



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102093477 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 26

(21) 申请号 201010575786. 1

(22) 申请日 2003. 05. 21

(30) 优先权数据

60/382, 649 2002. 05. 22 US

60/438, 256 2003. 01. 03 US

(62) 分案原申请数据

03814626. 6 2003. 05. 21

(73) 专利权人 艾斯巴技术 - 诺华有限责任公司

地址 瑞士施利伦

(72) 发明人 K · 缇索特 S · 艾沃特

A · 奥弗德尔茂尔 A · 巴伯里斯

D · 艾施尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(56) 对比文件

WO 01/48017 A1, 2001. 07. 05, 全文.

Visintin Michela et al. The

intracellular antibody capture technology

(IACT): towards a consensus sequence for

intracellular antibodies. 《Journal of

Molecular Biology》. 2002, 第 317 卷 (第 1 期),
第 73-83 页.

Knappik A et al. Fully synthetic human
combinatorial antibody libraries (HuCAL)

based on modular consensus frameworks

and CDRs randomized with trinucleotides.

《Journal of Molecular Biology》. 2000, 第 296
卷 (第 1 期), 第 57-86 页.

审查员 李子东

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书20页

序列列表8页 附图14页

(54) 发明名称

在胞内环境中表现出增强的稳定性的免疫球
蛋白构架及其鉴定方法

(57) 摘要

本发明提供了组合物,其可作为用于创建极为稳定且可溶的单链 Fv 抗体片段的构架。这些构架经胞内性能选择,因而可理想地适用于创建 scFv 抗体片段或 scFv 抗体文库,以用于其中稳定性和可溶性为抗体片段性能的限制因素的应用,例如在细胞的还原环境中。此类构架也可用于鉴定表现出增强的可溶性和稳定性的高度保守残基及共有序列。

1. 单链构架,具有如下通式结构:

$\text{NH}_2\text{-VL-接头-VH-COOH}$;或

$\text{NH}_2\text{-VH-接头-VL-COOH}$

其中 VL 结构域如序列 Seq. Id. No. 2 所示并且 VH 结构域如序列 Seq. Id. No. 10 所示。

2. 融合于第二蛋白成分的权利要求 1 的单链构架,以产生具有如下通式结构的融合构建体:

$\text{NH}_2\text{-VL-接头-VH-第二蛋白-COOH}$;或

$\text{NH}_2\text{-第二蛋白-VL-接头-VH-COOH}$ 。

3. 权利要求 2 的单链构架,其中 VH 和 VL 区的取向颠倒。

4. 根据权利要求 2 的单链构架,其中第二蛋白为胞内测定提供读出信息。

5. 根据权利要求 4 的单链构架,其中所述第二蛋白选自 GFP、增强的蓝色荧光蛋白、增强的黄色荧光蛋白、增强的青色荧光蛋白、转录激活剂或 DNA- 结合蛋白。

6. 根据权利要求 5 的单链构架,其中所述转录激活剂为 Gal4 激活结构域。

7. 根据权利要求 5 的单链构架,其中所述 DNA- 结合蛋白为 LexA 或 Gal4DNA- 结合结构域。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项的单链构架在靶确认或文库构建中的用途。

9. 权利要求 1 的构架序列在鉴定保守构架残基种类中的用途。

10. 根据权利要求 9 的用途,其中保守构架残基种类选自下组:

极性但不带电荷的 R 基团;

带正电荷的 R 基团;

带负电荷的 R 基团;

疏水 R 基团;及

特殊氨基酸,即,半胱氨酸、甘氨酸和脯氨酸。

11. 权利要求 1 的构架序列在鉴定至少一个保守构架序列中的用途。

12. 根据权利要求 11 的用途,其中保守构架序列为 2-5 个残基。

13. 根据权利要求 11 的用途,其中保守构架序列为 5-10 个残基。

14. 根据权利要求 11 的用途,其中保守构架序列为 10-25 个残基。

15. 根据权利要求 11-12 中任一项的用途,其中保守构架序列具有缺口。

16. 抗体,包括来自根据权利要求 1-7 中任一项的单链构架的 VL 和 VH。

17. 抗体片段,包括来自根据权利要求 1-7 中任一项的单链构架的 VL 和 VH。

18. 权利要求 16 的抗体或权利要求 17 的抗体片段在靶确认或文库构建中的用途。

19. 核酸,能够编码根据权利要求 1-7 中任一项的单链构架。

20. 载体,包含根据权利要求 19 的核酸。

21. 宿主细胞,包含根据权利要求 19 的核酸。

在胞内环境中表现出增强的稳定性的免疫球蛋白构架及其 鉴定方法

[0001] 本申请是申请号为 03814626.6、申请日为 2003 年 5 月 21 日的同名发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及蛋白质化学、分子生物学以及免疫学。

[0003] 相关技术领域背景

[0004] 抗体能以高度的特异性和亲和力识别并靶向几乎任何分子。这个特点已被开发,以便将这些天然蛋白转变为用于诊断和治疗应用的强有力的工具。重组 DNA 技术的进展已推动了抗体基因在广泛种类的非淋巴细胞中的操作、克隆和表达 (Skerra,1988 ; Martineau,1998 ;Verma,1998)。已经构建了许多不同的抗体片段,以便最佳地满足各种应用。保留整个母体免疫球蛋白全部抗原结合能力的最小实体是单链 Fv 片段 (scFv) (Bird, 1988)。该抗体片段包含由柔性肽接头连接起来的重链和轻链可变区,这使得该蛋白能够由单个基因表达。

[0005] 抗体片段较之于完整免疫球蛋白分子具有若干重要的优势。由于分子小,它们在多种表达宿主细胞如大肠杆菌细胞中的表达得以易化、且产量得以提高 (Plückthun, 1996)。而且,抗体片段允许在体内应用中改善肿瘤穿透力 (Yokota,1992),并且它们能够与多种用于治疗途径的效应分子共价连接。

[0006] 天然存在的抗体是由浆细胞分泌的,已进化至能够在胞外氧化环境中行使功能。为获得其功能性折叠结构,它们通常需要在不同结构域内形成二硫键,这对于免疫球蛋白折叠是至关重要的。与全长抗体形成对照,scFv 或 Fab 抗体片段原则上能够在任何细胞内部的还原环境中功能性地表达,并定向到任何区室,以靶向胞内蛋白,从而引发特定的生物学效应 (Biocca,1991)。的确,有些称之为内体 (intrabodies) 的胞内单链抗体片段,已被成功地用于调节不同的生物系统中胞内靶蛋白的功能。从而,针对病毒侵染的抗性已在植物生物技术中得到展示 (Tavladoraki,1993 ;Benvenuto,1995),内体与 HIV 蛋白的结合业已证明 (Rondon,1997),并且与癌基因产物的结合 (Biocca,1993 ;Cochet,1998 ;Lener, 2000) 也已有描述。而且胞内抗体在表征目前通过人类基因组测序鉴定到的大量基因的功能方面有希望成为有价值的工具 (Richardson,1995 ;Marasco,1997)。例如,它们可在功能基因组途径中用于封闭或调节新近鉴定的蛋白的活性,由此促成对其功能的了解。最后,内体具有诊断和治疗应用的潜力,例如在基因治疗环境中。

[0007] 尽管存在极大的前景,功能性内体的产生仍然受限于其不稳定性和不可溶性或者聚集的倾向。胞浆的还原环境防止形成保守的链内二硫桥,从而使得高百分比的抗体片段不稳定,因此在细胞内无功能 (Biocca,1995 ;Proba,1997)。抗体片段的稳定性和可溶性因此构成了内体在体内作为潜在的蛋白功能调解剂的应用的主要障碍。迄今为止,尚不可预言使得抗体片段在胞内环境中具备功能的序列要求。

[0008] 因此,急需在广范围的不同细胞类型中性能良好的抗体片段,从而可作为用于多

种结合特异性的构架。此类构架可用于构建用于胞内筛选的文库,或者可作为既有抗体结合部分的受体。

[0009] 除了独特地满足胞内应用之外,在众多的胞外和体外应用中,基于极为稳定的可变结构域构架的此类抗体片段或完整抗体相比于其它抗体也具有独特的优势。当此类构架在氧化环境中产生时,其二硫桥能够形成,进一步增强其稳定性,并使得它们高度抵抗聚集和蛋白酶降解。体内半衰期(及针对聚集和血清蛋白酶降解的抗性)是除了亲和力和特异性之外的、使抗体在治疗或诊断应用中成功的唯一最为重要的因素(Willuda,1999)。抗体片段的半衰期可通过共价连接聚合物分子如聚乙二醇(PEG)而进一步得以提高(Weir,2002)。这类稳定分子代表了抗体应用的显著进步,尤其但并非仅当不期望 F_c 功能时。

[0010] 抗体片段文库极大的实践重要性激发了该领域的研究。Winter(EP 0368684)提供了抗体可变区基因的初始克隆和表达。由这些基因出发,他建立了在互补决定区(CDR)以及构架区具有高度多样性的巨大抗体文库。不过,Winter未披露不同构架用于文库构建的用途。

[0011] 另一方面,Plückthun(EP 0859841)教导试图通过将构架限于有限数目的合成共有序列而改进文库设计。包括引入大量合理设计的突变的蛋白质工程的努力以前就提示针对相应共有序列的突变是提高分离的可变免疫球蛋白结构域稳定性的合适手段(Ohage 1999;Ohage1999以及US 5,854,027,特此并入作为参考)。

[0012] Plückthun(EP 0859841)公开了基于这些共有序列进一步优化结合亲和力的方法。Plückthun专利也承认正在发生着的有关抗体的知识的增长,因此意欲包括此类文库设计的远景发现。然而,未建议合成共有构架可能的进一步改善。

[0013] 因而Winter、Plückthun及他人(如Soderlind,W0 0175091)的教导试图以CDR的高度多样性为焦点建立巨大的抗体文库,用于选择并在氧化条件下应用所选scFv。然而,所有这些文库未进行胞内应用优化,因而不能用于还原环境或对所表达的抗体片段的稳定性和可溶性提出特殊要求的其它条件下的选择和应用。

[0014] 抗体片段在还原环境如原核和真核细胞的胞浆中表现良好所需的性质尚不清楚。因此胞内抗体或“内体”的应用目前受限于其在还原条件下(可影响其稳定性和可溶性能)不可预测的行为(Biocca,1995;Wörn,2000)。现有专利申请(EP1040201、EP1166121和W00200729)及出版物(Visintin,1999)涉及以筛选技术为焦点的内体的胞内筛选,但是未公开在真核细胞特别是酵母中有功能、从而可用于本上下文的文库构建的具体抗体序列。

[0015] Visintin和Tse独立地描述了所谓的胞内共有序列(ICS)的分离(Visintin,2002;Tse,2002)。该序列来自于已从酵母抗原-抗体相互作用筛选中分离出的许多序列。然而,由于现有噬菌体展示选择,胞内筛选的输入是有严重偏差的。因而,在Visintin等的例子中,只有一个输入序列属于VH 3亚群。公开的共有序列ICS与由Knappik(2000)和EP0859841描述的人类VH 3亚群的共有序列完全相同。ICS的62个氨基酸中的60个也与由Steipe以构建具有增强的稳定性的可变结构域为基础而提出的一般人类VH-结构域共有序列相同(美国专利号No. 6,262,238,特此并入作为参考)。这些工作依次建立在早期的序列收集(即Kabat,1991)和可变结构域亚群及结构决定簇的定义(Tomlinson,1992;Williams,1996;Chothia,1989和Chothia,1987)的基础上。然而,由于所述内体选择的输入是有严重偏差的(即在Visintin等例子中,只有一个VH结构域为VH3),由胞内筛选分离

VH3 序列并不是特别令人惊讶。由于其输入文库的严重偏差, Tse 等和 Visintin 等的工作未能提供对人类可变结构域所有组成部分的全面评价, 而这将会由无偏差的查询提供, 并且这是鉴定存在于人类所有组成部分中的有用内体构架所必需的。

[0016] 我们以前曾描述过不依赖于其抗体-结合特异性而允许在酵母中选择稳定且可溶的内体的系统 (Auf der Maur (2001), W00148 017)。这个途径允许有效地筛选 scFv 文库和分离特定构架, 它们在酵母细胞的还原环境中是稳定且可溶的。目的仍然是实际分离构架序列, 并且使用的模式是, 第一步中预测何种序列类型将会在还原环境中最稳定, 而第二步中通过分析、重组以及进一步的体内和体外实验鉴定最佳序列。

[0017] 发明的简要概述

[0018] 本发明填补了抗体产生领域缺失的环节。它提供了就稳定性和可溶性而言具有优异特性的抗体可变结构域构架序列。这些对许多相关应用, 例如在诊断、治疗或研究中是关键特点。这些构架可用于移植既有的结合特异性或者用于产生具有高稳定性和可溶性的抗体文库。

[0019] ScFv 文库被用来分离在酵母细胞的还原环境中稳定且可溶的构架。分离构架的性能随后在人类细胞系和体外实验中表征。所述构架可直接作为既有结合特异性的受体主链, 或者通过一个或多个高变环的随机化构建 CDR 文库用于还原或其它挑战性的环境。分离的可变结构域序列进一步通过对比进行分析, 以鉴定优选的序列家族。从那些优选的可变结构域序列家族中, 根据结构分析选择最佳序列, 该结构分析可排除含干扰免疫球蛋白折叠的构架残基的序列。鉴定的可变结构域序列候选物随后以所有可能的变化重组, 并通过分析其在酵母、哺乳动物细胞和体外的性能挑选最佳的轻链和重链可变结构域组合。

[0020] 这些优化的 scFv 及组成它们的可变结构域构架, 以及其它抗体片段或由其衍生的全抗体, 举例来说, 可理想地作为既有结合特异性的受体主链, 或通过一个或多个高变环的随机化构建 CDR 文库用于还原或其它挑战性的环境。适于胞内应用的抗体从定义上来讲更为稳定且可溶。从而, 它们在胞内环境外界的应用中的用途也将具有优势。

[0021] 本发明提供了包括抗体可变结构域构架和单链 Fv 抗体 (ScFv) 片段的组合物, 其可掺入到多种抗体片段或全抗体中。提供了最稳定且可溶种类的抗体可变结构域片段, 因而最适于胞内应用。也提供了在胞内测定中表现出最高性能的抗体可变结构域和 scFv 抗体片段的具体构架序列。本发明也提供了抗体可变结构域和 scFv 片段中轻链和重链可变结构域的人造组合的具体构架序列, 举例来说, 它们可最理想地用于胞内应用, 并且就稳定性和可溶性而言在体外表现出最佳性能。

[0022] 本发明提供具有如下通式结构的单链构架试剂:

[0023] $\text{NH}_2\text{-VL- 接头 -VH-COOH}$ 或

[0024] $\text{NH}_2\text{-VH- 接头 -VL-COOH}$ 。

[0025] 在本发明的另一个实施方案中, 所述单链构架可融合于第二蛋白成分, 以产生具有如下通式结构的融合构建体:

[0026] $\text{NH}_2\text{-VL- 接头 -VH- 第二蛋白 -COOH}$

[0027] $\text{NH}_2\text{- 第二蛋白 -VL- 接头 -VH-COOH}$

[0028] 这些融合构建体中 VH 和 VL 区的取向可以颠倒。

[0029] 在本发明的另一个实施方案中, 可变结构域可掺入到 Fab 片段中, 其可融合于第

二蛋白成分,以产生具有如下通式结构的融合构建体:

[0030] $\text{NH}_2\text{-VH-CH-第二蛋白-COOH}$ 及 $\text{NH}_2\text{-VL-CL-COOH}$

[0031] 第二蛋白可融合于重链或轻链的 N-端或 C-端。

[0032] 在优选的实施方案中,单链或 Fab 构架融合构建体的第二蛋白是直接或通过转录激活为胞内测定提供读出的蛋白。

[0033] 本发明的另一个目的是提供抗体可变结构域的构架类型以及可变结构域和 scFv 序列,举例来说,它们适于从既有抗体上移植高变环,以便获得在还原或者其它挑战性环境中具有功能的抗体。

[0034] 本发明的另一个目的是提供抗体可变结构域的构架类型以及可变结构域和 scFv 序列,举例来说,通过随机化此类构架的一个或多个高变环,它们适于建立文库用在还原或者其它挑战性环境中。

[0035] 本发明的另一个目的是所公开的序列在鉴定保守残基和共有序列中的应用。

[0036] 因利用所公开的构架而得的抗体或抗体片段可用作靶确认以及人类、动物和植物疾病的治疗、预防和诊断中的试剂。所述抗体可以蛋白或编码该蛋白的 DNA 的形式应用,而且不限于胞内应用。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1 显示了在啤酒糖酵母中进行质控筛选后的胞内性能。图 1 显示了通过 lacZ 表达的激活而测定的典型的酵母中的“质控”筛选(例如参见实施例 1)。在若干不同的筛选中鉴定到所选的阳性菌落(黑色),并且阳性菌落的相应序列可见于图 12 和 13。所选序列与阳性对照极为稳定的 λ -移植物(深灰)进行了比较。

[0039] 图 2 显示了在哺乳动物 HeLa 细胞系中所选构架的胞内性能。图 2 显示了通过与极为稳定的 λ -移植物(深灰)相比的由荧光素酶表达的激活而测定的由典型的酵母“质控”筛选分离的构架(黑色)在人类细胞系 HeLa 中的性能。阳性对照 Ga14-VP16(白色)给出了该系统最大可能的转录激活水平。荧光素酶活性已就转染效率进行了校正。

[0040] 图 3 显示了在啤酒糖酵母中新构架的胞内性能。图 3 显示了在酵母中通过 lacZ 表达的激活而测定的优良构架组合的体内性能。构架序列(黑色)与阳性对照(极为稳定的 λ -移植物(深灰))进行了比较。构架的编号如图 16 所述。

[0041] 图 4 显示了新构架在 HeLa 细胞系中的胞内性能。图 4 显示了在人类细胞系 HeLa 中通过荧光素酶表达的激活而测定的优良构架组合的体内性能,并通过与极为稳定的 λ -移植物(深灰)的比较进行图解说明。阳性对照 Ga14-VP16(白色)给出了该系统最大可能的转录激活水平。荧光素酶活性已就转染效率进行了校正。

[0042] 图 5 显示了在啤酒糖酵母的细胞质中可溶性表达产物。图 5 显示了通过酵母菌株酿酒酵母(*S. cerevisiae*) JPY9 胞浆中产生的可溶蛋白的量测定的优良构架组合的体内性能。

[0043] 图 6 显示了在 *E. coli* 中的表达行为。图 6 显示了所选构架组合在大肠杆菌(*E. coli*)周质中的表达行为。箭头标示对应于这些 scFv 构架的条带位置。

[0044] 图 7 显示了所选构架在不同哺乳动物细胞系中的胞内性能。图 7 显示了在三种人类细胞系(HeLa(黑色)、Saos-2(深灰)及 HEK 293(白色))中通过荧光素酶表达的激活而测定的所选优良构架组合的体内性能,并通过与极为稳定的 λ -移植物的比较进行图解

说明。阳性对照 Gal4-VP16 给出了该系统最大可能的转录激活水平。荧光素酶活性已就转染效率进行了校正。

[0045] 图 8 显示了在 37°C 对聚集的抗性。图 8 代表如在 PBS- 缓冲液中所示的通过温育前后存在的单体蛋白的量而定量的所选构架组合在 37°C 对聚集的抗性。图表 A 代表构架 2.4 和 5.2, 而图表 B 代表构架 4.4、6.4 和 7.3。

[0046] 图 9 显示了在人血清中对聚集和蛋白酶降解的抗性。图 9 代表通过延长温育前后存在的可溶性全长蛋白的量而定量的所选构架组合在 37°C 人类血清中对蛋白酶降解聚集的抗性。

[0047] 图 10 显示了在酵母相互作用测定中通过 lacZ 表达的激活而测定的两个所选结合物对 Fab- 环境下新构架 7.3 的性能。Fab- 链的表达始于位于 ars/cen 或 2 微米载体之上的双向半乳糖诱导型启动子。所述 Fab 载体的表达产生抗体轻链和 VH-CH1-Gal4-AD 融合蛋白。结合物定向于人类球样激酶 1 (hPLK1)。与该靶的结合和与无关抗原的非特异性结合以及未随机化的构架 7.3 的结合进行了比较。注意作为参照包括在内的相应 scFv 是由肌动蛋白启动子 (2 微米) 表达的。

[0048] 图 11 显示了通过酵母菌株 JPY9 胞浆中产生的可溶蛋白的量测定的所述 scFv 构架在 Fab- 环境下的体内性能。Gal4-AD-scFv 融合子 (肌动蛋白 /2 微米) 的表达与相应的 Fab- 构建体的表达并与作为 Fab 的母体构架 7.3 进行了比较, 两者均来自两个不同的载体 (Gal- 诱导型、ars/cen 和 2 微米)。Fab 载体的表达产生抗体轻链和 VH-CH1-Gal4-AD 融合蛋白, 它在该印迹中检测。

[0049] 图 12 显示了所选 VH 结构域序列的对比。图 12 显示了由多种酵母“质控”筛选挑选出的所有 VH- 结构域构架序列的对比。

[0050] 图 13 显示了所选 VL 结构域序列的对比。图 13 显示了由多种酵母“质控”筛选挑选出的所有 VL- 结构域构架序列的对比。

[0051] 图 14 显示了随机文库成员的对比。图 14 显示了从文库中随机挑取的序列的对比。

[0052] 图 15 显示了在质控系统中所选的性能良好的构架的亚类的统计分析 (占全部所选序列的百分比)。图 15 显示了由“质控”系统分离到的序列中 VH- 和 VL- 结构域亚类频率的统计分析。只考虑随后在定量酵母测定中发现了是阳性的那些序列。所选序列与由有限数目的随机序列 (图 14) 确定的未选文库进行了比较。

[0053] 图 16 显示了用于进一步重组和评价最佳 scFv 组合的序列以及它们各自的缩写 (abb.)、来源和亚家族。

[0054] 发明详述

[0055] 除非另有定义, 本文所用的所有技术和科学术语具有如本发明所属技术领域的普通技术人员所通常理解的相同的含义。尽管类似于或等同于本文所述那些的方法和材料可用于实施或检验本发明, 合适的方法和材料还是描述于下文。特此将文中提及的所有出版物、专利申请、专利及其它参考文献全文并入作为参考。如有冲突, 将以本说明书 (包括定义) 为准。另外, 所述材料、方法和实施例仅用于举例说明, 而并非旨在限制。

[0056] 如本文所用, “同一性”是指两多肽、分子或两核酸之间的序列相似性。当两相比序列的某位置都被同一碱基或氨基酸单体亚单位占据时 (例如, 两 DNA 分子中每一个的某位置都被腺嘌呤占据, 或者两多肽中每一个的某位置都赖氨酸占据), 则相应分子在该位置

上是一致的。两序列间的“百分比同一性”是两序列共有的匹配位置数目除以比较的位置数目 $\times 100$ 的函数,例如,如果两序列 10 个位置中有 6 个匹配,则这两个序列具有 60% 的同一性。作为离子, DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 享有 50% 的同源性(总共 6 个位置上有 3 个匹配)。一般而言,当两序列比对可得出最大同源性时就进行比较。此类对比可利用例如 Needleman 等, J. Mol Biol. 48:443-453(1970) 的方法提供,通过计算机程序例如 Align program(DNAstar, Inc.) 方便地执行。

[0057] “相似”序列是那些在比对时享有相同和相似氨基酸残基的序列,其中相似残基是比对的参照序列中相应氨基酸残基的保守取代或者“许可的点突变”。就这点而言,参照序列残基的“保守取代”是被与对应参照残基物理上或功能上类似,如具有相似大小、形状、电荷、化学特性,包括形成共价键或氢键的能力等的残基取代。因而,“保守取代修饰”的序列是与参照序列或野生型序列的差异在于存在一个或多个保守取代或许可的点突变的序列。两序列间的“阳性百分比”是含两序列共有的匹配残基或保守取代的位置数目除以比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如,如果两序列 10 个位置中有 6 个匹配,且 10 个位置中有 2 个含保守取代,则这两个序列具有 80% 的阳性同源。

[0058] “VH 结构域”是指免疫球蛋白分子重链的可变部分。

[0059] “VL 结构域”是指免疫球蛋白分子轻链的可变部分。

[0060] VH 或 VL “亚型”是指通过如 Knappik(2000) 中所定义的相应共有序列所定义的亚型。术语“亚家族”或“亚类”作为“亚型”的同义词使用。如本文所用的术语“亚型”是指与代表其亚型的相应共有序列享有高度同一性和相似性的序列。某一可变结构域序列是否属于某“亚型”是通过将该序列与相应结构域的所有已知人类生殖系区段、或者定义的共有序列比对,并随后鉴定最大同源性确定的。确定同源性和通过利用查询矩阵例如 BLOSUM(Henikoff 1992) 对序列分类的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0061] 如本文所用的“氨基酸共有序列”是指氨基酸序列,它可利用至少两个或优选更多比对的氨基酸序列矩阵产生,并且考虑到比对中的空缺,有可能确定各位置上最频繁的氨基酸残基。共有序列是包括了各位置上最频繁表示的氨基酸的序列。如果在单个位置上等地表示两个或多个氨基酸,则共有序列包括两个或所有那些氨基酸。

[0062] 蛋白的氨基酸序列可在多种水平分析。例如,保守或变异可表现在单残基水平、多残基水平、具有空缺的多残基水平等。残基可表现出相同残基的保守或者可以在分类的水平上保守。氨基酸分类的实例包括极性但不带电荷的 R 基团(丝氨酸、苏氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺);带正电荷的 R 基团(赖氨酸、精氨酸和组氨酸);带负电荷的 R 基团(谷氨酸和天门冬氨酸);疏水 R 基团(丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸和酪氨酸);以及特殊氨基酸(半胱氨酸、甘氨酸和脯氨酸)。其它分类是本领域技术人员公知的,并且可利用结构决定簇或其它数据定义,以评估可取代性。就该意义而言,可取代氨基酸可以指能够被取代并维持该位置上的功能保守性的任何氨基酸。

[0063] 如本文所用的“多核苷酸共有序列”是指核苷酸序列,它可利用至少两个或优选更多比对的核酸序列矩阵产生,并且考虑到对比中的空缺,有可能确定各位置上最频繁的核苷酸。共有序列是包括了各位置上最频繁表示的核苷酸的序列。如果在单个位置上等地表示两个或多个核苷酸,则共有序列包括两个或所有那些核苷酸。

[0064] 如本文所用的“结构亚-元件”是指蛋白或多肽内与该分子限定的结构或功能部

分对应的一段氨基酸残基。这些可以是环（即抗体的 CDR 环）或者蛋白或多肽内任何其它二级或功能结构（即结构域、 α -螺旋、 β -片层、抗体构架区等）。结构亚元件可利用相似或同源多肽的已知结构或者通过利用上文提及的比对氨基酸序列的矩阵鉴定。这里各位置上的变异是确定属于某一结构亚元件（如抗体高变区）的一段氨基酸残基的基础。

[0065] 如本文所用的“亚序列”是指编码至少一个结构亚元件的基因模块。它未必一定与结构亚元件相同。

[0066] 如本文所用的“抗体 CDR”是指抗体的互补决定区，其由如 Kabat 等 (1991) 所定义的抗原结合环组成。例如，抗体 Fv 片段的两可变结构域中的每一个都含 3 个 CDR。

[0067] 如本文所用的“抗体”是“免疫球蛋白”的同义词。根据本发明的抗体可以是完整免疫球蛋白或其片段，包括免疫球蛋白的至少一个可变结构域，例如单可变结构域，Fv (Skerra, 1988)、scFv (Bird, 1988 ;Huston, 1988)、Fab、(Fab')₂ 或本领域技术人员众所周知的其它片段。

[0068] 如本文所用的“抗体构架”是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，它起着该可变结构域抗原结合环的支架的作用 (Kabat 等, 1991)。

[0069] 合理设计的 scFv 片段已证明了 scFv 片段的热动力学稳定性与其体内性能之间清楚的关联 (Wörn, 2000 ;Auf der Maur, 2001)。利用最近研发的命名为“质控”的系统 (Auf der Maur, 2001)，已分离到适于胞内应用的特定抗体可变结构域构架序列 (图 12 和 13)、描述了特征 (图 1 和 2) 并进一步改善 (图 3 至 9 及图 14)。如同我们以前的实验中所观察到的那样，在胞内测定中所选的性能良好的构架表现出高的体外稳定性，如通过其 37°C 抗聚集和蛋白酶降解所证明的那样 (图 8 和 9)。而且，形成了允许在更广基础上根据其构架亚家族 (图 15) 选择用于胞内应用的构架的模式。文中公开了可用于胞内应用的特定抗体可变结构域，还有通用模式。一方面，这允许利用这些序列作为移植实验的构架供体以获得保留了环供体的结合特异性的功能性内体。另外，可利用公开的序列作为构架构建抗体文库。此类文库适用于还原条件下的胞内选择系统，例如原核和真核细胞系统。另外，所公开的序列可用于鉴定例如保守序列或残基或基序。结构亚元件的移植，例如抗体结合环的移植 (如 Jung, 1997)，还有抗体或其片段文库的制备 (如 Vaughan, 1996 ;Knappik, 2000) 已有详细描述，并且是本领域技术人员众所周知的。

