



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109254143 A

(43)申请公布日 2019.01.22

(21)申请号 201810793762.X

C12Q 1/6874(2018.01)

(22)申请日 2012.09.28

(30)优先权数据

61/540,454 2011.09.28 US

(62)分案原申请数据

201280057782.1 2012.09.28

(71)申请人 艾瑞普特公司

地址 美国阿拉巴马州

(72)发明人 韩建 米兰达·伯恩-斯蒂尔

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张国梁 张莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

使用Arm-PCR和高通量测序鉴定抗原特异的
适应性免疫应答

(57)摘要

公开的是用于将源自分离自人或动物血液
的抗体的至少一条氨基酸序列与对应于人或动
物的免疫组库中的抗体的至少一条DNA序列关联
的方法。所述方法还提供用于配对重链和轻链以
产生合成的单克隆抗体的手段。

1. 用于鉴定特异于给定抗原实体的抗体的方法,所述方法包括:
 - a) 分离获自人或动物受试者的血液或组织的至少一种抗体;
 - b) 获得所述至少一种抗体的氨基酸序列;
 - c) 将所述至少一种抗体的氨基酸序列与包括源自人或动物受试者的免疫组库的序列数据库进行比较,以鉴定抗原特异性克隆扩增的抗体序列;和
 - d) 克隆和表达所述抗原特异性克隆扩增的抗体序列,以将特异性结合至少一种靶抗原的重链和轻链相关联。
2. 如权利要求1的方法,其中获得所述至少一种抗体的氨基酸序列的步骤使用液相色谱串联质谱进行。
3. 如权利要求1的方法,其中源自人或动物受试者的免疫组库通过扩增子拯救多重PCR确定。
4. 鉴定抗原特异性T细胞的方法,所述方法包括:
 - a) 获得源自以前已经用抗原体内激发的受试者的血液或组织样品;
 - b) 从所述血液分离外周血单核细胞,并体外培养所述外周血单核细胞;
 - c) 将有效量的靶抗原体外加入到所述外周血单核细胞中;
 - d) 在加入所述靶抗原之后的经验确定的时间收获所述外周血单核细胞;
 - e) 从收获的外周血单核细胞产生测序的免疫组库;
 - f) 将源自收获的T细胞的免疫组库与arm-PCR测序的免疫组库进行比较,所述arm-PCR测序的免疫组库制备自同样受试者的未加入靶抗原的分离的T细胞;和
 - g) 基于与没有加入抗原的T细胞相比,在加入抗原的T细胞中增加的数目鉴定扩增的T细胞。

使用Arm-PCR和高通量测序鉴定抗原特异的适应性免疫应答

[0001] 本申请是国际申请号PCT/US2012/058128,国际申请日2012年9月28日,中国申请号201280057782.1,发明名称为“使用Arm-PCR和高通量测序鉴定抗原特异的适应性免疫应答”的专利申请的分案申请。

[0002] 优先权声明

[0003] 本申请要求2011年9月28日申请的较早申请的美国临时专利申请号61/540,454的优先权利益。根据适用的法律和规定允许,美国临时申请号61/540,454的内容通过引用并入本文。

发明领域

[0004] 本发明涉及用于鉴定抗原特异的适应性免疫应答的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 单克隆抗体(mAbs)广泛用在从诊断和研究试剂到治疗药物的范围内的应用中。生产医学上有用的抗体(Ab)的关键步骤是想要的抗原特异的Ab的初始鉴定。这通常在技术(例如杂交瘤和噬菌体展示)中使用多轮次的“淘选”或通过ELISPOT由在基于芯片的方法(例如ISAAC(Jin,A.,等人(2009),A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood.Nat Med 15,1088-1092))中进行。

[0007] 免疫组库由所有在任何给定时刻循环中的功能上多样的B和T细胞组成且很大程度上受遗传和环境因素二者(例如HLA类型和抗原暴露历史)的影响。

[0008] T和B淋巴细胞的多样的抗原受体通过有限的但非常大量的基因片段体细胞重组产生。这些基因片段:V(可变),D(多样性),J(连接),和C(恒定),决定免疫球蛋白和T细胞受体(TCR)的结合特异性。

[0009] 用于生产单克隆抗体的第一种和最普通的方法由Kohler和Milstein在1975年研发出。在该方法中,小鼠通过注射抗原免疫以刺激抗原特异的抗体的产生。单个抗体-形成细胞从小鼠的脾分离并与永生化的骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤(Kohler,G.,和Milstein,C.(1975).Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.Nature 256,495-497)。由每个不同克隆分泌的抗体,使用良好建立的方法,例如ELISA对其抗原结合能力进行测定。最稳定和多产的克隆通过使用体外细胞培养技术或通过注射它们入小鼠的腹腔(杂交瘤在那以腹水的形式分泌单克隆抗体)的形式之一大量生产。

[0010] 杂交瘤技术从历史的观点说是耗时和劳动密集的,且产生的杂交瘤可能是遗传不稳定的(Chambers,R.S.(2005).High-throughput antibody production.Curr Opin Chem Biol 9:46-50.)。此外,如果杂交瘤在小鼠中繁殖太多腹水可以积累,可能对动物产生疼痛和痛苦。源自鼠杂交瘤的抗体的治疗成功率从历史的观点说是低的,因为外源蛋白在人中有法高的免疫原性。(Carter,P.J.(2006).Potent antibody therapeutics by design.Nat Rev Immunol 6,343-357;Reichert,J.M.,等人(2005).Monoclonal antibody

successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23,1073-1078.)。为了治疗的目的,经常需要额外的步骤,例如嵌合化或人源化,以使抗体有用。嵌合化包括连接鼠的可变结构域(抗原结合结构域)与人抗体的恒定结构域,而人源化包括嫁接源自鼠抗体的互补决定区(CDR;可变结构域中的抗原结合环)于人IgG上。时常,"人源化的"IgG不以如原鼠抗体的同样的亲和力结合抗原,因为对于结合,需要经常有助于正确CDR构象的嫁接位点侧翼的框架区(Kipriyanov,S.M.,和Le Gall,F.(2004).Generation and production of engineered antibodies. *Mol Biotechnol* 26,39-60)。已开发其它方法用于全人抗体的生产,且很多目前进入临床试验的抗体是全人的(Carter,P.J.(2006).Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6,343-357)。典型的,它们或者源自能够表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(并使用杂交瘤技术生产),或者它们源自噬菌体展示技术(Carter,P.J.(2006).Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6,343-357)。利用噬菌体展示技术,抗体基因表达并以融合蛋白的形式展示在丝状噬菌体的表面。展示的抗体基因经常分离自非免疫的供体的B-淋巴细胞,建立用作针对多种抗原的人抗体的重要来源的初次文库(naive library) (Pansri,P.,等人(2009).A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnol* 9,6)。

[0011] 噬菌体展示抗体文库是噬菌体的集合,每个噬菌体粒子在其表面展示单个抗体。噬菌体文库必须淘选,经常重复地,以便鉴定高亲和力的抗原特异克隆。此外,因为噬菌体展示文库依赖于合适抗体的体外筛选,文库必须覆盖至少 10^8 单个克隆。

