



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110382548 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201880016352.2

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

1704115.3 2017.03.15 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2018/050645 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/167481 EN 2018.09.20

(71)申请人 牛津遗传学有限公司

地址 英国牛津郡

(72)发明人 赖安·卡伍德 托马斯·佩恩

理查德·派克-曼纽

(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728

代理人 尹吉伟

(51)Int.Cl.

G07K 16/42(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

G01N 33/566(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图7页

(54)发明名称

选择抗体的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于鉴定与所需靶多肽结合的特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的方法。具体地,所述方法:涉及在哺乳动物细胞群体中表达抗体或抗体模拟物的库,其中所述细胞群体中的每个细胞在所述细胞的外表面上展示所述靶多肽;以及涉及鉴定或分离所述细胞群体内的、抗体或抗体模拟物与其结合的细胞。

1. 一种鉴定产生与靶多肽结合的抗体或抗体模拟物的细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 在哺乳动物细胞群体中表达抗体或抗体模拟物的库,其中每种抗体或抗体模拟物由它在其中产生的细胞分泌,其中所述靶多肽在所述哺乳动物细胞群体中的每个细胞的外表面上展示,并且其中所述靶多肽是整合膜蛋白;以及

(b) 分离所述哺乳动物细胞群体内的、抗体或抗体模拟物与其结合的细胞,其中所述抗体或抗体模拟物与其结合的细胞是产生与所述靶多肽结合的抗体或抗体模拟物的细胞。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述靶多肽在所述细胞群体中的每个细胞内表达,优选地由表达构建体表达。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其另外包括以下步骤:

(c) 对所分离的细胞中编码与所述靶多肽结合的所述抗体或抗体模拟物的(优选地全部或一部分的)多核苷酸序列进行测序。

4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述靶多肽是免疫检查点分子。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物细胞选自由以下组成的组:来自人、小鼠、大鼠、仓鼠、猴、兔、驴、马、羊、牛和猿的任何器官或组织的那些细胞,优选人细胞。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体是scFV抗体。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体模拟物是Affibody、DARPin、Anticalin、Avimer或Versabody,优选地是DARPin。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中使用与所述抗体或抗体模拟物结合的标记的二抗检测所述抗体或抗体模拟物。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法在液体介质中、在半固体介质中、在固体介质中实施,或者所述细胞是完全或部分固定的。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括以下步骤:

(b) 分离所述细胞群体内的、所述抗体或抗体模拟物首先与其结合的细胞。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括以下步骤:

(b) 分离所述哺乳动物细胞群体内的、抗体或抗体模拟物在一时间点之后与其结合的细胞,在所述时间点时,所述抗体或抗体模拟物能够仅与在已分泌所述抗体或抗体模拟物的细胞上展示的靶多肽结合。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(a)另外包括以下特征:

其中所述方法在以连续或不连续方式更换的液体介质中实施。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中实施步骤(a)的所述液体介质的动态粘度在25°C下为至少 10×10^{-4} Pa·s。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中实施步骤(a)的所述液体介质是水凝胶,优选地是海藻酸凝胶。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(a)包括:

(a1) 在哺乳动物细胞群体中表达抗体或抗体模拟物的库,其中每种抗体或模拟物由它在其中产生的细胞分泌,

(a2) 从所述哺乳动物细胞群体中去除抗体或抗体模拟物与其结合的细胞;然后

(a3) 在所述哺乳动物细胞群体中的每个细胞的外表面上诱导所述靶多肽的表达(优选地由诱导型启动子表达)。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述诱导型启动子是包含Tet阻遏蛋白(TetR)能够与其结合的多个Tet操纵子序列的启动子。

17. 一种获得与靶多肽结合的(优选地全部或一部分的)抗体或抗体模拟物的核苷酸序列的方法,所述方法包括如前述权利要求中任一项所限定的方法,并且另外包括对所述细胞中编码所述抗体或抗体模拟物的(优选地全部或一部分的)核酸进行测序的步骤。

18. 一种获得与靶多肽结合的(优选地全部或一部分的)抗体或抗体模拟物的氨基酸序列的方法,所述方法包括如前述权利要求中任一项所限定的方法,并且另外包括纯化所述抗体或抗体模拟物的步骤,以及对(优选地全部或一部分的)所纯化的抗体或抗体模拟物进行测序的步骤。

19. 一种抗体或抗体模拟物,其由通过已如权利要求1至16中任一项所限定的方法鉴定的细胞产生。

20. 一种用于产生哺乳动物细胞群体的方法,所述方法包括以下步骤:

用以下转化第一哺乳动物细胞群体:

(a) 多个第一表达构建体,所述多个第一表达构建体编码可分泌抗体或抗体模拟物的库;和

(b) 第二表达构建体,其编码所需靶多肽,所述靶多肽包含跨膜结构域,

以便产生第二哺乳动物细胞群体,其中所述第二哺乳动物细胞群体中的每个细胞分泌或能够分泌一种或多种抗体或抗体模拟物,并且其中所述第二哺乳动物细胞群体中的每个细胞在所述哺乳动物细胞的外表面上展示或能够展示所述靶多肽。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述靶多肽是整合膜蛋白。

22. 如权利要求20或权利要求21所述的方法,其中所述靶多肽在所述细胞群体中的每个细胞内表达,优选地由表达构建体表达。

23. 如权利要求20至22中任一项所述的方法,其中所述多个第一表达构建体(和/或所述第二表达构建体)通过能够感染所述哺乳动物细胞的病毒(优选地为逆转录病毒,更优选地为慢病毒)递送到所述第一哺乳动物细胞群体。

选择抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于鉴定与所需靶多肽结合的特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的方法。具体地,所述方法:涉及在哺乳动物细胞群体中表达抗体或抗体模拟物的库,其中细胞群体中的每个细胞在细胞外表面上展示靶多肽;以及涉及鉴定或分离细胞群体内、抗体或抗体模拟物与其结合的细胞。

背景技术

[0002] 自从1986年发明了杂交瘤技术,单克隆抗体已经作为强大且多功能的生物治疗剂出现,将靶选择性、功效、良好的生物和递送半衰期与相对简单的大规模制造结合起来。今天,差不多五十种单克隆抗体在美国和欧洲被授权用于医疗用途,并且许多其他抗体正在开发中。它们用于治疗广泛范围的疾病,包括炎症(例如,类风湿关节炎、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎等)、器官移植、哮喘、癌症和白血病、病毒和细菌感染、异常血液凝固和许多其他疾病。

[0003] 在医学方面,单克隆抗体通常是耐受良好的,具有很少的副作用,并且可具有改变生命的医疗益处。然而,对于其医疗潜力的增加认识使得产生对于针对广泛范围的靶的新单克隆抗体的增加的需求。这进而突出了限定单克隆抗体所面临的困难,所述单克隆抗体具有针对挑战性靶、最值得注意的是针对细胞表面上的分子诸如整合膜蛋白的足够功效。这些靶需要在抗体选择期间保留其生理构型,并且这严重限制了可用于产生识别所述靶的单克隆抗体的策略(Jones, M. 等人, Scientific Reports, 6, 26240 (2016))。由于在开发期间许多自我识别抗体的克隆缺失,限定与人类靶结合的天然存在的人类抗体是特别具有挑战性的。

[0004] 由于其需要保持膜缔合以便保留其构型, GPCR一直以来难以产生单克隆抗体。GPCR构成人类中最大的膜蛋白家族,并且负责对于激素和神经递质、光感测、嗅觉和味觉的细胞应答。当前约一半的低分子量药物靶向GPCR;然而,很少有单克隆抗体正处于开发-甚至用于研究-因为它们难以靶向。一个良好的实例是DRD1(多巴胺受体的D1亚型),其调节神经元生长和发育,一些行为应答,并且调控DRD2活性。DRD1失调被认为在精神分裂症、亨廷顿氏病、帕金森氏病、高血压、阿尔茨海默氏病和许多其他疾病中发挥作用。GPCR市场当前估计为16亿美元(<http://www.transparencymarketresearch.com/g-protein-coupled-receptors-market.html>)。在47种被批准的靶向DRD1的药物中,没有一种是单克隆抗体。这说明了使单克隆抗体有效识别呈其天然构型的膜抗原的挑战。

[0005] 癌症检查点抑制剂抗体是当前癌症研究的最令人激动的新方面,其中若干种针对各种靶的药剂已被授权。预测这些抗体的市场在2022年达到惊人的190亿美元(<http://immunecheckpoint-europe.com/partner/sponsorship-opportunities/>)。这些靶共有的一种特征是它们全部是膜抗原(例如, PD1、PDL1、CTLA4等)。

[0006] 抗体展示可用于筛选针对特定靶多肽的抗体。抗体展示的现有技术包括噬菌体展示、酵母展示、哺乳动物展示、核糖体展示、基于顺式活性(CIS)的展示和共价抗体展示

