



(21) 申请号 201880074681.2

(22) 申请日 2018.11.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111511768 A

(43) 申请公布日 2020.08.07

(30) 优先权数据
62/588,914 2017.11.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/061592 2018.11.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/099882 EN 2019.05.23

(73) 专利权人 南特生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 安德斯·奥尔森

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
务所(普通合伙) 11413
专利代理师 王春伟 刘继富

(51) Int. Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101720368 A, 2010.06.02

CN 102227440 A, 2011.10.26

CN 102227638 A, 2011.10.26

CN 1672160 A, 2005.09.21

CN 1946422 A, 2007.04.11

US 2009318297 A1, 2009.12.24

WO 2009085462 A1, 2009.07.09

WO 2017186928 A1, 2017.11.02

Isao Fukuda等. In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display.《Nucleic Acids Res》.2006,第34卷(第19期),e127第1-6页,图1、4.

Gautier Robin, Pierre Martineau. Synthetic customized scFv libraries.《Methods Mol Biol》.2014,第907卷第109-122页.

Kathryn E Tiller等. Facile Affinity Maturation of Antibody Variable Domains Using Natural Diversity Mutagenesis.《Front Immunol》.2017,第8卷Article 986摘要、第3-4页.

审查员 何永培

权利要求书6页 说明书15页
序列表14页 附图15页

(54) 发明名称

mRNA展示抗体文库和方法

(57) 摘要

本发明提供了编码多个抗体或抗体片段的高多样性核酸文库的组合物、方法和用途。所述高多样性核酸文库包含或衍生自(1) V_H -CDR1/2子文库,(2) 多个 V_H -CDR3子文库,和(3) V_L 子文库,其中的每个包含多个成员。优选地,所述子文库的每个成员包含至少一个具有多个简并碱基位置的随机盒。在一个特别优选的实施例中,将所述 V_H -CDR1/2子文库、所述多个 V_H -CDR3子文库和所述 V_L 子文库的至少两个成员的至少部分进行重组以形成表达文库中的表达文库成员,其中

所述表达文库的每个成员编码不同的抗体或抗体片段。

POS#	VH 类型	CDR1	CDR2	CDR3	H3 长度	K 类型	CDRL3	K 长度
2nd	3-54	FFFSYVSH	SAISSGGSTTY	RHHYNAFDV	14	K1-33	QQYDNLGOLF	255
42nd	3-30	FFFSYVSH	AVISYDGGNTY	RHHYVGMGV	14	K1-33	QQYDNLPLTF	255
42nd	3-11	FELSDYTHN	AVISSEGGYTN	RHHYDQYKH	12	K1-33	QQYDNLPTF	255
19th	3-23	FFFSYVSH	SGVSSGGGMD	KHHYVGFDS	12	K1-33	QQYDNLPLTF	255
19th	3-8	FFFSYVSH	SGVSSGGGSG	KHHYVAFDI	17	K1-5	QQYNSY-SF	255
42nd	3-30	FFFSYVSH	AVMYDGGND	RHHYVGLDV	19	K1-17	LQHNRP-LTF	255
42nd	3-13	FFFSYVSH	GGTADQTY	RHHYVGMGV	14	K1-5	KQYADYV-TF	255
12nd	3-30	FFFSYVSH	ALISYDGGNTY	KHHYVAFDI	12	K1-39	QQYNSAP-RTF	255
2nd	3-23	FFFSYVSH	ABLSGGGTH	KHHYVGFDL	12	K1-16	QQYNSYV-RTF	255
2nd	3-48	FFFSYVSH	SYSTSTSTTY	RHHYVGFDI	6	K1-39	QQYNSAP-RTF	255
19th	3-30	FFFSYVSH	AVISDGGNTY	RHHYVGMGV	14	K1-33	QQYNSYV-TF	255
42nd	3-30	FFFSYVSH	ALISYDGGNTY	RHHYVGMGV	13	K1-12	QQYNSAP-LTF	255
3rd	3-30	FFFSYVSH	ALISYDGGNTY	RHHYVGMGV	19	K1-33	QQYNSAP-LTF	255
42nd	3-30	FFFSYVSH	AFISYDGGNTY	RHHYVGMGV	16	K1-39	QQYNSAP-LTF	255

随机化方案: 10-16 K1-33 QQYNSYV-TF 255

VH3 种系共有/序列: 10-16 K1-33 QQYNSYV-TF 255

[接上页]

(56) 对比文件

Dongmei Hu等.Effective Optimization of Antibody Affinity by Phage Display Integrated with High-Throughput DNA Synthesis and Sequencing Technologies.《PLOS One》.2015,第10卷(第6期),e0129125第3-4、6-8页.

Sachdev S Sidhu等.Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining

regions.《J Mol Biol》.2004,第338卷(第2期),摘要、第300-302页,图2-3.

Weizao Chen等.Construction of a human antibody domain (VH) library.《Methods Mol Biol》.2010,第525卷第81-99页.

Wei-Ching Liang等.Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library.《J Mol Biol》.2006,第366卷(第3期),摘要,第817-819、826页,表2.

1. 一种产生编码多个抗体或抗体片段的高多样性核酸文库的方法, 其中所述高多样性核酸文库的成员各自独立地包含多个随机盒, 所述多个随机盒衍生自 (1) V_H -CDR1/2 子文库, (2) 多个 V_H -CDR3 子文库, 和 (3) V_L 子文库, 其中所述随机盒的每一个独立地具有多个简并碱基位置, 所述方法包括:

产生或提供 (1) 所述 V_H -CDR1/2 子文库, (2) 所述多个 V_H -CDR3 子文库, 和 (3) 所述 V_L 子文库, 其中所述子文库 (1) - (3) 中的每一个包含多个成员;

其中所述子文库的每个成员包含至少一个具有多个简并碱基位置的随机盒; 并且

重组所述 V_H -CDR1/2 子文库、所述多个 V_H -CDR3 子文库和所述 V_L 子文库的至少两个成员的至少部分, 以形成表达文库中的表达文库成员, 其中所述表达文库包含多个表达文库成员, 每个表达文库成员编码不同的抗体或抗体片段;

其中 V_H -CDR1 子文库包含选自 SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:5 的随机盒,

其中所述 V_H -CDR2 子文库包含两个随机盒: 针对 CDR2 的 5' 末端侧的选自 SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:12 的 V_H -CDR2-n, 和针对 CDR2 的 3' 末端侧的选自 SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:16 的 V_H -CDR2-c,

其中所述 V_H -CDR3 子文库包含序列为 SEQ ID NO:17 的随机盒, 并且

其中 V_L -CDR3 子文库包含选自 SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:25 的随机盒。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 V_H -CDR1/2 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR1 的一部分和 V_H CDR2 的一部分中的至少一个的随机盒。

3. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 V_H -CDR1/2 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR1 的至少一部分和 V_H CDR2 的部分的多个随机盒。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中所述 V_H -CDR1/2 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR2 的至少一部分的多个随机盒。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 V_H -CDR3 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR3 的至少一部分的随机盒。

6. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 V_H -CDR3 子文库的成员的至少两个随机盒编码不同长度的肽。

7. 如权利要求 6 所述的方法, 其中所述肽的长度在 10-20 个氨基酸的范围内。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述 V_L 子文库的多个成员包含在 V_L CDR3 的一部分处的随机盒。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述子文库的多个成员具有共有序列。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述表达文库成员中的每个包含多个所述随机盒。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述重组包括分离所述 V_H -CDR1/2 子文库的多个成员的至少多个部分和所述多个 V_H -CDR3 子文库中的一个并融合在一起以形成 V_H 结构域文库中的 V_H 结构域文库成员, 其中所述 V_H 结构域文库包含多个 V_H 结构域文库成员。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 所述方法进一步包括分离所述 V_L 子文库的所述成员的至少一部分, 并将所述 V_L 子库的所述成员的所述部分与所述 V_H 结构域库成员之一融合以形成所述表达文库成员。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中所述 V_L 子文库的所述成员的所述部分通过编码接头的序列偶联。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述接头是富含甘氨酸的肽。

15. 如权利要求1所述的方法,其中所述重组包括分离所述 V_H -CDR1/2子文库的多个成员的至少多个部分和所述多个 V_H -CDR3子文库中的一个并融合在一起以形成第一组表达文库成员。

16. 如权利要求15所述的方法,所述方法进一步包括第二组表达文库成员,其中所述第二组包含所述 V_L 子文库的多个成员的至少多个部分。

17. 如权利要求1所述的方法,其中所述不同的抗体或抗体片段包含scFv。

18. 如权利要求17所述的方法,所述方法进一步包括亚克隆所述表达文库成员以构建具有所述scFv的IgG1。

19. 如权利要求16所述的方法,所述方法进一步包括亚克隆来自所述第一和第二组中的每一组的各一个成员,以形成具有重组 V_H 和 V_L 结构域的IgG1。

20. 如权利要求1所述的方法,所述方法进一步包括基于以下中的至少一个选择所述表达文库成员的子集:对配体的亲和力、pH敏感性和物种交叉反应性。

21. 如权利要求20所述的方法,所述方法进一步包括选择所述表达文库成员的子集,所述子集编码以小于50nM的Kd结合到所述配体的scFv。

22. 如权利要求1所述的方法,所述方法进一步包括:

将所述表达文库成员转录成mRNA片段;并且

在所述mRNA片段的3'末端偶联嘌呤霉素分子。

23. 一种具有多个核酸文库的组合物,所述组合物包含:

(1) V_H -CDR1/2子文库,(2)多个 V_H -CDR3子文库,和(3) V_L 子文库;

其中所述子文库(1)-(3)中的每一个包含多个成员;并且

其中所述子文库的每个成员包含至少一个具有多个简并碱基位置的随机盒,并且

其中所述核酸文库的每个成员独立地包含多个随机盒,所述多个随机盒衍生自(1) V_H -CDR1/2子文库,(2)多个 V_H -CDR3子文库,和(3) V_L 子文库,其中所述随机盒的每一个独立地具有多个简并碱基位置;

其中 V_H -CDR1子文库包含选自SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:5的随机盒,

其中所述 V_H -CDR2子文库包含两个随机盒:针对CDR2的5'末端侧的选自SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:12的 V_H -CDR2-n,和针对CDR2的3'末端侧的选自SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:16的 V_H -CDR2-c,

其中所述 V_H -CDR3子文库包含序列为SEQ ID NO:17的随机盒,并且

其中 V_L -CDR3子文库包含选自SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:25的随机盒。

24. 如权利要求23所述的组合物,所述组合物进一步包含编码柔性肽接头的核酸序列。

25. 如权利要求23所述的组合物,其中所述子文库(1)-(3)中的至少一个包含编码柔性肽接头的核酸序列。

26. 如权利要求23所述的组合物,其中所述多个 V_H -CDR3子库中的第一具有与所述多个 V_H -CDR3子库中的第二不同的长度。

27. 如权利要求23所述的组合物,其中所述多个简并碱基位置是至少两个简并碱基位置。

28. 如权利要求23所述的组合物,其中所述 V_H -CDR1/2子文库的多个成员包含对应于 V_H

CDR1的一部分和 V_H CDR2的一部分中的至少一个的随机盒。

29. 如权利要求23所述的组合物,其中所述 V_H -CDR1/2子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR1的至少一部分和 V_H CDR2的部分的多个随机盒。

30. 如权利要求23所述的组合物,其中所述 V_H -CDR1/2子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR2的至少一部分的多个随机盒。

31. 如权利要求23所述的组合物,其中所述 V_H -CDR3子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR3的至少一部分的随机盒。

32. 如权利要求23所述的组合物,其中所述 V_L 子文库的多个成员包含在 V_L CDR3的一部分处的随机盒。

33. 如权利要求23所述的组合物,其中所述 V_H -CDR3子文库的成员的至少两个随机盒编码不同长度的肽。

34. 如权利要求33所述的组合物,其中所述肽的长度在10-20个氨基酸的范围内。

35. 如权利要求23所述的组合物,其中所述子文库的多个成员包含共有序列。

36. 如权利要求23所述的组合物,所述组合物进一步包含具有多个 V_H 结构域文库成员的 V_H 结构域文库,其中所述 V_H 结构域文库成员中的每个包含所述 V_H -CDR1/2子文库的成员的至少一部分和所述 V_H -CDR3子文库之一的成员的至少一部分。

37. 如权利要求23-36中任一项所述的组合物用于产生高多样性核酸文库的用途。

38. 一种具有多个文库成员的高多样性核酸文库组合物,其中每个文库成员包含:

重组核酸,所述重组核酸包含多个随机盒,每个随机盒具有多个简并碱基位置;

其中所述多个随机盒来自以下中的两个库中的任何一个库中的至少两个成员衍生:

(1) V_H -CDR1/2子文库, (2) 多个 V_H -CDR3子文库,和 (3) V_L 子文库;并且

其中所述子文库中的每一个包含多个成员;

其中 V_H -CDR1子文库包含选自SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:5的随机盒,

其中所述 V_H -CDR2子文库包含两个随机盒:针对CDR2的5'末端侧的选自SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:12的 V_H -CDR2-n,和针对CDR2的3'末端侧的选自SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:16的 V_H -CDR2-c,

其中所述 V_H -CDR3子文库包含序列为SEQ ID NO:17的随机盒,并且

其中 V_L -CDR3子文库包含选自SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:25的随机盒。

39. 如权利要求38所述的组合物,其中所述 V_H -CDR1/2子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR1的一部分和 V_H CDR2的一部分中的至少一个的随机盒。

40. 如权利要求38所述的组合物,其中所述 V_H -CDR1/2子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR2的至少一部分的多个随机盒。

41. 如权利要求38所述的组合物,其中所述 V_H -CDR1/2子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR2的至少一部分的多个随机盒。

42. 如权利要求38所述的组合物,其中所述 V_H -CDR3子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR3的至少一部分的随机盒。

43. 如权利要求38所述的组合物,其中所述 V_L 子文库的多个成员包含在 V_L CDR3的一部分处的随机盒。

44. 如权利要求38所述的组合物,其中所述 V_H -CDR3子文库的成员的至少两个随机盒编

码不同长度的肽。

45. 如权利要求44所述的组合物,其中所述肽的长度在10-20个氨基酸的范围内。

46. 如权利要求38所述的组合物,其中所述子文库的多个成员包含共有序列。

47. 如权利要求38所述的组合物,其中所述多个文库成员包含在所述多个随机盒中的两个之间的接头。

48. 如权利要求38所述的组合物,其中每个文库成员编码不同的抗体或抗体片段。

49. 如权利要求38所述的组合物,其中所述多个文库成员基于以下中的至少一个来分级:对配体的亲和力、pH敏感性和物种交叉反应性。

50. 如权利要求49所述的组合物,其中所述文库成员的子集编码以小于50nM的Kd结合到所述配体的scFv。

51. 如权利要求38所述的组合物,其中所述文库成员是mRNA片段,每个片段在3'末端与嘌呤霉素偶联。

52. 如权利要求38-50中任一项所述的组合物在产生针对癌症新表位的治疗性重组抗体中的用途。

53. 一种产生重组抗体的方法,所述方法包括:

产生或提供高多样性核酸文库,其中所述高多样性核酸文库的成员各自独立地包含多个随机盒,所述多个随机盒衍生自(1) V_H -CDR1/2子文库,(2)多个 V_H -CDR3子文库,和(3) V_L 子文库,其中所述随机盒的每一个独立地具有多个简并碱基位置;

其中所述子文库的每个成员包含至少一个具有多个简并碱基位置的随机盒;

