

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680053419.7

[51] Int. Cl.

*C40B 40/02 (2006.01)*

*C07K 16/00 (2006.01)*

*C07K 19/00 (2006.01)*

*C12N 15/09 (2006.01)*

*C12N 15/62 (2006.01)*

*C12P 21/02 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年3月18日

[11] 公开号 CN 101389791A

[51] Int. Cl. (续)

*C40B 30/04 (2006.01)*

*C40B 40/10 (2006.01)*

*C40B 50/06 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*G01N 33/554 (2006.01)*

*C12N 15/63 (2006.01)*

[22] 申请日 2006.12.22

[21] 申请号 200680053419.7

[30] 优先权

[32] 2005.12.23 [33] US [31] 60/752,871

[86] 国际申请 PCT/CA2006/002113 2006.12.22

[87] 国际公布 WO2007/071061 英 2007.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.25

[71] 申请人 维文蒂阿生物技术股份有限公司

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 艾德里安·施瓦兹·米特尔曼

吉恩尼克·西兹尔尤

尼古拉斯·R·格罗沃

格伦·麦克唐纳

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 武晶晶 陶貽丰

权利要求书 5 页 说明书 78 页 序列表 28 页  
附图 11 页

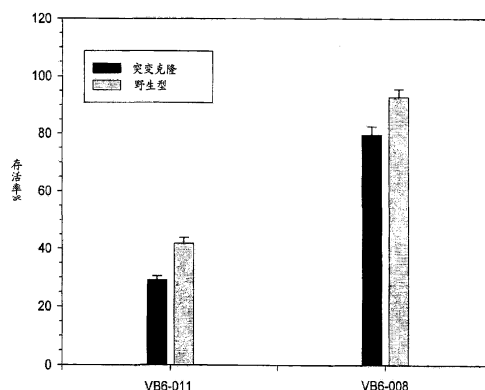
[54] 发明名称

融合蛋白文库的产生和筛选方法及其应用

[57] 摘要

本发明提供了制备融合蛋白文库如免疫毒素文库的方法。本发明还涉及编码包括融合蛋白的核酸序列的重组细胞文库。此外，本发明还涉及所述文库本身以及使用所述文库筛选对靶细胞，如癌细胞特异的融合蛋白。并且，本发明涉及改进融合蛋白的方法及改进的融合蛋白。

MTS 分析



1. 一种制备重组细胞文库的方法，其中每个重组细胞包括编码融合蛋白的核酸序列，其包括如下步骤：

(a) 构建载体文库，其中每个载体编码融合蛋白并且包含 1) 核酸序列，其编码结合到靶分子的配体蛋白所述靶分子连接到 2) 编码效应分子的核酸序列；以及

(b) 用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库。

2. 根据权利要求 1 所述的制备重组细胞文库的方法，其中每个重组细胞表达免疫毒素，其包括如下步骤：

(a) 构建载体文库，其中每个载体含有一个轻链可变区核酸序列和/或一个重链可变区核酸序列，且其中轻链可变区核酸序列或重链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列上；以及

(b) 用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中轻链可变区和重链可变区从 B 细胞中分离。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述 B 细胞是成熟的 B 细胞。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其中所述 B 细胞来自患有癌症的受试者。

6. 根据权利要求 2 到 5 中任一项所述的方法，其中所述细胞毒素是核糖体失活多肽。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述细胞毒素选自多花白树毒蛋白、bouganin、皂草毒蛋白、蓖麻毒蛋白、蓖麻蛋白 A 链、异株泻根毒蛋白、白喉、局限毒素(restrictocin)、假单胞菌外毒素 A 及它们的变异性。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述细胞毒素是改性的 bouganin 或其变异性。

9. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述细胞毒素是假单胞菌外毒素 A 的变异体，其没有功能性细胞结合域。

10. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述细胞毒素是假单胞菌外毒素 A 的截短形式，其由氨基酸 252-608 或其变异体和内质网保留序列组成。

11. 根据权利要求 1 到 10 中任一项所述的方法，其中所述宿主细胞为大肠杆菌。

12. 重组细胞文库，其中每个重组细胞表达融合蛋白，根据权利要求 1 到 11 中任何一项所述的方法制备。

13. 制备融合蛋白文库的方法，包括：

(a) 制备根据权利要求 1~10 中任何一项所述的重组细胞文库；

(b) 克隆所述的重组细胞；以及

(c) 表达融合蛋白文库，其中所述融合蛋白是所述重组细胞表达的可溶蛋白。

14. 根据权利要求 13 所述的方法制备的融合蛋白文库。

15. 免疫毒素文库，其包括多个重链可变区和多个轻链可变区，并且其中文库中的每个免疫毒素具有一个重链可变区和一个轻链可变区，且所述轻链可变区或所述重链可变区与细胞毒素相连。

16. 根据权利要求 15 所述的文库，其中所述细胞毒素是核糖体失活多肽。

17. 根据权利要求 16 所述的文库，其中所述细胞毒素选自多花白树毒蛋白、bouganin、皂草毒蛋白、蓖麻毒蛋白、蓖麻蛋白 A 链、异株泻根毒蛋白、白喉、局限毒素、假单胞菌外毒素 A 及它们的变异体。

18. 根据权利要求 17 所述的文库，其中所述细胞毒素是改性的 bouganin 或其变异体。

19. 根据权利要求 17 所述的文库，其中所述细胞毒素是假单胞杆菌外毒素 A，其没有功能性细胞结合域。

20. 根据权利要求 19 所述的文库，其中所述细胞毒素是假单胞菌外毒素 A 的截短形式，其由氨基酸 252-608 或其变异体和内质网保留序列组成。

21. 根据权利要求 15 到 20 中任一项所述的文库，其中所述轻链可变区和重链可变区从 B 细胞中分离。

22. 根据权利要求 21 所述的文库，其中所述 B 细胞是成熟的 B 细胞。

23. 根据权利要求 21 或 22 所述的文库，其中所述 B 细胞来自患有癌症的受试者。

24. 筛选结合靶细胞的融合蛋白的文库的方法，包括步骤：

- (a) 提供根据权利要求 14 所述的融合蛋白的文库；
- (b) 将融合蛋白与靶分子接触；和
- (c) 确定融合蛋白结合到靶分子上。

25. 筛选对靶细胞具有细胞毒性的融合蛋白的文库的方法，包括步骤：

- (a) 提供根据权利要求 14 所述的融合蛋白文库；
- (b) 将融合蛋白与靶细胞接触；和
- (c) 确定融合蛋白对靶细胞的细胞毒性。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的方法，其中所述融合蛋白是免疫毒素。

27. 根据权利要求 25 或 26 所述的方法，其中所述靶细胞是癌细胞。

28. 制备改进的融合蛋白的方法，包括步骤：

- (a) 提供编码可结合到靶分子上的配体蛋白的核酸序列；
- (b) 在编码配体蛋白的所述核酸序列中引入至少一个点突变，以制备编码变异配体蛋白的核酸序列文库；
- (c) 构建载体文库，其中每个载体编码融合蛋白，并且包括 1) 一种变异配体蛋白的核酸序列，其在步骤 (b) 中制备并连接到 2) 编码效应分子的核酸序列；

- (d) 用所述载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;
- (e) 克隆转化的宿主细胞;
- (f) 表达融合蛋白文库,其中所述融合蛋白是所述宿主细胞表达的可溶蛋白;和
- (g) 筛选同未改性的融合蛋白相比,具有改进活性的融合蛋白的文库,其中改进的活性表示改进的融合蛋白。

29. 根据权利要求 28 所述的方法,其中所述融合蛋白改进的免疫毒素,包括步骤:

(a) 制备根据权利要求 2 到 12 中任一项所述的重组细胞文库,其中在构建所述载体文库之前,在编码所述轻链可变区和/或所述重链可变区的核酸序列中引入至少一个点突变;

(b) 克隆表达所述免疫毒素的转化的宿主细胞;

(c) 表达免疫毒素文库,其中所述免疫毒素是宿主细胞所述表达的可溶蛋白;和

(d) 筛选同未改进的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有改进的结合和/或改进的细胞毒性的免疫毒素文库,其中同未改进的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有改进的结合和/或改进的细胞毒性表示改进的免疫毒素。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述突变是在所述轻链可变区中引入。

31. 根据权利要求 29 的方法,其中所述突变是在所述重链可变区中引入。

32. 根据权利要求 29 所述的方法,其中在轻链可变区和重链可变区中均引入突变。

33. 根据权利要求 29 到 32 中任一项所述的方法,其中所述突变包括在编码轻链所述可变区和/或所述重链可变区的核酸序列的热点区的至少一个点突变。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述点突变是在轻链可变区的热点区引入。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述点突变是在重链可变区的热点区引入。

36. 根据权利要求33所述的方法,其中所述点突变是在轻链可变区和重链可变区两者的热点区引入。

37. 根据权利要求29到36中任一项所述的方法,其中所述靶细胞是癌细胞。

38. 根据权利要求28到37中任一项所述的方法制备的融合蛋白。

39. 免疫毒素,其包括示于SEQ ID NO:2中的轻链可变区。

40. 免疫毒素,其包括示于SEQ ID NO:1中的重链可变区。

41. 根据权利要求40所述的免疫毒素,其包括示于SEQ ID NO:2中的轻链可变区。

42. 根据权利要求38至41中任一项所述的免疫毒素在预防或治疗疾病中的应用。

43. 根据权利要求42所述的免疫毒素在预防或治疗癌症中的应用。

## 融合蛋白文库的产生和筛选方法及其应用

### 发明领域

本发明涉及产生融合蛋白文库，尤其是免疫毒素文库的方法。本发明还涉及文库本身以及使用这些文库筛选对靶细胞，如癌细胞特异的融合蛋白。此外，本发明涉及免疫毒素亲和力成熟的方法以及获得的免疫毒素。

### 发明背景

融合蛋白，其包括与具有期望效应功能的蛋白质结合的靶细胞结合的蛋白质，有许多应用。当所述效应蛋白是检测试剂时，这样的融合蛋白可用于检测或诊断与靶细胞相关的疾病或在靶细胞上表达的蛋白质。当效应蛋白为治疗剂时，这样的融合蛋白可用于将治疗剂输送到靶细胞。治疗用融合蛋白的例子包括免疫毒素，所述免疫毒素包括与能够杀死癌细胞的毒素相连的癌症特异性的配体。

在最近几年已经对许多免疫毒素进行了试验 (Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11:570-578; Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. *Expert Opin Pharmacother* 1:1117-1129; Wahl RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 73:989-992; Grossbard ML, Fidas P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol Immunopathol* 76:107-114; Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol* 33:287-314; Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 14:115-120; Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 18:195-201; Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M,

Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345:241-247)。目前为止试验的大多数抗体已经对已知的癌症标记物产生抗性,其为鼠单克隆抗体的形式,有时是通过分子工程“人源化”的形式。遗憾地是,它们的靶通常还存在于正常细胞的亚群上,因此仍导致一些非特异性的作用。而且,这些抗体基本上是鼠蛋白,它们被人类患者的免疫系统视作外源蛋白。随后的免疫应答和抗体应答会导致功效丧失或副作用。

两种策略通常被用于增强抗体的结合亲和力。一种方法是利用 Ab-Ag 复合物的结晶结构的分辨率来识别参与抗原结合的关键残基 (Davies D.R., Cohen G.H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 93:7-12)。随后,对这些残基进行突变以增强所述相互作用。然而,如果抗原是未知的,这种方法不能使用。另一种方法是模仿活体内的抗原刺激,其可促使由 B 细胞产生的免疫球蛋白的亲和力成熟。在免疫应答的成熟过程中,免疫球蛋白的可变区受到体细胞突变。(McHeyzer-Williams M. 2003. B-cell signaling mechanism and activation. *Fundamental Immunology*, Fifth edition, pp:195-225)。该方法对免疫系统高度特异,其特征在于以非常高的频率引入点突变。其只发生于编码可变区的 DNA 片段中,并排除了保守区。表达体细胞突变的变异抗体的 B 细胞接着受到抗原介导的选择,获得更高亲和力的免疫球蛋白的选择。为了在活体外重复该现象,已使用几种方法通过随机的或有目的的过程来引进突变。可使用易错 PCR, 链改组或突变大肠杆菌株引进随机突变。(Clackson T. Hoogenboom N.R., Griffiths A.D. and Winter G. 1991 Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352:624-628; Hawkins R.E., Russell S.J. and Winter G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Low N., Holliger P. and Winter G. 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol. Biol.* 260:359-368)。该方法导致了大文库的产生,用显示技术如核糖体、噬菌体或酵母显示技术在其中选择活性克隆 (Min L. 2000.

Applications of display technology in protein analysis. Nat. Biotechnol. 18:1251-1256).

已表明轻链和重链的 CDR, 尤其是 CDR3 的靶突变, 是增加抗体亲和力的一项有效的技术。CDR3 的 3~4 个氨基酸段或被称为“热点区”的特异区被靶向作用突变。Yang 等人报导了通过突变 4 个 CDR 残基实现了抗-HIV gp120 Fab 片段的 420 倍的增加。(Yang W.P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A.T., Burton D.R. and Barbas C.F. III. 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into picomolar range. J. Mol. Biol. 254:392-403)。V<sub>L</sub> CDR3 中的一个突变的结合 C6.5 scFv 的 V<sub>H</sub> CDR3 中的三个突变产生了 1230 倍增加的亲和力 (Schier R., McCall A., Adams G.P., Marshall K.W., Merrit H., Yin M., Crawford R.S., Weiner L.M., Marks C. and Marks J.D. 1996. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementary determining regions in the center of the antibody binding site. J. Mol. Biol. 263:551-567)。通过靶向作用 3~4 个氨基酸的突变, 2x10<sup>5</sup> 个克隆的小型文库足以覆盖所有可能的组合。所述文库的大小适合作为直接筛选的方法, 在该方法中抗体片段可表达为可溶性蛋白并用于功能检测。

因此需要有识别与靶细胞特异结合的融合蛋白的改进方法。特别地, 需要更好的方法来提高免疫毒素的筛选以及功效。

## 发明概述

本发明人们已经研发出了含有编码融合蛋白的核酸序列的重组细胞的新文库, 融合蛋白文库, 构建所述文库的方法和所述文库的用途。所述融合蛋白包括 1) 能够与靶分子结合的配体蛋白, 以及 2) 能够检测、作用靶细胞和/或处理含有目标分子的靶细胞的效应分子。产生可用于检测或治疗疾病的融合蛋白文库大大地便利了有用的融合蛋白的筛选和选择。尤其是, 可对整个融合蛋白而不是对融合蛋白的每一部分进行筛选。

在一个优选的实施方式中, 所述融合蛋白为免疫毒素。制备免疫毒素文库是有益的, 因为其允许对完整的免疫毒素在肿瘤细胞结合和/或杀死的

功效进行筛选。以前，筛选出肿瘤细胞结合的肿瘤特异性抗体，有用的抗体接着用于制备免疫毒素。然后需要筛选出杀死肿瘤细胞的免疫毒素。因此，免疫毒素库大大地方便了治疗上有用的免疫毒素的选择，并且允许方法自动化和适于高通量的方法。

因此，本发明的一方面是产生重组细胞文库的方法，其中每个重组细胞包括编码融合蛋白的核酸序列，其包括如下步骤：

(a) 构建一个载体文库，其中每个载体编码一种融合蛋白且包含 1) 核酸序列，其编码结合到靶分子的配体蛋白，所述靶分子连接到 2) 编码效应分子的一种核酸序列；和

(b) 用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库。

本发明也包括使用本发明的方法产生的重组细胞文库。

本发明的另一个方面是构建融合蛋白文库的方法，其包括如下步骤：

(a) 构建载体文库，其中每个载体编码一种融合蛋白且包含 1) 核酸序列，其编码结合到靶分子的配体蛋白，所述靶分子连接到 2) 编码效应分子的核酸序列；

(b) 用载体库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；

(c) 克隆转化的宿主细胞；和

(d) 表达融合蛋白文库，其中所述融合蛋白是宿主细胞表达的可溶蛋白。

本发明也包括使用本发明的方法构建的融合蛋白文库。具体地说，本发明包括免疫毒素库，其包括来自研究对象的 B 细胞的多个重链可变区以及多个轻链可变区，并且其中所述文库中的每个免疫毒素具有一个重链可变区和一个轻链可变区，且所述轻链可变区或重链可变区连接到细胞毒素上。

本发明进一步的方面筛选结合到靶分子的融合蛋白文库的方法，其包括如下步骤：

(a) 提供本发明的融合蛋白库；

- (b)将融合蛋白与靶分子接触；以及
- (c)确定一个或多个融合蛋白分子对靶分子的结合。

本发明另一方面是筛选对含有所述靶分子的靶细胞具有细胞毒性的融合蛋白的文库的方法，该方法包括如下步骤：

- (a)提供本发明的融合蛋白的文库；
- (b)将所述融合蛋白与靶细胞接触；以及
- (c)确定一个或多个融合蛋白对靶细胞的细胞毒性。

本发明还包括可用于检测、治疗或预防疾病如癌症的融合蛋白，其可通过本发明的方法进行识别。此外，本发明包括使用本发明的融合蛋白治疗或预防疾病如癌症的方法，以及使用融合蛋白来治疗或预防疾病如癌症。

本发明的附加方面是制备改良的融合蛋白的方法以用于预防或治疗疾病如癌症。在一个实施方式中，改进的融合蛋白对靶分子或靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性。

因此，本发明的一个实施方式是制备改进的融合蛋白的方法，其包括如下步骤：

- (a)提供编码结合靶分子的配体蛋白的核酸序列；
- (b)在编码配体蛋白的核酸序列中引进至少一个点突变，以形成编码变异配体蛋白的核酸序列文库；
- (c)构建载体文库，其中每个载体编码融合蛋白并且包括 1) 在步骤 (b) 中制备的变异配体蛋白核酸序列的一种，并连接到 2) 编码效应分子的核酸序列；
- (d)用所述载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；
- (e)克隆转化的宿主细胞；
- (f)表达融合蛋白文库，其中所述融合蛋白宿主细胞表达的可溶蛋白；以及
- (g)筛选出与未改性的融合蛋白相比，具有增加活性的融合蛋白的文

库，其中增加的活性表示其是改良的融合蛋白。

在另一个实施方式中，该方法用于制备改良的免疫毒素且其包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；

(b)在编码轻链可变区和/或重链可变区的核酸序列中引入至少一点突变，从而构建编码变异的轻链可变区和/或重链可变区的核酸序列文库；

(c)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或变异的轻链可变区核酸序列中的一个，且其中变异的轻链可变区核酸序列和/或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接至编码细胞毒素的核酸序列；

(d)用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；

(e)克隆转化的宿主细胞；

(f)表达所述免疫毒素文库，其中所述免疫毒素是所述宿主细胞表达的可溶蛋白；以及

(g)同步骤(a)中未改性的融合蛋白比较，筛选出对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本领域的技术人员将认识到重链和/或轻链可变区的靶突变可用来构建文库，例如，在轻链和/或重链的可变区的热点区。在对受体结合区发生受体配体突变的情况下或在形成复合物的蛋白的情况下，可进行二聚基序中的突变。

在一个实施方式中，制备改良免疫毒素的方法包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；

(b)识别轻链可变区中的热点区；

(c)在热点区在编码轻链可变区的核酸序列引进至少一个点突变，以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库；

(d)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素，并且含有步骤(c)中制备的变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中所述变异的轻链可变区重链可变区核酸序列或所述变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接至编码细胞毒素的核酸序列；

(e)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库；

(f)克隆转化的宿主细胞；

(g)表达免疫毒素文库，其中所述免疫毒素宿主细胞表达的可溶蛋白；以及

(h)筛选出同步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素比较，具有对靶细胞增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

在另一种实施方式中，该方法包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和一个重链可变区的核酸序列；

(b)识别重链可变区中的热点区；

(c)在热点区向编码重链可变区的核酸序列引进至少一个点突变，以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库；

(d)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(c)中制备的变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接至编码细胞毒素的核酸序列；

(e)用载体库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；

(f)克隆转化的宿主细胞；

(g)表达免疫毒素文库，其中所述免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；以及

(h)筛选出同步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具

有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明还包括上述方法所进行变化，例如，该方法可结合突变重链可变区和轻链可变区。在一种实施方式中，重链可变区和轻链可变区可序贯地突变和筛选。在另一个实施方式中，重链可变区和轻链可变区可同时进行突变和筛选。

因此，本发明的另一种实施方式是一种制备改良免疫毒素的方法，其包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；

(b)在编码轻链可变区的核酸序列中引进至少一个点突变，以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库；

(c)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有步骤(b)中制备的变异的轻链可变区核酸序列的一个和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接至编码细胞毒素的核酸序列；

(b)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库；

(c)克隆转化的宿主细胞；

(f)表达免疫毒素库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；

(g)筛选出与步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素比较，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素；

(h)在编码重链可变区的核酸序列中引进至少一个点突变，以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库；

(i)构建一个载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(h)中制备的变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或在步骤(h)中识别的改良免疫毒素的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核

酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(j)用载体库转化宿主细胞以产生重组细胞文库;

(k)克隆转化的宿主细胞;

(l)表达免疫毒素库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;以及

(m)筛选出同未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明进一步包括用于制备改良免疫毒素的方法,其包括如下步骤:

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列;

(b)在编码重链可变区的核酸序列中引进至少一个点突变,以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库;

(c)构建一个载体文库,其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(b)中制备的变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地接到编码细胞毒素的核酸序列;

(d)用载体库转化宿主细胞以产生重组细胞文库;

(e)克隆转化的宿主细胞;

(f)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;

(g)筛选出与步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素比较,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素;

(h)在核酸序列编码的轻链可变区中引进至少一个点突变,以产生编码变异的轻链可变区的核酸序列的文库;

(i)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(h)中制备的变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或在步骤(g)中识别的改良免疫毒素的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列；

(j)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库；

(k)克隆转化的宿主细胞；

(l)表达免疫毒素文库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；以及

(m)筛选同未改性的抗体或免疫毒素比较，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

因此，本发明的另一种实施方式是制备改良免疫毒素的方法，其包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；

(b)识别轻链可变区中的热点区；

(c)在热点区向编码轻链可变区的核酸序列引进至少一个点突变，以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库；

(d)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(c)中制备的变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接至编码细胞毒素的核酸序列；

(e)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库；

(f)克隆转化的宿主细胞；

(g)表达免疫毒素文库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；

(h)筛选与步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素比较，对靶细胞具有

增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素；

(i)识别重链可变区中的热点区；

(j)在编码重链可变区核酸序列的热点区中引进至少一个点突变，以形成编码变异的重链可变区的核酸序列文库；

(k)构建一个载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(j)中制备的变异的重链可变区核酸序列的一个和/或在步骤(h)中识别的改良免疫毒素的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的重链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地链接到编码细胞毒素的核酸序列；

(l)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库；

(m)克隆转化的宿主细胞；

(n)表达免疫毒素文库进行表达，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；并且

(o)筛选与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明进一步包括用于制备改良免疫毒素的方法，其包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；

(b)识别重链可变区的热点区；

(c)在热点区向编码重链可变区的核酸序列引进至少一个点突变，以形成编码变异的重链可变区的核酸序列文库；

(d)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(c)中制备的变异的重链可变区核酸序列中一个和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的重链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接至编码细胞毒素的核酸序列；

(e)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库;

(f)克隆转化的宿主细胞;

(g)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;

(h)筛选出同步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素;

(i)识别轻链可变区中的热点区;

(j)在编码轻链可变区的核酸序列的热点区中引进至少一个点突变,以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库;

(k)构建载体文库,其中每个载体编码免疫毒素并且含有在步骤(j)中制备的变异的轻链可变区核酸序列中的一个和/或在步骤(h)中识别的改良免疫毒素的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地链接到编码细胞毒素的核酸序列;

(l)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库;

(m)克隆转化的宿主细胞;

(n)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;并且

(o)筛选与未改性的抗体或免疫毒素比较,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明还包括改良的免疫毒素。此外,本发明包括使用改良的免疫毒素来治疗或预防疾病,如癌症,以及使用本发明改良的免疫毒素治疗或预防疾病如癌症的方法。

从下面详细的描述中,本发明的其它特性以及优点将变得显而易见。然而,应当理解的是,尽管指出了本发明的优选的实施方式,所述具体的

描述和具体的实施例，只是通过说明的方式给出，因为从该详细描述，在本发明精神和范围内的各种变化和修改，对本领域技术人员是显而易见的。

### 附图简述

现对本发明相关的附图进行描述，其中

图 1 是来自于患者 B 细胞群的未成熟 B 细胞的耗竭流程图。从淋巴结中提取的细胞混合物在耗竭前（上图）和耗竭后（下图）用抗-IgD-FITC 缀合物进行标记。活细胞的门控识别出两个群，M1 和 M2，它们分别表示未标记和标记的细胞。标记的细胞的去除表示未成熟的 B 细胞的去除。

图 2 是免疫文库的诱导克隆的蛋白印迹（Western blot）分析。将在 96 孔板中生长并诱导的 15 个独立克隆的上清液 16  $\mu$ L 在非还原性条件下负荷到 SDS-PAGE 凝胶上并使用抗人  $\kappa$  轻链-HRP 抗体（1/1000）进行免疫印迹化。L 和 C 分别对应于梯（ladder）和 VB6-845-FAB-ETA<sub>(252-608)</sub> 的诱导上清液。箭头表示约在 75 kDa 处迁移的全长抗体，其通过克隆表达。

