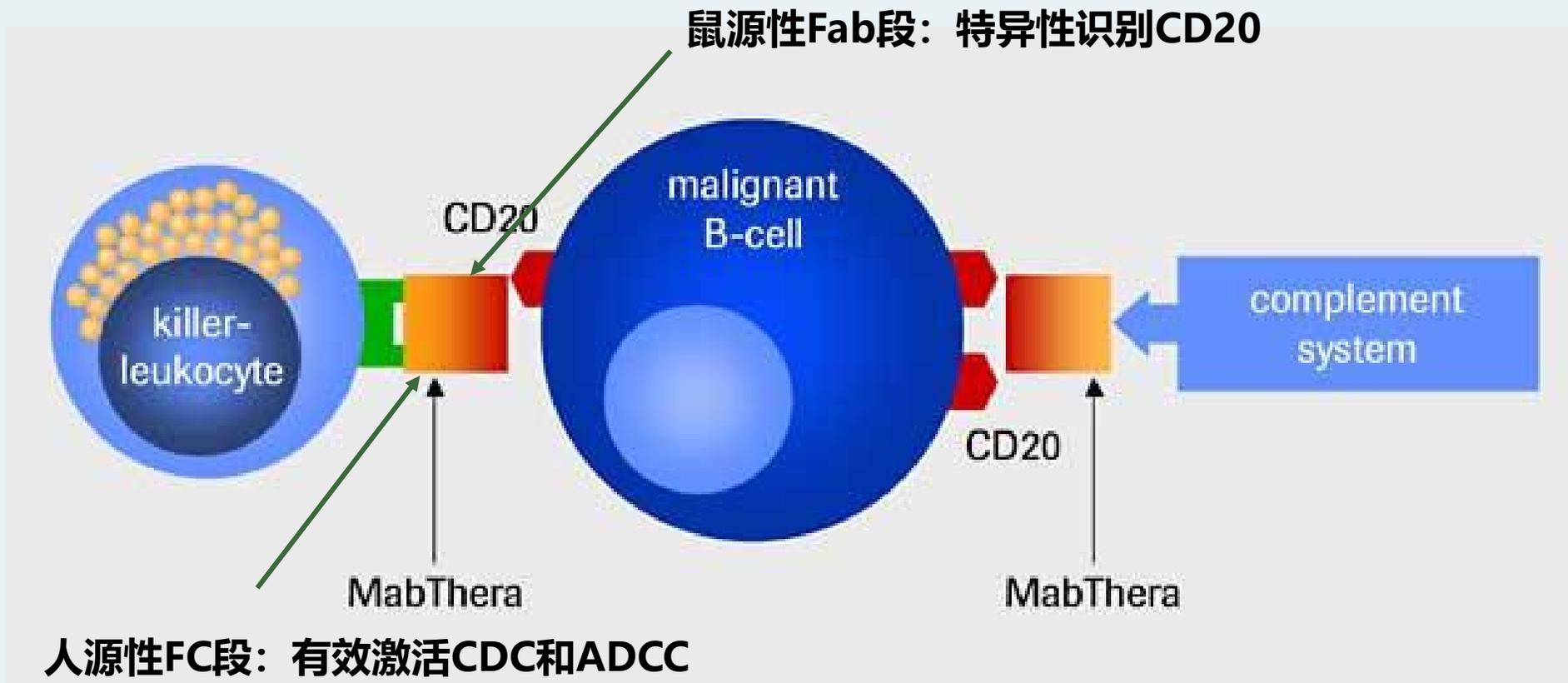
| 抗体名称             | 抗体种类               | 靶向抗原                           | 适应症              | 批准日期          |
|------------------|--------------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| <b>OKT3</b>      | 鼠单抗                | <b>CD3</b>                     | 移植排斥             | 1986          |
| <b>Panorex</b>   | 鼠单抗                | <b>17-1A</b>                   | 大肠癌              | 1995 (德国)     |
| <b>ReoPro</b>    | 人-鼠嵌合Fab           | 血小板受体<br><b>IIbIIIa</b>        | 冠心病              | 1994          |
| <b>Rituxan</b>   | 人-鼠嵌合抗体            | <b>CD20</b>                    | 淋巴瘤              | 1997          |
| <b>Simulect</b>  | 人-鼠嵌合抗体            | <b>CD25</b>                    | 移植排斥             | 1998          |
| <b>Remicade</b>  | 人-鼠嵌合抗体            | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 炎症性肠病、<br>类风湿关节炎 | 1998、<br>1999 |
| <b>Zanapax</b>   | 人源化抗体              | <b>CD25</b>                    | 移植排斥             | 1997          |
| <b>Herceptin</b> | 人源化抗体              | <b>HER-2</b>                   | 乳腺癌              | 1998          |
| <b>Synagis</b>   | 人源化抗体              | <b>RSV F蛋白</b>                 | RSV感染            | 1998          |
| <b>Mylotarg</b>  | 人源化抗体 -<br>化疗药物交连物 | <b>CD33</b>                    | 淋巴瘤              | 2000          |
| <b>Campath</b>   | 人源化抗体              | <b>CD52</b>                    | 淋巴瘤              | 2001          |

# Rituxan 嵌合抗体的应用



**MabThera for the treatment of non-Hodgkin-lymphomas**





**Malignant B-cells are destroyed after docking of MabThera**



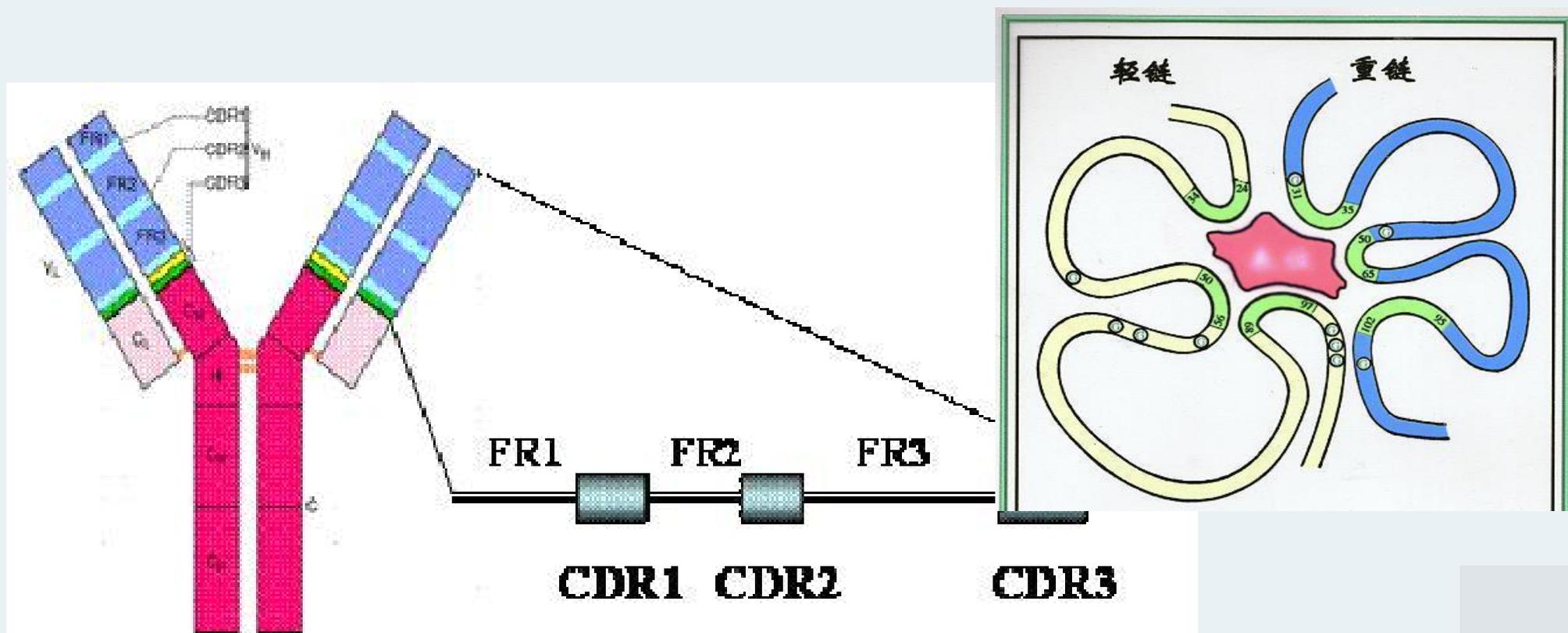
# 嵌合抗体的发展方向：

- 一. 设计优化：优化嵌合抗体的设计，提高了其稳定性和亲和力。这包括**改进嵌合界面的结构，优化抗体可变区的序列，以及引入新的稳定化策略。**
- 二. 表达与纯化技术：表达与纯化技术的改进对于提高产量和纯度至关重要。
- 三. 针对新靶点的嵌合抗体：紧跟新靶点和新的治疗思路。
- 四. 临床应用的拓展：全面诊疗的应用