重组所述 V_H -CDR1/2子文库、所述多个 V_H -CDR3子文库和所述 V_L 子文库的至少两个成员的至少部分,以形成表达文库中的表达文库成员,其中所述表达文库包含多个表达文库成员,每个表达文库成员编码不同的抗体或抗体片段;并且

使用所述表达文库成员产生所述重组抗体或其片段;

其中 V_H -CDR1子文库包含选自SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:5的随机盒,

其中所述 V_H -CDR2子文库包含两个随机盒:针对CDR2的5'末端侧的选自SEQ ID NO:6-SEQ ID NO:12的 V_H -CDR2-n,和针对CDR2的3'末端侧的选自SEQ ID NO:13-SEQ ID NO:16的 V_H -CDR2-c,

其中所述 V_H -CDR3子文库包含序列为SEQ ID NO:17的随机盒,并且

其中 V_L -CDR3子文库包含选自SEQ ID NO:18-SEQ ID NO:25的随机盒。

54. 如权利要求53所述的方法,其中通过将所述表达文库成员亚克隆到抗体载体中产生所述重组抗体或其片段。

55. 如权利要求53所述的方法,其中所述抗体或其片段选自由以下组成的组:

(a) 完整免疫球蛋白分子;

(b) scFv;

(c) 单克隆抗体;

(d) 人抗体;

(e) 人源化的抗体;

(f) 嵌合抗体;

(g) Fab片段;

- (h) Fab' 片段;
- (i) F(ab')₂;
- (j) Fv; 以及
- (k) 二硫键连接的 Fv。

56. 如权利要求 54 所述的方法, 其中所述抗体载体包含选自下组的重链免疫球蛋白恒定结构域, 该组由以下组成:

- (b) 人 IgG 1 恒定结构域;
- (c) 人 IgG2 恒定结构域;
- (d) 人 IgG3 恒定结构域;
- (e) 人 IgG4 恒定结构域; 以及
- (f) 人 IgA 恒定结构域。

57. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述 V_H-CDR1/2 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR1 的一部分和 V_H CDR2 的一部分中的至少一个的随机盒。

58. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述 V_H-CDR1/2 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR1 的至少一部分和 V_H CDR2 的部分的多个随机盒。

59. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述 V_H-CDR1/2 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR2 的至少一部分的多个随机盒。

60. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述 V_H-CDR3 子文库的多个成员包含对应于 V_H CDR3 的至少一部分的随机盒。

61. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述 V_L 子文库的多个成员包含在 V_L CDR3 的一部分处的随机盒。

62. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述 V_H-CDR3 子文库的成员的至少两个随机盒编码不同长度的肽。

63. 如权利要求 62 所述的方法, 其中所述肽的长度在 10-20 个氨基酸的范围内。

64. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述子文库的多个成员包含共有序列。

65. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述表达文库成员中的每个包含多个所述随机盒。

66. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述重组包括分离所述 V_H-CDR1/2 子文库的多个成员的至少多个部分和所述多个 V_H-CDR3 子文库中的一个并融合在一起以形成 V_H 结构域文库中的 V_H 结构域文库成员, 其中所述 V_H 结构域文库包含多个 V_H 结构域文库成员。

67. 如权利要求 53 所述的方法, 所述方法进一步包括分离所述 V_L 子文库的所述成员的至少一部分, 并将所述 V_L 子库的所述成员的所述部分与所述 V_H 结构域库成员之一融合以形成所述表达文库成员。

68. 如权利要求 67 所述的方法, 其中所述 V_L 子文库的所述成员的所述部分用接头偶联。

69. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述接头是富含甘氨酸的肽。

70. 如权利要求 53 所述的方法, 其中所述重组包括分离所述 V_H-CDR1/2 子文库的多个成员的至少多个部分和所述多个 V_H-CDR3 子文库中的一个并融合在一起以形成第一组表达文库成员。

71. 如权利要求 70 所述的方法, 所述方法进一步包括第二组表达文库成员, 其中所述第二组包含所述 V_L 子文库的多个成员的至少多个部分。

72. 如权利要求71所述的方法,所述方法进一步包括亚克隆来自所述第一和第二组中的每一组的各一个成员,以形成具有重组 V_H 和 V_L 结构域的IgG1。

73. 如权利要求53所述的方法,所述方法进一步包括基于以下中的至少一个选择所述表达文库成员的子集:对配体的亲和力、pH敏感性和物种交叉反应性。

74. 如权利要求73所述的方法,所述方法进一步包括选择所述表达文库成员的子集,所述子集编码以小于50nM的Kd结合到所述配体的scFv。

75. 一种分离对抗原具有等于或小于100nM亲和力的高亲和力结合物的方法,所述方法包括:

使所述抗原与通过如权利要求1-22中任一项或权利要求53-74中任一项所述的方法构建的组合物接触。

mRNA展示抗体文库和方法

[0001] 本申请要求2017年11月20日提交的序列号为62/588,914的我们共同未决的美国临时专利申请的优先权。

技术领域

[0002] 本发明的领域是用于超高多样性抗体文库的组合物和方法,特别是因为它涉及mRNA展示文库以及涉及mRNA展示文库用于产生重组高亲和力结合物的用途。

背景技术

[0003] 背景描述包括可用于理解本发明的信息。并不承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明相关,也不承认具体地或隐含地提到的任何出版物是现有技术。

[0004] 本文中的所有出版物和专利申请都通过引用并入,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体地且单独地指明通过引用并入一样。在并入的参考文献中的术语的定义或用法与本文提供的该术语的定义不一致或相反时,适用本文提供的该术语的定义,而不适用于该术语在该参考文献中的定义。

[0005] 以高亲和力、特异性抗体或结合分子靶向肿瘤抗原或新表位已被证明是治疗癌症患者的有效方法。随着越来越多的患者特异性和/或癌症特异性肿瘤抗原和/或新表位通过组学数据分析通过体内、体外或计算机模拟被鉴定,创建抗体文库或展示文库的需求已经增长,所述抗体文库或展示文库提供高概率地选择稳定、可溶性、功能性和适应性的抗体或结合物。虽然高亲和力、特异性抗体或结合分子可以在天然抗体池中鉴定或衍生自天然抗体池,但这种鉴定或衍生的天然抗体或结合物可能不是有效或特异性的,因为取决于暴露于这些抗原或新表位的频率或强度,这些天然抗体的多样性可能受到限制。

[0006] 在解决此类问题的一种方法中,可以使用重组噬菌体展示文库。虽然这样的方法允许生成具有合理高多样性的文库,但是经常需要对结合物进行多轮的富集,这是劳动密集的和耗时的。此外,尽管有相对较大的多样性,结合物往往具有不太理想的亲和力和稳定性。此外,多样性通常受到诸如文库体积、转染效率等实际考虑因素的限制。例如,如WO 2006/072773中所述,使用多个人工选择压力可以进一步优化这样的方法和其他方法。尽管此类方法可以改善稳定性特征,但需要大量的文库操作和时间。

[0007] 在另一种方法中,可以进行mRNA展示。这里,编码候选结合分子(典型的scFv)的mRNA序列在其3'末端与嘌呤霉素分子偶联,并且通过体外翻译产生由所述mRNA序列编码的肽,以产生将所述mRNA直接偶联到由所述mRNA编码的蛋白质的融合产物。然而,尽管当前的mRNA展示技术有利地避免了与转染限制相关的问题,并且至少在概念上允许更高的多样性,但仍然存在结构完整性或稳定性、相对低的亲和力和/或交叉反应性的问题。为了进一步改善来自mRNA展示的scFv的至少选定的结合特征,执行VH-CDR3谱型分析(见Protein Engineering, Design & Selection[蛋白质工程、设计与选择],2015,第28卷 第10期,第427-435页)。然而,这样的过程需要迭代分析,并且并不是能对所有抗原都有效。

[0008] 因此,即使使用mRNA展示和其他方法创建和鉴定候选结合物的方法是已知的,具有高结构完整性/稳定性、低亲和力和/或低交叉反应性的结合物的高多样性文库仍然难以得到。因此,仍然需要改进用于mRNA展示文库的组合物、方法和用途,以快速产生稳定的重组高亲和力结合物。

发明内容

[0009] 本发明的主题涉及编码多个抗体或抗体片段的高多样性核酸文库的各种组合物、方法和用途,以允许可靠且有效地鉴定针对多种生物分子特别是癌症抗原或新表位的稳定的、可溶性的和功能性的抗体或结合物。因此,本主题的一个方面包括产生编码多个抗体或抗体片段的高多样性核酸文库的方法。在此方法中,生成或提供三个子文库:(1) V_H -CDR1/2子文库,(2) 多个 V_H -CDR3子文库,以及(3) V_L 子文库,每个子文库都具有多个成员。三个子文库中的每个成员都包含至少一个随机盒,所述随机盒具有多个简并的碱基位置。三个文库的至少两个成员的至少部分被重组以形成表达文库中的表达文库成员,所述表达文库具有多个表达文库成员。每个表达文库成员编码不同的抗体或抗体片段。在优选实施例中,将表达文库成员转录成mRNA片段,所述mRNA片段然后在3'末端与嘌呤霉素分子偶联。

[0010] 在本发明主题的另一方面,发明人设想了具有多个核酸文库的组合物。所述多个核酸文库包含(1) V_H -CDR1/2子文库,(2) 多个 V_H -CDR3子文库,和(3) V_L 子文库。子文库(1)-(3)中的每个包含多个成员,并且子文库的每个成员包含具有多个简并碱基位置的至少一个随机盒。

[0011] 在本发明主题的另一方面,发明人设想了上述组合物在产生高多样性核酸文库中的用途。

[0012] 在本发明主题的又一方面,发明人设想了具有多个文库成员的高多样性核酸文库组合物。所述高多样性核酸文库成员包含重组核酸,所述重组核酸包含多个随机盒,每个盒具有多个简并碱基位置。所述多个随机盒来自以下中的两个库中的任何一个库中的至少两个成员衍生:(1) V_H -CDR1/2子文库,(2) 多个 V_H -CDR3子文库,和(3) V_L 子文库。

[0013] 在本发明主题的又一方面,发明人设想了高多样性核酸文库用于产生针对癌症新表位的治疗性重组抗体的用途。

[0014] 在本发明主题的又一方面,发明人设想了产生重组抗体的方法。在此方法中,生成或提供三个子文库:(1) V_H -CDR1/2子文库,(2) 多个 V_H -CDR3子文库,以及(3) V_L 子文库,每个子文库都具有多个成员。三个子文库中的每个成员都包含至少一个随机盒,所述随机盒具有多个简并的碱基位置。三个文库的至少两个成员的至少部分被重组以形成表达文库中的表达文库成员,所述表达文库具有多个表达文库成员。每个表达文库成员编码不同的抗体或抗体片段。然后,所述方法继续使用表达文库成员产生重组抗体或其片段。

[0015] 在本发明主题的另一个方面,发明人设想了一种通过使抗原与通过上述方法构建的组合物接触来分离与抗原具有等于或小于100nM亲和力的高亲和力结合物的方法。

[0016] 在本发明主题的又一方面,发明人设想了使用选自下面提供的表1或表2的寡核苷酸生成的重组核酸片段。

[0017] 在本发明主题的又一方面,发明人设想了具有选自下面提供的表1或表2的核酸序列的合成核酸混合物。

[0018] 本发明主题的多个对象、特征、方面和优点将根据以下关于优选实施例的详细描述以及附图而变得更清楚。

附图说明

[0019] 图1示出了使用VH3/Vk1对的一个示例性随机化策略。

[0020] 图2示出了重链CDR1和CDR2中序列随机化的示例性位置。

[0021] 图3示出了重链CDR3中的示例性序列随机化。

[0022] 图4示出了轻链CDR3中的示例性序列随机化,其中核酸序列位于左侧,氨基酸选择位于右侧。

[0023] 图5示出了通过分离和组合多个重组核酸片段的随机盒来产生杂合核酸元件的示例性方法。

[0024] 图6显示了尺寸排阻色谱结果,所述结果显示表明 α B7-H4₈₀₁的稳定蛋白表达的单个峰。

[0025] 图7显示了毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)数据,表明与商业抗体相比, α B7-H4₈₀₁的分子行为相似。

[0026] 图8显示了表明体外选择的 α B7-H4抗体与B7-H4结合的图。

[0027] 图9显示了体外选择的 α B7-H4结合物和 α PD-L1结合物的功能分析的图。

[0028] 图10显示了表明 α B7-H4 scFv和 α B7-H4 IgG1的结合亲和力的图。

[0029] 图11显示了通过测量中性粒细胞大小变化的IL-8活性测定及其结果。

[0030] 图12显示了柱状图,表明 α IL-8抗体对增加中性粒细胞大小的IL-8活性的中和作用。

[0031] 图13在柱状图中显示了IL-8活性测定及其结果,表明 α IL-8抗体通过抑制中性粒细胞迁移而对IL-8活性的中和作用。

[0032] 图14显示了使用本文所述的mRNA展示文库组合物相对于所选抗原靶标的示例性结果。

[0033] 图15显示了描述配置为scFv的选定结合物相比于IgG的亲合力的示例性图,其中结合物使用本文所述的mRNA展示文库组合物鉴定。

具体实施方式

[0034] 发明人现在发现,通过使用由高多样性核酸文库成员编码的抗体或其片段的选定结构域的靶向多样化构建高多样性核酸文库,可以产生或鉴定特异性和有效的重组抗体或其片段。为了实现这样的目标,发明人现在已经发现,可以预选抗体/结合物的一个或多个结构域或亚结构域,并且可以使用预选的结构域或亚结构域中的随机盒来产生多个核酸亚文库。发明人进一步发现,子文库的成员可以重组以构建高多样性核酸文库,所述高多样性核酸文库允许文库成员之间的高多样性,但提供鉴定抗体/结合物的更高概率,所述抗体/结合物当用于体内对抗癌症抗原或新表位(优选癌症特异性、患者特异性新表位或新抗原)时是稳定的、可溶性的、功能性的和适应性的。

[0035] 实际上,如下文更详细地所示,本文所述文库允许分离至少一种与任何任意抗原的结合物,典型地以单次或两次富集,其中所述结合物具有等于或小于100nM,更典型地等

于或小于10nM的 K_d 。此外,所设想的系统和方法允许scFv文库具有至少 10^9 、至少 10^{10} 、至少 10^{11} 、至少 10^{12} 、至少 10^{13} 、至少 10^{14} 、至少 10^{15} 或至少 10^{16} 个不同文库成员的多样性,所有这些都在与常规文库构建相比显著减少的时间范围内。因此,应当理解,抗体发现的速度大大提高了。

[0036] 如本文所用,术语“肿瘤”是指以下项并且可与以下项互换使用:一种或多种癌细胞、癌组织、恶性肿瘤细胞或恶性肿瘤组织,它们可以位于或者发现于人体的一个或多个解剖位置中。

[0037] 如本文所用,术语“结合”是指术语“识别”和/或“检测”,并且可以与该术语互换使用,即具有高亲和力的两个分子之间的相互作用, K_D 等于或小于 10^{-6} M或等于或小于 10^{-7} M。

