



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201028432 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：098133249

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 30 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/00 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

C40B40/04 (2006.01)

(30)優先權：2008/09/30

美國

61/101,483

(71)申請人：亞培公司 (美國) ABBOTT LABORATORIES (US)

美國

(72)發明人：辛瓊明 HSIEH, CHUNG-MING (US)；克特司可瓦 尤利亞 A KUTSKOVA,

YULIYA A. (RU)；米莫特 約翰 E MEMMOTT, JOHN E. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：31 共 200 頁

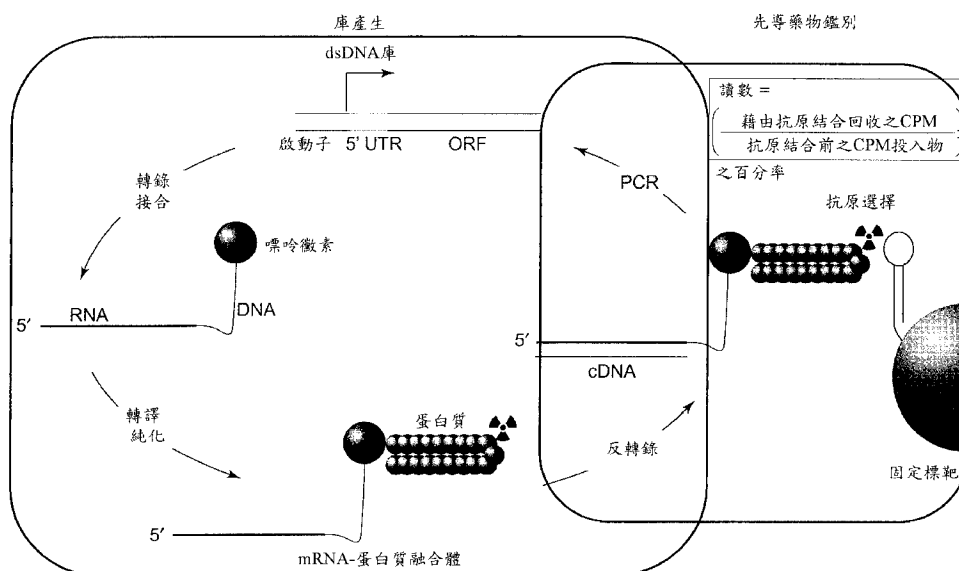
(54)名稱

改良之抗體庫

IMPROVED ANTIBODY LIBRARIES

(57)摘要

本發明係關於允許自表現庫可靠地表現及選擇 scFv 抗體分子之改良之活體外 RNA 呈現庫。本發明之 scFv 抗體庫含有改良 scFv 抗體表現之經優化且縮短之域間連接子。該等 scFv 抗體庫亦包括允許鑑別個別庫純系、其庫或亞群的短核酸條碼。亦提供用於產生、擴增及譜型定型本發明之 scFv 抗體庫的引子。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201028432 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：098133249

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 30 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/00 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

C40B40/04 (2006.01)

(30)優先權：2008/09/30

美國

61/101,483

(71)申請人：亞培公司 (美國) ABBOTT LABORATORIES (US)

美國

(72)發明人：辛瓊明 HSIEH, CHUNG-MING (US)；克特司可瓦 尤利亞 A KUTSKOVA,

YULIYA A. (RU)；米莫特 約翰 E MEMMOTT, JOHN E. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：31 共 200 頁

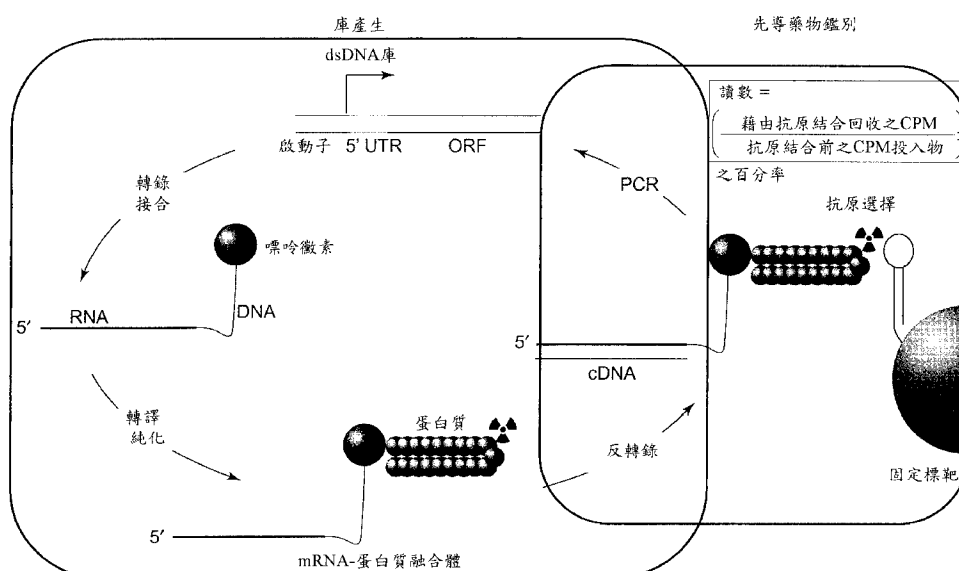
(54)名稱

改良之抗體庫

IMPROVED ANTIBODY LIBRARIES

(57)摘要

本發明係關於允許自表現庫可靠地表現及選擇 scFv 抗體分子之改良之活體外 RNA 呈現庫。本發明之 scFv 抗體庫含有改良 scFv 抗體表現之經優化且縮短之域間連接子。該等 scFv 抗體庫亦包括允許鑑別個別庫純系、其庫或亞群的短核酸條碼。亦提供用於產生、擴增及譜型定型本發明之 scFv 抗體庫的引子。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於改良之抗體庫及用於製造該等庫之方法及材料。

本申請案主張2008年9月30日申請之美國臨時申請案第61/101,483號之優先權，該案之內容以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

以高特異性及親和力結合至幾乎任何結構抗原決定基的抗體通常用作研究工具及FDA批准之治療劑。因此，治療性及診斷性單株抗體構成全世界幾十億美元市場。

使動物免疫以獲得抗體之典型方法較慢且麻煩。因此，已開發若干種使用合成抗體庫離體選擇所需標靶分子之抗體的方法。在一些方法中，在生物體(例如酵母細胞、細菌細胞或哺乳動物細胞)或次顯微因子(例如噬菌體或病毒)之表面上呈現抗體或其片段之庫，且選擇表現所需抗體的生物體或次顯微因子。在其他方法中，在無細胞活體外系統中表現及選擇抗體庫。目前的活體外表現系統儘管善於表現單一抗體可變域，但表現諸如單鏈抗體(scFv)分子之多域抗體的效率低。此係歸因於目前scFv抗體庫之結構與目前活體外表現系統之反應條件。

因此，此項技術中需要用於選擇針對所需標靶之scFv抗體的改良之抗體庫。

【發明內容】

本發明藉由提供允許可靠地表現及選擇scFv抗體分子之改良之活體外呈現RNA庫來解決上述問題。

本發明具有若干優點，其包括(但不限於)以下優點：

- 提供改良之活體外呈現scFv抗體庫，其含有經優化之域間連接子以改良表現；
- 提供含有短核酸條碼之改良之活體外呈現scFv抗體庫；
- 提供可產生改良之活體外呈現scFv抗體庫的引子；
- 提供可對本發明之庫中之scFv抗體分子之重鏈可變區之CDR3區進行譜型定型的引子；及
- 製造改良之活體外呈現庫的方法。

在一態樣中，本發明提供一種由如SEQ ID NO: 1-14、19-42及58-210中任一者所示之核酸序列組成的寡核苷酸。

在另一態樣中，本發明提供一種包含如SEQ ID NO: 1-14、19-42及58-210中任一者所示之核酸序列的寡核苷酸。

在另一態樣中，本發明提供一種由如SEQ ID NO: 14-16及43-57中任一者所示之核酸序列組成的寡核苷酸。在另一態樣中，本發明提供一種包含如SEQ ID NO: 14-16及43-57中任一者所示之核酸序列的寡核苷酸。

在另一態樣中，本發明提供一種由如SEQ ID NO: 17或18所示之核酸序列組成的寡核苷酸。在另一態樣中，本發明提供一種包含如SEQ ID NO: 17或18所示之核酸序列的寡核苷酸。

在一實施例中，本發明提供SEQ ID NO: 1-210所示之任

何序列用於庫擴增、庫反轉錄及/或庫譜型定型的用途。

在另一態樣中，本發明提供一種用於表現單鏈抗體(scFv)之核酸庫，該庫包含編碼重鏈可變域及輕鏈可變域之序列譜系，其中該庫之各成員均含有包含重鏈可變域、輕鏈可變域及連接區之開放閱讀框架，且其中該庫係使用 SEQ ID NO: 1-210所示之一或多種寡核苷酸產生。

在一實施例中，該庫進一步包含編碼少於20個胺基酸之連接區。在另一實施例中，庫進一步包含編碼15個胺基酸之連接區。

在一實施例中，庫之各成員進一步包含可操作性連接於該開放閱讀框架之啟動子。在另一實施例中，該啟動子係選自由T7、SP6及T3組成之群。在又一實施例中，啟動子為T7啟動子。

在一實施例中，庫之各成員進一步包含5'未轉譯區(5'UTR)，其能夠增強與其可操作性連接之基因之轉錄。在另一實施例中，該5'UTR為菸草花葉病毒(Tobacco Mosaic Virus)5'UTR或其活性片段。在另一實施例中，庫之各成員進一步包含聚腺嘌呤序列。

在又一實施例中，庫進一步包含核酸條碼。在另一實施例中，該核酸條碼包含8個核苷酸。

在另一實施例中，庫之各成員進一步包含編碼抗原決定基標籤之核酸序列。在又一實施例中，該抗原決定基標籤為FLAG標籤。在又一實施例中，該核酸序列為scFv之連接區之一部分。在另一實施例中，庫進一步包含編碼抗體

恒定區或其片段之核酸序列。

在一實施例中，庫進一步包含核糖體中止序列。

在一實施例中，庫進一步包含肽受體。在另一實施例中，該肽受體經由包含補骨脂素C6(Psoralen C6)分子之連接子共價連接。在又一實施例中，該連接子為5'(補骨脂素C6) 2'Ome (U AGC GGA UGC(SEQ ID NO:211)) XXX XXX CC(嘌呤黴素)，其中X為三乙二醇連接子或PEG-150且CC為DNA主鏈。

在另一態樣中，本發明提供一種製造用於表現單鏈抗體(scFv)之核酸庫的方法，其包含(a)提供核酸組合物，其中該組合物中之核酸之至少一部分包含至少一個編碼抗體可變域之開放閱讀框架；及(b)使用SEQ ID NO 1-210所示之一或多種寡核苷酸擴增複數個抗體可變域。

在另一態樣中，本發明提供一種對包含至少一個編碼抗體可變域之開放閱讀框架的核酸進行譜型定型的方法，該方法包含(a)提供核酸組合物，其中該組合物中之核酸之至少一部分包含至少一個編碼抗體可變域之開放閱讀框架；及(b)使用SEQ ID NO 1-210所示之一或多種寡核苷酸擴增該等可變域之CDR3區。

【實施方式】

為了可更易於瞭解本發明，首先定義某些術語。

I. 定義

術語「抗體」包括單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、嵌合抗體、

CDR移植抗體、人類化抗體、人類抗體、鼠類抗體及其片段，例如抗體輕鏈(VL)、抗體重鏈(VH)、單鏈抗體(scFv)、F(ab')₂片段、Fab片段、Fd片段、Fv片段及單域抗體片段(DAb)。

術語「抗體庫」係指複數個含有編碼抗體或其片段之開放閱讀框架(ORF)的DNA或RNA分子。其亦包括複數個由該等DNA或RNA分子表現之抗體蛋白及核酸/抗體融合體分子。

術語「重鏈可變域」係指編碼抗體重鏈可變區之核酸及該核酸之蛋白質產物。

術語「輕鏈可變域」係指編碼抗體輕鏈可變區之核酸及該核酸之蛋白質產物。

術語「譜型定型」係指基於PCR之方法，其基於CDR3長度區分編碼抗體之遺傳序列。CDR3長度分布之變化與抗體譜系之變化有關(Janeway等人，「Immunobiology」，第5版，Garland Publishing, New York and London, (2001))。

術語「抗原決定基標籤」係指化學上或遺傳上連接於抗體可偵測之分子、由該抗體特異性識別的短胺基酸序列，例如FLAG標籤、HA標籤、MYC標籤或T7標籤。

術語「核酸條碼」係指本發明之庫之未轉譯區中所包括的短核酸。該條碼為用以向個別純系或複數個庫成員提供唯一識別符之隨機或預定序列。

術語「非抗體序列」係指本發明之抗體庫中所出現之不

為原始抗體序列之一部分的任何核酸或胺基酸序列。該等序列包括例如抗原決定基標籤或核酸條碼。

術語「控制序列」係指在特定宿主生物體、次顯微因子或活體外表現系統中表現可操作性連接之編碼序列所需的核酸序列或遺傳元件。該等序列在此項技術中已熟知。適合於原核生物之控制序列包括例如啟動子、視情況存在之操縱序列及核糖體結合位點。已知真核細胞使用啟動子、聚腺苷酸化信號及增強子。當核酸與另一核酸序列呈功能關係置放時，其「可操作性連接」。舉例而言，若啟動子或增強子影響序列轉錄，則其可操作性連接於編碼序列，或若核糖體結合位點定位於有利於轉譯之位置，則其可操作性連接於編碼序列。一般而言，「可操作性連接」意謂所連接之核酸序列為鄰接的。然而，增強子不必為鄰接的。連接係藉由例如在習知限制性位點接合來實現。若該等位點不存在，則根據習知實務使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

術語「特異性結合」或「特異性結合至」係指結合分子能夠以至少約 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M 或更高之親和力結合至標靶，及/或能夠以至少兩倍於針對非特異性抗原之親和力的親和力結合至標靶。

術語「標靶」係指由抗體識別之抗原或抗原決定基。標靶包括例如任何肽、蛋白質、醣類、核酸、脂質及產生特異性抗體之小分子。在一實施例中，抗體係針對人類蛋白

質，例如 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-12 或 IL-1 α 。

「保守性胺基酸取代」為胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換的取代。具有類似側鏈之胺基酸殘基家族已在此項技術中定義。

術語「RNA呈現」或「mRNA呈現」係指活體外技術，其中所表現之蛋白質或肽以共價方式或藉由緊密非共價相互作用連接於其編碼 mRNA 以形成「RNA/蛋白質融合體」分子。RNA/蛋白質融合體之蛋白質或肽組份經選擇可結合至所需標靶且蛋白質或肽之身分可藉由對所連接之編碼 mRNA 組份測序來測定。該等方法在此項技術中已熟知且描述於例如以下專利中：美國專利第 7,195,880 號；第 6,951,725 號；第 7,078,197 號；第 7,022,479，6,518,018 號；第 7,125,669 號；第 6,846,655 號；第 6,281,344 號；第 6,207,446 號；第 6,214,553 號；第 6,258,558 號；第 6,261,804 號；第 6,429,300 號；第 6,489,116 號；第 6,436,665 號；第 6,537,749 號；第 6,602,685 號；第 6,623,926 號；第 6,416,950 號；第 6,660,473 號；第 6,312,927 號；第 5,922,545 號；及第 6,348,315 號。

術語「單鏈 Fv 抗體」或「scFv」係指使用重組方法、藉由合成連接子接合在一起的輕鏈可變區之抗原結合部分及重鏈可變區之抗原結合部分，該合成連接子使其能夠以單一蛋白質鏈形式產生，其中 VL 區與 VH 區配對形成單價分子（稱為單鏈 Fv(scFv)；參見例如 Bird 等人，(1988) Science 242:423-426；及 Huston 等人，(1988) Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A 85:5879-5883)。

術語「功能性部分」係指賦予其所連接之分子其他功能性的任何生物或化學實體。

術語「選擇」係指使分子與群體中之其他分子實質上分開。如本文中所使用，「選擇」步驟提供在該選擇步驟後所需分子相對於群體中之非所需分子至少2倍、較佳30倍、更佳100倍且最佳1000倍之富集。如本文中所指示，選擇步驟可重複任意次，且在既定方法中可組合不同類型之選擇步驟。

術語「中止序列」係指引起核糖體減慢或中止其轉譯速率之核酸序列。

術語「固體載體」係指(不限於)親和複合物可直接或間接(例如經由其他結合搭配物中間物，諸如其他抗體或蛋白A)結合或親和複合物可包埋於其中(例如經由受體或通道)的任何管柱(或管柱材料)、珠粒、試管、微量滴定皿、固體顆粒(例如瓊脂糖(agarose或sepharose))、微晶片(例如矽、矽-玻璃或金晶片)或膜(例如脂質體或微脂粒之膜)。

術語「連接區」係指scFv抗體基因中連接編碼抗體VH及VL域之核酸序列的核酸區。連接區與編碼抗體VH及VL之核酸序列同框以便形成含有VH、VL及連接區之連續開放閱讀框架。該術語亦指scFv蛋白中連接VH及VL之區。

術語「肽受體」係指能夠藉由核糖體肽基轉移酶之催化活性添加至生長蛋白質鏈之C端的任何分子。通常，該等分子含有(i)核苷酸或核苷酸樣部分(例如嘌呤黴素及其類

似物)、(ii)胺基酸或胺基酸樣部分(例如20種D-胺基酸或L-胺基酸或其任何胺基酸類似物中之任一者)(例如由Ellman等人,(1991) Meth. Enzymol. 202:301所述之O-甲基酪胺酸或任何類似物)及(iii)兩者之間的鍵聯(例如3'位置或次佳2'位置處之酯、醯胺或酮鍵聯);較佳地,此鍵聯不顯著干擾天然核糖核苷酸構形之環結構。另外,此術語包涵(不限於)與蛋白質編碼序列共價鍵結(直接或經由介入核酸序列而間接鍵結)之肽受體分子,以及藉由一些非共價方式(例如經由使用結合於蛋白質編碼序列之3'端處或附近且自身與肽受體分子結合之第二核酸序列之雜合)與蛋白質編碼序列接合之分子。

II. 概述

本發明係關於允許自表現庫可靠地表現及選擇scFv抗體分子之改良之活體外RNA呈現庫。RNA呈現方法一般涉及表現蛋白質或肽之庫,其中所表現之蛋白質或肽以共價方式或藉由緊密非共價相互作用連接於其編碼mRNA以形成RNA/蛋白質融合體分子。RNA/蛋白質融合體之蛋白質或肽組份經選擇可結合至所需標靶且蛋白質或肽之身分可藉由對所連接之編碼mRNA組份測序來測定。

本發明之scFv抗體庫含有改良scFv抗體表現之經優化且縮短之域間連接子。該等scFv抗體庫亦包括允許鑑別個別庫純系、其庫或亞群之短核酸條碼。

本發明亦提供用於產生、擴增及譜型定型本發明之scFv抗體庫的新穎引子。

III. 庫建構

作為產生單株抗體候選藥物之抗體技術開發，本發明揭示兩種重組抗體產生方法PROfusion(mRNA呈現)及酵母表面呈現之開發。該PROfusion mRNA呈現技術為用於篩檢人類抗體庫之從頭開始方法。該酵母表面呈現技術為用於篩檢在酵母表面上特異性呈現之單株抗體的細胞方法。

在一態樣中，本發明係關於能夠表現抗體分子之新穎抗體庫。本發明之庫由能夠與標靶結合之任何抗體片段產生。在一實施例中，產生抗體可變域之庫。在一實施例中，此等域為VH及/或VL域。在另一實施例中，產生scFv庫。

本發明之庫亦可包括編碼可變區外部區域(例如恆定區或其片段，或鉸鏈區)的抗體核酸序列。

本發明之核酸庫可包含RNA、DNA，或RNA與DNA元件。

1) 產生核酸投入物多樣性

用於產生本發明之抗體庫的核酸序列可自任何來源獲得。在一實施例中，本發明之庫可自任何動物之抗體譜系獲得，該等動物包括(但不限於)齧齒動物、靈長類動物、駱駝類、鯊魚或任何含有人類免疫球蛋白基因譜系之轉殖基因動物。用於分離及選殖編碼生物體之抗體補體之可變區之核酸的技術在此項技術中已熟知。實際上，許多含有編碼抗體之可變區之核酸的cDNA庫在市面上可購得，例如自各種免疫細胞(例如周邊血液單核細胞(PBMC)、脾或

淋巴結)產生之人類抗體可變區庫。在另一實施例中，本發明之庫可藉由從頭合成編碼一或多種抗體之核酸而獲得。

本發明之庫可能需要藉由引入可導致所表現之抗體分子中一或多個胺基酸取代及/或缺失的核酸取代及/或缺失來引入額外多樣性。本發明涵蓋此項技術認可之任何突變誘發方法，例如隨機突變誘發、「模糊(walk through)」突變誘發及「精確(look through)」突變誘發。抗體之該突變誘發可使用例如易錯PCR、酵母或細菌之「突變」株或在整個或部分抗體之從頭合成期間合併隨機或限定之核酸變異來達成。在一實施例中，可形成一或多個胺基酸已隨機突變之抗體分子庫。在另一實施例中，可形成一或多個胺基酸突變為一或多個預定胺基酸之抗體分子庫。

2) 控制序列

本發明之核酸庫可含有便於活體外表現及篩檢所編碼之抗體的其他控制序列。

一種該控制序列可為連合所需RNA聚合酶用於mRNA合成之啟動子。如本文所述，可使用能夠導引自線性雙股DNA合成之任何啟動子，例如T7、SP6或T3噬菌體啟動子。

第二控制序列可稱為5'未轉譯區(或5'UTR)且對應於轉譯起始位點之RNA上游。可使用任何其他適當5'UTR(參見例如Kozak (1983) Microbiol. Rev. 47:1)。在一實施例中，該5'UTR(稱為「TE」)可為菸草花葉病毒5'未轉譯區之缺失

突變體且尤其對應於直接處於TMV轉譯起始序列之5'的鹼基；此UTR之序列如下：rGrGrG rArCrA rArUrU rArCrU rArUrU rUrArC rArArU rUrArC rA(其中開頭3個G核苷酸經插入可加強轉錄)。

第三元件可為轉譯起始位點。一般而言，其為AUG密碼子。然而，存在在天然存在之編碼序列中使用除AUG外之密碼子的實例，且此等密碼子亦可用於本發明之選擇流程中。此轉譯起始位點較佳處於稱為「Kozak」序列之合適序列範圍內(參見例如 Kozak (1983) Microbiol. Rev. 47:1)。

第四元件可為含有5'終止密碼子之聚腺苷酸化(poly A)序列。該poly A序列可置於核酸庫構築體中之抗體編碼序列後。該等序列在此項技術中已熟知且本發明涵蓋任何該序列。

3) 其他核酸序列元件

本發明之核酸庫亦可包括併入mRNA轉錄物中、從而編碼抗體之其他序列元件。此等元件可包括非抗體序列。

在一實施例中，可將短核酸序列或「核酸條碼」併入抗體mRNA轉錄物之未轉譯部分中。此等條碼序列可用作區分核酸庫之個別成員或區分不同庫之唯一識別符。該等短核酸序列較佳含有少於50個鹼基、少於20個鹼基或少於10個鹼基。在一實施例中，短核酸序列包含8個鹼基。

在其他實施例中，可將編碼特異性非抗體胺基酸序列之核酸序列元件併入本發明之核酸庫之開放閱讀框架(ORF)

中以便將所編碼之胺基酸序列併入所表現之抗體中。在一實施例中，可將非抗體核酸序列元件併入scFv中介於VH與VL區之間的ORF內以用作連接區。編碼缺乏終止密碼子之連續胺基酸序列的任何核酸序列可預期用於連接區。該連接區之長度少於50個胺基酸，或少於20個胺基酸，或少於16個胺基酸。

在另一實施例中，可將編碼一或多個抗原決定基標籤(例如FLAG標籤)的核酸序列元件併入抗體編碼序列中。此等序列可產生其中抗原決定基標籤存在於任何位置(例如N端、C端或scFv抗體分子之VH與VL域之間的連接區中)的抗體。在一實施例中，可將編碼抗體恆定區或其片段之序列包括於本發明之核酸庫之ORF的3'部分中。此抗體恆定區或其片段在特定庫之所有成員中均相同。

在其他實施例中，可將編碼特異性非抗體胺基酸序列之核酸序列元件併入載體中，從而使用該等載體、在酵母細胞之表面上特異性表現本發明之核酸庫。此等元件可包括(但不限於)此項技術中已知之跨膜域。在一實施例中，可將此等元件併入本發明之核酸庫之ORF中以便將所編碼之胺基酸序列併入所表現之抗體中。在另一實施例中，可將此等元件併入載體序列而非本發明之核酸庫之ORF中。此等元件可有助於本發明之上述核酸庫之表現、穩定性、摺疊及抗原決定基呈現或其他特徵。

4) 寡核苷酸引子

在一態樣中，本發明係關於適用於合成及/或擴增本發

明之抗體庫的核酸寡核苷酸引子。例示性引子包括SEQ ID NO: 1-13(表6)。

在另一態樣中，本發明係關於適用於反轉錄由本發明之庫所製造之mRNA的核酸寡核苷酸引子(表3)。例示性引子包括SEQ ID NO: 14-16(表3)。

在另一態樣中，本發明係關於適用於譜型PCR分析庫或其選擇產物中之VH CDR3尺寸分布的寡核苷酸引子(表4)。譜型定型可為適用於評估抗體庫多樣性及選擇進程之工具。例示性譜型PCR引子包括SEQ ID NO: 17-18。

5) 核酸與肽受體之鍵聯

在一實施例中，本發明之抗體核酸庫可經修飾以含有肽受體部分。此有利於核酸表現庫之個別成員共價連接於其同源蛋白質產物。本發明涵蓋此項技術認可之肽受體與核酸連接之任何方式。

在一態樣中，本發明係關於用於使肽受體連接於核酸庫之新穎方法及組合物。在一實施例中，可合成包含補骨脂素C6分子及肽受體分子之連接分子，其中該補骨脂素C6分子及肽受體分子可與核酸序列融合，其中該核酸序列可與核酸庫之3'端的序列互補。該等連接分子可經由互補鹼基配對與核酸庫純系之3'端結合。補骨脂素C6對紫外(UV)光敏感且會使連接子與核酸庫純系交聯，由此使肽受體共價連接於核酸庫純系。在另一實施例中，連接分子之核酸部分可含有經修飾之核苷酸，例如2'甲氧基(2'OMe)核糖核苷酸。在另一實施例中，連接分子可進一步包含分隔含有

補骨脂素 C6 分子之核酸區與肽受體分子的三乙二醇或 PEG-150 連接子。在一實施例中，該連接子可為：5'(補骨脂素 C6) 2'OMe (U AGC GGA UGC(SEQ ID NO:211)) XXX XXX CC (嘌呤黴素) 3'，(其中 X 為三乙二醇連接子或 PEG-150 且 CC 為標準 DNA 主鏈)。在一實施例中，該等連接子由例如 TriLink BioTechnologies, Inc(San Diego, CA) 定製合成。

IV. 譜型定型方法

譜型分析為臨床及基礎免疫配置中所用之方法，其中評估抗原受體長度多樣性以替代功能多樣性(參見例如 Cochet, M. 等人，(1992) *Eur. J. Immunol.*, 22:2639-2647；Pannetier, C. 等人，(1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:4319-4323；Pannetier, C. 等人(1997)於 Austin, O.J.R. (編)。 *The Antigen T Cell Receptor: Selected Protocols and Applications*, TX Landes，第 287-325 頁)。譜型檢定可使用例如自個體之周邊血液樣品分離之 CD4 或 CD8 T 細胞，而在其他情況下使用總 CD3 或 PBMC 細胞。

在本發明中，可使用 PCR 特定地複製可變長度區(CDR3)以基於 CDR3 長度分析編碼抗體之遺傳序列。CDR3 長度分布之變化與抗體譜系之變化有關。在一些實施例中，可使用對在本發明實施中所建構之個別庫具有特異性的引子提供各庫之獨立譜型。在一較佳實施例中，可使用分別與 VH 構架 3 區及 J 區黏接之標記螢光染料之 5' 正向引子(6-FAM-PanVHFR3-Fwd，5'-GACACGGCCGTGTATTACTGT-

3'，SEQ ID NO: 17) 及反向引子 (PanJH-Rev，5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3'，SEQ ID NO: 18)、藉由PCR擴增VH域之CDR3區。在其他實施例中，可使用此項技術中已知之其他引子，其與編碼抗體庫之聚核苷酸序列上之相同區或其他區特異性黏接。在一較佳實施例中，CDR3複製子之所得混合物可藉由電泳進行尺寸分離，且藉由光密度測定法定量。在其他實施例中，可使用此項技術中已知之其他方法來表徵所得CDR3複製子。

在一較佳實施例中，可對VH cDNA片段上不同VH家族間之CDR3尺寸分布進行譜型分析。在一實施例中，例示性VH家族可自單一生殖系或自諸如VH1-46、VH2、VH5及VH6之不同VH家族獲得。在一較佳實施例中，用於譜型定型之模板可選自例如人類淋巴結庫、酵母脾庫、天然人類 λ 庫、人類PBMC κ 庫、VH-V λ scFv庫、VH-V κ scFv庫。在其他實施例中，用於譜型定型之模板可選自其他庫。

V. 一般篩檢方法

在一態樣中，本發明係關於篩檢本發明之表現庫以鑑別能夠與所需標靶結合之抗體的方法。本發明涵蓋允許自表現庫選擇抗體、基於抗體與標靶分子結合進行活體外或活體內篩檢的任何方法。

在一實施例中，本發明之表現庫可使用此項技術認可之活體外無細胞表型-基因型相關呈現來篩檢。該等方法在此項技術中已熟知且描述於例如以下專利中：美國專利第7,195,880號；第6,951,725號；第7,078,197號；第7,022,479

號；第 6,518,018 號；第 7,125,669 號；第 6,846,655 號；第 6,281,344 號；第 6,207,446 號；第 6,214,553 號；第 6,258,558 號；第 6,261,804 號；第 6,429,300 號；第 6,489,116 號；第 6,436,665 號；第 6,537,749 號；第 6,602,685 號；第 6,623,926 號；第 6,416,950 號；第 6,660,473 號；第 6,312,927 號；第 5,922,545 號；及第 6,348,315 號。此等方法涉及以使得蛋白質與其來源之核酸實體上連合或結合之方式自核酸活體外轉錄蛋白質。藉由標靶分子選擇所表現之蛋白質，亦可選擇編碼該蛋白質之核酸。

為改良 scFv 蛋白之表現，上文提及之活體外篩檢檢定可能需要添加或移除某些試劑。在一實施例中，可將蛋白質二硫鍵異構酶添加至活體外表現系統中以改良功能性 scFv 分子之產生。在另一實施例中，可將溫和氧化劑(例如 GSSG(氧化型麩胱甘肽)/GSH(還原型麩胱甘肽)，例如 100 mM GSSG/10 mM GSH)添加至 scFv 蛋白之活體外轉譯反應混合物中以允許在 scFv 分子之 VH 與 VL 區中形成鏈內二硫鍵。在另一實施例中，可自 scFv 之活體外轉譯反應混合物中移除還原劑(例如二硫蘇糖醇(DTT))。

在另一實施例中，可將一或多種經標記之胺基酸或其衍生物添加至活體外轉譯系統中以使得該(等)經標記之胺基酸併入所得抗體中。本發明涵蓋此項技術認可之任何經標記之胺基酸，例如放射性標記之胺基酸，例如標記 ^{35}S 之甲硫胺酸或半胱胺酸。

在一實施例中，本發明之活體外篩檢檢定需要在活體外

選擇抗體或複數個抗體後，可反轉錄與該抗體或複數個抗體實體上連合之mRNA以產生編碼該抗體或複數個抗體之cDNA。本發明涵蓋任何適合於反轉錄之方法，例如酶介導之反轉錄，例如莫洛尼氏鼠類白血病毒(Moloney murine leukemia virus)反轉錄酶。

本發明所用之篩檢方法可能需要擴增編碼特異性結合至所需標靶之抗體的核酸。在一實施例中，可擴增與抗體或複數個抗體實體上連合之mRNA以產生更大mRNA。本發明涵蓋此項技術認可之任何RNA複製方法，例如使用RNA複製酶。在另一實施例中，首先將與抗體或複數個抗體實體上連合之mRNA反轉錄為cDNA，隨後藉由PCR擴增。在一實施例中，PCR擴增係使用高保真校對聚合酶來完成，例如小寶島產嗜熱古菌(*Thermococcus kodakaraensis*)之KOD1熱穩定DNA聚合酶或Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)。在另一實施例中，可於使得將突變引入經擴增之DNA中的條件下執行PCR擴增，例如易錯PCR。