图 3 是亲和力成熟算法。

图 4 是 VB6-011--ETA<sub>(252-608)</sub> CDR-3 轻链克隆的蛋白印迹。将分别在含 150  $\mu$ l 和 1 ml 的 96 孔板(W)或在 5 mL 试管 (T) 中得到的上清液(16  $\mu$ L) 在非还原条件下负荷到 SDS-PAGE 凝胶中并用兔抗-假单胞菌外毒素 A 抗体接着用羊抗-兔 HRP 抗体进行免疫印迹。克隆 13 是在 5 ml 试管或 96 孔板中生长和诱导的 VB6-011--ETA<sub>(252-608)</sub> 野生型。箭头表示期望大小的全长蛋白。蛋白印迹分析显示 13 个克隆中有 10 个表达了全长蛋白。在试管或孔中的表达水平与野生型的表达水平相似和相当。

图 5 为 FMAT 筛选。A) VB6-011--ETA<sub>(252-608)</sub>。将来自诱导克隆和野生型的上清液 5  $\mu$ l 加入到含有前一天每孔 15000 细胞接种的 A-375 细胞的 FMAT 板上。在室温下进行 6 小时温育后，用与 Alexa Fluor 647<sup>®</sup> 缀合的羊抗-人重链加轻链抗体检测 VB6-011--ETA<sub>(252-608)</sub> 的结合。孔、板 3 A1 的图像通过 FMAT 系统技术鉴定为阳性，且野生型 (WT) 显示出不同的细胞

膜染色。在以 Y 轴表示平均荧光 (FL-1) 和 X 轴表示事件数目的散点图显示, 与野生型相比, 板 3 的克隆 A1 的平均荧光和事件数目增加。通过将平均荧光与事件数目相乘计算总荧光。B) VB6-008--ETA<sub>(252-608)</sub>。使用 FMAT 系统检测另一个 Fab-PE 片段。将诱导克隆和野生型的上清液 10  $\mu$ l 加入到含有在前一天以每孔 15000 的数量接种的 MB435S 细胞的 FMAT 板上。在室温下进行 6 小时温育后, 用含有 Alexa Fluor 647<sup>®</sup> 缀合的兔抗-假单胞菌外毒素 A 抗体以及羊抗-兔抗体的混合物检测 VB6-008 的结合。板分析表明板 1 孔 F4 中的克隆显示了增加的平均荧光以及事件数目。

图 6 是通过 FMAT 分析选择的克隆的 MTS 分析。MTS 板用在 50 $\mu$ l 体积的培养基中的 5000 个细胞/孔接种。A-375 细胞和 MB-435S 细胞被分别用来测试 VB6-011--ETA<sub>(252-608)</sub> 和 VB6-008--ETA<sub>(252-608)</sub>。在 37 $^{\circ}$ C 以及 5% CO<sub>2</sub> 的条件下持续 2 小时后, 将 10 $\mu$ l 的大肠杆菌上清液以及 40 $\mu$ l 培养基加入孔, 使得最终体积为 100 $\mu$ l/孔。在 37 $^{\circ}$ C 以及 5% CO<sub>2</sub> 下用上清液对细胞培育 72 小时。温育后, 向每个孔加入 20 $\mu$ l 的 MTS 试剂(1:20 的 MTS 溶液:PMS 溶液), 并在 37 $^{\circ}$ C 以及 5% CO<sub>2</sub> 条件下显影另外 2 小时。然后在 490nm 下读取 OD 值来确定活性细胞的百分比。

图 7 是流式细胞分析 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub> 在 A-375 细胞上的亲和力成熟 VL 克隆的结合。N1=未诱导的大肠杆菌上清液, 3302=用 pING3302 转化的大肠杆菌, 845=VB6-845-ETA<sub>(252-608)</sub> 的阴性对照, WT=具有亲和力成熟轻链的原始 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>, VL-1 到 VL-4 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>。

图 8 是与野生型和对照相比, 通过亲和力成熟的轻链 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>-VL2 识别硫酸软骨素 A 的 ELISA。

图 9 是对 VB6-011 的亲和力成熟的结合的轻链和重链克隆的流式细胞计数。PBS 阴性对照、VB3-011 野生型亲代抗体、VL-2 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub> 野生型重链和亲和力成熟的轻链、来自未诱导的 VL-2 克隆的 N-1 上清液、具有亲和力成熟的轻(VL-2)和各重链的 20A10、2D3、11F11 以及 8E8 各种克隆。

图 10 是亲和力成熟 VB6-011 克隆 2D3 的氨基酸序列(SEQ ID NOS:1 和 2)。

图 11 是与亲代 VB6-011 和阳性对照 VB6-845 相比，缀合 bouganin 的优化的亲和力成熟的纯 VB6-011 克隆 2D3 在抗原高阳性(Cal-27)以及抗原低阳性(PANC-1)细胞系上的结合进行的流式细胞分析。并作对照。

## 具体实施方式

### (A) 定义

术语“氨基酸”包括所有的天然氨基酸和改性的氨基酸。

这里使用的术语“抗体”意在包括单克隆抗体，多克隆抗体，和嵌合抗体。抗体可来自重组源和/或在转基因动物内产生。这里所用的“抗体片段”意在包括 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, 二聚体, 微抗体(minibody), 双链抗体(diabody), 和它们的多聚体以及双特异性的抗体碎片。抗体可采用传统技术破裂。例如, F(ab')<sub>2</sub> 片段可通过用胃蛋白酶处理抗体产生。对所得的 F(ab')<sub>2</sub> 片段进行处理还原二硫键, 以产生 Fab' 片段。木瓜蛋白酶消化可形成 Fab 片段。Fab, Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub>, scFv, dsFv, ds-scFv, 二聚体, 微抗体, 双链抗体和双特异性抗体片段和其他片段也可通过重组技术合成。

这里使用的术语“B 细胞或 B 淋巴细胞”指提供体液免疫的淋巴细胞。“成熟的 B 细胞”是指已被抗原刺激并成熟为产生抗原特异的抗体的浆细胞的 B 细胞。

这里使用的术语“疾病”指任何会导致具有可识别的迹象和/或症状的医疗病症或紊乱。在优选的实施方式中, 所述疾病为癌症。

这里使用的术语“融合蛋白”表示重组蛋白, 其包括 1) 结合靶细胞的配体蛋白, 其连接到 2) 效应分子。

这里使用的术语“有效量”是指在获得期望结果所需的剂量和时间下的有效的量。融合蛋白的有效量可根据因素如动物的疾病状态、年龄、性别、体重改变。给药方案可调整以提供最佳的治疗应答。例如, 可每日施用几次分次剂量或可根据治疗情况中的紧急事件的指示, 适当地减少剂量。

这里使用的术语“效应分子”表示任何期望能够连接到配体蛋白的分

子，所述配体蛋白包括但不限于，治疗蛋白、诊断蛋白以及对辅助配体蛋白连接到效应分子的有用的蛋白或其片段。

这里使用的术语“免疫毒素”表示含有轻链可变区和/或重链可变区的融合蛋白，其中轻链可变区或重链可变区被连接至细胞毒素。

这里使用的术语“热点区”指在活体内发生体细胞超变的轻链可变区和重链可变区的特异核苷酸序列。在一种实施方式中，热点区包括四核苷酸 RGYW，其中 R 可为 A 或 G，Y 可为 C 或 T 以及 W 可为 A 或 T。在另一种实施方式中，热点区包括核苷酸 AGY。

这里所用的术语“文库”指不同的但相关的项目的集合。例如，这里使用的“重组细胞文库”表示不同的重组细胞的集合。在一种优选的实施方式中，每个重组细胞包含编码融合蛋白的核酸序列。在另一个实施例中，“核酸序列文库”表示不同的核酸序列的集合。在优选的实施方式中，文库中的每个核酸序列编码抗体的轻链可变区和/或重链可变区。这里使用的术语“载体库”表示不同载体的集合。在优选的实施方式中，每个载体包括一个编码配体蛋白的核酸序列，所述配体蛋白可正常运转地连接到编码效应分子的核酸序列。这里使用的术语“融合蛋白文库”表示不同的融合蛋白的集合。在一种实施方式中，免疫毒素文库包括已突变用于亲和力成熟的轻链可变区和/或重链可变区。

这里使用的术语“改性的 bouganin”表示具有减少的激活免疫应答倾向的改性 bouganin，如 International Publication NO. WO/2005/090579 和 United States Publication No. 2005/0238642 所述。在一个实施例中，改性的 bouganin 具有氨基酸序列：

YNTVSNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKR  
FVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKV  
PTVATSKLFPGVTNRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKL  
EFSIEAIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVDRLGLY  
GSFKPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPW  
VVNKVSQISPDMGILKFKSSK (SEQ ID NO:88)。

这里使用的术语“核酸序列”是指由天然碱基，糖和糖间（骨架）键构

成的核苷或核苷酸单体的序列。该术语也包括含有非天然单体或其部分的改性的或取代的序列。本发明的核酸序列可以是脱氧核糖核酸序列(DNA)或核糖核酸序列(RNA),且可包括天然碱基,所述天然碱基包括腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶和尿嘧啶。该序列还可含有修饰的碱基。这样的修饰的碱基的例子包括氮杂和脱氮的腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及黄嘌呤和次黄嘌呤。该术语包括双链或单链 DNA 或 RNA。

这里使用的术语“研究对象”表示动物界任何具有 B 细胞的成员。在优选的实施方式中,研究对象是哺乳动物。在更加优选的实施方式中,研究对象是人。

这里使用的术语“靶分子”表示结合到本发明配体蛋白上的分子。该分子可为靶细胞上的抗原或包括固定化抗原的分离的抗原。

这里使用的术语“靶细胞”表示具有结合本发明配体蛋白的靶分子的任何细胞。在一种实施方式中,该细胞为癌细胞。

这里使用的术语“治疗癌症”表示抑制癌症细胞的增殖、抑制癌症的扩散(转移)、抑制肿瘤生长、降低癌症细胞的数目或肿瘤生长、降低癌症的恶性程度(例如,增加分化)或改善癌症相关的症状。

### **(B) 重组细胞和融合蛋白文库**

如上所述,构建表达融合蛋白的细胞文库是有益的,因为其有利于筛选用于治疗或诊断应用的融合蛋白。本发明的一些优点包括但不限于下述优点:

1. 使用融合蛋白而不是配体蛋白进行的筛选是有效的,因为其避免了在制备融合蛋白前首先筛选配体的步骤。
2. 改进了对配体蛋白如抗体的选择,其中在融合蛋白的形式中没有包括所述抗体的结合以及内化特性。
3. 由于效应分子即使在未纯化的情况下也是有效的,从而可对未纯化的上清液进行筛选。

4. 允许选择出结合到靶细胞上的未知抗原的融合蛋白。在这种情况下，效应分子可为毒素并且细胞死亡可作为筛选参数。

因此，本发明的一方面是构建重组细胞文库的方法，其中每个重组细胞包括编码融合蛋白的核酸序列，其包括如下步骤：

(a) 构建载体文库，其中每个载体编码融合蛋白且包含 1) 编码结合靶分子的配体蛋白的核酸序列，所述靶分子连接 2) 编码效应分子的核酸序列；以及

(b) 用载体文库转化宿主细胞从而产生重组细胞文库。

配体蛋白可为能够结合靶分子的任意蛋白，它包括但不限于抗体、抗体片段、受体结合蛋白、转录因子以及复合物形成蛋白。

在优选的实施方式中，配体为抗体或抗体片段。可使用的抗体片段包括来自于重组源的 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv 以及 dsFv 片段。抗体或片段可来源于包括小鼠、大鼠、兔、仓鼠以及人的任何物种。嵌合抗体衍生物，即结合非人类动物可变区以及人的恒定区的抗体分子也预期在本发明的范围内。例如，嵌合抗体分子可含有人源化抗体，其包含来自于小鼠、大鼠或其它物种的抗原结合区和人的恒定区。

融合蛋白的配体部分可以是免疫球蛋白，其衍生于，即追溯到是免疫球蛋白（或抗体）的起始分子。例如，配体蛋白可通过使用本领域已知的标准技术对免疫球蛋白支架进行改性产生。在另一个非限制性实施例中，免疫球蛋白结构域（如可变重和/或轻链）可连接到非免疫球蛋白支架上。

免疫毒素的配体部分不必是免疫球蛋白基的。例如，配体可包括特异地结合至靶细胞的 Affibody®或其变体。这样的非免疫球蛋白多肽配体可设计成结合到靶肿瘤相关的分子上。而且，非免疫球蛋白多肽配体可设计为期望的亲和力或亲合力，并可被设计为耐受各种物理条件，包括极限 pH 范围以及相对高的温度。在生理条件下（如存在肽酶时的 37°C 下）具有相对较长的半衰期的非免疫球蛋白多肽的设计是有益的。此外，这样的分子或其变体可显示出良好的溶解度、分子小、合适的折叠和可在易得的、低费用的细菌系统中表达，因此可以商业合理的数量生产。设计非免

疫球蛋白多肽的能力在本领域技术人员的技术范围内。参见如 U.S. Patent Nos. 5,831,012 和 6,534,628, 从中获得适用于设计、生产以及选择期望的结合伴侣。

配体可为结合靶细胞上的表位的蛋白。表位结合多肽的例子包括但不限于, 含有纤连蛋白 III 型结构域的配体(如参见 International Publication Nos. WO 01/64942, WO 00/34784, WO 02/32925)。蛋白 A 基的亲合力文库也已被用于鉴别表位结合多肽(参见如 U.S. Patent Nos. 5,831,012 和 6,534,628) 并且这样的文库可用于根据本发明来选择那些选择性结合到靶细胞上的多肽。

本领域所知的其它类型的结合分子包括但不限于, 基于装配重复蛋白结构域的结合分子(如参见 Forrer et al., 2003, "A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins." FEBS Lett. 539:2-6; Kohl et al., 2003, "Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein." Proc Natl Acad Sci USA. 100:1700-1705)。根据本发明, 具有随机装配的重复结构域的文库可用于选择选择性结合靶细胞的配体。

几种非免疫球蛋白基的、表位结合的多肽和制备和使用这样的多肽的方法为本技术领域已知(如参见 Eklund et al., 2002, "Anti-idiotypic protein domains selected from Protein A-based affibody libraries." Prot. Struct. Funct. Gen. 48:454-462; Gunneriusson et al., 1999, "Affinity maturation of a Taq DNA polymerase specific affibody by helix shuffling." Prot. Eng. 12:873-878; Hansson et al., 1999, "An in vitro selected binding protein (affibody) shows conformation-dependent recognition of the respiratory syncytial virus (RSV) G protein." Immunotechnol. 4: 237-252; Henning et al., 2002, "Genetic modification of adenovirus 5 tropism by a novel class of ligands based on a three-helix bundle scaffold derived from staphylococcal protein A." Human Gene Therapy 13:1427-1439; Högbom et al., 2003, "Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. Proc Natl Acad Sci USA. 100(6):3191-3196; Nord et al., 1997, "Binding proteins selected from

combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain.” *Nature Biotechnol.* 15:772-777; Nord et al., 2000, “Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and Taq DNA polymerase.” *J. Biotechnol.* 80:45-54; Nord et al., 1995, “A combinatorial library of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain.” *Prot. Eng.* 8:601-608; Nord et al., 2001, “Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A.” *Eur. J. Biochem.* 268:1-10; Nygren et al., 1997, “Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins.” *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:463-469; Rönnmark et al., 2002, “Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A.” *Eur. J. Biochem.* 269:2647-2655; Rönnmark et al., 2002, “Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*.” *J. Immunol. Meth.* 261:199-211; Wahlberg et al., 2003, “An affibody in complex with a target protein: structure and coupled folding.” *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(6):3185-3190; Gotz et al., 2002, “Ultrafast electron transfer in the complex between fluorescein and a cognate engineered lipocalin protein, a so-called anticalin.” *Biochemistry.* 41:4156-4164; Skerra, 2001, “Anticalins: a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties.” *J Biotechnol.* 2001 74:257-275; Skerra, 2000, “Lipocalins as a scaffold.” *Biochim Biophys Acta.* 1482:337-350; Skerra et al., 2000, “Engineered protein scaffolds for molecular recognition.” *J Mol Recognit.* 13:167-187; Schlehuber et al., 2000, “A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin.” *J Mol Biol.* 297:1105-1120; Beste et al., 1999, “Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold.” *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:1898-1903; PCT International Publication No. WO97/45538 entitled “Novel Synthetic Protein Structural Templates For The Generation, Screening And Evolution Of Functional Molecular Surfaces” (relating to production of libraries of peptide sequences in the framework of a structural template derived from Pleckstrin-Homology (PH)

domains)。

效应分子优选为在靶分子或细胞上具有期望作用的任何蛋白。效应分子的例子包括但不限于，对检测或治疗靶分子或细胞有用的蛋白。

诊断蛋白可为能够在合适的测定中检测靶分子的任何蛋白。诊断蛋白的例子包括但不限于，荧光蛋白如荧光素酶或绿色荧光蛋白。使用已知的技术可分析它们的存在，如显微镜或带有合适滤器的扫描荧光板读数仪。

治疗蛋白可为在靶细胞上具有期望治疗效果的任何蛋白。治疗蛋白的包括但不限于，毒素、细胞因子、生长激素、酶、肿瘤抑制因子、转录调控因子和核苷酸结合蛋白。

除了诊断和治疗分子，附加的残基可加到配体蛋白的末端，如带有活性基团的半胱氨酸或重组多肽（Kaufmann and Weberskirch, 2006, Flennicken et al 2005; United States Patent No. 6,747,135 Nolan 等），以用于加入放射性同位素、荧光标记物或抗癌药物的简单化学修饰。可根据加入的标记物的化学要求进行选择添加的残基。分析包括上述用于放射性的荧光或闪烁计数分析或用于抗癌药物的细胞生长/细胞死亡的分析。

本发明的一方面是构建重组细胞文库的方法，其中每个重组细胞包括编码免疫毒素的核酸序列，包括如下步骤：

(c)构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且包含所述核酸序列文库中的一个轻链可变区核酸序列和/或一个重链可变区核酸序列，且其中所述轻链可变区核酸序列或重链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列；以及

(b)用载体文库转化宿主细胞以产生重组细胞文库。

编码轻链和/或重链可变区的核酸序列可从合适的源如 B 细胞获得。B 细胞源可来自有疾病的研究对象或没有疾病的研究对象。在优选的实施方式中，B 细胞是来自于患有疾病如癌症的研究对象。

在一种实施方式中，所述 B 细胞源来自患有任何类型癌症的研究对象。在一种实施方式中，癌症包括但不限于，胃癌、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、皮肤癌、子宫癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、头颈癌、鳞状细胞

癌、胃肠癌、乳腺癌（例如导管癌、小叶癌、和乳头癌）肺癌、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病（例如急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病和急性髓性白血病）、脑癌、成神经细胞瘤、肉瘤、直肠癌、膀胱癌、子宫内膜癌、浆细胞瘤、淋巴瘤或黑素瘤。

B 细胞可从来来自于研究对象的样品中分离得到。样品可为来自于研究对象的含有 B 细胞的液体、细胞或组织样品。在一种实施方式中，样品为淋巴结组织、淋巴液或全血。

在本发明的另一个实施方式中，成熟 B 细胞被用作源来构建文库。

本领域技术人员将认识到可使用多种方法将成熟的 B 细胞从研究对象的样品中分离出来。例如，成熟 B 细胞可通过不合需要的细胞的阴性选择或目的细胞的阳性选择从样品中分离出来。在本发明的一种实施方式中，B 细胞用对 CD19 特异性的抗体选择。在本发明的另一种实施方式中，使用对 IgD 特异的抗体将稚 B 细胞从样品中去除。在进一步的实施方式中，使用对 CD38 特异性的抗体选择成熟 B 细胞。

为了确保有足够的数目的 B 细胞用于本发明的方法，可对 B 细胞定量。例如，如果使用成熟的 B 细胞，那么可使用 CD38 的特异性抗体，其是成熟 B 细胞强烈表达的标记物。在优选的实施方式中，在本发明的方法中使用了超过  $10^6$  个 B 细胞。可能混合来自于超过一个研究对象的 B 细胞，以确保在本发明的方法中使用足够的起始数目的 B 细胞。

在本发明的方法中，构建了载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有核酸序列文库中的一个轻链可变区核酸序列和/或一个重链可变区核酸序列。本领域的技术人员将认识到所述轻链可变区核酸序列可以在与重链可变区核酸序列相同的载体或不同的载体上。

免疫毒素包含轻链可变区和重链可变区，其中轻链可变区或重链可变区可正常运转地连接到治疗试剂，如细胞毒素，其或为细胞毒性的、细胞抑制的或在其它情况下阻止或降低细胞分裂和/或转移能力。正常运转地连接意以保持其轻链可变区或重链可变区和细胞毒素的功能的方式，将轻链可变区或重链可变区连接到细胞毒素。细胞毒素可正常运转地直接或间接地连接到轻链可变区或重链可变区。

在一种实施方式中，细胞毒素为具有核糖体-失活活性的多肽，其包括但不局限于多花白树毒蛋白、bouganin、皂草毒蛋白、蓖麻毒素、蓖麻蛋白 A 链、异株泻根毒蛋白(bryodin)、白喉毒素、局限毒素、假单胞菌外毒素 A 及其变异体。当细胞毒素为核糖体-失活蛋白时，免疫毒素必须在结合到癌症细胞时被内化，以为了使蛋白对细胞具有毒性。因此，在本发明的实施方式中，免疫毒素可以被细胞内化。

在本发明的一种实施方式中，毒素为 bouganin 或假单胞菌外毒素 A 及它们的变异体。在另一种实施方式中，毒素为改性的 bouganin 或缺少细胞结合区的截短形式的假单胞菌外毒素 A。在进一步的实施方式中，毒素为基本缺失 T 细胞表位的 bouganin 或截短形式的假单胞菌外毒素 A，其由氨基酸 252-608 以及内质网保留序列构成。

在优选的实施方式中，治疗试剂为具有很强毒性的细胞毒素以致在本发明的筛选方法中只需要有限量的免疫毒素来检测其对细胞的细胞毒性。例如，在优选的实施方式中使用了假单胞菌外毒素 A，更优选地使用丧失能力的细胞结合区或缺少细胞结合区的假单胞菌外毒素 A。在进一步的实施方式中，所述毒素为由氨基酸 252-608 组成的截短形式的假单胞菌外毒素 A。

在本发明的方法中使用了重组方法。例如重组方法可用于分离编码轻链可变区和重链可变区编码的核酸序列，并可用于构建载体文库，其中每个载体编码免疫毒素并且含有一个轻链可变区核酸序列和一个重链可变区核酸序列，且或轻链可变区核酸序列或重链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列。此外，使用所述载体文库，重组方法可用于构建重组细胞文库。

重组方法还可用于构建本发明的融合蛋白文库。例如，本发明的重组细胞可被克隆，然后由细胞编码的融合蛋白可被表达。在优选的实施方式中，融合蛋白被表达为可溶蛋白。

本发明的核酸分子可通过已知的方式并入适合的表达载体中，这确保了融合蛋白的良好表达。可能的表达载体包括但不限于粘粒、质粒或改性的病毒（例如复制缺陷型逆转录酶病毒、腺病毒和腺相关病毒），只要该

载体与使用的宿主细胞相容即可。表达载体“适合宿主细胞的转化”，其表示表达载体含有本发明的核酸分子以及在宿主细胞的基础上进行选择以用于表达的核酸分子调控序列，其正常运转地连接到所述核酸分子上。正常运转地连接表示以允许所述核酸表达的方式将核酸连接到调控序列上。

此，本发明预期了本发明的重组表达载体，其含有在本发明中使用的核酸分子以及融合蛋白的转录和翻译所必需的调节序列。

适合的调节序列可来自各种来源，其包括细菌，真菌，病毒，哺乳动物，或昆虫基因（例如参见在 Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中描述的调节序列）。如以下讨论的那样，合适的调节序列的选择取决于所选择的宿主细胞，这可由本领域技术人员轻易地完成。这样的调节序列的例子包括：转录启动子和增强子或 RNA 聚合酶结合序列、核糖体结合序列，其包括翻译起始信号。此外，根据选择的宿主细胞和采用的载体，其他的序列，如复制起点、附加的 DNA 限制位点、增强子，和给予转录可诱导性的序列可并入到表达载体中。

本发明的重组表达载体也可含有可选择的标记基因，以便于选择用本发明方法中使用的核酸序列转化或转染的宿主细胞。可选择的标记基因的例子是编码对某些药物产生抗性的蛋白如 G418 和潮霉素、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、荧光虫荧光素酶，或免疫球蛋白或其部分如免疫球蛋白优选为 IgG 的 Fc 部分，。通过可选择的标记蛋白如 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶或萤火虫荧光素酶的浓度变化监控可选择的标记基因的转录。如果可选择的标记基因编码产生抗生素抗性如新霉素抗性的蛋白，则可用 G418 选择转化细胞。已插入可选择的标记基因中的细胞会存活，而其它的细胞死亡。这就使得观察和分析本发明的重组表达载体的表达成为可能，特别是确定突变对表达和表型的影响成为可能。应理解的是，可选择的标记可从目的核酸中引入到单独的载体上。

该重组表达载体也可含有编码融合部分的基因，该融合部分提供了重组蛋白的增强的表达、重组蛋白的增加的溶解度和通过作为亲和纯化的配体帮助靶重组蛋白的纯化。例如，可在靶重组蛋白中加入蛋白水解裂解位

点,以允许在融合蛋白纯化后从融合部分分离重组蛋白。典型的融合表达载体包括 pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia)、pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) 和 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ),它们分别将谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、麦芽糖 E 结合蛋白或蛋白 A 融合到重组蛋白上。

