



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105705947 A

(43) 申请公布日 2016.06.22

(21) 申请号 201480052177.4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.09.22

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(30) 优先权数据

61/881,203 2013.09.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.03.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/056782 2014.09.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/042528 EN 2015.03.26

(71) 申请人 X 博迪公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 陈艳 S·沙玛

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 侯宝光

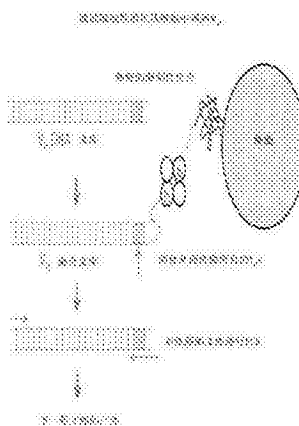
权利要求书4页 说明书14页 附图22页

(54) 发明名称

用于生成对抗细胞表面抗原的结合剂的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于识别结合多肽（例如抗体或其抗原结合片段）的方法和组合物，其中所述的结合多肽特异性地结合细胞表面抗原。本发明的方法总体而言包括将结合多肽的多样的核酸展示文库与细胞外部表面上的细胞表面抗原接触；以及由所述的文库分离至少一种文库的成员，该成员特异性地结合所述的外部表面上的细胞表面抗原。本发明还提供了用于本发明的方法中的新的核酸展示文库（例如 DNA 展示文库）。



1. 一种识别特异性结合细胞表面抗原的结合多肽的方法,该方法包括:
  - a. 将第一细胞类型与结合多肽的多样的核酸展示文库接触,其中所述的第一细胞类型在外部表面上展示细胞表面抗体;以及
  - b. 由所述的文库分离至少一种文库的成员,由此识别特异性地结合所述的细胞表面抗原的结合多肽,其中所述的文库的成员特异性地结合在所述的第一细胞类型的外部表面上的细胞表面抗原。
2. 权利要求1所述的方法,其中在步骤(a)之前,将所述的结合多肽的多样的核酸展示文库与第二细胞类型接触,其中所述的第二细胞类型未展示在所述的外部表面上展示的抗原。
3. 一种使用特异性地结合细胞表面抗原的结合多肽的方法,该方法包括:
  - a. 将第一细胞类型与结合多肽的多样的核酸展示文库接触,并由所述的文库分离至少一种特异性地结合所述的第一细胞类型的文库的成员,其中所述的第一细胞类型在所述的外部表面上展示细胞表面抗原;
  - b. 将第二细胞类型与结合多肽的多样的核酸展示文库接触,并由所述的文库分离至少一种特异性地结合所述的第二细胞类型的文库的成员,其中所述的第二细胞类型未展示在所述的外部表面上的细胞表面抗原;以及
  - c. 选择特异性地结合所述的第一细胞类型、但不结合所述的第二细胞类型的文库的成员,由此识别特异性地结合所述的细胞表面抗原的结合多肽。
4. 权利要求3所述的方法,其中步骤(a)和(b)是使用所述的文库的分离的等分物平行实施的。
5. 一种识别特异性地结合细胞表面抗原的结合多肽的方法,该方法包括:
  - a. 将第一细胞类型与结合多肽的多样的核酸展示文库结合,其中所述的第一细胞类型在所述的外部表面上展示所述的细胞表面抗原;
  - b. 将所述的第一细胞类型与表面活性剂接触,使得所述的结合多肽/抗原复合物的群体溶解;以及
  - c. 分离所述的溶解的结合多肽/抗原复合物的群体,由此识别特异性地结合所述的细胞表面抗原的结合多肽。
6. 权利要求5所述的方法,其中所述的溶解的结合多肽/抗原复合物的群体是使用对于所述的结合多肽的一部分具有特异性的结合剂来分离的。
7. 权利要求5所述的方法,其中所述的表面活性剂不破坏所述的抗原的三级结构。
8. 一种识别特异性地结合细胞表面抗原的内化结合多肽的方法,该方法包括:
  - a. 在允许所述的细胞表面抗原内化并且可以形成内化的结合多肽/抗原复合物的群体的条件下,将第一细胞类型与所述的结合多肽的多样的核酸展示文库接触,其中所述的第一细胞类型在所述的外部表面上展示所述的细胞表面抗原;以及
  - b. 洗涤所述的第一细胞类型,从而除去与所述的外部表面结合的文库的成员;以及
  - c. 分离所述的内化的结合多肽/抗原复合物,由此识别特异性地结合所述的细胞表面抗原的内化结合多肽。
9. 权利要求8所述的方法,其中在步骤(b)中,所述的洗涤是使用pH低于大约3的溶液来实施的。

10. 权利要求8所述的方法,其中在步骤(c)中,所述的内化的结合多肽/抗原复合物是通过表面活性剂的提取来分离的。

11. 权利要求8所述的方法,其中所述的内化的结合多肽/抗原复合物是使用对于所述的结合多肽或所述的抗原的一部分具有特异性的结合剂来进一步分离的。

12. 权利要求8所述的方法,其中所述的内化的结合多肽是通过编码所述的结合多肽的核酸的沉淀来进一步分离的。

13. 一种识别结合多肽的方法,其中所述的结合多肽特异性地结合抗原的不同于参照结合剂所识别的表位,所述的方法包括:

a. 在一定的条件下将所述的抗原与所述的参照结合剂接触,从而形成所述的抗原与所述的参照结合剂的复合物;

b. 将所述的抗原与所述的参照结合剂的复合物与结合多肽的多样的核酸展示文库接触,从而形成至少一种结合多肽/抗原的复合物;

c. 由所述的文库分离至少一种特异性地识别所述的抗原的文库的成员,由此识别所述的结合多肽,该结合多肽特异性地结合所述的抗原的不同于所述的参照结合剂所识别的表位。

14. 权利要求13所述的方法,其中所述的抗原为在所述的细胞的外部表面上展示的细胞表面抗原。

15. 权利要求13所述的方法,其中所述的参照结合剂为抗体。

16. 一种识别特异性地结合所需的激活状态的细胞表面抗原的结合多肽的方法,该方法包括:

a. 将第一细胞类型与以下物质接触,其中所述的第一细胞类型在所述的外部表面上展示所述的细胞表面抗原:

i. 结合剂,其特异性地结合所述的细胞表面抗原并调控所述的细胞表面抗原的激活状态;和

ii. 所述的结合多肽的多样的核酸展示文库;以及

b. 由所述的文库分离至少一种文库的成员,该成员特异性地结合在所述的第一细胞类型的外部表面上的细胞表面抗原,由此识别特异性地结合所述的所需的激活状态的细胞表面抗原的结合多肽。

17. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的多样的核酸展示文库为V结构域文库,该文库的各个成员均包含由第一抗体得到的FR1-FR3区的序列和由第二抗原得到的CDR3-FR4区的序列。

18. 权利要求17所述的方法,其中所述的FR1-FR3区的序列得自人类的天然免疫谱型。

19. 权利要求17所述的方法,其中所述的CDR3-FR4区的序列得自人类的天然免疫谱型。

20. 权利要求17所述的方法,其中所述的V结构域为VH结构域。

21. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的多样的核酸展示文库为DNA展示文库。

22. 权利要求21所述的方法,其中所述的DNA展示文库的各个成员均包含通过插入的DNA连接体与编码所述的结合多肽的DNA编码序列连接的结合多肽,其中所述的DNA连接体包含限制性核酸内切酶位点。

23. 权利要求22所述的方法,其中所述的限制性内切酶位点不存在于所述的DNA展示文库的成员的编码序列中。

24. 权利要求22或23所述的方法,其中所述的方法进一步包括以物理方式分开所述的分离的文库成员的DNA编码序列和连接的结合多肽。

25. 权利要求24所述的方法,其中所述的分离的文库的成员的DNA编码序列与连接的结合多肽是通过限制性酶消化来分离的。

26. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的方法进一步包括将所述的完整的分离的文库成员与所述的第一或第二细胞类型分开。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述的分离的文库的成员是通过使用所述的抗原的配体进行洗脱而与所述的第一或第二细胞类型分离的。

28. 权利要求26所述的方法,其中所述的分离的文库的成员是通过所述的细胞表面抗原的酶切而与所述的第一或第二细胞类型分离的。

29. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的细胞表面抗原是通过糖脂锚状物而附着在所述的细胞表面上,并且所述的分离的文库的成员是通过糖脂锚状物的磷脂酶切割而与所述的第一或第二细胞类型分离的。

30. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的方法进一步包括测定所述的分离的文库成员的至少一部分的DNA编码序列。

31. 权利要求30所述的方法,其中所述的DNA编码序列是通过焦磷酸测序来测定的。

32. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原是天然形成的蛋白质、多糖或脂质。

33. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原为细胞表面蛋白质。

34. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原为GPCR或离子通道蛋白质。

35. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原为GCGR, CXCR4或Nav1.7蛋白质。

36. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原为糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白质。

37. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原为重组抗原。

38. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原为嵌合抗原。

39. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的第一细胞类型为天然表达所述的细胞表面抗原的细胞。

40. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的第一细胞类型为经改造而异源表达所述的细胞表面抗原的重组细胞。

41. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的第一细胞类型为正常细胞的疾病相关的变体。

42. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的第一细胞类型为肿瘤细胞。

43. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的结合多肽为抗体或其片段。

44. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的结合多肽为抗体VH或VL结构域。

45. 一种嵌合V结构域的多样的核酸展示文库,其中所述的文库的各个成员均包含由第一抗原得到的FR1-FR3区的序列和由第二抗原得到的CDR3-FR4区的序列。

46. 权利要求45的任意一项所述的文库,其中所述的FR1-FR3区的序列得自天然人类的免疫谱型。

47. 权利要求45的任意一项所述的文库,其中所述的CDR3-FR4区的序列得自天然人类的免疫谱型。

48. 权利要求45的任意一项所述的文库,其中所述的V结构域为VH结构域。

49. 上述权利要求的任意一项所述的方法或文库,其中所述的文库是使用至少一种寡核苷酸而形成的,其中所述的寡核苷酸具有选自以下的序列:SEQ ID No:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17和18。

50. 一种寡核苷酸,其具有选自以下的序列:SEQ ID No:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17和18。

## 用于生成对抗细胞表面抗原的结合剂的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2013年9月23日提交的美国临时申请No. 61/881, 203的优先权, 该申请的内容以引用方式全部并入本文。

### 背景技术

[0003] 结合多肽(例如抗体及其片段)作为治疗剂和诊断剂在商业上是重要的。用于结合多肽的传统的筛选方法通常使用可溶性的抗原。然而, 对于某些细胞表面抗原而言, 当该抗原由原生质膜上溶解时, 在这些抗原上的构象表位改变, 从而导致不能生成可以识别天然抗原的结合多肽。因此, 本领域需要用于结合多肽的新的筛选方法, 其中所述的结合多肽在它们的天然构象下可以特异性地结合细胞表面抗原。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明提供了用于识别特异性结合细胞表面多肽的结合多肽(例如抗体或其抗原结合片段)的方法和组合物。本发明的方法总体而言包括将结合多肽的多样的核酸展示文库与细胞外部表面上展示的细胞表面抗原接触; 以及由所述的文库分离至少一种文库的成员, 该成员与细胞外部表面上的细胞表面抗原特异性地结合。本发明的方法和组合物是特别有利的, 原因在于它们允许快速地识别与天然形式的靶细胞表面抗原结合的结合多肽, 以及具有新的表位特异性和功能性质(例如内化、激动、拮抗或变构调控性质)的结合多肽。这些方法和组合物还允许识别新的治疗用途的细胞类型特异性抗原或表位。本发明还提供了新的V-结构域(例如VH和/或VL结构域)核酸展示文库(例如DNA展示文库), 其可以用于筛选新的结合多肽。

[0006] 附图简述

[0007] 图1为示例性DNA展示组合物和筛选方法的示意图。

[0008] 图2为示例性DNA展示组合物和筛选方法的示意图。

[0009] 图3为在本发明的方法中使用的示例性靶细胞筛选策略的示意图。

[0010] 图4为在本发明的方法中使用的示例性平行选择和深度测序策略的示意图。

[0011] 图5为在本发明的方法中使用的示例性平行选择和深度测序策略的示意图。

[0012] 图6为在本发明的方法中使用的示例性平行选择和深度测序策略的示意图。

[0013] 图7为在本发明的方法中使用的示例性平行选择策略和深度测序分析的结果的示意图。

[0014] 图8描绘了显示使用本发明的方法选择的高亲和性VH分子的FACS基结合测试结果的示意图。

[0015] 图9描绘了显示使用本发明的方法选择的VH分子的差异结合的图。

[0016] 图10描述了显示使用本发明的方法选择的VH分子的差异结合的图。

[0017] 图11为在本发明的方法中使用的示例性平行筛选和深度测序策略的示意图, 其中具有平行功能选择压力的多轮活细胞选择用于富集与特异性细胞表面蛋白质结合并调控该蛋白质的抗体。所选的集合经bar-标记并进行深度测序。由平行选择得到的富集序列的

比较生物信息学分析允许识别具有与前导标准(Lead criteria)匹配的选择和活性。

[0018] 图12描绘了使用本文公开的方法来识别抗-胰高血糖素受体(GCGR)VH结构域的示例性平行筛选策略的结果。由活细胞GCGR(B类GPCR)选择得到的富集的集合经过结合和功能测试,包括(逆时针)竞争性结合、cAMP、无标记粘附、细胞内化和b-抑制蛋白测试。分离出一组多样的调控活性的抗-GCGR VH结构域,其通过多种不同的作用机制而展现出不同的功能活性。

[0019] 图13描绘了使用本文公开的方法选择的抗-GCGR VH结构域的cAMP和b-抑制蛋白测试的结果。在所示的VH结构域存在或缺乏下,使用10nM胰高血糖素挑战表达GCGR的HEK293细胞。克隆子B07和B05抑制GCGR诱导的b-抑制蛋白活性,但是对受体激活的cAMP的产生具有很小的作用。

[0020] 图14描绘了使用本文公开的方法选择的抗-GCGR VH结构域的cAMP和葡萄糖释放测试的结果。在所示的GCGR VH结构域缺乏或存在下,使用2nM胰高血糖素刺激原代人类肝细胞。胰高血糖素激活的cAMP的产生和葡萄糖的释放都受到VH结构域的抑制,表明这些克隆子对抗内源受体和在生物相关检测中的功能活性。

[0021] 图15为示例性平行活细胞选择的示意图,其识别具有多种多样性和功能特征的抗-GCGR VH结构域。

[0022] 图16描绘了使用本文公开的方法选择的抗-CXCR4VH结构域的结合、cAMP和趋化作用测试的结果。针对CXCR4(A类趋化因子GPCR)的活细胞功能选择产生一组多样的VH结构域,其证明了与表达CXCR4的细胞的特异性结合、SDF-1 $\alpha$ -介导的cAMP信号传递的抑制、以及在内源表达CXCR4的Jurkat细胞中对配体诱导的趋化作用的抑制。

[0023] 图17描绘了使用藜芦碱和蝎子毒刺激的表达Nav1.7的HEK293细胞的BIND无标记细胞应答测试的结果。BIND允许通过检测由光学生物传感器的表面反射的光的峰值波长值(PWV)的变化来进行实时无标记细胞应答测量。使用藜芦碱(V)+蝎子毒(SVqq)刺激重组Nav1.7/HEK293细胞以激活通道。BIND测量对通道开放的延迟的激发应答,其中所述的通道开放会在刺激后的1小时后激发PWV的降低。河豚毒素(TTX)抑制Nav1.7通道,并将阴性PWV转变为在亲代HEK293细胞中观察到的应答。

[0024] 图18为识别与人类疾病细胞特异性结合的VH结构域的示例性平行筛选的示意图。使用活细胞选择来识别在不同的细胞群体(包括基本患者与正常人类的细胞)上特异性表达的靶物或表位。使用细胞类型特异性选择策略并使用深度测序来识别具有预测的结合特异性概况的富集的VH结构域。分离高亲和性(pM)结合剂,其证明了疾病细胞特异性的结合概况,可通过FACS测量。

