



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102149727 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 10

(21) 申请号 200980134840. 4

C12N 15/10 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 07. 10

(30) 优先权数据

61/134, 929 2008. 07. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 03. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/050290 2009. 07. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02010/006286 EN 2010. 01. 14

(71) 申请人 航道生物技术有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 劳伦斯·霍罗威茨

拉梅什·R·巴特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 17 页

(54) 发明名称

包含抗体替代卡帕轻链序列的构建体和文库

(57) 摘要

本发明涉及包含抗体替代 κ 轻链序列的构建体和文库。具体地, 本发明涉及包含抗体替代 κ 轻链序列 (任选地, 与另一多肽诸如例如抗体重链和 / 或轻链域序列配偶的) 的构建体及含有其的文库。

1. 一种 κ 样替代轻链 (SLC) 构建体,其包含 V_{κ} 样和 / 或 J_{κ} 序列。
2. 权利要求 1 的 κ 样 SLC 构建体,其包含 V_{κ} 样序列。
3. 权利要求 1 的 κ 样 SLC 构建体,其包含 J_{κ} 序列。
4. 权利要求 1 的 κ 样 SLC 构建体,其包含 V_{κ} 样序列和 J_{κ} 序列二者。
5. 权利要求 1 的 κ 样 SLC 构建体,其能够特异性结合靶物。
6. 权利要求 5 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列包含 SEQ ID NO :2,有或无信号序列且有或无 C 端尾,或其片段。
7. 权利要求 6 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列包含 SEQ ID NO :2 的 N 端信号肽 (氨基酸 1-20)。
8. 权利要求 7 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列包含来自 SEQ ID NO :2 内的 C 端尾的至少一部分。
9. 权利要求 5 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列选自 SEQ ID NO :7-18,有或无信号序列且有或无 C 端尾,或其片段。
10. 权利要求 5 的 κ 样 SLC 构建体,其中 J_{κ} 序列包含 SEQ ID NO :4,有或无 N 端延伸,或其片段。
11. 权利要求 5 的 κ 样 SLC 构建体,其中 J_{κ} 序列包含选自 SEQ ID NO :19-23 的序列,有或无 N 端延伸,或其片段。
12. 权利要求 1-3 和 5-11 任一项的 κ 样 SLC 构建体,其与抗体重链序列结合。
13. 权利要求 4 的 κ 样 SLC 构建体,其与抗体重链序列结合。
14. 权利要求 13 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列包含 C 端尾。
15. 权利要求 13 的 κ 样 SLC 构建体,其中 J_{κ} 序列包含 N 端延伸。
16. 权利要求 13 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列包含 C 端尾且 J_{κ} 序列包含 N 端延伸。
17. 权利要求 13 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列缺乏 C 端尾且 J_{κ} 序列缺乏 N 端延伸。
18. 权利要求 12 的 κ 样 SLC 构建体,其中抗体重链序列是全长抗体重链或其片段。
19. 权利要求 13 的 κ 样 SLC 构建体,其中抗体重链序列是全长抗体重链或其片段。
20. 权利要求 13 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列和 J_{κ} 序列彼此共价连接。
21. 权利要求 20 的 κ 样 SLC 构建体,其中连接是直接融合。
22. 权利要求 20 的 κ 样 SLC 构建体,其中连接是经由异源接头。
23. 权利要求 22 的 κ 样 SLC 构建体,其中异源接头包含天然多肽序列或其片段。
24. 权利要求 22 的 κ 样 SLC 构建体,其中异源接头包含治疗性多肽序列或其片段。
25. 权利要求 22 的 κ 样 SLC 构建体,其中异源接头包含抗体序列。
26. 权利要求 25 的 κ 样 SLC 构建体,其中抗体序列包含抗体轻链和重链可变区序列。
27. 权利要求 26 的 κ 样 SLC 构建体,其中抗体轻链和重链序列能够结合抗原。
28. 权利要求 27 的 κ 样 SLC 构建体,其中抗原不同于所述构建体结合的靶物。
29. 权利要求 13 的 κ 样 SLC 构建体,其包含共价连接至 V_{κ} 样序列和 / 或 J_{κ} 序列的抗体的至少一种抗原结合区。
30. 权利要求 29 的 κ 样 SLC 构建体,其是双功能的。

31. 权利要求 29 的 κ 样 SLC 构建体,其是三功能的。
32. 权利要求 1 的 κ 样 SLC 构建体,其中 V_{κ} 样序列包含 C 端尾且 J_{κ} 序列包含 N 端延伸。
33. 权利要求 32 的 κ 样 SLC 构建体,其中 C 端尾和 / 或 N 端延伸连接至异源分子。
34. 权利要求 33 的 κ 样 SLC 构建体,其中异源分子是肽或多肽。
35. 权利要求 12 的 κ 样 SLC 构建体,其具有相对于具有相同结合特异性的抗体改良的药动力学概况。
36. 权利要求 12 的 κ 样 SLC 构建体,其具有相对于具有相同结合特异性的抗体改良的效力。
37. 权利要求 12 的 κ 样 SLC 构建体,其具有相对于结合相同靶物的抗体改良的特异性。
38. 一种文库,其包含权利要求 1 的 κ 样 SLC 构建体的集合。
39. 处于展示形式的权利要求 38 的文库。
40. 权利要求 39 的文库,其中所述展示选自下组:噬菌体展示、细菌展示、酵母展示、核糖体展示、mRNA 展示、DNA 展示、哺乳动物细胞上的展示、孢子展示、病毒展示、基于蛋白质-DNA 连接的展示、和微珠展示。
41. 权利要求 40 的文库,其中展示是噬菌体展示。
42. 权利要求 38 的文库,其进一步包含抗体序列的集合。
43. 权利要求 42 的文库,其中抗体序列包含重链和 / 或轻链可变区序列。
44. 权利要求 38 的文库,其包含 V_{κ} 样序列的集合。
45. 权利要求 44 的文库,其中所述 V_{κ} 样序列的集合包含其 CDR 序列和 / 或 C 端序列不同的 V_{κ} 样序列变体。
46. 权利要求 38 的文库,其包含 J_{κ} 序列的集合。
47. 权利要求 46 的文库,其中所述 J_{κ} 序列的集合包含其 N 端延伸不同的 J_{κ} 序列变体。

包含抗体替代卡帕轻链序列的构建体和文库

发明领域

[0001] 本发明涉及包含抗体替代 κ 轻链序列的构建体和文库。具体地,本发明涉及包含抗体替代 κ 轻链序列(任选地,与另一多肽诸如例如抗体重链和/或轻链域序列配偶的)的构建体及含有其的文库。

[0002] 发明背景

[0003] 由B淋巴细胞所生成的抗体(Ig)分子是由重(H)链和轻(L)链构成的。H和L链的氨基端域的氨基酸序列是可变的(V_H 和 V_L),尤其在形成抗原结合位点的三个高变区(CDR1、CDR2、CDR3)处。H和L链的装配物通过L链的恒定区(C_L)和重链的第一恒定区(C_{H1})之间的二硫键及通过 V_H 和 V_L 域之间的非共价相互作用而稳定化。

[0004] B淋巴细胞发育的各个阶段以Ig基因基因座的重排状态表征(参见例如 Melchers, F. 和 Rolink, A., 《B-Lymphocyte Development and Biology》, Paul, W. E. 编, 1999, Lippincott, Philadelphia)。在人和许多动物(诸如小鼠)中,编码抗体H和L链的基因是通过编码V区各部分的基因片段以规定的有序方式的逐步体细胞重排而装配的,其中 μ 重链在 λ 轻链之前(Burrows PD 和 Cooper MD, Curr Opin Immunol 9:239-44(1997); Alt 等, Immunol Today 13:306-14(1992); Bassing 等, Cell 109Suppl.:S45-55(2002))。

[0005] 已知轻链(LC)重排由经由前B细胞受体(pre-BCR)驱动的信号启动,该受体由两条重链(μ HC)与两条共价结合的由 $\lambda 5$ 和VpreB分子构成的替代轻链(SLC)联合而形成。如此,B细胞的前体(前B细胞)已经在骨髓中被鉴定为这样的淋巴细胞,它们生成 μ 重链,但是不是完全形成的轻链,而是表达一组分别称为VpreB(1-3)和 $\lambda 5$ 的B谱系特异性基因。

[0006] 人VpreB1的主要同等型(CAG30495)是一种长145个氨基酸的多肽。它具有Ig V域样的结构,但是缺乏典型V域的最后的 β 链($\beta 7$),并且具有与任何其它蛋白质没有显示序列同源性的羧基末端。VpreB2具有数种同等型,包括142个氨基酸的小鼠VpreB2多肽(P13373)、和长171个氨基酸的小鼠VpreB2序列剪接变体(CAA019641)。VpreB1和VpreB2序列已经披露于EP 0 269 127和美国专利No. 5,182,205;Collins等, Genome Biol. 5(10):R84(2004);及 Hollins 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(14):5552-5556(1989)。人VpreB3的主要同等型是一种长123个氨基酸的蛋白质(CAG30496),其披露于Collins等, Genome Biol. 5(10):R84(2004)。

[0007] VpreB(1-3)与另一种蛋白质 $\lambda 5$ 非共价结合。人 $\lambda 5$ 是一种209个氨基酸的多肽(CAA01962),它携带与抗体轻链具有强烈同源性的Ig C域样结构和朝向其氨基末端末端的两个功能上独特的区域,其中之一与 $V\lambda$ 域的 $\beta 7$ 链显示了强烈的同源性。人 $\lambda 5$ 样蛋白具有213个氨基酸(NP 064455),而且与抗体 λ 轻链恒定区显示约84%的序列同一性。

[0008] 关于进一步的详情,参见下列综述文章:Karasuyama等, Adv. Immunol. 63:1-41(1996);Melchers等, Immunology Today 14:60-68(1993);及 Melchers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2571-2573(1999)。

[0009] VpreB和 $\lambda 5$ 多肽一起形成非共价结合的Ig轻链样结构,其称为替代轻链

(surrogate light chain) 或假轻链 (pseudo light chain)。在早期前 B 细胞表面上, 替代轻链与膜结合 Ig μ 重链以二硫键连接, 并与信号转导物 CD79a/CD79b 异二聚物结合以形成 B 细胞受体样结构, 前 B 细胞受体 (pre-BCR)。

[0010] 有趣的是, 甚至在 $\lambda 5$ 表达缺失的情况下, 观察到 B 细胞祖先的成熟、细胞表面表达和 μ 重链 (λ HC) 信号传导。如此, 已有报告, 替代轻链缺陷小鼠和替代轻链敲除小鼠仍能够生成抗体, 由此提示 B 细胞发育的可选途径 (参见例如 Kitamura 等, Cell 69 : 823-31(1992) ; Rolink 等, Eur J Immunol 23 : 1284-8(1993) ; Schuh 等, J Immunol 171 : 3343-7(2003) ; Martensson 等, Int Immunol 11 : 453-60(1999) ; Mundt 等, J Exp Med 193 : 435-45(1991) ; Shimizu 等, J Immunol 168 : 6286-93(2002))。

[0011] 已经鉴定出利用 κ 样替代轻链 (κ 样 SLC) 的 κ 样 B 细胞受体 (κ 样 BCR) (Frances 等, EMBO J 13 : 5937-43(1994) ; Thompson 等, Immunogenetics 48 : 305-11(1998) ; Rangel 等, J Biol Chem 280 : 17807-14(2005))。

[0012] Rangel 等, J Biol Chem 280(18) : 17807-17814(2005) 报告了 V κ 样蛋白的鉴定和分子表征, 该 V κ 样蛋白是未重排的 V κ 基因的产物, 发现它与 Thompson 等, Immunogenetics 48 : 305-311(1998) 先前报告的 cDNA 序列相同。但是, Frances 等, EMBO J 13 : 5937-43(1994) 报告了经重排的种系 JC κ 的鉴定和表征, 该经重排的种系 JC κ 有能力结合 B 细胞前体表面处的 μ 重链, 由此为 B 细胞发育提供 $\lambda 5$ 途径的备选。

[0013] 已经提出 κ 样和 λ 样 pre-BCR 协同工作以促进轻链重排及确保 B 细胞祖先成熟。综述参见 McKeller 和 Martinez-Valdez, Seminars in Immunology 18 : 4043(2006)。

[0014] 发明概述

[0015] 一方面, 本发明涉及 κ 样替代轻链 (SLC) 构建体, 其包含 V κ 样和 / 或 JC κ 序列。

[0016] 在不同实施方案中, κ 样 SLC 构建体包含 V κ 样序列或 JC κ 序列, 或者 V κ 样序列和 JC κ 序列二者。

[0017] 在所有实施方案中, κ 样 SLC 构建体可能能够特异性结合靶物。

[0018] 在其他不同的实施方案中, 在 κ 样 SLC 构建体中, V κ 样序列包含 SEQ ID NO : 2, 有或无信号序列且有或无 C 端尾, 或其片段, 或者 SEQ ID NO : 2 的 N 端信号肽 (氨基酸 1-20), 而且可以另外包含来自 SEQ ID NO : 2 内的 C 端尾的至少一部分。

[0019] 在特定实施方案中, V κ 样序列选自 SEQ ID NO : 7-18, 有或无信号序列且有或无 C 端尾, 或其片段。

[0020] 在另一实施方案中, 在本文 κ 样 SLC 构建体中, JC κ 序列包含 SEQ ID NO : 4, 有或无 N 端延伸, 或其片段, 或者选自 SEQ ID NO : 19-23 的序列, 有或无 N 端延伸, 或其片段。

[0021] 在所有实施方案中, κ 样 SLC 构建体可以与抗体重链序列结合。

[0022] 在其它实施方案中, 在 κ 样 SLC 构建体中, V κ 样序列包含 C 端尾。

[0023] 在还有一些实施方案中, 在 κ 样 SLC 构建体中, JC κ 序列包含 N 端延伸。

[0024] 在又一个实施方案中, 在本文 κ 样 SLC 构建体中, V κ 样序列包含 C 端尾且 JC κ 序列包含 N 端延伸。

[0025] 在不同的实施方案中, V κ 样序列缺乏 C 端尾且 JC κ 序列缺乏 N 端延伸。

[0026] 在所有实施方案中, 如果构建体结合或连接至抗体重链序列, 那么后者可以是全长抗体重链或其片段。

[0027] 在一个实施方案中,在 κ 样 SLC 构建体中, V_{κ} 样序列和 $J_{C\kappa}$ 序列彼此共价连接,包括但不限于直接融合和经由异源接头的连接,该异源接头可以例如包含天然多肽序列或其片段,诸如治疗性多肽序列或其片段。

[0028] 在另一个实施方案中,异源接头包含抗体序列,其可以包括抗体重链和 / 或轻链可变和 / 或恒定区序列。

[0029] 在一个具体的实施方案中,抗体轻链和重链序列在存在时能够结合抗原,所述抗原可以与所述构建体结合的靶物相同或不同。

[0030] 如此,例如,本文构建体可以是双功能的、三功能的或一般是多功能的。

[0031] 在其它实施方案中, V_{κ} 样序列包含 C 端尾且 $J_{C\kappa}$ 序列包含 N 端延伸,其中之一或二者可以连接至异源分子,诸如例如肽或多肽。

[0032] 在所有实施方案中, κ 样 SLC 构建体可以具有相对于具有相同定性结合特异性的抗体改良的药动力学概况和 / 或效力,和 / 或其它改良的功能特性。

[0033] 另一方面,本发明涉及一种文库,其包含本文 κ 样 SLC 构建体的集合。

[0034] 文库可以处于展示形式,诸如噬菌体展示、细菌展示、酵母展示、核糖体展示、mRNA 展示、DNA 展示、在哺乳动物细胞上的展示、孢子展示、病毒展示、基于蛋白质-DNA 连接的展示、和微珠展示。

[0035] 另外,文库可以包含抗体序列的集合,诸如抗体重链和 / 或轻链序列。

[0036] 在一些实施方案中,文库包含 V_{κ} 样序列的集合,其中 V_{κ} 样序列的集合可以包含其 CDR 序列和 / 或 C 端序列不同的 V_{κ} 样序列变体。

