



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102227638 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 26

(21) 申请号 200980147651. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 09. 30

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/101471 2008. 09. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/059057 2009. 09. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02010/039850 EN 2010. 04. 08

(71) 申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 C·谢 Y·A·库茨科瓦

J·E·梅莫特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 郭文洁

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图 25 页

(54) 发明名称

RNA 展示的改良方法

(57) 摘要

本发明的特征在于体外 RNA 展示的改良方法,以允许从表达文库中可靠表达和选择 scFv 抗体分子。改良方法部分涉及温和还原条件的使用,这有利于 scFv 链内二硫键且从而有利于 scFv 抗体分子的正确折叠。尽管特别适合于表达和选择 scFv 抗体分子,但本发明的方法对于所有类别蛋白质的体外 RNA 展示也是有利的。

1. 一种筛选 scFv 抗体 RNA 展示文库的方法,所述方法包括步骤:
 - (a) 提供嘌呤霉素或其类似物交联的单链 Fv (scFv) mRNA 分子,所述分子包括编码 5' scFv 和 3' 间隔区序列的 mRNA,所述分子与单链核酸接头交联,所述接头包括在 3' 末端上的嘌呤霉素或其类似物和在 5' 末端上的补骨脂素 C6;
 - (b) 在标记的存在下,在使得形成标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子条件下,体外翻译所述嘌呤霉素交联的 scFv mRNA;
 - (c) 纯化所述标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子;
 - (d) 用至少一种抗原对所述纯化的标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子实施抗原选择;和
 - (e) 使用基于亲和力的磁珠回收所述纯化的标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。
2. 权利要求 1 的方法,其进一步包括步骤(g)在抗原选择后使所述 scFv mRNA 逆转录,以制备 cDNA。
3. 权利要求 2 的方法,其进一步包括步骤(h)扩增所述 cDNA。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述标记是放射性标记。
5. 权利要求 4 的方法,其中所述标记是 ³⁵S 甲硫氨酸或半胱氨酸。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述 3' 间隔区序列包括约 0 - 约 200 个氨基酸。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述 3' 间隔区序列包括约 16 个氨基酸。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述 3' 间隔区序列包括亲和标记。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述核酸接头从 5' 到 3' 包括:
 - 补骨脂素 C6;
 - 包括序列 UAGCGGAUGC (SEQ ID NO:20) 的 2' OMe 核糖核苷酸;
 - 6 个三甘醇或 PEG-150 部分;
 - 2 个脱氧胞苷残基;和
 - 嘌呤霉素。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述 scFv mRNA 分子通过 UVA 与所述 DNA 接头光交联。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述 scFv mRNA 分子包括选自 T7、SP6 和 T3 的 5' 启动子。
12. 权利要求 1 的方法,其中所述 scFv mRNA 分子包括烟草花叶病毒 5' 非翻译区。
13. 权利要求 1 的方法,其中通过寡脱氧胸苷酸层析纯化所述标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。
14. 权利要求 1 的方法,其中使用抗 FLAG M2 单克隆抗体琼脂糖珠纯化所述标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。
15. 权利要求 1 的方法,其中通过寡脱氧胸苷酸层析和抗 FLAG M2 单克隆抗体琼脂糖珠纯化所述标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。
16. 权利要求 1 的方法,其中所述抗原是生物素化肽、蛋白质或半抗原。
17. 权利要求 1 的方法,其中所述抗原是具有人免疫球蛋白可结晶片段(Fc)的融合蛋白。
18. 权利要求 1 的方法,其中所述抗原是具有鼠免疫球蛋白可结晶片段(Fc)的融合蛋白。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述抗原是生物素化肽、蛋白质或半抗原。
20. 权利要求 1 的方法,其中所述抗原是细胞群体。
21. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体是抗 IL-12 抗体。
22. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体是抗 HA 抗体。
23. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体是鼠抗体。
24. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体是人抗体。
25. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体是人源化抗体。
26. 权利要求 1-24 中任一项的方法,其中另外在 GSSH/GSH 的存在下执行所述嘌呤霉素交联的 scFv mRNA 的体外翻译。
27. 权利要求 26 的方法,其中另外在蛋白质二硫键异构酶(PDI) 的存在下执行所述嘌呤霉素交联的 scFv mRNA 的体外翻译。
28. 权利要求 1-24 中任一项的方法,其中另外在不存在二硫苏糖醇的情况下执行所述嘌呤霉素交联的 scFv mRNA 的体外翻译。
29. 权利要求 27 的方法,其中另外在不存在二硫苏糖醇的情况下执行所述嘌呤霉素交联的 scFv mRNA 的体外翻译。
30. 权利要求 1 的方法,其中所述方法不包括 mRNA 加帽步骤。
31. 权利要求 1 的方法,其中所述方法不包括在所述纯化步骤前的体外逆转录步骤。
32. 权利要求 1 的方法,其中在步骤(a)到(g)中的任何一个之前、期间或之后添加 RNA 酶抑制剂。
33. 权利要求 1 的方法,其中所述纯化步骤包括在不存在二硫苏糖醇(DTT)的情况下的所述 mRNA 逆转录,以产生 cDNA。
34. 权利要求 2 或 33 的方法,其中通过在约 pH=8.0 - 约 pH=10.0 的碱水解洗脱所述 cDNA。
35. 权利要求 2 或 33 的方法,其中通过热洗脱所述 cDNA。
36. 权利要求 2 或 33 的方法,其中通过在约 pH=3.0 - 约 pH=6.0 的酸洗脱所述 cDNA。
37. 权利要求 33 的方法,其中通过聚合酶链反应扩增所述 cDNA。
38. 权利要求 37 的方法,其中所述聚合酶链反应采用热稳定的 DNA 聚合酶。
39. 权利要求 37 的方法,其中所述聚合酶链反应采用选自 Platinum HiFi 和 KOD 的扩增酶。
40. 权利要求 1 的方法,其中所述珠选自链霉抗生物素蛋白 -M280、中性抗生物素蛋白 -M280、SA-M270、NA-M270、SA-MyOne、NA-MyOne、SA- 琼脂糖、和 NA- 琼脂糖。

RNA 展示的改良方法

[0001] 相关申请

本申请要求于 2008 年 9 月 30 日提交的美国临时申请号 61/101471 的优先权,其内容在此引入作为参考。

发明领域

[0002] 本公开内容涉及 RNA 展示,且具体涉及允许选择可溶性和细胞表面抗原的 RNA 展示方法。

[0003] 发明背景

可以选择以高特异性和亲和力与几乎任何结构表位结合的抗体且将其常规用作研究工具和 FDA 批准的治疗剂。因此,治疗用和诊断用单克隆抗体构成全世界数十亿美元的市场。

[0004] 使动物免疫接种以获得抗体的传统方法是缓慢且麻烦的。因此,已开发了使用合成抗体文库用于先体外后体内选择针对所需靶分子的抗体的方法。在一些方法中,抗体或其片段的文库展示在生物的表面, (例如,噬菌体、病毒、酵母细胞、细菌细胞或哺乳动物细胞),并且就所需抗体的表达选择生物。在其他方法中,在无细胞体外系统中表达且选择抗体文库。在称为 RNA 展示的一个此种系统中,所表达的蛋白质或肽与其编码 mRNA 共价或通过紧密的非共价相互作用连接,以形成 RNA/蛋白质融合分子。可以就与所需靶的结合选择 RNA/蛋白质融合物的蛋白质或肽组分,并且通过测序所附着的编码 mRNA 组分来测定蛋白质或肽的特性。

[0005] 目前的体外 RNA 展示系统尽管善于表达单个抗体可变结构域,但在表达多结构域抗体例如单链抗体(scFv)分子方面无效。这主要是由于目前的体外表达系统的反应条件和通过经由 PCR 的反复扩增丧失来自文库的全长 scFv cDNA 的趋势。

[0006] 因此,本领域需要改良的体外展示方法用于选择针对所需靶的 scFv 抗体。

[0007] 发明概述

本发明通过提供改良的体外 RNA 展示方法解决了前述问题,以允许从表达文库中可靠表达和选择 scFv 分子。尽管特别适合于表达和选择 scFv 分子,但本发明的方法对于所有类别蛋白质的体外展示也是有利的,包括可溶性和细胞表面抗原。

[0008] 因此,本发明具有几个优点,这包括但不限于提供改良的体外 RNA 展示方法,其执行比先前描述的方法更简单且更不耗时。此外,本发明的方法允许含链内二硫键的蛋白质例如 scFv 抗体分子增强的功能表达。

[0009] 在一个方面,本发明提供了筛选 scFv 抗体 RNA 展示文库的方法,该方法包括步骤 (a) 提供嘌呤霉素或其类似物交联的 scFv mRNA 分子,所述分子包括编码 5' scFv 和 3' 间隔区序列的 mRNA,所述分子与单链核酸接头交联,所述接头包括在 3' 末端上的嘌呤霉素或其类似物和 5' 末端上的补骨脂素 C6 ;(b)在标记的存在下,在 GSSG(氧化谷胱甘肽)/GSH(还原谷胱甘肽)和 PDI(蛋白质二硫键异构酶)的存在下和在不存在二硫苏糖醇的情况下,在使得形成标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/蛋白质分子的情况下,体外翻译嘌呤霉素交

联的 scFv mRNA ;(c)纯化标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子 ;(d)用至少一种抗原对纯化的标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子实施抗原选择 ;和(e)使用基于亲和力的磁珠回收纯化的标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。

[0010] 在一个实施方案中,该方法进一步包括步骤(g)在抗原选择后使 scFv mRNA 逆转录,以制备 cDNA。在另一个实施方案中,该方法进一步包括步骤(h)扩增 cDNA。

[0011] 在一个实施方案中,标记是放射性标记,例如 ^{35}S 甲硫氨酸或半胱氨酸。

[0012] 在一个实施方案中,3' 间隔区序列包括约 0 - 约 200 个氨基酸,例如约 16 个氨基酸,和 / 或 3' 间隔区包括亲和标记。

[0013] 在一个实施方案中,接头从 5' 到 3' 包括 :补骨脂素 C6、包括序列 UAGCGGAUGC(SEQ ID NO :20) 的 2' OMe 核糖核苷酸、6 个三甘醇或 PEG-150 部分、2 个胞苷残基和嘌呤霉素。

[0014] 在一个实施方案中,scFv mRNA 分子通过 UVA 与 DNA 接头光交联。在另一个实施方案中,scFv mRNA 分子包括选自 T7、SP6 和 T3 的 5' 启动子。在具体实施方案中,scFv mRNA 分子包括烟草花叶病毒 5' 非翻译区。

[0015] 在一个实施方案中,通过寡脱氧胸苷酸层析纯化标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。在另一个实施方案中,使用抗 FLAG M2 单克隆抗体琼脂糖珠纯化标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。在另外一个实施方案中,通过寡脱氧胸苷酸层析和抗 FLAG M2 单克隆抗体琼脂糖珠纯化标记的嘌呤霉素交联的 scFv mRNA/ 蛋白质分子。

[0016] 在一个实施方案中,抗原是生物素化肽、蛋白质或半抗原。在另一个实施方案中,抗原是具有人免疫球蛋白可结晶片段(Fc)或具有鼠免疫球蛋白可结晶片段(Fc)的融合蛋白,或抗原是细胞群体。在具体实施方案中,根据本发明的抗体是抗 IL-12 抗体、抗血凝素(抗 HA)抗体、鼠抗体或人抗体。

[0017] 在一个实施方案中,在 GSSH/GSH 的存在下执行嘌呤霉素交联的 scFv mRNA 的体外翻译。

[0018] 在一个实施方案中,该方法不包括 mRNA 加帽步骤。在另一个实施方案中,该方法不包括在纯化步骤前的体外逆转录步骤。在另外一个实施方案中,在步骤(a)到(g)中的任何一个之前、期间或之后添加 RNA 酶抑制剂。在一个实施方案中,纯化步骤包括在不存在二硫苏糖醇(DTT)的情况下的 mRNA 逆转录,以产生 cDNA。

[0019] 在特定实施方案中,通过在约 pH=8.0 - 约 pH=10.0 的碱水解洗脱 cDNA。可替代地,通过足以使 DNA:RNA 杂交物(hybrids)变性的热、通过在约 pH=3.0 - 约 pH=6.0 的酸、或通过 RNA 酶 H 消化洗脱 cDNA。

[0020] 在一个实施方案中,通过聚合酶链反应扩增 cDNA。在一个实施方案中,聚合酶链反应采用热稳定的 DNA 聚合酶或选自 Platinum HiFi 和 KOD 的 DNA 聚合酶。

[0021] 在另一个实施方案中,珠选自链霉抗生物素蛋白 -M280、中性抗生物素蛋白(neutravidin) -M280、SA-M270、NA-M270、SA-MyOne、NA-MyOne、SA- 琼脂糖、和 NA- 琼脂糖。

[0022] 本发明的其他特征和优点根据下述详述和权利要求将是显而易见的。

[0023] 附图简述

图 1 描述了在本发明的一些实施方案中关于 mRNA-scFv 展示技术的一般方案。

[0024] 图 2 描述了在本发明的其他实施方案中关于 mRNA-scFv 展示技术的一般方案。

[0025] 图 3 描述了文库 DNA 构建体的一般描述。

- [0026] 图 4a 描述了显示功能性 scFv 可以作为 mRNA-scFv 分子生成的结果。
- [0027] 图 4b 描述了游离 scFv 分子和 mRNA-scFv 分子的模型。
- [0028] 图 5 描述了显示在 mRNA-scFv 分子形式中附着的 scFv 在功能上等价于游离 scFv 分子的结果。
- [0029] 图 6 描述了具有不同 3' 间隔区长度的 3 种 D2E7 mRNA-scFv 构建体。
- [0030] 图 7 描述了显示较短的间隔区长度改善 mRNA-scFv 与抗原的结合和 mRNA-scFv 抗体分子得率的结果。
- [0031] 图 8 描述了 D2E7 短、中等和长 Ck 3' 间隔区的序列 (SEQ ID NOS 42-44, 分别按出现的次序)。
- [0032] 图 9a 描述了具有短和长间隔区长度的 17/9 mRNA-scFv 构建体。
- [0033] 图 9b 描述了显示较短的间隔区长度改善 17/9 mRNA-scFv 分子与靶抗原的结合和 mRNA-scFv 抗体分子得率的结果。
- [0034] 图 10 描述了显示 PDI 活性是一些 scFv 功能所需的结果。
- [0035] 图 11 描述了显示在逆转录过程中 DTT 的存在抑制 17/9 scFv 与血凝素 (HA) 抗原的结合的结果。
- [0036] 图 12 描述了显示 DTT 不显著改变逆转录过程的琼脂糖凝胶电泳结果。
- [0037] 图 13 描述了在选择前和后来自具有或不具有 DTT 和 RNaseOUT™ 的不同 RT 条件的琼脂糖凝胶电泳结果。
- [0038] 图 14 描述了显示与选择前 RT 和 cDNA 的碱洗脱 (左泳道) 相比较, 在选择前或后逆转录时, Phyllos 40 VH 序列的回收的琼脂糖凝胶电泳结果。
- [0039] 图 15 描述了显示在抗原选择后 RNA 酶抑制剂保存通过逆转录的 RNA 模板回收的琼脂糖凝胶电泳结果。
- [0040] 图 16 描述了在 RNaseOUT™ 的存在或不存在下, CL- 长和 CL- 短间隔区的并排比较结果。
- [0041] 图 17 描述了显示在 RNaseOUT™ 的存在或不存在下, CL- 长和 CL- 短间隔区回收的并排比较的琼脂糖凝胶电泳结果。
- [0042] 图 18 描述了在一轮 mRNA-scFv 选择前和后, 定量 17/9 scFv 的琼脂糖凝胶电泳结果。
- [0043] 图 19 描述了在 D2E7 和 2SD4 之间的嵌合体的一般描述。
- [0044] 图 20a 描述了在不同嵌合体之间在抗原结合后的回收百分比, 从而显示 mRNA 展示技术可以用于区别具有不同亲和力的结合剂。
- [0045] 图 20b 描述了在抗原选择后标准化的回收百分比, 从而显示 mRNA 展示技术可以用于区别具有不同亲和力的结合剂。
- [0046] 图 21 描述了 mRNA-scFv 分子的热稳定性。
- [0047] 图 22 描述了显示 RNA 可以在 mRNA-scFv 分子的高温处理后回收的琼脂糖凝胶电泳结果。
- [0048] 图 23 描述了具有短和长间隔区长度的 mRNA-scFv Y61 构建体以及在 mRNA 和 scFv 蛋白质之间的 DNA 接头上包括聚腺苷酸尾的 PF-y61scGene3 构建体。
- [0049] 图 24 描述了在本发明的其他实施方案中关于 mRNA-scFv 展示技术的一般方案。

[0050] 发明详述

序列标识号

说明书中提及的核苷酸和氨基酸序列已给予下述序列标识号：

SEQ ID NO:1 - MAK195 scFv 蛋白质序列的氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO:2 - Y61 scFv 短蛋白质序列的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:3 - Y61 scFv 长蛋白质序列的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:4 - Y61 scFv Gene3 蛋白质序列的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID NO:5 - D2E7 scFv 短蛋白质序列的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:6 - D2E7 scFv 中等蛋白质序列的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID NO:7 - D2E7 scFv 长蛋白质序列的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:8 - 17/9 scFv 短蛋白质序列的氨基酸序列。

[0058] SEQ ID NO:9 - 17/9 scFv 长蛋白质序列的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID NO:10 - MAK195 scFv 核苷酸序列的核酸序列。

[0060] SEQ ID NO:11 - Y61 scFv 短核苷酸序列的核酸序列。

[0061] SEQ ID NO:12 - Y61 scFv 长核苷酸序列的核酸序列。

[0062] SEQ ID NO:13 - Y61 scFv Gene3PA 核苷酸序列的核酸序列。

[0063] SEQ ID NO:14 - Y61 scFv Gene3 核苷酸序列的核酸序列。

[0064] SEQ ID NO:15 - D2E7 scFv 短核苷酸序列的核酸序列。

[0065] SEQ ID NO:16 - D2E7 scFv 中等核苷酸序列的核酸序列。

[0066] SEQ ID NO:17 - D2E7 scFv 长核苷酸序列的核酸序列。

[0067] SEQ ID NO:18 - 17/9 scFv 短核苷酸序列的核酸序列。

[0068] SEQ ID NO:19 - 17/9 scFv 长核苷酸序列的核酸序列。

[0069] 为了本发明可以更容易理解,首先定义了特定术语。

[0070] I. 定义

术语“抗体”包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、嵌合抗体、CDR 嫁接的抗体、人源化抗体、人抗体、鼠抗体及其片段,例如抗体轻链(VL)、抗体重链(VH)、单链抗体(scFv)、F(ab')₂ 片段、Fab 片段、Fd 片段、Fv 片段、和单结构域抗体片段(dAb)。

[0071] 术语“抗体文库”指包含可读框(ORF)的多个 DNA 或 RNA 分子,所述可读框编码抗体或其片段。它还包括由所述 DNA 或 RNA 分子表达的多个抗体蛋白质和核酸/抗体融合分子。

[0072] 术语“重链可变结构域”指编码抗体重链可变区的核酸和所述核酸的蛋白质产物。

[0073] 术语“轻链可变结构域”指编码抗体轻链可变区的核酸和所述核酸的蛋白质产物。

[0074] 术语“附加表位”指由抗体特异性识别的短氨基酸序列,其与分子化学或遗传地附着,以允许所述分子通过所述抗体的检测,例如 FLAG 标记、HA 标记、Myc 标记或 T7 标记。

[0075] 术语“非抗体序列”指在本发明的抗体文库中出现的任何核酸或氨基酸序列,其不是原始抗体序列的部分。此种序列包括例如附加表位。

[0076] 术语“控制序列”指在具体宿主生物或体外表达系统中表达可操作地连接的编码序列所需的 DNA 序列或遗传元件。此种序列是本领域众所周知的。适合于原核生物的控制

序列例如包括启动子、任选地操纵基因序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。例如,当核酸置于与另一种核酸序列的功能关系内时,它是“可操作地连接的”。例如,启动子或增强子与编码序列可操作地连接,如果它影响序列的转录的话,或核糖体结合位点与编码序列可操作地连接,如果它如此放置,以便促进翻译的话。一般地,“可操作地连接的”意指被连接的 DNA 序列是邻接的。然而,增强子无需是邻接的。

[0077] 术语“特异性结合”或“与之特异地结合”指结合分子以至少 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M 或更少的亲和力与靶结合,和 / 或以是其对于非特异性抗原的亲和力至少 2 倍的亲和力与靶结合的能力。

[0078] 术语“靶”指由抗体识别的抗原或表位。靶包括任何肽、蛋白质、糖、核酸或其他分子,包括对于其可以生成特异性抗体的小分子。在一个实施方案中,抗体针对人蛋白质,例如 TNF α 、IL-12、IL18、IL-1 α 或 IL-1 β 。

[0079] “保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基由具有相似侧链的氨基酸残基替换的置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中得到限定。

[0080] 术语“RNA 展示”或“mRNA 展示”指体外技术,其中所表达的蛋白质或肽与其编码 mRNA 共价或通过紧密的非共价相互作用连接,以形成“RNA/ 蛋白质融合”分子。可以就与所需靶的结合选择 RNA/ 蛋白质融合物的蛋白质或肽组分,并且通过测序所附着的编码 mRNA 组分来测定蛋白质或肽的特性。此种方法是本领域众所周知的,并且例如在美国专利号 7,195,880 ;6,951,725 ;7,078,197 ;7,022,479,6,518,018 ;7,125,669 ;6,846,655 ;6,281,344 ;6,207,446 ;6,214,553 ;6,258,558 ;6,261,804 ;6,429,300 ;6,489,116 ;6,436,665 ;6,537,749 ;6,602,685 ;6,623,926 ;6,416,950 ;6,660,473 ;6,312,927 ;5,922,545 ;和 6,348,315 中描述 ;所述专利各自整体引入本文作为参考。

[0081] 术语“单链抗体”或“scFv”指使用重组方法通过使其能够制备为单条蛋白质链的合成接头连接的轻链可变区的抗原结合部分和重链可变区的抗原结合部分,其中 VL 和 VH 区配对以形成单价分子(称为单链 Fv (scFv));参见例如, Bird 等人(1988) *Science* 242:423-426 ;和 Huston 等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:5879-5883)。

[0082] 术语“功能部分”指对其与之附着的分子赋予另外功能性的任何生物或化学实体。

[0083] 术语“选择”指使分子与群体中的其他分子基本上分开。如本文使用的,“选择”步骤提供在选择步骤后相对于群体中不希望有的分子,所需分子至少 2 倍、优选 30 倍、更优选 100 倍、且最优选 1000 倍富集。如本文指出的,选择步骤可以重复任何次数,并且不同类型的选择步骤可以在给定方法中组合。

[0084] 术语“中止序列 (pause sequence)”指促使核糖体减慢或停止其翻译速率的核酸序列。

[0085] 术语“固体支持体”指但不限于亲和复合物可以与之直接或间接(例如通过其他结合配偶体中间物,例如其他抗体或 A 蛋白)结合,或亲和复合物可以包埋入其中(例如,通过受体或通道)的任何柱(或柱材料)、珠、试管、微量滴定皿、固体颗粒(例如,琼脂糖或琼脂糖凝胶 (sepharose))、微芯片(例如,硅、硅-玻璃或金芯片)、或膜(例如,脂质体或小泡的膜)。

[0086] 术语“接头区域”指使 scFv 抗体基因中编码抗体 VH 和 VL 结构域的核酸序列连接的核酸区域。接头区域与编码抗体 VH 和 VL 的核酸序列符合读框,从而使得形成包含 VH、VL 和接头区域的邻接可读框。该术语还指在 scFv 蛋白质中连接 VH 和 VL 的区域。

[0087] 术语“肽接纳体”指通过核糖体肽基转移酶功能的催化活性能够添加到成长中的蛋白质链的 C 末端的任何分子。一般地,此种分子包含(i)核苷酸或核苷酸样部分(例如,嘌呤霉素及其类似物),(ii)氨基酸或氨基酸样部分(例如,20 种 D- 或 L- 氨基酸中的任何一种或其任何氨基酸类似物(例如,由 Ellman 等人,Meth. Enzymol. 202:301,1991 描述的 O- 甲基酪氨酸或任何类似物),和(iii)2 个之间的键(例如在 3' 位置上或较不优选地在 2' 位置上的酯、酰胺或酮键);优选地,这种键不显著干扰来自天然核糖核苷酸构象的环结构。此外,这个术语包括但不限于与蛋白质编码序列共价键合(直接或通过间插核酸序列间接)的肽接纳体分子,以及通过一些非共价方法与蛋白质编码序列连接的那种,例如通过使用第二种核酸序列的杂交,所述第二种核酸序列在蛋白质编码序列的 3' 末端上或接近 3' 末端处结合,并且其自身与肽接纳体分子结合。

