



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107428827 A

(43)申请公布日 2017. 12. 01

(21)申请号 201680016526.6

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

(22)申请日 2016.03.11

代理人 肖善强

(30)优先权数据

62/135,084 2015.03.18 US

(51)Int.Cl.

G07K 16/22(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G07K 16/26(2006.01)

2017.09.18

G07K 16/40(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/022181 2016.03.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/149137 EN 2016.09.22

(71)申请人 宜康公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 卢克·亚当 卡琳·弗罗姆 项亮

魏力 朱伟民

权利要求书2页 说明书24页

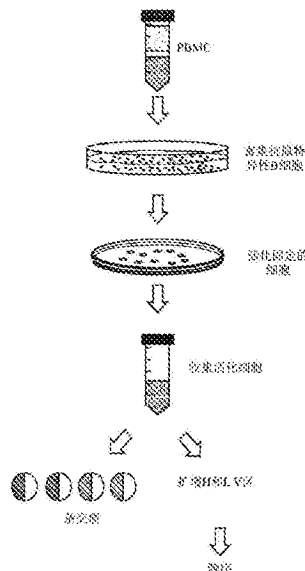
序列表2页 附图12页

(54)发明名称

通过B细胞淘选和增殖高通量产生单克隆抗体

(57)摘要

本文尤其提供一种用于产生富集的抗原特异性浆细胞群体的方法。在一些实施例中,所述方法可包含:(a)从已经通过抗原免疫的动物获得细胞样本,其中所述样本包含B细胞;(b)通过以下富集抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对所述抗原具有特异性的细胞表面抗体:i. 使在所述样本中的至少10⁵个所述细胞全体与所述抗原或其部分接触;和ii. 分离与所述抗原或其部分结合的细胞;和(c)在所述抗原或其部分存在下,全体活化所述富集的B细胞,以产生所述富集的抗原特异性浆细胞群体。



1. 一种用于产生富集的抗原特异性浆细胞群体的方法,包含:
 - (a) 从已经通过抗原免疫的动物获得细胞样品,其中所述样品包含B细胞;
 - (b) 通过以下富集抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对所述抗原具有特异性的细胞表面抗体:
 - i. 使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与所述抗原或其部分接触;和
 - ii. 分离与所述抗原或其部分结合的细胞;和
 - (c) 在所述抗原或其部分存在下,全体活化所述富集的B细胞,以产生所述富集的抗原特异性浆细胞群体。
2. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中从所述动物的脾、淋巴结、骨髓或外周血获得所述样品中的细胞。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述富集步骤(b)包含:
 - i. 在所述抗原特异性B细胞与所述抗原或其部分结合的条件下,使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与包含所述抗原或其部分的支持物接触;和
 - ii. 洗涤所述支持物以除去未结合的细胞。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述富集步骤(b)通过以下进行:
 - i. 在所述抗原特异性B细胞与可检测标记的抗原或其部分结合的条件下,使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与所述抗原或其部分接触;和
 - ii. 分选与所述抗原或其部分结合的细胞。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,进一步包含:
 - (d) 使所述富集的抗原特异性浆细胞群体与融合搭配物融合以产生多个杂交瘤。
6. 根据权利要求5所述的方法,进一步包含
 - (e) 筛选所述杂交瘤以鉴定产生与所述抗原或其部分结合的抗体的杂交瘤。
7. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,进一步包含
 - (d) 从所述富集的抗原特异性浆细胞群体制备cDNA;和
 - (e) 测序所述cDNA以获得多个重链可变结构域序列和多个轻链可变结构域序列。
8. 根据权利要求7所述的方法,进一步包含:
 - (f) 选择重链序列和轻链序列,和
 - (g) 测试包含所选择的重链和轻链序列的抗体以确定所述抗体是否与所述抗原或其部分结合。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中通过以下选择所述重链和轻链序列:
 - i. 获得多个最丰富的重链和轻链序列的交织图,其中使用天然彼此配对的重链和轻链锚定所述交织图;
 - ii. 选择重链序列和轻链序列,其中在所述交织图中使所述选择的重链和轻链序列彼此对齐;和
 - iii. 测试包含所述选择的重链和轻链序列的抗体以确定所述抗体是否与所述抗原或其部分结合。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述动物为兔、鼠或鸡。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活化通过CD40活化进行。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含收集所述富集

的抗原特异性浆细胞群体,其中所述收集通过在活化所分离的B细胞之后从支持物收集培养基进行。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述富集步骤富集包含专用细胞表面抗体的抗原特异性B细胞。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包含:

(a)从已经通过复合免疫原免疫的动物获得细胞样品,其中所述细胞包含B细胞;

(b)通过以下富集第一抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对第一抗原具有特异性的细胞表面抗体:

i.使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与所述第一抗原或其部分结合;和

ii.分离与所述第一抗原或部分结合的细胞;和

(c)在所述第一抗原或其部分存在下,全体活化所述富集的B细胞以获得第一抗原特异性浆细胞群体。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述方法包含:

(b)通过以下富集第二抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对所述免疫原的第二抗原具有特异性的细胞表面抗体:

i.使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与所述第二抗原或其部分结合;和

ii.分离与所述第二抗原或其部分结合的细胞;和

(c)在所述第二抗原或其部分存在下,全体活化所述富集的B细胞以获得第二抗原特异性浆细胞群体。

通过B细胞淘选和增殖高通量产生单克隆抗体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2015年5月18日提交的美国临时申请第62/135,084号的权益,所述申请以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 哺乳动物响应于通过抗原免疫接种而产生非常多样的抗体库的能力已经用于广泛领域中,包括诊断和治疗。数十年前Kohler和Milstein研发杂交瘤技术并且现今已经研发数种用于产生单克隆抗体的低通量方法。这类方法包括B细胞永生化、通过单细胞PCR克隆编码抗体的基因和cDNA和需要生成巨大重组抗体库的活体外“组合”方法。

[0004] 高通量地开发抗体的方法一直发展缓慢,因为单独基于序列信息,不可能确定结合抗体的抗原和哪些重链和轻链应配对在一起。

[0005] Lightwood(免疫方法杂志《(J.Immun.Methods)》2006 316:13-143)描述用于产生高亲和力单克隆抗体的方法。在Lightwood的方法中,将来自经免疫的兔的相对少量的B细胞放入多孔ELISA板的每个孔中,所述ELISA板含有固相抗原的涂层。在充分洗涤以除去未结合的细胞以及以低亲和力结合的B细胞之后,将保留的B细胞培养7天以诱导增殖和免疫球蛋白的分泌。筛选上清液以鉴定所述板的哪些孔含有抗原特异性抗体。通过RT-PCR从各个孔中回收单个重链和轻链可变区基因,并测序。Lightwood方法,由于其需要将相对少滴定量的B细胞沉积到96孔板的凹孔中、筛选上清液和对从各个孔收获的细胞执行PCR,所以固有地低通量。此外,Lightwood的方法每孔需要单个活化B细胞或相对少量的活化B细胞,因为不这样的话重链和轻链配对将是未知的。此外,使用Lightwood方法产生的活化B细胞的数目对于工业规模生产杂交瘤是不足够的。

[0006] Reddy(《自然·生物技术(Nat.Biotechnol.)》2010 28:965-9)描述基于生物信息学的方法以从经免疫的小鼠的骨髓浆细胞(BMPC)得到(mine)抗体可变区-基因抗体库。Reddy发现,骨髓浆细胞的抗体库在免疫接种之后变得高度极化,其中最丰富的序列占总抗体库的约1%到超过10%之间的频率。Reddy基于最丰富的可变重(VH)基因和可变轻(VL)基因的相对频率将它们配对,使用自动基因合成将它们重构,并且在细菌或哺乳动物细胞中表达重组抗体。以此方式从六个小鼠(每个用三种抗原中的一种免疫)产生的抗体大部分是抗原特异性的(21/27或78%)。骨髓浆细胞并不容易获得,因为它们的分离需要动物安乐死和选择CD138⁺细胞。因此,虽然Reddy的方法的一些方面可被认为是高通量的,但他的方法仍然相当受限,因为其需要从安乐死动物的骨髓中分离的特定类型的浆细胞(BMPC)。

[0007] Kodituwakku等人(《免疫细胞生物学》2003 81:163-170)综述了在分离抗原特异性B细胞的方法中的现有技术水平,例如通过淘选和其它类似技术。Kodituwakku作出结论,虽然存在若干种用于分离抗原特异性B细胞的方法,但那些方法提供非常多变的结果并且受非特异性结合的困扰,所述非特异性结合继而降低在分离的群体中所需细胞的纯度和富集。

[0008] 考虑到上文,仍需要高通量产生抗体的方法。

发明内容

[0009] 本文尤其提供一种用于产生富集的抗原特异性浆细胞群体的方法。在一些实施方案中,方法可包含:(a)从已经通过抗原免疫的动物获得细胞样品,其中所述样品包含B细胞;(b)通过以下富集抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对抗原具有特异性的细胞表面抗体:i.使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与抗原或其部分接触;和ii.分离与抗原或其部分结合的细胞;和(c)在抗原或其部分存在下,全体活化富集的B细胞,以产生富集的抗原特异性浆细胞群体。

[0010] 根据方法如何实施,方法可具有优于常规方法的某些优势。举例来说,如上所述,大多数分离抗原特异性B细胞的方法得到含有大量与底物非特异性结合的污染细胞的细胞群体。本文所述的方法的活化步骤,仅活化具有与抗原结合的表面系留抗体的B细胞。此方法提供两种作用,首先活化步骤仅使与抗原特异性结合的那些B细胞增殖,从而增加那些细胞相对于与支持物非特异性结合的细胞的相对浓度。其次,方法的活化步骤使重链和轻链mRNA的表达仅在与抗原特异性结合的那些B细胞中诱导。换句话说,额外活化步骤允许选择性地刺激记忆B细胞以分化和变为成浆细胞和浆细胞,其快速分裂并表达较大量的抗体。

[0011] 在每细胞的基础上,富集和活化步骤,以组合形式,增加抗原特异性细胞的总数(即,产生与抗原结合的抗体的细胞的总数)并且此外增加抗原特异性细胞相对于其它细胞的相对浓度。发明人已经发现多至25%到50%的所收集的细胞为抗原特异性的并且,因而在许多情况下富集可远超过100倍。因而,所收集的细胞可比其它细胞群体(例如脾细胞等)高效得多进行筛选(例如,使用常规杂交瘤方法)。此外,富集和活化步骤,以组合形式,可活化可能在活体内以其他方式的话未活化的B细胞(其原因未知)从而增加可用于分析的抗体池的多样性。最后,富集和活化步骤,以组合形式,使“罕见的”抗原特异性B细胞(例如,编码抗体的B细胞,所述抗体与由所述群体产生的其它抗体不通过谱系相关)增殖,从而当筛选细胞群体(或从其获得的序列的集合)时增加鉴定那些细胞(或由其产生的序列)的机率。

[0012] 此外,因为在本发明方法中以全体(en masse)形式采用细胞,所以方法是高度可扩展的并且可调整而无需额外工作量以产生如所期望多的不同抗原特异性浆细胞。举例来说,在一些情况下,可勘测动物的完整抗原应答的代表性部分,并且可获得数千(如果不是数万的话)的杂交瘤或编码抗原特异性抗体的序列而无需额外工作量。筛选动物的完整抗原应答的相当大部分的能力还允许鉴定“罕见的”抗体(例如,在除此外强的免疫应答的情况下未非常丰富表达的抗体)并且允许对抗原应答执行进一步分析,如谱系分析或不同抗体序列的丰度的分析。谱系分析需要尽可能多抗体的序列信息并且是有用的,因为一旦已经鉴定具有期望活性(例如,潜在的治疗或诊断活性)的候选抗体,那么所述抗体的谱系的分析可提供对抗体的结构的深刻理解并且允许鉴定可被取代的氨基酸残基(参见,例如,Yu等人,《公共科学图书馆·综合(PLoS ONE)》,2010 5:e9072)。这继而提供第二代抗体可以靶向方式形成的方式。此外,免疫应答的量值随动物和表位不同而大大变化,并且在一些情况下,抗体对特定表位的效价可极其低。本发明方法,因为其应用全体方法,所以容许动物免疫应答的不可预测性并且有助于鉴定罕见的抗体,因为在单个实验中可有效地筛选整个免疫应答。

[0013] 实际上,使用上述Lightwood方法不可能实现这些优势,因为Lightwood的方法需

要将相对少量的抗体产生细胞等分到微量滴定板的每个孔中,希望一些孔接收不超过单个被活化的抗原特异性B细胞。Lightwood的方法受以下限制:a)泊松分布,意指除了含有太多抗原特异性B细胞的孔以外,将总是存在不含抗原特异性B细胞的孔,使所述方法低效;b)缺乏可扩展性,因为所述方法需要不切实际的工作量(例如,潜在数百或数千的微量滴定板、检定和PCR反应)来勘测动物的整个免疫系统;和c)缺乏高效方式以容许动物免疫应答的不可预测性。缺乏高效方式以容许动物免疫应答的不可预测性意指,甚至在最佳的条件下,实践Lightwood的方法需要使用若干种不同稀释度的细胞进行相同实验若干次以便获得潜在起作用的稀释度并且然后执行所述方法。

[0014] 除了上述以外,富集和活化步骤还激活在每个活化B细胞中的抗体表达。这继而大大地增加在所得细胞群体中编码抗原特异性抗体的mRNA的量。额外活化步骤对于涉及测序所收集的细胞的重链和轻链cDNA的高通量实施方案特别相关,因为在富集之后,富集的细胞仍高度不纯。“噪音”由非特异性被捕获在支持物上或未洗掉的B细胞产生。这些细胞(大部分为浆细胞)比抗原特异性记忆B细胞表达若干倍多的抗体。因此,在无活化的情况下,来自污染细胞的VH和VL序列通常比抗原特异性抗体的序列更丰富。因此,测序来自已经富集但未活化(例如在珠粒纯化之后)的群体的VH和VL cDNA,产生主要由不是抗原特异性的抗体的序列构成的数据集。相比之下,测序来自已经富集并活化的群体的VH和VL cDNA,产生主要由抗原特异性的抗体的序列构成的数据集。

[0015] 如将在下文更详细地描述,通过本发明方法制得的细胞群体可与合适的融合搭配物融合以制备杂交瘤(其可通过杂交瘤筛选)或在一些实施方案中,可从那些细胞测序编码VH和VL的cDNA。

[0016] 在杂交瘤实施方案中,所收集的细胞可与合适的融合搭配物融合以制备杂交瘤,并且杂交瘤可使用任何方便的方法(例如,ELISA)筛选以鉴定产生抗原特异性抗体的杂交瘤。在这些实施方案中,执行富集和活化步骤大大地降低待筛选的克隆数目(在一些情况下降低超过10倍),并且,同时增加输入融合步骤中的细胞数目。另外,因为在先前步骤中“罕见的”B细胞已经扩增,所以存在那些细胞将表示在杂交瘤群体中的较高机会。具体来说,本发明人发现,“罕见的”抗体(即低丰度的抗体,其在没有详尽的测序工作或详尽的筛选由那些细胞制备的杂交瘤的情况下以另外方式不会从B细胞群体(即,在无富集或活化的情况下,直接从动物获得的B细胞)取样)显示出在富集和活化B细胞中相对于其它细胞处于增加的浓度。因而,这类罕见的抗体具有通过测序富集和扩增的B细胞群体的重链和轻链或通过筛选由那些细胞制备的杂交瘤而被鉴定的较高机会。最后,使所收集的B细胞永生允许产生如所需要多的抗体而不必在瞬时检定中克隆、序列和校验,这可节省大量的时间并且使在生产背景中的总体处理减到最少。

[0017] 在测序实施方案中,可容易鉴定最丰富的序列(例如,读段计数高于阈值例如在5到10个序列读段范围内的阈值的那些)。这些序列更可能是抗原特异性的,并且因而,本发明方法允许快速鉴定数百(如果不是数千的话)的抗原特异性VH和VL序列而无需实施劳动密集的筛选工作。如下文将更详细地描述,可通过交织图(tanglegram)分析来分析序列以鉴定可在细胞中表达的VH和VL序列对,并且进行测试。此外,因为对于每个VH或VL获得多个序列读段,所以可使用生物信息学方法校正测序误差。

[0018] 此外,本发明人出乎意料地发现,如果执行富集和活化,那么通过测序活化细胞群

体获得的重链和轻链序列有时极化并且在某些情况下可通过它们的相对丰度配对。在本发明人的经验中,从B细胞(即,在无富集或活化的情况下,直接从动物获得的B细胞)获得的重链和轻链序列并未同样极化并且不可通过它们的丰度配对。这允许通过以下鉴定抗体:通过对抗原的亲合力来富集记忆B细胞群体、活化那些细胞、收集细胞(而无需任何筛选培养物上清液以鉴定哪些细胞产生抗原特异性抗体)、分开地测序重链和轻链,并且鉴定重链和轻链序列和通过它们的相对丰度将它们配对在一起以产生与抗原结合的抗体。此方法,其可使用在许多情况下可非常容易获得的样品进行,从常规方法除去重要的瓶颈。

[0019] 此外,方法的富集步骤提供一种手段,通过其抗原可多重化(multiplexed)并且可产生“专用”抗体。在多重化实施方案中,动物可用多种抗原免疫,并且可彼此分开地富集多种抗原中的每一种的抗原特异性细胞。然后可彼此分开地活化并收集抗原特异性细胞,如上文所概括,以提供多个细胞群体,每个群体对不同抗原具有特异性。“专用”抗体,即选用于特定用途例如FACS、免疫沉淀、免疫组织化学、治疗法等)的抗体,可通过调整富集步骤产生以有利于产生特定类型抗体(例如,与一种抗原结合但不与另一种抗原结合的抗体、识别细胞的抗体、仅在某些条件下结合的抗体或与固定组织切片中的抗原结合的抗体等)的细胞。

[0020] 这些和其它优势可通过以下描述而显而易见。

附图说明

[0021] 熟练技术人员将理解下文描述的图仅出于说明的目的。这些图并非旨在以任何方式限制本传授内容的范围。

[0022] 图1示意性地示出本发明方法的一些一般原理。

[0023] 图2示意性地示出其中活化B细胞与融合搭配物融合以制备杂交瘤的实施方案。

[0024] 图3示意性地示出在交织图中谱系树可如何比对。

[0025] 图4示意性地示出在锚定交织图中插入VH和VL序列可如何配对。

[0026] 图5示意性地示出用于解析不明确评级的轻链序列的方式。

[0027] 图6示意性地示出专用B细胞可如何富集。

[0028] 图7A和7B示出从总PBMC的NGS与在抗原特异性淘选和增殖(BPP)之后的B细胞回收的VH序列的比较分析。图7A:总PBMC与亲和力选择/增殖的VH序列之间的重叠。图7B:仅在亲和力选择/增殖的数据集中发现的独特VH序列。

[0029] 图8示出锚定交织图的实例。

[0030] 图9示出通过流式细胞测量术的细胞培养物的表征。

[0031] 图10示出AS(富集和活化的)与PBMC样品之间丰度数目的极化。

[0032] 定义

[0033] 在进一步描述本主体发明之前,应理解,本发明不限于所描述的特定实施方案,因而当然可变化。还应理解,本文中所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而并非旨在为限制性的,这是由于本发明的范围将仅受到所附权利要求书的限制。

[0034] 除非另外定义,否则本文中所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管在本发明的操作或测试中也可以使用与本文中描述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但是现在描述优选的方法和材料。本

文中提及的所有公开案均以引用的方式并入本文中,以公开和描述与所列公开案相关的方法和/或材料。

[0035] 必须指出,除非上下文另外明确规定,否则如本文和所附权利要求书中不使用数量词修饰时包括复数个指示物。因此,举例来说,参考“抗体”包括多个这类抗体并且涉及“框架区”时包括参考一个或多个框架区和本领域的技术人员已知的其等效物等。

[0036] 提供本文中讨论的公开出版物仅用于其在本申请的申请日之前的公开内容。不应将本文中的任何内容理解为承认本发明无权先于凭借先前发明的这类公开。另外,所提供的公开的日期可不同于可需要独立确认的实际公开出版物日期。

[0037] 术语“多个/种”是指多于1,例如多于2、多于约5、多于约10、多于约20、多于约50、多于约100、多于约200、多于约500、多于约1000、多于约2000、多于约5000、多于约10,000、多于约20,000、多于约50,000、多于约100,000,通常不多于约200,000个/种。“群体”含有多个/种项目。

[0038] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换地使用。这些术语被本领域的技术人员很好地理解,并且是指由特异性结合抗原的一种或多种多肽组成的蛋白质。抗体的一种形式构成抗体的基础结构单元。此形式为四聚体并且由两个相同的抗体链对组成,每对具有一个轻链和一个重链。在每对中,轻链和重链可变区一起对与抗原结合负责,并且恒定区对抗体效应子功能负责。

[0039] 识别的免疫球蛋白多肽包括 κ 和 λ 轻链以及 α 、 γ (IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、 Δ 、 ϵ 和 μ 重链或在其它物种中的等效物。全长免疫球蛋白“轻链”(约25kDa或约214个氨基酸)包含在NH₂-末端处的约110个氨基酸的可变区和在COOH-末端处的 κ 或 λ 恒定区。全长免疫球蛋白“重链”(约50kDa或约446个氨基酸)类似地包含可变区(约116个氨基酸)和前述重链恒定区中的一个,例如 γ (约330个氨基酸)。

[0040] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白、保持与抗原特异性结合的抗体的片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv和Fd片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。抗体可为用例如放射性同位素、产生可检测产物的酶、荧光蛋白等检测标记的。抗体可进一步结合到其它部分,如特异性结合对的成员,例如生物素(生物素-抗生物素蛋白特异性结合对的成员)等。抗体还可与固体支持物结合,包括但不限于聚苯乙烯板或珠粒等。所述术语还涵盖Fab'、Fv、F(ab')₂和或保持与抗原特异性结合的其他抗体片段和单克隆抗体。

[0041] 抗体可以多种其它形式存在,包括例如Fv、Fab和(Fab')₂以及双官能(即双特异性)杂交抗体(例如,Lanzavecchia等人,《欧洲免疫学杂志(Eur.J.Immunol.)》17,105(1987)),和以单链形式存在(例如,Huston等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)》,85,5879-5883(1988)和Bird等人,《科学(Science)》,242,423-426(1988),这些文献以引用的方式并入本文中)。(一般来说参见,Hood等人,《免疫学(Immunology)》,纽约州本杰明市(Benjamin,N.Y.),第2版,1984和Hunkapiller与Hood,《自然(Nature)》,323,15-16,1986)。

[0042] 免疫球蛋白轻链或重链可变区由间杂有三个高变区(也被称为“互补决定区”或“CDR”)的框架区(FR)组成。框架区和CDR的范围已经精确地限定(参见,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,E.Kabat等人,美国

卫生和公众服务部(U.S.Department of Health and Human Services),1991)。在一种物种内不同轻链或重链的框架区的序列相对地保守。抗体的框架区,即组成型轻链和重链的合并框架区,用以定位和对准CDR。CDR主要负责结合于抗原的表位。

[0043] 所谓“免疫球蛋白链的可变区”或“免疫球蛋白链可变区”为包含免疫球蛋白的重链的可变结构域(即,VH结构域)或轻链的可变结构域(即,VL结构域)的至少一部分的多肽,其中VL和VH结构域的部分形成免疫球蛋白的抗原结合结构域。因此,免疫球蛋白的可变区包括通过FR1和FR4(例如,FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4)中的任一者或两者侧接的三个CDR。在一些实施方案中,免疫球蛋白链可变区为在重链或轻链中的一个上的区,其当与免疫球蛋白的其它链(即,轻链或重链)的免疫球蛋白链可变区组合时,形成抗原结合结构域。

[0044] 所谓“抗原结合结构域”意指在免疫球蛋白中组装有单个轻链的单个重链的区,其具有对于其特异性抗原的完整抗体的特异性结合活性。因此,完整IgG免疫球蛋白,其包含两个重链和两个轻链,具有两个抗原结合结构域。

[0045] 术语“天然”抗体是指其中抗体的重链和轻链已经通过多细胞生物体的免疫系统制造和配对的抗体。脾、淋巴结、骨髓和血液为含有产生天然抗体的细胞的组织的实例。举例来说,通过从用抗原免疫的第一动物中分离的B细胞产生的抗体为天然抗体。天然抗体含有天然配对的重链和轻链。

[0046] 术语“天然配对的”是指已经通过多细胞生物体的免疫系统配对的重链和轻链序列。

[0047] 如本文所用,术语“混合物”是指穿插且不呈任何特定顺序的元素例如细胞的组合。混合物为均质的并且不在空间上分成其不同成分。元素的混合物的实例包括以空间上未梳理的方式存在于同一水溶液中的多种不同细胞。

[0048] 术语“评定”包括任何形式的测量,并且包括测定元素存在或不存在。术语“测定”、“测量”、“评估”、“评定”和“检定”可互换地使用并且可包括定量和/或定性测定。评定可为相对的或绝对的。“评定某物的存在”包括测定存在的某物的量和/或确定其存在还是不存在。

[0049] 术语“富集”旨在是指组合物的组分(例如,特定类型的细胞)相对于所述样品中的其它组分(例如,其它细胞)比在富集之前更浓(例如,至少 $2\times$ 、至少 $5\times$ 、至少 $10\times$ 、至少 $50\times$ 、至少 $100\times$ 、至少 $500\times$ 、至少 $1,000\times$)。在一些情况下,经富集的某物可占其所存在的样品的显著百分比(例如,大于 2% 、大于 5% 、大于 10% 、大于 20% 、大于 50% 或更多,通常多至约 90% 到 100%)。

[0050] 术语“富集”意指可从较大B细胞群体获得抗原特异性细胞的任何方式。如下文将更详细地描述,富集可通过例如淘选,使用珠粒或细胞分选进行。

[0051] 在获得元素例如细胞或序列的情况下术语“获得”旨在包括接收所述元素以及物理地产生所述元素。

[0052] 术语“外周血单核细胞”或“PBMC”是指具有单个大致圆形细胞核(相对于凸起的细胞核)的血细胞并且包括淋巴细胞(T细胞、B细胞和NK细胞)、单核细胞和巨噬细胞。PBMC可从全血使用ficoll梯度富集。

[0053] 术语“细胞表面抗体”是指系留于B细胞表面的抗体。具有细胞表面抗体的B细胞包

括记忆B细胞和原初B细胞。在一些公开中这类抗体可被称作“B细胞受体”。

[0054] 术语“特异性结合”是指抗体优先与存在于不同分子的均质混合物中的特定抗原结合的能力。在某些实施方案中,特异性结合相互作用将区分样品中的期望和不期望分子,在一些实施方案中大于约10到100倍或更大(例如,大于约1000或10,000倍)。

[0055] 在某些实施方案中,当抗体和抗原在捕获剂/分析物复合物中特异性结合时它们之间的亲和力通过小于 10^{-6} M、小于 10^{-7} M、小于 10^{-8} M、小于 10^{-9} M、小于 10^{-9} M、小于 10^{-11} M或小于约 10^{-12} M或更小的 K_D (解离常数)表征。

[0056] 术语“抗原特异性B细胞”是指具有与在其表面上的抗原特异性结合的抗体的记忆B细胞以及其祖细胞。

[0057] 如果细胞或其后代自宿主获得,那么细胞“来源于”宿主。祖细胞的后代来源于所述祖细胞。

[0058] 术语“包含抗原的支持物”包含任何类型的含有固定在其上的抗原或其部分的支持物(例如,固体或半固体支持物,包括板和珠粒)。举例来说,抗原可例如经由连接子、经由生物素-抗生蛋白链菌素相互作用或经由细胞直接或间接固定于支持物上。通过淘选或使用珠粒富集抗原特异性B细胞的方法利用这类支持物。

[0059] 术语“淘选”用于指B细胞被施用到具有涂布抗原或其部分的一个或多个表面的容器(例如,板)的方法。未结合的细胞可通过在细胞施用到其之后洗涤表面除去。

[0060] 术语“基于珠粒的富集”用于指B细胞与连接到抗原或其部分的珠粒例如磁珠混合的方法。

[0061] 术语“细胞分选”用于指在溶液中B细胞混合可检测抗原(例如,荧光可检测抗原)的方法。在细胞分选方法中,从未结合的细胞中分选与抗原结合的细胞。荧光激活细胞分选(FACS)为细胞分选方法的实例。

[0062] 术语“抗原或其部分”是指用于免疫接种的抗原或其部分(例如,长度为5到20个氨基酸的肽)。

[0063] 术语“复合免疫原”旨在是指含有多种抗原的免疫原。复合免疫原可由已经分开地制备并且然后混合在一起的多种不同抗原构成,或在免疫接种中它们可为天然复合物(例如,如同当使用整个细胞或其级分时的情况)。

[0064] 术语“活化”是指刺激B细胞以a)增殖和b)分化成成浆细胞和/或浆细胞和c)分泌抗体。B细胞活化可通过使B细胞与抗原、表达CD40L的T细胞和细胞因子接触进行,但其它方法是已知的(参见,例如,Wykes,《免疫细胞生物学(Imm.Cell.Biol)》2003 81:328-331)。

[0065] 术语“活化的B细胞”是指包含被活化的B细胞的后代的细胞群体。如上所述,活化使B细胞增殖,并且这类细胞的后代在本文中被称作活化的B细胞。

[0066] 术语“收集”是指分离在培养基中的细胞与底物的行为。举例来说,收集可通过移液或通过倾析进行。

[0067] 术语“通过抗原免疫”和其语法等效物(例如,“经免疫的动物”)旨在是指安放免疫应答抗原的任何动物(人类、兔、小鼠、大鼠、绵羊、奶牛、鸡、人类、骆驼)。举例来说,动物可经由暴露于传染物、接种或通过施用抗原和佐剂(例如,通过注射)而暴露于外来抗原。术语“通过抗原免疫”还旨在包括安放针对“自体”抗原的免疫应答,即具有自体免疫疾病的动物。

[0068] 术语“全体”是指将样品作为单个单位添加到容器中,而在先前或之后不再分级分离或再分割所述样品。举例来说,将样品的部分等分到多孔板的各个孔中不是全体行为。将样品的部分等分到多孔板的同一孔中(即,使用同一移液器进行从一个容器到另一容器的多次转移)为全体行为。全体可使用至少 10^5 、至少 10^6 或至少 10^7 个细胞。

[0069] 术语“评级”和“评级丰度顺序”是指当序列通过它们的丰度列出时的序列顺序,即,其中首先是最丰富的序列,接下来是第二最丰富的序列和接下来第三最丰富的序列等。在某些情况下,序列可通过进行频率分布并且然后通过它们的频率排序序列来评级。

[0070] 术语“对应的等级”或“对应评级的”是指在两个等级中具有相同位置的两个序列。举例来说,在第一等级中的第一、第二和第三位置分别对应于在第二等级中的第一、第二和第三位置。如下文将更详细地描述,评级中的不明确性(例如,如果两个序列以类似丰度表达)可以通过分析那些序列的谱系来解析。

[0071] 如本文所用,术语“谱系相关抗体”和“通过谱系相关的抗体”以及其语法等效变型为通过共有共同B细胞祖先的细胞产生的抗体。通过谱系相关的抗体与抗原的相同表位结合并且在序列中通常非常类似,特别是在它们的L3和H3CDR中。谱系相关抗体的H3和L3CDR两者可具有相同长度和几乎相同的序列(即,不同至多5个,即,0、1、2、3、4或5个残基)。在某些情况下,B细胞祖先含有具有重新排列的轻链VJC区和重新排列的重链VDJC区的基因组,并且产生尚未经历亲和力成熟的抗体。存在于脾组织中的“原初”或“原始”B细胞为示例性B细胞共同祖先。相关抗体经由共同抗体祖先相关,例如在原初B细胞祖先中产生的抗体。术语“谱系相关抗体”并非旨在描述不是通过由相同祖先B细胞产生的细胞而产生的一组抗体。“谱系群组”含有通过谱系彼此相关的一组抗体。

[0072] 如本文所用,术语“至少CDR3”或“至少CDR3序列”是指仅CDR3序列、CDR3序列连同CDR1和/或CDR2序列或可变结构域的至少50个连续氨基酸,至多整个长度的可变结构域的序列,其中序列含有CDR3序列。

[0073] 如本文所用,术语“进化分枝图”和“谱系树”是指由支序分析产生的图,其描绘产生所关注的各种物质的谱系的假设支化序列。在进化分枝图内的支化点被称为节点。

[0074] 如本文所用,术语“构建系统发生树”是指从序列制备系统发生树的计算行为。

[0075] 如本文所用,术语“谱系”是指理论系谱。

[0076] 如本文所用,术语“谱系分析”是指分析抗体的理论系谱,其通常通过分析谱系树进行。

[0077] 如本文所用,术语“序列读段”是指通过测序仪测定的核苷酸的序列,所述测定借助于例如与所述技术相关联的碱基判定软件进行。

[0078] 如本文所用,术语“进化枝”是指通过谱系相关的一组VH或VL序列,即,它们是共同祖先的后裔。

[0079] 如本文所用,术语“抗体重链和/或轻链序列”是指抗体的VH、抗体的VL链,或抗体的VH和VL链两者。

[0080] 如本文所用,术语“获得氨基酸序列”是指获得含有氨基酸序列的文件。如所熟知,核酸序列可经计算机模拟翻译成氨基酸序列。

[0081] 如本文所用,术语“最丰富表达”,涉及蛋白质序列时,是指在样品中最丰富的蛋白质序列。蛋白的丰度可通过例如计数编码所述蛋白的序列读段来测定。具有最多序列读段

的蛋白为最丰富的蛋白。

[0082] 如本文所用,术语“序列比较”是指用于比较查询序列与序列数据库和鉴定在一定阈值以上相似于查询序列的文库序列方法。BLAST (Altschul等人《分子生物学杂志 (Journal of Molecular Biology)》1990 215:403-10) 和FASTA (Lipman等人《科学》1985227:1435-41) 为可用于序列比较的算法的实例,并且许多其它算法是可用的。

[0083] 如本文所用,术语“交织图”是指一对谱系树,其中树叶以使配对中的“交叉”减到最少的方式彼此对齐(参见图3)。谱系树的每一分支可围绕节点旋转,并且在制备交织图中,分支围绕它们的节点旋转以提供树叶之间的最佳匹配,其中最佳匹配使匹配树叶之间的交叉的数目减到最少。交织图已经广泛用于生物学中以比较彼此相关的事物的进化史,例如以分析宿主和寄生虫物种的分子进化,或以分析在相同地理区域中物种的基因。交织图详细地描述于Scornavacca等人(《生物信息学 (Bioinformatics)》2011 27:248-256)、Venkatachalam等人(《IEEE/ACM计算生物学生物信息学会报 (IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.)》2010 7:588-97) 和Lozano(《IEEE/ACM计算生物学生物信息学会报》2008 5:503-13)。图3示出交织图分析可如何对齐两个简单谱系树的实例。在此实例中,交叉完全被消除。

[0084] 交织图可使用已知彼此配对的树叶“锚定”。在这些实施方案中,分支围绕它们的节点旋转直到在锚定的序列之间存在最少数目的交叉(例如,无交叉)。在树已经通过交织图分析“对齐”之后,已知配对的树叶可通过边(例如,如由在图4和图8中示出的系统发生树的树叶之间绘制的线指示)连接。如果已知配对的树叶通过边连接,那么在理论上,插入树叶可彼此配对,只要它们不与一条边或彼此形成交叉事件。图4和图8示出锚定交织图的实例,其中插入序列(即,未通过边连接的序列)可彼此配对,只要配对不与边或彼此形成交叉。

[0085] 如本文所用,术语“对齐”在交织图的情况下是指在交织图中两个序列在彼此的对面,其中“在彼此的对面”意指它们可配对而不与已知的边交叉。在一个谱系树中一个序列可与另一树中的多于序列对齐。图8中示出的交织图示出VH和VL序列对齐的交织图的实例。

[0086] 如本文所用,术语“输入”用于指使信息进入计算机中的任何方式。举例来说,在某些情况下,输入可涉及选择已经存在于计算机系统上的序列或模型。在其它情况下,输入可涉及将序列或模型添加到计算机系统中。输入可使用用户界面来进行。

[0087] 如本文所用,术语“实行”用于指用户采取以启动程序的行为。

具体实施方式

[0088] 本发明方法的一个实施方案示意性地示出在图1中示出。参考图1,方法的某些实施方案可包含:从已经通过抗原免疫的动物获得包含B细胞的细胞群体。在图1中示出的实例中,获得外周血单核细胞(PBMC)。然而,可替代地使用其它来源的B细胞(例如,脾、淋巴结和骨髓)。接下来,方法包含富集抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对抗原具有特异性的细胞表面抗体。一般来说,方法的此步骤涉及使在样品中的至少 10^5 个细胞全体与抗原或其部分接触和分离与抗原或其部分结合的细胞。此步骤可通过淘选(如图1中所示)进行,但可替代地使用任何其它合适的方法,例如基于珠粒的富集方法或通过细胞分选(例如,FACS)。举例来说,在使用淘选或珠粒的实施方案中,方法的此步骤可通过以下进行:i. 在抗原特异性

B细胞与抗原或其部分结合的条件下,使在样品中的至少 10^5 个细胞全体与包含抗原或其部分的支持物(例如,容器或珠群)接触;和ii.洗涤支持物以除去未结合的细胞。在使用细胞分选的实施方法中,方法的此步骤可通过以下进行:i.在抗原特异性B细胞与抗原或其部分结合的条件下,使在样品中的至少 10^5 个细胞全体与抗原或其部分接触;和ii.分选与标记的抗原或其部分结合的细胞。

[0089] 接下来,在存在抗原或其部分的情况下,全体活化富集的B细胞。在这些实施方法中,除了活化细胞的其它必需成分以外,可将抗原或其部分添加到培养基中。最后,方法可包含收集活化细胞,例如通过倾析或移取细胞。

[0090] 如下文将更详细地描述,所收集的细胞可以多种不同方式使用而不需要测试活化细胞的培养基以确定细胞是否分泌与抗原或其部分结合的抗体。

[0091] 在一些实施方法中,方法的富集步骤包含i.在抗原特异性B细胞与抗原或其部分结合的条件下,使来自样品的多个细胞(例如,至少 10^5 、至少 10^6 或至少 10^7 个细胞)全体与包含抗原或其部分的支持物接触;和ii.洗涤支持物以除去未结合的细胞。富集步骤可使用任何合适的富集方法进行,所述富集方法采用支持物例如涂布抗原的固体支持物(如皮氏培养皿等)或涂布抗原的珠粒(例如磁珠或涂布抗链蛋白链菌素的珠粒)。这些方法有时可被称作“淘选”或“基于珠粒的”富集并且这类方法的实例描述描述于前述Lightwood、前述Koditwakku和US7,790,414中,这些文献以引用的方式并入。在替代实施方法中,抗原特异性B细胞可通过FACS获得(参见,例如Weitkamp等人2003《免疫方法杂志(J. of Imm. Methods)》275,223-237和US20130017555)。如果使用FACS,那么分选的细胞可全部合并到单个孔中,不分到不同孔中。在分选实施方法中,可标记细胞以检测其它细胞表面标记物的存在,从而允许富集具体细胞类型,例如记忆细胞。

[0092] 在执行方法的此步骤中,有时可允许B细胞接触已经涂布抗原或其部分的支持物(例如板或珠粒(如果使用珠粒的话))持续足够的时间以允许结合。未与支持物结合的B细胞然后可被除去,留下与支持物结合的那些B细胞。在一些实施方法中抗原与用于使动物免疫的抗原相同,或为其部分。如下文将更详细地描述,在底物上的抗原可以选择表达专用抗体(即,可用于FACS、免疫组织化学、蛋白质印迹法、治疗法等)的B细胞的方式呈现给B细胞。在某些实施方法中,对于与其它抗原非特异性结合的细胞,B细胞可被耗尽。在这些实施方法中,在与含有所关注的抗原的支持物结合之前,细胞可与第一底物结合以除去与另一种抗原非特异性结合的细胞。此步骤可用于除去与类似于所关注的抗原的抗原结合的细胞,或潜在污染的其它来源。在其它情况下,在富集步骤期间可将第二抗原添加到溶液中,其中第二抗原阻断一些细胞与底物上的抗原的非特异性结合。

[0093] 一旦B细胞已经与底物接触持续足够的时间以允许结合,那么就用培养基洗涤混合物,所述培养基有助于从底物除去未附着的细胞但留下经由在B细胞的表面上的抗体与支持物结合的细胞。合适的培养基将是本领域的技术人员已知的或可通过本领域的技术人员容易地凭经验确定。可使用任何培养基,例如罗斯威尔帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)培养基(RPMI)或杜尔贝可改良伊格尔(Dulbecco's Modified Eagle)培养基(DMEM)。在一些情况下,可使用多次洗涤以除去未附着的细胞,例如5或10或更多次洗涤。

[0094] 富集可在任何合适的容器中进行。可选择所用的容器以容纳用于方法中的细胞

(例如, PBMC) 的体积。在一些情况下, 将体积为 0.5ml 到 50ml (例如, 1ml 到 10ml) 的 10^4 到 10^7 个细胞 (例如, 10^5 到 10^7 或更多个细胞) 沉积到含有支持物的器皿中。在一些实施方案中, 抗原或其部分将使容器的表面饱和。本领域的技术人员将容易地能够调节富集步骤的参数以优化保留在底物上的 B 细胞的数目和类型。可调节的参数包括添加到底物中的体积、底物的表面积、与底物结合的抗原的浓度或量; 添加到容器中的 B 细胞的浓度或量; B 细胞的来源 (例如如果 B 细胞来自低反应者, 那么可使用更多的 B 细胞); 除去未附着的细胞的洗涤次数; 洗涤溶液等。与一些其它方法相反, 此方法不需要将单种细胞沉积到多个容器中, 也不需要怀着每个容器将含有相对少数目例如低于 5 个 (例如, 一、二、三、四或五个) 抗原特异性 B 细胞的期望, 小心地滴定添加到底物中的 B 细胞的数目。相反, 在本发明方法中可将如所期望多的 B 细胞添加到底物中, 而无需滴定添加到底物中的抗原特异性 B 细胞的量。

[0095] 可替代地, 可将抗原或其部分涂布到珠粒上。使用珠粒选择与所关注的抗原结合的细胞在本领域中已被充分地证明。简单来说, 例如, 抗原或其部分可与磁珠结合。然后 B 细胞与磁珠混合并且与抗原或其部分结合的那些 B 细胞将经由捕获剂与磁珠结合。然后可通过磁分离获得与磁珠结合的 B 细胞。磁珠的使用描述于 Lagerkvist 等人 (《生物技术 (BioTechniques)》1995 18:862-869) 中。

[0096] 如上所述, 细胞分选 (例如, FACS) 可用于方法的一些实施方案中。在这些实施方案中, 可荧光标记抗原或其部分以有助于 B 细胞的 FACS 分选。如果使用细胞分选, 那么在方法的下一步骤中, 大部分 (例如至少 50%、至少 70% 或至少 90%) 的富集的细胞, 例如, 至少 1,000、至少 5,000、至少 10,000、至少 50,000 或至少 100,000 个细胞可被全体活化。

[0097] 当富集产生与所关注的抗原特异性结合的抗体的那些细胞时, 可期望确保不选择 (例如与支持物或不表达抗原的细胞) 非特异性结合的 B 细胞。在这些实施方案中, B 细胞可首先暴露于尚未结合抗原或其部分的容器和/或支持物, 并且然后丢弃与容器非特异性结合的那些 B 细胞。类似地, 如果使用珠粒, 那么在 B 细胞与涂布抗原的珠粒一起培育之前, B 细胞可首先与未涂布的珠粒一起培育并且然后可除去与未涂布的珠粒结合的细胞。可替代地, 与抗原或其部分非特异性结合的细胞可在细胞已经被富集之后被除去。

[0098] 如将显而易见的, 用于本发明方法中的细胞可从各种来源获得。举例来说, 细胞可从动物的脾、淋巴结骨髓或外周血获得, 所述动物已经用抗原免疫或由于疾病已经形成对抗原的免疫应答。动物可用所选择的抗原使用本领域中众所周知的适合于产生免疫应答的任何技术来免疫 (参见《实验免疫学手册 (Handbook of Experimental Immunology)》, D.M.Weir (编), 第 4 卷, 布莱克威尔科学出版社 (Blackwell Scientific Publishers), 牛津, 英格兰 (Oxford, England), 1986)。可使许多温血动物如人类、兔、小鼠、大鼠、绵羊、奶牛、鸡、人类、骆驼或猪免疫。在一些实施方案中, 动物可具有自体免疫疾病, 或可已经形成对疾病 (例如, 癌症) 的抵抗性或已经从所述疾病恢复。在一些实施方案中, 抗体产生细胞还可从在所选择的疾病或病况过程期间已经产生所述细胞的受试者获得。举例来说, 可获得来自患有未知原因疾病如类风湿性关节炎的人类的抗体产生细胞并且所述抗体产生细胞用于鉴定对疾病过程起作用的抗体或可导致鉴定致病因子或涉及疾病原因的机体组分的抗体。类似地, 抗体产生细胞可从患有由于已知的病原体的疾病 (如疟疾或 AIDS) 的受试者获得。这些抗体产生细胞可来源于血液、淋巴结或骨髓以及来源于其它患病的或正常组织。可使用从已经暴露于抗原 (例如已接种疫苗) 的人类获得的细胞。

[0099] 在一些实施方案中,动物可在存在佐剂下例如多次用抗原免疫。在这些实施方案中,合适的抗原有许多并且包括可溶和溶解的蛋白,包括细胞外暴露的片段膜蛋白。在特定实施方案中,动物可用含有多种抗原(例如,至少2、至少5、至少10、至少50、至少100、至少500或至少1,000,多至5,000或更多种抗原)的复合免疫原免疫。

[0100] 如果使用PBMC,那么它们可从已经用抗凝血剂如肝素或EDTA处理的血液富集。可通过lympholyte密度离心(Biozol;#CL5120)或使用Ficoll密度梯度(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)目录号:10771;MP Biomedicals,目录号:091692254)从全血中分离PBMC。用于分离PBMC的方法是众所周知的(参见,例如,Panda,Bio-protocol 2013 3:e323)并且在某些情况下可包括以下步骤:收集静脉血液样品并且与肝素混合,在Ficoll Histopaque的顶部上层铺血液,在4°C中在摆动式桶(swing-out bucket)中以 $100\times g$ 离心30min;除去在histopaque和培养基之间的分界面中的细胞,并且然后例如用PBS洗涤所述细胞。在许多物种中,从4ml血液产生的细胞的大致产量可在 10^5 到 10^8 之间变化。

[0101] 在已经富集抗原特异性B细胞之后,它们在存在抗原或其部分下活化。可通过任何合适的方法活化B细胞,例如通过CD40活化。在某些情况下,活化可通过以下进行,例如通过使固定细胞与含有抗原或其部分的培养基接触,所述培养基还含有CD40-L(其可在T细胞上)和一种或多种细胞因子和/或生长因子(参见,例如,Liebig等人,《可视化实验杂志(J Vis Exp.)》2010Mar 5 37:1734;van Kooten等人,《白细胞生物学杂志(J.Leukoc.Biol.)》2000 67:2-17;Kondo等人,《临床实验免疫学(Clin Exp Immunol.)》2009 155:249-56;W0 91/09115;W0 94/24164;Tsuchiyama L等人,《人类抗体(Hum Antibodies.)》1997 8:43-7;Imadome等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci.)》2003 100:7836-40等等)。

[0102] 在一些实施方案中,活化步骤引起在同一器皿中至少100个抗原特异性B细胞(例如,至少500个抗原特异性B细胞、至少1,000个抗原特异性B细胞、至少5,000个抗原特异性B细胞、至少10,000个抗原特异性B细胞、至少50,000个抗原特异性B细胞或至少100,000个抗原特异性B细胞)的活化,得到含有由若干B细胞克隆群体(例如,至少50个B细胞克隆群体、至少100个B细胞克隆群体、至少500个B细胞克隆群体、至少1000个B细胞克隆群体、至少5000个B细胞克隆群体、至少10,000个B细胞克隆群体、至少50,000个B细胞克隆群体或至少100,000个B细胞克隆群体等)构成的至少 10^5 个活化B细胞(例如,至少 10^6 个活化B细胞、至少 10^7 个活化B细胞或至少 10^8 个活化B细胞)的混合物和抗体的高度复合混合物的培养基。方法的下一步骤可在不测试培养基以确定抗原特异性抗体是否产生的情况下执行,但在一些情况下,人们可想要在继续之前任选地测试培养基的抗原特异性抗体。

[0103] 在活化B细胞并且已经增殖之后,收集所述B细胞。如上所述,这可通过从固体支持物移取或倾析培养基和将倾析的材料放入器皿中进行。此步骤也可全体进行。所收集的B细胞可用于如下所述的各种应用。

[0104] B细胞融合实施方案

[0105] 在一些实施方案中,方法可包含使活化细胞与融合搭配物融合以产生多个杂交瘤,并且筛选杂交瘤以鉴定产生与抗原或其部分结合的抗体的杂交瘤。

[0106] 在这些实施方案中,所收集的细胞可与合适的永生细胞(例如,NIH 3T3、DT-40或240E细胞等;Spieker-Polet等人,《美国国家科学院院刊》92:9348-9352,1995)融合以产生杂交瘤。在这些实施方案中,所收集的B细胞中的至少 10^5 、至少 10^6 或至少 10^7 个可与合适的

融合搭配物融合并且使用任何合适的方法沉积到孔中。通过酶联免疫吸附检定 (ELISA) 筛选孔中上清液的抗体分泌并且可根据标准程序选择和扩增分泌对抗原具有特异性的单克隆抗体的阳性克隆 (Harlow 等人,《抗体:实验室手册 (Antibodies:A Laboratory Manual)》,第一版 (1988) 纽约州冷泉港 (Cold spring Harbor,N.Y.);和前述 Spieker-Polet 等人)。可在结合活性的基础上进一步选择合适的单克隆抗体,所述结合活性包括其结合特异性、结合亲和力、结合的结合力、阻断活性或造成影响 (例如促进或抑制细胞表型,例如细胞生长、细胞增殖、细胞迁移、细胞活力 (例如,凋亡)、细胞分化、细胞粘附性、细胞形状改变 (例如,管状细胞形成)、补体依赖性细胞毒性 CDC、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 ADCC、受体活化、基因表达改变、翻译后修饰的改变 (例如,磷酸化)、蛋白靶向的改变 (例如,NF B 局部化等) 等或抑制受体多聚化 (例如,二聚体或三聚) 或受体-配体相互作用) 的任何其它活性。使用标准分子生物学技术如聚合酶链反应 (PCR) 或反转录 PCR (RT-PCR) 从杂交瘤中分离编码抗体的核酸 (Ausubel 等人,《分子生物学短方案 (Short Protocols in Molecular Biology)》,第 3 版,威利父子出版社 (Wiley&Sons),1995; Sambrook 等人,《分子克隆实验指南 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》第二版,(1989) 纽约州冷泉港),并且转移到不同宿主以表达重组抗体。此方法的实例在图 2 中说明。

[0107] 测序实施方案

[0108] 在一些实施方案中,方法可包含从所收集的细胞制备 cDNA,和测序 cDNA 以获得多个 VH (重链可变结构域) 序列和多个 VL (轻链可变结构域) 序列。在这些实施方案中,方法可进一步包含选择 VH 和 VL 序列,和测试包含所选择的序列的抗体以确定抗体是否与抗原或其部分结合。在一些实施方案中和如下文将更详细地描述,可通过以下选择重链和轻链序列:
i. 获得多个最丰富的重链和轻链序列的交织图,其中使用天然彼此配对的重链和轻链锚定交织图;
ii. 选择重链序列和轻链序列,其中在交织图中使所选择的重链和轻链序列彼此对齐;和
iii. 测试包含所选择的重链和轻链序列的抗体以确定抗体是否与抗原或其部分结合。

[0109] 在这些实施方案中,可对编码所收集的细胞产生的抗体的 cDNA 进行测序。在某些实施方案中,扩增至少编码重链和轻链的可变结构域的 cDNA。用于执行 RT-PCR 以扩增编码兔、鼠和人类等等的抗体的序列的策略描述于 US20040067496、Kantor 等人 (《纽约科学院年鉴 (Ann.N Y Acad.Sci.)》1995 764:224-7)、Boekel 等人 (《免疫 (Immunity)》1997 7:357-68)、Yamagami 等人 (《免疫》1999 11:309-16)、Beerli 等人 (MAbs.20102)、Morbach 等人 (《分子免疫学 (Mol.Immunol.)》2008 45:3840-6)、Küppers 等人 (《分子生物学方法 (Methods Mol Biol.)》2004 271:225-238) 和 Seidl 等人 (《国际免疫学 (Int.Immunol.)》1997 9:689-702) 中,这些文献以引用的方式并入本文中。用于通过 PCR 克隆抗体序列的若干策略是已知的并且可容易地经调适用于本发明方法中 (例如,通过使用除了所公开的引物以外的 CDR-特异性引物)。这类策略包括由以下描述的那些:LeBoeuf (《基因 (Gene.)》1989 82:371-7)、Dattamajumdar (《免疫遗传学 (Immunogenetics.)》1996 43:141-51)、Kettleborough (《欧洲免疫学杂志 (Eur.J.Immunol.)》1993 23:206-11)、Babcock (《美国国家科学院院刊》1996 93:7843-7848) 和 Williams (《冷泉港定量生物学研讨会文集 (Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.)》1989 54:637-47) 以及许多其他人。在某些情况下,举例来说,第二引物可为不同引物或简并引物的混合物。

[0110] 在一些实施方案中,编码VH或VL序列的整个多核苷酸可使用跨越那些区的第一和最后一个密码子的引物来扩增。在某些情况下,可使用通用引物或简并引物。可将合适的尾添加到引物中以有助于测序。还可使用使用嵌套引物的扩增程序,其中这类嵌套引物是本领域的技术人员众所周知的。

[0111] 如将显而易见,可使用下一代测序平台进行测序,例如Illumina的可逆终止子方法、Roche的焦磷酸测序方法(454)、生命技术(Life Technology)的连接测序(SOLiD平台)、生命技术的离子激流平台、太平洋生物科学(Pacific Biosciences) SMRT平台等。这类方法的实例描述于以下文献中:Margulies等人(《自然》2005 437:376-80);Ronaghi等人(《分析生物化学 (Analytical Biochemistry)》1996 242:84-9);Shendure(《科学》2005 309:1728);Imelfort等人(《生物信息学简介 (Brief Bioinform.)》2009 10:609-18);Fox等人(《分子生物学方法》2009;553:79-108);Appleby等人(《分子生物学方法》2009;513:19-39)和Morozova(《基因组学 (Genomics.)》2008 92:255-64),这些文献以引用的方式并入用于方法和方法的具体步骤的一般描述,包括所有起始产物、反应物和每个步骤的最终产物。在其它实施方案中,可使用纳米孔测序(例如如Soni等人《临床化学 (Clin Chem)》53:1996-2001 2007中所述或如由牛津纳米孔技术(Oxford Nanopore Technologies)所描述)进行测序。

[0112] 根据所期望读段深度,测序步骤可得到至少5,000个重链序列读段(至少10,000、至少50,000、至少100,000、至少500,000、至少1M、至少5M、至少10M、至少50M或至少100M个重链序列读段)和至少5,000个轻链序列读段(至少10,000、至少50,000、至少100,000、至少500,000、至少1M、至少5M、至少10M、至少50M或至少100M个重链序列读段)。在某些实施方案中,每个序列读段可覆盖所述抗体的重链或轻链的整个可变区。此时,在不知道哪个轻链序列与哪个重链序列配对的意义上,重链和轻链序列未配对。

[0113] 如上所述,可使用交织图分析配对重链和轻链。在这些实施方案中,方法可包含制备最丰富的VH序列的谱系树和最丰富的VL序列的谱系树并且在交织图中使树对齐。在一些实施方案中,可任意地选择选用于分析的序列的数目,或在某些实施方案中,选择用于分析的序列的数目可由一定数目的序列读段(例如,至少10、至少50、至少100、至少500、至少1,000、至少2,000、至少5,000或至少10,000个序列读段)表示。无论哪种方式,选择最丰富的VH和VL序列的数目(例如,最丰富的VH和VL序列中的多至50、多至100、多至500、多至1,000、多至2,000或多至5,000个)。在选择最丰富的VH和VL序列之后,构建交织图,其一般涉及制备单独的谱系树(一个所选择的VH序列的树和另一个所选择的VL序列的树),并且然后制备通过已知彼此配对的VH和VL锚定的交织图。如上文所解释,在这些实施方案中,谱系树的分支围绕它们的节点旋转,直到锚定序列之间存在最少数目的交叉(例如,无交叉)。在已经通过交织图分析“对齐”树之后,已知彼此配对的序列可通过边连接,如图4和图8中所示。插入序列可彼此配对和测试,只要配对不与现有的边形成交叉。此概念在图4中说明。举例来说,谱系分析可使用由序列读段编码的至少CDR3区(例如,仅CDR3区、所有CDR或整个可变区)来进行。在一些情况下,在选择用于测试的VH序列和VL序列中,可考虑序列丰度。举例来说,如果存在三个插入VH序列和三个插入VL序列,那么最丰富的序列更可能彼此配对。

[0114] 如上所述,可使用已知彼此配对的VH和VL锚定交织图。这些序列可使用任何合适的方法获得。举例来说,可通过单个细胞RT-PCR从各个B细胞(通过以单个细胞稀释度铺板

所收集的B细胞来获得) 扩增VH和VL序列。可替代地, 所收集的B细胞可与合适的融合搭配物(如上所述) 融合并且可从杂交瘤扩增VH和VL序列。用于锚定交织图的序列的数目可根据所分析的序列的数目而变化。在一些情况下, 平均起来在交织图中至少10%、至少20%或至少30%或至少50%的序列应被锚定。根据交织图的尺寸, 这可由至少10、至少20、至少30、至少50或最少100或更多个边表示。在某些实施方案中, 可需要获得至少100、至少500、至少1,000、至少5,000、至少10,000或更多个已知配对的VH和VL序列。

[0115] 在使用本发明方法获得的序列数据中, 通常存在确定数目的抗体, 即, 约10到500个VH和VL序列, 所述VH和VL序列比其余的序列丰富得多并且可容易地通过它们的丰度评级(参见图10)。在一些实施方案中, 此“极化”通常允许通过VH和VL序列的丰度来配对并且产生与原始抗原结合的抗体。因而, 在某些实施方案中, 在已经获得序列之后, VH和VL序列可根据它们的丰度独立地评级(即, 其中首先是最丰富的序列, 接下来是第二最丰富的序列, 和接下来是第三最丰富的序列等)。此评级步骤可单独基于序列读段, 其中例如将相同或非常类似(即, 至少98%或99%相同以容许序列误差)的所有序列读段放入一组中并且计数每组的序列读段的数目。还可使用翻译的序列制作评级干, 其中通过至少由序列读段编码的CDR3区(例如, 仅CDR3区、所有CDR或整个可变区) 分组序列读段。在此实例中, 将编码有类似或相同CDR3区、CDR或可变区(即, 至少98%或99%相同或具有一个或两个氨基酸取代以容许序列误差)的抗体的所有序列读段放入一组中并且计数每组的序列读段的数目。

[0116] 在进行评级之后, 重链和轻链可根据它们的评级丰度顺序配对在一起。在此实例中, 最丰富评级的重链序列与对应评级的轻链序列配对, 即, 第一、第二、第三、第四和第五最丰富的重链序列与第一、第二、第三、第四和第五最丰富的轻链序列配对。可制备和测试含有这类配对的重链和轻链的抗体。等级排序描述于US20110312505、Haessler(《分子生物学方法》2014 1131:191-203)和Reddy(《自然·生物技术》2010 28:965-9)中。

[0117] 在某些情况下, 两个或更多个序列的等级顺序可不明确, 因为它们具有类似丰度(例如, 丰度在彼此的10%或20%内)。举例来说, 最丰富的重链序列可由10,000个序列读段表示, 而第二和第三最丰富的重链序列可分别由5,500和6,000个读段表示。在此实例中, 第二和第三最丰富的重链序列可具有不明确的评级, 并且因而, 可难以确定它们是否正确地评级。

[0118] 不明确的评级可通过分析不明确评级的序列的谱系和来自其它链的对应评级的序列的谱系来解析。此“局部”谱系分析方法一般涉及构建两个单独的谱系树, 所述两个谱系树示出最丰富的重链和轻链序列(例如, 最丰富的序列中的2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多个)与测序数据中表示的其它类似序列的理论关系。使用VH序列构建一个谱系树并且使用VL序列构建另一谱系树。在尝试解析两个轻链的评级中的不明确性中, 可查看重链(其中对应评级的序列明确)的系统发生树, 并且确定两个轻链应评级成哪种顺序。举例来说, 如果两个重链序列映射到含有相对大数目的彼此相差一个或两个氨基酸(其由亲和力成熟产生)的序列的进化枝, 那么对应的轻链序列可能映射到含有相对大数目的彼此相差一个或两个氨基酸的序列的进化枝。在另一实例中, 如果一个重链序列映射到含有相对大数目的彼此相差一个或两个氨基酸的序列的进化枝并且另一重链序列映射到离开进化枝的一个侧分支, 那么对应的轻链序列可能映射到类似进化枝和离开进化枝的一个侧分支。在另一实例中, 如果两个重链序列映射到高度支化的进化枝中的不同分支, 那么对应的轻链序列

可能映射到高度支化的进化枝中的不同分支。在另一实例中,如果重链序列映射到基底进化枝(在树的根部附近的进化枝),那么对应的轻链序列可能映射到基底进化枝。因此,在尝试解析评级例如VH序列评级中的潜在的不明确性中,可查看VL序列(其中对应评级的序列明确)的系统发生树,并且基于对应评级的序列在所述树上的位置来确定哪个评级是正确的。

[0119] 此概念在图5中说明。在图5中,第二和第三最丰富的轻链序列评级不明确。通过比较最丰富的轻链序列的谱系树到最丰富的重链序列的谱系树,可解析轻链序列的评级并且确定哪一个与哪个重链正确地配对。在此实例中,第二和第三最丰富的轻序列以某一组合与第二和第三最丰富的轻链序列配对。基于VH和VL树,可推断在总体上配对可能是正确的,因为重链和轻链树的支化图案类似;b)基于重链树,第二最丰富的轻链序列可能可能在与最丰富的重轻序列相同的进化枝中,和c)基于重链树,第三最丰富的轻链序列可能在含有第二最丰富的轻链序列的进化枝的一个侧分支中。基于此分析,可解析评级的不明确性。在这种情况下,最丰富的重链与最丰富的轻链配对,第二最丰富的重链与第二最丰富的轻链配对,并且第三最丰富的重链与第三丰富的轻链配对。即使这类分析未除去所有不明确性,但候选对可被缩减并且进行测试。

[0120] 在某些实施方案中,方法可涉及:(a)从已经通过抗原免疫的动物获得细胞样品,其中所述样品包含B细胞;b)通过以下富集抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对抗原具有特异性的细胞表面抗体:i.使在样品中的至少 10^5 个细胞全体与抗原或其部分接触;和ii.分离与抗原或其部分结合的细胞;和(c)在抗原或其部分存在下,全体地活化富集的B细胞,以产生富集的抗原特异性浆细胞群体;d)从富集的抗原特异性浆细胞群体制备cDNA;和(e)通过测序cDNA,获得多个重链可变结构域序列和多个轻链可变结构域序列;和(f)比较在(e)中获得序列和通过测序(a)的样品的第二部分获得的多个重链可变结构域序列和多个轻链可变结构域序列。方法的此实施方案可用于鉴定真正编码抗原特异性抗体的序列,以鉴定由在原始样品中潜在未被活化的B细胞产生的抗体,而不需要执行筛选。

[0121] 如上所述,方法可多重化,因为动物可用复合免疫原免疫,并且可彼此分开地富集免疫原的多种抗原中的每一种的抗原特异性细胞。在这些方法中,二、三、四、五或更多,至少10、至少20、至少50、或至少100或更多个不同支持物可用于分开地分离不同抗原特异性B细胞,从而允许单个动物用复合免疫原免疫。可彼此分开地富集对每个所关注的抗原具有特异性的B细胞。在一些实施方案中,然后可活化和收集抗原特异性细胞,如上文概括,以提供多个细胞群体,每个群体对不同抗原具有特异性。这些方法一般涉及:(a)从已经通过复合免疫原免疫的动物获得细胞样品,其中所述细胞包含B细胞;b)通过以下富集第一抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对第一抗原具有特异性的细胞表面抗体:i.使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与第一抗原或其部分结合;和ii.分离与第一抗原或其部分结合的细胞;c)在第一抗原或其部分存在下,全体活化富集的B细胞,以获得第一活化B细胞群体;和(d)从支持物收集第一活化B细胞群体。此方法可包含(b)通过以下富集第二抗原特异性B细胞群体,所述B细胞包含对免疫原的第二抗原具有特异性的细胞表面抗体:i.使在所述样品中的至少 10^5 个细胞全体与第二抗原或其部分结合;和ii.分离与第二抗原或其部分结合的细胞;c)在第二抗原或其部分存在下,全体活化富集的B细胞,以获得第二活化B细胞群体;和(d)从支持物收集第二活化B细胞活化细胞群体。

[0122] 另外如上所述,可调整富集步骤以富集专用抗体,即,选用于特定用途例如FACS、免疫组织化学、治疗法等)的抗体。这一点的实例在图6中示出。在一些实施方案中,抗原特异性B细胞可通过以下富集:在特定条件例如特定盐浓度、pH下,在特定机械力、温度下,或在结合缓冲液的添加剂存在下,与抗原结合。在其它实施方案中,可使用以特定定向存在的抗原(其应使最终抗体更适合于ELISA检定等)、固定/嵌入抗原(其应使最终抗体更适合于在FFPE样品上进行的IHC检定)、连接到抗原的珠粒(其应使最终抗体更适合于免疫沉淀)和细胞(其应使最终抗体更适合于FACS和细胞富集应用)来捕获抗原特异性B细胞。这些仅是实例并且其它实例将显而易见。

[0123] 一旦重链和轻链序列配对,就制备并且表达编码抗体的可变区的多核苷酸。在一些情况下,通过HEK293细胞或另一合适的细胞类型的转染,可将合成序列插入适当的载体中用于表达,例如作为全长IgG或单链抗体。一旦制备,核酸就可操作地连接到将允许表达并且任选地从宿主细胞分泌功能抗体的表达多核苷酸。在特定情况下,表达的抗体可为单链抗体。用于例如在哺乳动物、细菌和酵母宿主细胞中产生重组抗体的策略是众所周知。一旦已经产生本发明的抗体分子,其可通过本领域中已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化,例如通过色谱法(例如,离子交换、亲和力,特别是通过对于在蛋白A之后的特异性抗原的亲和力,和尺寸柱色谱法)、离心、差别溶解,或通过用于纯化蛋白质的任何其它标准技术。在许多实施方案中,抗体从细胞分泌到培养基中并从培养基中收获。

[0124] 在通过另一宿主细胞产生重组抗体之后,其可在多种检定中测试,并且根据抗体如何使用,其可被人源化。举例来说,抗体可在结合检定(例如,ELISA、FACS检定或使用免疫组织化学)或活性检定(其可活体内、活体外或在无细胞系统中)中测试,所述方法是众所周知的(参见,例如,US20040067496)。

[0125] 发现通过本发明方法产生的抗体用于例如诊断中、抗体成像中和治疗可通过基于单克隆抗体的疗法治病的疾病中。具体来说,通过本发明方法人源化的抗体可用于被动免疫接种或除去不想要的细胞或抗原,如通过补体介导的裂解或抗体介导的细胞毒性(ADCC),均无与许多先前抗体相关联的实质性免疫反应(例如,过敏性休克)。

[0126] 在一个实施方案中,提供鉴定的抗体的人源化形式。在某些情况下,人源化抗体可通过取代父代非人类抗体的框架区中的氨基酸以产生比父代非人类抗体在人类中更低免疫原性的经修饰抗体来制备。抗体可使用本领域中已知的多种技术人源化,所述技术包括例如,CDR-接枝(EP 239,400;PCT公开案W0 91/09967;美国专利第5,225,539号;第5,530,101号;和第5,585,089号)、镶面或表面重修(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,《分子免疫学》28(4/5):489-498(1991);Studnicka等人,《蛋白质工程(Protein Engineering)》7(6):805-814(1994);Roguska.等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》91:969-973(1994)),和链改组(美国专利第5,565,332号)。在某些实施方案中,框架取代通过以下鉴定:建模CDR和框架残基的相互作用以鉴定对于抗原结合重要的框架残基和序列比较从而鉴定在特定位置处的反常框架残基(参见,例如,美国专利第5,585,089号;Riechmann等人《自然》332:323(1988))。考虑用于本发明中的用于人源化抗体的额外方法描述于以下中:美国专利第5,750,078号;第5,502,167号;第5,705,154号;第5,770,403号;第5,698,417号;第5,693,493号;第5,558,864号;第4,935,496号;和第4,816,567号,和PCT公开案W0 98/45331和W0 98/45332。在特定实施方案中,受试者抗体可根据公布的美国专利申请20040086979和

20050033031中所阐述的方法人源化。因此,上述抗体可使用本领域中已知的方法人源化。

[0127] 在尤其受关注的一个实施方案中,受试者抗体可根据在US7,462,697中详细阐述方法的人源化,所述申请以全文引用的方式并入本文中。一般来说,此人源化方法涉及通过比较与相同抗原结合的抗体序列来鉴定可取代的抗体位置,和用存在于类似人类抗体的相同位置处的不同氨基酸替换在所述位置处的氨基酸。在这些方法中,将亲本抗体的氨基酸序列和与亲本抗体克隆地相关的其它抗体的氨基酸序列相比较(即,与其比对)以鉴定允许变化的位置。亲本抗体的可变结构域的氨基酸序列可与人类抗体序列的数据库相比较,并且选择氨基酸序列类似于亲本抗体的氨基酸序列的人类抗体。比较(例如,比对)亲本抗体和人类抗体的氨基酸序列,并且在亲本抗体的一个或多个允许变化的位置处氨基酸由在人类抗体中的对应地定位的氨基酸取代。在此人源化方法中,除了框架区以外,抗体的CDR区可被人源化。

[0128] 实例

[0129] 提供以下实例以便证实并且进一步说明本发明的某些实施方案和各方面并且不应理解为限制本发明的范围。

[0130] 概述

[0131] 在将下一代测序(NGS)技术应用于单克隆抗体研发中的一个挑战为在数百万个VH/VL序列之中鉴定表示靶向抗原应答的子集。为实现此目标,整合实验设计与生物信息学(数据挖掘策略)是必需的。本文所述的为组合B细胞富集、活化和NGS从而以更高置信度和更佳分辨率鉴定抗原特异性IgG的新型方法。

[0132] 来源于经免疫动物的外周血的B细胞可用作起始材料。此样品含有不同分化阶段和特异性的大的B细胞群体、不成熟的、原初和血浆B细胞,并且估计(基于公布的流式细胞测量术分析)在仅0.1%到1%的循环B细胞与免疫接种后抗原应答有关。为降低此复杂性、使抗原特异性B细胞的范围变窄和增加灵敏度(测序深度),针对对抗原的亲合力在固体支持物上选择B细胞。活体外增殖促进收集和测序的抗原特异性B细胞的细胞分裂和分化。抗体呈递B细胞(其在理论上应为记忆B细胞)转化成抗体产生B细胞伴随着IgG mRNA表达的强增加,这可通过NGS检测并且可通过计数序列读段估算它们的丰度。此外,仅通过与抗原相互作用而初始地活化的B细胞分化成浆细胞。

[0133] 根据如何实施方法,不同于其它方法,所述方法提供更大的灵敏度、降低“噪音”并且是高度可扩展的。通过以下实现更大的灵敏度:富集抗原特异性B细胞,在涂布抗原的板上富集可允许5到10×富集表达抗原特异性IgG的B细胞,和选择表达在不富集的情况下将会遗漏的罕见的单克隆抗体的B细胞。噪音的降低可通过活化抗原特异性B细胞实现。在此步骤中,仅与抗原结合的B细胞增殖并分化成浆细胞。来自活化的细胞群体的mRNA表达的显著增加有助于区别那些序列与在更传统的选择方法中固有的噪音(例如,来自在富集期间非特异性结合的浆细胞的序列)。最后,方法是高度可扩展的。因为大的细胞群体(例如,5到10百万个细胞)可进行富集并且用于方法中。

[0134] 实施例1

[0135] PBMC分离、富集和活化的方案

[0136] 1) 抗原涂布和阻断:

[0137] 1. 通过使用0.22μm针筒过滤器,无菌过滤抗原溶液。

- [0138] 2.用在10mL的PBS中的抗原(1.5 μ g/ml)涂布高亲和力培养皿。
- [0139] 3.在4 $^{\circ}$ C下培育过夜。
- [0140] 4.第二天早晨抽吸所述板并且用10ml PBS洗涤2 \times 。
- [0141] 5.通过添加10ml 5%FBS/PBS溶液,封闭所述板。在室温下培育2小时或在37 $^{\circ}$ C下培育30分钟。
- [0142] 6.抽吸所述板并且然后用10ml 1640RPMI培养基洗涤1 \times
- [0143] 2) PBMC分离:
- [0144] 1.将15ml的梯度培养基(Ficoll-Paque Premium 1.084)添加到Leucosep淋巴细胞分离管中。其应高于白色膜。在使用之前剧烈摇动Ficoll瓶。
- [0145] 2.以1200rpm离心30秒。梯度应低于白色膜。
- [0146] 3.用室温PBS 1:1稀释兔血。然后将20mL的稀释的兔血倾倒入Leucosep管中。其应层铺在膜和梯度培养基的顶部上。
- [0147] 4.以1500rpm离心30min。
- [0148] 5.使用Pasteur滴管,将PBMC层小心地转移到新的50ml管中(仔细的以避免混合PBMC层与血清层)。
- [0149] 6.用45ml的DPBS洗涤并且以1150rpm离心10min以收集细胞。因你可能抽吸到细胞,所以不要抽吸上清液,取而代之将倾倒入废料容器中。
- [0150] 7.重复步骤6。
- [0151] 8.将细胞小球再悬浮在5ml B细胞融合培养基中并且通过血细胞计或FACS计数活的细胞的数目。
- [0152] 3) 淘选:
- [0153] 1.将5M PBMC添加到具有5ml B细胞融合培养基(细胞密度1M/ml)的高亲和力培养皿中(涂布、封闭和洗涤)。如果细胞数目低于5M,那么将所有细胞放入5ml中。
- [0154] 2.在缓慢搅动(50rpm)的情况下,在37 $^{\circ}$ C下培育90min。
- [0155] 3.抽吸培养基并且用5ml B细胞融合培养基洗涤2 \times 。缓慢添加培养基,并且总是到培养皿上的同一点。在每次洗涤之后用显微镜检查培养皿。如果附着的细胞的数目低,那么减少洗涤步骤的次数;如果细胞数目高,而且在悬浮液中存在许多细胞,则再多洗涤一次。两次洗涤是标准。
- [0156] 4) B细胞培养:
- [0157] 1.在洗涤之后,将10ml的B细胞融合培养基添加在培养皿中。
- [0158] 2.然后将10ml CD40L喂养细胞培养基添加在培养皿中。
- [0159] 3.在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培育。
- [0160] 4.在5到6天之后,使用显微镜检查细胞状态和数目,如果培养基为黄色并且在显微镜下可看到许多细胞,那么将10ml的B细胞融合培养基添加到培养皿中并且在第7天进行融合;如果细胞生长和扩增并且培养基仍为粉红色,那么在第7天进行融合;如果细胞数目低,那么添加10ml喂养细胞培养基(无喂养细胞)并且在第10天进行融合。
- [0161] 实施例2
- [0162] 杂交瘤制备的方案
- [0163] 5) B细胞融合

- [0164] 1. 将B细胞收获到50ml管中。
- [0165] 2. 用锥虫蓝或FACS计数活的细胞的数目。
- [0166] 3. 将8M B细胞转移到另一新的50ml管并且将4M 240E-W2添加到管中(如果细胞数目小于8M,那么以2:1的比率添加240E细胞数目)。
- [0167] 4. 以1500rpm离心5min。
- [0168] 5. 完全抽吸上清液同时仔细以不失去任何细胞。
- [0169] 6. 使用无菌Pasteur滴管缓慢地(应耗时10到30s)将0.3到0.4ml经预热的PEG添加到管的底部(应耗时总共1min)。
- [0170] 7. 缓慢地添加21mL经预热的1640RPMI培养基(应耗时1min)。
- [0171] 8. 缓慢地添加21mL经预热的B细胞生长培养基(应耗时1min)。
- [0172] 9. 关闭管盖,使管倒置以缓慢地混合培养基。
- [0173] 10. 将喂养细胞(240E-W2)添加到管中(2×10^6 的240E/1 \times 96板)。
- [0174] 11. 以1100rpm沉降细胞5min。
- [0175] 12. 抽吸上清液。
- [0176] 13. 添加1ml的240E生长培养基并且用移液管再悬浮细胞小球。
- [0177] 14. 用B细胞生长培养基稀释细胞并且添加到4个96孔板中(100微升/孔)。
- [0178] 15. 在24小时之后,将2 \times HAT 240E-W2培养基添加到板(100微升/孔)。

[0179] 实施例3

[0180] 制备VH和VL文库

[0181] 根据上述方案富集和活化来自外周血的B细胞。在增殖之后5到8天收集5百万个细胞,然后细胞在TRIzol反应剂(生命技术)中裂解并且根据制造商的方案(凯杰(Qiagen))使用RNeasy纯化试剂盒分离总RNA。用ND-1000分光光度计(Nanodrop)测量RNA浓度。总共2ug总RNA以1:8v/v比率与TCL缓冲液组合,等分在2个孔中(VH和VL文库各用一个),然后根据制造商的方案(TurboCapture,凯杰)通过杂交到孔固定的寡聚dT分离mRNA。

[0182] 使用ImProm II反转录系统(普洛麦格(Promega))通过直接将反应剂添加到含有固定mRNA的孔中进行第一链cDNA合成。在反转录之后,孔用100ul 10mM Tris-Cl缓冲液(pH 7.5)洗涤3次。通过PCR使用略微简并的IgG特异性引物的调拌料扩增VH和VL基因(参见下文)。80ul PCR反应物由0.2uM的正向和反向引物调拌料、1 \times 精度缓冲液(安捷伦(Agilent))、0.2mM dNTP和5U TaqPlus精度(安捷伦)组成。热循环仪程序为:95 $^{\circ}$ C持续3min和34个循环(95 $^{\circ}$ C持续40s、62 $^{\circ}$ C持续30s和72 $^{\circ}$ C持续50s);72 $^{\circ}$ C持续10min;4 $^{\circ}$ C储存。

[0183] 凝胶纯化PCR产物(凯杰凝胶提取试剂盒)并且使用ND-1000分光光度计(Nanodrop)定量产率。然后通过有限的循环PCR添加Illumina衔接子和相容的索引。30ul PCR反应物由20ng PCR产物(参见上文)、5ul的各Nextera XT索引引物(N7xx和N5xx)和2 \times KAPA HiFi HotStart即用调拌料组成。热循环仪程序为:95 $^{\circ}$ C持续3min和8个循环(98 $^{\circ}$ C持续20s、62 $^{\circ}$ C持续15s和72 $^{\circ}$ C持续50s);72 $^{\circ}$ C持续10min;4 $^{\circ}$ C储存。凝胶纯化PCR产物(凯杰凝胶提取试剂盒)并且提交用于Illumina MiSeq 2x300测序(加州大学戴维斯基因组中心(UC Davis Genome Center))。

[0184] VH扩增引物

[0185] 正向:

[0186] 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCC-3'
(SEQ ID NO:1)

[0187] 反向(1:1比率)

[0188] 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGTGGGAAGACTGACGGAGCCTTAG-3' (SEQ ID NO:2)

[0189] 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGTGGGAAGACTGATGGAGCCTTAG-3' (SEQ ID NO:3)

[0190] VK扩增引物

[0191] 正向:

[0192] 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATGGACACGAGGGCCCCAC-3' (SEQ ID NO:4)

[0193] 反向(9:0.5:0.5比率)

[0194] 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGTGGGAAGAKGAGGACAGTAGG-3' (SEQ ID NO:5)

[0195] 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGTGGGAAGAKGAGGACACTAGG-3' (SEQ ID NO:6)

[0196] 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGTGGGAAGAKGAGGACAGAAGG-3' (SEQ ID NO:7)

[0197] 实施例4

[0198] 数据分析方法

[0199] 预处理:使用预安装的MiSeq Reporter软件用Illumina MiSeq仪器执行合并文库(n=10到15/测序运行)的解多重化和FastQ文件产生。FastQ文件含有每个碱基对的测序和相关联的Phred品质分数。我们使用NGS QC工具包、开放源软件以评估总体性能和NGS测序运行的品质(《公共科学图书馆·综合》2012;7(2):e30619)。使用PEAR组合Illumina R1(正向)和R2(反向)文件中所含的成对端读段(《生物信息学》2014Mar1;30(5):614-20)以重建抗体库的VH或VK区。以下参数用于序列组装:在出现以下时微调每个序列:两个连续碱基对Phred品质分数小于20;最小重叠长度等于50个碱基对或更大;比对的p值大于0.0001;和组装序列的长度大于300个碱基对。使用FASTX-工具包(用于短-读段FASTA/FASTQ文件预处理的命令行工具的集合(hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/))将FASTQ文件转换成FASTA格式并且序列翻译成氨基酸用于进一步分析。将在ORF内具有“终止”密码子的序列滤出数据集。通过剖析相同氨基酸序列的序列和滤出冗余序列形成管理的数据集。在日志文件中记录相同序列的数目以捕获特定VH/VL序列的读段的频率,即读段计数。

[0200] VH/VL结构域的映射:Kabat编号流程为广泛采纳的标准用于编号在可变轻链和重链内的氨基酸残基(A1-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948;汇总:<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)。Chothia编号方案与Kabat相同,但将在CDR-L1和CDR-H1中的插入放在结构上正确的位置处(A1-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948)。此为我们用于映射可变IgG区内的结构域,即限定前导、FRM1、CDR1、FRM2、CDR2、FRM3、CDR3和FRM4结构域的编号方案。VH/VL框架1到3一般为高度保守氨基酸序列,而CDR1到3高度可变。基于约2300个已知MAb VH和VL序列形成数据库,所述序列捕获在保守前导+FRM1、FRM2、FRM3和FRM4内

的序列变化。然后数据库用作BLAST数据库以精确地划定在抗体库NGS内的每个序列的前导+FRM1、FRM2和FRM3。插入氨基酸序列分别分配到可变CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0201] 重链和轻链的系统发生配对：基于在预处理步骤测定的读段计数构建VH或VL序列的递减有序列表。频率为特定IgG序列，通过a) 存在于样品中的克隆B细胞的数目和b) 此特异性子群体的平均表达水平测定。因此，在VH和VL序列计数之间可看出直接相关性。选择每个有序列表中相同数目的顶部最主要序列以使用CLUSTALX2 (<http://www.clustal.org/>) 构建整个VH或VL区的氨基酸多重比对。用于多重比对的参数为：缺口开放罚分=25；缺口延伸=0.2；延迟分歧序列=30%；和蛋白权重矩阵=单位矩阵。使用Dendroscope 3 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/dendroscope/>) 视觉化输出无根树。使用Dendroscope中可用的交织图算法，彼此比较来源于VH和VK序列的系统发生树。

[0202] 实施例5

[0203] 用于B细胞染色的方案用于通过流式细胞测量术分析

[0204] 从用匙孔螺血氰蛋白 (KLH, 皮尔斯生物技术 (Pierce Biotechnology)) 免疫并且在细胞分离之前用在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的0.5mg KLH增强两周的兔中分离外周血单核细胞 (PBMC)。在37°C下在涂布KLH的皮氏培养皿 (用在PBS中1.5ug/mL KLH涂布过夜, 用10%胎牛血清 (FBS) 封闭, 并且用PBS洗涤两次) 上的培养基中培育约五百万个经纯化PBMC持续1.5小时。然后涂布细胞的皮氏培养皿用培养基洗涤三次并且收集所有未附着的细胞并转移到新的聚苯乙烯皮氏培养皿。使用先前描述的B细胞培养条件, 在单独盘中培养淘选的细胞和未附着的细胞持续六天。然后收获并染色所得细胞群体用于流式细胞测量术分析。

[0205] 对于染色, 从淘选的和未附着的细胞培养物中收集约四百万个细胞并且再悬浮用于在PBS中的400uL 10%FBS中染色。细胞首先在4°C下用山羊抗兔IgG Fc特异性Alexa Fluor 647缀合物 (杰克逊免疫研究 (Jackson ImmunoResearch), 1:100稀释度) 和生物素化KLH (使用皮尔斯生物技术EZ-Link Sulfo-NHS生物素化试剂盒, 1ug/100uL制备) 表面染色20分钟。在主要表面染色后, 细胞用在PBS中的10%FBS洗涤一次, 并且然后在4°C下用抗生蛋白链菌素DyLight 405 (皮尔斯生物技术, 1:200稀释度) 培育10分钟。接下来, 细胞用在PBS中的10%FBS洗涤两次, 在室温下使用在PBS中的2%多聚甲醛固定20分钟, 并且然后用PBS洗涤一次。对于胞内染色, 使用在PBS中的0.25%皂苷/10%FBS渗透样品5分钟, 沉淀, 并且然后在室温下在400uL的在PBS中的0.25%皂苷/10%FBS中用山羊抗兔IgG Fc特异性Alexa Fluor 488缀合物 (杰克逊免疫研究, 1:100稀释度) 和KLH-perCP ((Abcam perCP缀合试剂盒, 1ug/100uL) 染色25分钟。最后, 细胞用在PBS中的0.25%皂苷/10%FBS洗涤两次并且存储于在PBS中的1%多聚甲醛中直到分析。

[0206] 结果

[0207] 序列分析

[0208] 图7A和7B示出从总PBMC的NGS与在抗原特异性淘选和增殖 (BPP) 之后的B细胞回收的VH序列的比较分析。在图7A和7B中的每个列表示丰度呈现在Y轴上的独特VH序列。在图7A中重叠的列表示从两个数据集回收的相同序列。图7B示出单独在亲和力选择样品内回收的序列, 其示出对于抗原特异性IgG的测序深度的显著增加。

[0209] 由用KDR蛋白作为抗原免疫的兔制备外周血单核细胞。由单独的取血制备两个IgG

文库。第一文库由总B细胞群体 (PBMC) 构成。样品含有在最后皮下抗原注射 (最后抗原增强) 之后在10天循环中样品与抗原应答相关联的B细胞以及原初B细胞。基于全长可变IgG结构域和绘制在图7A中 (PBMC-红色) 的对于阈值高于2的每个读段的频率鉴定独特VH序列。通过MiSeq 2×300测序鉴定50,513个独特VH序列。

[0210] 第二VH文库由对KDR抗原的亲合力选择B细胞 (亲合力选择-蓝色) 构成。然后在CD40L、KDR抗原和细胞因子 (其促进抗原依赖性记忆B细胞分化) 的存在下,活体外增殖在固体支持物上捕获的B细胞。此外,仅通过与抗原相互作用而初始地活化的B细胞分化成更成熟的B细胞。抗体呈递B细胞 (记忆B细胞) 转化成抗体产生B细胞伴随着IgG mRNA表达的强增加,这可通过NGS (读段计数) 检测。

[0211] 根据其在NGS数据集内的频率 (序列读段的数目) 从数据集中鉴定独特VH序列。数据绘制在图7A和7B中。在对应的PBMC序列旁边绘制存在于总PBMC中的亲合力选择的序列的子集,示出仅少部分的抗原特异性B细胞存在于总PBMC中。542个独特VH序列共同存在在PBMC和亲合力选择/增殖B细胞 (亲合力选择-蓝色) 之间。约1%的存在于总PBMC中的独特VH序列对应于抗原特异性B细胞。正如期望,在亲合力选择VH中mRNA丰度 (数目序列读段) 比总PBMC中的对应的频率显著更大。

[0212] 如上文概述,亲合力选择提供抗原特异性B细胞的显著富集。这引起对于KDR特异性B细胞测序深度的增加和在数据集内大得多的占比。图7B绘制独特地从亲合力选择/增殖数据集回收的独特VH序列和它们的丰度 (序列读段)。回收41,923个额外独特VH序列。

[0213] 图9示出从富集/活化的数据集获得的序列高度极化。

[0214] 在方法的下一代测序实施方案中,不需要抗体筛选。使用下一代测序,可采样完整抗原应答,其由1%到5%的在PBMC中的总B细胞表示。此数据示出可使用NGS数据鉴定抗原特异性序列而无需任何筛选并且具有高置信度。举例来说,图7A中示出的曲线图绘制在BPP之前 (红色) 和BPP之后 (蓝色) 的VH序列。X轴列出在数据集内计数高于2的所有非冗余VH序列。Y轴表示每个序列的丰度。重叠由存在于两个数据集中的序列表示。下一代测序方法可用于以高分辨率捕获抗原特异性B细胞的全部抗体库。这允许应用合理的方法选择候选抗体而非仅依赖于传统方法所提供的“看运气”。此外,当丰度用作单独的准则以鉴定抗原特异性B细胞时其为差的衡量标准,因为如图7A中所示,实际上最丰富序列是假阳性的。

[0215] 通过叠加两个序列数据集 (在富集和活化之前=PBMC,在富集和活化之后),现在可以高置信度通过查看两个数据集之间差异表达来从噪音鉴定哪些序列可能为抗原特异性的 (蓝色线比红色高至少2×)。此方法提供与噪音的良好区分。

[0216] 此外,当从B细胞克隆回收的序列与本发明数据相比较时,可看出B细胞克隆结果仅产生最丰富的抗体。借助本发明方法,我们可从高到低丰度捕获整个序列谱图。

[0217] 重链和轻链的系统发生配对

[0218] 谱系分析用于使用Illumina MiSeq 2x300提供针对VH或VL文库序列导出的氨基酸序列的结构。在亲合力成熟期间,VH和VL链通过体细胞超突变和基因转化共同进化。相关序列之间的关系可通过多重比对的谱系分析捕获。基于在每个VH和VL数据集内的每个序列的相对丰度 (读段计数) 形成分选列表。读段计数与在增殖期间克隆扩增 (细胞分裂) 和编码VH和VL IgG的mRNA的表达水平相关。任何数目的序列可用于分析。出于说明的目的,我们从

有列表选择前100个最丰富的独特VH和VL序列。在使用CLUSTALX2多重比对之后,在Dendroscope中使系统发生树视觉化。

[0219] 由于在CDR1到3内序列的多样性,界定VH和VK谱系树之间的共线性可具有挑战性。若干工具可用于粗略估计VH/VL配对。报导各个VH和VL序列的丰度以帮助粗略估计配对,但限于在高度极化的鼠数据集内的最丰富的序列。局部系统发生结构(在树的多个区处相关VH和VL序列内的关系)为可帮助比对整个树的另一准则,但在整个系统发生树中通常仅极少数独特地共用。

[0220] 交织图分析

[0221] 图8示出使用上述方法获得的VH和VL序列的交织图。使用具有已知配对的序列,总共15个VH和VL序列连接在一起。如可看出,树之间的连接大致平行并且无交叉。图8中示出的方法依赖于已知VH/VL对的映射到每个VH和VL系统发生树作为用于共比对的多个锚,所述已知VH/VL对来源于例如已经以已知VH和VL配对的方式获得的抗体。此方法可与丰度和局部系统发生结构结合使用以增加我们对大数据集的配对的信任。借助此方法,使用基于已知配对的“种子”序列编程性控制地解析最佳共比对的交织图算法。然后可选择在整个系统发生树中的额外配对用于验证。

[0222] 通过流式细胞测量术表征

[0223] 通过流式细胞测量术表征从使KLH-免疫的兔的PBMC进行BPP程序获得的细胞群体。五百万个PBMC细胞用于B细胞淘选和增殖并且流过物保留和培养用于比较。不像在其它模型系统中,如鼠或人类,无表面标记物抗体可用于表征B细胞群体。然而,可通过针对IgG-fc或抗原特异性B细胞染色进行粗略估计。

[0224] 从每个培养物收集四百万个细胞并且使用抗兔IgG-Fc-dylight 488(在曲线图上的FITC)染色用于胞内IgG表达,这是抗体产生B细胞的特征。类似地,使用与perCP缀合的KLH抗原检测B细胞群体产生KLH-特异性抗体(在曲线图上的PI/PE-Cy5.5)。图9中图(A)示出在培养7天之后回收的约50%的细胞表达IgG(P2区段,高FITC)。在流过物中小于10%的细胞染色IgG,示出用于淘选的条件(37°C,不搅动,随后若干次洗涤)捕获大部分的抗原特异性记忆B细胞。P2(IgG+)和P3(IgG-)群体的门控揭示大部分的IgG+B细胞表达与KLH抗原相互作用的抗体(图9中图(b))。

序列表

<110> 宜康公司

<120> 通过B细胞淘选和增殖高通量产生单克隆抗体

<130> EPIT-046W0

<150> 62/135,084

<151> 2015-03-18

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 61

<212> DNA

<213> 人工序列()

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 1

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagatggaga ctgggctgcg ctggcttctc 60
c 61

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列()

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 2

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acagcagtgg gaagactgac ggagccttag 60
<210> 3

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 3

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acagcagtgg gaagactgat ggagcctta 59
<210> 4

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列()

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagatggaca cgagggccccc cac 53

<210> 5

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列()

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 5

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acagtgggtgg gaagakgagg acagtagg 58

<210> 6

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列()

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 6

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acagtgggtgg gaagakgagg acactagg 58

<210> 7

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列()

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acagtgggtgg gaagakgagg acagaagg 58

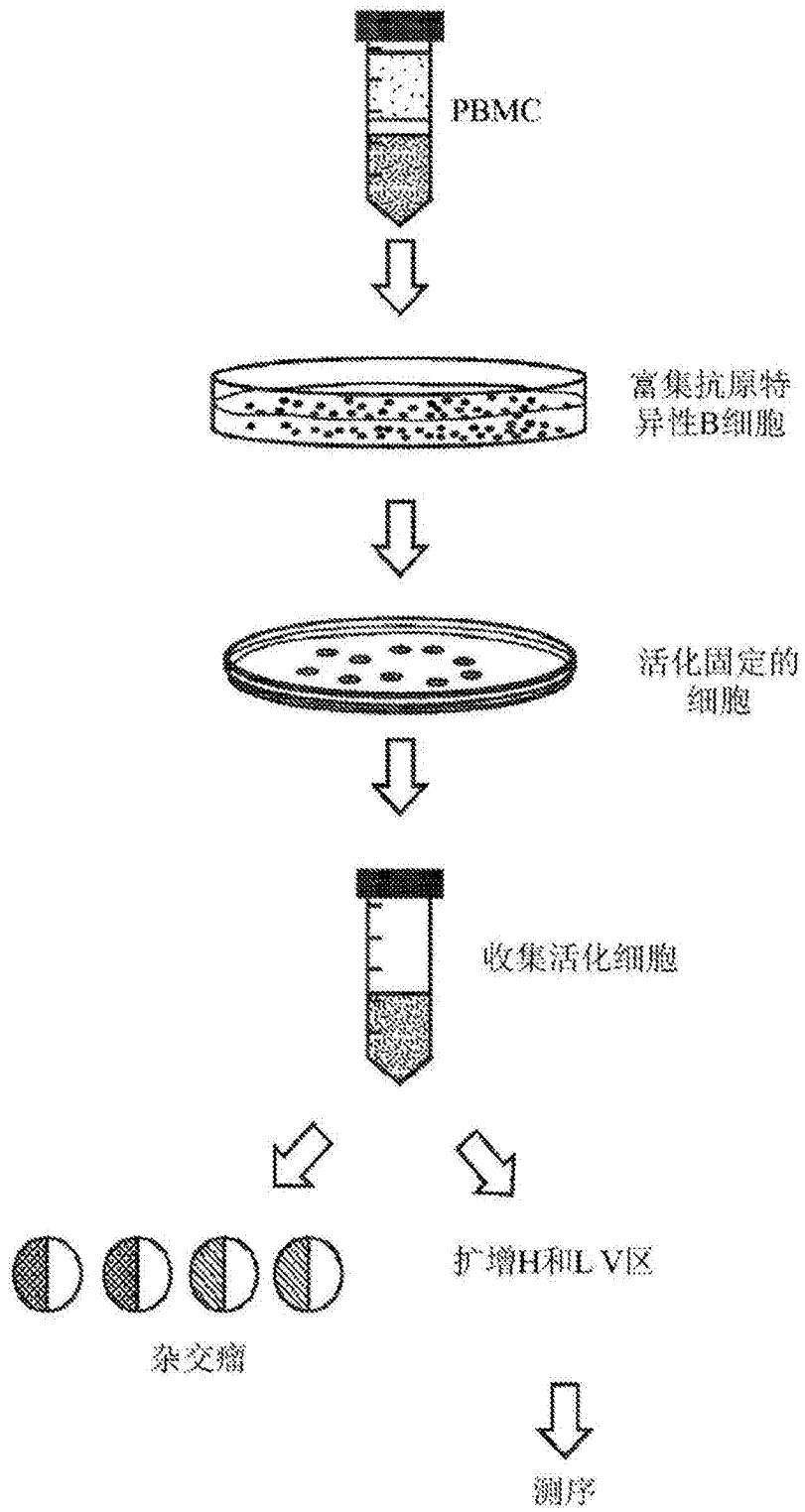


图1

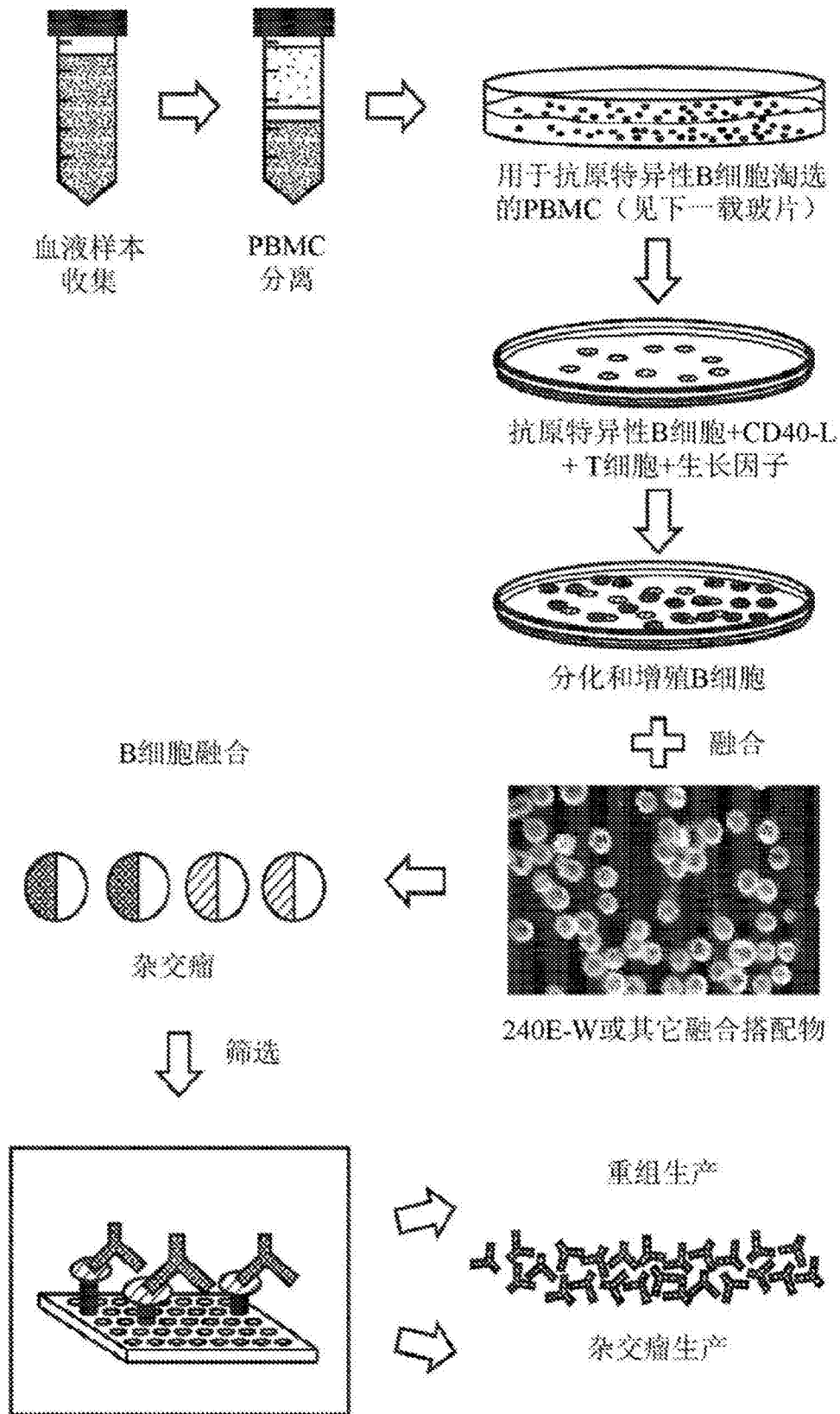
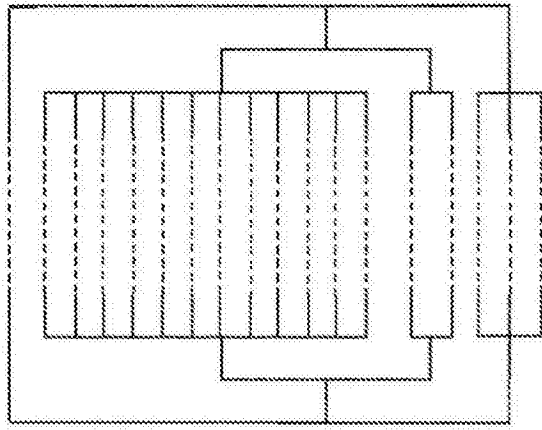
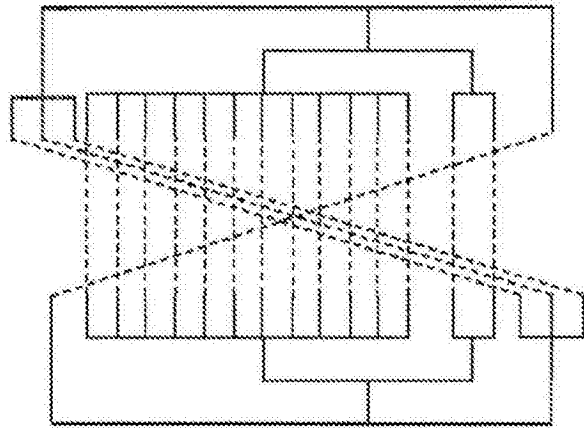


图2



交织图



无纺

图3

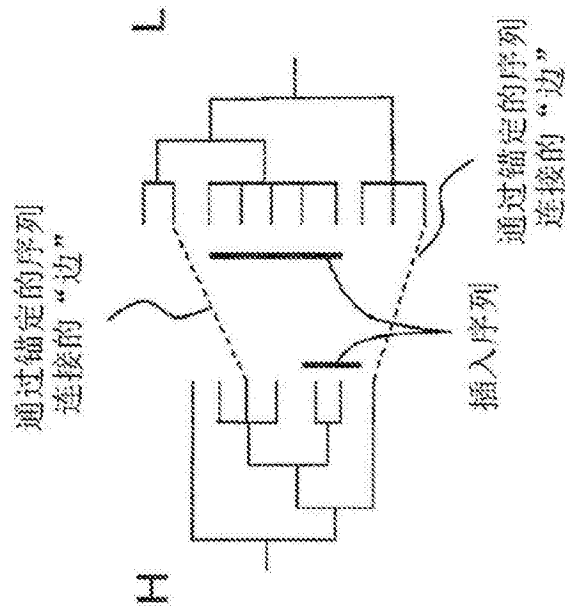


图4

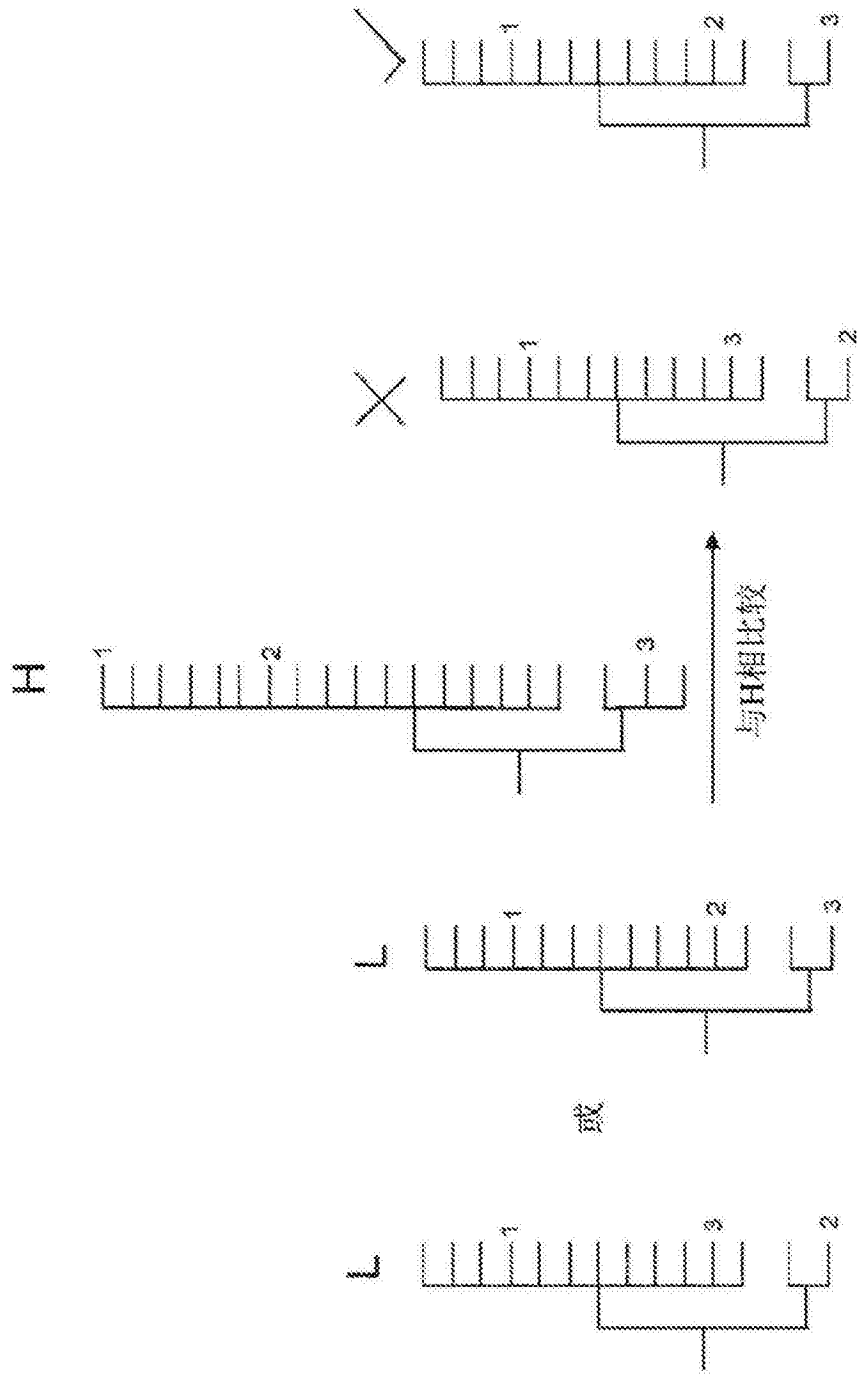
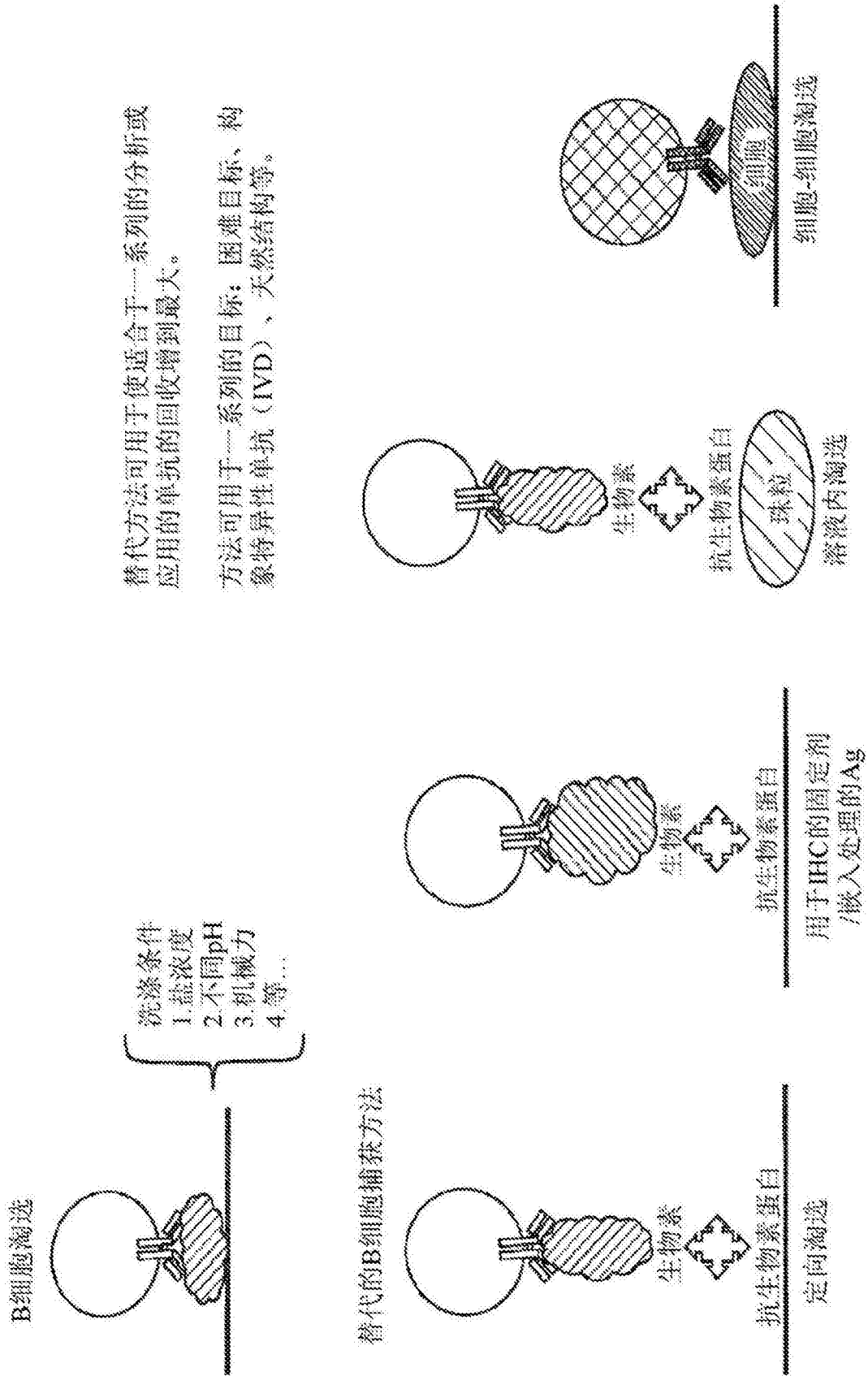


图5



替代方法可用于使适合于一系列的分析和应用的单抗的回收增到最大。

方法可用于一系列的目標：困难目標、构象特异性单抗（IVD）、天然结构等。

图6

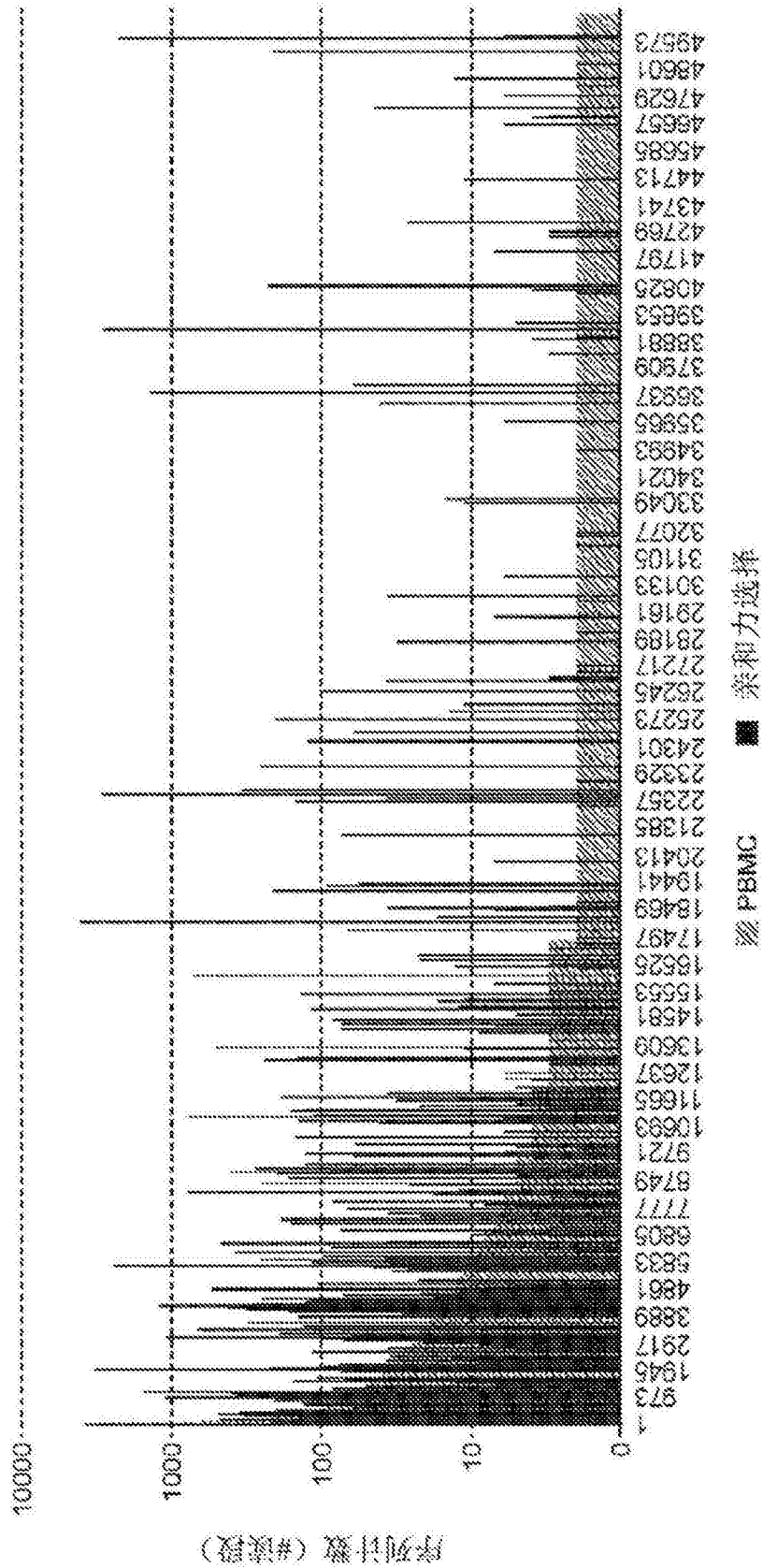


图7A

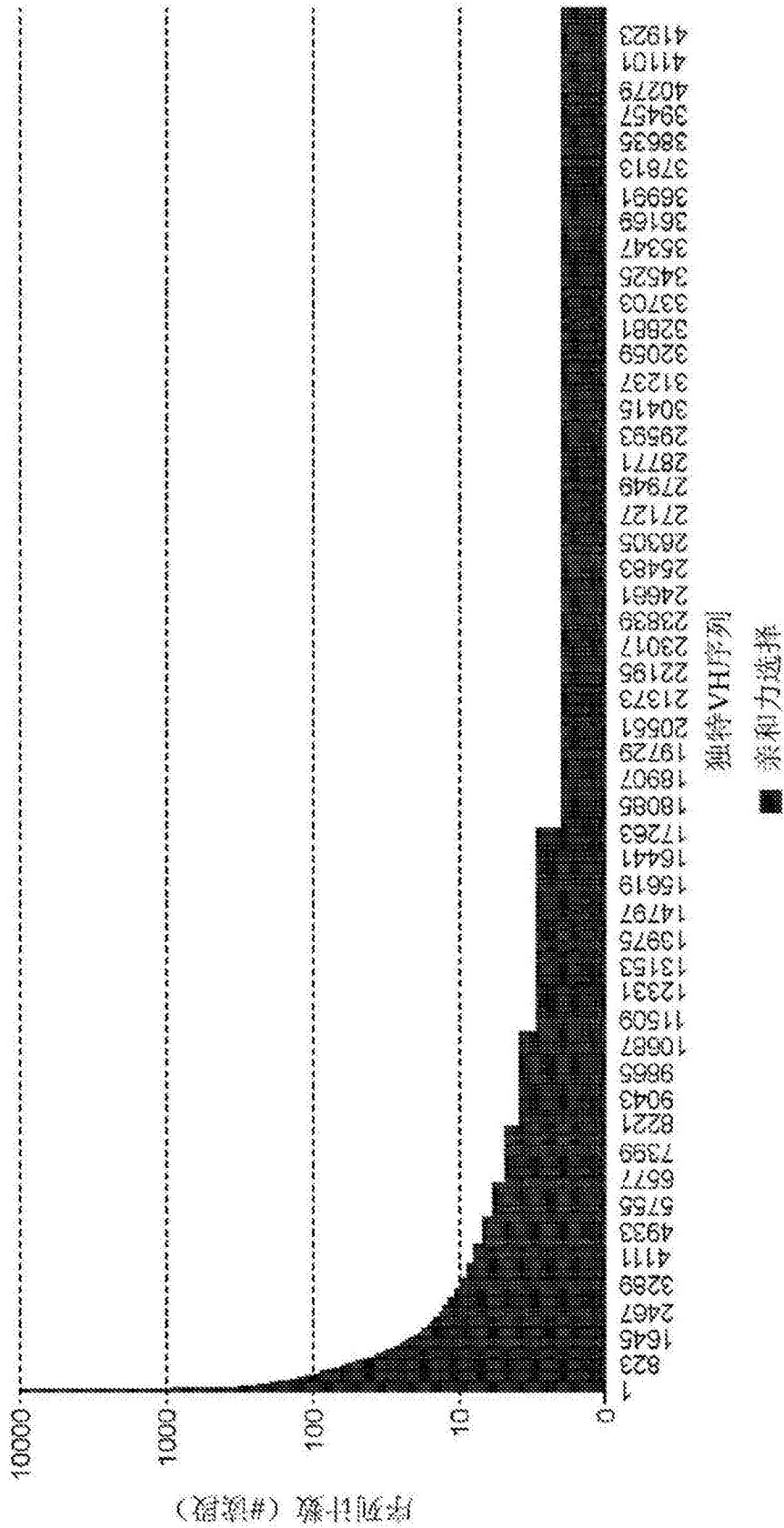


图7B

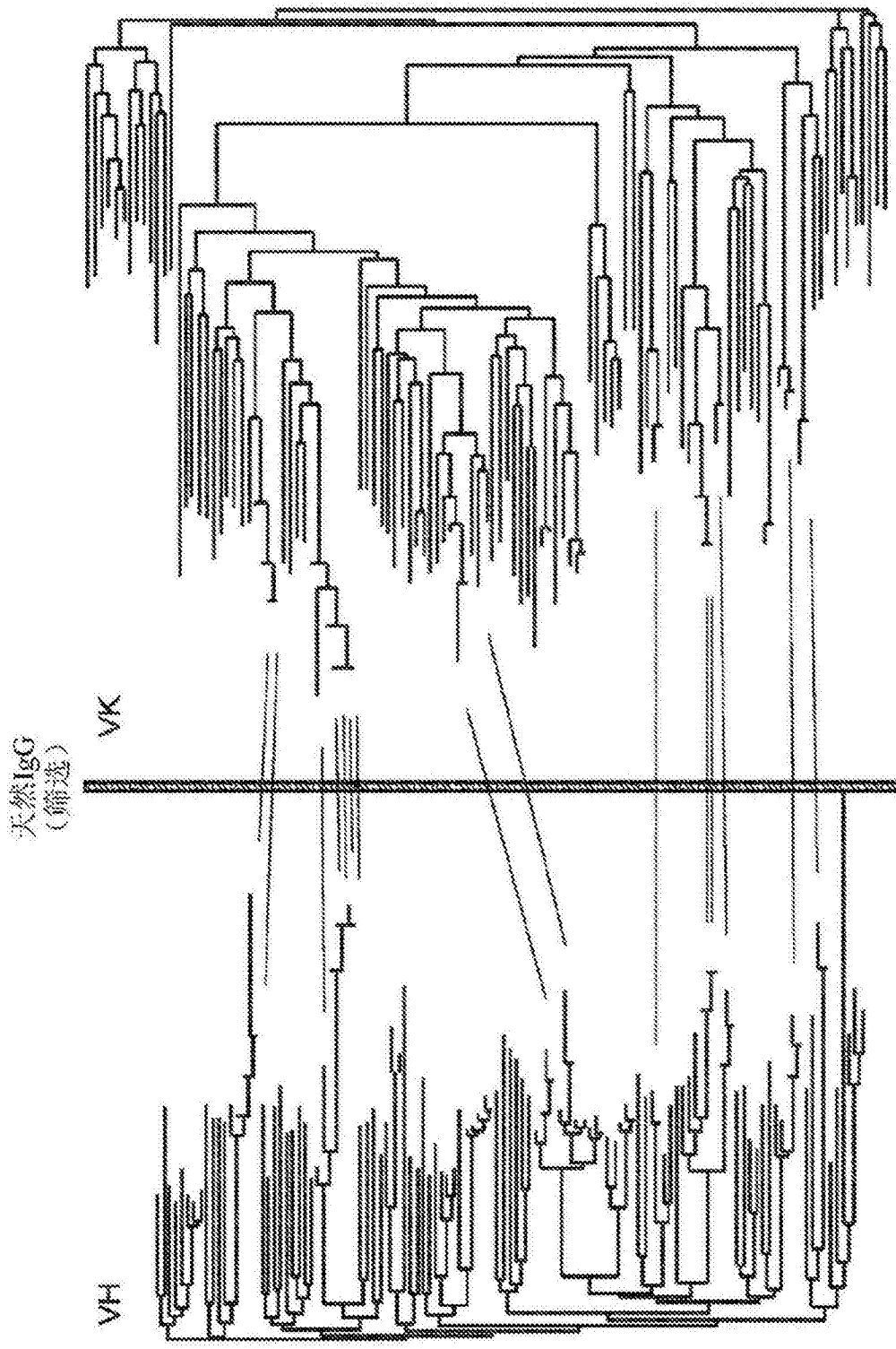
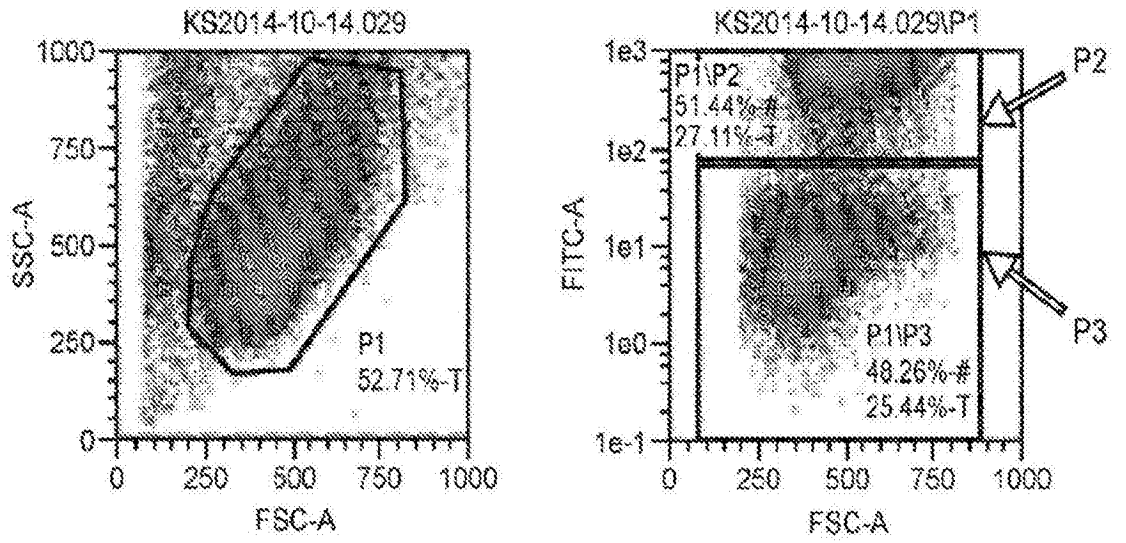


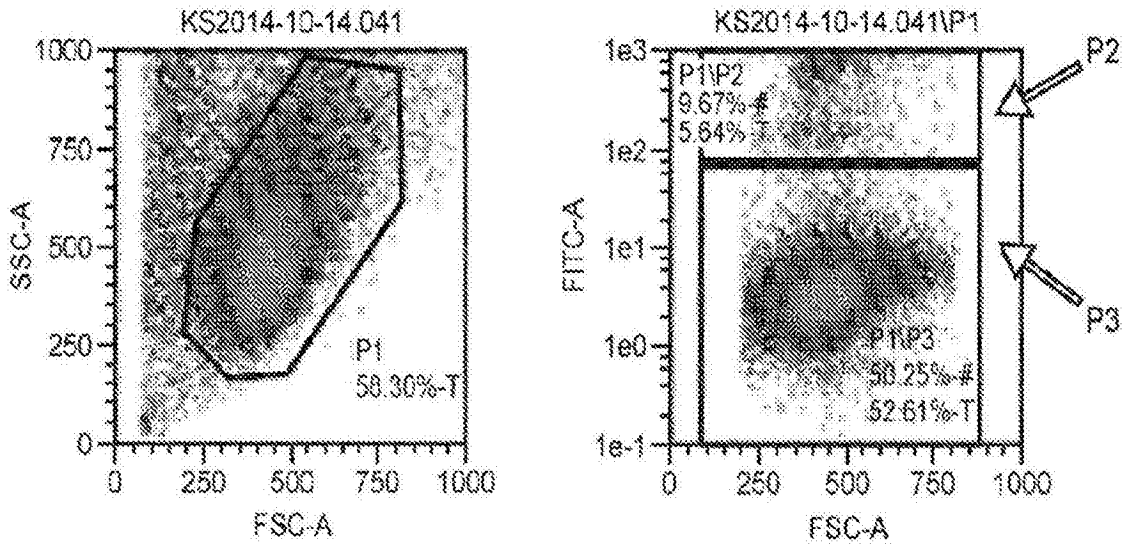
图8

(A)

通过淘选捕获的增殖的细胞培养物



流过细胞培养物

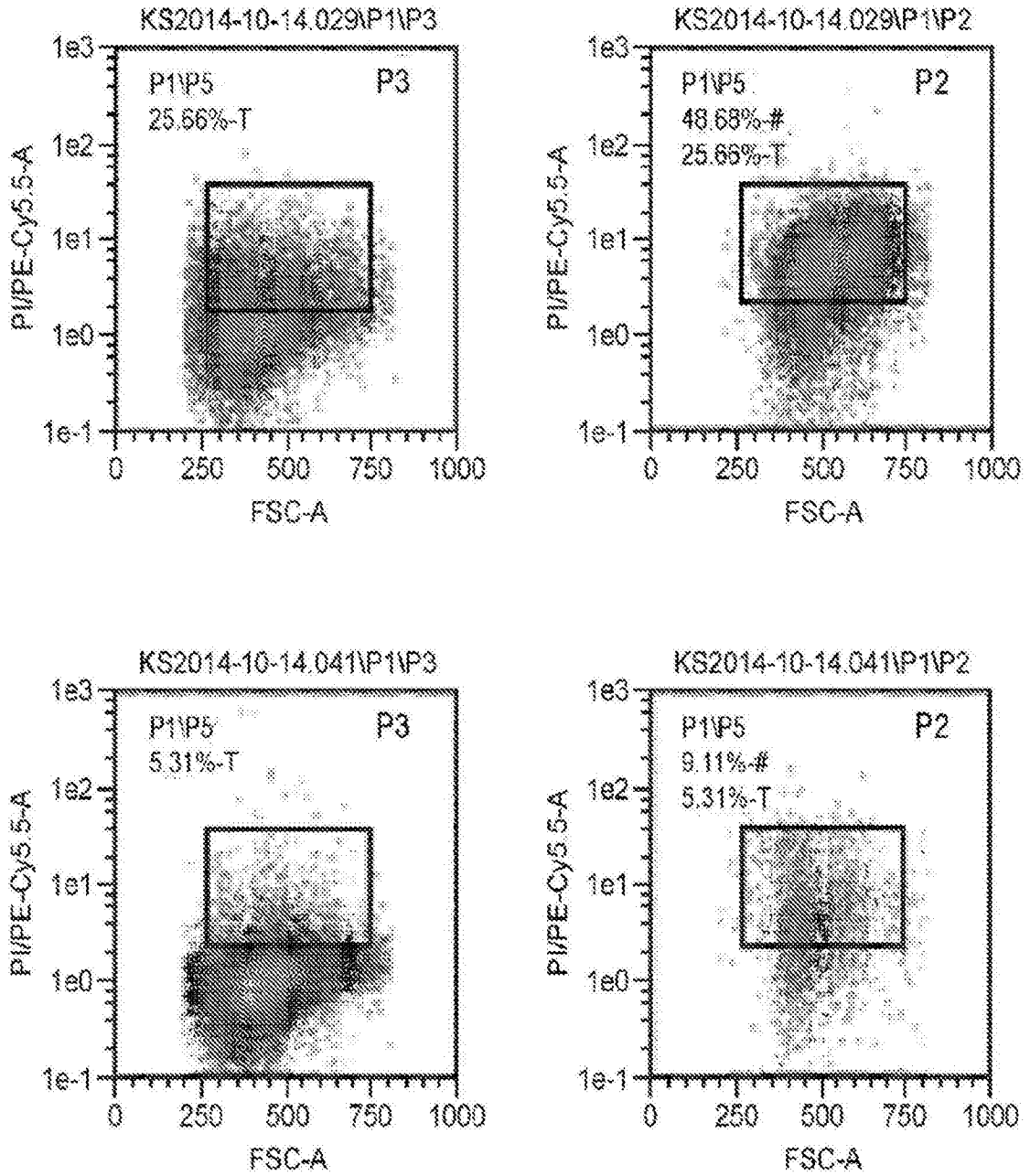


前向/侧向散点图

胞内IgG-Fc

图9

(B)



与KLH-抗原相互作用的胞内IgG

图9(续)

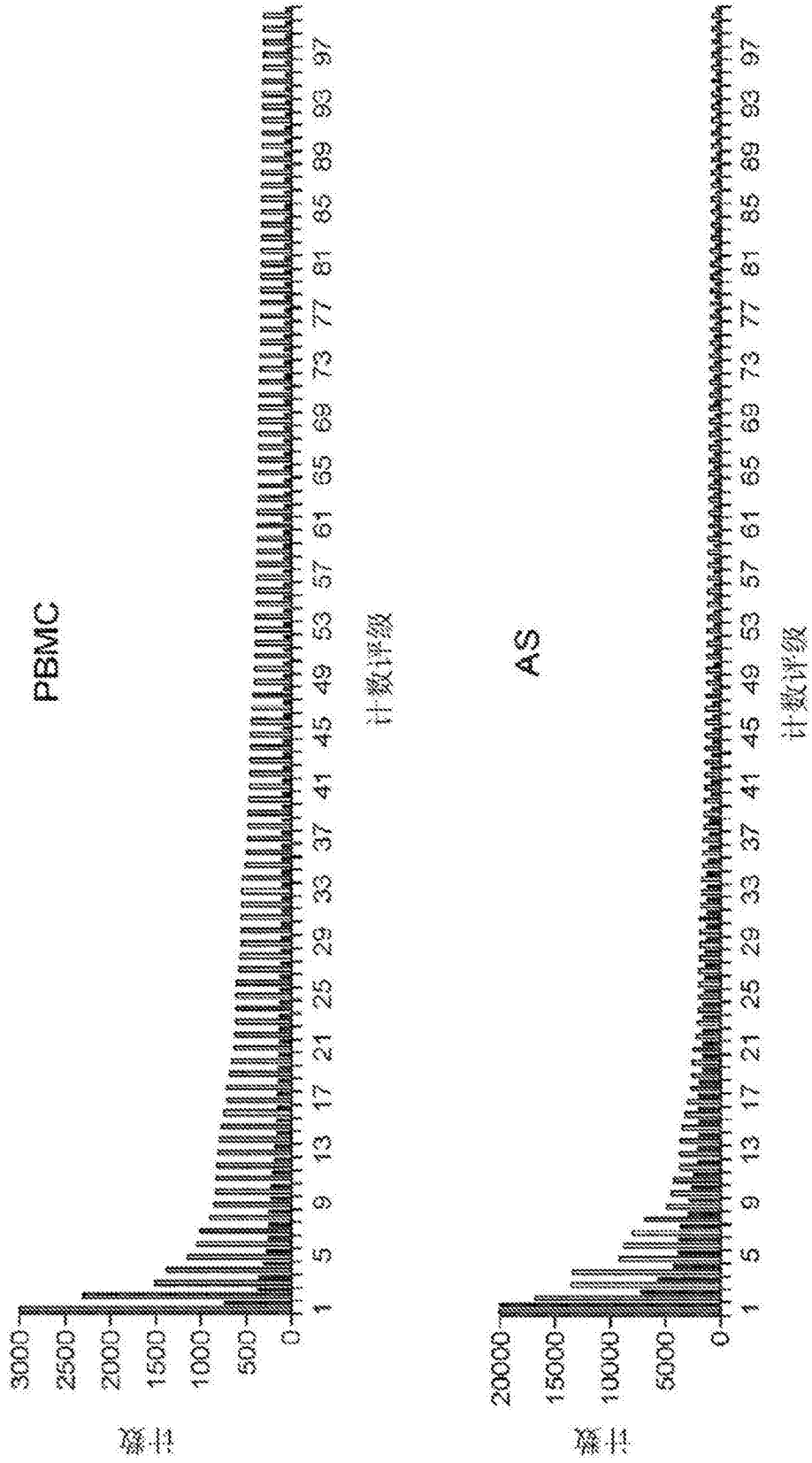


图10