



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102216328 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200980134392. 8

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(22) 申请日 2009. 07. 02

代理人 顾晋伟 田旻

(30) 优先权数据

0812120. 4 2008. 07. 02 GB

61/077, 730 2008. 07. 02 US

61/110, 161 2008. 10. 31 US

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 16/24 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 03. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/006329 2009. 07. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02010/001251 EN 2010. 01. 07

(71) 申请人 阿尔金-X 公司

地址 荷兰鹿特丹

(72) 发明人 托尔斯滕·德赖尔

克里斯托夫·弗雷德里克·杰罗

姆·布朗什托·

约翰内斯·约斯夫·威廉默斯·德哈

德

权利要求书 7 页 说明书 89 页 附图 3 页

(54) 发明名称

骆驼科动物来源的抗原结合多肽

(57) 摘要

本发明涉及用于生产抗原结合多肽的技术平台,其中所述抗原结合多肽对期望靶标抗原具有特异性,该技术平台以骆驼科物种常规抗体库为基础,并且涉及使用该技术平台获得的抗原结合多肽。特别是,本发明提供了包含 VH 结构域和 VL 结构域的抗原结合多肽,其中在 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。

1. 包含 VH 结构域和 VL 结构域的抗原结合多肽,其中在所述 VH 结构域或所述 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科 (Camelidae) 物种的 VH 或 VL 结构域。

2. 根据权利要求 1 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域中的高变环 H1 或高变环 H2、或者高变环 H1 和高变环 H2 二者来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。

3. 根据权利要求 1 或 2 的抗原结合多肽,其中所述 VL 结构域中的高变环 L1 或高变环 L2、或者高变环 L1 和高变环 L2 二者来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。

4. 根据权利要求 2 或 3 的抗原结合多肽,其中 VH 结构域中的高变环 H3 或者 VL 结构域中的高变环 L3 或者二者来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。

5. 根据权利要求 1 的抗原结合多肽,其中 VH 结构域和 VL 结构域中的每一个高变环或互补决定区都来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。

6. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其中来自于骆驼科物种之 VH 或 VL 结构域的高变环或互补决定区 (CDR) 具有由骆驼科物种之 VH 或 VL 基因编码的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的抗原结合多肽,其中来自于骆驼科物种之 VH 或 VL 结构域的高变环或互补决定区具有的氨基酸序列与通过主动免疫骆驼科物种获得之常规抗体的高变环或互补决定区的氨基酸序列基本一致。

8. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的抗原结合多肽,其与通过主动免疫骆驼科物种获得的骆驼科 VH 或 VL 结构域相比或者与由骆驼科物种之 VH 或 VL 基因编码的 VH 或 VL 结构域相比,在所述 VH 结构域或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区中包含至少一个氨基酸替换。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项的抗原结合多肽,其与通过主动免疫骆驼科物种获得的骆驼科 VH 或 VL 结构域相比或者与由骆驼科物种之 VH 或 VL 基因编码的 VH 或 VL 结构域相比,在所述 VH 结构域或 VL 结构域的至少一个框架区中包含至少一个氨基酸替换。

10. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其中与由人类种系或体细胞突变的 VH 基因所编码的 VH 结构域相比,所述 VH 结构域包含在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上的至少一个氨基酸序列不匹配。

11. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其中与由人类种系或体细胞突变的 VL 基因所编码的 VL 结构域相比,所述 VL 结构域包含在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上的至少一个氨基酸序列不匹配。

12. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其包含 VH 结构域,所述 VH 结构域表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人 VH 结构域具有 80%或更高、优选 85%或更高的序列一致性。

13. 根据权利要求 12 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人 VH 结构域具有 90%或更高的序列一致性。

14. 根据权利要求 13 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人 VH 结构域具有 95%或更高的序列一致性。

15. 根据权利要求 14 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人 VH 结构域具有 97%或更高的序列一致性。

16. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其包含 VL 结构域,所述 VL 结构域表现

出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人 VL 结构域具有 80%或更高、优选 85%或更高的序列一致性。

17. 根据权利要求 16 的抗原结合多肽,其中所述 VL 结构域表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人类 VL 结构域具有 90%或更高的序列一致性。

18. 根据权利要求 17 的抗原结合多肽,其中所述 VL 结构域表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人类 VL 结构域具有 95%或更高的序列一致性。

19. 根据权利要求 18 的抗原结合多肽,其中所述 VL 结构域表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与一个或多个人类 VL 结构域具有 97%或更高的序列一致性。

20. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域并且表现出预测的或实际的典型折叠结构,该结构与人抗体中出现的典型折叠结构基本相同。

21. 根据权利要求 20 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域中的高变环 H1 和高变环 H2 各自来自于骆驼科物种的 VH 结构域,并且各自表现出预测的或实际的典型折叠结构,该结构与在人抗体中出现的典型折叠结构基本相同。

22. 根据权利要求 21 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域中的高变环 H1 和高变环 H2 形成预测的或实际的典型折叠结构的组合,该组合与已知在人类种系 VH 结构域中出现的典型折叠结构的组合相同。

23. 根据权利要求 22 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域中的高变环 H1 和高变环 H2 形成选自 1-1、1-2、1-3、1-4、1-6、2-1、3-1 和 3-5 的典型折叠的组合。

24. 根据权利要求 22 或 23 的抗原结合多肽,其表现出在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上与人类 VH 结构域具有 80%或更高的序列一致性,并且其中高变环 H1 和高变环 H2 形成预测的或实际的典型折叠结构的组合,该组合与已知在相同人 VH 结构域中天然出现的典型折叠结构的组合相同。

25. 根据权利要求 21 至 24 中任一项的抗原结合多肽,其中所述 VL 结构域中的高变环 L1 和高变环 L2 各自来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域,并且各自表现出预测的或实际的典型折叠结构,该结构与在人抗体中出现的典型折叠结构基本相同。

26. 根据权利要求 25 的抗原结合多肽,其中所述 VL 结构域中的高变环 L1 和高变环 L2 形成预测的或实际的典型折叠结构的组合,该组合与已知在人类种系 VL 结构域中出现的典型折叠结构的组合相同。

27. 根据权利要求 26 的抗原结合多肽,其中所述 VL 结构域中的高变环 L1 和高变环 L2 形成下列典型折叠组合中的一种:11-7、13-7(A, B, C)、14-7(A, B)、12-11、14-11、12-12、2-1、3-1、4-1 和 6-1。

28. 根据权利要求 1 的抗原结合多肽,其中所述 VH 结构域和 / 或 VL 结构域具有由骆驼科物种的 VH 或 VL 基因编码的氨基酸序列。

29. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其中所述骆驼科物种选自骆驼、大羊驼 (llama)、单峰驼 (dromedary)、小羊驼 (vicunia)、原驼 (guanaco) 和阿尔帕卡羊驼 (alpaca)。

30. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其与靶标抗原发生免疫反应。

31. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其特异性结合靶标抗原。

32. 根据权利要求 30 或 31 中的抗原结合多肽,其中所述靶标抗原是非骆驼科动物抗原。

33. 根据权利要求 32 中的抗原结合多肽,其中所述靶标抗原是人类抗原。

34. 根据权利要求 32 中的抗原结合多肽,其中所述靶标抗原是病毒抗原或细菌抗原。

35. 根据权利要求 30 至 34 中任一项的抗原结合多肽,其中所述靶标抗原是具有治疗或诊断价值的靶标。

36. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其是嵌合多肽。

37. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其是重组表达的多肽。

38. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其是抗体。

39. 根据前述任一项权利要求的抗原结合多肽,其包含至少一个恒定结构域,所述恒定结构域具有由人类免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列或者与其具有至少 90%一致性的氨基酸序列。

40. 根据权利要求 39 的抗原结合多肽,其包含人抗体的完整恒定结构域。

41. 根据权利要求 1 至 37 中的任何一项的抗原结合多肽,其是 Fab、Fab'、F(ab')₂、双特异性 Fab'、Fv 片段、微型双功能抗体、线性抗体、单链可变片段(scFv)或由抗体片段形成的多特异性抗体。

42. 编码权利要求 1 至 41 中任一项所述抗原结合多肽或者编码所述抗原结合多肽之片段的多核苷酸分子,所述片段包含来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区(CDR)。

43. 包含与调控序列有效连接的权利要求 42 之多核苷酸分子的表达载体,所述调控序列允许所述抗原结合多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达。

44. 包含权利要求 43 之表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

45. 用于生产重组抗原结合多肽的方法,其包括在允许抗原结合多肽表达的条件下培养权利要求 44 的宿主细胞或无细胞表达系统,并回收所表达的抗原结合多肽。

46. 用于制备与靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的方法,所述方法包括:

(a) 确定如下核苷酸序列,其编码与所述靶标抗原发生免疫反应的骆驼科常规抗体 VH 和 / 或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区(CDR);以及

(b) 表达与所述靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽,所述抗原结合多肽包含 VH 和 VL 结构域,其中所述 VH 结构域或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区(CDR)具有由步骤(a)所确定之核苷酸序列编码的氨基酸序列。

47. 根据权利要求 46 的方法,其中步骤(a)中的骆驼科常规抗体通过免疫骆驼科物种而获得,从而产生与所述靶标抗原发生免疫反应的常规抗体。

48. 根据权利要求 46 或 47 的方法,其中步骤(a)包括确定编码与所述靶标抗原发生免疫反应之骆驼科常规抗体 VH 和 / 或 VL 结构域的核苷酸序列;步骤(b)包括表达与所述靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽,所述抗原结合多肽包含 VH 和 VL 结构域,其中所述 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个具有由步骤(a)所确定之核苷酸序列编码的氨基酸序列。

49. 根据权利要求 46 至 48 中任一项的方法,其中步骤(b)中表达的抗原结合多肽包含非骆驼科动物抗体、优选人抗体的至少一个恒定结构域。

50. 用于制备与靶标抗原发生免疫反应（或特异性结合）的重组抗原结合多肽的方法，所述抗原结合多肽包含 VH 结构域和 VL 结构域，其中所述 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区（CDR）来自于骆驼科物种，所述方法包括以下步骤：

(a) 分离如下骆驼科核酸，其编码与所述靶标抗原发生免疫反应的骆驼科常规抗体 VH 和 / 或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区（CDR）；

(b) 制备包含编码如下高变环或互补决定区之核苷酸序列的多核苷酸，所述高变环或互补决定区具有与由步骤 (a) 分离之核酸编码的高变环或互补决定区一致的氨基酸序列，该多核苷酸编码包含与所述靶标抗原发生免疫反应（或特异性结合）的 VH 和 VL 结构域的抗原结合多肽；以及

(c) 由步骤 (b) 的重组多核苷酸表达所述抗原结合多肽，其中所述抗原结合多肽不与步骤 (a) 的骆驼科常规抗体相同。

51. 根据权利要求 50 的方法，其中 (a) 包括分离编码所述抗体之 VH 结构域和 / 或 VL 结构域的骆驼科核酸，以及改变所述核酸序列从而使其编码具有一个或多个氨基酸替换、缺失或添加的 VH 结构域和 / 或 VL 结构域。

52. 根据权利要求 50 或 51 的方法，其中步骤 (b) 制备的重组多核苷酸额外包含如下核苷酸序列，所述序列编码非骆驼科动物抗体、优选人抗体的一个或多个恒定结构域。

53. 根据权利要求 50 至 52 中任一项的方法，其中步骤 (a) 的骆驼科常规抗体通过免疫骆驼科物种而获得，从而产生抗所述靶标抗原的常规抗体。

54. 根据权利要求 53 的方法，其中所述骆驼科物种是骆驼、大羊驼、单峰驼、小羊驼、原驼和阿尔帕卡羊驼。

55. 根据权利要求 53 或 54 的方法，其中所述靶标抗原选自人类抗原、病毒抗原、细菌抗原以及具有治疗或诊断价值的靶标抗原。

56. 根据权利要求 46 至 55 中任一项的方法，其中通过该方法制备的抗原结合多肽不与步骤 (a) 的骆驼科常规抗体相同。

57. 根据权利要求 1 的抗原结合多肽，其可通过权利要求 46 至 56 中任一项的方法获得。

58. 检测试剂盒，其包含权利要求 1 至 41 中任一项的抗原结合多肽。

59. 根据权利要求 58 的检测试剂盒，其中所述检测试剂盒包含至少一种对于使用所述抗原结合多肽进行免疫测定来说所需的另外试剂。

60. 药物制剂，其包含权利要求 1 至 41 中任一项的抗原结合多肽以及至少一种可药用的稀释剂、赋形剂或载体。

61. 用于产生表达载体文库的方法，所述表达载体编码骆驼科常规抗体的 VH 和 / 或 VL 结构域，所述方法包括以下步骤：

a) 扩增编码骆驼科常规抗体之 VH 和 / 或 VL 结构域的核酸分子的区域以获得经扩增的基因区段，每个基因区段包含编码骆驼科常规抗体之 VH 结构域的核苷酸序列或编码骆驼科常规抗体之 VL 结构域的核苷酸序列，以及

b) 将 a) 中获得的基因区段克隆入表达载体，从而使每个表达载体至少包含编码 VH 结构域的基因区段和 / 或编码 VL 结构域的基因区段，由此获得了表达载体文库。

62. 根据权利要求 61 的方法，其中步骤 a) 中扩增的核酸包括从骆驼科动物淋巴组织制

备的 cDNA 或基因组 DNA, 所述淋巴组织包括一种或多种 B 细胞、淋巴结、脾细胞、骨髓细胞, 或其组合。

63. 根据权利要求 62 的方法, 其中所述淋巴组织从接受主动免疫的骆驼科动物获得。

64. 根据权利要求 62 或 63 的方法, 其中所述淋巴组织包括选择用来表达骆驼科动物常规抗体的一种或多种 B 细胞, 其中所述抗体具有期望的抗原结合特性。

65. 根据权利要求 64 的方法, 其中所述靶标抗原选自人类抗原、病毒抗原、细菌抗原以及具有治疗或诊断价值的靶标抗原。

66. 根据权利要求 61 至 65 中任一项的方法, 其中步骤 b) 包括将编码 VH 和 VL 结构域的基因区段克隆入表达载体以产生表达载体文库, 其中所述文库中的每个表达载体包含编码 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段, 并且指导包含所述 VH 结构域和所述 VL 结构域之抗原结合多肽的表达。

67. 根据权利要求 61 至 66 中任一项的方法, 其中所述文库中的表达载体选自噬菌体载体、噬菌粒载体、酵母、哺乳动物表达载体和细菌表达载体。

68. 用于产生表达载体文库的方法, 所述表达载体编码骆驼科常规抗体的 VH 和 VL 结构域, 所述方法包括以下步骤:

a) 主动免疫骆驼科动物, 从而产生针对靶标抗原的常规骆驼科动物抗体;

b) 从包含来自所述经免疫骆驼科动物之淋巴组织 (例如循环中 B 细胞) 的样品制备 cDNA 或基因组 DNA;

c) 扩增所述 cDNA 或基因组 DNA 的区域以获得经扩增的基因区段, 每个基因区段包含编码骆驼科动物常规抗体之 VH 结构域的核苷酸序列或包含编码骆驼科动物常规抗体之 VL 结构域的核苷酸序列; 以及

d) 将 c) 中获得的基因区段克隆到表达载体中, 从而使每个表达载体包含编码 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段, 并且指导包含所述 VH 结构域和所述 VL 结构域之抗原结合多肽的表达, 由此获得表达载体文库。

69. 权利要求 68 的方法, 其中步骤 d) 中获得的表达载体指导抗原结合多肽形式的所述 VH 结构域和所述 VL 结构域的表达, 所述抗原结合多肽形式选自 scFv、Fab 和抗体。

70. 根据权利要求 61 至 69 中任一项的方法, 其中所述骆驼科动物是大羊驼或阿尔帕卡羊驼。

71. 通过权利要求 61 至 70 中任一项的方法制备的表达载体文库。

72. 用于制备表达载体的方法, 所述表达载体编码与靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽, 该方法包括以下步骤:

i) 制备表达载体的文库, 其中所述文库中的每个载体都包含编码 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段, 其中所述 VH 结构域或所述 VL 结构域的至少一个来自于骆驼科动物常规抗体, 并且其中所述文库中的每个载体都指导包含所述 VH 结构域和 VL 结构域之抗原结合多肽的表达;

ii) 针对与所述靶标抗原的免疫反应性筛选由所述文库编码的抗原结合多肽, 并由此选择编码与所述靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的表达载体。

73. 权利要求 72 的方法, 其中所述 VH 结构域和所述 VL 结构域皆来自于骆驼科动物常规抗体。

74. 根据权利要求 73 的方法,其中步骤 i) 中的文库通过权利要求 66 至 69、72 或 73 中任一项的方法制备。

75. 根据权利要求 72 至 74 中任一项的方法,其还包括步骤 iii):将编码步骤(ii)中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和编码步骤(ii)中选出之载体的 VL 结构域的基因区段克隆到另一表达载体中,其与编码人抗体之一个或多个恒定结构域的核苷酸序列有效连接,从而产生编码嵌合抗原结合多肽的表达载体,所述嵌合抗原结合多肽包含与人抗体之一个或多个恒定结构域相融合的步骤(ii)中选出之 VH 和 VL 结构域。

76. 根据权利要求 75 的方法,其中在克隆到另一表达载体中之前,改造编码步骤(ii)中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和 / 或编码步骤(ii)中选出之载体的 VL 结构域的基因区段,从而向编码所述 VH 和 / 或所述 VL 结构域的核苷酸序列中引入一个或多个改变。

77. 根据权利要求 72 至 74 中任一项的方法,其还包括轻链改组的方法,其包括以下步骤:

iii) 制备第二表达载体文库,其中该文库中的每个载体包含编码在步骤(ii)中选出之表达载体的 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段;

iv) 针对与所述靶标抗原的免疫反应性筛选由所述第二文库编码的抗原结合多肽,并由此选择编码与所述靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的表达载体。

78. 根据权利要求 77 的方法,其还包括步骤 v):将编码在步骤(iv)中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和编码在步骤(iv)中选出之载体的 VL 结构域的基因区段克隆到另一表达载体中,其与编码人抗体之一个或多个恒定结构域的核苷酸序列有效连接,从而产生编码嵌合抗原结合多肽的表达载体,所述嵌合抗原结合多肽包含与人抗体之一个或多个恒定结构域相融合的在步骤(iv)中选出的 VH 和 VL 结构域。

79. 根据权利要求 78 的方法,其中在克隆到另一表达载体中之前,改造编码在步骤(iv)中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和 / 或编码在步骤(iv)中选出之载体的 VL 结构域的基因区段,从而向编码所述 VH 和 / 或所述 VL 结构域的核苷酸序列中引入一个或多个改变。

80. 根据权利要求 77 的方法,其还包括重链改组的方法,其包括以下步骤:

v) 制备第三表达载体文库,其中所述文库中的每个载体包含编码在步骤(iv)中选出之表达载体的 VL 结构域的基因区段和编码 VH 结构域的基因区段;

vi) 针对与所述靶标抗原的免疫反应性筛选由所述第三文库编码的抗原结合多肽,并由此选择编码与所述靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的表达载体。

81. 根据权利要求 80 的方法,其还包括步骤 vii):将编码在步骤(vi)中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和编码在步骤(vi)中选出之载体的 VL 结构域的基因区段克隆到另一表达载体中,其与编码人抗体之一个或多个恒定结构域的核苷酸序列有效连接,从而产生编码嵌合抗原结合多肽的表达载体,所述嵌合抗原结合多肽包含与人抗体之一个或多个恒定结构域相融合的在步骤(vi)中选出之载体的 VH 和 VL 结构域。

82. 根据权利要求 81 的方法,其中在克隆到另一表达载体中之前,改造编码在步骤(vi)中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和 / 或编码在步骤(vi)中选出之载体的 VL 结构域的基因区段,从而向编码所述 VH 和 / 或所述 VL 结构域的核苷酸序列中引入一个或多个改变。

83. 根据权利要求 72 至 82 中任一项的方法制备的表达载体。

84. 用于生产表达载体的方法,所述表达载体编码与靶标抗原发生免疫反应的嵌合抗原结合多肽,所述方法包括以下步骤:

a) 主动免疫骆驼科动物(大羊驼或阿尔帕卡羊驼),从而产生抗靶标抗原的常规骆驼科动物抗体;

b) 从包含来自于所述经免疫骆驼科动物之淋巴组织(如循环中 B 细胞)的样品制备 cDNA 或基因组 DNA;

c) 扩增所述 cDNA 或基因组 DNA 的区域以获得经扩增的基因区段,每个基因区段包含编码骆驼科动物常规抗体之 VH 结构域的核苷酸序列或编码骆驼科动物常规抗体之 VL 结构域的核苷酸序列;

d) 将 c) 中获得的基因区段克隆到表达载体中,从而使每个表达载体包含编码 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段,并且指导包含所述 VH 结构域和所述 VL 结构域之抗原结合多肽的表达,由此产生表达载体文库。

e) 针对与所述靶标抗原的免疫反应性筛选由在步骤 d) 中获得之文库编码的抗原结合多肽,从而选择编码与所述靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的表达载体,

f) 任选地,进行轻链改组步骤和/或重链改组步骤以选择这样的表达载体,其编码与所述靶标抗原发生免疫反应的效力经优化的抗原结合多肽;

g) 任选地,对编码步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和/或编码在步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VL 结构域的基因区段进行种系化和/或密码子优化;以及

h) 将编码在步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VH 结构域的基因区段或在步骤 g) 中产生的经种系化和/或密码子优化的 VH 基因区段以及编码在步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VL 结构域的基因区段或在步骤 g) 中产生的经种系化和/或密码子优化的 VL 基因区段克隆到另一表达载体中,其与编码人抗体之一个或多个恒定结构域的核苷酸序列有效连接,从而产生编码嵌合抗原结合多肽的表达载体,所述嵌合抗原结合多肽包含与人抗体之一个或多个恒定结构域相融合的 VH 和 VL 结构域。

85. 根据权利要求 84 的方法制备的表达载体。

86. 用于生产与靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的方法,该方法包括以下步骤:

a) 使用权利要求 72 至 82 中任一项的方法或权利要求 84 的方法制备表达载体,其编码与靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽;

b) 在允许所编码的抗原结合多肽表达的条件下,将所述表达载体引入宿主细胞或无细胞表达系统;以及

c) 回收所表达的抗原结合多肽。

骆驼科动物来源的抗原结合多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及用于产生抗原结合多肽（包括单克隆抗体）的新平台，其与人抗体可变结构域的序列和结构高度同源。

背景技术

[0002] 单克隆抗体已被广泛地用作研究工具，并且越来越多地被用作治疗或诊断试剂。目前有超过 20 种不同的单克隆抗体已经获得监管部门的批准以用于治疗不同的疾病，其中包括癌症、炎症、自身免疫病、传染性疾病、哮喘、心血管疾病和移植排斥，而且在开发过程中的单克隆抗体药物的数量也在逐年增加。

[0003] 啮齿类动物（特别是鼠）单克隆抗体由于其非人源性的相关问题（特别是其在人类宿主中的免疫原性）因而在人类治疗中的实用性具有局限。为了尽可能地降低人类对治疗性抗体药物的免疫应答，单克隆抗体技术已经从完全小鼠抗体发展到嵌合抗体（小鼠的可变结构域被嫁接到人 IgG 的骨架上）、人源化抗体（小鼠的 CDR 被嫁接到人 IgG 的骨架上）、“完全人”抗体（来源于合成文库或来源于经免疫的表达部分人 IgG 库的转基因小鼠）。

[0004] 许多可以生产针对治疗性目的之靶标抗原的完全人或“人源化”单克隆抗体的技术平台已被开发。这些平台中的每一个都有其独特的特点和潜在的缺陷。

[0005] 小鼠单克隆抗体的人源化最初通过将小鼠的可变结构域与人的恒定结构域结合而实现，产生具有约 70% 人源成份的所谓“嵌合抗体”。随后，更进一步的人源化通过将小鼠单克隆抗体的互补决定区（complementarity-determining region, CDR）嫁接到人抗体可变抗体结构域的框架区上实现。此外，发现存在于这些框架区中的一些氨基酸残与 CDR 或抗原相互作用，而后使人源化抗体中的这些氨基酸回复突变以提高结合。（Almagro 等 *Frontiers in Bioscience*, 13:1619-1633(2008)）。使用这种方法改造的单克隆抗体在人源化后与人类的 VH 和 VL 结构域序列有较高等级的一级序列同源性，但缺点是其可能以不具备人样结构的高变环（hypervariable loop）来结束，这是因为并非所有小鼠编码的 CDR 都使用标准的折叠和标准折叠的组合，而在人抗体中则没有这种情况发生（Almagro 等，*Mol. Immunol.* 34:1199-1214(1997)；Almagro 等，*Immunogen.* 47:355-63(1998)）。更糟糕的是人源化此类抗体通常需要进行大量的突变（其过程复杂且费时），由于人源化需要进行大量的改变并且鼠源库中主要使用 VKappa 结构域（而所有人抗体中约一半具有 VLambda 结构域），抗体还有丧失亲和力和效力的风险。

[0006] 作为对人源化小鼠单克隆抗体潜在的改进，“完全人”单克隆抗体可以通过两种非常不同的方法生产。第一种方法是从完全合成的人类组合抗体文库（例如 HuCAL®、MorphoSys）中筛选。这种方法的潜在缺点是，该合成文库只是接近于人类种系中天然存在的功能多样性，因而其多样性是较有限的。此外，使用这种方法产生的抗体不是来自于通过主动免疫而进行的体内 CDR 筛选，因而通常必须进行亲和力成熟（affinity maturation）以提高其对靶标抗原的亲和力。亲和力成熟是一个耗时的过程，其可能会大大增加筛选出

抗体的时间。此外,在亲和力成熟过程中,某些氨基酸残基可能会被改变,这可能会对所得的抗体的结合特异性或稳定性产生负面影响(Wu等, J. Mol. Biol. 368 :652-65(2007))。

[0007] 另一种“完全人”平台是基于用人类种系的抗体编码序列进行改造以取代鼠免疫球蛋白编码区的转基因小鼠(例如 HuMab、Medarex)。这些系统的优点是:抗体是使用靶标抗原通过主动免疫而产生的,即它们具有针对抗原的高初始亲和力,并且不需要或只需最低限度地对原始抗体进行抗体改造以使它们更加人源化。然而,转基因小鼠品系必然是高度近交的,这对于抗体应答的强度和多样性具有不利影响。该平台的另一个缺点是在一些转基因小鼠系统中由于人类 Fc/小鼠 Fc 受体相互作用可能导致 B 细胞成熟障碍。

[0008] 另一种平台是基于免疫非人灵长类动物(特别是食蟹猴(cynomologous monkey))。由于猴子与人类的免疫球蛋白之间氨基酸序列具有高度一致性,因此推断在猴子中产生的抗体将几乎不需要或不需为使其适用于人类治疗而额外地对可变结构域进行“人源化”(见 WO 93/02108)。

发明概要

[0009] 本发明已认识到对这样的“人源化”单克隆抗体(抗原结合多肽)平台的需求,其避免了现有技术中人源化或完全人抗体平台所发现的部分或全部缺点,并且其可产生针对广泛的具有治疗意义的靶标抗原具有高度特异性和亲和力的抗体,同时最大限度地减小其在人类宿主中的免疫原性。

[0010] 本发明人已发现,来自于骆驼科(Camelidae)动物常规抗体的 VH 和 VL 结构域与人抗体 VH 和 VL 结构域在框架区表现出高度的氨基酸序列一致性。事实上,骆驼科动物常规的 VH 结构域与人类 VH 结构域之间以及骆驼科动物常规的 VL 结构域与人类 VL 结构域之间的序列一致性程度可以接近于在人类与其它灵长类动物物种(例如食蟹猴)之间所观察到的程度,而这远远高于根据人类和骆驼科动物之间的进化距离所预期的程度。该发现是出人意料的,因为骆驼科动物抗体重链可变结构域(variable domain of heavy-chain camelid antibody, VHH)并未显示出与人类的可变结构域具有高度的序列同源性。

[0011] 此外,本发明人还发现骆驼科动物 VH 和 VL 结构域的高变环(H1、H2、L1、L2 和 L3)与人类 VH 和 VL 结构域的高变环通常表现出高度的结构同源性,考虑到人类与骆驼科动物之间的进化距离,这又是意料之外的。骆驼科动物常规抗体(或更确切地说是该抗体的高变环)与人抗体之间的高度结构同源性也同样出人意料,这是因为已有报道骆驼科动物抗体重链的高变环在构象和长度上与人类和小鼠 VH 中相应的环差异很大(见综述 De Genst 等, Develop Compo Immunol. 30 :187-98(2006))。

[0012] 与人抗体框架区具有氨基酸一级序列的高度同源性、与人抗体结合位点具有抗原结合位点(包括高变环)的高度结构同源性以及骆驼科动物常规抗体可由与人类有很大进化距离的远交动物种群主动免疫获得的事实使本发明人推测:骆驼科动物的常规抗体对于改造得到在人类治疗中具有潜在应用的单克隆抗体提供了诱人的新思路。

[0013] 因此,根据本发明的第一方面,提供了包含 VH 结构域和 VL 结构域的抗原结合多肽,其中在所述 VH 结构域和 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区(CDR)来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。

[0014] 在一个实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以与靶标抗原发生免疫反应。在另

一实施方案中,所述抗原结合多肽可以特异性与靶标抗原结合。

[0015] 在一个非限制性的实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以是重组多肽。

[0016] 在一个非限制性的实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以是嵌合多肽。

[0017] 在一个非限制性的实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以是单克隆抗体。

[0018] 在一个非限制性的实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以是重组表达的嵌合单克隆抗体。

[0019] 在一个非限制性的实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以包含通过骆驼科物种的主动免疫获得的高变环或互补决定区。

[0020] 本发明的第二方面提供了用于制备与靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽的方法,该方法包括:

[0021] (a) 确定编码骆驼科动物常规抗体 VH 和 / 或 VL 结构域之至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 的核苷酸序列,其中所述抗体与所述靶标抗原发生免疫反应;以及

[0022] (b) 表达与所述靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽,所述抗原结合多肽包含 VH 和 VL 结构域,其中 VH 或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 具有由 (a) 步骤确定的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0023] 本发明的第三方面提供了用于制备与靶标抗原发生免疫反应 (或特异性结合) 的重组抗原结合多肽的方法,所述抗原结合多肽包含 VH 和 VL 结构域,其中在 VH 结构域或 VL 结构域中至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种,所述方法包括以下步骤:

[0024] (a) 分离编码骆驼科动物常规抗体 VH 和 / 或 VL 结构域之至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 的骆驼科动物核酸,其中该抗体与所述靶标抗原发生免疫反应;

[0025] (b) 制备包含编码如下高变环或互补决定区之核苷酸序列的多核苷酸,所述高变环或互补决定区具有与由步骤 (a) 分离的核酸编码的高变环或互补决定区一致的氨基酸序列,该多核苷酸编码包含 VH 和 VL 结构域的与所述靶标抗原发生免疫反应 (或特异性结合) 的抗原结合多肽;以及

[0026] (c) 利用步骤 (b) 的重组多核苷酸表达所述抗原结合多肽。

[0027] 步骤 (b) 中制备的多核苷酸优选地为重组多核苷酸。

[0028] 本发明还提供了多核苷酸,其包含编码本发明第一方面所述的抗原结合多肽或者编码所述抗原结合多肽之片段的核苷酸序列,所述片段包含来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区 (CDR)。

[0029] 本发明还提供了包含上述多核苷酸 (与允许该抗原结合多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调控序列有效连接) 的表达载体、含有表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统、以及生产重组抗原结合多肽的方法,该方法包括在允许抗原结合多肽表达的条件下培养宿主细胞或无细胞表达系统以及回收所表达之抗原结合多肽。

[0030] 此外,本发明提供了检测试剂盒,其包含本发明第一方面所述的抗原结合多肽以及药物制剂 (其包括本发明第一方面所述的抗原结合多肽和至少一种可药用的稀释剂、赋形剂或载体)。

附图说明

[0031] 图 1- 显示 ELISA 的结果,其中经 IL1-Beta 免疫的大羊驼 (llama) 的血清在免疫后第 0 天及第 28 天用来检测 IL1-Beta 抗体的存在。

[0032] 图 2- 示意与 IL-1Beta 发生免疫反应的两种 Fab (编号为 1E2 和 1F2) 的“人源化”变体的氨基酸序列。根据与最接近的人类种系的比对,提出了在 1E2 和 1F2 的 VH 和 VL 框架区具有突变。除了完全人源化的 (hum) 和野生型的 (wt) V 区域以外,还提出了只有三个野生型残基保留的“安全变体” (safe)。

[0033] 图 3- 显示 ELISA 的结果,其中使用重组表达的 Fab 来检测其与 biot-IL-1Beta 结合的能力。为此,利用包被有抗 myc 抗体的 Maxisorp 板捕获 Fab。加入生物素化的人 IL-1Beta (Biot-IL-1Beta),然后使用经 HRP 缀合的链霉亲和素检测所结合的细胞因子。

[0034] 图 4- 显示噬菌体 ELISA 的结果,其中检测了展示 Fab 1E2 和 1F2 之人源化变体的噬菌体与 IL-1Beta 的结合。

[0035] 图 5- 显示 ELISA 的结果,其中检测了嵌合 1E2 与 IL-1Beta 的结合。

具体实施方式

[0036] 本发明涉及一种新的用于生产对期望靶标抗原具有特异性的抗原结合多肽的技术平台,其基于骆驼科物种的常规抗体库,以及使用该技术平台获得的抗原结合多肽。

[0037] 因此,在本发明第一方面提供了包含 VH 和 VL 结构域的抗原结合多肽,其中在 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。

[0038] 在下文中,本发明的不同方面会更详细地定义。由此定义的每一方面可以与任何其它方面结合,除非有明确相反的指示。特别是,任何被作为优选或有利的特征可与任何其它被作为优选或有利的特征结合。

[0039] 定义

[0040] 术语“抗原结合多肽”是指包含 VH 和 VL 结构域的任何多肽,其与靶标抗原发生免疫反应和特异性结合。如本文别处所述,示例性的抗原结合多肽包括抗体和免疫球蛋白,还包括抗体片段。

[0041] 当提及与抗原结合多肽发生免疫反应的“靶标抗原”时,术语“抗原”具有本领域普通技术人员所通常理解的含义,其包括多肽、肽、多糖、糖蛋白、多核苷酸 (例如 DNA) 或合成化学抗原等。

[0042] 术语“抗原”也可以用来描述在制备本发明抗原结合多肽时用来免疫动物 (例如骆驼科动物) 的材料。在这种情况下,术语“抗原”可具有更广义的含义,其可以包括抗原的纯化形式,也可以是抗原的原始或半纯化制剂 (例如细胞、细胞裂解物或上清液、细胞级分 (例如细胞膜) 等),以及与适当载体蛋白缀合的半抗原。免疫方案中所使用的“抗原”并不一定与能够跟所产生的抗原结合多肽发生免疫反应的“靶标抗原”在结构上一致。通常,用于进行免疫的“抗原”可以是“靶标抗原”的截短形式,例如含有免疫原性表位的片段。用于进行主动免疫的“抗原”的其它特征将在本文别处进行描述,并可能是本领域技术人员通常已知的。

