



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105793705 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201480052115.3

(22)申请日 2014.09.26

(30)优先权数据

61/884,348 2013.09.30 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/US2014/057672 2014.09.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/048413 EN 2015.04.02

(71)申请人 X博迪公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 理查德·W·瓦格纳

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C07K 14/78(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

抗原受体的筛选测试

(57)摘要

本发明提供了用于识别特异性地结合所关注的抗原的抗原受体(例如抗体)的方法。总体而言,本方法涉及将多个表达抗原受体的细胞与所关注的抗原接触;测量在表达抗原受体的细胞的表面上激活的粘附分子的水平;以及由多个表达抗原受体的细胞识别在细胞的表面上激活的粘附分子的量增加的、表达抗原受体的细胞。

1. 一种用于识别特异性地结合所关注的抗原的抗原受体的方法,该方法包括:
 - (a)将多个表达抗原受体的细胞与抗原结合;
 - (b)在所述的抗原存在和缺乏下,在所述的表达抗原受体的细胞的表面上测量激活的粘附分子的量;以及
 - (c)由多个所述的表达抗原受体的细胞识别特异性地结合所述的抗原的所述的表达抗原受体的细胞,其中在所述的抗原存在下,在所述的表达抗原受体的细胞的表面上,激活的粘附分子的量相对于合适的对照增多,表明所述的抗原与所述的表达抗原受体的细胞结合,由此识别特异性地结合所述的所关注的抗原的抗原受体。
2. 权利要求1所述的方法,其进一步包括无性分离在所述的步骤(c)中识别的所述的表达抗原受体的细胞。
3. 权利要求1所述的方法,其进一步包括测定在所述的步骤(c)中识别的所述的抗原受体的至少一部分的核酸或氨基酸序列。
4. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的粘附分子为整合素。
5. 权利要求4所述的方法,其中所述的整合素为白细胞功能抗原1(LFA-1)或Very Late 抗原4(VLA-4)分子。
6. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中通过测量所述的表达抗原受体的细胞与细胞外基质蛋白质或抗体的结合来测量所述的激活的粘附分子的量,其中所述的细胞外基质蛋白质或抗体与所述的激活的粘附分子结合但是不能与静止的粘附分子结合。
7. 权利要求5所述的方法,其中所述的细胞外基质蛋白质为细胞间粘附分子1(ICAM-1)或纤连蛋白分子。
8. 权利要求6或7所述的方法,其中使用涂敷所述的细胞外基质蛋白质或所述的抗体的无标记生物传感器来测量所述的表达抗原受体的细胞与所述的细胞外机制蛋白质或所述的抗体的结合。
9. 权利要求8所述的方法,其中所述的生物传感器为比色共振反射光学生物传感器。
10. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的抗原受体为B细胞受体。
11. 权利要求10所述的方法,其中所述的B细胞受体为人类B细胞受体。
12. 上述权利要求的任意一项所述的方法,其中所述的表达抗原受体的细胞为B细胞或杂交瘤细胞。
13. 权利要求12所述的方法,其中所述的B细胞是由一种或多种天然动物分离的。
14. 权利要求12所述的方法,其中所述的B细胞是由一种或多种天然动物分离的,其中所述的动物未使用所述的所关注的抗原进行免疫攻击。
15. 权利要求13或14所述的方法,其中所述的动物为人类。
16. 权利要求12所述的方法,其中所述的B细胞经过永生生化。
17. 权利要求12所述的方法,其中所述的B细胞表达内源抗体。
18. 权利要求12所述的方法,其中所述的B细胞表达异源抗体的文库。
19. 权利要求18所述的方法,其中所述的文库包含独特的抗体的天然谱系。
20. 权利要求19所述的方法,其中所述的文库为天然抗体的文库。
21. 权利要求18所述的方法,其中所述的文库包含人类抗体。
22. 权利要求18所述的方法,其中所述的文库包含多个独特的合成的抗原受体。

23. 权利要求12所述的方法,其中所述的B细胞表达独特的嵌合抗原受体的文库,其中各个嵌合受体包含与异源结合分子连接的抗原受体的一部分。

24. 一种用于制备特异性地结合所关注的抗原的抗原受体的方法,该方法包括:

(a)根据上述权利要求的任意一项所述的方法,识别抗原受体;以及

(b)表达所述的抗原受体或其抗原结合部分。

25. 权利要求24所述的方法,其中所述的抗原受体为抗体。

26. 权利要求25所述的方法,其进一步包括测定所述的抗体的至少一个互补性决定区(CDR)的核酸或氨基酸序列。

27. 权利要求26所述的方法,其进一步包括将所述的至少一个CDR接枝到异源抗体的构架中。

抗原受体的筛选测试

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求2013年9月30日提交的美国临时专利申请No. 61/884,348的优先权,该申请的内容以引用方式全文并入本文。

[0003] 发明概述

[0004] 本发明提供了用于识别特异性结合所关注的抗原的抗原受体(例如抗体)的方法。本发明至少部分基于以下发现:抗原与表达抗原受体的细胞(例如B细胞)表面上的同源抗原受体结合使得该细胞表面上的粘附分子(例如整合素)被激活。这些激活的粘附分子可以容易地检测(例如使用无标记测试系统),因此起到识别表达抗原受体的细胞的作用,其中所述的细胞包含特异性地结合所关注的抗体的抗原受体。本发明的方法特别用于识别特异性地结合所关注的抗原的表达抗体的细胞(和其中表达的抗体)。

[0005] 因此,在一个方面中,本发明提供了用于识别特异性地结合所关注的抗原的抗原受体的方法,该方法包括:将多个表达抗原受体的细胞与抗原接触;在抗原存在和缺乏下,测量在表达抗原受体的细胞的表面上激活的粘附分子的量;以及由多个表达抗原受体的细胞识别特异性地结合抗原的表达抗原受体的细胞,其中在抗原存在下,在表达抗原受体的细胞的表面上,激活的粘附分子的量增相对于合适的对照增多表明抗原与表达抗原受体的细胞结合,由此识别特异性地结合所关注的抗原的抗原受体。

[0006] 在某些实施方案中,所述的方法进一步包括无性分离所识别的表达抗原受体的细胞。

[0007] 在其他的实施方案中,所述的方法进一步包括测定所识别的抗原受体的至少一部分的核酸或氨基酸序列。

[0008] 在某些实施方案中,粘附分子为整合素。合适的整合素包括但不限于白细胞功能抗原1(LFA-1)或Very Late抗原4(VLA-4)分子。

[0009] 在某些实施方案中,激活的粘附分子的量是通过测量表达抗原受体的细胞与细胞外基质蛋白质的结合来测量的,其中所述的细胞外基质蛋白或抗体与激活的粘附分子结合,但是不与静止粘附分子结合。合适的细胞外基质蛋白质包括但不限于Inter-Cellular Adhesion Molecule 1(ICAM-1)或纤连蛋白分子。

[0010] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞与细胞外基质蛋白或抗体的结合是使用涂敷细胞外基质蛋白或抗体的无标记生物传感器测量的。在特定的实施方案中,生物传感器为比色共振反射生物传感器。

[0011] 在某些实施方案中,抗原受体为B细胞受体(例如人类B细胞受体)。

[0012] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞为B细胞(例如人类B细胞)或杂交瘤细胞。在特定的实施方案中,B细胞是由一个或多个自然动物(例如人类)分离的。在另一个特定的实施方案中,B细胞是由未使用所关注的抗原进行免疫攻击的一种或多种动物(例如人类)分离的。

[0013] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞(例如B细胞)被永生化的。

[0014] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞(例如B细胞)表达内源抗原。

[0015] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞(例如B细胞)表达异源抗原的问题。在特定的实施方案中,所述的文库包含独特抗体(例如人类抗体)的天然谱系(repertoire)。在另一个特定的实施方案中,所述的文库为天然抗体文库。在另一个特定的实施方案中,所述的文库包含多个独特的合成的抗原受体。

[0016] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞(例如B细胞)表达独特的嵌合抗原受体的文库,其中各个嵌合受体包含与异源结合分子连接的抗原受体(例如抗体)的一部分。

[0017] 在另一个方面中,本发明提供了用于生产特异性地结合所关注的抗原的抗原受体(例如抗体,例如人类抗体)的方法,该方法包括:根据上述权利要求的任意一项所述的方法识别抗原受体;以及表达抗原受体或其抗原结合部分。