[0037] 在其它实施方案中,文库可以包含 $J_{C\kappa}$ 序列的集合,其可以包含其 N 端延伸不同的 $J_{C\kappa}$ 序列变体。

[0038] 在所有实施方案中,当包含可变区序列的抗体重链存在时,本发明的多肽和抗体重链可变区序列可以结合相同或不同的靶物。

[0039] 附图简述

[0040] 图 1: V_{preB1} 结构域的 CDR 类似区和 C 端尾跨越相当长的距离。浅灰色: CDR 残基;深灰色: 框架残基。

[0041] 图 2 显示人 V_{κ} 样核酸的核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 及所编码的蛋白质的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。

[0042] 图 3 显示人 $J_{C\kappa}$ 核酸的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 及所编码的蛋白质的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)。

[0043] 图 4 显示 κ 样替代轻链 (AJ004956 V_{κ} 样, SEQ ID NO:2 和 AAB32987 人 $J_{C\kappa}$, SEQ ID NO:4) 与人 Ig 可变和恒定 κ 轻链 ($V_{\kappa IV_B3}$, SEQ ID NO:5; 恒定 κ , SEQ ID NO:6) 的比对。 V_{κ} 样是未重排的 $V_{\kappa IV}$ 基因家族成员,但是具有独特的 C 端延伸; $J_{C\kappa}$ 与 κJ 和恒定区共享同一性,但是具有独特的 N 端;CDR1 和 CDR2 是保守的,但是 CDR3 中断。

[0044] 图 5 是各种异二聚体替代 κ 轻链删除变体的示意图。在“全长”构建体中, V_{κ} 样和 $J_{C\kappa}$ 序列二者分别保留 C 端和 N 端延伸(尾)。在 dJ 变体中, $J_{C\kappa}$ 的 N 端延伸被删除。在 d V_{κ} 尾变体中,去除了 V_{κ} 样序列的 C 端延伸,但是保留了 $J_{C\kappa}$ 的 N 端延伸。在“短 κ ”变体中, V_{κ} 样序列的 C 端尾和 $J_{C\kappa}$ 序列的 N 端延伸二者被保留。

[0045] 图 6: κ 样轻链删除和单链构建体,其可以单独或与另一种蛋白质(诸如抗体重链

或其片段)一起使用。

[0046] 图7:将组合功能多样性掺入 κ 样替代轻链构建体。红线指示附加的多样性,诸如肽文库。

[0047] 图8:轻链是基因重排和RNA加工的产物。

[0048] 图9图示了 V_{κ} 样蛋白衍生自未重排的 V_{κ} IV基因转录和翻译。 V_{κ} IV是71种VL种系基因之一。由于有额外的70种能够制备 V_{κ} 样蛋白的VL种系基因,因而另有39种 κ V基因和31种 λ V基因。

[0049] 图10:可能来自所有 V_{κ} 家族的 V_{κ} 样蛋白的推定氨基酸序列,与AJ004956 V_{κ} 样原型序列(SEQ ID NO:2)比对,每种拥有不同的延伸长度(SEQ ID NO:7-18)。

[0050] 图11:JC κ 是来自未重排J和C种系的经加工RNA的产物。JC κ 是45种JC种系组合之一。有另外44种能够创建JC κ 样蛋白的VL种系基因,4种另外的J κ 基因与C κ 组合,而4种J λ 基因与10种C λ 基因组合(总共40种)。

[0051] 图12:来自剩余 κ J恒定区重排(J1-J5C κ)的推定JC κ 样(SEQ ID NO:19-23)。

[0052] 图13:对 κ 样替代轻链成分添加功能性的示意图。图示了双功能和三功能结构。A:scFv约束融合物;B: V_{κ} 样scFv融合物;C:JC κ scFv融合物;D:SLC双重融合物。

[0053] 图14:替代轻链功能性尾延伸的例示类型。

[0054] 图15:例示性替代轻链GLP-1融合物。

[0055] 图16:例示性 κ 样和 λ 样替代轻链功能性嵌合物。

[0056] 图17:人VpreB1(SEQ ID NO:30)、小鼠VpreB2(SEQ ID NO:31)、人VpreB3(SEQ ID NO:33)、人 λ 5序列(SEQ ID NO:34)、和人 λ 5样序列(SEQ ID NO:35)的氨基酸序列。

[0057] 发明详述

[0058] A. 定义

[0059] 除非另有定义,本文中所使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员的一般理解相同的意义。Singleton等,《Dictionary of Microbiology and Molecular Biology》,第2版,J. Wiley & Sons(New York, NY1994)为本领域技术人员提供本申请中所使用的许多术语的一般指导。

[0060] 本领域技术人员会认识到与那些本文中所描述的类似或等同的许多方法和材料,这些方法和材料可以用于实施本发明。实际上,本发明绝不限于所述方法和材料。出于本发明的目的,下列术语定义如下。

[0061] 术语“ κ 样替代轻链可变域”、“ V_{κ} 样SLC”和“ V_{κ} 样”可互换使用,指作为未重排 V_{κ} 基因的产物的任何天然序列多肽及其变体。天然序列“ V_{κ} 样”多肽明确包括但不限于图2(SEQ ID NO:2)所示人 κ 样多肽AJ004956和图10(SEQ ID NO:7-18)所示人 V_{κ} 样多肽,以及在非人哺乳类物种中的同系物,特别是在主要通过基因重排和/或高突变来产生抗体多样性的物种(像人)中,诸如啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)和非人高等灵长类动物。在一个实施方案中,天然序列 V_{κ} 样多肽的变体相对于抗体 κ 轻链序列包含C端延伸(尾)。在一个具体的实施方案中,天然序列 V_{κ} 样多肽的变体保留至少部分和优选整个独特的C端延伸(尾),将 V_{κ} 样多肽与相应的抗体 κ 轻链区分开。在另一个实施方案中,变异型 V_{κ} 样多肽的C端尾是与所述序列剩余部分非天然连接的序列。在后一实施方案中,天然 V_{κ} 样序列中天然存在的C端尾与变异序列之间的差异可源自一处或多处氨基

酸改变（取代、插入、删除、和 / 或添加），或者 C 端尾可以与不同 V κ 样蛋白中天然存在的尾相同。如此，例如，在图 10 中列出的任何 V κ 样蛋白（SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO 7-18）中，C 端延伸（在图 10 中称作“翻译的延伸”）可以用另一种 V κ 样蛋白的 C 端延伸替换和 / 或改变，使得它不同于任何天然存在 C 端延伸序列。或者 / 另外，天然序列 V κ 样多肽的变体可以在序列中与天然抗体 κ 可变域序列（特别是此类序列的互补决定区（CDR）和 / 或框架残基中一个或多个中）相同的部分中含有一处或多处氨基酸改变。如此，V κ 样多肽可以在与抗体 κ 轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列中一个或多个对应的区域中含有氨基酸改变。在所有情况中，变体可以且优选确实相对于天然抗体 κ 轻链可变区序列包括至少 4 个、或至少 5 个、或至少 6 个、或至少 7 个、或至少 8 个、或至少 9 个、或至少 10 个氨基酸，优选 4-100、或 4-90、或 4-80、或 4-70、或 4-60、或 4-50、或 4-45、或 4-40、或 4-35、或 4-30、或 4-25、或 4-20、或 4-15、或 4-10 个氨基酸残基的 C 端延伸。如本文中定义的，V κ 样多肽变体会不同于天然抗体 λ 或 κ 轻链序列或其片段，而且会优选保留与天然序列 V κ 多肽至少约 65%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 98% 序列同一性。在另一个优选的实施方案中，V κ 样多肽变体在其氨基酸序列方面与天然抗体 λ 或 κ 轻链序列的同一性小于 95%、或小于 90%、或小于 85%、或小于 80%、或小于 75%、或小于 70%、或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40%。在其它实施方案中，序列同一性介于约 40% 与约 95% 之间、或介于约 45% 与约 90% 之间、或介于约 50% 与约 85% 之间、或介于约 55% 与约 80% 之间、或介于约 60% 与约 75% 之间、或介于约 60% 与约 80% 之间、或介于约 65% 与约 85% 之间、或介于约 65% 与约 90% 之间、或介于约 65% 与约 95% 之间。在所有实施方案中，优选 V κ 样多肽能够结合靶物。

[0062] 术语“JC κ ”和“JC κ 样”可互换使用，指包括与天然序列 κ J 恒定（C）区区段相同的一部分和独特的 N 端延伸（尾）的天然序列多肽及其变体。天然序列 JC κ 样多肽包括但不限于图 3 和 4（SEQ ID NO :4）所示 AAB32987 人 JC κ 多肽和图 12（SEQ ID NO :19-23）所示 JC κ 样多肽，以及在非人哺乳类物种中的同系物，特别是在主要通过基因重排和 / 或高突变来产生抗体多样性的物种（像人）中，诸如啮齿类动物（例如小鼠和大鼠）和非人高等灵长类动物。在一个实施方案中，天然序列 JC κ 样多肽的变体包含 N 端延伸（尾），将它们与抗体 JC 区段区分开。在一个具体的实施方案中，天然序列 JC κ 样多肽的变体保留至少部分和优选整个独特 N 端延伸（尾），将 JC κ 样多肽与相应的抗体 κ 轻链 JC 区段区分开。在另一个实施方案中，变异型 JC κ 样多肽的 N 端尾是与序列剩余部分非天然连接的序列。在后一种实施方案中，天然 JC κ 样序列中天然存在的 N 端尾与变异序列之间的差异可源自一处或多处氨基酸改变（取代、插入、删除、和 / 或添加），或者 N 端尾可以与不同 JC κ 样蛋白中天然存在的尾相同。如此，例如，在图 12 列出的任何 JC κ 样蛋白中，N 端延伸可以用另一种 JC κ 样蛋白的 N 端延伸替换和 / 或改变，使得它不同于任何天然存在 N 端延伸序列。或者 / 此外，天然序列 JC κ 样多肽的变体可以在与天然抗体 κ 可变域 JC 序列相同的部分序列中含有一处或多处氨基酸改变。在所有情况中，变体可以且优选确实相对于天然多肽 κ 轻链 JC 序列包括至少 4 个、或至少 5 个、或至少 6 个、或至少 7 个、或至少 8 个、或至少 9 个、或至少 10 个氨基酸，优选 4-100、或 4-90、或 4-80、或 4-70、或 4-60、或 4-50、或 4-45、或 4-40、或 4-35、或 4-30、或 4-25、或 4-20、或 4-15、或 4-10 个氨基酸残基的 N 端

延伸（独特的 N 末端）。如本文中定义的，JC κ 样多肽变体将不同于天然抗体 λ 或 κ 轻链 JC 序列或其片段，优选保留与天然序列 JC 多肽至少约 65%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 98% 序列同一性。在另一个优选的实施方案中，JC κ 样多肽变体在其氨基酸序列方面具有与天然抗体 λ 或 κ 轻链 JC 序列小于 95%、或小于 90%、或小于 85%、或小于 80%、或小于 75%、或小于 70%、或小于 65%、或小于 60% 的同一性。在其它实施方案中，序列同一性介于约 40% 与约 95% 之间、或介于约 45% 与约 90% 之间、或介于约 50% 与约 85% 之间、或介于约 55% 与约 80% 之间、或介于约 60% 与约 75% 之间、或介于约 60% 与约 80% 之间、或介于约 65% 与约 85% 之间、或介于约 65% 与约 90% 之间、或介于约 65% 与约 95% 之间。

[0063] 氨基酸序列同一性百分比可以使用序列比较程序 NCBI-BLAST2 (Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402(1997)) 来确定。NCBI-BLAST2 序列比较程序可以自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载，或以其它方式从国立卫生研究院 (National Institute of Health, Bethesda, MD) 获得。NCBI-BLAST2 使用数项搜索参数，其中所有那些搜索参数设置成缺省值，包括例如未遮掩 = 是，链 = 全部，期望发生 = 10，最小低复杂性长度 = 15/5，多通道 e 值 = 0.01，多通道常数 = 25，最终带缺口比对的降低 (dropoff) = 25 和评分矩阵 = BLOSUM62。

[0064] 任选地，“ κ 样”替代轻链序列可以与异质氨基酸序列，或任何其它异质构件偶联以形成本文中的“ κ 样替代轻链构建体”。如此，术语“ κ 样替代轻链构建体”以最广义使用，包括任何和所有别的异质构件，包括与 κ 样替代轻链序列偶联的异质氨基酸序列、核酸、和其它分子，其中“偶联”在下文定义。在一个优选的实施方案中，“ κ 样替代轻链序列”能够结合靶物。在一个优选的实施方案中，“ κ 样”替代轻链序列与 JC κ 样序列和 / 或抗体重链序列或其片段非共价或共价结合。共价结合包括直接融合，但是还有经由接头的连接。如此，例如，V κ 样和 JC κ 样序列可经由抗体轻链和 / 或重链可变区序列来连接。

[0065] 术语“VpreB”在本文中以最广义使用，指任何天然序列或变异型 VpreB 多肽，明确包括但不限于 SEQ ID NO :30 的人 VpreB1、SEQ ID NO :31 和 32 的小鼠 VpreB2、SEQ ID NO :33 的人 VpreB3 和同种型，包括剪接变体和通过翻译后修饰所形成的变体，它们的其它哺乳动物同源物（尤其是在主要通过基因重排和 / 或高突变来产生抗体多样性的哺乳动物（像人）中，诸如啮齿类动物，例如小鼠和大鼠），以及这些天然序列多肽的变体。

[0066] 术语“ λ 5”在本文中以最广义使用，指任何天然序列或变异型 λ 5 多肽，明确包括但不限于 SEQ ID NO :34 的人 λ 5、SEQ ID NO :35 的人 λ 5 样蛋白、及其同种型，包括剪接变体和通过翻译后修饰所形成的变体，它们的其它哺乳动物同源物（尤其是在主要通过基因重排和 / 或高突变来产生抗体多样性的哺乳动物（像人）中，诸如啮齿类动物，例如小鼠和大鼠），以及这些天然序列多肽的变体。

[0067] 在本发明多肽的语境中，相对于第一氨基酸序列，术语“异质氨基酸序列”用于指与第一氨基酸序列非天然相关的、至少不处于其在本文中 κ 样替代轻链构建体中的存在形式的氨基酸序列。如此，相对于 V κ 样多肽，“异质氨基酸序列”是任何在其天然环境中与天然 V κ 样多肽无关的氨基酸序列，包括但不限于这样的 JC κ 序列，其不同于那些与 V κ 样序列一起形成 κ 样替代轻链的 JC κ 序列，诸如氨基酸序列变体，例如截短的和 / 或衍生化的序列。相对于 V κ 样多肽的“异质氨基酸序列”还包括与 V κ 样多肽共价结合（例如

融合)的 JC κ 序列,包括天然序列 JC κ ,因为在它们的天然环境中,V κ IV 和 JC κ 序列彼此不是共价结合(例如融合)的。此外,相对于 JC κ 序列,“异质氨基酸序列”可以是任何在其天然环境中 JC κ 序列与其无关的 V κ 样多肽序列。相对于 V κ -样和 JC κ 序列二者的更多代表性“异质氨基酸序列”包括天然和变异型 VpreB 和 λ 5 序列,及抗体轻链和重链可变和恒定区序列。一般而言,本发明提供与经典的轻链氨基酸序列不同的异质氨基酸序列。例如,异质氨基酸序列不包含经典轻链的 V-J 接合。

[0068] 术语“偶联”指任何和所有形式的共价或非共价连接,包括但不限于直接的基因或化学融合、经由接头或交联剂进行的偶联、和非共价结合,例如经由范德华力或通过使用亮氨酸拉链来实现。

[0069] 术语“融合/融合物”在本文中用于指在一条多肽链中不同起源的氨基酸序列的组合,其通过以符合读码框的方式组合它们的编码核苷酸序列来实现。除了与其末端之一的融合之外,术语“融合/融合物”明确涵盖内部融合/融合物,即在多肽链内插入不同起源的序列。

[0070] 如本文中所使用的,术语“靶/靶物”指与本文中的多肽相互作用的物质。本文中所定义的靶物明确包括本发明的含有 V κ IV 或 JC κ 的构建体与之相互作用的抗原。优选地,相互作用通过直接结合发生。

[0071] 如本文中所使用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”均指通过共价“肽连接”接合的氨基酸一级序列。一般而言,肽由少数氨基酸组成,通常约 2 个至约 50 个氨基酸,比蛋白质短。本文中所定义的术语“多肽”涵盖肽和蛋白质。

