



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105116138 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201510261116. 5

(22) 申请日 2010. 02. 22

(30) 优先权数据

832/09 2009. 06. 02 CH

PCT/CH2009/000222 2009. 06. 25 CH

61/155, 041 2009. 02. 24 US

61/155, 105 2009. 02. 24 US

(62) 分案原申请数据

201080003451. 0 2010. 02. 22

(71) 申请人 艾斯巴技术 - 诺华有限责任公司

地址 瑞士施利伦

(72) 发明人 V·胡尔曼 - 考提尔 D·厄里什

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书27页

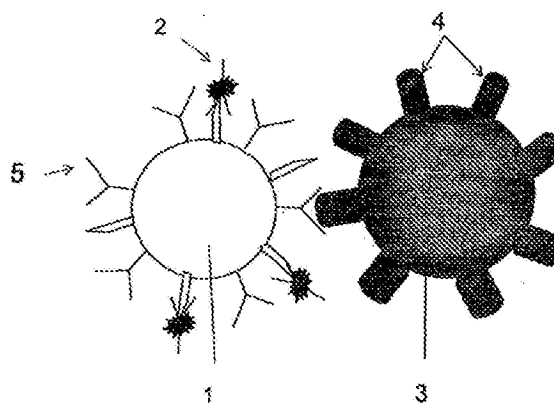
序列表14页 附图8页

(54) 发明名称

用于鉴定细胞表面抗原的免疫结合剂的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于鉴定能够特异性结合细胞表面抗原的免疫结合剂例如 scFv 抗体的方法和按照所述方法鉴定的组合物。



1. 用于鉴定特异性结合目的抗原的免疫结合剂的方法,其包括:
 - (a) 提供多个 B 细胞;
 - (b) 使多个 B 细胞与目的抗原接触,其中所述目的抗原包括第一可分选标记,及用以下抗体对所述多个 B 细胞进行染色:
抗-IgG 抗体,其包括第二可分选标记,及
抗-IgM 抗体,其包括第三可分选标记;以及
 - (c) 使用细胞分选器从多个 B 细胞分离一个或多个能特异性结合目的抗原的 B 细胞,其中复合物中所述第一和第二可分选标记、而非第三可分选标记的存在标示着 B 细胞与目的抗原结合,从而鉴定了结合目的抗原的 B 细胞克隆。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述多个 B 细胞在多个淋巴细胞中提供。
3. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 (b) 中与所述目的抗原接触之前,对所述多个 B 细胞进行染色。
4. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 (b) 中与所述目的抗原接触之后,对所述多个 B 细胞进行染色。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述免疫结合剂的鉴定包括克隆性分离步骤 (c) 中获得的 B 细胞,然后任选地克隆性扩增所述克隆性分离的细胞。
6. 权利要求 5 的方法,还包括从与目的抗原结合的 B 细胞克隆分离编码免疫结合剂的核酸分子。
7. 权利要求 6 的方法,还包括产生能与目的抗原结合的免疫结合剂,其中将所述核酸序列引入表达环境,以便产生所编码的免疫结合剂。
8. 免疫结合剂,其与由权利要求 7 的方法产生的目的抗原结合。
9. 权利要求 8 的免疫结合剂,其中所述免疫结合剂是抗体。
10. 权利要求 9 的免疫结合剂,其中所述抗体是全长免疫球蛋白、Fab、Dab、scFv 或纳米抗体。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述分离的 B 细胞在对于抗体被分泌到培养基而言合适的条件下培养。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述抗体就与目的抗原的特异性结合而被测试。
13. 权利要求 11 的方法,其中所述抗体是小鼠抗体、兔抗体、大鼠抗体、仓鼠抗体、绵羊抗体、鸡抗体、骆驼抗体、山羊抗体或人抗体。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述可分选标记是荧光标记。
15. 权利要求 1 的方法,其中所述目的抗原是可溶性抗原。
16. 权利要求 1 的方法,其中所述 B 细胞是来自兔的 B 细胞。
17. 权利要求 16 的方法,其中所述兔经目的抗原免疫。
18. 用于鉴定特异性结合目的抗原的 B 细胞克隆的方法,其包括:
 - (a) 用目的抗原免疫动物;
 - (b) 自被免疫的动物分离多个 B 细胞;
 - (c) 使多个 B 细胞与目的抗原接触,其中所述目的抗原包括第一可分选标记,及用以下抗体对所述多个 B 细胞进行染色:
抗-IgG 抗体,其包括第二可分选标记,及

抗-IgM 抗体,其包括第三可分选标记;以及

(d) 使用细胞分选器从多个B细胞分离一个或多个能特异性结合目的抗原的B细胞,其中复合物中所述第一和第二可分选标记、而非第三可分选标记的存在标示着B细胞与目的抗原结合,从而鉴定了结合目的抗原的B细胞克隆。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述可分选标记是荧光标记。

20. 权利要求 18 的方法,其中所述目的抗原是可溶性抗原。

21. 权利要求 18 的方法,其中所述动物是兔。

用于鉴定细胞表面抗原的免疫结合剂的方法

[0001] 本申请是 2010 年 2 月 22 日提交的同名发明专利申请 201080003451.0 的分案申请。

[0002] 【背景信息】

[0003] 免疫结合剂,包括抗体、其缀合物和衍生物,作为治疗剂和诊断剂在商业上是极其重要的。用于抗体制备或筛选的常规方法通常利用可溶性抗原。然而,对于某些膜结合的蛋白抗原,如果从膜上溶解抗原将改变抗原上的构象表位,从而导致抗体制备或筛选的失败。此外,免疫印迹和亲和层析法中的一个主要问题是将选择具有对抗原的中等亲和力的抗体。这允许包含许多交叉反应性或粘性抗体(sticky antibody),从而在连续筛选方法中造成负担。虽然已将表达膜结合抗原的细胞直接用于抗体制备,但仍然缺乏能够检测和富集高亲和力的抗细胞表面抗原的抗体的高效筛选方法。

[0004] 【发明概述】

[0005] 本发明提供了用于鉴定能够特异性结合细胞表面抗原的免疫结合剂例如 scFv 抗体的方法。本发明的方法通常包括将标记的表达抗原的细胞与标记的表达免疫结合剂的细胞接触,然后使用细胞分选仪分离结合表达抗原的细胞的表达免疫结合剂的细胞。此类方法对于快速且高效地鉴定存在于膜内在蛋白(integral membrane protein)例如 GPCR 中的构象表位的免疫结合剂是特别有用的。本发明还提供了使用本发明的方法鉴定的分离的免疫结合剂和编码免疫结合剂的核酸。

[0006] 在一个方面,本发明提供了用于鉴定特异性结合目的细胞表面抗原的免疫结合剂的方法。该方法包括:提供多个可操作地连接第一可分选标记的表达免疫结合剂的细胞;提供多个可操作地连接至第二可分选标记的表达抗原的细胞,其中目的抗原展示在表达抗原的细胞的表面;将表达抗原的细胞与表达免疫结合剂的细胞接触;和使用细胞分选器(例如,荧光激活细胞分选器)从多个表达免疫结合剂的细胞分离一个或多个可特异性结合表达抗原的细胞的表达免疫结合剂的细胞,其中单个细胞复合物(例如,抗原与 B 细胞受体之间形成的复合物)中第一和第二可分选标记的存在标示着表达免疫结合剂的细胞与表达抗原的细胞的结合,从而鉴定了结合目的抗原的免疫结合剂。

[0007] 在一些实施方案中,克隆性地分离分离的表达免疫结合剂的细胞。在一些实施方案中,将表达免疫结合剂的细胞经历克隆扩增(clonal expansion)。在其他实施方案中,从表达免疫结合剂的细胞分离编码免疫结合剂的核酸序列。用于分离编码免疫结合剂的核酸序列的适当方法包 PCR,例如单细胞 PCR。可在克隆性分离细胞后和/或克隆扩增后分离编码免疫结合剂的核酸序列。

[0008] 在一些实施方案中,将使用本发明的方法分离的表达免疫结合剂的细胞经历基于细胞的测定以在功能上表征免疫结合剂。适当的基于细胞的测定包括 CELISA。

[0009] 在一些实施方案中,免疫结合剂是抗体。此类抗体包括小鼠抗体、兔子抗体、兔源化(rabbitized)抗体、鸡抗体、骆驼抗体、骆驼源化(camelized)抗体、人抗体、人源化抗体和嵌合抗体。适当的抗体形式包括但不限于 Fab、Dab、纳米抗体(Nanobody)和 scFv。

[0010] 在一些实施方案中,从外源基因表达目的抗原。在其他实施方案中,目的抗原是经

遗传工程改造的抗原。在其他实施方案中,目的抗原是膜内在蛋白。适当的膜内在蛋白包括但不限于 GPCR(例如, CXCR2) 或离子通道。

[0011] 在一些实施方案中,第一或第二可分选标记是荧光标记。适当的荧光标记包括但不限于荧光蛋白质、抗体 / 荧光缀合物 (fluor conjugate) 和荧光细胞标记。

[0012] 在一些实施方案中,表达抗原的细胞是酵母或哺乳动物细胞(例如,人细胞)。在一些实施方案中,表达抗原的细胞表达外源抗原。在一些实施方案中,用表达载体转染表达抗原的细胞。

[0013] 在一些实施方案中,表达免疫结合剂的细胞是酵母或哺乳动物细胞。适当的哺乳动物细胞包括但不限于 B 细胞,例如兔 B 细胞。在一些实施方案中,从经免疫的动物例如通过 DNA 接种免疫的动物分离 B 细胞。在一些实施方案中,表达免疫结合剂的细胞包含从表达载体表达的免疫结合剂。

[0014] 在另一个方面中,本发明提供了编码通过本发明的方法鉴定的免疫结合剂的分离的核酸分子。

[0015] 在另一个方面中,本发明提供了产生能够结合目的抗原的免疫结合剂的方法,其包括将通过本发明的方法鉴定的编码免疫结合剂的核酸序列引入表达环境以便产生编码的免疫结合剂。

[0016] 在另一个方面中,本发明提供了由本发明的方法产生的免疫结合剂。

[0017] 在另一个方面中,本发明还提供了用于鉴定特异性结合目的细胞表面抗原的 B 细胞克隆的方法,其包括:用编码细胞表面抗原的 DNA 免疫动物;从免疫的动物分离 B 细胞;用第一可分选标记标记 B 细胞;提供多个可操作地连接至第二可分选标记的表达抗原的细胞,其中目的抗原展示在表达抗原的细胞的表面;将表达抗原的细胞与 B 细胞接触;和使用细胞分选器从多个 B 细胞分离可特异性结合表达抗原的细胞的一个或多个 B 细胞,其中第一和第二可分选标记在单个细胞复合物中的存在标示着 B 细胞与表达抗原的细胞结合,从而鉴定了结合目的抗原的 B 细胞克隆。

[0018] 【附图概述】

[0019] 图 1 示意性显示用荧光抗体 2 标记的 B 细胞 1 与用细胞内染料 3 染色的表达靶的细胞相互作用。(4: 选择的靶 / 抗原;5: B 细胞受体 (BCR))。

[0020] 图 2: 结合 ESBA903 可溶性靶的兔 B 细胞的 FACS 选择过程。图 2A: 按照前向和侧向散射门控淋巴细胞。图 2B: 在它们当中,选择 IgG+IgM- 细胞(可能是记忆 B 细胞)(加圈显示的)。图 2C: 用 ESBA903-PE 和 ESBA903-PerCP 双染色的细胞(加圈显示的)预期编码针对 ESBA903 的高亲和力 IgG。在 96 孔板中分选显示最亮荧光的细胞(未加圈的)。

[0021] 图 3: 用抗 TNF α 抗体 (PE 标记的) 包被的珠粒结合 TNF α - 转染的 CHO 细胞(上图框)。用抗 CD19 抗体 (APC 标记的) 包被的对照珠粒不结合 TNF α 转染的 CHO 细胞(中图框)。用抗 TNF α 抗体 (PE 标记的) 包被的珠粒不结合野生型 (wt) CHO 细胞(下图框)。左边的散点图 (Dot plot) 显示前向和侧向散射,其分别表示事件的大小和粒度。单珠粒 (约 3 μ m) 群体在 P2 被门控。最终结合珠粒的 CHO 细胞 (约 30 μ m) 在 P1 被门控。中间的散点图显示就其 PE 或 APC 染色而言的 P1 事件 (CHO 细胞)。因此,与抗 TNF α 珠粒相互作用的细胞将出现在 P3 门控中,与抗 CD19 珠粒相互作用的细胞将出现在 P4 门控中。在右边,描述了每一个样品的统计数据。

[0022] 图 4: 将用抗 TNF α -PE 包被的珠粒和用抗 CD19-APC 包被的珠粒与 TNF α -转染的 CHO 细胞混合在一起。CHO 细胞被门控 (P1), 并且在它们当中, 结合抗 TNF α PE 包被的珠粒或抗 CD19-APC 包被的珠粒的细胞分别示于门控 P3 和 P4 中。未结合的珠粒可见于门控 P2 中。

[0023] 图 5a: 3 种不同的 CHO-TNF α -记忆 B 细胞悬浮液的 FACS 分析。左上: 显示细胞悬浮液前向和侧向散射的散点图。活细胞, 包括一大群转基因 CHO 细胞和一小群记忆 B 细胞, 被门控。左下: 显示 APC 和 FITC 荧光的散点图。此处, 记忆 B 细胞 (IgG⁺/IgM⁻) 被门控。这两个散点图对于全部 3 种样品都是相同的; 因此, 它们只显示一次。

[0024] 图 5b: 3 个样品的直方图和群体分层 (population hierarchy): 上: CHO-TNF α 细胞 +ESBA105+ESBA105 免疫的兔子的记忆 B 细胞; 中: CHO-TNF α 细胞 +ESBA105+ 未免疫的兔子的记忆 B 细胞; 下: CHO-TNF α 细胞 +ESBA105 免疫的兔子的记忆 B 细胞。在直方图上, 结合 CHO 细胞的记忆 B 细胞被门控。

[0025] 图 6: 由与用 ESBA105 “包被的” TNF α 转基因 CHO 细胞混合的经免疫的淋巴细胞组成的悬浮液的 FACS 分析。图 6a: 显示细胞悬浮液前向和侧向散射的散点图。活细胞, 包括一大群转基因 CHO 细胞和一小群淋巴细胞, 被门控。图 6b: 显示 APC 和 FITC 荧光的散点图。此处, 记忆 B 细胞 (IgG⁺/IgM⁻) 被门控。图 6c: 显示被门控的记忆 B 细胞的钙黄绿素荧光的直方图。分选被门控的群体 (结合 CHO-TNF α -ESBA105 复合物的记忆 B 细胞)。

[0026] 图 7: 用抗 TNF α IgG 包被的与 CHO-TNF α (B220) 转基因细胞相互作用的珠粒的亮视野显微镜检查图。

[0027] 图 8: 结合至 B 细胞的 CHO-TNF α /ESBA105 细胞 (大细胞) 的亮视野显微镜检查图 (左栏) 和荧光显微镜检查图 (右栏), 所述 B 细胞 (较小的细胞) 在表面上具有抗 ESBA105 抗体。

[0028] 【详述】

[0029] 本发明提供了用于鉴定能够特异性结合细胞表面抗原的免疫结合剂例如 scFv 抗体的方法。本发明的方法通常包括将标记的表达抗原的细胞与标记的表达免疫结合剂的细胞接触, 然后使用细胞分选器分离结合表达抗原的细胞的表达免疫结合剂的细胞。此类方法对于快速且高效地鉴定针对存在于膜内在蛋白例如 GPCR 中的构象表位的免疫结合剂是特别有用的。本发明还提供了使用本发明的方法鉴定的分离的免疫结合剂和编码免疫结合剂的核酸。