[0018] 在某些实施方案中,所述的方法进一步包括测定抗体的至少一个互补性决定区(CDR)的核酸或氨基酸序列。在特定的实施方案中,所述的方法进一步包括将至少一个CDR接枝到异源抗体的构架中。

[0019] 附图简述

[0020] 图1描绘了连接B细胞受体激活至整合素激活的“内-外”信号传递途径的示意图。

[0021] 图2描绘了无标记生物传感器测试的结果,其中所述的测试测量了响应于B细胞受体的激活的、B细胞与细胞外基质蛋白质的结合。

[0022] 发明详述

[0023] 本发明提供了用于识别特异性地结合所关注的抗体的抗原受体的方法。本发明的方法总体而言涉及将多个表达抗原受体的细胞与所关注的抗原结合;测量在表达抗原受体的细胞的表面上激活的粘附分子的量;以及由多个表达抗原受体的细胞识别表达抗原受体的细胞,该细胞展现出细胞表面上的激活的粘附分子的量增多。

[0024] I. 定义

[0025] 如本文所用,术语“抗原受体”是指B细胞受体的膜结合的抗体成分(即,膜结合的抗体)或T细胞受体的链或链成分。所述的术语还涵盖嵌合抗原受体,其中B细胞或T细胞受体的一部分已经被异源结合分子替代。

[0026] 如本文所用,术语“抗体”是指IgG, IgM, IgA, IgD或IgE,或者其抗原结合片段(例如VH和/或VL),与其是由自天然产生抗体的任何物种衍生的还是由重组DNA技术创建的无关。

[0027] 如本文所用,术语“抗原”是指被抗原受体识别的分子。

[0028] 如本文所用,术语“粘附分子”是指介导细胞-细胞或细胞-细胞外基质结合的细胞表面蛋白质。“激活的”粘附分子为采用三级结构构造的粘附分子,其中所述的三级结构构造允许与同源结合伴侣结合。“静止的”粘附分子为采用三级结构构造的粘附分子,其中所述的三级结构构造阻止与同源结合伴侣的结合。

[0029] 如本文所用,术语“合适的对照”是指用于识别细胞表面上激活的粘附分子的量增多的任何样品或参照值。合适的对照样品包括但不限于缺乏所关注的抗原的细胞。合适的参照值包括但不限于在缺乏所关注的抗原下,在细胞的表面上发现的激活的粘附分子的平均量。

[0030] 如本文所用,术语“与……特异性地结合”或“特异性地结合”是指抗原受体与抗原的结合的亲合性为至少大约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$, $1 \times 10^{-8} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$, $1 \times 10^{-10} \text{M}$, $1 \times 10^{-11} \text{M}$, $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 或更高、和/或抗原受体与靶物的结合的亲合性比非特异性抗原的亲合性高至少2倍以上的

能力。

[0031] 如本文所用,术语“免疫攻击”是指动物在抗原下的暴露和免疫应答。

[0032] 如本文所用,术语“天然动物”是指未被所关注的抗原免疫攻击的动物。

[0033] 如本文所用,术语“抗原受体的天然谱系”是指在动物的免疫细胞中天然表达的抗原受体的谱系。

[0034] 如本文所用,术语“合成的抗原受体”是指非天然形成的抗原受体。

[0035] II. 抗原受体

[0036] 本发明的方法用于识别特异性地结合所关注的抗原的抗原受体。当与抗原结合时可以引起细胞表面粘附分子的激活的任何细胞表面抗原受体可以用于本发明的方法中。

[0037] 在某些实施方案中,抗原受体包含B细胞受体的膜结合抗体成分。能够在细胞的表面上展示并且当与抗原结合时可以引起细胞表面粘附分子的激活的任何抗体可以用于本发明的方法中。抗体可以得自产生抗体的任何动物,包括但不限于啮齿动物、兔类动物、鸟类动物、骆驼、鲨鱼或灵长动物(例如人类)。抗体可以为任何同种型,包括但不限于IgA, IgE, IgM, IgG和IgD。抗体可以是人工的,天然衍生的或它们的组合。在优选的实施方案中,抗原受体为完整的人类抗体。

