



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I877823 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：112138352

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 20 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C40B40/06 (2006.01)

(30)優先權：2017/11/20 美國

62/588,914

(71)申請人：美商南特生物科學股份有限公司 (美國) NANTBIO INC. (US)

美國

(72)發明人：奧爾森 安德斯 OLSON, ANDERS (US)

(74)代理人：劉勝元

(56)參考文獻：

WO 2010/054007A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：15 共 53 頁

(54)名稱

具有複數個核酸庫的組成物

(57)摘要

提供了編碼一複數種抗體或抗體片段的高度多樣性核酸庫之組合物、方法以及用途。高度多樣性核酸庫包含或衍生自(1)一 V_H -CDR1/2 子庫、(2)一複數個 V_H -CDR3 子庫，以及(3)一 V_L 子庫，其每個包含一複數個成員。較佳地，該子庫的每個成員包括至少一個具有一複數個簡併鹼基位置的隨機盒。於一特別較佳的具體實施例中，重組該 V_H -CDR1/2 子庫、該複數個 V_H -CDR3 子庫，以及該 V_L 子庫的至少二個成員的至少部分以在一表現庫中形成一表現庫成員，其中該表現庫的每個成員編碼一不同的抗體或抗體片段。

Compositions, methods and uses of high-diversity nucleic acid library that encodes a plurality of antibodies or antibody fragments are presented. The high-diversity nucleic acid library comprises or is derived from (1) a V_H -CDR1/2 sub-library, (2) a plurality of V_H -CDR3 sub-libraries, and (3) a V_L sub-library, each of which comprises a plurality of members. Preferably, each member of the sub-libraries comprises at least one random cassette that has a plurality of degenerate base positions. In an especially preferred embodiment, at least portions of at least two members of the V_H -CDR1/2 sub-library, the plurality of V_H -CDR3 sub-libraries, and the V_L sub-library are recombined to form an expression library member in an expression library, where each member of the expression library encodes a distinct antibody or antibody fragment.

指定代表圖：

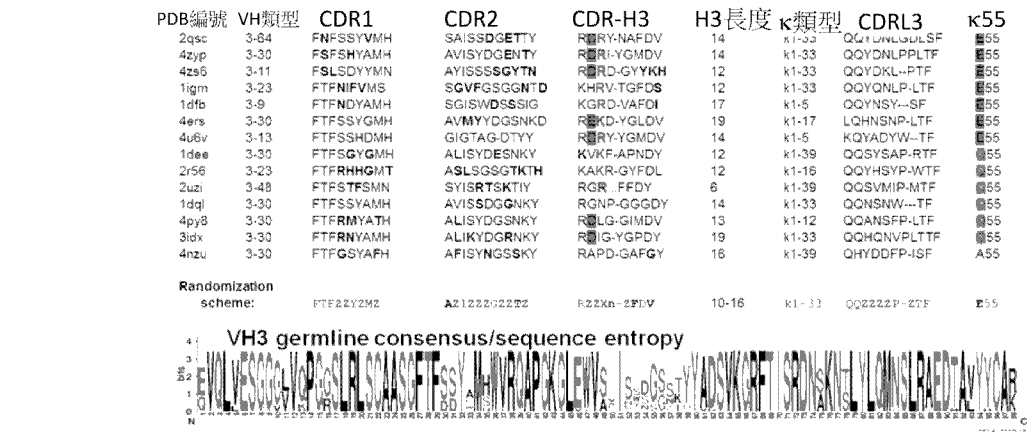


圖1



I877823

【發明摘要】

【中文發明名稱】 具有複數個核酸庫的組成物

【英文發明名稱】 Composition Having a Plurality of Nucleic Acid Libraries

【中文】

提供了編碼一複數種抗體或抗體片段的高度多樣性核酸庫之組合物、方法以及用途。高度多樣性核酸庫包含或衍生自(1)一 V_H -CDR1/2子庫、(2)一複數個 V_H -CDR3子庫，以及(3)一 V_L 子庫，其每個包含一複數個成員。較佳地，該子庫的每個成員包括至少一個具有一複數個簡併鹼基位置的隨機盒。於一特別較佳的具體實施例中，重組該 V_H -CDR1/2子庫、該複數個 V_H -CDR3子庫，以及該 V_L 子庫的至少二個成員的至少部分以在一表現庫中形成一表現庫成員，其中該表現庫的每個成員編碼一不同的抗體或抗體片段。

【英文】

Compositions, methods and uses of high-diversity nucleic acid library that encodes a plurality of antibodies or antibody fragments are presented. The high-diversity nucleic acid library comprises or is derived from (1) a V_H -CDR1/2 sub-library, (2) a plurality of V_H -CDR3 sub-libraries, and (3) a V_L sub-library, each of which comprises a plurality of members. Preferably, each member of the sub-libraries comprises at least one random cassette that has a plurality of degenerate base positions. In an especially preferred embodiment, at least portions of at least two members of the V_H -CDR1/2 sub-library, the plurality of V_H -CDR3 sub-libraries, and the V_L sub-library are recombined to form an expression library member in an

expression library, where each member of the expression library encodes a distinct antibody or antibody fragment.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 具有複數個核酸庫的組成物

【英文發明名稱】 Composition Having a Plurality of Nucleic Acid Libraries

【技術領域】

【0001】 本申請案主張本案申請人所請之同為申請中的序號為 62/588,914 的美國臨時申請案之優先權，其於 2017 年 11 月 20 日提出申請。

【0002】 本發明之領域為超高多樣性抗體庫的組合物和方法，特別是關於 mRNA 展示庫以及 mRNA 展示庫用於產生重組高親和力結合物之用途。

【先前技術】

【0003】 背景描述包括可用於理解本發明之資訊。這並非承認本文提供的任何資訊為現有技術或與當前請求保護之發明相關，或者承認具體或隱含地引用之任何出版物為現有技術。

【0004】 本文中的所有出版物均以引用方式併入，其程度如同每個單獨的出版物或專利申請被具體且單獨地指出透過引用方式併入。如果併入的引用文獻中術語的定義或用法與本文提供的術語的定義不一致或相反，則適用本文提供之術語的定義，且不適用該術語在該引用文獻中的定義。

【0005】 以高親和力、特異性抗體或結合分子將腫瘤抗原或新表位作為標的已被證明是治療癌症患者的一種有效方法。隨著越來越多的患者特異性及/或癌症特異性腫瘤抗原及/或新表位在體內、體外或通過組學數據分析電腦模擬而被辨識出來，創造提供具有高機率選擇穩定、可溶、功能性，以及適應性強

的抗體或結合物之抗體庫或展示庫的需求已經增長。雖然高親和力、特異性抗體或結合分子可以自天然抗體庫之中被鑑定出或衍生出來，但是這種鑑定或衍生的天然抗體或結合物可能不是有效的或特異性的，因為這些天然抗體的多樣性可能受限於頻率或暴露於此類抗原或新表位的強度。

【0006】在一種解決這種問題的方法中，可以使用重組噬菌體展示庫。雖然這種方法能生成具有相當高多樣性的庫，但是經常需要對結合物進行多次富集作用，這是很耗費勞力及時間的工作。此外，儘管具有相對較大的多樣性，結合物往往具有不太理想的親和力及穩定性。更進一步地，多樣性通常受到實際考量因素的限制，例如庫量、轉染效率等。這種及其他方法可被進一步優化，例如，使用如PCT專利申請WO 2006/072773中描述的多個人工選擇壓力。雖然這些方法可以改善穩定性特徵，但是需要大量的庫操作及時間。

【0007】於另一方法中，可以進行mRNA展示。此處，編碼候選結合分子(通常為scFv)的mRNA序列在其3'端與嘌呤黴素分子偶聯，並由該mRNA序列編碼的胜肽經由體外轉譯產生，以產生將該mRNA直接偶聯至由該mRNA編碼的蛋白質之融合產物。然而，儘管目前的mRNA展示技術有利地避免了與轉染限制相關的問題，且至少在概念上允許更高的多樣性，但仍然存在結構完整性或穩定性、相對低的親和力及/或交叉反應性的問題。為了進一步改善來自mRNA展示的scFv的至少選擇的結合特徵，進行V_H-CDR3譜型分析(參見*Protein Engineering, Design & Selection*, 2015, vol. 28 no. 10, pp. 427–435)。然而，這種過程需要迭代分析，且可能對所有抗原都不具有生產力。

【0008】因此，即使使用mRNA展示以及其他方法產生並鑑定候選結合物的方法為已知的，具有高結構完整性/穩定性、低親和力及/或低交叉反應性的

結合物的高度多樣性庫仍然是難以捉摸的。因此，仍然需要改善mRNA展示庫的組合物、方法以及用途，用於快速產生穩定的重組高親和力結合物。

【發明內容】

【0009】 本發明之主題涉及編碼一複數種抗體或抗體片段的一高度多樣性核酸庫之各種組合物、方法以及用途，以允許可靠且有效地鑑定針對各種生物分子，尤其是癌症抗原或新表位的穩定、可溶，以及功能性的抗體或結合物。因此，本主題之一方面包括產生編碼一複數種抗體或抗體片段的一高度多樣性核酸庫之方法。於此方法中，產生或提供三個子庫：(1)一 V_H -CDR1/2子庫、(2)一複數個 V_H -CDR3子庫，以及(3)一 V_L 子庫，每個子庫具有一複數個成員。該三個子庫中的每個成員包含至少一個具有一複數個簡併鹼基位置的隨機盒。重組該三個子庫的至少二個成員的至少部分，以在一表現庫中形成一表現庫成員，該表現庫包含一複數個表現庫成員。每個表現庫成員編碼一不同的抗體或抗體片段。於一較佳具體實施例中，該表現庫成員轉錄為一mRNA片段，然後在3'端與一嘌呤黴素分子偶聯。

【0010】 在本發明主題之另一方面，本案發明人考慮一具有一複數個核酸庫之組合物。該複數個核酸庫包括(1)一 V_H -CDR1/2子庫、(2)一複數個 V_H -CDR3子庫，以及(3)一 V_L 子庫。該子庫(1) - (3)的每個包括一複數個成員，且該子庫的每個成員包括至少一個具有一複數個簡併鹼基位置的隨機盒。

【0011】 於本發明主題之又一方面，本案發明人考慮使用上述組合物以產生一高度多樣性的核酸庫。

【0012】於本發明主題之又一方面，本案發明人考慮一具有一複數個庫成員的高度多樣性核酸庫組合物。該高度多樣性核酸庫成員包括一含有一複數個隨機盒的重組核酸，每個盒具有一複數個簡併鹼基位置。該複數個隨機盒衍生自來自下列的二個庫中的任一個中的至少二個成員：(1)一V_H-CDR1/2子庫、(2)一複數個V_H-CDR3子庫，以及(3)一V_L子庫。

【0013】於本發明主題之另一方面，本案發明人考慮使用該高度多樣性核酸庫以產生一針對一癌症新表位的治療性重組抗體。

【0014】於本發明主題之又一方面，本案發明人考慮一種產生一重組抗體之方法。於此方法中，產生或提供三個子庫：(1)一V_H-CDR1/2子庫、(2)一複數個V_H-CDR3子庫，以及(3)一V_L子庫，每個子庫具有一複數個成員。該三個子庫中的每個成員包含至少一個具有一複數個簡併鹼基位置的隨機盒。重組該三個子庫的至少二個成員的至少部分，以在一表現庫中形成一表現庫成員，該表現庫包含一複數個表現庫成員。每個表現庫成員編碼一不同的抗體或抗體片段。然後，該方法繼續使用該表現庫成員以產生該重組抗體或其片段。

【0015】於本發明主題之另一方面，本案發明人考慮透過使該抗原與透過上述方法構建的一組合物接觸，以將具有等於或小於100 nM親和力的一高親和力結合物分離到一抗原之方法。

【0016】於本發明主題之另一方面，本案發明人考慮使用選自下列提供之表1或表2的一寡核苷酸產生的一重組核酸片段。

【0017】於本發明主題之又一方面，本案發明人考慮一合成核酸混合物，其具有選自下列提供之表1或表2的一核酸序列。

【0018】 由以下較佳具體實施例之詳細描述及附圖，本發明主題的各種目的、特徵、方面，以及優點將變得更加明顯。

【圖式簡單說明】

【0019】 圖1所示為使用VH3/Vk1對之一種示例性隨機化策略。

【0020】 圖2所示為重鏈CDR1及CDR2中序列隨機化之示例性位置。

【0021】 圖3所示為重鏈CDR3中的示例性序列隨機化。

【0022】 圖4所示為輕鏈CDR3中的示例性序列隨機化，其中左側為核酸序列，右側為胺基酸選擇。

【0023】 圖5所示為透過分離及組合多個重組核酸區段之隨機盒的一示例性產生的雜交核酸元件。

【0024】 圖6所示為尺寸排阻色層分析結果，顯示一單峰指示 α B7-H4₈₀₁的一穩定蛋白質表現。

【0025】 圖7所示為一毛細管電泳十二烷基硫酸鈉(capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate, CE-SDS)數據，顯示相較於市售抗體， α B7-H4₈₀₁具有相似的分子行為。

