



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117050176 A

(43) 申请公布日 2023.11.14

(21) 申请号 202310957514.5

C07K 16/28 (2006.01)

(22) 申请日 2018.07.27

C07K 16/46 (2006.01)

(30) 优先权数据

17183933.5 2017.07.31 EP

(62) 分案原申请数据

201880048859.6 2018.07.27

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·奥尔 G·乔治斯

S·克洛斯特曼 W·舍费尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

权利要求书3页 说明书52页

序列表(电子公布)

(54) 发明名称

基于三维结构的人源化方法

(57) 摘要

本文报道,使用基于结构的评分矩阵进行非人抗体的人源化的方法。利用该评分矩阵,可以确定在所选人种系序列的限定位置上氨基酸残基的特定(回复)突变的(要求和)适宜性。该评分矩阵考虑相应残基的拓扑学、三维结构以及相互作用和变化。因此,可以确定特定氨基酸残基改变对抗原结合的影响。

1. 一种产生抗体的方法,其包括以下步骤:

a) 对非人抗体的可变结构域进行测序(其氨基酸序列或编码的核酸序列),从而获得非人抗体的可变结构域的氨基酸序列,

b) 任选地产生所述非人抗体的三维同源性模型,

c) 针对每个可变结构域(对于i)和ii),彼此独立;对于iii)和iv),彼此依存),鉴定并选择以下作为可变结构域的受体序列

i) 与相应的非人抗体可变结构域具有最高序列同源性的人种系序列,或

ii) 一起形成一个完整的可变结构域的两个或更多个人种系序列片段,其中与单个人种系序列相比,当比对时,所述的序列片段与相应的非人抗体可变结构域具有更高的序列同源性,或

iii) 允许维持非人抗体的重链可变结构域与轻链可变结构域的夹角(VH/VL角)的人种系氨基酸序列,

iv) 人或人源化抗体的VH/VL对,

d) 将非人抗体的HVR/CDR残基嫁接到步骤c)中选择的受体序列上,

e) 定量非人抗体与步骤c)中选择的序列或步骤d)中获得的序列之间的结构差异(通过对氨基酸残基差异进行评分),

f) 基于上一步的定量,在所选序列或嫁接序列中引入氨基酸(回复和正向)突变,(基于上一步的定量/评分,突变步骤c)或步骤d)的氨基酸序列),

g) 合成或产生编码在f)中获得的氨基酸序列的核酸序列,

h) 培养包含g)的核酸的细胞,从而产生抗体。

2. 权利要求1的方法,其中,仅对非人抗体轻链可变结构域或非人抗体重链可变结构域,进一步执行所述方法。

3. 一种用于合成或产生或提供编码免疫球蛋白可变结构域的核酸序列的方法,其包括以下步骤

a) 比对非人抗体重链或轻链可变结构域的氨基酸序列

与

所述非人抗体重链或轻链可变结构域的第一人源化变体,其中所述第一人源化变体通过将非人抗体重链或轻链可变结构域的CDR或高变区(HVR)或特异性决定残基(SDR)嫁接到以下序列上而获得:

i) 与相应非人抗体重链或轻链可变结构域具有最高序列同源性的人种系氨基酸序列,或

ii) 形成一个完整的可变结构域的两个或两个以上人种系氨基酸序列片段,其中,与单个人种系氨基酸序列相比,所述的序列片段,在比对后,与相应的非人抗体可变结构域具有更高的同源性,

或

iii) 允许维持非人抗体可变结构域的VH/VL角的人种系氨基酸序列,

或

iv) 人或人源化抗体的重链或轻链,

(以实现最大水平的氨基酸序列同一性),

b) 定量比对的构架位置(或其中)的三维差异,其中在所述位置中非人重链或轻链可变结构域和所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体具有不同的氨基酸残基(由于该差异而影响抗原结合和/或三维结构)

c) 用比所替代的氨基酸残基对抗原结合和/或三维结构影响程度较小的(一个或多个)氨基酸残基(即得分较低),替换在步骤b)中确定的一个或多个氨基酸残基,来修饰(即突变)所述非人重链或轻链可变结构域氨基酸序列的第一人源化变体,以获得所述非人重链或轻链可变结构域的、具有减少的三维差异的新人源化变体,

d) 可选地,重复步骤b)和c),其中将在步骤c)中获得的新人源化变体作为第一人源化变体,直到由RMSD分析确定,三维差异不再改变/可能不再减小/小于10%为止,

e) 合成或产生或提供编码在步骤c)或d)中获得的修饰的可变结构域的核酸序列。

4. 一种生产免疫球蛋白的方法,其包括以下步骤

a) 分别对重链可变结构域和轻链可变结构域

- 比对非人重链或轻链可变结构域的氨基酸序列

与

所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体,其中所述第一人源化变体通过将非人抗体重链或轻链可变结构域的CDR或超变区或特异性确定残基嫁接到以下序列上而获得:

i) 与非人可变结构域具有最高序列同源性的物种系氨基酸序列,

或

ii) 两个或两个以上物种系氨基酸序列片段,其中所述片段在比对时比单个人种系氨基酸序列具有更高的同源性,

或

iii) 允许维持VH/VL角的人种系氨基酸序列,

或

iv) 人或人源化抗体的重链或轻链可变结构域,

(以实现最大水平的氨基酸序列同一性),

- 量化比对的构架位置处/中的三维差异,其中在所述位置,非人重链或轻链可变结构域和所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体具有不同的氨基酸残基,(由于该差异而影响抗原结合和/或三维结构)

- 替换在先前步骤中确定的一个或多个氨基酸残基(替换为比所替换的氨基酸残基对抗原结合和/或三维结构的影响程度较小的氨基酸残基(即得分较低)),来修饰/突变所述非人重链或轻链可变结构域氨基酸序列的第一人源化变体,以生成具有减小的三维差异的修饰的可变结构域,

- 可选地重复前两个步骤,其中将修饰的可变结构域作为第一个人源化变体,直到根据RMSD分析确定,三维差异不再改变/可不再减小/小于10%,

- 合成/产生/提供编码在先前步骤中获得的修饰的可变结构域的核酸序列,

b) 培养包含编码免疫球蛋白重链的核酸和编码免疫球蛋白轻链的核酸的哺乳动物细胞用于表达免疫球蛋白,其中所述编码免疫球蛋白重链的核酸包含编码步骤a)的经修饰的重链可变结构域的核酸,所述免疫球蛋白轻链包含步骤a)的经修饰的轻链可变结构域,

c) 从哺乳动物细胞或培养基中回收免疫球蛋白,从而产生免疫球蛋白。

## 基于三维结构的人源化方法

[0001] 本申请是申请日为2018年7月27日的、发明名称为“基于三维结构的人源化方法”的中国专利申请201880048859.6 (PCT/EP2018/070372)的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本文报道了使用基于结构的方法将非人抗体人源化的方法。利用本文报道的方法,可以确定在选定的人或人源化受体序列的限定位置上氨基酸残基的特定(回复或正向)突变的(要求和)适宜性。考虑相应残基的拓扑学、三维结构和相互作用以及其变化。由此解决特定氨基酸残基改变对抗原结合的影响。

### 背景技术

[0003] 抗体与其抗原的相互作用基于其3维结构。抗体互补位由6个CDR(互补决定区)环形成,可识别抗原表面的互补表位。在对小抗原(例如小分子)具有特异性的抗体的情况下,只有来自一些而非全部CDR的少数氨基酸参与抗原识别。通常,与VL(可变抗体轻链结构域)CDR相比,VH(可变抗体重链结构域)CDR(特别是VH CDR3)对于与抗原形成接触而言具有更大贡献,抗原-抗体接触的几何中心紧靠VH CDR3。参与直接抗原接触的CDR氨基酸残基称为特异性决定区(SDR)。通过分析抗原-抗体复合物的3维结构,可以基于氨基酸残基的距离,鉴定直接接触抗原的氨基酸残基。CDR之间间隔的FR(构架)残基也可以参与抗原识别,但程度较小(此类区域的表面可占抗原和抗体接触表面的最多15%) (例如,参见Altshuler, E.P., *Chemie* 50(2010)203-258; Bujotzek, A.等人, *mAbs* 8(2016)288-305)。

[0004] 二级和三级抗体结构公开在例如EP 0 239 400中。四个构架区主要采用 $\beta$ -折叠构象,而CDR形成连接 $\beta$ -折叠结构且在某些情况下构成 $\beta$ -折叠结构一部分的环。CDR通过构架区紧密靠近,并且与来自另一可变域的CDR一起促成抗原结合位点的形成(参见例如Poljak, RJ等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(1973)3305-3310; Segal, DM等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(1974)4298-4302, Marquart, M.等, *J. Mol. Biol.*, 141, (1980)369-391)。

[0005] 并非可变域内的所有残基都是溶剂可及的(参见,例如,Amit, A.G.等人, *Science*, 233(1986)747-753)。

[0006] 在一个结构域内,通过二硫键连接的两个 $\beta$ -折叠的堆积和方向(以及由此CDR环的末端)相对保守,尽管这些 $\beta$ 折叠在堆积和方向上确实发生小的迁移(例如,参见,Lesk, A.M.和Chothia, C., *J. Mol. Biol.*, 160, 325-342, 1982; Chothia, C.等, *J. Mol. Biol.*, 186(1985)651-653, 1985)。

[0007] 抗原结合位点两个部分的可变区通过链间非共价相互作用保持正确的方向。这些可能涉及CDR内的氨基酸残基。

[0008] 因此,为了将一个可变结构域的抗原结合能力转移到另一可变结构域,可能没有必要用来自供体可变区的完整CDR替换所有CDR。可能只需要从抗原结合位点转移那些可及残基——CDR残基以及构架残基。此外,还可能有必要的是,确保链间相互作用所必需的残

基保留在受体可变域中。

[0009] 免疫球蛋白分子的功能取决于其三维结构,而三维结构又取决于其一级氨基酸序列。

[0010] Bujotzek等人(MAbs.7(2015)838-852)公开了模建抗体的Fv区。WO 2005/061540公开了一种抗体的人源化方法以及由此获得的人源化抗体。Williams等人(“Antibody Engineering”,Springer(Berlin),2010,pp319-339)公开了通过CDR嫁接来人源化抗体。WO 2014/100542公开了高通量抗体人源化。Bujotzek等人(Prot.Struct.Funct.Bioinf.83(2015)681-695)公开了用于模建抗体可变结构域的VH-VL结构域取向的预测。WO 2016/062734公开了基于VH-VL-域间角的抗体人源化。

[0011] 发明概述

[0012] 本文报道了使用基于结构的方法将非人抗体人源化的方法。利用本发明方法,对于已被选择作为非人抗体CDR或其残基的受体的人或人源化受体序列,可以鉴定在该所选择的人或人源化受体序列的限定位置上氨基酸残基的特定(回复)突变(的要求)。该初始选择可以如本领域所公知的进行。待回复突变的残基的鉴定考虑相应残基的拓扑学,三维结构以及相互作用以及变化的影响。因此,可以对特定氨基酸残基改变对抗原结合的影响,做出改进的预测并定量。

[0013] 已经发现,与不使用额外的拓扑学特征、通过常规人源化方法获得的人源化抗体相比,通过本发明的方法获得的人源化抗体具有更多的人源性(humaneness)(人的特征)。

[0014] 根据本发明的方法包括必要步骤:对于非人抗体的互补决定区(CDR)转移的所选受体序列和亲本非人抗体之间的每个氨基酸差异,量化该差异对拓扑学,即三维结构和取向的影响。

[0015] 在一个实施方案中,(拓扑学)量化是通过分别为每个改变/差异赋分或为所有改变/差异共同赋分来完成的。该得分一方面基于改变的氨基酸残基之间的结构差异,另一方面基于所述改变的位置的拓扑学。在一个实施方案中,基于/使用三维同源性模型来分配分数。该得分反映了氨基酸差异对构架稳定性或CDR构象的影响,并且如下:0:无影响;1:影响轻微;2:影响中等;3:可能影响构架的稳定性;4:将破坏构架稳定性或CDR构象。

[0016] 通过为存在于任何人类种系序列中的相应位置的每个氨基酸残基差异分别分配分数,可以获得可能变化的完整矩阵。

[0017] 本发明至少部分基于以下发现:通过定量分析抗体的三维结构,更准确地,分析亲本非人抗体结构与人源化候选物结构之间的结构差异,可以鉴定出适宜的(和所需的)氨基酸变化,所述氨基酸变化对构架/CDR构象导致不同的,优选更低的影响/变形或甚至不导致影响/变形,并且由此尤其是增加该人源化抗体对其抗原的结合。因此,本发明提供了一种改进的人源化方法。

[0018] 本发明的一方面是,提供(或合成或鉴定或产生)编码(人源化)免疫球蛋白可变域的核酸序列的方法,其包括以下步骤

[0019] a) 比对非人重链或轻链可变域的氨基酸序列

[0020] 与

[0021] 所述非人重链或轻链可变域的第一人源化变体,其中所述第一人源化变体通过将相应的非人抗体重链或轻链可变域的CDR或高变区或特异性决定残基嫁接到如下序列上而

获得:

[0022] i) 与非人可变域具有最高序列同源性的人种系氨基酸序列,

[0023] 或

[0024] ii) 两个或两个以上人类种系氨基酸序列片段,其中所述片段在比对后形成一个完整的可变域,并且具有比单个人类种系氨基酸序列更高的同源性,

[0025] 或

[0026] iii) 允许维持VH/VL角度的人种系氨基酸序列,

[0027] 或

[0028] iv) 人源化抗体可变域,

[0029] (具有最大水平的氨基酸序列同一性),

[0030] b) 鉴定(比对的) 构架位置,其中在所述位置,非人重链或轻链可变域和所述非人重链或轻链可变域的第一人源化变体具有不同的氨基酸残基,并且由于该差异,所述位置影响该可变结构域(与相应的另一可变结构域组合为Fv)的抗原结合和/或三维结构,

[0031] c) 通过对步骤b)中鉴定的一个或多个氨基酸残基进行氨基酸残基替换,修饰所述非人重链或轻链可变域的第一人源化变体,其中用于替代的氨基酸残基比被替换的氨基酸残基对所述可变域(与相应的另一可变域组合为Fv)的抗原结合和/或三维结构具有较小的影响,

[0032] d) 合成编码修饰的可变结构域的核酸序列,从而提供(或合成或鉴定)编码免疫球蛋白可变结构域的核酸序列。

[0033] 在一个实施方案中,步骤b)还包括:使用同源性建模,产生所述非人可变结构域或非人抗体的三维模型。

[0034] 在一个实施方案中,步骤b)还包括:将拓扑学分类器I,E,C,A,L,S或N之一分配给各位置。

[0035] 在一个实施方案中,步骤b)还包括:向每个差异分配分数0、1、2、3或4。

[0036] 在一个实施方案中,步骤b)还包括:向每个差异分配分数0、1、2、3或4,其中

[0037] -对于拓扑学E的氨基酸残基,变化为脯氨酸以外的任何氨基酸残基,得0分,

[0038] -对于变化为脯氨酸,如果脯氨酸替代改变了该残基周围的phi和psi角,则该脯氨酸变化得3或4分,如果脯氨酸变化不改变该残基周围的氨基酸链的构象,则该脯氨酸变化得0或1分,

[0039] -对于拓扑学I的氨基酸残基,变为具有较小侧链的氨基酸残基,得0分;替换为侧链多一个碳原子的氨基酸残基,得1分;替换为侧链多两个碳原子的氨基酸残基,得2分;替换为侧链多三个碳原子的氨基酸残基,得3分;所有其他变化将得4分;

[0040] -对于拓扑学A的氨基酸残基,变化为任何氨基酸残基,得4分,

[0041] -对于拓扑学C的氨基酸残基,变化为非疏水性氨基酸残基,得3或4分,

[0042] -对于拓扑学S的氨基酸残基,变化为带相反电荷或不带电荷的氨基酸残基时,如果该盐桥暴露于溶剂,则得3分,如果盐桥在内部,则得4分。

[0043] 发明详述

[0044] 抗体的抗原结合位点由重链可变域(VH)和轻链可变域(VL)形成。这些结构域通过五链 $\beta$ -折叠相互作用,形成半径约8.4 Å的九链 $\beta$ -桶,结构域界面处的链彼此倾斜约50°。由