[0012] 应用高通量测序对免疫组库分析相对新且非常强大。例如在2009年,一次测序运行产生远多于贯穿NCBI的整个寿命所积累的的独特CDR3序列(Wang,C.,等人.(2010).High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* 107,1518-1523)。所需要的是使用高通量测序用于分析免疫应答和用于为了治疗疾病的目的操控所述应答的方法。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及用于鉴定特异于给定抗原实体的抗体的方法,所述方法包括从获自人或动物受试者的血液或组织样品分离至少一种抗原特异的抗体,确定所述至少一种抗原特异的抗体的氨基酸序列(举例来说,肽序列),且将所述至少一种抗原特异的抗体的氨基酸(肽)序列与包含源自人或动物受试者的免疫组库的序列数据库比较以鉴定抗原特异的克隆扩增的抗体序列,并克隆和表达所述抗原特异性克隆扩增的抗体序列以将特异性结合至少一种靶抗原或其表位的重链和轻链相关联。

[0015] 本发明还提供用于鉴定抗原特异性T细胞的方法,所述方法包括从人或动物血液样品分离外周血单核细胞(PBMC),将PBMC分开为至少两个亚群(一个将不接收抗原对照亚群和一个接收以经验决定量的抗原的实验亚群),体外培养PBMC,在培养开始向PBMC体外加入有效量的靶抗原,加入靶抗原之后,在经验决定的时间收获PBMC,从收获的PBMC(源自刺激和未刺激的亚群的T细胞组库和B细胞组库二者)产生arm-PCR测序的免疫组库,并且将该免疫组库与制备自从同样的受试者分离的未加入靶抗原的PBMC的arm-PCR测序的免疫组库进行比较,并基于与没有抗原加入的T细胞相比,在加入抗原的T细胞中其增加的数目鉴定扩增的T细胞。

[0016] 可以利用类似的方法以从同样的实验中鉴定抗原特异的B细胞应答。比较源自刺激的和非刺激的样品的B细胞组库以鉴定响应抗原而克隆扩增的群体。此外,可以从体外培养基纯化任何分泌的抗原特异抗体并利用LC质谱肽与非刺激或刺激的组库相匹配而进行鉴定。在本发明的不同方面中,如其可能特异应用于抗体和B细胞,可以加入步骤-所述步骤包括克隆和表达重链和轻链对以匹配以对至少一种靶抗原特异性结合的重链和轻链结合对。

[0017] 附图简述

[0018] 图1是描述允许其在多种用途中更广泛使用的本发明的各种步骤和一些修饰的图表。

[0019] 图2是进一步描述本发明步骤的图表。

[0020] 图3是显示鉴定自用**Fluzone®** (包含每个以下三种病毒的血凝素抗原:A/Brisbane/59/2007,IVR-148(H1N1),A/Uruguay/716/2007,NYMC X-175C(H3N2)(A/Brisbane/10/2007样病毒),和B/Brisbane/60/2008)激发后获得的产生抗体的细胞的肽序列的样本的表格。

[0021] 图4是表示对于通过与组库数据库关联的LC MS/MS确定的抗原特异对的ELISA测定结果的图表。

[0022] 详细说明

[0023] 发明人研发一种使用将扩增子拯救多重PCR(amplicon rescued multiplex PCR, arm-PCR,描述于美国专利号7,999,092中)与高通量免疫组库测序连同液相色谱串联质谱法(LC MS/MS)结合的方法,从生物体快速和直接鉴定抗原特异的适应性免疫应答用的新的方法。本发明利用arm-PCR和高通量测序以建立B和T细胞受体的V(D)J重排的序列数据库。纯化的抗原特异的抗体的V-区(或抗原特异的部分)随后使用针对高通量测序数据库的质谱肽绘图鉴定。本发明还提供用于通过比较抗原在体内和体外二者都暴露之前或之后T和B细胞组库获得抗原特异的组库信息的方法。

[0024] 在不同的方面,本发明涉及鉴定特异于给定抗原实体的抗体的方法,所述方法包括从获自人或动物受试者的血清分离至少一种抗原特异的抗体,从所述至少一种抗原特异的抗体获得氨基酸序列(肽序列),并将所述至少一种抗原特异的抗体的氨基酸序列与包含源自人或动物受试者的免疫组库的序列数据库比较,以鉴定抗原特异性克隆扩增的抗体序列,并克隆和表达所述抗原特异性克隆扩增的抗体序列以将对至少一种靶抗原或其表位的特异性结合的重链和轻链相关联。

[0025] 本发明还提供用于鉴定抗原特异性T细胞的方法,所述方法包括获得从源自事先用抗原体内激发的受试者的血液样品,从所述样品分离T细胞并体外培养所述T细胞,体外加入有效量的靶抗原到所述T细胞,在加入靶抗原后的经验决定的时间点收获T细胞,从收获的T细胞产生arm-PCR测序的免疫组库,将那个免疫组库与制备自分离的源自同样受试者的不加靶抗原的T细胞的arm-PCR测序的免疫组库比较,并基于与没有抗原加入的T细胞相比,在加入抗原的T细胞中其增加的数目鉴定扩增的T细胞。

[0026] 本发明的不同的方面,如其可以特异应用于抗体和B细胞,可以加入步骤-所述步骤包括克隆和表达重链和轻链对,以匹配以对至少一种靶抗原的特异性结合的重链和轻链结合对。此外,任何分泌的抗原特异的抗体可以从体外培养基纯化并利用LC质谱肽与非刺

激或刺激的组库匹配而进行鉴定。

[0027] 如在此使用的，“抗原实体，”为，例如，抗原，抗原物质，微生物，例如细菌或病毒，等，其包括一种或多种由人和/或动物的免疫系统识别的抗原或表位。如在此使用的，“免疫组库”是包含在个体人或动物受试者的包含T和/或B细胞的血液样品中的可检测的可变区基因重排的DNA和/或蛋白序列的数据库。在本发明的不同方面，免疫组库根据描述于美国专利申请公开号US20100021896中的获得，其可以，例如，使用被称为arm-PCR的方法（描述于美国专利号7,999,092）制备。使用高通量测序以从T细胞中产生几十万测序读数，例如，已由Wang,等人(Wang,C.等人,High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets,Proc Natl Acad Sci U S A.2010 Jan26;107(4):1518-23)描述。