[0030] 在一个方面, 本发明提供了用于鉴定特异性结合目的细胞表面抗原的免疫结合剂的方法。该方法包括: 提供多个可操作地连接至第一可分选标记的表达免疫结合剂的细胞; 提供多个可操作地连接至第二可分选标记的表达抗原的细胞, 其中目的抗原展示在表达抗原的细胞的表面上; 将表达抗原的细胞与表达免疫结合剂的细胞接触; 和使用细胞分选器 (例如, 荧光激活细胞分选器) 从多个表达免疫结合剂的细胞分离一个或多个可特异性结合表达抗原的细胞的表达免疫结合剂的细胞, 其中第一和第二可分选标记在单个细胞复合物 (例如, 抗原与 B 细胞受体之间形成的复合物) 中的存在标示着表达免疫结合剂的细胞与表达抗原的细胞的结合, 从而鉴定了结合目的抗原的免疫结合剂。

[0031] 在一些实施方案中, 克隆性分离所述分离的表达免疫结合剂的细胞。

[0032] 在某些实施方案中, 使用本领域技术人员公知的方法将克隆性分离的表达免疫结

合剂的细胞经历克隆扩增。

[0033] 在其他实施方案中,从表达免疫结合剂的细胞分离编码免疫结合剂的核酸序列。可在克隆性分离后或在克隆扩增后进行核酸序列的分离。用于分离编码免疫结合剂的核酸序列的适当方法包括 PCR,例如单细胞 PCR。

[0034] 在一些实施方案中,将使用本发明的方法分离的表达免疫结合剂的细胞经历基于细胞的测定,以功能性表征免疫结合剂。适当的基于细胞的测定包括 CELISA。

[0035] 在一些实施方案中,免疫结合剂是抗体。此类抗体包括小鼠抗体、兔子抗体、兔源化 (rabbitized) 抗体、鸡抗体、骆驼抗体、骆驼源化 (camelized) 抗体、人抗体、人源化抗体和嵌合抗体。适当的抗体形式包括但不限于 Fab、Dab、纳米抗体 (Nanobody) 和 scFv。

[0036] 在一些实施方案中,从外源基因表达目的抗原。在其他实施方案中,目的抗原是经遗传工程改造的抗原。在其他实施方案中,目的抗原是膜内在蛋白。适当的膜内在蛋白包括但不限于 G 蛋白偶联受体 (GPCR, 例如 CXCR2) 或离子通道。

[0037] 在一些实施方案中,第一或第二可分选的标记是荧光标记。适当的荧光标记包括但不限于荧光蛋白质、抗体 / 荧光缀合物和荧光细胞标记。

[0038] 在一些实施方案中,表达抗原的细胞是酵母或哺乳动物细胞 (例如,人细胞)。在一些实施方案中,表达抗原的细胞表达外源抗原。在一些实施方案中,用表达载体转染表达抗原的细胞。

[0039] 在一些实施方案中,表达免疫结合剂的细胞是酵母或哺乳动物细胞。适当的哺乳动物细胞包括但不限于 B 细胞,例如兔 B 细胞。在一些实施方案中,从经免疫的动物,例如利用 DNA 接种免疫的动物分离 B 细胞。在一些实施方案中,表达免疫结合剂的细胞包含从表达载体表达的免疫结合剂。

[0040] 在另一个方面中,本发明提供了编码通过本发明的方法鉴定的免疫结合剂的分离的核酸分子。

[0041] 在另一个方面中,本发明提供了产生能够结合目的抗原的免疫结合剂的方法,包括将通过本发明的方法鉴定的编码免疫结合剂的核酸序列引入表达环境以便产生编码的免疫结合剂。

[0042] 在另一个方面中,本发明提供了通过本发明的方法产生的免疫结合剂。

[0043] 在另一个方面中,本发明还提供了用于鉴定特异性结合目的细胞表面抗原的 B 细胞克隆的方法,其包括:用编码细胞表面抗原的 DNA 免疫动物;从经免疫的动物分离 B 细胞;用第一可分选标记标记 B 细胞;提供多个可操作地连接至第二可分选标记的表达抗原的细胞,其中目的抗原展示在表达抗原的细胞的表面上;将表达抗原的细胞与 B 细胞接触;以及使用细胞分选器从多个 B 细胞分离可特异性结合表达抗原的细胞的一个或多个 B 细胞,其中第一和第二可分选标记在单细胞复合物中的存在标示着 B 细胞与表达抗原的细胞结合,从而鉴定了结合目的抗原的 B 细胞克隆。

[0044] **【定义】**

[0045] 为了可更容易地理解本发明,如下定义某些术语。其他定义示于整个详细的说明书中。

[0046] 术语“抗体”是指完整抗体和其任意抗原结合片段 (即,“抗原结合部分”、“抗原结合多肽”或“免疫结合剂”) 或单链。“抗体”是指包含通过二硫键互连的至少两个重 (H)

链和两个轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每一个重链包含重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含3个结构域,CH1、CH2和CH3。每一个轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。VH和VL区还可细分成高变区(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的区域(称为构架区(FR))。每一个VH和VL包含3个CDR和4个FR,其以下列顺序从氨基端至羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q))结合。

[0047] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体分子,其中(a)恒定区或其部分被改变、替换或交换以便将抗原结合部位(可变区)连接至具有不同的或改变的种类、效应子功能和/或物种的恒定区、或连接至赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b)用具有不同的或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换可变区或其部分。

[0048] 术语抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)是指抗体的保持特异性结合抗原(例如,TNF)的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合部分”中包含的结合片段的实例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段,(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体的单臂的VH和VL结构域组成的Fv片段;(v)单结构域例如dab片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;和(vi)分离的互补决定区(CDR)或(vii)可任选地通过合成接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但可使用重组方法,通过合成接头连接它们,所述合成接头使其能够产生为其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人(1988)Science 242:423-426;和Huston等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合部分”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段,并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组DNA技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同的同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚类),IgA1,IgA2,IgD,IgE或IgM抗体。

[0049] 术语“免疫结合剂”是指分子,所述分子包含抗体的全部或部分抗原结合位置,例如重链和/或轻链可变结构域的全部或一部分,这样免疫结合剂能够特异性识别靶抗原。免疫结合剂的非限定性实例包括全长免疫球蛋白分子和scFv,以及抗体片段,包括但不限于(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段,(iii)Fab'片段,其基本上是具有铰链区的一部分的Fab(参见,Fundamental Immunology(Paul编辑,3.sup.rd ed.1993);(iv)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(v)包含抗体的单臂的VL和VH结构域的Fv片段;(vi)单结构域抗体例如Dab片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546),其由VH或VL结构域组成,Camelid(参见Hamers-Casterman,等人,Nature 363:446-448(1993)和Dumoulin等人,Protein Science 11:500-515(2002))或Shark抗体(例如,shark Ig-NARs

Nanobodies®) ;和 (vii) 纳米抗体 (nanobody), 包含单个可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。

[0050] 如本文中所使用的, 术语“功能性质”是例如为了提高多肽的生产性质或治疗功效, 其提高 (例如相对于常规多肽) 对于本领域技术人员来说是期望的和 / 或有利的多肽 (例如, 免疫结合剂) 的性质。在一个实施方案中, 功能性质是提高的稳定性 (例如, 热稳定性)。在另一个实施方案中, 功能性质是提高的溶解性 (例如, 在细胞条件下)。在另一个实施方案中, 功能性质是非聚集性。在另一个实施方案中, 功能性质是表达 (例如, 在原核细胞中) 的提高。在另一个实施方案中, 功能性质是在内含体纯化方法后重折叠产量的提高。在某些实施方案中, 功能性质不是抗原结合亲和力的提高。

[0051] 术语“构架”是指存在于更趋异的 CDR 区之间的本领域公认的抗体可变区的部分。此类构架区通常称为构架 1 至 4 (FR1、FR2、FR3 和 FR4) 并且提供支架, 所述支架以三维空间形式支持在重链或轻链抗体可变区中发现的 3 个 CDR, 以便所述 CDR 可形成抗原结合表面。此类构架还可称为支架, 因为它们提供支持以呈现更趋异的 CDR。免疫球蛋白超家族的其他 CDR 和构架例如锚蛋白重复序列和纤连蛋白可用作抗原结合分子 (也参见, 例如, 美国专利 6, 300, 064、6, 815, 540 和美国公开案 20040132028)。

[0052] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的位置。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个氨基酸。参见, 例如, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, 第 66 卷, G. E. Morris, Ed. (1996)。

[0053] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异地结合”是指抗体结合预定的抗原上的表位。通常, 抗体以约小于 10^{-7} M, 例如约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力 (KD) 结合。

[0054] 术语“ K_D ”是指特定抗体 - 抗原相互作用的解离平衡常数。通常, 本发明的抗体以小于约 10^{-7} M, 例如小于约 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数 (K_D) 结合抗原, 例如, 如使用表面等离子体共振 (SPR) 技术在 BIACORE 仪中测定的。

[0055] 如本文中所使用的, “同一性”是指两个多肽、分子之间或两个核酸之间匹配的序列。当两个进行比较的序列中的位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据 (例如, 如果两个 DNA 分子的每一个中的位置都被腺嘌呤占据, 或两个多肽的每一个中的位置都被赖氨酸占据) 时, 那么各个分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目再乘以 100 的函数。例如, 如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配, 那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如, DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性 (总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常, 在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用, 例如, 通过计算机程序例如 Align 程序 (DNASTAR, Inc.) 方便地进行的 Needleman 等人 (1970) *J. Mol. Biol.* 48 :443-453 的方法来提供。还可使用已整合入 ALIGN 程序 (版本 2.0) 的 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-17 (1988)) 的算法, 使用 PAM120 权重残基表 (weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外, 可使用已整合入 GCG 软件包 (可在 www.gcg.com 上获得) 的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (*J Mol Biol.* 48:444-453 (1970)) 算法, 使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及

16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重 (gap weight) 和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

[0056] “相似的”序列是当比对时共有相同和相似氨基酸残基的序列,其中相似的残基是进行比对的参照序列中的相应氨基酸残基的保守置换。在这点上,参照序列中的残基的“保守置换”是用于在物理或功能上与相应的参照残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质,包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。因此,“经保守置换修饰的”序列是与参照序列或野生型序列相异在于存在一个或多个保守置换的序列。两个序列之间的“百分数相似性”是包含由两个序列共有的匹配残基或保守置换的位置数目除以进行比较的位置数目再乘以 100 的函数。例如,如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配以及 10 个位置中有 2 个包含保守置换,那么这两个序列具有 80% 的正相似性。

[0057] 本文中使用的术语“保守序列修饰”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。此类保守序列修饰包括核苷酸和氨基酸置换、添加和缺失。例如,可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入修饰。保守氨基酸置换包括其中用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代预测的非必需氨基酸残基。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见,例如,Brummell 等人, *Biochem.* 32:1180-1187(1993); Kobayashi 等人 *Protein Eng.* 12(10):879-884(1999); 和 Burks 等人 *Proc. Natl Acad. Sci USA* 94:412-417(1997))。

[0058] 本文中使用的“氨基酸共有序列”是指可使用至少两个,优选更多的进行比对的氨基酸序列的矩阵产生的氨基酸序列(允许在比对中出现缺口),其使得能够确定各位置上出现频率最高的氨基酸残基。共有序列是包含在各位置上出现频率最高的氨基酸的序列。如果两个或更多个氨基酸等同地出现在单个位置上,那么共有序列包括两个或所有此类氨基酸。

[0059] 可在不同水平上分析蛋白质的氨基酸序列。例如,可在单个残基水平、多个残基水平、具有缺口的多个残基水平等上展示保守性或变异性。残基可展示相同残基的保守性或可在种类水平上保守。氨基酸种类的实例包括极性但不带电荷的 R 组(丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺);带正电荷的 R 组(赖氨酸、精氨酸和组氨酸);带负电荷的 R 组(谷氨酸和天冬氨酸);疏水 R 组(丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸);以及特殊氨基酸(半胱氨酸、甘氨酸和脯氨酸)。其他种类对于本领域技术人员来说是已知的并且可使用结构测定法或其他数据来定义以估量可置换性。在该意义上,可置换的氨基酸可以指可在该位置上进行置换并且保持功能保守性的任何氨基酸。

[0060] 然而应理解,相同类别的氨基酸在它们的生物物理性质上可具有一定程度的不同。例如,应理解,某些疏水 R 组氨基酸(例如,丙氨酸)比其他疏水 R 组氨基酸(例如,缬氨酸)

酸或亮氨酸)更加亲水(即,具有更高的亲水性或更低的疏水性)。相对亲水性或疏水性可使用本领域公认的方法(参见,例如,Rose 等人, *Science*, 229:834-838(1985) 和 Cornette 等人, *J. Mol. Biol.*, 195:659-685(1987))来测定。

[0061] 如本文中所使用的,当一个氨基酸序列(例如,第一 VH 或 VL 序列)与一个或多个另外的氨基酸序列(例如,数据库中的一个或多个 VH 或 VL 序列)比对时,可将一个序列(例如,第一 VH 或 VL 序列)中的氨基酸位置与一个或多个另外的氨基酸序列中的“相应位置”相比较。如本文中所使用的,“相应位置”表示当对序列进行最优比对时,即当序列进行比对以获得最高百分数同一性或百分数相似性时进行比较的序列中的等同位置。

[0062] 术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能性关系中时,核酸是“可操作地连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子可操作地连接至所述序列。

[0063] 术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。载体的另一种类型是病毒载体,其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在已引入其的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而随宿主基因组一起复制(例如,非附加型哺乳动物载体)。

[0064] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*) 的成员,例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的菌株;芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*),例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*);肺炎球菌 (*Pneumococcus*);链球菌 (*Streptococcus*) 和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和 NS0 细胞。

[0065] 术语“治疗”、“疗法”和“医治”是指本文中描述的治疗性或预防性措施。“治疗”的方法利用给有此治疗需要的受试者(例如,患有 GPCR 介导的疾病的受试者或最终可获得这样疾病的受试者)施用本发明的抗体以预防、治愈、延迟、减轻疾病或复发性疾病的严重程度或改善其的一个或多个症状,或以延长受试者的存活期以超过在这样的治疗不存在的情况下所预期的存活期。

[0066] 术语“有效剂量”或“有效给药量 (effective dosage)”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。对于该用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重程度和患者自己的免疫系统的总体状态。

[0067] 术语“受试者”是指任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可用于治疗患有 GPCR 介导的疾病的受试者。

[0068] 如本文中所使用的,术语“兔”是指属于兔科的动物。

[0069] 术语“细胞分选器”是指基于可检测的“可分选”标记的存在分离细胞的任何装置。此类装置包括但不限于荧光激活细胞分选器。任何细胞标记可用作可分选标记,包括但不

限于荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白、抗体/荧光(fluor)缀合物和荧光细胞标记例如荧光钙离子载体。

[0070] 术语“细胞复合物”是指与一个或多个表达免疫结合剂的细胞结合的一个或多个表达抗原的细胞,其中,所述结合由表达抗原的细胞的表面上的抗原介导。在一些实施方案中,表达抗原的细胞与表达免疫结合剂的细胞的结合由表达抗原的细胞表面上的抗原与表达免疫结合剂的细胞表面上的免疫结合剂之间的直接相互作用组成。

[0071] 术语“克隆性分离”是指用于从细胞群体分离单个细胞克隆的任何方法。适当的方法包括但不限于,细胞至多孔板的有限稀释和转移,以便每一个孔包含不超过单个细胞。

[0072] 术语“获得编码免疫结合剂的核酸序列”是指用于获得由表达免疫结合剂的细胞表达的免疫结合剂的核酸序列的任何方法。适当的方法包括但不限于,来自表达免疫结合剂的细胞的编码免疫结合剂的核酸序列的核酸分离、PCR扩增和DNA测序。在一些实施方案中,通过PCR从单个细胞扩增编码免疫结合剂的核酸序列,即“单细胞PCR”。

[0073] 术语“外源抗原”是指通常不在特定宿主细胞中表达的抗原。例如,与宿主细胞相比,外源抗原可来自不同的界、门、纲、目、属或种,例如在酵母细胞中表达的人抗原。此外或可选地,外源抗原可来自相同种但不适当地在该宿主细胞中表达,例如在脑细胞中表达的肺特异性抗原。“外源抗原”还指通常在正常细胞中未发现的突变抗原,例如在肺细胞中表达的癌特异性突变抗原。