(CAD)。这些技术全部具有相同的限制,因为膜靶多肽(‘诱饵’)在其天然折叠膜结合状态下不被呈递。

[0007] 蛋白质相互作用的高通量筛选的经典方法是噬菌体展示。在此系统中,抗体库与噬菌体外壳蛋白的基因融合。然后将库转化到大肠杆菌宿主菌株中(使用噬粒),从而产生噬菌体颗粒群,每个在其基因组内含有抗体序列,并且自身在其表面上展示蛋白质。首先,用靶向抗原筛选噬菌体库,固定到表面。然后,冲洗掉未结合的噬菌体;回收结合的噬菌体并感染到细菌中,并且随后扩增以用于库富集。正常重复此方法若干次,从而产生逐渐改善对于靶的亲合力的序列。库中噬菌体的蛋白质序列(和出现共有性或同源性的水平)可通过分离个体群落并在适当区域中对其DNA进行测序来确定。

[0008] 其他系统使用相似的理念:例如,Isogenica的专有CIS体外展示技术使用称为RepA的蛋白质与其自己的DNA序列结合,从而允许其充当表型与基因型之间的接头的的能力。此系统的优点在于它有利于在选择步骤之后快速回收编码DNA序列的抗体。然而,此系统的显著缺点是诱饵蛋白必须在体外选择步骤期间固定到固体载体。这阻碍了某些蛋白质(诸如大的多通道膜蛋白)的靶向。

[0009] 细胞表面展示是通过将抗体蛋白与细胞的暴露于细胞外环境的功能组件融合进行的抗体蛋白在活细胞表面上的表达。细胞表面展示的原理与噬菌体展示类似,其中重组抗体锚固到细胞表面并且编码DNA驻留在细胞内。细胞表面展示的一个优点是细胞足够大来通过流式细胞术进行筛选。相比于非细胞方法,将用荧光团标记的抗原在溶液中与细胞展示抗体库一起孵育,并且然后通过荧光激活的细胞分选(FACS)分离任何抗原结合细胞。已经开发了用于与细菌、酵母和哺乳动物细胞一起使用的展示策略。使用哺乳动物细胞的优点是其能够以高保真性以及甚至以适当的翻译后修饰在库中表达并折叠抗体。

[0010] 细胞展示技术的一个优点是出于将库转染到细胞中的限制,与非细胞技术相比,仅相对小的库大小是可能的。

[0011] 然而,哺乳动物细胞展示的关键缺点是抗原必须在溶液中。这将抗原限制为相对小的亲水性蛋白,基本上排除了大的多通道膜蛋白,所述大的多通道膜蛋白是用于抗体发现的靶的重要类别。解决此问题的尝试包括在膜囊泡的环境下呈递抗原,但是此方法是费力的并且目前尚未非常成功。

[0012] Chen Zhou的团队已经开发了一种用于筛选基于全长抗体cDNA的库的哺乳动物展示系统(Zhou等人,Acta Biochimica et Biophysica Sinica,42(8),575-84.2010;US 2012/0101000)。他们的系统在哺乳动物细胞表面上一起表达人抗体重链和轻链;来自血小板衍生生长因子的跨膜结构域与重链融合以将抗体锚固到表达其的细胞膜。通过RT-PCR扩增来自PBMC的可变结构域并将其克隆到质粒载体中来单独构建人重链(IgG-1)库。相似地构建人轻链(κ)库,并且使用所述系统成功地选择针对可溶性靶抗原的抗体。这证明可以在进行针对哺乳动物细胞中的靶的筛选所需的规模下使用全长抗体库。然而,他们的方法不能获得针对复杂膜结合靶的抗体(最常需要的),因为它需要用于生物选择的可溶性蛋白。

发明内容

[0013] 本发明旨在通过提供用于生物选择识别细胞上的蛋白质、特别是整合膜蛋白的单克隆抗体的新的且快速的策略来克服一种或多种以上提及的问题。该方法通过在分泌多肽

结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的库的细胞表面上表达抗原并且然后分离自我标记的细胞来相对于现有策略进行改善。可以重复所述方法以便实现库演变,接着进行先导候选物多肽结合配偶体的亲和力突变。

[0014] 此解决方案的一个优点是膜结合靶多肽通过适当的细胞折叠和膜插入途径,之后呈递在细胞表面上。呈递到库中的多肽结合配偶体(例如,抗体/模拟物)的膜结合靶多肽的片段与可用于在体内(细胞培养或治疗)环境中被结合的片段相同。选择与膜蛋白结合的结合配偶体(例如,抗体/模拟物)的能力是重要的,因为通常膜蛋白(包括免疫检查点和G蛋白偶联受体)是关键的治疗靶。

[0015] 在一个实施方案中,本发明提供一种鉴定产生与靶多肽结合的特异性结合配偶体的细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

[0016] (a) 在哺乳动物细胞群体中表达结合配偶体的库,

[0017] 其中每个结合配偶体包含核心框架(core framework)和多个可变区,每个多个可变区赋予此结合配偶体对于靶的特异性结合亲和力,其中每个结合配偶体由它在其中产生的细胞分泌,并且其中所述靶多肽在所述哺乳动物细胞群体中的每个细胞的外表面上展示;以及

[0018] (b) 分离或鉴定所述哺乳动物细胞群体内特异性结合配偶体与其结合的细胞,

[0019] 其中特异性结合配偶体与其结合的细胞是产生与所述靶多肽结合的特异性结合配偶体的细胞。优选地,所述特异性结合配偶体是抗体或抗体模拟物。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明提供一种鉴定产生与靶多肽结合的抗体或抗体模拟物的细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

[0021] (a) 在哺乳动物细胞群体中表达抗体或抗体模拟物的库,其中每种抗体或抗体模拟物由它在其中产生的细胞分泌,并且其中所述靶多肽在所述哺乳动物细胞群体中的每个细胞的外表面上展示;以及

[0022] (b) 分离或鉴定所述哺乳动物细胞群体内的、抗体或抗体模拟物与其结合的细胞,

[0023] 其中抗体或抗体模拟物与其结合的细胞是产生与所述靶多肽结合的抗体或抗体模拟物的细胞。

[0024] 优选地,所述靶多肽在所述细胞群体中的每个细胞内表达,优选地由表达构建体表达。

[0025] 优选地,所述方法另外包括以下步骤:

[0026] (c) 对所分离的细胞中编码与所述靶多肽结合的抗体或抗体模拟物的(一部分或全部的)多核苷酸序列进行测序。

[0027] 本发明还提供一种获得与靶多肽结合的特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的核苷酸序列的方法,所述方法包括本发明的方法的鉴定产生与靶多肽结合的特异性结合配偶体的细胞的步骤,并且另外包括对所述细胞中编码此特异性结合配偶体的(全部或一部分的)核酸进行测序的步骤。

[0028] 本发明还提供一种获得与靶多肽结合的特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的氨基酸序列的方法,所述方法包括本发明的方法的以下步骤:鉴定产生与靶多肽结合的特异性结合配偶体的细胞,纯化此特异性结合配偶体,以及获得此纯化特异性结合配偶体的(全部或一部分的)氨基酸序列。

[0029] 在又一个实施方案中,本发明提供一种用于产生细胞群体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0030] 用以下物质转化第一哺乳动物细胞群体:

[0031] (a) 多个第一表达构建体,所述多个第一表达构建体编码可分泌结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的库;和

[0032] (b) 第二表达构建体,其编码所需靶多肽,所述靶多肽包含跨膜结构域,

[0033] 以便产生第二哺乳动物细胞群体,其中所述第二哺乳动物细胞群体中的每个细胞分泌或能够分泌一种或多种结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物),并且其中所述第二哺乳动物细胞群体中的每个细胞在所述哺乳动物细胞的外表面上展示或能够展示所述靶多肽。

[0034] 优选地,所述多个第一表达构建体(和/或所述第二表达构建体)通过能够感染哺乳动物细胞的病毒(优选地逆转录病毒,更优选地慢病毒)递送到所述哺乳动物细胞群体。

[0035] 本发明的方法通常在体外或离体实施。所述哺乳动物细胞群体中的每个细胞(或基本上每个细胞)在细胞的外表面上展示靶多肽。所述靶多肽不分泌到细胞周围的介质中;所述靶多肽保持与细胞结合。

[0036] 所述靶多肽优选地包含一个或多个跨膜结构域,以便将所述靶多肽定位在细胞的外细胞膜中。在一个实施方案中,所述靶多肽是整合膜蛋白。优选地,它直接整合在外细胞膜中。

[0037] 在一个实施方案中,所述靶多肽是包含与跨膜结构域(例如,血小板衍生的生长因子受体结构域)连接的抗原多肽的融合多肽。所述跨膜结构域将抗原多肽锚固在细胞膜中,并且允许抗原结构域被展示。抗原多肽和跨膜结构域的氨基酸序列可通过短的氨基酸接头(例如,1-10或1-20个氨基酸)连接。所述靶多肽可以是糖基化多肽或非糖基化多肽。