【0026】 圖8所示為指示體外選擇的 α B7-H4抗體與B7-H4結合的圖。

【0027】 圖9所示為體外選擇的 α B7-H4結合物與 α PD-L1結合物的功能分析圖。

【0028】 圖10所示為指示 α B7-H4 scFv與 α B7-H4 IgG1的結合親和力的圖。

【0029】 圖11所示為一IL-8活性測定及其透過測量嗜中性白血球尺寸變化之結果。

【0030】圖12所示為指示 α IL-8抗體對增加的嗜中性白血球尺寸的IL-8活性之中和作用的柱狀圖。

【0031】圖13所示為以柱狀圖顯示之IL-8活性測定及其結果，其指示 α IL-8抗體透過抑制嗜中性白血球遷移對IL-8活性之中和作用。

【0032】圖14所示為使用本文提供之mRNA展示庫組合物對所選抗原標的之示例性結果。

【0033】圖15所示為描繪配置為scFv對IgG的所選結合物之親和力的示例性圖，其中使用本文提供之mRNA展示庫組合物鑑定該結合物。

【實施方式】

【0034】本案發明人現在發現，透過使用由一高度多樣性核酸庫的成員編碼之抗體或其片段的選定結構域的目標多樣化而構建該高度多樣性核酸庫，可以產生或鑑定特異性且有效的重組抗體或其片段。為了達成此目標，本案發明人現在已經發現可以預先選擇抗體/結合物的一個或複數個結構域或次結構域，並且可以使用一預先選擇的結構域或次結構域中的隨機盒產生一複數個核酸子庫。本案發明人進一步發現，可以重組該子庫的成員以構建該高度多樣性核酸庫，其允許庫成員之間的高度多樣性，但當在體內用於抗癌抗原或新表位時(較佳為癌症特異性、患者特異性新表位或新抗原)提供了更高的機率鑑定出穩定、可溶、功能性及高適應性的抗體/結合物。

【0035】實際上，如下文更詳細所示，本文提供的庫允許將至少一種結合物分離成任何任意抗原，通常在單次或雙次富集中，其中該結合物的 K_d 等於或小於100 nM，更通常等於或小於10 nM。此外，預期的系統及方法允許scFv庫具有至少 10^9 、至少 10^{10} 、至少 10^{11} 、至少 10^{12} 、至少 10^{13} 、至少 10^{14} 、至少

10^{15} ，或至少 10^{16} 個不同庫成員的多樣性，所有這些都在與傳統庫構築相比顯著減少的時間範圍內。因此，應當理解的是，抗體發現的速度顯著增加。

【0036】如本文所用，術語“腫瘤”係指並且可與一種或多種癌細胞、癌症組織、惡性腫瘤細胞，或惡性腫瘤組織互換使用，其可以在一人體內的一或多個解剖位置中被放置或發現。

【0037】如本文所用，術語“結合”係指，並且可以與術語“識別”及/或“檢測”互換使用，兩個分子之間的相互作用具有高親和力且 K_D 等於或小於 10^{-6} M，或等於或小於 10^{-7} M。

【0038】如本文所用，術語“提供(動詞)”或“提供(動名詞)”係指並包括製造、生成、放置、使能使用，或使其準備使用之任何行為。

核酸子庫之構築

【0039】通常，抗體的結構組成分(重鏈、輕鏈、恆定結構域、可變結構域)與其功能密切相關。例如，重鏈(V_H)與輕鏈(V_L)中的可變結構域一起構成表位結合結構域，其為抗體提供特異性。 V_H 與 V_L 中的每一個包括三個互補決定區(CDRs, CDR1-3)，其具有基於它們對一抗原之特異性的獨特胺基酸序列。因此，先前已經預期可以透過隨機化編碼 V_H 與 V_L 的CDR之序列來產生用於產生或鑑定抗體之重組核酸庫。然而，本案發明人發現雖然 V_H 與 V_L 的所有CDR的完全隨機化可以為庫提供很大的多樣性，但是它也造成產生隨機序列的所有組合及篩選所有隨機組合的低效率，因為當其重組形成一抗體(例如，IgG1等)時，並非所有隨機化的 V_H 及 V_L 都能是可溶的或穩定表現的。此外，由於可能的庫成員數量極大，覆蓋整個多樣性空間是不切實際的。

【0040】因此，本案發明人考慮 V_H 與 V_L 的次結構域可以分為兩類：不同抗體(或編碼抗體的基因)的 V_H 或 V_L 中通常常見的框架區以及可以至少部分或完全隨機化而不顯著影響最終胜肽產物(例如scFv, IgG1等)的穩定性及/或溶解度

的目標多樣化區。較佳地， V_H 的目標多樣化區域包括CDR1、CDR2-n (CDR2的N-端側)、CDR2-c (CDR2的C-端側)，以及CDR3的至少一部分。在進一步較佳的方面， V_L 的目標多樣化區域包括CDR3的至少一部分。

【0041】因此，於本發明主題之一示例性且特別較佳之方面，可以透過在 V_H 及/或 V_L 的一個或多個目標多樣化區域中產生包含一個或多個隨機序列盒的重組核酸來產生一核酸庫。於一較佳的具體實施例中，本案發明人考慮了三個不同的子庫，其在不同的目標多樣化區域中具有不同組的隨機序列盒，使得每個子庫在隨機化的目標多樣化區域內保留多樣性，如此每個子庫保留了隨機目標多樣化區域內的多樣性，同時在單個子庫中避免過多的隨機化重組序列，這可能使單個子庫的容量大到不切實際或低效率，無法快速或及時地進行篩選。此外，選擇或設計目標多樣化區域之間的保守區域以獲得最大穩定性及溶解度。

【0042】於一具體實施例中，該子庫包括一 V_H -CDR1/2子庫。該 V_H -CDR1/2子庫包含一複數個重組核酸(例如，重組DNA)，其具有一或多個隨機序列盒，其對應於 V_H CDR1的至少一部分及/或 V_H CDR2的一部分。如本文所用，該對應於 V_H CDR1的一部分的隨機盒表示該隨機盒位於該重組核酸的一區域中，其中應存在編碼CDR1部分的序列以編碼 V_H 結構域的一部分，其至少在結構上或功能上類似於天然抗體的 V_H 結構域。例如，一 V_H -CDR1/2子庫中的重組核酸可具有下列結構(隨機區域以底線標示，固定序列區域以括號標示)：

5'-(啟動子-5' UTR-FW1)+CDR1+(FW2)+CDR2+(FW3-CDR3-FW4)

如本文所用，UTR係指非轉譯區，FW係指框架區(例如，FW1為可以與第二框架區域(FW2)不同之第一框架區域)。在該結構中，該隨機序列盒可以插入CDR1或CDR2的區域，或較佳插入CDR1及CDR2二者。於一些具體實施例中，

可以在CDR2區域中插入多於一個隨機序列盒，較佳為二個隨機序列盒：

CDR2-n (CDR2的5'端側)以及CDR-c (CDR2的3'端側)。

【0043】 該子庫還可以包括一複數個V_H-CDR3子庫。每個V_H-CDR3子庫包含一複數個重組核酸(例如，重組DNA)，其具有一個或多個對應於V_H CDR3的至少一部分的隨機序列盒。與V_H-CDR1/2子庫類似，V_H-CDR1/2子庫中的一重組核酸可具有下列結構(隨機區域以底線標示，固定序列區域以括號標示)：

5'-(啟動子-5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3)-CDR3-(FW4)

較佳地，選擇該V_H-CDR1/2子庫及/或該V_H-CDR3子庫的重組核酸之固定序列(例如，啟動子-5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3, FW4)以使用天然抗體(例如，針對各種抗原的IgG1)之中最常見及/或保守的序列，使得該固定序列最可表現並適應多種形式，包括表現為一單鏈可變片段(scFv)、一scFv的修飾形式、全長免疫球蛋白，或免疫球蛋白的一部分的胜肽。因此，於較佳的具體實施例中，V_H-CDR1/2子庫的重組核酸以及V_H-CDR3子庫的重組核酸之固定序列彼此為至少70%，較佳至少80%，更佳至少90%相同(共享)。

【0044】 該子庫還可以包括一V_L子庫。該V_L子庫包含一複數個重組核酸(例如，重組DNA)，其具有一或多個對應於V_L CDR3的至少一部分之隨機序列盒。與該V_H-CDR1/2子庫類似，V_H-CDR1/2子庫中的重組核酸可具有下列結構(隨機區域以底線標示，固定序列區域以括號標示)：

5'-(啟動子-5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3)-CDR3-(FW4)

較佳地，該V_L子庫的重組核酸之固定序列與該V_H-CDR1/2子庫或V_H-CDR3子庫的重組核酸的固定序列至少70%，較佳至少80%，更佳至少90%相同(共有)。

【0045】 儘管任何隨機序列可被認為可以產生該隨機序列盒，但本案發明人認為，當表現為結合胜肽(例如scFv等)時，該V_H的CDR1、CDR2、CDR3以及該V_L結構域的CDR3的策略性隨機序列盒將呈現高複雜性以及大的潛在結合

表面。例如，該V_H-CDR1/2子庫的CDR1、CDR2的策略化隨機序列盒可以為每個盒具有3個或更少，較佳2個或更少，或更佳地，一個隨機序列的半隨機序列盒(每個盒編碼3個或更少，2個或更少，或一個隨機胺基酸)。該隨機序列在該隨機盒中的位置可以根據盒中的隨機胺基酸而變化。於另一實施例中，V_H-CDR3子庫的CDR3的策略化隨機序列盒可包括更多隨機化序列，使得每個盒存在4個或更多個，較佳5個或更多個，或更佳6個或更多個隨機序列(每個盒編碼4個或更多，較佳5個或更多，或更佳6個或更多個隨機胺基酸)。於又一實施例中，V_L子庫的CDR3的策略化隨機序列盒可包括更多隨機序列，使得每個盒存在4個或更多個，較佳5個或更多個，或更佳6個或更多個隨機序列(每個盒編碼4個或更多，較佳5個或更多，或更佳6個或更多個隨機胺基酸)。

【0046】 於本發明主題之一特別較佳之方面，本案發明人考慮可以使用表1 (對於V_H-CDR1/2子庫與V_H-CDR3子庫)與表2 (對於V_L子庫)中所示的寡核苷酸以產生用於子庫的較佳隨機序列盒。如表1及2中所示，每個寡核苷酸包括具有簡併代碼的一隨機序列(突出顯示)，顯示為IUPAC模糊代碼。例如，CDR1隨機序列盒的一個寡核苷酸包括一隨機序列“RVT”，其代表“A/G,A/C/G,T”，其組合可編碼蘇胺酸(T)、丙胺酸(A)、天門冬醯胺(N)、天門冬胺酸(D)、絲胺酸(S)，或甘胺酸(G)之一。由簡併密碼子編碼的胺基酸的選擇如右側所示，並以X表示。

另外且較佳地，V_H-CDR3子庫的隨機序列盒可包括不同長度的核酸序列。例如，V_H-CDR3子庫的隨機序列盒可為10-30個胺基酸之間的任何長度，較佳為10-25個胺基酸，更佳為10-20個胺基酸。因此，如表1所示，用於產生V_H-CDR3子庫的隨機序列盒之寡核苷酸可包括介於編碼D/G-R/L以及A/G的序列之間的各種重複(例如，4-10個重複)的“NNK”(其代表G/A/T/C, G/A/T/C, G/T) (亦參見圖3)。輕鏈序列的產生及多樣性示例性地顯示於圖4中。

V _H CDR1	SEQ ID NO.1: GGCTTAGGTCTCATTTCT RV TAGTTACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,D, S ,G
	SEQ ID NO.2: GGCTTAGGTCTCATTTCTCT RV KTACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,K,D,E, S ,R,G
	SEQ ID NO.3: GGCTTAGGTCTCATTTCTCTAGTTAC KK GATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=G,W,L,V
	SEQ ID NO.4: GGCTTAGGTCTCATTTCTCTAGTTAC WM TATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,Y,T,N
	SEQ ID NO.5: GGCTTAGGTCTCATTTCTCTAGTTACGCTATG AV TTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T,N
V _H CDR2-n	SEQ ID NO.6: GGCTTAGGTCTCGTTCAT HC ATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,F,S
	SEQ ID NO.7: GGCTTAGGTCTCGTTC AV KTATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=V,G,I,S,L,R
	SEQ ID NO.8: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATT YG GGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,R
	SEQ ID NO.9: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATT ID ATGGTAATGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D+N53
	SEQ ID NO.101: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGT WM TAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,S,T,N
	SEQ ID NO.11: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGT KGG AGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,G
	SEQ ID NO.12: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTGG TR RTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,S,N
	SEQ ID NO.13: GGCTTAGGTCTCGTGGAR V KAGTACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T, G ,A,N,K,D,E
V _H CDR2-c	SEQ ID NO.14: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGT NA TACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D,H
	SEQ ID NO.15: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGT RV AACCTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,K,R,E,A,G
	SEQ ID NO.16: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTAGTACT VR TTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,N,S,H,R
	SEQ ID NO.17: GGCTTAGGTCTCTCCGT GRTCKC (NNK) n GS TT TCGCGAGACGAGGTCTGAACGG	(D , G)-(R,L)-(Xaa=4-10)- (A , G)

表1

V _L CDR3	SEQ ID NO.18: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTD SGCCTT WCACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	Q-X ₁ -X ₂ -X ₃ -X ₄ -P-X ₅ X ₁ =Y,D,L,A,H,S, F,R,T,W,G
	SEQ ID NO.19: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTD MTRV TD SGCCTT WCACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.20: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVT NW TCCTT WCACTT CGAGACGAGGTCTGAACGG	X ₂ =Y,N,D,S,T,A
	SEQ ID NO.21: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTD MTRVT NWTCCTT WCACTT CGAGACGAGGTCTGAACGG	X ₃ =S,N,T,A,D,G
	SEQ ID NO.22: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTD SGCCTY KGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	X ₄ =Y,F,A,L,T,S, H,W,I,N,R,V,D,G
	SEQ ID NO.23: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTD MTRVT DSGCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.24: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVT NW TCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	X ₅ =L,Y,W,F,R
	SEQ ID NO.25: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTD MTRVT NWTCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.26: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTD MTRVT NWTCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	

表2

【0047】 最典型地，表1及2中呈現的寡核苷酸以一單鏈DNA提供，其可以使用DNA聚合酶I (Klenow片段)轉化為雙鏈DNA片段，從而插入包含固定序列區域的骨架中(例如，5'-(啟動子- 5' UTR – FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) – (FW4)用於V_L子庫的重組核酸等)。然而，還預期表1及2中呈現的寡核苷酸也與互補寡核苷酸一起存在以形成一雙鏈核酸而不使用聚合酶。