[0070] 由于胞内应用将抗体片段暴露于极为不利的条件下 (即升高的温度、还原环境)，而本发明公开的序列获得了使之抵抗最不利条件的特点。因此，当与“普通”序列相比时，这里公开的序列具有出色的稳定性和可溶性，如通过其对聚集和蛋白酶降解的抗性所证明的那样 (图 8 和 9)。这些特点，连同其优良的表达产率，使得所公开的抗体构架序列独特地不仅适于胞内应用，而且尤其适于所有其中极需关注长半衰期、耐用性和制备的容易性的治疗和诊断应用。

[0071] 本发明使得可能设计包括至少抗体的可变部分、可用于还原或其它挑战性环境下的应用的多肽序列。在第一实施方案中，本发明提供了可用于胞内应用的抗体构架序列集合 (图 12 和 13)。在第一步中，利用酵母质控系统不依赖于结合亲和力和地筛选多种序列的文库。分离的序列可在酵母和哺乳动物细胞中评价其胞内性能 (图 1 和 2)。

[0072] 在本发明的一个实施方案中，对分离序列的集合通过比对进行分析，以鉴定抗体可变结构域亚类和适用于胞内应用的共有序列。

[0073] 在本发明另一优选的实施方案中,对上述抗体构架序列的集合进一步通过相互比对和亚家族分类进行分析。属于一个亚型的所有构架就其在酵母和在哺乳动物细胞中的胞内性能进行比较(图1和2,作为实例),并就其氨基酸序列中相对于各亚型共有序列所发生的阴性、中性或阳性交换进行比较。本领域技术人员能够根据免疫球蛋白结构域中特定交换残基的结构环境区别阳性、中性和阴性变化。随后,选择表现出最佳胞内性能的可变抗体结构域构架序列,并且其与相应亚型共有序列相比没有阴性交换。优选地,挑选进一步含有据认为是阳性氨基酸交换的序列。

[0074] 在另一优选的实施方案中,所选的重链和轻链抗体可变结构域随后以所有可能的组合重组为 scFv 片段,以鉴定具有最高稳定性和可溶性的组合。为了这个目的,对新的重组 scFv 片段进行有关在酵母(图3)和在哺乳动物细胞系(图4和7)的胞内相互作用测定中还原条件下的性能以及有关在酵母中的可溶性胞内表达(图5)的评价。对有希望的组合进一步通过分析大肠杆菌中的周质表达(图6)、升高的温度下对聚集的抗性(图8)以及在人类血清中于 37°C 延长温育后对聚集和蛋白酶降解的抗性(图9)进行有关氧化条件下的行为的评价。这些数据被用来鉴定最适于胞内或氧化条件下的任何特定应用的 scFv 构架。

[0075] 本文公开的所选且优化了的构架序列不仅在胞内应用中,而且在所有可得益于 scFv 提高的稳定性和/或可溶性的应用中都具有显著的优势。实例有在诊断应用中需要以高浓度长期贮存,以及 37°C 血清中延长的功能半衰期(例如象治疗应用中所需的那样)。

[0076] 根据本发明的一个方面,提供了包括具有如下通式结构的单链构架的内体构架:

[0077] $\text{NH}_2\text{-VL-接头-VH-COOH}$;或

[0078] $\text{NH}_2\text{-VH-接头-VL-COOH}$

[0079] 其中 VH 构架为 1a、1b 或 3 亚型。

[0080] 在另一个实施方案中,上述单链构架中 VH 和 VL 区的取向颠倒。

[0081] 根据本发明的一个方面,提供了包括具有如下通式结构的单链构架的内体构架:

[0082] $\text{NH}_2\text{-VL-接头-VH-COOH}$;或

[0083] $\text{NH}_2\text{-VH-接头-VL-COOH}$

[0084] 其中 VH 构架为 1a、1b 或 3 亚型,且 VL 构架为 λ 1、 λ 3 或 κ 1 亚型。

[0085] 在另一个实施方案中,本发明提供了融合于第二蛋白成分的单链构架,以产生具有如下通式结构的融合构建体:

[0086] $\text{NH}_2\text{-VL-接头-VH-第二蛋白-COOH}$;或

[0087] $\text{NH}_2\text{-第二蛋白-VL-接头-VH-COOH}$

[0088] 其中 VH 构架为 1a、1b 或 3 亚型,且 VL 构架为 λ 1、 λ 3 或 κ 1 亚型。

[0089] 在另一个实施方案中,这些融合构建体中 VH 和 VL 区的取向可以颠倒。

[0090] 在另一个实施方案中,可变结构域可掺入到 Fab 片段中,所述片段可另外融合于第二蛋白成分,以产生具有如下通式结构的融合构建体:

[0091] $\text{NH}_2\text{-VH-CH-第二蛋白-COOH}$ 和 $\text{NH}_2\text{-VL-CL-COOH}$

[0092] 所述第二蛋白可融合于重链或轻链的 N-端或 C-端。

[0093] 如本文所公开的,胞内应用中存在着对亚型为 3 及 1a 和 1b 的 VH 构架极强的偏好。至于轻链可变结构域(VL), κ 1 构架在数量上具有清楚的偏好,但 λ 1 和 3 也被富集。

因此,这些构架亚型,即与 κ 1、 λ 3VL 结构域相组合的 VH 1a、1b 和 3 最适合用于胞内应用以及需要 scFv 折叠性质的其它应用。因此,为了降低还原环境中无功能分子的数量,用于胞内筛选系统的文库应当优选由这些构架亚型的混合物构建。

[0094] 在优选的实施方案中,本发明抗体片段的 VH 结构域为 1a、1b 或 3 亚群。

[0095] 在优选的实施方案中,本发明抗体片段的 VL 结构域为 κ 1、 λ 1 或 3 亚群。

[0096] 在优选的实施方案中,用作为构架的抗体片段选自如图 16 所示的 1.1、2.1、3.1、4.1、5.1、1.2、2.2、3.2、4.2、5.2、1.3、2.3、3.3、4.3、5.3、7.3、1.4、2.4、3.4、4.4、5.4 和 6.4。

[0097] 在本发明的一个实施方案中,至少两个并且优选多个构架被鉴定然后予以分析。当蛋白序列彼此比对时,可建立蛋白序列的数据库。则该比对可用于定义例如在序列和结构排列上(如果该信息可用的话)都表现出高度相似性的残基、亚元件、亚序列或构架序列亚群。

[0098] 亚元件的长度优选,但并非仅在 1 个氨基酸(例如酶活性位点中的一个残基或结构决定残基)和 150 个氨基酸(例如完整蛋白结构域)的范围之内。最优选的是,长度范围在 3 和 25 个氨基酸之间,例如最常见于抗体 CDR 环中的。

[0099] 在另一个实施方案中,合成了由分析推测的共有核酸序列。这可通过本领域熟练从业人员众所周知的多种方法中的任何一种,例如通过全基因合成或通过以 PCR 为基础的途径实现。

[0100] 在另一个实施方案中,所述核酸序列被克隆到载体中。载体可以是测序载体、表达载体或展示(如噬菌体展示)载体,所有这些都是本领域技术人员众所周知的。载体可包含一个核酸序列或在不同或同一操纵子中的两个或多个核酸序列。在最后一种情况下,它们可单独或作为连续的序列克隆。

[0101] 在一个实施方案中,多肽具有特定物种的模式特征。例如,这可通过由仅仅一个种类的同源蛋白的集合,优选由人类蛋白集合推断共有序列而实现。

[0102] 本发明另一实施方案涉及通过提供编码如上所述的多肽和附加成分的 DNA 序列而得的融合蛋白。

[0103] 在另一实施方案中,本发明提供了核酸序列、含所述核酸序列的载体、含所述载体的宿主细胞以及根据本文所述方法可获得的多肽。

[0104] 在另一实施方案中,本发明提供了合成或以其它方式在本发明的核酸序列末端安置限制性位点,以使其能够克隆到合适的载体中。

[0105] 在另一优选的实施方案中,本发明提供了与编码所述多肽的核酸序列相容的载体系统。所述载体包括限制性位点,这将是,举例来说,在该载体系统中独一无二的,并且就掺入到编码所述多肽的核酸序列中的限制性位点而言基本上是唯一的,除了例如该核酸序列克隆到载体中所必需的限制性位点之外。

[0106] 在另一个实施方案中,本发明提供了试剂盒,包括一个或多个核酸序列、重组载体、多肽和根据上述方法的载体,以及例如用于产生所述多肽的合适的宿主细胞。

[0107] 所有上述本发明的实施方案可利用本领域技术人员公知的分子生物学标准技术完成。

[0108] 在另一个实施方案中,核酸序列是能够编码本发明的多肽的任何序列。

[0109] 在另一个实施方案中,本发明的核酸用于基因治疗。

[0110] 在另一个实施方案中,单链构架是(图16)中1.1、2.1、3.1、4.1、5.1、1.2、2.2、3.2、4.2、5.2、1.3、2.3、3.3、4.3、5.3、7.3、1.4、2.4、3.4、4.4、5.4、6.4任一序列的变体,其中如本文所用的“变体”是指表现出90%或更大的同一性、同时又保持增强的稳定性的序列。

[0111] 在另一个实施方案中,单链构架是(图16)中1.1、2.1、3.1、4.1、5.1、1.2、2.2、3.2、4.2、5.2、1.3、2.3、3.3、4.3、5.3、7.3、1.4、2.4、3.4、4.4、5.4、6.4任一序列的衍生物,其中如本文所用的“衍生物”是指仅保持了对于该分子功能和稳定性至关重要的那些氨基酸的序列。如实施例3中所述的构架中孤立的中性或阳性交换不被认为是与本发明的抗体构架相关的变化。

[0112] 在本发明优选的实施方案中,所述单链构架融合于第二蛋白,其中该蛋白为胞内测定提供了读出。所述读出可以是直接的,例如以与可检测的蛋白如可通过荧光观察的GFP(绿色荧光蛋白)、增强的蓝色荧光蛋白、增强的黄色荧光蛋白、增强的青色荧光蛋白或者具有不同检测方法的其它融合伴侣融合的形式。或者,所述读出可通过报告基因的转录激活实现,其中scFv-融合蛋白的融合伴侣是转录激活剂,例如Gal4激活结构域,或者DNA-结合蛋白,例如LexA或Gal4DNA-结合结构域,其激活酶例如 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、 α -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸酶、氯霉素乙酰基转移酶等报告基因的转录,这转录提供了读出。提供读出的融合蛋白是本领域技术人员众所周知的。

[0113] 本发明的另一个实施方案是包括本文所述的构架的抗体。

[0114] 本发明的另一个实施方案是本发明抗体的应用。

[0115] 本发明另一优选的实施方案是抗体可变结构域的所述构架类别以及可变结构域和scFv序列用于从既有抗体上移植高变环的用途,以获得在还原或其它挑战性环境中具有功能的抗体。

[0116] 本发明另一个进一步优选的实施方案是抗体可变结构域的所述构架类别以及可变结构域和scFv序列的用途,例如通过此类构架的一个或多个高变环的随机化,用于建立文库,应用于还原或或其它挑战性环境中。

[0117] 对本领域普通技术人员将会显而易见的是,文中所述的本发明的分子可用于诊断和治疗应用、靶确认以及基因治疗。

[0118] 本发明可通过如下实施例举例说明,其并不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0119] 参考文献

[0120] Agatep, R., Kirkpatrick, D. I., Parchaliuk, R. A., Woods 和 Gietz, R. D. (1998). "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol." Technical.Tips Online(<http://tto.trends.corn>).

[0121] Auf der Maur, A., Escher, D. 和 Barberis, A. (2001). "Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain antibodies." FEBS Lett 508: 407-412.

[0122] Benvenuto, E. 和 Tavladoraki, P. (1995). "Immunotherapy of plant viral diseases." Trends Microbiol 3(7):272-5.

- [0123] Biocca, S. 和 Cattaneo, A. (1995). " Intracellular immunization :antibody targeting to subcellular compartments. " Trends Cell Biol 5 :248-252.
- [0124] Biocca, S., Di Luzio, A., Werge, T. 和 Cattaneo, A. (1991). " Intracellular immunization :expression of antibody domains in the cytoplasm and in the nucleus of mairurtalian cells. " Cytotechnology 5 Suppl 1 :49-50.
- [0125] Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P. 和 Catta-neo, A. (1993). " Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of xenopus oocytes. " Biochern Biophys Res Coinmun 197(2) :422-7.
- [0126] Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P. 和 Cattaneo, A. (1995). " Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochond.ria. " Bio/Technology 13(10) :1110-5.
- [0127] Bird, R. E., liardinan, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. 和 Whitlow, I-E. (1988). " Single-35 chain antigen-binding proteins. " Science 242(4877) :423-6
- [0128] Chothia, C. 和 Lesk, A. N. (1987). " Canonical structures for the hypervariable regions of immuno-globulins. " J..Tylol.Biol.196(4) :901-17.
- [0129] Chothia, C., Lesk, A. N., Tramontano, A., Le5 vitt, N., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Pad-lan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, W. R., Spinelli, S., Alzari, P. N. 和 Poljak, R. J. (1989). " Conformations of immunoglobulinhypervariable regions. " J. Mol. Biol. 342 :877-883.
- [0130] Johnson, G., Kabat, E. A. 和 Wu, T. T. (1996). kabat database of sequences of proteins of immunological interest. WEIR ' S Handbook of experimantal Inurtu-nology I Immunochemistry and Molecular Immunology. Cambridge, NA, Blackwell Science Inv :6.1-6.21.
- [0131] Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. N., Gottesman, K. S. 和 Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242. Wasinghton, DC, US Department of health and human servi-ces.
- [0132] Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, N., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A. 和 Virnekas, B. (2000). " Fully synthetic human combinatorial antibody libraries(HuCAL)based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. " JMol Biol 296(1) :57-86.
- [0133] Cochet, D., Kenigsberg, N., Delumeau, I., Virone-Dddos, A., Nulton, N. C., Fridinan, W. H., Schweighoffer, F., Teillaud, J. L. 和 Tocque, B. (1998). " Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. " Cancer Res 58(6) :1170-6.
- [0134] Corpet, F. (1988). " Nultalin. Multiple se-quence alignment with hierarchical clustering. " Nucleic Acids Res16(22) :10881-10890.
- [0135] Cox, J. P., Tomlinson, I. N. 和 Winter, G. (1994). " A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage. " .Eur J

Immunol 24 :827-836.