[0028] 以前的体外鉴定抗原特异的T细胞的尝试由于很多测定技术缺乏灵敏度和特异性而妨碍。T细胞受体(TCR)在一些方面相当不同于B细胞受体(BCR)。第一,TCR是膜结合的且不以如BCR的可溶形式出现。因此,需要相当复杂的细胞测定法以测定TCR特异性。第二,在其它蛋白复合体例如MHC不存在的情况下,TCR对其靶底物具有低的结合亲和力,然而抗体和BCR在没有任何额外帮助的情况下紧密结合其底物。TCR需要MHC复合体的帮助以结合和识别其相关的抗原。MHC携带初始抗原的肽并呈递给TCR。目前,用于鉴定抗原特异的TCR的最普通的方法是MHC四聚体方法。在该方法中,重组MHC生物素化并与关注的肽折叠。MHC通过荧光标记的链亲和素四聚化。所述四聚体将特异标记表达特异于给定肽-MHC复合体的TCR受体的T细胞。需要四聚体,因为单个TCR和单个MHC分子之间的结合弱,而四聚体可以一次结合三个TCR(Altman,J.D.,Moss,P.A.,Goulder,P.J.,Barouch,D.H.,McHeyzer-Williams,M.G,Bell,J.I.,McMichael,A.J.,and Davis,M.M.Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.Science.1996.274:94-96.J Immunol 187,7-9.)。

[0029] 然而,抗原特异性T细胞的鉴定将提供对于疾病的诊断有价值的信息。例如,基于本发明的方法鉴定的与特定疾病状态相关的T细胞,能够易于用作对在另一个尚未进行诊断的个体疾病的存在的标志物。使用本发明的方法,基于其应答体内或体外抗原激发的增殖,鉴定与特定抗原相关的T细胞,还能够使医生确认个体具有亚临床的疾病,所述亚临床疾病例如在去诊所看病时尚未产生显著症状。

[0030] 需要的特异性和灵敏度由用于产生免疫组库的arm-PCR测序提供,所述免疫组库包含由在采样的T细胞群体中各种T细胞受体遗传重排代表的序列。为了鉴定可能以更高或更低的在初始体外T细胞群中百分数存在但响应抗原而增殖的细胞,arm-PCR提供半定量结果,所述结果允许比较如由检测的序列代表的细胞的相对数量。通过鉴定代表体外抗原激发后群体显著增加的T细胞的序列,鉴定参与对特定抗原实体的细胞免疫应答的T细胞受体序列,并因此鉴定相关T细胞,是可能的。

[0031] 在本发明的方法中,获自源自单个患者的血液样品的PBMC(其包含T细胞和B细胞)用抗原,或其表位刺激,以体外产生回忆记忆(recall memory)和增殖,随后将那个样品中的如由通过使用arm-PCR测序的方法扩增和检测的序列代表的T细胞群与从源自同样个体患者的血液样品的,未受到由同样的抗原或表位体外激发的T细胞群扩增和检测的序列比较。

[0032] 分离抗原特异的抗体,尤其是IgG中的第一步,是通过从血清中纯化总的IgG用以

移除可能导致下游的抗原特异的IgG较低产量的任何污染的血清白蛋白和其它血清蛋白。存在很多可以进行此步的方式,包括但不限于例如,硫酸铵沉淀继之以大小排阻层析,或如直接以蛋白A,蛋白G,或IgSelect的亲层析,或以离子交换层析。纯化总IgG群体之后,免疫亲和纯化是纯化抗原特异的抗体最常用的方法。典型的,免疫亲和纯化包括共价交联关注的抗原或表位片段于固相支持物。所述固相支持基质典型地为市售的“激活的”琼脂糖,交联琼脂糖,聚炳烯酸的或磁性的珠子。每种具有依赖于支持基质和厂家使用说明的不同的偶联机制。在免疫亲和纯化过程中,允许总IgG群体结合从一小时到过夜的任何时间。未结合的抗体通过洗涤移除,且典型地通过降低pH(通过加入高度浓缩的碱性缓冲溶液立刻恢复溶液的pH)洗脱特异的抗体。然而,洗脱可以通过多种方式进行,例如,通过加入苛刻试剂例如1.5M硫氰酸钾,4M脲,3.5M MgCl₂,或通过使用低pH缓冲溶液的梯度。

[0033] 在本发明的不同方面,总IgG群体的分离使用亲和柱例如源自GE Healthcare的IgSelect柱进行,如在所附的实施例中公开的。在公开的实施例中,抗原特异的群体的免疫亲和纯化使用源自Thermoscientific/Pierce的MicroLink蛋白偶联试剂盒(MicroLink Protein Coupling Kit),根据每个制造商的使用说明进行。在该情况下,浓缩纯化的抗原特异的IgG,其重链和轻链通过在还原条件下进行SDS-PAGE分析分离。此外,浓缩样品的一些用于Fab微制备试剂盒(Fab Micro Preparation kit)以制备Fab片段。所述Fab片段也用于在还原条件下的SDS-PAGE胶。在一定程度上以避免角蛋白污染的方式小心切下与重链,轻链,和Fab片段相应的胶条带。分离的一种抗体/多种抗体的蛋白序列的分析可以使用液相色谱串联质谱法(LC/MS/MS)快速和有效地进行,所述LC/MS/MS为以前已在文献中描述的技术。受试者的免疫组库可以使用描述于美国专利号7,999,092和美国专利公开号20100021896中的技术,使用例如在那些出版物中公开的引物产生。使用对特定抗体或小的亚群的抗体进行的LC/MS/MS产生的序列和抗体所分离自的受试者的免疫组库的比较可以通过数据管理和信息技术领域中的技术人员已知的方法进行。比较序列确定特定的序列并提供在与给定的时间点的克隆扩增的程度相关的信息,其可能例如在评价疫苗应答方面是尤其有用的。克隆和表达以配对相应的重链和轻链可能使用本领域技术人员已知技术完成,并且,对于其易于获得试剂盒。

[0034] 使用本发明的方法鉴定抗原特异的抗体使科学家能够扩大生产合适的重/轻链抗体组合以生产“单克隆”抗体具有如那些初始细胞源自的个体同样抗原结合V区蛋白序列。虽然外周血将经常是此种细胞的来源,可以使用多种技术获得样品且可以包括,例如,外周血单核细胞,脾,淋巴结,等。采样以获得细胞可以在暴露于抗原之前或之后的不同时间点进行。

[0035] 在高通量测序过程中,重链和轻链配对信息丢失。为了克服该限制,重链和轻链对的组合可以在微量滴定板上以网格形式重组表达为Fab片段,且其针对抗原的结合用ELISA测定。表达可以使用代表重链(FD)的质粒和代表轻链(κ 或 λ 之一)的质粒在人体外表达系统进行。然而,可以使用任何表达系统,或者体外,或者体内,或者二者,包括大肠杆菌(E.coli),哺乳动物表达系统例如Hek 293,酵母,等。在本发明的该方面中,使用与源自Thermoscientific/Pierce的包括有人体外糖蛋白表达试剂盒的pT7CFE1-Chis载体同源重组进行克隆。修饰包含用于基因靶的体外表达的重要元件的载体,以也包含代表性的第四框架区(FR4)和对于重链和两种轻链(κ 和 λ)的C区序列(发明人称为“V-就绪(V-ready)”盒