## 二、可变区的人源化改造

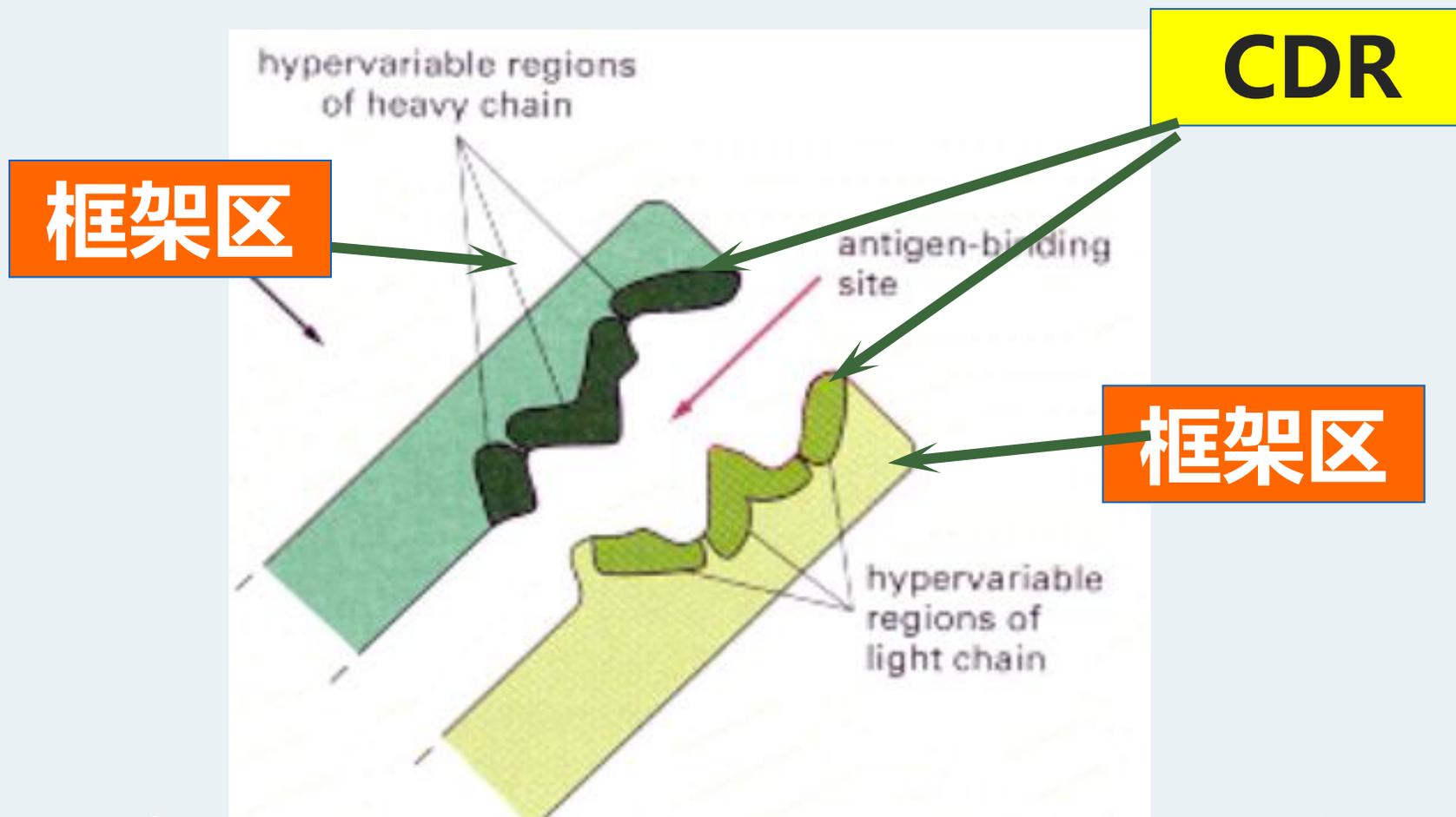
---改形抗体

# 抗体可变区的不连续结构



可变区中互补决定区CDR负责与抗原的结合，具有很大的变异性，其余部分骨架区FR相对保守。

# 抗体可变区的空间结构



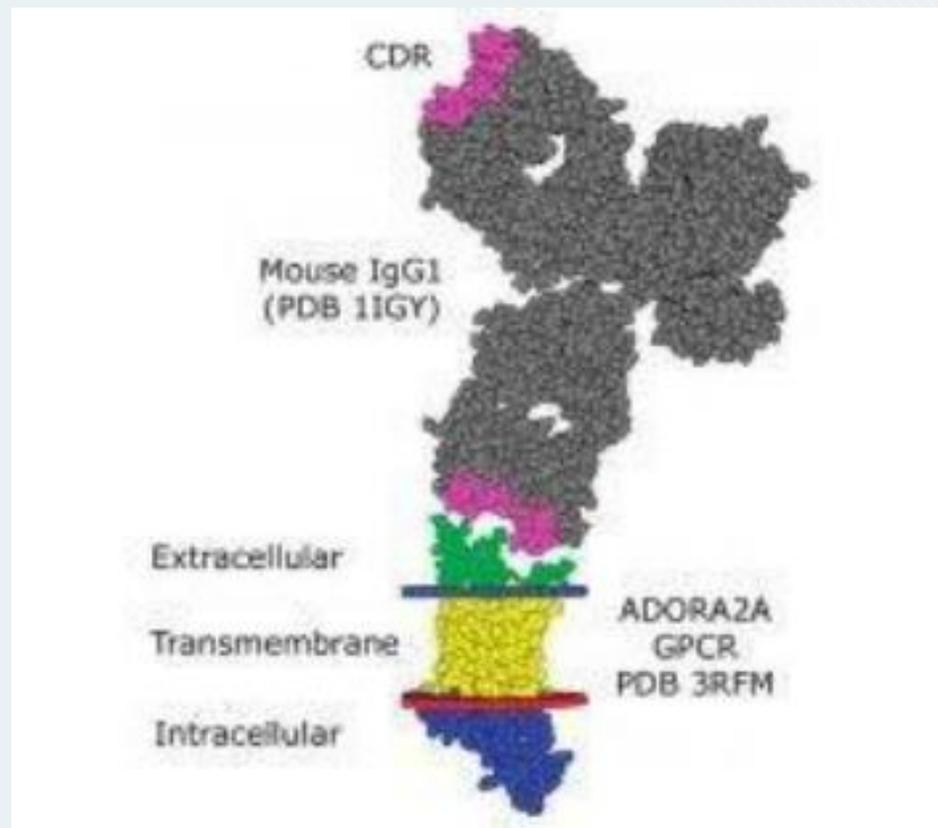
Sources from Molecular Biology of the Cell  
Context 24. The Adaptive Immune System

V. Cells in Their Social  
B Cells and Antibodies



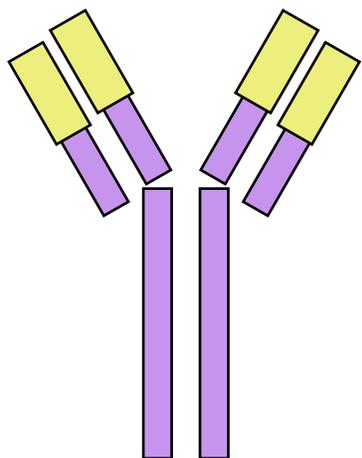
# 抗体可变区的细化

- 抗体可变区并不完全是可变的，一般可以分为比较保守的框架区（FR区）和真正可变的区域——互补决定区（CDR区）。
- CDR区才是抗体和抗原特异性结合的决定部位。



## (一) 改形抗体 (reshaped antibody)

- 在嵌合抗体的基础上，进一步提升抗体的人源性，降低鼠源性。

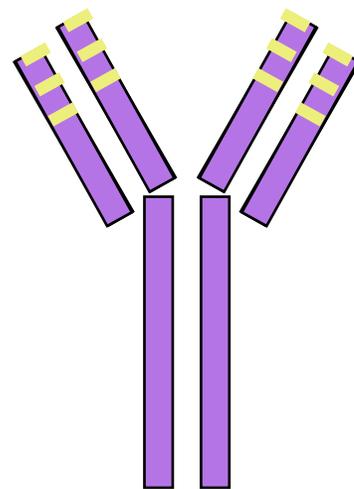


鼠/人嵌合单抗

(66-75 % 人源)

---

ReoPro, Rituxan,  
Remicade, Simulect



改形单抗

(90-95 % 人源)

---

Zenapax, Mylotarg,  
Herceptin, Campath,  
Synagis

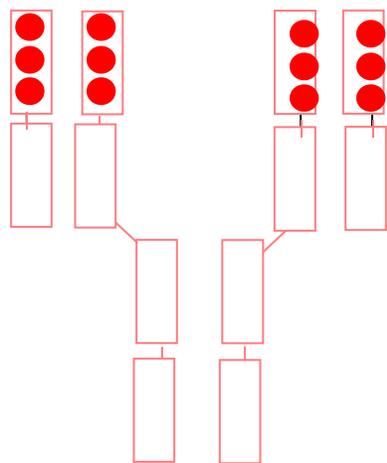
# 1.人改形抗体（CDR移植）

定义：指利用基因工程技术，将人抗体可变区（V）中互补决定簇（CDR）序列改换成鼠源单抗CDR序列。

重构成既具有鼠源性单抗的特异性又保持抗体亲和力的人源化抗体，亦叫“重构型抗体”，因其主要涉及CDR的“移植”，又可称为“**CDR移植抗体**”。

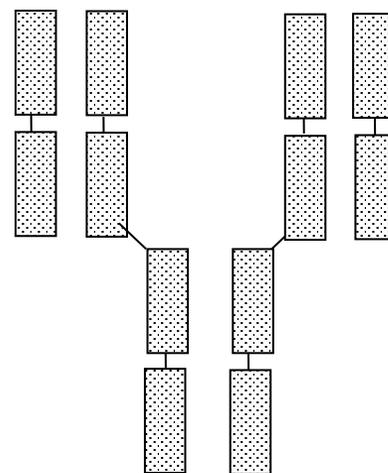
意义：

多种特异的鼠源单抗有可能应用于临床治疗



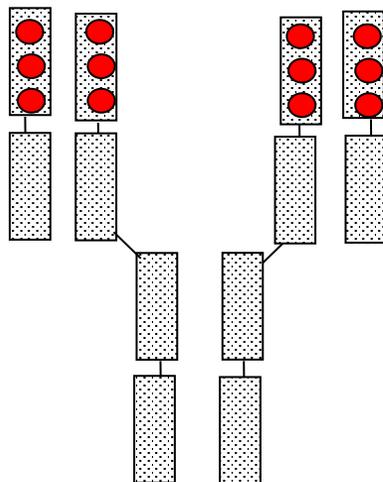
鼠单克隆抗体

CDR序列



人抗体

第一代改形抗体



人源化抗体（改形抗体）

鼠单克隆V区人源化（CDR移植）

## 2. 改形抗体的构建策略

改形抗体可变区的构建：如何将鼠的CDR和人的骨架区拼接



- 重叠延伸PCR;
- 定点突变法;





## 2. 改形抗体的构建策略

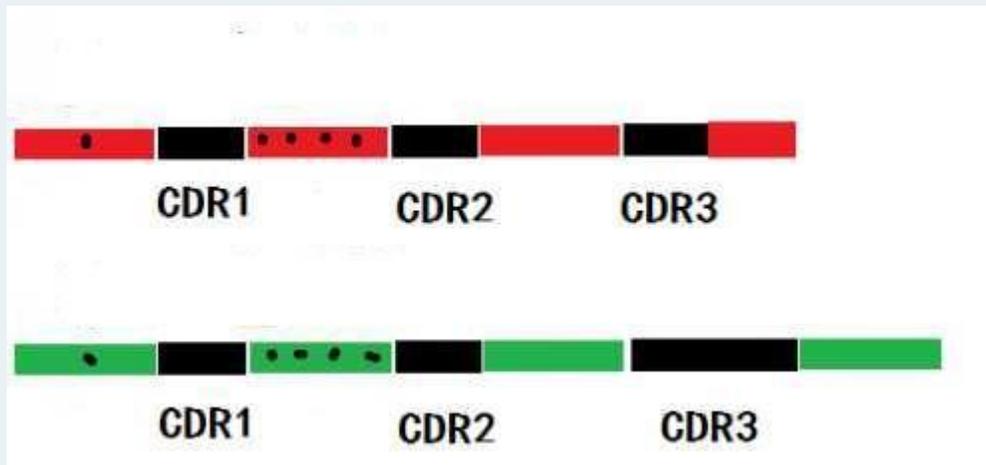
---

### 2.1 重叠延伸PCR技术(gene splicing by overlap extension PCR,简称SOE PCR)

以下是重叠延伸PCR的原理及步骤：

- 根据需要连接的片段设计引物，整个可变区序列的两条链**分解成若干片段**；
  - 在设计引物的时候末端设计**互补的粘性末端**，使PCR产物形成了一小段的重叠链；
  - 然后在随后的扩增反应中通过**重叠链的延伸**，将不同来源的扩增片段重叠拼接起来。
- 