[0074] 术语“经遗传工程改造的抗原”是指通过重组DNA技术产生的任意抗原,包括为嵌合体或包含点突变、缺失和/或插入的抗原。除非另外定义,否则本文中使用的全部技术和科学术语具有与本发明所属领域内的技术人员通常理解的意义相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可用于实践或测试本发明,但在下文中描述适当的方法和材料。在矛盾的情况下,以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实施例仅是举例说明性的并且无意是限定性的。

[0075] 在下列部分更详细地描述本发明的不同方面。应理解,可随意组合不同实施方案、参数选择和范围。此外,取决于具体的实施方案,可不使用选择的定义、实施方案或范围。

[0076] 本发明提供了使用FACS鉴定和分离与表达相应抗原的细胞粘附的表达免疫结合剂的细胞的筛选方法。在具体的实施方案中,免疫结合剂是抗体。

[0077] 【抗原表达】

[0078] 用于抗体制备的靶抗原可以是任何蛋白质、肽、核苷酸、碳水化合物、脂质和可溶性的或在细胞表面上表达的或整合在质膜中的其他分子。抗原可以是天然的或合成的。优选,靶抗原是蛋白质或肽。靶抗原的非限定性实例包括CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、Bestrophins、TMEM16A、GABA受体、甘氨酸受体、ABC转运蛋白、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、1-磷酸鞘氨醇受体(S1P1R)、NMDA通道等。在一个实施方案中,靶抗原是跨膜蛋白。在另一个实施方案中,靶抗原是多次跨膜蛋白,例如,G蛋白偶联受体(GPCR)、离子通道等。

[0079] GPCR家族具有至少250个成员(Strader等人FASEB J., 9:745-754, 1995; Strader等人Annu. Rev. Biochem., 63:101-32, 1994)。已估计百分之一的人基因可编码GPCR。GPCR结合范围广泛的配体,包括光子、小生物胺类(即,肾上腺素和组胺)、

肽（即，IL-8）和大的糖蛋白激素（即，甲状旁腺素）。当配体结合时，GPCR 通过激活鸟嘌呤核苷酸结合蛋白（G 蛋白）调控细胞内信号转导途径。有趣地，GPCR 在人巨细胞病毒和疱疹病毒中具有功能性同源物（homologue），这提示可能已在病毒发病机制的进化过程中获得 GPCR（Strader 等人，FASEB J., 9:745-754, 1995；Arvanitakis 等人 Nature, 385:347-350, 1997；Murphy, Annu. Rev. Immunol. 12:593-633, 1994）。

[0080] 迄今已知的大多数 GPCR 的特征性质是，7 簇疏水性氨基酸残基位于一级结构中并且在其每一个区域通过（横跨）细胞膜。所述结构域据认为代表通过 3 个细胞内环、3 个细胞外环以及氨基和羧基末端结构域连接的跨膜 α -螺旋（K. Palczewski 等人，Science 289, 739-45 (2000)）。大多数 GPCR 在前两个细胞外环的每一个中具有单个保守半胱氨酸残基，其形成据认为稳定功能性蛋白质结构的二硫键。7 个跨膜区被命名为 TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6 和 TM7。众所周知，上述这些结构在 G 蛋白偶联受体蛋白中是很普遍的并且相应于其中蛋白质通过膜的区域（穿膜区（membrane-spanning region）或跨膜区（transmembrane region））的氨基酸序列以及穿膜区附近的氨基酸序列在受体当中通常是高度保守的。因此，由于 GPCR 中高度的同源性，新型 GPCR 的鉴定以及此类新型成员的细胞内和细胞外部分的鉴定可由本领域技术人员容易地完成。例如，Watson 和 Arkininstall 的书（1994）（通过引用合并入本文）提供了 50 多种 GPCR 的序列。该书还描述了每一个序列的包含各个跨膜结构域的精确残基。

[0081] G 蛋白偶联受体的小配体结合位置据认为包含位于细胞外表面附近并且由若干 G 蛋白偶联受体跨膜结构域形成的亲水性小窝（hydrophilic socket），该小窝被 G 蛋白偶联受体的疏水性残基包围。每一个 G 蛋白偶联受体跨膜螺旋的亲水侧据假设面向内部，形成极性配体结合位置。已暗示 TM3 在若干 G 蛋白偶联受体中具有配体结合位置，例如包括 TM3 天冬氨酸残基。此外，TM5 丝氨酸、TM6 天冬酰胺和 TM6 或 TM7 苯丙氨酸或酪氨酸也牵涉配体结合。肽激素受体和具有其他更大的配体的受体例如糖蛋白（LH、FSH、hCG、TSH）和 Ca^{2+} /谷氨酸/GABA 类受体的配体结合位置可能位于细胞外结构域和环中。

[0082] 从无活性受体转换至活性受体的关键事件是具有 7 个跨膜螺旋的 GPCR 的跨膜螺旋 3(TM3) 和 6(TM6) 的配体诱导的构象改变（U. Gether 和 B. K. Kolbilka, J. Biol. Chem. 273, 17979-17982 (1998)）。此类螺旋运动又改变受体的细胞内环的构象以促进缔合的异三聚体 G 蛋白的激活。诱变研究（S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. A. Kjelsberg, M. G. Caron 和 R. J. Lefkowitz, J. Biol. Chem. 267, 1633-1639 (1992)；E. Kostenis, B. R. Conklin 和 J. Wess, Biochemistry 36, 1487-1495 (1997)；M. A. Kjelsberg, S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. G. Caron, 和 R. J. Lefkowitz, J. Biol. Chem. 267, 1430-1433 (1992)）证明第三细胞内环（i3）介导大部分受体与 G 蛋白之间的偶联。也已显示表达为微基因（minigene）的 I3 环直接与肾上腺素能受体竞争对 Gq 的结合（L. M. Luttrell, J. Ostrowski, S. Cotecchia, H. Kendal 和 R. J. Lefkowitz, Science 259, 1453-1457 (1993)）或可在无细胞条件下作为可溶性肽激活 G 蛋白（T. Okamoto 等人，Cell 67, 723-730 (1991)）。

[0083] 目的抗原可以是靶细胞（有时也称为表达抗原的细胞）中的内源性来源的抗原。可选地，可将外源分子引入细胞以表达抗原。可通过本领域技术人员已知的任何方法实现抗原至细胞内的引入。在一个实施方案中，可在体外将编码抗原为多肽的多核苷酸插入载

体,该载体可进一步引入用于表达的靶细胞。多核苷酸可包含靶抗原的 cDNA 序列、DNA 序列或本领域内已知的其他序列。载体可以是质粒、粘粒、脂质体或本领域内已知的其他天然或人造载体。引入可以是下列方法:转染、转化、感染、材料的直接显微注射、基因枪递送 (biolistic particle delivery)、电穿孔或本领域内已知的其他方法。表达抗原的靶细胞可以是本领域内已知的任意细胞,包括例如,直接获自动物的细胞,例如癌细胞、非癌细胞、原代细胞等,或经分子改造的细胞,例如培养细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HEK293 细胞等)、永生化细胞、转染的/感染的细胞、T 细胞等。可选地,靶细胞可来自非动物来源,例如细菌、昆虫等。在一个实施方案中,表达靶抗原的细胞是酵母细胞,优选酵母球芽。可选地,靶“细胞”可以是人造细胞样小体或结构,例如脂质体、单层膜小体等。靶细胞或细胞样小体中抗原的表达可以是瞬时的,即,表达将在比较短的时间段(例如,从数分钟至数天)后减弱或终止,或是稳定的,即,表达将以相对稳定的水平持续相对长的时间(例如,在数天或细胞的数代后)。在一个优选实施方案中,抗体在靶细胞的质膜的细胞外表面上表达。在另一个优选实施方案中,抗原是膜内在抗原或多次跨膜抗原。为了到达其在质膜上的位置,可将抗原直接表达在这些位置上,或可在它们在靶细胞的细胞质中表达后将其迁移至这些位置。该迁移可以是靶细胞的自然过程或是通过例如在抗原表达之前或之后连接信号/标签分子(例如,高尔基分选信号,针对某些膜结合分子的抗体等)、锚定移植体(anchoring graft)(例如,糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚)或与抗原化学交联、突变抗原或本领域内已知的导致其迁移的其他方法进行的工程改造过程。

【0084】 【表达免疫结合剂的细胞和免疫】

【0085】 在一个实施方案中,待通过本文中描述的方法选择的表达免疫结合剂的细胞是哺乳动物 B 细胞,优选兔 B 细胞。

【0086】 在优选实施方案中, B 细胞源于用目的靶免疫的动物。可利用本领域技术人员已知的任何方法实施动物的免疫。通常,从免疫的动物的淋巴器官(例如脾或淋巴结)分离 B 细胞。

【0087】 在一个优选实施方案中,通过 DNA 免疫/接种进行目的抗原的免疫。可选地,将表达靶抗原的细胞注射入动物(例如,兔子、大鼠、小鼠、仓鼠、绵羊、山羊、鸡等)以进行免疫。用于该免疫步骤的优选动物是兔子。DNA 免疫/接种诱导快速免疫应答并且允许靶抗原天然表达,并且通常仅天然表达。因为其不牵涉重组蛋白的表达或操作,因此该方法比使用重组蛋白的常规免疫更高效和更具成本效益。此外,更重要地,体内表达的抗原具有与天然背景中的靶蛋白相同的二级结构和甚至可具有与其相同的翻译后修饰,这提高了制备的抗靶抗原的抗体的识别正确性。示例性 DNA 免疫在加拿大专利申请 CA2350078 和 W004/087216 中得到举例说明。具体地,通过基因枪法将编码作为靶抗原的多肽的 DNA 直接引入动物,从而导致多肽在动物中表达,该表达引起抗所述多肽的抗体形成。为了获得更强的抗体形成,同时应用所谓的基因佐剂(genetic adjuvant)和编码多肽的 DNA。此类基因佐剂是表达细胞因子(例如,GM-CSF、IL-4 和 IL-10)和在实验室动物中刺激体液免疫应答的质粒。在一个优选实施方案中,针对靶抗原的抗体在 B 细胞的细胞表面上表达为 B 细胞受体(BCR)。在另一个优选实施方案中,表达抗体的细胞是记忆 B 细胞,其特征在于在其表面上不存在任何 IgM 并且因此可与常规 B 细胞区分。

【0088】 在一个实施方案中,表达免疫结合剂的细胞是酵母细胞,并且免疫结合剂优选是

抗体片段,更优选 scFv。

[0089] 【使用荧光激活细胞分选 (FACS) 的筛选】

[0090] 在免疫步骤后,需要将 B 细胞上特异性结合靶抗原的膜结合抗体与表达非特异性抗体的其他细胞分离。在一个优选实施方案中,通过抗原-抗体结合,在其质膜上表达特异性抗体的 B 细胞粘附至表达抗原的靶细胞。在另一个优选实施方案中,在 B 细胞与靶细胞之间可发生其他或更多相互作用(例如,相同或不同的抗原-抗体相互作用、化学交联、配体-受体相互作用等)。B 细胞可存在于表达不同抗体的 B 细胞的库中,与其他免疫细胞组合,直接从免疫的动物,从免疫的/未免疫的动物的库或从体外工程方法例如通过 V(D)J 基因重组技术产生的表达不同抗体的 B 细胞的文库收集。

[0091] 可在本领域内已知的任意方法中进行表达特异于靶抗原的抗体的 B 细胞的分离。此类方法包括但不限于对抗原的淘选、有限稀释、亲和纯化或利用表达的抗体或产生抗体的 B 细胞的特征的其他方法。

[0092] 在一个优选实施方案中,用标签标记表达抗原的细胞,所述标签用于将来检测和/或分离粘附的 B 细胞。标签可以是交联剂、抗原/抗体、小分子(例如,谷胱甘肽(GSH)、生物素/抗生物素蛋白等)、磁性颗粒、荧光标签等。在一个优选实施方案中,用荧光蛋白/肽标记表达抗原的细胞。在另一个实施方案中,还用标签优选不同的荧光蛋白/肽标记产生抗体的 B 细胞。在另一个实施方案中,可通过 B 细胞上标记的荧光蛋白/肽的荧光发射检测粘附至表达抗原的细胞的 B 细胞。在另一个实施方案中,利用其上标记的两种不同荧光蛋白/肽的荧光发射检测处于粘附中的 B 细胞和表达抗原的细胞。在一个优选实施方案中,可通过其上和粘附的 APC 上标记的荧光蛋白/肽的荧光发射来检测表达特异于靶抗原的抗体的 B 细胞和进一步将其与产生其他抗体的 B 细胞分离。优选,该检测和分离可利用荧光激活细胞分选(FACS)技术来进行。

[0093] 首字母简略词 FACS 已被 Becton Dickinson(Franklin Lakes, NJ) 注册商标和拥有。如本文中所使用的,术语 FACS 可代表任意形式的基于流式细胞术的细胞分选。

[0094] 荧光激活细胞分选是专业化类型的流式细胞术。其提供了基于每一个细胞的特定光散射和荧光特征每次一个细胞地将生物细胞的异质混合物分选至 2 或更多个容器中的方法。其是有用的科学仪器,因为其提供了来自个体细胞的荧光信号的快速、客观和定量记录以及特别关注的细胞的物理分离。

[0095] 在经典的 FACS 系统中,细胞悬浮物在狭窄、快速流动的液流中央被带动。安排流动以便细胞间存在大的间隔(与其直径相比)。振动机制引起细胞流中断成单独的微滴。调整系统以便使超过 1 个细胞存在于一个微滴的概率较低。在液流即将断裂成微滴前,液流通过其中测量每一个细胞的目的荧光特征的荧光测量站。将带电环置于正好液流断裂成微滴的点上。基于刚才的荧光强度测量值将电荷置于环上,当微滴从流中断裂时相反电荷被捕获在微滴上。然后带电荷的微滴下落通过静电偏转系统,该系统基于微滴的电荷使微滴偏转进入容器。在一些系统中,将电荷直接用于液流并且断开的微滴保持与液流相同符号的电荷。在微滴断开后液流则回复中性。

[0096] 用于 FACS 技术的荧光标记取决于用于激发荧光染料的灯或激光器和可获得的检测器。单激光机器上最常见地可获得的激光是蓝色氩激光(488nm)。可用于该类型的激光的荧光标记包括但不限于,(1) 对于绿色荧光(通常标记的 FL1):FITC, Alexa Fluor

488, GFP, CFSE, CFDA-SE 和 DyLight 488 ; (2) 对于橙色荧光 (通常 FL2) : PE 和 PI ; (3) 对于红色荧光 (通常 FL3) : PerCP、PE-Alexa Fluor 700、PE-Cy5 (TRI-COLOR) 和 PE-Cy5.5 ; 以及 (4) 对于红外荧光 (通常 FL4 ; 在一些 FACS 机器中) : PE-Alexa Fluor 750 和 PE-Cy7。其他激光和其相应的荧光标记包括但不限于, (1) 红色二极管激光 (635nm) : 别藻蓝蛋白 (APC)、APC-Cy7、Alexa Fluor 700、Cy5 和 Draq-5 ; 和 (2) 紫色激光 (405nm) : Pacific Orange、Amine Aqua、Pacific Blue、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 和 Alexa Fluor 405。

[0097] 在优选实施方案中,用标记的抗-IgG 和抗 IgM 抗体染色 B 细胞,并且只有被抗 IgG 抗体但不被抗 IgM 抗体阳性染色的记忆 B 细胞被优先选择。IgG 通常具有比 IgM 更高的亲和力;从而选择在其表面上表达 IgG 而非 IgM (这是记忆 B 细胞的特征) 的阳性 B 细胞。为了所述目的,优选使用多色染色,其中例如分别用 APC 和 FITC 差异标记特异于 IgG 和 IgM 的抗体。优选,还标记靶抗原和 / 或表达靶抗原的靶细胞。在一个实施方案中,通过用细胞内荧光染料染色表达靶抗原的细胞来间接地染色靶抗原。