[0043] 靶标抗原和抗原结合多肽之间的“特异性结合”是指免疫特异性。如果与其它表位相比,抗原结合多肽优先与靶标抗原上的表位结合,则抗原结合多肽与其靶标抗原“特异

性地”结合。“特异性结合”并不排除与其它具有类似抗原表位的抗原发生交叉反应。

[0044] “抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是糖蛋白,其表现出与(靶标)抗原的特异性结合。

[0045] 已知骆驼科动物物种包括两种不同类型的抗体;经典的(或“常规”的)抗体以及重链抗体。

[0046] 本文使用的术语“常规抗体”是指任何同种型的抗体,包括 IgA、IgG、IgD、IgE 或 IgM。骆驼科动物本源的或天然的“常规”抗体通常是异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链中不同。每条重链和轻链链内也具有规则间隔的二硫桥。每条重链在一端(N端)具有可变结构域(VH),其后是若干恒定结构域。每条轻链在一端(N端)具有可变结构域(VL)而在另一端具有恒定结构域(CL),轻链的恒定结构域与重链的第一个恒定结构域对齐,轻链的可变结构域与重链的可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基形成轻、重链可变结构域之间的界面。

[0047] 术语“重链抗体”是指已知在骆驼科物种中天然存在的第二种类型的抗体,该抗体天然缺失轻链(Hamers-Casterman 等,Nature. 1993 ;363 ;446-8)。重链抗体(heavy-chain antibody, HCAb)由共价二硫键连接的两条重链组成。HCAb 中每条重链的一端具有可变结构域。为将它们与骆驼科动物“常规”抗体重链的可变结构域(VH)区分开,HCAb 的可变结构域被称为“VHH”。VHH 结构域与 VH 结构域完全不同,它们由骆驼科动物基因组中的不同基因区段编码。

[0048] 本发明多肽的 VL 结构域可以是 VLambda 型或 VKappa 型。因此,术语“VL 结构域”是指骆驼科动物的 VKappa 和 VLambda 两种同种型以及由其改造的变体(相对于骆驼科动物的 VL 结构域来说,所述变体包含一个或多个氨基酸替换、插入或缺失)。

[0049] 术语“VH 结构域”是指骆驼科动物任何已知的重链同种型的 VH 结构域,包括 γ 、 ϵ 、 δ 、 α 或 μ 同种型以及由其改造的变体(相对于骆驼科动物的 VH 结构域来说,所述变体包含一个或多个氨基酸替换、插入或缺失)。术语“VH 结构域”仅指骆驼科动物常规抗体的 VH 结构域,而不包括骆驼科动物的 VHH 结构域。

[0050] 术语“可变”是指可变结构域 VH 和 VL 的某些部分的序列在抗体之间差异很大,并用于每个特定抗体针对其靶标抗原的结合及特异性。然而,可变性在抗体的可变结构域中并非均匀分布。它集中在每个 VL 结构域和 VH 结构域中被称为“高变环”的三个区段中,并形成抗原结合位点的一部分。VLambda 轻链结构域中的第一、第二和第三高变环在本文中被称为 L1(λ)、L2(λ)和 L3(λ),并可定义为包含 VL 结构域中的 24-33 位(L1(λ),由 9、10 或 11 个氨基酸残基组成)、49-53 位(L2(λ),由 3 个残基组成)和 90-96 位(L3(λ),由 5 个残基组成)残基(Morea 等,Methods 20 :267-279(2000))。VKappa 轻链结构域中的第一、第二和第三高变环在本文中被称为 L1(κ)、L2(κ)和 L3(κ),并可定义为包含 VL 结构域中的 25-33 位(L1(κ),由 6、7、8、11、12 或 13 个残基组成)、49-53 位(L2(κ),由 3 个残基组成)和 90-97 位(L3(κ),由 6 个残基组成)残基(Morea 等,Methods 20 :267-279(2000))。VH 结构域中的第一、第二和第三高变环在本文中被称为 H1、H2 和 H3,并可定义为包含 VH 结构域中的 25-33 位(H1,由 7、8 或 9 个残基组成)、52-56 位(H2,由 3 或 4 个残基组成)和 91-105 位(H3,其长度非常不等)残基(Morea 等,Methods 20 :267-279(2000))。

[0051] 除非另有说明,术语 L1、L2 和 L3 分别是指 VL 结构域的第一、第二和第三高变环,并且包括来自骆驼科动物 $V\kappa$ 和 $V\lambda$ 同种型二者的高变环。术语 H1、H2 和 H3 分别是指 VH 结构域的第一、第二和第三高变环,并且包括来自骆驼科动物任何已知重链同种型的高变环,包括 γ 、 ϵ 、 δ 、 α 或 μ 。

[0052] 高变环 L1、L2、L3、H1、H2 和 H3 可以各自包括“互补决定区”(或“CDR”)的一部分。术语“高变环”和“互补决定区”不是严格意义的同义词,因为高变环(HV)是基于结构定义的,而互补决定区(CDR)是基于序列可变性定义的(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983),并且 HV 和 CDR 的范围在某些 VH 和 VL 结构域中可以不同。

[0053] VL 和 VH 结构域的 CDR 通常定义为包含下列氨基酸:轻链可变结构域 24-34 位(CDRL1)、50-56 位(CDRL2)和 89-97 位(CDRL3)残基,以及重链可变结构域 31-35 位或 31-35b 位(CDRH1)、50-65 位(CDRH2)和 95-102 位(CDRH3)残基;Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)。因此, HV 可以包含在相应的 CDR 中,并且本文中关于 VH 和 VL 结构域的“高变环”也应解释为包括相应的 CDR,反之亦然,除非另有说明。

[0054] 可变结构域保守性较高的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR(分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4),主要是采取 β -片层构型,通过三个高变环相连接。每条链中的高变环通过 FR 而紧密联系在一起,并与其它链中的高变环一起促成抗体之抗原结合位点的形成。对抗体的结构分析表明序列与通过互补决定区形成的结合位点形状之间的关系(Chothia等, *J. Mol. Biol.* 227:799-817(1992));Tramontano等, *J. Mol. Biol.* 215:175-182(1990))。尽管它们具有高度序列可变性,但六个环中有五个只采取了主链构象一小部分,称为“典型结构”。这些构象首先取决于环的长度,其次取决于环和框架区中某些位点关键残基的存在(其通过包装、氢键键合或决定不寻常主链构象的能力来确定构象)。

[0055] 恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出多种不同的效应功能,如抗体参与抗体依赖的细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)或补体依赖的细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity, CDC)。

[0056] 在本发明的所有方面和实施方案中,骆驼科(或骆驼科动物)物种(本发明抗原结合多肽的高变环或 CDR 来源于此)可以是骆驼(camel)、大羊驼(llama)、单峰驼(dromedary)、小羊驼(vicunia)、原驼(guanaco)和阿尔帕卡羊驼(alpaca),以及由其杂交的任何物种。大羊驼(Lama glama)和阿尔帕卡羊驼(Lama pacos)是本发明所有方面优选的骆驼科物种。

[0057] 本发明抗原结合多肽的特征在于包含来自于骆驼科物种的 VH 结构域或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区。为明确起见,术语“VH 结构域”、“VL 结构域”是指来自于骆驼科动物常规抗体的结构域。该定义排除了骆驼科动物只有重链的 VH μ 抗体以及仅包含骆驼科动物 VH μ 结构域之 HV 或 CDR 的重组构建体,这些不包括在本发明的范围内。

[0058] 所谓“来自于骆驼科物种的 VH 结构域或 VL 结构域的高变环或互补决定区”是指高变环(HV)或 CDR 具有的氨基酸序列与由骆驼科免疫球蛋白基因编码的高变环或 CDR 的

氨基酸序列一致或基本一致。此处的“免疫球蛋白基因”包括种系基因、已经历重排的免疫球蛋白基因以及体细胞突变基因。因此,来自于骆驼科物种 VH 或 VL 结构域的 HV 或 CDR 的氨基酸序列可以与存在于成熟的骆驼科常规抗体中的 HV 或 CDR 的氨基酸序列一致。本文中的术语“来自于”表明了结构关系,意思是本发明抗原结合多肽的 HV 或 CDR 代表了最初由骆驼科免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列(或其略微发生改变的变体)。但是,对于制备本发明抗原结合多肽的生产方法而言,该术语并不一定意味着特定的关系。正如下面将要讨论地,若干方法可以用来制备包含 HV 或 CDR(其氨基酸序列与最初由骆驼科免疫球蛋白基因编码的序列一致(或基本上一致))的抗原结合多肽。

[0059] 为明确起见,术语“骆驼科动物常规抗体的 VH 结构域”和“来自于骆驼科物种的 VH 结构域”可同义使用,其包含这样的 VH 结构域,即合成的或经改造之重组基因(包括密码子经优化的合成基因)的产物,该 VH 结构域具有的氨基酸序列与骆驼科免疫球蛋白基因(种系的、重排的或体细胞突变的)编码之 VH 结构域的氨基酸序列一致(或基本一致)。类似地,“骆驼科动物常规抗体的 VL 结构域”和“来自于骆驼科物种的 VL 结构域”可同义使用,其包含这样的 VL 结构域,即合成的或经改造之重组基因(包括密码子经优化的合成基因)的产物,该 VL 结构域具有的氨基酸序列与骆驼科免疫球蛋白基因(种系的、重排的或体细胞突变的)编码之 VL 结构域的氨基酸序列一致(或基本一致)。

[0060] 本发明的抗原结合多肽通常是重组表达的多肽,也可以是嵌合多肽。术语“嵌合多肽”是指通过将不连续存在的两个或更多个肽片段相邻放置而产生的人工(非天然)多肽。此定义中包括“物种”嵌合多肽,其由两个或更多个物种(例如骆驼科动物和人)编码的肽片段相邻放置形成。

[0061] 本发明的抗原结合多肽不是天然的人抗体(特别是人类自身抗体),因为需要来自于骆驼科动物的至少一个高变环(或 CDR)。所谓“天然的”人抗体是指在人对象中天然表达的抗体。本发明范围内不包括具有与天然人抗体或其片段的氨基酸序列具有 100%一致性的氨基酸序列的抗原结合多肽,其中天然抗体或片段不是嵌合的,并且在氨基酸序列上也没有受到任何经改造的变化(不包括体细胞突变)。

[0062] 本发明的抗原结合多肽包含重链可变结构域(VH)结构域和轻链可变结构域(VL)结构域,并且特征在于在 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区来自于骆驼科物种。

[0063] 在一些替代性的实施方案中,VH 结构域中的 H1 或 H2 或者 H1 和 H2 二者可以来自于骆驼科物种,并且与之独立地,VL 结构域中的 L1 或 L2 或者 L1 和 L2 二者可以来自于骆驼科物种。在另一些实施方案中,VH 结构域中的 H3 或 VL 结构域中的 L3 也可以来自于骆驼科物种。上述所有可能的排列都是允许的。

[0064] 在一个具体的实施方案中,VH 结构域和 VL 结构域中的每个高变环 H1、H2、H3、L1、L2 和 L3 都可以来自于骆驼科物种。

[0065] 在一个实施方案中,整个 VH 结构域和/或整个 VL 结构域可以来自于骆驼科物种。然后,可以对骆驼科的 VH 结构域和/或骆驼科的 VL 结构域进行蛋白质改造,其中向骆驼科序列中引入一个或多个氨基酸替换、插入或缺失。这些经改造的变化优选地包括相对于骆驼科序列而言的氨基酸替换。这些变化包括“人源化”或“种系化(germlining)”,其中骆驼科动物编码的 VH 或 VL 结构域中的一个或多个氨基酸残基被来自于同源的人类编码的 VH

或 VL 结构域中的对应残基替代。

[0066] 在某些实施方案中,骆驼科的高变环(或 CDR)可以通过使用期望的靶标抗原对骆驼科物种进行主动免疫而获得。正如本文详细举例和讨论地,使用靶标抗原免疫骆驼科动物(本源动物或者经改造表达骆驼科物种免疫球蛋白库的转基因动物)后,可以鉴定由 B 细胞产生的对期望抗原具有特异性的(常规骆驼科)抗体,并且可以使用已知的技术分离编码该抗体之 VH 和 VL 结构域的多核苷酸。

[0067] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明提供了与靶标抗原发生免疫反应的重组抗原结合多肽,该多肽包含 VH 和 VL 结构域,其中 VH 或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域,该抗原结合多肽通过包括以下步骤的方法获得:

[0068] (a) 使用靶标抗原或编码该靶标抗原的多核苷酸免疫骆驼科物种,产生针对所述靶标抗原的抗体;

[0069] (b) 确定如下核苷酸序列,所述核苷酸序列编码与所述靶标抗原发生免疫反应的骆驼科常规抗体的 VH 和 / 或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区(CDR);

[0070] (c) 表达与所述靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽,所述抗原结合多肽包含 VH 和 VL 结构域,其中 VH 结构域或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区(CDR) 具有由步骤(a)所确定的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0071] 通过主动免疫获得的分离的骆驼科 VH 和 VL 结构域可以用作改造本发明抗原结合多肽的基础。从完整的骆驼科 VH 和 VL 结构域开始,可以进行一个或多个氨基酸的替换、插入或缺失,从而与初始骆驼科序列不同。在某些实施方案中,这样的替换、插入或缺失可存在于 VH 结构域和 / 或 VL 结构域的框架区。在一级氨基酸序列中进行这种改变的目的可以是为了减少推测的不利性质(例如在人类宿主中的免疫原性(所谓的人源化)、使潜在产物具有异质性和 / 或不稳定性的位点(糖基化、去酰胺、异构化等)或是为了提高分子的某些其它有利性质(例如溶解性、稳定性、生物可利用度等)。在另一些实施方案中,在一级氨基酸序列上的改变可以在通过主动免疫获得的骆驼科 VH 和 / 或 VL 结构域的一个或多个高变环(或 CDR) 上进行。可以引入这样的变化从而提高抗原结合的亲和力和 / 或特异性,或减少推测的不利性质(例如在人类宿主中的免疫原性(所谓的人源化)、使潜在产物具有异质性和 / 或不稳定性的位点(糖基化、去酰胺、异构化等)),或是为了提高分子的某些其它有利性质(如溶解性、稳定性、生物可利用度等)。

[0072] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了重组的抗原结合多肽,相对于通过采用靶标抗原对骆驼科物种进行主动免疫获得的骆驼科 VH 或 VL 结构域而言,其在 VH 结构域或 VL 结构域的至少一个框架区或 CDR 区中包含至少一个氨基酸替换。该特定的实施方案排除了通过主动免疫产生的含有本源骆驼科 VH 和 VL 结构域的抗原结合多肽。

[0073] 作为使用靶标抗原(或者包含靶标抗原或编码靶标抗原之多核苷酸的组合物)进行“主动免疫”的一个替代方案,还可以利用患病骆驼科动物中的免疫应答或者骆驼科物种中的天然免疫应答作为 VH 和 / 或 VL 结构域(其可以用作具有期望抗原结合特性的抗原结合多肽的组成部分)的来源。该 VH/VL 结构域也可以用作以通过主动免疫获得的 VH/VL 结构域类似的方式改造抗原结合多肽的起始点。本发明还进一步包括使用非免疫文库,以及由此获得的抗原结合多肽。

[0074] 在另一些实施方案中,本发明包括“嵌合”抗体分子,其包含来自骆驼科动物的 VH 和 VL 结构域(或其经改造的变体)和来自非骆驼科动物抗体的一个或多个恒定结构域,例如由人编码的恒定结构域(或其经改造的变体)。本发明还延伸至嵌合抗原结合多肽(例如抗体分子),其中 VH 或 VL 结构域之一是经骆驼科动物编码的,而其它可变结构域是非骆驼科动物(例如人)的。在这样的实施方案中,优选 VH 结构域和 VL 结构域均来自于同一骆驼科动物物种,例如,VH 和 VL 可以都来自于大羊驼或者 VH 和 VL 可以都来自于阿尔帕卡羊驼(之后引入经改造的氨基酸序列变化)。在这样的实施方案中,VH 和 VL 结构域可以都来自于一只动物,尤其是一只已被主动免疫的动物。

[0075] 作为在骆驼科 VH 和 / 或 VL 结构域的一级氨基酸序列上进行改造的一个替代方案,可将单个的骆驼科高变环或 CDR 或者它们的组合从骆驼科的 VH/VL 结构域中分离出来,并通过 CDR 嫁接将其转移到替代的(即非骆驼科的)框架(例如人 VH/VL 框架)内。

[0076] 与人可变结构域一致 / 同源的序列

[0077] 本发明人已发现,在框架区上,编码骆驼科物种常规抗体 VH 和 VL 结构域的骆驼科种系和经体细胞突变的 DNA 序列表现出与编码人抗体 VH 和 VL 结构域的人种系 DNA 序列具有高度的序列一致性 / 序列同源性。

[0078] 因此,本发明的抗原结合多肽的特征在于它们与人抗体 VH 和 VL 结构域具有氨基酸序列高度同源性。

[0079] 在一个实施方案中,本发明抗原结合多肽的 VH 结构域可以表现出与一个或多个人类 VH 结构域在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 具有 80% 或更高的氨基酸序列一致性或序列同源性。在另一些实施方案中,本发明多肽的 VH 结构域与一个或多个个人 VH 结构域之间的氨基酸序列一致性或序列同源性可以为 85% 或更高、90% 或更高、95% 或更高、97% 或更高、或高达 99%, 或甚至 100%, 当然前提条件是至少有一个高变环或 CDR 来自于骆驼科动物,即其具有的氨基酸序列与骆驼科 VH 或 VL 基因编码的高变环或 CDR 的氨基酸序列一致(或基本一致)。

[0080] 在一个实施方案中,本发明多肽的 VH 结构域可以相对于最匹配的人类 VH 序列而言在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 中包含一个或多个氨基酸序列不匹配。该后一实施方案明确排除了包含 VH 结构域或者 VH 和 VL 结构域二者的多肽,其中所述结构域中的框架区完全是人序列。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明抗原结合多肽的 VL 结构域可以表现出与一个或多个人类 VL 结构域在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 具有 80% 或更高的序列一致性或序列同源性。在另一些实施方案中,本发明多肽的 VL 结构域与一个或多个个人 VL 结构域之间的氨基酸序列一致性或序列同源性可达到 80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高、97% 或更高、或高达 99%, 或甚至 100%。

[0082] 在一个实施方案中,本发明多肽的 VL 结构域可以相对于最匹配的人类 VL 序列而言在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 中包含一个或多个氨基酸序列不匹配。该后一实施方案明确排除了包含 VL 结构域或者 VH 和 VL 结构域二者的多肽,其中所述结构域中的框架区完全是人序列。

[0083] 本发明的抗原结合多肽可以包括“完全人”的 VH 或 VL 结构域,条件是只存在一个完全人可变结构域,并且而后与包含来自于骆驼科之高变环或 CDR 的可变结构域结合。

[0084] 所附实施例中包括骆驼科与人类种系序列的代表性比对,其显示骆驼科动物常规的 VH 和 VL 结构域表现出与人类相应结构域具有非常高的序列同源性。从这些实施例可以得出结论,在给定位置,VH 或 VL 结构域的框架区上通常有小于 8 个(常常只有 5 个)氨基酸残基与最接近的人类种系编码的序列不同。由于这些位置与结构限制无关,因此预期通过定点突变进行的人源化会相对简单。

[0085] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以包含骆驼科常规抗体的 VH 和 / 或 VL 结构域,例如通过使用靶标抗原(或编码靶标抗原的多核苷酸)对骆驼科动物进行主动免疫获得的骆驼科常规抗体,其中所述 VH 和 VL 结构域已被(独立地)改造以在 VH 结构域和 VL 结构域中的一个或者两个的框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 上引入总共 1~10 个(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个)氨基酸替换。这样的氨基酸替换可以包括(但不限于)导致“人源化”的替换,其通过使用在人类种系编码的 VH 或 VL 结构域中发现的对应残基取代起始的骆驼科 VH 或 VL 结构域中的不匹配氨基酸残基来实现。其也可以独立地在所述骆驼科动物来源的 VH 和 VL 结构域的高变环(CDR)中进行氨基酸替换,而这些变体可构成本发明的一部分。本文中的“氨基酸替换”包括这样的替换,其中天然氨基酸被非天然的氨基酸或进行了翻译后修饰的氨基酸替换。

[0086] 在分析骆驼科和人类种系 VH 和 VL 之间序列一致性的百分比前,可先确定典型折叠,其可用于识别具有 H1 和 H2 或者 L1 和 L2(及 L3) 典型折叠之相同组合的人种系区段家族。随后,选择那些与目的骆驼科动物可变结构域具有高度序列同源性的人类种系家族成员用于计算序列同源性。高变环 L1、L2、L3、H1 和 H2 之正则标准类型(Chothia canonical classes) 的确定通过使用在网站 www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html 上公开可用的生物信息学工具进行。该程序的输出结果显示了在数据文件中需要的关键残基。在这些数据文件中,显示出关键残基的位置以及每个位置上允许的氨基酸。抗体可变结构域序列被作为输入,并首先与按 Kabat 编码系统编码的共有抗体序列对齐。典型折叠的分析采用了一系列来自于 Martin 和 Thornton 发明的自动化方法的关键残基模板(Martin 等, J. Mol. Biol. 263 :800-815(1996))。

[0087] 使用已知特定的人类种系 V 区段(其使用与 H1 和 H2 或者 L1 和 L2(及 L3) 同样的典型折叠的组合),确定了就序列同源性而言最佳匹配的家庭成员。使用生物信息学工具可以确定骆驼科 VH 和 VL 结构域的框架氨基酸序列与由人类种系编码的相应序列之间的序列一致性百分比,但实际上也可以使用手动比对这些序列。人类免疫球蛋白序列可以从若干蛋白质数据库中确定,如 VBase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 或 Pluckthun/Honegger 数据库(<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germline>)。为了比较人类序列与骆驼科 VH 或 VL 结构域的 V 区,可以使用序列比对算法(如通过像 www.expasy.ch/tools/#align 的网站可获得的),而对于有限的序列同样可进行手动比对。与每条链的框架区 1、2 和 3 具有最高程度同源性的具有相同典型折叠组合的人类种系的轻链和重链序列家族被选出来,并与目的骆驼科可变结构域进行比较;FR4 也与人类种系的 JH 和 JK 或 JL 区进行比较。

[0088] 注意,在计算序列同源性的整体百分比时,使用与具有相同典型折叠组合的人类种系家族最匹配的序列来评估 FR1、FR2 和 FR3 的残基。只计算了与具有相同典型折叠的组合的同一家族中最匹配的成员或其它成员不同的残基(注:不包括任何引物编码的差异)。

然而,为了人源化的目的,框架区中与其它人类种系家族成员一致的残基(其不具备相同的典型折叠的组合)可以被认为是“人的”,然而事实上,根据上述严格的条件,这些都被归为“阴性的”。这种假设是基于用于人源化的“混合与匹配(mix and match)”法,其中FR1、FR2、FR3和FR4均被分别与其最匹配的人类种系序列进行比较,并且人源化的分子因此包含了不同FR的组合,正如Qu及其同事(Qu等, Clin. Cancer Res. 5 :3095-3100(1999))和Ono及其同事(Ono等, Mol. Immunol. 36 :387-395(1999))所做的一样。

[0089] 各框架区的边界可以使用IMGT编码系统来确定,其是正则编码系统(numbering scheme of Chothia)的改编版本(Lefranc等, NAR 27 :209-212(1999) ;<http://imgt.cines.fr>)。

[0090] 虽然骆驼科动物与人类在VH和VL结构域的框架区有出乎意料的高序列同源性,但仍然可以通过对骆驼科动物和人类种系的VH和VL序列进行简单的序列比较而将骆驼科动物编码的高变环(CDR)与人类编码的高变环(CDR)区分开。

[0091] 与人类编码的VH和VL结构域的结构同源性

[0092] 如下文详细描述地,一个优选的实施方案也使用了具有人典型折叠或人样典型折叠的骆驼科动物的高变环或CDR。

[0093] 因此,在一个实施方案中,在本发明抗原结合多肽的VH结构域或VL结构域中至少一个高变环或CDR来自于骆驼科物种的VH或VL结构域,但表现出预测的或实际的典型折叠结构(其与出现在人抗体中的典型折叠结构基本一致)。

[0094] 本领域已熟知,虽然存在于由人类种系编码的VH和VL结构域中的高变环的氨基酸一级序列必然是高变的,但是所有高变环(除了VH结构域的CDR H3以外)均采取少数几种不同的结构构象,(称为典型折叠)(Chothia等, J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987) ; Tramontano等 Proteins 6 :382-94(1989)),其取决于高变环的长度以及所谓典型氨基酸残基的存在(Chothia等, J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987))。完整VH或VL结构域中高变环的实际典型结构可以通过结构分析(例如X-射线晶体学)来确定,但也可以根据具有特定结构特征的关键氨基酸残基来预测(详见下文)。事实上,确定每种典型结构的特定残基模式形成“识别标志”,这使得能够识别未知结构的VH或VL结构域中的高变环中的典型结构,因此典型结构也可以仅根据氨基酸一级序列来预测。

[0095] 基于对种系和体细胞系突变的VH和VL序列的分析,本发明者预测,骆驼科VH和VL结构域(除了VH结构域的H3以及有时也除了VL结构域的L3)的高变环也采用了典型折叠结构,其与人抗体高变环采用的典型折叠结构基本一致。

[0096] 可以使用从如下网站可公开获得的算法对抗原结合多肽中任何给定VH或VL序列的高变环的经预测典型折叠结构进行分析:www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html, www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibodies.html和www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hVk.html。这些工具可查询VH或VL序列与已知典型结构的人VH或VL结构域序列的比对,并对查询序列高变环的典型结构进行预测。

[0097] 至于VH结构域,如果其至少符合下列第一个标准(优选地符合两个标准),则来自于骆驼科的H1和H2环可以被认为具有与已知出现在人抗体中的典型折叠结构“基本一致”的典型折叠结构, :

[0098] 1. 通过确定残基数与最匹配的人典型结构类别具有一致的长度。

[0099] 2. 与相应的人 H1 和 H2 典型结构类别的关键氨基酸残基具有至少 33% 的一致性, 优选地为至少 50% 的一致性。

[0100] (注: 为了进行上述分析, H1 和 H2 环被分别处理并且各自与其最匹配的人典型结构类别进行比较)

[0101] 上述分析依赖于对骆驼科 H1 和 H2 环的典型结构的预测。如果已知 H1 和 H2 环的实际结构已知(例如基于 X-射线晶体学)的话, 即使环的长度与最匹配的人典型结构类别长度不同(通常相差 ± 1 或 ± 2 个氨基酸)而骆驼科 H1 和 H2 环的实际结构与人典型折叠的结构相匹配, 那么来自于骆驼科的 H1 和 H2 环可以被认为具有与已知出现在人抗体中的典型折叠结构“基本一致”的典型折叠结构。

[0102] 在人典型结构类别中发现的针对人 VH 结构域(H1 和 H2) 第一和第二高变环的关键氨基酸残基由 Chothia 等人描述(Chothia 等, J. Mol. Biol. 227:799-817(1992)), 其内容作为整体通过引用并入本文中。特别地, 在 Chothia 等第 802 页的表 3(其通过引用具体并入本文中)列出了在人类种系中发现的针对 H1 典型结构的关键位点上的优选氨基酸残基, 而同样通过引用具体并入本文中的第 803 页的表 4 列出了在人类种系中发现的针对 CDR H2 典型结构关键位点上的优选氨基酸残基。

[0103] 所附的实施例包括对来自于骆驼科物种(特别是大羊驼和单峰驼)的种系 VH 序列的分析, 其将骆驼科中发现的实际氨基酸残基与最接近的人类种系 VH 序列中的氨基酸残基中被认为是典型折叠结构之关键的 H1 和 H2 以及基本框架区中的每个位置进行比较(根据 Chothia 等, J. Mol. Biol. 227:799-817(1992) 的标准)。现已发现在骆驼科动物与人类之间一致的关键残基的数目往往超过 33%, 通常为 50 ~ 100%。

[0104] 在一个实施方案中, 本发明抗原结合多肽 VH 结构域中的 H1 和 H2 来自于骆驼科物种的 VH 结构域, 并表现出预测的或实际的典型折叠结构, 其与出现在人抗体中的典型折叠结构基本一致。

[0105] 本发明人推测, 不仅高变环(特别是 VH 结构域中的 H1 和 H2)各自具有天然存在于人抗体中的典型结构类型是非常重要的, 同样重要的还有任何给定 VH 结构域的 H1 和 H2 形成典型折叠结构的组合(其与出现在至少一个人类种系 VH 结构域中的已知典型结构的组合一致)。现已发现 H1 和 H2 上只有某些典型折叠结构的组合实际发生在由人类种系编码的 VH 结构域中。本发明人出人意料地发现, 所有可进行分析的可用骆驼科种系或体细胞突变的 VH 序列都不仅表现出 H1 和 H2 中各典型折叠结构与人抗体中所用的一致, 而且表现出 H1 和 H2 中结构的正确组合也与人抗体中发现的组合匹配。与生产能在人类中进行潜在治疗应用的抗体的其它平台(其可产生出在 H1 和 H2 中具有“正确的”人样典型折叠结构的抗体, 但其组合形式并不存在于人抗体中)相比, 这展示出了独特的优势。例如, 本发明人自己对来源于非人灵长类动物的抗体结构的分析(Biogen IDEC's galiximab(anti-CD80) and lumiliximab(anti-CD23) and the non-human primate mAb against Anthrax Toxin, Pelat 等, J. Mol. Biol. 384:1400-7(2008))表明, 它们在结构上并非与人抗体结构非常接近(特别是考虑到典型折叠的组合时)。H1 和 H2 典型折叠的正确组合的缺失可导致给定抗原结合多肽(其在框架区被“人源化”)在人类宿主中具有免疫原性。

[0106] 因此, 在另一些实施方案中, 本发明抗原结合多肽 VH 结构域中的 H1 和 H2 来自于骆驼科物种的 VH 结构域, 并形成预测或实际的典型折叠结构的组合, 该组合与已知出现在

人类种系或体细胞突变的 VH 结构域中的典型折叠结构的组合一致。

[0107] 在一些非限制性的实施方案中,本发明抗原结合多肽的 VH 结构域中的 H1 和 H2 来自于骆驼科物种的 VH 结构域,并形成下列典型折叠组合的一种:1-1、1-2、1-3、1-6、1-4、2-1、3-1 和 3-5。

[0108] 优选地,本发明抗原结合多肽的 VH 结构域表现出与人 VH 的高度序列一致性/序列同源性,并且 VH 结构域的高变环表现出与人 VH 具有结构同源性。

[0109] 将本发明抗原结合多肽 VH 结构域中 H1 和 H2 上存在的典型折叠及其组合“更正(correct)”为人 VH 种系序列(就整体一级氨基酸序列的一致性而言,其与本发明抗原结合多肽的 VH 结构域最匹配)可以是有利的。例如,如果与人类种系 VH3 结构域的序列匹配是最接近的,那么 H1 和 H2(来自于骆驼科)形成人 VH3 结构域中天然存在的典型折叠的组合可以是有利的。

[0110] 因此,在一个实施方案中,本发明抗原结合多肽的 VH 结构域可表现出与人 VH 结构域在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 具有 80%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、97%或更高、或高达 99%,或甚至 100%的序列一致性或序列同源性,另外,同一抗原结合多肽中的 H1 和 H2 来自于骆驼科物种的 VH 结构域,形成预测的或实际的典型折叠结构的组合(其与已知的天然存在于相同人 VH 结构域中的典型折叠组合相同)。

[0111] 在另一些实施方案中,本发明抗原结合多肽的 VL 结构域中的 L1 和 L2 均来自于骆驼科物种的 VL 结构域,并都表现出预测的或实际的典型折叠结构(其基本与出现在人抗体中的典型折叠结构基本一致)。

[0112] 与 VH 结构域一样,VLambda 和 VKappa 型 VL 结构域的高变环可以采取有限数目的构象或典型结构,这部分取决于长度,还取决于某些典型位置上关键氨基酸残基的存在。

[0113] 如果符合下列至少第一个标准(优选地符合两个标准),那么来自于骆驼科物种 VL 结构域的 L1、L2 和 L3 环也可以被认为具有与已知出现在人抗体中的典型折叠结构“基本一致”的典型折叠结构:

[0114] 1. 由残基数确定地,与最匹配的人类结构类别具有一致的长度。

[0115] 2. 与来自 VLambda 库或 VKappa 库的相应的人 L1 或 L2 典型结构类别的关键氨基酸残基具有至少 33%的一致性,优选地为至少 50%的一致性,。

[0116] (注,为了进行上述分析,L1 和 L2 环被分别处理并且各自与其最匹配的人典型结构类别进行比较)

[0117] 上述分析依赖于对骆驼科 L1、L2 和 L3 环的典型结构的预测。如果 L1、L2 和 L3 环的实际结构是已知的(例如基于 X-射线晶体学),即使环的长度与最匹配的人典型结构类别长度不同(通常相差 ± 1 或 ± 2 个氨基酸),而骆驼科环的实际结构与人典型折叠的相匹配,那么来自于骆驼科的 L1、L2 和 L3 环也可被认为具有与已知出现在人抗体中的典型折叠结构“基本一致”的典型折叠结构。

[0118] 在人典型结构类别中发现的针对人 VLambda 和 VKappa 结构域 CDR 的关键氨基酸残基由 Morea 等 Methods, 20:267-279(2000) 以及 Martin 等, J. Mol. Biol., 263:800-815(1996) 描述。人 VKappa 结构域的结构库(structural repertoire)由 Tomlinson 等, EMBO J. 14:4628-4638(1995) 描述, VLambda 结构域的结构库由 Williams 等 J. Mol. Biol., 264:220-232(1996) 描述。所有这些文献均通过引用并入本文中。

[0119] 所附的实施例包括对来源于骆驼科物种（特别是大羊驼和单峰驼）的种系 VL 序列或者 kappa 和 lambda 型的分析，其将骆驼科中发现的实际氨基酸残基与最接近的人类种系 VLambda 或 VKappa 序列中的氨基酸残基中被认为对于典型折叠结构关键的 L1 和 L2 中的每个位置进行比较。已发现在骆驼科动物和人类之间一致的关键残基的数目通常为 33 ~ 100%，往往为 50 ~ 100%，通常接近于 100%。