## 2.1.1 片段连接重叠延伸PCR技术



人的可变区

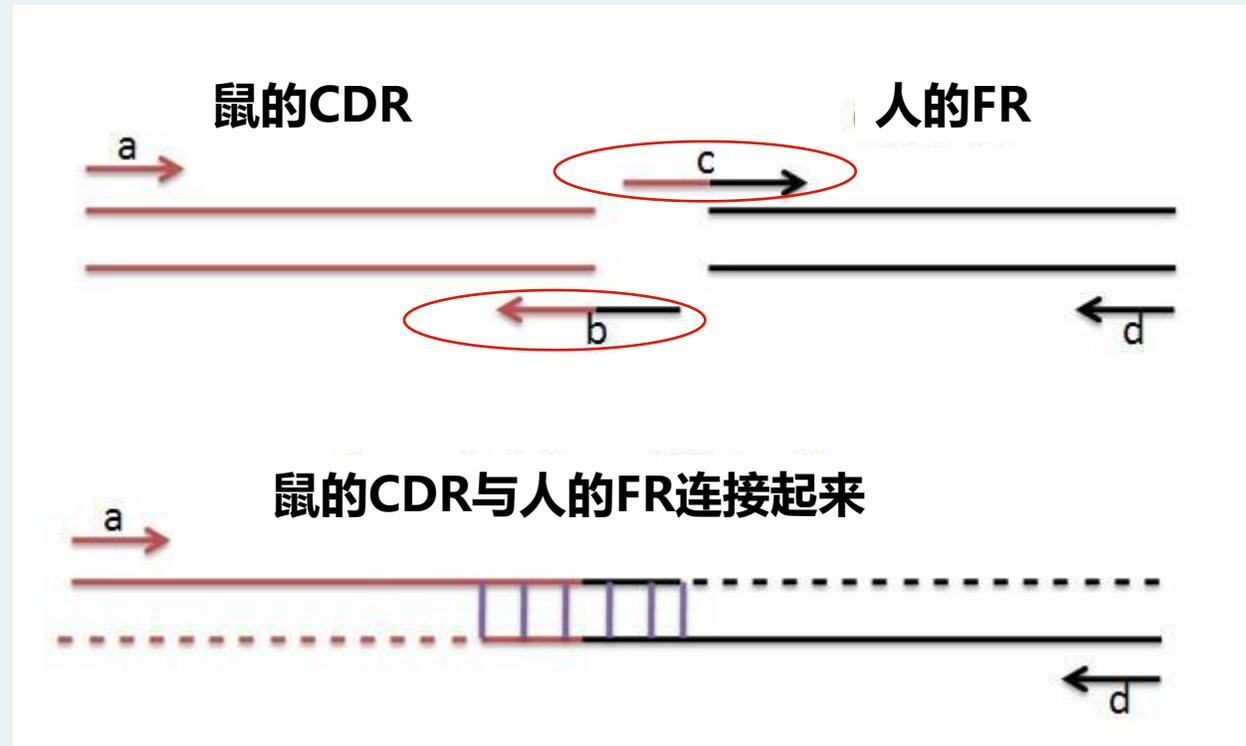
鼠的可变区

鼠的CDR

人的FR

重新拼接

分别将人的FR区和鼠的CDR区分别克隆出来

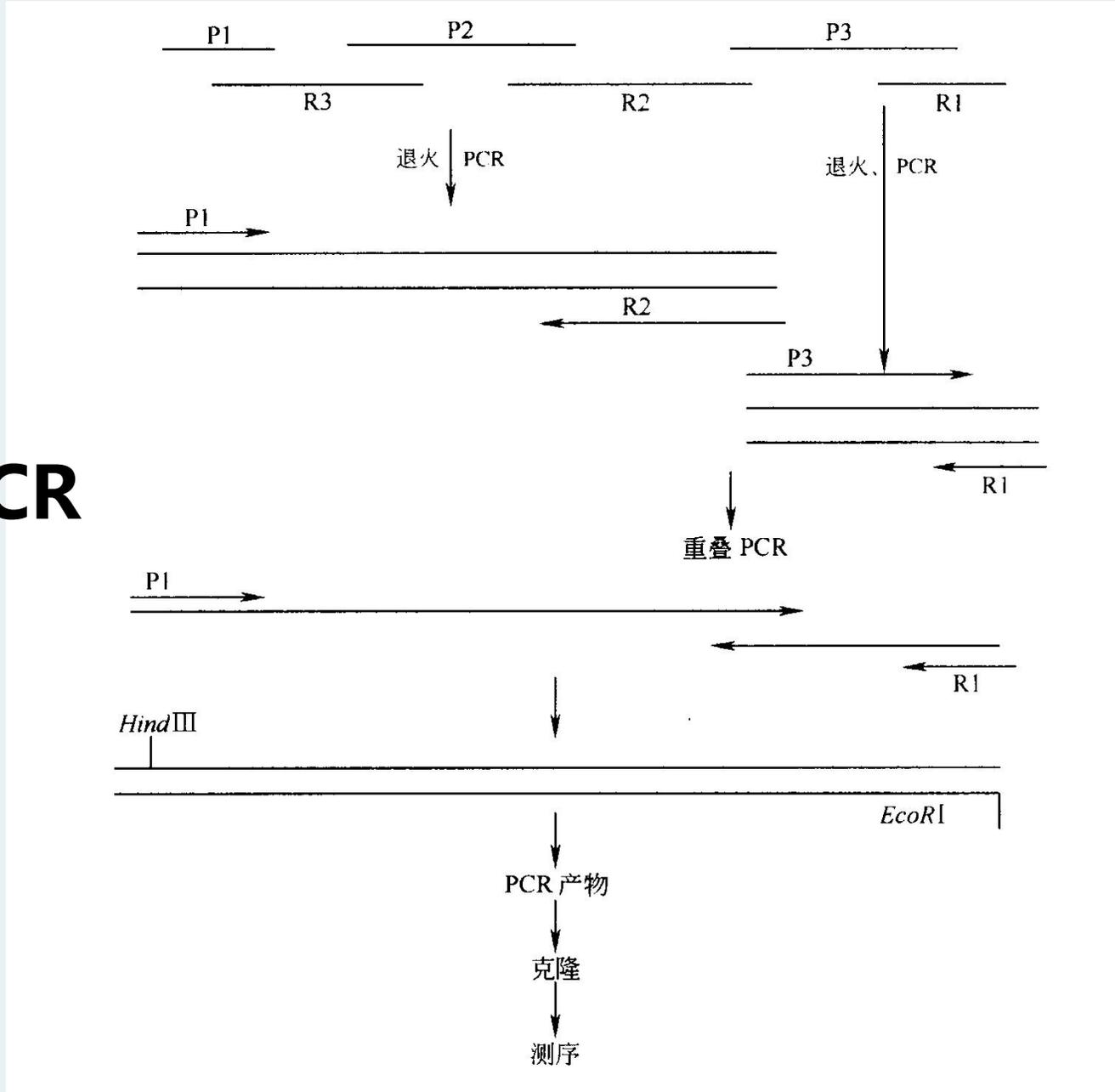


**重叠PCR将需要连接的片段连接起来。**



## 2.1.2

# 全合成法重叠PCR



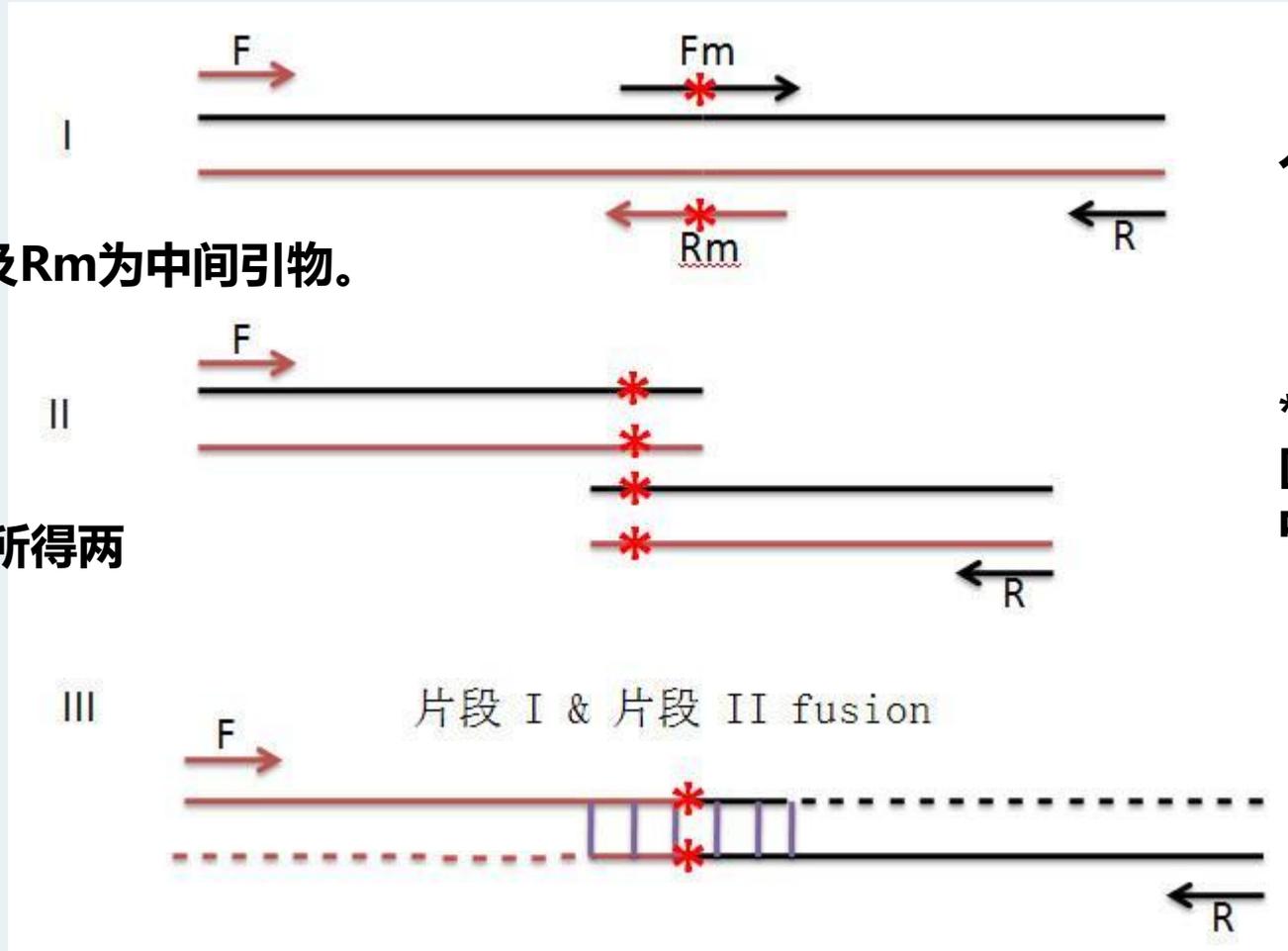
## 2.2 定点突变法

- 将人的可变区基因克隆，根据鼠抗体的CDR序列合成几种突变引物，；
- 定点突变PCR的方法将人的可变区基因的CDR序列变为鼠抗体的CDR序列，然后表达出改形抗体。

# 引物F及R为人可变区基因两端特异引物

其中Fm及Rm为中间引物。

分别回收第1步所得两条PCR产物

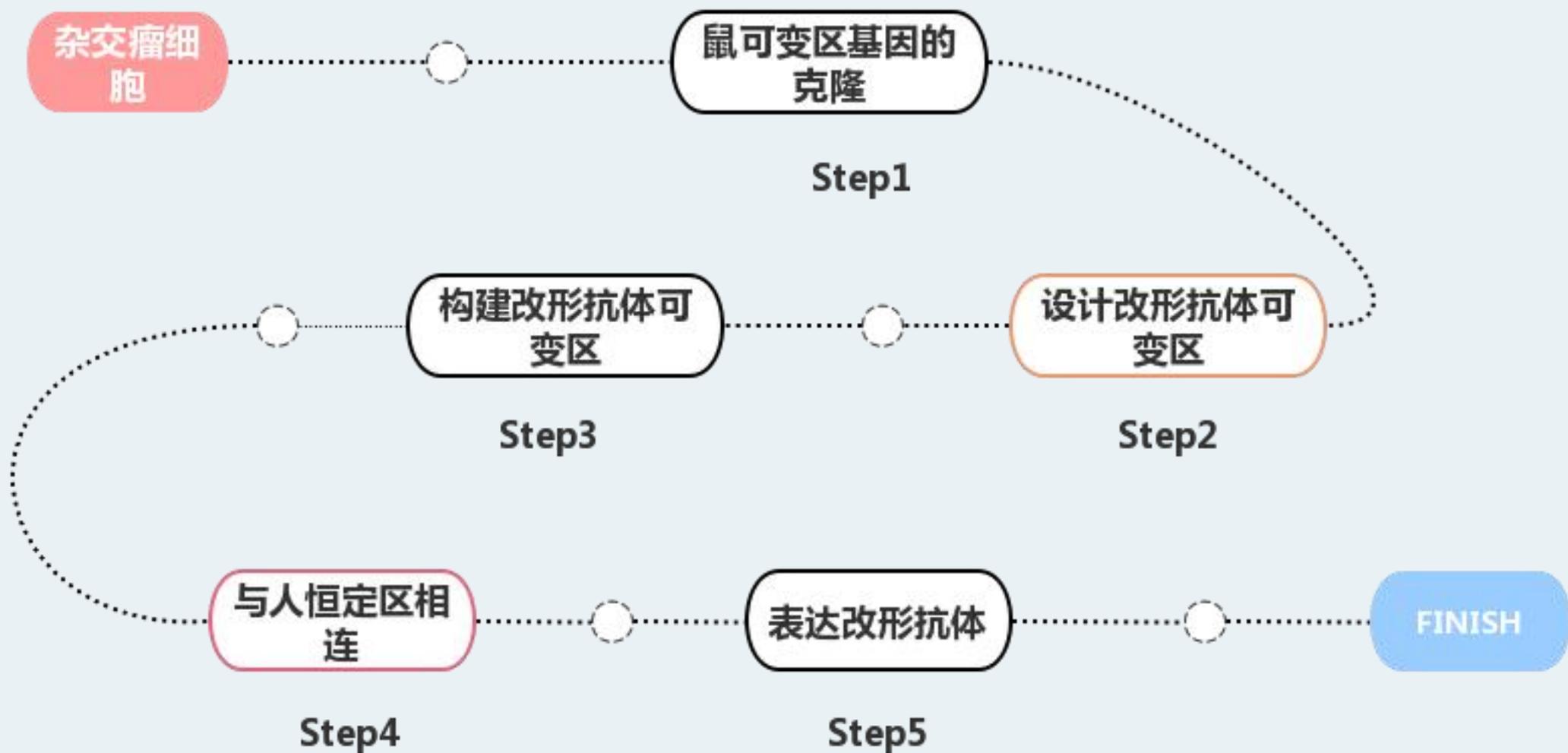


人的可变区

\*为鼠的CDR区设计到引物中作为突变点

连接两个产物

## 2.3. 构建改形抗体的流程图



### 3.部分CDR移植抗体



- ◎ 在简单CDR 移植的基础上又相继发展了部分CDR移植技术，研究发现轻链的CDR1、CDR2和重链的CDR3对保证抗体与抗原特异性结合至关重要，其余三个CDR的作用则较低。
- ◎ 因此只将抗体结合抗原必须的CDR移植到人抗体的FR骨架上即能获得对人免疫原性更小的嵌合抗体，这类抗体称为**部分CDR移植抗体**。

