

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 10 月 29 日 (29.10.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/216191 A1

(51) 国际专利分类号:
C40B 50/06 (2006.01) *C40B 40/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/085706

(22) 国际申请日: 2020 年 4 月 20 日 (20.04.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910327739.6 2019 年 4 月 22 日 (22.04.2019) CN

(71) 申请人: 泷振 (上海) 生物科技有限公司
(**DDBIO. CO, LTD., (SHANG HAI)**) [CN/CN]; 中国
上海市浦东新区高科中路 1976 号 1 幢 4 层
A401 室, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 周辰 (**ZHOU, Chen**); 中国上海市浦东新区高科中路 1976 号 1 幢 4 层 A401 室, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 上海巔石知识产权代理事务所 (普通合伙) (**SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.**); 中国上海市浦东新区盛夏路 608 号 2 号楼 103 室/张琤, 蒋舫玮, Shanghai 201210 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** METHOD FOR PREPARING PHAGE LIBRARY

(54) 发明名称: 制备噬菌体文库的方法

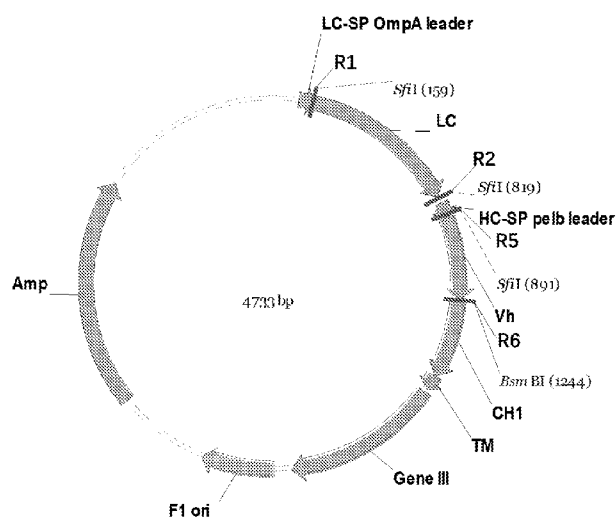


图 8

(57) **Abstract:** Provided is a method for producing a phage library displaying antibodies or antibody fragments, comprising: providing a first polynucleotide containing LC, a second polynucleotide containing connexon, and a third polynucleotide containing HC; respectively introducing the first, second and third polynucleotides to first, second and third bacteria to obtain a light chain component bacterial library, a connexon component bacterial library, and a heavy chain component bacterial library; obtaining a light chain component plasmid, a connexon component plasmid, and a heavy chain component plasmid from the libraries; obtaining the released LC, released connexon and released HC from the plasmids; connecting the released display vector segments to form a connection product for display; introducing a third bacterium to obtain a display bacterial library; and using the display bacterial library to prepare the phage library for displaying the antibodies or antibody fragments. Also provided is a phage library produced according to the method.

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(57) 摘要: 提供了一种产生展示抗体或抗体片段的噬菌体文库的方法, 包括提供包含LC的第一多核苷酸、包含连接子的第二多核苷酸和包含HC的第三多核苷酸, 将第一、第二和第三多核苷酸分别导入第一、第二和第三细菌中获得轻链组件细菌文库、连接子组件细菌和重链组件细菌文库, 从文库获得轻链组件质粒、连接子组件质粒和重链组件质粒, 从中获得经释放的LC、经释放的连接子和经释放的HC, 与经释放的展示载体片段连接形成展示用连接产物, 导入第四细菌中获得展示细菌文库, 使用所述展示细菌文库制备展示所述抗体或抗体片段的噬菌体文库。还提供了根据该方法产生的噬菌体文库。

说明书

制备噬菌体文库的方法

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种产生展示抗体或抗体片段的噬菌体文库的方法。

背景技术

本领域存在一些制备噬菌体文库的方法，然而这些方法均存在一定的缺陷。例如，文库的库容量过小（例如，难以获得库容量超过 10^9 的文库），并且文库多样性不足，难以满足筛选高质量抗体的需求。同时，为了扩大库容量，需要把多个较小的文库进行积累，这不光需要花费数年的时间，而且很难保证这些较小文库之间的一致性，难以控制所获得文库的质量。此外，利用现有的方法构建文库，难以在文库制备的过程中方便、可靠地进行质量控制，通常只能在文库建成之后才得知其质量如何，风险高且失败的概率大。

此外，由于通过目前的方法建立的文库成本高、周期长，长期保存后质量下降严重，难以满足工业化量产的需求。

因此，亟需能够满足工业化量产需求、质量可控且操作简便的方法来制备大容量的噬菌体文库。

发明内容

本申请提供了一种产生展示抗体或抗体片段的噬菌体文库的方法，以及通过使用该方法获得的噬菌体文库，和借助该噬菌体文库筛选抗体或抗体片段的方法。本申请所述的产生展示抗体或抗体片段的噬菌体文库的方法具备至少一个以下性质：1）有效减少 PCR 所导致的引入突变的几率；本申请所述的噬菌体文库没有采用本领域常规抗体库构建方法所使用的组合 PCR 策略，用于构建所述噬菌体文库的每个组件可以仅仅通过 1 次 PCR 扩增，然后连接所需的所需组件得到 Fab 的噬菌体文库；2）能够满足工业化量产的需求；3）能够较容易地进行质量控制；构建本申请所述的噬菌体文库所需的每个步骤都可以独立、简便地进行质量控制；同时，在获得本申请所述的噬菌体文库之后，可以简便地（例如，采用基因测序，或者可溶性 Fab 表达分析）对其进行质量分析；4）制备过程简便、快捷；构建本申请所述的噬菌体文库可以采用特殊的限制性内切核酸酶的识别位点，既保证定向连接，又防止错误连接，连接时各个组件片段的分子个数可以控制为 1：1，从而提高连接转化效率；同时，采用构建轻链组件细菌文库等细菌文库的策略，提高各个抗体或其片段的连接和转化效率（例如，得

说明书

到的连接产物，每 μg 的转化效率可以为约 10^9 以上）；通过获得连接子组件质粒，确保得到的经释放的连接子具备合适且完整的黏性末端，提高连接转化效率；此外，本申请所述的噬菌体文库既可以通过铺皿培养，也可以通过液体培养；5）产生的文库库容量大且多样性好；从而有助于快速且高效地筛选抗体或其抗原结合片段；6）特异性高；构建本申请所述的噬菌体文库没有采用本领域常规方法所使用的简并引物，避免了简并引物引起的错误，同时用于构建本申请所述的噬菌体文库的引物所需 PCR 退火温度较高，能够提高这些引物与其扩增目的片段的结合特异性；以及 7）可扩增并容易保存；轻链组件细菌文库等细菌文库以及包含连接子组件质粒的细菌均可以在 -80°C 条件下长期保存，而在需要使用时则可以随时取用（例如，可以仅需两天就获得本申请所述的噬菌体文库），并且按需进行不同种类和比例的混合。

一方面，本申请提供了一种产生展示抗体或抗体片段的噬菌体文库的方法，所述方法包括：1）提供第一多核苷酸，第二多核苷酸和第三多核苷酸，所述第一多核苷酸包含 LC，所述第二多核苷酸包含连接子且所述第三多核苷酸包含 HC，其中所述 LC 包含编码所述抗体或抗体片段的轻链或轻链片段的核酸序列，所述 HC 包含编码所述抗体或抗体片段的重链或重链片段的核酸序列；2）将所述第一多核苷酸导入第一细菌中以获得轻链组件细菌文库，将所述第二多核苷酸导入第二细菌中以获得连接子组件细菌，将所述第三多核苷酸导入第三组细菌中以获得重链组件细菌文库；3）由所述轻链组件细菌文库获得包含所述 LC 的轻链组件质粒，由所述连接子组件细菌获得包含所述连接子的连接子组件质粒，且由所述重链组件细菌文库获得包含所述 HC 的重链组件质粒；4）由所述轻链组件质粒获得经释放的 LC，由所述连接子组件质粒获得经释放的连接子，且由所述重链组件质粒获得经释放的 HC；5）提供展示载体，并由所述展示载体获得经释放的展示载体片段；6）使所述经释放的 LC、经释放的连接子、经释放的 HC 以及经释放的展示载体片段连接，以形成展示用连接产物；7）将所述展示用连接产物导入第四组细菌中，以获得所述抗体或抗体片段的展示细菌文库；8）使用所述展示细菌文库制备展示所述抗体或抗体片段的噬菌体文库。

在某些实施方式中，在适于抗体或抗体片段表达的条件下，6）的所述展示用连接产物能够依照阅读框表达所述轻链或轻链片段以及所述重链或重链片段。

在某些实施方式中，所述第一多核苷酸，所述第二多核苷酸和所述第三多核苷酸均为线性核酸分子。

在某些实施方式中，编码所述重链或重链片段的核酸序列与编码所述轻链或轻链片段的核酸序列位于不同的阅读框中。

在某些实施方式中，所述连接子包含编码信号肽 pelB 或其片段的核酸序列。在某些实施方式中，所述连接子的长度为约 50 至约 200 个碱基。

说明书

在某些实施方式中，在 6) 的所述展示用连接产物中，所述 LC 位于所述连接子的上游，且所述连接子位于所述 HC 的上游。

在某些实施方式中，2) 包括冷冻保存所述轻链组件细菌文库和/或所述重链组件细菌文库。

在某些实施方式中，7) 包括冷冻保存所述展示细菌文库。

在某些实施方式中，8) 包括融化并培养所述经冷冻保存的展示细菌文库，并使用经培养的所述展示细菌文库构建所述噬菌体文库。

在某些实施方式中，所述第一多核苷酸以 5' 至 3' 方向包含结构 R1-LC-R2，所述第二多核苷酸以 5' 至 3' 方向包含结构 R3-连接子-R4，所述第三多核苷酸以 5' 至 3' 方向包含结构 R5-HC-R6，且所述展示载体中以 5' 至 3' 方向包含结构 R7-展示载体片段-R8，其中所述 R1，R2，R3，R4，R5，R6，R7 和 R8 为限制性内切核酸酶的识别位点。

在某些实施方式中，所述 R2 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R3 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R4、R5、R6、R7 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。

在某些实施方式中，所述 R4 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R5 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R2、R3、R6、R7 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。

在某些实施方式中，所述 R6 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R7 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R2、R3、R4、R5 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。

在某些实施方式中，所述 R8 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R1 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R2、R3、R4、R5、R6 及 R7 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。

在某些实施方式中，所述 R1，R2，R3，R4，R5、R6、R7 和 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端为非回文序列。

在某些实施方式中，所述 R1，R2，R3，R4，R5、R6、R7 和 R8 中的两项或更多项能够被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。

在某些实施方式中，所述 R2 与所述 R3 相同。在某些实施方式中，所述 R4 与所述 R5 相同。在某些实施方式中，所述 R6 与所述 R7 相同。在某些实施方式中，所述 R8 与所述 R1 相同。

在某些实施方式中，所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 能够被相同的限制性内切核酸酶

说明书

识别及切割。在某些实施方式中,所述 R6 和 R7 能够被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。

在某些实施方式中,所述限制性内切核酸酶选自 SfiI, BsmBI 和 Esp3I。在某些实施方式中,所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 能够被 SfiI 识别及切割。在某些实施方式中,所述 R6 和 R7 能够被 BsmBI 和/或 Esp3I 识别及切割。

在某些实施方式中,所述 R1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述 R2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述 R3 包含 SEQ ID NO: 2 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述 R4 包含 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述 R5 包含 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述 R6 包含 SEQ ID NO: 4 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述 R7 包含 SEQ ID NO: 4 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述 R8 包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。

在某些实施方式中,所述轻链或轻链片段包含轻链可变区部分和/或轻链恒定区部分。在某些实施方式中,所述重链或重链片段包含重链可变区部分和/或重链恒定区部分。在某些实施方式中,所述抗体或其片段包括 Fab, Fab', (Fab)₂ 和/或(Fab')₂。