[0038] 如本文所用,术语“提供(provide)”或“提供(providing)”是指并且包括制造、产生、放置、使得能使用或准备使用的任何行为。

[0039] 核酸子文库的构建

[0040] 通常抗体的结构组分(重链、轻链、恒定结构域、可变结构域)与其功能密切相关。例如,重链(V_H)和轻链(V_L)中的可变结构域共同构成表位结合结构域,其提供针对抗体的特异性。 V_H 和 V_L 中的每一个包含三个互补决定区(CDR, CDR1-3),其具有基于其对抗原的特异性的独特氨基酸序列。因此,先前已设想通过随机化编码 V_H 和 V_L 的CDR的序列来创建用于产生或鉴定抗体的重组核酸文库。然而,发明人发现,尽管 V_H 和 V_L 的所有CDR的完全随机化可为文库提供很大的多样性,但它也在产生随机序列的所有组合和筛选所有随机化的组合方面造成低效,因为当重组以形成抗体(例如IgG1等)时,并非所有随机化的 V_H 和 V_L 都可溶解或稳定表达。而且,由于可能的库成员数量极其庞大,覆盖整个多样性空间并不现实。

[0041] 因此,发明人设想, V_H 和 V_L 的子结构域可分为两类:在不同抗体(或编码所述抗体的基因)的 V_H 或 V_L 中通常共同的框架区以及靶向多样化区,所述靶向多样化区可至少部分或完全随机化而不显著影响最终肽产物(例如scFv, IgG1等)的稳定性和/或溶解度。优选地, V_H 的靶向多样化区包含CDR1的至少一部分、CDR2-n(CDR2的N-末端侧)、CDR2-c(CDR2的C-末端侧)和CDR3。在进一步优选的方面中, V_L 的靶向多样化区包含CDR3的至少一部分。

[0042] 因此,在本发明主题的一个示例性和特别优选的方面中,可以通过产生重组核酸来创建核酸文库,所述重组核酸包括在 V_H 和/或 V_L 的一个或多个靶向多样化区中的一个或多个随机序列盒。在一个优选实施例中,发明人设想三个不同的子文库,其在不同的靶向多样化区中具有不同的随机序列盒组,使得每个子文库在随机化的靶向多样化区中保留多样性,同时避免单个子文库中有太多的随机化的重组序列(这可能使得单个子文库的体积对于快速或及时筛选来说是操作不切实际或低效的)。此外,靶向多样化区之间的保守区域被选择或设计为最大的稳定性和溶解性。

[0043] 在一个实施例中,子文库包括 V_H -CDR1/2子文库。所述 V_H -CDR1/2子文库包含多个重组核酸(例如,重组DNA),所述重组核酸具有对应于 V_H CDR1的至少一部分和/或 V_H CDR2的至少一部分处的一个或多个随机序列盒。如本文所使用的,对应于 V_H CDR1的一部分的随机盒是指所述随机盒位于重组核酸的区域中,其中应该存在编码CDR1部分的序列,以便编码 V_H 结构域的一部分,该部分至少在结构上或功能上类似于天然抗体的 V_H 结构域。例如, V_H -CDR1/2子文库中的重组核酸可能具有如下结构(随机化的区域加下划线,并且固定的测序的区域加括号):

[0044] 5' - (启动子-5' UTR-FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (FW3-CDR3-FW4)

[0045] 如本文所使用的,UTR指的是未翻译区,FW指的是框架区(例如,FW1是可以不同于第二框架区(FW2)的第一框架区)。在这种结构中,可以将随机序列盒插入CDR1或CDR2的区域,或者优选地插入CDR1和CDR2的区域。在一些实施例中,可以在CDR2的区域中插入多于一个随机序列盒,优选两个随机序列盒:CDR2-n(对于CDR2的5'端侧)和CDR-c(对于CDR2的3'端侧)。

[0046] 子文库还可以包括多个 V_H -CDR3子文库。每个 V_H -CDR3子文库包含多个重组核酸(例如重组DNA),所述重组核酸具有对应于 V_H CDR3的至少一部分的一个或多个随机序列盒。与 V_H -CDR1/2子文库相似, V_H -CDR1/2子文库中的重组核酸可能具有如下结构(随机化的区域加下划线,并且固定的测序的区域加括号):

[0047] 5' - (启动子-5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3) - CDR3 - (FW4)

[0048] 优选地,选择 V_H -CDR1/2子文库和/或 V_H -CDR3子文库的重组核酸的固定序列(例如,启动子-5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3,FW4)以使用天然抗体(例如抗各种抗原的IgG1)中最常见和/或保守的序列,使得所述固定的序列是最可表达的并且可适应多种形式,包括表达为单链可变片段(scFv)的肽、scFv的修饰形式、全长免疫球蛋白或免疫球蛋白的一部分。因此,在优选实施例中, V_H -CDR1/2子文库的重组核酸和 V_H -CDR3子文库的重组核酸的固定的序列彼此至少70%、优选至少80%、更优选至少90%相同(共享)。

[0049] 子文库还可以包括 V_L 子文库。 V_L 子文库包含多个重组核酸(例如重组DNA),所述重组核酸具有对应于 V_L CDR3的至少一部分的一个或多个随机序列盒。与 V_H -CDR1/2子文库相似, V_H -CDR1/2子文库中的重组核酸可能具有如下结构(随机化的区域加下划线,并且固定的测序的区域加括号):

[0050] 5' - (启动子-5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3) - CDR3 - (FW4)

[0051] 优选地, V_L 子文库的重组核酸的固定的序列与 V_H -CDR1/2子文库或 V_H -CDR3子文库的重组核酸的固定的序列至少70%、优选至少80%、更优选至少90%相同(共享)。

[0052] 虽然任何随机化的序列都可以被认为产生随机序列盒,但发明人设想,针对 V_H 的CDR1、CDR2、CDR3和 V_L 结构域的CDR3的策略化随机序列盒将在表达为结合肽(例如scFv等)时提供高复杂性和大的潜在结合表面。例如, V_H -CDR1/2子文库的CDR1、CDR2的策略化随机序列盒可以是每个盒具有3个或更少、优选2个或更少、或更优选一个随机序列(每个盒编码3个或更少、2个或更少、或一个随机氨基酸)的半随机序列盒。随机序列在随机盒中的位置可根据盒中的随机氨基酸而变化。在另一个实例中, V_H -CDR3子文库的CDR3的策略化随机序列盒可包括更多的随机化的序列,使得每个盒存在4个或更多、优选5个或更多、或更优选6个或更多随机序列(每个盒编码4个或更多、优选5个或更多、或更优选6个或更多随机氨基酸)。在又一个实例中, V_L 子文库的CDR3的策略化随机序列盒可包括更多的随机化的序列,使得每个盒存在4个或更多、优选5个或更多、或更优选6个或更多随机序列(每个盒编码4个或更多、优选5个或更多、或更优选6个或更多随机氨基酸)。

[0053] 在本发明主题的一个特别优选的方面,发明人设想,用于子文库的优选随机序列盒可以使用表1(对于 V_H -CDR1/2子文库和 V_H -CDR3子文库)和表2(对于 V_L 子文库)中所示的寡核苷酸产生。如表1和2所示,每个寡核苷酸包括具有简并密码的随机序列(突出显示),所述简并密码显示为IUPAC模糊密码。例如,CDR1随机序列盒的一个寡核苷酸包括随机序列

“RVT”, RVT代表“A/G, A/C/G, T”, 其组合可编码苏氨酸(T)、丙氨酸(a)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、丝氨酸(S)或甘氨酸(G)中的一个。由简并密码子编码的氨基酸的选择被描绘在右边并且用X表示。

[0054] 另外且优选地, 用于 V_H -CDR3子文库的随机序列盒可以包括不同长度的核酸序列。例如, V_H -CDR3子文库的随机序列盒可以是10-30个氨基酸之间、优选10-25个氨基酸之间、更优选10-20个氨基酸之间的任意长度。因此, 如表1所示, 用于产生 V_H -CDR3子文库的随机序列盒的寡核苷酸可以包括在编码D/G-R/L和A/G的序列之间的“NNK” (其代表G/A/T/C, G/A/T/C, G/T) 的各种重复 (例如, 4-10个重复) (也参见图3)。轻链序列的产生和多样性示例性地示于图4中。

[0055]

V _H CDR1	SEQ ID NO.1: GGCTTAGGTCTCATTTC[REDACTED]AGTTACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,D,S,G
	SEQ ID NO.2: GGCTTAGGTCTCATTTCCT[REDACTED]TACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,K,D,E, S,R,G
	SEQ ID NO.3: GGCTTAGGTCTCATTTCCTAGTTAC[REDACTED]ATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=G,W,L,V
	SEQ ID NO.4: GGCTTAGGTCTCATTTCCTAGTTAC[REDACTED]ATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,Y,T,N
	SEQ ID NO.5: GGCTTAGGTCTCATTTCCTAGTTACGCTATG[REDACTED]TGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T,N
V _H CDR2-n	SEQ ID NO.6: GGCTTAGGTCTCGTTCA[REDACTED]ATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,F,S
	SEQ ID NO.7: GGCTTAGGTCTCGTTCA[REDACTED]ATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=V,G,I,S,L,R
	SEQ ID NO.8: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATT[REDACTED]GGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,R
	SEQ ID NO.9: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATT[REDACTED]GGTAATGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D+N53
	SEQ ID NO.101: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGT[REDACTED]AGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,S,T,N
	SEQ ID NO.11: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGT[REDACTED]AGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,G
	SEQ ID NO.12: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTGGT[REDACTED]GGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,S,N

[0061] 在一些实施例中,子文库的重组核酸还包括编码蛋白质标签的核酸序列,使得重组核酸编码的肽可以使用针对所述蛋白质标签的结合剂来分离。例如,优选蛋白质标签包括FLAG标签(具有序列基序DYKDDDDK),Myc标签(具有序列基序EQKLISEEDL)和HA-标签。在一些实施例中,可以重复蛋白质标签以加强信号或增加检测(例如,FLAG标签的三次重复(3X FLAG)等)

[0062] 可以设想的是,插入到子文库的重组核酸中的一些随机序列盒可引入框架移位、无义突变和使重组核酸编码的肽结构不稳定的一个或多个序列。因此,在一些实施例中,发明人设想对子文库的重组核酸进行体外测试,从而可以从文库中去除编码不稳定的或错误折叠的肽的任何重组核酸。例如, V_H -CDR3子文库或 V_L 子文库的重组核酸可被测试其与金黄色葡萄球菌蛋白A或大型非戈尔迪亚氏菌蛋白L的结合亲和力,其分别独立地结合至免疫球蛋白的 V_H 3结构域或 V_L (Vk)结构域的结构化表位的CDR序列。

[0063] 可以设想通过重组核酸与蛋白A或蛋白L的结合亲和力来筛选重组核酸的任何合适的方法。在一个示例性实施例中,通过体外转录将子文库的重组核酸转录成mRNA,并且将所述mRNA的3'末端偶联(共价连接)到嘌呤霉素。嘌呤霉素偶联的mRNA被体外翻译,使得从嘌呤霉素偶联的mRNA转录的肽通过嘌呤霉素与mRNA偶联。接下来,将所述肽与蛋白A或蛋白L接触以鉴定有效结合蛋白A或蛋白L的肽。优选地,选择和分离与蛋白A或蛋白L结合的肽,其亲和力具有等于或小于 10^{-6} M、优选等于或小于 10^{-7} M的 K_D 。一旦分离出与蛋白A或蛋白L具有高亲和力的肽,则可通过与嘌呤霉素和肽偶联的mRNA在体外逆转录生成分离的肽的cDNA。然后,所产生的分离的肽的cDNA可以作为随机序列盒插入以产生 V_H -CDR3子文库或 V_L 子文库的选定重组核酸。可替代地,还可以设想子文库的重组核酸可以以mRNA的形式存在,其任选地与嘌呤霉素分子预偶联,使得重组核酸的体外转录步骤(以DNA形式)可能不需要。

[0064] 从子文库构建scFv文库

[0065] 本发明人还设想可以重组子文库的至少两个重组核酸(成员)以形成重组scFv核酸。在优选实施例中,所述至少两个重组核酸(成员)中的每一个选自不同的子文库。例如,一个重组核酸可选自 V_H -CDR1/2子文库、多个 V_H -CDR3子文库和 V_L 子文库中的每一个。再例如,一个重组核酸可选自 V_H -CDR1/2子文库、多个 V_H -CDR3子文库和 V_L 子文库中的两个中的每一个。优选地,通过如上所述的亲和力结合筛选预选选自子文库的一个或多个重组核酸中的至少一个,更优选全部。

[0066] 最典型的是,重组scFv核酸可以通过重组来自子文库的重组核酸的一部分来构建。在这一实施例中,重组核酸的部分包括插入到重组核酸中的随机序列盒。因此,例如,作为第一步, V_H -CDR1/2子文库的重组核酸的部分可以是5' - [CDR1 + (FW2) + CDR2] - 3' (随机序列盒加下划线),优选5' - (FW1的部分) - [CDR1 + (FW2) + CDR2] - (FW3的部分) - 3',更优选5' - (启动子-5' UTR-FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (FW3的部分) - 3' 或5' - (启动子-5' UTR-FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (小接头) - 3'。类似地,例如, V_H -CDR3子文库的重组核酸的部分可以是5' - [CDR3] - 3' (随机序列盒加下划线),优选5' - (FW3的部分) - CDR3 - (FW4的部分) - 3',更优选5' - (FW3的部分) - CDR3 - (FW4) - 3' 或5' - (小接头) - CDR3 - (FW4) - 3'。然后(例如,通过PCR)分离来自 V_H -CDR1/2子文库和 V_H -CDR3子文库的重组核酸的部分,并且可以重组(例如,通过限制性连接方法融合,通过重组-PCR产生,等等)以形成 V_H 结构域重组核酸。因此,典型地, V_H 结构域重组核酸将会以5' - 启动子-5' UTR-FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3 - CDR3 - FW4 - 3' (随机序列

盒加下划线)的结构。任选地, V_H 结构域重组核酸还可以包括如上所述编码在其3'末端的蛋白质标签(例如,FLAG标签、Myc标签、HA标签等)的核酸序列。此外,这样生成的 V_H 结构域重组核酸可以作为 V_H 结构域文库成员放置在 V_H 结构域文库中。

[0067] 这样形成的 V_H 结构域重组核酸可与 V_L 子文库的重组核酸进一步重组,形成重组scFv核酸。图5示出了重组来自子文库的序列的一种示例性方法。如图所示,并且也是典型地, V_H 结构域重组核酸的一部分和 V_L 子文库的重组核酸的一部分融合为一个重组scFv核酸。例如, V_H 结构域重组核酸的部分可以包括5'-启动子-[5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3-CDR3-FW4-3' (优选没有编码在其3'末端的蛋白质标签的任何核酸),且 V_L 子文库的重组核酸的部分可包括FW1'+CDR1+FW2'+CDR2+FW3'-CDR3-FW4' (无启动子和5'-UTR),使得 V_L 子文库的重组核酸可融合到 V_H 结构域重组核酸的部分的3'末端。因此,典型的重组scFv核酸将会以5'-启动子-[5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3-CDR3-FW4] V_H -[FW1'+CDR1+FW2'+CDR2+FW3'-CDR3-FW4'] V_L -3'的结构。高度优选将 V_H 结构域重组核酸的部分和 V_L 子文库的重组核酸的部分置于相同的阅读框中,使得它们编码单个多肽。

[0068] 优选地, V_H 结构域重组核酸的部分和 V_L 子文库的重组核酸的部分通过编码两部分之间的接头(短肽间隔片子段)的核酸融合。可以使用接头或间隔子的肽序列的任何合适的长度和顺序。但是,优选地,接头肽的长度在3-30个氨基酸之间,优选在5-20个氨基酸之间,更优选在5-15个氨基酸之间。例如,发明人设想使用富含甘氨酸的序列(例如gly-gly-ser-gly-gly等)来提供scFv在 V_H 和 V_L 结构域之间的灵活性。