重组表达载体可被引入到宿主细胞中以产生转化的宿主细胞。术语“用...转化”、“用...转染”、“转化”和“转染”意在包括通过本技术领域已知的许多可能技术中的一种将核酸(如载体)引入细胞。这里使用的术语“转化的宿主细胞”也意在包括能够进行糖基化的细胞,其已经用本发明的重组表达载体进行了转化。原核细胞可用核酸通过如电穿孔或氯化钙介导的转化进行转化。例如,可通过常规的技术如磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染试剂、电穿孔或微注射将核酸引入到哺乳动物细胞中。用于转化和转染宿主细胞的合适方法可在 Sambrook 等人(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)以及其它实验教科书中找到。

合适的宿主细胞包括大量的各种真核宿主细胞和原核细胞。例如,本发明的蛋白质可在酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞可在 Goeddel, Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991)中找到。此外,本发明的蛋白可在原核细胞如大肠杆菌(*Escherichia coli*)(Zhang et al., Science 303(5656): 371-3 (2004))中表达。另外,可使用假单胞菌(*Pseudomonas*)基的表达系统例如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)(US Patent Application Publication No. US 2005/0186666, Schneider, Jane C et al)。

适用于本发明操作的酵母和真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母(*Pichia*)属或克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)属以及曲霉菌类的各个种。用于在酵母酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中表达的载体包括 pYepSec1 (Baldari. et al., Embo J. 6:229-234 (1987))、pMFa (Kurjan and Herskowitz, Cell 30:933-943 (1982))、pJRY88 (Schultz et al., Gene 54:113-123 (1987))和 pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)。酵母和真菌转化的实验方案为本领域技术人员熟知(参见

Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978); Ito et al., J. Bacteriology 153:163 (1983),和 Cullen et al.(BiolTechnology 5:369 (1987))。

适用于进行本发明的哺乳动物细胞包括但不限于: COS (例如, ATCC 号 CRL 1650 或 1651)、BHK (例如, ATCC 号 CRL 6281)、CHO (ATCC 号 CCL 61)、HeLa (例如, ATCC 号 CCL 2)、293 (ATCC 号 1573) 和 NS-1 细胞。用于指导哺乳动物细胞中的表达的适合的表达载体通常包括启动子 (例如来自病毒材料如多瘤病毒、腺病毒 2、巨细胞病毒和猿猴病毒 40) 以及其它的转录和翻译控制序列。哺乳动物表达载体的例子包括 pCDM8 (Seed, B., Nature 329:840 (1987))和 pMT2PC (Kaufman et al., EMBO J. 6:187-195 (1987))。

根据这里提供的教导,也可以轻松地实现启动子、终止子和用于将合适类型的表达载体引入植物,禽类,和昆虫细胞内的方法。例如,在一种实施方式中,本发明的蛋白质可由植物细胞表达(参见 Sinkar et al., J. Biosci (Bangalore) 11:47-58 (1987), 该文综述了发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 载体的使用; 也可见 Zambryski et al., Genetic Engineering, Principles and Methods, Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp.253-278, Plenum Press, New York (1984), 该文描述了用于植物细胞的表达载体的使用, 包括但不限于 PAPS2022、PAPS2023 和 PAPS2034)。

适合于进行本发明的昆虫细胞包括来自家蚕 (*Bombyx*)、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 或斜纹夜蛾 (*spodotera*) 种的细胞和细胞系。可获得的用于在培养的昆虫细胞中表达蛋白的杆状病毒载体包括 pAc 系列 (Smith et al., Mol.Cell Biol.3:2156-2165 (1983)) 和 pVL 系列 (Luckow, V.A., and Summers, M.D., Virology 170:31-39 (1989))。一些适合本发明的重组蛋白质表达的杆状病毒-昆虫细胞表达系统在 PCT/US/02442 中进行了描述。

单个重组细胞中存在多个载体是效率低下的并且可引起文库的简并, 因此优选地避免。因此, 在优选的实施方式中, 在本发明的重组细胞文库中的大部分重组细胞每个重组细胞含有来自于载体文库的一个载体, 且轻链和重链可变区在同一个载体中。如果轻链和重链可变区在单独的载体中, 那么优选地, 在本发明的重组细胞文库中的大部分重组细胞, 每个重

组细胞含有来自于载体文库的两个载体，其中一个载体含有编码重链可变区的核酸序列，另一个载体含有编码轻链可变区的核酸序列。本领域技术人员将认识到可进行常规的测试来最优化转化方法中的每个宿主细胞的载体比例，而该比例将根据 DNA、宿主细胞和使用的转化方法而变化。

重组细胞文库可用来产生融合蛋白文库。在一种实施方式中，根据本发明的方法构建出了免疫毒素文库。在另一种实施方式中，本发明包括免疫毒素文库，其包括从研究对象的 B 细胞得到的多个重链可变区以及多个轻链可变区，并且其中文库中的每个免疫毒素具有一个重链可变区以及一个轻链可变区，且轻链可变区或重链可变区与编码细胞毒素的核酸序列相连接。

本发明另一方面是结合靶分子的融合蛋白文库的方法，其包括如下步骤：

- (a)提供本发明的融合蛋白文库；
- (b)将融合蛋白与靶分子进行接触；以及
- (c)确定一个或多个融合蛋白分子与靶分子的结合。

融合蛋白与靶分子的结合可使用本领域已知的技术来确定，这些技术包括但不限于，流式细胞术、荧光微体积测定技术(FMAT)或酶联免疫吸附试验(ELISA)。

可根据效应分子的活性或功能筛选融合蛋白文库。例如，当效应分子为毒性分子时，可筛选出杀死靶细胞的融合蛋白。本发明另一方面是筛选对靶细胞具有毒性的融合蛋白的文库的方法，其包括如下步骤：

- (a)提供本发明的融合蛋白的文库；
- (b)将融合蛋白与靶细胞进行接触；以及
- (c)确定一个或多个融合蛋白对靶细胞的细胞毒性。

融合蛋白对靶细胞的细胞毒性可使用本领域已知的技术确定，其包括但不限于，铬-51 释放分析、MTS 分析、膜连蛋白 V 细胞凋亡分析或细胞增殖分析如 BrDu 结合 ELISAS。

根据效应分子的性质可研发其它合适的分析方法。对诱导细胞生长的

分子，可使用细胞生长或增殖分析。对诊断分子如荧光蛋白，可使用已知的分析技术检测这些这些分子。

靶细胞可为任何被融合蛋白结合的细胞。所述靶通常表达融合蛋白的配体部分识别的靶分子或抗原，，例如疾病相关的抗原。在本发明优选的实施方式中，靶细胞为表达疾病相关的抗原的疾病细胞，在更加优选的实施方式中，靶细胞为癌细胞。在一种实施方式中，癌症包括但不限于，胃癌、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、皮肤癌、子宫癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、头颈癌，鳞状细胞癌、胃肠癌、乳腺癌（如导管的癌、小叶癌和乳头癌）、肺癌，非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病（例如急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病和急性髓性白血病）、脑癌、成神经细胞瘤，肉瘤、直肠癌、膀胱癌、子宫内膜癌、浆细胞瘤、淋巴瘤或黑素瘤。

在上述方法中可使用合适的对照来确定融合蛋白是否对靶细胞具有包括结合和/或杀死靶细胞的特异性作用。对照可以是任何已知的不表达目的抗原的细胞。例如，如果靶细胞是一癌细胞，则对照可以是非癌细胞。

一旦选定一种特定的融合蛋白，有可能用另一种效应分子取代该效应分子。

本发明包括使用本发明中的筛选方法识别的融合蛋白，以及使用融合蛋白来预防或治疗疾病，如癌症，或通过施用本发明的融合蛋白来治疗或预防疾病如癌症的方法。

本发明还包括使用本发明的筛选方法识别的免疫毒素，以及使用免疫毒素来预防或治疗疾病，如癌症，或通过使用本发明的免疫毒素来治疗或预防疾病如癌症的方法。

### **(c) 亲和力成熟**

本发明的另一方面是改良融合蛋白的方法。本发明人们已经研发出一种新的方法，利用本发明的文库，使用亲和力成熟来增加免疫毒素的结合和/或细胞毒性。本发明的方法包括突变编码融合蛋白免疫毒素的结合区的核苷酸序列的步骤。

对融合蛋白如免疫毒素而不仅仅是结合配体进行亲和力成熟是有益的，并有利于改良融合蛋白的制备。在本发明之前，制备免疫毒素要进行亲和力成熟抗体，接着用亲和力成熟的抗体制备免疫毒素。本发明有利于该方法，因为其避免了在制备融合蛋白前的筛选抗体或结合配体的额外步骤。此外，突变融合蛋白本身是更有效的，因为其避免了对本身正常工作但在融合蛋白如免疫毒素中不起作用的配体进行选择。此外，如前所述，本发明的方法不需要靶抗原的先有知识并且允许使用未纯化的上清液。

在一种实施方式中，配体蛋白是突变的。因此，本发明包括制备改良融合蛋白的方法，其包括如下步骤：

- (a) 提供编码结合靶分子的配体蛋白的核酸序列；
- (b) 在编码配体的核酸序列中引进至少一个点突变，以形成编码变异配体蛋白的核酸序列文库；
- (c) 构建载体文库，其中每个载体编码融合蛋白并且包括一种在步骤(b)中制备的变异配体蛋白核酸序列，其连接到编码效应分子的核酸序列；
- (d) 用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；
- e) 克隆转化的宿主细胞；
- f) 表达融合蛋白文库，其中所述融合蛋白是宿主细胞表达的可溶蛋白；以及
- (g) 筛选比未改性的融合蛋白具有增加活性的融合蛋白的文库，其中与未改性的融合蛋白相比，增加的活性表示其是改良的融合蛋白。

融合蛋白的增加活性包括但不限于，融合蛋白对靶分子的增加的结合和/或效应分子的改善的功能。

如前所述，测试的效应功能取决于融合蛋白中使用的效应分子。对诱导细胞生长的效应分子，可使用细胞生长或增殖分析。对抑制细胞生长的效应分子，可如上所述使用细胞生长分析。对

在具体的实施方式中，轻链可变区或重链可变区在本发明的方法中被随机突变。在优选的实施方式中，互补决定区在本发明的方法被随机突变。

在更优选的实施方式中，轻链可变区和/或重链可变区中的热点区在本发明的方法中被随机突变。

在本发明的一种实施方式中，轻链可变区在本发明的方法中被随机突变。

因此，本发明包括制备改良的免疫毒素的方法，其包括如下步骤：

- (a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；
- (b)在编码核酸序列的轻链可变区中引进至少一个点突变以产生编码变异的轻链可变区的核酸序列的文库；
- (c)构建载体文库，其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(b)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到对一种细胞毒素编码的核酸序列；
- (d)用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；
- (e)克隆转化的宿主细胞；
- (f)表达免疫毒素文库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；以及
- (g)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

在另一种实施方式中，制备改良的免疫毒素的方法包括如下步骤：

- (a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；
- (b)识别轻链可变区中的热点区；
- (c)在编码核酸序列的轻链可变区的热点区中引进至少一个点突变以产生编码变异的轻链可变区的核酸序列的文库；
- (d)构建载体文库，其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步

骤(c)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(e)用载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;

(f)克隆转化的宿主细胞;

(g)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;以及

(h)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

在本发明的另一种实施方式中,重链可变区在本发明的方法中发生随机突变。在另一种实施方式中,该方法包括如下步骤:

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列;

(b)在编码核酸序列的重链可变区中引进至少一个点突变以形成编码变异的重链可变区的核酸序列文库;

(c)构建载体文库,其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(b)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(d)用载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;

(e)克隆转化的宿主细胞;

(f)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;以及

(g)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明另一种实施方式为一种方法，其包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；

(b)识别重链可变区中的热点区；

(c)在编码核酸序列的重链可变区的热点区中引进至少一个点突变以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库；

(d)构建载体文库，其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(c)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列；

(e)用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；

(f)克隆转化的宿主细胞；

(g)表达免疫毒素文库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；以及

(h)，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明还包括对上述方法的变动，例如，所述方法可结合变异的轻链可变区和变异的轻链可变区。在一种实施方式中，轻链可变区和轻链可变区可被序贯突变和筛选。在另一种实施方式中，轻链可变区和轻链可变区可同时被突变和筛选。

因此，本发明的另一种实施方式是一种制备改良的免疫毒素的方法，其包括如下步骤：

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列；

(b)在编码核酸序列的轻链可变区中引进至少一个点突变以产生编码变异的轻链可变区的核酸序列的文库；

(c)构建载体文库，其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(b)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异

的重链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(d)用载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;

(e)克隆转化的宿主细胞;

(f)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;

(g)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素;

(h)在编码核酸序列的重链可变区中引进至少一个点突变以形成编码变异的重链可变区的核酸序列文库;

(i)构建载体文库,其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(h)中制备的变异的重链可变区核酸序列和/或在步骤(g)中识别的改良的免疫毒素的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的重链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(j)用载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;

(k)克隆转化的宿主细胞;

(l)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;以及

(m)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明进一步包括用于制备改良的免疫毒素的方法,其包括如下步骤:

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列;

(b)在编码核酸序列的重链可变区中引进至少一个点突变以形成编码

变异的重链可变区的核酸序列文库；

(c)构建载体文库，其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(b)中制备的变异的重链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的重链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列；

(d)用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；

(e)克隆转化的宿主细胞；

(f)表达免疫毒素文库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；

(g)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素；

(h)在编码核酸序列的轻链可变区中引进至少一个点突变以产生编码变异的轻链可变区的核酸序列的文库；

(i)构建载体文库，其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(h)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或在步骤(g)中识别的改良的免疫毒素的变异的重链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的重链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列；

(j)用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；

(k)克隆转化的宿主细胞；

(l)表达免疫毒素文库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；以及

(m)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

因此，本发明的另一种实施方式是一种制备改良的免疫毒素的方法，

其包括如下步骤:

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列;

(b)识别轻链可变区中的热点区;

(c)在编码核酸序列的轻链可变区的热点区中引进至少一个点突变以产生编码变异的轻链可变区的核酸序列的文库;

(d)构建载体文库,其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(c)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(e)用载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;

(f)克隆转化的宿主细胞;

(g)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;

(h)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素;

(i)识别重链可变区中的热点区;

(j)在编码核酸序列的重链可变区的热点区中引进至少一个点突变以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库;

(k)构建载体文库,其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(j)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或在步骤(h)中识别的改良的免疫毒素的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(l)用载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;

(m)克隆转化的宿主细胞;

(n)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;以

及

(o)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

本发明进一步包括用于制备改良的免疫毒素的方法,其包括如下步骤:

(a)提供抗体或免疫毒素的轻链可变区和重链可变区的核酸序列;

(b)识别重链可变区中的热点区;

(c)在编码核酸序列的重链可变区的热点区中引进至少一个点突变以形成编码变异的轻链可变区的核酸序列文库;

(d)构建载体文库,其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(c)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或一个在步骤(a)中制备的变异的轻链可变区核酸序列,且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列;

(e)用载体文库转化宿主细胞,以产生重组细胞文库;

(f)克隆转化的宿主细胞;

(g)表达免疫毒素文库,其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白;

(h)以步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素为参照,筛选出对靶细胞具有改良结合和/或改良细胞毒性的免疫毒素库,其中与未改性的抗体或免疫毒素相比,对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素;

(i)识别轻链可变区中的热点区;

(j)在编码核酸序列的轻链可变区的热点区中引进至少一个点突变以产生编码变异的轻链可变区的核酸序列的文库;

(k)构建载体文库,其中每个载体编码一种免疫毒素并且含有一个在步骤(j)中制备的变异的轻链可变区核酸序列和/或在步骤(h)中识别的改

良的免疫毒素的变异的轻链可变区核酸序列，且其中变异的轻链可变区核酸序列或变异的轻链可变区核酸序列可正常运转地连接到编码细胞毒素的核酸序列；

(l)用载体文库转化宿主细胞，以产生重组细胞文库；

(m)克隆转化的宿主细胞；

(n)表达免疫毒素文库，其中免疫毒素是宿主细胞表达的可溶蛋白；并且

(o)筛选出比步骤(a)中未改性的抗体或免疫毒素对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性的免疫毒素文库，其中与未改性的抗体或免疫毒素相比，对靶细胞具有增加的结合和/或增加的细胞毒性表示其是改良的免疫毒素。

在一种优选的实施方式中，在重链可变区发生突变并筛选前，轻链可变区被突变和筛选。

因为在一轮突变内对所有可能的组合进行筛选在统计学上是不可能的，本发明预期多轮突变和筛选。在一种实施方式中，混合第一轮筛选中的所有阳性克隆，接着进行可变区的突变形成为筛选用的二级文库，其中二级文库要显著地小于一级文库。例如，可进行改组步骤来产生用于筛选的二级文库，其中可变区从阳性克隆中进行随机组合来创建二级文库。

在本发明的方法中多个步骤可进行自动化并且与高的生产能力匹配。例如，克隆转化的宿主细胞的步骤、表达免疫毒素文库的步骤以及筛选免疫毒素库的步骤可自动化。

一旦改良的融合蛋白或免疫毒素被制备，它可进行改性从而用另一种效应分子来取代该效应分子。例如，对于免疫毒素来讲，该毒素可被实施例4中描述的另一种毒素取代。

#### **(D) 改良的融合蛋白及其应用**

本发明还包括使用本发明的方法制备的改良的融合蛋白。具体地说，如实施例4中所述，发明人们用本发明的亲和力成熟方法制备了改良的免疫毒素。一种亲和力成熟抗体的序列见图10(SEQ ID NOS:1和2)。因此，

在一种实施方式中，免疫毒素包含 SEQ ID NO:2 中所示的轻链可变区和 SEQ ID NO:1 中所示的重链可变区。

本发明包括使用改良的融合蛋白来治疗或诊断疾病以及使用本发明的改良的融合蛋白来治疗或诊断疾病的方法。

在一种实施方式中，本发明提供一种治疗或预防癌症的方法，包括向患有或怀疑患有癌症的研究对象施用有效量的本发明的融合蛋白。在另一种实施方式中，本发明提供了施用有效量的本发明的融合蛋白用于制造治疗或预防癌症的药物。此外，本发明提供了有效量的本发明的融合蛋白的应用，进一步包括使用另外的癌症治疗剂制造用于同时、单独或序贯治疗或预防癌症的药物。本发明还提供了使用有效量的本发明的融合蛋白来治疗或预防癌症。而且，本发明提供了有效量的本发明的融合蛋白的应用，进一步包括使用另外的癌症治疗剂来同时、单独或序贯治疗或预防癌症。

在本发明的一种实施方式中，癌症包括但不限于，胃癌、结肠癌、前列腺癌和宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、头颈癌、鳞状细胞癌、胃肠癌、乳腺癌（例如导管癌、小叶癌和乳头癌）肺癌非霍奇金氏淋巴瘤多发性骨髓瘤、白血病（例如急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病和急性髓性白血病）、脑癌、成神经细胞瘤、肉瘤、直肠癌、膀胱癌、胰腺癌、子宫内膜癌、浆细胞瘤、淋巴瘤和黑素瘤。

本发明的融合蛋白还可以配制成药物组合物，以适合活体给药的生物相容的形式给予研究对象。这些物质可向包括人和动物的活的有机体施用。治疗有效量的本发明的药物组合物的给药定义为在获得期望结果所必需的剂量和时间下的有效的量。例如，物质的治疗有效量可根据各种因素而变化，例如个体的疾病状况、年龄、性别和体重，以及本发明的重组蛋白质诱发个体期望应答的能力。给药方案可调整以提供最佳的治疗应答。例如，可每日施用几个分次剂量或可根据治疗情况中出现的紧急事件而适当地减少剂量。

因此，本发明提供了用于治疗或预防癌症的药物组合物，其包含本发明的融合蛋白和药物学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一种优选的

实施方式中，药物组合物中融合蛋白的效应分子是癌症治疗剂，更优选为毒素。

包含本发明的融合蛋白的药物制剂可全身给药。药物制剂可直接向癌症位点施用。根据给药途径，融合蛋白被包衣在材料中，以保护化合物免受酶、酸和可使化合物失去活性的其他天然条件的作用。

根据本发明的一个方面，融合蛋白通过直接给药输送到患者。本发明预期以至少足以获得治疗终点的量进行施用的药物组合物，且如果需要，包括药学上可接受的载体。

本发明还提供了用于降低手术后并发症危险的方法，该方法包括在治疗癌症的手术之前、过程中或之后施用有效量的本发明的融合蛋白。

这里描述的组合物可通过制备可施用于研究对象的药学上可接受的组合物的已知方法制备，这样有效量的活性物质与药学上可接受的载体在混合物中组合。合适的载体例如在 Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 2000)中被描述。在此基础上，单独组合物包括但不限于含在具有所述物质与一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂组合的溶液，其包含在与生理流体组成的具有合适 pH 和等渗的缓冲液中。

药物组合物包括但不限于，冻干粉或水的或非水的无菌可注射溶液或悬浮液，其可进一步含有抗氧化剂缓冲液、抑菌剂和使组合物与预期的受体的组织或血液基本相容的溶质。可存在于这样的组合物中的其它成分包括如水、表面活性剂（例如 Tween）、醇、多元醇、甘油和植物油。临时配制的注射溶液和悬浮液可由无菌粉末、颗粒、片剂或浓缩溶液或悬浮液制备。融合蛋白可以作为例如包括但不限于冻干粉的形式供给，其在给予患者前用无菌水或盐水重建。

本发明的药物组合物可含有药学上可接受的载体。合适的药学上可接受的载体包括基本上为化学惰性和无毒的组合物，它们不干扰药物组合物的生物活性的有效性。合适的药物载体的例子包括但不限于，水、盐水溶液、甘油溶液、乙醇、N-(1(2,3-二油酰氧基)丙基)N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)和脂质体。这些组合物应当含有

治疗有效量的化合物和合适量的载体，从而提供可向患者直接施用的形式。

组合物可以是药学上可接受的盐的形式，其包括但不限于与自由氨基形成的盐，例如那些衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐，以及那些与自由羧基形成的盐，例如那些衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

在本发明的各种实施方式中，药物组合物是直接全身地施用或直接向肿瘤区施用。

该药物组合物可用于治疗患有癌症的动物包括哺乳动物，优选为人的方法当中。被施用的融合蛋白的剂量和类型将取决于各种因素，这些因素在人类研究对象中可以容易地监控。这样的因素包括癌症的病因和严重程度（等级和阶段）。

使用本发明的融合蛋白的癌症治疗的临床结果可容易由相关领域内的技术人员，如医师所辨别。例如，用于测量癌症的临床标记的标准医学检测可作为治疗功效的强有力的指示物。这样的检测可包括但不限于身体检查、操作量表、疾病标记、12-导联心电图、肿瘤测量、组织活检、细胞检查、细胞学、肿瘤最长直径计算、射线照相术、肿瘤的数字成像、生命体征、体重、不利事件的记录、传染性发作的评估、伴随药物治疗的评价、疼痛的品家、血液或血清化学、尿分析、CT 扫描以及药物动力学分析。另外，包含融合蛋白和另一种癌症治疗剂的联合疗法的协同效果可通过比较研究进行单一疗法的患者确定。

本发明的另一种实施方式是用于治疗或预防癌症的试剂盒，其包含有效量的本发明的融合蛋白，以及使用这种融合蛋白来治疗癌症的说明。

以下非限制性的实施例对本发明是说明性的：

## **实施例**

### **实施例 1: 免疫文库的构建和筛选**

使用可溶性表达体系构建文库。通过 RT-PCR，使用从癌症患者分离

出的淋巴结组织进行  $V_H$  和  $V_L C_L$  片段的扩增。来自于正常的研究对象或患有其它医学疾病的研究对象的样品是期望的,这取决于需要鉴定的抗体类型或细胞表面靶。当文库是从浆细胞获得时,淋巴结组织是合适的 B 细胞源,因为它是 B 细胞成熟为浆细胞的位点,所述浆细胞在暴露于抗原后,活跃分泌抗体。来自浆细胞的 mRNA 的 RT-PCR 扩增产生 cDNA,其编码应答肿瘤而产生的抗体的可变区。

用于文库筛选所选择的重组布置为 VB6-变异的假单胞菌外毒素 A(ETA<sub>(252-608)</sub>)形式,其是 Fab 形式的抗体片段,其连接到截短的假单胞菌外毒素 A 细胞毒素,其被附加改性以包括 KDEL 内质网保留序列。Fab 是具有高度官能的稳定实体。ETA 提供了这类构建物通常观察到的表达水平的合适的敏受性,可允许选择内化的克隆,与细胞毒素或细胞增殖分析如 MTS 和 Annexin V 相容并且也适合于正常组织和肿瘤组织的微阵列 (TMA)。

#### 1. 在扩增前从患者样品中去除稚 B 细胞

B 细胞分化和成熟的过程包括几个阶段 (Molecular Immunology, Second Edition. Edited by Hames B.D. and Glover D.M. IRL Press)。早期的阶段发生在骨髓中,在这里前-B 细胞成熟为处女型 B 细胞,在其表面存在非常大的非抗原诱导的、基本上是随机的所有表面 Ig。这些细胞迁移到脾和淋巴结,在这里它们暴露于抗原并且相关的克隆被扩大,最终成熟为到浆细胞。

获得可进行更为有效筛选的较小文库的一种方法是对来源于浆细胞的 mRNA 进行扩增。这些浆细胞参与抗体的主动产生,其中抗体来自于抗原攻击的 B 细胞的克隆增殖。对来自在它们的表面存在非抗原诱导的抗体群的稚 B 细胞群进行 mRNA 扩增会产生很大的文库,其需要更长的时间来进行筛选并且可能产生更多不相关的克隆。尽管有时期望筛选这样的“非诱导”文库,但要被用作扩增模板的样品中去除稚 B 细胞会产生更高比例的抗原诱导克隆。

