



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102227440 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 26

(21) 申请号 200980147724. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 09. 30

C07H 21/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C40B 40/08 (2006. 01)

61/101483 2008. 09. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/059059 2009. 09. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02010/039852 EN 2010. 04. 08

(71) 申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 C-M. 谢 Y. A. 库茨科瓦

J. E. 梅莫特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 权陆军 郭文洁

权利要求书 2 页 说明书 60 页 附图 28 页

(54) 发明名称

改良的抗体文库

(57) 摘要

本发明的特征在于改良的体外 RNA 展示文库, 以允许从表达文库中可靠表达和选择 scFv 抗体分子。本发明的 scFv 抗体文库包含最优化的、缩短的结构域间接头, 其改善表达 scFv 抗体表达。scFv 抗体文库还包括短核酸条形码, 其允许鉴定个别文库克隆、文库或其亚群。还提供了用于生成、扩增且对本发明的 scFv 抗体文库进行谱型分析的引物。

1. 一种寡核苷酸,其由如 SEQ ID NOs :1-14、19-42、和 58-210 的任何一个中所示的核酸序列组成。

2. 一种寡核苷酸,其由如 SEQ ID NOs :14-16、和 43-57 的任何一个中所示的核酸序列组成。

3. 一种寡核苷酸,其由如 SEQ ID NOs :17 或 18 中所示的核酸序列组成。

4. 前述权利要求中的任何序列用于文库扩增、文库逆转录和 / 或文库谱型分析的用途。

5. 一种用于表达单链抗体(scFv)的核酸文库,所述文库包括编码重链可变结构域和轻链可变结构域的序列谱,其中所述文库的每个成员包含可读框,所述可读框包括重链可变结构域、轻链可变结构域和接头区域,并且其中所述文库使用权利要求 1 的一种或多种寡核苷酸生成。

6. 权利要求 5 的文库,其中所述接头区域编码小于 20 个氨基酸。

7. 权利要求 5 的文库,其中所述接头区域编码 15 个氨基酸。

8. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括与可读框可操作地连接的启动子。

9. 权利要求 8 的文库,其中所述启动子是选自 T7、SP6 和 T3 的启动子。

10. 权利要求 9 的文库,其中所述启动子是 T7 启动子。

11. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括能够增强它与之可操作地连接的基因转录的 5' 非翻译区(5' UTR)。

12. 权利要求 11 的文库,其中所述 5' UTR 是烟草花叶病毒 5' UTR 或其活性片段。

13. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括聚腺嘌呤序列。

14. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括核酸条形码。

15. 权利要求 14 的文库,其中所述核酸条形码包括 8 个核苷酸。

16. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括编码附加表位的核酸序列。

17. 权利要求 16 的文库,其中所述附加表位是 FLAG 标记。

18. 权利要求 16 的文库,其中所述核酸序列是所述 scFv 的接头区域的部分。

19. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括编码抗体恒定区或其片段的核酸序列。

20. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括核糖体中止序列。

21. 权利要求 5 的文库,其中所述文库的每个成员进一步包括肽接纳体。

22. 权利要求 21 的文库,其中所述肽接纳体经由包括补骨脂素 C6 分子的接头共价附着。

23. 权利要求 22 的文库,其中所述接头是 5' (补骨脂素 C6) 2' Ome (U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (嘌呤霉素),其中 X 是三甘醇接头或 PEG-150,并且 CC 是 DNA 主链。

24. 一种产生用于表达单链抗体(scFv)的核酸文库的方法,其包括:

提供核酸组合物,其中所述组合物中的至少部分核酸包括编码抗体可变结构域的至少一个可读框;和,

使用权利要求 1 的一种或多种寡核苷酸扩增多个抗体可变结构域。

25. 一种用于对包括至少一个可读框的核酸进行谱型分析的方法,所述可读框编码抗体可变结构域,所述方法包括:

提供核酸组合物,其中所述组合物中的至少部分核酸包括编码抗体可变结构域的至少一个可读框;和,

使用权利要求 2 的一种或多种寡核苷酸扩增所述可变结构域的 CDR3 区。

改良的抗体文库

[0001] 相关申请

本申请要求于 2008 年 9 月 30 日提交的美国临时申请号 61/101,483 的优先权,其内容在此引入作为参考。

发明领域

[0002] 本发明涉及改良的抗体文库以及用于制备其的方法和材料。

[0003] 发明背景

以高特异性和亲和力与几乎任何结构表位结合的抗体常规用作研究工具和 FDA 批准的治疗剂。因此,治疗用和诊断用单克隆抗体构成全世界数十亿美元的市场。

[0004] 使动物免疫接种以获得抗体的传统方法是缓慢且麻烦的。因此,已开发了使用合成抗体文库用于先体外后体内选择针对所需靶分子的抗体的几种方法。在一些方法中,抗体或其片段的文库展示在生物(例如,酵母细胞、细菌细胞或哺乳动物细胞)或亚显微因子(例如,噬菌体或病毒)的表面上,并且就所需抗体的表达选择生物或亚显微因子。在其他方法中,在无细胞体外系统中表达且选择抗体文库。目前的体外表达系统尽管善于表达单个抗体可变结构域,但在表达多结构域抗体例如单链抗体(scFv)分子方面无效。这是由于目前的 scFv 抗体文库的结构和目前的体外表达系统的反应条件。

[0005] 因此,本领域需要改良的抗体文库用于选择针对所需靶的 scFv 抗体。

[0006] 发明概述

本发明通过提供改良的体外展示 RNA 文库以允许可靠表达和选择 scFv 抗体分子解决了前述问题。

[0007] 本发明具有几个优点,这包括但不限于下述:

- 提供包含最优化的结构域间接头用于改善表达的改良的体外展示 scFv 抗体文库;
- 提供包含短核酸条形码(barcodes)的改良的体外展示 scFv 抗体文库;
- 提供引物以生成改良的体外展示 scFv 抗体文库;
- 提供引物以对本发明文库中的 scFv 抗体分子的重链可变区的 CDR3 区进行谱型分析(spectratype);和
- 制备改良的体外展示文库的方法。

[0008] 在一个方面,本发明提供了由如 SEQ ID NOs:1-14、19-42、和 58-210 的任何一个中所示的核酸序列组成的寡核苷酸。在另一个方面,本发明提供了包括如 SEQ ID NOs:1-14、19-42、和 58-210 的任何一个中所示的核酸序列的寡核苷酸。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了由如 SEQ ID NOs:14-16、和 43-57 的任何一个中所示的核酸序列组成的寡核苷酸。在另一个方面,本发明提供了包括如 SEQ ID NOs:14-16、和 43-57 的任何一个中所示的核酸序列的寡核苷酸。

[0010] 在另外一个方面,本发明提供了由如 SEQ ID NOs:17 或 18 中所示的核酸序列组成的寡核苷酸。在另一个方面,本发明提供了包括如 SEQ ID NOs:17 或 18 中所示的核酸序列的寡核苷酸。

[0011] 在一个实施方案中,本发明提供了 SEQ ID NOs :1-210 中所示的任何序列用于文库扩增、文库逆转录和 / 或文库谱型分析的用途。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了用于表达单链抗体(scFv)的核酸文库,所述文库包括编码重链可变结构域和轻链可变结构域的序列谱(repertoire),其中所述文库的每个成员包含可读框,所述可读框包括重链可变结构域、轻链可变结构域和接头区域,并且其中所述文库使用 SEQ ID NOs :1-210 中所示的一种或多种寡核苷酸生成。

[0013] 在一个实施方案中,文库进一步包括编码小于 20 个氨基酸的接头区域。在另一个实施方案中,文库进一步包括编码 15 个氨基酸的接头区域。

[0014] 在一个实施方案中,文库的每个成员进一步包括与可读框可操作地连接的启动子。在另一个实施方案中,启动子选自 T7、SP6 和 T3。在另外一个实施方案中,启动子是 T7 启动子。

[0015] 在一个实施方案中,文库的每个成员进一步包括能够增强它与之可操作地连接的基因转录的 5' 非翻译区(5' UTR)。在另一个实施方案中,5' UTR 是烟草花叶病毒 5' UTR 或其活性片段。在另一个实施方案中,文库的每个成员进一步包括聚腺嘌呤序列。

[0016] 在另外一个实施方案中,文库进一步包括核酸条形码。在另一个实施方案中,核酸条形码包括 8 个核苷酸。

[0017] 在另一个实施方案中,文库的每个成员进一步包括编码附加表位的核酸序列。在另外一个实施方案中,附加表位是 FLAG 标记。在另外一个实施方案中,核酸序列是 scFv 的接头区域的部分。在另一个实施方案中,文库进一步包括编码抗体恒定区或其片段的核酸序列。

[0018] 在一个实施方案中,文库进一步包括核糖体中止(pause)序列。

[0019] 在一个实施方案中,文库进一步包括肽接纳体。在另一个实施方案中,肽接纳体经由包括补骨脂素 C6 分子的接头共价附着。在另外一个实施方案中,接头是 5' (补骨脂素 C6) 2' Ome (U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (嘌呤霉素),其中 X 是三甘醇接头或 PEG-150,并且 CC 是 DNA 主链。

[0020] 在另一个方面,本发明提供了产生用于表达单链抗体(scFv)的核酸文库的方法,其包括(a)提供核酸组合物,其中组合物中的至少部分核酸包括编码抗体可变结构域的至少一个可读框,和(b)使用 SEQ ID NOs 1-210 中所示的一种或多种寡核苷酸扩增多个抗体可变结构域。

[0021] 在另一个方面,本发明提供了用于对包括至少一个可读框的核酸进行谱型分析的方法,所述可读框编码抗体可变结构域,所述方法包括(a)提供核酸组合物,其中所述组合物中的至少部分核酸包括编码抗体可变结构域的至少一个可读框,和(b)使用 SEQ ID NOs 1-210 中所示的一种或多种寡核苷酸扩增所述可变结构域的 CDR3 区。

[0022] 附图简述

图 1 描述了在本发明的特定实施方案中关于 mRNA-scFv 展示技术的一般方案。

[0023] 图 2 描述了在本发明的特定实施方案中关于 mRNA-scFv 展示技术的一般方案。

[0024] 图 3 描述了文库 DNA 构建体的一般描述。

[0025] 图 4 描述了作为 mRNA-scFv 分子生成的功能 scFv。

[0026] 图 5 描述了显示在 mRNA-scFv 分子形式中附着的 scFv 在功能上等价于游离 scFv

分子的结果。

[0027] 图 6 描述了在 17/9 mRNA-scFv 构建体的 TMV-UTR 和 Kozak 共有序列之间插入的 4 个 8-bp 标记。

[0028] 图 7 描述了示例性构建体和控制序列。

[0029] 图 8 描述了在 3 轮选择中鉴定的随机标记序列。

[0030] 图 9 描述了在一轮 mRNA-scFv 选择前和后定量 17/9 scFv 的结果。

[0031] 图 10 描述了在 D2E7 和 2SD4 之间的嵌合体。

[0032] 图 11 描述了关于不同 TNF α 结合剂的 K_D 曲线。

[0033] 图 12 描述了 mRNA-scFv 分子的热稳定性。

[0034] 图 13 描述了显示 RNA 可以在 mRNA-scFv 分子的高温处理后回收的结果。

[0035] 图 14 描述了在首次用于实验的人 PBMC κ scFv PROfusion 文库中 PBMCs 供体的年龄、种族划分和性别分布。

[0036] 图 15 描述了在构建的首次用于实验的人 PBMC κ scFv PROfusion 文库中的 VH 家族特异性 PCR 片段。

[0037] 图 16 描述了在构建的首次用于实验的人 PBMC κ scFv PROfusion 文库中的 V κ 家族特异性 PCR 片段。

[0038] 图 17 描述了在构建的首次用于实验的人 PBMC κ scFv PROfusion 文库中的 VH-V κ scFv PCR 产物。

[0039] 图 18 描述了在构建的首次用于实验的人 PBMC κ scFv PROfusion 文库中的 VH 和 V κ 家族分布。

[0040] 图 19 描述了首次用于实验的人 PBMC 抗体 CDR3 大小的谱型分析。

[0041] 图 20 描述了 VH/V κ 文库通过谱型分析的质量控制。

[0042] 图 21 描述了在首次用于实验的人 PBMC λ scFv PROfusion 文库中的 V λ 家族特异性 PCR 片段。

[0043] 图 22 描述了在构建的首次用于实验的人 PBMC λ scFv PROfusion 文库中的 VH-V λ scFv PCR 产物。

[0044] 图 23 描述了在构建的首次用于实验的人 PBMC λ scFv PROfusion 文库中的 VH 和 V λ 家族分布。

[0045] 图 24 描述了首次用于实验的人淋巴结 κ 和 λ scFv PROfusion 文库中 PROfusion 文库构建的图解。

[0046] 图 25 描述了在构建的首次用于实验的人淋巴结 κ 和 λ scFv PROfusion 文库中的 VH 家族特异性 PCR 片段。

[0047] 图 26 描述了在构建的首次用于实验的人淋巴结 κ 和 λ scFv PROfusion 文库中的 V κ 家族特异性 PCR 片段。

[0048] 图 27 描述了在构建的首次用于实验的人淋巴结 κ 和 λ scFv PROfusion 文库中的 V λ 家族特异性 PCR 片段。

[0049] 图 28 描述了在构建的首次用于实验的人淋巴结 κ 和 λ scFv PROfusion 文库中的 VH-V κ 和 VH-V λ scFv PCR 产物。

[0050] 图 29 描述了在构建的 VH-V κ scFv 文库中的 VH 和 V κ 家族分布。

[0051] 图 30 描述了在构建的 VH-V λ scFv 文库中的 VH 和 V λ 家族分布。

[0052] 图 31 描述了在构建的 VH-V λ scFv 文库中 VH-V κ 和 VH-V λ 文库通过谱型分析的质量控制。

[0053] 发明详述

为了本发明可以更容易理解,首先定义了特定术语。

[0054] I. 定义

术语“抗体”包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、嵌合抗体、CDR 嫁接的抗体、人源化抗体、人抗体、鼠抗体及其片段,例如抗体轻链(VL)、抗体重链(VH)、单链抗体(scFv)、F(ab')₂ 片段、Fab 片段、Fd 片段、Fv 片段、和单结构域抗体片段(DAb)。

[0055] 术语“抗体文库”指包含可读框(ORF)的多个 DNA 或 RNA 分子,所述可读框编码抗体或其片段。它还包括由所述 DNA 或 RNA 分子表达的多个抗体蛋白质和核酸/抗体融合分子。

[0056] 术语“重链可变结构域”指编码抗体重链可变区的核酸和所述核酸的蛋白质产物。

[0057] 术语“轻链可变结构域”指编码抗体轻链可变区的核酸和所述核酸的蛋白质产物。

[0058] 术语“谱型分析”指基于 PCR 的方法,其基于 CDR3 长度使编码抗体的遗传序列分开。CDR3 长度分布中的改变与抗体谱中的改变相关(Janeway 等人“Immunobiology”,第 5 版 Garland Publishing, New York and London, (2001))。

[0059] 术语“附加表位”指由抗体特异性识别的短氨基酸序列,其与分子化学或遗传地附着,以允许其通过所述抗体的检测,例如 FLAG 标记、HA 标记、MYC 标记或 T7 标记。

[0060] 术语“核酸条形码”指在本发明文库的非翻译区中包括的短核酸。条形码是用来给个别克隆或多个文库成员提供独特标识符的随机或预定序列。

[0061] 术语“非抗体序列”指在本发明的抗体文库中出现的任何核酸或氨基酸序列,其不是原始抗体序列的部分。此种序列包括例如附加表位或核酸条形码。

[0062] 术语“控制序列”指在具体宿主生物、亚显微因子或体外表达系统中表达可操作地连接的编码序列所需的核酸序列或遗传元件。此种序列是本领域众所周知的。适合于原核生物的控制序列例如包括启动子、任选地操纵基因序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。当核酸置于与另一种核酸序列的功能关系内时,它是“可操作地连接的”。例如,启动子或增强子与编码序列可操作地连接,如果它影响序列的转录的话;或核糖体结合位点与编码序列可操作地连接,如果它如此放置,以便促进翻译的话。一般地,“可操作地连接的”意指被连接的核酸序列是邻接的。然而,增强子无需是邻接的。例如,连接通过在方便的限制位点上的连接来完成。如果此种位点不存在,那么依照常规实践使用合成寡核苷酸衔接头或接头。

[0063] 术语“特异性结合”或“与之特异地结合”指结合分子以至少约 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 或更多的亲和力与靶结合,和/或或是其对于非特异性抗原的亲和力至少 2 倍的亲和力与靶结合的能力。

[0064] 术语“靶”指由抗体识别的抗原或表位。靶包括例如任何肽、蛋白质、糖、核酸、脂质和对于其生成特异性抗体的小分子。在一个实施方案中,抗体针对人蛋白质,例如 TNF α 、IL-12 或 IL-1 α 。

[0065] “保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基由具有相似侧链的氨基酸残基替换的置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中得到限定。

[0066] 术语“RNA 展示”或“mRNA 展示”指体外技术,其中所表达的蛋白质或肽与其编码 mRNA 共价或通过紧密的非共价相互作用连接,以形成“RNA/蛋白质融合”分子。就与所需靶的结合选择 RNA/蛋白质融合物的蛋白质或肽组分,并且通过测序所附着的编码 mRNA 组分来测定蛋白质或肽的特性。此种方法是本领域众所周知的,并且例如在美国专利号 7,195,880 ;6,951,725 ;7,078,197 ;7,022,479,6,518,018 ;7,125,669 ;6,846,655 ;6,281,344 ;6,207,446 ;6,214,553 ;6,258,558 ;6,261,804 ;6,429,300 ;6,489,116 ;6,436,665 ;6,537,749 ;6,602,685 ;6,623,926 ;6,416,950 ;6,660,473 ;6,312,927 ;5,922,545 ;和 6,348,315 中描述。

[0067] 术语“单链 Fv 抗体”或“scFv”指使用重组方法通过使得其能够制备为单条蛋白质链的合成接头连接的轻链可变区的抗原结合部分和重链可变区的抗原结合部分,其中 VL 和 VH 区配对以形成单价分子(称为单链 Fv (scFv);参见例如, Bird 等人(1988) *Science* 242:423-426 ;和 Huston 等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85:5879-5883)。

[0068] 术语“功能部分”指对其与之附着的分子赋予另外功能性的任何生物或化学实体。

[0069] 术语“选择”指使分子与群体中的其他分子基本上分开。如本文使用的,“选择”步骤提供在选择步骤后相对于群体中不希望有的分子,所需分子至少 2 倍、优选 30 倍、更优选 100 倍、且最优选 1000 倍富集。如本文指出的,选择步骤可以重复任何次数,并且不同类型的选择步骤可以在给定方法中组合。

[0070] 术语“中止序列(pause sequence)”指促使核糖体减慢或停止其翻译速率的核酸序列。

[0071] 术语“固体支持体”指但不限于亲和复合物可以与之直接或间接(例如通过其他结合配偶体中间物,例如其他抗体或 A 蛋白)结合,或亲和复合物可以包埋入其中(例如,通过受体或通道)的任何柱(或柱材料)、珠、试管、微量滴定皿、固体颗粒(例如,琼脂糖或琼脂糖凝胶(sepharose))、微芯片(例如,硅、硅-玻璃或金芯片)、或膜(例如,脂质体或小泡的膜)。

[0072] 术语“接头区域”指使 scFv 抗体基因中编码抗体 VH 和 VL 结构域的核酸序列连接的核酸区域。接头区域与编码抗体 VH 和 VL 的核酸序列符合读框,从而使得形成包含 VH、VL 和接头区域的邻接可读框。该术语还指在 scFv 蛋白质中连接 VH 和 VL 的区域。

[0073] 术语“肽接纳体”指通过核糖体肽基转移酶的催化活性能够添加到成长中的蛋白质链的 C 末端的任何分子。一般地,此种分子包含(i)核苷酸或核苷酸样部分(例如,嘌呤霉素及其类似物), (ii)氨基酸或氨基酸样部分(例如,20 种 D- 或 L- 氨基酸中的任何一种或其任何氨基酸类似物(例如,由 Ellman 等人(1991) *Meth. Enzymol.* 202:301 描述的 O- 甲基酪氨酸或任何类似物),和(iii)2 个之间的键(例如在 3' 位置上或较不优选地在 2' 位置上的酯、酰胺或酮键);优选地,这种键不显著干扰来自天然核糖核苷酸构象的环结构。此外,这个术语包括但不限于与蛋白质编码序列共价键合(直接或通过间插核酸序列间接)的肽接纳体分子,以及通过一些非共价方法与蛋白质编码序列连接的那种,例如通过使用第二种核酸序列的杂交,所述第二种核酸序列在蛋白质编码序列的 3' 末端上或接近 3' 末端处结合,并且其自身与肽接纳体分子结合。

[0074] II. 概述

本发明的特征在于改良的体外 RNA 展示文库,以允许从表达文库中可靠表达和选择 scFv 抗体分子。RNA 展示方法一般涉及蛋白质或肽文库的表达,其中所表达的蛋白质或肽与其编码 mRNA 共价或通过紧密的非共价相互作用连接,以形成 RNA/蛋白质融合分子。可以就与所需靶的结合选择 RNA/蛋白质融合物的蛋白质或肽组分,并且通过测序所附着的编码 mRNA 组分来测定蛋白质或肽的特性。

[0075] 本发明的 scFv 抗体文库包含最优化的、缩短的结构域间接头,其改善表达 scFv 抗体表达。scFv 抗体文库还包括短核酸条形码,其允许鉴定个别文库克隆、文库或其亚群。

[0076] 本发明还提供了用于生成、扩增且对本发明的 scFv 抗体文库进行谱型分析的新引物。

[0077] III. 文库构建

作为生成单克隆抗体药物候选物的抗体技术开发,本发明公开了 2 种重组抗体生成方法的开发,PROfusion (mRNA 展示)和酵母表面展示。PROfusion mRNA 展示技术是用于筛选抗体文库的从头开始方法。酵母表面展示技术是用于筛选在酵母表面上特异性展示的单克隆抗体的细胞方法。

[0078] 在一个方面,本发明的特征在于能够表达抗体分子的新抗体文库。本发明的文库由能够与靶结合的任何抗体片段生成。在一个实施方案中,生成抗体可变结构域的文库。在一个实施方案中,这些是 VH 和 / 或 VL 结构域。在另一个实施方案中,生成 scFv 文库。

[0079] 本发明的文库还可以包括编码在可变区外的区域的抗体核酸序列,例如其恒定区或片段,或铰链区。

[0080] 本发明的核酸文库可以包括 RNA、DNA 或 RNA 和 DNA 元件。

[0081] 1) 核酸输入多样性的生成

用于生成本发明的抗体文库的核酸序列可以得自任何来源。在一个实施方案中,本发明的文库可以得自任何动物的抗体谱,包括但不限于,啮齿类动物、灵长类动物、骆驼科物种 (camelid)、鲨鱼或包含人免疫球蛋白基因谱的任何转基因动物。用于分离和克隆编码生物物的抗体补体可变区的核酸的技术是本领域众所周知的。事实上,包含编码抗体可变区的核酸的许多 cDNA 文库是商购可得的,例如由各种免疫细胞生成的人抗体可变区文库,例如外周血单核细胞 (PBMC)、脾或淋巴结。在另一个实施方案中,本发明的文库可以通过编码一种或多种抗体的核酸的从头开始合成获得。

[0082] 本发明的文库可能需要通过引入核酸置换和 / 或缺失将另外的多样性引入,这导致在表达的抗体分子中的一个或多个氨基酸置换和 / 或缺失。预期了任何领域公认的诱变方法,例如随机诱变、“步移 (walk through)”诱变和“审核 (look through)”诱变。可以通过使用例如易错 PCR、酵母或细菌的“增变”株、或在所有或部分抗体的从头开始合成过程中随机或限定的核酸改变的掺入来达到抗体的此种诱变。在一个实施方案中,可以生成抗体分子的文库,其中一个或多个氨基酸是随机突变的。在另一个实施方案中,可以生成抗体分子的文库,其中一个或多个氨基酸突变为一个或多个预定的氨基酸。

[0083] 2) 控制序列

本发明的核酸文库可以包含另外的控制序列,以促进编码的抗体在体外的表达和筛选。

[0084] 一种此种控制序列可以是与用于 mRNA 合成的所需 RNA 聚合酶一起使用的启动子。

如本文描述的,可以使用能够指导来自线性双链 DNA 的合成的任何启动子,例如 T7、SP6 或 T3 噬菌体启动子。

[0085] 第二种控制序列可以被称为 5' 非翻译区(或 5' UTR),并且与翻译起始位点的 RNA 上游对应。可以利用任何其他合适的 5' UTR (参见例如, Kozak (1983) Microbiol. Rev. 47:1)。在一个实施方案中,5' UTR(被称为“TE”)可以是烟草花叶病毒 5' 非翻译区的缺失突变体,并且特别与 TMV 翻译起始直接 5' 的碱基对应;这种 UTR 的序列如下:rGrGrG rArCrA rArUrU rArCrU rArUrU rUrArC rArArU rUrArC rA (其中插入第一个 3 G 核苷酸以增加转录)。

[0086] 第三种元件可以是翻译起始位点。一般而言,这是 AUG 密码子。然而,存在其中除 AUG 外的密码子用于天然存在的编码序列中的例子,并且这些密码子也可以用于本发明的选择方案中。这种翻译起始位点优选在被成为“Kozak”序列的合适序列背景中(参见例如, Kozak (1983) Microbiol. Rev. 47:1)。

[0087] 第四种元件可以是包含 5' 终止密码子的聚腺苷酸(poly A)序列。聚腺苷酸序列可以置于在核酸文库构建体内的抗体编码序列后。此种序列是本领域众所周知的,并且预期了任何此种序列。

[0088] 3) 另外的核酸序列元件

本发明的核酸文库还可以包括掺入编码抗体的 mRNA 转录物内的另外序列元件。这些可以包括非抗体序列。

[0089] 在一个实施方案中,短核酸序列或“核酸条形码”可以掺入抗体 mRNA 转录物的非翻译部分内。这些条形码序列可以充当独特标识符,以区别核酸文库的个别成员或区别不同文库。短核酸序列优选包含小于 50 个碱基、小于 20 个碱基或小于 10 个碱基。在一个实施方案中,短核酸序列包括 8 个碱基。

[0090] 在其他实施方案中,编码特异性非抗体氨基序列的核酸序列元件可以掺入本发明核酸文库的可读框(ORF)内,从而使得编码的氨基酸序列掺入表达的抗体内。在一个实施方案中,非抗体核酸序列元件可以掺入在 VH 和 VL 区之间的 scFv 的 ORF 内,以充当接头区域。编码缺乏终止密码子的邻接氨基酸序列的任何核酸序列可以预期用于接头区域。接头区域的长度小于 50 个氨基酸、或小于 20 个氨基酸、或小于 16 个氨基酸。

[0091] 在另一个实施方案中,编码一种或多种附加表位(例如 FLAG 标记)的核酸序列元件可以掺入抗体编码序列内。这些序列可以导致产生具有在任何位置上存在的附加表位的抗体,例如在 N 末端、C 末端上或在 scFv 抗体分子的 VH 和 VL 结构域之间的接头区域中。在一个实施方案中,编码抗体恒定区或其片段的序列可以包括在本发明核酸文库的 ORF 的 3' 部分中。这个抗体恒定区或其片段在特定文库的所有成员中是等同的。

[0092] 在其他实施方案中,编码特异性非抗体氨基序列的核酸序列元件可以掺入载体内,所述载体用于在酵母细胞的表面上特异性表达本发明中的核酸文库。这些元件可以包括但不限于,本领域已知的跨膜结构域。在一个实施方案中,这些元件可以掺入本发明核酸文库的 ORF 内,从而使得所编码的氨基酸序列掺入所表达的抗体内。在另一个实施方案中,这些元件可以掺入载体序列内,而不是本发明抗体文库的 ORF 内。这些元件可以帮助表达、稳定性、折叠和表位呈递,或本发明和上文提及的核酸文库的其他特征。

[0093] 4) 寡核苷酸引物

在一个方面,本发明的特征在于适合于合成和 / 或扩增本发明的抗体文库的核寡核苷酸引物。示例性引物包括 SEQ ID NOs :1-13 (表 6)。

[0094] 在另一个方面,本发明的特征在于适合于逆转录由本发明的文库产生的 mRNA 的核寡核苷酸引物(表 3)。示例性引物包括 SEQ ID NOs :14-16 (表 3)。

