



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104583238 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201380044710. 8

(22) 申请日 2013. 08. 30

(30) 优先权数据

61/695, 664 2012. 08. 31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/067979 2013. 08. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/033252 EN 2014. 03. 06

(71) 申请人 阿尔金-X 有限公司

地址 荷兰布雷达

(72) 发明人 约翰内斯·约斯夫·威廉默斯·德哈德

克里斯托夫·弗雷德里克·杰罗姆·布朗什托

塞巴斯蒂安·保罗·万德沃宁

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

C12N 15/10(2006. 01)

C40B 40/08(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表10页

(54) 发明名称

用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法

(57) 摘要

本发明公开了用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法。所述方法包括如下步骤：建立针对来自第一物种（例如人）之靶抗原的第一免疫文库；在链改组方案中组合来自第一免疫文库的可变区以产生第二免疫文库；并针对与靶抗原和来自第二物种的相应抗原两者的亲和力来筛选第二免疫文库。第二物种不同于第一物种。通过使用合适的受试动物作为第二物种，所述方法为抗体分子的方便测试铺平了道路。

1. 一种用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法，所述方法包括以下步骤：

- a. 建立对来自第一物种的靶抗原具有特异性的第一免疫文库；
- b. 在链改组方案中组合来自所述第一免疫文库的可变区以产生第二免疫文库；
- c. 在所述第二免疫文库中鉴定与所述靶抗原和来自第二物种的相应抗原反应的抗体分子；

其中所述第二物种不同于所述第一物种。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中用于步骤 b 之链改组方案的可变区获得自一只动物个体。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述第一免疫文库获得自用所述靶抗原感染之所述第一物种的成员。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述第一免疫文库获得自用所述靶抗原免疫之第三物种的动物。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述第一物种和所述第三物种相同。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述第一物种与所述第三物种不同。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述第一物种是人。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法，其中所述第三物种属于骆驼科 (camelidae)。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述第三物种是大羊驼。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述第二物种是啮齿类动物。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述第二物种是小鼠。

12. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法，其中所述第二物种是非人灵长类动物。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述第二物种是食蟹猴 (Cynomolgus)。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述第一物种是人并且所述靶抗原是人 IL22R。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述第三物种属于骆驼科。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述第二物种是啮齿类动物。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述第二物种是小鼠。

18. 抗体分子，其通过权利要求 1 所述的方法获得。

19. 根据权利要求 18 所述的抗体分子，其与人 IL22R 和非人 IL22R 反应。

20. 根据权利要求 18 所述的抗体，其 VH 序列与 SEQ. ID. No. 1、13 或 14 具有至少 90% 同源性。

21. 根据权利要求 18 所述的抗体，其 VL 序列与 SEQ. ID. No. 11 或 12 具有至少 90% 同源性。

22. 根据权利要求 18 所述的抗体，其 Vκ 序列与 SEQ. ID. No. 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 中至少之一具有至少 90% 同源性。

23. 抗体，其与权利要求 20、21 或 22 所述的抗体竞争性地与人 IL22R 结合。

24. 抗体，其与权利要求 20、21 或 22 所述的抗体竞争性地与鼠 IL22R 结合。

用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法

[0001] 发明背景

[0002] 1. 技术领域

[0003] 本发明一般性涉及采用抗体链改组来产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体的方法。

[0004] 2. 相关领域描述

[0005] 用于设计和产生抗体,特别是单克隆抗体的技术在本领域中已有描述。可以将单克隆抗体设计成选择性地与特定抗原结合。这样的抗体可用于利用抗体的结合亲和力和选择性的诊断和 / 或治疗方法中。

[0006] Dreier 等的美国专利申请公开 2011/0300140 公开了用于产生骆驼科动物 (camelid) 来源的常规抗体的方法,所述方法包括用抗原来免疫骆驼科动物物种,例如大羊驼 (llama)。已经发现,特别是完全远交 (outbred) 的骆驼科动物物种产生稳健 (robust) 的免疫应答,产生靶标特异性抗体的多样性文库,所述靶标特异性抗体的特征在于对靶抗原的高亲和力。

[0007] 此外,已经发现常规骆驼科动物抗体拥有这样的可变结构域,所述可变结构域与人种系抗体的相应可变结构域具有出乎意料的高序列同源性。而且,骆驼科动物抗体与人抗体具有出乎意料的高结构相似性。因此,骆驼科动物抗体需要很少的突变即可将可变结构域的人特征升高至这样的水平,其中免疫原性的水平为可接受的低。这些很少的突变对抗体针对靶标的亲和力具有很小的作用或没有作用。