稚 B 在它们的表面表达 IgD,其可用作标记(Fundamental Immunology, Fifth Edition, W.E. Paul, Lippincott Williams & Wilkins publishers, p126)。当

细胞成熟为活性 B 细胞并随后成熟为浆细胞时, 该标记就会失去。因此, 通过使用可商业获得的生物素化抗-IgD 单克隆抗体和随后的捕获步骤抗原去除稚 B 细胞。该步骤的功效可使用缀合到 FITC 上的抗-IgD 抗体通过流式细胞仪进行检验。

## 2. 对患者样品中可用浆细胞文库大小的评估

在对浆细胞文库进行实际扩增步骤前, 通过定量用作模板的临床样品中的可用浆细胞的文库大小估计预期产生的文库大小。例如, 通过流式细胞仪用作为一抗的抗-CD38 标记的细胞可完成该过程。CD38 是由浆细胞强烈表达的表面标记 (Harada H.H., Kawano M.M., Huang N., Harada Y., Iwato K., Tanabe O., Tanaka H., Sakai A., Asaoku H. and Kuramoto A. 1993 “Phenotypic Difference of Normal Plasma Cells from Mature Myeloma Cells” Blood 81:2658-2663)。产生大浆细胞群的临床样品是最有用的。 $\geq 10^6$  菌落形成单位的最终的文库大小是期望的, 因此类似大小的用作模板的样品浆细胞文库是期望的。为了得到期望数目的浆细胞, 也可能将几个癌症患者的样品混合到一起。如果样品是从几个癌症患者混合得到, 这也会使筛选不含有对肿瘤免疫应答产生的抗体文库的机会最小。

## 3. 扩增来自患者样品的 $V_H$ 和 $V_L C_L$ 片段, 接着进行克隆

通过使用 RT-PCR, 使用提取的临床样品 mRNA 作为模板, 使用在 5' 和 3' 端含有限制位点的特异引物, 扩增每条轻链 ( $\kappa$  和  $\lambda$ ) 和重链 ( $\gamma$ )。使用合适的限制酶将得到的片段随机克隆到 Xoma 载体。文库的大小是重要的。对于标准文库筛选实验方案来讲, 具有  $\geq 10^6$  CFU (菌落形成单位) 是期望的。为了达到此目的, 进行几个步骤。

将扩增的材料连接到载体中:

该步骤通常是文库创建中的瓶颈 (Directed Evolution, Library Creation, Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 231, edited by Frances H Arnold and George Georgiu, 2003, Humana Press)。因此, 需要高效的连接以及仔细的优化。试验消化的插入片段/载体的几个比率。用于库构建的连接反应在最佳条件下进行温育 (Arnold and Georgiu, 2003)。连接的效率使用琼脂糖凝胶电泳进行半定量评价和通过电穿孔进入大肠杆菌

以及平板计数转化的细落来进行定量评价。

### 连接的 DNA 转化进大肠杆菌

电穿孔是一种有效和快速的转化方法。参数如波形、电压以及阻抗能够容易被最优化。对于该方案，使用商业获得的电转感受态细胞。

### 电穿孔过程中连接的 DNA/电转感受态细胞的比率

每次转化使用最少量的 DNA 是期望的，同时任然能够获得合适大小的文库，进行合理次数的单次电穿孔。

对连接的 DNA/电转感受态细胞的比率进行优化直到获得对每个测序的菌落来说具有清楚和明确的序列。接着通过比较大约 20 个不同的菌落序列，可能评价最终文库的简并度，如果有的话。（这不适用于前述的期望出现简并的重新涂板的菌落）。

在这个阶段，评价该方法的效率并且确定是否已经构建了有代表性的以及合适大的文库。

## 4. 筛选文库

通过用自动菌落挑取仪，接着将菌落接种到微孔中含有的液体生长培养基中，对库进行有效的筛选。可使用自动液体处理仪对液相进行有效处理。在这个阶段，确定每个板上不会引起过度拥挤的平板接种的细胞数量是重要的。确定出给定大小的文库有效平板接种所需的平板数目。使用 T 形的一次性的无菌环进行平板接种。

期望的筛选速率为  $10^4$  克隆/天。因此，对  $10^6$  CFU 的全库进行筛选需要 4~5 个月。在筛选过程中，VB6-845ETA(252-608)被用作阳性对照，没有插入物的 pING3302 载体作为阴性对照。

文库构建和筛选方法的一个重要特征就在于能够获得随机配对的扩增的可变区，其随后被克隆到所选择的载体中，在本例中载体为 pING3302 XOMA。因为可能的组合这能够构建出非常多样性的文库。几乎不可能在一轮中筛选所有的组合。因此，在一轮后选择的阳性克隆不可能为  $V_H$  和  $V_L$  区的最佳可得组合。进行重新重组步骤可创建和选择扩增区的最好组合。这可通过如下过程获得：将第一轮筛选出来的所有阳性克隆混合

在一起，随后对可变区进行扩增和随机克隆至可能显著小于一级文库的二级文库。如果克隆产生比阴性对照更强的信号则被认为是阳性，其中阴性对照为最小的阈值。如果获得大量的阳性体，则对克隆进行分级并挑出最好的。

筛选过程可在几个阶段内进行。首先，通过 FMAT 分析对整个文库进行筛选以获得细胞系内细胞凋亡的有效诱导，其中细胞系与原始文库中的癌症类型相匹配。对第一轮 FMAT 筛选的作为阳性的克隆再通过第二次 FMAT 分析进行筛选。对通过两轮 FMAT 筛选后仍在选择的阳性细胞系上保持阳性的克隆，再通过针对阳性细胞系的 FMAT 筛选阳性细胞系，选择阴性细胞系作为癌症无关的指示。接着通过对肿瘤细胞的流式细胞术结合，和随后通过针对正常细胞的筛选，筛选通过第三轮的每个克隆。通过 MTS 确定所选择细胞的效价，然后在肿瘤组织微阵列(TMA)上筛选得到最终效价的克隆。通过 MTS 测试没有发现的效价但具有高的癌症选择性的克隆仍可以保留以用于不同的研发途径如癌症诊断或癌症抗原发现。

### **实施例 2: 克隆免疫文库的构建**

使用大肠杆菌可溶性显示构建出适用于高通量筛选的免疫文库。该方法是基于抗体可变区的 RT-PCR 扩增，使用的是来自于结肠癌患者的淋巴结的浆 B 细胞富集群。γ 和 κ 链中可变区的 cDNA 被随机克隆到 Xoma pING3302 载体中，成为 Fab-ETA<sub>(252-608)</sub> 构建物并且被转化到大肠杆菌细胞中。通过对 100% 的测试克隆中的每条链的 PCR 扩增验证了构建出的  $2.10^5$  克隆的文库。此外，序列显示所有的克隆均具有唯一的 CDR 环，这确保了免疫应答被多样性的递呈。此外，在使用 L-阿拉伯糖进行诱导后，在 96 孔板内生长的克隆上清液中检测到合适的表达水平。与截短的假单胞菌外毒素 A 的融合将允许通过细胞凋亡的测量来选择内化克隆，并且将适合于 TMA 的筛选方法。

#### **1. 来自结肠癌患者淋巴结的浆 B 细胞的富集**

浆 B 细胞产生抗原特异性的抗体并因此是构建免疫文库的目的群。结合到 IgD 细胞表面标记的抗-IgD 抗体被用来耗竭稚 B 细胞。从结肠癌患者转移的三个冷冻的淋巴结被用作浆 B 细胞源。在 37 °C 水浴条件下对保

存在 DMSO 中的淋巴结的冷冻细胞进行快速解冻并将其稀释在 47 mL 的 DMEM +10% FBS 中。在 2000 RPM 进行 3 分钟的离心后,使用 20 mL 的 DMEM +10% FBS 对细胞进行洗涤并将其重新悬浮于 1 mL 的相同培养基中。与生物素进行缀合的两种抗体抗-IgD mAb (250 ng) (1) 和 抗-THY-1 mAb (50 ng) (2)被分别用来耗竭稚 B 细胞和 T 细胞。在置于冰上 1.5 小时后,细胞被离心并重悬浮 1 mL 新鲜新鲜的 DMEM +10% FBS 中。将等体积的涂有链霉亲和素的磁珠(使用 1 mL 的 PBS 缓冲液预洗 3 次)加入到细胞中,在偶尔搅拌 (3)的条件下在冰上温育 1 小时。在温育时间结束时,磁分离连接到珠上的稚 B 细胞和 T 细胞,并收集富集的浆 B 细胞的上清液,将其保存于冰上。

在单独的实验中,在耗竭前和耗竭后通过流式细胞仪用抗 IgD-生物素化抗体来评估耗竭效率。如图 1A 所示,在耗竭前确定出两个群体,IgD 阴性 (M1, 66.34%) 和 IgD 阳性 (M2, 33.75%)。在耗竭后,IgD 阴性群的比例从 66.34% 增加到 99.35%,这表明在耗竭后没有细胞被标记。

## 2. mRNA 提取和 cDNA 合成

使用 Oligotex<sup>TM</sup> kit (5)从具有 50%生存力的  $2.6 \times 10^6$  细胞的库中提取浆 B 细胞的 mRNA。简单地说,在 4 °C 以 2000 rpm 离心细胞 3 分钟并重新悬浮在 600  $\mu$ L 的裂解缓冲液中。然后将细胞裂解产物与 17.5  $\mu$ L 的预热 Oligotex<sup>TM</sup> 颗粒在室温下温育 10 分钟。然后用洗涤缓冲液洗涤 Oligotex<sup>TM</sup> 颗粒并在 50  $\mu$ L 洗脱缓冲液中洗脱结合的 mRNA。

使用 SuperScriptIII<sup>TM</sup> 逆转录酶试剂盒按提供的指示合成第一链 cDNA。简单地说,将 8  $\mu$ L 提取的 mRNA、1  $\mu$ L 随机六聚体混合物以及 1  $\mu$ L 的 dNTP 在 65 °C 条件下温育 5 分钟。cDNA 合成混合物含有下面的成份: 2  $\mu$ L 10 X RT 缓冲液、4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ L DTT、1  $\mu$ L RNase Out 以及 1  $\mu$ L SuperScriptIII 酶,将该混合物加入到 RNA/引物混合物并在 25 °C 下温育 10 分钟。第一链 cDNA 在 50 °C 下合成 50 分钟时间。然后在 85 °C 下 5 分钟停止反应,在冰上进行冷却并进行离心。随后在 37 °C 下对 RNase H 处理 20 分钟,将 cDNA 储存在 -20 °C。

## 3. 文库的构建

为了创建 Fab-ETA<sub>(252-608)</sub> 结肠免疫文库, 通过 PCR 设计 PelB-V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(κ) 的片段, 随后通过亚克隆步骤与 PelB 前导顺序融合(V<sub>H</sub>)并分别使用 *EcoRI/ApaI* 和 *SfiI/XhoI* 限制性位点插入到 *EcoRI-ApaI-CH-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-SfiI-XhoI/3302* 质粒中。为了捕获淋巴结中发生的大部分免疫应答, 在 PCR 反应中使用对应于不同亚类的 κ 和 γ 链的 5' 引物的混合物。用于 γ 和 κ 链的 3' 引物被设计成分别退火进入链的恒定区和链的 3' 末端。使用从浆 B 细胞中提取的 cDNA, 通过 PCR 对 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(κ) 片段进行扩增。引物含有用于 V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(κ) 片段克隆的限制性位点。扩增的 *NcoI-V<sub>H</sub>-ApaI* 片段被向下游融合至含于亚克隆载体内含有的 *EcoRI-ETA<sub>(252-608)</sub>IB-NcoI* 区。通过该处理, 生成了适用于克隆的带有 *EcoRI/ApaI* 末端的 PelB-V<sub>H</sub> 片段。PCR 扩增的 *NcoI-V<sub>H</sub>-ApaI* 片段不能直接克隆入通用克隆载体 ( Universal Cloning Vector ), *EcoRI-ApaI-CH-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-SfiI-XhoI/3302* 中, 这是由于在该载体内 *NcoI* 位点有两个。然而, 该位点已经从亚克隆载体中去除。PelB-V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(κ) 这两个片段均可以通过在 *EcoRI-ApaI-CH-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-SfiI-XhoI/3302* DNA 质粒中的 *EcoRI/ApaI* 和 *SfiI/XhoI* 限制性位点连接, 并且该连接反应被转化到 10B 细胞。轻链和重链的连接的转化体的数目均为  $2 \times 10^5$ 。相反, 同前述相比, 没有插入物的同样的连接反应具有少于 10% 的转化体。中对最终的质粒群进行转化, 含有被随机克隆成 Fab-ETA<sub>(252-608)</sub> 的重链和 κ 链的质粒群被转化到 JM109 中, 使用从 10B 细胞纯化的 2 μL 超螺旋 DNA 的每一个单独的电穿孔产生约  $0.5 \cdot 10^5$  克隆(29)。

### V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>κ 区的 PCR 扩增:

#### a. PelB-V<sub>H</sub> 片段

使用两步法对 PelB-V<sub>H</sub> 片段进行组装, 该法涉及 PCR 扩增 V<sub>H</sub> 区, 再通过亚克隆步骤融合 PelB 前导序列:

#### γ 引物混合物

1. 5' V<sub>H</sub>: CCAGCCATGGCGCAGRTGCAGCTGGTGCARTCTGG  
(SEQ ID NO:3)

2. 5' V<sub>H</sub>: **CCAGCCATGGCGSAGGTCCAGCTGGTRCAGTCTGG**  
(SEQ ID NO:4)

3. 5' V<sub>H</sub>: **CCAGCCATGGCGCAGRTCACCTTGAAGGAGTCTGG**  
(SEQ ID NO:5)

4. 5' V<sub>H</sub>: **CCAGCCATGGCGSAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG**  
(SEQ ID NO:6)

5. 5' V<sub>H</sub>: **CCAGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGWCYGG**  
(SEQ ID NO:7)

6. 5' V<sub>H</sub>: **CCAGCCATGGCGCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG**  
(SEQ ID NO:8)

7. 5' V<sub>H</sub>: **CCAGCCATGGCGCAGSTGCAGCTGCAGGAGTCSGG**  
(SEQ ID NO:9)

8. 5' V<sub>H</sub>:  
**CCAGCCATGGCGCAGGARGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG** (SEQ ID  
NO:10)

9. 5' V<sub>H</sub>:  
**CCAGCCATGGCGCAGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG** (SEQ ID  
NO:11)

10. 3' C<sub>H</sub>:  
**TGCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGCTAG** (SEQ ID NO:12)

注意：为了使用单一引物分离出尽可能多的变异体，对某些共有引物使用了混合的碱基：R=A+G, D=A+T+G, Y=C+T, H=A+C+T, V=A+C+G, K=T+G, S=C+G, W=A+T。

*Nco*I 和 *Apa*I 的限制性位点以粗体表示。所有的 PCR 反应均包括 50μL 的反应体积，其中含有：

10X PCR 缓冲液 5 μL

2mM dNTPs 5 μL

引物 5'	20 pmol
引物 3'	20 pmol
Taq DNA 聚合酶, EasyA	2.5 U
DNA	10 $\mu$ L

PCR 的循环条件为: 95 °C 1 分钟, 62 °C 1 分钟, 以及 72 °C 1 分钟, 总共 25 个循环, 然后在 72 °C 下作最后延伸 10 分钟。引物混合物的浓度表示每个单独引物的浓度之和。片段的构建包括下面的步骤:

### 步骤 1

PCR 反应以合成的 cDNA (10  $\mu$ L) 作为模板, 涉及到引物 1~9 和引物 10 的混合物。这生成了 450 bp  $V_H$  片段的混合物, 其两侧为 5' 端 *NcoI* 位点以及 3' 端 *ApaI* 位点。

### 步骤 2

为了用先前得到的  $V_H$  片段融合 *PeIB* 前导序列, 需要进行亚克隆步骤。亚克隆载体的设计如下: 将 *EcoRI-XhoI* 从通用克隆载体 *EcoRI-ApaI-C<sub>H</sub>-ETA<sub>(252-608)</sub>-PeIB-SfiI-XhoI/3302* 中切离出来并插入到类似消化的 pSV-73 辅助质粒中。将含有不需要的 *NcoI* 限制点位的 *Sall-XhoI* 片段切除, 由于 *Sall* 和 *XhoI* 具有相匹配的末端, 从而载体随后可进行自连。约 100 ng 的凝胶纯化  $V_H$  片段和 200 ng 的亚克隆载体用 *ApaI* (1.5  $\mu$ L) 在总体积为 20  $\mu$ L 以及 25 °C 下进行消化 2 小时。然后将温度上升到 37 °C 并加入 *NcoI* (1.5  $\mu$ L) 进行进一步温育 2 小时。所有的消化产物均经过凝胶纯化。消化的  $\gamma$  重链 50 ng 与 100 ng 消化的质粒在 16 °C 和 2000 单位的 T4 DNA 连接酶存在条件下进行连接过夜。然后使用 Zymo Research™ Concentrator 试剂盒对连接反应混合物进行纯化并洗脱至终体积为 16  $\mu$ L。用 2  $\mu$ L 纯化的连接反应对 EasyShock™ 10B 电转感受态细胞进行电穿孔并重新悬浮于 1 mL 的 SOC 培养基中。将转化混合物的 1/10 和 1/100 稀释液涂平板到添加氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 LB 琼脂板上, 以对连接效率进行分析。将质粒从 1 mL 的过夜培养液中提取出来。提取出的质粒 (900 ng) 用 1.5  $\mu$ L 的 *EcoRI* 在总体积为 20  $\mu$ L, 37 °C 下下进行消化 2 小时, 用 Zymo

Research™ Concentrator 试剂盒进行纯化并用 1.5  $\mu$ L 的 *Apa*I 在总体积为 20  $\mu$ L, 于 25 °C 下进行消化 2 小时。

### b. $\kappa$ 轻链

使用 cDNA (10  $\mu$ L) 做为模板, 用正反应的引物 1~6 和逆反应的引物 7 进行 PCR 反应来构建和扩增  $V_L$ - $C_L$ ( $\kappa$ ) 片段。加入 *Sfi*I 和 *Xho*I 限制性位点 ( 黑体 ) 来助于  $V_L$ - $C_L$ ( $\kappa$ ) 克隆入 *Eco*RI-*Apa*I- $C_H$ -ETA<sub>(252-608)</sub>-*Pe*I B-*Sfi*I-*Xho*I/3302 质粒。 $\kappa$  轻链含有 VI 区以方便克隆。

1. 5'  $V_L$ : TCGCGGCCCAACCGGCCATGGCGCACCATCATCACCAT  
CACGACATCCAGWTGACCCAGTCTCC (SEQ ID NO:13)

2. 5'  $V_L$ : TCGCGGCCCAACCGGCCATGGCGCACCATCATCACCAT  
CACGATGTTGTGATGACTCAGTCTCC (SEQ ID NO:14)

3. 5'  $V_L$ : TCGCGGCCCAACCGGCCATGGCGCACCATCATCACCAT  
CACGAAATTGTGWTGACRCAGTCTCC (SEQ ID NO:15)

4. 5'  $V_L$ : TCGCGGCCCAACCGGCCATGGCGCACCATCATCACCAT  
CACGATATTGTGWTGACRCAGTCTCC (SEQ ID NO:16)

5. 5'  $V_L$ : TCGCGGCCCAACCGGCCATGGCGCACCATCATCACCAT  
CACGAAACGACACTCACGCAGTCTCC (SEQ ID NO:17)

6. 5'  $V_L$ : TCGCGGCCCAACCGGCCATGGCGCACCATCATCACCAT  
CACGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC (SEQ ID NO:18)

逆向(粗体表示 *Xho*I 限制性位点 ):

7.  
3'  $V_L$ : GCACTCGAGCTACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGG (SEQ ID NO:19)

PCR 的循环条件为: 95 °C 下 1 分钟, 62 °C 下 1 分钟 和 72 °C 下 1 分钟, 进行 25 次循环, 随后在 72 °C 下进行 10 分钟的最后延伸。

在 1% 的琼脂糖胶中的电泳被用以分离扩增的 *Pe*I B- $V_H$  和  $\kappa$  轻链 PCR 产物。对目的带进行切离, 使用 Zymo Research™ 试剂盒进行纯化并在洗

脱至 16 $\mu$ L。2  $\mu$ L 被克隆进 TOPO PCR 2.1 克隆载体并在 10F 大肠杆菌细胞中进行转化。对转化的大肠杆菌质粒进行分离并使用 CEQ 测序仪测序，作为下面描述的测序验证步骤的一部分。

### 验证:

为了确保文库的质量，需进行三个测试：在每次连接反应后进行 PCR 筛选，在插入表达载体前和在文库组装后对随机选择的重链和  $\kappa$  链的独立克隆进行测序和在 96 孔板中表达。

### 文库的构建:

#### $\kappa$ 轻链克隆

一旦通过测序证实了序列多样性，则使用唯一的限制性酶 SfiI 和 XhoI 将  $\kappa$  链 PCR 反应物，约 100 ng，克隆进通用克隆载体 EcoRI-ApaI-CH-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-SfiI-XhoI/3302。在 BSA 存在条件下，将  $\kappa$  链 PCR 反应物和 EcoRI-ApaI-CH-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-SfiI-XhoI/3302 质粒与 XhoI (1.5  $\mu$ L) 终体积 50  $\mu$ L 中在 37 °C 下温育 2 小时，随后加入 1.5  $\mu$ L 的 SfiI。在 50 °C 下温育 2 小时后，将消化的  $\kappa$  轻链和质粒加到琼脂糖凝胶上，使用 Zymo Research™ 凝胶纯化试剂盒进行纯化并洗脱至 16  $\mu$ L。

消化的  $\kappa$  轻链 50 ng 与 100 ng 消化的质粒在 16°C 和 2000 单位的 T4 DNA 连接酶存在下进行连接过夜。然后使用 Zymo Research™ Concentrator 试剂盒对连接反应混合物进行纯化(8)并洗脱至最终体积为 16  $\mu$ L。对 EasyShock™ 10B 电转感受态细胞(9)使用 2  $\mu$ L 的纯化连接反应物进行电穿孔并重新悬浮于 1mL 的 SOC 培养基中。通过将转化混合物的 1/10 和 1/100 稀释液涂平板到添加四环素(15  $\mu$ g/mL)的 LB 琼脂板上，分析连接效率。此外，使用在 4B 部分中描述的引物混合物通过 PCR 筛选出存在  $\kappa$  轻链的 10 个独立的菌落。剩余的转化细胞在 37 °C 下生长在 50 mL 存在 15  $\mu$ g/mL 四环素的 2xYT 中。在过夜温育后，从 1mL 过夜培养液中提取 C<sub>H</sub>-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>( $\kappa$ )/3302 质粒。

#### a. PelB-V<sub>H</sub> 克隆

前面的双消化的(EcoRI 和 ApaI) PelB-V<sub>H</sub> 片段 100 ng 被连接到

C<sub>H</sub>-ETA<sub>(252-608)</sub>-PeIB- V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(κ)/3302 载体中, 该载体已使用上述同样的酶进行了预消化。除了使用 γ 引物外, 进行了如上所述的连接纯化、转化和 PCR 筛选。

#### b. JM109 转化

克隆的质粒通过 Zippy 少量提取试剂盒纯化并电穿孔进电转感受态 JM109 菌株中, 在预实验中已发现该菌株是最高的表达宿主。将转化混合物的 1/10 和 1/100 稀释物涂板到含有 15 μg/mL 四环素的 LB 琼脂板上后, 通过计算菌落数目估算得到文库的大小。

#### c. 对独立克隆的重链和 κ 链的测序

对含有 PeIB-V<sub>H</sub> 和 κ 链插入的独立克隆进行测序, 以确定在所构建的文库中存在最小冗余。如表 1 和 2 所示, 每条链的 CDR 环氨基酸序列都是唯一的。如所预期的, 获得了重链的 CDR3 区的长度变异性, 其最小为 11 个残基, 最大为 19 个残基。此外, 还显示出了 κ 和重链片段的亚类。

#### d. 免疫文库克隆的蛋白印迹分析

在文库筛选过程中所使用的条件下诱导后, 通过蛋白印迹对 15 个独立克隆的表达水平进行评定。(图 2)用单个转化的 JM109 菌落/孔接种含有 150 μL 添加 15 μg/mL 的四环素 2xYT 的 96 孔板的孔, 并且在 37 °C 恒定摇动下过夜温育。将过夜生长的种子培养液 20 μL 加入到含有 130 μL TB 的孔中, 并在 37 °C 下温育 7~8 小时。然后, 用 17.5 μL 的 2% L-阿拉伯糖进行诱导培养物并在 25°C 下进行过夜温育。在 5000 RPM 条件下离心 30 分钟后, 将来自于 15 个不同孔的 16 μL 上清液在非还原条件下加载到 SDS-PAGE 丙烯酰胺凝胶中, 并使用缀合至 HRP 上的抗-人 κ 轻链抗体进行蛋白印迹分析来验证重组蛋白的存在与大小。检测到 3 个克隆具有全长表达的 Fab-ETA(252-608), 并且表达水平与阳性对照 VB6-845-Fab-ETA(252-608)类似。观察到另外 2 个克隆具有低水平的表达(在右侧印迹的泳道 3 和 6)。此外, 还检测到截短产物并且其带型类似于阳性对照。