本發明所用之篩檢方法亦可能需要增加標靶結合篩檢檢定之嚴格度以選擇對標靶之親和力改良之抗體。可考量此項技術認可之任何增加抗體-標靶相互作用檢定之嚴格度的方法。在一實施例中，可改變一或多種檢定條件(例如檢定緩衝液之鹽濃度)以降低抗體分子對所需標靶之親和力。在另一實施例中，可縮短允許抗體與所需標靶結合之時間長度。在另一實施例中，可將競爭性結合步驟添加至

抗體-標靶相互作用檢定中。舉例而言，首先可使抗體與所需固定標靶結合。接著可添加特定濃度之非固定標靶，其用以與固定標靶競爭結合以使得對抗原之親和力最低之抗體自固定標靶溶離，從而富集抗原結合親和力改良之抗體。在一實施例中，檢定條件之嚴格度可進一步藉由增加添加至檢定中之非固定標靶之濃度來增加。

本發明之篩檢方法亦可能需要多輪選擇以富集一或多種具有經改良之標靶結合之抗體。在一實施例中，在每一輪選擇時，可使用此項技術認可之方法將其他胺基酸突變引入抗體中。在另一實施例中，在每一輪選擇時，可增加與所需標靶結合之嚴格度以選擇對所需標靶之親和力增加之抗體。

本發明之篩檢方法可能需要自活體外轉譯系統之組份純化RNA-抗體融合蛋白。此可使用此項技術認可之任何分離方法來完成。在一實施例中，RNA-抗體融合蛋白可藉由使用聚去氧胸苷(polydT)樹脂之層析法來分離。在另一實施例中，RNA-抗體融合蛋白可藉由使用對RNA-抗體融合蛋白之抗體組份中存在的抗原決定基具有特異性之抗體的層析法來分離。在一實施例中，該抗原決定基可為併入RNA-抗體融合蛋白之抗體組份之胺基酸序列中(例如N端、C端處或可變區間連接子中)的胺基酸序列標籤，例如FLAG或HA標籤。

自本發明之庫選擇抗體可能需要使用固定標靶分子。在一實施例中，標靶分子可直接連接於固體受質，例如瓊脂

糖珠粒。在另一實施例中，首先可修飾標靶分子，例如進行生物素標記，且可經由該修飾使經修飾之標靶分子與固體載體結合，例如抗生蛋白鏈菌素-M280、中性鏈親和素-M280、SA-M270、NA-M270、SA-MyOne、NA-MyOne、SA-瓊脂糖及NA-瓊脂糖。

本發明藉由以下實例進一步說明，該等實例不應視為限制本發明。

本發明之實例

除非另有規定，否則在實例中使用以下材料及方法。

材料及方法

一般而言，除非另有指示，否則使用化學、分子生物學、重組DNA技術、免疫學(尤其例如免疫球蛋白技術)及畜牧學之習知技術實施本發明。參見例如 Sambrook, Fritsch及Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Press (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty 編, Irl Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow等人, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等人編, John Wiley & Sons (1992)。

實例 1

用於 scFv 分子之 mRNA 呈現方案

mRNA 呈現可根據圖 2 中所示之方法來進行。下文更詳細

地描述此方法之特定實施例。此等實施例意欲說明本發明之方法，且不應視為限制本發明。

1. 設計抗體庫模板

根據圖3中所描繪之示圖設計庫DNA構築體。雙股DNA構築體自5'至3'端一般含有以下功能元件。T7啟動子可適用於活體外RNA轉錄。TMV-UTR(菸草花葉病毒未轉譯區)可適用於活體外蛋白質轉譯。視情況選用之標記含有對於各庫唯一之8鹼基對序列，其可適用於鑑別屬於特定庫之構築體。Kozak共同序列有利於啟動蛋白質轉譯。所關注之抗體庫可含有編碼scFv、VH或VL之序列。在一較佳實施例中，該抗體庫編碼scFv。在一實施例中，亦包含恆定位於所有抗體庫之3'端的部分抗體恆定區序列。在一些實施例中，構築體另外包含適用於親和純化之FLAG標籤。在其他實施例中，構築體含有包含黏接位點之連接子黏接序列，其中經補骨脂素及嘌呤黴素修飾之DNA寡核苷酸連接子可在方案之後續步驟中與構築體交聯。在一實施例中，具有5'終止密碼子之聚腺苷酸化序列可適用於穩定mRNA及經由寡聚去氧胸苷(oligo-dT)纖維素分批純化法純化。

2. 製備標靶抗原

一般可針對生物素標記抗原選擇mRNA呈現抗體庫。雖然各標靶之最佳抗原應視不同情況而定，但可使用以下考量因素作為一般準則。標靶抗原通常經充分表徵，且為相關或顯性遺傳同型，如依據多形現象(SNP及單倍體)及/或

藥物遺傳學分析所判定。標靶抗原另外可具有合理的生物活性(與天然抗原相當)、良好溶解性及良好化學及物理特性，且可以足夠用於庫選擇或篩檢及下游生物檢定之量製備。適用於庫選擇之標靶抗原的例示性量標示於下表1中。

表1：庫選擇所需之標靶抗原量

技術	人類抗體scFv庫之選擇	抗原需要量(乘以庫數目)		臨時抗原需要量	傳遞藥物
		用於各庫選擇	用於各庫產物篩檢		
PROfusion mRNA呈現	2個PBMC(κ/λ) 2個脾(κ/λ) 2個淋巴結(κ/λ)	1奈莫耳， 標記生物素	2.5奈莫耳， 標記生物素	2奈莫耳， 標記生物素	可能需要 LO之生物 活性IgG候 選藥物
酵母呈現	2個PBMC(κ/λ) 1個脾(κ) 1個淋巴結(κ)	6.5 奈莫耳 (較佳標記 生物素)	3奈莫耳， 標記生物素	3奈莫耳， 標記生物素	

3. 製備庫DNA

庫DNA及其選擇產物可藉由PCR擴增。用於庫擴增之例示性引子展示於表2中。

表2：用於庫擴增之引子

引子	擴增	序列
5'正向引子		
T7TMVUTR (SEQ ID NO:1)	所有scFv 及VH庫	TAATACGACTCACTATAGGGACAATT ACTATTTACAATTACA
VL-T7TMV標籤3GS- Fwd ^a (SEQ ID NO:2)	V κ 及V λ PBMC庫	TAATACGACTCACTATAGGGACAATT ACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACC ATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
3'反向引子		
CK5FLAGA20 Rev(SEQ ID NO:7)	所有 κ scFv 及V κ 庫	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAG TCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA
CL5FLAGA20	所有 λ scFv	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG

引子	擴增	序列
Rev(SEQ ID NO:12)	及Vλ庫	GATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTG TAG TCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG
VH-GSFLAGA20- Rev ^a (SEQ ID NO:13)	來自人類 PBMC之 VH庫	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCTTTGTCATCATCATCTTTATAA TCGCTACCTCCGCCGCCAGAC

PCR擴增可使用此項技術中已知之方法來執行。PCR反應通常含有DNA模板、反應緩衝液、dNTP、用於擴增之引子、DNA聚合酶及水。自母混合物同時配置多個反應管以增加經擴增之DNA產量。25個PCR循環通常產生足夠擴增，但可使用多達35個循環獲得更多產物。

4. 庫DNA純化

若上述PCR產物尺寸正確(對於scFv為約850 bp，對於VH或VL庫為約500 bp)且含有極少非特異性產物，則該等PCR產物可直接用於轉錄反應中。或者，可對產物進行凝膠純化。若對PCR產物執行凝膠純化，則可於製備型瓊脂糖凝膠上分離產物且可剪切含有PCR產物之特定條帶。接著可使用此項技術中已知之標準方法，藉由凝膠萃取自該條帶純化DNA，且用分光光度計量測其濃度。

5. RNA轉錄

可使用此項技術中已知之標準方法自庫DNA執行RNA轉錄。可使用大反應體積轉錄足夠DNA模板以對庫總多樣性進行取樣。在一例示性實施例中，RNA轉錄反應中可使用庫模板之 1×10^{13} 個複本。RNA轉錄反應通常含有5-10 µg PCR產物、反應緩衝液以及ATP、CTP、GTP、UTP及T7 RNA聚合酶。RNA轉錄反應可於37°C下進行2小時至隔

夜。在最初數輪選擇後可使用較短時間。在RNA轉錄後，可使用去氧核糖核酸酶I自反應混合物移除DNA模板。

6. 藉由NAP管柱層析法進行RNA純化

在RNA轉錄後，可使用NAP-10管柱(GE Healthcare, Piscataway, NJ)分離RNA。可將多達1 mL之轉錄反應物加載至NAP-10管柱上以進行RNA純化。在分離之前可使用焦碳酸二乙酯(DEPC)處理之dH₂O使該管柱平衡。總溶離體積應小於轉錄反應體積之150%。或者或另外，可使用NAP-25管柱(GE Healthcare, Piscataway, NJ)分離RNA。

7. RNA品質控制及定量

RNA樣品之尺寸及產量可使用凝膠電泳來監測。RNA產量通常在約20 nmol/mL轉錄反應濃度時達到最大。

8. RNA與連接子之接合

在3'端含有肽受體分子之DNA連接子可與各RNA分子之3'端共價接合。可進入核糖體A位點且與新生多肽鏈之羧基端共價偶合的肽受體最終能夠使mRNA(基因型)與由此mRNA編碼之蛋白質(表型)共價連合。例示性PEG6/10連接子可具有下式：

5'(補骨脂素C6) 2'OMe(U AGC GGA UGC(SEQ ID NO:211))
XXX XXX CC (嘌呤黴素) 3'。

補骨脂素C6 5'修飾具有光敏性且作用為藉由UV交聯而在連接子與mRNA之間形成共價鍵。2'OMe (U AGC GGA UGC(SEQ ID NO:211))主鏈區經由連接子黏接位點3'黏接至mRNA上之FLAG序列(參見圖1)。在上述序列中，X表示

「間隔子9」，或者稱為三乙二醇或PEG-150。此間隔子已優化成為將嘌呤黴素插入真核核糖體A位點中提供柔性。CC包含標準DNA主鏈。嘌呤黴素3'修飾插入核糖體A位點中可在連接子與新生肽之間形成穩定連接。本文所述之連接子的消光係數為147.7 OD₂₆₀/微莫耳。因為此連接子具有光敏性，所以含有此連接子之溶液應避光保存。

對於最初數輪庫選擇，推薦大規模接合反應(3.1×10^{15} 個經轉錄之RNA分子)以對庫總多樣性進行取樣。可設定此RNA量以確保有足夠模板投入轉譯反應中之且產生約10 pmol功能性mRNA呈現分子。在稍後數輪中，RNA投入量可減少至每次選擇0.5 nmol。在一例示性實施例中，RNA接合反應物可含有以下組份：RNA、水、化學接合緩衝液及PEG6/嘌呤黴素連接子(1 mM)。在一例示性實施例中，總反應體積為100 μ L。在一較佳實施例中，連接子/RNA之莫耳比可大於1.5。在一實施例中，反應物中之最終連接子濃度可為15 μ M，且反應物中之RNA濃度可在約3-10 μ M(=0.3-1 nmol RNA投入量)範圍內。作為參考，850 nt scFv RNA對應於1 mg/mL=3.56 μ M，且可達到之最大接合濃度為3.16 μ M(=0.32 nmol)。

黏接反應(使連接子與所轉錄之RNA黏接)可在熱循環器中執行。在一較佳實施例中，黏接反應可藉由於約85°C下培育樣品30秒，接著於約4°C下使用每秒約0.3°C之溫變率培育來進行。接著可於4°C下保持反應。

所黏接之連接子/RNA之接合可藉由UV交聯來完成。此

可使用熟習此項技術者已知之任何方法來進行。在一實施例中，可將反應管置於手提式UV燈(長波長，約365 nm)中心上方且交聯約15分鐘。可將冷凍包置於該燈上方以有助於消散UV照射期間所產生之熱。典型接合效率為約50-90%且通常不需要純化。接合產物可儲存於-80℃下。

9. 轉譯反應

在一例示性實施例中，在所有反應及純化後，所投入RNA約0.1%可形成mRNA呈現分子。活體外轉譯可使用熟習此項技術者已知之方法及試劑來進行。在一實施例中，使用scFv庫之轉譯反應可使用約5 nmol RNA模板及約10 mL網狀紅血球溶解物，反應體積為約15 mL。

為轉譯反應作準備，可製備最終濃度為約100 mM GSSG/10 mM GSH之GSSG/GSH(氧化型麩胱甘肽/還原型麩胱甘肽)之溶液。可藉由將PDI(蛋白質二硫鍵異構酶)粉末溶解於dH₂O中以達到約1個單位/微升之濃度來製備PDI。PDI溶液可儲存於-20℃下。

可如下配置例示性轉譯反應物：

RNA(100 pmol)	X	X μ L
dH ₂ O	至 73.7	至 370 μ L
胺基酸母混合物(Met)	15	75 μ L
100 mM GSSG/10 mM GSH	3.3	16.5 μ L
PDI(1 U/ μ L)	6	30 μ L
[³⁵ S]甲硫胺酸	2	10 μ L
網狀紅血球溶解物	200	1000 μ L
總體積	300	1500 μ L

將轉譯反應物於30°C水浴中培育1-2小時。當轉譯體積超過1.5 mL時，觀測到RNA/蛋白質融合體產量顯著減少。因此，若反應體積將大於1.5 mL，則可製備轉譯反應之母混合物，隨後分成較小等分試樣。

10. RNA/蛋白質融合體形成

轉譯反應後，每300 μ L轉譯反應混合物可添加約100 μ L 2 M KCl及約20 μ L 1 M $MgCl_2$ ，且於室溫下培育1小時。由此使位於mRNA模板末端之所中止核糖體穩定且允許位於DNA連接子末端之嘌呤黴素進入所中止核糖體之A位點，從而經轉譯之scFv蛋白永久地連接於其mRNA模板。若將反應物儲存於-20°C下隔夜，則可縮短室溫培育時間。可藉由添加50 μ L 0.5 M EDTA以破壞核糖體來終止反應。反應物可儲存於-20°C下。可移除5 μ L等分試樣以稍後用於閃爍計數。

11. 藉由寡聚去氧胸苷纖維素進行RNA/蛋白質融合體純化

此步驟係自轉譯/融合反應物純化mRNA呈現分子及殘餘RNA模板。對於寡聚去氧胸苷結合，可估計捕捉所有RNA模板所需之預洗滌之寡聚去氧胸苷纖維素量。可將足量寡聚去氧胸苷結合緩衝液添加至融合反應物中以達到約1×最終濃度。接著可添加預洗滌之寡聚去氧胸苷纖維素，且於4°C下進行反應1小時。可視情況於4°C下以約1500 rpm離心反應物5分鐘，且丟棄上清液。可轉移寡聚去氧胸苷纖維素珠粒且使用旋轉管柱、以1×寡聚去氧胸苷結合緩衝液洗滌約6次，且緩衝液通常可藉由以約1000 rpm旋轉管柱10

秒來移除。可丟棄流過液，但可保留最後洗液以用於閃爍計數。可藉由將dH₂O添加至珠粒中且於室溫下培育5分鐘來溶離mRNA呈現分子(及游離RNA模板)。可藉由以約4000 rpm旋轉20秒來收集溶離液。通常可重複一次溶離且合併溶離液。可移出5 μL溶離液以用於閃爍計數。寡聚去氧胸苷純化效率亦可使用NanoDrop分光光度計(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)、依據260 nm下之OD值(OD₂₆₀)來評估。理論上寡聚去氧胸苷珠粒可回收所有殘餘RNA模板及mRNA呈現分子。可將5×FLAG結合緩衝液添加至溶離液中以達到約1×最終濃度。若不進行下一個FLAG純化步驟，則樣品可儲存於-80℃下。

可如下計算寡聚去氧胸苷回收率。對約5 μL投入物(來自融合反應)、100 μL最後洗液及5 μL產物(來自寡聚去氧胸苷純化之溶離液)計數。使用最後洗液評估洗滌程度，且使用其他2項計數自初始RNA模板投入量計算RNA/蛋白質融合體回收率。RNA/蛋白質融合體產量(pmol)=(CPM_{產物} × 體積_{產物} × 5 μM × 體積_{溶解物})/[CPM_{投入物} × 體積_{投入物} × (產物中甲硫胺酸之量)]。此式假定網狀紅血球溶解物中甲硫胺酸濃度為5 μM，且計算中所使用之所有體積均以μL表示。對於最初數輪選擇，mRNA呈現分子之產量通常為0.5-2%，但在稍後數輪中可增加至10%。

12. 藉由抗FLAG M2瓊脂糖進行RNA/蛋白質融合體純化

此步驟係自殘餘RNA模板純化mRNA呈現分子。可估計捕捉所有mRNA呈現分子所需之預洗滌之抗FLAG M2瓊脂

糖珠粒的量。在一實施例中，珠粒之結合能力為每毫升50%漿液約6 nmol融合蛋白。為在結合及洗滌期間具有足夠珠粒體積用於操作，建議使用不少於約200 μ L之預洗滌珠粒。以下所給出之實例係針對初始300 μ L轉譯反應物。

對於FLAG純化，可使用寬口吸管尖將300 μ L預洗滌之抗FLAG M2瓊脂糖轉移至寡聚去氧胸苷純化之產物中。可混合混合物且藉由於4°C下旋轉1小時進行培育。可與抗FLAG M2瓊脂糖一起繼續培育隔夜。抗FLAG M2瓊脂糖可視情況於4°C下、在離心機中以約1500 rpm旋轉1分鐘，且可丟棄上清液。抗FLAG珠粒可用1 $\times$ FLAG結合緩衝液洗滌約5次且各洗液可使用旋轉管柱、以約1000 rpm離心10秒。可丟棄流過液。珠粒可另外以約1000 rpm離心10秒，用700 μ L選擇緩衝液(參見下文)洗滌2次。可保留最後洗液以用於閃爍計數。mRNA呈現分子可藉由添加約400 μ L 100 μ g/mL FLAG肽(於選擇緩衝液中)且於室溫下培育5分鐘來溶離。溶離液可藉由以約3000 rpm旋轉20秒來收集且藉由添加約400 μ L 100 μ g/mL FLAG肽再一次溶離。可合併兩次溶離液且可移出約5 μ L合併之溶離液以用於閃爍計數。此體積之FLAG肽對於自至多約1 mL之50%漿液溶離通常為足夠的且若使用較少漿液且/或需要較高RNA/蛋白質融合體濃度，則可分成兩半(200 μ L)。為防止在儲存及抗原選擇期間RNA降解，可將適量之此項技術中已知之核糖核酸酶抑制劑(亦即1-2 U/ μ L RNaseOUT及0.02 μ g/mL酵母tRNA)添加至經純化之mRNA呈現庫中。若不進行下一

個抗原選擇步驟，則於-80℃下儲存樣品。

為定量FLAG回收率，可用β計數器對約5 μL溶離產物及約100 μL最後洗液計數。回收率預計可為10-30%或高於30%，且可根據下式計算：

PROfusion分子回收%=(CPM_{產物}×體積_{產物})/(CPM_{投入物}×體積_{投入物})。

13. 藉由生物素標記抗原進行庫選擇

選擇設計成當庫與抗原結合達到平衡時富集特異性結合至所關注標靶之分子。負向選擇(預清除)可能為移除非特異性及基質結合物所需要的。選擇方案視標靶形式而改變。以下為用於生物素標記標靶之例示性選擇方案。此方案經修改可適合其他形式之標靶抗原，且可視所需產量而定按比例增大或縮小。

A. 選擇前之製備

抗生蛋白鏈菌素(SA)磁性珠粒可用於捕捉且通常在使用之前預阻斷。可將SA珠粒自原裝瓶轉移至1.5 mL或2 mL管中，且用2 mL 1×FLAG結合緩衝液洗滌兩次。接著可於4℃下、在旋轉下用2 mL選擇緩衝液阻斷珠粒2小時至隔夜。應製備對於預清除與選擇捕捉皆足夠之珠粒。於4℃下儲存預阻斷之珠粒。每10 pmol生物素標記抗原通常使用約100 μL珠粒。

用1×FLAG結合緩衝液預阻斷1.5 mL或2 mL微離心管約1小時至隔夜。所有預清除及選擇步驟均可使用預阻斷之管。通常各樣品需要4個管：預清除需要2個、珠粒需要1

個及選擇需要1個。

最佳結果可藉由預清除庫而獲得。可將FLAG純化之mRNA呈現庫添加至SA珠粒(與緩衝液分離)中。SA珠粒之體積可等於捕捉體積之一半。珠粒可於30℃下、在旋轉下培育約30分鐘，隨後使用磁體使預清除之mRNA呈現庫與珠粒分離。此預清除步驟可再重複一次且可洗滌第二次預清除SA珠粒並如上文所述進行計數以判定背景是否較高。此亦可用作「無抗原」陰性對照物。

B. 庫選擇：結合

對於最初數輪選擇，可將生物素標記標靶添加(100 nM)至整個預清除庫中，且於30℃下、在旋轉下培育1小時。對於稍後數輪選擇，當預計抗原結合分子之回收率超過1%時，可將預清除庫分為2個等分試樣。可將生物素標記抗原添加至一個等分試樣中，且另一個等分試樣用作「無抗原」陰性對照物。或者，如上所述，儘管經洗滌之第二次預清除珠粒將具有一次較小「預清除」程序，但此等珠粒亦可視為「無抗原」對照物。當抗原結合分子之回收率超過5%時，可降低稍後數輪中之抗原濃度。

C. 庫選擇：捕捉

可將預阻斷之SA珠粒(與緩衝液分離)添加至結合反應物中且於30℃下、在旋轉下培育5至10分鐘。用於捕捉之SA珠粒量應基於能力及選擇中所用之標靶濃度來計算(參見上文)。當降低標靶濃度以避免產生SA珠粒結合物時，應降低SA珠粒量，但通常使用不少於50 µL珠粒。

D.庫選擇：洗滌

可使用磁體收集SA珠粒且可用1 mL選擇緩衝液洗滌1分鐘。再次使用磁體收集珠粒且再洗滌約5次(總共約6次)。可在稍後數輪中增加洗滌時間以將解離速率選擇策略與一些目標結合。可最後一次用1 mL適合於反轉錄之1×緩衝液洗滌珠粒。用磁體收集珠粒且再懸浮於水(上文所計算之捕捉珠粒體積之四分之一)中。

E. 庫選擇：計數及回收率計算

自第3輪開始，對約10-20%之最後洗液及珠粒計數。通常僅對少於100 μ L之珠粒計數，因為更多珠粒可能會中止計數。庫選擇回收率係根據下式來計算：

$$\text{選擇回收}\% = 100 \times \text{CPM}_{\text{總珠粒}} / \text{CPM}_{\text{總投入物}}。$$

14. 藉由RT-PCR再擴增庫DNA

可使用自庫捕捉之物質執行反轉錄。此項技術中已知之試劑及方案適合於執行反轉錄反應。反應體積可根據選擇後之珠粒體積而按比例增大或縮小。

適用於反轉錄之例示性引子展示於表3中，儘管可使用此項技術中已知之方法設計其他引子。 κ 庫使用C κ 反向引子， λ 庫使用CJL反向引子，且人類PBMC VH庫使用Lib-GS-Rev。

表3：適合於反轉錄之例示性引子

C κ 反向引子(SEQ ID NO:14)	GTCGTCGTCGTCCTTG TAGTCGAAGACAGATGGTG CAGCCACAGTTCG
CJL反向引子(SEQ ID NO:15)	GTCGTCGTCGTCCTTG TAGTCAGTGACAGTGGGGT TGGCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT
Lib-GS-Rev(VH, PBMC)(SEQ ID NO:16)	CGCTACCTCCGCCGCCAGAC

例示性反轉錄反應物含有來自庫選擇之珠粒(於水中)、約10 μ M反向引子及約10 mM dNTP。於65°C下培育反應物5分鐘且於冰上冷卻。接著通常將第一股合成緩衝液、0.1 M DTT及核糖核酸酶抑制劑添加至反應物中。於約42°C下培育反轉錄反應物2分鐘，隨後添加反轉錄酶。接著於42°C下、在偶爾攪動下培育反應物50分鐘且於95°C下進一步培育5分鐘。接著藉由磁體收集珠粒，且將上清液轉移至新管中，若其來自相同選擇產物，則可混合。使珠粒再懸浮於水(RT體積之一半)中且於95°C下在管中培育5分鐘。再次使用磁體收集珠粒，且將上清液與先前轉移之上清液混合。此含有用於PCR擴增選擇產物之cDNA模板。

可使用譜型PCR分析庫或其選擇產物中之VH CDR3尺寸分布。其為評估庫多樣性及選擇進程之有用工具。最初數輪庫選擇產物及選擇前之庫應廣泛多樣且CDR3尺寸分布接近高斯分布(Gaussian distribution)。例示性譜型PCR引子展示於表4中。

表4：例示性譜型PCR引子

6-FAM-PanVHFR3-Fwd(SEQ ID NO:17)	GACACGGCCGTGTATTACTGT
PanJH-Rev(SEQ ID NO:18)	GCTGAGGAGACGGTGACC

例示性譜型PCR反應展示於下表5中，但反應組份可替換為此項技術中已知之類似試劑，且可調整反應體積以適應選擇反應之規模。

表 5：例示性譜型 PCR 反應

cDNA 模板	2.0	μL
dH ₂ O	18.1	μL
5×熱穩定 DNA 聚合酶反應緩衝液	6.0	μL
25 mM MgCl ₂	1.8	μL
10 mM dNTP	0.6	μL
5'正向引子(10 μM)	0.6	μL
3'反向引子(10 μM)	0.6	μL
熱穩定 DNA 聚合酶	0.3	μL
總體積	30.0	μL

此項技術中已知之熱穩定 DNA 聚合酶適用於此反應。在一例示性實施例中，最終 Mg²⁺ 濃度為 1.5 mM。作為例示性熱循環程式，於 94℃ 下培育反應物 2 分鐘且接著經受 30 個熱循環以延長 DNA。對於各循環，於 94℃ 下培育反應物 20 秒，於 55℃ 下培育 20 秒，且接著於 72℃ 下培育 30 秒。30 個循環後，於 72℃ 下進一步培育反應物 5 分鐘且接著儲存於 4℃ 下。PCR 後，將 10 μL PCR 產物加載至 2% 瓊脂糖凝膠上以證實反應成功。藉由譜型電泳分析反應物及殘餘產物。

經擴增之 DNA 產物具有以下結構：

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

VH CDR3 尺寸可自表觀 DNA 產物尺寸推算。此可使用以下計算式、藉由 Rox 染料尺寸標記來測定：

尺寸_{VH CDR3}=(尺寸_{表觀 DNA 產物}-60)/3，

其中 60=(62_{兩端之構架}-1_{3' A突出}+3_{DNA標記低估})。

15. 用於庫DNA模板擴增之PCR

對於第一及第二輪之選擇產物，可使用 8 kDa分離點、相對於水透析 cDNA(來自 RT反應之上清液)且可使用全部量之 cDNA 作為 PCR 模板。對於來自稍後數輪之選擇產物，使用 10%之 cDNA 作為 PCR 模板，且通常不需要透析。例示性擴增引子展示於表 6 中。

表 6：擴增引子

引子	序列(5'-3')
用於所有 scFv 及 VH 庫之正向引子	
T7TMVUTR ^a (SEQ ID NO:1)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTA CA
用於所有 V _κ 及 V _λ 庫之正向引子	
VL-T7TMV 標籤 3GS-Fwd(SEQ ID NO:2)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTA CAGGCTTTGGACCATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
用於所有 κ scFv 及 V _κ 庫之反向引子	
Ck1-FlagA20 Rev(SEQ ID NO:3)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCGAA GACAGAT
Ck2-FlagA20 Rev(SEQ ID NO:4)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGT
Ck3-FlagA20 Rev(SEQ ID NO:5)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCA
Ck4-FlagA20 Rev(SEQ ID NO:6)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGCC
Ck5-FlagA20 Rev ^b (SEQ ID NO:7)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA
用於所有 λ scFv 及 V _λ 庫之反向引子	
CL1FLAGA20 Rev ^b (SEQ ID NO:8)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTG
CL2FLAGA20 Rev(SEQ ID NO:9)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGG
CL3FLAGA20 Rev(SEQ ID NO:10)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGTTG

引子	序列(5'-3')
CL4FLAGA20 Rev(SEQ ID NO:11)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGCC
CL5FLAGA20 Rev(SEQ ID NO:12)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG
用於所有VH庫之反向引子	
VH-GSFLAGA20- Rev(SEQ ID NO:13)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCATC ATCATCTTTATAATCGCTACCTCCGCCGCCAGAC
^a 亦可使用T7TMV標籤-引子(標籤序列視庫而定)。 ^b 較佳引子	

用於庫DNA模板擴增之例示性PCR反應展示於下表7中。

表7：用於庫DNA模板擴增之例示性PCR反應

cDNA 模板	X μL
dH ₂ O	添加至 790 μL
10×高保真 Taq DNA 聚合酶緩衝液	100 μL
MgSO ₄ (50 mM)	40 μL
10 mM dNTP	20 μL
5'正向引子(10 μM)	20 μL
3'反向引子(10 μM)	20 μL
高保真 Taq DNA 聚合酶	10 μL
總體積	1000 μL

在一例示性實施例中，對於第1輪及第2輪產物使用1 mL PCR反應物，且對於來自稍後數輪之產物使用0.5 mL反應物。100 μL反應物之等分試樣應由母混合物製得。用於擴增庫DNA模板之例示性熱循環條件展示於下表8中。

表 8：用於庫 DNA 模板擴增之熱循環條件

94°C	2 分鐘
↓	
94°C	20 秒
55°C	20 秒
68°C	1 分鐘
↓	
68°C	5 分鐘
↓	
4°C	一直保持

*應注意：25個循環通常產生足夠擴增，但其可增加至多達35個循環以獲得更多產物。在額外擴增循環下各種尺寸之非特異性產物可變得更明顯，且產物可能需要凝膠純化。若可能，則宜增加DNA模板投入量而非擴增循環之數目。

PCR後，將5 μ L至10 μ L產物加載至具有適當DNA尺寸標記的1.2%瓊脂糖凝膠上以檢驗結果。若產物尺寸正確(對於scFv為約850 bp，對於VH或VL庫為約500 bp)且具有極少非特異性產物，則可直接用於下一輪轉錄反應中。產物可能需要凝膠純化。若PCR產物進行凝膠純化，則分離製備型瓊脂糖凝膠上之所有殘餘產物且可剪切含有產物之特異性條帶以用於凝膠萃取。因為DNA中之殘餘EtBr易於干擾UV吸光度，所以會誤導凝膠純化DNA之定量。在凝膠萃取期間更廣泛洗滌步驟可有助於減少此干擾。若可能，

則應用分光光度計量測DNA濃度，因為在乾淨DNA樣品與具有殘餘EtBr之DNA之間，UV掃描跡線差異很大。隨後重複此方案以進行多輪選擇。

16. 例示性試劑及緩衝液組成

10X化學接合緩衝液

Tris(pH 7)	250 mM
NaCl	1 M

寡聚去氧胸苷結合緩衝液

	1X	2X	3X
Tris(pH 8)	100	200	300 mM
NaCl	1	2	3 M
Triton X-100	0.05	0.1	0.15%

FLAG結合緩衝液

基於磷酸鹽之緩衝液

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

基於HEPES之替代性緩衝液

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

選擇緩衝液

基於磷酸鹽之緩衝液

PBS	1X
BSA	1 mg/mL
鮭魚精子DNA	0.1 mg/mL
Triton X-100	0.025%
酵母tRNA(視情況選用，在使用之前添加)	20 ng/mL

基於HEPES之替代性緩衝液

HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
BSA	1 mg/mL
鮭魚精子DNA	0.1 mg/mL
Triton X-100	0.025%
酵母tRNA(視情況選用，在使用之前添加)	20 ng/mL