[0098] 本发明提供了使用 FACS 筛选 B 细胞库 (其中 B 细胞可粘附至表达靶抗原的细胞) 以鉴定和进一步分离产生特异性结合目的靶抗原的抗体的 B 细胞的方法。优选,用荧光标记标记 B 细胞,利用不同的荧光标记分开标记表达靶抗原的细胞。此类标记可以是细胞内、细胞外或整合在质膜中的。在免疫和抗体产生后,将全部 B 细胞混合在一起,使其运行通过 FACS 系统。只有产生特异于靶抗原的抗体的那些 B 细胞才可粘附至表达抗原的细胞。与其他单独的细胞之间的大的间隔相比较,它们的粘附缩短了这两个细胞在液流中的距离,从而在它们共同通过扫描激光束的过程中导致可检测的“双色事件 (bi-color event)”。因此,可鉴定产生目的抗体的 B 细胞并且将其分选至与其他非特异性 B 细胞不同的收集管内。

[0099] 在另一个优选实施方案中,如果 B 细胞与相应的表达抗原的细胞之间的相互作用导致细胞特征的某些改变,例如去极化、荧光共振能量转移 (FRET) 等,那么可将更多的荧光标记加至能够这样改变的细胞。因此,处于接触的 B 细胞和表达抗原的细胞将产生“三色事件”事件或同时包含甚至超过三种颜色的事件。

[0100] 可选地,粘附的 B 细胞的鉴定和分选不需要其荧光标记的存在。在一个实施方案中,细胞间相互作用在任一个细胞中导致功能改变。在另一个实施方案中,这些功能改变可用于鉴定和进一步分离产生特异性结合靶抗原的抗体的 B 细胞。例如,细胞间相互作用可在任一细胞中功能性阻断或激活受体信号转导,从而导致可通过 FACS 系统检测的细胞变化,例如 Ca^{2+} 流出量变化等。因此,通过监控此类可检测的功能变化,还可鉴定和分离目的 B 细胞。功能性阻断或激活受体信号转导的一个具体实施方案包括将 B 细胞与功能性表达 GPCR (G 蛋白偶联受体) 的细胞一起温育。可向混合物中加入通过 GPCR 发信号的激动剂以诱导 GPCR 介导的 Ca^{2+} 从内质网流出。如果存在于 B 细胞上的抗体功能性阻断激动剂信号转导,那么 Ca^{2+} 流出也将被该细胞间相互作用阻止。可以例如通过流式细胞术定量测量 Ca^{2+} 流出。因此,只有显示 Ca^{2+} 流出增加或减少的 B 细胞 / 靶细胞聚集体才被分选。

[0101] 【由分离的 B 细胞产生的抗体的亲和力测定】

[0102] 在某些实施方案中,在适当的条件下培养 B 细胞以便将抗体分泌入培养基。产生的抗体是例如单克隆抗体。培养可包括使用辅助细胞系例如胸腺瘤辅助细胞系 (例如 EL4-B5, 参见 Zubler 等人, 1985, J. Immunol., 134 (6) : 3662-3668)。

[0103] 任选地,可进行额外的亲和力测定,然后进一步处理以评估由分离的 B 细胞产生

的抗体的选择性和与配体竞争的能力。此类测定包括但不限于基于细胞的测定（例如，细胞 ELISA (CELISA)，其是将完整细胞用于包被的改进的 ELISA 法）。如 CA2350078 中所论述的，可如下文实施例中所述进行 CELISA。进行验证步骤以就对靶的特异性结合测试产生的抗体，从而例如排除抗在细胞表面上表达的蛋白质而非靶蛋白的抗体。

[0104] 可选地，可就抗体亲和力直接检查鉴定和分离的目的 B 细胞，并且可在处理之前将 B 细胞与粘附的表达抗原的细胞分离。

[0105] 【进一步处理分离的 B 细胞以用于抗体的产生】

[0106] 可进一步处理鉴定的和分离的 B 细胞（其任选地通过亲和测定（例如，CELISA）进行测试）以产生目的免疫结合剂。可以使用例如常规杂交瘤技术。该技术可包括步骤例如纯化免疫结合剂，阐明其氨基酸序列和 / 或核酸序列。

[0107] 可选地，以其 scFv 形式进行结合剂的表征。为了进行该方法，可通过 RT-PCR 从培养的分选的细胞或直接从单个细胞取出在分选的 B 细胞上表达的结合剂的 CDR 序列。其中一个寡核苷酸库编码 CDR 并且第二库编码适当的 scFv 支架的构架区的两个部分交叠的寡核苷酸库的组合将允许在一步 PCR 法中产生人源化 scFv。HT 测序、克隆和产生将允许进行基于纯化的人源化 scFv 的性能的克隆选择，而非表征细胞培养上清液中分泌的 IgG。已鉴定和表征了适合于接受来自任意兔抗体的 CDR 的 scFv 支架（“兔源化”人 FW 或兔接受体 (acceptor) RabTor；参见 W009/155726，将其通过引用完整并入本文）。已显示许多种在一些情况下甚至包含兔特异性 CDR 间二硫键的 CDR 的概念的证据。

[0108] 产生兔源化抗体的一般性说明描述于下文中。

[0109] 【免疫结合剂的移植】

[0110] 可将使用本发明的方法鉴定的免疫结合剂的 CDR 或抗原结合区移植至接受体抗体构架中。这种移植可以例如减小免疫结合剂的免疫原性或提高其功能特性，例如提高热力学稳定性。

[0111] 用于将 CDR 移植至人接受体构架中的一般方法已由 Winter 在美国专利 5, 225, 539（将其通过引用完整并入本文）中公开。

[0112] 用于从兔单克隆抗体移植 CDR 的具体策略公开于美国临时专利申请案 61/075, 697 和 61/155, 041，将其通过引用完整并入本文。这些策略与 Winter 的策略相关，但差异在于接受体抗体构架特别适合作为所有人或非人供体抗体的通用接受体。具体地，已显示人单链构架 FW1.4 (SEQ ID NO:1（在 W003/097697 中称为 a43）和 SEQ ID NO:2（在 W003/097697 中称为 KI27）的组合）与兔抗体的抗原结合位置高度相容。因此，FW1.4 代表了构建衍生自兔环的移植的稳定的人源化 scFv 抗体片段的适合支架。

[0113] 此外，已发现可通过置换 FW1.4 的重链中的 5 或 6 个残基位点和 / 或通过置换 FW1.4 的轻链中的 1 个位点来最优化 FW1.4。因此，令人惊讶地发现，VH 中许多种兔 CDR 的环构象可得到完全保持，而很大程度上不依赖于供体构架的序列。FW1.4 的重链中的所述 5 或 6 个残基以及轻链中的所述 1 个位点在兔抗体中是保守的。从兔集库 (repertoire) 推断出重链中的所述 5 或 6 个位点以及轻链中的所述 1 个位点的共有残基，将其引入人接受体构架的序列。因此，经修饰的构架 1.4（在本文中称为 rFW1.4）与几乎任意兔 CDR 相容。与兔野生型单链不同，含有不同兔 CDR 的 rFW1.4 良好表达并且几乎完全保持原始供体兔抗体的亲和力。

[0114] 因此, 示例性免疫结合剂接受体构架包含

[0115] (i) 与 SEQ ID No. 1 具有至少 70% 的同一性, 优选至少 75%、80%、85%、90%, 更优选至少 95% 的同一性的可变重链构架; 和 / 或

[0116] (ii) 与 SEQ ID No. 2 具有至少 70% 的同一性, 优选至少 75%、80%、85%、90%, 更优选至少 95% 的同一性的可变轻链构架。

[0117] 在优选实施方案中, 可变轻链在位置 87 (AHo 编号) 上包含苏氨酸 (T)。

[0118] 在优选实施方案中, 所述免疫结合剂接受体构架包含:

[0119] (i) 选自 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 4 和 SEQ ID No. 6 的可变重链构架; 和 / 或

[0120] (ii) SEQ ID No. 2 或 SEQ ID No. 9 的可变轻链构架。

[0121] 在优选实施方案中, 通过接头将可变重链构架与可变轻链构架连接。接头可以是任意适当的接头, 例如包含 1 至 4 个重复的序列 GGGGS (SEQ ID No. 10) 的接头, 优选 (GGGGS)₄ 肽 (SEQ ID No. 8), 或如 Alfthan 等人 (1995) Protein Eng. 8:725-731 中公开的接头。

[0122] 在最优选实施方案中, 免疫结合剂接受体构架是与 SEQ ID No. 3 具有至少 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 更优选至少 95% 的同一性的序列。更优选, 免疫结合剂接受体构架包含或为 SEQ ID No. 3。

[0123] 在另一个优选实施方案, 免疫结合剂接受体构架是与 SEQ ID No. 5 具有至少 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 更优选至少 95% 的同一性的序列。更优选, 免疫结合剂接受体构架包含或为 SEQ ID No. 5。

[0124] 在另一个优选实施方案, 免疫结合剂接受体构架是与 SEQ ID No. 7 具有至少 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 更优选至少 95% 的同一性的序列。更优选, 免疫结合剂接受体构架包含或为 SEQ ID No. 7。

[0125] 此外, 可利用 SEQ ID No. 1 的示例性可变重链构架, 其还包含通常支持来源于兔免疫结合剂的 CDR 的构象的一个或多个氨基酸残基。具体地, 所述残基存在于选自 24H、25H、56H、82H、84H、89H 和 108H (AHo 编号) 的一个或多个氨基酸位置上。已证明这些位置影响 CDR 构象, 从而预期用于突变以接纳供体 CDR。优选, 所述一个或多个残基选自: 位置 24 上的苏氨酸 (T)、位置 25 上的缬氨酸 (V)、位置 56 上的甘氨酸或丙氨酸 (G/A)、位置 82 上的赖氨酸 (K)、位置 84 上的苏氨酸 (T)、位置 89 上的缬氨酸 (V) 和位置 108 上的精氨酸 (R) (AHo 编号)。

[0126] 在优选实施方案中, 所述可变重链构架是或包含 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 6。可将两个可变重链构架例如与任意适当的轻链构架组合。

[0127] 上文中公开的序列如下 (X 残基是 CDR 插入位点):

[0128] 【SEQ ID NO. 1:FW1.4 的可变重链构架 (a43)】

[0129] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (X)_{n=1 50} WVRQAPGKGLEWVS (X)_{n=1 50} RFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (X)_{n=1 50} WGQGLTVTVSS

[0130] 【SEQ ID NO. 2:FW1.4 的可变轻链构架 (KI27)】

[0131] EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC (X)_{n=1 50} WYQQKPGKAPKLLIY (X)_{n=1 50} GVPSRFS GSGSGAE
FTLTISLQPDFATYYC (X)_{n=1 50} FGQGYKLT VLG

[0132] 【SEQ ID NO. 3:FW1.4 的构架】

[0133] EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRF
SGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAAS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVS(X)_{n=1-50} RFTISRDNLSLNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAK(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

[0134] 【SEQ ID NO. 4:rFW1.4 的可变重链构架】

[0135] EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTAS(X)_{n=1-50}

[0136] WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}

[0137] RFTISRDTSKNTVYLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLV TVSS

[0138] 【SEQ ID NO. 5:rFW1.4 的构架】

[0139] EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSGTE
FTLTISLQPDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG
GSLRSLCTAS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISRDTSKNTVYLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

[0140] 【SEQ ID NO. 6:rFW1.4(V2) 的可变重链构架】

[0141] EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSVTVS(X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}RFTISKDTSKNTV
YLQMNLSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

[0142] 【SEQ ID NO. 7:rFW1.4(V2) 的构架】

[0143] EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRF
SGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTVS(X)_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISKDTSKNTVYLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50}WGQGTLVTVSS

[0144] 【SEQ ID NO. 8: 接头】

[0145] GGGSGGGSGGGSGGGGS

[0146] 【SEQ ID NO. 9:FW1.4 的经置换的可变轻链构架】

[0147] EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}GVPSRFSGSGSG
TEFTLTISLQPDFATYYC(X)_{n=1-50}FGQGTKLTVLG

[0148] 因此,与 Winter 的一般方法不同,用于本发明的人源化方法的构架序列不必是展示与供体 CDR 所源自的非人(例如,兔子)抗体的序列的最大序列相似性的构架序列。此外,不需要从供体序列移植构架残基来支持 CDR 构象。

[0149] 接受体抗体构架还可包含美国临时申请系列案 61/075,692(将其通过引用完整并入本文)中描述的一个或多个稳定性增强突变。在位置 12、103 和 144(AHo 编号)上发现重链构架中的示例性稳定性增强置换。更优选,重链构架包含(a)位置 12 上的丝氨酸(S);(b)位置 103 上的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)和/或(c)位置 144 上的丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。此外,稳定性增强氨基酸可存在于可变轻链构架的一个或多个下列位置上:1、3、4、10、47、57、91 和 103(AHo 编号)。更优选,可变轻链构架包含位置 1 上的谷氨酸(E)、位置 3 上的缬氨酸(V)、位置 4 上的亮氨酸(L)、位置 10 上的丝氨酸(S);位置 47 上的精氨酸(R)、位置 57 上的丝氨酸(S)、位置 91 上的苯丙氨酸(F)和/或位置 103 上的缬氨酸(V)。

【实施例】

[0150] 在整个实施例中,除非另外指出,否则使用下列材料和方法。

[0151] 【材料和方法】

[0152] 一般而言,除非另有指定,否则本发明的实施使用化学、分子生物学、重组 DNA 技术、免疫学(尤其是例如抗体技术)的常规技术和多肽制备的标准技术。参见,例如,Sambrook,Fritsch 和 Maniatis,Molecular Cloning:Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);Antibody Engineering Protocols(Methods in Molecular Biology),510,Paul,S.,Humana Pr(1996);Antibody Engineering:A Practical Approach(Practical Approach Series,169),McCafferty,Ed.,Irl Pr(1996);Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow 等人,C.S.H.L.Press,Pub.(1999);和 Current Protocols in Molecular Biology,eds.Ausubel 等人,John Wiley&Sons(1992)。

[0153] 【细胞 ELISA (CELISA)】

[0154] 下列实施例描述了 CELISA 用于分析表达 CXCR2 的细胞的用途:

[0155] 可将表达 CXCR2 的 CHO 细胞以 50,000 个细胞/孔的密度接种在 96-孔 Half Area 板中。在 37°C 下过夜温育后,用 1% 的在 PBS 中的甲醛在室温下固定细胞 30 分钟。然后洗涤细胞层 3 次,在室温下用细胞培养基封闭非特异性结合位点,进行 1 个小时。接着,在 3 次清洗步骤后,将上清液在培养基中 1:1 稀释,然后加入孔中。在 3 个对照孔中,将商业兔抗 CXCR2 抗体掺入上清液中。然后在室温下将上清液在细胞层上温育 1.5 小时。最后,使用偶联至 HRP 的山羊抗兔 IgG Fc 抗体检测兔 IgG。在加入过氧化物酶底物(来自 Roche 的 Blue POD 底物)后,发生比色反应,在 25 分钟后用 1M HCl 终止该反应。在 450nm 处测量吸光度。

[0156] 【实施例 1】

[0157] 【使用可溶性抗原的 B 细胞筛选系统】

[0158] 此处举例说明,本发明中描述的基于 FACS(荧光激活细胞分选术)的筛选系统能够选择通过其 B 细胞受体(BCR)特异性结合目的靶(可溶性蛋白质)的 B 细胞。在本实施例中,靶是用荧光染料(PE 和 PerCP)标记的单链抗 VEGF 抗体 ESBA903。从用重组靶免疫的兔子的脾制备淋巴细胞悬浮液。然后将细胞与 PE 和 PerCP 标记的 scFv 以及与特异于 IgG(APC- 标记的)或 IgM(FITC 标记的)的抗体一起温育。在其表面上表达 IgG 但不表达 IgM 的 ESBA903 阳性 B 细胞被分选并且在 96 孔板中被选出(图 2)。如图 2 的图框 A 中所示,按照前向和侧向散射门控淋巴细胞。在它们当中,IgG+IgM- 细胞(很可能是记忆 B 细胞)被选择(图框 B)。预期具有 scFv-PE 和 scFv-PerCP 双染色的细胞编码针对 scFv 的高亲和力 IgG(图框 C)。在 96 孔板中分选出显示最亮荧光的细胞,分选统计数据列于图框 D 中。利用胸腺瘤辅助细胞系(EL4-B5:参见 Zubler 等人,1985,J. Immunol. 134(6):3662-3668),所选择的 B 细胞增殖、分化成浆细胞,然后分泌抗体。通过 ELISA 和 Biacore 测量验证此类 IgG 分子对靶蛋白的亲和力。7 个选择的克隆的动力学参数描述于表 1 中。来自约 200 个分选的细胞的库的这些克隆显示在低纳摩尔至皮摩尔范围中的高结合亲和力。最后,从 6 个目的克隆分离分泌的 IgG 分子的 mRNA 并且将 CDR 移植到 ESBAtech 单链构架 RabTor(也称为构架 rFW1.4)上。