在某些实施方式中, 7) 中所述展示用连接产物的连接转化效率为至少 10⁸ 个克隆/μg 多核苷酸。

在某些实施方式中, 2) 包括使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述第一多核苷酸进行酶切处理, 使经酶切处理的所述第一多核苷酸与轻链存储载体片段连接形成轻链存储连接产物, 并将所述轻链存储连接产物导入所述第一细菌中以获得所述轻链组件细菌文库; 其中所述轻链存储载体包含所述 R1 和 R2, 并且通过使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述轻链存储载体进行酶切处理而获得所述轻链存储载体片段。

在某些实施方式中, 所述轻链存储载体源自 pUC 载体。在某些实施方式中, 所述 pUC 载体为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体。在某些实施方式中, 所述 pUC 载体为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在某些实施方式中, 所述识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。

在某些实施方式中, 2) 包括使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述第三多核苷酸进行酶切处理, 使经酶切处理的所述第三多核苷酸与重链存储载体片段连接形成重链存储连接产物, 并将所述重链存储连接产物导入所述第三细菌中以获得所述重链组件细菌文库; 其中所述重链存储载体包含所述 R5 和 R6, 并且通过使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述重链存储载体进行酶切处理而获得所述重链存储载体片段。在某些实施方式

说明书

中，所述重链存储载体源自 pUC 载体。在某些实施方式中，所述 pUC 载体为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体。在某些实施方式中，所述 pUC 载体为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在某些实施方式中，所述重链存储载体中包含且仅包含一个 BsmBI 的识别位点。

在某些实施方式中，所述识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶包括 SfiI, BsmBI 和/或 Esp3I。

在某些实施方式中，2) 包括使所述第二多核苷酸与载体片段连接形成连接子存储载体，并将所述连接子存储载体导入所述第二细菌中以获得所述连接子组件细菌。在某些实施方式中，所述连接子存储载体中包含所述 R3 和 R4。在某些实施方式中，用于构建所述连接子存储载体的所述载体片段源自 pUC 载体。在某些实施方式中，其中所述 pUC 载体为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体。在某些实施方式中，所述 pUC 载体为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在某些实施方式中，4) 包括使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述轻链组件质粒进行酶切处理，从而获得所述经释放的 LC。在某些实施方式中，所述识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。

在某些实施方式中，4) 包括使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述重链组件质粒进行酶切处理，从而获得所述经释放的 HC。在某些实施方式中，所述识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶包括 SfiI, BsmBI 和/或 Esp3I。

在某些实施方式中，4) 包括使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶对所述连接子存储载体进行酶切处理，从而获得所述经释放的连接子。在某些实施方式中，4) 包括由所述连接子存储载体获得扩增产物，所述扩增产物包含所述连接子、所述 R3 以及所述 R4；并且使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶对所述扩增产物进行酶切处理，从而获得所述经释放的连接子。在某些实施方式中，所述识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。

在某些实施方式中，5) 包括使用识别所述 R7 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理以释放所述展示载体片段。在某些实施方式中，所述识别所述 R7 和 R8 的限制性内切核酸酶包括 SfiI, BsmBI 和/或 Esp3I。

在某些实施方式中，所述展示载体源自 pComb3x 载体。

在某些实施方式中，使用识别所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后，将获得三个不同的酶切片段。在某些实施方式中，所述识别所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。在某些实施方式中，使用识别所述 R6 和 R7 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后，使所述展示载体线性

说明书

化。在某些实施方式中，识别所述 R6 和 R7 的限制性内切核酸酶包括 BsmBI 和/或 Esp3I。

在某些实施方式中，使用识别所述 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后，将获得四个不同的酶切片段。在某些实施方式中，所述识别所述 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7 和 R8 的限制性内切核酸酶包括 SfiI，BsmBI 和/或 Esp3I。

在某些实施方式中，2) 包括对所述轻链组件细菌文库，所述连接子组件细菌和/或所述重链组件细菌文库进行取样检测，以确定所述轻链组件细菌文库，所述连接子组件细菌和/或所述重链组件细菌文库的库容量和/或质量。

在某些实施方式中，所述轻链组件细菌文库包含至少 10^6 个不同的克隆。

在某些实施方式中，所述重链组件细菌文库包含至少 10^7 个不同的克隆。

在某些实施方式中，所述轻链组件细菌文库中有效克隆的比例为至少约 70%。

在某些实施方式中，所述重链组件细菌文库中有效克隆的比例为至少约 70%。

在某些实施方式中，2) 包括根据所述轻链组件细菌文库和/或所述重链组件细菌文库的库容量，所述连接子组件细菌和/或质量测算所述展示细菌文库的库容量和/或质量。

在某些实施方式中，所述展示细菌文库包含至少 10^{10} 个不同的克隆。

在某些实施方式中，所述展示细菌文库中有效克隆的比例为至少约 70%。

在某些实施方式中，由样品材料获得所述第一多核苷酸和所述第三多核苷酸。在某些实施方式中，所述样品材料包括源自外周血淋巴细胞样品的材料。在某些实施方式中，所述外周血淋巴细胞为人外周血淋巴细胞。在某些实施方式中，所述样品材料包括源自所述样品的总 RNA 和/或 mRNA。

在某些实施方式中，8) 包括使所述展示细菌文库与辅助噬菌体接触来制备所述噬菌体文库。

另一方面，本申请提供了一种通过所述的方法产生的噬菌体文库。在某些实施方式中，所述的噬菌体文库包含至少 10^{10} 个不同的克隆。在某些实施方式中，所述的噬菌体文库能够展示至少 10^{10} 种不同的抗体或抗体片段。

另一方面，本申请提供了一种筛选抗体或抗体片段的方法，其包括使用所述的噬菌体文库。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限

说明书

制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是 pUC19 载体的示意图。

图 2 显示的是本申请中改造后的 pUC19 载体的示意图。

图 3 显示的是本申请所述的轻链存储载体的示意图。

图 4 显示的是本申请所述的连接子存储载体的示意图。

图 5 显示的是本申请所述的重链存储载体的示意图。

图 6 显示的 pCom3x 载体的示意图。

图 7 显示的是本申请所述的展示载体的示意图。

图 8 显示的是包含本申请的展示用连接产物的质粒的示意图。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

在本申请中，术语“噬菌体文库”通常是指包含编码能够展示在噬菌体上的不同重组多肽的多核苷酸的文库。在某些情形下，所述噬菌体文库还可以包含用多核苷酸文库转染的噬菌体的集合。在本申请中，所述文库可以指多核苷酸多样化的集合体或混合物，其可以包含编码不同重组多肽的多核苷酸。例如，所述多核苷酸文库集合体内可以包含至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 或更多种不同的多核苷酸。所述噬菌体文库中的多核苷酸可以来源于单一物种（例如哺乳动物，例如人），其组织、器官和/或细胞。所述文库可以包含共同属类的多核苷酸。例如，所述属类可以为编码某一型或某一类的免疫球蛋白亚基多肽的多核苷酸。例如，所述多核苷酸可以编码抗体的轻链或轻链片段。例如，所述多核苷酸可以编码抗体的重链或重链片段。

在本申请中，术语“抗体”通常是指能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。基本的四链抗体单元是异四聚体糖蛋白，其由两条相同的轻链和两条相同的重链构成。在 IgG 的情况下，每个 L 链通过一个共价二硫键连接到 H 链，而两条 H 链通过一个或多个二硫键彼此相连，二硫键的数目取决于 H 链的同种型。每个 H 和 L 链还具有规律间隔的链内二硫键。每

说明书

条 H 链在 N-末端具有可变结构域 (VH)，接着是三个 (对于每条 α 和 γ 链) 或四个 (对于 μ 和 ϵ 同种型) 恒定结构域 (CH)。

在本申请中，术语“抗体片段”通常是指完整抗体的一部分。例如，所述抗体片段可以包含完整抗体的抗原结合区和/或抗体可变区。所述抗体片段可以通过化学方法和/或基因工程的方法获得。例如，可以采用蛋白酶，包括胃蛋白酶和木瓜蛋白酶，消化抗体后产生所述抗体片段。在本申请中，所述抗体片段可以为 Fab。

在本申请中，术语“Fab”通常是指由木瓜蛋白酶消化具有完整结构的抗体后 (例如，去除了 Fc 区和铰链区) 而产生两个相同的抗原结合片段。Fab 可以由完整的轻链、重链可变区 (VH) 和重链的第一恒定结构域 (CH1) 组成。每个 Fab 可以具有单一的抗原结合位点。

在本申请中，术语“连接子”通常是指能够将两种以上多核苷酸分子或其片段相连接的试剂。所述连接子可以为多核苷酸或其片段。在本申请中，所述连接子可以具备不同的长度。例如，所述连接子的长度可以为 40bp 以上、50bp 以上、60bp 以上、70bp 以上、80bp 以上、90bp 以上、100bp 以上、150bp 以上、200bp 以上或更长。

在本申请中，术语“LC”通常是指包含编码抗体或抗体片段的轻链或轻链片段的核酸序列的多核苷酸。在本申请中，所述轻链或轻链片段可具备与同一或类似抗体的重链相结合的能力。在本申请中，所述轻链或轻链片段可包含轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL)。所述轻链恒定区可以分为 κ 型和 λ 型。所述轻链还包括具有与 κ 恒定区 (C- κ) 相连的 λ 可变区 (V- λ) 或与 λ 恒定区 (C- λ) 相连的 κ 可变区 (V- κ) 的轻链。例如，所述 LC 可以为包含编码抗体或抗体片段的轻链的核酸序列的多核苷酸。

在本申请中，术语“HC”通常是指包含编码抗体或抗体片段的轻链或轻链片段的核酸序列的多核苷酸。在本申请中，所述重链或重链片段可具备与同一或类似抗体的轻链相结合的能力。在本申请中，所述重链或重链片段可包含重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH)。所述重链恒定区可包含 CH1 结构域、铰链区、CH2 结构域和 CH3 结构域。在 IgE、IgM 和 IgY 的情况下，所述重链恒定区可包含 CH4 结构域但是不具有铰链区。在本申请中，所述“重链恒定区”可以为 CH1、铰链区、CH2、CH3、CH4 结构域或其任何组合。例如，所述 HC 可以为包含编码抗体或抗体片段的 VH 和 CH1 的核酸序列的多核苷酸。

在本申请中，术语“第一多核苷酸”通常是指包含 LC 的多核苷酸，所述 LC 可以为包含编码所述抗体或抗体片段的轻链或轻链片段的核酸序列。在本申请中，所述第一多核苷酸还可以在 5' 端和/或 3' 端存在内切酶 (例如，限制性内切核酸酶) 的识别位点。例如，所述第一多核苷酸可以以 5' 至 3' 方向包含结构 R1-LC-R2，其中所述 R1, R2 可以为限制性内切核酸酶的识别位点。例如，经识别所述第一多核苷酸中的内切酶识别位点的内切酶 (例如，识别 R1 和

说明书

R2 的限制性内切核酸酶，例如 SfiI）酶切处理后，经酶切处理的所述第一多核苷酸可包含所述 LC。

在本申请中，术语“轻链存储载体片段”通常是指经限制性内切核酸酶酶切处理的轻链存储载体的片段。在本申请中，所述轻链存储载体所包含的限制性内切核酸酶的识别位点可以与所述第一多核苷酸所包含的限制性内切核酸酶的识别位点对应地相同。例如，所述轻链存储载体可以包含所述 R1 和所述 R2。在本申请中，经限制性内切核酸酶（例如，识别所述 R1 和所述 R2 的限制性内切核酸酶）酶切后，得到的所述轻链存储载体片段可以与经酶切处理的所述第一多核苷酸连接。在本申请中，所述轻链存储载体片段可以源自 pUC 载体。例如，所述 pUC 载体可以为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体；又例如，所述 pUC 载体可以为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在本申请中，术语“轻链存储连接产物”通常是指经酶切处理后的所述第一多核苷酸与所述轻链存储载体片段连接形成的产物。在本申请中，所述第一多核苷酸与所述轻链存储载体片段可以包含相同限制性内切核酸酶的识别位点，可以被连接酶（例如 DNA 连接酶）相连接，而得到所述轻链存储连接产物。

