

一种基于结构稳定性的抗体人源化设计流程

钟强*

(中国科学院生物物理研究所, 核酸生物学重点实验室, 北京 100101)

摘要: 本研究开发了基于结构稳定性的抗体人源化设计流程, 进一步提高了抗体人源化设计的效率, 减小了抗体药物引起的免疫原性。使用CDR移植方法, 排除了移植导致的抗体VH和VL链内和链间结合能过高的结构模板。使用人源化框架筛选方法排除了不同人源抗体VH和VL组合方式导致的抗体VH和VL链内和链间结合能过高的组合类型。通过使用VH和VL的链内和链间结合能筛选出的人源化抗体VH和VL组合类型, 能有效预测实验结果。结果表明, 基于VH和VL的链内和链间结合能的抗体人源化方法可以辅助人源化抗体的筛选。

关键词: 抗体人源化; CDR移植; 抗体结构稳定性; 抗体VH-VL结合能

A computational antibody humanization pipeline based on the structural stability of antibody

ZHONG Qiang*

(Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In this research, we report a computational antibody humanization pipeline based on the structural stability of antibody. It increased the efficiency of antibody humanization and decreased the immunogenicity of antibody drug. In this pipeline, CDR grafting excluded antibody structures which increase intra and inter VH-VL binding energy. Human germline framework selection excluded human VH-VL combination which increased intra and inter VH-VL binding energy. The resulted humanized antibodies are ranked and compared to experimental dataset, which confirms the validity of humanized antibody design by intra and inter VH-VL binding energy.

Key Words: antibody humanization; CDR grafting; structural stability of antibody; antibody VH-VL binding energy

在已经上市和正在研发的抗体药物中, 人源化抗体药物占据了很大的比例^[1]。这些人源化抗体主要是通过改造非人源抗体开发出来的。非人源抗体通常会引起人体的免疫反应。这种抗体药物免疫反应通常会引起药物的药代动力学变化、减少药物的半衰期、降低药物的疗效, 甚至带来副作用^[2]。为了减少非人源抗体引起的免疫反应, 通

常会对抗体药物进行人源化设计^[3]。通过移植非人源抗体的互补决定区(complementarity determining region, CDR)到人源框架上, 可以保留抗体药物对靶分子的识别作用, 减小非人源抗体重链可变区(variable heavy chain, VH)和轻链可变区(variable light chain, VL)框架区域引起的免疫反应^[4,5]。目前常用的CDR移植方法主要有两种, 分别是基于

收稿日期: 2021-09-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2014AA021103)

*通信作者: E-mail: zhongqiang@ibp.ac.cn

抗体文库的筛选方法^[6], 以及基于计算机辅助抗体人源化的筛选方法^[7]。

抗体文库筛选方法的基本原理是通过克隆非人源抗体的CDR序列到人源抗体框架文库中, 表达CDR移植的人源VH和VL抗体, 从中筛选出能与靶分子结合的抗体。该方法的优点是可以直接大规模筛选出与靶分子结合的人源化抗体; 其缺点是实验工作量大, 需要大规模鉴定出具有亲和力的人源化抗体, 实验成本和人力成本高, 成功率低。Jones等^[8]将鼠源抗体的CDR移植到人源抗体上, 使人源抗体获得鼠源抗体识别靶蛋白的能力, 这些人源化抗体由于CDR边界氨基酸发生改变, 导致人源化抗体与靶蛋白的亲和力下降。为了恢复人源化抗体的亲和力, Foote等^[9]通过突变CDR周围的氨基酸, 提高了人源化抗体识别靶蛋白的能力。为了筛选到高亲和力的人源化抗体, Wu等^[10]同时突变了CDR和周围的氨基酸, 获得了比鼠源抗体亲和力高出500倍的人源化抗体。后来的实验进一步证实, 抗体的CDR和框架区域具有很高的可塑性, 同时突变CDR和框架区的氨基酸可以得到高亲和力的人源化抗体^[11]。为了增加氨基酸突变位点, 提高筛选通量和实验效率, Elter等^[12]在突变细胞筛选环节加入了高通量测序方法, 减少了克隆鉴定有效抗体的实验工作量。

计算机辅助抗体人源化的基本原理是通过非人源抗体序列相似性筛选人源VH和VL框架序列, 构建人源化抗体结构模型, 计算人源化抗体结构稳定性, 筛选VH和VL组合类型, 实验验证人源化抗体与靶分子的亲和力。该方法的优点是大量计算排除了结构不稳定的人源化抗体, 实验只需验证少数的VH和VL组合类型。比如, 通过突变鼠源抗体的框架区域序列, 提高鼠源抗体的人源化序列比例, 可以得到近似人源的高亲和力抗体^[13]。该研究表明, 保持VH和VL框架区域的部分鼠源特性, 有利于保持鼠源抗体的靶蛋白识别能力。为了保持鼠源抗体VH和VL框架区域的相对空间位置, Bujotzek等^[14]通过机器学习的方法筛选VH和VL的组合方式, 结果表明, 保持人源抗体VH和VL相对空间位置与鼠源抗体一致, 有利于保持CDR的空间构象不变, 从而保持抗体与靶蛋白的亲和力。比较鼠源抗体与人源化抗体的CDR空

间构象, 结果表明, 有效的人源化抗体与鼠源抗体具有相似的CDR构象, 人源化失败的抗体的CDR构象与鼠源抗体不同^[15]。因此, 现有的计算方法主要通过最大限度保持CDR构象, 提高鼠源抗体框架区域的人源化比例, 从而减少人源化抗体引起的免疫原性^[16]。

本研究通过结构模拟, 实现抗体CDR移植和框架区域人源化; 对人源化的抗体进行结构优化, 计算VH和VL的链内和链间结合能; 比较不同人源VH和VL组合类型的链内和链间结合能, 从中筛选能量最优的组合类型。本研究提出了一种基于结构稳定性的抗体人源化筛选方法, 减少了实验的工作量, 加速了抗体人源化过程。

1 材料与方法

1.1 抗体可变区结构和序列数据库

从IMGT^[17]下载抗体结构数据, 对每个抗体结构进行处理。(1)检查抗体VH和VL结构域完整性; (2)对缺失侧链的抗体进行结构建模; (3)计算VH和VL链内和链间结合能, 过滤掉链内和链间结合能过大的抗体; (4)统计VH和VL序列相同的抗体, 筛选链内和链间结合能最低的抗体作为该VH和VL序列组合的代表性抗体, 识别VH和VL序列的CDR区域并进行标记。