[0120] VL 结构域中的 L1 和 L2 可以形成预测的或实际的典型折叠结构的组合，其与已知出现在人类种系 VL 结构域中的典型折叠结构的组合一致。

[0121] 在一些非限制性的实施方案中，VLambda 结构域中的 L1 和 L2 可以形成下列典型折叠的组合中的一种：11-7、13-7 (A、B、C)、14-7 (A、B)、12-11、14-11 和 12-12 (如 Williams 等 J. Mol. Biol. 264 :220-32(1996) 中所定义地，并显示于 www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.html)。在一些非限制性的实施方案中，Vkappa 结构域中的 L1 和 L2 可以形成下列典型折叠组合中的一种：2-1、3-1、4-1 和 6-1 (如 Tomlinson 等 EMBO J. 14 :4628-38(1995) 中所定义地，并显示于 http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html)。

[0122] 在另一实施方案中，VL 结构域的 L1、L2 和 L3 三者可以都表现出基本的人结构。大多数 V κ 种系区段还编码 L3 环的单一构象（类型 1），其通过第 95 位上保守的顺式 - 脯氨酸而稳定，但是由于 V-J 连接过程以及该脯氨酸残基的可能丢失，因此重排序列也可以具有其它构象。可公开获得的体细胞突变的单峰驼 V κ 序列具有 L3(κ) 的 1 型典型折叠（如同在人类 kappa 种系序列中发现的一样），并且在七个单峰驼 V κ 结构域中有六个在第 95 位出现了脯氨酸。因此，当抗原结合多肽包含 V κ 结构域时，该结构域可以在第 95 位包含保守的脯氨酸残基。

[0123] Williams 及其同事分析了人 VL 种系序列的结构库 (Williams 等, J. Mol. Biol. 264 :220-232(1996))。此处分析的三个家族编码相同的 L2 环构象。L3 环的构象被认为是更高变的，因为其具有某些长度的变化，并且没有顺式 - 脯氨酸残基。事实上，可用的体细胞突变的单峰驼 V λ 序列显示 L3 长度的高变性。其中大多具有 L3 的典型折叠（例如 VLambda 3-1 家族成员 Camv119(10A) 和 Camv120(1/9A)，VLambda 2-18 家族成员 Camv15、17、30、36 和 52 (所有 10B) 和 VLambda 1-40 家族成员 Camv144(5/11A))。

[0124] 优选地，本发明抗原结合多肽的 VL 结构域表现出与人 VL 具有高度的序列一致性 / 序列同源性，并且 VL 结构域的高变环表现出与人 VL 具有结构同源性。

[0125] 在一个实施方案中，本发明抗原结合多肽的 VL 结构域可表现出与人 VL 结构域在框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 具有 80% 或更高、85% 或更高、90% 或更高、95% 或更高、97% 或更高、或高达 99%，或甚至 100% 的序列一致性，另外，高变环 L1 和高变环 L2 可以形成预测的或实际的典型折叠结构的组合（其与已知的天然存在于相同人 VL 结构域中的典型折叠的组合相同）。

[0126] 当然，可以设想将表现出与人 VH 具有高度序列一致性 / 序列同源性并与人 VH 的高变环具有结构同源性的 VH 结构域与表现出与人 VL 具有高度序列一致性 / 序列同源性并与人 VL 的高变环具有结构同源性的 VL 结构域相结合以提供包含（骆驼科动物来源的）VH/VL 对（其与人类编码的 VH/VL 对具有最高的序列和结构同源性）的抗原结合多肽。本发明所提供的骆驼科动物平台的独特优势是 VH 和 VL 结构域都表现出与人抗体的可变结构域

具有高度的序列和结构同源性。

[0127] 抗原结合多肽的结构

[0128] 只要 VH 和 VL 结构域都存在,本发明的抗原结合多肽可以采用多种不同的实施方案。因此,在一些非限制性的实施方案中,抗原结合多肽可以是免疫球蛋白、抗体或抗体片段。本文中使用的术语“抗体”从广义上来说包括(但不限于)单克隆抗体(包括全长的单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体),只要它们表现出对靶标抗原具有适当的特异性即可。本文使用的术语“单克隆抗体”是指由一群基本同源的抗体获得的抗体,即包含在该群体中的各个抗体是相同的(除了可能以少量存在的可能的天然突变以外)。单克隆抗体针对单个抗原位点具有高度特异性。此外,与常规的(多克隆)抗体制剂(其通常包括针对抗原上不同决定簇(表位)的不同抗体)不同的是,每个单克隆抗体只针对抗原上的单个决定簇或表位。

[0129] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,一般为其抗原结合区或可变结构域。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、双特异性 Fab' s 以及 Fv 片段、微型双功能抗体(diabody)、线性抗体、单链抗体分子、单链可变片段(scFv)和由抗体片段组成的多特异性抗体(见 Holliger 和 Hudson, Nature Biotechnol. 23 :1126-36 (2005),其通过引用并入本文中)。

[0130] 在一些非限制性的实施方案中,本发明的抗体和抗体片段可以包含 CH1 结构域和/或 CL 结构域(其氨基酸序列完全或基本上是人的)。当本发明的抗原结合多肽是作为人类治疗用途的抗体时,抗体的整个恒定结构域或者至少其一部分通常具有完全或基本人的氨基酸序列。因此,本发明的抗体必须包含 VH 和 VL 结构域,其至少一个包含来源于骆驼科的至少一个高变环,但 CH1 结构域、铰链区、CH2 结构域、CH3 结构域和 CL 结构域(以及 CH4 结构域,如果存在的话)中的一个或多个或者任意组合的氨基酸序列可完全或基本是人的。

[0131] 有利地,CH1 结构域、铰链区、CH2 结构域、CH3 结构域和 CL 结构域(以及 CH4 结构域,如果存在的话)可以都具有完全或基本人的氨基酸序列。就人源化或嵌合的抗体或抗体片段的恒定结构域而言,术语“基本上人的”是指氨基酸序列与人恒定结构域至少具有 90%、或至少 95%、或至少 97%、或至少 99% 的一致性。此处的术语“人的氨基酸序列”是指人免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列,其中包括种系的、重排的和体细胞突变的基因。本发明还涵盖这样的多肽,其包含已被改变的“人”恒定结构域序列(对于人序列,其进行一个或多个氨基酸的添加、缺失或替换)。

[0132] 正如本文别处所讨论地,预想到可以在重链和/或轻链的恒定结构域(特别是在 Fc 区中)进行一个或多个氨基酸的替换、插入或缺失。氨基酸的替换可涉及使用不同的天然氨基酸或者使用非天然的或经修饰的氨基酸来取代被替换的氨基酸。其它结构修饰也是允许的,如改变糖基化模式(例如通过添加或删除 N- 或 O- 连接的糖基化位点来实现)。基于抗体的预期用途,修饰本发明抗体对 Fc 受体的结合特性可以是期望的,例如用以调节效应功能。例如,可以将半胱氨酸残基引入 Fc 区中,从而使该区中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可具有提高的内化能力和/或增强的补体介导之细胞杀伤和抗体依赖的细胞毒性(ADCC)。见 Caron 等, J. Exp. Med. 176 :1191-1195 (1992) 以及 Shopes, B. J. Immunol. 148 :2918-2922 (1992)。或者,抗体可以被改造成具有双 Fc 区,从而

可具有增强的补体裂解和 ADCC 的能力。见 Stevenson 等, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989)。本发明还涉及包含本文所述抗体的免疫缀合物, 其中所述抗体与细胞毒剂 (如化疗剂、毒素 (例如, 细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素, 或其片段) 或放射性同位素 (即放射性缀合物)) 相缀合。还可以改造 Fc 区以延长其半衰期。

[0133] 在某些实施方案中, 本发明可涉及嵌合的骆驼科动物 / 人抗体, 特别是其中 VH 和 VL 结构域完全是骆驼科动物序列 (例如大羊驼或阿尔帕卡羊驼), 而抗体的其余部分完全是人序列的嵌合抗体。在本发明的一些优选实施方案中, 还包括“人源化”或“种系化”的骆驼科抗体以及骆驼科 / 人嵌合抗体, 其中 VH 和 VL 结构域相对于通过主动免疫获得的骆驼科 VH 和 VL 结构域来说在框架区包含一个或多个氨基酸替换。通过使用在人类种系编码的 VH 或 VL 结构域中发现的对应残基取代起始骆驼科 VH 或 VL 结构域中的不匹配氨基酸残基, 该“人源化”提高了与人类种系 VH 或 VL 结构域的序列一致性百分比。

[0134] 本发明还包括 CDR 经嫁接的抗体, 其中来自于骆驼科抗体 (例如使用靶标抗原进行主动免疫获得的骆驼科抗体或者由骆驼科动物的基因编码的抗体) 的 CDR (或高变环) 被嫁接到人 VH 和 VL 的框架上, 而抗体的其它部分仍是完全人的。然而, 考虑到骆驼科与人类免疫球蛋白之间发现的高度的氨基酸序列同源性和结构同源性, 本发明入预期, 在大多数情况下, 通过“人源化”骆驼科动物来源的 VH 和 VL 结构域的框架区, 而无需进行 CDR 嫁接或者通过将 CDR 嫁接到数量有限的不需要修饰的骨架序列上, 便可能实现用于体内治疗使用的人类同源性水平 (见 Almagro 等, *Frontiers in Bioscience* 13:1619-1633 (2008), 其通过引用并入本文中)。

[0135] 本发明人源化的、嵌合的和 CDR 嫁接的抗体 (特别是包含来自于使用靶标抗原对骆驼科动物进行主动免疫获得之高变环的抗体) 可以使用常规的重组 DNA 操作和表达技术容易地生产, 其利用经改造的原核和真核宿主细胞 (包括但不限于细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞, 其中的一些在本文中有所描述并在所附实施例中举例说明) 以产生目的多肽。

[0136] 本发明还包括这样的抗原结合多肽, 其中 VH 或 VL 结构域中的一个或另一个来自于骆驼科, 或包含至少一个来自于骆驼科的 CDR 或高变环, 并且“其它”可变结构域具有非骆驼科动物 (例如人) 的氨基酸序列。因此, 预想到将骆驼科动物的 VH 结构域与人 VL 结构域配对, 或者将人 VH 结构域与骆驼科动物 VL 结构域配对。这样的配对可以增加可用的抗原结合库 (从中挑选具有所需抗原结合特性的高亲和力结合分子)。

[0137] 本发明还进一步延伸至这样的抗原结合多肽, 其中 VH 结构域和 / 或 VL 结构域的高变环或 CDR 来自于骆驼科, 但相对于骆驼科动物编码的序列来说, 其中至少一个所述 (骆驼科动物来源的) 高变环或 CDR 被改造成包含一个或多个氨基酸替换、添加或缺失。这些变化包括高变环 / CDR 的“人源化”。以这种方式改造的骆驼科动物来源之 HV / CDR 仍可以表现出与由骆驼科动物编码的 HV / CDR 之氨基酸序列“基本一致”的氨基酸序列。在这种情况下, “基本一致”可允许与骆驼科动物编码的 HV / CDR 含有不超过一个, 或不超过两个氨基酸序列不匹配。

[0138] 本发明的抗体可以是任何同种型。用于人类治疗用途的抗体类型通常为 IgA、IgD、IgE、IgG、IgM 型, 通常是 IgG 型, 在这种情况下, 它们可以属于 IgG1、IgG2a 和 b、IgG3 或 IgG4 四个亚类中的任何一种。在这些亚类中, 允许在 Fc 部分进行一个或多个氨基酸的替换、插

入或缺失,或进行其它结构修饰,从而例如提高或降低 Fc 依赖的功能。

[0139] 本发明的抗原结合多肽可以具有广泛的应用,包括在研究中以及在诊断和 / 或治疗疾病方面。由于与天然人抗体的 VH 和 VL 结构域具有高度的氨基酸序列同源性和高度的结构同源性 (特别是如同在人抗体中发现的正确的典型折叠的组合),本发明的抗原结合多肽 (特别是以单克隆抗体的形式) 将会对作为人类治疗性药物特别有用。

[0140] 本发明提供了用于生产针对广泛抗原的抗原结合多肽 (特别是单克隆抗体) 的平台,并且从广义上讲,本发明不受靶标抗原之精确性质的限制,也不受与靶标抗原结合的特异性或亲和力的限制。然而,在一些具体的非限制性实施方案中,靶标抗原可以是非骆驼科动物的抗原、细菌抗原、病毒抗原或人类抗原。在一个优选的实施方案中,靶标抗原可以是具有特定治疗意义的抗原。术语“具有治疗意义的靶标”是指参与人类或动物疾病或与各疾病相关之作用的形成、发病、发展、介导的靶标。该定义包括这样的靶标,其表达水平和 / 或活性受到抗体结合的调节 (例如受体活性可以受激动剂或拮抗剂抗体的结合而调节),或者其活性和 / 或表达对疾病有直接或间接的影响。

[0141] 例如,“人类抗原”可以包括这样的人天然多肽 (蛋白质),其行使受体、受体之配体、细胞信号传导分子、激素、细胞因子或细胞因子受体、神经递质等作用。“天然”是指多肽在发育之任何阶段的人体内表达,包括在疾病过程中人体所表达的多肽。

[0142] 本发明抗原结合多肽的一些非限制性的实施方案包括:

[0143] 包含 VH 结构域和 VL 结构域的嵌合抗原结合多肽,其中在 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。在一个特定的实施方案中,VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼 (*Lama glama*)。

[0144] 包含 VH 结构域和 VL 结构域的重组表达之抗原结合多肽,其中在 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。在一个特定的实施方案中,VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼 (*Lama glama*)。

[0145] 包含 VH 结构域和 VL 结构域的单克隆抗体,其中在 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域。在一个特定的实施方案中,VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼。

[0146] 包含 VH 结构域和 VL 结构域的抗原结合多肽,其中在 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种的 VH 或 VL 结构域,并且其中所述抗原结合多肽与具有治疗或诊断意义的靶标抗原发生免疫反应。在一个特定的实施方案中,VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼。

[0147] 包含骆驼科动物 (特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼) 常规抗体的 VH 结构域、骆驼科动物 (特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼) 常规抗体的 VL 结构域以及人抗体的一个或多个恒定结构域或由其组成的嵌合抗原结合多肽。在一个特定的实施方案中,VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼。

[0148] 与具有治疗或诊断意义的靶标抗原发生免疫反应的嵌合抗原结合多肽,该抗原结合多肽包含骆驼科动物 (特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼) 常规抗体的 VH 结构域、骆驼科动物 (特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼) 常规抗体的 VL 结构域以及人抗体的一个或多个恒定结构域或由其组成。在一个特定的实施方案中,VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼。

[0149] 包含骆驼科动物 (特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼) 常规抗体的 VH 结构域、骆驼科

动物（特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼）常规抗体的 VL 结构域以及选自 IgG、IgM、IgD、IgE 和 IgA 之人抗体同种型的恒定结构域或由其组成的嵌合抗体。在一个特定的实施方案中，VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼。

[0150] 与具有治疗或诊断意义的靶标抗原发生免疫反应的嵌合抗原结合多肽，该抗原结合多肽包含骆驼科动物（特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼）常规抗体的 VH 结构域、骆驼科动物（特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼）常规抗体的 VL 结构域以及选自 IgG、IgM、IgD、IgE 和 IgA 之人抗体同种型的恒定结构域或由其组成。在一个特定的实施方案中，VH 结构域和 VL 结构域都来自于大羊驼。

[0151] 在上述具体实施方案中，VH 和 VL 结构域可以来自于骆驼科动物的同一物种（特别是大羊驼或阿尔帕卡羊驼），甚至可以来自于该物种的同一只动物（例如，已进行主动免疫的单只动物）。特别是，VH 和 VL 结构域可以来自于单个主动免疫的大羊驼。然而，这并非排除 VH 和 VL 结构域可以来自于不同的动物或非免疫文库。

[0152] 在上述的实施方案中，术语“骆驼科动物常规抗体的 VH 结构域”和“骆驼科动物常规抗体的 VL 结构域”意指包括这样的变体，其被改造成在氨基酸序列中引入一个或多个改变，例如，如本文别处所述地，在一个或多个框架区进行“人源化”或“种系化”的变体，并且还包括合成（例如密码子经优化的）基因的产物，如本文别处所述地。

[0153] 多核苷酸、载体和重组表达

[0154] 本发明还提供了编码本发明抗原结合多肽的多核苷酸分子、包含与调节序列有效连接的编码本发明抗原结合多肽之核苷酸序列的表达载体，其中所述调节序列允许抗原结合多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达，以及包含该表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

[0155] 编码本发明抗原结合多肽的多核苷酸分子包括例如重组 DNA 分子。

[0156] 本文使用的术语“核酸”、“多核苷酸”或“多核苷酸分子”可互换使用，其是指任何 DNA 或 RNA 分子，无论是单链或双链的，并且如果是单链的话，还包括具有其互补序列的分子。在讨论核酸分子时，本文中可根据以 5' 至 3' 方向提供序列的标准惯例描述特定核酸分子的序列或结构。在本发明的一些实施方案中，核酸或多核苷酸是“分离”的。当涉及核酸分子时，该术语是指将核酸分子从其来源之生物体的天然基因组中与其直接相连的序列分离出来。例如，“分离的核酸”可以包括插入到载体（如质粒或病毒载体）中的 DNA 分子，或是整合到原核或真核细胞或非人类宿主生物体的基因组 DNA 中的 DNA 分子。当涉及 RNA 时，“分离的多核苷酸”主要是指由上述分离的 DNA 分子编码的 RNA 分子。或者，该术语可指这样的 RNA 分子，其被从其它的核酸（所述 RNA 分子在自然状态下（即在细胞或组织内）与其混合（associate）在一起）中纯化 / 分离出来。分离的多核苷酸（DNA 或 RNA）还可表示通过生物或合成方法直接产生，并在其生产过程中与存在的其它组分分开的分子。

[0157] 对于本发明抗原结合多肽的重组产生，可以制备（使用标准的分子生物学技术）编码其的重组多核苷酸并插入到可复制载体中以便在选定的宿主细胞或无细胞表达系统中表达。合适的宿主细胞可以是原核生物、酵母或者高级真核细胞（特别是哺乳动物细胞）。可用的哺乳动物宿主细胞系的实例有：通过 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系（COS-7，ATCC CRL 1651）、人胚胎肾细胞系（293 细胞或亚克隆以悬浮培养生长的 293 细胞，Graham 等，J. Gen. Virol. 36 :59(1977))、幼仓鼠肾细胞（BHK，ATCC CCL10）、中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR(CHO，

Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980))、小鼠睾丸支持细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980))、小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0-AG14(ATCC CRL 1581, ATCC CRL 8287) 或 NS0(HPA 培养物保藏号 no. 85110503)、猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL70)、非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)、人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2)、犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34)、布法罗大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)、人肺细胞 (W138, ATCC CCL75)、人肝细胞 (Hep G2, HB8065)、小鼠乳腺癌 (MMT 060562, ATCC CCL51)、TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982))、MRC 5 细胞、FS4 细胞和人肝癌细胞系 (Hep G2), 以及 DSM's PERC-6 细胞系。适合于这些宿主细胞的表达载体也是本领域普遍已知的。

[0158] 应注意, 术语“宿主细胞”一般是指培养细胞系。引入编码本发明抗原结合多肽之表达载体的完整人类个体被明确排除在本发明的范围以外。

[0159] 在一个重要的方面, 本发明还提供了用于生产重组抗原结合多肽的方法, 其包括在允许所述抗原结合多肽表达的条件下, 培养包含编码重组抗原结合多肽之多核苷酸 (例如表达载体) 的宿主细胞 (或无细胞表达系统), 并回收所表达的抗原结合多肽。该重组表达方法可用于本发明抗原结合多肽 (包括旨在用于人类治疗用途的单克隆抗体) 的大规模生产。用于大规模生产适用于体内治疗用途的重组抗体的合适载体、细胞系和生产方法都是在本领域常规可得的, 并为本领域技术人员所熟知。

[0160] 本发明的另一些方面涉及检测试剂盒, 包括诊断试剂盒等, 其包含本发明的抗原结合多肽, 以及包含本发明抗原结合多肽的药物制剂。

[0161] 当所述抗原结合多肽用于诊断时 (例如, 当抗原结合多肽特异性针对作为疾病状态或疾病易感性之生物标志物的抗原时), 可方便地提供该抗原结合多肽作为检测试剂盒的组分。诊断检测通常采用标准的免疫测定, 如 ELISA、放射免疫测定、Elispot 等。这种检测试剂盒的组分可基于检测或测定 (其旨在使用本发明的抗原结合多肽来实施) 的性质而有所改变, 但通常还包括使用本发明抗原结合多肽进行免疫测定所需的其它试剂。作为诊断试剂应用的抗原结合多肽可带有显示标记物 (revealing lable), 如荧光基团、酶标记或放射性标记。

[0162] 作为体内治疗应用的抗原结合多肽通常被配制成与一种或多种可药用稀释剂、载体或赋形剂组合的药物剂型 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编, 1980)。本发明的抗原结合多肽通常配制成无菌水溶液, 以对有此需要的哺乳动物对象 (通常是人类患者) 通过静脉内、肌内、腹膜内、脑脊髓内、肿瘤内、口服、瘤周、皮下、滑膜内、鞘内、局部、舌下或吸入途径施用。为预防或治疗疾病, 抗原结合多肽的合适剂量将取决于待治疗之疾病的类型、疾病的严重程度和病程, 以及患者的年龄、体重和病史, 并由主治医师判断确定。

[0163] 抗原结合多肽的生产方法

[0164] 本发明的一个重要方面涉及用于生产针对目的靶标抗原具有高亲和力的抗原结合多肽 (特别是单克隆抗体) 的方法。

[0165] 因此, 本发明提供了制备与靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽的方法, 所述方法包括:

[0166] (a) 确定如下核苷酸序列, 其编码与所述靶标抗原发生免疫反应的骆驼科常规抗

体 VH 和 / 或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) ; 以及

[0167] (b) 表达与所述靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽, 所述抗原结合多肽包含 VH 和 VL 结构域, 其中 VH 结构域或 VL 结构域的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 具有步骤 (a) 所确定的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0168] 在一个实施方案中, 步骤 (b) 中表达的抗原结合多肽并不与步骤 (a) 的骆驼科常规抗体一致。

[0169] 在一个非限制性的实施方案中, 本发明提供了制备与靶标抗原发生免疫反应 (或特异性结合) 的重组抗原结合多肽的方法, 所述抗原结合多肽包含 VH 结构域和 VL 结构域, 其中 VH 结构域或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) 来自于骆驼科物种, 所述方法包括以下步骤:

[0170] (a) 分离如下骆驼科动物的核酸, 其编码与所述靶标抗原发生免疫反应的骆驼科常规抗体 VH 结构域和 / 或 VL 结构域中的至少一个高变环或互补决定区 (CDR) ;

[0171] (b) 制备包含编码如下高变环或互补决定区之核苷酸序列的重组多核苷酸, 其中所述高变环或互补决定区具有与由步骤 (a) 分离的核酸编码的高变环或互补决定区一致的氨基酸序列, 该重组多核苷酸编码包含与所述靶标抗原发生免疫反应 (或特异性结合) 之 VH 和 VL 结构域的抗原结合多肽 ; 以及

[0172] (c) 由步骤 (b) 的重组多核苷酸表达所述抗原结合多肽。

[0173] 在一个实施方案中, 步骤 (c) 中表达的抗原结合多肽并不与步骤 (a) 的骆驼科常规抗体一致。

[0174] 上述方法在本文中可被称为制备抗原结合多肽的“常规方法”。

[0175] 上述方法的第一步均可包括对骆驼科物种进行主动免疫以引起其对靶标抗原的免疫应答, 从而产生与靶标抗原发生免疫反应的骆驼科常规抗体。对骆驼科动物免疫的方案在所附实施例中描述。用于免疫的抗原制剂可以是靶标抗原的纯化形式, 例如重组表达的多肽或其免疫原性片段。然而, 也可使用抗原的未加工制剂 (例如表达或编码靶标抗原的细胞或组织制剂、细胞裂解物、细胞上清液或级分 (如细胞膜) 等) 或编码所述靶标抗原的多核苷酸 (DNA 免疫) 进行免疫。

[0176] 该方法通常涉及骆驼科物种 (包括, 但不限于, 大羊驼和阿尔帕卡羊驼) 动物的免疫, 并且有利的是这些动物属于远交种群。但是, 还预想到使用包含骆驼科动物常规 Ig 基因座, 或至少其一部分的转基因动物 (例如转基因小鼠)。

[0177] 一个日益感兴趣的话题似乎是体内和体外生成的抗体的互补决定区 (CDR 的) 之间的差异。本发明人推测, 体内选择对于免疫原性、功能性、稳定性具有有利的影响, 并因此提高了所产生抗体的可制备性, 而体外生成和选择的合成 CDR 从这些方面具有不利因素。这是很重要的, 因为给定的治疗性抗体具有被来自患者的所谓抗独特型抗体应答中和的风险 (Lonberg, Nature Biotechnology, 23 : 1117-1125, (2005))。

[0178] 本发明基于骆驼科动物主动免疫的方法的关键优势在于: 所有骆驼科物种都能以大规模的远交种群来维系, 其中每只动物都有不同的遗传背景。因此, 可采用主动免疫来引起针对目的抗原的强的和多样性的免疫应答, 并从中可获得多样的潜在抗原结合分子集合。如所附实施例所示, 本发明人已发现骆驼科动物的主动免疫可产生具有高度免疫多样性的与靶标抗原结合之 Fab 片段。不希望受理论的约束, 本发明人推测, 人类和骆驼科动物

之间的进化距离可能对于针对给定靶标抗原的多样性免疫应答的产生是重要的。相反地，非人灵长类动物在进化上与人类接近，因此在非人灵长类动物和人类之间具有高度同源性的靶标只可以在非人灵长类动物中引起强度和多样性上有限的免疫应答。

[0179] 如果所产生的抗体与人抗体表现出低的序列和结构同源性（从而需要进行大规模的“蛋白质改造”来产生具有治疗潜能的候选抗体），那么在远交种群（其与人的进化距离远）中使用主动免疫不会是特别有利的。因此，极为重要的是，本发明人已显示，骆驼科种系（以及体细胞突变的序列）编码的 VH 和 VL 结构域与人 VH 和 VL 结构域具有非常高的序列和结构同源性（如上所述）。这种高度同源性大量远交种群的可用性相结合从而产生了非常强大的用于开发作为人类治疗用途的单克隆抗体的平台。

[0180] 在使用靶标抗原进行主动免疫后，可从经免疫动物中分离出外周血淋巴细胞或活检样品（如淋巴结或脾活检样品），并筛选出产生针对靶标抗原的骆驼科动物常规抗体。如实施例中所示，该阶段中可使用例如淘选（panning）或 FACS 分选的富集技术以减少待筛选的 B 细胞库的复杂性。然后，选出抗原特异性 B 细胞并用于提取总 RNA 以及随后 cDNA 合成。编码骆驼科动物本源 VH 和 VL 结构域的核酸（特异性针对靶标抗原）可通过 PCR 进行分离。

[0181] 得到与靶标抗原发生免疫反应的骆驼科动物常规抗体并不一定要使用主动免疫。在另一些实施方案中，可利用骆驼科动物的自身免疫应答，无论是在动物中天然存在的免疫多样性，或者例如患病动物或已天然暴露于特定病原体的动物（例如通过正常的感染途径）。在这方面，本发明包括使用非免疫文库。如果骆驼科动物中的“天然”免疫应答已产生与目的靶标抗原结合的抗体，则可利用本文所述的基因改造以及本领域已知的其它标准技术来培养并分离产生该抗体的 B 细胞或产生该抗体的单克隆细胞培养物和 / 或确定编码该抗体 VH 和 / 或 VL 结构域的骆驼科动物基因区段的核苷酸序列。了解到该序列的信息，就可以改造出编码如下抗原结合多肽的重组 DNA 构建体，所述抗原结合多肽包含骆驼科动物来源的 VH 和 / 或 VL 或者高变环（或 CDR）。

[0182] 可以将编码骆驼科动物 VH 和 VL 结构域的核酸（无论是以主动免疫获得或是以其它方式获得）直接克隆到用于生产本发明抗原结合多肽的表达载体中。特别地，可以将这些序列克隆到还编码人抗体恒定结构域或其一部分的表达载体中以产生嵌合抗体。然而，通常是在克隆和表达人类恒定结构域序列之前，对分离的骆驼科动物 VH 和 VL 序列进行进一步操作。

[0183] 第一步，可使用候选的骆驼科动物 VH 和 VL 序列（包括主动免疫后分离的序列）制备骆驼科动物文库（例如 Fab 文库，如所附实施例中所述地）。然后可针对与靶标抗原的结合来筛选文库（例如使用噬菌体展示技术）。可以对有前景的首选候选物针对与靶标抗原的结合进一步进行检测，例如使用 Biacore 或合适的生物测定来实现。最后，将最有前景的编码 VH 和 VL 结构域的序列与编码人抗体恒定结构域的序列进行框内融合克隆。

[0184] 用于编码（骆驼科动物来源的）HV/CDR 的多核苷酸序列（例如用于本发明抗原结合多肽的重组表达）不需要与骆驼科动物中天然编码 HV/CDR 的本源多核苷酸序列一致。因此，本发明包括 / 允许密码子优化以及在多核苷酸序列中涉及克隆和 / 或表达的其它改变，所述优化或改变不改变所编码的氨基酸序列。

[0185] 在某些实施方案中，可进行“链改组（chain shuffling）”，其中已知与目的抗原结

合的特定可变结构域与一系列相反类型的可变结构域中的一个配对（即 VH 库与 VL 库配对或相反亦然）以产生文库以及所得到的针对抗原亲和力和 / 或特异性进行检测的 VH/VL “混杂” 组合。或者，VH 结构域文库可随机或以分级的方式与 VL 结构域文库配对，并检测所得到的组合（见 Clackson 等, Nature, 卷 352, 624-638 页, 1991）。在该方法中，所述文库可以是来源于骆驼科动物（其表现出对目的抗原具有免疫性（包括已被主动免疫的动物））的重排 VH 和 VL (V_K 或 V_L) 的文库。该链改组过程可增加免疫多样性和生产具有显著增强的亲和力的配对。

[0186] 本发明还预想到从骆驼科动物 VH 或 VL 结构域开始进行表位印迹选择 (epitope imprinted selection) (所谓“定向选择 (guided selection)”), 其中另一可变结构域来自于非骆驼科动物物种（例如人）。因此，在一个实施方案中，骆驼科动物的 VH 结构域可被人编码的 VL 结构域文库“改组”，以取代本源的骆驼科动物编码的 VL 结构域，从而导致骆驼科动物 VH/ 人 VL 配对。然后，可对这些配对中的一个或多个进行第二次链改组，其中人 VL 结构域针对 VH 结构域（其可以是人编码的）文库进行改组。该第二个步骤可产生人编码的 VH/VL 组合，其具有原先骆驼科动物编码之 VH/VL 组合的表位印迹。

[0187] 本发明的范围还包括逆向的“链改组”方法，即从非骆驼科动物（优选人类）编码的 VH/VL 结构域组合（其与目的抗原结合）开始。例如，这可以是针对确定之疾病靶标的完全人治疗性抗体。从该 VH/VL 组合开始，可进行第一轮选择（其中 VH 结构域被骆驼科动物编码的 VL 结构域文库“改组”（或反之亦然）），并针对抗原结合检测该配对。然后，可将所选的非骆驼科动物（例如人）VH/ 骆驼科动物 VL 的配对进行第二轮选择，其中骆驼科动物编码的 VL 被骆驼科动物编码的 VH 文库改组，并针对抗原结合检测该配对。结果，可以产生骆驼科动物 VH/ 骆驼科动物 VL 的组合，其携带了起始 VH/VL 组合的表位印迹。使用本文所述的任何方法，该骆驼科动物 VH/VL 的组合可根据需要进一步被改造 / 修饰以及与人类编码的恒定结构域结合。

[0188] 在本发明的方法中，可对“本源的”骆驼科动物来源之 VH 和 VL 结构域进行蛋白质改造以引入一个或多个选择性的氨基酸替换，通常引入框架区中。将这样的替换引入“野生型”骆驼科动物序列的原因可以是 (i) 框架区的人源化，(ii) 稳定性、生物利用度、产物均一性、组织渗透性的提高等，或 (iii) 靶标抗原结合能力的优化。

[0189] 可根据已被认可的原则通过在框架区中选择性替换一个或多个氨基酸残基来进行骆驼科动物来源之 VH 和 VL 结构的“人源化”（如所附实施例所示，综述于 Almagro 等, Frontiers in Bioscience 13:1619-1633 (2008), 其内容通过引用并入本文中）。应当理解，为实现任何给定 VH 结构域、VL 结构域或其组合的可接受的“人源化”而进行的氨基酸改变的精确特征将视情况而定，因为这取决于来源于骆驼科的框架区的序列以及这些框架区与最匹配的人类种系（或体细胞突变的种系）框架区之间的起始同源性，并且也可能取决于形成抗原结合位点的高变环的序列和构象。

[0190] 人源化的总体目标是产生这样的分子，当将其引入人对象中时，其中的 VH 和 VL 结构域都表现出尽可能小的免疫原性，而保留了由骆驼科动物编码的亲本 VH 和 VL 结构域（例如通过主动免疫获得的骆驼科动物 VH/VL）形成的抗原结合位点的特异性和亲和力。有一些现成的办法可实现能达成这一目标的人源化。一般地，技术可分为理性方法或经验性方法。理性方法包括 CDR 嫁接、表面重修或修饰，超级人源化 (superhumanization) 和人类

链组成优化 (string content optimisation)。经验性方法包括 FR 文库方法、定向选择、FR 改组和人源改造 (humaneering)。所有这些技术综述于 Almagro, *Frontiers in Bioscience* 2008 (同上), 并且任何这些技术或者其组合或修改均可用来制备本发明的“人源化”抗原结合多肽。

[0191] 文库构建方法

[0192] 在相关方面, 本发明还包括产生如下表达载体文库的方法, 所述表达载体编码骆驼科动物常规抗体的 VH 和 / 或 VL 结构域, 所述方法包括以下步骤:

[0193] a) 扩增编码骆驼科动物常规抗体之 VH 和 / 或 VL 结构域的核酸分子区域以获得经扩增的基因区段, 每个基因区段均包含编码骆驼科动物常规抗体之 VH 结构域的核苷酸序列或编码 VL 结构域的核苷酸序列, 以及

[0194] b) 将 a) 中获得的基因片段克隆到表达载体中, 从而每个表达载体至少包含编码 VH 结构域的基因区段和 / 或编码 VL 结构域的基因区段, 由此获得表达载体文库。

[0195] 上述“文库构建”的方法也可构成用于生产本发明抗原结合多肽之一般方法的一部分。因此, 在本发明的这一方面被描述为优选或有利的任何特征也可被认为在一般方法中是优选或有利的, 反之亦然, 除非另有说明。