[0038] 在某些实施方案中,抗原受体包含T细胞受体的 $\alpha\beta$ 或 $\beta\gamma$ 链。能够在细胞表面上展示并且当与抗原结合时可以引起细胞表面粘附分子的激活的任何T细胞抗体可以用于本发明的方法中。T细胞受体可以得自具有T细胞的任何动物,包括但不限于啮齿动物、兔类动物、鸟类动物、骆驼、鲨鱼或灵长动物(例如人类)。T细胞受体可以是人工的,天然衍生的或它们的组合。在优选的实施方案中,抗原受体为完整的人类T细胞受体。

[0039] 在其他的实施方案中,抗原受体为嵌合分子,其包含与异源结合分子连接(化学方式或遗传方式)的抗原受体(B细胞和/或T细胞受体)的至少一部分。合适的异源结合分子包括但不限于抗体片段或衍生物,以及备选的结合支架分子。

[0040] 合适的抗体片段或衍生物包括但不限于单一结构域抗体(例如参见Ward et al., Nature 341:544(1989),该文献以引用方式全部并入本文),Fab片段,单链抗体(例如参见Bird et al.(1988)Science 242:423-426,该文献以引用方式全部并入本文),单价抗体(例如参见W02007/059782,该文献以引用方式全部并入本文),只有重链的抗体,和纳米抗体(例如参见美国专利No.5,759,808,该文献以引用方式全部并入本文)。

[0041] 合适的备选结合支架分子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,该文献以引用方式全部并入本文),DARPin(例如参见Stumpp et al.(2008)Drug Discov.Today 13(15-16):695-701,该文献以引用方式全部并入本文),蛋白质A的Z结构域(参见Nygren et al.(2008)FEBS J.275(11):2668-76,该文献以引用方式全部并入本文),载脂蛋白(例如参见Skerra et al.(2008)FEBS J.275(11):2677-83,该文献以引用方式全部并入本文),Affilins(例如参见Krehenbrink et al.(2008).J.Mol.Biol.383(5):1058-68,该文献以引用方式全部并入本文),Avimers(例如参见Silverman et al.(2005)Nat.Biotechnol.23(12):1556-61,该文献以引用方式全部并入本文),Fynomers(例如参见Grabulovski et al.(2007)J Biol Chem 282(5):3196-3204,该文献以引用方式全部并入本文),以及Kunitz结构域的肽(例如参见Nixon et al.(2006)Curr Opin Drug Discov Devel 9(2):261-8,该文献以引用方式全部并入本文)。

[0042] 在某些实施方案中,本发明使用了编码多个独特的抗原受体(例如B细胞受体)的核酸文库。所述的文库可以包含抗原受体(例如在一种或多种脊椎动物中正常表达的抗原受体的一部分)和/或多个合成的抗原受体(即,通常在脊椎动物中不表达的抗原受体)的天然谱系。在优选的实施方案中,所述的文库包含由一个或多个人类受试对象的B细胞分离的完整的人类抗原受体的谱系。用于生成抗原受体文库的方法是本领域公知的(例如参见在美国专利No.6,291,159中列出的方法,该文献以引用方式全部并入本文)。

[0043] III. 表达抗原受体的细胞

[0044] 表达细胞表面抗原受体的任何细胞都适用于本发明的方法中,前提条件是细胞表面抗体受体与同源抗原的结合使得细胞表面上的粘附分子激活。适用于本发明的细胞包括但不限于正常的原代细胞(例如分离的B细胞)、肿瘤细胞(例如淋巴瘤细胞)、杂交瘤或永生化的原代细胞。

[0045] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞为脊椎动物的细胞,包括但不限于灵长动物(例如人类)、啮齿动物、兔类动物、小鸡和骆驼细胞。脊椎动物细胞可以衍生自任何脊椎动物的器官,但是优选地衍生自白细胞(例如淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞)。在特定的实施方案中,脊椎动物细胞为B细胞系的淋巴细胞。由于这些细胞表达了抗体特异性的伴侣蛋白质和辅助分子(其介导了B细胞受体的抗体成分的细胞表面表达),所以它们特别适用于B细胞受体的表达。B细胞可以由天然动物(即,未使用所关注的抗原攻击的动物)或者由事先使用所关注的抗原攻击的动物分离。在优选的实施方案中,B细胞由事先使用所关注的抗原攻击的人类分离。由于该方法允许识别完整的人类抗原特异性抗体,所以其是特别有用的。