[0095] 在另一个方面,本发明的特征在于适合于对文库或其选择输出中的 VH CDR3 大小分布进行谱型 PCR 分析的寡核苷酸引物(表 4)。谱型分析可以是用于评估抗体文库多样性和选择进展的有用工具。示例性谱型分析 PCR 引物包括 SEQ ID NOs :17-18。

[0096] 5) 核酸与肽接纳体的连接

在一个实施方案中,本发明的抗体核酸文库可以进行修饰以包含肽接纳体部分。这促进核酸表达文库的个别成员与其关连蛋白质产物的共价附着。预期了任何领域公认的肽接纳体与核酸附着的方法。

[0097] 在一个方面,本发明的特征在于用于使肽接纳体与核酸文库附着的新方法和组合物。在一个实施方案中,可以合成包括补骨脂素 C6 分子和肽接纳体分子的连接分子,其中补骨脂素 C6 分子和肽接纳体分子可以与核酸序列融合,其中所述核酸序列可以与核酸文库的 3' 末端上的序列互补。此种连接分子可以经由互补碱基配对与核酸文库克隆的 3' 末端结合。补骨脂素 C6 对紫外(UV)线敏感,并且将使接头与核酸文库克隆交联,从而使肽接纳体与核酸文库克隆共价连接。在另一个实施方案中,接头分子的核酸部分可以包含修饰的核苷酸,例如 2' 甲氧基(2' OMe)核糖核苷酸。在另一个实施方案中,接头分子可以进一步包括使包含补骨脂素 C6 分子和肽接纳体分子的核酸区域分离的三甘醇或 PEG-150 接头。在一个实施方案中,接头可以是 :5' (补骨脂素 C6) 2' OMe (U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (嘌呤霉素) 3', (其中 X 是三甘醇或 PEG-150, 并且 CC 是标准 DNA 主链)。在一个实施方案中,此种接头通过例如 TriLink BioTechnologies, Inc (San Diego, CA) 定制合成。

[0098] IV. 谱型分析方法

谱型分析方法是在临床和基础免疫学背景中使用的方法,其中评估抗原受体长度多样性作为功能多样性的替代物(参见例如, 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) In Austin, O. J. R. (Ed.). The Antigen T Cell Receptor : Selected Protocols and Applications, TX Landes, 第 287 - 325 页)。谱型分析测定可以使用例如从来自受试者的外周血样品中分离的 CD4 或 CD8T 细胞,而在其他情况下使用总 CD3 或 PBMC 细胞。

[0099] 在本发明中, PCR 可以用于特异性复制可变长度区(CDR3), 用于基于 CDR3 长度分析编码抗体的遗传序列。CDR3 长度分布中的改变与抗体谱中的改变相关。在一些实施方案中,对本发明实践中构建的个别文库特异的引物可以用于提供用于每种文库的独立谱型(spectratype)。在一个优选实施方案中,分别与 VH 的构架 3 区和 J 区退火的荧光染料标记的 5' 正向引物(6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5' -GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', SEQ ID NO :17) 和反向引物(PanJH-Rev, 5' -GCTGAGGAGACGGTGACC-3', SEQ ID NO :18), 可以用于通过 PCR 扩增跨越 VH 结构域的 CDR3 区。在其他实施方案中,可以使用本领域已知的其他引物,其与编码抗体文库的多核苷酸序列上的相同区域或其他区域特异性退火。在一个优选实施方案中,所得到的 CDR3 复制子混合物可以通过电泳进行大小分离,并且通过光密度测定法进行

定量。在其他实施方案中,本领域已知的其他方法可以用于表征所得到的 CDR3 复制子。

[0100] 在一个优选实施方案中,可以对 VH cDNA 片段执行在不同 VH 家族中 CDR3 大小分布的谱型分析。在一个实施方案中,示例性 VH 家族可以得自单个种系或不同 VH 家族,例如 VH1-46、VH2、VH5 和 VH6。在一个优选实施方案中,用于谱型分析的模板可以选自例如人淋巴结文库、酵母脾文库、首次用于实验的人 λ 文库、人 PBMC κ 文库、VH-V λ scFv 文库、VH-V κ scFv 文库。在其他实施方案中,用于谱型分析的模板可以选自其他文库。

[0101] V. 一般筛选方法

在一个方面,本发明的特征在于筛选本发明的表达文库的方法,以鉴定能够与所需靶结合的抗体。预期了基于抗体与靶分子的结合,允许从表达文库中选择抗体的任何体外或体内筛选方法。

[0102] 在一个实施方案中,本发明的表达文库可以使用领域公认的体外无细胞表型-基因型连接的展示进行筛选。此种方法是本领域众所周知的,并且例如在美国专利号 7,195,880 ;6,951,725 ;7,078,197 ;7,022,479,6,518,018 ;7,125,669 ;6,846,655 ;6,281,344 ;6,207,446 ;6,214,553 ;6,258,558 ;6,261,804 ;6,429,300 ;6,489,116 ;6,436,665 ;6,537,749 ;6,602,685 ;6,623,926 ;6,416,950 ;6,660,473 ;6,312,927 ;5,922,545 ;和 6,348,315 中描述。这些方法涉及以这样的方式从核酸体外转录蛋白质,从而使得蛋白质与它源于其的核酸在物理上缔合或结合。通过用靶分子选择表达的蛋白质,还可以选择编码蛋白质的核酸。

[0103] 为了改善 scFv 蛋白质的表达,上文提及的体外筛选测定可能需要特定试剂的添加或去除。在一个实施方案中,蛋白质二硫键异构酶可以添加到体外表达系统中,以改善功能 scFv 分子的生产。在另一个实施方案中,温和氧化剂(例如 GSSG (氧化谷胱甘肽)/GSH (还原谷胱甘肽),例如 100mM GSSG /10mM GSH)可以添加到 scFv 蛋白质的体外翻译反应混合物中,以允许 scFv 分子的 VH 和 VL 区中的链内二硫键形成。在另一个实施方案中,还原剂(例如,二硫苏糖醇(DTT))可从 scFv 的体外翻译反应混合物中去除。

[0104] 在另一个实施方案中,一种或多种标记的氨基酸或其衍生物可以添加到体外翻译系统中,从而使得一种或多种标记的氨基酸掺入所得到的抗体内。预期了任何领域公认的标记的氨基酸,例如放射性标记的氨基酸,例如 ³⁵S 标记的甲硫氨酸或半胱氨酸。

[0105] 在一个实施方案中,本发明的体外筛选测定需要在抗体或多种抗体的体外选择后,可以使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 逆转录,以生成编码所述抗体或多种抗体的 cDNA。预期了用于逆转录的任何合适方法,例如酶介导的,例如莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶。

[0106] 在本发明中采用的筛选方法可能需要扩增编码与所需靶特异性结合的抗体的核酸。在一个实施方案中,可以使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 扩增,以产生更多 mRNA。预期了任何领域公认的 RNA 复制方法,例如使用 RNA 复制酶。在另一个实施方案中,在通过 PCR 扩增前,首先使与抗体或多种抗体在物理上结合的 mRNA 逆转录成 cDNA。在一个实施方案中,PCR 扩增使用高保真度的校正聚合酶完成,例如来自 *Thermococcus kodakaraensis* 的 KOD1 热稳定性 DNA 聚合酶或 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA)。在另一个实施方案中,PCR 扩增可以在导致突变引入扩增的 DNA 内的条件下执行,即易错 PCR。

[0107] 在本发明中采用的筛选方法还可能增加靶-结合筛选测定的严格性,以选择对于靶具有改善的亲合力的抗体。预期了增加抗体-靶相互作用测定的严格性的任何领域公认的方法。在一个实施方案中,可以改变一种或多种测定条件(例如,测定缓冲液的盐浓度),以减少抗体分子对于所需靶的亲合力。在另一个实施方案中,可以减少允许抗体与所需靶结合的时间长度。在另一个实施方案中,竞争结合步骤可以添加到抗体-靶相互作用测定中。例如,可以首先允许抗体与所需固定化靶结合。随后可以添加特定浓度的非固定化靶,其用来与固定化靶竞争结合,从而使得从固定化靶中洗脱对于抗原具有最低亲和力的抗体,从而导致具有改善的抗原结合亲和力的抗体富集。在一个实施方案中,通过增加添加到测定中的非固定化靶的浓度,可以进一步增加测定条件的严格性。

[0108] 本发明的筛选方法还可能多轮选择,以富集具有改善的靶结合的一种或多种抗体。在一个实施方案中,在每轮选择时,进一步的氨基酸突变可以使用领域公认的方法引入抗体内。在另一个实施方案中,在每轮选择时,可以增加与所需靶结合的严格性,以选择对于所需靶具有增加的亲和力的抗体。

[0109] 本发明的筛选方法可能需要从体外翻译系统的组分中纯化 RNA-抗体融合蛋白。这可以使用任何领域公认的分选方法完成。在一个实施方案中,使用聚脱氧胸苷(polydeoxythymidine)(poly dT)树脂通过层析分离 RNA-抗体融合蛋白。在另一个实施方案中,通过层析使用对于 RNA-抗体融合蛋白的抗体组分中存在的表位特异的抗体,可以分离 RNA-抗体融合蛋白。在一个实施方案中,表位可以是掺入 RNA-抗体融合蛋白的抗体组分的氨基酸序列内的氨基酸序列标记,例如 FLAG 或 HA 标记,例如在 N 末端、C 末端上或在可变区间接头中。

[0110] 从本发明的文库中选择抗体可能需要使用固定化的靶分子。在一个实施方案中,靶分子可以与固体基质例如琼脂糖珠直接连接。在另一个实施方案中,靶分子可以首先进行修饰,例如生物素化,并且可以使修饰的靶分子经由修饰与固体支持体结合,例如链霉抗生物素蛋白-M280、中性抗生物素蛋白(neutravidin)-M280、SA-M270、NA-M270、SA-MyOne、NA-MyOne、SA-琼脂糖、和 NA-琼脂糖。

[0111] 本发明通过不应解释为限制性的下述实施例进一步举例说明。

[0112] 本发明的例证

实施例自始至终,使用下述材料和方法,除非另有说明。

[0113] 材料与方法

一般而言,除非另有说明,否则本发明的实践采用化学、分子生物学、重组 DNA 技术、免疫学(尤其是例如免疫球蛋白技术)和畜牧业的常规技术。参见例如,Sambrook,Fritsch 和 Maniatis,Molecular Cloning:Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology),510,Paul, S., Humana Pr (1996);Antibody Engineering:A Practical Approach (Practical Approach Series, 169),McCafferty,Ed., Irl Pr (1996);Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow 等人,C. S. H. L. Press, Pub. (1999);Current Protocols in Molecular Biology,编辑 Ausubel 等人,John Wiley & Sons (1992)。

[0114] 实施例 1

用于 scFv 分子的 mRNA 展示规程

mRNA 展示可以根据图 2 中所示的方法进行。这种方法的具体实施方案在下文更详细地描述。这些实施方案预期举例说明本发明的方法,并且不应解释为限制性的。

[0115] 1. 抗体文库模板的设计

根据图 3 中所述的图解设计文库 DNA 构建体。双链 DNA 构建体一般从 5' 到 3' 末端包含下述功能元件。T7 启动子可以用于体外 RNA 转录。TMV-UTR (烟草花叶病毒非翻译区) 可以用于体外蛋白质翻译。任选标记包含对于每个文库独特的 8 碱基对序列,其可以用于鉴定属于给定文库的构建体。Kozak 共有序列促进蛋白质翻译的起始。目的抗体文库可以包含编码 scFv、VH 或 VL 的序列。在优选实施方案中,抗体文库编码 scFv。在一个实施方案中,还包括了在所有抗体文库的 3' 末端上不变的部分抗体恒定区序列。在一些实施方案中,构建体另外包括对于亲和力纯化有用的 FLAG 标记。在其他实施方案中,构建体含有包含退火位点的接头退火序列,其中补骨脂素和嘌呤霉素修饰的 DNA 寡核苷酸接头可以在规程的后续步骤中与构建体交联。在一个实施方案中,具有 5' 终止密码子的聚腺苷酸序列可以用于通过寡脱氧胸苷酸纤维素分批纯化的 mRNA 稳定性和纯化。

[0116] 2. 靶抗原的制备

一般地,mRNA 展示抗体文库可以针对生物素化的抗原进行选择。虽然关于每种靶的最优抗原应基于具体情况(case-by-case)进行测定,但下述考虑可以用作一般指导。靶抗原一般是充分表征的,并且是相关或显性遗传同种型,如通过多态性(SNP 和单元型)和/或药物遗传学分析测定的。靶抗原另外可以具有合理生物活性(可与天然抗原比较)、良好可溶性以及良好的化学和物理性质,并且可以以足够量制备以用于文库选择或筛选和下游生物测定。对于文库选择有用的示例性靶抗原量在下表 1 中指出。

[0117] 表 1:文库选择所需的靶抗原量

技术	人抗体 scFv 文库的选择	抗原需求 (待乘以文库 #)		伴随抗原需求	可递送 (Deliverables)
		用于每个文库选择	用于每个文库输出筛选		
PROfusion mRNA 展示	2 个 PBMC (κ/λ) 2 个脾 (κ/λ) 2 个淋巴结 (κ/λ)	1 nmole 生物素化的	2.5 nmole 生物素化的	2 nmole 生物素化的	将可能需要 LO 的生物活性 IgG 候选物
酵母展示	2 个 PBMC (κ/λ) 1 个脾 (κ) 1 个淋巴结 (κ)	6.5 nmole (优选生物素化的)	3 nmole 生物素化的	3 nmole 生物素化的	

3. 文库 DNA 的制备

文库 DNA 及其选择输出可以通过 PCR 进行扩增。用于文库扩增的示例性引物显示于表 2 中。

[0118] 表 2:用于文库扩增的引物

引物	扩增	序列
5' 正向引物		
T7TMVUTR (SEQ ID NO:1)	所有 scFv 和 VH 文库	TAATACGACTCACTATAGGGACAATT ACTATTTACAATTACA
VL-T7TMVTag3GS- Fwd^a (SEQ ID NO:2)	V κ 和 V λ PBMC 文库	TAATACGACTCACTATAGGGACAATT ACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACC ATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
3' 反向引物		
CK5FLAGA20 Rev (SEQ ID NO:7)	所有 κ scFv 和 V κ 文库	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAG TCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA
CL5FLAGA20 Rev (SEQ ID NO:12)	所有 λ scFv 和 V λ 文库	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAG TCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG
VH-GSFLAGA20- Rev^a (SEQ ID NO:13)	来自人 PBMC 的 VH 文库	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCG GATGCTTTGTCATCATCATCTTTATAA TCGCTACCTCCGCCGCCAGAC

PCR 扩增可以使用本领域已知的方法执行。PCR 反应一般包含 DNA 模板、反应缓冲液、dNTP、用于扩增的引物、DNA 聚合酶和水。多个反应管由主混合物同时设立,以增加扩增的 DNA 得率。25 个 PCR 循环一般给出足够扩增,但多达 35 个循环可以用于获得更多产物。

[0119] 4. 文库 DNA 纯化

如果来自上述 PCR 的产物是正确大小(对于 scFv ~850 bp,对于 VH 或 VL 文库 ~500 bp)且包含最低限度非特异性产物,那么它们可以直接用于转录反应中。可替代地,产物可以进行凝胶纯化。如果对于 PCR 产物执行凝胶纯化,那么可以在制备型琼脂糖凝胶上分离产物,并且可以切出包含 PCR 产物的特异性条带。DNA 随后可以通过凝胶提取从条带中纯化,其中使用本领域已知的标准方法,并且在分光光度计上测量其浓度。

[0120] 5. RNA 转录

来自文库 DNA 的 RNA 转录可以使用本领域已知的标准方法执行。大反应体积可以用于转录足够的 DNA 模板,以取样整个文库多样性。在示例性实施方案中,1 x 10¹³ 文库模板拷贝可以用于 RNA 转录反应中。RNA 转录反应一般包含 5-10 μ g PCR 产物、反应缓冲液、加上

ATP、CTP、GTP、UTP 和 T7 RNA 聚合酶。RNA 转录反应可以在 37℃ 运行 2 小时至过夜。在初始选择循环后可以使用较短的时间。在 RNA 转录后, DNA 模板可以使用 DNA 酶 I 从反应混合物中去除。

[0121] 6. 通过 NAP 柱层析的 RNA 纯化

在 RNA 转录后, RNA 可以使用 NAP-10 柱(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 进行分级分离。最高达 1 mL 转录反应可以装载到 NAP-10 柱上用于 RNA 纯化。在分级分离前, 柱可以使用焦碳酸二乙酯(DEPC) 处理的 dH₂O 进行平衡。总洗脱体积应小于 150% 的转录反应体积。RNA 可以另外或可替代地使用 NAP-25 柱(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 进行分级分离。

[0122] 7. RNA 质量控制和定量

RNA 样品的大小和得率可以使用凝胶电泳进行监控。RNA 得率一般达到 ~20 nmol/mL 转录反应的最大限度。

[0123] 8. RNA 与接头的连接

在其 3' 末端上包含肽接纳体分子的 DNA 接头可以与每种 RNA 分子的 3' 末端共价连接。可以进入核糖体 A 位点且与新生多肽链的羧基末端共价偶联的肽接纳体, 最终将使得 mRNA (基因型) 能够与由这种 RNA 编码的蛋白质(表型) 共价结合。示例性 PEG6/10 接头可以具有下式:

5' (补骨脂素 C6) 2' OMe (U AGC GGA UGC) XXX XXX CC (嘌呤霉素) 3'。

[0124] 补骨脂素 C6 5' 修饰是光敏感的, 并且作用于通过 UV 交联在接头和 mRNA 之间产生共价键。2' OMe (U AGC GGA UGC) 主链区域与 mRNA 上的 FLAG 序列 3' 的接头退火位点退火(参见图 1)。在上文序列中, X 指示“间隔区 9”, 可替代地称为三甘醇或 PEG-150。这个间隔区已得到最优化, 以提供用于嘌呤霉素插入真核核糖体 A 位点内的柔性。CC 包括标准 DNA 主链。嘌呤霉素 3' 修饰插入核糖体 A 位点内, 以在接头和新生肽之间产生稳定连接。关于本文描述的接头的消光系数是 147.7 OD₂₆₀/μmole。因为这种接头是光敏感的, 所以包含这种接头的溶液应被保护不受光。

[0125] 对于文库选择的初始循环, 推荐大规模连接反应(3.1×10^{15} 转录的 RNA 分子), 以取样文库的整个多样性。这种 RNA 量可以设为确保足够模板置于翻译反应内, 且产生 ~10 pmol 功能 mRNA 展示分子。在随后循环中, RNA 输入可以减少至 0.5 nmol/ 选择。在示例性实施方案中, RNA 连接反应可以包含下述组分: RNA、水、化学连接缓冲液和 PEG6/ 嘌呤霉素接头(1mM)。在示例性实施方案中, 总反应体积是 100 μL。在优选实施方案中, 接头 /RNA 摩尔比可以大于 1.5。在一个实施方案中, 反应中的最终接头浓度可以是约 15 μM, 并且反应中的 RNA 浓度范围可以为约 3 - 10 μM (= 0.3 - 1 nmol RNA 输入)。作为参考, 1 mg/mL 的 850 nt scFv RNA = 3.56 μM 和可达到的最大限度连接浓度是 3.16 μM (= 0.32 nmol)。

[0126] 退火反应(这使接头与转录的 RNA 退火)可以在热循环仪中执行。在优选实施方案中, 通过在约 85℃ 温育样品 30 秒, 随后在约 4℃, 可以执行退火反应, 其中使用约 0.3℃/秒的斜升速率。反应随后可以在 4℃ 保持。

[0127] 退火的接头 /RNA 的连接可以通过 UV 交联完成。这可以使用本领域技术人员已知的任何方法进行。在一个实施方案中, 反应管可以置于手提式 UV 灯(长波长, 约 365 nm)中

心上,并且交联约 15 分钟。制冷器包可以置于灯上,以帮助消散在 UV 照射过程中生成的热。一般连接效率是约 50 - 90%,并且通常不需要纯化。连接产物可以贮存于 -80℃。

[0128] 9. 翻译反应

在示例性实施方案中,在所有反应和纯化后,约 ~0.1% 输入 RNA 可以制备成 mRNA 展示分子。体外翻译可以使用本领域技术人员已知的方法和试剂进行。在一个实施方案中,使用 scFv 文库的翻译反应可以使用在约 15 mL 的反应体积中的约 5 nmol RNA 模板连同约 10 mL 网织红细胞裂解物。

[0129] 在用于翻译反应的制备中,GSSG/GSH (氧化谷胱甘肽 / 还原谷胱甘肽)溶液可以以约 100 mM GSSG/10 mM GSH 的最终浓度制备。通过使 PDI 粉末溶解于 dH₂O 内可以制备 PDI (蛋白质二硫键异构酶),以达到约 1 单位 / μ L 的浓度。PDI 溶液可以贮存于 -20℃。

[0130] 示例性翻译反应可以如下设立:

RNA (100 pmol)	X	X μ L
dH ₂ O	至 73.7	至 370 μ L
氨基酸主混合物 (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]甲硫氨酸	2	10 μ L
网织红细胞裂解物	200	1000 μ L
总体积	300	1500 μ L

翻译反应在 30℃ 水浴中温育 1 - 2 小时。当翻译体积超过 1.5 mL 时,观察到 RNA/ 蛋白质融合物得率中的显著降低。因此,如果反应体积将大于 1.5 mL,那么可以制备翻译反应的主混合物,然后将其分成更小等分试样。

[0131] 10. RNA/ 蛋白质融合物形成

在翻译反应后,对于每 300 μ L 翻译反应混合物,可以添加约 100 μ L 2M KCl 和约 20 μ L 1M MgCl₂,并且在室温温育 1 小时。这使在 mRNA 模板末端上的中止的核糖体稳定,并且允许在 DNA 接头的末端上的嘌呤霉素进入中止的核糖体的 A 位点,这使翻译的 scFv 蛋白质与其 mRNA 模板永久连接。如果反应将在 -20℃ 贮存过夜,那么室温温育可以缩短。反应可以通过添加 50 μ L 0.5 M EDTA 以破坏核糖体得到终止。反应可以贮存于 -20℃。可以取出 5 μ L 等分试样用于随后闪烁计数。

[0132] 11. 通过寡脱氧胸苷酸纤维素的 RNA/ 蛋白质融合物纯化

这个步骤从翻译 / 融合反应中纯化 mRNA 展示分子和剩余的 RNA 模板。对于寡脱氧胸苷酸结合,可以估计捕获所有 RNA 模板所需的预洗涤的寡脱氧胸苷酸纤维素量。足够体积的寡脱氧胸苷酸结合缓冲液可以添加到融合反应,以达到约 1X 最终浓度。随后可以添加预洗涤的寡脱氧胸苷酸纤维素,并且使反应在 4℃ 执行 1 小时。反应可以任选在 4℃ 以约 1500 rpm 离心 5 分钟,并且弃去上清液。可以转移寡脱氧胸苷酸纤维素珠,并且使用旋转柱,用 1X 寡脱氧胸苷酸结合缓冲液洗涤约 6 次,并且缓冲液一般可以通过使柱以约 1000 rpm 旋

转 10 秒去除。可以弃去流通物(flow-through),但可以保存末次洗涤用于闪烁计数。通过将 dH_2O 添加到珠中且在室温温育 5 分钟,可以洗脱 mRNA 展示分子(和游离 RNA 模板)。通过以约 4000 rpm 旋转 20 秒可以收集洗脱物。洗脱一般可以重复 1 次,且组合洗脱物。可以取出 5 μL 洗脱物用于闪烁计数。还可以通过在 NanoDrop 分光光度计机器(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)上在 260 nm 的 OD (OD_{260}) 评估寡脱氧胸苷酸纯化的效率。所有剩余的 RNA 模板和 mRNA 展示分子在理论上通过寡脱氧胸苷酸珠回收。5X FLAG 结合缓冲液可以添加到洗脱物中,以达到约 1X 最终浓度。样品可以贮存于 -80°C ,如果未进行至下一个 FLAG 纯化步骤的话。

[0133] 寡脱氧胸苷酸回收可以如下计算。计数约 5 μL 输入(来自融合反应)、来自末次洗涤的 100 μL 和 5 μL 输出(来自寡脱氧胸苷酸纯化的洗脱物)。末次洗涤用于评估洗涤程度,并且其他 2 个计数用于计算来自原始 RNA 模板输入的 RNA/蛋白质融合物回收。 $\text{RNA/蛋白质融合物得率}(\text{pmol}) = (\text{CPM}_{\text{输出}} \times \text{体积}_{\text{输出}} \times 5 \mu\text{M} \times \text{体积}_{\text{裂解物}}) / [\text{CPM}_{\text{输入}} \times \text{体积}_{\text{输入}} \times (\text{产物中的甲硫氨酸} \#)]$ 。这个公式假定网织红细胞裂解物中的 5 μM 甲硫氨酸浓度,并且计算中使用的所有体积表示为 μL 。对于较早的选择循环,mRNA 展示分子的得率一般是 0.5 - 2%,但在随后循环中可以增加至 10%。

[0134] 12. 通过抗 FLAG M2 琼脂糖的 RNA/蛋白质融合物纯化

这个步骤从剩余的 RNA 模板中纯化 mRNA 展示分子。可以估计捕获所有 mRNA 展示分子所需的预洗涤的抗 FLAG M2 琼脂糖珠的量。在一个实施方案中,珠的结合容量是约 6 nmol 融合蛋白 /mL 50%浆。为了具有足够的珠体积用于在结合和洗涤过程中处理,不推荐使用小于 200 μL 预洗涤的珠。下文给出的例子用于初始 300 μL 翻译反应。

[0135] 对于 FLAG 纯化,宽口移液管管尖可以用于将 300 μL 预洗涤的抗 FLAG M2 琼脂糖转移至寡脱氧胸苷酸纯化的输出。混合物可以混合,并且通过在 4°C 旋转 1 小时进行温育。与抗 FLAG M2 琼脂糖温育可继续过夜。抗 FLAG M2 琼脂糖可以任选在 4°C 在离心机中以约 1500 rpm 旋转 1 分钟,并且可以弃去上清液。抗 FLAG 珠可以用 1X FLAG 结合缓冲液洗涤约 5 次,其中使用旋转柱和对于每次洗涤以约 1000 rpm 离心 10 秒。可以弃去流通物。通过以约 1000 rpm 离心 10 秒,珠可以另外用 700 μL 选择缓冲液(参见下文)洗涤 2 次。可以保存末次洗涤用于闪烁计数。通过添加约 400 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ FLAG 肽(在选择缓冲液中)且在室温温育 5 分钟,可以洗脱 mRNA 展示分子。洗脱物可以通过以约 3000 rpm 旋转 20 秒进行收集,且通过添加约 400 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ FLAG 肽,可以再洗脱一次。2 种洗脱物可以组合,并且可以取出 5 μL 组合的洗脱物用于闪烁计数。这个体积的 FLAG 肽一般足以洗脱最高达约 1 mL 50%浆,并且如果使用较少的浆和/或需要更高的 RNA/蛋白质融合物浓度,那么可以减半(cut in half)(200 μL)。为了预防在贮存和抗原选择过程中的 RNA 降解,适量的本领域已知的 RNA 酶抑制剂(即,1 - 2 U/ μL RNaseOUT 和 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 酵母 tRNA)可以添加到纯化的 mRNA 展示文库中。如果不进行至下一个抗原选择步骤,那么将样品贮存于 -80°C 。

[0136] 为了定量 FLAG 回收,可以在 β 计数器上计数约 5 μL 洗脱输出和来自末次洗涤的约 100 μL 。可以预期 10-30%或更高的回收,并且可以根据下式进行计算:

$$\text{PROfusion 分子回收}\% = (\text{CPM}_{\text{输出}} \times \text{体积}_{\text{输出}}) / (\text{CPM}_{\text{输入}} \times \text{体积}_{\text{输入}})。$$