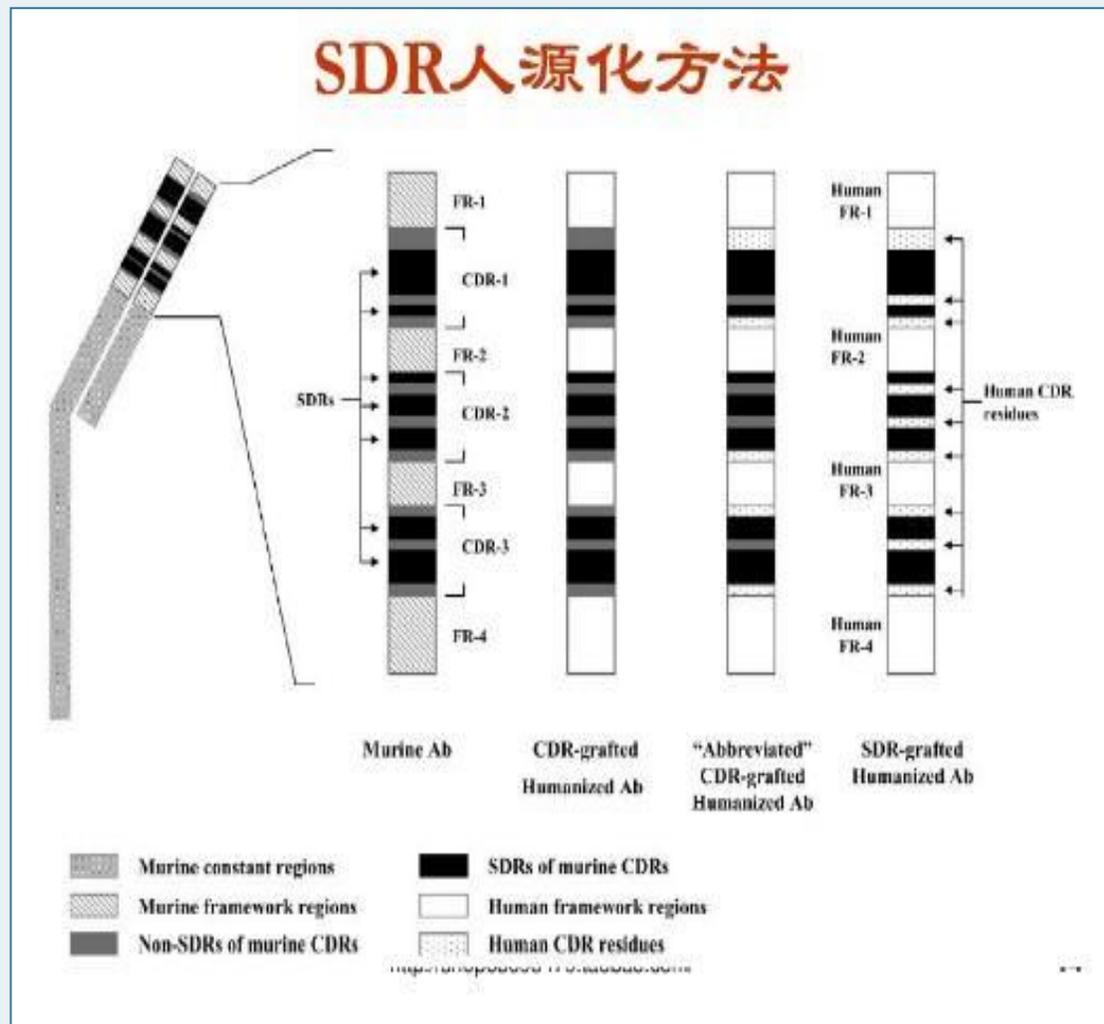


## 4. 特异决定区 (SDR) 移植抗体

- 一. 正如并非所有的CDR在抗原抗体反应中具有同样的重要作用, 一个CDR中不是所有的蛋白分子都参与抗原的特异性识别。
- 二. 执行抗原识别的CDR中的一些**特定区域称SDR**。由此又产生了SDR 移植抗体。

# SDR转移法

- 特定决定区 (SDR) 参与抗原抗体结合以及抗体结构稳定的相关区域。
- **SDR转移，将异源抗体中与抗原结合密切相关的SDR移植到人抗体相应位置上。**



# SDR的判定

CDR氨基酸组成变化最多的区域。

- 通过比对大量抗体的序列，找到组成变化程度最高的区域。
- 这些区域被认为是抗体与抗原特异性结合的决定位点。
- （不同抗体相同的部分可以认为没有特异性，不同抗体之间不同的区域可以认为是经过亲和力成熟后针对抗原做出特异性改变的区域，因此也是决定抗体特异性和亲和力的区域。）
- 可针对该区域进行定点突变或者小片段突变，来提升抗体的亲和力。



# SDR的判定

在CDR中抗原结合率最高的区域。

与抗原-抗体结合相关

## 涉及序列

- CDR中暴露在外与抗原结合密切相关的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端的残基



# 确定SDR的方法：



- 确定哪些SDR是决定抗体亲和力的关键是一个复杂且精细的过程，通常涉及多个步骤和实验策略。以下是一些常用的方法来确定关键SDR：

## 序列比对与结构分析：

- 通过**比对不同抗体的SDR序列**，寻找保守性较高或具有特定特征的氨基酸残基。这些残基可能与抗原结合或稳定性有关。
- 利用**结构生物学技术**（如X射线晶体学、冷冻电镜或核磁共振）解析抗体与抗原的复合物结构，观察SDR与抗原的相互作用模式，从而识别出对亲和力至关重要的区域。
- **计算模拟与预测**：利用计算生物学方法，如分子动力学模拟、结合自由能计算或机器学习算法，预测SDR与抗原的相互作用及亲和力。

## 突变分析：

- **利用定点突变技术**，在SDR中引入单个或多个氨基酸的替换、删除或插入，然后评估这些突变对抗体亲和力的影响。通过构建一系列突变体，可以系统地研究SDR中每个氨基酸残基对亲和力的贡献。
- **截短与拼接实验**：构建不同长度的SDR截短体，进行拼接，以评估不同SDR组合对亲和力的影响，从而识别出关键SDR。

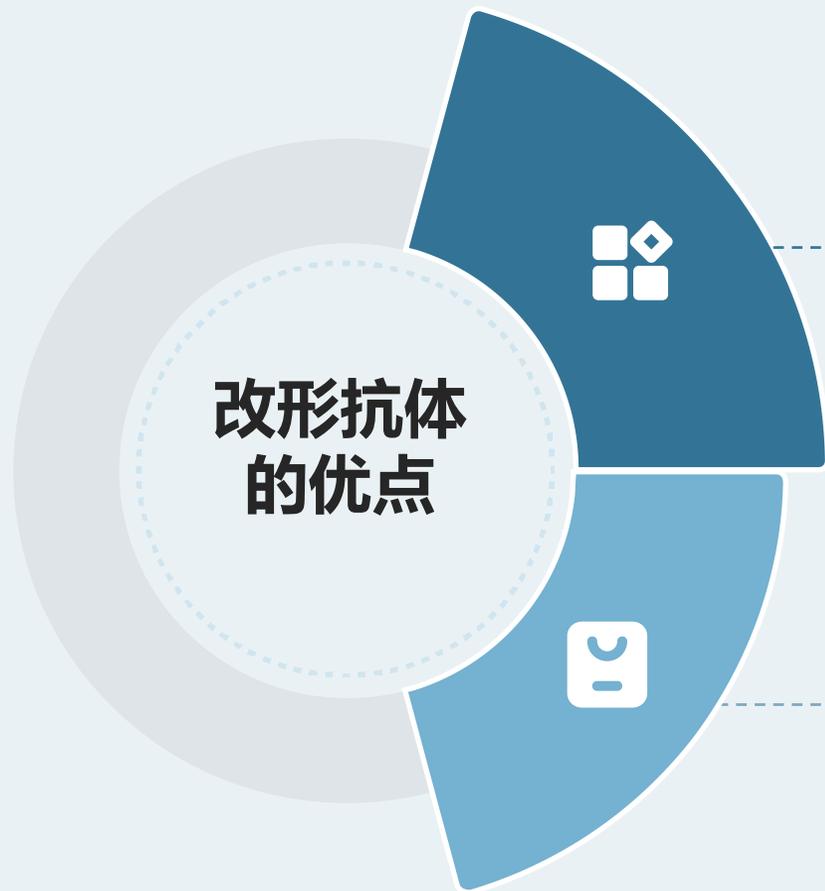
## 4. 改形抗体的优缺点



**鼠源性成分越来越少，基本不会引发HAMA**



## 4.1 改形抗体的优点



### 应用广泛

01

早期的人源化抗体为嵌合抗体，目前正在进行的人源性抗体研究都采取CDR移植的方法进行。

### 大幅降低免疫原性

02

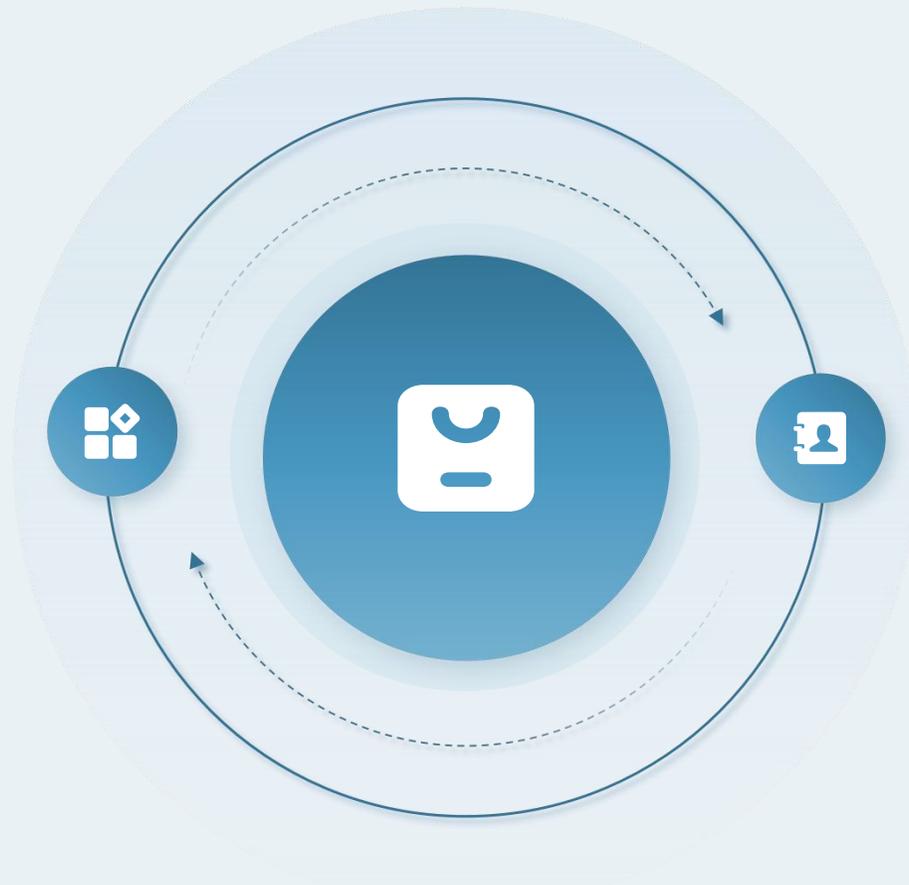
- 具有鼠源性单克隆抗体的抗原结合特异性。
- 抗体分子中鼠源部分只占很小的比例，可基本消除免疫原性。