在本申请中，术语“第一细菌”通常是指用于引入或包含所述第一多核苷酸的细菌。所述第一细菌可以包含所述 LC。在本申请中，所述第一细菌可以被导入所述轻链存储连接产物。在本申请中，所述第一细菌可以表达、复制和/或存储（例如，冷冻保存）所述 LC、所述第一多核苷酸和/或所述轻链存储连接产物。

在本申请中，术语“轻链组件细菌文库”通常是指通过将所述第一多核苷酸导入所述第一细菌中获得的细菌文库。在本申请中，所述轻链组件细菌文库可以为包含编码抗体或抗体片段的轻链或轻链片段的核酸序列的细菌文库。在本申请中，所述轻链组件细菌文库可以包含约 10^5 -约 10^9 个（例如，可以包含约 10^5 -约 10^8 个、约 10^5 -约 10^7 个、约 10^6 -约 10^7 个）编码抗体或抗体片段的不同的轻链或轻链片段的核酸序列。在本申请中，所述轻链组件细菌文库可包含约 10^7 -约 10^{12} 个（例如，可以包含约 10^7 -约 10^{11} 个、约 10^7 -约 10^{10} 个、约 10^7 -约 10^9 个、约 10^7 -约 10^8 个）所述第一细菌。

在本申请中，术语“第二多核苷酸”通常是指包含连接子的多核苷酸。在本申请中，所述第二多核苷酸还可以在 5'端和/或 3'端存在内切酶（例如，限制性内切核酸酶）的识别位点。例如，所述第一多核苷酸可以以 5'至 3'方向包含结构 R3-连接子-R4，其中所述 R3，R4 可以为限制性内切核酸酶的识别位点。例如，经识别所述第二多核苷酸中的内切酶识别位点的内切酶（例如，识别 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶，例如 SfiI）酶切处理后，经酶切处理的所述第二多核苷酸可包含所述连接子。

说明书

在本申请中，当与第二多核苷酸或连接子共同使用时，术语“载体片段”通常是指能够与所述第二多核苷酸连接的载体片段。在本申请中，所述载体片段可以源自 pUC 载体。例如，所述 pUC 载体可以为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体；又例如，所述 pUC 载体可以为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在本申请中，术语“连接子存储载体”通常是指所述第二多核苷酸和所述载体片段连接形成的产物。在本申请中，所述连接子存储载体所包含的限制性内切核酸酶的识别位点可以与所述第一多核苷酸所包含的限制性内切核酸酶的识别位点对应地相同。例如，所述连接子存储载体可以包含所述 R3 和所述 R4。在本申请中，所述连接子存储载体可仅包含一种所述连接子。

在本申请中，术语“第二细菌”通常是指用于引入或包含所述第二多核苷酸的细菌。所述第二细菌可以包含所述连接子。在本申请中，所述第二细菌可以被导入所述连接子存储载体。在本申请中，所述第二细菌可以表达、复制和/或存储（例如，冷冻保存）所述连接子和/或所述第二多核苷酸。

在本申请中，术语“连接子组件细菌”通常是指通过将所述连接子存储载体导入所述第二细菌中获得的细菌。在本申请中，所述连接子组件细菌可以为单一品种的细菌。在本申请中，单一品种的所述连接子组件细菌可以仅包含单一类型的所述连接子。

在本申请中，术语“第三多核苷酸”通常是指包含 HC 的多核苷酸，所述 HC 可以为包含编码所述抗体或抗体片段的重链或重链片段的核酸序列。在本申请中，所述第三多核苷酸还可以在 5'端和/或 3'端存在内切酶（例如，限制性内切核酸酶）的识别位点。例如，所述第一多核苷酸可以以 5'至 3'方向包含结构 R5-HC-R6，其中所述 R5, R6 可以为限制性内切核酸酶的识别位点。例如，经识别所述第三多核苷酸中的内切酶识别位点的内切酶（例如，识别 R5 的限制性内切核酸酶，例如 SfiI；又例如，识别 R6 的限制性内切核酸酶，例如 SfiI, BsmBI 和 Esp3I）酶切处理后，经酶切处理的所述第三多核苷酸可包含所述 HC。

在本申请中，术语“重链存储载体片段”通常是指经限制性内切核酸酶酶切处理的重链存储载体的片段。在本申请中，所述重链存储载体所包含的限制性内切核酸酶的识别位点可以与所述第三多核苷酸所包含的限制性内切核酸酶的识别位点对应地相同。例如，所述重链存储载体可以包含所述 R5 和所述 R6。在本申请中，经限制性内切核酸酶（例如，识别所述 R5 和所述 R6 的限制性内切核酸酶）酶切后，得到的所述重链存储载体片段可以与经酶切处理的所述第三多核苷酸连接。在本申请中，所述重链存储载体片段可以源自 pUC 载体。例如，所述 pUC 载体可以为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体；又例如，所述 pUC 载体可以为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

说明书

在本申请中，术语“重链存储连接产物”通常是指经酶切处理后的所述第三多核苷酸与所述重链存储载体片段连接形成的产物。在本申请中，所述第三多核苷酸与所述重链存储载体片段可以包含相同限制性内切核酸酶的识别位点，可以被连接酶（例如 DNA 连接酶）相连接，而得到所述重链存储连接产物。

在本申请中，术语“第三细菌”通常是指用于引入或包含所述第三多核苷酸的细菌。所述第三细菌可以包含所述 HC。在本申请中，所述第三细菌可以被导入所述重链存储连接产物。在本申请中，所述第三细菌可以表达、复制和/或存储（例如，冷冻保存）所述 HC、所述第三多核苷酸和/或所述重链存储连接产物。

在本申请中，术语“重链组件细菌文库”通常是指通过将所述第三多核苷酸导入所述第三细菌中获得的细菌文库。在本申请中，所述重链组件细菌文库可以为包含编码抗体或抗体片段的重链或重链片段的核酸序列的细菌文库。在本申请中，所述重链组件细菌文库可以包含约 10^5 -约 10^9 个（例如，可以包含约 10^5 -约 10^8 个、约 10^5 -约 10^7 个、约 10^6 -约 10^7 个）编码抗体或抗体片段的不同的重链或重链片段的核酸序列。在本申请中，所述重链组件细菌文库可包含约 10^7 -约 10^{12} 个（例如，可以包含约 10^7 -约 10^{11} 个、约 10^7 -约 10^{10} 个、约 10^7 -约 10^9 个、约 10^7 -约 10^8 个）所述第三细菌。

在本申请中，术语“轻链组件质粒”通常是指从所述轻链组件细菌文库的细菌中获得的、包含所述 LC 的质粒。在本申请中，所述轻链组件质粒可以包含所述 LC。例如，所述轻链组件质粒可以包含所述第一多核苷酸。在本申请中，所述轻链组件质粒可以包含限制性内切核酸酶的识别位点，例如，可以包含 R1 和 R2。

在本申请中，术语“重链组件质粒”通常是指从所述重链组件细菌文库的细菌中获得的、包含所述 HC 的质粒。在本申请中，所述重链组件质粒可以包含所述 HC。例如，所述重链组件质粒可以包含所述第三多核苷酸。在本申请中，所述重链组件质粒可以包含限制性内切核酸酶的识别位点，例如，可以包含 R5 和 R6。

在本申请中，术语“经释放的 LC”通常是指所述轻链组件质粒经处理后释放出的所述 LC。在本申请中，所述处理可以为酶切处理。例如，可以针对所述轻链组件质粒上的限制性内切核酸酶的识别位点，选择合适的限制性内切核酸酶（例如，识别 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶），从而使所述 LC 从所述轻链组件质粒中释放而分离。

在本申请中，术语“经释放的连接子”通常是指所述连接子组件质粒经处理后释放出的所述连接子。在本申请中，所述处理可以为酶切处理。例如，可以针对所述连接子组件质粒上的限制性内切核酸酶的识别位点，选择合适的限制性内切核酸酶（例如，识别 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶），从而使所述连接子从所述连接子组件质粒中释放而分离。又例如，可以

说明书

先以所述连接子组件质粒为模板，扩增（例如，使用 PCR 扩增）包含所述第二多核苷酸，继而对获得的扩增产物进行酶切处理。例如，可以针对所述连接子组件质粒上的限制性内切核酸酶的识别位点，选择合适的限制性内切核酸酶（例如，识别 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶），从而使所述连接子从所述连接子组件质粒中释放而分离。

在本申请中，术语“经释放的 HC”通常是指所述重链组件质粒经处理后释放出的所述 HC。在本申请中，所述处理可以为酶切处理。例如，可以针对所述重链组件质粒上的限制性内切核酸酶的识别位点，选择合适的限制性内切核酸酶（例如 R5 和 R6），从而使所述 HC 从所述重链组件质粒中释放而分离。

在本申请中，术语“经释放的展示载体片段”通常是指展示载体经处理后释放出的展示载体的片段。在本申请中，所述展示载体可以以 5' 至 3' 方向包含结构 R7-展示载体片段-R8，其中所述 R7 和 R8 可以为限制性内切核酸酶。在本申请中，所述处理可以为经限制性内切核酸酶酶切处理。例如，可以针对所述展示载体上的限制性内切核酸酶的识别位点，选择合适的限制性内切核酸酶（例如，R7 和 R8），从而使所述经释放的展示载体片段从所述展示载体中释放而分离。

在本申请中，术语“连接”通常是指将两个或者两个以上的多核苷酸分子连接在一起。例如，所述连接可以通过连接酶（例如，DNA 连接酶）实现。例如，使一个多核苷酸的 3' 端与另一个多核苷酸的 5' 端连接，从而形成一个完整的多核苷酸分子。

在本申请中，术语“展示用连接产物”通常是指包含所述经释放的 LC、所述经释放的连接子、所述经释放的 HC 以及所述经释放的展示载体片段的一个多核苷酸分子。在本申请中，所述展示用连接产物可以通过所述经释放的 LC、所述经释放的连接子、所述经释放的 HC 和所述经释放的展示载体片段按比例混合而得到。

在本申请中，所述“展示”可以指在使包含所述展示用连接产物的细胞表达所述展示用连接产物所编码的蛋白（例如，抗体或抗体片段，例如，Fab）。

在本申请中，术语“导入”通常是指将外源多核苷酸转移或导入细胞中的过程。所述细胞可以为宿主细胞。所述导入的细胞包括对象的初级细胞及其后代。所述细胞可以为原核细胞，例如，可以为细菌细胞。

在本申请中，术语“第四细菌”通常是指用于引入或包含所述展示用连接产物的细菌，其中所述展示用连接产物包含所述经释放的 LC、所述经释放的连接子、所述经释放的 HC 以及所述经释放的展示载体片段。在本申请中，所述第四细菌可以通过转化而导入所述展示用连接产物。在本申请中，所述第四细菌可以表达所述经释放的 LC 所编码的抗体或抗体片段的轻链或轻链片段；可以表达所述经释放的 HC 所编码的抗体或抗体片段的重链或重链片段。

说明书

在本申请中，所述第四细菌可以表达、复制和/或存储（例如，冷冻保存）所述抗体或抗体片段。

在本申请中，术语“展示细菌文库”通常是指包含所述展示用连接产物的细菌文库。在本申请中，所述展示用细菌文库可包含所述第四细菌。在本申请中，所述展示细菌文库可以包含 10^{10} 个以上的不同的抗体或抗体片段。

在本申请中，术语“信号肽 pelB”通常是指果胶酶裂解酶的信号肽。所述信号肽 pelB 通常用于原核表达系统。例如，所述信号肽 pelB 在 GenBank 中的登录号可以为 ABS75961.1。

在本申请中，术语“限制性内切核酸酶”通常是指一种将双股 DNA 切开的酶。所述限制性内切核酸酶可以产生具有突出单股 DNA 的黏性末端，从而可以与 DNA 连接酶黏合。在本申请中，所述限制性内切核酸酶可以具备识别和限制性切割的作用。例如，所述限制性内切核酸酶的切割位点距离其识别位点存在一定的距离。例如，所述限制性内切核酸酶可以选自 SfiI, BsmBI 和 Esp3I。