### 4. 基于免疫毒素文库的结肠癌的筛选

扩增每个独立的克隆并通过向培养基中 96 孔板中的一个孔的培养基加入阿拉伯糖表达该克隆。检测每个孔的上清液，获得诱导所选择的靶细胞系的细胞凋亡的能力

#### FMAT 分析:

向 SW-480 肿瘤细胞(前面在 96 孔板中接种的)中介入每孔上清液 10  $\mu\text{L}$ 。为了提供定量数据，用 Annexin V 和 centriRed 染色进行死/或分析。野生型的 VB6-845-ETA (252-608)用作阳性对照。FMAT 板在 37  $^{\circ}\text{C}$  下温育 24 小时。将 20  $\mu\text{L}$  的 Annexin-Alexa-Fluor 647/Centri-Red <sup>TM</sup> 溶液加到每个孔中，并且所述平板在室温下在黑暗中温育 1 小时。接着在 FMAT 读取仪上读数。细胞凋亡阳性的细胞会应该结合。所有的细胞被 Cetri-Red 染料染色。%细胞凋亡被计算为 Annexin 阳性事件除以 Cetri-Red 阳性事件数的#比率。如果细胞凋亡超过含有空表达载体(pING-3302)细胞上清液的阴性对照 20%以上，克隆被认为是阳性的。

然后对在第一次筛选中为阳性的所有克隆在相同的条件下进行再筛选。通过前两轮为阳性的细胞随后在第三轮中进行测试，该轮测试包括阳性（癌症类型匹配的）和阴性（无关癌症类型）细胞系。FMAT 筛选的 3 阶段的结果显示于表 3。通过 FMAT 分析的所有 3 阶段的克隆被进一步纯化和验证。

#### FMAT 筛选呈阳性克隆的纯化:

培养表达所选择的阳性克隆的细胞。将 2xYT+四环素(25mg/L)的 100 mL 初始培养液均匀地分在两个振荡培养瓶中，使用储存在 10%甘油中的 1 mL 冷冻细胞储备液接种并且在振荡条件下于 37  $^{\circ}\text{C}$  进行过夜的生长。第二天，将 6L 的 TB 培养基分在 12 个振荡培养瓶中(每个 0.5L)，使用 60 mL 的初始培养物(每个 5 mL)进行接种并且在振荡条件下于 37  $^{\circ}\text{C}$  进行生长直至  $\text{OD}_{600} \approx 2.0$ 。在该阶段，加入阿拉伯糖至最终浓度为 0.2%，接着在振荡条件下于 25  $^{\circ}\text{C}$  进行温育对蛋白表达进行诱导。次日，于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下，以 8000 RPM (Sorvall<sup>TM</sup>)离心 50 分钟去除细胞，随后通过筒式过滤器 (Sartorius<sup>TM</sup>)进行粗过滤。使用 30 KDa MWCO 薄膜， $\text{NaPO}_4$  20 mM pH-7.5

缓冲液对上清液进行渗滤，使体积从 6L 减少到 0.5L。

下一个阶段包括使用  $\text{Ni}^{+2}$  柱(12 mL)进行纯化。第一个步骤包括向柱中加入  $\text{NiCl}_2$  0.1M (5xCV)，随后用  $\text{H}_2\text{O}$  (10xCV)洗涤并用 5xCV 的  $\text{NaPO}_4$  20mM、 $\text{NaCl}$  150mM pH-7.5 缓冲液进行平衡。以 5mL/min 的速度载入渗滤材料，然后先用 10xCV 的  $\text{NaPO}_4$  20 mM、 $\text{NaCl}$  150mM pH-7.5 缓冲液洗涤，然后再用 8xCV 的  $\text{NaPO}_4$  20 mM、 $\text{NaCl}$  150mM、咪唑 100mM pH-7.5 洗涤。用  $\text{NaPO}_4$  20 mM、 $\text{NaCl}$  150mM、咪唑 250mM pH-7.5 洗脱柱子并收集到 10x2 mL 的馏分，测量  $\text{OD}_{280\text{nm}}$  来选择哪一种馏分用于下一个阶段筛选，下一个阶段包括 Q-Sepharose™ (3 mL)柱。在载入含有上步馏分的稀释的蛋白之前，使用  $\text{NaPO}_4$  20 mM、 $\text{NaCl}$  90mM pH-7.5 平衡柱子。在  $\text{NaPO}_4$  20 mM pH-7.5 中进行稀释以得到类似于平衡缓冲液的导电性。载入样品后，使用 15xCV 的平衡缓冲液洗涤柱子并用  $\text{NaPO}_4$  20 mM、 $\text{NaCl}$  500mM pH-7.5 缓冲液进行洗脱。收集馏分(10x2 mL) 并存储在-20°C 下过夜。第二天，将上阶段的洗脱物加载到 S-200 大小排阻柱中，该柱事先用  $\text{NaPO}_4$  20 mM、 $\text{NaCl}$  150mM pH-7 进行冲洗。在通过 100 mL 的空隙体积后收集馏分 (10 mL 每个)。按照 SOP 的 2.1.55 和 2.1.63，使用检测用的  $\alpha$ -Kappa HRP-缀合抗体，通过考马斯和蛋白印迹法来估计被处理材料的纯度和同一性。最后，使用旋转柱将纯化的材料浓缩到约 1 mL 体积并使用 BCA 分析确定蛋白质的浓度。

### 结合亲和力的测量:

使用流式细胞仪来测量结合并确定用于阳性筛选细胞系中所选择的阳性克隆的亲和力。(SW-480)。为了评估结合，针对固定数目的 SW-480 细胞来对纯化克隆上清液进行温育以建立饱和曲线。使用兔抗-ETA(252-608)来检测结合并与阳性对照 VB6-845PE (高亲和力)和 VB6-011ETA(252-608) (中等亲和力)做比较。为了确定亲和力，温育高浓度的纯化克隆的上清液。结合亲和力通过解离常数来表达，通过 Lineweaver-Burk 方法来计算  $K_D$ ，该方法中，以中值荧光度的倒数作为抗体浓度倒数的函数来作图。通过下面的等式来确定解离常数： $1/F=1/F_{\text{Max}}+(K_D/F_{\text{Max}})(1/[scFv])$ ，其中 F 对应于减去背景的中值荧光度， $F_{\text{Max}}$  由图中计

算得到。对 8 个可接受克隆中的 4 个的结合估测的结果列于表 4。

### MTS 分析:

MTS 分析用于确定所选择的阳性克隆的  $IC_{50}$  值, 其使用阳性细胞系 SW-480 和来自不相关的癌症类型的阴性细胞系 CA-46。MTS 分析的结果汇总于表 4。

### 实施例 3: 用于亲和力成熟的文库的构建

为了对由“热点区改性”或通过随机突变所产生的亲和力成熟抗体进行有效筛选, 将每个候选的 Fab 形式连接到细胞毒性蛋白假单胞菌外毒素 A 的变异体。Fab-ETA(252-608)形式 (这里也称之为 VB6-ETA(252-608) 形式)适用于评测结合活性以及肿瘤细胞效价, 其允许对表达高亲和力抗体的克隆快速识别。此外, 该形式还允许通过 TMA 压型对正常组织和肿瘤组织进行快速筛选。

#### 1. 文库的构建

##### “热点区方法论”

##### a. 热点区识别

在活体靶特异性序列发生的体细胞超变被称为“热点区”(Neuberger M.S and Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7:248-254)。热点区序列可定义为在某些密码子中共有的核苷酸序列。共有序列为四核苷酸、RGYW, 其中 R 可以是 A 或 G, Y 可以是 C 或 T 以及 W 可以是 A 或 T (Neuberger M.S. et al., 1995)。此外, 由 AGY 编码的丝氨酸残基主要位于可变区的 CDR 区, 位于那些由 TCN 编码的与潜在的热点区序列对应的区之上(Wagner S.D., Milstein C. and Neuberger M.S. 1995. Codon bias targets mutation. *Nature*, 376, p732)。结构分析已显示 CDR 环, 尤其是 CDR3 环, 对于抗原结合起了最大的作用(Giudicelli V., Chaume D. and Lefranc M.P. 2004. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res.* 32:435-440)。因此, 对每个候选的重链和轻链的 CDR 的核苷序列进行扫描以检测热点区序列和 AGY 密码子的存在。利用

International ImMunoGen Tics 数据库, 轻链和重链的 CDR 区鉴定的热点区可与重链和轻链的生殖序列做对比(IGMT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies D.R., Padlan E.A. and Sheriff S. 1990. Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473)。与种系相同的序列表明未发生体细胞突变; 因此模仿在体内发生的体细胞事件引进随机突变。相反, 不同的序列则表明一些体细胞突变已经发生。仍需确定是否在活体内的体细胞突变是最佳的。用于对 CDR 内的隐蔽的或保守的氨基酸进行编码的热点区不会被诱变。这些残基对于整个结构通常是至关重要的并且由于其是隐蔽的, 所以不可能与抗原相互作用。此外, 该分析被比作在主要发生体细胞突变的种系序列中的预测位置 (Tomlinson I.M., Cox J.P.L., Gherardi E., Lesk A.M. and Chotia C. 1995. The structural repertoire of the human  $V_{\lambda}$  domain. *EMBO J.* 14:4628-4638; Tomlinson I.M., Walter G., Jones P.T., Dear P.H., Sonnhammer E.L.L. and Winter G. 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256:813-817)。类似的策略适用于 BL22 scFv 的亲和力成熟。在重链的 CDR3 中引入点突变导致各种 CD22-阳性细胞系上的结合活性 5~10 倍的增加 (Salvatore G., Beers R., Margulies I., Kreitman R.J. and Pastan I. 2002. Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display *Clinical Cancer Research*, 8:995-1002.)。此外, 在 CDR1 和 CDR2 环中的各种氨基酸的突变也产生了亲和力提高 3~7 倍的变异体 (Ho M., Kreitman J., Onda M. and Pastan I. 2005. In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *J. Biol. Chem.*, 280:607-617)。

#### **b. 通过 PCR 在所选择的 $V_L$ 区热点区中引入随机突变**

一旦热点区被鉴定, 就使用含有简并密码子(NNS, 其中 N 为 A、G、C 或 T 且 S 为 G 或 C)的寡核苷酸在靶位置引入所有可能的氨基酸, 但不包括 TAA 和 TGA 终止密码子。先前的研究建议, 与在轻链和重链两种链中独立分离的突变相比, 轻链 CDR 诱变后接着重链 CDR 诱变会导

致亲和力增加。因此，每个候选对象的亲和力成熟将起始于轻链的最优化。通过 PCR 对  $V_L$  区的 CDR 中识别的热点区进行随机诱变。产生的 PCR 片段含有适合于在表达载体 VB6-ETA(252-608)/3302 中定向克隆的唯一的限制性位点。在通过电穿孔转化大肠杆菌细胞后和用合适的抗生素涂平板选择后，生长了 20 个克隆并对分离的质粒测序。对序列进行分析以评估在靶位置引入的多样性。

## 2. 筛选过程

### 表达

用单个转化的 JM109 菌落/孔接种含有 150  $\mu\text{L}$  添加 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  四环素的 2xYT 的 96 孔板的孔,并且在 37° 恒定摇动下过夜温育。将 20  $\mu\text{l}$  过夜生长的种子培养液加入到含有 130  $\mu\text{l}$  TB 的 96 孔板中,并在 37°C 下温育 7~8 小时。然后,使用 17.5  $\mu\text{l}$  的 2% L-阿拉伯糖对培养液进行诱导并在 25°C 下温育过夜,以允许上清液中分泌 Fab-ETA(252-608)。用 PCR 测序确定的变异体在可溶性重组 VB6-ETA(252-608)形式中表达,并筛选在肿瘤细胞上具有增强的结合/杀死的突变体。简而言之,筛选始于用菌落挑取仪将单菌落接种到含有培养基的 96 孔板中。然后在振动的培养箱中于 37°C 下培养平板。当  $\text{OD}_{600}$  达到 2 时,取出每孔的等量培养液并在甘油存在时冷冻。然后,加入诱导剂对细菌进行诱导,并在 25°C 下温育过夜以允许在上清液中分泌 Fab-ETA(252-608)。

### 基于肿瘤结合的功能性筛选:

在 5000 RPM 下离心 30 分钟后,将每个孔中的上清液加入到活的肿瘤细胞(先前接种在 96 孔板中)中,并使用针对对 VB6-ETA(252-608)形式的兔抗体抗-Fab 或抗-ETA(252-608)来检测 VB6-ETA(252-608)的结合活性,随后进行抗-兔-FITC。在 FMAT™ 酶表仪中对 96 孔板进行读数。可期望通过二个多克隆抗体放大的荧光检测能够提高分析的灵敏度并能足以检测到野生型和随后的增强结合剂。挑选出对表达了比野生型具有更高结合反应性的 VB6-ETA(252-608) 变异体的任何克隆并验证其反应性。预计对来自于酶表仪的数据将是定量的,这样克隆可根据反应性而被分级。基于表型筛选的主要优点在于能够进行快速的分析。

### 基于存活/死亡分析的功能性筛选

此外,可使用 Annexin V 或钙黄绿素染色来实施存活/死亡分析。用接种在 96 孔 FMAT 板中的肿瘤细胞温育 VB6-ETA(252-608)上清液,并在 24 小时后评定细胞毒性的水平。建立细胞毒性的水平后,诱变克隆的效力得以分析并与野生型 VB6-ETA(252-608)做对比。由于每种克隆的靶是相同的,所有通常认为在杀死活性上的增加与亲和力上的增加是相互关联的。出于分析细胞毒性效果需要温育时间的原因,因此存活/死亡分析要慢于肿瘤细胞的表型。

### ELISA 分析以及流式细胞术

如果由突变的融合蛋白如在一些亲和力成熟免疫毒素的情况下所识别的表位或配体(如靶分子)是已知的,则将相应的蛋白或肽或化合物加在 96 孔板上并与诱导的上清液在室温下温育 2 小时。来自诱导克隆的野生型(原始抗体)以及空载体 3302 的上清液被用作阳性和阴性对照以进行表位的识别。然后通过 ELISA 来评估亲和力成熟抗体对表位的结合。为了验证阳性克隆的反应性,接着将上清液与选择的靶肿瘤细胞进行温育并使用流式细胞仪来检测结合的膜膜相关的免疫毒素。

### 测序:

一旦验证了前十个克隆的反应性,质粒 DNA 将被提取出进行测序。如果测序在热点区位置识别出一个唯一的氨基酸,则设计出最终的构建物以含有该残基。然而如果得到了多个残基,那么将使用在不同位置的最优化的残基来构建一个组合文库并如上所述那样进行筛选。一旦选出最优克隆,则通过对野生型 VB6-ETA(252-608)和亲代抗体的竞争性分析评估其特异性。预期轻链 Fab-ETA(252-608)蛋白的最优化的 CDR 将与这两种蛋白竞争。

由单点突变所获得的增加的亲和力可能无法通过表型或存活/死亡分析进行测量。因此,将设计出具有两个或三个诱变位置的文库。例如,可对 CDR1 和 CDR2 的热点区进行组合。

### 3.通过 PCR 在 V<sub>H</sub> 区的选择热点区中引入随机突变

使用先前描述的相同的策略在识别的  $V_H$  区 CDR 的热点区构建随机突变。然后使用唯一的限制性位点插入 PCR 片段构建 Fd-ETA(252-608)文库。设计出最优的轻链后,将在不同的 Fd-ETA(252-608)文库中对其进行克隆。使用连接反应物对大肠杆菌细胞进行电穿孔以及适当的选择后,如上所述对单克隆使用进行筛选。选择出与最优化的轻链克隆相比具有较高 VB6-ETA(252-608)反应性的克隆并分级。证实了前五个候选对象的反应性后,提取质粒 DNA 并进行测序。然后设计出在重链和轻链的 CDR 中具有组合突变的最终构建物并测试其生物活性。在亲和力成熟的 Fab 和亲代抗体之间进行竞争性分析以确保最初的结合特异性被保留。

#### 4. 进一步生物测试

将含有可溶亲和力成熟的 Fab-ETA(252-608)、野生型 Fab-ETA(252-608)以及 VB6-845-ETA(252-608)加入到抗原-阳性肿瘤细胞(用于淘选)以及抗原-阴性肿瘤细胞中。在 37°C 下温育 3 天后,将可溶亲和力成熟 Fab-ETA(252-608)的  $IC_{50}$  与野生型 Fab-ETA(252-608)以及 VB6-845-ETA(252-608)的进行比较。可能出现不同的情况: A) 如果  $IC_{50}$  在可接受的范围,即 <10pM,并且在阴性肿瘤细胞中至少高出 2 个 log 值,则克隆还会生长。纯化产物将使用 Proxinium™ 建立的程序通过 TMA 进行检测以确保与正常的关键组织相比,在肿瘤组织中观察到选择结合。如果克隆通过 TMA,则将使用流式细胞术对反应性 Fab-ETA(252-608)作进一步表征,以确定其对含有 15 种不同指征的全体肿瘤细胞文库的特异性和交叉反应性。 B) 如果  $IC_{50}$  高于 10pM,因而不适合于临床前开发,除了具有结构功能的氨基酸以及 N-附加段中的氨基酸以外,轻链和重链的 CDR3 中的 3~4 个氨基酸嵌段将被随机诱变。在另一种方法中,  $V_H$  和  $V_L$  区将通过易错 PCR 进行随机诱变。已有几篇文章报告在构架中引入突变会通过 CDR 环的调整而导致亲和力增加,因此增强了与抗原的相互作用 (Daugherty P.S., Chen G., Iverson B.L. and Georgiou G. 2000. Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:2029-2034)。例如可使用 APEX 显示器。如上所述进行热点区诱变所述述的进行生物检测,

并将以具有合适  $IC_{50}$  值的克隆作为临床候选对象而作进一步研究。

图 3 描绘了亲和力成熟过程。

#### **实施例 4: VB6-011 免疫毒素的亲和力成熟**

##### **1. 目标**

设计成 Fab-de-bouganin 融合蛋白的纯化 VB6-011 与亲代抗体 VB1-011 相竞争, 表明在重组形式和亲代抗体之间保留了特异性。然而, VB6-011 的亲和力, 在  $10^{-6} \sim 10^{-7}$  M 之间, 其要比 VB1-011 少 5 ~ 10 倍, 获得 350 nM 的  $IC_{50}$ 。因此, VB6-011 需要亲和力成熟步骤使其能够适合用于进一步的临床研究的有效治疗剂。该项研究方案将描述 VB6-011-PE 的设计、在 CDR 区中引入点突变以及文库的构建和筛选程序。

##### **2. 实验设计**

用于 VB6-011 的亲和力成熟的重组形式是连接到具有添加的 KDEL 序列的假单胞菌外毒素 A 变异体上的 011-Fab 片段。先前的研究已表明, 当转化的大肠杆菌被诱导时, 该形式导致上清液中可溶材料的表达。然后该可溶表达 Fab-ETA(252-608) 蛋白被用于一混合和读数检测中, 以评价肿瘤细胞经 Fab 部分的相互作用与缀合抗原的结合, 以及被用于通过测量细胞毒性的活性的 MTS 分析中, 并适合 TMA 染色。

产生了含有 2 个单元的双顺反子表达体系。一个单元含有 PE-<sub>252-608</sub>, 其通过接头连接到  $V_H-C_H$  区。第二个单元含有  $V_L-C_L$  区, 其含有放于 N-端的组氨酸亲和力标签。双顺反子单元被克隆进 pING3302 Xoma 载体中, 在阿拉伯糖-可诱导的 araBAD 启动子控制下。在两个单元中均存在的 PelB 前导序列使得蛋白分泌到周质空间, 在这里, 非还原环境将使得在 Fab 的两个恒定区之间形成二硫键。最后, VB6-011-ETA(252-608) 融合蛋白分泌到培养液上清液中。

##### **A) VB6-011--ETA 的设计**

VB6-011-ETA(252-608) 的设计是通过在含有 ApaI-CH-ETA(252-608)-PelB-SfiI-XhoI 插入片段的 3302 质粒 DNA 中将 PelB- $V_{H11}$  和  $V_{L11}-C_{Lk}$  进行连接而实现。

VB6-011/3302 质粒 DNA 通过 PvuII 和 NheI 限制酶进行消化并且将  $V_{H11}$  片段连接到用相同的酶预消化的 PelB-NcoI- $V_{H08}$ - $C_H$ /pSV73 质粒中。PelB 序列和 PelB-NcoI- $V_{H08}$ - $C_H$ /pSV73 的  $C_H$  区分别含有创建  $V_H$  盒的 NcoI 和 ApaI 限制性位点。使用连接反应物对 10F 感受态细胞进行转化并涂平板补充有氨苄青霉素的 LB-琼脂板上。具有 PelB- $V_{H11}$ - $C_H$  片段的克隆用 EcoRI 和 ApaI 消化并连接到用相应的酶进行消化的  $C_H$ -ETA(252-608)-PelB-SfiI-XhoI/3302 质粒 DNA 中。

类似的, VB6-011/3302 质粒 DNA 用 EcoRV 和 XhoI 限制酶进行消化且  $V_{L11}$ - $C_{Lk}$  片段被连接到使用相同的酶进行预消化的 PelB-SfiI- $V_{L845}$ - $C_{Lk}$ /pSV73 质粒上。对 PelB 序列进行修饰使其含有创建轻链盒的唯一的 SfiI 限制性位点。在用连接反应物对 10F 感受态细胞进行转化后, 在补充有氨苄青霉素的 LB-琼脂板上对细胞进行选择。具有 PelB-SfiI- $V_{L11}$ - $C_{Lk}$  片段的克隆用 SfiI 和 XhoI 消化并连接到使用相应的酶进行消化的质粒 PelB- $V_{H11}$ - $C_H$ -ETA(252-608)-PelB-SfiI-XhoI/3302 中。然后使用含有 VB6-011-ETA(252-608)插入物的质粒对 E104 和 JM109 细胞进行转化。

#### 小规模的表达研究:

含有 VB6-011-ETA(252-608)的转化 E104 和 JM109 细胞在 250 mL 摇瓶的 30 mL TB 培养基(1%接种物)中, 在 37°C 下, 以 225 rpm 摇动增殖约 5 小时直到光密度(O.D. 600 nm)达到 2。此时, 对培养液使用最终浓度为 0.1% 的 L- (+)阿拉伯糖诱导 16 小时并在 25°C 下进行温育。随后, 上清液通过在 14000 rpm 下进行 5 分钟离心后收集并在还原和非还原条件下使用抗-人  $\kappa$  轻链 (Sigma A-7164) 进行蛋白印迹分析, 以确定免疫毒素的存在及大小。

如果 VB6-011-ETA(252-608) 的蛋白印迹分析表明完整 Fab-ETA(252-608)在适当的水平被表达, 则在用单个转化 E104 和 JM109 菌落接种的 96 孔板中的 200  $\mu$ L TB 中进行类似实验。与摇瓶相比, 96 孔板中存在类似表达水平的 VB6-011-ETA(252-608)表明可使用 96 孔上清液对文库进行筛选。

#### VB6-011-ETA(252-608) 的生物学活性

使用抗原-阳性细胞系, A-375 和 Saos-2 以及抗原-阴性细胞系, Panc-1, 通过流式细胞术对上清液中含有的 VB6-011-ETA(252-608)的结合特异性进行评测。使用兔抗-ETA(252-608) (1/100)检测结合。此外, 使用 MTS 分析来确定是否可使用抗原-阳性细胞系、A-375 和 Saos-2 以及抗原-阴性细胞系、Panc-1 来对上清液中含有的 VB6-011-ETA(252-608)的细胞毒性进行检测。

#### **VB6-011-ETA(252-608)的亲和力成熟:**

种系和 VB1-011 的  $V_H$  和  $V_L$  序列的分析显示在轻链的 CDR 环中的 13 个密码子以及在重链的 CDR 环中有 7 个密码子含有热点区或 AGY 序列。因此, 分别构建 5 和 3 个文库来覆盖轻链和重链。

##### **a. 通过在轻链中饱和诱变来引入靶点突变**

通过 PCR 在靶位置产生含有随机核苷酸的 PCR 片段。引物 1 和 4 对所有的文库共有的而引物 2 和 3 对每个文库是特异的。存在于 PCR 片段中的限制性位点 SfiI 和 XhoI 被用于创建 VB6-011-ETA(252-608)文库。

通过拼接重叠延伸聚合酶链式反应的方法(Weissensteiner et al. (2004): PCR technology, Current Innovations. CRC Press, Boca Raton, Florida 33431, USA; Horton, R.M. and Tait, R.C. (1998): Genetic Engineering with PCR. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, England)在 CDR 环中引入点突变, 使用 PelB-SfiI- $V_{L11}$ - $C_{Lk}$  作为模板以及如下的引物:

5' 引物 1:

5' PelB: **GAA TTC** CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT (SEQ ID NO:20)

2) 3' 引物 2:

5' CDR1-L1: GTA GCT GCT ACT AAC SNN CTB SNN GGC CCT GCA GGA (SEQ ID NO:21)

5' CDR1-L2: GTA CCA GGC TAA GTA SNN SNN SNN AAC ACT CTG ACT (SEQ ID NO:22)

5' CDR2-L1: CAT GCC AGT GGC CCT SNN GGA TGC ACC ATA  
(SEQ ID NO:23)

5' CDR3-L1: CTG AGG TGA GCT ACC SNN SNN SNN ACA GTA  
ATA CAC (SEQ ID NO:24)

5' CDR3-L2: AGG TGT CTG AGG TGN SNN SNN ATA CTG CTG  
ACA (SEQ ID NO:25)

### 3) 5' 引物 3

5' CDR1-L1: CTC TCC TGC AGG GCC NNS VAG NNS GTT AGT  
AGC AGC (SEQ ID NO:26)

5' CDR1-L2: GCC AGT CAG AGT GTT NNS NNS NNS TAC TTA  
GCC TGG (SEQ ID NO:27)