(总共3个盒:重, κ 和 λ 的V-就绪盒)),所述重要元件包括T7启动子,内部核糖体进入位点(IRES),多克隆位点(MCS),C-端6x-His标签,聚腺苷酸尾,和氨苄抗性基因。所述FR4用作重叠区域,允许V-区与V-就绪盒的C区重组。FR4表示在紧接CDR3之后的区域中共有序列,所述共有序列如从通过V-base数据库可获得的序列比对确定并有助于维持与抗原特异性关联的CDR3的正确三维结构。鉴定的V区可以容易地通过同源重组克隆(HRC)插入正确的“V-就绪”盒用于下游在体外系统表达为Fab片段。HRC基于很多大肠杆菌(E.coli)株(包括在克隆中使用的RecA缺陷株)的在其末端共享同源序列的DNA片段之间进行体内分子间重组的能力(Bubeck,P.,Winkler,M.,和Bautsch,W.(1993).Rapid cloning by homologous recombination in vivo.Nucleic Acids Res 21,3601-3602;Jones,D.H.,和Howard,B.H.(1991).A rapid method for recombination and site-specific mutagenesis by placing homologous ends on DNA using polymerase chain reaction.Biotechniques 10,62-66;Oliner,J.D.,Kinzler,K.W.,和Vogelstein,B.(1993).In vivo cloning of PCR products in E.coli.Nucleic Acids Res 21,5192-5197.)。基因片段可以不经限制性消化,连接或其它酶操作快速亚克隆入线性化的靶质粒载体(Marsic,D,Hughes,RC,Byrne-Steele,ML,和Ng,JD(2008)PCR-based gene synthesis to produce recombinant proteins for crystallization BMC Biotechnol 8,44)。匹配V-就绪盒的重叠末端用包括与V-就绪盒同源的序列的引物通过PCR置于V区。在当前描述的设计中,在PCR扩增以利于下游检测表达和抗原结合的过程中,向重链和轻链V区二者分别加上c-myc标签和FLAG标签。可以使用任何类型的克隆以将给定的V区,FD,重链,或轻链序列置于具有用于体外表达的合适元件的载体;然而,发明人相信,HRC方法是对当前应用的最快和最简单的解决方案。首先,所述方法不需要限制,如果使用高通量方法检测很多V区,其是重要的。第二,其是高度有效和快速的。发明人证明当与高度纯化的引物和高保真聚合酶(例如源自Finzymes的Phusion)(当PCR扩增V区时)一起使用时,95%具有正确序列的阳性插入率。第三,发明人已能够通过设计直接临近限制性位点但不包括引物中的位点的重叠区域在V区和C区之间建立无缝重叠。这移除最终蛋白产物中的额外氨基酸序列,所述额外氨基酸序列有时产生是由于载体中不可避免的存在限制性位点。

[0036] 一旦在体外系统表达,可以使用金属亲和层析和蛋白上的His标签纯化蛋白。这可以以很多方式进行,然而,在当前的描述中,使用Ni-NTA磁珠因为其简易性和速度。可以使用偶联的针对c-myc和FLAG标签二者的检测抗体的ELISA确定结合。一旦确定结合对,它们可以相对容易的转变其它形式(scFv,全长IgG,等),并可以根据应用的需要依比例决定生产。

[0037] 本发明的方法的一个显著优点是抗体有可能成为全人的,因此避免用鼠IgG遇到的免疫原性。这可以通过测序人样品的免疫组库和直接从那个样品用质谱作图鉴定抗原特异的抗体,通过比较抗原施用前后的组库,或通过比较体外培养之后激发和未激发的外周血单核细胞的组库完成。此外,将重组生产抗体,完全避免对鼠杂交瘤的需求。

[0038] arm-PCR的半定量性质允许鉴定特异上调的通过对给定抗原的健康免疫系统体内选择的克隆群体。此外,因为多次暴露于抗原改进了抗体的应答,该技术可以使用免疫应答的固有的亲和力(affinity)成熟和鉴定那些具有对特定抗原最高亲合力(avidity)的克隆扩增群体。因此,可以避免用噬菌体展示所需的淘选轮次和在鼠杂交瘤中个体B细胞克隆的

冗长的筛选。

[0039] 此外,产生的组库数据库匹配抗体纯化自的样品,如果与公共数据库比较,不是此种情况。当比较未激发的组库相对激发的组库时(体外和体内二者),arm-PCR的半定量性质精确显示特定的可能抗原相关的差异。Arm-PCR与高通量测序联合和焦磷酸测序平台中的近期进展使得此种分析的类型是可能的。

[0040] 该方法具有很多其它的可能性。例如,探测对抗原特异的抗体初次(**naïve**)免疫系统可以是可能的,从而颠覆对抗原施用的需求。对于人受试者,这将是方便的,因为在伦理学上不是所有抗原都能够施用。此外,代替用完全抗原提纯,可以用表位片段提纯抗原特异的抗体。这将允许使用者仅抽出使用者可能感兴趣的那些表位特异的抗体。

[0041] 本发明可以通过以下非限制性实施例进一步描述。

实施例

[0042] 血凝素(HA)是发现于流感病毒表面上的抗原糖蛋白且用作疫苗的组分以引起免疫应答。**Fluzone**[®]的2009-2010制剂包含以下三种病毒的每种30μg/ml HA:A/Brisbane/59/2007,IVR-148(H1N1),A/Uruguay/716/2007,NYMC X-175C(H3N2)(类A/Brisbane/10/2007病毒),和B/Brisbane/60/2008。向两个健康志愿者施用2009-2010流感疫苗**Fluzone**[®],所述志愿者报告为在接种前30天时期内感觉正常和良好。2008-2009和2009-2010疫苗二者基本上包含相同的A型流感H1N1和H3N2抗原而不同的B-株抗原。为了测试我们的方法和提供将抗原特异的抗体与体液的组库测序结果匹配的最高的可能性,我们选择之前接受2008-2009流感疫苗的志愿者。

[0043] 样品制备

[0044] 在四个特定的时间点取血液样品:第0天,疫苗施用前;第3天,记忆B细胞响应之前遇到的抗原;第7天,激活的和记忆B细胞应答;和第21天,响应新遇到的抗原的记忆B细胞的出现。使用适当标记的磁珠(MiltenyiBiotec)分类B细胞为初次的(**naïve**),激活的和记忆亚型。分离的细胞在RNA保护试剂中重悬并使用血细胞计数器计数。使用RNAeasy试剂盒(Qaigen)从细胞中提取RNA,且所述源自四个时间点的血清储存于-80℃。使用ELISA以证明血清的免疫性(数据未显示)。

[0045] 抗原特异的IgG纯化和LC MS/MS

[0046] 在这一点上,研究按照两个平行途径:(1)用LC质谱的抗原特异的IgG纯化和(2)B细胞组库分析。抗原特异的纯化方法在图1中展示。简要的,从第3天和第7天的血清样品中纯化抗原特异的IgG。使用两个1mL IgSelect柱(GeHealthcare)以从每个个体的血清样品中纯化总IgG群体。重组血凝素A/Brisbane/59/2007和A/Brisbane/10/2007(SinoBiological Inc)使用MicroLink蛋白偶联试剂盒(Pierce)分别共价交联于微离心柱。产生总共八个柱子:对每个个体四个柱子,每个时间点2个抗原特异的柱。因此,分别评估每个志愿者对每个抗原的特异抗体应答。纯化的IgG(使用IgSelect柱)用于交联柱,且使用低pH缓冲液洗脱抗原特异的IgG群体。该过程重复三次且收集洗脱液并浓缩。还使用Fab微量制备试剂盒(Pierce)产生Fab片段。由于关注重链中许多恒定结构域使肽与可变区的匹配不明显,因此,产生Fab片段。使用SDS-PAGE分析在还原条件下分析纯化的样品。将针对