## 4.2 改形抗体的缺点

简单的CDR或者SDR移植难以保持抗体功能

### 亲和力下降

与抗原结合的稳定性不足



### 特异性改变

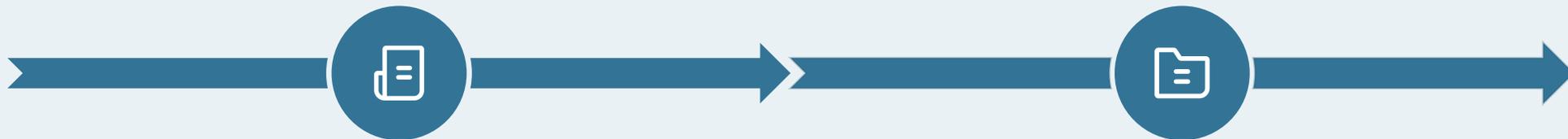
可能出现特异性降低，交叉反应增加的情况



## 4.3 改形抗体不足的原因

骨架区与CDR的相互作用也是空间构象组成的一个部分。

抗体亲和力由空间构象组成



鼠源性的**CDR**和人源性的**FR**不匹配

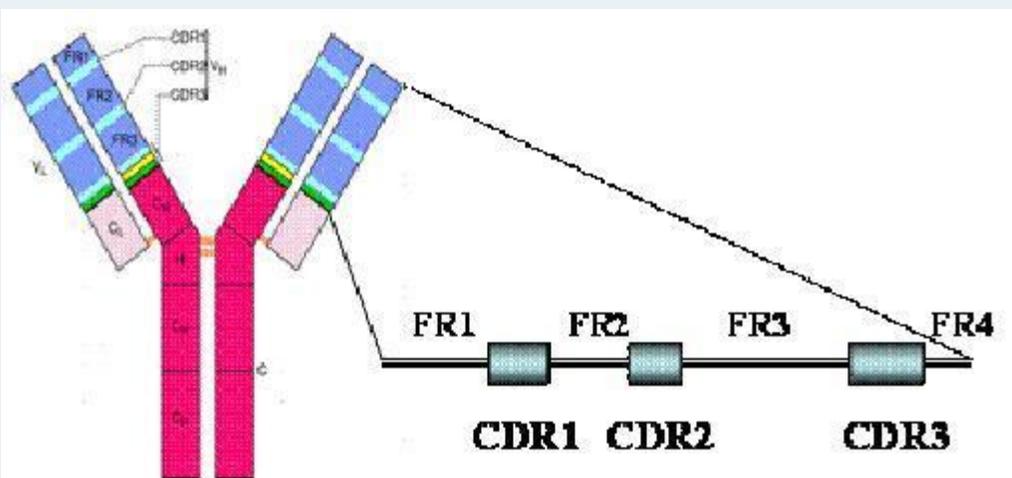
最大的问题是人Ig分子的框架（FR区）中的一些氨基酸与鼠单抗的CDR区不协调，从而使改形抗体的亲和力下降，甚至丧失活性。

单纯的CDR移植无法完全恢复天然抗体的亲和力和特异性。

## FR在抗体空间结构中的意义:



### FR: 可变区的框架结构



- FR的意义:
- 为CDR构象提供环境
- 参与抗体结合位点正确构象的形成
- 参与抗原的结合
- 是抗体具有保守序列的结构

FR框架结构虽然不结合抗原，但是对保持抗体空间结构，同样意义重大！

“

## （二）、第二代改形抗体

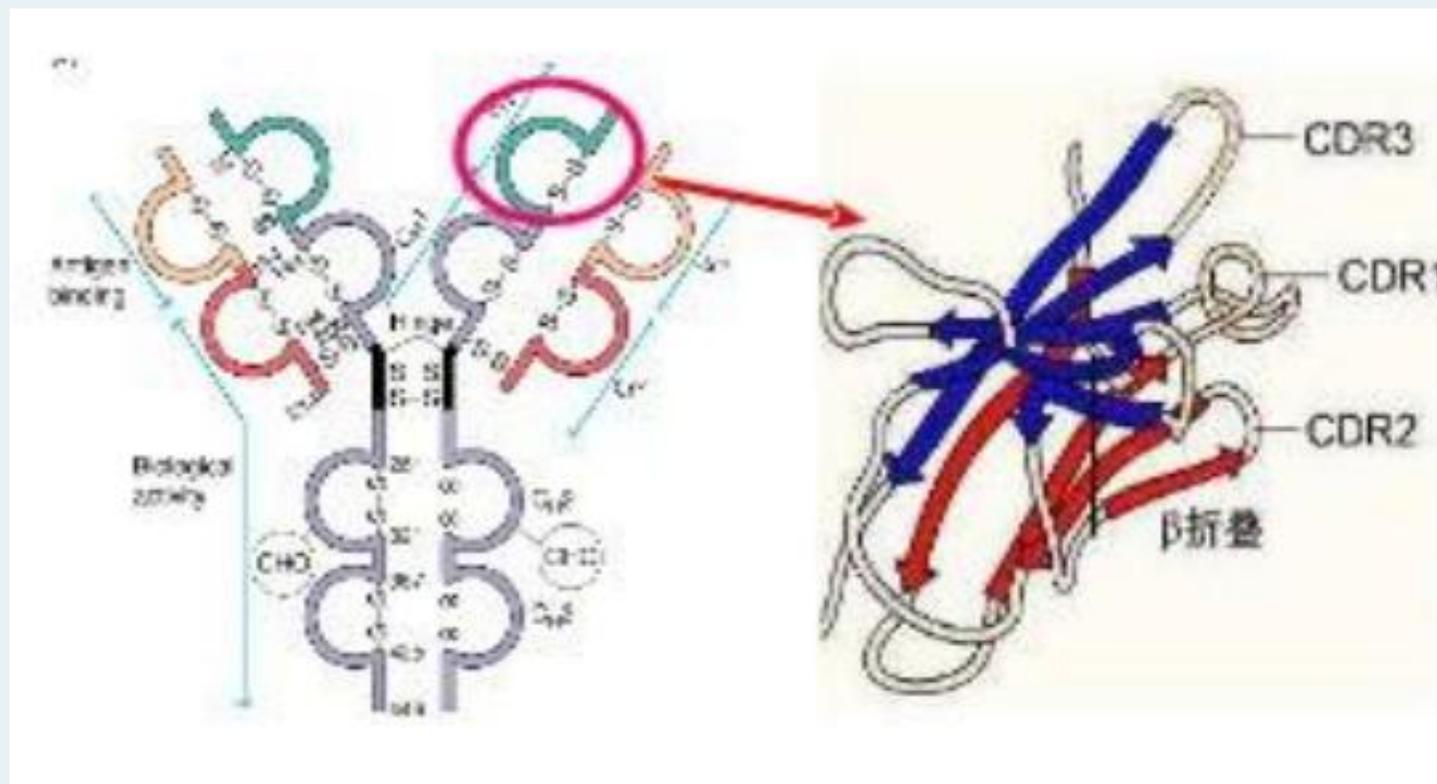
---

### 1.在SDR基础上的鼠抗体可变区的人源化重塑（重构抗体）

- 原理：从简单的鼠源CDR或SDR与人源FR区的拼接，变成一种**构想模拟型重构**，力争在将异源性降到最低的基础上，力争保持抗体的高亲和力。
- 获得高亲和力抗体始终是抗体工程的最大目标。

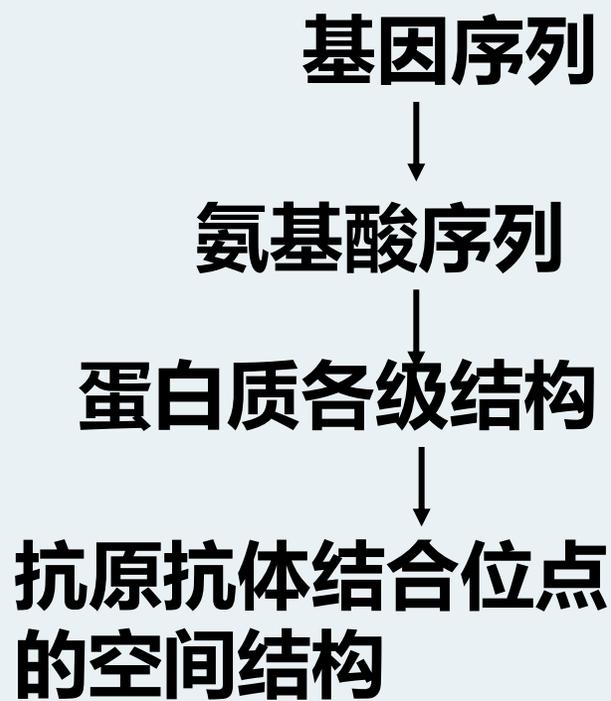
”