[0072] 术语“氨基酸”或“氨基酸残基”典型地指具有其领域公认的定义的氨基酸,诸如选自下组的氨基酸:丙氨酸(Ala);精氨酸(Arg);天冬酰胺(Asn);天冬氨酸(Asp);半胱氨酸(Cys);谷氨酰胺(Gln);谷氨酸(Glu);甘氨酸(Gly);组氨酸(His);异亮氨酸(Ile);亮氨酸(Leu);赖氨酸(Lys);甲硫氨酸(Met);苯丙氨酸(Phe);脯氨酸(Pro);丝氨酸(Ser);苏氨酸(Thr);色氨酸(Trp);酪氨酸(Tyr);和缬氨酸(Val),然而需要时也可以使用经修饰的、合成的、或罕见的氨基酸。如此,37 CFR 1.822(b)(4)中所列出的经修饰的和不常见的氨基酸明确包括在该定义之内,并且通过提及而明确收入本文。氨基酸可以细分成多个亚组。如此,氨基酸可以分组为具有非极性侧链(例如 Ala、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val);带负电荷的侧链(例如 Asp、Glu);带正电荷的侧链(例如 Arg、His、Lys);或不带电荷的极性侧链(例如 Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、和 Tyr)。氨基酸还可以分组为小氨基酸(Gly、Ala)、亲核性氨基酸(Ser、His、Thr、Cys)、疏水性氨基酸(Val、Leu、Ile、Met、Pro)、芳香族氨基酸(Phe、Tyr、Trp、Asp、Glu)、酰胺(Asp、Glu)、和碱性氨基酸(Lys、Arg)。

[0073] 术语“多核苷酸”指核酸诸如 DNA 分子和 RNA 分子及其类似物(例如使用核苷酸类似物或使用核酸化学所生成的 DNA 或 RNA)。根据需要,多核苷酸可以以合成方式制备,例如使用本领域公认的核酸化学来实现或者使用例如聚合酶以酶法来实现,如果需要,可以进行修饰。典型的修饰包括甲基化、生物素化、和其它本领域已知的修饰。此外,核酸分子可以是单链的或双链的,而且若想要的话,可以连接至可检测的模块。

[0074] 关于参照多肽的术语“变体”指与天然多肽相比拥有至少一处氨基酸突变或修饰(即改变)的多肽。通过“氨基酸修饰”所生成的变体可以例如通过取代、删除、插入和/或

化学修饰天然氨基酸序列中的至少一个氨基酸来制备。

[0075] “氨基酸修饰”指预定氨基酸序列的氨基酸序列中的变化。例示性修饰包括氨基酸取代、插入和 / 或删除。

[0076] “在指定位置的氨基酸修饰”指指定残基的取代或删除,或邻近所述指定残基的至少一个氨基酸残基的插入。“邻近”指定残基的插入意指其 1 至 2 个残基之内的插入。插入可以在指定残基的 N 端或 C 端。

[0077] “氨基酸取代”指用另一种不同的“替换”氨基酸残基替换预定氨基酸序列中的至少一个现有氨基酸残基。替换残基可以是“天然存在的氨基酸残基”(即由遗传密码所编码的),且选自下组:丙氨酸 (Ala);精氨酸 (Arg);天冬酰胺 (Asn);天冬氨酸 (Asp);半胱氨酸 (Cys);谷氨酰胺 (Gln);谷氨酸 (Glu);甘氨酸 (Gly);组氨酸 (His);异亮氨酸 (Ile);亮氨酸 (Leu);赖氨酸 (Lys);甲硫氨酸 (Met);苯丙氨酸 (Phe);脯氨酸 (Pro);丝氨酸 (Ser);苏氨酸 (Thr);色氨酸 (Trp);酪氨酸 (Tyr);和缬氨酸 (Val)。用一种或多种非天然存在的氨基酸残基进行的取代也为本文中的氨基酸取代的定义所涵盖。

[0078] “非天然存在的氨基酸残基”指除以上所列出的那些天然存在的氨基酸残基以外的残基,其能够共价结合多肽链中的邻近氨基酸残基。非天然存在氨基酸残基的例子包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸和其它氨基酸残基类似物,诸如那些记载于 Ellman 等, *Meth. Enzym.* 202 :301-336 (1991) 的。为了生成此类非天然存在的氨基酸残基,可以使用 Noren 等, *Science* 244 :182 (1989) 和 Ellman 等, 见上文 的程序。简言之,这些程序涉及用非天然存在的氨基酸残基化学活化抑制型 tRNA,接着是 RNA 的体外转录和翻译。

[0079] “氨基酸插入”指至少一个氨基酸掺入预定的氨基酸序列中。虽然插入通常会由一个或两个氨基酸残基的插入组成,但是本申请涵盖更大的“肽插入”,例如约 3 个至约 5 个或者甚至多至约 10 个氨基酸残基的插入。所插入的残基可以是如上文所公开的天然存在的或非天然存在的。

[0080] “氨基酸删除”指从预定氨基酸序列除去至少一个氨基酸残基。

[0081] 除非另有说明,术语“诱变”指用于改变多核苷酸或多肽序列的任何本领域公认的技术。优选的诱变类型包括易错 PCR 诱变、饱和诱变、或其它定点诱变。

[0082] “定点诱变”是本领域中的标准技术,使用如下的合成寡核苷酸引物进行,除了有限的错配之外,所述合成寡核苷酸引物与要诱变的单链噬菌体 DNA 互补,所述错配代表所需突变。简言之,使用合成的寡核苷酸作为引物来指导与单链噬菌体 DNA 互补的链的合成,将所得的双链 DNA 转化入支持噬菌体的宿主细菌中。将经转化细菌的培养物铺板于上层琼脂中,容许自含有噬菌体的单细胞形成噬斑。理论上,50% 的新噬斑会含有具有作为单链的突变形式的噬菌体;50% 会具有原始序列。通过在一定温度下与经激酶处理的合成引物杂交来选择感兴趣的噬斑,所述温度容许精确匹配发生杂交,但是在此温度与原始链的错配足以阻止杂交。然后选择与探针杂交的噬斑,测序并培养,回收 DNA。

[0083] 在本发明的语境中,术语“抗体”(Ab) 用于指来自 V(D)J 基因重组衍生的经典重组重链和同样自 VJ 基因重组衍生的经典重组轻链的天然抗体,或其片段。

[0084] “天然抗体”是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由两条相同的轻 (L) 链和两条相同的重 (H) 链构成。每条轻链通过共价二硫键与重链连接,但不同免疫球蛋白同种型的重链之间的二硫键数目有所不同。每条重链和轻链还具有间隔规则的链内二硫键。每

条重链在一端具有可变域 (V_H), 随后是几个恒定域。每条轻链在一端具有可变域 (V_L), 在其另一端具有恒定域; 轻链的恒定域与重链的第一恒定域排列在一起, 轻链可变域与重链的可变域排列在一起。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变域之间形成界面, Chothia 等, *J. Mol. Biol.* 186 :651 (1985); Novotny 和 Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 : 4592 (1985)。

[0085] 关于抗体链的术语“可变的”用于指抗体链中在抗体间序列差异巨大并参与每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的部分。这种可变性集中于轻链和重链可变域中称为高变区的 3 个区段中。可变域中更加高度保守的部分称为框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变域各包含 4 个 FR (分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4), 框架区主要采取 β -片层构象, 由 3 个高变区连接, 高变区形成连接 β -片层结构的环, 并在某些情况中形成 β -片层结构的一部分。每条链中的高变区通过 FR 紧密相邻地保持在一起, 并与来自另一条链的高变区一起帮助形成抗体的抗原结合位点 (参见 Kabat 等, 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 第 647 页 - 第 669 页)。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合, 但是展现出多种效应器功能, 诸如在抗体依赖性细胞毒性中抗体的参与。

[0086] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (即轻链可变域中的残基 30-36 (L1)、46-55 (L2) 和 86-96 (L3) 和重链可变域中的 30-35 (H1)、47-58 (H2) 和 93-101 (H3); MacCallum 等, *J. Mol. Biol.* 262 (5) : 732-45 (1996)。

[0087] 术语“框架区”指抗体可变区中更趋异的 CDR 区之间所存在的本领域公认的部分。这些框架区通常称为框架 1 至 4 (FR1、FR2、FR3、和 FR4), 在三维空间中提供支持重链或轻链抗体可变区中找到的 3 处 CDR 的支架, 使得 CDR 能形成抗原结合表面。

[0088] 根据其重链恒定域氨基酸序列, 抗体可归入不同的类。有五大类抗体: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 且这些中的数种可进一步分为亚类 (同种型), 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。

[0089] 与不同类的免疫球蛋白相对应的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。

[0090] 基于其恒定域的氨基酸序列, 可将来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”归入两种截然不同的类型之一, 称为卡帕 (kappa, κ) 和拉姆达 (lambda, λ)。本文中对抗体轻链的任何提及包括 κ 和 λ 轻链两者。

[0091] “抗体片段”包括全长抗体的一部分, 通常是其抗原结合或可变域。抗体片段的例子包括但不限于 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、scFv、 $(scFv)_2$ 、dAb、和互补决定区 (CDR) 片段、线性抗体、单链抗体分子、迷你抗体 (minibody)、双抗体、由抗体片段形成的多特异性抗体, 一般而言, 至少含有免疫球蛋白中足以将特异性抗原结合赋予多肽的部分的多肽。

[0092] “单链 Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 域, 其中这些域存在于一条多肽链中。一般而言, Fv 多肽在 V_H 和 V_L 域之间进一步包含多肽接头, 其使得 sFv 能够形成所需的抗原结合结构。关于 sFv 的综述参见 Plückthun, 于 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页, 1994。单链抗体披露于例如 W088/06630 和 WO 92/01047。

[0093] 双抗体是二价的双特异性抗体, 其中 V_H 和 V_L 域出现在一条多肽链上, 但使用

过短的接头使得同一条链上的两个域之间不能配对,由此迫使域与另一条链的互补域配对,产生两个抗原结合位点(参见例如 Holliger, P. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 64446448(1993);及 Poljak, R. J. 等, Structure 2:11211123(1994))。

[0094] 术语“迷你抗体”用于指自我装配成 80kDa 的二价二聚体 (scFv-CH3)₂ 的 scFv-CH3 融合蛋白。

[0095] 术语“适体”在本文中用于指以高特异性和亲和力结合蛋白质靶物的合成的核酸配体。已知适体是蛋白质功能的强力抑制剂。

[0096] 术语“亲和体”用于指工程化的、靶物特异性的非免疫球蛋白结合蛋白,其通常基于自葡萄球菌蛋白 A 衍生的 Z 域的三螺旋支架。58 个氨基酸的 Z 域衍生自金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 蛋白 A (SPA) 中的 5 个同源域之一 (B 域)。SPA 强烈地结合免疫球蛋白的 Fc 区, Z 最初开发为稳定化的基因融合配偶体,用于通过使用含有 IgG 的树脂来亲和纯化重组蛋白。SPA 的 B 域和 Fc 片段之间的复合物的结构显示了结合表面由螺旋 1 和 2 上暴露的残基组成,而螺旋 3 不直接参与结合。亲和体通常选自组合文库,在该组合文库中,通常使螺旋 1 和 2 的 Fc 结合表面处的 13 个残基随机化。然后对针对所需靶物的噬菌体展示文库进行生物淘选,以鉴定靶蛋白的特异性结合物。在多种生物化学测定法和临床应用中,此类亲和体可作为免疫球蛋白的替代物使用。

[0097] dAb 片段 (Ward 等, Nature 341:544546(1989)) 由 V_H 域或 V_L 域组成。

[0098] 如本文中所使用的,术语“抗体结合区”指免疫球蛋白或抗体可变区中能够结合抗原的一个或多个部分。典型地,抗体结合区是例如抗体轻链 (VL) (或其可变区)、抗体重链 (VH) (或其可变区)、重链 Fd 区、组合的抗体轻链和重链 (或其可变区) 诸如 Fab、F(ab')₂、单域、或单链抗体 (scFv)、或全长抗体,例如 IgG (例如 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE、或 IgM 抗体。

[0099] 如本文中所使用的,术语“表位”指至少约 3 至 5 个,优选至少约 5 至 10 个,或至少约 5 至 15 个氨基酸,典型地不大于约 500 个,或约 1,000 个氨基酸的序列,这些氨基酸定义通过自身或作为更大序列的一部分而与应答此序列所生成的抗体结合的序列。表位不限于具有与衍生其的亲本蛋白质的一部分相同的序列的多肽。实际上,病毒基因组处于不断变化的状态,并且在分离群之间展现出相对高度的变异性。如此,术语“表位”涵盖与天然序列相同的序列,以及对天然序列的修饰,诸如删除、取代和 / 或插入。一般而言,此类修饰本质上是保守的,但是也涵盖非保守修饰。该术语明确包括“模拟表位”,即这样的序列,其没有鉴定出连续的线性天然序列或者不必在天然蛋白质中存在,但是在功能上模拟天然蛋白质上的表位。术语“表位”明确包括线性或构象性表位。

[0100] 术语“载体”用于指能够在细胞中自主复制,并且 DNA 区段 (例如基因或多核苷酸) 能与其可操作连接以便引起附着区段复制的 rDNA 分子。能够指导编码一种或多种多肽的基因表达的载体在本文中称为“表达载体”。术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。适用于原核生物的控制序列包括例如启动子、任选的操纵基因序列、及核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、及增强子。

[0101] 若核酸与另一核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接的”。例如,若前序列 (presequence) 或分泌前导 (secretory leader) 的 DNA 表达成参与多肽分泌的前

蛋白质 (preprotein), 则它与该多肽的 DNA 可操作连接; 若启动子或增强子影响编码序列的转录, 则它与该序列可操作连接; 或者, 若核糖体结合位点的定位促进翻译, 则它与编码序列可操作连接。一般而言, “可操作连接的” 意味着相连的 DNA 序列是相邻的, 而且在分泌前导的情况下意味着相邻且处于阅读状态。然而, 增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接来实现。若不存在此类位点, 则依照常规实践使用合成的寡核苷酸适配头或接头。

[0102] “噬菌体展示文库” 是蛋白质表达文库, 其将所克隆的蛋白质序列的集合表达为与噬菌体外壳蛋白的融合物。如此, 短语“噬菌体展示文库” 在本文中指噬菌体 (例如丝状噬菌体) 的集合, 其中所述噬菌体表达外部 (通常为异源) 蛋白质。外部蛋白质自由地与接触噬菌体的其它模块相互作用 (结合)。每个展示外部蛋白质的噬菌体都是该噬菌体展示文库的“成员”。

[0103] 术语“丝状噬菌体” 指能够在其表面上展示异质多肽的病毒颗粒, 包括但不限于 f1、fd、Pf1 和 M13。丝状噬菌体可以包含可选择标志, 诸如四环素 (例如“fd-tet”)。各种丝状噬菌体展示系统是本领域技术人员公知的 (参见例如 Zacher 等, Gene 9 : 127-140(1980); Smith 等, Science 228 : 1315-1317(1985); 及 Parmley 和 Smith, Gene 73 : 305-318(1988))。

[0104] 术语“淘选 (panning)” 用于指在对携带对靶物具有高亲和力和特异性的化合物 (诸如抗体) 的噬菌体的鉴定和分离中的多轮筛选过程。

[0105] 术语“显性阴性” 在本文中用于指作为亲本或相关蛋白的至少一些生物学特性的拮抗剂起作用的多肽变体或多肽片段。

[0106] B. 详细描述

[0107] 用于实施本发明方法的技术是本领域熟知的, 并记载于标准实验室教科书中, 包括例如 Ausubel 等, 《Current Protocols of Molecular Biology》, John Wiley and Sons(1997); 《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》, 第三版, J. Sambrook 和 D. W. Russell 编, Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; O’ Brian 等, 《Analytical Chemistry of Bacillus Thuringiensis》, Hickie 和 Fitch 编, Am. Chem. Soc., 1990; 《Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety》, T. R. Glare 和 M. O’ Callaghan 编, John Wiley, 2000; 《Antibody Phage Display, Methods and Protocols》, Humana Press, 2001; 及《Antibodies》, G. Subramanian 编, Kluwer Academic, 2004。例如, 诱变可以使用定点诱变来进行 (Kunkel 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 488-492(1985))。PCR 扩增方法记载于美国专利号 4, 683, 192; 4, 683, 202; 4, 800, 159; 和 4, 965, 188, 及数本教科书, 包括《PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification》, H. Erlich 编, Stockton Press, New York(1989); 及《PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications》, Innis 等编, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。