[0196] 在一个实施方案中, 步骤 a) 中被扩增的核酸包括从骆驼科动物淋巴组织制备的 cDNA 或基因组 DNA, 所述淋巴组织包括一种或多种 B 细胞、淋巴结、脾细胞、骨髓细胞, 或其组合。循环中 B 细胞是特别优选的。本发明人出人意料地发现外周血淋巴细胞 (PBL) 可作为编码骆驼科动物常规抗体之 VH 和 VL 结构域的核酸的来源, 即在 PBL 样品中有足够量的 (表达抗体的) 浆细胞使得可以进行直接扩增。这是有利的, 因为 PBL 可利用动物 (骆驼科动物) 的全血样品制备。这就避免了需要使用介入性方法来获取组织活检样品 (例如, 来自于脾或淋巴结)。这意味着采样程序可视需要而经常重复进行, 同时对动物的影响最小。例如, 可以主动免疫骆驼科动物, 从该动物中抽取第一份血样, 并制备 PBL, 然后使用“加强”剂量的同一抗原或不同抗原再次免疫同一动物, 然后抽取第二份血样, 并制备 PBL。

[0197] 据此, 本发明这一方法的一个具体实施方案可包括: 制备包含来自骆驼科动物之 PBL 的样品, 从 PBL 制备 cDNA 或基因组 DNA, 并利用该 cDNA 或基因组 DNA 作为模板来扩增编码骆驼科动物常规抗体之 VH 或 VL 结构域的基因区段。

[0198] 在一个实施方案中, 淋巴组织 (例如循环中 B 细胞) 取自于被主动免疫的骆驼科动物, 如本文别处所述。然而, 该实施方案并不是限制性的, 其还涉及制备非免疫文库和来自于患病骆驼科动物之淋巴组织的文库, 如本文别处所述。

[0199] 总 RNA (或 mRNA) 可从淋巴组织样品 (例如外周血细胞或组织活检样品) 中方便地制备, 然后使用标准技术转换为 cDNA。另外, 还可使用基因组 DNA 作为起始材料。

[0200] 本发明的这一方面包括用于构建文库的多样性文库方法和 B 细胞选择方法。在多样性文库方法中, 可从取自淋巴组织的核酸中扩增 VH 和 VL 编码基因区段的库, 而不需事先进行 B 细胞选择。在 B 细胞选择方法中, 可在核酸提取和扩增 VH 和 VL 编码之基因区段之前, 选择那些展示具有期望抗原结合特性的抗体的 B 细胞。

[0201] 可使用多种常规方法来选择表达具有期望抗原结合特性之抗体的骆驼科动物 B 细胞。例如, B 细胞可被荧光标记的单克隆抗体 (mAb, 特异性识别来源于大羊驼或其它骆驼科动物的常规抗体) 和其它荧光染料标记的靶标抗原染色以用于常规 IgG 的细胞表面展

示。然后,利用 FACS 分离各个双阳性 B 细胞,并且从各个细胞中提取总 RNA (或基因组 DNA)。或者,可以对细胞进行体外增殖,然后可筛选含有分泌的 IgG 的培养上清,再从阳性细胞中提取总 RNA (或基因组 DNA)。在另一方法中,各个 B 细胞可经特定基因进行转化或与肿瘤细胞来融合以产生可以“根据需要”进行生长的细胞系,随后从这些细胞中制备总 RNA (或基因组 DNA)。

[0202] 除了使用 FACS 进行分选,还可利用固定化的单克隆抗体(针对骆驼科动物的常规抗体)并随后利用固定化的靶标抗原对表达常规 IgG 的靶标特异性 B 细胞进行“淘选”。RNA (或基因组 DNA) 可从抗原特异性 B 细胞集合中提取,或者这些集合可被转化并可通过有限稀释或 FACS 克隆出单个细胞。

[0203] B 细胞选择方法可包括阳性选择或阴性选择。

[0204] 无论是使用不进行任何 B 细胞选择的多样性文库方法或是使用 B 细胞选择方法,对从淋巴组织制备出核酸(cDNA 或基因组 DNA)进行扩增步骤,从而扩增编码各 VH 或 VL 结构域的基因区段。

[0205] 可将从淋巴组织(例如外周 B 细胞或组织活检样品)中提取的总 RNA 转化成随机引物 cDNA,或者可使用寡 dT 引物合成 cDNA,或者可用 Ig 特异性寡核苷酸引物合成 cDNA,或者可在 cDNA 合成前使用寡 dT 纤维素从总 RNA 中纯化 mRNA (即多聚腺苷酸 RNA)。可将从 B 细胞中分离的基因组 DNA 用于 PCR。

[0206] 可使用与可变结构域 5' 端退火的 FR1 引物连同与 CH1 或 Ckappa/Clambda 区 3' 端退火的引物进行编码至少 VH 或 VL 的重链和轻链(κ 和 λ) 基因区段的 PCR 扩增,其优势在于:就这些恒定结构域引物而言,每种类型只需要一种引物。该方法使骆驼科动物的 Fab 得以克隆。或者,可使用与可变结构域的 3' 端退火的一系列 FR4 引物用于克隆 Fab (融合到编码恒定结构域的载体中)或 scFv (单链 Fv,其中重链和轻链的可变结构域通过柔性的连接序列相连);或者,可变结构域可在这样的表达载体中克隆,所述表达载体允许产生在哺乳动物细胞上展示的全长 IgG 分子。

[0207] 通常扩增以两步进行,在使用非标记引物的第一步中使用大量的 cDNA (以保持多样性),在第二步中,使用经标记的引物(其是延伸引物,在 5' 端引入了限制性酶切位点以进行克隆)在少数几个循环中对扩增产物进行再次扩增。在第二扩增步骤之前,可将第一扩增步骤(使用非标记的引物)中产生的扩增产物进行凝胶纯化以去除多余的引物。或者,可引入启动子序列,其使得可以转录成 RNA 用于核糖体展示。除了限制性位点以外,还可以引入重组位点(例如 Cre-Lox 或 TOPO 位点),后者允许定点插入到适当的载体中。

[0208] 然后,可将编码骆驼科动物常规 VH 和 VL 结构域经扩增基因区段克隆到适合于 VH/VL 组合表达为功能性抗原结合多肽的载体中。例如,首先,可将来自 B 细胞集合(或未进行任何 B 细胞选择的其它淋巴组织)集合的经扩增 VHCH1/VKCK/VLCL 基因区段分别克隆作为单独的文库(最初的文库),然后在第二步中,通过切下轻链片段并将其连接到编码重链片段的载体中组装成 Fab 或 scFv 文库。该两步法支持大型文库的构建,因为 PCR 产物的克隆是相对低效的(由于限制性酶的消化效果欠佳所致)。通过基于扩增产物序列中少部分重叠的“重叠剪接延伸(splicing-by-overlap extension, SOE)PCR”可生成编码 scFv 的 DNA 片段;在 PCR 中,通过混合编码连接序列的小 DNA 片段与编码 VH 和 VL 的扩增产物,利用其重叠序列形成单个 DNA 片段。

[0209] 可以将包含编码 VH 和 VL 之基因区段的扩增产物克隆进噬菌体或噬菌粒载体中, 其允许使用以噬菌体展示为基础的筛选方法来选择靶标特异性抗体片段。或者, 可将扩增产物克隆到允许在酵母细胞上 (作为 Fab、scFv 或全长 IgG) 或在哺乳动物细胞上 (作为 IgG) 展示的表达载体中。

[0210] 在另一些实施方案中, 可通过使用核糖体展示的扩增产物来避免克隆, 其中在扩增引物中包含 T7 (或其它) 启动子序列和核糖体结合位点。在针对结合靶标抗原的筛选后, 克隆该集合并对各个克隆进行分析。因为文库的克隆和噬菌体的选择仅限于 10^{10} 至 10^{12} 个克隆, 因此从理论上讲, 与噬菌体展示文库相比, 使用该方法可得到更大的免疫库。

[0211] 当使用 B 细胞分选时, 可将包含编码单个靶标特异性 B 细胞的 VH 或 VL 之基因区段的扩增产物直接克隆到细菌或哺乳动物表达载体中用于生成抗体片段 (scFv 或 Fab) 或甚至全长 IgG。

[0212] 在“文库构建”方法的一个特定的非限制性的实施方案中, 本发明提供了用于生成编码骆驼科动物常规抗体之 VH 和 VL 结构域的表达载体文库的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0213] a) 主动免疫骆驼科动物, 从而产生针对靶标抗原的骆驼科动物常规抗体;

[0214] b) 从包含来自所述经免疫骆驼科动物 (包括但不限于大羊驼或阿尔帕卡羊驼) 的淋巴组织 (如循环中 B 细胞) 的样品制备 cDNA 或基因组 DNA;

[0215] c) 扩增所述 cDNA 或基因组 DNA 的区域以获得这样的扩增基因区段, 所述每个基因区段都包含编码骆驼科动物常规抗体之 VH 结构域的核苷酸序列或包含编码 VL 结构域的核苷酸序列; 以及

[0216] d) 将 c) 中获得的基因区段克隆到表达载体中, 从而使每个表达载体都包含编码 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段, 并且指导包含所述 VH 结构域和所述 VL 结构域的抗原结合多肽的表达, 由此就得到了表达载体文库。

[0217] 上述方法可用于制备骆驼科动物编码之 VH 和 VL 结构域 (特别是大羊驼和阿尔帕卡羊驼的 VH 和 VL 结构域) 的文库, 其适合于将 VH/VL 组合表达为有功能的抗原结合多肽, 如以 scFv、Fab 或全长抗体的形式。

[0218] 根据上述方法制备的编码骆驼科动物 (包括但不限于大羊驼或阿尔帕卡羊驼) VH 和 VL 结构域的表达载体文库也构成了本发明主题的一部分。

[0219] 在一个特定的实施方案中, 本发明提供了编码 Fab 或 scFv 分子的噬菌体载体文库, 其中该文库编码的每个 Fab 或 scFv 均包含骆驼科动物常规抗体的 VH 结构域和骆驼科动物常规抗体的 VL 结构域。

[0220] 在一个实施方案中, 文库是“多样性的”文库, 其中文库中的大部分克隆编码具有独特氨基酸序列的 VH 结构域和 / 或具有独特氨基酸序列的 VL 结构域, 其包括骆驼科动物 VH 结构域和骆驼科动物 VL 结构域的多样性文库。因此, 就 VH 结构域和 / 或 VL 结构域的氨基酸序列而言, 多样性文库中的大部分克隆 (例如大于 90%) 编码的 VH/VL 对与同一文库中编码的任何其它 VH/VL 对是不同的。

[0221] 本发明还包括包含编码 VH 和 VL 之基因区段的表达载体, 所述基因区段分离自骆驼科动物 (如大羊驼或阿尔帕卡羊驼) 单个所选出的 B 细胞。

[0222] 在另一个方面, 本发明还提供了选择如下表达载体的方法, 所述表达载体编码与

靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽,该方法包括以下步骤:

[0223] i) 提供表达载体文库,其中所述文库中的每个载体都包含编码 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段,其中所述 VH 结构域或所述 VL 结构域的至少一个来自于骆驼科动物常规抗体,并且其中所述文库中的每个载体都指导包含所述 VH 结构域和 VL 结构域之抗原结合多肽的表达;

[0224] ii) 针对与所述靶标抗原的免疫反应性,筛选由所述文库编码的抗原结合多肽,并由此选择编码与所述靶标抗原发生免疫反应的抗原结合多肽的表达载体。

[0225] 本发明的方法包括从编码 VH/VL 对的克隆文库中筛选/选择与靶标抗原发生免疫反应的克隆。该方法还可包括文库构建,其可使用如上所述的文库构建方法进行。如下所述,可针对选定克隆进行可选的下游处理/优化步骤。该选择和筛选的方法也可构成上述用于生产本发明抗原结合多肽之一般方法的一部分。因此,在本发明的这一方面被描述为优选或有利的特征也可被认为在一般方法中是优选或有利的,反之亦然,除非另有说明。

[0226] 与靶标抗原发生免疫反应之克隆的筛选和选择

[0227] 筛选/选择通常包括将由文库中之克隆编码的表达产物(即以抗原结合多肽形式存在的 VH/VL 对,如 Fab、scFv 或抗体)与靶标抗原接触,并选择所编码的 VH/VL 对表现出期望之抗原结合特性的一个或多个克隆。

[0228] 噬菌体展示文库可利用固定化的靶标抗原或可溶性(通常是生物素化的)的靶标抗原进行筛选。因其以单体存在并在噬菌体上以单价展示,所以 Fab 形式允许基于亲和力的筛选,而这对于 scFv(由于会发生凝集并在噬菌体上以多价展示)和 IgG(二价形式)是不适用的。通常需要两到三轮的筛选才能获得足够富集的靶标特异性结合物。

[0229] 基于亲和力的筛选可通过在接下来的一轮筛选中降低靶标抗原量来进行,而使用非生物素化靶标进行延长清洗可鉴定出具有极佳亲和力的结合物。

[0230] 该筛选方法能让使用者追踪(home in on)某些表位,而从固定化靶标上洗脱噬菌体克隆的经典方法是基于 pH 休克(其使得抗体片段和/或靶标变性),与针对靶标抗原的参照 mAb 或可溶性受体或细胞因子的竞争导致展示与靶标相关表位结合的抗体片段的噬菌体得以洗脱(这自然也适用于其它展示系统,包括 B 细胞选择方法)。。

[0231] 使用从细胞或培养上清液制备的周质级分(片段从细胞中“渗漏”入其中),可将选择产物中取得的单个克隆用于小规模抗原结合多肽(如抗体片段)的生产。表达可由诱导型启动子(例如 lac 启动子)驱动,这意味着一经加入诱导剂(IPTG),便启动了片段的产生。前导序列确保了片段向周质的转运,在此处片段被适当地折叠并形成分子内二硫桥。

[0232] 由此产生的粗蛋白级分可用于靶标结合测定(例如 ELISA)。对于结合研究来说,从单个克隆制备的噬菌体可用来克服 Fab 的低表达产量(其通常获得非常低的结合信号)。还可以使用体外受体-配体结合测定来筛选这些蛋白级分,以鉴定拮抗抗体;可以使用基于 ELISA 的受体-配体结合测定,还可以使用如 Alphascreen 的高通量测定。

[0233] 也可以通过放射性标记的配体结合测定来进行筛选,其中过表达受体之细胞系的膜级分被固定,后一测定极其灵敏,因为只需要皮摩尔量的放射性细胞因子,这意味着粗蛋白级分中极少量的拮抗性 Fab 就将给出阳性读数。或者,也可应用 FACS 进行抗体的筛选,其抑制了荧光标记的细胞因子与细胞上表达的其受体的结合,而 FMAT 是其高通量的变通方法。

[0234] 可以将存在于周质级分中的或者通过其六组氨酸标签进行 IMAC 部分纯化的或者通过 G 蛋白（已知与 Fab 的 CH1 结构域结合）进行部分纯化的 Fab 直接用于使用细胞的生物测定（其对细菌杂质不敏感）中；或者，来自单个大肠杆菌细胞的 Fab 可以在哺乳动物系统中再克隆以用于 Fab 或 IgG 的表达，并随后在生物测定中进行筛选。

[0235] 在确定阳性表达载体克隆（即编码与期望靶标抗原结合的功能性 VH/VL 组合的克隆）后，常规地确定该可变结构域核苷酸序列，并据此推导出其编码的 VH 和 VL 结构域的氨基酸序列。

[0236] 如果需要，Fab（或 scFv）编码区域可被再克隆到另一表达平台（例如，细菌表达载体（除了没有用于在噬菌体上展示所必需的基因 3 以外，其与噬菌粒载体相同））中，从而实现更大规模的编码片段生产和纯化。

[0237] 纯化的 Fab（或 scFv）的靶标结合亲和力可以通过表面等离子体共振（例如 Biacore）或其它方法确定以及通过使用体外受体-配体结合测定和基于细胞的测定来确定中和效力。

[0238] 抗原结合的家族（特别是拮抗性 Fab（或 scFv））可基于序列分析（主要是 VH，特别是 VH 结构域的 CDR3 的长度和氨基酸序列）来确定。

[0239] 效力优化

[0240] 如有需要，可对通过筛选 / 选择鉴定出的编码对期望靶标抗原具有亲和力的 VH/VL 组合的克隆进行以下下游步骤，其中对亲和力和 / 或中和效力进行优化。

[0241] 每个 VH 家族表现最佳的成员的效力优化可以通过轻链改组、重链改组或其组合来实现，从而选出在动物中天然存在的亲和力变体。这在最初的骆驼科动物 VH/VL 结构域选自于主动免疫之骆驼科动物的实施方案中是特别有利的，因为可使用从同一经免疫动物制备的原始文库来进行链改组，从而筛选在同一经免疫动物中产生的亲和力变体。

[0242] 对于轻链改组而言，可使用编码具有期望抗原结合特征的 VH/VL 对（例如拮抗性 Fab）的 VH 区（或 VHCH1）的基因区段来构建文库，在该文库中编码 VH 的单个基因区段与文库（所述克隆最初从该文库中挑出）中的轻链集合结合。例如，如果编码 VH 的区段选自于通过利用靶标抗原进行主动免疫而引起免疫应答的骆驼科动物制备的文库（例如，Fab 文库），那么可通过将该 VH 编码区段与同一经免疫骆驼科动物的轻链（VL）集合结合来构建“链改组”文库。然后，可利用所得到的文库来选择靶标抗原，但要在严格的条件（低靶标浓度、使用溶液中非生物素化的靶标进行彻底清洗）下，以确保分离出最高亲和力的变体。周质级分的解离速率筛选（off-rate screening）也可有助于鉴定出更优的克隆。在经过序列分析并再次克隆到细菌生产载体中后，可对纯化的选定 Fab 进行亲和力（如通过表面等离子体共振）和效力（如使用生物测定）的检测。

[0243] 可通过将编码轻链改组后选定之克隆的轻链（VL）的基因区段克隆回来自于同一动物（原始 VH/VL 编码克隆从中选择）的原始重链文库而进行重链改组。或者，可使用 CDR3 特异性寡核苷酸引物来扩增 VH 区家族，其可被克隆为集合从而与拮抗性 Fab 的轻链结合。然后基于亲和力的筛选和解离速率筛选，可鉴定该家族内表现最优的 VH。

[0244] 应当理解，轻链改组和重链改组步骤在实践中可以任一顺序进行，即先进行轻链改组，随后进行重链改组，或先进行重链改组，随后进行轻链改组。这两种可能性都包含在本发明的范围内。

[0245] 根据具有增强之亲和力和效力的 VH/VL 对（例如 Fab）的轻链或重链，（特别是）CDR 的序列可用于生成改造变体（其中组合了若干单个 Fab 的突变）。已知突变通常可以叠加，这意味着将这些突变进行组合可得到更高的亲和力。

[0246] 为人类治疗用途而进行的种系化和改换形式 (formatting)

[0247] 可以对选定的编码 VH/VL 对的表达克隆（其表现出期望的抗原结合特征，例如编码 scFv 或 Fab 的噬菌体克隆）的 VH 和 VL 编码基因区段经历下游加工步骤并再次克隆到另外的表达平台（例如编码适合于人类治疗用途的抗原结合多肽的形式的载体（例如，具有完全人抗体恒定结构域的全长抗体））中。

[0248] 有前景的“首选”选定克隆可被改造成在编码 VH 结构域和 / 或 VL 结构域的核苷酸序列中引入一个或多个改变，该改变可改变或不改变 VH 结构域和 / 或 VL 结构域所编码的氨基酸序列。VH 或 VL 结构域序列中的这些改变可根据本文中别处所述的任何目的而设计，包括种系化或人源化、密码子优化、增强的稳定性和优化的亲和力等。

[0249] 本文所述的种系化或人源化的一般原则同样适用于本发明的这一实施方案。例如，包含骆驼科动物编码的 VH 和 VL 结构域的首选克隆可以在它们的框架区 (FR) 中通过应用文库方法被种系化 / 人源化。如本文中别处详细描述地，在与最接近的人类种系（针对 VH 和 VL）以及与具有相同 CDR1 和 CDR2 典型折叠的其它人类种系比对后，即可确定在 FR 中需要被改变的残基，并选定优选的人类残基。虽然种系化可以包括使用来自于最匹配的人类种系的对应残基替换骆驼科动物编码的残基，但是这不是必须的，也可使用来自于其它人类种系的残基。

[0250] 对与人 VH3 家族成员具有氨基酸同源性的 VH 结构域进行种系化通常包括替换 / 替代多个与公开已知的大羊驼、阿尔帕卡羊驼或单峰驼 (*Camelus dromedarius*) 来源之种系序列不同的残基。允许用于大羊驼、阿尔帕卡羊驼或单峰驼（特别是大羊驼）的 VH3 结构域之种系化 / 人源化的氨基酸替代包括但不限于：在框架区的第 71、83 和 84 位（使用 Kabat 编号）中的任何一个或其任何组合上进行的氨基酸替换。这样的替换将包括使用不同的氨基酸（其可以是天然或非天然的氨基酸，并且优选是已知出现在人类编码的 VH3 结构域中对应位置上的氨基酸）代替这些位点上骆驼科动物编码的残基。例如，第 71 位的丙氨酸可以被丝氨酸或丙氨酸替换，第 83 位的赖氨酸可以被精氨酸替换，第 84 位的脯氨酸可以被丙氨酸替换。因此，本发明抗原结合多肽的特定的非限制性的实施方案包括包含表现出与人 VH3 结构域具有序列同源性的骆驼科动物（更具体地说是大羊驼、阿尔帕卡羊驼或单峰驼）VH 结构域的变体，其中 VH 结构域在第 71、83 和 84 位（使用 Kabat 编号）中一个或多个或所有位点上包含氨基酸替换（相对于骆驼科动物编码的序列而言）。特别地，具有下列替换中的一个或多个或其任何组合的变体是允许的：在第 71 位 A 变为 S，在第 83 位将 K 变为 R，或在第 84 位将 P 变为 A。

[0251] 一旦知晓首选的 VH 和 VL 结构域（需要时，在效力优化后）的氨基酸序列，即可设计 VH 和 VL 的合成基因，其中与人类种系不同的残基被优选的人残基（来自于最匹配的人类种系，或使用出现在其它人类种系中的残基，或者甚至是骆驼科动物的野生型残基）替换。在该阶段，编码可变结构域的基因区段可以被再克隆到表达载体中，从而使其在基因合成中或通过克隆到合适的展示载体中而与 Fab 的人类恒定结构域融合。

[0252] 所得的 VH 和 VL 合成基因可以与 Fab 文库重组，或者经种系化的 VH 可以与野生型

VL 重组（反之亦然，称为“杂交”文库）。基于亲和力的筛选允许分离出表现最优的种系化形式，就“杂交”文库而言，可将表现最优的种系化 VH 与表现最优的种系化 VL 进行重组。

[0253] 可使用经种系化之 Fab 的氨基酸和核苷酸序列信息来生成密码子经优化的合成基因以产生优选同种型（IgG1（适用于 ADCC 和 CDC）、IgG2（适用于有限的效应功能）、IgG4（类似于 IgG2，但适用于需要单价结合的情况）的全长人 IgG。对于非长期的应用和快速指示，也可制备细菌或哺乳动物细胞来产生人类 Fab。

[0254] 在一个具体的非限制性实施方案中，组合上述方法步骤，本发明提供了生产编码与靶标抗原发生免疫反应之嵌合抗原结合多肽的表达载体的方法，所述方法包括以下步骤：

[0255] a) 主动免疫骆驼科动物（包括但不限于大羊驼或阿尔帕卡羊驼），从而产生针对靶标抗原的骆驼科动物常规抗体；

[0256] b) 从包含来自于所述经免疫骆驼科动物的淋巴组织（例如循环中 B 细胞）的样品制备 cDNA 或基因组 DNA；

[0257] c) 扩增所述 cDNA 或基因组 DNA 的区域以获得如下经扩增的基因区段，每个基因区段包含编码骆驼科动物常规抗体之 VH 结构域的核苷酸序列或包含编码 VL 结构域的核苷酸序列；以及

[0258] d) 将 c) 中获得的基因区段克隆到表达载体中，从而使每个表达载体包含编码 VH 结构域的基因区段和编码 VL 结构域的基因区段，并且指导包含所述 VH 结构域和 VL 结构域的抗原结合多肽的表达，由此就产生了表达载体文库；

[0259] e) 筛选与所述靶标抗原具有免疫反应性的由步骤 d) 中获得的文库编码的抗原结合多肽，从而选择编码与所述靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的表达载体；

[0260] f) 任选地，进行轻链改组步骤和 / 或重链改组步骤以选择这样的表达载体，其编码与所述靶标抗原发生免疫反应的效力经优化的抗原结合多肽；

[0261] g) 任选地，对编码步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VH 结构域的基因区段和 / 或编码步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VL 结构域的基因区段进行种系化和 / 或密码子优化；以及

[0262] h) 将编码步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VH 结构域的基因区段或步骤 g) 中产生的经种系化和 / 或密码子优化的 VH 基因区段以及编码步骤 e) 或 f) 中选出之载体的 VL 结构域的基因区段或步骤 g) 中产生的经种系化和 / 或密码子优化的 VL 基因片段克隆到另一表达载体中，并使其与编码人抗体之一或多个恒定结构域的核苷酸序列进行有效连接，从而产生编码包含与人抗体之一或多个恒定结构域相融合的 VH 和 VL 结构域的嵌合抗原结合多肽的表达载体。

[0263] 本发明还涉及到根据上述方法制备的表达载体，并涉及生产与靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的方法，该方法包括以下步骤：

[0264] a) 使用上述方法制备编码与靶标抗原发生免疫反应之抗原结合多肽的表达载体；

[0265] b) 在允许所编码的抗原结合多肽表达的条件下，将所述表达载体引入宿主细胞或无细胞表达系统中；以及

[0266] c) 回收所表达的抗原结合多肽。

[0267] 在一个实施方案中，后一方法包括本发明抗原结合多肽的批量生产，特别是旨在

用作药理学活性制剂的治疗性抗体的批量生产。在这样的实施方案中,步骤 a) 中制备的表达载体和步骤 b) 中使用的宿主细胞 / 表达系统选用适于大规模生产旨在施用于人类患者的重组抗体。针对此目的合适载体和表达系统的一般特征为本领域众所周知。

[0268] 参照以下非限制性的实施例来进一步理解本发明。

[0269] 实施例 1 至 9 示意针对示例抗原(表示为“细胞因子 x”)产生抗体的方法,其从免疫大羊驼开始。同样的一般操作方案可适用于任何骆驼科动物物种的任何靶标抗原,因而“细胞因子 x”的确切身份并不重要。还针对制备与 IL-1Beta 结合的 Fab 对该方法进行举例说明(从实施例 15 开始)。

[0270] 在上文的描述以及以下的实施例中引用了多篇出版物,其中每一篇都作为整体通过引用并入本文中。

[0271] 一般操作方案

[0272] 实施例 1

[0273] 大羊驼的免疫

[0274] 大羊驼(Lama glama)的免疫和外周血淋巴细胞的获取以及随后 RNA 的提取和抗体基因片段的扩增都依照 De Haard 及其同事所描述的方案进行(De Haard 等, J. Bact. 187 :4531-4541(2005))。通过使用弗氏完全佐剂或适当的动物用佐剂 Stimune(Cedi Diagnostics BV, The Netherlands),将重组人类细胞因子 x 经肌肉免疫一只大羊驼。细胞因子 x(在被改造的人类细胞系中重组表达)是购买的。在免疫前,冻干的细胞因子 x 在 PBS(Dulbecco)中以 250 μ g/ml 的浓度重溶。大羊驼每周接受 6 次注射,前两次注射每次注射使用 100 μ g 细胞因子,后四次注射每次使用 50 μ g 进行加强。在末次免疫后 4 天,从动物中抽取 150ml 的血液样品(PBL1)并制备血清。末次免疫后十天,抽取第二份 150ml 的血液样品(PBL2)并制备血清。使用 Ficoll-Paque 梯度(Amersham Biosciences),将作为大羊驼免疫球蛋白基因来源的外周血淋巴细胞(Peripheral blood lymphocytes, PBL)从血液样品中分离出来,得到 $1 \sim 5 \times 10^8$ 个 PBL。抗体的最大多样性预期与取样的 B 淋巴细胞数目一致,约为 PBL 数量的 10% (9.2 ~ 23.2%) ($1 \sim 5 \times 10^7$) (De Genst 等, Dev. Comp. Immunol. 30 :187-98(2006))。大羊驼血清中常规抗体的比例达到总免疫球蛋白量的 80%,其可以推测出产生常规抗体之 B 淋巴细胞具有类似比例。因此,150ml 血液样品中常规抗体的最大多样性被计算为 $0.8 \sim 4 \times 10^7$ 个不同分子。根据 Chomczynski 等 Anal. Biochem. 162 :156-159(1987)的方法从 PBL 分离出总 RNA。

[0275] 实施例 2

[0276] 通过淘选或 FACS 分选来富集抗原反应性 B 细胞(可选)。

[0277] 为了降低所采样的 B 细胞集合的复杂性使重组的 Fab 噬菌体展示文库得以有效克隆,通过使用荧光标记的抗原或特异性识别骆驼科动物常规抗体的 mAb(作为 B 细胞标志物)进行 FACS 分选(Weitkamp 等, J. Immunol. Meth. (2003) 275 :223-237)或通过利用固定化抗原进行过淘选(Lightwood 等, J. Immunol. Meth. 316 :133-143(2006))来富集抗原反应性 B 细胞。

[0278] 来自于经免疫动物的 PBL 通过利用上述 Ficoll-Paque 密度离心法进行分离。可选地,在室温下,通过将 PBL 沉淀用 20ml 的裂解缓冲液(8.29g/L NH_4Cl 、1.09g/L KHCO_3 和 37mg/L EDTA)重悬,然后以 $200 \times g$ 离心 10 分钟,以裂解一起纯化出的红细胞。同样可选

的是去除单核细胞,其通过将它们粘附于 T150 培养瓶的塑料表面来实现。为此目的,将该细胞重悬在 70 毫升含 10%胎牛血清、二聚谷氨酸 (Glutamax)、25mM Hepes、青霉素-链霉素 (Invitrogen) 以及 0.38%柠檬酸钠的 RPMI (Invitrogen) 中,并在 37°C 和 5% CO₂ 的培养箱中孵育 2 小时。回收包含所选出 B 细胞的上清液并进行细胞计数。

[0279] 通过对特异性识别骆驼科动物常规抗体的 mAb (使用荧光标记) 和靶标抗原 (使用另一种荧光染料标记) 同时染色来对展示靶标特异性之常规抗体的 (活的) B 细胞进行大规模 FACS 分选。通过使用 Gough 及其同事的操作方案 (Gough, Anal. Biochem. 173 : 93-95 (1988)) 或使用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen) 分选出 1,000 至 100,000 个抗原特异性细胞并用于 RNA 提取。总 RNA 被转换成随机引物 cDNA (作为模板) 以用于扩增抗体重链和轻链可变基因 (参见实施例 3 及其后实施例)。

[0280] 实施例 3

[0281] 可变结构域基因的扩增和克隆。

[0282] 使用 Superscript III 第一链合成系统 (Superscript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen) 进行 RT-PCR,从 80 µg 的 PBL RNA 中制备出随机引物 cDNA。在 8 个独立反应体系 (20 µl 反应体系) 中,在 2.5 µM 随机六核苷酸引物和 500 µM dNTP 存在下,将 RNA 在 65°C 热变性 5min。随后,根据供应商的说明,将缓冲液和二硫苏糖醇以及 640 单位的 RNaseOUT (40 单位 / µl, Invitrogen) 和 3200 单位的 Superscript III 逆转录酶 (200 单位 / µl, Invitrogen) 加入 8×40 µl 的总最终体积中。在 50°C 孵育 50min 后,在 85°C 孵育 5min 然后在 1°C 孵育 1min。加入 RNase H (~4U) 并在 37°C 孵育 20min。根据供应商的建议,使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化所富集的 cDNA 并用于 PCR。

[0283] 根据来自于大羊驼和单峰驼的种系序列,设计退火到 CH1 的 3' 端和 VH 的 5' 和 3' 端的引物,所操作的序列可以从 IMGT 和根据 De Genst 及其同事 (De Genst 等, Dev. Comp. Immunol. 30 :187-198 (2006)) 所述的其它数据库中获取。为了设计用于轻链扩增的寡核苷酸,使用重排的和体细胞突变的单峰驼序列 (其在研究论文中发表 (I. Legssyer, Free University Brussels))。

[0284] 所有最初的 PCR 都使用退火到可变结构域 5' 端的独立 BACK 引物和退火到 CH1 之 3' 端的 FOR 引物相组合来进行,利用相对大量的随机引物 cDNA 为模板 (高达 2.5 µl, 对应于 6 µg 的总 RNA),从而保持最大的多样性。可使用 JHFOR 引物和 SfiI- 标记的 VHBACK 引物组合再次扩增源自重链的扩增产物 (其中 JHFOR 引物退火到 VH 的 3' 端并包含天然的 BstEII 位点, VHBACK 引物退火到 VH 基因的 5' 端),并且随后克隆为 VH 片段。轻链 V 基因通过 PCR 获得,其使用了一系列退火到恒定结构域 3' 端的 CKFOR 或 CLFOR 引物以及退火到 V 区 5' 端的 BACK 引物。使用 CH1FOR (包含 NotI 位点) 或 CKFOR 以及 CLFOR (包含 AscI 位点) 延伸引物,再次扩增来自首次 PCR 反应的扩增产物,并随后克隆为大羊驼 Fab 片段。或者,使用被限制性酶切位点标记的引物 (FOR 引物具有 AscI 位点,基于 FR4 的 BACK 引物具有 XhoI 位点),DNA 区段可被再次扩增并克隆为 VL 片段,从而形成包含大羊驼来源的、与人类 C 区相结合的 V 区的嵌合 Fab。

[0285] PCR 在 50 µL 的反应体系中进行,其使用了 Phusion 聚合酶 (Finnzymes) 和 500pM 的每种引物,进行了 28 个循环 (96°C 1min, 60°C 1min 以及 72°C 1min)。使用 QIAex-II 提取试剂盒 (Qiagen),从琼脂糖凝胶纯化所有产物。为了引入限制性酶切位点,作为再扩增的

输入物,在 100 μ l 的反应体系中使用 100 ~ 200ng 经纯化的 DNA 片段作为模板。通过对琼脂糖凝胶上 4 μ l “未扩增”的 PCR 混合物的分析来证实大量的输入,其保证了变异性。

[0286] 实施例 4

[0287] 原始和二级骆驼科动物 Fab 库的构建。

[0288] 为了构建原始重链和两个原始轻链的库,对附带限制性酶切位点的 PCR 产物进行凝胶纯化,而后进行酶切并与三个不同的 VH、VK 和 VL 家族组合成三个集合。VHCH1 片段用 SiiI 和 NotI 酶切, VKCK 和 VLCL 片段用 ApaLI 和 AscI 酶切,并被克隆到噬菌粒载体 pCB3 中(与经改造具有多克隆位点的 pCES1 载体相似)。使用 T4-DNA 连接酶 (Fermentas),将酶切片段 (1 ~ 2 μ g) 连接到经酶切及纯化的 pCB3 (2 ~ 4 μ g) 上,在室温孵育几个小时,然后在 37℃ 孵育 1-2 小时。将针对轻链或重链集合的经脱盐的连接混合物对大肠杆菌 TG1 进行电穿孔以构建单链的文库。