[0069] 任选地,重组scFv核酸还可以包括如上所述编码在其3'末端的蛋白质标签(例如FLAG标签、Myc标签、HA标签等)的核酸序列。此外,这样产生的重组scFv核酸可以作为表达文库成员放置在表达文库中。

[0070] 在一些实施例中,基于所述重组scFv核酸与一种或多种目的配体(例如,癌症抗原,新表位等)的结合亲和力、稳定性,pH敏感性和/或物种交叉反应性,进一步筛选和/或分级所述这样形成的重组scFv核酸。例如,重组scFv核酸编码的scFv肽的稳定性可以通过尺寸排阻色谱法测量肽随时间的大小来分析。例如,可以通过在不同的缓冲液条件(pH,温度等)下使scFv肽与一种或多种配体接触来分析由重组scFv核酸编码的scFv肽的pH敏感性和结合亲和力。

[0071] 对于这些分析和从表达文库中进一步分离所需的重组scFv核酸,发明人设想重组scFv核酸可以以mRNAs的形式存在,其任选地在mRNA的3'末端与嘌呤霉素分子预偶联。然后可以在体外翻译嘌呤霉素偶联的mRNA,使得从嘌呤霉素偶联的mRNA转录的肽通过嘌呤霉素与mRNA偶联。然后,任选地在不同的缓冲液条件(pH,温度等)下,将肽与一种或多种配体接触。优选地,选择和分离在pH 5.0-8.0之间、优选在pH 6.0-8.0之间、更优选在pH 6.5-8.0之间与配体具有等于或小于 10^{-6} M、优选等于或小于 10^{-7} M的 K_D 的结合亲和力的肽。一旦分离出与一种或多种配体具有高亲和力的肽,就可以通过与嘌呤霉素和肽偶联的mRNA在体外逆转录生成分离出的肽的cDNA。

[0072] 此外,由重组scFv核酸编码的分离的肽的如此产生的cDNA可以接枝到免疫球蛋白的部分上并替代所述部分以形成重组免疫球蛋白或其片段。例如,如此产生的cDNA可与免疫球蛋白重链恒定区的主链融合,从而免疫球蛋白的重链和轻链可变区可被由分离的肽形成的scFv所替代。可替代地,发明人还设想,重组scFv核酸的 V_H 部分(或衍生自 V_H 结构域重组

核酸)和 V_L 部分(或衍生自重组scFv核酸)可以接枝到免疫球蛋白的部分上并替代所述部分,以形成重组免疫球蛋白或其片段。例如,重组scFv核酸的 V_H 部分(或衍生自 V_H 结构域重组核酸)和 V_L 部分(或衍生自重组scFv核酸)分别与免疫球蛋白重链恒定区或轻链恒定区的主链融合,以形成具有对所需配体特异性的可变区的免疫球蛋白。

[0073] 在这些实例中,设想免疫球蛋白可以包括任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)和任何类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)的重链或恒定结构域,以构成不同类型的免疫球蛋白。此外,“抗体”可包括但不限于人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体。在此上下文中,应当注意,设想的系统和方法允许通过将分离的 V_H 和 V_L 结构域接枝到所需物种(例如,人)的抗体的剩余部分上来产生物种特异性抗体。在另一个实例中,如此产生的cDNA可与编码免疫球蛋白的其他部分的核酸融合以形成免疫球蛋白的片段。在本实例中,设想免疫球蛋白的片段可以是Fab片段、Fab'片段、 $F(ab')_2$ 、二硫键连接的Fv(sdFv)和Fv。发明人还设想,如此产生的cDNA的一部分可与编码免疫球蛋白的其他部分的核酸融合,以形成包含 V_H 区段和/或 V_L 区段的任何片段。

[0074] 此外,发明人设想scFv部分也可用作各种蛋白质和非蛋白质分子的靶向实体。例如,scFv部分可偶联(典型地作为嵌合蛋白)到ALT-803型分子以形成具有特异性靶向能力的TxM实体(见例如,J Biol Chem.[生物化学杂志]2016年11月11日;291(46):23869-23881)。在另一个实例中,scFv部分可以偶联到运载体蛋白(例如,白蛋白)以允许将一种或多种药物靶向特异性递送到药物偶联至运载体的肿瘤微环境中的特定位置。

[0075] 发明人进一步设想,通过随机序列的靶向多样化构建子文库,和/或预选子文库的成员,表达文库可以通过去除不稳定的、非结合的或错误折叠的序列,以最小的多样性牺牲实现约 10^{12} 的复杂性。因此,上述产生表达文库的方法提供了有意义的序列复杂性大小,但以小体积筛选结合物/抗体是实用的。另外,上述产生表达文库的方法简化了结合物/抗体的筛选程序。传统上,任何编码结合域(或基序)的核酸序列(如随机化的序列)的体外验证都需要将核酸序列转化为 F_{ab} 结构域,然后通过目的配体的拉下测定来测试结合亲和力。本文提出的方法允许通过亲和力(例如,Kd值)、pH敏感性和物种交叉反应性(例如,通过表面等离子体共振测定等)分级来体外验证编码结合结构域(或基序)的核酸序列,而无需将核酸序列转换为 F_{ab} 结构域。此外,基于稳定性和敏感性从每个文库中预选成员减少了文库中的待测试的池,从而可以更快速和有效地鉴定所需的结合物/scFv/抗体结构域。因此,发明人还设想了使用mRNA展示技术(其中针对固相结合抗原筛选体外翻译后的文库成员)从高多样性池中分离高亲和力结合物(例如,具有纳摩尔和皮摩尔 K_d)的方法。一旦鉴定了结合物,就可以通过表面等离子体共振光谱关于亲和力和 K_{on}/K_{off} 特征进一步表征它们,如下文进一步描述。从不同的角度来看,所设想的系统和方法允许在完全独立于体内免疫系统的过程中快速检测结合物和产生scFv或抗体。

[0076] 实例

[0077] 虽然可以设想任何适当的多样化方案来鉴定一个或多个靶向多样化区域,以便在保持效率的同时使多样性最大化,发明人发现,VH3/Vk1可以是免疫球蛋白的各种结构域中用于随机化的良好候选区域之一,VH3被认为是迄今为止最稳定和可溶的VH结构域,并且轻链的Vk1是稳定和可溶的。因此,设想VH3/Vk1随机化的对将更有效地转化为全尺寸免疫球蛋白。因此,发明人使用VH3和Vk1框架开发了预选策略。图1显示了使用VH3/Vk1对的一个示

例性随机化策略。对特异于一个抗原的至少14个免疫球蛋白分子的蛋白质序列进行比较和分析。14个免疫球蛋白分子中最稳定并且最保守的序列被用为框架,并且分析可变序列的位点以作为随机化的序列和随机化程度(如完全随机,部分随机等)。

[0078] 基于随机化策略,发明人还产生了针对V_H结构域的CDR1、CDR2-n、CDR2-c(见图2)和针对VH结构域的CDR3(见图3)的靶向多样化序列(随机化的序列,随机寡聚物)。使用V_H结构域的CDR1、CDR2-n、CDR2-c、CDR3和V_L结构域的CDR3的随机寡聚物产生重组scFv核酸的过程如上文所述,并也在图4中的示意图中示出。构建了一个高多样性文库,如图5中示例性地显示,并在上面进行了更详细的讨论。

[0079] 使用如图1-5所述的靶向多样化方案和产生重组scFv核酸的方法,发明人产生了高多样性文库,并由此分离出重组 α -B7-H4₈₀₁(α -B7-H4,克隆号801)结合物。通过分析尺寸排阻色谱经15分钟确定重组 α -B7-H4₈₀₁的稳定性以评估抗体的任何降解或变形。如图6中所示, α -B7-H4₈₀₁的洗脱液显示单峰,没有任何显著的小峰,这表明通过上述方法产生的 α -B7-H4₈₀₁结合物可以产生具有高稳定性的scFv或抗体。

[0080] 发明人发现重组 α -B7-H4₈₀₁包含基本上类似于其他市售 α -B7-H4抗体(**Rituxan®**, **LEAF®**)的抗体组分。通过十二烷基硫酸钠毛细管电泳(CE-SDS)分析重组 α -B7-H4₈₀₁和两种市售 α -B7-H4抗体(**Rituxan®**, **LEAF®**)的片段。如图7中所示,CE-SDS分离重组 α -B7-H4₈₀₁抗体和两种市售 α -B7-H4抗体(**Rituxan®**, **LEAF®**)片段显示两个极大峰,每个峰对应于轻链(中峰)和糖基化重链(右峰)。左峰表示用于CE-SDS分析的10Kd标准标志物的位置。

[0081] 发明人进一步发现,各种重组 α -B7-H4抗体可显示与靶配体的不同结合特征(例如亲和力和特异性等)。图8显示了两种重组 α -B7-H4抗体, α -B7-H4₈₀₁和 α -B7-H4₈₁₇,通过平均荧光强度(MFI)测量来测试它们与表达B7-H4的293T细胞的结合。结果表明,与 α -B7-H4₈₁₇抗体相比, α -B7-H4₈₀₁抗体对表达B7-H4的293T细胞具有更高的结合亲和力,这表明不同地随机化的CDR结构域可提供对配体的不同结合亲和力。最右边的图显示了用非特异性人IgG1(hIgG1)进行的对照实验。

[0082] 用流式细胞术检测重组 α -B7-H4抗体以确定与抗原呈递细胞(APC)上表达的配体(B7-H4)的特异性和有效结合。如图9中所示,重组 α -B7-H4抗体能与B7-H4配体特异性结合(从非特异性同种型结合中分离出峰),这表明重组 α -B7-H4抗体具有完全的功能。

[0083] 发明人还发现,抗B7-H4的scFv肽(scFv B7-H4₈₀₁)和由同一scFv肽与scFv B7-H4₈₀₁产生的重组 α -B7-H4抗体(IgG α -B7-H4₈₀₁)使用表面等离子体共振测定在功能上相容。在这一测定中,通过与表面连接的中性亲和素偶联的 α -Flag生物素化抗体将带有Flag标签的scFv B7-H4₈₀₁固定在表面上。然后将表面固定的scFv B7-H4₈₀₁肽与包括B7-H4的分析物接触。用 α -B7-H4抗体进行类似的测定。如图10和表3中所示,scFv B7-H4₈₀₁和IgG α -B7-H4₈₀₁具有与B7-H4的基本相似的亲和力和结合特征,这表明它们在功能上是相容的。此外,由于体外翻译的肽(scFv)的结合亲和力可以直接测量,而不需要将肽接枝进入抗体主链,因此可以高效地筛选表达文库中更多的重组scFv核酸。

[0084]

	Ka	Kd	KD	Res sd
IgG	1.2e ⁶	2.0e ⁻⁴	175pm	0.391
scFv	1.2e ⁶	1.7e ⁻⁴	141pm	0.353

[0085] 表3

[0086] 在针对B7-H4的在V_H的CDR1-3和V_L的CDR3中具有各种随机序列盒的多个scFv肽中, 发明人检查了特定结构域(特定随机序列盒)中的相似性是否可使scFv肽具有与配体的相似的结合特征。检测了五种scFv肽(801、802、905、906和817)与B7-H4的结合亲和力。其中, 如表4中所示, 四种scFv肽(克隆801、802、905、906)具有相似的CDR3序列。在25℃和37℃下, 这四种在V_H的CDR3中具有相似随机序列盒的scFv肽显示与B7-H4的相似结合亲和力(如表5中所示), 这表明至少在针对B7-H4的scFv肽中, V_H的CDR3中的序列可能是与配体结合的关键。

[0087]

克隆	CDR1	CDR2	CDR3	CDR L3
801	NSYAMH (SEQ ID NO:26)	AISGNGGSTR (SEQ ID NO:27)	DRFRKVHG (SEQ ID NO:28)	DATFPL (SEQ ID NO:29)
802	GSYAMH (SEQ ID NO:30)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:31)	DLYRRVHG (SEQ ID NO:32)	DYGFPL (SEQ ID NO:33)
905	SSYLMH (SEQ ID NO:34)	VISGSGGSTR (SEQ ID NO:35)	DLYRRVAG (SEQ ID NO:36)	DYALPL (SEQ ID NO:37)
906	SNYAMH (SEQ ID NO:38)	AISGNGGSTH (SEQ ID NO:39)	DRFRRVYG (SEQ ID NO:40)	DYTFPL (SEQ ID NO:41)
817	SSYAMH (SEQ ID NO:42)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:43)	GRWSKVG (SEQ ID NO:44)	TDNFPY (SEQ ID NO:45)

[0088] 表4

[0089]

温度	scFv	ka	kd	KD
25℃	801	1.20E+06	2.00E-04	174 pM
	802	4.50E+05	2.40E-05	54 pM
	905	4.10E+05	1.20E-04	290 pM
	906	1.70E+05	1.00E-05	59 pM
37℃	801	6.10E+05	7.30E-04	1.2 nM
	802	5.70E+05	5.50E-04	1.0 nM
	905	5.80E+05	9.70E-04	1.7 nM
	906	2.80E+05	3.80E-04	1.4 nM

[0090] 表5

[0091] 发明人还使用所述子文库和表达文库生成多个与白细胞介素-8 (IL-8) 结合的scFv肽(scFv IL-8), 并在不同条件(温度和pH)下检查与IL-8的亲和力。在各种条件下测得的示例性scFv IL-8肽及其结合亲和力显示在表6中。在表6所示的克隆中, 克隆49-7、49-1和49-12含有相似的V_H CDR3序列, 克隆49-19、49-37和49-25含有相似的V_H CDR3序列。此外, 克隆49-3和43-2含有相似的V_H CDR3序列。与抗B7-H4的scFv肽相比, 发明人发现scFv IL-8肽的结合亲和力可能不严重依赖于V_H的CDR3中随机序列的相似性。例如, 虽然克隆49-18、49-37和49-25包含相似的V_H CDR3序列, 但这些序列的结合亲和力(单位以K_D×10⁻⁹M测量)在0.894×10⁻⁹M和25×10⁻⁹M之间变化。

[0092]

克隆	计数	25℃	pH 6	25℃	pH 6	37℃
49-31	1/36	0.012	0.0025			
49-22	3/36	0.113	0.328			
49-7	1/36	0.166	0.462			
49-32	1/36	0.239	0.714			
49-34	1/36	0.618	0.342			
49-18	1/36	0.894	2.23			
49-3	4/36	1.26	6.68	2.14	3.14	9.19
43-2	5/16	1.41	1.3	0.79	0.96	0.89
49-37	1/36	1.46	4.01			
43-12	3/16	1.5	11.04			
49-10	6/36	1.65	8.58	2.21	8.7	3.45
49-1	1/36	2.66	6.13			
49-6	1/36	4.8	17.6			
49-12	3/36	10.1	11.9			
49-25	2/36	25	7.26			

[0093] 表6

[0094] 发明人通过测量中性粒细胞大小进一步测试scFv IL-8是否能有效捕获IL-8从而中和IL-8的作用。通常,中性粒细胞在受到IL-8刺激后变大(例如,具有更大的直径等)(如图11所示)。发明人发现,在添加重组 α -IL-8抗体(mAb α IL-8₂₀₁,如图12中左上角图所示)或几种scFv IL-8肽(α IL-8_{#2}、 α IL-8₄₉₋₃、 α IL-8₄₉₋₁₀,如图12中靠下图所示)后,这种IL-8对中性粒细胞增大的作用可被大量消除,这表明scFv IL-8肽可通过与培养基中的游离IL-8结合而有效地中和IL-8的作用。