[0108] 本发明涉及包含抗体替代轻链序列的构建体和文库。

[0109] κ 样替代轻链构建体

[0110] 替代轻链 (SLC) 是一种受发育调节的多肽, 其天然结合新出现的发育中 B 细胞受体的重链。对重链和替代轻链的研究在有些情况中显示它们能结合自身抗原。已经确立含

有替代轻链的B细胞得到较好的耐受,而且可找到在正常条件下循环。通过延伸,治疗性 VH 替代轻链异二聚体蛋白质可更容易结合自身抗原,并且作为治疗剂得到较好的耐受。一个重要的区别在于替代轻链不是抗体轻链。它独特地由两条分离的多肽构成,所述多肽没有经历经典的轻链 VJ 重排来进行它们的表达,但仍结合经典的抗体重链。

[0111] 存在有详细描述的 λ 样替代轻链,但是也有大量证据支持别的 SLC,特别是替代 κ 样轻链的概念。这在替代轻链敲除小鼠中得到支持,所述小鼠仍能够生成抗体,由此提示 B 细胞发育的备选途径。一种候选替代轻链是 κ 样轻链。 κ 样轻链是与 JC κ 融合基因配偶的种系 V κ IV 基因。在每一种这些基因中,在与 CDR3 类似的位点周围附近存在肽延伸。由于这两种蛋白质没有表现出基因组水平的组合,因此有可能它们对重链的结合彼此互相排斥,而且与针对 κ 样替代轻链描述的结合类似。重要的是,在这些基因中看到的肽延伸提供了掺入别的多样性或功能性的机会。

[0112] 由于 V κ 样和 JC κ 样基因编码能作为替代轻链彼此独立地发挥功能的蛋白质,因此本发明的 κ 样替代轻链构建体明确包括包含不具有 JC κ 样序列的 V κ 样序列及包含不具有 V κ 样序列的 JC κ 样序列的构建体。

[0113] 一方面,本发明提供了包含 V κ 样和 / 或 JC κ 序列且具有结合靶物能力的构建体。所述靶物可以是例如任何如下的肽或多肽,其是 V κ 样和 / 或 JC κ 序列或含有此类序列的构建体的结合配偶体。靶物特别包括在抗体结合的语境中通常称为“抗原”的所有靶物类型。

[0114] 当本发明的 κ 样替代轻链构建体包含 V κ 样和 JC κ 序列二者时,这两种序列典型地是独立的多肽,未彼此融合,但是也可以非共价结合,或者可以通过共价接头诸如肽接头和 / 或包含抗体序列的接头彼此连接。

[0115] 本发明的构建体包括但不限于 V κ IV 和 / 或 JC κ 序列与异质氨基酸序列的偶联物。与异质氨基酸序列的结合可以是共价的或非共价的,可以直接发生,或者经由接头(包括肽接头)发生。

[0116] V κ 样和 / 或 JC κ 序列(包括它们的变体和片段)的游离末端可用于将别的多样性掺入此类序列的文库中。例如,可以将随机肽文库附加或替代至这些游离末端之一,并淘选对特定靶物的特异性结合。通过将经鉴定具有所需结合特异性的替代轻链与针对同一靶物的重链或重链片段组合,可以制备如下分子,所述分子具有在两个不同位置上结合关联靶物的能力。与在二聚体免疫球蛋白中所看到的亲和力效应类似地,这种串联结合或“整合”效应强烈地加强对单一靶物的结合。还有可能使用结合不同靶物的构件。如此,例如,可以将具有想要的结合特异性的替代轻链构件与结合不同靶物的抗体重链或重链片段组合。例如,替代轻链构件可以结合肿瘤抗原,而抗体重链或重链片段可以结合效应细胞。这样,可以创建具有靶向和抗肿瘤活性的单一实体(entity)。在一个具体的实施方案中,连接 V κ 样和 JC κ 序列的附加物或多肽可以是抗体或抗体片段,诸如 Fab 或 scFv 片段。抗体序列的掺入不仅会创建“整合”效应,而且还可以在不需要第二独立臂(诸如双特异性抗体中找到的)的情况下在单个分子中产生双特异性。两种特异性可以是针对同一靶物的不同部分,或者针对不同靶物,或者针对靶物抗体复合物。

[0117] 本文中的多肽构建体的具体例子包括如下的多肽,其中 V κ 样和 / 或 JC κ 序列与抗体重链或其片段结合。包含 V κ 样和 JC κ 序列二者的具体的异二聚体构建体例示于图

5。如图 5 中所示,在本发明的 κ 样替代轻链构建体中, V_{κ} 样多肽和 / 或 J_{κ} 多肽可分别含有在相似抗体序列中不存在的 C 和 N 端延伸。或者,可以自本文中 κ 样替代轻链构建体除去部分或整个延伸。

[0118] 其它 κ 样替代轻链构建体,其可以单独地使用或者可以进一步衍生化和 / 或与别的异质序列(诸如抗体重链序列,诸如全长抗体重链或其片段)结合。

[0119] 虽然本发明的构建体中不需要存在 V_{κ} 样多肽和 / 或 J_{κ} 多肽的 C 和 N 端延伸,但是保留至少一项此类附加物的至少部分是有利的,因为它们提供唯一的机会来创建组合功能多样性,或是通过线性延伸或是例如以约束多样性的形式,作为筛选环文库的结果,如图 7 中所示。此外, V_{κ} 样多肽和 / 或 J_{κ} 多肽的“尾”部分可融合至其它肽和 / 或多肽,以提供各种期望特性,诸如例如增强的结合、额外的结合特异性、增强的 pK、改善的半衰期、缩短的半衰期、细胞表面锚定、细胞移位的增强、显性阴性活性等。具体的功能性尾延伸列于图 14。

[0120] 需要的话,可以工程化本发明的构建体,例如通过将来自抗体(包括已知的治疗性抗体)CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区的已知序列或序列基序掺入或附加到 κ 样替代轻链序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 类似区中来实现。这容许创建如下分子,所述分子不是抗体,但是会展现出类似于或优于已知的治疗性抗体的结合特异性和亲和力。

[0121] 在某些实施方案中,异质氨基酸序列可以对本发明的构建体添加一种或多种额外的功能性。此类具有额外的功能性(包括具有所需结合特异性的抗体可变区序列)的构建体例示于图 13。具体而言,图 13 例示多种双功能和三功能构建体,其包括上文所述 V_{κ} 样和 J_{κ} 多肽序列。

[0122] 虽然通过提及某些实施方案例示了本发明的构建体,但是普通技术人员会理解,通过对替代轻链和抗体序列的各种变换所获得的许多别的实施方案也是有可能的,并且在本发明的范围之内。本发明包括所有如下构建体,所述构建体包含替代轻链序列,并具有结合想要的靶物的能力。在某些实施方案中,所述构建体还具有与抗体重链可变区序列结合的能力。

[0123] 可以使用本发明的构建体来建造替代轻链序列的文库,与抗体文库类似地,其可以用于多种目的,包括选择具有所需结合特异性和亲和力的构建体。

[0124] 由于 V_{κ} 样和 J_{κ} 基因编码的多肽能作为独立蛋白质发挥功能并作为替代轻链发挥功能,因此可以自真正的轻链工程化改造替代样轻链,用于每一种先前为工程化改造真正替代轻链而建议的应用。这可以通过表达可变轻链区以含有与 V_{preB} 或 V_{κ} 样基因类似的肽延伸来实现。类似地,可工程化恒定区以模拟 $\lambda 5$ 或 J_{κ} 基因及其肽延伸。另外,任何嵌合物或异二聚体配偶的组合都在本发明范围内。

[0125] κ 样替代轻链构建体的制备

[0126] 可以通过本领域中已知的方法来制备本发明的 κ 样替代轻链构建体,包括重组 DNA 技术的熟知技术。

[0127] 可以自天然来源(例如发育中的 B 细胞)分离和 / 或通过合成或半合成方法获得编码 κ 样替代轻链多肽的核酸。一旦鉴定并分离或以其它方式生成了这种 DNA,则可以将它连接入可复制的载体中以进行进一步克隆或表达。

[0128] 可用于表达本文中多肽编码序列的克隆和表达载体是本领域公知的,并且是商品

化的。载体构件通常包括但不限于以下一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。适用于克隆或表达本文载体中编码替代轻链构建体的 DNA 的宿主细胞是原核生物、酵母、或高等真核生物（哺乳动物）细胞，优选哺乳动物细胞。

[0129] 合适的哺乳动物宿主细胞系的例子包括但不限于经 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651)；为了在悬浮培养中生长而亚克隆的人胚肾系 293 (293 细胞) (Graham 等, J. Gen. Virol. 36 :59 (1977))；幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10)；中华仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216 (1980))；小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 :243-251 (1980))；猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70)；非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2)；犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL1442)；人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75)；人肝细胞 (Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68 (1982))；及 MRC 5 细胞；FS4 细胞。

[0130] 为了在哺乳动物细胞中使用，常常由病毒材料提供对表达载体的控制功能。如此，通常使用的启动子可以衍生自多瘤病毒、腺病毒 2、逆转录病毒、巨细胞病毒、和猿病毒 40 (SV40) 的基因组。其它启动子（诸如 β -肌动蛋白启动子）源自异源来源。合适启动子的例子包括但不限于 SV40 病毒的早期和晚期启动子 (Fiers 等, Nature, 273 :113 (1978))、人巨细胞病毒的立即早期启动子 (Greenaway 等, Gene, 18 :355-360 (1982))、和正常情况下与所需基因序列关联的启动子和 / 或控制序列，只要此类控制序列与宿主细胞系统相容。

[0131] 高等真核生物转录编码所需异源多肽的 DNA 可以通过将增强子序列插入载体中而得到增加。增强子是对启动子起作用而增加其转录启动活性的 DNA 顺式作用元件，通常为约 10-300bp。增强子方向和位置相对独立，但是优选位于表达载体中所存在的启动子序列的上游。增强子可以与启动子源自相同的来源，诸如例如来自真核细胞病毒，例如复制起点的晚期侧上的 SV40 增强子 (bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点的晚期侧上的多瘤病毒增强子、和腺病毒增强子。

[0132] 哺乳动物宿主细胞中所使用的表达载体还含有多腺苷酸化位点，诸如那些衍生自病毒诸如例如 SV40 (早期和晚期) 或 HBV 的。

[0133] 可以通过构建载体来提供复制起点，以包括外源起点，诸如可以是衍生自 SV40 或其它病毒（例如多瘤病毒、腺病毒、VSV、BPV）来源的，或者可以由宿主细胞提供。

[0134] 表达载体通常含有选择标志，其编码用该载体转化的宿主细胞存活或生长所必需的蛋白质。适用于哺乳动物细胞的选择标志的例子包括二氢叶酸还原酶 (DHFR)、胸苷激酶 (TK)、和新霉素。

[0135] 可以在多种培养基中培养经转化的宿主细胞。商品化培养基包括 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM) (Sigma)。此外，Ham 等, Meth. Enz. 58 :44 (1979) 和 Barnes 等, Anal. Biochem. 102 :255 (1980) 中所述的任何培养基均可以用作宿主细胞的培养基。培养条件（诸如温度、pH 等）就是那些先前与为表达所选择的宿主细胞一起使用的，其包括在制造商的说明书中或者对于普通技术人员会是显而易见的。

[0136] 包含 κ 样替代轻链序列的文库

[0137] 本发明进一步涉及 κ 样替代轻链序列的各种文库和包含此类序列的构建体。如此,此类文库可包含 κ 样替代轻链序列(诸如本发明的含有 V_{κ} 样和/或 J_{κ} 的构建体,包括但不限于那些上文或实施例中所具体描述的)的展示,或基本上由其组成,或由其组成。

[0138] 本发明的文库优选处于展示形式。用于展示异源蛋白质(包括抗体和其它多肽)的系统是本领域公知的。已经在编码抗体基因的丝状噬菌体表面上展示了抗体片段(Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 222:381-388(1992); McCafferty 等, Nature 348(6301):552-554(1990); Griffiths 等, EMBO J., 13(14):3245-3260(1994))。关于选择和筛选抗体文库的技术的综述,参见例如 Hoogenboom, Nature Biotechnol. 23(9):1105-1116(2005)。此外,有本领域中已知的用于在大肠杆菌(Agterberg 等, Gene 88:37-45(1990); Charbit 等, Gene 70:181-189(1988); Francisco 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2713-2717(1992))和酵母(诸如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))(Boder 和 Wittrup, Nat. Biotechnol. 15:553-557(1997); Kieke 等, Protein Eng. 10:1303-1310(1997))表面上展示异源蛋白质及其片段的系统。其它已知的展示技术包括核糖体或 mRNA 展示(Mattheakis 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026(1994); Hanes 和 Pluckthun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-4942(1997))、DNA 展示(Yonezawa 等, Nucl. Acid Res. 31(19):e118(2003)); 微生物细胞展示诸如细菌展示(Georgiou 等, Nature Biotech. 15:29-34(1997))、哺乳动物细胞上的展示、孢子展示(Isticato 等, J. Bacteriol. 183:6294-6301(2001); Cheng 等, Appl. Environ. Microbiol. 71:3337-3341(2005))、病毒展示诸如逆转录病毒展示(Urban 等, Nucleic Acids Res. 33:e35(2005)、基于蛋白质-DNA 连接的展示(Odegrip 等, Proc. Acad. Natl. Sci. USA 101:2806-2810(2004); Reiersen 等, Nucleic Acids Res. 33:e10(2005))和微珠(microbead)展示(Sepp 等, FEBS Lett. 532:455-458(2002))。

[0139] 出于本发明的目的,可使用任何展示技术(包括噬菌体展示和孢子展示)来有利地展示含有替代轻链的文库。

[0140] 在噬菌体展示中,将异源蛋白质(诸如替代轻链多肽)连接至噬菌体颗粒的外壳蛋白,而表达它的 DNA 序列包装在噬菌体外壳之内。噬菌体展示方法的详情可见于例如 McCafferty 等, Nature 348:552-553(1990),该文献记载了从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)域基因全集在体外制备人抗体和抗体片段。依照此技术,以符合读码框的方式将抗体 V 域基因克隆入丝状噬菌体(诸如 M13 或 fd)的主要或次要外壳蛋白基因中,作为功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,所以基于抗体的功能性特性的选择也导致对编码展现出那些特性的抗体的基因的选择。如此,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式实施;关于它们的综述,参见例如 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson 等, Nature 352:624-628(1991)从衍生自经免疫小鼠脾的 V 基因小型随机组合文库分离了一批不同的抗噁唑酮抗体。可以构建来自未免疫人供体的 V 基因全集,可以分离针对一批不同抗原(包括自身抗原)的抗体,基本上遵循 Marks 等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991),

或 Griffith 等, *EMBO J.* 12 :725-734(1993) 所记载的技术进行。在天然的免疫应答中, 抗体基因以高速率积累突变 (体细胞高突变)。所引入的一些变化会赋予更高的亲和力, 展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞优先在随后的抗原攻击期间复制和分化。此自然过程可通过采用称为“链改组”的技术来模拟 (Marks 等, *Bio/Technol.* 10, 779-783(1992))。在此方法中, 通过噬菌体展示获得的“初级”人抗体的亲和力可通过用自未免疫供体获得的天然存在的 V 域基因变体 (全集) 的全集顺序替换重链和轻链 V 区基因而得到改善。此技术容许生成具有在 nM 范围内的亲和力的抗体和抗体片段。用于制备非常大的噬菌体抗体全集的策略已经记载于 Waterhouse 等, *Nucl. Acids Res.* 21, 2265-2266(1993)。可以改进这些技术和本领域已知的其它技术以展示任何多肽, 包括包含替代轻链序列的多肽和其它构建体。