第一股緩衝液

Tris-HCl(pH 8.3)	250 mM
KCl	75 mM
MgCl ₂	15 mM

50×FLAG儲備溶液

FLAG肽	25 mg
選擇緩衝液	5 mL
製備1 mL等分試樣且儲存於-20°C下	

FLAG溶離溶液

50×FLAG儲備溶液	1 mL
選擇緩衝液	49 mL
製備1 mL等分試樣且儲存於-20°C下	

寡聚去氧胸苷纖維素製備

可將2.5 g寡聚去氧胸苷纖維素轉移至50 mL管中且與25 mL 0.1 N NaOH混合。可以1500 rpm離心混合物3分鐘且丟棄上清液。接著可用25 mL 1×寡聚去氧胸苷結合緩衝液洗滌寡聚去氧胸苷纖維素且以1500 rpm離心3分鐘。可丟棄上清液。洗滌步驟可再重複3次且量測上清液之pH值。該pH值應與洗滌緩衝液相同(約pH 8.5)。可藉由添加1×寡聚去氧胸苷結合緩衝液直至25 mL之最終體積使寡聚去氧胸苷纖維素再懸浮以產生約50%漿液且儲存於4°C下。最終濃度=100 mg/mL=1 nmol RNA能力。

抗FLAG M2瓊脂糖製備

可將25 mL M2瓊脂糖珠粒轉移至50 mL管中且在貝克曼離心機(Beckman centrifuge)(Beckman Coulter, Fullerton, CA)中以1000 rpm離心5分鐘。可藉由抽吸移除上清液。可使所得珠粒再懸浮，用等體積之10 mM甘胺酸(pH 3.5)洗滌且以1000 rpm離心5分鐘。藉由抽吸再次移除上清液。

用一個管柱體積之1×FLAG結合緩衝液使珠粒再懸浮且以1000 rpm離心5分鐘。藉由抽吸移除上清液。此洗滌步驟可重複3次且用一個管柱體積之1×結合緩衝液(含有1 mg/mL BSA及100 mg/mL鮭魚精子DNA)使珠粒再懸浮。可於4°C下旋轉混合物1小時或隔夜且必要時分成2 mL分離部分之等分試樣並保存於4°C下。

實例2

驗證功能性mRNA-scFv分子

使用四種抗體來驗證功能性mRNA-scFv分子可得以呈現且結合其各別抗原：D2E7(人類抗hTNF)、Y61(人類抗hIL-12)、17/9(小鼠抗HA)及MAK195(小鼠抗hTNF)。使用表9中之以下引子、藉由PCR來產生MAK195 scFv。

表9：用於建構MAK195 mRNA-scFv構築體之寡核苷酸引子

引子	序列
T7-MAK195VH-Fwd(SEQ ID NO: 19)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTT ACAATTACACCATGGAGGTGCAGCTGAAGGAG TCAGG
MAK195VHGS-Rev(SEQ ID NO: 20)	CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT CC
MAK195VLGS-Fwd(SEQ ID NO: 21)	GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG CGGTGGCGGATCGGACATTGTGATGACCCAGTC TC
MAK195VL-Rev(SEQ ID NO: 22)	GATGGTGCAGCCACCGTACGTTTTATTTC AAC TTTGTCCCCGAG

抗HA 17/9 scFv(參見Schulze-Gahmen等人，(1993) J. Mol. Biol. 234(4): 1098-118)係使用基於自NCBI資料庫下載之蛋白質序列A31790及B31790的以下引子(參見以下表10)、藉由PCR來產生。

表 10：用於建構 17/9 mRNA-scFv 構築體之寡核苷酸引子

引子	序列
T7TMVUTR-17/9 VH-1 Fwd (SEQ ID NO: 23)	GGACAATTACTATTTACAATTACACCATGGAAG TGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGATCTGGTG AAACC
17/9 VH-2 Rev (SEQ ID NO: 24)	GCTGCTAAAGCTAAAGCCGCTCGCCGCGCAGCT CAGTTTCAGGCTGCCGCCCCGGTTTCACCAGATC GCCG
17/9 VH-3 Fwd (SEQ ID NO: 25)	GGCTTTAGCTTTAGCAGCTATGGCATGAGCTGG GTGCGCCAGACCCCGGATAAACGCCTGGAATG GGTGG
17/9 VH-4 Rev (SEQ ID NO: 26)	GCCTTTCACGCTATCCGGATAATAGGTATAGCC GCCGCCGTTGCTAATGGTCGCCACCCATTCCAG GCGT
17/9 VH-5 Fwd (SEQ ID NO: 27)	CCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGC CGCGATAACGCGAAAAACACCCTGTATCTGCAG ATG
17/9 VH-6 Rev (SEQ ID NO: 28)	GTTCGCGGCGCGCGCAATAATACATCGCGCTAT CTTCGCTTTTCAGGCTGCTCATCTGCAGATACA GGGT
17/9 VH-7 Fwd (SEQ ID NO: 29)	ATTGCGCGCGCCGCGAACGCTATGATGAAAAC GGCTTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACCGT
17/9 VH-8 GS Rev(SEQ ID NO: 30)	CGATCCGCCACCGCCGCTGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCCGCGCTCACGGTCACCAGGGT GCCC
GS-17/9 VL-1 Fwd(SEQ ID NO: 31)	AGCGGCGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACC CAGAGCCCGAGCAGCCTGACCGTGACCGCGGG CGAAA
17/9 VL-2 Rev(SEQ ID NO: 32)	TGTTTGCCGCTGTAAACAGGCTCTGGCTGCTG GTGCAGCTCATGGTCACTTTTTCGCCCGCGGTC ACGG
17/9 VL-3 Fwd(SEQ ID NO: 33)	GTTTAACAGCGGCAAACAGAAAACTATCTGA CCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGCCGCCG AAAGTG
17/9 VL-4 Rev (SEQ ID NO: 34)	CGGTAAAGCGATCCGGCACGCCGCTTTCGCGGG TGCTCGCCCAATAAATCAGCACTTTCGGCGGCT GGCC
17/9 VL-5 Fwd(SEQ ID NO: 35)	TGCCGGATCGCTTTACCGGCAGCGGCAGCGGCA CCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCGTGCAGG CGGA
17/9 VL-6 Rev (SEQ ID NO: 36)	AAAGGTCAGCGGGTTGCTATAATCGTTCTGGCA ATAATACACCGCCAGATCTTCCGCCTGCACGCT GCTA
17/9 VL-7 Fwd (SEQ ID NO: 37)	AGCAACCCGCTGACCTTTGGCGGGCGGCACCAAA CTGGAAGTGAACGTACGGTGGCTGCACCATCT GTCT
17/9 VL-8 Flag Rev(SEQ ID NO: 38)	TTAAATAGCGGATGCCTTGTGTCGTCGTCCTT GTAGTCGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACC

17/9 抗體序列係使用寄存編號 A31790 及 B31790、自 NCBI 資料庫檢索。

活體外轉錄用於此等 scFv 之 DNA 構築體且接著在兔網狀紅血球溶解物中以 mRNA-scFv (蛋白質經由具有嘌呤黴素修飾之連接子連接於 mRNA) 形式或以游離 scFv (蛋白質不連接於 mRNA) 形式轉譯。純化兩種類型之分子且藉由相應生物素標記抗原進行吸引檢定 (pull-down assay) (參見圖 4)。

圖 4 中之資料顯示功能性 m-RNA-scFv (與生物素標記抗原結合) 分子被抗生蛋白鏈菌素磁性珠粒吸引，儘管回收百分率低於游離 scFv 分子。其他實驗顯示此差異僅僅歸因於繫拴於 scFv 之大 RNA 分子。核糖核酸酶降解 mRNA-scFv 分子中之 RNA 部分可使藉由抗原達成之 scFv 回收恢復至與游離 scFv 分子相同之水準 (參見圖 5)。

實例 3

mRNA-scFv 庫建構

自 SeraCare 獲得 18 位供體之人類周邊血液單核細胞 (PBMC)。下表 11 展示藉由螢光活化細胞分選 (FACS) 方法之 PBMC 分析。接著萃取 poly A RNA 以用於庫建構。

表 11：藉由 FACS 之 PBMC 分析

批號	每小瓶總細胞數目， $\times 10^6$	CD20+細胞			CD27+/CD20+總計
		CD27-	CD27+	總計	
#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%

批號	每小瓶總細胞數目， $\times 10^6$	CD20+細胞			CD27+/CD20+總計
		CD27-	CD27+	總計	
#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%

實例 4

庫標籤選擇

選擇 4 個 8 鹼基對標籤 (SEQ ID NO: 39-42) 且插入 17/9 mRNA-scFv 構築體之 TMV-UTR 與 Kozak 共同序列之間 (參見圖 6)。標籤序列設計成不包括腺苷且在三輪選擇後鑑別。如圖 6 中所示，第一位置優選 G，且第二位置優選 T。藉由設計在 5'UTR 之 TMV 與 Kozak 共同序列之間具有 8 個隨機 (B=G、C、T) 核苷酸插入的 5' 引子來產生隨機序列標籤 (參見圖 7)。接著擴增 17/9 scFv 且經由 2-3 輪選擇進行選擇，其中隨後數輪選擇用 5' 引子再擴增。接著加工序列產物以鑑別通過選擇過程之標籤。來自各輪選擇之不同產物標籤展示於圖 8 中。一些重複序列可見於各輪選擇中，然而多輪選擇中未見標籤序列。應注意因為 ATG 序列不可能存在於標籤序列中，所以在第 2 輪中標籤存在一個可能突變。

實例 5

針對 17/9 scFv 之庫選擇

為驗證 mRNA-scFv 分子可使用本文所述之 mRNA 呈現方法、藉由多輪選擇來富集，藉由重疊 PCR 方法建構 25 種多樣性之 scFv 庫。為形成 scFv 庫，如上文所述使用 17/9、D2E7、2SD4、Y61 及 MAK195 之 VH 及 VL 片段。接著藉由生物素標記 HA 標籤，自此庫選擇 17/9 scFv。選擇後，藉由選殖及群落 PCR 來檢驗 17/9 富集。在一輪 mRNA-scFv 選擇之前及之後定量 17/9 scFv 之結果展示於圖 9 中。

實例 6

使用 mRNA 呈現技術辯別具有不同親和力之 scFv 結合物為判定 mRNA 呈現技術(亦即如上文所述)是否可用於辯別具有不同親和力之 scFv 結合物，製造 D2E7 與 2SD4 間之嵌合體。2SD4 為對 TNF α 展現低親和力(為游離蛋白質時，KD 為約 200 nM)之 D2E7 scFv 前驅體。圖 10 描繪該等嵌合體。

對游離蛋白質執行滴定。圖 11 展示不同嵌合體間之抗原結合後之回收百分率，以及抗原選擇後之經校正之回收百分率。上述結果顯示如本文中所述之 mRNA 呈現技術可用於辯別具有不同親和力之結合物。

實例 7

mRNA-scFv 分子之熱穩定性

為測定 mRNA-scFv 分子之熱穩定性，如本文中所述，轉譯 D2E7-scCk 及 Y61-scCk 及以 mRNA-scFv 形式純化。接著於不同溫度下培育 mRNA-scFv 分子 30 分鐘，隨後進行抗原選擇。抗原選擇後之經校正之回收百分率展示於圖 12 中。

圖 13 展示 RNA 可在高溫處理 mRNA-scFv 分子後回收。此時，對回收有 Y61-scC1 mRNA-scFv 分子的珠粒執行 RT-PCR。

實例 8

自人類 PBMC RNA 建構天然 κ PROfusion scFv 庫

以下實例描述使用 PROfusion 技術產生適用於選擇之人類天然 κ scFv 庫。

人類周邊血液單核細胞 (PBMC) 係購自 SeraCare (Milford, MA, 目錄號 72000)。藉由抗人類 CD20-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, 目錄號 556632) 及抗人類 CD27-PE (BD Pharmingen, 目錄號 555441) 抗體染色來表徵來自不同供體之細胞。根據製造商之方案，使用 RNeasy Midi 套組 (QIAGEN, Valencia, CA, 目錄號 75144) 自 PBMC 分離總 RNA。簡言之，於 37°C 下使冷凍細胞快速解凍，再懸浮於含有異硫氰酸胍之緩衝液中且藉由通過 21G 針多次來均質化。添加乙醇且將溶解物施加至 RNeasy midi 管柱 (總共 18 個管柱)。洗滌管柱且用無核糖核酸酶水溶離總 RNA。藉由量測 OD 260 nm 吸光度來測定 RNA 濃度及產量。接著使用 Invitrogen Fastrack MAG Maxi mRNA 分離套組 (目錄號 K1580-02)，根據套組手冊自總 RNA 分離 mRNA。在分離程序期間添加核糖核酸酶抑制劑 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 目錄號 10777-019) 以使 RNA 降解最小化。首先用去氧核糖核酸酶 (Invitrogen, 目錄號 18-68-015) 處理總 RNA 以使基因組 DNA 污染最小化。簡言

之，首先洗滌寡聚去氧胸苷磁性珠粒且接著添加至總RNA中，於65℃下培育10分鐘，且接著於室溫下結合30分鐘。洗滌珠粒若干次，且藉由無核糖核酸酶水溶離所結合之mRNA。藉由量測OD₂₆₀ nm吸光度來定量mRNA。

反轉錄

接著根據製造商之方案，藉由SuperScript II反轉錄酶(Invitrogen, Carlsbad, CA, 目錄號18064-014)及15個引子之混合物(總濃度為100 nM)(表12)，由37 µg mRNA合成第一股cDNA。以兩個各0.9 ml之等分試樣進行反應。藉由通過36個MicroSpin S-200 HR管柱(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, 目錄號27-5120-01)(每個管柱50 µL)來純化RT反應物(總體積為1.8 ml)。管柱溶離液於37℃下與核糖核酸酶H一起培育20分鐘。

表12：反轉錄引子

名稱	寡核苷酸序列
FcyRev1(SEQ ID NO: 43)	AGTTCCACGACACC
FcyRev2(SEQ ID NO: 44)	GAAGGTGTGCACG
FcyRev3(SEQ ID NO: 45)	CCACGCTGCTGAG
FcμRev1(SEQ ID NO: 46)	ACTTTGCACACCAC
FcμRev2(SEQ ID NO: 47)	TTTGTTGCCGTTGG
FcμRev3(SEQ ID NO: 48)	GGGAATTCTCACAGG
FcδRev1(SEQ ID NO: 49)	GCTGCTTGTCATGT
FcδRev2(SEQ ID NO: 50)	TGCCTTTGGAGACT
Fcδ反向3(SEQ ID NO: 51)	GACCACGCATTTGT
CκRev1(SEQ ID NO: 52)	TCCACCTTCCACTG
CκRev2(SEQ ID NO: 53)	CAGGCACACAACAG
CκRev3(SEQ ID NO: 54)	GAGTGTCACAGAGC
CλRev1(SEQ ID NO: 55)	GGGAACAGAGTGAC
CλRev2(SEQ ID NO: 56)	GTGTGGCCTTGTTG
CλRev3(SEQ ID NO: 57)	CCATCTGCCTTCCA

VH cDNA擴增

在含有 VH 前導序列 (LS) 特異性正向引子混合物 (總濃度為 200 nM) 及 JH 特異性反向引子混合物 (總濃度為 200 nM) (表 13) 之反應物中，藉由 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen，目錄號 11304-102) 有限擴增三分之一的上述 RT 反應物。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；10 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (60 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。接著藉由 QIAquick PCR 純化套組 (QIAGEN, Valencia, CA，目錄號 28106)、根據製造商之方案純化 PCR 產物。小規模中間實驗證實 cDNA 擴增至至少 100 倍。

表 13：用於 VH 片段擴增之引子

名稱	寡核苷酸序列
VH1/7LS (SEQ ID NO: 58)	ATCCTCTTYTTGGTGGGAGC
VH1-46LS (SEQ ID NO: 59)	GGTCTTCTGCTTGCTGGCTG
VH2LS (SEQ ID NO: 60)	CCTGCTGCTGACCAATCCCTTC
VH3LS (SEQ ID NO: 61)	GCTATTTTWVRAGGTGTCCARTGT
VH4LS (SEQ ID NO: 62)	GCRGCTCCAGATGGGTCCCTG
VH5LS (SEQ ID NO: 63)	ATGGGGTCAACCGCCATCCT
VH6LS (SEQ ID NO: 64)	TGGGCCTCCCATGGGGTGTC
JH1/2sRev (SEQ ID NO: 65)	CTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC
JH4/5sRev (SEQ ID NO: 66)	CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC
JH6sRev (SEQ ID NO: 67)	CTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC
JH3sRev (SEQ ID NO: 68)	CTGAAGAGACGGTGACCATTGTCC

使用 1/100 之經純化 PCR 產物作為用於擴增各 VH 家族特異性 cDNA 之模板。在含有個別 VH LS 特異性正向引子 (200 nM) 及 JH 特異性反向引子混合物 (總濃度為 200 nM) (表 13) 之反應物中，用 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 之藉由 PCR 來進行擴增。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；25 個 94°C (30 秒)、55°C (30

秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。藉由QIAquick PCR純化套組(QIAGEN, Valencia, CA)、根據製造商之方案純化上述PCR產物。隨後在含有相應VH特異性巢式正向引子(200 nM)及JH特異性反向引子混合物(總濃度為200 nM)(表14)之PCR反應物中，藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)擴增各PCR產物。各反應物中之正向引子具有8個核苷酸「標籤」(加下劃線)，引入其可在隨後庫擴增期間增加特異性。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；25個94℃(30秒)、55℃(30秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。

表14：用於巢式VH特異性PCR之引子

名稱	寡核苷酸序列
VH1標籤2正向引子 (SEQ ID NO: 69)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAGTCTGGRSCT
VH2標籤2正向引子 (SEQ ID NO: 70)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGRTCACCTTGAR GGAGTCTGGT
VH3標籤2正向引子 (SEQ ID NO: 71)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGKT GGAGTCTSGRGA
VH4標籤2正向引子 (SEQ ID NO: 72)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGCA GSAGTSSGGC
VH5標籤2正向引子 (SEQ ID NO: 73)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAGTCTGGAGCA
VH6標籤2正向引子 (SEQ ID NO: 74)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTACAGCTGCA GCAGTCAG
VH7標籤2正向引子 (SEQ ID NO: 75)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAATCTGGGT
JH反向引子1/2 (SEQ ID NO: 76)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGAC RGTGACCAGGGTGC
JH反向引子4/5 (SEQ ID NO: 77)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGAC GGTGACCAGGGTTC

名稱	寡核苷酸序列
JH反向引子6 (SEQ ID NO: 78)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGAC GGTGACCGTGGTCC
JH反向引子3 (SEQ ID NO: 79)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAAGAGAC GGTGACCATTGTCC

使PCR產物經受1%瓊脂糖凝膠電泳，且藉由QIAquick凝膠萃取套組(QIAGEN, Valencia, CA，目錄號28704)純化。進一步在PCR反應中藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)及200 nM以下通用引子大規模地擴增此等PCR產物之等分試樣：

T7TMV標籤2 (SEQ ID NO: 80):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTGTGCGAC

庫 -GS-Reverse (SEQ ID NO: 16): CGCTACCTCCGCCGCCAGAC.

此等引子將T7啟動子及TMV-UTR序列添加至PCR產物之5'端，且將部分甘胺酸-絲胺酸(G4S)連接子添加至PCR產物之3'端。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；26個94℃(30秒)、55℃(30秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。

用QIAquick PCR純化套組(QIAGEN, Valencia, CA)純化PCR產物，依據260 nm下之UV吸光度定量，且藉由1%瓊脂糖凝膠電泳觀察此等產物之等分試樣以確定純度。使用TOPO TA選殖套組(Invitrogen，目錄號45-0641)選殖VH家族特異性cDNA片段之等分試樣，且藉由測序分析個別純系。

Vκ cDNA擴增

在含有 V κ 前導序列 (LS) 特異性正向引子混合物 (總濃度為 200 nM) 及 C κ 特異性反向引子 (200 nM) (表 15) 之反應物中，藉由 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 有限擴增上述 RT 反應所產生之 cDNA 之三分之一。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；10 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (60 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。獨立小規模實驗證實 cDNA 藉由該 PCR 擴增 10 至 100 倍。

使用 QIAquick PCR 純化套組 (QIAGEN, Valencia, CA)、根據製造商之方案純化 PCR 產物。使用 1/500 之經純化 PCR 產物作為用於擴增各 V κ 家族特異性 cDNA 之模板。在含有個別 V κ LS 特異性正向引子 (200 nM) 及 C κ 特異性反向引子 (200 nM) (表 16) 之反應物中，使用 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、藉由 PCR 進行擴增。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；25 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (40 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。

表 15：用於 V κ 片段擴增之引子

名稱	寡核苷酸序列
V κ 1LS (SEQ ID NO: 81)	GCTCCTGGGRCTYCTGC
V κ 2LS (SEQ ID NO: 82)	CTYCTGGGGCTGCTAATG
V κ 3LS (SEQ ID NO: 83)	CTCTGGCTCMCAGATACCAC
V κ 4LS (SEQ ID NO: 84)	GGATCTCTGGTGCCTACGG
V κ 5LS (SEQ ID NO: 85)	GGATCTCTGATACCAGGGCA
V κ 6LS (SEQ ID NO: 86)	CTGGGTTCAGCCTCCAG
C κ -s 反向引子 (SEQ ID NO: 87)	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

表 16：用於巢式 V κ 特異性 PCR 之引子

名稱	寡核苷酸序列
V κ 1 正向引子 (SEQ ID NO:88)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACA TCCRGWTGACCCAGTCTCCWT
V κ 2 正向引子 (SEQ ID NO:89)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATA TTGTGATGACYCAGWCTCCAC
V κ 3 正向引子 (SEQ ID NO:90)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAATT GTGWTGACRCAGTCTCCAGSCA
V κ 4/6 正向引子 (SEQ ID NO:91)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACA TCGTGMTGACYCAGTCTCCAGA
V κ 5 For-Redo (SEQ ID NO:92)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAACG ACACTCACGCAGTCTCCAGCAT
V κ 6 For-NEW (SEQ ID NO: 93)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATGTC GTGATGACACAGTCTCCAGCTT
C κ 反向引子 (SEQ ID NO:14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGC CACAGTTCG

使用 QIAquick PCR 純化套組 (QIAGEN, Valencia, CA)、根據製造商之方案純化 PCR 產物。隨後在含有相應 V κ 特異性巢式正向引子 (200 nM) 及 C κ 特異性反向引子 (200 nM) (表 13) 之 PCR 反應物中，藉由 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 擴增各 PCR 產物。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；25 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (40 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。

使 PCR 產物經受 1% 瓊脂糖凝膠電泳，且藉由 QIAquick 凝膠萃取套組 (QIAGEN, Valencia, CA) 純化。進一步在含有 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及以下通用引子 (200 nM) 之 PCR 反應物中，大規模地擴增此等 PCR 產物之等分試樣：

庫-GS-正向引子 (SEQ ID NO: 94): GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

FlagA20Rev (SEQ ID NO: 95):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTC.

此等引子將部分 G4S 連接子添加至 PCR 產物之 5' 端且將 FLAG 標籤、連接子黏接位點及 poly A 尾添加至所得 PCR 產物之 3' 端。

PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；26 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (30 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。用 QIAquick PCR 純化套組 (QIAGEN, Valencia, CA) 純化 PCR 產物，依據 260 nm 下之 UV 吸光度定量，且藉由 1% 瓊脂糖凝膠電泳觀察此等產物之等分試樣以確定純度。使用 TOPO TA 選殖套組 (Invitrogen，目錄號 45-0641) 選殖所獲得之 V κ 家族特異性 cDNA 片段之一部分，且藉由測序分析個別純系。

VH-V κ scFv 建構

根據各家族中之生殖系數目混合 VH 及 V κ cDNA 片段 (表 17 及 18)。

表 17：VH 片段之混合比

VH 片段	VH1/7	VH1-46	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	總計
生殖系數目	10	1	3	22	7	1	1	45
總%	22.2%	2.7%	6.7%	48.9%	15.5%	2.7%	2.7%	100%

表 18：V κ 片段之混合比

V κ 片段	V κ 1	V κ 2	V κ 3	V κ 4	V κ 5	V κ 6	總計
生殖系數目	21	11	8	1	1	3	45
總%	46.7%	2.4%	17.8%	2.7%	2.7%	8.3%	100%

使用總共 10 μ g VH cDNA 片段 (2×10^{13} 個分子) 及總共 10

μg V κ cDNA 片段 (2×10^{13} 分子) 作為重疊 PCR 之模板。用 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶及引子 T7TMV 標籤 2 (200 nM) 及 FlagA20 反向 (200 nM) 以 30 μl 體積進行 PCR。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；17 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (60 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。使用 TOPO TA 選殖套組 (Invitrogen, 目錄號 45-0641) 選殖 PCR 產物之等分試樣，且藉由測序分析個別純系。

譜型定型

使用分別與 VH 構架 3 區及 J 區黏接之標記螢光染料之 5' 正向引子 (6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5'-GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', SEQ ID NO: 17) 及反向引子 (PanJH-Rev, 5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3', SEQ ID NO: 18)、藉由 PCR 擴增 VH 域之 CDR3 區。在含有 200 nM 6-FAM-PanVHFR3-Fwd 引子、200 nM PanJH-Rev 引子、200 μM dNTP、1 $\times$ GoTaq 緩衝液及 1.5 U GoTaq (Promega, Madison, WI) 之 30 μL 反應體積中使用 50 ng scFv 庫 DNA 模板。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；30 個 94°C (20 秒)、55°C (20 秒) 及 72°C (30 秒) 之循環；隨後為 5 分鐘的 72°C 擴展及 4°C 儲存步驟。PCR 後，將 10 μL 產物加載至 2% 瓊脂糖凝膠上以證實反應成功且使用 ABI 測序儀 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 對殘餘產物進行譜型電泳。藉由將產物長度減去 60 bp 側接構架序列來計算 CDR3 長度，產物長度藉由標記 ROX 染料之 DNA 標記測

定。

結果

人類PBMC表徵

藉由流式細胞測量術，針對B(CD20⁺)及記憶性B(CD27⁺)細胞，預篩檢20位供體之PBMC樣品，從而選擇10位供體(PBMC中之B>9%且總B細胞中之記憶性B細胞<35%)且將可利用之供體的年齡、性別及種族分布優化至最佳程度(圖14)。

RNA純化

為獲得用於庫建構之抗體cDNA譜系，自 2.3×10^9 個人類PBMC(其中B細胞估計有 2.6×10^8 個)獲得1.9 mg總RNA。隨後自總RNA之poly A mRNA純化產生42.2 μ g mRNA。

VH cDNA片段之擴增

藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察由VH通用引子(T7TMV標籤2，SEQ ID NO: 80及庫-GS-Rev，SEQ ID NO: 16)擴增之約500 bp之VH家族特異性cDNA片段的等分試樣(圖15)。

個別VH純系之測序分析呈現於表19中。經選殖之VH序列與已知VH生殖系序列之比較證實VH家族特異性引子之高特異性擴增。

V κ 片段之擴增

藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察用通用引子(庫-GS-Fwd，SEQ ID NO: 94及FlagA20反向，SEQ ID NO: 95)擴增之V κ 家族特異性cDNA片段之等分試樣(圖16)。個別V κ 純系之測序分析呈現於表20中。資料證實各V κ 生殖系家族之引子特異

性。

表 19：VH 家族特異性 PCR 產物之測序分析

片段	純系數目	生殖系匹配	家族	片段	純系數目	生殖系匹配	家族
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	VH2	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				

VH-V κ scFv 建構

執行重疊 PCR 以建構 VH-V κ scFv cDNA 片段。所得產物之一部分藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察(圖 17)。所產生之 VH-V κ scFv 片段具有可藉由 PROfusion mRNA 呈現技術選擇的所有必需元件(圖 17)。個別 VH-V κ scFv 純系之測序分析證實大部分純系之正確 VH-V κ 重組係使用功能性介入 G4S 連接子。所建構之 scFv 庫中之各種 VH 及 V κ 家族之分布與先前文獻報導一致(圖 18, 亦參見 Tsuiji 等人, (2006). *Exp. Med.*; 第 203 卷 (2), 第 393-400 頁 及 Arons 等人, (2006) *British Journal of Haematology* 第 133 卷, 第 504-512 頁)。

表 20：V κ 家族特異性PCR產物之測序分析

片段	純系數目	生殖系匹配	家族	片段	純系數目	生殖系匹配	家族
V κ 1	3	O18/O8	V κ 1	V κ 3	5	A11/A27	V κ 3
	3	O12/O2	V κ 1		4	L20/L6	V κ 3
	2	A20	V κ 1		2	L16/L2	V κ 3
	2	L19/L5	V κ 1	V κ 4	14	B3	V κ 4
	1	L19	V κ 1				
	1	L1/L15	V κ 1	V κ 5	13	B2	V κ 5
	1	L1	V κ 1				
V κ 2	7	A19/A3	V κ 2	V κ 6	12	A10/A26	V κ 6
	3	A1/A17	V κ 2		1	A14	V κ 6
	1	O1/O11	V κ 2				

譜型定型

在 VH cDNA 片段即將組裝為 scFv 庫之前，對不同 VH 家族間之 CDR3 尺寸分布進行譜型分析(圖 19)。如對高度多樣性之 cDNA 庫所預期，所觀測之 CDR3 尺寸在所分析之所有家族中變化很大。所觀測之不同 CDR3 尺寸之峰高度呈現代表常態分布之鐘形曲線且表示極大群體尺寸。此在自單一生殖系或自諸如 VH1-46、VH2、VH5 及 VH6 之極小 VH 家族獲得之結果中尤為明顯。亦感興趣的是注意到不同 VH 家族中之 CDR3 尺寸稍微不同。舉例而言，VH1 及 VH2 傾向於具有更多 15-16 個殘基之 CDR3，而 VH3 具有更多 13 個殘基之 CDR3。綜上所述，個別 VH 家族之譜型分析證實 cDNA 文庫中之廣泛多樣且極大的 VH 序列。

對 8 個 scFv 庫模板隨機取樣且如上所述進行譜型分析。自所有 8 個樣品所得之結果無法區分，表明各等分試樣中之庫模板可再現地類似(圖 20)。庫 VH CDR3 尺寸具有常態分布且大多數在 6 至 24 個殘基之間且中心在 13 至 16 殘基之

間。此分布正如所料且與個別VH家族譜型定型結果一致。

結論

選擇高品質人類抗體先導藥物為成功開發治療性抗體藥物之前提。除穩健選擇技術外，抗體庫品質(來源、多樣性及建構)亦大大地決定其製備良好先導藥物之有效性。針對較大多樣性預篩檢許多人類供體且PCR引子設計成具有極高特異性以涵蓋所有抗體生殖系序列以便可捕捉供體集合中之所有多樣性。所建構之抗體scFv庫具有來源於 2×10^8 個以上B細胞的 2×10^{12} 以上之理論多樣性，此已藉由對多個純系測序及藉由譜型定型證實。

實例9

自人類PBMC RNA建構天然 λ PROfusion scFv庫

總RNA及mRNA純化、mRNA反轉錄及藉由PCR進行VH cDNA擴增已描述於實例1中。

V λ cDNA擴增

在含有V λ 前導序列(LS)特異性正向引子(總濃度為200 nM)混合物及C λ 特異性反向引子(200 nM)(表21)之反應物中，藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)有限擴增上述RT反應所產生之cDNA之三分之一。PCR條件如下：初始94°C變性2分鐘；10個94°C(30秒)、55°C(30秒)及68°C(60秒)之循環；隨後為5分鐘的68°C及4°C儲存步驟。獨立小規模實驗證實cDNA藉由該PCR擴增10至100倍。

表 21：用於 V λ 片段擴增之引子

名稱	寡核苷酸序列
VL1LS1(SEQ ID NO: 96)	TCACTGTGCAGGGTCCTG
VL1LS3(SEQ ID NO: 97)	TCACTGCACAGGGTCCTG
VL2LS3(SEQ ID NO: 98)	TCAGGRCACAGGGTCCTG
VL2LS4(SEQ ID NO: 99)	TCAGGGCACAGGATCCTG
VL3LS2(SEQ ID NO: 100)	TGCATAGGTTCTGTGGTTTCTTCTG
VL3LS3(SEQ ID NO: 101)	ACAGGHTCTGWGGCCTCCTATG
VL3LS4(SEQ ID NO: 102)	TGCACAGGCTCTGTGACCTCCTATG
VL3LS5(SEQ ID NO: 103)	TACACAGGCTCTATTGCCTCCTATG
VL4ABLS2(SEQ ID NO: 104)	TCCACTGSACAGGGTCTCTCT
VL4CLS2(SEQ ID NO: 105)	CTTCATTTTCTCCACAGGTCTCTGTG
VL5LS(SEQ ID NO: 106)	CACTGCACAGGTTCCCTC
VL6LS(SEQ ID NO: 107)	CTGCACAGGTTCTTGGGC
VL7LS(SEQ ID NO: 108)	CTCACTTGCTGCCCAGGG
VL8LS(SEQ ID NO: 109)	GCTTATGGATCAGGAGTGGATTC
VL9LS(SEQ ID NO: 110)	CACCCTCCTCAGTCTCCTC
VL10LS(SEQ ID NO: 111)	CTCTGCAGTGTGAGTGGTC
CJLS反向引子(SEQ ID NO: 112)	GCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT

使用 QIAquick PCR 純化套組 (QIAGEN)、根據製造商之方案純化 PCR 產物。使用 1/250 之經純化 PCR 產物作為用於擴增各 V λ 家族特異性 cDNA 之模板。在含有個別 V λ LS 特異性正向引子 (200 nM) 及 C λ 特異性反向引子 (200 nM) (表 22) 之反應物中，使用 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、藉由 PCR 進行擴增。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；35 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (60 秒) 之循環；隨後為 5 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。

表 22：用於巢式 V λ 特異性 PCR 之引子

名稱	寡核苷酸序列
VL1/10 ForRedo(SEQ ID NO: 113)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGATCGCAGTC TGKGCTGACKCAGCCRC
VL2 For(SEQ ID NO: 114)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGT CTGCCCTGACTCAGCCT
VL3 ForNew(SEQ ID NO: 115)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGTCCT ATGAGCTGACDCAG

名稱	寡核苷酸序列
VL4ab For(SEQ ID NO: 116)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGC YTGTGCTGACTCAATC
VL4c For(SEQ ID NO: 117)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCTGC CTGTGCTGACTCAGCCCCCG
VL5/9 ForRedo(SEQ ID NO: 118)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGC CTGTGCTGACTCAGCCRBT
VL6 For(SEQ ID NO: 119)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGAATT TTATGCTGACTCAGCCC
VL7/8 For(SEQ ID NO: 120)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGR CTGTGGTGACYAGGAG
CJL 反向引子(SEQ ID NO: 15)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGC CTTGGGCTGACCKAGGACGGT

使 PCR 產物在 2% 瓊脂糖凝膠上運作，且使用 QuantumPrep FreezeNSqueeze 管柱 (Biorad, Hercules, CA)、根據製造商之方案純化。隨後在含有相應 Vλ 特異性巢式正向引子 (200 nM) 及 Cλ 特異性反向引子 (200 nM) (表 13) 之 PCR 反應物中，藉由 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 擴增各 PCR 產物。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；35 個 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 及 68°C (60 秒) 之循環；隨後為 5 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。

使 PCR 產物在 2% 瓊脂糖凝膠上運作，且使用 QuantumPrep FreezeNSqueeze 管柱 (Biorad, Hercules, CA)、根據製造商之方案純化。進一步在含有 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及以下通用引子 (200 nM) 之 PCR 反應物中，大規模地擴增此等 PCR 產物之等分試樣：

庫-GS-正向引子 (SEQ ID NO: 94): GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

FlagA20Rev (SEQ ID NO: 95):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCG TCCTTGTAGTC.