[0137] 13. 通过生物素化的抗原的文库选择

设计选择以富集与目的靶特异性结合的分子。可能需要阴性选择(预澄清),以去除非特异性和基质结合剂。依赖于靶形式,选择规程改变。下述是用于与生物素化的靶一起使用的示例性选择规程。这种规程可以进行修饰,以适应以其他形式的靶抗原,并且依赖于所需输出可以按比例扩大或缩小。

[0138] A. 在选择前的制备

链霉抗生物素蛋白(SA)磁珠可以用于捕获,并且一般在使用前预封闭。SA 珠可以从原始瓶转移到 1.5 或 2 mL 管,并且用 2 mL 1X FLAG 结合缓冲液洗涤 2 次。珠随后可以用 2 mL 选择缓冲液在 4℃ 伴随旋转封闭 2 小时到过夜。应制备足够珠用于预澄清和选择捕获。预封闭的珠贮存于 4℃。约 100 μ L 珠一般用于每 10 pmol 生物素化的抗原。

[0139] 1.5 mL 或 2 mL 微量离心(microfuge tube)管用 1X FLAG 结合缓冲液预封闭约 1 小时到过夜。预封闭的管可以用于所有预澄清和选择步骤。一般地需要 4 个管用于每个样品:2 个用于预澄清,1 个用于珠,并且 1 个用于选择。

[0140] 最优结果可以通过使文库预澄清获得。FLAG 纯化的 mRNA 展示文库可以添加到 SA 珠(与缓冲液分离)。SA 珠的体积可以等于捕获体积一半。在使用磁体使预澄清的 mRNA 展示文库与 SA 珠分离前,总混合物可以在 30℃ 伴随旋转温育 30 分钟。再重复一次这个预澄清步骤,并且第二次预澄清的 SA 珠可以如上文所述洗涤且计数,以测定本底是否高。这还可以充当‘无抗原’阴性对照。

[0141] B. 文库选择:结合

对于第一轮选择,生物素化的靶可以添加到(100 nM)整个预澄清的文库,并且在 30℃ 伴随旋转温育 1 小时。对于随后的选择循环,当抗原结合分子的回收预期超过 1% 时,预澄清的文库可以分成 2 个相等分试样。生物素化的抗原可以添加到一个等分试样,并且另一个充当‘无抗原’阴性对照。可替代地,洗涤的第二次预澄清珠也可以被视为‘无抗原’对照,如上所述,尽管这些珠将具有一次较少的‘预澄清’程序。当抗原结合分子的回收超过 5% 时,随后循环中的抗原浓度可能降低。

[0142] C. 文库选择:捕获

预封闭的 SA 珠(与缓冲液分离)可以添加到结合反应,并且在 30℃ 伴随旋转温育 5 - 10 分钟。用于捕获的 SA 珠的量应基于容量和选择中使用的靶浓度进行计算(参见上文)。当降低靶浓度以避免 SA 珠结合剂时,SA 珠的量应降低,但一般使用不小于 50 μ L 的珠。

[0143] D. 文库选择:洗涤

SA 珠可以使用磁体进行收集,并且可以用 1 mL 选择缓冲液洗涤 1 分钟。珠再次使用磁体进行收集,并且再洗涤约 5 次(总共约 6 次)。洗涤时间可以在随后循环中增加,以对一些靶掺入解离速率选择策略。珠可以用适合于逆转录的 1 mL 1X 缓冲液洗涤最后一次。用磁体收集珠,并且在水中重悬浮(上文计算的捕获珠体积的四分之一)。

[0144] E. 文库选择:计数和回收计算

从第 3 轮开始,计数约 10 - 20% 的末次洗涤和珠。一般仅计数小于 100 μ L 珠,因为更多的珠可以猝灭计数。文库选择回收根据下式进行计算:

$$\text{选择回收 \%} = 100 \times \text{CPM}_{\text{总珠}} / \text{CPM}_{\text{总输入。}}$$

[0145] 14. 通过 RT-PCR 再次扩增文库 DNA

逆转录可以使用由文库捕获的材料执行。本领域已知的试剂和规程适合于执行逆转录

反应。反应体积可以根据在选择后的珠体积按比例扩大或缩小。

[0146] 用于逆转录的示例性引物显示于表 3 中, 尽管可以使用本领域已知的方法设计另外引物。Cκ 反向引物用于 κ 文库, CJL 反向引物用于 λ 文库, 并且 Lib-GS-Rev 用于人 PBMC VH 文库。

[0147] 表 3: 适合于逆转录的示例性引物

Cκ 反向 (SEQ ID NO:14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTG CAGCCACAGTTCCG
CJL 反向 (SEQ ID NO:15)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGT TGGCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT
Lib-GS-Rev (VH, PBMC) (SEQ ID NO:16)	CGCTACCTCCGCCGCCAGAC

示例性逆转录反应可以包含来自文库选择的珠(在水中)、约 10 μM 反向引物和约 10 mM dNTP。反应在 65°C 温育 5 分钟, 并且在冰上冷却。随后一般将第一链合成缓冲液、0.1M DTT 和 RNA 酶抑制剂添加到反应中。在添加逆转录酶前, 逆转录反应在 42°C 温育 2 分钟。反应随后在 42°C 伴随偶尔搅动温育 50 分钟, 并且进一步在 95°C 温育 5 分钟。珠随后通过磁体进行收集, 并且将上清液转移至新管, 如果它来自相同选择输出, 那么可以将其合并。使珠重悬浮于水中(一半 RT 体积), 并且在管中在 95°C 温育 5 分钟。珠再次使用磁体进行收集, 并且上清液与先前转移的上清液合并。这包含用于选择输出的 PCR 扩增的 cDNA 模板。

[0148] 谱型分析 PCR 可以用于分析文库或其选择输出中的 VH CDR3 大小分布。它是评估文库多样性和选择进展的有用工具。初始少数轮文库选择输出和在选择前的文库应是非常多样的, 并且 CDR3 大小分布近似高斯分布。示例性谱型分析 PCR 引物显示于表 4 中。

[0149] 表 4: 示例性谱型分析 PCR 引物

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

示例性谱型分析 PCR 反应显示于下表 5 中, 尽管反应组分可以用本领域已知的可比较试剂置换, 并且可以调整反应体积以适应选择反应的规模。

[0150] 表 5: 示例性谱型分析 PCR 反应

cDNA 模板	2.0 μL
dH ₂ O	18.1 μL
5X 热稳定的 DNA 聚合酶反应缓冲液	6.0 μL
25 mM MgCl ₂	1.8 μL
10 mM dNTP	0.6 μL
5' 正向引物 (10 μM)	0.6 μL
3' 反向引物 (10 μM)	0.6 μL

热稳定的 DNA 聚合酶

0.3 μ L

总体积

30.0 μ L

本领域已知的热稳定的 DNA 聚合酶适合于这个反应。在示例性实施方案中,最终 Mg^{2+} 浓度是 1.5 mM。作为示例性热循环程序,反应在 94°C 温育 2 分钟,并且随后实施 30 个热循环,以延长 DNA。对于每个循环,反应在 94°C 温育 20 秒,在 55°C 进行 20 秒,并且随后在 72°C 进行 30 秒。在 30 个循环后,反应进一步在 72°C 温育 5 分钟,并且随后贮存于 4°C。在 PCR 后,将 10 μ L PCR 产物装载到 2% 琼脂糖凝胶上,以证实反应是成功的。反应和剩余的产物通过谱型分析电泳进行分析。

[0151] 扩增的 DNA 产物具有下述组织:

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

[0152] VH CDR3 大小可以由表观 DNA 产物大小推断。这可以使用下述计算通过 Rox 染料大小标记进行测定:

$$\text{大小}_{\text{VH CDR3}} = (\text{Size}_{\text{表观 DNA 产物大小}} - 60) / 3$$

其中 60 = (62_{在 2 个末端上的构架} - 1_{3' A 突出端} + 3_{DNA 标记低估})。

[0153] 15. 用于文库 DNA 模板扩增的 PCR

对于来自第一轮和第二轮的选择输出, cDNA (来自 RT 反应的上清液) 可以针对水进行透析, 其中使用 8 kDa 截止, 并且完整量的 cDNA 可以用作 PCR 模板。对于来自后续循环的选择输出, 10% cDNA 用作 PCR 的模板, 并且透析一般不是必需的。示例性扩增引物显示于表 6 中。

[0154] 表 6: 扩增引物

引物	序列 (5' - 3')
用于所有 scFv 和 VH 文库的正向引物	
T7TMVUTR ^a (SEQ ID NO:1)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTA CA
用于所有 V _K 和 V _L 文库的正向引物	
VL- T7TMVTag3GS- Fwd (SEQ ID NO:2)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTA CAGGCTTTGGACCATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
用于所有 K _H scFv 和 V _K 文库的反向引物	
Ck1-FlagA20 Rev (SEQ ID NO:3)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCGAA GACAGAT
Ck2-FlagA20 Rev (SEQ ID NO:4)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCGAAGACAGATGGT
Ck3-FlagA20 Rev (SEQ ID NO:5)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCGAAGACAGATGGTGCA
Ck4-FlagA20 Rev (SEQ ID NO:6)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCGAAGACAGATGGTGACAGCC
Ck5-FlagA20 Rev ^b (SEQ ID NO:7)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCGAAGACAGATGGTGACAGCCACA
用于所有 L _H scFv 和 V _L 文库的反向引物	
CL1FLAGA20 Rev ^b (SEQ ID NO:8)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCAGTGACAGTG
CL2FLAGA20 Rev (SEQ ID NO:9)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCAGTGACAGTGGGG
CL3FLAGA20 Rev (SEQ ID NO:10)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCAGTGACAGTGGGGTTG
CL4FLAGA20 Rev (SEQ ID NO:11)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGCC
CL5FLAGA20 Rev (SEQ ID NO:12)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTC GTCGTCCTTGTAAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG
用于所有 VH 文库的反向引物	
VH-GSFLAGA20-	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCATC

Rev (SEQ ID NO:13)	ATCATCTTTATAATCGCTACCTCCGCCGCCAGAC
^a 还可以使用T7MVT _{ag} -引物(标记的序列依赖于文库)。	
^b 优选引物	

用于文库 DNA 模板扩增的示例性 PCR 反应显示于下表 7 中。

[0155] 表 7:用于文库 DNA 模板扩增的示例性 PCR 反应

cDNA 模板	X μ L
dH ₂ O	加入至 790 μ L
10X High Fidelity Taq DNA 聚合酶缓冲液	100 μ L
MgSO ₄ (50 mM)	40 μ L
10 mM dNTP	20 μ L
5' 正向引物(10 μ M)	20 μ L
3' 反向引物 (10 μ M)	20 μ L
High Fidelity Taq DNA 聚合酶	10 μ L
总体积	1000 μ L

在示例性实施方案中,1 mL PCR 反应用于第 1 和 2 轮输出,并且 0.5 mL 反应用于来自后面循环的输出。应由主混合物制备 100 μ L 反应的等分试样。用于文库 DNA 模板扩增的示例性热循环条件显示于下表 8 中。

[0156] 表 8:用于文库 DNA 模板扩增的热循环条件

94 °C	2 分钟	
	↓	
94 °C	20 秒	} 25 个循环*
55 °C	20 秒	
68 °C	1 分钟	
	↓	
68 °C	5 分钟	
	↓	
4 °C	长时间保持	

* 注:25 个循环一般给出足够扩增,但它可以增至多达 35 个循环以获得更多产物。对于另外扩增循环,各种大小的非特异性产物可以变得更明显,并且产物可能需要进行凝胶纯化。若可能,则增加 DNA 模板输入而不是扩增循环数目可能是有帮助的。

[0157] 在 PCR 后,将 5 - 10 μ L 产物装载到具有合适 DNA 大小标记的 1.2% 琼脂糖凝胶

上,以检查结果。如果产物是正确大小(对于 scFv ~850 bp,对于 VH 或 VL 文库 ~500 bp),并且具有最低限度非特异性产物,那么它们可以直接用于下一轮转录反应中。产物可能需要进行凝胶纯化。如果将对于 PCR 产物进行凝胶纯化,那么在制备型琼脂糖凝胶上分离所有剩余的产物,并且可以切出包含产物的特异性条带用于凝胶提取。凝胶纯化的 DNA 的定量可能是易误解的,这是因为 DNA 中的残留 EtBr 趋于干扰 UV 吸光度。在凝胶提取过程中更强烈的洗涤步骤可以帮助减轻这种干扰。若可能,则 DNA 浓度应在分光光度计上进行测量,这是因为 UV 扫描痕量在干净的 DNA 样品和具有残留的 EtBr 的 DNA 之间是非常不同的。随后重复这种规程以进行多轮选择。

[0158] 16. 示例性试剂和缓冲液组成

10X 化学连接缓冲液

Tris, pH 7	250 mM		
NaCl	1 M		
寡脱氧胸苷酸结合缓冲液	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 结合缓冲液	1X	5X	
基于磷酸盐的缓冲液			
PBS	1X	5X	
Triton X-100	0.025	0.125%	
可替代的基于 HEPES 的缓冲液			
HEPES	50	250 mM	
NaCl	150	750 mM	
Triton X-100	0.025	0.125%	
选择缓冲液			
基于磷酸盐的缓冲液			
PBS	1X		
BSA	1 mg/mL		
鲑精 DNA	0.1 mg/mL		
Triton X-100	0.025%		
酵母 tRNA (任选的,在使用前添加)	20 ng/mL		
可替代的基于 HEPES 的缓冲液			
HEPES	50 mM		
NaCl	150 mM		
BSA	1 mg/mL		
鲑精 DNA	0.1 mg/mL		
Triton X-100	0.025%		
酵母 tRNA (任选的,在使用前添加)	20 ng/mL		
第一链缓冲液			

Tris-HCl, pH 8.3	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM
50X FLAG 母液	
FLAG 肽	25 mg
选择缓冲液	5 mL

制备 1 mL 等分试样且贮存于 -20℃。

[0159] FLAG 洗脱缓冲液

50X FLAG 母液	1 mL
选择缓冲液	49 mL

制备 1 mL 等分试样且贮存于 -20℃

寡脱氧胸苷酸纤维素制剂

可将 2.5 g 寡脱氧胸苷酸纤维素转移到 50 mL 管内, 且与 25 mL 0.1 N NaOH 混合。混合物可以以 1500 rpm 离心 3 分钟, 且弃去上清液。随后可以用 25 mL 1X 寡脱氧胸苷酸结合缓冲液洗涤寡脱氧胸苷酸纤维素, 并且以 1500 rpm 离心 3 分钟。可以弃去上清液。洗涤步骤可以再重复 3 次, 并且测量上清液的 pH。pH 应与洗涤缓冲液相同 (~ pH 8.5)。通过添加 1X 寡脱氧胸苷酸结合缓冲液, 可以使寡脱氧胸苷酸纤维素重悬浮至 25 mL 的最终体积, 以制备约 50% 浆, 并且贮存于 4℃。最终浓度 = 100 mg/mL = 1 nmol RNA 容量。

[0160] 抗 FLAG M2 琼脂糖制剂

25 mL M2 琼脂糖珠可以转移到 50 mL 管内, 并且在 Beckman 离心机 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 中以 1000 rpm 离心 5 分钟。可以通过抽吸去除上清液。所得到的珠可以重悬浮, 在等体积的 10 mM 甘氨酸 (pH 3.5) 中洗涤, 并且以 1000 rpm 离心 5 分钟。再次通过抽吸去除上清液。用 1 柱体积的 1X FLAG 结合缓冲液使珠重悬浮, 并且以 1000 rpm 离心 5 分钟。通过抽吸去除上清液。这个洗涤步骤可以重复 3 次, 并且用 1 柱体积的 1X 结合缓冲液 (包含 1 mg/mL BSA 和 100 mg/mL 鲑精 DNA) 使珠重悬浮。混合物可以在 4℃ 旋转 1 小时或过夜, 并且若需要则分成 2 mL 级分的等分试样, 并且保持在 4℃。

[0161] 实施例 2

功能 mRNA-scFv 分子的证实

4 种抗体用于证实功能 mRNA-scFv 分子可以展示且与其各自抗原结合: D2E7 (人抗 hTNF)、Y61 (人抗 hIL-12)、17/9 (小鼠抗 HA) 和 MAK195 (小鼠抗 hTNF)。使用表 9 中的下述引物, 通过 PCR 生成 MAK195 scFv。

[0162] 表 9: 用于构建 MAK195 mRNA-scFv 构建体的寡核苷酸引物

引物	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)	GATGGTGCAGCCACCGTACGTTTTATTTCCAAC TTTGTCCCCGAG

基于由 NCBI 的数据库下载的蛋白质序列 A31790 和 B31790(参见下表 10),使用下述引物,通过 PCR 生成抗 HA 17/9 scFv (参见 Schulze-Gahmen 等人(1993)J. Mol. Biol. 234 (4):1098-118)。

[0163] 表 10: 用于构建 17/9 mRNA-scFv 构建体的寡核苷酸引物

引物	序列
T7TMVUTR-17/9 VH-1 Fwd (SEQ ID NO: 23)	GGACAATTACTATTTACAATTACACCATGGAAG TGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGATCTGGTG AAACC

引物	序列
17/9 VH-2 Rev (SEQ ID NO: 24)	GCTGCTAAAGCTAAAGCCGCTCGCCGCGCAGCT CAGTTTCAGGCTGCCGCCCGGTTTCACCAGATC 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)	CCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATTAGC 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)	GTTTAACAGCGGCAAAACAGAAAACTATCTGA CCTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGCCGCCG AAAGTG
17/9 VL-4 Rev (SEQ ID NO: 34)	CGGTAAAGCGATCCGGCACGCCGCTTTCGCGGG TGCTCGCCCAATAAATCAGCACTTTCGGCGGCT

引物	序列
	GGCC
17/9 VL-5 Fwd (SEQ ID NO: 35)	TGCCGGATCGCTTTACCGGCAGCGGCAGCGGCA CCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCGTGCAGG CGGA
17/9 VL-6 Rev (SEQ ID NO: 36)	AAAGGTCAGCGGGTTGCTATAATCGTTCGGCA ATAATACACCGCCAGATCTTCCGCCTGCACGCT GCTA
17/9 VL-7 Fwd (SEQ ID NO: 37)	AGCAACCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCACCAAA CTGGAACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT GTCT
17/9 VL-8 Flag Rev (SEQ ID NO: 38)	TTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTT GTAGTCGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACC

17/9 抗体序列使用登记号 A31790 和 B31790 从 NCBI 数据库中检索。

[0164] 关于这些 scFv 的 DNA 构建体在体外转录,并且随后在兔网织红细胞裂解物中翻译为 mRNA-scFv (蛋白质经由具有嘌呤霉素修饰的接头与 mRNA 附着)或游离 scFv (蛋白质不与 mRNA 附着)。纯化 2 种类型的分子且通过相应生物素化的抗原实施拉下 (pull-down) 测定 (参见图 4)。

[0165] 图 4 中的数据显示功能 mRNA-scFv (与生物素化的抗原结合) 分子通过链霉抗生物素蛋白-磁珠拉下,尽管以比游离 scFv 分子更低的百分比回收。进一步的实验显示这种差异仅仅是由于与 scFv 栓系的大 RNA 分子。来自 mRNA-scFv 分子的 RNA 部分的 RNA 酶降解使通过抗原的 scFv 回收恢复至与游离 scFv 分子的那种相同的水平 (参见图 5)。

[0166] 实施例 3

mRNA-scFv 文库构建

来自 18 个供体的人外周血单核细胞 (PBMC) 得自 SeraCare。下表 11 显示了通过荧光激活细胞分选 (FACS) 法的 PBMC 分析。随后提取聚腺苷酸 RNA 用于文库构建。

[0167] 表 11: 通过 FACS 的 PBMC 分析

批次	总细胞数目 /小瓶, $\times 10^6$	CD20+细胞			CD27+/CD20+ 总计
		CD27-	CD27+	总计	
#012505	22	2.8%	5.6%	8.4%	67%
#020805	21	12.1%	2.4%	14.5%	17%
#022205A	23	4.9%	3.7%	8.5%	43%
#030305A	14	7.6%	3.5%	11.1%	32%
#032905A	11	3.8%	2.8%	6.7%	42%
#041205A	23	4.9%	4.8%	9.7%	49%
#041405A	23	5.9%	3.2%	9.1%	35%
#041905A	18	5.1%	2.2%	7.3%	30%
#042604B	26	9.3%	2.5%	11.9%	21%
#042805B	24	11.4%	1.9%	13.3%	14%
#050305B	17	7.4%	3.1%	10.5%	30%
#050505B	20	6.2%	2.4%	8.6%	28%
#051005B	18	6.7%	3.1%	9.7%	32%
#051205B	17	7.6%	2.4%	10.1%	24%
#051705B	16	7.3%	2.1%	9.4%	23%
#051905A	27	4.8%	0.7%	5.5%	13%
#052405I	28	7.4%	2.2%	9.6%	23%
#122105	14	11.4%	1.4%	12.8%	11%

实施例 4

文库标记选择

选择 4 个 8 碱基对标记 (SEQ ID NOs :39-42), 并且将其插入 17/9 mRNA-scFv 构建体的 TMV-UTR 和 Kozak 共有序列之间 (参见图 6)。标记序列设计为不包括腺苷且在 3 轮选择后鉴定。如图 6 中可见, 第一个位置优选 G, 并且第二个位置优选 T。通过设计在 5' UTR 的 TMV 和 Kozak 共有序列之间具有 8 个随机 (B=G、C、T) 核苷酸插入的 5' 引物生成随机序列标记 (参见图 7)。随后扩增 17/9 scFv, 并且通过 2-3 轮选择进行选择, 其中后续循环用 5' 引物再扩增。随后处理序列输出, 以鉴定经过选择过程的标记。来自每个循环的不同输出标记显示于图 8 中。一些重复序列在每个循环内部可见, 然而, 标记序列在多个循环中不可见。应当指出在第 2 轮中在标记中存在一个可能突变, 因为 ATG 序列在标记序列中应是不可能的。

[0168] 实施例 5

关于 17/9 scFv 的文库选择

为了证实 mRNA-scFv 分子可以使用本文描述的 mRNA 展示方法通过几轮选择进行富集, 通过重叠 PCR 法构建具有多样性 25 的 scFv 文库。为了生成 scFv 文库, 如上所述使用 17/9、D2E7、2SD4、Y61 和 MAK195 的 VH 和 VL 片段。随后通过生物素化的 HA 标记从这种文库中选

择 17/9 scFv。在选择后,通过克隆和集落 PCR 检查 17/9 富集。定量在一轮 mRNA-scFv 选择前和后的 17/9 scFv 的结果显示于图 9 中。

[0169] 实施例 6

mRNA 展示技术用于区别具有不同亲和力的 scFv 结合剂

为了测定 mRNA 展示技术即如上所述是否用于区别具有不同亲和力的 scFv 结合剂,制备在 D2E7 和 2SD4 之间的嵌合体。2SD4 是对于 TNF α 显示出低亲和力(KD ~ 200 nM 作为游离蛋白质)的 D2E7 scFv 前体。图 10 描述了嵌合体。

[0170] 对于游离蛋白质执行滴定。图 11 显示在不同嵌合体之间在抗原结合后的回收百分比,以及在抗原选择后标准化的回收百分比。上述结果显示如本文描述的 mRNA 展示技术可以用于区别具有不同亲和力的结合剂。

[0171] 实施例 7

mRNA-scFv 分子的热稳定性

为了测定 mRNA-scFv 分子的热稳定性,D2E7-scCk 和 Y61-scCk 以 mRNA-scFv 形式翻译且纯化,如本文描述的。mRNA-scFv 分子随后在抗原选择前在不同温度温育 30 分钟。在抗原选择后标准化的回收百分比显示于图 12 中。

[0172] 图 13 显示了 RNA 可以在 mRNA-scFv 分子的高温处理后回收。此处,在具有回收的 Y61-scC1 mRNA-scFv 分子的珠上执行 RT-PCR。

[0173] 实施例 8

由人 PBMC RNA 构建首次用于实验的 κ PROfusion scFv 文库

下述实施例描述了使用 PROfusion 技术生成适合于选择的人首次用于实验的 κ scFv 文库。

[0174] 人外周血单核细胞(PBMCs)购自 SeraCare (Milford,MA,目录 # 72000)。来自不同供体的细胞通过用抗人 CD20-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, 目录 # 556632)和抗人 CD27-PE (BD Pharmingen, 目录 # 555441)抗体染色进行表征。根据制造商的规程,使用 RNeasy Midi Kit (QIAGEN, Valencia, CA, 目录 # 75144)从 PBMCs 中分离总 RNA。简言之,使冷冻的细胞在 37°C 快速解冻,重悬浮于含有异硫氰酸胍的缓冲液中,并且通过多次经过 21G 针进行匀浆。添加乙醇,并且将裂解物应用于 RNeasy midi 柱(总共 18 个柱)。洗涤柱,并且用无 RNA 酶水洗脱总 RNA。通过测量 OD 260 nm 吸光度来测定 RNA 浓度和得率。随后使用 Invitrogen Fastrack MAG Maxi mRNA Isolation kit(目录 #K1580-02),根据试剂盒手册从总 RNA 中分离 mRNA。在程序过程中添加 RNA 酶抑制剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, 目录 #10777-019),以使 RNA 降解降到最低。首先用 DNA 酶(Invitrogen, 目录 #18-68-015)处理总 RNA,以使基因组 DNA 污染降到最低。简言之,首先洗涤寡脱氧胸苷酸磁珠,并且随后添加到总 RNA 中,在 65°C 温育 10 分钟,并且随后允许在室温结合 30 分钟。使珠洗涤几次,并且通过无 RNA 酶水洗脱结合的 mRNA。通过测量 OD₂₆₀ nm 吸光度来定量 mRNA。

[0175] 逆转录

随后根据制造商的规程,通过 SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, 目录 # 18064-014)和 15 种引物的混合物(100 nM 总浓度)(表 12),由 37 μ g mRNA 合成第一链 cDNA。反应以各 0.9 ml 的 2 个等分试样完成。通过经过 36 MicroSpin S-200 HR 柱(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, 目录 # 27-5120-01)(50 μ l/柱)

纯化 RT 反应(1.8 ml 总体积)。使柱洗脱物与 RNA 酶 H 在 37℃温育 20 分钟。

[0176] 表 12 逆转录引物

名称	寡核苷酸序列
FcγRev1 (SEQ ID NO: 43)	AGTTCCACGACACC
FcγRev2 (SEQ ID NO: 44)	GAAGGTGTGCACG
FcγRev3 (SEQ ID NO: 45)	CCACGCTGCTGAG
FcμRev1 (SEQ ID NO: 46)	ACTTTGCACACCAC
FcμRev2 (SEQ ID NO: 47)	TTTGTTGCCGTTGG
FcμRev3 (SEQ ID NO: 48)	GGAATTCTCACAGG
FcδRev1 (SEQ ID NO: 49)	GCTGCTTGTCATGT
FcδRev2 (SEQ ID NO: 50)	TGCCTTTGGAGACT
FcδRev3 (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)	GGAACAGAGTGAC
CλRev2 (SEQ ID NO: 56)	GTGTGGCCTTGTTG
CλRev3 (SEQ ID NO: 57)	CCATCTGCCTTCCA

VH cDNA 扩增

在包含 VH 前导序列(LS)特异性正向引物(200 nM 总浓度)的混合物和 JH 特异性反向引物(200 nM 总浓度)的混合物的反应中(表 13),通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, 目录 # 11304-102),对三分之一的上述 RT 反应实施限制性扩增。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (30 秒)、55℃ (30 秒)和 68℃ (60 秒)的 10 个循环;随后为 3 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。随后根据制造商的规程,通过 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, 目录 # 28106)纯化 PCR 产物。小规模预实验证实 cDNA 的至少 100 倍扩增。

[0177] 表 13 用于 VH 片段扩增的引物

名称	寡核苷酸序列
VH1/7LS (SEQ ID NO: 58)	ATCCTCTTYTTGGTGGSAGC
VH1-46LS (SEQ ID NO: 59)	GGTCTTCTGCTTGCTGGCTG
VH2LS (SEQ ID NO: 60)	CCTGCTGCTGACCAAYCCCTTC
VH3LS (SEQ ID NO: 61)	GCTATTTTWVVRAGGTGTCCARTGT
VH4LS (SEQ ID NO: 62)	GCRGCTCCCAGATGGGTCCTG
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

1/100 的纯化 PCR 产物用作模板用于扩增每种 VH 家族特异性 cDNA。在包含个别 VH LS 特异性正向引物 (200 nM) 和 JH 特异性反向引物 (200 nM 总浓度) 的混合物的反应中 (表 13), 通过 PCR 用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 执行扩增。PCR 条件如下: 初始 2 分钟的 94°C 变性; 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 和 68°C (40 秒) 的 25 个循环; 随后为 3 分钟的 68°C 延伸和 4°C 贮存步骤。

[0178] 随后根据制造商的规程, 通过 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA) 纯化上述 PCR 产物。随后在包含相应 VH 特异性嵌套正向引物 (200 nM) 和 JH 特异性反向引物 (200 nM 总浓度) 的混合物的 PCR 反应中 (表 14), 通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 扩增每种 PCR 产物。每次反应中的正向引物携带 8 核苷酸“标记” (有下划线的), 其被引入以增加后续文库扩增过程中的特异性。PCR 条件如下: 初始 2 分钟的 94°C 变性; 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 和 68°C (40 秒) 的 25 个循环; 随后为 3 分钟的 68°C 延伸和 4°C 贮存步骤。

[0179] 表 14 用于嵌套式 VH 特异性 PCR 的引物

名称	寡核苷酸序列
VH1Tag2Forward (SEQ ID NO: 69)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAGTCTGGRSCT
VH2Tag2Forward (SEQ ID NO: 70)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGRTCACCTTGAR GGAGTCTGGT
VH3Tag2Forward (SEQ ID NO: 71)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGKT GGAGTCTSGRGA
VH4Tag2Forward (SEQ ID NO: 72)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGCA GSAGTSSGGC
VH5Tag2Forward (SEQ ID NO: 73)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAGTCTGGAGCA
VH6Tag2Forward (SEQ ID NO: 74)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTACAGCTGCA GCAGTCAG
VH7Tag2Forward (SEQ ID NO: 75)	TTTACAATTACAGTGTGCGACCATGGAGGTGCAGCTGGT GCAATCTGGGT
JHReverse1/2 (SEQ ID NO: 76)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGAC RGTGACCAGGGTGC
JHReverse4/5 (SEQ ID NO: 77)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGAC GGTGACCAGGGTTC
JHReverse6 (SEQ ID NO: 78)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGAC GGTGACCGTGGTCC
JHReverse3 (SEQ ID NO: 79)	CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAAGAGAC GGTGACCATTTGTCC

对 PCR 产物实施 1 % 琼脂糖凝胶电泳, 并且通过 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, 目录 # 28704) 纯化。通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 200 nM 下述通用引物, 在 PCR 反应中以大规模进一步扩增这些 PCR 产物的等分试样:

T7TMVTag2 (SEQ ID NO: 80):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTGTGCGAC

文库 -GS- 反向 (SEQ ID NO: 16): CGCTACCTCCGCCGCCAGAC.