[0046] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞为通过将白细胞(例如B细胞)与骨髓瘤细胞融合而形成的杂交瘤细胞。用于形成杂交瘤细胞的方法是本领域公知的。例如参见WO 90/13660,其描述了通过将人类B细胞与异源骨髓瘤细胞融合而产生人类杂交瘤细胞,并且所述的文献以引用方式全文并入本文。

[0047] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞为永生化的原代细胞。细胞永生化的任何方法可以用于本发明的方法中,包括但不限于Epstein-Barr Virus(EBV)转化(例如参见WO 04/76677,该文献以引用方式全文并入本文),或者抑制凋亡的基因(例如bcI-6和/或bcI-xI)的异源表达(例如参见Kwakkenbos, et al., (2010) Nature Medicine 16(1)123-129,该文献以引用方式全文并入本文)。这种永生化的特别用于其中细胞响应于抗原结合而发生凋亡的情况,这是天然B细胞发生的情况。

[0048] 在某些实施方案中,表达抗原受体的细胞表达内源抗原受体(即,通常是由所述的细胞表达的抗原受体)。在其他的实施方案中,细胞表达一种或多种异源抗原受体(多种)(即,通常不是所述的细胞表达的抗原受体)。用于取得这种异源表达的方法在本领域中是常规的(例如参见在例如Antibody Engineering: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology Volume 248, (B.K.C.Lo, Ed) Humana Press, 2004 (ISBN: 1-58829-092-1)中列出的方法,该文献以引用方式全文并入本文)。

[0049] 表达抗原受体的细胞还可以用于本发明的方法中,其中所述的细胞不会天然地表达响应于抗原与细胞表面抗原受体的结合而引起粘附分子激活所必需的细胞成分(例如细胞内信号传递分子、抗原受体的成分和粘附分子)。在这种情况下,必需异源表达细胞中缺

失的蛋白质,从而促进抗原介导的粘附分子的激活。在一个特定的实施方案中,表达抗原受体的细胞异源表达抗原受体的成分。示例性抗原受体成分包括但不限于B细胞受体的Ig α 和/或Ig β 成分。

[0050] 在某些实施方案中,使用表达抗原受体的细胞的群体,其中所述的群体表达抗原受体(例如B细胞受体)的多样的文库。表达抗原受体的细胞的群体可以由脊椎动物分离。备选地,可以通过引入编码异源抗原受体(例如B细胞受体)的多样文库的核酸(例如以表达载体的形式)来生成表达抗原受体的细胞的群体。多样文库可以包含抗原受体(例如通常在一种或多种脊椎动物中表达的抗原受体的一部分)的天然谱系和/或多个独特的合成的抗原受体(即,通常在脊椎动物中不表达抗原受体)。在优选的实施方案中,表达抗原受体的细胞的群体表达完整的人类抗原受体的多样的文库。用于生成抗原受体文库的方法是本领域公知的(例如参见在美国专利No.6,291,159中列出的方法,该文献以引用方式全文并入本文)。

[0051] IV. 抗原和抗原递呈

[0052] 任何抗原都适用于本发明的方法中,包括但不限于多肽、碳水化合物、脂质和小分子抗原。但是,技术人员将理解的是将抗原递呈给表达抗原受体的细胞的方法将根据所表达的抗原受体的类型而改变。

[0053] 在表达B细胞受体的细胞中,抗原可以与表达抗原受体的细胞直接接触。抗原可以以可溶的形式加入至包含表达抗原受体的细胞的细胞培养基或缓冲液中。此外或备选地,抗原可以粘附于基底(例如光学生物传感器)上,在该基底上设置有表达抗原受体的细胞。

[0054] 在表达T细胞受体($\alpha\beta$ 和/或 $\beta\gamma$)的细胞中,必须将抗原以短肽与MHC分子形成复合物的形式递呈给细胞。分离的MHC/肽复合物可以以可溶的形式加入至包含表达抗原受体的细胞的细胞培养基中。此外或备选地,分离的MHC/肽复合物可以粘附在基底(例如光学传感器)上,在该基底上,设置有表达抗原受体的细胞。此外或备选地,抗原可以在细胞(例如树突状细胞)的表面上形成MHC/肽复合物的形式递呈给表达T细胞受体的细胞。将肽抗原展示给表达T细胞受体的细胞的方法是本领域公知的(例如参见W01992007952,该文献以引用方式全文并入本文)。