[0008] Dreier 等的美国专利申请公开 2011/0165621 公开了用于人源化骆驼科动物来源的抗体的方案。

[0009] 已经开发出若干技术来模拟存在于活动物之免疫应答中的亲和力成熟。一旦将这样的技术称为“链改组”,早就认识到链改组作为用于从抗体之重链或轻链的文库中产生新抗体的手段,所述抗体在例如初次免疫应答中获得。可使用筛选方法来针对亲和力和选择性对链改组方案中获得的抗体进行选择。以这样的方式,可产生具有与亲本抗体相比更高亲和力和 / 或靶标选择性的抗体。参见,例如, Kang 等,“Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries”Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88(1991),11120-11123。还可以将链改组用于通过表位印迹 (imprinting) 的抗体人源化。

[0010] 为了在人类中的诊断和 / 或治疗用途,正开发大量抗体。因此,可针对这些抗体与人抗原结合的能力来产生和筛选这样的抗体。对于这样的抗体在实验室环境中的测试,高度期望这样的抗体还与在非人动物物种 (特别是在实验室实践中常用的动物物种,例如啮齿类动物,特别是小鼠) 中存在的相应抗原结合。

[0011] 因此,需要用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法。

发明内容

[0012] 本发明通过提供用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法而解决了该需求,所述方法包括以下步骤:

[0013] a. 产生对来自第一物种的靶抗原具有特异性的第一免疫文库;

[0014] b. 在链改组方案中组合来自所述第一免疫文库的可变区以产生第二免疫文库;

[0015] c. 在所述第二免疫文库中鉴定与所述靶标抗原和来自第二物种的相应抗原反应的抗体分子;

[0016] 其中所述第二物种不同于所述第一物种。

[0017] 在一个优选的实施方案中,第一物种是人,并且第一免疫文库是针对人抗原建立的。在该优选的实施方案中,第二物种是非人动物,优选为常用的实验室动物,例如小鼠。

[0018] 本发明的另一个方面是具有物种间、靶标内交叉反应性的抗体分子。

[0019] 发明详述

[0020] 以下是本发明的详细描述。

[0021] 定义

[0022] 术语“抗体”、“抗原”、“靶抗原”、“特异性”、“亲和力”、“骆驼科动物物种”、“VL 结构域”、“VH 结构域”、“可变结构域”、“L1”、“L2”、“L3”、“H1”、“H2”、“H3”、“框架区”、“恒定结构域”和“高变环”以及本文中使用的其他特定术语如在 Dreier 等的美国专利申请公开号 2011/0300140 中所定义,所述专利的公开内容通过引用并入本文。术语“抗体分子”是指与靶抗原免疫反应和/或表现出与靶抗原特异性结合的包含 VH 结构域和 VL 结构域的任何多肽。实例包括抗体、免疫球蛋白和抗体片段。

[0023] 本文使用的术语“免疫文库”是指抗体分子的集合。可通过合适的载体(例如噬菌体、质粒或噬菌粒载体)来展示抗体分子。在 J. Brichta 等, Vet. Med. -Czech, 50, 2005 (6): 231-252 中综述了用于建立免疫文库的技术,其公开内容通过引用并入本文。

[0024] 本文使用的术语“链改组”是指这样的技术,其用于通过提供来自文库的抗体片段来增加抗体文库的多样性;在展示工具(例如噬菌体展示)中表达所述片段;以及将所表达的片段重组到抗体分子中。可针对与靶抗原 X 的结合,针对相对缺乏的与竞争抗原(rival antigen)Y 的不期望结合,或者两者来筛选所得的抗体分子。链改组是用于产生对靶标具有更高亲和力或者更高结合特异性或者两者之抗体的通常使用的技术。还可将链改组用作获得自非人物种(例如小鼠)之抗体的人源化方案。在 Kang 等,“Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries”Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(1991), 11120-11123 中讨论了链改组技术,其公开内容通过引用并入本文。

[0025] 可用任何类型的抗体片段来进行链改组,所述抗体片段例如高变环、互补决定区(CDR)、轻链可变结构域、重链可变结构域等。例如,可用一条重链来改组轻链文库,或者可用一条轻链来改组重链文库。