。

[0180] 这些引物给 PCR 产物的 5' 末端添加 T7 启动子和 TMV-UTR 序列, 且给 PCR 产物的 3' 末端添加部分甘氨酸-丝氨酸(G4S)接头。PCR 条件如下: 初始 2 分钟的 94°C 变性; 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 和 68°C (40 秒) 的 26 个循环; 随后为 3 分钟的 68°C 延伸和 4°C 贮存步骤。

[0181] 用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA) 纯化 PCR 产物, 通过

在 260 nm 下的 UV 吸光度定量,并且通过 1% 琼脂糖凝胶电泳显现这些产物的等分试样,以证实纯度。使用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641) 克隆 VH 家族特异性 cDNA 片段的等分试样,并且通过测序分析个别克隆。

[0182] V_κ cDNA 扩增

在包含 V_κ 前导序列 (LS) 特异性正向引物 (总浓度 200 nM) 和 C_κ 特异性反向引物 (200 nM) 的混合物的反应中 (表 15), 通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA), 对由前述 RT 反应生成的三分之一 cDNA 实施限制性扩增。PCR 条件如下: 初始 2 分钟的 94°C 变性; 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 和 68°C (60 秒) 的 10 个循环; 随后为 3 分钟的 68°C 延伸和 4°C 贮存步骤。分开的小规模实验证实 cDNA 通过此种 PCR 的 10 - 100 倍扩增。

[0183] 根据制造商的规程, 用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA,) 纯化 PCR 产物。1/500 的纯化 PCR 产物用作模板用于扩增每种 V_κ 家族特异性 cDNA。在包含个别 V_κ LS 特异性正向引物 (200 nM) 和 C_κ 特异性反向引物 (200 nM) 的反应中 (表 16), 通过 PCR 用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 完成扩增。PCR 条件如下: 初始 2 分钟的 94°C 变性; 94°C (30 秒)、55°C (30 秒) 和 68°C (40 秒) 的 25 个循环; 随后为 3 分钟的 68°C 延伸和 4°C 贮存步骤。

[0184] 表 15 用于 V_κ 片段扩增的引物

名称	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 -sReverse (SEQ ID NO: 87)	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

表 16 用于嵌套式 V_κ 特异性 PCR 的引物

名称	寡核苷酸序列
Vκ1 正向 (SEQ ID NO:88)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACA TCCRGWTGACCCAGTCTCCWT
Vκ2 正向 (SEQ ID NO:89)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATA TTGTGATGACYCAGWCTCCAC
Vκ3 正向 (SEQ ID NO:90)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAATT GTGWTGACRCAGTCTCCAGSCA
Vκ4/6 正向 (SEQ ID NO:91)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACA TCGTGMTGACYCAGTCTCCAGA
Vκ5 For-Redo (SEQ ID NO:92)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAACG ACACTCACGCAGTCTCCAGCAT
Vκ6 For-NEW (SEQ ID NO: 93)	CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATGTC GTGATGACACAGTCTCCAGCTT
Cκ反向 (SEQ ID NO:14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGAAGACAGATGGTGCAGC CACAGTTTCG

根据制造商的规程,用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)纯化 PCR 产物。随后在包含相应 Vκ 特异性嵌套正向引物(200 nM)和 Cκ 特异性反向引物(200 nM)的 PCR 反应中(表 13),通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity(Invitrogen, Carlsbad, CA)扩增每种 PCR 产物。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃ 变性;94℃ (30 秒)、55℃ (30 秒)和 68℃ (40 秒)的 25 个循环;随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。

[0185] 对 PCR 产物实施 1% 琼脂糖凝胶电泳,并且通过 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA) 纯化。在包含 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和下述通用引物(200 nM)的 PCR 反应中,以大规模进一步扩增这些 PCR 产物的等分试样:

文库 -GS- 正向 (SEQ ID NO: 94): GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
FlagA20Rev (SEQ ID NO: 95):
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTC

。

[0186] 这些引物给 PCR 产物的 5' 末端添加部分 G4S- 接头,且给所得到的 PCR 产物的 3' 末端添加 FLAG 标记、接头退火位点和聚腺苷酸尾。

[0187] PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃ 变性;94℃ (30 秒)、55℃ (30 秒)和 68℃ (30 秒)的 26 个循环;随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA) 纯化 PCR 产物,通过在 260 nm 下的 UV 吸光度定量,并且通过 1% 琼脂糖凝胶电泳显现这些产物的等分试样,以证实纯度。使用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641) 克隆所得到的 Vκ 家族特异性 cDNA 片段的部分,并且通过

测序分析个别克隆。

[0188] VH-Vκ scFv 构建

根据每个家族中的种系数目混合 VH 和 Vκ cDNA 片段(表 17 和 18)。

[0189] 表 17 VH 片段的混合比

VH 片段	VH1/7	VH1-	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	总计
	46							
种系#	10	1	3	22	7	1	1	45
总计的%	22.2%	2.7%	6.7%	48.9%	15.5%	2.7%	2.7%	100%

表 18 关于 Vκ 片段的混合比

Vκ 片段	Vκ1	Vκ2	Vκ3	Vκ4	Vκ5	Vκ6	总计
种系#	21	11	8	1	1	3	45
总计的%	46.7%	2.4%	17.8%	2.7%	2.7%	8.3%	100%

总共 10 μg VH cDNA 片段(2×10^{13} 分子)和总共 10 μg Vκ cDNA 片段(2×10^{13} 分子)用作模板用于重叠 PCR。在 30 ml 的体积中,用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 以及引物 T7TMVTag2 (200 nM)和 FlagA20Rev (200 nM)完成 PCR。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (30 秒)、55℃ (30 秒)和 68℃ (60 秒)的 17 个循环;随后为 3 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。使用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641)克隆 PCR 产物的等分试样,并且通过测序分析个别克隆。

[0190] 谱型分析

分别与 VH 的 构架 3 区和 J 区退火的荧光染料标记的 5' 正向引物 (6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5' -GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', SEQ ID NO:17) 和反向引物 (PanJH-Rev, 5' -GCTGAGGAGACGGTGACC-3', SEQ ID NO:18), 用于通过 PCR 扩增跨越 VH 结构域的 CDR3 区。在包含 200 nM 6-FAM-PanVHFR3-Fwd 引物、200 nM PanJH-Rev 引物、200 μM dNTP、1 x GoTaq 缓冲液、和 1.5 U GoTaq (Promega, Madison, WI) 的 30 μl 反应体积中,使用 50 ng scFv 文库 DNA 模板。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 72℃ (30 秒)的 30 个循环;随后为 5 分钟的 72℃延伸和 4℃贮存步骤。在 PCR 后,将 10 μL 产物装载到 2% 琼脂糖凝胶上,以证实成功反应,并且使用 ABI 测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 对剩余的产物实施谱型分析电泳。通过从产物长度中扣除 60 bp 侧翼构架序列计算 CDR3 长度,所述产物长度通过 ROX 染料标记的 DNA 标记进行测定。

[0191] 结果

人 PBMC 表征

通过流式细胞术就 B (CD20⁺) 和记忆 B (CD27⁺) 细胞预筛选来自 20 个供体的 PBMC 样品导致 10 个供体的选择(在 PMBC 中 > 9 % B 和在总 B 细胞中 < 35% 记忆 B 细胞),并且允许供体年龄、性别和种族划分分布最优化至供体可用性的最优程度(图 14)。

[0192] RNA 纯化

为了获得抗体 cDNA 谱用于文库构建,从具有估计 2.6×10^8 B 细胞的 2.3×10^9 人

PBMCs 获得 1.9 mg 总 RNA。来自总 RNA 的后续聚腺苷酸 mRNA 纯化获得 42.2 μ g mRNA。

[0193] VH cDNA 片段的扩增

通过琼脂糖凝胶电泳显现通过 VH 通用引物(T7TMVTag2, SEQ ID NO:80 和文库 -GS-Rev, SEQ ID NO:16)扩增的 ~ 500 bp VH 家族特异性 cDNA 片段的等分试样(图 15)。

[0194] 个别 VH 克隆的测序分析呈现于表 19 中。克隆的 VH 序列与已知 VH 种系序列的比较证实通过 VH 家族特异性引物的高特异性扩增。

[0195] V κ 片段的扩增

通过琼脂糖凝胶电泳显现用通用引物(文库 -GS-Fwd, SEQ ID NO:94 和 FlagA20Rev, SEQ ID NO:95)扩增的 V κ 家族特异性 cDNA 片段的等分试样(图 16)。个别 V κ 克隆的测序分析呈现于表 20 中。数据证实对于 V κ 种系家族各自的引物特异性。

[0196] 表 19 VH 家族特异性 PCR 产物的测序分析

片段	克隆#	种系匹配	家族	片段	克隆#	种系匹配	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				
	1	VH3-48	VH3	VH2	12	VH2-5	VH2
	2	VH3-9	VH3		3	VH2-26	VH2
	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 构建

执行重叠 PCR, 以构建 VH-V κ scFv cDNA 片段。通过琼脂糖凝胶电泳显现所获得的产物的部分(图 17)。所生成的 VH-V κ scFv 片段具有通过 PROfusion mRNA 展示技术选择的所有必需元件(图 17)。个别 VH-V κ scFv 克隆的测序分析证实绝大多数具有功能性间插 G4S 接头的正确 VH-V κ 重组。在构建的 scFv 文库中各种 VH 和 V κ 家族的分布与先前文献报道一致(图 18, 还参见 Tsuiji 等人(2006). Exp. Med.; V. 203 (2), 第 393 - 400 页和 Arons 等人(2006) British Journal of Haematology V. 133, 第 504-512 页)。

[0197] 表 20 V κ 家族特异性 PCR 产物的测序分析

片段	克隆#	种系匹配	家族	片段	克隆#	种系匹配	家族
Vk1	3	O18/O8	Vk1	Vk3	5	A11/A27	Vk3
	3	O12/O2	Vk1		4	L20/L6	Vk3
	2	A20	Vk1		2	L16/L2	Vk3
	2	L19/L5	Vk1	Vk4	14	B3	Vk4
	1	L19	Vk1				
	1	L1/L15	Vk1		13	B2	Vk5
	1	L1	Vk1	Vk5			
Vk2	7	A19/A3	Vk2	Vk6	12	A10/A26	Vk6
	3	A1/A17	Vk2		1	A14	Vk6
	1	O1/O11	Vk2				

谱型分析

正好在其装配成 scFv 文库前,对 VH cDNA 片段执行在不同 VH 家族中的 CDR3 大小分布的谱型分析(图 19)。如在具有高度多样性的 cDNA 文库中将预期的,观察到的 CDR3 大小在分析的所有家族中极大改变。观察到的不同 CDR3 大小的峰高度呈现正态分布特有的钟形曲线,并且指示非常大的群体大小。这在得自单个种系或非常小 VH 家族例如 VH1-46、VH2、VH5 和 VH6 的结果中尤其明显。指出不同 VH 家族中 CDR3 大小的轻微差异也是有趣的。例如, VH1 和 VH2 趋于具有更多 15-16 个残基的 CDR3s,而 VH3 具有更多 13 个残基的 CDR3s。总之,个别 VH 家族的谱型分析证实在 cDNA 文库中的高多样和非常大 VH 序列。

[0198] 随机取样 8 个 scFv 文库模板,并且如前所述实施谱型分析。得自所有 8 种样品的结果是不能区别的,从而暗示每个等分试样中的文库模板是可重现地相似的(图 20)。文库 VH CDR3 大小具有正态分布,并且大多数介于 6 - 24 个残基之间,并且集中于 13 - 16 个残基之间。这个分布为如预期的并且与个别 VH 家族谱型分析结果一致。

[0199] 结论

高质量人抗体前导的选择是关于成功的治疗用抗体药物开发的必要条件。除强选择技术外,抗体文库质量(来源、多样性和构建)极大地决定其产生良好前导的有用性。许多人供体就更大的多样性进行预筛选,并且设计具有极高特异性的 PCR 引物以覆盖所有抗体种系序列,从而使得可以捕获在供体集合内的所有多样性。构建的抗体 scFv 文库具有来自超过 2×10^8 B 细胞的大于 2×10^{12} 的理论多样性,这已通过测序多个克隆且通过谱型分析加以证实。

[0200] 实施例 9

由人 PBMC RNA 构建首次用于实验的 λ PROfusion scFv 文库

总 RNA 和 mRNA 纯化、mRNA 逆转录和通过 PCR 的 VH cDNA 扩增已在实施例 1 中描述。

[0201] V λ cDNA 扩增

在包含 V λ 前导序列(LS)特异性正向引物(总浓度 200 nM)和 C λ 特异性反向引物

(200 nM) 的混合物的反应中(表 21),通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA),对由前述 RT 反应生成的三分之一 cDNA 实施限制性扩增。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (30 秒)、55℃ (30 秒)和 68℃ (60 秒)的 10 个循环;随后为 5 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。分开的小规模实验证实 cDNA 通过此种 PCR 的 10 - 100 倍扩增。

[0202] 表 21 用于 V λ 片段扩增的引物

名称	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)	CTGCACAGGTCTTGGGC
VL7LS (SEQ ID NO: 108)	CTCACTTGCTGCCCAGGG
VL8LS (SEQ ID NO: 109)	GCTTATGGATCAGGAGTGGATTG
VL9LS (SEQ ID NO: 110)	CACCTCCTCAGTCTCCTC
VL10LS (SEQ ID NO: 111)	CTCTGCAGTGTCAGTGGTC
CJLS Reverse (SEQ ID NO: 112)	GCCTTGGGCTGACCKAGGACGGT

根据制造商的规程,使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化 PCR 产物。1/250 的纯化 PCR 产物用作模板用于扩增每种 V λ 家族特异性 cDNA。在包含个别 V λ LS 特异性正向引物(200 nM)和 C λ 特异性反向引物(200 nM)的反应中(表 22),通过 PCR 用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 完成扩增。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (30 秒)、55℃ (30 秒)和 68℃ (60 秒)的 35 个循环;随后为 5 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。

[0203] 表 22 用于巢式 V λ 特异性 PCR 的引物

名称	寡核苷酸序列
VL1/10 ForRedo (SEQ ID NO: 113)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGTC TGKGCTGACKCAGCCRC
VL2 For (SEQ ID NO: 114)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGT CTGCCCTGACTCAGCCT
VL3 ForNew (SEQ ID NO: 115)	GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGTCCT ATGAGCTGACDCAG
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 Reverse (SEQ ID NO: 15)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAGTGACAGTGGGGTTGGC CTTGGGCTGACCKAGGACGGT

根据制造商的规程,在2%琼脂糖凝胶上运行PCR产物,并且使用QuantumPrep FreezeNSqueeze Columns (Biorad,Hercules,CA)纯化。随后在包含相应Vλ特异性嵌套正向引物(200 nM)和Cλ特异性反向引物(200 nM)的PCR反应中(表13),通过Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen,Carlsbad,CA)扩增每种PCR产物。PCR条件如下:初始2分钟的94℃变性;94℃(30秒)、55℃(30秒)和68℃(60秒)的35个循环;随后为5分钟的68℃延伸和4℃贮存步骤。

[0204] 在2%琼脂糖凝胶上运行PCR产物,并且使用QuantumPrep FreezeNSqueeze Columns (Biorad,Hercules,CA)纯化。在包含Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen,Carlsbad,CA)和下述通用引物(200 nM)的PCR反应中,以大规模进一步扩增这些PCR产物的等分试样:

文库-GS- 正向 (SEQ ID NO: 94): GTCTGGCGGCGGAGGTAGCG
FlagA20Rev (SEQ ID NO: 95):
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCG
TCCTTGTAGTC

[0205] 这些引物给PCR产物的5'末端添加部分G4S-接头,且给所得到的PCR产物的3'末端添加FLAG标记、接头退火位点和聚腺苷酸尾。PCR条件如下:初始2分钟的94℃变性;94℃(30秒)、55℃(30秒)和68℃(30秒)的35个循环;随后为5分钟的68℃延伸和4℃

贮存步骤。使用 Purelink PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) 纯化 PCR 产物,通过在 260 nm 下的 UV 吸光度定量,并且通过 2% 琼脂糖凝胶电泳显现这些产物的等分试样,以证实纯度。

[0206] 使用 TOP0 TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641) 克隆所得到的 V λ 家族特异性 cDNA 片段的部分,并且通过测序分析个别克隆。

[0207] VH-V λ scFv 构建

根据由每种 PCR 产物表示的种系多样性混合 VH 和 V λ cDNA 片段(表 23 和 24)。

[0208] 表 23 VH 片段的混合比

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

表 24 关于 V λ 片段的混合比

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

总共 10 μ g VH cDNA 片段(2×10^{13} 分子)和 10 μ g V λ cDNA 片段(2×10^{13} 分子)用作模板用于重叠 PCR。在 30 ml 的体积中,用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 以及引物 T7TMVTag2 (200 nM)和 FlagA20Rev (200 nM)完成 PCR。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94°C 变性;94°C (30 秒)、55°C (30 秒)和 68°C (60 秒)的 17 个循环;随后为 5 分钟的 68°C 延伸和 4°C 贮存步骤。使用 TOP0 TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641) 克隆 PCR 产物的等分试样,并且通过测序分析个别克隆。

[0209] 结果

V λ 片段的扩增

通过琼脂糖凝胶电泳显现用通用引物(文库 -GS-Fwd 和 FlagA20Rev)扩增的 V λ 家族特异性 cDNA 片段的等分试样(图 21)。

[0210] 个别 V λ 克隆的测序分析呈现于表 25 中。数据证实对于 V λ 种系家族各自的引物特异性,其中一个错配以粗体突出显示(VL1 LS3, 种系 V1-3)。

[0211] 表 25 V λ 家族特异性 PCR 产物的测序分析

VL片段	种系	克隆#		VL片段	种系	克隆#
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 构建

执行重叠 PCR,以构建 VH-V λ scFv cDNA 片段。通过琼脂糖凝胶电泳显现所获得的产物的部分(图 22)。所生成的 VH-V λ scFv 片段具有通过 PROfusion mRNA 展示技术选择的所有必需元件(图 23)。

[0212] 个别 VH-V λ scFv 克隆的测序分析证实绝大多数具有功能性间插 G4S 接头的正确 VH-V λ 重组。

[0213] 实施例 10

由人淋巴结 mRNA 构建首次用于实验的 κ 和 λ PROfusion scFv 文库

这个实施例描述了由淋巴结 mRNA 生成 PROfusion 人首次用于实验的 scFv 文库(PBMC κ 和 PBMC λ)。

[0214] 10.1 逆转录

根据制造商的规程,通过 SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen,目录 # 18064-014)和 15 种引物的混合物(100 nM 总浓度)(表 12),由 40 μ g mRNA 合成第一链 cDNA。反应以各 0.1 ml 的 16 个等分试样完成。使 RT 反应合并(1.6 ml 总体积),与 20 μ l RNA 酶 H 在 37°C 温育 20 分钟,并且随后针对水透析。

[0215] 10.2 PCR

10.2.1 VH cDNA 扩增

在包含 VH 前导序列(LS)特异性正向引物(200 nM 总浓度)的混合物和 JH 特异性反向引物(200 nM 总浓度)的混合物的反应中(表 13),通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen,目录 # 11304-102),对三分之一的上述 RT 反应实施限制性扩增。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94°C 变性;94°C (20 秒)、55°C (20 秒)和 68°C (60 秒)的 10

个循环；随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。随后根据制造商的规程，通过 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 目录 # 28106) 纯化 PCR 产物。小规模预实验证实 cDNA 的至少 10 倍扩增。

[0216] 将一半纯化的 PCR 产物分成 7 个相等等分试样，并且每个等分试样用作模板用于扩增 VH 家族特异性 cDNA 之一。在包含个别 VH LS 特异性正向引物 (200 nM) 和 JH 特异性反向引物 (200 nM 总浓度) 的混合物的反应中 (表 13)，通过 PCR 用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 执行扩增。PCR 条件如下：初始 2 分钟的 94℃ 变性；94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒) 和 68℃ (40 秒) 的 25 个循环；随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。

[0217] 根据制造商的规程，通过 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化上述 PCR 产物。随后在包含相应 VH 特异性嵌套正向引物 (200 nM) 和 JH 特异性反向引物 (200 nM 总浓度) 的混合物的 PCR 反应中 (表 26)，通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 扩增每种 PCR 产物。每次反应中的正向引物携带 8 核苷酸“标记” (有下划线的)，其被引入以增加后续文库扩增过程中的特异性。PCR 条件如下：初始 2 分钟的 94℃ 变性；94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒) 和 68℃ (40 秒) 的 25 个循环；随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。

[0218] 对 PCR 产物实施 1% 琼脂糖凝胶电泳，并且通过 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 目录 # 28704) 纯化。通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 200 nM 通用引物 (T7TMVTag4s 和 Lib-GSv2-Rev)，在 PCR 反应中以大规模进一步扩增这些 PCR 产物的等分试样。这些引物给 PCR 产物的 5' 末端添加 T7 启动子和 TMV-UTR 序列，且给 PCR 产物的 3' 末端添加部分甘氨酸 - 丝氨酸 (G4S) 接头。PCR 条件如下：初始 2 分钟的 94℃ 变性；94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒) 和 68℃ (40 秒) 的 25 个循环；随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。

[0219] 用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化 PCR 产物，通过在 260 nm 下的 UV 吸光度定量，并且通过 1% 琼脂糖凝胶电泳显现这些产物的等分试样，以证实纯度。使用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641) 克隆 VH 家族特异性 cDNA 片段的等分试样，并且通过测序分析个别克隆。

[0220] 表 26 用于嵌套式 VH 特异性 PCR 的引物

名称	寡核苷酸序列
VH1Tag4 正向 (SEQ ID NO: 121)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGG TGCAGTCTGGRSCT
VH2Tag4 正向 (SEQ ID NO: 122)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGRTCACCTTGAR GGAGTCTGGT
VH3Tag4 正向 (SEQ ID NO: 123)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGK TGGAGTCTSGRGGA
VH4Tag4 正向 (SEQ ID NO: 124)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGC AGSAGTSSGGC
VH5Tag4 正向 (SEQ ID NO: 125)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGG TGCAGTCTGGAGCA
VH6Tag4 正向 (SEQ ID NO: 126)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTACAGCTGC AGCAGTCAG
VH7Tag4 正向 (SEQ ID NO: 127)	TTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAGGTGCAGCTGG TGCAATCTGGGT
JH1/2 RevV2 (SEQ ID NO: 128)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAGGAGA CRGTGACCAGGGTGC
JH3 RevV2 (SEQ ID NO: 129)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAAGAGA CGGTGACCATTTGTCC
JH4/5 RevV2 (SEQ ID NO: 130)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAGGAGA CGGTGACCAGGGTTC
JH6 RevV2 (SEQ ID NO: 131)	CAGACCCTCCACCGCCGCTGCCGCCTCCACCTGAGGAGA CGGTGACCGTGGTCC
T7TMVTag4s (SEQ ID NO: 132)	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATT ACAGCTTCTTC
Lib-GSv2-Rev (SEQ ID NO: 133)	CAGACCCTCCACCGCCGCTG

10.2.2 V_K cDNA 扩增

在包含 V_K 前导序列(LS) 特异性正向引物(总浓度 200 nM) 和 C_K 特异性反向引物(200 nM) 的混合物的反应中(表 15), 通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA), 对由前述 RT 反应生成的三分之一 cDNA 实施限制性扩增。PCR 条件如下: 初始 2 分钟的 94℃ 变性; 94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒) 和 68℃ (60 秒) 的 10 个循环; 随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。分开的小规模实验证实 cDNA 通过此种 PCR 的最高达 10 倍扩增。

[0221] 根据制造商的规程, 用 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN) 纯化 PCR 产物。将一半纯化的 PCR 产物分成 6 个相等等分试样, 并且每个等分试样用作模板用于扩增个别

V κ 家族特异性 cDNA。在包含个别 V κ LS 特异性正向引物(200 nM)和 C κ 特异性反向引物(200 nM)的反应中(表 15),通过 PCR 用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 完成扩增。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃ 变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (40 秒)的 25 个循环;随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。

[0222] 根据制造商的规程,对 PCR 产物实施 1% 琼脂糖凝胶电泳,并且用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化。随后在包含相应 V κ 特异性嵌套正向引物(200 nM)和 C κ 特异性反向引物(200 nM)的 PCR 反应中(表 27),通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 扩增每种 PCR 产物。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃ 变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (40 秒)的 25 个循环;随后为 3 分钟的 68℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。

[0223] 在包含 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 200 nM 通用引物(Lib-GSv2-Fwd 和 CKReverse)的 PCR 反应中,以大规模进一步扩增这些 PCR 产物的等分试样。

[0224] 引物 Lib-GSv2-Fwd 在 V κ 上游添加部分 G4S- 接头。编码 G4S- 接头的通用引物的序列(Lib-GSv2-Fwd 和 Lib-GSv2-Rev)由用于人 PBMC 文库构建的引物的那种(文库-GS- 正向和文库-GS- 反向)进行修饰。完成这种修饰以避免与 VH3 家族种系的构架 1 退火的引物文库-GS- 反向的交叉引发问题,这产生截短的 VH 序列。

[0225] 表 27 用于嵌套式 V κ 特异性 PCR 的引物

名称	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 (SEQ ID NO:14)	GTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCGAAGACAGATGGTGCAGC CACAGTTCG
Lib-GSv2-Fwd (SEQ ID NO:140)	CAGCGGCGGTGGAGGGTCTG

PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃ 变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (40 秒)