[0038] 在一些实施方案中,所述靶多肽是单通道膜蛋白或多通道膜蛋白。在一些实施方案中,所述靶多肽包含1、2、3、4、5、6或7个跨膜结构域。

[0039] 在一些实施方案中,所述靶多肽是G蛋白偶联受体(GPCR)(例如,DRD1)。在一些实施方案中,所述靶多肽是免疫疗法靶,例如CD19、CD40或CD38。在一些实施方案中,所述靶多肽是增加/降低细胞增殖的蛋白质,例如生长因子受体。在一些实施方案中,所述靶多肽是离子通道多肽。

[0040] 在一些优选的实施方案中,所述靶多肽是免疫检查点分子。优选地,免疫检查点分子是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的成员(例如,CD27、CD40、OX40、GITR或CD137)或B7-CD28超家族的成员(例如,CD28、CTLA4或ICOS)。优选地,免疫检查点分子是PD1、PDL1、CTLA4、Lag1或GITR。

[0041] 在一些实施方案中,所述靶多肽不是抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。在其他实施方案中,所述靶多肽以靶多肽/MHC1复合物的形式在细胞外表面上展示。在这种实施方案中,所述靶多肽和MHC1两者均可在细胞内过表达,以便实现靶多肽在MHC槽中的呈递。

[0042] 所述靶多肽优选地在所述细胞群体中的每个细胞内表达。所述靶多肽优选地由表达构建体表达。此表达构建体可整合到宿主细胞基因组中,或者它可存在于(非整合)表达载体中或存在于可以是整合或非整合的病毒载体基因组中。表达构建体优选地包含合适的信号多肽,其将靶多肽导向到外细胞膜。

[0043] 合适的信号多肽的实例包括来自以下的那些:BM-40(骨粘连蛋白SPARC)、水泡性口炎病毒G(VSVG)蛋白、胰凝乳蛋白酶原、人白细胞介素-2(IL-2)、Gaussia荧光素酶、人血清白蛋白、流感血凝素和人胰岛素。

[0044] 在一些实施方案中,所述表达构建体另外包含诱导型启动子元件。优选地,所述诱导型启动子元件包含:DNA序列,其能够结合可形成基础转录复合物并启动转录的蛋白质;和多个Tet操纵子序列,Tet阻遏蛋白(TetR)能够与其结合。在此结合状态下,获得严格的转录抑制。然而,在强力霉素的存在下,抑制被减轻,从而允许启动子获得完全转录活性。这种诱导型启动子元件优选地置于另一个启动子(例如,CMV启动子)的下游。

[0045] 在一些实施方案中,所述细胞包含靶多肽表达构建体的多个拷贝,以便增加表达的靶多肽的水平。增加靶多肽表达水平也可通过增加细胞培养时间来实现。

[0046] 靶多肽表达构建体还可包含抗生素抗性基因,例如编码对于嘌呤霉素的抗性的基因。

[0047] 靶多肽在哺乳动物细胞群体上展示。所述细胞可以是分离的细胞,例如,它们不存在于活的动物中。哺乳动物细胞的实例包括来自人、小鼠、大鼠、仓鼠、猴、兔、驴、马、羊、牛和猿的任何器官或组织的那些。优选地,所述细胞是人细胞。所述细胞可以是原代细胞或永生化细胞。优选的人细胞包括HEK293、HEK293T、HEK293A、PerC6、911、HeLa和COS细胞。其他优选的细胞包括CHO和VERO细胞。更优选地,所述细胞是CHO细胞。

[0048] 优选地,所述群体中全部或基本上全部细胞展示靶多肽。优选地,所述群体中全部或基本上全部细胞表达小于10或小于5种、更优选地1、2或3种并且最优选单一结合配偶体。

[0049] 在本发明的方法中,结合配偶体的库在哺乳动物细胞群体中表达。目的是鉴定至少一种特异性结合配偶体,其以可鉴定此类特异性结合配偶体与其结合的细胞的方式与靶多肽的暴露区域或结构域结合。

[0050] 如本文所用,术语“特异性结合配偶体”涉及结合配偶体以所需的特异性和/或亲和程度与靶多肽结合的能力。特异性结合配偶体可能不唯一地与靶多肽结合。优选地,如果特异性结合配偶体对于其靶多肽的亲和力比其对于非靶多肽的亲和力的大约5倍,则所述特异性结合配偶体进行特异性地结合。理想地,不存在与不希望的物质的显著交叉反应或交叉结合。

[0051] 特异性结合配偶体对于靶分子的亲和力可以比其对于非靶多肽的亲和力大例如至少约5倍,诸如10倍,诸如25倍,尤其是50倍,并且特别是100倍或更多倍。

[0052] 在一些实施方案中,特异性结合配偶体与靶多肽之间的结合意指至少 10^6M^{-1} 的结合亲和力。抗体可例如以至少约 10^7M^{-1} ,诸如在 10^8M^{-1} 至约 10^9M^{-1} 、约 10^9M^{-1} 至约 10^{10}M^{-1} 、或约 10^{10}M^{-1} 至约 10^{11}M^{-1} 之间的亲和力进行结合。

[0053] 抗体可例如以50nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100pM或更小、或更优选地10pM或更小的 EC_{50} 进行结合。如本文所用的术语“ EC_{50} ”意图是指通过定量产生50%最大应答/作用的浓度的化合物功效。 EC_{50} 可通过Scatchard或FACS确定。

[0054] 每种结合配偶体包含核心框架和多个可变区,每个多个可变区赋予此结合配偶体对于靶的特异性结合亲和力。所述核心框架可包含一个或多个多肽。优选地,存在2-10个、更优选地2-6、3-6、4-6或5-6个可变区。结合配偶体通常是多肽。这些可以是或可以不是糖基化的。结合配偶体可被视为靶多肽的潜在结合配偶体或潜在特异性结合配偶体。

[0055] 结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)通过产生它们的细胞分泌,由所述细胞分泌或分泌到所述细胞外。在一些实施方案中,结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)分泌到产生它们的细胞外并进入细胞周围的介质中。换言之,在此实施方案中,结合配偶体从细胞释放。

[0056] 在其他实施方案中,结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)由产生它们的细胞分泌。结合配偶体然后可或可不被释放到细胞周围的介质中。

[0057] 多肽结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)和靶多肽将通过附接到粗面内质网(ER)的核糖体在哺乳动物细胞中合成。这些多肽均包含信号肽以便指导多肽通到细胞的分泌途径。在它们合成之后,这些多肽将易位到内质网腔中,在其中它们可被糖基化并且在其中分子伴侣帮助蛋白质折叠。含有多肽的囊泡然后进入高尔基体。在高尔基体中,多肽的任何糖基化可被修饰,并且可发生进一步的翻译后修饰(包括裂解和官能化)。然后多肽移动到分泌性囊泡中,所述分泌性囊泡沿细胞骨架行进到哺乳动物细胞边缘。在分泌性囊泡中可发生进一步的修饰。最终,在称为胞外分泌的过程中,在称为蛋白酶体(porosome)的结构处存在与细胞膜的囊泡融合,所述胞外分泌使得囊泡的内容物释放到周围介质中。当去掉囊泡内容物时,膜整合蛋白将保留在细胞的质膜中。

[0058] 因为多肽结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)和靶多肽两者通过此分泌途径产生,所以一些特异性结合配偶体与靶多肽的结合可能在此途径的过程中发生。如果是这种情况,则特异性结合配偶体将不分泌到细胞外到外部介质中;它将保持与靶多肽结合。特异性结合配偶体和靶多肽因此将一起呈递在细胞的外表面上。

[0059] 在一些实施方案中,抗体或抗体模拟物以其CDR序列与靶多肽结合的形式由产生它们的细胞分泌。在其他实施方案中,抗体或抗体模拟物以其CDR序列不与靶多肽结合的形式由产生它们的细胞分泌。

[0060] 结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)不直接或间接地共价附接到细胞表面。结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)在细胞周围的介质内自由扩散(在分泌途径内与靶多肽结合的那些结合配偶体除外)。

[0061] 如本文所用,术语“库”是指多个(潜在)结合配偶体,每个具有不同的结合特异性和/或亲和力。每个结合配偶体具有(共同的)核心框架和多个不同的可变区。优选地,术语“库”是指多个多肽,每个具有不同的结合特异性和/或亲和力。多个多肽通常由多个多核苷酸编码。

[0062] 优选地,库通过能够感染哺乳动物细胞的病毒(优选地逆转录病毒,更优选地慢病毒)递送到哺乳动物细胞群体。

[0063] 在一些优选的实施方案中,编码结合配偶体多肽的多核苷酸在细胞内表达。这些多核苷酸可瞬时表达(例如,由逆转录病毒载体表达)或由表达载体表达。在一些实施方案中,表达载体整合到细胞的基因组中。

[0064] 在某些实施方案中,多肽的库可包含至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 或更多个不同的多肽。