[0055] V. 粘附分子

[0056] 在抗原与细胞表面的抗原受体结合时将被激活的任何细胞表面表达的粘附分子都适用于本发明的方法中的测量。合适的粘附分子包括但不限于整合素、钙粘蛋白和选择蛋白。

[0057] 整合素的激活特别适用于本发明的方法的测量中。在未刺激的免疫细胞的表面上的整合素分子以无活性的构造存在,并且不能与细胞外基质蛋白质结合。抗原与免疫细胞上的抗原受体的结合导致细胞表面的整合素被激活,使得它们现在可以结合细胞外基质蛋白质(就整合素激活的讨论,例如参见Arana et al.(2008)J.CeII.Sci.121(14):2279-2286,该文献以引用方式全文并入本文)。示例性的整合素包括白细胞功能抗原1(LFA-1)和Very Late抗原4(VLA-4)。示例性的LFA-1分子包括人类LFA-1,其包含在genbank登录号GI:167466217和GI:188595677中列出的2个亚基;和小鼠LFA-1,其包含在genbank登录号GI:198786和GI:111607447中列出的2个亚基。示例性的VLA-4分子包括人类VLA-4,其包含在genbank登录号GI:119631392和GI:19743819中列出的2个亚基;和小鼠VLA-4,其包含在

genbank登录号GI:114326554和GI:45504394中列出的2个亚基。

[0058] 在某些实施方案中,待测量的粘附分子为内源粘附分子(即,通常在待测试的表达抗原受体的细胞中表达的分子)。在其他的实施方案中,待测量的粘附分子或其成分在待测试的表达抗原受体的细胞中是异源表达的。

[0059] VI. 粘附分子激活的测量

[0060] 在抗原与细胞表面抗原受体结合时测量细胞表面粘附分子的激活的任何方法均适用于本发明的方法中,通常,通过测量表达抗原受体的细胞与一种或多种细胞外基质蛋白质的结合来检测细胞表面粘附分子的激活。此外或备选地,可以使用抗原来检测激活的细胞表面的粘附分子,其中所述的抗原与激活状态的粘附分子结合,但是不与无活性状态的粘附分子结合。

[0061] 在某些实施方案中,使用无标记的结合测试来检测细胞表面粘附分子的激活。这种测试通常包括使生物传感器上的细胞外基质蛋白质永生,以及在抗原存在和缺乏下,测量表达抗原受体的细胞与生物传感器的结合。在抗原存在下,表达抗原受体的细胞与生物传感器的结合的增加表明表达抗原受体的细胞与抗原结合。

[0062] 在优选的实施方案中,使用比色共振反射光学生物传感器来检测细胞表面粘附分子的激活。合适的比色共振反射光学生物传感器及其使用方法在美国专利申请No.2004/0091397,20100196925,20100221847,20100202923,20070172894,20100291575中公开,这些文献以引用方式全文并入本文。

[0063] 与抗原激活的粘附分子结合的任何细胞外基质蛋白质都可以用于无标记的结合测定中。合适的细胞外基质蛋白质包括但不限于细胞间粘附分子1(ICAM-1)和纤连蛋白。示例性的ICAM-1分子包括在genbank登录号GI:825682中列出的人类ICAM-1和在genbank登录号GI:124099中列出的小鼠ICAM-1。示例性的纤连蛋白分子包括在genbank登录号GI:300669710中列出的人类纤连蛋白和在genbank登录号GI:1181242中列出的小鼠纤连蛋白。

[0064] 在无标记的结合测定中,一种或多种细胞外基质蛋白质(多种)用于生物传感器的表面上。细胞基质蛋白质可以均匀地施加在生物传感器的表面上,或者可以以分离的斑点排列。细胞外基质蛋白质可以单独地施加在生物传感器上,或者与所关注的抗原一起施加在生物传感器上。