- 建立一个“完美”的改形抗体，需要彻底，透彻地了解抗体！



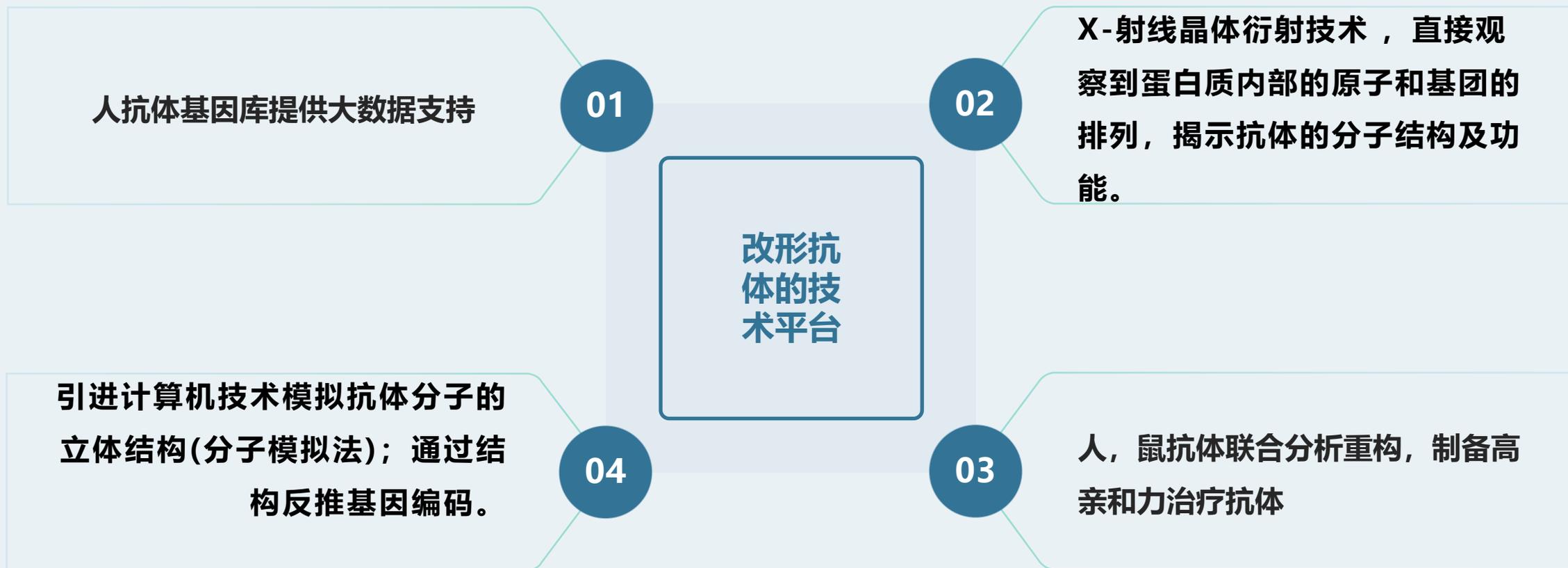
抗体的形成：基因序列——氨基酸序列——蛋白质构想！

# 抗体造模与抗体的逆设计



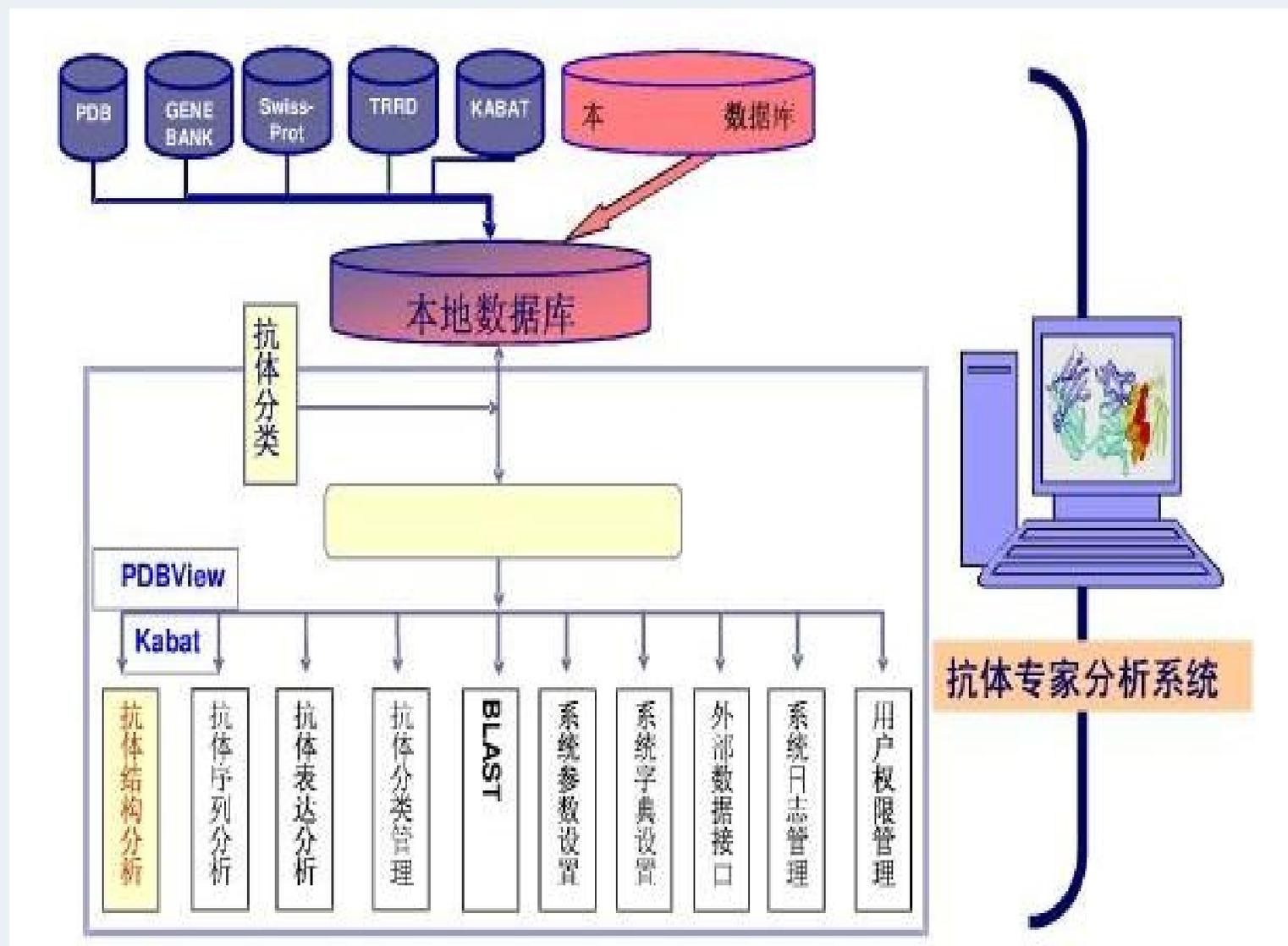
从具有高亲和力的抗体反向推测和设计其基因序列。

## 2. 第二代改形抗体的技术基础



# 通过大数据分析及分子建模技术设计抗体

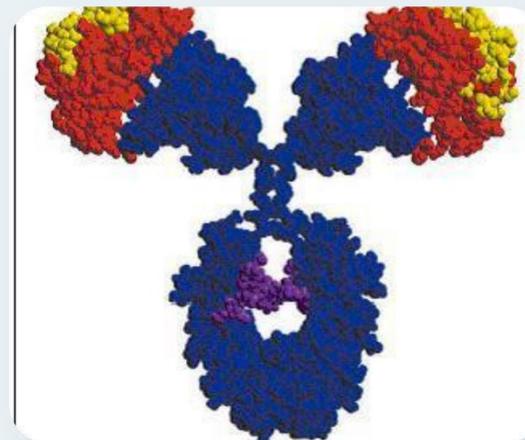
## 第二代改形抗体



## 2.1. 第二代改形抗体的设计步骤

### 根据鼠抗体的空间结构，将FR区纳入设计体系

- 供体鼠抗体可变区空间结构的模建
- 供体鼠抗体氨基酸序列的分析
- 受体人FR区序列的选择
- （确定那些关键的氨基酸和SDR对保证抗原与抗体结合密切相关。）
- 重新确认人FR区序列的选择并设计人源化抗体序列



## 2.1. 第二代改形抗体的设计步骤

供体鼠抗体可变区空间结构的模建

供体鼠抗体氨基酸序列的分析

受体人FR区序列的选择

(确定那些关键的氨基酸和SDR对保证抗原与抗体结合密切相关。)

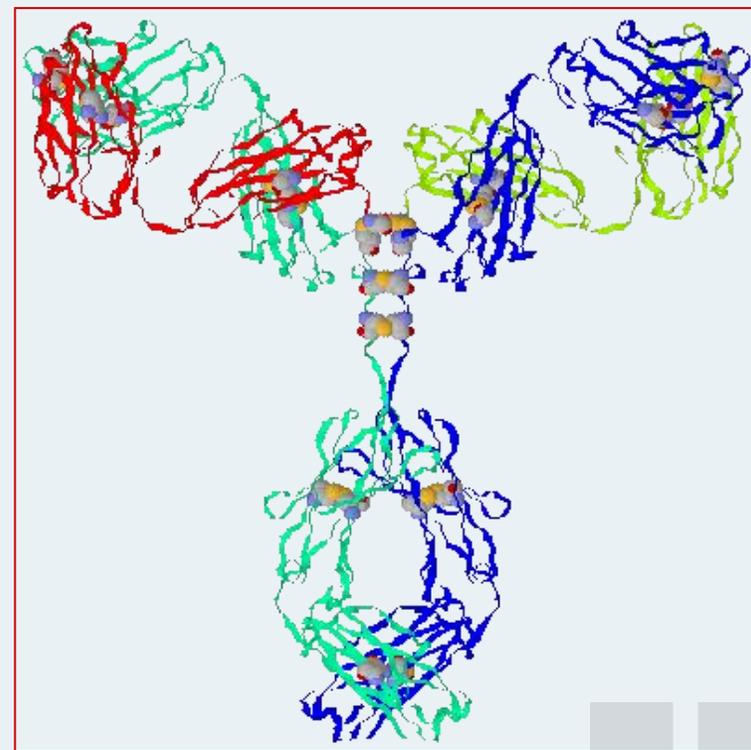
重新确认人FR区序列的选择并设计人源化抗体序列





## 2.2 可变区空间结构的模建

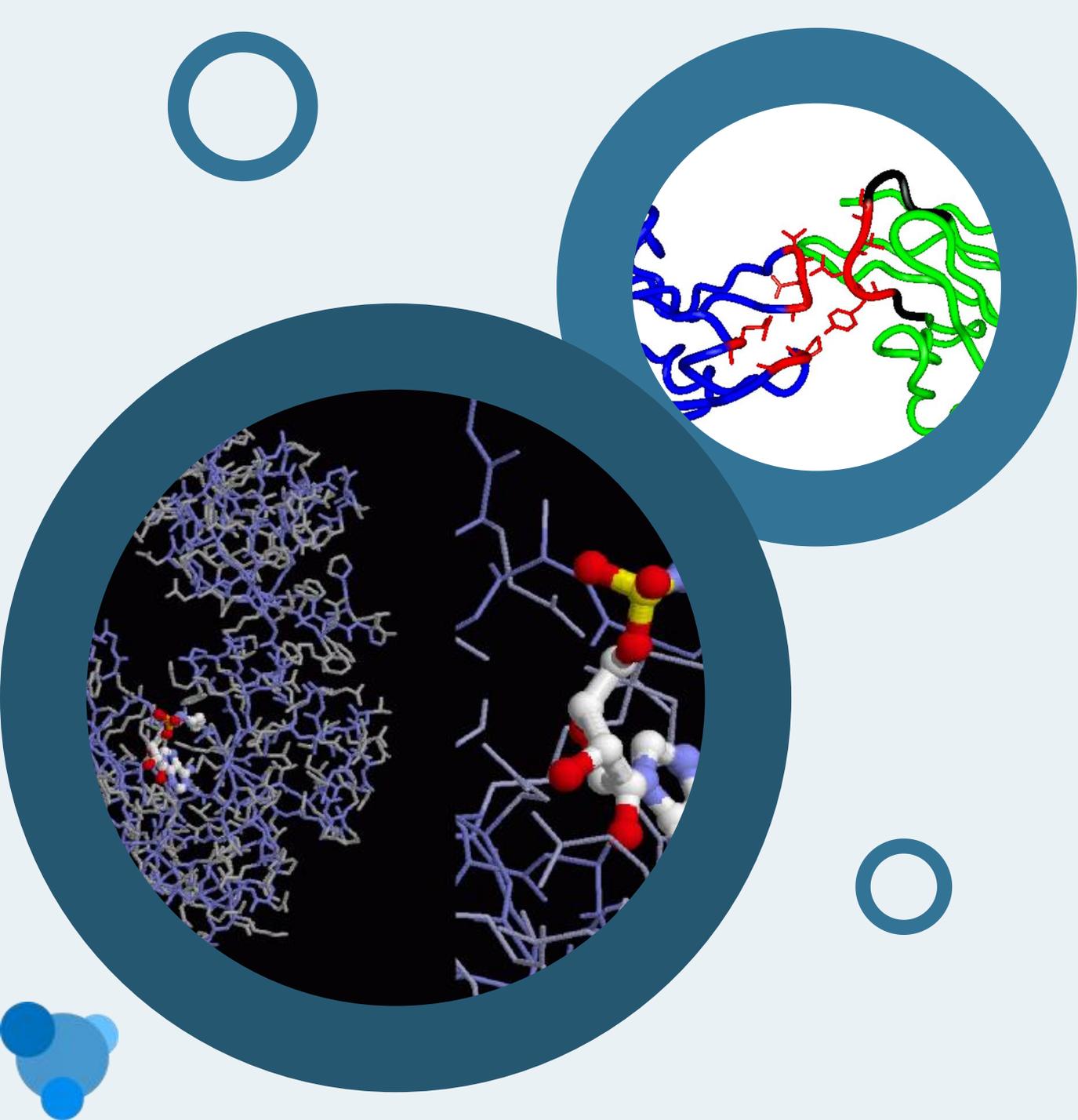
- 参考一些已知抗体的X射线晶体衍射数据，采用适当的分析软件，对鼠单抗可变区进行结构模拟。
- 作为重构抗体的模板



## 2.3 可变区空间结构的模建

常用分子建模软件包

- AbM
- Quanta
- Insight II
- Swiss-Model  
<http://www.expasy.org/swissmod>



## 2.4 供体鼠抗体氨基酸序列分析



### 2.4.1 CDR区的判定

- 含有最可能结合抗原残基，因而必须被保留在人源化的抗体中
- 判断CDR区的方法
  - Kabat的序列判断法  
<http://www.kabatdatabase.com>
  - Chothia的结构判断法

```
      E L T Q S P A I M S A S P G E K V
CCA TGG CC GAG CTC ACG CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ( 60)
Nco I
      T M T C S A S S S V T S M H W Y Q Q K S
ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA ACT TCC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG TCA (120)
      CDR 1
      G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A
GGC ACC TCC CCC AAG AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT (180)
      CDR 2
      R F S G S G S G T S Y S L T V S S M E
CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA GTC AGC AGC ATG GAG (240)
      A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P P T F
GCT GAG GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAG CCA CCC ACC TTC (300)
      CDR 3
      G G G T K L E
GGA GGG GGG ACC AAG CTC GAG (321)
Xho I
```



# CDR区的判定的原则：

## 序列保守性

抗体可变区中的某些序列是高度保守的，这些保守的序列通常构成了抗体的框架区，它们负责维持抗体的整体结构和稳定性。相比之下，**CDR区域**在序列上表现出较高的变异性。