在本申请中，术语“线性化”通常是指载体呈线性而非闭合的环状。例如，所述载体进行酶切处理后，破坏了所述载体原有的环状结构，从而形成线性化的载体。例如，所述载体（例如 T 载体）经限制性内切酶酶切后，可以产生一个 3' 端的 T 末端，此时与具有 A 末端的 PCR 产物可以直接通过 T4 连接酶的作用而将该 PCR 产物与线性化的载体相连接。

在本申请中，术语“克隆”通常是指菌落的数量。例如，所述克隆可以为细菌文库（例如，所述轻链组件细菌文库、所述重链组件细菌文库、所述展示细菌文库和/或所述噬菌体文库）中菌落的数量。在某些情形下，所述克隆可以为所述细菌文库中不同的菌落的数量。在某些情形下，所述克隆可以为某一单一克隆所产生的子代群体的数量。

在本申请中，术语“多核苷酸”通常是指核苷酸，即连接在一起的至少两个核苷酸。所述多核苷酸可以是任何长度的聚合物，包括例如 200、300、500、1000、2000、3000、5000、7000、10,000、100,000 等。所述多核苷酸可以含有磷酸二酯键。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

一方面，本申请提供一种产生展示抗体或抗体片段的噬菌体文库的方法，所述方法包括：

1) 提供第一多核苷酸，第二多核苷酸和第三多核苷酸，所述第一多核苷酸包含 LC，所述第二多核苷酸包含连接子且所述第三多核苷酸包含 HC，其中所述 LC 包含编码所述抗体或抗体片段的轻链或轻链片段的核酸序列，所述 HC 包含编码所述抗体或抗体片段的重链或重链片

说明书

段的核酸序列；2) 将所述第一多核苷酸导入第一细菌中以获得轻链组件细菌文库，将所述第二多核苷酸导入第二细菌中以获得连接子组件细菌，将所述第三多核苷酸导入第三组细菌中以获得重链组件细菌文库；3) 由所述轻链组件细菌文库获得包含所述 LC 的轻链组件质粒，由所述连接子组件细菌获得包含所述连接子的连接子组件质粒，且由所述重链组件细菌文库获得包含所述 HC 的重链组件质粒；4) 由所述轻链组件质粒获得经释放的 LC，由所述连接子组件质粒获得经释放的连接子，且由所述重链组件质粒获得经释放的 HC；5) 提供展示载体，并由所述展示载体获得经释放的展示载体片段；6) 使所述经释放的 LC、经释放的连接子、经释放的 HC 以及经释放的展示载体片段连接，以形成展示用连接产物；7) 将所述展示用连接产物导入第四组细菌中，以获得所述抗体或抗体片段的展示细菌文库；8) 使用所述展示细菌文库制备展示所述抗体或抗体片段的噬菌体文库。

在本申请中，在适于抗体或抗体片段表达的条件下，6) 的所述展示用连接产物可以依照阅读框表达所述轻链或轻链片段以及所述重链或重链片段。

在本申请中，所述第一多核苷酸，所述第二多核苷酸和所述第三多核苷酸可以均为线性核酸分子。

在本申请中，编码所述重链或重链片段的核酸序列与编码所述轻链或轻链片段的核酸序列可以位于不同的阅读框中。在本申请中，所述阅读框可以为从起始密码子开始至终止密码子结束的连续的核苷酸序列，并且其内部不再含有启动子或终止子。例如，所述阅读框可以编码蛋白质或多肽片段。

在本申请中，所述连接子可以包含编码信号肽 pelB 或其片段的核酸序列。

在本申请中，所述连接子可包含编码信号肽 pelB 的片段的核酸序列，其余编码信号肽 pelB 的片段的核酸序列还可以位于所述 R5 中。例如，所述编码信号肽 pelB 的片段的核酸序列的 3' 端的核苷酸可以位于所述 R5 中。例如，当所述经释放的连接子与所述经释放的 HC 连接时，所述经释放的连接子中包含的编码信号肽 pelB 的片段的核酸序列可以与所述经释放的 HC 中包含的编码信号肽 pelB 的片段的核酸序列相连接，从而形成编码完整的信号肽 pelB 的核酸序列。

在本申请中，所述连接子的长度可以为约 50 至约 200 个碱基。例如，所述连接子的长度可以为约 50 至约 200 个碱基、约 50 至约 180 个碱基、约 50 至约 160 个碱基、约 50 至约 140 个碱基、约 50 至约 120 个碱基、约 50 至约 100 个碱基、约 50 至约 90 个碱基、约 50 至约 80 个碱基、约 50 至约 75 个碱基、约 50 至约 70 个碱基、约 50 至约 60 个碱基。

在本申请中，在 6) 的所述展示用连接产物中，所述 LC 可以位于所述连接子的上游，且所述连接子可以位于所述 HC 的上游。在本申请中，所述上游可以为核苷酸序列的 5' 端。

说明书

在本申请中，2) 可以包括冷冻保存所述轻链组件细菌文库和/或所述重链组件细菌文库。在本申请中，7) 可以包括冷冻保存所述展示细菌文库。在本申请中，所述冷冻保存可以指在低于-18℃的条件下保存，例如，可以在低于-80℃的条件下保存。

在本申请中，8) 可以包括融化并培养所述经冷冻保存的展示细菌文库，并使用经培养的所述展示细菌文库构建所述噬菌体文库。

在本申请中，所述第一多核苷酸以 5'至 3'方向可以包含结构 R1-LC-R2，所述第二多核苷酸以 5'至 3'方向可以包含结构 R3-连接子-R4，所述第三多核苷酸以 5'至 3'方向可以包含结构 R5-HC-R6，且所述展示载体中以 5'至 3'方向可以包含结构 R7-展示载体片段-R8，其中所述 R1，R2，R3，R4，R5，R6，R7 和 R8 为限制性内切核酸酶的识别位点。

在本申请中，所述 R2 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R3 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R4、R5、R6、R7 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。在本申请中，所述 R2 可以与所述 R3 相同。

在本申请中，所述 R4 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R5 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R2、R3、R6、R7 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。在本申请中，所述 R4 可以与所述 R5 相同。

在本申请中，所述 R6 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R7 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R2、R3、R4、R5 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。在本申请中，所述 R6 可以与所述 R7 相同。

在本申请中，所述 R8 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R1 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R2、R3、R4、R5、R6 及 R7 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。在本申请中，所述 R8 可以与所述 R1 相同。

在本申请中，所述 R1，R2，R3，R4，R5、R6、R7 和 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端可以为非回文序列。

在选择内切核酸酶识别位点时（例如，R1，R2，R3，R4，R5、R6、R7 和 R8 时），可选择抗体的可变区（例如，轻链可变区或重链可变区）中基本上不包含的序列以尽量保持抗体可变区的完整性，防止酶切时破坏（例如，降解）抗体基因库。此外，所述核酸酶识别位点经限制性内切核酸酶切割后形成的末端可以是非回文序列，以防止其自我连接，进而实现

说明书

减低非目的连接。此外，所述内切核酸酶识别位点的选择可使得多个片段的定向连接成为可能，以提高连接效率。

在本申请中，所述 R1，R2，R3，R4，R5、R6、R7 和 R8 中的两项或更多项（例如，2 项、3 项、4 项、5 项、6 项、7 项或 8 项）能够被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。

例如，在本申请中，所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 可以被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。例如，所述 R6 和 R7 能够被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。在某些情形中，识别所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 的限制性内切核酸酶可以与识别所述 R6 和 R7 的限制性内切核酸酶不同。

在本申请中，所述限制性内切核酸酶可以选自 *SfiI*，*BsmBI* 和 *Esp3I*。在本申请中，所述 *BsmBI* 和 *Esp3I* 可以为同工酶，其可以识别相同的限制性内切核酸酶的识别位点。

在本申请中，例如，所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 可以被 *SfiI* 识别及切割。在本申请中，例如，所述 R6 和 R7 能够被 *BsmBI* 和/或 *Esp3I* 识别及切割。

例如，*SfiI* 可以识别由 13 个碱基构成的序列（5'至 3'）GGCCNNNN/NGGCC（SEQ ID NO:99），其经过酶切后可形成 3'端的突出序列（overhang，例如包含 3 个碱基的单链序列），其中 N 可以代表 GATC 四种碱基中的任何一种。因此，有 64 种不同的序列均能够被 *SfiI* 识别。

例如，*BsmBI* 和 *Esp3I* 可以识别由 12 个碱基构成的序列（5'至 3'）CGTCTCN/NNNNN（SEQ ID NO:100），其经过酶切后可形成 5'端的突出序列（overhang，例如包含 4 个碱基的单链序列），其中 N 可以代表 GATC 四种碱基中的任何一种。因此，有 264 种不同的序列均能够被 *BsmBI* 和 *Esp3I* 识别。

在本申请中，所述 R1 可以包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。在本申请中，所述 R2 可以包含 SEQ ID NO: 2 所示的核酸序列。在本申请中，所述 R3 可以包含 SEQ ID NO: 2 所示的核酸序列。在本申请中，所述 R4 可以包含 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列。在本申请中，所述 R5 可以包含 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列。在本申请中，所述 R6 可以包含 SEQ ID NO: 4 所示的核酸序列。在本申请中，所述 R7 可以包含 SEQ ID NO: 4 所示的核酸序列。在本申请中，所述 R8 可以包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。

在本申请中，所述轻链或轻链片段可以包含轻链可变区部分和/或轻链恒定区部分。在本申请中，所述重链或重链片段可以包含重链可变区部分和/或重链恒定区部分。

例如，所述 LC 可以包含编码所述轻链或轻链片段的轻链可变区 VL 的多核苷酸。例如，所述第一多核苷酸可以包含编码所述轻链或轻链片段的轻链可变区 VL 的多核苷酸。所述第一多核苷酸的 5'端可连接所述 R1 且所述第一多核苷酸的 3'端可以连接所述 R2；且，所述轻

说明书

链存储载体片段的 5'端可以连接所述 R3 且所述轻链存储载体片段的 3'端可以连接所述 R8。

例如,所述 HC 可以包含编码所述重链或重链片段的重链可变区 VH 和重链恒定区的 CH1 的多核苷酸。例如,所述第三多核苷酸可以包含编码所述重链或重链片段的重链可变区 VH 和重链恒定区的 CH1 的多核苷酸。所述第三多核苷酸的 5'端可连接所述 R5 且所述第三多核苷酸的 3'端可连接所述 R6; 且,所述重链存储载体片段的 5'端可连接所述 R7 且所述重链存储载体片段的 3'端可连接所述 R4。

又例如,所述 HC 可以包含编码所述重链或重链片段的重链可变区 VH 的多核苷酸。例如,所述第三多核苷酸可以包含编码所述重链或重链片段的重链可变区 VH 的多核苷酸。此时,所述重链存储载体片段可以包含编码所述重链或重链片段的重链恒定区的 CH1 的多核苷酸。所述第三多核苷酸的 5'端可连接所述 R5 且所述第三多核苷酸的 3'端可连接所述 R6; 且,所述重链存储载体片段的 5'端可连接所述 R7 且所述重链存储载体片段的 3'端可连接所述 R4。

在本申请中,所述抗体或其片段可以包括 Fab, Fab', (Fab)₂ 和/或(Fab')₂。

在本申请中,7) 中所述展示用连接产物的连接转化效率可以为至少 10⁸ 个克隆/μg 多核苷酸(例如,可以为至少 10⁹ 个克隆/μg 多核苷酸、至少 10¹⁰ 个克隆/μg 多核苷酸、至少 10¹¹ 个克隆/μg 多核苷酸、至少 10¹² 个克隆/μg 多核苷酸)。

在本申请中,2) 可以包括使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述第一多核苷酸进行酶切处理,使经酶切处理的所述第一多核苷酸与轻链存储载体片段连接形成轻链存储连接产物,并将所述轻链存储连接产物导入所述第一细菌中以获得所述轻链组件细菌文库;其中所述轻链存储载体可包含所述 R1 和 R2,并且通过使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述轻链存储载体进行酶切处理而获得所述轻链存储载体片段。