的 25 个循环;随后为 3 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)纯化 PCR 产物,通过在 260 nm 下的 UV 吸光度定量,并且通过 1%琼脂糖凝胶电泳显现这些产物的等分试样,以证实纯度。使用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641) 克隆所得到的 V κ 家族特异性 cDNA 片段的部分,并且通过测序分析个别克隆。

[0226] 10.2.3 V λ cDNA 扩增

在包含 V λ 前导序列(LS) 特异性正向引物(总浓度 200 nM)和 C λ 特异性反向引物(200 nM)的混合物的反应中(表 21),通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA),对由前述 RT 反应生成的三分之一 cDNA 实施限制性扩增。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (40 秒)的 10 个循环;随后为 3 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。分开的小规模实验证实 cDNA 通过此种 PCR 的最高达 10 倍扩增。

[0227] 根据制造商的规程,使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)纯化 PCR 产物。将一半纯化的 PCR 产物分成 16 个相等等分试样,并且每个等分试样用作模板用于扩增个别 V λ 家族特异性 cDNA。在包含个别 V λ LS 特异性正向引物(200 nM)和 C λ 特异性反向引物(200 nM)的反应中(表 21),通过 PCR 用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA)完成扩增。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (40 秒)的 30 个循环;随后为 3 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。

[0228] 根据制造商的规程,用 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)纯化 PCR 产物。在后续扩增前合并下述片段:VL-1 LS-1 和 VL1 LS-3 片段以 3:2 比合并成 VL1 LS 混合物片段;VL-2 LS-3 和 VL2 LS-4 片段以 3:2 比合并成 VL2 LS 混合物片段;VL3 LS-2、VL3 LS-3、VL3 LS-4 和 VL3 LS-5 片段以 1:6:1:1 比合并成 VL3 LS 混合物片段。随后在包含相应 V λ 特异性嵌套正向引物(200 nM)和 C λ 特异性反向引物(200 nM)的 PCR 反应中(表 22),通过 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA)扩增对应于个别家族的 PCR 产物。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (40 秒)的 25 个循环;随后为 3 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。

[0229] 对 PCR 产物实施 1%琼脂糖凝胶电泳,并且通过 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)纯化。在包含 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA)和 200 nM 通用引物(Lib-GSv2-Fwd 和 CJLReverse)的 PCR 反应中,以大规模进一步扩增这些 PCR 产物的等分试样。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (30 秒)、55℃ (30 秒)和 68℃ (30 秒)的 25 个循环;随后为 5 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。

[0230] 用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)纯化 PCR 产物,通过在 260 nm 下的 UV 吸光度定量,并且通过 1%琼脂糖凝胶电泳显现这些产物的等分试样,以证实纯度。先前证实了 VL 家族特异性引物的特异性。

[0231] 10.2.4 VH-V κ scFv 构建

根据每个家族中的种系数目混合 VH 和 V κ cDNA 片段(基于 NCBI) (表 17 和 18)

总共 10 μ g VH cDNA 片段(2×10^{13} 分子)和总共 10 μ g V κ cDNA 片段(2×10^{13}

分子)用作模板用于重叠 PCR。在 30 ml 的体积中,用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 以及引物 T7TMVUTR (200 nM)和 Cκ 5-FlagA20 Rev (200 nM)完成 PCR,具有下述步骤:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (60 秒)的 12 个循环;随后为 3 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。使用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641)克隆 PCR 产物的等分试样,并且通过测序分析个别克隆。

[0232]

T7TMVUTR (SEQ ID NO: 1):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA

Cκ5-FlagA20 Rev (SEQ ID NO: 7):

**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA**

[0233] 引物 Cκ5-FlagA20 Rev 在 PCR 产物的 3' 末端上添加聚腺苷酸尾。因此,序列用于 PROfusion 分子的寡脱氧胸苷酸纯化。

[0234] 10.2.5 VH-Vλ scFv 构建

根据由每种 PCR 产物表示的种系多样性混合 VH 和 Vλ cDNA 片段(表 18 和 28)。总共 10 μg VH cDNA 片段(2×10^{13} 分子)和 10 μg Vλ cDNA 片段(2×10^{13} 分子)用作模板用于重叠 PCR。在 30 ml 的体积中,用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 以及引物 T7TMVUTR (200 nM)和 CL5 FlagA20 (200 nM)完成 PCR。PCR 条件如下:初始 2 分钟的 94℃变性;94℃ (20 秒)、55℃ (20 秒)和 68℃ (60 秒)的 10 个循环;随后为 5 分钟的 68℃延伸和 4℃贮存步骤。使用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 目录 # 45-0641)克隆 PCR 产物的等分试样,并且通过测序分析个别克隆。

[0235] 表 28 关于 Vλ 片段的混合比

VL片段	VL1	VL2	VL3	VL4	VL5	VL6	VL7	VL8	VL9	VL10	总计
种系#	5	5	9	3	3	1	2	1	1	1	31
总计的%	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):

**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG**

引物 CL5-FlagA20 在 PCR 产物的 3' 末端上添加聚腺苷酸尾。因此,序列用于 PROfusion 分子的寡脱氧胸苷酸纯化。

[0236] 10.3 谱型分析

分别与 VH 的构架 3 区和 J 区退火的荧光染料标记的 5' 正向引物 (6-FAM-PanVHFR3-Fwd, 5' -GACACGGCCGTGTATTACTGT-3', SEQ ID NO:17) 和反向引物 (PanJH-Rev, 5' -GCTGAGGAGACGGTGACC-3', SEQ ID NO:18), 用于通过 PCR 扩增跨越 VH 结构域的 CDR3 区。在包含 200 nM 6-FAM-PanVHFR3-Fwd 引物、200 nM PanJH-Rev 引物、200 μM dNTP、1 x GoTaq 缓冲液、和 1.5 U GoTaq (Promega, Madison, WI) 的 30 μl 反应体积中,使

用 50 ng scFv 文库 DNA 模板。PCR 条件如下：初始 2 分钟的 94℃ 变性；94℃（20 秒）、55℃（20 秒）和 72℃（30 秒）的 30 个循环；随后为 5 分钟的 72℃ 延伸和 4℃ 贮存步骤。在 PCR 后，将 10 μL 产物装载到 2% 琼脂糖凝胶上，以证实成功反应，并且使用 ABI 测序仪对剩余的产物实施谱型分析电泳。通过从产物长度中扣除 60 bp 侧翼构架序列计算 CDR3 长度，所述产物长度通过 ROX 染料标记的 DNA 标记进行测定。

[0237] 结果

PROfusion ScFv 文库构建的概述

表示 PROfusion 文库构建中的不同步骤的流程图呈现于图 24 中。

[0238] VH cDNA 片段的扩增

通过琼脂糖凝胶电泳显现通过 VH 通用引物 (T7TMVUTR 和 Lib-GSv2-Rev) 扩增的 VH 家族特异性 cDNA 片段 (~ 500 bp) 的等分试样 (图 25)。VH 家族特异性引物的特异性先前已进行测试，并且对于扩增具有大量种系的家族的引物再次得到证实 (表 29)。

[0239] Vκ 片段的扩增

通过琼脂糖凝胶电泳显现用通用引物 (Lib-GSv2-Fwd: 和 CK 反向) 扩增的 Vκ 家族特异性 cDNA 片段的等分试样 (图 26)。Vκ 家族特异性引物的特异性先前已进行测试，并且再对于扩增具有大量种系的家族的引物再次得到证实 (表 30)。

[0240] 表 29 VH 家族特异性 PCR 产物的测序分析

片段	克隆#	种系匹配	家族	片段	克隆#	种系匹配	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 Vκ 家族特异性 PCR 产物的测序分析

片段	克隆#	种系匹配	家族	片段	克隆#	种系匹配	家族
Vk1	20	O12/O2	Vk1	Vk2	13	A19/A3	Vk2
	8	O18/O8	Vk1		3	A17/A1	Vk2
	4	A20	Vk1		3	A18/A2	Vk2
	4	A30	Vk1		3	O1/O11	Vk2
	3	L19/L5	Vk1	Vk3	8	A11/A27	Vk3
	2	L1/L15	Vk1		4	L20/L6	Vk3
	2	L8	Vk1		3	L16/L2	Vk3
	2	L11	Vk1	Vk6	7	A10/A26	Vk6
	1	L12	Vk1				
	1	L14	Vk1				
	1	L18/L4	Vk1				

V λ 片段的扩增

通过琼脂糖凝胶电泳显现用通用引物(Lib-GSv2-Fwd, SEQ ID NO:140, 和 CJL 反向, SEQ ID NO:15)扩增的 V λ 家族特异性 cDNA 片段的等分试样(图 27)。先前测试了 V λ 家族特异性引物的特异性。

[0241] VH-V κ 和 VH-V λ scFv 构建

执行重叠 PCR, 以构建 VH-V κ 和 VH-V λ scFv cDNA 片段。通过琼脂糖凝胶电泳显现所获得的产物的部分(图 27)。所生成的 VH-V κ 和 VH-V λ scFv 片段具有通过 PROfusion mRNA 展示技术选择的所有必需元件(图 28)。

[0242] 个别 VH-V κ 和 VH-V λ scFv 克隆的测序分析证实绝大多数克隆中具有功能性间插 G4S 接头的正确 VH-V κ 和 VH-V λ 重组。在构建的 scFv 文库中各种 VH 和 V κ 和 V λ 家族的分布与先前文献报道一致(图 29, 图 30, 还参见 Tsuiji 等人(2006). Exp. Med.; V. 203(2), 第 393 - 400 页和 Arons 等人(2006)British Journal of Haematology V. 133, 第 504-512 页)。

[0243] 谱型分析

对通过逆转录用反向引物的混合物由淋巴结 RNA 获得的 cDNA (参见 10.1)、对正好在其装配成 scFv 文库前 VH DNA 片段的混合物、和对最终 VH-V κ 和 VH-V λ scFv 片段, 执行 VH CDR3 大小分布的谱型分析(图 31)。如在具有高度多样性的 cDNA 文库中将预期的, 观察到的 CDR3 大小具有正态分布, 并且大多数介于 6 - 22 个残基之间, 并且集中于 11 - 14 个残基之间。

[0244] 结论

高质量人抗体前导的选择是关于成功的治疗用抗体药物开发的必要条件。除强选择技术外, 抗体文库质量(来源、多样性和构建)极大地决定其产生良好前导的有用性。在本发明中, 来自多个供体的 mRNA 用于增加文库多样性, 并且设计高度特异性 PCR 引物以覆盖所有

抗体种系序列,从而使得可以捕获在供体集合内的所有多样性。分开构建 VH-V_K 和 VH-V_λ scFv 文库,以增加选择来自相同 RNA 来源的多种抗体前导的机会。通过谱型分析且通过测序多个克隆证实 2 个文库的大多样性。2 个文库都用于针对不同靶的 PROfusion mRNA 展示选择。

[0245] 实施例 11

用于 PROfusion 构建体的测序引物

这个实施例提供了用于 PROfusion 构建体的测序引物。

[0246] 用于所有 scFv 和 VH 文库的正向引物:

T7TMVUTR (SEQ ID NO: 1):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA

用于所有 V_K 和 V_λ 文库的正向引物:

VL-T7TMVTag3GS-Fwd (SEQ IN NO: 2):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGAC
CATGGGGTCTGGCGGCGGAGGTAGCG

用于所有 κ scFv 和 V_K 文库的反向引物:

Cκ1FLAGA20 (SEQ ID NO: 3):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGAT

Cκ2FLAGA20 (SEQ ID NO: 4):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGT

Cκ3FLAGA20 (SEQ ID NO: 5):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGCA

Cκ4FLAGA20 (SEQ ID NO: 6):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGACAGCC

Cκ5FLAGA20 (SEQ ID NO: 7):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGACAGCCACA

用于所有 λ scFv 和 V_λ 文库的反向引物:

CL1FLAGA20 (SEQ ID NO: 8):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTG

CL2FLAGA20 (SEQ ID NO: 9):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGG

CL3FLAGA20 (SEQ ID NO: 10):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTG

CL4FLAGA20 (SEQ ID NO: 11):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTGGCC

CL5FLAGA20 (SEQ ID NO: 12):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTG

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

用于所有 VH 文库的反向引物：

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

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCATCATCATCTTTATA
ATCGCTACCTCCGCCGCCAGAC

在逆转录中用于合成第一链 cDNA 的引物：

Fcγ:

FcγRev1 (SEQ ID NO: 43): AGTTCACGACACC

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

Fcδ:

FcδRev1 (SEQ ID NO: 49): GCTGCTTGTCATGT

FcδRev2 (SEQ ID NO: 50): TGCCTTTGGAGACT

FcδRev3 (SEQ ID NO: 51): GACCACGCATTTGT

Cκ-RT 引物:

CκRev1 (SEQ ID NO: 52): TCCACCTTCCACTG

CκRev2 (SEQ ID NO: 53): CAGGCACACAACAG

CκRev3 (SEQ ID NO: 54): GAGTGTCACAGAGC

CLRT 引物

CλRev1 (SEQ ID NO: 55) GGGAACAGAGTGAC

CλRev2 (SEQ ID NO: 56): GTGTGGCCTTGTTG

CλRev3. (SEQ ID NO: 57): CCATCTGCCTTCCA

用于 VH 片段扩增的引物:

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

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

用于嵌套式 VH 特异性 PCR 的引物:

VH 引物 Tag2:

VH1 正向 (SEQ ID NO: 69):

tttacaattacagtggtgcgaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2 正向 (SEQ ID NO: 70):

tttacaattacagtggtgcgaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3 正向 (SEQ ID NO: 71):

tttacaattacagtggtgcgaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGRGA

VH4 正向 (SEQ ID NO: 72):

tttacaattacagtggtgcgaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5 正向 (SEQ ID NO: 73):

tttacaattacagtggtgcgaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA

VH6 正向 (SEQ ID NO: 74):

tttacaattacagtggtgcgaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7 正向 (SEQ ID NO: 75):

tttacaattacagtggtgcgaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGT

用于 Vκ 片段扩增的引物:

T7TMVTag2 (SEQ ID NO: 80):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAG TGTGCGAC

Vκ1LS (SEQ ID NO: 81): GCTCCTGGGRCTYCTGC

Vκ2LS (SEQ ID NO: 82): CTYCTGGGGCTGCTAATG

Vκ3LS (SEQ ID NO: 83): CTCTGGCTCMCAGATAACCAC

Vκ4LS (SEQ ID NO: 84): GGATCTCTGGTGCCTACGG

Vκ5LS (SEQ ID NO: 85): GGATCTCTGATAACCAGGGCA

Vκ6LS (SEQ ID NO: 86): CTGGGTTCAGCCTCCAG

文库 Gly-Ser 重叠引物:

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

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

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGT
CGTCCTTG TAGTC

用于 Vλ 片段扩增的引物:

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

VL4CIs-2 (SEQ ID NO: 104): CTTTCATTTTCTCCACAGGTCTCTGTG

VL4abLS-2 (SEQ ID NO: 105): TCCACTGSACAGGGTCTCTCT

VL5LS (SEQ ID NO: 106): CACTGCACAGGTTCCCTC

VL6LS (SEQ ID NO: 107): CTGCACAGGTTCTTGGGC

VL7LS (SEQ ID NO: 108): CTCACCTTGCTGCCCAGGG

VL8LS (SEQ ID NO: 109): GCTTATGGATCAGGAGTGGATTC

VL9LS (SEQ ID NO: 110): CACCCTCCTCAGTCTCCTC

VL10LS (SEQ ID NO: 111): CTCTGCAGTGTCAGTGGTC

用于嵌套式 VH 特异性 PCR 的引物:

VH 引物 Tag4:

VH1 正向 (SEQ ID NO: 121):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2 正向 (SEQ ID NO: 122):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3 正向 (SEQ ID NO: 123):

ttacaattacagcttcttcaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGRGA

VH4 正向 (SEQ ID NO: 124):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5 正向 (SEQ ID NO: 125):

tttacaattacagcttcttcaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA

VH6 正向 (SEQ ID NO: 126):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7 正向 (SEQ ID NO: 127):

tttacaattacagcttcttcaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGT

JH 反向 1/2 (SEQ ID NO: 128):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACRGT
GACCAGGGTGC

JH 反向 3 (SEQ ID NO: 129):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAAGAGACGGTG
ACCATGTCC

JH 反向 4/5 (SEQ ID NO: 130):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGT
GACCAGGGTTC

JH 反向 6 (SEQ ID NO: 131):

CGCTACCTCCGCCGCCAGACCCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTG
ACCGTGGTCC

用于 Vλ 片段扩增的引物:

Vκ 引物 V2:

Vκ1FwdV2 (SEQ ID NO: 134):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACATCCRGWTGACCC
AGTCTCCWT

Vκ2FwdV2 (包括L10ofVK3) (SEQ ID NO: 135):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATATTGTGATGACYC
AGWCTCCAC

Vκ3FwdV2 (除L10外) (SEQ ID NO: 136):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAATTGTGWTGACRC
AGTCTCCAGSCA

Vκ4/6FwdV2 (SEQ ID NO: 137):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGACATCGTGMTGACYC
AGTCTCCAGA

Vκ5FwdV2 (SEQ ID NO: 138):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGAAACGACACTCACGC
AGTCTCCAGCAT

Vκ6FwdV2 (SEQ ID NO: 139):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTGATGTCGTGATGACAC
AGTCTCCAGCTT

T7-TMV-Seq (9970) (SEQ ID NO: 148): CTC ACT ATA GGG ACA ATT AC
T7TMVTag3 (SEQ ID NO: 149):
TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGAC
T7TMVTag4 (SEQ ID NO: 150):
TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCAC
T7TMVTag2s (SEQ ID NO: 151):
TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAG TGTGCG
T7TMVTag3s (SEQ ID NO: 152):
TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGG
T7TMVTag4s (SEQ ID NO: 132):
TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTC
T7TMVTag4L (SEQ ID NO: 153):
TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA
GCTTCTTCACCATGG
TMVTag4L (SEQ ID NO: 154):
ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGG
TMVTag4 (SEQ ID NO: 155): ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCAC
TMVTag4s (SEQ ID NO: 156): ACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTC
phylflag3's (无聚腺苷酸) (SEQ ID NO: 157): CCTTGTCGTCGTCGTCCTTG TAGTC
VH-FLAGA20-Rev (FLAG重新编码以使与VL' s FLAG序列的X-引发降到
最低) (SEQ ID NO: 158):
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTTTGTCATCATCATCTTTATA
ATC

制备具有 C_μ 间隔区的 VH 结构域文库的引物：

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

V_K 引物:

V_K1 正向 (SEQ ID NO: 88):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACATCCRGWTGACCCA
GTCTCCWT

V_K2 正向 (包括 L10 of V_K3) (SEQ ID NO: 89):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACYCA
GWCTCCAC

V_K3 正向 (除 L10 外) (SEQ ID NO: 90):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAATTGTGWTGACRCAGT
CTCCAGSCA

V_K4/6 正向 (SEQ ID NO: 91):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGACATCGTGMTGACYCA
GTCTCCAGA

V_K5 For-NEW (SEQ ID NO:92):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCACGCAGT
CTCCAGCAT

Vκ6 For-NEW (SEQ ID NO: 93):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATGTCGTGATGACACAGT
CTCCAGCTT

Vκ5 正向 (SEQ ID NO: 168):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCACGCA
GTCTC

Vκ6 正向 (SEQ ID NO: 169):

CTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGGATGTCGTGATGACACAGT
CTCCAGCT

Cκ 反向 (SEQ ID NO: 14):

GTCGTCGTCGTCCTTGTAAGTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCG

Cκ5 FLA20 (SEQ ID NO: 7):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCGAAGACAGATGGTGCAGCCACA

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

Cκ-长-反向引物 (SEQ ID NO: 170): 长 Cκ 反向引物以在FLAG 前添加7个A. A.

gtcgtcgtcgtccttgtagtcCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGC
CACAGTTCG

FLAG hCκ 引物 :

CκL4-FlagA20-Rev (SEQ ID NO: 171):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGGCGGGAAGAT

CκL3-FlagA20-Rev (SEQ ID NO: 172):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGGCGGGAA

CκL2-FlagA20-Rev (SEQ ID NO: 173):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGGCGG

CκL1-FlagA20-Rev (SEQ ID NO: 174):

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTA
GTCCTCATCAGATGG

VL 引物 :

VL1/10 正向 (SEQ ID NO: 175):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGKGCTGACKCA
GCCRC

VL2 正向 (SEQ ID NO: 114):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCA
GCCT

VL3 正向 -New (SEQ ID NO: 115):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGTCCTATGAGCTGACDCA
G

VL4ab 正向 (SEQ ID NO: 116):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGCYTGTGCTGACTCA
ATC

VL4c 正向 (SEQ ID NO: 117):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCTGCCTGTGCTGACTCA
GCCCCCG

VL5/9 正向 (SEQ ID NO: 118):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGCCTGTGCTGACTCA
GCCRBCT

VL6 正向 (SEQ ID NO: 119):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGAATTTTATGCTGACTCA
GCCC

VL7/8 正向 (SEQ ID NO: 120):

GTCTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCGCAGRCTGTGGTGACYCA
GGAG

CJL 反向 (SEQ ID NO: 15):

GTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCAAGTGACAGTGGGGTTGGCCTTGGGCTGACCK
AGGACGGT

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

VH 引物 Tag3 :

VH1FwdTag3 (SEQ ID NO: 176):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRSCT

VH2FwdTag3 (SEQ ID NO: 177):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3FwdTag3 (SEQ ID NO: 178):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGR GGA

VH4FwdTag3 (SEQ ID NO: 179):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5FwdTag3 (SEQ ID NO: 180):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6FwdTag3 (SEQ ID NO: 181):

tttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7FwdTag3 (SEQ ID NO: 182):

TttacaattacaGGCTTTGGaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCT GGGT

VL 引物:

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

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGTCTGKGCTGACKC
AGCCRC

VL2FwdV2 (SEQ ID NO: 184):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGTCTGCCCTGACTCA
GCCT

VL3FwdV2 (SEQ ID NO: 185):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTTCCTATGAGCTGACDCA
G

VL4abFwdV2 (SEQ ID NO: 186):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGCYTGTGCTGACTCA
ATC

VL4cFwdV2 (SEQ ID NO: 187):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCTGCCTGTGCTGACTCA
GCCCCCG

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

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGCCTGTGCTGACTCA
GCCRBCT

VL6FwdV2 (SEQ ID NO: 189):

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTAATTTTATGCTGACTCA
GCCC

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

CAGCGGCGGTGGAGGGTCTGGCGGTGGCGGAAGTCAGRCTGTGGTGACYC
AGGAG

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

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

JH1/2RevV2 (SEQ ID NO: 128):

cagaccctccaccgccgtgccgctccacCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGC

JH4/5RevV2 (SEQ ID NO: 130):

cagaccctccaccgccgtgccgctccacCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC

JH6RevV2 (SEQ ID NO: 131):

cagaccctccaccgccgtgccgctccacCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC

JH3RevV2 (SEQ ID NO: 129):

cagaccctccaccgccgtgccgctccacCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCC

文库 GlySer 接头 v2 :

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

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

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

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

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

在 PCR 过程中的重叠

VH3 FR1: CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG
 GGG TTC

TCC TCA GGT GGA GGC GGC AGC GGC GGT GGA GGG TCT G
G TCG CCG CCA CCT CCC AGA CCG CCA CCG
 CCT TCA

(for Vk3, Vk6) <----CG CCG CCA CCT CCC AGA CCG CCA CCG
 CCT TCA

用于人扁桃体文库的具有新标记的引物

VH 引物 Tag5:

VH1FwdTag5 (SEQ ID NO: 191):

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGR SCT

VH2FwdTag5 (SEQ ID NO: 192):

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGRTACCTTGARGGAGTC TGGT

VH3FwdTag5 (SEQ ID NO: 193):

tttacaattacaGTGTCTGTaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSGR GGA

VH4FwdTag5 (SEQ ID NO: 194):

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5FwdTag5 (SEQ ID NO: 195):

tttacaattacaGTGTCTGTaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6FwdTag5 (SEQ ID NO: 196):

tttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7FwdTag5 (SEQ ID NO: 197):

TttacaattacaGTGTCTGTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGT

用于人骨髓文库的具有新标记的引物

VH 引物 Tag6:

VH1FwdTag6 (SEQ ID NO: 198):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGRS CT

VH2FwdTag6 (SEQ ID NO: 199):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGRTCACCTTGARGGAGTCTGGT

VH3FwdTag6 (SEQ ID NO: 200):

tttacaattacaGTTTGGCTCaccatgGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTSG RGA

VH4FwdTag6 (SEQ ID NO: 201):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGCAGSAGTSSGGC

VH5FwdTag6 (SEQ ID NO: 202):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatgGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGA GCA

VH6FwdTag6 (SEQ ID NO: 203):

tttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG

VH7FwdTag6 (SEQ ID NO: 204):

TttacaattacaGTTTGGCTaccatggAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGG GT

再扩增 Tag5 正向引物

TMVTag5s (SEQ ID NO: 205): ACAATTACTATTTACAATTACAGTGTCTGT

TMVTag6s (SEQ ID NO: 206): ACAATTACTATTTACAATTACAGTTTGGCT

TMVTag5 (SEQ ID NO: 207): ACAATTACTATTTACAATTACAGTGTCTGTacc

TMVTag6 (SEQ ID NO: 208): ACAATTACTATTTACAATTACAGTTTGGCTacc

T7TMVTag5s (SEQ ID NO: 209):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTT ACA AT TA CAGTGTCTGT

T7TMVTag6s (SEQ ID NO: 210):

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTAC AGTTTGGCT

引入作为参考

在本申请自始至终可以引用的所有引用的参考文献(包括文献参考、专利、专利申请和网站)的内容都在此特别整体引入作为参考,其中引用的参考文献也如此。除非另有说明,否则本发明的实践将采用本领域众所周知的免疫学、分子生物学和细胞生物学的常规技术。

[0247] 等同方案

本发明可以在不背离其精神或基本特征的情况下以其他具体形式体现。前述实施方案因此在所有方面视为本文描述的本发明的举例说明而不是限制。本发明的范围因此由附加权利要求而不是前述说明书指出,并且因此预期在本文中包含在权利要求等同的含义和范围内的所有改变。