[0136] de Haard, ii. J. , van Neer, N. , Reurs, A. , Hufton, S. E. , Roovers, R. C. , Henderik, P. , de Bruine, A. P. , Arends, J. -W. 和 Hoogenboom, ii. R. (1999). " a large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. " J. Biol. Chexn. 274 :18218-18230.

[0137] Escher, D. , Bodiner-Glavas, M. , Barberis, A. 和 Schaffner, W. (2000). " Conservation of glutamine-rich transactivationfunction between yeast and humans. " Mol Cell Biol 20(8) :2774-82.

[0138] Escher, D. 和 Schaffner, W. (1996). " Improved " activator trap " method for the isolation of transcriptional activation domains from random DNA f ragments. " Biotechniques 21(5) :848-54.

[0139] Krebber, A. , Bornhauser, S. , Burmester, J. , Honegger, A. , Willuda, J. , Bosshard, H. R. 和 PJAickthun, A. (1997) " Reliable cloning of functional variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. " J Imrnunol Methods 201 :35-55.

[0140] Lener, M. , Horn, I. R. , Cardinale, A. , Messina, S. , Nielsen, U. B. , Rybak, S. N. , Hoogenboom, H. R. , Cattaneo, A. 和 Biocca, 5. (2000). " Diverting a protein from its cellular location by intracellular antibodies. The case of p21Ras. " Eur J Biochern 267(4) :1196-205.

[0141] Marasco, W. A. (1997). " Intrabodies:turning the humoral immune system outside in for intracellular immunization. " Gene Ther 4(1) :11-5.

[0142] Martineau, P. , Jones, P. 和 Winter, G. (1998). " Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. " J. Mol. Biol. 280(1) :117-27.

[0143] Ohage, B. 和 Steipe, B. (1999). " Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability. " JJxfol Biol 291(5) :1119-28.

[0144] Ohage, E. C. , Wirtz, P. , Barnikow, J. 和 Steipe, B. (1999). " Intrabody construction and expression. II. A synthetic catalytic Fv fragment. " JMol Biol 291(5) :1129-34.

[0145] Plückthun, A. , Krebber, A. , Krebber, C. , Horn, U. , Kniipfer, U. , Wenderoth, R. , Nieba, L. , Proba, K. 和 Riesenberger, D. (1996). Producing antibodies in Escherichia coli :from PCR to fermentation. Antibody Engineering, a practical approach. Dxford, Oxford University Press.

[0146] Proba, K. , Honegger, A. 和 Pluckthun, A. (1997). " A natural antibody missing a cysteine in Vii :consequences for thermodynamic stability and folding. " J. Mol. Biol. 265(2) :161-72.

[0147] Richardson, J. H. 和 Marasco, W. A. (1995). " Intracellular antibodies : development and therapeutic potential. " Trends Biotechnol 13(8) :306-10.

[0148] Rondon, I. J. 和 Marasco, W. A. (1997). " Intracellular antibodies(intrabodies)for gene therapy of infectious diseases. " Annu Rev

Microbiol 51:257-83.

[0149] Skerra, A. 和 Plückthun, A. (1988). " Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. " Science 240(4855): 1038-41.

[0150] Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. 和 Galeffi, P. (1993). " Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. " Nature 366(6454): 469-72.

[0151] Tomlinson, I.N., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, N.B. 和 Winter, G. (1992). " The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops. " J.Mol.Biol 227: 776-798.

[0152] Tse, E., Lobato, N.N., Forster, A., Tanaka, T., Chung, O. 和 Rabbitts, T. (2002). " Intracellular antibody capture technology: application to selection of intracellular antibodies recognising the BCR-ABL oncogenic protein. " J.Mol Biol 317((1)):85-94.

[0153] Verma, R., Boleti, E. 和 George, A.J. (1998). " Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. " J. Immunol Methods 216(1-2):165-81.

[0154] Visintin, M., Settanni, G., Maritan, A., Graziosi, S., Marks, J.D. 和 Cattaneo, A. (2002). " The intracellular antibody capture technology (IAC): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. " J.Mol.Biol. 317((1)):73-83.

[0155] Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T.H. 和 Cattaneo, A. (1999). " Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. " Proc Natl Acad Sci USA 96(21):11723-8.

[0156] Welschhof, M., Terns, P., Kolbinger, F., Zewe, M., Dübeler, S., Dürsam, H., Ham, C., Finger, M., Jung, M., Moldenhauer, G., Hayashi, N., Little, M. 和 Dpelz, G. (1995). " Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. " J. Immunol Methods 179:203-214.

[0157] Williams, S.C., Frippiat, J.P., Tomlinson, I.N., Ignatovic, D., Lefranc, N.P. 和 Winter, G. (1996). " Sequence and evolution of the human germline V_λ repertoire. " J.Mol Biol 264:220-232.

[0158] Wörn, A., Auf der Maur, A., Escher, D., Honegger, A., Barberis, A. 和 Plückthun, A. (2000). " Correlation between in vitro stability and in vivo performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors. " J.Biol.Chem. 275(4):2795-803.

[0159] Yokota, T., Milenic, D.E., Whitlow, N. 和 Schlöter, J. (1992). " Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin

forms." Cancer Res52(12):3402-8.

[0160] Auf der Maur, A., Zahnd, C., Fischer, F., Spinelli, S., Honegger, A., Cambillau, C., Escher, D., Plückthun, A. 和 Barberis, A. (2002). " Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework." J Biol Chem277(47):45075-45085.

[0161] Gietz, R.D. 和 Sugino, A. (1988). " New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites" Gene 74:527-534.

[0162] Willuda, J., Honegger, A.; Waibel, P., Schubiger, A. Stahel, R., Zangmeister-Wittke, U. 和 Plückthun, A. (1999). " High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments:engineering of a humanized anti-epithelialglycoprotein-2(epithelial cell adhesion molecule)single-chain Fv fragment" Cancer Research 59:5758-5767.

[0163] Wörn, A. 和 Plückthun, A. (1999). " Different equilibrium stability behavior of scFv fragments:identification, classification, and improvement by protein engineering" Biochemistry 38:8739-8750.

[0164] 本发明在如下非限制性的实施例中进一步举例说明。

[0165] 实施例 1

[0166] 通过在酵母“质控”系统中筛选人类文库而选择内体构架

[0167] 由“质控”系统筛选稳定的构架基本上如 Auf der Maur 详细描述的那样进行(W00148017, Auf der Maur 2001, 特此分别并入作为参考)。

[0168] 用于表达 scFv- 融合构建体以在酵母中进行筛选的质粒衍生自 pESBA-Act (Wörn, 2000)。它含有用于酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 转化选择的酵母 TRP1 基因, 以及 2 微米复制起点以确保高拷贝数。而且它具有用于强表达的组成型肌动蛋白启动子, 以及 GAL11 转录终止序列, 两者由多克隆位点隔开。对于细菌系统的操作, 它也具有细菌复制起点和 amp 抗性基因。

[0169] Gal4 激活结构域 (AD 氨基酸 768-881) 最初是利用 pGAD424 (Clontech) 作为模板, 用包括位于 Gal4-AD N- 端的 SV40T- 抗原核定位信号的引物通过 PCR 扩增的。编码 Gal11P 氨基酸 263-352 的 DNA 片段通过 PCR 扩增, 并以正确读码框克隆到 SV40-NLS-Gal4-AD 构建体的 N- 端。人类 scFv 文库, 是由别处描述的人脾细胞 cDNA 扩增的 (Welschhof, 1995; Krebber, 1997; de Haard, 1999), 通过 SfiI 位点以正确读码框克隆到该融合构建体的 N- 端, 并且取向为 V_L- 接头 -V_H, 其中接头具有序列 (GGGS)₄。从而表达产生具有通式结构 scFv-Gal11p-SV40 NLS-Gal4AD 的融合蛋白。

[0170] 在酵母菌株酿酒酵母 YDE172 (MAT α ura3-52leu2 Δ 1 trp1 Δ 63his 3 Δ 200 lys2 Δ 385 gal4 Δ 11) (Auf der Maur, 2001) 中实施筛选, 所述菌株通过将取向相异的 LacZ 和 HIS3 报告基因在来自 Gal11-GAL10 调控序列的天然 UASG 调节之下整合到 his3 Δ 200 基因座而衍生自菌株 JPY9 (Escher, 2000)。该报告系统的转录激活是继其 Gal11P 部分与 Gal4-DNA- 结合结构域 (DBD, 氨基酸 1-100) 特异性相互作用之后, 由 scFv- 融合构建体的 Gal4-AD 部分介导的。所述 Gal4-DBD 由第二质粒 pMP83 的表达提供。它含用于酿酒酵母转

化选择的酵母 LEU2 基因以及 ARS CEN 复制起点。而且,它具有用于强表达的组成型肌动蛋白启动子以及 GAL11 转录终止序列。对于细菌系统的操作,它也具有细菌复制起点和 amp 抗性基因。

[0171] 对于筛选,酵母菌株酿酒酵母 YDE172 由作为位于载体 pESBA-Act2 之上的融合构建体的 scFv- 文库共转化,而 pMP83- 载体提供 Gal4-DBD。使用标准醋酸锂转化方案 (Agatep,1998)。在转化之后,将细胞涂布于含 80mM 3- 氨基三唑的漏失 (drop out) 平板 (-Trp/-Leu/-His)。在于 30℃温育 3 天后挑取菌落,并在含 80mM 3- 氨基三唑的漏失平板 (-Trp/-Leu/-His) 上重新划线。重新长出的菌落通过在含底物 X-Gal 板的滤纸测定中的蓝色形成进行 LacZ- 表达测试。取阳性菌落用于进一步的分析,包括从酵母中分离 scFv- 携带质粒、转化大肠杆菌 DH5 α 、从大肠杆菌单菌落中分离质粒、并重新转化到新鲜制备的酵母菌株 YDE172 中用于下文所述的测定。所有方法根据本领域普通技术人员众所周知的标准操作实施。

[0172] 另外,利用了改良的筛选操作,其中 scFv 直接融合于 DNA- 结合结构域 (LexA 氨基酸 1-202) 和激活结构域 (Gal4,氨基酸 768-881),以产生具有如下结构的融合构建体: scFv-LexA-NLS-Gal4AD。用于表达 scFv- 融合构建体以在酵母中进行筛选的质粒衍生自 pESBA-Act2。它含有用于酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 转化选择的酵母 TRP1 基因,以及 2 微米复制起点以确保高拷贝数。而且它具有组成型肌动蛋白启动子 (用于强表达) 和 GAL11 转录终止序列,两者由多克隆位点隔开。对于细菌系统的操作,它也具有细菌复制起点和 amp 抗性基因。

[0173] 筛选在酵母菌株酿酒酵母 ImmunaLHB (MAT α ura 3-52 leu2 Δ 1 trp1 Δ 63 his3 Δ 200 lys2 Δ 385) 中实施,该菌株通过在具有六 LexA- 结合位点的双向启动子 (整合型报告质粒 pDE200, Escher 2000) 调控之下将取向相异的 LacZ 和 HIS3 报告基因整合到 his3 Δ 200 基因座、并将处于具有八 LexA- 结合位点的启动子 (来自 EGY48) 调控之下的 LEU2 报告基因整合到 leu2 Δ 1 基因座而衍生自菌株 JPY5。该报告系统的转录激活是由 scFv- 融合构建体的 Gal4-AD 部分介导的。筛选基本上如上文所述利用漏失培养基 (-Trp/-Leu/-His) 和高达 40mM 的 3- 氨基三唑浓度实施。

[0174] 实施例 2

[0175] 体内性能评价

[0176] a) 酵母中

[0177] 对于酵母中所选构架性能的定量分析 (图 1 和 3),酿酒酵母菌株 Immuna LHB 用作 pESBA-Act2 载体之上的 LexA-Gal4-AD- 融合构建体的分离的 scFvs 按照标准醋酸锂转化方案 (Agatep,1998) 转化。转化后,将细胞涂布于漏失平板 (-Trp) 上。平行接种来自数个菌落划线的 2ml 漏失培养基 (-Trp) 的过夜培养物,并于 30℃培养。将培养物在 1ml 漏失培养基 (-Trp) 中稀释至 600nm (OD600) 0.7 的光密度。它们接着于 30℃培养 2 小时。对于测定,取 100 μ l 细胞培养物,与 900 μ l 缓冲液、45 μ l 氯仿和 30 μ l 0.1% SDS 混合,震荡并于室温下温育 5 分钟。显色通过添加 0.2ml ONPG (4mg/ml) 起始,并由 0.5ml Na₂CO₃ (1M) 终止。活性通过考虑所测培养物的 OD600 以及显色的温育时间和所用的培养物体积计算。

[0178] 对至少等同于或优于阳性对照 (以前描述的极为稳定的 λ - 移植物 (Wörn, 2000 ;Auf der Maur,2001)) 的菌落进行测序,以鉴定构架亚型 (构架亚型根据 Tomlinson,

(1992), Cox, (1994) 和 Williams, (1996) 定义)。测序揭示了对某些构架亚型惊人的偏好。对于重链可变结构域 (VH), 构架亚型 2 和 6 从未见过, 并且亚型 4 在阳性菌落中显著减少。分离序列的性能经酵母胞内测定校正后, 胞内应用不仅对亚型 3, 而且还有 1a 和 1b 的 VH 构架都具有极其强烈的偏好。关于轻链可变结构域 (VL), 对 κ 1、 λ 1 和 λ 3 亚型的构架具有清楚的偏好 (图 15)。

[0179] 这些构架亚型, 即与 κ 1、 λ 1 和 λ 3 VL 结构域组合的 VH 1a、1b 和 3 因此最佳地满足胞内用途以及就 scFv 折叠特性而言具有严格要求的其它应用。用于胞内筛选系统的文库应当, 例如, 优选仅由这些构架亚型的混合物构件, 以减少在还原环境下无功能分子的数量。