每种流感HA的特异重链,轻链,和Fab片段从胶中切下,并送去蛋白鉴定,所述蛋白通过ProtTech的蛋白鉴定服务鉴定使用LC质谱肽鉴定。在ProtTech的LC-MS/MS肽测序过程中,切下的条带用胰蛋白酶处理并在注入HPLC之前浓缩50-200倍,所述HPLC随后分离肽混合物。串联质谱计在线与HPLC联合,且洗脱的肽通过称为碰撞诱导解离(CID)的过程片段化。获得对于每个片段化的肽的MS/MS谱(从每个样品经常存在数千MS/MS谱)。使用每个MS/MS谱(对应于特定蛋白序列)以在蛋白数据库中搜索匹配的肽。在我们的研究中,使用B细胞组库基因测序结果作为用于鉴定的数据库(见下文)。

[0047] Arm-PCR扩增和高通量测序

[0048] 为了B细胞组库分析,条码编码并收集源自全部个体的样品,以便测序在相同运行中进行。使用Roche 454 Titanium测序仪的高通量测序允许读取达400bp。因此,对于重链和轻链二者,从框架1区在正向和C区的开始在反向设计序列特异的引物。从而,可以监控特异B细胞克隆的类别转换且随之以其通过记忆应答的进行。进行Arm-PCR且扩增产物送至Seq-Wright用于在Roche 454 Titanium测序仪上测序。产生的重链和轻链V区的454测序数据库送至ProtTech以用作用于匹配具有LC MS/MS谱的肽的数据库。

[0049] 肽测序结果

[0050] 对于每个个体对所有A型流感病毒株的应答,成功匹配了一些独特的V区。图3表示一个个体的响应于A/Brisbane/59/2007血凝素抗原特异的的重链和轻链的部分样品输出。例如,表中第一个匹配肽覆盖重链的整个CDR3区(用红色突出),第四个框架区,和C区的开始。该肽是独特的,仅匹配于整个数据库中的一条序列并对应于正确的个体。未显示对于>gi|xxxxxxx|CPO_IGH_GJQGNIM01EKNUS的完整VH序列。显示的仅是用于匹配序列的肽。此外,第二部分(B1)表示对同样抗原和个体的轻链匹配。鉴定出两条独特的轻链匹配。Fab结果(对于同样的个体;数据未显示)包含一些其它的独特重链肽匹配,由于应答是多克隆的,其是可预期的。

[0051] 因为对于响应于疫苗中所有A型流感株的每个个体,成功匹配了一些独特的肽,我们克隆和表达这些V区为Fab片段以测试其结合A型流感抗原的能力。如在前提到的,当前与测序结果相关的问题是不能将相应重链与其轻链匹配。为了克服该问题,我们直接在微量滴定板上共表达重链和轻链质粒的不同组合。尽管任何重组系统应当足够,因为一些原因选择源自Pierce的人体外糖蛋白表达系统。然而,发明人相信使用如在此描述的体外系统提供一些重要的好处。第一,体外系统提供简单的方法用于同时共表达两种质粒,而不为一个质粒超过另一个的转化效率担忧(如用体内系统所具有的)。例如,由Jiang等使用大肠杆菌(E.coli)体外转录/翻译系统使用两个分离的质粒(一个用于重链和一个用于轻链)用于生产对6D9的Fab片段(Jiang,X.,Ookubo,Y.,Fujii,I.,Nakano,H.,and Yamane,T.(2002).Expression of Fab fragment of catalytic antibody 6D9 in an Escherichia coli in vitro coupled transcription/translation system.FEBS Lett 514,290-294.)。我们已修饰该思想以评估以96孔的形式加入无细胞表达系统的重链和轻链质粒的组合。对于无细胞系统,另外的好处是免除包涵体的形成,所述包涵体当在微生物细胞中表达重组蛋白时不时发生。因为在描述的情况中基因靶从来源上是人的,对于其生产,人表达系统是最合适的。此外,建议的系统生产糖蛋白,其是重要的,因为V区的糖基化发生在10%的抗体中,且可以影响其抗原结合能力(Jacquemin,M.,Radcliffe,C.M.,Lavend'homme,R.,

Wormald, M.R., Vanderelst, L., Wallays, G., Dewaele, J., Collen, D., Vermylen, J., Dwek, R.A., 等人. (2006). Variable region heavy chain glycosylation determines the anticoagulant activity of a factor VIII antibody. *J Thromb Haemost* 4, 1047-1055.; Spiegelberg, H.L., Abel, C.A., Fishkin, B.G., 和 Grey, H.M. (1970). Localization of the carbohydrate within the variable region of light and heavy chains of human gamma g myeloma proteins. *Biochemistry* 9, 4217-4223.; Zhu, D., McCarthy, H., Ottensmeier, C.H., Johnson, P., Hamblin, T.J., 和 Stevenson, F.K. (2002). Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood* 99, 2562-2568.). 最后, 表达系统是快速的, 在小于6小时提供表达的蛋白。转录/翻译反应典型的是25 μ L并产生达40 μ g/ml (1 μ g总量) 的表达的蛋白, 其大大高于ELISA的检测极限 (0.0001-0.01 μ g/ml)。从3个不同重链与3个不同轻链联合 (9个组合) 的初始表达试验中, 我们已能够鉴定两个抗原特异的结合对。使用体外系统放大反应以便结合可以以四组测量测定, 并且如用ELISA和在450nm处的吸光度测定所确定的, 结合仍然是明显的。重链具有加工的N端c-myc标签, 同时轻链包含N端FLAG标签以利于ELISA中的检测。

[0052] 体外或体内抗原-刺激比较

[0053] 体内刺激比较指按设定的时间表暂时监控个体的免疫组库。例如, 时间点可以包括但将不限于第0天, 抗原施用前; 第3天, 记忆B细胞响应之前遇到的抗原; 第7天, 激活的和记忆B细胞应答; 和第21天, 响应新遇到的抗原的记忆B细胞的出现。通过在每个时间点采样免疫组库, 可以获得在抗原激发之前和在激发后的不同时间点循环中的B细胞和T细胞的分子快照。相对于未刺激的样品, 特定克隆群体的扩增可以指示对抗原的应答且可以通过使用如在之前描述的质谱方法中同样的重组表达策略校验。