[0025] 参考实施方案的描述

[0026] 本发明提供了用于识别结合多肽(例如抗体或其抗原结合片段)的方法和组合物,其中所述的结合多肽与细胞表面抗原特异性地结合。本发明的方法总体而言包括将结合多肽的多样的核酸展示文库与细胞外部表面上展示的细胞表面抗原接触;以及由所述的文库分离至少一种文库的成员,该成员与细胞外部表面上的细胞表面抗原特异性地结合。本发明的方法和组合物是特别有利的,原因在于它们允许快速地识别与天然形式的靶细胞表面抗原结合的结合多肽,以及具有新的表位特异性和功能性质(例如内化、激动、拮抗或变构调控性质)的结合多肽。这些方法和组合物还允许识别新的治疗用途的细胞类型特异性抗

原或表位。本发明还提供了新的V-结构域(例如VH和/或VL结构域)核酸展示文库(例如DNA展示文库),其可以用于筛选新的结合多肽。

#### [0027] I. 定义

[0028] 如本文所用,术语“核酸展示文库”是指本领域公认的任何体外无细胞表现型-基因型的相关展示,包括但不限于在例如美国专利No.7,195,880;6,951,725;7,078,197;7,022,479;6,518,018;7,125,669;6,846,655;6,281,344;6,207,446;6,214,553;6,258,558;6,261,804;6,429,300;6,489,116;6,436,665;6,537,749;6,602,685;6,623,926;6,416,950;6,660,473;6,312,927;5,922,545;6,348,315,W02012125733和W02010/011944中列出的那些,这些文献的全部内容均以引用方式并入本文。

[0029] 如本文所用,术语“抗原”是指结合多肽所识别的分子。

[0030] 如本文所用,术语“特异性结合”是指结合分子(例如VH或VL结构域)以至少大约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-12} \text{M}$ ,或更高的亲和性与抗原结合、和/或以针对非特异性抗原的亲和性至少2倍以上的亲和性与靶物结合的能力。

[0031] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子或其多聚体(例如IgM),其中所述的免疫球蛋白分子包含4条多肽链,其中2条重链(H)和2条轻链(L)通过二硫键相互连接。每条重链包含重链可变区(简称为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含3个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(简称为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含1个结构域(CL1)。VH和VL区可以进一步细分成超变区,称为互补性决定区(CDR),其散布于更保守的称为构架区(FR)的区域中。

[0032] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”包括特异性地结合抗原从而形成复合物的任何天然形成的,可酶法获得的、合成的或基因改造的多肽或糖蛋白。可以使用任何合适的标准的技术,例如由完整的抗体分子来衍生抗体的抗原结合片段,其中所述的技术例如有蛋白水解消化或涉及编码抗体可变区和可任选的恒定区的DNA的操纵和表达的重组合基因改造技术。抗原结合部分的非限定性实例包括:(i)Fab片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;以及(vii)最小识别单元,其由模拟抗体的超变区的氨基酸残基组成(例如分离的互补性决定区(CDR))。其他改造分子(例如双特异性抗、三特异性抗、四特异性抗和微抗体)也涵盖在表达“抗原结合部分”范围内。

[0033] 如本文所用,术语“V结构域”是指包含VH结构域或VL结构域的单多肽,其缺乏促进所述的VH结构域或VL结构域分别与互补VL结构域或VH结构域共价配对的恒定区序列。

[0034] 如本文所用,术语“VH结构域”和“VL结构域”分别指单一抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域,其包含FR(构架区)1、2、3和4,以及CDR(互补性决定区)1、2和3(参见see Kabat et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest.(NIH Publication No.91-3242,Bethesda)。

[0035] 如本文所用,术语“FR1-FR3”是指包含FR1,CDR1,FR2,CDR2和FR3但排除CDR3和FR4区的VH区。

[0036] 如本文所用,术语“CDR3-FR4”是指包含CDR3和FR4但排除FR1,CDR1,FR2,CDR2和FR3区的VH区。

[0037] 关于抗体的可变区,如本文所述,术语“嵌合的”是指包含由2个或多个不同的抗体可变结构域得到的氨基酸序列的抗体可变结构域,例如具有由参照抗体得到的CDR3序列和

由一个或多个不同的抗体得到的FR1-FR3序列的可变结构域。

### [0038] II. 细胞表面抗原

[0039] 在某些方面中,本发明提供了识别特异性地结合细胞表面抗原的结合多肽的方法。

[0040] 能够在细胞表面上展示的任何抗原可以用于本发明的方法中,包括但不限于蛋白质、多糖和/或脂质抗原。在某些实施方案中,抗原为天然形成的分子。适当地,天然形成的抗原的非限定性实例包括跨膜蛋白质(例如G-蛋白偶联受体)和GPI锚定蛋白质。在某些实施方案中,抗原为非天然形成的重组或合成的抗原。适当地,天然形成的抗原的非限定性实例包括但不包括包含由不同的抗原分子得到的部分的嵌合抗原。在某些实施方案中,在实施本发明的方法之前,抗原的特性是已知的。在某些实施方案中,在实施本发明的方法之前,抗原的特性是未知的。

[0041] 在某些实施方案中,抗原为跨膜蛋白质。在某些实施方案中,抗原为多次跨越的跨膜蛋白质(例如G蛋白偶联受体(GPCR)和离子通道)。靶蛋白的非限定性实例包括但不限于胰高血糖素受体(GCGR),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,鞘氨醇-1-磷酸受体receptor(S1P1R)和NMDA通道。在某些实施方案中,抗原为人类抗原。在某些实施方案中,抗原为GCGR,CXCR4或NAV1.7(例如人类GCGR,CXCR4或NAV1.7)。

[0042] 在本发明的方法中使用的细胞表面抗原可以在任何细胞或细胞样颗粒(例如脂质囊泡)上展示。在某些实施方案中,细胞为天然表达细胞表面抗原的细胞类型。在某些实施方案中,细胞为经改造从而异源表达细胞表面抗原的重组细胞。在某些实施方案中,细胞为正常细胞的疾病相关的变体(例如肿瘤细胞)。

### [0043] III. 结合多肽

[0044] 在某些方面中,本发明提供了识别特异性结合细胞表面抗原的结合多肽的方法。

[0045] 任何类型的结合多肽都可以用于本发明的方法中,包括但不限于抗体或其片段,以及免疫球蛋白样结构域。合适的免疫球蛋白样结构域包括但不限于纤连蛋白结构域(例如参见Koide et al.(2007),Methods Mol.Biol.352:95-109,其以引用方式全文并入本文),DARPin(例如参见Stumpp et al.(2008)Drug Discov.Today 13(15-16):695-701,其以引用方式全文并入本文),蛋白质A的Z结构域(参见Nygren et al.(2008)FEBS J.275(11):2668-76,其以引用方式全文并入本文),载脂蛋白(例如参见Skerra et al.(2008)FEBS J.275(11):2677-83,其以引用方式全文并入本文),Affilins(例如参见Ebersbach et al.(2007)J.Mol.Biol.372(1):172-85,其以引用方式全文并入本文),Affitins(例如参见Krehenbrink et al.(2008).J.Mol.Biol.383(5):1058-68,其以引用方式全文并入本文),Avimers(例如参见Silverman et al.(2005)Nat.Biotechnol.23(12):1556-61,其以引用方式全文并入本文),Fynomers,(例如参见Grabulovski et al.(2007)J BioI Chem 282(5):3196-3204,其以引用方式全文并入本文),和Kunitz结构域的肽(例如参见Nixon et al.(2006)Curr Opin.Drug Discov Devel 9(2):261-8,其以引用方式全文并入本文)。

[0046] 在某些实施方案中,结合多肽为抗体VH或VL结构域。

#### [0047] IV. 核酸展示文库

[0048] 在某些方面中,本发明的方法使用了核酸展示文库。在一个方面中,本发明提供了嵌合V结构域(例如VH或VL结构域)的多样的核酸展示文库,该文库的每个成员均包含由第一抗体得到的FR1-FR3区的序列以及由第二抗体得到的CDR3-FR4区的序列。示例性的文库在本文中公开,例如在实施例2中。本文公开的文库适用于任何本文公开的方法中。

[0049] 本发明的文库可以包含由任何来源或物种得到的VH或VL结构域序列。在某些实施方案中,FR1-FR3区的序列得自自然人类的免疫谱系(immunological repertoire)。在某些实施方案中,CDR3-FR4序列得自自然人类的免疫谱系。在某些实施方案中,V结构域为VH结构域(例如人类VH结构域)。

[0050] 在某些实施方案中,针对与抗原的结合来预选所述的文库,使得该文库的各个成员均与相同的抗原结合。在某些实施方案中,文库的各个成员均与GCCR,CXCR4或NAV1.7(例如人类GCCR,CXCR4或NAV1.7)结合。

[0051] 在某些实施方案中,文库包含至少 $10^2$ (例如 $10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}$ 或 $10^{15}$ )个独特的V结构域(例如VH结构域)。

[0052] 可以使用任何本领域公认的方法来制作本发明的文库。在某些实施方案中,使用至少一个核苷酸生成文库(例如通过PCR),其中所述的核苷酸具有选自SEQ ID No:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17和18的序列。

[0053] 在一个方面中,本发明提供了一个或多个核苷酸(例如DNA核苷酸),其具有选自SEQ ID No:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17和18的序列。

#### [0054] V. 细胞表面展示方法

[0055] 在某些方面中,本发明提供了识别特异性地结合细胞表面抗原的结合多肽的方法。该方法总体而言包括:(a)将结合多肽的多样的核酸展示文库与第一细胞类型的外部表面上展示的细胞表面抗原接触;以及(b)由所述的文库分离至少一种文库的成员,该成员与第一细胞类型的外部表面上的细胞表面抗原特异性地结合。在某些实施方案中,在步骤(a)之前,将结合多肽的多样的核酸展示文库与未展示所述的抗原(其在所述的外部表面上展示)的第二细胞类型接触,从而对不能特异性地结合抗原的结合多肽的文库进行预清理。

[0056] 在某些方面中,本发明提供了识别特异性地结合细胞表面抗原的结合多肽的方法。该方法总体而言包括:(a)将结合多肽的多样的核酸展示文库与表达细胞表面抗原的第一细胞类型接触;并由所述的文库分离特异性地结合第一细胞类型的至少一个文库的成员;(b)将结合多肽的多样的核酸展示文库与不表达细胞表面抗原的第二细胞类型接触;并由所述的文库分离特异性地结合第二细胞类型的至少一个文库的成员;以及(c)选择特异性地结合第一细胞类型但不结合第二细胞类型的文库的成员。在某些实施方案中,使用文库的分离的等分物以平行方式实施步骤(a)和(b),从而识别对第一细胞类型或第二细胞类型具有选择性的结合剂,其可以通过结合2种细胞类型的VH序列的频率的深度测序分析来预测。

[0057] 第一和第二细胞类型可以是相同或不同物种的密切或远端相关的细胞类型。在某些实施方案中,第二细胞类型与第二细胞类型密切相关。例如第二细胞类型可以由相同物种和细胞系得到的、但是由不同于第一细胞类型的成熟期得到的细胞类型。备选地,第二细胞类型可以与第一细胞类型是同基因型的,仅在靶抗原的表达中不同。在某些实施方案

中,第二细胞类型与第一细胞类型是同基因型的,但是表达在第一细胞类型中表达的靶抗原的同源物(例如由不同物种得到的等价抗原)。使用这种密切相关的细胞类型作为逆选择允许选择结合所需的靶物但不会与相关的抗原同源物产生任何交叉反应性的结合多肽(例如V结构域)。备选地,在共选择测试中使用密切相关的细胞类型允许选择结合所需的靶物并且还与相关的抗原同源物发生交叉反应的结合多肽(例如V结构域)。该共选择方法用于生成结合人类靶抗原以及小鼠或猿的同源物的结合多肽(例如V结构域),从而避免产生用于动物研究的替代结合多肽(例如V结构域)的需要。

[0058] 适用于本发明的方法的核酸展示文库为例如在美国专利No.7,195,880;6,951,725;7,078,197;7,022,479;6,518,018;7,125,669;6,846,655;6,281,344;6,207,446;6,214,553;6,258,558;6,261,804;6,429,300;6,489,116;6,436,665;6,537,749;6,602,685;6,623,926;6,416,950;6,660,473;6,312,927;5,922,545;6,348,315;W02012125733和W02010/0119中列出的那些,这些文献以引用方式全文并入本文。在某些实施方案中,多样的核酸展示文库为DNA展示文库。在某些实施方案中,核酸展示文库为在本文中所述的、或者在W02012125733和/或W02010/011944中所述的DNA展示文库,这些文献以引用方式全文并入本文。

[0059] 在某些实施方案中,DNA展示文库的每个成员均包含通过内含子DNA连接体与编码结合多肽的DNA编码序列连接的结合多肽,其中所述的DNA连接体包含限制性内切酶位点(例如参见图1)。可以使用任何限制性内切酶位点。在一个具体的实施方案中,在DNA展示文库的成员的DNA编码序列中不存在限制性内切酶位点,因此在限制性内切酶消化文库成员时,避免DNA编码序列断裂。在一个具体的实施方案中,限制性内切酶位点为NotI位点。

[0060] 在某些实施方案中,理想的是以物理方式将分离的文库成员的DNA编码序列与连接的结合多肽分开。可以使用任何物理分离方法。在分离的文库成员包含含有限制性内切酶位点的DNA连接体时(例如参见图1),可以通过分离的文库成员的限制性内切酶消化来实现物理分离。所得的释放的DNA编码序列可以进一步通过任何本领域公认的方法(例如离心)与细胞/结合多肽复合物分离。

[0061] 在某些实施方案中,理想的是以物理方式将完整的分离的文库成员与第一和/或第二细胞类型分开。可以使用任何物理分离方法。在某些实施方案中,通过使用靶抗原的配体(例如天然配体)进行洗脱将分离的文库成员与第一或第二细胞类型分离。在某些实施方案中,分离的文库成员通过细胞表面抗原的酶切而与第一或第二细胞类型分开。可以使用抗原酶切的任何方法,例如蛋白酶、脂肪酶和/或糖苷酶的酶切。在某些实施方案中,在细胞表面抗原通过糖脂锚状物而附着在细胞表面上的情况下,通过糖脂锚的磷脂酶酶切将分离的文库成员与第一或第二细胞类型分开。所得的释放的文库成员可以进一步通过任何本领域公认的方法(例如离心)与第一或第二细胞类型分离。

[0062] 一旦分离特异性结合第一和/或第二细胞类型的文库成员,则可以测定这些分子的DNA编码序列。因此,在某些实施方案中,本发明的方法进一步包括测定分离的文库成员的至少一部分的DNA编码序列的步骤。可以使用用于DNA序列测定的任何本领域公认的手段。在一个具体的实施方案中,通过单一分子的深度测序技术(例如焦磷酸测序)来测定DNA编码序列。单一分子的深度测序技术是本领域公知的(例如参见US6,210,891中所述的那些,该文献以引用方式全文并入本文)。在某些实施方案中,在结合多肽为抗体或其抗原结

合片段的情况下,测定CDR3区的DNA编码序列。在某些实施方案中,测定结合第一和第二细胞类型的文库成员的DNA编码序列。认为特异性地结合第一细胞类型、但不结合第二细胞类型的文库成员包含特异性地结合抗原(第一细胞类型特异性)的结合多肽。

[0063] 一旦识别特异性结合细胞表面抗原的结合多肽,其便可以在体外(例如在细胞或无细胞表达系统中)或体内(例如在转基因动物中)进行异源表达。因此,在某些实施方案中,本发明的方法进一步包括在体外(例如在细胞或无细胞表达系统中)或体内(例如在转基因动物中)异源表达所识别的结合多肽的步骤。

[0064] 在某些实施方案中,在实施本发明的方法之前,抗原的特性是已知的。但是,没有必须知道抗原的特性。事实上,在某些实施方案中,在实施本发明的方法之前,抗原的特性是未知的。因此,在这后一种的情况下,本发明的方法允许识别在所关注的细胞类型(例如肿瘤细胞)的表面上存在的新的抗原和表位。