在本申请中,所述 LC 的长度可以为大于约 600bp。例如,可以为大于约 650bp,可以为大于约 680bp,大于约 700bp。在本申请中,所述第一多核苷酸的长度可以为大于约 600bp。例如,可以为大于约 650bp,可以为大于约 680bp,大于约 700bp。在本申请中,所述轻链存储载体片段的长度可以为大于约 900bp,例如,可以为大于约 1000bp,大于约 1500bp,大于约 1800bp,大于约 2100bp。在本申请中,所述轻链存储载体片段的长度可以与所述 LC 的长度显著不同。例如,所述轻链存储载体片段的长度可以与所述 LC 的长度借助聚丙烯酰胺凝胶电泳显著区分。

在本申请中,所述轻链存储载体可以源自任何载体,例如任何可扩增和/或容易保存的载体。在某些情形中,用于作为轻链存储载体的所述载体可具有高拷贝数、分子量小等性质。例如,所述轻链存储载体可以为 pUC 载体。在本申请中,所述 pUC 载体可以为 pUC19 载体(其结构示意图可以如图 1 所示)或源自 pUC19 载体。在本申请中,所述 pUC 载体可以为

说明书

pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在本申请中，所述识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*。

在本申请中，2) 可以包括使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述第三多核苷酸进行酶切处理，使经酶切处理的所述第三多核苷酸与重链存储载体片段连接形成重链存储连接产物，并将所述重链存储连接产物导入所述第三细菌中以获得所述重链组件细菌文库；其中所述重链存储载体包含所述 R5 和 R6，并且通过使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述重链存储载体进行酶切处理而获得所述重链存储载体片段。

在本申请中，所述 HC 的长度可以为大于约 320bp。例如，可以为大于约 350bp，可以为大于约 380bp，大于约 400bp。在本申请中，所述第三多核苷酸的长度可以为大于约 320bp。例如，可以为大于约 350bp，可以为大于约 380bp，大于约 400bp。在本申请中，所述重链存储载体片段的长度可以为大于约 900bp，例如，可以为大于约 1000bp，大于约 1500bp，大于约 1800bp，大于约 2100bp。在本申请中，所述重链存储载体片段的长度可以与所述 HC 的长度显著不同。例如，所述轻链存储载体片段的长度可以与所述 HC 的长度借助聚丙烯酰胺凝胶电泳显著区分。

在本申请中，所述重链存储载体可以源自任何载体，例如任何可扩增和/或容易保存的载体。在某些情形中，用于作为重链存储载体的所述载体可具有高拷贝数、分子量小等性质。例如，所述重链存储载体可以为 pUC 载体。在本申请中，所述 pUC 载体可以为 pUC19 载体（其结构示意图可以如图 1 所示）或源自 pUC19 载体。在本申请中，所述 pUC 载体可以为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在本申请中，为了构建所述重链存储载体，可以对所述 pUC 载体或源自 pUC 的载体进行工程化/修饰。例如，可以通过定点突变去除所述载体中的一个或多个内切核酸酶识别位点（例如，去除其中的一个或多个 *BsmBI* 的识别位点）。在某些情形中，也可以通过定点突变在所述载体中增加一个或多个内切核酸酶识别位点（例如，在选定的位置增加一个或多个 *BsmBI* 的识别位点）。

在一个实例中，可通过定点突变的方法去除所述载体中原本含有一个或多个 *BsmBI* 识别位点，然后可在所述载体中的另一个位置添加一个或多个另外的 *BsmBI* 识别位点，以获得经改造的载体（例如，经改造的 pUC 载体）。

在本申请中，所述重链存储载体中可以包含且仅包含一个 *BsmBI* 的识别位点。

在本申请中，所述识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*，*BsmBI* 和/或 *Esp3I*。在某些情形中，识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶为 *BsmBI* 和/或 *Esp3I*。

在本申请中，2) 可以包括使所述第二多核苷酸与载体片段连接形成连接子存储载体（例

说明书

如，根据 Takara 公司 TA 克隆产品的说明书），并将所述连接子存储载体导入所述第二细菌中以获得所述连接子组件细菌。在本申请中，所述连接子存储载体中可以包含所述 R3 和 R4 位点。

在本申请中，所述连接子的长度可以为大于约 70bp，例如，可以为约 72bp，或者可以为约 90bp。在本申请中，所述第二多核苷酸的长度可以为大于约 80bp，例如，可以为大于约 90bp，可以为大于约 100bp，可以为大于约 120bp。在本申请中，所述载体片段的长度可以为大于约 800bp。

在本申请中，用于构建所述连接子存储载体的所述载体片段可以源自任何载体，例如任何可扩增和/或容易保存的载体。在某些情形中，用于构建所述连接子存储载体的载体可具有高拷贝数、分子量小等性质。例如，用于构建所述连接子存储载体的所述载体片段可以源自 pUC 载体。在本申请中，所述 pUC 载体可以为 pUC19 载体（其结构示意图可以如图 1 所示）或源自 pUC19 载体。在本申请中，所述 pUC 载体可以为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。

在本申请中，所述 pUC19 载体或 pMD19-T 载体包括源自其但经过修饰/改造的载体。

在本申请中，4）可以包括使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述轻链组件质粒进行酶切处理，从而获得所述经释放的 LC。在本申请中，所述识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*。

在本申请中，4）可以包括使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述重链组件质粒进行酶切处理，从而获得所述经释放的 HC。在本申请中，所述识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*，*BsmBI* 和/或 *Esp3I*。

在某些情形下，在本申请中，4）可以包括使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶对所述连接子存储载体进行酶切处理，从而获得所述经释放的连接子。

例如，可以直接使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶（例如，*SfiI*）对所述连接子存储载体进行酶切处理，从而获得所述经释放的连接子。在本申请中，所述连接子的长度可以为约 72bp 以上，例如可以为约 90bp 以上。

在某些情形下，在本申请中，4）可以包括由所述连接子存储载体获得扩增产物，所述扩增产物包含所述连接子、所述 R3 以及所述 R4；并且使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶对所述扩增产物进行酶切处理，从而获得所述经释放的连接子。

例如，可以通过 PCR 等方法获得包含所述连接子、所述 R3 以及所述 R4 的所述扩增产物，该扩增产物的长度可以为约 800bp 以上。例如，可以为约 900bp 以上，可以为约 1000bp 以上，可以为约 1200bp 以上。在本申请中，可以使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸

说明书

酶（例如，*SfiI*）对所述扩增产物进行酶切，从而获得所述经释放的连接子。在本申请中，所述连接子的长度可以为约 72bp 以上，可以为约 90bp 以上。在本申请中，所述扩增产物的长度可以与所述连接子的长度显著不同。这样可以更容易、更高效地得到单一的所述连接子。例如，所述扩增产物的长度可以与所述连接子的长度借助聚丙烯酰胺凝胶电泳显著区分。

在本申请中，所述识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*。

在本申请中，5) 可以包括使用识别所述 R7 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理以释放所述展示载体片段。在本申请中，所述识别所述 R7 和 R8 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*，*BsmBI* 和/或 *Esp3I*。

在本申请中，所述展示载体可以源自任何合适的载体，例如 pComb3x 载体。可对所述 pComb3x 载体进行改造以适合用于本申请的目的。例如，所述 pComb3x 载体可包含一个位于 5'端的 *SfiI* 识别位点以及一个位于 3'端的 *SfiI* 识别位点，在所述改造过程中，可通过定点突变去除所述 pComb3x 载体中 3'端的 *SfiI* 识别位点。在某些情形中，所述定点突变可不影响所述载体中蛋白（例如，抗体重链片段和/或抗体轻链片段）的框内表达。例如，所述突变可以为无义突变，例如仅改变碱基序列但不改变氨基酸序列的突变。

在本申请中，使用识别所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后，可以获得三个不同的酶切片段。例如，所述展示载体可以包含 3 个可以被 *SfiI* 识别的限制性核酸内切酶识别位点。当用 *SfiI* 酶切处理所述展示载体时，可以得到三个所述不同的酶切片段。

在本申请中，所述识别所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*。在本申请中，使用识别所述 R6 和 R7 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后，可以使所述展示载体线性化。

在本申请中，识别所述 R6 和 R7 的限制性内切核酸酶可以包括 *BsmBI* 和/或 *Esp3I*。

在本申请中，使用识别所述 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后，可以获得四个不同的酶切片段。例如，所述展示载体可以包含 3 个可以被 *SfiI* 识别的限制性核酸内切酶识别位点，以及 1 个可以被 *BsmBI* 和/或 *Esp3I* 识别的限制性核酸内切酶识别位点。当用 *SfiI*、*BsmBI* 和/或 *Esp3I* 酶切处理所述展示载体时，可以得到四个所述不同的酶切片段。

例如，利用所述限制性内切核酸酶 R1 和 R2 可以获得所述经释放的 LC；利用所述限制性内切核酸酶 R5 和 R6 可以获得所述经释放的 HC；

在本申请中，所述识别所述 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7 和 R8 的限制性内切核酸酶可以包括 *SfiI*，*BsmBI* 和/或 *Esp3I*。

说明书

在本申请中，所述载体（例如，所述展示载体或存储载体）可包含或编码一个或多个合适的标记物（例如，用于纯化/识别/筛选的标记物），所述标记物可以为，例如 His tag，Flag Tag，荧光蛋白，选择性抗生素，和/或亲和素等。

在本申请中，2) 可以包括对所述轻链组件细菌文库，所述连接子组件细菌和/或所述重链组件细菌文库进行取样检测，以确定所述轻链组件细菌文库，所述连接子组件细菌和/或所述重链组件细菌文库的库容量和/或质量。

在本申请中，所述轻链组件细菌文库可以包含约至少 10^6 个（例如，约至少 10^7 个、约至少 10^8 个、约至少 10^9 个、约至少 10^{10} 个、约至少 10^{11} 个、约至少 10^{12} 个或更多）不同的克隆。

在本申请中，所述重链组件细菌文库可以包含至少约 10^7 个（例如，约至少 10^8 个、约至少 10^9 个、约至少 10^{10} 个、约至少 10^{11} 个、约至少 10^{12} 个或更多）不同的克隆。

在本申请中，所述轻链组件细菌文库中有效克隆的比例可以为至少约 70%（例如，至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 99%）。

在本申请中，所述重链组件细菌文库中有效克隆的比例可以为至少约 70%（例如，至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 99%）。

在本申请中，2) 可以包括根据所述轻链组件细菌文库和/或所述重链组件细菌文库的库容量，所述连接子组件细菌和/或质量测算所述展示细菌文库的库容量和/或质量。

在本申请中，所述展示细菌文库可以包含约至少 10^{10} 个（例如，约至少 10^{11} 个、约至少 10^{12} 个、约至少 10^{13} 个、约至少 10^{14} 个、约至少 10^{15} 个、约至少 10^{16} 个或更多）不同的克隆。

在本申请中，所述展示细菌文库中有效克隆的比例可以为至少约 70%（例如，至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 99%）。

在本申请中，所述展示细菌文库中细菌可以进行液体培养。所述液体培养的培养时间可以为不大于约 8 小时，例如，可以为不大于约 4 小时、不大于约 5 小时、不大于约 6 小时或者不大于约 7 小时。在本申请中，所述液体培养操作较为简便。在某些情形下，所述展示细菌文库中的细菌可以取少量菌液铺皿培养，然后再挑选菌落。所述铺皿培养的培养时间可以为约 12-18 小时，例如，可以为约 12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时或 18 小时。在本申请中，所述铺皿培养可以挑选菌落（例如，挑选单克隆）再进行测序分析。在本申请中，所述铺皿培养可以降低优势克隆的数量。

在本申请中，可以由样品材料获得所述第一多核苷酸和所述第三多核苷酸。在本申请中，所述样品材料可以包括源自外周血淋巴细胞样品的材料。在本申请中，所述外周血淋巴细胞可以为人外周血淋巴细胞。在本申请中，所述样品材料也可以源自其他任意的组织和/或细胞，