[0054] 在体外刺激过程中, 测试T细胞和B细胞二者的组库的抗原记忆。在该实验中, PBMC分离自血液样品并在存在和缺少抗原的情况下在合适的条件下培养 (参见方案)。必须根据经验确定抗原的量。在这些类型的实验中情况不同, 这是由于起始的组库 (2×10^6 PBMC) 的固有限制。然而, 抗原-刺激应该导致扩增和记忆B细胞分化为浆细胞。在RNA水平, 由于arm-PCR的半定量性质, 抗原特异的克隆的扩增应该是明显的, 并且可以通过使用如之前描述的同样的重组表达策略校验。此外, 可以从生长培养基 (如用血清) 中直接纯化分泌的抗体并可以使用串联LC MS/MS, 用如之前讨论的组库数据库以鉴定抗体。此类型的实验具有额外的好处是能够使用任何选择的抗原以刺激PBMC, 包括使用施用于人将是不道德的抗原。

[0055] IgG纯化和鉴定

[0056] 使用源自GEHealthcare的IgSelect柱从人血清中纯化IgG。结合缓冲液 (平衡缓冲液) / 洗涤缓冲液: 1xPBS (磷酸缓冲的盐) pH 7.4, (137mMNaCl, 2.7mMKCl, 10mM磷酸氢二钠, 2mM磷酸二氢钾和pH为7.4-预包装的)。洗脱缓冲液: 100mM甘氨酸pH 3.0或100mM柠檬酸钠pH 3.0。中和缓冲液: 1M Tris-HCl pH 9.0。

[0057] 所有流速为0.5ml/分钟 (0.5ml/分钟-1.0ml/分钟), 约15滴每分钟 (30滴, 如果速率是1.0ml/分钟)。柱用10ml (10CV) 结合缓冲液平衡, 且1ml的血清用3ml的结合缓冲液稀释。(血清在使用前是无菌过滤的) 稀释的血清 (4ml) 加入柱且洗涤液保存于康宁管。用10ml的洗涤缓冲液洗涤柱。在洗涤柱的同时, 200 μ L的中和缓冲液置于3个管中。加入洗脱缓冲液

(6ml) 到柱中且每2mL使用“中和”康宁管中的一个以收集洗脱液。向柱中加入结合缓冲液(10ml)继之以5CV的20%乙醇,且柱储存于4℃。

[0058] 在第一次运行中监控一个中和管的pH以确保pH接近中性。在12%PAGE胶上,在还原条件下对(1)血清(2)洗涤和(3-5)3个应该包含选择的IgG的康宁管的每个,(7)最终柱洗涤和(8)LMW跑SDS-PAGE。此外,测量每个洗脱管在280nm的UV吸光度以确定等分试样包含洗脱IgG。根据需要,汇集含有IgG的管并浓缩用于进一步的步骤。

[0059] 使用交联抗原的柱子纯化特异性IgG。

[0060] 使用的试剂是500mL的偶联缓冲液(MicroLink[®]试剂盒):0.1M磷酸钠;0.15M NaCl,pH 7.2;500ml的超纯水;100μg的抗原(重组的A/Brisbane/10/2007或A/Brisbane/59/2007血凝素之一--SinoBiological);1ml纯化的IgG。使用的仪器包括MicroLink蛋白偶联试剂盒;0.45μm滤器(或0.8μm);Amicon Ultra-0.5mL浓缩器;用于A₂₈₀测量的UV;12%SDS Page胶和SDS试剂。

[0061] 通过在500ml纯水中溶解干混物制备偶联缓冲液。在300μl的偶联缓冲液中溶解抗原,保留样品用于A₂₈₀测量和SDS PAGE二者。按照用于偶联抗原到柱的制造商的使用说明,并且洗涤柱并储存在4℃。纯化的IgG样品浓缩到200-300μl。用于亲和纯化的一般工艺根据试剂盒使用说明进行。直接施加浓缩的IgG到柱。在4℃孵育浆/IgG过夜。在用PBS-T和0.5M NaCl洗涤3次和PBS-T洗涤3次之后进行洗脱2-3次。洗脱后,用偶联缓冲液洗涤柱3次,且流过的普通IgG再加入并与抗原特异的柱孵育过夜。接着是同样的洗脱工艺,并且重复该过程额外一次。汇集洗脱液并使用Amicon Ultra-0.5mL浓缩器浓缩。部分浓缩的抗原特异的样品在还原条件下应用于12%SDS PAGE胶并警惕以避免角蛋白污染。切下重链和轻链条带并送至Prottech用于使用组库测序数据库的LC MS/MS分析。

[0062] 抗原特异的IgG Fab制备

[0063] 使用的试剂是:Pierce Fab微量制备试剂盒;12%BioRad Ready胶;0.5mL微量离心管,高压灭菌;SDS试剂。

[0064] 另一部分浓缩的抗原特异的IgG应用于Pierce Fab微量制备试剂盒,并按照用于分离Fab片段的试剂盒使用说明。基本上,IgG跑过具有固定的木瓜蛋白酶的柱,所述酶在柔性铰链区切割。流过液跑过固定有蛋白A的柱子并保存。Fc区保留结合于柱上(蛋白A),而Fab臂(二硫键合的)洗脱到流过液中。

[0065] 使用Amicon Ultra-0.5ml浓缩器浓缩从蛋白A柱的流过液,并在还原条件下进行SDS PAGE并警惕以避免角蛋白污染。轻链和重链片段在胶上的二者跑胶的约25kDa处重叠。切下对应于Fab片段的条带并经过用ProtTech的串联LC MS分析。

[0066] ELISA方案

[0067] 使用的试剂包括:结合缓冲液:碳酸氢钠缓冲液,50mM pH 9.6;洗涤缓冲液:PBS-T(包含0.05%吐温-20的PBS);封闭缓冲液:PierceStartingBlock[®];终止酸:2N H₂SO₄或3N HCl;100ug冻干的重组血凝素(A/Brisbane/10/2007和/或A/Brisbane/59/2007血凝素);兔抗myc-HRP偶联抗体(1:1000);兔抗FLAG-HRP偶联抗体(1:1000);1步UltraTMB。

[0068] 通过重悬冻干的重组血凝素(A/Brisbane/59/2007或A/Brisbane/10/2007之一)于超纯水中到终浓度为200ug/ml,继之以加入100ul的碳酸氢钠缓冲液pH 9.6中0.5ug/mL抗原到Polysorp平板(Nunc)的每个孔中以制备平板。平板在4℃孵育过夜。用PBS-T(300ul

每次洗涤) 洗涤6x, 并使用StartingBlock缓冲液(Pierce) 封闭30分钟。(在这一点上, 平板可以干燥储存在4℃达一年)。向每个平板中加入100μl的抗原特异的溶液并在4℃孵育过夜。

[0069] 抗原特异的Fab片段检测和测量

[0070] 用PBS-T (300u1每次洗涤) 洗涤平板6x以移除未结合的Fab。向平板的每孔加入100u1的在PBS-T中1:1000的抗cmyc和抗FLAG的混合物, 并且平板在室温孵育3小时。未结合的缀合物通过用PBS-T洗涤平板6x移除。向每孔加入100uL的1-步TMB ultra并允许反应达30分钟。通过加入50uL的1M H₂SO₄终止反应, 平板迅速在450nm读值。