[0065] 在某些实施方案中,本文公开的方法包括选择在结合细胞表面抗原时能够功能内化的结合多肽。由于此类结合多肽允许将细胞毒性药品传递至靶细胞的内部,所以它们特别用于药品缀合物的制造中。可以使用用于筛选功能内化的任何方法学。例如在允许结合多肽内化的条件(例如在37°C下大约1-2小时)下,可以将结合多肽的多样的核酸展示文库与靶细胞接触。然后,可以洗涤细胞,并在蛋白酶抑制剂存在下使用细胞裂解缓冲液裂解细胞。接着,内化的文库成员可以被乙醇沉淀,并通过PCR扩增富集DNA编码序列。

[0066] 本文公开的方法可以用于任何靶表位的发现过程。例如靶表位可以包含:用于炎症的归巢(homing)结构域;由对治疗具有或不具有抗性的原代肿瘤、肿瘤细胞系和容纳任何突变(可以得到新表位)的肿瘤得到的肿瘤特异性靶表位;以及介导疾病特异性功能紊乱并且为生物治疗靶向的其他疾病特异性表位。

#### [0067] VI. 抗原溶解

[0068] 在某些方面中,本发明的方法涉及使用可以保持抗原的天然构造并允许回收结合多肽(例如VH或VL结构域)和抗原的复合物的表面活性剂使由细胞得到的抗原(例如细胞表面抗原,例如GPCR)溶解。这些方法特别用于选择天然构造的细胞表面抗原(例如GPCR)的结合多肽(例如VH结构域)。

[0069] 在一个方面中,本发明提供了识别特异性地结合细胞表面抗原的结合多肽(例如VH或VL结构域)的方法。该方法总体而言包括:将在外部表面上展示细胞表面抗原的第一细胞类型与结合多肽的多样的核酸展示文库接触,从而形成结合多肽/抗原复合物群体;将所述的第一细胞类型与表面活性剂接触,使得结合多肽/抗原复合物群体溶解;以及分离溶解的结合多肽/抗原复合物群体。

[0070] 在某些实施方案中,使用对结合多肽的一部分具有特异性的结合剂来分离溶解的结合多肽/抗原复合物的群体。在所述的这种方法中可以使用结合天然多肽的任何结合剂。合适的结合剂包括但不限于对多肽(或与多肽基因融合的表位标记)具有特异性的抗体。

[0071] 在某些实施方案中,对特定的激活状态具有特异性的结合剂可以用于分离结合多肽/抗原复合物群体。合适的结合剂包括但不限于对抗原的化学改性的(例如磷酸化)变体具有特异性的抗体(例如磷特异性抗体)。

[0072] 在某些实施方案中,在特定的激活状态下对与抗原有关的辅助分子(例如细胞内信号传递分子或共受体)具有特异性的结合剂可以用于分离结合多肽/抗原复合物的群体。

[0073] 可以由细胞膜提取抗原并且保持抗原的天然构造的任何表面活性剂都可以用于本发明的方法中。合适的表面活性剂包括但不限于正十二烷基- $\beta$ -d-麦芽糖苷(DDM)和3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸盐(CHAPS)。在某些实施方案中,使用DDM和CHAPS的混合物溶解抗原或者结合多肽/抗原复合物的群体。

[0074] 可以使用所述的方法分离本领域已知的任何细胞表面抗原(包括在本文中公开的那些)。本领域已知的任何细胞类型(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。本领域中已知的任何核酸展示文库(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。可以针对与细胞表面抗原的结合来筛选本领域已知的任何结合多肽或小分子(包括在本文中公开的那些),以结合该方法的细胞-表面抗原。

#### [0075] VII. 内化

[0076] 在某些方面中,本发明的方法涉及特异性地结合所需的细胞表面抗原并且与该抗原一起内化的结合多肽的选择。该方法特别用于产生可以将负荷(例如趋化作用)传递至细胞的结合多肽。

[0077] 在一个方面中,本发明提供了识别特异性地结合细胞表面抗原的内化结合多肽(例如VH或VL结构域)的方法。该方法总体而言涉及:在允许细胞表面抗原内化的条件下,使在外部表面上展示细胞表面抗原的第一细胞类型与结合多肽的多样的核酸展示文库接触,由此形成内化的结合多肽/抗原复合物的群体;洗涤第一细胞类型,从而除去与外部表面结合的文库成员;以及分离内化的结合多肽/抗原复合物。

[0078] 在某些实施方案中,通过表面提取来分离内化的结合多肽/抗原的复合物。可以由细胞膜提取抗原并保持抗原的天然构造的任何表面活性剂都可以用于本发明的方法中。合适的表面活性剂包括但不限于正十二烷基- $\beta$ -d-麦芽糖苷(DDM)和3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸盐(CHAPS)。在某些实施方案中,使用DDM和CHAPS的混合物溶解抗原或者结合多肽/抗原复合物的群体。

[0079] 在某些实施方案中,使用对结合多肽的一部分具有特异性的结合剂进一步分离内化的结合多肽/抗原的复合物。合适的结合剂包括但不限于对抗原的化学改性的(例如磷酸化)变体具有特异性的抗体(例如磷特异性抗体)。在某些实施方案中,对在特定的激活状态下与抗原有关的辅助分子(例如细胞内信号传递分子或共受体)具有特异性的结合剂可以用于分离结合多肽/抗原复合物的群体。

[0080] 在某些实施方案中,通过编码结合多肽的核酸的沉淀(例如通过乙醇沉淀)进一步分离内化的结合多肽。

[0081] 可以使用任何合适的洗涤缓冲液除去结合在第一细胞类型的外部表面上的文库的成员。在某些实施方案中,通过使用低pH溶液(例如pH低于大约5的溶液,例如低于大约pH4,低于大约pH3或者低于大约pH2)进行洗涤而除去结合在第一细胞类型的外部表面上的文库的成员。合适的低pH溶液包括低于pH3的HCl或甘氨酸。在某些实施方案中,低pH溶液为大约pH2.7的0.1M HCl。

[0082] 在某些实施方案中,在使用多轮筛选的情况下,通过在初始的几轮筛选中沉淀(例如通过乙醇沉淀)编码结合多肽的核酸来分离内化的结合多肽,并且在后面的一轮或多轮的筛选(更严谨的)中使用对结合多肽的一部分具有特异性的结合剂来分离内化的结合多肽。

[0083] 可以使用所述的方法分离本领域已知的任何细胞表面抗原(包括在本文中公开的那些)。本领域已知的任何细胞类型(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。本领域已知的任何核酸展示文库(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。可以针对与天然的细胞表面抗原的结合来筛选本领域已知的任何结合多肽或小分子(包括在本文中公开的那些),以结合该方法的细胞-表面抗原。

#### [0084] VIII. 抗原转向

[0085] 在某些方面中,本发明的方法涉及在不同于参照结合剂(例如抗体)识别的表位处与抗原特异性地结合的结合多肽的选择。此类方法特别用于产生具有新的功能性质的结合多肽。

[0086] 在一个方面中,本发明提供了识别在不同于参照结合剂(例如抗体)识别的表位处与抗原特异性地结合的结合多肽(例如VH或VL结构域)的方法。所述的方法总体而言包括:在一定的条件下使抗原与参照结合剂接触,从而形成抗原和参照结合剂(例如抗体)的复合物;将抗原和参照抗体的复合物与结合多肽的多样的核酸展示文库接触,从而形成至少一种结合多肽/抗原的复合物;以及由文库分离至少一种特异性地结合抗原的文库的成员。

[0087] 可以使用所述的方法分离本领域已知的任何细胞表面抗原(包括在本文中公开的那些)。本领域已知的任何细胞类型(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。本领域已知的任何核酸展示文库(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。可以针对与天然的细胞表面抗原的结合来筛选本领域已知的任何结合多肽或小分子(包括在本文中公开的那些),以结合该方法的细胞-表面抗原。

[0088] 在某些实施方案中,抗原为在细胞的外部表面上展示的细胞表面抗原(例如细胞表面受体,例如GPCR)。在某些实施方案中,抗原为GCGR, CXCR4或NAV1.7(例如人类GCGR, CXCR4或NAV1.7)。

#### [0089] IX. 对抗原激活状态的偏压

[0090] 在某些方面中,本发明的方法涉及特异性地结合所需的激活状态的抗原(例如细胞表面抗原)的结合多肽的选择。此类方法特别用于产生变构调控(例如抑制)靶抗原的结合多肽。

[0091] 在一个方面中,本发明提供了识别内化结合多肽(例如VH或VL结构域)的方法,其中所述的结合多肽特异性地结合所需的激活状态的细胞表面抗原。该方法总体而言包括:将在外部表面上展示细胞表面抗原的第一细胞类型与以下物质接触:i)特异性地结合细胞表面抗原并调控细胞表面抗原的激活状态的结合剂,和ii)结合多肽的多样的核酸展示文库;以及由文库分离至少一种文库的成员,其特异性地结合在第一细胞类型的外部表面上的细胞表面抗原。

[0092] 在本发明的方法中可以使用抗原的任何调控剂,包括激动剂、拮抗剂、部分激动剂等。在某些实施方案中,调控剂为抗原的天然配体。在某些实施方案中,调控剂将抗原锁定成无活性的构造。

[0093] 可以使用所述的方法分离本领域已知的任何细胞表面抗原(包括在本文中公开的那些)。本领域已知的任何细胞类型(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。本领域已知的任何核酸展示文库(包括在本文中公开的那些)可以用于所述的方法中。可以针对与天然的细胞表面抗原的结合来筛选本领域已知的任何结合多肽或小分子(包括在本文中

中公开的那些),以结合该方法的细胞-表面抗原。

#### [0094] X. 抗体的形式

[0095] 在本发明的方法中使用的VH和/或VL结构域可以用于分离或者与其他的氨基酸(例如表位标记)和/或结构域融合。在某些实施方案中,文库中的至少一个VH结构域与至少一个CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域或它们的组合融合。在特定的实施方案中,文库中的至少一个VH结构域与包含至少一个CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域的至少一个重链恒定区融合。在某些实施方案中,文库中的至少一个VL结构域与至少一个轻链恒定区融合。

[0096] 使用本文公开的方法识别的VH或VL结构域还可以经过进一步的筛选方法,从而使用例如在W02012125733中所述的方法来选择互补性VH/VL对(所述的文献以引用方式全文并入本文)。

[0097] 使用本发明的方法选择的VH或VL结构域、和/或VH/VL对可以引入另一种抗体形式中,包括但不限于scFv, Fab和/或完整的四聚体抗体。

### 实施例

[0098] 实施例1:使用人类VII文库和dsDNA展示技术(其并入了活细胞选择和深度序列分析)识别靶细胞特异性表位

#### [0099] A. 综述

[0100] 构建由人类供者的骨髓、外周血和脾细胞获得的完整的人类抗体VH文库,并使用dsDNA展示技术识别对多种靶物的多种高度亲和性和特异性的VH结合剂。使用人类VH文库和dsDNA展示技术通过活细胞选择和深度测序分析来识别靶细胞特异性表位。在这些方法中使用平行的差异性选择和靶细胞选择性选择的策略(参见图4、5、6)。在经过所有轮的测试后,由所有池的深度测序得到的CDR3的频率的表格预测出VH克隆子的选择性。识别选择性结合靶细胞和相关细胞类型的高亲和性VH。

#### [0101] B. 用于发现活细胞表位的文库改造和选择方法

[0102] 研发2种方法有效地回收与活细胞结合的文库的成员。

[0103] 第一种方法涉及通过DNA的限制性消化由活细胞剥离结合剂,其中所述的DNA与结合抗体融合。该方法能够完全回收与细胞上的所有表位结合的VH。VH DNA文库的C-末端经过改造而携带NotI限制性位点(参见图1)。在天然VH构架中不存在NotI位点,因此仅由细胞洗脱全长的VH结合剂用于最后的扩增。在活细胞上检验NotI限制性消化缓冲液,并且在37°C下在至多温育2小时下,细胞是活的。NotI消化的效率较高。在4°C下在文库与细胞结合1小时后,洗涤细胞,并在37°C下使用NotI缓冲液将细胞消化1小时,然后将细胞离心,收集上清液(包含结合的VH DNA)用于PCR扩增(参见图1)。

[0104] 第二种方法是使用磷脂酶C(PLC)消化由活细胞切下VH结合剂。该方法能够洗脱VH,其与任何GPI锚定的膜蛋白的表位(即,表位的子集)结合。PLC的切割效率较高,这可以使用对照分子在FAGS上证实。在4°C下文库与细胞温育1小时后,洗涤细胞,并使用在37°C下与PLC温育15min。随后将细胞离心,并对上清液进行PCR扩增,其中所述的上清液包含与GPI锚定的膜蛋白的细胞外结构域复合的融合VH(参见图2)。

[0105] C. 在靶向且相关的/不需要的细胞类型上的平行选择、差异性选择和靶细胞选择性选择

[0106] 根据在W02010/011944中列出的方案形成主要的天然融合的文库(所述的文献以引用方式全文并入本文)。对于第一轮的选择,纯化的融合文库相等地分成多个文库,对于所有的选择分支而言,所述的文库均携带相同的多样性(参见图5)。

[0107] 根据标准的细胞生物学方案,将由正常供者或患者获得的原代细胞新鲜解冻,或者由细胞培养烧瓶分离。然后在37°C下在完全培养基中在1小时内回收细胞,之后在冰上在选择缓冲液中封闭30min。在冰上实施所有的选择,从而防止抗体和靶物内化。

[0108] 对于平行选择而言,在室温下,在30min内,使用200uI预封闭的链霉亲和素珠和200uI预封闭的hIgG-Epoxy珠预清理文库,继而除去任何错误折叠的和粘性文库成员。然后,将预清理的文库在冰上冷冻,并预封闭细胞,再在冰上温育1小时。

[0109] 对于靶细胞的选择性选择而言,在冰上,在不需要的和密切相关的细胞类型上预清理1小时,从而除去任何非选择性结合剂,然后在靶细胞上进行预清理。

[0110] 在第4轮的选择中,在靶细胞(在细胞上进行预清理或未进行预清理)上对选择分支使用差异性选择方法。在这一轮中,将文库分成多管,并平行地与各种细胞类型和由疾病的不同阶段得到的患者细胞结合。该策略允许通过深度测序分析直接比较靶细胞与其他细胞类型,并识别结合剂,该结合剂识别随着疾病进程出现的不同的表位(参见图6)。

[0111] 对于所有的选择分支而言,在结合后,使用10mL结合缓冲液洗涤细胞,并经过NotI限制性消化从而回收膜蛋白的所有结合剂,或者经过PLC切割从而回收上文所述的GPI锚定的膜蛋白的结合剂。

#### [0112] D. 用于预测靶细胞的选择性结合剂的深度测序分析

[0113] 在各轮选择后,对结合池进行PCR扩增。使用VH片段的构架3的C-末端和N-末端的低聚引物通过PCR使各个结合池中的HCDR3增多。然后,使用用于Illumina测序的特异性DNA条形码,通过PCR标记由单一选择轮和分支衍生的这些HCDR3片段。合并标记的HCDR3,并送至使用Hi-Seq技术的高通量测序。由靶细胞得到的第4轮结合池也使用DNA条形码标记,并提交454测序,从而得到全长VH序列。

[0114] 在测序后,基于DNA条形码使序列去卷积。通过比较在不同轮和选择分支中存在的特定的CDR3序列的频率将由各个选择轮和选择分支衍生得到的无数的序列制成表格。用于识别选择性结合剂的标准为:1)由早期选择轮至晚期选择轮,在靶细胞上而非对照细胞或密切相关的细胞类型上特异性地富集CDR3序列;2)在不同的选择轮中,在特异性的靶细胞类型上具有较高的频率,而在对照或密切相关的细胞类型上具有较低频率(参见图7);以及3)不存在于其他靶点或细胞中的序列选择自数据库中的其他程序。然后,基于454全长序列信息来合成通过Illumina测序识别的选择性克隆子。