[0026] 术语“交叉反应性(cross-reactivity)”通常用来描述抗体分子与抗原之间的非特异性结合。例如,设计为与抗原 X 结合的抗体 X 还可表现出与抗原 Y 结合。则认为抗体 X 与抗原 Y 交叉反应。如果抗原 X 和抗原 Y 是来自相同物种的抗原,那么这种类型的交叉反应性可称为“靶标间、物种内”交叉反应性。术语“靶标间”是指与不同靶标的交叉反应性。术语“物种内”是指靶标或抗原来自相同物种。这种类型的交叉反应性通常是不期望的,因

为非预期的与抗原 Y 结合有损于并且可干扰与抗原 X 的期望结合。此外,非预期的与抗原 Y 结合可干扰抗原 Y 的正常功能,因此引起不期望的副作用。

[0027] 当设计为与第一物种的抗原 X(例如人 X 或 hX) 结合的抗体还与第二物种的抗原 Y(例如鼠 Y 或 mY) 结合时存在交叉反应性的另一种形式。可将其适当地称为“靶标间、物种间交叉反应性”。这种类型的交叉反应性可具有令人感兴趣的科学意义,并且可用于例如表位作图但是在其他方面没有很大价值。

[0028] 当设计为与第一物种的抗原 X(例如人 X,或 hX) 结合的抗体还与第二物种的相应抗原 X(例如鼠 X,或 mX) 结合时存在交叉反应性的又一种形式。可将其适当地标注为“物种间、靶标内交叉反应性”。这种类型的交叉反应性有很大的实践价值,因为其允许使用第二物种(在该实例中为小鼠)在为人治疗和/或诊断用途所开发之抗体的研究中作为动物模型。

[0029] 实际上,基于在靶标亲和力和特异性方面所期望的特性来筛选和选择抗体。所选择的候选者是否具有期望的物种间、靶标内交叉反应性本质上看运气(the luck of the draw)。迄今为止,认为不存在将这种类型的交叉反应性改造到抗体分子中的方法。

[0030] 现在已经发现可使用链改组来产生具有特异性期望之物种间、靶标内交叉反应性的抗体分子。因此,在其最一般的范围内,本发明涉及用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0031] a. 建立对来自第一物种的靶抗原具有特异性的第一免疫文库;

[0032] b. 在链改组方案中组合来自所述第一免疫文库的可变区以产生第二免疫文库;

[0033] c. 在所述第二免疫文库中鉴定与所述靶抗原和来自第二物种的相应抗原反应的抗体分子;

[0034] 其中所述第二物种不同于所述第一物种。

[0035] 可通过任何合适的方法来确认来自第二文库的抗体是否与靶抗原和来自第二物种的相应抗原反应,所述任何合适的方法包括直接方法(例如结合测定),或者用于测试结合相关功能性的间接方法。

[0036] 应理解的是,第一物种通常是产生抗体分子的物种。在许多情况下,该物种将是人,但是原则上所述第一物种可以是将会受益于抗体分子有效性的任何物种,例如饲养和伴侣动物等。为了本文件的目的,第一物种将假定为人,但是读者应记住这无意于进行限制。

[0037] 可以以任何合适的方式从第一物种中获得第一免疫文库。例如,免疫文库可以是获得自一名或更多名健康志愿者的原初文库(**naïve** library);或者其可以获得自以天然方式用靶抗原感染的供体。如果第一物种是人,则通常伦理上不可能从用靶抗原有意感染的供体建立第一免疫文库。

[0038] 在一个替代实施方案中,第一免疫文库获得自靶抗原所免疫之第三物种的动物。第三物种可与第一物种相同或不同。如果第一物种是人,那么第三物种通常不同于第一物种。例如,第三物种可以是骆驼科(Camelidae)的成员或骆驼科动物。在一个优选的实施方案中,第三物种是大羊驼。

[0039] 已经发现,骆驼科动物特别适于产生第一免疫文库,原因很多。人靶抗原通常在骆驼科动物中引起强大的免疫应答。此外,完全远交的骆驼科动物可容易地用于免疫;使用

完全远交的动物有助于建立高度多样性的免疫文库。如之前所报道,获得自骆驼科动物物种的抗体的可变结构域与相应人可变结构域具有高度的序列同源性,以及高度的结构同源性。因此,这样的抗体需要很少的突变或者不需要突变来降低其免疫原性,使得很少存在损失对人靶标的高度亲和力的风险。