## 功能重要性

**CDR区域**是抗体与抗原结合的关键部位，它们通过与抗原表面的特定区域进行相互作用，实现了抗体的特异性识别。

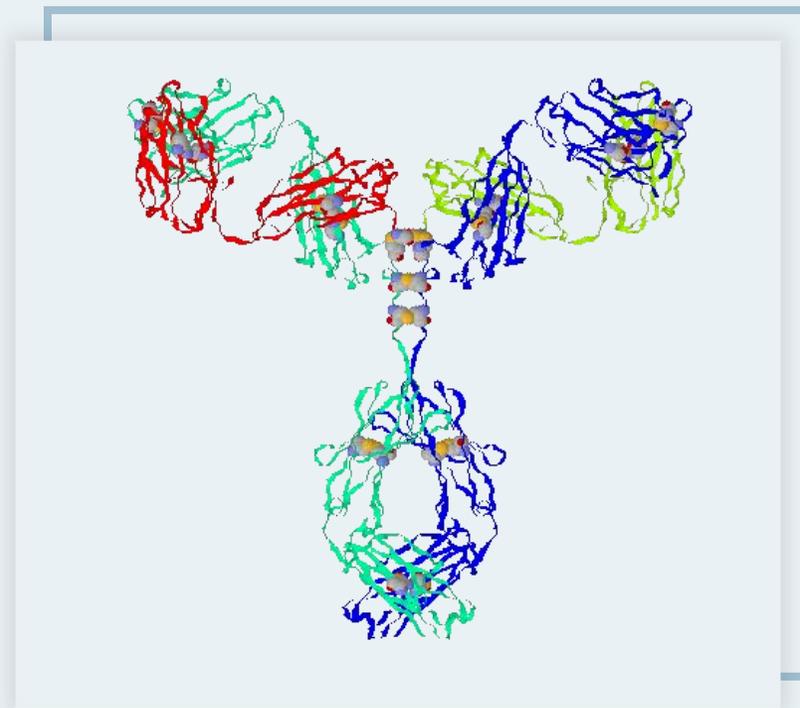


## 2.4 供体鼠抗体氨基酸序列分析

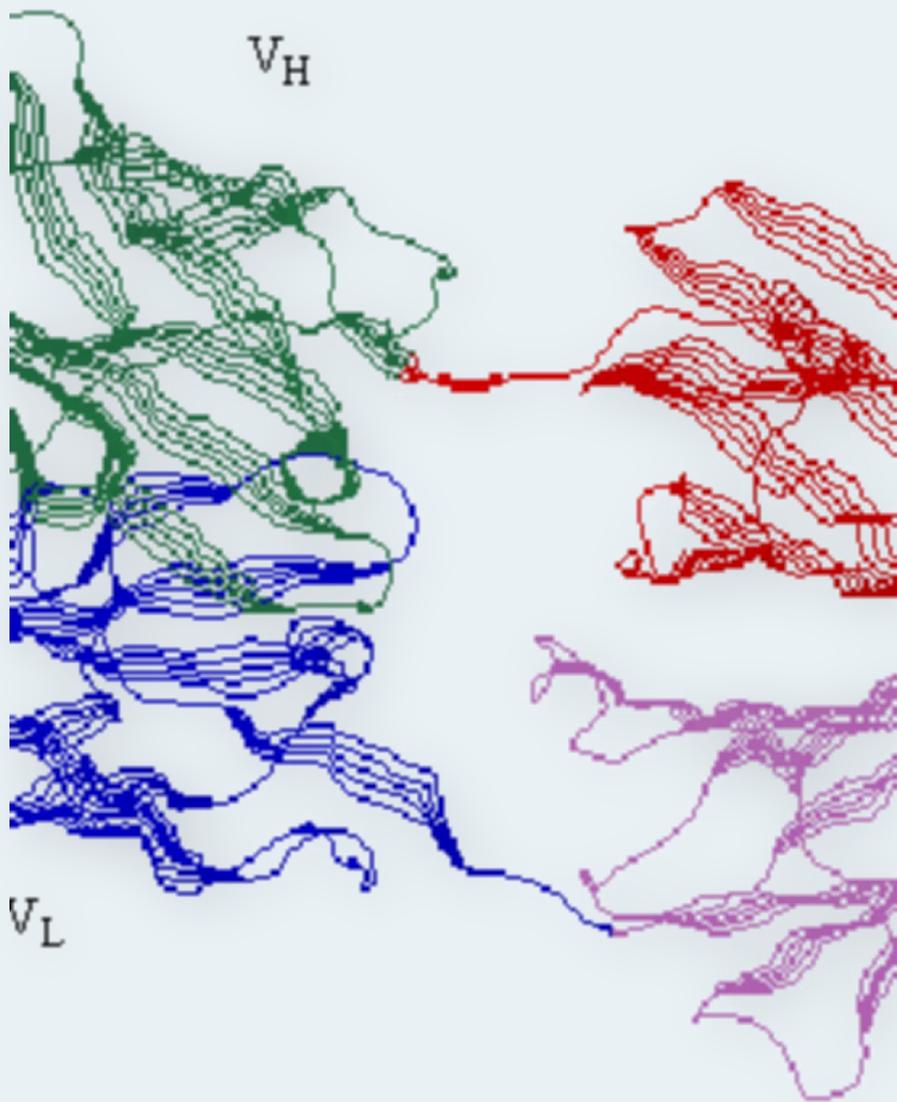
### 2.4.2 维持CDR区空间构象的残基的确定

#### Canonical残基的确认

- 抗体基因的CDR区存在规范序列 (canonical) 和非规范序列 (noncanonical)
  - 规范结构: CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2 (对维持抗体形态很重要)
  - 非规范结构: CDR-H3 (对抗原结合最关键, 突变最多)
- 如果Canonical残基与人FR区的残基不同, 那它们应该被保留在人源化的抗体中。



## 2.4 供体鼠抗体氨基酸序列分析



### 2.4.3 VL/VH界面的残基的确认

#### 链间堆积残基的分析

- 轻、重链可变区之间界面的**堆积残基**是维持轻重链空间结构的关键因素。
- 如果鼠抗体特殊的堆积残基与人FR区的不同,那它们应该被保留人源化的抗体中。

## 2.4 供体鼠抗体氨基酸序列分析



### 2.4.4 特殊的FR区残基（定位保留）

鼠抗体：根据Kabat的方法来鉴定稀有残基的位置。

- 与寻找SDR的方式类似，寻找FR序列中与FR构型相关的区域
- 供体特异性的差别碱基可能归因于体细胞突变，有利于增强抗体的活性。这些残基必须保持。
- FR区紧靠抗原结合部位的残基也尽量保持。



## 2.5.人源FR模板的重构

- 途径一：

- 根据已有**晶体结构数据**的人源抗体的可变区框架，借助序列比较与分子建模确定在人、鼠间的种源差异，尤其是鼠FR中与CDR有密切作用的氨基酸残基，要保留在替换的人源FR中。

- 途径二：

- 在已有的抗体序列库中搜寻与鼠单克隆抗体FR有**最大同源性**的人源FR用以替换。在选择同源的人FR时,先前倡导将VL和VH作为一个整体来考虑,寻找最高同源的人FR。后来则认为,将VL和VH分开考虑,分别寻找最高同源的对应序列，然后综合分析。

通过改造人源性的FR模板与鼠的CDR区形成具有功能的结构

## 2.5.1 第一条途径（定点置换）

- 以鼠单抗可变区立体模型为指导
- 采用统一的人源FR作为替换模板（VHIII,VkI）
- 根据已发表的信息，确定在FR中起关键作用的氨基酸。
- 鼠FR中与CDR有密切作用的氨基酸残基，要保留在替换的人源FR中。

**优点：**

**FR晶体结构提供明确信息**

**缺点：**

**简单置换可能不能获得相应效果**

## 2.5.2 第二条途径

### 优点

更好地保持CDR需要的空间环境。

### 不足

选择的人源FR可能并无结构数据，分子建模缺乏直观性。

在现有的抗体序列库中搜寻与鼠单抗FR有最大同源性的人源FR用以替换

**原则：**鼠CDR在FR同源替换模板中可保持原来的构象。

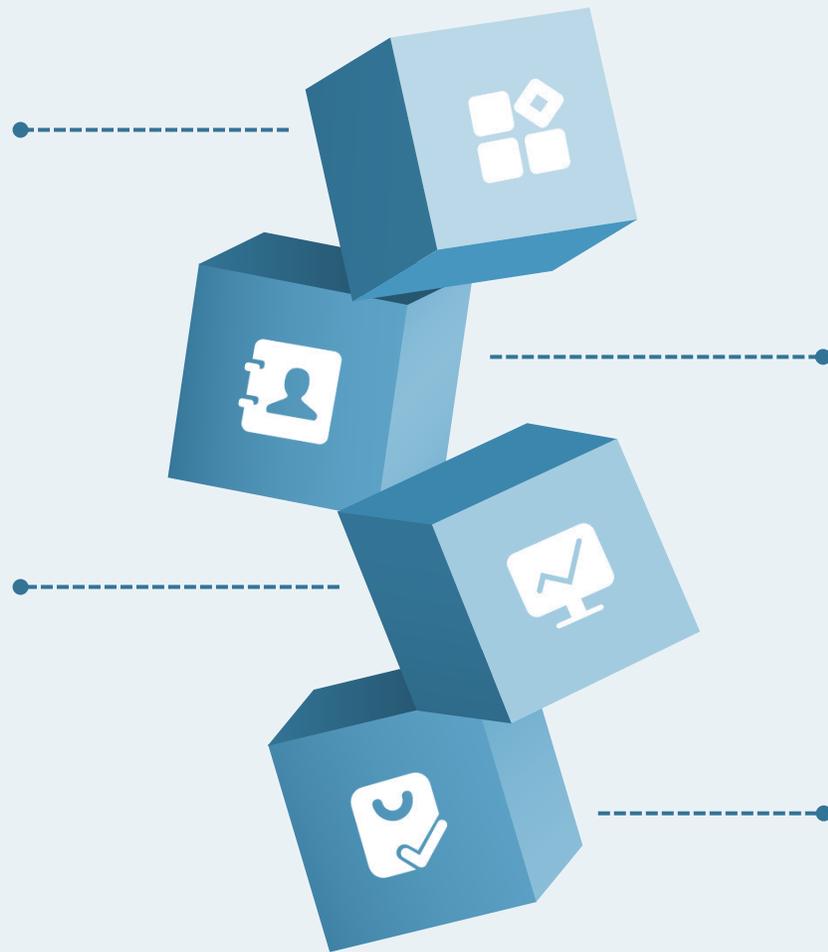
**辅助手段：**分子建模，同源性分析

从同源抗体中或者抗体共同序列中选择人源FR；

# 3. 第二代改形抗体的设计原则

选择与天然单抗同源性最高的序列；

适当保留CDR两侧的骨架区；

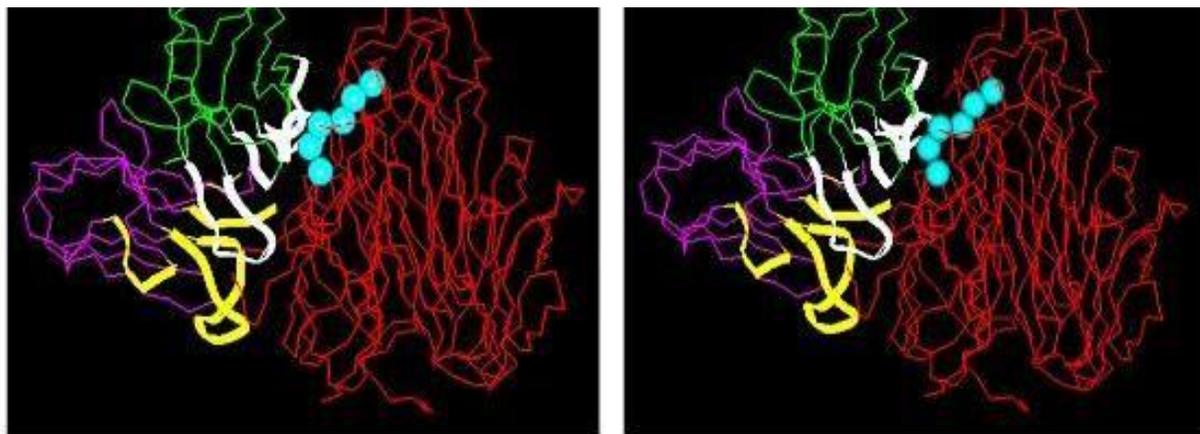


晶体衍射分析抗体结构，  
替换抗原结合部位的氨基酸残基；

选择性保留抗体N末端；



## 4. 第二代改形抗体的技术方法



根据设计的抗体序列转化成核酸序列，分段合成之后，采用**定点突变**，或者是**OVERLAP PCR**的方法构建相应可变区片段。

## 5. 第二代改形抗体的优缺点

- **优点：**
  - 已经在最大程度上进行了人源化改造。
- **缺点：**
  - ◆ 仍不可避免抗独特性抗体的产生。
  - ◆ 构建方法比较复杂，涉及多次分子建模，计算机模拟以及计算机模拟和现实细微结构的统一性上面临很大的困难。
  - ◆ 可供选择的FR序列相对不足，抗体亲和力和免疫原性之间的矛盾仍然存在。