[0289] 或者,可使用 9 个单位的 T4-DNA 连接酶于室温下在 100 ~ 200 μ l 的反应混合物中,将总共 1.5 μ g 的 VH 片段用(存在于 VH 中的) SfiI 和 BstEII 酶切并连接到 4 μ g 经凝胶纯化的载体 pCB4(类似于载体 pCB3,但没有 pIII 基因)中。此外, VH 基因区段可通过 SfiI 和 BstEII 来克隆, VK/VL 基因区段通过 ApaLI 和 XhoI 来克隆,从而产生嵌合 Fd 和 VKCK 和 VLCL。

[0290] 通过将轻链片段(从制备自轻链库的质粒 DNA 酶切获得)克隆到包含重链文库的质粒集合中而获得 Fab 文库。从 VL 文库(供者载体)的至少 3×10^9 个细菌中分离的质粒 DNA 被 ApaLI 和 AscI 酶切用于在受者载体中克隆凝胶纯化的 DNA 片段,其中受者载体已经包含重链文库,从而创建独立的具有 kappa 轻链的 Fab 文库,以及由具有 lambda 轻链的 Fab 组成的另一文库,其大小为 $1 \sim 10 \times 10^9$ 个克隆。同样,来自单链文库的 VLCL 或 VKCK 可以使用 ApaLI/AscI 利用琼脂糖凝胶分离出来,并使用相同的限制性酶切位点克隆到 VHCH 文库载体中。

[0291] 实施例 5

[0292] 文库的选择

[0293] 使用辅助噬菌体 M13-K07 或 VCSM-13 以 2 升的规模进行噬菌体颗粒援救(rescue),其使用代表性数目的来自接种文库的细菌以保证来自每个克隆的至少 10 个细菌存在于起始接种体中。为进行选择, 10^{13} 个克隆形成单位与固定在免疫管(Maxisorp tubes, Nunc)上或在 96 孔微量滴定板中的抗原或可溶性生物素化的抗原一起使用。在随后的几轮选择中,固定化抗原的量减少 10 ~ 100 倍,第 1 轮以 10 μ g/ml 开始。根据供应商的建议,抗原以每个抗原分子 3 ~ 10 个 NHS-生物素(Pierce)分子的比率被生物素化并在生物测定中测试其生物活性。除非另有说明,抗原在第一轮中以 1 至 10nM 的浓度被用于选择,在随后的几轮中以 10pM 至 1nM 的浓度用于选择。

[0294] 实施例 6

[0295] 拮抗性细胞因子 x 特异性 Fab 的筛选

[0296] 如 Marks 等(Marks 等, J. Mol. Biol. 222 :581-597(1991)) 中所述,从单个克隆中制备可溶性 Fab,但优选地是单克隆噬菌体(Lee 等, Blood 108 :3103-3111(2006)) 以提高灵敏度。包含可溶性 Fab 或展示 Fab 之噬菌体的培养上清在具有直接包被抗原的 ELISA 中进行检测,或通过固定化链霉亲和素捕获。在 4℃,重组的人类细胞因子 x 和链霉亲和素以

10 μ g/ml 在 0.1M 碳酸氢钠 (pH 9.6) 的条件下被包被 16h。在使用含 0.1% (v/v) Tween 20 的 PBS 洗涤 3 次后,将生物素化的抗原加入,其浓度为 0.5 μ g/ml,在室温下孵育 30 至 60 分钟。将板在室温下用含有 2% (w/v) 半脱脂奶粉 (Marvel) 的 PBS 或 1% 酪蛋白溶液 (在 PBS 中) 封闭 30min。培养上清液用 2% (w/v) Marvel/PBS 稀释 1 或 5 倍并孵育 2h;使用抗 Myc 抗体 9E10 (其识别重 Fd 链羧基端的 myc 肽标记) (5 μ g/ml) 和兔抗小鼠 HRP 缀合物 (Dako) 检测所结合的 Fab。在最后一次孵育后,使用四甲基联苯胺和过氧化氢为底物进行染色然后加入 0.5 倍体积的 1M H_2SO_4 终止反应,测定 450nm 处的光密度。使用寡核苷酸引物 M13- 反向和 geneIII- 正向 (4) 扩增获得的 PCR 产物或单独的 Fd 和 VKCK 或 VLCL 扩增产物进行 BstNI 或 HinfI 指纹图谱分析从而分析在 ELISA 中得到阳性信号 (超过背景 2 倍) 的克隆。

[0297] 对 Fab 干扰细胞因子 x 与其受体结合之能力的筛选在适当的受体-配体结合 ELISA 中进行。对此,利用经细胞因子 x-受体包被的板,将少量的生物素化细胞因子 x 与培养上清中的 Fab 一起孵育,随后使用链霉亲和素 HRP 缀合物检测所结合的细胞因子 x。将阳性命中物进行测序并纯化 Fab 以用于在体外的受体-配体测定中确定其效力 (IC₅₀),并且在 BIAcore 中评估它们对被固定化细胞因子 x 的亲和力。

[0298] 从单个克隆大规模产生可溶性 Fab 片段在包含 100 μ g/ml 羧苄青霉素 (carbenicillin) 和 2% 葡萄糖的 2 $\times$ TY 中以 50ml 或 250ml 的规模进行。在 37 $^{\circ}$ C 培养到 OD₆₀₀ 值为 0.9 后,沉淀细胞 (2,934 $\times$ g, 10min),然后用含有羧苄青霉素和 1mM 异丙基-1-硫-D-半乳糖苷 (Isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside, IPTG) 的 2 $\times$ TY 悬浮。根据替代性的 De Bellis 方法 (De Bellis 和 Schwartz, NAR(1990) 18(5):1311) (其用 0.2% 代替 2% 的葡萄糖),从而允许直接向对数期后期细胞的培养基中加入 IPTG。细菌在 30 $^{\circ}$ C 生长 3.5h 后通过离心收获 (如前);通过用 1ml 冰冷 PBS 重悬细胞沉淀来制备周质级分。在 4 $^{\circ}$ C 经过 2~16h 的颠倒旋转后,通过两步离心法去除原生质球;在以 3400 $\times$ g 离心 10 分钟后,通过另一离心步骤 (其在 Eppendorf 离心机中以 13000 $\times$ g 离心 10 分钟) 澄清上清液。获得的周质级分被直接用于不同的功能测定 (靶标结合 ELISA, 体外受体-配体结合测定和 Biacore) 中。

[0299] 对于测序,使用 Qiagen Mini 试剂盒 (Qiagen),从 30 $^{\circ}$ C 培养在包含 100 μ g/ml 羧苄青霉素和 2% 葡萄糖的 LB 培养基中的 5ml 培养物中制备质粒 DNA,或使用退火到 Fab 插入物边界之载体引物 M13- 反向和 geneIII- 正向的扩增产物。

[0300] 实施例 7

[0301] 首选 Fab 的大规模生产和纯化

[0302] 通过 ApaLI-NotI,在表达载体 (称为 pCB5) 中将来自 3 到 6 个不同首选物的 Fab 插入片段进行再克隆,除了没有 M13 噬菌体的基因 3 以外,该表达载体与 pCB3 相同 (都包含六组氨酸和与 Fd 羧基端相融合的 c-Myc 标签)。同样,使用适当的限制性内切酶组合再克隆 V 区,随后克隆进基因 3 缺失的、包含人 CH1 和 CK 或 CL 的载体中用于表达嵌合 Fab。经过指纹图谱分析,再克隆后获得的单克隆以 50ml 或 250ml 的规模培养,并如上所述制备周质级分。使用 IMAC 纯化 Fab 片段,并将正确形成的 Fab 进一步通过使用 Superdex 75HR 柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 进行尺寸排阻色谱纯化。当进行基于细胞的测定时,需要将样品通过阴离子交换柱 (Source30Q, GE Healthcare) 以去除内毒素,其中离子交换柱

在 1M NaOH 中过夜敏化,并随后用 D-PBS 进行平衡。产量通过测定在 280nm 处的光密度来确定,对于 Fab 其使用的摩尔消光系数为 13。

[0303] 通过体外受体-配体结合测定和 Biacore 测试经纯化的 Fab,以确定 Fab 片段产生的观察结果与包含基因 3 之 pCB3 载体产生的相同。最后 Fab 的效力通过生物测定来确定。

[0304] 实施例 8

[0305] 在本实施例中,将针对细胞因子 x 的大羊驼来源的首选 Fab 进行人源化,其通过使用靶向少部分框架残基的“软随机突变 (soft randomization)”方法并通过在丝状噬菌体表面上单价展示所产生的 Fab 文库(从而通过基于亲和力的筛选确定具有高亲和力的框架序列 (US2003/0190317A1,其通过引用并入本文中))来实现。例如,对于单峰驼来源的种系 VH(IGHV1S20)建立了一个小文库,其中第 5 位 (Val, Leu)、第 55 位 (Gly, Ala)、第 83 位 (Ala, Ser)、第 95 位 (Lys, Arg)、第 96 位 (Ser, Ala) 和第 101 位 (Met, Val) 保留了 70% 的野生型残基 (IMGT 编号)。高变环中的氨基酸可以类似的方式处理。

[0306] 为修正 PCR 错误或引入额外的特定单个密码子改变,基本上按照 Kunkel 等, Curr. Protoc. Mol. Biol. CH8U8.1 (2001) 所述的方案或者从 GeneArt 订购的“编码变体的合成基因”进行定点突变。用于定点实验的模板是来自人源化 Fab 克隆的单链 DNA。

[0307] 定点突变也可直接用来为人源化或修饰目的来改变编码野生型或人源化 Fab 的 DNA 中有限数目的氨基酸密码子。

[0308] 选出后,检测单个首选克隆的亲和力和效力,选择最佳的首选克隆用于再次更换为人类 Fab/IgG 形式。

[0309] 实施例 9

[0310] 人 Fab 片段和人单克隆抗体的表达。

[0311] 从人源化的 VH 和 VL 区开始,人源化 Fab 的表达按照 Rauchenberger 等 J. Biol. Chem. 278 :38194-204 (2003) 中所述的方案进行。对于人单克隆抗体的表达,构建两个独立的基于 pcDNA3.1 载体的载体,一个针对轻链载体,一个针对重链构建体。针对轻链的表达载体包含在 CMV 启动子下游的人类 C kappa 或人类 C lambda 序列,以及允许轻链构建体作为 KpnI/BsmBI 片段克隆到 CMV 启动子下游并与轻链恒定结构域同读码框的限制性酶切位点。针对重链的表达载体包含在 CMV 启动子下游的人类 CH1- 铰链 -CH2-CH3 序列,以及允许 VH 构建体作为 KpnI/BsmBI 片段克隆到 CMV 启动子下游并与重链恒定结构域同读码框的限制性酶切位点。

[0312] VL 和 VH 片段作为 KpnI/BsmBI 片段被克隆到合适的表达载体中,所述载体包含 Kozak 序列及其后的与各 VH 或 VL 序列同读码框的小鼠 IgG kappa 前导序列。这些序列通过基因合成获得并针对在哺乳动物细胞中表达而优化 (Geneart)。

[0313] 对于全长 IgG 的产生, VH 和 VL 表达载体构建物被共转染到哺乳动物细胞 (HEK-293 (瞬时转染) 或 CHO (稳定转染)) 中。来自瞬时转染细胞或稳定转染细胞的上清液通过蛋白 A 进行层析。

[0314] 通过受体结合测定和生物测定检测单克隆抗体或 Fab,并选择最佳的首选物用于进一步开发。

[0315] 实施例 10- 骆驼科动物与人类的同源性分析

[0316] 方法

[0317] 将编码 FR4 的大羊驼和单峰驼种系的 J 区序列与人类序列进行比较,其与人类序列完全一致(10 个残基完全匹配),唯一的例外是 IGHJ4(其在 FR4 的第 6 位包含谷氨酰胺(而非亮氨酸或蛋氨酸))(其比对参见下文)。对于来自单峰驼的体细胞突变之 VLambda FR4,10 个残基中有 9 个匹配(90%的同源性),因为大多数可获得的序列的第 6 位具有组氨酸而非赖氨酸或谷氨酸或谷氨酰胺(其比对参见下文)。最后,在由六个可获得的体细胞突变之单峰驼 VKappa 序列组成的集合中的 FR4 也具有 90%的一致性(10 个残基中有 9 个匹配),因为第 3 位丝氨酸残基与在人类种系 JK 区段中发现的(即谷氨酰胺、脯氨酸和甘氨酸)不同(其比对参见下文)。

[0318] 对于 VH、VLambda 和 VKappa 的分析通过比对来进行(见下文)。序列比对是与最接近的具有相同 H1 和 H2 典型折叠的人类种系序列进行的。

[0319] 不匹配、但出现在同一种系的另一家族成员(或亚类)中的残基被认为是同源的,其基于以下假设,即将它们突变回所述最接近之人类种系序列是可行的。

[0320] 典型结构通过使用下列程序进行对比:

[0321] <http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia/html> 和 http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html。

[0322] 检查所分析的不完全拟合典型折叠算法的骆驼科动物抗体(或来自其它物种的抗体)的残基是否存在于具有相同典型折叠组合的人类种系家族匹配的成员序列中,或检查所述形成折叠的残基是否存在于所分析抗体所属之骆驼科动物抗体的家族中。

[0323] 结果如下所示:

[0324] 10.1- 单峰驼 VH

[0325] 10.2- 大羊驼 VH

[0326] 10.3-VL 1-40

[0327] 10.4-VL 2-18

[0328] 10.5-VL 3-1

[0329] 10.6-VL 3-12

[0330] 10.7-VKappa 2-40

[0331] 10.8- 大羊驼与人类 J(H) 区的比较

[0332] 10.9- 轻链 J 区的比较

[0333] 10.10- 阿尔帕卡羊驼(Lama pacos)VH 同源性分析

[0334] 10.11- 大羊驼来源的 VH 同源性分析

[0335] 10.12- 大羊驼来源的 VL 分析

[0336]

10.1 单峰驼

VH

IGHV gene	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)						
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
M99679 ,IGHV3-53	EVQLVESGG	GLIQPGGSLRLSCAAS	GFTVSSNY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSGGST	YYADSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AR		
AF000603,IGHV1S1	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245151,IGHV1S2	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245152,IGHV1S3	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245153,IGHV1S4	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245154,IGHV1S5	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245155,IGHV1S6	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245157,IGHV1S7	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245158,IGHV1S8	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245159,IGHV1S9	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245160,IGHV1S10	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245164,IGHV1S11	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245165,IGHV1S12	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245167,IGHV1S13	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245168,IGHV1S14	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245170,IGHV1S15	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245171,IGHV1S16	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245173,IGHV1S17	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245174,IGHV1S18	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		
AJ245156,IGHV1S19	EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYY	MSWVRQAPGKGLEWVS	IYSDGST	YYGDSVK	GRFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AE	DTAVYYC	AG		

A) 序列比对

与人类IGHV3-23以及其它人种系相比较的序列:

55 G/S/A 可被认为是可变/CDR2的起始部分
 68 G 在人 (IGHV1S17/18) 中为A, 即应当替换为A
 83 A 在其它许多人种系中存在
 86 M/V 在人种系 3-15/49/72/73中也如此
 95 K 在人种系 3-15/49/72/73中也如此
 96 P 在人种系 3-19中也如此
 101 M 在人种系 3-19中也如此

序列同源性 26/26 (FR1) + 17/17 (FR2) + 38/39 (FR3) = 81/82 = 99%

B) CDR H1和H2的典型折叠分析

1) 对单峰驼种系VH序列IGHV1S1至IGHV1S19的分析显示CDR1为典型折叠1, CDR2为折叠1, 这与人类种系VH3-13和VH3-53的折叠非常一致, 证实了Neuyon及同事 (EMBO J (2000), 19(5), 921-930页) 发表的数据。对单峰驼IGHV1S1和人IGHV3-53的分析显示如下, 其作为使用自动生成3DR模板的例子。

IGHV1S1
 CDR H1 类型
 与类型1/10A相似, 但是
 ！ 缺失H94 (Chothia编号)
 CDR H2 类型 1/9A [1q1g]
 IGHV3-53
 CDR H1 类型
 与类型1相似, 但是
 ！ 缺失H94 (Kabat 编号)
 CDR H2 类型 1 chothia:人 [1q1g]

IGHV 基因	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)
IGHV3-23 , IGHV39660	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWYRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	AK
AJ245177, IGHV1S20	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSY(	MSWYRQAPGKGLEWVSG	INSGGNT	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLKSPEDTANYVC	
AJ245178, IGHV1S21	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYY	MSWYRQAPGKGLEWVSG	IYTGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLKSPEDTANYVC	
AJ245183, IGHV1S22	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWST	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLKSPEDTANYVC	
AJ245185, IGHV1S23	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWST	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245186, IGHV1S24	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGEWVST	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245187, IGHV1S25	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWST	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245189, IGHV1S26	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWST	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245191, IGHV1S27	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYD	MSWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245192, IGHV1S28	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYD	MSWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245193, IGHV1S29	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	ISWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245194, IGHV1S30	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245195, IGHV1S31	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	ISWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245197, IGHV1S32	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWVSS	IYTGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245180, IGHV1S33	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWVSS	IYTGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245182, IGHV1S34	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLQWVS	IYTGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245190, IGHV1S35	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245196, IGHV1S36	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWYRQAPGKGLEWVSA	IYTGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245197, IGHV1S37	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYD	MSWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245181, IGHV1S38	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MYWYRQAPGKGLEWVSS	IYTGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245198, IGHV1S39	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	AYTSSCC	MYWYRQAPGKGEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	
AJ245199, IGHV1S40P	EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAAS	*FTFSSYA	ISWYRQAPGKGLEWVSA	INSGGGST	YYADSVK GFTTISRDNKNTLYLQNNSLRPEDTANYVC	

A) 序列比对

与人IGHV3-23以及其它人种系相比的序列:
 5 V 在所有其它VH3种系中均存在
 55 G/T/S 可被认为更可变/CDR2的起始部分
 83 A 在其它许多VH3类种系中存在
 86 M/V 大多数情况下在人中为T, 即应当可替换为T

[0339]

95 K 在人种系 3-15/49/72/73中也如此
96 P 在人种系 3-19中也如此
101 M 在人IGHV3类中不存在

序列比对 26/26 (FR1) + 17/17 (FR2) + 38/39 (FR3) = 81/82 = 99%

B) CDR H1和H2的典型折叠分析

2) 对单峰驼种系VH序列IGHV1S20和IGH1S22至IGH1S24的分析显示CDR1存在典型折叠1，CDR2存在折叠3，这与人类种系VH3-23的折叠非常一致，证实了Nguyen及同事 (EMBO J (2000), 19(5), 921-930 页) 发表的数据。对单峰驼IGHV1S1和IGHV的分析显示如下，其作为H57位残基天冬酰胺在VH3-21 (其CDR2具有类型3折叠，CDR1具有类型1折叠 (缺失位于D-或J-编码区)) 中发现的例子。

IGHV1S20
CDR H1 类型 ?
! 与类型1/10A相似，但是：
! 缺失H94 (Clothia编码)
! H102 (Clothia编码) -- (允许YHVISDG)
CDR H2 类型 ?
! 与类型3/10B相似，但是：
! H52=N (允许SPWH)

IGHV3-21
CDR H1 类型 ?
! 与类型1相似，但是
! 缺失H94 (Clothia编码)
CDR H2 类型 3 chothua 人 [11gc]

3) 单峰驼种系VH序列IGH1S21和IGHV1S25至IGHV1S39的CDR1具有典型折叠1，CDR2具有折叠2，其与人类种系VH5的折叠一致，因此证实了Nguyen及其同事 (EMBO J (2000), 19(5), 921-930 页) 发表的数据。对IGHV1S32的分析显示如下，其作为使用自动生成SDR模板的例子。在CDR2具有折叠2的人类种系VH中未发现H65位的丝氨酸 (S) 或赖氨酸 (K) 。

IGHV1S32
CDR H1 类型 ?
! 与类型1/10A相似，但是：
! 缺失H94 (Clothia编码)
! H102 (Clothia编码)
CDR H2 类型 ?
! 与类型2/10A相似，但是
! H50 (Choethia编码) = S (允许
! H71 (Choethia编码) = K (允许
YHVISDG)
REWYGOVLNKA)
VAL)

针对IGHV3-23的结果比较

CDR H1 类型 ?
! 与类型1/10A相似，但是：
! H94 (Choethia 编码) is deleted
! H102 (Choethia 编码) = K (允许
CDR H2 类型 ?
! 与类型2/10A相似，但是
! H71 (Choethia 编码) = R (允许
YHVISDG)
VAL)

结论

[0340]

针对一大群单峰驼VH种系预测CDR1的典型折叠1以及CDR2的折叠1（与人种系VH3-13中类似），另一大群使用典型折叠1的CDR1以及折叠3的CDR2的（与人种系VH3-21中类似），另一群使用典型折叠的CDR1以及折叠2的CDR2（如人种系VH3-21中所发现地）。

注：分别将根据Chothia编号的50、52、71、94、102位残基与使用IMGT编号系统的55、57、80、107、117位残基进行比较。

10 2 大羊驼 VH

IGHV 基因	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
M99660 , IGHV3-23		EVQLLESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVK	GRFTISRDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYC	AK		
AF305949, IGHV1S6		EVQLVESGG	GLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSSA	MSWVRQAPGKGLEWYSS	IYSYSSNT	YYADSVK	SRETISTDNAKNTLYLQMN	SLKPKEDTAVYYC	AA		

A) 序列分析

与人IGHV3-23以及其它人种系相比的序列：
5 V 在所有其它VH3种系中存在
55 S 在3-21//38中；可被假定为可变/CDR2的起始部分
74 S 在人种系类型4和6中，但不在类型3中
80 T 在任何其它人VH3种系中不存在
83 A 在许多的其它人类型3种系中
95 L 在任何其它人VH3种系中不存在
96 P 在人种系类型2和6中存在，但不在类型3中

序列比对 26/26 (FR1) + 17/17 (FR2) + 35/39 (FR3) = 78/62 = 95%

B) 典型折叠分析

M99660 , IGHV3-23

CDR H1 类型 ? 使用自动生产的SDR模板的结果

! 与类型1/10A相似，但是
! 未知94 (Chothia 编号)
! H102 (Chothia 编号) = K (允许 YHVISDG)
CDR H2 类型 ?
! 与类型2//10A相似，但是
! H71 (Chothia 编号) = R (允许 VAL)

AF305949, IGHV1S6 使用自动生产的SDR模板的结果

CDR H1 类型 ?
! 与类型1/10A相似，但是
! H32 (Chothia 编号) = S (允许 IHFTNCEG)
! 未知94 (Chothia 编号)
! H102 (Chothia 编号) = A (允许 YHVISDG)

[0341]

CDR H2 类型 ?
与类型2/10A相似,但是
H50 (Unorthia 编号) = S (允许 RENVGVNLNKA)
H56 (Chothia 编号) = N (允许 YREDGVSA)
H71 (Chothia 编号) = T (允许 VAL)
(B) CDR H1和H2的典型折叠分析
对大羊驼唯一可获得的种系VH序列与人种系IGHV3-23的比对进行分析,显示CDR1具有典型折叠1以及CDR2具有折叠2,这与人类种系的某些VH2成员以及所有VH5和VH7的CDR1和2的折叠一致。对IGHV1S6的分析如下:

讨论分析:
1) 第32位的丝氨酸同样在人种系VH2-8、VH3-20和VH3-22中发现,其都有典型折叠1的CDR1
2) 第94位缺失,102位是A;这些残基由D和/或I区域编码
3) 针对CDR2之典型折叠2的第50位丝氨酸(S)未在人种系VH中发现具有同样折叠
4) 第56位天冬酰胺(N)在VH2-9和VH2-10中发现,其都具有典型折叠2的CDR2
5) 第71位苏氨酸(T)在几乎所有的具有典型折叠2之CDR2的人种系VH中发现

结论:
大羊驼种系序列IGHV1S6最有可能采用典型折叠1/10A的CDR1和2/10A的CDR2,正如在人IGHV3-23种系序列中所发现地。
注: Chothia编号的32、50、56、71、94和102位残基与IMGT编号系统的33、55、62、77、107和115位残基进行比较。

10 3 VL 1-40

IGLV 基因	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	FR4
M94116, IGLV1-40	QSVLTQPPS	VSGAPQRTTICTGS	SSNIGAGYD	VHWYQQLPCTAPKLLIY	GNS	NRPSGVP	DRFSGSK	SGTSASLALTGLQAEDEADYYC	QSYDSLSLG				
Camv144	QSVLTQPPS	MSGSLGQRVTICTGS	SSNIGGGSG	VOMFQQLPCTAPKLLIY	GNS	NRASGIP	DRFSLSK	SGSSASLTITIGLQADDEADYYC	ASYNRLSG---	PV	FGG	GKLT	VLG

A) 序列比较
11 M 未在任何人类序列中发现
14 S 不在人VL1序列中,但在几乎所有其它VL类型中
15 L 不在人VL1类中,但在VL3、4、9、10类中
40 Q 不在人VL1中,但在VL6-57中
42 F 在3-27和V17中,但不在类型1中
69 A 不在任何人VL中
78 E 不在任何人VL中
85 S 不在任何人VL中
90 T 不在人VL1中,但在类型2-4和6-8中
97 D 不在VL1但在4-3和8-61

序列同源性 23/26 (FR1) + 15/17 (FR2) + 34/39 (FR3) = 72/82 = 88% 同源性

B) 典型折叠分析

M94116, IGLV1-40 使用自动生成的SDR模板的结果

CDR L1 类型 ?
! 与类型6/14A相似, 但是:
! L31 (Chothia 编号)) = Y { 允许 H)
! L32 (Chothia 编号)) = D { 允许 N)
! L93 (Chothia 编号)) = S { 允许 R)
CDR L2 类型 1/7A [11mk]

Camv144 使用自动生成的SDR模板的结果

CDR L1 类型 ?
! 与类型6/14A相似, 但是:
! L31 (Chothia 编号)) = S { 允许 H)
! L32 (Chothia 编号)) = G { 允许 N)
! L93 (Chothia 编号)) = N { 允许 R)
CDR L2 类型 1/7A [11mk]

- CDR L2与典型折叠1/7A完美匹配, 但对于CDR L1来说, 三个关键性残基是否与典型折叠6/14A完美匹配尚有疑问, 以下分别讨论:
- 1) L31位的丝氨酸 (S, 在CDR1中) 和L32甘氨酸 (G, 在CDR1中) 应分别为组氨酸 (H) 和天冬酰胺 (N), 这两个残基在典型折叠14A序列中未发现; 与人种系VL1家族进行对比时, 未找出其它骆驼科动物Lambda序列, 因此使得该分析更加困难
 - 2) L93位的天冬酰胺 (N, 在CDR3中) 应当为精氨酸 (R), 但天冬酰胺 (R), 同样存在于两个人种系VL4家族成员中, 其与人种系VL1-2都具有典型折叠14A
- 结论:
- 1) 预期CDR2具有典型折叠1/7 (A), CDR1可能具有6/14A折叠, 即, 与在人种系VL1成员1-40中发现的一致。
- 注: 第31、32和93位 (Chothia编号) 与IMGT编号系统的34、35和109位进行比较, 用于序列比较。

[0342]

10 4 VL 2-18

IGLV 基因	前导序列	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4
273642 IGLV2-18	QSAITQPS	VSGPGQVTISCTGT	SDVGSYR	VSWYQQLPCTAPKLLIY	EVS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	SLYSSSTF	
Camv117	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	SL FGGGTHLTVLG
Camv133	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	LV FGGGTHLTVLG
Camv136	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	IV FGGGTHLTVLG
Camv159	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	AV FGGGTHLTVLG
Camv130	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	LP FGGGTHLTVLG
Camv132	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	AV FGGGTHLTVLG
Camv157	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	AV FGGGTHLTVLG
Camv15	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	DVD	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	AA FGGGTHLTVLG
Camv165	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	AV FGGGTHLTVLG
Camv151	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	VL FGGGTHLTVLG
Camv131	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	AV FGGGTHLTVLG
Camv160	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	AV FGGGTHLTVLG
Camv152	NMAALLLLTLTGTSWA	QSAITQPS	VSGTPEGVTISCTGT	SDVGSYR	QDS	SCNTASHTISGLQSADEADYYC	ASVSTTH---	V FGGGTHLTVLG

A) 序列比对

0 S 不在类型2中,但在3-27和4-60,5-52中
 14 T 不在类型2中,但在1-44/47中
 18 T 不在类型2中,但在许多其它类型3种系中存在,以及在许多其它种系类型中存在
 45 L 不在类型2中,仅在类型1中
 53 L 在2-33以及类型1、4、5、7、8、10中
 56 K 在类型1、2、3中
 68 N/L/A/G 体细胞突变,并且人P残基也在Camv151和Camv131中发现
 71 I 在其它类型2成员中,以及在类型1-41/51和类型3、4、9、10中
 89 M 体细胞突变(?) ,并且人L残基也在Camv131中发现
 96 S 在类型1、2、4、5中
 97 A 不在人种系中存在

序列同源性 23/26 (FR1) + 16/17 (FR2) + 38/39 (FR3) = 78/82 = 94% 同源性

B) 典型折叠分析

273642, IGLV2-18 使用自动生成的SDR模板的结果

CDR L1 类型 ? 与类型 2/14C,相似,但是:
 L32 (Chothia 编号) = R (允许 Y)
 L90 (Chothia 编号) = L (允许 S)
 L93 (Chothia 编号) = S (允许 G)
 CDR L2 类型 1/7A [11mk]

[0344]

Camv159 使用自动生成的SDR模板的结果

CDR L1 类型 ? 与类型 ?/14C相似, 但是:
! L28 (Chothia 编号) = N (允许 S)
! L93 (Chothia 编号) = S (允许 G)
CDR L2 类型 1/7A [11mk]

将骆驼科动物Lambda轻链可变序列与人种系IGLV2-18比对显示CDR1具有典型折叠2/14, CDR2具有折叠1/7A, 这与人种系VL2家族CDR1和2的折叠相同。对Camv159的分析如下例子所示:

CDR L2与典型折叠1/7A完美匹配, 但对于CDR L1来说, 仅有两个关键性残基是否与典型折叠2/14C完美匹配尚有疑问, 以下分别讨论:

- 1) L28位的天冬酰胺 (N, 在CDR1中) 应为丝氨酸 (S), 但Camv133中的天冬氨酸 (D) 是在人种系VL2序列最常发现的残基。
- 2) L93位的丝氨酸 (S, 在CDR3中) 应当为甘氨酸 (G), 但在8个进行比对的骆驼科动物VL中的3个中存在丝氨酸是最常在人种系VL2中出现的残基, 与用于比较的人IGLV2-18中一样。

注: 93位 (Chothia编号) 与IMGT编号系统的109位进行比较, 用于序列比较。

结论:

预期CDR1具有典型折叠2/14, CDR2具有折叠1/7 (A), 即, 与在人种系VL2中发现的一致。

10 5 VL 3-1

IGLV 基因	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)
1	10 I	30 I	40 I	60 I	80 I	110 I
X57826, IGLV3-1	SYELTPPS VSVSGQTASITCSG KLGDKY	ACWYQKPGQSPVLIYIY QDS	KRPSGIP ERFSGSN	SGTATLTITISGTAQAEADYYC	QAWDSSTA	
Camv119	QSVLTQPSA VSVSLGETARITCOGG NFGSYI	ANWYQKPGQSPVLIYIY KDS	ARPSGIP ERFSGSS	SGCTATLTISGTAQAEADYYC	QSGSSA-SA--V FGGGTHLTVLG	
Camv120	QSVLTQPSA VSVPIGETARITCOGG DFGDYI	VSWYQKPGQSPVLIYIY KDT	LRPSGIP ERFTGSS	SGCTATLTISGTAQAEADYYC	QSETSSA-T---V FGGGTHLTVLG	
Camv18	TALTQPSA VSVSLGETARITCOGG NFGSYI	TSWYQKPGQSPVLIYIY KDT	ERPSGIP ERFSASS	SGCTATLTISGTAQAEADYYC	QSGSSA-NAP-V FGGGTHLTVLG	
Camv118	QAVLTQPSA VSVSLGETARITCOGG NFGSYI	FSWYQKPGQSPVLIYIY RNS	NRPSGIP ERFSASS	SGCTATLTISGTAQAEADYYC	QSAUSSGRNAR-A FGGGTHLTVLG	
Camv123	QSVLTQPSA VSVSLGETARITCOGG ILGSKK	TWYQKPGQSPVLIYIY GDD	SRPSGIP ERFSGR	SGCTATLTISGTAQAEADYYC	QLLDSTDSSSYV FGGGTHLTVLG	

C) 序列比对

1 Q 引物编码的
2 S/T 引物编码的
3 V/A 引物编码的
5 S 引物编码的
8 S 也在3-27和4-60中
9 A 也在3-19/32中
15 L 在3-9/16/19/32中
17 E 不在人类型3中,但在Camv123中存在人中的Q
20 R 在所有其它的人类型3序列等中
24 Q 在3-19/32中
26 G 体细胞突变/部分CDR; 在Camv118中存在人中的D
39 V/T/F 体细胞突变/部分CDR
40 N/S 体细胞突变/部分CDR
49 A 在许多其它类型3中
66 A/L/N/S 体细胞突变/部分CDR
80 S 在3-16/19/10/25/27中
85 G 不在类型3中,但在类型6和7中
94 A 在3-19/10/9中
97 E 在3-10/16/19中

序列同源性 26/26 (FR1) + 17/17 (FR2) + 38/39 (FR3) = 81/82 = 99% 同源性

D) 典型折叠分析

对UCL网站<http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html>中列出的骆驼科动物Lambda轻链可变序列的分析显示CDR-L1采取典型折叠11, 而CDR-L2具有典型折叠7。这对应于在所有人种系IGLV3家族成员中出现的典型折叠(见Pluckthun主页http://www.biochem.unizh.ch/antibody/Sequences/germlines/Vbase_hvk.html)。所述典型折叠通过CDR的长度以及CDR内部和外部的某些关键性残基来确定的。例如Camv120的分析如下:

CDR L1 类型 ?
L1 与类型 2/11A 相似,但是,
L2 (Chothia 编号 = S (允许 I))

1 L25 (Choethia 编码
 1 L26 (Choethia 编码
 1 L28 (Choethia 编码
 1 L29 (Choethia 编码
 1 L51 (Choethia 编码
 1 L71 (Choethia 编码
 1 L90 (Choethia 编码
 CDR L2 类型 1/7A [11mk]