[0040] 特别地,获得自骆驼科动物的免疫文库的高多样性显著地提高了通过本发明的方法成功建立交叉反应性的概率。

[0041] 以本领域已知的任何方法来产生和选择第一免疫文库的抗体。例如,从供体动物收获成熟 B 细胞;收集并表达 RNA;针对与靶抗原的亲合力来筛选抗体片段;对所选择的抗体进行测序和扩增。另一些方法包括使用杂交瘤技术和克隆;B 细胞分选和转染等。

[0042] 第一免疫文库可具有任何合适的形式。例如,第一免疫文库可以为来自第一免疫文库的抗体之可变区的一个或更多个噬菌体展示文库的形式。例如,这些可变区可以是轻链和重链。

[0043] 可使用任何链改组方案来产生第二免疫文库。应理解的是,尽管所述方法的链改组步骤的目的是产生具有物种间、靶标内交叉反应性的抗体分子,但是可期望或者甚至必须确认与靶抗原的结合得以保持。还可期望针对与第一免疫文库的抗体分子相比改善的选择性来从第二免疫文库进一步选择抗体分子。除了获得期望的靶标内、物种间交叉反应性之外,链改组还可产生对靶抗原的物种内同源物具有亲和力的抗体。

[0044] 期望地,获得自第二文库的抗体与靶抗原的结合亲合力至少等于,优选为优于由第一文库的大部分反应性抗体分子所表现出的与靶抗原的结合亲合力。为此目的,可期望使用单个重链来进行轻链改组,以使得来自第二文库的抗体分子可能如第一个文库的抗体分子所做的那样与靶抗原的相同表位结合。

[0045] 还已经发现,如果用于轻链改组的轻链和重链是从相同的动物个体获得的,那么在第二文库中产生较高的亲合力。

[0046] 本发明方法的一个关键步骤是在第二免疫文库中鉴定对来自第二物种的抗原具有阈值活性的抗体分子,所述来自第二物种的抗原对应于来自第一物种的靶抗原。还关键的是,第二物种不同于第三物种。

[0047] 第二物种的选择主要取决于所寻求的交叉反应性之目的。通常,物种间、靶标内交叉反应性的有用性在于其提供抗体分子的动物测试的途径。在许多情况下,可期望使用易于饲养和照顾的动物,例如啮齿类动物,特别是小鼠。在另一些情况下,选择第二物种的决定性因素可以是在该物种中存在成熟的疾病模型,其在许多情况下还是小鼠。此外,在啮齿类动物(特别是小鼠或大鼠)中的初期毒性研究比在例如非人灵长类动物中的研究便宜得多。但是也可以有需要与啮齿类动物之外的物种之交叉反应性的其他因素。本发明方法的本质是其提供具有物种间、靶标内交叉反应性的抗体分子。如何最好地利用该特征基于具体情况来决定。

[0048] 在一个替代实施方案中,第二物种是非人灵长类动物,例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)。非人灵长类动物比啮齿类动物更难以饲养并且更难以照顾,但是非人灵长类动物进化得更接近于人类,使得其常常更适用于开发人用途的抗体分子。

[0049] 应理解的是,本发明方法还可用于产生对于两个不同物种具有物种间、靶标内交叉反应性的抗体分子,例如针对靶标 hX 的人抗体分子具有对小鼠以及食蟹猴中之相应抗

原的交叉反应性。

[0050] 在本发明的一个高度具体的实施方案中,第一物种是人,并且靶抗原是人白介素 22 受体 (hIL22R)。在该高度具体的实施方案中,第二物种是啮齿类动物,更具体地为小鼠,并且相应的抗原是小鼠白介素 22 受体 (mIL22R)。第三物种是骆驼科成员,例如原驼 (Lama guanaco)。

[0051] 说明性实施方案 / 实施例的描述

[0052] 用重组人 IL22R1 (R&D 系统, cat 2770-LR) 来免疫两只大羊驼。在每周注射六次重组蛋白质之后,采集血液,收获 PBMC,并提取其 RNA。在随机引发的 cDNA 合成之后,使用包含额外克隆位点的特异性引物来 PCR 扩增免疫球蛋白重链和轻链的可变区和第一恒定结构域。