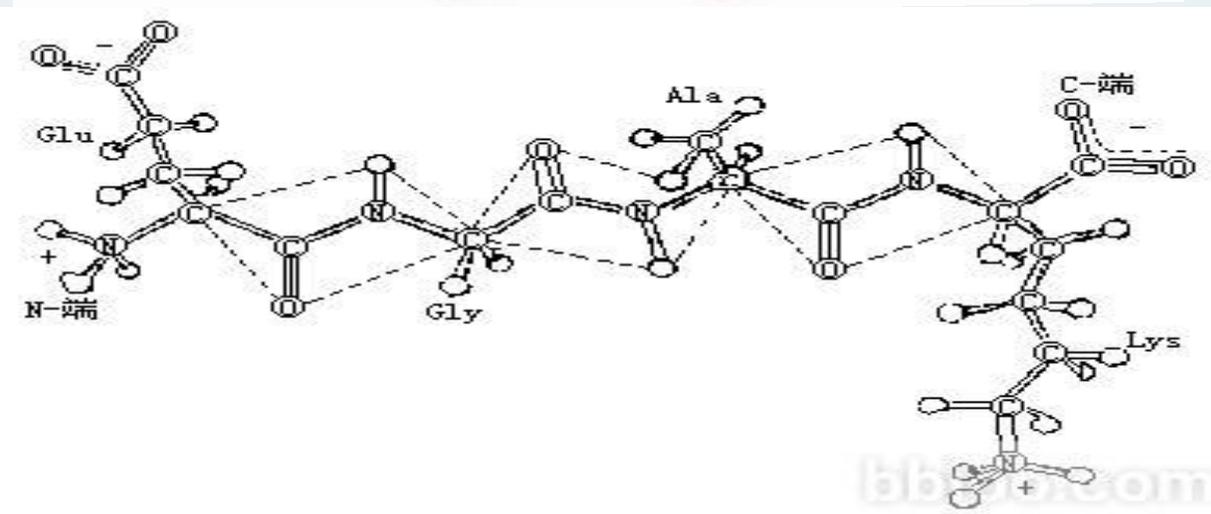
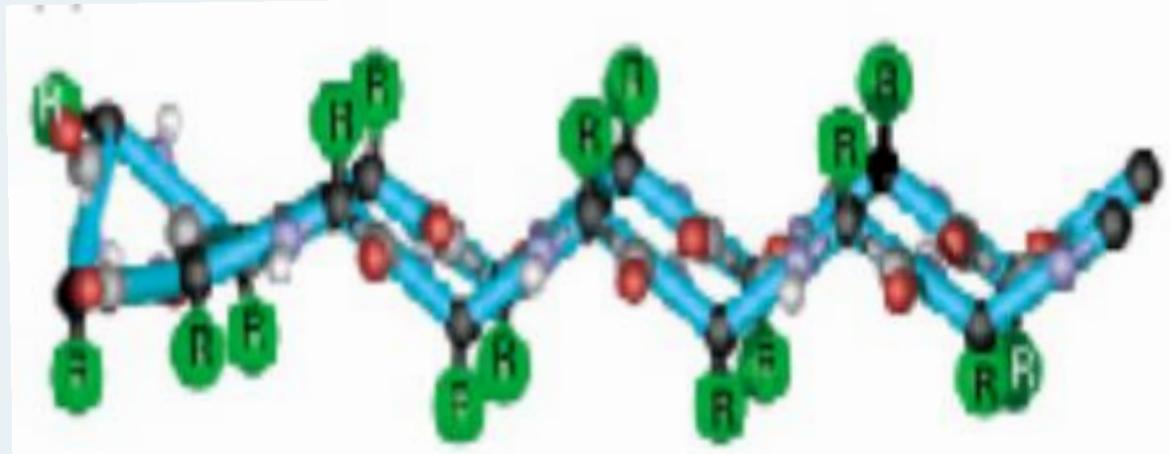
## 四、镶面抗体（表面重塑抗体）

基于蛋白质表面重塑技术的鼠抗体改造！

# 1. 镶面抗体的理论基础

## Aa 氨基酸残基

组成多肽的氨基酸在相互结合时，由于其部分基团参与了肽键的形成而失去一分子水，因此把多肽中的氨基酸单位称为氨基酸残基。即由肽键连接的氨基酸失水后剩余部分。



- 1991年，Padlan等分析了大量鼠单抗可变区Aa和人抗体可变区Aa的表面暴露情况，发现抗体表面所暴露的Aa位置和数量都很保守，不因种属和型别而改变。
- 抗体表面暴露的Aa是鼠源可变区免疫源性的主要来源。

## 镶面抗体的定义：



- ◎ 将鼠单抗V区表面暴露的氨基酸残基中与人V区相应的氨基酸残基改为人源的，就可以使V区表面人源化，消除了异源性而不影响V区的整体空间构象，这种对鼠单抗进行人源改造的方式称表面氨基酸残基的“人源化”。
- ◎ 基本原理：对鼠CDR及FR表面残基进行镶饰或重塑，以使其类似于人抗体CDR的轮廓或人FR的型式。





镶面抗体的原理，就类似于换手套！



在不改变鼠抗体空间结构的情况下，  
改变其外观。

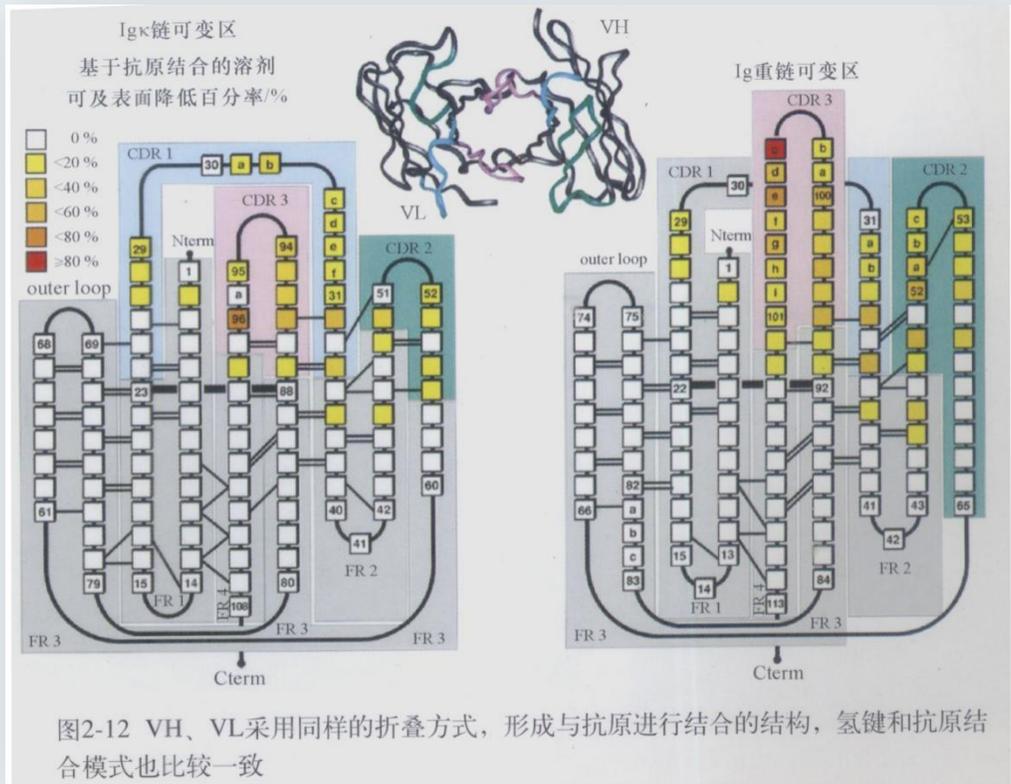
使之不被人体免疫系统所识别。



# 3. 镶面抗体的设计原则

- 表面重塑抗体是指对异源抗体表面氨基酸残基进行人源化改造。
- 该方法的原则是仅替换与人抗体差别明显的区域，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残基替换；
- 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。

# 3.2 Fv区表面溶液可及残基的确定



人、鼠抗体当一个残基的原子中超过30%暴露于溶液中时，其相对可接近性大于30%，这一残基被定义为可接近的，即Fv区表面溶液可及残基。



# 4. 镶面抗体序列选择与构建

01

建立鼠抗的框架区模型；  
(基于X射线晶体结构分析和分子模拟)

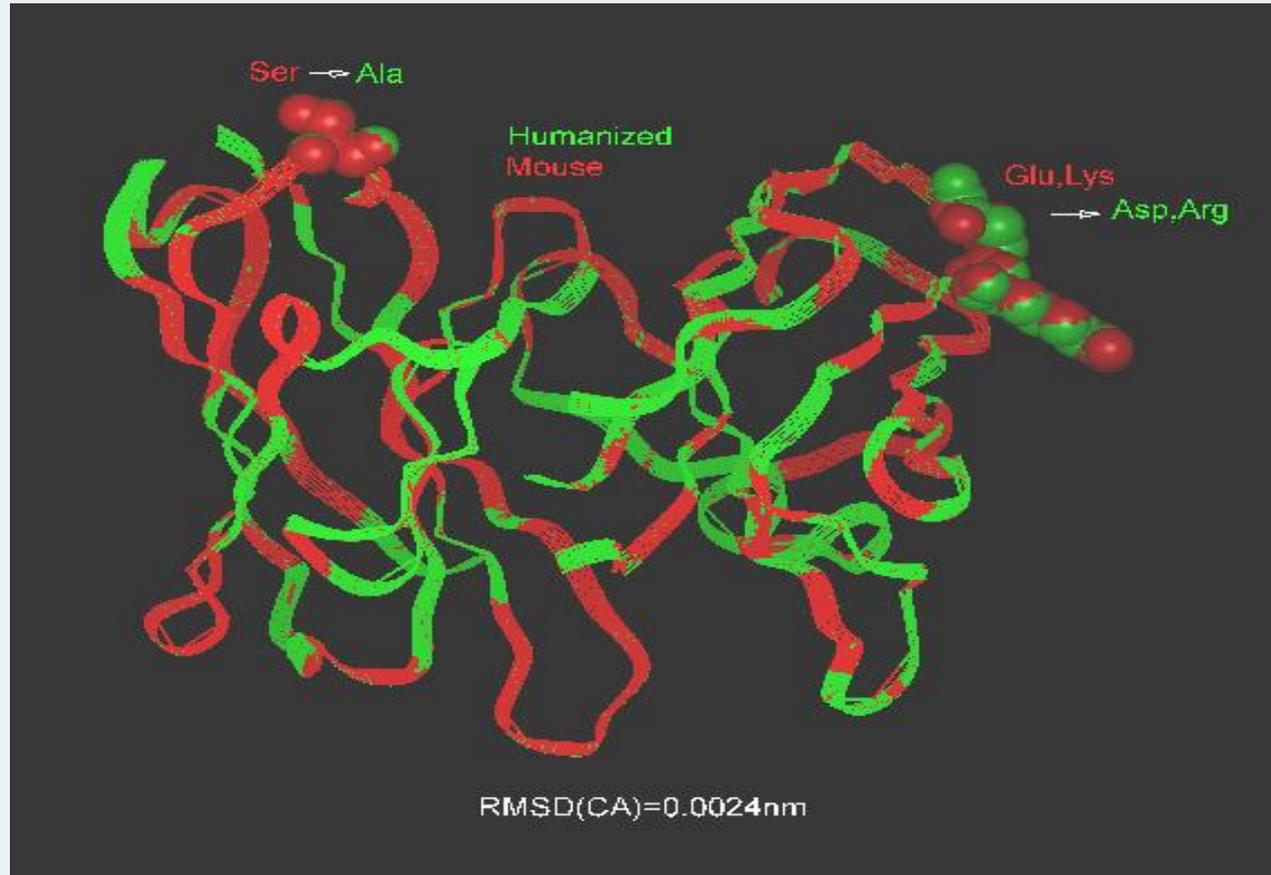
02

与人Ig数据库进行比对分析，筛选最相似的人Ig序列。

03

用选择的人Ig分子表面残基替代鼠Ig表面残基，产生复合序列建立表面重塑的结构模型。

# 表面氨基酸残基人源化



鼠抗体（红）和人源化抗体（绿）Fv结构的叠合图



## 4. 镶面抗体序列选择与构建

对表面重塑抗体和鼠抗体的结构模型进行分析，无论哪种Fv模型中，当表面残基与CDRs在0.5nm 之内时，检查残基替代情况。如果在大小、电荷、疏水性或形成氢键的潜能方面有改变，将会严重影响CDR的构型，这时鼠的残基被保留。



## 5. 镶面抗体的优缺点



- ◎ 优点：
- ◎ 原理简单，操作简单，可操作性强，易于一次成功得到理想的人源化抗体。
- ◎ 缺点：
- ◎ 仅替换亲水性残基，消除异源性的效果存在不确定性。



# 复习题：

## 1. 抗体人源化改造的策略：

- 嵌合抗体
- CDR移植的人源化抗体
- 鼠抗体可变区的表面重塑

“

## 2. 人源化抗体优点

---

- 减少降低了机体的免疫排斥反应
- 募集效应因子或效应细胞
- 在体内的半衰期长
  - 对于该现象的解释是：人源化抗体中的Fc段可以特异结合人血管内皮细胞上的Fc受体（FcRn），使抗体内化到血管内皮细胞而不被降解，并能够回到血液中参与循环。鼠抗体由于不能有效的与人FcRn结合而很快从循环系统中清除。

”

# 3.人-鼠嵌合抗体的特点

含75~80%人抗体，20%鼠抗体。

1

恒定区是人源性的，大大降低了HAMA。

2

可有效激活CDC和ADCC。

3

可变区为鼠源，保留了亲本单抗的亲合力和特异性。

4

在人体内的半衰期明显延长。

5

## 4. 嵌合抗体和改形抗体的特点对比

|        | 嵌合抗体   | 改形抗体     |
|--------|--------|----------|
| 亲和力    | 高      | 低 (需要修复) |
| 特异性    | 高      | 低 (需要修复) |
| 需要分子模拟 | 不需要    | 需要       |
| 免疫原性   | 强      | 弱        |
| 鼠源性比例  | 20-25% | 1%-5%    |

# 谢谢！

汇报人姓名