【0048】於某些具體實施例中，子庫的重組核酸還包括編碼一蛋白質標籤的一核酸序列，使得可以使用針對該蛋白質標籤的結合物分離由該重組核酸編碼的該胜肽。例如，較佳的蛋白質標籤包括一FLAG標籤(具有序列基序DYKDDDDK)，一Myc標籤(具有序列基序EQKLISEEDL)，以及一HA標籤。於某些具體實施例中，可以重複該蛋白質標籤以增強該信號或增加該檢測(例如，三次重複的FLAG標籤(3X FLAG)等)。

【0049】預期插入子庫的重組核酸中的一些隨機序列盒可引入移碼、無義突變，以及使該重組核酸編碼之胜肽的結構不穩定之序列。因此，於某些具體實施例中，本案發明人考慮對該子庫的重組核酸進行體外測試，以便可以從該庫中除去編碼不穩定或錯誤折疊的胜肽的任何重組核酸。例如，可以測試V_H-CDR3子庫或V_L子庫的重組核酸對金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A或大芬戈爾德菌(*Finegoldia magna*)的蛋白L的結合親和力，其與V_H3結構域的結構化表位結合或免疫球蛋白的V_L(V_κ)結構域分別獨立地與CDR序列結合。

【0050】透過重組核酸與蛋白質A或蛋白質L的結合親和力來篩選重組核酸的任何合適方法被考慮。於一示例性具體實施例中，透過體外轉錄將子庫的重組核酸轉錄成mRNA，並將該mRNA的3'端偶聯(共價連接)至嘌呤黴素。體外轉譯嘌呤黴素偶聯的mRNA，使得從該嘌呤黴素偶聯的mRNA轉錄的胜肽經由該嘌呤黴素與mRNA偶聯。接下來，使該胜肽與蛋白A或蛋白L接觸以鑑定與蛋白A或蛋白L有效結合的胜肽。較佳地，選擇並分離與蛋白A或蛋白L結合的胜肽，其具有等於或小於 10^{-6} M，較佳等於或小於 10^{-7} M的K_D的親和力。一旦分離出對蛋白質A或蛋白質L具有高親和力的胜肽，就可以透過與嘌呤黴素及該胜肽偶聯的mRNA的體外反轉錄產生分離的胜肽的cDNA。然後可以將如此產生的分離的胜肽的cDNA作為隨機序列盒插入，以產生V_H-CDR3子庫或該V_L子庫

的選定重組核酸。或者，還預期子庫的重組核酸可以mRNA的形式存在，其任選地與嘌呤黴素分子預偶聯，使其可能不需要該重組核酸的體外轉錄步驟(以DNA形式)。

自該子庫構築scFv庫

【0051】 本案發明人進一步考慮可以重組子庫的至少二個重組核酸(成員)以形成重組scFv核酸。於一較佳具體實施例中，該至少二種重組核酸(成員)中的每一種選自不同的子庫。例如，可以從該V_H-CDR1/2子庫、該複數個V_H-CDR3子庫，以及該V_L子庫中的每一個中選擇一種重組核酸。對於其他實施例，可以從V_H-CDR1/2子庫、該複數個V_H-CDR3子庫，以及該V_L子庫中的二個中的每一個中選擇一種重組核酸。較佳地，透過如上所述之親和結合篩選預先選擇至少一種，更佳所有選自該子庫的重組核酸。

【0052】 最典型地，該重組scFv核酸可以透過重組來自子庫的一部分重組核酸來構築。於該具體實施例中，該重組核酸的一部分包括插入該重組核酸中的該隨機序列盒。因此，例如，作為第一步，該V_H-CDR1/2子庫的重組核酸的部分可為5'-[CDR1 + (FW2) + CDR2]-3' (隨機序列盒以底線標示)，較佳為5'-(FW1的一部分)-[CDR1 + (FW2) + CDR2]- (FW3的一部分)-3'，更佳為5'-(啟動子 -5' UTR - FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (FW3的一部分)-3'或5'-(啟動子 -5' UTR - FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (一個小連接子)-3'。類似地，例如，該V_H-CDR3子庫的重組核酸的部分可為5'- [CDR3] - 3' (隨機序列盒以底線標示)，較佳為5'-(FW3的一部分) - CDR3 - (FW4的一部分)-3'，更佳地，5'-(FW3的一部分) - CDR3 - (FW4)-3'，或5'-(一個小連接子) - CDR3 - (FW4)-3'。然後分離來自該V_H-CDR1/2子庫以及該V_H-CDR3子庫的重組核酸的部分(例如，透過PCR)並且可以重組(例如，透過限制性連接方法融合，透過經由重組PCR等)以形成一V_H結構域重組核酸。因此，通常，該V_H結構域重組核酸將為

5'-啟動子- 5' UTR – FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3 – CDR3 –FW4 –3'的結構(隨機序列盒以底線標示)。任選地，該V_H結構域重組核酸還可以包括在其3'端編碼一蛋白質標籤(例如，FLAG標籤、Myc標籤、HA標籤等)的核酸序列，如上所述。另外，這樣產生的V_H結構域重組核酸可以作為V_H結構域庫成員而被置於一V_H結構域庫中。

【0053】 如此形成的V_H結構域重組核酸可以進一步與該V_L子庫的重組核酸重組，以形成該重組scFv核酸。圖5所示為自子庫重組序列的一種示例性方法。如圖所示，並且通常還將一部分的該V_H結構域重組核酸與一部分的該V_L子庫的重組核酸融合到一個重組scFv核酸中。例如，V_H結構域重組核酸的部分可包括5'-啟動子 – [5' UTR – FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3 – CDR3 –FW4 – 3' (較佳在其3'端不含任何編碼一蛋白質標籤的核酸)，且該V_L子庫的重組核酸的部分可包括FW1' + CDR1 + FW2' + CDR2 + FW3' – CDR3 – FW4' (無啟動子及5'-UTR)，如此可以將該V_L子庫的重組核酸與V_H結構域重組核酸部分的3'端融合。因此，典型的重組scFv核酸將為5'-啟動子– [5' UTR – FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3 – CDR3 –FW4]V_H- [FW1' + CDR1 + FW2' + CDR2 + FW3' – CDR3 – FW4']V_L-3'的結構。高度較佳為將V_H結構域重組核酸的部分與該V_L子庫的重組核酸的部分置於相同的閱讀框中，使它們編碼一單一多肽。

【0054】 較佳地，V_H結構域重組核酸的部分與V_L子庫的重組核酸的部分透過編碼介於該二個部分之間的一連接子(一短肽間隔區片段)進行融合。可以使用針對該連接子或間隔區的肽序列的任何合適長度及順序。然而，較佳的連接子肽的長度為3-30個胺基酸，較佳為介於5-20個胺基酸之間，更佳為介於5-15個胺基酸之間。例如，本案發明人考慮使用富含甘胺酸的序列(例如，gly-gly-ser-gly-gly等)來提供介於V_H及V_L結構域之間scFv的彈性。

【0055】 任選地，該重組scFv核酸還可以包括在其3'端編碼一蛋白質標籤(例如，FLAG標籤、Myc標籤、HA標籤等)的核酸序列，如上所述。另外，這樣產生的重組scFv核酸可以作為表現庫成員而被置於一表現庫中。

【0056】 於某些具體實施例中，這樣形成的重組scFv核酸基於它們對一種或多種目標配體(例如，癌症抗原、新表位等)的結合親和力、穩定性、pH敏感性及/或物種交叉反應而進一步篩選及/或分級。例如，該重組scFv核酸編碼的scFv胜肽的穩定性可以透過尺寸排阻色層分析法分析，測量胜肽的大小隨時間的變化。對於其他實施例，可以透過使該scFv胜肽與一種或多種配體在不同的緩衝條件(pH、溫度等)下接觸以分析由該重組scFv核酸編碼的scFv胜肽的pH敏感性及結合親和力。

【0057】 對於那些分析及從該表現庫中進一步分離所需的重組scFv核酸，本案發明人考慮到該重組scFv核酸可以mRNA的形式存在，其任選地在該mRNAs的3'端與嘌呤黴素分子預偶聯。然後可以體外轉譯與該嘌呤黴素偶聯的mRNAs，使得從該與嘌呤黴素偶聯的mRNA轉錄的胜肽通過該嘌呤黴素與mRNAs偶聯。然後，使該胜肽與一或多種配體接觸，任選地在不同的緩衝條件(pH、溫度等)下進行。較佳地，選擇並隔離具有一 K_D 等於或小於 10^{-6} M，較佳等於或小於 10^{-7} M的親和力，介於pH 5.0-8.0之間，較佳為pH 6.0-8.0之間，更佳為pH 6.5-8.0之間的結合該配體之胜肽。一旦分離出對該配體具有高親和力的胜肽，就可以透過與該嘌呤黴素及該胜肽偶聯的mRNAs的體外反轉錄產生該分離的胜肽的cDNA。

【0058】 另外，由此產生的由重組scFv核酸編碼的分離的胜肽之cDNA可以移植到免疫球蛋白的一部分上並替換該部分，以形成重組免疫球蛋白或其片段。例如，由此產生的cDNA可以與該免疫球蛋白重鏈恆定區的主鏈融合，使該免疫球蛋白的重鏈與輕鏈的可變區可以被該分離的胜肽形成的scFv替換。或

者，本案發明人還考慮了該重組scFv核酸的V_H部分(或衍生自V_H結構域重組核酸)以及V_L部分(或衍生自該重組scFv核酸)可被移植並替換該免疫球蛋白的部分以形成一重組免疫球蛋白或其片段。例如，該重組scFv核酸的V_H部分(或源自V_H結構域重組核酸)以及V_L部分(或源自該重組scFv核酸)與該免疫球蛋白重鏈恆定區的主鏈或輕鏈恆定區分別融合，以形成一具有對所需配體特異的可變區之免疫球蛋白。

【0059】 於這些實施例中，預期該免疫球蛋白可包括任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA以及IgY)以及重鏈或恆定結構域的任何類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1以及IgA2)，以構築不同類型的免疫球蛋白。此外，該“抗體”可包括，但不限於，一人類抗體、一人源化抗體、一嵌合抗體、一單株抗體、一多株抗體。在這種情況下，應當注意的是，所考慮的系統及方法允許通過將該分離的V_H及V_L結構域移植到一所需物種(例如，人類)的抗體之剩餘部分上以產生物種特異性抗體。於另一實施例中，由此產生的cDNA可以與編碼該免疫球蛋白的其他部分之核酸融合，以形成該免疫球蛋白的一片段。於此實施例中，預期該免疫球蛋白的片段可為Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂、二硫鏈連接的Fvs(sdFv)，以及Fvs。本案發明人進一步設想，由此產生的cDNA的一部分可以與編碼該免疫球蛋白的其他部分的核酸融合，以形成包含V_H區段及/或V_L區段的任何片段。

【0060】 另外，本案發明人考慮該scFv部分也可作為各種蛋白質及非蛋白質分子的目標實體。例如，該scFv部分可以偶聯(通常作為嵌合蛋白)至ALT-803型分子以形成具有特異性目標能力的一TxM實體(參見例如，*J Biol Chem.* 2016 Nov 11;291(46):23869-23881)。於另一實施例中，該scFv部分可以與一載體蛋白(例如，白蛋白)偶聯，以允許目標特異性遞送一或多種藥物到一腫瘤微環境中的特定位置，其中該藥物與該載體偶聯。

【0061】 本案發明人進一步考慮透過隨機序列的目標多樣化構建子庫，及/或預選該子庫的成員，透過去除不穩定的、非結合的，或錯誤折疊的序列，該表現庫可以達到約 10^{12} 的複雜性，同時最小化對多樣性的犧牲。因此，上述產生表現庫之方法提供了有意義的序列複雜性大小，但對於小體積篩選結合物/抗體而言是實用的。此外，上述產生表現庫之方法簡化了該結合物/抗體的篩選程序。傳統上，編碼結合結構域(或基序)的任何核酸序列(例如，隨機序列)的體外驗證需要將核酸序列轉化為 F_{ab} 結構域，然後可以透過以目標配體的拉下(pull-down)分析來測試結合親和力。本文所提供之方法允許透過親和力(例如， K_d 值)、pH敏感性，以及物種交叉反應性(例如，透過表面等離子體共振分析等)排序來進行編碼結合結構域(或基序)的核酸序列之體外驗證，而不將該核酸序列轉化為 F_{ab} 結構域。此外，基於穩定性及靈敏度從每個庫中預先選擇成員則減少了在庫中測試的群體，使得可以更快速且有效地鑑定所需的結合物/scFv/抗體結構域。因此，本案發明人還考慮使用mRNA展示技術從一高度多樣性群體中分離高親和力結合物(例如，使用奈米和微微摩爾 K_d)的方法，其中體外轉譯後的庫成員針對固相結合抗原進行篩選。一旦鑑定了結合物，就可以透過表面等離子體共振光譜法進一步描述它們的親和力與 K_{on}/K_{off} 特徵，如下面進一步所描述的。從不同的角度看，預期的系統及方法允許在完全獨立於體內免疫系統的過程中快速檢測結合物與scFv或抗體的產生。

實施例

【0062】 雖然可以考慮用於識別目標多樣化區域的任何合適的多樣化方案以在保持效率的同時最大化多樣性，但本案發明人發現VH3/Vk1可以是免疫球蛋白的各種結構域中隨機化的良好候選區域之一，VH3被認為是迄今為止最穩定且最可溶的 V_H 結構域，且輕鏈的Vk1穩定可溶。因此，預期VH3/Vk1隨機對將更有效地轉化為全長免疫球蛋白。因此，本案發明人使用VH3與Vk1框架

開發了預選策略。圖1所示為使用VH3/Vk1對的一種示例性隨機化策略。比較並分析對一種抗原特異的至少14種免疫球蛋白分子的蛋白質序列。將14個免疫球蛋白分子之中最穩定且最保守的序列作為框架，並分析可變序列的基因座以作為隨機序列及隨機化程度(例如，完全隨機，部分隨機等)。