[0095] IL-8是一种中性粒细胞趋化因子,可导致中性粒细胞向IL-8释放部位(如感染部位)迁移。为了评价scFv IL-8肽的功能作用,将中性粒细胞放置在具有多孔膜的插入物底部,并放置在包含各种浓度IL-8的培养基中,使得被IL-8吸引的中性粒细胞能够通过多孔膜向培养基从插入物迁移出来。如图13中所示,随着培养基中IL-8浓度的增加,迁移的中性粒细胞的数量增加。有趣的是,当添加scFv IL-8肽(α IL-8₄₃₋₂)或衍生自scFv IL-8肽的重组IL-8抗体(mAb α IL-8₂₀₁)时,这种IL-8作用几乎完全消除。

[0096] 图14描绘了使用本文所述的mRNA展示文库分离的多种scFv的进一步实验数据。更具体地,每个数据点表示针对底部指示的靶标的scFv,并且确定每个scFv的亲合力值。可以很容易地看到,(相同的)文库产生了多种针对不同靶标的高亲合力结合物,所有结合物都在亚mM的亲合力范围内,并且许多在亚nM的亲合力范围内。此外,发明人还研究了在CDR接枝到人IgG上后是否可以保持scFv的亲合力。图15描述了用于接枝到人IgG1支架中的所选scFv的29个CDR接枝实验的示例性结果。从图15中的结果可以看出,人源化的IgG1抗体保持高的特异性和亲合力(典型地在一个数量级内)。

[0097] 对于本领域技术人员应当清楚的是,在不脱离本文的发明构思的情况下,除了已经描述的那些之外,更多修改是可能的。因此,本发明主题仅受限于所附权利要求的范围。此外,在解释说明书和权利要求时,所有术语应当以与上下文一致的尽可能广泛的方式解

释。特别地,术语“包含”(“comprises”和“comprising”)应当被解释为以非排他性方式提及要素、组分或步骤,从而指示所提及的要素、组分或步骤可以与未明确提及的其他要素、组分或步骤一起存在、或使用、或组合。如本文的说明书和随后的整个权利要求中所使用,“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”以及“该(the)”的含义包括复数参照物,除非上下文清楚地另外指明。而且,如本文的说明书中所使用,“在.....中(in)”的含义包括“在.....中(in)”和“在.....上(on)”,除非上下文另有明确说明。在说明书权利要求书提及选自由A、B、C...和N组成的组的某物的至少一种的情况下,该文字应当被解释为只需要该组中的一个要素,而不是A加N、或B加N等。

序列表

<110> 南特生物科学公司

<120> mRNA展示抗体文库和方法

<130> 102538.0050PCT

<150> US62/588,914

<151> 2017-11-20

<160> 45

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的人工序列

[0001] <400> 1
ggcttaggtc tcatttcrvt agttacgcta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的人工序列

<400> 2
ggcttaggtc tcatttctct rvktacgcta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 3

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的人工序列

<400> 3
ggcttaggtc tcatttctct agttackkga tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 4
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1的人工序列

<400> 4
ggcttaggtc tcatttctct agttacwmta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 5
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

[0002] <220>
<223> VH CDR1的人工序列

<400> 5
ggcttaggtc tcatttctct agttacgcta tgavttgggc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 6
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2-n的人工序列

<400> 6
ggcttaggtc tcgttcathc attagtggta gtggacgaga cgaggtctga acgg
54

<210> 7
<211> 54
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR2-n的人工序列

<400> 7

ggcttaggtc tcgttcavkt attagtggta gtggacgaga cgaggtctga acgg
54

<210> 8

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR2-n的人工序列

<400> 8

ggcttaggtc tcgttcagct attyggggta gtggacgaga cgaggtctga acgg
54

[0003]

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR2-n的人工序列

<400> 9

ggcttaggtc tcgttcagct attdatggta atggacgaga cgaggtctga acgg
54

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR2-n的人工序列

<400> 10

ggcttaggtc tcgttcagct attagtwmta gtggacgaga cgaggtctga acgg
54

<210> 11
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2-n的人工序列

<400> 11
ggcttaggtc tcgttcagct attagtkgga gtggacgaga cgaggtctga acgg
54

<210> 12
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2-n的人工序列

[0004] <400> 12
ggcttaggtc tcgttcagct attagtggtr rtggacgaga cgaggtctga acgg
54

<210> 13
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2-c的人工序列

<400> 13
ggcttaggtc tcgtggarvk agtacttact acgcgagacg aggtctgaac gg
52

<210> 14
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2-c的人工序列

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (21)..(21)
<223> n是a, c, g, 或t

<400> 14
ggcttaggtc tcgtggaggt natacttact acgcgagacg aggtctgaac gg
52

<210> 15
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2-c的人工序列

<400> 15
ggcttaggtc tcgtggaggt rvaacttact acgcgagacg aggtctgaac gg
52

[0005] <210> 16
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2-c的人工序列

<400> 16
ggcttaggtc tcgtggaggt agtactvrtt acgcgagacg aggtctgaac gg
52

<210> 17
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR3的人工序列

<220>
<221> 尚未归类的特征

<222> (24)..(25)
<223> n是a, c, g, 或t

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (27)..(27)
<223> n是a, c, g, 或t

<400> 17
ggcttaggtc tctccgtgrt ckcnknkgst ttcgcgagac gaggtctgaa cgg
53

<210> 18
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

[0006] <400> 18
ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtdsgc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 19
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<400> 19
ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtdsgc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 20
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (27).. (27)
<223> n是a, c, g, 或t

<400> 20
ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtnwtc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 21
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (27).. (27)
<223> n是a, c, g, 或t

[0007]

<400> 21
ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtnwtc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 22
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<400> 22
ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtdsgc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 23
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR3的人工序列

<400> 23

ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtdsgc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 24

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR3的人工序列

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (27)..(27)

<223> n是a, c, g, 或t

<400> 24

ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtnwtc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

[0008]

<210> 25

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR3的人工序列

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (27)..(27)

<223> n是a, c, g, 或t

<400> 25

ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtnwtc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg
58

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆801 CDRH1

<400> 26

Asn Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆801 CDRH2

<400> 27

Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Arg
1 5 10

[0009]

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆801 CDRH3

<400> 28

Asp Arg Phe Arg Lys Val His Gly
1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆801 CDRL3

<400> 29

Asp Ala Thr Phe Pro Leu
1 5

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆802 CDRH1

<400> 30

Gly Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010] <220>
<223> 克隆802 CDRH2

<400> 31

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆802 CDRH3

<400> 32

Asp Leu Tyr Arg Arg Val His Gly
1 5

<210> 33

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆802 CDRL3

<400> 33

Asp Tyr Gly Phe Pro Leu
1 5

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆905 CDRH1

<400> 34

[0011] Ser Ser Tyr Leu Met His
1 5

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆905 CDRH2

<400> 35

Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg
1 5 10

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆905 CDRH3

<400> 36

Asp Leu Tyr Arg Arg Val Ala Gly
1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆905 CDRL3

<400> 37

Asp Tyr Ala Leu Pro Leu
1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

[0012] <213> 人工序列

<220>

<223> 克隆906 CDRH1

<400> 38

Ser Asn Tyr Ala Met His
1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆906 CDRH2

<400> 39

Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr His
1 5 10

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆906 CDRH3

<400> 40

Asp Arg Phe Arg Arg Val Tyr Gly
1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆906 CDRL3

[0013] <400> 41

Asp Tyr Thr Phe Pro Leu
1 5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆817 CDRH1

<400> 42

Ser Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆817 CDRH2

<400> 43

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg
1				5					10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆817 CDRH3