[0065] 在一些实施方案中,库中的不同多肽通过例如它们的来自单一动物物种(例如,人、小鼠、兔、山羊、马)、组织类型、器官或细胞类型的起源联系起来。

[0066] 在其他实施方案中,库是天然存在的多肽的库,其可能是丰富的。在又其他的实施

方案中,库是合成多肽的库。

[0067] 结合配偶体必须能够由细胞分泌(优选地分泌到细胞外)。在一些实施方案中,这种分泌可通过包含5'-信号多肽来辅助。

[0068] 在一些优选的实施方案中,结合配偶体是抗体或抗体模拟物。在此实施方案中,步骤(a)包括在哺乳动物细胞群体中表达抗体或抗体模拟物的库,其中每种抗体或抗体模拟物由产生它的细胞分泌。

[0069] 如本文所用,“抗体”包括广泛种类的结构,如本领域技术人员将认识到的,所述结构在一些实施方案中最少含有一组6个CDR,所述抗体包括但不限于传统抗体(包括单克隆抗体)、人源化和/或嵌合抗体、抗体片段、工程化抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)和其他本领域已知的类似物。

[0070] “抗体”是免疫球蛋白分子,其能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点与靶(诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)特异性结合。

[0071] 在一些实施方案中,抗体可以是来自不同物质(例如,嵌合抗体和/或人源化抗体)的混合物。即,CDR组可与除它们从其原始获得的那些以外的框架区和恒定区一起使用。

[0072] 通常,“嵌合抗体”和“人源化抗体”两者是指组合来自多于一种物质的区域的抗体。例如,“嵌合抗体”传统上包含来自小鼠(或在一些情况下,大鼠)的一个或多个可变区和来自人类的一个或多个恒定区。“人源化抗体”通常是指将可变结构域框架区交换为人抗体中存在的序列的非人抗体。通常,在人源化抗体中,除CDR之外的整个抗体由人来源的多核苷酸编码或与这种抗体相同,除在其CDR内之外。其一些或全部由起源于非人生物体的核酸编码的CDR接枝到人抗体可变区的 β -折叠框架中,以产生抗体,所述抗体的特异性由接枝的CDR决定。

[0073] 在一个实施方案中,抗体是抗体片段。特异性抗体片段包括但不限于(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单一抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段;(iv)由单一可变区组成的dAb片段(Ward等人,1989,Nature 341:544-546);(v)分离的CDR区域;(vi)F(ab')₂片段,一种包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过允许两个结构域缔合以形成抗原结合位点的肽接头连接(Bird等人,1988,Science242:423-426,Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:5879-5883);(viii)双特异性单链Fv(例如,W0 03/11161);以及(ix)“双体”或“三体”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段(Tomlinson等人,2000,Methods Enzymol.326:461-479;W094/13804;Holliger等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448)。

[0074] 术语“抗体”还包括结构域抗体、纳米抗体和单抗体(UniBodies)。术语“抗体”还包括融合蛋白,其包含具有抗原识别位点的抗体部分或片段。最优选地,抗体是scFv抗体。

[0075] 抗体库可例如包含某一类型或类别的免疫球蛋白多肽。例如,库可编码抗体 μ 、 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4、 α 1、 α 2、 ϵ 或 δ 重链和/或抗体 κ 或 λ 轻链。抗体同种型可以是IgM、IgD、IgG、IgA或IgE。优选地,抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0076] 虽然本文所述的任一种库的每个成员可编码相同的重链或轻链恒定区,但是库可共同地包含至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 或更多个不同的可变区,即,与共同的恒定区相关联的“多个”可变区。

[0077] 在一个实施方案中,细胞群体通过用编码scFv库的多个逆转录病毒(优选地慢病毒)颗粒感染(例如,瞬时感染)初始(同类)细胞群体来产生,其中scFv库包含多个具有不同结合特异性和亲和力的scFv抗体。

[0078] 例如,每个逆转录病毒颗粒可包含逆转录病毒或慢病毒载体,其包含启动子、信号肽(以促进scFv的分泌)和scFv编码序列。所述载体还可包含3' 标签,诸如血凝素,以便帮助由二抗进行的识别。慢病毒载体(表达构建体)可另外包含编码抗细胞凋亡因子的多核苷酸序列。

[0079] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,抗细胞凋亡因子在编码靶多肽的核酸的最后一个终止密码子的下游(即,3')在IRES之后(即,3')插入。这提供一种构型,其中启动转录的启动子在靶多肽基因的编码序列的上游(即,5'),其之后(3')是IRES,再之后(3')是抗细胞凋亡因子基因的编码区。在此构型中,靶多肽和抗细胞凋亡因子两者均由相同的mRNA编码,但是由于相对低的IRES介导的翻译效率,靶多肽将以比抗细胞凋亡因子更大的丰度翻译。

[0080] 本发明的方法不限于涉及抗体的方法。它们还可通过使用抗体模拟物来实践。各种各样的抗体模拟物技术是本领域已知的。具体地,虽然它们模拟传统抗体结合,但是采用结合结构的技术(诸如Affibodies(亲和体)、DARPs(经设计的锚蛋白重复蛋白)、Anticalins(抗运载蛋白)、Avimers(高亲和性多聚体)和Versabodies)通过不同的机制生成和作用。

[0081] Affibody分子代表一类新的亲和力蛋白,其基于58个氨基酸残基蛋白结构域,衍生自金黄色葡萄球菌蛋白A的IgG结合结构域中的一个。此三螺旋束结构域已经被用作构造组合噬粒库的支架,可使用噬菌体展示技术由其选择靶向所需分子的Affibody变体(Nord K,Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A(IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55.)。Affibody的进一步细节及其产生方法可参考US 5,831,012获得。

[0082] DARPs(经设计的锚蛋白重复蛋白(Designed Ankyrin Repeat Proteins))是抗体模拟物DRP(经设计的重复蛋白)技术的一个实例,其被开发来利用非抗体多肽的结合能力。重复蛋白(诸如锚蛋白或富含亮氨酸重复蛋白)是普遍存在的结合分子,其与抗体不同,在细胞内和细胞外产生。其独特的模块化架构的特征在于重复结构单元(重复序列),该重复结构单元堆叠在一起以形成展示可变且模块化靶结合表面的伸长的重复结构域。基于此模块性,可生成具有高度多样化的结合特异性的多肽的组合库。此策略包括自我兼容重复序列的共有设计,其展示可变表面残基及其随机组装成重复序列结构域。关于DARPs和其他DRP技术的另外信息可见于US 2004/0132028和WO 02/20565。

[0083] Anticalin是另一种抗体模拟物技术。然而,在这种情况下,结合特异性来源于脂质运载蛋白,一个低分子量蛋白的家族,其在人类组织和体液中被天然且丰富地表达。

[0084] 脂质运载蛋白已发生演变来执行与化学敏感或不可溶化合物的生理转运和储存相关联的一系列体内功能。脂质运载蛋白具有包括高度保守的 β -桶的稳健内在结构,其在

蛋白质的一个末端支持四个环。这些环形成结合口袋的入口,并且分子的这部分中的构象差异是个体脂质运载蛋白之间的结合特异性变化的原因。

[0085] 虽然由保守 β -板框架支持的高变环的整体结构使人想到免疫球蛋白,但是脂质运载蛋白在大小方面与抗体非常不同,其由160-180个氨基酸的单一多肽链构成,这比单一免疫球蛋白结构域略大。

[0086] 克隆脂质运载蛋白,并且将其环经受工程化以便产生Anticalin。已经生成了结构上不同的Anticalin的库,并且Anticalin展示允许选择和筛选结合功能,接着表达和产生可溶性蛋白以用于在原核或真核系统中进行进一步分析。研究已经成功地证明了可开发对于基本上任何可分离的人靶蛋白特异性的Anticalin,并且可获得纳摩尔或更高范围的结合亲和力。

[0087] Anticalin还可被构建为双重靶向蛋白,即所谓的双脂质运载蛋白(Duocalins)。双脂质运载蛋白使用标准制造方法结合一种易于产生的单体蛋白中的两种单独的治疗靶,同时保留靶特异性和亲和力,无论其两个结合结构域的结构取向如何。关于Anticalin的另外信息可见于US 7,250,297和WO 99/16873。

[0088] 可用于本发明的上下文的另一种抗体模拟物技术是Avimers。Avimers通过体外外显子改组和噬菌体展示由人细胞外受体结构域大家族演变而来,从而生成具有结合和抑制特性的多结构域蛋白。已经显示连接多个独立的结合结构域产生亲合性并且导致与常规单表位结合蛋白相比改善的亲和力和特异性。其他潜在的优点包括在大肠杆菌中简单且有效地产生多靶特异性分子,改善的热稳定性和对于蛋白酶的抗性。已经获得了针对各种靶的具有亚纳摩尔亲和力的Avimers。关于Avimers的另外信息可见于US 2006/0286603、2006/0234299、2006/0223114、2006/0177831、2006/0008844、2005/0221384、2005/0164301、2005/0089932、2005/0053973、2005/0048512和2004/0175756。