[0088] II. 概述

本发明的特征在于体外 RNA 展示的改良方法,其允许从表达文库中可靠表达和选择 scFv 抗体分子。

[0089] RNA 展示方法一般涉及蛋白质或肽文库的表达,其中所表达的蛋白质或肽与其编码 mRNA 共价或通过紧密的非共价相互作用连接,以形成 RNA/蛋白质融合分子。可以就与所需靶的结合选择 RNA/蛋白质融合物的蛋白质或肽组分,并且通过测序所附着的编码 mRNA 组分来测定蛋白质或肽的特性。目前的 RNA 展示方法不是对于 scFv 抗体表达最佳的,这是因为几个步骤在还原条件下进行,这阻止 scFv 链内二硫键的形成且从而阻止 scFv 抗体分子的正确折叠。目前方法另外在选择过程中利用 VH 或 VL 抗体片段。

[0090] 本发明通过在温和还原条件下执行体外 RNA 展示测定,解决了这个技术问题,所述温和还原条件有利于 scFv 链内二硫键且从而有利于 scFv 抗体分子的正确折叠。使用 scFv 形式而不是单个可变结构域(例如,单个可变重(VH)结构域)还消除了对于所选择的 VH 结构域转化为完全 IgG 抗体所需的鉴定相容的可变轻(VL)结构域的需要。因此,尽管特别适合于表达和选择 scFv 抗体分子,但本发明的方法对于所有类别蛋白质的体外 RNA 展示也是有利的。

[0091] 本发明的方法还提供了用于执行 RNA 展示的更短和更简单的规程。这部分通过避免在用靶选择前使 RNA-蛋白质融合物中的 mRNA 逆转录为 cDNA 的费时步骤来达到。

[0092] III. 改良的体外 RNA 展示筛选方法

在一个方面,本发明的特征在于改良的体外 RNA 展示筛选方法。一般方法如下:

1) RNA/蛋白质融合物的形成

使一种或多种体外抗体 DNA 表达文库转录,以生成 mRNA。任何体外抗体表达文库都是合适的(例如,VH、VL 或 scFv 文库),然而,本发明的方法特别良好地适合于 scFv 文库。任何领域公认的转录方法都是合适的。在 RNA 转录后,去除 DNA 文库模板。这可以使用任何领域公认的方法完成,例如通过用 DNA 酶 I 消化。

[0093] 在 DNA 去除后,使肽接纳体与文库 mRNA 的 3' 末端附着。这可以使用任何领域公认的方法完成。在一个实施方案中,使用包括 5' (补骨脂素 C6)2' OMe (U AGC GGA UGC)XXX XXX CC (嘌呤霉素)3' (SEQ ID NO:20)的接头(其中 X 是三甘醇或 PEG-150,并且 CC 是标准 DNA 主链)。首先通过互补碱基配对允许接头与文库 mRNA 的 3' 末端结合。随后通过补骨脂素 C6 分子的 UV 活化使接头与 mRNA 交联。

[0094] 在肽接纳体添加后,随后在体外系统中翻译文库 mRNA。任何领域公认的体外翻译方法都是合适的,例如兔网织红细胞裂解物。然而,为了允许在 scFv 分子中的正确链内二硫键形成,将蛋白质二硫键异构酶(PDI)添加到体外翻译反应中,和 / 或在温和氧化条件下执行反应。在一个实施方案中,将温和氧化剂(例如 GSSG/GSH,例如 100mM GSSG /10mM GSH)添加到体外翻译反应中。在另一个实施方案中,还原剂(例如,二硫苏糖醇(DTT))从体外翻译反应中省略。

[0095] 一种或多种标记的氨基酸或其衍生物可以添加到体外翻译系统中,从而使得标记的氨基酸掺入所得到的抗体内。预期任何领域公认的标记的氨基酸,例如放射性标记的氨基酸,例如 ³⁵S 标记的甲硫氨酸或半胱氨酸。

[0096] 在体外翻译反应过程中, mRNA 分子经由在 3' 末端上融合的肽接纳体(例如,嘌呤霉素)与其蛋白质产物共价连接。从体外翻译反应混合物中纯化掉这些 RNA/ 蛋白质融合分子。预期了任何领域公认的方法从反应混合物中分离 RNA/ 蛋白质融合分子的方法。在一个实施方案中,使用聚脱氧胸苷(polydeoxythymidine) (Poly dT) 树脂通过层析分离 RNA/ 蛋白质融合蛋白。在另一个实施方案中,通过与对于 RNA/ 蛋白质融合蛋白的抗体组分中存在的表位特异的抗体结合,分离 RNA- 抗体融合蛋白。表位可以是掺入 RNA- 抗体融合蛋白的抗体组分的氨基酸序列内的氨基酸序列标记,例如 FLAG 或 HA 标记,例如在 N 末端、C 末端上或在可变区间接头中。

[0097] 本发明的 RNA/ 蛋白质融合物涉及裸 RNA 的使用。在优选实施方案中,接触 RNA/ 蛋白质融合物的所有试剂用 RNA 酶抑制剂试剂进行处理,例如 RNaseOUT™、酵母 tRNA、SUPERaseIn™、RNasin® 和本领域已知的其他 RNA 酶抑制剂。

[0098] 2) 针对所需靶筛选抗体

就与所需靶的体外结合筛选 RNA/ 蛋白质融合物的文库。一般而言,靶分子与固体支持体例如琼脂糖珠结合。在一个实施方案中,靶分子与固体基质直接连接。在另一个实施方案中,靶分子首先进行修饰,例如生物素化,随后使修饰的靶分子经由修饰与固体基质结合,例如链霉抗生物素蛋白 -M280、中性抗生物素蛋白 -M280、SA-M270、NA-M270、SA-MyOne、NA-MyOne、SA- 琼脂糖、和 NA- 琼脂糖。在其他实施方案中,固体支持体进一步包括磁珠,例如 Dynabeads。此种磁珠允许使用磁体从测定混合物中分离固体支持体和任何结合的 RNA/ 抗体融合物。

[0099] 在 RNA/ 蛋白质融合物结合后,使固体支持体洗涤一次或多次,以去除未结合的 RNA/ 蛋白质融合物,并且随后扩增 RNA。在一个实施方案中,使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 扩增,以产生更多 mRNA。预期了任何领域公认的 RNA 复制方法,例如使用 RNA 复制酶。在另一个实施方案中,在通过 PCR 扩增前,可以使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 转录成 cDNA。可以对 PCR 扩增的库实施一轮或多轮筛选,以富集最高亲和力抗体。

[0100] 另外或可替代地,在扩增核酸组分前,可以从固体支持体中洗脱 RNA/ 蛋白质融合物。预期了任何领域公认的洗脱方法。在一个实施方案中,使用碱性条件例如使用约 8.0 - 10.0 的 pH,洗脱 RNA/ 蛋白质融合物。在另一个实施方案中,使用酸性条件例如使用约 3.0 - 6.0 的 pH,洗脱 RNA/ 蛋白质融合物。在一个实施方案中,在扩增核酸组分前,不洗脱 RNA/ 蛋白质融合物,而是将 RNA/ 蛋白质融合物直接添加到扩增反应混合物中。

[0101] 另外或可替代地,核酸的 PCR 扩增库可以使用单个分子测序方法进行测序,以测

定每一种选择的 RNA/蛋白质分子的核酸序列。在一个实施方案中,PCR 扩增可以使用高保真度的校正聚合酶完成,例如来自 *Thermococcus kodakaraensis* 的 KOD1 热稳定性 DNA 聚合酶或 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)。

[0102] 另外或可替代地,核酸序列可以在导致突变引入扩增的 DNA 的条件下扩增,从而将进一步的多样性引入所选择的核酸序列内。可以对这种 DNA 分子突变库实施进一步的筛选循环。

[0103] IV. 文库构建

本发明的文库可以由能够与靶结合的任何抗体片段生成。在一个实施方案中,生成抗体可变结构域的文库。这些可以是 VH 和 / 或 VL 结构域。在另一个实施方案中,生成 scFv 文库。

[0104] 本发明的文库还可以包括编码在可变区外的区域的抗体核酸序列,例如其恒定区或片段,或铰链区。

[0105] 本发明的核酸文库可以包括 RNA、DNA 或包含 RNA 和 DNA 元件的杂交物。

[0106] 核酸与肽接纳体的连接

抗体核酸文库可以进行修饰以包含肽接纳体部分。这可以促进核酸表达文库的个别成员与其关联蛋白质产物的共价附着。预期了任何领域公认的肽接纳体与核酸附着的方法,包括例如在美国专利号 5,643,768、美国专利号 5,658,754、美国专利号 7,195,880 和美国专利号 6,951,725 中描述的方法,所述专利的内容引入本文作为参考。

[0107] 在一个方面,本发明的特征在于用于使肽接纳体与核酸文库附着的新方法和组合物。在一个实施方案中,可以合成包括补骨脂素 C6 分子和肽接纳体分子的连接分子,其中补骨脂素 C6 分子和肽接纳体分子与核酸序列融合,其中所述核酸序列与核酸文库的 3' 末端上的序列互补。此种连接分子可以经由互补碱基配对与核酸文库克隆的 3' 末端结合。补骨脂素 C6 对紫外(UV)线敏感,并且将使接头与核酸文库克隆交联,从而使肽接纳体与核酸文库克隆共价连接。在另一个实施方案中,接头分子的核酸部分可以包含修饰的核苷酸,例如 2' 甲氧基(2' OMe)核糖核苷酸。在另一个实施方案中,接头分子进一步包括使包含补骨脂素 C6 分子和肽接纳体分子的核酸区域分离的三甘醇或 PEG-150 接头。在一个实施方案中,接头从 5' 到 3' 可以包括:补骨脂素 C6、包括序列 UAGCGGAUGC (SEQ ID NO:20) 的 2' OMe)核糖核苷酸、6 个三甘醇或 PEG-150 部分、2 个胞苷残基和嘌呤霉素。此种接头可以通过例如 TriLink BioTechnologies, Inc 定制合成。

[0108] V. 一般筛选方法

在一个方面,本发明的特征在于筛选本发明的表达文库的方法,以鉴定能够与所需靶结合的抗体。预期了基于抗体与靶分子的结合,允许从表达文库中选择抗体的任何体外或体内筛选方法。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的表达文库可以使用领域公认的体外无细胞表型-基因型连接的展示进行筛选。此种方法是本领域众所周知的,并且例如在美国专利号 7,195,880 ;6,951,725 ;7,078,197 ;7,022,479,6,518,018 ;7,125,669 ;6,846,655 ;6,281,344 ;6,207,446 ;6,214,553 ;6,258,558 ;6,261,804 ;6,429,300 ;6,489,116 ;6,436,665 ;6,537,749 ;6,602,685 ;6,623,926 ;6,416,950 ;6,660,473 ;6,312,927 ;5,922,545 ;和 6,348,315 中描述。这些方法涉及以这样的方式从核酸体外转录蛋白质,从

而使得蛋白质与它源于其的核酸在物理上缔合或结合。通过用靶分子选择表达的蛋白质，同样选择编码蛋白质的核酸。

[0110] 为了改善 scFv 蛋白质的表达，上文提及的体外筛选测定可能需要特定试剂的添加或去除。在一个实施方案中，蛋白质二硫键异构酶可以添加到体外表达系统中，以改善功能 scFv 分子的生产。在另一个实施方案中，温和氧化剂（例如 GSSG/GSH，例如 100mM GSSG/10mM GSH）可以添加到 scFv 蛋白质的体外翻译反应混合物中，以允许 scFv 分子的 VH 和 VL 区中的链内二硫键形成。在另一个实施方案中，还原剂（例如，二硫苏糖醇（DTT））可从 scFv 的体外翻译反应混合物中去除。

[0111] 在另一个实施方案中，一种或多种标记的氨基酸或其衍生物可以添加到体外翻译系统中，从而使得标记的氨基酸掺入所得到的抗体内。预期了任何领域公认的标记的氨基酸，例如放射性标记的氨基酸，例如 ³⁵S 标记的甲硫氨酸或半胱氨酸。

[0112] 在一个实施方案中，本发明的体外筛选测定需要在抗体或多种抗体的体外选择后，可以使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 逆转录，以生成编码所述抗体或多种抗体的 cDNA。预期了用于逆转录的任何合适方法，例如酶介导的逆转录，例如莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶。

[0113] 在本发明中采用的筛选方法可能需要扩增编码与所需靶特异性结合的抗体的核酸。在一个实施方案中，可以使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 扩增，以产生更多 mRNA。预期了任何领域公认的 RNA 复制方法，例如使用 RNA 复制酶。在另一个实施方案中，在通过 PCR 扩增前，可以首先使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 逆转录成 cDNA。在一个实施方案中，PCR 扩增可以使用高保真度的校正聚合酶完成，例如来自 *Thermococcus kodakaraensis* 的 KOD1 热稳定性 DNA 聚合酶或 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)。在另一个实施方案中，PCR 扩增可以在将突变引入扩增的 DNA 内的条件下执行，例如易错 PCR。

[0114] 在另一个实施方案中，本发明的表达文库可以通过在细胞、病毒或噬菌体表面上展示，并且实施使用固定化靶分子的选择进行筛选。合适的筛选方法在美国专利号 7,063,943 ;6,699,658 ;6,423,538 ;6,696,251 ;6,300,065 ;6,399,763 ;6,114,147 和 5,866,344 中描述。

[0115] 在本发明中采用的筛选方法可能需要通过引入核酸置换和 / 或缺失将多样性引入抗体文库内，这可以导致在表达的抗体分子中的一个或多个氨基酸置换和 / 或缺失。预期了任何领域公认的诱变方法，例如随机诱变、“步移(walk through)”诱变和“审核(look through)”诱变。可以使用例如易错 PCR、酵母或细菌的“增变”株、或在所有或部分抗体的从头开始合成过程中随机或限定的核酸改变的掺入来达到抗体的此种诱变。在一个实施方案中，可以生成抗体分子的文库，其中一个或多个氨基酸是随机突变的。在另一个实施方案中，可以生成抗体分子的文库，其中一个或多个氨基酸突变为一个或多个预定的氨基酸。

[0116] 在本发明中采用的筛选方法还可能增加靶 - 结合筛选测定的严格性，以选择对于靶具有改善的亲合力的抗体。可以考虑增加抗体 - 靶相互作用测定的严格性的任何领域公认的方法。在一个实施方案中，可以改变一种或多种测定条件（例如，测定缓冲液的盐浓度），以减少抗体分子对于所需靶的亲合力。在另一个实施方案中，可以减少允许抗体与所需靶结合的时间长度。在另一个实施方案中，竞争结合步骤可以添加到抗体 - 靶相互作用

用测定中。例如,可以首先允许抗体与所需固定化靶结合。随后可以添加特定浓度的非固定化靶,其用来与固定化靶竞争结合,从而使得从固定化靶中洗脱对于抗原具有最低亲和力的抗体,从而导致具有改善的抗原结合亲和力的抗体富集。通过增加添加到测定中的非固定化靶的浓度,可以进一步增加测定条件的严格性。

[0117] 本发明的筛选方法还可能需要多轮选择,以富集具有改善的靶结合的一种或多种抗体。在一个实施方案中,在每轮选择时,进一步的氨基酸突变可以使用领域公认的方法引入抗体内。在另一个实施方案中,在每轮选择时,可以增加与所需靶结合的严格性,以选择对于所需靶具有增加的亲和力的抗体。

[0118] 本发明的筛选方法可能需要从体外翻译系统的组分中纯化 RNA- 抗体融合蛋白。这可以使用任何领域公认的分选方法完成。在一个实施方案中,使用聚脱氧胸苷(poly dT)树脂通过层析分离 RNA- 抗体融合蛋白。在另一个实施方案中,通过层析使用对于 RNA- 抗体融合蛋白的抗体组分中存在的表位特异的抗体,可以分离 RNA- 抗体融合蛋白。表位可以是掺入 RNA- 抗体融合蛋白的抗体组分的氨基酸序列内的氨基酸序列标记,例如 FLAG、Myc 或 HA 标记,例如在 N 末端、C 末端上或在可变区间接头中。

[0119] 从本发明的文库中选择抗体可能需要使用固定化的靶分子。在一个实施方案中,靶分子与固体基质例如琼脂糖珠直接连接。在另一个实施方案中,靶分子首先进行修饰,例如生物素化,随后使修饰的靶分子经由修饰与固体支持体结合,例如链霉抗生物素蛋白-M280、中性抗生物素蛋白-M280、SA-M270、NA-M270、SA-MyOne、NA-MyOne、SA-琼脂糖和 NA-琼脂糖。

[0120] 本发明的例证(EXEMPLIFICATION)

实施例自始至终,使用下述材料和方法,除非另有说明。

[0121] *材料与方法*

一般而言,除非另有说明,否则本发明的实践采用化学、分子生物学、重组 DNA 技术、免疫学(尤其是例如免疫球蛋白技术)和畜牧业的常规技术。参见例如,Sambrook,Fritsch 和 Maniatis,Molecular Cloning;Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology),510,Paul, S., Humana Pr (1996);Antibody Engineering :A Practical Approach (Practical Approach Series, 169),McCafferty,Ed.,Irl Pr (1996);Antibodies :A Laboratory Manual,Harlow 等人,C. S. H. L. Press, Pub. (1999);Current Protocols in Molecular Biology,编辑 Ausubel 等人,John Wiley & Sons (1992)。

[0122] *用于 scFv 的 mRNA 展示规程*

mRNA 展示可以根据图 2 中所示的方法进行。这种方法的具体实施方案在下文更详细地描述。这些实施方案预期举例说明本发明的方法,并且不应解释为限制性的。

[0123] *1. 抗体文库模板的设计*

根据本领域已知的抗体文库生成方法可以设计文库 DNA 构建体。在一个实施方案中,文库构建体可以编码抗体片段,即抗体轻链片段(VL)或抗体重链片段(VH)。在一个示例性实施方案中,文库构建体可以编码单链可变片段(scFv)。

[0124] *2. 靶抗原的制备*

一般地,mRNA 展示抗体文库可以针对生物素化抗原进行选择。虽然关于每种靶的最佳

抗原应基于具体情况 (case-by-case) 进行测定, 但下述考虑可以用作一般指导。靶抗原一般是充分表征的, 并且是相关或显性遗传同种型, 如通过多态性 (SNP 和单元型) 和 / 或药物遗传学分析测定的。靶抗原另外可以具有合理生物活性 (可与天然抗原比较)、良好可溶性以及良好的化学和物理性质, 并且可以以足够量制备以用于文库选择或筛选和下游生物测定。

[0125] 3. 文库 DNA 的制备

文库 DNA 及其选择输出可以通过 PCR 进行扩增。PCR 扩增可以使用本领域已知的方法执行。PCR 反应一般包含 DNA 模板、反应缓冲液、dNTP、用于扩增的引物、DNA 聚合酶和水。多个反应管可以由主混合物同时设立, 以增加扩增的 DNA 得率。25 个 PCR 循环一般给出足够扩增, 但多达 35 个循环可以用于获得更多产物。

[0126] 4. 文库 DNA 纯化

如果产物是正确大小 (对于 scFv ~850 bp, 对于 VH 或 VL 文库 ~500 bp) 且包含最低限度非特异性产物, 那么产物可以直接用于转录反应中。可替代地, 通过切出正确大小的特异性条带, 可以在制备型琼脂糖凝胶上纯化产物。DNA 浓度可以在分光光度计上进行测量。

[0127] 5. RNA 转录

来自文库 DNA 的 RNA 转录可以使用本领域已知的标准方法执行。大反应体积可以用于转录足够的 DNA 模板, 以取样整个文库多样性。在示例性实施方案中, 1×10^{13} 文库模板拷贝可以用于 RNA 转录反应中。RNA 转录一般包含 5-10 μg PCR 产物、反应缓冲液、ATP、CTP、GTP、UTP 和 T7 RNA 聚合酶。RNA 转录反应可以在 37°C 运行 2 小时至过夜。在初始选择循环后可以使用较短的时间, 然而, 过夜温育可以使反应的 RNA 得率达到最大。在 RNA 转录后, DNA 模板可以通过 DNA 酶 I 消化从反应混合物中去除。

[0128] 6. 通过 NAP 柱层析的 RNA 纯化

在转录后, RNA 可以使用 NAP-10 柱进行分级分离。最高达约 1 mL 转录反应可以装载到 NAP-10 柱上用于 RNA 纯化。在分级分离前, 柱可以使用 DEPC 处理的 dH_2O 进行平衡。RNA 可以使用约 1.5X 反应体积 DEPC 处理的 dH_2O (例如 750 μL /500 μL 转录反应) 从柱中洗脱。总洗脱体积可以小于约 150% 的转录反应体积。RNA 可以另外或可替代地使用 NAP-25 柱进行分级分离。

[0129] 7. RNA 质量控制和定量

RNA 样品的大小和得率可以使用凝胶电泳, 或可替代地通过测量收集的级分中 RNA 浓度在 260 nm 下的 OD (OD_{260}) 进行分析。例如, scFv RNA 的摩尔浓度可以如下计算:

$$\begin{aligned} [\text{RNA}] (\mu\text{M}) &= [\text{RNA}] (\text{mg/mL}) \times 10^6 / (850 \times 330) \\ &= \text{OD}_{260} \times \text{稀释因子} \times 40 (\mu\text{g/mL}) \times 1000 / (850 \times 330)。 \end{aligned}$$

$$[\text{0130}] \quad \text{RNA 得率 (nmol)} = [\text{RNA}] (\mu\text{M}) \times \text{体积} (\mu\text{L}) / 1000$$

RNA 得率一般达到每 500 μL 转录反应约 20 nmol/mL 的最大限度。

[0131] 8. RNA 与接头的连接

在其 3' 末端上包含肽接纳体分子的 DNA 接头可以通过 UV 交联与每种 RNA 分子的 3' 末端共价连接。可以进入核糖体 A 位点且与新生多肽链的羧基末端共价偶联的肽接纳体, 可以最终使得 mRNA (基因型) 能够与由这种 RNA 编码的蛋白质 (表型) 共价结合。可以使用具有下式的示例性 PEG6/10 接头:

5' (补骨脂素 C6) 2' OMe (U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (嘌呤霉素) 3' (SEQ ID NO : 20)

补骨脂素 C6 5' 修饰是光敏感的,并且作用于通过 UV 交联在接头和 mRNA 之间产生共价键。2' OMe (U AGC GGA UGC) (SEQ ID NO :20) 主链区域与 mRNA 上的 FLAG 序列 3' 的接头退火位点退火(参见图 1)。在上文序列中, X 指示“间隔区 9”,可替代地称为三甘醇或 PEG-150。这个间隔区已得到最优化,以提供用于嘌呤霉素插入真核核糖体 A 位点内的柔性。CC 包括标准 DNA 主链。嘌呤霉素 3' 修饰插入核糖体 A 位点内,以在接头和新生肽之间产生稳定连接。关于本文描述的接头的消光系数可以是约 $147.7 \text{ OD}_{260}/\mu\text{mole}$ 。因为这种接头是光敏感的,所以包含这种接头的溶液应被保护不受光。

[0132] 对于文库选择的初始循环,可以推荐大规模连接反应(约 5 nmol 或约 3.1×10^{15} 转录的 RNA 分子),以取样具有约 $10^{12} - 10^{13}$ 的估计多样性的首次用于实验的抗体文库的整个多样性。这种 RNA 量可以确保足够模板掺入翻译反应内,以产生 ~ 10 pmol 功能 mRNA 展示分子。在随后循环中, RNA 输入可以减少至约 0.5 nmol/ 选择。在示例性实施方案中, RNA 连接反应可以包含下述组分:RNA、水、化学连接缓冲液和 PEG6/ 嘌呤霉素接头(1mM)。在示例性实施方案中,总反应体积是约 100 μL 。在优选实施方案中,接头 /RNA 摩尔比可以大于约 1.5。在一个实施方案中,反应中的最终接头浓度是约 15 μM ,并且反应中的 RNA 浓度范围可以为约 3 - 10 μM (= 0.3 - 1 nmol RNA 输入)。作为参考,1 mg/mL 的 850 nt scFv RNA = 3.56 μM 和可达到的最大限度连接浓度将是约 3.16 μM (约 0.32 nmol)。

[0133] 退火反应(这使接头与转录的 RNA 退火)可以在热循环仪中执行。在优选实施方案中,通过在约 85°C 温育样品约 30 秒,随后在约 4°C,可以执行退火反应,其中使用约 0.3°C / 秒的斜升速率。反应随后可以在约 4°C 保持。

[0134] 退火的接头 /RNA 的连接可以通过 UV 交联完成。这可以使用本领域技术人员已知的任何方法进行。在一个实施方案中,反应管可以置于冷冻制冷器包之上,并且直接置于手提式长波长(约 365 nm) UV 灯下,并且在黑暗中交联约 15 分钟。一般连接效率是约 50 - 90%。一般不需要纯化。连接产物可以贮存于 -80°C。

[0135] 9. 翻译反应

在示例性实施方案中,在所有反应和纯化后,约 $\sim 0.1\%$ 输入 RNA 可以制备成 mRNA 展示分子。体外翻译使用本领域技术人员已知的方法和试剂进行。在一个实施方案中,使用 scFv 文库的翻译反应使用在约 15 mL 的反应体积中的约 5 nmol RNA 模板连同约 10 mL 网织红细胞裂解物。

[0136] 在用于翻译反应的制备中,GSSG/GSH (氧化谷胱甘肽 / 还原谷胱甘肽)溶液可以以约 100 mM GSSG/10 mM GSH 的终浓度制备。通过使 PDI 粉末溶解于 dH_2O 内制备 PDI,以达到约 1 单位 / μL 的浓度。PDI 溶液可以贮存于 -20°C。

[0137] 示例性翻译反应可以如下设立:

RNA (100-120 pmol/300 μ L 或 500-600 pmol/1.5 ml)	X	X	μ L
dH ₂ O	至 73.7	至 370	μ L
氨基酸主混合物 (Met)	15	75	μ L
100 mM GSSG/10 mM GSH	3.3	16.5	μ L
PDI (1 U/ μ L)	6	30	μ L
[³⁵ S]甲硫氨酸	2	10	μ L
网织红细胞裂解物	200	1000	μ L
<hr/>			
总体积	300	1500	μ L

翻译反应可以在 30°C 水浴中温育 1 - 2 小时, 并且 RNA/ 蛋白质融合物形成应无延迟地执行。当翻译体积超过 3 mL 时, 可以观察到 RNA/ 蛋白质融合物得率中的显著降低; 因此, 如果反应体积大于 3 mL, 那么可以制备翻译反应的主混合物, 并且随后分成小等分试样。

[0138] 10. RNA/ 蛋白质融合物形成

在翻译反应后, 对于每 300- μ L 翻译反应混合物, 可以添加约 100 μ L 2M KCl 和约 20 μ L 1M MgCl₂, 并且在室温温育约 1 小时, 或在 -20°C 过夜。可替代地, 对于每 1.5 ml 翻译反应混合物, 可以添加约 500 μ L 2M KCl 和约 100 μ L 1M MgCl₂, 并且在室温温育约 1 小时, 或在 -20°C 过夜。这使在 mRNA 模板末端上的中止的核糖体稳定, 并且允许在 DNA 接头的末端上的嘌呤霉素进入中止的核糖体的 A 位点, 这使翻译的 scFv 蛋白质与其 mRNA 模板永久连接。如果反应在 -20°C 贮存过夜, 那么室温温育可以缩短。反应可以通过分别添加约 50 μ L 或约 250 μ L 0.5 M EDTA / 300 μ L 或 1.5 ml 翻译反应以破坏核糖体得到终止。反应可以贮存于 -20°C。可以取出 5-10 μ L 等分试样用于随后闪烁计数。

[0139] 11. 通过寡脱氧胸苷酸纤维素的 RNA/ 蛋白质融合物纯化

包括这个步骤, 以从翻译 / 融合反应中纯化 mRNA 展示分子和剩余的 RNA 模板。对于寡脱氧胸苷酸结合, 应估计捕获所有 RNA 模板所需的预洗涤的寡脱氧胸苷酸纤维素量。足够体积的寡脱氧胸苷酸结合缓冲液可以添加到融合反应, 以达到约 1X 终浓度。随后可以添加预洗涤的寡脱氧胸苷酸纤维素, 并且使反应在 4°C 旋转 1 小时。反应可以任选在 4°C 以约 1500 rpm 离心 5 分钟, 并且弃去上清液。可以转移寡脱氧胸苷酸纤维素珠, 并且使用旋转柱, 用 1X 寡脱氧胸苷酸结合缓冲液洗涤约 6 次, 并且缓冲液一般通过使柱以约 1000 rpm 旋转 10 秒去除。可以弃去流通物 (flow-through), 但可以保存末次洗涤用于闪烁计数。为了减少盐浓度且促成洗脱, dH₂O 初始浆体积的 1/10 可以添加到干燥寡脱氧胸苷酸珠中, 这可以立即离心 10 秒且可以弃去流通物。通过将 dH₂O 添加到珠中且在室温温育 5 分钟, 可以洗脱 mRNA 展示分子 (和游离 RNA 模板)。通过以约 4000 rpm (或更高) 旋转 20 秒收集洗脱物。洗脱一般重复 1 次, 且组合洗脱物。可以取出 5 μ L 洗脱物用于闪烁计数。任选地, 还可以通过在 NanoDrop 分光光度计机器上在 260 nm 的 OD (OD₂₆₀) 评估寡脱氧胸苷酸纯化的效率。所有剩余的 RNA 模板和 mRNA 展示分子在理论上通过寡脱氧胸苷酸珠回收。5X FLAG 结合缓冲液添加到洗脱物中, 以达到约 1X 终浓度。样品可以贮存于 -80°C, 如果未进行至下一个 FLAG 纯化步骤的话。

[0140] 寡脱氧胸苷酸回收可以如下计算。约 5 μ L 输入(来自融合反应)、来自末次洗涤的约 100 μ L、和约 5 μ L 输出(来自寡脱氧胸苷酸纯化的洗脱物)。末次洗涤用于评估洗涤程度,并且其他 2 个计数用于计算来自原始 RNA 模板输入的 RNA/蛋白质融合物回收。RNA/蛋白质融合物得率(pmol) = $(\text{CPM}_{\text{输出}} \times \text{体积}_{\text{输出}} \times 5 \mu\text{M} \times \text{体积}_{\text{裂解物}}) / [\text{CPM}_{\text{输入}} \times \text{体积}_{\text{输入}} \times (\text{产物中的甲硫氨酸} \#)]$ 。这个公式假定网织红细胞裂解物中的 5- μ M 甲硫氨酸浓度,并且计算中使用的所有体积表示为 μ L。对于较早的选择循环,mRNA 展示分子的得率一般是 0.5 - 2%,但在随后循环中可以增加至 10%。例如,PROfusion 文库中甲硫氨酸的早期循环数目可以是:

- 对于 VH-V κ scFv 约 3 μ M
- 对于 VH-V λ scFv 约 2 - 3 μ M,
- 对于 VH 约 2 μ M,
- 对于 V κ 约 2 μ M,和
- 对于 V λ 约 1 μ M。

[0141] 这些数目是平均值并且基于种系序列,并且本领域技术人员将认识到当文库针对特异性序列富集时,它们可以随着选择循环改变。

[0142] 12. 通过抗 FLAG M2 琼脂糖的 RNA/蛋白质融合物纯化

这个步骤设计为从剩余的 RNA 模板中纯化 mRNA 展示分子。如果文库将通过抗原解离速率(off-rate)竞争或通过抗原表达细胞进行选择,那么无需进行至这个步骤。可以估计捕获所有 mRNA 展示分子所需的预洗涤的抗 FLAG M2 琼脂糖珠的量。在一个实施方案中,珠的结合容量可以是约 6 nmol 融合蛋白 /mL 50%浆。为了具有足够的珠体积用于在结合和洗涤过程中处理,推荐使用至少约 200 μ L 预洗涤的珠。下文给出的例子用于初始 300- μ L 翻译反应。

[0143] FLAG 纯化:宽口移液管管尖可以用于将 300 μ L 预洗涤的抗 FLAG M2 琼脂糖转移至寡脱氧胸苷酸纯化的输出,这随后可以在 4°C 旋转 1 小时。与抗 FLAG M2 琼脂糖温育可以继续过夜。抗 FLAG M2 琼脂糖可以任选在 4°C 在离心机中以约 1500 rpm 旋转约 1 分钟,并且可以弃去上清液。抗 FLAG 珠可以用约 500-700 μ L 1X FLAG 结合缓冲液洗涤约 5-6 次,其中使用旋转柱(例如 Invitrogen™ Microcentrifuge Spin Column),并且对于每次洗涤以约 1000 rpm 离心 10 秒(应当指出 Invitrogen™ 柱可以以更高速度例如约 10,000 rpm 旋转)。可以弃去流通物。通过以约 1000 rpm 离心 10 秒,珠可以另外用 700 μ L 选择缓冲液(参见下文)洗涤 2 次。可以保存末次洗涤用于闪烁计数。通过添加约 400 μ L 100 μ g/mL FLAG 肽(在选择缓冲液中)且在室温温育 5 分钟,可以洗脱 mRNA 展示分子。洗脱物(elute)可以通过以约 3000 rpm (或可能时更高)旋转 20 秒进行收集。通过添加约 400 μ L 100 μ g/mL FLAG 肽,洗脱步骤可以再复一次。2 种洗脱物可以组合,并且可以取出约 5 μ L 用于闪烁计数。这个体积的 FLAG 肽可以足以洗脱最达约 1 mL 50%浆,并且如果使用较少的浆和/或需要更高的 RNA/蛋白质融合物浓度,那么可以减半(cut in half)(200 μ L)。为了预防在贮存和抗原选择过程中的 RNA 降解,适量的本领域已知的 RNA 酶抑制剂(即,1 - 2 U/ μ L RNaseOUT 和 0.02 μ g/mL 酵母 tRNA)可以添加到纯化的 mRNA 展示文库中。如果不进行至下一个抗原选择步骤,那么将样品贮存于 -80°C。

[0144] 为了定量 FLAG 回收,在 β 计数器上计数约 5 μ L 洗脱输出和来自末次洗涤的约

100 μL 。可以预期 10-30% 或更高的回收, 并且可以根据下式进行计算:

$$\text{PROfusion 分子回收}\% = (\text{CPM}_{\text{输出}} \times \text{体积}_{\text{输出}}) / (\text{CPM}_{\text{输入}} \times \text{体积}_{\text{输入}})$$

13. 通过生物素化抗原的文库选择

设计选择以在与抗原的文库结合达到平衡时, 富集与目的靶特异性结合的分子。可能需要阴性选择(预澄清), 以从首次用于实验的 scFv 文库中去除非特异性和基质结合剂, 但如果使用由单个模板制备的文库, 例如但不限于基于单个 scFv 模板进行亲和力成熟的制备用于亲和力成熟的文库, 那么可以省略。依赖于靶形式, 选择规程改变。下述是用于与生物素化靶一起使用的示例性选择规程。这种规程可以进行修饰, 以适应以其他形式的靶抗原, 并且依赖于所需输出可以按比例扩大或缩小。

[0145] A. 在选择前的制备

链霉抗生物素蛋白(SA)磁珠可以用于捕获, 并且一般在使用前预封闭。SA 珠可以从原始瓶转移到 1.5 或 2 mL 管, 并且用 2 mL 1X FLAG 结合缓冲液洗涤 2 次。珠可以用 2 mL 选择缓冲液(2 小时到过夜)在 4°C 伴随旋转进行封闭。重要的是制备足够珠用于两者, 预澄清和选择捕获。预封闭的珠可以贮存于 4°C。约 100 μL 珠一般用于每 10 pmol 生物素化抗原, 但本领域技术人员将认识到捕获珠体积应考虑到相对于反应得率的游离生物素结合容量进行计算(例如 650-900 pmol/mg 珠, 其中珠浓度一般是 10 mg/ml)。

[0146] 1.5 mL 或 2 mL 微量离心管(microfuge tube)可以用 1X FLAG 结合缓冲液预封闭约 1 小时到过夜。预封闭的管可以用于所有预澄清和选择步骤。一般地需要 4 个管用于每个样品: 2 个用于预澄清, 1 个用于珠, 并且 1 个用于选择。

[0147] 最佳结果可以通过使文库预澄清获得。FLAG 纯化的 mRNA 展示文库可以添加到珠(与缓冲液分离), 其中使用等于捕获体积一半的 SA 珠体积。珠可以在 30°C 旋转约 30 分钟。预澄清的 mRNA 展示文库可以使用磁体与珠分离, 并且预澄清可以再重复一次。第二种预澄清的 SA 珠可以如上文所述洗涤且计数, 以测定本底是否高。这还可以充当‘无抗原’阴性对照。

[0148] B. 文库选择: 结合

对于第一轮选择, 生物素化靶(100 nM)可以添加到整个预澄清的文库, 并且在 30°C 旋转 1 小时。对于随后的选择循环, 当抗原结合分子的回收预期超过 1% 时, 预澄清的文库可以分成 2 个相等等分试样。生物素化抗原可以添加到一个等分试样, 并且另一个可以充当‘无抗原’阴性对照。可替代地, 洗涤的第二种预澄清珠也可以被视为‘无抗原’对照, 如上所述, 尽管这些珠将具有一次较少的‘预澄清’。当抗原结合分子的回收超过 5% 时, 随后循环中的抗原浓度可能降低。特别地, 如果抗原看起来‘粘性’且在早期循环中观察到显著回收, 那么抗原浓度应减少。当抗原结合分子的回收变得显著高于本底时(例如相对于无抗原对照), 抗原浓度在随后循环中可以减少。重要的是注意文库和抗原之间的化学计量, 以确保存在超过文库 PROfusion 分子的至少 5 倍摩尔过量的抗原, 尤其是在较低抗原浓度。

[0149] C. 文库选择: 捕获

用于封闭 SA 珠用于文库捕获的选择缓冲液可以通过离心和磁性分离去除。抗原结合的文库可以转移至预封闭的 SA 珠(与缓冲液分离), 并且随后至结合反应, 并且在 30°C 旋转 5 - 10 分钟。用于捕获的 SA 珠的量应基于容量和选择中使用的靶浓度进行计算(参见上文)。当降低靶浓度以避免 SA 珠结合剂时, SA 珠的量应降低, 但一般使用不小于 50 μL 的

珠。

[0150] D. 文库选择 : 洗涤

SA 珠可以使用磁体进行收集, 并且用约 1 mL 选择缓冲液洗涤 1 分钟。这个步骤可以重复约 5 次(总共约 6 次)。洗涤时间可以在随后循环中增加, 以对一些靶掺入解离速率选择策略。珠可以用适合于逆转录的约 1 mL 1X 缓冲液洗涤最后一次, 用磁体收集, 并且在水中重悬浮(上文计算的捕获珠体积的四分之一)。

[0151] 作为另一个例子, 可以使用 Dynabeads™ (Invitrogen), 但本领域技术人员将认识到其他珠可以是同样合适的。Dynabeads™ 可以通过离心和磁性分离与未结合的文库分离。上清液可以用 1 mL 管尖取出, 其中使用一个新过滤的管尖用于每个文库选择管, 以消除交叉污染。Dynabeads™ 可以用 1 mL 选择缓冲液洗涤, 并且通过轻轻移液或通过使管颠倒多次重悬浮。在处理下一个文库时, 管可以放回到磁支架上用于珠分离。在洗涤所有文库后, 上清液可以通过 1 mL 管尖取出, 其中使用一个新过滤的管尖用于每个文库选择管, 以消除交叉污染。对于 5 次洗涤重复。Dynabeads™ 可以用 1 mL 1X 第一链缓冲液 (SuperScript II, Invitrogen) 如上所述洗涤 2 次。在末次洗涤时, 如果需要如此, 那么取出文库的 1/10 至分管用于计数, 以测定文库回收。Dynabeads™ 可以通过磁性分离捕获, 并且可以保存约 100 μL 洗涤缓冲液用于本底计数。Dynabeads™ 可以重悬浮于水中, 其中使用如上计算的 1/4 捕获珠体积)。

[0152] E. 文库选择 : 计数和回收计算

从第 3 轮开始, 计数约 10 - 20% 的末次洗涤和珠。计数超过 100 μL 珠是不可取的, 因为这可以猝灭计数。文库选择回收可以根据下式进行计算:

$$\text{选择回收 \%} = 100 \times \text{CPM}_{\text{总珠}} / \text{CPM}_{\text{总输入}}$$

14. 通过 Fc 融合蛋白平衡文库选择

在另一个实施方案中, 文库选择可以对于已与抗体 Fc 结构域融合的靶抗原 (例如, Fc 融合蛋白) 执行。可能需要阴性选择 (预澄清), 以从首次用于实验的抗体文库中去除非特异性和基质结合剂, 但对于亲和力成熟可以省略。选择特异性可以通过使靶抗原与人 IgG1 和小鼠 IgG2a 融合得到改善。通过在文库选择过程中在 Fc 融合蛋白中具有不同 Fc 结构域, 可以使鉴定对 Fc 区特异性的文库结合剂的危险降到最低。这还将使得文库结合剂能够通过 2 种不同磁珠 (G 蛋白和抗小鼠 IgG) 拉下 (pulled down), 从而进一步减少回收抗 G 蛋白或抗小鼠 IgG 结合剂的概率。靶 Fc 融合蛋白也可以是生物素化的, 并且通过本文描述的方法或通过上文章节 13 中描述的方法进行选择。应当指出 A 蛋白磁珠可能不适合于针对 Fc 融合蛋白靶选择, 这是因为与抗体 VH 结构域的特定部分的交叉反应性 (例如源于人 VH3 家族种系序列的 VH)。用于拉下抗原结合 scFv-PROfusion 分子的合适磁珠包括但不限于, Dynabeads G 蛋白、Dynabeads Pan 小鼠 IgG、和针对人或小鼠 IgGs 的其他可用的 Dynabeads M-280。一般而言, G 蛋白珠容量被视为约 25 μg 人 IgG1 (~167 pmol)/100 μL A/G 蛋白磁珠。

[0153] A. 在选择前的制备

Dynabeads G 蛋白或 Dynabeads Pan 小鼠 IgG (如果靶抗原是小鼠 Fc 融合蛋白) 可以用于捕获, 并且一般在使用前预封闭。可以计算对于文库预澄清和选择所需的 Dynabeads 量。Dynabeads 可以从原始瓶转移到 1.5 或 2 mL 微量离心管, 并且去除缓冲液。珠可以用

1 mL 选择缓冲液(2 小时到过夜)在 4°C 或在室温 1 小时进行封闭。重要的是制备足够珠用于预澄清和选择捕获。

[0154] 1.5 mL 或 2 mL 微量离心管可以用选择缓冲液预封闭 1 小时到过夜,并且预封闭的管应用于所有预澄清和文库选择步骤。

[0155] FLAG 纯化的 scFv PROfusion 文库可以添加到预封闭的珠(与缓冲液分离),可使用等于捕获体积(如上计算)一半的 Dynabead (G 蛋白或 Pan 小鼠 IgG)体积,并且反应在 30°C 旋转 30 分钟。预澄清的融合物文库可以使用磁体与珠分离,并且预澄清再重复一次。第二种预澄清的 Dynabeads 可以如上文所述洗涤且计数,以测定本底是否高。这还可以充当‘无抗原’阴性对照。

[0156] B. 文库选择:结合

对于第一轮选择,生物素化靶(100 nM)可以添加到整个预澄清的文库,并且在 30°C 旋转 1 小时。对于随后的选择循环,当抗原结合分子的回收预期超过 1% 时,预澄清的文库可以分成 2 个等分试样(依赖于文库计数,从 50/50 到 80/20)。生物素化抗原可以添加到一个等分试样(整体的 50 - 80%),而另一个等分试样可以充当‘无抗原’阴性对照。可替代地,洗涤的第二种预澄清珠也可以被视为‘无抗原’对照,如上所述,只是它将具有一次较少的‘预澄清’。如果抗原看起来‘粘性’且在早期循环中观察到显著回收,那么抗原浓度可以减少。此外,当抗原结合分子的回收变得显著高于本底时(无抗原对照),抗原浓度在随后循环中可以减少。重要的是注意文库和抗原之间的化学计量,以确保存在超过文库 PROfusion 分子的至少 5 倍摩尔过量的抗原,尤其是在较低抗原浓度下。

[0157] C. 文库选择:捕获

用于封闭 Dynabeads 用于文库捕获的选择缓冲液可以通过离心和磁性分离去除。抗原结合的文库可以转移至预封闭的 Dynabeads (与缓冲液分离),并且随后至结合反应,并且在 30°C 旋转 20 分钟。用于捕获的 Dynabeads 的量应如上所述基于珠容量和选择中使用的靶抗原浓度进行计算。为了避免拉下珠粘合剂,当靶抗原浓度减少时,Dynabeads 的量应减少(但不小于 500 μ g 或 50 μ L)。

[0158] D. 文库选择:洗涤

Dynabeads™ 可以通过离心和磁性分离与未结合的文库分离。上清液可以用 1 mL 管尖取出,并且一个新过滤的管尖可以用于每个文库选择管,以消除交叉污染。新移液管管尖可以用于由约 1 mL 选择缓冲液洗涤 Dynabeads™,并且 Dynabeads™ 可以通过轻轻移液或通过使管颠倒多次进行重悬浮。在处理下一个文库时,管可以放回到磁支架上用于珠分离。在洗涤所有文库后,上清液可以通过 1 mL 管尖取出(使用一个新过滤的管尖用于每个文库选择管,以消除交叉污染)。对于 5 次洗涤可以重复这个步骤。Dynabeads™ 可以用 1 mL 1X 第一链缓冲液(SuperScript II, Invitrogen)如上所述洗涤 2 次。在末次洗涤时,如果需要如此,那么取出文库的 1/10 至分管用于计数,以测定文库回收。Dynabeads™ 可以通过磁性分离捕获,并且可以保存约 100 μ l 洗涤缓冲液用于本底计数。Dynabeads™ 可以重悬浮于水中,其中使用如上计算的 $\frac{1}{4}$ 捕获珠体积)。

[0159] E. 文库选择:计数

可以如上文章节 13 (E) 中所述执行。

[0160] 15. 通过抗原竞争的解离速率文库选择

解离速率选择和平衡选择之间的主要差异是在 FLAG 纯化前,文库首先与选择抗原结合。在 FLAG 纯化后,文库可以与过量竞争抗原或抗体(例如当竞争者抗原不可用时)温育,从而使得在解离速率竞争过程中变得与 PROfusion 分子不结合的任何预结合的抗原由竞争者替换。竞争者不同于预结合的抗原之处在于,竞争者结合的 PROfusion 分子不可以在后续回收步骤中回收。它们可以是未修饰的抗原或不同形式的抗原。尽管抗体也可以是竞争者,但一般地它们不是与抗原一样有效的竞争者,并且它们的效率随着文库对于抗原的亲合力增加而降低。恰好在选择前测定文库的解离速率是有利的,以鉴定竞争的适当持续时间。这种持续时间可以范围从几小时到几周。

[0161] A:具有生物素化抗原或抗原-Fc 融合蛋白的预装载文库

PROfusion 分子可以如上所述进行翻译且通过寡脱氧胸苷酸进行纯化。寡脱氧胸苷酸纯化的文库可以通过添加 5X FLAG 结合缓冲液至 1X 的终浓度(仅仅添加 25%的文库体积)进行平衡。可以添加抗原(生物素化或 Fc- 融合物)至足够高浓度,并且在 30°C 旋转 30 分钟,以饱和抗原-抗体结合。PROfusion 分子可以通过抗 FLAG M2 琼脂糖如上所述进行纯化。重要的是应当指出 FLAG 纯化的 PROfusion 文库应保持在冰上,但不冷冻。重要的是如上所述预封闭足够量的捕获珠。

[0162] B:测定竞争者浓度和文库基线回收

可以计算来自上述步骤的回收的文库的量,以测定其摩尔浓度。这代表文库结合的抗原的最大限量,并且可以用于计算对于解离速率竞争所需的量(500× 至 1000×)。

[0163] 10%预封闭的珠可以添加到来自抗原结合的 PROfusion 文库的 10%等分试样,并且在约 4°C 旋转约 20 分钟。珠可以如上所述用 1 mL 选择缓冲液洗涤 5 次。珠可以如下进行计数,以测定在解离速率选择前通过抗原结合的 PROfusion 文库百分比:

$$\text{回收}\% = 100 \times (\text{CPM}_{\text{珠}} / \text{CPM}_{\text{输入}}) \times 10$$

C:文库选择:竞争

1000 倍摩尔过量的竞争者(例如未修饰的抗原或抗体)可以添加到 FLAG 纯化的 PROfusion 文库,并且在约 30°C 旋转预定持续时间,这将施加足够的选择压力,以选择具有更佳解离速率的克隆。使文库在冰上冷却约 1 - 2 分钟,以减慢珠捕获前的解离速率。

[0164] D:文库选择:捕获

用于封闭 Dynabeads 用于文库捕获的选择缓冲液可以通过离心和磁性分离去除。抗原结合的文库可以转移至预封闭的 Dynabeads (与缓冲液分离),并且在 4°C 旋转约 20 分钟。

[0165] E:文库选择:洗涤

Dynabeads 可以通过离心和磁性分离从文库中收集。上清液可以用 1 mL 管尖取出(使用一个新过滤的管尖用于每个文库选择管,以消除交叉污染,如上所述)。

[0166] 珠可以用约 1 mL 1X 第一链缓冲液(SuperScript II, Invitrogen)如上所述洗涤 2 次。在末次洗涤时,如果需要如此,那么取出文库的 10 - 20%至分管用于计数,以测定文库回收。Dynabeads 可以通过磁性分离捕获,并且可以保存 100 μl 洗涤缓冲液用于本底计数。珠可以重悬浮于水中(如上计算的 1/4 捕获珠体积)。

[0167] F:文库选择:计数和回收计算

可以计数 10 - 20%的末次洗涤和珠。避免使用超过 100 μL 珠是可取的,因为这可以猝灭计数。文库选择回收可以使用下式进行计算:

选择回收% = $100 \times \text{CPM}_{\text{总珠}} / \text{CPM}_{\text{总输入}}$

16. 文库选择输出的逆转录

逆转录可以用 SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen™) 完成。每种反应的体积可以根据在选择后的珠体积按比例扩大。输出可以通过用合适引物对逆转录 (RT) 进行分析。例如, ‘Ck 反向’ 或 ‘Ck5-FLAGA20 Rev’ 引物可以用于 κ 文库, ‘CJL 反向’ 或 ‘CL5FLAGA20 Rev’ 引物可以用于 λ 文库, 并且 ‘Lib-GS-Rev’ 或 ‘VH-GSFLAGA20-Rev’ 引物可以用于人 PBMC VH 文库。

[0168] 逆转录引物应具有至少与后续 PCR 反向引物相同的 5' 末端序列, 以避免从逆转录反应留下残留引物, 从而产生具有不同 3' 末端序列的扩增产物。如果较短 ‘Ck 反向’、‘CJL 反向’ 或 ‘Lib-GS-Rev’ 引物用于 RT, 那么这是尤其重要的, 因为任何残留量的这些引物可以参与下述 PCR, 并且产生缺乏聚腺苷酸尾的产物。

[0169] 表 1: 用于扩增文库选择输出的寡核苷酸引物

Ck 反向	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGA TGGTGCAGCCACAGTTCG
Ck5- FlagA20 Rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATG CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGAT GGTGCAGCCACA
CJL 反向	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGT GGGGTTGGCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT
CL5FLAG A20 Rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATG CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTG GGGTTGGCCTTG
Lib-GS- Rev (VH, PBMC)	CGCTACCTCCGCCGCCAGAC
VH- GSFLAGA20- Rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATG CTTTGTCATCATCATCTTTATAATCGCTACCTCCGC CGCCAGAC

示例性 RT 反应条件

对于 200 μ L 最终体积的反应, RT 反应可以如下设立:

珠 (在水中)	X μ L
dH ₂ O	至 108 μ L
10 μ M 反向引物	2 μ L
10 mM dNTP	10 μ L
在 65°C 温育 5 分钟, 在冰上冷却。添加:	
5x 第一链缓冲液	40 μ L
0.1 M DTT	20 μ L

RNase OUT

10 μ L

在添加 10 μ L SuperScript II 逆转录酶前,反应可以在 42°C 温育 2 分钟。反应可以分成 100 μ L 等分试样,并且在 42°C 伴随偶尔搅动温育 50 分钟。管随后可以在反应后在 95°C 温育 5 分钟。可以分离珠且将上清液转移至新管。一般地,样品可以合并,如果它们来自相同选择输出的话。使珠重悬浮于水中(一半 RT 体积)。管可以在反应后在 95°C 温育 5 分钟,并且珠可以通过磁体捕获,并且上清液可以与先前转移的上清液合并。这代表用于选择输出的 PCR 扩增的 cDNA 模板。

[0170] 17. 针对细胞表面抗原的文库选择

针对细胞表面抗原和可溶性生物素化抗原选择 PROfusion 文库之间的主要区别是 PROfusion 分子中的 mRNA 部分通过 cDNA 互补被保护不受细胞 RNA 酶降解,并且因此需要在文库选择前逆转录为 cDNA。依赖于在寡脱氧胸苷酸纯化后的文库体积,可以在 FLAG 纯化前或后执行逆转录反应。重要的是要指出还原剂 DTT 不应包括在逆转录中,或文库选择前的任何步骤,以保存 scFv 分子的链内二硫键。

[0171] A:在寡脱氧胸苷酸纯化后的文库制备

在一个实施方案中,可以使用对于第一轮选择合适的初始 10 ml 翻译体积,但应当指出下述方法可以容易地适合于较小的翻译反应。

[0172] PROfusion 分子可以如上所述进行翻译通过寡脱氧胸苷酸且纯化。纯化的文库应在等于或小于用于翻译的网状(reticulate)裂解物体积的 dH₂O 体积中回收。可以计数输入、末次洗涤缓冲液和 10 μ l 文库,以如上所述测定得率和百分比回收。

[0173] B:FLAG 结合

寡脱氧胸苷酸纯化的文库可以通过添加 1/4 文库体积的 5X PBS 平衡至 1X PBS 的终浓度。可以估计捕获所有 PROfusion 分子所需的抗-FLAG M2 琼脂糖珠量(例如,估计珠的结合容量为约 6 nmol 融合蛋白/mL 50%浆)。为了具有足够的珠体积用于在结合和洗涤过程中处理,使用小于 200 μ L 预洗涤的珠是不可取的。宽口移液管管尖可以用于将抗 FLAG M2 琼脂糖转移至新管。珠可以离心(1500 rpm 1 分钟),并且去除缓冲液。珠可以用 1 ml PBS 洗涤 2 - 3 次,以去除贮存缓冲液中存在的任何痕量去污剂。寡脱氧胸苷酸纯化的文库可以在 1X PBS 中转移至洗涤的抗 FLAG M2 琼脂糖珠,并且在 4°C 旋转 1 小时至过夜。

[0174] C:FLAG 洗涤

作为任选步骤,抗 FLAG M2 琼脂糖珠可以在 4°C 以 1500 rpm 离心 1 分钟,并且弃去上清液。1X PBS 可以用于将珠转移到 Bio-Rad™ Mini-spin 柱或 Invitrogen™ Microcentrifuge Spin Column 上,并且随后通过以 1000 rpm 旋转 10 秒去除缓冲液。Invitrogen™ 柱可以以更高速度(例如 10,000 RPM 是可能的)旋转。珠可以通过 500 - 600 μ L 1 X PBS 洗涤 4X,并且使 PBS 旋转通过柱。珠可以通过 500 - 600 1 X RT 第一链缓冲液(不含 DTT)洗涤 2X。可以弃去流通物,但保存末次洗涤用于闪烁计数是可取的。

[0175] D:FLAG 洗脱

通过添加在第一链缓冲液(不含 DTT)中的 450 μ L (应当指出 230 μ L 可以用于更小的 M2 琼脂糖体积) 100 μ g/mL FLAG 肽,所述第一链缓冲液包含 1:20 稀度的 RNaseOUT,并且随后使混合物在室温温育 10 分钟,可以洗脱 PROfusion 分子。洗脱物可以通过以 3000 rpm 或更快速旋转 20 秒进行收集。这个步骤可以重复一次,并且随后可以合并来自 2 次洗

脱的文库。

[0176] E:FLAG 回收计算

在 β 计数器上计数 5 - 10 μ L 洗脱输出和来自末次洗涤的 100 μ L。可以如下计算 PROfusion 分子回收% (应当指出预期 10-30% 或更高的回收):

$$= (\text{CPM}_{\text{输出}} \times \text{体积}_{\text{输出}}) / (\text{CPM}_{\text{输入}} \times \text{体积}_{\text{输入}})$$

F:逆转录

可以使用章节 16 中描述的引物。

[0177] RT 反应条件

纯化的 PROfusion 文库	445 μ L	890 μ L
10 μ M 反向引物	5 μ L	10 μ L
10 mM dNTP	25 μ L	50 μ L
Superscript II	25 μ L	50 μ L
总体积	500 μ L	1000 μ L

反应可以在 37°C 温育 1 小时, 连同或不连同搅动。

[0178] 文库可以如下进行平衡用于针对细胞表面抗原选择。在逆转录反应已完成, 5 M NaCl 可以添加到反应混合物中至 75 mM (15.3 μ L - 1 mL 和 7.6 - 500 μ L 反应)。如果需要增加体积, 那么另外 1X PBS 可以添加到文库中。下述封闭试剂可以在选择前添加到文库中。

	终浓度	
BSA, 50 mg/ml	21 μ L	1 mg/ml
鲑精 DNA, 10 mg/ml	10.5 μ L	0.1 mg/ml

[0179] 预澄清步骤可能是首次用于实验的文库选择所需的, 但如果使用由单个模板制备的文库, 例如制备用于亲和力成熟的文库, 那么可以省略。

[0180] 用于文库预澄清的细胞 (抗原首次用于实验的细胞) 应通过流式细胞术或蛋白质印迹分析证实在细胞表面上不具有靶抗原表达。例如, 这可以是用于生成抗原表达性稳定细胞系的亲本细胞, 这呈现了其中在用于预澄清和用于选择的细胞之间唯一已知的表面蛋白质差异应是靶抗原自身的情况。

[0181] 应计算用于预澄清文库所需的细胞数目。这是用于预澄清文库所需的抗原首次用于实验的细胞数目, 并且与用于文库选择的数目相同。细胞数目 (X) 由几个数目进行计算: 抗原表达性细胞表面上的抗原拷贝 (C)、用于选择的文库大小 ($S = \text{摩尔} \times 6 \times 10^{23}$)、和将与靶抗原结合的文库级分 (F)。它还可以通过这个公式大致计算, 以允许靶抗原或预澄清能力的 10 倍过量:

$$X = 10 \times S \times F / C$$

例如, 假定一种特定抗原具有 1×10^4 的估计细胞表面拷贝数, 并且在 10 pmol 首次用于实验的抗体文库中, 通过抗原结合或本底粘着可以回收小于 0.05% (5×10^{-4}) 的文库。用于预澄清和选择所需的细胞数目是

$$X = 10 \times (10 \times 10^{-12} \times 6 \times 10^{23}) \times (5 \times 10^{-4}) / (1 \times 10^4) = 3 \times 10^6$$

在实践中,细胞数目应是 5×10^6 或更多,以确保细胞沉淀可以在形成沉淀后可见。

[0182] G:预澄清文库

细胞密度可以通过血细胞计数器或 Coulter 计数器进行计数,并且足够细胞可以转移至离心管。细胞可以在 4°C 以 1500 rpm 离心,并且非常轻轻地重悬浮于 1 mL 冰冷冷却的 PBS 中。细胞悬浮液可以转移至 1.7 mL 螺旋盖微量离心管。小心不通过移液剪切细胞。细胞可以以 1500 rpm 离心并且去除 PBS。用 PBS 的洗涤步骤可以再一次重复。来自步骤 13.3.3 的文库应立即添加到轻轻重悬浮的细胞中。管随后可以浸入冰水浴内,并且搅动约 60 分钟。细胞可以以 1500 rpm 离心,并且将文库转移至新细胞管用于第二次预澄清或用于抗原选择。

[0183] H:针对抗原表达性细胞的文库选择

计算用于抗原选择所需的细胞数目。这是与如上计算用于预澄清文库相同的数目。细胞数目(X)由几个数目进行计算:抗原表达性细胞表面上的抗原拷贝(C)、用于选择的文库大小($S = \text{摩尔} \times 6 \times 10^{23}$)、和将与靶抗原结合的文库级分(F)。它还可以通过这个公式大致计算,以允许靶抗原或预澄清能力的 10 倍过量:

$$X = 10 \times S \times F / C$$

I:文库选择

抗原表达性细胞密度可以通过血细胞计数器或 Coulter 计数器进行计数,并且足够抗原表达性细胞可以转移至离心管。细胞可以在 4°C 以 1500 rpm 离心,并且非常轻轻地重悬浮于 1 mL 冰冷冷却的 PBS 中。细胞悬浮液可以转移至 1.7 mL 螺旋盖微量离心管。小心不通过移液剪切细胞。细胞以 1500 rpm 离心并且去除 PBS,并且用 PBS 再一次重复洗涤。纯化和/或预澄清的文库可以立即用于轻轻重悬浮细胞。管可以浸入冰水浴内,并且旋转 2 小时。以 1500 rpm 离心,并且弃去上清液。细胞可以用 1 mL PBS 洗涤 4 次,以 1500 rpm 离心并且弃去上清液。细胞可以重悬浮于 500 μL PBS 中。若需要,则计数最高达 20% 的细胞和末次洗涤。

[0184] J:文库输出回收

5 μL RNA 酶 H (2 U/ μL) 可以添加到重悬浮的细胞中,并且在 37°C 温育 20 分钟。这将消化 RNA,并且释放来自细胞表面的 cDNA。细胞可以以 1500 rpm 离心 30 秒,并且将上清液转移至新管。细胞目前可以被弃去。5 μL RNA 酶 A (20 mg/ml) 可以添加到上清液,并且在 37°C 温育 30 分钟。这降解在选择过程期间可以来自破裂细胞的任何细胞 RNA。降解的 RNA 可以随后通过透析回收,并且从而阻止干扰通过 PCR 的文库扩增。向上清液中添加等体积酚/CHCl₃/异戊醇(25:24:1)且涡旋 30 秒。通过在 Phase Lock Gel Heavy 2 ml 管(Eppendorf)中以最大限度速度离心 5 分钟,底部有机相可以与顶部水相分离。顶部水相可以转移至新管,并且萃取用酚/CHCl₃/异戊醇(25:24:1)重复一次且通过 CHCl₃ 重复一次。在 CHCl₃ 萃取后的顶部水相可以转移至 Mini Dialysis Kit, 8 kDa 截止, 2 mL (GE healthcare),并且在 4°C 针对 4 升 dH₂O 透析过夜。

[0185] K:计数和文库选择回收计算

从第 3 轮开始,计数 10 - 20% 的末次洗涤和细胞。

[0186] 选择回收 % = $100 \times \text{CPM}_{\text{总细胞}} / \text{CPM}_{\text{总输入}}$

18. 通过 RT-PCR 再扩增文库 DNA

逆转录可以使用由文库捕获的材料执行。本领域已知的试剂和规程适合于执行逆转录反应。反应体积可以根据在选择后的珠体积按比例扩大或缩小。

[0187] 用于逆转录的引物可以是位于抗体文库的 3' 末端不变区上的任何合适的反向互补序列,并且可以与后续扩增 PCR 中使用的反向引物相同或进一步在其 3'。

[0188] 示例性逆转录反应包含来自文库选择的珠(在水中)、反向引物和 dNTP。反应在 65°C 温育约 5 分钟,并且在冰上冷却。随后一般将第一链合成缓冲液、约 0.1M DTT 和 RNA 酶抑制剂添加到反应中。在添加逆转录酶前,逆转录反应在约 42°C 温育 2 分钟。反应在约 42°C 下伴随偶尔搅动温育 50 分钟。反应随后在 95°C 温育 5 分钟。珠随后通过磁体进行收集,并且将上清液转移至新管,如果它来自相同选择输出,那么将其合并。使珠重悬浮于水中(一半 RT 体积),并且在管中在 95°C 温育 5 分钟。珠再次使用磁体进行收集,并且上清液与先前转移的上清液合并。这包含用于选择输出的 PCR 扩增的 cDNA 模板。在 PCR 后,将 10- μ L PCR 产物装载到 2% 琼脂糖凝胶上,以证实反应是成功的。

[0189] 19. 用于文库 DNA 模板扩增的 PCR

对于来自第一轮和第二轮的选择输出,cDNA (来自 RT 反应的上清液)可以针对水进行透析,其中使用 8 kDa 截止,并且完整量的 cDNA 可以用作 PCR 模板。对于来自后面循环的选择输出,10% cDNA 一般可以用作用于 PCR 的模板,并且透析一般不是必需的。对于第 1 和 2 轮输出(使用所有 RT 产物),反应可以在 1 mL PCR 体积中执行,而对于来自后面循环的输出,反应体积可以按比例缩小。应由主混合物制备用于 100- μ L 反应的等分试样。用于文库 DNA 模板扩增的示例性 PCR 反应显示于下表 7 中。

[0190] 表 2: 用于文库 DNA 模板扩增的示例性 PCR 反应

DNA 模板	X μ L
dH ₂ O 添加至	740 μ L
10X KOD 缓冲液	100 μ L
MgSO ₄ (25 mM)	60 μ L
10 mM dNTP	20 μ L
5' 正向引物 (10 μ M)	30 μ L
3' 反向引物 (10 μ M)	30 μ L
KOD Hot Start DNA 聚合酶	20 μ L

总体积	1000 μ L*

在示例性实施方案中,1 mL PCR 反应用于第 1 和 2 轮输出,并且 0.5 mL 反应用于来自后面循环的输出。应由主混合物制备 100- μ L 反应的等分试样。用于文库 DNA 模板扩增的示例性热循环条件显示于下表 8 中。

[0191] 表 3: 用于文库 DNA 模板扩增的示例性可替代 PCR 反应

cDNA模板	X μ L
dH ₂ O	添加至 790 μ L
10X High Fidelity Taq DNA聚合酶缓冲液	100 μ L
MgSO ₄ (50 mM)	40 μ L
10 mM dNTP	20 μ L
5' 正向引物 (10 μ M)	20 μ L
3' 反向引物 (10 μ M)	20 μ L
High Fidelity Taq DNA聚合酶	10 μ L

总体积	1000 μ L

在示例性实施方案中,1 mL PCR 反应用于第 1 和 2 轮输出,并且 0.5 mL 反应用于来自后面循环的输出。应由主混合物制备 100- μ L 反应的等分试样。用于文库 DNA 模板扩增的示例性热循环条件显示于下表 8 中。

[0192] 表 4: 用于文库 DNA 模板扩增的另一种示例性可替代 PCR 反应

DNA模板	X μ L
dH ₂ O	添加至 660 μ L
10X KOD buffer	100 μ L
MgSO ₄ (25 mM)	60 μ L
2 mM dNTP	100 μ L
5' 正向引物 (10 μ M)	30 μ L
3' 反向引物 (10 μ M)	30 μ L
KOD Hot Start DNA聚合酶	20 μ L

总体积	1000 μ L*

用于文库 DNA 模板扩增的热循环条件

95 °C	2 分钟	
	↓	
95 °C	20 秒	} 20 个循环 *
55 °C	10 秒	
70 °C	15 秒	
	↓	
70 °C	30 秒	
	↓	
4 °C	长时间保持	

*注 :18 - 20 个扩增循环可以一般与 KOD Hot Start DNA 聚合酶一起使用,然而,少至 13 个循环可以在扩增足够量的文库 DNA 中是成功的。对于另外扩增循环,各种大小的非特异性产物可以变得更明显,并且产物可能需要进行凝胶纯化。若可能,则增加 DNA 模板输入而不是扩增循环数目可能是有帮助的。

[0193] 表 5 : 用于文库 DNA 模板扩增的热循环条件

94 °C	2 分钟	
	↓	
94 °C	20 秒	} 25 个循环 *
55 °C	20 秒	
68 °C	1 分钟	
	↓	
68 °C	5 分钟	
	↓	
4 °C	长时间保持	

*注 :25 个循环一般给出足够扩增,但它可增至多达 35 个循环以获得更多产物。对于另外扩增循环,各种大小的非特异性产物可以变得更明显,并且产物可能需要进行凝胶纯化。若可能,则增加 DNA 模板输入而不是扩增循环数目可能是有帮助的。

[0194] 在 PCR 后,通过例如琼脂糖凝胶电泳证实 PCR 产物的大小。如果产物是正确大小(对于 scFv ~850 bp,对于 VH 或 VL 文库 ~500 bp)且存在最低限度非特异性产物,那么产物可以一般直接或在用旋转柱(例如 Qiagen™ QIAquick PCR Purification Kit)纯化后用于下一轮转录反应中。在一些情况下,PCR 产物可能需要进行凝胶纯化。如果凝胶纯化待用于 PCR 产物,那么在制备型琼脂糖凝胶上分离所有剩余产物,并且切出特异性条带用于凝胶提取。凝胶纯化的 DNA 的定量可能是易误解的,这是因为 DNA 中的残留 EtBr 趋于干扰 UV 吸光度。在凝胶提取过程中更强烈的洗涤步骤可以帮助减轻这种干扰。若可能,则 DNA 浓度应在分光光度计上进行测量,这是因为 UV 扫描痕量在干净的 DNA 样品和具有残留的 EtBr 的 DNA 之间是非常不同的。随后重复这种规程以进行多轮选择。

[0195] A :VH CDR3 谱型分析 (spectratyping) PCR

谱型分析 PCR 可以用于分析在文库或其选择输出中的 VH CDR3 大小分布。它是评估文库多样性以及选择的进展的有用工具。初始少数轮文库选择输出和在选择前的文库应是非常多样的, 并且 CDR3 大小分布近似高斯分布。

[0196] 表 6 :谱型分析 PCR 引物

6-FAM- PanVHFR3-Fwd	GACACGGCCGTGTATTACTGT
PanJH- Rev	GCTGAGGAGACGGTGACC

谱型分析 PCR 设置

cDNA 模板	2.0 μ L
dH ₂ O	18.1 μ L
5X GoTaq Flexi 反应缓冲液	6.0 μ L
25 mM MgCl ₂	1.8 μ L
10 mM dNTP	0.6 μ L
5' 正向引物 (10 μ M)	0.6 μ L
3' 反向引物 (10 μ M)	0.6 μ L
GoTaq Flexi DNA 聚合酶	0.3 μ L

总体积	30.0 μ L

Promega GoTaq DNA 聚合酶用于这个设置中, 并且可以由来自其他来源的热稳定的 DNA 聚合酶置换。最终 Mg²⁺ 浓度是 1.5 mM。

[0197] 热循环程序

94 °C	2 分钟	
↓		
94 °C	20 秒	} 30 个循环
55 °C	20 秒	
72 °C	30 秒	
↓		
72 °C	5 分钟	
↓		
4 °C	长时间保持	

B: 谱型分析电泳和分析

在 PCR 后, 10- μ L 产物可以装载到 2% 琼脂糖凝胶上, 以证实成功反应, 并且剩余产物可以提交给测序核心设施用于在测序机器上的谱型分析电泳, 连同 ROX 标记的 DNA 大小标记, 这一般而言使 DNA 产物的大小低估 3-bp, 可能是由于标记染料中的差异。

[0198] 扩增的 DNA 产物具有下述组织:

5'-FR3 (27 bp) - VH CDR3 - FR4 (35 bp) -3'

VH CDR3 大小由表观 DNA 产物大小推断, 如通过下述计算通过 Rox 染料大小标记测定的:

$$\text{Size}_{\text{VH CDR3}} = (\text{Size}_{\text{表观 DNA 产物大小}} - 60) / 3$$

其中 60 = (62_{在 2 个末端上的构架} - 1_{3' A 突出端} + 3_{DNA 标记低估})

16. 示例性试剂和缓冲液组成

10X 化学连接缓冲液

	Tris, pH 7	250 mM
	NaCl	1 M
寡脱氧胸苷酸结合缓冲液	1X	2X 3X
Tris, pH 8	100	200 300 mM
NaCl	1	2 3 M
Triton X-100	0.05	0.1 0.15%
FLAG 结合缓冲液	1X	5X
基于磷酸盐的缓冲液		
PBS	1X	5X
Triton X-100	0.025	0.125%
可替代的基于 HEPES 的缓冲液		
HEPES	50	250 mM
NaCl	150	750 mM
Triton X-100	0.025	0.125%
选择缓冲液		
基于磷酸盐的缓冲液		
PBS	1X	
BSA	1 mg/mL	
鲑精 DNA	0.1 mg/mL	
Triton X-100	0.025%	
酵母 tRNA (任选的, 在使用前添加)	20 ng/mL	
可替代的基于 HEPES 的缓冲液		
HEPES	50 mM	
NaCl	150 mM	
BSA	1 mg/mL	
鲑精 DNA	0.1 mg/mL	

Triton X-100	0.025%
酵母 tRNA (任选的, 在使用前添加)	20 ng/mL
第一链缓冲液	
Tris-HCl, pH 8.3	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM
50X FLAG 母液	
FLAG 肽	25 mg
选择缓冲液	5 mL

制备 1 mL 等分试样且贮存于 -20°C。

[0199] FLAG 洗脱缓冲液

50X FLAG 母液	1 mL
选择缓冲液	49 mL

制备 1 mL 等分试样且贮存于 -20°C。

[0200] 寡脱氧胸苷酸纤维素制剂

在 50 mL 管中称重 2.5 g 寡脱氧胸苷酸纤维素。

[0201] 添加 25 mL 0.1 N NaOH 且混合。

[0202] 以 1500 rpm 离心 3 分钟, 弃去上清液。

[0203] 用 25 mL 1X 寡脱氧胸苷酸结合缓冲液洗涤寡脱氧胸苷酸纤维素。

[0204] 以 1500 rpm 离心 3 分钟, 弃去上清液。

[0205] 再重复 3 次洗涤, 并且测量上清液的 pH。pH 应与洗涤缓冲液相同 (~ pH 8.5)。

[0206] 通过添加 1X 寡脱氧胸苷酸结合缓冲液, 使寡脱氧胸苷酸纤维素重悬浮至 25 mL 的最终体积。这可以是约 50% 浆。将预洗涤的纤维素珠贮存于 4°C。

[0207] 最终浓度 = 100 mg/mL = 1 nmol RNA 容量。

[0208] 抗 FLAG M2 琼脂糖制剂

将 25 mL M2 琼脂糖珠转移到 50 mL 管内。

[0209] 使珠在 Beckman 离心机中以 1000 rpm 离心 5 分钟, 并且通过抽吸去除上清液。

[0210] 通过使珠重悬浮于 10 mM 甘氨酸, pH 3.5 的相等体积中洗涤。

[0211] 使珠在 Beckman 离心机中以 1000 rpm 离心 5 分钟, 并且通过抽吸去除上清液。

[0212] 用 1 柱体积的 1X FLAG 结合缓冲液重悬浮。

[0213] 使浆在 Beckman 离心机中以 1000 rpm 离心 5 分钟, 并且通过抽吸去除上清液。

[0214] 重复 3 次洗涤。

[0215] 用 1 柱体积的 1X 结合缓冲液 (包含 1 mg/mL BSA 和 100 mg/mL 鲑精 DNA) 重悬浮。

[0216] 在 4°C 翻滚 1 小时或过夜。

[0217] 若需要则以 2 mL 级分等分试样且保持在 4°C。

[0218] 实施例 1

功能 mRNA-scFv 分子的证实

4 种已知抗体用于证实功能 mRNA-scFv 分子可以展示且与其各自抗原结合: D2E7 (人抗 hTNF)、Y61 (人抗 hIL-12)、17/9 (小鼠抗 HA) 和 MAK195 (小鼠抗 hTNF)。使用下表 9 中

所示的引物,通过 PCR 由质粒 DNA 生成 MAK-195 scFv。

[0219] 表 7 :用于构建 MAK195 mRNA-scFv 构建体的寡核苷酸引物

引物	序列
T7-MAK195VH- Fwd	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTT ACAATTACACCATGGAGGTGCAGCTGAAGGAG TCAGG (SEQ ID NO: 22)
MAK195VhGS- Rev	CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT CC (SEQ ID NO: 23)
MAK195VLGS- Fwd	GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG CGGTGGCGGATCGGACATTGTGATGACCCAGTC TC (SEQ ID NO: 24)
MAK195VL-Rev	GATGGTGCAGCCACCGTACGTTTTATTTC AAC TTTGTCCCGAG (SEQ ID NO: 25)

基于由 NCBI 的数据库下载的蛋白质序列 A31790 和 B31790(参见下表 10),使用下述引物,通过 PCR 生成抗 HA 17/9 scFv (参见 Schulze-Gahmen 等人(1993)J. Mol. Biol. 234 (4):1098-118)。

[0220] 表 8 : 用于构建 17/9 mRNA-scFv 构建体的寡核苷酸引物

引物	序列
T7TMVUTR-	GGACAATTACTATTTACAATTACACCATGGAAG
17/9 VH-1 Fwd	TGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGATCTGGTG AAACC (SEQ ID NO: 26)
17/9 VH-2 Rev	GCTGCTAAAGCTAAAGCCGCTCGCCGCGCAGCT CAGTTTCAGGCTGCCGCCCGGTTTCACCAGATC GCCG (SEQ ID NO: 27)
17/9 VH-3 Fwd	GGCTTTAGCTTTAGCAGCTATGGCATGAGCTGG GTGCGCCAGACCCCGGATAAACGCCTGGAATG GGTGG (SEQ ID NO: 28)
17/9 VH-4 Rev	GCCTTTCACGCTATCCGGATAATAGGTATAGCC GCCGCCGTTGCTAATGGTCGCCACCCATTCCAG GCGT (SEQ ID NO: 29)
17/9 VH-5 Fwd	CCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGC CGCGATAACGCGAAAAACACCCTGTATCTGCAG ATG (SEQ ID NO: 30)
17/9 VH-6 Rev	GTTCGCGGCGCGCGCAATAATACATCGCGCTAT CTTCGCTTTTCAGGCTGCTCATCTGCAGATAACA GGGT (SEQ ID NO: 31)
17/9 VH-7 Fwd	ATTGCGCGCGCCGCGAACGCTATGATGAAAAC GGCTTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACCGT (SEQ ID NO: 32)
17/9 VH-8 GS Rev	CGATCCGCCACCGCCGCTGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCCGCGCTCACGGTCACCAGGGT GCC (SEQ ID NO: 33)
GS-17/9 VL-1 Fwd	AGCGGCGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACC CAGAGCCCGAGCAGCCTGACCGTGACCGCGGG CGAAA (SEQ ID NO: 34)
17/9 VL-2 Rev	TGTTTGCCGCTGTAAACAGGCTCTGGCTGCTG GTGCAGCTCATGGTCACTTTTCGCCCGCGGTC ACGG (SEQ ID NO: 35)

引物	序列
17/9 VL-3 Fwd	GTTTAAACAGCGGCAAACAGAAAACTATCTGA CCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGCCGCCG AAAGTG (SEQ ID NO: 36)
17/9 VL-4 Rev	CGGTAAAGCGATCCGGCACGCCGCTTTCGCGGG TGCTCGCCCAATAAATCAGCACTTTCGGCGGCT GGCC (SEQ ID NO: 37)
17/9 VL-5 Fwd	TGCCGGATCGCTTTACCGGCAGCGGCAGCGGCA CCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCGTGCAGG CGGA (SEQ ID NO: 38)
17/9 VL-6 Rev	AAAGGTCAGCGGGTTGCTATAATCGTTCCTGGCA ATAATACACCGCCAGATCTTCCGCCTGCACGCT GCTA (SEQ ID NO: 39)
17/9 VL-7 Fwd	AGCAACCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCACCAAA CTGGAAGTCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT GTCT (SEQ ID NO: 40)
17/9 VL-8 FLAG Rev	TTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTT GTAGTCGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACC (SEQ ID NO: 41)

17/9抗体序列使用登记号A31790和B31790从NCBI数据库中检索。

关于这些 scFv 的 DNA 构建体在体外转录,并且随后通过兔网织红细胞裂解物翻译为 mRNA-scFv (蛋白质经由具有嘌呤霉素修饰的接头与 mRNA 附着)或游离 scFv (蛋白质不与 mRNA 附着)。纯化 2 种类型的分子且通过相应生物素化抗原实施拉下测定(参见图 4)。

[0221] 图 4 中的数据显示功能 m-RNA-scFv (与生物素化抗原结合)可以通过链霉抗生物素蛋白-磁珠拉下,尽管以比游离 scFv 更低的百分比回收。进一步的实验显示这种差异仅仅是由于与 scFv 栓系的重 RNA。来自 mRNA-scFv 分子的 RNA 部分的 RNA 酶降解使通过抗原的 scFv 回收恢复至与游离 scFv 相同的水平(参见图 5)。

[0222] 实施例 2

mRNA 展示技术的最优化以改善翻译反应

在优选实施方案中,文库大小是 1×10^{12} 。需要约 20 pmol 融合蛋白(例如 1.2×10^{13})用于选择,以覆盖文库大小 12 次。在 FLAG 纯化后的回收一般是约 30%。因此,在寡脱氧胸苷酸纯化后需要约 60 pmol 融合蛋白,以输入 FLAG 纯化内。在一个实施方案中,在寡脱氧胸苷酸纯化后获得约 1.2 pmol 融合蛋白/100 pmol RNA。在这个实施方案中,需要约 5 nmol RNA (这覆盖文库大小 3000 次),以获得 60 pmol 融合蛋白。应当指出这种计算不考虑仅约 20-30%融合的 mRNA 展示分子是功能的观察(可以在选择后回收)。

[0223] 由于对于 mRNA 展示方法的后续步骤所需的融合蛋白的上述量,使翻译反应最优

化以使蛋白质回收达到最大。在 FLAG 纯化后评估改变进入翻译反应内的 RNA 输入的初始量。通过测量在翻译反应过程中掺入的 S^{35} 甲硫氨酸百分比,并且通过计算 pmol 蛋白质(输出)与 pmol RNA (输入)的比,评估蛋白质回收。测试的输入 RNA 的起始量,以及所得到的蛋白质回收,显示于表 12 中。如通过这种分析证实的,较低 RNA 输入令人惊讶地导致较高蛋白质回收百分比。

[0224] 表 9 :RNA 输入和蛋白质回收之间的关系

进入翻译内的RNA输入 (1小瓶裂解物)	在FLAG纯化后	
	掺入的 S^{35} Met %	pmol 蛋白质/pmol RNA
400 pmol	0.40%	1/400 = 0.25%
200 pmol	0.67%	1.7/200 = 0.85%
100 pmol	0.99%	2.5/100 = 2.5%
50 pmol	0.76%	1.9/50 = 3.8%
25 pmol	0.73%	1.8/25 = 7.2%

翻译反应也使用不同量的游离氨基酸混合物执行,以测定对蛋白质回收的作用。测试的相对起始量的氨基酸混合物,以及所得到的蛋白质回收,显示于表 13 中。每种情况下的 RNA 输入是 50 pmol。如通过这种分析证实的,增加氨基酸库导致翻译效率中的降低。

[0225] 表 10 :氨基酸浓度和蛋白质回收之间的关系

氨基酸混合物	在FLAG纯化后	
	掺入的 S^{35} Met %	pmol 蛋白质 /pmol RNA
1x	1.60%	2/50 = 4%
2x	0.42%	0.5/50 = 1%
3x	0.13%	0.77/50 = 0.3%
4x	0.03%	0.04/50 = 0.07%

还就其对翻译效率的作用测试了不同量的“冷”(即非放射性)甲硫氨酸。测试的不同浓度的冷甲硫氨酸,以及所得到的蛋白质回收,显示于表 14 中。每种情况下的 RNA 输入是 50 pmol。如通过这种分析证实的,增加冷甲硫氨酸的输入不导致翻译效率中的增加。

[0226] 表 11 :冷甲硫氨酸浓度和蛋白质回收之间的关系

冷甲硫氨酸浓度	在FLAG纯化后	
	掺入的 S^{35} Met %	pmol 蛋白质/pmol RNA
5 μ M	1.00%	1.31/50 = 2.6%
17.5 μ M	0.23%	1.15/50 = 2.3%
30 μ M	0.20%	1.52/50 = 3.0%
42.5 μ M	0.15%	1.58/50 = 3.2%

当计划用于 mRNA 展示的翻译反应时,因此应考虑 RNA 输入和氨基酸浓度。尽管降低每

个反应中的 RNA 输入可以改善蛋白质回收,但它还可以影响文库大小。可以用于实践本发明的 mRNA 展示方法的示例性 RNA 翻译反应显示于表 15 中。

[0227] 表 12 :示例性 RNA 翻译反应

体外转录的 RNA	100 pmol = 29-36 μ g
翻译混合物 (包括氨基酸混合物, 不包括甲硫氨酸)	15 μ l
³⁵ S 甲硫氨酸	2 μ l
网织红细胞裂解物	200 μ l
100 mM GSSG/10 mM GSH	3.3 μ l
PDI (1 U/ μ L)	6 μ l
H ₂ O	至 300 μ L
反应条件	30°C 进行 60-90 分钟

实施例 3

用于 scFv 选择的 mRNA 展示技术的最优化 - 间隔区长度

先前已提议 scFv 蛋白质和 mRNA 末端之间的长间隔区长度改善 scFv 折叠和功能(参见 Hanes 等人(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (10):4937-42)。因此,研究了 scFv 和接头退火位点之间的间隔区长度对 mRNA-scFv 分子功能和得率的作用(参见图 6)。制备了具有短、中等和长 3' 间隔区的 3 种不同 D2E7 scFv 构建体,以及用于 Y61 和 17/9 scFv 的 2 种短和长间隔区构建体(关于 D2E7 间隔区构建体参见图 8)。图 7 中所述的结果显示较长的间隔区不提供 mRNA-scFv 分子的功能中可测量的优点,如通过抗原结合评估的。此外,较长的间隔区长度显著减少 mRNA-scFv 得率(参见图 7)。RNA 得率对于较长的间隔区也较低:短间隔区获得 6 nmol RNA;中等间隔区获得 3.4 nmol RNA;并且长间隔区获得 1.7 nmol。因此,在一个实施方案中,短间隔区对于 scFv 文库构建是优选的。

[0228] 还使用 3 种不同 Y61 构建体执行不同间隔区和接头的比较(参见图 23)。下表 16 中所示的结果显示 RNA 得率对于较长的间隔区也较低。此外,通过将聚腺苷酸尾从 mRNA 自身(Y61-scGene3pA)移动到 mRNA 和 scFv 蛋白质之间的 DNA 接头(Y61-scGene3),在 mRNA 分子纯化和抗原结合中都不存在差异,这是因为 scFv 蛋白质在这 2 种构建体之间是等同的,如分别在 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:4 中显示的。

[0229] 表 13 :不同间隔区和接头的比较

构建体	回收百分比		
	寡脱氧胸苷酸纯化	FLAG 纯化	IL-12 (50nM 选择)
Y61-scCL- 短	1.00%	51.3%	21.1%
Y61-scGene3	0.46%	50.3%	8.0%
Y61-scGene3pA	0.45%	47.4%	6.1%

如下所示,17/9 需要在翻译过程中的 PDI 以是功能的,并且在选择前在逆转录反应中

的 DTT 显示影响其抗原结合。如这些结果指出的,二硫键是 17/9 功能必需的,并且这使得 17/9 成为研究间隔区长度需求的良好候选物。图 9 显示尽管较长的间隔区长度不改善 mRNA-scFv 分子与抗原的结合,但它减少其得率。

[0230] 实施例 4

改善 scFv 蛋白质折叠和功能的 mRNA 展示技术的最优化 - 省略在半胱氨酸残基上的化学修饰

本领域的信使 RNA 展示技术包括在游离半胱氨酸残基上的化学加帽反应,以预防通过 2-硝基-5-氰硫基苯甲酸形成不希望有的半胱氨酸二硫键,这导致氰基化(cyanylation),或通过 N-乙基马来酰亚胺,这与硫氢基基团共价连接。虽然这个加帽反应消除了由游离半胱氨酸残基的随机交联引起的潜在蛋白质错折叠,但本发明消除了游离半胱氨酸在抗体体内的人工保存,这可以是由于不可预测的物理或化学性质对于其未来可制造性的损害。化学加帽的步骤这样消除,从而使得在文库选择过程中不积极保存超过 scFv Ig 结构域折叠所需的 4 个半胱氨酸的任何额外游离半胱氨酸。

[0231] 实施例 5

改善 scFv 蛋白质折叠和功能的 mRNA 展示技术的最优化 - 需要共翻译的蛋白质二硫键异构酶活性

已暗示 PDI 通过异构酶或蛋白伴侣活性或两者促成更佳的蛋白质功能和分泌(参见 Shusta 等人 Nat Biotechnol 16 (8):773-7;Smith 等人 Biotechnol Bioeng 85 (3):340-50)。2 个 Ig 结构域内二硫键由每个 scFv 序列编码,一个在 VH 中且另一个在 VL 结构域中。已暗示共翻译的蛋白质二硫键异构酶(PDI)活性是体外正确的二硫键形成至关重要的(参见 Rybova 等人 Nat Biotechnol 15 (1):79-84)。本领域中的 mRNA 展示规程已规定在翻译反应中包括(PDI)。

[0232] D2E7、Y61 和 17/9 scFv 用于测试其对 mRNA 展示系统中的 PDI 活性的需要。结果显示在其生成过程中如果没有 PDI,那么 2 种 scFv (D2E7 和 17/9)不与其关联抗原结合,而 Y61 看起来不受影响(参见图 10)。得出结论为在大抗体文库水平下,高多样性将需要 PDI 活性,以确保最大限度 scFv 功能。

[0233] 还测试了连同或不连同添加的另外 PDI 翻译的 D2E7 scFv 的回收和功能性。翻译反应包括 1 管裂解物(200 μ l)、100 pmol D2E7 短间隔区 RNA 和 PDI 和 GSSG/GSH。不含 PDI 的翻译排除 PDI 和 GSSG/GSH。用 FLAG 纯化回收翻译的蛋白质,并且定量回收量。随后用 50 mM 生物素化 TNF α 和对于各自相等的输入,100000 cpm 执行抗原结合/回收。结果显示于下表 17 中。

[0234] 表 14:测试 D2E7 scFv +/- PDI

翻译	FLAG 回收 (cpm)	FLAG 回收 (%) 输入)	抗原结合回收
D2E7 + PDI	290000 cpm	1.6%	25%
D2E7 - PDI	460000 cpm	2.5%	4%

显示 Y61 在翻译过程中不需要 PDI 用于功能性的结果显示于下表 18 中。

[0235] 表 15 :Y61-Scc1- 短在翻译过程中不需要 PDI 用于功能性

PDI	RT	回收%		
		寡脱氧胸苷 酸纯化	FLAG 纯化	IL-12 (50 nM) 选择
否	否	0.57%	34.0%	18.9%
否	是		9.2%	20.8%
是	否	0.50%	31.9%	24.3%
是	是		9.8%	22.7%

显示 17/9 在翻译过程中需要 PDI 用于功能性的结果显示于下表 19 中。

[0236] 表 16 :17/9 在翻译过程中需要 PDI 用于功能性

	PDI	回收%			无Ag选择
		寡脱氧胸苷 酸纯化	FLAG 纯化	HA (50 nM) 选择	
游离蛋白质	否	N/A	N/A	3.3%	N/A
	是			30.5%	0.7%
连接的 蛋白质	否	3.4%	27.6%	2.3%	N/A
	是	2.5%	39.3%	12.4%	0.8%

实施例 6

改善 scFv 蛋白质折叠和功能的 mRNA 展示技术的最优化 - 从反应中去除二硫苏糖醇
二硫苏糖醇 (DTT) 是通常引入酶促反应中的还原剂, 以使蛋白质聚集降到最低且减少蛋白质氧化。它一般还在 mRNA scFv 分子的体外翻译步骤后用于逆转录 (RT) 反应中。因为它的包括可能减少 scFv 分子中由 PDI 活性产生的 2 个链内二硫键, 所以研究了 DTT 对 scFv 抗原结合功能的潜在作用 (参见图 11)。DTT 的存在显著取消在 RT 后 17/9 scFv 的抗原结合活性, 这与 PDI 活性对于图 11 中所示的 17/9 功能的依赖性一致。抗原结合活性的这种丧失不是由于 RT 反应自身, 这是因为 17/9 的大多数抗原结合活性得到保存, 如果 DTT 从 RT 中省略的话。此外, 结果显示 17/9 scFv cDNA 实际上在不存在 DTT 的情况下通过 PCR 由 mRNA 逆转录, 从而暗示 DTT 不是 RT 反应必要的 (数据未显示)。

[0237] 显示在选择前在 RT 反应中的 DTT 影响 17/9 功能性的结果显示于下表 20 中。然而, 如图 12 中所示, DTT 不影响 RT 过程。

[0238] 表 17 :在选择前在 RT 反应中的 DTT 影响 17/9 功能性

PDI	RT	回收%			
		寡脱氧胸苷酸纯化	FLAG 纯化	HA (50 nM) 选择	无Ag选择
否	否	3.4%	27.6%	2.3%	N/A
是	否	2.5%	39.3%	12.4%	0.8%
	是, 无 DTT		14.2%	9.4%	N/A
	是, 有 DTT		9.9%	2.0%	N/A

与 17/9 scFv 形成对比, 抗 IL-12 Y61 scFv 功能不受 DTT 影响(参见图 11)。这与其前述的对 PDI 活性的不敏感性一致, 并且暗示并非所有抗体 scFv 都需要二硫键用于功能。对于 Y61-scCL- 短采用的不同 RT 条件和相应结果显示于下表 21 和图 13 中。

[0239] 表 18 :用于 Y61-scCL- 短的不同 RT 条件

RT	RT反应中的DTT	选择中的RNaseOUT	回收%		
			寡脱氧胸苷酸纯化	FLAG 纯化	IL-12 (50 nM) 选择
在选择前	是	否	1.6%	25.9%	21.6%
在选择前	否	否		29.3%	18.8%
在选择后	是	否		22.2%	
在选择后	是	是		56.1%	21.0%

在一个实施方案中, DTT 不存在 RT 中, 或可替代地 RT 延迟直至抗原选择后, 以使来自 mRNA-scFv 文库的功能 scFv 得率生产达到最大。下表 22 和 23 分别显示对于 Y61-ScCL- 长和 Y61-ScCL- 短, 延迟 RT 步骤直至抗原选择步骤后的结果。

[0240] 表 19 :比较连同或不连同 RT 步骤的 Y61-ScCL- 长

		RNA 得率	回收%			
			寡脱氧胸苷 酸纯化	FLAG 纯化	IL-12 (50 nM) 选择	无Ag选择
游离蛋白质		3.2 nmoles	N/A		49.5%	0.3%
连接的 蛋白质	无 RT步骤		13%	57.6%	31%	0.2%
	RT步骤			15%	28.6%	0.3%

表 20 :比较连同或不连同 RT 步骤的 Y61-ScCL- 短

		RNA 得率	回收%			
			寡脱氧胸苷 酸纯化	FLAG 纯化	IL-12 (50 nM) 选择	无Ag选择
游离蛋白质		4.7 nmoles	N/A	N/A	40.2%	0.2%
连接的 蛋白质	无 RT步骤		0.55%	47.6%	20.8%	0.1%
	RT步骤			19.3%	21.8%	0.1%

实施例 7

改善 scFv 蛋白质折叠和功能的 mRNA 展示技术的最优化 - 在抗原选择过程中包括 RNA 酶抑制剂

认为通过 RT 产生双链 mRNA-cDNA, 以制备 mRNA-scFv 分子用于抗原结合, 以预防 RNA 降解且减少 RNA 二级结构。在通过抗原选择后, cDNA 可以通过 mRNA 的碱水解进行回收, 且充当通过 PCR 的扩增模板。为了避免通过 RT 在抗原选择前 DTT 对 scFv 功能的潜在影响, 需要采用可替代方法以保护 mRNA 用于在选择后的扩增。

[0241] 因此, 研究了在 mRNA-VH 分子中缺乏其保护性 cDNA 链的 mRNA 是否将足够稳定且便于在抗原选择后通过 RT-PCR 扩增。先前验证的 IL-1 α 结合 mRNA-VH 分子用作模型分子。当在抗原选择前或后进行 RT 时, 比较 Phyl040 VH 序列的回收 (参见图 14)。与本领域中的方法比较 (选择前 RT 和 cDNA 的碱洗脱, 左泳道), 当 mRNA-IL-1 α 复合物在 SA-磁珠上捕获且直接用于 RT 时 (右泳道), 在抗原选择后通过 RT-PCR 的 mRNA 回收看起来明显减少。这可能是由于在抗原选择过程中的部分 RNA 降解或在珠上对于 RT 的弱 mRNA 可接近性。通过酸洗脱 (在 pH 3) 中断 IL-1 α -Phyl040 VH 相互作用且使 mRNA-VH 分子与 SA 珠解离用于更佳 mRNA 可接近性的尝试看起来使其回收更糟, 这可能是由于降低的 mRNA 稳定性或在复合物用 SA 珠取出前进入洗脱缓冲液内的 mRNA-VH 分子与其抗原的弱解离。图 14 显示在抗原选择后的逆转录结果, 比较了在寡脱氧胸苷酸后 RT-PCR 的标准方法与酸洗脱随后为 RT-PCR 和在捕获后珠的直接 RT-PCR。用游离珠以 1:10、1:100 和 1:1000 稀释显示在 1:1000 的稀度下达到强的再扩增。

[0242] 因为可能在抗原选择前省略 RT 且随后通过 RT-PCR 回收 mRNA, 所以研究了通过经由 RNA 酶抑制剂保护 RNA 不受污染 RNA 酶活性, 减少的 mRNA 模板回收是否可以得到恢复或增强。RNaseOUT™ (Invitrogen, 目录 #10777-019) 以 1:20 的稀度包括在抗原选择步骤过程中, 并且随后为 RT-PCR 以比较 mRNA 回收 (参见图 15)。与在抗原选择前执行 RT 相比较, mRNA 模板回收再次减少, 如果 RT 在抗原选择后无 RNA 酶抑制剂时执行的话。有趣的是, RNA 酶抑制剂对于抗原选择的包括不仅恢复而且显著增强 mRNA 回收。因此, 看起来这种增强至少部分是由于用另外的 cDNA 捕获更轻的 ~280 kDa mRNA-scFv 分子比更重的 ~560 kDa mRNA-scFv 分子的那种的更佳效率。

[0243] 还用 mRNA-scFv 分子测试了 RNaseOUT 的包括。图 16 描述了执行的实验, 以比较在 RNaseOUT 的存在或不存在下的 Y61-CL- 长与 Y61-CL- 短。结果可以在下表 24 和图 17 中可见。

[0244] 表 21 :CL- 长和 CL- 短间隔区在 RNaseOUT 的存在或不存在下的比较

构建体	RNaseOUT	回收%		
		寡脱氧胸苷酸纯化	FLAG 纯化	IL-12 (50 nM) 选择
Y61-scCL- 长	否	0.22%	29.3%	27.7%
	是	0.25%	30.5%	33.8%
Y61-scCL- 短	否	0.64%	42.2%	47.2%
	是	0.59%	46.2%	49.4%

实施例 8

关于 17/9 scFv 的文库选择

为了证实 mRNA-scFv 分子可以使用本文描述的 mRNA 展示方法通过几轮选择进行富集, 通过重叠 PCR 构建具有多样性 25 的 scFv 文库。为了生成 scFv 文库, 使等量的 17/9、D2E7、2SD4、Y61 和 MAK195 VH 和 VL 片段混合, 并且组合为具有最大限度多样性 25 的 scFv 文库且如上所述使用。随后通过生物素化 HA 标记肽从这种文库中选择 17/9 scFv。在选择后, 通过克隆和集落 PCR 检查 17/9 富集。定量在一轮 mRNA-scFv 选择前和后的 17/9 scFv 的结果显示于图 18 中。在针对 HA 肽的一轮选择后, 从选择输出回收的所有 scFv 序列都是 17/9 scFv 的那种。

[0245] 实施例 9

mRNA 展示技术可以用于区别具有不同亲和力的 scFv 结合剂

为了测定 mRNA 展示技术即如上所述是否可以用于区别具有不同亲和力的 scFv 结合剂, 制备在 D2E7 和 2SD4 之间的嵌合体。2SD4 是对于 TNF α 显示出低亲和力 (KD ~ 200 nM 作为游离蛋白质) 的 D2E7 scFv 前体。图 19 描述了嵌合体。

[0246] 对于游离蛋白质执行滴定。图 20a 显示在不同嵌合体之间在抗原结合后的回收百分比, 而图 20b 描述了在抗原选择后标准化的回收百分比。上述结果显示如本文描述的 mRNA 展示技术可以用于区别具有不同亲和力的结合剂。

[0247] 实施例 10

mRNA-scFv 分子的热稳定性

为了测定 mRNA-scFv 分子的热稳定性, D2E7-scCk 和 Y61-scCk 以 mRNA-scFv 形式翻译且纯化, 如本文描述的。mRNA-scFv 分子随后在抗原选择前在不同温度温育 30 分钟。在抗原选择后标准化的回收百分比显示于图 21 中。

[0248] 图 22 显示了 RNA 可以在 mRNA-scFv 分子的高温处理后回收。此处, 在具有回收的 Y61-scCk mRNA-scFv 分子的珠上执行 RT-PCR。

[0249] 引入作为参考

在本申请自始至终可以引用的所有引用的参考文献(包括文献参考、专利、专利申请和网站)的内容都是为了任何目的在此特别整体引入作为参考, 其中引用的参考文献也如此。除非另有说明, 否则本发明的实践可以采用本领域众所周知的细胞培养和分子生物学的常规技术。

[0250] 等同方案

本发明可以在不背离其精神或基本特征的情况下以其他具体形式体现。前述实施方案因此在所有方面视为本文描述的本发明的举例说明而不是限制。本发明的范围因此由附加权利要求而不是前述说明书指出, 并且因此预期在本文中包含在权利要求等同的含义和范围内的所有改变。

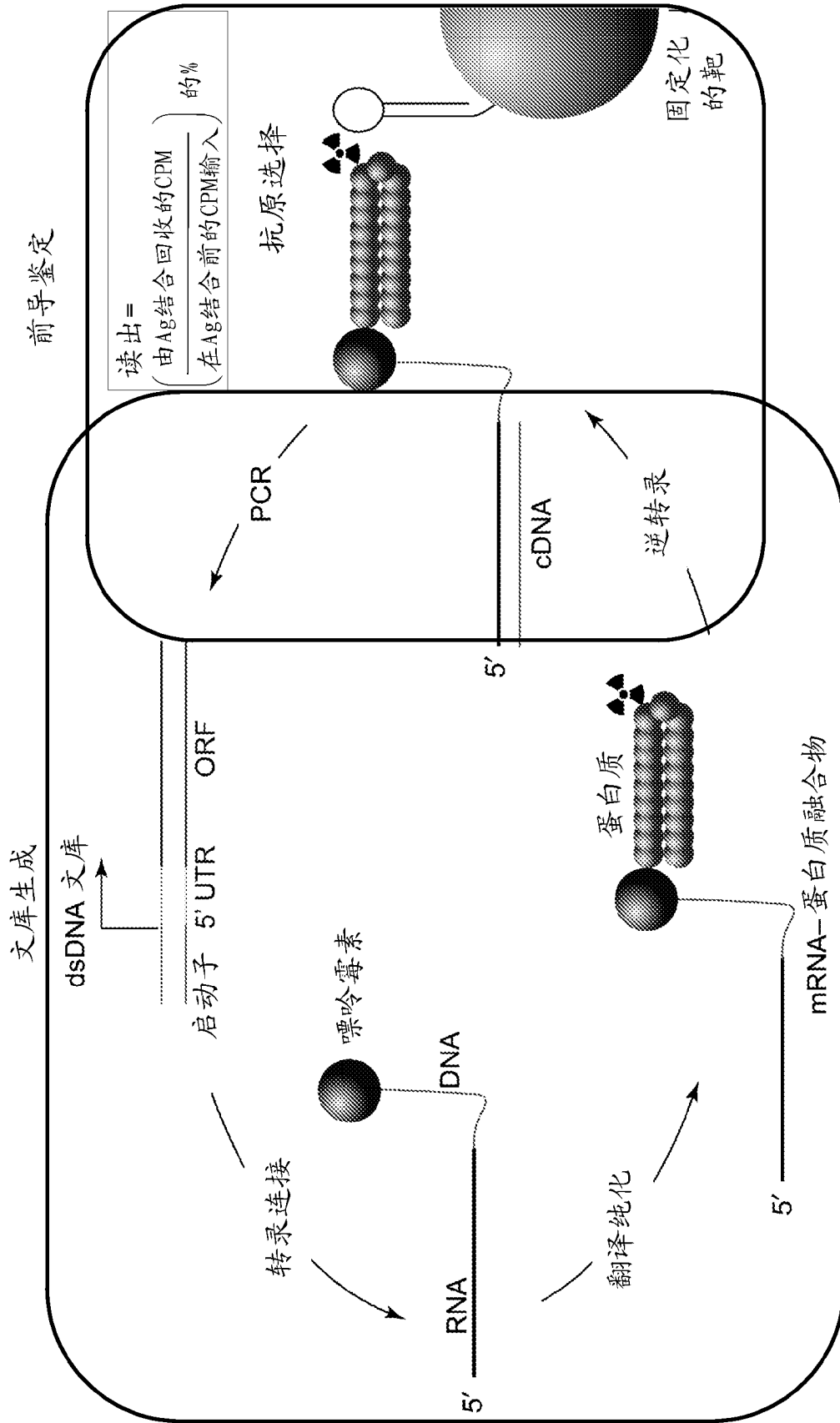


图 1

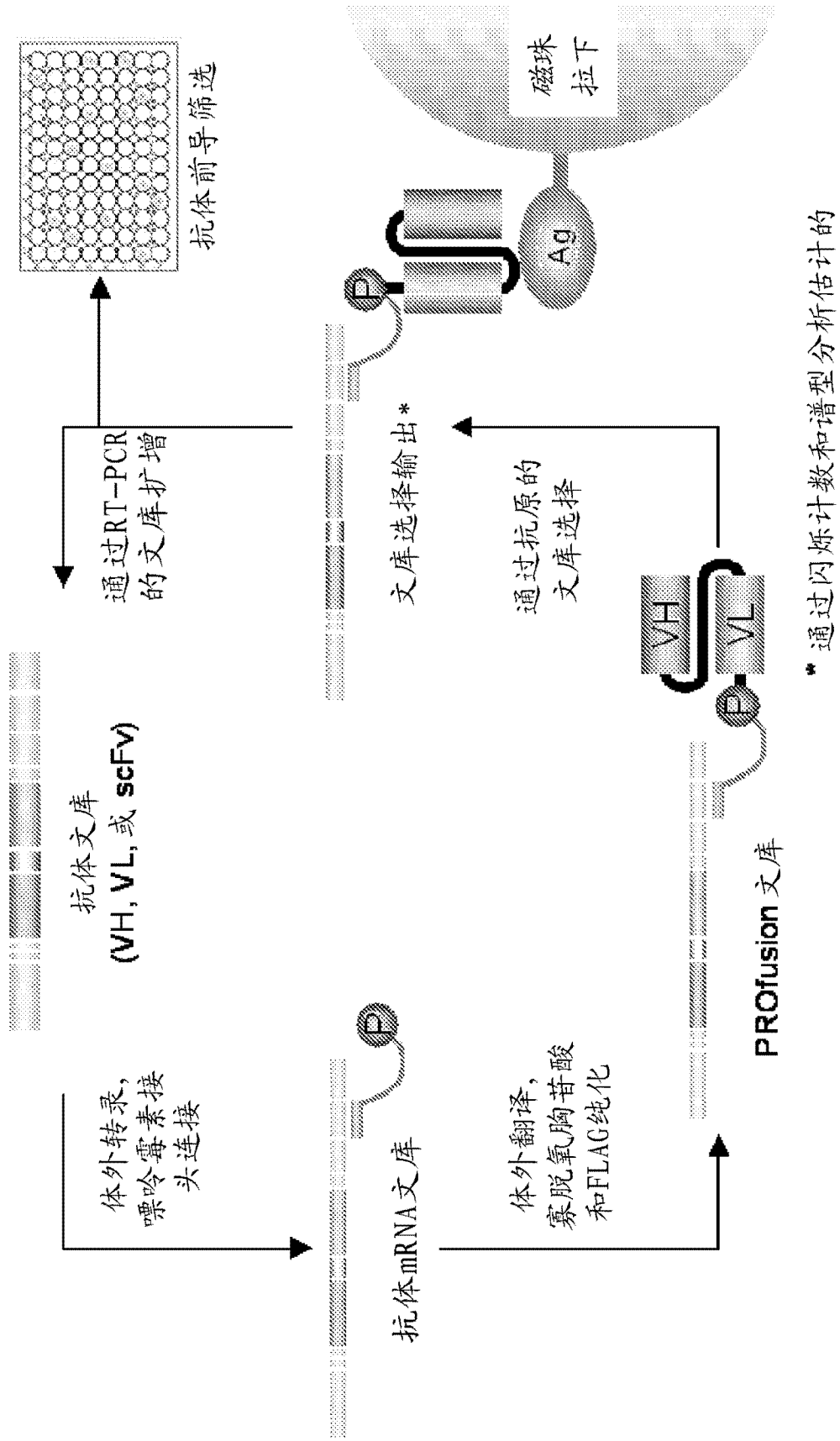


图 2



图 3

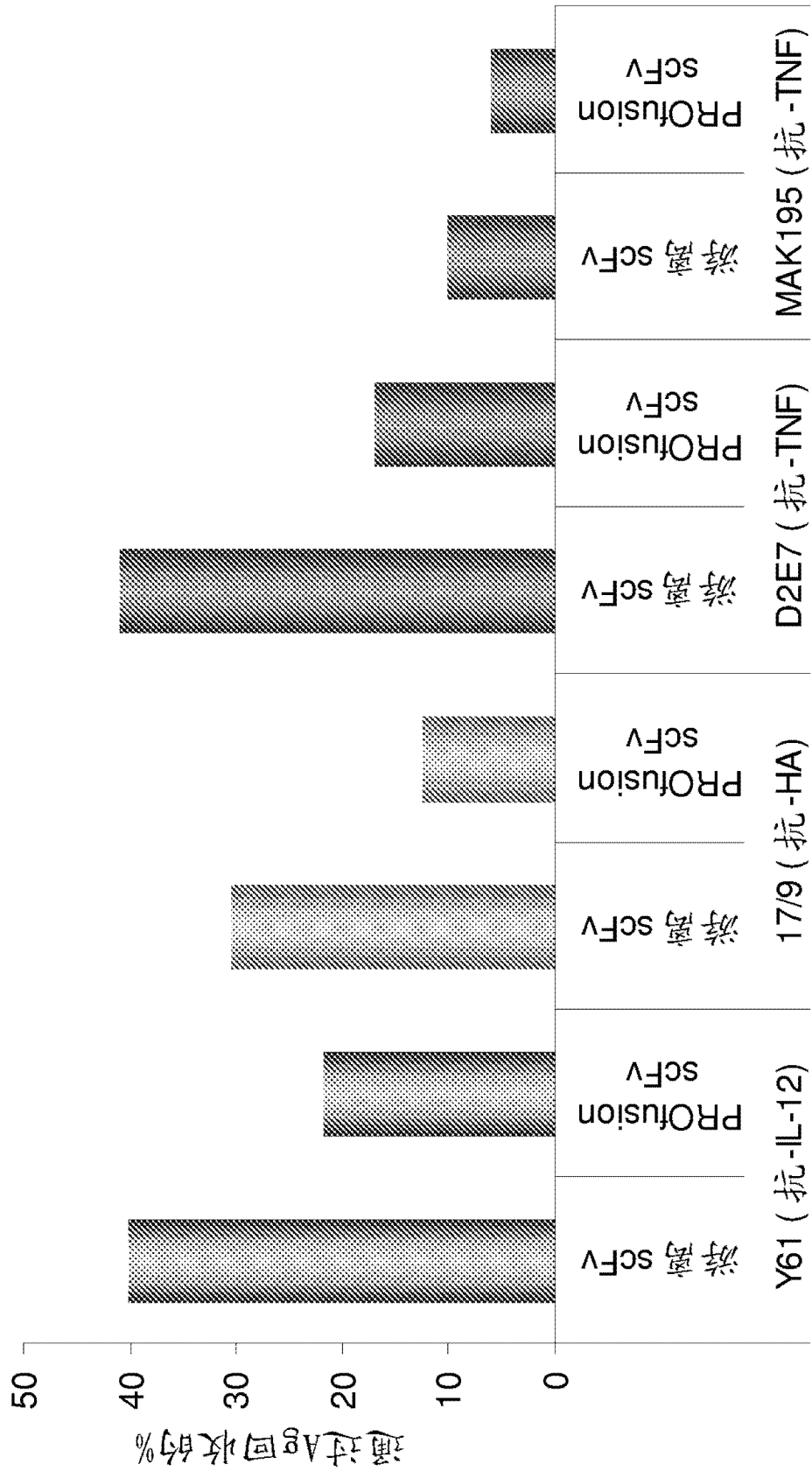
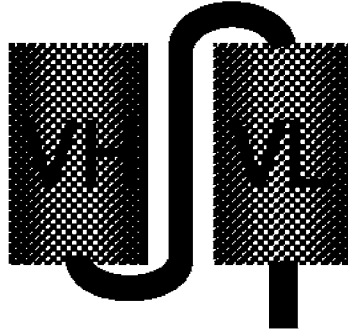


图 4a

游离 scFv



PROfusion scFv

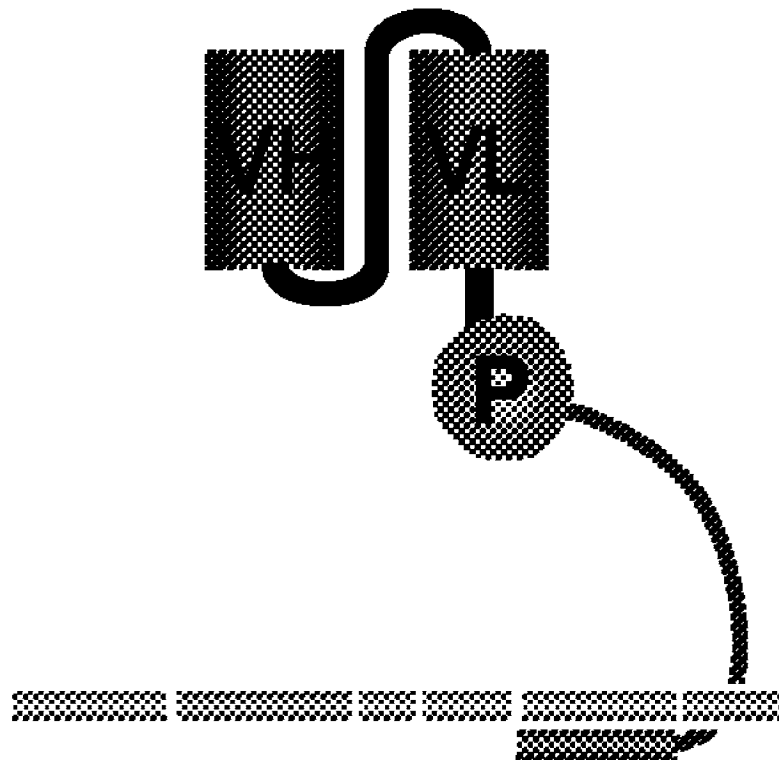


图 4b

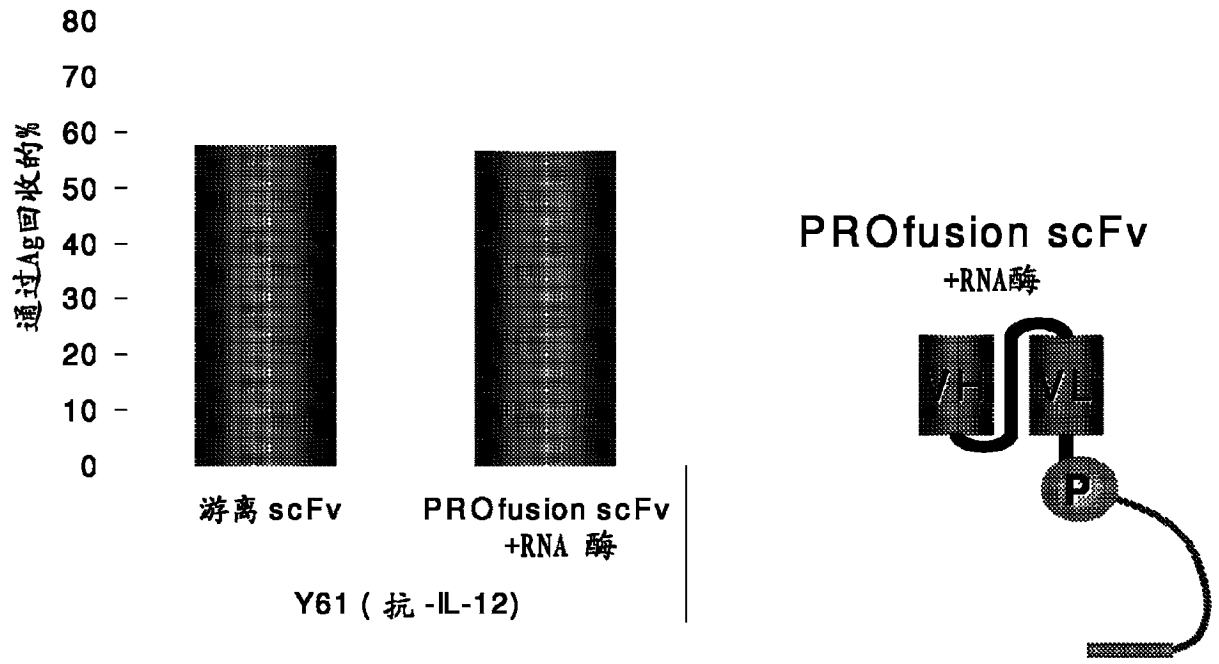


图 5

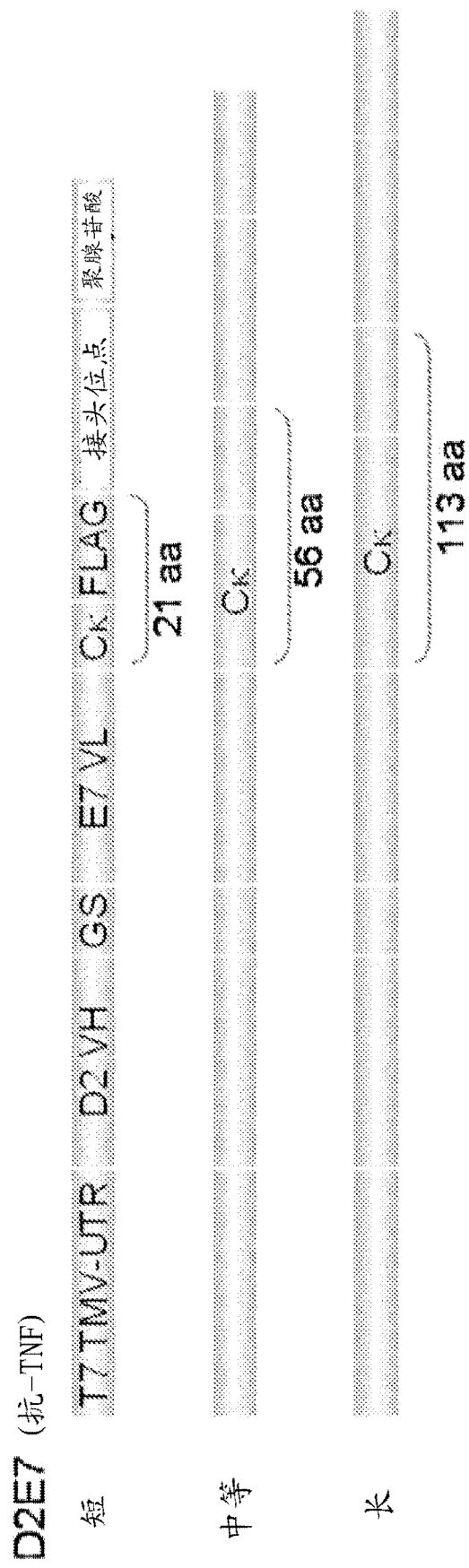


图 6

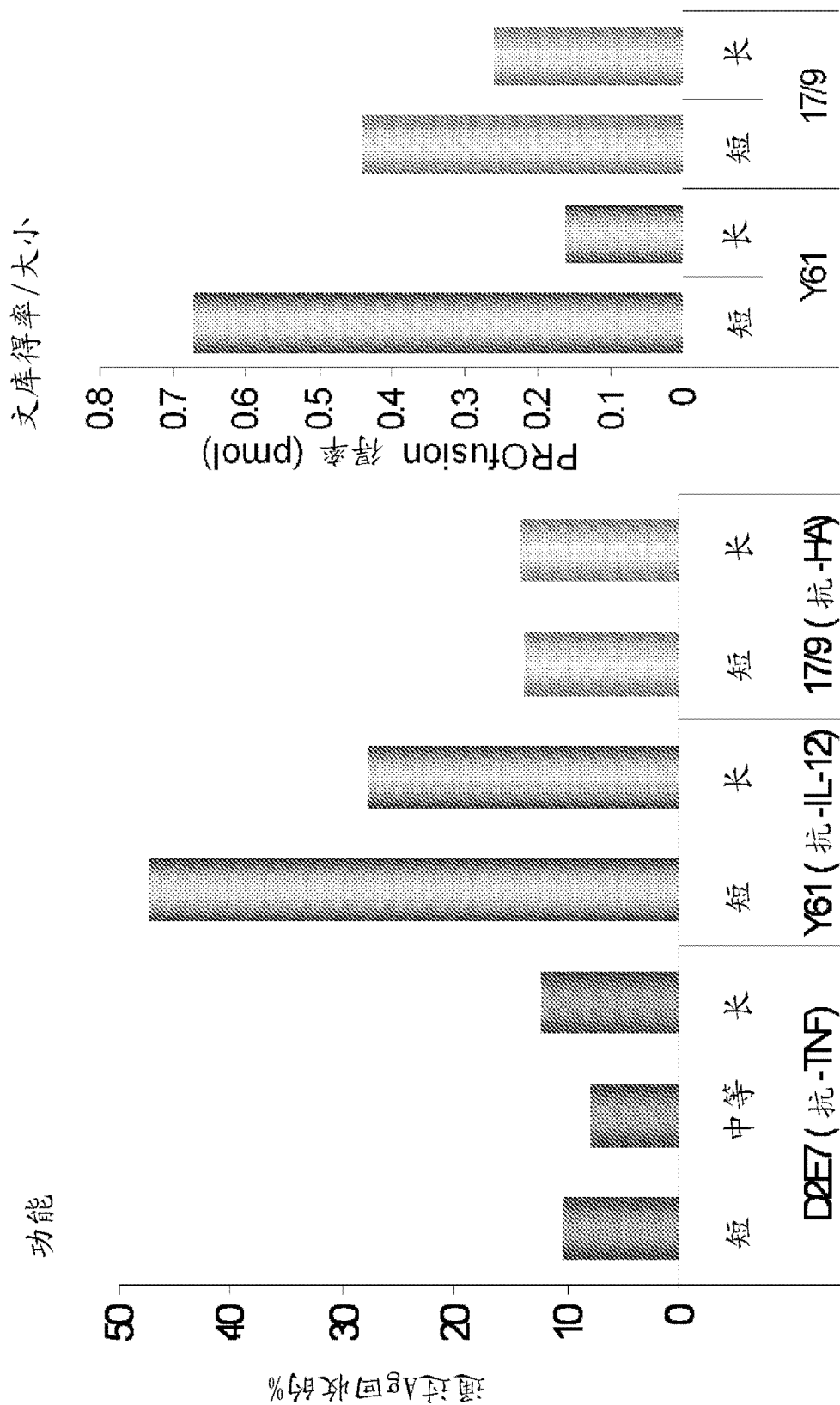


图 7

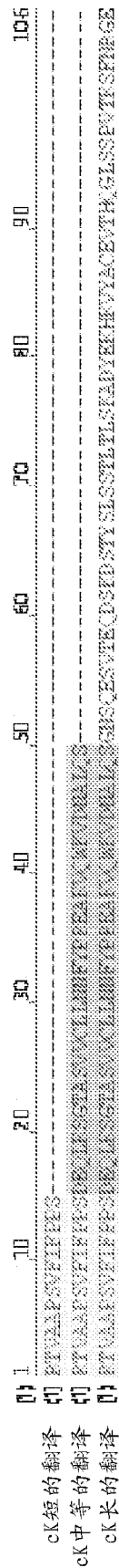
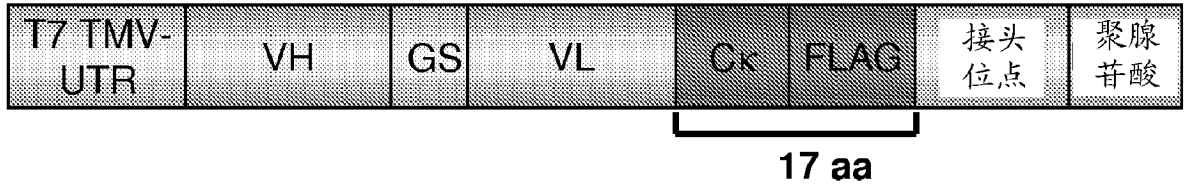


图 8

17/9-短



17/9-长

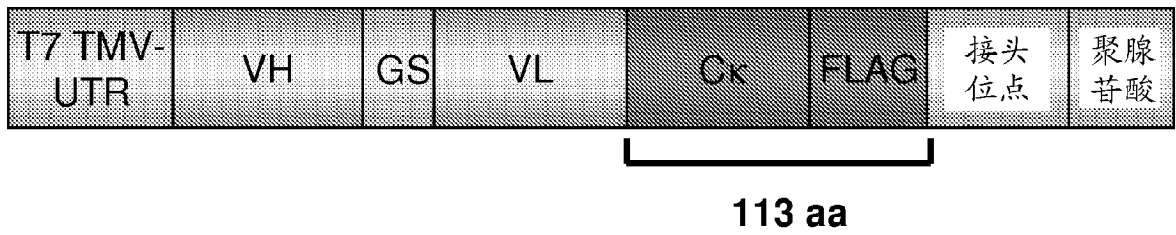


图 9a

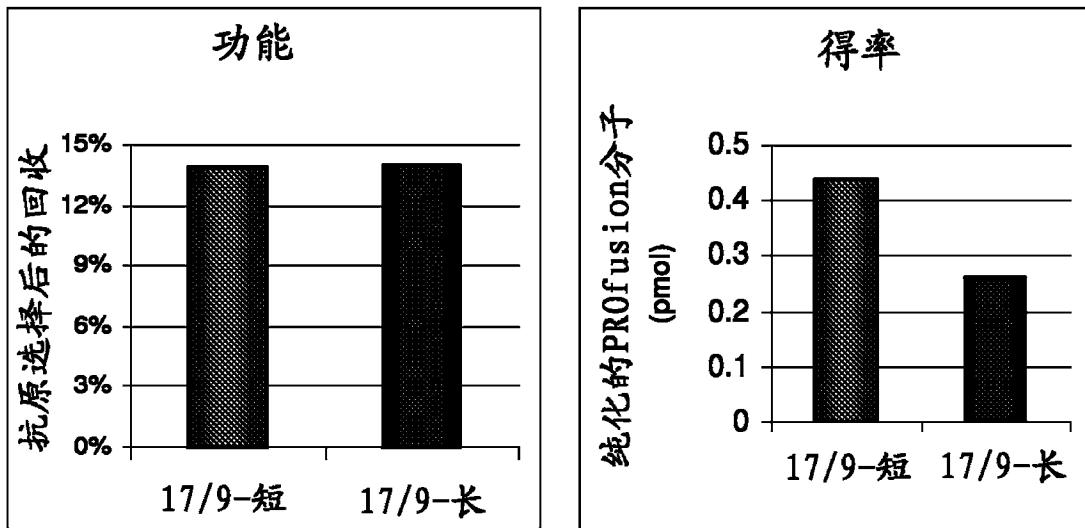


图 9b

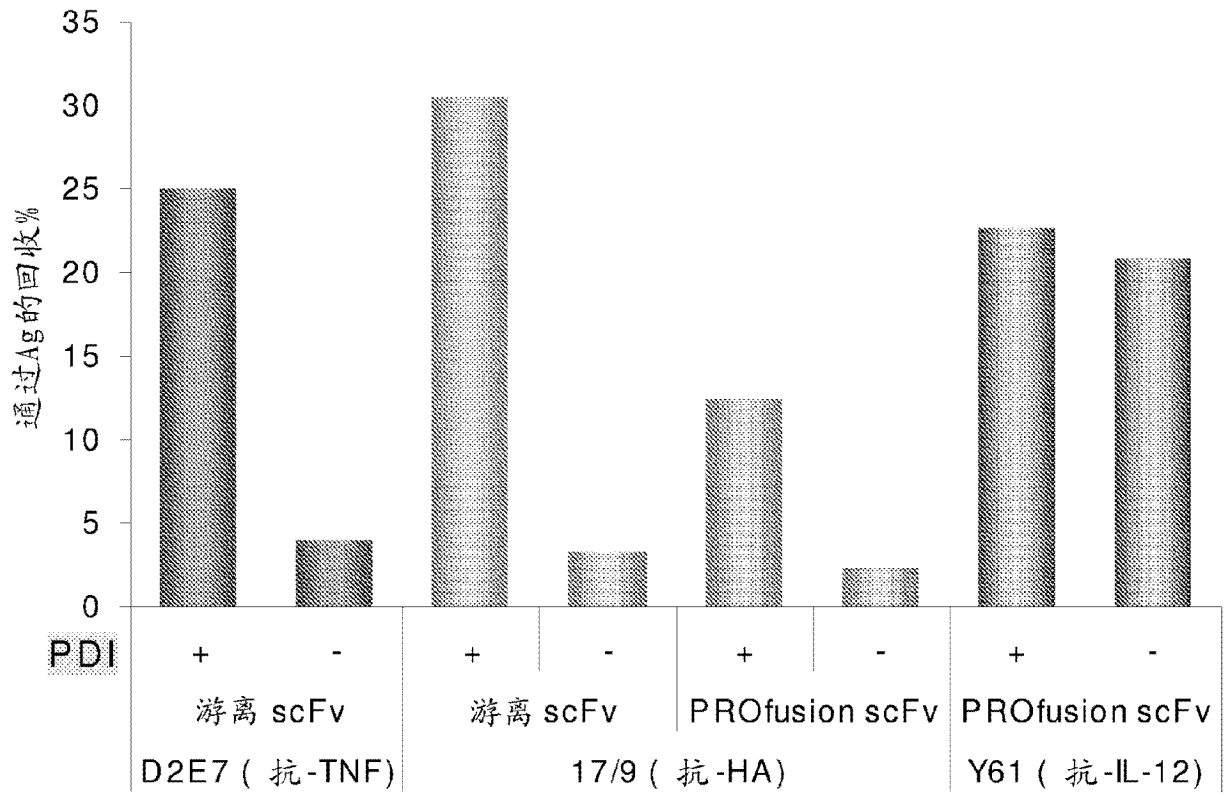


图 10

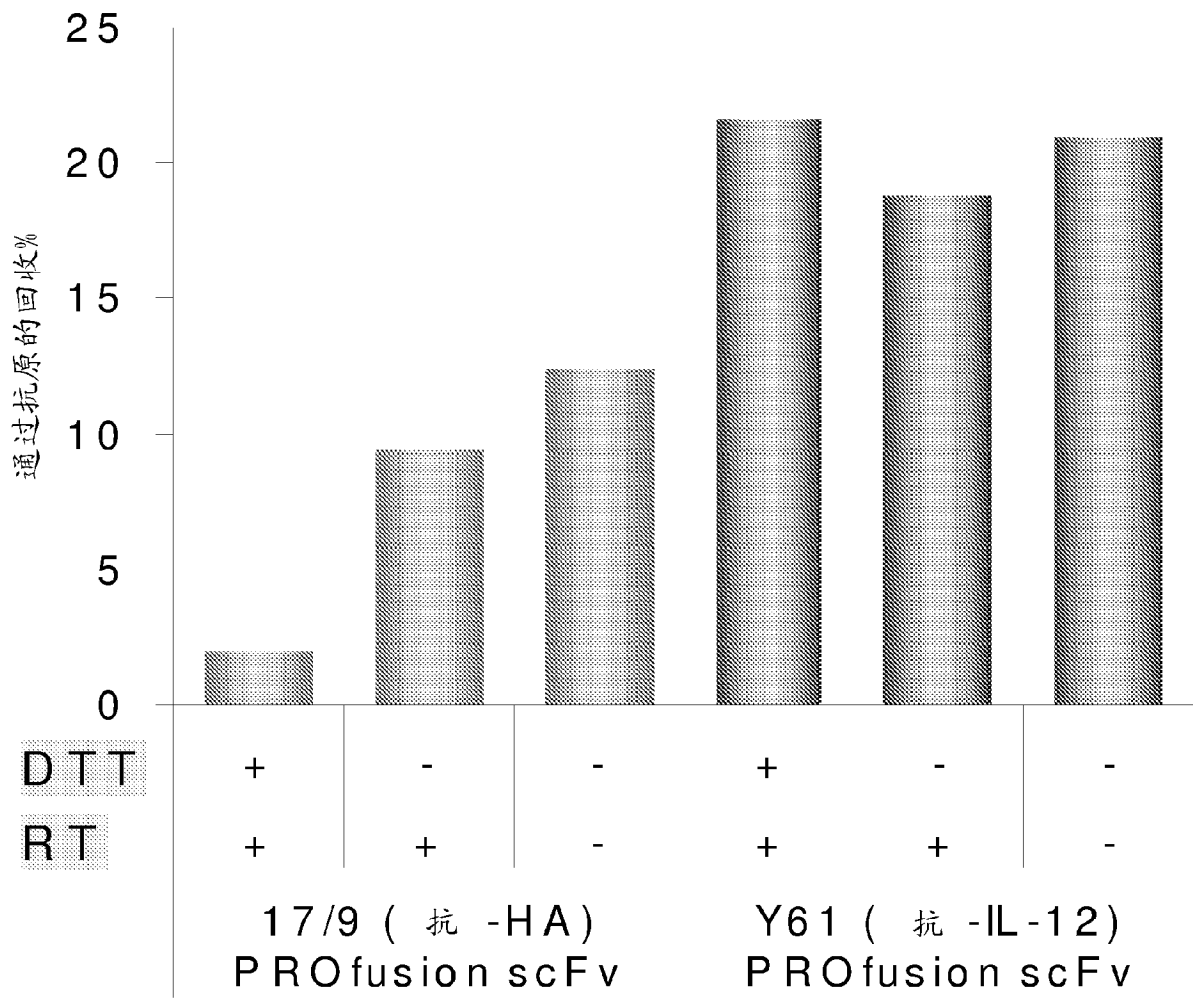
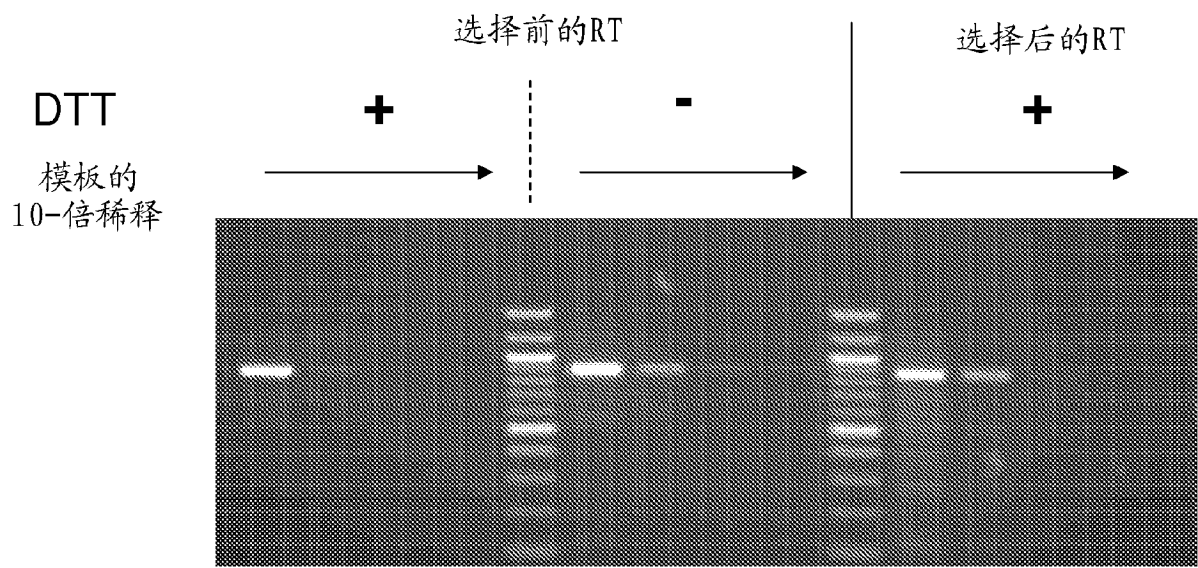