[0071] 人PBMC的抗原特异的体外刺激

[0072] 目的是刺激抗原特异的人外周血单核细胞(PBMC) 体外的增殖和分化以使用高通量测序评估应答。

[0073] 使用的试剂是: 补充有4mM L-谷氨酰胺的RPMI-1640培养基; 10%热失活的FCS/FBS(胎牛血清); 50U/ml青霉素; 50μg/ml链霉素; 磷酸缓冲盐(PBS) 溶液。

[0074] 使用的抗原是200ug/ml重组血凝素A/Brisbane/59/2007。

[0075] 全血(8ml) 引入CPT真空采血管(vacutainer)。分离外周血单核细胞(PBMC) 层并洗涤以移除任何血清抗原, 所述抗原可能干扰下游的ELISA。血清储存在-80℃用于随后的分析。

[0076] 制备至少100mL的无菌补充RPMI培养基并且等分所述培养基到4-6ml康宁管中。向每个康宁管中加入抗原以制备一系列抗原浓度, 用其体外激发PBMC, 包括0ug/ml(未激发样品), 0.02ug/ml, 0.2ug/ml和2ug/ml。该培养基(2-ml每3孔) 置于3x 4细胞培养板的每个孔中, 并且每孔覆盖2x 10⁶PBMC。平板随后在CO₂培养箱在具有5%CO₂的潮湿条件下于37℃孵育。每隔一天通过台盼蓝染色监控细胞的生长和健康。根据需要每隔一天加入新鲜的培养基, 每天保留100μl的培养基用于ELISA分析。在第11天使用柠檬酸盐方法用温和的搅拌和小的橡胶刮铲收获细胞。

[0077] 单核细胞分离

[0078] 通过制备1L具有6克的柠檬酸钠和0.1%FCS(1ml FCS/1L) 的PBS溶液制备缓冲液A。血液(8ml) 引入CPT真空采血管(vacutainer) 并且在摇摆离心机中在室温下1500RCF离心所述管15分钟。离心后, 温和倒置管5-10次。打开真空采血管(vacutainer), 并且移出全部浆组分并置于新的15ml圆锥管中。通过加入合适量的缓冲液A增加总体积到15ml, 并且温和倒置管5次。管在室温300RCF离心15分钟。移出上清且使用缓冲液A调整体积到10ml。温和倒置管5次, 并且重复此步骤一次。管在室温300RCF离心10分钟。移出上清且重悬细胞沉淀到需要的体积。使用移液管温和混合管内物质。