[0089] Versabodies是可在本发明的上下文中使用的另一种抗体模拟物技术。Versabodies是具有>15%半胱氨酸的3-5kDa的小蛋白质,其形成高的二硫化物(disulfide)密度支架,从而替换典型蛋白质所具有的疏水性核心。用少量二硫化物替换包含疏水性核心的大量疏水性氨基酸产生一种蛋白质,其更小,更具亲水性(更少的聚集和非特异性结合),对于蛋白酶和热更具抗性,并且具有更低密度的T细胞表位,因为对MHC呈递贡献最多的残基是疏水性的。这些特性中的全部四种影响免疫原性是人们所熟知的,并且预期它们一起导致免疫原性的大量降低。

[0090] 考虑到Versabodies的结构,这些抗体模拟物提供通用格式,其包括多价、多特异性、半衰期机制的多样性、组织靶向模块和不存在抗体Fc区。关于Versabodies的另外信息可见于US 2007/0191272。

[0091] 在其他实施方案中,结合配偶体不是抗体或抗体模拟物。例如,靶多肽的所需特异性结合配偶体可以是靶多肽能够与其结合的多肽配体。在此类情况下,结合配偶体的库可以是多肽的库,所述多肽的氨基酸序列是基于已知与靶多肽结合的多肽配体的氨基酸序列。例如,这种库中的多肽可与已知的多肽配体具有至少60%、70%、80%、90%或95%氨基酸序列一致性。

[0092] 本发明的步骤(b)包括鉴定和/或分离哺乳动物细胞群体内特异性结合配偶体与其结合的细胞。(特异性结合配偶体与在这些细胞上展示的靶多肽结合。)特异性结合配偶

体与其结合的细胞是产生靶多肽的特异性结合配偶体的细胞。以这种方式,可鉴定和/或分离靶多肽的所需特异性结合配偶体。

[0093] 特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)与靶多肽的结合可通过多种不同的手段检测,这主要取决于特异性结合配偶体的身份。此类手段是本领域熟知的,并且包括使用标记的二抗(例如,荧光标记、生物素标记或放射活性标记)、酶促手段(例如,比色测定)和功能结构域(例如,促进或抑制某种活性的多肽结构域)。

[0094] 在本发明的其中特异性结合配偶体是抗体或抗体模拟物的实施方案中,此类抗体或抗体模拟物与靶多肽的结合可通过使用标记的二抗检测。例如,如果特异性结合配偶体是全长抗体,则可使用与一抗的Fc区结合的标记的二抗。如果特异性结合配偶体是scFV抗体,则可使用与scFV抗体上的标签(例如,HA标签)结合的标记的二抗。

[0095] 在一些实施方案中,特异性结合配偶体(例如,一抗)或与其结合的二抗包含功能结构域,所述功能结构域的存在和/或活性可被建立和/或量化。此类功能结构域的实例包括促进或抑制细胞增殖的结构域(例如,生长因子的适当结构域)。

[0096] 本发明的方法可在液体介质中、在半固体介质中、在固体介质(例如,凝胶)中实施,或者细胞可完全或部分固定。优选地,所述方法在液体介质中、例如在含水生理介质中实施,所述含水生理介质例如是适于细胞培养和潜在特异性结合配偶体与靶多肽的结合的含水生理介质。在此实施方案中,分泌的结合配偶体将在溶液中,并且因此它们不仅与分泌它们的细胞自由结合,还与其他(例如,相邻)细胞自由结合。在这种情况下,细胞群体内特异性结合配偶体与其结合的第一细胞是产生此特异性结合配偶体的细胞。随时间推移,结合配偶体将能够接触除分泌它们的那些细胞之外的细胞(例如,通过对流或扩散到所述之外的细胞),但是在适当静态的系统中,结合配偶体将首先与分泌它们的细胞结合(如果结合配偶体能够与靶多肽结合的话)。

[0097] 因此如果本发明的方法在液体介质中实施,则可能需要测定细胞在多个不同时间点(例如,4小时,6小时,24小时,48小时等)处特异性结合配偶体的任何结合,以便建立细胞何时首先与内部产生的特异性结合配偶体结合。然后可分选或分离此类细胞(例如,在荧光标记的特异性结合配偶体的情况下,通过荧光激活细胞分选(FACS))。

[0098] 因此,在一些实施方案中,步骤(b)包括以下步骤:

[0099] (b) 鉴定或分离细胞群体内特异性结合配偶体首先与其结合的细胞。

[0100] 因此,在其他实施方案中,步骤(b)包括以下步骤:

[0101] (b) 鉴定或分离细胞群体内特异性结合配偶体在一个时间点之后与其结合的细胞,在所述时间点时,特异性结合配体可仅与在细胞上展示的靶多肽结合,特异性结合配偶体本身由所述细胞分泌。

[0102] 在大多数方法中,鉴于仅存在很少的分泌能够与靶多肽结合的结合配偶体的细胞的事实,结合配偶体向其他细胞的对流或扩散的问题并不认为是显著的。

[0103] 减少这种扩散的影响的另一种方式是以连续或不连续方式更换液体介质,从而从液体介质中去除任何扩散的结合配偶体。因此,在其他实施方案中,步骤(a)另外包括以下特征:其中所述方法在以连续或不连续方式更换的液体介质中实施。

[0104] 在本发明的一些实施方案中,希望抑制结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)远离产生它们的细胞的移动。这帮助降低非特异性背景结合的水平并且避免假阳性细胞的产

生。达到此目的的一种方式是在25℃下其动态粘度大于水的动态粘度的液体介质中执行本发明的方法。以这种方式,减少了结合配偶体(例如,抗体)远离产生它们的细胞的扩散。水的动态粘度在25℃下是 $8.9 \times 10^{-4} \text{Pa} \cdot \text{s}$ 。优选地,在其中实施本发明的方法的步骤(a)的液体介质的动态粘度在25℃下是至少 $10 \times 10^{-4} \text{Pa} \cdot \text{s}$ 。

[0105] 更优选地,在其中实施本发明的方法的步骤(a)的液体介质的动态粘度在25℃下在 $1 \times 10^{-4} \text{Pa} \cdot \text{s}$ 与 $10 \text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间,甚至更优选地在25℃下在 $0.01 \text{Pa} \cdot \text{s}$ 与 $1 \text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间,并且最优选地在25℃下在 $0.01 \text{Pa} \cdot \text{s}$ 与 $0.1 \text{Pa} \cdot \text{s}$ 之间。例如,液体介质的动态粘度可使用中性增粘剂增加,所述中性增粘剂例如糖、聚乙烯吡咯烷(PVP)、聚乙二醇(PEG,分子量高达20KDa,更优选地约8KDa,高达50%vol/vol)或聚[N(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺](优选地10-100KDa,高达40%wt/vol)。

[0106] 防止结合配偶体远离产生它们的细胞的扩散的另一种方式是在凝胶中实施本发明的方法。凝胶是固体果冻状材料,其可具有范围为软且弱至硬且实的特性。凝胶被定义为基本上稀释的交联系统,其在稳态下不表现出流动。凝胶按重量计主要是液体,但是它们由于液体内的三维交联网络而表现出固体状。正是流体内的交联给予了凝胶结构(硬度)并有助于粘剂剂粘(粘性)。以这种方式,凝胶是液体分子在固体内的分散体,其中固体是连续相,并且液体是不连续相。优选地,凝胶是水凝胶,即亲水性聚合物链的交联网络。

[0107] 在一些实施方案中,水凝胶由聚乙烯醇、聚丙烯酸钠、丙烯酸酯聚合物或具有丰富亲水性基团的聚合物或共聚物,诸如基于聚[N(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺]的共聚物或基于聚乙二醇或寡肽的嵌段共聚物。在其他实施方案中,水凝胶由海藻酸、琼脂糖、甲基纤维素、透明质酸或其他天然衍生的聚合物形成。

[0108] 优选地,凝胶是海藻酸水凝胶,更优选地是海藻酸钙水凝胶。夹带在这种凝胶内的细胞可易于在施加二价阳离子螯合剂(例如,EDTA或EGTA)时释放,并且然后可以正常方式分离(例如,通过流式分选)‘标记的’细胞。水凝胶可呈珠粒的形式。

[0109] 可通过阴性选择步骤降低结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)与细胞的非特异性结合的背景水平。在此步骤中,首先从细胞群体中去除在靶多肽在细胞上展示之前结合配偶体与其(非特异性地)结合的细胞。因此,在一些实施方案中,步骤(a)包括:

[0110] (a1) 在细胞群体中表达结合配偶体的库,其中每个结合配偶体由产生它的细胞分泌,

[0111] (a2) 从细胞群体中去除结合配偶体与其结合的细胞;然后

[0112] (a3) 在细胞群体中的每个细胞的外表面上诱导靶多肽的表达(优选地由诱导型启动子表达)。

[0113] 优选地,诱导型启动子是包含Tet阻遏蛋白(TetR)能够与其结合多个的Tet操纵子序列的启动子。在结合状态下,获得严格转录抑制。步骤(a3)可包括将细胞与强力霉素(其替换Tet阻遏蛋白,从而允许启动子获得完全转录活性)接触的额外步骤。