【0063】基於隨機化策略，本案發明人進一步為V_H結構域的CDR1、CDR2-n、CDR2-c (參見圖2)以及V_H結構域的CDR3 (參見圖3)產生目標多樣化序列(隨機序列，隨機寡核苷酸)。使用V_H結構域的CDR1、CDR2-n、CDR2-c、CDR3以及V_L結構域的CDR3的隨機寡核苷酸產生重組scFv核酸的過程如上所述，並亦顯示於圖4的示意圖中。如圖5中示例性地示出並且在上面更詳細地討論的，構築了一高度多樣性庫。

【0064】使用如圖1-5所述之目標多樣化方案以及產生重組scFv核酸之方法，本案發明人產生一種高度多樣性庫並從該庫中分離出一種重組 α -B7-H4₈₀₁ (α -B7-H4，選殖株編號801)結合物。透過分析尺寸排阻色層分析法在15分鐘內測定重組 α -B7-H4₈₀₁的穩定性，以評估該抗體的任何降解或變形。如圖6所示， α -B7-H4₈₀₁的流洗液顯示一單峰而沒有任何顯著較小的峰值，這表示透過上述方法產生的 α -B7-H4₈₀₁結合物可產生scFv或一具有高穩定性的抗體。

【0065】本案發明人發現重組 α -B7-H4₈₀₁包含與其他市售 α -B7-H4抗體(Rituxan®、LEAF®)基本相似的抗體組成分。透過毛細管電泳十二烷基硫酸鈉(CE-SDS)分析重組 α -B7-H4₈₀₁的片段與二種市售的 α -B7-H4抗體(Rituxan®、LEAF®)。如圖7所示，重組 α -B7-H4₈₀₁抗體與二種市售 α -B7-H4抗體(Rituxan®、LEAF®)片段的CE-SDS分離顯示出二個深峰，每個峰對應輕鏈(中峰)以及糖基化重鏈(右峰)。左峰表示用於CE-SDS分析的一個10 Kd標準標記之位置。

【0066】 本案發明人進一步發現，各種重組 α -B7-H4抗體可顯示與目標配體不同的結合特徵(例如，親和力、特異性等)。圖8所示為二種重組 α -B7-H4抗體， α -B7-H4₈₀₁以及 α -B7-H4₈₁₇，透過平均螢光強度(mean fluorescence intensity, MFI)測量，測試其與表現B7-H4的293T細胞的結合。結果顯示，相較於 α -B7-H4₈₁₇抗體， α -B7-H4₈₀₁抗體對表現B7-H4的293T細胞具有更高的結合親和力，表示不同隨機化的CDR結構域可以對配體產生不同的結合親和力。最右邊的圖顯示了非特異性人類IgG1 (hIgG1)的對照實驗。

【0067】 使用流式細胞儀進一步測試重組 α -B7-H4抗體以確定與抗原呈現細胞(antigen presenting cells, APCs)上表現的配體(B7-H4)的特異性並有效結合。如圖9所示，該重組 α -B7-H4抗體可特異性結合B7-H4配體(將峰與非特異性同種型結合分開)，表示該重組 α -B7-H4抗體具有完全功能。

【0068】 本案發明人還發現，使用表面等離子體共振測定，針對B7-H4的scFv胜肽(scFv B7-H4₈₀₁)與由該scFv B7-H4₈₀₁相同的scFv胜肽產生的重組 α -B7-H4抗體(IgG α -B7-H4₈₀₁)在功能上是相容的。在該測定中，Flag標記的scFv B7-H4₈₀₁透過 α -Flag生物素化抗體固定在表面上，該抗體與表面連接的中性抗生物素蛋白偶聯。然後將該表面固定的scFv B7-H4₈₀₁胜肽與包括B7-H4的分析物接觸。以 α -B7-H4抗體進行類似的測定。如圖10及表3所示，scFv B7-H4₈₀₁以及IgG α -B7-H4₈₀₁顯示出與B7-H4基本相似的親和力及結合特徵，表示它們在功能上是相容的。此外，由於可以在不將胜肽移植到抗體骨架中的情況下直接測量體外轉譯胜肽(scFv)的結合親和力，因此可以有效篩選表現庫中的更多重組scFv核酸。

	Ka	Kd	KD	Res sd
IgG	1.2e ⁶	2.0e ⁻⁴	175 pm	0.391
scFv	1.2e ⁶	1.7e ⁻⁴	141 pm	0.353

第 19 頁，共 23 頁(發明說明書)

表3

【0069】 在V_H的CDR1-3以及V_L的CDR3中具有各種隨機序列盒的一複數個針對B7-H4的scFv胜肽中，本案發明人檢查了特定結構域(特異性隨機序列盒)中的相似性是否可以使scFv胜肽具有與配體結合的相似特徵。檢查五種scFv胜肽(801、802、905、906，以及817)對B7-H4的結合親和力。其中，如表4所示，四種scFv胜肽(選殖株801、802、905、906)具有相似的CDR3序列。在V_H的CDR3中具有相似隨機序列盒的該四種scFv胜肽在25°C以及37°C下顯示出與B7-H4相似的結合親和力(如表5中所示)，表示至少在針對B7-H4的scFv胜肽中，V_H的CDR3中的序列在與配體的結合中可能是關鍵的。

選殖株	CDR1	CDR2	CDR3	CDR L3
801	NSYAMH (SEQ ID NO:26)	AISGNGGSTR (SEQ ID NO:27)	DRFRKVHG (SEQ ID NO:28)	DATFPL (SEQ ID NO:29)
802	GSYAMH (SEQ ID NO:30)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:31)	DLYRRVHG (SEQ ID NO:32)	DYGFPL (SEQ ID NO:33)
905	SSYLMH (SEQ ID NO:34)	VISGSGGSTR (SEQ ID NO:35)	DLYRRVAG (SEQ ID NO:36)	DYALPL (SEQ ID NO:37)
906	SNYAMH (SEQ ID NO:38)	AISGNGGSTH (SEQ ID NO:39)	DRFRRVYG (SEQ ID NO:40)	DYTFPL (SEQ ID NO:41)
817	SSYAMH (SEQ ID NO:42)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:43)	GRWSKWG (SEQ ID NO:44)	TDNFPY (SEQ ID NO:45)

表4

溫度	scFv	ka	kd	K _D
25°C	801	1.20E+06	2.00E-04	174 pM
	802	4.50E+05	2.40E-05	54 pM
	905	4.10E+05	1.20E-04	290 pM

	906	1.70E+05	1.00E-05	59 pM
37°C	801	6.10E+05	7.30E-04	1.2 nM
	802	5.70E+05	5.50E-04	1.0 nM
	905	5.80E+05	9.70E-04	1.7 nM
	906	2.80E+05	3.80E-04	1.4 nM

表5

【0070】 本案發明人還使用該子庫與表現庫產生了一複數種與介白素-8 (IL-8)結合的scFv胜肽(scFv IL-8)，並檢測了在不同條件(溫度及pH)下對IL-8的親和力。在各種條件下測量的示例性scFv IL-8胜肽及其結合親和力顯示於表6中。在表6中所示的選殖株中，選殖株49-7、49-1，以及49-12含有相似的V_H CDR3序列，選殖株49-19、49-37，以及49-25含有相似的V_H CDR3序列。此外，選殖株49-3與43-2含有相似的V_H CDR3序列。與針對B7-H4的scFv胜肽相反，本案發明人發現scFv IL-8胜肽的結合親和力可能不嚴格依賴於V_H的CDR3中隨機序列的相似性。例如，雖然選殖株49-18、49-37以及49-25含有相似的V_H CDR3序列，但這些序列的結合親和力(在K_D X 10⁻⁹ M中測量的單位)介於0.894 X 10⁻⁹ M至25 X 10⁻⁹ M之間變化。

選殖株	計數	25°C	pH 6	25°C	pH 6	37°C
49-31	1/36	0.012	0.0025			
49-22	3/36	0.113	0.328			
49-7	1/36	0.166	0.462			
49-32	1/36	0.239	0.714			
49-34	1/36	0.618	0.342			
49-18	1/36	0.894	2.23			
49-3	4/36	1.26	6.68	2.14	3.14	9.19
43-2	5/16	1.41	1.3	0.79	0.96	0.89
49-37	1/36	1.46	4.01			
43-12	3/16	1.5	11.04			
49-10	6/36	1.65	8.58	2.21	8.7	3.45
49-1	1/36	2.66	6.13			
49-6	1/36	4.8	17.6			
49-12	3/36	10.1	11.9			
49-25	2/36	25	7.26			

表6

【0071】 本案發明人進一步測試了scFv IL-8是否能夠有效地捕捉IL-8，從而透過測量嗜中性白血球大小以中和IL-8的作用。通常，在被IL-8刺激後，嗜中性白血球被擴大(例如，具有更大的直徑等)(如圖11所示)。本案發明人發現，加入重組 α -IL-8抗體(mAb α IL-8₂₀₁，如圖12，左上圖所示)或幾種scFv IL-8胜肽(α IL-8_{#2}、 α IL-8₄₉₋₃、 α IL-8₄₉₋₁₀，如圖12，下圖所示)後，這種IL-8對中性粒細胞增大的作用可以被大量消除，表示該scFv IL-8胜肽可透過與培養基中的游離IL-8結合而有效地中和IL-8之作用。

【0072】 IL-8為一種嗜中性白血球趨化因子，其導致嗜中性白血球朝向IL-8釋放的位點(例如，感染部位)遷移。為了評估scFv IL-8胜肽的功能效果，將嗜中性白血球置於具有一多孔膜的插入物的底部，並置於包含各種濃度的IL-8的培養基中，使得受IL-8吸引的嗜中性白血可以轉移出該插入物而通過該多孔膜朝向該培養基。如圖13所示，遷移的嗜中性白血球的數量隨該培養基中的IL-8濃度增加而增加。有趣的是，加入scFv IL-8胜肽(α IL-8₄₃₋₂)或衍生自一scFv IL-8胜肽(mAb α IL-8₂₀₁)的重組IL-8抗體後，這種IL-8效應幾乎完全消失。

【0073】 圖14所示為使用如本文所示之mRNA展示庫分離的多種scFv的進一步實驗數據。更具體而言，每個數據點代表底部指示的目標的scFv，並確定每個scFv的親和力值。可以容易地看出，(相同的)庫為複數種不同的目標產生了複數種高親和力結合物，其中所有的鍵合物都在次微米莫耳內，且許多在次奈米莫耳親和力的範圍內。此外，本案發明人還研究了在CDR移植到人類IgG上之後是否可以保留scFv的親和力。圖15所示為移植到人類IgG1支架中的選擇的scFv的29個CDR移植實驗的示例性結果。由圖15中的結果可以看出，人源化IgG1抗體保留了高特異性及親和力(通常於一數量級內)。

【0074】對於本領域技術人員應當為顯而易見的是，除了已經描述的那些之外，在不悖離本文之發明構思下，還可進行更多的修改。因此，除了所附之申請專利範圍的範圍之外，本發明的主題不受限制。此外，在解釋說明書及申請專利範圍時，所有術語應以符合上下文之最廣泛的方式進行解釋。特別是，術語“包括(comprises)”以及“包括(comprising)”應被解釋為以非排他性的方式指元素、組件或步驟，指示所引用之元件、組件或步驟可以與未明確引用的其他元素、組件或步驟一起存在、或使用，或組合。如本文的描述及隨後的申請專利範圍中所使用的，除非上下文另有明確說明，“一”、“一個”以及“該”的含義包括複數指示物。此外，如在本文的描述中所使用的，除非上下文另有明確規定，否則“在...中”的含義包括“在...中”以及“在...上”。凡說明書聲明涉及選自由A、B、C ... 以及N所組成之群組中的至少一種某物，該內文應該被解釋為僅需該群組中的一個元素，而非A加N，或B加N等。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 南特生物科學股份有限公司 NantBio Inc.