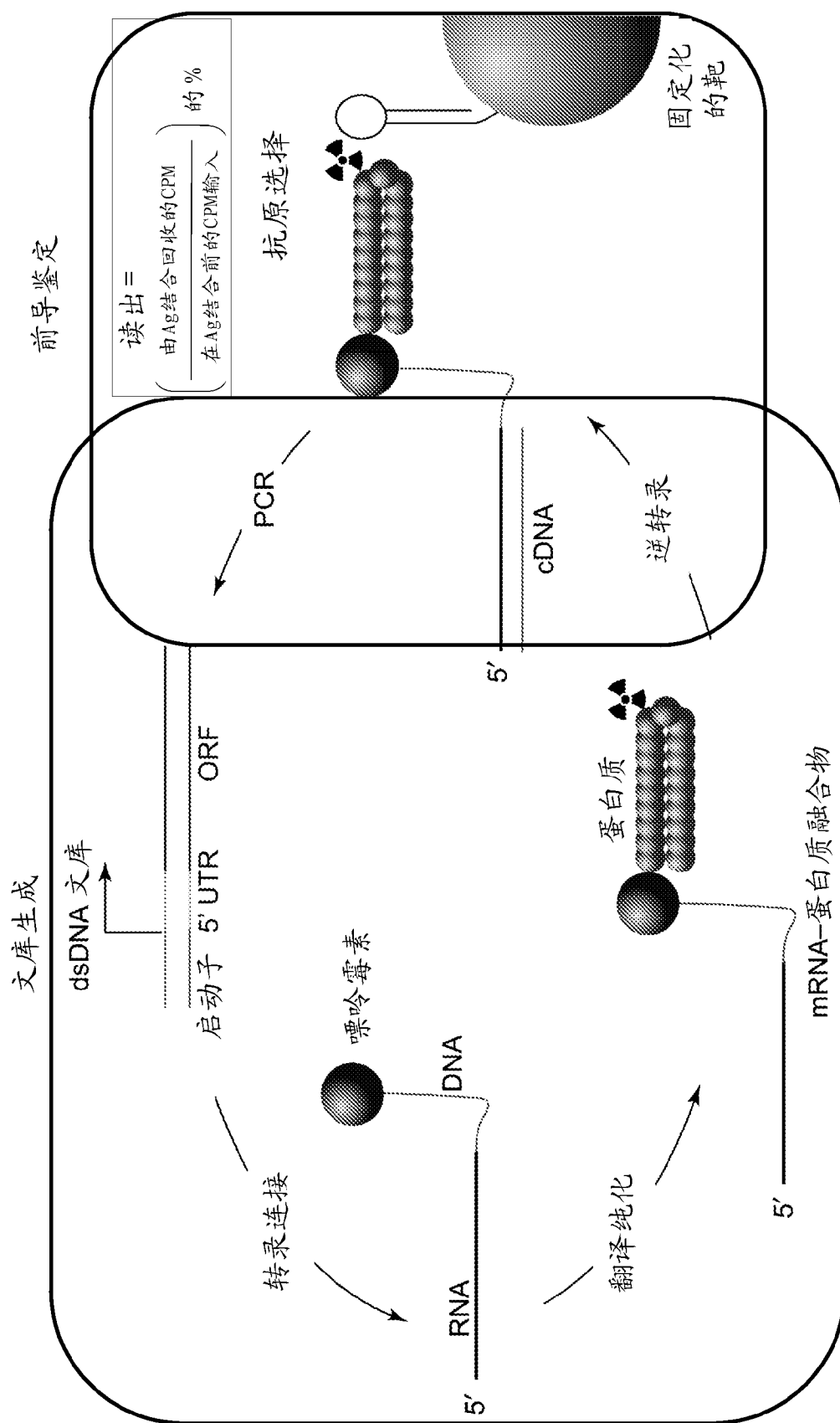


图 1

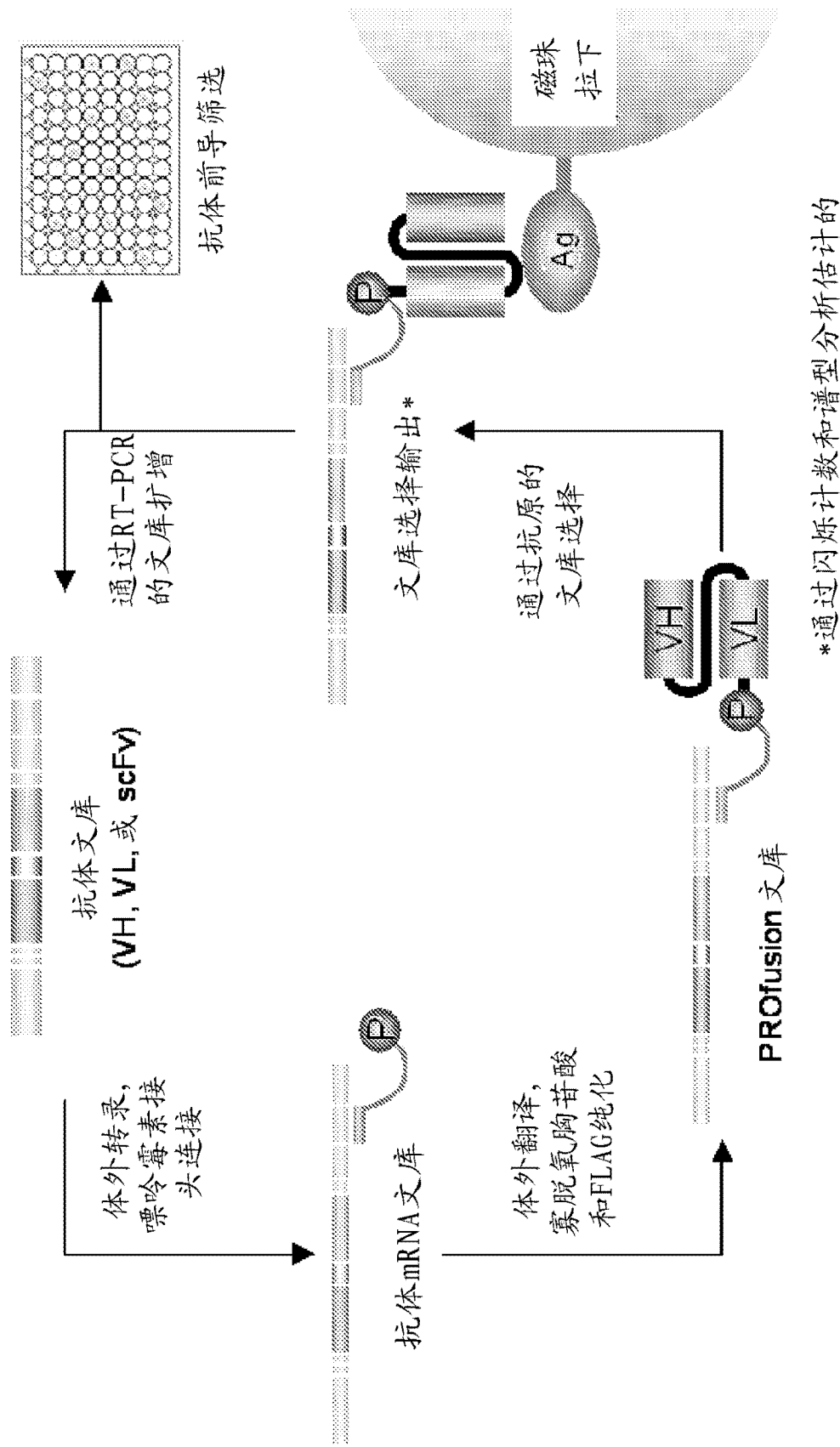


图 2

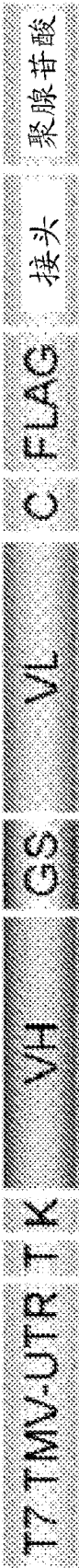


图 3

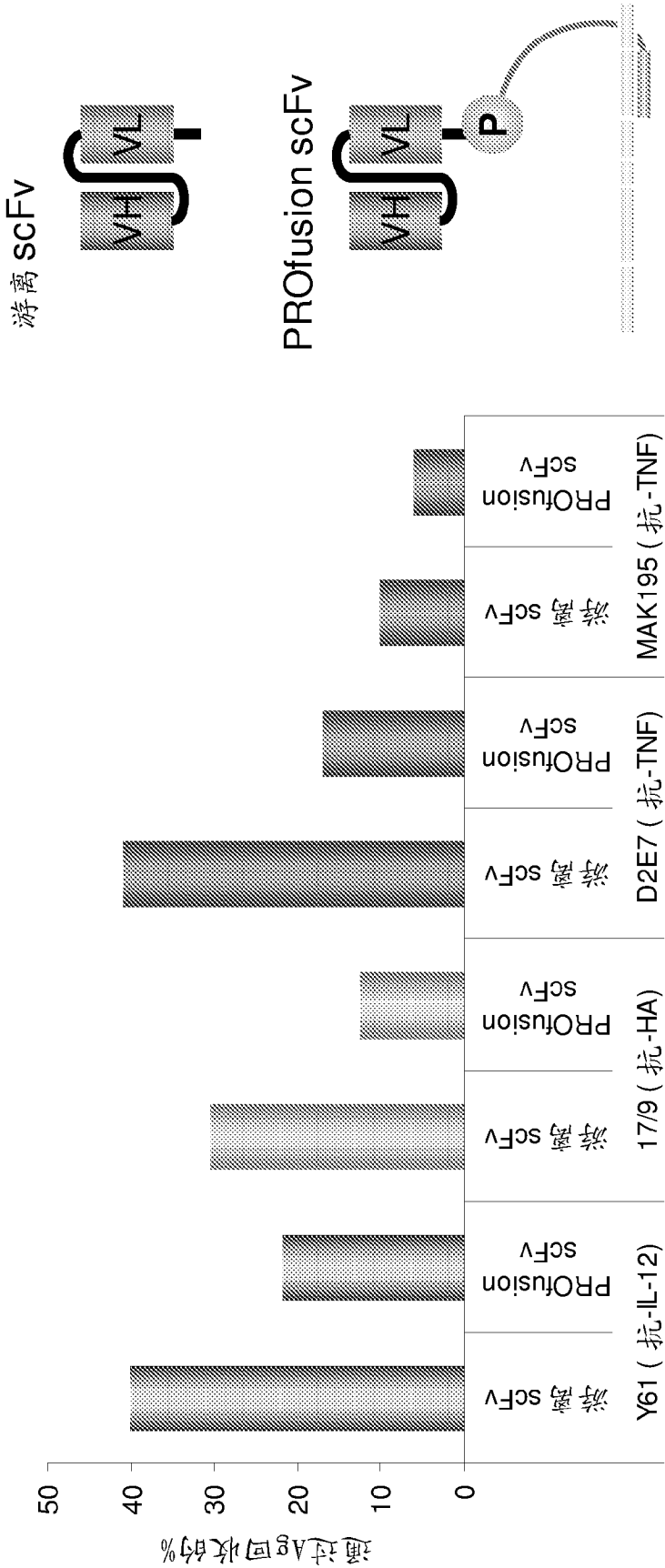


图 4

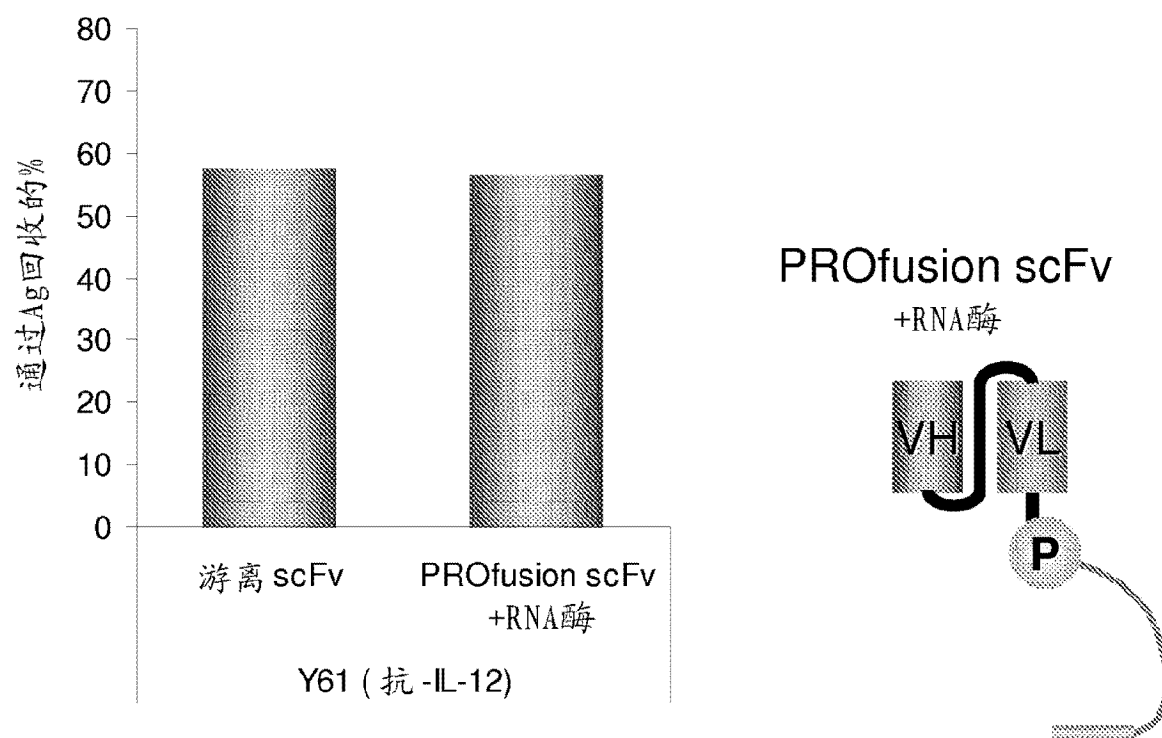


图 5

1

60

17_9-tag1

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCGTGGGTACCATGGAAG

17_9-tag2

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGTGTTCGGACCATGGAAG

17_9-tag3

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGGCTTTGGACCATGGAAG

17_9-tag4

TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAGCTTCTTCACCATGGAAG

T7 启动子

TMV-UTR

标记

Kozak 17/9

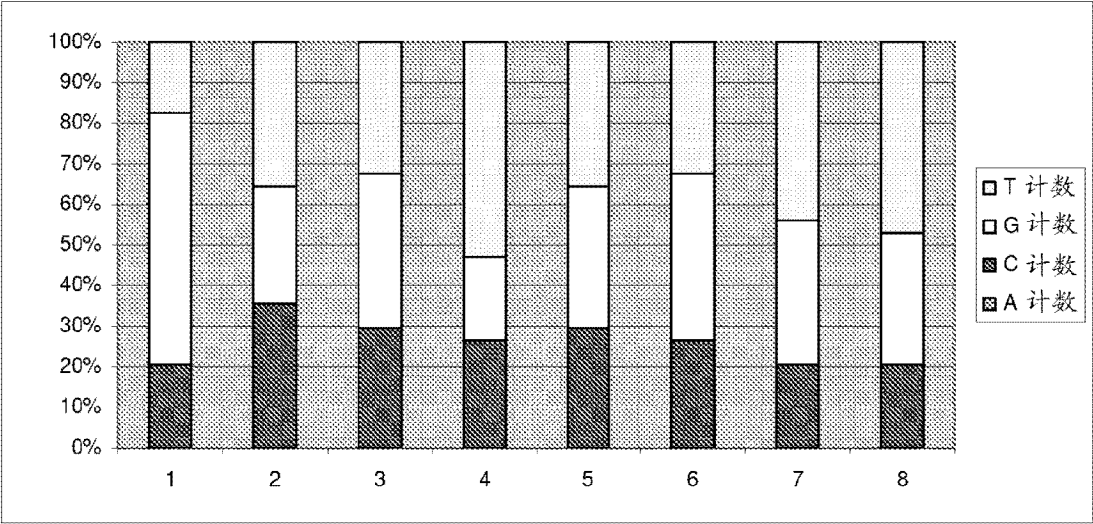


图 6

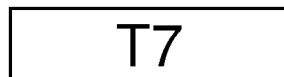
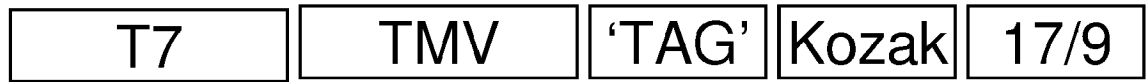


图 7

R1输出标记	R2输出标记	R3输出标记
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
TGCCCGCG	GGCTT ATG	GGCGGGTG
TGCCGGTG	GGGCGGCT	GGCTTTGG
TGGTCGCT	GGGTGTGT	GGGCCTTG
TGGTCTTG	GGTTGTGC	GGGGGCGT
TTTGCTGC	GTCGGGCG	GGTCCTTC
	GTCGGGTT	GTGCGTCG
	GTGTGCTC	GTGTCTGT
	GTGTTTTT	GTGTTGCG
	TGCTTTGT	GTTGTCG
	TGCTTTGT	GTTCTTGC
	TGCTTTTG	GTTTGGCT
	TGTTTTCG	TCGTGCGT
	TTCGGCTT	TGTCTGTG
	TTGGGCTT	TTCTCCTT
	TTGTGTTT	TTGGCCTG
	TTTGGCTC	TTGTTGGC
	TTTGGCTC	TTTTGCTC
	TTTTGTTG	

图 8

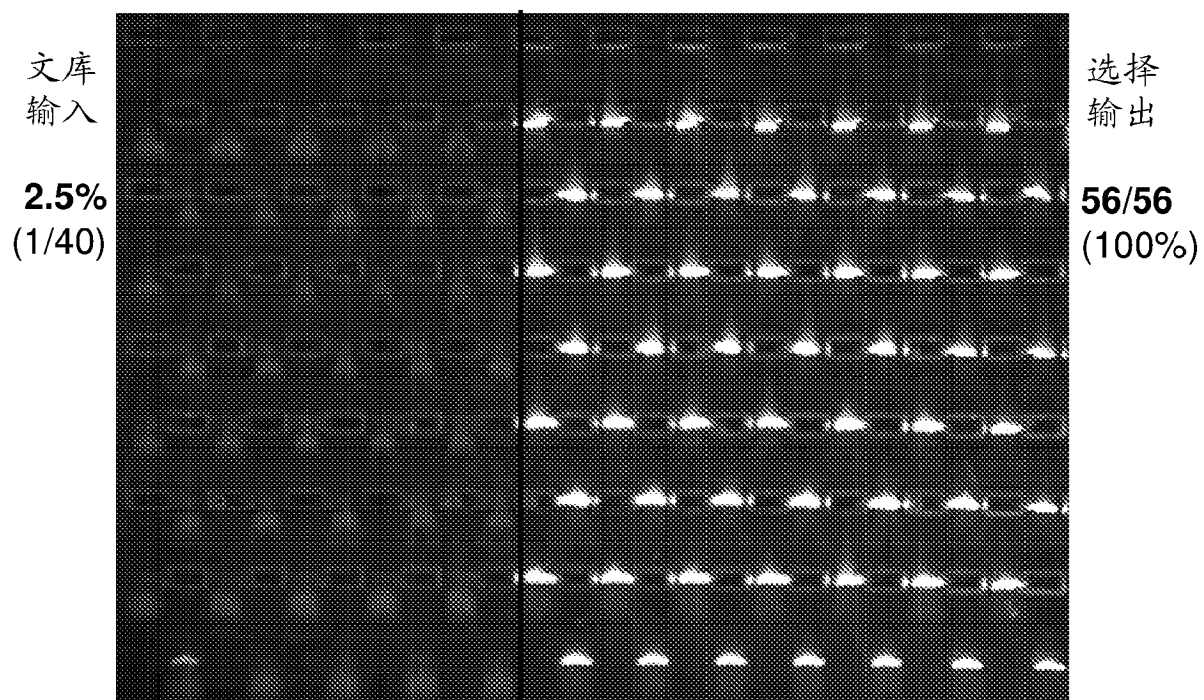


图 9

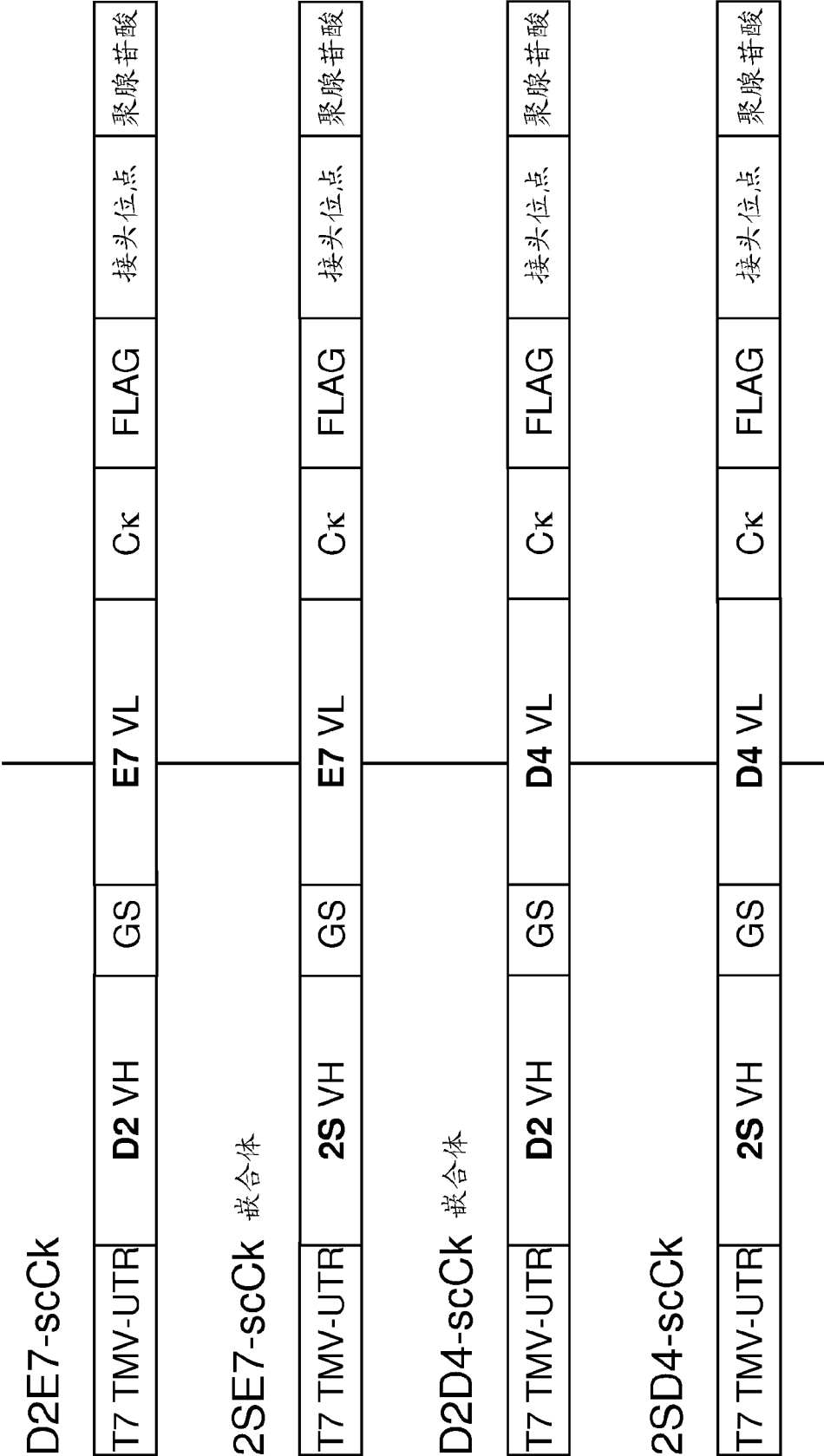


图 10

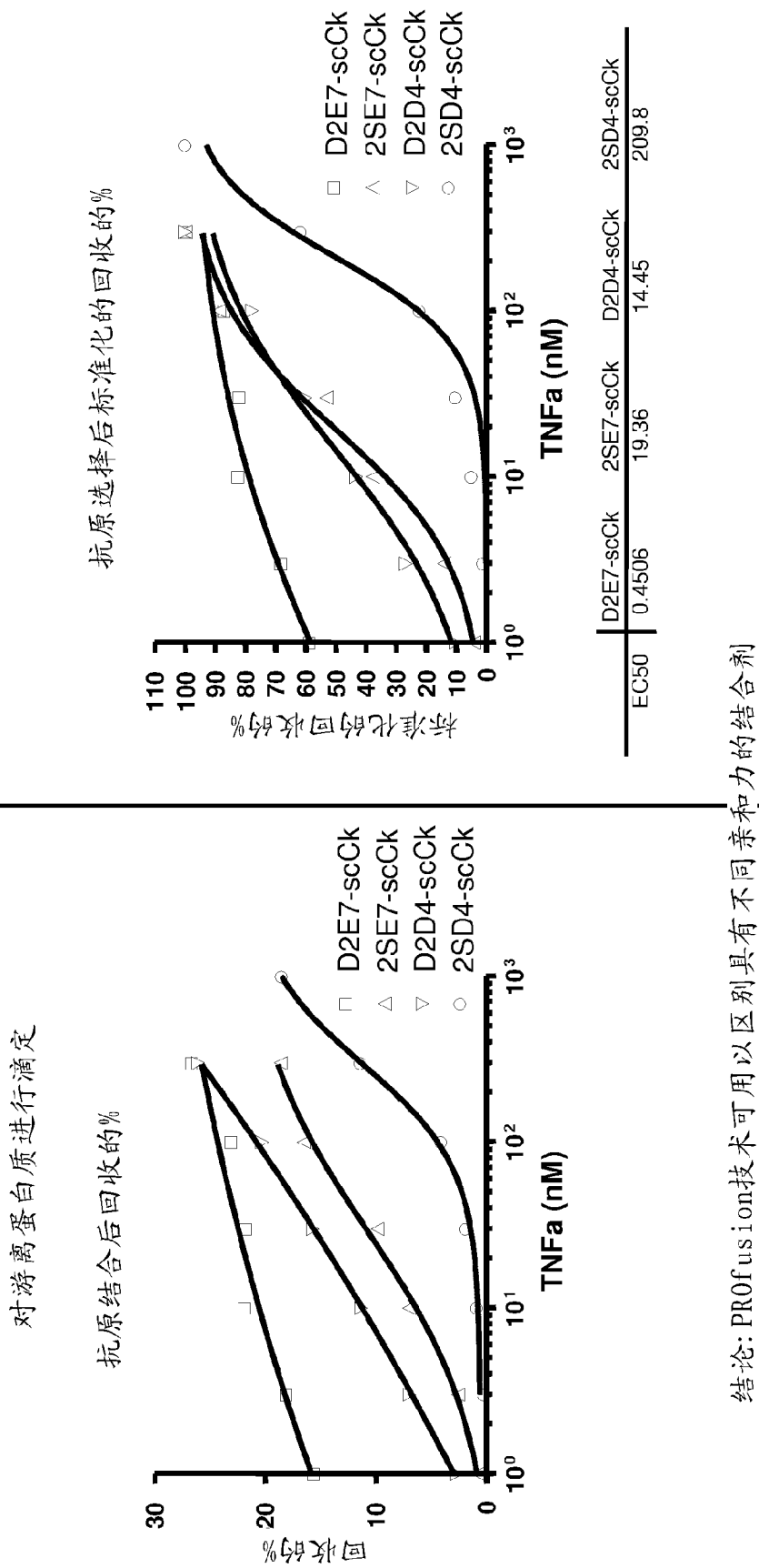
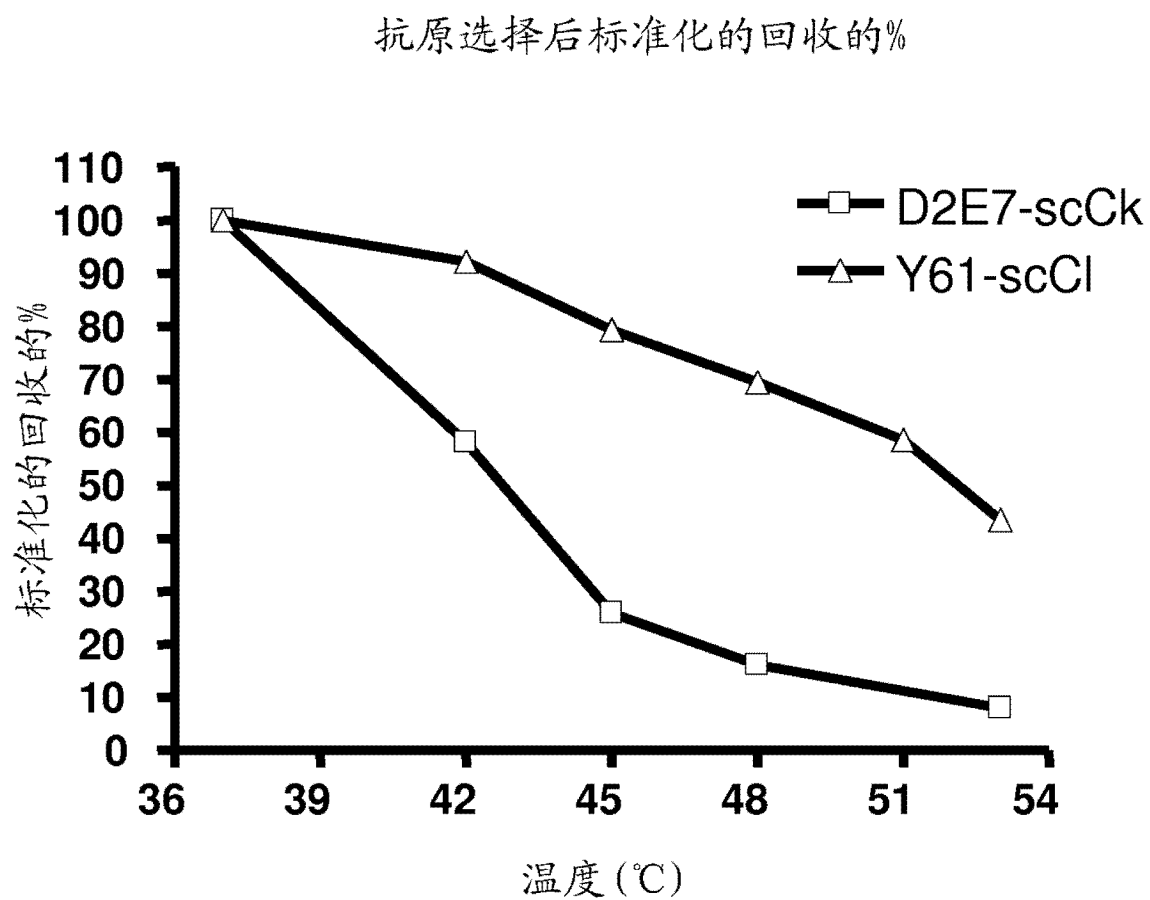