[0014] <400> 44

Gly	Arg	Trp	Ser	Lys	Trp	Gly
1				5		

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆817 CDRL3

<400> 45

Thr	Asp	Asn	Phe	Pro	Tyr
1				5	

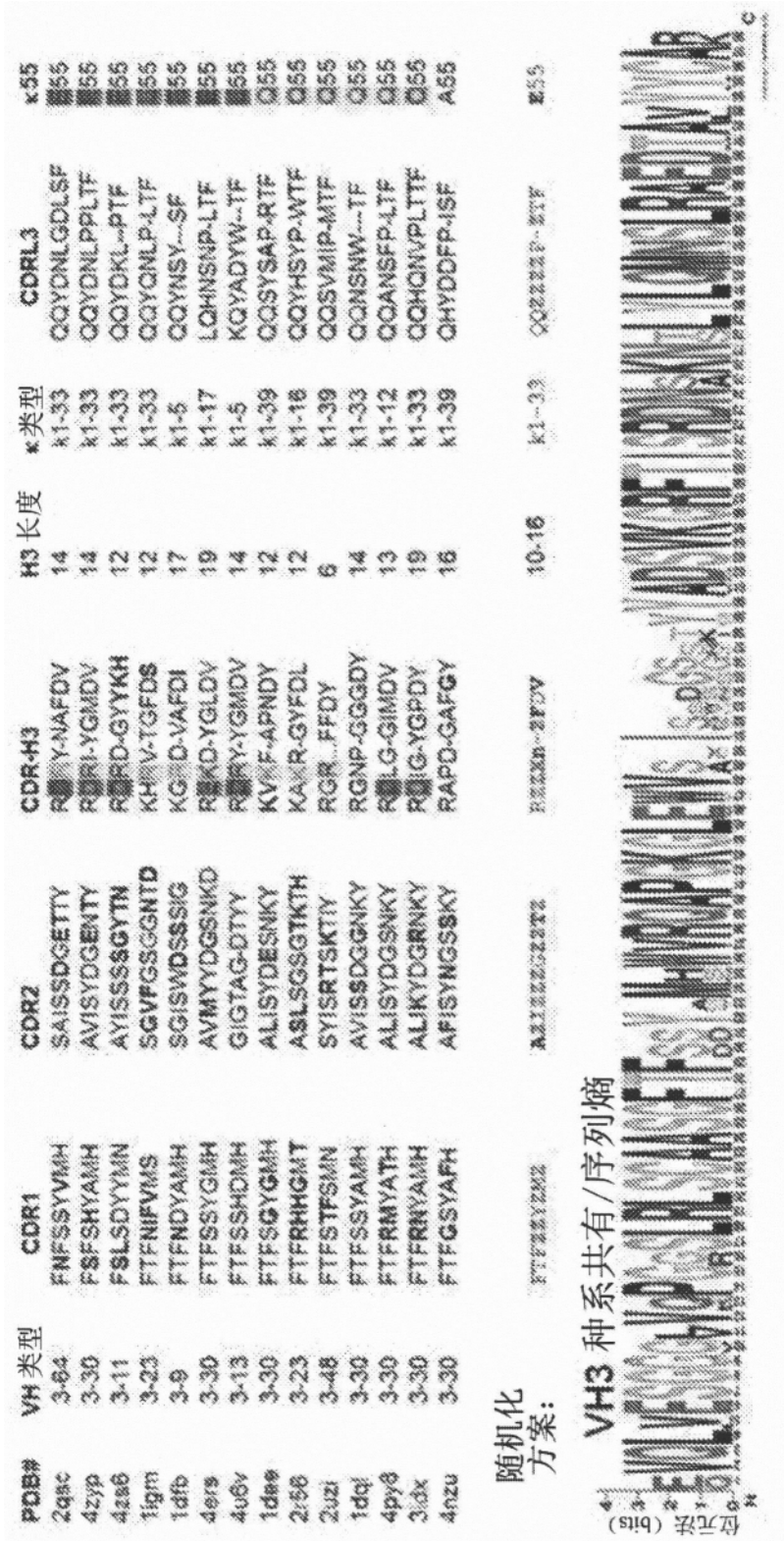


图1

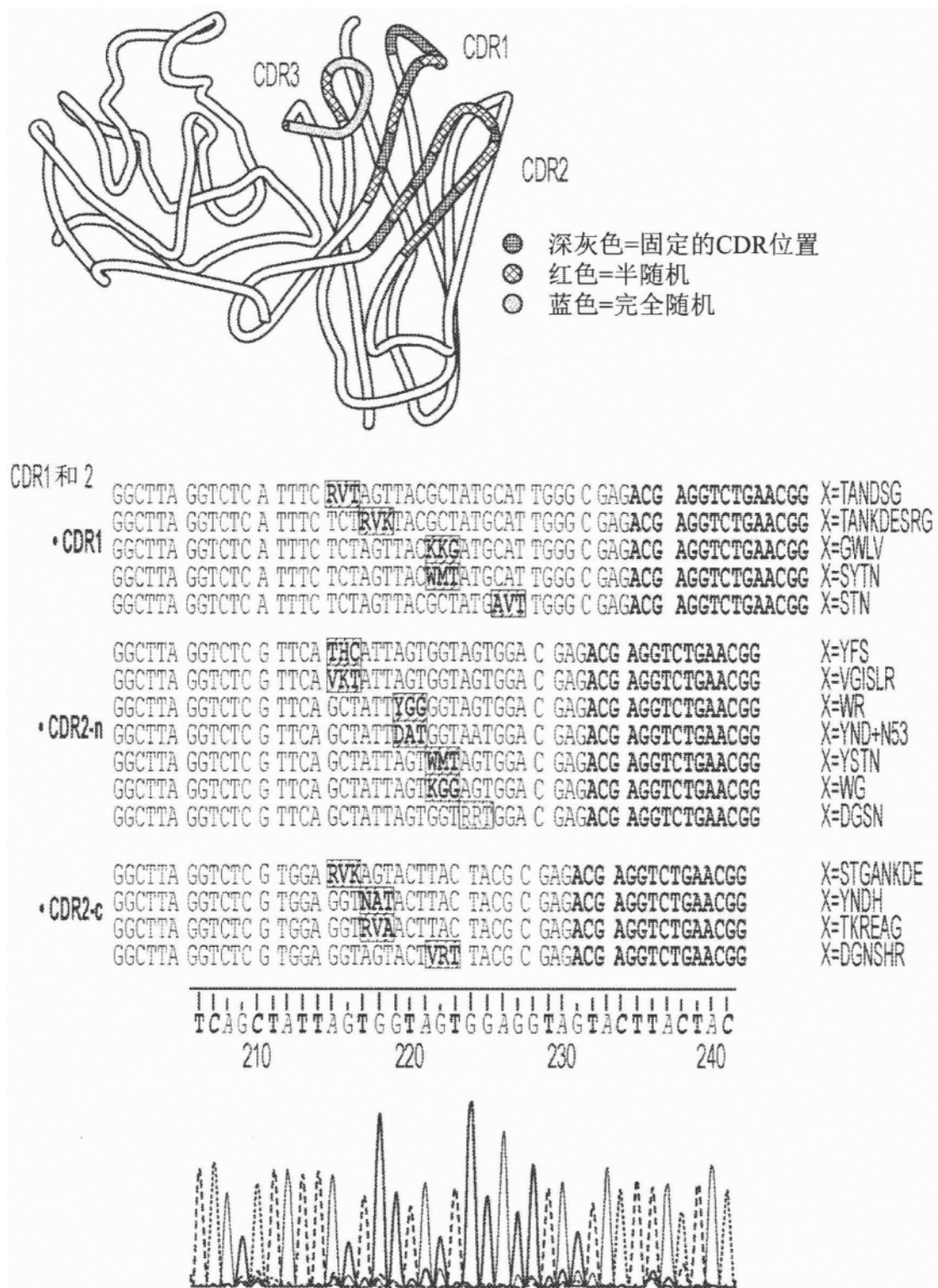


图2

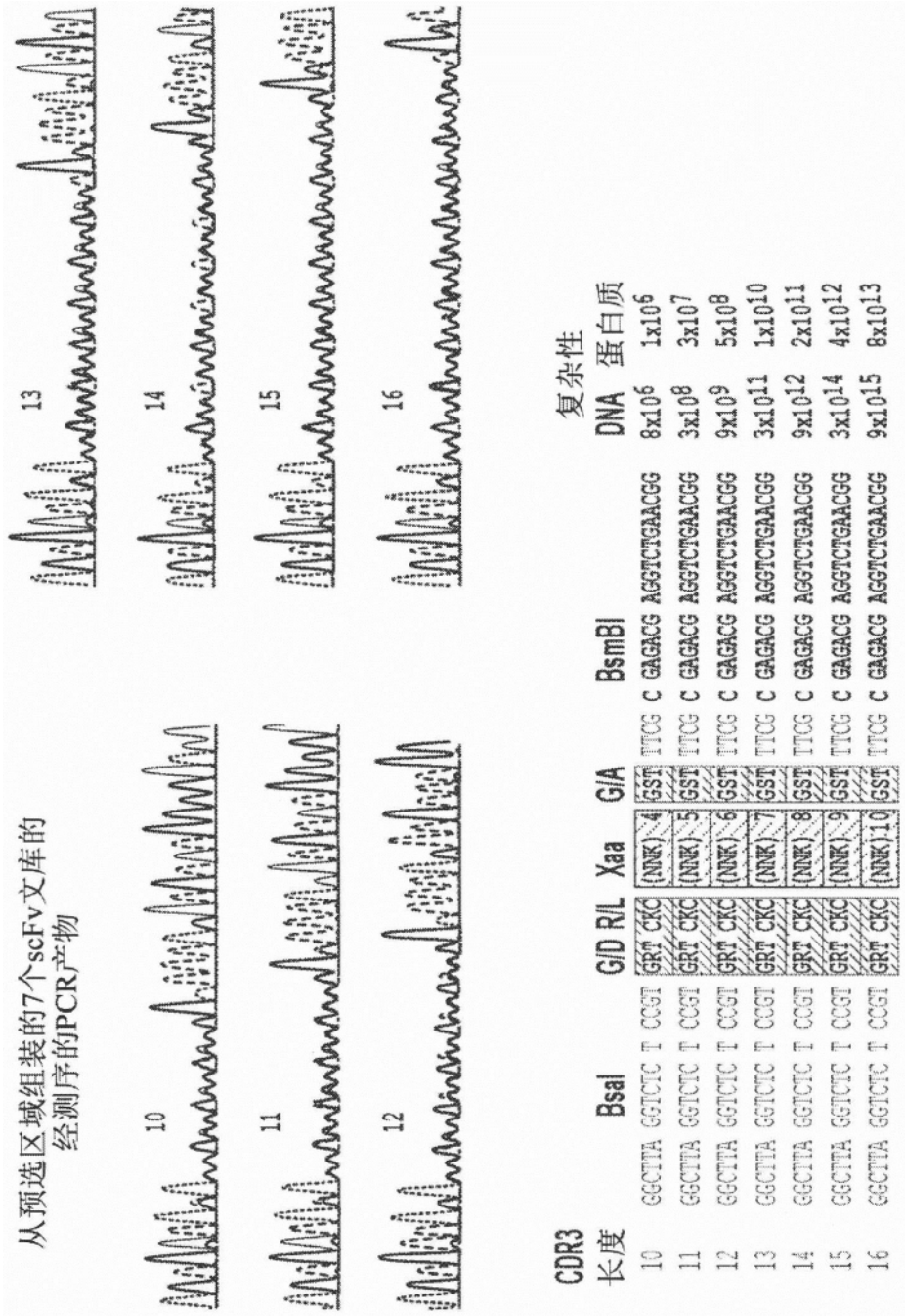