[0114] 一旦鉴定了产生靶多肽的特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的细胞(即,特异性结合配偶体与其结合的那些细胞),就可通过任何合适的手段纯化那些细胞。优选地,通过流式细胞术(例如,FACS)纯化特异性结合配偶体(例如,抗体)与其结合的细胞。

[0115] 在一些实施方案中,通过流式细胞术(例如,FACS)多于一次(即,反复地)地纯化特异性结合配偶体(例如,抗体)与其结合的细胞。

[0116] 可对编码由纯化细胞产生的特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的多核苷酸进行测序,从而提供所有或部分特异性结合配偶体的氨基酸序列。优选地,获得抗体或抗体模拟物的CDR序列中的一个或多个的氨基酸序列。

[0117] 然后可将最有希望的特异性结合配偶体的氨基酸序列经受例如通过氨基酸序列的诱变进行的亲和力突变,以便产生具有对于靶多肽的更高亲和力或特异性的特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)。

[0118] 在另一个实施方案中,本发明提供一种特异性结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物),其通过本发明的方法鉴定。

[0119] 在又一个实施方案中,本发明提供一种用于产生细胞群体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0120] 用以下物质转化第一哺乳动物细胞群体:

[0121] (a) 多个第一表达构建体,所述多个第一表达构建体编码可分泌结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)的库;和

[0122] (b) 第二表达构建体,其编码所需的靶多肽,所述靶多肽包含跨膜结构域,

[0123] 以便产生第二哺乳动物细胞群体,其中第二哺乳动物细胞群体中的每个细胞分泌或能够分泌一种或多种结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物),并且

[0124] 其中第二哺乳动物细胞群体中的每个细胞在哺乳动物细胞的外表面上展示或能够展示靶多肽。

[0125] 如本文所用,术语“转化”是指通过其将表达构建体插入细胞中的任何步骤。因此,它尤其包括电穿孔、缀合、感染(例如,通过逆转录病毒颗粒)或转染的任何形式。

[0126] 优选地,结合配偶体是抗体,更优选地是scFv抗体或抗体模拟物(优选地为DARPs)。第一表达构建体的库优选地编码如本文定义的抗体库。

[0127] 优选地,术语“用多个第一表达构建体转化细胞群体”包括用编码scFv库的多个逆转录病毒颗粒(优选地慢病毒颗粒)感染细胞群体,其中scFv库包含多个具有不同结合特异性和/或亲和力的scFv抗体。

[0128] 第二细胞群体中的每个细胞(或基本上每个细胞)分泌或能够分泌一种或多种结合配偶体(例如,抗体或抗体模拟物)。优选地,细胞群体中的每个细胞(或基本上每个细胞)分泌或能够分泌1-3、1-2或最优选地仅1种结合配偶体(例如,抗体)。

附图说明

[0129] 图1:用抗EpCAM单链抗体标记表达EpCAM蛋白的细胞。条形图示出用荧光标记的抗HA抗体染色之后每个细胞群体的中值荧光强度和随后的流式细胞术分析。将HEK293细胞用EpCAM和抗EpCAM单链抗体共转染(顶部条)。对照包括用EpCAM或单独的抗体或用空载体(底部)转染的细胞。

[0130] 图2:将表达EpCAM和GFP的细胞与表达EpCAM和抗EpCAM scFv的细胞混合。X轴指示scFv标记的程度,而Y轴指示GFP荧光强度。表达GFP但不表达scFv的细胞出现在左上(UL)象限中;用scFv自我标记但对于GFP阴性的细胞出现在右下(LR)象限中;由表达scFv的细胞变成用可溶性scFv反式标记的GFP阳性细胞出现在右上(UR)象限中。在更高的EpCAM-GFP与EpCAM-scFv细胞的比率(25:1和125:1)下,在任何可检测的抗体有机会转移到群体中的其

他细胞之前,观察到自我标记细胞的小亚群体。

[0131] 图3:本发明的方法的一个实例,示出识别整合膜蛋白的抗体。A. 在分泌的scFv库(平均每个细胞一个scFv)的旁边的人细胞表面(开放的点)上诱饵蛋白的共表达。B. 表达与诱饵结合的scFv的细胞变成自我标记。C. 针对表面结合的scFv用荧光二抗对细胞染色(星号标记)。D. 通过FACS将荧光细胞分选到微量滴定板的各个孔中。在亲和力突变之前表征上清液结合活性并且对先导候选物进行测序。

[0132] 图4:靶多肽(诱饵)表达构建体的一个实例。

[0133] 图5:scFv表达构建体的一个实例。通过脾灶形成病毒(SFFV)启动子驱动表达。表达构建体编码C末端人流感血凝素(HA)-标签。

具体实施方式

[0134] 实施例

[0135] 通过以下实施例进一步说明本发明,其中除非另外声明,否则份数和百分比按重量计,并且温度是摄氏度。应理解,这些实施例虽然指示本发明的优选实施方案,但仅通过说明的方式给出。根据以上讨论和这些实施例,本领域技术人员可确定本发明的关键特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可对本发明进行各种改变和修改以使其适应于各种用途和条件。因此,除了本文所示和描述的那些之外,对于本领域的技术人员而言本发明的各种修改将根据前述的说明书变得显而易见。此类修改也意图落入所附权利要求书的范围内。

[0136] 本文列出的每个参考文献的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0137] 实施例1:由表达抗EpCAM抗体的细胞进行自我标记的说明

[0138] 选择上皮细胞粘附分子(EpCAM)作为合适的靶多肽(诱饵抗原)。EpCAM是糖基化的30-至40-kDa I型膜蛋白,其含有三个潜在的N-连接糖基化位点。

[0139] 用EpCAM表达构建体(HEK293细胞通常是EpCAM阴性的)与分泌的HA标记的抗EpCAM单链抗体表达构建体一起转染HEK293细胞。在24小时孵育时间段之后,用荧光标记的抗HA-标签抗体对细胞进行染色,并且通过流式细胞术分析以确定哪些细胞已经用编码的抗EpCAM抗体自我标记它们的膜EpCAM。

[0140] 结果在图1中示出。表达‘诱饵’抗原(EpCAM)和scFv两者的细胞是高度荧光的,而所有其他细胞(仅表达EpCAM或仅表达scFv)则不是高度荧光的。这显示分泌scFv的细胞可在其自身表面上标记抗原。

[0141] 实施例2:优化严格性以防止非相关细胞的标记

[0142] 制备两个群体的表达EpCAM的细胞。一些表达抗EpCAM抗体而其他表达绿色荧光蛋白(GFP)。以不同的比率(其中表达抗体的细胞总是最少)将细胞混合,孵育不同的时间,通过在红色通道中进行染色来使固定且表面结合的抗体可视化。少量表达抗体的细胞总是首先自我标记,从而产生在流式细胞术图的右下象限中的细胞(细胞是红色而非绿色的,从而指示产生抗体的细胞在非相关细胞之前被标记)。

[0143] 结果在图2中示出。甚至在1:125的稀释度下,明显数量的细胞出现在右下象限中,代表表达结合细胞表面抗原的抗体的细胞。

[0144] 实施例3:DRD1抗体的产生

[0145] 在此实施例中,靶多肽(诱饵)是DRD1;其在CHO细胞中表达(总图参见图3)。使用逆转录病毒转移载体将靶多肽(诱饵)构建体和抗体库克隆到CHO细胞中。

[0146] 通过使用逆转录病毒系统将靶多肽(诱饵)的基因以及可选择标记物整合到宿主细胞(CHO)基因组中来产生靶多肽(诱饵)细胞系(参见图4)。靶多肽构建体还含有用于Tet阻遏蛋白(TetR)的基因。通过强力霉素诱导型启动子驱动靶多肽(诱饵)表达。

[0147] 使用编码人样scFv序列的人scFv序列的基于cDNA的库的逆转录病毒颗粒的库来感染CHO细胞。对于scFv库,修饰逆转录病毒转移载体以含有组成型启动子(SFFV)和scFv抗体亚基的侧接区域(参见图5)。每个scFv还包括HA标签。

[0148] 在24小时孵育时间段之后,用荧光标记的抗HA-标签抗体对细胞进行染色,并且通过流式细胞术分析以确定哪些细胞已经用scFv抗体自我标记它们的膜DRD1。