此等引子將部分G4S連接子添加至PCR產物之5'端且將FLAG標籤、連接子黏接位點及poly A尾添加至所得PCR產物之3'端。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；35個94℃(30秒)、55℃(30秒)及68℃(30秒)之循環；隨後為5分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。使用Purelink PCR純化套組(Invitrogen, Carlsbad, CA)純化PCR產物，依據260 nm下之UV吸光度定量，且藉由2%瓊脂糖凝膠電泳觀測此等產物之等分試樣以確定純度。

使用TOPO TA選殖套組(Invitrogen, 目錄號45-0641)選殖所得V λ 家族特異性cDNA片段之一部分，且藉由測序分析個別純系。

VH-V λ scFv建構

根據各PCR產物所代表之生殖系之多樣性，混合VH及cDNA片段(表23及24)。

表 23：VH片段之混合比

VH家族	VH1/7	VH1-46	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	總計
總%	22.2%	2.7%	6.7%	48.9%	15.5%	2.7%	2.7%	100%

表 24：V λ 片段之混合比

VL家族	VL1	VL2	VL3	VL4	VL5	VL6	VL7	VL8	VL9	VL10	總計
總%	18.5%	3.70%	33.30%	11.10%	11.10%	3.70%	7.40%	3.70%	3.70%	3.70%	100%

使用總共10 μ g VH cDNA片段(2×10^{13} 個分子)及10 μ g V κ cDNA片段(2×10^{13} 分子)作為重疊PCR之模板。使用Platinum Taq DNA高保真聚合酶及引子T7TMV標籤2(200 nM)及FlagA20Rev(200 nM)、以30 ml體積進行PCR。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；17個94℃(30秒)、

55°C (30秒) 及 68°C (60秒) 之循環；隨後為 5 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。使用 TOPO TA 選殖套組 (Invitrogen, 目錄號 45-0641) 選殖 PCR 產物之等分試樣，且藉由測序分析個別純系。

結果

Vλ 片段之擴增

藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察用通用引子 (庫 -GS-Fwd 及 FlagA20Rev) 擴增之 Vλ 家族特異性 cDNA 片段之等分試樣 (圖 21)。

個別 Vλ 純系之測序分析呈現於表 25 中。資料證實各 Vλ 生殖系家族之引子特異性，其中一個錯配以粗體突出顯示 (VL1 LS3, 生殖系 V1-3)。

表 25：Vλ 家族特異性 PCR 產物之測序分析

VL 片段	生殖系	純系數目	VL 片段	生殖系	純系數目
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

VH-V λ scFv 建構

執行重疊PCR以建構VH-V λ scFv cDNA片段。藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察所得產物之一部分(圖22)。所產生之VH-V λ scFv片段具有可藉由PROfusion mRNA呈現技術所選擇之所有必需元件(圖23)。

個別VH-V λ scFv純系之測序分析證實大部分純系之正確VH-V λ 重組係使用功能性介入G4S連接子。

實例10

自人類淋巴結mRNA建構天然 κ 及 λ PROfusion scFv庫

本實例描述自淋巴結mRNA產生PROfusion人類天然scFv庫(PBMC κ 及PBMC λ)。

10.1 反轉錄

根據製造商之方案，藉由SuperScript II反轉錄酶(Invitrogen，目錄號18064-014)及15個引子之混合物(100 nM總濃度)(表12)，自40 μ g mRNA合成第一股cDNA。以16個各0.1 ml之等分試樣進行反應。混合RT反應物(總體積為1.6 ml)，於37°C下與20 μ L核糖核酸酶H一起培育20分鐘且接著相對於水透析。

10.2 PCR

10.2.1 VH cDNA擴增

在含有VH前導序列(LS)特異性正向引子混合物(總濃度為200 nM)及JH特異性反向引子混合物(總濃度為200 nM)(表13)之反應物中，藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)有限擴增上述RT反應物之三

分之一。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；10個94℃(20秒)、55℃(20秒)及68℃(60秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。藉由QIAquick PCR純化套組(QIAGEN，目錄號28106)、根據製造商之方案純化PCR產物。小規模中間實驗證實cDNA擴增至少10倍。

將經純化PCR產物之一半等分為7個等分試樣，且各等分試樣用作擴增VH家族特異性cDNA之一之模板。在含有個別VH LS特異性正向引子(200 nM)及JH特異性反向引子混合物(總濃度為200 nM)(表13)之反應物中，使用Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)、藉由PCR進行擴增。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；25個94℃(20秒)、55℃(20秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。

藉由QIAquick PCR純化套組(QIAGEN)、根據製造商之方案純化上述PCR產物。隨後在含有相應VH特異性巢式正向引子(200 nM)及JH特異性反向引子混合物(總濃度為200 nM)(表26)之PCR反應物中，藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)擴增各PCR產物。各反應物中之正向引子具有8個核苷酸「標籤」(加下劃線)，引入其可在隨後庫擴增期間增加特異性。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；25個94℃(20秒)、55℃(20秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。

使PCR產物經受1%瓊脂糖凝膠電泳，且藉由QIAquick凝膠萃取套組(QIAGEN，目錄號28704)純化。進一步在PCR

反應中，藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)及200 nM通用引子(T7TMV標籤4s及Lib-GSv2-Rev)大規模地擴增此等PCR產物之等分試樣。此等引子將T7啟動子及TMV-UTR序列添加至PCR產物之5'端，且將部分甘胺酸-絲胺酸(G4S)連接子添加至PCR產物之3'端。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；25個94℃(20秒)、55℃(20秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。

用QIAquick PCR純化套組(QIAGEN)純化PCR產物，依據260 nm下之UV吸光度定量，且藉由1%瓊脂糖凝膠電泳觀察此等產物之等分試樣以確定純度。使用TOPO TA選殖套組(Invitrogen，目錄號45-0641)選殖VH家族特異性cDNA片段之一部分，且藉由測序分析個別純系。

表 26：用於巢式VH特異性PCR之引子

名稱	寡核苷酸序列
VH1標籤4正向引子 (SEQ ID NO: 121)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT
VH2標籤4正向引子 (SEQ ID NO: 122)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT
VH3標籤4正向引子 (SEQ ID NO: 123)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGTGGAGTCTSGRGA
VH4標籤4正向引子 (SEQ ID NO: 124)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC
VH5標籤4正向引子 (SEQ ID NO: 125)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA
VH6標籤4正向引子 (SEQ ID NO: 126)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

名稱	寡核苷酸序列
VH7標籤4正向引子 (SEQ ID NO: 127)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGT
JH1/2 RevV2(SEQ ID NO: 128)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC
JH3 RevV2(SEQ ID NO: 129)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCC
JH4/5 RevV2(SEQ ID NO: 130)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC
JH6 RevV2(SEQ ID NO: 131)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC
T7TMV 標 籤 4s(SEQ ID NO: 132)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTC
Lib-GSv2-Rev(SEQ ID NO: 133)	CAGACCCTCCACCGCCGCTG

10.2.2 V κ cDNA擴增

在含有 V κ 前導序列 (LS) 特異性正向引子混合物 (總濃度為 200 nM) 及 C κ 特異性反向引子 (200 nM) (表 15) 之反應物中，藉由 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 有限擴增上述 RT 反應所產生之 cDNA 之三分之一。PCR 條件如下：初始 94°C 變性 2 分鐘；10 個 94°C (20 秒)、55°C (20 秒) 及 68°C (60 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68°C 擴展及 4°C 儲存步驟。獨立小規模實驗證實 cDNA 藉由該 PCR 擴增多達 10 倍。

使用 QIAquick PCR 純化套組 (QIAGEN)、根據製造商之方案純化 PCR 產物。將經純化 PCR 產物之一半等分為 6 個等分試樣，且各等分試樣用作擴增個別 V κ 家族特異性 cDNA 之模板。在含有個別 V κ LS 特異性正向引子 (200 nM) 及 C κ 特異性反向引子 (200 nM) (表 15) 之反應物中，使用 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad,

CA)、藉由PCR進行擴增。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；25個94℃(20秒)、55℃(20秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。

使PCR產物經受1%瓊脂糖凝膠電泳且用QIAquick PCR純化套組(QIAGEN)、根據製造商之方案純化。隨後在含有相應V κ 特異性巢式正向引子(200 nM)及C κ 特異性反向引子(200 nM)(表27)之PCR反應物中，藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)擴增各PCR產物。PCR條件如下：初始94℃變性2分鐘；25個94℃(20秒)、55℃(20秒)及68℃(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68℃擴展及4℃儲存步驟。

進一步在含有Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)及200 nM通用引子(Lib-GSv2-Fwd及CK反向引子)之PCR反應物中，大規模地擴增此等PCR產物之等分試樣。

引子Lib-GSv2-Fwd將部分G4S連接子添加至V κ 之上游。編碼G4S連接子之通用引子(Lib-GSv2-Fwd及Lib-GSv2-Rev)之序列係自人類PBMC庫建構所用之引子(庫-GS-正向引子及庫-GS-反向引子)之序列修飾而來。此修飾可避免庫-GS-反向引子黏接於VH3家族生殖系之構架1所致的交叉致敏問題，形成截短VH序列。

表 27：用於巢式 V κ 特異性 PCR 之引子

名稱	寡核苷酸序列
V κ 1FwdV2(SEQ ID NO:134)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACA TCCRGWTGACCCAGTCTCCWT
V κ 2FwdV2(SEQ ID NO:135)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATA TTGTGATGACYCAGWCTCCAC
V κ 3FwdV2(SEQ ID NO:136)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAA TTGTGWTGACRCAGTCTCCAGSCA
V κ 4/6FwdV2(SEQ ID NO:137)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACA TCGTGMTGACYCAGTCTCCAGA
V κ 5FwdV2(SEQ ID NO:138)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAA CGACACTCACGCAGTCTCCAGCAT
V κ 6FwdV2(SEQ ID NO:139)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATG TCGTGATGACACAGTCTCCAGCTT
C κ 反向引子(SEQ ID NO:14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTG CAGCCACAGTTCG
Lib-GSv2-Fwd(SEQ ID NO:140)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTG

PCR 條件如下：初始 94℃ 變性 2 分鐘；25 個 94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒) 及 68℃ (40 秒) 之循環；隨後為 3 分鐘的 68℃ 擴展及 4℃ 儲存步驟。用 QIAquick PCR 純化套組 (QIAGEN) 純化 PCR 產物，依據 260 nm 下之 UV 吸光度定量，且藉由 1% 瓊脂糖凝膠電泳觀察此等產物之等分試樣以確定純度。使用 TOPO TA 選殖套組 (Invitrogen，目錄號 45-0641) 選殖所得 V κ 家族特異性 cDNA 片段之等分試樣，且藉由測序分析個別純系。

10.2.3 V λ cDNA 擴增

在含有 V λ 前導序列 (LS) 特異性正向引子混合物 (總濃度為 200 nM) 及 C λ 特異性反向引子 (200 nM) (表 21) 之反應物中，藉由 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 有限擴增上述 RT 反應所產生之 cDNA 之三分之一。PCR 條件如下：初始 94℃ 變性 2 分鐘；10 個 94℃ (20

秒)、55°C(20秒)及68°C(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68°C擴展及4°C儲存步驟。獨立小規模實驗證實cDNA藉由該PCR擴增多達10倍。

使用 QIAquick PCR純化套組(QIAGEN)、根據製造商之方案純化PCR產物。將經純化PCR產物之一半等分為16個等分試樣且各等分試樣用作擴增個別V λ 家族特異性cDNA之模板。在含有個別V λ LS特異性正向引子(200 nM)及C λ 特異性反向引子(200 nM)(表 21)之反應物中，使用 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)、藉由PCR進行擴增。PCR條件如下：初始94°C變性2分鐘；30個94°C(20秒)、55°C(20秒)及68°C(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68°C擴展及4°C儲存步驟。

使用 QIAquick PCR純化套組(QIAGEN)、根據製造商之方案純化PCR產物。在隨後擴增之前混合以下片段：將VL-1 LS-1與VL1 LS-3片段以3:2比率混合為VL1 LS混合片段；將VL-2 LS-3與VL2 LS-4片段以3:2比率混合為VL2 LS混合片段；將VL3 LS-2、VL3 LS-3、VL3 LS-4及VL3 LS-5片段以1:6:1:1比率混合為VL3 LS混合片段。隨後在含有相應V λ 特異性巢式正向引子(200 nM)及C λ 特異性反向引子(200 nM)(表 22)之PCR反應物中，藉由Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)擴增對應於個別家族之PCR產物。PCR條件如下：初始94°C變性2分鐘；25個94°C(20秒)、55°C(20秒)及68°C(40秒)之循環；隨後為3分鐘的68°C擴展及4°C儲存步驟。

使PCR產物經受1%瓊脂糖凝膠電泳且藉由QIAquick凝膠萃取套組(QIAGEN)純化。進一步在含有Platinum Taq DNA高保真聚合酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)及200 nM通用引子(Lib-GSv2-Fwd及CJL反向引子)之PCR反應物中，大規模地擴增此等PCR產物之等分試樣。PCR條件如下：初始94°C變性2分鐘；25個94°C(30秒)、55°C(30秒)及68°C(30秒)之循環；隨後為5分鐘的68°C擴展及4°C儲存步驟。

用QIAquick PCR純化套組(QIAGEN)純化PCR產物，依據260 nm下之UV吸光度定量，且藉由1%瓊脂糖凝膠電泳觀察此等產物之等分試樣以確定純度。如上證實VL家族特異性引子之特異性。

10.2.4 VH-V κ scFv建構

根據各家族中之生殖系數目(基於NCBI)混合VH及V κ cDNA片段(表17及18)。

使用總共10 μ g VH cDNA片段(2×10^{13} 個分子)及總共10 μ g V κ cDNA片段(2×10^{13} 個分子)作為重疊PCR之模板。使用Platinum Taq DNA高保真聚合酶及引子T7TMVUTR(200 nM)及C κ 5-FlagA20 Rev(200 nM)、以30 μ l體積進行PCR，其中步驟如下：初始94°C變性2分鐘；12個94°C(20秒)、55°C(20秒)及68°C(60秒)之循環；隨後為3分鐘的68°C擴展及4°C儲存步驟。使用TOPO TA選殖套組(Invitrogen，目錄號45-0641)選殖PCR產物之等分試樣，且藉由測序分析個別純系。

T7TMVUTR (SEQ ID NO: 1):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA

Ck5-FlagA20 Rev (SEQ ID NO: 7):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAG
ACAGATGGTGCAGCCACA.

引子 Ck5-FlagA20 Rev 將 polyA 尾添加於 PCR 產物之 3' 端。因此，該序列用於 PROfusion 分子之寡聚去氧胸苷純化。

10.2.5 VH-Vλ scFv 建構

根據各種 PCR 產物所代表之生殖系多樣性，混合 VH 及 Vλ cDNA 片段(表 18 及 28)。使用總共 10 μg VH cDNA 片段 (2×10^{13} 個分子)及總共 10 μg Vλ cDNA 片段 (2×10^{13} 個分子) 作為重疊 PCR 之模板。使用 Platinum Taq DNA 高保真聚合酶及引子 T7TMVUTR(200 nM)及 CL5 FlagA20(200 nM)、以 30 ml 體積進行 PCR。PCR 條件如下：初始 94℃ 變性 2 分鐘；10 個 94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)及 68℃ (60 秒)之循環；隨後為 5 分鐘的 68℃ 擴展及 4℃ 儲存步驟。使用 TOPO TA 選殖套組 (Invitrogen，目錄號 45-0641)選殖 PCR 產物之等分試樣，且藉由測序分析個別純系。

表 28：Vλ 片段之混合比

VL 片段	VL1	VL2	VL3	VL4	VL5	VL6	VL7	VL8	VL9	VL10	總計
生殖系數目	5	5	9	3	3	1	2	1	1	1	31
總%	16.1%	16.1%	29.0%	9.7%	9.7%	3.2%	6.4%	3.2%	3.2%	3.2%	100%

CL5 FlagA20 (SEQ ID NO: 12):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTG
ACAGTGGGGTTGGCCTTG

引子 CL5-FlagA20 將 polyA 尾添加於 PCR 產物之 3' 端。因此，該序列用於 PROfusion 分子之寡聚去氧胸苷純化。

10.3 譜型定型

使用分別與 VH 構架 3 區及 J 區黏接之標記螢光染料之 5' 正向引子 (6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5'-GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', SEQ ID NO: 17) 及反向引子 (PanJH-Rev, 5'-GCTGAGGAGACGGTGACC-3', SEQ ID NO: 18)、藉由 PCR 擴增 VH 域之 CDR3 區。在含有 200 nM 6-FAM-PanVHFR3-Fwd 引子、200 nM PanJH-Rev 引子、200 μ M dNTP、1 $\times$ GoTaq 緩衝液及 1.5 U GoTaq (Promega, Madison, WI) 之 30 μ L 體積之反應物中使用 50 ng scFv 庫 DNA 模板。PCR 條件如下：初始 94 $^{\circ}$ C 變性 2 分鐘；30 個 94 $^{\circ}$ C (20 秒)、55 $^{\circ}$ C (20 秒) 及 72 $^{\circ}$ C (30 秒) 之循環；隨後為 5 分鐘的 72 $^{\circ}$ C 擴展及 4 $^{\circ}$ C 儲存步驟。PCR 後，將 10 μ L 產物加載至 2% 瓊脂糖凝膠上以證實反應成功且使用 ABI 測序儀、對殘餘產物進行譜型電泳。藉由自產物長度減去 60 bp 側接構架序列來計算 CDR3 長度，產物長度藉由標記 ROX 染料之 DNA 標記測定。

結果

PROfusion scFv 庫建構之概述

表示 PROfusion 庫建構之不同步驟的流程圖呈現於圖 24 中。

VH cDNA 片段之擴增

藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察藉由 VH 通用引子 (T7TMVUTR

及 Lib-GSv2-Rev) 擴增之 VH 家族特異性 cDNA 片段 (約 500 bp) 之等分試樣 (圖 25)。如上測試 VH 家族特異性引子之特異性且對擴增具有大量生殖系之家族的引子再次驗證 (表 29)。

V κ 片段之擴增

藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察藉由通用引子 (Lib-GSv2-Fwd 及 CK 反向引子) 擴增之 V κ 家族特異性 cDNA 片段之等分試樣 (圖 26)。如上測試 V κ 家族特異性引子之特異性且對擴增具有大量生殖系之家族的引子再次驗證 (表 30)。

表 29：VH 家族特異性 PCR 產物之測序分析

片段	純系數目	生殖系匹配	家族	片段	純系數目	生殖系匹配	家族
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
VH2	11	VH2-5	VH2		2	VH3-9	VH3
	4	VH2-26	VH2		2	VH3-48	VH3
VH4	5	VH4-59	VH4		1	VH3-43	VH3
	4	VH4-55P	VH4		1	VH3-53	VH3
	4	VH4-39	VH4				
	3	VH4-31	VH4				

表 30：V κ 家族特異性 PCR 產物之測序分析

片段	純系數目	生殖系匹配	家族	片段	純系數目	生殖系匹配	家族
V κ 1	20	O12/O2	V κ 1	V κ 2	13	A19/A3	V κ 2
	8	O18/O8	V κ 1		3	A17/A1	V κ 2
	4	A20	V κ 1		3	A18/A2	V κ 2
	4	A30	V κ 1		3	O1/O11	V κ 2
	3	L19/L5	V κ 1	V κ 3	8	A11/A27	V κ 3
	2	L1/L15	V κ 1		4	L20/L6	V κ 3
	2	L8	V κ 1		3	L16/L2	V κ 3
	2	L11	V κ 1	V κ 6	7	A10/A26	V κ 6
	1	L12	V κ 1				
	1	L14	V κ 1				
	1	L18/L4	V κ 1				

V λ 片段之擴增

藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察藉由通用引子 (Lib-GSv2-Fwd, SEQ ID NO: 140, 及CJL反向引子, SEQ ID NO: 15) 擴增之V λ 家族特異性cDNA片段之等分試樣(圖27)。如上測試V λ 家族特異性引子之特異性。

VH-V κ 及VH-V λ scFv建構

執行重疊PCR以建構VH-V κ 及VH-V λ scFv cDNA片段。藉由瓊脂糖凝膠電泳觀察所得產物之一部分(圖27)。所產生之VH-V κ 及VH-V λ scFv片段具有可藉由PROfusion mRNA呈現技術選擇之所有必需元件(圖28)。個別VH-V κ 及VH-V λ scFv純系之測序分析證實大部分純系之正確VH-V κ 及VH-V λ 重組係使用功能性介入G4S連接子。所建構之scFv庫中之各種VH及V κ 及V λ 家族的分布與先前文獻報導一致(圖29、圖30, 亦參見Tsuiji等人, (2006). *Exp. Med.*; 第203卷(2), 第393-400頁及Arons等人, (2006) *British Journal of Haematology*第133卷, 第504-512頁)。

譜型定型

針對藉由反向引子混合物反轉錄(參見10.1)自淋巴結RNA獲得之cDNA, 針對即將組裝為scFv庫之前之VH DNA片段混合物, 及針對最終VH-V κ 及VH-V λ scFv片段進行VH CDR3尺寸分布之譜型分析(圖31)。如對具有高度多樣性之cDNA文庫所預期, 所觀察之CDR3尺寸具有常態分布且大多數在6至22個殘基之間且中心在11至14殘基之間。

結論

選擇高品質人類抗體先導藥物為成功開發治療性抗體藥物之前提。除穩健選擇技術外，抗體庫品質(來源、多樣性及建構)大大地決定其製造良好先導藥物之有效性。在本發明中，使用來自多位供體之mRNA增加庫多樣性且高特異性PCR引子設計成涵蓋所有抗體生殖系序列以便可捕捉供體集合中之所有多樣性。VH-V κ 及VH-V λ scFv庫係分別建構以增加自相同RNA來源選擇多種抗體先導藥物之機率。兩個庫之高度多樣性可藉由對多個純系進行譜型定型及測序來證實。兩個庫皆用於針對不同標靶進行PROfusion mRNA呈現選擇。

實例 11

用於PROfusion構築體之測序引子

本實例提供用於PROfusion構築體之測序引子。

用於所有scFv及VH庫之正向引子：

T7TMVUTR (SEQ ID NO: 1):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA

用於所有V κ 及V λ 庫之正向引子：

VL-T7TMV標籤3GS-Fwd (SEQ IN NO: 2):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACCATGGGG

TCTGGCGGCGGAGGTAGCG

用於所有 κ scFv及V κ 庫之反向引子：

Ck1FLAGA20 (SEQ ID NO: 3):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAG
ACAGAT

Ck2FLAGA20 (SEQ ID NO: 4):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAG
ACAGATGGT

Ck3FLAGA20 (SEQ ID NO: 5):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAG
ACAGATGGTGCA

Ck4FLAGA20 (SEQ ID NO: 6):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAG
ACAGATGGTGCAGCC

Ck5FLAGA20 (SEQ ID NO: 7):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAG
ACAGATGGTGCAGCCACA

用於所有 λ scFv及 $V\lambda$ 庫之反向引子：

CL1FLAGA20 (SEQ ID NO: 8):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTG
ACAGTG

CL2FLAGA20 (SEQ ID NO: 9):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTG
ACAGTGGGG

CL3FLAGA20 (SEQ ID NO: 10):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTG

ACAGTGGGGTTG

CL4FLAGA20 (SEQ ID NO: 11):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTG TAGTCAGTG

ACAGTGGGGTTGGCC

CL5FLAGA20 (SEQ ID NO: 12):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTG TAGTCAGTG

ACAGTGGGGTTGGCCTTG

Lib-GS-Rev (SEQ ID NO: 16): CGCTACCTCCGCCGCCAGAC

用於所有 VH庫之反向引子：

VH-GSFLAGA20-Rev (SEQ ID NO: 13):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCATCATCATCTTTATAATCGCTA

CTCCGCCGCCAGAC

用於在反轉錄中合成第一股 cDNA 之引子：

Fcγ：

FcγRev1(SEQ ID NO: 43)：AGTTCCACGACACC

FcγRev2(SEQ ID NO: 44)：GAAGGTGTGCACG

FcγRev3(SEQ ID NO: 45)：CCACGCTGCTGAG

Fcμ：

FcμRev1(SEQ ID NO: 46)：ACTTTGCACACCAC

FcμRev2(SEQ ID NO: 47)：TTTGTTGCCGTTGG

FcμRev3(SEQ ID NO: 48)：GGGAATTCTCACAGG

Fcd：

FcdRev1(SEQ ID NO: 49)：GCTGCTTGTCATGT

FcdRev2(SEQ ID NO: 50)：TGCCTTTGGAGACT

FcδRev3(SEQ ID NO: 51) : GACCACGCATTTGT

Cκ-RT引子 :

CκRev1(SEQ ID NO: 52) : TCCACCTTCCACTG

CκRev2(SEQ ID NO: 53) : CAGGCACACAACAG

CκRev3(SEQ ID NO: 54) : GAGTGTCACAGAGC

CLRT引子

CλRev1(SEQ ID NO: 55)GGGAACAGAGTGAC

CλRev2(SEQ ID NO: 56) : GTGTGGCCTTGTTG

CλRev3(SEQ ID NO: 57) : CCATCTGCCTTCCA

用於VH片段擴增之引子 :

VH1/7LS (SEQ ID NO: 58): ATCCTCTTYTTGGTGGGAGC

VH1-46LS (SEQ ID NO: 59): GGTCTTCTGCTTGCTGGCTG

VH2LS (SEQ ID NO: 60): CCTGCTGCTGACCAYCCCTTC

VH3LS (SEQ ID NO: 61): GCTATTTTWVRAGGTGTCCARTGT

VH4LS (SEQ ID NO: 62): GCRGCTCCCAGATGGGTCCTG

VH5LS (SEQ ID NO: 63): ATGGGGTCAACCGCCATCCT

VH6LS (SEQ ID NO: 64): TGGGCCTCCCATGGGGTGTC

用於巢式VH特異性PCR之引子 :

VH引子標籤2 :

VH1正向引子(SEQ ID NO: 69) :

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2正向引子(SEQ ID NO: 70) :

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3正向引子(SEQ ID NO: 71) :

tttacaattacagtgttgcgaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGRGGGA

VH4正向引子(SEQ ID NO: 72) :

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5正向引子(SEQ ID NO: 73) :

tttacaattacagtgttgcgaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA

VH6正向引子(SEQ ID NO: 74) :

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7正向引子(SEQ ID NO: 75) :

tttacaattacagtgttgcgaccatggAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGT

用於 Vκ 片段擴增之引子 :

T7TMV標籤2(SEQ ID NO: 80) :

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTGTTGCGAC

Vκ1LS(SEQ ID NO: 81) : GCTCCTGGGRCTYCTGC

Vκ2LS(SEQ ID NO: 82) : CTYCTGGGGCTGCTAATG

Vκ3LS(SEQ ID NO: 83) : CTCTGGCTCMCAGATACCAC

Vκ4LS(SEQ ID NO: 84) : GGATCTCTGGTGCCTACGG

Vκ5LS(SEQ ID NO: 85) : GGATCTCTGATACCAGGGCA

Vκ6LS(SEQ ID NO: 86) : CTGGGTTCAGCCTCCAG

庫 Gly-Ser 重疊引子 :

Lib-GS-Fwd(SEQ ID NO: 94) : GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

FLAG-A20.Rev(SEQ ID NO: 95) :

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGT CGTCCTTG TAGTC

用於 Vλ 片段擴增之引子 :

VL1LS-1(SEQ ID NO: 96) : TCACTGTGCAGGGTCCTG

VL1LS-3(SEQ ID NO: 97) : TCACTGCACAGGGTCCTG
 VL2LS-3(SEQ ID NO: 98) : TCAGGRCACAGGGTCCTG
 VL2LS-4(SEQ ID NO: 99) : TCAGGGCACAGGATCCTG
 VL3LS-2(SEQ ID NO: 100) : TGCATAGGTTCTGTGGTTTCTTCTG
 VL3LS-3(SEQ ID NO: 101) : ACAGGHTCTGWGGCCTCCTATG
 VL3LS-4(SEQ ID NO: 102) : TGCACAGGCTCTGTGACCTCCTATG
 VL3LS-5(SEQ ID NO: 103) : TACACAGGCTCTATTGCCTCCTATG
 VL4Cls-2(SEQ ID NO: 104) : CTTCAATTTTCTCCACAGGTCTCTGTG
 VL4abLS-2(SEQ ID NO: 105) : TCCACTGSACAGGGTCTCTCT
 VL5LS(SEQ ID NO: 106) : CACTGCACAGGTTCCCTC
 VL6LS(SEQ ID NO: 107) : CTGCACAGGTTCTTGGGC
 VL7LS(SEQ ID NO: 108) : CTCACTTGCTGCCCAGGG
 VL8LS(SEQ ID NO: 109) : GCTTATGGATCAGGAGTGGATTC
 VL9LS(SEQ ID NO: 110) : CACCCTCCTCAGTCTCCTC
 VL10LS(SEQ ID NO: 111) : CTCTGCAGTGTCAGTGGTC

用於巢式VH特異性PCR之引子：

VH引子標籤4：

VH1正向引子(SEQ ID NO: 121)：

ttacaattacagcttcttcaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2正向引子(SEQ ID NO: 122)：

ttacaattacagcttcttcaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3正向引子(SEQ ID NO: 123)：

ttacaattacagcttcttcaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGRGA

VH4正向引子(SEQ ID NO: 124)：

tttacaattacagcttcttcacccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5正向引子(SEQ ID NO: 125) :

tttacaattacagcttcttcacccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA

VH6正向引子(SEQ ID NO: 126) :

tttacaattacagcttcttcacccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7正向引子(SEQ ID NO: 127) :

tttacaattacagcttcttcacccatggAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGT

JH反向引子1/2(SEQ ID NO: 128) :

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACRGT

GACCAGGGTGC

JH反向引子3(SEQ ID NO: 129) :

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAAGAGACGGTG ACCATTGTCC

JH反向引子4/5(SEQ ID NO: 130) :