5' CDR2-L1: ATC TAT GGT GCA TCC NNS AGG GCC ACT GGC  
(SEQ ID NO:28)

5' CDR3-L1: GCA GTG TAT TAC TGT NNS NNS NNS GGT AGC  
TCA CCT (SEQ ID NO:29)

5' CDR3-L2: TAC TGT CAG CAG TAT NNS NNS NCA CCT CAG  
ACA (SEQ ID NO:30)

### 4) 3' $\kappa$ -XhoI

5' **CTC GAG** TCA CTA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT  
(SEQ ID NO:31)

使用所有上述引物进行二步拼接重叠延伸 PCR 法对相应的文库进行扩增, 即 CDR1 环的文库 1 和 2、CDR2 环的文库 1 和 2 以及 CDR3 环的文库 1 和 2(Weissensteiner et al, 2004; Horton and Tait, 1998)。限制性位点以下划线表示。N 对应于随机的核苷酸 A、G、C、T; B 对应 T、C、G; V 对应 A、C、G 以及 S 对应 G、C。

PCR 反应包括 50 $\mu$ L 的反应体积, 其含有:

10X PCR 缓冲液            5  $\mu$ L

2mM dNTPs	5 $\mu$ L
50mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L
引物 5'	20 pmol
引物 3'	20 pmol
Taq DNA 聚合酶	2.5 U
DNA 模板	50 ng

PCR 的循环条件为：94°C 1 min., 62°C 1 min., 以及 72°C 0.5 min., 总的进行 20 个循环, 最后在 72°C 下延伸 10 分钟。

#### 步骤 1:

使用引物 1 和 2 扩增 5'文库 PCR 片段, 其在 5'末端含有 PelB 区、在 3'末端含具有靶随机的核苷酸的 CDR 环。在第二个 PCR 反应中, 使用引物 3 和 4 扩增 3'文库 PCR 片段, 其在 5'末含具有靶随机的核苷酸的 CDR 环, 在 3'末端含 2 个终止密码子以及 XhoI 限制性位点。

#### 步骤 2:

在第二个 PCR 反应中, 将 1 $\mu$ l 各 PCR 产物与引物 1 和 4 一起使用以生成 PCR 片段, 其在相应的 CDR 环(818 bp)中的特定位置上含有随机的核苷酸。

使用 DNA 清洁和浓缩试剂盒对带进行纯化并用 SfiI 和 XhoI 限制性酶进行消化。对该消化的带经纯化并插入到使用相同的酶进行预消化的 PelB-V<sub>H11</sub>-C<sub>H</sub>-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-SfiI-XhoI/3302 载体中。试验不同比率如 1:3 和 1:2 的载体/插入物, 并在高浓度的 T4 DNA 连接酶的存在下在最终体积 20 $\mu$ L 中进行连接反应, 且在 16°C 下温育 12 小时。然后用连接反应物对 JM109 电-受态细胞进行转化并涂平板于补充有四环素的 LB-琼脂板上。在转化完成后得到的菌落数将决定用于连接反应的最佳条件。

#### **文库的筛选:**

##### **a. 生长和诱导**

用单转化的 JM109 菌落/孔接种含有 150  $\mu$ L 补充有 15  $\mu$ g/mL 四环素

的 2xYT 的 96 孔板孔,并且在 37 °C 恒定摇动下过夜温育。将 20  $\mu$ l 的种子培养液加入到含有 130  $\mu$ l TB 的 96 孔板中并在 37°C 下温育 7 ~ 8 小时。然后使用 17.5  $\mu$ l 的 L-阿拉伯糖对培养液进行过夜诱导,从而使得 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>分泌进上清液。图 4 显示了 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>轻链克隆的蛋白免疫印迹结果。

#### b. 基于肿瘤细胞表型的功能性筛选

野生型 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>的滴定结合曲线用于确定室温下的温育时间,由此获得使用 FMAT™时的最佳信号。将每孔中的上清液 10  $\mu$ L 加入到 Saos-2 肿瘤细胞(先前接种在 96 孔板中)中并且使用与 AlexaFluor 647 (1/250)缀合的羊抗-人 IgG (H+L)抗体来检测 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>突变克隆的结合活性。此外,在每个实验中,野生型 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>被用作阳性对照。仅挑选出对表达了比野生型具有较高结合反应性的 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub> 变异体的任何克隆并确认其反应性。

图 5 显示了 FMAT 筛选的结果。

#### c. 基于存活/死亡分析的功能性筛选

然而,如果数据不是定量的,使用 Annexin V 以及 centriRed 染色进行存活/死亡分析。将野生型 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>上清液与肿瘤细胞一起进行温育,在 24 小时后分析细胞毒性的水平并与野生型(原始序列) VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>作对比。一旦建立,即对诱变克隆的效力进行分析并与野生型 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>做对比。如果对于每个克隆来讲靶是相同的,通常认为杀死活性的增加与亲和力的增加是相互关联的。

图 6 显示了 MTS 分析的结果。

#### d. 测序以及反应性

一旦证实了前十克隆的反应性,提取它们的质粒 DNA 并进行排序。如果测序在热点区位置识别到一个唯一的氨基酸,那么设计终构建物以含有该残基。然而如果得到多个残基,那么将使用在不同位置的最优化的残基来构建一个组合文库并如上所述进行筛选。从 VB6-011ETA<sub>(252-608)</sub>的轻链的亲和力纯化中得到的修饰轻链被列于表 5 中。如上所述使用流式细胞术

分析 VB6-011 的结合。如图 7 所示, 通过比野生型克隆或竞争型克隆更高的平均荧光度确定最优克隆, 并通过对抗原的 ELISA 结合证实。在 VB6-011 的情况下, 这是固定的硫酸软骨素的 ELISA, 如图 8 所示。

一旦选定了最优克隆, 通过与 VB1-011 抗体的竞争性分析来评价其特异性。简言之, 即对升高浓度的 VB1-011 与固定数目的 Saos-2 细胞进行温育, 所述 Saos-2 细胞是用野生型或诱变的 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>上清液进行预温育的。

然后将优化的轻链与重链中的靶突变文库进行组合。

### 在重链中通过饱和诱变来引入靶点突变:

通过 PCR 产生在靶位置含有随机核苷酸的 PCR 片段。引物 1 和 4 为所有的文库共有, 而引物 2 和 3 对每个文库是特定的。在 PCR 中存在的限制性位点 EcoRI 和 ApaI 被用于创建 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>文库。

用 PelB-V<sub>H11</sub> 为模板以及下述引物, 通过拼接重叠延伸聚合酶链式反应的方法(Weissensteiner, 2004; Horton and Tait, 1998)在 CDR 环中引入点突变:

#### 1) 5' 引物 1

5' PelB: **GAA TTC** CTG CAG GTC TAT GGA ACG ATA AAT (SEQ ID NO:32)

#### 2) 3' 引物 2

5' CDR1-H1: GAC CCA GTG CAT AGC AAA SNN TCT GAA GGG GAA TCC (SEQ ID NO:33)

5' CDR2-H1: CAC GGA GTC TGC GTA SNN TTT SNN SNN TCC ATC ATA TGA TAT AAC (SEQ ID NO:34)

5' CDR3-H1: TTT GCC CCA GAC GTC CAN SNN GTA GTA GTG GTC ATA GTC ACC CAA CAG SNN CTG ATC TCT (SEQ ID NO:35)

#### 3) 5' 引物 3

5' CDR1-H1: TCT GGA TTC CCC TTC AGA NNS TTT GCT ATG  
CAC TGG (SEQ ID NO:36)

5' CDR2-H1: ATA TCA TAT GAT GGA NNS NNS AAA NNS TAC  
GCA GAC TCC GTG AAG (SEQ ID NO:37)

5' CDR3-H1: GCG AGA GAT CAG NNS CTG TTG GGT GAC TAT  
GAC CAC TAC TAC NNS NTG GAC GTC TGG (SEQ ID NO:38)

#### 4) 3' V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-ApaI

5' CGA TGG GCC CTT GGT GCT AGC TGA AGA GAC CGT GAC  
(SEQ ID NO:39)

使用所有上述引物进行二步拼接重叠延伸 PCR 法扩增相应的文库,即各 CDR 环的一个文库 (Griffin and Griffin, 1994; Horton and Tait, 1998)。限制性位点以下划线表示。N 对应于随机核苷酸 A、G、C、T, 以及 S 对应 G、C。

#### 步骤 1

使用引物 1 和 2 扩增 5'文库 PCR 片段,其在 5'末端含有 PelB 区、在 3'末端含具有靶随机核苷酸的 CDR 环。在第二个 PCR 反应中,使用引物 3 和 4 扩增 3'文库 PCR 片段,其在 5'末含具有靶随机核苷酸的 CDR 环,在 3'末端含 2 个终止密码子以及 ApaI 限制性位点。

#### 步骤 2

在第二个 PCR 反应中,使用引物 1 和 4 与 1 $\mu$ l 各 PCR 产物以生成 PCR 片段,其在相应的 CDR 环(527 bp)中的特定位置上含有随机的核苷酸。

如上所述对目的带进行纯化并使用 EcoRI 和 ApaI 限制性酶进行消化。纯化该消化的带并插入到使用相同的酶进行预消化且含有最优轻链的 PelB-C<sub>H</sub>-ETA<sub>(252-608)</sub>-PelB-SfiI-V<sub>L11</sub>-C<sub>Lk</sub>/3302 载体中。使用连接反应物对 JM109 电-感受态细胞进行转化并涂平板于补充有四环素的 LB-琼脂板上。

然后通过 FMAT 对阳性细胞系 MDA-MB-345S 进行文库筛选。如果获得的 % 细胞凋亡大于含有优化 VL-2 轻链的野生型(原始序列) VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>的 % 细胞凋亡,则克隆被选作阳性并进行测序。如果发

现不止一个基序，则构建一个组合文库并重复 FMAT 筛选。表 6 中列出了一些用于 VB6-011ETA<sub>(252-608)</sub>重链的 CDR 基序。通过 FMAT 筛选，从 VB6-011ETA<sub>(252-608)</sub> VL-2 重链组合文库中选出了 43 个为阳性的克隆。通过 CSA ELISA 验证了其中的 25 个维持抗原的特异性。通过流式细胞术验证了 12 个为阳性。由流式细胞术选出具有最高 MF 结合的一个为最优克隆（图 9）。表 7 总结出了用于 VB6-011ETA<sub>(252-608)</sub>的前 4 个的亲合力成熟的构建物的结果。设计具有最优重链和轻链的最终构建物，在这里选择了克隆 2D3。最终的构建物可保持 ETA<sub>(252-608)</sub>形式或其它的毒素，或可在如改性的 bouganin 中设计效应物。选择的克隆的最终序列示于图 10。

### 亲和力成熟的 VB6-011- bouganin 的纯化

使用 ApaI 和 SfiI 限制性酶用去-bouganin 毒素设计最终克隆 2D3。简言之，使用 ApaI 和 SfiI 对 VB6-011ETA<sub>(252-608)</sub> 进行消化并得到二个片段。第一个片段对应具有 VH 和 VL-CL 的 pING3302 质粒，而第二个片段对应于 CH-ETA<sub>(252-608)</sub>。将第一个片段进行纯化并与使用相同的酶预消化的 CH-去-bouganin 片段进行连接，以产生 VB6-011-Boug-2D3/3302 载体。在 20L 的 CHEMAP 发酵罐中使用 GMM 培养基(14)对 VB6-011-2D3 克隆进行补料分批发酵。将装 500 mL GMM 的 2L 摇瓶通过一小瓶的 MCB 进行接种，其中 GMM 中含有 25 μg/mL 的四环素并补充有微量元素 D、氯化钙、尼克酸以及硫胺。将细胞置于一振动培养箱中，设置温度为 28°C 及 200 rpm 的匀速搅动。让培养液生长直到 OD<sub>600</sub> 达到 2.0 - 2.5。然后，用 150 mL 的种子培养液接种含有 15 L 的 GMM 培养基以及上述补充元素的 20 L 的 chemap 发酵罐。设置温度为 28°C，且在整个发酵过程中，通过 pH 控制回路添加 50% 氢氧化铵溶液维持 pH 在 7.0。设置搅动速率为 300 rpm 及空气流速为 3 slpm，并持续升高至 600 rpm 以及 6 slpm，然后再升至 1000 rpm 和 10 slpm，从而在整个分批阶段维持溶解氧在 41% 以上。当分批培养基中的碳源被耗竭时，溶解氧升高到 90% 以上，此时要求加入料 1 溶液（50% 甘油溶液）。然后，设置 DO 恒定调定点在 41% 并根据 DO 读数的级联控制进行供料。在光密度为 100 时，切换到料 2 溶液（50% 甘油 + 30 g/L 阿拉伯糖溶液）对培养液进行诱导，且该诱导在与料 1 相同的控制下持续 48 小时。

在经过48小时的诱导后,收集培养液并在8000 rpm下进行离心30分钟,然后使用CM-琼脂糖、螯合-琼脂糖SP-琼脂糖柱进行纯化,最后通过大小排阻柱进行纯化。简言之,对上清液进行浓缩并用20 mM磷酸钠pH 7 ± 0.1进行渗滤。然后将渗滤浓缩后的上清液加到已经用20 mM磷酸钠, 25 mM NaCl pH 7 ± 0.1进行平衡的CM-琼脂糖柱上。使用20 mM磷酸钠, 25 mM NaCl pH 7 ± 0.1洗脱柱子。随后使用20 mM磷酸钠, 150 mM NaCl pH 7.5 ± 0.1对结合的VB6-008进行洗脱。将CM-琼脂糖洗脱液调节至0.25% triton-X100的最终浓度并加到在带电的螯合琼脂糖凝胶柱上。然后使用20 mM磷酸钠、150 mM NaCl、10 mM咪唑 pH 7.5 ± 0.1洗脱螯合-琼脂糖凝胶柱。使用20 mM磷酸钠、150 mM NaCl、250 mM咪唑, pH 7.5 ± 0.1对结合的VB6-008进行洗脱,并收集在5 mL的馏分中。确定每种馏分在A280 nm下的吸光率,并混合含有材料的馏分,且分别调节pH和电导率至6 和 5.8 mS。然后,将材料加到SP-琼脂糖凝胶柱上,使用20 mM 磷酸钠、25 mM NaCl pH 6.0 ± 0.1进行洗脱,并用20 mM磷酸钠, 300 mM NaCl pH 7.5 ± 0.1进行洗脱。将SP-琼脂糖凝胶柱的混合的馏分加到SEC-200柱上,其中SEC-200柱已经用20 mM磷酸钠、150 mM NaCl pH 7.5 ± 0.1平衡。使用centricon柱对含有全长VB6-011-Boug-2D3的馏分进行浓缩。

### 亲和力成熟的 VB6-011 的生物活性:

#### a. Boug 改性的流式细胞术验证

为了验证 VB6-011 2D3 boug 相对于野生型 VB6-011 boug 来讲具有增加的亲和力,用高 011 结合细胞系(Cal-27)和中到低结合的细胞系 PANC-1 进行流式细胞术分析。结果见图 11 和表 8 中。

#### b. 亲和力测量

使用流式细胞术测量 VB6-011-Boug 的亲和力。用固定数目的 Cal-27 细胞对高浓度的纯化 VB6-011-Boug 进行温育以建立饱和曲线。使用兔抗 - boug 来检测结合并与野生型 VB6-011 做对比。结合亲和力表达为解离常数,通过 Lineweaver-Burk 方法来计算  $K_D$ , 该方法将中值荧光的倒数作为抗体浓度倒数的函数来进行绘图。通过下面的等式来确定解离常数:

$1/F = 1/F_{Max} + (K_D/F_{Max})(1/[scFv])$ , 其中 F 对应于减去背景的中值荧光, 并且

$F_{Max}$  由图中计算得到。

#### **TMA:**

用固定的 saos-2 细胞系沉淀首先检测 VB6-011-Boug 以确定用于染色的最佳条件。然后进行 IHC。

#### **MTS 分析:**

使用 MTS 分析用抗原阳性细胞系、A-375 和 Saos-2 以及抗原阴性细胞系 Panc-1 来确定变异体的  $IC_{50}$  值。变异体的  $IC_{50}$  值被确定并与 VB6-011-Boug 野生型的做对比。

尽管本发明已通过当前认为的优选的实施例进行了描述，但应知晓本发明并不局限于这些公开的实施例。相反，本发明意在包括各种在本发明精神和后附的权利要求范围内的各种变形和替代的组合。

这里提及的所有的公开的内容、专利和专利申请均经引用而全部并入本文，正如每个独立公开的内容、专利和专利申请经引用而全部并入本文。

表 1: K 轻链的 CDR 区的氨基酸序列

亚类	CDR1	CDR2	CDR3	SEQ ID NOS:
2	QGLVYSDGNMY	KVSYRDS	QGTHWP	40-42
1	QDISKF	DASNVQT	VFIFPPSDEQL	43-45
1	QGISTY	AASTLQS	QKDNSDPRT	46-48
2	QSLNSNGNN	LGFNRAS	MQTLQIPYT	49-51
1	VRTLSNY	AAATLQR	LQYNSYPLT	52-54
1	VRV*LVI	ATSTLQS	QSYTTPYT	55-57
2	QSLVHSNEYNY	LGSNRAS	TQALQIPIT	58-60
1	QGISTY	AVSTLQS	QQLNSYPIT	61-63

\*-序列不清楚

表 2: V<sub>H</sub> 片段的 CDR 区的氨基酸序列

亚类	CDR1	CDR2	CDR3	SEQ ID NOS:
3	GFTFSSYA	AISGNNGRT	AKDRWGG SIVAAGGTGFDP	64-66
1	GYTFTGY Y	RINPNSGGT	ARDHSYGDSNW FDP	67-69
4	GGSISSGGYY	YIYYSGTT	SLKLSSVTAAD	70-72
3	GFTFSGSA	RIRTKANNYAT	TRHEWRGKEGDY	73-75
3	GFTFDDYA	GTSWNSATI	ARDMGSGWFTAFHI	76-78
1	VTPLPALI	ISAYKGNT	AREPMTTVTVDY	79-81
3	GFTFSNYA	GISGSGHST	AKSERAVTVILVVITGVYFDY	82-84
3	GFSFSNSG	LLSYDGVSK	ATDRARGYYDSGGAYFDY	85-87

表 3: 来自结肠免疫毒素文库的 FMAT 筛选结果

筛选步骤	筛选的克隆数	克隆阳性数	该步中被筛选的%	总共被筛选的%
第一次 FMAT	44,372	2016	4.5%	N/A
第二次 FMAT	2016	174	8.6%	0.4%
第三次 FMAT 阳性和阴性 细胞	174	8	4.5 %	0.02%

\*该文库最初含 520,000 个克隆, 此时有约 45000 被筛选

表 4: 基于结肠的免疫毒素文库中通过 FMAT 筛选的克隆

克隆	SW-480 (+)		CA-46 (-)	
	IC50 (MTS)	MFI	IC50 (MTS)	MFI
VB6-845ETA(252-608)	0.2pM	144	-	1.1
VB6-011ETA(252-608)	2.8nM		-	
VB6-A8ETA(252-608)	1.8nM	2.6	-	1.8
VB6-H10ETA(252-608)	1.85nM	3.5	-	1.1
VB6-H7ETA(252-608)	1.6nM	1.3	-	1.1
VB6-B1ETA(252-608)	0.7nM	5.3	-	1.1

表 5: VB6-011ETA(252-608)亲和力成熟轻链基序

轻链	CDR1 基序 1	CDR1 基序 2	CDR3 基序 1	CDR3 基序 2
WT	SES	SSS	QQY	GSS
VL-1	LKA	WYY	QQY	GGA
VL-2	LKA	WLE	LPC	GGA
VL-3	LKA	WYY	QQY	KRP
VL-4	LKA	WLE	LPC	KRP

表 6: VB6-011ETA(252-608)亲和力成熟重链基序

重链	CDR1	CDR2	CDR3
WT-VL2	S	STKY	S..GL
2D3	A	MCKS	Y..MM
11F11	T	GVKT	Y..TM
8E8	V	MCKS	G..DL
20A10	V	GVKT	S..LL

表 7: VB6-011ETA(252-608)的亲合力成熟的克隆的筛选结果

	CDR1	CDR2	CDR3	% 细胞凋亡 (FMAT)	ELISA OD 450	% M2 事件
WT-VL2	S	STKY	S..GL	17	0.7	28.5
2D3	A	MCKS	Y..MM	33.4	1.1	74.68
11F11	T	GVKT	Y..TM	29.9	0.708	49
8E8	V	MCKS	G..DL	26	0.403	55.3
20A10	V	GVKT	S..LL	20	0.454	35.76

表 8: 对 VB6-011-2D3 bouganin 的 %M2 流式细胞术

处理	Cal 27	Panc-1
VB6-845-Boug	235	20.4
VB6-011 WT Boug	13	2.1
VB6-011 2D3 Boug	170	9.5

### 参考文献

1. Molecular Immunology. Leeds, UK: Oxford University Press; 1996.
2. Fundamental Immunology.: Lippincott, Williams & Wilkins; 2003.
3. Arnold FH, Georgiou G. Directed Evolution Library Creation Methods and Protocols.: Humana Press; 2003.
4. Baldari C, Murray JA, Ghiara P, Cesareni G, Galeotti CL. A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 beta in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 1987;6:229-234.
5. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 1991;352:624-628.
6. Cullen D, Gray GL, Wilson LJ et al. Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus Nidulans*. Nat Biotech 1987;5:369-376.
7. Daugherty PS, Chen G, Iverson BL, Georgiou G. Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 2000;97:2029-2034.
8. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S. Antibody-antigen complexes. Annu.Rev.Biochem. 1990;59:439-473.
9. Flenniken ML, Liepold LO, Crowley BE et al. Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture. Chem Commun.(Camb.) 2005447-449.
10. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res 2004;32:W435-W440.
11. Goeddel DV. Systems for heterologous gene expression. Methods Enzymol. 1990;185:3-7.

12. Grossbard ML, Fidijs P. Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol.Immunopathol.* 1995;76:107-114.
13. Harada H, Kawano MM, Huang N et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993;81:2658-2663.
14. Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol.Biol.* 1992;226:889-896.
15. Heyzer-Williams MG. B cells as effectors. *Curr.Opin.Immunol.* 2003;15:354-361.
16. Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1978;75:1929-1933.
17. Ho M, Kreitman RJ, Onda M, Pastan I. In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *J Biol.Chem.* 2005;280:607-617.
18. Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 1983;153:163-168.
19. Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA. Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv.Pharmacol.* 1995;33:287-314.
20. Kaufman RJ, Murtha P, Davies MV. Translational efficiency of polycistronic mRNAs and their utilization to express heterologous genes in mammalian cells. *EMBO J* 1987;6:187-193.
21. Kaufmann D, Weberskirch R. Efficient synthesis of protein-drug conjugates using a functionalizable recombinant elastin-mimetic polypeptide. *Macromol.Biosci.* 2006;6:952-958.
22. Kreitman RJ. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr.Opin.Immunol.* 1999;11:570-578.
23. Kreitman RJ. Immunotoxins. *Expert.Opin.Pharmacother.* 2000;1:1117-1129.

24. Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K et al. Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N.Engl.J Med.* 2001;345:241-247.
25. Kurjan J, Herskowitz I. Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell* 1982;30:933-943.
26. Lewis JP, DeNardo GL, Denardo SJ. Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 1995;14:115-120.
27. Low NM, Holliger PH, Winter G. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol.Biol.* 1996;260:359-368.
28. Luckow VA, Summers MD. High level expression of nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 1989;170:31-39.
29. Min L. Applications of display technology in protein analysis. *Nat Biotech* 2000;18:1251-1256.
30. Neuberger MS, Milstein C. Somatic hypermutation. *Curr.Opin.Immunol.* 1995;7:248-254.
31. Salvatore G, Beers R, Margulies I, Kreitman RJ, Pastan I. Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. *Clin Cancer Res* 2002;8:995-1002.
32. Sambrook J, MacCallum P, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
33. Schier R, McCall A, Adams GP et al. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol.Biol.* 1996;263:551-567.

34. Schultz LD, Tanner J, Hofmann KJ et al. Expression and secretion in yeast of a 400-kDa envelope glycoprotein derived from Epstein-Barr virus. *Gene* 1987;54:113-123.
35. Seed B. An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* 1987;329:840-842.
36. Sinkar VP, White FF, Gordon MP. Molecular Biology of the RI Plasmid - A Review. *J.Biosci.* 1987;11:47-57.
37. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol.Cell Biol.* 1983;3:2156-2165.
38. Tait RC, Horton RM. Genetic Engineering with PCR. *Genetic Engineering with PCR.* Norfolk UK: Horizen Scientific Press; 1998:
39. Tomlinson IM, Cox JP, Gherardi E, Lesk AM, Chothia C. The structural repertoire of the human V kappa domain. *EMBO J* 1995;14:4628-4638.
40. Tomlinson IM, Walter G, Jones PT et al. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol.Biol.* 1996;256:813-817.
41. Uckun FM, Reaman GH. Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 1995;18:195-201.
42. Wagner SD, Milstein C, Neuberger MS. Codon bias targets mutation. *Nature* 1995;376:732.
43. Wahl RL. Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 1994;73:989-992.
44. Weissensteiner T, Griffin HG, Griffin A. PCR Technology: Current Innovations. Boca Raton, FL: CRC Press; 2004.

- 
45. Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S et al. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol.Biol.* 1995;254:392-403.
  46. Zambryski P, Herrera-Estrella L, DeBlock M, Van Montagu M. In: Setlow J, Hollaender A, eds. *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Vol 6. New York, NY: Plenum Press; 1984:253-278.
  47. Zhang Z, Gildersleeve J, Yang YY et al. A new strategy for the synthesis of glycoproteins. *Science* 2004;303:371-373.