<120> 具有複數個核酸庫的組成物

<130> 102538.0050PCT

<150> US62/588,914

<151> 2017-11-20

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的人工序列

<400> 1

ggcttaggtc tcatttcrvt agttacgcta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的人工序列

<400> 2

ggcttaggtc tcatttctct rvktacgcta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 3

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的人工序列

<400> 3

ggcttaggtc tcatttctct agttackkga tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 4

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1的人工序列

<400> 4

ggcttaggtc tcatttctct agttacwmta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210>	5	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR1的人工序列	
<400>	5	
ggcttaggtc tcatttctct agttacgcta tgavttgggc gagacgaggt ctgaacgg		58
<210>	6	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-n的人工序列	
<400>	6	
ggcttaggtc tcgttcathc attagtggta gtggacgaga cgaggtctga acgg		54
<210>	7	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-n的人工序列	
<400>	7	
ggcttaggtc tcgttcavkt attagtggta gtggacgaga cgaggtctga acgg		54
<210>	8	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-n的人工序列	
<400>	8	
ggcttaggtc tcgttcagct attyggggta gtggacgaga cgaggtctga acgg		54
<210>	9	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-n的人工序列	
<400>	9	
ggcttaggtc tcgttcagct attdatggta atggacgaga cgaggtctga acgg		54

<210>	10	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-n的人工序列	
<400>	10	
ggcttaggtc tcgttcagct attagtwmta gtggacgaga cgaggtctga acgg		54
<210>	11	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-n的人工序列	
<400>	11	
ggcttaggtc tcgttcagct attagtkgga gtggacgaga cgaggtctga acgg		54
<210>	12	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-n的人工序列	
<400>	12	
ggcttaggtc tcgttcagct attagtggtr rtggacgaga cgaggtctga acgg		54
<210>	13	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-c的人工序列	
<400>	13	
ggcttaggtc tcgtggarvk agtacttact acgcgagacg aggtctgaac gg		52
<210>	14	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VH CDR2-c的人工序列	
<220>		
<221>	雜項_特徵	
<222>	(21)..(21)	
<223>	n is a, c, g, or t	

<400> 14	
ggcttaggtc tcgtggaggt natacttact acgcgagacg aggtctgaac gg	52
<210> 15	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VH CDR2-c的人工序列	
<400> 15	
ggcttaggtc tcgtggaggt rvaacttact acgcgagacg aggtctgaac gg	52
<210> 16	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VH CDR2-c的人工序列	
<400> 16	
ggcttaggtc tcgtggaggt agtactvrtt acgcgagacg aggtctgaac gg	52
<210> 17	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列 for VH CDR3	
<220>	
<221> 雜項_特徵	
<222> (24)..(25)	
<223> n is a, c, g, or t	
<220>	
<221> 雜項_特徵	
<222> (27)..(27)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 17	
ggcttaggtc tctccgtgrt ckennkngst ttcgcgagac gaggtctgaa cgg	53
<210> 18	
<211> 58	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VL CDR3的人工序列	
<400> 18	
ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtdsgc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg	58

<210> 19
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<400> 19
ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtdsgc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

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

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<220>
<221> 雜項_特徵
<222> (27)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 20
ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtnwtc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 21
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<220>
<221> 雜項_特徵
<222> (27)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 21
ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtnwtc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 22
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<400> 22
ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtdsgc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 23

<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<400> 23
ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtdsgc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 24
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<220>
<221> 雜項_特徵
<222> (27)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 24
ggcttaggtc tctgcagds g dmtrvtnwtc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 25
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL CDR3的人工序列

<220>
<221> 雜項_特徵
<222> (27)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 25
ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtnwtc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株801 CDRH1

<400> 26

Asn Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 27

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株801 CDRH2

<400> 27

Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Arg
1 5 10

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株801 CDRH3

<400> 28

Asp Arg Phe Arg Lys Val His Gly
1 5

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株801 CDRL3

<400> 29

Asp Ala Thr Phe Pro Leu
1 5

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株802 CDRH1

<400> 30

Gly Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株802 CDRH2

<400> 31

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株802 CDRH3

<400> 32

Asp Leu Tyr Arg Arg Val His Gly
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株802 CDRL3

<400> 33

Asp Tyr Gly Phe Pro Leu
1 5

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株905 CDRH1

<400> 34

Ser Ser Tyr Leu Met His
1 5

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株905 CDRH2

<400> 35

Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg
1 5 10

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株905 CDRH3

<400> 36

Asp Leu Tyr Arg Arg Val Ala Gly
1 5

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株905 CDRL3

<400> 37

Asp Tyr Ala Leu Pro Leu
1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株906 CDRH1

<400> 38

Ser Asn Tyr Ala Met His
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株906 CDRH2

<400> 39

Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr His
1 5 10

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株906 CDRH3

<400> 40

Asp Arg Phe Arg Arg Val Tyr Gly
1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株906 CDRL3

<400> 41

Asp Tyr Thr Phe Pro Leu
1 5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株817 CDRH1

<400> 42

Ser Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株817 CDRH2

<400> 43

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg
1 5 10

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株817 CDRH3

<400> 44

Gly Arg Trp Ser Lys Trp Gly

1

5

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 選質株817 CDRL3

<400> 45

Thr	Asp	Asn	Phe	Pro	Tyr
1				5	

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種具有複數個核酸庫的組成物，包括：

(1) 一 V_H -CDR1/2子庫、(2) 一複數個 V_H -CDR3子庫，以及
(3) 一 V_L 子庫，其中該子庫(1)-(3)中的每一個包括複數個成員；

其中該 V_H -CDR1/2子庫的至少一成員包括根據SEQ ID NO:1-16的任一的一隨機序列盒；

其中該 V_H -CDR3子庫的至少一成員包括根據SEQ ID NO:17的一隨機序列盒；

其中該 V_L -CDR3子庫的至少一成員包括根據SEQ ID NO:18-25的任一的一隨機序列盒。

【請求項2】 如請求項1所述的組成物，其中該子庫的每一個成員更包括一核酸序列，該核酸序列編碼一彈性胜肽連接子。

【請求項3】 如請求項1所述的組成物，其中該複數個 V_H -CDR3子庫的第一個具有不同於複數個 V_H -CDR3子庫的第二個的一長度。

【請求項4】 如請求項1所述的組成物，其中該子庫的每一個成員包括具有複數個簡併鹼基位置的至少一隨機盒，且其中該複數個簡併鹼基位置為至少兩個簡併鹼基位置。

【請求項5】 如請求項1所述的組成物，其中該 V_H -CDR1/2子庫的該複數個成員包含對應於 V_H CDR1的至少一部分以及 V_H CDR2的一部分的一隨機盒。

- 【請求項6】 如請求項1所述的組成物，其中該V_H-CDR1/2子庫的該複數個成員包含對應於V_H CDR1的至少一部分以及V_H CDR2的一部分的複數個隨機盒。
- 【請求項7】 如請求項1所述的組成物，其中該V_H-CDR1/2子庫的該複數個成員包含對應於V_H CDR2的至少一部分的複數個隨機盒。
- 【請求項8】 如請求項1所述的組成物，其中該V_H-CDR3子庫的複數個成員包括對應於V_H CDR3的至少一部分的一隨機盒。
- 【請求項9】 如請求項1所述的組成物，其中該V_L子庫的該複數個成員包含V_L CDR3的一部分處的一隨機盒。
- 【請求項10】 如請求項1所述的組成物，其中該V_H-CDR3子庫的成員的至少兩個隨機盒編碼具有不同長度的胜肽。
- 【請求項11】 如請求項10所述的組成物，其中該胜肽具有10至20個胺基酸的長度。
- 【請求項12】 如請求項1所述的組成物，其中該子庫的該複數個成員包括一共通序列。
- 【請求項13】 如請求項1所述的組成物，更包括具有複數個V_H結構域庫成員的一V_H結構域庫，其中該V_H結構域庫中的每一個包括V_H-CDR1/2子庫的至少一部分成員以及V_H-CDR3子庫的至少一部分成員。
- 【請求項14】 如請求項1至13中任一項所述的組成物，其用於產生一高度多樣性核酸庫。

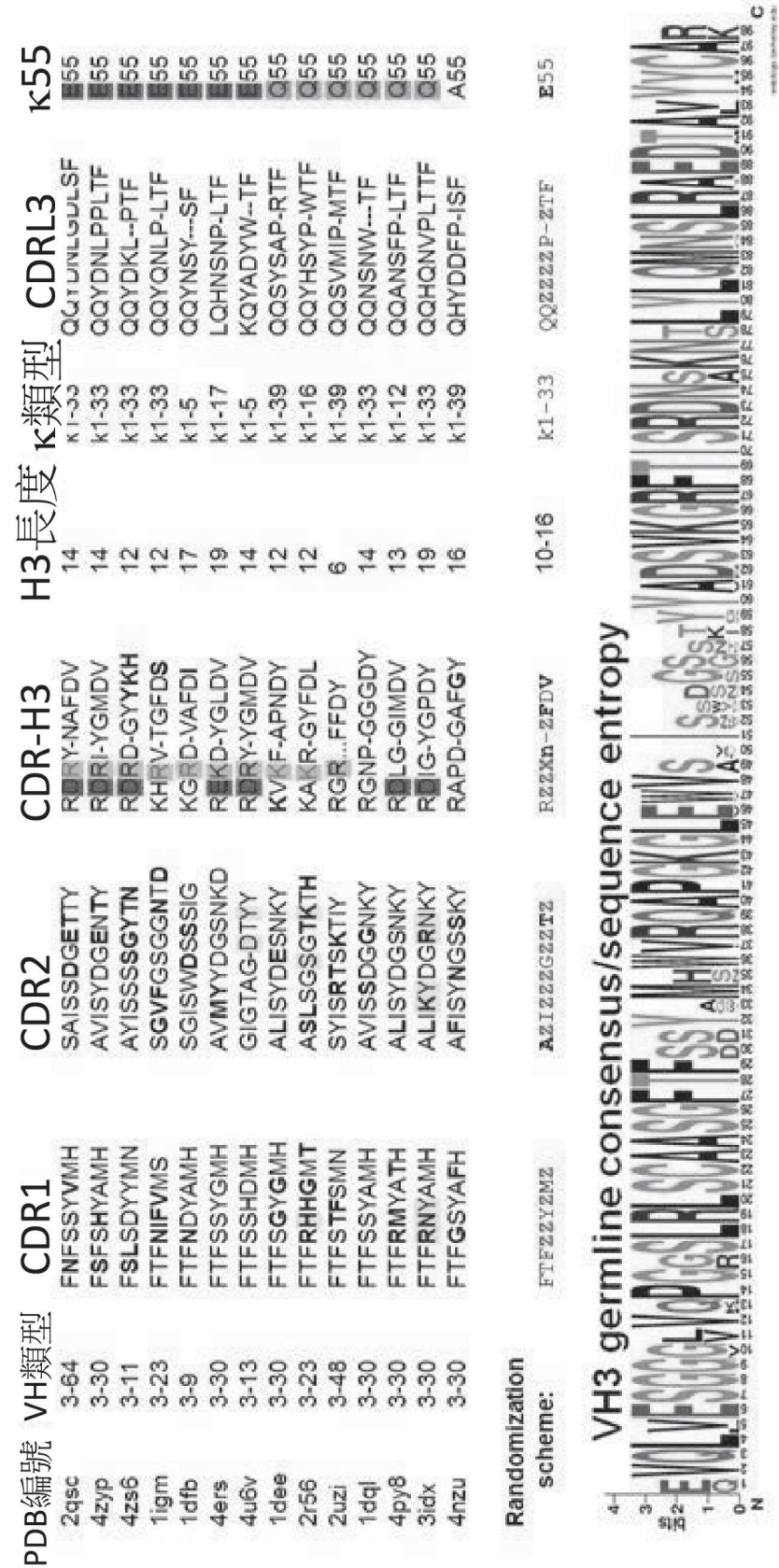
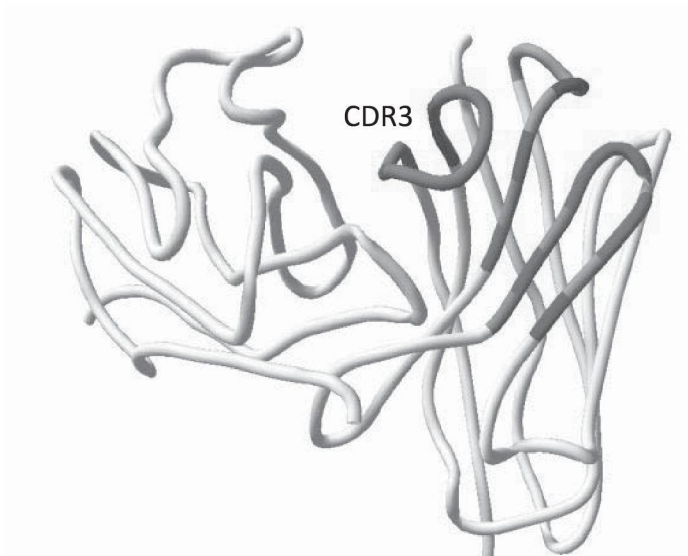


圖1



深灰色 = 固定CRD位置
紅色 = 半隨機
藍色 = 全長隨機化

CDR1 and 2

• CDR1

GGCTTA GGTCTC A TTTC	RVTAGTTACGCTATGCAT	TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=TANDSG
GGCTTA GGTCTC A TTTC	TCTRVKTACGCTATGCAT	TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=TANKDESRG
GGCTTA GGTCTC A TTTC	TCTAGTTACKKGATGCAT	TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=GWL V
GGCTTA GGTCTC A TTTC	TCTAGTTACWMTATGCAT	TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=SYTN
GGCTTA GGTCTC A TTTC	TCTAGTTACGCTATGAVT	TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=STN

• CDR2-n

GGCTTA GGTCTC G TTCA	THCATTAGTGGTAGTGGA	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=YFS
GGCTTA GGTCTC G TTCA	VKTATTAGTGGTAGTGGA	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=VGISLR
GGCTTA GGTCTC G TTCA	GCTATTYGGGGTAGTGGA	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=WR
GGCTTA GGTCTC G TTCA	GCTATTDATGGTAATGGA	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=YND+N53
GGCTTA GGTCTC G TTCA	GCTATTAGTWMTAGTGGA	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=YSTN
GGCTTA GGTCTC G TTCA	GCTATTAGTKGGAGTGGA	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=WG
GGCTTA GGTCTC G TTCA	GCTATTAGTGGTERRTGGA	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=DGSN

• CDR2-c

GGCTTA GGTCTC G TGGG	RVKAGTACTTAC TACG	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=STGANKDE
GGCTTA GGTCTC G TGGG	GGTNATACTTAC TACG	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=YNDH
GGCTTA GGTCTC G TGGG	GGTRVAECTTAC TACG	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=TKREAG
GGCTTA GGTCTC G TGGG	GGTAGTACTVRT TACG	C GAGACG AGGTCTGAACGG	X=DGN SHR