[0180] b) 哺乳动物细胞中

[0181] 利用 HeLa 细胞系进行人类细胞中所选构架性能的定量分析 (图 2、4 和 7)。荧光素酶报告基因由共转染的 pGL3 (Promega) 报告质粒提供, 其含有处于天然 Gal4UAS 调控之下的荧光素酶。用于瞬时转染的哺乳动物表达载体含有 Gal4(1-147), 融合于 VP16-AD 的 C-端, 处于 CMV 启动子的调控之下。分离的 scFv 以正确的读码框克隆到 Gal4(1-147)-VP16-融合子的 C-端, 以便经表达产生 Gal4(1-147)-VP16-scFv-融合蛋白。细胞在 DMEM 中培养, 补充有 2.5% FCS 和 2mM L-谷氨酰胺。瞬时转染根据 Polyfect-方案 (Qiagen) 实施, 在 60mm 组织培养板中利用 0.01-0.1 μ g 含 scFv-构建体的载体, 0.5 μ g CMV 启动子驱动的 Gal4(1-147)-VP16-scFv 表达质粒和 0.5 μ g LacZ 表达载体用作转染效率的参照。细胞在转染后 24-48 小时收获, 重悬于 1000 μ l 缓冲液中, 并通过三次冻融循环裂解。细胞裂解物离心, 对上清利用荧光素酶测定液 (Promega) 进行荧光素酶活性测定, 并根据标准方案测定 LacZ 活性。所得的荧光素酶活性由 LacZ 活性校正, 以说明转染效率的变化。

[0182] 实施例 3

[0183] 序列比较的多重比对和分析

[0184] 为阐明适用于胞内应用的构架序列的通用模式, 分离所有阳性菌落 (即在质控系统的选择条件下生长的那些菌落), 并对编码 scFv 的部分进行测序。随后, scFv 以其轻链和重链组分进行划分, 以允许根据 Honegger (2001) 结构调整的免疫球蛋白结构域编号策略对各自的结构域进行比对 (图 12 和 13)。

[0185] 为允许对所得的数据加以阐述, 建立了代表所选文库的比对 (图 14)。为获得未选定的序列, 文库在不表达 scFv 基因的大肠杆菌细胞中转化, 并随机挑取菌落用于质粒分离和 scFv-序列的测序。文库如期涵盖了人类抗体的所有组成部分, 因而就特定亚型而言没有偏差, 与由通常见于人类的表达模式所预期的不同。

[0186] VH 和 VL 序列根据其亚群分组。亚群特异性共有序列的改变被突出显示。本领域技术人员能够根据特定交换残基的结构环境来辨别阳性、中性和阴性改变 (如 Honegger, 2001)。属于特定氨基酸组别的残基交换为同组的残基一般确认为中性交换。属于指向蛋白疏水核心的疏水氨基酸组的残基交换为极性但不带电荷或者带正或负电荷的氨基酸组的氨基酸将会是非常不利的, 因为不饱和的氢供体 / 受体位点干扰疏水核心的密堆积。此种改变因此被认为是阴性的。属于位于免疫球蛋白结构域表面的极性但不带电荷组的残基交换为带正或负电荷组的氨基酸是非常有利的, 因为蛋白的可溶性得以提高。此种改变因此

确认是阳性的,而由极性交换为疏水残基是非常不利的,因为蛋白的可溶性下降,因此确认是阴性的。在具有保守正 Φ -角的位置处,任何氨基酸交换为甘氨酸确认是阳性的,而甘氨酸交换为任何氨基酸确认是阴性的,因为甘氨酸是唯一能够形成正 Φ -角的氨基酸。因带正或负电荷的残基组的氨基酸交换为不带电荷的氨基酸所致的位置 45-53、45-100、77-100 以及 108-137 之间保守盐桥的丧失导致热动力学稳定性下降,因此认为是阴性的。

[0187] 最后,我们挑选了在质控期间优选的 7 个 VL 结构域和 4 个 VH 结构域(即表现出共有序列的最少阴性和最多阳性交换且涵盖亚群),并且每一个在酵母中都表现出高的体内性能。序列总结于图 16,并且包括两个 V κ 1(k I 27(1.x) 和 k III 25(2.x))、两个 V κ 3(k IV 103(3.x) 和 k IV135(5.x))、一个 V λ 1(k IV 107(4.x))、两个 V λ 3(a 33(7.x) 和 a43(6.x))、一个 VH1b(a33(x.3)) 和三个 VH 3(a fw10(x.2)、a43(x.4) 和 a44(x.1))。这些 VL 和 VH 结构域被改组,给出 22 个 scFv 形式的新组合(1.1、2.1、3.1、4.1、5.1、1.2、2.2、3.2、4.2、5.2、1.3、2.3、3.3、4.3、5.3、7.3、1.4、2.4、3.4、4.4、5.4、6.4)。

[0188] 实施例 4

[0189] 改组的结构域的体内性能评价

[0190] a) 在酵母和哺乳动物细胞胞内测定中的性能

[0191] 如实施例 2 所述的那样对这 22 个组合测试了其在酵母和哺乳动物细胞中的体内性能(图 3 和 4)。

[0192] b) 可溶性蛋白在酵母中还原条件下的表达

[0193] 为比较可溶性蛋白在还原条件下表达后的产量,所选的构架作为与 Gal4 AD 的融合蛋白在酵母酿酒酵母的胞浆中表达。位于 pESBA-Act2 载体上的融合构建体具有通式结构 Gal4AD-scFv。它们被如上所述转化到酵母酿酒酵母菌株 JPY9 中,并涂布于 -Trp 漏失平板中。

[0194] 接种来自含数个菌落的划线的 5ml 漏失培养基(-Trp)过夜培养物,并于 30℃ 培养。将培养物在 50ml 漏失培养基(-Trp)中稀释至 600nm(OD600)0.5 的光密度。它们于 30℃ 培养 5 小时。对于天然细胞提取物,离心收集 2.5ml 标准化至 OD600 为 3 的细胞培养物,液氮中冷冻,随后重悬于含蛋白酶抑制剂(PMSF)的 75 μ l Y-PER(Pierce)中。重悬的细胞沉淀震荡片刻,并于 20℃ 温育(轻摇)20 分钟。不溶和聚集的物质在 eppendorf 离心机中于 4℃ 以最大速度离心 10 分钟沉淀。上清与上样染料混合,加热到 100℃ 5 分钟,然后在 12% SDS-PAGE 上分离。可溶性 Gal4 AD-scFv 融合构建体由蛋白质印迹通过用抗 -Gal4AD 单克隆鼠抗体(Santa Cruz Biotechnology)作为一抗、而抗 -鼠 -过氧化物酶偶联物(Sigma)作为二抗、并利用化学发光底物(Pierce)检测 Gal4- 部分而显现(图 5)。SDS-PAGE 和蛋白质印迹操作是本领域普通技术人员众所周知的。

[0195] c) 在大肠杆菌周质中的表达行为

[0196] 为评价在大肠杆菌中的周质表达(图 6),将分离的 scFv- 构架克隆到带有 cam 抗性基因(catR)和 lacI 阻遏基因(Krebber,1997)的细菌载体上,其中 N- 端具有 pelB- 前导序列,而 C- 端具有 his- 标签,处于 lac 启动子/操纵子调控之下。感受态大肠杆菌 JM83 用这些质粒转化。在 50ml 含 35mg/l 氯霉素的 dYT- 培养基摇瓶中以 1 : 40 接种过夜培养物,并于 30℃ 温育。细胞在 OD600 为 0.8 时用 1mM IPTG 诱导,并在诱导 3 小时之后通过离心收集。沉淀重悬于 50mM Tris, pH 7.5, 500mM NaCl 中,并标准化至 OD600 为 10。对

每个 scFv 片段样品或直接（总提取物）分析或在超声破碎再离心后（可溶性级分）通过 SDS-PAGE 进行分析。可溶蛋白的含量由考马斯亮兰染色的凝胶估计。

[0197] 实施例 5

[0198] 具有优良特性的 5 个组合用于胞外用途的详细评价

[0199] 选取五个组合作为实例，它们在酵母和哺乳动物胞内测定中表现出良好性能，在酵母和大肠杆菌表达期间产生可溶性蛋白，并且涵盖了在质控期间偏好选择的亚群（2.4、4.4、5.2、6.4 和 7.3，详见图 16）。我们更为详细地分析这些组合，以进一步评价其在还原以及氧化条件下的用途。

[0200] a) 在不同哺乳动物细胞的胞内测定中的性能

[0201] 五个组合在人类细胞中性能的定量分析利用 HeLa 细胞并且额外利用人骨肉瘤细胞系 Saos-2 和人胚肾细胞系 HEK293 如实施例 2 所进行的那样实施（图 7）。

[0202] b) 体外表达和纯化的性能

[0203] 为评价体外性能，将五个优良组合在大肠杆菌周质中表达（图 6）。在 0.11 含 35mg/l 氯霉素的 dYT- 培养基摇瓶中以 1 : 40 接种过夜培养物，并于 30℃ 温育。细胞在 OD550 为 1.5 时用 1mM IPTG 诱导，并在诱导 2 小时之后通过离心收集。为纯化 scFv，将细胞沉淀重悬并通过超声裂解。在可溶蛋白的含量由考马斯亮兰染色的凝胶估计。在 SS34 中以 20krpm、4℃ 离心 30 分钟之后，将上清以 pH 7.5 施加到 Ni-MC- 亲和柱（Hi-Trap™ Chelating HP, 1ml, Amersham Pharmacia）上，并利用来自 Amersham Pharmacia 的 Äkta Basic 系统由 200mM 咪唑洗脱。scFv 片段的纯度大于 98%，如通过 SDS-PAGE 所测定的（数据未显示）。纯化蛋白的浓度利用计算的 280nm 处的消光系数确定。可溶性纯化蛋白的产量以 OD600 为 10 的 1 升培养物体积标准化，并且从 8 到超过 55mg 不等。

[0204] 聚集抗性

[0205] 聚集抗性已证明与体外的热动力学稳定性（Wörn, 1999）以及小鼠异种移植肿瘤模型的肿瘤定位效率（Willuda, 1999）有关。为了测试稳定性、聚集抗性以及解折叠可逆性，处于 50mM Tris, pH 7.5, 100mM NaCl 中浓度为 6 μM 的 200 μl 纯化蛋白样品或于 4℃ 保存 4 天或 37℃ 4 天或 4℃ 3 天，紧接着在 100℃ 温育 15 或 60 分钟，缓慢冷却至室温，并于 4℃ 过夜温育。每个样品的寡聚状态随后在由 50mM Tris, pH 7.5, 100mM NaCl 平衡的凝胶过滤柱上分析，以估计聚集体相对于单体物质的含量（图 8）。将蛋白以 100 μl 的体积在 Äkta Basic 系统（Amersham Pharmacia）中以 1ml/ 分的流速注入 Superdex-75 柱（Amersham Pharmacia）中。

[0206] 蛋白酶降解抗性

[0207] 为确定分离的构架就蛋白酶降解而言的稳定性（对于治疗应用很重要的一个参数），我们在人类血清中于 37℃ 温育纯化的构架（图 9）。

[0208] 将浓度为 50 μM 的纯化的 his- 标记的 scFv- 蛋白（见上文）在人类血清中稀释 10 倍，至 90% 血清中的终浓度 5 μM。样品然后在 37℃ 温育 3 天或 1 天，或者直接取来上样。在上样前，不溶和聚集的物质在 eppendorf 离心机中于 4℃ 以最大速度离心 10 分钟沉淀。上清由上样染料稀释 6 倍，以降低上样到凝胶上的血清的量，100℃ 加热 5 分钟，然后在 12% SDS-PAGE 上分离。可溶性 his- 标记的 scFv 片段由蛋白质印迹通过用抗-his 单克隆鼠抗体（Qiagen）作为一抗、而抗-鼠-过氧化物酶偶联物（Sigma）作为二抗、并利用化

学发光底物 (Pierce) 检测 his- 标签观察。SDS-PAGE 和蛋白质印迹操作是本领域普通技术人员众所周知的。

[0209] 实施例 6

[0210] 通过在酵母交互作用筛选系统中在构架 7.3 中筛选随机化的 CDR- 文库来选择抗原结合剂

[0211] 用交互作用系统筛选抗原结合剂基本上如以前所详述的那样进行 (Auf der Maur, 2002)。

[0212] 用于表达 scFv- 融合构建体以在酵母中进行筛选的质粒衍生自 pESBA-Act2。它含有酵母 TRP1 营养标记和 2 微米复制起点。而且它具有用于强表达的组成型肌动蛋白启动子和 GAL11 转录终止序列, 两者由多克隆位点隔开。对于细菌系统的操作, 它也具有细菌复制起点和 amp 抗性基因。

[0213] Gal4 激活结构域 (AD 氨基酸 768-881) 最初是利用 pGAD424 (Clontech) 作为模板, 用包括位于 Gal4-AD N- 端的 SV40T- 抗原核定位信号在内的引物通过 PCR 扩增的。scFv 文库利用引物随机化 VH 的 CDR3 内的 7 个氨基酸通过 PCR 扩增 scFv- 构架 7.3 而获得。所得的 PCR 产物以正确读码框克隆进构架 7.3 中, 以 V_L - 接头 - V_H 的取向存在于载体中, 作为 Gal4-AD 的 C- 端融合物。从而表达产生具有通式结构 Gal4-AD-scFv 的融合蛋白。

[0214] 在酵母菌株酿酒酵母 Immuna LHB (MAT α ura3-52leu2 Δ 1 trp1d63his3 Δ 200 lys2 Δ 385) 中实施筛选。它通过将处于具有六个 LexA- 结合位点的双向启动子调控之下的取向相异的 LacZ 和 HIS3 报告基因 (整合型报告质粒 pDE200, Escher 2000) 整合到 his3 Δ 200 基因座、并将处于具有八个 LexA- 结合位点的启动子 (来自 EGY48) 调控之下的 LEU2 报告基因整合到 leu2 Δ 1 基因座而衍生自菌株 JPY5。

[0215] 该报告系统的转录激活是继其 scFv 部分与诱饵-融合蛋白的抗原部分特异性相互作用之后, 由 scFv- 融合构建体的 Gal4-AD 部分介导的。诱饵-融合蛋白由融合于 DNA- 结合 LexA 蛋白 C- 端的人类球样激酶 1 的激酶结构域 (hPlk1-KD) 组成。激酶结构域 (氨基酸 2-332) 由 hPlk1cDNA 利用上游引物 5' -tgctctagaagtgtgtgcagtgtgactgcag-3' (Seq. Id. No. 12) 和下游引物 5' -ggttgtgtcgacttacaggctgtgtggagcaatcg-3' (Seq. Id. No. 13) 进行 PCR 扩增。所得的 PCR 产物通过 XbaI 和 SalI 被克隆到的诱饵载体中 LexA 的 C- 端。诱饵载体含有 URA3 营养标记和 Ars Cen 复制起点。诱饵-融合蛋白的表达由组成型活性的肌动蛋白启动子驱动。转录通过 GAL11 终止序列终止。诱饵蛋白也携带用于在细菌系统中增殖的细菌复制起点和 amp 抗性基因。