[0141] 孢子展示 (包括使用枯草芽孢杆菌孢子外壳成分 (CotB) 的表面展示系统和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (Bt) 孢子展示) 记载于 Isticato 等, *J. Bacteriol.* 183 : 6294-6301(2001) ; Cheng 等, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 :3337-3341(2005), 在此通过提及明确收录其全部内容。其它孢子展示系统记载于美国专利申请公开文本号 20020150594 ; 20030165538 ; 20040180348 ; 20040171065 ; 及 20040254364。

[0142] κ 样替代轻链序列、含有其的构建体和文库的用途

[0143] 本发明的文库可用于鉴定具有所需特性的 κ 样替代轻链序列和 κ 样替代轻链构建体, 诸如包含替代轻链序列的融合物。例如, 对本文中文库的体外或体内筛选可产生包含以高结合特异性和亲和力结合所需靶物的 κ 样替代轻链序列的多肽。如此, 本文中的文库可用于鉴定用于治疗 and 诊断目的分子, 诸如包含结合肿瘤标志物或治疗性干预的其它分子靶物的替代轻链序列的多肽。此外, 通过上文所描述的技术, 可以工程化替代轻链多肽的高度多样文库, 包括包含结合相同靶物的多肽集合的文库, 结合不同靶物的多肽的文库, 具有多特异性的多肽的文库等。

[0144] 在下列非限制性实施例中提供了本发明的更多细节。

[0145] 实施例

[0146] 实施例 1 : 作为结合域蛋白质的 κ 样 SLC 构件、Vκ 样或 JCκ

[0147] 为了制备 Vκ 样结合域, 以重组方式制备了图 2 和 4 (SEQ ID NO :2) 中所示的单一蛋白质。替代轻链 (SLC) 结合域蛋白质构建体由来自 SEQ ID NO :2 之推定分泌 Vκ 样蛋白的氨基酸 21 至 180 (可以短 3-6 个氨基酸) 构成。需要的话, 为了创建新的特异性的结合能力, 依照结构或序列证据来对分子进行再工程化。再工程化可包括例如 CDR 和 / 或 C 端尾中的多样化, 经由随机或合理设计诱变手段来进行。此外 / 或者, 随机地 (通过例如易错 PCR) 或是直接地 (通过用氨基酸集合进行的单位点或多位点特异性诱变) 沿着 Vκ 样蛋白的整个长度来制备变体集合。然后将所得的克隆或集合与 pIII 以符合读码框的方式克隆, 用于噬菌体或噬菌粒展示。然后将这种噬菌粒构建体转化入 TG1 细胞中, 在补充有 50 μg/ml 氨苄青霉素和 2% 葡萄糖的 Luria Broth (LB) 中增殖, 直至其达到 OD600 约 0.3, 在不进行摇动的情况中于 37℃ 用 MK307 辅助噬菌体感染 30 分钟。沉淀细胞, 然后在含有 50 μg/ml 氨苄青霉素和 75 μg/ml 卡那霉素的 LB 中重悬, 使之在剧烈通气的情况中于 30℃ 生长过夜。次日, 依照普遍接受的淘选方法针对人 TNF-α 淘选含有噬菌粒表达的 Vκ 样蛋白的上清液。可以经由反复选择和扩增来富集结合 TNF-α 的特异性 Vκ 样克隆, 然后分别

评估结合,这也可以利用普遍接受的 m13 噬菌体评估方法,其典型地涉及噬菌体 ELISA 或测试在大肠杆菌中生成的分泌型蛋白质的粗制或纯化的周质溶胞物。

[0148] 上文描述涉及 V κ 样结合蛋白的制备,但是 V κ 样蛋白也可以与识别共同靶物的其它异源序列以重组方式重组,并作为文库筛选。此外,这种 V κ 样结合蛋白可以与先前选定的抗体重链集合组合,并直接针对感兴趣的相同靶物或感兴趣的第二靶物进行筛选以制备双特异性分子。或者,可以通过与未选择的轻链集合联合进行的筛选来发现这种加强的结合或双特异性结合。

[0149] 虽然本实施例提及抗体重链,但是应当理解完整重链是不必要的。包含重链可变区序列(在没有重链恒定区的情况中)或整个重链恒定区的组合可以以类似的方式制备,并且在在本实施例的范围之内。

[0150] 最后,JC κ 可以以相同的方式来制备和使用,只是可以在 N 端尾延伸、非 CDR 环中、或遍及 JC κ 蛋白的整个长度掺入多样化,单独地或以上文所述组合地进行。

[0151] 实施例 2:卡帕 SLC 构建

[0152] 可以将图 5 中显示的异二聚体 SLC 删除变体(也称为“SURROBODY™ 变体”)的卡帕替代轻链构件的编码序列与全长 IgG1 抗体重链共转染入 CHO-K1 细胞(ATCC CCL-61)中,以瞬时生成替代轻链构建体,用于生化分析。

[0153] 例如,将全长 V κ 样(SEQ ID NO:2)和 JC κ (SEQ ID NO:4)分开克隆入哺乳动物表达载体 pCI (Promega, Madison WI) 中。对于这两种蛋白质,均删除其推定的非结构性尾部的部分。对于 V κ 样,这种 C 端尾在 SEQ ID NO:2 的 Kabat 类似残基 #95 或残基 122-146 的后面,而对于 JC κ ,这包括 SEQ ID NO:4 的 J 区 N 端氨基酸 1-28。具体而言,对于 JC κ ,残基 1-28 代表卡帕 J 区推定的起点至终点。V κ 样构建体含有天然的推定分泌信号,在 V κ 样的情况中,这种预测信号肽是 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-20。然而,JC κ 没有显示具有规范的信号序列。Frances 等显示了 JC κ 能结合表面暴露的重链,表明翻译的蛋白质能够转运或移位至细胞外表面。然而,为了过表达的目的,还制备了一组变体,它们含有附加至 JC κ 蛋白的氨基端或任何尾删除变体的规范的哺乳动物轻链信号序列,以改进 SURROBODY™ 蛋白生产。这种截短型 JC κ 序列的序列显示为 SEQ ID NO:24,在与重链和全长 V κ 样组合时形成图 5 中称作“dJ”的 SLC 删除变体。截短型 V κ 样序列的序列显示为 SEQ ID NO:25,而且在与重链和全长 JC κ 组合时形成图 5 中称作“dV κ 尾”的 SLC 删除变体。当截短型 JC κ 序列和截短型 V κ 样蛋白二者均与重链组合时,SLC 删除变体在图 5 中称作“短卡帕”。

[0154] 实施例 3:卡帕替代轻链构建体(SURROBODY™)在哺乳动物细胞中的表达和纯化

[0155] 可以将图 5 中四种组合卡帕替代轻链可能性之每一种与已知的人抗流感重链(含有 C 端六组氨酸(His6)标签)(SEQ ID NO:26)共转染,依照制造商的建议(Invitrogen, Carlsbad CA)在低血清培养基中表达。3 天后,收集上清液,过滤,通过镍螯合物层析(Qiagen, Germany)来纯化。然后通过用抗肽家兔血清(V κ 样和 JC κ)或抗组氨酸抗体(Serotec, Raleigh NC)进行的 Western 印迹分析来检查纯化的蛋白质。抗家兔 HRP(V κ 样和 JC κ)或抗小鼠 HRP(重链)和用 TMB 底物进行的比色显色后显现蛋白质的检测。

[0156] 测试每一种组合卡帕替代轻链变体结合抗流感重链相关的关联抗原的能力。这可以用纯化的蛋白质或澄清的转染上清液来实施。在任何事件中,如 Kashyap et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 105:5986-5991 (2008) 所述用 H5N1 血凝素(越南 1203)包被并封闭 96

孔 ELISA 板的孔。接着,添加 SURROBODIES™,使之于室温结合抗原 1 小时。用 PBS+0.05% Tween 的清洗步骤后,使用抗人 Fc-HRP 抗体和 TMB 底物比色检测记录 450nm 处的吸光度读数来定量检测结合。

[0157] 实施例 4:添加功能性至卡帕 SLC 构件

[0158] 因为卡帕 SLC 由两条独立的多肽构成,所以这产生了附加或嵌入第二 (secondary) 功能性的天然机会。在本实施例中,在第一种情况中,插入抗 VEGF scFv 以制备连接 V κ 样或 dV κ 与 JC κ 或 dJ 任一的融合蛋白 (图 13A)。将所得工程化的卡帕 SLC 约束 scFv 与抗 TNF- α 抗体的重链配对。如下制备所需蛋白质,即将各约束融合物与全长重链 (含有 C 端六组氨酸 (His6) 标签) (SEQ ID NO:27) 共转染,依照制造商的建议 (Invitrogen, Carlsbad CA) 在低血清培养基中表达蛋白质。3 天后,自培养基收集分泌的 SURROBODIES™,过滤,并通过镍螯合物层析 (Qiagen, Germany) 来纯化。

[0159] 在 ELISA 中使用所得蛋白质测定靶向结合。简言之,ELISA 需要用人 TNF- α 或人 VEGF 包被并封闭 ELISA 板,接着卡帕 SLC SURROBODIES™ 于 4℃ 温育 2 小时,用 PBS-Tween-20 (0.05%) 清洗,用抗人重链 -HRP 抗体直接检测。

[0160] 或者,可以制备抗 VEGF scFv 融合至 V κ 样的 C 端 (图 13B) 或融合至 JC κ 的 N 端 (图 13C) 的融合物,与上文所述 surrobody ELISA 类似评估所得蛋白质复合物构建体。

[0161] 最后,将抗 VEGF scFv 融合至 V κ 样 C 端的融合物和抗卵清蛋白 scFv 融合至 JC κ 的氨基端,测试所述三元蛋白质复合物对 VEGF、TNF- α 、和卵清蛋白的结合 (图 13D)。

[0162] 在说明书中,加入了针对不同靶物的 scFv,然而可以将功能性结合物与相同靶物组合以制备串联的“超级结合物”。这些串联合合物能提供加强的结合,或者甚至在一些例子中提供交联功能。在完整抗体提供不期望的冗长交联的例子中,Fab 交联将是有益的。例如,此种充当胰岛素替代物的完整免疫球蛋白胰岛素受体抗体是不需要的,它们的血清清除需要 3-4 周。因为胰岛素通常具有几分钟的半衰期,所以 Fab 将更适合于这种规模的半衰期,串联功能性能恰当地解决这种应用。

[0163] 上文说明书仅描述了作为第二功能团的抗体,但是还可以类似地将相关肽 (例如促红细胞生成素模拟物)、受体 (例如 TNF-RI)、显性阴性完整蛋白 (例如 DN-TNF, Steed 等, Science. 301:1895-1898 (2003)) 拮抗性片段或域 (例如基于 HGF 的 NK1 或 NK4 域) 和结合蛋白 (例如 IL-1ra) 掺入附加的约束的构建体以制备具有类似功能的分子。还可以利用两个位点来掺入异二聚体蛋白质,诸如重链和轻链,以制备第二 Fab 样分子。

[0164] 实施例 5:卡帕 SLC 文库

[0165] 如所描述的,V κ 样和 JC κ 域可用作单一结合实体,但是也可以将它们与重链组合以制备组合文库,用于针对抗原的淘选。重链可以是幼稚或超免疫淋巴细胞衍生的集合或合成的集合。在一些例子中,将来自先前富集的抗体文库的重链集合与卡帕 SLC 文库组合使用可能是有益的。在任何情况中,可以如上文实施例 1 中所述,在恰当的选择和设计下,卡帕 SLC SURROBODIES™ 的完全多样性集合能经由每种卡帕 SLC 构件中的独立结合元件来提供多重抗原选择性,或者经由经典抗体中不存在的额外结合来提供增强的结合,所述额外的结合是经由 V κ 样和 JC κ 尾与靶物的结合。

[0166] 具体而言,我们将使用重复手段,其使用自 H5N1 禽流感幸存者的骨髓制备的组合抗体文库。针对 H5N1 病毒血凝素蛋白筛选达两轮选择。接着,扩增噬菌粒质粒,纯化,通

过来自这种质粒制备物的限制性消化来分离重链可变区。然后将这些重链与重链恒定域 1 以符合读码框的方式克隆,以形成与 m13 基因 III 外壳蛋白的重组融合物,供噬菌粒展示使用。

[0167] 淘选后,对来自所有适宜选择轮次和文库的克隆抗原结合噬菌体进行 ELISA 测试,这通过将富集的克隆转移到 HB2151 大肠杆菌菌株以生成可溶性 SURROBODY™ 蛋白质来进行。简言之,将培养和诱导 HB2151 克隆以生产可溶性 SURROBODIES™。具体而言,将菌落在补充有 100mcg/ml 氨苄青霉素和 200 微摩尔 IPTG 的 2-YT 培养基中于 30℃ 培养过夜,如上所述通过 ELISA 测试周质溶胞物,基本上如先前概述的。

[0168] 实施例 6 :自现有的轻链 V 基因和轻链恒定基因工程化 SLC 样分子

[0169] 因为卡帕 SLC 的构件提供来自未重排轻链 V 基因和经重排轻链 JC 基因的备选功能,所以自所有剩余卡帕和拉姆达轻链 V 基因工程化相似的翻译蛋白质以制备 V_κ 样分子(图 9 和 10) 及剩余卡帕 JC 重排(4 种 JC_κ 样)(图 11 和 12) 和拉姆达 JC 重排(4 种“J”x 10 种“恒定”= 40 种 JC_κ 样)(图 11) 的所有组合是可行的。这些工程化分子中的每一种都能服务于与那些使用 V_κ 样和 JC_κ 的,以及那些包括在共同未决的 2007 年 3 月 28 日提交的 PCT 申请流水号 No. PCT/US2008/058283 中,具有 VpreB 和 λ 5 的,及其组合和嵌合物(图 16) 相同的目的。

[0170] 实施例 7 :用于延长血清半衰期的卡帕替代轻链融合物

[0171] 当抗体片段是与完整的全部重链的融合物的一部分时,其体内半衰期得到相当大地延长,所述完整的全部重链包括所有重链恒定域,不仅仅是那些形成稳定抗原结合片段所必需的区域。在 IgG 的情况中,这意味着包括域 CH1、CH2、和任选的 CH3。特别地,很明确,CH2 和 CH3 赋予大部分的这种体内效应。实际上,与亲本分子相比,这些 CH2 和 CH3 域与异源蛋白质的融合物典型地足以改善这些嵌合分子的效力和 PK/PD。类似地,与 V_κ 样和 JC_κ 任一或两者的功能性融合物受益于与重链恒定域的这种结合。

[0172] 为了治疗 II 型糖尿病,胰高血糖素样肽 1 (或 GLP-1) 的施用通过在胰腺中诱导葡萄糖依赖性胰岛素分泌,由此改善那些患者中的葡萄糖管理而使个体受益。然而,长寿命的 GLP-1 肽是所希望的目标。因为卡帕替代轻链的尾部是独特且易接近的,所以可以通过以重组方式将活性 GLP-1 模块融合至 V_κ 样的 C 端尾 (SEQ ID NO :28) 或 JC_κ 的 N 端尾 (SEQ ID NO :29) 来实现这个目标。在 JC_κ 融合物的情况中,可以在存在或不存在 V_κ 样的情况中,甚至在存在或不存在重链可变域的情况中实施表达,如图 15 中所描绘的。可以类似地在存在或不存在 JC_κ 的情况中,可能在有或没有重链 CH1 域的情况中制备与 V_κ 样的融合物。类似地,可以制备其它有益的生长因子、细胞因子、受体、和酶融合物。在所有的这些情况中,结合不是替代轻链或 SURROBODY™ 构件所必需的,而是可以由异源替代轻链融合元件完全或大部分地赋予。

[0173] 虽然在上述说明书中参照某些实施方案例示了本发明,但是它不限于此。实际上,在那些本文中所显示的和描述的之外对本发明的各种修饰对于本领域技术人员根据上述说明书会变得显而易见,并落入所附权利要求书的范围之内。