[0053] 用 ApaLI 和 AscI 来消化经 PCR 扩增的轻链,而用 SfiI 和 NotI 来消化经 PCR 扩增的 VH-CH1。如由 de Haard 等 (JBC 1999) 和 Dreier 等的美国专利申请公开号 2011/0300140 所述将两者均克隆到噬菌粒载体 pCB3 载体中。

[0054] Fab 文库的多样性在 10^8 与 10^9 之间。产生噬菌体并在 IL22R 上进行噬菌体展示选择。为了选择 IL22R 特异性克隆,将 IL22R 直接包被在 MaxiSorp™板 (Nunc) 上或者用非竞争性抗人 IL22R 抗体 (MAB2770, R&D 系统) 捕获或者在生物素化 (biotinylation) 之后用中性抗生物素蛋白 (neutravidin) 捕获。通常以两个不同的浓度进行 IL22R 的包被和捕获;例如 $5 \mu\text{g/ml}$ 和 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 。如现有技术所述进行噬菌体展示选择。

[0055] 在两轮和三轮之后,观察到所有文库中的剂量依赖性富集;在第二轮之后达 100 倍并且在第三轮之后达 10,000 倍。值得注意的是,与直接包被的 IL22R 上的那些相比在抗体捕获的 IL22R 上的富集明显较高。这可能是由于 IL22R 为仅 25kDa,而且直接包被影响其构象或限制可用之表位的事实。因此,使用生物素化的 hIL22R 来进行选择活动。在选择之后,挑取单个克隆并测试在细菌周质中表达的 Fab 与 IL22R 和小鼠 IL22R (R&D 系统, cat. 4294-MR) 结合的能力以及竞争 IL22 结合的能力。

[0056] 对克隆的 VH-CH1 和轻链进行测序,所述克隆对于一个或多个所提及的特征呈阳性。通常,发现不同的 VH-CH1 属于不同的 VH 家族 (由 CDR3 长度和序列同源性所限定)。发现每个 VH 家族与若干个轻链家族 (由框架亚型、CDR3 长度和序列同源性所限定) 配对。将最感兴趣的 Fab 克隆的 V 区与人恒定结构域相融合。将编码单克隆抗体的 DNA 转染到哺乳动物细胞中以允许产生和纯化抗体。然后在细胞上测试经纯化抗体的生物活性。能够阻断具有最高效力的 IL22R 的抗体是治疗性抗体的最佳候选者。

[0057] 治疗性抗体的开发需要在进入人体之前在不同动物物种中的若干功效和毒性研究。因此,非常期望抗体与啮齿类动物并且特别是小鼠 IL22R 结合以产生在体内的概念证明。对抗体对不同远缘物种 (像小鼠和人类) 的交叉反应性的鉴定并不明显,原因是两个物种之间相对低的序列同一性 (77%)。事实上,一些抗体 (例如 170B2) 是人 IL22R 的非常有效的阻断物,但是对小鼠 IL22R 没有作用。为了引入小鼠对 170B2 的交叉反应性,我们使用链改组方法,之后对生物素化的小鼠 IL22R 进行选择。

[0058] 对于链改组,将 170B2 的 VH-CH1 引入获得自相同大羊驼 (从其中获得初始的 170B2) 的大羊驼轻链文库载体中。对于选择,将人和小鼠细胞因子受体生物素化并用于选择展示出与小鼠 IL22R1 交叉反应之 Fab 的噬菌体。用中性抗生物素蛋白包被 96 孔

MaxiSorp™板 (Nunc) 以捕获生物素化的 IL22R1。在两个不同浓度下捕获小鼠以及人 IL22R1 以用于选择。针对人 IL22R1 进行选择以确定交叉反应性克隆的选择是否以与人靶标结合为代价而发生。用捕获的 IL22R1 孵育噬菌体文库两个小时,然后洗去未结合的噬菌体。通过胰蛋白酶消化来收获结合的噬菌体 (噬菌体产出)。随后,拯救 (rescue) 噬菌体产物并使用对数期大肠杆菌 (E. coli) TG1 细胞来滴定。进行多至三轮选择。针对小鼠 IL22R1,观察到 170B2V κ 改组文库的大量富集:在第一轮之后 100 倍,在第二轮之后 1,000 倍,并且在第三轮之后 10,000 倍。