#### [0115] E. 产生、纯化和FACS结合测试

[0116] 然后,将结合池和合成的VH亚克隆至pET22b表达载体中。在BL-21E.coli细胞中形成VH,并使用标准的方案通过C-末端His标记来纯化。实施FACS测试,从而评估VH与不同细胞类型的结合和选择性,以及结合剂的EC50。通过活细胞选择过程来识别高亲和性和选择性HV结合剂(参见图8、9和10)。

#### [0117] 实施例2:多样性增强的VH文库的构建

[0118] 为了扩大现存的VH天然文库(例如在W02010/011944中公开的那些)的多样性,采用CDR3和构架重排方法。简言之,使用引发VH构架3的C末端区和构架4的N末端区的低聚物

来实施PCR。该策略涉及用于扩增由各个VH家族(衍生自天然VH文库)得到的完整的CDR3环结构域。使用家族特异性生成的N-末端构架1和C-末端构架3低聚物(得自相同的天然的文库)通过PCR来扩增VH构架1-3。使用T7UTR和构架4低聚物实施重叠PCR(其中CDR3与构架以等摩尔比混合)。重新改组的文库经过进一步的修改,从而携带dsDNA融合文库用于选择的环化标记。具体而言,使用构架3和构架4的正向和反向低聚物由各个V<sub>H</sub>家族增加由天然文库得到的HCDR3,并使用构架特异性寡核苷酸将其组装至文库中,该文库包含由骨髓B细胞和PBMC扩增的天然人类V<sub>H</sub>结构域的构架区1-3。使用5'VH家族特异性和3'FR3类别的反向引物来扩增人类VH构架区,从而创建VH家族构架区的分开的文库。使用5'T7TMV和3'FR4低聚物,通过进一步的PCR扩增而改组VH家族的构架文库和由相同的文库增加的HCDR3。其还在5'末端加入T7TMV启动子序列用于体外转录/翻译。还分别使用FR4Cu3反向和Y109引物以及5'T7TMV引物,通过PCR加入C-末端C<sub>μ</sub>3序列和FLAG标记(在翻译后用于纯化)。用于制备HCDR3-改组的VH文库的寡核苷酸的核酸序列列于表1中。

[0119] 通过扩大以包含由正常个体和疾病患者(如果需要)得到的更多个供体来增加文库的多样性。

[0120] 表1.用于构建HCDR3改组的VH文库的寡核苷酸

[0121]

低聚物	序列	SEQ ID NO.
FR3 反向	CGCACAGTAATACACGGC	1.
VH1 a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTGGTGCAGTCTG	2.
VH1b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTG	3.
VH1c	CAATTACTATTTACAATTACAATGSAGGTCCAGCTGGTACAGTCTG	4.
VH1d	CAATTACTATTTACAATTACAATGCARATGCAGCTGGTGCAGTCTG	5.
VH2	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGRTCACCTTGAAGGAGTCTG	6.
VH3a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	7.
VH3b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	8.
VH3c	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG	9.
VH4a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGSTGCAGCTGCAGGAG	10.
VH4b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG	11.
VH5	CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGCAGTCTG	12.
VH6	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG	13.
VH7	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTGGTGCAACTCTG	14.
T7 TMVUTR	TAATACGACTCACTATAAGGACAATTACTATTTACAATTACA	15.
FR3 正向	GCCGTGTATTACTGTGC	16.
FR4 Cu3 反向	GGAGACGAGGGGGAAAAGGGTTGAGGAGACGGTGACCAG	17.
Y109	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTAAGGACGACTTGT CGTCG TCGTCCTTGTAGTCGGAGACGAGGGGGAAAAGGGT	18.

[0122] 多样性增强的文库可以进一步改造以用于活细胞表面剥离选择方法中,如本文所述。

[0123] 实施例3:使用人类VII文库和dsDNA展示技术进行活细胞选择,其中所述的技术并入免疫沉淀

[0124] 评价多种表面活性剂溶解GPCR以及保持天然功能构造的能力。具体而言,使用对照VH分子(包含Myc亲和性标记)和GPCR-表达细胞系来研发<sup>35</sup>S标记的抗体结合测试。在这种测试中,使用Triton X100, CHAPS, DDM或Brij35表面活性剂裂解等量的表达GPCR靶物的细胞,然后使用抗Myc标记抗体进行免疫沉淀,并通过蛋白质G磁性珠捕获。在体外翻译反应过程中,使用<sup>35</sup>S放射性标记与靶细胞结合的阳性对照VH。将标记的VH与GPCR靶物温育,并在使用上述不同的表面活性剂进行细胞裂解后,通过抗Myc抗体捕获。使用闪烁计数器定量与

GPCR靶物结合的VH的量。基因VH结合活性对通过表面活性剂溶解而保持的功能构造进行评级。平行地,通过Western印迹来评价使用抗Myc抗体免疫沉淀的GPCR的定量。当使用DDM或CHAPS裂解细胞时,阳性对照VH显示良好的与GPCR结合的活性。在这2种测试中,DDM和CHAPS的组合显示最大的功能GPCR活性和最佳的GPCR定量,并选择该组合用于选择结合GCGR(胰高血糖素受体)的VH结构域。

[0125] 在一个GCGR选择分支中,将纯化的和预清理的VH DNA展示文库与表达GCGR的细胞接触1小时。洗涤细胞,并使用DDM/CHAPS裂解,然后使用抗Myc标记抗体进行免疫沉淀。回收VH-GCGR-Myc Ab复合物,并使用0.1N KOH洗脱VH DNA。使用该方法,在4轮选择后,识别与表达GCGR的细胞结合的高亲和性VH。

[0126] 备选地,可以使用溶解的和浓缩的GPCR靶物(或所关注的另一个靶物)进行选择,其中所述的GPCR靶物是在使用DDM/CHAPS溶解细胞后使用抗Myc抗体免疫沉淀的。然后,可以在与珠上捕获的这些靶物温育后,洗脱VH文库。

[0127] 除了上文所述的方法,在VH文库与表达功能GPCR(或所关注的其他靶物)的活细胞结合时,所述的细胞可以被裂解,并且可以使用类似于抗Myc抗体的抗细胞内N-或C-末端的抗体进行免疫沉淀。抗磷酸化的特异性抗体可以用于捕获激活的受体和由无活性的受体得到的链段。还可以使用辅助分子的抗体来实施免疫沉淀,其中所述的辅助分子与激活的或无活性的靶物有关,该靶物用于捕获调控靶物特异性途径的多种激活和无活性状态的VH。然后,在PCR扩增过程中,可以使用DNA条形码标记在这些结合池中的DNA展示文库的成员,并对其进行深度测序,从而识别具有不同的作用机制的功能结合剂。

[0128] 实施例4.内化选择

[0129] 研发选择方法来识别具有内化活性的激动剂或拮抗剂抗体。简言之,在50mM NH<sub>4</sub>Cl存在下,将天然的人类dsDNA展示VH文库(如上文所述)在37°C下与表达GPCR(或所关注的其他靶物)的活细胞温育,从而允许结合GPCR的VH内化。然后,使用缓冲液洗涤细胞,并通过低pH酸(例如0.1M HCl, pH2.7)剥离细胞表面VH。在低pH剥离后,如上文所述,使用CHAPS/DDM的组合来裂解细胞,并进行DNA沉淀,从而回收内化的dsDNA展示文库成员的编码序列。备选地,可以使用抗C-末端或抗-Myc标记抗体进行免疫沉淀。还可以将这些方法中的2种方法结合。例如在针对结合GCGR的VH的选择中,进行4轮筛选,其中通过DNA沉淀回收内化的文库成员,然后进行第5轮筛选,其中使用抗Myc抗体对内化的文库成员进行的免疫沉淀用于增加选择严谨性。在这些试验中,在5轮内化选择后,识别高亲和性拮抗剂。这些结合GCGR的VH证明符合所施加的选择压力的内化活性。

[0130] 实施例5:在靶细胞的激活的/失活的状态下的活细胞选择

[0131] 为了增强GPCR靶物的靶向功能表位和变构调控性VH的识别,研发选择策略从而允许在激活的和灭活的靶细胞上进行选择(例如在活细胞中激动剂激活的或拮抗剂灭活的GPCR)。在内源配体(或配体类似物)存在下的选择有利于VH的识别,其中所述的VH与不同于正构结合位点的位置结合,或者与通过配体和受体呈现的新的表位结合。简言之,表达GCGR的细胞被封闭,并且在激动剂(配体。类似物或激动抗体)后拮抗剂(抑制剂或中和抗体)的存在下,与天然的人类dsDNA展示VH文库(如上文所述)温育。例如在针对GCGR的选择中,在胰高血糖素的存在下,实施一个选择分支。在另一种GPCR选择中,在识别变构调控剂的配体模拟物和拮抗剂存在下,实施一些选择分支。使用激活的和灭活的靶细胞的这些选择与本

文所公开的多种文库回收方法偶联,其中所述的方法用于在所需的激活状态下有效地捕获结合GPCR靶物的VH。

[0132] 实施例6.活细胞上的配体洗脱和表位剥离,从而识别GPCR的正构和变构调控剂

[0133] 使用活细胞选择,研发用于靶向GPCR(或所关注的其他靶物)的特异性功能表位的方法。这些方法允许识别GPCR的正构(激动剂/拮抗剂)和变构调控剂。例如在针对结合GCGR的VH的选择中,在胰高血糖素存在下实施一个分支的选择。对于GCGR选择的另一个分支,在抗体文库与表达GCGR的靶细胞温育后,洗涤细胞并使用胰高血糖素洗脱4小时。然后,使用本文公开的方法将剩余的结合剂由细胞上剥离,其中所述的剩余的结合剂与不同于配体结合结构域的表位结合。由这些试验,识别多个高亲和性VH结构域,该结构域封闭结合GCGR的胰高血糖素以及GCGR引起的配体诱导的cAMP产生。一个所识别的VH结构域起到阳性变构调控剂的作用。对于另一种靶物,我们使用拮抗剂抗体,其预封闭在拮抗剂抗体存在下选择的细胞上的表位。该试验得以识别多个VH结构域,其识别不同于现有拮抗剂参照抗体的表位。

[0134] 实施例7:针对啮齿动物、灵长动物的同源膜蛋白的选择性

[0135] 为了增加抗GPCR抗体对GPCR物种同源物的选择性,可以以平行方式生成表达这些相关的同源物的细胞系,并将其作为反选择工具(如果跨物种是不需要的)用于本文所述的DNA展示选择方法中,或者与靶细胞选择平行使用,然后进行深度测序和生物信息列表,从而识别选择性克隆子。为了生成用于随后的动物效力和毒性研究的与啮齿动物或灵长动物具有交叉反应性的抗体,采用人类靶细胞的最初的一轮选择、然后通过对啮齿动物表达靶物的细胞的交叉选择来进行选择。备选地,在备选的多轮选择中可以使用人类和啮齿动物细胞。许多所识别的VH结构域证明与人类和啮齿动物细胞上的靶物结合,从而避免了生成用于动物研究的替代抗体的需要。

[0136] 实施例8.深度测序的应用

[0137] 深度测序技术已经广泛地用于本文所述的DNA展示选择方法中。在某些试验中,在选择方法中建立前导标准,并实施许多的平行选择。使用用于通过PCR进行Illumina测序的特异性DNA条形码来标记由单个的选择轮和分支衍生得到的HCDR3片段。将标记的HCDR3合并,并送至使用Hi Seq或My Seq技术的高通量测序。由靶细胞得到的第4轮结合池也使用DNA条形码标记,并提交454测序,从而得到全长VH序列。在测序后,基于DNA条形码使序列去卷积。通过比较在不同选择轮和选择分支中存在的特定的CDR3序列的频率将由各个选择轮和选择分支衍生得到的无数的序列制成表格,从而指导前导分子(其具有引入的选择性结合、表位覆盖和功能概况)的选择。