图3

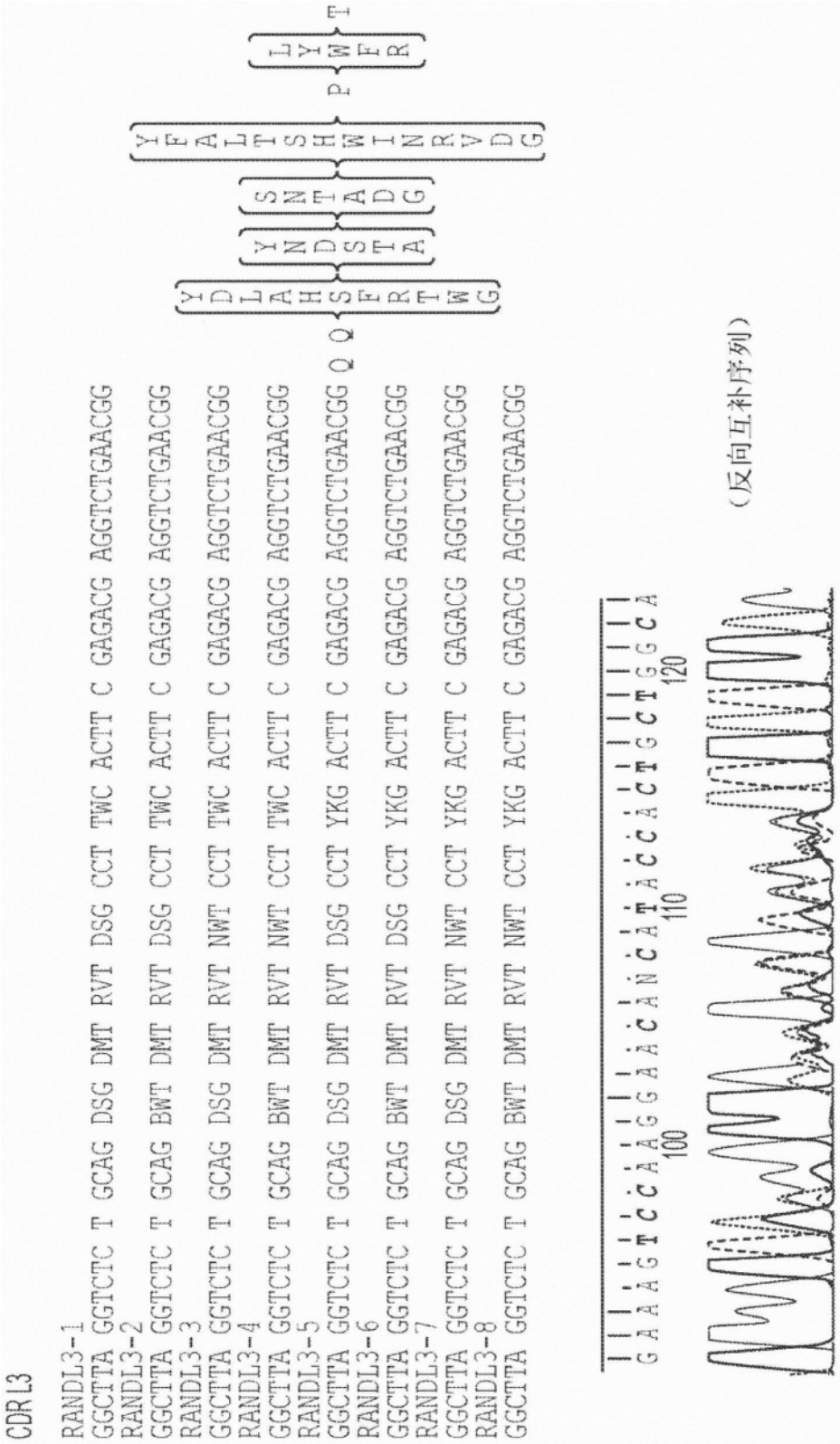


图4

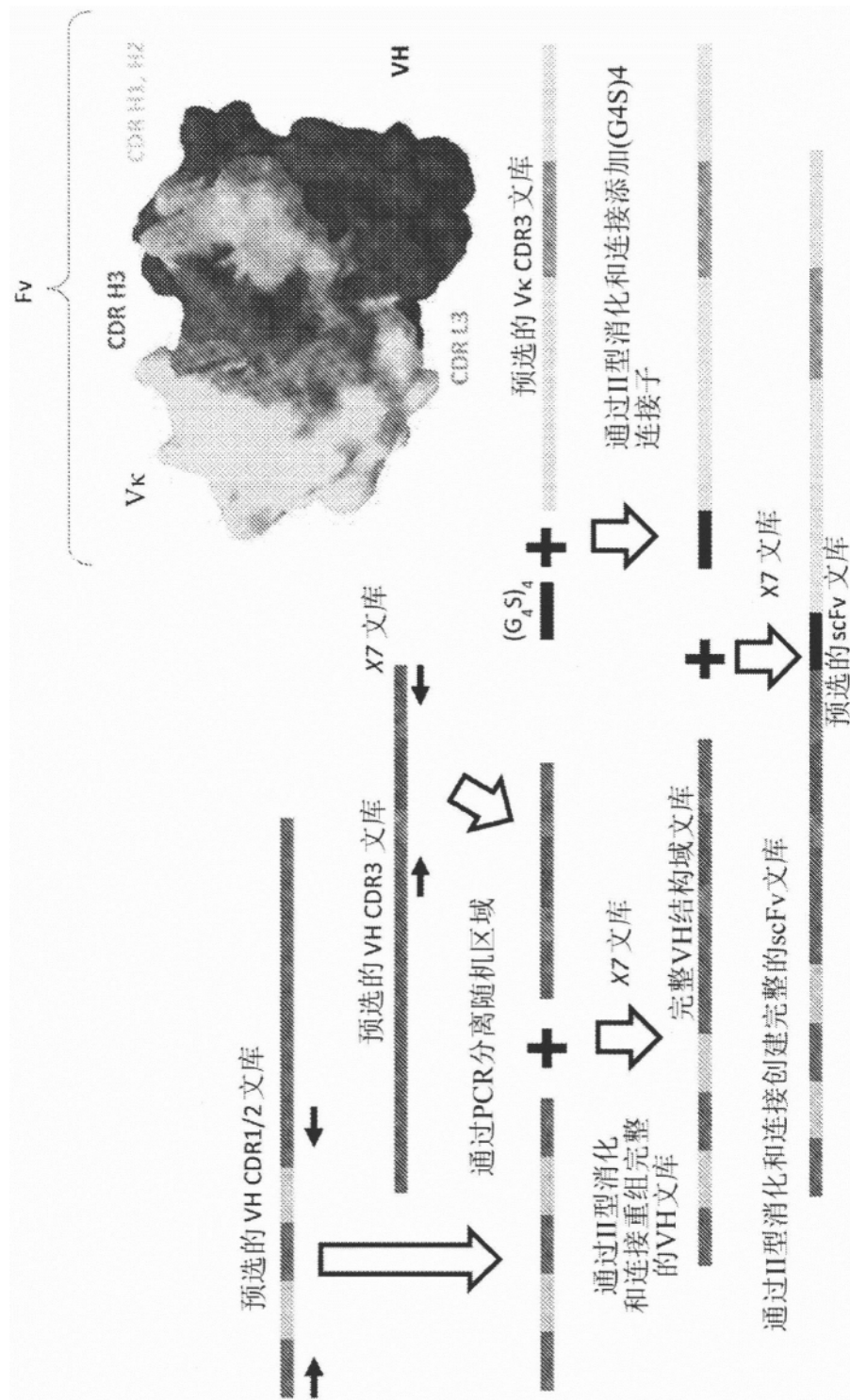


图5

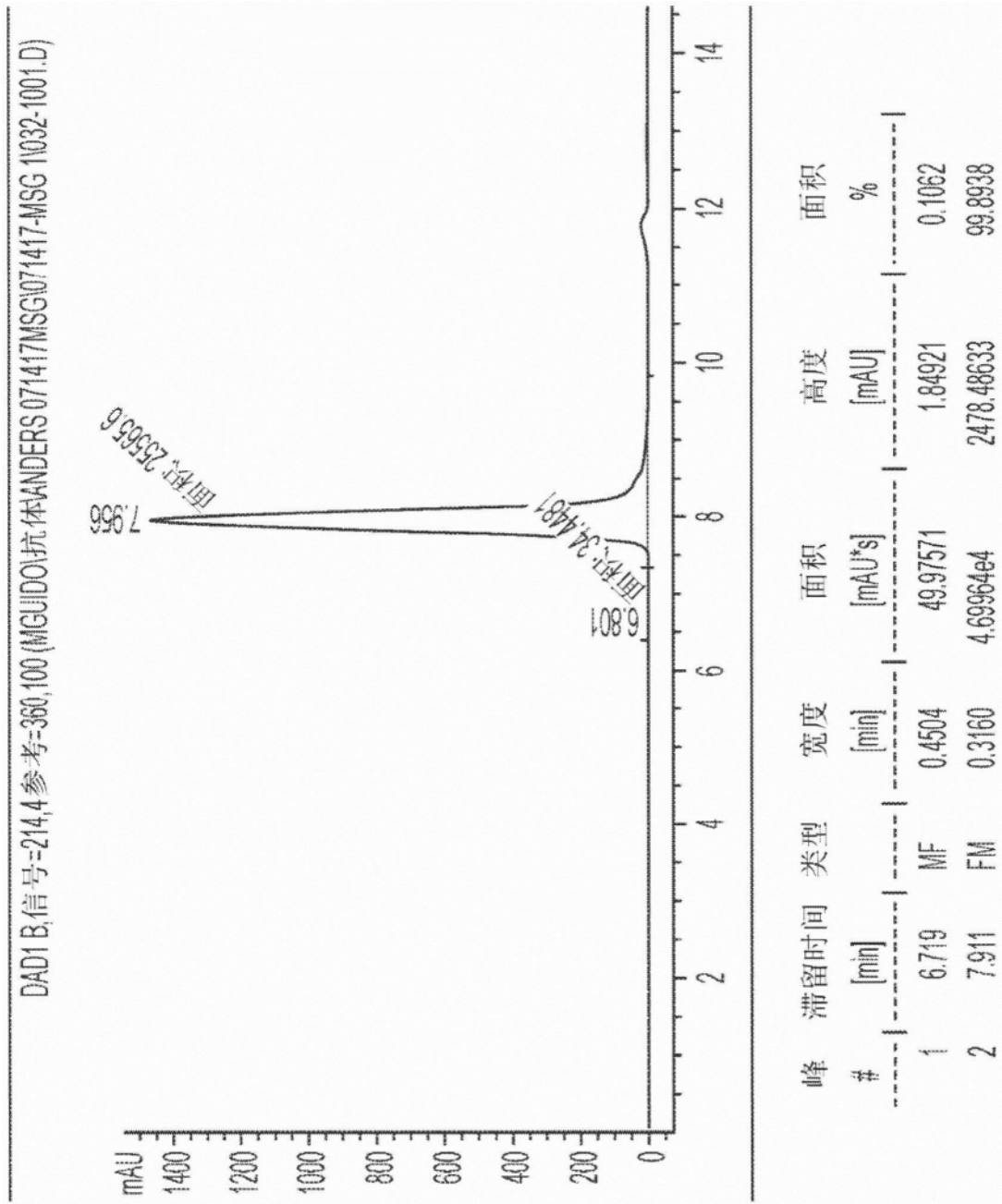


图6

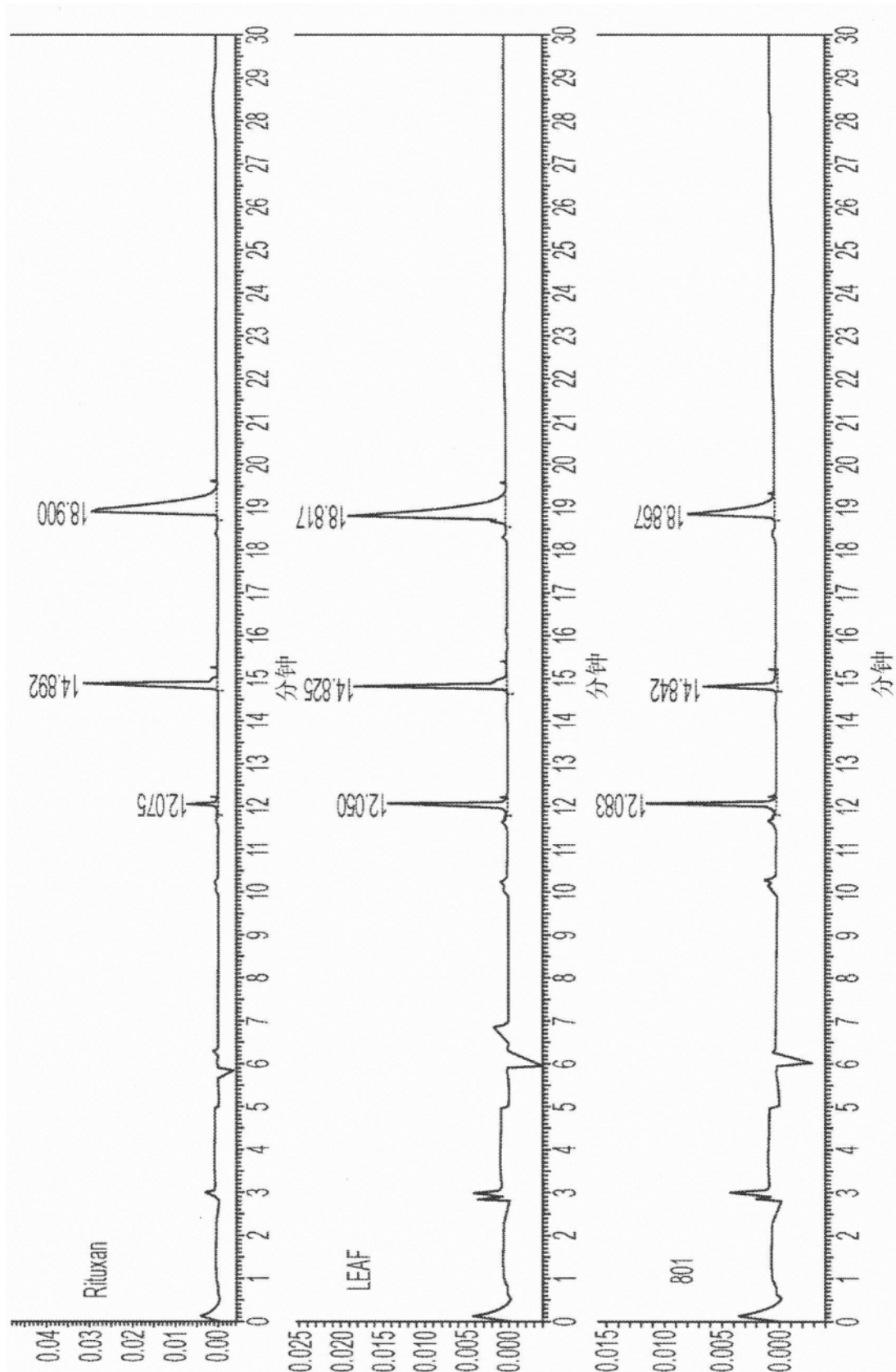


图7

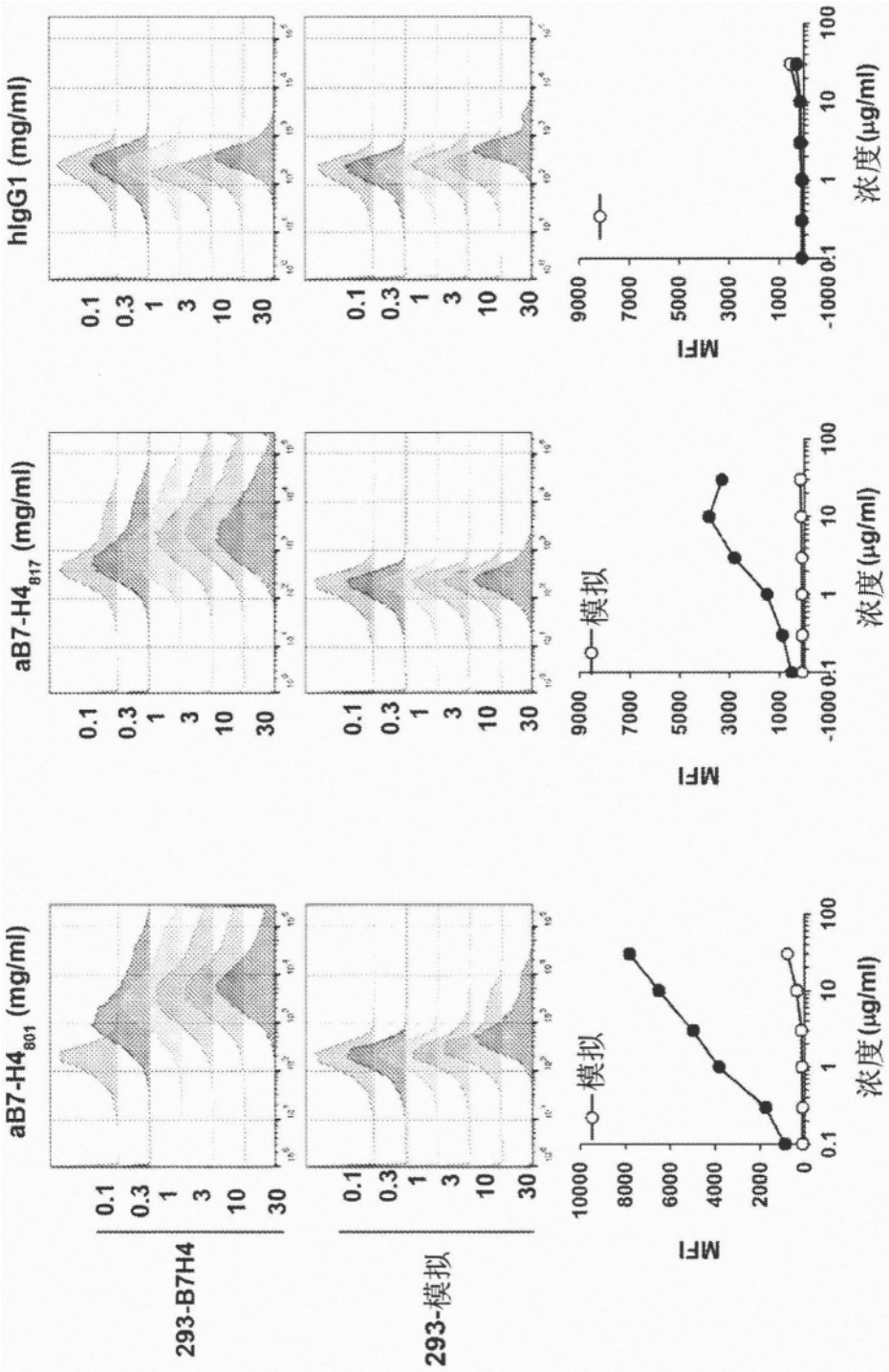


图8

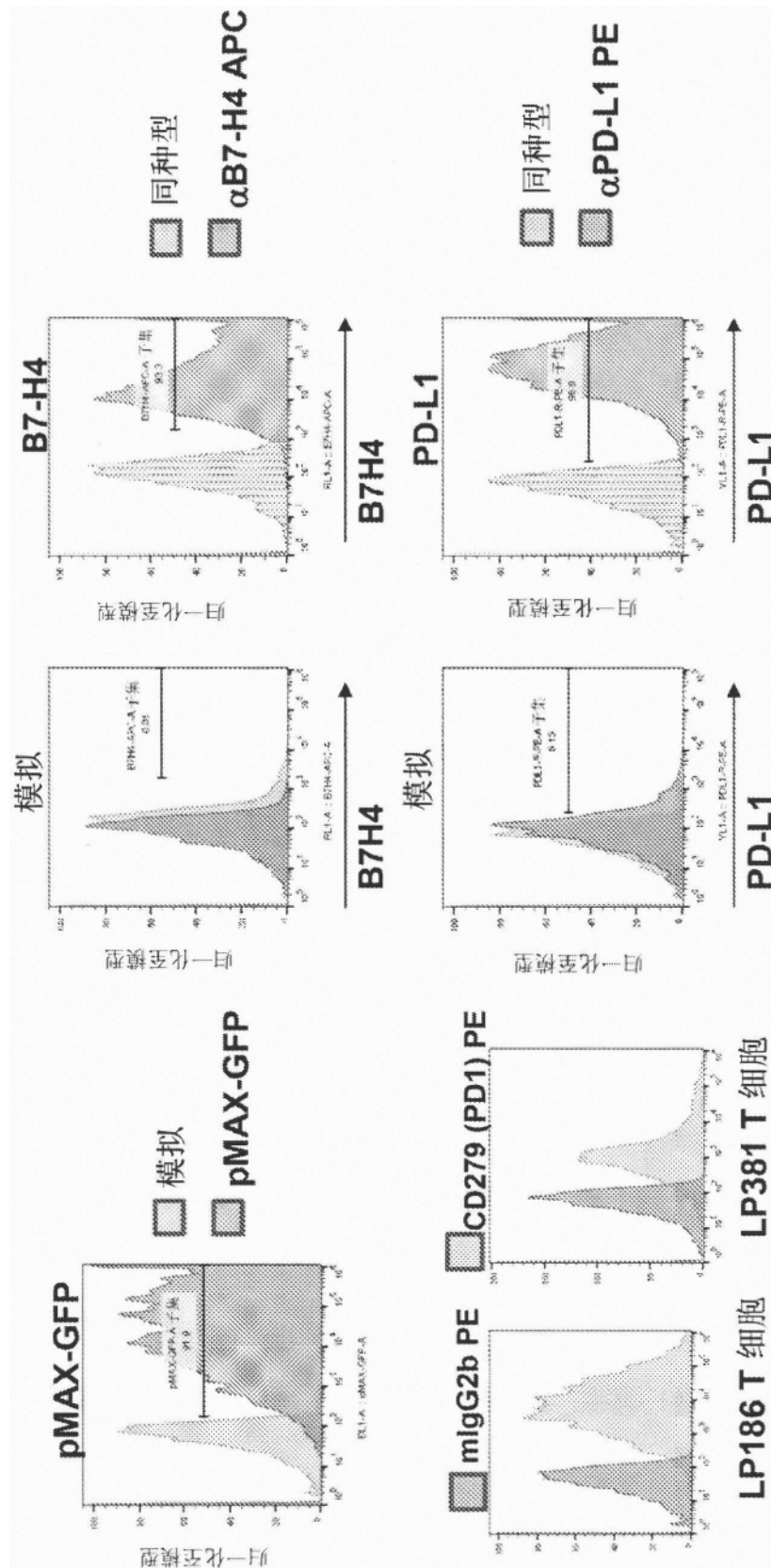


图9