[0159] 【表 1:7 个 B 细胞培养上清液的动力学值】

[0160]

B 细胞克隆	k_a [Ms^{-1}]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
SG2	2.91E+06	2.95E-04	1.01E-10
SE11	3.63E+05	3.81E-04	1.05E-09
2E-03	8.34E+05	3.53E-04	4.23E-10
9E-03	8.66E+05	6.47E-04	7.47E-10
7D-03	3.97E+05	3.04E-04	7.65E-10
12B-02	1.08E+06	1.10E-04	1.01E-10
11G-02	5.48E+05	1.52E-04	2.78E-10

[0161] 【表 1a: 图 2 的分选统计数据】

[0162]

群体	# 事件	% 亲本	% 总数
全部事件	100,000	####	100.0
淋巴细胞	86,585	86.6	86.6
单个淋巴细胞 1	86,013	99.3	86.0
单个淋巴细胞 2	85,523	99.4	85.5
记忆 B 细胞?	5,450	6.4	5.4
分选的细胞	16	0.3	0.0
903- 结合细胞	160	2.9	0.2

[0163] 【选择的文献】

[0164] Zuber 等人 Mutant EL-4thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction. *J Immunol.* 1985;134(6):3662-3668。

[0165] 【跨膜靶】

[0166] 当靶是可溶性的和当重组蛋白是可获得的时,上述筛选系统有效地运行。然而,一些目的靶是多次跨膜蛋白(例如, GPCR 和离子通道)。利用重组蛋白的常规免疫在此类情况下是不妥的或不可能的。此外,如果抗原是膜内在蛋白,那么不能基于纯化的标记的蛋白质的结合进行 B 细胞的分选。为了解决这些问题,进行上述方法的下列改进。

[0167] 【(1) 用 DNA 而非重组蛋白质进行免疫】

[0168] DNA 接种诱导快速的对天然抗原的免疫应答。由于不需要重组蛋白,因此该技术一方面性价比非常高,另一方面,更重要的是,该方法允许膜内在复合物和 / 或多跨膜蛋白的

天然表达。

[0169] 【(2) 结合表达膜内在靶蛋白的细胞的 B 细胞的分选】

[0170] 流式细胞术通常测量当细胞穿过激光束时由单个细胞发射的荧光。然而,一些研究人员已经使用细胞计数器研究细胞间相互作用,例如由钙粘蛋白 (Panorchan 等人, 2006, *J. Cell Science*, 119, 66-74; Leong et Hibma, 2005, *J. Immunol. Methods*, 302, 116-124) 或整联蛋白 (Gawaz 等人, 1991, *J. Clin. Invest*, 88, 1128-1134) 介导的粘附。然而,此类研究未证明此类细胞间相互作用在细胞分选的物理步骤过程中是否保持完整。此外,从未显示 B 细胞受体与其存在于另一个细胞表面上的靶的结合将强至足以允许进行这样的物理分选。

[0171] 为了选择结合跨膜靶的 B 细胞,可用选择的靶瞬时或优选稳定地转染细胞(例如, CHO 或 HEK293 细胞),或可使用天然地表达选择的靶的细胞。用细胞内荧光染料(例如钙黄绿素)染色此类靶细胞,将其与经免疫的兔子的记忆 B 淋巴细胞一起温育。用结合细胞表面特异性标志的荧光抗体染色 B 淋巴细胞。因此,可实现包含通过 BCR-靶相互作用(参见图 1)彼此粘附的两个细胞的双色“事件”的选择。

[0172] 如上所述进行这些 B 细胞的进一步处理,这导致例如以 IgG 或 scFv 形式存在的单克隆抗体的产生。为了评估这些抗体对靶的亲合力,进行 CELISA(其中使用完整细胞进行包被步骤的 ELISA)。利用该方法,可评估抗体竞争配体的选择性和能力。最后,利用寡核苷酸延伸法,通过基因合成将目的克隆的 CDR 克隆入我们的兔源化构架 (RabTor)。

[0173] B 细胞分选的读出 (read-out) 不一定限于细胞间相互作用,其还可用于选择该相互作用在功能上阻断/激活受体信号转导的能力。例如,可将 B 细胞与功能性表达 GPCR 的细胞一起温育。可向混合物中加入通过 GPCR 发信号的激动剂来诱导 GPCR 介导的 Ca^{2+} 从内质网的流出。如果存在于 B 细胞上的抗体功能性阻断激动剂的信号转导,那么 Ca^{2+} 流出将因此也被该细胞间相互作用阻断。可利用流式细胞术定量测量 Ca^{2+} 流出。因此只有未显示 Ca^{2+} 流出的 B 细胞/靶细胞聚集体可被分选。

[0174] 【实施例 2】

[0175] 【用抗 TNF α 抗体包被的珠粒与表达膜结合 TNF α 的 CHO 细胞之间的相互作用的检测】

[0176] 在开始针对跨膜蛋白的 B 细胞筛选之前,必须证明可利用 FACS 阳性地选择细胞间相互作用(特别是 BCR 与靶细胞上的跨膜蛋白之间的相互作用)。为了确定流式细胞仪液流中的高压是否打断两个细胞之间的非共价结合,进行下列实验。

[0177] 将用膜结合 TNF α 稳定地转染的 CHO 细胞 (B-220 细胞)(含有突变的膜结合 TNF α , 该 TNF α 在 TACE 切割位点中具有阻止 TNF α 配体的切割和脱落的点突变;参见,例如 Scallion 等人 *J Pharmacol Exp Ther* 2002 ;301:418-26) 与用 PE- 标记的抗 -TNF α 抗体包被的珠粒一起温育。在该情况 (set-up) 中,珠粒模拟记忆 B 细胞。作为阴性对照,使用未转染的 CHO 细胞以及用 APC 标记的无关抗体(抗 -CD19) 包被的珠粒。在搅拌的条件下于 4 $^{\circ}$ C 下温育 2 小时后,利用 FACS(使用 130 μ m 喷嘴)分析细胞-珠粒悬浮液。图 3 显示可用 FACS 明确地检测到抗 -TNF α 珠粒与 TNF α -转染的 CHO 细胞之间的特异性结合。事实上,在该样品(上图框)中,约三分之二的珠粒结合细胞(585 个结合的对 267 个未结合的)。相反地,在对照样品(中间和下图框)中,几乎没有珠粒结合 CHO 细胞。此外,将两种

珠粒群体（抗-TNF α -PE 和抗-CD19-APC）与 TNF α -转染的 CHO 细胞混合在一起。图 4 显示约一半的抗-TNF α 珠粒结合 CHO 细胞，而绝大部分抗-CD19 珠粒保持未结合。每一个样品中结合细胞的珠粒的百分比描述于表 2 中。因此，证明了使用流式细胞术能够特异性选择通过其 B 细胞受体结合膜内在靶蛋白的单个 B 细胞。

[0178] 【表 2: 每一个样品中结合 CHO 细胞的珠粒的百分比】

[0179]

	细胞	珠粒上的 mAb	%结合的珠粒
样品 1	CHO-TNF α (B220)	抗 TNF α	68.0
样品 2	CHO-TNF α (B220)	抗 CD19	0.9
样品 3	CHO wt	抗 TNF α	1.5
样品 4	CHO-TNF α (B220)	抗 TNF α	47.0
		抗 CD19	0.4

[0180] 【表 2a: 图 3 的上图框的分选统计数据 ;用抗 TNF α 抗体包被的珠粒与 TNF α 转染的 CHO 细胞结合】

[0181]

群体	# 事件	%亲本	%总数
全部事件	10,000	####	100.0
P1	9,692	96.9	96.9
P3	585	6.0	5.9
P4	1	0.0	0.0
P2	267	2.7	2.7

[0182] 【表 2b: 图 3 的中间图框的分选统计数据 ;用抗 CD19 抗体包被的珠粒不结合 TNF α 转染的 CHO 细胞】

[0183]

群体	# 事件	%亲本	%总数
全部事件	10,000	####	100.0
P1	9,399	94.0	94.0
P3	3	0.0	0.0
P4	6	0.1	0.1
P2	558	5.6	5.6

[0184] 【表 2c: 图 3 的下图框的分选统计数据 ;用抗 TNF α 抗体包被的珠粒不结合 CHO 野生型细胞】

[0185]

群体	# 事件	% 亲本	% 总数
全部事件	10,000	####	100.0
P1	9,001	90.0	90.0
P3	13	0.1	0.1
P4	7	0.1	0.1
P2	811	0.1	0.1

[0186] 【表 2d: 图 4 的分选统计数据】

[0187]

群体	# 事件	% 亲本	% 总数
全部事件	10,000	####	100.0
P1	9,096	91.0	91.0
P3	401	4.4	4.0
P4	2	0.0	0.0
P2	856	8.6	8.6

[0188] 【实施例 3】

[0189] 【从抗 -TNF α 抗体免疫的兔子分离的 B 细胞与用抗 -TNF α 抗体饱和的表达膜结合 TNF α 的 CHO 细胞之间的相互作用的检测】

[0190] 为了进行图 5 中描述的实验,从抗 -TNF α 抗体 (ESBA105, 内部 (in-house) 产生的) 免疫的兔子的脾或从未免疫的兔子的脾分离淋巴细胞。将它们用抗兔 IgG-APC 和抗兔 IgM-FITC (AbD serotec) 染色,随后进行预分选以获得纯的记忆 B 细胞群体 (IgG+/IgM-)。平行地,用 1 μ g/mL 钙黄绿素 - 红 (Invitrogen) (荧光染色活细胞的细胞质染料) 加载表达 TNF α 的 CHO 细胞 (由 Dr. P Scheurich, Univ. of Stuttgart 捐赠)。然后洗涤这些细胞一次,将其与 (或不与,用于阴性对照) 100 μ g/mL ESBA105 一起温育,最后用 PBS 再洗涤 3 次。最终以约 1:10 的比率将记忆 B 细胞与 CHO 细胞混合,在旋转板上 4 $^{\circ}$ C 下温育 2 小时 (浓度: 3 \times 10⁷个细胞 /mL)。

[0191] 制备下列样品:

[0192] (1) CHO-TNF α 细胞 +ESBA105+ESBA105 免疫的兔子的记忆 B 细胞[0193] (2) CHO-TNF α 细胞 +ESBA105+ 未免疫的兔子的记忆 B 细胞[0194] (3) CHO-TNF α 细胞 +ESBA105 免疫的兔子的记忆 B 细胞

[0195] 在 2 小时的温育后,使用 70 μ m 喷嘴,利用 FACS 测量 3 个样品。根据表 3a 中显示的群体分层,5% 的 ESBA105 免疫的细胞结合“ESBA105- 包被的”TNF α 转基因 CHO 细胞。

相比较下,只有 0.5%的未免疫的 B 细胞结合这些“ESBA105- 包被的”TNF α 转基因 CHO 细胞 (表 3b),以及 0.6%的免疫的 B 细胞在 ESBA105 不存在于 CHO 细胞表面上的情况下结合 (表 3c)。这些结果显示 BCR (B 细胞受体) 与跨膜靶之间的特异性相互作用可通过 FACS 检测到。

[0196] 【表 3a: 图 5b 的上图框的分选统计数据】

[0197]

群体	# 事件	% 亲本	% 总数
全部事件	50,000	####	100.0
活细胞	43,828	87.7	87.7
B 细胞	5,162	11.8	10.3
粘附至 CHO 的 B 细胞	78	1.5	0.2

[0198] 【表 3b: 图 5b 的中间图框的分选统计数据】

[0199]

群体	# 事件	% 亲本	% 总数
全部事件	50,000	####	100.0
活细胞	43,834	87.7	87.7
B 细胞	4,290	9.8	8.6
粘附至 CHO 的 B 细胞	23	0.5	0.0

[0200] 【表 3c: 图 5b 的下图框的分选统计数据】

[0201]

群体	# 事件	% 亲本	% 总数
全部事件	50,000	####	100.0
活细胞	42,982	86.0	86.0
B 细胞	10,150	23.6	20.3
粘附至 CHO 的 B 细胞	65	0.6	0.1

[0202] 【实施例 4】

[0203] 【从 ESBA105 免疫的兔子分离的 B 细胞与用 ESBA105 饱和的表达膜结合 TNF α 的 CHO 细胞之间的相互作用的检测】

[0204] 在另外的实验中,不进行记忆 B 细胞的预分选。将整个淋巴细胞群体与染色的 CHO-TNF α -ESBA105 细胞一起温育。如上所述制备转基因 CHO 细胞。然而,为了防止它们在

96 孔板中分选后在 B 细胞培养基中增殖,在钙黄绿素染色之前通过丝裂霉素 C(M4287-2MG)处理使细胞的细胞周期停滞。将 ESBA105 免疫的兔子的淋巴细胞与染色的 CHO 细胞以 3:1 的比率混合(细胞悬液的浓度:约 3-10⁷个细胞/mL),在旋转板上于 4℃下温育 2 小时。此后,对细胞悬浮液进行 FACS 分析,按照图 6 中描述的门控,如表 3 中所示利用 1、10 或 100 个细胞/孔分选结合 CHO-TNF α -ESBA105 的记忆 B 细胞。分选的细胞分别代表 5.5% 的记忆 B 细胞群体,0.2% 的总事件。

[0205] 在 96 孔板中收集分选的细胞,将其在 37℃和 5% CO₂下培养 13 天。之后,收集培养上清液,在直接 ELISA 中进行测试以检查结合 ESBA105 的 IgG 的存在。ELISA 结果(表 3)显示 ESBA105 特异性抗体可在许多小孔中以及也在其中分选单个 B 细胞的小孔中被检测到。这些上清液的 Biacore(GE Healthcare)分析(表 4)确认这些抗体确实结合 ESBA105 靶。

[0206] 【表 3: 在分选后 13 天获得的 B 细胞培养上清液样品的 ELISA 分析】

[0207] 为了验证 OD450 信号的特异性,不分选 A 行小孔中的 B 细胞。在小孔 A11 和 A12 中,将多克隆兔抗 ESBA105 抗体(AK3A;2 μ g/mL)掺入上清液作为阳性对照。以粗体突显其中 OD450 显著高于背景的小孔。

[0208]

第 13 天	0 个 B 细胞/孔										阳性对照	
$\langle \rangle$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0690	0.0680	0.0600	0.0470	0.0540	0.0700	0.0660	0.0750	0.0490	0.0690	2.7270	2.7020
B	0.0660	0.0630	2.7190	0.0460	0.0500	0.0640	0.0630	0.0770	2.7920	0.0580	2.8670	2.8880
C	0.0700	2.8380	0.0520	0.0470	0.0540	0.0690	2.9260	2.7160	0.0570	0.0690	2.9500	2.7730
D	0.0680	0.0630	0.0560	0.0490	0.0520	0.0640	0.0650	0.7840	0.4480	0.0620	3.0010	2.9250
E	0.0750	0.0730	0.0630	0.0530	0.0630	0.0670	2.8550	0.0830	0.0580	1.9820	2.1250	2.8090
F	0.0680	0.0640	2.7090	0.0530	0.0580	0.0680	0.0750	2.5610	0.0610	0.3820	2.8150	2.8180
G	0.0820	0.0740	0.0660	1.7530	0.0700	0.0780	0.3980	0.0740	2.8920	1.8240	2.7910	2.7510
H	0.0730	0.0680	0.0620	0.0570	0.0610	0.0720	0.1710	1.9590	0.0610	2.7830	0.1800	2.8510
	1 个 B 细胞/孔					10 个 B 细胞/孔					100 个 B 细胞/孔	