通过限制性消化从细胞中剥离V<sub>H</sub>

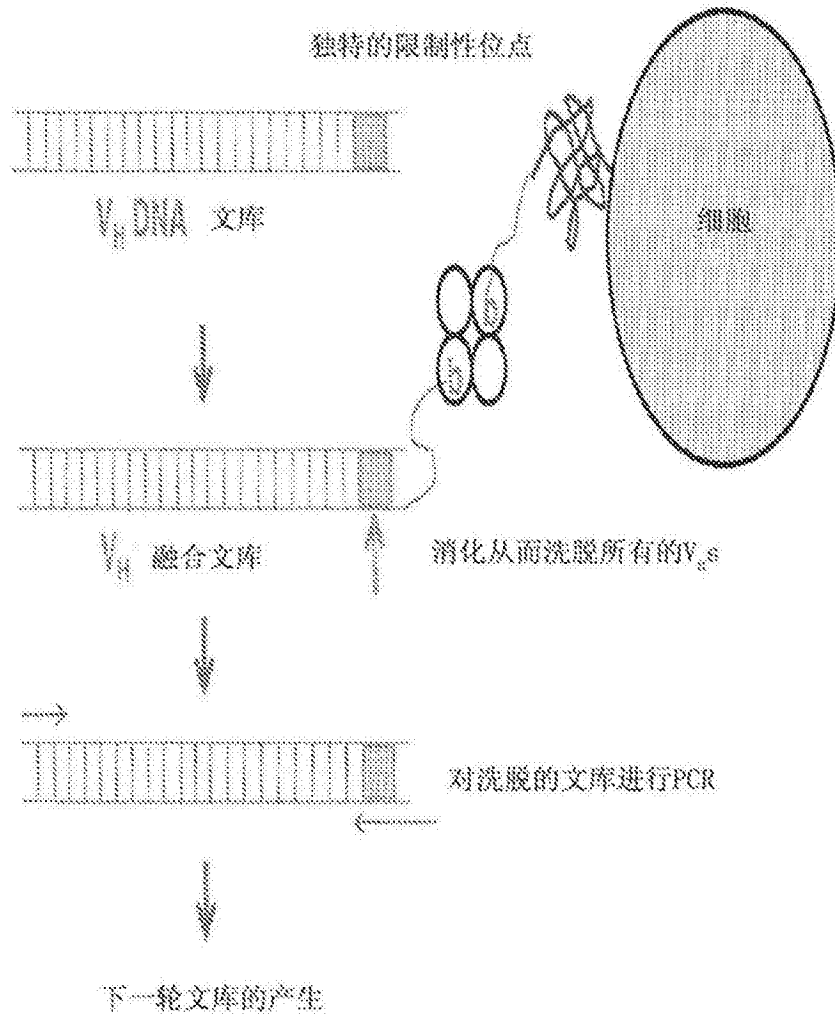


图1

通过PLC消化从细胞中剪切 $V_H$

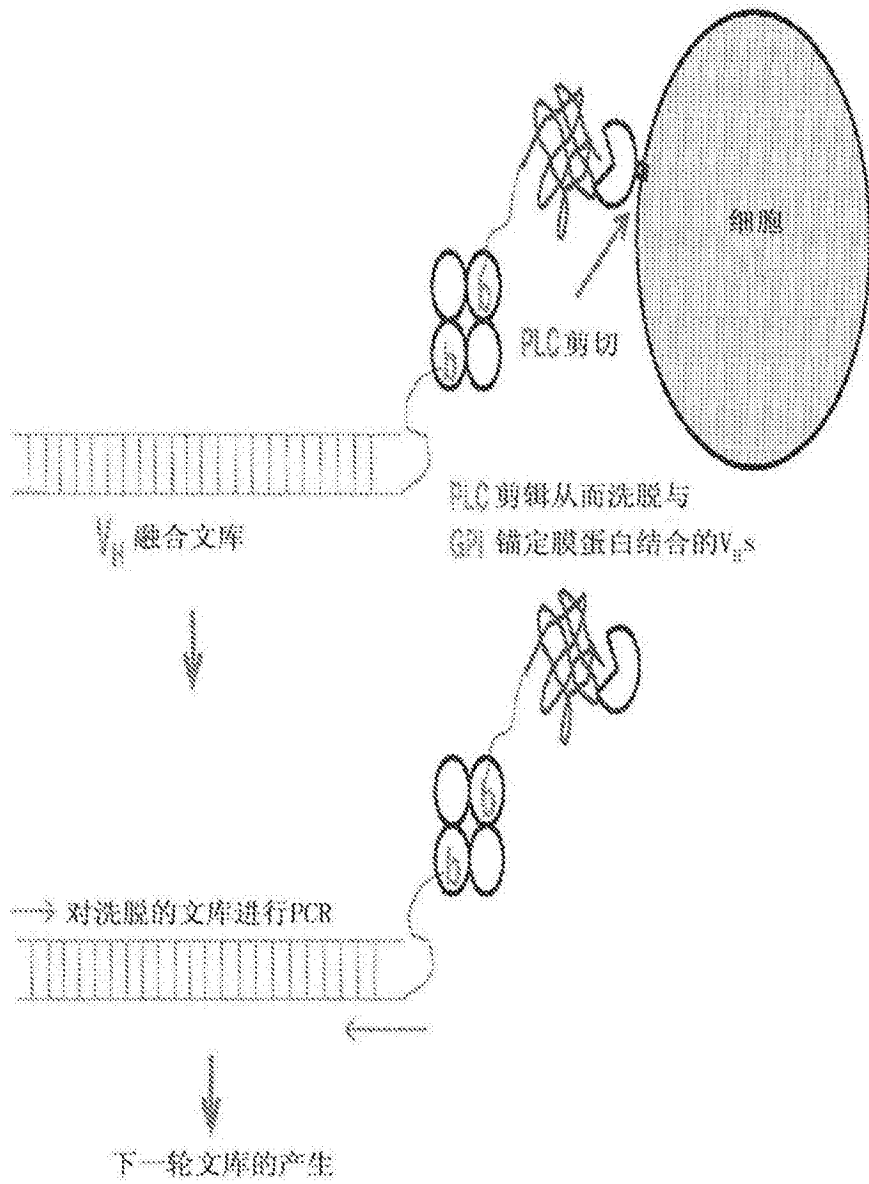


图2

鉴定靶向细胞“A”但不能结合  
对照细胞B、C或D 的结合剂

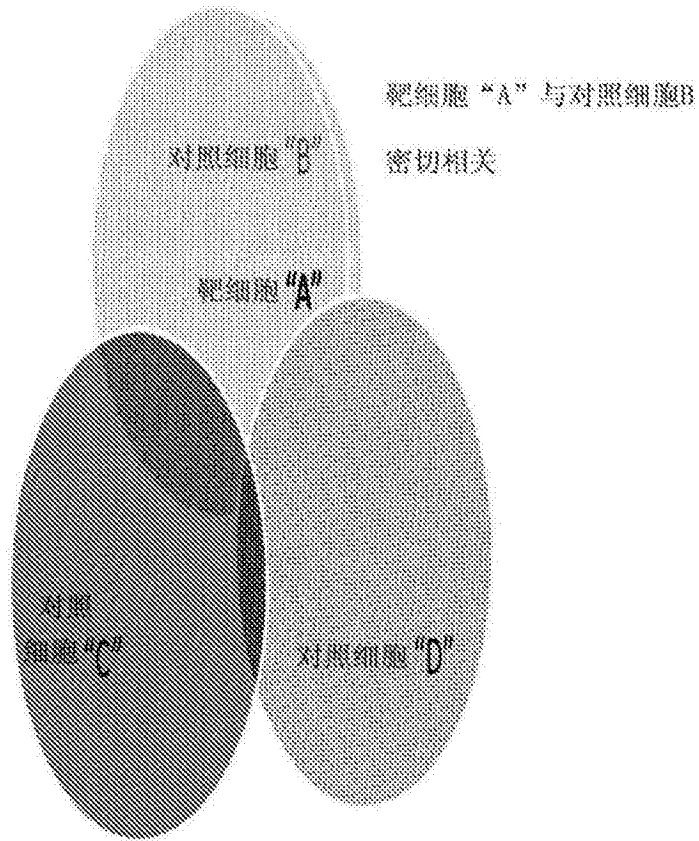


图3

# 鉴定靶细胞特异性靶表位的活细胞选择和深度测序

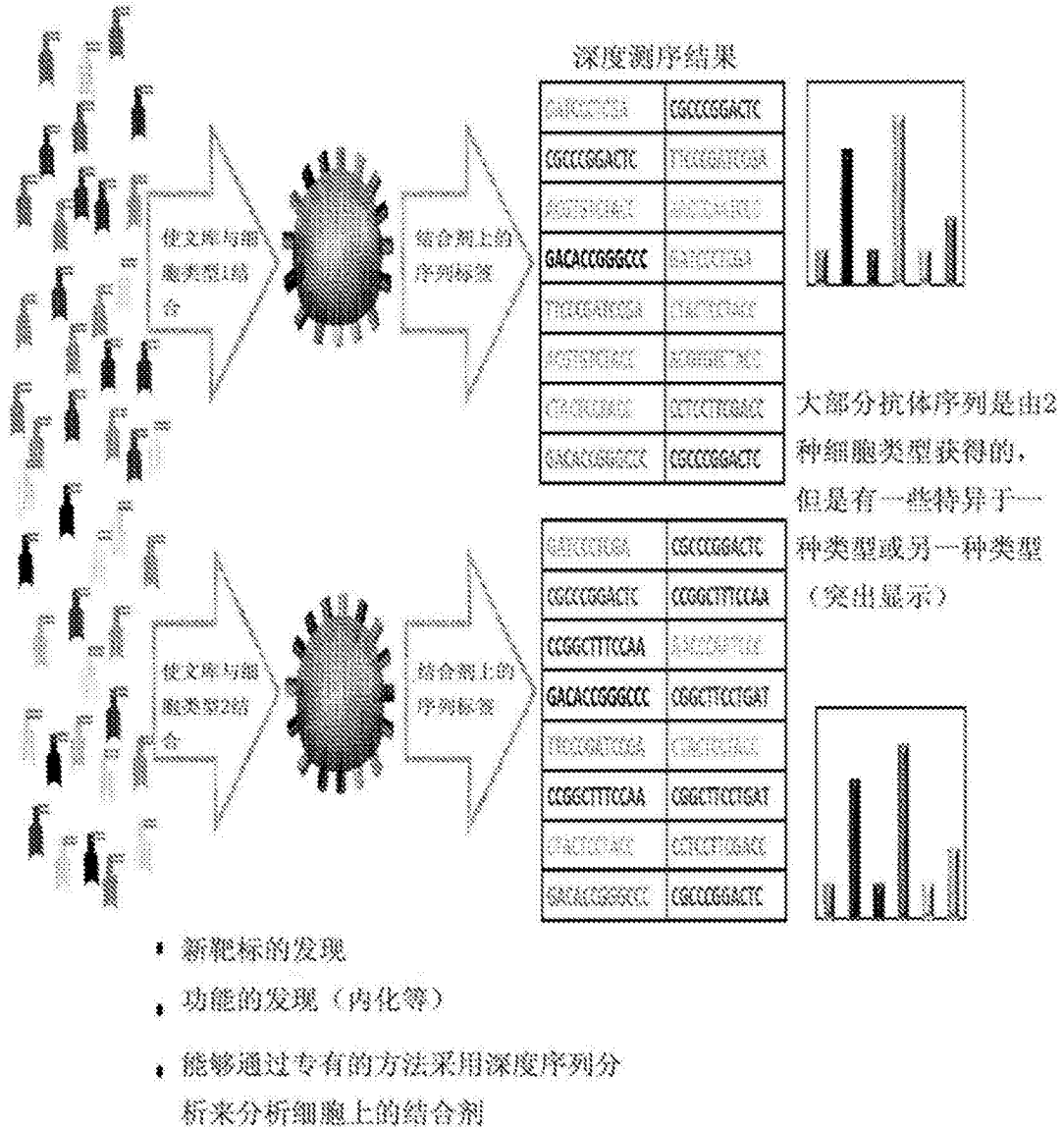


图4

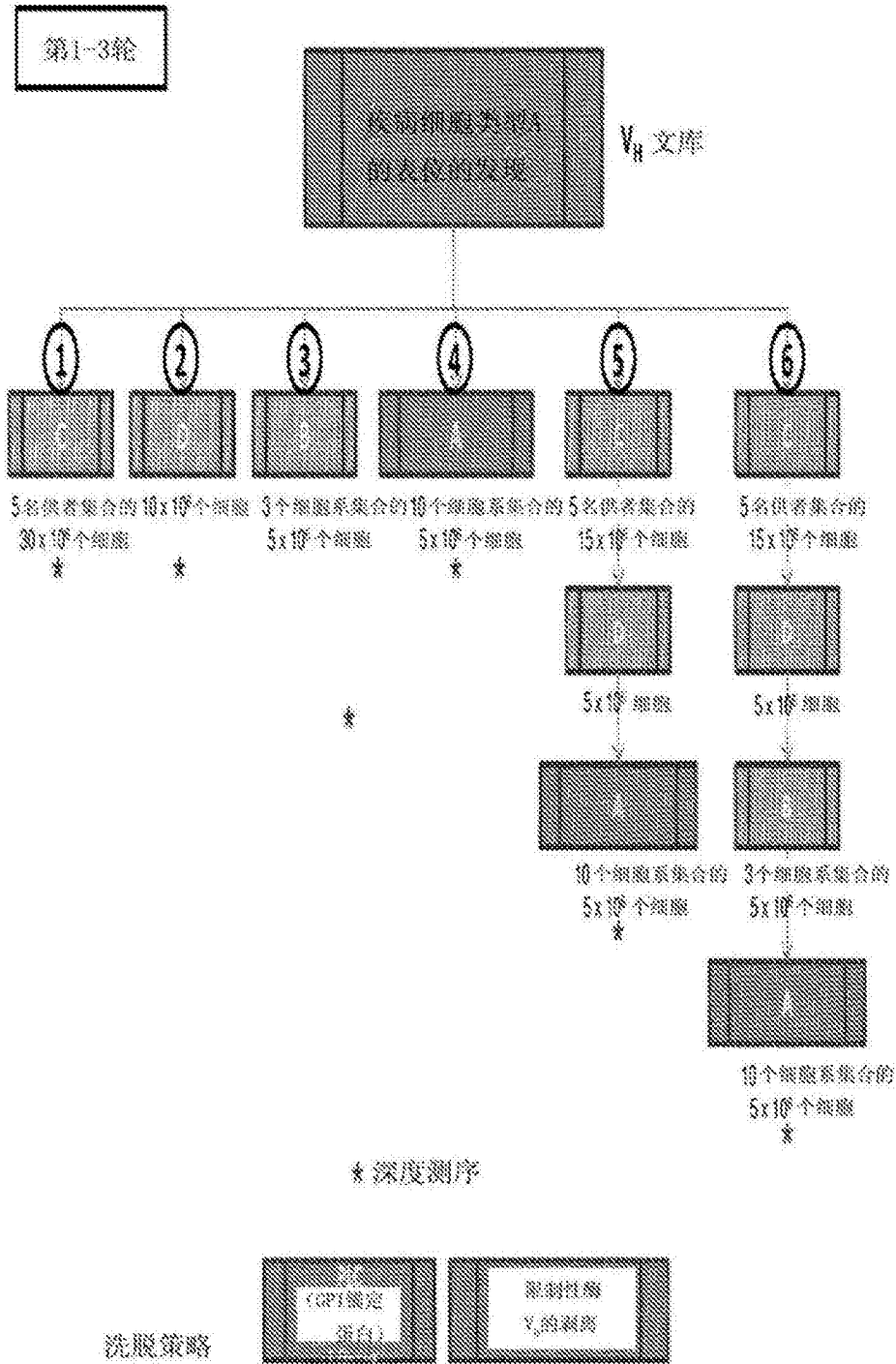


图5

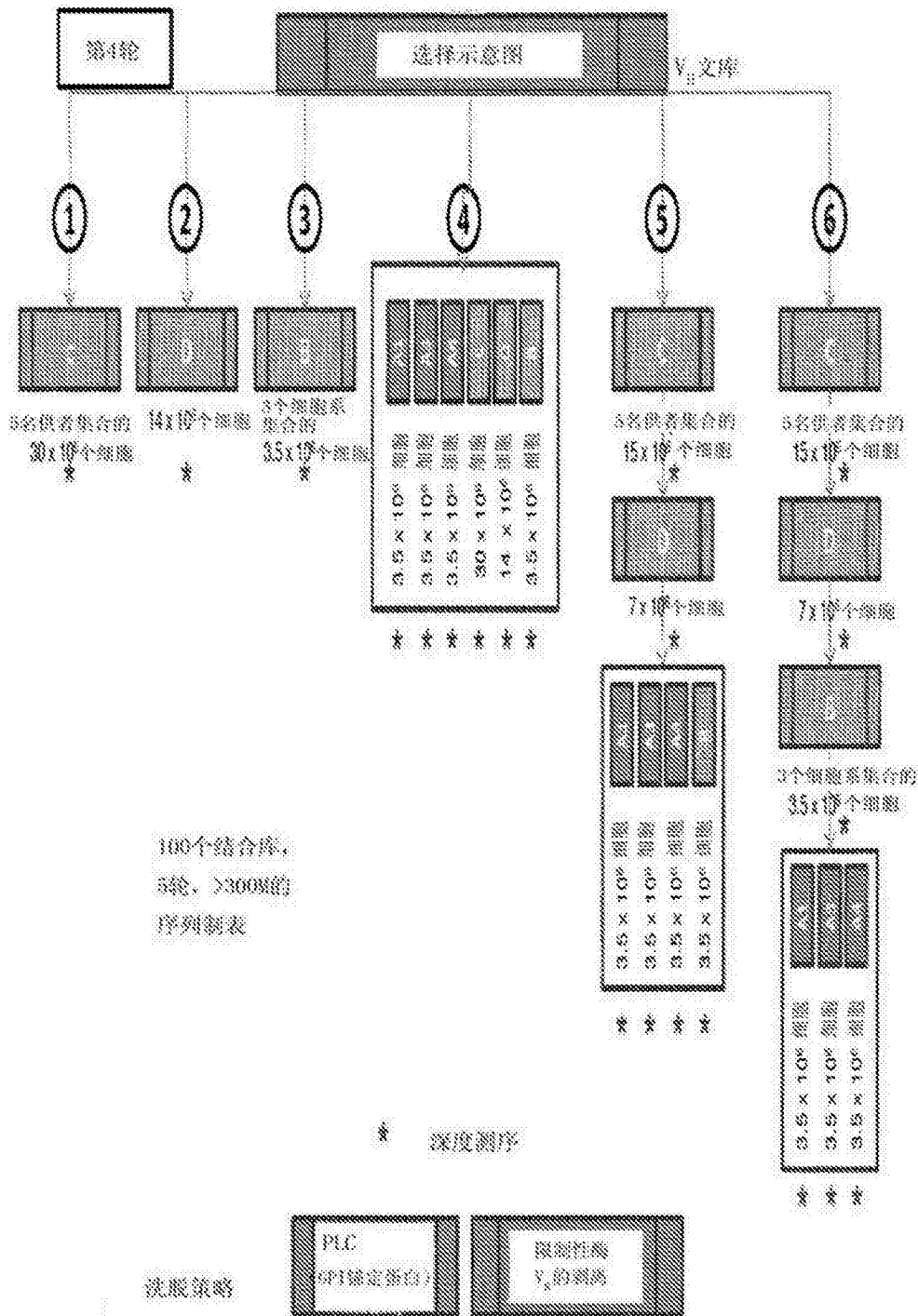
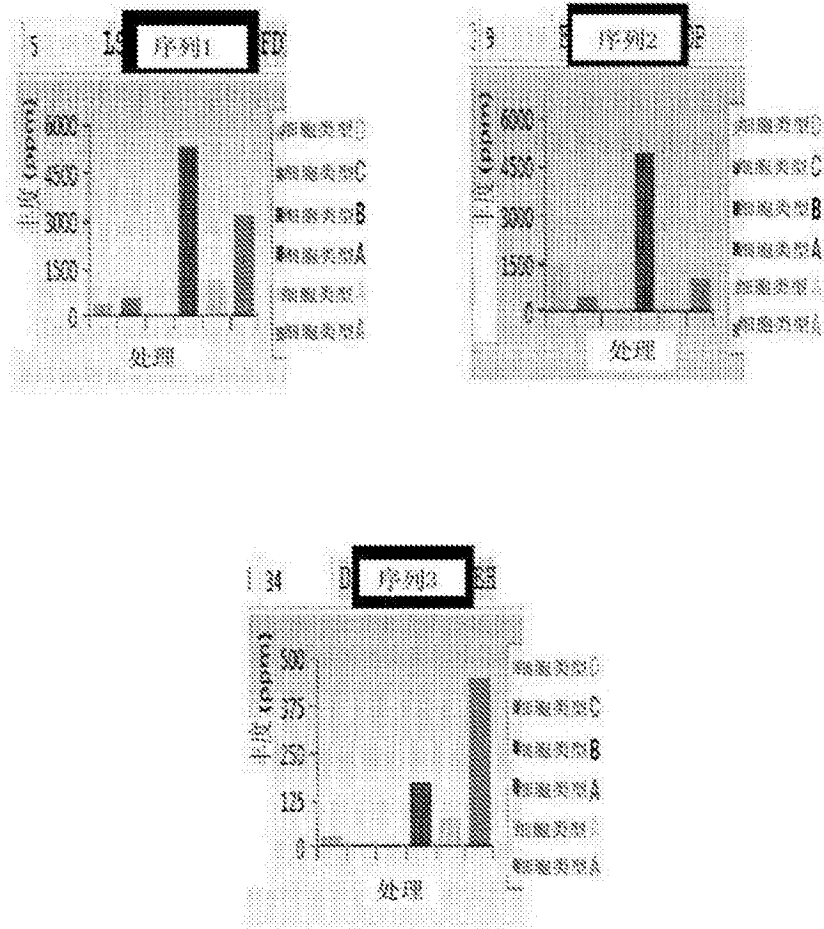