[0065] 在某些实施方案中,使用荧光激活细胞分选仪(FACS)来检测细胞表面粘附分子的激活。此类测定通常包括:将表达抗原受体的细胞与抗体接触,其中所述的抗体与激活状态的细胞表面粘附分子结合,但是不与无活性状态的细胞表面粘附分子结合;以及使用FACS,在抗原存在和缺乏下,检测抗原与表达抗原受体的细胞的结合。在抗原存在下,抗体与表达抗原受体的细胞结合表明表达抗原受体的细胞与抗原结合。

[0066] VII. 抗原特异性抗原受体的分离

[0067] 一旦识别与所关注的抗原结合的表达抗原受体的细胞(即,抗原结合细胞),便测定该细胞表达的抗原受体的氨基酸序列。用于测定抗原受体的氨基酸序列的任何本领域公认的手段都可以用于本发明的方法中。通常,无性分离抗原结合细胞,并分离和测序编码表达的抗原受体的核酸。

[0068] 在某些实施方案中,使用细胞挑取器装置由细胞群体无性分离抗原结合细胞。合适的细胞挑取器装置包括但不限于在美国专利申请No.20030179916中列出的那些,该文献

以引用方式全文并入本文。

[0069] 在其他的实施方案中,抗原结合细胞可以通过在多孔平板中限制稀释而由细胞群体分离。

[0070] 在其他的实施方案中,使用FACS机器和特异性地结合抗原结合细胞的分类标记由细胞的群体分离抗原结合细胞。在一些实施方案中,分类标记为荧光标记的抗体,其特异性地结合抗原结合细胞上激活的细胞表面粘附分子。在其他的实施方案中,分类标记为所关注的荧光标记的抗原。

[0071] 此外或备选地,可以根据抗原结合细胞结合底物的能力将抗原结合细胞与非抗原结合细胞的群体分离,其中所述的底物包括所关注的细胞外基质蛋白质和/或抗原。

[0072] 可以使用本领域公认的手段由抗原结合细胞分离编码表达的抗原受体的核酸,包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)扩增,其使用对抗原受体基因的保守区具有特异性的核酸引物。可以使用任何本领域公认的方法来测序编码表达的抗原受体的分离的核酸(并推断编码的氨基酸序列)。

[0073] 一旦分离编码抗原受体(其特异性地结合所关注的抗原)的核酸,其便可以在体外(例如在细胞或无细胞的表达系统中)或体内(例如在转基因动物中)异源表达。

实施例

[0074] 通过以下实施例进一步说明本发明,所述的实施例不应该解释为是进一步的限定。

[0075] 实施例1

[0076] 本实施例证明可以使用BIND™扫描仪,使用比色共振反射光学生物传感器检测在B细胞的表面上,B细胞受体介导的、整合素LFA-1的激活。在室温下,使用浓度为1μg/ml的细胞间粘附分子1(ICAM-1)蛋白质将96孔BIND™ TiO₂生物传感器平板涂敷1小时。还使用牛血清白蛋白(BSA)封闭生物传感器。然后,将B细胞淋巴细胞(得自ATCC的RL系)以40,000个细胞/孔放置在ICAM-1涂敷的BIND生物传感器上,并在完全生长培养基中生长。在室温下,将生物素化的山羊抗人IgM抗体F(ab)₂片段与中性链亲和素(neutravidin)温育30min至1小时,从而允许F(ab)₂片段多聚化。然后,将多聚化的IgM抗体片段加入至B细胞淋巴瘤细胞培养物中,从而交联细胞表面的B细胞受体。在室温下,在3.75μm分辨率下使用BIND™扫描仪将生物传感器扫描15个小时来评估细胞与生物传感器的结合(每10分钟取样)。图2中列出的数据显示B细胞受体交联使得B相比与生物传感器的结合增加,因此,B细胞受体的激活使得可以检测到细胞表面上LFA-1的激活。