说明书

并不限于所述外周血淋巴细胞样品。

在本申请中，所述样品材料可以包括源自所述样品的总 RNA 和/或 mRNA。

在本申请中，8) 可以包括使所述展示细菌文库与辅助噬菌体接触来制备所述噬菌体文库。

另一方面，本申请提供了一种通过所述的方法产生的噬菌体文库。

在本申请中，所述的噬菌体文库可以包含约至少 10^{10} 个（例如，约至少 10^{11} 个、约至少 10^{12} 个、约至少 10^{13} 个、约至少 10^{14} 个、约至少 10^{15} 个、约至少 10^{16} 或更多）不同的克隆。在本申请中，所述的噬菌体文库能够展示约至少 10^{10} 种（例如，约至少 10^{11} 种、约至少 10^{12} 种、约至少 10^{13} 种、约至少 10^{14} 种、约至少 10^{15} 种、约至少 10^{16} 种或更多）不同的抗体或抗体片段。

另一方面，本申请提供了一种筛选抗体或抗体片段的方法，其包括使用所述的噬菌体文库。

例如，所述的抗体片段可以为 Fab。例如，所述抗体或抗体片段可以特异性结合 $\text{TNF}\alpha$ ，IL-6，IL6R，IL17-FR，CD38，GMCSF 和 Siglec3。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的融合蛋白、制备方法和用途等，而并不用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1. 构建人 PBMC 的噬菌体表面抗体 (Fab) 展示库

1.1 获取免疫材料总 RNA/mRNA

从人的外周血淋巴细胞提取总 RNA，并且进一步从总 RNA 分离 mRNA (Takara Cat# Z652N/636592，具体试验步骤参见产品说明书)。

1.2 设计合成引物

参照《Phage Display》(A Laboratory Manual, ISBN 0-87969-546-3)，设计针对人重链可变区 VH、轻链 KLC (全长 Kappa 轻链)、轻链 LLC (全长 Lambda 轻链) 的引物。其中，轻链正向引物 5'-端含有 R1 的核苷酸序列 GGCCCAGGCGGCC (SEQ ID NO:1)，反向引物 5'-端含有 R2 的核苷酸序列 GGCCACATAGGCC (SEQ ID NO:2)；重链可变区正向引物 5'-端含有 R5 的核苷酸序列 GGCCCAACCGGCC (SEQ ID NO:3)，反向引物 5'-端含有 R6 的核苷酸序列 GGCCCTCAGCGGCC (SEQ ID NO:4)。引物由金维智公司合成。

以 pComb3x 载体为模板，设计扩增连接子的正向和反向引物。其中，正向引物 5'-端含有 R3 的核苷酸序列 GGCCACATAGGCC (SEQ ID NO:2)，反向引物 5'-端含有 R4 的核苷酸序列 GGCCCAACCGGCC (SEQ ID NO:3)。

说明书

具体的引物序列可参照下表 1-1:

表 1-1 引物序列-1

引物名称	SEQ ID NO :
轻链 KLC 的正向引物	5-22
轻链 KLC 的反向引物	23
轻链 LLC 的正向引物	24-48
轻链 LLC 的反向引物	49
VH 的正向引物	50-73
VH 的反向引物	74-78
连接子的正向引物	79
连接子的反向引物	80

1.3 获得第一多核苷酸和第三多核苷酸

通过两步法扩增组件抗体基因库。

第一步，以实施例 1.1 中获得的 mRNA 为模板，用 Promega 的 MMLV 进行逆转录合成 cDNA（按照 Promega 公司产品的说明书进行，其中引物为 Thermo Cat# N8080127、逆转录酶为 Promega Cat# M1701）。

第二步，以第一步获得的 cDNA 为模板，利用实施例 1.2 中获得的引物，通过 PCR（Takara Cat# RR900A，按照公司产品的说明书进行）扩增组件抗体的 KLC，LLC 和 VH 基因库。凝胶电泳纯化回收后（利用 Axygen 的凝胶回收试剂盒，按照《分子克隆实验指南》中的记载操作）分别获得 PCR 产物——KLC 片段（即本申请的第一多核苷酸）、LLC 片段（即本申请的第一多核苷酸）和 VH 片段（即本申请的第三多核苷酸）。

1.4 构建存储载体

1.4.1 设计引物

参照实施例 1.2 的内容设计引物。

设计合成用于获得存储载体的引物。具体的引物序列可参照下表 1-2:

表 1-2 引物序列-2

引物名称	SEQ ID NO :
R1-1kb-R2 的正向引物	81
R1-1kb-R2 的反向引物	82
R5-1kb-R6 的正向引物	85
R5-1kb-R6 的反向引物	86

1.4.2 PCR 扩增

以 1kb 长的人 IgG1 的 Fc（SEQ ID NO : 87）为模板，利用实施例 1.4.1 制备的引物 R1-1kb-R2 的正向引物和 R1-1kb-R2 的反向引物，进行 PCR，凝胶电泳纯化回收后（利用 Axygen 凝胶回收试剂盒），得到 PCR 产物——R1-1kb-R2（SEQ ID NO : 88）。

说明书

以 pComb3x 载体为模板, 利用 R3-连接子-R4 的正向引物 (SEQ ID NO: 83) 和 R3-连接子-R4 的反向引物 (SEQ ID NO: 84) 进行 PCR, 凝胶电泳纯化回收后 (利用 Axygen 凝胶回收试剂盒), 得到 PCR 产物——R3-连接子-R4 (SEQ ID NO: 90), 得到本申请的所述第二多核苷酸。其中所述连接子的长度可以为 72bp, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 89 所示。

以 1kb 长的人 IgG1 的 Fc (SEQ ID NO: 87) 为模板, 利用实施例 1.4.1 制备的引物 R5-1kb-R6 的正向引物和 R5-1kb-R6 的反向引物, 进行 PCR, 凝胶电泳纯化回收后, 得到 PCR 产物——R5-1kb-R6 (SEQ ID NO: 91)。

1.4.3 构建轻链存储载体和重链存储载体

借助 TA cloning (TA cloning 试剂盒, 购自 Takara 公司) 的方法, 将 1.4.2 制备的 R1-1kb-R2 片段插入 pMD19-T 载体, 得到用于插入全长轻链基因库的轻链存储载体 DDB-R1-1kb-R2, 其载体图谱如图 3 所示。

借助 TA cloning (TA cloning 试剂盒, 购自 Takara 公司) 的方法, 将 1.4.2 制备的 R5-1kb-R6 片段插入 pMD19-T 载体得到含有 R5-1kb-R6 片段的载体, 然后以这个载体为模板, 利用引物突变去除这个载体中原有的 BsmBI 酶切位点, 得到用于插入 VH 基因库的重链存储载体 DDB-R5-1kb-R6, 其载体图谱如图 5 所示。

具体的引物序列可参照下表 1-3:

表 1-3 引物序列-3

引物名称	SEQ ID NO :
载体突变的正向引物	92
载体突变的反向引物	93

1.4.4 构建连接子存储载体并获得连接子组件细菌

借助 TA cloning (TA cloning 试剂盒, 购自 Takara 公司) 的方法, 将实施例 1.4.2 制备的 R3-连接子-R4 插入 pMD19-T 载体, 得到连接子存储载体 DDB-R3-连接子-R4, 其载体图谱如图 4 所示。可用所述连接子存储载体转化 TG1 感受态细菌 (Lucigen 公司), 铺皿 37°C 培养过夜, 送菌落测序, 然后收集菌落得到连接子组件细菌。可将该连接子组件细菌冻存备用。

1.5 获得组件细菌文库

1.5.1 获得轻链组件细菌文库

利用限制性内切核酸酶 R1 和 R2 酶切实施例 1.3 所制得的第一多核苷酸 (包括 KLC 和 LLC) 获得目的轻链片段 (约为 0.65kb)。

利用限制性内切核酸酶 R1 和 R2 酶切实施例 1.4 所制得的轻链存储载体 DDB-R1-1kb-R2。获得轻链存储载体片段 (约为 2.7kb)。

说明书

将所得的目的轻链片段和轻链存储载体片段混合，再利用连接酶 T4 DNA ligase（购自 NEB, Thermo）连接得到轻链存储连接产物，然后用所述轻链存储连接产物转化 TG1 感受态细菌（Lucigen, Cat# 60502-2, 按照厂家的说明书操作），铺氨苄青霉素抗性的平皿（Thermo, Cat#240845），37°C 培养过夜，送菌落测序，然后收集全部菌落得到轻链组件细菌文库。可检测该轻链组件细菌文库的质量和/或将该轻链组件细菌文库冻存储用。

1.5.2 获得重链组件细菌文库

利用限制性内切核酸酶 R5 和 R6 酶切实施例 1.3 所制得的第三多核苷酸获得目的重链可变区片段（约为 0.35kb）。

利用限制性内切核酸酶 R5 和 R6 酶切实施例 1.4 所制得的重链存储载体 DDB-R5-1kb-R6。获得重链存储载体片段（约为 2.7kb）。

将所得的目的重链可变区片段和重链存储载体片段混合，再利用连接酶 T4 DNA ligase（购自 NEB, Thermo）连接得到重链存储连接产物，然后用所述重链存储连接产物转化 TG1 感受态细菌（Lucigen, Cat# 60502-2, 按照厂家的说明书操作），铺氨苄青霉素抗性的平皿（Thermo, Cat#240845），37°C 培养过夜，挑菌落测序，然后收集全部菌落得到重链组件细菌文库。可检测该重链组件细菌文库的质量和/或将该重链组件细菌文库冻存储用。

1.6 获得轻链组件质粒、重链组件质粒和连接子片段

使用质粒提取试剂盒（购自 Axygen），分别提取实施例 1.5.1 制备的轻链组件细菌文库、实施例 1.5.2 制备的重链组件细菌文库中的质粒，分别得到轻链组件质粒和重链组件质粒。

利用限制性内切核酸酶 R1 和 R2 酶切实施例 1.5.1 制备的轻链组件质粒，经凝胶电泳纯化回收后，得到轻链插入片段 LC。

利用限制性内切核酸酶 R5 和 R6 酶切实施例 1.5.2 制备的重链组件质粒，经凝胶电泳纯化回收后，得到重链插入片段 HC。

使用质粒提取试剂盒（购自 Axygen），提取实施例 1.4.4 制备的连接子组件细菌中的质粒，得到连接子组件质粒。以该连接子组件质粒或实施例 1.4.4 中的连接子存储载体为模板，用连接子的正向引物（SEQ ID NO: 79）和连接子的反向引物（SEQ ID NO: 80）扩增含有连接子的 0.8kb 的片段，然后用限制性内切核酸酶 R3 和 R4 酶切该 0.8kb 的 PCR 产物，经凝胶电泳纯化回收（利用小片段凝胶回收试剂盒，购自莱枫生物，Cat# DK402）得到 72pb 的连接子片段。

1.7 获得展示载体

购买获得 pComb3x 载体，其载体图谱如图 6 所示，其中用于抗体 Fab 展示的经改造的 pComb3x-fab 载体图谱如图 7 所示。

说明书

通过无义突变除去 pComb3x-fab 载体中在 Fab 基因 3'端的 SfiI 酶切位点。

然后在无义突变后的载体中轻链终止密码子的下游加入限制性内切核酸酶 R2 的酶切位点，在重链可变区信号肽的末端通过无义突变引入限制性内切核酸酶 R5 的酶切位点，获得经改造后的展示载体 DDB-R1R2R5R6，其图谱如图 8 所示。

1.8 制备展示细菌文库

利用限制性内切核酸酶 R7 和限制性内切核酸酶 R8 酶切实施例 1.7 制备的展示载体 DDB-R1R2R5R6，获得 3.6kb 展示载体片段。

将实施例 1.6 获得的轻链插入片段 LC (0.65kb)、重链插入片段 HC (0.35kb)、连接子片段 (72bp) 和所述展示载体片段 (3.6kb) 按照 1:1:1:1 的分子比例混合，用 T4 DNA 连接酶 20°C 连接 20 小时以上，得到展示用连接产物。

利用 PCR-Clean-up 纯化连接产物，转入 TG1 感受态细菌 (Lucigen, Cat# 60502-2, 按照厂家的说明书操作)，在不含抗菌素的 2YT 培养液中，37°C，250rpm 震荡培养 60 分钟，铺氨苄青霉素抗性的平皿 (Thermo, Cat#240845)，37°C 生长过夜。挑选菌落测序，收集平皿上生长的全部菌落，即为展示细菌文库。可将该展示细菌文库保存备用。