图 11



Notebook 84093-165

图 12

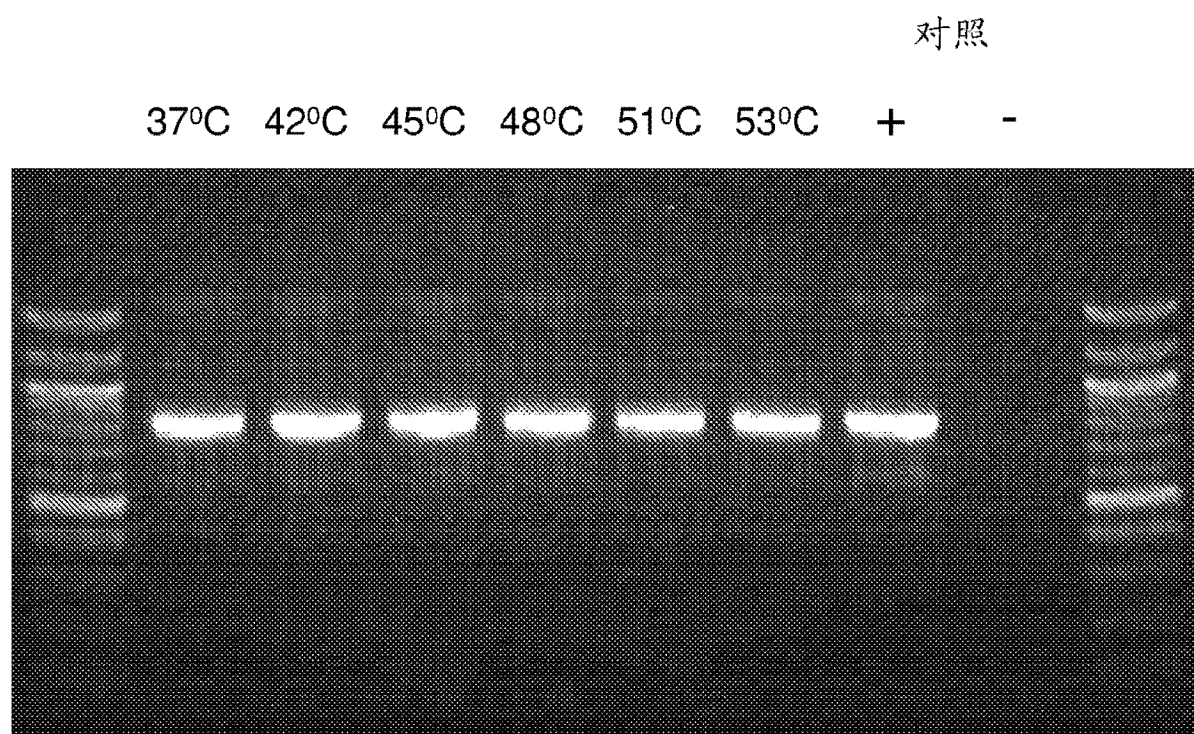


图 13

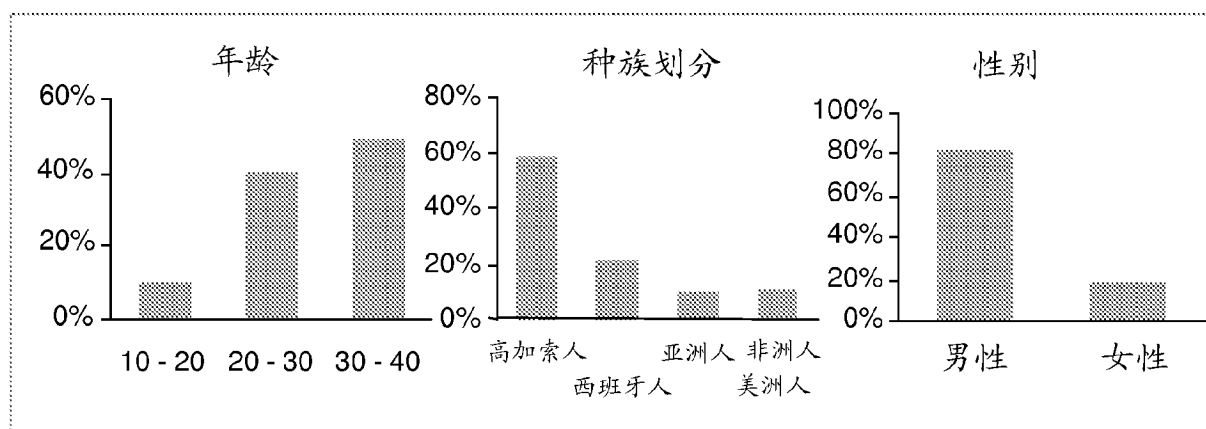


图 14

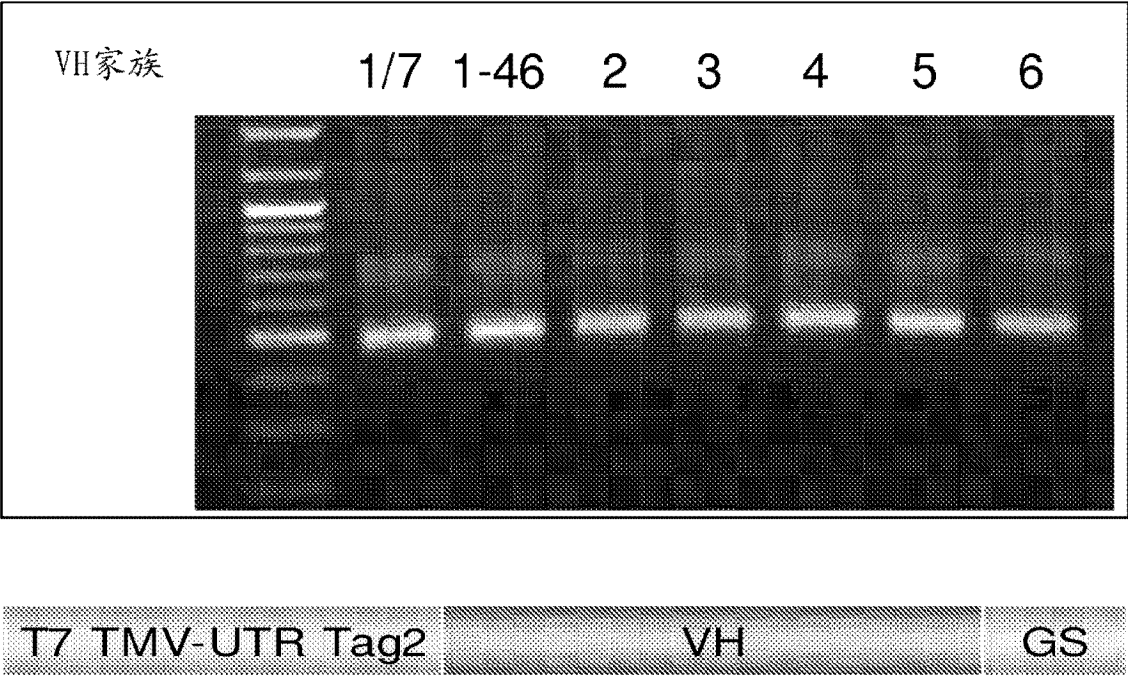


图 15

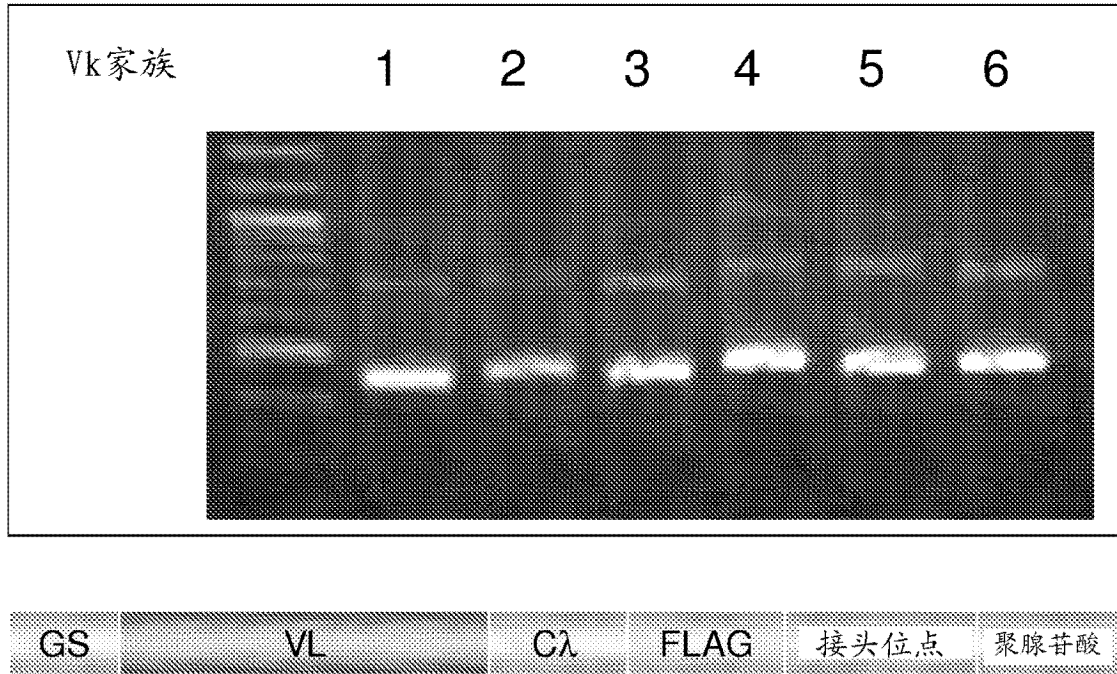


图 16

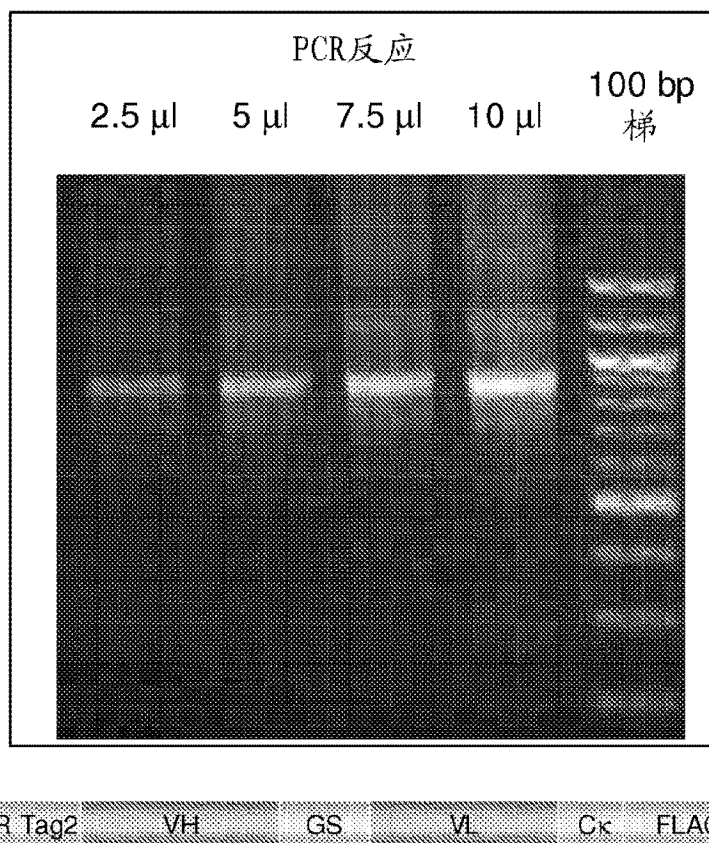


图 17

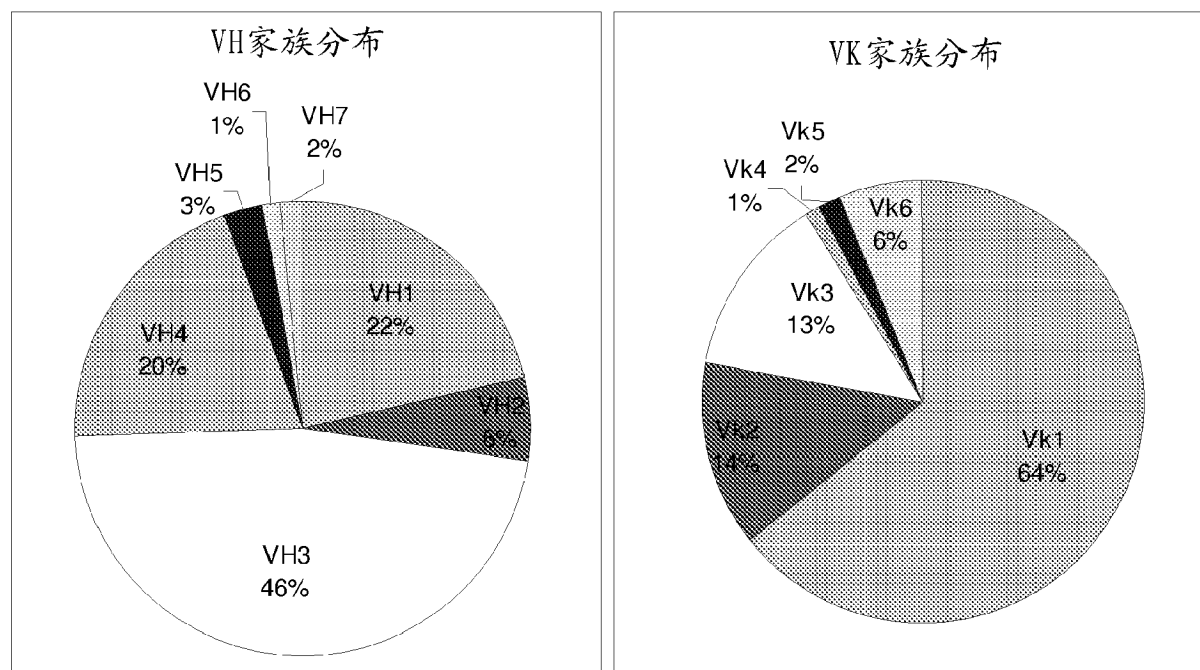


图 18

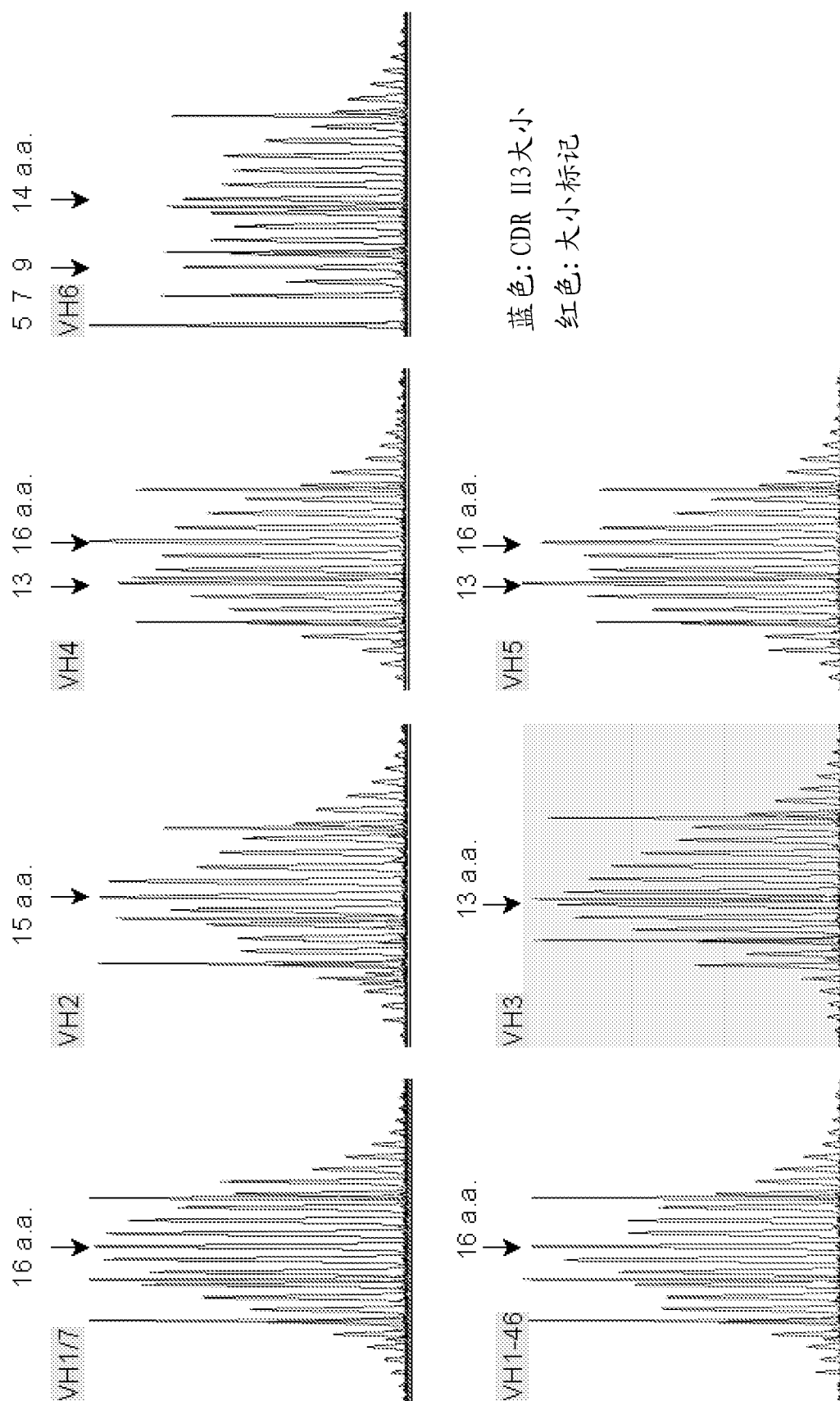


图 19

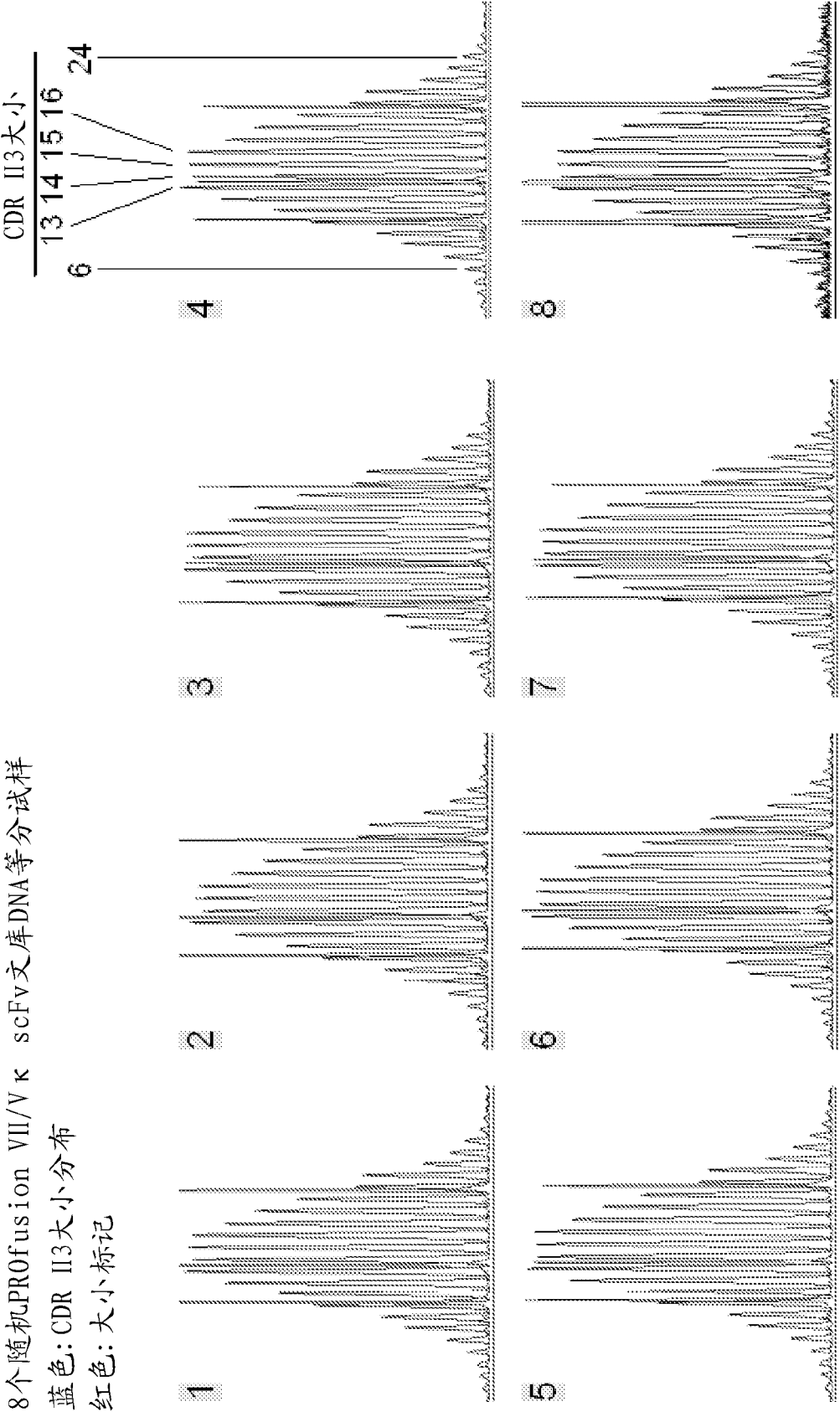


图 20

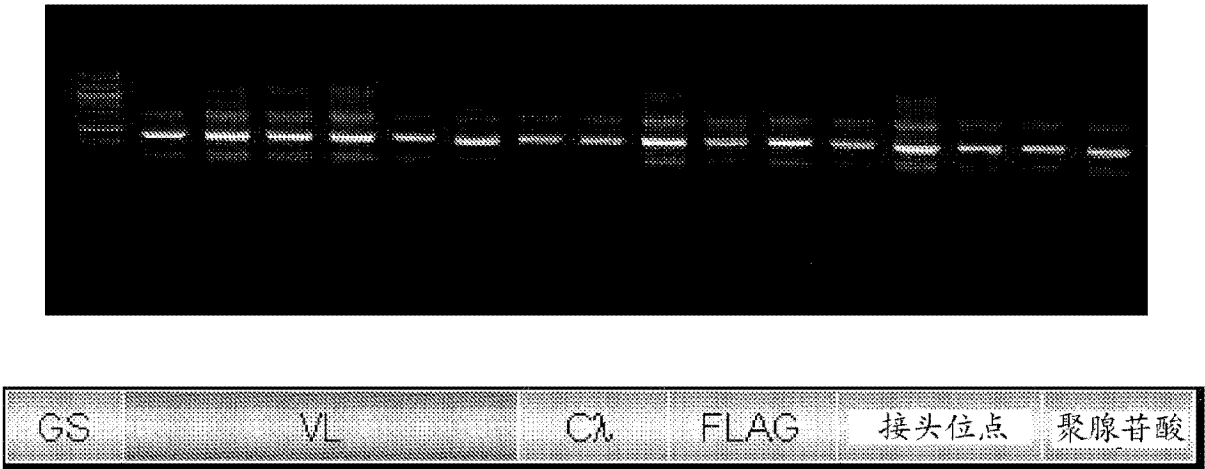


图 21