[0059] 在选择之后,针对小鼠和人 IL22R 结合来筛选单个克隆。对阳性克隆进行测序,并且将一些重新改换形式 (reformat) 为单克隆抗体以在基于细胞的测定中表征。

[0060] 表 1 包含原代克隆的 VH 序列和针对小鼠 IL22R 选择的克隆的 V κ 序列

[0061]

克隆	V κ	SEQ ID
VH_170B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSWMYWVRQAPGKGLEFVSVINTRSGI THYVESVKGRFTISTDNAKNTLFLQMNSLKSEDTAVYYCATRIQGLIDYWGGGTQVT VSS	No. 1
VK_170B2	LDIVMTQSPSSLSVSLGDRVITTCQASQSIGSVNALAWYQQKPGQSLKLLIHGASRLQ TGVPSRFSGSGSGTSFTLAISGVEAEDLATYYCLQDYAWPLTFGQGTKVELK	No. 2
VK_198C9	LDIVMTQSPSSLSASLGDRVITTCQATQSISTFLSWYQQKPGQTPKLLVYGASRLQTG VPSRFSGTSGSGTKFTLTISGVEAEDLASFYCLQDYSWPLTFGQGTKVELK	No. 3
VK_197B7	LDIVMTQSPSSLSASLGDRVITTCQASQSIRSFIDWYQQKPGQAPKLLIYGTSRLETGV PSRFSGTSGSGTSFTLTISGVEAEDLATYYCLQDYSWPLTFGQGTKVELK	No. 4
VK_196F8	LDIQMTQSPSSLSASLGDRVITTCQASQSISSMLAWYQQKPGQAPNLLIYGASRLQTG VPSRFSGSRSGTSFTLTISGVEAEDLATYYCLQDYSWPLTFGQGTKVELK	No. 5
VK_198B7	LDIQMTQSPSSLSASLGDRVITTCQASQSISSQLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTG VPSRFSGSGSGTSFTLTISGVEAEDLATYYCLQDYSWPLTFGQGTKVELK	No. 6
VK_196C2	LDIQMTQSPSSLSASLGDRVITTCQASQSISSLLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTGV PSRFSGSGSGTSFTLTISGVEAEDLATYYCLQDYSWPLTFGQGTKVELK	No. 7
VK_198G11	LDIVMTQSPSSLSASLGDRVITTCQASQSIRSSLNWYQQKPGQAPKLLIYGASRLRIGV PSRFSGSASGTSFTLTISGVESEDATYYCLQDYTWPLSFGSGTRLEIK	No. 8
VK_197D3	LDIQMTQSPSSLSASLGDRVITTCQASQSIRSSLNWYQQKPGQAPKLLIYGASRLRIG VPSRFSGSASGTSFTLTISGVEAEDLATYYCLQDYAWPLTFGQGTKVELK	No. 9
VK_197G10	LDIQMTQSPSSMSASLGDSVTISCQASENIGTQLFWYQQNAGQPPKLLIYGASRLQT GVPSRFSGSGSGTFTLTISGVETGDLATYYCLQDYSWPLTFGQGTKVELK	No. 10

[0062] 表 2 示出在基于细胞的测定中 biacore 和效力之亲和力的汇总表

[0063]

mAb	与 IL22R1 结合		K _D (M) biacore		效力 (pM)	
	人	小鼠	hIL22R	mIL22R	BW-hIL22R	BaF3-mIL22R
170B2	是	否	1.2E-10	-	106	-
197G10	是	是	2.9E-10	4.5E-10	124	790
197D3	是	是	8.9E-11	3.7E-10	57	+
196C2	是	是	8.0E-11	4.5E-10	67	870
197B7	是	是	3.8E-11	3.9E-10	69	160
196F8	是	是	1.0E-11	3.1E-10	87	105

[0064]