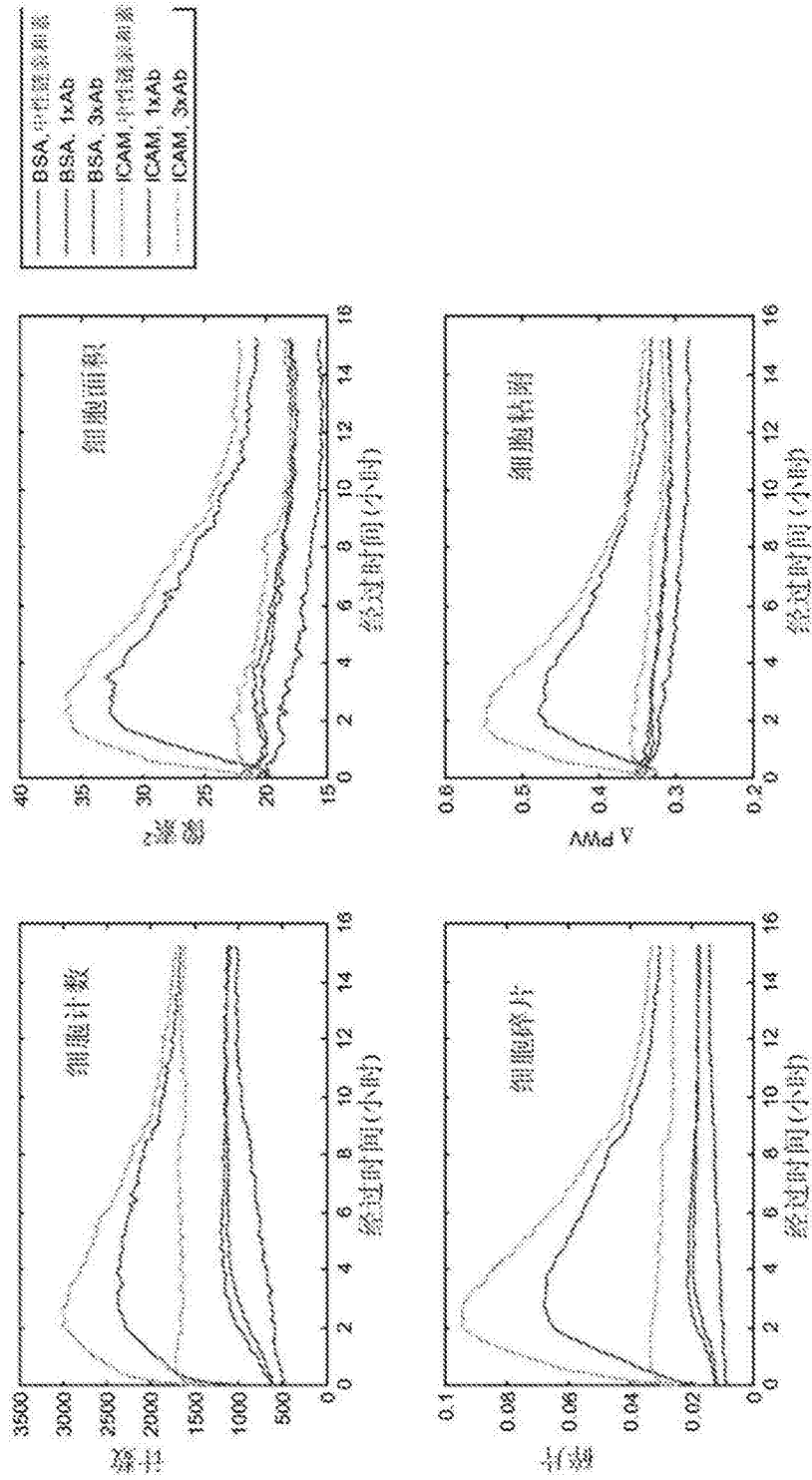


图2

专利名称(译)	抗原受体的筛选测试		
公开(公告)号	CN105793705A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201480052115.3	申请日	2014-09-26
[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	理查德W瓦格纳		
发明人	理查德·W·瓦格纳		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/53 C07K14/78		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N2333/70525 G01N2333/70546 G01N2500/04 G01N2500/10 C07K16/2821 C07K16/2845 C07K2317/21 C07K2317/54 C07K2317/565 C07K2317/567 G01N21/78 G01N33/6845 G01N2021/7773 G01N2333/70553		
代理人(译)	洪欣		
优先权	61/884348 2013-09-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于识别特异性地结合所关注的抗原的抗原受体(例如抗体)的方法。总体而言,本方法涉及将多个表达抗原受体的细胞与所关注的抗原接触;测量在表达抗原受体的细胞的表面上激活的粘附分子的水平;以及由多个表达抗原受体的细胞识别在细胞的表面上激活的粘附分子的量增加的、表达抗原受体的细胞。

