

【發明說明書】

【中文發明名稱】

以三維結構為主之人類化方法

【英文發明名稱】

THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE-BASED HUMANIZATION
METHOD

【技術領域】

【0001】 本文報告使用以結構為主之方式人類化非人類抗體之方法。使用本文所報告之方法可確定(對)所選人類或人類化受體序列之所定義位置之胺基酸殘基之特定(回復或正向)突變的(必要條件及)適合性。考慮到個別殘基之拓樸學、三維結構及相互作用及其變化。藉此解決特定胺基酸殘基變化對抗原結合性之影響。

【先前技術】

【0002】 抗體與其抗原之相互作用係基於其3維結構。抗體互補位係由6個CDR (互補決定區)環形成，識別抗原表面上之互補表位。在對小抗原(例如小分子)具有特異性之抗體之情形下，僅來自一些CDR之少數胺基酸而非全部參與抗原識別。通常，與VL (可變抗體輕鏈結構域) CDR相比，VH (可變抗體重鏈結構域) CDR (尤其VH CDR3)更有助於形成與抗原之接觸，且抗原-抗體接觸之幾何中心靠近VH CDR3。參與直接抗原接觸之CDR胺基酸殘基稱為特異性決定區(SDR)。藉由抗原-抗體複合物之3維結構之分析，直接接觸抗原之胺基酸殘基可基於其距離來鑑別。CDR之間間隔之FR (框架)殘基亦可參與抗原識別，但程度較小(該等區域之表面可佔抗原及抗體接觸表面之高達15%) (例如，參見Altshuler, E.P.,

Chemie 50 (2010) 203-258 ; Bujotzek, A.等人，mAbs 8 (2016) 288-305)。

【0003】 二級及三級抗體結構揭示於例如EP 0 239 400中。四個框架區主要採用 β -褶疊構形且CDR形成連接 β -褶疊結構之環，且在一些情形下形成 β -褶疊結構之一部分。CDR藉由框架區緊密靠近，且與來自另一可變結構域CDR一起有助於形成抗原結合位點(例如，參見Poljak, R.J.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 3305-3310；Segal, D.M.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71 (1974) 4298-4302；Marquart, M.等人，J. Mol. Biol., 141, (1980) 369-391)。

【0004】 可變結構域內之並非所有殘基皆為溶劑可及的(例如，參見Amit, A.G.等人，Science, 233 (1986) 747-753)。

【0005】 在一結構域內，兩個二硫鍵結之 β -褶疊(及因此CDR環之末端)之堆積在一起及位向係相對保守的，但該等 β -褶疊之堆積及位向確會出現小的位移(例如，參見Lesk, A.M.及Chothia, C., J. Mol. Biol., 160, 325-342, 1982；Chothia, C.等人，J. Mol. Biol., 186 (1985) 651-653, 1985)。

【0006】 抗原結合位點之兩部分之可變區藉由鏈間非共價相互作用保持在正確位向中。該等可涉及CDR內之胺基酸殘基。

【0007】 因此，為使一個可變結構域之抗原結合能力轉移至另一者，可能不必用來自供體可變區之完整CDR來替代所有CDR。可能僅需要轉移彼等自抗原結合位點獲得之殘基，即CDR殘基以及框架殘基。亦可必要地確保鏈間相互作用所需之殘基保留在受體可變結構域中。

【0008】 免疫球蛋白分子之功能取決於其三維結構，其三維結構進

而取決於其一級胺基酸序列。

【0009】 對抗體之Fv區建模揭示於Bujotzek等人(MAbs. 7 (2015) 838-852)中。WO 2005/061540揭示人類化抗體之方法及藉此獲得之人類化抗體。藉由CDR移植使抗體人類化揭示於Williams等人(「Antibody Engineering」, Springer (Berlin), 2010, 第319-339頁)中。WO 2014/100542揭示高通量抗體人類化。預測用於抗體可變結構域建模之VH-VL結構域位向揭示於Bujotzek等人(Prot. Struct. Funct. Bioinf. 83 (2015) 681-695)中。WO 2016/062734揭示以VH-VL結構域間角為主之抗體人類化。

【發明內容】

【0010】 本文報告使用以結構為主之方式人類化非人類抗體之方法。使用本發明之方法可鑑別出(對)所選人類或人類化受體序列之所定義位置之胺基酸殘基的特定(回復)突變(的必要條件)，該所選人類或人類化受體序列已經選擇作為非人類抗體之CDR或其個別殘基之受體。此初選係如業內已知來進行。欲回復突變之殘基之鑑別慮及個別殘基之拓樸學、三維結構及相互作用以及變化之效應。因此，可進行並量化特定胺基酸殘基變化對抗原結合性之影響之改良預測。

【0011】 已發現，所得人類化抗體與利用不使用此額外拓樸表徵之習用人類化方法獲得之人類化抗體相比更具人性化(人類特徵)。

【0012】 本發明之方法包含量化用於轉移非人類抗體及親代非人類抗體之互補決定區(CDR)之所選受體序列之間的每一胺基酸差別對拓樸學(即三維結構及位向)之效應作為必需步驟。

【0013】 在一個實施例中，(拓樸)量化係藉由個別地提供每一變化/

差別之評分或一起提供所有變化/差別之評分來進行。此評分係基於一方面係基於所改變胺基酸殘基之間之結構差別及另一方面係基於該變化之位置之拓樸學。在一個實施例中，評分係基於/使用三維同源性模型來指配。評分反映胺基酸差別對框架穩定性或CDR構形之影響且如下：0：無影響；1：輕度影響；2：中度影響；3：可影響框架穩定性；4：將破壞框架穩定性或CDR構形。

【0014】 藉由對存在於任一人類生殖系序列中之個別位置之每一胺基酸殘基差別指配，獲得填充可能變化之完全矩陣之個別評分。

【0015】 本發明至少部分基於以下發現：藉由抗體之三維結構、更精確而言親代非人類抗體結構與人類化候選者結構之間之結構差別的定量分析，可鑑別出適宜(及所需)胺基酸變化，產生針對框架/CDR構形之不同、較佳較低或甚至無影響/變形，且由此增加人類化抗體與其抗原之結合。因此，本發明提供改良之人類化方法。

【0016】 本發明之一個態樣係提供(或合成或鑑別或產生)編碼(人類化)免疫球蛋白可變結構域之核酸序列之方法，其包含以下步驟

a) 比對非人類重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列

與

該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體，該變體係藉由將個別非人類抗體重鏈或輕鏈可變結構域之CDR或超變區或特異性決定殘基移植於以下序列上來獲得：

i) 與非人類可變結構域具有最高序列同源性之人類生殖系胺基酸序列，

或

ii) 兩個或更多個人類生殖系胺基酸序列片段，其在比對時形成完整可變結構域且具有高於單一人類生殖系胺基酸序列之同源性，

或

iii) 容許維持VH/VL角之人類生殖系胺基酸序列，

或

iv) 人類化抗體可變結構域，

(具有最大程度之胺基酸序列一致性)，

b) 鑑別(所比對)框架位置，其中非人類重鏈或輕鏈可變結構域及該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體具有不同的胺基酸殘基，其因該差別而影響可變結構域(與個別其他可變結構域組合成為Fv)之抗原結合性及/或三維結構，

c) 修飾該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體，其係藉由用對可變結構域(與個別其他可變結構域組合成為Fv)之抗原結合性及/或三維結構之影響小於經替代胺基酸殘基之胺基酸殘基替代步驟b)中所鑑別出之一或多個胺基酸殘基來實施，

d) 合成編碼經修飾可變結構域之核酸序列且藉此提供(或合成或鑑別)編碼免疫球蛋白可變結構域之核酸序列。

【0017】 在一個實施例中，步驟b)進一步包含使用同源性建模生成非人類可變結構域或非人類抗體之三維模型。

【0018】 在一個實施例中，步驟b)進一步包含向個別位置指配拓樸分類器I、E、C、A、L、S或N中之一者。

【0019】 在一個實施例中，步驟b)進一步包含向每一差別指配評分0、1、2、3或4。

【0020】 在一個實施例中

- 將評分0指配給具有拓樸E之胺基酸殘基成為除脯胺酸外之任一胺基酸殘基之變化，
- 若脯胺酸替代改變此殘基周圍之 ϕ 及 ψ 角則成為脯胺酸之變化將指配為評分3或4，若成為脯胺酸之變化並未改變該殘基周圍胺基酸段之構形則指配其評分0或1，
- 將評分0指配給具有拓樸I之胺基酸殘基成為具有較小側鏈之胺基酸殘基之變化，用具有多一個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分1，用具有多兩個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分2，用具有多三個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分3，且所有其他變化則指配評分4，
- 將評分4指配給具有拓樸A之胺基酸殘基成為任一胺基酸殘基之變化，
- 將評分3或4指配給具有拓樸C之胺基酸殘基成為非疏水胺基酸殘基之變化，
- 若鹽橋暴露到溶劑，使具有拓樸S之胺基酸殘基成為帶負電或不帶電胺基酸殘基之變化時，則指配評分3，若鹽橋在內部，則指配評分4。

【實施方式】

【0021】 抗體之抗原結合位點係由重鏈可變結構域(VH)及輕鏈可變結構域(VL)形成。該等域經由五股 β -褶疊相互作用以形成約8.4 Å半徑之九股 β -桶，其中域界面處之股彼此傾斜約50°。藉此使HVR (即由HVR胺基酸殘基形成之胺基酸環)彼此緊密靠近。此可見於自結構之頂部觀察時。HVR亦佔據25%或更大之VH/VL界面。

【0022】 為測定CDR/HVR，業內已報導不同方法。最常用方法係根據Kabat之定義，其係基於抗體胺基酸序列可變性(例如，參見Sequences of Proteins of immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991))。Chothia已報導另一定義(例如，參見Chothia, C.等人，J. Mol. Biol. 227 (1992) 799-817；Tomlinson, I.M.等人，EMBO J. 14 (1995) 4628-4638)，其慮及抗原結合位點以定義超變環。經修訂Chothia編號方法係基於Chothia編號方案且亦包括具有位置經校正之FR插入/缺失之框架殘基(例如，參見Abhinandan, K.R.及Martin, A.C., Mol. Immunol. 45 (2008) 3832-3839)。另一方法係Oxford Molecular's AbM抗體建模軟體所用之AbM定義(例如，參見Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. Antibody Engineering Lab Manual (編輯：Duebel, S.及Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg))。另一方法稱為增強型Chothia編號(由Martin, A.C.R.提出；例如，參見<http://www.bioinfo.org.uk/index.html>，特定而言<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)。另一方法係基於用於確定「接觸」HVR之抗體-抗原複合物晶體結構之分析(MacCallum, R.M.等人，J. Mol. Biol. 262 (1996) 732-745)。North, B.等人提出新穎或延長的典型比對(J. Mol. Biol. 406 (2011) 228-256)。與Chothia分析不同，North, B.等人已發現該典型比對最直觀地將CDR分成CDR類型(L1、L2等)及環長度。當提及該等時，稱為「CDR-長度組合」或簡稱為「CDR-長度」。其以不同於最常用的Kabat及Chothia方案定義CDR。如本文所報告之方法可使用該等方法中之任一者來實踐。

【0023】 如本文所用術語「超變區」或「HVR」係指抗體可變結構

域之序列超變(「互補決定區」或「CDR」)及/或形成在結構上經定義之環(「超變環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原接觸」)之區中的每一者。通常，抗體包含6個HVR；3個位於VH中(H1、H2、H3)，且3個位於VL中(L1、L2、L3)。

【0024】 HVR包括

(a) 超變環，其出現於胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處(Chothia, C.及Lesk, A.M., *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917)；

(b) CDR，其出現於胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處(Kabat, E.A.等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service，國立衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda, MD (1991), NIH公開案91-3242。)；

(c) 抗原接觸，其出現於胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處(MacCallum等人，*J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))；及

(d) (a)、(b)及/或(c)之組合，包括胺基酸殘基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及94-102 (H3)。

【0025】 除非另有指示，否則可變結構域中之HVR殘基及其他殘基(例如FR殘基)在本文中係根據Kabat等人來編號(見上文)。

【0026】 因此，本文中使用Kabat CDR/HVR定義報告之態樣及實施例同樣可使用其他CDR/HVR定義方法中之一者來實施。下表提供使用

不同方法測定之HVR殘基之比較。

	Kabat	Chothia	AbM	接觸
HVR-L1	24-34	26-32	24-34	30-36
HVR-L2	50-56	50-52	50-56	46-55
HVR-L3	89-97	91-96	89-97	89-96
HVR-H1 (根據Kabat)	31-35B	26-32	26-35B	30-35B
HVR-H1 (根據Chothia)	31-35	26-32	26-35	30-35B
HVR-H2	50-65	53-55	50-58	47-58
HVR-H3	95-102	96-101	95-102	93-101

【0027】 除不同CDR定義外，亦可使用不同方法對可變結構域胺基酸殘基編號。Kabat及合著者(Wu, T.I.及Kabat, E.A., J. Exp. Med. 132 (1970) 211-250 ; Kabat, E.A. 等人，Sequence of Proteins of Immunological Interest. Bethesda:國立衛生研究院(1983))使用基於序列比對及同源性的編號。Chothia及Lesk (Chothia, C.及Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917 ; Chothia, C.等人，Nature, 342 (1989) 877-883)使用基於結構比對之編號。Lefranc及同事(Giudicelli, V.等人，Nucl. Acids Res. 25 (1997) 206-211 ; Lefranc, M.P. 等人，Dev. Comp. Immunol. 27 (2003) 55-77)研發出IMGT編號方案。AHO編號方案(Honegger, A.及Plueckthun, A., J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670)係基於空間比對之3D結構。

【0028】 WolfGuy編號將CDR區定義為Kabat及Chothia定義之聯集。此外，編號方案基於CDR長度(且部分地基於序列)對CDR環尖端進行註解，以使得CDR位置之索引指示CDR殘基是否係升環或降環之一部分。與已確立編號方案之比較顯示於下表中。

表： 使用 Chothia/Kabat (Ch-Kb)、Honegger 及 WolfGuy 編號方案對 CDR-L3 及 CDR-H3 編號。後者具有自 N 末端基底至 CDR 峰值之增加的數量及自 C 末端 CDR 端開始減少的數量。Kabat 方案固定最後兩個 CDR 殘基且引入字母以適應 CDR 長度。與 Kabat 命名相比，Honegger 編號不使用字母且常用於 VH 及 VL。

WolfGuy VL	Ch-Kb VL	Honegger	Ch-Kb VH	WolfGuy VH
730	84	102	88	326
731	85	103	89	327
732	86	104	90	328
733	87	105	91	329
734	88	C	92	330
751	89	107	93	331
752	90	108	94	332
753	91	109	95	351
754	92	110	96	352
755	93	111	97	353
756	94	112	98	354
757	95	113	99	355
758	95a	114	100	356
759	95b	115	100a	357
760	95c	116	100b	358
761	95d	117	100c	359
762	95e	118	100d	360
763	95f	119	100e	361
764		120	100f	362
765		121	100g	363
766		122	100h	364
784		123	100i	384

WolfGuy VL	Ch-Kb VL	Honegger	Ch-Kb VH	WolfGuy VH
785		124	100j	385
786		125	100k	386
787		126	100l	387
788		127		388
789		128		389
790		129		390
791		130		391
792		131		392
793		132		393
794		133		394
795		134		395
796		135		396
797		136		397
798	96	137	101	398
799	97	138	102	399
801	98	F W	103	401
802	99	140	104	402
803	100	141	105	403
804	101	142	106	404

表：使用 WolfGuy、Kabat 及 Chothia 編號之 VH (左) 及 VL (右) 序列。

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia
框架 1	101	1	1	框架 1	501	1	1
	102	2	2		502	2	2
	103	3	3		503	3	3
	104	4	4		504	4	4
	105	5	5		505	5	5