1.2 人源抗体框架序列数据库

从IMGT^[17]下载抗体序列数据库, 从中筛选出人源抗体VH和VL序列, 识别VH和VL序列的框架区域并进行标记。

1.3 抗体CDR移植和人源化框架筛选

如图1所示, 程序自动定义出VH和VL序列的CDR区域序列, 根据抗体序列同源性从抗体结构数据库中筛选出同源结构, 进行结构建模, 包括CDR序列移植、CDR结构建模。计算抗体结构稳定性, 根据抗体结构稳定性进行排序, 筛选排名靠前的CDR移植抗体。通过CDR移植抗体的序列, 搜索人源VH和VL序列数据库, 筛选序列同源性排名靠前的人源框架。将人源抗体框架序列移植到CDR移植后抗体上, 进行主链和侧链结构优化, 计算结构稳定性。根据人源化抗体结构稳定性进行排序, 筛选出排名靠前的人源化抗体结构。软件名为CDRGraft, 具体方法如下所示。

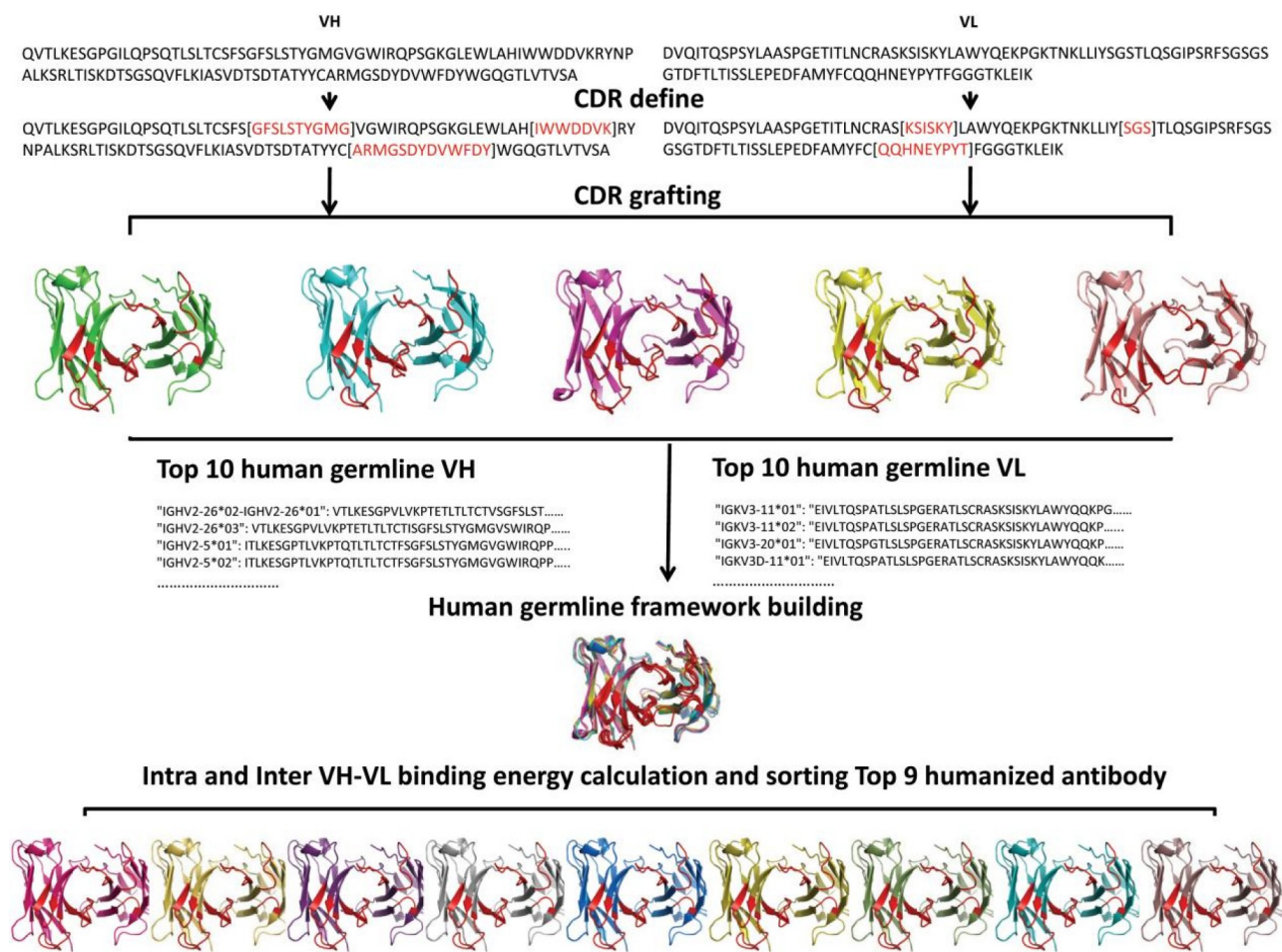


图1 抗体人源化计算流程

输入的抗体VH和VL序列被程序自动识别出CDR区域序列, 然后根据序列同源性从抗体结构数据中筛选出排名靠前的抗体结构, 进行CDR序列移植, CDR结构建模。根据移植后的抗体结构稳定性, 筛选出排名靠前的CDR移植后抗体。根据这些移植后抗体的序列同源性, 从人源抗体VH和VL序列数据库中筛选出同源性排名靠前的人源化框架。将人源VH和VL框架序列移植到CDR移植后抗体结构上, 计算抗体结构稳定性, 根据稳定性进行排序, 输出排名靠前的人源化抗体序列。

1.3.1 抗体主链构象模拟

抗体的主链构象可以通过几何约束依赖的逆向运动学方法进行计算^[18-20]。通过固定键长、键角, 允许二面角变化, 减少了主链的构象空间。在周围环境的约束下, 可以选择出能量较低的构象。如图2所示, 从主链的初始构象出发, 可以构

建出6R的逆向运动学单元, 这些逆向运动学单元相互嵌套形成了分层迭代的6R问题, 从而可以计算出抗体主链的构象空间。

N、CA和C原子是参与逆向运动学求解的主链原子。第一层共有8个原子, 红色的原子在求解过程中保持位置不变, 这些原子的位置在其余各层求解过程中都作为约束原子, 其二面角保持不变。在第一层中, 左侧的三个原子可以定义为ArmL坐标系, 右侧的三个原子可以定义为ArmR坐标系, 中间的原子可以定义为ArmM坐标系。左右两侧四个原子可以定义为ArmB坐标系。使用这种方法可以定义其余各层的坐标系统。

每一层的6R逆向运动学问题可以用下式1表示:

$$(ArmL_1^{0 \rightarrow 1}, ArmM_1^{0 \rightarrow 1}, ArmR_1^{0 \rightarrow 1}) = f^{-1}(ArmB_1^0) \quad (1)$$