[0209] 【表 4: 利用 Biacore 测定的 B 细胞培养上清液的动力学值和浓度】只测量其中一个细胞/孔被分选的上清液。BLQ: 低于定量的下限

[0210]

蛋白质	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	%SE (ka)	%SE (kd)	KD (M)	拟合的 Rmax (RU)	Chi2 (Rmax 的%)	捕获水平 具有 IgG 的 B 细胞培养基	捕获水平 B 细胞培养基	近似净捕获水平	浓度 (ug/ml)
19-01-B3	1.54E+06	2.83E-03	0.29	0.20	1.8E-09	64.0566	0.30	772.65	554.36	218.30	0.273
19-01-C2	2.30E+09	3.23E+01	0.04	0.04	1.4E-08	99.0582	10.46	1069.06	546.00	523.06	1.576
19-01-F3	1.46E+06	2.31E-03	0.30	0.20	1.6E-09	77.848	0.37	803.86	537.13	266.72	0.347
19-01-G4	3.40E+06	4.45E-03	2.86	2.29	1.3E-09	4.43221	1.43	578.01	548.58	29.43	BQL
19-02-B4	8.18E+05	3.18E-03	0.22	0.15	3.9E-09	80.3549	0.22	822.67	539.30	283.37	0.397
19-02-D3	1.01E+06	2.95E-03	0.54	0.36	2.9E-09	23.7639	0.41	652.51	547.28	105.23	0.066
19-02-F2	2.61E+06	6.61E-04	1.53	0.59	2.5E-10	12.533	0.64	5214.04	514.43	9.61	BLQ

[0211] 【实施例 5】

[0212] 【用 CXCR2 免疫的兔子的淋巴细胞的筛选（分选 27/29）】

[0213] 用 CXCR2 表达载体免疫 3 只兔子。在数次真皮内施用 CXCR2-cDNA 后，采集血清，就特异性抗体的存在存在 CXCR2 转染的细胞上测试所述血清。然后取出淋巴结细胞，冷冻在 5 个等分中，每一个等分 1.6×10^7 个细胞，将其贮存在液氮罐中。

[0214] 解冻等分，用特异于 IgG (APC- 标记的) 或 IgM (FITC 标记的) 的抗体染色。平行地，用丝裂霉素 c 处理表达 CXCR2 的 CHO 细胞以阻止进一步生长而不杀死细胞，加载 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 钙黄绿素 - 红。然后以 10^7 个细胞 / ml 的终细胞浓度混合两种细胞制剂，淋巴细胞的丰度是 CXCR2- 转染的 CHO 细胞的 2 倍。在轻轻搅拌的条件下于 4°C 下温育 2 小时，将细胞悬浮液通过 $50\text{-}\mu\text{m}$ 过滤器过滤，然后加载在 FACS 上。如图 6 中所述进行门控。在总共 10×96 孔板中每个孔分选一个“事件”（结合至 CXCR2- 转染的 CHO 细胞的记忆 B 细胞）（总共 900 个事件）。分选的事件分别代表 3.1% 的记忆 B 细胞群体，0.035% 的样品中总细胞数量。

[0215] 将选择的淋巴细胞在 37°C 培养箱中培养 21 天。每 2 至 3 天，从孔中收集 $100 \mu\text{L}$ 的培养上清液并且更换以新鲜培养基。在该培养时期中，B 细胞增殖、分化成浆细胞并且分泌抗体。为了显现包含 CXCR2 特异性抗体的上清液，进行 CELISA。为此，将表达 CXCR2 的 CHO 细胞以 $50,000$ 个细胞 / 孔的密度接种在 96- 孔 Half Area 板上。在 37°C 下过夜温育后，用 1% 的在 PBS 中的甲醛在室温下固定细胞 30 分钟。然后洗涤细胞层 3 次，在室温下用细胞培养基封闭非特异性结合位点 1 个小时。然后，在 3 次清洗步骤后，将上清液在培养基中 1:1 稀释，然后加入孔中。在 3 个对照孔中，将商业兔抗 CXCR2 抗体掺入上清液中。在室温下将上清液在细胞层上温育一个半小时。最后，使用偶联至 HRP 的山羊抗兔 IgG Fc 抗体检测兔 IgG。在加入过氧化物酶底物（来自 Roche 的 Blue POD 底物）后，进行比色反应，在 25 分钟后用 1M HCl 终止该反应。在 450nm 处测量吸光度。

[0216] 该 CELISA 导致 1.8% (16/900) 的孔展示阳性信号。在第二 CELISA 中验证所有阳性。还针对其他细胞系：CHO-K1 (野生型) (用于显示最终的非特异性结合克隆)、CHO- 人 CXCR1 和 CHO- 小鼠 CXCR2 (用于显示对密切相关的受体或物种对应物的交叉反应性) 测试上清液。最后，在直接 ELISA 中就与由 CXCR2 的 48 个 N- 端氨基酸组成的肽的结合测试上清液。结果示于表 5 中。全部选择的上清液在 CELISA 中都产生强的抗人 CXCR2 的 OD_{450} 信号。它们中的一些在使用 CHO 野生型细胞的对照实验中也有微弱阳性，这意味着它们可能以非特异性方式结合。没有一个克隆与人 CXCR1 或小鼠 CXCR2 交叉反应。最后，一些克隆但并非全部，结合至 CXCR2 的 N- 末端肽，这表明 CXCR2 上存在可能的可选择的结合位点。鉴于不可能将完整细胞固定在 Biacore 芯片上，因此目前不可能定量测量选择的抗体对 CXCR2 受体的亲和力。然而，收集的数据汇集起来表明，使用上述细胞间相互作用分选系统选择了特异于人 CXCR2 的抗体。

[0217] 【表 5: 来自在分选 27 和 29 中分离的抗 CXCR2 克隆的 CELISA 结果的概述】

[0218]

克隆编号	针对 CXCR2 的直接 CELISA			兔 IgG 定量	CELISA CXCR1	CELISA mCXCR2	ELISA N-端
	1. 测定 OD ₄₅₀	2. 测定 OD ₄₅₀	CHO wt. OD ₄₅₀	于 ELISA 中 (ng/mL)	(OD ₄₅₀)	(OD ₄₅₀)	(OD ₄₅₀)
27-01-E3	3.3576	3.384	0.199	13501.9	0.1111	0.2210	2.3224
27-01-D9	3.1769	3.652	0.084	431.6	0.1100	0.1081	2.1632
27-01-H9	3.2068	3.707	0.366	6439.8	0.3410	0.3180	0.0552
27-02-D3	2.1209	2.971	0.090	370.2	0.1190	0.1169	0.0507
27-03-H4	3.4092	3.490	0.373	904.3	0.4470	0.2562	2.7145
27-04-B3	2.7205	3.284	0.410	2896.1	0.4810	0.2724	0.0602
27-06-B5	0.4456	0.457	0.091	< 5ng/ml	0.1050	0.0980	0.05
27-06-A6	3.2461	3.507	0.423	1259	0.3640	0.2119	2.1627
27-07-B2	3.2434	3.390	0.140	455.9	0.1210	0.1216	2.4233
27-08-D5	3.1386	3.302	0.090	178.4	0.1060	0.0910	2.2873
27-08-G9	3.3705	3.302	0.100	427.6	0.1160	0.0881	2.4506
27-08-G11	3.2857	3.380	0.125	2755	0.1660	0.1389	0.2955
27-09-A1	0.9547	1.926	0.103	261.1	0.1180	0.0996	0.0383
27-09-D1	3.2530	3.503	0.094	1576.5	0.1210	0.1238	0.0504
27-09-A5	3.2953	3.501	0.482	4502	0.4970	0.2491	2.5863
27-10-C3	0.6464	1.522	0.092	35.5	0.1030	0.1080	0.0513
29-01-H10	3.3345	3.3405	0.1558	5238.5	0.1810	0.1644	2.5374
29-02-C4	3.1456	3.3931	0.1219	2406.9	0.1490	0.1513	2.5126
29-02-H8	3.4441	3.3891	0.1178	4645.7	0.1260	0.1287	2.4003
29-02-C10	3.1259	3.4947	0.1128	861.3	0.1220	0.1074	1.9841
29-03-G11	2.5987	3.0270	0.1181	420.1	0.1110	0.0828	0.0501
29-04-F11	3.0250	3.1871	0.2768	16071.6	0.3160	0.1999	2.6047
29-05-E11	3.5481	3.4769	0.1531	2857.3	0.1950	0.1081	2.2094
29-06-H3	3.4308	3.4005	0.1254	8741.7	0.1530	0.1489	2.6543
29-06-D10	3.3152	3.4020	0.1316	1522.1	0.1210	0.1101	2.4598
29-07-H4	3.3693	3.4622	0.8502	16580.3	1.5030	0.7195	2.4458
29-08-E1	3.7283	3.4990	1.0667	10562.2	1.4780	0.5225	2.3015
29-08-G10	2.8429	2.5070	0.1107	40.4	0.1110	0.0955	1.8621
29-09-C4	1.1362	0.8767	0.1054	< 5ng/ml	0.1090	0.0900	0.3539

[0219] 【等同物】

[0220] 根据前述说明,本发明的许多改进和备选实施方案对于本领域技术人员来说是显而易见的。因此,本说明书被解释为仅为示例性的并且目的在于教导本领域技术人员进行本发明的最佳模型。结构的细节可显著改变而不背离本发明的精神,并且落在所附权利要求的范围内的所有修饰的专门用途被保留权利。本发明意欲只限于所附权利要求和适用的法律法规。

[0221] 本说明书中引用的所有文献和相似材料包括专利、专利申请、文章、书籍、论文、学术论文、网页、图和 / 或附件,无论此类文献和相似材料的形式如何,都以其全文通过引用明确地合并入本文。如果一个或多个合并的文献和相似材料与本申请不同或矛盾,包括定义的术语、术语的使用、描述的技术等,以本申请为准。

[0222] 本说明书还包括如下内容:

[0223] 1. 用于鉴定特异性结合目的细胞表面抗原的免疫结合剂的方法,其包括:

[0224] (a) 提供多个可操作地连接至第一可分选标记的表达免疫结合剂的细胞;

[0225] (b) 提供多个可操作地连接至第二可分选标记的表达抗原的细胞,其中目的抗原展示在表达抗原的细胞的表面;

[0226] (c) 将表达抗原的细胞与表达免疫结合剂的细胞接触;和

[0227] (d) 使用细胞分选器从多个表达免疫结合剂的细胞分离一个或多个能特异性结合表达抗原的细胞的表达免疫结合剂的细胞,其中所述第一和第二可分选标记在单个细胞复合物中的存在标示着表达免疫结合剂的细胞与表达抗原的细胞结合,从而鉴定了结合目的抗原的免疫结合剂。

[0228] 2. 实施方式 1 的方法,其还包括克隆性分离步骤 (d) 中获得的表达免疫结合剂的细胞,然后任选地克隆性扩增所述克隆性分离的细胞。

[0229] 3. 实施方式 2 的方法,其还包括从分离的表达免疫结合剂的细胞获得编码免疫结合剂的核酸序列。

[0230] 4. 实施方式 3 的方法,其中通过 PCR 获得所述编码免疫结合剂的核酸序列。

[0231] 5. 实施方式 4 的方法,其中所述 PCR 是单细胞 PCR。

[0232] 6. 实施方式 2 的方法,其还包括使分离的表达免疫结合剂的细胞经历基于细胞的测定以功能性表征免疫结合剂。

[0233] 7. 实施方式 6 的方法,其中所述基于细胞的测定是 CELISA。

[0234] 8. 实施方式 1 的方法,其中在抗原与 B 细胞受体之间形成细胞复合物。

[0235] 9. 前述实施方式的任一项的方法,其中免疫结合剂是抗体。

[0236] 10. 实施方式 9 的方法,其中所述抗体选自小鼠抗体、兔抗体、鸡抗体、骆驼抗体、人抗体、人源化抗体和嵌合抗体。

[0237] 11. 实施方式 9 的方法,其中所述抗体选自全长免疫球蛋白、Fab、Dab 和纳米抗体。

[0238] 12. 实施方式 9 的方法,其中所述抗体是 scFv。

[0239] 13. 前述实施方式的任一项的方法,其中从外源基因表达目的抗原。

[0240] 14. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述目的抗原是经遗传工程改造的抗原。

[0241] 15. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述目的抗原是膜内在蛋白。

[0242] 16. 实施方式 15 的方法,其中所述膜内在蛋白是 GPCR。

[0243] 17. 实施方式 16 的方法,其中所述 GPCR 选自 CXCR2、CXCR1、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、Bestrophins、TMEM16A、GABA 受体、甘氨酸受体、ABC 转运蛋白、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、1-磷酸鞘氨醇受体 (S1P1R) 和 NMDA 通道。

[0244] 18. 实施方式 15 的方法,其中所述膜内在蛋白是离子通道。

[0245] 19. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述第一或第二可分选标记是荧光标记。

[0246] 20. 实施方式 19 的方法,其中所述荧光标记选自荧光蛋白、抗体/荧光缀合物和荧光细胞标记。

[0247] 21. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述细胞分选器是荧光激活细胞分选器。

[0248] 22. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述表达抗原的细胞是酵母细胞、酵母球芽或哺乳动物细胞。

[0249] 23. 实施方式 22 的方法,其中所述表达抗原的细胞是人细胞。

- [0250] 24. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述表达抗原的细胞表达外源抗原。
- [0251] 25. 前述实施方式的任一项的方法,其中用表达载体转染所述表达抗原的细胞。
- [0252] 26. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述表达免疫结合剂的细胞是酵母或哺乳动物细胞。
- [0253] 27. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述表达免疫结合剂的细胞是 B 细胞。
- [0254] 28. 实施方式 27 的方法,其中所述 B 细胞是兔 B 细胞。
- [0255] 29. 实施方式 27 或 28 的任一项的方法,其中从经免疫的动物分离所述 B 细胞。
- [0256] 30. 实施方式 29 的方法,其中通过 DNA 接种免疫所述动物。
- [0257] 31. 前述实施方式的任一项的方法,其中所述表达免疫结合剂的细胞包含从表达载体表达的免疫结合剂。
- [0258] 32. 编码通过实施方式 1 至 31 的任一项的方法选择的免疫结合剂的分离的核酸分子。
- [0259] 33. 产生能够结合目的抗原的免疫结合剂的方法,其包括将实施方式 32 的编码免疫结合剂的核酸序列引入表达环境,以便产生所编码的免疫结合剂。
- [0260] 34. 通过实施方式 33 的方法产生的免疫结合剂。
- [0261] 35. 用于鉴定特异性结合目的细胞表面抗原的 B 细胞克隆的方法,其包括:
- [0262] (a) 用编码细胞表面抗原的 DNA 免疫动物;
- [0263] (b) 从所述免疫的动物分离 B 细胞;
- [0264] (c) 用第一可分选标记标记 B 细胞;
- [0265] (d) 提供多个可操作地连接至第二可分选标记的表达抗原的细胞,其中目的抗原展示在表达抗原的细胞的表面上;
- [0266] (e) 将表达抗原的细胞与 B 细胞接触;和,
- [0267] (f) 使用细胞分选器从多个 B 细胞分离能特异性结合表达抗原的细胞的一个或多个 B 细胞,其中所述第一和第二可分选标记在单个细胞复合物中的存在标示着 B 细胞与表达抗原的细胞结合,从而鉴定了结合目的抗原的 B 细胞克隆。

[0001]

序列表

<110> ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT
 <120> 用于鉴定细胞表面抗原的免疫结合剂的方法
 <130> 细胞-细胞相互作用
 <150> CH00832/09
 <151> 2009-06-02
 <150> US61/155,105
 <151> 2009-02-24
 <150> US61/155,041
 <151> 2009-02-24
 <150> PCT/CH2009/000222
 <151> 2009-06-25
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FW1.4的可变重链构架 (a43)
 <220>
 <221> CDR
 <222> (26)..(75)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。
 <220>
 <221> CDR
 <222> (90)..(139)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。
 <220>
 <221> CDR
 <222> (172)..(221)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

[0002]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 2
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FW1.4的可变轻链构架 (KI27)

<220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(73)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (89)..(138)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (171)..(220)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<400> 2

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

[0003]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 3

<211> 483

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FW1.4的构架

<220>

<221> CDR

<222> (24)..(73)