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGT GACCAGGGTTC

JH反向引子6(SEQ ID NO: 131) :

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTG ACCGTGGTCC

用於Vλ片段擴增之引子 :

Vκ引子V2 :

Vκ1FwdV2(SEQ ID NO: 134) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACATCCRGWTGACCCAGTCTCC

WT

Vκ2FwdV2(包括VK3之L10)(SEQ ID NO: 135) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATATTGTGATGACYCAGWCTCC

AC

Vk3FwdV2(L10除外)(SEQ ID NO: 136) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAATTGTGWTGACRCAGTCTCC
AGSCA

Vk4/6FwdV2(SEQ ID NO: 137) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACATCGTGMTGACYCAGTCTCC
AGA

Vk5FwdV2(SEQ ID NO: 138) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAACGACACTCACGCAGTCTCC
AGCAT

Vk6FwdV2(SEQ ID NO: 139) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATGTCGTGATGACACAGTCTCC
AGCTT

T7-TMV-Seq(9970)(SEQ ID NO: 148) : CTC ACT ATA GGG ACA ATT AC

T7TMV標籤3(SEQ ID NO: 149) :

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGAC

T7TMV標籤4(SEQ ID NO: 150) :

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCAC

T7TMV標籤2s(SEQ ID NO: 151) :

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAG TGTTGCG

T7TMV標籤3s(SEQ ID NO: 152) :

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGG

T7TMV標籤4s(SEQ ID NO: 132) :

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTC

T7TMV標籤4L(SEQ ID NO: 153):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGG

TMV標籤4L(SEQ ID NO: 154) :

ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGG

TMV標籤4(SEQ ID NO: 155) :

ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCAC

TMV標籤4s(SEQ ID NO: 156) :

ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTC

phylflag3's(無poly A)(SEQ ID NO: 157) :

CCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTC

VH-FLAGA20-Rev(FLAG經重新編碼可使VL之FLAG序列的X致敏最小化)(SEQ ID NO: 158) :

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCAATCAATCCTTATAATC

產生具有 C_μ間隔子之 VH域庫的引子 :

JH1/2Cm-Rev(SEQ ID NO: 159) :

GGTTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC

JH4/5Cm-Rev(SEQ ID NO: 160) :

GGTTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

JH6Cm-Rev(SEQ ID NO: 161) :

GGTTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAGGAGACGGTGACCGTGG TCC

JH3Cm-Rev(SEQ ID NO: 162) :

GGTTGGGGCGGATGCACTCCCCTGAAGAGACGGTGACCATTG TCC

JH1/2sRev(SEQ ID NO: 65) : CTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC

JH4/5sRev(SEQ ID NO: 66) : CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

JH6sRev(SEQ ID NO: 67) : CTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC

JH3sRev(SEQ ID NO:68) : CTGAAGAGACGGTGACCATTGTCC

Vk引子 :

Vk1正向引子(SEQ ID NO: 88) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGACATCCRGWTGACCCAGTCTCC
WT

Vk2正向引子(包括Vk3之L10)(SEQ ID NO: 89) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGATATTGTGATGACYCAGWCTCC
AC

Vk3正向引子(L10除外)(SEQ ID NO: 90) :

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGAAATTGTGWTGACRCAGTCTCCAG
SCA

Vk4/6正向引子(SEQ ID NO: 91) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGACATCGTGMTGACYCAGTCTCC
AGA

Vk5 For-NEW(SEQ ID NO:92) :

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGC
AT

Vk6 For-NEW(SEQ ID NO: 93) :

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGATGTCGTGATGACACAGTCTCCAGC
TT

Vk5正向引子(SEQ ID NO: 168) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGAAACGACACTCACGCAGTCTC

Vk6正向引子(SEQ ID NO: 169) :

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGGATGTCGTGATGACACAGTCTCCAGC

I

Cκ反向引子(SEQ ID NO: 14) :

GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

Cκ5 FLAGA20(SEQ ID NO: 7) :

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAG
ACAGATGGTGCAGCCACA

Cκ-s反向引子 : (SEQ ID NO: 87) : GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

Cκ-長反向引子(SEQ ID NO: 170) : 長Cκ反向引子將7 A.A.添加至FLAG
之前 :

gtcgtcgtcgtcctttagtcCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTT
CG

FLAG hCκ引子 :

CκL4-FlagA20-Rev(SEQ ID NO: 171) :

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCTCA
TCAGATGGCGGGAAGAT

CκL3-FlagA20-Rev(SEQ ID NO: 172) :

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCTCA
TCAGATGGCGGGAA

CκL2-FlagA20-Rev(SEQ ID NO: 173) :

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCTCA
TCAGATGGCGG

CκL1-FlagA20-Rev(SEQ ID NO: 174) :

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCTCA

TCAGATGG

VL 引子 :

VL1/10正向引子(SEQ ID NO: 175) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGKGCTGACKCAGCCRC

VL2正向引子(SEQ ID NO: 114) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCT

VL3正向引子新標籤(SEQ ID NO: 115) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGTCCTATGAGCTGACDCAG

VL4ab正向引子(SEQ ID NO: 116) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGCYTGCTGACTCAATC

VL4c正向引子(SEQ ID NO: 117) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCCG

VL5/9正向引子(SEQ ID NO: 118) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGCCTGTGCTGACTCAGCCRBCT

VL6正向引子(SEQ ID NO: 119) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGAATTTATGCTGACTCAGCCC

VL7/8正向引子(SEQ ID NO: 120) :

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGRCTGTGGTGACYCAGGAG

CJL反向引子(SEQ ID NO: 15) :

GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTGGGCTGACCKAGGACG

GT

CJL-s反向引子(SEQ ID NO: 112) : GCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT

VH引子標籤3 :

VH1Fwd標籤3(SEQ ID NO: 176) :

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2Fwd標籤3(SEQ ID NO: 177) :

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3Fwd標籤3(SEQ ID NO: 178) :

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGR GGA

VH4Fwd標籤3(SEQ ID NO: 179) :

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5Fwd標籤3(SEQ ID NO: 180) :

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6Fwd標籤3(SEQ ID NO: 181) :

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7Fwd標籤3(SEQ ID NO: 182) :

TttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCT GGGT

VL引子 :

VL1/10FwdV2(SEQ ID NO: 183) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGTCTGKGCTGACKCAGCCRC

VL2FwdV2(SEQ ID NO: 184) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGTCTGCCCTGACTCAGCCT

VL3FwdV2(SEQ ID NO: 185) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTTCCTATGAGCTGACDCAG

VL4abFwdV2(SEQ ID NO: 186) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGCYTGTGCTGACTCAATC

VL4cFwdV2(SEQ ID NO: 187) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCCG

VL5/9FwdV2(SEQ ID NO: 188) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGCCTGTGCTGACTCAGCCRBCT

VL6FwdV2(SEQ ID NO: 189) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTAATTTATGCTGACTCAGCCC

VL7/8FwdV2(SEQ ID NO: 190) :

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGRCTGTGGTGACYCAGGAG

Lib-GSv2-Fwd(SEQ ID NO: 140) : CAGCGGCGGTGGAGGGTCTG

Lib-GSv2-Rev(SEQ ID NO: 133) : CAGACCCTCCACCGCCGCTG

JH1/2RevV2(SEQ ID NO: 141) :

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC

JH4/5RevV2(SEQ ID NO: 142) :

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

JH6RevV2(SEQ ID NO: 143) :

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC

JH3RevV2(SEQ ID NO: 144) :

cagaccctccaccgccgctgccgcctccacCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCC

庫 GlySer 連接子 v2 :

庫GS Fwd: C AGC GGC GGT GGA GGG TCT G -----> (SEQ ID NO: 145)

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

GGA AGT (SEQ ID NO: 146)

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

TCA (SEQ ID NO: 147)

Library GS Rev: <----- G TCG CCG CCA CCT CCC AGA C (SEQ ID NO: 163)

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

S (SEQ ID NO: 164)

PCR期間之重疊

VH3 FR1: CAG CTG GTG GAG TCT **GGG GGA GGC** TTG GTC CAG CCT GGG
GGG TTC (SEQ ID NO: 165)

TCC TCAGGT GGA GGC GGC **AGC** GGC GGT GGA GGG **TCT G** (SEQ ID NO: 166)
G **TCG** CCG CCA CCT CCC **AGA** CCG CCA CCG CCT
TCA (SEQ ID NO: 167)

(for Vk3, Vk6) <-----**CG** CCG CCA CCT CCC **AGA** CCG CCA CCG
CCT **TCA** (SEQ ID NO: 212)

具有用於人類扁桃體庫之新標籤之引子

VH引子標籤5：

VH1Fwd標籤5(SEQ ID NO: 191)：

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGR SCT

VH2Fwd標籤5(SEQ ID NO: 192)：

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTC TGGT

VH3Fwd標籤5(SEQ ID NO: 193)：

tttacaattacaGTGTCTGTaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGR GGA

VH4Fwd標籤5(SEQ ID NO: 194)：

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5Fwd標籤5(SEQ ID NO: 195)：

tttacaattacaGTGTCTGTaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6Fwd標籤5(SEQ ID NO: 196)：

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7Fwd標籤5(SEQ ID NO: 197)：

TttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGT

具有用於人類骨髓庫之新標籤之引子

VH引子標籤6：

VH1Fwd標籤6(SEQ ID NO: 198)：

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRS CT

VH2Fwd標籤6(SEQ ID NO: 199)：

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3Fwd標籤6(SEQ ID NO: 200)：

tttacaattacaGTTTGGCTCaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSG
RGGA

VH4Fwd標籤6(SEQ ID NO: 201)：

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5Fwd標籤6(SEQ ID NO: 202)：

tttacaattacaGTTTGGCTaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6Fwd標籤6(SEQ ID NO: 203)：

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7Fwd標籤6(SEQ ID NO: 204)：

TttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGG GT

再擴增標籤5正向引子

TMV標籤5s(SEQ ID NO: 205)：ACAATTACTATTTACAATTACAGTGTCTGT

TMV標籤6s(SEQ ID NO: 206)：ACAATTACTATTTACAATTACAGTTTGGCT

TMV標籤5(SEQ ID NO: 207)：ACAATTACTATTTACAATTACAGTGTCTGTacc

TMV標籤6(SEQ ID NO: 208)：ACAATTACTATTTACAATTACAGTTTGGCTacc

T7TMV標籤5s(SEQ ID NO: 209)：TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTT

ACAATTACAGTGTCTGT

T7TMV標籤6s(SEQ ID NO: 210)：

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTTTGGCT

以引用的方式併入

整篇本申請案中所引用之所有引用參考文獻(包括文獻參照案、專利、專利申請案及網站)之內容明確地以全文引用的方式併入本文中以用於任何目的，該等參考文獻中所引用之參考文獻亦如此併入本文中。除非另有指示，否則可使用此項技術中熟知之免疫學、分子生物學及細胞生物學的習知技術實施本發明。

均等案

本發明可以其他特定形式實施而不悖離本發明之精神或實質性特徵。因此，在各個方面，上述實施例均視為說明性而非限制本文所述之本發明。因此，本發明之範圍由隨附申請專利範圍而非由以上說明來指定，且因此本文中希望涵蓋屬於申請專利範圍之均等案之含義及範圍內的所有變化。

【圖式簡單說明】

圖1描繪本發明之特定實施例中之mRNA-scFv呈現技術之一般流程；

圖2描繪本發明之特定實施例中之mRNA-scFv呈現技術之一般流程；

圖3描繪庫DNA構築體之一般圖示；

圖4描繪以mRNA-scFv分子形式產生之功能性scFv；

圖5描繪的結果顯示mRNA-scFv分子形式中所連接之scFv在功能上等效於游離scFv分子；

圖 6 描繪插入 17/9 mRNA-scFv 構築體之 TMV-UTR 與 Kozak 共同序列之間的 4 個 8 bp 標籤 (SEQ ID NOs:39-42) ；

圖 7 描繪例示性構築體及控制序列 ；

圖 8 描繪在三輪選擇中所鑑別之隨機標籤序列 ；

圖 9 繪在一輪 mRNA-scFv 選擇之前及之後定量 17/9 scFv 的結果 ；

圖 10 描繪 D2E7 與 2SD4 間之嵌合體 ；

圖 11 描繪不同 TNF α 結合物之 K_D 曲線 ；

圖 12 描繪 mRNA-scFv 分子之熱穩定性 ；

圖 13 描繪的結果顯示 RNA 在高溫處理 mRNA-scFv 分子後回收 ；

圖 14 描繪天然人類 PBMC κ scFv PROfusion 庫中之 PBMC 供體之年齡、種族及性別分布 ；

圖 15 描繪所建構之天然人類 PBMC κ scFv PROfusion 庫中之 VH 家族特異性 PCR 片段 ；

圖 16 描繪所建構之天然人類 PBMC κ scFv PROfusion 庫中之 V κ 家族特異性 PCR 片段 ；

圖 17 描繪所建構之天然人類 PBMC κ scFv PROfusion 庫中之 VH-V κ scFv PCR 產物 ；

圖 18 描繪所建構之天然人類 PBMC κ scFv PROfusion 庫中之 VH 及 V κ 家族分布 ；

圖 19 描繪天然人類 PBMC 抗體 CDR3 尺寸之譜型分析 ；

圖 20 描繪藉由譜型分析對 VH/V κ 庫進行品質控制 ；

圖 21 描繪所建構之天然人類 PBMC λ scFv PROfusion 庫

中之V λ 家族特異性PCR片段；

圖 22描繪所建構之天然人類PBMC λ scFv PROfusion庫中之VH-V λ scFv PCR產物；

圖 23描繪所建構之天然人類PBMC λ scFv PROfusion庫中之VH及V λ 家族分布；

圖 24描繪天然人類淋巴結 κ 及 λ scFv PROfusion庫之PROfusion庫建構流程；

圖 25描繪所建構之天然人類淋巴結 κ 及 λ scFv PROfusion庫中之VH家族特異性PCR片段；

圖 26描繪所建構之天然人類淋巴結 κ 及 λ scFv PROfusion庫中之V κ 家族特異性PCR片段；

圖 27描繪所建構之天然人類淋巴結 κ 及 λ scFv PROfusion庫中之V λ 家族特異性PCR片段；

圖 28描繪所建構之天然人類淋巴結 κ 及 λ scFv PROfusion庫中之VH-V κ 及VH-V λ scFv PCR產物；

圖 29描繪所建構之VH-V κ scFv庫中之VH及V κ 家族分布；

圖 30描繪所建構之VH-V λ scFv庫中之VH及V λ 家族分布；及

圖 31描繪藉由譜型分析對所建構之VH-V λ scFv庫中之VH-V κ 及VH-V λ 庫進行品質控制。

序列表

<110>	美商亞培公司	
<120>	改良之抗體庫	
<140>	098133249	
<141>	2009-09-30	
<150>	US 61/101,483	
<151>	2008-09-30	
<160>	212	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: T7TMVUTR	
<400>	1	
	taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta ca	42
<210>	2	
<211>	78	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VL-T7TMVTag3GS-Fwd	
<400>	2	
	taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta caggctttgg accatggggt	60

ctggcggcgg aggtagcg 78

<210> 3
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)1FLAGA20

<400> 3
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcgaa 60

gacagat 67

<210> 4
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)2FLAGA20

<400> 4
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcgaa 60

gacagatggt 70

<210> 5
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)3FLAGA20

<400> 5
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct ttagtgcgaa 60

gacagatggt gca 73

<210> 6
<211> 76
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)4FLAGA20

<400> 6
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct ttagtgcgaa 60

gacagatggt gcagcc 76

<210> 7
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)5FLAGA20

<400> 7
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct ttagtgcgaa 60

gacagatggt gcagccaca 79

<210> 8
<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: CL1FLAGA20

<400> 8

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgatc tcgtcgatcct ttagatcagt 60

gacagtgc 67

<210> 9

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: CL2FLAGA20

<400> 9

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgatc tcgtcgatcct ttagatcagt 60

gacagtgggg 70

<210> 10

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: CL3FLAGA20

<400> 10

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgatc tcgtcgatcct ttagatcagt 60

gacagtgggg ttg 73

<210> 11
<211> 76
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: CL4FLAGA20

<400> 11
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgctcct ttagtcagt 60
gacagtgggg ttggcc 76

<210> 12
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: CL5FLAGA20

<400> 12
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgctcct ttagtcagt 60
gacagtgggg ttggccttg 79

<210> 13
<211> 76
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH-GSFLAGA20-Rev

<400> 13
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgctttgtca tcatcatctt tataatcgct 60

acctccgccg ccagac 76

<210> 14
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa) Reverse

<400> 14
gtcgtcgtcg tccttgtagt cgaagacaga tgggtgcagcc acagttcg 48

<210> 15
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: CJL Reverse

<400> 15
gtcgtcgtcg tccttgtagt cagtgcaggt ggggttggcc ttgggctgac ckaggacggt 60

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: Lib-GS-Rev

<400> 16	
cgctacctcc gccgccagac	20
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: 6-FAM-PanVHFR3-Fwd	
<400> 17	
gacacggccg tgtattactg t	21
<210> 18	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: PanJH-Rev	
<400> 18	
gctgaggaga cggtgacc	18
<210> 19	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: T7-MAK195VH-Fwd	
<400> 19	
taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta caccatggag gtgcagctga	60

aggagtcagg 70

<210> 20
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: MAK195VHGS-Rev

<400> 20
cgatccgcc cgcgcagagc cacctccgcc tgaaccgcct ccacctgcag agacagtgc 60

cagagtcc 68

<210> 21
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸: MAK195VLGS-Fwd

<400> 21
ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcggacat tgtgatgacc 60

cagtctc 67

<210> 22
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: MAK195VL-Rev

<400> 22

gatggtgcag ccaccgtacg ttttatttcc aactttgtcc ccgag

45

<210> 23

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: T7TMVUTR-17/9 VH-1 Fwd

<400> 23

ggacaattac tatttacaat tacaccatgg aagtgcagct ggtggaaagc ggcggcgatc

60

tggtgaaacc

70

<210> 24

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VH-2 Rev

<400> 24

gctgctaaag ctaaagccgc tcgccgcgca gctcagtttc aggctgccgc ccggtttcac

60

cagatcgccg

70

<210> 25

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VH-3 Fwd

<400> 25

ggcttttagct ttagcagcta tggcatgagc tgggtgcgcc agaccccgga taaacgcctg 60

gaatgggtgg 70

<210> 26

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VH-4 Rev

<400> 26

gcctttcacg ctatccgat aataggtata gccgccgccg ttgctaattg tcgccaccca 60

ttccaggcgt 70

<210> 27

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VH-5 Fwd

<400> 27

ccggatagcg tgaaaggccg cttaccatt agccgcgata acgcgaaaaa caccctgtat 60

ctgcagatg 69

<210> 28

<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VH-6 Rev

<400> 28

gttcgcggcg cgcgcaataa tacatcgcg c tatcttcgct tttcaggctg ctcatctgca 60

gatacagggt 70

<210> 29
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VH-7 Fwd

<400> 29

attgcgcgcg ccgcgaacgc tatgatgaaa acggctttgc gtattggggc cagggcaccc 60

tggtgaccgt 70

<210> 30
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VH-8 GS Rev

<400> 30

cgatccgcca ccgccgctgc cacctccgcc tgaaccgcct ccacccgcgc tcacggtcac 60

cagggtgccc 70

<210> 31
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: GS-17/9 VL-1 Fwd

<400> 31
agcggcggtg gcg gatcgga tattgtgatg acccagagcc cgagcagcct gaccgtgacc 60

gcgggcgaaa 70

<210> 32
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VL-2 Rev

<400> 32
tgtttgccgc tgtaaacag gctctggctg ctggtgcagc tcatggtcac tttttcgccc 60

gcggtcacgg 70

<210> 33
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VL-3 Fwd

<400> 33
gtttaacagc ggcaaacaga aaaactatct gacctggtat cagcagaaac cgggccagcc 60

gccgaaagtg 70

<210> 34

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VL-4 Rev

<400> 34
cggtaaagcg atccggcacg ccgctttcgc gggtgctcgc ccaataaatc agcactttcg 60

gcggctggcc 70

<210> 35

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VL-5 Fwd

<400> 35
tgccggatcg ctttaccggc agcggcagcg gcaccgattt taccctgacc attagcagcg 60

tgcaggcgga 70

<210> 36

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VL-6 Rev

<400> 36

aaaggtcagc gggttgctat aatcgttctg gcaataatac accgccagat cticcgcctg 60

cacgctgcta 70

<210> 37

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VL-7 Fwd

<400> 37

agcaaccgcg tgacctttgg cggcggcacc aaactggaac tgaaacgtac ggtggctgca 60

ccatctgtct 70

<210> 38

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: 17/9 VL-8 Flag Rev

<400> 38

ttaaatagcg gatgccttgt cgtcgtcgtc cttgtagtcg atgaagacag atggtgcagc 60

cacc 64

<210> 39
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
· <223> 合成寡核苷酸: 17_9-tag1

· <400> 39
taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta cagcgtgggt accatggaag 60

● <210> 40
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: 17_9-tag2

<400> 40
taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta cagtgttgcg accatggaag 60

● <210> 41
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
· <223> 合成寡核苷酸: 17_9-tag3

· <400> 41
taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta caggctttgg accatggaag 60

<210> 42
<211> 60

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: 17_9-tag4

<400> 42
taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta cagcttcttc accatggaag 60

<210> 43
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: Fc(gamma)Rev1

<400> 43
agttccacga cacc 14

<210> 44
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: Fc(gamma)Rev2

<400> 44
gaaggtgtgc acg 13

<210> 45
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: Fc(gamma)Rev3

<400> 45
ccacgctgct gag 13

<210> 46
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: Fc(mu)Rev1

<400> 46
actttgcaca ccac 14

<210> 47
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: Fc(mu)Rev2

<400> 47
tttgttgccg ttgg 14

<210> 48
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: Fc(mu)Rev3

<400> 48

gggaattctc acagg

15

<210> 49

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: Fc(delta)Rev1

<400> 49

gctgcttgct atgt

14

<210> 50

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: Fc(delta)Rev2

<400> 50

tgcctttgga gact

14

<210> 51

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: Fc(delta)Rev3

<400> 51
gaccacgcat ttgt 14

<210> 52
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)Rev1

<400> 52
tccaccttcc actg 14

<210> 53
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)Rev2

<400> 53
caggcacaca acag 14

<210> 54
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)Rev3

<400> 54
gagtgtcaca gagc 14

<210> 55
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: C(lambda)Rev1

<400> 55

gggaacagag tgac

14

<210> 56
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: C(lambda)Rev2

<400> 56

gtgtggcctt gttg

14

<210> 57
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: C(lambda)Rev3.

<400> 57

ccatctgcct tcca

14

<210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH1/7LS

<400> 58

atcctcttyt tgggtggsagc

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH1-46LS

<400> 59

ggtcttctgc ttgctggctg

20

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH2LS

<400> 60

cctgctgctg accayccctt c

21

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH3LS

<400> 61

gctatttttwv raggtgtcca rtgt

24

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH4LS

<400> 62

gcrgtccca gatgggtcct g

21

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH5LS

<400> 63

atgggggtcaa ccgcatcct

20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH6LS

<400> 64
tgggcctccc atggggtgtc 20

<210> 65
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH1/2sRev

<400> 65
ctgaggagac rgtgaccagg gtgc 24

<210> 66
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH4/5sRev

<400> 66
ctgaggagac ggtgaccagg gttc 24

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: JH6sRev

<400> 67

ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc

24

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: JH3sRev

<400> 68

ctgaagagac ggtgaccatt gtcc

24

<210> 69

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH1Forward

<400> 69

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct

53

<210> 70

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH2Forward

<400>	70	
tttacaatta cagtgttgcg accatggagr tcacctgar ggagtctggt		50
<210>	71	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VH3Forward	
<400>	71	
tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctgkt ggagtctsgg gga		53
<210>	72	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VH4Forward	
<400>	72	
tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctgca gsagtssggc		50
<210>	73	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VH5Forward	
<400>	73	
tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca		53

<210> 74
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH6Forward

<400> 74

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tacagctgca gcagtcag

48

<210> 75

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH7Forward

<400> 75

tttacaatta cagtgttgcg accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t

51

<210> 76

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: JHReverse1/2

<400> 76

cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac rgtgaccagg gtgc

54

<210> 77
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JHReverse4/5

<400> 77
cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccagg gtcc 54

<210> 78
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JHReverse6

<400> 78
cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc 54

<210> 79
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JHReverse3

<400> 79
cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaagagac ggtgaccatt gtcc 54

<210> 80
<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag2

<400> 80

taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta cagtgttgcg ac

52

<210> 81

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)1LS

<400> 81

gctcctgggr ctyctgc

17

<210> 82

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)2LS

<400> 82

ctyctggggc tgctaag

18

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)3LS

<400> 83
ctctggctcm cagataccac 20

<210> 84
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)4LS

<400> 84
ggatctctgg tgcctacgg 19

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)5LS

<400> 85
ggatctctga taccagggca 20

<210> 86
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)6LS

<400> 86
ctgggttcca gcctccag 18

<210> 87
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)-s 反股引子:

<400> 87
gaagacagat ggtgcagcca cagttcg 27

<210> 88
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)1 正股

<400> 88
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcggacatc crgwtgaccc agtctccwt 59

<210> 89
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)2 正股

<400> 89

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcggatatt gtgatgacyc agwctccac 59

<210> 90
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)3 正股

<400> 90
ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggaaattgt gwtgacrcag tctccagsca 60

<210> 91
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)4/6 正股

<400> 91
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcggacatc gtgmtgacyc agtctccaga 60

<210> 92
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)5 For-NEW

<400> 92
ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggaaacgac actcacgcag tctccagcat 60

<210> 93
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)6 For-NEW

<400> 93
ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggatgtcgt gatgacacag tctccagctt 60

<210> 94
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: Lib-GS-Fwd

<400> 94
gtctggcggc ggaggtagcg 20

<210> 95
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: FLAG-A20.Rev

<400> 95
tttttttttt tttttttttt aaatagcggg tgccttgctg tcgtcgtcct tgtagtc 57

<210> 96

<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL1LS-1

<400> 96
tcactgtgca gggtcctg 18

<210> 97
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL1LS-3

<400> 97
tcactgcaca gggtcctg 18

<210> 98
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL2LS-3

<400> 98
tcaggrcaca gggtcctg 18

<210> 99
<211> 18
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL2LS-4

<400> 99

tcagggcaca ggatcctg

18

<210> 100

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL3LS-2

<400> 100

tgcatagggtt ctgtggtttc ttctg

25

<210> 101

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL3LS-3

<400> 101

acagghtctg wggcctccta tg

22

<210> 102

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL3LS-4

<400> 102
tgcacaggct ctgtgacctc ctatg 25

<210> 103
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL3LS-5

<400> 103
tacacaggct ctattgcctc ctatg 25

<210> 104
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL4ClS-2

<400> 104
cttcattttc tccacaggtc tctgtg 26

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL4abLS-2

<400> 105
tccactgsac agggctctctc t 21

<210> 106
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL5LS

<400> 106
cactgcacag gttccctc 18

<210> 107
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL6LS

<400> 107
ctgcacaggt tcttgggc 18

<210> 108
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL7LS

<400> 108

ctcacttgct gccaggg	18
<210> 109	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: VL8LS	
<400> 109	
gcttatggat caggagtgga ttc	23
<210> 110	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: VL9LS	
<400> 110	
caccctctc agtctctc	19
<210> 111	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: VL10LS	
<400> 111	
ctctgcagtg tcagtggtc	19

<210> 112
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: CJL-s 反股

<400> 112

gccttgggct gacckaggac ggt

23

<210> 113
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL1/10 ForRedo

<400> 113

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcga tcgcagtctg kgctgackca gccrc

55

<210> 114
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL2 正股

<400> 114

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgcagtct gccctgactc agcct

55

<210> 115

<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL3 Forward-New

<400> 115
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgtcctat gagctgacdc ag 52

<210> 116
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL4ab 正股

<400> 116
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgcagcyt gtgctgactc aatc 54

<210> 117
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL4c 正股

<400> 117
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgtgcct gtgctgactc agcccccg 58

<210> 118
<211> 58
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL5/9 正股

<400> 118

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgagcct gtgctgactc agccrbct 58

<210> 119

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL6 正股

<400> 119

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgaatttt atgctgactc agccc 55

<210> 120

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL7/8 正股

<400> 120

gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgagcct gtggtgacgc aggag 55

<210> 121

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH1 正股

<400> 121

tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct 53

<210> 122

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH2 正股

<400> 122

tttacaatta cagcttcttc accatggagr tcaccttgar ggagtctggt 50

<210> 123

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH3 正股

<400> 123

ttacaattac agcttcttca ccatggaggt gcagctgktg gagtctsgrg ga 52

<210> 124

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH4 正股

<400> 124
tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50

<210> 125
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH5 正股

<400> 125
tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210> 126
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH6 正股

<400> 126
tttacaatta cagcttcttc accatggagg tacagctgca gcagtcag 48

<210> 127
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH7 正股

<400> 127

tttacaatta cagcttcttc accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51

<210> 128
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JHReverse1/2

<400> 128
cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac rgtgaccagg gtgc 54

<210> 129
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JHReverse3

<400> 129
cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaagagac ggtgaccatt gtcc 54

<210> 130
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JHReverse4/5

<400> 130
cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccagg gtgc 54

<210>	131	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: JHReverse6	
<400>	131	
	cgctacctcc gccgccagac ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc	54
<210>	132	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: T7TMVTag4s	
<400>	132	
	taatacgact cactataggg acaattacta ttitacaatta cagctttcttc	50
<210>	133	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: Lib-GSv2-Rev	
<400>	133	
	cagaccctcc accgccgctg	20
<210>	134	

<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)1FwdV2

<400> 134
cagcggcggt ggaggggtctg gcggtggcgg aagtgcacatc crgwtgaccc agtctccwt 59

<210> 135
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)2FwdV2

<400> 135
cagcggcggt ggaggggtctg gcggtggcgg aagtgatatt gtgatgacyc agwctccac 59

<210> 136
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)3FwdV2

<400> 136
cagcggcggt ggaggggtctg gcggtggcgg aagtgaaatt gtgwtgacrc agtctccags 60

ca 62

<210> 137

<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)4/6FwdV2

<400> 137

cagcggcggt ggaggggtctg gcggtggcgg aagtgcacatc gtgmtgacyc agtctccaga 60

<210> 138

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)5FwdV2

<400> 138

cagcggcggt ggaggggtctg gcggtggcgg aagtgaaacg acactcacgc agtctccagc 60

at 62

<210> 139

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: V(kappa)6FwdV2

<400> 139

cagcggcggt ggaggggtctg gcggtggcgg aagtgatgtc gtgatgacac agtctccagc 60

tt 62

<210> 140
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: Lib-GSv2-Fwd

<400> 140
cagcggcggg ggagggtctg 20

<210> 141
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH1/2RevV2

<400> 141
cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaggagac rgtgaccagg gtgc 54

<210> 142
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH3RevV2

<400> 142
cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaagagac ggtgaccatt gtcc 54

<210> 143

<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH4/5RevV2

<400> 143
cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccagg gttc 54

<210> 144
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH6RevV2

<400> 144
cagaccctcc accgccgctg ccgcctccac ctgaggagac ggtgaccgtg gtcc 54

<210> 145
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 145
cagcggcggt ggagggtctg 20

<210> 146
<211> 51
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 146

tcctcaggtg gaggcggcag cggcgggtgga gggctctggcg gtggcggaag t 51

<210> 147

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 147

acttccgcca cgcagacc ctccaccgcc gctgccgcct ccacctgagg a 51

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: T7-TMV-Seq

<400> 148

ctcactatag ggacaattac 20

<210> 149

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>	
<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag3	
<400> 149	
taatacgact cactataggg acaattacta ttitacaatta caggctttgg ac	52
<210> 150	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag4	
<400> 150	
taatacgact cactataggg acaattacta ttitacaatta cagctttcttc ac	52
<210> 151	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag2s	
<400> 151	
taatacgact cactataggg acaattacta ttitacaatta cagtgttgcg	50
<210> 152	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag3s	

<400> 152
taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta caggctttgg 50

<210> 153
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag4L

<400> 153
taatacgact cactataggg acaattacta tttaacaatta cagctttcttc accatgg 57

<210> 154
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: TMVTag4L

<400> 154
acaattacta tttaacaatta cagctttcttc accatgg 37

<210> 155
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: TMVTag4

<400> 155

acaattacta tttacaatta cagcttcttc ac 32

<210> 156
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: TMVTag4s

<400> 156
acaattacta tttacaatta cagcttcttc 30

<210> 157
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: phylflag3's

<400> 157
ccttgtcgtc gtcgtccttg tagtc 25

<210> 158
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH-FLAGA20-Rev

<400> 158
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgctttgtca tcatcatctt tataatc 57