中值荧光强度

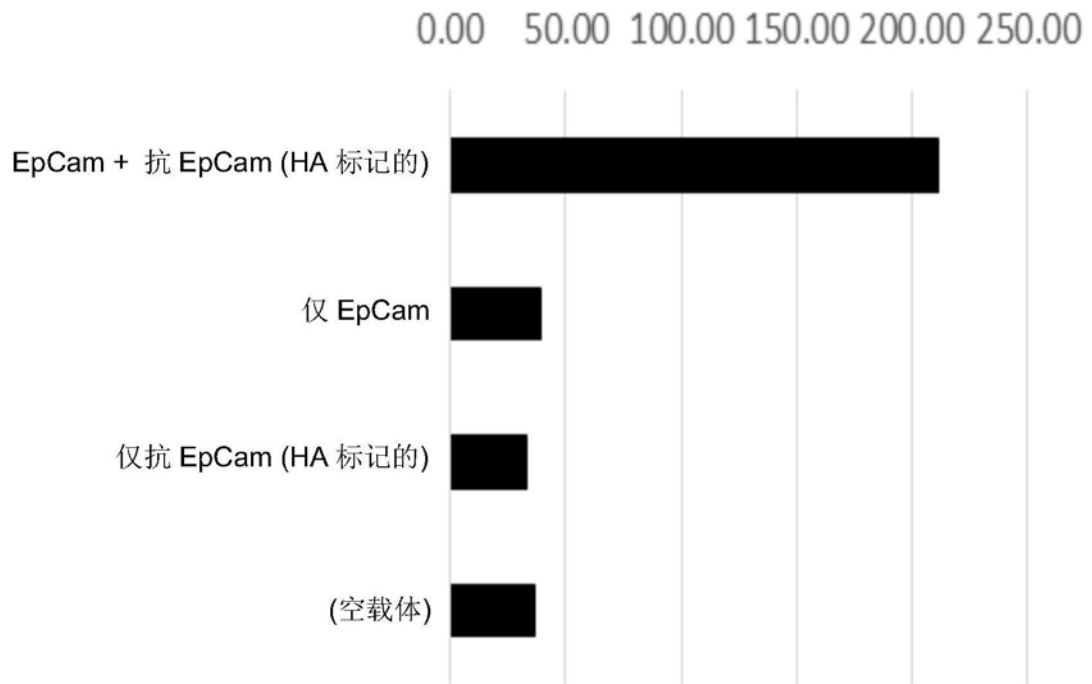
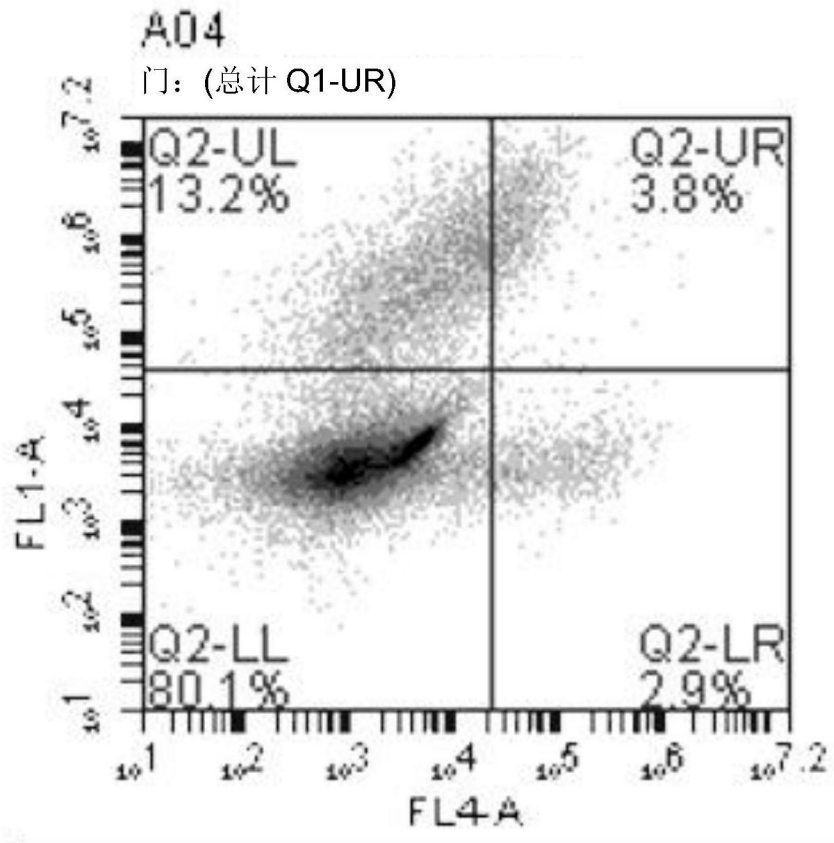


图1

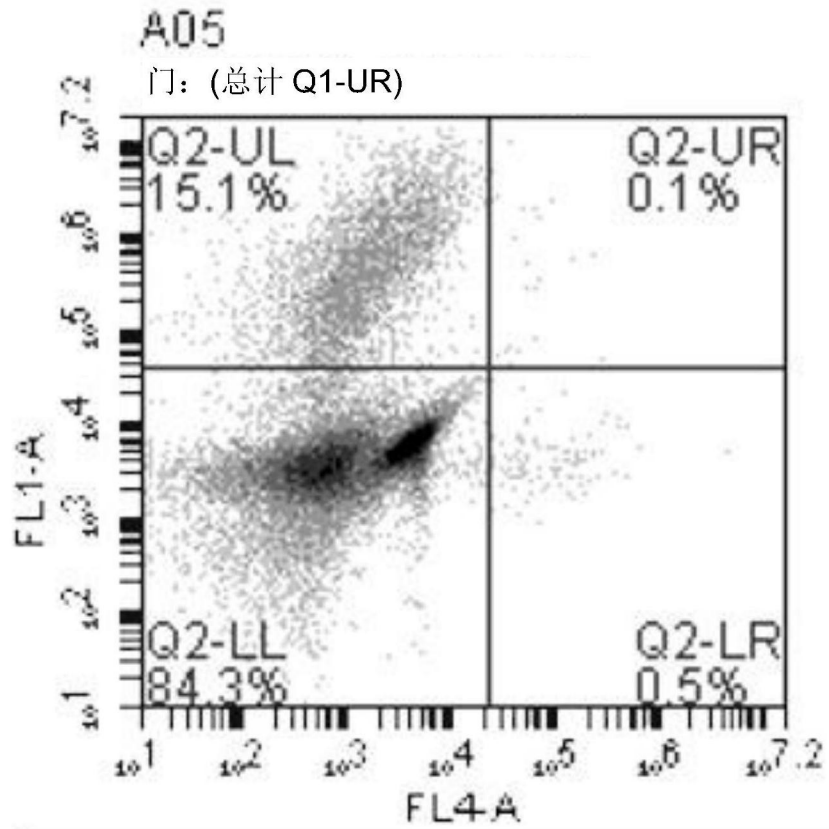
A



5 (Epcam GFP): 1 (Epcam Scfv)

图2A

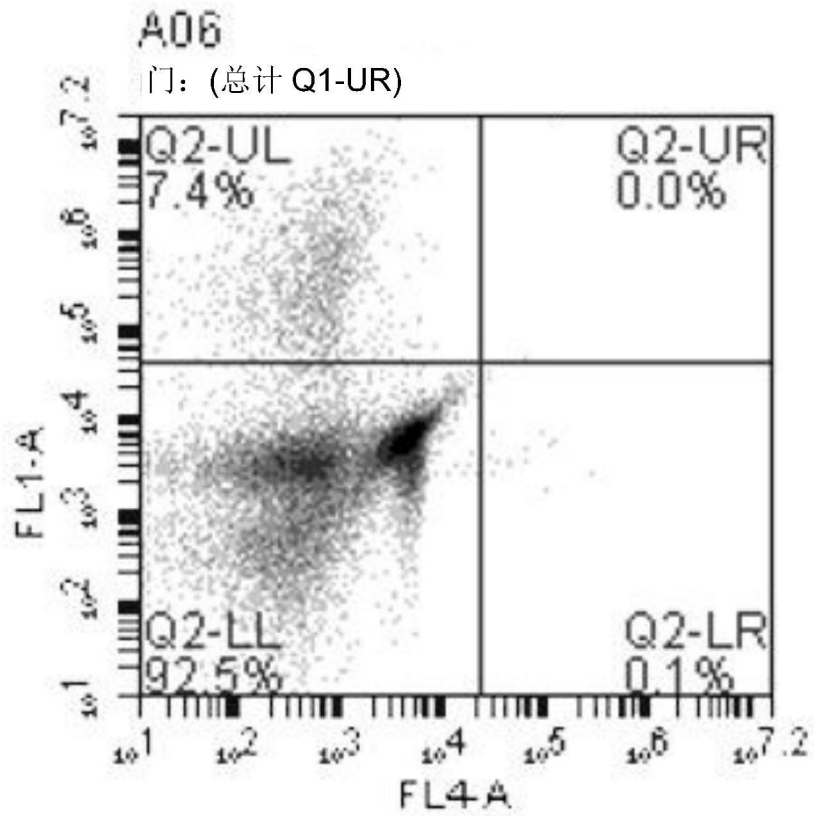
B



25 (Epcam GFP): 1 (Epcam Scfv)