符号0→1表示主链的构象从初始状态转换到

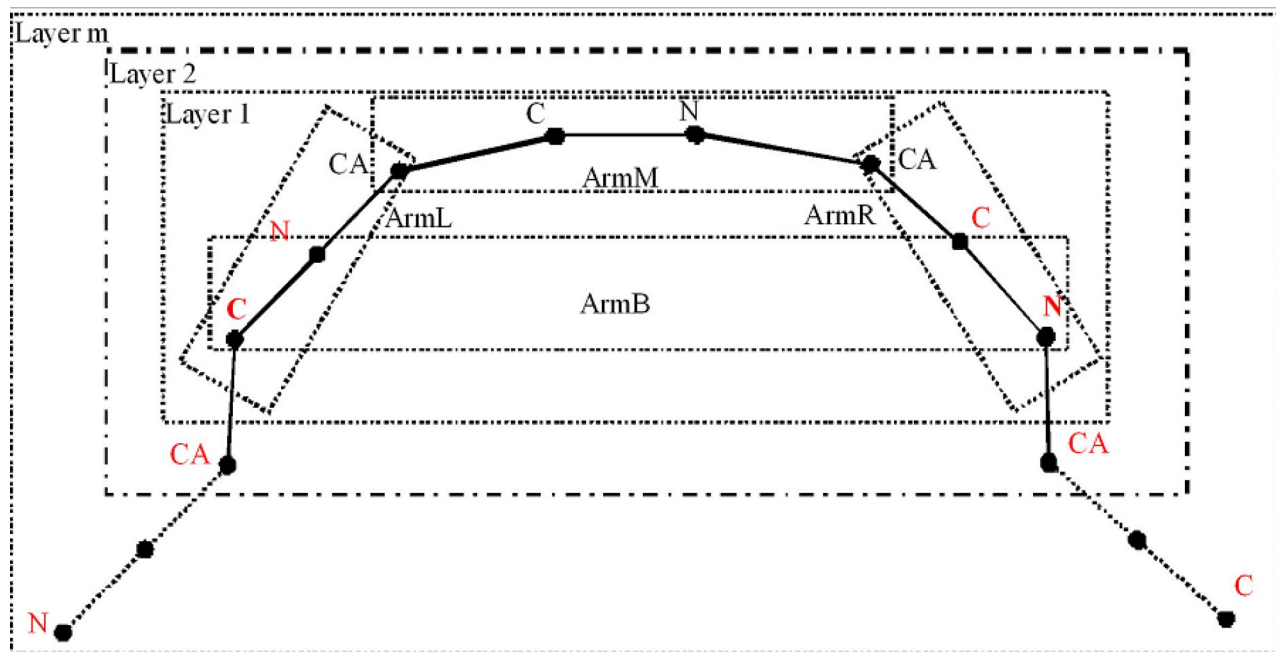


图2 分层的逆向运动学方法

新的状态。如下式2和式3所示,使用该方法可以从主链的初始构象计算出其他各层的可能构象空间。

$$(ArmL_2^{0 \rightarrow 1}, ArmM_2^{0 \rightarrow 1}, ArmR_2^{0 \rightarrow 1}) = f^{-1}(ArmB_2^0) \quad (2)$$

$$(ArmL_m^{0 \rightarrow 1}, ArmM_m^{0 \rightarrow 1}, ArmR_m^{0 \rightarrow 1}) = f^{-1}(ArmB_m^0) \quad (3)$$

上式中 m 表示第 m 层,0表示初始构象,1表示所有从初始构象解出的子构象。所有的第1轮构象成为第2轮构象的输入构象,可以表示为1→2。由此可以推导出第 $j-1$ 轮构象是第 j 轮构象的输入构象(式4)。

$$(ArmL_i^{j-1 \rightarrow j}, ArmM_i^{j-1 \rightarrow j}, ArmR_i^{j-1 \rightarrow j}) = f^{-1}(ArmB_i^{j-1}) \quad (4)$$

上式中, i 表示第 i 层, j 表示第 j 轮构象。如果构象在前面的计算中已经出现,则在该轮计算中被舍弃,如果该构象与周围原子发生碰撞则该构象被舍弃^[21]。所有保留的构象可以进行侧链模拟和能量计算。

1.3.2 抗体侧链构象模拟

抗体的主链构象确定的情况下,侧链的构象可以通过侧链转子库中的侧链二面角进行构建^[22]。每个侧链与主链的相互作用能量可以表示为范德华相互作用和静电相互作用,如果侧链原子与主链发生碰撞则侧链构象被舍弃。如果没有提供侧链构象,则会产生连续的侧链构象。不同

残基之间的侧链可以发生相互作用。通过计算侧链之间的两两相互作用能,使用DEE(dead-end elimination)方法消除那些相互作用能过高的侧链构象^[23],然后通过branch-and-terminate方法计算出全局能量最小的构象^[24]。

对于侧链模拟后的主链构象,非共价重原子之间的距离小于2.0 Å则被舍弃,否则用于计算相互作用能量。如果相互作用能量大于0,则主链构象被舍弃。最后,所有保留的抗体构象用于后续分析。这些有序产生的抗体构象组成了抗体的构象转换空间。计算每个抗体构象的链内和链间结合能,从中筛选出能量最低的抗体构象。

1.3.3 抗体CDR移植方法

根据输入的抗体序列与抗体结构数据库的序列同源性,选择序列相似性排名靠前的抗体结构进行CDR结构移植。根据CDR序列相似性可以分为:(1)无插入或者删除的CDR序列移植,该类型CDR直接使用原始CDR主链构象作为主链模拟的起始构象,进行CDR构象空间搜索;(2)对于存在插入或者删除的CDR序列移植,需要对CDR进行结构重建,然后进行CDR构象空间搜索。计算CDR的结合能,筛选结合能最低的构象作为CDR移植后抗体的构象,并计算CDR移植后抗体的VH和VL链内和链间结合能。根据结合能对CDR移植

后抗体进行排序,筛选出稳定性靠前的抗体结构。

1.3.4 抗体人源化框架筛选

使用CDR移植后抗体的序列搜索人源VH和VL序列数据库,筛选出序列同源性排名靠前的人源抗体序列。突变CDR移植后抗体的框架序列,使之与人源抗体VH和VL的框架序列一致。通过主链模拟和侧链模拟方法优化人源化抗体结构,计算VH和VL结构域的链内和链间结合能,排除那些链内和链间结合能大于给定阈值的人源化抗体。根据人源化抗体的链内和链间结合能进行排序,筛选出排名靠前的人源化抗体结构。

1.4 计算人源化抗体链内和链间结合能

选择结构数据库中的人源化抗体计算VH和VL的链内和链间结合能。如表1所示,3个人源化抗体结构1AD9、3L7F、5F3H的可变区用于计算链内

和链间结合能。

1.5 计算非人源抗体链内和链间结合能

如表2所示,选择结构数据库中的非人源抗体计算VH和VL链内和链间结合能。使用同源建模的方法,突变非人源抗体VH和VL的框架序列(保持抗体的CDR区域序列不变),使其与表1中的人源VH和VL的框架序列一致;突变非人源抗体1AE6的框架序列,使其与表1中的1AD9一致;突变3L7E的框架序列,使其与表1中的3L7F一致;突变5F3B的框架序列,使其与表1中的5F3H一致。然后,对同源结构模型进行优化,计算VH和VL链内和链间结合能。