此,HVR,即由HVR氨基酸残基形成的氨基酸环,彼此紧密靠近。这从结构顶部看时可以看到。另外,HVR贡献VH/VL界面的25%或更多。

[0045] 为了确定CDR/HVR,本领域已经报道了不同的方法。最常用的方法是根据Kabat的定义,该定义基于抗体氨基酸序列的变异性(例如参见Sequences of Proteins of immunological Interest,USDepartment of Health and Human Services(1991))。另一种定义由Chothia报道(参见,例如,Chothia,C.等,J.Mol.Biol.227(1992)799-817; Tomlinson,I.M.等,EMBO J.14(1995)4628-4638),其中考虑了抗原结合位点以定义高变环。修订的Chothia编号方法基于Chothia编号方案,也包括具有位置校正的FR插入缺失(indel)的构架残基(参见例如Abhinandan,K.R.和Martin,A.C.,Mol.Immunol.45(2008)3832-3839)。另一种方法是Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用的AbM定义(例如,参见Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains.《Antibody Engineering Lab Manual》(Ed.:Duebel,S.和Kontermann,R.,Springer-Verlag,Heidelberg))。另一种方法称为增强的Chothia编号(由Martin A.C.R.提出;参阅例如<http://www.bioinfo.org.uk/index.html>,特别是<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)。另一种方法基于对抗体-抗原复合物晶体结构的分析,以确定“接触”HVR(MacCallum,R.M.等,J.Mol.Biol.262(1996)732-745)。North,B.等人(J.Mol.Biol.406(2011)228-256)提出了一种新颖的或扩展的规范比对(canonical alignment)。与Chothia的分析不同,他们发现,按照CDR类型(L1,L2等)和环长度将CDR分组,将最直观。被称为“CDR-长度组合”或简称为“CDR-长度”。他们定义了与最常用的Kabat和Chothia方案不同的CDR。本文报道的方法可以用这些方法中的任何一种来实施。

[0046] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中的这样每个区域,所述区域包含序列上高变的氨基酸残基片段(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上确定的环(“高变环”),和/或包含抗原接触残基(“抗原接触”)。通常,抗体包含六个HVR:VH中三个(H1,H2,H3),VL中三个(L1,L2,L3)。

[0047] HVR包括:

[0048] (a) 在氨基酸残基26-32(L1),50-52(L2),91-96(L3),26-32(H1),53-55(H2)和96-101(H3)的高变环(Chothia,C.和Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.196(1987)901-917);

[0049] (b) 在氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2),89-97(L3),31-35b(H1),50-65(H2)和95-102(H3)的CDR((Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991),NIH Publication 91-3242.);

[0050] (c) 在氨基酸残基27c-36(L1),46-55(L2),89-96(L3),30-35b(H1),47-58(H2)和93-101(H3)的抗原接触(MacCallum等人,J.Mol.Biol.,262:732-745(1996));和

[0051] (d) (a),(b)和/或(c)的组合,包括氨基酸残基46-56(L2),47-56(L2),48-56(L2),49-56(L2),26-35(H1),26-35b(H1),49-65(H2),93-102(H3)和94-102(H3)。

[0052] 除非另有说明,否则可变区中的HVR残基和其他残基(例如FR残基)在本文中根据Kabat等人(同上引文)进行编号。

[0053] 因此,本文中使用的Kabat CDR/HVR定义报告的方面和实施方案同样可以使用其他CDR/HVR确定方法之一来实施。下表提供了使用不同方法确定的HVR残基的比较。

	<b>Kabat</b>	<b>Chothia</b>	<b>AbM</b>	<b>contact</b>
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
[0054] HVR-H1 (根据 Kabat)	31-35B	26-32	26-35B	30-35B
HVR-H1 (根据 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

[0055] 除了不同的CDR定义之外,还可以获得编号可变域氨基酸残基的不同方法。Kabat和其合著者(Wu, T. I.和Kabat, E. A., J. Exp. Med. 132 (1970) 211-250; Kabat, E. A., 等, Sequence of Proteins of Immunological Interest. Bethesda: National Institute of Health (1983))使用基于序列比对和同源性的编号。Chothia和Lesk (Chothia, C.和Lesk, A. M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917; Chothia, C.等, Nature, 342 (1989) 877-883)使用基于结构比对的编号。Lefranc及其同事(Giudicelli, V. et al., Nucl. Acids Res. 25 (1997) 206-211; Lefranc, M. P., et al., Dev. Comp. Immunol. 27 (2003) 55-77)开发了IMGT编号方案。Aho编号方案(Honegger, A. and Plueckthun, A., J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670)基于空间比对的3D结构。

[0056] WolfGuy编号将CDR区域定义为Kabat和Chothia定义的并集。此外,该编号方案基于CDR长度(且部分基于序列)对CDR环端进行注释,以便CDR位置的索引指示CDR残基是升环还是降环的一部分。下表列出了与已建立的编号方案的比较。

[0057] 表:使用Chothia/Kabat (Ch-Kb), Honegger和WolfGuy编号方案对CDR-L3和CDR-H3进行的编号。后者具有从N端基础到CDR峰递增的编号,以及从C端CDR末端开始递减的编号。Kabat方案固定最后两个CDR残基,并引入字母以适应CDR长度。与Kabat命名法不同,Honegger编号不使用字母,并且对于VH和VL是通用的。

[0058]

<b>WolfGuy VL</b>	<b>Ch-Kb VL</b>	<b>Honegger</b>	<b>Ch-Kb VH</b>	<b>WolfGuy VH</b>
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
785		124	100j	385
786		125	100k	386
787		126	100l	387
788		127		388
789		128		389
790		129		390
791		130		391

[0059]

WolfGuy VL	Ch-Kb VL	Honegger	Ch-Kb VH	WolfGuy VH
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

[0060] 表:VH(左)和VL(右)序列,以WolfGuy,Kabat和Chothia编号。

[0061]

WolfGuy	Kabat	Chothia	WolfGuy	Kabat	Chothia
101	1	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
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

[0062]

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia	
CDR-H1	124	24	24	CDR-L1	551	24	24	
	125	25	25		552	25	25	
	151	26	26		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	
	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	
	VH-构架 2	201	36		36	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	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		
			VL-构架 2	601	35	35		
				602	36	36		
				603	37	37		
				604	38	38		
				605	39	39		
				606	40	40		
				607	41	41		
				608	42	42		
				609	43	43		
				610	44	44		
				611	45	45		
				612	46	46		
				613	47	47		
				614	48	48		
				615	49	49		
			CDR-L2	651	50	50		
				652	*	*		
				653	*	*		
				692	*	*		
				693	*	*		
				694	51	51		
				695	52	52		
				696	53	53		

[0063]

	WolfGuy	Kabat	Chothia		WolfGuy	Kabat	Chothia
VH-构架 3	288	54	54	VL-构架 3	697	54	54
	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
	301	66	66		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		
319	82b	82b	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		
				CDR-L3			

[0064]

	WolfGuy	Kabat	Chothia
	331	93	93
	332	94	94
CDR-H3	351	95	95
	352	96	96
	353	97	97
	354	98	98
	355	99	99
	356	100	100
	357	100a	100a
	358	100b	100b
	359	100c	100c
	360	100d	100d
	361	100e	100e
	362	100f	100f
	363	100g	100g
	364	100h	100h
	365	100i	100i
	385	100j	*
	386	100k	*
	387	100l	*
	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	
VH-构架 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

	WolfGuy	Kabat	Chothia
	756	94	94
	757	95	95
	758	95a	95a
	793	95b	95b
	794	95c	95c
	795	95d	95d
	796	95e	95e
	797	95f	95f
	798	96	96
	799	97	97
VL-构架 4	801	98	98
	802	99	99
	803	100	100
	804	101	101
	805	102	102
	806	103	103
	807	104	104
	808	105	105
	809	106	106
	810	107/106A	107

[0065] WolfGuy经设计使得结构上等价的残基(即,就Fv结构中的保守空间定位而言非常相似的残基)可以(尽可能地)用等价的索引编号。

**[0066]** 人源化方法

**[0067]** 抗体人源化的一般方法描述于例如WO 92/22653;Bajorath,等,J.Biol.Chem.270 (1995) 22081-22084;Iba, Y.,等,Prot.Eng.11 (1998) 361-370;WO 2002/84277;Luo等,J. Immunol.Meth. 275 (2003) 31-40;WO 2004/006955;US2004/0133357;Yazaki等, Prot.Eng.Des.Sel.17 (2004) 481-489;WO 2005/061540;WO 2006/096653;US2006/0258852;WO 2007/109742;Leem,J.,等,mAbs 8 (2016) 1259-1268;US 5,861,155,US 6,479,284,US2000/0660169,US 6,407,213,US1993/0146206,US 6,639,055,US2000/0705686,US 6,500,931,US 5,530,101,US 5,585,089,US 5,693,761,US 5,693,762,US 6,180,370,US2003/0229208,US2003/0389155,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,US2003/0166871,US2002/0078757,US 5,225,539,US 6,548,640,US 5,624,821,Jones等,Nature 321 (1986) 522,Verhoeyen等,Science 239 (1988) 1534,Sims等,J. Immunol.151 (1993) 2296,Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196 (1987) 901,Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89 (1992) 4285,Presta等,J. Immunol.151 (1993) 2623,Padlan,Mol. Immunol.28 (1991) 489-498,Studnicka et al,Prot.Eng.7 (1994) 805-814,Roguska,等,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,和US 6,204,023。

**[0068]** 下面更详细地概述本发明之前在本领域中使用的一些人源化方法。

**[0069]** 减少旨在用于人类治疗用途的非人抗体的免疫原性的第一种本领域方法是,“嵌合抗体”的产生。嵌合抗体是通过将非人抗体轻链和重链的完整可变域嫁接到人恒定区(用于重链可变域的为CH1-铰链-CH2-CH3,用于轻链可变域的为CL)而获得的。这些嵌合抗体具有降低的免疫原性,但是仍然诱导受体的免疫反应(参见,例如,WO 86/01533;US 4,816,567;Morrison,S.L.,等Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81 (1984) 6851-6855;Morrison,S.L.和Schlom,J.,Important Adv.Oncol. (1990) 3-18;Morrison,L.,Science 229 (1985) 1202-1207;Oi,V.T.和Morrison,S.L.,BioTechniques 4 (1986) 214-221;Gillies,S.D.,等,J. Immunol.Methods 125 (1989) 191-202;US 5,807,715;US 4,816,397)。

**[0070]** US2003/0054407公开,尽管蛋白质可能具有天文数字的可能构象(对于100个残基的小蛋白质而言大约为 $10^{16}$ ),但是所有抗体总体上采用特征性的“免疫球蛋白折叠”。进一步公开,热力学计算分析可以用于评估测试序列与靶结构模板的结构相容性。结构评估基于经验和参数化功能,旨在减少后续必要的体外筛选次数。该函数由三个能量项组成:非极性溶剂化(nonpolar solvation),侧链熵和静电能。

**[0071]** 本领域中降低免疫原性的另一种方法是“重塑”(reshaping)。在这种方法中,首先,将非人抗体的仅HVR(供体抗体;根据Kabat确定)以及由此非人抗体的“抗原结合特性”转移到人可变域(受体抗体)上。因此,相应的人区域被非人区域代替。术语“相应的”表示,当比对相应序列时位于对应位置的单个氨基酸残基或一段氨基酸残基。与人恒定区组合,

获得“人源化抗体”(参见,例如,EP 0 239 400;US 5,225,539;US 5,530,101;US 5,585,089;WO 91/09967;Jones,P.T.等,Nature 321(1986)522-525;Verhoeyen,M.,et al., Science 239(1988)1534-1536;Riechmann,L.等,Nature 332(1988)323-327)。嫁接的成功取决于非人供体抗体和人受体抗体三维结构的相似性。推测,通过具有相似的三维结构,HVR和特定构架残基之间的接触也可以保留。EP 0 578 515公开了通过利用比较性模型构建的方法生产人源化单克隆抗体的方法。EP 0592106公开了一种产生抗体或其片段的方法,所述抗体或其片段包含啮齿动物抗体可变区的人源化重链和轻链,所述方法包括:根据来自一组抗体可变区重链和轻链的x射线晶体学结构的相对可及性分布,仅在构架位置中,产生序列比对,以得到一组重链和轻链表面暴露的构架位置。

[0072] 为了嫁接人种系,在本领域中选择具有最大“同源性”的成熟或共有抗体可变区作为受体。术语“同源”,“同源性”或“同源的”表示序列或结构或功能的同一性(等同性)。同源性可以使用本领域技术人员已知的方法来确定,例如,FASTA,BLAST(Mount,D.M.,(2004) in Bioinformatics:Sequence and Genome Analysis 2nd ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press:Cold Spring Harbor,NY.ISBN 0-87969-608-7),EMBOSS,MPsrch或 Scanps。

[0073] 可以使用本领域技术人员已知的任何方法或计算机程序来执行“序列比对”。比对可以基于序列和/或结构同源性(参见,例如,WO 2012/006490)。

[0074] 为了鉴定两个序列的最佳匹配的局部(片段序列)或整体(总序列)比对,可以采用成对的比对方法。成对比对可以执行一次或多次。可以使用本领域技术人员已知的不同方法进行成对比对,例如点-矩阵方法,动态编程,BLAST2SEQ和字方法。

[0075] 多重序列比对是同时对两个以上序列进行的成对比对的扩展。在多重比对中,所有查询序列彼此比对,并且保守的序列残基和/或区域被鉴定。

[0076] 局部比对可以使用例如Smith-Waterman算法(Smith,T.F.和Waterman,M.S., J.Mol.Biol.147(1981)195-197)进行。全局对齐可以使用例如Needleman-Wunsch算法(Needleman,S.B.和Wunsch,C.D.,J.Mol.Biol.48(1970)443-453)进行。

[0077] 可以按如下方式计算所讨论的两个序列的“同源性”或“序列同一性”:排列所讨论的序列以产生最佳比对,即错配和缺口的数量最少(可以在一个或两个序列中引入缺口)。通常,为了比较目的而比对的参考序列部分为参考序列总长度的至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,或100%。此后,比较在相应位置的氨基酸残基。如果在第一序列和第二序列的相应位置存在相同的氨基酸残基,则该序列在该位置相同(如本文所用,氨基酸或核酸的“同一性”等同于氨基酸或核酸的“同源性”)。两个序列之间的序列同一性(通常以百分比数值给出)取决于两个序列共享的相同位置的数目,其中考虑为了获得两个序列的最佳比对而已经添加到序列中的空位的数目和每个空位的长度。

[0078] 尽管有序列比对,也可以进行结构比对,例如,使用DALI方法(Holm,L.和Sander,C.,Science 273(1996)595-603),SSAP方法(顺序结构比对程序;Taylor,WR等,Prot.Sci.3(1994)1858-1870),或组合扩展方法。

[0079] 必须指出的是,可以在一个、多个或所有比对的序列中,在相同或不同位置插入空位,以获得具有增加的序列同一性延伸的比对。

[0080] 在“最佳匹配”方法中,所讨论的非人可变域与人可变域比对。选择与非人序列最

相似的人序列作为受体 (Sims, MJ, 等人, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; Chothia 等人, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917)。

[0081] 在“共有”方法中,特定构架序列源自具有特定亚组的轻链或重链的所有人类抗体的共有序列。例如,共有序列可以源自最丰富的人类亚类,VL6亚组I (VL6I) 和VH亚组III (VHIII) (Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Presta, L., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632)。

[0082] 在本领域的另一种方法中,基于人CDR与待人源化的小鼠抗体的CDR的结构相似性,从人种系基因的集合中选择人构架序列。可以通过对小鼠CDR与具有相同Chothia规范结构的人候选物进行残基至残基的同源性评分,评估结构相似性。不引入任何人类构架的突变(参见例如Hwang, W.Y.K.等, *Methods* 36 (2005) 35-42)。

[0083] 本领域认为,人源化抗体与非人抗体的同源性越高,则如下风险也将越小,所述风险为:在将非人CDR引入所选人构架中时,也引入CDR或构架变形、从而导致人源化抗体的抗原结合特性降低或甚至完全丧失的风险。

[0084] 因此,在本领域中,首先选择具有高于阈值的序列同一性(不包括CDR)的可变域作为受体序列。此阈值可以低至65%,但也可以高达80%或更高。但是事实证明,在大多数情况下,不可能通过简单的CDR嫁接将非人抗体的结合特性转移至人源化抗体。为了至少部分地恢复结合特性,经常地,需要非人抗体的CDR或构架中的额外残基的回复突变。需要这些额外的残基来保留CDR三维构象。由于这些另外转移的残基是所选受体抗体内的突变,它们被称为“回复突变”(参见例如Kabat, E.A. and Wu, T.T., *J. Immunol.* 147 (1991) 1709-1719; Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; Co, M.S. and Queen, C., *Nature* 351 (1991) 501-502; Tempest, P.R., et al., *Biotech.* 9 (1991) 266-271; WO 92/04381)。