图6

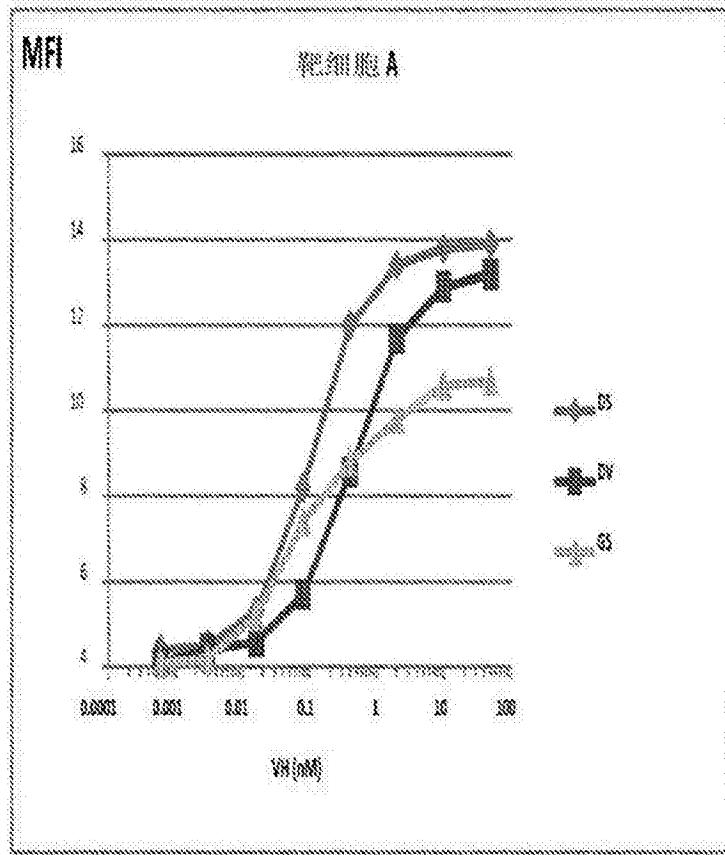
深度序列分析预测所选的V<sub>H</sub>的细胞结合特异性



通过4轮选择富集这些克隆子并预测与细胞类型A的结合选择性

图7

V<sub>h</sub>与细胞类型A的高亲和性结合



曲线号	EC <sub>50</sub>
65	1.10
64	4.30
63	8.5

图8

选择产生了各个密切相关细胞类型的特异性结合剂

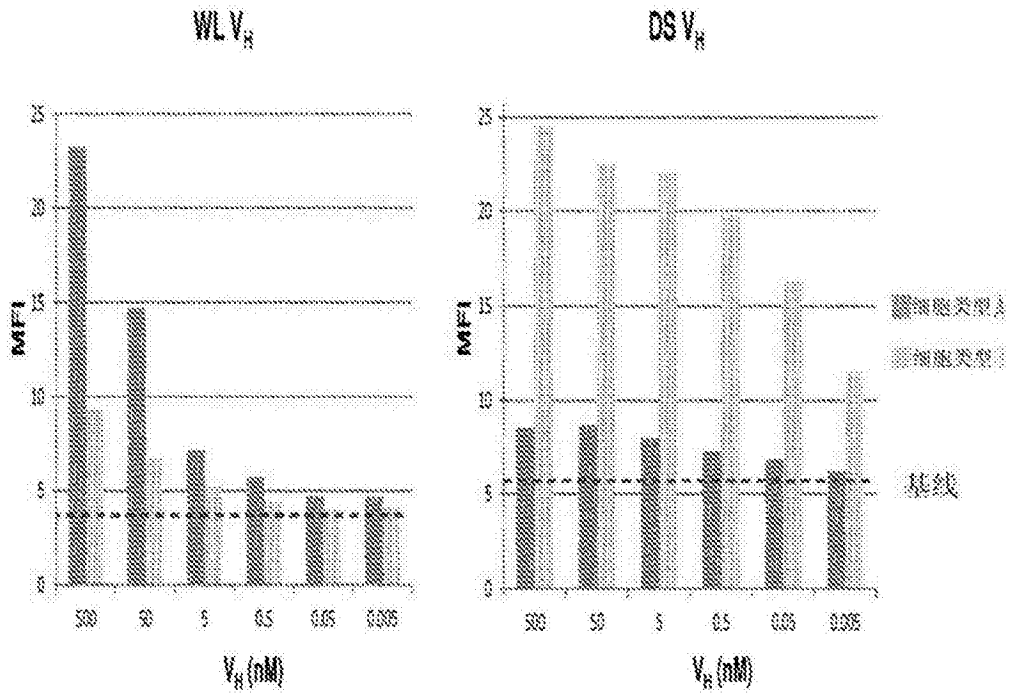


图9

选择性结合靶细胞A但不结合对照细胞B、C和D的3种不同的V<sub>g</sub>s

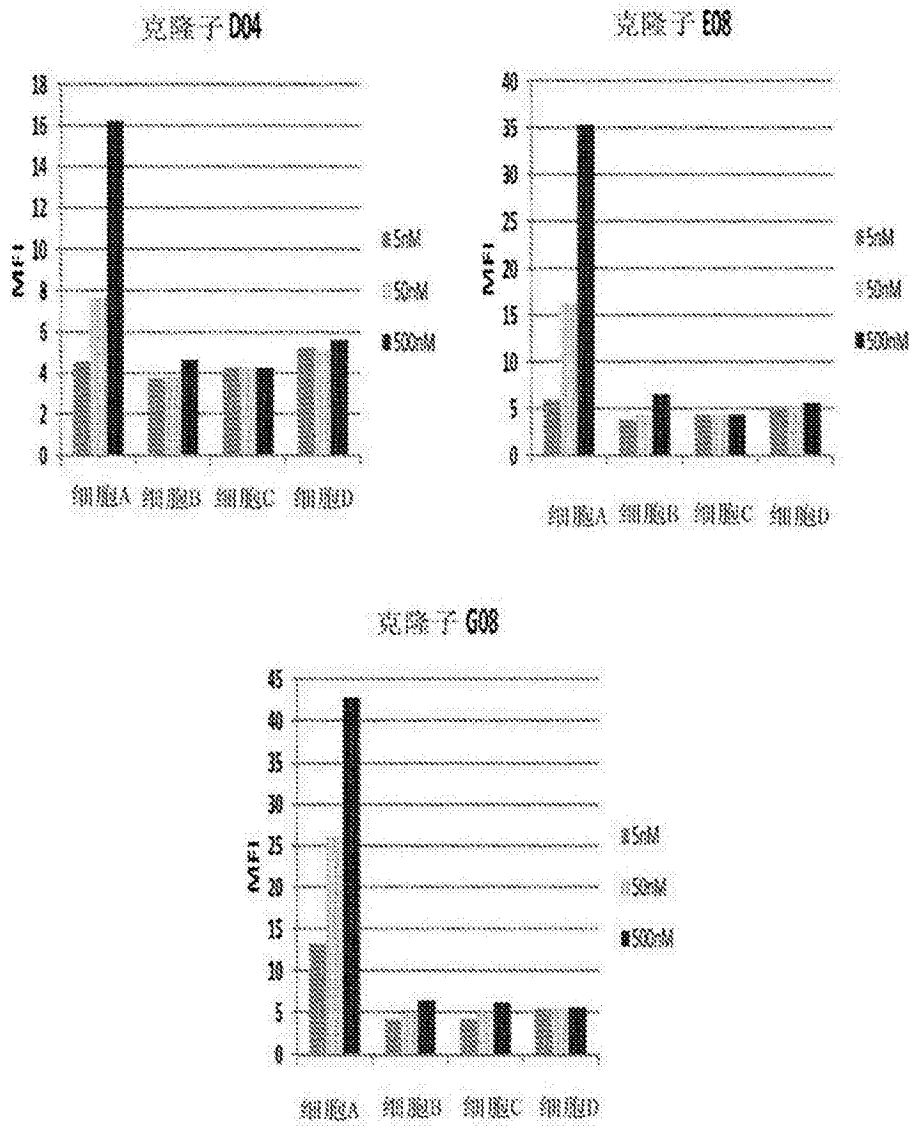


图10

针对在细胞上表达的靶标的选择

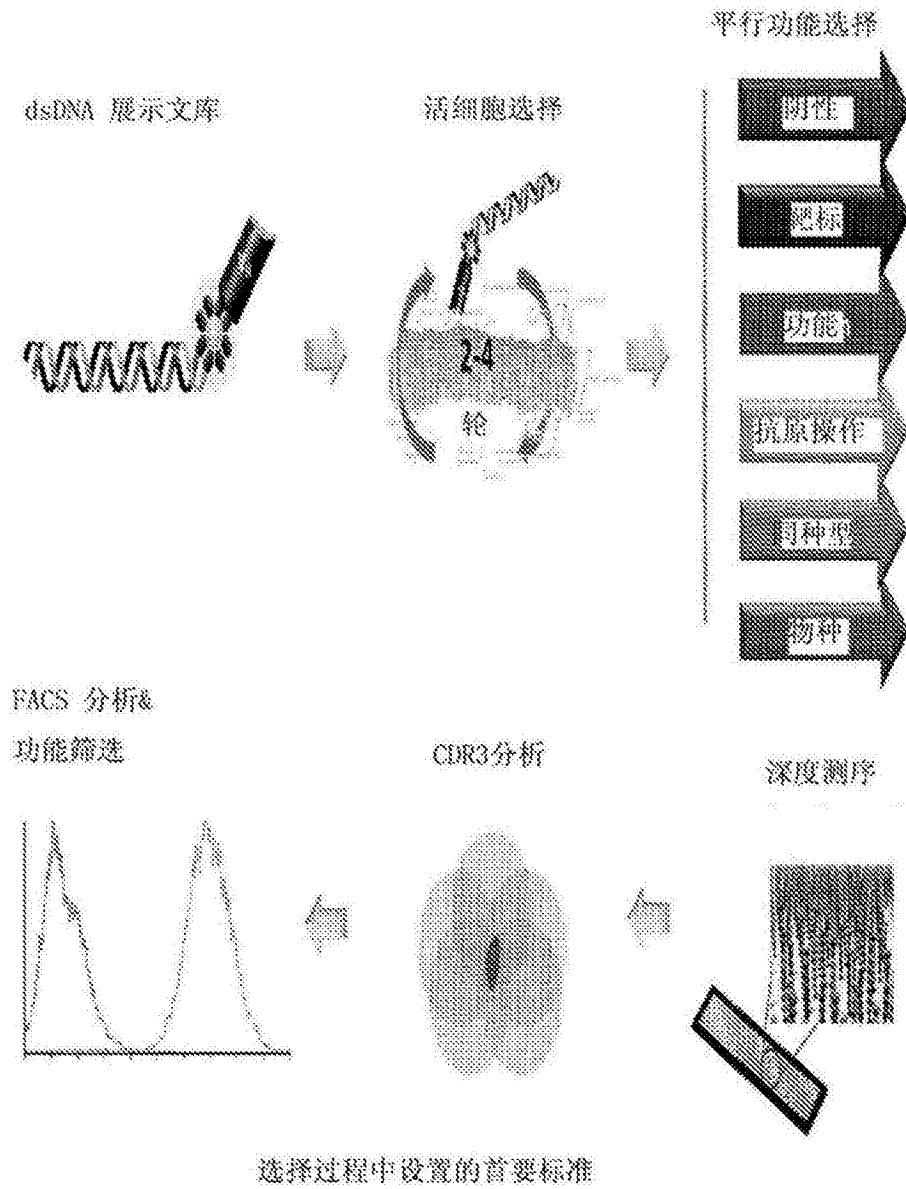


图11



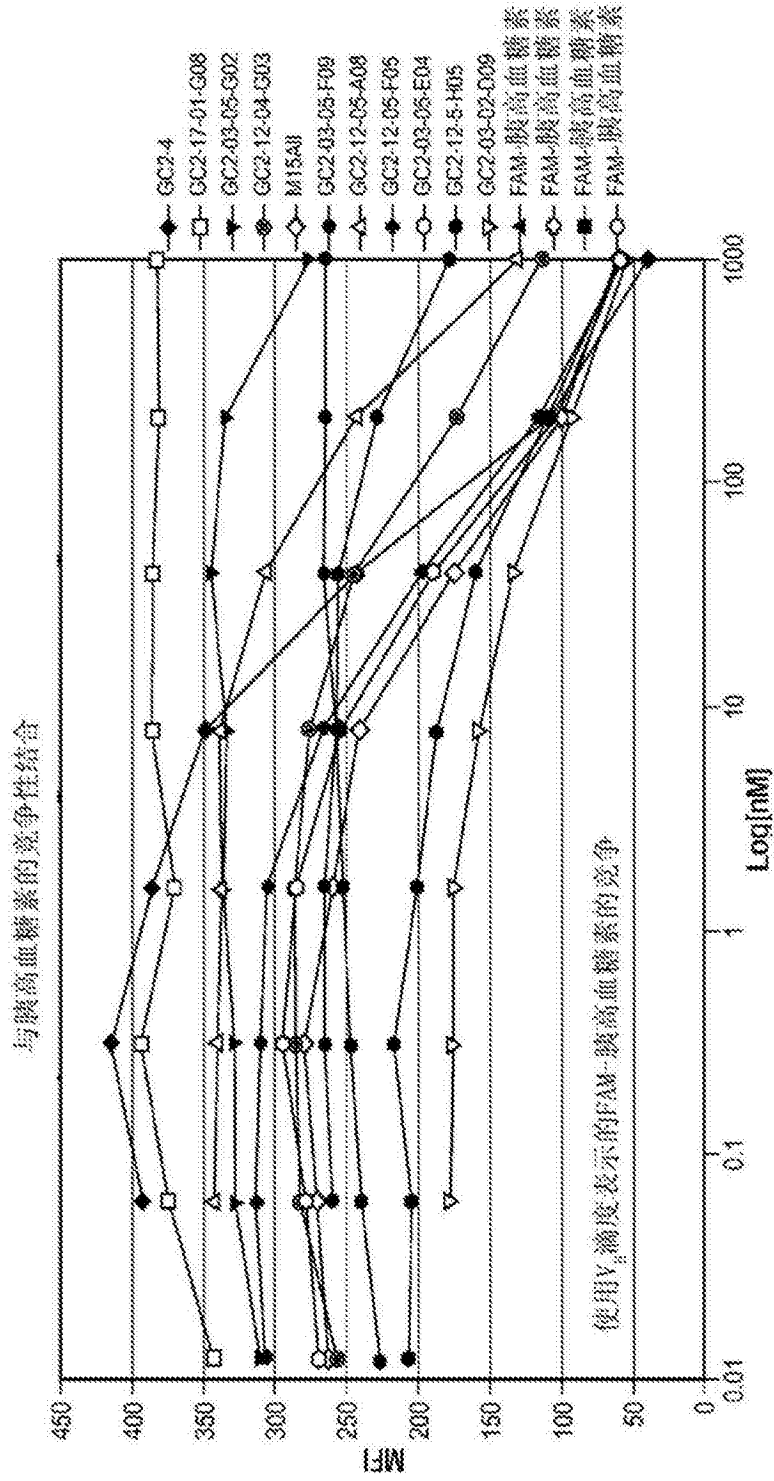


图12(续)