1.9 制备展示型抗体噬菌体文库

从实施例 1.8 所制备的展示细菌文库中取适量的菌液，在 2YT 培养液 (含有氨苄青霉素 100µg/ml 和 2%葡萄糖) 中 37°C 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.5。然后向该菌液中加入 M13KO7 辅助噬菌体 (购自 NEB, Cat# N0315S, MOI 约为 10-20) 混匀后，37°C 静止 30 分钟，接着在 37°C，250rpm 条件下震荡 30 分钟，离心弃去含有 M13KO7 辅助噬菌体的培养液上清部分，以该菌液原始体积 4 倍的培养液 (含有氨苄青霉素和卡那霉素) 重悬细菌，30°C，250rpm 条件下振荡过夜。第二天用 PEG 沉淀收集噬菌体，滴定噬菌体浓度，分装保存。即得到展示型抗体噬菌体文库。

实施例 2 组件细菌文库的质量分析

分析实施例 1.5 所制备的组件细菌文库的质量。结果如表 2 所示，

表 2 组件细菌文库的质量

组件库	库容量	送样克隆数	可用测序报告	正确读框	重复序列	有效克隆比例
重链组件细菌文库	10 ⁸	40	32	31	0	97%
轻链组件细菌文库 (KLC)	10 ⁷	20	16	13	0	81%
轻链组件细菌文库 (LLC)	10 ⁷	20	18	18	0	100%

在构建展示细菌文库时，轻链组件细菌文库 (KLC) 与轻链组件细菌文库 (LLC) 的比例

说明书

为 2:1, 根据以上质量结果, 可估算展示细菌文库的有效克隆比例将达到 84% 以上。而所述轻链组件细菌文库和重链组件细菌文库随机组合后得到的库容量理论上最高可以达到 10^{15} 。

实施例 3 展示细菌文库的质量分析

用实施例 1.8 获得的分离纯化后的展示用连接产物 197 μ g, 转化 398 支 TG1 感受态细菌 (Lucigen, Cat# 60502-2, 按照厂家的说明书操作), 在不含抗菌素的 2YT 培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm 震荡培养 60 分钟, 铺氨苄青霉素抗性的平皿 (Thermo, Cat#240845) 197 个, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 收获全部菌落, 分装保存 (即得到实施例 1.8 所制备的展示细菌文库)。展示细菌文库的库容量为 10^{11} , 背景克隆比例为 2%。

分析该展示细菌文库的质量, 结果如表 3 所示:

表 3 展示细菌文库的质量

测序批次	送样测序克隆	可用测序报告	正确读框	重复序列	有效克隆	有效克隆比例
第一批	100	79	65	1	64	81%
第二批	100	79	67	0	67	85%

分析表 3 中两个批次共 158 个可用测序结果, 其中有 131 个克隆的具有正确的阅读框 (包括同时含有正确的重链可变区和轻链), 可见展示细菌文库的有效克隆比例达到 83%, 与实施例 2 中的估算结果相吻合。

实施例 4. 构建人 PBMC 的噬菌体表面抗体 (Fab) 展示库**4.1 提取免疫材料总 RNA**

从外周血淋巴细胞 (购自妙通生物 Cat# PB100C) 提取总 RNA (使用 Qiagen 的 RNA 小提试剂盒, Cat# 74101, 具体试验步骤参见试剂盒说明书)。

4.2 设计合成引物

参照《Phage Display》(A Laboratory Manual, ISBN 0-87969-546-3), 设计针对人重链可变区 VH、轻链 KLC (全长 Kappa 轻链)、轻链 LLC (全长 Lamda 轻链) 的引物。其中, 轻链正向引物 5'-端含有 R1 的核苷酸序列 GGCCAGGCGGCC (SEQ ID NO:1), 反向引物 5'-端含有 R2 的核苷酸序列 GGCCACATAGGCC (SEQ ID NO:2); 重链可变区正向引物 5'-端含有 R5 的核苷酸序列 GGCCCAACCGGCC (SEQ ID NO:3), 反向引物 5'-端含有 R6 的核苷酸序列 GGCCCTCAGCGGCC (SEQ ID NO:4)。引物由金维智公司合成。

以 pComb3x 载体为模板, 设计扩增连接子的正向和反向引物。其中, 正向引物 5'-端含有 R3 的核苷酸序列 GGCCACATAGGCC (SEQ ID NO. 2), 反向引物 5'-端含有 R4 的核苷酸序列 GGCCCAACCGGCC (SEQ ID NO. 3)。

说明书

具体的引物序列可参照下表 4-1:

表 4-1 引物序列-1

引物名称	SEQ ID NO :
轻链 KLC 的正向引物	5-22
轻链 KLC 的反向引物	23
轻链 LLC 的正向引物	24-48
轻链 LLC 的反向引物	49
VH 的正向引物	50-73
VH 的反向引物	74-78
90bp 连接子的正向引物	96-97
90bp 连接子的反向引物	98

4.3 获得第一多核苷酸和第三多核苷酸

通过两步法扩增组件抗体基因库。

第一步, 以实施例 4.1 中获得的总 RNA 为模板, 用 Promega 的 MMLV 进行逆转录合成 cDNA (按照 Promega 公司产品的说明书进行, 其中引物为 Thermo Cat# N8080127、逆转录酶为 Promega Cat# M1701)。

第二步, 以第一步获得的 cDNA 为模板, 利用实施例 4.2 中获得的引物, 通过 PCR (Takara Cat# RR900A, 按照公司产品的说明书进行) 扩增组件抗体的 KLC, LLC 和 VH 基因库。凝胶电泳纯化回收后 (利用 Axygen 的凝胶回收试剂盒, 按照《分子克隆实验指南》中的记载操作) 分别获得 PCR 产物——KLC 片段 (即本申请的第一多核苷酸)、LLC 片段 (即本申请的第一多核苷酸) 和 VH 片段 (即本申请的第三多核苷酸)。

4.4 构建存储载体

4.4.1 设计引物

设计用于获得存储载体的引物。具体的引物序列可参照下表 4-2:

表 4-2 引物序列-2

引物名称	SEQ ID NO :
R1-1kb-R2 的正向引物	81
R1-1kb-R2 的反向引物	82
R5-1kb-R6 的正向引物	85
R5-1kb-R6 的反向引物	86

4.4.2 PCR 扩增

以 1kb 长的人 IgG1 的 Fc (SEQ ID NO. 87) 为模板, 利用实施例 4.4.1 制备的引物 R1-1kb-R2 的正向引物和 R1-1kb-R2 的反向引物, 进行 PCR, 凝胶电泳纯化回收后 (利用 Axygen 凝胶回收试剂盒), 得到 PCR 产物——R1-1kb-R2 (SEQ ID NO. 88)。

以 pComb3x 载体为模板, 利用 R3-连接子-R4 的正向引物 (SEQ ID NO. 83) 和 R3-连接

说明书

子-R4 的反向引物 (SEQ ID NO. 84) 进行 PCR, 凝胶电泳纯化回收后 (利用 Axygen 凝胶回收试剂盒), 得到 PCR 产物——R3-连接子-R4 (SEQ ID NO. 95), 得到本申请的所述第二多核苷酸。其中所述连接子的长度可以为 90bp, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.89 所示。

以 1kb 长的人 IgG1 的 Fc (SEQ ID NO. 87) 为模板, 利用实施例 4.4.1 制备的引物 R5-1kb-R6 的正向引物和 R5-1kb-R6 的反向引物, 进行 PCR, 凝胶电泳纯化回收后, 得到 PCR 产物——R5-1kb-R6 (SEQ ID NO. 91)。

4.4.3 构建轻链存储载体和重链存储载体

借助 TA cloning (TA cloning 试剂盒, 购自 Takara 公司) 的方法, 将 4.4.2 制备的 R1-1kb-R2 片段插入 pMD19-T 载体, 得到用于插入全长轻链基因库的轻链存储载体 DDB-R1-1kb-R2, 其载体图谱如图 3 所示。

借助 TA cloning (TA cloning 试剂盒, 购自 Takara 公司) 的方法, 将 4.4.2 制备的 R5-1kb-R6 片段插入 pMD19-T 载体得到含有 R5-1kb-R6 片段的载体, 然后以这个载体为模板, 利用引物突变去除这个载体中原有的 BsmBI 酶切位点, 得到用于插入 VH 基因库的重链存储载体 DDB-R5-1kb-R6, 其载体图谱如图 5 所示。

具体的引物序列可参照下表 4-3:

表 4-3 引物序列-3

引物名称	SEQ ID NO :
载体突变的正向引物	92
载体突变的反向引物	93

4.4.4 构建连接子存储载体并获得连接子组件细菌

借助 TA cloning (TA cloning 试剂盒, 购自 Takara 公司) 的方法, 将实施例 4.4.2 制备的 R3-连接子-R4 插入 pMD19-T 载体, 得到连接子存储载体 DDB- R3-连接子-R4, 其载体图谱如图 4 所示。可用所述连接子存储载体转化 TG1 感受态细菌 (Lucigen 公司), 铺皿 37°C 培养过夜, 送菌落测序, 然后收集菌落得到连接子组件细菌。可将该连接子组件细菌冻存备用。

4.5 获得组件细菌文库

4.5.1 获得轻链组件细菌文库

利用限制性内切核酸酶 R1 和 R2 酶切实施例 4.3 所制得的第一多核苷酸 (包括 KLC 和 LLC) 获得目的轻链片段 (约为 0.65kb)。

利用限制性内切核酸酶 R1 和 R2 酶切实施例 4.4 所制得的轻链存储载体 DDB-R1-1kb-R2。获得轻链存储载体片段 (约为 2.7kb)。

将所得的目的轻链片段和轻链存储载体片段混合, 再利用连接酶 T4 DNA ligase (购自

说明书

NEB, Thermo) 连接得到轻链存储连接产物, 然后用所述轻链存储连接产物转化 TG1 感受态细菌 (Lucigen, Cat# 60502-2, 按照厂家的说明书操作), 在不含抗菌素的 2YT 培养液中, 37°C, 250rpm 震荡培养 60 分钟, 铺氨苄青霉素抗性的平皿 (Thermo, Cat#240845), 37°C 培养过夜, 送菌落测序, 然后收集全部菌落得到轻链组件细菌文库。可检测该轻链组件细菌文库的质量和/或将该轻链组件细菌文库冻存备用。

4.5.2 获得重链组件细菌文库

利用限制性内切核酸酶 R5 和 R6 酶切实施例 4.3 所制得的第三多核苷酸获得目的重链可变区片段 (约为 0.35kb)。

利用限制性内切核酸酶 R5 和 R6 酶切实施例 4.4 所制得的重链存储载体 DDB-R5-1kb-R6。获得重链存储载体片段 (约为 2.7kb)。

将所得的目的重链可变区片段和重链存储载体片段混合, 再利用连接酶 T4 DNA ligase (购自 NEB, Thermo) 连接得到重链存储连接产物, 然后用所述重链存储连接产物转化 TG1 感受态细菌 (Lucigen, Cat# 60502-2, 按照厂家的说明书操作), 在不含抗菌素的 2YT 培养液中, 37°C, 250rpm 震荡培养 60 分钟, 铺氨苄青霉素抗性的平皿 (Thermo, Cat#240845), 37°C 培养过夜, 挑菌落测序, 然后收集全部菌落得到重链组件细菌文库。可检测该重链组件细菌文库的质量和/或将该重链组件细菌文库冻存备用。

4.6 获得轻链组件质粒、重链组件质粒和连接子片段

使用质粒提取试剂盒 (购自 Axygen), 分别提取实施例 4.5.1 制备的轻链组件细菌文库、实施例 4.5.2 制备的重链组件细菌文库中的质粒, 分别得到轻链组件质粒和重链组件质粒。