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia
	106	6	6		506	6	6
	107	7	7		507	7	7
	108	8	8		508	8	8
	109	9	9		509	9	9
	110	10	10		510	10	10
	111	11	11		511	11	11
	112	12	12		512	12	12
	113	13	13		513	13	13
	114	14	14		514	14	14
	115	15	15		515	15	15
	116	16	16		516	16	16
	117	17	17		517	17	17
	118	18	18		518	18	18
	119	19	19		519	19	19
	120	20	20		520	20	20
	121	21	21		521	21	21
	122	22	22		522	22	22
	123	23	23		523	23	23
	124	24	24		551	24	24
	125	25	25		552	25	25
CDR-H1	151	26	26	CDR-L1	553	26	26
	152	27	27		556	27	27
	153	28	28		561	27a	28
	154	29	29		562	27b	29
	155	30	30		563	27c	30
	156	31	31		581	27d	30a
	157	32	31a		582	27e	30b
	158	33	31b		583	28	30c
	193	34	31c		594	29	30d

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia
	194	35	31d		595	30	30e
	195	35a	31e		596	31	31
	196	35b	32		597	32	32
	197	35c	33		598	33	33
	198	35d	34		599	34	34
	199	35e	35		601	35	35
框架2	201	36	36	框架2	602	36	36
	202	37	37		603	37	37
	203	38	38		604	38	38
	204	39	39		605	39	39
	205	40	40		606	40	40
	206	41	41		607	41	41
	207	42	42		608	42	42
	208	43	43		609	43	43
	209	44	44		610	44	44
	210	45	45		611	45	45
	211	46	46		612	46	46
	212	47	47		613	47	47
	213	48	48		614	48	48
	214	49	49		615	49	49
CDR-H2	251	50	50	CDR-L2	651	50	50
	252	51	51		652	*	*
	253	52	52		653	*	*
	254	52a	52a		692	*	*
	255	52b	52b		693	*	*
	256	52c	52c		694	51	51
	286	52d	52d		695	52	52
	287	53	53		696	53	53
	288	54	54		697	54	54

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia
	289	55	55		698	55	55
	290	56	56		699	56	56
	291	57	57		701	57	57
	292	58	58		702	58	58
	293	59	59		703	59	59
	294	60	60		704	60	60
	295	61	61		705	61	61
	296	62	62		706	62	62
	297	63	63		707	63	63
	298	64	64		708	64	64
	299	65	65		709	65	65
框架3	301	66	66	框架3	710	66	66
	302	67	67		711	67	67
	303	68	68		712	68	68
	304	69	69		713	*	*
	305	70	70		714	*	*
	306	71	71		715	69	69
	307	72	72		716	70	70
	308	73	73		717	71	71
	309	74	74		718	72	72
	310	75	75		719	73	73
	311	76	76		720	74	74
	312	77	77		721	75	75
	313	78	78		722	76	76
	314	79	79		723	77	77
	315	80	80		724	78	78
	316	81	81		725	79	79
	317	82	82		726	80	80
	318	82a	82a		727	81	81

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia
CDR-H3	319	82b	82b	CDR-L3	728	82	82
	320	82c	82c		729	83	83
	321	83	83		730	84	84
	322	84	84		731	85	85
	323	85	85		732	86	86
	324	86	86		733	87	87
	325	87	87		734	88	88
	326	88	88		751	89	89
	327	89	89		752	90	90
	328	90	90		753	91	91
	329	91	91		754	92	92
	330	92	92		755	93	93
	331	93	93		756	94	94
	332	94	94		757	95	95
	351	95	95		758	95a	95a
	352	96	96		793	95b	95b
353	97	97	794	95c	95c		
354	98	98	795	95d	95d		
355	99	99	796	95e	95e		
356	100	100	797	95f	95f		
357	100a	100a	798	96	96		
358	100b	100b	799	97	97		
359	100c	100c	框架4	801	98	98	
360	100d	100d		802	99	99	
361	100e	100e		803	100	100	
362	100f	100f		804	101	101	
363	100g	100g		805	102	102	
364	100h	100h		806	103	103	
365	100i	100i		807	104	104	

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia
	385	100j	*		808	105	105
	386	100k	*		809	106	106
	387	100l	*		810	107/106A	107
	388	100m	*				
	389	100n	*				
	390	100o	*				
	391	100p	*				
	392	100q	*				
	393	100r	*				
	394	100s	*				
	395	100t	*				
	396	100u	*				
	397	100v	*				
	398	101	101				
	399	102	102				
框架4	401	103	103				
	402	104	104				
	403	105	105				
	404	106	106				
	405	107	107				
	406	108	108				
	407	109	109				
	408	110	110				
	409	111	111				
	410	112	112				
	411	113	113				

【0029】 WolfGuy經設計使得結構等效之殘基(即Fv結構中之保守空間定位極其相似之殘基)係使用等效索引編號(儘可能)。

【0030】

人類化方法

一般抗體人類化方法闡述於例如以下文獻中：WO 92/22653；Bajorath等人，J. Biol. Chem. 270 (1995) 22081-22084；Iba, Y.等人，Prot. Eng. 11 (1998) 361-370；WO 2002/84277；Luo等人，J. Immunol. Meth. 275 (2003) 31-40；WO 2004/006955；US 2004/0133357；Yazaki等人，Prot. Eng. Des. Sel. 17 (2004) 481-489；WO 2005/061540；WO 2006/096653；US 2006/0258852；WO 2007/109742；Leem, J.等人，mAbs 8 (2016) 1259-1268；US 5,861,155、US 6,479,284、US 2000/0660169、US 6,407,213、US 1993/0146206、US 6,639,055、US 2000/0705686、US 6,500,931、US 5,530,101、US 5,585,089、US 5,693,761、US 5,693,762、US 6,180,370、US 2003/0229208、US 2003/0389155、US 5,714,350、US 6,350,861、WO 2010/065921、US 5,777,085、US 5,834,597、US 5,882,644、US 5,932,448、US 6,013,256、US 6,129,914、US 6,210,671、US 6,329,511、US 2003/0166871、US 2002/0078757、US 5,225,539、US 6,548,640、US 5,624,821；Jones等人，Nature 321 (1986) 522；Verhoeyen等人，Science 239 (1988) 1534；Sims等人，J. Immunol. 151 (1993) 2296；Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987) 901；Carter等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285；Presta等人，J. Immunol. 151 (1993) 2623；Padlan, Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498；Studnicka等人，Prot. Eng. 7 (1994) 805-814；Roguska等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 969-973 (1994)；WO 90/14424、WO 90/14430、WO 90/14443、WO 91/09967、WO 92/001047、WO 92/011272、WO 93/006213、WO

94/018219、WO 99/06834、EP 0 229 246、EP 0 239 400、EP 0 519 596、EP 0 544 809、EP 0 578 515、EP 0 592 106、EP 0 519 596、EP 0 868 504、US 4,816,567、US 5,225,539、US 5,565,332、US 5,714,352、US 5,723,323、US 5,763,192、US 5,766,886、US 5,814,476、US 5,817,483、US 5,824,514、US 5,976,862 及 US 6,204,023。

【0031】 在本發明之前業內所用之一些人類化方法更詳細概述於下文中。

【0032】 業內用於降低意欲用於人類中之治療用途之非人類抗體之免疫原性的第一方法係生成「嵌合抗體」。嵌合抗體係藉由將非人類抗體之輕鏈及重鏈之完整可變結構域移植至人類恆定區上來獲得(重鏈可變結構域之CH1-鉸鏈-CH2-CH3及輕鏈可變結構域之CL)。該等嵌合抗體具有降低的免疫原性但仍誘導接受者之免疫反應(例如，參見WO 86/01533；US 4,816,567；Morrison, S.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984) 6851-6855；Morrison, S.L.及Schlom, J., Important Adv. Oncol. (1990) 3-18；Morrison, L., Science 229 (1985) 1202-1207；Oi, V.T.及Morrison, S.L., BioTechniques 4 (1986) 214-221；Gillies, S.D.等人，J. Immunol. Methods 125 (1989) 191-202；US 5,807,715；US 4,816,397)。

【0033】 US 2003/0054407揭示，儘管蛋白質可具有極大數量之可能構形(約 10^{16} 個對於100個殘基之小蛋白)，但所有抗體總體上採取特徵性「免疫球蛋白摺疊」。進一步揭示，可使用熱力學計算分析來評估具有靶結構模板之測試序列之結構相容性。結構評估係基於經驗及參數化函數且意欲減少所需後續活體外篩選之數量。該函數係由三個能量項組成：非

極性溶劑化能、側鏈熵及靜電能。

【0034】業內用於降低免疫原性之不同方法係「改型」。在此方法中，首先僅將非人類抗體(供體抗體；根據Kabat測定)之HVR且藉此將非人類抗體之「抗原結合性質」轉移至人類可變結構域(受體抗體)上。由此用非人類區域替代相應人類區域。術語「相應」表示在比對個別序列時經定位所橫跨之單一胺基酸殘基或胺基酸殘基段。與人類恆定區組合，獲得「人類化抗體」(例如，參見EP 0 239 400；US 5,225,539；US 5,530,101；US 5,585,089；WO 91/09967；Jones, P.T.等人，Nature 321 (1986) 522-525；Verhoeyen, M.等人，Science 239 (1988) 1534-1536；Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327)。移植之成功取決於非人類供體抗體及人類受體抗體之三維結構之相似性。假設藉由具有相似之三維結構，亦可保留HVR與特定框架殘基之間之接觸。EP 0 578 515揭示藉由利用比較模型構建之製程產生人類化單株抗體之方法。EP 0 592 106揭示產生包含齧齒類動物抗體可變區之人類化重鏈及輕鏈之抗體或其片段之方法，該方法包含根據一組抗體可變區重鏈及輕鏈之x射線結晶結構之相對可及性分佈僅在框架位置生成序列比對以獲得一組重鏈及輕鏈表面暴露之框架位置。

【0035】為移植人類生殖系，業內選擇具有最大「同源性」之成熟或共有抗體可變區作為受體。術語「同源性」、「同系物」或「同源」表示序列或結構或功能一致性(等效性)。同源性可使用熟習此項技術者已知之方法來測定，該等方法係例如FASTA、BLAST (Mount, D.M., (2004) in *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* 第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. ISBN 0-87969-608-

7)、EMBOSS、MPsrch或Scanps。

【0036】 「序列比對」可使用熟習此項技術者已知之任一方法或電腦程式來實施。比對可基於序列及/或結構同源性(例如,參見WO2012/006490)。

【0037】 可採用成對比對方法來鑑別兩個序列之最佳匹配之局部(片段序列)或全域(總序列)比對。成對比對可實施一或多次。成對比對可使用熟習此項技術者已知之不同方法(例如點矩陣方法、動態程式化、BLAST2SEQ及word方法)來進行。

【0038】 多序列比對係對兩個以上之序列同時實施之成對比對之延伸。在多比對中,彼此比對所有查詢序列且鑑別出保守序列殘基及/或區域。

【0039】 局部比對可使用例如Smith-Waterman算法(Smith, T.F.及Waterman, M.S., J. Mol. Biol. 147 (1981) 195-197)來進行。全域比對可使用例如Needleman-Wunsch算法(Needleman, S.B.及Wunsch, C.D., J. Mol. Biol. 48 (1970) 443-453)來進行。

【0040】 可如下計算兩個所討論序列之「同源性」或「序列一致性」:所討論序列經配置以產生最佳比對,即具有最少數量之失配及空位(空位可引入一或兩個序列中)。通常,出於比較目的比對之參照序列之部分係參照序列總長度之至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%。此後,比較相應位置之胺基酸殘基。若在第一序列及第二序列中之相應位置存在相同的胺基酸殘基,則該等序列在該位置係一致的(如本文所用胺基酸或核酸「一致性」等效於胺基酸或核酸「同源性」)。兩個序列之間之序列一致性(通常以百分比值給

出)取決於兩個序列所共用之一致位置之數量，其中慮及空位數及每一空位之長度，該空位已添加至序列以獲得兩個序列之最佳比對。

【0041】 儘管進行序列比對，亦可例如使用DALI方法(Holm, L.及 Sander, C., *Science* 273 (1996) 595-603)、SSAP方法(時序結構比對程式；Taylor, W.R.等人，*Prot. Sci.* 3 (1994) 1858-1870)或組合延伸方法進行結構比對。

【0042】 必須指出，空位可插入一個、多個或所有比對序列中之相同或不同位置以獲得具有增加的序列一致性段之比對。

【0043】 在「最佳擬合」方法中，比對所討論非人類可變結構域與人類可變結構域。選擇類似於最佳非人類序列之人類序列作為受體(Sims, M.J.等人，*J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308；Chothia等人，*J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917)。

【0044】 在「共有」方法中，特定框架序列係衍生自輕鏈或重鏈之特定亞組之所有人類抗體之共有序列。舉例而言，共有序列可衍生自最豐富的人類子類VL6亞組I (VL6I)及VH亞組III (VHIII) (Carter, P.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289；Presta, L.等人，*J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632)。

【0045】 在業內之另一方法中，人類框架序列係選自基於人類CDR與欲人類化之小鼠抗體之彼等之結構相似性的人類生殖系基因集。結構相似性係藉由對小鼠CDR與具有相同Chothia典型結構之人類候選者之殘基與殘基同源性評分來評估。無論怎樣不引入人類框架之突變(例如，參見Hwang, W.Y.K.等人，*Methods* 36 (2005) 35-42)。

【0046】 業內假設，人類化抗體與非人類抗體相比同源性越高，將

非人類CDR引入所選人類框架中亦引入CDR或框架之扭變從而使得人類化抗體之抗原結合性質降低或甚至完全喪失之風險越小。

【0047】 因此，業內首先選擇可變結構域作為具有高於臨限值之序列一致性之受體序列(不包括CDR)。此臨限值可低至65%但亦可高達80%或以上。但業內證實在大多數情形下藉由簡單移植CDR不可能將非人類抗體之結合特徵轉移至人類化抗體。通常，非人類抗體之CDR或框架中額外殘基之回復突變為至少部分地恢復結合特徵所必需。額外殘基為保持CDR三維構形所必需。由於額外轉移之殘基係所選受體抗體內之突變，故其稱為「回復突變」(例如，參見Kabat, E.A.及Wu, T.T., *J. Immunol.* 147 (1991) 1709-1719；Queen, C.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033；Co, M.S.及Queen, C., *Nature* 351 (1991) 501-502；Tempest, P.R.等人，*Biotech.* 9 (1991) 266-271; WO 92/04381)。

【0048】 術語「回復突變」或「回復至[非人類物種]突變」表示胺基酸殘基自人類殘基復原回至非人類物種殘基以改良人類化抗體之性質。此亦可為體細胞突變之胺基酸，其經相應生殖系殘基替代。為鑑別出回復突變之候選殘基，比對一級人類化抗體之胺基酸序列與例如自VBASE數據庫(VBASE係所有人類生殖系可變區之綜合目錄)獲得之個別生殖系序列。必須檢查鑑別為回復突變之候選殘基之每一胺基酸殘基係直接或係間接參與抗原結合。經鑑別(例如在突變後)能夠改變人類化抗體之特徵之胺基酸殘基應復原回至非人類殘基。

【0049】 然而，與非人類抗體相比，藉由業內使用移植之方法人類化之抗體之結合親和力通常顯著降低。然而，確定應引入哪些非人類殘基以獲得具有類似於非人類抗體之結合效率之人類化抗體難以預測，極大程

度上憑經驗且可能無法教示。

【0050】業內已概述，在非人類抗體中不常見且靠近抗原結合殘基或為堆積殘基之框架殘基或所謂的Vernier區中之殘基以及靠近抗原之彼等係重要殘基(例如，參見Martin及Thornton, *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 800-815；Foote等人，*J. Mol. Biol.* 224 (1992) 487-499)。