<223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>

<221> CDR

<222> (89)..(138)

<223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>

<221> CDR

<222> (171)..(220)

<223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

[0004]

<220>
 <221> CDR
 <222> (277)..(326)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (341)..(390)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (423)..(472)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<400> 3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

[0005]

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 385 390 395 400

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser

- <210> 4
- <211> 232
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> rFW1.4的可变重链构架

[0006]

<220>
 <221> CDR
 <222> (26)..(75)
 <223> CDR: 可以存在或不在于至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (90)..(139)
 <223> CDR: 可以存在或不在于至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (172)..(221)
 <223> CDR: 可以存在或不在于至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220

[0007]

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 5
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> rFW1.4的构架

<220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(73)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (89)..(138)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (171)..(220)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (277)..(326)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (341)..(390)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (423)..(472)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<400> 5

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

[0008]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400

[0009]

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 6
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> rFW1.4(V2)的可变重链构架

<220>
 <221> CDR
 <222> (26)..(75)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (90)..(138)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<220>
 <221> CDR
 <222> (171)..(220)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

[0010]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys
 130 135 140

Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 145 150 155 160

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
 210 215 220

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

- <210> 7
- <211> 483
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> rFWL 4 (V2)的构架

- <220>
- <221> CDR
- <222> (24).. (73)
- <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

- <220>
- <221> CDR
- <222> (89).. (138)
- <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

- <220>
- <221> CDR
- <222> (171).. (220)
- <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

- <220>
- <221> CDR
- <222> (277).. (326)
- <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

- <220>
- <221> CDR
- <222> (341).. (390)
- <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

[0011]

<220>
 <221> CDR
 <222> (423)..(472)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

<400> 7
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

[0012]

Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 接头

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 9

[0013]

<211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> FW1.4的经取代的可变轻链构架

 <220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(73)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

 <220>
 <221> CDR
 <222> (89)..(138)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

 <220>
 <221> CDR
 <222> (171)..(220)
 <223> CDR; 可以存在或不存在至少1个和至多50个的氨基酸。
 Xaa可以是任何天然存在的氨基酸。