- G (允许
 - G (允许
 - F (允许
 - G (允许
 - D (允许
 - A (允许
 - S (允许

CDR L2与典型折叠1/7A完美匹配, 但对于CDR L1来说, 某些关键性残基是否与典型折叠2/11A完美匹配尚有疑问, 以下分别讨论:

- 1) L2位的丝氨酸(S)应为异亮氨酸(I), 但人IGLV3-5(其也具有折叠11)具有在这些骆驼科动物VL中发现的丝氨酸(S)。
- 2) L25甘氨酸(G)在所有入VL3家族成员中发现
- 3) L26甘氨酸(G)应当为丝氨酸(S), 但在Camv118中发现的天冬氨酸(D)最常在入VL3成员中使用。
- 4) L28苯丙氨酸(F, 在CDR1中)应当为天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)、天冬氨酸(D)或者谷氨酸(E), 但在Camv123中发现的亮氨酸(L)最常在入VL3中使用。
- 5) L29甘氨酸(G, 在CDR1中)在9个人VL3种系的4个中发现
- 6) L51天冬氨酸(D, 在CDR2中)最常在入VL3中使用。
- 7) L71丙氨酸(A, FR3)最常在入VL3中使用。
- 8) L90丝氨酸(S, 在CDR3中)为最常在入VL3中使用的残基。

结论:

2) 预期CDR1具有典型折叠11, CDR2具有折叠7, 即, 与在人种系VL3中发现的一致。

注: Choethia编号51、71和90与IMGT编号系统的57、87和106位进行比对。

10 6 VL 3-12

IGLV 基因	leader	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4
273658 IGLV3-12		SVETLPQPHS VSVATQAQRITCGGN NIGSKA		VHWYQKFGQDFVIVIVY SDS		PGNTTTLTISRIRIAGDEADYYC QVWDSSSDH		
Camv111		QSVLTQPST ASMSLGQTAKITCGGS SIRHYA		AHWYQKFGQDFVIVIVY NDN		SGGTATLTISHTKAEADYYC LSLDMSDSH-RVV FGGGTHLTVLG		

A) 序列比对

- 1 Q 引物编码的
 2 S 引物编码的
 3 V 引物编码的
 5 S 引物编码的
 8 S 也在3-27和4、5中
 9 F 不在任何入种系中
 11 A 不在类型3中, 但在类型1、2、4和9中
 13 M 不在任何入种系中
 14 S 在许多其它类型3种系中, 以及在许多其它类型中
 15 L 在3-16/19/32中以及在许多其它类型中
 16 G 除该特定种系外的几乎任何地方

[0346]

[0347]

18 T 在许多其它类型3种系中,以及在许多其它种系类型中
20 K 不在人类型3序列中,但在类型4中
24 Q 在3-19/32中
26 G 体细胞突变/部分CDR
39 A 在许多其它类型3种系中
48 A 不在任何种系中
49 A 在许多其它类型3种系中,以及在许多其它种系类型中
80 K 在3-32和许多其它种系类型中
85 G 不在类型3中,但在类型7中
87 A 在许多其它类型3种系中,以及在许多其它种系类型中
94 T 在3-1中
95 K 不在类型3中,但在2-33和16-57中
97 E 在3-10/16/19和许多其它种系类型中
序列同源性 22/26 (FR1) + 16/17 (FR2) + 37/39 (FR3) = 75/82 = 91% 同源性

由于体细胞突变且仅发现一个家族成员导致同源性低估。

B) 典型折叠分析

273658, IGLV3-12 使用自动生成的SDR模板的结果

CDR L1 类型 ? 与类型 2/11A 相似,但是:
L2 (Choethia 编号) = Y (允许 I)
L25 (Choethia 编号) = G (允许 A)
L26 (Choethia 编号) = N (允许 S)
L28 (Choethia 编号) = I (允许 NSDE)
L29 (Choethia 编号) = G (允许 IV)
L51 (Choethia 编号) = D (允许 ATGV)
L71 (Choethia 编号) = T (允许 YF)
L90 (Choethia 编号) = V (允许 HQ)
CDR L2 类型 1/7A [llmk]

Camv111 使用自动生成的SDR模板的结果

CDR L1 类型 ? 与类型 2/11B相似,但是:
L25 (Choethia 编号) = G (允许 A)
L26 (Choethia 编号) = G (允许 N)
L29 (Choethia 编号) = R (允许 P)
L34 (Choethia 编号) = H (允许 Y)
L46 (Choethia 编号) = L (允许 M)
L71 (Choethia 编号) = A (允许 V)
L90 (Choethia 编号) = S (允许 A)
L93 (Choethia 编号) = M (允许 N)
CDR L2 类型 1/7A [llmk]

备注:更难以比对,尤其是PR1。这些是体细胞突变序列,意味着PR的变化也可预期。背离典型折叠分析在IGLV3-12中具有相当可比性,所以很可能采取相当的典型折叠。
针对CDR L2折叠来说,1-7A显示完美匹配,CDR L2将采取折叠2-11,就像在人的对应物中一样

结论:

CDR1采取典型折叠2/11, CDR2采取折叠1/7A, 这与人种系VL3非常一致。只发现一个家族成员, 其抗体细胞突变, 因此难以得出结论。

10.7 VKappa 2-40

IGKV 基因	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)
X59314	1	1	1	1	1	1
1GKV2-40	DIWMTQFLSLPVTGEPASISCRSS	QSLDSDDGNTY	LDWYLOKEGQSPQLLIY	TLS	YNASGVP	DRFSGSG
Kp6	DIWMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSS	QSVFDTSRQKSF	LWHRQRGQSPRLIY	YAS	TRQSGVP	DRFSGSG
Kp48	DIWMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSS	QSVFSSSQKSL	LDWHRQRGQSPRLIY	YAS	ARASGVP	DRFSGSG
Kp3	DIWMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSS	QSVIVSYNQASY	LWYQQRGQSPRLIY	YAS	TRQSGIP	DRFSGSG
Kp20	DIWMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSS	QSVLSSNQASY	LWYQQRGQSPRLIY	YAS	TRQSGIP	DRFSGSG
Kp7	DIWMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSS	QSVLSSNQASY	LWYQQRGQSPRLIY	YAS	TRQSGIP	DRFSGSG
Kp10	DIWMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSS	QSVFSSSQKSL	LWYQQRGQSPRLIY	YAS	TRQSGIP	DRFSGSG
Kp1	DIWMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSS	QSVLSSNQASY	LWYQQRGQSPRLIY	YAS	TRQSGIP	DRFSGSG

序列分析

- A) 引物编码的
 7 S 位于人Kappa 1 (而不在Kappa 2) 家族中
 9 S 位于人Kappa 1-12 (而不在Kappa 2) 家族中
 11 V 不在人Kappa 1-12 (而不在Kappa 2) 家族中
 12 T/L 不在人Kappa 1-12 (而不在Kappa 2) 家族中
 13 A 不在类型2但在类型1和5中
 14 S 不在类型2但在1、3、4和7中
 15 V 不在类型1中
 19 V 不在类型2但在1、5和6中
 20 T 不在类型2但在1、3、4、6和7中
 22 N 不在类型2但在类型4中
 24 K 在类型2、4、5中
 40 N/A 体细胞突变, 也存在人KP48中的D
 42 H 体细胞突变, 也存在人KP3/20/7中的Y
 43 Q/R Q也存在人KP3/20/7中的Y
 51 R 在2-24和2-30中, 以及在类型3中
 52 R/K R在2-30和1-17中; 也存在人中的L
 66 T/A 在类型1、3、4但不存在2中, 体细胞突变/部分CDR
 68 Q/E 体细胞突变, 也存在人KP48中的A
 71 I 体细胞突变, 在不同单峰Kappa链中也存在人中的V
 84 T 不在任何Kappa 1-12 (而不在Kappa 2) 家族中
 90 T 不在类型2但在1、3、4、5、6和7中
 93 S 不在类型2但在1、3、4、6中
 95 Q 不在类型2但在1、3、4中
 96 P 不在类型2但在1、3中
 99 A 不在类型2但在5、6中
 100 A/V 不在类型2但在1、3、4、5、6和7中

[0348]

[0349]

序列同源性 17/26 (FR1) + 17/17 (FR2) + 31/39 (FR3) = 66/82 = 80% 同源
由于体细胞突变且所有序列看似属于同一类型而导致同源性低估。

B) 典型折叠分析
X59314 , IGV2-40 使用自动生成的SDR模板的结果。

CDR L1 类型 ?
! 与类型3/17A相似, 但是:
! L90 (Chothia 编号) = Q (允许 N)
! L93 (Chothia 编号) = E (允许 NS)
CDR L2 类型 1/7A [11mk]

Kp6 使用自动生成的SDR模板的结果

CDR L1 类型 ?
! 与类型3/17A相似, 但是:
! L29 (Chothia 编号) = V (允许 L)
! L90 (Chothia 编号) = Q (允许 N)
CDR L2 类型 1/7A [11mk]

将骆驼科动物kappa轻链可变序列与人种系IGLV2-40进行比对显示CDR1具有典型折叠3/17A, CDR2具有折叠1/7A, 这与人种系IGKV2-40的CDR1和2的折叠非常一致。
以单峰驼Kp6为例进行分析。CDR2与典型折叠1完美匹配, 而对于CDR1来说, 多个残基是否与典型折叠3/17A完美匹配尚有疑问, 以下将分别讨论。

- 1) L29位的缬氨酸 (V, 在CDR1中) 应为亮氨酸 (L), 因为CDR1具有典型折叠3, 但该残基存在于单峰驼Kp1序列中
- 2) L90位谷氨酰胺 (Q, 在CDR3中) 也存在于人种系VBase_VK4_1中, 其也具有CDR1的典型折叠3 (以及CDR2的折叠1)

结论:

预期CDR2具有典型折叠1, 最有可能CDR1具有折叠3/17A并且CDR2具有折叠1, 即, 其与人种系中发现的一致。

注: 90位 (Chothia编号) 与IMGT编号系统的107位用于序列比较。

10 8 人与大羊驼的J(H)区域比较

人

IGHJ 基因			
		---CDR3---	-----FR4-----
		1	10 20
J00256 , IGHJ1	AEYFQH	WGQGTILVTSS	
J00256 , IGHJ2	YWFEDL	WGRGTLVTSS	
J00256 , IGHJ3	AEDV	WGQGTILVTSS	
J00256 , IGHJ4	YFDY	WGQGTILVTSS	
J00256 , IGHJ5	NWFS	WGQGTILVTSS	
J00256 , IGHJ6	YYYVGM	DV WGQGTILVTSS	

羊驼

IGHJ 基因			
		---CDR3---	-----FR4-----
		1	10
AF305952 , IGHJ2	GYRYLEV	WGQGTILVTSS	
AF305952 , IGHJ3	NALDA	WGQGTILVTSS	
AF305952 , IGHJ4	EYDY	WGQGTILVTSS	
AF305952 , IGHJ5	PQFEY	WGQGTILVTSS	
AF305952 , IGHJ6	DFGS	WGQGTILVTSS	

序列分析:

来自大羊驼的J(H)区域显示与其人中对应物具有很高同源性。具有100%的序列一致性。唯一例外是在大羊驼IGHJ4的FR4第6残基是Gln(Q)。而在人J(H)区域的此位置上未发现该残基。

10. 9 轻链J区域的比较
Lambda J

Kabat 编号	97	98	108
--- CDR3 ---			
---FR4---			
-J-lambda-			
X04457 ,IGLJ1	YV	FGTGTKVTVL	
M15641 ,IGLJ2	VV	FGGTRKLTVL	
M15642 ,IGLJ3	VV	FGGTRKLTVL	
X51755 ,IGLJ4	FV	FGGTRQLIIL	
X51755 ,IGLJ5	WV	FGGTRKLTVL	
M18338 ,IGLJ6	NV	FGGTRKLTVL	
X51755 ,IGLJ7	AV	FGGTRKLTVL	
Camv119 etc		FGGTRKLTVLG (38/44 所分析序列)	
Camv18/18/4		FGGTRKLTVLG (3/44 所分析序列)	
Camv158/28/5		FGGTRKLTVLG (3/44 所分析序列)	

序列分析:

人种系J的最初2个残基被认为是CDR3的一部分。它们常在连接过程中发生改变。单峰驼J-lambda区域与IGLJ2和3最佳匹配。9/10的氨基酸相同，即具有90%序列一致性。仅有103位 (Kabat) 的氨基酸或精氨酸不匹配。精氨酸带正电荷 (与Lys一样)，甚至组氨酸可被认为某种程度带正电荷。因此替换成人Lys是合理的。

Kappa J

Kabat 编号	97	98	108
--- CDR3 ---			
---FR4---			
Kappa			
J00242 ,IGKJ1	WT	FGQTKRVEIK	
J00242 ,IGKJ2	YT	FGQTKRLEIK	
J00242 ,IGKJ3	FT	FGPGTRVDIK	
J00242 ,IGKJ4	LT	FGGTRKVEIK	
J00242 ,IGKJ5	IT	FGQTRLEIK	
Kp6/48/3/20/10/1		FGSSTRLEIKR (6/7 所分析序列)	
Kp7		FGNSTRLEIKR (1/7 所分析序列)	

序列分析:

人种系J区域的最初2个残基被认为是CDR3的一部分。它们常在连接过程中发生改变。单峰驼J-kappa区域与人IGKJ5最佳匹配。9/10氨基酸匹配，即具有90%序列一致性。

阿尔帕卡羊驼VH种系分析

10.10

[illegible]

姓名	同源性百分比	FR1	CDRL1	FR2	CDRL2	FR3
3X22221 [IGHV4 30-2703]		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 87 [AM939704]	78.4%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
2L42321 [IGHV4 30-4191]		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 43 [AM939770]	86.5%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 43 [AM939771]	82.4%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 45 [AM939773]	82.9%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 46 [AM939773]	82.4%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 43 P2 [AM939703]	82.4%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 48 [AM939705]	82.4%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 48 P2 [AM939706]	83.4%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC
LPVH2 49 P3 [AM939702]	83.4%	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTISCTCAVSGGSHLS	SVPMN	WNRQAPKPKGLLEWAS	AIAMS	RGFTISRDTSNQRPELSLQSLSVTAARDTAVYVC

颜色代码

在最匹配种系中发现的残基

在相同亚类 (VH3, VK4……) 的其它种系中发现的残基

在相同类型 (VII、VK或VL) 的其它种系中发现的残基

在相同类型(VH、VK或VL)的任何种系中未发现的残基

引物编码的残基

分數

一一致性百分比: 在最匹配种系中发现的框架残基的分数

同源百分比: 在最匹配系中或相同亚类中其它系中出现的框架残基的分数

11 大羊驼来源的VH分析

名称	同一作業源型 突出百分率	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560	1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568	1569	1570	1571	1572	1573	1574	1575	1576	1577	1578	1579	1580	1581	1582	1583	1584	1585	1586	1587	1588	1589	1590	1591	1592	1593	1594	1595	1596	1597	1598	1599	1600	1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	1610	1611	1612	1613	1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638	1639	1640	1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648	1649	1650	1651	1652	1653	1654	1655	1656	1657	1658	1659	1660	1661	1662	1663	1664	1665	1666	1667	1668	1669	1670	1671	1672	1673	1674	1675	1676	1677	1678	1679	1680	1681	1682	1683	1684	1685	1686	1687	1688	1689	1690	1691	1692	1693	1694	1695	1696	1697	1698	1699	1700	1701	1702	1703	1704	1705	1706	1707	1708	1709	1710	1711	1712	1713	1714	1715	1716	1717	1718	1719	1720	1721	1722	1723	1724	1725	1726	1727	1728	1729	1730	1731	1732	1733	1734	1735	1736	1737	1738	1739	1740	1741	1742	1743	1744	1745	1746	1747	1748	1749	1750	1751	1752	1753	1754	1755	1756	1757	1758	1759	1760	1761	1762	1763	1764	1765	1766	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778	1779	1780	1781	1782	1783	1784	1785	1786	1787	1788	1789	1790	1791	1792	1793	1794	1795	1796	1797	1798	1799	1800	1801	1802	1803	1804	1805	1806	1807	1808	1809	1810	1811	1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1820	1821	1822	1823	1824	1825	1826	1827	1828	1829	1830	1831	1832	1833	1834	1835	1836	1837	1838	1839	1840	1841	1842	1843	1844	1845	1846	1847	1848	1849	1850	1851	1852	1853	1854	1855	1856	1857	1858	1859	1860	1861	1862	1863	1864	1865	1866	1867	1868	1869	1870	1871	1872	1873	1874	1875	1876	1877	1878	1879	1880	1881	1882	1883	1884	1885	1886	1887	1888	1889	1890	1891	1892	1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900	1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	1919	1920	1921	1922	1923	1924	1925	1926	1927	1928	1929	1930	1931	1932	1933	1934	1935	1936	1937	1938	1939	1940	1941	1942	1943	1944	1945	1946	1947	1948	1949	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
----	-----------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

10.12 大羊驼来源的VL分析

Lambda

[illegible]

Kappa

[illegible]

[0354] 实施例 11- 分析 H1 和 H2 之典型折叠的关键残基, 并对 H1 和 H2 残基与人类种系进行比较

[0355] 抗体的结构分析揭示了序列与由互补决定区形成之结合位点的形状之间的关系 ((Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987) ;Tramontano 等, J. Mol. Biol. 215 :175-82(1990))。尽管它们具有高度的序列可变性,但六个环中有五个仅采取主链构象中的一小部分,称为“典型结构”。这些构象首先取决于环的长度,其次取决于环和框架区中某些位点关键残基的存在(其通过包装、氢键键合或决定不寻常主链构象的能力来确定构象)。

[0356] 根据这些环的长度以及之前所提及的关键残基的存在,已对单峰驼和大羊驼种系的 VH 区段进行了 H1 和 H2 之预测典型结构的分析。对关键残基进行比较(表 1),这是因为关键残基出现在就存在相同典型折叠组合和整体序列同源性而言最匹配的人类种系中;此外,也显示出由 Morea 及其同事(Morea 等, Methods 20 :267-279(2000))所提出的与相应典型折叠相应的氨基酸。对于单峰驼种系的 VH 家族 IGHV1S(1-19)(其 H1 形成典型折叠 1(表 1 中示为 H1 :1),H2 形成折叠 1(H2 :1)),对于家族 IGHV1S(20、22、23、24)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1),H2 形成折叠 3(H2 :3)),对于家族 IGHV1S(21,25-39)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1),H2 形成折叠 2(H2 :2)),对于大羊驼种系的 IGHV1S8(其 H1 形成折叠 1(H1 :1),H2 形成折叠 2(H2 :2)),对于 H1 的典型折叠起关键作用的第 24、26、27、29、34 和 94 位残基与这些来自类似的具有相同典型折叠组合的人类种系家族的残基一起显示(表 1 的上半部分)。另外,对于单峰驼种系的 VH 家族 IGHV1S(1-19)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1),H2 形成折叠 1(H2 :1)),对于家族 IGHV1S(20、22、23、24)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1),H2 形成折叠 3(H2 :3)),对于家族 IGHV1S(21,25-39)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1),H2 形成折叠 2(H2 :2)),对于大羊驼种系的 IGHV1S8(其 H1 形成折叠 1(H1 :1),H2 形成折叠 2(H2 :2)),第 52a 或 54 或 55 位的关键残基连同第 71 位残基与这些来自类似的具有相同典型折叠组合的人类种系家族的残基一起显示(表 1 的下半部分)。

[0357] 该分析清楚地显示了典型环的“人属性”,因为在骆驼科动物 VH 区段中发现的关键残基与在相应的人 VH 区段中发现的相同。例如,所有 19 个来自单峰驼编码之 IGHV1S(1-19)种系的 VH 区段在第 19 位均为丙氨酸,第 26 位为甘氨酸,在第 27 和 29 位为苯丙氨酸,以及在第 34 位为蛋氨酸,正如它们主要出现在人类种系家族 3 成员(其与这些单峰驼种系序列相似,H1 形成典型折叠类型 1,H2 形成折叠类型 1)中一样。第 94 位只在(所有 39 个种系 VH 片段中的)一个种系的单峰驼中被编码,这意味着不可能有合适的分析。Nguyen 及其同事(Nguyen 等, EMBO J. 19 :921-930(2000))注意到,单峰驼种系 VH 和 VHH 区段“从保守的八聚体(即重组信号)跨越到 FR3 的半胱氨酸残基 92”,而人类区段编码两个额外的残基(93 和 94)。不过,我们将利用对仅仅已知的六个体细胞突变的来源于骆驼科动物常规抗体的 VH 区段的分析,讨论这些残基。

[0358] 几乎无一例外,与人类种系区段和 Morea 及其同事(Morea 等, Methods 20 :267-279(2000))所提出的关键残基都完美匹配,除了大羊驼种系 IGHV1S6 中第 52a 位残基(其在此位为丝氨酸,而人的类似物使用苏氨酸)以外,其中大羊驼种系 IGHV1S6 的环 H2 形成典型折叠类型 2。令人鼓舞的发现是,在六个被公开的大羊驼 VH(其来源于体细胞突变的常规抗体(Vu 等, Mol. Immunol. 34 :1121-31(1997))中有四个在第 52a 位是苏氨酸。值得一提的是,丝氨酸和苏氨酸是密切相关的,因为它们都具有一个极性羟基和小侧链基团,这表明在人源化过程中可以互换这两个残基。

[0359] 在第 71 位的谷氨酰胺似乎是相当特别的,在 H2 环具有典型折叠类型 1 的 19 个单

峰驼种系 VH 区段中仅有 1 个出现了该氨基酸,而在 H2 环具有典型折叠类型 2 的 16 个单峰驼种系 VH 区段中仅有 4 个出现了该氨基酸。H2 环覆盖第 71 位的残基并且环相对于框架的位置主要取决于该位点残基的大小。具有 6 个残基的典型结构 2 和 3 在 H2 环中。当第 52a 和 71 位残基为小型或中等大小的疏水残基时,会出现结构 2,当第 71 位残基为精氨酸或赖氨酸时,会出现典型折叠 3。在体细胞突变的常规抗体中无法预测在第 71 位具有谷氨酰胺的单峰驼种系片段的频率,但在使用该特定残基的首选抗体中,对该残基的人源化需要仔细检测。在单峰驼 IGHV1S(20、22、23、24) 家族成员中的第 71 位出现精氨酸和谷氨酰胺是相当意外的,其中该家族成员具有用于形成 H2 的典型折叠 2,但在另一方面,人类种系 VH1 家族成员 VH1-9、VH1-10 和 VH1-11(其 H2 形成典型折叠 2)也具有精氨酸, VH5 成员 5-1(其 H2 形成典型折叠 2)在此位置上携带谷氨酰胺。

[0360] 当讨论人 VH 区段的结构库时,如 Chothia 及其同事们所做地(Chothia 等, J. Mol. Biol. 227 :799-817(1992)),我们研究了单峰驼和大羊驼 VH 区段之 H1 和 H2 环的氨基酸残基和关键残基,并将这些与具有相同典型折叠组合的人类对应部分进行对较(表 2)。对于单峰驼种系的 VH 家族 IGHV1S(1-19)(其 H1 形成典型折叠 1, H2 形成折叠 1),对于家族 IGHV1S(20、22、23、24)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1), H2 形成折叠 3(H2 :3)),对于家族 IGHV1S(21, 25-39)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1), H2 形成折叠 2(H2 :2)),对于大羊驼种系的 IGHV1S8(其 H1 形成折叠 1, H2 形成折叠 2), H1 的第 26 至 33 位残基与位于 H1 外的第 24 位和第 94 位关键残基一起显示(表 2A)。另外,对于单峰驼种系的 VH 家族 IGHV1S(1-19)(其 H1 形成典型折叠 1(H1 :1), H2 形成折叠 1(H2 :1)),对于家族 IGHV1S(20、22、23、24)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1), H2 形成折叠 3(H2 :3)),对于家族 IGHV1S(21, 25-39)(其 H1 形成折叠 1(H1 :1), H2 形成折叠 2(H2 :2)),对于大羊驼种系的 IGHV1S8(其 H1 形成折叠 1(H1 :1), H2 形成折叠 2(H2 :2)), H2 的第 52 至 56 位残基与位于 H2 外的第 71 位关键残基一起分析(表 2B)。

[0361] 看到可变环中的高度序列同源性是出人意料的,特别是在 H1 中,几乎与相关的人类序列没有差异。例如,具有典型折叠组合 H1 :1/H2 :1 的种系单峰驼家族 IGHV1S(1-19)主要包含第 24 位上的丙氨酸、第 26 位上的甘氨酸、第 27 位上的苯丙氨酸、第 28 位上的苏氨酸、第 29 位上的苯丙氨酸,第 30、31 位上的丝氨酸、第 33 位上的酪氨酸、第 34 位上的蛋氨酸和第 35 位上的丝氨酸,其与同样具有 H1 和 H2 典型折叠组合的人类种系家族 3 成员完全匹配。公开已知的例外仅有大羊驼种系 VH 区段上的第 27 位残基(苯丙氨酸)和第 32 位残基(丝氨酸),但其同样在 6 个公开已知的体细胞突变之大羊驼 VH 中的 4 个中出现(Vu 等, Mol. Immunol. 34 :1121-1131(1997))。在第 32 位具有酪氨酸,如在类似的人类种系中发现的一样。在单峰驼种系 VH 区段的 H2 环中也发现了同样的高度序列同源性,除家族 IGHV1S(1-19) 的第 54 位残基以外。特别是单峰驼家族 IGHV1S(21, 25-39) 在 H2 环上有一些位点不同(即第 53、54、56 和 58 位)。具有相同折叠的大羊驼种系 VH 区段的 H2 环得分更高,但在第 50、52、52a、54、55 和 58 位也包含了一些不同的残基,但很难予以解释,因为仅仅使用了已知的种系区段来进行分析。对来源于大羊驼的体细胞突变的 VH 的分析表明,在这些位点上出现某些残基,其也出现相应的人类种系序列中,虽然很少发生(如,第 50 位上的甘氨酸、第 52、58 位上的天冬酰胺、第 52a 位上的苏氨酸和第 55 位上的甘氨酸)。

[0362] 我们还分析了六个公开已知的来源于大羊驼之体细胞突变的 VH 序列(Vu 等, Mol.

Immunol. 34 :1121-31(1997))。下文显示了与人 VH3 成员 3-23 的比对,其显示了非常高的序列同源性:整体上,只观察到了 3 个不同残基(其中之一是由用于扩增的引物编码,而其它两个也发生在同类型的人类种系中)。甚至 CDR 也显示具有非常高的序列同源性:CDR1 可能是一致的,CDR2 只有三个残基是不同的。对典型折叠的分析表明,两个 VH 的 H1 形成折叠 1,H2 形成折叠 2,如在唯一可得的大羊驼来源之种系 VH 中观察到的一样,但其它四个的 H1 形成折叠 1,H2 形成折叠 3,如在 3-23 和大多数人类家族 VH3 种系区段中出现的一样。这可能暗示着,这些都来源于其它、至今未知的种系 VH 区段。支持典型折叠之关键残基的实验给出了与出现在具有相同典型折叠组合的人类种系中的残基完美匹配,其中相同典型折叠组合如已在表 1 中列举的大羊驼种系 VH 区段中所观察到的。非常有趣的发现是,这些体细胞突变序列中的第 94 位关键残基是赖氨酸(5 个中有 2 个)、丝氨酸(5 个中有 1 个)和精氨酸(5 个中有 1 个),其都在具有相同折叠组合的人类种系中被发现或者被 Morea 及其同事(Morea 等,Methods 20 :267-279(2000))推荐过。

[0363]

11 1 来自常规抗体的体细胞突变之大羊驼VH

IGRV 基因	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
		FR1-INGT (11-26)	CDRL-INGT (27-38)	FR2-INGT (39-55)	CDRL-INGT (56-65)	FR3-INGT (66-104)	CDRL-INGT (105-115)					
MP5660	IGHV3 23	EVQLVDSGG GLVQPGGSLRLSCAAS GFTTSSYA				YVADSVK CRTTISDUNSNRTLYLQPSISLAEEDPAVTC AK						(JL 4 5) MGQGLVTVSS
IVH24		EVQLVDSGG GLVQPGGSLRLSCAAS GFATSSVD				YVADSVK CRTTISDUNSNRTLYLQPSISLAEEDPAVTC AK						MGQGLVTVSS
IVH69		EVQLVDSGG GLVQPGGSLRLSCAAS GFATSSHY				YVADSVK CRTTISDUNSNRTLYLQPSISLAEEDPAVTC AK						MGQGLVTVSS
IVH47		EVQLVDSGG GLVQPGGSLRLSCAAS GLTIDTDA				YVADSVK CRTTISDUNSNRTLYLQPSISLAEEDPAVTC AK						MGQGLVTVSS
IVH46		EVQLVDSGG GLVQPGGSLRLSCAAS GFTTSSVY				YVADSVK CRTTISDUNSNRTLYLQPSISLAEEDPAVTC AK						MGQGLVTVSS
IVH70		EVQLVDSGG GLVQPGGSLRLSCAAS GFTTSSLY				YVADSVK CRTTISDUNSNRTLYLQPSISLAEEDPAVTC AK						MGQGLVTVSS
IVH71		EVQLVDSGG GLVQPGGSLRLSCAAS GFTTSSVD				YVADSVK CRTTISDUNSNRTLYLQPSISLAEEDPAVTC AK						MGQGLVTVSS

A) 序列同源性

- 1) 5位缬氨酸 (引物编码) 也在f.i. IGHV3-15中发现
- 2) 比起3-23的丝氨酸, 83位丙氨酸常在人类VH3种系中发现,
- 3) 95/96赖氨酸/脯氨酸在IGHV3-15/49/73中为赖氨酸/苏氨酸
- 4) CDR1完全为人样的, 在CDR2中仅有57、58和59位残基看上去偏离人种系3-23 (57丝氨酸, 58甘氨酸, 59丝氨酸)
- 5) FR4与人J1、J4和J5完美匹配

B) 典型折叠分析

- 1) 针对IVH28与IVH69, 组合H1的折叠1和H2的折叠2 (如同在11个人种系家族VH1成员中的3个以及两个人种系家族VH5成员一样)
- 2) 针对IVH47、48、70和71, 组合H1的折叠1和H2的折叠3, 如同在3-23和大部分家族VH3成员中发现的一样。

分析例子

IVH28

CDR H1 类型	?
与类型1/10A类似, 但是:	
H33 (Choethia 编号	) = D (允许 YAWGTLV)
H94 (Choethia 编号	) = A (允许 RKGSNN)
CDR H2 类型	?
与类型2/10A类似, 但是:	
H33 (Choethia 编号	) = D (允许 YWGATL)
H59 (Choethia 编号	) = N (允许 Y)
H71 (Choethia 编号	) = R (允许 VAL)

IVH47

CDR H1 类型	2/10A [2fbj]
CDR H2 类型	?
与类型3/10B类似, 但是:	
H52 (Choethia 编号	) = Y (允许 SFWH)
H53 (Choethia 编号	) = H (允许 DGSN)

[0364] 实施例12-用于形成L1(λ)和L2(λ)的典型折叠的关键残基的分析以及L1(λ)和L2(λ)残基与人类种系的比较

[0365] 同样, 我们根据环的长度和与典型折叠相关的关键残基的存在, 为体细胞突变的单峰驼 VLambda 区段分析了预测的 L1 和 L2 的典型结构。使用这样的关键残基进行比较 (表 3), 其中关键残基出现在具有相同的典型折叠的组合和具有总的序列同源性的最匹配的人类种系中。对于体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-1 (Camv18、18、19、20 和 23) (其 L1 形成折叠 11 (L1 :11), L2 形成折叠 7 (L2 :7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-12/32 (Camv111) (其 L1 形成折叠 11 (L1 :11), L2 形成折叠 7 (L2 :7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL 1-40 (Camv144) (其 L1 形成折叠 14 (L1 :14), L2 形成折叠 7 (L2 :7)), 对

于体细胞突变的单峰驼 VL2-18 (Camv15、17、30-33、36、52、57、59、60 和 65) (其 L1 形成折叠 14(L1:14), L2 形成折叠 7(L2:7)), 与 L1 的典型折叠相关的第 2、25、29、30、33 和 71 位关键残基与这些来自类似的具有相同典型折叠组合的人类种系家族的残基一起显示 (表 3 的上半部分)。对于体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-1 (Camv18、18、19、20 和 23) (其 L1 形成折叠 11(L1:11), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-12/32 (Camv111) (其 L1 形成折叠 11(L1:11), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL 1-40 (Camv144) (其 L1 形成折叠 14(L1:14), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL2-18 (Camv15、17、30-33、36、52、57、59、60 和 65) (其 L1 形成折叠 14(L1:14), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对 L2 的典型折叠起重要作用的第 48 和 64 位关键残基与这些来自类似的具有相同典型折叠组合的人类种系家族的残基一起显示 (表 3 的下半部分)。

[0366] 如在 VH 中观察到的, 分析显示了典型环 L1 和 L2 的“人属性”, 因为骆驼科动物 VLambda 区段的关键残基与那些相应的人 VLambda 片段中的残基相同。例如, 在单峰驼 VL3-12/32、VL1-40 和 VL2-18 中, 所有 L1 的关键残基都与那些出现在相应的人类种系中的残基相同, 并且在单峰驼 VL3-1、VL3-12/32 和 VL2-18 中, L2 的关键残基与相应的人类种系 VL 区段完全匹配。基本上只有两个例外。首先, VL1-40 的 L2 的第 64 位关键残基是谷氨酸, 其与存在于人类种系 VM (其具有与 VL1-40 相同的 L1/L2 典型折叠组合) 中的甘氨酸非常不同。这是很难得出一般性结论的, 因为 VL1-40 仅由一个孤体组成 (即 Camv144)。第二个例外是 VL3-1, 其中苯丙氨酸是最主要的在第 30 位出现的 L1 关键残基, 而亮氨酸最常在 VL 家族 3 成员 (其与 VL3-1 都是 L1 形成折叠 11, L2 形成折叠 7) 中被发现。然而, 亮氨酸也存在于五个 VL3-1 成员中的一个成员中。