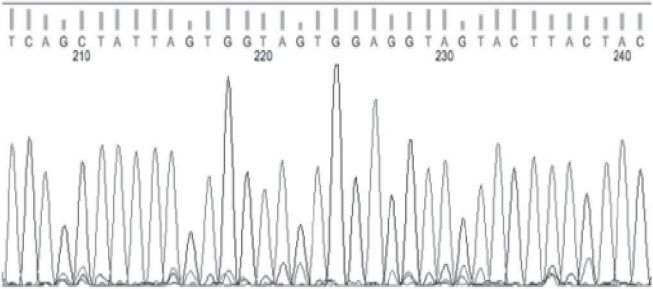
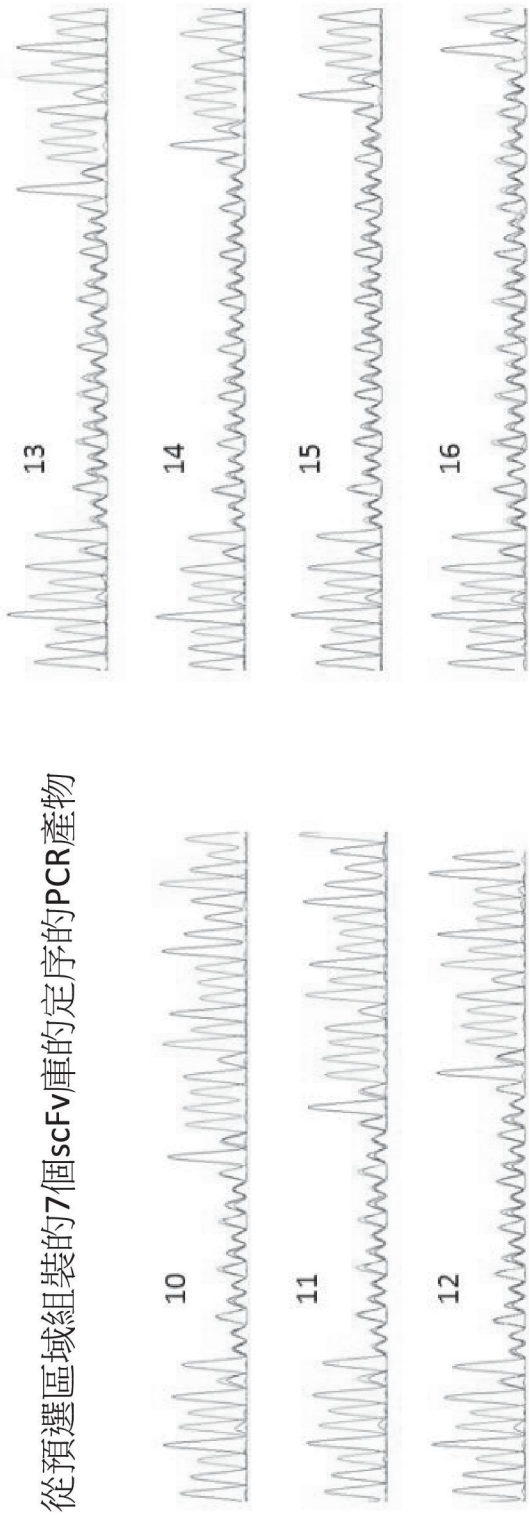


圖2

從預選區域組裝的7個scFv庫的定序的PCR產物



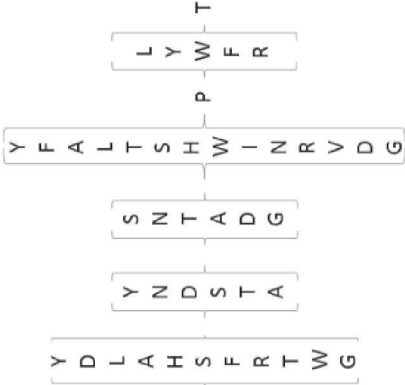
CDR3長度	Bsal	G/D	R/L	Xaa	G/A	BsmBI	重複度	
							DNA	蛋白質
10	GGCTTA GGTCTC T CCGT	GRT CKC	(NNK) 4	GST	TTCG C GAGACG AGGTCCTGAACGG	8x10 ⁶	1x10 ⁶	
11	GGCTTA GGTCTC T CCGT	GRT CKC	(NNK) 5	GST	TTCG C GAGACG AGGTCCTGAACGG	3x10 ⁸	3x10 ⁷	
12	GGCTTA GGTCTC T CCGT	GRT CKC	(NNK) 6	GST	TTCG C GAGACG AGGTCCTGAACGG	9x10 ⁹	5x10 ⁸	
13	GGCTTA GGTCTC T CCGT	GRT CKC	(NNK) 7	GST	TTCG C GAGACG AGGTCCTGAACGG	3x10 ¹¹	1x10 ¹⁰	
14	GGCTTA GGTCTC T CCGT	GRT CKC	(NNK) 8	GST	TTCG C GAGACG AGGTCCTGAACGG	9x10 ¹²	2x10 ¹¹	
15	GGCTTA GGTCTC T CCGT	GRT CKC	(NNK) 9	GST	TTCG C GAGACG AGGTCCTGAACGG	3x10 ¹⁴	4x10 ¹²	
16	GGCTTA GGTCTC T CCGT	GRT CKC	(NNK) 10	GST	TTCG C GAGACG AGGTCCTGAACGG	9x10 ¹⁵	8x10 ¹³	

圖3

CDR L3

RANDL3-1
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT DSG CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCGACGG
RANDL3-2
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT DSG CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCGACGG
RANDL3-3
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT NWT CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCGACGG
RANDL3-4
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT NWT CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCGACGG
RANDL3-5
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT DSG CCT YRG ACTT C GAGACG AGGTCGACGG
RANDL3-6
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT DSG CCT YRG ACTT C GAGACG AGGTCGACGG
RANDL3-7
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT NWT CCT YRG ACTT C GAGACG AGGTCGACGG
RANDL3-8
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT NWT CCT YRG ACTT C GAGACG AGGTCGACGG

Q Q



(反向互補)

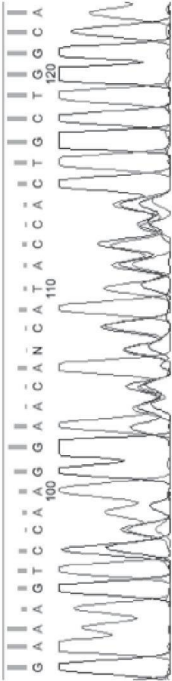


圖4

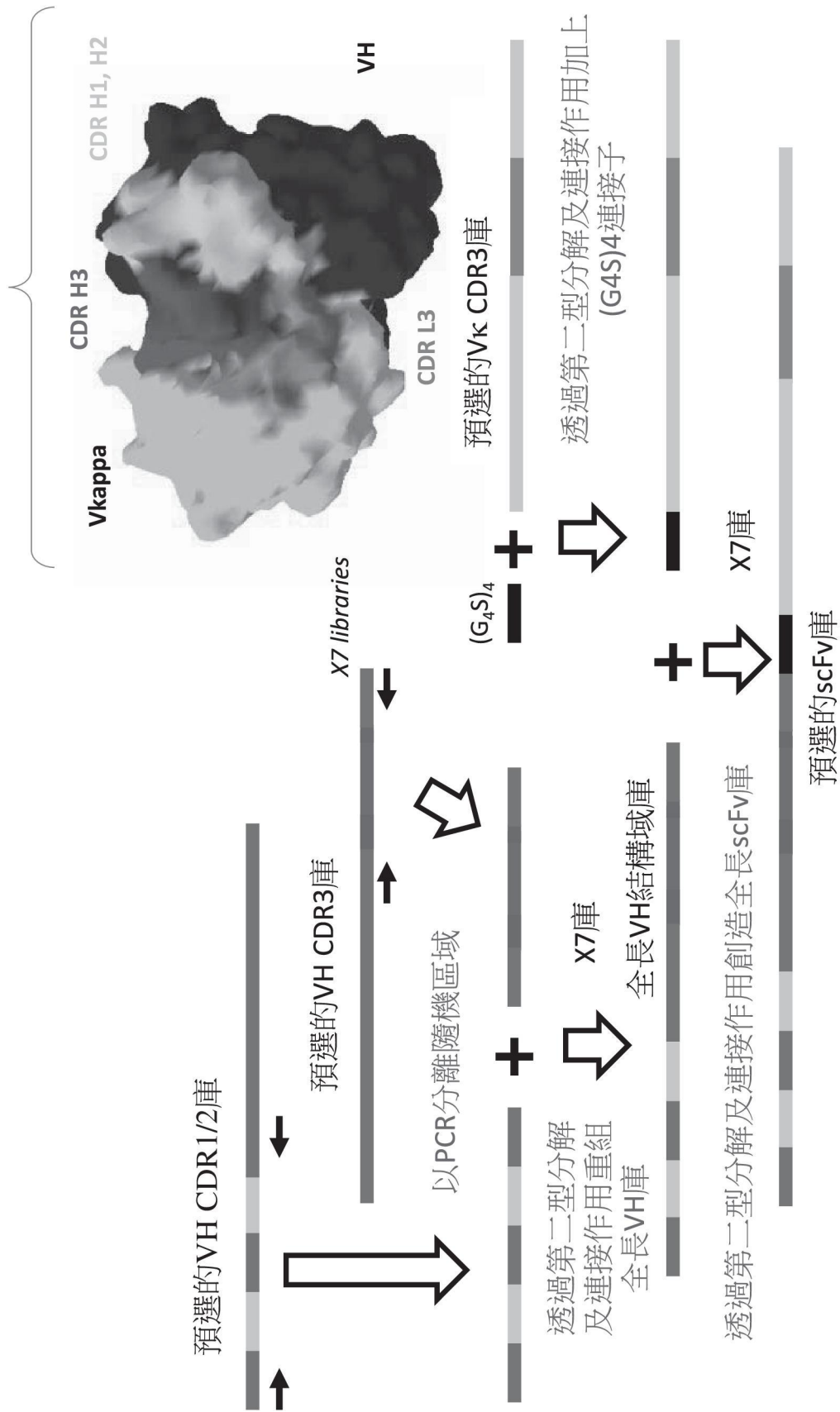
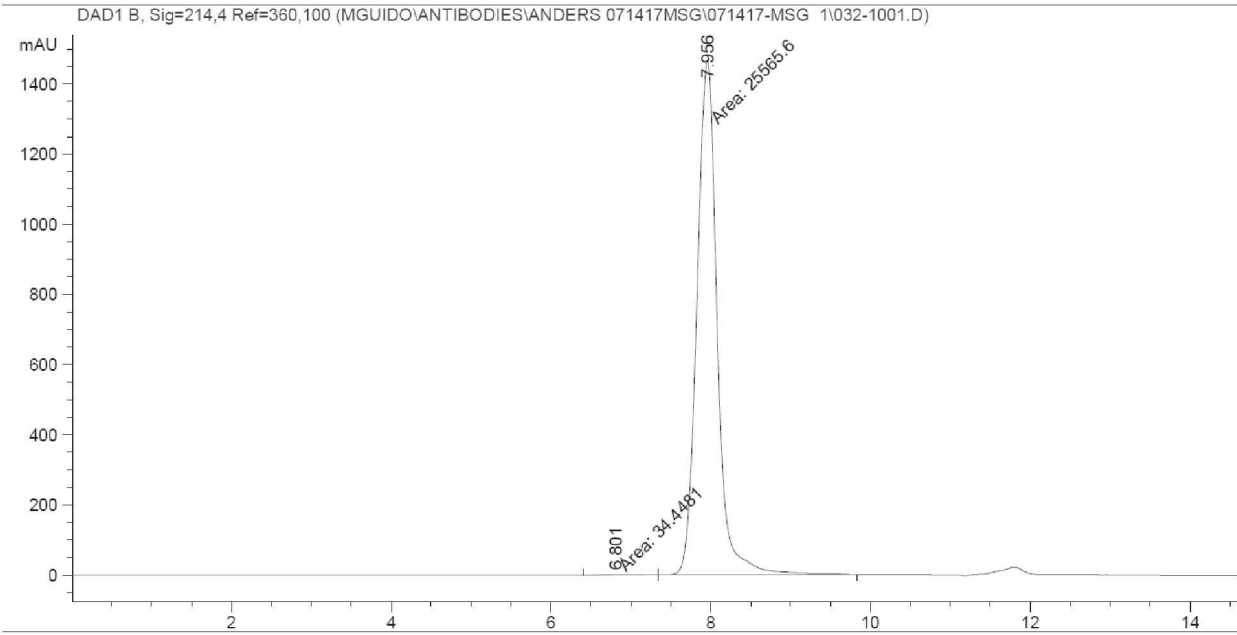


圖5



峰編號	延遲時間 [分鐘]	類型	寬度 [分鐘]	區域 [mAU*s]	高度 [mAU]	區域%
1	6.719	MF	0.4504	49.97571	1.84921	0.1062
2	7.911	FM	0.3160	4.69964e4	2478.48633	99.8938