【0051】WO 90/07861揭示設計人類化抗體之四條規則：1)人類受體與非人類供體序列之間之同源性；2)使用供體而非受體胺基酸，其中該受體胺基酸在該位置不常見；3)使用鄰近CDR之位置之供體框架胺基酸；4)使用其中側鏈原子在3-D模型中之CDR之3埃內之框架位置的供體胺基酸。

【0052】業內之另一人類化方法係「SDR移植」。此方法係基於以下發現：胺基酸殘基數低於形成CDR之彼等實際上製造與抗原之接觸且因此確定抗體之結合特異性。該等殘基稱為「特異性決定殘基(SDR)」。其佔總CDR殘基之約三分之一。僅彼等殘基在移植過程中發生轉移(例如，參見Padlan等人，*FASEB J.* 9 (1995) 133-139；Kashmiri等人，*Methods* 36 (2005) 25-34)。

【0053】業內用於使非人類抗體人類化之另一方法係「鑲飾」(亦稱為「表面重修」)(例如，參見EP 0 592 106；EP 0 519 596；Studnicka等人，*Prot. Eng.* 7 (1994) 805-814；Roguska等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 969-973；WO 2004/016740)。藉由分析人類及鼠類抗體，可確定特異性表面/溶劑暴露之胺基酸殘基。表面殘基通常具有30%或更大之相對溶劑可及性(例如，參見Pedersen, J.等人，*Mol. Biol.* 235 (1994) 959-973)。揭示特定表面位置對特定有限數量之殘基具有偏好

性(例如, 參見 Padlan 等人, *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 ; Pedersen 等人, *J. Mol. Biol.* 235 (1994) 959-973 ; Roguska 等人, *Prot. Eng.* 9 (1996) 895-904)。藉由替代非人類抗體中不同於人類殘基之暴露殘基, 可降低免疫原性, 此乃因免疫原性似乎與表面特徵相關聯。使用此方法, 意欲藉由向鼠類抗體提供人類化表面來將其遮蔽(例如, 參見 Mark 等人, *Handbook of Experimental Pharmacology* 第113卷, Springer, 105-134 (1994))。

【0054】 業內之另一方法稱為「超人類化」。此方法包括以下動作：獲得由非人類成熟抗體基因編碼之個體可變區之肽序列及鑑別出用於非人類抗體可變區內之至少兩個CDR之第一組典型CDR結構類型。然後獲得人類抗體之人類抗體可變區之肽序列之文庫。在下一步驟中鑑別出人類可變區序列文庫內之每一序列之至少兩個CDR之典型CDR結構類型(即, 第二組典型CDR結構類型)。藉由比較第一組典型CDR結構類型與第二組典型CDR結構類型(即, 比較可變區內之相應位置之小鼠典型CDR結構類型與人類典型CDR結構類型)及選擇其中第二組典型CDR結構與第一組典型CDR結構類型之CDR序列分別在非人類及人類可變區內之相應位置相同的彼等人類序列自此文庫選擇候選序列之亞組。該方法使用該等候選人類可變區序列作為構築嵌合分子之基礎, 該嵌合分子包括至少兩個來自非人類可變區(例如小鼠CDR之非人類可變區)之CDR序列與來自候選人類可變區序列之框架區的組合。此使得嵌合抗體含有在可變區中之相應位置取代每一人類CDR序列之每一非人類CDR序列, 以使得嵌合抗體中之框架序列與候選人類框架序列相差不超過10個胺基酸殘基(參見WO 2004/006955 ; Tan, P. 等人, *J. Immunol.* 169 (2002) 1119-1125)。

【0055】業內用於抗體人類化之另一方法係基於抗體人類性之度量，稱為人類串含量(HSC)。此方法比較小鼠序列與人類生殖系基因之譜且將差別評定為HSC。然後藉由最大化靶序列之HSC而非使用全域一致性量測來人類化靶序列以生成多種不同的人類化變體(Lazar等人，Mol. Immunol. 44 (2007) 1986-1998)。

【0056】業內之另一方法係「框架改組」。在此方法中，將來自所有已知框架之個別框架與個別非人類CDR組合且表現並篩選四個框架與三個CDR之任一組合(Dall'Acqua, W.F.等人，Methods 36 (2005) 43-60；Damschroder, M.M.等人，Mol. Immunol. 44 (2007) 3049-3060)。

【0057】業內之另一方法係「人工程化」。在本文中，使用可變結構域之個別非人類區域與人類對應體之連續交換及篩選個別部分人類化抗體文庫之成員之結合以實驗方式測定最小特異性決定子(MSD)。此可藉由在轉移D區段或CDR3或CDR3-FR4或包含最小必需結合特異性決定子之任何其他CDR3-FR4片段背景下轉移最小必需結合特異性來實現。假設使用此方法保留結合表位且可分離與人類生殖系基因抗體91-96%同源之抗體(例如，參見WO 2005/069970)。

【0058】因此，根據上文可見，如業內所用術語「人類化抗體」表示包含最小數量之非人類抗體胺基酸殘基、但具有與非人類抗體相當之抗原特異性及親和力之抗體，且同時人類化抗體在施加至人類時不具或僅具有極低免疫原性。

【0059】業內之另一方法係基於非人類抗體及不同人類化抗體變體之三維模型之分析及比較，以鑑別出殘基關於抗原結合之可能作用。藉此，可鑑別出與非人類抗體之結合特徵相關之供體殘基。

【0060】 在約1990年，業內使用第一種建模方法來解決人類化抗體之降低的親和力問題。此係藉由三級結構建模基於非人類抗體之推定的CDR接觸殘基之胺基酸序列同源性及比對選擇人類框架區之兩步方法(例如，參見Queen, C.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033；Co, M.S.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 2869-2873；WO 90/07861；US 5,693,762；US 5,693,761；US 5,585,089；US 5,530,101)。

【0061】 可變結構域之三維結構且由此CDR之三維構形係藉由胺基酸-胺基酸相互作用(例如離子相互作用、氫鍵或疏水相互作用)構成。

【0062】 不同胺基酸殘基因其結構而具有不同性質，且因此自一個胺基酸殘基變成不同胺基酸殘基可影響可變結構域之三維結構/穩定性且藉此影響人類化抗體之特徵。

【0063】 舉例而言，用胺基酸殘基丙胺酸替代胺基酸殘基甘胺酸引入新的CH₃基團且藉此因增加的空間需求而減少此胺基酸殘基之可能位向，由此減小構形撓性且增加解摺疊之熵，從而改良可變結構域之構形穩定性(Manning, M.C.等人，Pharm. Res. 6 (1989) 903-917)。

【0064】 蛋白質摺疊係藉由形成疏水相互作用來起始。

【0065】 個別胺基酸殘基、胺基酸序列段或多肽區域可表徵為親水或疏水。Black及Mould (Anal. Biochem. 193 (1991) 72-82)定義個別胺基酸殘基之以下疏水性序列(最疏水至最親水)：

Phe > Leu = Ile > Tyr ≈ Trp > Val > Met > Pro > Cys > Ala > Gly > Thr > Ser > Lys > Gln > Asn > His > Glu > Asp > Arg。

【0066】 如Black及Mould報導之疏水性之換算值列舉於下表中。

胺基酸	疏水性值	胺基酸	疏水性值	胺基酸	疏水性值
-----	------	-----	------	-----	------

胺基酸	疏水性值	胺基酸	疏水性值	胺基酸	疏水性值
A, Ala	0.616	I, Ile	0.943	S, Ser	0.359
C, Cys	0.68	K, Lys	0.283	T, Thr	0.45
D, asp	0.028	M, met	0.738	V, Val	0.825
E, Glu	0.043	N, Asn	0.236	W, Trp	0.878
F, Phe	1	P, pro	0.711	Y, Tyr	0.88
G, Gly	0.501	Q, Gln	0.251	Asx	0.132
H, his	0.165	R, Arg	0	Glx	0.147

【0067】 胺基酸殘基之三維位向可假設為基於小分子結構之鍵長及鍵角之「標準幾何學」(例如，參見Weiner, S.J.等人，J. Amer. Chem. Soc., 106 (1984) 765-784)。

【0068】 在「同源性建模」方法中，抗體之計算型三維近似值或模型係基於參照抗體之已知三維結構生成。由於參照抗體及所討論抗體具有相關三維結構，故可生成參照抗體與所討論抗體之間之比對。比對該兩種抗體之胺基酸序列且將一致序列段之三維坐標自參照抗體直接轉移至所討論抗體。在兩種抗體之不一致部分(即源自不同胺基酸殘基、插入或缺失)之情形下，三維坐標係基於具有能量細化之一般結構模板來測定。同源性建模可用於鑑別非人類抗體之可能參與支持由CDR形成之結合位點之結構的殘基(例如，參見Kolinski等人，Proteins. 37 (1999) 592-610；Rost等人，Protein Sci. 5 (1996) 1704-1718；US 7,212,924；US 6,256,647；US 6,125,331；Xiang等人，Curr. Prot. Pept. Sci. 7 (2006) 217-227)。

【0069】 可藉由將一個三維結構疊加於另一個上來比對不同的三維結構。因此，舉例而言，三維固定一個且空間旋轉並轉換另一個，以使 α -螺旋及 β -褶疊之二級結構元件位向以使其儘可能地彼此適合(空間位置及位向相似/接近)。

【0070】 在比對後，計算每一胺基酸殘基之相同的一級碳原子($C\alpha$)之間之距離。基於該等距離可評估具有相同位置之胺基酸殘基及具有不同位置之胺基酸殘基。通常，若胺基酸殘基之 $C\alpha - C\alpha$ 距離為 1.0 \AA 或更低，則該位置可視為三維相似或甚至一致，且若胺基酸殘基之 $C\alpha - C\alpha$ 距離大於 1.0 \AA ，則該位置可視為三維不同。

【0071】 為進一步改良比對，可使模型之能量最小化，其中固定 $C\alpha$ 坐標(否則比對將再次變壞)。由此，在形成比對期間已引入之「不常見」鍵長及鍵角可返回至標準(化學上可接受之)幾何學。

【0072】 鑑別出之框架胺基酸殘基影響人類化抗體之結合特徵之可能性取決於空間距離。依據結構模型，經鑑別可能干擾抗原結合之殘基係依據與CDR中之殘基之空間距離分級。通常，在任一CDR原子之 4.5 \AA 內之殘基視為可能相互作用之殘基。

【0073】 現今，三維免疫球蛋白模型為常用且為熟習此項技術者所熟悉。已知有不同類別之免疫球蛋白之三維組態(例如，參見Abbas等人，*Cellular and Mol. Immunology*，第4版，W.B. Saunders, Co., (2000))。藉助於特定電腦程式，可展現抗體可變結構域之經計算三維構形結構(例如，參見US 5,821,337)。可使用晶體結構數據庫(例如蛋白質數據庫pdb)作為結構之來源(例如，參見Bernstein, F.C.等人，*J. Mol. Biol.*, 112 (1977) 535-542)。

【0074】 WO 2006/096653揭示使免疫球蛋白(Ig)可變區人類化之方法，該免疫球蛋白(Ig)可變區包含a)來自受體免疫球蛋白可變區之可變區框架(FR)胺基酸殘基及b)來自非人類供體免疫球蛋白可變區之互補決定區(CDR)，該方法包括，i)提供容許預測至少一個CDR之3-D構形之數據；

ii)鑑別出經預測影響至少一個CDR之3-D構形之FR胺基酸殘基；iii)鑑別出至少一個可用所選出胺基酸殘基取代之候選供體CDR胺基酸殘基，其中所選出胺基酸殘基在構形上適應供體免疫球蛋白可變區與受體免疫球蛋白可變區之間之FR胺基酸殘基差別而不影響CDR構形；及iv)用所選出胺基酸殘基取代至少一個候選供體CDR胺基酸殘基以形成人類化免疫球蛋白可變區。其中亦揭示設計人類化免疫球蛋白可變區之方法，該人類化免疫球蛋白可變區包含a)來自受體免疫球蛋白可變區之可變框架區(FR)及b)來自非人類供體免疫球蛋白可變區之互補決定區(CDR)，該方法包含，(a)鑑別出在受體免疫球蛋白可變區與供體免疫球蛋白可變區之間不同之框架區(FR)胺基酸；(b)鑑別出鄰近在步驟(a)中鑑別出之FR胺基酸之胺基酸；(c)自在步驟(b)中鑑別出之胺基酸鑑別出至少一個候選胺基酸以用在構形上適應在步驟(a)中鑑別出之FR胺基酸之所選出胺基酸殘基取代。

【0075】 US 2006/0258852揭示藉由使用以結構為主之計算設計方法再設計可變區序列(例如CDR序列及視情況FR序列)之實例性方法。撓性區中殘基之一致性固定於受體殘基，但在計算期間容許其3維位置發生變化。容許突變區中之殘基之胺基酸一致性及構形二者發生變化。突變區外之CDR中之所有殘基係供體，且突變區外之FR中之所有殘基係受體。在此方法中，具有在框架中在幾何上靠近(例如在該等區域之約4-25 Å、尤其< 5 Å距離內)一或多個重要殘基差別(如步驟2中所鑑別)之側鏈的候選殘基(例如CDR殘基及視情況FR殘基)同時以計算方式突變成20種天然胺基酸中之任一者之所有可能的3維構形(旋轉異構物)且以計算方式評估所得突變體。一種該方法稱為側鏈改裝方法。在側鏈改裝計算中，候選胺基酸殘基可以計算方式修飾，且以計算方式評估所得多肽突變體之穩定

性。側鏈改裝計算生成具有改變的穩定性(即，改變的分子內能量)之變體之分級列表。然後可選擇產生低自由能且藉由目視檢查3維模型確認在構形上適應之突變體用於實驗表現。可根據突變體之經計算穩定性分選以計算方式生成之突變體之列表以生成將以實驗方式表現之變體之列表。在計算中，容許蛋白質主鏈具有極小或不具撓性，此確保經設計突變體經預測在給定CDR構形下穩定。因此，計算分析容許預測結構上相容之序列，尤其在可變區內具有給定FR結構域之CDR序列。

【0076】 WO 2007/109742揭示設計人類化免疫球蛋白之方法，其包含以下步驟：a)確定親代抗體可變結構域或結合至半抗原之親代抗體可變結構域之三維結構；b)鑑別出該親代結構之特異性決定殘基(SDR)；c)將該結構分成多個部分，該等部分包含六個互補決定區(CDR)環及包含重鏈及輕鏈二者之框架區(FR)；d)將該等部分之三維結構疊加至人類受體抗體之相應三維CDR環及框架結構之所定義數據庫上；e)將親代SDR移植至所選受體結構中以確定該等人類化免疫球蛋白之胺基酸序列之模型；f)計算胺基酸殘基取代之能量值；g)藉由選擇具有負能量值之殘基最佳化該等人類化免疫球蛋白之胺基酸序列；及h)命名人類化免疫球蛋白可變區區段之胺基酸序列。

【0077】 通常，在業內，特定相似性(例如> 70%序列同源性)之可變結構域係選自數據庫且用於生成同源性模型。

【0078】 Worn, A.及Plueckthun, A. (J. Mol. Biol. 305 (2001) 989-1010)報導，抗體之穩定性受多個因素之影響，該等因素包括(1)影響其固有穩定性之個別結構域之核心堆積，(2)對HC及LC配對具有影響之蛋白質/蛋白質界面相互作用，(3)極性及帶電殘基之埋藏，(4)極性及帶電殘基之

H鍵結網絡；及(5)表面電荷及極性殘基分佈，尤其分子內及分子間力(例如，參見US 2012/0064095)。

【0079】 人類化科學家之目的係提供具有例如降低的免疫原性、最佳化抗原結合性、親和力、親合力及/或半衰期之人類化抗體。

【0080】 藉由適宜篩選方法產生及評估不同的人類化變體。抗體篩選存在不同的已知方法，例如活體外分析、活體內及以細胞為主之分析及選擇方法。通常，該分析係結合分析，其中抗體結合至其靶且測定結合或測定因結合起始之效應。

