 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0061629 (43) 공개일자 2011년06월09일
<p>(51) Int. Cl. <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C40B 40/06</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7009192</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년09월30일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년04월22일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/059059</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/039852 국제공개일자 2010년04월08일</p> <p>(30) 우선권주장 61/101,483 2008년09월30일 미국(US)</p>	<p>(71) 출원인 아보트 러보러터리즈 미국 일리노이주 60064-6008 아보트 파크 아보트 파크 로드 100 디파트먼트 377 빌딩 에이피6 에이-1</p> <p>(72) 발명자 세 충-밍 미국 매사추세츠주 02459-2733 뉴턴 올드 필드 로 드 22 쿠츠코바 율리야 아. 미국 매사추세츠주 01532 노쓰보로 휘트니 스트리 트 183 메모트 존 이. 미국 매사추세츠주 01701 프레이밍햄 코디 로드 10</p> <p>(74) 대리인 장훈</p>

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 개선된 항체 라이브러리

(57) 요약

본 발명은 발현 라이브러리로부터 scFv 항체 분자의 확실한 발현 및 선별을 가능하게 하는 개선된 시험관내 RNA 디스플레이 라이브러리에 관한 것이다. 본 발명의 scFv 항체 라이브러리는, scFv 항체 발현을 개선하는, 최적화된 단축형 도메인간 링커를 포함한다. 또한, 상기 scFv 항체 라이브러리는 각각의 라이브러리 클론, 라이브러리들 또는 이의 서브세트의 확인을 가능하게 하는 짧은 핵산 바코드를 포함한다. 또한, 본 발명의 scFv 항체 라이브러리를 생성, 증폭 및 스펙트라타이핑하기 위한 프라이머가 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 14, 19 내지 42, 및 58 내지 210 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

서열번호 14 내지 16, 및 43 내지 57 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

서열번호 17 또는 18에 제시된 핵산 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

라이브러리 증폭, 라이브러리 역전사 및/또는 라이브러리 스펙트라타이핑(spectratyping)을 위한 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 서열의 용도.

청구항 5

단쇄 항체(scFv)의 발현을 위한 핵산 라이브러리로서, 상기 라이브러리는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 서열의 레퍼토리를 포함하고, 상기 라이브러리의 각 구성원은 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인 및 링커 영역을 포함하는 개방 판독 프레임을 포함하고, 상기 라이브러리는 제1항의 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 생성되는, 핵산 라이브러리.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 링커 영역이 20개 미만의 아미노산을 암호화하는, 라이브러리.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 링커 영역이 15개의 아미노산을 암호화하는, 라이브러리.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이, 개방 판독 프레임에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 프로모터가 T7, SP6, 및 T3로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 프로모터인, 라이브러리.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 프로모터가 T7 프로모터인, 라이브러리.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이, 작동가능하게 연결된 유전자의 전사를 증진시킬 수 있는 5' 비해독 영역(5' UTR)을 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 5' UTR이 담배 모자이크 바이러스 5' UTR 또는 이의 활성 단편인, 라이브러리.

청구항 13

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이 폴리아데닌 서열을 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 14

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이 핵산 바코드를 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 핵산 바코드가 8개의 뉴클레오타이드를 포함하는, 라이브러리.

청구항 16

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이, 에피토프 태그를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 에피토프 태그가 FLAG 태그인, 라이브러리.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 핵산 서열이 scFv의 링커 영역의 일부인, 라이브러리.

청구항 19

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이, 항체 불변 영역 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 20

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이 리보솜 정지 서열을 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 21

제5항에 있어서, 상기 라이브러리의 각 구성원이 펩타이드 수용체를 추가로 포함하는, 라이브러리.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 펩타이드 수용체가, 소랄렌 C6 (Psoralen C6) 분자를 포함하는 링커를 통해 공유적으로 부착되는, 라이브러리.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 링커가 5'(소랄렌 C6) 2'Ome (U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (퓨로마이신)이고, 여기서 X는 트리에틸렌 글리콜 링커 또는 PEG-150이고 CC는 DNA 골격인, 라이브러리.

청구항 24

핵산 조성물을 제공하는 단계로서, 상기 조성물 중의 핵산의 적어도 일부가, 항체 가변 도메인을 암호화하는 하나 이상의 개방 판독 프레임을 포함하는 단계; 및

제1항의 올리고뉴클레오타이드 하나 이상을 사용하여 다수의 항체 가변 도메인을 증폭시키는 단계를 포함하여, 단쇄 항체 (scFv)의 발현을 위한 핵산 라이브러리를 생성하는 방법.

청구항 25

핵산 조성물을 제공하는 단계로서, 상기 조성물 중의 핵산의 적어도 일부가, 항체 가변 도메인을 암호화하는 하나 이상의 개방 판독 프레임을 포함하는 단계; 및

제2항의 올리고뉴클레오타이드 하나 이상을 사용하여 상기 가변 도메인의 CDR3 영역을 증폭시키는 단계

를 포함하여, 항체 가변 도메인을 암호화하는 하나 이상의 개방 판독 프레임을 포함하는 핵산을 스펙트라타이핑하는 방법.

명세서

기술 분야

관련 출원

본원은 2008년 9월 30일자로 출원된 미국 임시출원 제61/101,483호 (이의 내용은 본원에 참조로 삽입된다)를 우선권으로 주장한다.

발명의 분야

본 발명은 개선된 항체 라이브러리 및 이를 제조하기 위한 방법 및 재료에 관한 것이다.

배경 기술

대부분의 모든 구조적 에피토프에 대해 높은 특이성 및 친화성으로 결합하는 항체가 통상적으로 연구 수단 및 FDA 승인된 치료제로서 사용된다. 그 결과, 치료 및 진단적 모노클로날 항체는 세계적으로 수십억 달러의 시장을 형성한다.

항체를 얻기 위해 동물을 면역화시키는 전통의 방식은 느리며 번거롭다. 이에, 합성 항체 라이브러리를 사용하여 목적하는 표적 분자에 대한 항체를 생체의 선별하기 위한 수개의 방법이 개발되었다. 일부 방법에서, 항체 또는 이의 단편의 라이브러리는 유기체 (예: 효모 세포, 세균 세포 또는 포유동물 세포) 또는 서브-현미경적 체제 (예: 박테리오파지 또는 바이러스)의 표면에 디스플레이되며, 유기체 또는 서브-현미경적 체제를 목적하는 항체의 발현에 대해 선별한다. 다른 방법에서, 항체 라이브러리는 세포 비함유의 시험관내 시스템에서 발현 및 선별된다. 현재의 시험관내 발현 시스템은 단일 항체 가변 도메인의 발현에 있어서는 우수하지만, 단쇄 항체 (scFv) 분자와 같은 다수-도메인 항체를 발현하는데 있어서는 효과적이지 않다. 이는 현재의 scFv 항체 라이브러리의 구조 및 현재의 시험관내 발현 시스템의 반응 조건 모두에 기인한다.

따라서, 목적하는 표적물에 대한 scFv 항체의 선별을 위한 개선된 항체 라이브러리가 당해 기술 분야에서 요구된다.

발명의 내용

본 발명은 scFv 항체 분자의 확실한 발현 및 선별을 가능하게 하는 개선된 시험관내 디스플레이 RNA 라이브러리를 제공함으로써 이전의 문제를 해결한다.

본 발명은, 이로 제한됨이 없이, 하기와 같은 수개의 이점을 갖는다:

* 개선된 발현을 위한 최적화된 도메인간 링커를 포함하는 개선된 시험관내 디스플레이 scFv 항체 라이브러리의 제공;

* 짧은 핵산 바코드를 포함하는 개선된 시험관내 디스플레이 scFv 항체 라이브러리의 제공;

* 개선된 시험관내 디스플레이 scFv 항체 라이브러리를 생성하기 위한 프라이머의 제공;

* 본 발명의 라이브러리에서 scFv 항체 분자의 중쇄 가변 영역의 CDR3 영역을 스펙트라타이핑(spectratyping)하기 위한 프라이머의 제공; 및

* 개선된 시험관내 디스플레이 라이브러리를 제조하는 방법.

하나의 양상으로, 본 발명은 서열번호 1 내지 14, 19 내지 42, 및 58 내지 210 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 또 다른 양상으로, 본 발명은 서열번호 1 내지 14, 19 내지 42, 및 58 내지 210 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

또 다른 양상으로, 본 발명은 서열번호 14 내지 16, 및 43 내지 57 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 또 다른 양상으로, 본 발명은 서열번호 14 내지 16, 및 43 내지 57 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

또 다른 양상으로, 본 발명은 서열번호 17 또는 18에 제시된 핵산 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 또 다른 양상으로, 본 발명은 서열번호 17 또는 18에 제시된 핵산 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

하나의 양태에서, 본 발명은 라이브러리 증폭, 라이브러리 역전사 및/또는 라이브러리 스펙트라타이핑을 위한

서열번호 1 내지 210에 제시된 서열 중 어느 하나의 서열의 용도를 제공한다.

- [0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 단쇄 항체 (scFv)의 발현을 위한 핵산 라이브러리로서, 상기 라이브러리는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 서열의 레퍼토리를 포함하고, 상기 라이브러리의 각 구성원은 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인 및 링커 영역을 포함하는 개방 판독 프레임을 포함하고, 상기 라이브러리는 서열번호 1 내지 210에 제시된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 생성되는, 핵산 라이브러리를 제공한다.
- [0020] 하나의 양태에서, 라이브러리는 20개 미만의 아미노산을 암호화하는 링커 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 라이브러리는 15개의 아미노산을 암호화하는 링커 영역을 추가로 포함한다.
- [0021] 하나의 양태에서, 라이브러리의 각 구성원은 개방 판독 프레임에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 프로모터는 T7, SP6, 및 T3로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 양태에서, 프로모터는 T7 프로모터이다.
- [0022] 하나의 양태에서, 라이브러리의 각 구성원은 작동가능하게 연결된 유전자의 전사를 증진시킬 수 있는 5' 비해독 영역 (5' UTR)을 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 5' UTR은 담배 모자이크 바이러스 5' UTR 또는 이의 활성 단편이다. 또 다른 양태에서, 라이브러리의 각 구성원은 폴리아데닌 서열을 추가로 포함한다.
- [0023] 또 다른 양태에서, 라이브러리의 각 구성원은 핵산 바코드를 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 핵산 바코드는 8개의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 라이브러리의 각 구성원은 에피토프 태그를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 에피토프 태그는 FLAG 태그이다. 또 다른 양태에서, 핵산 서열은 scFv의 링커 영역의 일부이다. 또 다른 양태에서, 라이브러리는 항체 불변 영역 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.
- [0025] 하나의 양태에서, 라이브러리는 리보솜 정지 서열을 추가로 포함한다.
- [0026] 하나의 양태에서, 라이브러리는 펩타이드 수용체를 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 펩타이드 수용체는 소랄렌 C6 (Psoralen C6) 분자를 포함하는 링커를 통해 공유적으로 부착된다. 또 다른 양태에서, 링커는 5'(소랄렌 C6) 2'Ome (U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (퓨로마이신)이고, 여기서 X는 트리에틸렌 글리콜 링커 또는 PEG-150이고 CC는 DNA 골격이다.
- [0027] 또 다른 양상으로, 본 발명은 (a) 핵산 조성물을 제공하는 단계로서, 상기 조성물 중의 핵산의 적어도 일부가, 항체 가변 도메인을 암호화하는 하나 이상의 개방 판독 프레임을 포함하는 단계, 및 (b) 서열번호 1 내지 210에 제시된 올리고뉴클레오타이드 하나 이상을 사용하여 다수의 항체 가변 도메인을 증폭시키는 단계를 포함하여, 단쇄 항체 (scFv)의 발현을 위한 핵산 라이브러리를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0028] 또 다른 양상으로, 본 발명은 (a) 핵산 조성물을 제공하는 단계로서, 상기 조성물 중의 핵산의 적어도 일부가, 항체 가변 도메인을 암호화하는 하나 이상의 개방 판독 프레임을 포함하는 단계, 및 (b) 서열번호 1 내지 210에 제시된 올리고뉴클레오타이드 하나 이상을 사용하여 상기 가변 도메인의 CDR3 영역을 증폭시키는 단계를 포함하여, 항체 가변 도메인을 암호화하는 하나 이상의 개방 판독 프레임을 포함하는 핵산을 스펙트라타이핑하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명의 특정 양태에서의 mRNA-scFv 디스플레이 기술에 대한 일반적인 도식도이다.
- 도 2는 본 발명의 특정 양태에서의 mRNA-scFv 디스플레이 기술에 대한 일반적인 도식도이다.
- 도 3은 라이브러리 DNA 제작물의 일반적인 도식도이다.
- 도 4는 mRNA-scFv 분자로서 생성되는 기능성 scFv를 도시한다.
- 도 5는 mRNA-scFv 분자에 부착된 scFv가 유리된 scFv 분자와 기능적으로 동일하다는 것을 제시하는 결과를 나타낸다.
- 도 6은 17/9 mRNA-scFv 제작물의 TMV-UTR과 코작 (Kozak) 컨센서스 서열 사이에 삽입된 4개의 8-bp 태그를 도시한다.

- 도 7은 예시적 제작물 및 대조 서열을 도시한다.
- 도 8은 3 라운드의 선별에서 확인된 무작위 (random) 태그 서열을 도시한다.
- 도 9는 1 라운드의 mRNA-scFv 선별 전 및 후에 17/9 scFv를 정량한 결과를 도시한다.
- 도 10은 D2E7과 2SD4 사이의 키메라를 도시한다.
- 도 11은 상이한 TNF α 결합체에 대한 K_D 곡선을 도시한다.
- 도 12는 mRNA-scFv 분자의 열안정성을 도시한다.
- 도 13은 RNA가 mRNA-scFv 분자의 고온 처리 후 회수된다는 것을 제시하는 결과를 도시한다.
- 도 14는 나이브 (naive) 사람 PBMC 카과 scFv PROfusion 라이브러리에서 PBMC 공여자의 나이, 민족성 및 성별 분포를 도시한다.
- 도 15는 제작된 나이브 사람 PBMC 카과 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_H 계열-특이적 PCR 단편을 도시한다.
- 도 16은 제작된 나이브 사람 PBMC 카과 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_K 계열-특이적 PCR 단편을 도시한다.
- 도 17은 제작된 나이브 사람 PBMC 카과 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_H-V_K scFv PCR 생성물을 도시한다.
- 도 18은 제작된 나이브 사람 PBMC 카과 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_H 및 V_K 계열 분포를 도시한다.
- 도 19는 나이브 사람 PBMC 항체 CDR3 크기의 스펙트라타이핑 분석을 도시한다.
- 도 20은 스펙트라타이핑 분석에 의한 V_H/V_K 라이브러리의 정성 조절을 도시한다.
- 도 21은 나이브 사람 PBMC 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V _{λ} 계열-특이적 PCR 단편을 도시한다.
- 도 22는 제작된 나이브 사람 PBMC 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_H-V _{λ} scFv PCR 생성물을 도시한다.
- 도 23은 제작된 나이브 사람 PBMC 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_H 및 V _{λ} 계열 분포를 도시한다.
- 도 24는 나이브 사람 림프절 카과 및 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 PROfusion 라이브러리 제작물 설계 를 나타낸다.
- 도 25는 제작된 나이브 사람 림프절 카과 및 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_H 계열-특이적 PCR 단편을 도시한다.
- 도 26은 제작된 나이브 사람 림프절 카과 및 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_K 계열-특이적 PCT 단편 을 도시한다.
- 도 27은 제작된 나이브 사람 림프절 카과 및 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V _{λ} 계열-특이적 PCR 단편을 도시한다.
- 도 28은 제작된 나이브 사람 림프절 카과 및 람다 scFv PROfusion 라이브러리에서의 V_H-V_K 및 V_H-V _{λ} scFv PCR 생성물을 도시한다.
- 도 29는 제작된 V_H-V_K scFv 라이브러리에서의 V_H 및 V_K 계열 분포를 도시한다.
- 도 30은 제작된 V_H-V _{λ} scFv 라이브러리에서의 V_H 및 V _{λ} 계열 분포를 도시한다.
- 도 31은 제작된 V_H-V _{λ} scFv 라이브러리에서 스펙트라타이핑 분석에 의한 V_H-V_K 및 V_H-V _{λ} 라이브러리의 정성 조절을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명이 더욱 쉽게 이해될 수 있도록 먼저 특정 용어가 정의된다.

[0031] I. 정의

[0032] 용어 "항체"는 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다특이적 항체 (예: 이특이적

항체), 키메릭 항체, CDR-이식된 항체, 사람화 항체, 사람 항체, 쥐 항체 및 이의 단편, 예를 들어 항체 경쇄 (VL), 항체 중쇄 (VH), 단쇄 항체 (scFv), F(ab')₂ 항체, Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편 및 단일 도메인 항체 단편 (Dab)를 포함한다.

- [0033] 용어 "항체 라이브러리"는 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 개방 관독 프레임 (ORF)을 포함하는 다수의 DNA 또는 RNA 분자를 언급한다. 이는 또한 상기 DNA 또는 RNA 분자로부터 발현되는 다수의 항체 단백질 및 핵산/항체 융합 분자를 포함한다.
- [0034] 용어 "중쇄 가변 도메인"은 항체 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 및 상기 핵산의 단백질 생성물을 언급한다.
- [0035] 용어 "경쇄 가변 도메인"은 항체 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 및 상기 핵산의 단백질 생성물을 언급한다.
- [0036] 용어 "스펙트라타이핑 (spectratyping)"은 CDR3 길이에 기초하여 항체를 암호화하는 유전 서열을 분리하는 PCR 기본 방법을 언급한다. CDR3 길이 분포의 변화는 항체 레퍼토리의 변화와 관련된다 [참조: Janeway *et al.*, "Immunobiology", 5th ed. Garland Publishing, New York and London, (2001)].
- [0037] 용어 "에피토프 태그"는, 항체에 의한 검출을 가능하게 하도록, 임의의 분자에 화학적으로나 유전적으로 부착된, 항체에 의해 특이적으로 인지되는 짧은 아미노산 서열, 예를 들어 FLAG 태그, HA 태그, MYC 태그 또는 T7 태그를 언급한다.
- [0038] 용어 "핵산 바코드"는 본 발명의 라이브러리의 비해독 영역에 포함되는 짧은 핵산을 언급한다. 바코드는 개별 클론 또는 다수의 라이브러리 구성원에 대해 특정한 확인자를 제공하는 역할을 하는 임의의 또는 예정된 서열이다.
- [0039] 용어 "비-항체 서열"은 최초 항체 서열의 일부가 아닌 본 발명의 항체 라이브러리에서 나타나는 임의의 핵산 또는 아미노산 서열을 언급한다. 이러한 서열은, 예를 들어 에피토프 태그 또는 핵산 바코드를 포함한다.
- [0040] 용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체, 서브-현미경적 제제 또는 시험관내 발현 시스템에서 작동가능하게 연결된 암호화 서열의 발현에 필요한 핵산 서열 또는 유전적 요소를 언급한다. 이러한 서열은 당해 기술 분야에 널리 알려져 있다. 원핵 세포에 대해 적합한 조절 서열은, 예를 들어 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓이는 경우 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우, 프로모터 또는 인핸서가 암호화 서열에 작동가능하게 연결되거나; 해독을 촉진하도록 위치되는 경우, 리보솜 결합 부위가 암호화 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 핵산 서열이 인접하다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접하지 않는다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결합에 의해 수행된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성적 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 통상의 절차에 따라 사용된다.
- [0041] 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 적어도 약 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 이상의 친화도로 표적물에 결합하고/하거나 비특이적 항원에 대한 친화성보다 적어도 2배 더 큰 친화성으로 표적물에 결합하는 능력을 언급한다.
- [0042] 용어 "표적물"은 항체에 의해 인식되는 항원 또는 에피토프를 언급한다. 표적물은, 예를 들어 특이적 항체가 생성되는 임의의 펩타이드, 단백질, 사카라이드, 핵산, 지질 및 소분자를 포함한다. 하나의 양태에서, 항체는 사람 단백질, 예를 들어 TNF알파, IL-12 또는 IL-1알파에 대한 것이다.
- [0043] 용어 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 부류는 당해 기술 분야에 정의되어 있다.
- [0044] 용어 "RNA 디스플레이" 또는 "mRNA 디스플레이"는 발현된 단백질 또는 펩타이드가 공유적으로 또는 단단한 비-공유적 상호작용에 의해 이들의 암호화 mRNA에 연결되어 "RNA/단백질 융합" 분자를 형성하는 시험관내 기술을 언급한다. RNA/단백질 융합물의 단백질 또는 펩타이드 성분은 목적하는 표적물과의 결합 및 부착된 암호화 mRNA 성분의 서열 분석에 의해 측정되는 단백질 또는 펩타이드의 확인을 위해 선별된다. 이러한 방법은 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [참조: 미국특허 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; 및 6,348,315]에 기술되어 있다.

- [0045] 용어 "단쇄 Fv 항체" 또는 "scFv"는, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 일가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇄로 만들어지게 할 수 있는 합성 링커에 의해, 재조합 방법을 이용하여 결합되는 경쇄 가변 영역의 항원 결합부 및 중쇄 가변 영역의 항원 결합부를 언급한다 (단쇄 Fv (scFv)로도 알려짐) [참조: Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 85:5879-5883].
- [0046] 용어 "기능성 잔기"는 부착되는 분자에 추가의 기능성을 부여하는 임의의 생물학적 또는 화학적 실체를 언급한다.
- [0047] 용어 "선별하는"은 일 집단에 있는 다른 분자들로부터 일 분자를 실질적으로 구분하는 것을 언급한다. 본원에서 사용되는 "선별" 단계는 선별 단계 후 일 집단에 있는 목적하지 않는 분자와 관련하여 목적하는 분자의 적어도 2배, 바람직하게는 30배, 더욱 바람직하게는 100배, 가장 바람직하게는 1000배 농축을 제공한다. 본원에서 지시되는 바와 같이, 선별 단계는 임의의 횟수로 반복될 수 있으며, 상이한 유형의 선별 단계를 소정의 접근법으로 조합할 수 있다.
- [0048] 용어 "정지 서열"은 리보솜이 이의 해독 속도를 늦추거나 정지시키게 하는 핵산 서열을 언급한다.
- [0049] 용어 "고체 지지체"는, 이로 제한됨이 없이, 친화성 복합체가 직접적으로나 간접적으로 (예를 들어, 다른 결합 파트너 중간체, 예를 들어 다른 항체 또는 단백질 A를 통해) 결합될 수 있거나, 친화성 복합체가 (예를 들어, 수용체 또는 채널을 통해) 문힐 수 있는, 임의의 걸림 (또는 걸림 재료), 비드, 시험관, 미세역가 디쉬, 고정 입자 (예: 아가로스 또는 세파로즈), 마이크로칩 (예: 규소, 규소-유리 또는 골드 칩), 또는 막(예: 리포솜 또는 소포의 막)을 언급한다.
- [0050] 용어 "링커 영역"은 scFv 항체 유전자에 있는 항체 VH 및 VL 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 연결하는 영역을 언급한다. 링커 영역은 항체 VH와 VL을 암호화하는 핵산 서열과 인-프레임 (in-frame)이며 VH, VL 및 링커를 포함하는 연속 개방 관독 프레임이 형성된다. 또한, 이 용어는 scFv 단백질에 있는 VH 및 VL을 연결하는 영역을 언급한다.
- [0051] 용어 "펩타이드 수용체"는 리보솜 펩티딜 트랜스퍼라제의 촉매 활성화에 의해 성장하는 단백질의 C-말단에 첨가될 수 있는 임의의 분자를 언급한다. 전형적으로, 이러한 분자는 (i) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드-유사 잔기 (예를 들어, 퓨로마이신 및 이의 유사체), (ii) 아미노산 또는 아미노산-유사 잔기 (예를 들어, 임의의 20 개의 D- 또는 L-아미노산 또는 이의 임의의 아미노산 유사체 (예: O-메틸 티로신 또는 문헌 [참조: Ellman et al. (1991) Meth. Enzymol. 202:301]에 기술된 임의의 유사체)), 및 (iii) 둘 사이의 연결 (예를 들어, 3' 위치에서 또는 덜 바람직하게는 2' 위치에서의 에스테르, 아마이드 또는 케톤 연결)을 포함하며; 바람직하게는, 이러한 연결은 천연 리보뉴클레오타이드 형태로부터 환 구조를 유의하게 변동시키지 않는다. 또한, 이러한 용어는, 이로 제한됨이 없이, 단백질 암호화 서열에 공유적으로 결합된(개재 핵산 서열을 통해 간접적 또는 직접적으로) 펩타이드 수용체 분자, 및 일부 비-공유적 수단, 예를 들어 단백질 암호화 서열의 3'에서 또는 근처에서 결합하고 그 자체가 펩타이드 수용체 분자에 결합되는 제2 핵산 서열을 사용하여 하이브리드화를 통해 단백질 암호화 서열에 연결되는 것을 포함한다.
- [0052] **II. 개요**
- [0053] 본 발명은 발현 라이브러리로부터 scFv 항체 분자의 확고한 발현 및 선별을 가능하게 하는 개선된 시험관내 RNA 디스플레이 라이브러리를 제공한다. RNA 디스플레이 방법은 일반적으로, 발현된 단백질 또는 펩타이드가 공유적으로 또는 강한 비-공유 상호작용에 의해 이들의 암호화 mRNA에 연결되어 RNA/단백질 융합 분자를 형성하는, 단백질 또는 펩타이드 라이브러리의 발현을 포함한다. RNA/단백질 융합물의 단백질 성분은 목적하는 표적물과의 결합 및 부착된 암호화 mRNA 성분의 서열분석에 의해 결정되는 단백질 또는 펩타이드의 확인을 위해 선택된다.
- [0054] 본 발명의 scFv 항체 라이브러리는 scFv 항체 발현을 개선하는 최적화된 단축형의 도메인간 링커를 포함한다. scFv 항체 라이브러리는 또한 각각의 라이브러리 클론, 라이브러리들 또는 이의 서브세트의 확인을 가능하게 하는 짧은 핵산 바코드를 포함한다.
- [0055] 또한, 본 발명은 본 발명의 scFv 항체 라이브러리를 생성, 증폭 및 스펙트라타이핑하기 위한 신규한 프라이머를 제공한다.

[0056] **III. 라이브러리 제작**

[0057] 모노클로날 항체 약물 후보물을 생성하기 위한 항체 기술 발달에 따라, 본 발명은 2개의 재조합 항체 생성 접근법인 PROfusion (mRNA 디스플레이) 및 효모 표면 디스플레이의 개발을 기술한다. PROfusion mRNA 디스플레이 기술은 사람 항체 라이브러리를 스크리닝하기 위한 초기 (*ab initio*) 방법이다. 효모 표면 디스플레이 기술은 효모 표면에 특이적으로 디스플레이되는 모노클로날 항체를 스크리닝하기 위한 세포적 방법이다.

[0058] 하나의 양상으로, 본 발명은 항체 분자를 발현할 수 있는 신규한 항체 라이브러리를 제공한다. 본 발명의 라이브러리는 표적물에 결합할 수 있는 임의의 항체 단편으로부터 생성된다. 하나의 양태에서, 항체 가변 도메인의 라이브러리가 생성된다. 하나의 양태에서, 이들은 VH 및/또는 VL 도메인이다. 또 다른 양태에서, scFv 라이브러리가 생성된다.

[0059] 본 발명의 라이브러리는 또한 가변 영역 바깥의 영역, 예를 들어 불변 영역 또는 이의 단편, 또는 힌지 영역을 암호화하는 항체 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 핵산 라이브러리는 RNA, DNA 또는 RNA와 DNA 성분 모두를 포함할 수 있다.

[0061] **1) 핵산 투입물 다양성 (nucleic acid input diversity) 발생**

[0062] 본 발명의 항체 라이브러리를 생성하기 위해 사용되는 핵산 서열은 임의의 공급원으로부터 취득될 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명의 라이브러리는, 이로 제한됨이 없이, 사람 면역글로불린 유전자의 레퍼토리를 포함하는 설치류, 영장류, 낙타류 (camelid), 상어 또는 임의의 유전자도입 동물을 포함하는 임의의 동물의 항체 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 유기체의 항체 보체의 가변 영역을 암호화하는 핵산을 분리 및 클로닝하는 기술이 당해 기술 분야에 익히 공지되어 있다. 실제로, 항체의 가변 영역을 암호화하는 핵산을 포함하는 많은 cDNA 라이브러리, 예를 들어 다양한 면역 세포, 예를 들어 말초혈단핵세포 (PBMC), 비장 또는 림프절로부터 생성되는 사람 항체 가변 영역의 라이브러리가 시판된다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 라이브러리는 하나 이상의 항체를 암호화하는 핵산의 초기 합성에 의해 취득될 수 있다.

[0063] 본 발명의 라이브러리는 발현되는 항체 분자에 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 결실을 초래하는 핵산 치환 및/또는 결실을 도입함으로써 추가의 다양성 도입을 필요로 할 수 있다. 당해 기술 분야에서 인식되는 돌연변이 유발에 대한 임의의 방법, 예를 들어 무작위 돌연변이 유발, "워크 스루 (walk through) 돌연변이 유발" 및 "룩 스루 (look through) 돌연변이 유발"이 고려된다. 항체에 대한 이러한 돌연변이 유발은, 예를 들어 오류 발생이 쉬운 (error-prone) PCR, 효모 또는 세균의 "돌연변이주" 균주, 또는 모든 또는 일부 항체의 초기 합성 동안 무작위 또는 규정된 핵산 변화의 삽입을 이용함으로써 달성될 수 있다. 하나의 양태에서, 하나 이상의 아미노산이 무작위로 돌연변이되는 항체 분자의 라이브러리가 생성될 수 있다. 또 다른 양태에서, 하나 이상의 아미노산이 하나 이상의 예정된 아미노산으로 돌연변이되는 항체 분자의 라이브러리가 생성될 수 있다.

[0064] **2) 조절 서열**

[0065] 본 발명의 핵산 라이브러리는 시험관내에서 암호화되는 항체의 발현 및 스크리닝을 용이하게 하기 위해 추가의 조절 서열을 포함할 수 있다.

[0066] 하나의 이러한 서열은 mRNA 합성을 위한 바람직한 RNA 폴리머라제와 연관지어 사용될 프로모터일 수 있다. 본원에서 기술되는 바와 같이, 선형의 이분체 DNA로부터 합성을 지시할 수 있는 임의의 프로모터, 예를 들어 T7, SP6 또는 T3 파지 프로모터가 사용될 수 있다.

[0067] 제2 조절 서열은 5' 비해독 영역 (또는 5'UTR)이라 불릴 수 있으며 해독 개시 부위의 상부에 있는 RNA에 상응한다. 임의의 다른 적합한 5'UTR이 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kozak (1983) Microbiol. Rev. 47:1] 참조). 하나의 양태에서, 5'UTR ("TE"라 불림)은 담배 모자이크 바이러스 5' 비해독 영역의 결실 돌연변이체일 수 있으며, 특히 직접적으로 TMV 해독 개시의 5'에 있는 염기에 상응하며; 이러한 UTR의 서열은 rGrGrG rArCrA rArUrU rArCrU rArUrU rUrArC rArArU rUrArC rA (처음 3개의 G 뉴클레오타이드는 전사 증대를 위해 삽입된다)이다.

[0068] 제3 요소는 해독 개시 부위이다. 일반적으로, 이는 AUG 코돈이다. 그러나, AUG 이외의 다른 코돈이 천연-발생 암호화 서열에 사용되는 예가 있으며, 이러한 코돈도 본 발명의 선별 계획에 이용될 수 있다. 이러한 해독 개시 부위는 바람직하게는 "코작 (Kozak)" 서열이라 불리는 적합한 서열 배경 (context)에 존재한다 (예를 들어, 문헌 [Kozak (1983) Microbiol. Rev. 47:1] 참조).

[0069] 제4 요소는 5' 정지 코돈을 포함하는 폴리아데닐화 (폴리 A) 서열일 수 있다. 폴리 A 서열은 핵산 라이브러리 제작물 내의 항체 암호화 서열 다음에 위치될 수 있다. 이러한 서열은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 어떠한 서열이라도 고려된다.

[0070] 3) 추가의 핵산 서열 요소

[0071] 본 발명의 핵산 라이브러리는 항체를 암호화하는 mRNA 전사물에 삽입되는 추가의 서열 요소를 포함할 수 있다. 이들은 비-항체 서열을 포함할 수 있다.

[0072] 하나의 양태에서, 짧은 핵산 서열 또는 "핵산 바코드"가 항체 mRNA 전사물의 비해독부에 삽입될 수 있다. 이들 바코드 서열은 핵산 라이브러리의 각각의 구성원을 구별하거나 상이한 라이브러리를 구별하기 위한 특정 확인자로서 사용될 수 있다. 짧은 핵산 서열은, 바람직하게는 50개 미만 염기, 20개 미만 염기 또는 10개 미만 염기를 포함한다. 하나의 양태에서, 짧은 핵산 서열은 8개 염기를 포함한다.

[0073] 다른 양태에서, 특정 비-항체 아미노산을 암호화하는 핵산 서열 요소가 본 발명의 핵산 라이브러리의 개방 판독 프레임 (ORF)에 삽입됨으로써 암호화된 아미노산 서열이 발현되는 항체에 삽입될 수 있다. 하나의 양태에서, 비-항체 핵산 서열 요소는 링커 영역으로 작용하도록 VH와 VL 영역 사이의 scFv의 ORF로 삽입될 수 있다. 정지 코돈이 결여되는 연속 아미노산 서열을 암호화하는 임의의 핵산 서열이 링커 영역에 대해 고려될 수 있다. 링커 영역의 길이는 50개 미만의 아미노산, 20개 미만의 아미노산 또는 16개 미만의 아미노산이다.

[0074] 또 다른 양태에서, 하나 이상의 에피토크 태그 (예: FLAG 태그)를 암호화하는 핵산 서열 요소가 항체 암호화 서열로 삽입될 수 있다. 이들 서열로 인해 임의의 위치, 예를 들어 N-말단, C-말단 또는 scFv 항체 분자의 VH와 VL 도메인 사이의 링커 영역에 존재하는 에피토프 태그를 갖는 항체를 생성할 수 있다. 하나의 양태에서, 항체 불변 영역 또는 이의 단편을 암호화하는 서열이 본 발명의 핵산 라이브러리의 ORF의 3' 부분에 포함될 수 있다. 이러한 항체 불변 영역 또는 이의 단편은 특정 라이브러리의 모든 구성원들간에 동일하다.

[0075] 다른 양태에서, 특정 비-항체 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열 요소가 벡터에 삽입되어 효소 세포의 표면에 본 발명의 핵산 라이브러리를 특이적으로 발현하는데 이용될 수 있다. 이들 요소는, 이로 제한됨이 없이, 당해 기술 분야에서 공지된 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 이들 요소는 암호화된 아미노산 서열이 발현되는 항체에 삽입되도록 본 발명의 핵산 라이브러리의 ORF에 삽입될 수 있다. 또 다른 양태에서, 이들 요소는 벡터 서열에 삽입될 수는 있으나 본 발명의 핵산 라이브러리의 ORF에는 삽입될 수 없다. 이들 요소는 본 발명에서 핵산 라이브러리의 발현, 안정성, 폴딩 및 에피토프 제시를 도울 수 있다.

[0076] 4) 올리고뉴클레오타이드 프라이머

[0077] 하나의 양상으로, 본 발명은 이의 항체 라이브러리의 합성 및/또는 증폭에 적합한 핵산 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제공한다. 예시적 프라이머는 서열번호 1 내지 13 (표 6)을 포함한다.

[0078] 또 다른 양상으로, 본 발명은 이의 라이브러리로부터 생성되는 mRNA의 역전사에 적합한 핵산 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제공한다 (표 3). 예시적 프라이머는 서열번호 14 내지 16 (표 3)를 포함한다.

[0079] 또 다른 양상으로, 본 발명은 라이브러리 또는 이의 선별 산출물에서 VH CDR3 크기 분포에 대한 스펙트라이핑 PCR 분석에 적합한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제공한다 (표 4). 스펙트라이핑은 항체 라이브러리 다양성 및 선별 진행을 평가하기에 유용한 수단일 수 있다. 예시적인 스펙트라이핑 PCR 프라이머는 서열번호 17 및 18을 포함한다.

[0080] 5) 핵산의 펩타이드 수용체와의 연결

[0081] 일 양태에서, 본 발명의 항체 핵산 라이브러리는 펩타이드 수용체 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 이는 핵

산 발현 라이브러리의 각 구성원의 이들의 동족체 (cognate) 단백질 생성물들의 공유적 부착을 용이하게 한다. 펩타이드 수용체의 핵산에의 부착에 대한 당해 기술 분야에 공지된 모든 수단이 고려된다.

[0082] 하나의 양상으로, 본 발명은 펩타이드 수용체를 핵산 라이브러리에 부착하기 위한 신규한 방법 및 조성물을 제공한다. 하나의 양태에서, 소랄렌 C6 분자 및 펩타이드 수용체 분자를 포함하는 연결 분자가 합성될 수 있으며, 이때 소랄렌 C6 분자 및 펩타이드 수용체 분자는 핵산 서열에 융합될 수 있고, 핵산 서열은 핵산 라이브러리의 3' 말단에 있는 서열에 상보적일 수 있다. 이러한 연결 분자는 상보적 염기 짝지음을 통해 핵산 라이브러리 클론의 3' 말단에 결합될 수 있다. 소랄렌 C6은 자외선 (UV)에 민감하고, 핵산 라이브러리 클론에 링커를 가교결합시켜 펩타이드 수용체를 핵산 라이브러리 클론에 공유적으로 연결할 것이다. 또 다른 양태에서, 링커 분자의 핵산 부분은 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어 2' 메톡시 (2'OMe) 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 링커 분자는 소랄렌 C6 분자 및 펩타이드 수용체 분자를 포함하는 핵산 영역을 분리시키는 트리에틸렌 글리콜 또는 PEG-150을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 링커는 5' (소랄렌 C6) 2'OMe(U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (퓨로마이신) 3' (여기서, X는 트리에틸렌 글리콜 또는 PEG-150이고, CC는 표준 DNA 골격이다)일 수 있다. 하나의 양태에서, 이러한 링커는, 예를 들어 TriLink BioTechnologies, Inc (San Diego, CA)에 의해 주문-합성된다.

[0083] IV. 스펙트라타이핑 방법

[0084] 스펙트라타이핑 분석은, 항원 수용체 길이 다양성이 기능적 다양성에 대한 대행자로서 평가되는, 임상적 및 기본적인 면역학적 세팅에 이용되는 방법이다 [참조: Cochet, M., et al. (1992) *Eur. J. Immunol.*, 22:2639-2647; Pannetier, C., et al. (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:4319-4323; Pannetier, C., et al. (1997) In Austin, O.J.R. (Ed.). *The Antigen T Cell Receptor: Selected Protocols and Applications*, TX Landes, pp. 287-325]. 스펙트라타이핑 검정은, 예를 들어 피험자의 말초혈 샘플로부터 분리되는 CD4 또는 CD8 T 세포를 사용할 수 있으며, 다른 경우에는 전체 CD3 또는 PBMC 세포가 사용된다.

[0085] 본 발명에서, PCR은 CDR3 길이에 기초하여 항체를 암호화하는 유전자 서열을 분석하기 위해 다양한 길이의 영역 (CDR3)을 특이적으로 복제하는데 이용될 수 있다. CDR3 길이 분포의 변화는 항체 레퍼토리의 변화와 관련된다. 일부 양태에서, 본 발명의 실시예에서 제작되는 개별 라이브러리에 특이적인 프라이머는 각 라이브러리에 대한 독립적인 스펙트라타이핑을 제공하는데 사용될 수 있다. 하나의 바람직한 양태에서, 각각 VH의 프레임워크 3 영역 및 J 영역에 어닐링되는 형광 염료-표지된 5' 정방향 프라이머 (6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5'-GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', 서열번호 17) 및 역방향 프라이머 (PanJH-Rev, 5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3', 서열번호 18)가 PCR에 의해 VH 도메인의 CDR3 영역에 걸쳐 증폭하는데 사용될 수 있다. 다른 양태에서, 항체 라이브러리를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 상의 동일한 영역 또는 다른 영역에 특이적으로 어닐링하는 당해 기술 분야에 공지된 다른 프라이머가 사용될 수 있다. 바람직한 양태에서, CDR3 레플리콘의 생성 혼합물은 전기영동에 의해 크기-분리되고 밀도측정에 의해 정량될 수 있다. 다른 양태에서, 당해 기술 분야에 공지된 다른 방법이 생성된 CDR3 레플리콘을 특징분석하는데 이용될 수 있다.

[0086] 하나의 바람직한 양태에서, 상이한 VH 계열들 중에서 CDR3 크기 분포의 스펙트라타이핑 분석이 VH cDNA 단편 상에서 수행될 수 있다. 하나의 양태에서, 예시적 VH 계열은 단일 생식계열로부터 또는 VH1-46, VH2, VH5, 및 VH6과 같은 상이한 VH 계열로부터 획득될 수 있다. 하나의 바람직한 양태에서, 스펙트라타이핑을 위한 주형은, 예를 들어 사람 림프절 라이브러리, 효모 비장 라이브러리, 나이브 (naive) 사람 림프관 라이브러리, 사람 PBMC 카파 라이브러리, VH-V λ scFv 라이브러리, VH-V κ scFv 라이브러리로부터 선택될 수 있다. 다른 양태에서, 스펙트라타이핑을 위한 주형은 다른 라이브러리로부터 선택될 수 있다.

[0087] V. 일반적 스크리닝 방법

[0088] 하나의 양상으로, 본 발명은 목적하는 표적물에 결합할 수 있는 항체를 확인하기 위해 본 발명의 발현 라이브러리를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 표적 분자에 대한 항체 결합에 기초하여 발현 라이브러리로부터 항체의 선별을 가능하게 하는 모든 시험관내 또는 생체내 스크리닝 방법이 고려된다.

[0089] 하나의 양태에서, 본 발명의 발현 라이브러리는 당해 기술 분야에서 공지된 시험관내 세포-비함유 표현형-유전형 연결된 디스플레이를 이용하여 스크리닝될 수 있다. 이러한 방법은 당해 기술 분야에 널리 공지되어

있으며, 예를 들어 문헌 [참조: 미국특허 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; 및 6,348,315]에 기술되어 있다. 이들 방법은, 단백질이 기원하는 핵산에 물리적으로 화합되거나 결합되도록, 핵산으로부터 단백질의 시험관내 전사를 수반한다. 발현된 단백질을 표적 분자를 사용하여 선별함으로써 단백질을 암호화하는 핵산도 선별될 수 있다.

[0090] scFv 단백질의 발현을 개선하기 위해서, 상기 참조된 시험관내 스크리닝 검정은 특정 시약의 추가 또는 제거를 필요로 할 수 있다. 하나의 양태에서, 단백질 디설파이드 이소머라제 효소가 기능성 scFv 분자의 생성을 개선하기 위해 시험관내 발현 시스템에 추가될 수 있다. 또 다른 양태에서, 약한 산화제 (예: GSSG (산화된 글루타티온) /GSH (환원된 글루타티온), 예를 들어 100mM GSSG /10mM GSH)가, scFv 분자의 VH 및 VL 영역에서 쇠내 디설파이드 결합을 가능하게 하도록, scFv 단백질의 시험관내 해독 반응 혼합물에 첨가될 수 있다. 또 다른 양태에서, 환원제 (예를 들어, 디티오프레이톨 (DTT))가 scFv의 시험관내 해독 반응 혼합물로부터 제거될 수 있다.

[0091] 또 다른 양태에서, 하나 이상의 표지된 아미노산 또는 이의 유도체가, 표지된 아미노산(들)이 생성된 항체에 삽입되도록, 시험관내 해독 시스템에 가해질 수 있다. 방사성-표지된 아미노산, 예를 들어 ³⁵S-표지된 메티오닌 또는 시스테인과 같은 당해 기술 분야에서 공지된 표지된 아미노산이 고려된다.

[0092] 하나의 양태에서, 본 발명의 시험관내 스크리닝 검정은, 항체 또는 다수의 항체의 시험관내 선별 후, 항체 또는 다수의 항체와 물리적으로 화합된 mRNA가 상기 항체 또는 다수의 항체를 암호화하는 cDNA를 생성하도록 역전사될 수 있어야 한다. 효소 매개되는, 예를 들어 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 역전사효소에 의해 매개되는 것과 같은 역전사에 대한 모든 적합한 방법이 고려된다.

[0093] 본 발명에서 이용되는 스크리닝 방법은 목적하는 표적물에 특이적으로 결합하는 항체를 암호화하는 핵산의 증폭을 필요로 할 수 있다. 하나의 양태에서, 항체 또는 다수의 항체와 물리적으로 화합하는 mRNA가 더욱 많은 mRNA를 생성하도록 증폭될 수 있다. RNA 레플리카제 효소를 사용하는 것과 같은 당해 기술 분야에서 알려진 모든 RNA 복제가 고려된다. 또 다른 양태에서, 항체 또는 다수의 항체와 물리적으로 화합되는 mRNA는 PCR에 의해 증폭되기 전에 먼저 cDNA로 역전사된다. 하나의 양태에서, PCR 증폭은 높은 정확도의 고정 폴리머라제, 예를 들어 씨모코커스 코다카라엔시스 (*Thermococcus kodakaraensis*)로부터의 KOD1 열안정성 DNA 폴리머라제 또는 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity: Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 달성된다. 하나의 양태에서, PCR 증폭은 증폭된 DNA로 돌연변이가 도입되는 조건 하에서, 즉 오류 발생이 쉬운 PCR로 수행될 수 있다.

[0094] 또한, 본 발명에서 이용되는 스크리닝 방법은, 표적물에 대해 개선된 친화도를 갖는 항체를 선별하기 위해 표적물-결합 검정의 엄격함을 증가시키는 것을 필요로 할 수 있다. 항체-표적물 상호작용 검정의 엄격함을 증가시키는 것에 대한 당해 기술 분야에서 공지된 모든 방법이 고려된다. 하나의 양태에서, 목적하는 표적물에 대한 항체 분자의 친화성을 감소시키기 위해 하나 이상의 검정 조건 (예: 검정 완충액의 염 농도)을 변화시킬 수 있다. 또 다른 양태에서, 항체가 목적하는 표적물에 결합하는 것을 허용하는 시간 길이를 줄일 수 있다. 또 다른 양태에서, 경쟁적 결합 단계를 항체-표적물 상호작용 검정에 추가할 수 있다. 예를 들어, 먼저 항체가 목적하는 고정된 표적물에 결합하도록 할 수 있다. 이어서, 항체에 대해 가장 낮은 친화도를 갖는 항체가 고정된 표적물로부터 용출되어 개선된 항원 결합 친화도를 갖는 항체가 농축되도록 고정된 표적물과 결합에 대해 경쟁하는 특정 농도의 비-고정된 표적물이 가해질 수 있다. 하나의 양태에서, 검정 조건의 엄격함은 검정에 추가되는 비-고정된 표적물의 농도를 증가시킴으로써 더욱 증가될 수 있다.

[0095] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은 개선된 표적물 결합을 갖는 하나 이상의 항체가 농축되도록 다수의 선별 라운드를 필요로 할 수 있다. 하나의 양태에서, 각 라운드의 선별에서, 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 추가의 아미노산 돌연변이가 항체로 도입될 수 있다. 또 다른 양태에서, 목적하는 표적물에 대해 증가된 친화성을 갖는 항체를 선별하기 위해 각 라운드의 선별에서 목적하는 표적물에 대한 결합의 엄격성이 증가될 수 있다.

[0096] 본 발명의 스크리닝 방법은 시험관내 해독 시스템의 성분으로부터 RNA-항체 융합 단백질의 정제를 필요로 할 수 있다. 이는 당해 기술 분야의 공지된 분리 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 하나의 양태에서, RNA-항체 융합 단백질은 폴리데옥시티미딘 (polydT) 수지를 사용하는 크로마토그래피를 이용하여 분리될 수 있다. 또 다른 양태에서, RNA-항체 융합 단백질은 RNA-항체 융합 단백질의 항체 성분에 존재하는 에피토프에 특이적인 항체를 사

용하는 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. 하나의 양태에서, 에피토프는, 예를 들어 N-말단에서, C-말단에서 또는 가변 영역간 링커에서 RNA-항체 융합 단백질의 항체 성분의 아미노산 서열에 도입되는, 아미노산 서열 태그, 예를 들어 FLAG 또는 TA 태그일 수 있다.

[0097] 본 발명의 라이브러리로부터의 항체 선별은 고정된 표적 분자의 사용을 필요로 할 수 있다. 하나의 양태에서, 표적 분자는 고체 기질, 예를 들어 아가로즈 비드에 직접적으로 연결될 수 있다. 또 다른 양태에서, 표적 분자는 먼저 변형, 예를 들어 바이오티닐화될 수 있으며, 변형된 표적 분자는 고체 지지체, 예를 들어 스트렙타비딘-M280, 뉴트라비딘-M280, SA-M270, NA-M270, SA-MyOne, NA-MyOne, SA-아가로즈 및 NA-아가로즈에 변형을 통해 결합될 수 있다.

[0098] 본 발명은 비제한적인 하기 실시예에 의해 더욱 설명된다.

[0099] 본 발명의 예시

[0100] 실시예에서는, 달리 언급되지 않는 한, 하기 재료 및 방법이 이용된다.

[0101] 재료 및 방법

[0102] 일반적으로, 본 발명의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 화학, 분자 생물학, 제조합 DNA 기술, 면역학 (특히, 예를 들어 면역글로블린 기술), 및 축산에 대한 통상의 기술을 이용한다 [참조: Sambrook, Fritsch and 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 *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992)].

[0103] 실시예 1

[0104] scFv 분자를 위한 mRNA 디스플레이 프로토콜

[0105] mRNA 디스플레이는 도 2에 제시된 방법에 따라 수행될 수 있다. 이 방법의 특정 양태가 하기에서 더욱 상세히 기술된다. 이들 양태는 본 발명의 방법을 설명하기 위한 것으로서 제한하는 것으로 간주되지 말아야 한다.

[0106] 1. 항체 라이브러리 주형의 디자인

[0107] 라이브러리 DNA 제작물이 도 3에 도시된 다이어그램에 따라 디자인된다. 이본쇄 DNA 제작물은 일반적으로 5'로부터 3'말단까지 하기 기능 요소를 포함한다. T7 프로모터는 시험관내 RNA 전사에 적합할 수 있다. TMV-UTR (담배 모자이크 바이러스 비해독 영역)은 시험관내 단백질 해독에 유용할 수 있다. 임의의 태그는 각각의 라이브러리에 대해 고유한 8개 염기쌍을 포함하며, 이는 지정된 라이브러리에 속하는 제작물을 확인하는데 유용할 수 있다. 코작 컨센서스 서열은 단백질 해독 개시를 용이하게 한다. 목적하는 항체 라이브러리는 scFv, VH, 또는 VL를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 항체 라이브러리는 scFv를 암호화한다. 하나의 양태에서, 모든 항체 라이브러리의 3' 말단에서 비가변적인 부분적 항체 불변 영역 서열도 또한 포함한다. 일부 양태에서, 제작물은 친화성 정제에 유용한 FLAG 태그를 포함한다. 다른 양태에서, 제작물은 어닐링 부위를 구성하는 링커 어닐링 서열을 포함하며, 이때 소랄렌 및 퓨로마이신 변형된 DNA 올리고뉴클레오타이드 링커는 프로토콜의 후속 단계에서 제작물에 가교결합될 수 있다. 하나의 양태에서, 5' 정지 코돈과 함께 폴리아데닐화 서열이 mRNA 안정성 및 올리고-dT 셀룰로즈 배치 정제를 통한 정제에 유용할 수 있다.

[0108] 2. 표적 항원의 제조

[0109] 일반적으로, mRNA 디스플레이 항체 라이브러리가 바이오티닐화된 항원에 대해 선별될 수 있다. 각각의 표적물에 대한 최적 항원은 사건별로 결정되어야 하지만, 하기 사항을 일반적 지침으로서 이용할 수 있다. 표적물 항

원은 전형적으로 널리 특징분석되어 있으며, 다형태 (SNP 및 일배체형) 및/또는 약리유전학 분석에 의해 측정시, 관련되거나 우성적인 유전적 이소타입이다. 표적물 항원은 추가적으로 (천연 항원에 견줄 수 있는) 적당한 생물활성, 우수한 용해도 및 우수한 화학 및 물리적 특성을 가질 수 있으며, 라이브러리 선별 또는 스크리닝 및 다운스트림 생물검정을 위해 충분한 양으로 제조될 수 있다. 라이브러리 선별에 유용한 표적 항원의 예시적 양이 하기 표 1에 나타나 있다.

표 1

[0110]

라이브러리 선별에 필요한 표적 항원의 양

기술	사람 항체 scFv 라이브러리의 선택	(라이브러리의 수에 의해 배가될) 항원 요건	일시적 항원 요건	결과물 (Deliverables)
		각 라이브러리 선별용	각 라이브러리 산출물 스크리닝용	
PROfusion mRNA 디스플레이	2 PBMC (κ/λ) 2 비장 (κ/λ) 2 림프절 (κ/λ)	1 nmole 바이오티닐화	2.5 nmole 바이오티닐화	2 nmole 바이오티닐화
효모 디스플레이	2 PBMC (κ/λ) 1 비장 (κ) 1 림프절 (κ)	6.5 nmole (바람직하게는 바이오티닐화)	3 nmole 바이오티닐화	3 nmole 바이오티닐화
				LO를 필요로 할 것 같은 생물활성 IgG 후보물

[0111]

3. 라이브러리 DNA의 제조

[0112]

라이브러리 DNA 및 이의 선별 산출물은 PCR로 증폭될 수 있다. 라이브러리 증폭을 위한 예시적 프라이머가 표 2에 나타나 있다.

표 2

라이브러리 증폭용 프라이머

프라이머	증폭	서열
5' 정방향 프라이머		
T7TMVUTR (서열번호 1)	모든 scFv 및 VH 라이브러리	TAATACGACTCACTATAGGGACAATT ACTATTTACAATTACA
VL-T7TMVTag3GS-Fwd ^a (서열번호 2)	V κ 및 V λ PBMC 라이브러리	TAATACGACTCACTATAGGGACAATT ACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACC ATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
3' 역방향 프라이머		
CK5FLAGA20 Rev (서열번호 7)	모든 κ scFv 및 V κ 라이브러리	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAG TCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA
CL5FLAGA20 Rev (서열번호 12)	모든 λ scFv 및 V λ 라이브러리	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAG TCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG
VH-GSFLAGA20-Rev ^a (서열번호 13)	사람 PBMC로부터의 VH 라이브러리	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCTTTGTCATCATCATCTTTATAA TCGCTACCTCCGCCGCCAGAC

[0113]

[0114]

PCR 증폭은 당해 기술 분야에서 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다. PCR 반응은 전형적으로 DNA 주형, 반응 완충액, dNTP, 증폭에 사용되는 프라이머, DNA 폴리머라제 및 물을 포함한다. 마스터 믹스로부터 증가되고 증폭된 DNA 생성물까지의 다수의 반응관이 동시에 준비된다. 25 사이클의 PCR이 통상적으로 충분한 증폭을 제공한다, 35 사이클과 같이 많은 사이클도 보다 많은 생성물을 얻는데 이용될 수 있다.

[0115] 4. 라이브러리 DNA 정제

[0116] 상기 PCR로부터의 생성물이 정확한 크기 (scFv에 대해 약 850 bp, VH 또는 VL 라이브러리에 대해 약 500 bp)이고 최소한의 비-특이적 생성물을 포함한다면, 이들은 직접적으로 전사 반응에 사용될 수 있다. 달리, 생성물은 겔 정제될 수 있다. 겔 정제가 PCR 생성물에 대해 수행되는 경우, 생성물은 제조용 (preparative) 아가로스 겔에서 분리될 수 있고, PCR 생성물을 포함하는 특정 밴드가 절단될 수 있다. 이어서, DNA는 당해 기술 분야에 공지된 표준 방법을 이용하여 겔 추출에 의해 밴드로부터 정제되며, 이의 농도는 분광광도계로 측정된다.

[0117] 5. RNA 전사

[0118] 라이브러리 DNA로부터 RNA 전사는 당해 기술 분야에 공지된 표준 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 모든 라이브러리 다양성을 샘플링하도록 충분한 DNA 주형 전사를 위해 큰 반응 용적이 이용될 수 있다. 예시적 양태에서, 1×10^{13} 카피의 라이브러리 주형이 RNA 전사 반응에 사용될 수 있다. RNA 전사 반응물은 전형적으로 5 내지 10 μ g의 PCR 생성물, 반응 완충액, ATP, CTP, GTP, UTP, 및 T7 RNA 폴리머라제를 포함한다. RNA 전사 반응은 2시간 내지 밤새 동안 37°C에서 수행될 수 있다. 초기 라운드의 선별 후, 더욱 짧은 시간이 이용될 수 있다. RNA 전사 후, DNA 주형은 DNase I을 사용하여 반응 혼합물로부터 제거될 수 있다.

[0119] 6. NAP 컬럼 크로마토그래피에 의한 RNA 정제

[0120] RNA 전사 후, RNA를 NAP-10 컬럼 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)을 사용하여 분획화시킬 수 있다. 1 mL 이하의 전사 반응물을 RNA 정제를 위해 NAP-10 컬럼에 로딩할 수 있다. 컬럼을 분획화하기 전에 디에틸피로카보네이트 (DEPC)-처리된 dH₂O를 사용하여 평형화시킬 수 있다. 총 용출 용적은 전사 반응 용적의 150% 미만이어야 한다. RNA는 NAP-25 컬럼 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)을 사용하여 추가로 또는 대안적으로 분획화될 수 있다.

[0121] 7. RNA 정성 조절 및 정량화

[0122] RNA 샘플의 크기 및 수율은 겔 전기영동을 이용하여 모니터링될 수 있다. RNA 수율은 전형적으로 최대 약 20 nmol/mL 전사 반응물에 달한다.

[0123] 8. 링커에의 RNA 연결

[0124] 3' 말단에 펩타이드 수용체 분자를 포함하는 DNA 링커를 각 RNA 분자의 3' 말단에 공유적으로 연결시킬 수 있다. 리보솜 A 부위에 진입하고 신생 폴리펩타이드 쇄의 카복실 말단에 공유적으로 커플링될 수 있는 펩타이드 수용체는 궁극적으로 mRNA (유전형)의 이러한 mRNA에 의해 암호화되는 단백질 (표현형)로의 공유적 화합을 가능하게 할 것이다. 예시적 PEG6/10 링커는 하기 서열식을 갖는다:

[0125] 5' (소탈렌 C6) 2'OMe(U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (퓨로마이신) 3'.

[0126] 소탈렌 C6 5' 변형은 감광성이며, UV 가교에 의해 링커와 mRNA 사이에 공유 결합을 형성하도록 작용한다. 2'OMe (U AGC GGA UGC) 골격 영역은 mRNA 상의 FLAG 서열에 대한 링커 어닐링 부위 3'에 어닐링한다(도 1 참조). 상기 서열에서, X는 트리에틸렌 글리콜 또는 PEG-150으로도 알려진 "스페이서 9"를 나타낸다. 이러한 스페이서는 진핵세포 리보솜 A 부위로의 퓨로마이신 삽입을 위한 유연성을 제공하도록 최적화되었다. CC는 표준 DNA 골격을 포함한다. 링커와 신생 펩타이드간의 안정한 연결을 위해 퓨로마이신 3' 변형을 리보솜 A 부위에 삽입한다. 본원에 기술된 링커에 대한 흡광 계수는 $147.7 \text{ OD}_{260} / \mu\text{mole}$ 이다. 이러한 링커는 감광성이므로, 이러한 링커를 포함하는 용액은 광으로부터 보호되어야 한다.

[0127] 라이브러리 선별의 초기 라운드에 대해서는, 라이브러리 전체 다양성을 샘플링하기 위해서 대규모 결합 반응 (3.1×10^{15} 전사된 RNA 분자)이 권장된다. 이러한 RNA 양은 충분한 주형이 해독 반응에 투입되고 약 10 pmol

의 기능성 mRNA 디스플레이 분자를 생성하는 것을 확실하게 할 수 있다. 후기 라운드에서 RNA 투입은 0.5 nmol/선별로 감소될 수 있다. 예시적 양태에서, RNA 결합 반응은 하기 성분들을 포함할 수 있다: RNA, 물, 화학적 결합 완충액 및 PEG6/퓨로마이신 링커 (1 mM). 예시적 양태에서, 총 반응 용적은 100 μ L이다. 바람직한 양태에서, 링커/RNA 몰비는 1.5를 초과할 수 있다. 하나의 양태에서, 반응 혼합물 중 최종 링커 농도는 약 15 μ M이고, 반응물 중 RNA 농도는 약 3 내지 10 μ M (= 0.3 내지 1 nmol RNA 투입)일 수 있다. 참조로서, 1 mg/mL에서 850 nt scFv RNA는 3.56 μ M이며, 달성가능한 최대 결합 농도는 3.16 μ M (=0.32 nmol)이다.

[0128] (전사된 RNA에 링커를 어닐링하는) 어닐링 반응은 열 사이클러에서 수행될 수 있다. 바람직한 양태에서, 어닐링 반응은 샘플을 약 0.3°C/sec의 램프 속도로 30초 동안 약 85°C에서, 이어서 약 4°C에서 항온처리함으로써 수행될 수 있다. 이어서, 반응은 4°C로 유지될 수 있다.

[0129] 어닐링된 링커/RNA의 결합은 UV 가교결합에 의해 달성될 수 있다. 이는 당업자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 하나의 양태에서, 반응관을 소형 UV 램프(긴 파장, 약 365 nm) 센터 위에 놓고 약 15분 동안 가교결합시킬 수 있다. 냉동 팩을 램프 상단에 놓아 UV 조사 동안 발생하는 열을 발산되게 할 수 있다. 전형적인 결합 효율은 약 50 내지 90%이고, 정제는 통상 필요하지 않다. 결합 생성물은 -80°C에서 저장될 수 있다.

[0130] 9. 해독 반응

[0131] 예시적 양태에서, 모든 반응 및 정제 후 약 0.1%의 투입 RNA가 mRNA 디스플레이 분자로 제조될 수 있다. 시험 관내 해독은 당업자에게 공지된 방법 및 시약을 이용하여 수행될 수 있다. 하나의 양태에서, scFv 라이브러리를 사용하는 해독 반응은 약 15 mL의 반응 용적 중 약 10 mL의 망상적혈구 용해물과 함께 약 5 nmol의 RNA 주형을 사용할 수 있다.

[0132] 해독 반응 준비시, GSSG/GSH (산화된 글루타티온/환원된 글루타티온) 용액을 약 100 mM GSSG/10 mM GSH의 최종 농도로 제조할 수 있다. PDI (단백질 디설파이드 이소머라제)는 약 1 Unit/ μ L의 농도가 되도록 PDI 분말을 dH₂O에 용해시킴으로써 제조될 수 있다. PDI 용액은 -20°C에서 저장될 수 있다.

[0133] 예시적 해독 반응물은 하기와 같이 설정될 수 있다:

RNA (100 pmol)	X	X μ L
dH ₂ O	73.7까지	370 μ L까지
아미노산 마스터 믹스 (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]메티오닌	2	10 μ L
망상적혈구 용해물	200	1000 μ L

총 용적	300	1500 μ L

[0134]

[0135] 해독 반응물은 1 내지 2시간 동안 30°C 수조에서 항온처리된다. 해독 용적이 1.5 mL를 초과하는 경우, RNA/단백질 융합 수율에 상당한 감소가 관측되었다. 따라서, 반응 용적이 1.5 mL보다 클 경우, 반응 용적을 보다 적은 분취물로서 나누기 전에 해독 반응물의 마스터 믹스가 제조될 수 있다.

[0136] 10. RNA/단백질 융합물 형성

[0137] 해독 반응 후, 해독 반응 혼합물 300 μ L 마다 약 100 μ L 2M KCl 및 약 20 μ L 1M MgCl₂를 가하고, 실온에서 1 시간 동안 항온처리할 수 있다. 이는 mRNA 주형의 말단에 있는 정지된 리보솜을 안정화하고, DNA 링커의 말단에 있는 퓨로마이신이 정지된 리보솜의 A 부위로 들어가게 하며, 이는 해독된 scFv 단백질을 이들의 mRNA 주형에 영구적으로 연결한다. 반응물이 밤새 약 -20°C에서 저장되는 경우, 실온 항온처리는 단축될 수 있다. 리보솜을 붕괴시키기 위해 50 μ L 0.5 M EDTA를 가함으로써 반응을 종결시킬 수 있다. 반응물은 -20°C에서 저장될 수 있다. 5 μ L 분취물을 이후에 선허 계수를 위해 덜어낼 수 있다.

[0138] 11. 올리고-dT 셀룰로즈에 의한 RNA/단백질 융합물 정제

[0139] 이 단계는 해독/융합 반응으로부터 mRNA 디스플레이 분자 및 잔여 RNA 주형을 정제한다. 올리고-dT 결합을 위해, 모든 RNA 주형을 포착하는데 필요한 사전-세척된 올리고-dT 셀룰로즈의 양을 평가할 수 있다. 충분한 용적의 올리고-dT 결합 완충액을 약 1x 최종 농도가 되도록 융합 반응물에 가하였다. 이어서, 사전-세척된 올리고-dT 셀룰로즈를 가하고, 반응을 4℃에서 1시간 동안 수행하였다. 반응물을 임의로 4℃에서 5분 동안 약 1500 rpm으로 스핀 다운할 수 있으며, 상청액을 버린다. 올리고-dT 셀룰로즈 비드를 옮기고 스핀 컬럼을 사용하여 1x 올리고-dT 결합 완충액으로 약 6회 세척할 수 있으며, 완충액은 전형적으로 10초 동안 약 1000 rpm에서 컬럼을 회전시킴으로써 제거할 수 있다. 관류액 (flow-through)은 버릴 수 있으나, 마지막 세척물은 섬광 계수를 위해 보존할 수 있다. mRNA 디스플레이 분자 (및 유리 RNA 주형)는 dH₂O를 비드에 가하고 실온에서 5분 동안 향온처리함으로써 용출시킬 수 있다. 용출물은 20초 동안 약 4000 rpm으로 회전시킴으로써 수집할 수 있다. 용출은 전형적으로 1회 반복될 수 있고, 용출물은 합쳐질 수 있다. 5 μL의 용출물을 섬광 계수를 위해 덜어낼 수 있다. 또한, 올리고-dT의 효율은 NanoDrop 분광광도계 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)로 260 nm (OD₂₆₀)에서 OD에 의해 평가될 수 있다. 모든 잔여 RNA 주형 및 mRNA 디스플레이 분자가 올리고-dT 비드에 의해 이론적으로 회수된다. 5x FLAG 결합 완충액을 약 1x 최종 농도가 되도록 용출물에 가할 수 있다. 다음 FLAG 정제 단계로 진행하지 않는 경우, 샘플을 -80℃에서 저장할 수 있다.

[0140] 올리고-dT 회수는 하기와 같이 계산될 수 있다. 약 5 μL의 (융합 반응물로부터) 투입물, 100 μL의 마지막 세척물 및 5 μL의 산출물 (올리고-dT 정제로부터의 용출물)을 계수한다. 마지막 세척물은 세척 정도를 평가하는데 사용되고, 나머지 2개의 카운트는 최초 RNA 주형 투입물로부터 RNA/단백질 융합물 회수율을 계산하는데 사용된다. RNA/단백질 융합물 회수율 (pmol)=(CPM_{산출물} x 용적_{산출물} x 5 μM x 용적_{용해물})/(CPM_{투입물} x 용적_{투입물} x (생성물 중 메티오닌의 수)). 이 수학적식은 망상적혈구 용해물 중 메티오닌 농도를 5 μM로 추정하며, 계산에 사용된 모든 용적은 μL로서 표현된다. 초기 라운드의 선별에 대해서 mRNA 디스플레이 분자의 수율은 전형적으로 0.5 내지 2%이나, 후기 라운드에서는 10%로 증가될 수 있다.

[0141] 12. 항-FLAG M2 아가로즈에 의한 RNA/단백질 융합물 정제

[0142] 이 단계는 잔여 RNA 주형으로부터 mRNA 디스플레이 분자를 정제한다. 모든 mRNA 디스플레이 분자를 포착하는데 필요한 사전-세척된 항-FLAG M2 아가로즈 비드의 양을 평가할 수 있다. 하나의 양태에서, 비드의 결합 용량은 50% 슬러리 mL 당 약 6 nmol 융합 단백질이다. 결합 및 세척 동안 조작에 충분한 비드 용적을 갖기 위해서, 200 μL 미만의 사전-세척된 비드를 사용하는 것은 권장되지 않는다. 하기 제시된 예는 초기 300 μL 해독 반응을 위한 것이다.

[0143] FLAG 정제를 위해, 구멍이 넓은 피펫 팁을 사용하여 300 μL의 사전-세척된 항-FLAG M2 아가로즈를 올리고-dT 정제된 산출물로 옮길 수 있다. 혼합물을 혼합한 후, 4℃에서 1시간 동안 회전시키면서 향온처리할 수 있다. 항-FLAG M2 아가로즈와의 향온처리는 밤새 계속할 수 있다. 항-FLAG M2 아가로즈는 임의로 4℃에서 1분 동안 원심분리기에서 약 1500 rpm으로 회전시킬 수 있으며, 상청액은 버릴 수 있다. 항-FLAG 비드는 각각의 세척물에 대해 약 10초 동안 약 1000 rpm에서 스핀 컬럼 및 원심분리를 이용하여 1x FLAG 결합 완충액으로 약 5회 세척할 수 있다. 관류액은 버릴 수 있다. 비드를 추가로 10초 동안 약 1000 rpm에서 원심분리에 의해 700 μL 선별 완충액 (하기 참조)으로 2회 세척할 수 있다. 마지막 세척물은 섬광 계수를 위해 보존할 수 있다. mRNA 디스플레이 분자는 약 400 μL의 100 μg/mL FLAG 펩타이드 (선별 완충액 중)를 가하고 실온에서 5분 동안 향온처리함으로써 용출될 수 있다. 용출물은 20초 동안 약 3000 rpm으로 회전시킴으로써 수집되고, 약 400 μL 100 μg/mL FLAG 펩타이드를 가함으로써 한번 더 용출될 수 있다. 2개의 용출물 모두를 배합할 수 있으며, 5 μL의 배합한 용출물을 섬광 계수를 위해 덜어낼 수 있다. 이러한 용적의 FLAG 펩타이드는 전형적으로 약 1 mL 이하의 50% 슬러리 용출에 충분하며, 보다 적은 슬러리가 사용되고/되거나 보다 높은 RNA/단백질 융합물 농도가 바람직한 경우에는 절반 (200 μL)으로 낮출 수 있다. 저장 및 항원 선별 동안 RNA 분해를 방지하기 위해서, 당해 기술 분야에서 공지된 RNase 억제제 적당량 (즉, 1 내지 2 U/μL RNaseOUT 및 0.02 μg/mL 효모 tRNA)을 정제된 mRNA 디스플레이 라이브러리에 가할 수 있다. 이어지는 항원 선별 단계를 진행하지 않는 경우 샘플을 -80℃에서 저장한다.

[0144] FLAG 회수율을 정량하기 위해서, 약 5 μ L의 용출 산출물 및 약 100 μ L의 마지막 세척물을 베타 카운터에서 계수할 수 있다. 10 내지 30% 또는 그 이상의 회수율이 예상될 수 있으며, 하기 수학적식에 따라 계산될 수 있다:

[0145] PROfusion 분자 회수율 % = $(\text{CPM}_{\text{산출물}} \times \text{용적}_{\text{산출물}}) / (\text{CPM}_{\text{투입물}} \times \text{용적}_{\text{투입물}})$.

[0146] 13. 바이오티닐화 항원에 의한 라이브러리 선별

[0147] 선별은 목적하는 표적물에 특이적으로 결합하는 분자를 농축시키도록 디자인된다. 네거티브 선별 (사전-제거: pre-clear)은 비-특이적 매트릭스 결합체를 제거하는데 필요할 수 있다. 선별 프로토콜은 표적물 포맷에 따라 달라진다. 하기는 바이오티닐화 표적물과 함께 이용하기 위한 예시적 선별 프로토콜이다. 이 프로토콜은 다른 포맷의 표적 항원을 수용하도록 변형될 수 있으며, 목적하는 산출물에 따라 규모가 커지거나 작아질 수 있다.

[0148] A. 선별 전 준비

[0149] 스트렙타비딘 (SA) 자성 비드가 포착에 사용될 수 있으며, 전형적으로 사용 전에 사전-차단된다. SA 비드는 최초 병으로부터 1.5 내지 2 mL 관으로 옮겨질 수 있으며, 2 mL의 1x FLAG 결합 완충액으로 2회 세척될 수 있다. 이어서, 비드는 회전과 함께 4°C에서 2시간 내지 밤새 동안 2 mL의 선별 완충액으로 차단될 수 있다. 사전-제거 및 선별 포착 모두를 위해 충분한 비드가 제조되어야 한다. 사전-차단된 비드는 4°C에서 저장된다. 약 100 μ L의 비드가 전형적으로 10 pmol의 바이오티닐화된 항원마다 사용된다.

[0150] 1.5 mL 또는 2 mL 마이크로튜브 관을 약 1시간 내지 밤새 동안 1x FLAG 결합 완충액으로 사전-차단한다. 사전-차단된 관은 모든 사전-제거 및 선별 단계에 대해 사용될 수 있다. 전형적으로, 4개의 관이 각 샘플에 대해 필요하다: 사전-제거에 2개, 비드에 1개 및 선별에 1개.

[0151] 최적 결과는 라이브러리를 사전-제거함으로써 수득될 수 있다. FLAG-정제된 mRNA 디스플레이 라이브러리가 (완충액으로부터 분리된) SA 비드에 가해질 수 있다. SA 비드의 용적은 포착 용적의 절반에 상응할 수 있다. 자석을 사용하여 SA 비드로부터 사전-제거 mRNA 디스플레이 라이브러리를 분리하기 전에, 총 혼합물을 30분 동안 30°C에서 회전시키면서 항온처리할 수 있다. 이러한 사전-제거 단계는 한번 더 반복되며, 제2의 사전-제거 SA 비드는 백그라운드 높음을 결정하기 위해 상술된 바와 같이 세척되고 계수될 수 있다. 이는 또한 "항원이 없는" 네거티브 대조군으로 사용될 수 있다.

[0152] B. 라이브러리 선별: 결합

[0153] 제1 라운드의 선별을 위해, 바이오티닐화된 표적물을 전체의 사전-제거된 라이브러리에 가하고 (100 nM), 1시간 동안 30°C에서 회전하면서 항온처리할 수 있다. 후기 선별 라운드에 대해서, 항원-결합 분자의 회수율이 1%를 초과할 것으로 예상되는 경우, 사전-제거된 라이브러리는 2개의 동일한 분취물로 나눌 수 있다. 바이오티닐화 항원은 하나의 분취물에 첨가될 수 있으며, 다른 하나는 "항원이 없는" 네거티브 대조군으로서 사용될 수 있다. 달리, 세척된 제2의 사전-제거 비드는, 비록 이들 비드가 한번 더 사전-제거 절차를 가질 것이지만, 상기 주목되는 바와 같이 "항원이 없는" 대조군으로 간주될 수 있다. 후기 라운드에서 항원 농도는, 항원-결합 분자의 회수율이 5%를 초과하는 경우, 떨어질 수 있다.

[0154] C. 라이브러리 선별: 포착

[0155] (완충액으로부터 분리된) 사전-차단된 SA 비드를 결합 완충액에 가하고 30°C에서 5 내지 10분 동안 회전하면서 항온처리할 수 있다. 포착을 위한 SA 비드의 양은 수용능력 및 선별에 사용되는 표적물 농도에 기초하여 계산되어야 한다 (상기 참조). SA 비드의 양은 SA 비드 결합체를 피하기 위해 표적물 농도를 낮추는 경우 감소되어야 하나, 전형적으로 50 μ L 이상의 비드가 사용된다.

[0156] D. 라이브러리 선별: 세척

[0157] SA 비드는 자석을 이용하여 수집될 수 있으며, 1분 동안 1 mL의 선별 완충액으로 세척될 수 있다. 비드는 자석

을 사용하여 다시 수집되며, 약 5회 더 (약 총 6회) 세척된다. 세척 시간은 일부 표적물에 대해 유출물 선별 전략을 삽입하기 위해 후기 라운드에서 증가될 수 있다. 비드는 역전사에 적합한 1 mL의 1x 완충액으로 마지막에 세척될 수 있다. 비드는 자석을 사용하여 수집되며 물 중에 재현탁된다 (상기 계산된 포착 비드 용적의 1/4).

[0158] E. 라이브러리 선별: 계수 및 회수율 계산

[0159] 라운드 3부터 시작하여, 약 10 내지 20%의 마지막 세척물 및 비드를 계수한다. 전형적으로, 많은 비드는 계수를 켄칭시킬 수 있으므로, 단지 100 μ L 미만의 비드가 계수된다. 라이브러리 선별 회수율은 하기 수학적식에 따라 계산된다:

[0160] 선별 회수율 % = $100 \times \text{CPM}_{\text{총 비드}} / \text{CPM}_{\text{총 투입물}}$

[0161] 14. RT-PCR에 의한 라이브러리 DNA의 재증폭

[0162] 라이브러리로부터 포착된 물질을 사용하여 역전사를 수행할 수 있다. 당해 기술 분야에 공지된 시약 및 프로토콜이 역전사 반응을 수행하는데 적합하다. 반응 용적은 선별 후 비드 용적에 따라 규모가 확대되거나 감소될 수 있다.

[0163] 비록 추가의 프라이머가 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 디자인될 수 있으나, 역전사에 유용한 예시적 프라이머가 표 3에 도시된다. C_K 역방향 프라이머는 카파 라이브러리에 대해 사용되고, CJL 역방향 프라이머는 람다 라이브러리에 대해 사용되며, Lib-GS-Rev는 사람 PBMC VH 라이브러리에 대해 사용된다.

표 3

역전사에 적합한 예시적 프라이머

Ck Reverse (서열번호 14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGACAGATGGTG CAGCCACAGTTCG
CJL Reverse (서열번호 15)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGTACAGTGGGGT TGGCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT
Lib-GS-Rev (VH, PBMC) (서열번호 16)	CGCTACCTCCGCCGCCAGAC

[0164]

[0165] 예시적 역전사 반응물은 라이브러리 선별물로부터의 비드 (물 중), 약 10 μ M 역방향 프라이머 및 약 10 mM dNTP를 포함할 수 있다. 반응물을 5분 동안 65°C에서 항온처리하고, 얼음 상에서 냉각시킨다. 이어서, 제1 스트랜드 합성 완충액, 0.1M DTT 및 RNase 억제제를 전형적으로 반응물에 가한다. 역전사 효소를 가하기 전에, 역전사 반응물을 2분 동안 42°C에서 항온처리한다. 이어서, 반응물을 가끔씩 교반하면서 50분 동안 42°C에서 항온처리하고, 5분 동안 95°C에서 더욱 항온처리한다. 이어서, 비드를 자석으로 수집하고, 상청액을 새로운 관에 옮기며, 이때 동일한 선별 산출물로부터의 것인 경우에는 풀링할 수 있다. 비드를 물 (RT 용적의 절반) 중에 재현탁시키고, 5분 동안 95°C의 관에서 항온처리한다. 비드를 자석을 사용해 다시 수집하고, 상청액을 이전에 옮겨진 상청액과 함께 풀링한다. 이는 선별 산출물의 PCR 증폭을 위한 cDNA 주형을 포함한다.

[0166] 스펙트라타이핑 PCR을 이용하여 라이브러리 또는 이의 선별 산출물 중의 VH CDR3 크기 분포를 분석할 수 있다. 이는 라이브러리 다양성 및 선별 진행을 평가하기 위한 유용한 수단이다. 라이브러리 선별 산출물의 초기의 얼마간의 라운드 및 선별 이전의 라이브러리는 매우 다양해야 하며, CDR3 크기 분포는 가우스 분포에 가깝다. 예시적인 스펙트라타이핑 PCR 프라이머가 표 4에 제시된다.

표 4

예시적 스펙트라타이핑 PCR 프라이머

6-FAM-PanVHFR3-Fwd (서열번호 17)	GACACGGCCGTGTATTACTGT
PanJH-Rev (서열번호 18)	GCTGAGGAGACGGTGACC

[0167]

[0168]

비록 반응 성분들이 당해 기술 분야에서 공지된 필적하는 시약으로 대체될 수 있지만, 예시적 스펙트라타이핑 PCR 반응물이 하기 표 5에 제시되며, 반응 용적은 선별 반응물의 규모에 맞도록 조절될 수 있다.

표 5

예시적 스펙트라타이핑 PCR 반응물

cDNA 주형	2.0	μL
dH ₂ O	18.1	μL
5X 내열성 DNA 폴리머라제 반응 완충액	6.0	μL
25 mM MgCl ₂	1.8	μL
10 mM dNTP	0.6	μL
5' 정방향 프라이머 (10 μM)	0.6	μL
3' 역방향 프라이머 (10 μM)	0.6	μL
내열성 DNA 폴리머라제	0.3	μL
<hr/>		
총 용적	30.0	μL

[0169]

[0170]

당해 기술 분야에 공지된 내열성 DNA 폴리머라제가 이 반응에 적합하다. 예시적 양태에서, 최종 Mg²⁺ 농도는 1.5 mM이다. 예시적인 열적 사이클링 프로그램으로서, 반응물은 2분 동안 94℃에서 항온처리된 후, DNA를 연장 시키도록 30회의 열적 사이클에 적용된다. 각 사이클에 대해, 반응물은 20초 동안 94℃, 20초 동안 55℃, 이어서 30초 동안 72℃에서 항온처리된다. 30회 사이클 후, 반응물은 5분 동안 72℃에서 더욱 항온처리된 후, 4℃에서 저장된다. PCR 후, 10 μL의 PCR 생성물을 2% 아가로스 겔에 로딩하여 반응이 성공적인가를 확인한다. 반응물 및 잔여 생성물을 스펙트라타이핑 전기영동으로 분석한다.

[0171]

증폭된 DNA 생성물은 하기 구성을 갖는다:

[0172]

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

[0173]

VH CDR3 크기는 겔보기 DNA 생성물 크기로부터 유추될 수 있다. 이는 하기 계산을 이용하여 Rox 염료 크기 마커로 측정될 수 있다:

[0174]

$\text{크기}_{\text{VH CDR3}} = (\text{크기}_{\text{겔보기 DNA 생성물}} - 60) / 3$

[0175]

상기 식에서, 60 = (62_{양쪽 말단의 프레임워크} - 1_{3' A 돌출} + 3_{DNA 마커 과소평가})

[0176]

15. 라이브리리 DNA 주형 증폭을 위한 PCR

[0177]

제1 및 제2 라운드로부터의 산출물을 선별하기 위해서, cDNA (RT 반응으로부터의 상청액)을 8 kDa 컷-오프를 이용해 물에 대해 투석할 수 있으며, cDNA의 전체량을 PCR 주형으로서 사용할 수 있다. 후기 라운드로부터 산출물을 선별하기 위해, 10%의 cDNA를 PCR을 위한 주형으로 사용하고, 투석은 통상적으로 필요하지 않다. 예시적 증폭 프라이머가 표 6에 제시된다.

표 6

증폭 프라이머

프라이머	서열 (5' - 3')
모든 scFv 및 VH 라이브러리에 대한 정방향 프라이머	
T7TMVUTR ^a (서열번호 1)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA
모든 V _K 및 V _L 라이브러리에 대한 정방향 프라이머	
VL- T7TMVTag3GS- Fwd (서열번호 2)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACCATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
모든 κ scFv 및 V _K 라이브러리에 대한 역방향 프라이머	
Ck1-FlagA20 Rev (서열번호 3)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGACAGAT
Ck2-FlagA20 Rev (서열번호 4)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGACAGATGGT
Ck3-FlagA20 Rev (서열번호 5)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGACAGATGGTGCA
Ck4-FlagA20 Rev (서열번호 6)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGACAGATGGTGACAGCC
Ck5-FlagA20 Rev (서열번호 7)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGACAGATGGTGACAGCCACA
모든 λ scFv 및 V _L 라이브러리에 대한 역방향 프라이머	
CL1FLAGA20 Rev (서열번호 8)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGTACAGT
CL2FLAGA20 Rev (서열번호 9)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGTACAGTGGGG
CL3FLAGA20 Rev (서열번호 10)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGTACAGTGGGGTTG

[0178]

CL4FLAGA20 Rev (서열번호 11)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGTACAGTGGGGTTGGCC
CL5FLAGA20 Rev (서열번호 12)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCAAGTACAGTGGGGTTGGCCTTG
모든 VH 라이브러리에 대한 역방향 프라이머	
VH-GSFLAGA20- Rev (서열번호 13)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCATCATCATCTTTATAATCGCTACCTCCGCCGCCAGAC
^a T7TMVTag-프라이머 (Tag 서열은 라이브러리에 따른다)가 또한 사용될 수 있다. ^b 바람직한 프라이머	

[0179]

[0180]

라이브러리 DNA 주형 증폭을 위한 예시적 PCR 반응물이 하기 표 7에 제시된다.

표 7

라이브러리 DNA 주형 증폭을 위한 예시적 PCR 반응물

cDNA 주형	X	μL
dH ₂ O	790	μL가 되도록 첨가
10X 하이 피델리티 Taq DNA 폴리머라제 완충액	100	μL
MgSO ₄ (50 mM)	40	μL
10 mM dNTP	20	μL
5' 정방향 프라이머 (10 μM)	20	μL
3' 역방향 프라이머 (10 μM)	20	μL
하이 피델리티 Taq DNA 폴리머라제	10	μL
<hr/>		
총 용적	1000	μL

[0181]

[0182]

예시적 양태에서, 1 mL PCR 반응물을 라운드 1 및 2 산출물에 대해 사용하고, 0.5 mL 반응물을 후기 라운드로부터의 산출물에 대해 사용한다. 100 μL 반응물의 분취물은 마스터 믹스로부터 만들어져야 한다. 라이브러리 DNA 주형의 증폭을 위한 예시적인 열적 사이클링 조건이 하기 표 8에 제시된다.

표 8

라이브러리 DNA 주형 증폭을 위한 열적 사이클링 조건

94 °C	2분
	↓
94 °C	20초
55 °C	20초
68 °C	1분
	↓
68 °C	5분
	↓
4 °C	영구적으로 유지

[0183]

[0184]

*주: 25회 사이클이 전형적으로 충분한 증폭이나 더욱 많은 생성물을 얻기 위해 35회 사이클과 같이 많은 사이클로 증가될 수 있다. 다양한 크기의 비-특이적 생성물이 추가의 증폭 사이클로 더욱 뚜렷해질 수 있으며, 생성물은 겔 정제될 필요가 있을 수 있다. 가능하면, 증폭 사이클의 수보다는 오히려 DNA 주형 투입물을 증가시키는 것이 도움이 될 수 있다.

[0185]

PCR 후 5 내지 10 μL 생성물을 결과를 점검하기 위한 적합한 DNA 크기 마커와 함께 1.2% 아가로스 겔에 로딩시킨다. 생성물이 정확한 크기이고 (scFv에 대해서는 약 850 bp, VH 또는 VL 라이브러리에 대해서는 약 500 bp) 최소의 비-특이적 생성물을 갖는 경우, 생성물은 다음 라운드의 전사 반응에 직접적으로 사용될 수 있다. 생성물은 겔 정제할 필요가 있을 수 있다. 겔 정제가 PCR 생성물에 대해 수행되는 경우, 제조용 아가로스 겔 상의 모든 잔여 생성물을 분리하고, 생성물을 포함하는 모든 잔여 생성물을 분리시키고, 생성물을 포함하는 특이적 밴드를 겔 추출을 위해 절단해낼 수 있다. DNA 내의 잔류 EtBr이 UV 흡수를 방해하는 경향이 있기 때문에, 겔 정제된 DNA의 정량화가 잘못 유도될 수 있다. 겔 추출 동안 보다 광범위한 세척 단계가 이러한 방해를 완화하는 것을 도울 수 있다. 가능하면, UV 스캐닝 트레이스가 투명한 DNA 샘플과 잔류 EtBr을 갖는 DNA 사이에 상당한 차이가 있기 때문에, DNA 농도는 분광광도계로 측정되어야 한다. 이어서, 이러한 프로토콜은 다수 라운드의 선별을 수행하기 위해 반복된다.

[0186]

16. 예시적 시약 및 완충액 조성

10X 화학적 결합 완충액

Tris, pH 7	250 mM
NaCl	1 M

올리고-dT 결합 완충액

	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 결합 완충액

	1X	5X
--	----	----

포스페이트-기초 완충액

PBS	1X	5X
Triton X-100	0.025	0.125%

대안적 HEPES-기초 완충액

HEPES	50	250 mM
NaCl	150	750 mM
Triton X-100	0.025	0.125%

선별 완충액

포스페이트-기초 완충액

PBS	1X
BSA	1 mg/mL
연어 정자 DNA	0.1 mg/mL
Triton X-100	0.025%
효모 tRNA (임의적, 사용전에 첨가)	20 ng/mL

[0187]

대안적 HEPES-기초 완충액

HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
BSA	1 mg/mL
연어 정자 DNA	0.1 mg/mL
Triton X-100	0.025%
효모 tRNA (임의적, 사용전에 첨가)	20 ng/mL

제1 스트랜드 완충액

Tris-HCl, pH 8.3	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM

50X FLAG 스톱 용액

FLAG 펩타이드	25 mg
선별 완충액	5 mL
1 mL 분취물을 만들고 -20 °C에서 저장	

FLAG 용출 용액

50X FLAG 스톱 용액	1 mL
선별 완충액	49 mL
1 mL 분취물을 만들고 -20 °C에서 저장	

[0188]

올리고-dT 셀룰로즈 제조

[0189]

[0190]

2.5 g의 올리고-dT 셀룰로즈를 50 mL 관에 옮기고 25 mL의 0.1 N NaOH와 혼합할 수 있다. 혼합물을 3분 동안 1500 rpm으로 스핀 다운하고 상청액을 버릴 수 있다. 이어서, 올리고-dT 셀룰로즈를 25 mL의 1x 올리고-dT 결합 완충액으로 세척하고 3분 동안 1500 rpm으로 스핀 다운할 수 있다. 상청액을 버릴 수 있다. 세척 단계를 3회 이상 동안 반복하고, 상청액의 pH를 측정할 수 있다. pH는 세척 완충액 (약 pH 8.5)과 동일해야 한다. 올리고-dT 셀룰로즈는 1x 올리고-dT 결합 완충액을 가함으로써 25 mL의 최종 용적으로 재현탁시켜 약 50% 슬러리를 만들고 4°C에서 저장할 수 있다. 최종 농도 = 100 mg/mL = 1 nmol RNA 수용 능력.

[0191]

항-FLAG M2 아가로스 제조

[0192]

25 mL의 M2 아가로스 비드를 50 mL의 관에 옮기고 베크만 원심분리기 (Beckman Coulter, Fullerton, CA)에서 1000 rpm으로 5분 동안 스핀 다운할 수 있다. 상청액을 흡인시켜 제거할 수 있다. 생성된 비드를 재현탁하고, 동일 용적의 10 mM 글리신 (pH 3.5)에 세척한 후, 1000 rpm에서 5분 동안 스핀 다운할 수 있다. 상청액을 다시 흡인시켜 제거한다. 비드는 1 컬럼 용적의 1x FLAG 결합 완충액을 사용해 재현탁하고 1000 rpm으로 5분 동안 스핀 다운한다. 상청액을 흡인시켜 제거한다. 이러한 세척 단계를 3회 반복하고, 비드를 1 컬럼 용적의 1x 결합 완충액 (1 mg/mL BSA 및 100 mg/mL 연어 정자 DNA 함유)에 재현탁할 수 있다. 혼합물을 4°C에서 1시간 동안 또는 밤새 회전시키고, 필요한 경우, 2 mL 분획의 분취물로 나누고, 4°C에서 유지시킬 수 있다.

[0193]

실시예 2

[0194]

기능성 mRNA-scFv 분자의 설명

[0195]

4개의 항체를 사용하여, 작용성 mRNA-scFv 분자가 디스플레이되고 이들의 각각의 항원: D2E7 (사람 항-hTNF), Y61 (사람 항-hIL-12), 17/9 (마우스 항-HA), 및 MAK195 (마우스 항-hTNF)에 결합하는 것을 설명한다. MAK195

scFv가 표 9에 제시된 하기 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 생성된다.

표 9

MAK195 mRNA-scFv 제작물의 제조에 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

프라이머	서열
T7-MAK195VH-Fwd (서열번호 19)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTT ACAATTACACCATGGAGGTGCAGCTGAAGGAG TCAGG
MAK195VHGS-Rev (서열번호 20)	CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT CC
MAK195VLGS-Fwd (서열번호 21)	GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG CGGTGGCGGATCGGACATTGTGATGACCCAGTC TC
MAK195VL-Rev (서열번호 22)	GATGGTGCAGCCACCGTACGTTTTATTTC AAC TTTGTCCCCGAG

[0196]

[0197]

항-HA 17/9 scFv [참조: Schulze-Gahmen et al. (1993) J. Mol. Biol. 234(4): 1098-118]를 NCBI 데이터베이스로부터 다운로드된 단백질 서열 A31790 및 B31790에 기초하여 하기 프라이머를 사용하여 PCR로 생성한다 (하기 표 10 참조).

표 10

17/9 mRNA-scFv 제작물의 제조에 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

프라이머	서열
T7TMVUTR-17/9 VH-1 Fwd (서열번호 23)	GGACAATTACTATTTACAATTACACCATGGAAG TGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGATCTGGTG AAACC
17/9 VH-2 Rev (서열번호 24)	GCTGCTAAAGCTAAAGCCGCTCGCCGCGCAGCT CAGTTTCAGGCTGCCGCCCGGTTTCACCAGATC GCCG
17/9 VH-3 Fwd (서열번호 25)	GGCTTTAGCTTTAGCAGCTATGGCATGAGCTGG GTGCGCCAGACCCCGATAAACGCCTGGAATG GGTGG
17/9 VH-4 Rev (서열번호 26)	GCCTTTCACGCTATCCGGATAATAGGTATAGCC GCCGCCGTTGCTAATGGTCGCCACCCATTCCAG GCGT
17/9 VH-5 Fwd (서열번호 27)	CCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGC CGCGATAACGCGAAAAACACCCTGTATCTGCAG ATG
17/9 VH-6 Rev (서열번호 28)	GTTGCGGCGCGCGCAATAATACATCGCGCTAT CTTCGCTTTTCAGGCTGCTCATCTGCAGATACA GGGT
17/9 VH-7 Fwd (서열번호 29)	ATTGCGCGCGCCGCGAACGCTATGATGAAAAAC GGCTTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTG ACCGT
17/9 VH-8 GS Rev (서열번호 30)	CGATCCGCCACCGCCGCTGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCCGCGCTCACGGTCACCAGGGT GCCC
GS-17/9 VL-1 Fwd (서열번호 31)	AGCGGCGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACC CAGAGCCCGAGCAGCCTGACCGTGACCGCGGG CGAAA
17/9 VL-2 Rev (서열번호 32)	TGTTTGCCGCTGTAAACAGGCTCTGGCTGCTG

[0198]

프라이머	서열
32)	GTGCAGCTCATGGTCACTTTTCGCCC GCGGTC ACGG
17/9 VL-3 Fwd (서열번호 33)	GTTTAACAGCGGCAAACAGAAAACTATCTGA CCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGCCGCCG AAAGTG
17/9 VL-4 Rev (서열번호 34)	CGGTAAAGCGATCCGGCACGCGCTTTCGCGGG TGCTCGCCCAATAAATCAGCACTTTCGGCGGCT GGCC
17/9 VL-5 Fwd (서열번호 35)	TGCCGGATCGCTTTACCGGCAGCGGCAGCGGCA CCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCGTGCAGG CGGA
17/9 VL-6 Rev (서열번호 36)	AAAGGTCAGCGGGTTGCTATAATCGTTCTGGCA ATAATACACCGCCAGATCTCCGCCTGCACGCT GCTA
17/9 VL-7 Fwd (서열번호 37)	AGCAACCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCACCAAA CTGGAACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT GTCT
17/9 VL-8 Flag Rev (서열번호 38)	TTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTT GTAGTCGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACC

17/9 항체 서열은 등록번호 A31790 및 B31790을 사용하여 NCBI 데이터베이스로부터 검색된다.

[0199]

[0200]

이들 scFv를 위한 DNA 제작물을 시험관내에서 전사한 후, 토끼 망상적혈구 용해물에서 mRNA-scFv (단백질이 퓨로마이신 변형과 함께 링커를 통해 mRNA에 부착된다) 또는 유리 scFv (단백질이 mRNA에 부착되지 않는다)로서 해독한다. 두 종류의 분자 모두를 정제하고 상응하는 바이오티닐화 항원에 의해 풀-다운 (pull-down) 검정을 수행한다 (도 4 참조).

[0201]

도 4의 자료는 기능적 mRNA-scFv (바이오티닐화된 항원에 결합됨)가, 비록 유리 scFv 분자보다 낮은 회수율 (%)이기는 하지만, 스트렙타비딘-자성 비드에 의해 풀-다운된다는 것을 제시한다. 추가의 실험은 이러한 차이가 단지 scFv에 연결된 큰 RNA 분자에 기인한다는 것을 보인다. mRNA-scFv 분자로부터 RNA 부분의 RNase 분해는 유리 scFv 분자에 대한 것과 동일 수준으로 항원에 의한 scFv 회수율을 회복한다 (도 5 참조).

[0202]

실시예 3

[0203]

mRNA-scFv 라이브러리 제작

[0204]

18명의 공여자로부터의 사람 말초혈단핵세포 (PBMC)를 SeraCare로부터 구입한다. 하기 표 11은 형광-활성화된 세포 분류 (FACS) 방법에 의한 PBMC 분석을 나타낸다. 이어서, 폴리 A RNA를 라이브러리 제작을 위해 추출한다.

표 11

FACS에 의한 PBMC 분석

로트	바이알당 총 세포수, x10 ⁶	CD20+ 세포			CD27+/CD20+ 전체
		CD27-	CD27+	전체	
#012505	22	2.8%	5.6%	8.4%	67%
#020805	21	12.1%	2.4%	14.5%	17%
#022205A	23	4.9%	3.7%	8.5%	43%
#030305A	14	7.6%	3.5%	11.1%	32%
#032905A	11	3.8%	2.8%	6.7%	42%
#041205A	23	4.9%	4.8%	9.7%	49%
#041405A	23	5.9%	3.2%	9.1%	35%
#041905A	18	5.1%	2.2%	7.3%	30%
#042604B	26	9.3%	2.5%	11.9%	21%
#042805B	24	11.4%	1.9%	13.3%	14%
#050305B	17	7.4%	3.1%	10.5%	30%
#050505B	20	6.2%	2.4%	8.6%	28%
#051005B	18	6.7%	3.1%	9.7%	32%
#051205B	17	7.6%	2.4%	10.1%	24%
#051705B	16	7.3%	2.1%	9.4%	23%
#051905A	27	4.8%	0.7%	5.5%	13%
#0524051	28	7.4%	2.2%	9.6%	23%
#122105	14	11.4%	1.4%	12.8%	11%

[0205]

[0206]

실시예 4

[0207]

라이브러리 태그 선별

[0208]

4개의 8-염기 태그 (서열번호 39 내지 42)를 선별하고, 17/9 mRNA-scFv 제작물의 TMV-UTR와 코작 컨센서스 서열 사이에 삽입한다 (도 6 참조). 태그 서열은 아데노신을 포함하지 않도록 디자인하고, 3 라운드의 선별 후 확인한다. 도 6에 도시되는 바와 같이, 제1 위치는 G가 선호되며 제2 위치는 T가 선호된다. 무작위 서열 태그는 TMV와 5'UTR의 코작 컨센서스 서열 사이에 8개의 무작위 (B=G, C, T) 뉴클레오타이드 삽입물을 갖는 5' 프라이머를 디자인함으로써 생성된다 (도 7 참조). 이어서, 17/9 scFv를 2 내지 3 라운드의 선별을 통해 증폭하고 선별하며, 이때 후속 라운드는 5' 프라이머로 재증폭된다. 이어서, 서열 산출물을 프로세싱하여 선별 과정을 통과한 태그를 확인한다. 각 라운드로부터의 상이한 산출물 태그가 도 8에 제시된다. 일부 반복된 서열이 각 라운드의 안쪽에 나타나나, 어떠한 태그 서열도 다수 라운드에서 나타나지 않는다. ATG 서열이 태그 서열에서는 가능할 수 없으므로, 라운드 2에서 태그에 하나의 가능한 돌연변이가 있다는 것에 특별히 주의해야 한다.

[0209]

실시예 5

[0210]

17/9 scFv에 대한 라이브러리 선별

[0211]

mRNA-scFv 분자가 본원에서 기술되는 mRNA 디스플레이 방법을 이용하여 수개 라운드의 선별을 통해 농축될 수 있다는 것을 입증하기 위해서, 25의 다양성을 갖는 scFv 라이브러리를 중첩 (overlapping) PCR 방법으로 제작한다. scFv 라이브러리를 생성하기 위해서, 17/9, D2E7, 2SD4, Y61 및 MAK195의 VH 및 VL 단편을 상술된 바와 같이 사용한다. 이어서, 17/9 scFv를 바이오티닐화된 HA 태그로 이러한 라이브러리로부터 선별한다. 선별 후, 17/9 농축을 클로닝 및 콜로니 PCR로 조사한다. 1 라운드의 mRNA-scFv 선별 전 및 후에 17/9 scFv를 정량한 결과 도 9에 도시된다.

- [0212] 실시예 6
- [0213] mRNA 디스플레이 기술은 상이한 친화도를 갖는 scFv 결합체를 구별하는데 이용된다.
- [0214] mRNA 디스플레이 기술이 상술된 바와 같이 상이한 친화도를 갖는 scFv 결합체를 구별하는데 이용될 수 있는가를 결정하기 위해, D2E7과 2SD4 사이의 키메라를 제조한다. 2SD4는 TNF α 에 대해 낮은 친화도 (유리 단백질로서 KD 약 200 nM)를 나타내는 D2E7 scFv 전구체이다. 도 10은 키메라를 도시한다.
- [0215] 적정은 유리 단백질에 대해 수행한다. 도 11은 상이한 키메라 사이의 항원 결합 후 회수율 (%) 및 항원 선별 후 표준화된 회수율 (%)을 도시한다. 상기 결과는 본원에 기술되는 mRNA 디스플레이 기술이 상이한 친화도를 갖는 결합체를 구분하는데 사용될 수 있다는 것을 제시한다.
- [0216] 실시예 7
- [0217] mRNA-scFv 분자의 열안정성
- [0218] mRNA-scFv 분자의 열안정성을 측정하기 위해서, D2E7-scCk 및 Y61-scCk를 해독하고 본원에 기술되는 바와 같이 mRNA-scFv 포맷으로 정제한다. 이어서, mRNA-scFv 분자를 항원 선별 전에 30분 동안 상이한 온도에서 항온처리한다. 항원 선별 후의 표준화된 회수율 (%)이 도 12에 나타나 있다.
- [0219] 도 13은 RNA가 mRNA-scFv 분자의 고온 처리 후 회수될 수 있다는 것을 보인다. 이때 RT-PCR은 회수된 Y61-scC1 mRNA-scFv 분자로 비드 상에서 수행된다.
- [0220] 실시예 8
- [0221] 사람 PBMC RNA로부터 나이브 카파 PROfusion scFv 라이브러리의 제작
- [0222] 하기 실시예는 PROfusion 기술을 이용하는 선별에 적합한 사람 나이브 카파 scFv 라이브러리의 생성을 기술한다.
- [0223] 사람 말초혈단핵세포 (PBMC)를 SeraCare (Milford, MA, cat. # 72000)로부터 구입한다. 상이한 공여자로부터의 세포를 항-사람 CD20-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, cat. # 556632) 및 항-사람 CD27-PE (BD Pharmingen, cat. # 555441) 항체로 염색하여 특징분석한다. 총 RNA를 RNeasy 미디 키트 (QIAGEN, Valencia, CA, cat. # 75144)를 사용하여 제작자의 프로토콜에 따라 PBMC로부터 분리한다. 간단히 설명하면, 냉동 세포를 37°C에서 급속 해동시키고, 구아니딘 이소티오시아네이트를 포함하는 완충액에 재현탁시킨 후, 21G 니들을 통해 수회 통과시킴으로써 균질화시킨다. 에탄올을 가하고, 용해물을 RNeasy 미디 컬럼 (총 18개 컬럼)에 적용한다. 컬럼을 세척하고, 총 RNA를 RNase-비함유 물로 용출시킨다. RNA 농도 및 수율을 OD 260 nm 흡광도를 측정하여 결정한다. 이어서, mRNA를 Invitrogen Fastrack MAG Maxi mRNA 분리 키트 (cat #K1580-02)를 사용하여 총 RNA로부터 키트 매뉴얼에 따라 분리한다. RNase 억제제 (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat #10777-019)를 RNA 분해를 최소화하기 위해 절차 과정 중에 가한다. 총 RNA를 먼저 DNase (Invitrogen, cat #18-68-015)로 처리하여 게놈성 DNA 오염을 최소화한다. 간단히 설명하면, 올리고-dT-자성 비드를 먼저 세척한 후, 총 RNA에 가하고, 10분 동안 65°C에서 항온처리하고, 이어서 30분 동안 실온에서 결합시킨다. 비드를 수회 세척하고, 결합된 mRNA를 RNase-비함유 물로 용출시킨다. mRNA를 OD₂₆₀ nm 흡광도를 측정함으로써 정량한다.
- [0224] 역전사
- [0225] 이어서, 제1 스트랜드 cDNA를 SuperScript II 역전사효소 (Invitrogen, Carlsbad, CA, cat. # 18064-014) 및 15개 프라이머 혼합물 (100 nM 총 농도) (표 12)에 의해 제작자의 프로토콜에 따라 37 μ g의 mRNA로부터 합성한다. 반응은 각각 0.9 ml의 2개의 분취물에서 수행한다. RT 반응물 (1.8 ml 총 용적)을 36 MicroSpin S-200 HR 컬럼 (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., cat. # 27-5120-01) (50 μ l/컬럼)을 통과시켜 정제한다. 컬럼 용출물을 37°C에서 20분 동안 RNaseH와 함께 항온처리한다.

표 12

역전사 프라이머

명칭	올리고 서열
FcγRev1 (서열번호 43)	AGTTCACGACACC
FcγRev2 (서열번호 44)	GAAGGTGTGCACG
FcγRev3 (서열번호 45)	CCACGCTGCTGAG
FcμRev1 (서열번호 46)	ACTTTGCACACCAC
FcμRev2 (서열번호 47)	TTTGTTGCCGTTGG
FcμRev3 (서열번호 48)	GGGAATTCTCACAGG
FcδRev1 (서열번호 49)	GCTGCTTGTCATGT
FcδRev2 (서열번호 50)	TGCCTTTGGAGACT
FcδRev3 (서열번호 51)	GACCACGCATTTGT
CκRev1 (서열번호 52)	TCCACCTCCACTG
CκRev2 (서열번호 53)	CAGGCACACAACAG
CκRev3 (서열번호 54)	GAGTGTCACAGAGC
CλRev1 (서열번호 55)	GGGAACAGAGTGAC
CλRev2 (서열번호 56)	GTGTGGCCTTGTTG
CλRev3 (서열번호 57)	CCATCTGCCTTCCA

[0226]

[0227]

VH cDNA 증폭

[0228]

상기 RT 반응의 1/3은 VH 리더 서열 (LS)-특이적 정방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물 및 JH-특이적 역방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, cat. # 11304-102)에 의해 제한된 증폭을 수행한다 (표 13). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 10 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (60초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. 이어서, PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN, Valencia, CA, cat. # 28106)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 소규모의 파일럿 실험으로 cDNA의 적어도 100배 증폭을 확인한다.

표 13

VH 단편 증폭에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
VH1/7LS (서열번호 58)	ATCCTCTTYTTGGTGGSAGC
VH1-46LS (서열번호 59)	GGTCTTCTGCTTGCTGGCTG
VH2LS (서열번호 60)	CCTGCTGCTGACCAYCCCTTC
VH3LS (서열번호 61)	GCTATTTTWVRAGGTGTCCARTGT
VH4LS (서열번호 62)	GCRGCTCCAGATGGGTCCTG
VH5LS (서열번호 63)	ATGGGGTCAACCGCCATCCT
VH6LS (서열번호 64)	TGGGCCTCCCATGGGGTGTC
JH1/2sRev (서열번호 65)	CTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC
JH4/5sRev (서열번호 66)	CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC
JH6sRev (서열번호 67)	CTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC
JH3sRev (서열번호 68)	CTGAAGAGACGGTGACCATTGTCC

[0229]

[0230] 정제된 PCR 생성물의 1/100을 각각의 VH 계열-특이적 cDNA 증폭용 주형으로서 사용한다. 증폭은 각각의 VH LS-특이적 정방향 프라이머 (200 nM) 및 JH-특이적 역방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 PCR로 수행한다 (표 13). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.

[0231] 상기 PCR 생성물은 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN, Valencia, CA)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제된다. 이어서, 각각의 PCR 생성물을 상응하는 VH-특이적 네스티드 (nested) 정방향 프라이머 (200 nM) 및 JH-특이적 역방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물을 포함하는 PCR 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 증폭한다 (표 14). 각각의 반응물에서 정방향 프라이머는 후속하는 라이브러리 증폭 동안 특이성을 증가시키기 위해 도입된 8-뉴클레오타이드 "태그" (밑줄)를 갖는다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.

표 14

네스티드 VH-특이적 PCR에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
VH1Tag2Forward (서열번호 69)	TTTACAATTACAGT <u>GTGTCG</u> ACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAGTCTGGRSCT
VH2Tag2Forward (서열번호 70)	TTTACAATTACAGT <u>GTGTCG</u> ACCATGGAGRTCACCTTGAR GGAGTCTGGT
VH3Tag2Forward (서열번호 71)	TTTACAATTACAGT <u>GTGTCG</u> ACCATGGAGGTGCAGCTGKT GGAGTCTSGRGA
VH4Tag2Forward (서열번호 72)	TTTACAATTACAGT <u>GTGTCG</u> ACCATGGAGGTGCAGCTGCA GSAGTSSGGC
VH5Tag2Forward (서열번호 73)	TTTACAATTACAGT <u>GTGTCG</u> ACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAGTCTGGAGCA
VH6Tag2Forward (서열번호 74)	TTTACAATTACAGT <u>GTGTCG</u> ACCATGGAGGTACAGCTGCA GCAGTCAG
VH7Tag2Forward (서열번호 75)	TTTACAATTACAGT <u>GTGTCG</u> ACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAATCTGGGT
JHReverse1/2 (서열번호 76)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCTCCACCTGAGGAGAC RGTGACCAGGGTGC
JHReverse4/5 (서열번호 77)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCTCCACCTGAGGAGAC GGTGACCAGGGTTC
JHReverse6 (서열번호 78)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCTCCACCTGAGGAGAC GGTGACCGTGGTCC
JHReverse3 (서열번호 79)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCTCCACCTGAAGAGAC GGTGACCATTGTCC

[0232]

[0233] PCR 생성물을 1% 아가로스 겔 전기영동하고, QIAquick 겔 추출 키트 (QIAGEN, Valencia, CA, cat. # 28704)로 정제한다. 이들 PCR 생성물의 분취물을 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 200 nM의 하기 보편적 (universal) 프라이머를 포함하는 PCR 반응물에서 대규모로 더욱 증폭시킨다:

T7TMVTag2 (서열번호 80):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTGTGTCGAC

라이브러리-GS-Reverse (서열번호 16): CGCTACCTCCGCCGCCAGAC.

[0234]

- [0235] 이들 프라이머는 PCR 생성물의 5' 말단에 T7 프로모터 및 TMV-UTR 서열을 추가하며, PCR 생성물의 3' 말단에 부분적인 글리신-세린 (G4S)-링커를 추가한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 26 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.
- [0236] PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN, Valencia, CA)로 정제하고, 260 nm에서 UV 흡광도로 정량하며, 이들 생성물의 분취물을 1% 아가로즈 겔-전기영동으로 가시화하여 순도를 확인한다. VH 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.
- [0237] V_K cDNA 증폭
- [0238] 상술된 RT 반응물로부터 생성된 cDNA의 1/3을 V_K 리더 서열 (LS)-특이적 정방향 프라이머 (총 농도 200 nM) 및 C_K-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 제한 증폭한다 (표 15). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 10 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (60초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. 별도의 소규모 실험으로 이러한 PCR에 의한 cDNA의 10 내지 100배 증폭을 확인한다.
- [0239] PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN, Valencia, CA)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 정제된 PCR 생성물의 1/500을 각각의 V_K 계열-특이적 cDNA의 증폭용 주형으로서 사용한다. 각각의 V_K LS-특이적 정방향 프라이머 (200 nM) 및 C_K-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 PCR에 의해 증폭을 수행한다 (표 16). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.

표 15

V_K 단편 증폭에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
V _K 1LS (서열번호 81)	GCTCCTGGGRCTYCTGC
V _K 2LS (서열번호 82)	CTYCTGGGGCTGCTAATG
V _K 3LS (서열번호 83)	CTCTGGCTCMCAGATACCAC
V _K 4LS (서열번호 84)	GGATCTCTGGTGCCTACGG
V _K 5LS (서열번호 85)	GGATCTCTGATACCAGGGCA
V _K 6LS (서열번호 86)	CTGGGTTCAGCCTCCAG
C _K -sReverse (서열번호 87)	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

[0240]

표 16

네스티드 V_K-특이적 PCR에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
V _K 1 Forward (서열번호 88)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACA TCCRGWTGACCCAGTCTCCWT
V _K 2 Forward (서열번호 89)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATA TTGTGATGACYCAGWCTCCAC
V _K 3 Forward (서열번호 90)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAATT GTGWTGACRCAGTCTCCAGSCA
V _K 4/6 Forward (서열번호 91)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACA TCGTGMTGACYCAGTCTCCAGA
V _K 5 For-Redo (서열번호 92)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAACG ACACTCACGCAGTCTCCAGCAT
V _K 6 For-NEW (서열번호 93)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATGTC GTGATGACACAGTCTCCAGCTT
C _K Reverse (서열번호 14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGC CACAGTTCG

[0241]

[0242]

PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN, Valencia, CA)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 이어서, 각각의 PCR 생성물을 상응하는 V_K-특이적 네스티드 정방향 프라이머 (200 nM) 및 C_K-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 PCR 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 증폭한다 (표 13). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.

[0243]

PCR 생성물을 1% 아가로스 겔 전기영동하고, QIAquick 겔 추출 키트 (QIAGEN, Valencia, CA)로 정제한다. 이들 PCR 생성물의 분취물을 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 하기 보편적 프라이머 (200 nM)를 포함하는 PCR 반응물에서 대규모로 더욱 증폭시킨다:

라이브러리-GS-Forward (서열번호 94): GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

FlagA20Rev (서열번호 95):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA

GTC.

[0244]

[0245]

이들 프라이머는 PCR 생성물의 5' 말단에 부분적인 G4S-링커를 추가하며, 생성된 PCR 생성물의 3' 말단에 FLAG 태그 링커 어닐링 부위 및 폴리 A 테일을 추가한다.

[0246]

PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 26 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (30초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN, Valencia, CA)로 정제하고, 260 nm에서 UV 흡광도로 정량하며, 이들 생성물의 분취물을 1% 아가로스 겔-전기영동으로 가시화하여 순도를 확인한다. 수득된 V_K 계열-특이적 cDNA 단편의 일부를 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

[0247]

VH-V_K scFv 제작

[0248]

VH 및 V_K cDNA 단편을 각각의 계열에서의 생식계열 수에 따라 혼합한다 (표 17 및 18).

표 17

VH 단편의 혼합 비율

VH 단편	VH1/7	VH1-46	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	전체
생식계열 수	10	1	3	22	7	1	1	45
전체에 대한 비 (%)	22.2%	2.7%	6.7%	48.9%	15.5%	2.7%	2.7%	100%

[0249]

표 18

Vκ 단편에 대한 혼합 비율

Vκ 단편	Vκ1	Vκ2	Vκ3	Vκ4	Vκ5	Vκ6	전체
생식계열 수	21	11	8	1	1	3	45
전체에 대한 비 (%)	46.7%	2.4%	17.8%	2.7%	2.7%	8.3%	100%

[0250]

[0251]

총 10 μg의 VH cDNA 단편 (2×10^{13} 분자) 및 총 10 μg의 Vκ cDNA 단편 (2×10^{13} 분자)을 중첩 PCR용 주형으로 사용한다. PCR은 30 ml의 용적으로 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 및 프라이머 T7TMVTag2 (200 nM) 및 FlagA20Rev (200 nM)로 수행한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 17 사이클의 94℃ (30 초), 55℃ (30초), 및 68℃ (60초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. PCR 생성물의 분취물을 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

[0252]

스펙트라타이핑

[0253]

각각 VH의 프레임워크 3 영역 및 J 영역에 어닐링하는 형광 염료-표지된 5' 정방향 프라이머 (6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5'-GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', 서열번호 17) 및 역방향 프라이머 (PanJH-Rev, 5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3', 서열번호 18)가 PCR에 의해 VH 도메인의 CDR3 영역에 걸쳐 증폭하는데 사용될 수 있다. 50 ng의 scFv 라이브러리 DNA 주형을 200 nM 6-FAM-PanVHFR3-Fwd 프라이머, 200 nM PanJH-Rev 프라이머, 200 μM dNTP, 1x GoTaq 완충액 및 1.5 U의 GoTaq (Promega, Madison, WI)를 포함하는 30 μl의 반응 용적에 사용한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 30 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 72℃ (30초); 5분의 72℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. PCR 후, 10 μl의 생성물을 2% 아가로스 겔에 로딩하여 성공적인 반응을 확인하고, 잔여 생성물을 ABI 서열분석기 (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 스펙트라타이핑 전기영동한다. CDR3 길이는 ROX-염료 표지된 DNA 마커로 측정되는 생성물 길이로부터 60 bp 플랭킹 프레임워크 서열을 감함으로써 계산된다.

[0254]

결과

[0255]

사람 PBMC 특징분석

[0256]

20명의 공여자로부터의 PBMC 샘플을 유동 세포측정으로 B 세포 (CD20⁺) 및 기억 B 세포 (CD27⁺)에 대해 예비스 크리닝 (prescreening)함으로써 10명의 공여자를 선별하고 (PBMC 중 9% 초과와 B 세포 및 전체 B 세포 중 35% 미만의 B 세포), 공여자 이용도가 최대가 되도록 공여자 나이, 성별 및 민족성 분포를 최적화한다 (도 14).

[0257]

RNA 정제

[0258]

라이브러리 제작을 위한 항체 cDNA 레퍼토리를 수득하기 위해, 1.9 mg의 총 RNA를 2.6×10^8 B 세포를 갖는 것으

로 추정되는 2.3×10^9 사람 PBMC로부터 수득한다. 총 RNA로부터 후속적인 폴리 A mRNA 정제로 42.2 μ g의 mRNA를 수득한다.

[0259] VH cDNA 단편의 증폭

[0260] VH 보편적 프라이머 (T7TMVTag2, 서열번호 80 및 라이브러리-GS-Rev, 서열번호 16)로 증폭된 약 500 bp의 VH 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 아가로스 겔-전기영동으로 가시화한다 (도 15).

[0261] 각각의 VH 클론의 서열분석이 표 19에 제시되어 있다. 공지된 VH 생식계열 서열에 클로닝된 VH 서열을 비교함으로써 VH 계열-특이적 프라이머에 의한 고도의 특이적 증폭을 확인한다.

[0262] V_K 단편의 증폭

[0263] 보편적 프라이머 (라이브러리-GS-Fwd, 서열번호 94 및 FlagA20Rev, 서열번호 95)로 증폭된 V_K 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 아가로스 겔-전기영동으로 가시화한다 (도 16). 각각의 V_K 클론의 서열분석이 표 20에 제시되어 있다. 자료로부터 V_K 생식계열 계열 각각에 대한 프라이머 특이성을 확인한다.

표 19

VH 계열-특이적 PCR 생성물의 서열분석

단편	클론의 수	생식계열 매치	계열	단편	클론의 수	생식계열 매치	계열
VH1/7	3	VH7-4.1	VH7	VH4	3	VH4-59	VH4
	1	VH7-4.1/VH7-81	VH7		2	VH4-39	VH4
	7	VH1-8	VH1		8	VH4-34	VH4
	4	VH1-69	VH1		2	VH4-31	VH4
	1	VH1-24	VH1		1	VH4-61	VH4
VH3	3	VH3-23	VH3	VH1-46	15	VH1-46	VH1
	1	VH3-21	VH3		12	VH2-5	VH2
	1	VH3-48	VH3		3	VH2-26	VH2
	2	VH3-9	VH3				
	1	VH3-43/VH3-9	VH3	VH5	16	VH5-51	VH5
	2	VH3-7	VH3				
	2	VH3-74	VH3	VH6	16	VH6-1	VH6
	1	VH3-30/VH3-33	VH3				

[0264]

[0265] VH-V_K scFv 제작

[0266] VH-V_K scFv cDNA 단편을 제작하기 위해 중첩 PCR을 수행한다. 수득된 생성물의 일부를 아가로스 겔 전기영동으로 가시화한다 (도 17). 생성된 VH-V_K scFv 단편은 PROfusion mRNA 디스플레이 기술에 의해 선별될 모든 필요한 요소를 갖는다 (도 17). 각각의 VH-V_K scFv 클론의 서열분석으로 대부분에서 기능적인 개재 G4S 링커를 갖는 정확한 VH-V_K 재조합을 확인한다. 제작된 scFv 라이브러리 중 다양한 VH 및 V_K 계열의 분포가 이전 문헌 보고와 일치한다 (도 18) [참조: Tsuiji et al. (2006). Exp. Med.; V.203 (2), pp. 393-400 및 Arons et al. (2006) British Journal of Haematology V.133, pp. 504-512].

표 20

Vk 계열-특이적 PCR 생성물의 서열분석

단편	클론의 수	생식계열 매치	계열	단편	클론의 수	생식계열 매치	계열
Vk1	3	O18/O8	Vk1	Vk3	5	A11/A27	Vk3
	3	O12/O2	Vk1		4	L20/L6	Vk3
	2	A20	Vk1		2	L16/L2	Vk3
	2	L19/L5	Vk1	Vk4	14	B3	Vk4
	1	L19	Vk1				
	1	L1/L15	Vk1	Vk5	13	B2	Vk5
	1	L1	Vk1				
Vk2	7	A19/A3	Vk2	Vk6	12	A10/A26	Vk6
	3	A1/A17	Vk2		1	A14	Vk6
	1	O1/O11	Vk2				

[0267]

[0268]

스펙트라타이핑

[0269]

상이한 VH 계열간의 CDR3 크기 분포에 대한 스펙트라타이핑 분석을 scFv 라이브러리로의 어셈블리 바로 전에 VH cDNA 단편 상에서 수행한다 (도 19). 높은 다양성을 갖는 cDNA 라이브러리에서 예측되는 바와 같이, 관측된 CDR3 크기는 분석된 모든 계열에서 상당히 다양하다. 상이한 CDR3 크기에 대한 관측된 피크 높이로 정상적 분포에 대해 전형적인 종 모양의 곡선이 추정되며, 매우 큰 집단 크기를 나타낸다. 이는 특히 단일 생식계열 또는 매우 작은 VH 계열, 예를 들어 VH1-46, VH2, VH5, 및 VH6로부터 수득되는 결과에서 분명하다. 또한, 흥미롭게도 상이한 VH 계열에서는 CDR3 크기가 약간 다르다는 것에 주목한다. 예를 들어, VH1 및 VH2는 15 내지 16개 잔기의 CDR3를 더욱 많이 갖고, VH3은 13개 잔기의 CDR3를 더욱 많이 갖는다. 이들을 종합하면, 각각의 VH 계열의 스펙트라타이핑 분석으로부터 cDNA 라이브러리에서 더욱 다양하고 더욱 큰 VH 서열을 확인한다.

[0270]

8개의 scFv 라이브러리 주형을 무작위로 샘플링하고 전술된 바와 같이 스펙트라타이핑한다. 모든 8개의 샘플로부터 수득된 결과는 구별이 불가능하며, 이는 각각의 분취물에 있는 라이브러리 주형이 복제적으로 유사하다는 것을 제시한다 (도 20). 라이브러리 VH CDR3은 정상적 크기를 가지며, 대부분이 6 내지 24개의 잔기를 가지며, 13 내지 16개 잔기 사이에 집중된다. 이러한 분포는 예상되는 바와 같으며, 개개의 VH 계열 스펙트라타이핑 결과와 일치한다.

[0271]

결론

[0272]

고품질의 사람 항체 리드 (lead)의 선별은 성공적인 치료 항체 약물 개발을 위한 전제조건이다. 강력한 선별 기술에 추가하여, 항체 라이브러리의 특성 (공급원, 다양성 및 제작)이 우수한 리드를 생성하기 위한 유용성을 크게 결정한다. 많은 사람 공여자가 공여자 무리 내의 모든 다양성이 포착될 수 있도록 모든 항체 생식계열 서열을 커버하기 위해 매우 높은 특이성으로 디자인된 PCR 프라이머 및 더욱 큰 다양성에 대해 예비스크리닝되었다. 제작된 항체 scFv 라이브러리는 2×10^8 초과의 B 세포로부터 2×10^{12} 초과의 이론적 다양성을 가지며, 이는 다수의 클론을 서열분석하고 스펙트라타이핑함으로써 입증되었다.

[0273]

실시예 9

[0274]

사람 PBMC RNA로부터 나이트 람다 PROfusion scFv 라이브러리의 제작

[0275] 전체 RNA 및 mRNA 정제, mRNA 역전사 및 PCR에 의한 VH cDNA 증폭은 실시예 1에 기술되어 있다.

[0276] V λ cDNA 증폭

[0277] 상기 RT 반응으로부터 생성된 cDNA의 1/3은 V λ 리더 서열 (LS)-특이적 정방향 프라이머 (총 농도 200 nM) 및 C λ -특이적 역방향 프라이머 (200 nM)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 제한된 증폭을 수행한다 (표 21). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 10 사이클의 94°C (30초), 55°C (30초), 및 68°C (60초); 5분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계. 별도의 소규모 실험으로 이러한 PCR에 의한 cDNA의 10 내지 100배 증폭을 확인한다.

표 21

V λ 단편 증폭에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
VL1LS1 (서열번호 96)	TCACTGTGCAGGGTCCTG
VL1LS3 (서열번호 97)	TCACTGCACAGGGTCCTG
VL2LS3 (서열번호 98)	TCAGGRCACAGGGTCCTG
VL2LS4 (서열번호 99)	TCAGGGCACAGGATCCTG
VL3LS2 (서열번호 100)	TGCATAGGTTCTGTGGTTTCTTCTG
VL3LS3 (서열번호 101)	ACAGGHTCTGWGGCCTCCTATG
VL3LS4 (서열번호 102)	TGCACAGGCTCTGTGACCTCCTATG
VL3LS5 (서열번호 103)	TACACAGGCTCTATTGCCTCCTATG
VL4ABLS2 (서열번호 104)	TCCACTGSACAGGGTCTCTCT
VL4CLS2 (서열번호 105)	CTTCATTTTCTCCACAGGTCTCTGTG
VL5LS (서열번호 106)	CACTGCACAGGTTCCCTC
VL6LS (서열번호 107)	CTGCACAGGTTCTTGGGC
VL7LS (서열번호 108)	CTCACTTGCTGCCCAGGG
VL8LS (서열번호 109)	GCTTATGGATCAGGAGTGGATTC
VL9LS (서열번호 110)	CACCCTCCTCAGTCTCCTC
VL10LS (서열번호 111)	CTCTGCAGTGTCACTGGTC
CJLS Reverse (서열번호 112)	GCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT

[0278]

[0279] PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 정제된 PCR 생성물의 1/250을 각각의 V λ 계열-특이적 cDNA 증폭용 주형으로서 사용한다. 증폭은 각각의 V λ LS-특이적 정방향 프라이머 (200 nM) 및 C λ -특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 PCR로 수행한다 (표 22). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 35 사이클의 94°C (30초), 55°C (30초), 및 68°C (60초); 5분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계.

표 22

네스티드 Vλ-특이적 PCR에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
VL1/10 ForRedo (서열번호 113)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGATCGCAGTC TGKGCTGACKCAGCCRC
VL2 For (서열번호 114)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGT CTGCCCTGACTCAGCCT
VL3 ForNew (서열번호 115)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGTCCT ATGAGCTGACDCAG
VL4ab For (서열번호 116)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGC YTGTGCTGACTCAATC
VL4c For (서열번호 117)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCTGC CTGTGCTGACTCAGCCCCCG
VL5/9 ForRedo (서열번호 118)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGC CTGTGCTGACTCAGCCRBT
VL6 For (서열번호 119)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGAATT TTATGCTGACTCAGCCC
VL7/8 For (서열번호 120)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGR CTGTGGTGACYAGGAG
CJL Reverse (서열번호 15)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTACAGTGACAGTGGGGTTGGC CTTGGGCTGACCKAGGACGGT

[0280]

[0281]

PCR 생성물을 2% 아가로스 겔 상에서 진행시키고, QuantumPrep FreezeNSqueeze 컬럼 (Biorad, Hercules, CA)을 사용하여 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 이어서, 각각의 PCR 생성물을 상응하는 Vλ-특이적 네스티드 정방향 프라이머 (200 nM) 및 Cλ-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 PCR 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 증폭한다 (표 13). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 35 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (60초); 5분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.

[0282]

PCR 생성물을 2% 아가로스 겔 상에서 진행시키고, QuantumPrep FreezeNSqueeze 컬럼 (Biorad, Hercules, CA)으로 정제한다. 이들 PCR 생성물의 분취물을 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 하기 보편적 프라이머 (200 nM)를 포함하는 PCR 반응물에서 대규모로 더욱 증폭시킨다:

라이브러리-GS-Forward (서열번호 94): GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

FlagA20Rev (서열번호 95):

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCG

TCCTGTAGTC.

[0283]

[0284]

이들 프라이머는 PCR 생성물의 5' 말단에 부분적 G4S 링커를 추가하며, 생성된 PCR 생성물의 3' 말단에 FLAG 태그, 링커 어닐링 부위 및 폴리 A 테일을 추가한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 35 사이클의 94℃ (30초), 55℃ (30초), 및 68℃ (30초); 5분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. PCR 생성물을 Purelink PCR 정제 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 정제하고, 260 nm에서 UV 흡광도로 정량하며, 이들 생성물의 분취물을 2% 아가로스 겔-전기영동으로 가시화하여 순도를 확인한다.

[0285]

Vλ 계열-특이적 cDNA 단편의 일부를 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

[0286]

VH-Vλ scFv 제작

[0287] VH 및 V λ cDNA 단편을 각각의 PCR 생성물에 의해 대표되는 생식계열의 다양성에 따라 혼합한다 (표 23 및 24).

표 23

VH 단편의 혼합 비율

VH 계열	VH1/7	VH1-46	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	전체
전체에 대한 비 (%)	22.2%	2.7%	6.7%	48.9%	15.5%	2.7%	2.7%	100%

[0288]

표 24

V λ 단편에 대한 혼합 비율

VL 계열	VL1	VL2	VL3	VL4	VL5	VL6	VL7	VL8	VL9	VL10	전체
전체에 대한 비 (%)	18.5%	3.70%	33.30%	11.10%	11.10%	3.70%	7.40%	3.70%	3.70%	3.70%	100%

[0289]

[0290] 총 10 μ g의 VH cDNA 단편 (2×10^{13} 분자) 및 10 μ g의 V λ cDNA 단편 (2×10^{13} 분자)을 중첩 PCR용 주형으로 사용한다. PCR은 30 ml의 용적으로 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 및 프라이머 T7TMVTag2 (200 nM) 및 FlagA20Rev (200 nM)로 수행한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 17 사이클의 94°C (30초), 55°C (30초), 및 68°C (60초); 5분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계. PCR 생성물의 분취물을 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

[0291] 결과

[0292] V λ 단편의 증폭

[0293] 보편적 프라이머 (라이브러리-GS-Fwd 및 FlagA20Rev)로 증폭된 V λ 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 아가로스 겔-전기영동으로 가시화한다 (도 21).

[0294] 각각의 V λ 클론의 서열분석이 표 25에 제시되어 있다. 자료로부터 V λ 생식계열 계열 각각에 대한 프라이머 특이성을 확인하며, 하나의 미스매치 (mismatch)가 굵게 강조된다 (VL1 LS3, 생식계열 V1-3).

표 25

V λ 계열-특이적 PCR 생성물의 서열분석

VL 단편	생식계열	클론의 수		VL 단편	생식계열	클론의 수
VL1 LS1	V1-16	10		VL3 LS5	V2-1	5
	V1-17	2			V2-6	3
					V2-14	1
VL1 LS3	V1-3	1			V2-17	3
	V1-9	8				
	V1-13	1		VL4ab LS2	V5-4	3
					V5-6	9
VL2 LS3	V1-3	11				
				VL3c LS2	V5-1	12
VL2 LS4	V1-3	11				
				VL5 LS	V4-1	5
VL3 LS2	V2-13	11			V4-2	7
VL3 LS3	V2-1	9		VL6 LS	V1-22	10
	V2-14	1				
	V2-17	1		VL7 LS	V3-2	10
VL3 LS4	V2-1	7		VL8 LS	V3-4	12
	V2-6	1				
	V2-14	2		VL9 LS	V5-2	12
	V2-17	1				
	V2-19	1		VL10 LS	V1-20	10

[0295]

[0296]

VH-V λ scFv 제작

[0297]

VH-V λ scFv cDNA 단편을 제작하기 위해 중첩 PCR을 수행한다. 수득된 생성물의 일부를 아가로스 겔 전기영동으로 가시화한다 (도 22). 생성된 VH-V λ scFv cDNA 단편은 PROfusion mRNA 디스플레이 기술에 의해 선별될 모든 필요한 요소를 갖는다 (도 23).

[0298]

각각의 VH-V λ scFv 클론의 서열분석으로 대부분에서 기능적인 개재 G4S 링커를 갖는 정확한 VH-V λ 재조합을 확인한다.

[0299]

실시예 10

[0300]

사람 림프절 mRNA로부터 나이브 카파 및 람다 PROfusion scFv 라이브러리의 제작

[0301]

이 실시예는 림프절 mRNA로부터 사람 나이브 scFv 라이브러리 (PBMC 카파 및 PBMC 람다)의 생성을 기술한다.

[0302]

10.1 역전사

[0303]

제1 스트랜드 cDNA를 SuperScript II 역전사효소 (Invitrogen, cat. # 18064-014) 및 15개 프라이머 혼합물 (100 nM 총 농도) (표 12)에 의해 제작자의 프로토콜에 따라 40 μ g의 mRNA로부터 합성한다. 반응은 각각 0.1 ml의 16개의 분취물에서 수행한다. RT 반응물을 풀링하고 (1.6 ml 총 용적), 37°C에서 20분 동안 20 μ l의 RNaseH와 함께 항온처리한 후, 물에 대해 투석한다.

[0304]

10.2 PCR

[0305]

10.2.1 VH cDNA 증폭

[0306]

상기 RT 반응의 1/3은 VH 리더 서열 (LS)-특이적 정방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물 및 JH-특이적 역방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, cat. # 11304-102)에 의해 제한된 증폭을 수행한다 (표 13). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 10 사이클의 94°C (20초), 55°C (20초), 및 68°C (60초); 3분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계.

이어서, PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN, cat. # 28106)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 소규모의 파일럿 실험으로 cDNA의 적어도 10배 증폭을 확인한다.

- [0307] 정제된 PCR 생성물의 1/2을 7개의 동일한 분취물로 나누고, 각각의 분취물을 VH 계열-특이적 cDNA 증폭용 주형으로서 사용한다. 증폭은 각각의 VH LS-특이적 정방향 프라이머 (200 nM) 및 JH-특이적 역방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 PCR로 수행한다 (표 13). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.
- [0308] 상기 PCR 생성물은 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제된다. 이어서, 각각의 PCR 생성물을 상응하는 VH-특이적 네스티드 정방향 프라이머 (200 nM) 및 JH-특이적 역방향 프라이머 (200 nM 총 농도)의 혼합물을 포함하는 PCR 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 증폭한다 (표 26). 각각의 반응물에서 정방향 프라이머는 후속하는 라이브러리 증폭 동안 특이성을 증가시키기 위해 도입된 8-뉴클레오타이드 "태그" (밑줄)를 갖는다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.
- [0309] PCR 생성물을 1% 아가로스 겔 전기영동하고, QIAquick 겔 추출 키트 (QIAGEN, cat. # 28704)로 정제한다. 이들 PCR 생성물의 분취물을 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 200 nM의 하기 보편적 프라이머 (T7TMVTag4s 및 Lib-GSv2-Rev)를 포함하는 PCR 반응물에서 대규모로 더욱 증폭시킨다. 이들 프라이머는 PCR 생성물의 5' 말단에 T7 프로모터 및 TMV-UTR 서열을 추가하며, PCR 생성물의 3' 말단에 부분적인 글리신-세린 (G4S)-링커를 추가한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 정제하고, 260 nm에서 UV 흡광도로 정량하며, 이들 생성물의 분취물을 1% 아가로스 겔-전기영동으로 가시화하여 순도를 확인한다. VH 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

표 26

네스티드 VH-특이적 PCR에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
VH1Tag4 Forward (서열번호 121)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGG TGCAGTCTGGRSCT
VH2Tag4 Forward (서열번호 122)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGRTCACCTTGAR GGAGTCTGGT
VH3Tag4 Forward (서열번호 123)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGK TGGAGTCTSGRGA
VH4Tag4 Forward (서열번호 124)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGC AGSAGTSSGGC
VH5Tag4 Forward (서열번호 125)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGG TGCAGTCTGGAGCA
VH6Tag4 Forward (서열번호 126)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTACAGCTGC AGCAGTCAG
VH7Tag4 Forward (서열번호 127)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGG TGCAATCTGGGT
JH1/2 RevV2 (서열번호 128)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCTCCACCTGAGGAGA CRGTGACCAGGGTGC
JH3 RevV2 (서열번호 129)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCTCCACCTGAAGAGA CGGTGACCATTGTCC
JH4/5 RevV2 (서열번호 130)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCTCCACCTGAGGAGA CGGTGACCAGGGTTC
JH6 RevV2 (서열번호 131)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCTCCACCTGAGGAGA CGGTGACCGTGGTCC
T7TMVTag4s (서열번호 132)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATT ACAGCTTCTTC
Lib-GSv2-Rev (서열번호 133)	CAGACCCTCCACCGCCGCTG

[0310]

[0311]

10.2.2 V_K cDNA 증폭

[0312]

상술된 RT 반응물로부터 생성된 cDNA의 1/3을 V_K 리더 서열 (LS)-특이적 정방향 프라이머 (총 농도 200 nM) 및 C_K-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 제한 증폭한다 (표 15). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 10 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (60초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. 별도의 소규모 실험으로 이러한 PCR에 의한 cDNA의 10배 이하의 증폭을 확인한다.

[0313]

PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 정제된 PCR 생성물의 1/2을 6개의 동일한 분취물로 나누고, 각각의 분취물을 각각의 V_K 계열-특이적 cDNA의 증폭용 주형으로서 사용한다. 각각의 V_K LS-특이적 정방향 프라이머 (200 nM) 및 C_K-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 PCR에 의해 증폭을 수행한다 (표 15). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.

[0314]

PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 이어서, 각각의 PCR 생성물을 상응하는 V_K-특이적 네스티드 정방향 프라이머 (200 nM) 및 C_K-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 PCR 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 증폭한다 (표

27). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계.

[0315] 이들 PCR 생성물의 분취물을 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 200 nM의 보편적 프라이머 (Lib-GSv2-Fwd 및 CKReverse)를 포함하는 PCR 반응물에서 대규모로 더욱 증폭시킨다.

[0316] 프라이머 Lib-GSv2-Fwd는 V_k의 상부에 부분적인 G4S-링커를 추가한다. G4S 링커 (Lib-GSv2-Fwd 및 Lib-GSv2-Rev)를 암호화하는 보편적 프라이머의 서열은 사람 PBMC 라이브러리 제작을 위해 사용되는 프라이머 (라이브러리-GS-Forward 및 라이브러리-GS-Reverse)의 서열로부터 변형된다. 이러한 변형은, 절단된 VH 서열을 생성하는, VH3 계열 생식계열의 프레임워크 1에 대한 프라이머 라이브러리-GS-Reverse 어닐링의 교차-프라이밍 문제를 피하기 위해 수행된다.

표 27

네스티드 V_k-특이적 PCR에 사용된 프라이머

명칭	올리고 서열
Vk1FwdV2 (서열번호 134)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACA TCCRGWTGACCCAGTCTCCWT
Vk2FwdV2 (서열번호 135)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATA TTGTGATGACYCAGWCTCCAC
Vk3FwdV2 (서열번호 136)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAA TTGTGWTGACRCAGTCTCCAGSCA
Vk4/6FwdV2 (서열번호 137)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACA TCGTGMTGACYCAGTCTCCAGA
Vk5FwdV2 (서열번호 138)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAA CGACACTCACGCAGTCTCCAGCAT
Vk6FwdV2 (서열번호 139)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATG TCGTGATGACACAGTCTCCAGCTT
CkReverse (서열번호 14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGC CACAGTTCG
Lib-GSv2-Fwd (서열번호 140)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTG

[0317]

[0318] PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 25 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 정제하고, 260 nm에서 UV 흡광도로 정량하며, 이들 생성물의 분취물을 1% 아가로스 겔-전기영동으로 가시화하여 순도를 확인한다. 수득된 V_k 계열-특이적 cDNA 단편의 일부를 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

[0319] 10.2.3 V_λ cDNA 증폭

[0320] 상기 RT 반응으로부터 생성된 cDNA의 1/3은 V_λ 리더 서열 (LS)-특이적 정방향 프라이머 (총 농도 200 nM) 및 C_λ-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)의 혼합물을 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 제한된 증폭을 수행한다 (표 21). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94℃ 변성; 10 사이클의 94℃ (20초), 55℃ (20초), 및 68℃ (40초); 3분의 68℃ 연장 및 4℃ 저장 단계. 별도의 소규모 실험으로 이러한 PCR에 의한 cDNA의 10배 이하의 증폭을 확인한다.

[0321] PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 정제된 PCR 생성물의 1/2을 16개의 동일한 분취물로 나누고, 각각의 분취물을 각각의 V_λ 계열-특이적 cDNA 증폭용 주형으로서 사용

한다. 증폭은 각각의 VL-LS-특이적 정방향 프라이머 (200 nM) 및 CL-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 PCR로 수행한다 (표 21). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 30 사이클의 94°C (20초), 55°C (20초), 및 68°C (40초); 3분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계.

[0322] PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)를 사용하여 제작자의 프로토콜에 따라 정제한다. 하기 단편을 후속 증폭 전에 풀링한다: VL-1 LS-1 및 VL1 LS-3 단편을 VL1 LS 믹스 단편에 3:2 비율로 풀링하고; VL-2 LS-3 및 VL2 LS-4 단편을 VL2 LS 믹스 단편에 3:2 비율로 풀링하며; VL3 LS-2, VL3 LS-3, VL3 LS-4 및 VL3 LS-5 단편을 VL3 LS 믹스 단편에 1:6:1:1의 비율로 풀링한다. 이어서, 각각의 계열에 상응하는 PCR 생성물을 상응하는 VL-특이적 네스티드 정방향 프라이머 (200 nM) 및 CL-특이적 역방향 프라이머 (200 nM)를 포함하는 PCR 반응물에서 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 증폭한다 (표 22). PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 25 사이클의 94°C (20초), 55°C (20초), 및 68°C (40초); 3분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계.

[0323] PCR 생성물을 1% 아가로스 겔 상에서 진행시키고, QIAquick 겔 추출 키트 (QIAGEN)으로 정제한다. 이들 PCR 생성물의 분취물을 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 200 nM의 보편적 프라이머 (Lib-GSv2-Fwd 및 CJLReverse)를 포함하는 PCR 반응물에서 대규모로 더욱 증폭시킨다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 25 사이클의 94°C (30초), 55°C (30초), 및 68°C (30초); 5분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계.

[0324] PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (QIAGEN)로 정제하고, 260 nm에서 UV 흡광도로 정량하며, 이들 생성물의 분취물을 1% 아가로스 겔-전기영동으로 가시화하여 순도를 확인한다. VL 계열-특이적 프라이머의 특이성이 먼저 확인된다.

[0325] 10.2.4 VH-Vκ scFv 제작

[0326] VH 및 Vκ cDNA 단편을 각각의 계열에서의 생식계열 수에 따라 혼합한다 (NCBI에 기초함) (표 17 및 18).

[0327] 총 10 μg의 VH cDNA 단편 (2×10^{13} 분자) 및 총 10 μg의 Vκ cDNA 단편 (2×10^{13} 분자)을 중첩 PCR용 주형으로 사용한다. PCR은 30 ml의 용적으로 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 및 프라이머 T7TMVUTR (200 nM) 및 Cκ5-FlagA20 Rev (200 nM)로 수행한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 12 사이클의 94°C (20초), 55°C (20초), 및 68°C (20초); 3분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계. PCR 생성물의 분취물을 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

T7TMVUTR (서열번호 1):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA

Cκ5-FlagA20 Rev (서열번호 7):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA

GTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA.

[0328]

[0329] 프라이머 Cκ5-FlagA20 Rev는 PCR 생성물의 3' 말단에 폴리A 테일을 추가한다. 따라서, 이 서열은 PROfusion 분자의 올리고-dT 정제에 사용된다.

[0330] 10.2.5 VH-Vλ scFv 제작

[0331] VH 및 Vκ cDNA 단편을 각각의 PCR 생성물에 의해 대표되는 생식계열의 다양성에 따라 혼합한다 (표 18 및 28). 총 10 μg의 VH cDNA 단편 (2×10^{13} 분자) 및 총 10 μg의 Vλ cDNA 단편 (2×10^{13} 분자)을 중첩 PCR용 주형으로 사용한다. PCR은 30 ml의 용적으로 백금 Taq DNA 폴리머라제 하이 피델리티 및 프라이머 T7TMVUTR (200 nM) 및 CL5 FlagA20 (200 nM)로 수행한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 10 사이클의 94°C (20초), 55°C (20초), 및 68°C (60초); 5분의 68°C 연장 및 4°C 저장 단계. PCR 생성물의 분취물을 TOPO TA 클로닝 키트 (Invitrogen, cat. # 45-0641)를 사용하여 클로닝하고, 각각의 클론을 서열화하여 분석한다.

표 28

V λ 단편에 대한 혼합 비율

VL 단편	VL1	VL2	VL3	VL4	VL5	VL6	VL7	VL8	VL9	VL10	전체
생식계열의 수	5	5	9	3	3	1	2	1	1	1	31
전체에 대한 비 (%)	16.1%	16.1%	29.0%	9.7%	9.7%	3.2%	6.4%	3.2%	3.2%	3.2%	100%

CL5 FlagA20 (서열번호 12):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG

프라이머 CL5-FlagA20은 PCR 생성물의 3'말단에 폴리A 테일을 추가한다. 따라서, 이 서열은 PROfusion 분자의 올리고-dT 정제에 사용된다.

10.3 스펙트라타이핑

각각 VH의 프레임워크 3 영역 및 J 영역에 어닐링하는 형광 염료-표지된 5' 정방향 프라이머 (6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5'-GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', 서열번호 17) 및 역방향 프라이머 (PanJH-Rev, 5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3', 서열번호 18)가 PCR에 의해 VH 도메인의 CDR3 영역에 걸쳐 증폭하는데 사용될 수 있다. 50 ng의 scFv 라이브러리 DNA 주형을 200 nM 6-FAM-PanVHFR3-Fwd 프라이머, 200 nM PanJH-Rev 프라이머, 200 μ M dNTP, 1x GoTaq 완충액 및 1.5 U의 GoTaq (Promega, Madison, WI)를 포함하는 30 μ l의 반응 용적에 사용한다. PCR 조건은 하기와 같다: 초기 2분의 94°C 변성; 30 사이클의 94°C (20초), 55°C (20초), 및 72°C (30초); 5분의 72°C 연장 및 4°C 저장 단계. PCR 후, 10 μ l의 생성물을 2% 아가로즈 겔에 로딩하여 성공적인 반응을 확인하고, 잔여 생성물을 ABI 서열분석기를 사용하여 스펙트라타이핑 전기영동한다. CDR3 길이는 ROX-염료 표지된 DNA 마커로 측정되는 생성물 길이로부터 60 bp 플랭킹 프레임워크 서열을 감함으로써 계산된다.

결과

PROfusion scFv 라이브러리 제작의 개요

PROfusion 라이브러리 제작에서 상이한 단계를 나타내는 흐름도가 도 24에 도시되어 있다.

VH cDNA 단편의 증폭

VH 보편적 프라이머 (T7TMVUTR 및 Lib-GSv2-Rev)로 증폭된 약 500 bp의 VH 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 아가로즈 겔-전기영동으로 가시화한다 (도 25). VH 계열-특이적 프라이머의 특이성이 앞서 시험되었으며, 많은 수의 생식계열을 갖는 계열을 증폭하는 프라이머에 대해 다시 확인된다 (표 29).

V κ 단편의 증폭

보편적 프라이머 (Lib-GSv2-Fwd: 및 CK Reverse)로 증폭된 V κ 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 아가로즈 겔-전기영동으로 가시화한다 (도 26). V κ 계열-특이적 프라이머의 특이성이 먼저 시험되며, 많은 수의 생식계열을 갖는 계열을 증폭시키는 프라이머에 대해 다시 확인된다 (표 30).

표 29

VH 계열-특이적 PCR 생성물의 서열분석

단편	클론의 수	생식계열 매치	계열	단편	클론의 수	생식계열 매치	계열
VH1/7	8	VH1-69	VH1	VH3	11	VH3-30/VH3-33	VH3
	3	VH1-8	VH7		11	VH3-23	VH3
	2	VH1-18	VH1		7	VH3-7	VH3
	2	VH1-2	VH1		5	VH3-21	VH3
	1	VH1-24	VH1		4	VH3-15	VH3
					2	VH3-9	VH3
					2	VH3-48	VH3
					1	VH3-43	VH3
VH2	11	VH2-5	VH2		1	VH3-53	VH3
	4	VH2-26	VH2				
VH4	5	VH4-59	VH4				
	4	VH4-55P	VH4				
	4	VH4-39	VH4				
	3	VH4-31	VH4				

[0344]

표 30

Vκ 계열-특이적 PCR 생성물의 서열분석

단편	클론의 수	생식계열 매치	계열	단편	클론의 수	생식계열 매치	계열
Vκ1	20	O12/O2	Vκ1	Vκ2	13	A19/A3	Vκ2
	8	O18/O8	Vκ1		3	A17/A1	Vκ2
	4	A20	Vκ1		3	A18/A2	Vκ2
	4	A30	Vκ1		3	O1/O11	Vκ2
	3	L19/L5	Vκ1	Vκ3	8	A11/A27	Vκ3
	2	L1/L15	Vκ1		4	L20/L6	Vκ3
	2	L8	Vκ1		3	L16/L2	Vκ3
	2	L11	Vκ1	Vκ6	7	A10/A26	Vκ6
	1	L12	Vκ1				
	1	L14	Vκ1				
	1	L18/L4	Vκ1				

[0345]

[0346] Vλ 단편의 증폭

[0347] 보편적 프라이머 (Lib-GSv2-Fwd, 서열번호 140, 및 CJL Reverse, 서열번호 15)로 증폭된 Vλ 계열-특이적 cDNA 단편의 분취물을 아가로스 겔-전기영동으로 가시화한다 (도 27). Vλ 계열-특이적 프라이머의 특이성이 먼저 시험된다.

[0348] VH-Vκ 및 VH-Vλ scFv 제작

[0349] VH-Vκ 및 VH-Vλ scFv cDNA 단편을 제작하기 위해 중첩 PCR을 수행한다. 수득된 생성물의 일부를 아가로스 겔

전기영동으로 가시화한다 (도 27). 생성된 VH-V_K 및 VH-V_λ scFv 단편은 PROfusion mRNA 디스플레이 기술에 의해 선별될 모든 필요한 요소를 갖는다 (도 28).

[0350] 각각의 VH-V_K 및 VH-V_λ scFv 클론의 서열분석으로 대부분에서 기능적인 개재 G4S 링커를 갖는 정확한 VH-V_K 및 VH-V_λ 재조합을 확인한다. 제작된 scFv 라이브러리 중 다양한 VH 및 V_K 및 V_λ 계열의 분포가 이전 문헌 보고와 일치한다 (도 29, 도 30) [참조: Tsuiji et al. (2006). Exp. Med.; V.203 (2), pp. 393-400 및 Arons et al. (2006) British Journal of Haematology V.133, pp. 504-512].

[0351] 스펙트라타이핑

[0352] VH CDR3 크기 분포에 대한 스펙트라타이핑 분석은 역방향 프라이머 (10.1 참조) 혼합물을 사용한 역전사에 의한 림프절 RNA로부터 수득된 cDNA에 대해, VH DNA 단편의 scFv 라이브러리의 어셈블리 바로 직전 VH DNA 단편의 혼합물에 대해, 최종 VH-V_K 및 VH-V_λ scFv 단편에 대해 수행된다 (도 31). 높은 다양성을 갖는 cDNA 라이브러리에서 예측되는 바와 같이, 관측된 CDR3 크기는 정상적 분포를 가지며, 대부분이 6 내지 22개의 잔기를 가지며, 11 내지 14개 잔기 사이에 집중된다.

[0353] 결론

[0354] 고품질의 사람 항체 리드의 선별은 성공적인 치료 항체 약물 개발을 위한 전제조건이다. 강력한 선별 기술에 추가하여, 항체 라이브러리의 특성 (공급원, 다양성 및 제작)이 우수한 리드를 생성하기 위한 유용성을 크게 결정한다. 본 발명에서는 다수의 공여자로부터의 mRNA가 라이브러리 다양성을 증가시키기 위해 사용되고 공여자 무리 내의 모든 다양성이 포착될 수 있도록 모든 항체 생식계열 서열을 커버하기 위해 고특이적 PCR 프라이머가 디자인되었다. 동일한 RNA 공급원으로부터 다수의 항체 리드를 선별하는 가능성을 증가시키기 위해 VH-V_K 및 VH-V_λ ScFv 라이브러리가 별도로 제작된다. 라이브러리 둘 다의 큰 다양성이 스펙트라타이핑 및 다수 클론의 서열분석으로 확인된다. 라이브러리 둘 다를 상이한 표적물에 대한 PROfusion mRNA 디스플레이 선별에 사용한다.

[0355] 실시예 11

[0356] PROfusion 제작물에 대한 서열분석 프라이머

[0357] 본 실시예는 PROfusion 제작물에 사용되는 서열분석 프라이머를 제공한다.

모든 scFv 및 VH 라이브러리를 위한 정방향 프라이머:

T7TMVUTR (서열번호 1):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA

모든 V_K 및 V_L 라이브러리를 위한 정방향 프라이머:

VL-T7TMVTag3GS-Fwd (서열번호 2):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGAC
CATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

모든 κ scFv 및 V_K 라이브러리를 위한 역방향 프라이머:

Ck1FLAGA20 (서열번호 3):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGAT

Ck2FLAGA20 (서열번호 4):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGT

Ck3FLAGA20 (서열번호 5):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGCA

Ck4FLAGA20 (서열번호 6):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGACGCC

Ck5FLAGA20 (서열번호 7):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGACGCCACA

모든 λ scFv 및 V_L 라이브러리를 위한 역방향 프라이머:

CL1FLAGA20 (서열번호 8):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTG

[0358]

CL2FLAGA20 (서열번호 9):

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGG

CL3FLAGA20 (서열번호 10):

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTG

CL4FLAGA20 (서열번호 11):

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTGGCC

CL5FLAGA20 (서열번호 12):

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG

Lib-GS-Rev (서열번호 16): CGCTACCTCCGCCGCCAGAC

모든 VH 라이브러리를 위한 역방향 프라이머:

VH-GSFLAGA20-Rev (서열번호 13):

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCATCATCATCTTTATA
ATCGCTACCTCCGCCGCCAGAC

역전사에서 제1 스트랜드 cDNA의 합성을 위한 프라이머:

Fcg:

FcγRev1 (서열번호 43): AGTTCCACGACACC

FcγRev2 (서열번호 44): GAAGGTGTGCACG

FcγRev3 (서열번호 45): CCACGCTGCTGAG

Fcm:

FcμRev1 (서열번호 46): ACTTTGCACACCAC

FcμRev2 (서열번호 47): TTTGTTGCCGTTGG

FcμRev3 (서열번호 48): GGGAATTCTCACAGG

Fcd:

FcδRev1 (서열번호 49): GCTGCTTGTCATGT

FcδRev2 (서열번호 50): TGCCTTTGGAGACT

[0359]

FcδRev3 (서열번호 51): GACCACGCATTTGT

Cκ-RT 프라이머:

CκRev1 (서열번호 52): TCCACCTTCCACTG

CκRev2 (서열번호 53): CAGGCACACAACAG

CκRev3 (서열번호 54): GAGTGTCACAGAGC

CLRT프라이머

CλRev1 (서열번호 55) GGGAACAGAGTGAC

CλRev2 (서열번호 56): GTGTGGCCTTGTTG

CλRev3. (서열번호 57): CCATCTGCCTTCCA

VH 단편 증폭에 사용되는 프라이머:

VH1/7LS (서열번호 58): ATCCTCTTYTTGGTGGSAGC

VH1-46LS (서열번호 59): GGTCTTCTGCTTGCTGGCTG

VH2LS (서열번호 60): CCTGCTGCTGACCAYCCCTTC

VH3LS (서열번호 61): GCTATTTTWVRAGGTGTCCARTGT

VH4LS (서열번호 62): GCRGCTCCCAGATGGGTCCTG

VH5LS (서열번호 63): ATGGGGTCAACCGCCATCCT

VH6LS (서열번호 64): TGGGCCTCCCATGGGGTGTC

네스티드 VH-특이적 PCR에 사용되는 프라이머:

VHPrimersTag2:

VH1Forward (서열번호 69):

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2Forward (서열번호 70):

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3Forward (서열번호 71):

tttacaattacagtgttgcgaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGRGA

VH4Forward (서열번호 72):

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

[0360]

VH5Forward (서열번호 73):

tttacaattacagtgttgcgaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA

VH6Forward (서열번호 74):

tttacaattacagtgttgcgaccatgAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7Forward (서열번호 75):

tttacaattacagtgttgcgaccatgAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGT

V_k 단편 증폭에 사용되는 프라이머:

T7TMVTag2 (서열번호 80):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAG TGTTCGAC

V_k1LS (서열번호 81): GCTCCTGGGRCTYCTGC

V_k2LS (서열번호 82): CTYCTGGGGCTGCTAATG

V_k3LS (서열번호 83): CTCTGGCTCMCAGATACCAC

V_k4LS (서열번호 84): GGATCTCTGGTGCCTACGG

V_k5LS (서열번호 85): GGATCTCTGATACCAGGGCA

V_k6LS (서열번호 86): CTGGGTTCCAGCCTCCAG

라이브리 Gly-Ser 중첩 프라이머:

Lib-GS-Fwd (서열번호 94): GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

FLAG-A20.Rev (서열번호 95):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGT
CGTCCTTGTAGTC

V_λ 단편 증폭에 사용되는 프라이머:

VL1LS-1 (서열번호 96): TCACTGTGCAGGGTCCTG

VL1LS-3 (서열번호 97): TCACTGCACAGGGTCCTG

VL2LS-3 (서열번호 98): TCAGGRCACAGGGTCCTG

VL2LS-4 (서열번호 99): TCAGGGCACAGGATCCTG

VL3LS-2 (서열번호 100): TGCATAGGTTCTGTGGTTTCTTCTG

VL3LS-3 (서열번호 101): ACAGGHTCTGWGGCCTCCTATG

VL3LS-4 (서열번호 102): TGCACAGGCTCTGTGACCTCCTATG

[0361]

VL3LS-5 (서열번호 103): TACACAGGCTCTATTGCCTCCTATG
 VL4Cls-2 (서열번호 104): CTTCAATTTCTCCACAGGTCTCTGTG
 VL4abLS-2 (서열번호 105): TCCACTGSACAGGGTCTCTCT
 VL5LS (서열번호 106): CACTGCACAGGTTCCTC
 VL6LS (서열번호 107): CTGCACAGGTCTTGGGC
 VL7LS (서열번호 108): CTCACCTGCTGCCCAGGG
 VL8LS (서열번호 109): GCTTATGGATCAGGAGTGGATTC
 VL9LS (서열번호 110): CACCCTCCTCAGTCTCCTC
 VL10LS (서열번호 111): CTCTGCAGTGTCTAGTGGTC

네스티드 VH-특이적 PCR에 사용되는 프라이머:

VHPrimersTag4:

VH1Forward (서열번호 121):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2Forward (서열번호 122):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGRTACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3Forward (서열번호 123):

ttacaattacagcttcttcaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGRGGGA

VH4Forward (서열번호 124):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5Forward (서열번호 125):

tttacaattacagcttcttcaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA

VH6Forward (서열번호 126):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7Forward (서열번호 127):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGGT

JHReverse1/2 (서열번호 128):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACRGT
GACCAGGGTGC

[0362]

JHReverse3 (서열번호 129):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAAGAGACGGTG
ACCATTGTCC

JHReverse4/5 (서열번호 130):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGT
GACCAGGGTTC

JHReverse6 (서열번호 131):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTG
ACCGTGGTCC

Vλ 단편 증폭에 사용되는 프라이머:

VκPrimersV2:

Vκ1FwdV2 (서열번호 134):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACATCCRGWTGACCC
AGTCTCCWT

Vκ2FwdV2 (VK3의 L10 포함) (서열번호 135):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATATTGTGATGACYC
AGWCTCCAC

Vκ3FwdV2 (L10 제외) (서열번호 136):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAAATTGTGWTGACRC
AGTCTCCAGSCA

Vκ4/6FwdV2 (서열번호 137):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACATCGTGMTGACYC
AGTCTCCAGA

Vκ5FwdV2 (서열번호 138):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAACGACACTCACGC
AGTCTCCAGCAT

Vκ6FwdV2 (서열번호 139):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATGTCGTGATGACAC
AGTCTCCAGCTT

T7-TMV-Seq (9970) (서열번호 148): CTC ACT ATA GGG ACA ATT AC

[0363]

T7TMVTag3 (서열번호 149):
 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGAC
 T7TMVTag4 (서열번호 150):
 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCAC
 T7TMVTag2s (서열번호 151):
 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAG TGTTCG
 T7TMVTag3s (서열번호 152):
 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGG
 T7TMVTag4s (서열번호 132):
 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTC
 T7TMVTag4L (서열번호 153):
 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA
 GCTTCTTCACCATGG
 TMVTag4L (서열번호 154):
 ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGG
 TMVTag4 (서열번호 155): ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCAC
 TMVTag4s (서열번호 156): ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTC
 phylflag3's (폴리 A 없음) (서열번호 157): CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGATGTC
 VH-FLAGA20-Rev (FLAG는 VL의 FLAG 서열과의 X-프라이밍을 최소화하도록
 암호화된다) (서열번호 158):
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCATCATCATCTTTATA
 ATC

Cμ 스페이서를 갖는 VH 도메인 라이브러리를 제조하기 위한 프라이머:

JH1/2Cm-Rev (서열번호 159):
 GGTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC
 JH4/5Cm-Rev (서열번호 160):
 GGTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC
 JH6Cm-Rev (서열번호 161):
 GGTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAGGAGACGGTGACCGTGG TCC

[0364]

JH3Cm-Rev (서열번호 162):

GGTTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAAGAGACGGTGACCATTG TCC

JH1/2sRev (서열번호 65): CTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC

JH4/5sRev (서열번호 66): CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

JH6sRev (서열번호 67): CTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC

JH3sRev (서열번호 68): CTGAAGAGACGGTGACCATTGTCC

Vκ 프라이머:

Vκ1 Forward (서열번호 88):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACATCCRGWTGACCCA
GTCTCCWT

Vκ2 Forward (Vκ3의 L10 포함) (서열번호 89):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACYCA
GWCTCCAC

Vκ3 Forward (L10 제외) (서열번호 90):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAATTGTGWTGACRCAGT
CTCCAGSCA

Vκ4/6 Forward (서열번호 91):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACATCGTGMTGACYCA
GTCTCCAGA

Vκ5 For-NEW (서열번호 92):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCACGCAGT
CTCCAGCAT

Vκ6 For-NEW (서열번호 93):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATGTCGTGATGACACAGT
CTCCAGCTT

Vκ5 Forward (서열번호 168):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCACGCA
GTCTC

Vκ6 Forward (서열번호 169):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATGTCGTGATGACACAGT
CTCCAGCT

[0365]

Ck Reverse (서열번호 14):

GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

Ck5 FLAGA20 (서열번호 7):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA

Ck-s 역방향 프라이머: (서열번호 87): GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

Ck-긴-역방향 프라이머(서열번호 170): FLAG 앞에 7 A.A.를 추가하기 위한 긴 Ck
역방향 프라이머:

gtcgtcgtcgtcctttagtcCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGC
CACAGTTCG

FLAG hCk 프라이머:

CkL4-FlagA20-Rev (서열번호 171):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGGCGGGAAGAT

CkL3-FlagA20-Rev (서열번호 172):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGGCGGAA

CkL2-FlagA20-Rev (서열번호 173):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGGCGG

CkL1-FlagA20-Rev (서열번호 174):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGG

VL 프라이머:

VL1/10 Forward (서열번호 175):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGKGCTGACKCA
GCCRC

[0366]

VL2 Forward (서열번호 114):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCA
GCCT

VL3 Forward-New (서열번호 115):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGTCCTATGAGCTGACDCA
G

VL4ab Forward (서열번호 116):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGCYTGTGCTGACTCA
ATC

VL4c Forward (서열번호 117):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCTGCCTGTGCTGACTCA
GCCCCG

VL5/9 Forward (서열번호 118):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGCCTGTGCTGACTCA
GCCRBCT

VL6 Forward (서열번호 119):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGAATTTTATGCTGACTCA
GCCC

VL7/8 Forward (서열번호 120):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGRCTGTGGTGACYCA
GGAG

CJL Reverse (서열번호 15):

GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTGGGCTGACCK
AGGACGGT

CJL-sReverse (서열번호 112): GCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT

VH 프라이머 Tag3:

VH1FwdTag3 (서열번호 176):

tftacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2FwdTag3 (서열번호 177):

tftacaattacaGGCTTTGGaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

[0367]

VH3FwdTag3(서열번호 178):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGR GGA

VH4FwdTag3(서열번호 179):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5FwdTag3(서열번호 180):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6FwdTag3(서열번호 181):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7FwdTag3(서열번호 182):

TttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCT GGGT

VL프라이머:

VL1/10FwdV2(서열번호 183):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGTCTGKGCTGACKC
AGCCRC

VL2FwdV2(서열번호 184):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGTCTGCCCTGACTCA
GCCT

VL3FwdV2(서열번호 185):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTTCCTATGAGCTGACDCA
G

VL4abFwdV2(서열번호 186):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGCYTGTGCTGACTCA
ATC

[0368]

VL4cFwdV2 (서열번호 187):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCTGCCTGTGCTGACTCA
GCCCCCG

VL5/9FwdV2 (서열번호 188):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGCCTGTGCTGACTCA
GCCRBCT

VL6FwdV2 (서열번호 189):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTAATTTTATGCTGACTCA
GCCC

VL7/8FwdV2 (서열번호 190):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGRCTGTGGTGACYC
AGGAG

Lib-GSv2-Fwd (서열번호 140): CAGCGGCGGTGGAGGGTCTG

Lib-GSv2-Rev (서열번호 133): CAGACCCTCCACCGCCGCTG

JH1/2RevV2 (서열번호 128):

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC

JH4/5RevV2 (서열번호 130):

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

JH6RevV2 (서열번호 131):

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC

JH3RevV2 (서열번호 129):

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAAGAGACGGTGACCATGTCC

라이브러리 GlySer 링커 v2:

라이브러리 **GS Fwd:** C AGC GGC GGT GGA GGG TCT G ----->

TCC TCA GGT GGA GGC GGC AGC GGC GGT GGA GGG TCT GGC GGT GGC
GGA AGT

AGG AGT CCA CCT CCG CCG TCG CCG CCA CCT CCC AGA CCG CCA CCG
CCT TCA

라이브러리 **GS Rev:** <----- G TCG CCG CCA CCT CCC AGA C

[0369]

S S G G G G S G G G S G G
G G S

PCR 동안 중첩

VH3 FR1: CAG CTG GTG GAG TCT **GGG GGA GGC** TTG GTC CAG CCT GGG
GGG TTC
TCC TCA GGT GGA GGC GGC **AGC** GGC GGT GGA GGG **TCT** G
G **TCG** CCG CCA CCT CCC **AGA** CCG CCA CCG
CCT **TCA**
(**Vk3, Vk6-8**) <----**CG** CCG CCA CCT CCC **AGA** CCG CCA CCG
CCT **TCA**

사람 편도선 라이브러리를 위한 새로운 태그를 갖는 프라이머

VH PrimersTag5:

VH1FwdTag5 (서열번호 191):

ttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGR SCT

VH2FwdTag5 (서열번호 192):

ttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGRTACCTTGARGGAGTC TGGT

VH3FwdTag5 (서열번호 193):

ttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGR GGA

VH4FwdTag5 (서열번호 194):

ttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5FwdTag5 (서열번호 195):

ttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6FwdTag5 (서열번호 196):

ttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7FwdTag5 (서열번호 197):

TttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGT

사람 골수 라이브러리를 위한 새로운 태그를 갖는 프라이머

VHPrimersTag6:

[0370]

VH1FwdTag6 (서열번호 198):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRS CT

VH2FwdTag6 (서열번호 199):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3FwdTag6 (서열번호 200):

tttacaattacaGTTTGGCTCaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSG RGA

VH4FwdTag6 (서열번호 201):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5FwdTag6 (서열번호 202):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6FwdTag6 (서열번호 203):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7FwdTag6 (서열번호 204):

TttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCATCTGG GT

Tag5 정방향 프라이머를 재증폭

TMVTag5s (서열번호 205): ACAATTACTATTTACAATTACAGTGTCTGT

TMVTag6s (서열번호 206): ACAATTACTATTTACAATTACAGTTTGGCT

TMVTag5 (서열번호 207): ACAATTACTATTTACAATTACAGTGTCTGTacc

TMVTag6 (서열번호 208): ACAATTACTATTTACAATTACAGTTTGGCTacc

T7TMVTag5s (서열번호 209):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTT ACA AT TA CAGTGTCTGT

T7TMVTag6s (서열번호 210):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTAC AGTTTGGCT

[0371]

[0372]

참조문 인용

[0373]

본원을 통해 인용될 수 있는 모든 인용 참조문 (문헌 참조, 특허, 특허원 및 웹사이트 포함)의 내용은 당해 참조문에 인용된 참조문과 같이 전문이 참조로서 본원에 명확히 포함된다. 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 실시는 당해 기술 분야에 널리 알려진 면역학, 분자 생물학 및 세포 생물학에 대한 통상의 기술을 이용할 것이다.

[0374]

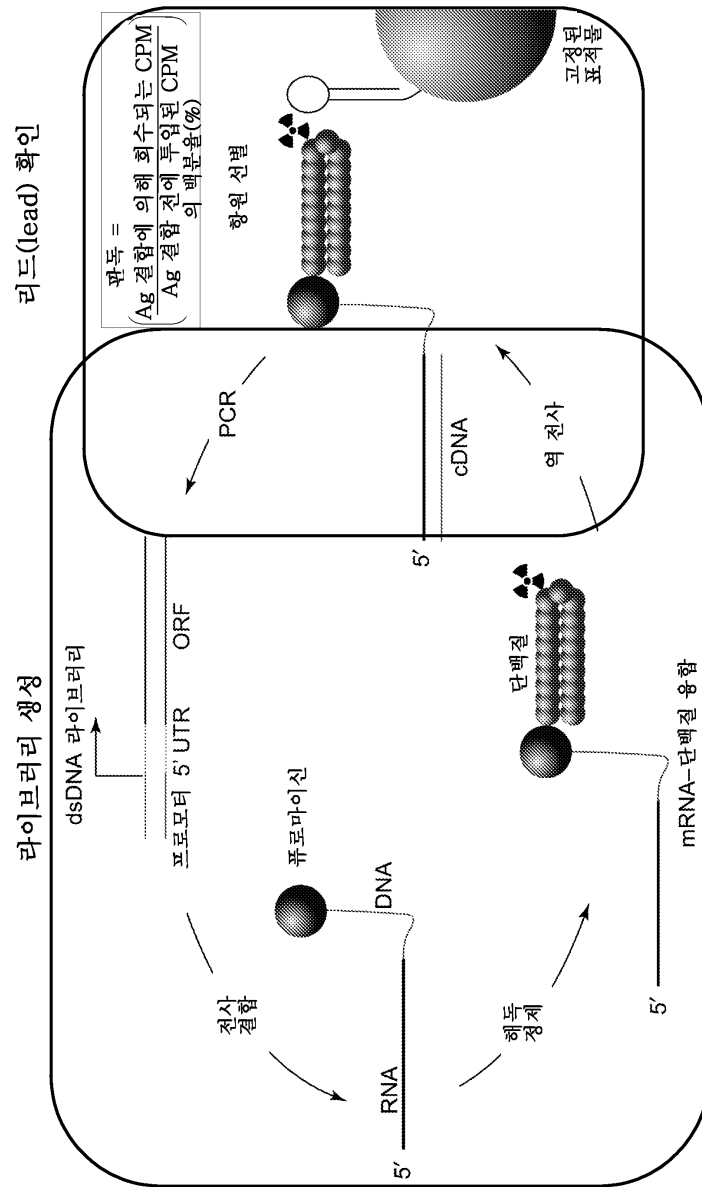
등가물

[0375]

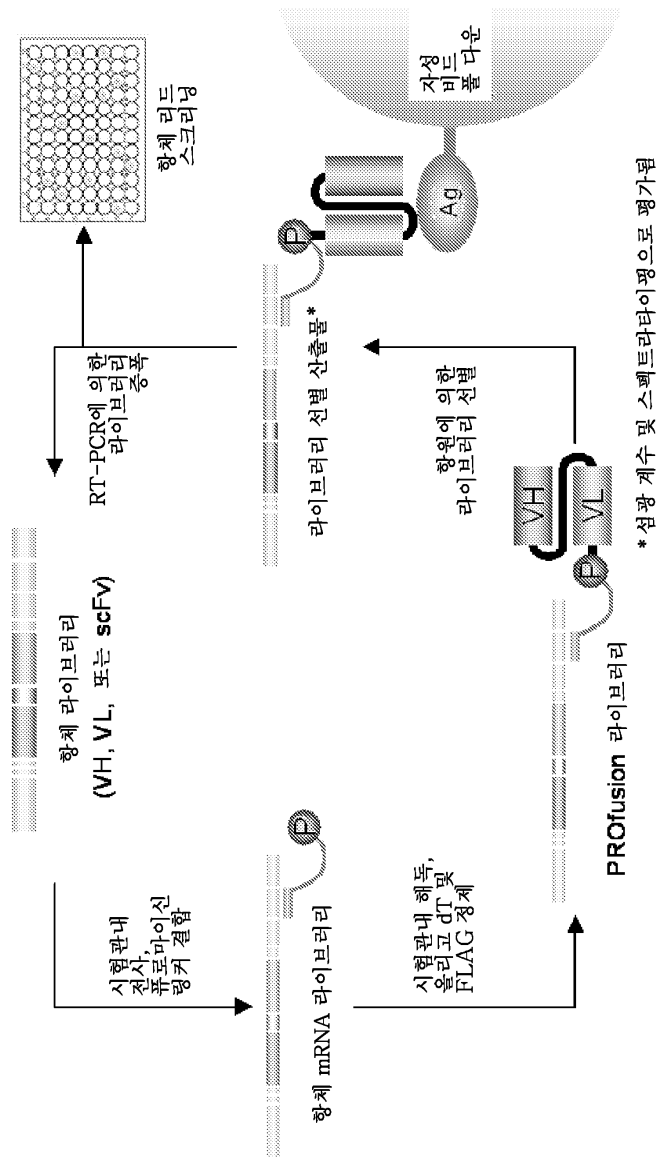
본 발명은 이의 취지 또는 본질적인 특성으로부터 벗어나지 않으면서 다른 특정 형태로 구체화될 수 있다. 따라서, 이전 양태들은 본원에 기술되는 본 발명을 제한하려는 것이 아니라 모든 면에서 본 발명을 설명하려는 것으로 간주되어야 한다. 따라서, 본 발명의 범위는 전술된 것에 의해 지시되기보다는 첨부된 특허청구범위에 의해서 지시되며, 따라서 특허청구범위와 등가의 의미 및 범위에 속하는 모든 변화를 본원에 포함시키고자 한다.

도면

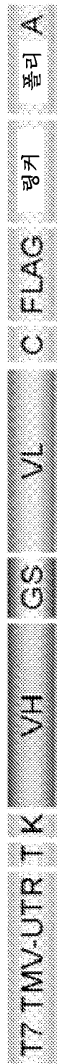
도면1



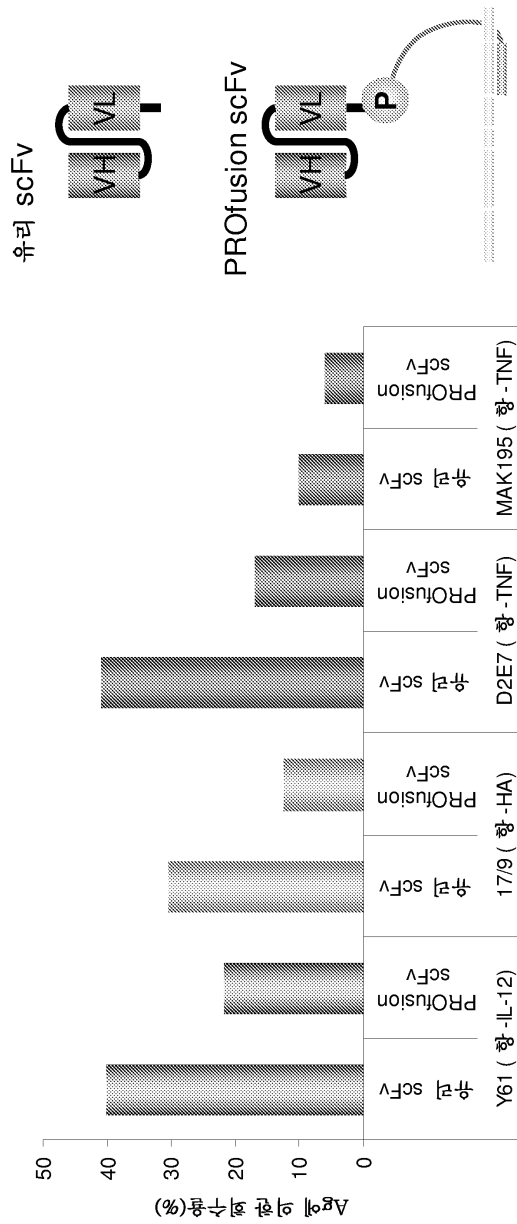
도면2



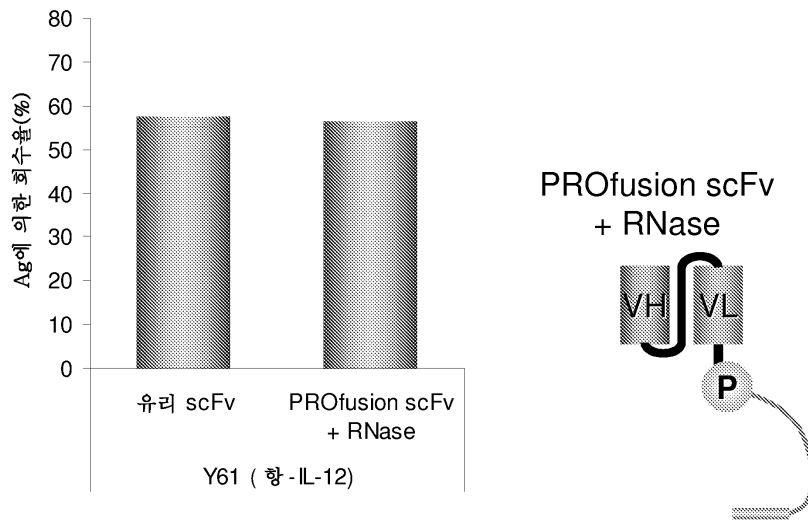
도면3



도면4



도면5



도면6

1 60

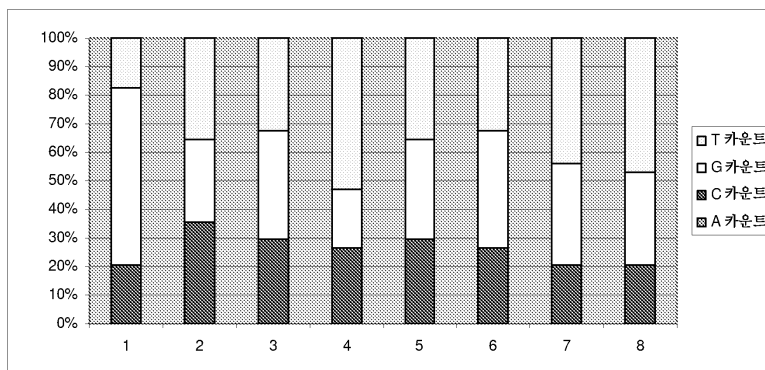
17_9-tag1 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCGTGGGTACCATGGAAG

17_9-tag2 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAAG

17_9-tag3 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACCATGGAAG

17_9-tag4 TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAAG

T7 프로모터 TMV-UTR 태그 코작 17/9



도면7

T7 TMV '태그' 코작 17/9

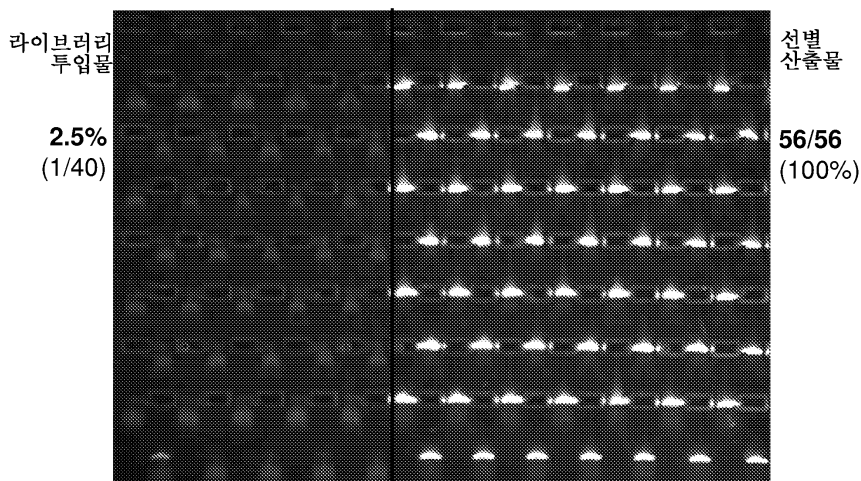
T7

T7 TMV '태그'

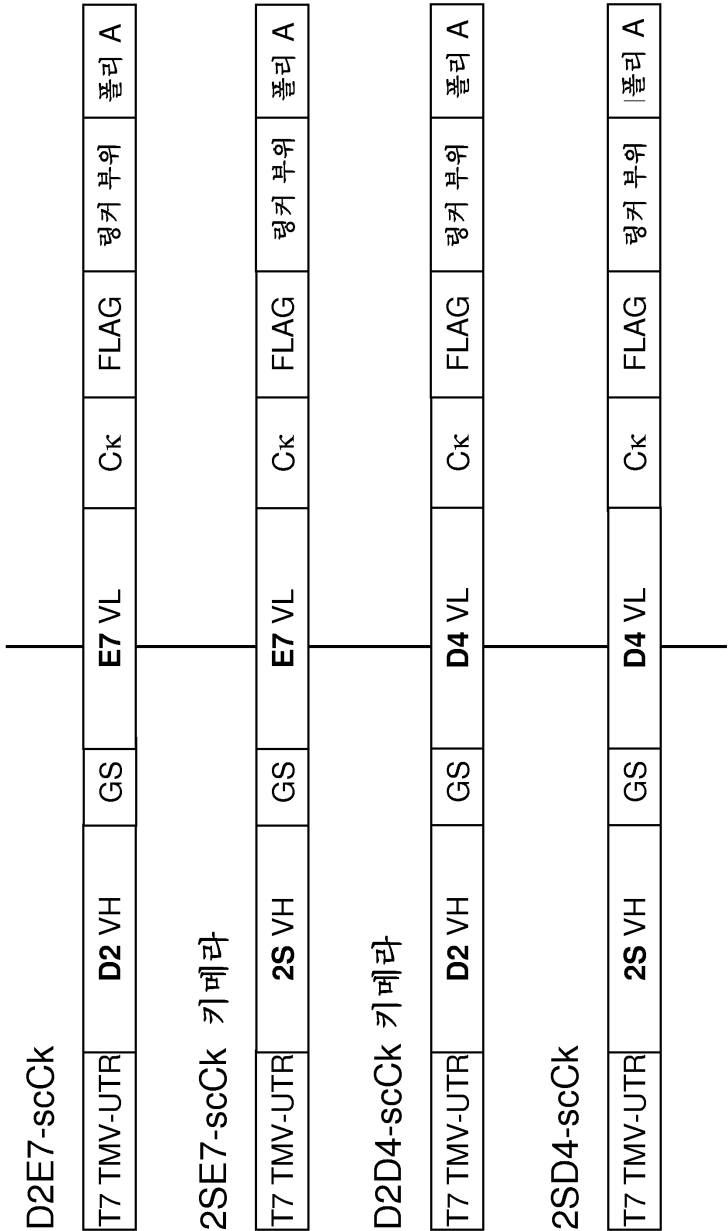
도면8

R1 산출물 태그	R2 산출물 태그	R3 산출물 태그
CGGTCCCT	CCGCGCGG	CCGTCTTT
CTCGTTTG	CCGGGTTG	CCTCTTGT
CTCTGTGT	CCTCCCGT	CCTGTGTT
CTGTGTTG	CGGGCTGG	CGCTGGTT
CTTTTGCT	CGTCGGTC	CGTCTGGT
GCCGCGGT	CGTGGGTT	CTCGCGCC
GGCGCTGT	CGTGGGTT	CTCTTGCG
GGCGCTGT	CTCCTGGC	GCCTTCTC
GGGTGTCT	GCCCGTCT	GCCTTTTT
GGTTCTTT	GCCTGTTC	GCGGCCTT
GGTTGCGG	GCGCTCGT	GCGTGGGT
GTGCTTCT	GCGGCCCT	GCGTGGGT
GTGTGCGT	GCGGCTTG	GCGTGGGT
GTGTCTTC	GCTTCTCG	GCTTCTTC
GTTTGCGC	GGCCTTTG	GCTTCTTC
TCGCGTCC	GGCTGTCC	GGCCGCGG
TCGTGCGT	GGCTT ATG	GGCGCGCG
TGCCCCGCG	GGCTT ATG	GGCGGGTG
TGCCGGTG	GGGCGGCT	GGCTTTGG
TGGTCGCT	GGGTGTGT	GGGCCTTG
TGGTCTTG	GGTTGTGC	GGGGGCGT
TTTGCTGC	GTCGGGCG	GGTCCTTC
	GTCGGGTT	GTGCGTCG
	GTGTGCTC	GTGTCTGT
	GTGTTTTT	GTGTTGCG
	TGCTTTGT	GTTCTGTCG
	TGCTTTGT	GTTCTTGC
	TGCTTTTG	GTTTGGCT
	TGTTTTCG	TCGTGCGT
	TTGCGCTT	TGTCTGTG
	TTGGGCTT	TTCTCCTT
	TTGTGTTT	TTGGCCTG
	TTTGGCTC	TTGTTGGC
	TTTGGCTC	TTTTGCTC
	TTTTGTTG	

도면9

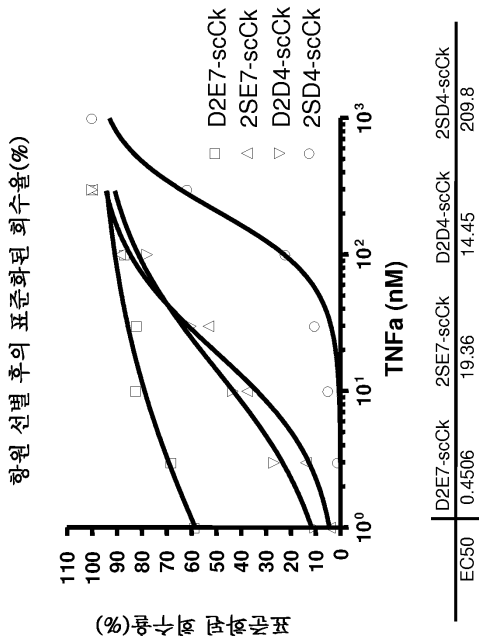
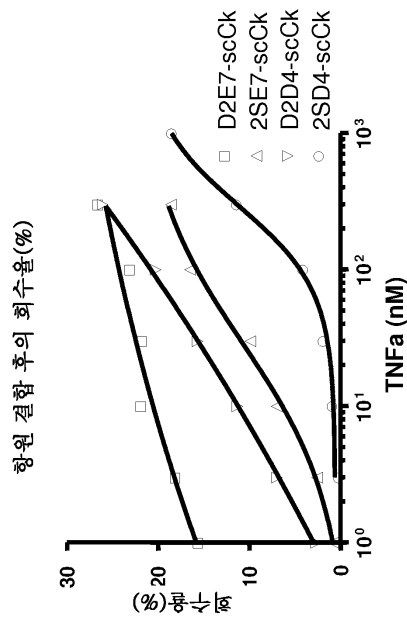


도면10



도면11

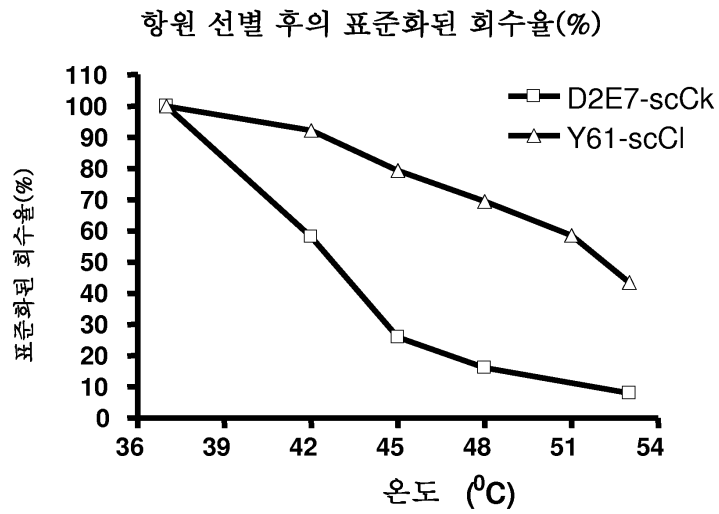
적정은 유리 단백질에 대해 수행되었다



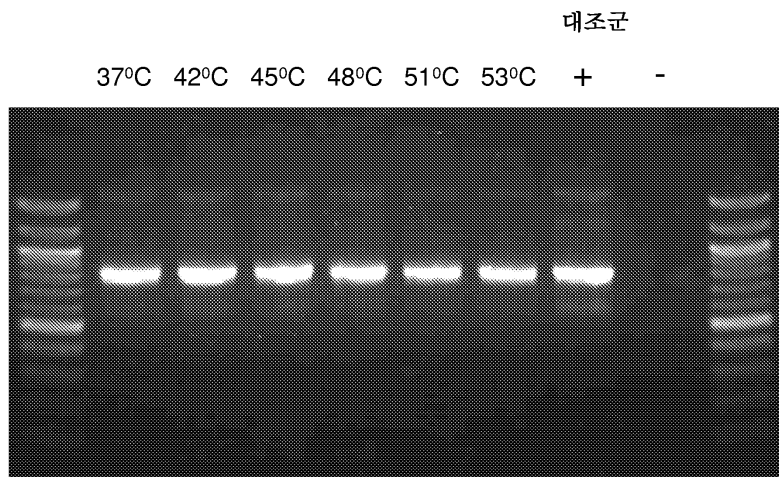
결론 : PROfusion 기술은 상이한 친화도를

갖는 결합체를 구분하는데 사용될 수 있다

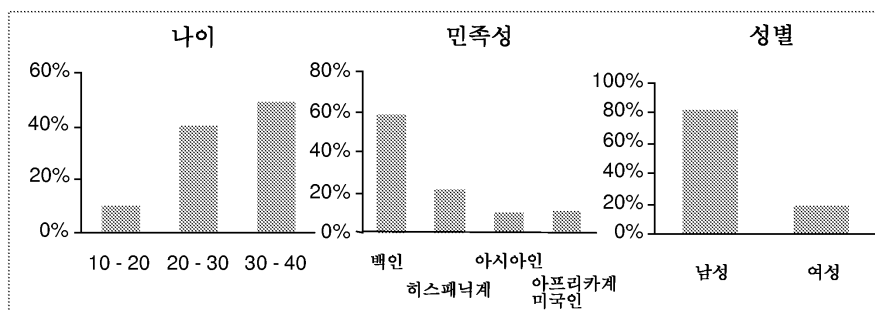
도면12



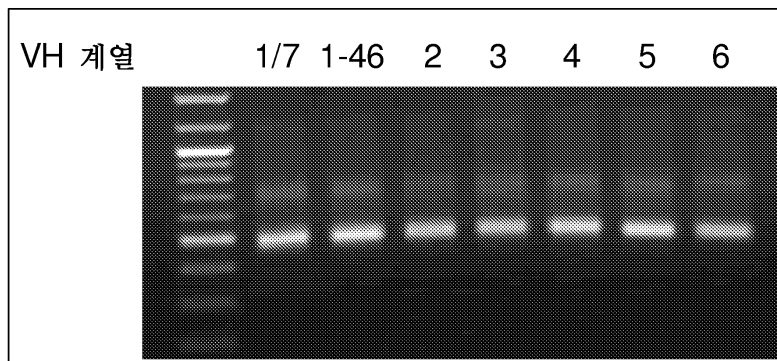
도면13



도면14

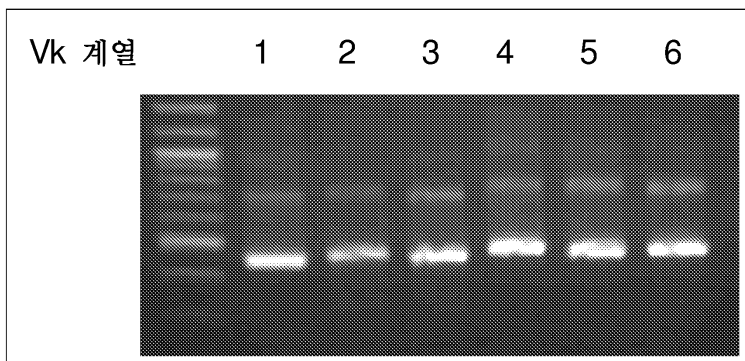


도면15



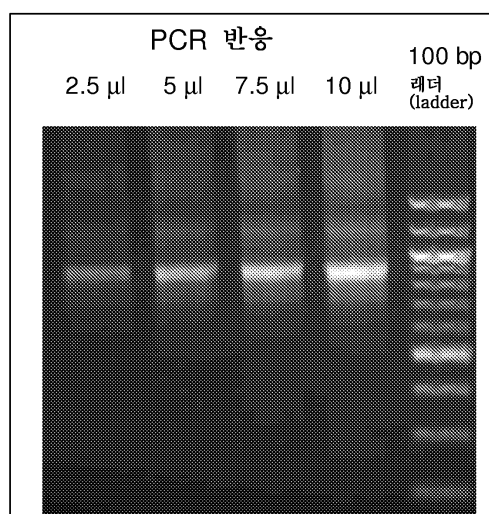
T7 TMV-UTR Tag2 VH GS

도면16



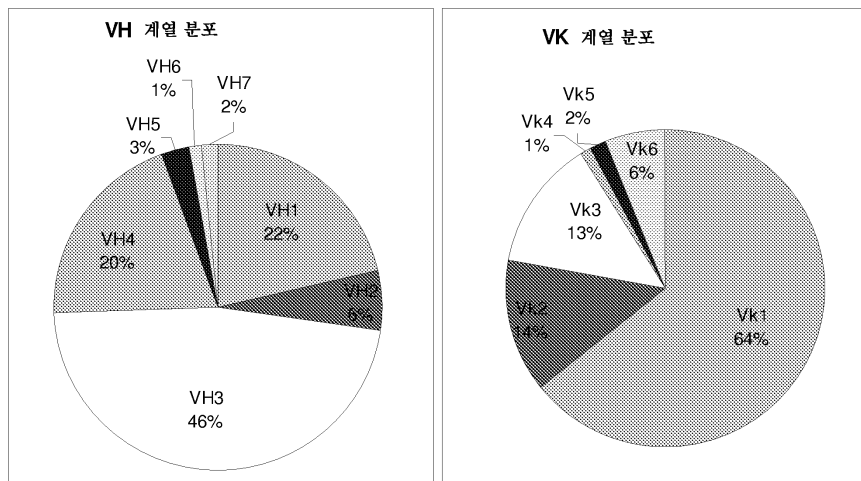
GS VL Cλ FLAG 링커 부위 폴리 A

도면17

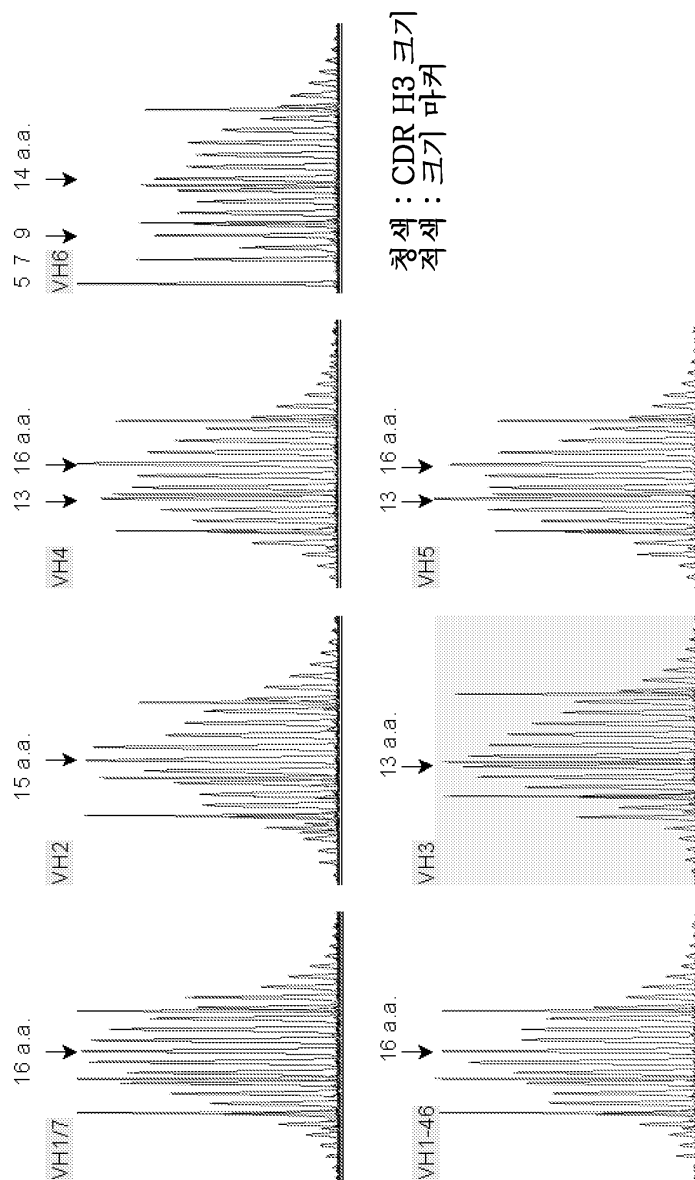


T7 TMV-UTR Tag2 VH GS VL Cκ FLAG 링커 부위 폴리 A

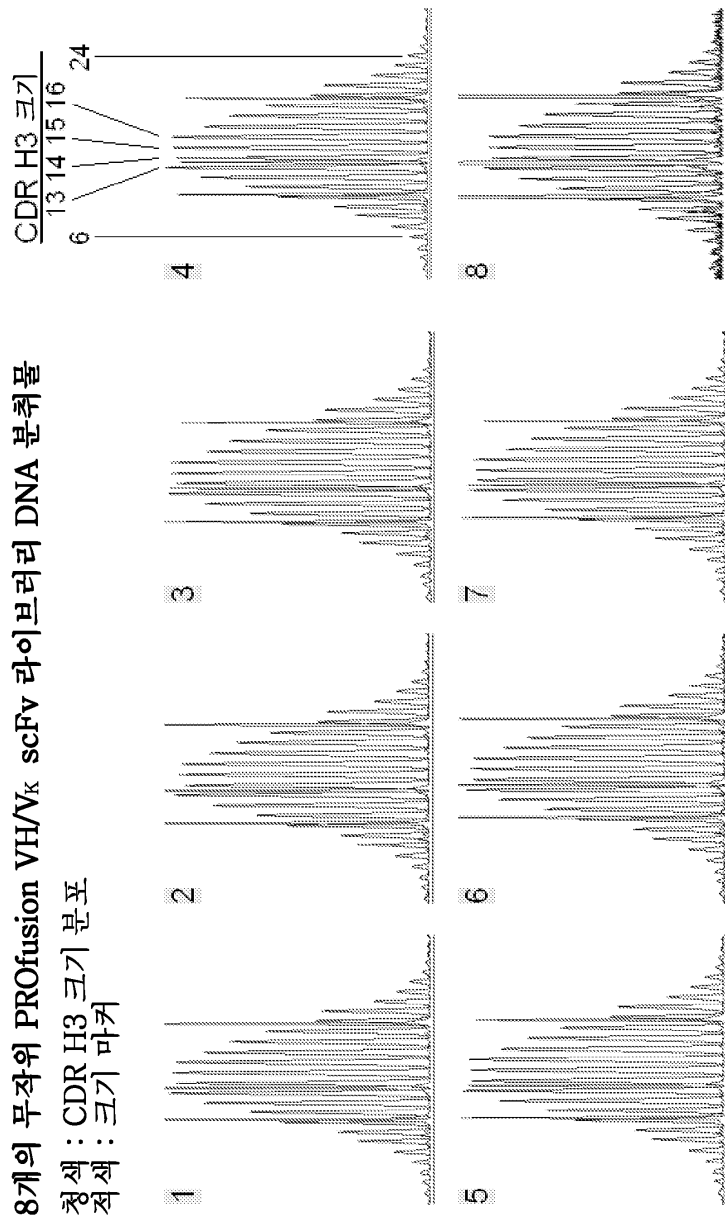
도면18



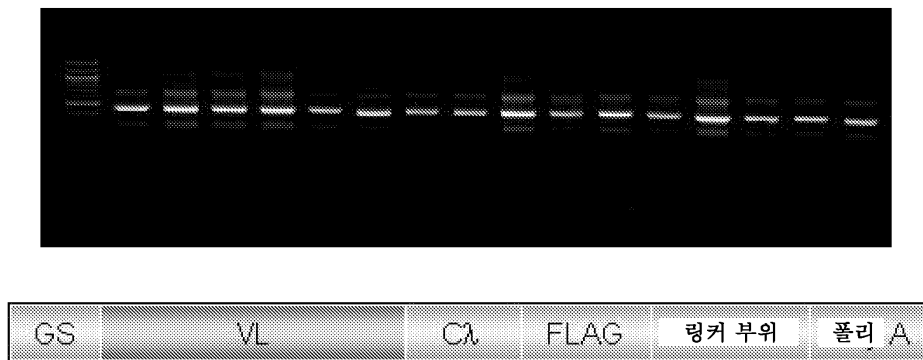
도면19



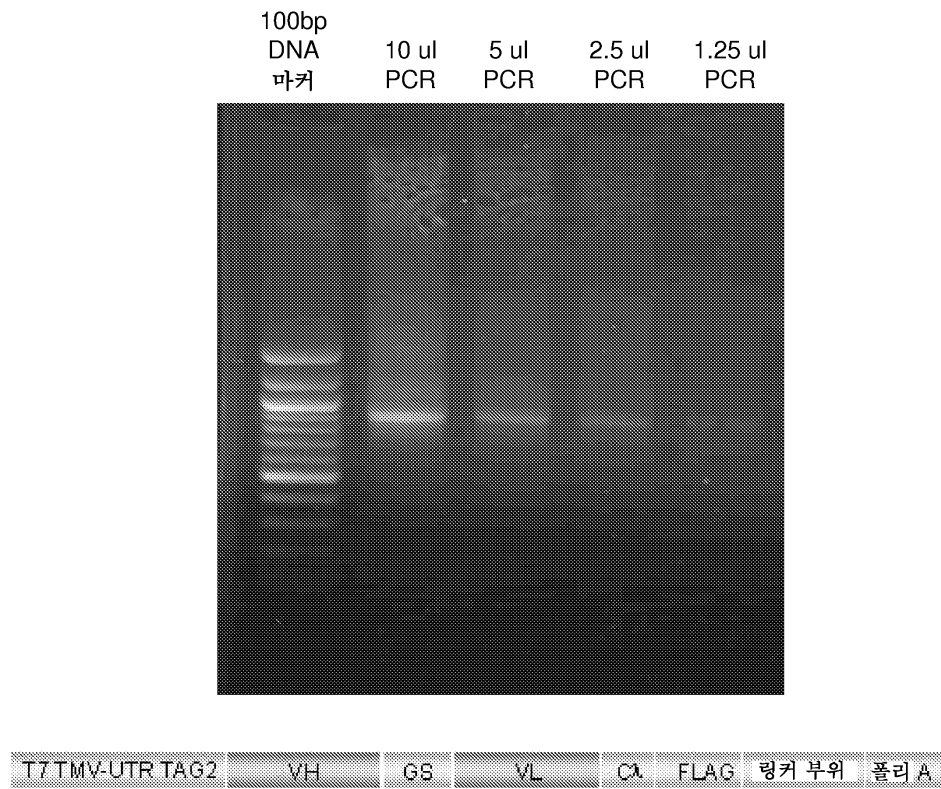
도면20



도면21

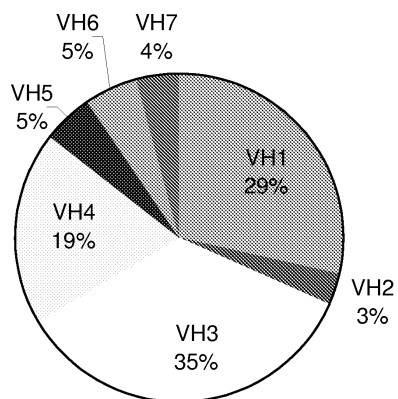


도면22

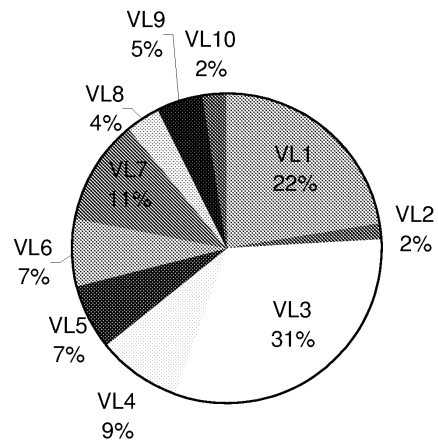


도면23

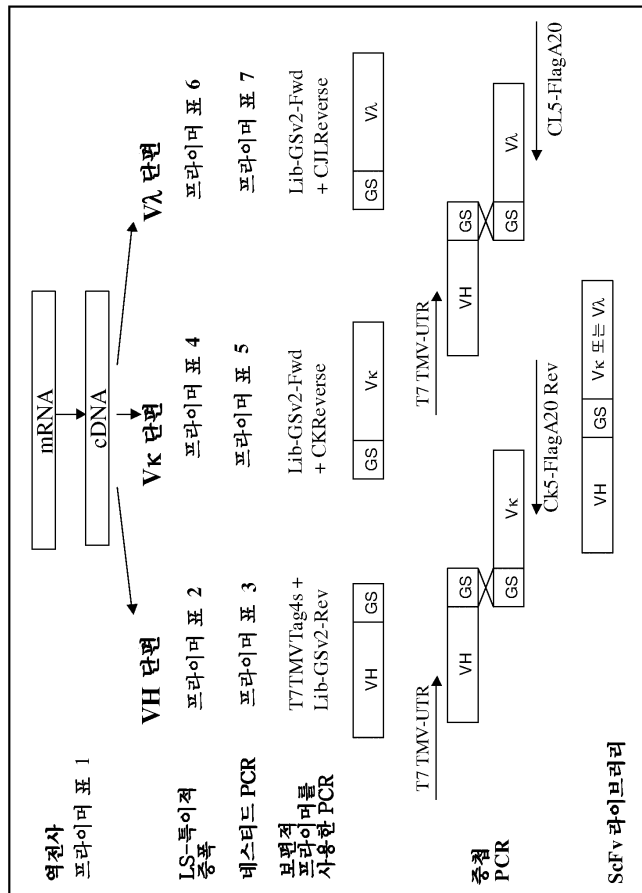
VH 계열 분포



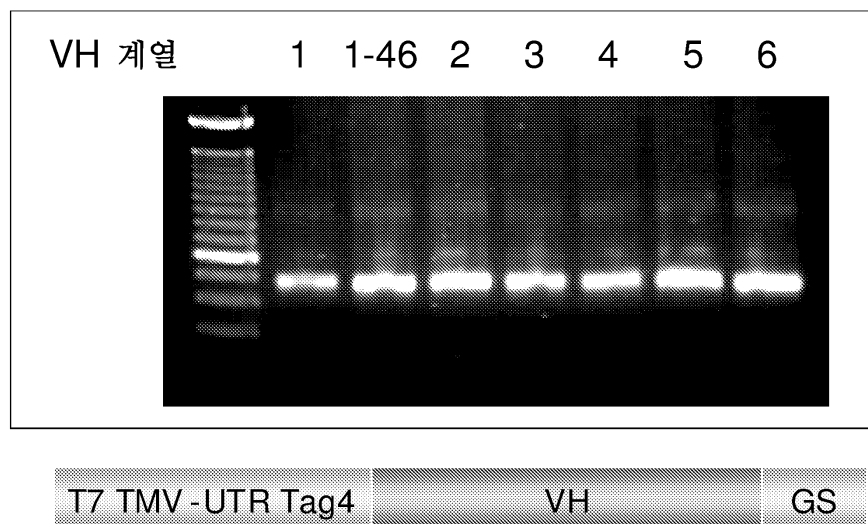
VL 계열 분포



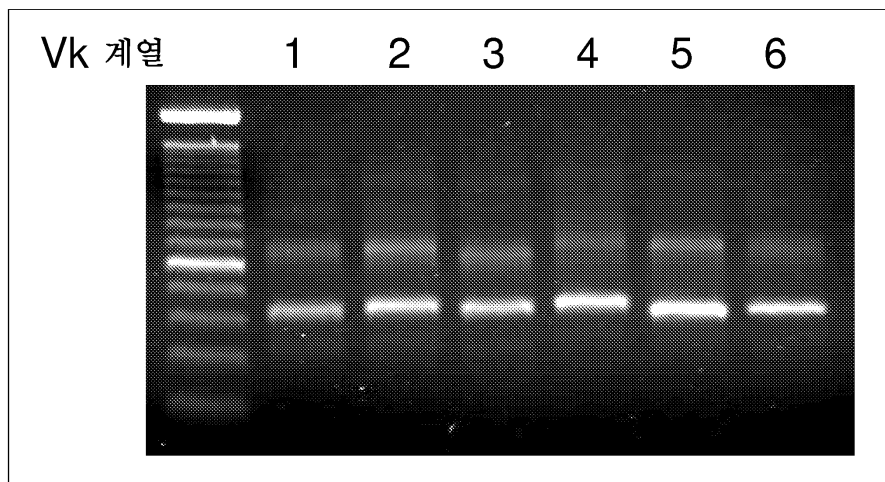
도면24



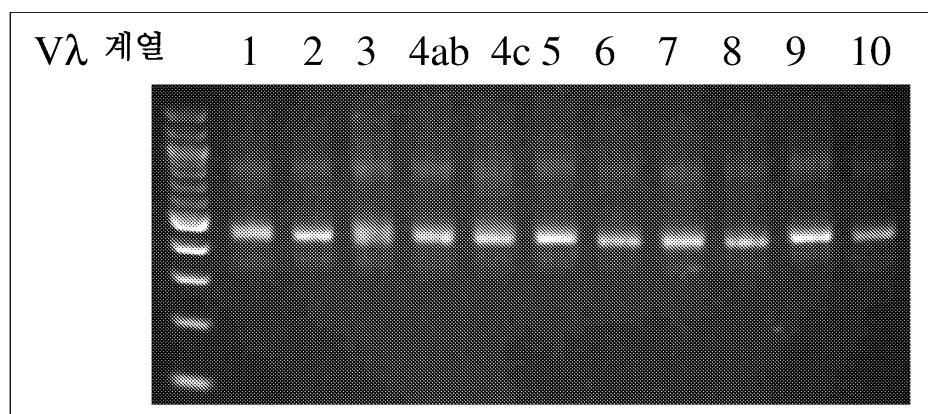
도면25



도면26

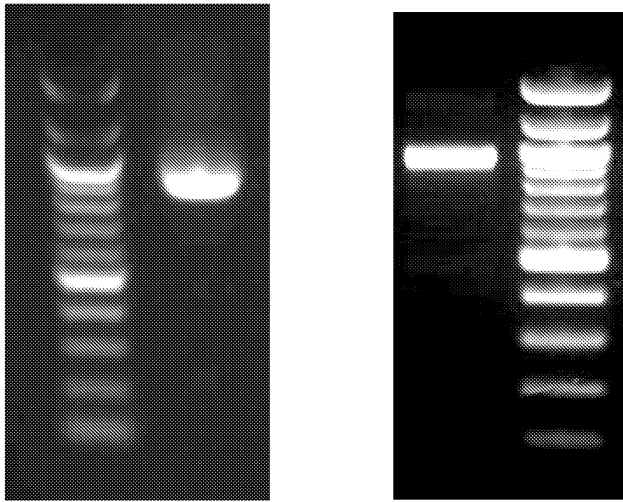


도면27



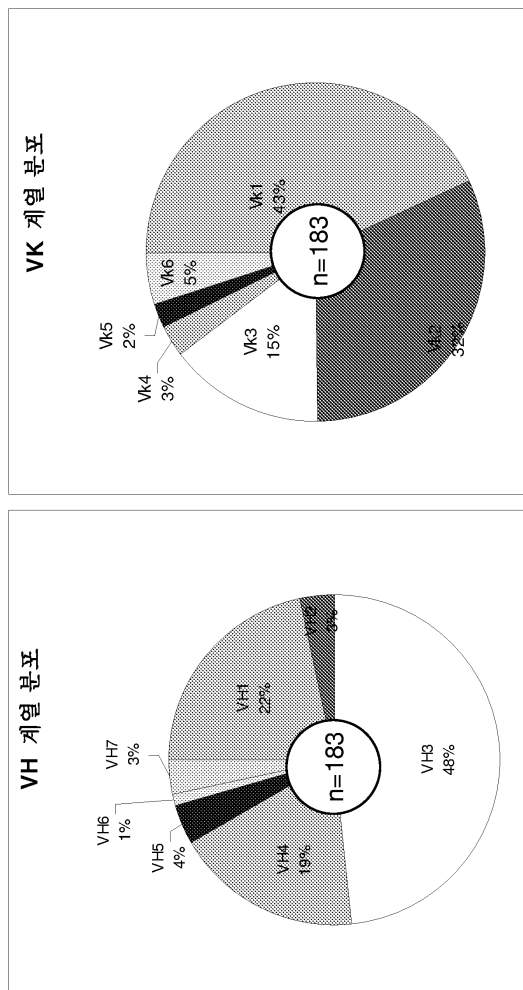
도면28

VH-V κ scFv VH-V λ scFv

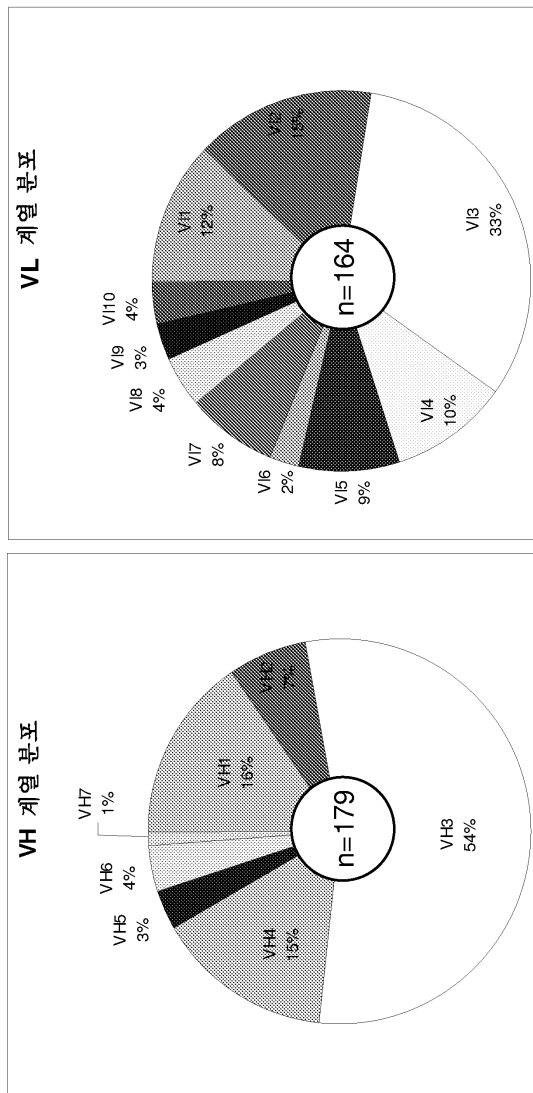


T7 TMV-UTR Tag2 VH GS VL C κ 또는 C λ FLAG 링커 부위 폴리 A

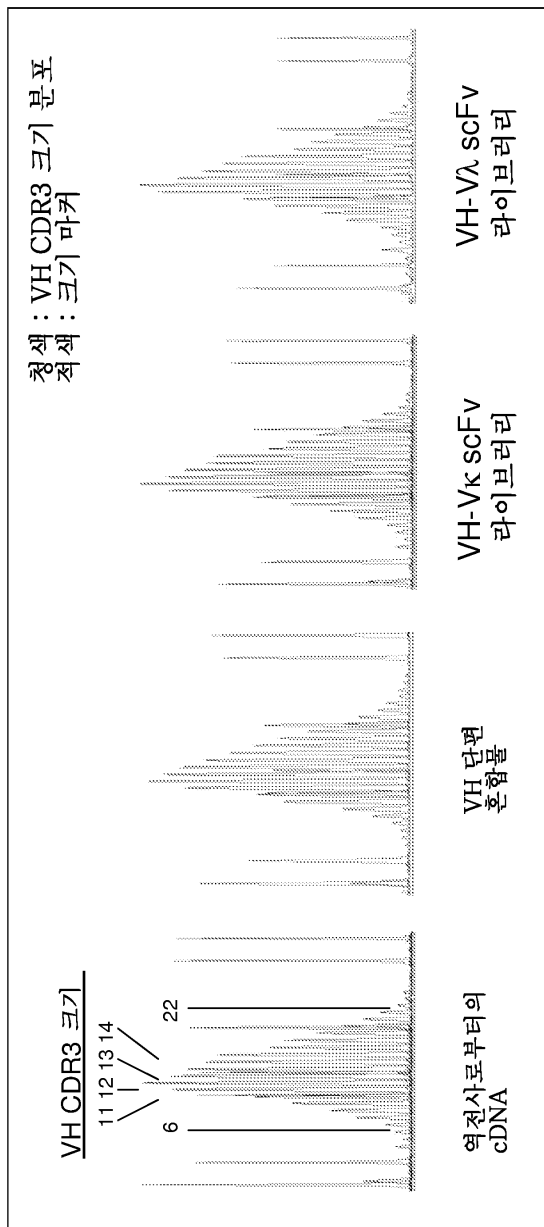
도면29



도면30



도면31



서열 목록

- <110> Abbott Laboratories
- <120> Improved antibody libraries
- <130> BBI-318PC
- <150> US 61/101,483
- <151> 2008-09-30
- <160> 212
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVUTR

<400> 1

taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta ca 42

<210> 2

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL-T7TMVTag3GS-Fwd

<400> 2

taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta caggcttttg accatggggt 60

ctggcggcgg aggtagcg 78

<210> 3

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)1FLAGA20

<400> 3

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgctg tcgtcgtcct tgtagtcgaa 60

gacagat 67

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)2FLAGA20

<400> 4

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgctg tcgtcgtcct tgtagtcgaa 60

gacagatggt 70

<210> 5

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)3FLAGA20

<400> 5

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcgaa 60

gacagatggt gca 73

<210> 6

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)4FLAGA20

<400> 6

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcgaa 60

gacagatggt gcagcc 76

<210> 7

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)5FLAGA20

<400> 7

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcgaa 60

gacagatggt gcagccaca 79

<210> 8

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: CL1FLAGA20

<400> 8

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcagt 60

gacagtg 67

<210> 9

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: CL2FLAGA20

<400> 9
 tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgctcct tgtagtcagt 60
 gacagtggggg 70
 <210> 10
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: CL3FLAGA20
 <400> 10
 tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgctcct tgtagtcagt 60
 gacagtggggg ttg 73
 <210> 11
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: CL4FLAGA20
 <400> 11
 tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgctcct tgtagtcagt 60
 gacagtggggg ttggcc 76
 <210> 12
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: CL5FLAGA20
 <400> 12
 tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgctcct tgtagtcagt 60
 gacagtggggg ttggccttg 79
 <210> 13
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH-GSFLAGA20-Rev
 <400> 13

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgctttgtca tcatcatctt tataatcgct 60
 acctccgccg ccagac 76
 <210> 14
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa) Reverse
 <400> 14
 gtcgtcgtcg tcctttagt cgaagacaga tggcgcagcc acagttcg 48

 <210> 15
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: CJL Reverse
 <400> 15
 gtcgtcgtcg tcctttagt cagtgacagt ggggttgccc ttgggctgac ckaggacggt 60
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Lib-GS-Rev
 <400> 16
 cgctacctcc gccgccagac 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 6-FAM-PanVHFR3-Fwd

 <400> 17
 gacacggccg tgtattactg t 21
 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: PanJH-Rev

<400> 18

gctgaggaga cggtgacc 18

<210> 19

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7-MAK195VH-Fwd

<400> 19

taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta caccatggag gtgcagctga 60

aggagtcagg 70

<210> 20

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: MAK195VHGS-Rev

<400> 20

cgatccgcca ccgccagagc cacctccgcc tgaaccgcct ccacctgcag agacagtgac 60

cagagtcc 68

<210> 21

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: MAK195VLGS-Fwd

<400> 21

ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcgggtggcg gatcggacat tgtgatgacc 60

cagtctc 67

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: MAK195VL-Rev

<400> 22	
gatgggtgcag ccaccgtacg ttttatttcc aactttgtcc ccgag	45
<210> 23	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVUTR-17/9 VH-1 Fwd	
<400> 23	
ggacaattac tatttacaat tacaccatgg aagtcagct ggtggaaagc ggcggcgatc	60
tggtgaaacc	70
<210> 24	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VH-2 Rev	
<400> 24	
gctgctaag ctaaagccgc tcgccgcgca gctcagtttc aggtgccgc ccggtttcac	60
cagatcgccg	70
<210> 25	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VH-3 Fwd	
<400> 25	
ggcttttagct ttagcagcta tggcatgagc tgggtgcgcc agaccccga taaacgcctg	60
gaatgggtgg	70
<210> 26	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VH-4 Rev	
<400> 26	
gcctttcacg ctatccgat aataggtata gccgccgccg ttgctaattg tcgccacca	60

ttccaggcgt	70
<210> 27	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VH-5 Fwd	
<400> 27	
ccgcatagcg tgaaggccg ctttaccatt agccgcgata acgcgaaaa caccctgtat	60
ctgcagatg	69
<210> 28	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VH-6 Rev	
<400> 28	
gttcgcggcg cgcgcaataa tacatcgcg tatcttcgct ttccaggctg ctcactgtca	60
gatacagggt	70
<210> 29	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VH-7 Fwd	
<400> 29	
attgcgcg cgcgcaacgc tatgatgaaa acggctttgc gtattggggc cagggcaccc	60
tggtgaccgt	70
<210> 30	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VH-8 GS Rev	
<400> 30	
cgatccgcca ccgccgtgc caccctccgc tgaaccgcct ccaccgcgc tcacggtcac	60
cagggtgccc	70

<210> 31
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: GS-17/9 VL-1 Fwd
 <400> 31
 agcggcgggtg gcggatcgga tattgtgatg acccagagcc cgagcagcct gaccgtgacc 60
 gcgggcgaaa 70

<210> 32
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VL-2 Rev
 <400> 32
 tgtttgccgc tgtaaacag gctctggctg ctggtgcagc tcatggtcac tttttcgccc 60
 gcggtcacgg 70

<210> 33
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VL-3 Fwd
 <400> 33
 gttaacagc ggcaaacaga aaaactatct gacctggtat cagcagaaac cgggccagcc 60
 gccgaaagtg 70

<210> 34
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VL-4 Rev
 <400> 34
 cggtaaagcg atccggcacg ccgctttcgc ggggtgctgc ccaataaatc agcactttcg 60
 gcggctggcc 70

<210> 35

<211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VL-5 Fwd
 <400> 35
 tgccggatcg ctttaccggc agcggcagcg gcaccgattt taccctgacc attagcagcg 60
 tgcaggcgga 70

<210> 36
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VL-6 Rev
 <400> 36
 aaaggtcagc gggttgctat aatcgttctg gcaataatac accgccagat ctccgcctg 60
 cacgctgcta 70

<210> 37
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VL-7 Fwd
 <400> 37
 agcaaccgcg tgacctttgg cggcggcacc aaactggaac tgaaacgtac ggtggctgca 60
 ccatctgtct 70

<210> 38
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17/9 VL-8 Flag Rev
 <400> 38
 ttaaatagcg gatgccttgt cgctgctgctc cttgtagtcg atgaagacag atggtgcagc 60
 cacc 64

<210> 39
 <211> 60

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17_9-tag1
 <400> 39
 taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta cagcgtgggt accatggaag 60
 <210> 40
 <211>
 > 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17_9-tag2
 <400> 40
 taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta cagtgttgcg accatggaag 60
 <210> 41
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17_9-tag3
 <400> 41
 taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta caggctttgg accatggaag 60
 <210> 42
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: 17_9-tag4
 <400> 42
 taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta cagcttcttc accatggaag 60
 <210> 43
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(gamma)Rev1
 <400> 43
 agttccacga cacc 14

<210> 44
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(gamma)Rev2
 <400> 44
 gaaggtgtgc acg 13
 <210>
 > 45
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(gamma)Rev3
 <400> 45
 ccacgtgtgct gag 13
 <210> 46
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(mu)Rev1
 <400> 46
 actttgcaca ccac 14
 <210> 47
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(mu)Rev2
 <400> 47
 tttgttgccg ttgg 14
 <210> 48
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(mu)Rev3

<400> 48	
gggaattctc acagg	15
<210> 49	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(delta)Rev1	
<400> 49	
gctgcttgtc atgt	14
<210> 50	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(delta)Rev2	
<400> 50	
tgcccttgga gact	14
<210> 51	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: Fc(delta)Rev3	
<400> 51	
gaccacgcat ttgt	14
<210> 52	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)Rev1	
<400> 52	
tccaccttcc actg	14
<210> 53	
<211> 14	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)Rev2

<400> 53

caggcacaca acag 14

<210> 54

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)Rev3

<400> 54

gagtgtcaca gagc 14

<210> 55

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(lambda)Rev1

<400> 55

gggaacagag tgac 14

<210> 56

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(lambda)Rev2

<400> 56

gtgtggcctt gttg 14

<210> 57

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(lambda)Rev3.

<400> 57

ccatctgcct tcca 14

<210> 58

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH1/7LS
 <400> 58
 atcctcttctt tgggtggsagc 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH1-46LS
 <400> 59
 ggtcttctctgc ttgctggctg 20
 <210> 60
 <211>
 > 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH2LS
 <400> 60
 cctgctgctg accayccctt c 21
 <210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH3LS
 <400> 61
 gctatttttwv raggtgtcca rtgt 24
 <210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH4LS
 <400> 62

gcrgetccca gatgggtcct g 21

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH5LS

<400> 63

atgggggtcaa cgccttcct 20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH6LS

<400> 64

tgggcctccc atgggggtgc 20

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH1/2sRev

<400> 65

ctgaggagac rgtgaccagg gtgc 24

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH4/5sRev

<400> 66

ctgaggagac ggtgaccagg gttc 24

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH6sRev

<400> 67

ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc

24

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH3sRev

<400> 68

ctgaagagac ggtgaccatt gtcc

24

<210> 69

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH1Forward

<400> 69

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct

53

<210> 70

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH2Forward

<400> 70

tttacaatta cagtgttgcg accatggagr tcaccttgar ggagtctggt

50

<210> 71

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH3Forward

<400> 71

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctgkt ggagtctsggr gga

53

<210> 72

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH4Forward

<400> 72

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50

<210> 73

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH5Forward

<400> 73

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210> 74

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH6Forward

<400> 74

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tacagctgca gcagtcag 48

<210> 75

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH7Forward

<400> 75

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51

<210> 76

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse1/2

<400> 76

cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac rgtgaccagg gtgc 54

<210> 77

<211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse4/5
 <400> 77
 cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccagg gttc 54
 <210> 78

<211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse6
 <400> 78
 cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc 54
 <210> 79

<211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse3
 <400> 79
 cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaagagac ggtgaccatt gtcc 54
 <210> 80

<211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag2
 <400> 80
 taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta cagtgttgcg ac 52
 <210> 81

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)1LS
 <400> 81

gctcctgggr ctyctgc	17
<210> 82	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)2LS	
<400> 82	
ctyctggggc tgctaatg	18
<210> 83	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)3LS	
<400> 83	
ctctggctcm cagataccac	20
<210> 84	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)4LS	
<400> 84	
ggatctctgg tgcctacgg	19
<210> 85	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)5LS	
<400> 85	
ggatctctga taccaggca	20
<210> 86	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)6LS
 <400> 86
 ctgggttcca gcctccag 18
 <210> 87
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)-s Reverse primer:
 <400> 87
 gaagacagat ggtgcagcca cagttcg 27
 <210> 88
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)1 Forward
 <400> 88
 gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgacatc crgwtgaccc agtctccwt 59
 <210> 89
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)2 Forward
 <400> 89
 gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgatatt gtgatgacyc agwtccac 59
 <210> 90
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)3 Forward
 <400> 90
 ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggaaattgt gwtgacrcag tetccagsca 60
 <210> 91
 <211> 60

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)4/6 Forward
 <400> 91
 gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcggacatc gtgmtgacyc agtctccaga 60
 <210> 92
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)5 For-NEW
 <400> 92
 ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggaaacgac actcacgcag tctccagcat 60
 <210> 93
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)6 For-NEW
 <400> 93
 ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggatgtcgt gatgacacag tctccagctt 60
 <210> 94
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Lib-GS-Fwd
 <400> 94
 gtctggcggc ggaggtagcg 20
 <210> 95
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: FLAG-A20.Rev
 <400> 95
 tttttttttt tttttttttt aaatagcggg tgccttgcg tcgtcgtcct tgtagtc 57

<210> 96
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL1LS-1
 <400> 96
 tcactgtgca gggtcctg 18
 <210> 97
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL1LS-3
 <400> 97
 tcactgcaca gggtcctg 18
 <210> 98
 <211>
 > 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL2LS-3
 <400> 98
 tcaggrcaca gggtcctg 18
 <210> 99
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL2LS-4
 <400> 99
 tcagggcaca ggatcctg 18
 <210> 100
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL3LS-2
 <400>

100

tgcatagggtt ctgtggtttc ttctg 25

<210> 101

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL3LS-3

<400> 101

acagghtctg wggcctccta tg 22

<210> 102

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL3LS-4

<400> 102

tgcacaggct ctgtgacctc ctatg 25

<210> 103

<211>

> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL3LS-5

<400> 103

tacacaggct ctattgcctc ctatg 25

<210> 104

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL4CIs-2

<400> 104

cttcattttc tccacaggtc tctgtg 26

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL4abLS-2

<400> 105

tccactgsac aggtctctc t 21

<210> 106

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL5LS

<400> 106

cactgcacag gttccctc 18

<210> 107

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL6LS

<400> 107

ctgcacaggt tcttgggc 18

<210> 108

<211

> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL7LS

<400> 108

ctcacttgct gccaggg 18

<210> 109

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL8LS

<400> 109

gcttatggat caggagtga ttc 23

<210> 110

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL9LS
 <400> 110

caccctctctc agtctctctc 19

<210> 111
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL10LS
 <400> 111

ctctgcagtg tcagtggtc 19

<210> 112
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: CJL-sReverse
 <400> 112

gccttgggct gacckaggac ggt 23

<210> 113
 <211> 55

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL1/10 ForRedo
 <400> 113

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcga tcgcagctctg kgctgackca gccrc 55

<210> 114
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL2 Forward
 <400> 114

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgagctct gccctgactc agcct 55

<210> 115

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL3 Forward-New

<400> 115

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgtcctat gagctgacdc ag 52

<210> 116

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL4ab Forward

<400> 116

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgacagcyt gtgctgactc aatc 54

<210> 117

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL4c Forward

<400> 117

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgtgcct gtgctgactc agcccccg 58

<210> 118

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL5/9 Forward

<400> 118

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgacagcct gtgctgactc agccrbct 58

<210> 119

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL6 Forward

<400> 119
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgaatttt atgctgactc agccc 55
<210> 120
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL7/8 Forward

<400> 120
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgagrcct gtggtgacgc aggag 55
<210> 121
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH1Forward

<400> 121
tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctggt gcagctctggr sct 53
<210> 122
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH2Forward

<400> 122
tttacaatta cagcttcttc accatggagr tcaccttgar ggagctctggt 50
<210>
123
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH3Forward

<400> 123
ttacaattac agcttcttca ccatggaggt gcagctgktg gactctsgrg ga 52
<210> 124
<211> 50
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH4Forward

<400> 124

tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50

<210> 125

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH5Forward

<400> 125

tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210> 126

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH6Forward

<400> 126

tttacaatta cagcttcttc accatggagg tacagctgca gcagtcag 48

<210> 127

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH7Forward

<400> 127

tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51

<210>

128

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse1/2

<400> 128

cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac rgtgaccagg gtgc 54

<210> 129

<211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse3
 <400> 129
 cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaagagac ggtgaccatt gtcc 54
 <210> 130
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse4/5
 <400> 130
 cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccagg gtcc 54
 <210> 131
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: JHReverse6
 <400> 131
 cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc 54
 <210> 132
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag4s
 <400> 132
 taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta cagcttcttc 50
 <210>
 133
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: Lib-GSv2-Rev
 <400> 133

cagaccctcc accgccgtg 20

<210> 134

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)1FwdV2

<400> 134

cagcggcggg ggagggtctg gcgggtggcgg aagtgcacatc crgwtgaccc agtctccwt 59

<210> 135

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)2FwdV2

<400> 135

cagcggcggg ggagggtctg gcgggtggcgg aagtgcacatc gtgatgacac agwtccac 59

<210> 136

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)3FwdV2

<400> 136

cagcggcggg ggagggtctg gcgggtggcgg aagtgcacatc gtgwtgacac agtctccags 60

ca 62

<210> 137

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)4/6FwdV2

<400> 137

cagcggcggg ggagggtctg gcgggtggcgg aagtgcacatc gtgwtgacac agtctccaga 60

<210> 138

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)5FwdV2

<400> 138

cagcggcggg ggagggtctg gcggtggcgg aagtgaacg acactcacgc agtctccagc 60

at 62

<210> 139

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)6FwdV2

<400> 139

cagcggcggg ggagggtctg gcggtggcgg aagtgatgac gtgatgacac agtctccagc 60

tt 62

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: Lib-GSv2-Fwd

<400> 140

cagcggcggg ggagggtctg 20

<210> 141

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH1/2RevV2

<400> 141

cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaggagac rgtgaccagg gtgc 54

<210> 142

<211>

> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH3RevV2

<400> 142

cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaagagac ggtgaccatt gtcc 54

<210> 143

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH4/5RevV2

<400> 143

cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccagg gtcc 54

<210> 144

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH6RevV2

<400> 144

cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc 54

<210> 145

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 145

cagcggcgggt ggagggtctg 20

<210> 146

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 146

tcctcaggtg gaggcggcag cggcgggtgga gggtctggcg gtggcggaag t 51

<210> 147

<211> 51

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 147

acttccgcc cgcagacc ctccaccgcc gctgccgcct ccacctgagg a 51

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7-TMV-Seq

<400> 148

ctcactatag ggacaattac 20

<210> 149

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag3

<400> 149

taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta caggctttgg ac 52

<210> 150

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag4

<400> 150

taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta cagcttcttc ac 52

<210> 151

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag2s

<400> 151

taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta cagtgttgcg 50

<210> 152

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag3s

<400> 152

taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta caggctttgg 50

<210> 153

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag4L

<400> 153

taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta cagcttcttc accatgg 57

<210> 154

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: TMVTag4L

<400> 154

acaattacta ttacaatta cagcttcttc accatgg 37

<210> 155

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: TMVTag4

<400> 155

acaattacta ttacaatta cagcttcttc ac 32

<210> 156

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: TMVTag4s

<400> 156

acaattacta ttacaatta cagcttcttc 30

<210> 157

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: phylflag3's

<400> 157

ccttgctgctc gtcgtccttg tagtc 25

<210> 158

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH-FLAGA20-Rev

<400> 158

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgctttgtca tcatcatctt tataatc 57

<210> 159

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH1/2Cm-Rev

<400> 159

ggttggggcg gatgcactcc cctgaggaga crgtgaccag ggtgc 45

<210> 160

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH4/5Cm-Rev

<400> 160

ggttggggcg gatgcactcc cctgaggaga cggtagaccag gggttc 45

<210> 161

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH6Cm-Rev

<400> 161

ggttggggcg gatgcactcc cctgaggaga cggtgaccgt ggtcc 45

<210> 162

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: JH3Cm-Rev

<400> 162

ggttggggcg gatgcactcc cctgaagaga cggtgaccat tgtcc 45

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 163

cagaccctcc accgccgtg 20

<210> 164

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid

<400> 164

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser

<210> 165

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 165

cagctggtgg agtctggggg aggcttggtc cagcctgggg ggttc 45

<210> 166

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 166
 tcctcaggtg gaggcggcag cggcgggtgga gggctctg 37
 <210> 167
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 167
 acttccgccca ccgccagacc ctccaccgcc gctg 34
 <210> 168
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)5 Forward
 <400> 168
 gtctggcggc ggaggtagcg gcgggtggcgg atcggaacg acactcacgc agtctc 56
 <210> 169
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: V(kappa)6 Forward
 <400> 169
 ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggatgtcgt gatgacacag tctccagct 59
 <210> 170
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)-Long-Reverse primer
 <400> 170

gtcgtcgtcg tcctttagt cctcatcaga tggcgggaag atgaagacag atggtgcagc 60
cacagttcg 69
<210> 171
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)L4-FlagA20-Rev
<400> 171
ttttttttt ttttttttt aaatagcgga tgccttgtagc tcgtcgtcct ttagtcctc 60
atcagatggc gggaagat 78
<210> 172
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)L3-FlagA20-Rev
<400> 172
ttttttttt ttttttttt aaatagcgga tgccttgtagc tcgtcgtcct ttagtcctc 60
atcagatggc gggaa 75
<210> 173
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)L2-FlagA20-Rev
<400> 173
ttttttttt ttttttttt aaatagcgga tgccttgtagc tcgtcgtcct ttagtcctc 60
atcagatggc gg 72
<210> 174
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic oligonucleotide: C(kappa)L1-FlagA20-Rev
<400> 174
ttttttttt ttttttttt aaatagcgga tgccttgtagc tcgtcgtcct ttagtcctc 60

atcagatgg 69

<210> 175

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL1/10 Forward

<400> 175

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgagctct gkgctgackc agccrc 56

<210> 176

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH1FwdTag3

<400> 176

tttacaatta caggctttgg accatggagg tgcagctggt gcagctctggr sct 53

<210> 177

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH2FwdTag3

<400> 177

tttacaatta caggctttgg accatggagr tcaccttgar ggagtctggt 50

<210> 178

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH3FwdTag3

<400> 178

tttacaatta caggctttgg accatggagg tgcagctgkt ggagtctsgg gga 53

<210> 179

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH4FwdTag3

<400> 179

tttacaatta caggctttgg accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50

<210> 180

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH5FwdTag3

<400> 180

tttacaatta caggctttgg accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210> 181

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH6FwdTag3

<400> 181

tttacaatta caggctttgg accatggagg tacagctgca gcagtcag 48

<210> 182

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH7FwdTag3

<400> 182

tttacaatta caggctttgg accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51

<210>

183

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VL1/10FwdV2

<400> 183

cagcgcggt ggagggtctg gcggtggcgg aagtcagtct gkgtgackc agccrc 56

<210> 184

<211> 55

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL2FwdV2
 <400> 184
 cagcggcggg ggagggctctg gcggtggcgg aagtcagtct gccctgactc agcct 55
 <210> 185
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL3FwdV2
 <400> 185
 cagcggcggg ggagggctctg gcggtggcgg aagttcctat gagctgacdc ag 52
 <210> 186
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL4abFwdV2
 <400> 186
 cagcggcggg ggagggctctg gcggtggcgg aagtcagcyt gtgctgactc aatc 54
 <210> 187
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL4cFwdV2
 <400> 187
 cagcggcggg ggagggctctg gcggtggcgg aagtcagcct gtgctgactc agcccccg 58
 <210> 188
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL5/9FwdV2
 <400> 188
 cagcggcggg ggagggctctg gcggtggcgg aagtcagcct gtgctgactc agccrbct 58

<210> 189
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL6FwdV2
 <400> 189
 cagcggcggg ggagggtctg gcggtggcgg aagtaatttt atgctgactc agccc 55
 <210> 190
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VL7/8FwdV2
 <400> 190
 cagcggcggg ggagggtctg gcggtggcgg aagtcagrct gtggtgacgc aggag 55
 <210> 191
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH1FwdTag5
 <400> 191
 ttacaatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct 53
 <210> 192
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH2FwdTag5
 <400> 192
 ttacaatta cagtgtctgt accatggagr tcaccttgar ggagtctggt 50
 <210>
 193
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH3FwdTag5

<400> 193
 tttaacatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctgkt ggagtctsgg gga 53
 <210> 194
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH4FwdTag5
 <400> 194
 tttaacatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50
 <210> 195
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH5FwdTag5

 <400> 195
 tttaacatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctggg gcagtctgga gca 53
 <210> 196
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH6FwdTag5
 <400> 196
 tttaacatta cagtgtctgt accatggagg tacagctgca gcagtcag 48
 <210> 197
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH7FwdTag5
 <400> 197
 tttaacatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctggg gcaatctggg t 51
 <210>
 198
 <211> 53
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH1FwdTag6

<400> 198

tttacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct 53

<210> 199

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH2FwdTag6

<400> 199

tttacaatta cagtttggct accatggagr tcaccttgar ggagtctggt 50

<210> 200

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH3FwdTag6

<400> 200

tttacaatta cagtttggct caccatggag gtgcagctgk tggagtctsg rgga 54

<210> 201

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH4FwdTag6

<400> 201

tttacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50

<210> 202

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: VH5FwdTag6

<400> 202

tttacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210>

203

<211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH6FwdTag6
 <400> 203
 tttaacaatta cagtttggct accatggagg tacagctgca gcagtcag 48
 <210> 204
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: VH7FwdTag6
 <400> 204
 tttaacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51
 <210> 205
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: TMVTag5s
 <400> 205
 acaattacta tttaacaatta cagtgtctgt 30
 <210> 206
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: TMVTag6s
 <400> 206
 acaattacta tttaacaatta cagtttggct 30
 <210> 207
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic oligonucleotide: TMVTag5
 <400> 207
 acaattacta tttaacaatta cagtgtctgt acc 33

<210> 208

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: TMVTag6

<400> 208

acaattacta tttaacaatta cagtttggt acc 33

<210> 209

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag5s

<400> 209

taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta cagtgtctgt 50

<210> 210

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: T7TMVTag6s

<400> 210

taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta cagtttggt 50

<210> 211

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide: linker sequence

<400> 211

uagcggaugc 10

<210> 212

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 212

acttccgcca ccgccagacc ctccaccgcc gc

32