- <110> 维文蒂阿生物技术股份有限公司  
艾德里安.施瓦兹.米特尔曼  
吉恩尼克.西兹尔尤  
尼古拉斯.R.格罗沃  
格伦.麦克唐纳
- <120> 融合蛋白库的产生和筛选方法及其应用
- <130> 10241-96
- <140>  
<141>
- <150> US 60/752,871  
<151> 2005-12-23
- <160> 88
- <170> 在版本 3.3 中的专利
- <210> 1  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> VH 011-2D3
- <400> 1

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

Ser Leu Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Arg Ala Phe  
20 25 30

Ala Met H 是 Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Met Cys Lys Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Thr Leu Leu Gly Asp Tyr Asp H 是 Tyr Tyr Met Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Lys Arg Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 2  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> VL 011-2D3

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Leu Lys Ala Val Trp Leu Glu  
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Met Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Pro Cys Gly Gly Ala Pro  
 85 90 95

Gln Thr Pro Gln Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 3  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)

---

<223> n = a 或者 g  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (30)..(30)  
 <223> n = a 或者 g  
 <400> 3  
 ccagccatgg cgcagntgca gctggtgcan tctgg 35

<210> 4  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n = c 或者 g

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (27)..(27)  
 <223> n = a 或者 g  
 <400> 4  
 ccagccatgg cgnaggtcca gctggtncag tctgg 35

<210> 5  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n = a 或者 g  
 <400> 5  
 ccagccatgg cgcagntcac cttgaaggag tctgg 35

<210> 6  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223> 引物

<220>

<221> 混杂特征

<222> (13)..(13)

<223> n = c 或者 g

<400> 6

ccagccatgg cgnaggtgca gctggtggag tctgg

35

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> 混杂特征

<222> (31)..(31)

<223> n = a 或者 t

<220>

<221> 混杂特征

<222> (33)..(33)

<223> n = c 或者 t

<400> 7

ccagccatgg cggaggtgca gctggtggag ncnng

35

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 8

ccagccatgg cgcaggtgca gctacagcag tgggg

35

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> 混杂特征

---

<222> (16)..(16)  
 <223> n = c 或者 g  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (33)..(33)  
 <223> n = c 或者 g  
  
 <400> 9  
 ccagccatgg cgcagntgca gctgcaggag tcngg 35  
  
 <210> 10  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n = a 或者 g  
  
 <400> 10  
 ccagccatgg cgcaggangt gcagctggtg cagtctgg 38  
  
 <210> 11  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 11  
 ccagccatgg cgcagcaggt acagctgcag cagtcagg 38  
  
 <210> 12  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <400> 12  
 tgccaggggg aagaccgatg ggcccttggg gctag 35  
  
 <210> 13  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (51)..(51)  
 <223> n = a 或者 t

<400> 13  
 tcgcggccca accggccatg gcgccaccatc atcaccatca cgacatccag ntgaccagt 60  
 ctcc 64

<210> 14  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 14  
 tcgcggccca accggccatg gcgccaccatc atcaccatca cgatggttg atgactcagt 60  
 ctcc 64

<210> 15  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (51)..(51)  
 <223> n = a 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (56)..(56)  
 <223> n = a 或者 g

<400> 15  
 tcgcggccca accggccatg gcgccaccatc atcaccatca cgaaattgtg ntgacncagt 60  
 ctcc 64

<210> 16  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	引物	
<400>	16	
	tcgcggccca accggccatg gcgcaccatc atcacatca cgatattgtg atgaccaca	60
	ctcc	64
<210>	17	
<211>	64	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	17	
	tcgcggccca accggccatg gcgcaccatc atcacatca cgaaacgaca ctcacgcagt	60
	ctcc	64
<210>	18	
<211>	64	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	18	
	tcgcggccca accggccatg gcgcaccatc atcacatca cgaaattgtg ctgactcagt	60
	ctcc	64
<210>	19	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	19	
	gcactcgagc tactaacact ctcccctggt gaagctcttt gtgacggg	48
<210>	20	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	20	
	gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat	30

<210> 21  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n = t, c 或者 g

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (23)..(24)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<400> 21  
 gtagctgcta ctaacnnct nnnnggcct gcagga

36

<210> 22  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (20)..(21)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (23)..(24)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<400> 22  
 gtaccaggct aagtannnnn nnnnaacact ctgact 36

<210> 23  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<400> 23  
 catgccagtg gccctnnngg atgcaccata 30

<210> 24  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>

<221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (20)..(21)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (23)..(24)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <400> 24  
 ctgaggtgag ctaccnnnnn nnnnacagta atacac

36

<210> 25  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (20)..(21)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <400> 25  
 aggtgtctga ggtgnnnnnn natactgctg aca  
  
  
 <210> 26  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n = a, c 或者 g  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <400> 26  
 ctctcctgca gggccnnna gnnngttagt agcagc

33

36

<223> 引物

<220>

<221> 混杂特征

<222> (16)..(17)

<223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>

<221> 混杂特征

<222> (18)..(18)

<223> n = g 或者 c

<220>

<221> 混杂特征

<222> (19)..(20)

<223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>

<221> 混杂特征

<222> (21)..(21)

<223> n = g 或者 c

<220>

<221> 混杂特征

<222> (22)..(23)

<223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>

<221> 混杂特征

<222> (24)..(24)

<223> n = g 或者 c

<400> 27

gccagtcaga gtgttnnnnn nnnntactta gcctgg

36

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<220>

<221> 混杂特征

<222> (16)..(17)

<223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>

<221> 混杂特征

<222> (18)..(18)

<223> n = g 或者 c

<400> 28

atctatggtg catccnnag ggccactggc

30

<210> 29  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(20)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = g 或者 c

<400> 29  
 gcagtgatt actgtnnnnn nnnnggtagc tcacct

36

<210> 30  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(20)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<400> 30  
 tactgtcagc agtatnnnnn nncacctcag aca 33

<210> 31  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 31  
 ctcgagtcac taacactctc ccctggtgaa gctctt 36

<210> 32  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 32  
 gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat 30

<210> 33  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (20)..(21)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <400> 33  
 gaccctagtgc atagcaaann ntctgaaggg gaatcc 36  
  
 <210> 34  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (17)..(18)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (23)..(24)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (25)..(25)  
 <223> n = g 或者 c  
  
 <220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (26)..(27)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t  
  
 <400> 34  
 cacggagtct gcgtannntt tnnnnmtcc atcatatgat ataac 45  
  
 <210> 35

<211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (20)..(21)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (49)..(49)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (50)..(51)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<400> 35  
 ttgccccag acgtccann ngtagtagtg gtcatagtca cccaacagnn nctgatctct 60

<210> 36  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(20)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n = g 或者 c

<400> 36  
 tctggattcc ccttcagann ntttgctatg cactgg 36

<210> 37  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (16)..(17)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (19)..(20)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (21)..(21)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (25)..(26)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (27)..(27)  
 <223> n = g 或者 c

<400> 37  
 atatcatatg atggannnnn naaannntac gcagactccg tgaag

45

<210> 38  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (13)..(14)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (43)..(44)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (45)..(45)  
 <223> n = g 或者 c

<220>  
 <221> 混杂特征  
 <222> (46)..(46)  
 <223> n 是 a, c, g, 或者 t

<400> 38  
 gcgagagatc agnnnctggt gggtgactat gaccactact acnnnntgga cgtctgg 57

<210> 39  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 39  
 cgatgggccc ttggtgctag ctgaagagac cgtgac 36

<210> 40  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 40  
 Gln Gly Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Met Tyr  
 1                   5                   10

<210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 41  
 Lys Val Ser Tyr Arg Asp Ser  
 1                   5

<210> 42  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 42

Gln Gly Thr H 是 Trp Pro  
 1 5

<210> 43  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 43

Gln Asp Ile Ser Lys Phe  
 1 5

<210> 44  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 44

Asp Ala Ser Asn Val Gln Thr  
 1 5

<210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 45

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 46

Gln Gly Ile Ser Thr Tyr  
 1 5

<210> 47  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 47

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人类

<400> 48

Gln Lys Asp Asn Ser Asp Pro Arg Thr  
1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人类

<400> 49

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Asn  
1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人类

<400> 50

Leu Gly Phe Asn Arg Ala Ser  
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人类

<400> 51

Met Gln Thr Leu Gln Ile Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 人类

<400> 52

Val Arg Thr Leu Ser Asn Tyr  
1 5

<210> 53  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人类

<400> 53

Ala Ala Ala Thr Leu Gln Arg  
1 5

<210> 54  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人类

<400> 54

Leu Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 55  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人类

<220>  
<221> 混杂特征  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<400> 55

Val Arg Val Xaa Leu Val Ile  
1 5

<210> 56  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人类

<400> 56

Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser  
1 5

<210> 57  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人类

<400> 57

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 58  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 58

Gln Ser Leu Val H 是 Ser Asn Glu Tyr Asn Tyr  
 1                   5                                   10

<210> 59  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 59

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
 1                   5

<210> 60  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 60

Thr Gln Ala Leu Gln Ile Pro Ile Thr  
 1                   5

<210> 61  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 61

Gln Gly Ile Ser Thr Tyr  
 1                   5

<210> 62  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 62

Ala Val Ser Thr Leu Gln Ser  
 1                   5

<210> 63  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 63

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Ile Thr  
1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> 人类

<400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> 人类

<400> 65

Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Arg Thr  
1 5

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> 人类

<400> 66

Ala Lys Asp Arg Trp Gly Gly Ser Ile Val Ala Ala Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Phe Asp Pro

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> 人类

<400> 67

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr  
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> 人类

<400> 68

Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
1 5

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

<213> 人类

<400> 69

Ala Arg Asp H 是 Ser Tyr Gly Asp Ser Asn Trp Phe Asp Pro  
1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 人类

<400> 70

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr  
1 5 10

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> 人类

<400> 71

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr  
1 5

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> 人类

<400> 72

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp  
1 5 10

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> 人类

<400> 73

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Ala  
1 5

<210> 74  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 74

Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr  
 1 5 10

<210> 75  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 75

Thr Arg H是 Glu Trp Arg Gly Lys Glu Gly Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 76  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 76

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala  
 1 5

<210> 77  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 77

Gly Thr Ser Trp Asn Ser Ala Thr Ile  
 1 5

<210> 78  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 78

Ala Arg Asp Met Gly Ser Gly Trp Phe Thr Ala Phe H是 Ile  
 1 5 10

<210> 79  
 <211> 8  
 <212> PRT

<213> 人类

<400> 79

Val Thr Pro Leu Pro Ala Leu Ile  
1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> 人类

<400> 80

Ile Ser Ala Tyr Lys Gly Asn Thr  
1 5

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> 人类

<400> 81

Ala Arg Glu Pro Met Thr Thr Val Thr Val Asp Tyr  
1 5 10

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> 人类

<400> 82

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> 人类

<400> 83

Gly Ile Ser Gly Ser Gly H 是 Ser Thr  
1 5

<210> 84

<211> 21

<212> PRT

<213> 人类

<400> 84

Ala Lys Ser Glu Arg Ala Val Thr Val Ile Leu Val Val Ile Thr Gly



Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val  
 35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile  
 50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly  
 65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser  
 85 90 95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly  
 100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu  
 115 120 125

Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile H 是 Gly  
 130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile  
 145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val  
 165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu  
 180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile H 是 Lys Ser  
 195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro  
 210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp  
 225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys  
 245 250

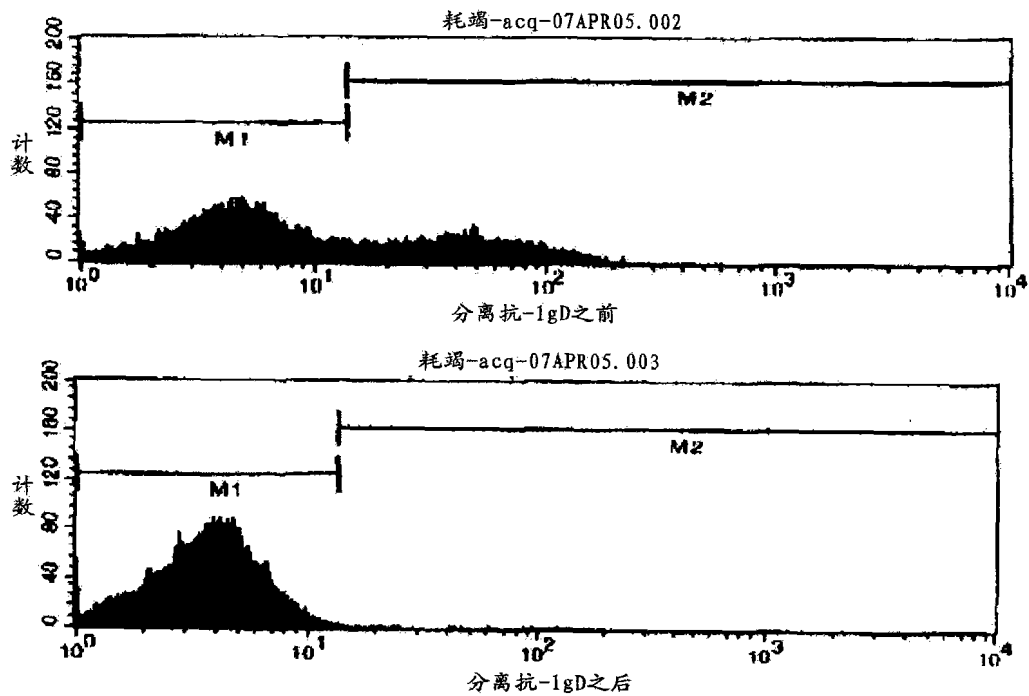


图1: B细胞的耗竭。从淋巴结中提取的细胞混合物在耗竭前(上图)和耗竭后(下图)用抗-IgD-FITC缀合物进行标记。活细胞的门控识别出两个群, M1和M2, 它们分别表示未标记和标记的细胞。

图 1

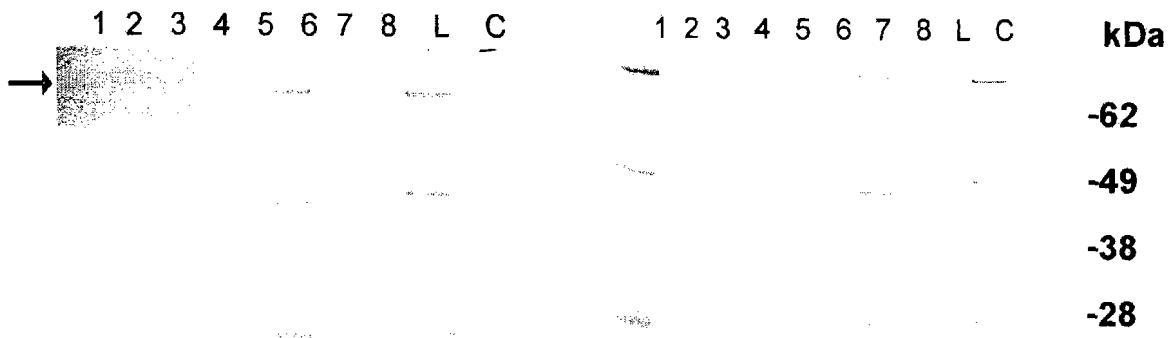


图2是免疫文库的诱导克隆的蛋白印迹分析。将在96孔板中生长并诱导的15个独立克隆的上清液16  $\mu$ L在非还原性条件下负荷到SDS-PAGE凝胶上并使用抗人 $\kappa$ 轻链-HRP抗体(1/1000)进行免疫印迹。L和C分别对应于梯和VB6-845-FAB-ETA<sub>(252-608)</sub>的诱导上清液。箭头表示约在75 kDa处迁移的全长抗体, 其通过克隆表达。