【0081】 結合分析中結合之測定可使用不同方法來實施，該等方法係例如FRET (螢光共振能量轉移)、以BRET (生物發光共振能量轉移)為主之分析、Alpha Screen® (放大的發光鄰近均相分析)、鄰近閃爍分析、ELISA (酶聯免疫吸附分析)、SPR (表面電漿共振)、等溫滴定量熱法、差示掃描量熱法、凝膠電泳及包括凝膠過濾之層析。

【0082】 基於抗體之結合親和力篩選抗體之一種較佳方法係表面電漿共振(SPR)。此方法尤其容許測定結合事件之締合速率(k_a 、 $k_{\text{締合}}$)及解離速率(k_d 、 $k_{\text{解離}}$) (例如，參見 Jonsson 及 Malmquist, *Advances in Biosensors*, 2 (1992) 291-336；Wu等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998) 6037-6042)。

【0083】 業內已知篩選及選擇抗體之不同方法，例如噬菌體展示 (Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual；Kay等人，Academic Press, San Diego, Calif., (1996)；Lowman等人，*Biochemistry* 30 (1991) 10832-10838；Smith, *Science* 228 (1985) 1315-1317)、選擇性噬菌體感染(Malmborg等人，*J. Mol. Biol.* 273 (1997))

544-551)、選擇性感染性噬菌體(Krebber等人, *J. Mol. Biol.* 268 (1997) 619-630)、延遲感染性淘選(Benhar等人, *J. Mol. Biol.* 301 (2000) 893-904)、細胞表面展示(Wittrup, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12 (2001) 395-399)、細菌展示(Georgiou等人, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 29-34 ; Georgiou等人, *Trends Biotechnol.* 11 (1993) 6-10 ; Lee等人, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 645-648 ; June等人, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 576-580)、酵母展示(Bader及Wittrup, *Methods Enzymol.* 328(2000) 430-444 ; Boder及Wittrup, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 553-557)及哺乳動物細胞(Whitehorn等人, *Biotechnol.* 13 (1995) 1215-1219)、活體外展示(Amstutz等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 400-405)、多染色體展示(Mattheakis等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9022-9026)、核糖體展示(Hanes等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4937-4942)、mRNA展示(Roberts及Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12297-12302 ; Nemoto等人, *FEBS Lett.* 414 (1997) 405-408)及核糖體不活化展示系統(Zhou等人, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 538-543)、周質表現及細胞計數篩選(Chen等人, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 537-542)、蛋白質片段互補分析(Johnsson及Varshavsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10340-10344 ; Pelletier等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 12141-12146)、酵母雙雜交篩選(Fields及Song, *Nature* 340 (1989) 245-246 ; Visintin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 11723-11728)。

【0084】 抗體之溶解度及總體結構完整性例如可藉由例如以下方法定量或定性地測定：凝膠電泳、等電聚焦、毛細管電泳、層析(例如粒徑

篩析層析、離子交換層析及反相高效液相層析)、肽映射、寡醣映射、質譜、紫外吸光度光譜、螢光光譜、圓二色譜學、等溫滴定量熱法、差示掃描量熱法、分析型超離心、動態光散射、蛋白分解及交聯、濁度量測、過濾器阻滯分析、免疫分析、螢光染料結合分析、蛋白質染色分析、顯微術及經由ELISA或其他結合分析檢測聚集體、X射線結晶學及NMR光譜。

【0085】 通常如下實施人類化：

1. 選擇人類或人類化或共有抗體框架

- 比對非人類可變結構域序列與人類/人類化/共有可變結構域序列

(例如自VBASE或NCBI獲得)之文庫

- 基於胺基酸序列同源性選擇受體框架

2. 細化

- 基於可用晶體結構資訊或同源建模鑑別出非人類抗體、尤其框架中之支持結合位點、VH-VL配對等之結構的關鍵殘基

- 所鑑別關鍵殘基之回復突變。

【0086】 因此，如自上文可見，在人類化非人類抗體期間至關重要的是鑑別出影響抗原結合性之殘基及其修飾方法以重新獲得人類化抗體丟失之性質。

【0087】 儘管已研發出許多不同方法來人類化非人類抗體，但業內尚未確立普遍適用之設計人類化抗體之方法。因此，需要多次嘗試來獲得具有期望性質之人類化抗體，例如必須生成及評估若干變體人類化抗體以鑑別出最佳人類化變體。

【0088】

本發明之實施例

本文報告使用以結構為主之方式使非人類抗體人類化之方法。使用本文所報告之方法可確定(對)所選受體序列(例如人類生殖系序列)之所定義位置之胺基酸殘基之特定(回復或正向)突變的(必要條件及)適合性。考慮到個別殘基之拓樸學、三維結構及相互作用以及其替代性質。藉此反映特定胺基酸殘基變化對抗原結合性之影響。此減少或甚至防止特定胺基酸殘基變化對抗原結合性之干擾。由此提供改良之人類化方法。

【0089】 該方法包含以下中心或核心步驟：

將欲經所有潛在受體序列人類化之胺基酸序列比對及分級；分級可基於相似性或最後基於評分/評分受體/最終序列之評分進行，即可對一群人類化建議候選者分級；

視情況指配典型環結構以進一步鑑別出最重要的結構影響殘基；

視情況在PDB中搜索以獲得起始構建模型之起點；

構建模型；此為歸屬於最終評分所必需；此包括高度複雜之搜索以鑑別出具有相同拓樸學之子結構，產生具有高準確度之模型；因此，實施三維搜索以構建三維環境依賴性模型；

檢查比對用於插入、缺失及是否存在一或多個具有較低同源性之特定區段；

若HVR在自所發現結構中之HVR構建之模型中係不同的，則在結構數據庫中單獨搜索每一HVR環或甚至僅搜索升環及降環部分；

VH/VL位向調整；已展示VH/VL位向對於配置CDRH與CDRL之間具有適當距離之CDR殘基至關重要；相對位向主要係由VH與VL之間之界面處之殘基觸發；該等殘基可為框架殘基以及CDR殘基；

模型之能量最小化：強烈建議使系統弛豫但並非必需的

基於拓樸學指配評分

分選所提出序列

選擇所選生殖系；若總體評分相似，則應選擇常用生殖系

基於拓樸學評分決定V及J組合

決定所需回復突變消除評分4或4/3；此可產生一些3中之若干變體而非沒有或其全部；考慮評分為1或2之變化及考慮評分亦較低之正向突變。

【0090】 已發現，使用如本文所報告之方法獲得之人類化抗體與使用習用方法獲得之人類化抗體相比更具人性(人類特徵)，該等習用方法不使用本發明方法之拓樸效應考慮因素。不受限於此理論，假設此歸因於較長非中斷段係取自人類生殖系序列之事實。如在本發明之方法中藉由使用較小子結構，可構建改良之模型。

【0091】 本發明方法包含以下步驟：量化已經選擇用於轉移非人類抗體之超變區之受體序列(例如人類生殖系序列)與基於個別殘基之三維結構、拓樸學及與其環境的相互作用之非人類抗體自身之間的每一/任一胺基酸差別(藉由獲得其評分)。

【0092】 為量化拓樸差別及其效應，慮及胺基酸殘基之間之結構差別及基於三維結構(例如使用三維同源性模型測定)之個別位置之拓樸學。結構差別反映於評分中。評分之量值受胺基酸差別對框架穩定性或HVR構形之影響所影響：其中0表示無影響，1表示輕度影響，2表示中度影響，3表示可能影響框架穩定性且4表示將嚴重破壞/影響框架穩定性或HVR構形。

【0093】 若假設20種天然胺基酸殘基之每一胺基酸存在於個別位置，則可測定20種天然胺基酸殘基之每一胺基酸之結構差別。其亦可連接

至存在於人類生殖系序列中之該位置之(更有限數量之不同)胺基酸殘基。藉此獲得反映所得(總體)結構差別之(評分)矩陣。

【0094】 本發明至少部分基於以下發現：基於所鑑別結構差別可鑑別出適宜胺基酸變化(若合意)。此差別/變化產生不同、較佳較低的結構扭變(例如降低的對框架/CDR構形之影響/變形)且藉此增加人類化抗體與其靶之結合。藉此在使用本發明方法時可提供具有改良性質之人類化抗體。

【0095】 如本文所報告之一個態樣係產生抗體之方法，其包含以下步驟：

a) 對非人類抗體之可變結構域(之胺基酸序列或編碼該等可變結構域之核酸序列)測序且藉此獲得非人類抗體之可變結構域之胺基酸序列，

b) 視情況生成該非人類抗體之三維同源性模型，

c) 鑑別及選擇以下各項作為每一可變結構域之可變結構域受體序列(i)及ii)彼此獨立且iii)及iv)彼此依賴)

i) 與個別非人類抗體可變結構域具有最高序列同源性之人類生殖系序列，或

ii) 兩個或更多個一起形成完整的可變結構域之人類生殖系序列片段，其在比對時具有高於單一人類生殖系序列之與個別非人類抗體可變結構域之序列同源性，或

iii) 容許維持非人類抗體之重鏈可變結構域對輕鏈可變結構域角(VH/VL角)之人類生殖系胺基酸序列，

iv) 人類或人類化抗體之VH/VL對，

d) 將非人類抗體之CDR殘基移植於步驟c)中所選之受體序列上，

e) 量化非人類抗體與步驟c)中所選之序列或步驟d)中所獲得之序列之間的結構差別(藉由對胺基酸殘基差別評分)，

f) 基於先前步驟之量化在所選序列或所移植序列中引入胺基酸(回復及正向)突變(基於先前步驟之量化/評分突變步驟c)或步驟d)之胺基酸序列)，

g) 合成或生成編碼f)中所獲得之胺基酸序列之核酸序列，

h) 培養包含g)之核酸之細胞且藉此產生抗體。

【0096】 在一個實施例中，僅對非人類抗體輕鏈可變結構域或非人類抗體重鏈可變結構域實施此方法。

【0097】 如本文所報告之一個態樣係合成或產生或提供編碼免疫球蛋白可變結構域之核酸序列之方法，其包含以下步驟

a)比對非人類抗體重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列

與

該非人類抗體重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體，該變體係藉由將非人類抗體重鏈或輕鏈可變結構域之CDR或超變區或特異性決定殘基移植於以下序列上來獲得：

i) 與個別非人類抗體重鏈或輕鏈可變結構域具有最高序列同源性之人類生殖系胺基酸序列，

或

ii) 兩個或更多個形成完整可變結構域之人類生殖系胺基酸序列片段，其在比對時具有高於單一人類生殖系胺基酸序列之與個別非人類抗體可變結構域之同源性，

或

iii) 容許維持非人類抗體可變結構域之VH/VL角之人類生殖系胺基酸序列，

或

iv) 人類或人類化抗體之重鏈或輕鏈，
(以達成最大程度之胺基酸序列一致性)，

b) 量化經比對框架位置(或其中)之三維差別，其中非人類重鏈或輕鏈可變結構域及該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體具有不同的胺基酸殘基(其因該差別而影響抗原結合性及/或三維結構)，

c) 修飾(即突變)該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體胺基酸序列，其係藉由用對抗原結合性及/或三維結構之影響程度小於經替代胺基酸殘基(即具有較低評分)之胺基酸殘基替代步驟b)中所確定之一或多個胺基酸殘基來實施，以獲得具有減少的三維差別之該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之新的人類化變體，

d) 視情況使用步驟c)中所獲得之新人類化變體作為第一人類化變體重複步驟b)及c)，直至三維差別不再變化/可能不再減少/小於10%，如藉由RMSD分析所測定，

e) 合成或產生或提供編碼步驟c)或d)中所獲得之經修飾可變結構域之核酸序列，

【0098】 如本文所報告之一個態樣係產生免疫球蛋白之方法，其包含以下步驟

a) 對於重鏈可變結構域及輕鏈可變結構域個別地

- 比對非人類重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列

與

該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體，該變體係藉由將非人類抗體重鏈或輕鏈可變結構域之CDR或超變區或特異性決定殘基移植於以下序列上來獲得：

i) 與非人類可變結構域具有最高序列同源性之人類生殖系胺基酸序列，

或

ii) 兩個或更多個人類生殖系胺基酸序列片段，其在比對時具有高於單一人類生殖系胺基酸序列之同源性，

或

iii) 容許維持VH/VL角之人類生殖系胺基酸序列，

或

iv) 人類或人類化抗體重鏈或輕鏈可變結構域，

(以達成最大程度之胺基酸序列一致性)，

- 量化經比對框架位置/其中之三維差別，其中非人類重鏈或輕鏈可變結構域及該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體具有不同的胺基酸殘基(其因該差別而影響抗原結合性及/或三維結構)，

- 修飾/突變該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體胺基酸序列，其係藉由替代先前步驟中所確定之一或多個胺基酸殘基(用對抗原結合性及/或三維結構之影響小於經替代胺基酸殘基之胺基酸殘基(即具有較低評分))來實施，以生成具有減少的三維差別之經修飾可變結構域，

- 視情況使用經修飾可變結構域作為第一人類化變體重複兩個先前步驟直至三維差別不再變化/可能不再減少/小於10%，如藉由RMSD分析所測定，

- 合成/產生/提供編碼先前步驟中所獲得之經修飾可變結構域之核酸序列。

b) 培養哺乳動物細胞，其包含編碼包含步驟a)之經修飾重鏈可變結構域的免疫球蛋白重鏈之核酸及編碼包含步驟a)之經修飾輕鏈可變結構域的免疫球蛋白輕鏈之核酸，用於表現免疫球蛋白，

c) 自哺乳動物細胞或培養基回收免疫球蛋白且藉此產生免疫球蛋白。

【0099】 非人類抗體與其人類化變體之間之胺基酸差別對抗原結合性及/或三維結構之影響可使用如本文所報告之評分方法來量化。

【0100】 為量化三維差別，即為進行評分，基於胺基酸殘基在例如自同源性模型獲得之三維結構中之位置表徵所有胺基酸殘基。

【0101】 首先，將胺基酸殘基基於其拓樸學如下分類：

I：內部側鏈，

E：外部側鏈，

C：接觸H-L鏈，

A：抗原接觸，

L：抗原之連接體，

S：參與鹽橋，

N：無特定相互作用。

【0102】 因此，在本發明任一方法之一個實施例中，藉由使用VH及/或VL之三維結構來量化不同胺基酸殘基在經比對框架位置中之效應。在一個實施例中，三維結構係藉由X射線結晶學或藉由同源建模來獲得。在一個實施例中，非人類可變結構域或非人類抗體之三維模型係藉由同源

建模生成。在一個實施例中，同源性建模係使用基於整個序列之子結構生成之模型來進行。在一個實施例中，子結構包含至多可變結構域之完整區域。在一個實施例中，子結構包含至多20個胺基酸殘基。在一個實施例中，子結構包含至多15個胺基酸殘基。在一個實施例中，子結構包含至多10個胺基酸殘基。在一個實施例中，子結構包含10個或更少之胺基酸殘基。在一個實施例中，本發明之任一方法進一步包含在量化之前向個別位置指配拓樸分類器I (內部側鏈)、E (外部側鏈)、C (接觸重鏈-輕鏈)、A (抗原接觸)、L (抗原之連接體)、S (參與鹽橋)或N (均無=無具體相互作用)中之一者之步驟。在一個實施例中，如本文所報告之方法中所用之同源性模型係針對每一框架區、HVR以及框架及HVR之組合單獨構建。

【0103】 業內已知不同的拓樸分類器，例如包含Strall (所有結構)位置(=在距VH-VL界面5埃內或靠近CDR殘基之所有殘基)、埋藏(=在模型中對在GXG中溶劑暴露低於20%)及Strltd (=製造與CDR或界面處之疏水、靜電或離子型相互作用之特定殘基)之群。該等拓樸分類器僅定義CDR殘基及在界面處或與CDR殘基接觸之額外特定殘基。