圖6

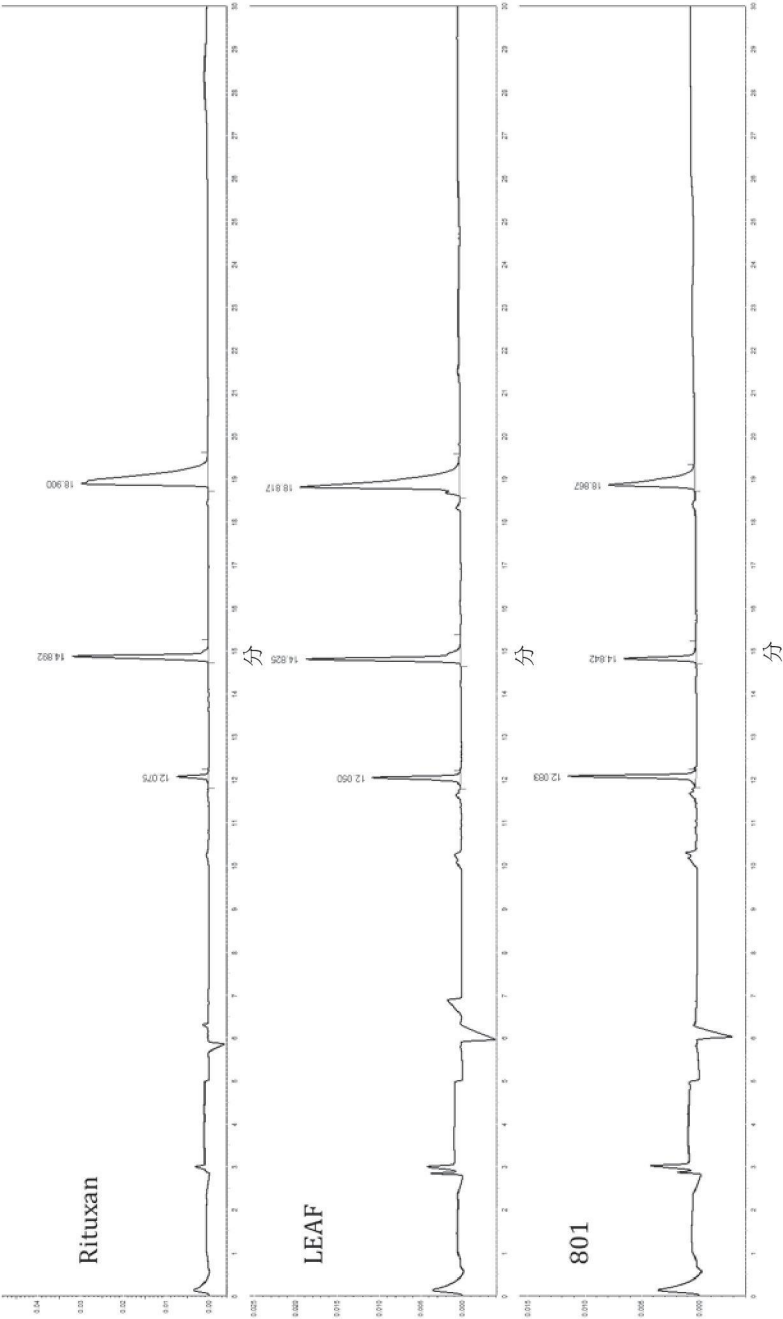


圖7

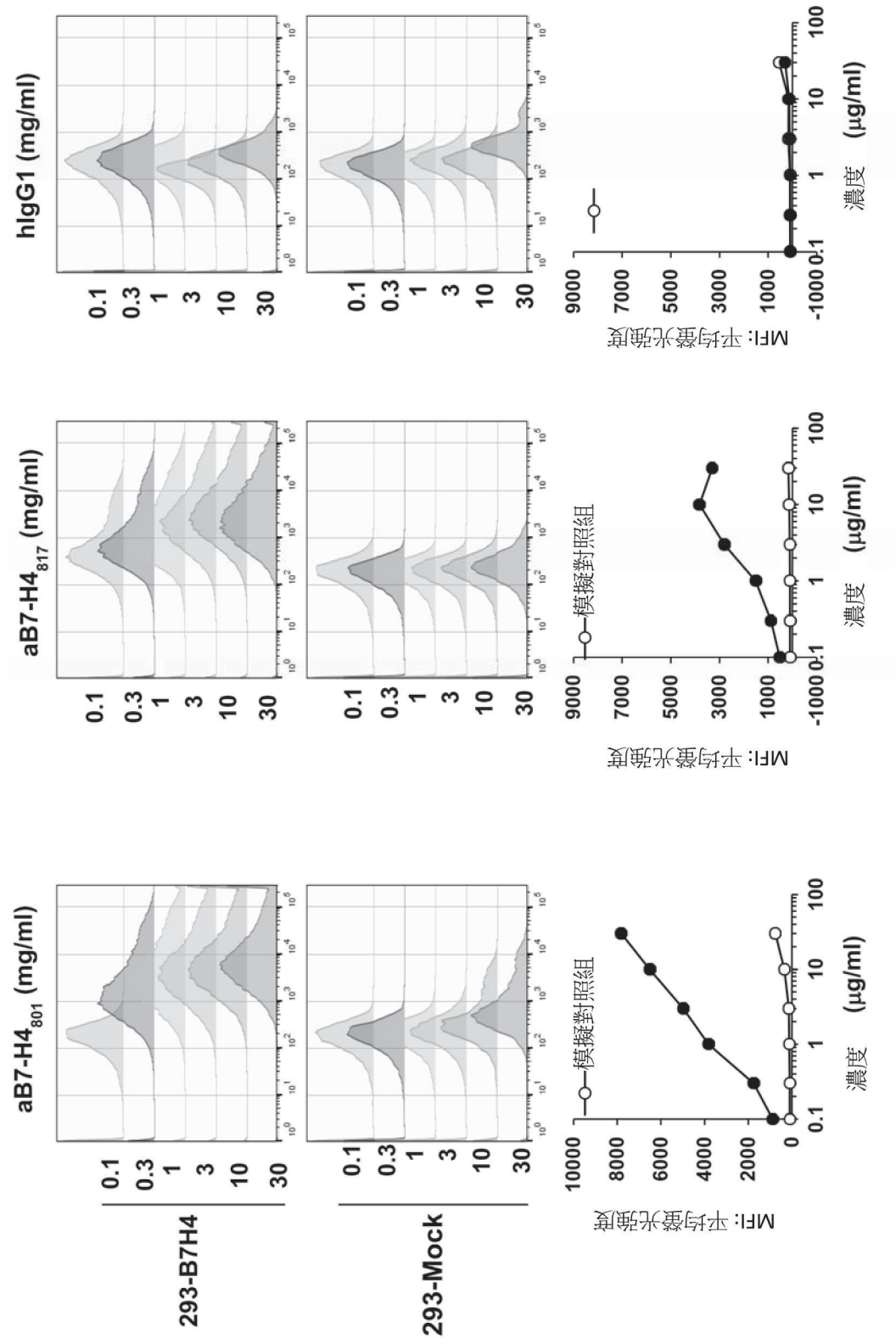


圖8

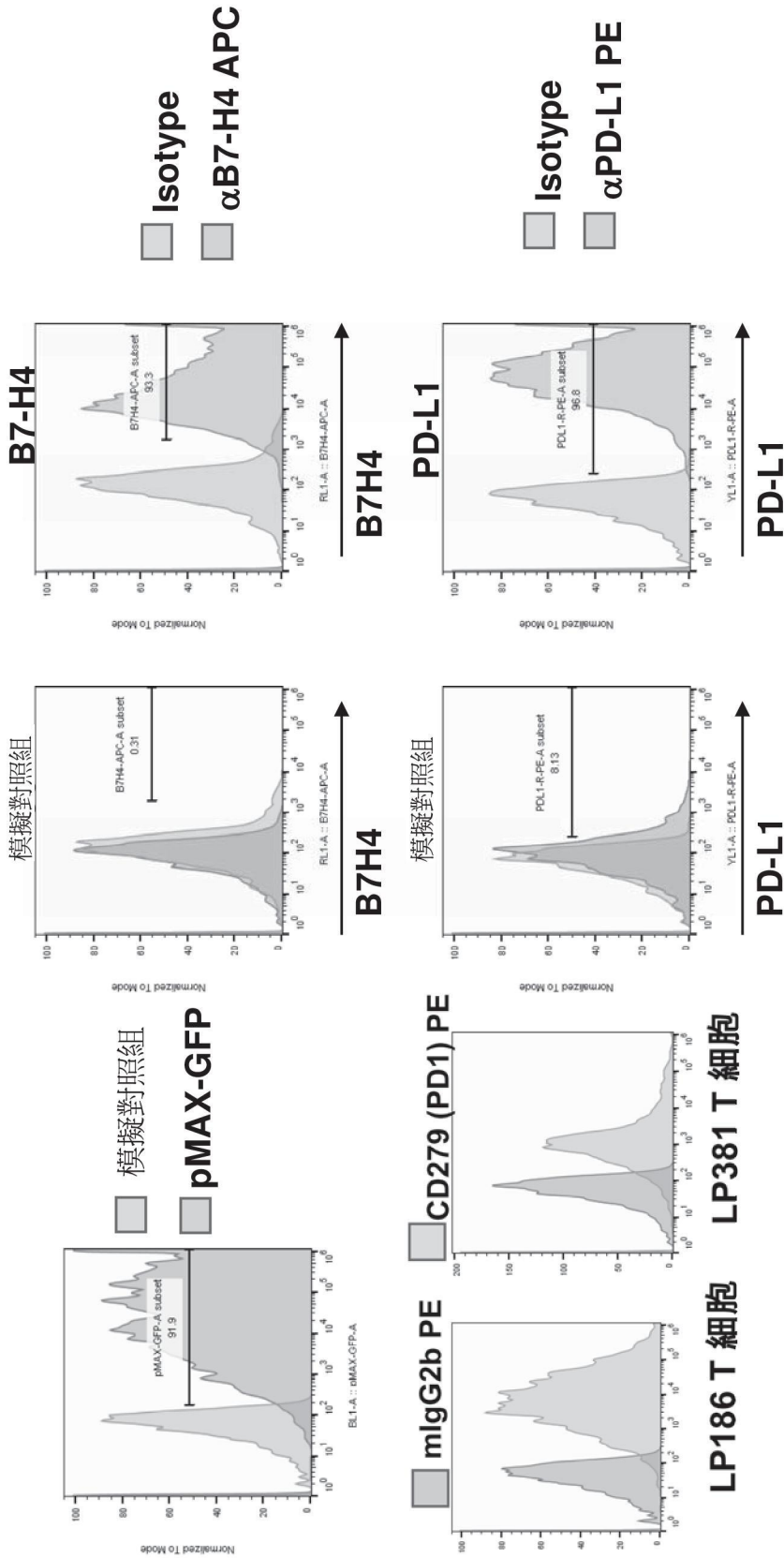


圖9

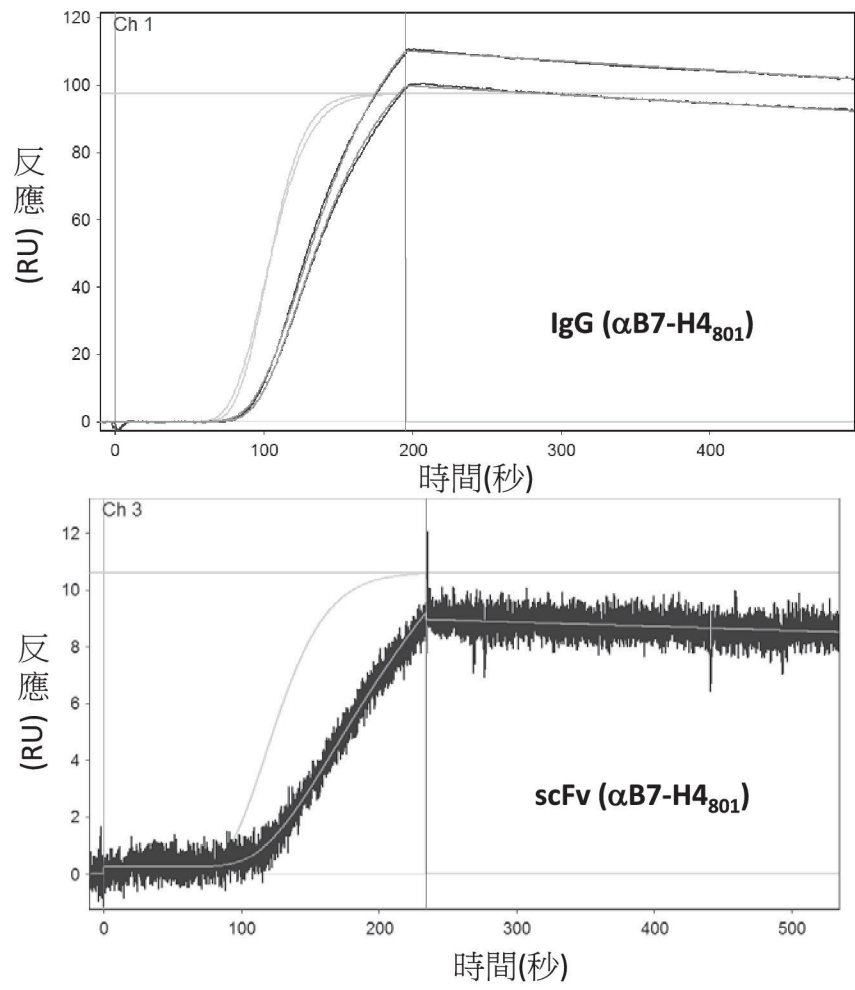


圖10

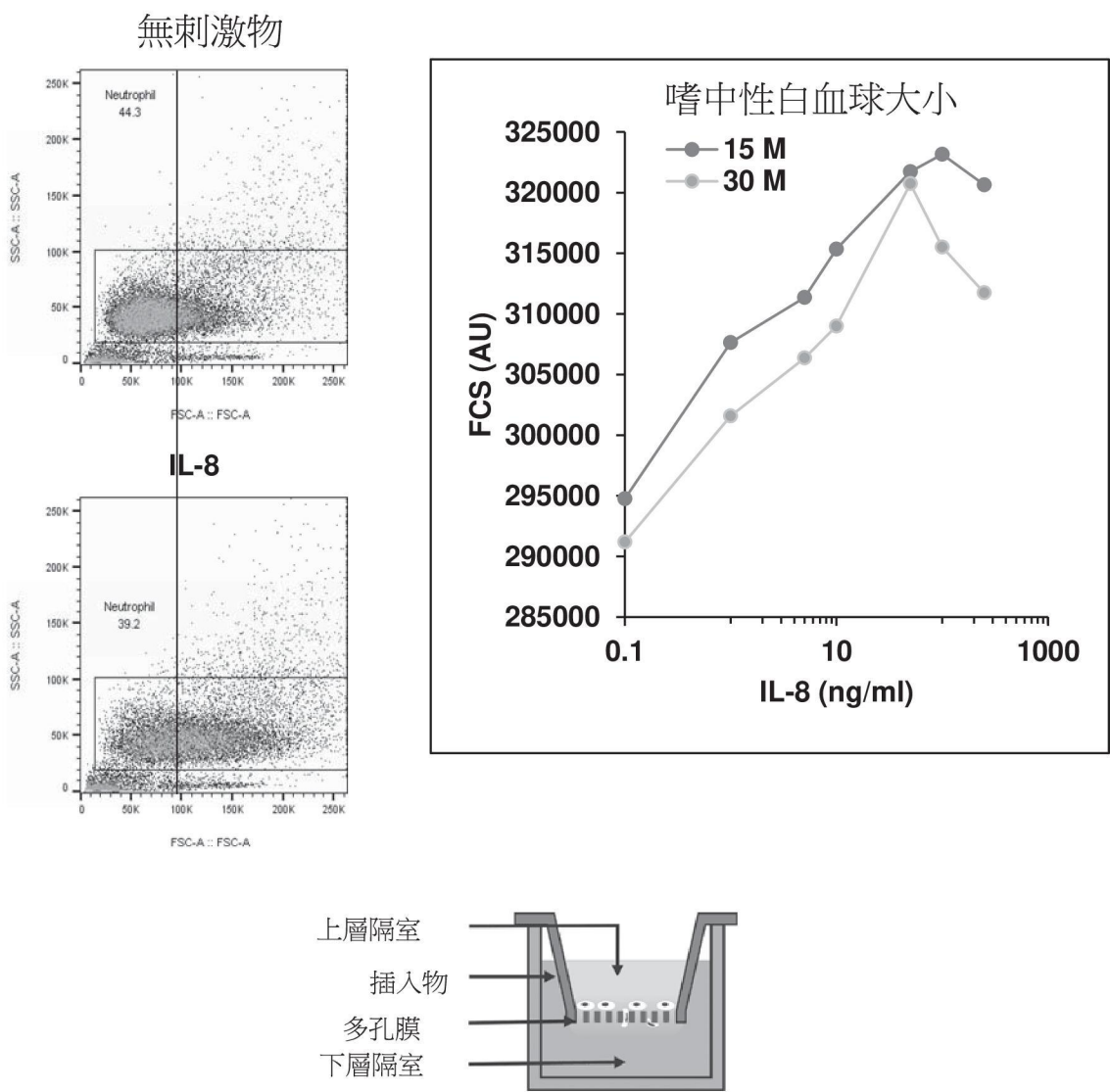


圖 11