<210> 159
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH1/2Cm-Rev

<400> 159
ggttggggcg gatgcactcc cctgaggaga crgtgaccag ggtgc 45

<210> 160
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH4/5Cm-Rev

<400> 160
ggttggggcg gatgcactcc cctgaggaga cggtgaccag ggttc 45

<210> 161
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH6Cm-Rev

<400> 161
ggttggggcg gatgcactcc cctgaggaga cggtgaccgt ggtcc 45

<210> 162

<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: JH3Cm-Rev

<400> 162
ggttggggcg gatgcactcc cctgaagaga cggtgaccat tgtcc 45

<210> 163
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 163
cagaccctcc accgccgctg 20

<210> 164
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸

<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> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 165 cagctggtgg agtctggggg aggcttggtc cagcctgggg ggttc	45
<210> 166 <211> 37 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 166 tcctcaggtg gaggcggcag cggcggtgga gggctctg	37
<210> 167 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸 <400> 167 acttccgcca ccgccagacc ctccaccgcc gctg	34

<210>	168	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: V(kappa)5 正股	
<400>	168	
	gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcggaaacg acactcacgc agtctc	56
<210>	169	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: V(kappa)6 正股	
<400>	169	
	ctggcggcgg aggtagcggc ggtggcggat cggatgtcgt gatgacacag tctccagct	59
<210>	170	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: C(kappa)-Long-反股引子	
<400>	170	
	gtcgtcgtcg tcctttagt cctcatcaga tggcgggaag atgaagacag atggtgcagc	60
	cacagttcg	69

<210> 171
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)L4-FlagA20-Rev

<400> 171
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcctc 60
atcagatggc gggaagat 78

<210> 172
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)L3-FlagA20-Rev

<400> 172
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcctc 60
atcagatggc gggaa 75

<210> 173
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)L2-FlagA20-Rev

<400> 173

tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcctc 60

atcagatggc gg 72

<210> 174
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: C(kappa)L1-FlagA20-Rev

<400> 174
tttttttttt tttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgtagtcctc 60
atcagatgg 69

<210> 175
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VL1/10 Forward

<400> 175
gtctggcggc ggaggtagcg gcggtggcgg atcgcagtct gkgctgackc agccrc 56

<210> 176
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH1FwdTag3

<400> 176

tttacaatta caggcttttg accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct 53

<210> 177

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH2FwdTag3

<400> 177

tttacaatta caggcttttg accatggagr tcaccttgar ggagtctggt 50

<210> 178

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH3FwdTag3

<400> 178

tttacaatta caggcttttg accatggagg tgcagctgkt ggagtctsgg gga 53

<210> 179

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH4FwdTag3

<400> 179

tttacaatta caggcttttg accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50

<210> 180
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH5FwdTag3

<400> 180
tttacaatta caggctttgg accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210> 181
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH6FwdTag3

<400> 181
tttacaatta caggctttgg accatggagg tacagctgca gcagtcag 48

<210> 182
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH7FwdTag3

<400> 182
tttacaatta caggctttgg accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51

	<210> 183 <211> 56 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸: VL1/10FwdV2 . <400> 183 cagcggcggg ggaggggtctg gcggtggcgg aagtcagtct gkgctgackc agccrc 56
	<210> 184 <211> 55 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸: VL2FwdV2 <400> 184 cagcggcggg ggaggggtctg gcggtggcgg aagtcagtct gccctgactc agcct 55
	<210> 185 <211> 52 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成寡核苷酸: VL3FwdV2 . <400> 185 cagcggcggg ggaggggtctg gcggtggcgg aagttcctat gagctgacdc ag 52
	<210> 186 <211> 54 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL4abFwdV2

<400> 186

cagcggcggg ggaggggtctg gcgggtggcgg aagtcagcyt gtgctgactc aatc 54

<210> 187

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL4cFwdV2

<400> 187

cagcggcggg ggaggggtctg gcgggtggcgg aagtctgcct gtgctgactc agcccccg 58

<210> 188

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VL5/9FwdV2

<400> 188

cagcggcggg ggaggggtctg gcgggtggcgg aagtcagcct gtgctgactc agccrbct 58

<210> 189

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VL6FwdV2	
<400>	189	
cagcggcggt	ggagggtctg gcggtggcgg aagtaatttt atgctgactc agccc	55
<210>	190	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VL7/8FwdV2	
<400>	190	
cagcggcggt	ggagggtctg gcggtggcgg aagtcagrct gtggtgacyc aggag	55
<210>	191	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VH1FwdTag5	
<400>	191	
tttacaatta	cagtgtctgt accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct	53
<210>	192	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸: VH2FwdTag5	

<400> 192
tttacaatta cagtgtctgt accatggagr tcaccttgar ggagtctggt 50

<210> 193
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH3FwdTag5

<400> 193
tttacaatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctgkt ggagtctsgt gga 53

<210> 194
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH4FwdTag5

<400> 194
tttacaatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctgca gsagtssggc 50

<210> 195
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH5FwdTag5

<400> 195

tttacaatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210> 196
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH6FwdTag5

<400> 196
tttacaatta cagtgtctgt accatggagg tacagctgca gcagtcag 48

<210> 197
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH7FwdTag5

<400> 197
tttacaatta cagtgtctgt accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51

<210> 198
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸: VH1FwdTag6

<400> 198
tttacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctggt gcagtctggr sct 53

<210> 199
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH2FwdTag6

<400> 199

tttacaatta cagtttggct accatggagr tcaccttgar ggagtctggt

50

<210> 200
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH3FwdTag6

<400> 200

tttacaatta cagtttggct caccatggag gtgcagctgk tggagtctsg rgga

54

<210> 201
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH4FwdTag6

<400> 201

tttacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctgca gsagtssggc

50

<210> 202
<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH5FwdTag6

<400> 202

tttacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctggt gcagtctgga gca 53

<210> 203

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH6FwdTag6

<400> 203

tttacaatta cagtttggct accatggagg tacagctgca gcagtcag 48

<210> 204

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: VH7FwdTag6

<400> 204

tttacaatta cagtttggct accatggagg tgcagctggt gcaatctggg t 51

<210> 205

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: TMVTag5s

<400> 205

acaattacta tttacaatta cagtgtctgt

30

<210> 206

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: TMVTag6s

<400> 206

acaattacta tttacaatta cagtttggct

30

<210> 207

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸: TMVTag5

<400> 207

acaattacta tttacaatta cagtgtctgt acc

33

<210> 208

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

	<223> 合成寡核苷酸: TMVTag6	
	<400> 208	
	acaattacta tttacaatta cagtttggct acc	33
	<210> 209	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
●	<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag5s	
	<400> 209	
	taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta cagtgtctgt	50
	<210> 210	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
●	<223> 合成寡核苷酸: T7TMVTag6s	
	<400> 210	
	taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta cagtttggct	50
	<210> 211	
	<211> 10	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸: 連接序列	

<400> 211

uagcggaugc

10

<210> 212

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 212

acttccgcca ccgccagacc ctccaccgcc gc

32

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98133249

※申請日：98.9.30

※IPC 分類：~~C07H~~

C07K 16/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C40B 40/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

改良之抗體庫

IMPROVED ANTIBODY LIBRARIES

二、中文發明摘要：

本發明係關於允許自表現庫可靠地表現及選擇 scFv 抗體分子之改良之活體外 RNA 呈現庫。本發明之 scFv 抗體庫含有改良 scFv 抗體表現之經優化且縮短之域間連接子。該等 scFv 抗體庫亦包括允許鑑別個別庫純系、其庫或亞群的短核酸條碼。亦提供用於產生、擴增及譜型定型本發明之 scFv 抗體庫的引子。

三、英文發明摘要：

The present invention features improved *in vitro* RNA display libraries to allow reliable expression and selection of scFv antibody molecules from expression libraries. The scFv antibody libraries of the invention contain an optimized, shortened inter-domain linker that improves expression scFv antibody expression. The scFv antibody libraries also include short nucleic acid barcodes that allow for identification of individual library clones, libraries or subsets thereof. Primers for generating, amplifying and spectratyping the scFv antibody libraries of the invention are also provided.

七、申請專利範圍：

1. 一種寡核苷酸，其由如 SEQ ID NO: 1-14、19-42 及 58-210 中任一者所示之核酸序列組成。
2. 一種寡核苷酸，其由如 SEQ ID NO: 14-16 及 43-57 中任一者所示之核酸序列組成。
3. 一種寡核苷酸，其由如 SEQ ID NO: 17 或 18 所示之核酸序列組成。
4. 一種如請求項 1 至 3 中任一項之任一序列用於庫擴增、庫反轉錄及/或庫譜型定型的用途。
5. 一種用於表現單鏈抗體(scFv)之核酸庫，該庫包含編碼重鏈可變域及輕鏈可變域之序列譜系，其中該庫之各成員含有包含重鏈可變域、輕鏈可變域及連接區之開放閱讀框架，且其中該庫係使用一或多種如請求項 1 之寡核苷酸產生。
6. 如請求項 5 之庫，其中該連接區編碼少於 20 個胺基酸。
7. 如請求項 5 之庫，其中該連接區編碼 15 個胺基酸。
8. 如請求項 5 之庫，其中該庫之各成員進一步包含可操作性連接於該開放閱讀框架之啟動子。
9. 如請求項 8 之庫，其中該啟動子為選自由 T7、SP6 及 T3 組成之群的啟動子。
10. 如請求項 9 之庫，其中該啟動子為 T7 啟動子。
11. 如請求項 5 之庫，其中該庫之各成員進一步包含 5' 未轉譯區(5'UTR)，該 5' 未轉譯區(5'UTR)能夠增強與其可操作性連接之基因之轉錄。

12. 如請求項11之庫，其中該5'UTR為菸草花葉病毒(Tobacco Mosaic Virus)5'UTR或其活性片段。
13. 如請求項5之庫，其中該庫之各成員進一步包含聚腺嘌呤序列。
14. 如請求項5之庫，其中該庫之各成員進一步包含核酸條碼。
15. 如請求項14之庫，其中該核酸條碼包含8個核苷酸。
16. 如請求項5之庫，其中該庫之各成員進一步包含編碼抗原決定基標籤之核酸序列。
17. 如請求項16之庫，其中該抗原決定基標籤為FLAG標籤。
18. 如請求項16之庫，其中該核酸序列為scFv之連接區之一部分。
19. 如請求項5之庫，其中該庫之各成員進一步包含編碼抗體恆定區或其片段之核酸序列。
20. 如請求項5之庫，其中該庫之各成員進一步包含核糖體中止序列。
21. 如請求項5之庫，其中該庫之各成員進一步包含肽受體。
22. 如請求項21之庫，其中該肽受體經由包含補骨脂素C6(Psoralen C6)分子之連接子共價連接。
23. 如請求項22之庫，其中該連接子為5'(補骨脂素C6)2'Ome (U AGC GGA UGC(SEQ ID NO:211)) XXX XXX CC(嘌呤黴素(Puromycin))，其中X為三乙二醇連接子或

PEG-150且CC為DNA主鏈。

24. 一種製造用於表現單鏈抗體(scFv)之核酸庫的方法，該方法包含：

提供核酸組合物，其中該組合物中之核酸的至少一部分包含至少一個編碼抗體可變域之開放閱讀框架；及

使用一或多種如請求項1之寡核苷酸擴增複數個抗體可變域。

25. 一種對包含至少一個編碼抗體可變域之開放閱讀框架之核酸進行譜型定型的方法，該方法包含：

提供核酸組合物，其中該組合物中之核酸的至少一部分包含至少一個編碼抗體可變域之開放閱讀框架；及

使用一或多種如請求項2之寡核苷酸擴增該等可變域之CDR3區。

八、圖式：

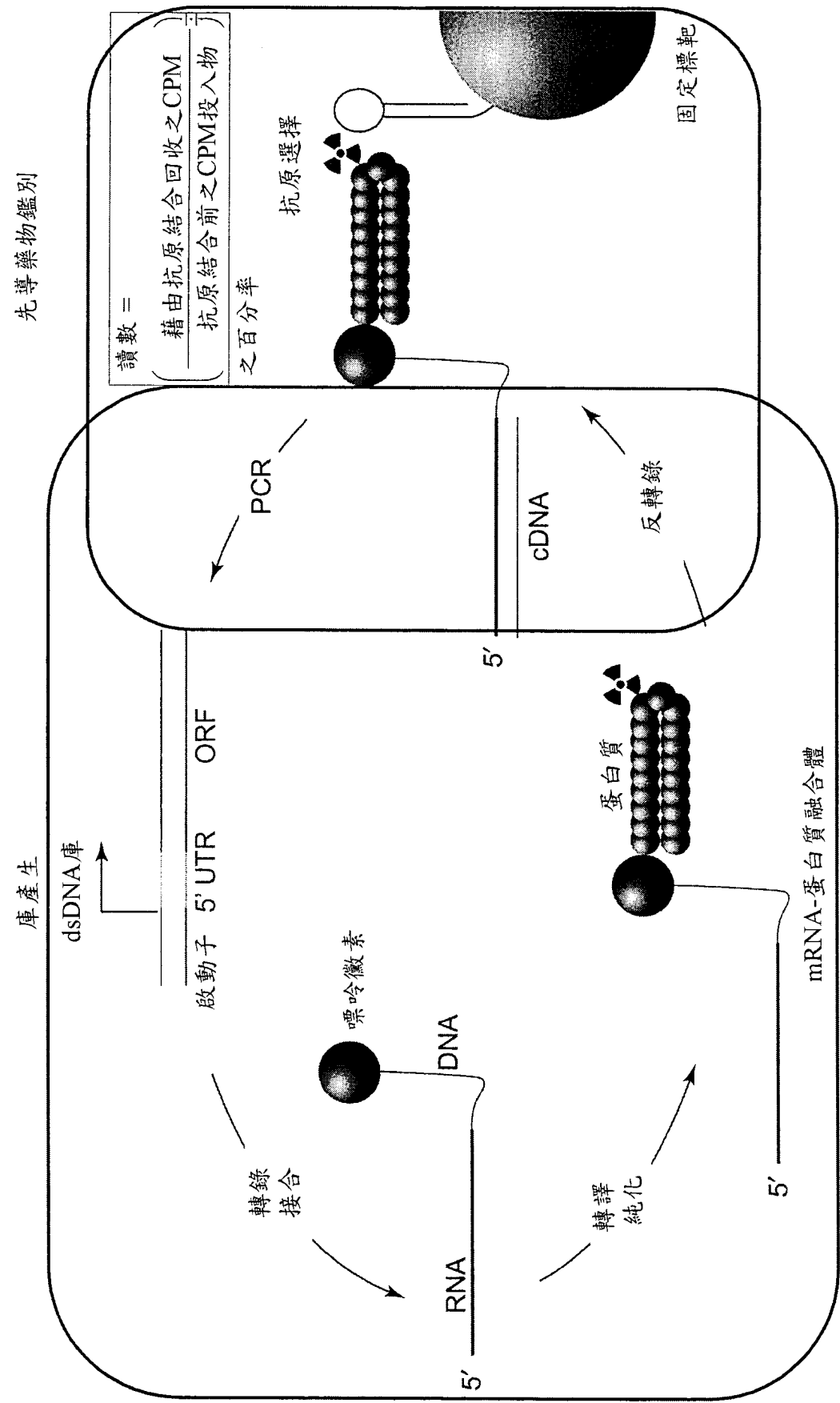


圖1



藉由閃爍計數及譜型定型來評估



圖 3

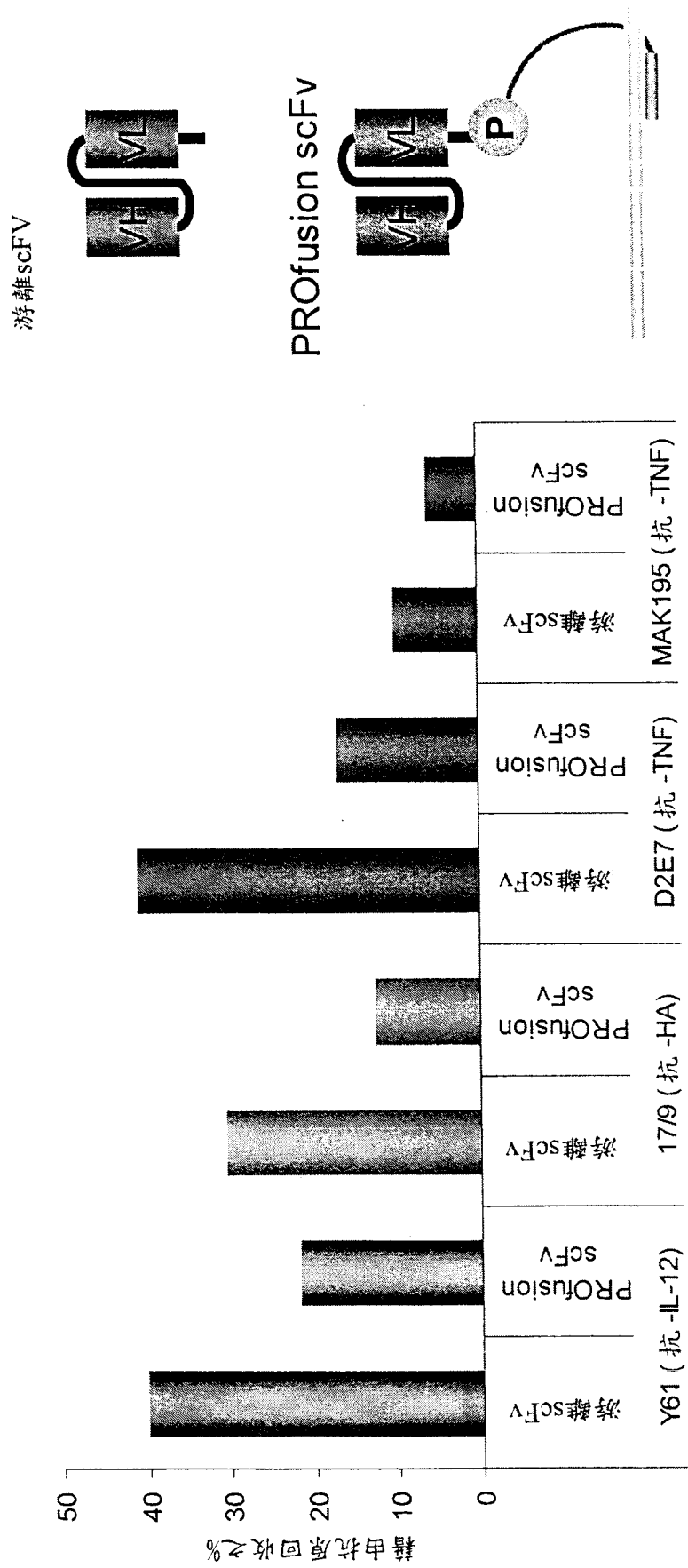


圖4

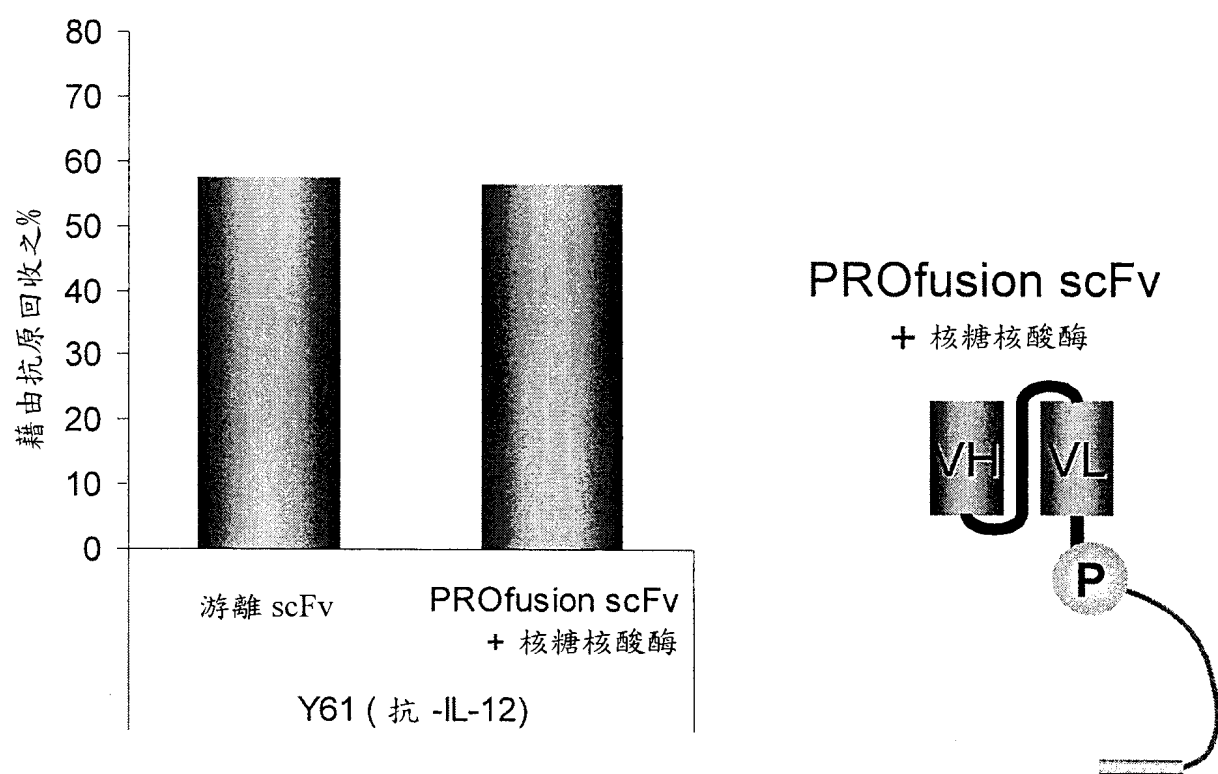


圖5

1

60

17_9-標籤1TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCGTGGGTACCATGGAAG

17_9-標籤2TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTGTTCGGACCATGGAAG

17_9-標籤3TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACCATGGAAG

17_9-標籤4TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAAG

T7 啟動子TMV-UTR標籤Kozak 17/9

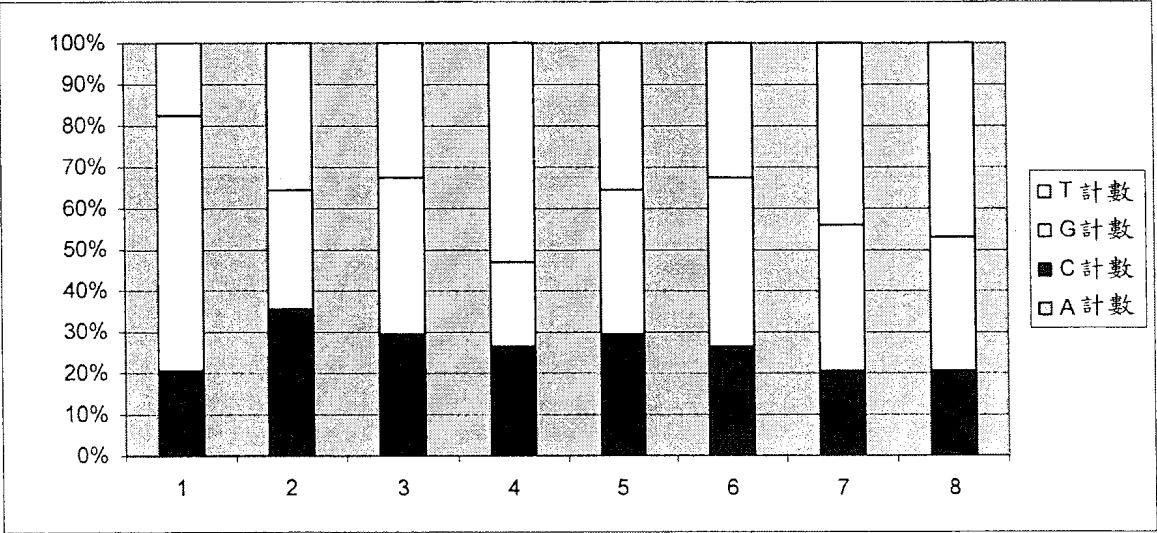


圖6



圖 7

R1 產物標籤	R2 產物標籤	R3 產物標籤
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
GTGTTCTC	GCTTCTCG	GCTTCTTC
GTTTGCGC	GGCCTTTG	GCTTTCTT
TCGCGTCC	GGCTGTCC	GGCCGCGG
TCGTGCGT	GGCTT ATG	GGCGCGCG
TGCCCCGG	GGCTT ATG	GGCGGGTG
TGCCGGTG	GGGCGGCT	GGCTTTGG
TGGTCGCT	GGGTGTGT	GGGCCTTG
TGGTCTTG	GGTTGTGC	GGGGGCGT
TTTGCTGC	GTCGGGCG	GGTCCTTC
	GTCGGGTT	GTGCGTCG
	GTGTGCTC	GTGTCTGT
	GTGTTTTT	GTGTTGCG
	TGCTTTGT	GTTCGTCG
	TGCTTTGT	GTTCTTGC
	TGCTTTTG	GTTTGGCT
	TGTTTTTCG	TCGTGCGT
	TTCGGCTT	TGTCTGTG
	TTGGGCTT	TTCTCCTT
	TTGTGTTT	TTGGCCTG
	TTTGCTC	TTGTTGGC
	TTTGCTC	TTTTGCTC
	TTTTGTTG	

圖 8

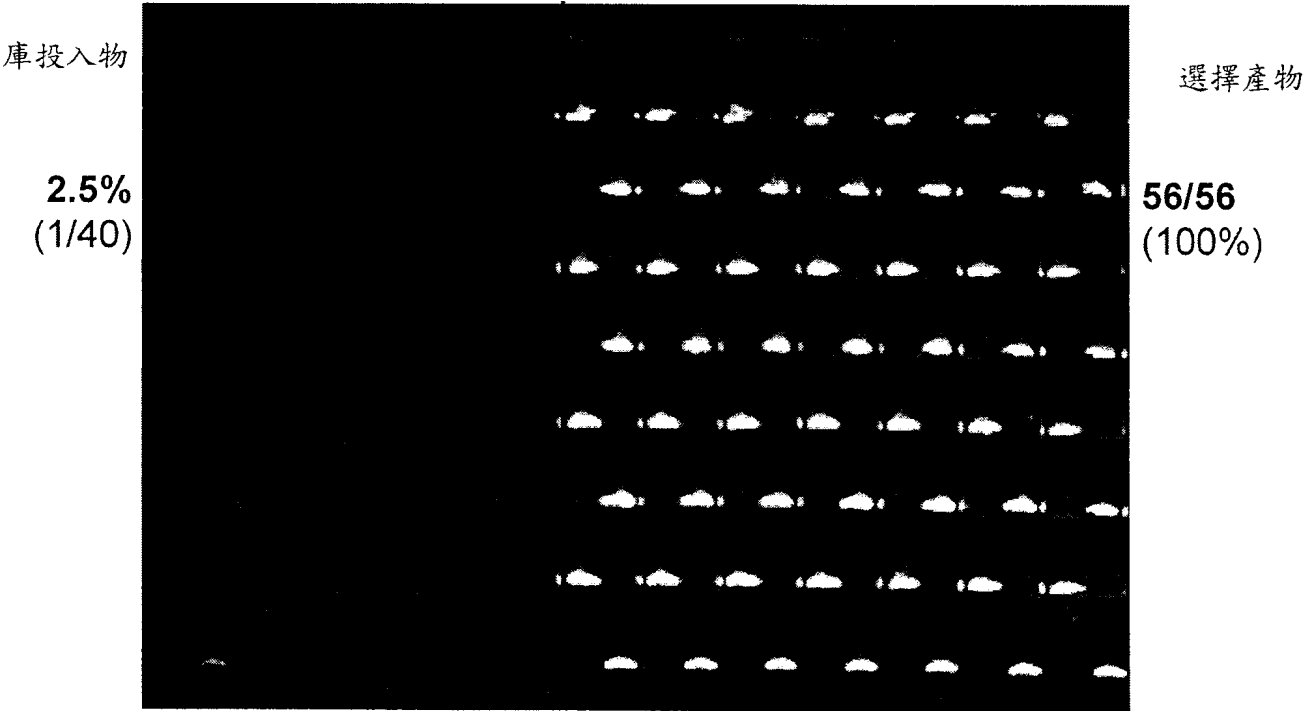
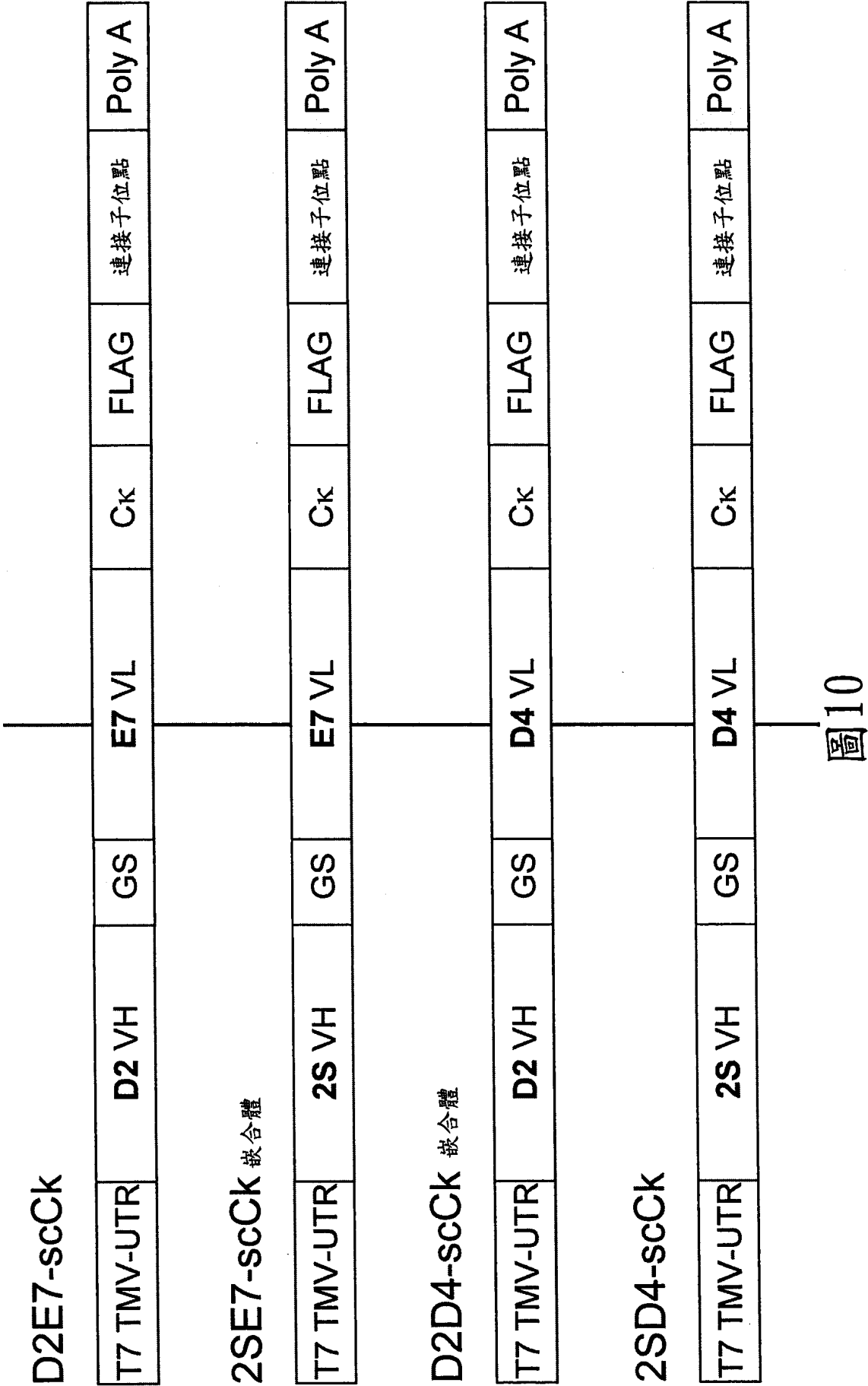
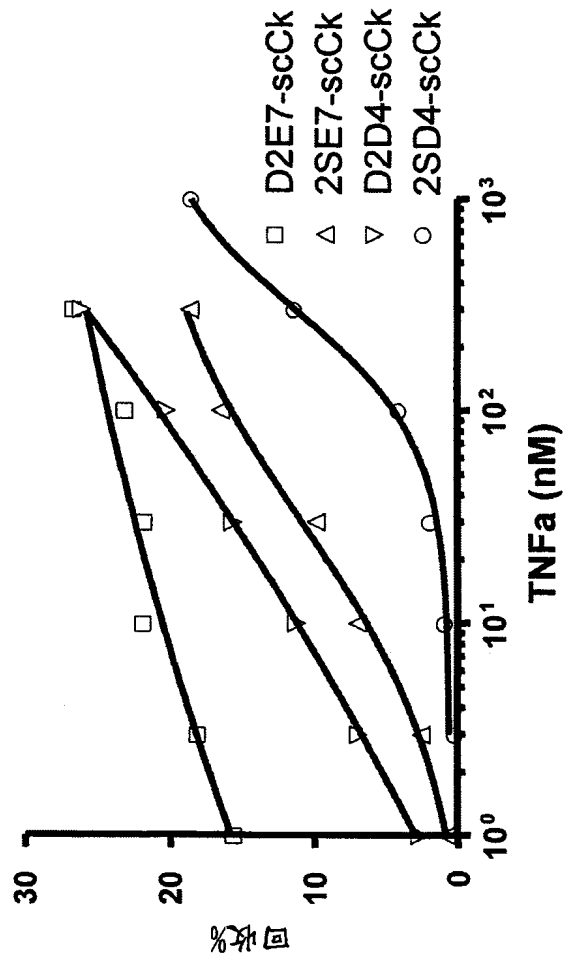