【0104】 與此相反，所報告分類自動影響所得評分。此提供額外資訊，即當評分較高時顯示需要引入回復突變來保護抗體完整性。本發明之拓樸學標識符具有以下等級：A為第一，其後為L，其後為S或C (取決於拓樸影響；例如接觸位置C的影響可大於遠離A殘基之鹽橋)，其後為I，其後為E。

【0105】 更詳細而言，

- 若CDR中之殘基具有拓樸A，則向變化指配評分4，即其高度影響該結構且因此改變其具有較高風險；

- 若拓樸L之殘基亦具有拓樸S，則對於一些變化而言向變化指配評分4而非3，此乃因其累加拓樸重要性；
- 若拓樸C (VH與VL之間之接觸)或A (可能與抗原接觸)或L (「A」殘基與框架殘基之間之連接體殘基)之殘基，基於其對VH-VL失去穩定或對A殘基之位向/構形之可能效應，而對該變化指配給較高評分；換言之，對於3種類別A、C及L，CDR中之正向突變得到高分且框架中之回復突變避免得到高分；
- 若拓樸C之殘基具有不使其與相鄰可變結構域接觸之短側鏈，則與用較大胺基酸側鏈之其他替代可得到評分2或3相比，其經較小胺基酸替代將評分為1或2，此端視側鏈之大小及與相鄰可變結構域接觸之性質而定；
- 若拓樸C之殘基具有不使其與相鄰可變結構域接觸之短側鏈且用巨大側鏈替代以使得僅可藉由改變VH-VL位向達成該側鏈之適應，則此變化將評分為4；
- 若拓樸C之殘基亦具有拓樸S，則對於多個變化而言向變化指配評分4而非3，此乃因其累加拓樸重要性；
- 若拓樸S之殘基亦具有拓樸I，則向變化指配評分4或3，分別針對反向電荷之側鏈及針對僅缺少適當電荷之中性較小側鏈；
- 若拓樸S之殘基亦具有拓樸I且用中性較大側鏈進行替代，則向變化指配評分4，此乃因在經替代側鏈與其前面之帶電殘基之間存在立體阻礙；
- 若拓樸S之殘基亦具有拓樸E，則向變化指配評分3或2，分別針對反向電荷之側鏈及僅缺少適當電荷之任一側鏈。

【0106】 若在非人類可變結構域與非人類重鏈或輕鏈可變結構域之

(第一)人類化變體之框架中之胺基酸殘基之間存在差別，則該等差別可，量化，即藉由指配評分。藉由相似(物理上，體積)胺基酸替代通常產生較低評分，即通常具耐受性，而完全改變側鏈特徵產生較高評分。變化之評分亦取決於因不同空間約束引起之位置之形貌(例如與改變外部側鏈相比，改變內部側鏈係/可能更顯著/更易損害整個結構)。

【0107】 因此，在一個實施例中，本發明之任一方法進一步包含藉由向每一差別指配評分0 (對構形無影響)、1 (輕微局部影響)、2 (影響局部構形)、3 (強烈影響局部構形及相鄰股或環構形)或4 (將嚴重破壞局部構形以使得將破壞抗原識別)量化經比對框架位置之差別之步驟，其中非人類重鏈或輕鏈可變結構域及該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之(第一)人類化變體具有不同的胺基酸殘基，其因該差別而影響抗原結合性及/或三維結構。

【0108】 將評分0指配給表面定位之胺基酸殘基(呈 β -褶疊或環形式)之變化，此乃因19胺基酸殘基(除脯胺酸外之全部)之側鏈可因存在自由空間而適應。脯胺酸除外：當三維結構不發生變化時，向變化指配評分0，否則端視對抗原結合性之影響，向變化指配評分3或4。

【0109】 因此，在一個實施例中，將評分0指配給具有拓樸E之胺基酸殘基成為除脯胺酸外之任一胺基酸殘基之變化(對於脯胺酸呈環狀殘基之約束更重要)。引入脯胺酸必須考慮此殘基附近之相容性 ϕ 及 ψ 角。舉例而言，假設緊密靠近CDR/HVR殘基之極性殘基經來自所選生殖系之脯胺酸替代，則此替代可評分為i) 1，歸因於自極性至疏水殘基之變化，ii) 2或3，取決於角相容性，及iii) 4，當預期CDR/HVR殘基之角度及構形變化時。

【0110】 向內部胺基酸殘基變化指配評分，此端視可用自由空間而定。用較小側鏈替代將接收低評分(例如0)，且用較大側鏈替代將接收1與4之間之評分，此端視三維結構中之可用空間而定。

【0111】 因此，在一個實施例中，將評分0指配給具有拓樸I之胺基酸殘基成為具有較小側鏈之胺基酸殘基之變化(即對於保守替代)，評分1將指配給具有多一個碳原子之側鏈之胺基酸殘基之變化，評分2將指配給具有多兩個碳原子之側鏈之胺基酸殘基之變化，評分3將指配給具有多三個碳原子之側鏈之胺基酸殘基之變化，且評分4將指配給所有其他變化。

【0112】 在經替代時，抗原接觸胺基酸殘基之變化總是指配評分4。

【0113】 因此，在一個實施例中，將評分4指配給具有拓樸A之胺基酸殘基成為任何其他胺基酸殘基之變化。

【0114】 不與抗原直接接觸但極靠近稱為A之胺基酸之胺基酸稱為L。其變化有時引起指配評分3或4之構形變化。

【0115】 若為 $\pi - \pi$ -/疏水相互作用之一部分之胺基酸殘基經非疏水胺基酸殘基替代，則疏水相互作用被破壞。該替代將指配評分3。

【0116】 因此，在一個實施例中，將評分3指配給具有拓樸C之胺基酸殘基成為非疏水胺基酸殘基之變化，若藉此改變(減小或消除)與相同結構域或相應可變結構域中之胺基酸殘基之相互作用。

【0117】 若為鹽橋之一部分之胺基酸殘基經帶相反電荷或不帶電之胺基酸殘基替代，則鹽橋被破壞。該替代將指配評分3 (在鹽橋暴露到溶劑之情形下)及評分4 (在鹽橋處於內部之情形下)。

【0118】 因此，在一個實施例中，在鹽橋暴露到溶劑之情形下，使

具有拓樸S之胺基酸殘基成為帶負電或不帶電胺基酸殘基之變化時，則指配評分3，在鹽橋處於內部之情形下則指配評分4。

【0119】 在某些實施例中如本文所報告之方法如下：

- 藉由融合V區之HVR1及2實施序列搜索(鑑別出具有已知結構之相似框架)
- 對HVR3進行單獨序列搜索(挑選出HVR3以移植於所選框架上)
- 容許J元件末端之(極)小差別(通常可使用來自針對框架選擇之結構之J元件作為受體模板)
- 確立同源性模型(在重建之模型結構上，突變偏離殘基以反映原始抗體序列)
- 測定相關殘基之拓樸學
- 確立評分矩陣(根據原始非人類抗體序列與人類生殖系之比對，對原始抗體胺基酸之所有可能替代評分)
- 基於低累積分(而非總體一致性百分比)選擇受體生殖系
- 基於評分矩陣決定欲製造之(回復)突變。

【0120】

本發明之實例性實施方案

如本文所報告之方法組合變化之效應之三維評價與序列資訊。在該方法中，比對非人類抗體與適宜人類生殖系序列。使用該比對，基於每一殘基之拓樸學與變化類別之組合量化差別/所需變化。結果收集於矩陣中。

【0121】 本發明方法通常包含以下步驟：

將非人類抗體之結合特異性轉移至人類或人類化受體框架上以消除

或至少減少源自人體可識別為外源之非人類序列段之潛在免疫原性問題。此係藉由將非人類(供體)抗體之超變區(HVR)植入人類/人類化(受體)抗體框架上來進行。

【0122】 在一情形下，藉由以下方式鑑別出適宜人類(受體)抗體框架：比對非人類可變結構域胺基酸序列與人類生殖系抗體V-基因(生殖系)之集合，及根據序列一致性及同源性將其分選出。基於高總體序列同源性亦及視情況正確典型殘基已於受體序列中之存在來選擇受體序列(參見 Poul, M-A. 及 Lefranc, M-P. , 「 Ingénierie des anticorps banques combinatoires 」, Lefranc, M-P.及Lefranc, G. , Les編輯INSERM, 1997)。另外，慮及VH/VL角之保守。

【0123】 生殖系V-基因僅編碼上至重鏈之CDR3之起始且直至輕鏈之CDR3之中間之區域。因此，未遍及整個V-結構域比對生殖系V-基因之基因。人類化構築體包含人類框架1至3及非人類HVR。人類框架4序列之輕鏈及重鏈分別衍生自人類JK元件或人類JH元件。

【0124】 在選擇一個特定受體序列之前，可確定供體抗體之所謂的典型環結構(例如，參見Morea, V.等人，Methods, 20 (2000) 267-279)。該等典型環結構係藉由存在於所謂的典型位置之殘基之類型確定。該等位置(部分地)位於HVR區之外部，且應保持與最後構築體功能等效以便保留親代(供體)抗體之HVR構形。

【0125】 在下文中，本發明概述包含以下重鏈可變結構域及輕鏈可變結構域之抗體：

VH (122個胺基酸殘基) (SEQ ID NO: 01) :

QIQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIT TSGYYWTWIR

QFPGKKLEWM GYIGYNSKTY YNPSLKSRI ITRDTSKNQF
 LLHLNSVTTE DTATYYCARS LYGGYKDAFD SWGQGLVTV SS

VL (107個胺基酸殘基) (SEQ ID NO: 05) :

DVVLTQTPAT LSAIPGERVT MTCKASQSIG TSLHWYQHRP
 NETPRLLIK ASRSITGIPS RFSGSGSGTD FTLGINNLEA
 EDFAIYYCQQ SPGFPPTFGS GTKLEIN

【0126】 使用非人類抗體之胺基酸序列構建模型。

【0127】 對於重鏈，搜索PDB之同系物以檢查極接近同系物之框架區及HVR二者是否存在於結構數據庫中。

【0128】 為鑑別出適宜框架，僅使用V區及融合HVR來進行搜索(當亦添加加下劃線之殘基時，HVR則對應於經組合之Kabat及Chothia CDR)：

QIQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGxxxx xxxxxxTWIR
 QFPGKKLEWM xxxxxxxxxxxx xNPSLKSRI ITRDTSKNQF
 LLHLNSVTTE DTATYYCAR

【0129】 結果如下：

評分 E值

(位元)

↓ JSAE structpro:32C2 IGG1抗體32C2；CHA1N:... 138 9e-34

structpro:32CZB IGG1抗體32C2；CHAIN:A；片段:輕鏈，可變區；長度= 218

評分= 138個位元(348)，預期值= 9e-34，一致性= 70/98 (71%)，陽性= 73/98 (74%)，空位= 1/98 (1%)

```

VH          IQLQESGPGL VKPSQSLSLT CSVTGXXXXX XXXXXTWIRQ
            +QLQESGPGL VKPSQSLSLT C+VTG          WIRQ
PDB-1      VQLQESGPGL VKPSQSLSLT CTVTGYSISS DYAW-NWIRQ

VH          FPGKKLEWMX XXXXXXXXXXXX NPSLKSRI SI TRDTSKNQFL
            FPG KLEWM          NPSLKSRI SI TRDTSKNQF
PDB-1      FPGNKLEWMG YISYSGSTSY NPSLKSRI SI TRDTSKNQFF

VH          LHLNSVTTED TATYYCAR
            L L+SVTTED TATYYCAR
PDB-1      LQLSSVTTED TATYYCAR

```

【0130】 檢查比對以鑑別出是否存在一些插入或缺失及是否存在同源性尤其差之特定框架(在該等情形下可單獨搜索特定框架1、2或3)。

【0131】 已發現，HVR內之胺基酸含量指導HVR之構形。

【0132】 藉由搜索非人類抗體之模型可發現例如HVR-H1之X射線結構在基於藉由融合HVR發現之結構構建之模型中有所不同。現然後單獨搜索每一HVR環。在此情形中，不容許空位；若短區段具有不同長度，則其具有不同構形。

HVR-H1 : TGFSITTS GYYWTW

structpro: 3B2UF IMC-11F8 FAB輕鏈 ; CHAIN:L、D1 GI K、0、R、U、X ; ENGINEERED:YES ; 長度= 215

評分= 32.7個位元(64)，預期值= 0.058，一致性= 10/18 (55%)，陽性= 15/18 (83%)

查詢 : 1 SVTGFSITTS GYYWTWIR 18

+V+G SI++ YYW+WIR

Sbjct: 23 TVSGGSISSGDYYWSWIR 40

HVR-H2 : WMGYIGYNSKTYYNP

評分 E值

(位元)

↓ JSAE structpro:2EKSB抗溶菌酶抗體FV... 31 0.39

↓ JSAE structpro:32C2B IGG1抗體32C2; CHA1N:A... 29 1.1

↓ JSAE structpro:1KCVH PC282免疫球蛋白 ; CHA1N:... 29 1.1

HVR-H3 : YCARSLYGGYKDAFDSWG

structpro: 1VGEH TR1.9 FAB ; CHA1N:L ; 片段zFAB人類IGG1κ

自體抗體Y之片段 ; ENGINEERED:YES ; 長度= 225

評分= 31.2個位元(69) , 預期值= 0.30 , 一致性= 12/18 (66%) , 陽性
= 12/18 (66%)

查詢 : 1 YCARSLYGGYKDAFDSWG 18

YCAR YGG K FD WG

Sbjct: 96 YCARDPYGGGKSEFDYWG 113

【0133】 構建重鏈之模型：該結構將藉由以下粗體序列構建。在此
實例中：32C2-FR1、3B2U-HVR-H1、32C2-FR2/HVR-H2/FR3、1VGE-
HVR-H3/J元件。

					40
2eksb	QVQ.LQESGP	GLMKPSETLS	LTCSVSGDSI	RSD..YWSWI	
32c2b	DVQ.LQESGP	GLVKPSQSLS	LTCTVTGYSI	SS.DYAWNWI	
3b2uf	QVQ.LQESGP	GLVKPSQTLS	LTCTVSGGSI	SSGDYYWSWI	
VH	QIQ.LQESGP	GLVKPSQSLS	LTCSVTGFSI	TTSGYYWTWI	
lvgeh	QVKLLEQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	TS..YGLHWV	
					80
2eksb	RQPPGKLEW	IGYVSY.SGS	TYYNPSLKSR	VTISVDTSKN	
32c2b	RQFPGNKLEW	MGYISY.SGS	TSYNPSLKSR	ISITRDTSKN	
3b2uf	RQPPGKLEW	1GYIYY.SGS	TDYNPSLKSR	VTMSVDTSKN	
VH	RQFPGKKLEW	MGYIGY.NSK	TYYNPSLKSR	ISITRDTSKN	
lvgeh	RQAPGQRLEW	MGWISAGTGN	TKYSQKFRGR	VTFTRDTSAT	
					120

```

2eksb  RFSLKLNSVT  AADTAVYYCA  RW.....  DGDYWGQGIL
32c2b  QFFLQLSSVT  TEDTATYYCA  R.GYYGSSH  ..PVWGAGTT
3b2uf  QFSLKVNSVT  AADTAVYYCA  RVSIFG..VG  TFDYWGQGTL
VH      QLLHLNSVT  TEDTATYYCA  R.SLYGGYKD  AFDSWGQGTL
lvgeh   TAYMGLSSLR  PEDTAVYYCA  R.DPYGGGKS  EFDYWGQGTL
                                               160

2eksb  VTVSS.....
32c2b  VTVSSAKTTP  PPVYPLVPGS  LAQTNSMVTL  GCLVKGYFPE
3b2uf  VTVSSASTKG  PSVFPLAPS.  ....GTAAL  GCLVKDYFPE
VH      VTVSS.....
lvgeh   VTVSSASTKG  PSVFPLAPSS  KSTSGGTAAL  GCLVKDYFPE