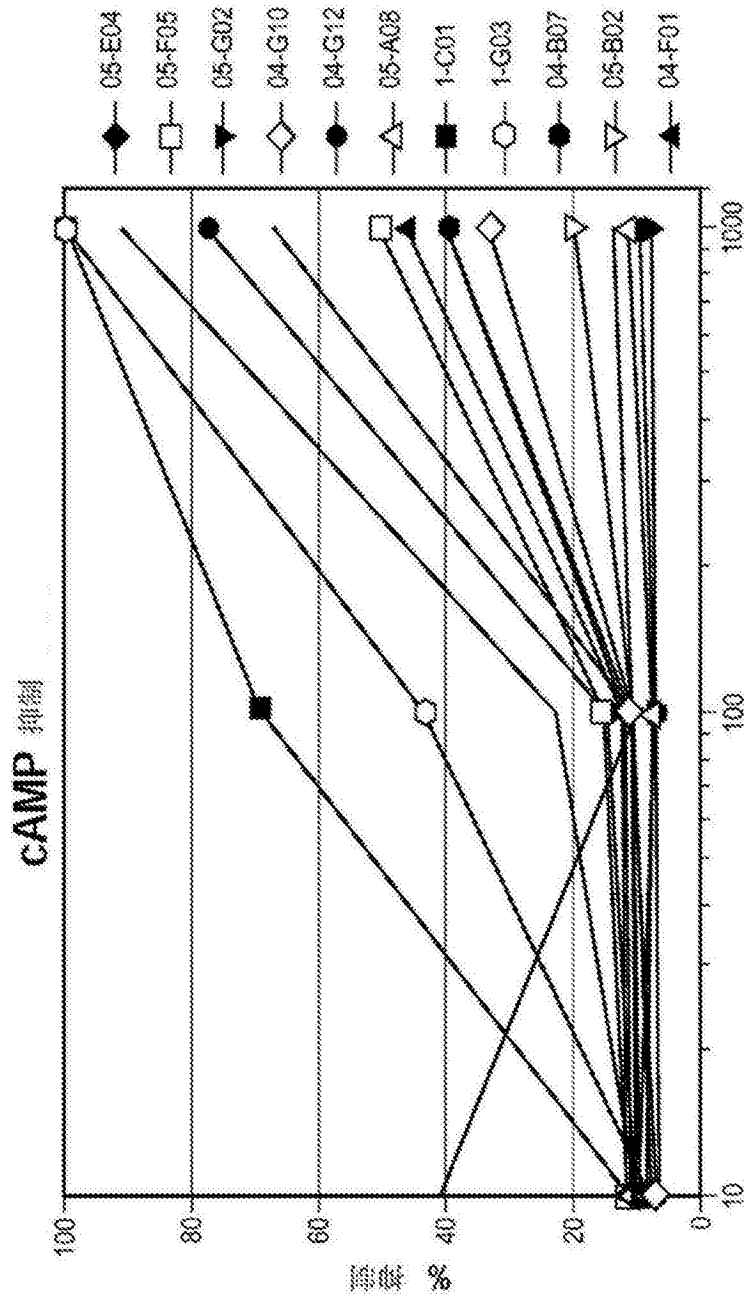


图12(续)

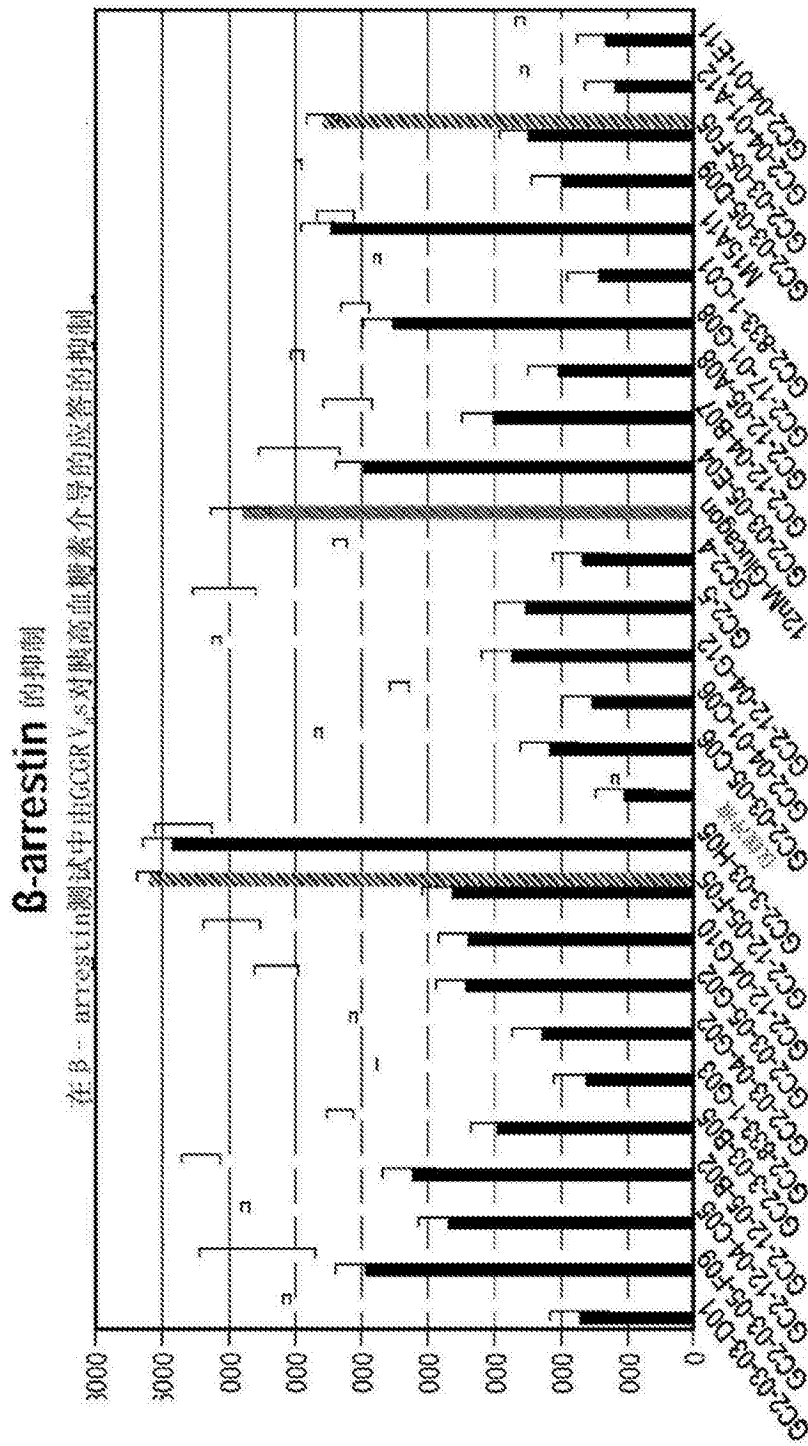


图12(续)

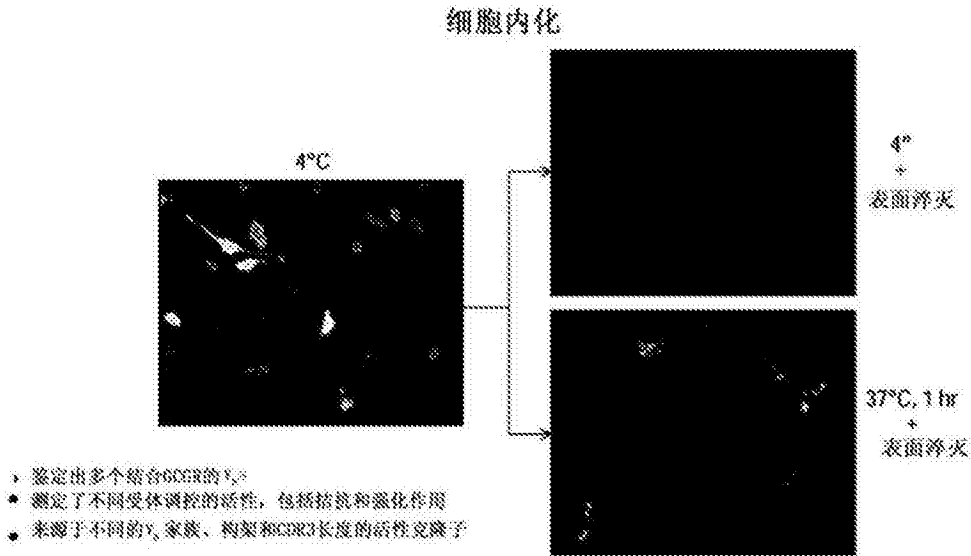


图12(续)

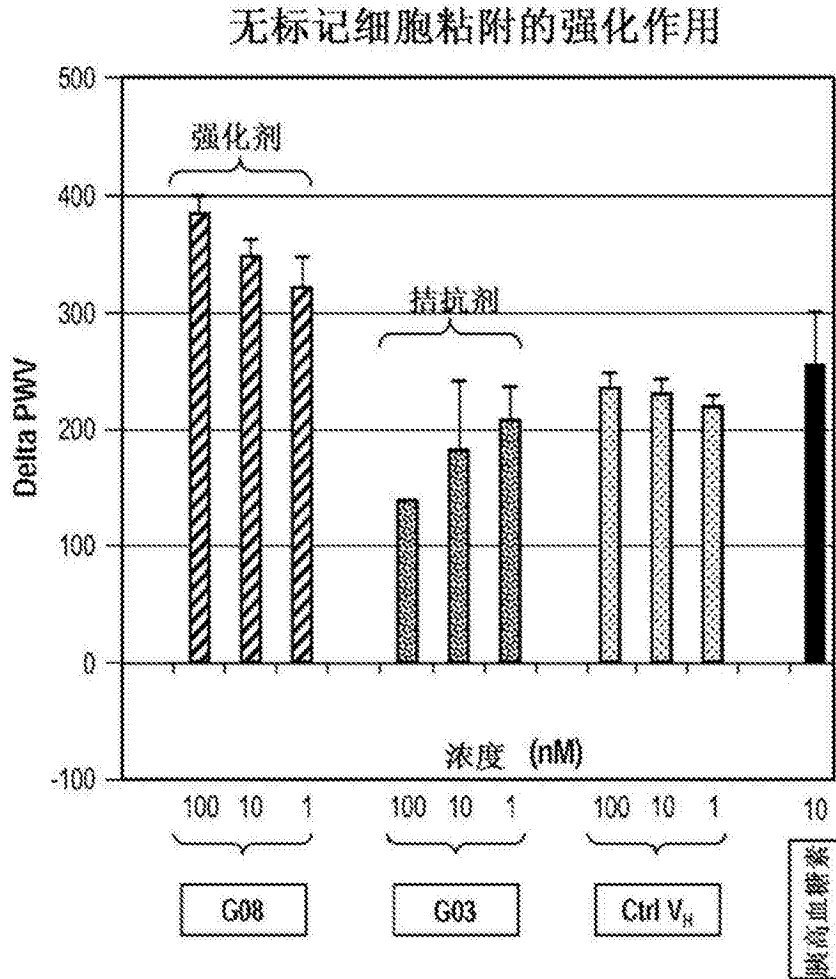


图12(续)

所选的  $V_{50}$  差异性地调控GCGR信号途径

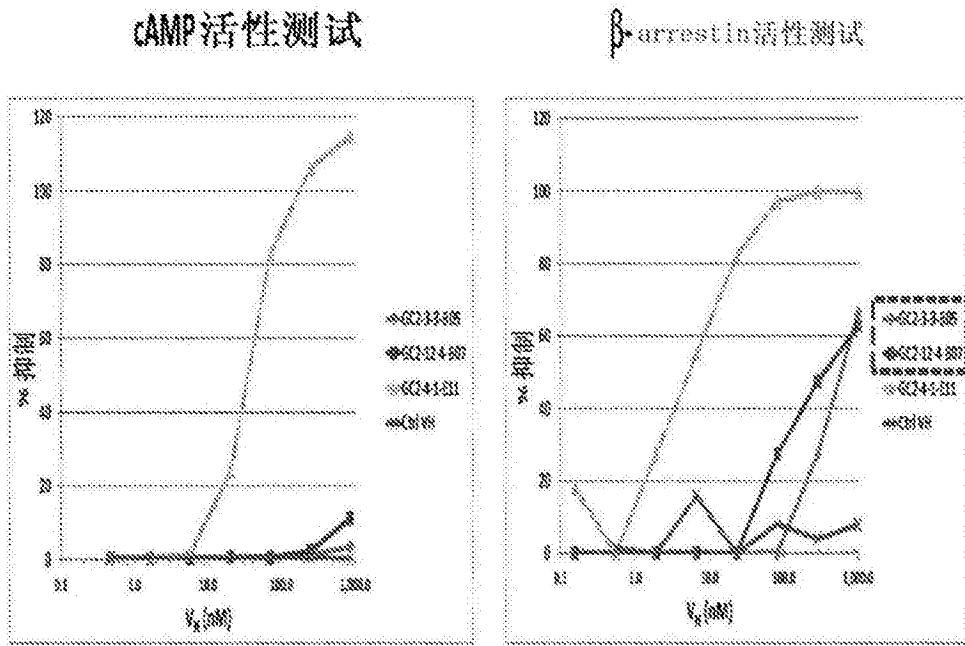
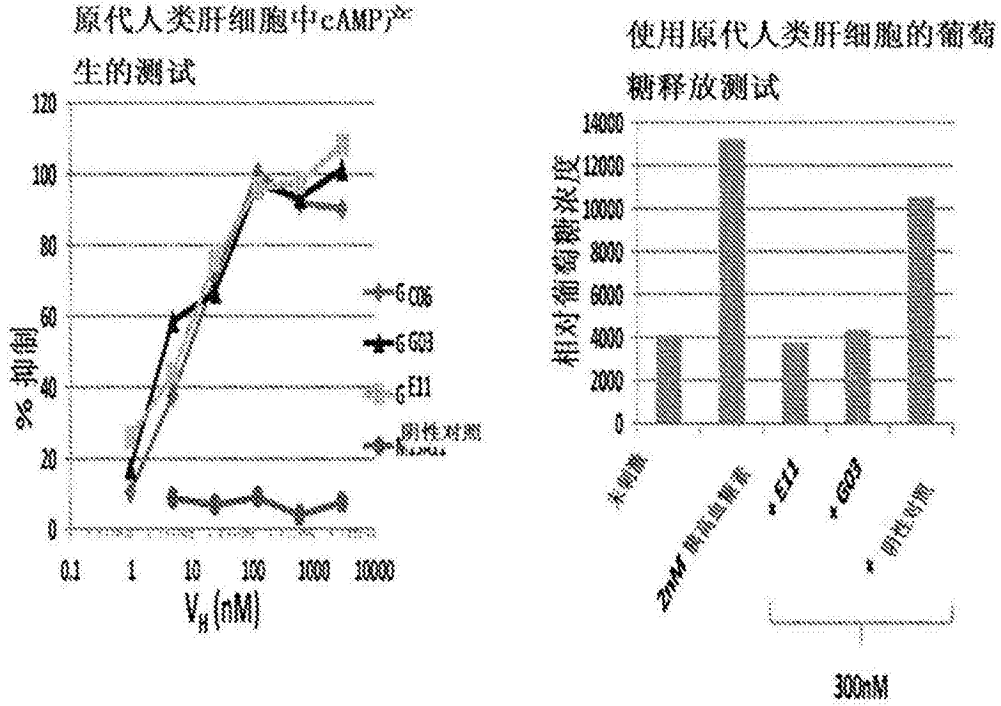