[0367] 我们分析了体细胞突变的单峰驼 VLambda 区段的 L1 和 L2 环的各个氨基酸残基和关键残基, 并将其与共用相同典型折叠组合的人类对应部分进行比较 (表 4)。对于体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-1 (Camv18、18、19、20 和 23) (其 L1 形成折叠 11(L1:11), L2 形成折叠 7(L2:7)), 以及体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-12/32 (Camv111) (其 L1 形成折叠 11(L1:11), L2 形成折叠 7(L2:7)), 将 L1 的第 27 至 33 位残基与 L1 外的第 71 位关键残基与出现在相应的人类种系 V λ (其具有 L1 和 L2 形成的相同的折叠组合) 中的相同残基进行比较 (表 4A 上半部分)。对于体细胞突变的单峰驼 VL1-40 (Camv144) (其 L1 形成折叠 14(L1:14), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL2-18 (Camv15、17、30-33、36、52、57、59、60 和 65) (其 L1 形成折叠 14(L1:14), L2 形成折叠 7(L2:7)), 将 L1 的第 26 至 33 位残基与 L1 外的第 2 和 71 位关键残基与出现在相应的人类种系 V λ 家族 (其具有 L1 和 L2 形成的相同的折叠组合) 中的相同残基进行比较 (表 4A 下半部分)。另外, 对于体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-1 (Camv18、18、19、20 和 23) (其 L1 形成折叠 11(L1:11), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL 家族 VL3-12/32 (Camv111) (其 L1 形成折叠 11(L1:11), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL 1-40 (Camv144) (其 L1 形成折叠 14(L1:14), L2 形成折叠 7(L2:7)), 对于体细胞突变的单峰驼 VL2-18 (Camv15、17、30-33、36、52、57、59、60 和 65) (其 L1 形成折叠 14(L1:14), L2 形成折叠 7(L2:7)), 将 L2 的第 49 至 53 位残基与位于 L2 外的第 48 和 64 位关键残基与出现在相应的人类种系 V λ 家族 (其 L1 和 L2 形成的相同的折叠组合) 中的相同残基进行比较 (表 4B)。L1、L2、关键残基与人类种系序列之间具有高度的序列同源性, 只有少数例外存在 (其主要存在于

VL3-12/32 和 VL1-40 家族的孤体成员中)。对于 VL3-12/32 的 L1, 其第 27、28、30、30a 和 30b 位残基与相应的人类种系 V λ 家族 3 不同, 而 VL1-40 的同一环中第 30b、31、和 32 位残基与相匹配的人类种系 V λ 家族 1 不同。在 VL3-12/32 的孤体成员中, L2 的第 50 位残基与人类类似物中不同, 而对于 VL1-40 的唯一成员, 其第 64 位的关键残基与人类类似物中不同。根本区别在于单峰驼家族 VL2-18L1 中的第 28 位残基(天冬酰胺或谷氨酸, 相对于类似的人 V λ 家族 2 中的丝氨酸来说)。

[0368] 实施例 13-用于形成 L1(κ) 和 L2(κ) 的典型折叠的关键残基的分析以及 L1(κ) 和 L2(κ) 残基与人类种系的比较

[0369] 我们根据环的长度和关键残基的存在为体细胞突变的单峰驼 VKappa 区段分析了预测的 L1(κ) 和 L2(κ) 的典型结构。如前所述, 使用这样的关键残基进行比较(表 5), 所述关键残基出现在具有相同的典型折叠的组合和具有总的序列同源性的最匹配之人类种系中。对于体细胞突变的单峰驼 VK 家族 VK2-40(Kp1、3、6、7、10、20 和 48)(其 L1 形成折叠 3(L1:3), L2 形成折叠 1(L2:1)), 与 L1 的典型折叠相关的第 2、25、29、30e、33 和 71 位关键残基与这些来自类似的具有相同典型折叠组合的人 VKappa 种系家族 2 的残基一起显示。另外, 与如 Morea 等人所提出的相应典型折叠相应的关键氨基酸示于最下面一行。对于第 2、25、33 和 71 位关键残基来说具有完美匹配, 而对于第 29 位残基则具有一定程度上的匹配。单峰驼 VKappa 的第 30e 位残基是谷氨酰胺(而非甘氨酸), 但 Morea 及同事(Morea 等, Methods 20:267-279(2000))暗示该残基与 L1 形成的折叠 3 相容。

[0370] 对于同样的体细胞突变的单峰驼 VK 家族 VK2-40(Kp1、3、6、7、10、20 和 48)(其 L1 形成折叠 3(L1:3), L2 形成折叠 1(L2:1)), 决定 L1 之典型折叠的第 48 和 64 位关键残基被与这些来自类似的人 VKappa 种系家族 2 的残基一起显示。此时匹配仍旧是完美的。

[0371] 将体细胞突变的单峰驼 VKappa 区段的 L1 和 L2 环的各个氨基酸残基和关键残基与那些出现在人类相应部分(VK 家族 2)(其共用相同的典型折叠的组合)中的残基进行比较(表 6)。对于体细胞突变的单峰驼 VK 家族 VL2-40(Kp1、3、6、7、10、20 和 48)(其 L1 形成折叠 3(L1:3), L2 形成折叠 1(L2:1)), 将 L1 和 L2 残基与那些在种系 VK 家族 2(其具有相同的典型环的组合)中发现的残基进行比较。大部分残基在单峰驼体细胞突变的 VK 与人类种系之间共用, 如第 2 位的异亮氨酸, 第 25、26、28 和 30b 位的丝氨酸、第 27 位的谷氨酰胺, 第 32 位的酪氨酸, 第 33 位的亮氨酸以及第 71 位的苯丙氨酸。然而, 一些残基与人类类似物不同, 即第 29 位的缬氨酸(尽管人类种系中的亮氨酸也出现在单峰驼 VK 中)、第 30 位的苯丙氨酸(人类亮氨酸残基也出现在单峰驼的 VK 中)、第 30a 位的丝氨酸(人类谷氨酸残基经常出现在单峰驼 VK 中)、第 30c 位的丝氨酸、第 30d 位的天冬酰胺、第 30e 位的谷氨酰胺、第 30f 位的赖氨酸以及第 31 位的丝氨酸。

[0372] 将体细胞突变的单峰驼 VKappa 区段 L2 环的残基和关键残基与那些出现在人类相应部分(VK 家族 2)(其共用相同的典型折叠的组合)中的残基进行比较(表 6)。同样, 从第 48 位的异亮氨酸、第 49 位的酪氨酸、第 52 位的丝氨酸、第 64 位的甘氨酸残基中观察到完美匹配, 而在第 50 位(酪氨酸, 而非人 VK 家族 2 中的苏氨酸)和第 51 位(丙氨酸, 而非亮氨酸)具有不同。

[0373] 总体结论

[0374] 对于骆驼科动物 VH 和 VL 序列的分析显示了非常高的同源性, 不然的话, 也与人类

的决定典型折叠的关键残基一致或与其高变环中发现的残基一致。这表明,绝大多数的骆驼科动物免疫球蛋白序列采用在人类种系中发现的典型折叠,不仅针对单个高变环,而且还针对在人 VH 和 VL 中发现的典型折叠的组合。

[0375]

表1. 在单峰驼和大羊驼VII种系中决定典型型折叠的关键残基位点。括号内的数字代表单峰驼/大羊驼或人类种系中发现的残基频率；根据Kabat等 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版(1991)) 对关键残基编号，并根据Morea及其同事 (Morea等, Methods 2000) 提出关键残基。IIa b代表IIa环的典型折叠类型b。

序列	典型结构	最接近的Hu GL 家族	H1 关键残基					H2 关键残基				
			24	26	27	29	34	94	52a	54	55	71
Gl Drom IGHV1S(1-19) Hu GI 家族 3	H1: 1	(3-53)	A(19) A(23);G(1)	G(19) G(24)	F(19) F(24)	F(19) F(22);V(2)	M(19) M(23);I(1)	G(1);(18) R(19);K(5);I(1)				
	H1: 1	(3-23)	A(4) A(23);G(1)	G(4) G(24)	F(4) F(24)	F(4) F(22);V(2)	M(4) M(23);I(1)	- R(18);K(5);I(1)				
	H1: 1	(V1.4.1b)	A(16) A(19);V(2)	G(15);A(1) G(21)	F(16) Y(16);F(1);G(2)	F(14);S(1);V(1) F(20);L(1)	M(13);I(2);V(1) M(13);K(5);L(2);V(1)	- R(17);I(2);A(1)				
Gl 大羊驼 IGHV1S6 Hu GI 家族 1	H1: 1	(3-23)	A(1) A(19);V(2)	G(1) G(21)	F(1) Y(16);F(1);G(2)	F(1) F(20);L(1)	M(1) M(13);K(5);L(2);V(1)	A(1) R(17);I(2);A(1)				
	H1: 1 (Morea)		A;V;I	Q	F;Y;S;D	F;L;I	M;V;Y;V;W	R;G;N;K;S				
	H2: 1	(3-53)							-	-	G(19) G(4)	R(18);G(1) R(4)
Gl Drom IGHV1S(20, 22, 23, 24) Hu GI 家族 3	H2: 1 (Morea)										GD	K;R;V;I
	H2: 3	(3-23)							-	G(4) Q(13);S(3)	-	R(4) R(14)
	H2: 3 (Morea)								-	-	-	-
Gl Drom IGHV1S(21, 25-39) Hu GI 家族 1	H2: 2	(V1.4.1b)							S(10);I(6) P(3);I(2);A(2)	-	G(16) G(7)	R(8);K(4);Q(4) A(3);I(2);L(2)
	H2: 2 (Morea)								P;T;A	-	G;N;D;S	A;L;I
	H2: 2	(3-23)							S(1) P(3);I(2);A(2)	-	S(1) G(7)	I(1) A(3);I(2);L(2)
Gl 大羊驼 IGHV1S6 Hu GI 家族 1	H2: 2 (Morea)								P;T;A	-	G;N;D;S	A;L;I
	H2: 2 (Morea)								P;T;A	-	G;N;D;S	A;L;I

[0376]

表2(A). 单峰驼和大羊驼种系VII与人类种系中H1序列的比较。根据Iabat等(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版(1991))进行编号。星号代表对于典型折叠来说重要的关键残基。

[illegible]

表2(B). 单峰驼和大羊驼种系VH与人类种系中H2序列的比较。根据Kabat等(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版(1991))进行编号。星号代表对于典型折叠来说重要的关键残基。

[illegible]

表3. 在体细胞突变的单峰胞VLambda序列中决定典型折叠的关键残基位点。根据Kabat等 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 (1991)) 进行编号, 并根据Morea及其同事 (Morea等, Methods 2000) 提出的关键残基。

序列	典型结构	最近的Hu GL 家族	2	25	29	30	33	71	L2(A) 关键残基
Som Mut Drom VL3-1 (Camv18,19,20,23) Hu Gl VA 家族 3	L1: 11 (或 2) L1: 2 (Morea)	(GLV3-1*01)	-	G(5) G(10) G	- - -	F(4),L(1) L(6),I(3),M(1) I	T(2),A(1),Y(1),F(1) A(6),Y(3),E(1) V	T(4),A(1) A(5),I(3),Y(2) A	48 64
Som Mut Drom VL3-1/232 (Camv11) Hu Gl VA 家族 3	L1: 11 (或 2) L1: 2 (Morea)	(GLV3-1*01)	-	G(1) G(10) G	- - -	L(1) L(6),I(3),M(1) I	A(1) A(6),Y(3),E(1) V	I(1) A(5),I(3),Y(2) A	
Som Mut Drom VL1-40 (Camv144) Hu Gl VA 家族 1	L1: 14 (或 6) L1: 16 (Martin)	(GLV1-40*01)	S(1) S(2) S	G(1) G(2) G	N(1) N(2) N	- - -	Y(1) Y(2) V	A(1) A(2) A	
Som Mut Drom VL2-18 (Camv5,17,30-33,36,52,57,59,60,65) Hu Gl VA 家族 2	L1: 14 (或 6) L1: 16 (Martin)	(GLV2-18*02)	S(1),A(1) S(6) S	G(12) G(6) G	D(12) D(6) N	- - -	V(12) V(6) V	A(1),Y(1) A(6) A	
Som Mut Drom VL3-1 (Camv18,19,20,23) Hu Gl VA 家族 3	L2: 7 L2: 1 (Morea)	(GLV3-1*01)							K(4),L(1) I(10) IV
Som Mut Drom VL3-1/232 (Camv11) Hu Gl VA 家族 3	L2: 7 L2: 1 (Morea)	(GLV3-1*01)							K(1) I(10) IV
Som Mut Drom VL1-40 (Camv144) Hu Gl VA 家族 1	L2: 7 L2: 1 (Morea)	(GLV1-40*01)							I(1) I(2) IV
Som Mut Drom VL2-18 (Camv5,17,30-33,36,52,57,59,60,65) Hu Gl VA 家族 2	L2: 7 L2: 6 (Morea)	(GLV2-18*02)							I(12) I(6) IV

[0379]

表 4 (A). 单峰蛇VLambda序列与人类种系中L1序列的比较。根据Kabat等 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 (1991)) 进行编号。星号代表对于典型折叠来说重要的关键残基。

	LE II 残基编号											
	0	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	7
	2	6	7	8	9	0	0a	0b	1	2	3	1
Som Mut Drom VL3-1 (Camv18.18.20.23) 家族 3 Hu G1 家族 3	-	-	G(1)E(1)	N(3)E(1)Q(1)	-	F(1)I(1)	G(5)	S(4)D(1)	-	Y(4)K(1)	T(2)A(1)Y(1)F(1)	A(6)
	-	-	D(6)N(3)E(1)	N(3)A(3)S(2)K(1)Y(1)	-	L(6)H(3)M(1)	G(5)F(3)R(1)E(1)	S(4)K(3)E(1)E(1)S(1)	-	Y(7)A(1)S(1)N(1)	A(6)Y(3)E(1)	A(3)T(3)Y(2)
	0	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	7
	2	6	7	8	9	0	0a	0b	1	2	3	1
Som Mut Drom VL3-12/32 (Camv11) 家族 3 Hu G1 家族 3	-	-	S(1)	L(1)	-	R(1)	M(1)	Y(1)	-	A(1)	A(1)	A(1)
	-	-	D(6)N(3)E(1)	N(3)A(3)S(2)K(1)Y(1)	-	L(6)H(3)M(1)	G(5)F(3)R(1)E(1)	S(4)K(3)E(1)E(1)S(1)	-	Y(7)A(1)S(1)N(1)	A(6)Y(3)E(1)	A(3)T(3)Y(2)
	0	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	7
	2	6	7	8	9	0	0a	0b	1	2	3	1
Som Mut Drom VL140 (Camv14) 家族 1 Hu G1 家族 1	S(1)	S(1)	S(1)	S(1)	N(1)	I(1)	G(1)	G(1)	G(1)	G(1)	Y(1)	A(1)
	S(2)	S(2)	S(2)	S(2)	N(2)	I(2)	G(2)	A(2)	Y(2)	D(1)Y(1)	Y(2)	A(2)
	0	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	7
	2	6	7	8	9	0	0a	0b	1	2	3	1
Som Mut Drom VL2-18 (Camv15.17.20.33.35.52.57.59.60.65) 家族 2 Hu G1 家族 2	S(1)A(1)	T(2)	S(1)R(2)	N(3)D(3)	D(1)G(1)	Y(2)	G(2)	G(3)Y(4)K(2)A(1)	Y(2)	N(1)A(1)	Y(2)	A(1)Y(1)
	S(6)	T(6)	S(6)	S(6)	D(6)	Y(6)	G(6)	G(3)S(2)E(1)	Y(6)	N(6)D(6)	Y(3)F(1)H(1)Y(1)	A(6)

[0380]

表6. 单峰蛇VKappa与人类种系中(A)L1和(B)L2序列的比较。根据Kabat等(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版(1991))进行编号。星号代表对于典型折叠来说重要的关键残基。

		L1(d:11) 殘基編號																	
		2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	7		
		2	5	6	7	8	9	0	0a	0b	0c	0d	0e	0f	1	2	3		
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
家族 2	Som Mut Dram VK2-40 (Kp1.3,5,7,10,20,48)	K7	S7	S7	Q7	S5(N1)H1	Y6(L1)	F3(L2)I1Y1	S5(D1)A1	S4(D1)T1Y1	S7	N4(S2)R1	Q7	K6(R1)	S7	Y3(L2)Q1	F1	L7	F7
	Hu-G1YK 家族 2 (011*01)	I1	S1	S1	Q1	S1	L1	L1	D1	S1	D1	D1	G1	N1	T1	Y1	L1	F1	F1

(B)

		L2(c): 11 残基编号						
家族 2	Som Mut Drom VK2-40 (Kp1,3,6,7,10,20,48)	I(7)	Y(7)	Y(7)	A(7)	S(7)	G(7)	
	Hu Gl VK 家族 2 (D11*+D1)	I(1)	Y(1)	T(1)	L(1)	S(1)	G(1)	
		*					*	

[0382] 实施例 14- 对来自大羊驼的体细胞突变之 VH、VK 和 VL 的序列分析

[0383] 从四只大羊驼中分离外周血淋巴细胞,如前所述进行 RNA 提取和随机引物 cDNA 合

成 (de Haard 等, JBC 1999)。进行 VHCH1、VLCL 和 VKCK 的扩增,并将扩增产物克隆到载体 pCB3 中以产生重链或轻链文库。在使用 PCR 筛选克隆以确定抗体结构域插入片段存在后,培养单个克隆并纯化质粒 DNA 以进行序列分析。

[0384] 14. A 显示了 λ 轻链可变结构域被归到各家族中,其根据是最接近的人类种系类似物 (其具有相同的 CDR1 和 CDR2 长度并推测具有相同的典型折叠的组合)。人类中最常使用 λ 种系,即 VL1、VL2 和 VL3,也常在所分析的大羊驼序列中发现,此外还有 VL4、VL5、VL6 (未显示在 14. A 中) 和 VL8,这意味着在人类中发现的 10 个 λ 家族中有 7 个家族也在大羊驼中使用。14. B 显示了三个 κ 轻链可变结构域中的两个 (即 VK1 和 VK4, VK2 未显示),其在约 50% 的人 κ 抗体中出现。在人抗体中最常使用 (50%) 的 VK3 家族的成员未鉴定到,但其很可能是所使用的扩增引物造成的,而其很可能也采用这类结构。14. C 显示了 VH 序列的比对,其揭示了与最常使用的人 VH3 (存在于 34% 的人抗体中) 和 VH1 (17%) 区段的高度序列同源性。必须注意的是,最近 Achour 等人的出版物 (J Immunol 2008) 提到阿尔帕卡羊驼种系中存在 VH2 家族,其与人 VH4 家族最为密切相关 (见实施例 10. 10)。

[0385] 整体而言,可以得出结论,骆驼科动物使用了高度多样性的重链和轻链家族,其与人类免疫系统发现的类似,这意味着,通过使用人类疾病靶标进行主动免疫,最佳选择的首选抗体可预期与人抗体具有高度序列同源性,并因此可以容易地改造用于治疗用途。

[0386]

[0387]

[illegible]

14. (A) VLAMBDA (续)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
	2	3	4	5	6	7	8	
1234567891234567890123	45678901abc234	567890123456789	01abcde23456	789012345678ab90123456789012345678	9012345abcde			
LPVLTQPPSASALIGASIKLTC	TLSSSEHSTY	TIE	WYQORPGKSPQYIMK	VKSDGS	HSKGD	GIPDRFMGSSSG	ADRYLTFFNLOSDDDEAEYHC	GESHTIDGOVG
QSVLTQPPSASALIGASAKLTC	TLSSSGYSSY	NVD	WYQQVPGKSPWELMK	VGSSGV	GSKGS	GVSDFRFGSSSG	LERYLTIGNVQDEDEAEYIC	GADHASSMYT

HuVL4-1
LAMBDA#10

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	2	3	4	5	6	7	8
1234567891234567890123	45678901abc234	567890123456789	01abcde23456	789012345678ab90123456789012345678	9012345abcde		
QPVLTQPPSSASPGESARLTC	TLPSDINVGSYNIY	WYQKPGSPPRYLLY	YISDSD	KQQGS	GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC	MIWFSNAS	
LPVLTQPPSLGASPGASARLTC	SLNSGTIVGGYHIN	WYQKAGSPPRYLLR	FYSDSN	KHQGS	GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQVEDEADYYC	GIYDSNTGTYY	FGGGTKLTVL
LPVLTQPPSLGASPGASARLTC	VLSSGTIVGGYHIN	WYQKPGSPPRYLLR	FYSDSS	KQQGS	GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQPEDEADYYC	GTIYHSNTGTYY	FGGGTKLTVL
LPVLNQPPSLGASPGESARLTC	SLSSGTIVGGYQIA	WYQTAGSPPRYLLR	FYSDSN	KHQGS	GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQPEDEADYYC	GIYHNSNTYY	FGGGTKLTVL
LPVLTQPPSLGASPGSVRLTC	TLSSGKSVGMVDIS	WYQKAGSPPRYLLY	YISDTS	NHQGS	GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQPEDEADYYC	ATGDRSSNPHV	FGGGTKLTVL
QSVLTQPPSLGASPGSSVRLTC	TLSSANSVDNYIIS	WYQKPGSPPRYLLY	YISDSY	MQRDS	GLPDRFSVSKDASTNAGILLISGLQPEDEADYYC	ASGDRNSNPHSV	FGGGTKLTVL

HuVL5-1
LAMBDA#3
LAMBDA#7
LAMBDA#9
LAMBDA#26
LAMBDA#12

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	2	3	4	5	6	7	8
1234567891234567890123	45678901abc234	567890123456789	01abcde23456	789012345678ab90123456789012345678	9012345abcde		
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	ASTGAVTSGYTFN	WFQKPGQAPRTLIY	ST	SNKHS	WTFARFSGSLIG	GKAAITLTSVGQPEDEAEYIC	LLIYGGAG
QAVVSOEPLSLVSPGGTVTLTC	GLSSGVTTSNYTPG	WFQOTPGQAPRTLIY	ST	SSRHS	GVPSRFSGSGTISG	NKAALITITGAQPEDEADYYC	ALDIGSYTV
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	GLTSGSVTASNLPG	WFQOTPGQAPRTLIY	DT	IYHHS	GVPSRFSGSGSIAG	NKATLITITGAQPEDEADYYC	VLWMDRIEAGSIM

HuVL8-1
LAMBDA#42
LAMBDA#31

14. (B) VKAPPA

[0389]

	L1			L2			L3		
	FR1			FR2			FR3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HuVK1-1	12345678901234567890123	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	45678901abcdef234	567890123456789	0123456	78901234567890123456789012345678			9012345
KAPPA#39	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSI	SSYLN	WYQKPGQAPKLLIY	AASLSQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSQPEDAAYTC			QQSYSTP
KAPPA#22	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSPYS
KAPPA#24	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	AASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
KAPPA#21	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	EASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			MADLWPLV
KAPPA#23	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSPPLT
KAPPA#7	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
KAPPA#19	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
KAPPA#25b	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
I-8	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
KAPPA#43	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
KAPPA#44	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
KAPPA#20b	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	QASQSI	STELS	WYQKPGQAPKLLIY	CASRLQT	GVPSRFSGSGSGTFTLTISGLEAEDLATYTC			LQDSSWPLT
HuVK4-1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#53	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#50	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#48	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#55	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#9	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#51	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#10	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#54	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#49	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#52	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#13	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#11	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#36	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#25	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#12	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#34	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#48b	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#21	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#24	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#22b	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#45	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP
KAPPA#46	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KSSQSVLYSSNNKNYLA		WYQKPGQAPKLLIY	WASTRES	GVPSRFSGSGSGTFTLTISLSQPEDAAYTC			QQYISTP

14. (C) VH

	FR1			CDR1	FR2	CDR2			FR3	
	1	2	3		4	5	6	7	8	9
VH1 (1-02)	123456789012345678901234567890			1ab2345	67890123456789	012abc3456789012345		67890123456789012345678901234		
1C2	EVQLVQSGAEYKPKGASVYKSCASGFTFT			G--YYID	WVROAPQGGLEWVG	WINP--NSGGTINVAQRFQ		RVTTRDTSTSTAVMELSLRSRSDTAVYYCAR		
1G5	EVQLVQSGAEIENPGASVYKSCASGFTFT			S--YYIE	WVROAPQGGLEWVG	RIDP--EDGCTKYAQRFQ		RVTFTADTSTSTAVVELLSLSRSEDVAVYCAT	SGRYELDY	SGATMSDLSDFGS
VH3 (3-23)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS			S--YAMS	WVROAPKGLWEWS	AISG--SGGSTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRSEDVAVYYCAK		
5B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			D--YPMN	WVROAPKGLWEWS	VISR--NGGSTYYAE SMK		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCTK	PSTSMSTNYGMDY	
1G4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			D--YAMS	WVROAPKGLWEWS	G1TW--NGGTINVAQRFQ		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	ATRGST	
5G7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--YAMS	WVROAPKGLWEWS	G1NT--GGSTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCTK	DIRDYSDYTFVN	
VH_99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--YAMT	WVROAPKGLWEWS	TVDA--SGATTSYAE SMK		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCTK	RSCTWMSGSLYTESSENG	
VH_76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			D--YAMT	WVROAPKGLWEWS	SINN--GGSTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	EGYSDYAAVGHAYDY	
VH_76	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			R--YAMS	WVROAPQGGLEWVS	YIDS--DGATTTADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	FGSSAYSMSGLGMDH	
VH_98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			I--YAMS	WVROAPKGLWEWS	VINS--GGSTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	GGVLGHSNYIAMDY	
VH_89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			N--TAMA	WVROAPKGLWEWS	DINS--LGNNTFYKSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	DASALSWSRPALEY	
VH_82	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			N--HMY	WVROAPKGLWEWS	AISS--SGGSTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	YDSFGMNVRYGMDY	
VH_68	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--SDMS	WVROAPKGLWEWS	GINS--GGSTYYAE SMK		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCTK	YDSFGMNVRYGMDY	
VH_73	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YHIS	WVROAPKGLWEWS	IIGR--WGADIIYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCTK	ELNWEPEAYSDH	
VH_107	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			K--YAMS	WVROAPKGLWEWS	NIDA--NSLTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	DPNRSWYTYGMDY	
VH_94	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YAMN	WVROAPKGLWEWS	VISS--SGGNTKYSDSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	RIEGGMGYGMDY	
VH_90	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			D--YGMT	WVROAPKGLWEWS	SIYI--FGASTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	SEWNTYTYGMDY	
VH_77	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YAMS	WVROAPKGLWEWS	TISS--GGSTYYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	SEGLVTGYVFGS	
VH_74	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			D--YDMS	WVROAPKGLWEWS	IHVS--GDGRIFYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	DSYHAATGYLEQ	
VH_67	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			D--YMG	WVROAPKGLWEWS	SIYS--LGDPFYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	DRHGMGTIRYDY	
VH_79	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			R--YMG	WVROAPKGLWEWS	GMTT--GSDTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	GGYIDADHFEF	
VH_75	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			I--YAMS	WVROAPKGLWEWS	DIDK--SGGRTTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	PTSSMWSPCDY	
VH_110	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			Y--YAMS	WVROAPKGLWEWS	TSIN--GGSTANYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	ISTELGNTLDA	
VH_109	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YAMS	WVROAPKGLWEWS	SVTC--DGLSTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	LDVYDYGMDY	
VH_103	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YAMN	WVROAPKGLWEWS	VSSS--GGGTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	ESGGPGMDLEV	
VH_84	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YAMS	WVROAPKGLWEWS	GINS--GGGTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	WEVTLDFGS	
VH_113	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--YMY	WVROAPKGLWEWS	TIIS--LGGSTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	GGLYGYDYEH	
VH_87	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YAMN	WVROAPKGLWEWS	GLTN--YGGSTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	VGNMWSDDY	
VH_105	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			N--YMY	WVROAPKGLWEWS	SIDT--SGGLTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	ALGYNADFAD	
VH_101	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--QGMN	WVROAPKGLWEWS	GIDS--RGNTNYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	TGFWYTYNY	
VH_108	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YMY	WVROAPKGLWEWS	GLSV--GGASTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	GGNTFYDY	
VH_106	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			D--YMT	WVROAPKGLWEWS	SIYS--GISTTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	PRNY	
VH3 (3-13)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YDMH	WVROAPKGLWEWS	AIG---TAGDTYYPGSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK		
VH_115	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--YAMS	WVROAPKGLWEWS	TIN---GADTYYSESVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	GLSLNMYGFGDY	
VH_85	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--YMY	WVROAPKGLWEWS	SID---GADTYYSESVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	GVYIMDYEPMDY	
VH_114	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--HTMS	WVROAPKGLWEWS	GIN---GAYGTYIDSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	VVDTWDEYDY	
VH_78	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			T--SGMT	WVROAPKGLWEWS	TIN---SGGLTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	LLELGH	
3B5	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			S--YMY	WVROAPKGLWEWS	TIT---GSGTYYSESVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	SNSGTHWYBYGMDY	
3A3	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGETEE			N--YDMS	WVROAPKGLWEWS	GIN---SGGKTYADSVKG		RFTISRDNKNTLYLQMNLSLSEDVAVYYCAK	GIVTLGS	

[0390] 实施例 15- 生成针对 IL-1Beta 的 Fab

[0391] 除非另有说明, 下列研究中使用的材料和操作方案与实施例 1-9 所用使的类似。

[0392] 大羊驼被 IL-1Beta 成功免疫

[0393] 根据标准的操作方案,使用人类 IL-1Beta 对两只大羊驼 (Lama glama) 进行免疫 (如实施例 1 所述)。

[0394] 在免疫前 (第 0 天) 和免疫后 (第 28 天),使用 ELISA 对来自两只大羊驼的血清进行检测,以检测 IL-1Beta 抗体的存在。如图 1 所示,免疫后,即使在对血清进行 10000 倍稀释后,在 ELISA 中也观察到了针对 IL-1Beta 的特异性信号。该抗体高效价显示了特异性的和适当的免疫应当。

[0395] 构建具有丰富多样性的 Fab 文库

[0396] 使用 de Haard 等人 (JBC 1999) 所述的策略,将从两只经免疫大羊驼中分离的 PBL 用于 RNA 提取、RT-PCR 以及将 Fab PCR 克隆到噬菌粒中以获取具有丰富多样性 ($2 \sim 5 \times 10^8$) 的多样性文库。

[0397] 使用下列引物:

[0398]

用于克隆 λ 轻链的引物

名称	序列
HuV1A-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGTCTGTGYTGACKCAGCC
HuV1B-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGTCTGTGYTGACGCAGCC
HuV1C-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGTCTGTGCTGACGCAGCC
HuV12-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGTCTGCCCTGACTCAGCC
HuV13A-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT TCCTATGAGCTGACWCAGCC
HuV13B-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT TCTTCTGAGCTGACTCAGGA
HuV14-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGCYTGTGCTGACTCAATC
HuV15-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGGCTGTGCTGACTCAGCC
HuV16-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT AATTTTATGCTGACTCAGCC
HuV17/8-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGRCTGTGGTGACYCAGGA
HuV19-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CWGCCTGTGCTGACTCAGCC
HuV110-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CAGGCAGGCTGACTCAGCC
caClambda1-FOR	CTAACACTGGGAGGGGACACCGCTCTTCTC
caClambda2-FOR	CTAACACTGGGAGGGNCTCACNGTCTTCTC

用于克隆 κ 轻链的引物

名称	序列
HuVk1B-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT GACATCCAGWTGACCCAGTCTCC
HuVk2-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
HuVk3B-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAAATTGTGWTGACRCAGTCTCC
HuVk2/4-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAYATYGTGATGACCCAGWCTCC
HuVk5-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAAACGACACTACGCAGTCTCC
HuVk6-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
HuVk4B-BACK-ApaLI	GCC TCC ACC AGT GCA CTT GATATTGTGATGACCCAGACTCC
caCHkapFOR-Ascl	GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTAGCAGTGTCTCCGGTGAAGCTCCT
caCHkap2FOR-Ascl	GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTARCARTGYCTNCGRTCRAA

用于克隆重链的无标签引物 (步骤1)

名称	序列
VH1a-BACK	CAGGTCAGCTGGTGAGTCTGG
VH5a-BACK	GARGTGAGCTGGTGAGTCTGG
VH4a-BACK	CAGSTGAGCTGCAGGAGTCTGG
VH4b-BACK	CAGGTGAGCTACAGCAGTCTGG
VH2b-BACK	CAGGTCACCTTGARGGAGTCTGG

用于克隆重链的带标签引物 (步骤2)

名称	序列
VH1a-BACK-Sfil	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCCCAGGTCAGCTGGTGAGTCTGG
VH5a-BACK-Sfil	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCCGARGTGAGCTGGTGAGTCTGG
VH4a-BACK-Sfil	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCCCAGSTGAGCTGCAGGAGTCTGG
VH4b-BACK-Sfil	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCCCAGGTGAGCTACAGCAGTCTGG
VH2b-BACK-Sfil	CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCCCAGGTCACCTTGARGGAGTCTGG

[0399] 使用单个（经标记）PCR 步骤（30 个循环）构建独立的 $V\lambda C\lambda$ 和 $V\kappa C\kappa$ 文库，以确保较高的克隆多样性。

[0400] 同时，使用两步 PCR（步骤 1 使用未经标记的引物进行 25 个循环，随后步骤 2 使用经标记引物进行 10 个循环）构建 VHCH1 文库。

[0401] 然后，将来自 $V\lambda C\lambda$ 和 $V\kappa C\kappa$ 文库的轻链分别再克隆至表达 VHCH1 的载体中，以分别构建大羊驼“Lambda”和“Kappa”Fab 文库（每只经免疫大羊驼构建两个文库）。使用 PCR 例行进行文库的质量控制。

[0402] 随机检测的克隆中有高达 93% 的克隆包含全长 Fab 序列，这显示出文库的高品质。

[0403] 选择人 IL-1Beta 特异性 Fab

[0404] 使用噬菌体展示技术来确定大量多样性的大羊驼 Fab 与生物素化的 IL-1Beta 的结合。使用生物素化的 IL-1Beta 来捕获以维持该蛋白质的活性构象。经过两轮选择后，观察到与对照相比的良好富集。噬菌体 ELISA 显示了表达细胞因子特异性 Fab 克隆的存在（数据未显示）。

[0405] 利用 pH 休克洗脱下与生物素化 IL-1Beta 结合的噬菌体。使用所得产物的连续稀释物 ($10^{-1} \sim 10^{-5}$) 转染新鲜的大肠杆菌 TG1 细胞。所获得的克隆数显示了在选择中结合的噬菌体数目。在上面的实施例中，当使用 100nM 和 10nM 的 biot-IL-1Beta 进行选择时，5 μ l 的产物得到了约 10^5 个噬菌体。相对于通过非特异性结合获得的 10^2 个噬菌体而言，这得到了 1000 倍的富集。

[0406] 94 个单克隆被培养并被用于产生单克隆噬菌体。这些噬菌体被用于噬菌体 ELISA 中。在利用生物素化的 IL-1Beta 进行二轮选择后，许多噬菌体显示出与 biot-IL-1Beta 的良好结合。

[0407] 特异性针对人 IL-1Beta 的 Fab 与人类种系具有较高的起始同源性

[0408] 将靶标特异性 VH 和 $V\lambda$ 结构域与常见的人类种系（其显示相同的 CDR1 和 CDR2 长度以及对应的典型折叠）中的 VH 和 $V\lambda$ 结构域进行匹配。随后，基于框架区中的序列同源性，选出最接近的人类种系。检查那些不相匹配的氨基酸残基在其它相关人类种系中的存在。如果没有匹配的话，这些残基被看作是异源的。

[0409] 表 7：大羊驼 VH 与人种系的整体序列同源性

[0410]