圖9

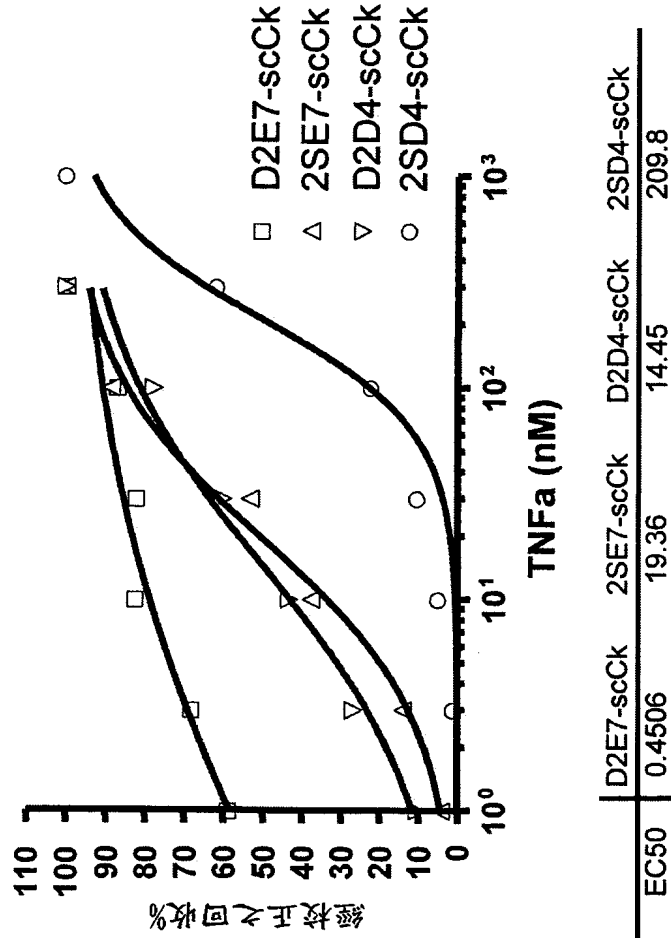


對游離蛋白質進行滴定

抗原結合後之回收%

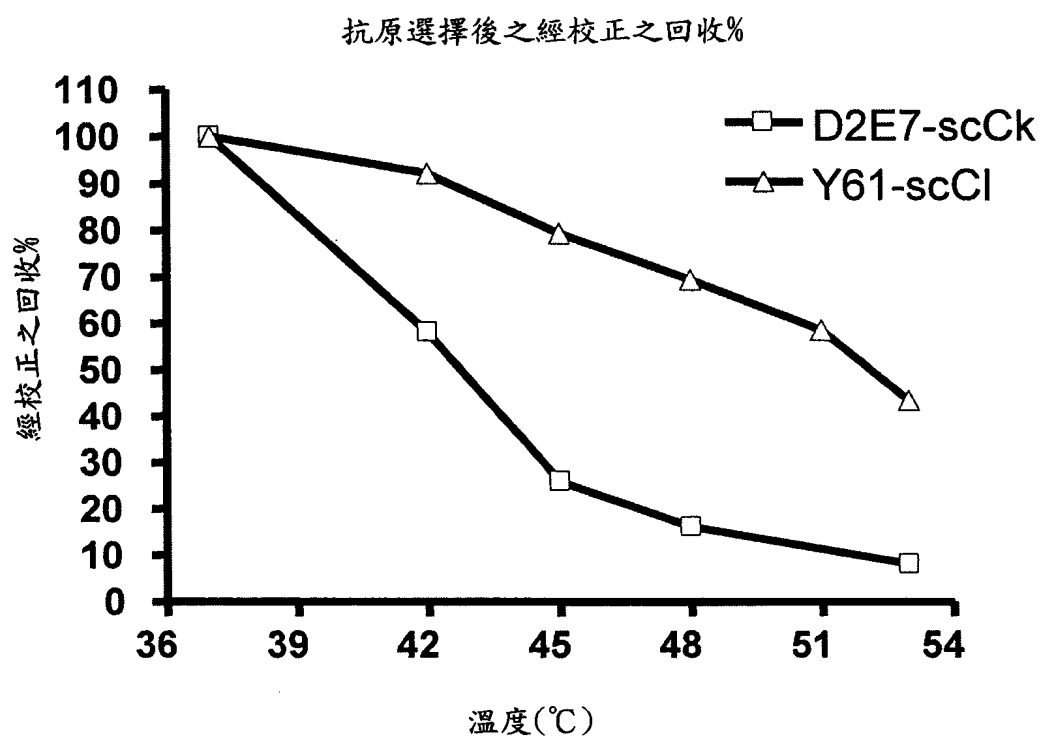


抗原選擇後之經校正之回收%



結論：PROfusion技術可用於辨別具有不同親和力之結合物

圖11



筆記型 84093-165

圖12

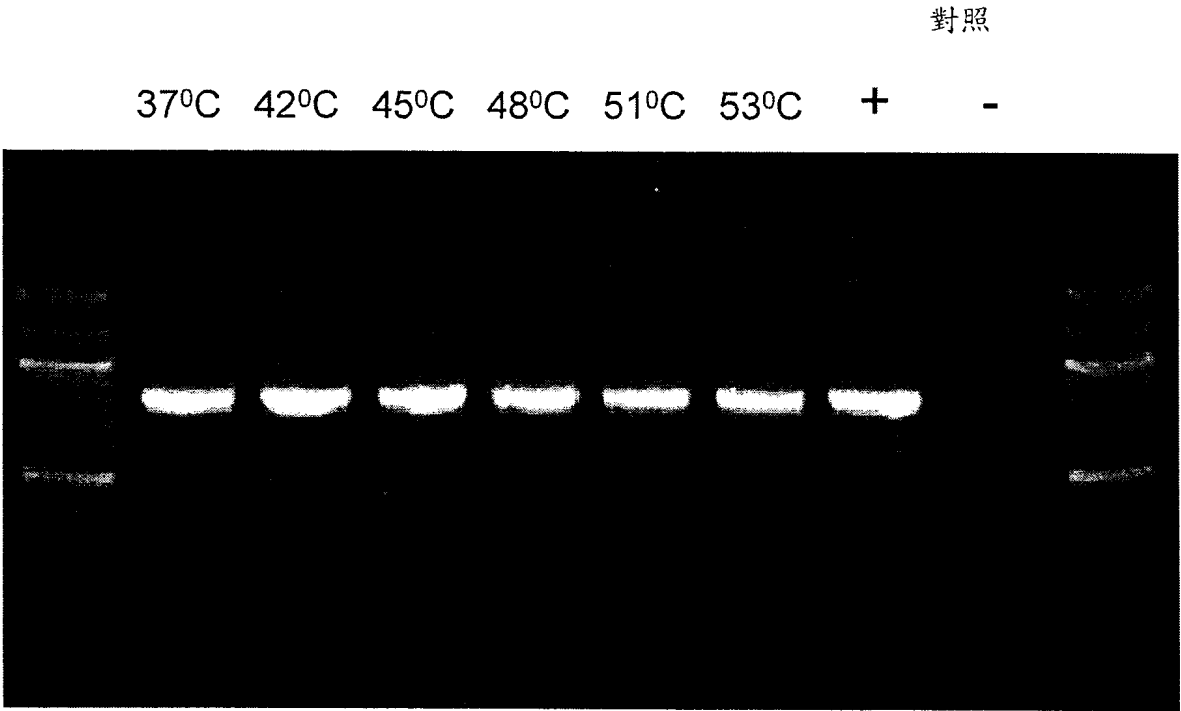


圖13

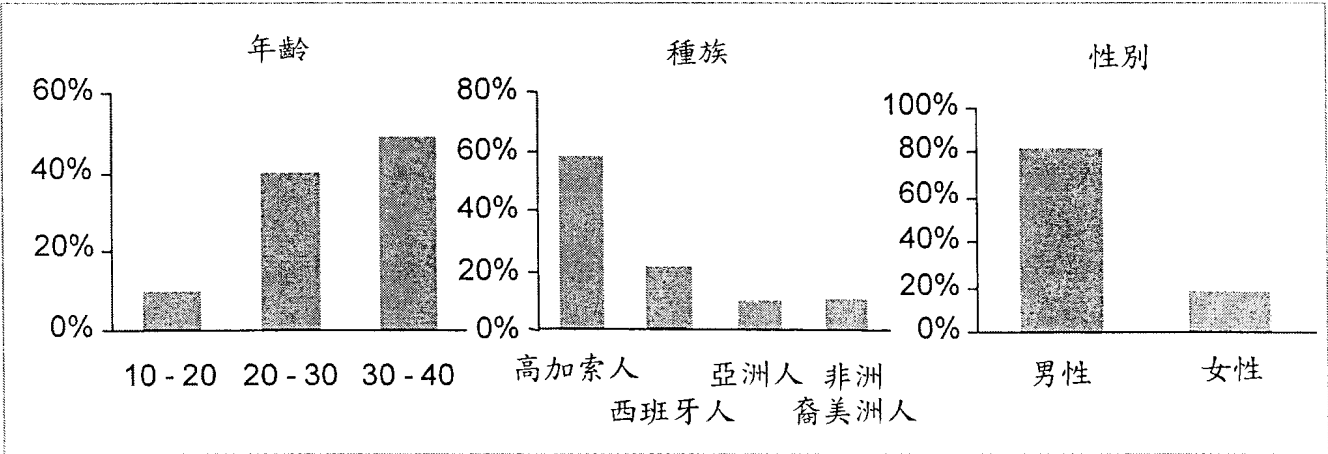


圖14

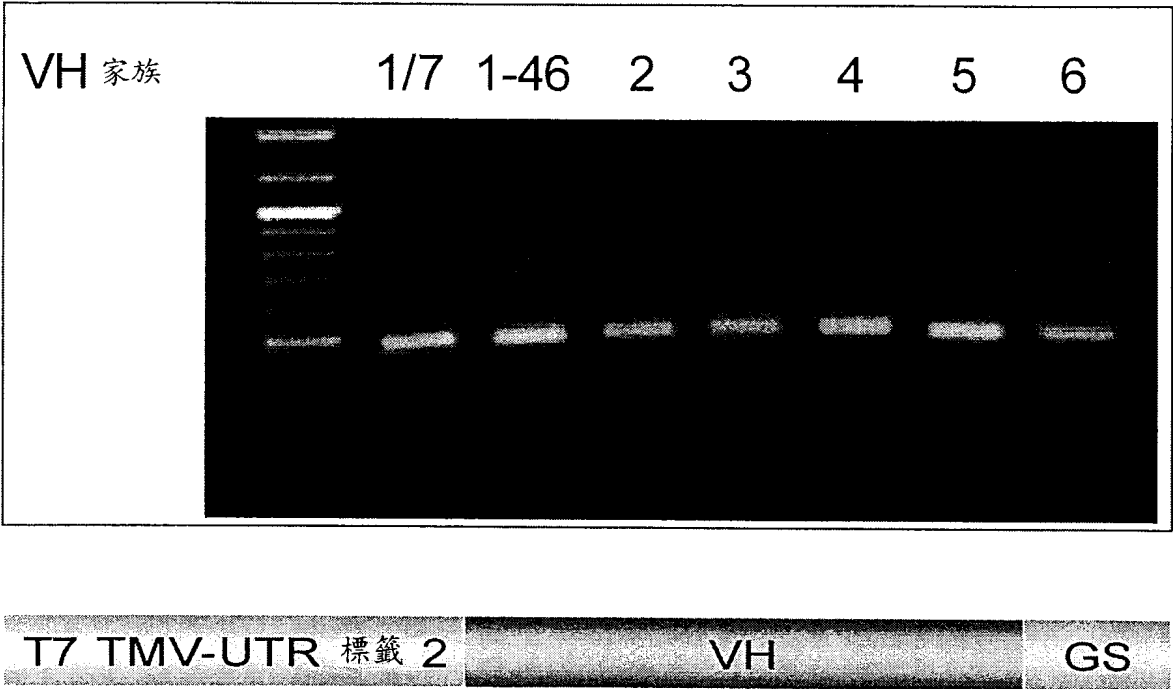


圖15

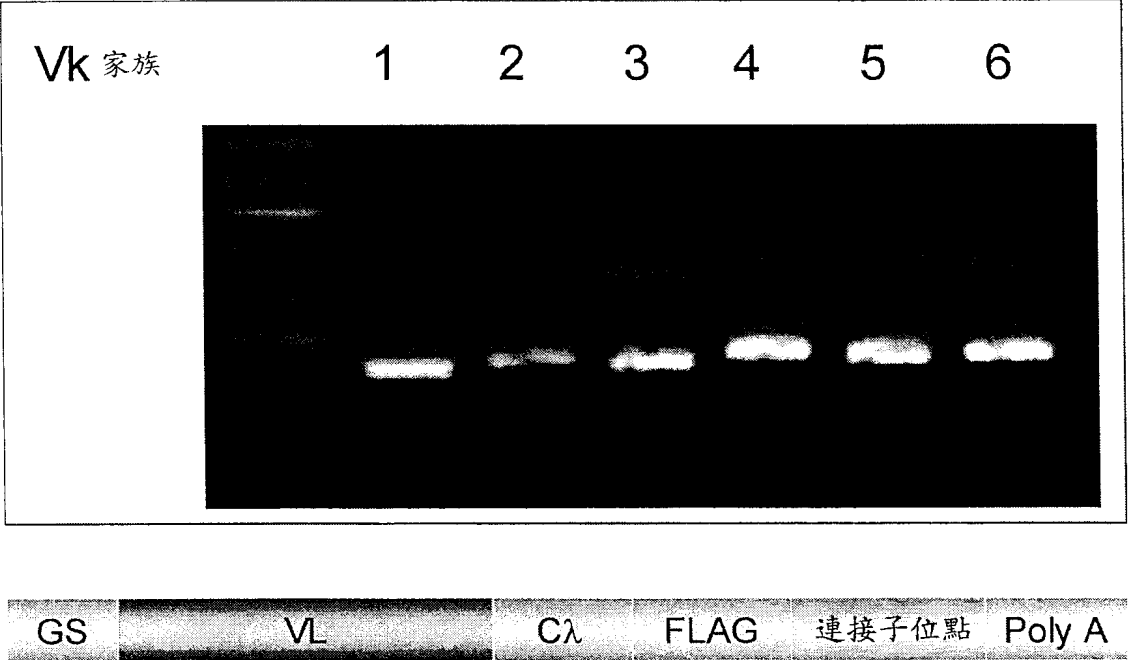


圖16

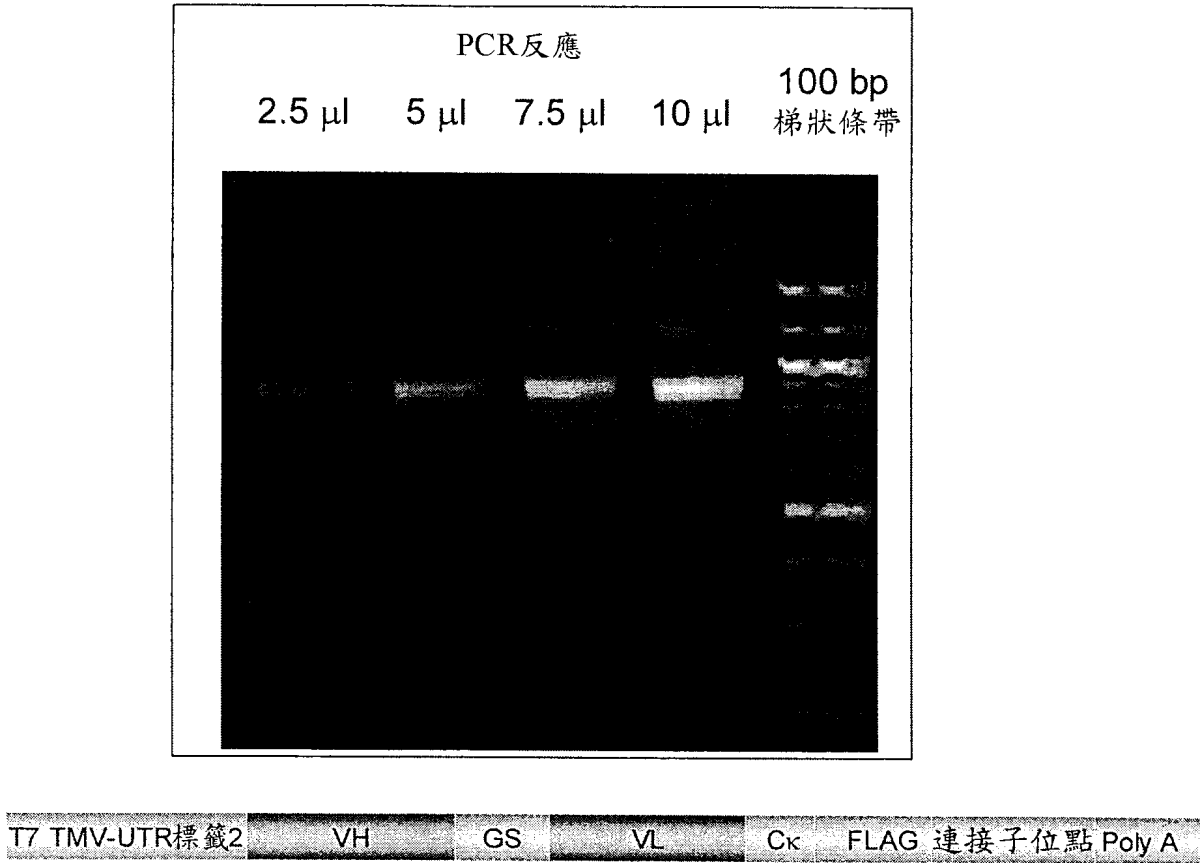


圖17

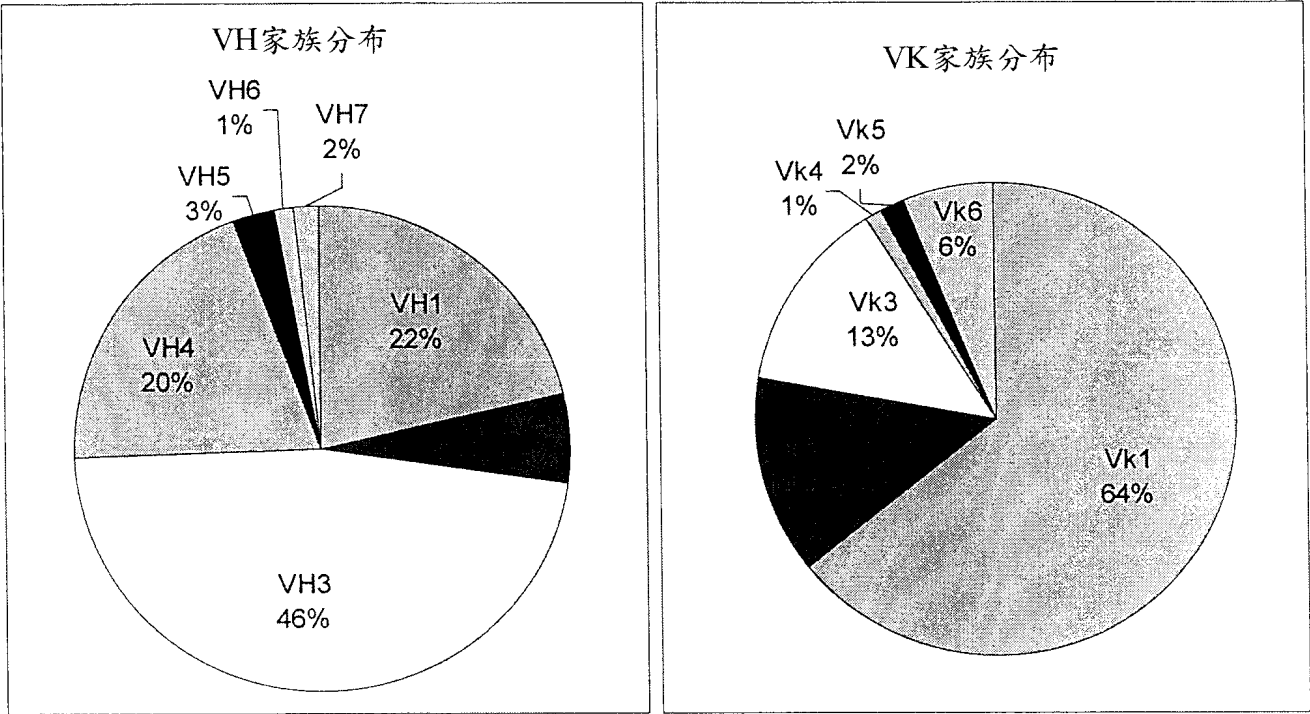


圖18

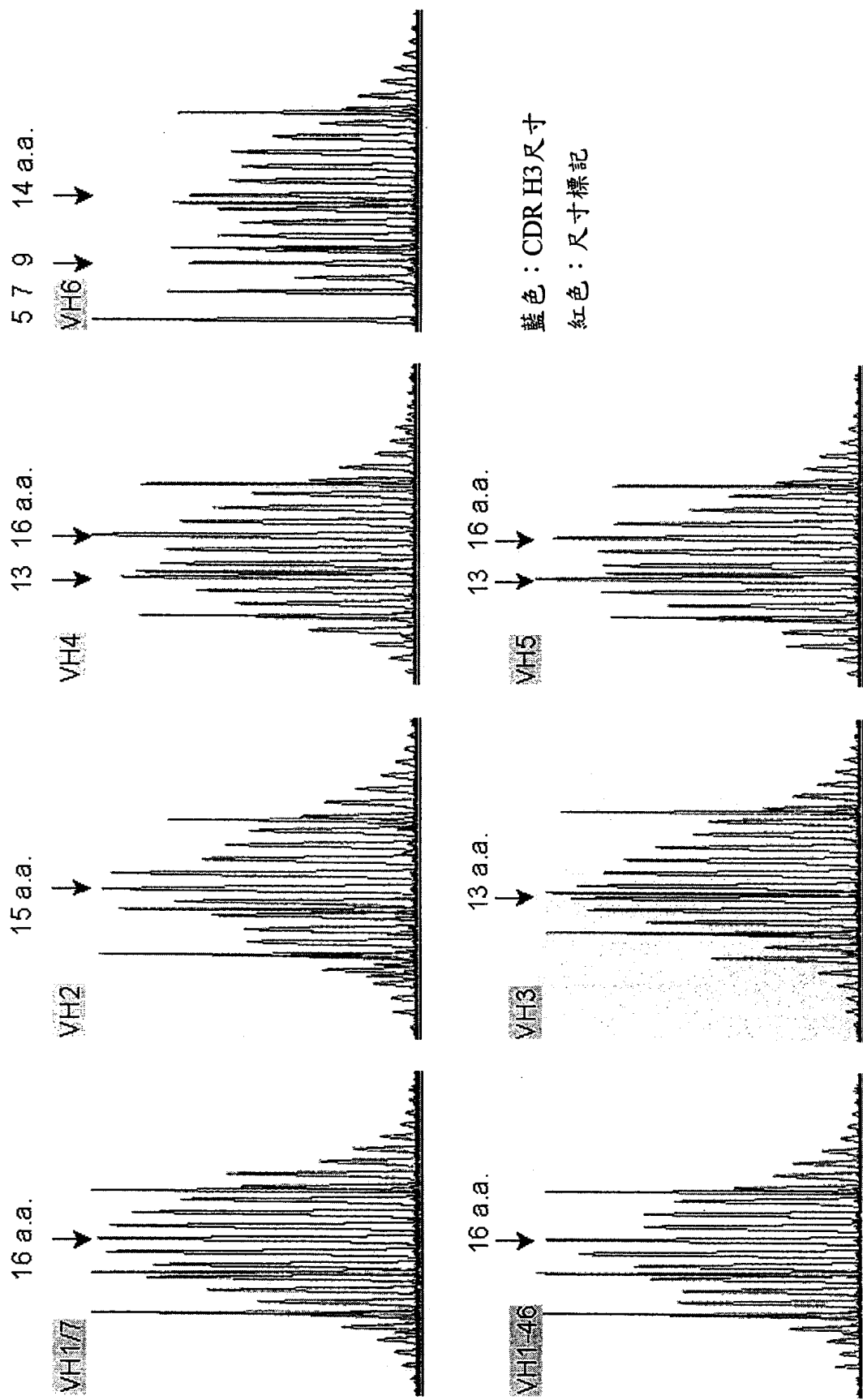


圖19

8 個隨機 PROfusion VH-Vκ scFv 庫 DNA 等分試樣

藍色：CDR H3 尺寸分布

紅色：尺寸標記

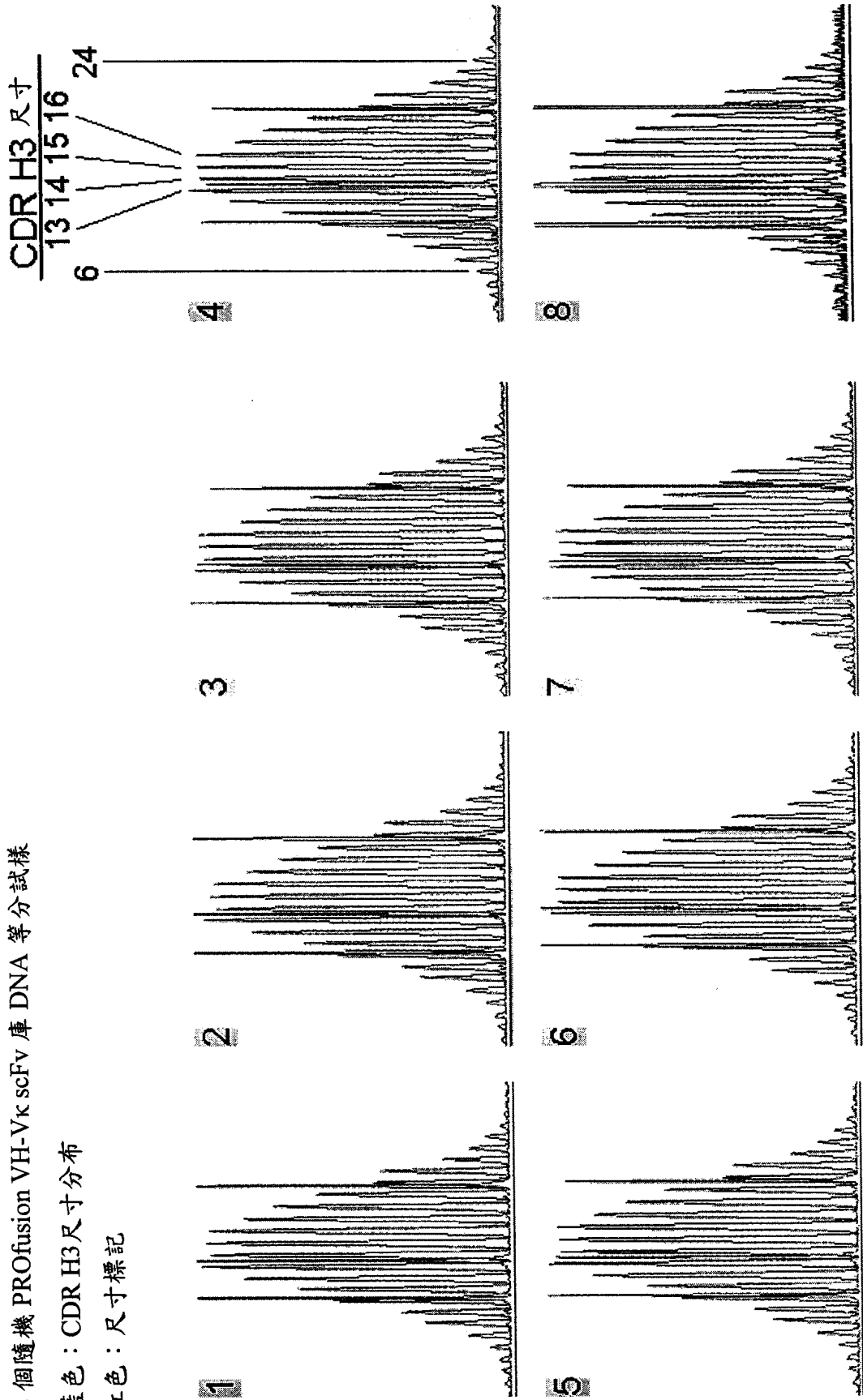


圖20

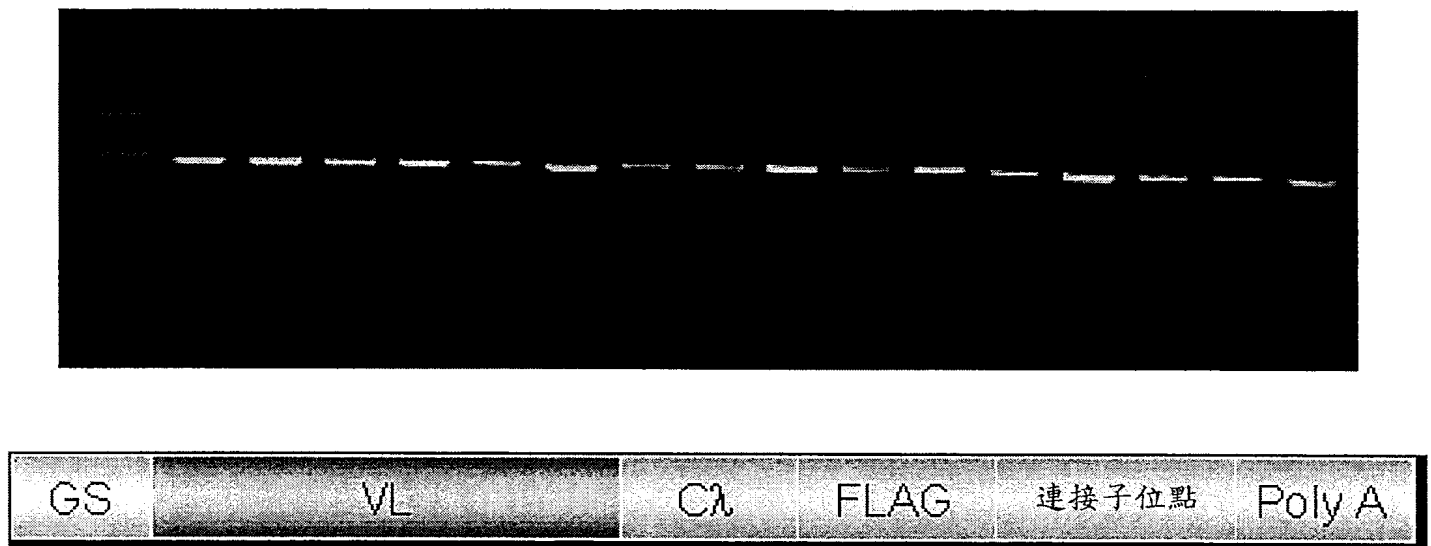


圖21

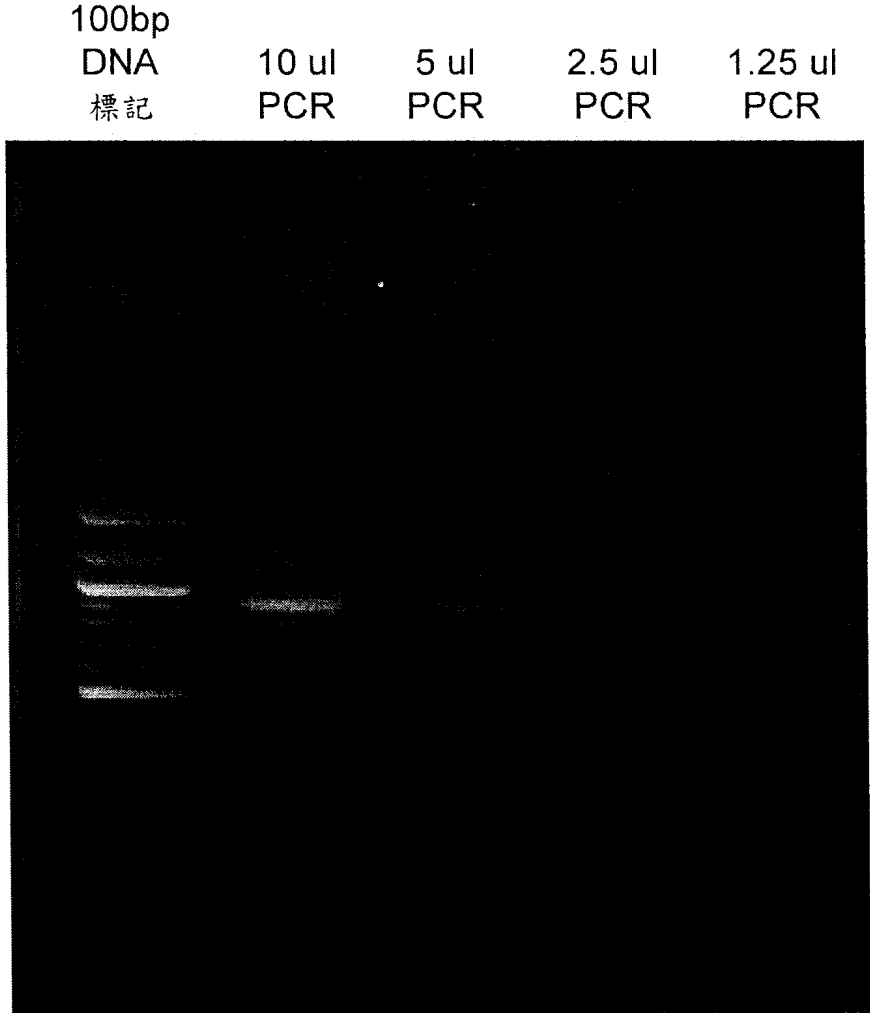


圖 22

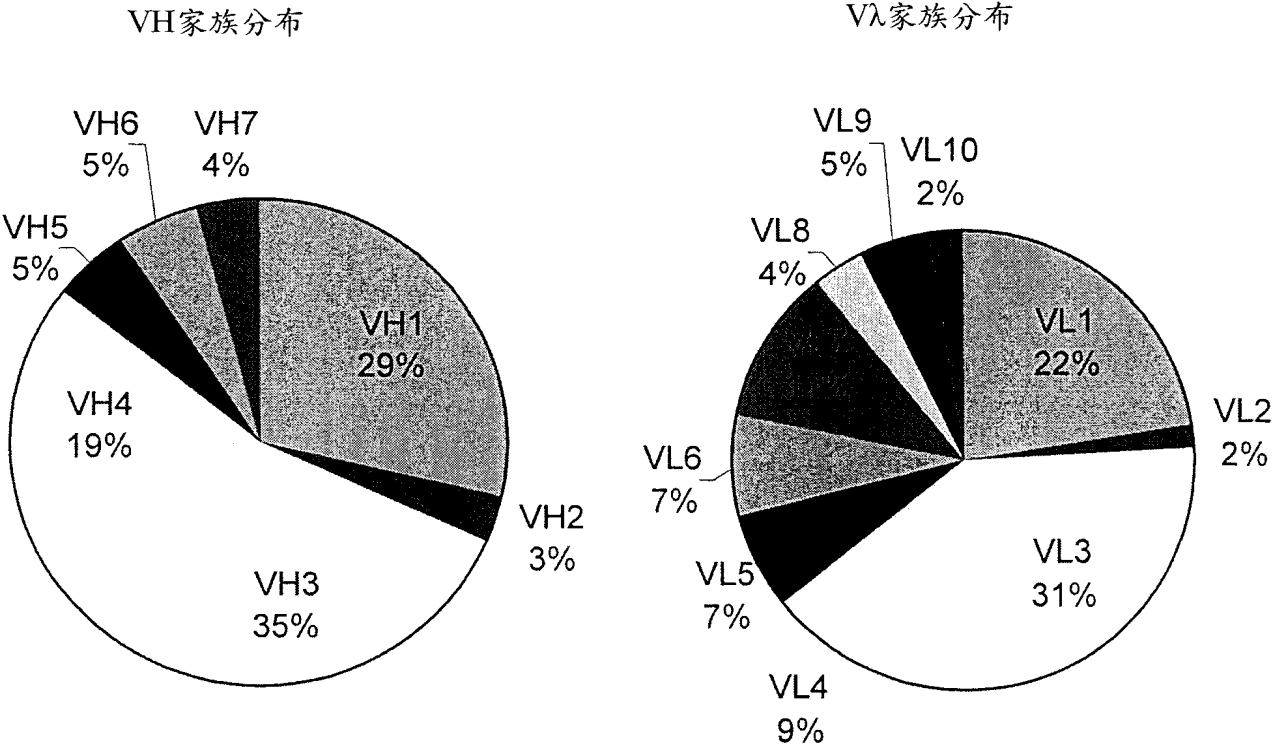