[0085] 术语“回复突变”或“回复至[非人物种]突变”是指,为了改善人源化抗体的特性,氨基酸残基从人残基还原为非人物种残基。这也可以是体细胞突变的氨基酸,其被相应的种系残基取代。为了鉴定候选残基用于回复突变,将初始人源化抗体的氨基酸序列与相应的种系序列比对,所述种系序列可以获自例如VBASE数据库(VBASE是所有人种系可变区的综合目录)。必须检查被鉴定为回复突变的候选残基的每个氨基酸残基是否直接或间接参与抗原结合。鉴定为(例如在突变后)能够修饰人源化抗体的特征的氨基酸残基,应恢复为非人残基。

[0086] 然而,与非人抗体相比,通过使用嫁接的本领域方法人源化的抗体的结合亲和力,通常显著降低。然而,难以预测应当引入哪些非人残基以获得具有与非人抗体相似的结合效率的人源化抗体,这在很大程度上是经验性的并且不能被教导。

[0087] 本领域已经概述如下构架残基是重要的残基:所述构架残基在非人抗体中是不常见的并且靠近抗原结合残基,或者所述构架残基是堆砌残基(packing residue),或者是所谓的韦尼尔区(Vernier-Zone)中的残基,以及与抗原接近的残基(参见例如Martin和Thornton, *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 800-815; Foote等人, *J. Mol. Biol.* 224 (1992) 487-499)。

[0088] WO 90/07861公开了设计人源化抗体的四个规则:1) 人受体和非人供体序列之间的同源性;2) 当受体氨基酸在该位置不常见时,使用供体而不是受体的氨基酸;3) 在CDR附近的位置使用供体构架氨基酸;4) 在3-D模型中侧链原子位于CDR的3埃内的构架位置,使用

供体氨基酸。

[0089] 本领域中的另一种人源化方法是“SDR嫁接”。该方法基于以下发现：与形成CDR的氨基酸残基数相比，实际上较少数量的氨基酸残基会与抗原接触，并因此确定抗体的结合特异性。这些残基被称为“特异性决定残基(SDR)”。它们约占总CDR残基数的三分之一。在嫁接过程中可以仅转移这些残基(参见例如Padlan等人,FASEB J.9(1995)133-139;Kashmiri等人,Methods 36(2005)25-34)。

[0090] 本领域中用于将非人抗体人源化的另一种方法是“饰面”(veneering)(也称为“表面重塑”,resurfacing)(例如,参见EP 0 592 106;EP 0 519 596;Studnicka,et al.,Prot.Eng.7(1994)805-814;Roguska,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(1994)969-973;WO 2004/016740)。通过分析人和鼠抗体,可以确定特定的表面/溶剂暴露的氨基酸残基。表面残基通常具有30%或更高的相对溶剂可及性(参见例如Pedersen,J.等人,Mol.Biol.235(1994)959-973)。公开了特定的表面位置优先于特定的有限数量的残基(参见例如Padlan,et al.,Mol.Immunol.28(1991)489-498;Pedersen,et al.,J.Mol.Biol.235(1994)959-973;Roguska et al.,Prot.Eng.9(1996)895-904)。由于免疫原性似乎与表面特性相关,通过替换与人残基不同的非人抗体中的暴露残基,由此可以降低免疫原性。通过这种方法,旨在通过给鼠抗体提供人源化表面来掩盖鼠抗体(参见例如Mark等,Handbook of Experiment Pharmacology,第113卷,Springer,105-134(1994))。

[0091] 本领域中的另一种方法被称为“超人源化”。该方法包括:获得由非人成熟抗体基因编码的肽序列用于主题可变区,为非人抗体可变区内的至少两个CDR鉴定第一组规范CDR结构类型。然后获得用于人抗体的人抗体可变区的肽序列文库。在下一步中,为人可变区序列文库中每个序列的至少两个CDR,鉴定规范CDR结构类型(即,第二组规范CDR结构类型)。通过比较第一组规范CDR结构类型与第二组规范CDR结构类型(即,在可变区内相应位置,比较小鼠规范CDR结构类型与人规范CDR结构类型),从该文库中选择候选序列的子集,和选择这样的人序列,其中对于这些CDR序列,在所述非人和人可变区中相应位置上,第二组规范CDR结构与第一组规范CDR结构类型相同。该方法使用这些候选人可变区序列作为构建嵌合分子的基础,该嵌合分子包括来自非人可变区(例如,小鼠CDR)的至少两个CDR序列与来自候选人可变区序列的构架区。其结果是,嵌合抗体在可变区的相应位置处包含各非人CDR序列分别对各人CDR序列的替代,从而使得嵌合抗体中的构架序列与候选人构架序列相差不超过10个氨基酸残基(参见WO 2004/006955;Tan,P.等人,J.Immunol.169(2002)1119-1125)。

[0092] 用于抗体人源化的本领域的另一种方法是基于对抗体人源性(humaneness)的度量,称为人字符串含量(Human string content,HSC)。该方法将小鼠序列与人种系基因库(repertoire)进行比较,并将差异记为HSC。然后通过最大化其HSC而不是使用全局同一性度量来生成多个多样的人源化变体,从而将靶序列人源化(Lazar等人,Mol.Immunol.44(2007)1986-1998)。

[0093] 本领域中的另一种方法是“构架改组”。在这种方法中,将来自所有已知构架的各个构架分别与相应的非人CDR组合,并且表达和筛选具有四个构架与三个CDR的任何组合(Dall'Acqua,WF等,Methods 36(2005)43-60;Damschroder,MM,等人,Mol.Immunol.44(2007)3049-3060)。

[0094] 本领域中的另一种方法是“人工程化”(humaneering)。在本文中,最小特异性决定子(MSD)是通过将可变域的各单个非人区域顺序变化为人对应物并筛选该相应的部分人源化的抗体文库的成员的结合来实验确定的。这可以通过在转移D片段、或CDR3、或CDR3-FR4、或任何包含最小必需结合特异性决定簇的CDR3-FR4片段的情况下转移最小必需结合特异性来实现。推测,使用这种方法可以保留结合表位,并且可以分离出与人种系基因抗体91-96%同源的抗体(参见例如WO 2005/069970)。

[0095] 因此,从以上可以看出,本领域中使用的术语“人源化抗体”表示,该抗体包含来自非人抗体的最少数量氨基酸残基但具有与非人抗体相当的抗原特异性和亲和力,且同时该人源化抗体在应用于人时不具有免疫原性或仅具有非常低的免疫原性。

[0096] 本领域的另一种方法是基于对非人抗体和不同人源化抗体变体的三维模型的分析 and 比较,以鉴定残基在抗原结合中的可能作用。由此可以鉴定与非人抗体的结合特性有关的供体残基。

[0097] 在1990年左右,本领域采用了第一种建模方法来解决人源化抗体亲和力降低的问题。这是两步法,其中通过三级结构建模,基于氨基酸序列同源性、以及来自非人抗体的推定CDR接触残基的比对,来选择人构架区(参见例如Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; Co, M. S., et al., 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)。

[0098] 可变域的三维结构以及由此CDR的三维构象由氨基酸-氨基酸相互作用组成,例如离子相互作用,氢键或疏水相互作用。

[0099] 不同的氨基酸残基由于其结构而具有不同的性质,因此,从一个氨基酸残基改变为不同的氨基酸残基可能影响可变结构域的三维结构/稳定性,从而影响人源化抗体的特性。

[0100] 例如,用氨基酸残基丙氨酸替换氨基酸残基甘氨酸会引入新的CH<sub>3</sub>基团,从而由于空间需求的增加而减少了该氨基酸残基的可能取向,从而降低了构象的灵活性并增加了解折叠的熵,导致可变结构域的构象稳定性提高(Manning, MC等, Pharm. Res. 6 (1989) 903-917)。

[0101] 蛋白质折叠通过疏水相互作用的形成而开始。

[0102] 各个氨基酸残基、氨基酸序列段或多肽区域可被表征为亲水或疏水的。Black和Mould (Anal. Biochem. 193 (1991) 72-82) 为各个氨基酸残基定义了以下疏水性顺序(从最大疏水性到最大亲水性):

[0103] Phe>Leu=Ile>Tyr≈Trp>Val>Met>Pro>Cys>Ala>Gly>Thr>Ser>Lys>Gln>Asn>His>Glu>Asp>Arg.

[0104] 下表列出了Black和Mold报告的疏水性换算值(scaled value)。

[0105]

氨基酸	疏水性值	氨基酸	疏水性值	氨基酸	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

[0106] 基于小分子结构的键长和角度,氨基酸残基的三维取向可以被认为是“标准几何形状”(参见,例如,Weiner,SJ等,J.Amer.Chem.Soc,106(1984)765-784)。

[0107] 在“同源性建模”方法中,基于参考抗体的已知三维结构,生成抗体的计算三维近似结构(approximation)或模型。由于参考抗体和所讨论的抗体具有相关的三维结构,因此可以在参考抗体和所讨论的抗体之间产生比对。将这两种抗体的氨基酸序列进行比对,并且将相同序列段的三维坐标直接从参考抗体转移至所讨论的抗体。在两种抗体的不相同部分(即,源自不同氨基酸残基、插入或缺失),基于通用结构模板和能量精细化,来确定三维坐标。同源性建模可用于鉴定可能参与了支持由CDR形成的结合位点的结构的非人抗体残基(参见,例如,Kolinski et al.,Proteins.37(1999)592-610;Rost et al.,Protein Sci.5(1996)1704-1718;US 7,212,924;US 6,256,647;US 6,125,331;Xiang,et al.,Curr.Prot.Pept.Sci.7(2006)217-227)。

[0108] 可以通过将一个三维结构叠加在另一个三维结构上来进行不同三维结构的比对。因此,例如,一个是三维固定的,而另一个可以在空间上旋转和平移,以便使二级结构元件 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠定向,从而尽可能地将它们叠合(在空间位置和方向上相似/接近)。

[0109] 比对后,针对每个氨基酸残基,计算相似的伯碳原子( $C\alpha$ )之间的距离。基于这些距离,可以评估哪些氨基酸残基具有相同位置,哪些氨基酸残基具有不同位置。通常,如果氨基酸残基的 $C\alpha$ - $C\alpha$ 距离为1.0 Å或以下,则该位置可被视为三维相似或甚至相同;如果氨基酸残基的 $C\alpha$ - $C\alpha$ 距离大于1.0Å,则该位置可以认为是三维不同的。

[0110] 为了进一步改善比对,可以对模型进行能量最小化,其中 $C\alpha$ 坐标是固定的(否则,比对将再次变差)。由此,在比对形成期间引入的“不寻常的”键长度和角度可以返回到标准(化学上可接受的)几何形状。

[0111] 所识别的构架氨基酸残基影响人源化抗体的结合特性的可能性,取决于空间距离。基于结构模型,基于距CDR中残基的空间距离,对鉴定为可能干扰抗原结合的残基进行排序。通常,在任何CDR原子的4.5Å范围内的残基均被视为是潜在相互作用的残基。

[0112] 如今,三维免疫球蛋白模型是普遍可得的,并且是本领域技术人员所熟悉的。已知不同类别的免疫球蛋白的三维构型(参见,例如,Abbas等人,Cellular and Mol.Immunology,第4版,W.B.Saunders,Co.,(2000))。借助于专门化的计算机程序,可以展示抗体可变结构域的计算三维构象结构(参见例如US 5,821,337)。晶体结构数据库(例如Protein Data Bank,pdb)可以用作结构的来源(参见例如Bernstein,F.C等人,J.Mol.Biol.,112(1977)535-542)。

[0113] WO 2006/096653公开了一种人源化免疫球蛋白(Ig)可变区的方法,所述Ig可变区包括:a)来自受体免疫球蛋白可变区的可变区构架(FR)氨基酸残基;和b)来自非人供体免疫球蛋白可变区的互补决定区(CDR),该方法包括:i)提供允许预测至少一个CDR的3-D构象的数据;ii)鉴定哪些FR氨基酸残基经预测会影响该至少一个CDR的3-D构象;iii)鉴定至少一个候选供体CDR氨基酸残基以替换为选择的氨基酸残基,其中选择的氨基酸残基在构象上适应供体免疫球蛋白可变区和受体免疫球蛋白可变区之间的FR氨基酸残基差异,而不会

影响CDR构象:和iv)用所选择的氨基酸残基取代该至少一个候选供体CDR氨基酸残基,以形成人源化免疫球蛋白可变区。其中还公开了一种设计人源化免疫球蛋白可变区的方法,所述可变区包括:a)来自受体免疫球蛋白可变区的可变构架区(FR)和b)来自非人供体免疫球蛋白可变区的互补决定区(CDR),该方法包含:(a)鉴定在受体免疫球蛋白可变区和供体免疫球蛋白可变区之间不同的构架区(FR)氨基酸;(b)鉴定与步骤(a)中鉴定的FR氨基酸相邻的氨基酸;(c)从步骤(b)鉴定的氨基酸中鉴定至少一个候选氨基酸,以用选择的氨基酸残基取代,所述选择的氨基酸残基在构象上适应步骤(a)中鉴定的FR氨基酸。

[0114] US2006/0258852公开了通过使用基于结构的计算设计方法来重新设计可变区序列(例如,CDR序列和任选的FR序列)的示例性方法。柔性区(flexible zone)中残基的身份被固定为受体残基,但在计算过程中允许更改其3维位置。允许突变区(mutation zone)中的残基改变其氨基酸身份和构象。突变区以外的CDR中的所有残基均为供体的,而突变区外的FR中的所有残基均为受体的。在该方法中,对于具有在几何上接近(例如,在这些区域的约4-25 Å内,特别是< 5 Å的距离内)构架中的一个或多个(如步骤2中所鉴定的)重要残基差异的侧链的候选残基(例如CDR残基,和任选地FR残基),通过计算同时突变为20种天然氨基酸中任何一种的所有可能的3维构象(旋转异构体),并通过计算评估所得的突变体。一种这样的方法称为侧链重堆砌(repacking)方法。在侧链重堆砌计算中,候选氨基酸残基可以通过计算进行修饰,并且所得多肽突变体的稳定性可以通过计算进行评估。侧链重堆砌计算产生具有改变的稳定性(即,改变的分子内能量)的排序变体列表。然后,可以选择产生低自由能并通过3维模型的目视检查确认为构象可容纳的突变体,用于实验表达。可以通过计算出的突变体的稳定性,对计算产生的突变体列表进行分选,以便产生将通过实验表达的变体列表。在计算中,蛋白质骨架被允许非常小的柔性或没有柔性,这可以确保设计的突变体经预测在给定的CDR构象下是稳定的。因此,通过该计算分析,可以预测在可变区内与给定FR结构域在结构上相容的序列,特别是CDR序列。

[0115] WO 2007/109742公开了一种设计人源化免疫球蛋白的方法,其包括以下步骤:a)确定亲本抗体可变域或与半抗原结合的亲本抗体可变域的三维结构;b)鉴定所述亲本结构的特异性确定残基(SDR);c)将所述结构划分为包含六个互补决定区(CDR)环和构架区(FR)(重链和轻链)的部分;d)将所述部分的三维结构叠加到人受体抗体的相应三维CDR环和构架结构的确定数据库上;e)将亲本SDR嫁接到选定的受体结构中,以确定所述人源化免疫球蛋白的氨基酸序列的模型;f)计算氨基酸残基取代的能量值;g)通过选择具有负能量值的残基来优化所述人源化免疫球蛋白的氨基酸序列;h)指定人源化免疫球蛋白可变区区段的氨基酸序列。

[0116] 通常,在本领域中,从数据库中选择具有特定相似性(例如>70%序列同源性)的可变域,并将其用于同源性模型的产生。

[0117] Worn,A.和Plueckthun,A.(J.Mol.Biol.305(2001)989-1010)报告,抗体的稳定性受许多因素影响,包括(1)影响其固有稳定性的各结构域的核心堆砌,(2)对HC和LC配对有影响的蛋白质/蛋白质界面相互作用,(3)极性和带电荷残基的掩埋,(4)极性和带电荷残基的H键网络;(5)在其他分子内和分子间力中表面电荷和极性残基的分布(参见,例如,US 2012/0064095)。

[0118] 人源化科学家的目的是为人源化抗体提供例如降低的免疫原性,优化的抗原结

合,亲和力(affinity),亲合性(avidity)和/或半衰期。

[0119] 产生不同的人源化变体并通过合适的筛选方法进行评估。有多种已知的抗体筛选方法,例如体外测定,体内和基于细胞的测定,以及选择方法。通常,这样的测定是结合测定,其中抗体结合其靶标并且测定该结合或测定由结合引发的效应。

[0120] 结合测定试验中结合确定可以使用不同的方法进行,例如,基于FRET(荧光共振能量转移),基于BRET(生物发光共振能量转移)的测定,AlphaScreen®(放大的发光邻近均相测定),闪烁邻近测定,ELISA(酶联免疫吸附测定),SPR(表面等离子体共振),等温滴定量热法,差示扫描量热法,凝胶电泳和包括凝胶过滤的色谱法。

[0121] 基于抗体的结合亲和力筛选抗体的一种优选方法是表面等离子体共振(SPR)。该方法尤其允许确定结合事件的缔合速率( $k_a$ ,  $k_{on}$ )和解离速率( $k_d$ ,  $k_{off}$ ) (参见例如Jonsson和Malmquist, *Advances in Biosensors*, 2 (1992) 291-336; Wu等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998) 6037-6042)。

[0122] 已知用于筛选和选择抗体的不同方法,例如噬菌体展示(肽和蛋白质的噬菌体展示:实验室手册, Kay等, Academic Press, San Diego, Calif., (1996); Lowman等, *Biochemistry* 30 (1991) 10832-10838; Smith, *Science* 228 (1985) 1315-1317), 选择性噬菌体感染(Malmborg等, *J. Mol. Biol.* 273 (1997) 544-551), 选择性感染性噬菌体(Kreber等, *J. Mol. Biol.* 268 (1997) 619-630), 延迟的感染性淘选(Benhar等, *J. Mol. Biol.* 301 (2000) 893-904), 细胞表面展示(Wittrup, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 395-399), 细菌展示(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&Wittrup, *Methods Enzymol.* 328 (2000) 430-444; Boder&Wittrup, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 553-557) 和哺乳动物细胞展示(Whitehorn等, *Biotechnol.* 13 (1995) 1215-1219), 体外展示(Amstutz等, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 400-405), polysomic展示(Mattheakis等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9022-9026), 核糖体展示(Hanes等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4937-4942), mRNA展示(Roberts&Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12297-12302; Nemoto et al., *FEBS Lett.* 414 (1997) 405-408), 和核糖体失活展示系统(Zhou等, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 538-543), 周质表达和细胞计筛选(Chen等, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 537-542), 蛋白质片段互补测定法(Jonsson&Varshavsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10340-10344; Pelletier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 12141-12146), 酵母双杂交筛选(Fields&Song, *Nature* 340 (1989) 245-246; Visintin等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 11723-11728)。

[0123] 抗体的溶解度和整体结构完整性例如可以通过如下方法来定量或定性确定,所述方法包括诸如凝胶电泳,等电聚焦,毛细管电泳,色谱法如尺寸排阻色谱法,离子交换色谱法和反相高效液相色谱,肽作图,寡糖作图,质谱,紫外吸收光谱,荧光光谱,圆二色光谱,等温滴定量热,差示扫描量热,分析性超离心,动态光散射,蛋白水解和交联,浊度测量,过滤阻滞测定,免疫测定,荧光染料结合测定,蛋白质染色测定,显微镜检查,以及通过ELISA或其他结合测定法检测聚集体,X射线晶体学和NMR光谱。

[0124] 人源化通常如下进行:

- [0125] 1.选择人的或人源化的或共有的抗体构架
- [0126] -非人可变结构域序列与人/人源化/共有可变结构域序列文库(例如从VBASE或NCBI获得)的比对
- [0127] -基于氨基酸序列同源性选择受体构架
- [0128] 2.精细化
- [0129] -基于可得的晶体结构信息或同源建模,鉴定非人抗体(尤其是构架)中支持结合位点的结构、VH-VL配对等的关键残基
- [0130] -鉴定出的关键残基的回复突变。
- [0131] 因此,从上面可以看出,在非人抗体的人源化过程中,鉴定影响抗原结合的残基以及如何修饰它们以重新获得人源化抗体的丢失的特性,是非常重要的。
- [0132] 尽管已经开发出许多不同的方法用于非人抗体的人源化,但是尚未建立用于设计人源化抗体的普遍适用的方法。由于该原因,需要多次尝试以获得具有所需性质的人源化抗体,例如,必须产生和评估几种变体人源化抗体来鉴定最佳的人源化变体。
- [0133] 发明的实施方式
- [0134] 本文报道了使用基于结构的方法来对非人抗体进行人源化的方法。利用本文报道的方法,可以确定在选定的受体序列(例如人种系序列)的限定位置上氨基酸残基的特定(回复或正向)突变的(要求和)适宜性。考虑相应残基的拓扑学,三维结构和相互作用,以及其取代的性质。由此,反映出特定氨基酸残基变化对抗原结合的影响。这可以减少或甚至防止由于特定氨基酸残基的改变而干扰人源化序列中的抗原结合。从而提供了一种改进的人源化方法。
- [0135] 该方法包括以下主要或核心步骤:
- [0136] 将待进行人源化的氨基酸序列与所有潜在的受体序列进行比对和排序;可以根据相似度进行排序,或者最终根据得分/受体序列的得分/最终序列的得分来进行排序,即可以对大量人源化(建议)候选物进行排序;
- [0137] 可选地,分配规范环(canonical loop)结构以进一步鉴定更重要的结构影响残基;
- [0138] (可选地)在蛋白质数据库(PDB)中搜索,以获得构建模型的起点;
- [0139] 建立模型;这是属性(最终)分数所必需的;这包括搜索以识别具有相同拓扑学的子结构,这些子结构可以导致高精度的模型;因此,执行三维搜索以建立三维环境依赖性模型;
- [0140] 检查插入、缺失和(如果存在)同源性较低的特定片段的比对;
- [0141] 如果在建立的模型中的HVR与在所找到的结构中的HVR不同,则在结构数据库中分别对每个HVR环进行搜索,或甚至仅对每个HVR的上升和下降环部分进行搜索;
- [0142] VH/VL方向调整;已经证明,VH/VL取向对于排列HVR残基以及在HVR-Hs和HVR-Ls之间保持正确的距离很重要;相对取向主要由VH和VL界面上的残基触发;这些可以是构架残基以及HVR残基;
- [0143] 模型的能量最小化;建议使该系统松弛,但不是必需的;
- [0144] 根据拓扑学为每个改变/差异分配分数
- [0145] 根据单个或整体得分对建议的序列进行分选

[0146] 选择所选的种系;如果总体得分相近,则应选择优选常用种系

[0147] 根据得分决定V和J的组合

[0148] 决定所需的回复突变,以消除4分或4和3分中的大部分或全部;这可导致具有一些3分而非具有全部3分或无3分的变体;考虑得分为1或2的变化,并考虑得分也较低的正向突变。

[0149] 已经发现,与不使用根据本发明方法的拓扑学效应考虑的常规方法获得的人源化抗体相比,通过本文报道的方法获得的人源化抗体具有更大的人源性(人特征)。不受该理论的束缚,认为这是由于以下事实所引起:在本领域中,从人种系序列采取更长的、不间断的区段。而通过如本发明的方法中那样使用较小的子结构,可以建立改善的模型,并且可以获得改善的人源化抗体。

[0150] 本发明的方法包括以下步骤:量化(通过获得分数)受体序列(例如人种系序列)和非人抗体本身之间的每个/任何氨基酸差异,其中所述受体序列已被选择用于非人抗体高变区的转移,所述量化基于三维结构、拓扑学以及相应残基与周围环境的相互作用。

[0151] 为了量化拓扑学差异及其影响,考虑基于三维结构,例如使用三维同源性模型确定的,氨基酸残基之间的结构差异和相应位置的拓扑学。必须指出,对于某些位置,可以分配两个或多个拓扑学标识符。通常,仅使用最重要的。根据本发明的拓扑学标识符具有以下等级:首先是A,然后是L,然后是S或C(取决于拓扑学影响;例如,接触位置C可以比远离A残基的盐桥具有更大的影响),然后是I,然后是E。结构差异反映在得分中。得分的大小受氨基酸差异对构架稳定性或HVR构象的影响所影响/确定:其中0表示无影响,1表示轻微影响,2表示中度影响,3表示可能受影响的构架稳定性,4表示构架稳定性或HVR构象将受到严重干扰/影响。

[0152] 可以针对20种天然存在的氨基酸残基中每个氨基酸,更精确地确定19种不同的氨基酸残基(推定在相应位置存在),确定结构差异。也可以与人种系序列中所述位置上存在的(更多有限数量的)氨基酸残基关联。由此获得反映所产生的(整体)结构差异的(得分)矩阵。

[0153] 本发明至少部分地基于以下发现:基于所鉴定的结构差异,按需要,可以鉴定合适的氨基酸变化。该差异/改变导致不同的,优选较低的,结构变形(例如,对构架/HVR构象的降低影响/减少的构架/HVR构象变形),从而增加人源化抗体与其靶标的结合。因此,当使用根据本发明的方法时,可以提供具有改善的特性的人源化抗体。例如,可以最小化人源化抗体的结合亲和力的降低。

[0154] 本文报道的一个方面是一种产生抗体的方法,其包括以下步骤:

[0155] a) 对非人抗体的可变结构域进行测序(其氨基酸序列或编码的核酸序列),从而获得非人抗体的可变结构域的氨基酸序列,

[0156] b) 任选地产生所述非人抗体的三维同源性模型,

[0157] c) 针对每个可变结构域(对于i)和ii),彼此独立;对于iii)和iv),彼此依存),鉴定并选择以下作为可变结构域的受体序列

[0158] i) 与相应的非人抗体可变结构域具有最高序列同源性的人种系序列,或

[0159] ii) 一起形成一个完整的可变结构域的两个或更多个人种系序列片段,其中与单个人种系序列相比,当比对时,所述的序列片段与相应的非人抗体可变结构域具有更高的

序列同源性,或

[0160] iii) 允许维持非人抗体的重链可变结构域与轻链可变结构域的夹角(VH/VL角)的人种系氨基酸序列,

[0161] iv) 人或人源化抗体的VH/VL对,

[0162] d) 将非人抗体的HVR/CDR残基嫁接到步骤c)中选择的受体序列上,

[0163] e) 定量非人抗体与步骤c)中选择的序列或步骤d)中获得的序列之间的结构差异(通过对氨基酸残基差异进行评分),

[0164] f) 基于上一步的定量,在所选序列或嫁接序列中引入氨基酸(回复和正向)突变,(基于上一步的定量/评分,突变步骤c)或步骤d)的氨基酸序列),

[0165] g) 合成或产生编码在f)中获得的氨基酸序列的核酸序列,

[0166] h) 培养包含g)的核酸的细胞,从而产生抗体。

[0167] 在一个实施方案中,仅对非人抗体轻链可变结构域或非人抗体重链可变结构域,进一步执行该方法。

[0168] 本文报道的一个方面是一种用于合成或产生或提供编码免疫球蛋白可变结构域的核酸序列的方法,其包括以下步骤

[0169] a) 比对非人抗体重链或轻链可变结构域的氨基酸序列

[0170] 与

[0171] 所述非人抗体重链或轻链可变结构域的第一人源化变体,其中所述第一人源化变体通过将非人抗体重链或轻链可变结构域的CDR或高变区(HVR)或特异性决定残基(SDR)嫁接到以下序列上而获得:

[0172] i) 与相应非人抗体重链或轻链可变结构域具有最高序列同源性的人种系氨基酸序列,

[0173] 或

[0174] ii) 形成一个完整的可变结构域的两个或两个以上人种系氨基酸序列片段,其中,与单个人种系氨基酸序列相比,所述的序列片段,在比对后,与相应的非人抗体可变结构域具有更高的同源性,

[0175] 或

[0176] iii) 允许维持非人抗体可变结构域的VH/VL角的人种系氨基酸序列,

[0177] 或

[0178] iv) 人或人源化抗体的重链或轻链,

[0179] (以实现最大水平的氨基酸序列同一性),

[0180] b) 定量比对的构架位置(或其中)的三维差异,其中在所述位置中非人重链或轻链可变结构域和所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体具有不同的氨基酸残基(由于该差异而影响抗原结合和/或三维结构)

[0181] c) 用比所替代的氨基酸残基对抗原结合和/或三维结构影响程度较小的(一个或多个)氨基酸残基(即得分较低),替换在步骤b)中确定的一个或多个氨基酸残基,来修饰(即突变)所述非人重链或轻链可变结构域氨基酸序列的第一人源化变体,以获得所述非人重链或轻链可变结构域的、具有减少的三维差异的新人源化变体,

[0182] d) 可选地,重复步骤b)和c),其中将在步骤c)中获得的新人源化变体作为第一人

源化变体,直到由RMSD分析确定,三维差异不再改变/可能不再减小/小于10%为止,

[0183] e) 合成或产生或提供编码在步骤c) 或d) 中获得的修饰的可变结构域的核酸序列。

[0184] 本文报道的一个方面是一种生产免疫球蛋白的方法,其包括以下步骤

[0185] a) 分别对重链可变结构域和轻链可变结构域

[0186] -比对非人重链或轻链可变结构域的氨基酸序列

[0187] 与

[0188] 所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体,其中所述第一人源化变体通过将非人抗体重链或轻链可变结构域的CDR或超变区或特异性确定残基嫁接到以下序列上而获得:

[0189] i) 与非人可变结构域具有最高序列同源性的人种系氨基酸序列,

[0190] 或

[0191] ii) 两个或两个以上人种系氨基酸序列片段,其中所述片段在比对时比单个人种系氨基酸序列具有更高的同源性,

[0192] 或

[0193] iii) 允许维持VH/VL角的人种系氨基酸序列,

[0194] 或

[0195] iv) 人或人源化抗体的重链或轻链可变结构域,

[0196] (以实现最大水平的氨基酸序列同一性),

[0197] -量化比对的构架位置处/中的三维差异,其中在所述位置,非人重链或轻链可变结构域和所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体具有不同的氨基酸残基,(由于该差异而影响抗原结合和/或三维结构)

[0198] -替换在先前步骤中确定的一个或多个氨基酸残基(替换为比所替换的氨基酸残基对抗原结合和/或三维结构的影响程度较小的氨基酸残基(即得分较低)),来修饰/突变所述非人重链或轻链可变结构域氨基酸序列的第一人源化变体,以生成具有减小的三维差异的修饰的可变结构域,

[0199] -可选地重复前两个步骤,其中将修饰的可变结构域作为第一个人源化变体,直到根据RMSD分析确定,三维差异不再改变/可不再减小/小于10%,

[0200] -合成/产生/提供编码在先前步骤中获得的修饰的可变结构域的核酸序列,

[0201] b) 培养包含编码免疫球蛋白重链的核酸和编码免疫球蛋白轻链的核酸的哺乳动物细胞用于表达免疫球蛋白,其中所述编码免疫球蛋白重链的核酸包含编码步骤a) 的经修饰的重链可变结构域的核酸,所述免疫球蛋白轻链包含步骤a) 的经修饰的轻链可变结构域,

[0202] c) 从哺乳动物细胞或培养基中回收免疫球蛋白,从而产生免疫球蛋白。

[0203] 非人抗体与其人源化变体之间的氨基酸差异对抗原结合和/或三维结构的影响可以通过本文报道的评分方法来量化。

[0204] 为了量化三维差异,即为了评分,所有氨基酸残基均基于它们在三维结构(例如从同源模型获得)中的位置来表征。

[0205] 首先,根据氨基酸残基的拓扑学,将其分类如下:

[0206] I: 内部侧链

[0207] E:外部侧链,

[0208] C:接触H-L链,

[0209] A:抗原接触,

[0210] L:与抗原的连接,

[0211] S:参加盐桥,

[0212] N:没有特别的相互作用。

[0213] 必须指出的是,对于某些残基,可以分配一个以上的拓扑学标识符。通常,选择更为重要的。根据本发明的拓扑学标识符具有以下等级:首先是A,然后是L,然后是S或C(取决于拓扑学影响;例如,接触位置C可比远离A残基的盐桥的影响更大),然后是I,然后是E。

[0214] 因此,在根据本发明的任何方法的一个实施方案中,通过使用VH和/或VL的三维结构,量化在比对的构架位置中不同氨基酸残基的影响。在一个实施方案中,三维结构通过X射线晶体学或通过同源性建模获得。在一个实施方案中,非人可变结构域或非人抗体的三维模型通过同源性建模来产生。在一个实施方案中,使用基于整个序列的子结构产生的模型,完成同源性建模。在一个实施方案中,子结构至多包括可变结构域的完整区域。在一个实施方案中,子结构包含至多20个氨基酸残基。在一个实施方案中,子结构包含至多15个氨基酸残基。在一个实施方案中,子结构包含至多10个氨基酸残基。在一个实施方案中,子结构包含10个或更少的氨基酸残基。在一个实施方案中,根据本发明的任何方法还包括:在量化步骤之前,将拓扑学分类器I(内部侧链),E(外部侧链),C(接触重链),A(抗原接触),L(与抗原的连接),S(参与盐桥),或N(无其它=没有特定的相互作用),分配给相应位置。在一个实施方案中,针对每个构架区域、HVR、以及构架和HVR的结合,建立在本文报道的方法中使用的同源性模型。

[0215] 在本领域中,已知不同的拓扑学分类器,例如,包括Strall(Structural all)位置(=接近CDR残基或距离VH-VL界面5埃内的所有残基),Buried(=在模型中相对于在GXG中,溶剂暴露低于20%)和Strltd(=在界面处或与CDR发生疏水、静电或离子相互作用的特定残基)的组。这些拓扑学分类器定义仅CDR残基以及额外地在界面处或与CDR残基接触的特定残基。

[0216] 与此相反,本文报告的分类会自动影响所得分数。这提供了其他信息,例如当得分高时,表明需要引入回复突变以确保抗体完整性。根据本发明的拓扑学标识符具有以下等级:首先是A,然后是L,然后是S或C(取决于拓扑学影响;例如,接触位置C可以比远离A残基的盐桥的影响更大),然后是I,然后是E。

[0217] 更详细地说,

[0218] -如果HVR中的残基为拓扑学A,则将改变的得分定为4分,即,它是高度影响结构的,并因此改变它是高风险的;

[0219] -如果拓扑学L的残基也具有拓扑学S,则由于某些改变会累积拓扑学重要性,因此对于这些改变,将改变的得分定为4分,而不是3分;

[0220] -如果拓扑学C(VH和VL之间接触)或A(可能与抗原接触)或L("A"残基和构架残基之间的连接残基)的残基,取决于它们对VH-VL失稳定或对A残基的取向/构象的潜在影响,将改变定为较高得分;换言之,对于这3个类别A、C和L,HVR中的正向突变获得高分,而构架中的回复突变避免获得高分;

[0221] -如果拓扑学C的残基具有不与相邻可变结构域接触的短侧链,则将其替代为更小的氨基酸将获得1或2分,而具有较大氨基酸侧链的其它替代可以得2分或3分,这取决于侧链的大小和与该相邻可变结构域接触;

[0222] -如果拓扑学C的残基具有不与相邻可变结构域接触的短侧链,且替换发生的侧链太大以至于只能通过改变VH-VL的取向才能容纳该侧链时,则该改变将获得4分;

[0223] -如果拓扑学C的残基也具有拓扑学S,则将改变的得分定为4分而不是3分,因为所述改变累积拓扑学重要性;

[0224] -如果拓扑学S的残基也具有拓扑学I,则对于带相反电荷的侧链和仅缺少适当电荷的中性较小侧链,改变的得分分别定为4分或3分;

[0225] -如果拓扑学S的残基也具有拓扑学I,并且替换以中性但较大的侧链发生时,则将该改变的得分定为4分,因为替换的侧链与其前面的带电荷残基之间存在空间位阻;

[0226] -如果拓扑学S的残基也具有拓扑学E,则对于带相反电荷的侧链以及任何仅缺少适当电荷的侧链,改变的得分分别定为3分或2分。

[0227] 如果非人可变结构域的构架中的氨基酸残基与非人重链或轻链可变结构域的(第一)人源化变体之间存在差异,则可以量化该差异,即通过分配分数来量化。用相似的(物理上,体积上的)氨基酸进行替换,通常导致较低的分,即通常是可容忍的,而完全改变侧链特性将导致较高的分。由于不同的空间约束性,一个改变的得分还取决于位置的拓扑学(例如,改变I-内部侧链比改变外部侧链对整个结构具有/可能具有更显著/更有害的影响)。

[0228] 因此,在一个实施方案中,根据本发明的任何方法还包括以下步骤:量化比对的构架位置的差异,其中在所述位置,非人重链或轻链可变结构域和所述非人重链或轻链可变结构域的(第一)人源化变体具有不同的氨基酸残基,并由于该差异而影响抗原结合和/或三维结构,其中为每个差异指定分数为0(不影响构象)、1(轻微局部影响)、2(影响局部构象)、3(强烈影响局部构象和邻近的链或环的构象)或4(将严重破坏局部构象,从而破坏抗原识别)。

[0229] 将0分分配给位于表面的氨基酸残基(在 $\beta$ 折叠或环中)的变化,这是因为19种氨基酸残基(脯氨酸除外)的侧链由于存在的自由空间都可以被容纳。脯氨酸是一个例外:当三维结构不发生变化时,将该改变记为0分;否则,根据对抗原结合的影响,将改变记为3或4分。

[0230] 因此,在一个实施方案中,将具有拓扑学E的氨基酸残基改变为除脯氨酸(对于其而言更重要的是作为环状残基的约束)之外的任何氨基酸残基的变化,记0分。对于脯氨酸的引入,必须就围绕该残基的相容Phi和Psi角来进行考虑。例如,假设紧邻CDR/HVR残基的极性残基被来自所选种系的脯氨酸替代,可以将该替代:i)由于从极性残基变为疏水残基,记分为1分;ii)取决于角度的兼容性,记分为2或3分;和iii)当预期出现CDR/HVR残基的角度和构象变化时,记分为4分。

[0231] 内部氨基酸残基变化根据可用的自由空间来分配分数。侧链较小的替换得分较低,例如0,而侧链较大的替换得分将在1-4之间,具体取决于三维结构中的可用空间。

[0232] 因此,在一个实施方案中,将拓扑学I的氨基酸残基改变为具有较小侧链的氨基酸残基的变化(即,保守置换),记为0分;将改变为具有多一个碳原子的侧链的氨基酸残基的

变化,记为1分;将改变为具有多两个碳原子的侧链的氨基酸残基的变化,记为2分;将改变为具有多三个碳原子的侧链的氨基酸残基的变化,记为3分;将所有其他变化,记为4分。

[0233] 在替换时,抗原接触氨基酸残基的变化总是被记为4分。

[0234] 因此,在一个实施方案中,将拓扑学A的氨基酸残基改变为任何其他氨基酸残基的变化,都记为4分。

[0235] 与抗原不直接接触但与指定为A的氨基酸非常接近的氨基酸,被指定为L。其变化有时会导致构象变化,其将得分为3或4分。

[0236] 如果作为 $\pi$ - $\pi$ -/疏水相互作用的一部分的氨基酸残基被非疏水氨基酸残基替换,则疏水相互作用被破坏。此类替换将获得3分。

[0237] 因此,在一个实施方案中,对于拓扑学C的氨基酸残基改变为非疏水性氨基酸残基的变化,如果由此与相同结构域或相应可变结构域中的氨基酸残基的相互作用被改变(减少或消除),则得分为3分。

[0238] 如果作为盐桥一部分的氨基酸残基被带相反电荷或不带电荷的氨基酸残基替换,则盐桥将被破坏。在该盐桥暴露于溶剂的情况下,这样的替换将记为3分;在该盐桥是内部的情况下,这样的替换将记为4分。

[0239] 因此,在一个实施方案中,对于拓扑学S的氨基酸残基改变为带相反电荷或不带电荷的氨基酸残基的变化,在盐桥暴露于溶剂的情况下,得分为3分;在盐桥位于内部的情况下,得分为4分。

[0240] 下表显示了一些示例性改变和所得分数。

拓扑学	变化	得分
L	G->Y	4
	T->K	2
	F->L	2
S	S->P	2
A	V->Y	4
	D->G	4
	T->N	4
I	V->W	4
	L->V	2
	L->I	2
	V->S	3
	V->A	3
	V->G	3
	L->F	2
	K->V	2
	V->L	2
	V->F	3

[0241]

拓扑学	改变	得分
C	S->M	2
	F->A	3
	F->D	3
	L->R	4
	S->P	2
	Y->F	2
	H->Y	3
	H->D	4
	H->S	4
	T->Y	4
	T->K	2
	N->A	2
	N->P	4
	H->N	3

[0242] 在某些实施方案中,本文所报告的方法如下:

[0243] -通过混合V区的HVR1&2执行序列搜索(鉴定具有已知结构的相似构架)

[0244] -对HVR3进行单独的序列搜索(挑选HVR3以嫁接到所选构架上)

[0245] -在J元件的末尾允许(非常)小的差异(通常,为构架选择的结构中的J元件可以用

作受体模板)

[0246] -建立同源性模型(在重建的模型结构上,突变偏离的残基以反映原始抗体序列)

[0247] -确定相关残基的拓扑学

[0248] -建立得分矩阵(通过将原始非人抗体序列与人种系进行比对,对原始抗体氨基酸的所有可能替换进行评分)

[0249] -根据低累积得分(而不是整体同一性百分比)选择受体种系

[0250] -基于得分矩阵,决定待进行的(回复)突变。

[0251] 本文报道的方法将变化的影响的三维评估与序列信息结合在一起。在该方法中,将非人抗体与合适的人种系序列进行比对。使用所述比对,基于拓扑学结合每个残基的改变类型,来量化差异/所需改变。结果收集在矩阵中。

[0252] 本发明的方法通常包括以下步骤:

[0253] 将非人抗体的结合特异性转移至人或人源化受体构架上,以消除或至少减少由人体可能识别为外源的非人序列区段引起的潜在免疫原性问题。这是通过将非人(供体)抗体的高变区(HVR)嫁接到人/人源化(受体)抗体构架上来完成的。

[0254] 在一种情况下,通过将非人可变结构域氨基酸序列与人种系抗体V基因(种系)的集合进行比对,然后根据序列同一性和同源性对它们进行分选,从而鉴定合适的人(受体)抗体构架。受体序列的选择是基于高的总体序列同源性以及任选地在受体序列中也已经存在正确的规范残基(参见,Poul,M-A.和Lefranc,M-P.,“Ingénierie des anticorps banques combinatoires”(Lefranc,M-P.编辑),和Lefranc,G.,Les Editions INSERM,1997)。另外,可以考虑VH/VL角的保守性。

[0255] 种系V基因仅编码直至重链CDR3起始的区域,以及直至轻链CDR3中间的区域。因此,种系V基因的基因并不与整个V结构域对齐。人源化构建体包含人构架1至3和非人HVR。对于轻链和重链,人构架4序列分别衍生自人JK元件或人JH元件。

[0256] 在选择一个特定的受体序列之前,可以确定供体抗体的所谓规范环结构(参见,例如,Morea,V.等,Methods,20(2000)267-279)。这些规范的环结构由存在于所谓规范位置的残基的类型决定。这些位置(部分)位于HVR外,在最终构建体中应保持功能上等价,以便保留亲本(供体)抗体的HVR构象。

[0257] 在下文中,本发明给出了包含以下重链可变结构域和轻链可变结构域的抗体:

[0258] VH(122个氨基酸残基)(SEQ ID NO:01):

QIQEQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIT TSGYYWTWIR QFPGKKLEWM

[0259] GYIGYNSKTY YNPSLKSRLS ITRDTSKNQF LLHLNSVTTE DTATYYCARS  
LYGGYKDAFD SWGQGLVTV SS

[0260] VL(107个氨基酸残基)(SEQ ID NO:05):

DVVLTPAT LSAIPGERVT MTCKASQSIG TSLHWYQHRP NETPRLLIKF

[0261] ASRSITGIPS RFSGSGSGTD FTLGINNLEA EDFAIYYCQQ SPGFPPPTFGS  
GTKLEIN

[0262] 利用非人抗体的氨基酸序列,建立模型。

[0263] 对于重链,搜索PDB以寻找同源物,以检查在结构数据库中对于构架区域和HVR两者而言是否存在非常接近的同源物。

[0264] 为了确定合适的构架,使用仅V区并混合HVR进行搜索(在添加带下划线的残基时,

HVR对应于组合的Kabat和Chothia CDR):

[0265] QIQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGxxxx xxxxxxTWIR QFPGKKLEWM  
xxxxxxxxxxx xNPSLKSRIS ITRDTSKNQF LLHLNSVTTE DTATYYCAR

[0266] 结果如下:

[0267] 得分 E-  
(bits) 值  
[0268] ↓JSAE structpro:32C2 IGG1抗体32C2;链:... 138 9e-34

[0269] structpro:32CZB IGG1抗体32C2;链:A;片段:轻链,可变区;长度=218

[0270] 得分=138bits(348),预期值(Expect)=9e-34,同一性=70/98(71%),

[0271] 同源性(positives)=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

[0272] VH FPGKKLEWMX XXXXXXXXXXXX NPSLKSRISI TRDTSKNQFL  
FPG KLEWM NPSLKSRISI TRDTSKNQF  
PDB-1 FPGNKLEWVG YISYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNQFF

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

[0273] 检查比对,以识别是否存在某些插入或缺失以及是否存在同源性特别差的特定构架(在这种情况下,可以分别搜索特定的构架1、2或3)。

[0274] 已经发现,HVR中的氨基酸内容指导HVR的构象。

[0275] 通过搜索用于非人抗体的模型,可能发现,例如,相对于X射线结构,在通过混合HVR而发现的结构上建立的模型中,HVR-H1是不同的。如此,则分别针对每个HVR环进行搜索。在这种情况下,空位是不被允许的;如果该短片段的长度不同,则其构象也不同。HVR-H1: TGFSITTSGYWWTWstructpro:3B2UF IMC-11F8 FAB轻链;链:L,D1 GI K,0,R,U,X; ENGINEERED:是;长度=215

[0276] 得分=32.7bits(64),预期值=0.058,同一性=10/18(55%),同源性=15/18(83%)

Query: 1 SVTGFSITTSGYWWTWIR 18  
+V+G SI++ YYW+WIR  
Sbjct: 23 TVSGGSISSGDYYWSWIR 40

HVR-H2: WMGYIGYNSKTYYNP

[0277] 得分 E-  
(bits) 值  
↓JSAE structpro:2EKSB ANTI-LYSOZYME ANTIBODY FV... 31 0.39  
↓JSAE structpro:32C2B IGG1 ANTIBODY 32C2; CHA1N:A... 29 1.1  
↓JSAE structpro:1KCVH PC282 IMMUNOGLOBULIN; CHA1N:... 29 1.1

HVR-H3: YCARSLYGGYKDAFDSWG

[0278] structpro:1VGEH TR1.9 FAB;链:L;FRAGMENTzFAB人IGG1κ自身抗体的片段;

ENGINEERED:是;长度=225

[0279] 得分=31.2bits (69), 预期值=0.30, 同一性=12/18 (66%), 同源性=12/18 (66%)

[0280] Query:1YCARSLYGGYKDAFDSWG 18

[0281] YCAR YGG K FD WG Sbj ct:96YCARDPYGGGKSEFDYWG 113

[0282] 为重链构建模型:按照粗体序列,构建结构。在此示例中: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	<b>DVQ.LQESGP</b>	<b>GLVKPSQSLS</b>	<b>LTCTVTGYSI</b>	SS.DYAWNWI
3b2uf	QVQ.LQESGP	GLVKPSQTL	LTCTVSGGSI	<b>SSGDYYWSWI</b>
VH	QIQ.LQESGP	GLVKPSQSLS	LTCSVTGFSI	TTSGYYWTWI
lvgeh	QVKLLEQSGA	EVKKPGASVK	VSCASGYSF	TS..YGLHWV
				80
2eksb	RQPPGKGLEW	<b>IGYVSY.SGS</b>	<b>TYYNPSLKSR</b>	VTISVDTSKN
32c2b	<b>RQFPGNKLEW</b>	<b>MGYISY.SGS</b>	<b>TSYNPSLKSR</b>	<b>ISITRDTSKN</b>
3b2uf	RQPPGKGLEW	1GYIYY.SGS	TDYNPSLKSR	VTMSVDTSKN
VH	RQFPGKLEW	MGYIGY.NSK	TYYNPSLKSR	ISITRDTSKN
lvgeh	RQAPGQRLEW	MGWISAGTGN	TKYSQKFRGR	VTFTRDTSAT
[0283]				120
2eksb	RFSCLKNSVT	AADTAVYYCA	RW.....	DGDYWGQGIL
32c2b	<b>QFFLQLSSVT</b>	<b>TEDTATYYCA</b>	R.GYYGSSHS	..PVWGAGTT
3b2uf	QFSLKNSVT	AADTAVYYCA	RVSIFG..VG	TFDYWGQGTL
VH	QFLLHLNSVT	TEDTATYYCA	R.SLYGGYKD	AFDSWGQGTL
lvgeh	TAYMGLSSLR	PEDTAVYYCA	<b>R.DPYGGGKS</b>	<b>EFDYWGQGTL</b>
				160
2eksb	VTVSS.....	.....	.....	.....
32c2b	VTVSSAKTTP	PPVYPLVPGS	LAQTNSMVTL	GCLVKGYFPE
3b2uf	VTVSSASTKG	PSVFPLAPS.	.....GTAAL	GCLVKDYFPE
VH	VTVSS.....	.....	.....	.....
lvgeh	<b>VTVSSASTKG</b>	PSVFPLAPSS	KSTSGGTAAL	GCLVKDYFPE

[0284] 建模可以使用WolfGuy抗体编号方案,该方案为Fv中的每个位置分配一个唯一的索引,识别CDR环末端,并区分上升和下降环段。输入序列的初始WolfGuy编号,等同于与可用抗体模板结构进行序列比对,构成了模板选择、VH-VL方向调整和模型精细化的基础。与其他已公布的抗体建模方案不同,构架模板不是根据VH和VL或Fv选择,而是针对每个构架片段分别选择,以最小化必需的氨基酸交换的数量。从构架和CDR区的不同模板结构组装原始模型(raw model)后,检查每个残基的(改变的)化学邻域(chemical neighborhood),所述邻域是由其附近某些类型的侧链形成的。根据Fv中每个位置的保守邻域定义,从匹配的已知化学邻域群集(constellation)中采取给定残基的侧链(在一定程度上还包括主链)构象。最后,通过首先根据结构域界面上某些关键残基的氨基酸类型来预测VH-VL方向的绝对参数,然后将该预测的方向参数应用于模型来进行坐标转换,从而对VH-VL方向进行调整。

[0285] 对轻链可变结构域执行相同的步骤。

[0286] 在比较任何两个基于氨基酸的结构时,通常使用基于距离的度量,例如等同原子的均方根偏差(RMSD)。

[0287] 为了表征任何两个三维对象之间的取向,必须定义:

[0288] -每个对象的参照构架(a frame of reference),

[0289] -测量方向参数所围绕的轴,

[0290] -描述和量化这些参数的术语。

[0291] ABangle概念是使用五个角度(HL,HC1,LC1,LC2和LC2)和距离(dc)以一致和绝对的方式完全表征VH-VL方向的方法。抗体的可变结构域对VH和VL共同表示为抗体Fv片段。

[0292] 重链结构域和轻链结构域中结构上最保守的残基位置被用于定义结构域的定位(domain location)。这些位置称为VH和VL核心集。这些位置主要位于构架的 $\beta$ 链上,并形成每个结构域的核心。下表列出了核心集位置:

[0293]

轻链	重链
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
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

[0294] 核心集位置被用于将参照构架配准到抗体Fv区结构域上。

[0295] 两个参考构架平面被映射到任何Fv结构上。因此,可以使VH-VL方向的测量等同于测量这两个平面之间的取向。在绝对意义上完全做到这一点,至少需要六个参数:距离,扭转角(torsion angle)和四个转角(bend angle)。这些参数必须围绕连接这些平面的一致定义的矢量进行测量。该矢量在下面表示为C。为了识别C,如上所述,将参考构架平面配准到非冗余集中的每个结构上,并将网格放置在每个平面上。因此,每个结构都具有等同的网格点,因此具有等同的VH-VL网格点对。对于每个结构中的每对网格点,测量欧几里德距离。确定在其分离距离中具有最小方差的点对。连接这些点的矢量定义为C。

[0296] 坐标系使用矢量完全定义,这些矢量位于每个平面中并以与C对应的点为中心。H1是平行于VH平面的第一主成分的矢量,而H2平行于第二主成分。类似地在VL结构域上定义L1和L2。HL角是这两个结构域之间的扭转角。HC1和LC1转角等同于一个结构域相对于另一个结构域的倾斜样变化(tilting-like variation)。HC2和LC2转角描述了一个结构域相对于另一个结构域的扭转样变化(twisting-like variation)。

[0297] 如本领域技术人员将理解的,术语“VH-VL取向”或“VH-VL方向”是根据其在本领域中的通用含义使用的(参见,例如,Dunbar等人,Prot.Eng.Des.Sel.26(2013)611-620;和Bujotzek,A.等人,Proteins,Struct.Funct.Bioinf.,83(2015)681-695)。它表示VH和VL结构域如何相对于彼此定向。

[0298] 因此,VH-VL方向定义为

[0299] -C的长度,dc,

[0300] -从H1到L1的扭转角HL,围绕C测量的,

[0301] -H1和C之间的转角HC1,

[0302] -H2和C之间的转角HC2,

[0303] -L1和C之间的转角LC1,以及

[0304] -L2和C之间的转角LC2,

[0305] 其中参考构架平面是通过以下方式配准的:i)对齐与VH的八个位置H36,H37,H38,H39,H89,H90,H91和H92对应的C $\alpha$ 坐标,并通过它们拟合一个平面,以及ii)对齐与VL的八个位置L35,L36,L37,L38,L85,L86,L87和L88对应的C $\alpha$ 坐标,并通过它们拟合一个平面,iii)在每个平面上放置一个网格,这样,每个结构都具有等同的网格点和等同的VH-VL网格点对,iv)测量每个结构中每对网格点的欧几里得距离,其中矢量C将在其分离距离上具有最小方差的点对连接起来,

[0306] 其中H1是平行于VH平面的第一主成分的矢量,H2是平行于VH平面的第二主成分的矢量,L1是平行于VL平面的第一主成分的矢量,L2是平行于VL平面的第二个主成分的矢量,HL角是两个结构域之间的扭转角,HC1和LC1是等同于一个结构域相对于另一个结构域的倾斜样变化的转角,HC2和LC2的转角等同于一个结构域相对于另一个结构域的扭转样变化。

[0307] 此后,使用合适的软件,例如Accelrys的INSIGHT软件,考虑所有侧链及其环境,对两个链一起进行能量最小化。

[0308] 考虑VH/VL角,使用两个可变结构域,将已提供构架(重链和轻链)的两个或更多个结构进行叠加。

[0309] 然后对复合VH-VL进行能量最小化,例如使用Insight的“discover”模块。最小化过程可以例如遵循VA09A梯度进行600个循环,阈值导数(threshold derivative)为1kcal/A;考虑部分电荷(partial charges)。

[0310] 得分矩阵的建立

[0311] 对于非人抗体模型结构的每个氨基酸位置,考虑人种系序列的列表,通过分配得分,来量化每个可能替换对三维结构的影响。

[0312] 对每个位置和每个替换进行定量。

[0313] 根据结构,为每个位置分配一个拓扑学描述:

[0314] I:内部侧链

[0315] E:外部侧链

[0316] C:接触H-L链

[0317] A:抗原接触

[0318] L:连接抗原

[0319] S:盐桥

[0320] 为每个替换分配分数,如下所示:

[0321] 0:此替换对构型没有影响

[0322] 1:小的局部影响(一些侧链的局部排列)

[0323] 2:影响局部构象

[0324] 3:对局部构象和相邻链或环的构象有强烈影响

[0325] 4:将严重破坏局部构象(可影响抗原结合)

[0326] 分数的分配方式取决于位置的拓扑学 and 变化:

[0327] 1. 在 $\beta$ 折叠或裸露的环上带有外部侧链的氨基酸:对于这种位置的变化,分配的分数通常为“0”,因为存在的自由空间可容纳20种天然氨基酸残基中的大多数;脯氨酸或大残基(如色氨酸)必须根据具体情况进行分数分配。

[0328] 2. 带有内部侧链的氨基酸:分配的分数取决于可用的自由空间;线性到支链氨基酸的替换必须进行有效替换和最终最小化的检查(强偏离导致高得分)。

[0329] 3. 具有抗原接触侧链的氨基酸:当认为一个氨基酸直接与抗原相互作用时,其任何替换都被分配“4”分。

[0330] 4. 连接氨基酸:与抗原不直接接触但与指定为“A”的氨基酸极为接近的那些氨基酸;此类氨基酸的强差异可导致构象变化,导致“3”或“4”分的高得分。

[0331] 5. 具有接触侧链的氨基酸:这些氨基酸位于轻链和重链之间的界面;对于复合物的稳定性是重要的;如果存在盐桥,则任何替换都应允许这种紧密的相互作用在替换后发生;类似地,氢键是方向性相互作用;替换侧链通常会导致方向性中断,必须分配高分(“3”或“4”分)。

[0332] 6. 没有(太多)溶剂暴露的盐桥在正电荷和负电荷之间带来很多的相互作用能;断裂盐桥可能导致结构域内或轻链和重链的界面的稳定性显著丧失。

结构位置	注释
	通常容忍被相似的氨基酸替换，而完全改变侧链特性效应，得分不同于“0”。
E	当侧链暴露于溶剂时，其替换通常不是问题；可以避免特定的氨基酸：容易氧化的暴露的色氨酸或甲硫氨酸；脯氨酸环化可能改变构象。
I	蛋白质结构在氨基酸侧链周围也具有内部一些可用空间；并非内部氨基酸侧链的所有原子都与相邻氨基酸接触；根据可用空间，为替换分配分数。
C	在重链和轻链可变结构域之间没有共价键：因此，为降低两个可变结构域之间的相互作用能的每个替换，分配一个不同于“0”的分数；在空间上影响结构域方向的替换将根据与 HVR 的接近程度来分配“3”或“4”的分数。
A	在抗原结合袋的周围，朝向推定抗原定向的所有侧链，将选择“A”；氨基酸“A”被推定对抗原结合至关重要；替换将始终被分配为“4”分。
L	推定不直接与抗原相互作用（不暴露而是内部侧链），但在称为“A”的氨基酸之前或之后的氨基酸；替换它们可能强烈地影响该接近的“A”。
S	盐桥带来高的相互作用能：破坏它们会影响抗体的固有稳定性；通常，分配“1”或“2”分以反映这种损失；如果该连接参与疏水区(hydrophobic patch)或进行几个范德华接触，则分配较高的分数“3”或“4”分。

[0333]

[0334] 术语芳族、直链或支链描述氨基酸侧链。术语极性、负或正用于描述侧链末端的官能。

结构位置	氨基酸 (单字母代码)				
	A	C	D	E	G
	小, 疏水	线性, 极性	线性, 负	线性, 负	无侧链
E		避免游离半胱氨酸			
I	18 种氨基酸大于丙氨酸	破坏盐桥将分配高分	改变为疏水残基将分配分数		所有其他氨基酸都大于甘氨酸
C		n. a.			替换基于侧链大小导致分数分配
A		n. a.			
L		n. a.			
S	n. a.	n. a.	E/D 的交换有时是可以的; 改变为极性残基将分配低分; 改变为疏水或带正电荷残基将分配高分		n. a.

[0335]

结构位置	氨基酸			
	H	K	R	I
	芳族, 极性, 中性或带电荷 (取决于 pH 和环境)	线性, 正	线性, 正	支链, 疏水
E				
I				
C				
A				
L				
S		K/R 的交换有时是可以的; 改变为极性残基将分配低分; 改变为疏水或带正电荷残基将分配高分		n. a.

结构位置	氨基酸				
	L	M	N	P	Q
	支链, 疏水	线性	线性, 极性	环状, 疏水	线性, 极性
E				替换脯氨酸导致较小的刚性; 由脯氨酸引起的转角需要保留	
I					
C					
A				CDR/HVR 中脯氨酸的替换将使得抗体具有更大的柔性	
L					
S	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

[0336]

结构位置	氨基酸				
	S	T	V	W	F
	线性, 极性	支链 ( $\beta$ ), 极性	支链 ( $\beta$ ), 疏水	双环, 芳族	芳族, 疏水
E				与邻近有双环特定相互作用?	与邻近有苯环特定相互作用?
I					
C					
A					
L					
S	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

结构位置	氨基酸	
	Y	插入或缺失正常记为“4”分
	疏水芳族, 在末端具有极性官能	
E	与邻近有苯环特定相互作用?	
I		
C		
A		
L		
S	n. a.	

[0337] 可以将基于可用人种系序列的可变结构域每个位置上每个推定替换的分配分数, 收集在矩阵中。

[0338] 对于比对的序列集每个位置 (所讨论的抗体-种系), 只有少数残基可以实际地

考虑用于替换,即在其他/所有种系中在该位置都发生。通过如下分配分数:

[0339] -根据结构域判断相对重要性;和/或

[0340] -对模型执行替换,并就该替换所引起的影响等级,量化分数;和/或

[0341] -替换和最小化整体结构:在不影响“A”残基或复合物稳定性的情况下改变局部构象,可以分配较低分数;严格处罚“A”侧链置换。

[0342] 下表描述了由上述方法产生的示例性抗体的一部分 (VH/SEQ ID NO:01)的24个N-端残基)的得分矩阵。

[0343]

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										
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														
C														
D														
E														
F														
G					0									
H														
I		0												
K		1												

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
[0344]	L	0												
	M													
	N													
	P				2									
	Q													
	R				0									
	S													
	T				0									
	V													
	W													
	Y													

[0345] 选择人种系和人源化

[0346] 针对推定的受体种系(无HVR;也可以考虑正向突变),汇总所有得分。然后使用总分对人种系进行分选。根据特定构架的使用频率,选择具有相同分数的支持人源化的种系构架;将优先考虑在人类中更常见的种系。对V区域和J元件分别进行评分(可以交替对三个构架的每个进行单独评分总和,并决定进行它们的组合)。

[0347] 对于保守的人源化,可接受分数不超过2的氨基酸替代,而分数3或4的氨基酸变化不被接受(这些氨基酸残基不改变,保持原来的);在HVR中,包含在得分为4的2个残基之间的所有氨基酸均保持原来的残基(不改变为人的)。

[0348] HVR的定义不固定为Chothia或Kabat的定义:在某些情况下,HVR可以小于上述定义;另一方面,HVR可以包含前面或后面构架的一些氨基酸。

[0349] 对于较不保守的人源化,仅拒绝评分为4的氨基酸变化并在构架区中进行回复突变;在HVR中,包含在得分为4的2个残基之间的所有氨基酸均保持原来的残基(不改变为人的)。

[0350] 对于更不保守的人源化,可以对HVR中分数低于或等于2的2个“A”残基之间的氨基酸进行替换。

[0351] 实施例1-鼠抗IL-17抗体的人源化

[0352] 使用本文报道的方法已经产生了鼠抗IL17抗体的人源化变体,其中根据本文报道的评分表,量化了不同残基对三维结构(评分)的影响。

[0353] 对于SEQ ID NO:09的重链,根据上述方法产生了同源性模型,并且如下表所示,将所示拓扑学分配给每个残基(上列:根据Kabat的残基编号;中列:氨基酸序列;下列:拓扑学)。

1	2	3	4	5	6	7	*	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
Q	V	Q	L	K	E	S	.	G	P	G	L	V	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S
E	I	E	I	E	I	E	.	E	E	E	E	S	E	E	E	S	E	I	E	I	E	I	E	I	E

2	*	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	*	*	*	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	5			
6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	5a	5	b			6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
G	.	F	S	L	D	S	.	.	.	.	.	Y	G	V	H	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L	V	V
E	.	I	L	L	L	A	.	.	.	.	.	L	L	I	C	I	C	S	C	E	E	E	E	C	C	S	C	I	I	A

[0354]

5	5	52	52	52	*	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7
1	2	a	b	c	.	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5
I	W	S	.	.	.	.	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	R	L	S	I	T	K	D	N	S	K
I	A	A	L				A	A	A	L	C	E	C	S	S	I	S	E	S	I	E	I	E	I	S	I	E	E

7	7	7	7	8	8	8	82	82	82	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10
6	7	8	9	0	1	2	a	b	c	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0		
S	Q	V	F	L	K	M	N	S	L	Q	T	D	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	D	T	H	Y	R	L		
E	E	I	E	I	E	I	E	E	I	E	E	E	S	E	I	E	I	C	I	I	S	A	L	A	L	L	A		

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3
a	b	c	d	e	f	g	h	i																								
Y	Y	Y	A	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
A	A	A	A	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	I	C	I	E	E	I	E	I	E	I	E	E

- [0355] 由此确定了2个关键位置/区段(上表中的灰色框)。
- [0356] 对于重链可变结构域,不使用评分方法,产生了8个人源化提议(HC-2a-h;鼠种系片段:SEQ ID NO:10;HC-2a-HC-2h:SEQ ID NO:11至18)。

[0357]

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

[0358] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0359]

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
鼠种系	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

变体HC-2a	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
变体HC-2b	D	G	T	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
变体HC-2c	D	G	T	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
变体HC-2d	D	G	T	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
变体HC-2e	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	f	t	i	s	r
变体HC-2f	G	T	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
变体HC-2g	D	G	T	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	f	t	i	s	r
变体HC-2h	D	G	T	T	T	Y	P	G	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r

[0360] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0361] 使用评分方法,针对重链可变结构域,产生了五种另外的人源化提议(HC-2i-m; SEQ ID NO:19至23;相应的种系片段SEQ ID NO:32至36)

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	35	*	*	*	36	37	38	39	40	41
鼠种系	t	v	s	G	F	S	L	T	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	p	p
<b>mVH IL-17</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
<b>变体 HC-2i</b>	<b>a</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>
人种系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
得分	0																		1
<b>变体 HC-2j</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>w</b>	<b>i</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
人种系	t	v	s	G	G	S	I	S	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p
得分												4		1					
<b>变体 HC-2k</b>	<b>a</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>
人种系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p
得分	0																		1
<b>变体 HC-2l</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>w</b>	<b>i</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
人种系	t	v	s	G	G	S	V	S	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p
得分												4		1					
<b>变体 HC-2m</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>M</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>
人种系	t	v	s	G	F	S	L	S	N	M	G	V	S	w	i	r	q	p	p
得分											0								1

[0362] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
鼠种系	D	G	S	T	N	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	s	k
<b>mVH IL-17</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>s</b>	<b>i</b>	<b>t</b>	<b>k</b>
<b>变体 HC-2i</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r

[0364]

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
得分															0	0	1	
<b>变体 HC-2j</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>v</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>v</b>
人种系	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
得分				4			2							1	0	0	2	
<b>变体 HC-2k</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分															0	0	1	
<b>变体 HC-2l</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>v</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>v</b>
人种系	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
得分							4										0	
<b>变体 HC-2m</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>k</b>
人种系	N	D	E	K	S	Y	S	T	S	L	K	S	r	l	t	i	s	k
得分				0													0	

[0366] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0367] 不使用本文报告的方法获得的8个建议,也已使用本文报告的方法进行了回顾性分析。

[0368] 组合结果示于下表(相应种系片段SEQ ID NO:24至31)。

[0369]

	2	3	4	25	26	27	28	29	30	31	35	*	*	*	36	37	38	39	40	41
											<b>b</b>									
鼠种系	t	v	s	G	F	S	L	T	S	Y	G	V	H	w	v	r	q	p	p	
<b>mVH IL-17</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>变体 HC-2a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>	
人种系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p	
得分	0	1									4	0	4						1	
<b>变体 HC-2b</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>	
人种系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p	
得分	0	1									4	0	4						1	
<b>变体 HC-2c</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>M</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>	
人种系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p	
得分	0	1									0									
<b>变体 HC-2d</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	<b>S</b>	<b>w</b>	<b>i</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	
人种系	t	v	s	G	G	S	I	S	S	Y	Y	W	S	w	i	r	q	p	p	
得分											4	4	4		1					
<b>变体 HC-2e</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>	
人种系	a	a	s	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	w	v	r	q	a	p	
得分	0	1																	1	
<b>变体 HC-2f</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>M</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>	
人种系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	w	v	r	q	a	p	
得分	0	1									0								1	
<b>变体 HC-2g</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>t</b>	
人种系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	D	M	H	w	v	r	q	a	t	

[0370]

	2	3	4	25	26	27	28	29	30	31	35	*	*	*	36	37	38	39	40	41	
											<b>b</b>										
得分	0	1																		1	0
<b>变体 HC-2h</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>t</b>		
人种系	a	a	s	G	F	T	F	S	S	Y	D	M	H	w	v	r	q	a	t		
得分	0	1			1	2	2													1	0
<b>变体 HC-2i</b>	<b>a</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>		
得分	0																			1	
<b>变体 HC-2j</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>w</b>	<b>i</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>		
得分													4		1						
<b>变体 HC-2k</b>	<b>a</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>		
得分	0																			1	
<b>变体 HC-2l</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>w</b>	<b>i</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>		
得分													4		1						
<b>变体 HC-2m</b>	<b>t</b>	<b>v</b>	<b>s</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>G</b>	<b>M</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>v</b>	<b>r</b>	<b>q</b>	<b>a</b>	<b>p</b>		
得分												0								1	

[0371] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0372]

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
鼠种系	D	G	S	T	T	Y	N	S	A	L	K	S	r	l	s	i	s	k
<b>mVH IL-17</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>s</b>	<b>i</b>	<b>t</b>	<b>k</b>
<b>变体 HC-2a</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>r</b>	<b>f</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分					4	2	1	1	2					2	0	0	1	
<b>变体 HC-2b</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>r</b>	<b>f</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分					4	2	1		2					2	0	0	1	
<b>变体 HC-2c</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>r</b>	<b>f</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分				2	4		2	1		2				2	0	0	1	
<b>变体 HC-2d</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>v</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>v</b>
人种系	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	r	v	t	i	s	v
得分					4		2	1						1	0	0	2	
<b>变体 HC-2e</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>f</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分														2	0	0	1	
<b>变体 HC-2f</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>r</b>	<b>f</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分	4	4	2	4		2	1		2					2	0	0	1	
<b>变体 HC-2g</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>f</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
人种系	A	G	D	T	Y	Y	P	G	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分														2	0	0	1	
<b>变体 HC-2h</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>r</b>	<b>f</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>

[0373]

	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
人种系	A	G	D	T	Y	Y	P	G	S	V	K	G	r	f	t	i	s	r
得分							4	1	1	2		2		2	0	0	1	
<b>变体 HC-2i</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
得分															0	0	1	
<b>变体 HC-2j</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>v</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>v</b>
得分					4		2							1	0	0	2	
<b>变体 HC-2k</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>r</b>
得分															0	0	1	
<b>变体 HC-2l</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>v</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>v</b>
得分					4		2							1	0	0	2	
<b>变体 HC-2m</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>t</b>	<b>i</b>	<b>s</b>	<b>k</b>
得分				2	2		1	1	1						0	0		

[0374] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0375] 在13项人源化建议中,有3项显示出可接受的结合亲和力。不使用本文报道的方法

获得了其中的两个 (8个中的2个=25%),使用本文报道的方法获得了一个 (5个中的1个=20%)。

[0376] 对于轻链可变结构域,不使用评分方法已经产生了4个人源化提议 (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
					<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>												
鼠种系		R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	w	y	l	q	k
mVH IL-17		<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
变体 LC-2a		<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
变体 LC-2b		<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
变体 LC-2c		<b>K</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
变体 LC-2d		<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>

[0378] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
鼠种系	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
变体LC-2a	p	g	q	s	p	r	r	l	i	y	K	V	S	N	R	D	S	g	v
变体LC-2b	p	g	q	S	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	A	S	g	v
变体LC-2c	p	g	q	p	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
变体LC-2d	p	g	q	S	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v

[0380] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0381] 对于SEQ ID NO:49的轻链,根据上文的方法,产生了同源性模型,并且如下表所示,对每个残基分配了所示的拓扑学(上列:根据Kabat的残基编号;中列:氨基酸序列;下列:拓扑学)。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
E	I	E	I	E	I	E	E	E	E	I	E	I	E	E	E	E	E	I	E	I	E	I	E	L	A	A
D	V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q

*	*	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	*	*	*	*
	A	A	L	L							L	L	C	I	C	I	C	I	C	C	E	C	C	E	C	I	I	C	L					
.	S	L	V	H	S	N	G	D	T	.	Y	F	H	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	.	.	.	.	.

[0382]

*	*	*	*	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	*	*	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	
				A	A	L	E	C	E	E	I	E	E	S	I	E	I	E	I	E	E	.	.	E	E	I	E	I	E	I	E	E	E	I	E	E	E
.	.	.	.	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	.	.	T	D	F	T	L	K	I	N	R	V	E	A	E	

82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	95c	95d	95e	95f	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	96	97	98	99	100	101	102	103		
S	E	I	C	I	C	I	C	C	L	A	A	A	A																						L	I	C	I	C	E	I	E
D	L	G	V	Y	F	C	S	Q	T	T	H	A	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	T	F	G	S	G	T	K	

[0383] 使用该方法,针对轻链可变结构域,已经产生了两个另外的人源化提议。(LC-2e-f;SEQ ID NO:41和42;相应种系片段SEQ ID NO:47和48)

	24	25	26	27	27	27	27	27	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39	
				<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>												
鼠种系	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	w	y	l	q	k
mVL IL-17	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
变体 LC-2e	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
人种系	K	S	S	Q	S	L	L	H	S	D	G	K	T	Y	L	Y	w	y	l	q	k
得分																					
变体 LC-2f	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
人种系	R	S	S	Q	S	L	V	Y	S	D	G	N	T	Y	L	N	w	f	q	q	r
得分																					

[0384]

[0385] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0386]

	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
鼠种系	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
变体LC-2e	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
人种系	p	g	q	p	p	q	l	l	i	y	E	V	S	N	R	F	S	g	v
得分						0													
变体LC-2f	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
人种系	p	g	q	s	p	r	r	l	i	y	K	V	S	N	R	D	S	g	v
得分						0													

[0387] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0388] 不使用本文报告的方法获得的4个建议,也已使用本文报告的方法进行了回顾分析。

[0389] 组合结果示于下表(相应的种系片段SEQ ID NO:43至46)。

	24	25	26	27	27	27	27	27	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39	
				a	b	c	d	e	f												
鼠种系	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	w	y	l	q	k
<b>mVL IL-17</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
<b>变体 LC-2a</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
人种系	R	S	S	Q	S	L	V	Y	S	D	G	N	T	Y	L	N	w	f	q	q	r
得分															2	3		2	0		0
<b>变体 LC-2b</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
人种系	R	S	S	Q	S	L	L	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	w	y	l	q	k
得分															2	4					
<b>变体 LC-2c</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
人种系	K	S	S	Q	S	L	L	H	S	D	G	K	T	Y	L	Y	w	y	l	q	k
得分															2	3					
<b>变体 LC-2d</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
人种系	R	S	S	Q	S	L	L	H	S	N	G	Y	N	Y	L	D	w	y	l	q	k
得分																					
<b>变体 LC-2e</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
得分																					
<b>变体 LC-2f</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>w</b>	<b>y</b>	<b>l</b>	<b>q</b>	<b>k</b>
得分																					

[0391] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
鼠种系	p	g	q	s	p	k	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v
<b>mVL IL-17</b>	<b>p</b>	<b>g</b>	<b>q</b>	<b>s</b>	<b>p</b>	<b>k</b>	<b>l</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>g</b>	<b>v</b>
<b>变体 LC-2a</b>	<b>p</b>	<b>g</b>	<b>q</b>	<b>s</b>	<b>p</b>	<b>r</b>	<b>r</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>g</b>	<b>v</b>
人种系	p	g	q	s	p	r	r	l	i	y	K	V	S	N	R	D	S	g	v
得分						0	4										3		

[0392]

				40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
	<b>p</b>	<b>g</b>	<b>q</b>	<b>s</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>l</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>g</b>	<b>v</b>			
	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	L	G	S	N	R	A	S	g	v			
						0											3					
	<b>p</b>	<b>g</b>	<b>q</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>l</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>g</b>	<b>v</b>			
	p	g	q	p	p	q	l	l	i	y	E	V	S	N	R	F	S	g	v			
[0393]				2		0																
	<b>p</b>	<b>g</b>	<b>q</b>	<b>s</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>l</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>g</b>	<b>v</b>			
	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	L	G	S	N	R	A	S	g	v			
						0																
	<b>p</b>	<b>g</b>	<b>q</b>	<b>s</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>l</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>g</b>	<b>v</b>			
	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v			
						0																
	<b>p</b>	<b>g</b>	<b>q</b>	<b>s</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>l</b>	<b>l</b>	<b>i</b>	<b>y</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>g</b>	<b>v</b>			
	p	g	q	s	p	q	l	l	i	y	K	V	S	N	R	F	S	g	v			
						0																

[0394] 大写字母:在HVR中;小写字母:在FR中

[0395] 在6个人源化建议中,只有4个显示出可接受的结合亲和力。不使用本文报道的方法获得了其中的两个(4个中的2个=50%),使用本文报道的方法获得了两个(2个中的2个=100%)。

[0396] 使用本文报道的方法,已经在轻链可变结构域中鉴定出,两个残基,即H34和F55,强烈影响抗原结合。

[0397] 下表总结了各个人源化抗IL17抗体的结果。

HC	LC		中和作用 在 NHDF 中	BIAcore	
		hIL-17A ELISA	IL-6 IC <sub>50</sub> (nM)	t/2 <sub>diss</sub> (min)	K <sub>D</sub> (nM)
鼠	鼠	+++	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

[0398]

[0399]	HC	LC		中和作用 在 NHDF 中	BIAcore	
			hIL-17A ELISA	IL-6 IC <sub>50</sub> (nM)	t/2 <sub>diss</sub> (min)	K <sub>D</sub> (nM)
	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

[0400] 因此,可以通过使用根据本发明的方法来减少非活性变体的数量。

[0401] 实施例2-抗CCR5抗体

[0402] 使用常规的人源化方法,即不使用本文报道的方法,已经产生了鼠抗CCR5抗体重链可变结构域的十七种人源化变体。对于这些变体,已经确定了与CCR5的结合。可以看出,通过使用根据本发明的方法,可以基于总分和得4分的氨基酸差异的数目,来鉴定不太可能结合抗原的人源化变体。由此,可以识别和淘汰抗原结合非活性变体。

[0403]	VH 变体	结合 CCR5	总分	得分"4"的数量
		鼠 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
	4	n	20	4
	5	n	20	4

[0404] 在本发明的某些方法和实施方案中,利用以下步骤,制备包含非人抗体的氨基酸

序列和人种系序列的人源化抗体：

[0405] a) 获得非人抗体可变结构域的氨基酸序列,以及i) 与非人可变结构域具有最高序列同源性的人种系序列,或ii) 当比对时具有高于单个人种系序列的同源性的两个或更多个人种系序列片段,或iii) 基于VH/VL角;

[0406] b) 鉴定非人抗体可变结构域和人种系序列中的高变区氨基酸序列;

[0407] c) 用非人抗体高变区氨基酸序列替换相应的人种系高变区氨基酸序列;

[0408] d) 将非人抗体的构架区(FR)的氨基酸序列与人种系序列的相应FR进行比对;

[0409] e) 在比对的FR序列中鉴定与相应的人种系残基不同的非人抗体FR残基;

[0410] f) 确定该不同的非人可变结构域氨基酸残基是否可以被合理预期具有以下拓扑学中的至少一种:

[0411] I: 内部侧链

[0412] E: 外部侧链

[0413] C: 接触H-L链

[0414] A: 抗原接触

[0415] L: 连接抗原

[0416] S: 盐桥

[0417] 以及该差异是否导致得分不为0,其中在相应的位置,针对任何未选择的人种系序列中存在于所述位置的每一种氨基酸残基,确定相应得分和由此产生得分矩阵;

[0418] g) 对于任何合理地预期具有这些拓扑学中至少一种的不同非人抗体氨基酸残基,用该残基替换矩阵中得分最低的相应氨基酸残基。

[0419] 可选地,确定在步骤(e)中识别的任何不同残基是否暴露在结构域的表面上或埋在其中,如果该残基是暴露的但没有在步骤(f)中鉴定的拓扑学,则可以保留该人种系残基。

[0420] 在一个实施方案中,该方法进一步包括:比对非人抗体和人种系FR序列,鉴定与所比对的人种系FR序列不同的非人抗体FR残基,以及对于每个这样的不同非人抗体FR残基,确定相应的人种系残基是否代表所有物种在该位点的高度保守的残基,如果是如此保守,则制备在该位点包含该人种系氨基酸残基的人源化抗体。

[0421] 在一个实施方案中,在同源性模型中,非人抗体序列和模板序列的主链构象的均方根差(RMSD)小于4 Å,小于3 Å,并且优选小于2 Å。

[0422] 在本发明的某些方法和实施方案中,提供了一种生产人源化抗体的方法,该人源化抗体包括至少一个轻链和一个重链,该方法包括以下步骤:

[0423] a) 选择具有至少一个HVR的非人抗体;

[0424] b) 选择人抗体重链或种系序列;

[0425] c) 选择人抗体轻链或种系序列

[0426] d) 将来自非人抗体重链的至少一个HVR引入人抗体重链,以形成重组重链;和

[0427] e) 将来自非人抗体轻链的至少一个HVR引入人抗体轻链,以形成重组轻链;

[0428] f) 根据本文报道的方法改变两个可变结构域氨基酸序列中的氨基酸残基,

[0429] 其中人抗体重链和轻链的选择分别仅由与非人抗体重链和轻链的序列同源性来确定。

- [0430] 在本发明的某些方法和实施方案中,提供了一种产生人源化抗体的方法,包括:
- [0431] 比较非人抗体的可变(V)区构架(FR)序列与人抗体或人抗体种系序列的可变(V)区构架(FR)序列,以确定非人抗体FR和人抗体或人种系FR之间的序列同源性程度;和
- [0432] 用本文报道的方法确定的人抗体或人种系FR替换非人抗体中的FR。
- [0433] 在一个实施方案中,分数的分配包括如本文所描述的所有改变。
- [0434] 在一个实施方案中,分配分数还包括为每个差异分配分数0、1、2、3或4,其中
- [0435] -HVR中拓扑学A的残基的变化,得分为4,
- [0436] -也具有拓扑学S的拓扑学L的残基的变化,得分为3或4(优选4),
- [0437] -具有短侧链的拓扑学C的残基改变为侧链更小(基于体积)的氨基酸残基的变化,得分最多为2,
- [0438] -具有短侧链的拓扑学C的残基改变为具有较大(体积)侧链的氨基酸残基的变化,取决于该侧链的大小和与相邻可变结构域接触的性质,得分为2或3,
- [0439] -具有短侧链的拓扑学C的残基改变为具有导致VH-VL方向改变的侧链的氨基酸残基的变化,得分为4,
- [0440] -也具有拓扑学S的拓扑学C的残基的变化,得分为4,
- [0441] -也具有拓扑学I的拓扑学S的残基,改变为带相反电荷的侧链和仅缺少适当电荷的中性较小侧链的变化,得分分别为4或3,
- [0442] -也具有拓扑学I的拓扑学S的残基,改变为具有中性但较大侧链的氨基酸残基的变化,
- [0443] 得分为4,
- [0444] -也具有拓扑学E的拓扑学S的残基,改变为带相反电荷的侧链和仅缺少适当电荷的任何侧链的变化,得分分别为3或2,
- [0445] -拓扑学S的残基的变化,除改变为脯氨酸的变化外,始终得分为0,对于改变为脯氨酸的变化,当三维结构不变时,得分为0,而当三维结构被改变时,得分为至少3分,
- [0446] -拓扑学E的氨基酸残基改变为脯氨酸以外的任何氨基酸残基的变化,得分为0,
- [0447] -拓扑学E的氨基酸残基改变为脯氨酸的变化,如果该变化是从极性到疏水残基,则得分为1;取决于VH/VL角改变,得分为2或3;在HVR残基的角度和构象预期将改变
- [0448] 时,得分为4;
- [0449] -拓扑学I的氨基酸残基,改变为侧链较小的氨基酸残基的变化,得分为0;改变为具有多一个碳原子的侧链的氨基酸残基的变化,得分为1;改变为具有多两个碳原子的侧链的氨基酸残基的变化,得分为2;改变为具有多三个碳原子的侧链的氨基酸残基的变
- [0450] 化,得分为3;且所有其他改变,得分为4;
- [0451] -拓扑学L的氨基酸残基的变化,当该变化导致构象改变时,得分为至少3分,
- [0452] -拓扑学C的氨基酸残基改变为非疏水性氨基酸残基的变化,如果由此与相同结构域或相应可变结构域中氨基酸残基的相互作用发生改变,则得分为3,
- [0453] -拓扑学S的氨基酸残基的变化,当该残基被替换为带相反电荷或不带电荷的氨基酸残基且该盐桥断裂时,得分为3或4,其中,如果盐桥是溶剂暴露的,则得分为3;如果盐桥在内部,则得分为4,
- [0454] -改变为脯氨酸的变化,如果该脯氨酸替换改变了该残基周围的phi和psi角,则得

分为3或4;如果改变为脯氨酸不引起该残基周围的氨基酸链的构象变化,则得分为0或1,

[0455] -拓扑学A的氨基酸残基改变为任何氨基酸残基的变化,得分为4,

[0456] -拓扑学C的氨基酸残基改变为非疏水性氨基酸残基的变化,得分为3或4,

[0457] 其中0分表示对构架稳定性或HVR构象无影响,1分表示对构架稳定性或HVR构象有轻微影响,2分表示对构架稳定性或HVR构象有中等影响,3分表示该变化将影响构架稳定性,4分表示该变化将破坏构架稳定性或HVR构象。

[0458] 在一个实施方案中,将得分为4的每个氨基酸残基,分别改变/突变成导致更低得分的氨基酸残基或改变/突变成导致更低总分(=所有3和4分的总和,任选地包括2分)的氨基酸残基。

[0459] 在一个实施方案中,将得分为4和3的每个氨基酸残基,分别改变/突变成导致更低得分的氨基酸残基或改变/突变成导致更低总分(=所有3和4分的总和,任选地包括2分)的氨基酸残基。

[0460] 提供以下实施例以帮助理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求中阐明。应该理解的是,可以在不背离本发明的精神的前提下对所提出的方案进行修改。

## 实施例

[0461] 实施例1

[0462] 通过ELISA测定与IL-17的结合

[0463] 用重组人IL-17 (Peprotech#200-17, www.peprotech.com) 以0.5 $\mu$ g/ml浓度在PBS中(100ml/孔)包被NUNC®MaxiSorp板(96孔)。将板在轨道振荡器上在37°C温育2小时。此后除去包被溶液,并加入100 $\mu$ l/孔的PBSTC(磷酸盐缓冲盐水,0.05% Tween®-20,2% 鸡血清)。将板在室温温育1小时。除去封闭溶液,并将样品(空白:PBSTC,样品(在PBS中10 $\mu$ g/ml))加入板中(100 $\mu$ l/孔)。将板在室温下振荡孵育。取出样品,用200 $\mu$ l/孔PBST(磷酸盐缓冲液,0.05% Tween®-20)洗涤板3次,加入二抗(山羊抗人IgG, Fc  $\gamma$ , HRP缀合物(Chemicon AP113P))用于检测人源化抗体。将二抗在PBSTC中以1:10,000稀释。并在室温下振荡孵育平板1小时。取出二抗,用200 $\mu$ l/孔PBST(磷酸盐缓冲盐水,0.05% Tween®-20)洗涤三次,加入100 $\mu$ l/孔ABTS®(Roche Diagnostics GmbH, 曼海姆,德国)。在405/492nm处测量光密度。

[0464] 实施例2

[0465] IgG1类免疫球蛋白表达质粒的制备

[0466] 质粒p6454是用于在真核细胞中表达抗IL-17抗体的表达质粒(具有保留的外显子-内含子组织的基因组组织的表达盒)。它包含以下功能元件:

[0467] -源自载体pUC18的复制起点(pUC起点),

[0468] -赋予大肠杆菌氨苄青霉素抗性的 $\beta$ -内酰胺酶基因(Amp),

[0469] -用于表达 $\gamma$ 1重链的表达盒,其包含以下元件:

[0470] -人巨细胞病毒的主要立即早期启动子和增强子(hCMV IE1启动子),

[0471] -合成的5'UTR,包括Kozak序列,

[0472] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,包括信号序列内含子(L1\_Intron\_L2),

[0473] -重链可变区(VH)的cDNA,在3'端带有剪接供体位点,

[0474] -小鼠免疫球蛋白 $\mu$ 增强子区域,

- [0475] -人免疫球蛋白重链  $\gamma$  1 基因 (IGHG1), 包括外显子CH1, 铰链, CH2和CH3, 间插内含子和带有聚腺苷酸化信号序列的3'UTR,
- [0476] -用于表达 $\kappa$ 轻链的表达盒, 其包含以下元件:
- [0477] -人巨细胞病毒的主要立即早期启动子和增强子 (hCMV IE1启动子),
- [0478] -合成5'UTR, 包括Kozak序列,
- [0479] -鼠免疫球蛋白重链信号序列, 包括信号序列内含子 (L1\_Intron\_L2),
- [0480] -轻链可变区的cDNA, 在3'端带有剪接供体位点 (VL),
- [0481] -内含子小鼠Ig- $\kappa$ 增强子区域,
- [0482] -人免疫球蛋白 $\kappa$ 基因 (IGK), 包括IGKC外显子和带有聚腺苷酸化信号序列的IGK 3' UTR,
- [0483] -用于表达鼠二氢叶酸还原酶 (DHFR)、适合在真核细胞中进行营养缺陷型选择的表达盒, 其包括
- [0484] -SV40早期启动子和起点的缩短版本,
- [0485] -鼠DHFR的编码序列,
- [0486] -SV40早期聚腺苷酸化信号。
- [0487] 将P6454转染到CHO-K1细胞中, 并用甲氨蝶呤 (MTX) 选择后分离稳定的细胞系, 并通过人IgG的ELISA筛选人源化抗体的产生。

[0488] 实施例3

[0489] IL-17A介导的原代正常人真皮成纤维细胞体外抑制作用

[0490] 正常人真皮成纤维细胞 (NHDF) 响应IL-17刺激产生hIL-6。在体外与抗IL17抗体预孵育细胞后, 进行测定以测量NHDF细胞对该IL-17刺激的细胞因子产生的抑制作用。

[0491] NHDF细胞在成纤维细胞生长培养基2 (Cambrex, #CC 3132) 中以 $4 \times 10^5$ 细胞/ml的密度培养, 在48孔板中每孔的体积为0.5ml。将NHDF细胞在37°C和5%CO<sub>2</sub>孵育过夜以使其贴壁。过夜孵育后, 将培养基吸出并替换为300 $\mu$ l新鲜培养基, 然后在一系列抗体浓度 (3000、1000、300、100、30、10、3、1、0ng/ml), 用抗体处理细胞30分钟。该抗体稀释系列是使用100 $\mu$ l/孔 (5x浓缩) 用培养基制成的。30分钟与抗体的预孵育后, 将细胞用10ng/ml hIL-17 (100 $\mu$ l 50ng/ml 5x浓度, R&D Systems#317-IL) 刺激, 并在37°C和5%CO<sub>2</sub>孵育过夜 (18h)。对于未刺激的对照, 使用100 $\mu$ l培养基 (有和没有抗体)。孵育期后, 将上清液转移到新试管中, 立即进行分析, 或保存在-80°C, 直到进行ELISA分析。

[0492] 实施例4

[0493] 人IL6 ELISA

[0494] 根据制造商的说明书, 使用hIL-6ELISA (BD Biosciences#555220), 测量培养上清液中的hIL-6水平, 以评估抗体抑制IL-17诱导的hIL-6的能力。

[0495] 将100 $\mu$ l稀释的捕获抗体 (在包被缓冲液中以1:250稀释) 添加到96孔Nunc MaxiSorp板 (Nunc#456537) 的每个孔中, 并在4°C下孵育过夜。吸板, 用洗涤缓冲液洗涤3次, 在室温下用200 $\mu$ l/孔的测定稀释剂封闭1小时。吸板, 用洗涤缓冲液洗涤3次, 然后根据制造商的说明添加100 $\mu$ l标准品和测定样品, 并在室温下孵育2小时。吸板, 用洗涤缓冲液洗涤至少3次。将100 $\mu$ l缀合物 (检测抗体+酶, 在测定稀释液中以1:250稀释) 添加到每个孔中, 并在室温下孵育1小时。吸板, 用洗涤缓冲液洗涤至少五次。将100 $\mu$ l TMB底物添加到每个孔中,

并孵育直至显示足够的颜色以供读取。用50 $\mu$ l/孔的1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,并在30分钟内在读板器上以450nm的波长读板。

[0496] 实施例5

[0497] 基于表面等离子体共振的分析(基于SPR的分析)

[0498] 所有测量均使用BIAcore 3000仪器在25℃进行。系统和样品缓冲液为HBS-EP (10mM HEPES,150mM NaCl,3.4mM EDTA,0.005%聚山梨酯20(v/v))。对BIAcore CM5传感器芯片进行了预处理。相继地在流通池上注射0.1% SDS,50mM NaOH,10mM HCl和100mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,30秒。

[0499] 胺偶联方案是按照制造商的说明书使用BIAcore 3000 wizard v.4.1完成的。EDC/NHS激活传感器表面后,将多克隆山羊抗人IgG抗体(Jackson)固定在所有传感器流通池(FC)上。以10 $\mu$ l/min,使用在10mM NaAc pH 5.0中的30 $\mu$ g/ml多克隆山羊抗人IgG抗体,处理7分钟,以固定约10,000RU的抗体捕获系统。通过用乙醇胺饱和,使表面失活。将该人捕获系统传感器以10 $\mu$ l/min用huIgG分析物(Bayer)结合5个循环,进行2分钟处理,然后以30 $\mu$ l/min用10mM甘氨酸pH 1.7再生3min。

[0500] 第二,注射抗体以形成捕获系统。

[0501] 第三,在规定的浓度范围内注射抗原。注射抗原后获得的结合反应(共振单位,RU)与结合抗体的抗原量相关,并针对所用抗原浓度范围作图。通过适当的计算机软件(例如Xlfit4,IDBS Software)分析所得的线性图,该软件拟合2参数线,因此可以确定y轴截距作为生物活性的读数。

[0502] 本发明的一些实施方案

[0503] 1.一种产生编码人源化免疫球蛋白可变结构域的核酸序列的方法,包括以下步骤

[0504] a) 比对非人重链或轻链可变结构域的氨基酸序列

[0505] 与

[0506] 所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体,其中所述第一人源化变体通过将非人抗体重链或轻链可变结构域的CDR或高变区或特异性决定残基嫁接到以下序列上获得:

[0507] i) 与非人可变结构域具有最高序列同源性的人种系氨基酸序列,

[0508] 或

[0509] ii) 在比对时具有比单个人种系氨基酸序列更高的同源性的两个或两个以上人种系氨基酸序列片段,

[0510] 或

[0511] iii) 允许维持VH/VL角的人种系氨基酸序列

[0512] (具有最大水平的氨基酸序列同一性),

[0513] b) 鉴定比对的构架位置,其中,在所述位置,非人重链或轻链可变结构域和所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体具有不同的氨基酸残基,并且由于该差异而影响该可变结构域(与相应的另一可变结构域组合为Fv)的抗原结合和/或三维结构,

[0514] c) 修饰所述非人重链或轻链可变结构域的第一人源化变体,其中将步骤b)中鉴定的一个或多个氨基酸残基,替换为比该替换的氨基酸残基较小地直接影响该可变结构域(与相应的另一可变结构域组合为Fv)的抗原结合和/或三维结构的氨基酸残基,

[0515] d) 产生编码该修饰的可变结构域的核酸序列,从而产生编码人源化免疫球蛋白可变结构域的核酸序列。

[0516] 2. 根据实施方案1所述的方法,其中步骤b) 还包括使用同源性建模生成所述非人可变结构域或所述非人抗体的三维模型。

[0517] 3. 根据实施方案1至2中任一项所述的方法,其中步骤b) 还包括:将拓扑学分类器I (内部侧链),E (外部侧链),C (接触重链),A (抗原接触),L (连接抗原),S (参与盐桥) 或N (无其它=没有特定相互作用) 之一分配给所有氨基酸残基。

[0518] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的方法,其中,步骤b) 还包括为每个差异分配分数0、1、2、3或4。

[0519] 5. 根据实施方案4所述的方法,其中

[0520] -拓扑学E的氨基酸残基变化为除脯氨酸外的任何氨基酸残基,得分为0,且变化为脯氨酸,得分为3或4,

[0521] -拓扑学I的氨基酸残基,变化为侧链较小的氨基酸残基,得分为0;替换为具有多一个碳原子的侧链的氨基酸残基,得分为1;替换为具有多两个碳原子的侧链的氨基酸残基,得分为2;替换为具有多三个碳原子的侧链的氨基酸残基,得分为3;且所有其他变化,得分为4,

[0522] -拓扑学A的氨基酸残基变化为任何氨基酸残基,得分为4,

[0523] -拓扑学C的氨基酸残基变化为非疏水性氨基酸残基,得分为3,

[0524] -拓扑学S的氨基酸残基变化为带相反电荷或不带电荷的氨基酸残基,如果该盐桥是暴露于溶剂的,则得分为3,且如果该盐桥为内部的,则得分为4。