VpreB1 结构域的 CDR 类似区和 C 端尾跨越相当长的距离

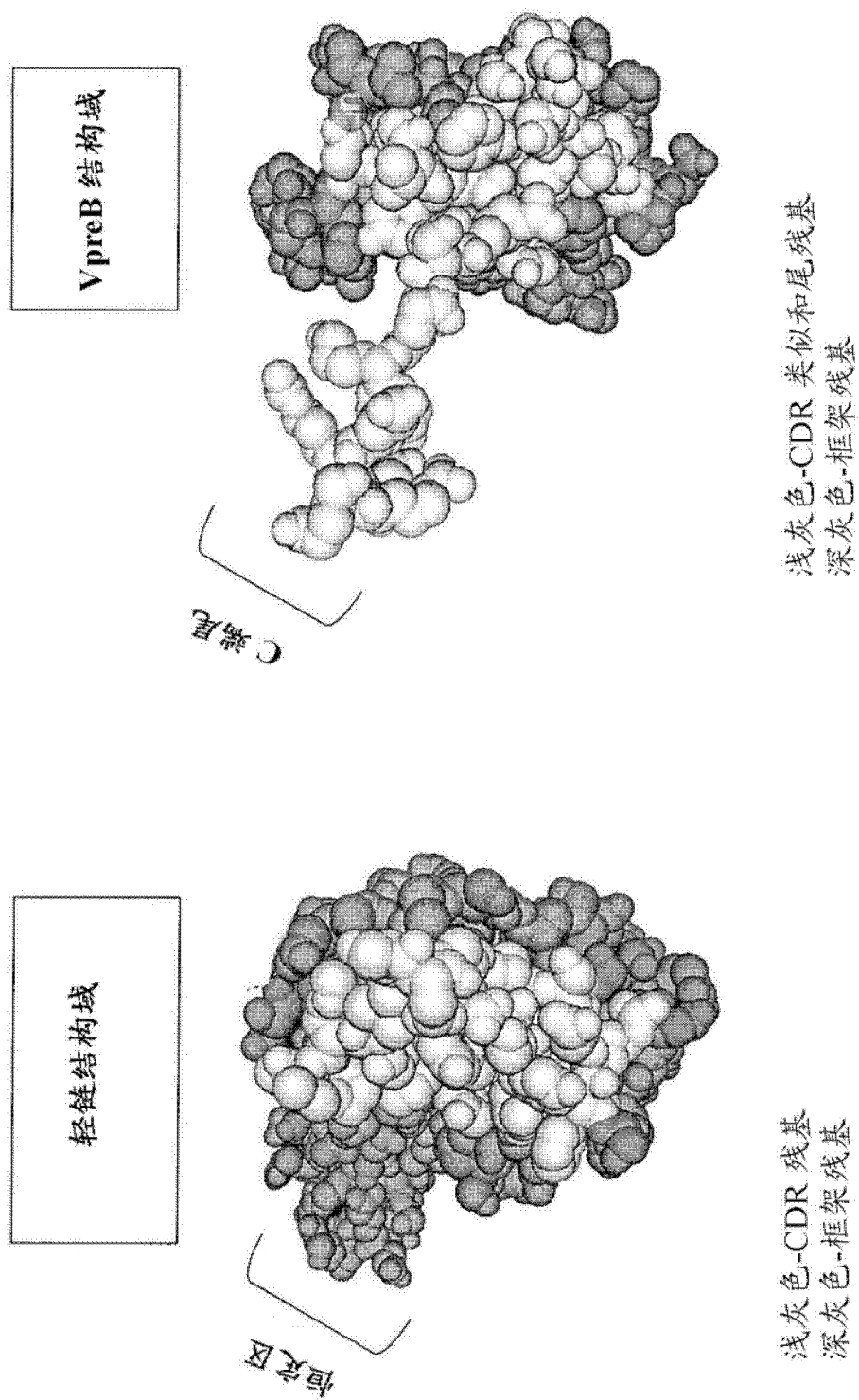


图 1

V_k样 DNA 序列及所编码的蛋白质

```

M V L Q T Q V F I S L L W I S G A Y G D I V .
1 CAGCAGATGGTGT GCAGACCCAGGTCTT CAITTCCTGTGCT CTGATCTCTGTGC CTACGGGAGATCGT
GTGGTCTACCAAA CGTCTGGTCCAGAA GTAAAGAGACAACGA GACCTAGAGACCAG GATGCCCTGTAGCA

. M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S .
76 GATGACCCAGTCC AGACTCCCTGGCTGT GTCTCTGGGCGAGAG GGCACCATCACTG CAACTCCAGCCAGAG
CTACTGGTCAAGG TCTGAGGACCGACA CAGAGACCCGCTCTC CCGGTGGTAGTGAC GTTCAGGTGGTCTC

. V L Y S S N N K N Y L A W Y Q Q K P G Q P P K L L .
151 TGTATTATACAGTC CAAATAAAGAACTA CTTAGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGACA GCCTCCTAAGTGT
ACAAATATGTCGAG GTTGTTATTTCTTGAT GAATCGAACCATGTT CGTCTTGGTCTGT CGGAGGATTCGACGA

. I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T .
226 CATTACTGGGATC TACCCGGAATCCGG GGTCCCTGACCCATT CAGTGGCAGCGGTC TGGACAGATTTCAC
GTAAATGACCCGTAG ATGGCCCTTAGGCC CCAGGACTGGCTAA GTCACCGTCGCCAG ACCCTGTCTAAGTG

. L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P P T .
301 TCTCACCATCAGCAG CCTGCAGGCTGAAGA TGTGGCAGTTTATTA CTGTCAGCAATATTA TAGTACTCTCTCCAC
AGAGTGGTAGTCGTC GGACGTCGACTTCT ACACGTCAAATAAT GACAGTCGTTATAAT ATCATGAGGAGGGTG

. V L Q P R T Q T S S P Y A G P V G L C C S S C F L .
376 AGTGCTTCAGCCTCG AACACAAACCTCCTC CCATACGCTGGCC AGTAGGTCTTTGCTG CAGCAGCTGCTTCT
TCACGAAGTCGGAGC TTGTGTTTGGAGAG GGGTATGCGACCCGG TCATCCAGAAACGAC GTCTCGACGAAGGA

. C T Q P P T C M L P L C V G E V T L L I Y S L E G .
451 CTGCACACAGCCCC AACATGATGCTTCC TCTGTGTGTGGGA GGTCACTCTCTGAT TTATTCTGTGGAGGG
GACGTGTGTGGGGG TTGTACGTACGAAGG AGACACACAAACCCCT CCAGTGAGAGAACTA AATAAGCAACCTCCC
. L Q G P G L N *

526 TTTCAGGGGCCAGG ATTAAATTAAAGAC TTGACTTTTGTGGA TCTCTTTTGTAGRA GATTATTAAACAAA
AAACGTCGCCGGTCC TAATTTAATTCTGTG AACTGAAAACGACCT AGAGAAAACATCTT CTAATAATTTCTGTTT

601 ATGTTGTAAAGATCC CTTAGAGACATTGTC AGGAGTTTGTGTT ACAGGAACCTGCATG TTTCACATGGACACA
TACACATTTCTAGG GAATCTCTGTACAG TCCTCAAAAACACAA TGTCTTGGACGTAC AAAGTGTACCTGTGT

676 TCACATGACCGAGCC AAATAGATTTATCTT TACTCT
AGTGTACTGGCTCGG TTTATCTAAATAGAA ATGAGA

```

图 2

JCκ DNA 序列及所编码的蛋白质

```

V R R V F V Q Q D N G E L T L W W T F G
1 GTGAGAAGGG TTTTGTTC GCAAGACAAT GGAGAGCTCA CACTGTGGTG GACGTTCCGG
CACTCTTCCC AAAACAAGT CGTCTGITA CCTCTGAGT GTGACACCAC CTGCAAGCCG

Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
61 CAAGGGACCA AGGTGGAAT CAAACGAAC GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTCCCG
GTTCCCTGGT TCCACCTTGA GTTGCTTGA CACCGACGTG GTAGACAGAA GTAGAAGGC

P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F
121 CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAC TCTCTGTTG TGTGCTGCT GAATAACTTC
GGTAGACTAC TCGTCAACTT TAGACCTTGA CGGAGACAA ACACGGACGA CTTAATTGAAG

Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
181 TATCCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGAAG GTGGATAACG CCCCACATC GGTAACTCC
ATAGGCTCTC TCCGGTTTCA TGTACCTTC CACCTATTGC GGGAGGTTAG CCCATTGAGG

Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L
241 CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCCCTG
GTCCCTCTAC AGTGTCTCGT CCTGTCGTTT CTGTCGTGGA TGTCGGAGTC GTCGTGGGAC

T L S K A D Y E K H K L Y A C E V T H Q
301 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAATCTTAG CCTGCGAAGT CACCCATCAG
TGGACTCGT TTCGTCTGAT GCTCTTGTG TTTGAGATGC GGACGCTTCA GTGGGTAGTC

G L S S P V T K S F N R G E C *
361 GGCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGTTAG
CCGACTCGA GCGGGCAGTG TTTCTCGAAG TTGTCCTC TCACAATC

```

图 3

κ样替代轻链与可变和恒定κ轻链比对

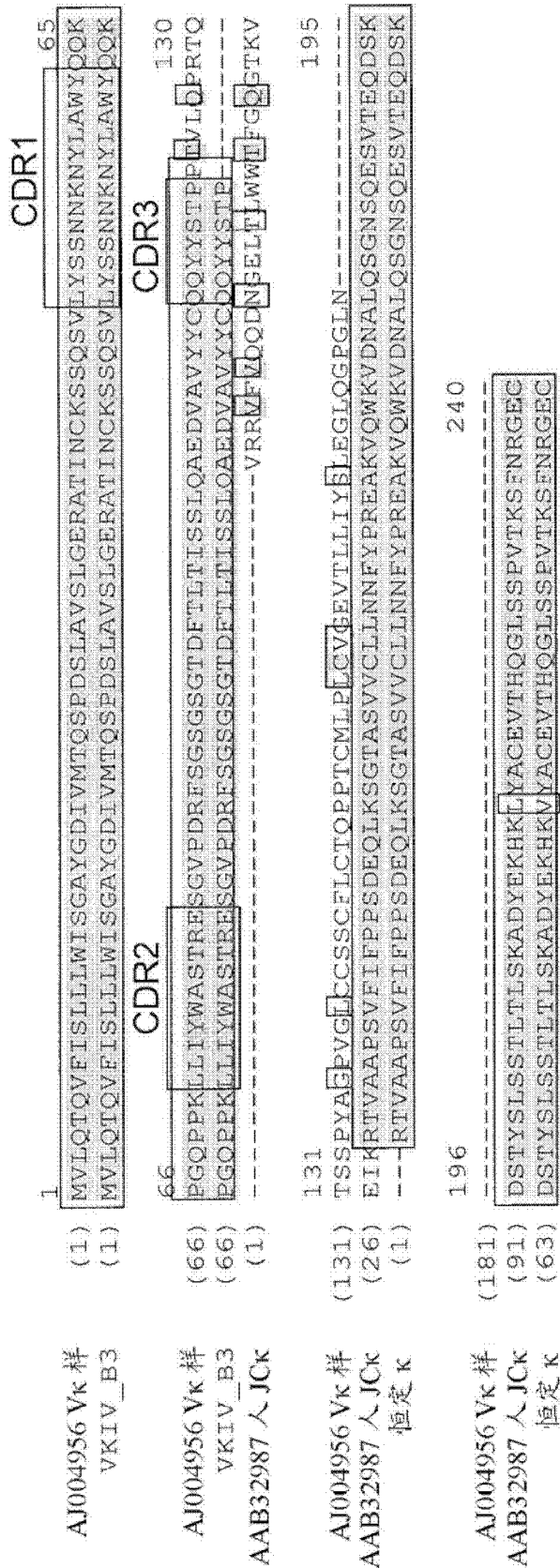


图 4

- Vκ样是未重排的 VκIV 基因家族成员，但是具有独特的 C 端延伸
- JCK 与 κJ 和恒定区共享同一性，但是具有独特的 N 端
- CDR1 和 CDR2 是保守的，但是 CDR3 中断