 <400> 9
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

[0014]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 接头

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

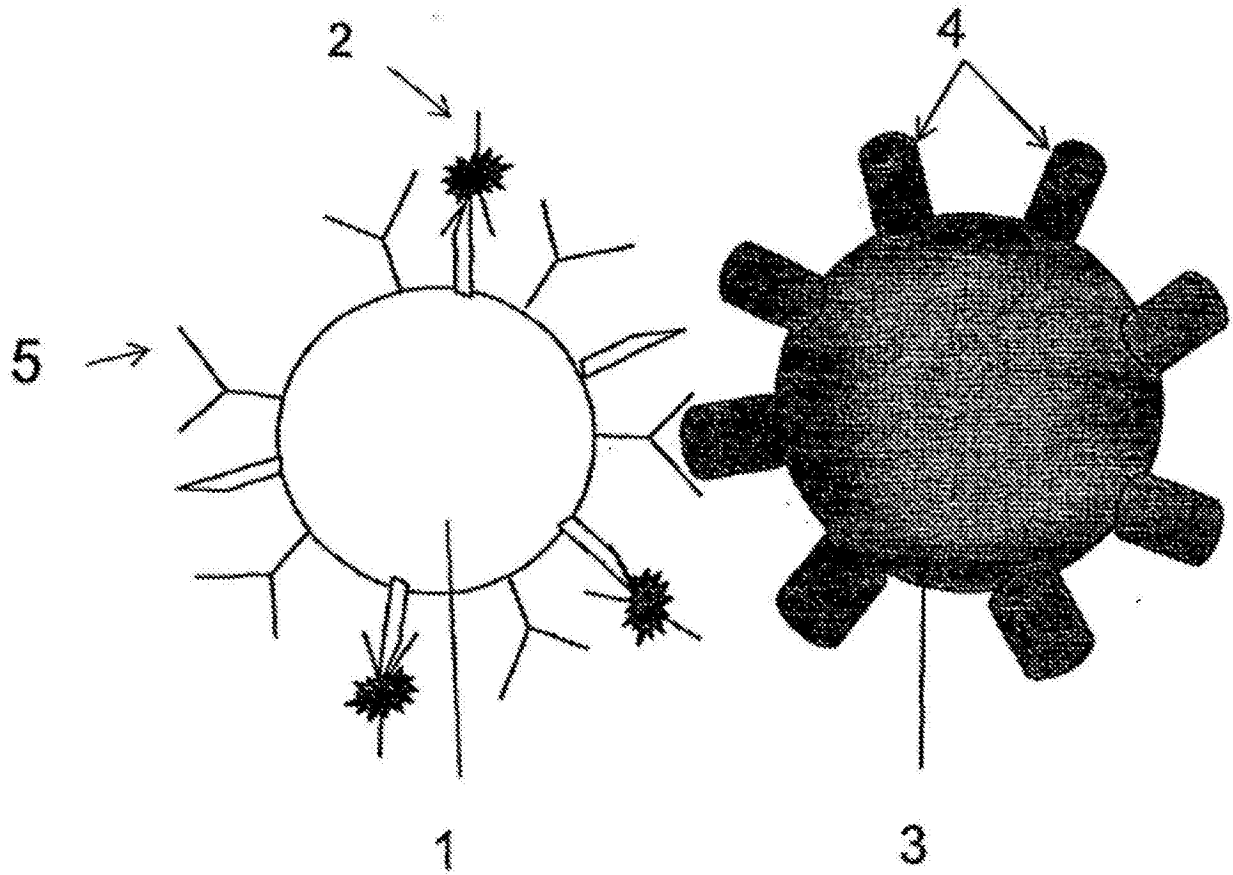


图 1

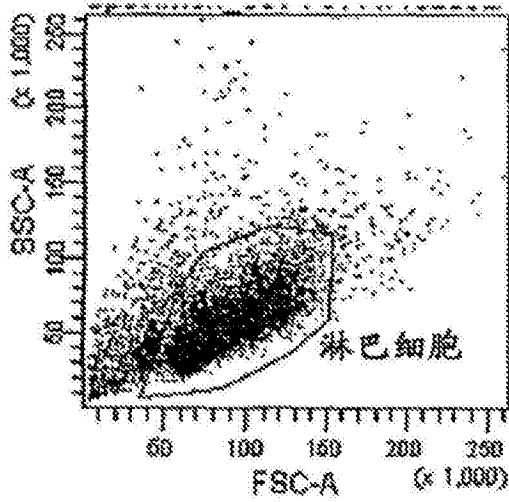


图 2A

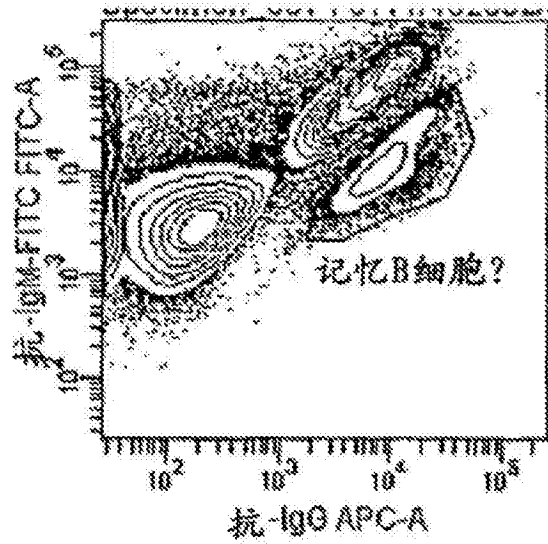


图 2B

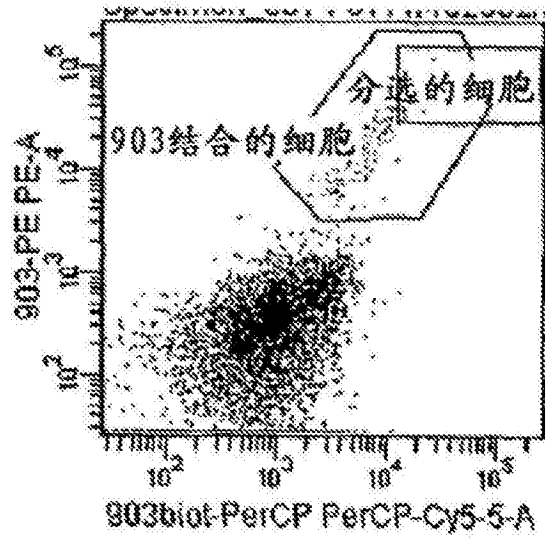


图 2C

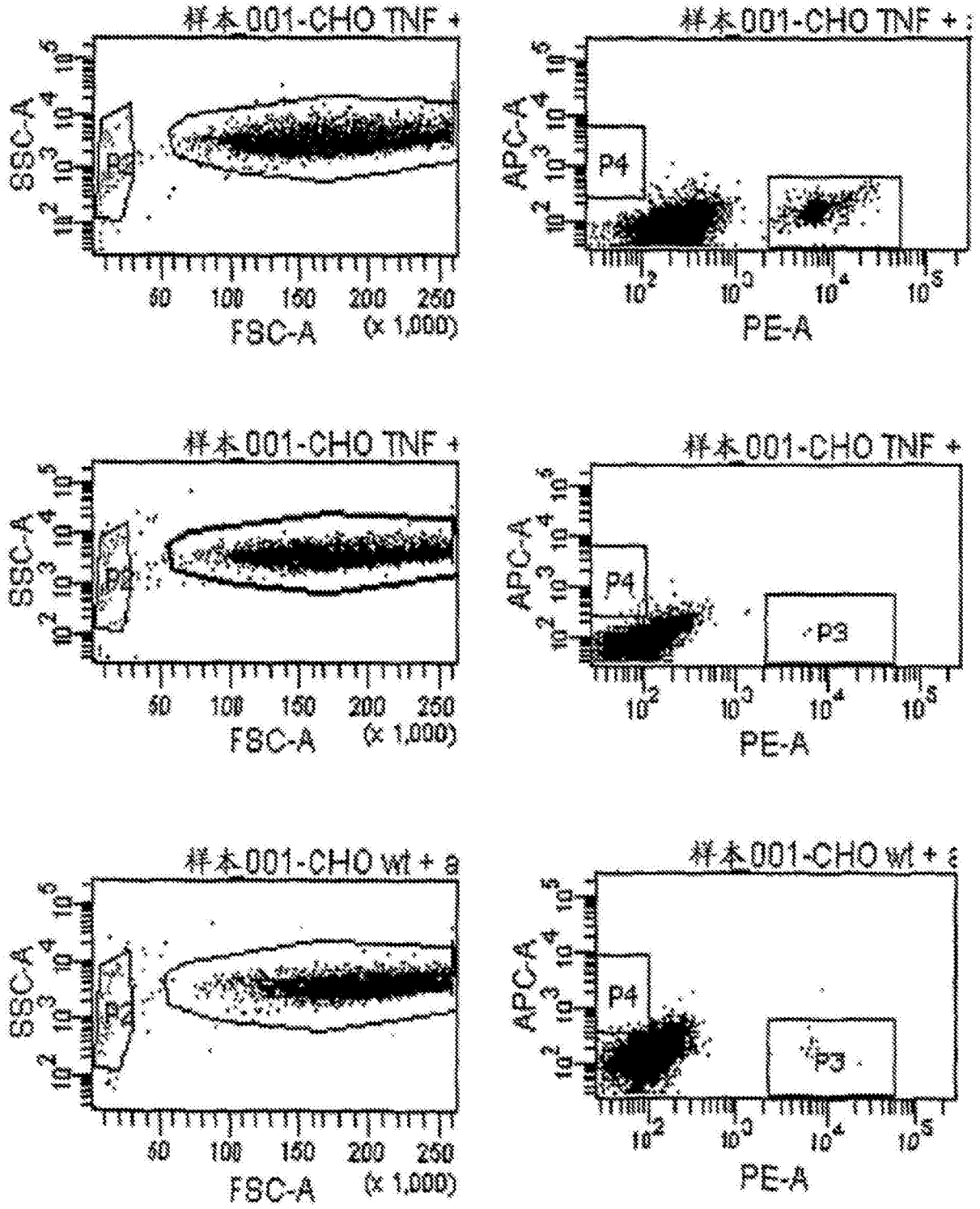


图 3

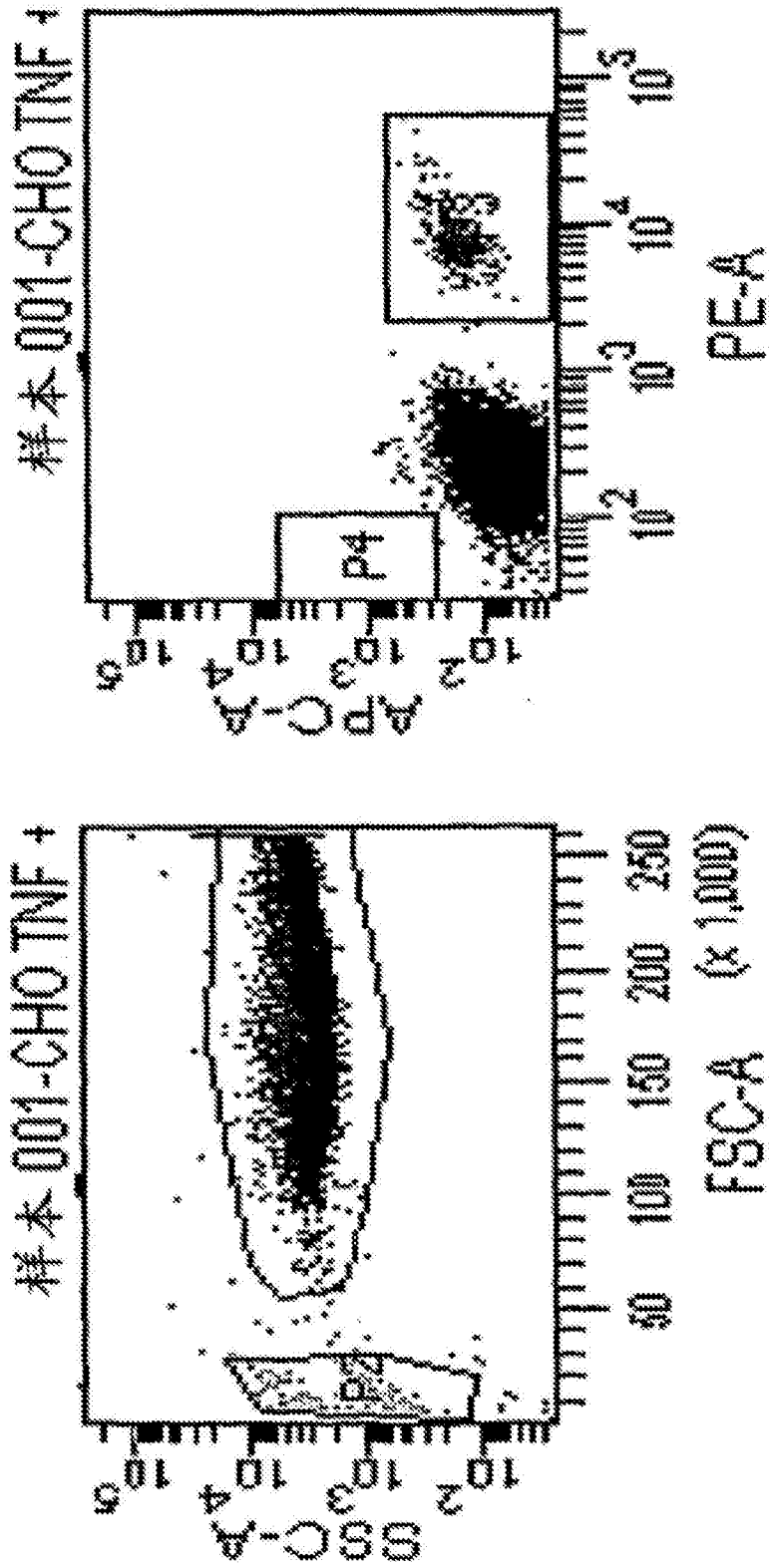


图 4

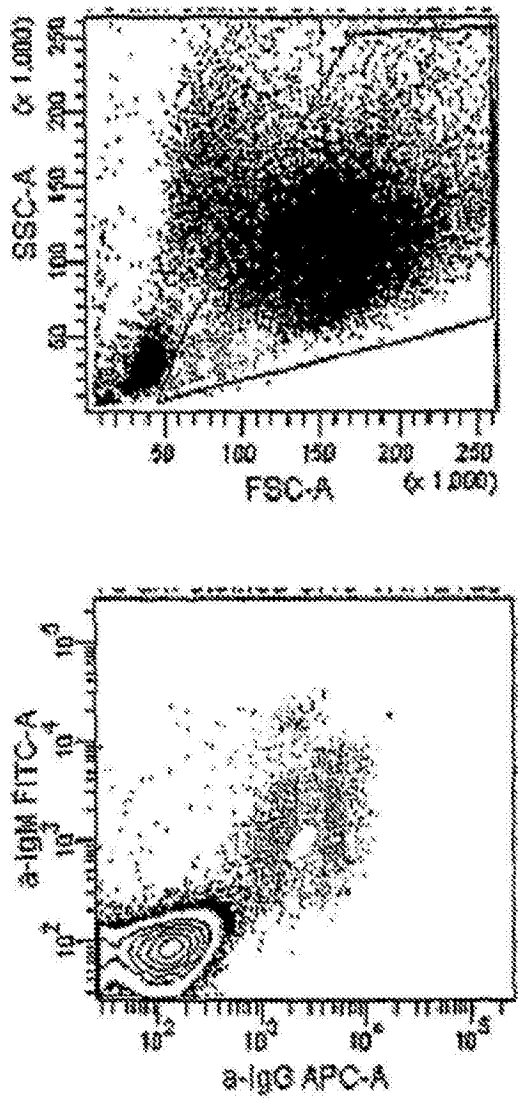


图 5a

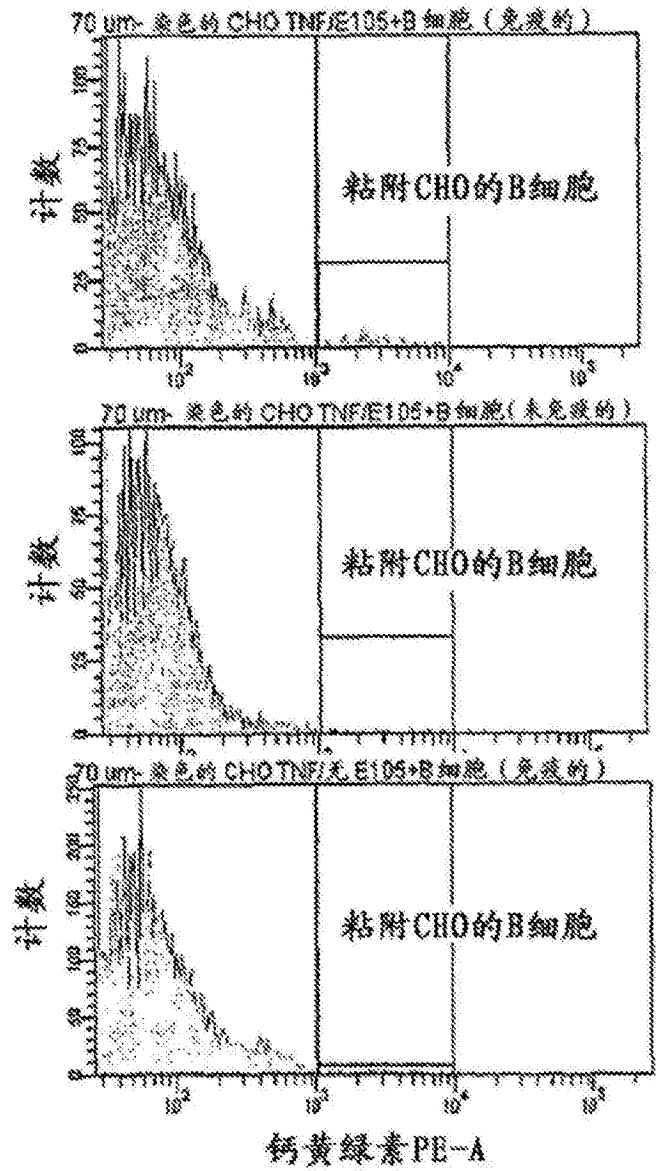


图 5b

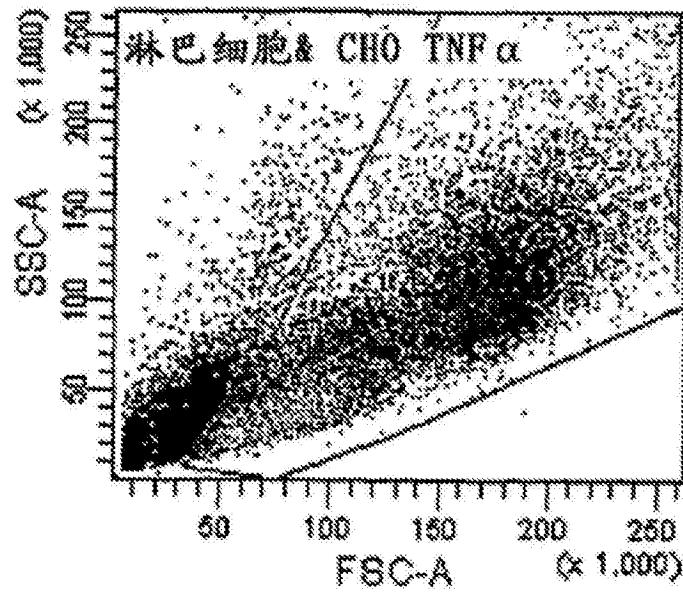


图 6a

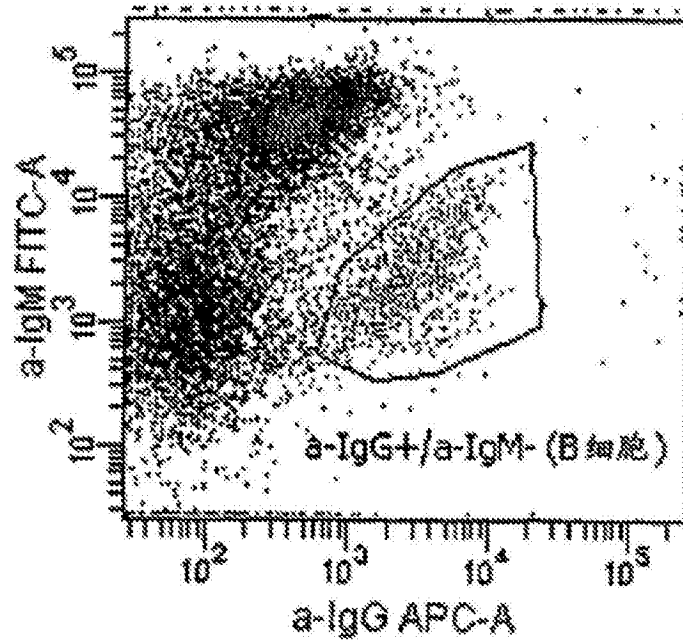


图 6b

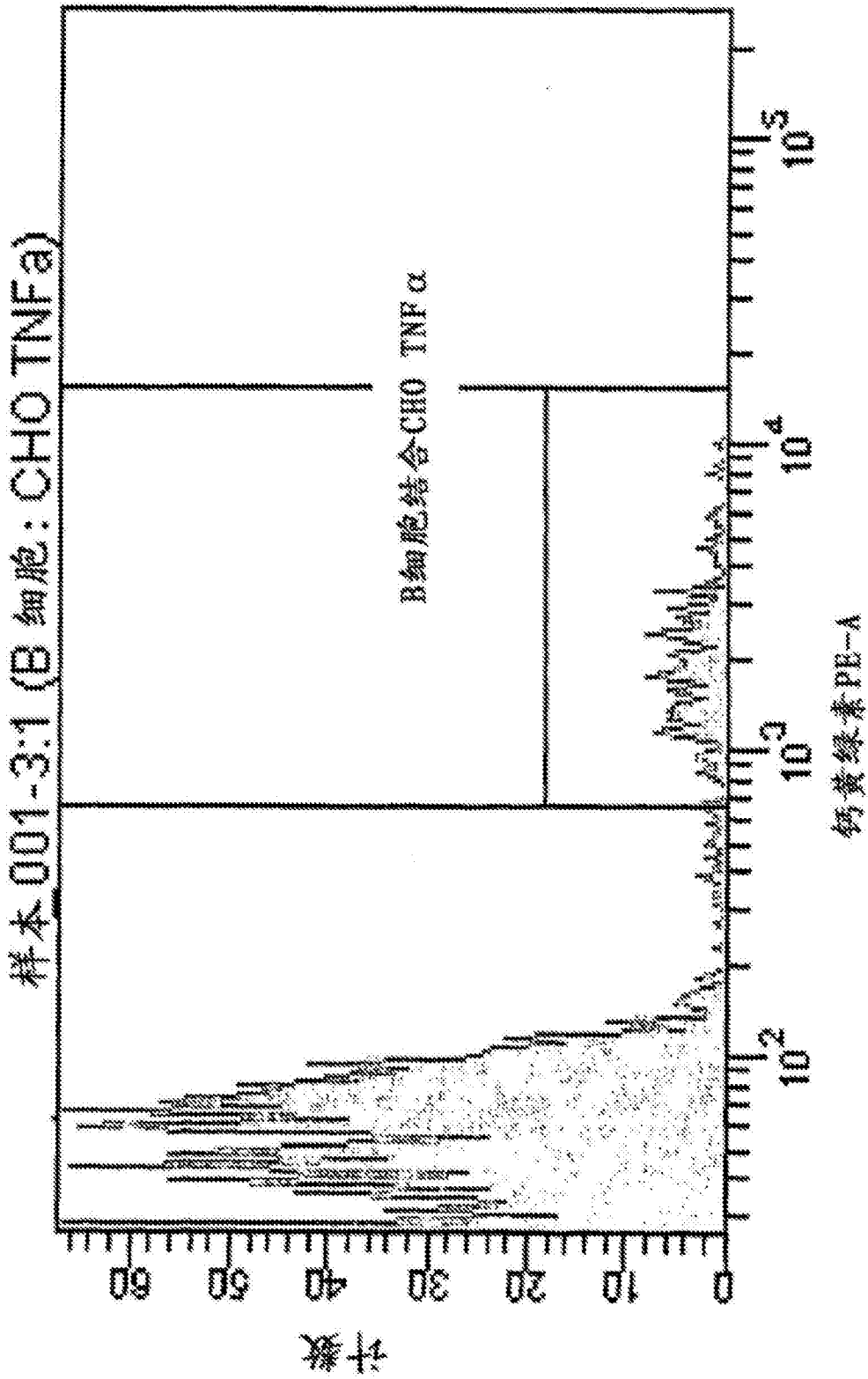


图 6c

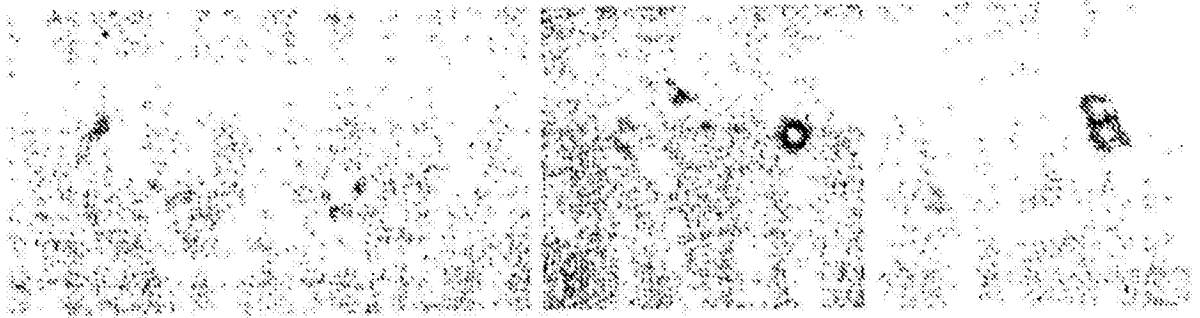


图 7

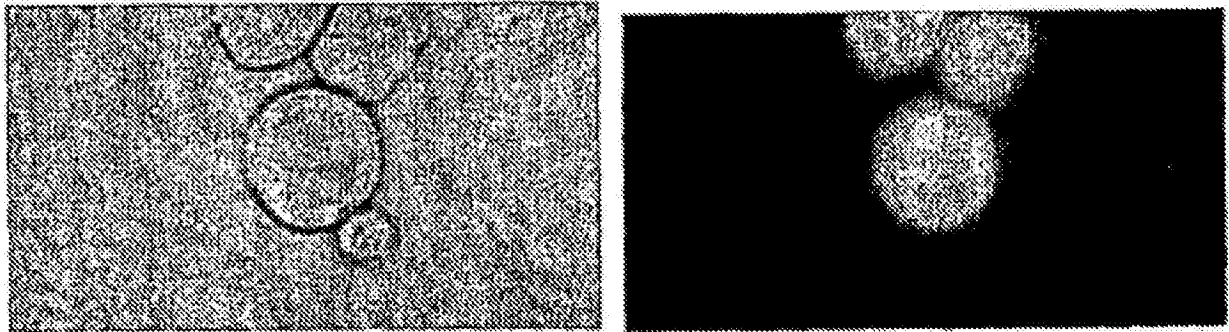


图 8a

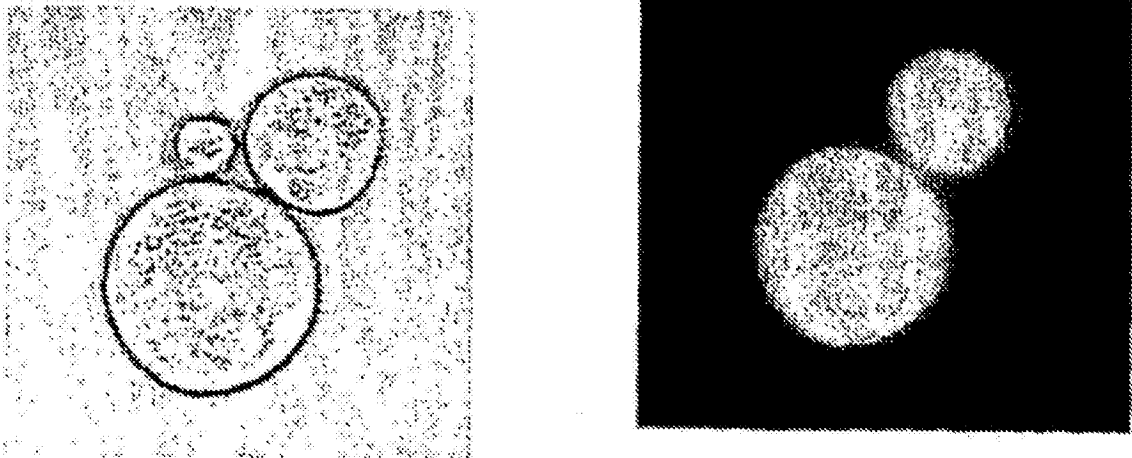


图 8b

专利名称(译)	用于鉴定细胞表面抗原的免疫结合剂的方法		
公开(公告)号	CN105116138A	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201510261116.5	申请日	2010-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	艾斯巴技术诺华有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	艾斯巴技术-诺华有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾斯巴技术-诺华有限责任公司		
[标]发明人	V胡尔曼 考提尔 D厄里什		
发明人	V·胡尔曼-考提尔 D·厄里什		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 C07K16/22 C07K16/241 C07K16/28 C07K16/2866 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/569 C07K2317/622 G01N33/5052 G01N33/537 G01N33/566		
优先权	2009000832 2009-06-02 CH PCT/CH2009/000222 2009-06-25 WO 61/155041 2009-02-24 US 61/155105 2009-02-24 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于鉴定能够特异性结合细胞表面抗原的免疫结合剂例如 scFv 抗体的方法和按照所述方法鉴定的组合物。