最接近的 人种系	匹配克隆	序列同源性%
IGHV1-2	1C2/2B7/2C12	93
	2D8	94
	1G5/2D7	93
	2E12/2G7	94
IGHV3-23	1F2	98
	1G4	92
	5G7	95
	5B12	92
	1A1/2B8/2B9	98
	1C3/1E3/2A7	98
IGHV3-13	1E2	94
	3A3/3B6/3E2/3E3	95
	3B5/4F1	98
IGHV3-20	4H1	94
	4H4	93

[0411] 表 8 :大羊驼 VL 与人种系的整体序列同源性

[0412]

最接近的 人种系	匹配克隆	序列同源性%
IGLV8-61	1E2	90
	1F2	90
	3E2/3E3/3A3	86
	3B5/4F1	86
IGLV2-18	3B6	91
IGLV5-52	1G4 VL	96
IGLV3-19	1C2/2B7/2D7	95
	2E12/2G7	96
	2D8	95

[0413] 讨论与结论：

[0414] ●基于初次筛选,鉴定出总共 14 个靶标特异性 VH 家族、9 个靶标特异性 VL 家族和 3 个 VK 家族。

[0415] ●这最初的 14 个抗 IL-1Beta WT VH 和 12 个抗 IL-1Beta WT VL 的集合显示与人类种系具有非常高的同源性。

[0416] ●所述 VH 结构域中有 33% 与人类情况具有 95% 或更高的起始同源性,以及约 44% 的 VL 结构域与人类情况具有 95% 或更高的起始同源性,从而无需再进行人源化。

[0417] ●VH 结构域 2D8 是 VH 1C2 的人源化形式,因为与最接近的人类种系相比,它缺少了一个不同的氨基酸残基。其相应的 VL 结构域 (VL 2D8) 与最接近的人类种系具有 95% 的起始同源性,通过回复突变 (VL 2G7),其同源性进一步增加到 96%。

[0418] ●当使用上述方法进行评估时,所有 VH 和 VL 结构域无一例外都表现出人的 3-D 结合位点结构 (即与所匹配的人类种系中出现的 CDR1 和 CDR2 典型折叠的组合相同) (数据未显示)。

[0419] Fab 1E2 和 1F2 的人源化

[0420] 在两个 IL-1Beta 特异性 Fab (编号 1E2 和 1F2) 中进行人源化。基于与最接近的人类种系的比对,提出在其 VH 和 VL 框架区中的突变 (图 2)。与人 VH3 家族相匹配的 VH

的种系化通常涉及许多残基,这些残基在公开已知的大羊驼、阿尔帕卡羊驼或单峰驼来源的种系序列中是不同的。例如,可将第 71 位的丙氨酸(根据 Kabat 编号)、第 83 位的赖氨酸和第 84 位的脯氨酸分别改变为丝氨酸(虽然丙氨酸也存在于某些人类种系的 VH3 成员中)、精氨酸(虽然许多人 VH3 种系中也使用赖氨酸)和丙氨酸。对于轻链可变序列,没有可获得的骆驼科动物种系序列,但很可能在 FR 中存在许多与人类种系的不同,这将会在大部分的首选抗体中被改变。除了完全人源化的(hnm)和野生型(wt)V 区以外,还提出只保留了三个野生型残基的“安全变体”(safe)。

[0421] Fab 1E2 通过逐步法被改换形式,据此,将融合到人类恒定结构域的 V λ 的各种形式(wt、safe 和完全人源化)与融合到人类恒定结构域 CH1 结构域的 VH 的各种形式组合,产生表 9 所示 Fab。

[0422] 表 9 :Fab 1E2 形式

		VH 1E2 + hum CH1		
		wt	safe	hum
VL 1E2 + humCL	wt	wt 1E2	wt/safe	wt/hum
	safe	safe/wt	safe 1E2	safe/hum
	hum	hum/wt	hum/safe	hum 1E2

[0424] 这些 Fab 基因作为合成基因向 GeneArt(德国)订购,随后在大肠杆菌中产生,并进行纯化以及检测其结合 biot-IL-1Beta 的能力。为此,利用经抗 myc 抗体包被的 Maxisorp 板来捕获 Fab。加入生物素化的人 IL-1Beta,并使用 HRP 缀合的链霉亲和素检测所结合的细胞因子。该测定的读数示于以下图 3 中。

[0425] ● 使用人类相应部分对野生型恒定结构域 CH1 和 C λ 进行替换不影响结合能力。

[0426] ● 1E2 的 VH 结构域的部分(wt V λ /safe VH)和完全(wt V λ /hum VH)人源化产生了功能性 Fab。

[0427] 使用表达基因 3-Fab 融合蛋白的噬菌体检测克隆 1F2 的人源化变体(图 4)。针对每个构建体,从 4 个独立的克隆制备噬菌体:

[0428] ● wt 1F2 和 wt 1E2(与人 C λ 和 CH1 融合的大羊驼 V λ 和 VH)

[0429] ● safe 变体 1F2 和 safe 变体 1E2(与人 C λ 和 CH1 融合的部分人源化的 V λ)

[0430] ● hum1F2 和 hum1E2(与人 C λ 和 CH1 融合的完全人源化 V λ 和 VH)

[0431] 针对每个 Fab 的四个克隆进行检测以克服克隆变异(由于细菌生长、噬菌体生产效率 and 毒性等所致)。通过利用中性亲和素包被的 Maxisorp 板捕获生物素化的 IL-1Beta 以及随后与粗噬菌体提取物(即细菌培养基)孵育来进行噬菌体 ELISA。经过充分的洗涤,使用抗 M13-HRP 单克隆抗体检测所结合的噬菌体。当利用中性亲和素包被的孔(不含生物素化的 IL-1Beta)检测时,同样的噬菌体制备物未得到信号(数据未显示)。

[0432] ● 1F2 VL 和 VH 结构域的框架区的回复突变到最接近的人类种系成功地产生了保持抗原特异性的部分(safe)和完全(hum)人源化的变体。

[0433] 使用人类恒定结构域对骆驼科动物可变结构域进行成功的形式改换

[0434] IL-1Beta 特异性克隆 1E2 的 VL 和 VH 可变结构域被成功融合到人类的 C λ 和 CH1 恒定结构域,产生了“嵌合”Fab,对其进行生产和纯化。

[0435] 通过在 37℃ 诱导 4h(o/d) 或在 28℃ 诱导 16h(o/n), 该嵌合 1E2 Fab 从 pCB5 噬菌粒 (Δ 基因 3) 中生产出来。通过在 30℃ 诱导 16h, 野生型大羊驼 1E2 Fab 从 pCB3 (包含 gene3 的噬菌粒) 中生产出来。纯化后, 这些 Fab 被加入到具有 (变性) 和不具有 (非变性) DTT 的 SDS-PAGE 中。进行考马斯染色, 其很好地显示了这些 Fab 或其包含的轻、重链在期望的分子量条带上的出现 (未显示)。

[0436] 利用抗 myc 抗体包被的 Maxisorp 板捕获上述纯化的大羊驼和嵌合 1E2Fab。在与生物素化的人 IL-1Beta 一起孵育和充分洗涤后, 使用 HRP- 缀合的链霉亲和素检测结合到 Fab 上的生物素化 IL-1Beta。纯化的大羊驼和嵌合 1E2 Fab 都表现出功能性靶标结合 (图 5)。这一发现表明了将骆驼科动物来源的可变结构域与人 IgG 恒定结构域相结合的可行性。

[0437] 显示功能性抑制靶标的 Fab 亚群

[0438] 下表显示了来自以下 ELISA 实验的 OD 值。用已知抑制 IL-1Beta 与其受体结合的小鼠单克隆抗体 (由 Diaclone SAS 提供) 包被孔。

[0439] 将生物素化的 IL-1Beta 与 Fab 的周质提取物一起加入到孔中, 其中周质提取物是在经过两轮针对生物素化 IL-1Beta 的筛选后确定的。通过 HRP 标记的链霉亲和素检测所结合的生物素化 IL-1Beta。降低的信号表明特异性 Fab 与封闭性小鼠单克隆抗体的竞争, 这表明具有拮抗作用。

[0440] 通过加入大量的竞争性小鼠单克隆抗体, 向孔 G12 (表 10 中的孔 12G) 加入阳性对照。

[0441] 表 10 : 竞争测定的结果

[0442]

	6A						6C					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.205	0.621	0.670	0.691	0.704	0.823	0.353	0.737	0.726	0.544	0.551	0.626
B	0.668	0.546	0.444	0.632	0.614	0.627	0.442	0.641	0.558	0.693	0.565	0.548
C	0.756	0.541	0.386	0.572	0.763	0.593	0.517	0.537	0.518	0.588	0.473	0.435
D	0.521	0.790	0.233	0.792	0.801	0.263	0.619	0.483	0.631	0.592	0.455	0.603
E	0.798	0.545	0.359	0.528	0.281	0.655	0.618	0.516	0.651	0.493	0.575	0.367
F	0.747	0.611	0.520	0.599	0.293	0.261	0.605	0.373	0.550	0.516	0.602	0.392
G	0.498	0.477	0.539	0.693	0.663	0.167	0.554	0.589	0.807	0.528	0.634	0.653
H	0.628	0.493	0.552	0.900	0.858	0.635	0.170	0.574	0.559	0.598	0.593	0.378

[0443] 鉴定出许多可成功地与封闭性小鼠单克隆抗体竞争的 Fab (表 10 中的阴影格)。对竞争性克隆的序列分析显示, 在 48 个筛选克隆 (表 10 中标记为 6A 部分) 中, 三个 Fab 具有不同的 VH。针对拮抗性 Fab 1A1 (在表 10 的竞争性试验中信号为 0.205)、1B3 (信号为 0.444) 和相关克隆 1G1 (信号为 0.498) 以及 1C3 (信号为 0.386) 的 VH 与最接近的人类种系进行序列比对和结构同源性分析显示如下。

[0444] 这三个与匹配的人类种系都具有非常高的序列同源性, 并且具有在人类种系中所发现的相同的典型折叠的组合。对于 λ 轻链, 在这三个首选克隆中也观察到了该现象 (数据未显示)。Fab 1A1 与拮抗性参照单克隆抗体强烈竞争 (在基于 ELISA 的竞争试验中, IC50 为 12 μ g/ml), 而 Fab 1C3 几乎不显示竞争 (只在浓度超过 50 μ g/ml 时)。然而, 在生

物测定中,1C3(IC₅₀ 为 3 μg/ml) 比 1A1(IC₅₀ 为 10 μg/ml) 效力更高,这提示它们识别不同的表位。如这些抗体的两个中所发现地,不同拮抗性 Fab 的高频出现(48 个筛选克隆中有 3 个不同)以及表位识别的差异证明了抗体的高度多样性,这是大羊驼远交特性的结果。与人类种系 V 区的高度序列同源性再加上(有效力)抗体的高度多样性以及广范的表位覆盖,使得从经免疫骆驼科动物鉴定出治疗性抗体的集合成为可能。

[0445]

STR 基因 Name FR/CIR	FR1-Kabat	CUR1 Name	FR2-Kabat	CUR2 Name	FR3-Kabat	CUR3 Name	FR4-Kabat	CUR4 Name
1007 编号	1 10 20 30	40	50	60 70	80 90 100	110 120	130	140
5V	引物编码并且存在于除2-22以外的所有其它类型2中 存在于除2-22以外的所有VB2家族成员中 也在10HV2-12/49/66/72以及类型5和7中 不在类型2但在类型1中 不在人类种系中							
83A	整体同源性 54/55 恒架线系 = 98% 同源性							
95K	典型折量分析 CIR 系 类型 2/23 (2B0) CUR 系 类型 3/108, 109 556 (CIR) 编号							
96S	= A (允许: 556)							
1070	STR 基因 Name FR/CIR							
1007 编号	1 10 20 30	40	50	60 70	80 90 100	110 120	130	140
5V	引物编码并且存在于除2-22以外的所有其它类型2中 存在于除2-22以外的所有VB2家族成员中 也在10HV2-12/49/66/72以及类型5和7中 不在类型2但在类型1中 不在人类种系中							
83A	整体同源性 54/55 恒架线系 = 98% 同源性							
95K	典型折量分析 CIR 系 类型 2/23 (2B0) CUR 系 类型 3/108, 109 556 (CIR) 编号							
96S	= A (允许: 556)							
1070	STR 基因 Name FR/CIR							

引物编码并且还存在于除3-23以外的所有其它类型3中
存在于除3-23以外的所有VH3家族成员中
也在IGHV3-13/49/66/72以及类型5和7中
不在类型3但在类型1中
不在人基因组中

整体同源性
84/86 框架残基 = 98% 同源性

典型折叠分析
 DR 模型类型 1/10A [25b] 但
 DR 模型类型 2/10A 编号
 类似于类型 2/10A 但
 571 000000

性。

[0449] 使用小分子量的重组产生之细胞因子免疫 10 只 BALB/c 小鼠。在完成免疫步骤后，处死这些动物，将它们的脾细胞永生生化以产生杂交瘤。在细胞因子结合 ELISA 中及随后的适当生物测定中检测由此产生的杂交瘤细胞上清液。可以鉴定出一个高度有效的拮抗剂和一个较弱的拮抗剂。

[0450] 同样，使用本文所述的一般方法，用同样的重组产生之细胞因子免疫 4 只大羊驼。在完成免疫步骤后，收获外周 B 淋巴细胞并提取和纯化其总 RNA。使用一系列大羊驼的特异性引物，通过噬菌体展示技术生成 Fab 文库。在细胞因子 / 细胞因子受体结合 ELISA 中检测这些 Fab。可以从前两只大羊驼中鉴定出 5 个不同的 VH 家族，从后两只大羊驼中鉴定出 6 个另外的不同 VH 家族，其高效地抑制细胞因子 / 受体的相互作用，这意味着这些 VH 结构域包含不同的独特 CDR（无论是长度还是氨基酸序列方面）。

[0451] 因此，相对于大量的近交 BALB/c 小鼠，可以从少量的远杂大羊驼中获得更高的功能多样性。通过主动免疫大羊驼获得的所有 VH 家族与最接近的人类种系相比表现出很高的序列同源性，并且具有如相匹配的人类种系中一样的 CDR1 和 CDR2 形成的典型折叠组合。

[0452] 实施例 17

[0453] 下表总结了阿尔帕卡羊驼种系 VH 结构域与最匹配的人类种系 VH 结构域之间的氨基酸序列同源性比较的结果。同源性百分比使用本文针对大羊驼所述的相同算法来计算。阿尔帕卡羊驼的原始 VH 序列数据未显示：

[0454] 表 11：阿尔帕卡羊驼种系 VH 与人类种系 VH 的氨基酸序列同源性

[0455]

阿尔帕卡羊驼 (<i>Lama pacos</i>) 种系 VH 家族	频率	与最接近之匹配人种系 VH 的 氨基酸序列同源性百分比
VH3	70% (36/51)	≥ 95%
VH1	10% (5/51)	90-92%
VH2 (注：阿尔帕卡羊驼 VH2 与人 VH4 比对)	20% (10/51)	81-88%

[0456] 提供下标以相互对照本文列出的核苷酸和氨基酸序列，并且以 ST. 25 格式提交的序列表用于检索目的。

[0457] 表 12：序列标示符的相互参考

[0458]

序列号	序列名称	序列号	序列名称
1	M99679, IGHV3-53	44	M94116, IGLV1-40
2	AF000603, IGHV1S1	45	Camv144
3	AJ245151, IGHV1S2	46	Z73642, IGLV2-18

4	AJ245152, IGHV1S3	47	Camv117
5	AJ245153, IGHV1S4	48	Camv133
6	AJ245154, IGHV1S5	49	Camv136
7	AJ245155, IGHV1S6	50	Camv159
8	AJ245157, IGHV1S7	51	Camv130
9	AJ245158, IGHV1S8	52	Camv132
10	AJ245159, IGHV1S9	53	Camv157
11	AJ245160, IGHV1S10	54	Camv15
12	AJ245164, IGHV1S11	55	Camv165
13	AJ245165, IGHV1S12	56	Camv151
14	AJ245167, IGHV1S13	57	Camv131
15	AJ245168, IGHV1S14	58	Camv160
16	AJ245170, IGHV1S15	59	Camv152
17	AJ245171, IGHV1S16	60	X57826, IGLV3-1
18	AJ245173, IGHV1S17	61	Camv119
19	AJ245174, IGHV1S18	62	Camv120
20	AJ245156, IGHV1S19	63	Camv18
21	M99660, IGHV3-23	64	Camv118
22	AJ245177, IGHV1S20	65	Camv123
23	AJ245178, IGHV1S21	66	Z73658, IGLV3-12
24	AJ245183, IGHV1S22	67	Camv111
25	AJ245185, IGHV1S23	68	X59314, IGKV2-40
26	AJ245186, IGHV1S24	69	Kp6
27	AJ245187, IGHV1S25	70	Kp48

28	AJ245189, IGHV1S26	71	Kp3
29	AJ245191, IGHV1S27	72	Kp20
30	AJ245192, IGHV1S28	73	Kp7
31	AJ245193, IGHV1S29	74	Kp10
32	AJ245194, IGHV1S30	75	Kp1
33	AJ245195, IGHV1S31	76	J00256, IGHJ1
34	AJ245179, IGHV1S32	77	J00256, IGHJ2
35	AJ245180, IGHV1S33	78	J00256, IGHJ3
36	AJ245182, IGHV1S34	79	J00256, IGHJ4
37	AJ245190, IGHV1S35	80	J00256, IGHJ5
38	AJ245196, IGHV1S36	81	J00256, IGHJ6
39	AJ245197, IGHV1S37	82	AF305952, IGHJ2
40	AJ245181, IGHV1S38	83	AF305952, IGHJ3
41	AJ245198, IGHV1S39	84	AF305952, IGHJ4
42	AJ245199, IGHV1S40P	85	AF305952, IGHJ5
43	AF305949, IGHV1S6	86	AF305952, IGHJ6 (1)
序列号	序列名称	序列号	序列名称
87	X04457, IGLJ1	130	LAMBDA#1
88	M15641, IGLJ2	131	LAMBDA#8 (2)
89	M15642, IGLJ3	132	LAMBDA#5 (2)
90	X51755, IGLJ4	133	LAMBDA#11
91	X51755, IGLJ5	134	HuVL3-2
92	M18338, IGLJ6	135	LAMBDA#13
93	X51755, IGLJ7	136	LAMBDA#40

94	Camv119 etc.	137	LAMBDA#2
95	Camv18/18/4	138	LAMBDA#14 (2)
96	Camv158/28/5	139	HuVL4-1
97	J00242, IGKJ1	140	LAMBDA#10
98	J00242, IGKJ2	141	HuVL5-1
99	J00242, IGKJ3	142	LAMBDA#3
100	J00242, IGKJ4	143	LAMBDA#7 (2)
101	J00242, IGKJ5	144	LAMBDA#9
102	Kp6/48/3/20/10/1	145	LAMBDA#26
103	Kp7(1/7 经分析)	146	LAMBDA#12
104	M99660, IGHV3-23	147	HuVL8-1
105	IVH28	148	LAMBDA#42
106	IVH69	149	LAMBDA#31
107	IVH47	150	HuVK1-1
108	IVH48	151	KAPPA#39
109	IVH70	152	KAPPA#22
110	IVH71	153	KAPPA#24
111	HuVL1-1 (3/4/5)	154	KAPPA#21
112	LAMBDA#14	155	KAPPA#23
113	LAMBDA#16	156	KAPPA#7
114	LAMBDA#46	157	KAPPA#19
115	LAMBDA#45	158	KAPPA#25b
116	LAMBDA#15	159	I-8
117	HuVL1-2	160	KAPPA#43

118	LAMBDA#47	161	KAPPA#44
119	LAMBDA#18	162	KAPPA#20b
120	LAMBDA#32	163	HuVK4-1
121	LAMBDA#28	164	KAPPA#53
122	LAMBDA#29	165	KAPPA#50
123	LAMBDA#27	166	KAPPA#20
124	LAMBDA#17	167	KAPPA#48
125	LAMBDA#4	168	KAPPA#55
126	LAMBDA#7	169	KAPPA#9
127	LAMBDA#8	170	KAPPA#51
128	LAMBDA#5	171	KAPPA#10
129	HuVL2-1	172	KAPPA#54
序列号	序列名称	序列号	序列名称
173	KAPPA#49	216	VH_105
174	KAPPA#52	217	VH_101
175	KAPPA#13	218	VH_108
176	KAPPA#11	219	VH_106
177	KAPPA#36	220	VH3(3-13)
178	KAPPA#25	221	VH_115
179	KAPPA#12	222	VH_85
180	KAPPA#34	223	VH_114
181	KAPPA#48b	224	VH_78
182	KAPPA#21(2)	225	3B5
183	KAPPA#24(2)	226	3A3

184	KAPPA#22b	227	HuV11A-BACK-ApaLI
185	KAPPA#45	228	HuV11B-BACK-ApaLI
186	KAPPA#46	229	HuV11C-BACK-ApaLI
187	VH1(1-02)	230	HuV12-BACK-ApaLI
188	1C2	231	HuV13A-BACK-ApaLI
189	1G5	232	HuV13B-BACK-ApaLI
190	VH3(3-23)	233	HuV14-BACK-ApaLI
191	5B12	234	HuV15-BACK-ApaLI
192	1G4	235	HuV16-BACK-ApaLI
193	5G7	236	HuV17/8-BACK-ApaLI
194	VH_99	237	HuV19-BACK-ApaLI
195	VH_76	238	HuV110-BACK-ApaLI
196	VH_86	239	caClambda1-FOR
197	VH_98	240	caClambda2-FOR
198	VH_89	241	HuVk1B-BACK-ApaLI
199	VH_82	242	HuVk2-BACK-ApaLI
200	VH_68	243	HuVk3B-BACK-ApaLI
201	VH_73	244	HuVk2/4-BACK-ApaLI
202	VH_107	245	HuVk5-BACK-ApaLI
203	VH_94	246	HuVk6-BACK-ApaLI
204	VH_90	247	HuVk4B-BACK-ApaLI
205	VH_77	248	caCHkapFOR-AscI
206	VH_74	249	caCHkap2FOR-AscI
207	VH_67	250	VH-1A1, 2B8, 2B9

208	VH_79	251	VH-1C3, 1E3, 2A7
209	VH_75	252	VH-1B3, 1G2, 2D8
210	VH_110	253	VH-1G1, 2B7
211	VH_109	254	X07448, IGHV1-2
212	VH_103	255	1F2 VH
213	VH_84	256	人源化的 VH 1F2
214	VH_113	257	Safe Variant VH 1F2
215	VH_87	258	X92218, IGHV3-66
序列号	序列名称	序列号	序列名称
259	1E2 VH	302	AM939733
260	人源化的 VH 1E2	303	AM939717
261	安全变体 VH 1E2	304	AM939734
262	Z73650, IGLV8-61	305	AM939735
263	1F2 VL	306	AM939736
264	人源化的 1F2 VL	307	AM939737
265	安全变体 VL 1F2	308	L33851 IGHV3-74*01
266	1E2 VL	309	AM939749
267	人源化的 VL 1E2	310	AM939724
268	安全变体 VL 1E2	311	AM939725
269	X92343 IGHV1-46*01	312	AM939745
270	LpVH1-s6 (AM939701)	313	AM939723
271	LpVH1-s2 (AM939697)	314	X92229 IGHV4-30-2*03
272	LpVH1-s3 (AM939698)	315	LpVH2-s7 (AM939704)
273	LpVH1-s4 (AM939699)	316	Z14238 IGHV4-30-4*01

274	LpVH1-s5 Ps (AM939700)	317	LpVH2-s2 (AM939769)
275	M99660 IGHV3-23*01	318	LpVH2-s3 (AM939770)
276	AM939712	319	LpVH2-s4 (AM939771)
277	AM939713	320	LpVH2-s5 (AM939772)
278	AM939730	321	LpVH2-s6 (AM939773)
279	AM939731	322	LpVH2-s11 Ps (AM939703)
280	AM939744	323	LpVH2-s8 (AM939705)
281	AM939726	324	LpVH2-s9 Ps (AM939706)
282	AM939727	325	LpVH2-s10 (AM939702)

[0459]

[0460]

[0461]

[0462]

283	AM939739	326	AJ879486 IGHV3-23*04
284	AM939740	327	S-VH1
285	AM939741	328	S-VH3
286	AM939742	329	S-VH4
287	AM939743	330	S-VH2
288	U29481 IGHV3-23*03	331	S-VH6
289	AM939716	332	S-VH5
290	AM939728	333	D86994 IGLV3-25*02
291	AM939738	334	VL25-28
292	AM939710	335	Z73672 IGLV5-37*01
293	AM939748	336	VL2, 12, 15
294	AM939750	337	Z73650 IGLV8-61*01
295	AM939751	338	VL3, 5
296	AM939767	339	VL17-24, 29-32
297	AM939768	340	VL10
298	AM939707	341	VL4, 6, 7, 8, 9, 13, 14
299	AM939708	342	U41644 IGKV2D-29*02
300	AM939709	343	KAPPA 33-36, 38, 39, 42, 4
301	AM939732	344	KAPPA 41, 43, 44
序列号	序列名称		
345	KAPPA 40, 44		
346	KAPPA 37, 46, 48		
347	VH1a-BACK		
348	VH5a-BACK		
349	VH4a-BACK		
350	VH4b-BACK		
351	VH2b-BACK		
352	VH1a-BACK-SfiI		
353	VH5a-BACK-SfiI		
354	VH4a-BACK-SfiI		
355	VH4b-BACK-SfiI		
356	VH2b-BACK-SfiI		

免疫接种后的阳性免疫应答

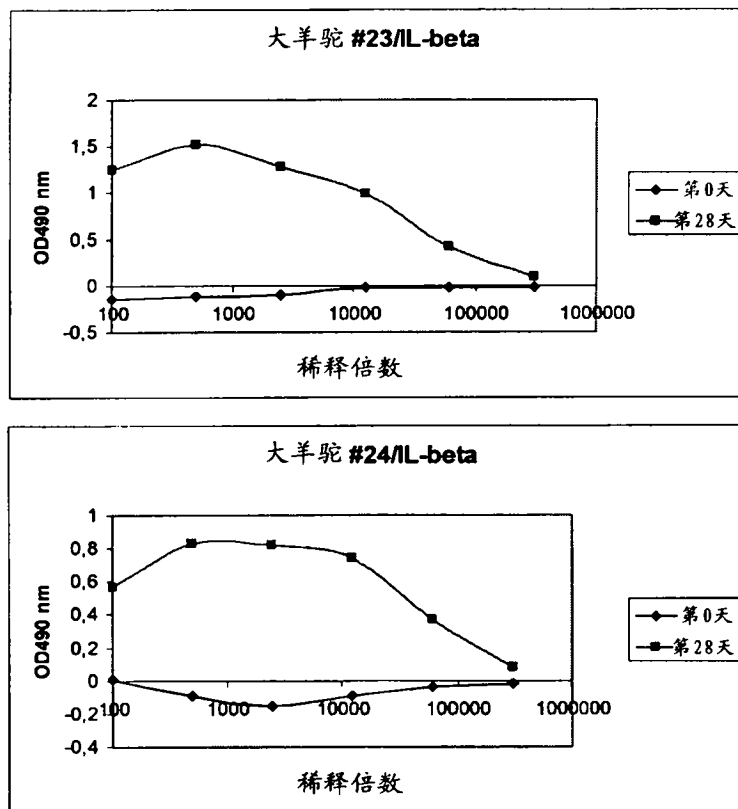


图 1

Fab 1E2和1F2的完全人源以及安全变体的序列

人源化 VH 1F2 和 1E2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
IGKV 基因	F01-IMGT (1-26)						CDR1-IMGT (27-36)						F02-IMGT (37-65)						CDR2-IMGT (66-85)						F03-IMGT (86-104)						CDR3-IMGT (105-116)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													

人源化 VL 1F2 和 1E2																														
IGLV 基因	F01-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-36)					F02-IMGT (37-65)					CDR2-IMGT (66-85)					F03-IMGT (86-104)					CDR3-IMGT (105-116)				
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110																		
K73650, IGW95-61	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
1F2 VL	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
1E2 VL Hum	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
野生型 VL 1F2	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
人源化 VL 1F2	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
安全变体 VL 1F2	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
K73650, IGW95-61	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
1E2 VL	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
1E2 VL Hum	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
野生型 VL 1E2	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
人源化 VL 1E2	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
安全变体 VL 1E2	QTVVIGQPS	FSVSPGQVILTCGLS	SGSVTSEY	...	FWTQQTPGAPKILLY	NTR	...	TRSPQVP	DRSSGSL	LSGKALITKQAKKEDNYC	VLVMSGCI	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						

图 2

来自抗 IL-1Beta 之 1E2 的人源化变体的 Fab 的 ELISA 应答

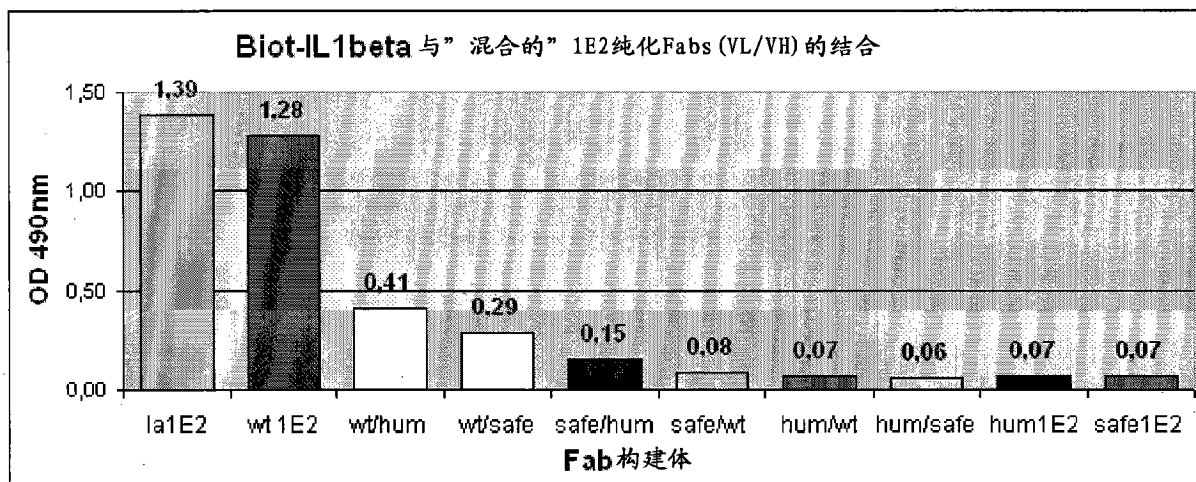


图 3

1F2和1E2的人源化Fab变体的噬菌体ELISA

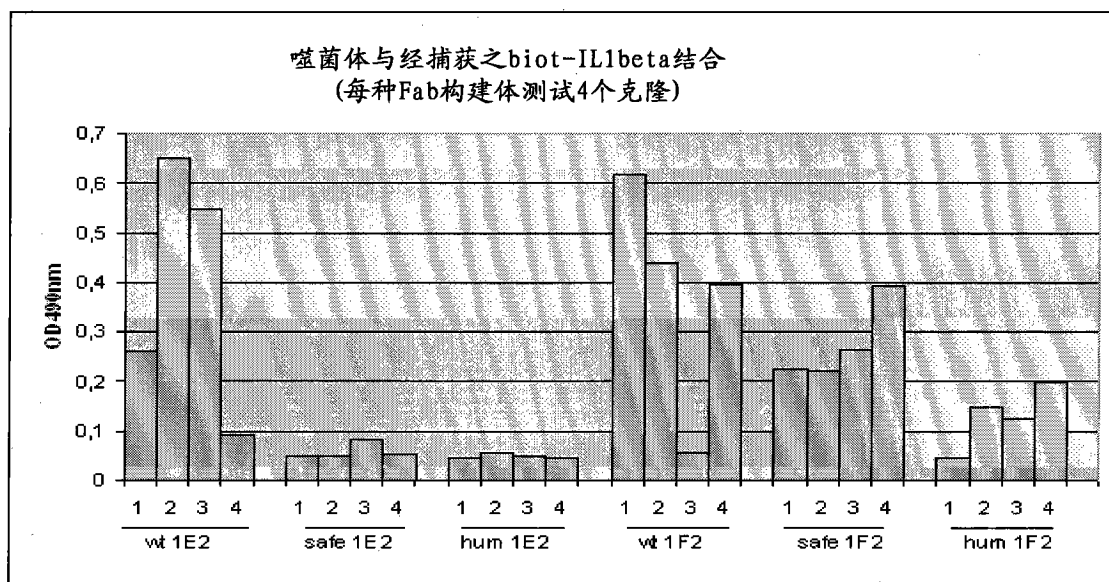


图 4

嵌合1E2与IL1beta的结合

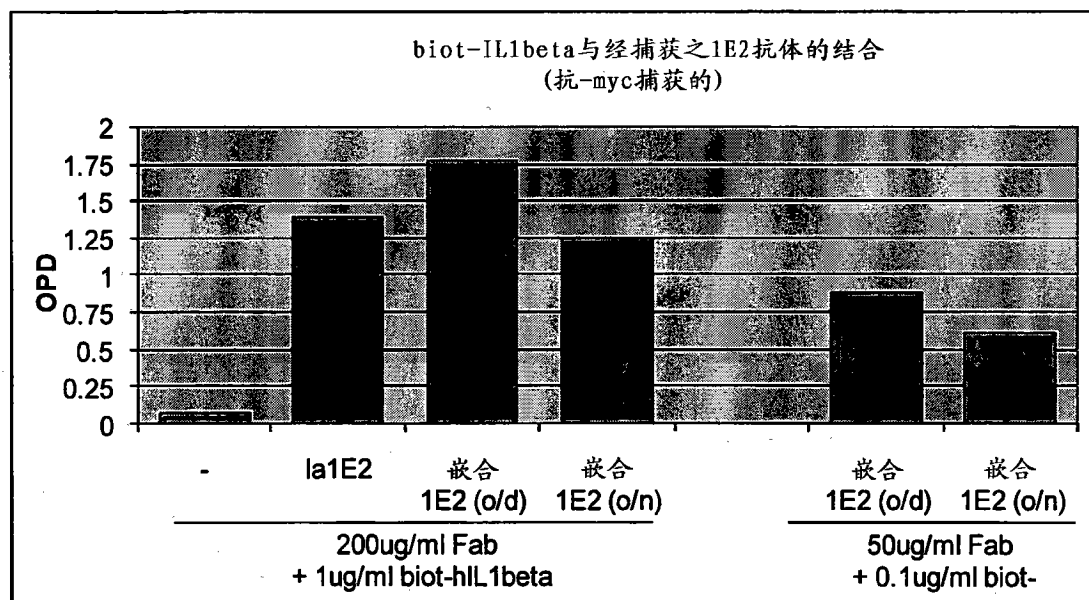


图 5