κ 替代抗体变体

异二聚体 SLC 删除变体

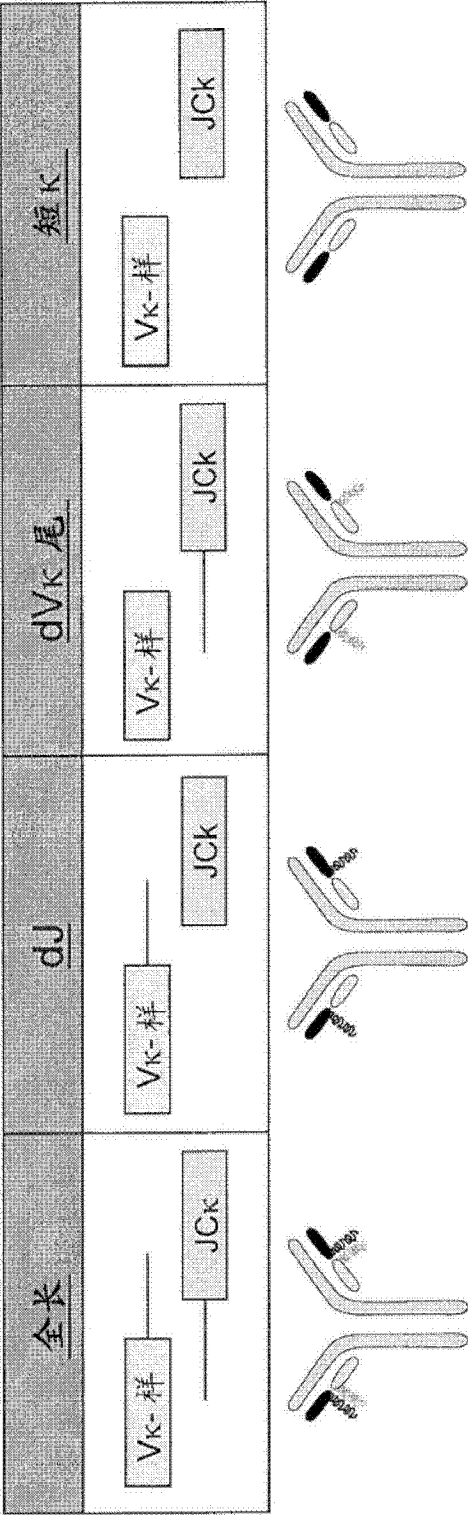


图 5

κ 样轻链删除和单链构建体
可以单独或与另一种蛋白质（诸如重链）一起使用

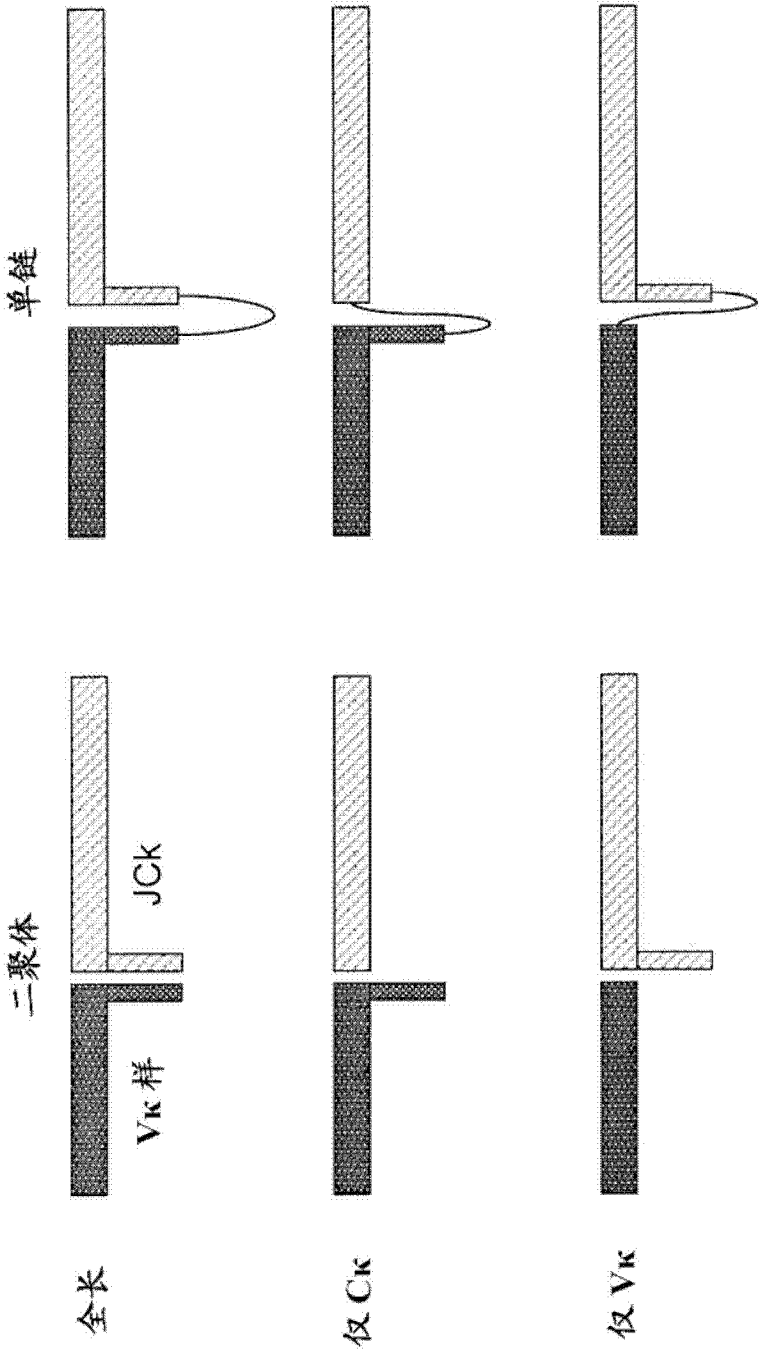
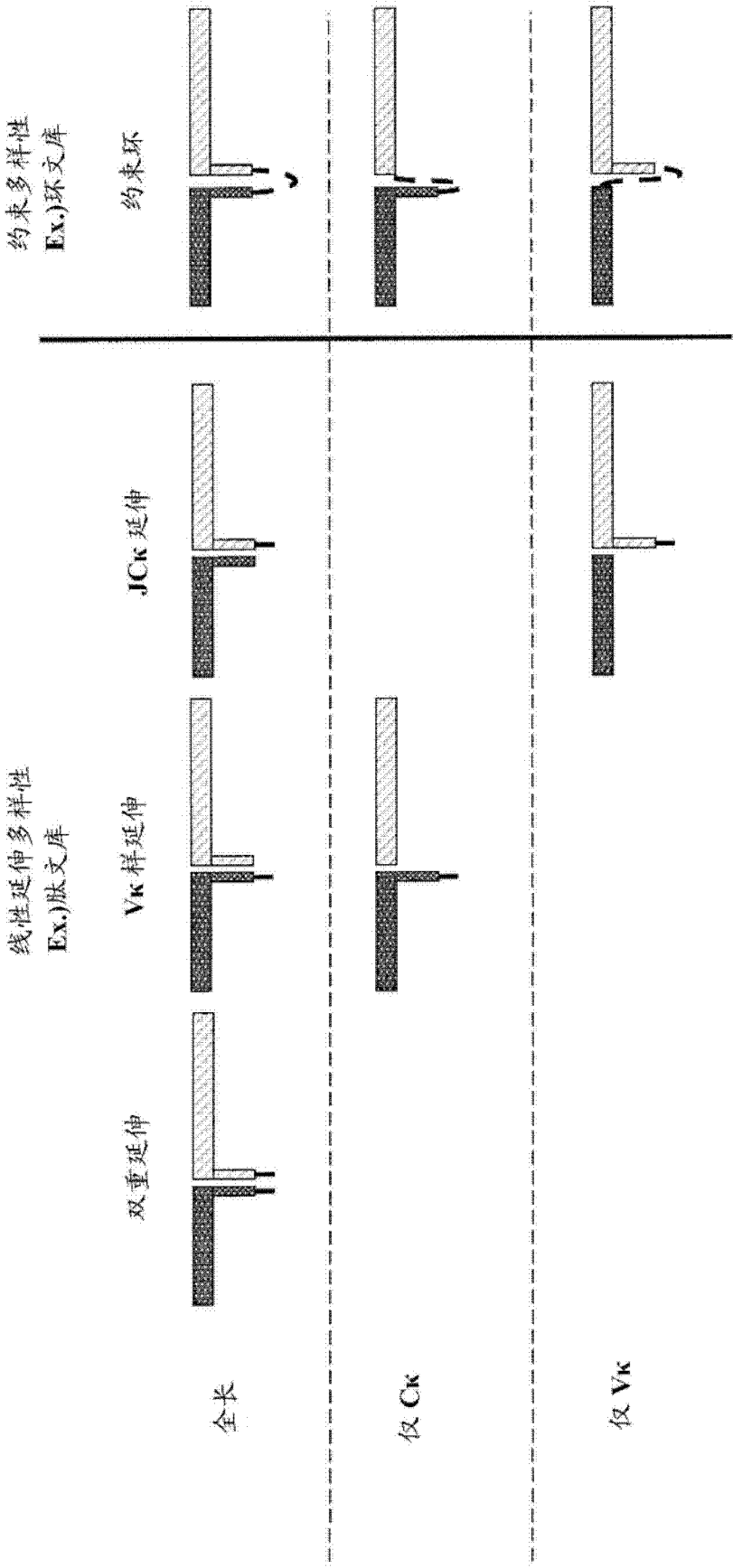


图 6

将组合功能多样性掺入κ样SLC构建体



注意：红线指示添加的多样性，诸如肽文库

图 7

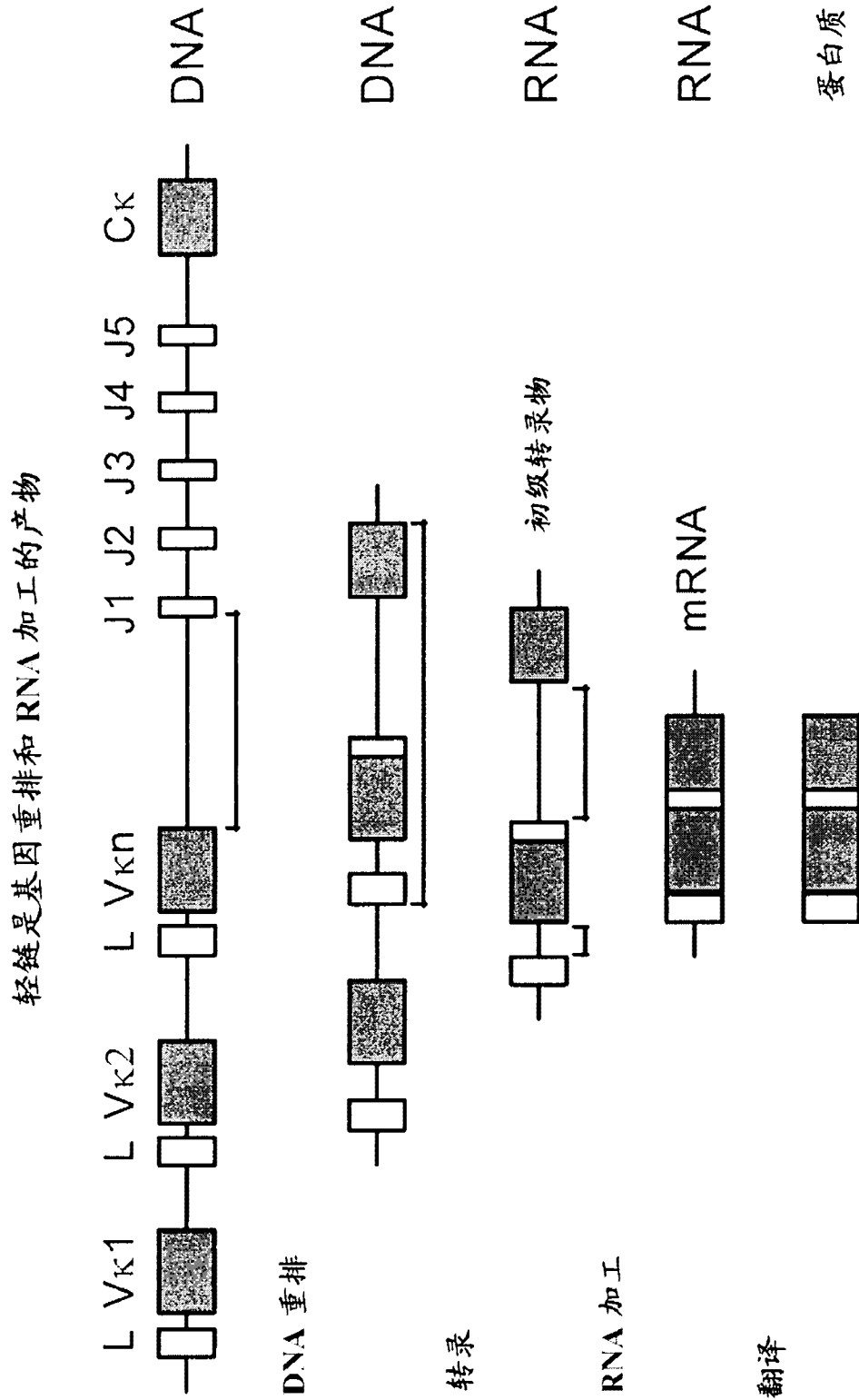


图 8

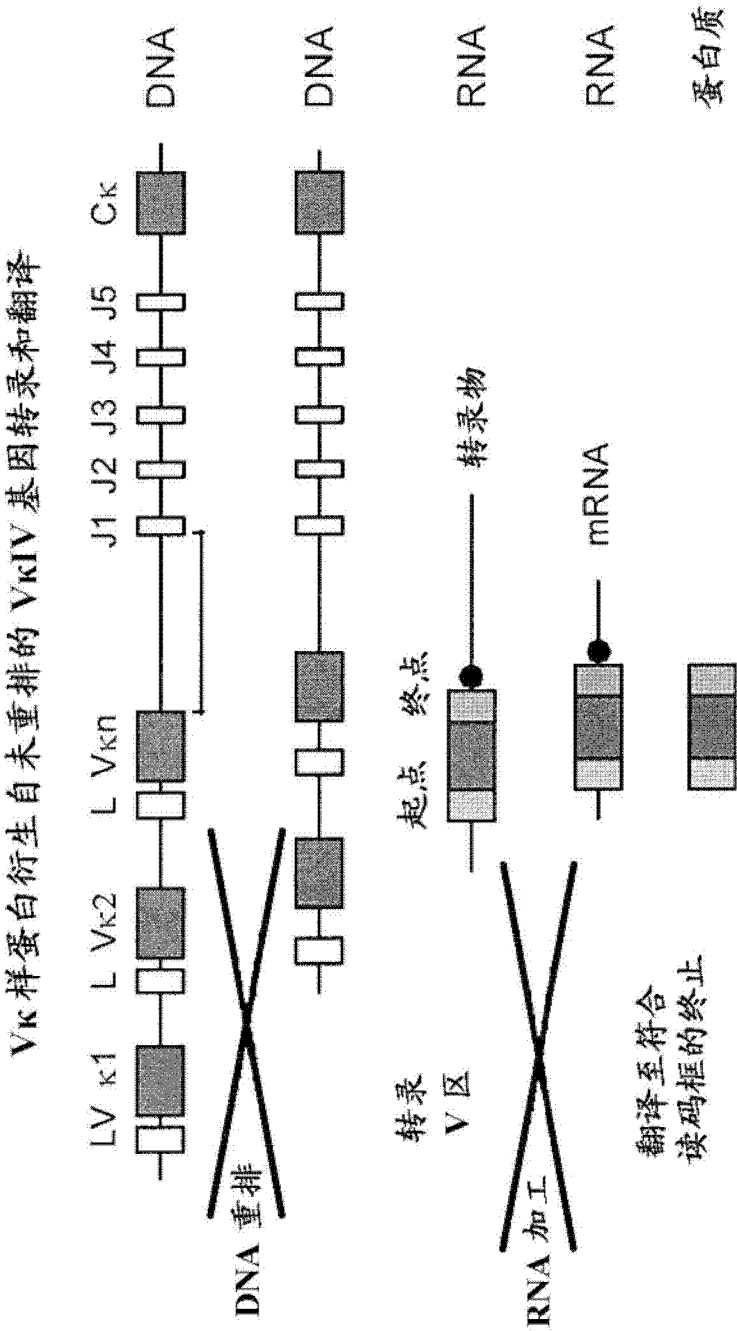


图 9

V_κIV 是 71 种 VL 种系基因之一

- 另外有 70 种能够创建 V_κ样蛋白的 VL 种系基因
 - 39 种更多的 κV 基因
 - 31 种更多的 λV 基因

预测 Vk 样蛋白可能来自所有 Vk 家族且每种携带不同长度的延伸

AJ004956	Vk 样	
V01577	VK1-12	DIQMTQSPDLSAVSLGHRATINCKSSQSVLYSSNNKNLYAWYQQKPGQPEPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
J00248	VK1-16	DIQMTQSPSSVSASVGRVITITCRASQGISS-----WLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
X72808	VK1-17	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGIN-----YLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGSGTDFTLTIS
M64856	VK1-33	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGIN-----DLGWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGSGTDFTLTIS
HSIGKL22	VK1-42	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDIN-----YLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
X12691	VK2D-28	DIQMTQSPSLPVTGPEPASISCRSSQSLIH-SNGYNYLDWYLOKFGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS
X63403	VK2-30	DVMTQSPSLPVTGPEPASISCRSSQSLVSDGN-TYLNWYQQKPGQSPRRLLIYKVSNRDVGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
HSIGKLC1	VK3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS-----YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTIS
X17264	VK3D-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSS-----YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTIS
X02485	VK5-2	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNI SCKASQDIDD--D--MNWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTIN
M27751	VK6D-41	DVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCQASEGIN-----YLYWYQQKPGDQAPKLLIKYASQSI SGVPSRFSGSGSGTDFTTIS
X12682	VK7-3	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGIN--LIHWYQQKPGQPEPKLLIYQASNKDTGVPAREFSGSGSGTDFTLTIN
AJ004956	Vk 样	
V01577	VK1-12	SLOAEDVAVYYCQYYSTPPTVLPQRTQTSSPYAGPVGLCCSCFLCTQPTPTMPLCVGEVTLIIYSLEGLQGPGLN----
J00248	VK1-16	SLOPEDFATYYCQOANSFPPTVLPTRT-----SLOPEDFATYYCQOANSFPPTVLPTRT-----
X72808	VK1-17	SLOPEDFATYYCQOANSFPPTVLPTRT-----SLOPEDFATYYCQOANSFPPTVLPTRT-----
M64856	VK1-33	SLOPEDFATYYCQOANSFPPTVLPTRT-----SLOPEDFATYYCQOANSFPPTVLPTRT-----
HSIGKL22	VK1-42	SLKPEDFAAYYCKQDFSPPTGLQA-----SLKPEDFAAYYCKQDFSPPTGLQA-----
X12691	VK2D-28	RVEAEDVGYYCMQALQTPPTVVQPLTETSSWGCPVAHMCCLSGEQLSRVESA-----RVEAEDVGYYCMQALQTPPTVVQPLTETSSWGCPVAHMCCLSGEQLSRVESA-----
X63403	VK2-30	RVEAEDVGYYCMQALQTPPTVVQPLTETSSWGCPVAHMCCLSGEQLSRVESA-----RVEAEDVGYYCMQALQTPPTVVQPLTETSSWGCPVAHMCCLSGEQLSRVESA-----
HSIGKLC1	VK3-11	SLEPEDFAVYYCQQRSNWHPVTPHETKTPTPRPSVETRLLYQLLPLOTASGVATQC-----SLEPEDFAVYYCQQRSNWHPVTPHETKTPTPRPSVETRLLYQLLPLOTASGVATQC-----
X17264	VK3D-11	SLEPEDFAVYYCQQRSNWHPVTPHETKTPTPRPSVETRLLYQ-----SLEPEDFAVYYCQQRSNWHPVTPHETKTPTPRPSVETRLLYQ-----
X02485	VK5-2	NIESEDAAYFCLQHDNFFLIIVHPVQKPPSSLSGIASA-----NIESEDAAYFCLQHDNFFLIIVHPVQKPPSSLSGIASA-----
M27751	VK6D-41	SLEAEDAATYYCQOQGNKHPTVLQPKTKISSAWRNRETEQYPVFMI LAGAVGEI IYQIPSHMAHSAELTPKSQCLILSSLP
X12682	VK7-3	FVEANDTANYCYCLOSKNFPPTVL-----FVEANDTANYCYCLOSKNFPPTVL-----