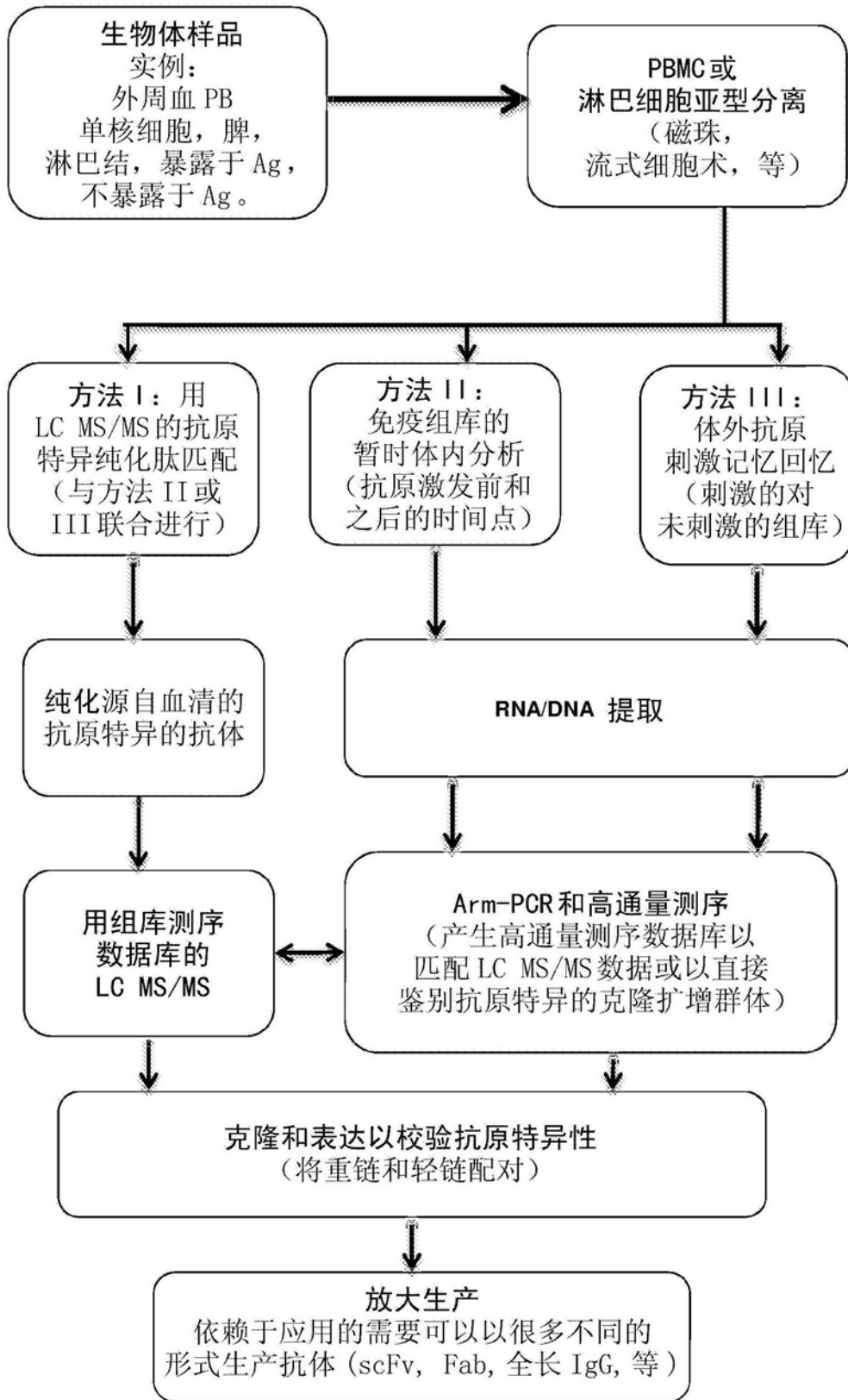


图1

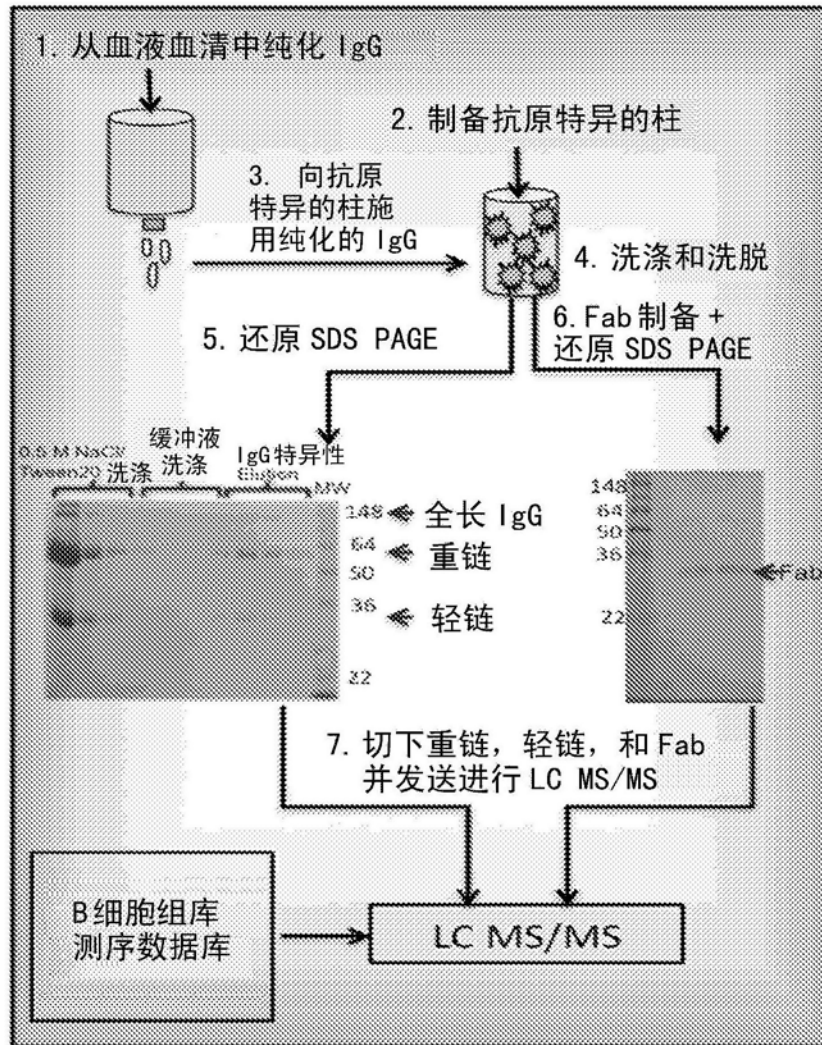


图2

BYRNE-STELLE_A1_091310_igpep			肽序列	肽质量	扫描号	序列头
		2424.16	SYNYVNYWGQGLTVTVSSASTK		3344	>gi xxxxxxx CP0_JGH_GJQGNIM01EKNUS
		1367.72	NTRYLQFNLSR		2912	>gi xxxxxxx J3M7_JGH_GMPTOXV01A70ID
		2424.27	VVRGYKSNWGGTGLTVTVSSASTK		3344	>gi xxxxxxx J3M7_JGH_GMPTOXV02HNMIK
		1635.81	DWGQGLTVTVSSASTK		3008	>gi xxxxxxx C2M21_JGH_GMNM01S01BJK0M
		1331.61	AEDTAVYYCIK		2716	>gi xxxxxxx C2M21_JGH_GMNM01S01BR76P
		1331.61	AEDTAVYYCLK		2716	>gi xxxxxxx C2M21_JGH_GMNM01S01CWUOL
BYRNE-STELLE_B1_091310_igpep			肽序列	肽质量	扫描号	序列头
		1816.93	NYIAWYQOKPGQPPK		2980	>gi xxxxxxx C2M21_JGK_GMNM01S01DQ2LJ
		1302.61	FGSSGSGTDFILK		2850	>gi xxxxxxx C2M21_JGK_GMNM01S02GGF4J
		1631.78	FGSSGSGTDFILTIISK		3034	>gi xxxxxxx C2M21_JGK_GMNM01S01C4RO5
		1218.66	SGTSASLAISGLR		2914	>gi xxxxxxx CP21_JGL_GJQGNIM02FZP7F
		2042.03	ANPTVTLFPPSSEELQANK		3084	>gi xxxxxxx F2_Bn_JGL_FWHEHJ01BUJBW

图3

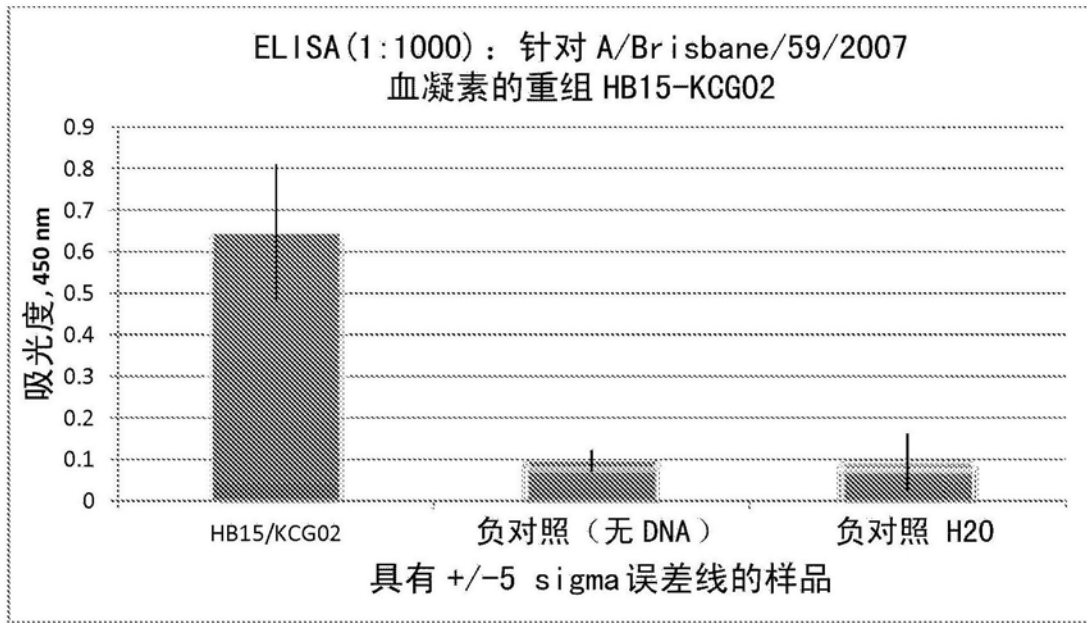


图4

专利名称(译)	使用Arm-PCR和高通量测序鉴定抗原特异的适应性免疫应答		
公开(公告)号	CN109254143A	公开(公告)日	2019-01-22
申请号	CN201810793762.X	申请日	2012-09-28
[标]发明人	韩建 米兰达伯恩斯特尔		
发明人	韩建 米兰达·伯恩-斯特尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 C12Q1/6874		
CPC分类号	C07K16/00 C07K16/1018 C07K2317/21 C07K2317/55 C12Q1/6874 G01N33/53 G01N33/56966		
代理人(译)	张国梁 张莹		
优先权	61/540454 2011-09-28 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开的是用于将源自分离自人或动物血液的抗体的至少一条氨基酸序列与对应于人或动物的免疫组库中的抗体的至少一条DNA序列关联的方法。所述方法还提供用于配对重链和轻链以产生合成的单克隆抗体的手段。