[0216] 对于筛选, 酵母菌株酿酒酵母 Immuna LHB 由作为位于载体 pESBA-Act2 之上 Gal4-AD 的融合物的 scFv- 文库以及提供 LexA-hPLK1-KD 融合子的诱饵载体按照标准醋酸锂转化方案 (Agatep, 1998) 共转化。在转化之后, 将细胞涂布于漏失平板 (-Trp/-Leu/-Ura)。于 30°C 温育 3 到 5 天后挑取菌落, 并在漏失平板 (-Trp/-Leu/-Ura) 上重新划线。重新长出的菌落通过在含底物 X-Gal 板的滤纸测定中的蓝色形成进行 LacZ- 表达测试。取阳性菌落用于进一步的分析, 包括从酵母中分离携带 scFv 的质粒、转化大肠杆菌 DH5 α 、从大肠杆菌单菌落中分离质粒、测序并重新转化到新鲜制备的酵母菌株 Immuna LHB 中用于下文所述的测定。所有方法根据本领域普通技术人员众所周知的标准操作实施。

[0217] 实施例 7

[0218] 来自新 scFv 构架的 Fab 构建体体内性能的评价

[0219] 为评价在不同抗体形式中使用稳定可变结构域构架的有益效果,构建 Fab 表达载体用于酵母相互作用的筛选。

[0220] a) 用于酵母胞内筛选的 Fab 构建体

[0221] 构建了两个不同的表达载体以允许不同的表达水平。所述载体以 yEplac 112(2 微米) 或 yCplac22(ars/cen) 主链 (Gietz,1988) 为基础。两者都含有酵母 TRP1 营养标记、可诱导的双向 Gal1/Gal10 启动子、用于细菌系统操作的细菌复制起点以及 amp 抗性基因。在一个方向上,构架 7.3 的 VH 结构域被克隆到包括 C-端半胱氨酸的 IgG1 的 CH1-结构域的 N-端,紧接着是接头和包括 SV40T-抗原在内的 Gal4 激活结构域 (AD 氨基酸 768-881)。在另一侧,构架 7.3 的 VL 结构域被克隆到包括 C-端半胱氨酸的 CL(λ) 结构域的 N-端。终止子为重链侧的 Gal11 终止子以及轻链侧的 Cyclin 1 终止子。

[0222] b) 酵母胞内测定中的性能

[0223] 为定量分析酵母中 s cFv 和 Fab 形式的抗原结合剂的性能 (图 1 和 3),酿酒酵母菌株 Immuna LHB 由作为载体 pESBA-Act2 上的 Gal4-AD-融合物构建体的分离的 scFv 以及含 LexA-hPLK-KD 融合子的诱饵载体按照标准醋酸锂转化方案 (Agatep,1998) 共转化。在转化之后,将细胞涂布于漏失平板 (-Trp, -Ura, Glc)。平行接种来自数个菌落划线的 2ml 漏失培养基 (-Trp, -Ura, Glc) 过夜培养物,并于 30℃ 培养。将培养物在 1ml 漏失培养基 (-Trp, -Ura, Glc) 中稀释至 600nm(OD600)0.7 的光密度。它们于 30℃ 培养 5 小时。测定如上文所述进行。

[0224] C) 酵母中还原条件下可溶性蛋白的表达

[0225] 为比较可溶性蛋白在还原条件下表达后的产量,scFv 和 Fab 构建体、连同 hPLK1-KD-诱饵载体,如上文所述在酵母菌酿酒酵母的胞浆中表达。

[0226] 它们如上文所述被转化到酵母菌株 YDE173 中,并涂布于含葡萄糖的 -Trp、-Ura 漏失平板上。

[0227] 接种来自含数个菌落的划线的 5ml 漏失培养基 (-Trp, -Ura, Glc) 过夜培养物,并于 30℃ 培养。将培养物在 YPAG 中稀释至 600nm(OD600)0.5 的光密度。它们于 30℃ 培养 7.5 小时。测定如上文所述进行。对于天然细胞提取物,离心收集 2.5ml 标准化至 OD600 为 3 的细胞培养物,液氮中冷冻,随后重悬于 75 μ l Y-PER(Pierce) 中。重悬的细胞沉淀震荡片刻,并于 20℃ 轻摇温育 20 分钟。随后不溶和聚集的物质在 eppendorf 离心机中于 4℃ 以最大速度离心 10 分钟沉淀。上清与上样染料混合,100℃ 加热 5 分钟,并在 12% SDS-PAGE 上分离。可溶性 Gal4AD-scFv 融合物和融合于 Gal4-AD 的 Fab 重链部分由蛋白质印迹通过用抗 -Gal4-AD 单克隆鼠抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 作为一抗、而抗 -鼠 -过氧化物酶偶联物 (Sigma) 作为二抗、并利用化学发光底物 (Pierce) 检测 Gal4-成分的显现 (图 11)。SDS-PAGE 和蛋白质印迹操作是本领域普通技术人员众所周知的。

[0001]

序列表

<110> ESBATECH AG

<120> 在胞内环境中表现出增强的稳定性的免疫球蛋白构架及其鉴定方法

<130> 08420PC

<150> US 60/382,649

<151> 2002-05-22

<150> US 60/438,246

<151> 2003-01-03

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体构架

<400> 1

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体构架

[0002]

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Glu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体构架

<400> 3

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

Glu Ser Ala Ala Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Thr Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys His Trp Pro Pro
85 90 95

[0003]

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体构架

<400> 4

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asp Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Gln Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体构架

<400> 5

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Leu Thr His Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

[0004]

Tyr Asp Thr Ser Lys Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体构架

<400> 6

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Val Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Asn Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体构架

<400> 7

[0005]

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Gly Gly Asn Asn Ile Glu Thr Ile Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Ser
35 40 45

Asp Asp Ser Val Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体构架

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Val Leu Arg Phe Leu Glu Trp Leu Pro Asp Ala Phe Asp

[0006]

	100	105	110
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210> 9			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗体构架			
<400> 9			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly	1	5	10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly	50	55	60
Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro	65	70	75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Phe	85	90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	100	105	
<210> 10			
<211> 123			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗体构架			
<400> 10			
Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser	1	5	10 15
Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe	20	25	30
Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly			

[0007]

35	40	45
Arg Ile Asn Pro Asp Ser Gly Asp Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln 50	55	60
Asp Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Gly Thr Val Tyr Met 65	70	75 80
Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85	90	95
Arg Val Pro Arg Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr 100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115	120	
<210> 11		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗体构架		
<400> 11		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1	5	10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85	90	95
Ala Lys Asp Ala Gly Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Phe Asp Tyr Trp 100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115	120	

[0008]

<210>	12	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	12	
	tgctctagaa gtgctgcagt gactgcag	28
<210>	13	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	13	
	ggttggtcgac ttacaggctg ctgggagcaa tcg	33

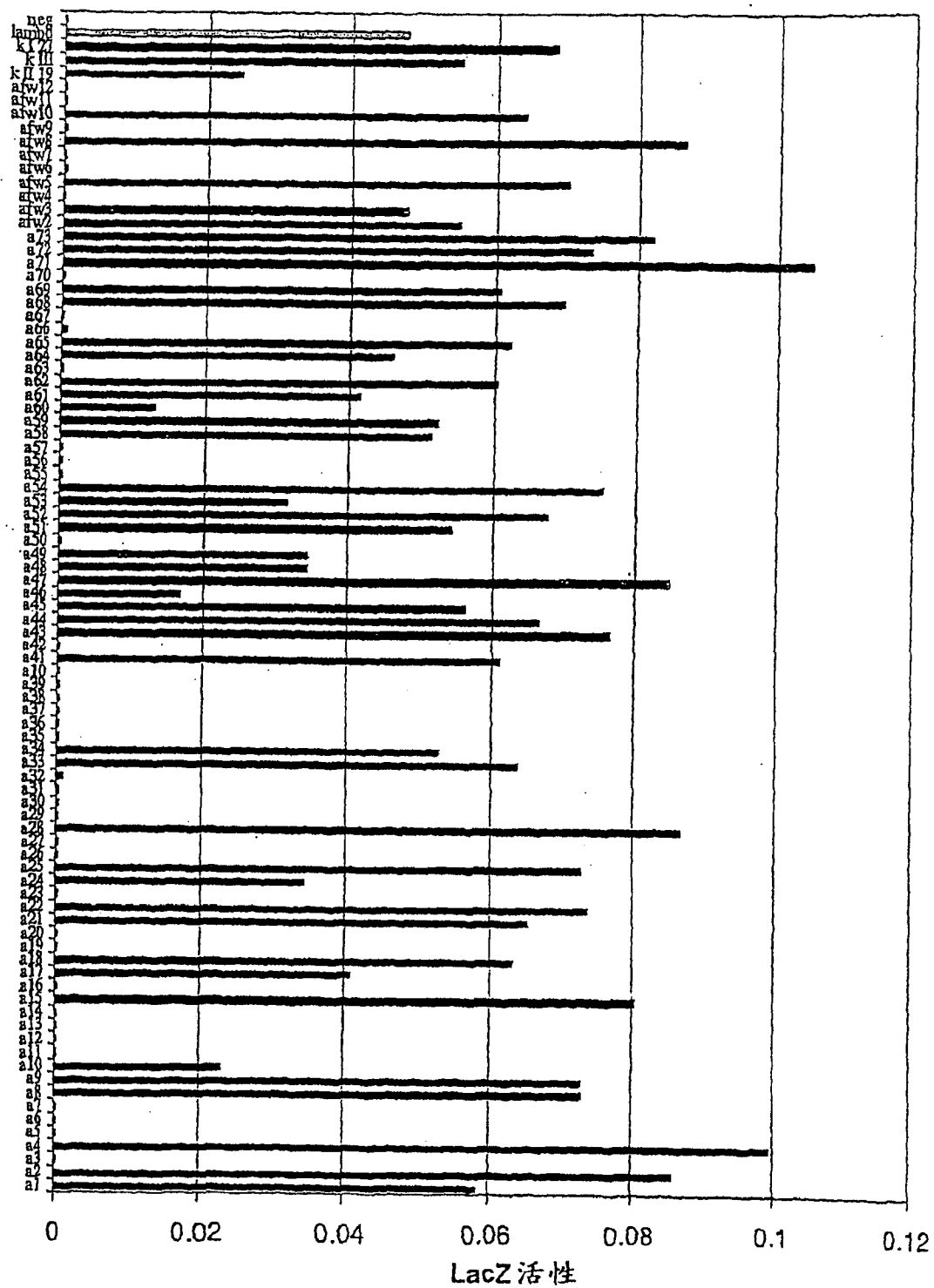
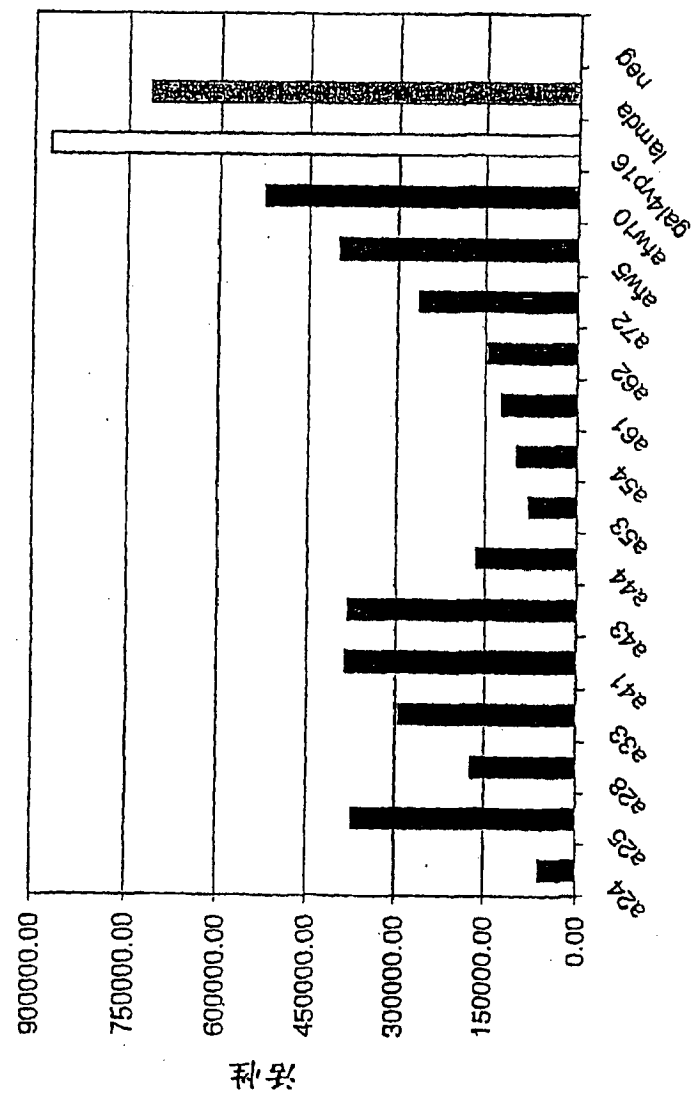