圖23

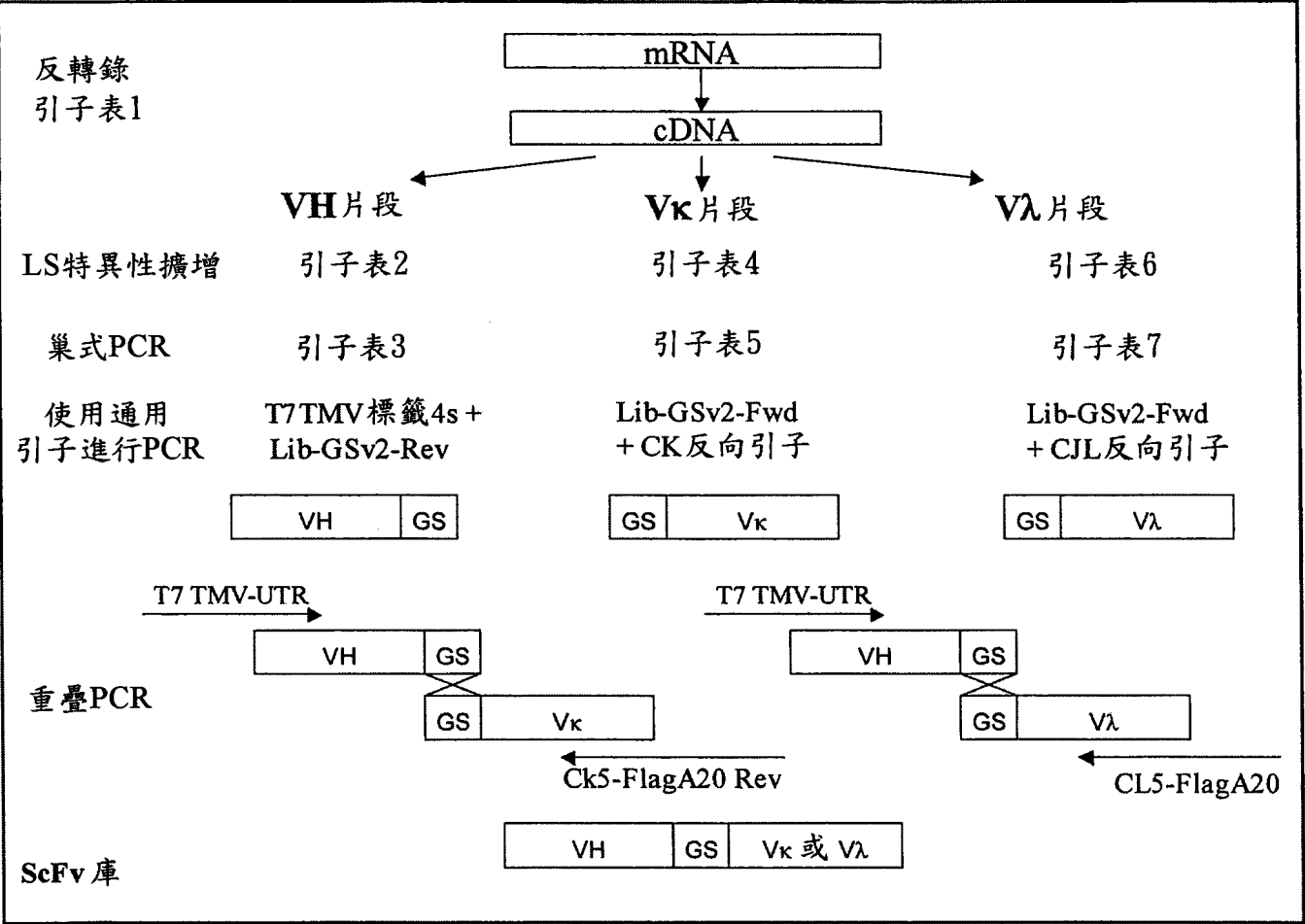


圖24

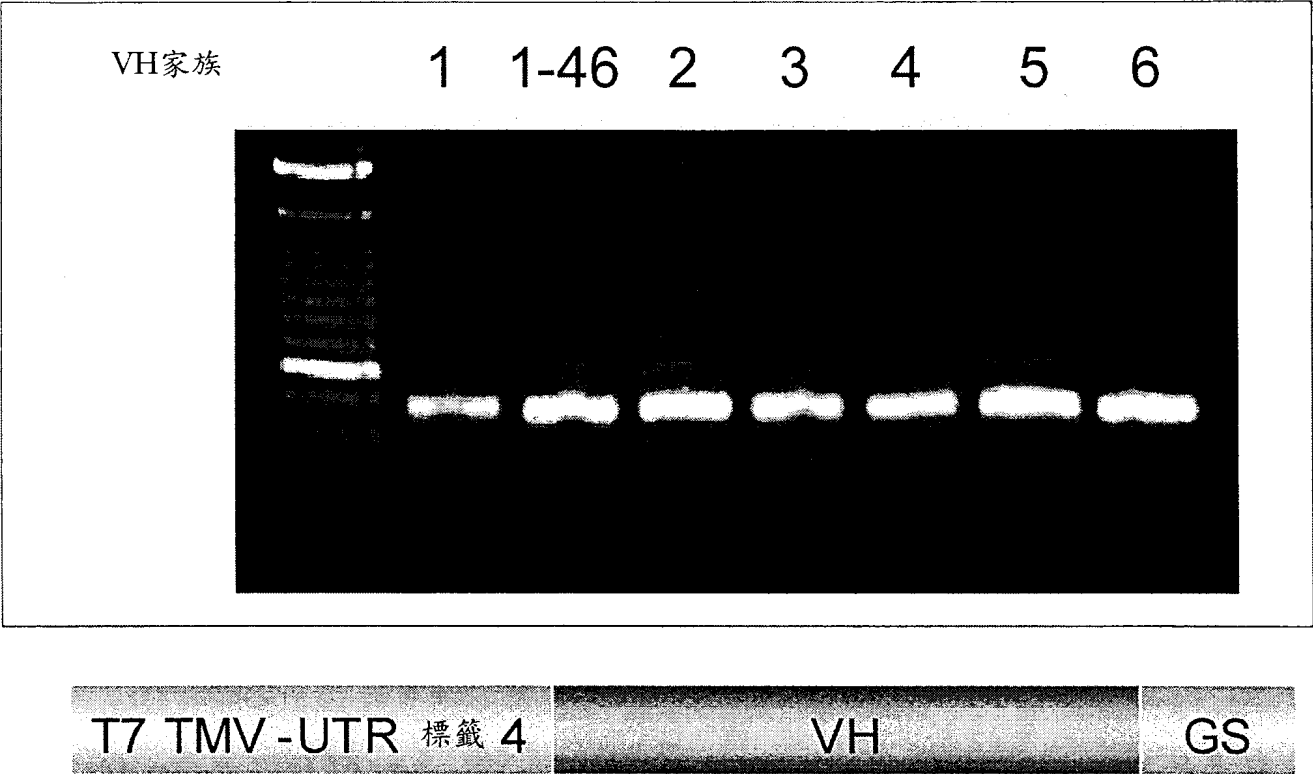


圖25

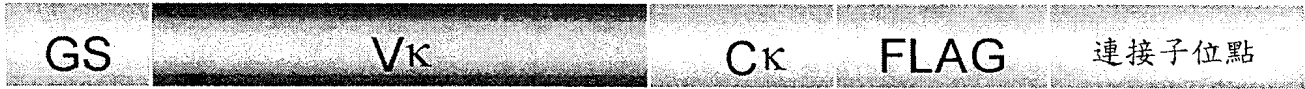
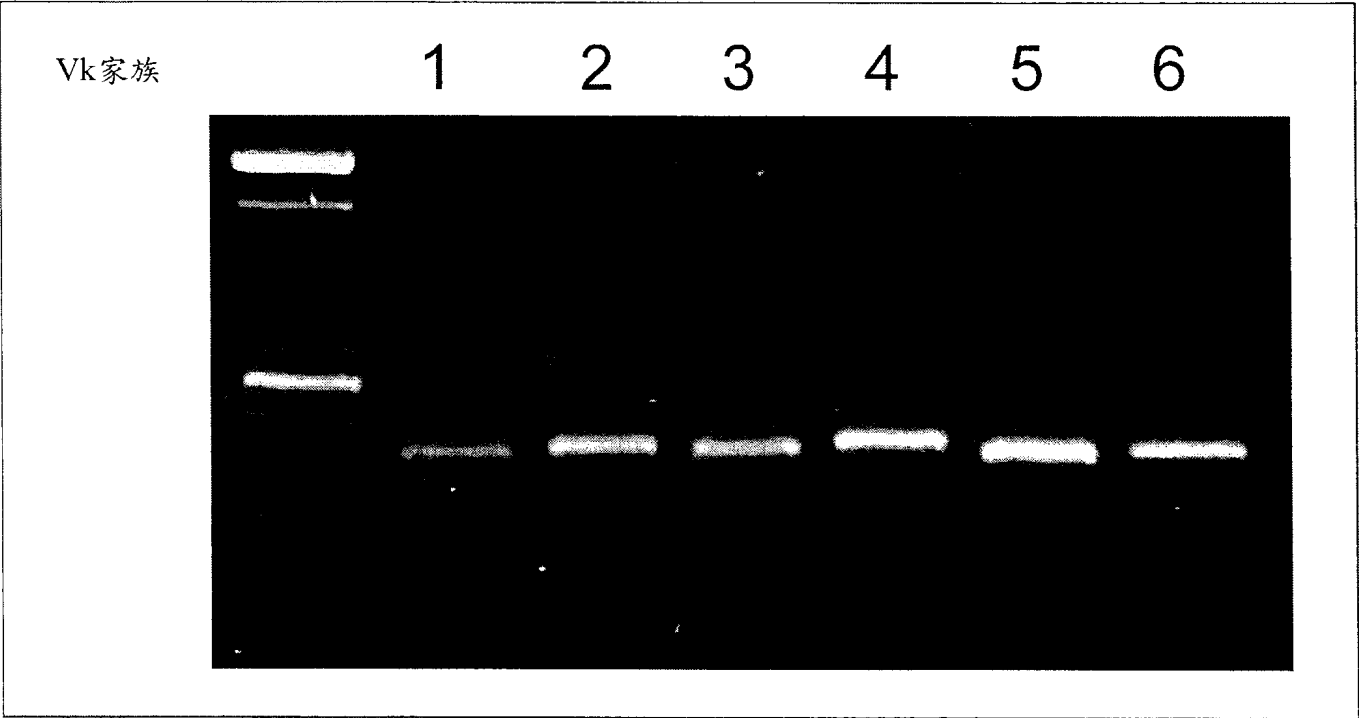


圖26

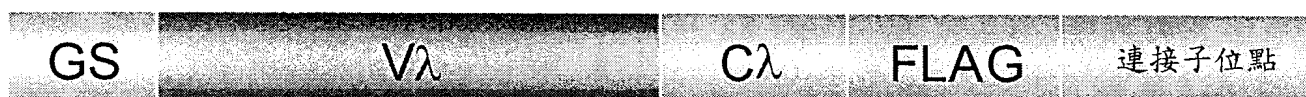
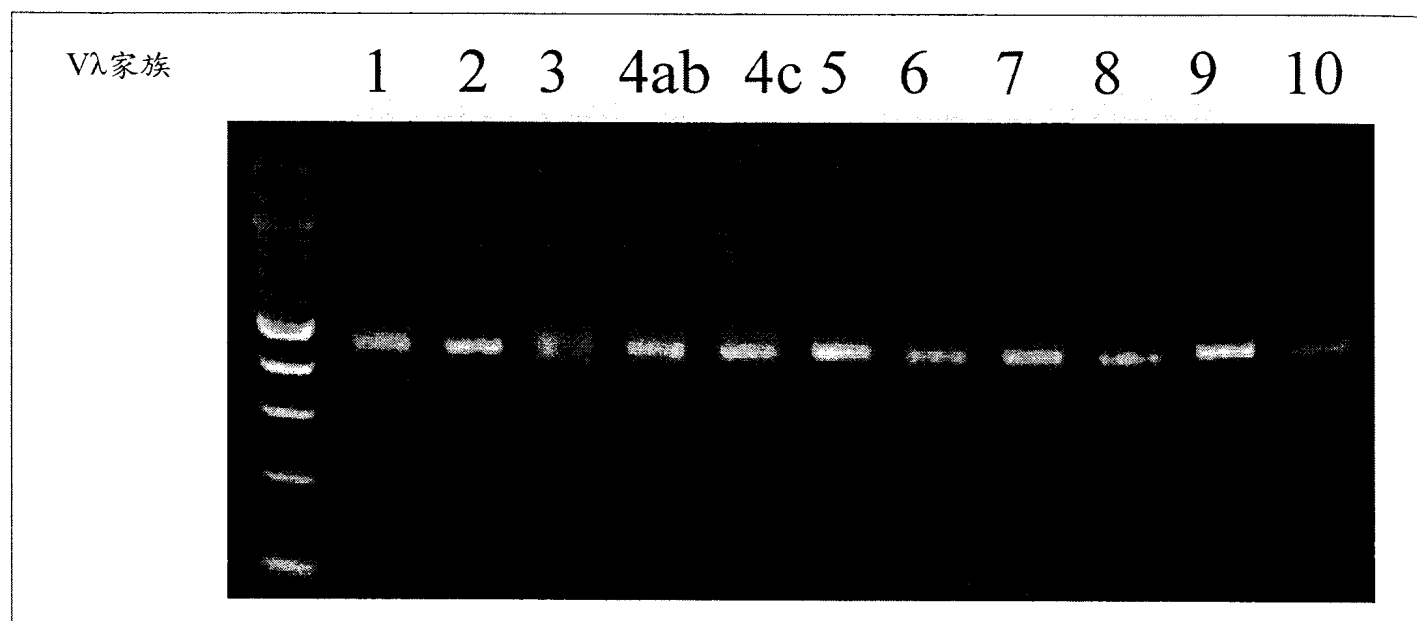
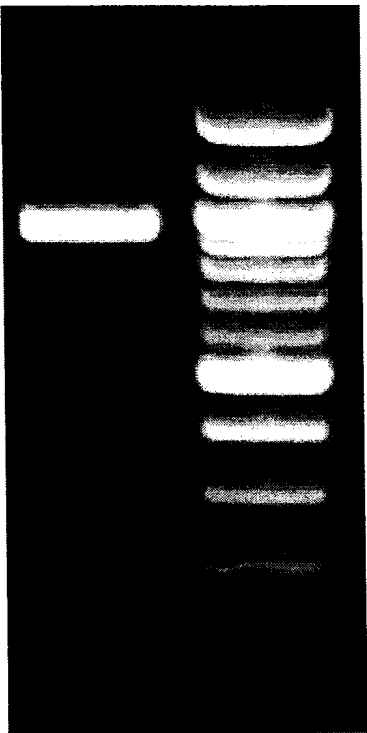
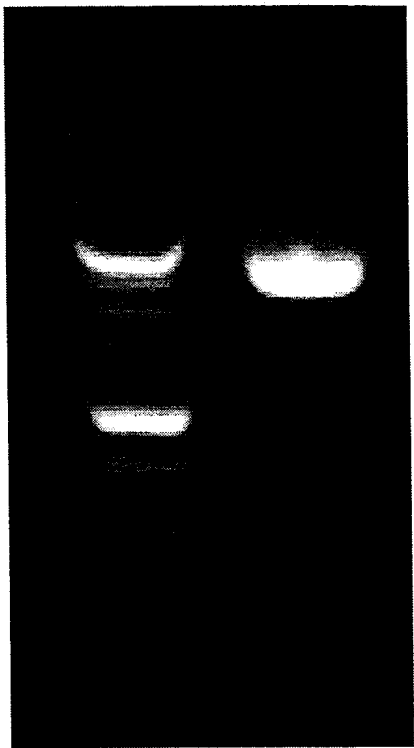


圖27

VH-V_K scFv

VH-V_λ scFv



T7 TMV-UTR標籤2	VH	GS	VL	C _K 或 C _λ	FLAG	連接子位點	Poly A
---------------	----	----	----	---------------------------------	------	-------	--------

圖28

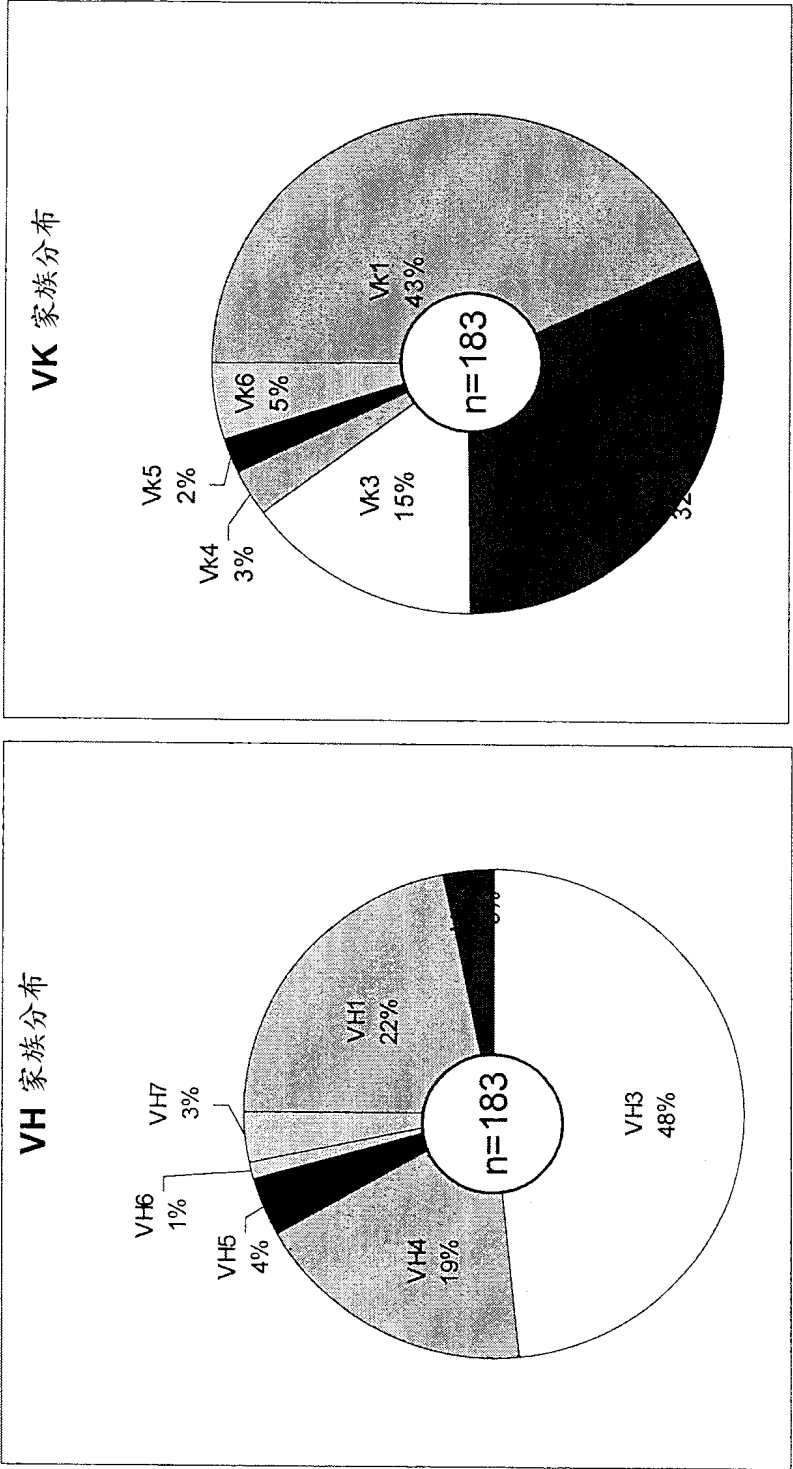


圖29

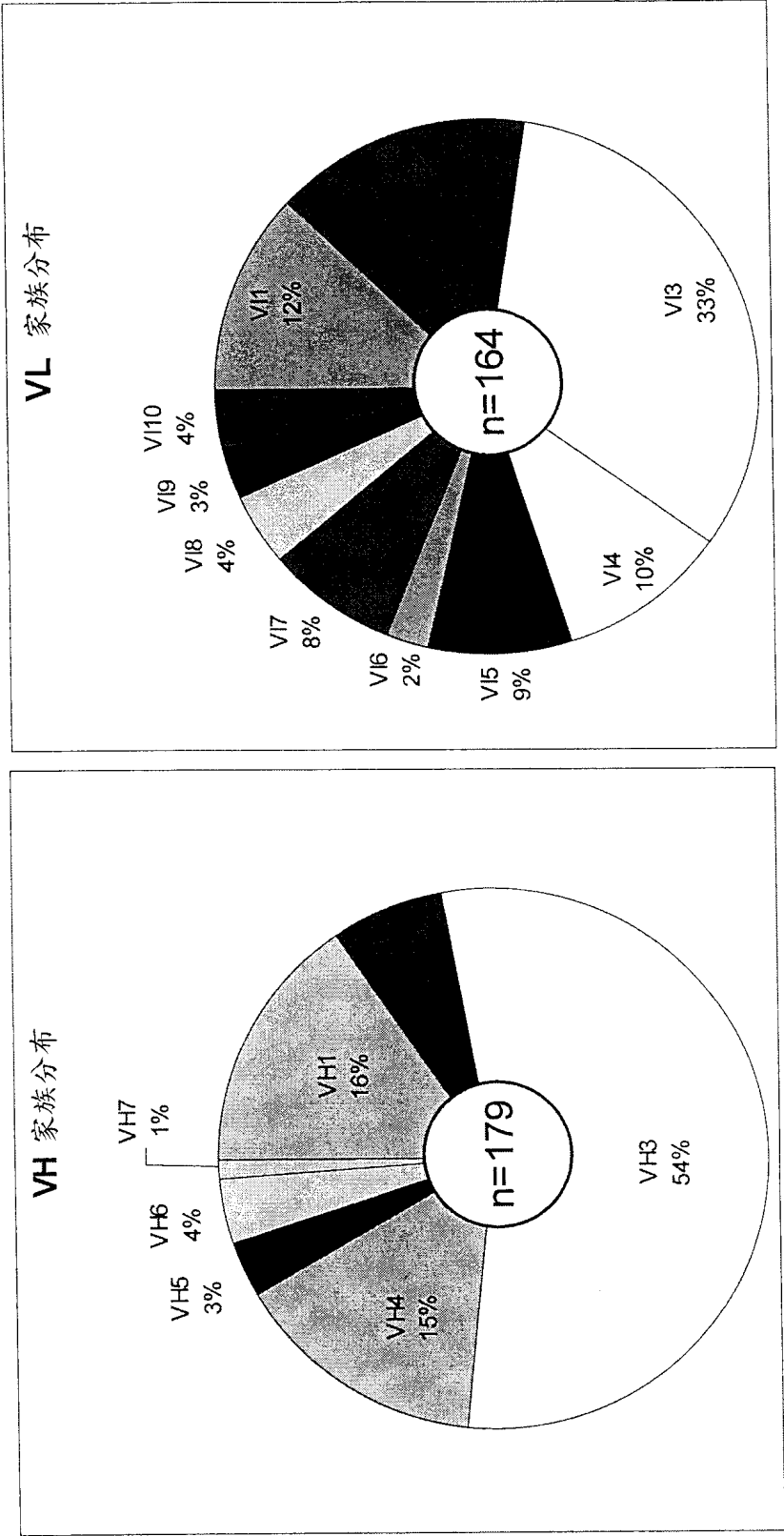


圖30

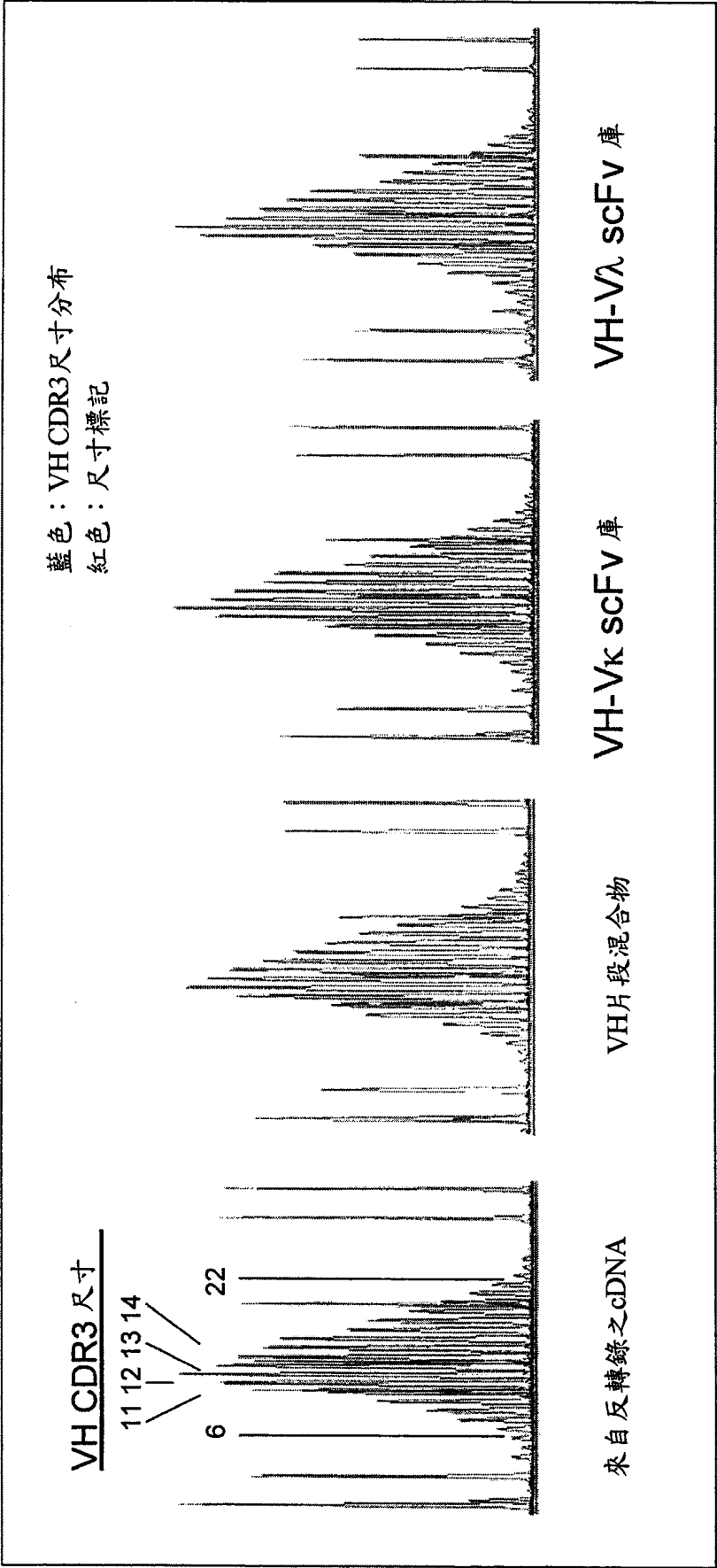


圖31

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)