图 2

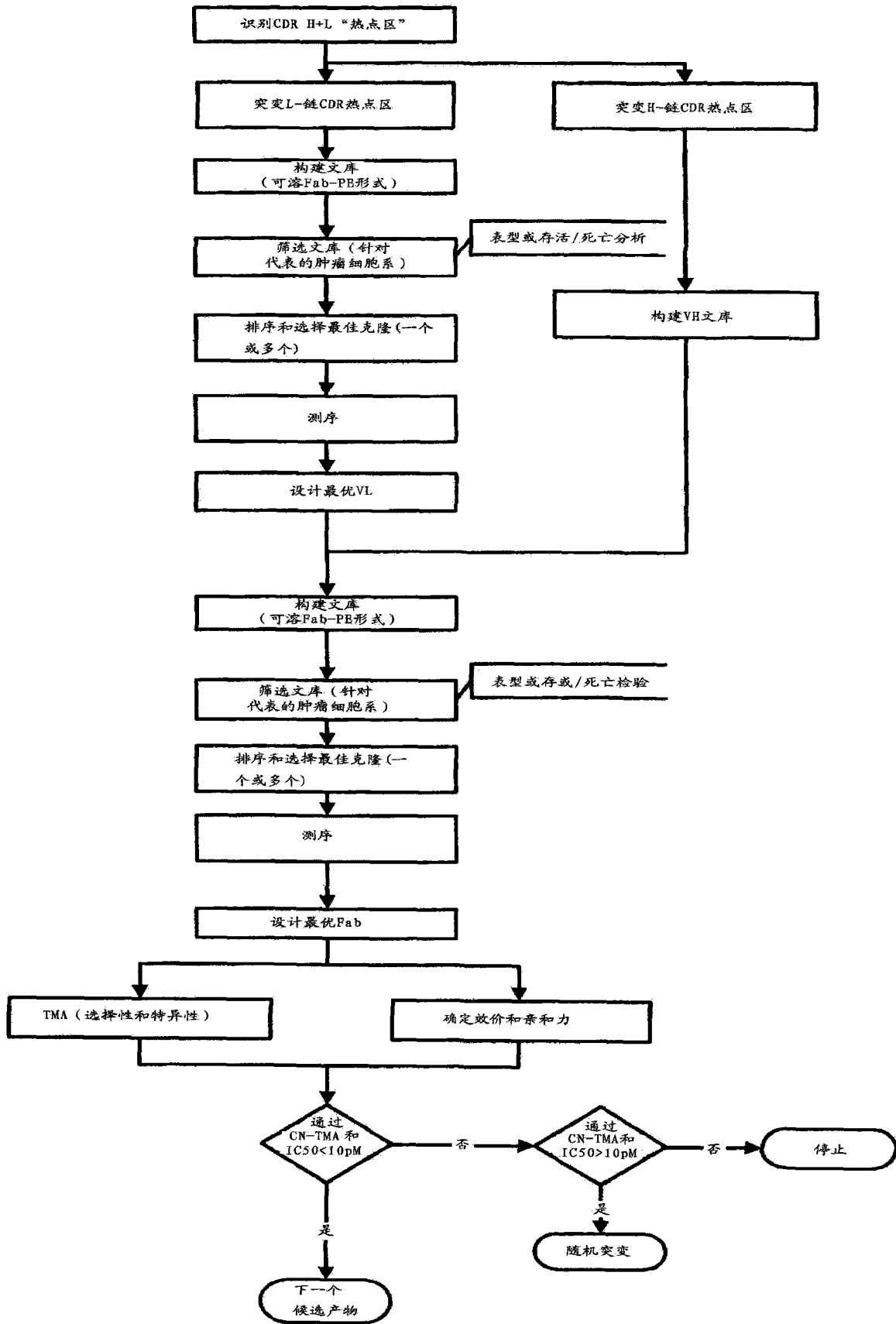


图 3

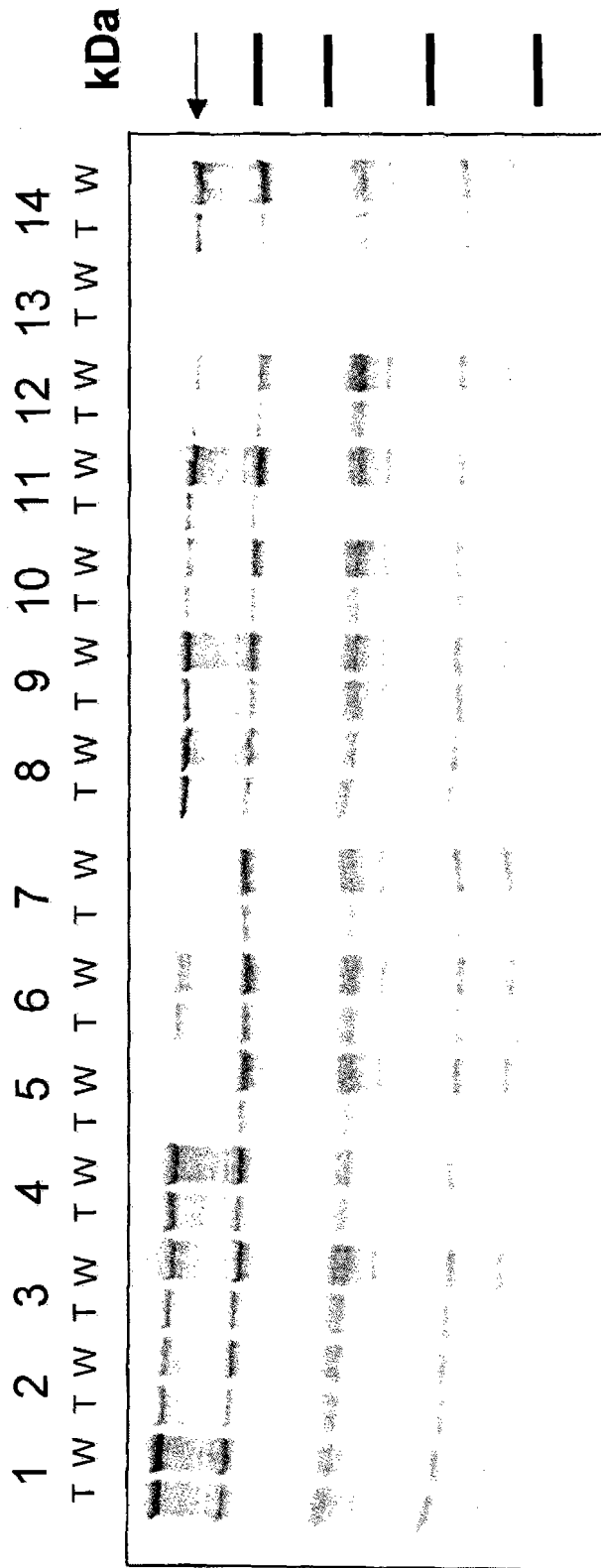


图 4

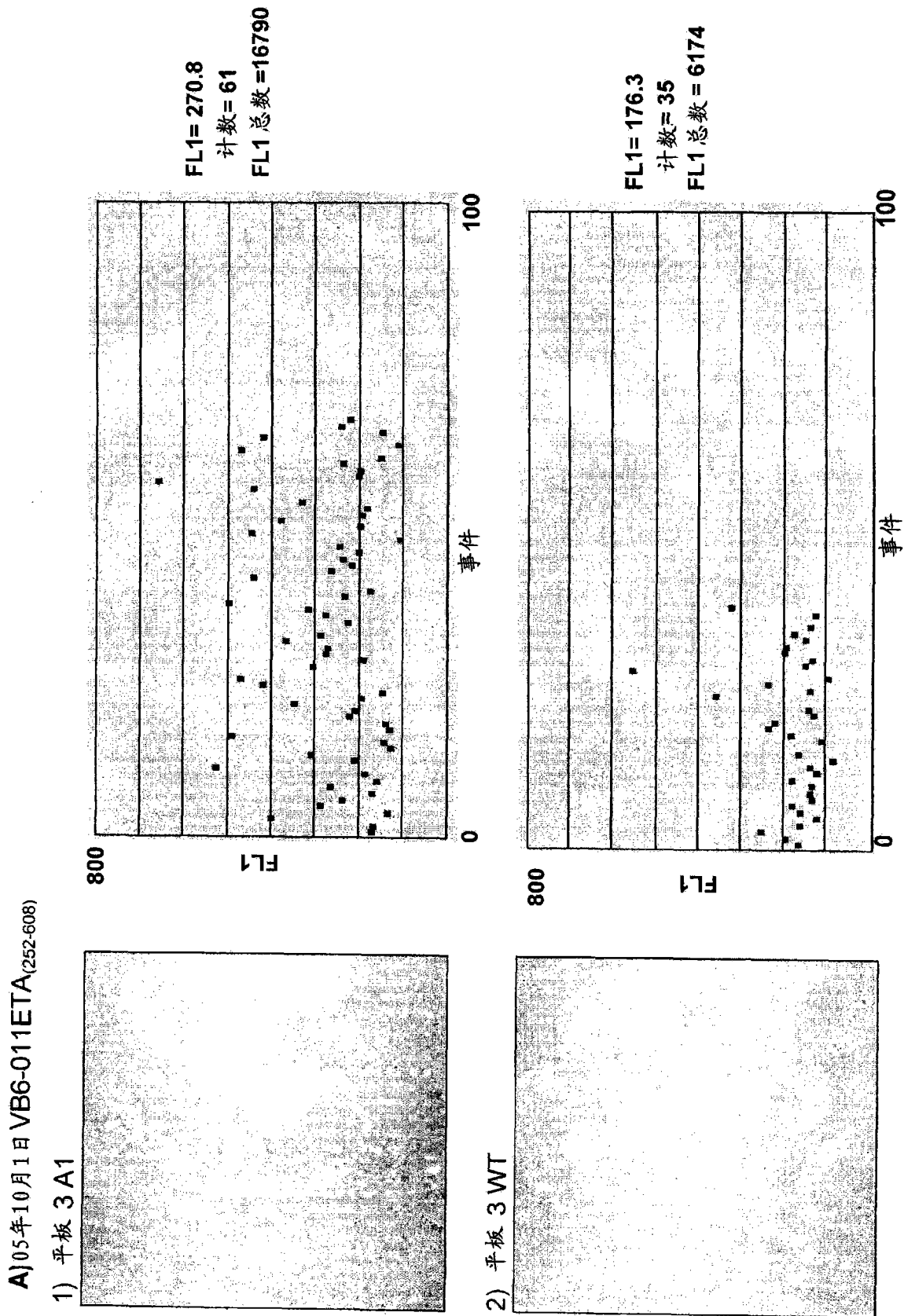


图 5A

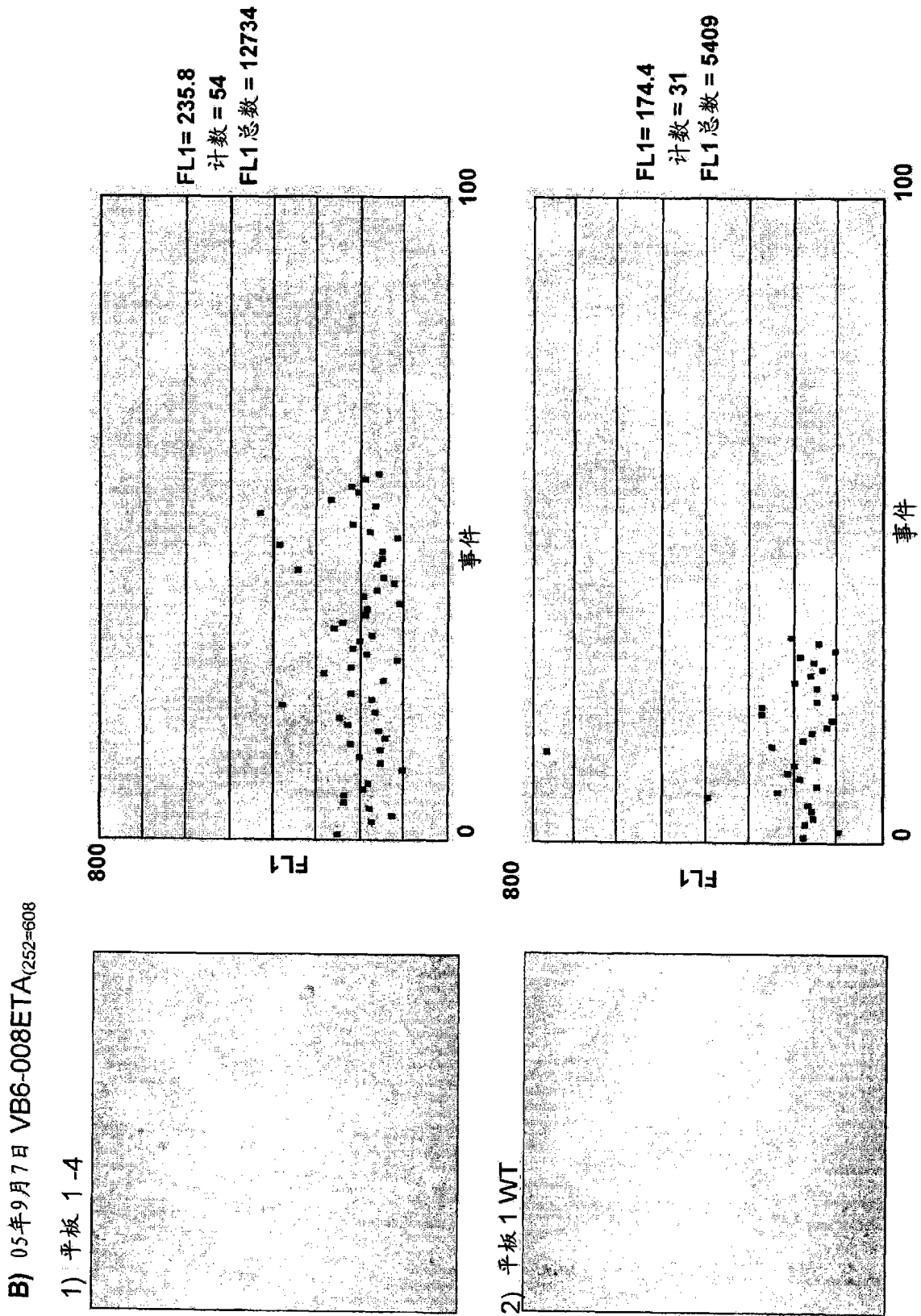


图 5B

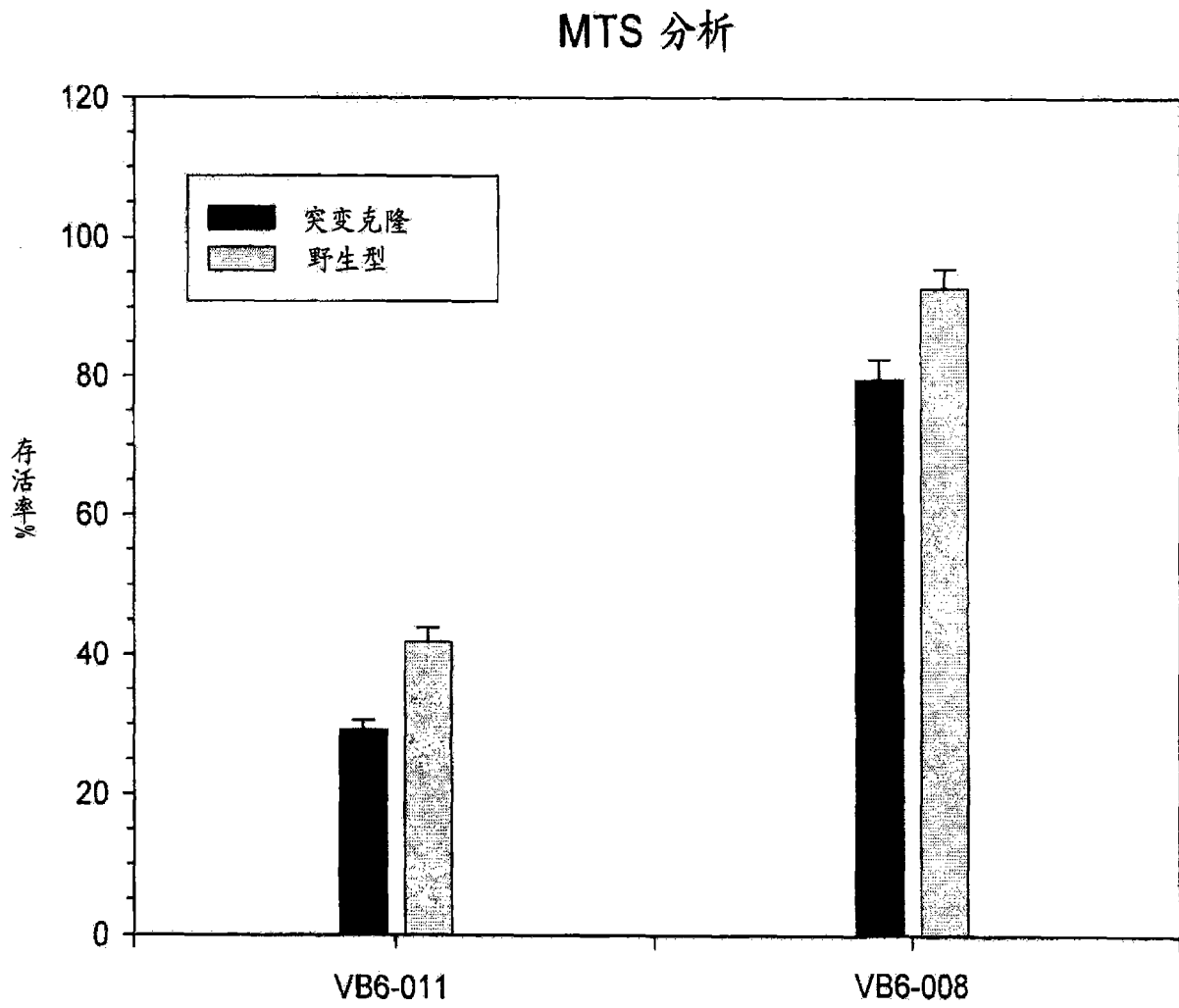
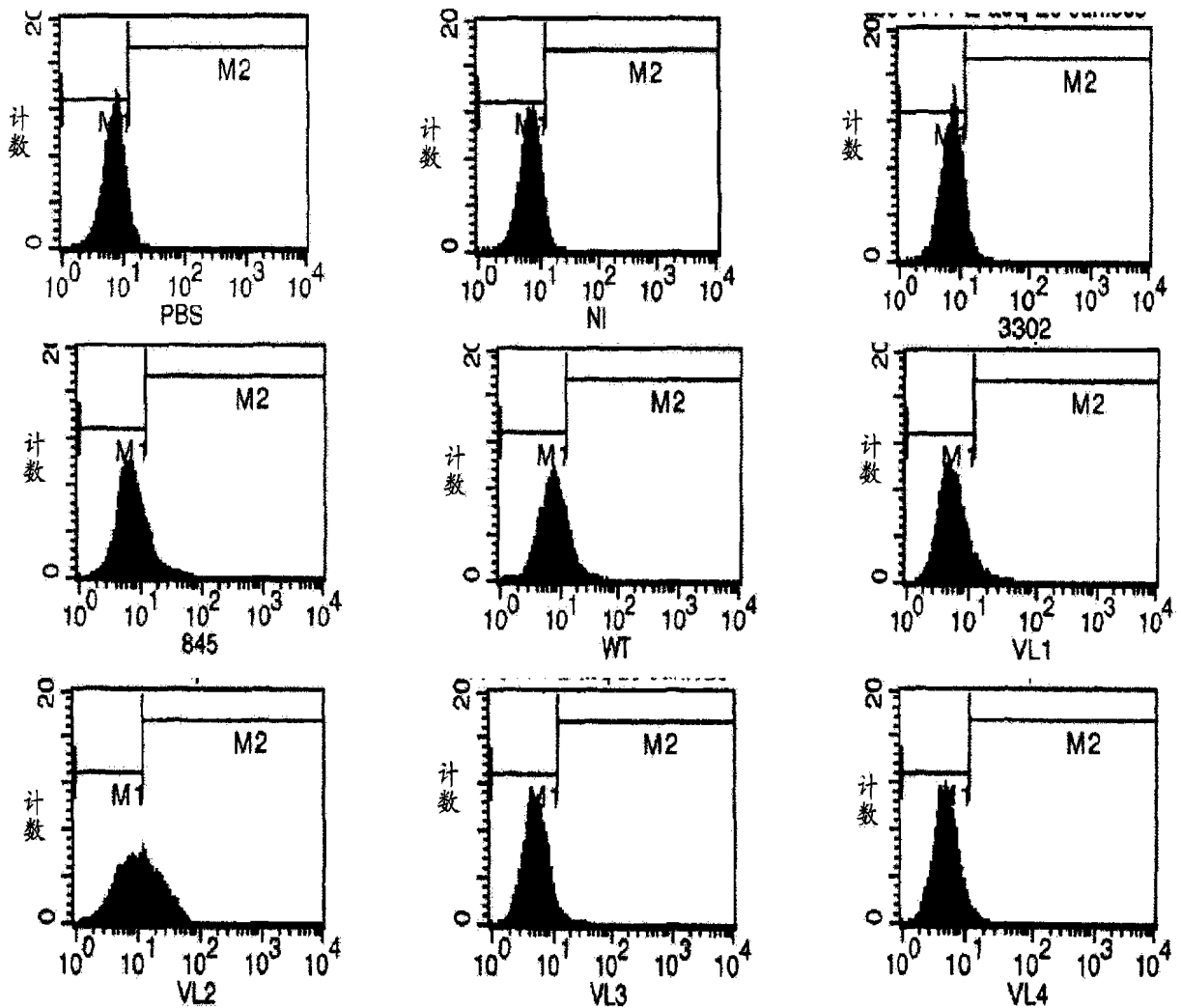


图 6



流式细胞分析VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>在A-375细胞上的亲和力成熟VL克隆的结合。NI=未诱导的大肠杆菌上清液，3302=用pING3302转化的大肠杆菌，845=VB6-845-ETA<sub>(252-608)</sub>的阴性对照，WT=原始VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>，具有亲和力成熟轻链的VL-1到VL-4 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>。

图 7

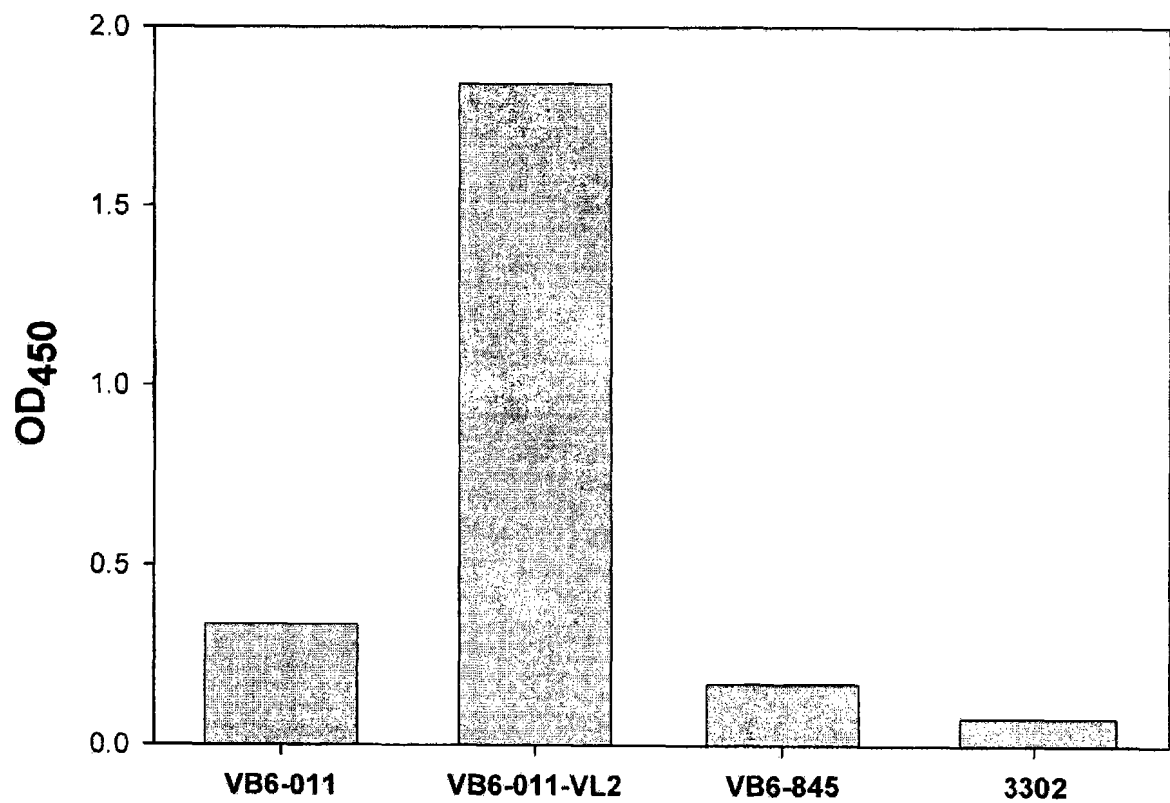
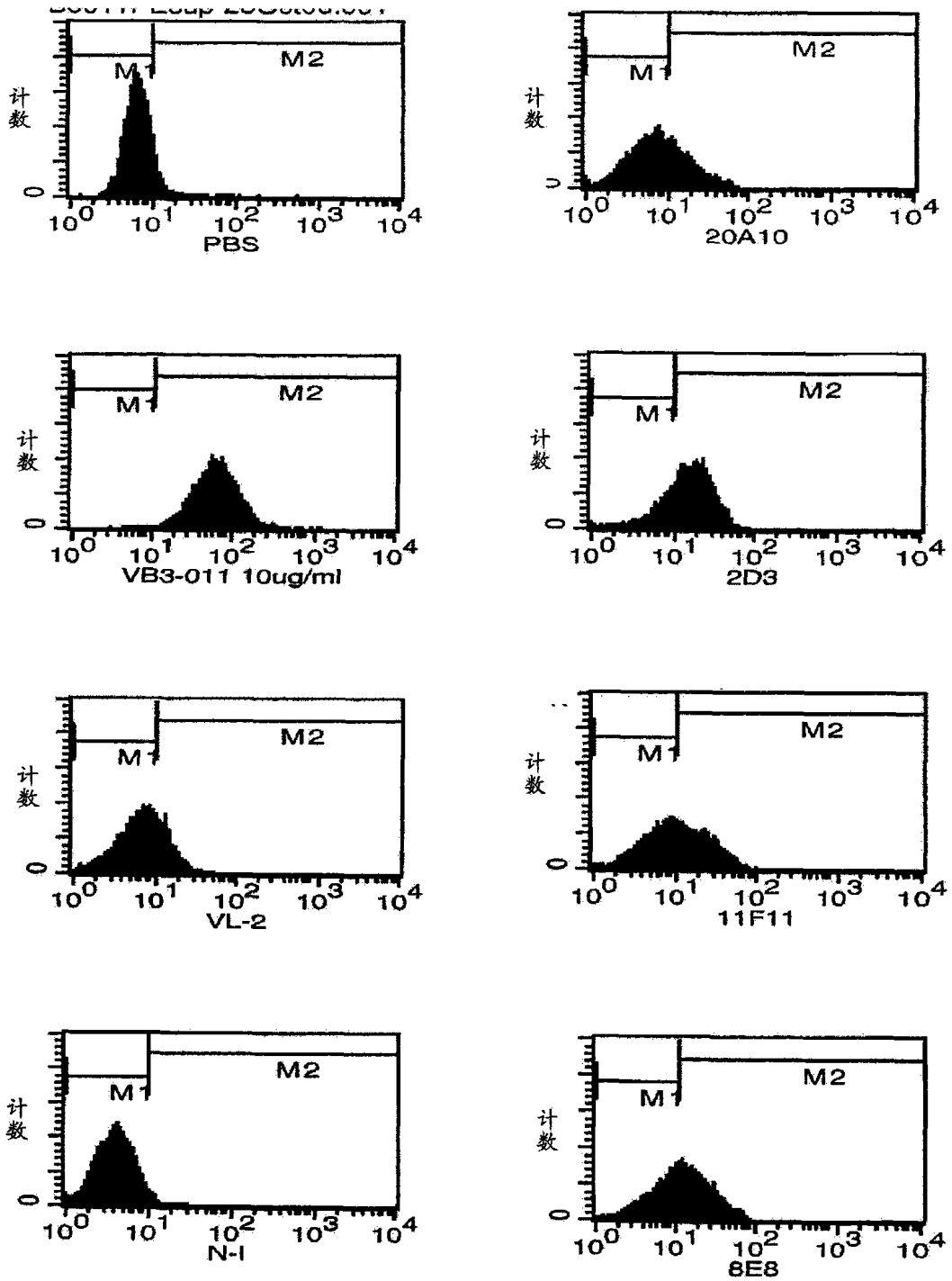


图 8

与野生型和对照相比，亲和力成熟的轻链VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>-VL2的CSA结合的ELISA。



VB6-011的亲力成熟的轻链和重链克隆的流式细胞计数。PBS阴性对照、VB3-011野生型亲代抗体、VL-2 VB6-011-ETA<sub>(252-608)</sub>野生型重链和亲和力成熟的轻链、来自未诱导的VL-2克隆的N-1上清液、具有亲和力成熟的轻(VL-2)和重链的20A10、2D3、11F11以及8E8各种克隆。

图 9

亲和力成熟的VB6-011 2D3序列

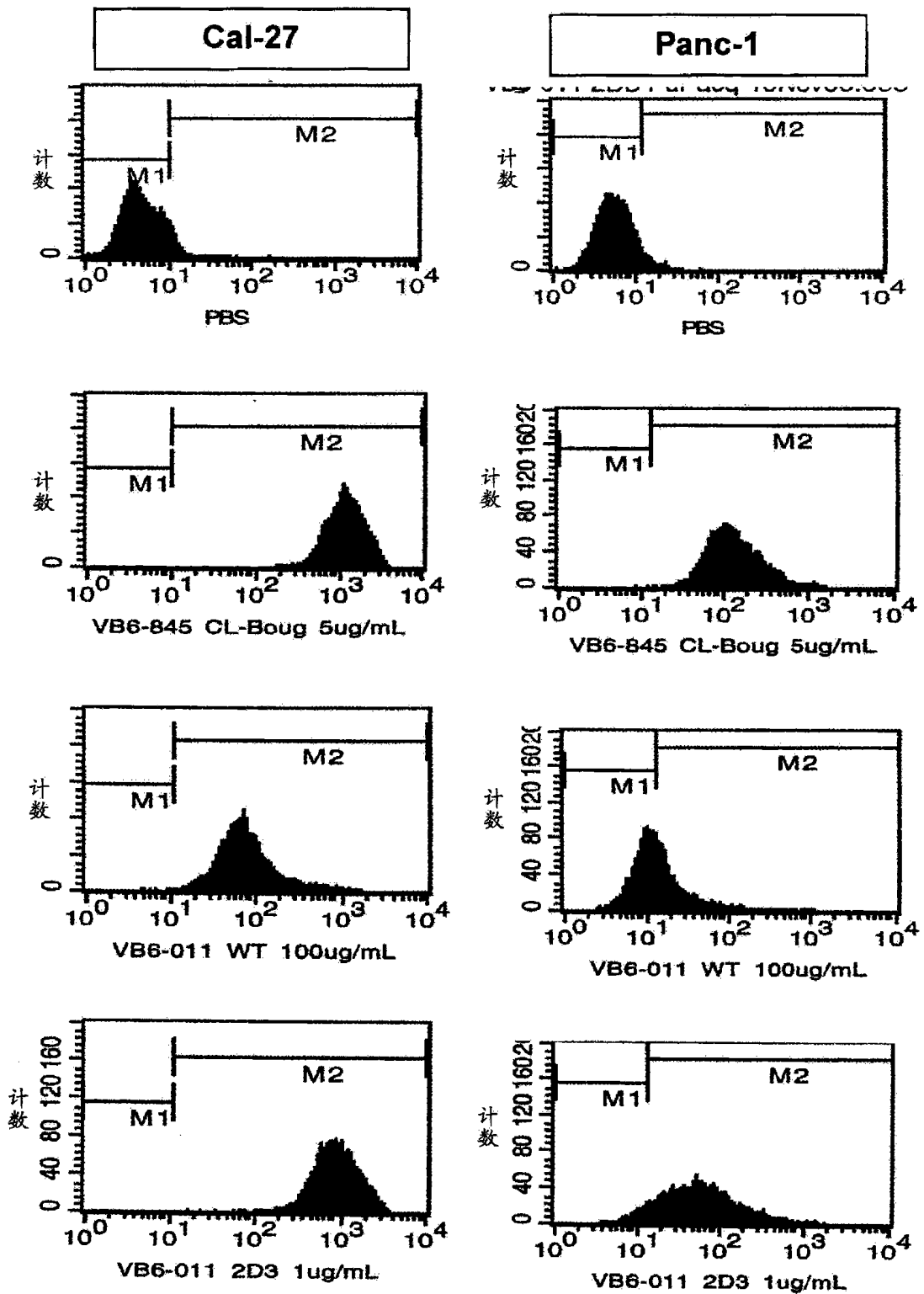
V<sub>H</sub>011-2D3

QVQLVESGGGVVQPGRSLGLSCAASGFPFRAFAMHWVRQALGKGLEWVAVI  
SYDGMCKSYADSVKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCARDQTLL  
GDYDHYYMMDVWGKRTTVTVSS

V<sub>L</sub>011-2D3

DIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRALKAVWLEYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS  
TRATGMPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCLPCGGAPQTPQITFGGG  
TKVEIKR

图 10



与亲代VB6-011和阳性对照VB6-845相比，优化亲和力成熟的VB6-011 2D3 boug的结合的流式细胞分析。

图 11

专利名称(译)	融合蛋白文库的产生和筛选方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101389791A</a>	公开(公告)日	2009-03-18
申请号	CN200680053419.7	申请日	2006-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	维文蒂阿生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	维文蒂阿生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	维文蒂阿生物技术股份有限公司		
[标]发明人	艾德里安施瓦兹米特尔曼 吉恩尼克西兹尔尤 尼古拉斯R格罗沃 格伦麦克唐纳		
发明人	艾德里安·施瓦兹·米特尔曼 吉恩尼克·西兹尔尤 尼古拉斯·R·格罗沃 格伦·麦克唐纳		
IPC分类号	C40B40/02 C07K16/00 C07K19/00 C12N15/09 C12N15/62 C12P21/02 C40B30/04 C40B40/10 C40B50/06 G01N33/53 G01N33/554 C12N15/63		
CPC分类号	C07K2317/55 C07K16/30 C12N15/1034 C07K2317/565 C07K2319/55 C12P21/02 G01N33/5014 C40B30/04 C07K2316/95 C07K2317/21 C12N15/1086 C07K2319/00 C07K2317/92 C07K2317/56 A61P35/00 A61P43/00		
代理人(译)	武晶晶		
优先权	60/752871 2005-12-23 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了制备融合蛋白文库如免疫毒素文库的方法。本发明还涉及编码包括融合蛋白的核酸序列的重组细胞文库。此外，本发明还涉及所述文库本身以及使用所述文库筛选对靶细胞，如癌细胞特异的融合蛋白。并且，本发明涉及改进融合蛋白的方法及改进的融合蛋白。