图 1



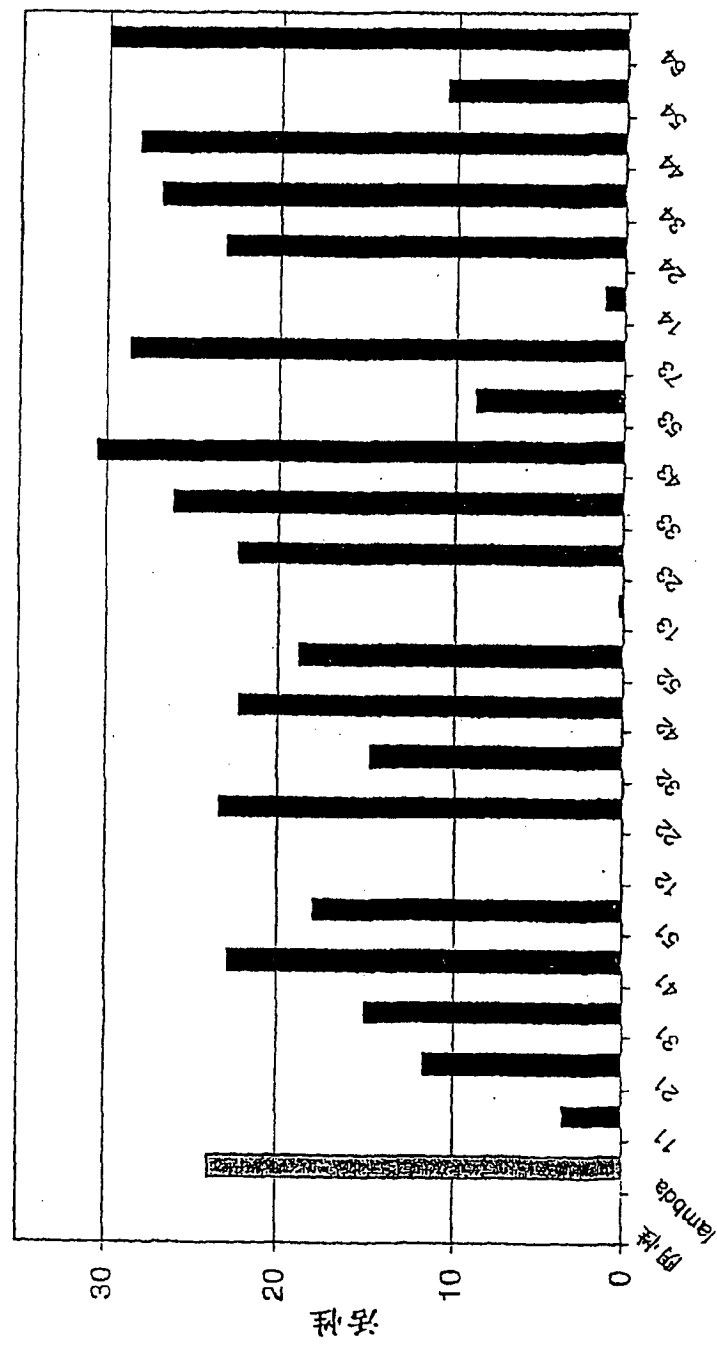


图 3

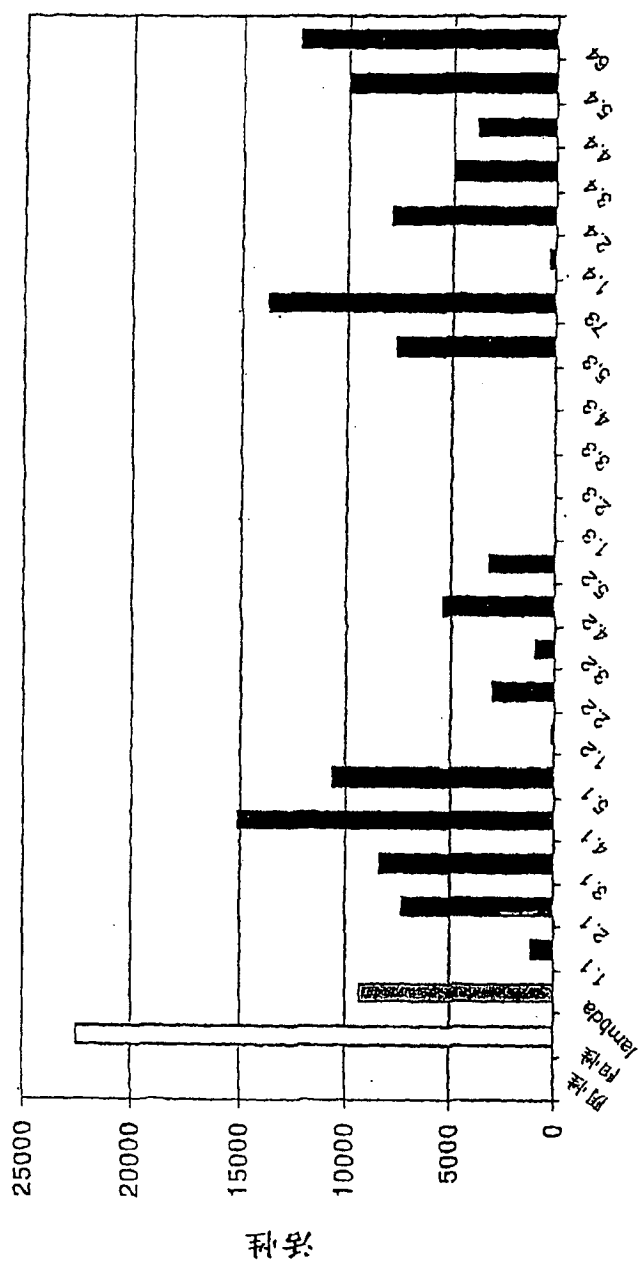


图 4

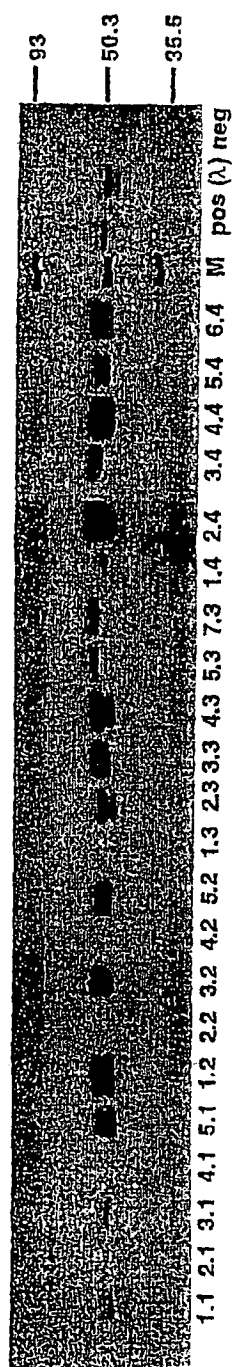


图 5

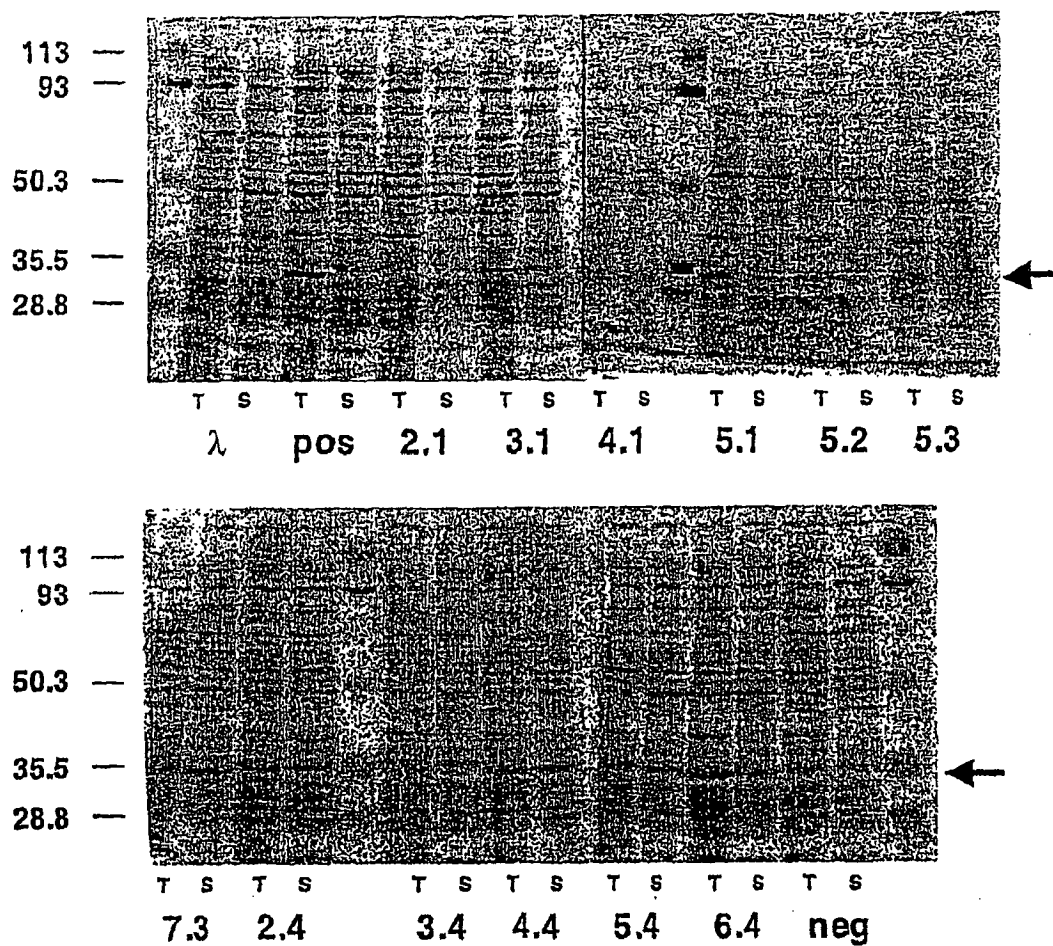


图 6

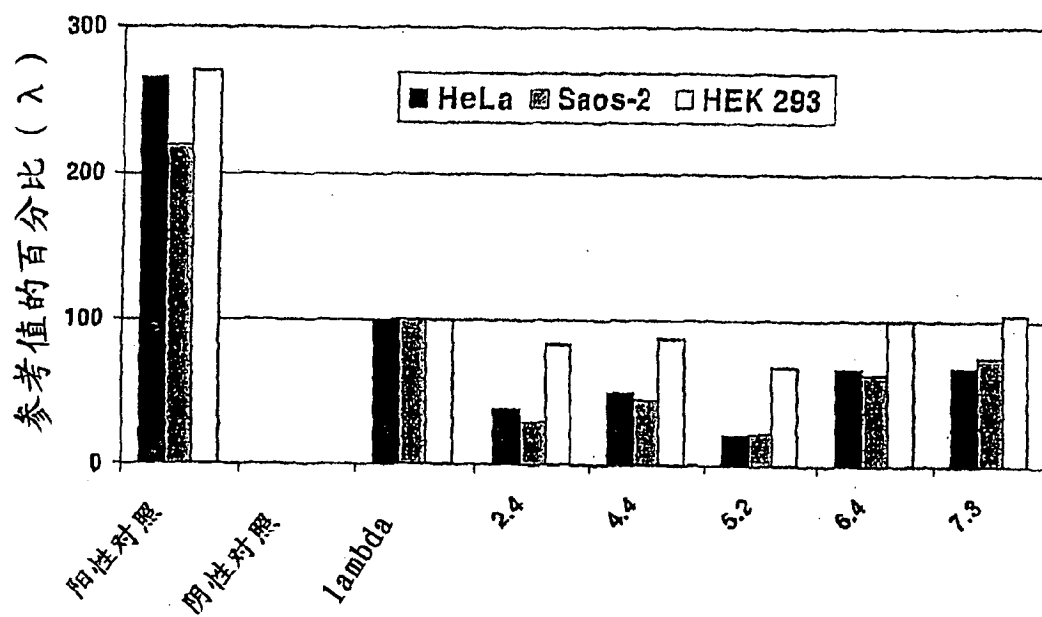


图 7

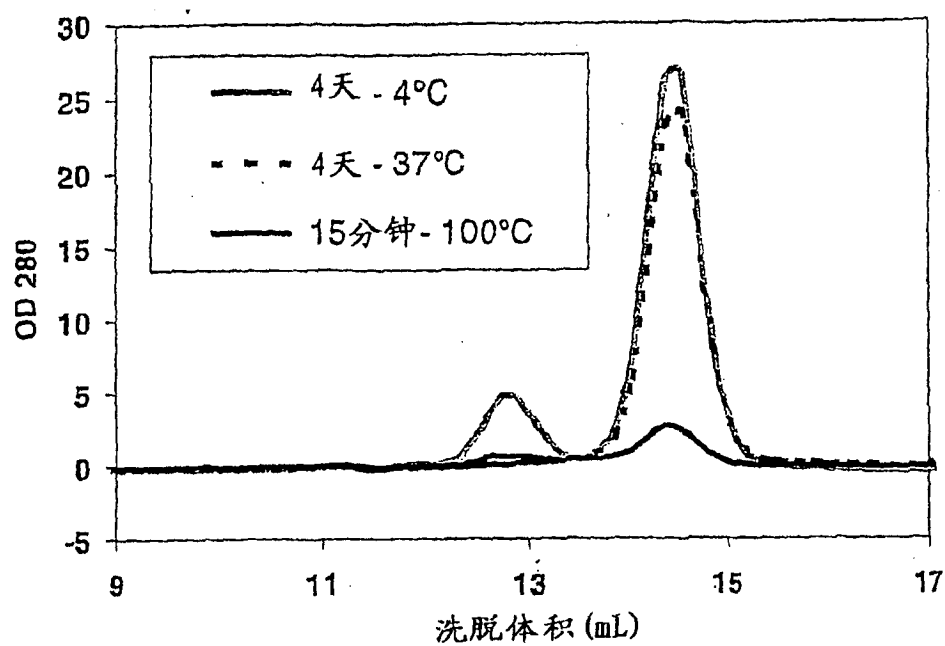


图 8A

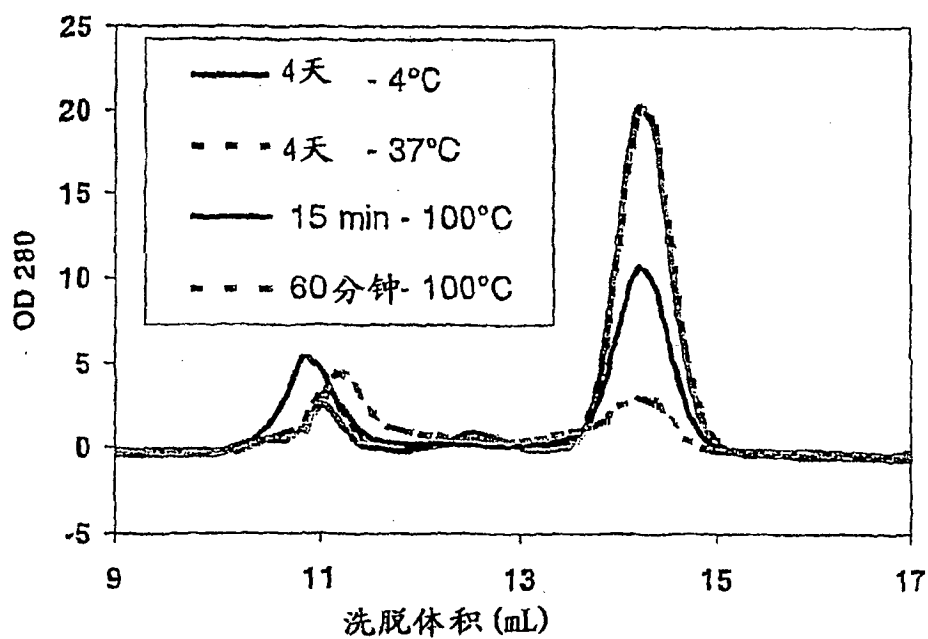


图 8B

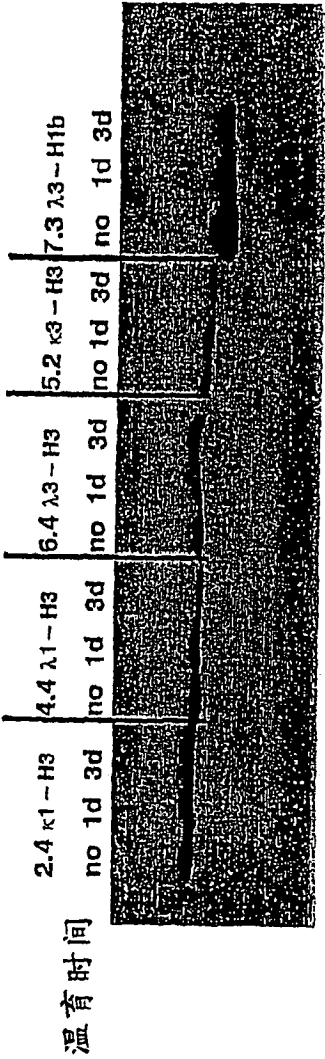


图 9

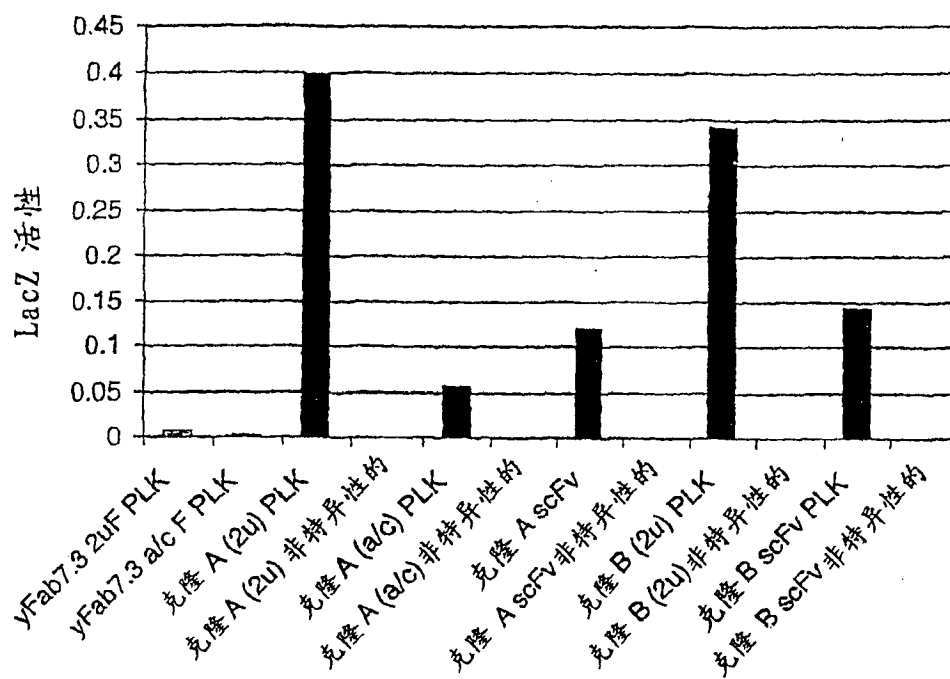


图 10

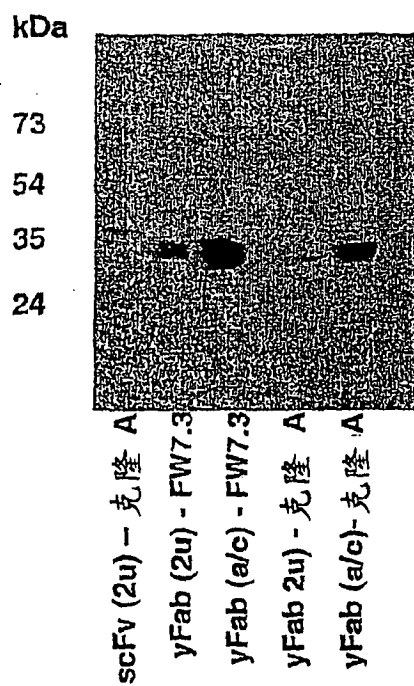


图 11

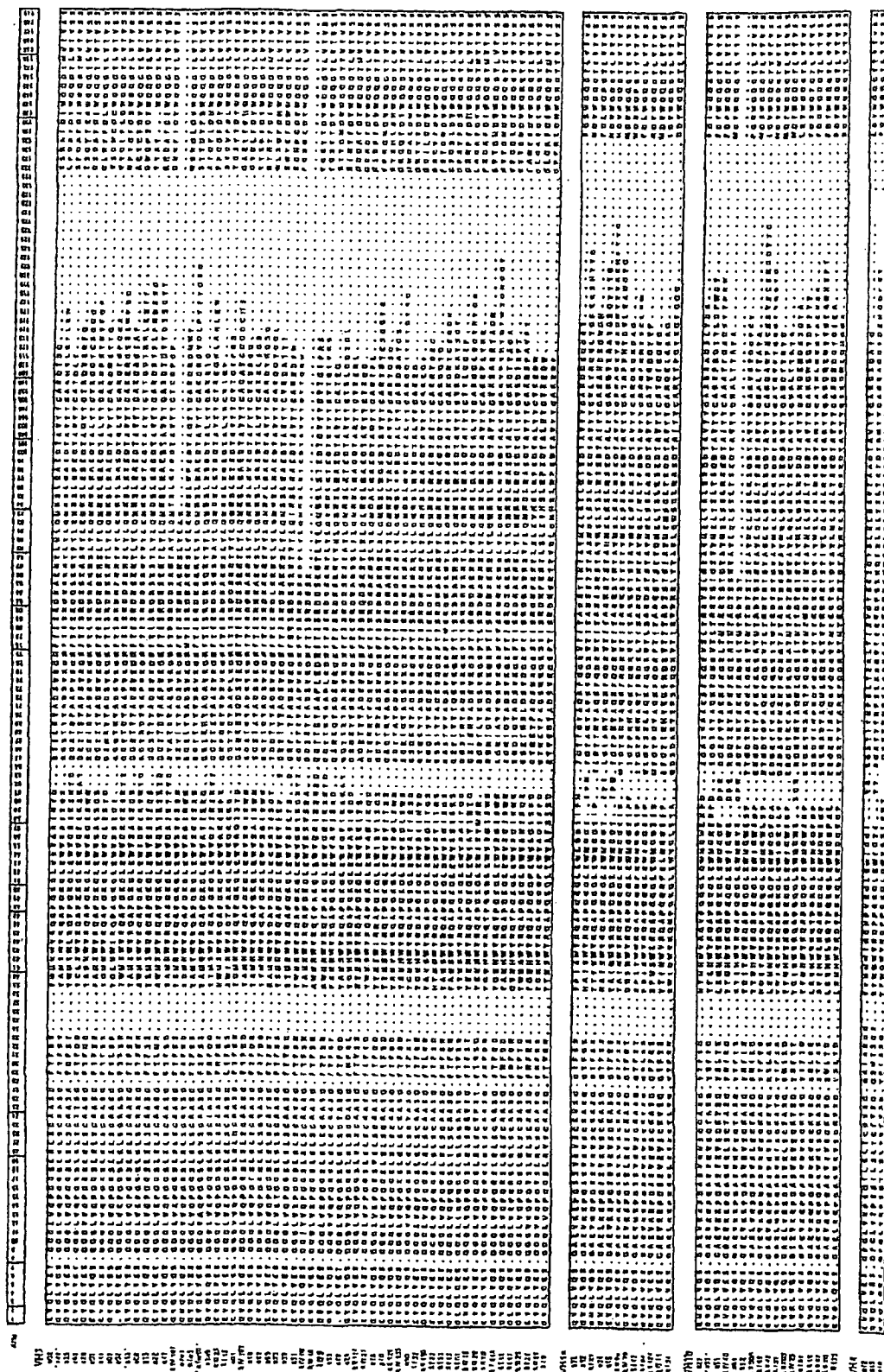


图 12

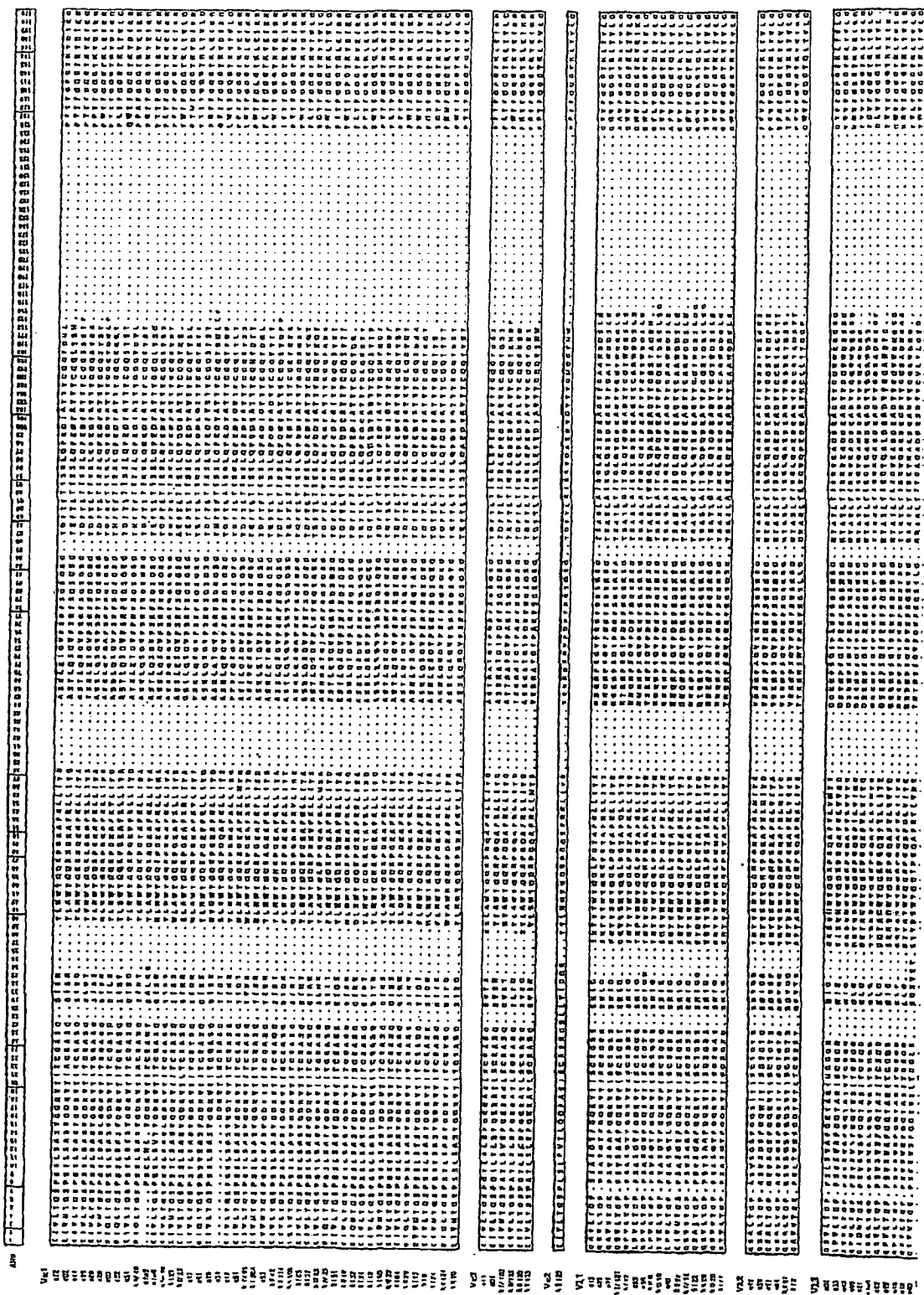


图 13

VL结构域	VL所选的	VL随机的
VL $\kappa 1$	52%	46%
VL $\kappa 2$	5%	8%
VL $\kappa 3$	5%	17%
VL $\kappa 4$	0	12.5%
VL $\lambda 1$	19%	4%
VL $\lambda 2$	5%	4%
VL $\lambda 3$	14%	8%
VH结构域	VH所选的	VH随机的
VH 1b	19%	39%
VH 1a	9%	13%
VH 2	0	0
VH 3	67%	22%
VH 4	5%	26%
VH 5	0	0%
VH 6	0	0%

图 15

用于新构架联合的VH及VL-结构域			
abb	来源	亚组	氨基酸序列
1.x	K I 27	V _k 1	EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISSW LAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFS GSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYKSY WTFGQGTKLTVLG (Seq. Id. No. 1)
2.x	K III25	V _k 1	EIVLTQSPSSLSASVGDRVLTLCRASQGIRNE LAWYQQRPQKAPKRLIYAGSILQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQYYSL PYMFGQGTKVDIKR (Seq. Id. No. 2)
3.x	K IV103	V _k 3	EIVMTQSPATLSVSPGESAAALSCRASQGVST NVAWYQQKPGQAPRLIYGATTRASGVPA RFSGSGSGTEFTLTINSLSQSEDFAAYYCQQY KHWPPWTFGQGTKVEIKR (Seq. Id. No. 3)