允许小鼠 IL22R 结合的轻链的序列比对

克隆	IC50pM	mIL22R
VK_170B2 (~106)	-	
VK_198C9 (39)	+	LEIVMTQSPSSLSVSLGDRVTITCAASGSSIGSVNAIAWTCQKPEPSIKLIHQASFLQFVPSRFSSGSGSTFTLAHGVDAEDLATYCLQDIAMHLITFQSTKAVELK
VK_197B7 (69)	+++	LEIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCAATQSIISTF--TSWYQOKPGQTEKLIIVYGASRLQTVGPRKFTGSGKFTLTISGVFAEPLASVFCLODSWELITFGSTKVELK
VK_196E8 (87)	+++	LEIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCAASGSIKSF--TDWYQOKPGDAEKLIYTSKILFTGPRERFTGSGSTFTLAHGVDAEDLATYCLQDIAMHLITFQSTKAVELK
VK_198B7 ND	+/+	LINQMTQSPSSLSASIGDRVTITCAASGSISSW--TAWYQOKPGDAEKLIYTSKILQVGSFSSRSRSEISFTLTSGTEAFHATYCLQDIAMHLITFQSTKAVELK
VK_196C2 (67)	++	LINQMTQSPSSLSASIGDRVTITCAASGSISSQ--LAWYQOKPGDAEKLIYTSKILQVGSFSSRSRSEISFTLTSGTEAFHATYCLQDIAMHLITFQSTKAVELK
VK_198G11 (132)	+	LINQMTQSPSSLSASIGDRVTITCAASGSISSL--LAWYQOKPGDAEKLIYTSKILQVGSFSSRSRSEISFTLTSGTEAFHATYCLQDIAMHLITFQSTKAVELK
VK_197D3 (57)	+	LINQMTQSPSSLSASIGDRVTITCAASGSISSS--NMWYQOKPGDAEKLIYTSKILQVGSFSSRSRSEISFTLTSGTEAFHATYCLQDIAMHLITFQSTKAVELK
VK_197G10 (124)	++	LINQMTQSPSSLSASIGDRVTITCAASGSISSQ--NMWYQOKPGDAEKLIYTSKILQVGSFSSRSRSEISFTLTSGTEAFHATYCLQDIAMHLITFQSTKAVELK

亲本 VK_170B2 与 Vκ 经改组的克隆的比对，发现所述 Vκ 经改组的克隆与小鼠 IL22R1 交叉反应并且且阻断 mIL22R1-hIL22 的相互作用。注意到与亲本 VK_170B2 相比，小鼠交叉反应克隆的 CDR1 较短。还表明的是对人 (IC50pM) 和小鼠 IL22R 表达细胞的效力。ND，未测定。

[0065] 除了 170B2 之外，在段落 [0045] 中描述的文库包含表现出对人 IL22R 强结合亲和力的其他克隆。使鉴定为 169G4 和 158H4 的两个克隆进行 VL 链改组和 VH 链改组。这两个克隆中，158H4 已经对小鼠 IL22R 具有一些亲和力，但是认为该亲和力不足以具有许多实际

用途。下表示出经改组的克隆的结合特征：

[0066] 经改组的克隆的结合特征。

[0067]

克隆	VH 家族	改组	经免疫的人IL22R ECD				经免疫的小鼠IL22R ECD			
			Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Chi2	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Chi2
169G4	19	VL	5.40E+5	3.10E-3	5.70E-9	4.8				
205A9	19		6.70E+5	2.80E-4	4.20E-10	16	2.60E+5	4.80E-4	1.80E-9	430
158H4	8	VH	1.80E+5	3.60E-5	2.00E-10	1.7	1.60E+5	1.30E-4	8.30E-10	170
205A5	8		1.60E+5	3.10E-7	1.90E-12	0.8	1.50E+5	1.00E-6	7.00E-12	190

[0068] 表 3 :在 Biacore 上分析的经改组的克隆及其亲本克隆的结合特征。可测量不出 169G4 与小鼠 IL22R 有明显的结合。

[0069] 测试经改组的克隆与人、食蟹猴 (cyno) 和恒河猴 (rhesus) IL22R 的结合亲和力的保留：

[0070] 与人、食蟹猴和恒河猴 IL22R 的结合

[0071]

		VH家族			
		19	19	8	8
生物素化IL22R		169G4	205A9	158H4	205A5
人	100 ng/ml	1.968	2.567	2.937	2.934
	2 ng/ml	1.284	1.027	0.483	1.005
食蟹猴	100 ng/ml	2.545	2.18	2.861	2.664
	2 ng/ml	2.067	9.354	1.121	1.362
恒河猴	100 ng/ml	2.452	2.59	2.679	2.769
	2 ng/ml	1.978	1.966	1.289	1.174
小鼠	100 ng/ml	0.078	2.358	1.724	2.36
	2 ng/ml	0.084	1.863	0.201	0.172