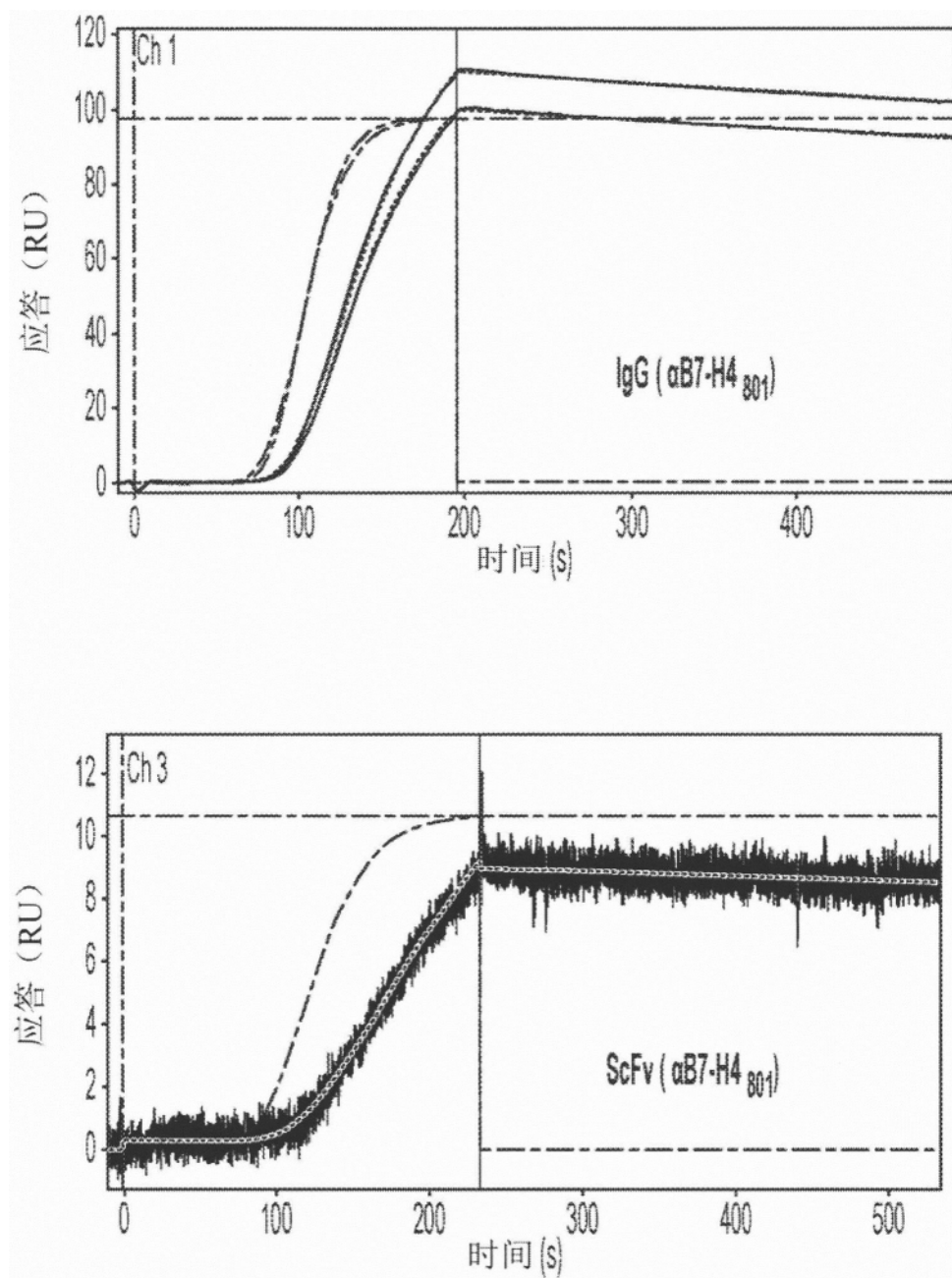


图10

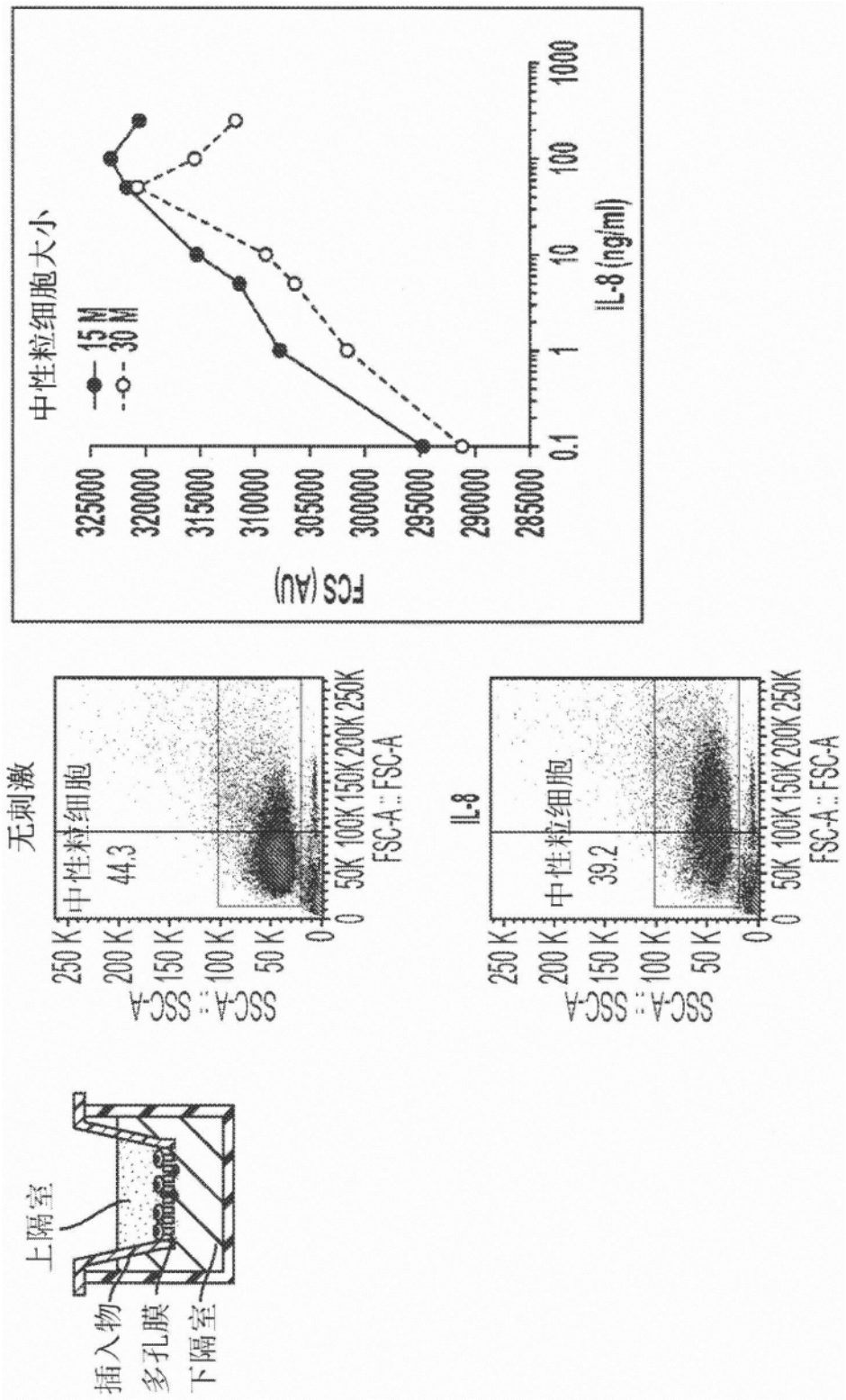


图11

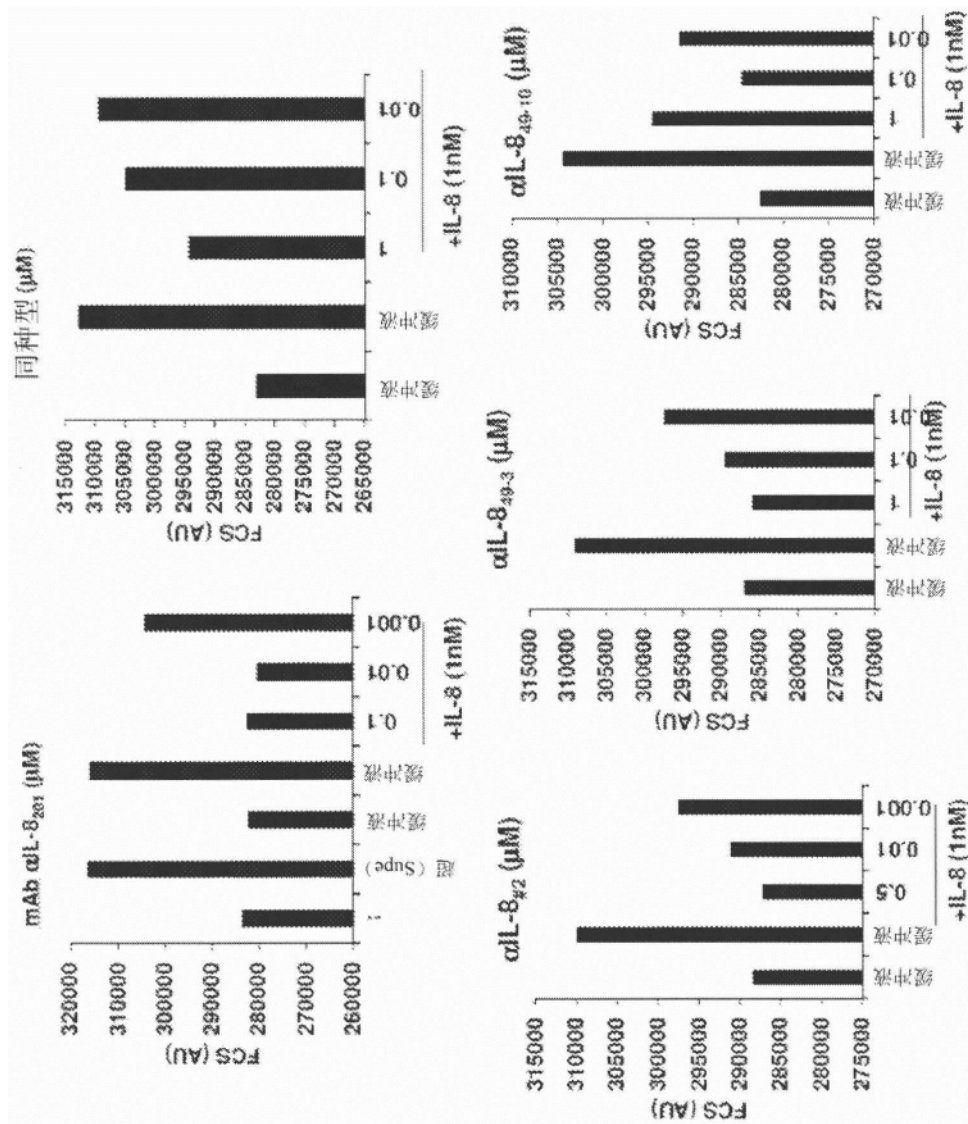


图12

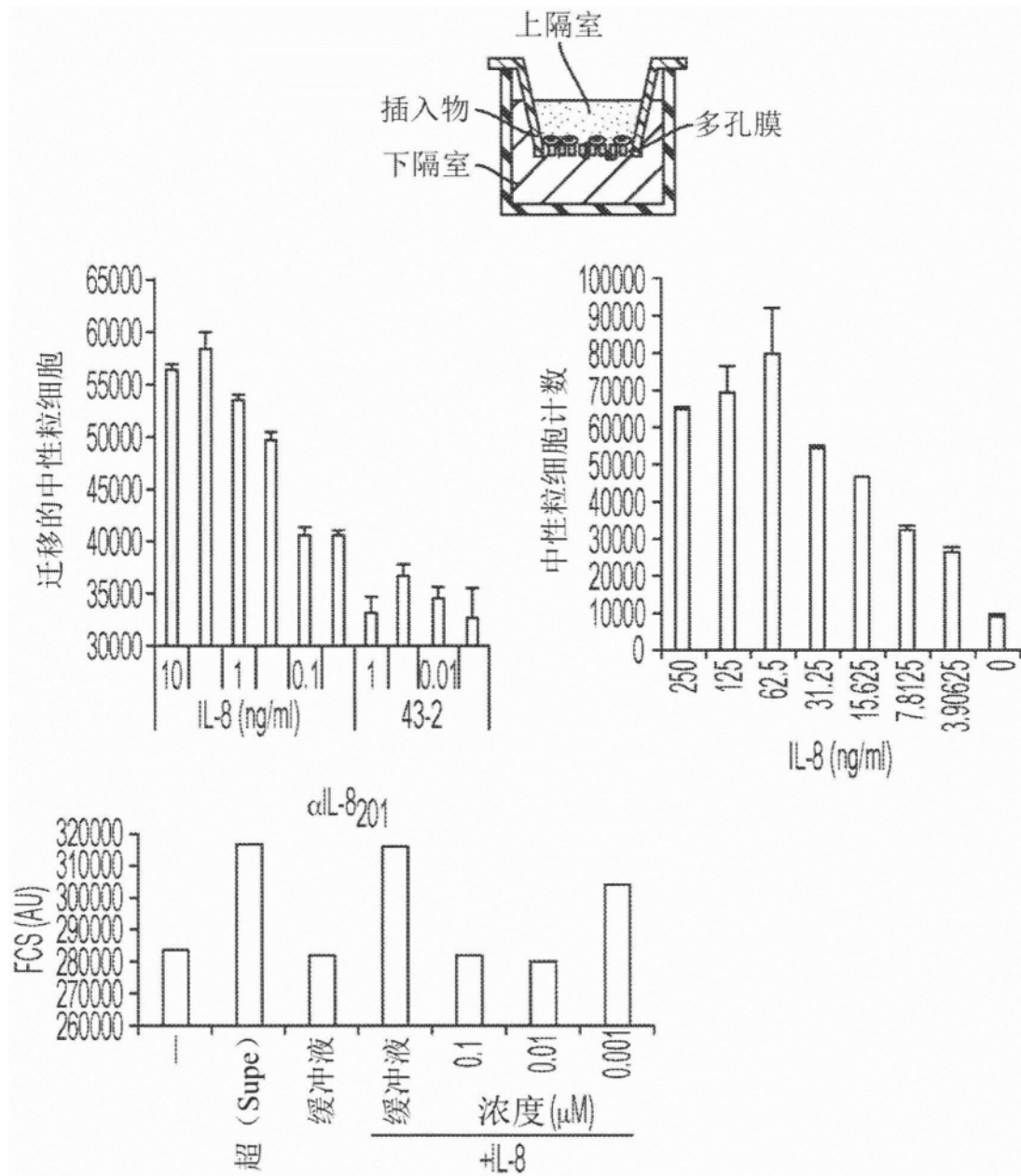


图13

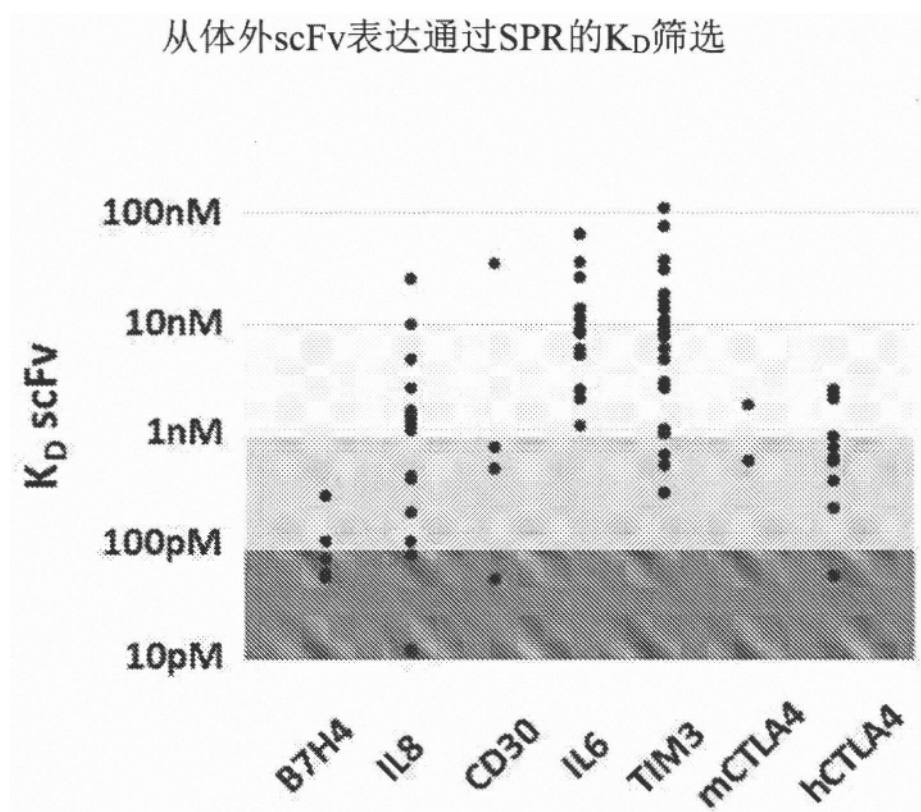


图14

IgG1转换：迄今为止测试的所有29个命中是功能性的

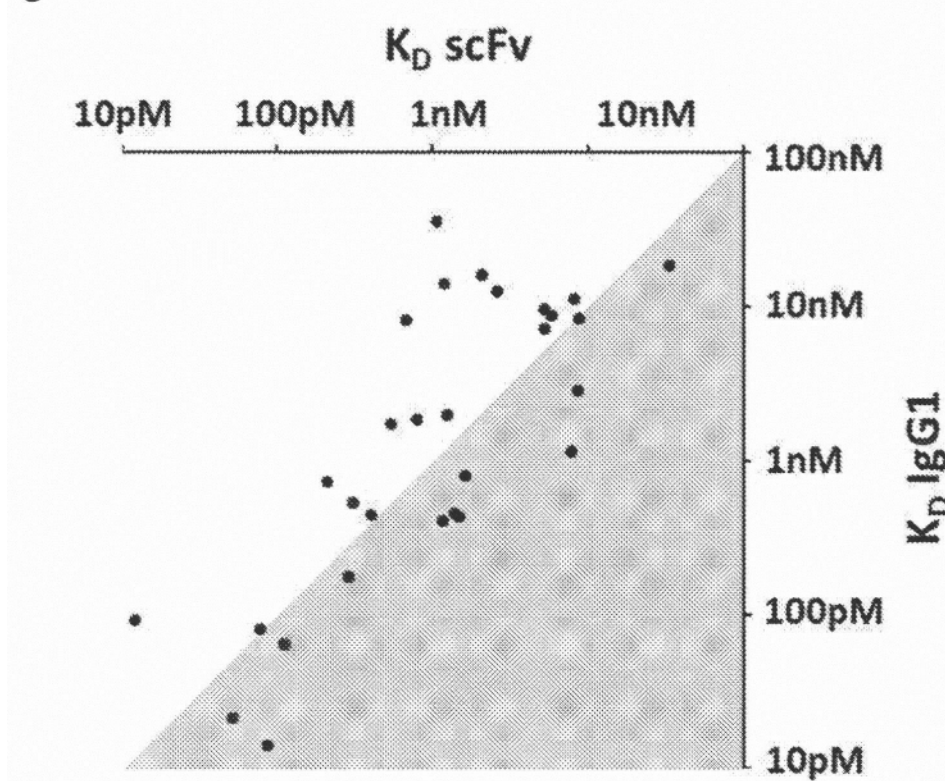


图15