翻译的延伸

Vk 样原型与每一个剩余 Vk 家族的选定成员比对

图 10

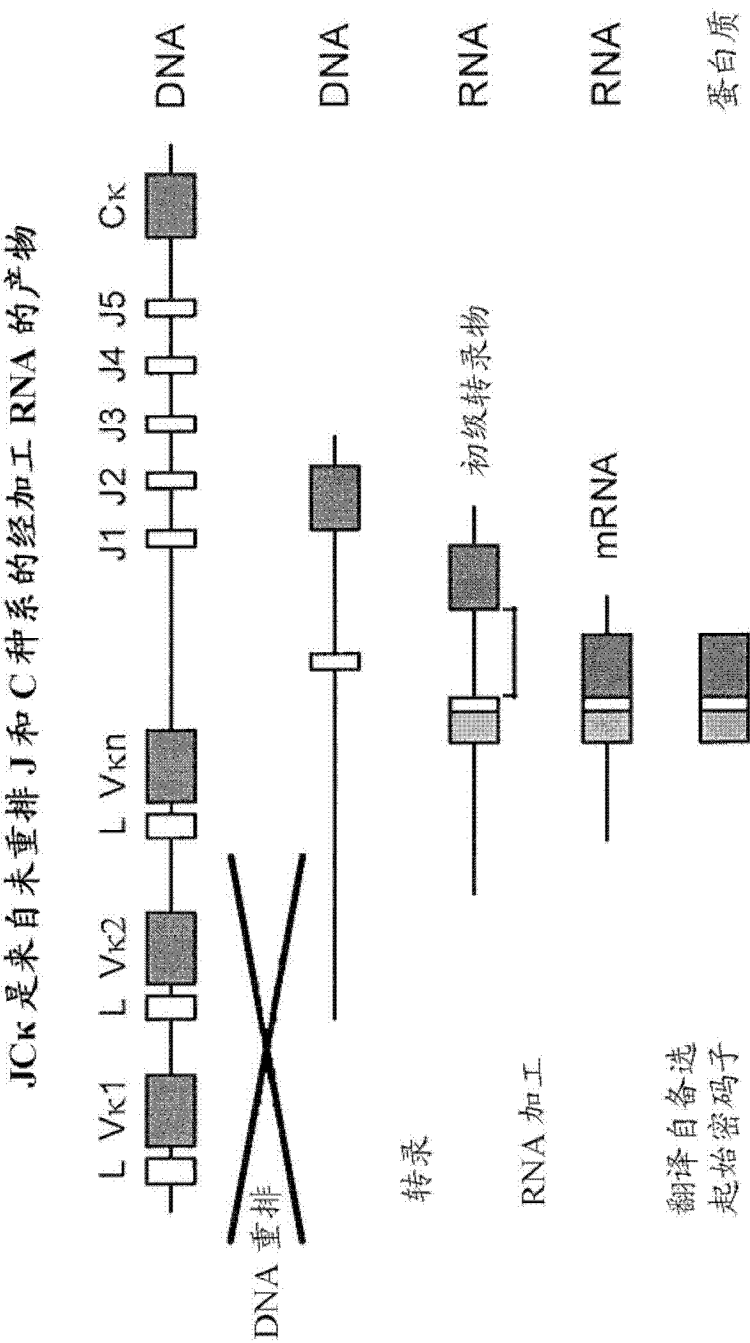


图 11

JC κ 是 45 种 JC 种系组合之一

- 有另外 44 种能够创建 JC κ 样蛋白的 VL 种系基因
 - 4 种更多的 J κ 基因与 C κ 组合
 - 4 种 J λ 基因与 10 种 C λ 基因组合 (总共 40 种)

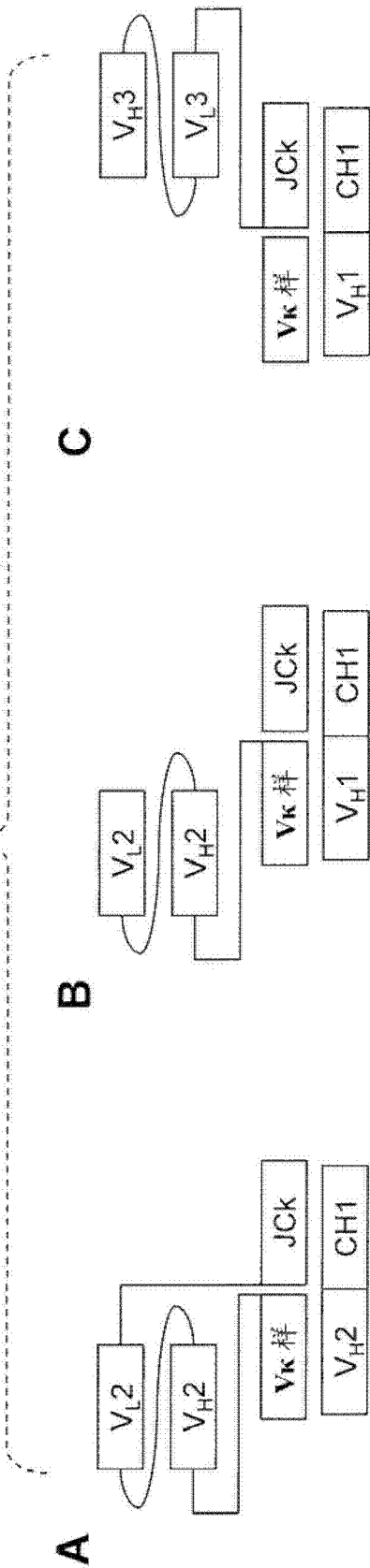
来自剩余 kJ 恒定区重排的预测 JCK 样

J1CK	WTFGGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
J2CK	YTFGGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
J3CK	FTFGPGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
J4CK	LTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
J5CK	ITFGGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
J1CK	SGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
J2CK	SGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
J3CK	SGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
J4CK	SGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
J5CK	SGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-

图 12

对 κ 样 SLC 构件添加功能性

双功能



三功能

- A - scFv 约束融合物
- B - V_K 样 scFv 融合物
- C - JCK scFv 融合物
- D - SLC 双重融合物

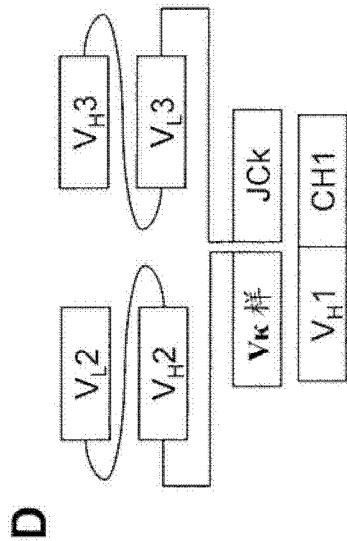


图 13

SLC 功能性尾延伸的类型

SLC 尾融合物	别的或增强的功能
金属配位肽	增强的结合
生长因子或细胞因子	第二活性或仅仅创建具有增强的 PK 的蛋白质
基于靶物的 (显性阴性完整蛋白质或片段)	指导结合来破坏蛋白质-蛋白质相互作用
蛋白酶	靶向渐进蛋白水解
糖肽	糖特异性相互作用和/或 PK 增强
膜相互作用肽	细胞表面锚定或细胞移位

图 14

与 κ 样 SLC 成分的 GLP-1 融合物

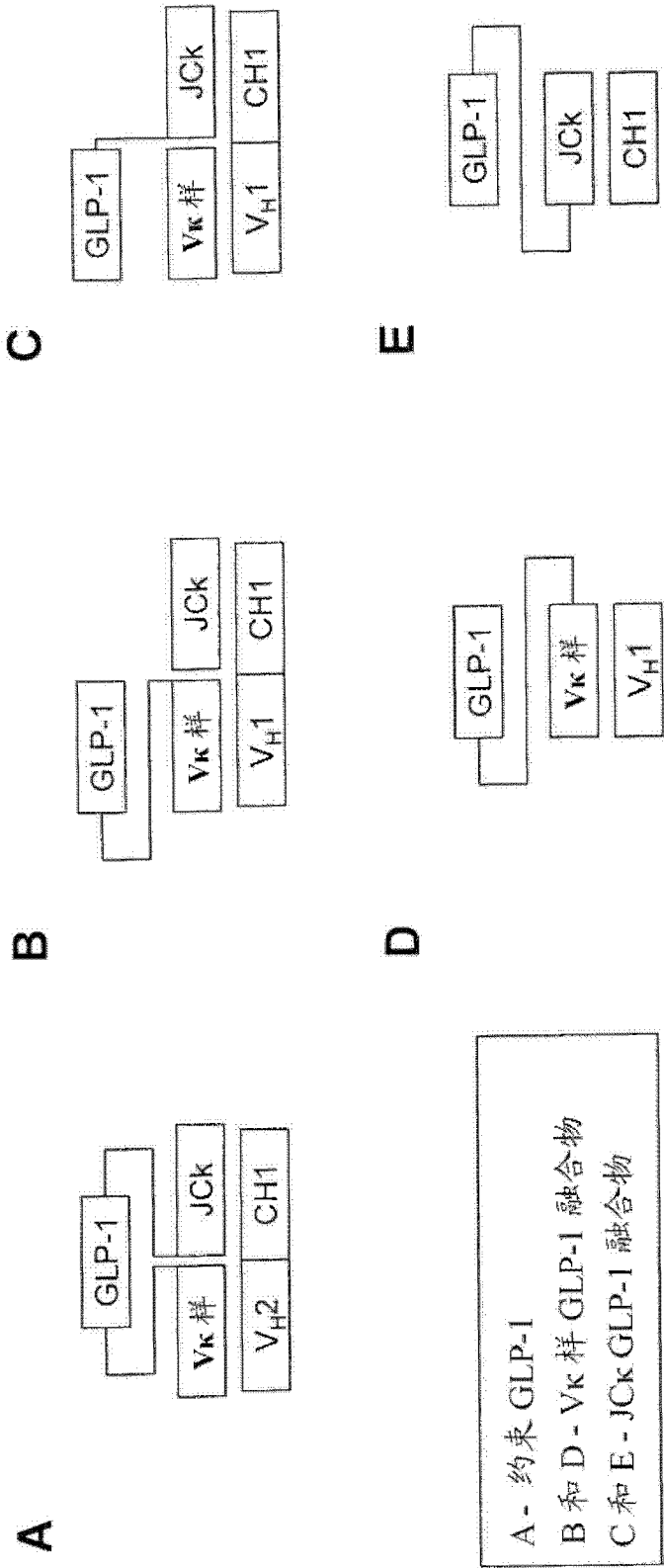


图 15

κ 样和 λ 样 SLC 嵌合物

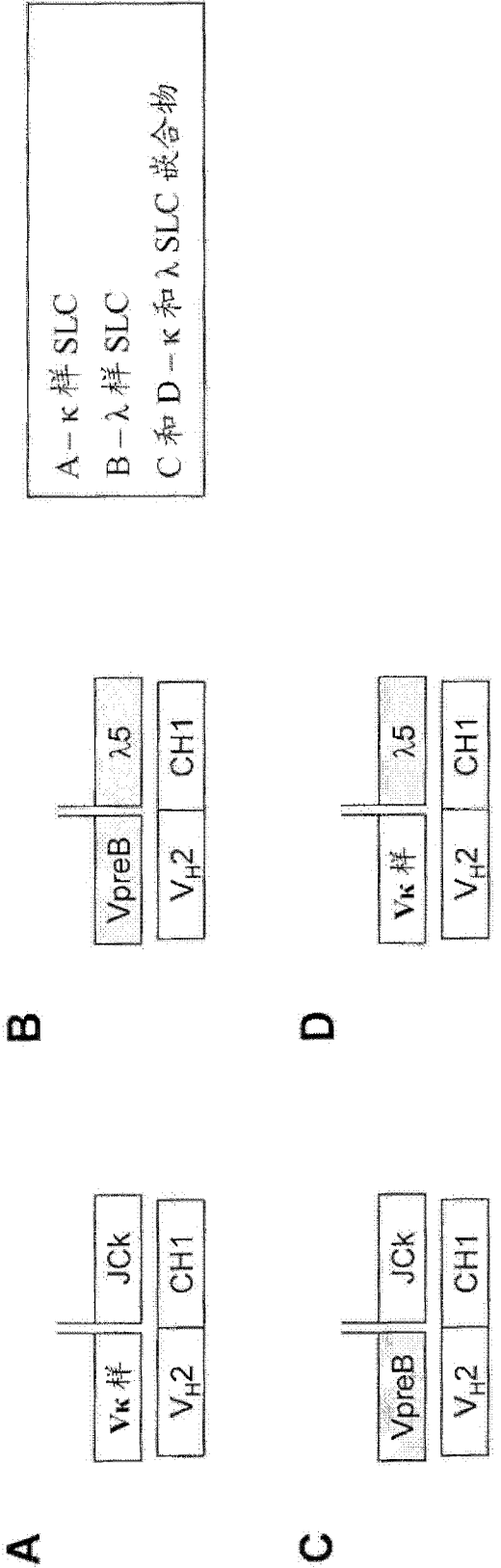


图 16

MSWAPVLLMLFVYCTGCGPQPV LHQPPAMSSALGTTIRLTCTLRNDHDIG
MSWAPVLLML FVYCTGCGPQ PVLHQPAMS SALGTTIRLT CTLRNDHDIG
VYSVYWYQQR PGHPPRFLLR YFSQSDKSQG PQVPPRFSGS KDVARNRGYL
SISELQPEDE AMYYCAMGAR SSEKEERERE WEEEMEPTAA RTRVP (人 VpreB1;
CAG30495; 145 个氨基酸; SEQ ID NO: 1)

MAWTSVLLML LAHLTGCGPQ PMVHQPPSAS SSLGATIRLS CTLSNDHNIG
IYSIWYQQR PGHPPRFLLR YFSHSDKHQG PDIPPRFSGS KDTARNLGYL
SISELQPEDE AVYYCAVGLR SHEKKRMERE WEGEKSYTDL GS (小鼠 VpreB2;
P13373; 142 个氨基酸; SEQ ID NO: 2)

MAWTSVLLML LAHLTGKGTG GVQGFAPPV ALLCPSDGHA SIFSGCGPQP
MVHQPPSASS SLGATIRLSC TLSNDHNIGI YSIWYQQR GHPPRFLLR
FSHSDKIHQGP DIPPRFSGS KDTARNLGYS ISELQPEDEA VYYCAVGLRS
HEKKRMEREW EGEKSYTDLG S (小鼠 VpreB2 剪接变体; CAA01964; 171 个氨基酸;
SEQ ID NO: 3)

MACRCLSFL MGTFLSVSQT VLAQLDALLV FPGQVAQLSC TLSPQHVTIR
DYGVSQYQQR AGSAPRYLLY YRSEEDHHRP ADIPDRFSAA KDEAHNACVL
TISPVQPEDD ADYYCSVGYG FSP (人 VpreB3; CAG30496; 123 个氨基酸; SEQ ID
NO: 4)

MKLRVGQTLGTIPRQCEVLLLLLLLGLVDGVHHILSPSSAERSRAVGPASVGSNRPSL
WALPGRLLFQIIPRGAGPRCSPHRLPSKPQFWYVFGGGTQLTILGQPKSDPLVTLFLPSLK
NLQPTRPHVVCLVSEFYPGTLVVDWKVDGVPVTQGVETTQPSKQTNNKYMVSSYLTLI
SDQWMPHSRYSRVTHEGNTVEKSVSPAEC (人 2.5; CAA01962; 209 个氨基酸;
SEQ ID NO: 5)

MRPGTGQGG EAPGEPGNL RQRWPLLLG LAVVTHGLLR PTAASQSRAL
GPGAPGGSSR SSLRSRWGRF LLQRGSWTGP RCWPRGFQSK HNSVTHVFGS
GTQLTVLSQP KATPSVTLFP PSSEELQANK ATLVCLMNDY YPGILTVTWK
ADGTPITQGV EMTTPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWRSRR SYSCQVMHEG
STVEKTVAPA ECS (人 2.5 样蛋白; NP_064455; 213 个氨基酸; SEQ ID NO: 6)

图 17