图2B

C



125 (Epcam GFP): 1 (Epcam Scfv)

图2C

D

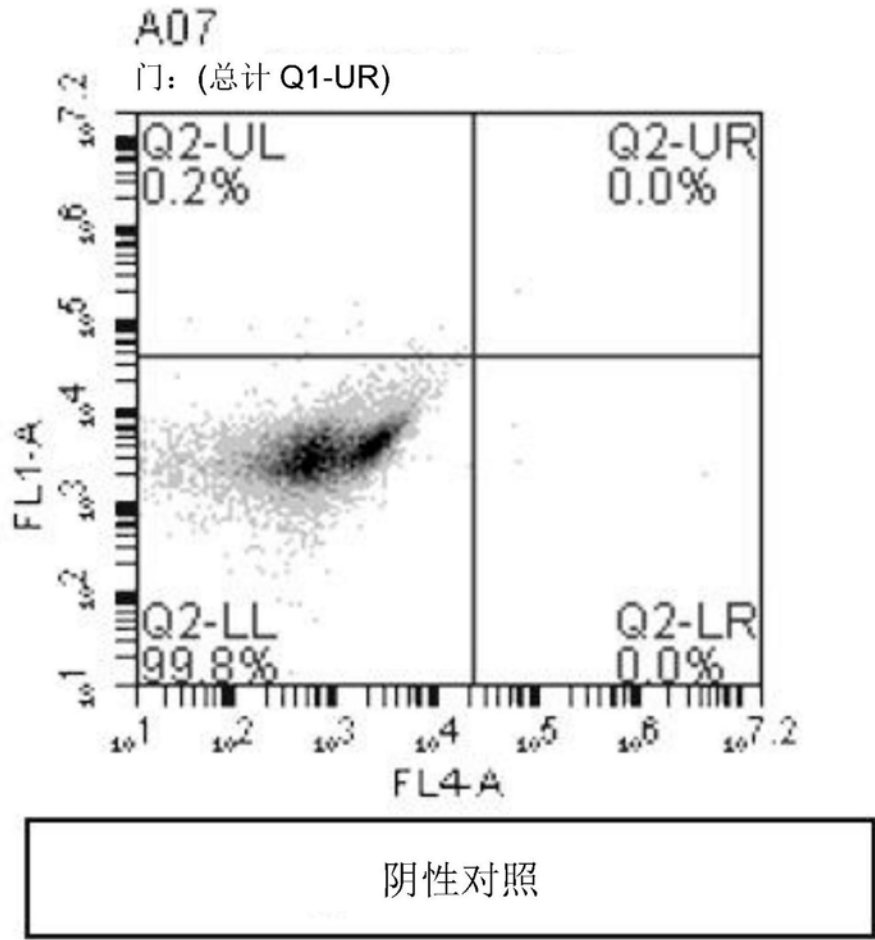


图2D

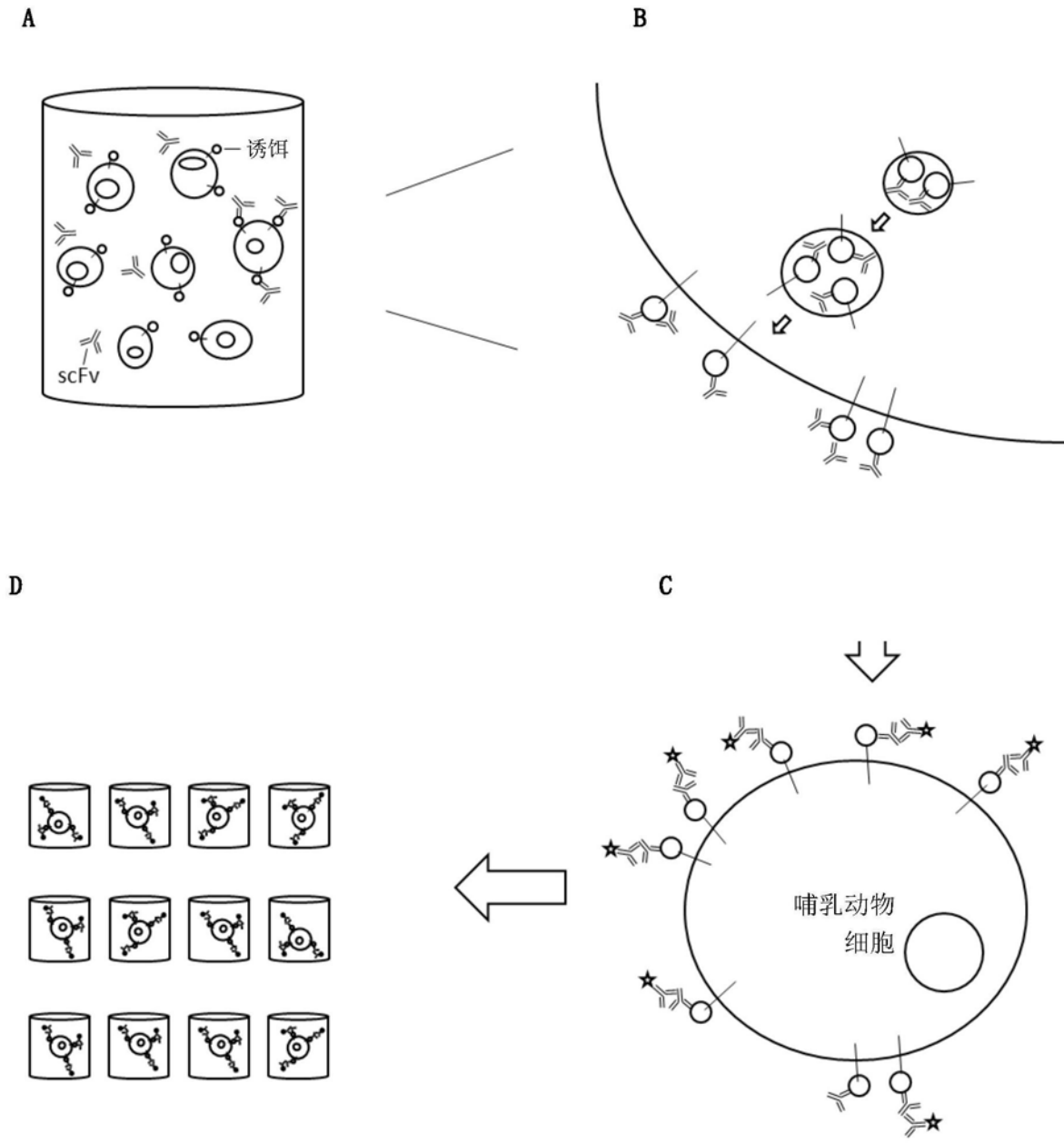


图3

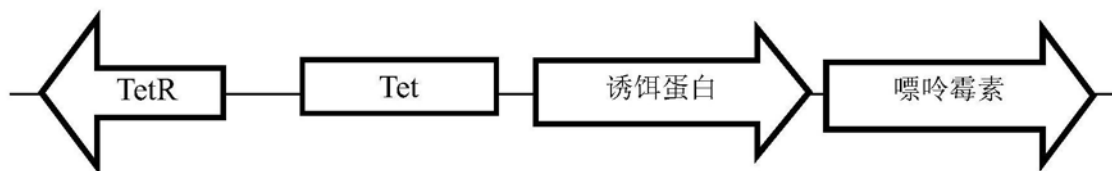


图4

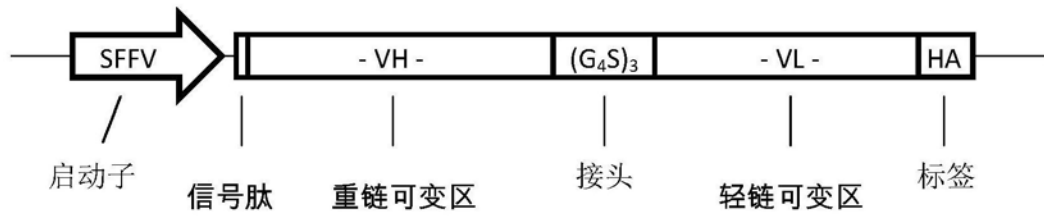


图5

专利名称(译)	选择抗体的方法		
公开(公告)号	CN110382548A	公开(公告)日	2019-10-25
申请号	CN201880016352.2	申请日	2018-03-14
[标]发明人	赖安卡伍德 托马斯佩恩 理查德派克曼纽		
发明人	赖安·卡伍德 托马斯·佩恩 理查德·派克-曼纽		
IPC分类号	C07K16/42 G01N33/537 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/6854 G01N2500/04 G01N2500/10 C07K16/42 C12N15/1037 C40B30/04 C40B40/02 C40B40/10 G01N33/5032 G01N33/537 G01N33/566 G01N33/6845		
优先权	2017004115 2017-03-15 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