```

【0134】 建模可使用WolfGuy抗體編號方案，其將獨特指數指配給Fv中之每一位置，鑑別出CDR環尖端且區分升環及降環區段。輸入序列之初始WolfGuy編號(實施與可用抗體模板結構之序列比對之等效形式)形成模板選擇、VH-VL位向調整及模型細化之基礎。與其他公開之抗體建模方案不同，並不對每個VH及VL或每個Fv選擇框架模板，但對每個框架區段單獨選擇以最小化所需胺基酸交換之數量。在自框架及CDR區之不同模板結構組裝原始模型後，檢查每一殘基之由其附近之某些類型之側鏈形成之(改變的)化學鄰域。基於Fv中之每一位置之保守鄰域定義，自匹配的已知化學鄰域集群採取給定殘基之側鏈(及在某一程度上亦為主鏈)構形。最後，基於首先根據結構域界面處之某些關鍵殘基之胺基酸類型預測VH-VL位向之絕對參數，然後進行將經預測位向參數施加至模型之坐標轉變來調整VH-VL位向。

【0135】 對輕鏈可變結構域實施相同程序。

【0136】 在任兩個以胺基酸為主之結構之間進行比較時，通常使用以距離為主之度量，例如等效原子之均方根差(RMSD)。

【0137】 為表徵任兩個三維物體之間之位向，需要定義：

- 每一物體上之參考架構，
- 量測位向參數約之軸，

-闡述及量化該等參數之術語。

【0138】 ABangle概念係在一致及絕對意義上使用五個角(HL、HC1、LC1、HC2及LC2)及距離(dc)充分表徵VH-VL位向之方法。抗體之可變結構域對VH及VL共同表示為抗體F_v片段。

【0139】 使用重鏈及輕鏈結構域中之結構最保守之殘基位置來定義結構域位置。該等位置表示為VH及VL核心集。該等位置主要位於框架之β-股上且形成每一結構域之核心。核心集位置於下表中給出：

輕鏈	重鏈
L44	H35
L19	H12
L69	H38
L14	H36
L75	H83
L82	H19
L15	H94
L21	H37
L47	H11
L20	H47
L48	H39
L49	H93
L22	H46
L81	H45
L79	H68
L80	H69
L23	H71
L36	H70
L35	H17
L37	H72

輕鏈	重鏈
L74	H92
L88	H84
L38	H91
L18	H90
L87	H20
L17	H21
L86	H85
L85	H25
L46	H24
L70	H86
L45	H89
L16	H88
L71	H87
L72	H22
L73	H23

【0140】 使用核心集位置將參考架構記錄至抗體Fv區結構域上。

【0141】 使兩個參考平面架構映射至任一Fv結構上。因此，量測VH-VL位向可以與量測兩個平面之間之位向等效之方式進行。為此完全且在絕對意義上需要至少6個參數：距離、扭轉角及4個彎曲角。該等參數必須圍繞連接該等平面之一致定義之向量量測。此向量在下文中表示為C。為鑑別出C，將參考平面架構記錄至如上文所述之非冗餘集中之每一結構上且將一網格置於每一平面上。因此，每一結構具有等效的網格點且因此具有等效的VH-VL網格點對。量測每一結構中之每一對網格點之歐幾里德距離(Euclidean distance)。鑑別出其分隔距離具有最小方差之點對。連結該等點之向量定義為C。

【0142】 坐標系統係完全使用多個向量充分界定，該等向量位於每

一平面中且中心位於對應於C之點。H1係與VH平面之第一主要組分平行之向量，而H2係與第二主要組分平行。L1及L2以類似方式定義於VL結構域上。HL角係兩個結構域之間之扭轉角。HC1及LC1彎曲角等同於一個結構域相對於另一結構域之傾斜樣變異。HC2及LC2彎曲角闡述一個結構域至另一結構域之扭轉樣變異。

【0143】術語「VH-VL位向」在業內係根據其常用含義使用，如熟習此項技術者所理解(例如，參見Dunbar等人，Prot. Eng. Des. Sel. 26 (2013) 611-620；及Bujotzek, A.等人，Proteins, Struct. Funct. Bioinf., 83 (2015) 681-695)。其表示VH及VL結構域彼此相對之位向。

【0144】因此，VH-VL位向係藉由以下定義：

- C之長度dc，
- 針對C所量測之自H1至L1之扭轉角HL，
- H1與C之間之彎曲角HC1，
- H2與C之間之彎曲角HC2，
- L1與C之間之彎曲角LC1，及
- L2與C之間之彎曲角LC2，

其中參考平面架構係藉由以下方式記錄：i)比對對應於VH之8個位置H36、H37、H38、H39、H89、H90、H91及H92之C α 坐標並透過其等擬合平面，及ii)比對對應於VL之8個位置L35、L36、L37、L38、L85、L86、L87及L88之C α 坐標並透過其等擬合平面，iii)將放置的置於每一平面上，其中每一結構具有同等網格點及同等VH-VL網格點對，及iv)量測每一結構中之每一對網格點之歐幾里德距離，其中向量C連結分隔距離具有最小方差的一對點，

其中H1係與VH平面之第一主要組分平行於之向量，H2係與VH平面之第二主要組分平行之向量，L1係與VL平面之第一主要組分平行之向量，L2係與VL平面之第二主要組分平行之向量，HL角係兩個結構域之間之扭轉角，HC1及LC1係等同一個結構域相對於另一結構域之傾斜樣變異之彎曲角，且HC2及LC2彎曲角等同一個結構域與另一結構域之扭轉樣變異。

【0145】 之後，使用適宜軟體(例如來自Accelrys之軟體INSIGHT)慮及所有側鏈及其環境，使兩個鏈一起之能量最小化。

【0146】 使用兩個可變結構域疊加兩個或更多個已遞送框架之結構(對於重鏈及輕鏈)，慮及VH/VL角。

【0147】 然後例如使用Insight之模組「discover」將複合的VH-VL能量最小化。最小化過程例如遵循600個循環之VA09A梯度，其中臨限導數為1 kcal/A；考慮部分電荷。

【0148】

評分矩陣之確立

對於非人類抗體模型結構之每一胺基酸位置，藉由指配評分量化考慮到人類生殖系序列之列表之每一可能替代對三維結構之效應。

【0149】 量化係針對每一位置及每一替代進行。

【0150】 拓樸描述係基於結構針對每一位置指配：

I：內部側鏈

E：外部側鏈

C：接觸H-L鏈

A：抗原接觸

L：抗原之連接體

S：鹽橋

【0151】 對每一替代指配評分如下：

- 0： 此替代對構形無影響
- 1： 小的局部影響(一些側鏈之局部配置)
- 2： 影響局部構形
- 3： 強烈影響局部構形及相鄰股或環構形
- 4： 將嚴重破壞局部構形(可影響抗原結合性)

【0152】 評分指配之方式取決於位置及變化之形貌：

1. 在 β -褶疊或暴露環上具有外部側鏈之胺基酸：對於該位置之變化，所指配評分通常為「0」，此乃因20種天然胺基酸殘基中之大多數可因存在自由空間而適應；脯胺酸或大殘基(如色胺酸)必須基於具體情況來指配。

2. 具有內部側鏈之胺基酸：所指配評分取決於可用自由空間；必須利用有效替代及最終最小化來檢查線性至具支鏈胺基酸之替代(強偏差產生高分)。

3. 具有抗原接觸側鏈之胺基酸：當假定胺基酸與抗原直接相互作用時，向其任一替代指配評分「4」。

4. 連接體胺基酸：不與抗原直接接觸但極靠近稱為「A」之胺基酸之彼等胺基酸；該等胺基酸之強烈差別可引起構形變化，產生「3」或「4」之高分。

5. 具有接觸側鏈之胺基酸：該等胺基酸位於輕鏈與重鏈之間之界面處；對於複合物之穩定性至關重要；若存在鹽橋，則任一替代應容許在替

代後發生此靠近的相互作用；類似地，氫鍵係方向性相互作用；替代側鏈通常會破壞方向性且必須評高分(「3」或「4」)。

6. 未(大量)暴露於溶劑之鹽橋在正電荷與負電荷之間帶有大量相互作用能量；破壞鹽橋可能會顯著損失結構域內或輕鏈與重鏈之間之界面處的穩定性。

結構位置	註解
	由相似胺基酸替代通常具耐受性，而完全改變側鏈特徵產生不為「0」之評分。
E	當側鏈暴露於溶劑時，其替代通常不成問題；可避免特定胺基酸：暴露的色胺酸或甲硫胺酸易於氧化；脯胺酸環化可改變構形。
I	蛋白質結構在胺基酸側鏈周圍亦具有一定內部可用空間；內部胺基酸側鏈之並非所有原子皆與相鄰胺基酸接觸；基於可用自由空間向替代指配評分。
C	在重鏈與輕鏈可變結構域之間無共價鏈接；因此將對降低兩個可變結構域之間之相互作用能量之每一替代指配不為「0」之評分；在立體上影響結構域位向之替代時，指配其評分「3」或「4」，此端視與HVR之靠近程度而定。
A	將對在抗原結合囊袋之周圍朝向推定的抗原位向之所有側鏈選擇「A」；假定胺基酸「A」為抗原結合之關鍵；將總是向替代指配評分「4」。
L	假定不與抗原(未暴露之內部側鏈)直接相互作用但在稱為「A」之胺基酸之前或之後之胺基酸；替代其可強烈影響附近的「A」。
S	鹽橋帶有高相互作用能量；破壞其影響抗體之固有穩定性；通常，將指配評分「1」或「2」以反映此損失；若連接體參與疏水性胺基酸小片段或製造若干凡得瓦接觸(van der Waals contacts)，則將指配較高評分「3」或「4」。

【0153】 術語芳香族、直鏈或具支鏈闡述胺基酸側鏈。術語極性、

陰性或陽性闡述側鏈末端之官能性。

結構位置	胺基酸(一字母代碼)				
	A	C	D	E	G
	小、疏水	直鏈、極性	直鏈、陰性	直鏈、陰性	無側鏈
E		避免游離半胱胺酸			
I	18個胺基酸大於丙胺酸	向破壞二硫橋指配高分	向成為疏水殘基之變化指配評分		所有其他胺基酸大於甘胺酸
C		n. a.			替代使得基於側鏈之大小指配評分
A		n. a.			
L		n. a.			
S	n. a.	n. a.	E/D之交換有時係可能的；向成為極性殘基之變化指配低分；向成為疏水或陽性殘基之變化指配高分		n. a.

結構位置	胺基酸			
	H	K	R	I
	芳香族、極性、中性或帶電(端視pH及環境而定)	直鏈、陽性	直鏈、陽性	具支鏈、疏水性
E				
I				
C				
A				
L				

結構位置	胺基酸			
	H	K	R	I
	芳香族、極性、中性或帶電(端視pH及環境而定)	直鏈、陽性	直鏈、陽性	具支鏈、疏水
S		K/R之交換有時係可能的；向成為極性殘基之變化指配低分；向成為疏水或陽性殘基之變化指配高分		n. a.

結構位置	胺基酸				
	L	M	N	P	Q
	具支鏈、疏水	直鏈	直鏈、極性	環狀、疏水	直鏈、極性
E				替代脯胺酸產生較小剛性；藉由脯胺酸引起之轉角需要係保守的	
I					
C					
A				替代CDR/HVR中之脯胺酸將使抗體更具撓性	
L					
S	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

結構位置	胺基酸				
	S	T	V	W	F
	直鏈、極性	具支鏈(β)、極性	具支鏈(β)、疏水	雙環、芳香族	芳香族、疏水

結構位置	胺基酸				
	S	T	V	W	F
	直鏈、 極性	具支鏈 (β)、極性	具支鏈(β)、 疏水	雙環、芳香 族	芳香族、疏水
E				與近鄰具有 雙環特定相 互作用?	與近鄰具有苯 環特定相互作 用?
I					
C					
A					
L					
S	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

結構位置	胺基酸	
	Y	插入或缺失通常評分為「4」
	在末端具有極性功能之疏水性芳香族	
E	與近鄰具有苯環特定相互作用?	
I		
C		
A		
L		
S	n. a.	

【0154】基於可用人類生殖系序列對可變結構域之每一位置之每一推定的替代指配的評分可收集於矩陣中。

【0155】對於經比對序列集(所討論抗體-生殖系)之每一位置，僅少數殘基實際上可視為用於替代，即出現在其他/所有生殖系之此位置。藉由以下方式指配評分：

- 基於結構域判斷相對重要性；及/或

- 在該模型上執行替代並量化關於此替代引起之影響等級之評分；及/或
- 替代並最小化總體結構：改變局部構形但不影響「A」殘基或複合物之穩定性可評分為較低等級；置換「A」側鏈受到嚴厲懲戒。

【0156】用於此實例性抗體之一部分(VH/SEQ ID NO: 01之24個N末端殘基)之源自上文所概述之方法的評分矩陣繪示於下表中(「10」表示尚未測定/計算個別位置之評分)。

aa seq		Q	I	Q	L	Q	E	S	.	G	P	G	L
topol.		E	I	E	I	E	I	E		E	E	E	E
	A										0		
	C												
	D		0										
	E												
	F												
	G										0		
	H										0		
	I												
	K												
	L		0										
	M		1										
	N												
	P												
	Q						1						
	R									2			
	S										0		
	T			0				0					
	V		0										

aa seq		Q	I	Q	L	Q	E	S	.	G	P	G	L
topol.		E	I	E	I	E	I	E		E	E	E	E
	W							1					
	Y												

aa seq		V	K	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	S	V
topol.		I	E	E	E	E	E	I	E	I	E	I	E	I
	A												10	10
	C													
	D													
	E													
	F													10
	G				0									10
	H													
	I	0								10				10
	K	1							10				10	
	L	0												
	M													
	N													
	P				2					10				
	Q													
	R				0				10					
	S										10			
	T				0				10					10
	V							10		10				
	W													
	Y													

【0157】

選擇人類生殖系及人類化

對推定的受體生殖系(不含HVR；亦可考慮正向突變)之所有評分求和。然後使用總體評分分選人類生殖系。具有一致評分之用於支持人類化之生殖系框架的選擇係基於特定框架之使用頻率；較佳者將為更經常出現在人類中之生殖系。對V區及J元件單獨進行評分(可改為三個架構中之每一者進行單獨評分取得總分且決定進行組合)。

【0158】 對於保守人類化胺基酸，接受評分高達2之替代且不接受評分為3或4之胺基酸變化(該等胺基酸殘基不發生變化且保持原狀)；在HVR內，封閉在評分為4之2個殘基之間之所有胺基酸保持原狀(未變成人類)。

【0159】 HVR之定義並不固定為Chothia或Kabat所定義：在一些情形下，HVR可小於上述定義；另一方面，HVR可包括之前或之後框架之一些胺基酸。

【0160】 對於較不保守之人類化，僅評分為4之胺基酸變化在框架區中被拒絕且回復突變；在HVR內，封閉在評分為4之2個殘基之間之所有胺基酸保持原狀(未變成人類)。

【0161】 對於甚至更不保守之人類化，可進行HVR內評分低於或等於2之2個「A」殘基之間之胺基酸的替代。

【0162】

實例1 - 鼠類抗IL-17抗體之人類化

在鼠類抗IL17抗體中，已使用如本文所報告之方法生成人類化變體，且根據本文所報告之評分表量化不同殘基對三維結構之影響(評分)。

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	35b*	*	*	36	37	38	39	40	41	
mVH IL-17	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	p	p
變體HC-2a	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
變體HC-2b	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
變體HC-2c	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p
變體HC-2d	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p
變體HC-2e	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	p
變體HC-2f	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p
變體HC-2g	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	t
變體HC-2h	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	t