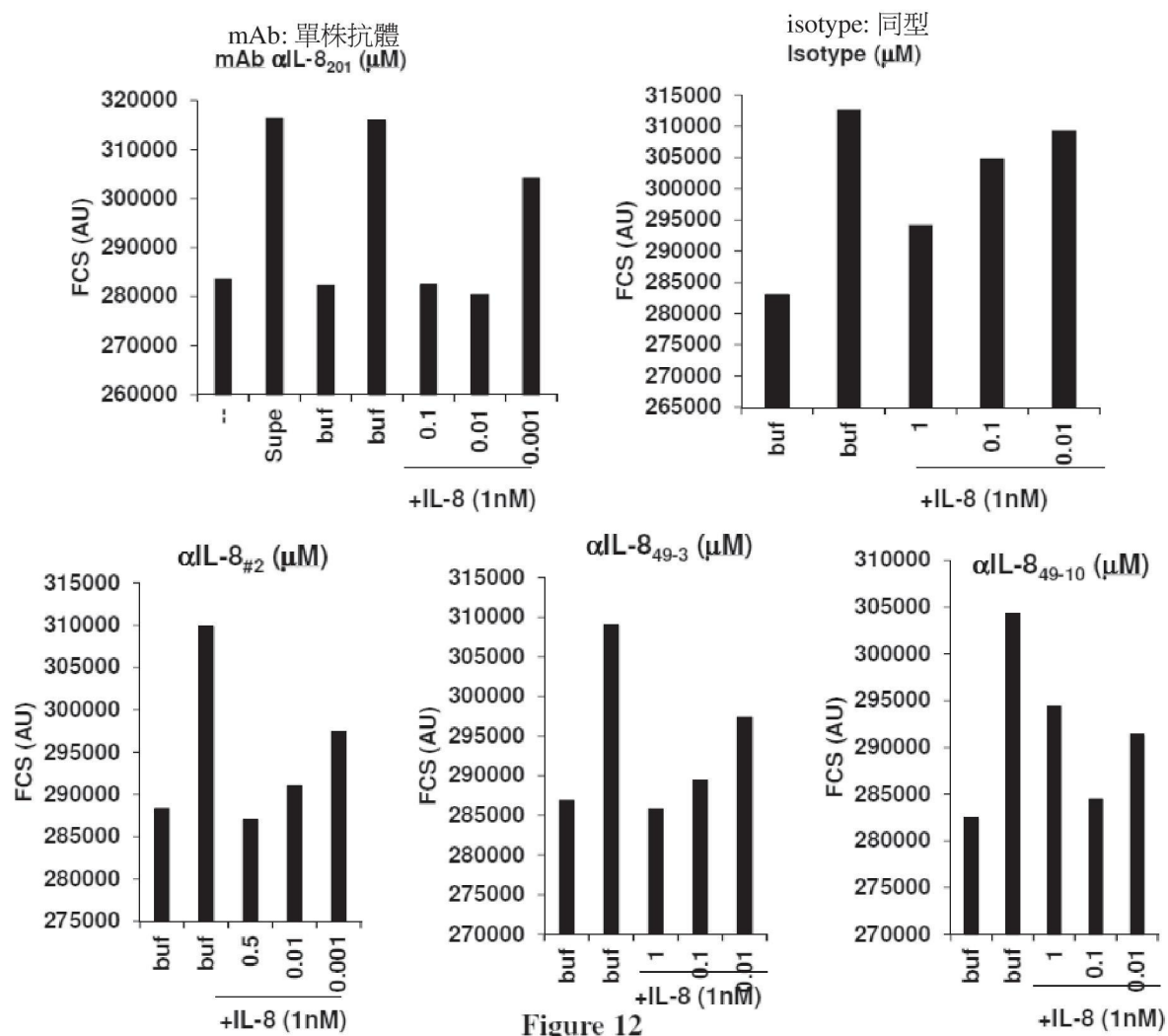


圖12

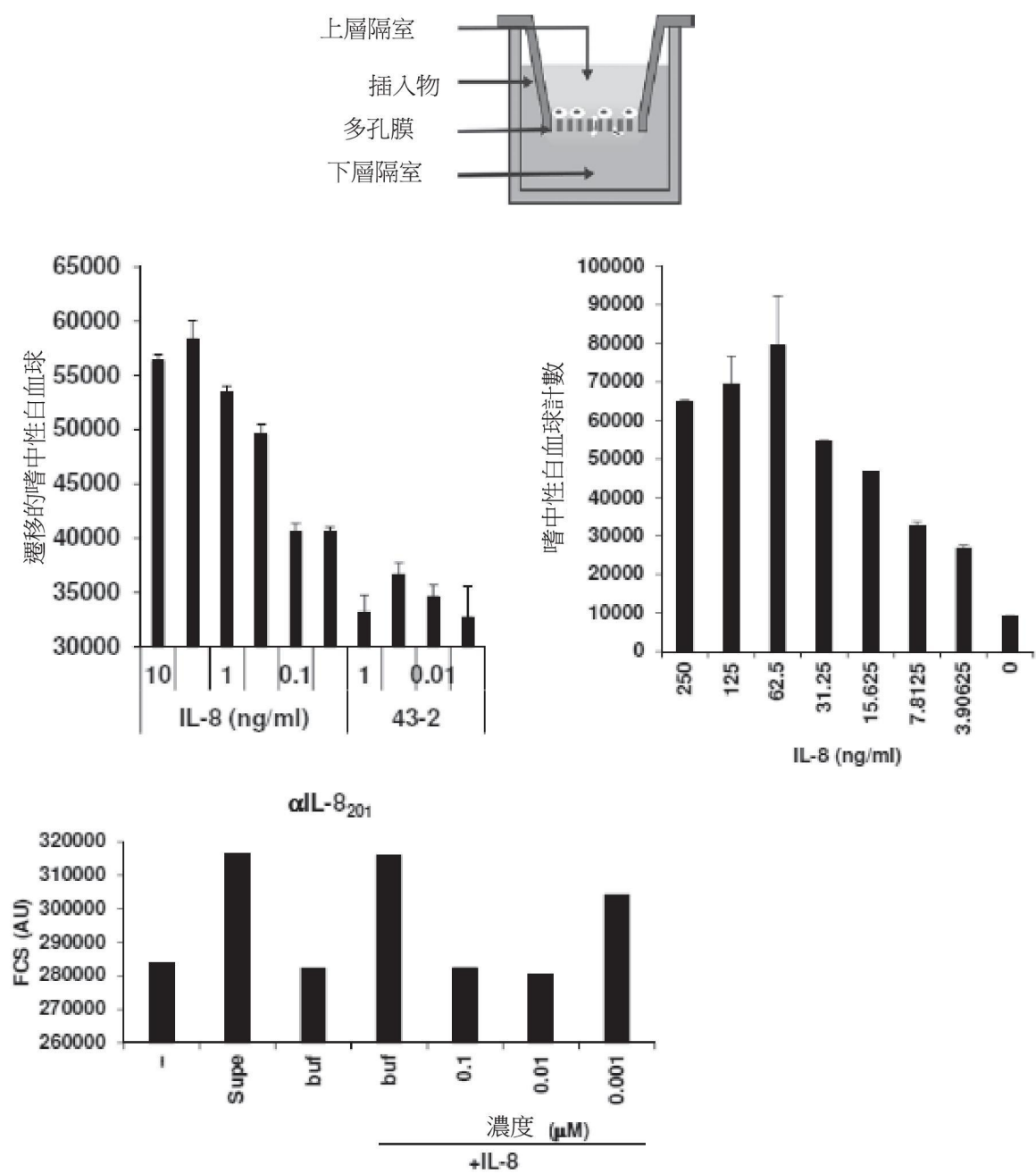


圖13

以SPR從體外scFv表現篩選Kd

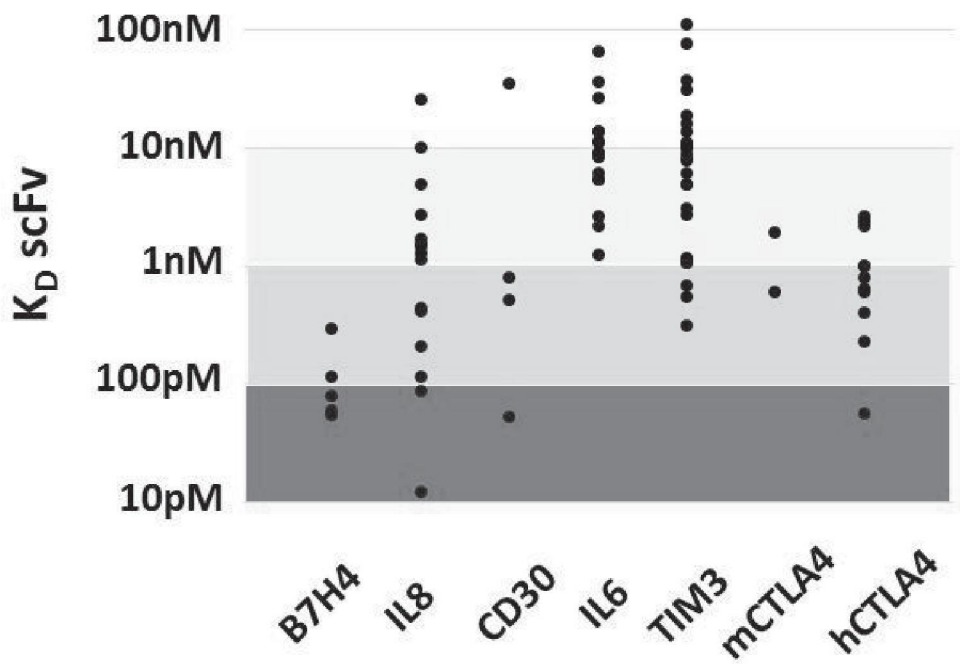


圖14

IgG1轉化：至目前為止測試的所有29個點擊都是有效的

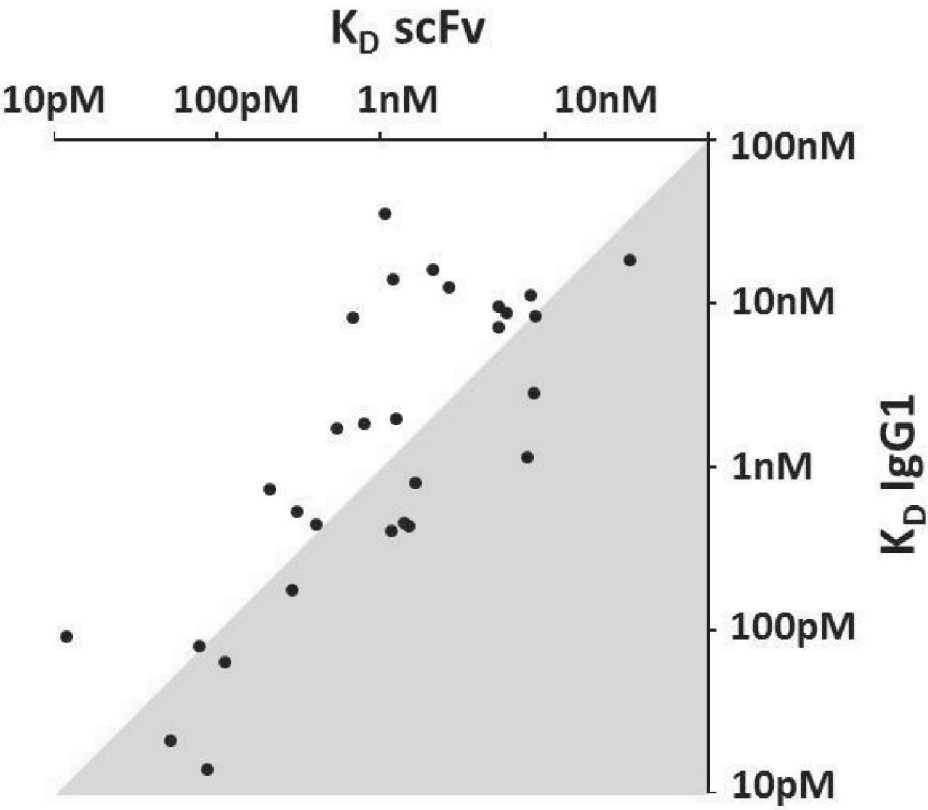


圖15