4.x	K IV107	V _λ 1	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDN YVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPSGIPDRF SGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWD SSLSGVVFGGGTKLTVLG (Seq. Id. No. 4)
5.x	K IV135	V _k 3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTLTHY LAWYQQKPGQAPRLIYDTSKRATGVPARF SGSGSGIDFTLTISLLEPEDSALYYCQQRNS WPHITFGGGTKLEIKR (Seq. Id. No. 5)
6.x	A43	V _λ 3	SYVLTQPPSVSVAPGQTATVTCGGNNIGSKS VHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERF SGSNSGNTATLTIRRV EAGDEADYYCQVWD SSSDHNVFGSGTKVEIKR (Seq. Id. No. 6)
7.x	A33	V _λ 3	LPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGNNIETISV HWYQQKPGQAPVLVVSDDSVRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDYVVFGGGTKLTVLG (Seq. Id. No. 7)

图 16

x.1	A44	VH3	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAHVLRHLEWLPDAFDIWG QGTLVTVSS (Seq. Id. No. 8)
x.2	Afw10	VH3	EIVLTQSPSSLSASLGDRVTTTCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSSQSGVPSR FRGSESGTDFLTISNLQPEDFATYYCQQS YRTPFTFGPGTKVEIKR (Seq. Id. No. 9)
x.3	A33	VH1b	VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYST GYFLHWVRQAPGQGLEWMGRINPDSDTI YAQKFQDRVTLTRDTSIGTVYMELTSLTSD DTAVYYCARVPRGTYLDPWDYFDYWGQ GTLVTVSS (Seq. Id. No. 10)
x.4	A43	VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDAGIAGTGFDFYWGQG TLVTVSS (Seq. Id. No. 11)

图 16(续)