图13

# 原代人类肝细胞中胰高血糖素介导的活性的抑制



在X-BODY 抗-GPCR V<sub>2S</sub> 缺失或存在下, 使用20nM胰高血糖素刺激原代人类肝细胞

多种GPCR V<sub>2S</sub> 抑制人类肝细胞中胰高血糖素刺激的cAMP产生和葡萄糖释放

图14

# 功能选择产生多种抗体

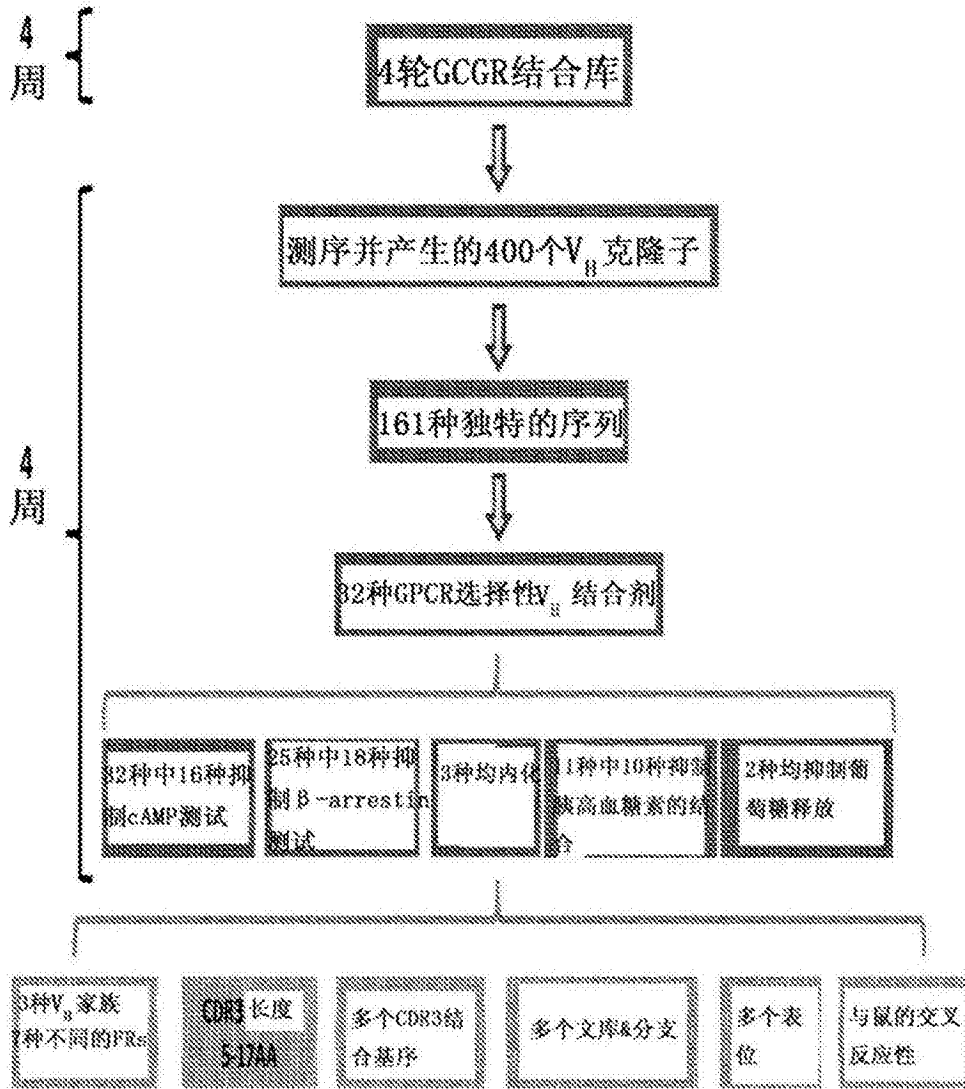
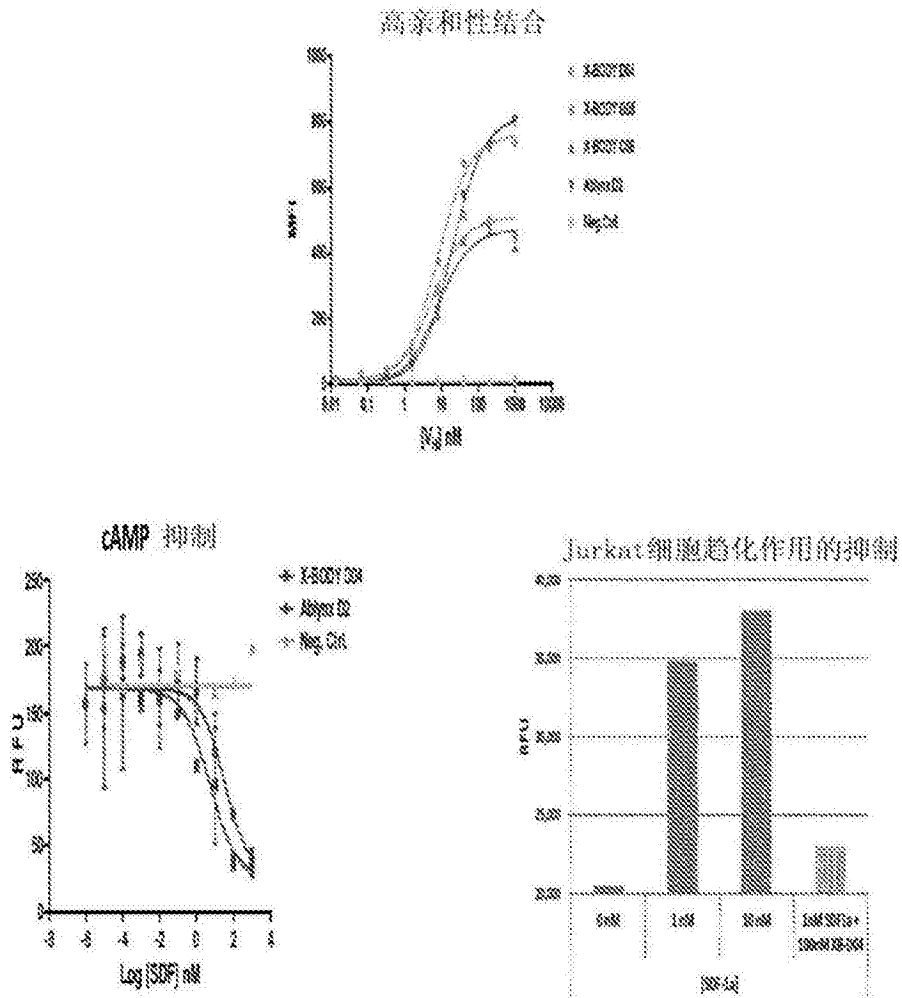


图15

由活细胞选择分离的高亲和性CXCR4拮抗剂



- \* 针对CXCR4 (一种A类GPCR) 实施的活细胞选择
- \* 个体V<sub>6</sub>克隆子以与Ablynx D2 V<sub>6</sub>相比改善的亲亲和性结合 CXCR4/HEK293细胞
- \* X-BOYD V<sub>6</sub>抑制CXCR4/HEK293细胞的cAMP信号通路和Jurkat 细胞的趋化作用

图16

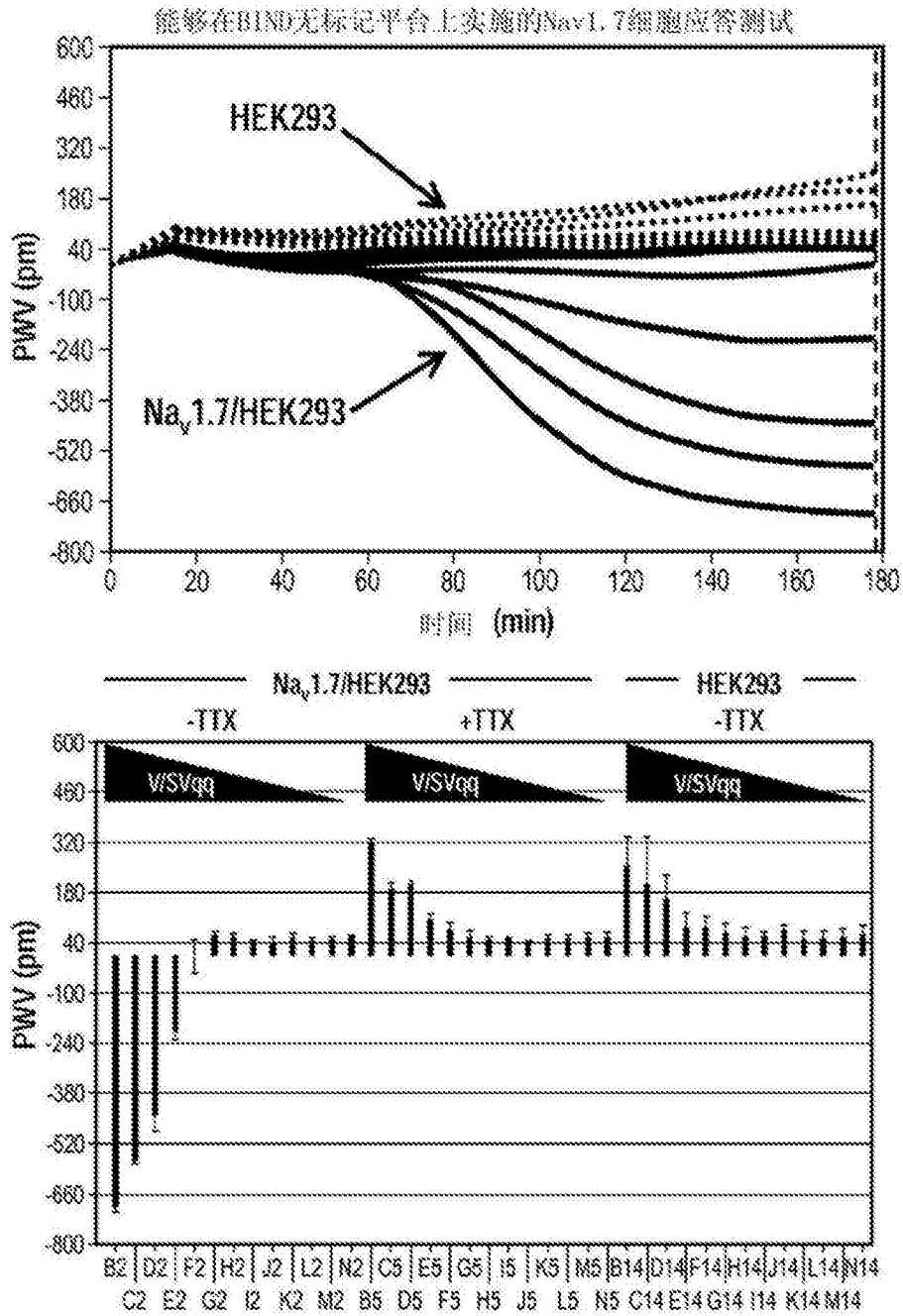


图17

结合疾病特异性表位的抗体的鉴定

目的：鉴定选择性结合原代人疾病病细胞（类型“A”）但不结合密切相关细胞的抗体

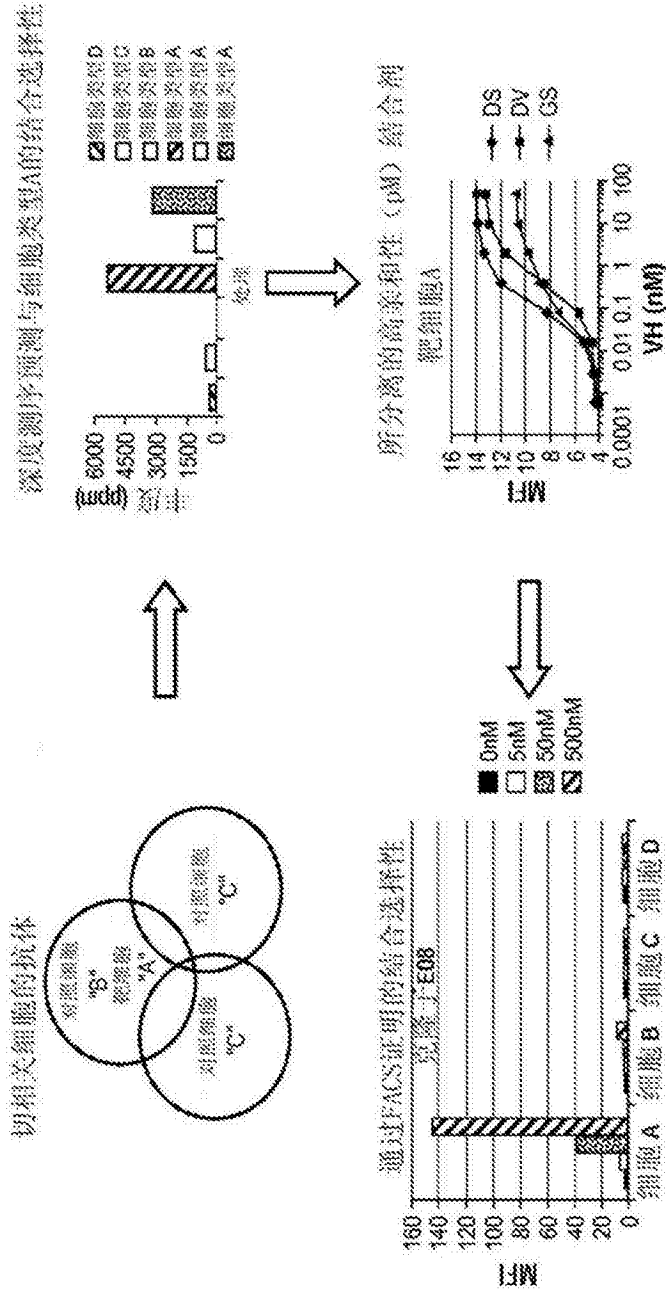


图18

专利名称(译)	用于生成对抗细胞表面抗原的结合剂的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN105705947A</a>	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201480052177.4	申请日	2014-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	X博迪公司		
申请(专利权)人(译)	X博迪公司		
当前申请(专利权)人(译)	X博迪公司		
[标]发明人	陈艳 S·沙玛		
发明人	陈艳 S·沙玛		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C07K16/2869 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/77 C12N15/1037 C12N15/1093 G01N2500/04 G01N2500/10 C07K2317/60 C40B30/04		
代理人(译)	陈文平 侯宝光		
优先权	61/881203 2013-09-23 US		
其他公开文献	CN105705947B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于识别结合多肽(例如抗体或其抗原结合片段)的方法和组合物,其中所述的结合多肽特异性地结合细胞表面抗原。本发明的方法总体而言包括将结合多肽的多样的核酸展示文库与细胞外部表面上的细胞表面抗原接触;以及由所述的文库分离至少一种文库的成员,该成员特异性地结合所述的外部表面上的细胞表面抗原。本发明还提供了用于本发明的方法中的新的核酸展示文库(例如DNA展示文库)。