1.6 计算其他非人源抗体链内和链间结合能

如表3所示,选择结构数据库中的其他非人源抗体计算VH和VL链内和链间结合能。突变其他非

表1 人源化抗体结构的VH和VL序列

PDBID	链	人源化抗体序列
1AD9	1AD9H	EIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYYINWMRQAPGQGLEWIGWIDPGSGNTKYNEKFK-GRATLTVDSTNTAYMELSSLRSEDATFYFCAREKTTYYYAMDYWGQGTLLTVSS
	1AD9L	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRSSKSLHLSNGDTFLYWFGQKPGKAPKLLMYRMSNLAGSVPSRFSGSGSG-TEFTLTISLQPDFFATYYCQMHLEYPTFGQGTKVEVK
3L7F	3L7FH	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRL-TISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATYYCARMGSDYDVWFDYWGQGTLLTVSS
	3L7FL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKISKPLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQHNEYPTFGQGTKLEIK
5F3H	5F3HH	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFESSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGSYTSYPDSVKGRF-TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDYAMNYWGQGTLLTVSS
	5F3HL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLNPEDFATYYCQQHYSPTWTFGGGTKVEIK

注:加粗和下划线部分代表抗体的CDR序列

表2 非人源抗体结构的VH和VL序列

PDBID	链	非人源抗体结构序列
1AE6	1AE6H	QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWMKQKPGQGLEWIGWIDPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTS-STAYMQLSSLTSEDATVYFCAREKTTYYYAMDYWGQGTSTVSA
	1AE6L	DIVMTQAAPSPVPTPGESLSISCRSSKSLHLSNGDTFLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLAGSVPDPRFSGSGSG-TAFTLRVSRVEADVGVYYCQMHLEYPTFGAGTKLELK
3L7E	3L7EH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRL-TISKDTSGSQVFLKIASVDTSDTATYYCARMGSDYDVWFDYWGQGTLLTVSA
	3L7EL	DVQITQSPSYLAASPGETITLNCRASKISKPLAWYQKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAMYFCQQHNEYPTFGGGTKLEIK
5F3B	5F3BH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFESSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTSYPDSVKGRFTISRDN-KNTLYLQMSSLRSEDATAMYYCARQDYAMNYWGQGTLLTVSS
	5F3BL	DIEMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLLYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTT-TISSVNAEDLAVYYCQQHYSPTWTFGGGTKVEIK

注:加粗和下划线部分代表抗体的CDR序列

表3 其他非人源抗体结构的VH和VL序列

PDBID	链	其他非人源抗体结构序列
1MJJ	1MJJH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS[<u><i>GYTFDYY</i></u>]INWVKQRPQGQLEWIGN[<u><i>IDPGSGNT</i></u>]HYNEKFKN-KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYC[<u><i>AREKTTYIAMDY</i></u>]WGQGTLLTVSA
	1MJJL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSS[<u><i>KSLLSNGDTF</i></u>]LYWFLQRPQGQSPQLLIY[<u><i>RMS</i></u>]NLASGVPDRFSGSGS-GTAFTLRISRVEAEDVGYYC[<u><i>MQHLEYPFT</i></u>]FGAGTKLEIK
3L5W	3L5WH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFS[<u><i>GFSLSITYGMC</i></u>]VGWIRQPSGKGLEWLAH[<u><i>IWWDDVK</i></u>]RYNPALKSRL-TISKDTSGSQVFLKIASVSDTSDTATYYC[<u><i>ARMGSDYDVWFDY</i></u>]WGQGTLLTVSA
	3L5WL	DVQITQSPSYLAASPGETITLNCRAS[<u><i>KSISKY</i></u>]LAWYQEKPGKTNKLLIY[<u><i>SGS</i></u>]TLQSGIPSRFSGSGSGTDFLTIS-SLEPEDFAMYYFC[<u><i>QOHNEYPT</i></u>]FGGGTKLEIK
5XS7	5XS7H	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS[<u><i>GFTFSSYA</i></u>]MSWVRQTPEKRLELVAH[<u><i>ISSGGSYT</i></u>]YYPDTVKGRFTISRD-NAKNTLYLQMSSLKSEDAMYYC[<u><i>ARQDYAMNY</i></u>]WGQGTLLTVSS
	5XS7L	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS[<u><i>QDVSTA</i></u>]VAWYQQRPGQSPKLLIY[<u><i>SAS</i></u>]YRYTGVPDRFTGSGSGTDFTF-TISSVQAEDLAVYYC[<u><i>QQHYSTPWT</i></u>]FGGGTKLEIK

注：加粗和下划线部分代表抗体的CDR序列

人源抗体的CDR区域序列，使其与表2中的非人源抗体CDR区域序列一致。突变其他非人源抗体1MJJ的CDR区域序列，使其与表2中的1AE6一致，突变3L5W的CDR区域序列，使其与表2中的3L7E一致，突变5XS7的CDR区域序列，使其与表2中的5F3B一致。使用同源建模的方法，突变其他非人源抗体的VH和VL框架序列，使其与表1中的人源VH和VL框架序列一致，对同源结构模型进行优化，计算VH和VL链内和链间结合能。

1.7 使用人源抗体结构筛选人源VH和VL组合

使用表1中的人源化抗体的VH和VL序列搜索人源抗体序列数据库，筛选出序列相似性排名前10的人源框架序列(表4)，进行两两组合，构建同源结构模型，计算VH和VL链内和链间结合能，筛选出排名前9的VH和VL组合类型。

1.8 使用非人源抗体结构筛选人源VH和VL组合

使用表2所示的非人源抗体结构为模板，对表4中的人源VH和VL组合类型进行同源建模。对非人源抗体模板的框架序列进行突变，使其与人源VH和VL框架序列一致，保持抗体CDR区域序列不变。对突变后的抗体结构进行主链和侧链结构优化。计算抗体的VH和VL链内和链间结合能，筛选出排名前9的人源VH和VL组合类型。

1.9 使用其他非人源抗体结构筛选人源VH和VL组合

使用表3所示的其他非人源抗体结构为模板对表4中的人源VH和VL组合类型进行同源建模。对

其他非人源抗体模板的框架序列进行突变，使其与人源VH和VL框架序列一致。突变抗体CDR序列，使其与表2所示的抗体CDR序列一致。对同源结构模型进行主链和侧链结构优化，计算VH和VL链内和链间结合能，筛选出排名前9的人源VH和VL组合类型。

2 结果

2.1 人源化抗体链内和链间结合能

计算表1中的人源化抗体的链内和链间结合能可以发现，这些人源化抗体的VH和VL结构域链内结合能数值范围在-500~-625 kcal/mol之间，VH和VL结构域之间的链间结合能范围在-49~-55 kcal/mol之间(表5)。