[0072] 表 4. 物种交叉反应性 ELISA。通过在指定浓度下将 100ng/ml mAb 直接包被于 microorb 板并且与生物素化的 IL22R ECD 结合来进行 ELISA。用链霉抗生物素蛋白 HRP 进行检测。用 TMB 染色,在 620nm 处吸收;吸收值以相对吸收单位来报道。

[0073] 如由这些数据所示,169G4 的 VL 改组和针对小鼠 IL22R 的选择导致鉴定出克隆 205A9,其以良好的亲和力与小鼠 IL22R 结合。此处看到对于小鼠的大的改善,正确。158H4 的 VH 改组导致鉴定出克隆 205A5,其对小鼠 IL22R 具有明显改善的亲和力。经改组的克隆 205A5 和 205A9 保留其亲本克隆在表位(数据未示出)以及与人、食蟹猴和恒河猴 IL22R 结合方面的特征。

[0074] 相关链序列如下：

[0075]

VL_169G4

LSYELTQPSAVSVLLGQTAKITCQGGSLRSSYAHWYQQKPGQAPVLVITEDDSRPSGI
PERFSGSSSGGTASLTISGAQADDEADYHCQSADISGNPVFGGGTQLTVL

(SEQ ID No. 11)

VL_205A9

HSAVTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGSYASWYQQKPGQAPVLVIYDDRRPSGI
PERFSGSSSGGRSTLTISGAQSGDEGDYICQSADLSGNPVFGGGTHLTVL

(SEQ ID No. 12)

VH_205A5

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYEMYWVRQAPGKGLEWVSGITADG
GYTTYADSVKGRFTMSRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCANLWNDYWGQGTQ
VIVSS

(SEQ ID No. 13)

VH_158H4

QLQVYESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSNYEMNWVRQAPGKGFEWVSLINSGGS
YTRYTDSVKGRFTISRDNAAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANIVNDYWGQGTQVT
VSS

(SEQ ID No. 14)

[0076] 因此,已经参照上面讨论的一些实施方案描述了本发明。应该认识到,这些实施方案易于进行本领域技术人员公知的多种修改和变化形式。例如,可通过使用用于建立第一免疫文库的不同平台;通过使用用于建立第一免疫文库的不同方法;通过使用不同的链改组方案等来修改方法。

[0077] 可对本文描述的结构和技术进行除了上面描述的那些之外的许多修改,而不脱离本发明的精神和范围。因此,尽管已经描述了一些具体的实施方案,但是这些具体实施方案仅是实例并且不会限制本发明的范围。

[0001]

序列表

<110> 阿尔金-X有限公司

<120> 用于产生具有物种间、靶标内交叉反应性之抗体分子的方法

<130> NLW/P124542W000

<150> US61/695,664

<151> 2012-08-31

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH 序列

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu 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 Ser
 20 25 30

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

Ser Val Ile Asn Thr Arg Ser Gly Ile Thr His Tyr Val Glu Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Thr Arg Ile Gln Gly Leu Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

[0002]

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK 序列

<400> 2

Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Ile His Gly Ala Ser Arg Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Ala Ile Ser Gly
65 70 75 80

Val Glu Ala Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Ala
 85 90 95

Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK 序列

<400> 3

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

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

[0003]

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Thr Gly Ser Gly Thr Lys Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK 序列

<400> 4

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

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

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Arg Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Thr Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
65 70 75 80

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

[0004]

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

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VK 序列

<400> 5

Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

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

Met Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Asn Leu Leu
35 40 45

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

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

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

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

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VK 序列

<400> 6

Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

[0005]

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> 人T_H

<220>

<223> VK 序列

<400> 7

Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
65 70 75 80

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

[0006]

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

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VK 序列

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VK 序列

<400> 9

Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

[0007]

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

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

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

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

Ala Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gln Tyr Ala Trp Pro
85 90 95

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

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK 序列

<400> 10

Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

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

Gln Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Thr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
65 70 75 80

[0008]

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

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

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VL 序列

<400> 11

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

Gln Thr Ala Lys Ile Thr Cys Gln Gly Gly Ser Leu Arg Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Asp Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Gln Ser Ala Asp Ile Ser Gly Asn
85 90 95

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

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VL 序列

<400> 12

[0009]

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Asn Phe Gly Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

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

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

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

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 13

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VII 序列

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

[0010]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Leu Trp Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Ile Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 14
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> VH 序列

<400> 14

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

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

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Arg Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Ile Val Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser