



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104531623 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201410803422. 2

(22) 申请日 2014. 12. 19

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 9717 2014. 10. 09

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 杭海英 陈川 赵云

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所

11430

代理人 郎坚

(51) Int. Cl.

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/85(2006. 01)

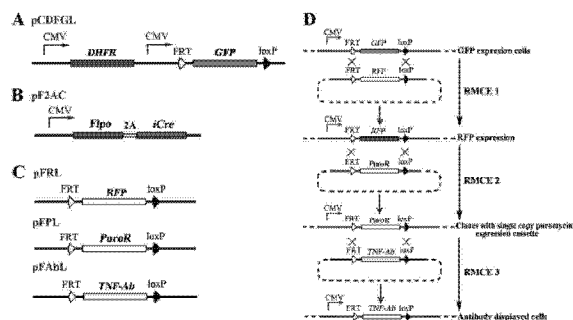
权利要求书1页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

用于抗体亲和力成熟筛选的细胞株及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于抗体亲和力成熟筛选的细胞株及其使用方法,所述细胞系通过 RMCE 技术构建,对目标抗体的表达稳定,结合胞嘧啶脱氨酶诱导激活 (AID, activation-induced cytidine deaminase) 的体细胞突变 (SHM, somatic hypermutation) 技术,该细胞系对抗体亲和力成熟进化筛选效率较高,能够在较短的时间和筛选轮次内将抗体亲和力大幅度提高。



1. 一株利用重组酶介导的盒式替换 (RMCE) 技术建立的 CHO 细胞系 PuroR-14, 所述 PuroR-14 细胞只含有单拷贝重组替换位点, 用于目标抗体亲和力成熟筛选, 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC), 编号 CGMCC No. 9717, 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

2. 根据权利要求 1 所述的 PuroR-14 细胞系, 其特征在于, 所述的重组替换位点含有一个 puromycin 抗性基因, 在该抗性基因前端含有一个 CMV 启动子, 所述启动子两端分别加上了 FRT 和 loxP 序列。

3. 根据权利要求 1 所述的 PuroR-14 细胞系, 其特征在于, 将所述抗体展示到细胞表面。

4. 根据权利要求 1 所述的 PuroR-14 细胞系, 其特征在于, 所述的替换抗体为单链抗体, 优选的, 所述的替换的抗体的编码基因中不包含启动子。

5. 一种对目标抗体进行亲和力成熟筛选的方法, 所述方法包括如下步骤,

(1) 构建目标抗体展示基因;

(2) 将所述的目标抗体展示基因替换载体细胞系中的重组替换位点;

(3) 通过体细胞高频突变 (SHM, somatic hypermutation) 和流式分选, 经 1 ~ 8 轮分选, 对所述抗体进行亲和力成熟筛选。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述的目标抗体为单链抗体, 优选的, 表达所述抗体的基因不包含启动子。

7. 根据权利要求 5 或 6 任一所述的方法, 其特征在于, 所述的载体细胞系为 PuroR-14 细胞系。

8. 根据权利要求 5 或 6 任一所述的方法, 其特征在于, 步骤 (3) 所述的分选轮数为 5 轮。

9. 根据权利要求 5 或 6 任一所述的方法, 其特征在于, 通过在所述替换了目标抗体展示基因的载体细胞中转染胞嘧啶脱氨酶诱导激活 (AID, activation-induced cytidine deaminase) 所述体细胞高频突变 (SHM, somatic hypermutation)。

## 用于抗体亲和力成熟筛选的细胞株及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药及抗体工程领域,具体而言,涉及一种用于抗体亲和力成熟筛选的细胞株及其使用方法

### 背景技术

[0002] 抗体的亲和力进化系统是抗体工程和大分子生物制药行业都十分关心的重要技术,在抗体的亲和力进化筛选过程中,对目标抗体的展示,是基础的步骤,常用的体外展示系统包括如噬菌体展示系统、酵母展示系统或细菌展示系统,近年来,基于哺乳动物细胞的展示系统同样得到了很大的发展,相比其他展示系统,哺乳动物展示系统在蛋白的折叠,翻译后修饰以及密码子偏好等方面有很多的优势,体细胞突变 (SHM, somatic hypermutation) 结合胞嘧啶脱氨酶诱导激活 (AID, activation-induced cytidine deaminase) 技术,能够通过诱导胞嘧啶变为尿嘧啶,使蛋白的氨基酸序列变化,从而改善抗体亲和力,目前,已有报道利用 AID 诱导的体细胞高频突变原理在不同的细胞系中 (293T、H1299 等) 建立了各种抗体亲和力成熟体系,然而这些系统耗时都比较长,而且抗体亲和力成熟效率不够高。主要体现在如下几点,

[0003] (1) 这两个细胞生长速度偏慢 (倍增时间约为 22 个小时),而且对外源的转染载体耐受性不是很强 (例如,用 lipo2000 转染 293T 后有相当一部分细胞死亡),同时,经流式分选后存活率也较低;

[0004] (2) 以两个细胞为基础的亲和力成熟体系的抗体亲和成熟过程,往往需要进行 8 轮以上的亲和力成熟过程才能得到高亲和力的抗体,由于生长缓慢且存活率较低,每轮进化所需要的时间更长,也导致了实验效率低下的结果。

[0005] 综上,哺乳动物抗体进化系统还有大的提升空间,需要一种稳定高效的抗体亲和力成熟系统。

[0006] CHO 细胞是抗体表达中常用的哺乳动物细胞,在治疗性抗体的表达中应用最为广泛,该细胞生长速度快 (倍增时间大约 16 个小时),耐受性强,并且生产的抗体具有同来源抗体相同或者类似的修饰,所以,选择 CHO 细胞为基础,结合重组酶介导的盒式替换技术 (recombinase-mediated cassette exchange, RMCE),有望建立更高效且更简便的抗体亲和力成熟系统。

### 发明内容

[0007] 本发明涉及一种利用重组酶介导的盒式替换 (RMCE) 技术建立的只含有单拷贝重组替换位点的用于目标抗体亲和力成熟筛选的 CHO 细胞系 PuroR-14,所述 PuroR-14 细胞保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),编号 CGMCC No. 9717,保藏日期 2014 年 10 月 9 日,分类命名: CHO-FRT-Puro-loxP,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号。

[0008] 所述的 PuroR-14 细胞重组替换位点含有一个 puromycin 抗性基因,该基因前端含

有一个 CMV 启动子,两边分别加上了 FRT 和 loxP 序列形成一个 FRT-puromycin-loxP 结构。在重组酶 Flp 和 Cre 共同作用下该位点能够与同样含有 FTR 和 loxP 位点的抗体展示基因 (FRT-Ab-TM-loxP) 相互替换,替换进入的抗体基因在 FRT 前端的 CMV 启动子作用下转录、翻译,从而将抗体展示到细胞表面。

[0009] 优选的,所述的替换抗体为单链抗体,替换的抗体基因不包含启动子。只有替换成功的抗体基因才能在 CMV 启动子的作用下转录表达,故每一个细胞中只有一个抗体基因表达,排除了多基因同时表达的影响。

[0010] 本发明还涉及一种使用所述 PuroR-14 细胞系对目标抗体进行亲和力成熟筛选的方法,所述方法包括如下步骤,

[0011] (1) 构建含有 FTR 和 loxP 位点的目标抗体展示基因,

[0012] (2) 将所述的目标抗体展示基因替换所述 PuroR-14 细胞的重组替换位点 FRT-puromycin-loxP,

[0013] (3) 通过体细胞高频突变 (SHM, somatic hypermutation) 和流式分选,经 1~8 轮分选,对所述抗体进行亲和力成熟筛选。

[0014] 优选的,所述的目标抗体为单链抗体,目标抗体展示基因不包含启动子。

[0015] 优选的,步骤 (3) 所述的分选轮数为 5 轮。

[0016] 优选的,通过在所述替换了目标抗体展示基因的 PuroR-14 细胞中转染胞嘧啶脱氨酶诱导激活 (AID, activation-induced cytidine deaminase) 所述体细胞高频突变 (SHM, somatic hypermutation)。

## 附图说明

[0017] 图 1:构建的质粒的结构示意图,目标基因功能区使用不同深浅标注

[0018] 图 2:RMCE 相关质粒功能区结构及利用 RMCE 技术构建细胞株流程。

[0019] 图 3:CHO-FGL 细胞的富集以及第一轮重组酶介导的盒式替换 (RMCE1)。

[0020] 图 4:第二轮重组酶介导的盒式替换 (RMCE2) 以及克隆重组替换位点的检测。

[0021] 图 5:第三轮重组酶介导的盒式替换 (RMCE3)。

[0022] 图 6:抗体基因转录水平的比较。

[0023] 图 7:抗 TNF- $\alpha$  单链抗体 (3f8-scFv) 的亲和力成熟流式分选结果。

[0024] 图 8:含有 N33K、A145V 和 M211I 氨基酸突变的抗体突变体统计图。

## 具体实施方式

[0025] 以抗 TNF- $\alpha$  的单链抗体 (3f8) 亲和力成熟筛选为例,详细说明本发明技术方案。

[0026] 实施例 1,质粒的构建

[0027] 为了建立以 CHO/dhFr- 细胞为基础的高效抗体亲和力成熟系统,构建了以下质粒 (表 1,图 1):

[0028] (1) 以 CHO-K1 细胞的 CDNA 为模板 PCR 出 CHO 的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因,然后通过 overlap PCR 将 SV40 启动子 (promoter) 和 SV40 多聚 A (polyA) 序列连接到 DHFR 上,形成 SV40promoter-DHFR-SV40polyA 序列 (该序列能在哺乳动物细胞内转录表达 DHFR),将 SV40promoter-DHFR-SV40polyA 序列插入到 pCDNA3.1/hygro (+) 质粒,构建 pCDNA3.1/

hygro(+)-DHFR 质粒 (简称 pCD)。

[0029] (2) 以 EGFP 为模板 PCR 出 FRT-EGFP-loxP 序列, 连接于 pCD 质粒上, 构建 pCDNA3.1/hygro(+)-FRT-GFP-loxP-DHFR 质粒 (简称 pCDFGL)。

[0030] (3) 以 Flpo 和 iCre 为模板通过 overlap PCR 扩增出 Flpo-2A-iCre 序列, 然后连接于 pCI 质粒。其中 Flpo 为 Flp 重组酶的突变体, 其活性比原始的 Flp 酶更高。iCre 为 Cre 酶的一个突变体, 其活性也要高于原始的 Cre 酶重组酶。2A 为 2A 多肽序列的 TaV 突变体, 该 2A 多肽表达后能自我剪切变成两段多肽, 其自我剪切效率比其余的 2A 序列要高。

[0031] (4) 以 mRFP、PuroR (puromycin 抗性基因) 和 SP-HA-Ab-TM (信号肽-HA 标签-3f8 单链抗体-跨膜序列) 序列为模板 PCR 出 FRT-mRFP-loxP、FRT-PuroR-loxP 和 FRT-SP-HA-Ab-TM-loxP 序列, 然后连接于 pCI 质粒, 成功构建 pFRT-mRFP-loxP (简称 pFRL)、pFRT-PuroR-loxP (简称 pFPL) 和 pFRT-SP-HA-Ab-TM-loxP (简称 pFAbL) 质粒。

[0032] (5) 首先将 EGFP 基因插入 PET28a(+) 质粒, 构建 PET28a(+)-GFP 质粒, 然后将 TNF- $\alpha$  基因插入 PET28a(+)-GFP 质粒, 成功构建 PET28a(+)-TNF- $\alpha$ -GFP 质粒。

[0033] (6) 用 puromycin 抗性基因替换掉 pCEP4 质粒的 hygromycin 抗性基因, 构建 pCEP-Neo 质粒, 然后将 mAID 基因插入 pCEP-Neo 质粒, 成功构建 pCEP-Neo-mAID 质粒。

[0034] (7) 将 SP-HA-Ab-TM 序列插入 pCDNA3.1-hygro(+) 和 pCEP4 质粒, 成功构建 pCDNA3.1-hygro(+)-Ab 和 pCEP4-Ab。

[0035] (8) 以人全长抗体基因为模板, PCR 出全长抗体 FC 片段 (hFC), 连接到 pCEP4 质粒上, 构建 pCEP4-hFC 质粒, 然后将 SP-HA-Ab 抗体序列, 或者其突变体 (Mut) 连接到 pCEP4-hFC 质粒, 构建 pCEP4-scFv (Mut)-hFC 质粒, 用于转染细胞, 以 scFv (Mut)-hFC 形式表达抗体用于测试各种抗体突变体的亲和力。

[0036] 表 1. 质粒的构建及功能

[0037]

质粒名称	插入片段	质粒功能
pCD	pSV40 - DHFR-SV40 pA	质粒构建过程中的中间质粒
pCDFGL	FRT-EGFP-loxP	高表达 GFP 且带有重组替换位点的 CHO 细胞
pF2AC	Flpo-2A-iCre	共表达 Flpo 和 iCre 重组酶
pFRL	FRT-mRFP-loxP	替换质粒, 用于 RMCE 替换建立只有单个重组位点的 CHO 细胞
pFPL	FRT-PuroR-loxP	
pFAbL	FRT-SP-HA-Ab-TM-loxP	
PET28a(+)-GFP	GFP	质粒构建过程中的中间质粒
PET28a(+)-TNF- $\alpha$ -GFP	TNF- $\alpha$	细菌表达 TNF- $\alpha$ -GFP 抗原
pCEP-Neo	neomycin	质粒构建过程中的中间质粒
pCEP-Neo-mAID	mAID	在细胞内表达 mAID 蛋白
pCDNA3.1-Ab	Ab-TM	细胞表面展示 3f8 单链抗体
pCEP4-Ab	Ab-TM	
pCEP4-hFC	hFC	中间载体
pCEP4-scFv (Mut) -hFC	SP-HA-Ab (Mut)	表达 3f8 scFv (Mut) -hFC 融合蛋白测定亲和力和

[0038] 实施例 2. 使用重组酶介导的盒式替换 (RMCE) 方法建立稳定、高效表达且可替换目的基因的 CHO 细胞

[0039] 1. 设计思路

[0040] 为了建立稳定、高效表达目的基因且可进行重组酶介导的盒式替换 (RMCE) 的 CHO 细胞用于抗体亲和力成熟, 选用了 Flp 和 Cre 双重组酶介导的盒式替换 (dual RMCE) 方法构建细胞系。建立了一系列用于 RMCE 的质粒, 其功能区结构如图 2 所示。

[0041] 图 2(A) 所示为 pCDFGL 质粒中, 含有 FRT 和 loxP 重组酶结合位点的 GFP 基因插入到 CMV 启动子下游, 同时含有 SV40 启动子的 DHFR 基因插入质粒中, 使得 pCDFGL 质粒能够同时表达 GFP 和 DHFR。

[0042] 图 2(B) 所示为在 pF2AC 质粒中, Flpo 和 iCre 基因通过 2A 自我剪切序列连接在一起, 经 CMV 启动子转录表达后, Flpo-2A-iCre 蛋白中 2A 序列自我剪切使得 Flpo 和 iCre 蛋白分开为两个独立的蛋白行使各自的功能。

[0043] 图 2(C) 所示为替换质粒 pFRL、pFPL 和 pFAbL。RFP、PuroR 以及 TNF-Ab 各自都连接有 FRT 和 loxP 位点重组酶结合位点, 用于通过 RMCE 替换细胞中同样含有 FRT 和 loxP 位点的目的片段。

[0044] 图 2(D) 所示为抗体亲和力成熟细胞株的建立流程,

[0045] 首先将含有 FRT-GFP-loxP 序列的表达质粒 (pCDFGL) 转入 CHO/dhFr- 细胞内, 让其随机插入到细胞基因组中, 富集稳定高效表达 GFP 的细胞 (CHO-FGL) ;

[0046] 然后经 RMCE1 用 RFP 基因替换掉细胞中的 GFP 基因, 使得细胞表达 RFP, 通过流式

富集只表达 RFP 的细胞 (CHO-FRL) ;

[0047] 再经 RMCE2 用 puromycin 抗性基因 (PuroR) 替换掉 RFP 细胞中的 RFP 基因,使得细胞获得 puromycin 抗生素抗性,利用 puromycin 抗生素筛选将 RFP 基因完全替换的细胞 (CHO-FPL),经鉴定拿到只含有一个重组替换位点的 puromycin 抗性细胞,以此做为抗体进化中使用的原始细胞株 (PuroR-14) ;

[0048] 最后用具有信号肽、标签和跨膜序列的抗体基因 TNF-Ab (SP-HA-Ab-TM) 将 puromycin 替换为抗体基因,从而将目的抗体稳定高效的展示到细胞表面 (CHO-FAbL),由于原始 PuroR-14 细胞株只含有一个重组替换位点,所以 CHO-FAbL 细胞中有且仅有一个拷贝的抗体基因整合到表达位点表达,该细胞只能展示一种抗体或者抗体突变体。

[0049] 2. CHO-FGL 细胞的建立及 RMCE 1

[0050] 将 pCDFGL 质粒用限制性内切酶 BglIII 酶切线性化,乙醇沉淀回收线性化的质粒,电击转染 CHO/DHFR-细胞。电转后将细胞转移到 10cm 盘中,用含有 10%胎牛血清,HT(胸腺嘧啶、次黄嘌呤混合物)和 250  $\mu$ g/ml hygromycin 的 IMDM 培养基培养七天,然后用不含有 hygromycin 抗生素的培养基培养 8 天,使质粒整合到细胞基因组中,流式分选富集 GFP 荧光最强的 10%部分细胞 (CHO-FGL) (图 3A)。用 pFRL 和 pF2AC 共转 CHO-FGL 细胞,在 Flpo 和 iCre 的作用下 RFP 基因替换掉细胞中的 GFP 基因 (图 3B) 从而使细胞转录表达 RFP 蛋白。从流式图上可以看到 RFP 阳性细胞分为两团,一团仅仅含有 RFP 荧光,一团含有 RFP 和 GFP 双荧光 (图 3C),流式分选富集仅仅含有 RFP 的细胞 (gate T) (命名为 CHO-FRL)。分选得到的红色荧光细胞对目的基因 (RFP) 的转录表达能力各不相同,为了得到转录表达能力最强的部分细胞,我们将的到的 CHO-FRL 细胞经长时间的培养扩大后继续进行了两轮分选 (分别命名为 CHO-FRL-S1 和 CHO-FRL-S2),每轮分选富集 10%荧光最强的细胞,从而得到 CHO-FRL-S2 细胞,其荧光强度约为原始 CHO-FRL 细胞的 8 倍左右 (图 3D)。

[0051] 3. RMCE 2

[0052] 将 CHO-FRL-S2 细胞共转染 pFPL 和 pF2AC,进行第二轮基因替换 (图 4)。转染后的细胞置于在含有 puromycin 抗生素的培养基中培养,没有替换成功的细胞由于不具有 puromycin 抗性而被杀死,存活下来的细胞则是成功的将 RFP 基因替换为 PuroR 基因的细胞,这些细胞能够稳定的表达 puromycin 抗性蛋白从而获得 puromycin 抗性。流式检测存活下来的细胞,发现细胞分为两团,一团是没有 RFP 荧光的细胞,另一团是有 RFP 荧光的细胞 (图 4B)。将无 RFP 荧光的部分细胞 (图 4B, gate L) 通过流式单细胞分选到 96 孔板中,每个孔仅分选入一个细胞,继续培养扩增从而获得大量的单克隆细胞株。

[0053] 我们选取了两个具有 puromycin 抗性的细胞克隆 (PuroR-12 和 PuroR-14),提取细胞克隆的基因组,以 CHO/dhFr- 细胞基因组作为阴性对照,southern bolt 测定细胞内整合位点的拷贝数 (图 4C)。阴性对照没有特异性条带存在,而 PuroR-12 和 PuroR-14 细胞均只含有一条带,说明这两个细胞克隆都只含有一个重组替换位点,选取了 PuroR-14 作为基础细胞进行后续的抗体亲和力成熟实验。

[0054] 4. RMCE 3

[0055] 用 pFAbL 和 pF2AC 质粒共转于 PuroR-14 细胞,在重组酶的作用下 PuroR 基因被 TNF-Ab 基因替换掉 (图 5),由于 TNF-Ab 基因是一个含有信号肽、HA 标签、TNF- $\alpha$  单链抗体和跨膜序列 (SP-HA-Ab-TM) 的重组蛋白基因,该抗体基因经转录表达后在信号肽和跨膜

序列的作用下被展示到细胞表面,通过标记 HA 标签就可以检测抗体的展示水平。将转染后的细胞培养两天,收集细胞用抗 HA 标签的抗体 (anti-HA-PE 1:300 稀释,BD) 标记细胞,流式检测抗体的展示效果。如图 5B 所示转染的细胞分为两部分,一部分细胞没有展示抗体,少部分细胞成功的将抗体展示到了细胞表面 (gate H),该部分细胞抗体展示非常的均一。流式分选成功展示抗体的细胞 (gate L, CHO-Ab) 用于后续抗体的亲和力成熟。

[0056] pFABL 质粒不含有启动子,该质粒转入细胞后不能转录,从而无法表达抗体,只有将抗体基因成功的替换到 PuroR-14 细胞重组替换位点后,抗体基因才能在 CMV 启动子的作用下进行转录表达。由于前面经 southern bolt 鉴定 PuroR-14 细胞仅含有一个重组替换位点,所以我们得到的展示抗体的细胞仅有一个抗体基因能够转录表达,通过 PuroR-14 替换得到的抗体展示细胞只能展示一种抗体或者抗体突变体。

[0057] 实施例 2. 使用 RMCE 快速构建稳定的抗体展示细胞。

[0058] 本部分系统的比较了重组酶介导的盒式替换、非整合质粒和随机整合质粒三种方法构建抗体展示细胞的优缺点。

[0059] 随机整合质粒 pCDNA3. 1-Ab 和非整合质粒 pCEP4-Ab 分别转染 CHO/dhfr- 细胞,命名为 Random-Ab 和 Episomal-Ab。pFABL 和 pF2AC 质粒共转 PuroR-14 细胞,命名为 RMCE-Ab。转染后的细胞培养两天,以 CHO/dhFr- 细胞为阴性对照 (Control),流式分选抗体展示最高的部分细胞,流式分选后细胞的抗体展示率大于 99%。分选后的细胞继续培养 7 天,流式检测细胞的抗体展示率,发现 RMCE-Ab 细胞阳性率仍为 98.2%,而 Random-Ab 仅有 1.2%,Episomal-Ab 细胞仅有 2.1% 的细胞展示抗体,绝大部分细胞经培养后都丢失了抗体展示能力。

[0060] 从以上结果可以得出通过随机整合 (pCDNA3. 1-Ab) 和非整合质粒 (pCEP4-Ab) 瞬时转染得到的抗体展示细胞 (Random-Ab 和 Episomal-Ab) 非常的不稳定,绝大部分细胞在后续的培养过程中都会丢失掉抗体展示从而变成阴性细胞,而通过重组替换得到的细胞 (RMCE-Ab) 在 7 天的培养过程中仅有 1.3% 的细胞丢失了抗体展示能力,说明用该方法的到的细胞非常的稳定,用重组替换的方法两天就可以分选得到稳定展示抗体的细胞,从而进行后续的抗体亲和力成熟实验,极大的缩短了制备稳定的抗体展示细胞所需要的时间。

[0061] 同之前一样,将随机整合质粒 pCDNA3. 1-Ab 和非整合质粒 pCEP4-Ab 分别转染 CHO/dhfr- 细胞,命名为 Random-Ab 和 Episomal-Ab。pFABL 和 pF2AC 质粒共转 PuroR-14 细胞,命名为 RMCE-Ab。Random-Ab 和 Episomal-Ab 细胞置于含有 500ug/mL hygromycin 抗生素的培养基培养 10 天,以杀掉没有转染成功和丢失转染质粒的细胞,然后用无 hygromycin 抗生素的培养基培养 5 天使细胞稳定,以获得稳定的细胞株,同时将 PuroR-14 细胞培养 15 天。流式分选三种细胞中抗体展示最高的 0.8% 的细胞。继续培养 15 天和 30 天流式检测抗体的展示水平。

[0062] 流式检测结果显示,培养 15 天后 RMCE-Ab 细胞抗体展示水平非常的均一,而且抗体展示量也高于 Random-Ab 以及 Episomal-Ab。流式分选 0.8% 抗体展示最高的的部分细胞,三种细胞的分选效率都大于 99%,继续培养 15 天后流式检测发现 98.1% 的 RMCE-Ab 细胞稳定的展示抗体,仅仅有 0.9% 的细胞丢失了抗体展示能力,而 Random-Ab 细胞展示抗体,有大约 11.2% 的细胞丢失了抗体展示能力,此外,仅仅只有 52.2% 的 Episomal-Ab 细胞展示抗体,接近一半的细胞都丢失了抗体展示能力。细胞继续培养 15 天 (day30) 后检测发



现 97.1% 的 RMCE-Ab 细胞、83.4% 的 Random-Ab 细胞以及 50.6% 的 Episomal-Ab 保持了抗体展示能力, 丢失抗体展示的细胞比例大为减少。

[0063] 从流式结果上我们可以看到 RMCE-Ab 细胞最为稳定, 在长时间的培养过程中仅仅只有 1.9% 的细胞丢失抗体展示能力, 而且细胞表面抗体展示量也最高, Random-Ab 细胞在抗体展示水平和稳定性方面都优于另外两种细胞。

[0064] 将培养 15 天和 30 天的细胞收集起来, 提取 RNA, 逆转录, qPCR 比较三种细胞内抗体基因的转录水平。如图 6 所示。15 天和 30 天各组细胞转录水平差异不大, 其中 RMCE-Ab 细胞抗体基因的转录水平大约是 Random-Ab 细胞的 2 倍, 是 Episomal-Ab 细胞的 8 倍。

[0065] 由于 AID 的突变作用与基因的转录呈正相关, 高的转录水平往往意味着高的突变率, 在抗体的进化过程中就能加快突变体的产生和积累, 提升抗体的进化效率, RMCE-Ab 细胞更高的转录水平意味着比 Random-Ab 和 Episomal-Ab 细胞具有更高的突变效率, 能更有效的产生各种不同的突变体, 而且 RMCE-Ab 细胞抗体展示非常稳定, 在亲和力成熟过程中很少有细胞会丢失掉抗体展示能力, 产生的突变能够很好的展示在细胞表面, 能够更为有效的将优良突变筛选和保留下来。

[0066] 实施例 3. 抗 TNF- $\alpha$  单链抗体 (3f8-scFv) 的亲和力成熟

[0067] 以抗 TNF- $\alpha$  单链抗体 (3f8-scFv) 为例, 验证 PuroR-14 细胞亲和力成熟方法

[0068] 抗体亲和力成熟的基本流程是: 将约  $2 \times 10^6$  个展示抗体的细胞转染 pCEP-Neo-mAID 质粒, 然后置于含有 G418 抗生素的培养基中培养 7 天 (细胞增殖到约 2 亿), 胰酶消化收集大约 1 亿细胞, 用抗 HA 标签的抗体 (anti-HA-PE 1:300 稀释, BD) 和 TNF- $\alpha$ -GFP 融合蛋白在 4 $^{\circ}$ C 下共同标记细胞后, 流式分选出亲和力最高的部分细胞 (约占总细胞的 0.02 ~ 0.05%), 分选后的细胞置于无 G418 抗生素的培养基中培养 3 天, 细胞扩增到约 20 万, 重新转染 pCEP-Neo-mAID 质粒进行下一轮进化。

[0069] 将 RMCE-Ab (展示有抗 TNF- $\alpha$  的单链抗体 (3f8-scFv) 的细胞) 细胞, 按以上步骤进行 5 轮的抗体进化, 从图 7 上可以看到原始 RMCE-Ab 细胞转染 AID 质粒培养 7 天后就有一部分亲和力更高的细胞团出现 (图 7A, gate P3), 流式分选该部分细胞 (大约占总细胞的 0.03-0.04%), 第一轮分选后得到的细胞 (图 7B, round 1) 大约有 2.16% 比野生型细胞 (图 7B, WT) 具有更高的亲和力, 随着进化轮数的增加低亲和力的细胞比例不断减少, 高亲和力细胞比例不断增加, 且出现了明显的更高亲和力的细胞团 (图 7B), 如 round2 细胞明显分为两团, round 4 则出现了三团具有不同亲和力的细胞。同时随着分选的进行, 绝大部分细胞能够稳定的展示抗体 (图 7B, gate N), 仅仅只有少部分细胞丢失了抗体展示能力, 在 5 轮分选中抗体展示细胞的比例都大于 80% (图 7C)。该亲和力成熟系统不仅能够高效的产生优良的突变体, 经流式分选能够高效的将这些突变体富集起来, 并且由于细胞抗体展示稳定性很高, 富集的展示优良抗体突变体细胞很少丢失掉抗体展示能力, 从而能够很好的维持突变体而不至于在后续的培养中丢失。

[0070] 每轮进化后提取细胞基因组, PCR 出 3f8-scFv 抗体序列, 构建到 pCDNA3.1(+) 载体上, 从每轮构建的克隆中随机挑取 35 个克隆测序, 测序结果经比对从而得到抗体突变体。经过 5 轮进化共获得 22 个含有不同突变体或者突变体组合的质粒, 总计 21 个氨基酸突变。其中有三个氨基酸突变 N33K、A145V、M211I 出现的频率最高, 分测到了 73、109 和 14 次, 并且随着进化轮数的增加这三个氨基酸突变不断的富集, 第五轮进化后测序结果中所

有的测序质粒都含有 N33K 和 A145V 突变 (34/34), 34 个克隆中有 13 个含有 M211I 氨基酸突变 (表 2),

[0071] 表 2: 抗体亲和力成熟过程中获得的突变体统计 (深色部分为分选过程中不断富集的突变)

[0072]

	Rounds of evolution
--	---------------------

[0073]

mutation	R1	R2	R3	R4	R5
N33K		3/33	3/34	5/34	
A130T	1/34				
A145V		21/33	20/34	6/34	
P229T	1/34				
A273T	1/34				
A145L		1/33			
N33K+L49V		1/33			
N33K+A130V				1/34	
N33K+G136R				1/34	
N33K+A145V		2/33	2/34	15/34	23/34
N33K+C197R			1/34		
N33K+H212N				1/34	
A135T+A145V		1/33			
A145V+M211I			2/34		
A145V+A262V		1/33			
A145L+A229V			3/34	1/34	
N33K+G136R+D248G				1/34	
N33KA145V+A199V				1/34	
N33K+A145V+Y209D				2/34	
N33K+A145V+M211I					11/34
L49V+A62T+A145V			1/34		
L49V+A145V+M211I				1/34	

[0074] 图 8 为每轮进化测序结果中含有 N33K、A145V、N33K+A145V、A145V+M211I 和含有 N33K+A145V+M211I 三个突变的抗体突变体统计图, 从图中可以看到仅含有 N33K 和 A145V 一个氨基酸突变的抗体在 round 2 中开始大量出现, 随着进化的进行含有 N33K+A145V 两个氨基酸突变的抗体不断积累, 在 round 4 和 round 5 中 N33K+A145V 突变体占主要部分, 同时 round 5 出现了大量的含有 N33K+A145V+M211I 三个氨基酸突变的突变体, 进化过程中产生的有利突变不断的积累到了一个质粒上, 说明该抗体亲和力成熟系统能够不断的积累有利突变从而获得更为优良的抗体突变体。本实验中仅仅进行了 5 轮的亲和力成熟过程, 如果需要的话该系统能够通过增加进化的轮数从而继续积累有利突变拿到更好的突变体。

[0075] 实施例 4. 抗体突变体的亲和力检测

[0076] 根据流式以及测序结果, 选取了 7 个具有代表性的突变体用来检测抗体的亲和力。将抗体突变体 N 端连接上信号肽, C 端连接上人 IgG Fc 片段构建在 pCEP4 载体上形成表达载体 pCEP4-scFv (Mut) - hFc, 将载体分别转染 CHO-S 细胞, 以 scFv (Mut) - hFc 的形式表达, 培养两天后收集培养基, 用 30Kd 超滤管浓缩, 将抗体的浓度调整到 100ug/mL 后 ForteBio Octet 分子相互作用技术平台测定抗体的亲和力 (表 3)。如表所示, 含有三个氨基酸突变的抗体亲和力最高, KD 达到了 5. 20E-10M, 相比野生型其抗体的亲和力提高了 15 倍。含有两个氨基酸突变的抗体亲和力稍低, 含有一个氨基酸突变的突变体亲和力整体上要更低一些, 所有的突变体亲和力都要高于野生型抗体, 亲和力检测结果与流式检测结果

基本一致,单基因抗体展示能够很好的体现抗体的亲和力。

[0077] 表 3 :抗体亲和力检测结果

[0078]

c.lone	mutation	$K_D$ (M)	$K_{off}$ (1/s)	$K_{on}$ (1/MS)
WT	No	7.82E-09	5.29E-04	6.76E+04
S1-26	A229T	5.69E-09	4.07E-04	7.15E+04
S2-17	N33K	4.34E-09	2.58E-04	5.96E+04
S3-19	A145V	2.12E-09	1.57E-04	7.40E+04
S2-23	N33K+A145V	1.25E-09	9.78E-05	7.81E+04
S3-18	A145V+M211I	1.32E-09	1.04E-04	7.87E+04
S4-10	N33K+H212N	2.88E-09	1.66E-04	5.77E+04
S5-8	N33K+A145V+M211I	5.20E-10	3.94E-05	7.84E+04

[0079] 利用该单基因抗体展示细胞PuroR-14,转入AID质粒后,经过5轮的抗体亲和力成熟过程(总时间小于2个月),获得了22个抗体突变体,其中有18个能够成功的展示到细胞表面,并且所有展示的抗体突变体都比野生型具有更高的抗原结合能力,22个突变体中共含有21个氨基酸突变,其中有三个氨基酸突变N33K、A145V、M211I出现的频率最高,分测到了73、109和14次,选取了7个具有代表性的突变体进行了亲和力测定,发现所有的突变体相比野生型都有更高的亲和力,而且随着突变氨基酸的积累抗体的亲和力也就越高 $N33K+A145V+M211I > N33K+A145V \approx A145V+M211I > A145V > N33K$ ,其中同时含有N33K+A145V+M211I这三个氨基酸突变的抗体突变株亲和力约为野生型抗体的15倍,说明抗体亲和力成熟系统能够非常有效的积累有利突变,在亲和力成熟过程中不会引入一些无用突变(易错PCR产生突变中由于基因会同时引入多个突变,筛选到的高亲和力突变株可能含有一些对亲和力提高并无作用的突变),这对维持抗体基本结构非常有利。

[0080] 该亲和力成熟系统抗体进化效率非常的高,仅仅一轮抗体进化(约10天)就得到了亲和力更高的突变体S1-26,并且在5轮抗体进化中将抗体亲和力提高了15倍,如果需要筛选更好的突变体则可以增加抗体进化的轮数,或者利用已经获得的突变体,通过基因混编的形式将不同氨基酸突变组合起来,以获得更好的突变株。

[0081] 附表:构建各种质粒所使用的引物

[0082]

Primers	Vectors
<p><i>Hind</i>III-DHFR-P1: 5'-GACTGAAGCTTATGGTTCGACCGCTGAACTGCAT-3'</p> <p><i>Xho</i>I-DHFR-P2: 5'-CTGACCTCGAGTTAGCCTTCTCTCATAGACTTCAAATTTATACTT GAT-3'</p> <p>Overlap-SV40*-DHFR-P1: 5'-CCTAGGCTTTTGCATGGTTCGACCGCTGAACTGCATC-3'</p> <p>Overlap-SV40pA-DHFR-P2: 5'-CCAGAGTCCCCTAGCCTTCTCTCATAGACTTCAAATTTATACTT GAT-3'</p> <p><i>Bam</i>HI-SV40*-P1: 5'-TGACTGGATCCGGTGGTTAAAGTCCCCAGGCTCC-3'</p> <p>Overlap-DHFR-SV40*-P2: 5'-CGGTCAACCATGCAAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGC-3'</p> <p>Overlap-DHFR-SV40pA-P1: 5'-GAGAAGAAAGGCTAAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAAT-3'</p> <p><i>Bgl</i>II-SV40 polyA-P2: 5'-GACTGAGATCTGGTATACAGACATGATAAGATACATTGAT-3'</p>	pCD
<p><i>Hind</i>III-FRT-<i>Bam</i>HI-GFP-P1: 5'-GACTGAAGCTTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCG GATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3'</p> <p><i>Xho</i>I-Loxp-<i>Eco</i>RV-GFP-P2: 5'-GACTGCTCGAGATAAAGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATG ATATCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3'</p>	pCDFGL
<p><i>F</i>lpo-<i>Nhe</i>I-P1: 5'-GTCTGGCTAGCATGAGCCAATTTGATATATTATGTAACACACCAC-3'</p> <p><i>F</i>lpc-overlap-2A-P2: 5'-CACGTCCCCGCATGTTAGAAGACTTCCCCTGCCCTCGGCTCTTATGC GTCTATTTATGTAGGATGAAAGG-3'</p> <p>2A-overlap-cre-P1: 5'-GAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCCGGGCCAT GTCCAATTTACTGACCGTACACC-3'</p> <p>Flag-Cre-<i>Xho</i>I-P2: 5'-CAGTCCTCGAGCTACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCATCGCCATC TTCCAGCAGGCG-3'</p>	pF2AC
<i>Bam</i> HI-FRT- <i>Hind</i> III-RFP-P1:	pFRL, pFPL <sub>s</sub>

[0083]

<p>5'-GCCTGGATCCGAAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACTCAAGCTTATGGCCTCCTCCGAGGACGTCAT-3'</p> <p><i>Bam</i>HI-<i>Loxp</i>-<i>Xho</i>I-RFP-P2: 5'-GCCTGGATCCATAAAGTTCCTATTCTAGCATAACATTATAACGAAGTTATCTCGAGCTAATAAGATCTGGCGCCGGTGGAG-3'</p> <p>Puro-<i>Hind</i>III-P1: 5'-TCACTAAGCTTATGACCGAGTACAAGCCCACGGT-3'</p> <p>Overlap-puro-TK-P1: 5'-CCGGTGCCATGGCTTCGTACCCCTGCCATC-3'</p> <p>Overlap-puro-TK-P2: 5'-GTACGAAGCCATGGCACCGGGCTTGCGGGT-3'</p> <p>TK-<i>Xho</i>I-P2: 5'-TGCTACTCGAGTCAGTTAGCCTCCCCATCTCCC-3'</p> <p>SP-3f8-<i>Hind</i>III-P1: 5'-TCACTAAGCTTATGACCCGGCTGACCGTGCT-3'</p> <p>TM-<i>Xho</i>I-P2: 5'-GATCACTCGAGCTAACGTGGCTTCTTCTGCCAAAGC-3'</p>	pFAbL, pCDNA3.1-Ab and pCEP4-Ab
<p>GFP-<i>Sac</i>I-P1: 5'-TACTGGAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3'</p> <p>GFP-<i>Xho</i>I-A-P2: 5'-GACTACTCGAGTCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3'</p> <p>TNFa-<i>Nco</i>I-P1: 5'-TGAGTCCATGGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCG-3'</p> <p>TNFa-<i>Eco</i>RI-P2: 5'-CTGTCGAATTCCAGGGCAATGATCCCAAAGTAGACC-3'</p>	PET28a(+)-TNFa-GFP
<p>pCEP-NEO-<i>Nru</i>I-P1: 5'-GACTGCTCGCGAAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGT-3'</p> <p>pCEP-NEO-<i>Sal</i>I-P2: 5'-GTCAGGTCGACGGTATACAGACATGATAAGATACATTG-3'</p> <p>CMV-<i>Sal</i>I-P1: 5'-GTAGCGTCGACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGC-3'</p> <p>CMV-<i>Sal</i>I-P2: 5'-TCATCGTCGACCTCATGGCTGCGCCCCGACAC-3'</p> <p>mAID-<i>Hind</i>III-P1: 5'-GCACGAAGCTTGCCACCATGGACAGCCTTCTGATGAAGCAAAAAG-3'</p> <p>mAID-<i>Xho</i>I-P2: 5'-CATCGCTCGAGTCAAATCCCAACATACGAAATGCATCT-3'</p>	pCEP-Neo-mAID
<p>3f8-SCFV-<i>Eco</i>RI-P2: 5'-GTCACGAATTCCCGTTTTATTTCCTCAACTTTGTCCCC-3'</p> <p>hFC-<i>Eco</i>RI-P1: 5'-CTGTCGAATTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCAC-3'</p> <p>hFC-<i>Xho</i>I-P2: 5'-TGACTCTCGAGTTATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG-3'</p>	pCEP4-scFv-hFC

[0084] 最后需要说明的是,以上实施例仅用于帮助本领域技术人员理解本发明的实质,并不解释为对本发明保护范围的限定。

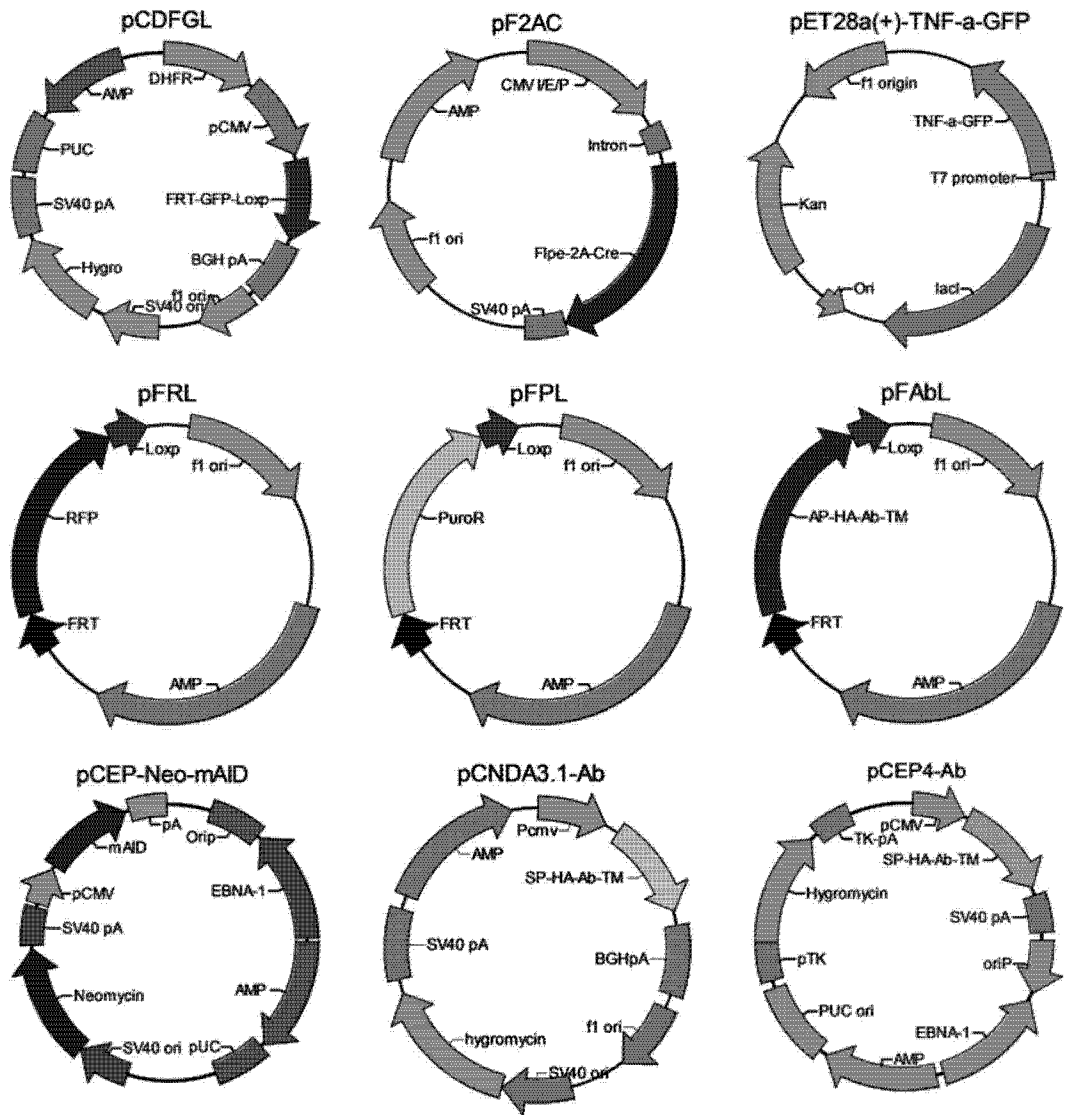


图 1

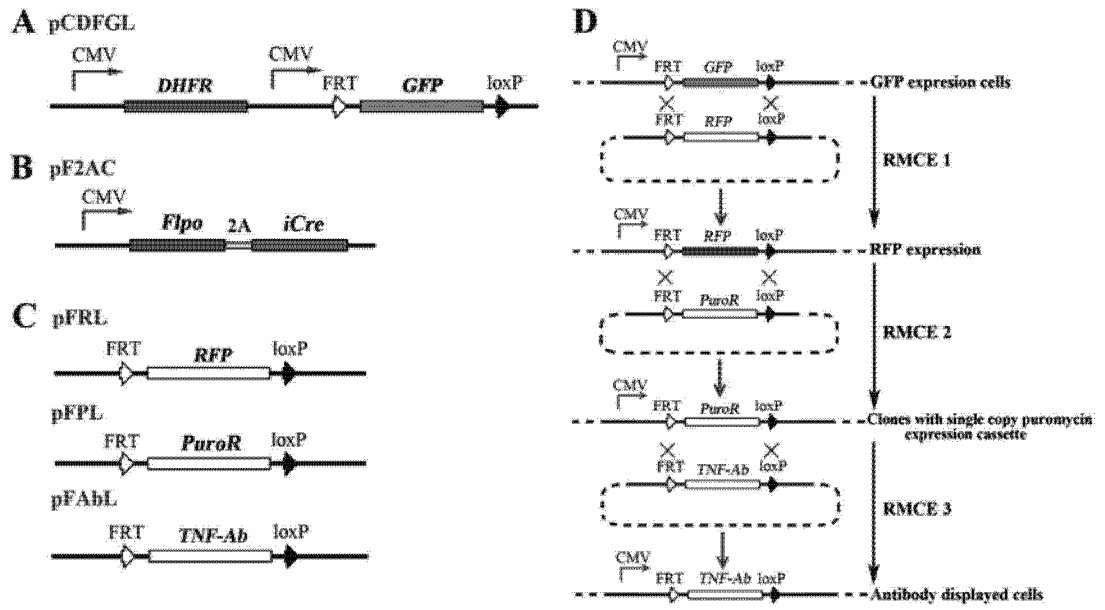


图 2

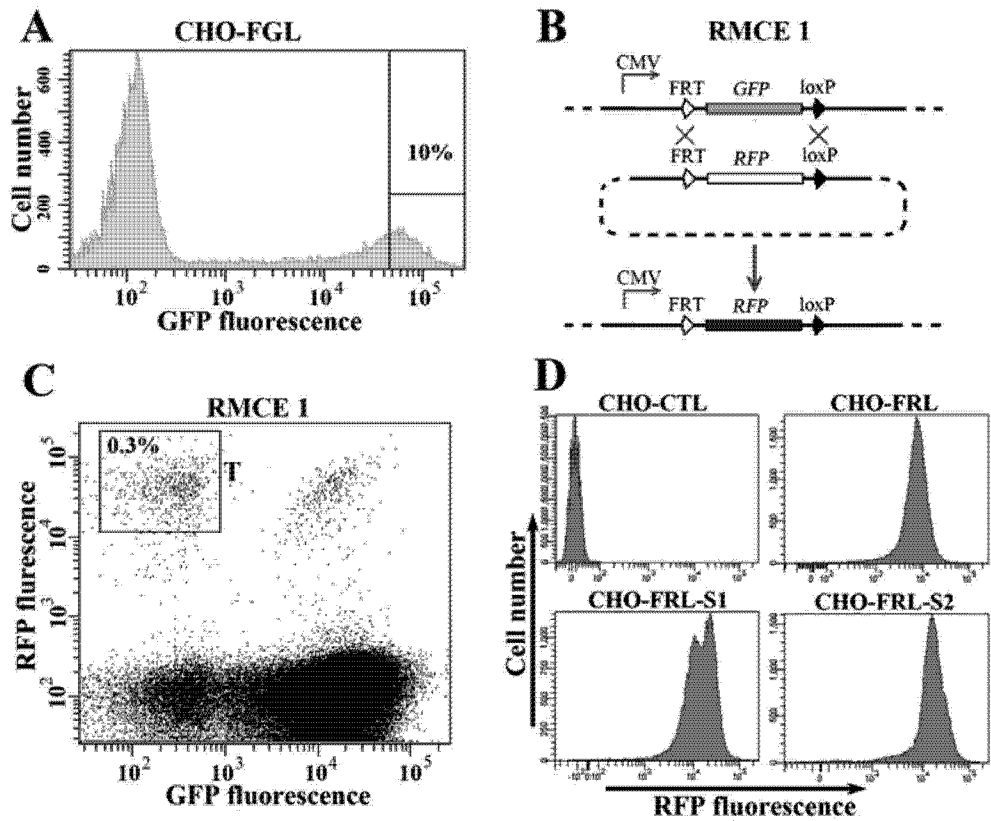


图 3



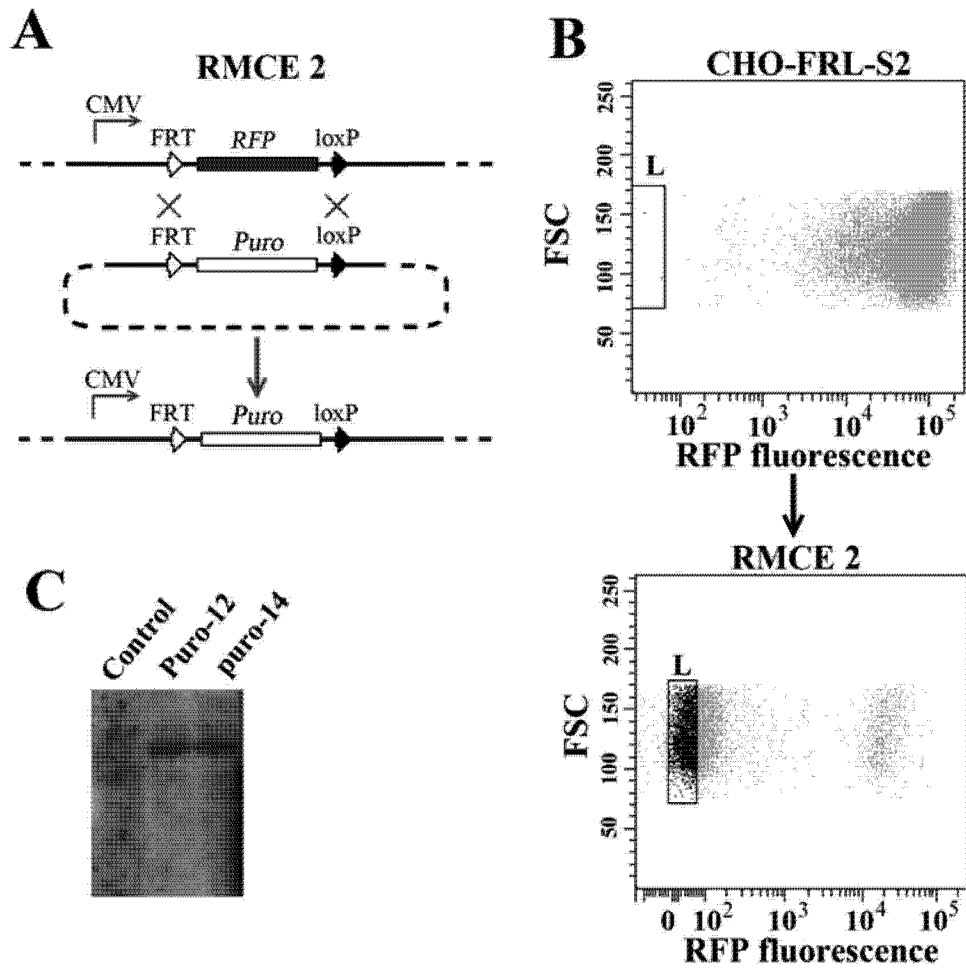


图 4

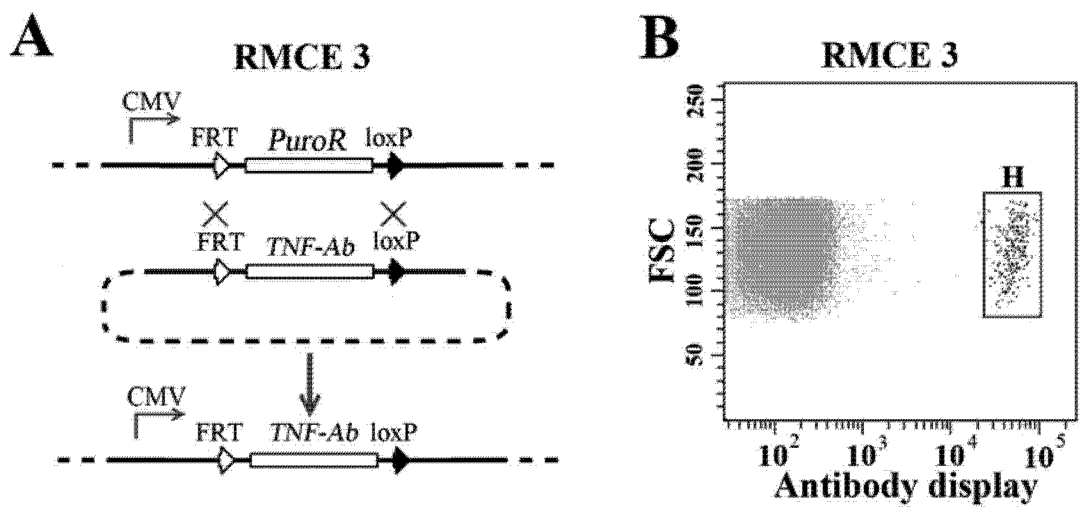


图 5

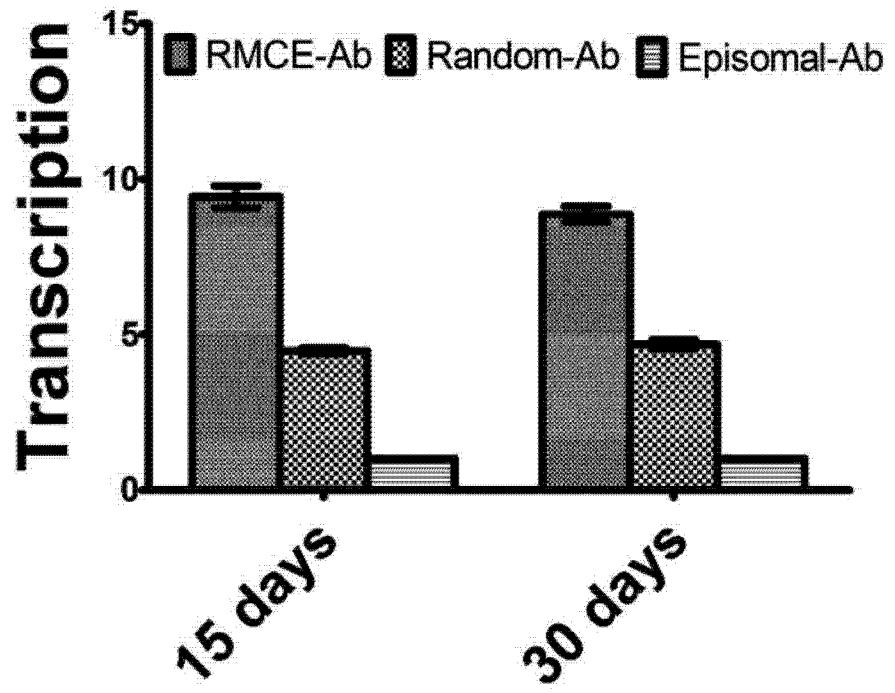


图 6

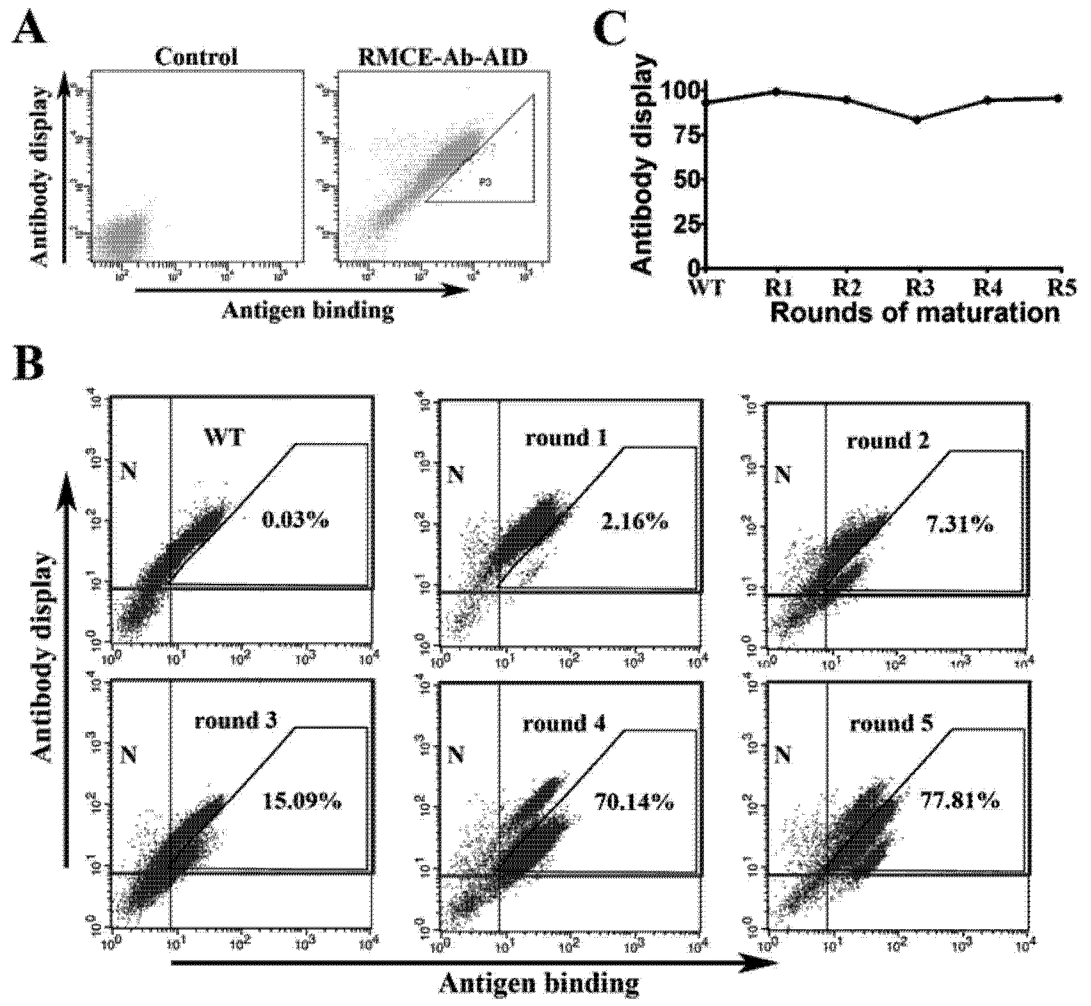


图 7

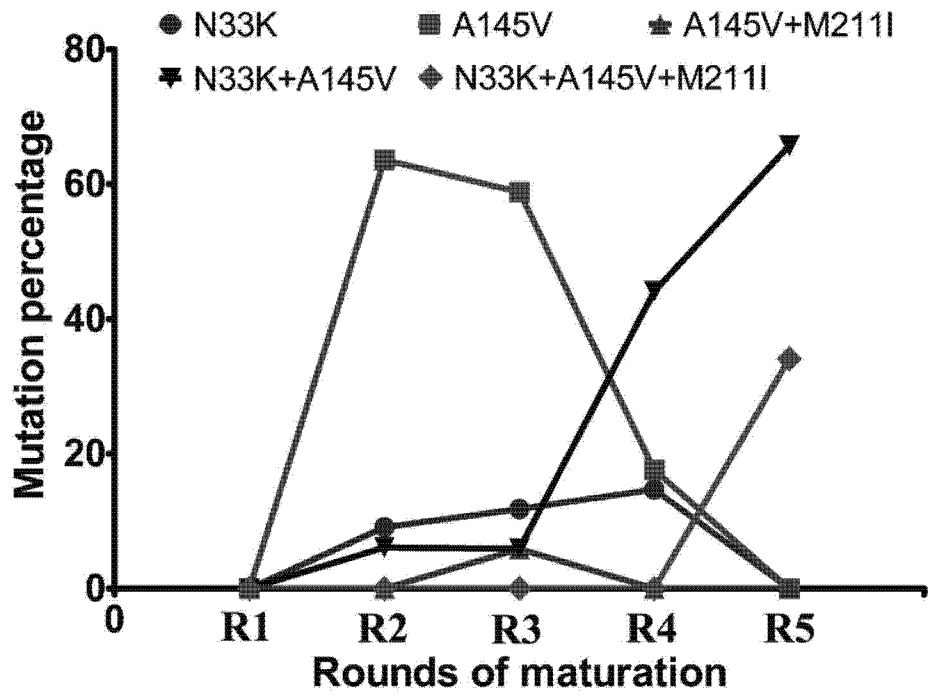


图 8