2.2 非人源抗体链内和链间结合能

计算表2中的非人源抗体的人源化结构模型的VH和VL链内和链间结合能可以发现，这些非人源抗体的人源化结构模型VH和VL链内结合能在-500~-625 kcal/mol之间，VH和VL链间结合能在-45~-55 kcal/mol之间(表6)。比较表5和表6可以发现，人源化结构模型的VH和VL链内和链间结合能大于IMGT数据库中抗体结构的VH和VL链内和链间结合能。由此推断，IMGT数据库中的抗体结构更稳定。

2.3 其他非人源抗体链内和链间结合能

计算表3中的其他非人源抗体的人源化结构模型的VH和VL链内和链间结合能可以发现，其他非

表4 排名前10的人源抗体VH和VL

排名	1AD9		3L7F		5F3H	
1	1AD9H	1AD9L	3L7FH	3L7FL	5F3HH	5F3HL
2	IGHV1-3*01	IGKV1-5*01	IGHV2-26*02- IGHV2-26*01	IGKV3-11*01	IGHV3-23*03	IGKV1D-12*02-IGKV1D- 12*01-IGKV1-12*02- IGKV1-12*01
3	IGHV1-18*04- IGHV1-18*01	IGKV1-5*03	IGHV2-26*03	IGKV3D-7*01- IGKV3/OR2-268*02- IGKV3/OR2-268*01	IGHV3-23*05	IGKV1-6*02-IGKV1-6*01
4	IGHV1-69D*01- IGHV1-69*13- IGHV1-69*12- IGHV1-69*01	IGKV1-5*02	IGHV2-5*02	IGKV3D-11*03	IGHV3-23*04	IGKV1D-13*02-IGKV1D- 13*01-IGKV1-13*02
5	IGHV1-69*05	IGKV1-17*01	IGHV2-5*01	IGKV3D-11*01	IGHV3-23D*01- IGHV3-23*01	IGKV1D-39*01-IGKV1- 39*01
6	IGHV1-69*16	IGKV1-16*01	IGHV2-5*09	IGKV3D-11*02	IGHV3-53*02	IGKV1-39*02
7	IGHV1-69*15	IGKV1-NL1*01	IGHV2-5*06- IGHV2-5*05	IGKV3-11*02	IGHV3-23*02	IGKV1-NL1*01
8	IGHV1-69*11	IGKV1-17*03	IGHV2-5*04	IGKV3D-20*02	IGHV3-66*04- IGHV3-66*02- IGHV3-66*01	IGKV1-5*01
9	IGHV1-69*17	IGKV1-9*01	IGHV2-5*08	IGKV3-20*01	IGHV3-66*03	IGKV1-5*03
10	IGHV1-69*14- IGHV1-69*06	IGKV1-17*02	IGHV2/OR16- 5*01	IGKV3D-15*01- IGKV3-15*01	IGHV3-53*01	IGKV1-27*01

表5 人源化抗体VH和VL链内和链间结合能

PDBID	VH链内结合能 (kcal/mol)	VL链内结合能 (kcal/mol)	VH和VL链间结合能 (kcal/mol)
1AD9	-620.885	-577.55	-53.3762
3L7F	-622.135	-524.21	-52.9754
5F3H	-584.2	-529.795	-49.1272

表6 非人源化抗体VH和VL链内和链间结合能

PDBID	VH链内结合能 (kcal/mol)	VL链内结合能 (kcal/mol)	VH和VL链间结合能 (kcal/mol)
1AE6	-573.325	-502.99	-46.0465
3L7E	-580.055	-552.54	-51.168
5F3B	-624.54	-543.245	-49.0268

人源抗体的人源化结构模型VH和VL链内结合能在-465~-625 kcal/mol之间, VH和VL链间结合能在-33~-51 kcal/mol之间(表7)。比较表6和表7可以发现, 其他非人源抗体的人源化结构模型链内和链间结合能更大。由此可知, 同源建模过程损失了部分抗体的结构稳定性。

2.4 人源抗体结构筛选人源VH和VL组合

使用表1中的人源抗体结构为模板, 计算表4

表7 其他非人源抗体VH和VL链内和链间结合能

PDBID	VH链内结合能 (kcal/mol)	VL链内结合能 (kcal/mol)	VH和VL链间结合能 (kcal/mol)
1MJJ	-476.5835	-525.58	-42.319
3L5W	-613.485	-553.34	-50.4224
5XS7	-542.58	-465.632	-33.7364

中的人源VH和VL组合的链内和链间结合能, 从中筛选出排名靠前的人源VH和VL组合类型。例如, 以1AD9为抗体结构模板, 两两组合10条人源VH和VL序列, 同源建模出人源抗体结构。经过结构优化, 计算出人源化抗体的VH和VL链内和链间结合能, 筛选出排名前9的VH和VL组合类型(表8)。VH和VL组合类型1AD9H-1AD9L的VH链内结合能为-620.885 kcal/mol, VL链内结合能为-577.55 kcal/mol, 链间结合能为-53.3762 kcal/mol。在所有组合类型中, 1AD9H-1AD9L的综合排名第5, 链间结合能排名第1。如表9所示, 以3L7F为模板, 计算出人源VH和VL链内和链间结合能。组合类型3L7FH-3L7FL的VH链内结合能为-622.135 kcal/mol, VL链内结合能为-524.21 kcal/mol, 链间结合能

表8 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为1AD9)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	IGHV1-3*01-1AD9L	-632.03	-587.265	-52.1395
2	IGHV1-3*01-IGKV1-NL1*01	-636.68	-566.865	-51.4032
3	IGHV1-69*11-1AD9L	-617.455	-585.245	-50.8565
4	IGHV1-69*15-1AD9L	-617.455	-585.245	-50.8565
5	<u>1AD9H-1AD9L</u>	-620.885	-577.55	-53.3762
6	IGHV1-69*05-1AD9L	-609.145	-585.795	-50.3606
7	IGHV1-69*16-1AD9L	-609.145	-585.795	-50.3606
8	1AD9H-IGKV1-NL1*01	-624.655	-567.66	-52.2981
9	IGHV1-69D*01-IGHV1-69*13- IGHV1-69*12-IGHV1-69*01- 1AD9L	-607.555	-585.535	-50.4236

表9 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为3L7F)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	3L7FH-IGKV3D-20*02	-622.685	-534.225	-52.9509
2	3L7FH-IGKV3-11*02	-623.15	-532.41	-52.8501
3	3L7FH-IGKV3-11*01	-623.1	-532.7	-49.4023
4	3L7FH-IGKV3D-15*01-IGKV3- 15*01	-622.76	-530.85	-49.9812
5	3L7FH-IGKV3-20*01	-623.025	-527.495	-52.8499
6	<u>3L7FH-3L7FL</u>	-622.135	-524.21	-52.9754
7	3L7FH-IGKV3D-7*01-IGKV3/OR2- 268*02-IGKV3/OR2-268*01	-622.955	-520.08	-50.3278
8	IGHV2-5*09-IGKV3D-20*02	-534.345	-537.82	-51.972
9	IGHV2-5*09-IGKV3-11*02	-534.225	-537.4	-52.1395