【0166】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
鼠類生殖系	D	G	S	T	N	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	s	k
mVH IL-17	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	t	k
變體HC-2a	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
變體HC-2b	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
變體HC-2c	D	G	T	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
變體HC-2d	D	G	T	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
變體HC-2e	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	f	t	i	s	r
變體HC-2f	G	T	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
變體HC-2g	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	f	t	i	s	r
變體HC-2h	D	G	T	T	T	Y	P	G	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r

【0167】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

【0168】 對於重鏈可變結構域使用評分方法已生成5個額外人類化提議(HC-2i-m：SEQ ID NO: 19至23；個別生殖系片段SEQ ID NO: 32至36)。

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	35b*	*	*	36	37	38	39	40	41	
鼠類生殖系	t	v	s	G	F	S	L	T	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	p	p
mVH IL-17	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	p	p

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	35b*	*	*	36	37	38	39	40	41	
變體HC-2i	a	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	p
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
評分	0																		1
變體HC-2j	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	S	w	i	r	q	p	p
人類生殖系	t	v	s	G	G	S	I	S	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p
評分												4		1					
變體HC-2k	a	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	p
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
評分	0																		1
變體HC-2l	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	S	w	i	r	q	p	p
人類生殖系	t	v	s	G	G	S	V	S	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p
評分												4		1					
變體HC-2m	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p
人類生殖系	t	v	s	G	F	S	L	S	N	M	G	V	S	w	i	r	q	p	p
評分											0								1

【0169】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
鼠類生殖系	D	G	S	T	N	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	s	k
mVH IL-17	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	t	k
變體HC-2i	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	t	i	s	r
人類生殖系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分															0	0	1	
變體HC-2j	D	G	T	T	N	Y	N	P	A	L	K	S	r	v	t	i	s	v
人類生殖系	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
評分					4			2						1	0	0	2	
變體HC-2k	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	t	i	s	r
人類生殖系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分															0	0	1	
變體HC-2l	D	G	T	T	N	Y	N	P	A	L	K	S	r	v	t	i	s	v

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
人類生殖系	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
評分								4									0	
變體HC-2m	D	G	T	K	S	Y	S	T	S	L	K	S	r	l	t	i	s	k
人類生殖系	N	D	E	K	S	Y	S	T	S	L	K	S	r	l	t	i	s	k
評分					0												0	

【0170】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

【0171】 以追溯方式亦及如本文所報告之方法分析不使用如本文所報告之方法獲得之8個提議。組合結果顯示於下表中(個別生殖系片段SEQ ID NO: 24至31)。

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	35*	* *	* *	36	37	38	39	40	41	
										b									
鼠類生殖系	t	v	s	G	F	S	L	T	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	p	p
mVH IL-17	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	p	p
變體HC-2a	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
評分	0	1									4	0	4					1	
變體HC-2b	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
評分	0	1									4	0	4					1	
變體HC-2c	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p
評分	0	1										0							
變體HC-2d	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p
人類生殖系	t	v	s	G	G	S	I	S	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p
評分											4	4	4		1				
變體HC-2e	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	p
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
評分	0	1																1	

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	35	*	*	*	36	37	38	39	40	41	
										b										
變體HC-2f	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p	
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p	
評分	0	1										0							1	
變體HC-2g	a	a	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	t	
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	D	M	H	w	v	r	q	a	t	
評分	0	1																	1	0
變體HC-2h	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	t	
人類生殖系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	D	M	H	w	v	r	q	a	t	
評分	0	1				1	2	2											1	0
變體HC-2i	a	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	p	
評分	0																		1	
變體HC-2j	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	S	w	i	r	q	p	p	
評分													4	1						
變體HC-2k	a	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	a	p	
評分	0																		1	
變體HC-2l	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	V	S	w	i	r	q	p	p	
評分													4	1						
變體HC-2m	t	v	s	G	F	S	L	D	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p	
評分												0							1	

【0172】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
鼠類生殖系	D	G	S	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	s	k
mVH IL-17	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	t	k
變體HC-2a	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
人類生殖系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分					4		2	1	1	2		0		2	0		0	1
變體HC-2b	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
人類生殖系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
評分					4		2	1		2		0		2	0		0	1
變體HC-2c	D	G	T	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
人類生殖系	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分				2	4		2	1		2		0		2	0		0	1
變體HC-2d	D	G	T	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
人類生殖系	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
評分					4			2	1					1	0		0	2
變體HC-2e	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	f	t	i	s	r
人類生殖系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分														2	0		0	1
變體HC-2f	G	T	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
人類生殖系	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分	4		4	2	4		2	1		2		0		2	0		0	1
變體HC-2g	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	f	t	i	s	r
人類生殖系	A	G	D	T	Y	Y	P	G	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分														2	0		0	1
變體HC-2h	D	G	T	T	T	Y	P	G	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
人類生殖系	A	G	D	T	Y	Y	P	G	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
評分							4	1	1	2		2		2	0		0	1
變體HC-2i	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	t	i	s	r
評分															0		0	1
變體HC-2j	D	G	T	T	N	Y	N	P	A	L	K	S	r	v	t	i	s	v
評分					4			2						1	0		0	2
變體HC-2k	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	t	i	s	r
評分															0		0	1
變體HC-2l	D	G	T	T	N	Y	N	P	A	L	K	S	r	v	t	i	s	v
評分					4			2						1	0		0	2
變體HC-2m	D	G	T	K	S	Y	S	T	S	L	K	S	r	l	t	i	s	k
評分					2	2		1	1	1					0		0	

【0173】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

【0174】 在13個人類化提議中，3個顯示可接受之結合親和力。其中之兩個係不使用如本文所報告之方法獲得(2/8 = 25%)，一個係使用如本文所報告之方法獲得(1/5 = 20%)。

【0175】 對於輕鏈可變結構域，不使用評分方法已生成4個人類化提議(LC-2a-d；SEQ ID NO: 37至40)。

	24	25	26	27	27	27	27	27	27	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39
				a	b	c	d	e	f												
鼠類生殖系	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	w	y	l	q	k
mVH IL-17	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	F	H	w	y	l	q	k
變體LC-2a	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	N	w	y	l	q	k
變體LC-2b	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	D	w	y	l	q	k
變體LC-2c	K	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	Y	w	y	l	q	k
變體LC-2d	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	F	H	w	y	l	q	k

【0176】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
鼠類生殖系	p	g	q	s	p	k	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
mVH IL-17	p	g	q	s	p	k	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
變體LC-2a	p	g	q	s	p	r	r	l	i	y	K	V	S	N	R	D	S	g	v
變體LC-2b	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	A	S	g	v
變體LC-2c	p	g	q	p	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
變體LC-2d	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v

【0177】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

【0178】 對於SEQ ID NO: 49之輕鏈，根據如上文所概述之方法已生成同源性模型且如所顯示之形貌已指配給每一殘基，如下表中所顯示(上部列：根據Kabat之殘基編號；中部列：胺基酸序列；下部列：形貌)。

	24	25	26	27	27	27	27	27	27	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39
				a	b	c	d	e	f												
評分																					

【0180】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	
鼠類生殖系	p	g	q	s	p	k	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v	
mVL IL-17	p	g	q	s	p	k	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v	
變體LC-2e	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v	
人類生殖系	p	g	q	p	p	q	l	l	i	y	E	V	S	N	R	F	S	g	v	
評分							0													
變體LC-2f	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v	
人類生殖系	p	g	q	s	p	r	r	l	i	y	K	V	S	N	R	D	S	g	v	
評分							0													

【0181】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

【0182】 以追溯方式亦及如本文所報告之方法分析不使用如本文所報告之方法獲得之4個提議。組合結果顯示於下表中(個別生殖系片段SEQ ID NO: 43至46)。

	24	25	26	27	27	27	27	27	27	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39
				a	b	c	d	e	f												
鼠類生殖系	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	w	y	l	q	k
mVL IL-17	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	F	H	w	y	l	q	k
變體LC-2a	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	N	w	y	l	q	k
人類生殖系	R	S	S	Q	S	L	V	Y	S	D	G	N	T	Y	L	N	w	f	q	q	r
評分															2	3		2	0		0
變體LC-2b	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	D	w	y	l	q	k
人類生殖系	R	S	S	Q	S	L	L	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	w	y	l	q	k
評分															2	4					
變體LC-2c	K	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	Y	w	y	l	q	k
人類生殖系	K	S	S	Q	S	L	L	H	S	D	G	K	T	Y	L	Y	w	y	l	q	k

	24	25	26	27	27	27	27	27	27	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39	
				a	b	c	d	e	f													
評分															2	3						
變體LC-2d	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	F	H	w	y	l	q	k	
人類生殖系	R	S	S	Q	S	L	L	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	w	y	l	q	k	
評分																						
變體LC-2e	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	F	H	w	y	l	q	k	
評分																						
變體LC-2f	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	D	T	Y	F	H	w	y	l	q	k	
評分																						

【0183】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
鼠類生殖系	p	g	q	s	p	k	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
mVL IL-17	p	g	q	s	p	k	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
變體LC-2a	p	g	q	s	p	r	r	l	i	y	K	V	S	N	R	D	S	g	v
人類生殖系	p	g	q	s	p	r	r	l	i	y	K	V	S	N	R	D	S	g	v
評分						0	4									3			
變體LC-2b	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	A	S	g	v
人類生殖系	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	L	G	S	N	R	A	S	g	v
評分						0										3			
變體LC-2c	p	g	q	p	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
人類生殖系	p	g	q	p	p	q	l	l	i	y	E	V	S	N	R	F	S	g	v
評分				2	0														
變體LC-2d	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
人類生殖系	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	L	G	S	N	R	A	S	g	v
評分						0													
變體LC-2e	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
評分						0													
變體LC-2f	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
評分						0													

【0184】 大寫字母：在HVR中；小寫字母：在FR中

【0185】 在6個人類化提議中，僅4個顯示可接受之結合親和力。其中之兩個係不使用如本文所報告之方法獲得(2/4 = 50%)，兩個係使用如本文所報告之方法獲得(2/2 = 100%)。

【0186】 使用如本文所報告之方法已鑑別出在輕鏈可變結構域中兩個殘基(即H34及F55)強烈影響抗原結合性。

【0187】 個別人類化抗IL17抗體之結果匯總於下表中。

HC	LC	hIL-17A ELISA	NHDF中和 IL-6 IC ₅₀ (nM)	BIAcore	
				t/2 _{diss} (min)	K _D (nM)
鼠類	鼠類	+++	0.21	>1160	0.05
嵌合	嵌合	166	0.14	464	0.03
HC2-e	LC2-a	52	53.7	22	1.27
HC2-e	LC2-d	93	0.32, 0.05	206	0.07
HC2-g	LC2-c	118	2.3, 1.5	219	0.11
HC2-g	LC2-d	160	0.20, 0.01	230	0.07
HC2-i	LC2-e	181	0.33	174	0.09
HC2-i	LC2-f	175	1.1	139	0.11
HC2-k	LC2-e	175	0.52, 0.34	237	0.06
HC2-m	LC2-e	169	5.9	38	0.39
HC2-m	LC2-f	209	30.8	26	0.53

【0188】 因此，無活性變體之數量可藉由使用本發明之方法減少。

【0189】

實例2 -抗CCR5抗體

使用習用人類化方法、即不使用如本文所報告之方法已生成鼠類抗CCR5抗體重鏈可變結構域之17個人類化變體。已測定該等變體與CCR5之結合。可觀察到，藉由使用本發明之方法基於總評分及指配評分4之胺基酸差別之數量可鑑別出不太可能結合抗原之人類化變體。藉此可鑑別出且去選擇抗原結合無活性變體。

VH變體	與CCR5之結合	總評分	評分「4」之數量
鼠類VH		0	
15	y	3	
16	y	3	
18	y	3	
14	y	4	
17	y	6	
7	n	11	1
8	n	6	1
9	n	6	1
10	y	10	2
11	y	10	2
12	y	10	2
13	y	13	3
6	n	16	3
2	n	20	4
3	n	20	4

VH變體	與CCR5之結合	總評分	評分「4」之數量
4	n	20	4
5	n	20	4

【0190】

其他實施例

在本發明之某些實施例中，利用以下步驟製造包含非人類抗體及人類生殖系序列之胺基酸序列之人類化抗體：

a)獲得非人類抗體可變結構域及以下之胺基酸序列：*i*)與非人類可變結構域具有最高序列同源性之人類生殖系序列，或*ii*)兩個或更多個人類生殖系序列片段，其在比對時具有高於單一人類生殖系序列之同源性，或*iii*)基於VH/VL角；

b)鑑別非人類抗體可變結構域及人類生殖系序列中之超變區胺基酸序列；

c)用非人類抗體超變區胺基酸序列取代相應人類生殖系超變區胺基酸序列；

d)比對非人類抗體之框架區(FR)與人類生殖系序列之相應FR之胺基酸序列；

e)鑑別經比對FR序列中與相應人類生殖系殘基不一致之非人類抗體FR殘基；

f)確定不一致非人類可變結構域胺基酸殘基是否經合理預期以具有以下形貌中之至少一者：

I：內部側鏈

E：外部側鏈

C：接觸H-L鏈

A：抗原接觸

L：抗原之連接體

S：鹽橋

及該差別是否產生不為0之評分，對個別位置之每一胺基酸殘基(存在於任一非所選人類生殖系序列之該位置)測定個別評分且藉此生成評分矩陣；

g)對於經合理預期以具有該等形貌中之至少一者之任一不一致非人類抗體胺基酸殘基，用該殘基取代來自矩陣之具有最低評分之相應胺基酸殘基。

【0191】 視情況，確定步驟(e)中所鑑別出之任何不一致殘基是暴露於結構域之表面上抑或埋藏於其內，且若殘基暴露且不具步驟(f)中所鑑別出之形貌，則可保留人類生殖系殘基。

【0192】 在一個實施例中，該方法包含比對非人類抗體與人類生殖系FR序列，鑑別出與經比對人類生殖系FR序列不一致之非人類抗體FR殘基，且對於每一該不一致非人類抗體FR殘基，確定相應人類生殖系殘基是否代表在所有物種中在該位點高度保守之殘基，且若其如此保守，製備包含該位點之人類生殖系胺基酸殘基之人類化抗體。

【0193】 在一個實施例中，在同源性模型中，非人類抗體序列及模板序列之主鏈構形之均方根差別小於4 Å、小於3 Å、且較佳小於2 Å。

【0194】 在本發明之某些實施例中，提供製造包含至少一個輕鏈及一個重鏈之人類化抗體之方法，該方法包含以下步驟：

a) 選擇具有至少一個HVR之非人類抗體；

- b) 選擇人類抗體重鏈或生殖系序列；
- c) 選擇人類抗體輕鏈或生殖系序列
- d) 將非人類抗體重鏈之至少一個HVR引入人類抗體重鏈中，以形成重組重鏈；及
- e) 將非人類抗體輕鏈之至少一個HVR引入人類抗體輕鏈中，以形成重組輕鏈；
- f) 基於如本文所報告之方法改變兩個可變結構域胺基酸序列中之胺基酸殘基，

其中人類抗體重鏈及輕鏈中之每一者之選擇分別僅藉由與非人類抗體重鏈及輕鏈之序列同源性來確定。

【0195】 在本發明之某些實施例中，提供製造人類化抗體之方法，其包含：

比較非人類抗體之可變(V)區框架(FR)序列與人類抗體或人類抗體生殖系序列之可變(V)區框架(FR)序列以確定非人類抗體FR與人類抗體或人類生殖系FR之間之序列同源度；及