图 11



*模板通过珠体积而不是通过计数标准化

图 12

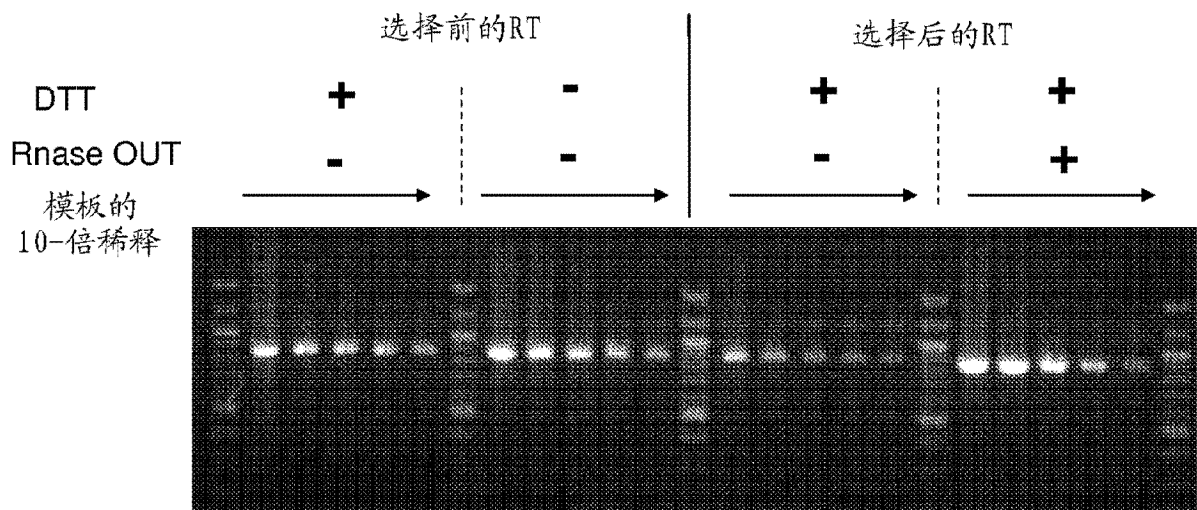


图 13

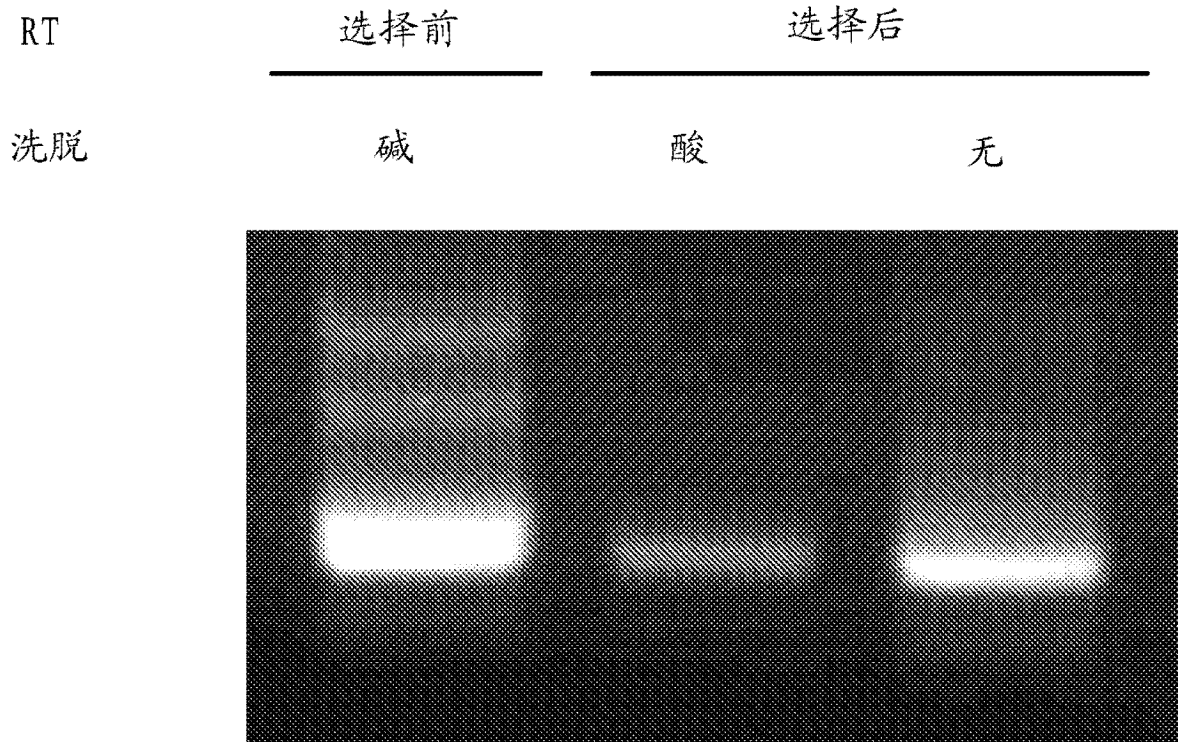


图 14

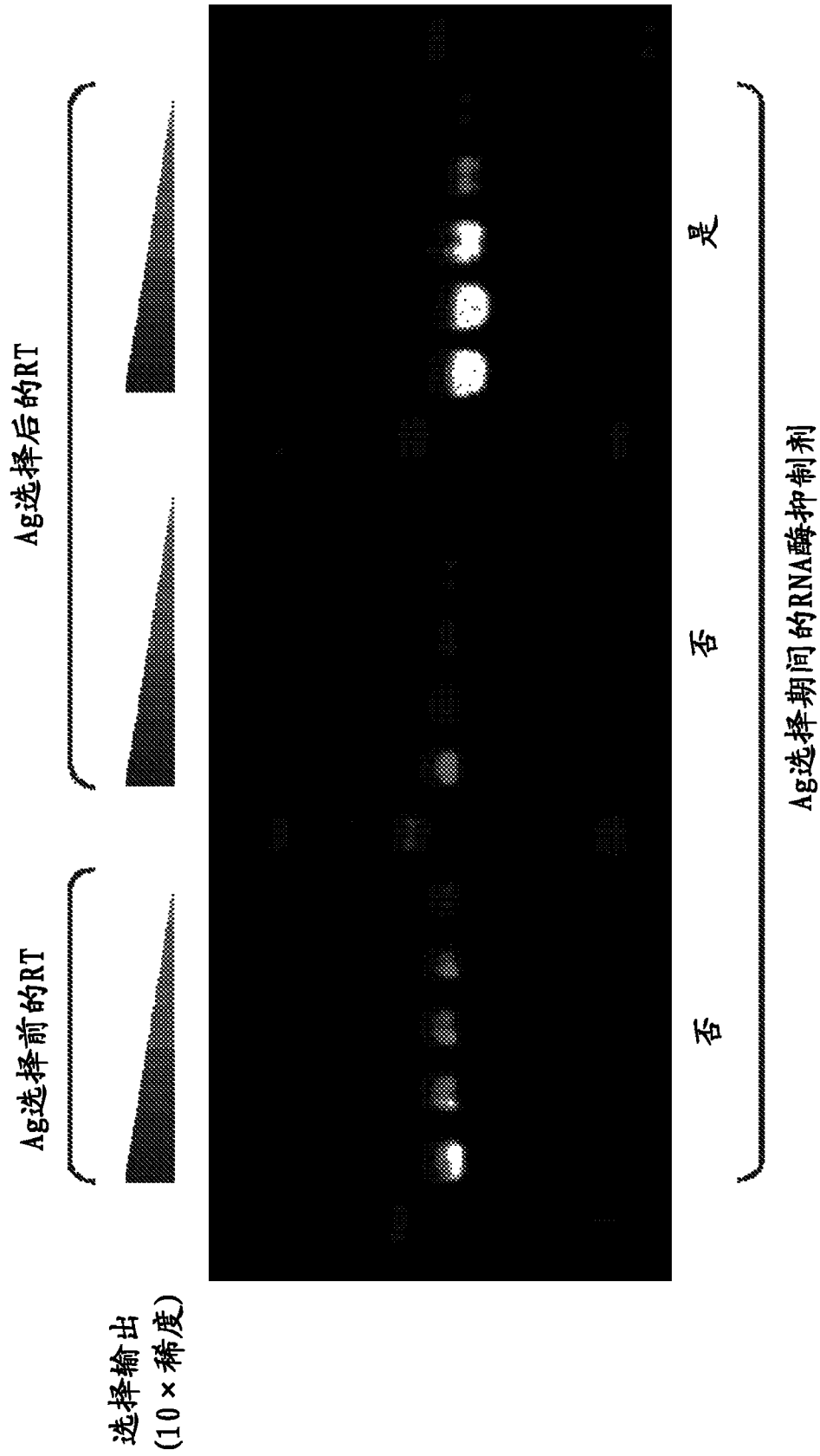


图 15



图 16

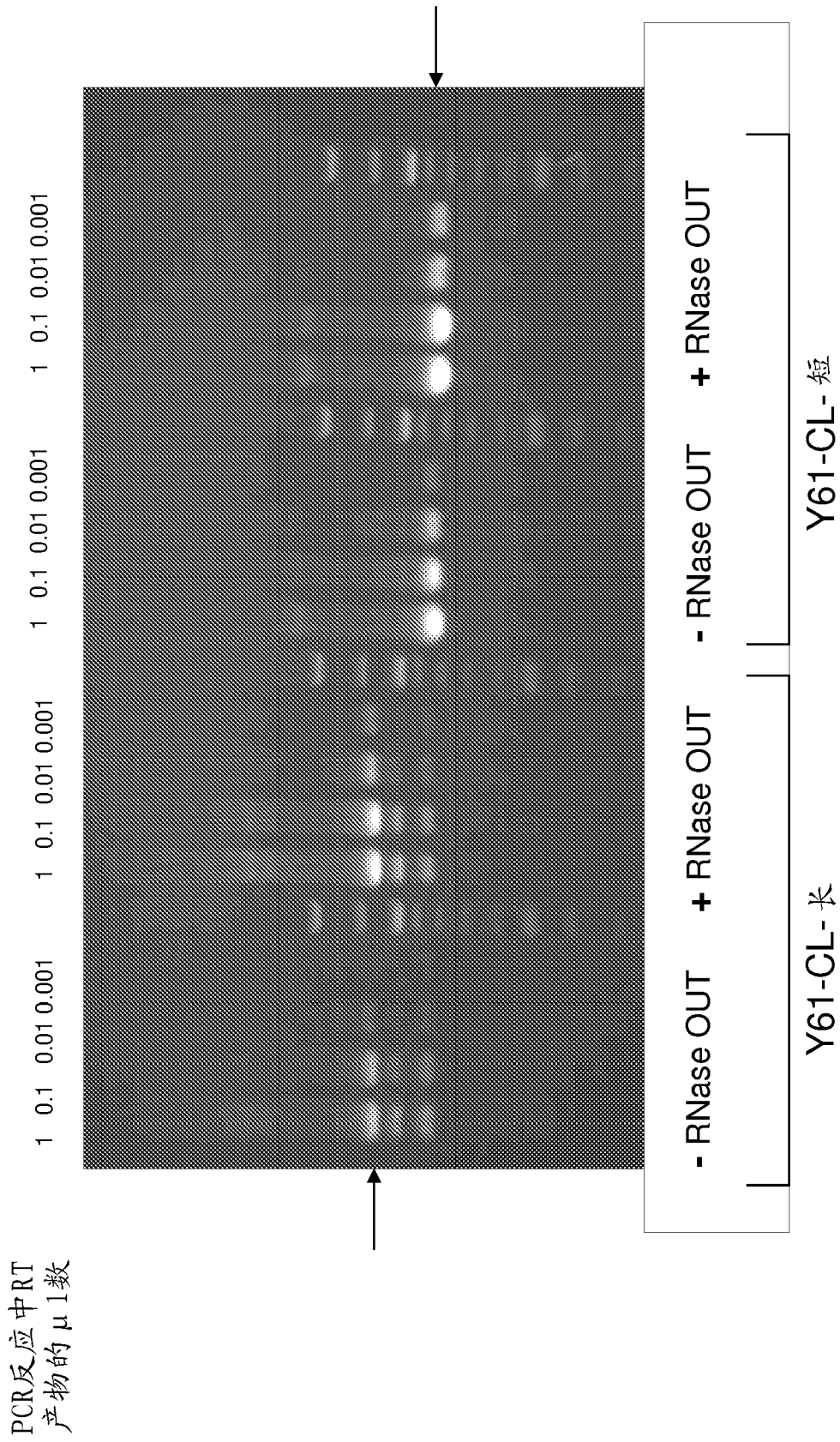


图 17

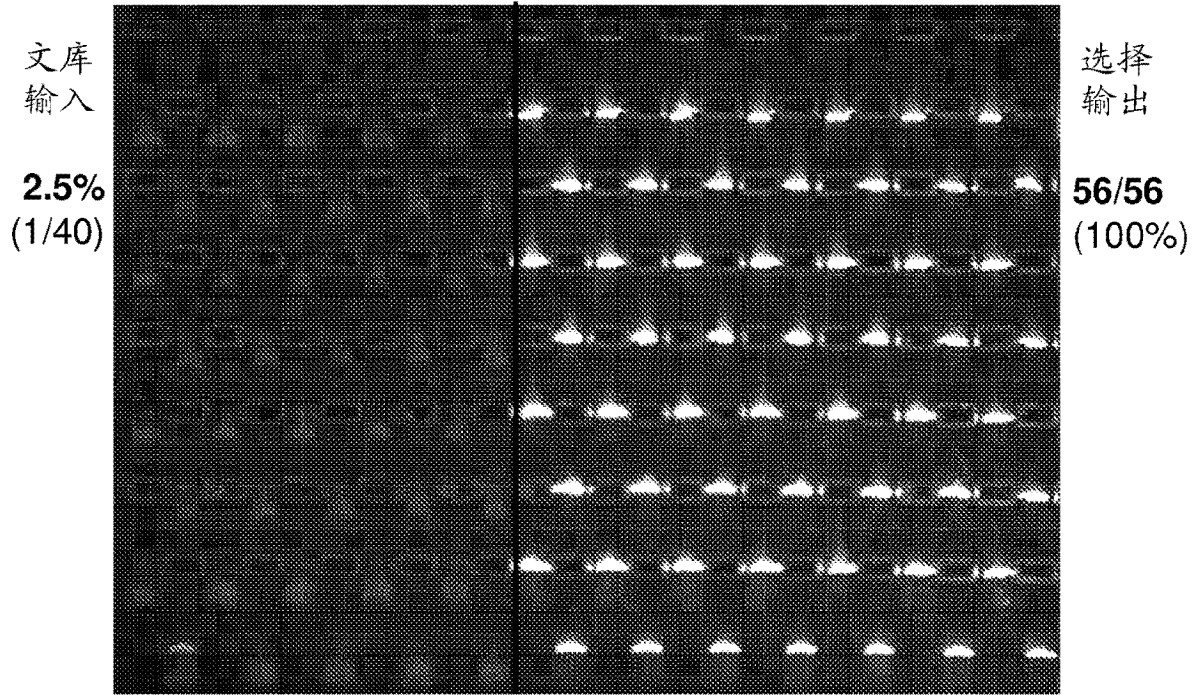


图 18

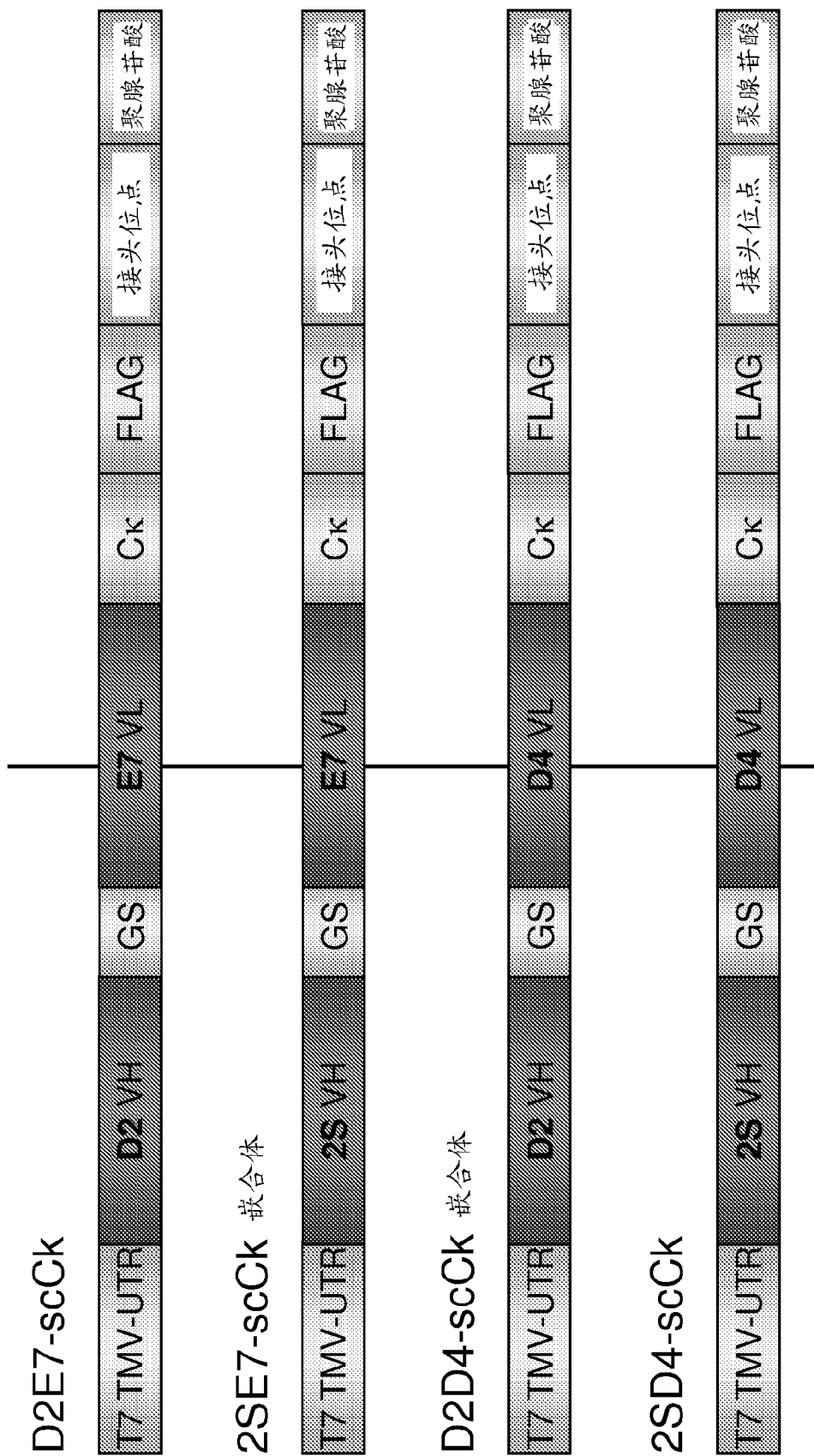


图 19

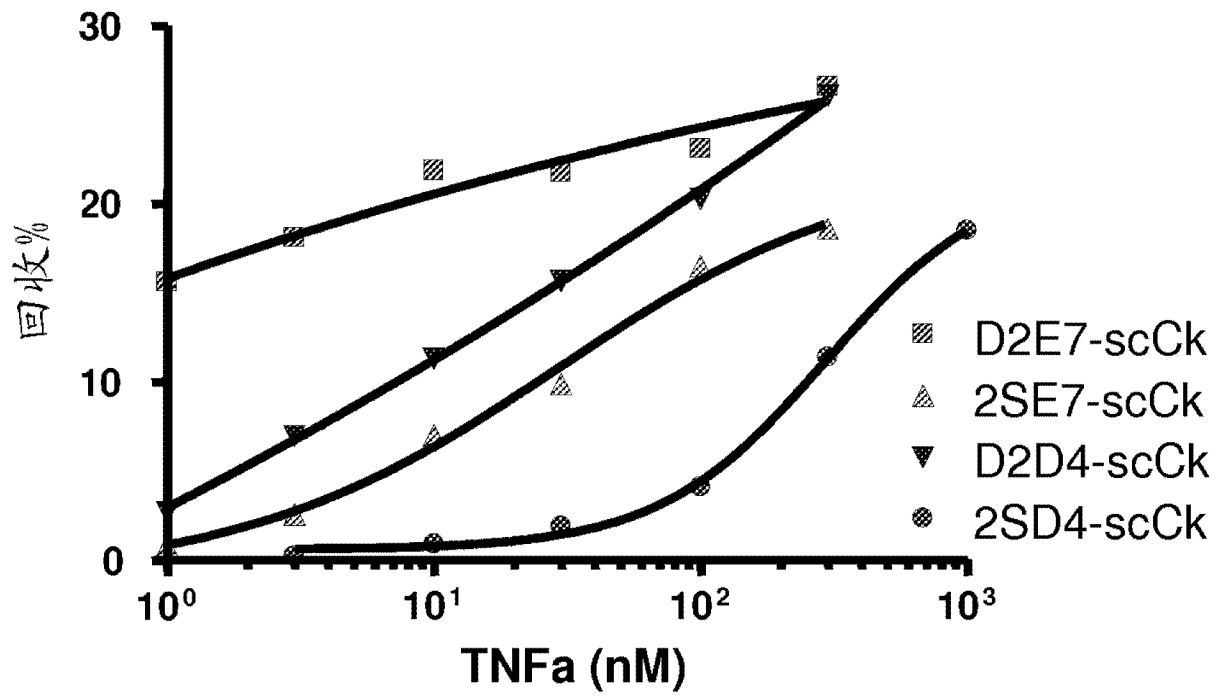


图 20a

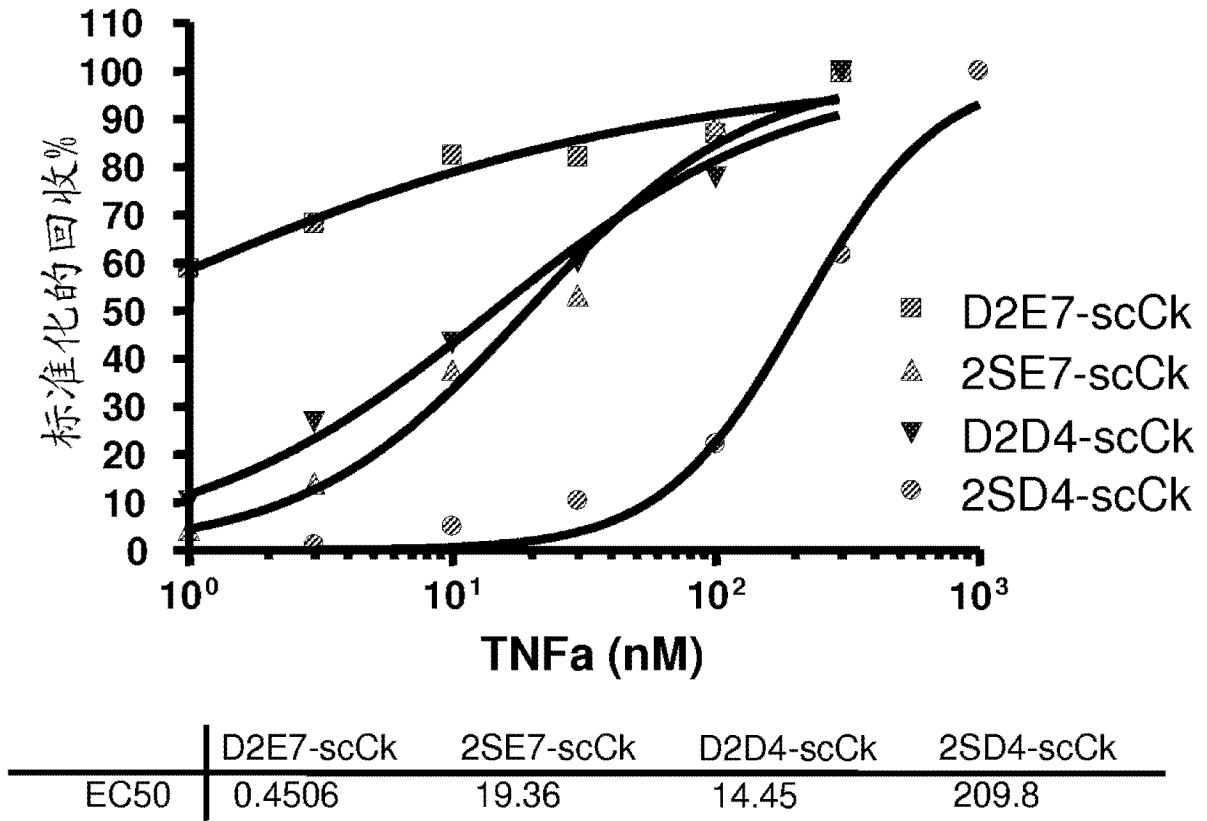


图 20b

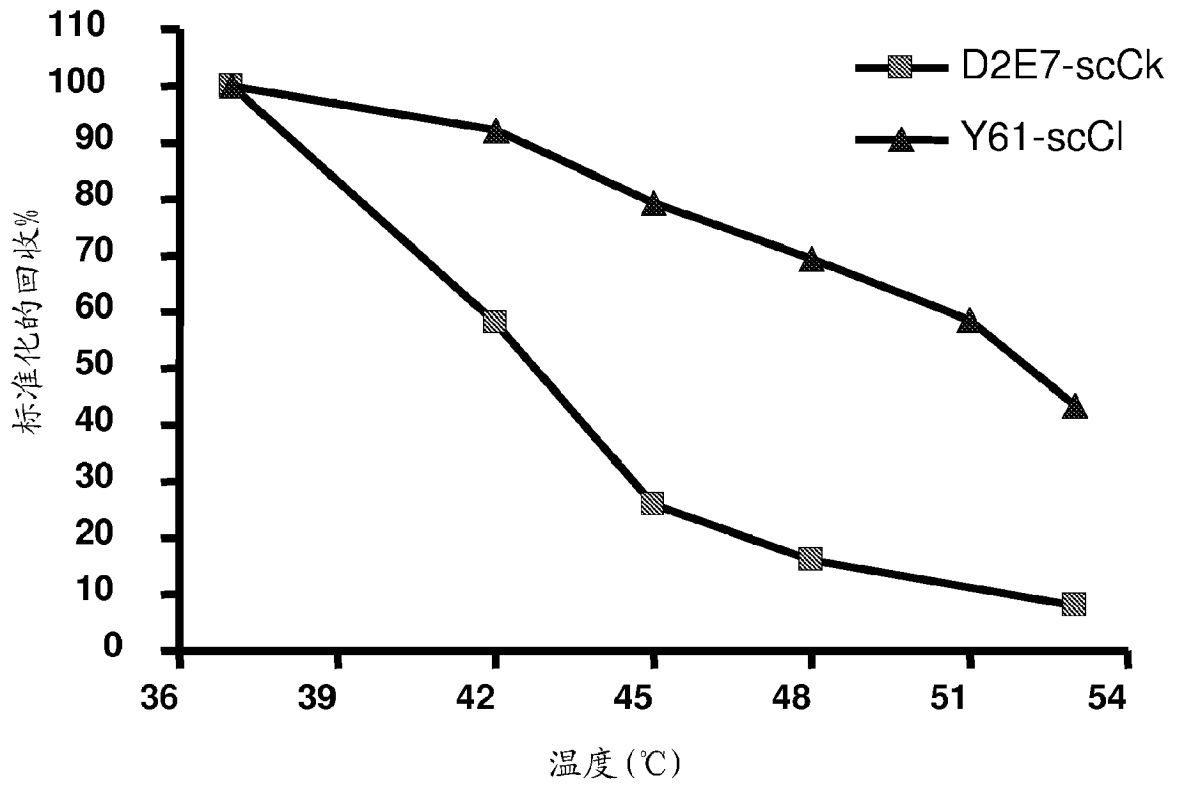


图 21

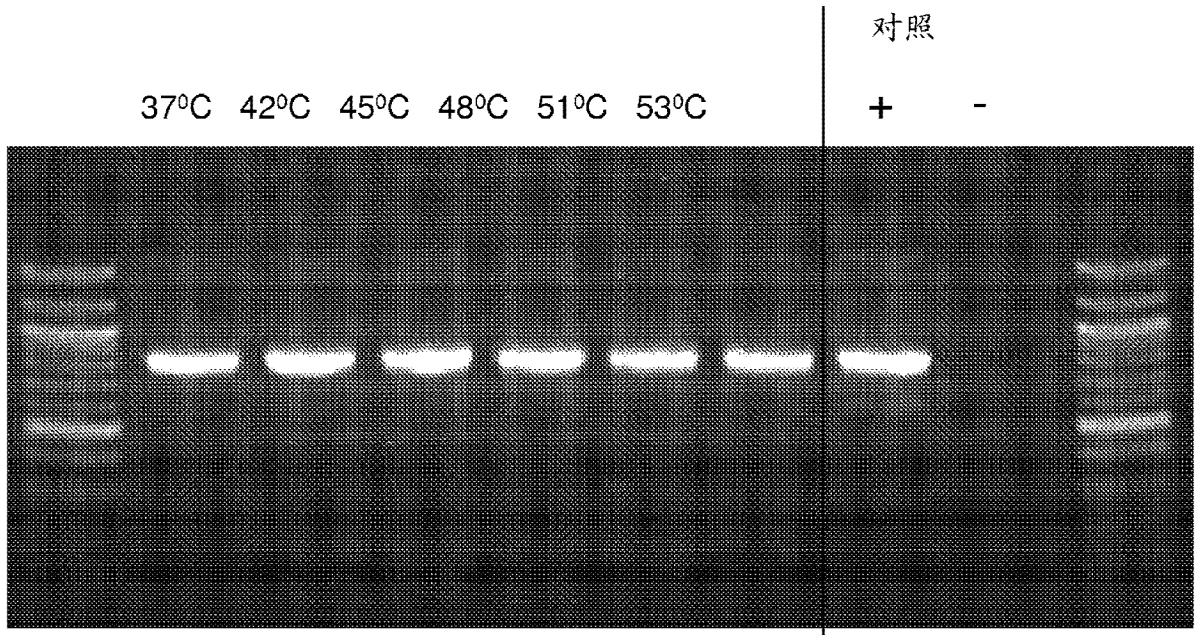


图 22

将以PROfusion形成测试的生成的Y61单链构建体:

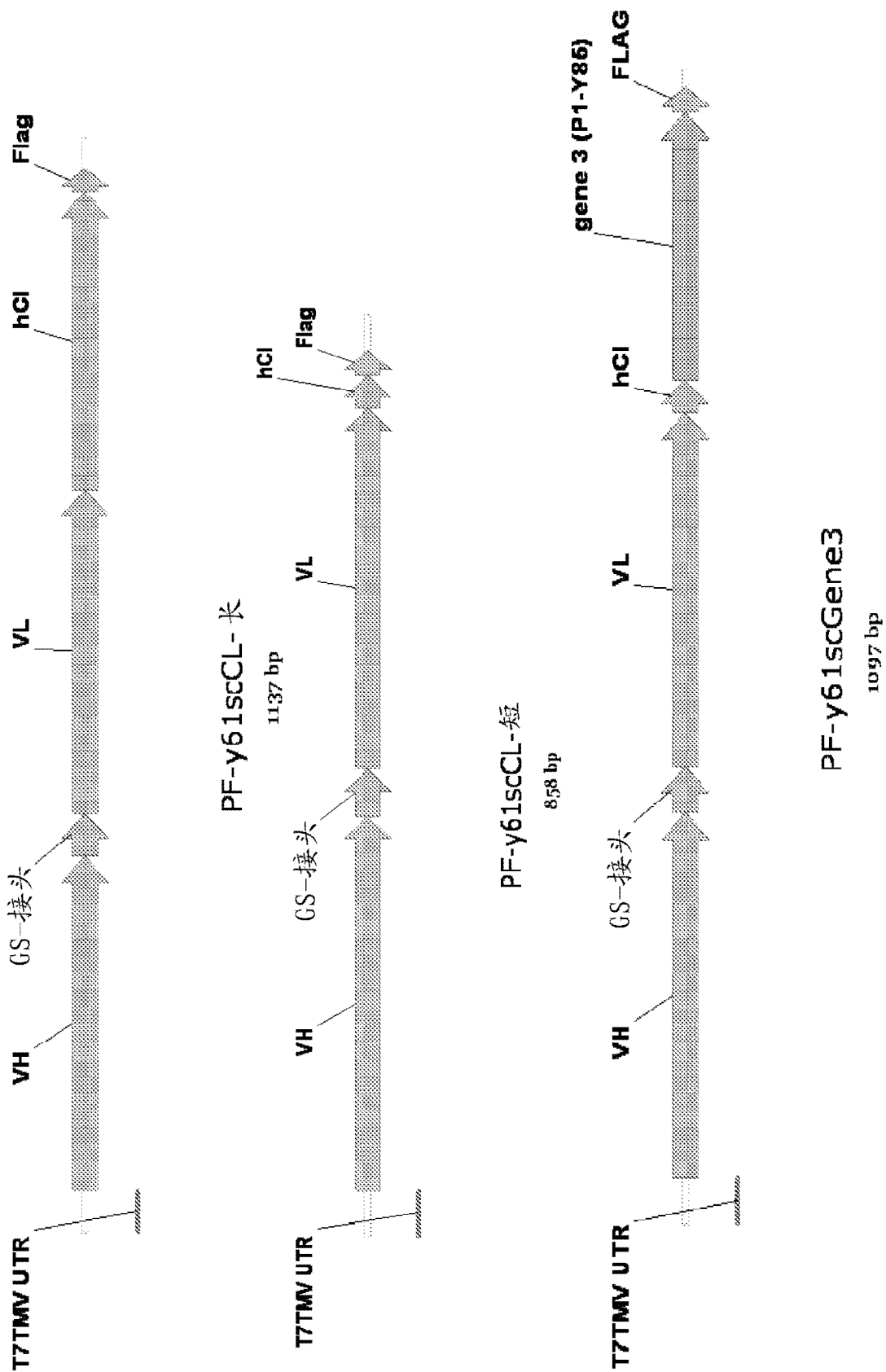
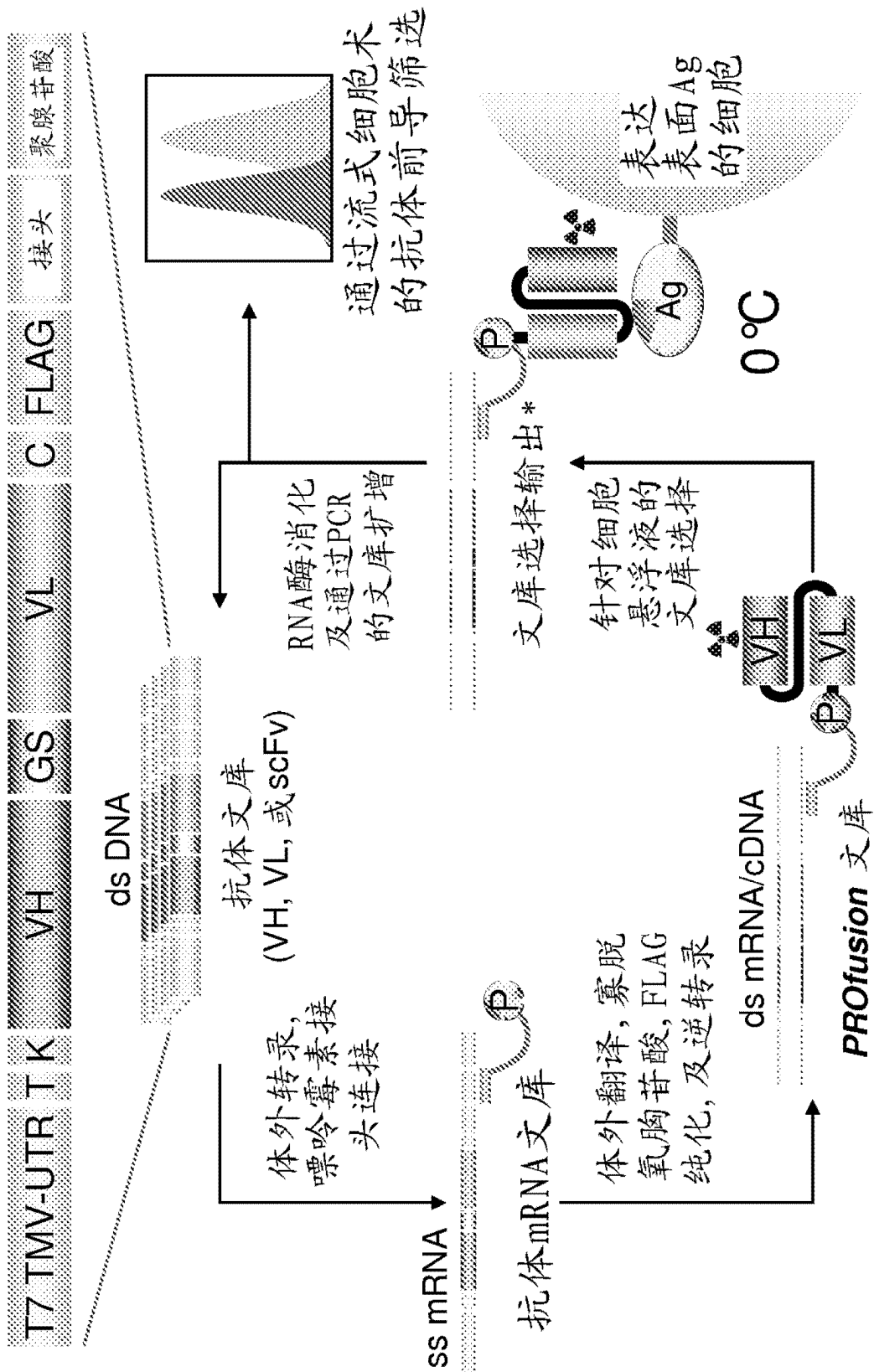


图 23



* 通过闪烁计数和谱型分析估计的

图 24

专利名称(译)	RNA展示的改良方法		
公开(公告)号	CN102227638A	公开(公告)日	2011-10-26
申请号	CN200980147651.0	申请日	2009-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	ABBVIE公司		
[标]发明人	C·谢 YA库茨科瓦 JE梅莫特		
发明人	C·谢 Y·A·库茨科瓦 J·E·梅莫特		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54326 C12N15/1041		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	61/101471 2008-09-30 US		
其他公开文献	CN102227638B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的特征在于体外RNA展示的改良方法，以允许从表达文库中可靠表达和选择scFv抗体分子。改良方法部分涉及温和还原条件的使用，这有利于scFv链内二硫键且从而有利于scFv抗体分子的正确折叠。尽管特别适合于表达和选择scFv抗体分子，但本发明的方法对于所有类别蛋白质的体外RNA展示也是有利的。

氨基酸混合物	在FLAG纯化后	
	掺入的 S^{35} Met %	pmol 蛋白质 / pmol RNA
1x	1.60%	2/50 = 4%
2x	0.42%	0.5/50 = 1%
3x	0.13%	0.77/50 = 0.3%
4x	0.03%	0.04/50 = 0.07%