为-52.9754 kcal/mol, 综合排名第6, 链间结合能排名第1。如表10所示, 以5F3H为模板, 计算出人源VH和VL链内和链间结合能。组合类型5F3HH-

5F3HL的VH链内结合能为-584.2 kcal/mol, VL链内结合能为-529.795 kcal/mol, 链间结合能为-49.1272 kcal/mol, 综合排名第22, 链间结合能排

表10 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为5F3H)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	IGHV3-23*03-IGKV1-5*01	-594.215	-532.995	-49.6727
2	IGHV3-23*03-IGKV1-5*03	-594.215	-532.995	-49.6727
3	IGHV3-66*04-IGHV3-66*02- IGHV3-66*01-IGKV1-5*01	-592.085	-533.11	-49.1262
4	IGHV3-66*04-IGHV3-66*02- IGHV3-66*01-IGKV1-5*03	-592.085	-533.11	-49.1262
5	5F3HH-IGKV1-5*01	-589.84	-532.725	-49.9844
6	5F3HH-IGKV1-5*03	-589.84	-532.725	-49.9844
7	IGHV3-23*05-IGKV1-5*01	-589.975	-532.78	-49.4334
8	IGHV3-23*05-IGKV1-5*03	-589.975	-532.78	-49.4334
9	IGHV3-53*01-IGKV1-5*01	-588.515	-533.075	-49.2809
22	<u>5F3HH-5F3HL</u>	-584.2	-529.795	-49.1272

表11 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为1AE6)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	<i>IGHV1-3*01-1AD9L</i>	-563.805	-523.56	-53.0664
2	1AD9H-IGKV1-5*01	-571.56	-516.19	-48.7873
3	1AD9H-IGKV1-5*03	-571.56	-516.19	-48.7873
4	1AD9H-IGKV1-5*02	-570.355	-514.805	-50.2803
5	IGHV1-3*01-IGKV1-5*01	-562.675	-516.805	-52.8156
6	IGHV1-3*01-IGKV1-5*03	-562.675	-516.805	-52.8156
7	1AD9H-IGKV1-17*02	-571.985	-513.115	-46.9193
8	1AD9H-IGKV1-17*01	-573.86	-511.315	-46.7637
9	IGHV1-3*01-IGKV1-5*02	-564.015	-515.83	-52.033

表12 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为3L7E)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	IGHV2-5*08- <i>IGKV3D-20*02</i>	-592.675	-557.79	-47.9664
2	IGHV2-5*08- <i>3L7FL</i>	-591.1	-554.33	-50.4048
3	IGHV2-5*08- <i>IGKV3-11*02</i>	-592.775	-553.92	-48.2813
4	IGHV2-5*08- <i>IGKV3-20*01</i>	-592.655	-553.78	-48.0529
5	IGHV2-5*04- <i>IGKV3D-20*02</i>	-587.605	-557.455	-48.0891
6	<i>IGHV2-5*01-IGKV3D-20*02</i>	-586.38	-557.6	-48.1578
7	<i>IGHV2-5*02-IGKV3D-20*02</i>	-586.38	-557.6	-48.1578
8	IGHV2-5*08- <i>IGKV3-11*01</i>	-592.785	-551.235	-48.0565
9	IGHV2-5*04- <i>IGKV3-11*02</i>	-588.195	-554.85	-48.1239

名第8。由此可见, 采用IMGT数据库中抗体结构为模板构建的人源抗体, 可以用于计算VH和VL链内和链间结合能, 筛选出结构稳定的VH和VL组合类型。

2.5 非人源抗体结构筛选人源VH和VL组合

以表2中的非人源抗体结构为模板, 两两组合表4中的人源VH和VL序列, 构建人源抗体的同源结构模型, 计算出VH和VL的链内和链间结合能。

表13 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为5F3B)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	IGHV3-53*01-5F3HL	-635.005	-543.06	-47.9012
2	IGHV3-66*03-5F3HL	-635.005	-543.06	-47.9012
3	IGHV3-66*04-IGHV3-66*02- IGHV3-66*01-5F3HL	-634.26	-542.865	-48.038
4	IGHV3-23*03-5F3HL	-633.075	-543.08	-48.9234
5	IGHV3-53*02-5F3HL	-631.04	-543.06	-48.8344
6	<i>IGHV3-23*03-IGKV1-5*01</i>	-632.805	-542.15	-46.7451
7	<i>IGHV3-23*03-IGKV1-5*03</i>	-632.805	-542.15	-46.7451
8	<i>IGHV3-66*04-IGHV3-66*02- IGHV3-66*01-IGKV1-5*01</i>	-633.58	-542.03	-45.8075
9	<i>IGHV3-66*04-IGHV3-66*02- IGHV3-66*01-IGKV1-5*03</i>	-633.58	-542.03	-45.8075

表14 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为1MJJ)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	<u>IGHV1-3*01-1AD9L</u>	-478.9615	-524.525	-47.2008
2	IGHV1-3*01-IGKV1-5*02	-476.967	-521.98	-50.0913
3	IGHV1-3*01-IGKV1-16*01	-477.054	-522.43	-49.342
4	IGHV1-3*01-IGKV1-9*01	-475.377	-523.185	-48.7738
5	IGHV1-3*01-IGKV1-5*01	-476.9535	-520.045	-49.9078
6	IGHV1-3*01-IGKV1-5*03	-476.9535	-520.045	-49.9078
7	<u>1AD9H-1AD9L</u>	-476.5835	-525.58	-42.319
8	1AD9H-IGKV1-9*01	-475.6875	-525.28	-41.6717
9	1AD9H-IGKV1-5*01	-475.487	-520.96	-46.0397

表15 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为3L5W)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	<u>3L7FH-IGKV3-11*02</u>	-610.075	-560.365	-54.1098
2	<u>3L7FH-IGKV3-11*01</u>	-609.355	-555.015	-55.5043
3	<u>3L7FH-IGKV3D-20*02</u>	-612.405	-556.7	-49.979
4	<u>3L7FH-3L7FL</u>	-613.485	-553.34	-50.4224
5	<u>3L7FH-IGKV3-20*01</u>	-612.31	-551.26	-52.3325
6	<u>IGHV2-5*09-IGKV3-11*02</u>	-599.435	-561.195	-53.9434
7	IGHV2-5*01-IGKV3-11*02	-598.96	-561.09	-53.0765
8	IGHV2-5*02-IGKV3-11*02	-598.96	-561.09	-53.0765
9	IGHV2-5*04-IGKV3-11*02	-597.415	-561.205	-53.9548