用藉由如本文所報告之方法確定之人類抗體或人類生殖系FR替代非人類抗體中之FR。

【0196】 提供以下實例以幫助理解本發明，本發明之實際範圍闡述於隨附申請專利範圍中。應理解，可在不背離本發明精神之情況下修改所述程序。

【0197】

實例

實例1

藉由ELISA量測之與IL-17之結合

用重組人類IL-17 (Peprotech 編號200-17, www.peprotech.com) 以PBS (100 ml/孔)中之0.5 µg/ml之濃度包覆NUNC® MaxiSorp板(96孔)。在37°C下在定軌振盪器上攪動下將板培育2小時。此後，去除包覆溶液且添加100 µl/孔之PBSTC (磷酸鹽緩衝鹽水、0.05% Tween®-20、2%雞血清)。在室溫下將板培育1小時。去除封阻溶液且將樣品(空白：PBSTC、樣品(10 µg/ml於PBS中))添加至板(100 µl/孔)。在室溫下在攪動下培育板。去除樣品，用200 µl/孔之PBST (磷酸鹽緩衝鹽水、0.05% Tween®-20)將板洗滌三次且添加二級抗體(山羊抗人類IgG、Fc γ、HRP結合物 (Chemicon AP113P)以檢測人類化抗體。將二級抗體以1:10,000稀釋於PBSTC中且在室溫下在攪動下將板培育1小時。去除二級抗體，用200 µl/孔之PBST (磷酸鹽緩衝鹽水、0.05% Tween®-20)將板洗滌三次且添加100 µl/孔之ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)。在405/492 nm下量測光學密度。

【0198】

實例2

製備用於IgG1類免疫球蛋白之表現質體

質體p6454係用於在真核細胞中表現抗IL-17-抗體(保留外顯子-內含子識別之基因體識別之表現盒)之表現質體。其包含以下功能元件：

- 衍生自載體pUC18 (pUC來源)之複製起點，
- β(beta)-內醯胺酶基因，其在大腸桿菌(E. coli)中賦予胺苄青黴素抗性(Amp)，
- 用於表現γ 1-重鏈之表現盒，其包含以下元件：

- 來自人類巨細胞病毒之主要立即早期啟動子及增強子(hCMV IE1啟動子)，
- 包括Kozak序列之合成5'UTR，
- 包括信號序列內含子之鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列(L1_內含子_L2)，
- 在3'端配置有剪接供體位點之重鏈可變區(VH)之cDNA，
- 小鼠免疫球蛋白 μ -增強子區域，
- 人類免疫球蛋白重鏈 γ 1-基因(IGHG1)，其包括外顯子CH1、鉸鏈、CH2及CH3、間插內含子及帶有多聚腺苷酸化信號序列之3'UTR，
- 用於表現 κ -輕鏈之表現盒，其包含以下元件：
 - 來自人類巨細胞病毒之主要立即早期啟動子及增強子(hCMV IE1啟動子)，
 - 包括Kozak序列之合成5'UTR，
 - 包括信號序列內含子之鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列(L1_內含子_L2)，
 - 在3'端配置有剪接供體位點之輕鏈可變區(VL)之cDNA，
 - 內含性小鼠Ig- κ 增強子區域，
 - 人類免疫球蛋白 κ 基因(IGK)，其包括IGKC外顯子及帶有多聚腺苷酸化信號序列之IGK 3'UTR，
- 用於表現適於在真核細胞中進行營養缺陷型選擇之鼠類二氫葉酸還原酶(DHFR)之表現盒，其包括
 - SV40早期啟動子及起點之縮短形式，
 - 鼠類DHFR之編碼序列，

- SV40早期多聚腺苷酸化信號。

【0199】 將P6454轉染至CHO-K1細胞中且在用胺甲喋呤(MTX)選擇後分離穩定細胞系並使用針對人類IgG之ELISA篩選人類化抗體之產生。

【0200】

實例3

抑制原代正常人類皮膚纖維母細胞之活體外IL-17A介導之刺激

正常人類皮膚纖維母細胞(NHDF)因應IL-17刺激產生hIL-6。實施分析以量測在將細胞與抗IL17抗體在活體外預培育後NHDF細胞對此IL-17刺激之細胞介素產生之抑制。

在48孔板中以0.5ml/孔之體積中之 4×10^5 個細胞/ml之密度將NHDF細胞培養於纖維母細胞生長培養基-2 (Cambrex, 編號CC 3132)中。在37°C及5% CO₂下將NHDF細胞培育過夜以進行黏附。過夜培育後, 抽吸掉培養基且更換為300 μ l新鮮培養基, 然後用抗體在一系列抗體濃度下(3000 ng/ml、1000 ng/ml、300 ng/ml、100 ng/ml、30 ng/ml、10 ng/ml、3 ng/ml、1 ng/ml、0 ng/ml)將細胞處理30分鐘。使用100 μ l/孔之培養基(5 \times 濃縮)製造抗體稀釋系列。與抗體一起預培育30 min.後, 用10 ng/ml hIL-17 (100 μ l 50 ng/ml 5 \times 濃縮物, R&D Systems編號317-IL)刺激細胞且在37°C及5% CO₂下培育過夜(18 h)。對於未經刺激之對照, 使用100 μ l培養基(存在及不存在抗體)。培育時段後, 將上清液轉移至新鮮管中且立即分析或儲存在-80°C下直至藉由ELISA分析。

【0201】

實例4

人類IL6 ELISA

根據製造商之說明書使用 hIL-6 ELISA (BD Biosciences 編號 555220)來量測培養物上清液中之hIL-6含量以評價抗體抑制IL-17誘導之hIL-6之功效。

將100 μ l經稀釋捕獲抗體(以1:250稀釋於包覆緩衝液中)添加至96孔 Nunc Maxisorp板(Nunc編號456537)之每一孔且在4°C下培育過夜。將板抽吸，用洗滌緩衝液洗滌三次，用200 μ l/孔分析稀釋劑在室溫下封阻1小時。將板抽吸，用洗滌緩衝液洗滌三次，然後根據製造商之說明書添加100 μ l標準品及分析樣品並在室溫下培育2 h。將板抽吸，用洗滌緩衝液洗滌至少三次。將100 μ l結合物(檢測抗體+酶，以1:250稀釋於分析稀釋劑中)添加至每孔且在室溫下培育1小時。將板抽吸，用洗滌緩衝液洗滌至少五次。將100 μ l TMB受質添加至每孔且培育直至足夠色彩已顯影用於讀取。用50 μ l/孔之1 M H₂SO₄終止反應且在讀板儀上在450 nm之波長下在30分鐘內讀取。

【0202】

實例5

以表面電漿共振為主之分析(以SPR為主之分析)

在25°C下使用BIAcore 3000儀器實施所有量測。系統及樣品緩衝液係HBS-EP (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005%聚山梨醇酯20 (v/v))。使BIAcore CM5感測器晶片經受預處理程序。在流動槽上方經30 sec.相繼注射0.1% SDS、50 mM NaOH、10 mM HCl及100 mM H₃PO₄。

【0203】 根據製造商之說明書使用BIAcore 3000嚮導v. 4.1進行胺偶合程序。在感測器表面之EDC/NHS活化後，將多株山羊抗人類IgG抗體

(Jackson)固定於所有感測器流動槽(FC)上。以10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 持續7 min.使用10 mM NaAc (pH 5.0)中之30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多株山羊抗人類IgG抗體以固定抗體捕獲系統之約10,000 RU。藉由用乙醇胺飽和對表面去活化。用以10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 持續2 min結合huIgG分析物(Bayer)及用10 mM甘胺酸(pH 1.7)以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 持續3 min再生的5個循環來條件化人類捕獲系統感測器。

【0204】 第二，注射抗體以形成捕獲系統。

【0205】 第三，在所定義濃度範圍內注射抗原。在注射抗原後獲得之結合反應(共振單位，RU)與結合至抗體之抗原之量相關聯且針對所用抗原濃度範圍繪製。藉由適當電腦軟體(例如XLfit4、IDBS軟體)分析所得線圖，該電腦軟體擬合2-參數線條且因此容許確定y軸截距作為生物活性讀出。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
 <120> 以三維結構為主之人類化方法
 <130> P34329-FT
 <150> EP17183933.5
 <151> 2017-07-31
 <160> 49
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 灰倉鼠
 <400> 1

Gln Ile Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys Leu Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Gly Tyr Asn Ser Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Leu Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Leu Tyr Gly Gly Tyr Lys Asp Ala Phe Asp Ser Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 灰倉鼠

<400> 2

Gly Phe Ser Ile Thr Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr
 1 5 10

<210> 3
 <211> 16

<212> PRT
<213> 灰倉鼠

<400> 3

Tyr Ile Gly Tyr Asn Ser Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 灰倉鼠

<400> 4

Ser Leu Tyr Gly Gly Tyr Lys Asp Ala Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 灰倉鼠

<400> 5

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ile Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln His Arg Pro Asn Glu Thr Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Arg Ser Ile Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Gly Ile Asn Asn Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Gly Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
100 105

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 灰倉鼠

<400> 6

Lys Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Leu His
1 5 10

<210> 7

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 灰倉鼠

<400> 7

Phe Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 灰倉鼠

<400> 8

Gln Gln Ser Pro Gly Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 9

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 10

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Leu Ser Ile Ser Lys
 35

<210> 11
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2a

<400> 11

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 12
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2b

<400> 12

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 13
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2c

<400> 13

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg

1 5 10 15
 Gln Ala Pro Asp Gly Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 14
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2d

<400> 14

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Val Thr Ile Ser Val
 35

<210> 15
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2e

<400> 15

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 16
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2f

<400> 16

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 17
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2g

<400> 17

Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Thr Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 18
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2h

<400> 18

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Thr Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 19
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2i

<400> 19

Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Leu Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 20
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2j

<400> 20

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Val Thr Ile Ser Val
 35

<210> 21
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2k

<400> 21

Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Leu Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 22
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2l

<400> 22

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Val Thr Ile Ser Val
 35

<210> 23
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 HC-2m

<400> 23

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Asp Gly Thr Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Leu Thr Ile Ser Lys
 35

<210> 24
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 24

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 25
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 25

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 26
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 27
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Val Thr Ile Ser Val
 35

<210> 28
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 29
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 30
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 31
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 32
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 33
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Val Thr Ile Ser Val
 35

<210> 34
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Phe Thr Ile Ser Arg
 35

<210> 35
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 35

Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Val Thr Ile Ser Val
 35

<210> 36
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 36

Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Met Gly Val Ser Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Pro Pro Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser Leu Lys Ser Arg
 20 25 30

Leu Thr Ile Ser Lys
 35

<210> 37
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 LC-2a

<400> 37

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys
 20 25 30

Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val
 35 40

<210> 38
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 LC-2b

<400> 38

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys
 20 25 30

Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val
 35 40

<210> 39
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 LC-2c

<400> 39

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys
 20 25 30

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 35 40

<210> 40
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 LC-2d

<400> 40

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys
 20 25 30

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 35 40

<210> 41
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 LC-2e

<400> 41

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys
 20 25 30

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 35 40

<210> 42
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 變體 LC-2f

<400> 42

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys

20

25

30

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 35 40

<210> 43
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 43

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys
 20 25 30

Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val
 35 40

<210> 44
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 44

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu
 20 25 30

Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val
 35 40

<210> 45
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 45

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu
 20 25 30

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 35 40

<210> 46
 <211> 40
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 46

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu
20 25 30

Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val
35 40

<210> 47

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu
20 25 30

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
35 40

<210> 48

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<400> 48

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys
20 25 30

Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val
35 40

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 49

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110



201910515

【發明摘要】

【中文發明名稱】

以三維結構為主之人類化方法

【英文發明名稱】

THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE-BASED HUMANIZATION
METHOD

【中文】

本文報告使用以結構為主之評分矩陣為非人類抗體進行人類化之方法。使用該評分矩陣可確定(對)所選人類生殖系序列在指定位置之胺基酸殘基之特定(回復)突變的(必要條件及)適合性。該評分矩陣慮及該個別殘基之拓樸學、三維結構及相互作用及變化。藉此可測定特定胺基酸殘基變化對抗原結合性之影響。

【英文】

Herein is reported a method for the humanization of non-human antibodies using a structure-based scoring matrix. With the scoring matrix it is possible to determine (the requirement for and) the suitability of specific (back)mutations of amino acid residues at defined positions of a selected human germline sequence. The scoring matrix takes into account the topology, the three-dimensional structure and the interactions of the respective residue and change. Thereby the influence on antigen binding of a specific amino acid residue change can be determined.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種產生編碼人類化免疫球蛋白可變結構域之核酸序列之方法，其包含以下步驟

a) 比對非人類重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列
與

該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之第一人類化變體，該變體係藉由將該個別非人類抗體重鏈或輕鏈可變結構域之CDR或超變區或特異性決定殘基移植於以下序列上而獲得：

i) 與該非人類可變結構域具有最高序列同源性之人類生殖系胺基酸序列，

或

ii) 兩個或更多個人類生殖系胺基酸序列片段，其在比對時具有高於單一人類生殖系胺基酸序列之同源性，

或

iii) 容許維持VH/VL角之人類生殖系胺基酸序列
(具有最大程度之胺基酸序列一致性)，

b) 鑑別比對框架位置，其中該非人類重鏈或輕鏈可變結構域及該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之該第一人類化變體具有不同的胺基酸殘基，基於該差別而影響該可變結構域(與個別其他可變結構域組合成為Fv)之抗原結合性及/或三維結構，

c) 修飾該非人類重鏈或輕鏈可變結構域之該第一人類化變體，其係藉由用對該可變結構域(與個別其他可變結構域組合成為Fv)之直接抗原結

合性及/或該三維結構之影響小於該經替代胺基酸殘基的胺基酸殘基替代步驟b)中所鑑別出之一或多個胺基酸殘基，

d)產生編碼該經修飾可變結構域之核酸序列且藉此產生編碼人類化免疫球蛋白可變結構域之核酸序列。

【第2項】

如請求項1之方法，其中步驟b)進一步包含使用同源建模產生該等非人類可變結構域或該非人類抗體之三維模型。

【第3項】

如請求項1至2中任一項之方法，其中步驟b)進一步包含向所有胺基酸殘基指配拓樸分類器I (內部側鏈)、E (外部側鏈)、C (接觸重鏈-輕鏈)、A (抗原接觸)、L (抗原之連接體)、S (參與鹽橋)或N (均無=無具體相互作用)中之一者。

【第4項】

如請求項1或2之方法，其中步驟b)進一步包含將每一差別指配評分0、1、2、3或4。

【第5項】

如請求項3之方法，其中步驟b)進一步包含將每一差別指配評分0、1、2、3或4。

【第6項】

如請求項4之方法，其中

將評分0指配給具有該拓樸E之胺基酸殘基成為除脯胺酸外之任一胺基酸殘基之變化，成為脯胺酸之變化則指配評分3或4，

將評分0指配給具有該拓樸I之胺基酸殘基成為具有較小側鏈之胺基

酸殘基之變化，用具有多一個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分1，用具有多兩個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分2，用具有多三個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分3，且所有其他變化則指配評分4，

將評分4指配給具有該拓樸A之胺基酸殘基成為任一胺基酸殘基之變化，

將評分3指配給具有該拓樸C之胺基酸殘基成為非疏水胺基酸殘基之變化，

若該鹽橋暴露到溶劑，使具有該拓樸S之胺基酸殘基成為帶相反電荷或不帶電胺基酸殘基之變化時，則指配評分3，若該鹽橋在內部，則指配評分4。

【第7項】

如請求項5之方法，其中

將評分0指配給具有該拓樸E之胺基酸殘基成為除脯胺酸外之任一胺基酸殘基之變化，成為脯胺酸之變化則指配評分3或4，

將評分0指配給具有該拓樸I之胺基酸殘基成為具有較小側鏈之胺基酸殘基之變化，用具有多一個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分1，用具有多兩個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分2，用具有多三個碳原子之側鏈之胺基酸殘基替代時，指配其評分3，且所有其他變化則指配評分4，

將評分4指配給具有該拓樸A之胺基酸殘基成為任一胺基酸殘基之變化，

將評分3指配給具有該拓樸C之胺基酸殘基成為非疏水胺基酸殘基之

變化，

若該鹽橋暴露到溶劑，使具有該拓樸S之胺基酸殘基成為帶相反電荷或不帶電胺基酸殘基之變化時，則指配評分3，若該鹽橋在內部，則指配評分4。