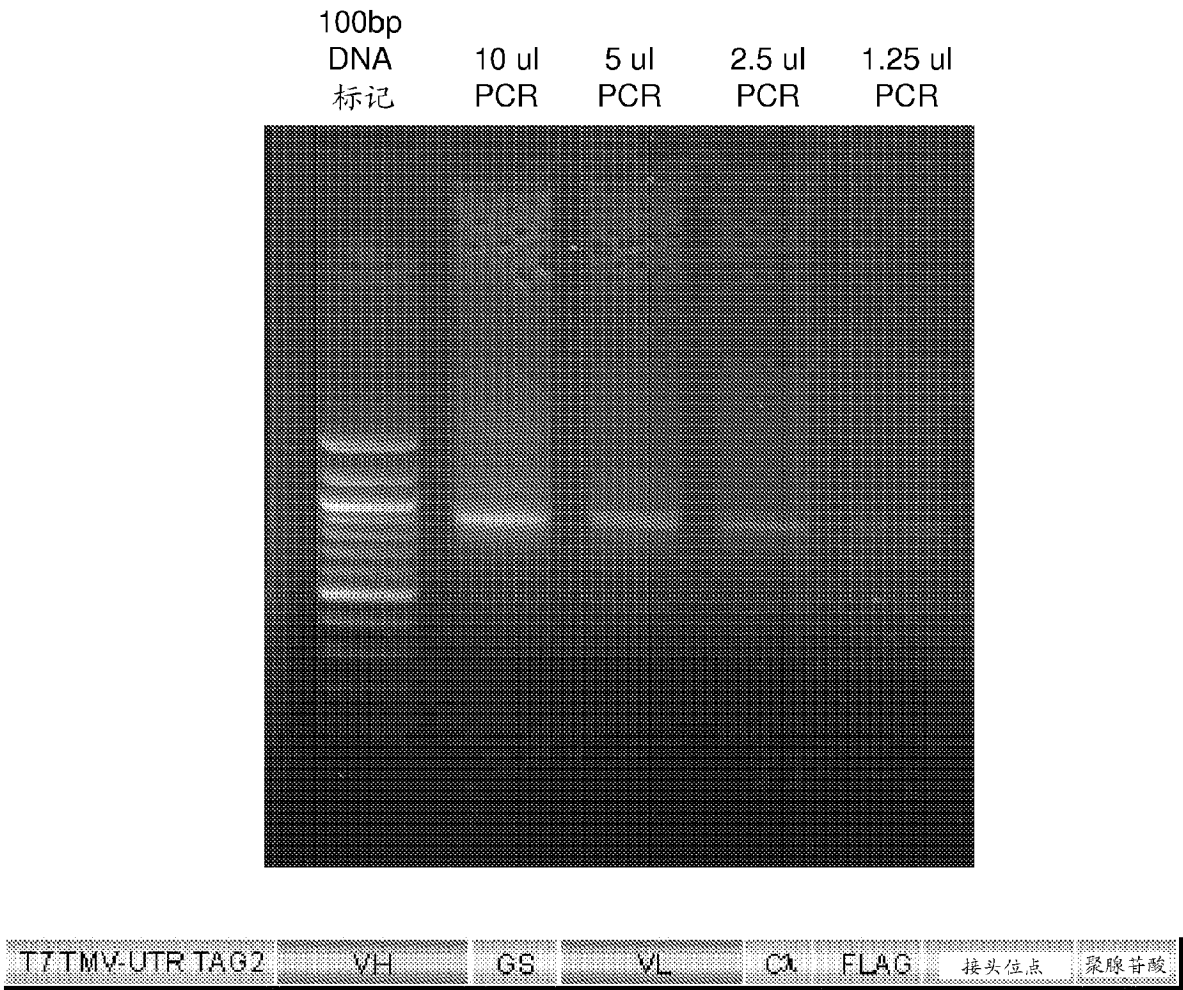


图 22

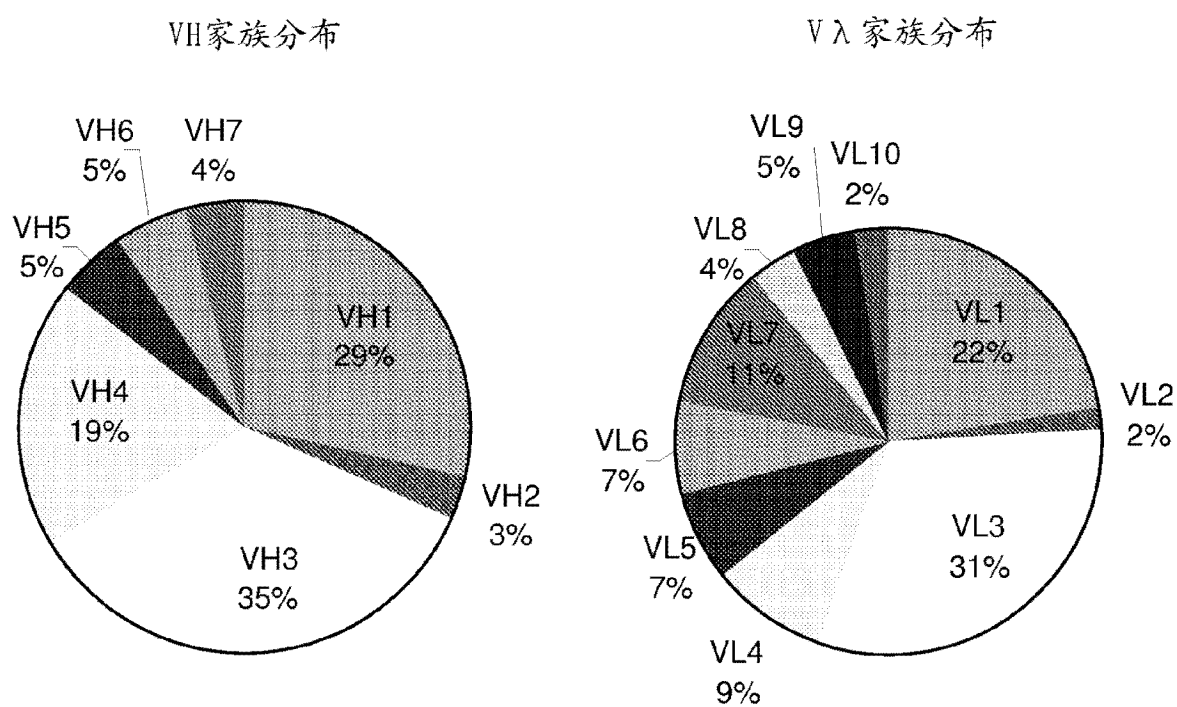


图 23

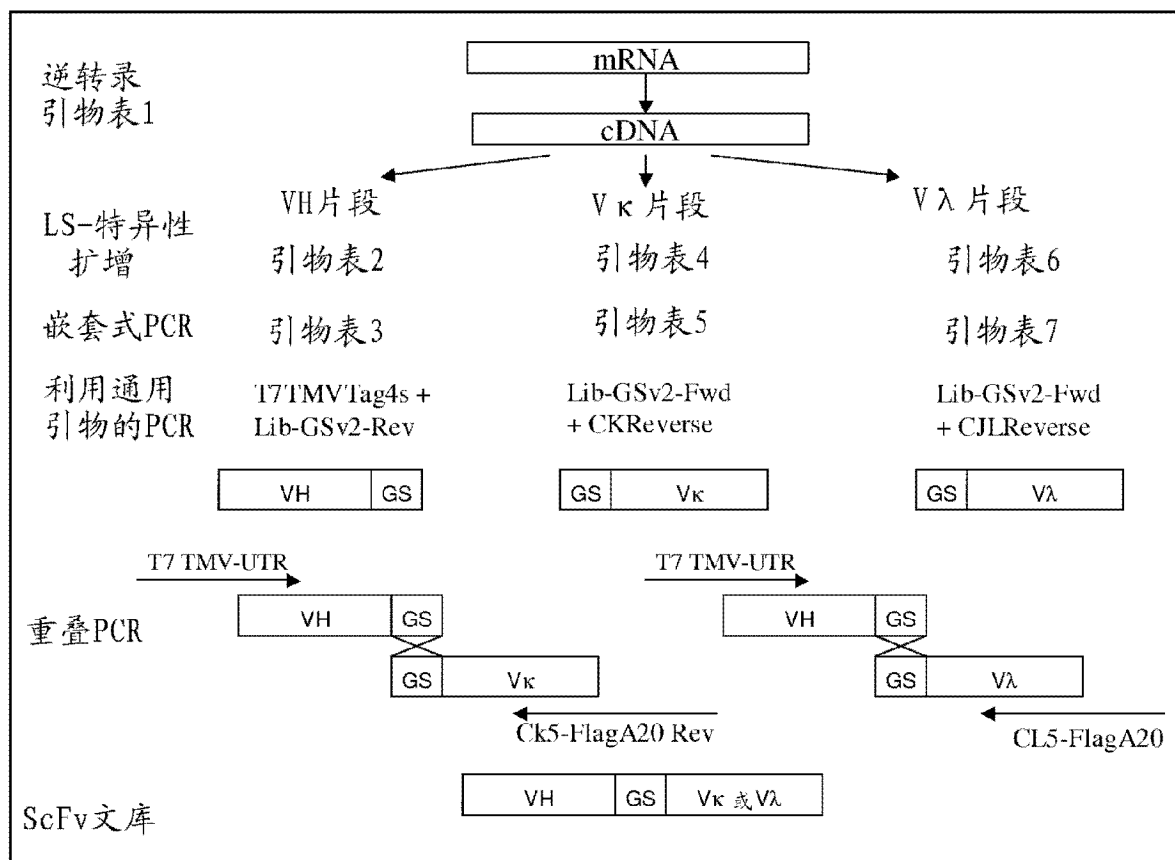


图 24

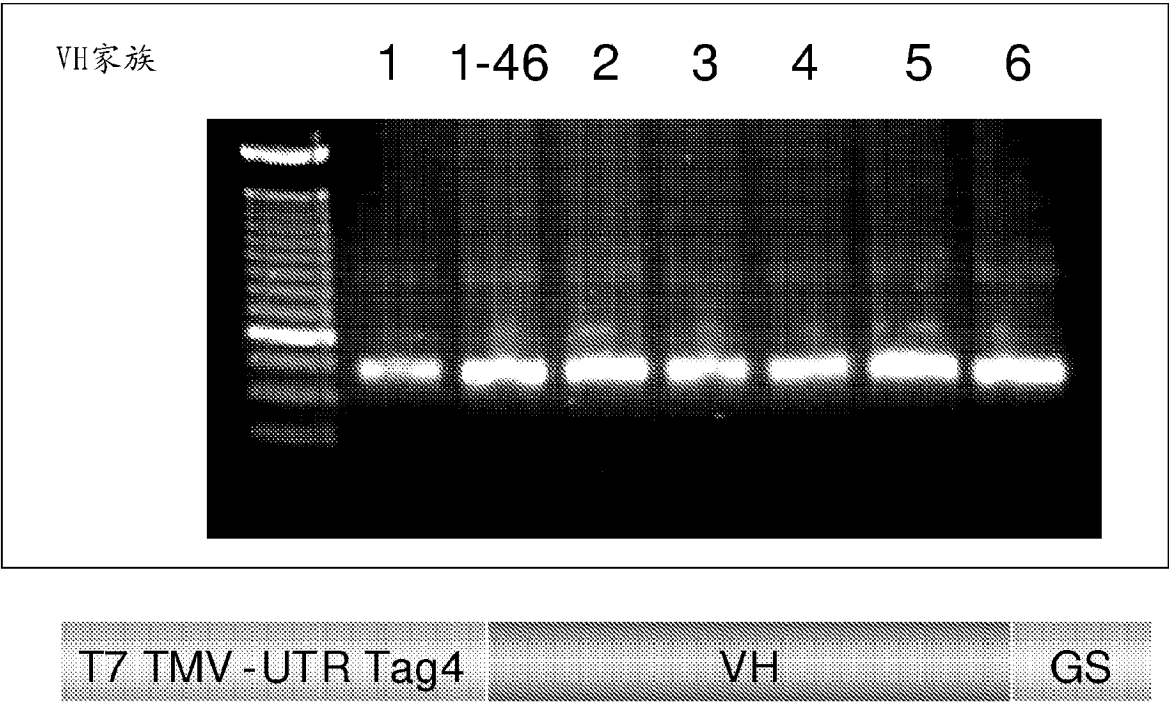


图 25

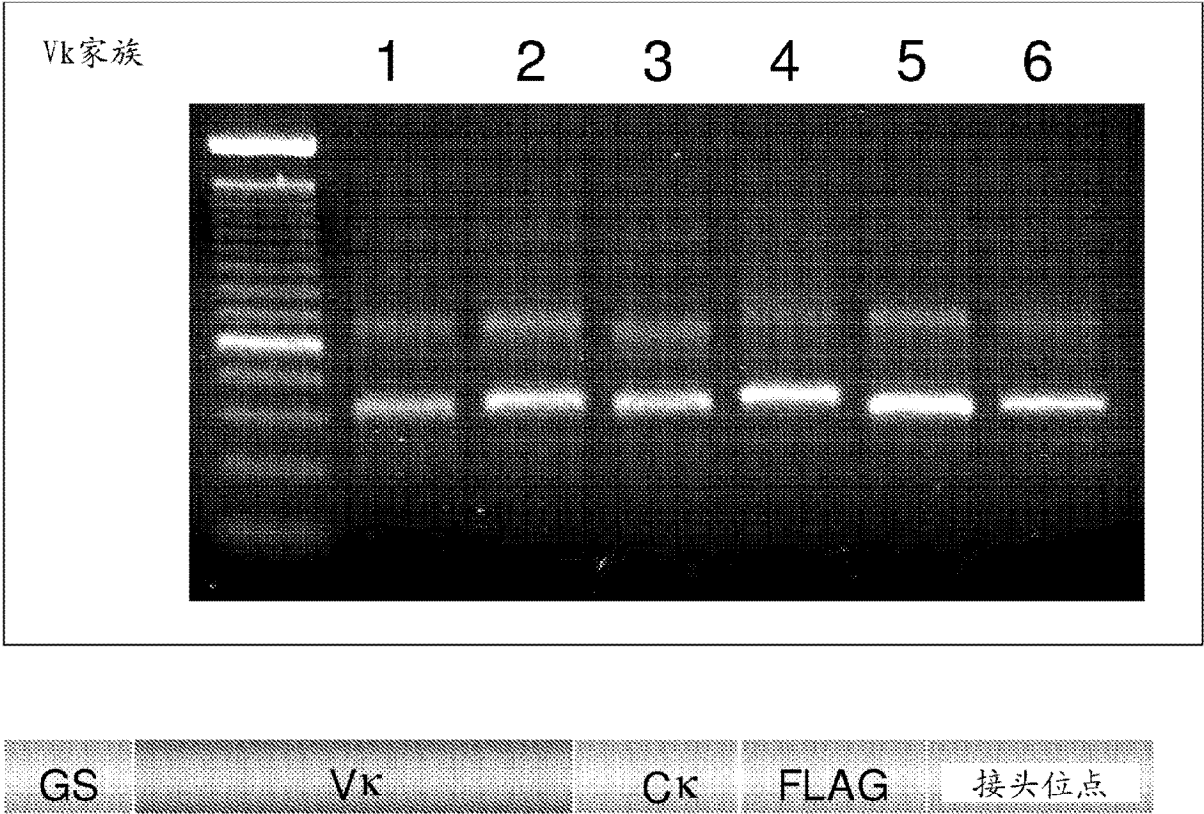


图 26

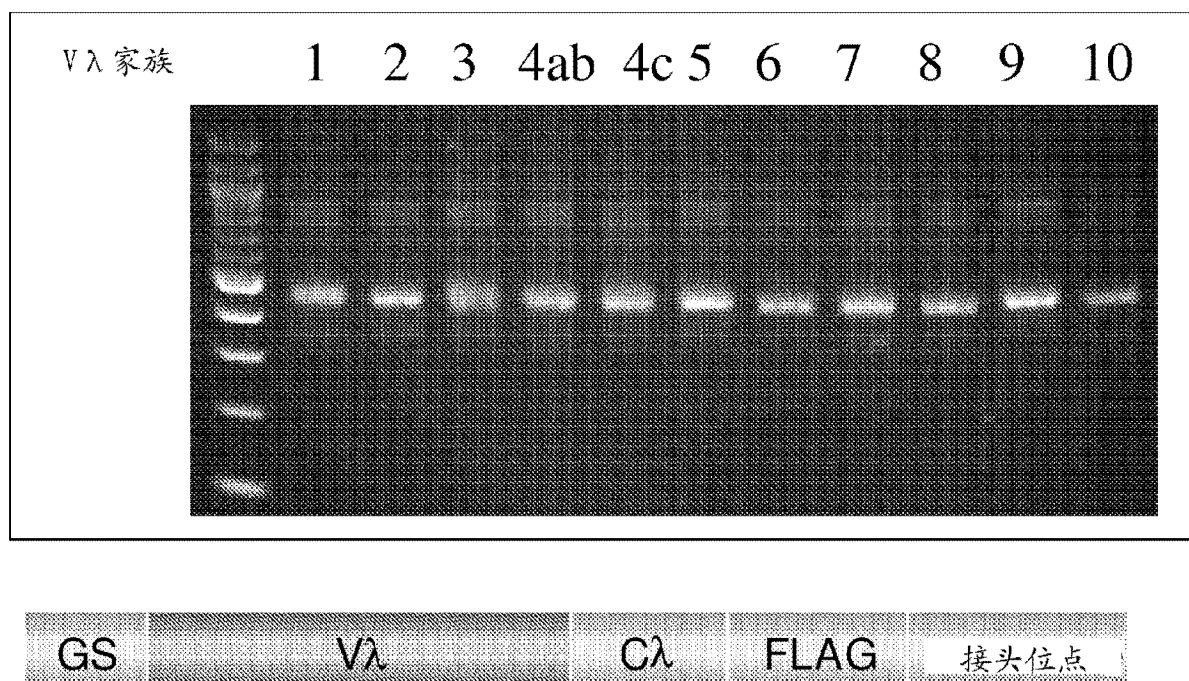


图 27

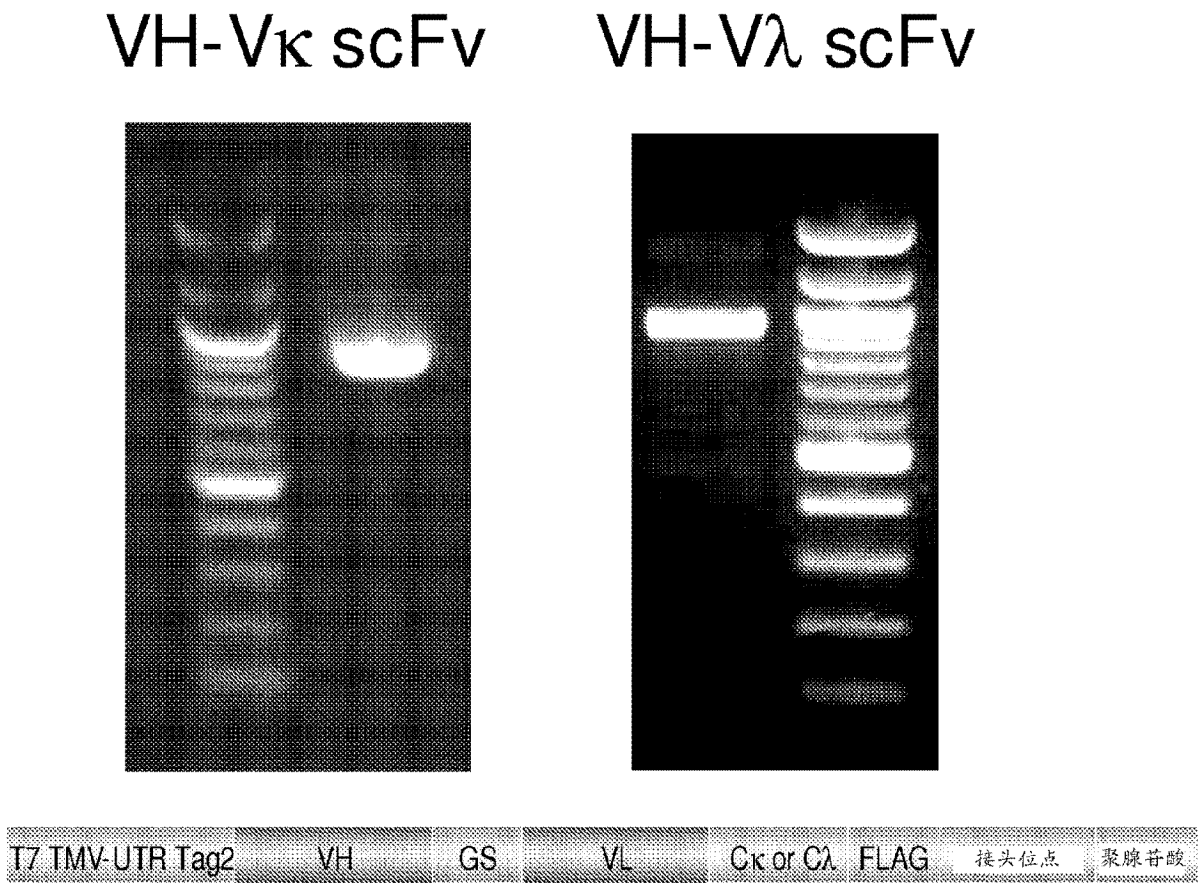


图 28

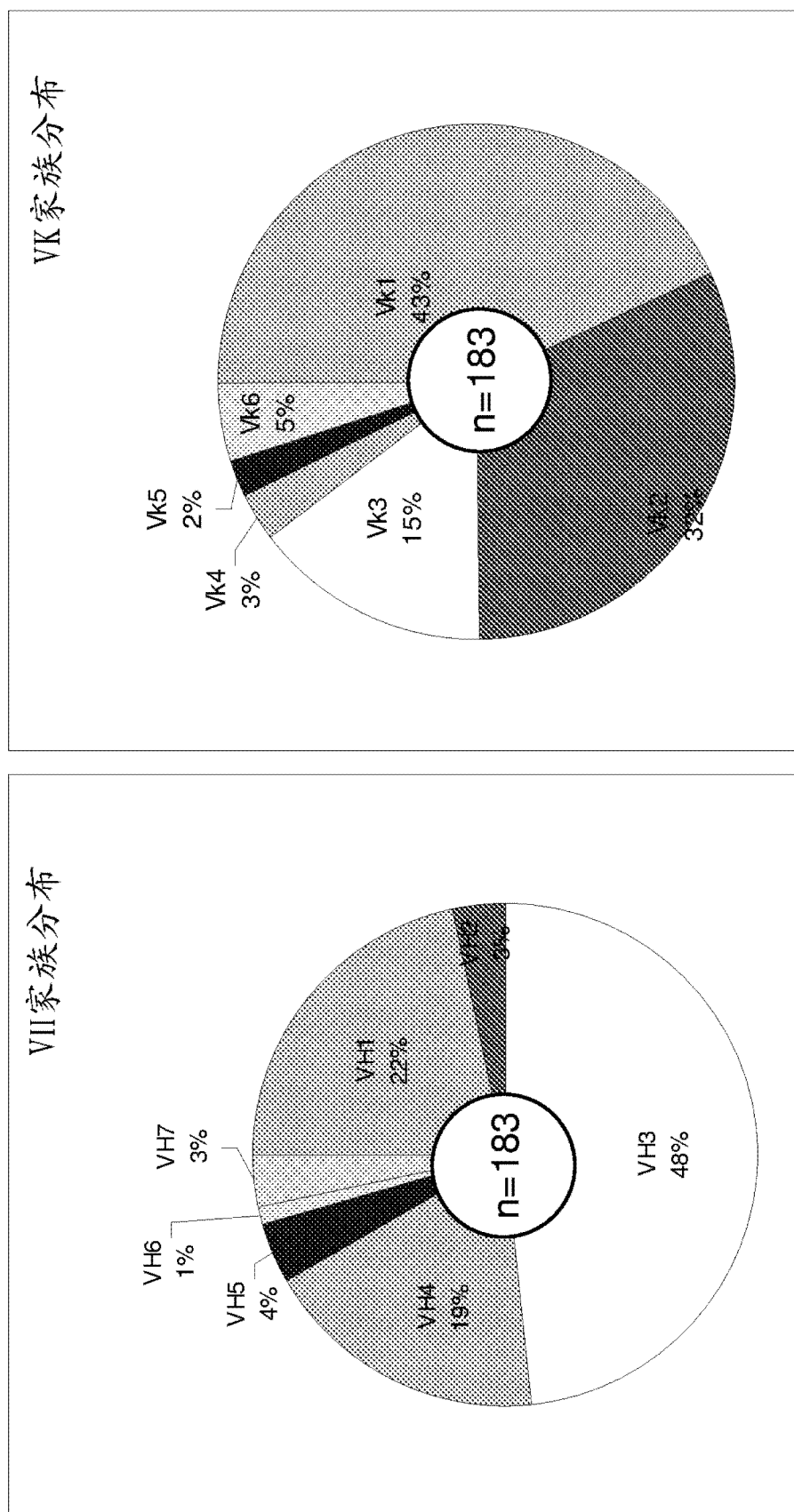


图 29

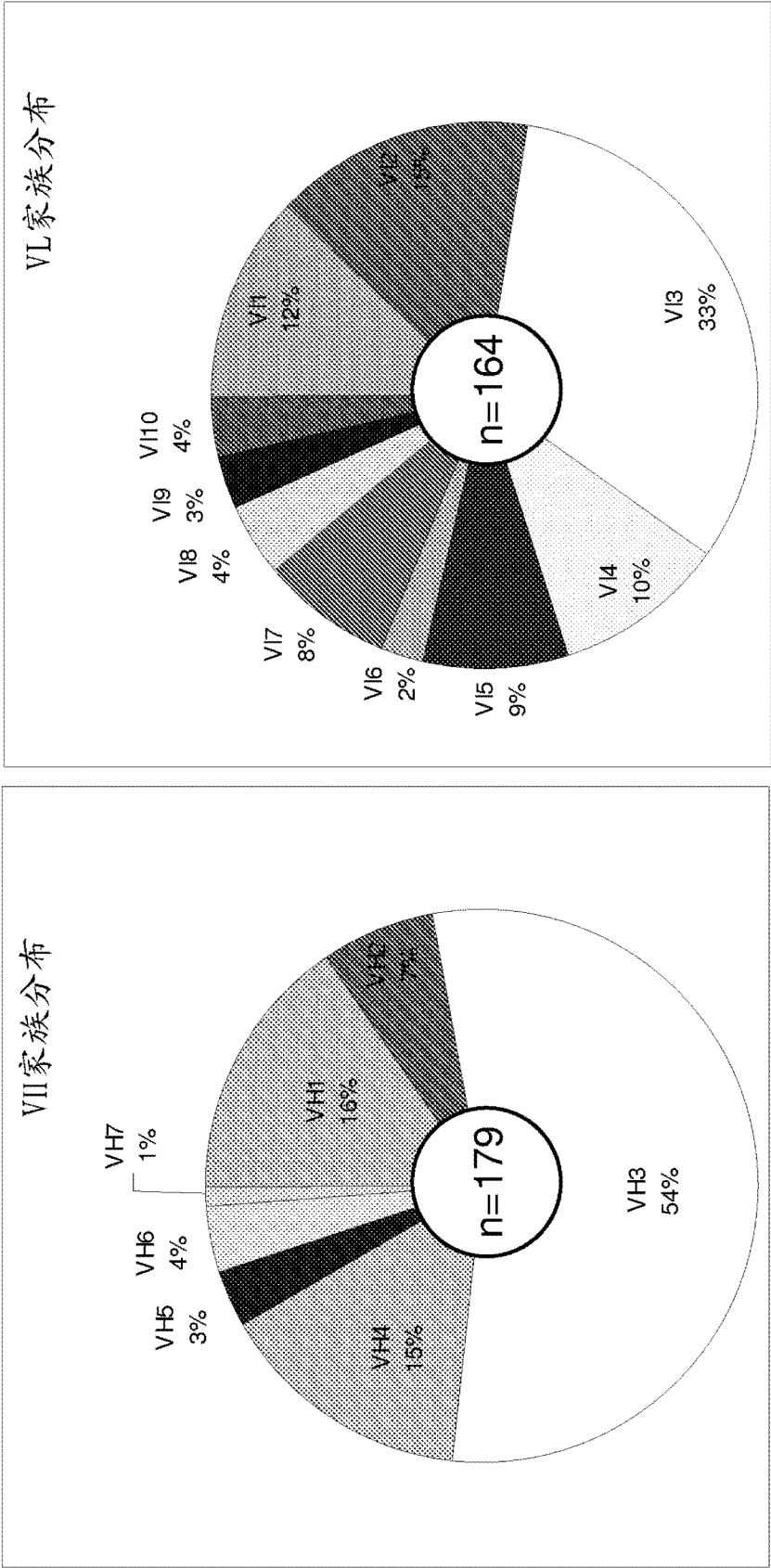


图 30

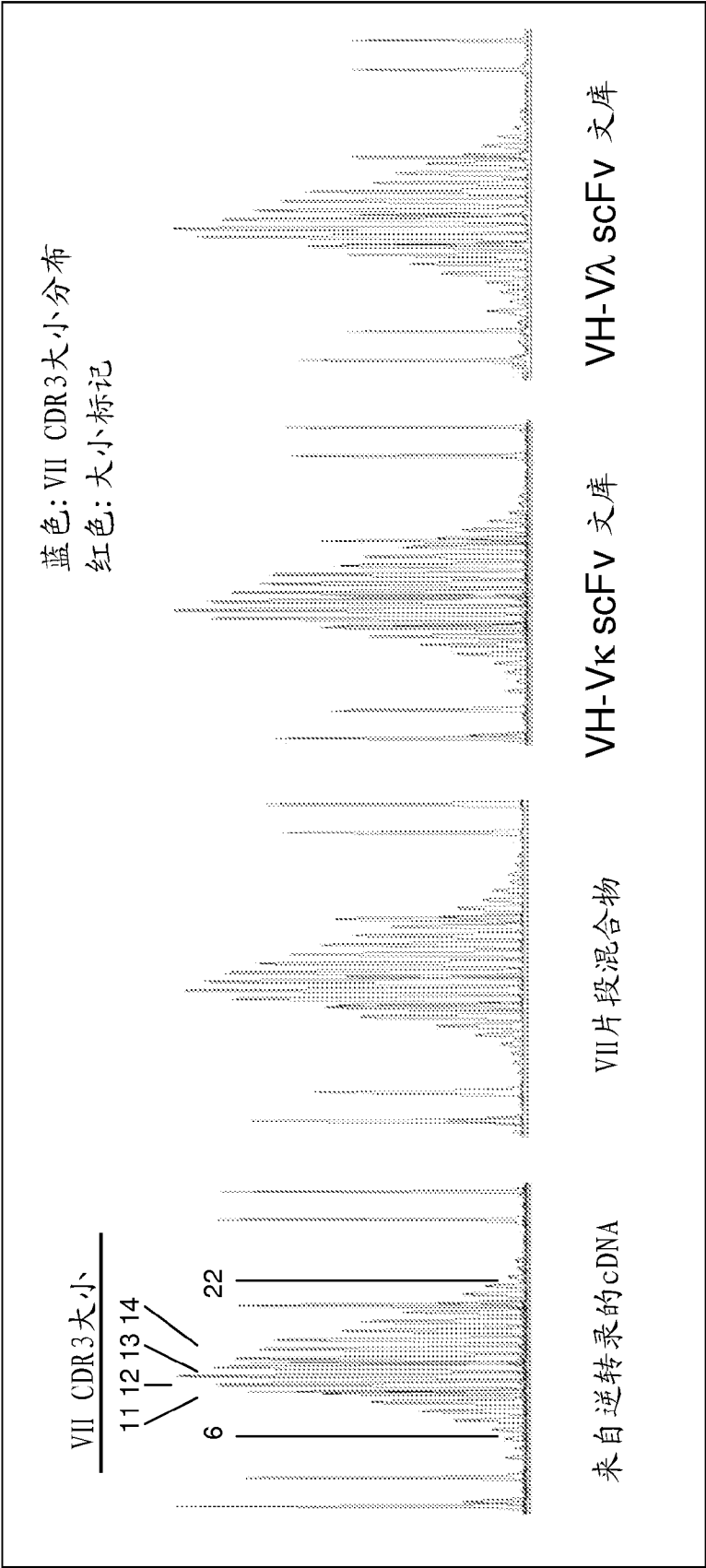


图 31