如表11所示,以1AE6为模板,计算VH和VL的链内和链间结合能,排名第1的组合类型IGHV1-3*01-1AD9L, VH链内结合能为-563.805kcal/mol, VL链内结合能为-523.56 kcal/mol, 链间结合能为-53.0664 kcal/mol, 该组合类型在表8中排名第1。如表12所示,以3L7E为模板,计算VH和VL链内和链间结合能,没有发现与表9一致的组合类型,可以发现与表9一致的VH或者VL序列(标粗斜体的基因型)。如表13所示,以5F3B为模板,计算VH和VL链内和链间结合能,可以发现排名6~9的组合类型在表10中均有出现。由此可见,采用非人源抗体为模板构建的人源化抗体,可以用于计算VH和VL链内和链间结合能,筛选出与IMGT数据库中抗体结构相似的VH和VL组合类型。

2.6 其他非人源抗体结构筛选人源VH和VL组合

以表3中的非人源抗体结构为模板,两两组合表4中的人源VH和VL序列,构建人源抗体的同源

结构模型,计算出VH和VL的链内和链间结合能。如表14所示,以1MJJ为模板,计算VH和VL的链内和链间结合能,排名第7的组合类型1AD9H-1AD9L, VH链内结合能为-476.5835 kcal/mol, VL链内结合能为-525.58 kcal/mol, 链间结合能为-42.319 kcal/mol, 该组合类型在表8中排名第5。如表15所示,以3L5W为模板,计算VH和VL的链内和链间结合能,排名第4的组合类型3L7FH-3L7FL, VH链内结合能为-613.485 kcal/mol, VL链内结合能为-553.34 kcal/mol, 链间结合能为-50.4224 kcal/mol, 该组合类型在表9中排名第6。如表16所示,以5XS7为模板,计算VH和VL的链内和链间结合能,没有发现与表10一致的组合类型,可以发现与表10一致的VH或者VL序列(标粗斜体的基因型)。由此可见,采用其他非人源抗体为模板构建的人源化抗体,可以用于计算VH和VL链内和链间结合能,筛选出与IMGT数据库中抗体

表16 链内和链间结合能排名前9位的人源VH和VL组合类型(抗体结构模板为5XS7)

排名	VH和VL基因型	VH链内结合能(kcal/mol)	VL链内结合能(kcal/mol)	VH和VL链间结合能(kcal/mol)
1	IGHV3-23*04- <i>5F3HL</i>	-552.45	-464.9985	-36.4064
2	IGHV3-23D*01-IGHV3-23*01- <i>5F3HL</i>	-551.525	-465.6155	-36.5693
3	IGHV3-23*05- <i>5F3HL</i>	-550.71	-466.2215	-36.3889
4	IGHV3-23*02- <i>5F3HL</i>	-550.395	-464.6275	-36.3646
5	<i>IGHV3-53*01-5F3HL</i>	-548.72	-465.601	-36.9109
6	IGHV3-66*03- <i>5F3HL</i>	-548.72	-465.601	-36.9109
7	<i>IGHV3-66*04-IGHV3-66*02-IGHV3-66*01-5F3HL</i>	-547.765	-464.9785	-37.0653
8	IGHV3-53*02- <i>5F3HL</i>	-547.575	-465.2645	-36.868
9	<i>IGHV3-23*03-5F3HL</i>	-546.56	-466.0445	-36.8587

结构相似的VH和VL组合类型。

3 讨论

通过VH和VL序列搜索抗体结构数据库, 筛选序列相似性排名靠前的抗体结构模板进行CDR移植, 对CDR区域进行主链和侧链模拟, CDR区域移植成功后, 根据抗体序列搜索人源序列数据库, 筛选排名靠前的人源序列组合类型, 突变抗体框架序列, 使其与人源序列一致, 对框架区域进行主链和侧链模拟, 计算VH和VL结构域的链内和链间结合能, 筛选出排名靠前的人源序列组合类型。从以上流程可以看出, 我们引入了基于结构稳定性的CDR移植和框架区域人源化方法。通过基于结构的CDR移植方法, 重建了非人源抗体的CDR空间构象, 排除了CDR移植后抗体VH和VL链内和链间结合能过高的结构模板。通过基于结构的框架区域人源化方法, 重建了人源抗体的框架区域空间构象, 排除了框架区域人源化后抗体VH和VL链内和链间结合能过高的组合类型。因此, 本研究采用的计算方法核心思想就是保证非人源抗体的CDR空间构象在人源化以后变化最小。

保持抗体CDR区域的空间构象不变, 是CDR移植的核心目标。为了达成这个目标, 可以通过突变CDR周围的氨基酸, 减少影响CDR空间构象的因素, 或通过筛选VH和VL的组合类型, 减少VH和VL的相对空间构象变化, 从而减少CDR空间构象的变化。为了实现以上目标, 研究人员首先

将非人源抗体的CDR序列移植到人源抗体文库中, 初步筛选出与靶分子具有一定亲和力的VH和VL组合类型^[25-27]。然后, 通过突变CDR区域周围的氨基酸, 增加人源化抗体与靶分子的亲和力^[28]。在此基础上, 提高VH和VL, 以及CDR区域的人源化序列比率^[29,30]。上述实验步骤中, 有两个关键的技术瓶颈。第一个是从人源抗体文库中筛选出具有一定活性的CDR移植VH和VL组合类型。该步骤的实验量大, 人力成本高, 成功率低^[31]。为了减少实验工作量, 研究者通常会使用序列同源性对VH和VL组合类型进行初步筛选, 然后通过少量的实验工作从候选的VH和VL类型中筛选出具有一定亲和力的人源框架^[32]。研究表明, 高序列相似性并不会导致高结构相似性^[33]。因此, 从序列相似性排名靠前的少量VH和VL组合类型中筛选人源框架具有较高的失败率^[34]。如何从大量的人源序列组合类型中筛选出结构相似性排名靠前的VH和VL序列组合类型, 成为计算机辅助抗体人源化设计的重要目标^[7,35]。筛选VH和VL组合类型之前, 需要确保抗体模板的CDR空间结构保持稳定。这些CDR空间结构稳定的抗体模板保证了筛选到的VH和VL组合类型不会影响CDR的空间构象。通常情况下, 待预测抗体的CDR空间构象是没有的^[36], 如何通过非人源抗体的序列重建抗体的CDR空间构象成为了重要的技术瓶颈^[7]。

本研究基于结构稳定性的CDR移植和框架区域人源化方法, 解决了抗体人源化的两个重要的技术瓶颈, 从非人源抗体序列重建抗体的CDR空

间构象,以CDR空间构象为约束条件筛选人源VH和VL组合类型。结果表明,该计算流程可以从大量VH和VL组合类型中筛选出结构稳定的人源化抗体,相较于传统的基于序列相似性方法,基于结构稳定性的方法可以更好地捕捉到序列差异对抗体稳定性的影响。实验验证的人源化抗体结构1AD9、3L7F、5F3H^[30,37,38]在预测结果中排名靠前(表11~表16),表明基于结构稳定性的抗体人源化方法具有较高的准确性。

致谢: 本研究得到了国家高技术研究发展计划(863计划)(2014AA021103)的资助。感谢姜继忠研究员的积极讨论和建议。

参考文献

- [1] Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 1-30
- [2] Waldmann H. Human monoclonal antibodies: the benefits of humanization. *Methods Mol Biol*, 2019, 1904: 1-10
- [3] Ministro J, Manuel AM, Goncalves J. Therapeutic antibody engineering and selection strategies. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2020, 171: 55-86
- [4] Safdari Y, Farajnia S, Asgharzadeh M, et al. Antibody humanization methods – a review and update. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2013, 29(2): 175-186
- [5] Mayrhofer P, Kunert R. Nomenclature of humanized mAbs: early concepts, current challenges and future perspectives. *Hum Antibodies*, 2019, 27(1): 37-51
- [6] Henry KA, Kim DY, Kandalafi H, et al. Stability-diversity tradeoffs impose fundamental constraints on selection of synthetic human VH/VL single-domain antibodies from in vitro display libraries. *Front Immunol*, 2017, 8: 1759
- [7] Kurella VB, Gali R. Antibody design and humanization via in silico modeling. *Methods Mol Biol*, 2018, 1827: 3-14
- [8] Jones PT, Dear PH, Foote J, et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986, 321(6069): 522-525
- [9] Foote J, Winter G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol*, 1992, 224(2): 487-499
- [10] Wu H, Nie Y, Huse WD, et al. Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *J Mol Biol*, 1999, 294(1): 151-162
- [11] Finlay WJ, Cunningham O, Lambert MA, et al. Affinity maturation of a humanized rat antibody for anti-RAGE therapy: comprehensive mutagenesis reveals a high level of mutational plasticity both inside and outside the complementarity-determining regions. *J Mol Biol*, 2009, 388(3): 541-558
- [12] Elter A, Bogen JP, Hinz SC, et al. Humanization of chicken-derived scFv using yeast surface display and NGS data mining. *Biotechnol J*, 2021, 16(3): 2000231
- [13] Choi Y, Hua C, Sentman CL, et al. Antibody humanization by structure-based computational protein design. *MAbs*, 2015, 7(6): 1045-1057
- [14] Bujotzek A, Lipsmeier F, Harris SF, et al. VH-VL orientation prediction for antibody humanization candidate selection: a case study. *mAbs*, 2016, 8(2): 288-305
- [15] Fernández-Quintero ML, Heiss MC, Liedl KR. Antibody humanization—the Influence of the antibody framework on the CDR-H3 loop ensemble in solution. *Protein Eng Des Sel*, 2019, 32(9): 411-422
- [16] Marks C, Hummer AM, Chin M, et al. Humanization of antibodies using a machine learning approach on large-scale repertoire data. *Bioinformatics*, 2021, 37(22): 4041
- [17] Lefranc MP, Lefranc G. Immunoglobulins or antibodies: IMGT® bridging genes, structures and functions. *Biomedicines*, 2020, 8(9): 319
- [18] Coutsiás EA, Seok C, Jacobson MP, et al. A kinematic view of loop closure. *J Comput Chem*, 2004, 25(4): 510-528
- [19] Milgram RJ, Liu G, Latombe JC. On the structure of the inverse kinematics map of a fragment of protein backbone. *J Comput Chem*, 2008, 29(1): 50-68
- [20] Mak CH. Loops MC: an all-atom Monte Carlo simulation program for RNAs based on inverse kinematic loop closure. *Mol Simul*, 2011, 37(7): 537-556
- [21] Chen VB, Arendall III WB, Headd JJ, et al. *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, 66(1): 12-21
- [22] Shapovalov MV, Dunbrack Jr RL. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*, 2011, 19(6): 844-858
- [23] Goldstein RF. Efficient rotamer elimination applied to protein side-chains and related spin glasses. *Biophys J*, 1994, 66(5): 1335-1340
- [24] Gordon DB, Mayo SL. Branch-and-terminate: a combinatorial optimization algorithm for protein design. *Structure*, 1999, 7(9): 1089-1098
- [25] Almagro JC, Fransson J. Humanization of antibodies. *Front Biosci*, 2008, 13: 1619-1633
- [26] Nam DH, Fang K, Rodriguez C, et al. Generation of

- inhibitory monoclonal antibodies targeting matrix metalloproteinase-14 by motif grafting and CDR optimization. *Protein Eng Des Sel*, 2017, 30(2): 113-118
- [27] Goydel RS, Weber J, Peng H, et al. Affinity maturation, humanization, and co-crystallization of a rabbit anti-human ROR2 monoclonal antibody for therapeutic applications. *J Biol Chem*, 2020, 295(18): 5995-6006
- [28] Julian MC, Rabia LA, Desai AA, et al. Nature-inspired design and evolution of anti-amyloid antibodies. *J Biol Chem*, 2019, 294(21): 8438-8451
- [29] Kim JH, Hong HJ. Humanization by CDR grafting and specificity-determining residue grafting. *Methods Mol Biol*, 2012, 907: 237-245
- [30] Apgar JR, Mader M, Agostinelli R, et al. Beyond CDR-grafting: structure-guided humanization of framework and CDR regions of an anti-myostatin antibody. *mAbs*, 2016, 8(7): 1302-1318
- [31] Teplyakov A, Obmolova G, Malia TJ, et al. Structural insights into humanization of anti-tissue factor antibody 10H10. *mAbs*, 2018, 10(2): 269-277
- [32] Dondelinger M, Filée P, Sauvage E, et al. Understanding the significance and implications of antibody numbering and antigen-binding surface/residue definition. *Front Immunol*, 2018, 9: 2278
- [33] Clavero-Álvarez A, Di Mambro T, Perez-Gavero S, et al. Humanization of antibodies using a statistical inference approach. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14820
- [34] Xu A, Kim HS, Estee S, et al. Susceptibility of antibody CDR residues to chemical modifications can be revealed prior to antibody humanization and aid in the lead selection process. *Mol Pharm*, 2018, 15(10): 4529-4537
- [35] Zhou B, Xia L, Zhang T, et al. Structure guided maturation of a novel humanized anti-HBV antibody and its preclinical development. *Antiviral Res*, 2020, 180: 104757
- [36] Kurella VB, Gali R. Structure guided homology model based design and engineering of mouse antibodies for humanization. *Bioinformation*, 2014, 10(4): 180-186
- [37] Banfield MJ, King DJ, Mountain A, et al. VL:VH domain rotations in engineered antibodies: crystal structures of the Fab fragments from two murine antitumor antibodies and their engineered human constructs. *Proteins*, 1997, 29(2): 161-171
- [38] Fransson J, Teplyakov A, Raghunathan G, et al. Human framework adaptation of a mouse anti-human IL-13 antibody. *J Mol Biol*, 2010, 398(2): 214-231