利用限制性内切核酸酶 R1 和 R2 酶切实施例 4.5.1 制备的轻链组件质粒, 经凝胶电泳纯化回收后, 得到轻链插入片段 LC。

利用限制性内切核酸酶 R5 和 R6 酶切实施例 4.5.2 制备的重链组件质粒, 经凝胶电泳纯化回收后, 得到重链插入片段 HC。

使用质粒提取试剂盒 (购自 Axygen), 提取实施例 4.4.4 制备的连接子组件细菌中的质粒, 得到连接子组件质粒。以该连接子组件质粒或实施例 4.4.4 中的连接子存储载体为模板, 用连接子的正向引物 (SEQ ID NO.96 或 SEQ ID NO.97) 和连接子的反向引物 (SEQ ID NO.98) 扩增含有连接子的 0.8kb 的片段, 然后用限制性内切核酸酶 R3 和 R4 酶切该 0.8kb 的 PCR 产物, 经凝胶电泳纯化回收 (利用小片段凝胶回收试剂盒, 购自莱枫生物, Cat# DK402) 得到 90pb 的连接子片段。

4.7 获得展示载体

购买获得 pComb3x 载体, 其载体图谱如图 6 所示, 其中用于抗体 Fab 展示的经改造的

说明书

pComb3x-fab 载体图谱如图 7 所示。

通过无义突变除去 pComb3x-fab 载体中在 Fab 基因 3'端的 SfiI 酶切位点。

然后在无义突变后的载体中轻链终止密码子的下游加入限制性内切核酸酶 R2 的酶切位点，在重链可变区信号肽的末端通过无义突变引入限制性内切核酸酶 R5 的酶切位点，获得经改造后的展示载体 DDB-R1R2R5R6，其图谱如图 8 所示。

4.8 制备展示细菌文库

利用限制性内切核酸酶 R7 和限制性内切核酸酶 R8 酶切实施例 4.7 制备的展示载体 DDB-R1R2R5R6，获得 3.6kb 展示载体片段。

将实施例 4.6 获得的轻链插入片段 LC (0.65kb)、重链插入片段 HC (0.35kb)、连接子片段 (90bp) 和所述展示载体片段 (3.6kb) 按照 1:1:1:1 的分子比例混合，用 T4 DNA 连接酶 20°C 连接 20 小时以上，得到展示用连接产物。

利用 PCR-Clean-up 纯化连接产物，转入 TG1 感受态细菌 (购自 Lucigen, Cat# 60502-2)，在不含抗菌素的 2YT 培养液中，37°C，250rpm 震荡培养 60 分钟，然后 1:20 的比例扩大到含有氨苄青霉素的 2YT 培养液中，37°C，250rpm 震荡培养 4.5 小时，离心收集细菌冻存，即为展示细菌文库。在加氨苄青霉素扩大培养前，取少量菌液铺皿，37°C 培养过夜，挑菌落测序。该展示细菌文库可以被保存备用。

4.9 制备展示型抗体噬菌体文库

从实施例 4.8 所制备的展示细菌文库中取适量的菌液，在 2YT 培养液 (含有氨苄青霉素 100µg/ml 和 2%葡萄糖) 中 37°C 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.5。然后向该菌液中加入 M13KO7 辅助噬菌体 (购自 NEB, Cat# N0315S, MOI 约为 10-20) 混匀后，37°C 静止 30 分钟，接着在 37°C，250rpm 条件下震荡 30 分钟，离心弃去含有 M13KO7 辅助噬菌体的培养液上清部分，以该菌液原始体积 4 倍的培养液 (含有氨苄青霉素和卡那霉素) 重悬细菌，30°C，250rpm 条件下振荡过夜。第二天用 PEG 沉淀收集噬菌体，滴定噬菌体浓度，分装保存。即得到展示型抗体噬菌体文库。

实施例 5 组件细菌文库的质量分析

分析实施例 4.5 所制备的组件细菌文库的质量。结果如表 5 所示。

表 5 组件细菌文库的质量

	库容量	送样克隆数	可用测序报告	正确读框	重复序列	有效克隆比例
重链组件细菌文库	10 ⁹	40	23	22	0	96%
轻链组件细菌文库 (KLC)	10 ⁹	20	11	10	0	91%

说明书

轻链组件细菌文库 (LLC)	10 ⁹	20	17	13	0	76%
----------------	-----------------	----	----	----	---	-----

在构建展示细菌文库时，轻链组件细菌文库 (KLC) 与轻链组件细菌文库 (LLC) 的比例为 2:1，根据以上质量结果，可估算展示细菌文库的有效克隆比例将达到 82%。而所述轻链组件细菌文库和重链组件细菌文库随机组合后得到的库容量理论上最高可以达到 10¹⁸。

实施例 6 展示细菌文库的质量分析

将实施例 4.8 获得的分离纯化后的展示用连接产物 16μg 转化 25 支 TG1 感受态细菌，扩增培养后离心收集细菌，收获细菌总量 2.4*10¹² 个，分装保存（即得到实施例 4.8 所制备的展示细菌文库）。展示细菌文库库容量为 4*10¹⁰，背景克隆比例为 3%，每 μg 连接产物的转化效率达到 2.5*10⁹。

用两种方法分析该展示细菌文库的质量：

第一种方法：随机挑选 90 个菌落测序，结果 56 个有正确阅读框，无重复序列，正确阅读框克隆比例 62.2%。

第二种方法：用抗人 Fab 的抗体铺平板，用 ELISA 检测上述 90 个克隆的 Fab 表达，结果两个阴性对照的读数分别为 0.07 和 0.082。共有 71 个克隆的读数高于 0.1，确定为 Fab 表达，阳性比例 79%。

分析序列错误的 34 个克隆，有 18 个有 Fab 表达，占 90 个克隆的 20%。将测序正确和测序错误但有表达的克隆相加（56+18），有效克隆比例达到 82.2%（74/90），与实施例 5 中的估算结果相吻合。

实施例 7 展示型抗体噬菌体文库的质量分析

用 PEG 沉淀实施例 4.9 中的展示型抗体噬菌体文库，离心沉淀后用 280ml PBS 重悬，加 60ml 甘油，混匀后分装冻存。取冻存的所述展示型抗体噬菌体文库，进行噬菌体文库滴度分析，结果表明该噬菌体文库的滴度为 2x10¹³/ml，该噬菌体文库的噬菌体总量达到 6.8x10¹⁵，100μl 含有 50 倍库容量的噬菌体。

为分析是否能够从所构建的噬菌体库筛选到抗原特异性抗体，选择三个分泌性细胞因子（IL6、IL17A/F、GM-CSF）和三个细胞膜蛋白（IL6R、EGFR、Siglec3），每个抗原用 100μl 所述噬菌体文库进行筛选。

用生物素化抗原结合亲和素标记磁珠吸附的液相筛选法筛选抗原特异性 Fab。上述 6 种生物素标记的抗原购自 AcroBiosystems（货号依次为 Cat# IL6-H8218、ILF-H82W1、GMF-H8214、CD6-H82E8、EGR-H82E3 和 CD3-H82E7），亲和素标记的磁珠购自 Thermo

说明书

(Cat#11206D)。三轮液相筛选的抗原浓度分别为 5μg/ml、3μg/ml 和 1μg/ml。第一轮筛选洗脱收集的噬菌体，经扩增后用于第二轮筛选。第二轮筛选洗脱收集的噬菌体，不经扩增直接用于第三轮筛选。

第三轮筛选洗脱收集的噬菌体，侵染 TG1 细菌，铺氨苄青霉素平皿，37℃培养过夜。次日，从每个抗原特异性平皿挑 96 个单克隆培养扩增（所述平皿的培养基中包含 2YT、氨苄青霉素 100μg/ml 和 0.2%葡萄糖）至 OD₆₀₀ 达到 0.6，加 IPTG（终浓度 1mM）诱导过夜。第三天 ELISA 分析培养液中的抗原特异性 Fab，结果如表 6 所示。

表 6 针对不同抗原的阳性克隆比例

抗原	最高 ELISA 读数	最低 ELISA 读数	阳性克隆数	阳性克隆比例
IL6	1.029	0.147	54	56%
IL6R	0.735	0.122	42	44%
IL17A/F	1.395	0.133	49	51%
GMCSF	0.925	0.066	84	87%
EGFR	0.729	0.149	24	25%
Siglec3	0.981	0.114	76	79%

表 6 中将 ELISA 读数大于最低 ELISA 读数两倍的克隆统计为阳性克隆。

表 6 的结果说明，从所述噬菌体抗体库中可分别筛选获得针对 IL-6、IL6R、IL17-FR、GMCSF、EGFR 和 Siglec3 的特异性 Fab，并且阳性克隆的比例可以达到约 25-87%。

从每组抗原特异性阳性克隆中选择 ELISA 读数最高的 12 个克隆进行测序分析，比对分析各组 12 个克隆的氨基酸序列。结果如表 7 所示。表 7 的结果说明，每组均有多个独特的氨基酸序列。

表 7 针对不同抗原的具有独特氨基酸序列的单克隆 Fab 的个数

抗原	IL-6	IL6R	IL17A/F	GMCSF	EGFR	Siglec3
独特 Fab 个数	8	8	7	4	4	5

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。

权 利 要 求 书

1. 一种产生展示抗体或抗体片段的噬菌体文库的方法，所述方法包括：
 - 1) 提供第一多核苷酸，第二多核苷酸和第三多核苷酸，所述第一多核苷酸包含 LC，所述第二多核苷酸包含连接子且所述第三多核苷酸包含 HC，其中所述 LC 包含编码所述抗体或抗体片段的轻链或轻链片段的核酸序列，所述 HC 包含编码所述抗体或抗体片段的重链或重链片段的核酸序列；
 - 2) 将所述第一多核苷酸导入第一细菌中以获得轻链组件细菌文库，将所述第二多核苷酸导入第二细菌中以获得连接子组件细菌，将所述第三多核苷酸导入第三细菌中以获得重链组件细菌文库；
 - 3) 由所述轻链组件细菌文库获得包含所述 LC 的轻链组件质粒，由所述连接子组件细菌获得包含所述连接子的连接子组件质粒，且由所述重链组件细菌文库获得包含所述 HC 的重链组件质粒；
 - 4) 由所述轻链组件质粒获得经释放的 LC，由所述连接子组件质粒获得经释放的连接子，且由所述重链组件质粒获得经释放的 HC；
 - 5) 提供展示载体，并由所述展示载体获得经释放的展示载体片段；
 - 6) 使所述经释放的 LC、经释放的连接子、经释放的 HC 以及经释放的展示载体片段连接，以形成展示用连接产物；
 - 7) 将所述展示用连接产物导入第四细菌中，以获得所述抗体或抗体片段的展示细菌文库；
 - 8) 使用所述展示细菌文库制备展示所述抗体或抗体片段的噬菌体文库。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中在适于抗体或抗体片段表达的条件下，6) 的所述展示用连接产物能够依照阅读框表达所述轻链或轻链片段以及所述重链或重链片段。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的方法，其中所述第一多核苷酸，所述第二多核苷酸和所述第三多核苷酸均为线性核酸分子。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中编码所述重链或重链片段的核酸序列与编码所述轻链或轻链片段的核酸序列位于不同的阅读框中。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法，其中所述连接子包含编码信号肽 pelB 或其片段的核酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法，其中所述连接子的长度为约 50 至约 200 个碱基。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法，其中在 6) 的所述展示用连接产物中，所述 LC 位于所述连接子的上游，且所述连接子位于所述 HC 的上游。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的方法，其中 2) 包括冷冻保存所述轻链组件细菌文库和/或所述重链组件细菌文库。

权 利 要 求 书

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法，其中 7) 包括冷冻保存所述展示细菌文库。
10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中 8) 包括融化并培养所述经冷冻保存的展示细菌文库，并使用经培养的所述展示细菌文库构建所述噬菌体文库。
11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的方法，其中所述第一多核苷酸以 5' 至 3' 方向包含结构 R1-LC-R2，所述第二多核苷酸以 5' 至 3' 方向包含结构 R3-连接子-R4，所述第三多核苷酸以 5' 至 3' 方向包含结构 R5-HC-R6，且所述展示载体中以 5' 至 3' 方向包含结构 R7-展示载体片段-R8，其中所述 R1，R2，R3，R4，R5，R6，R7 和 R8 为限制性内切核酸酶的识别位点。
12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述 R2 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R3 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R4、R5、R6、R7 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。
13. 根据权利要求 11-12 中任一项所述的方法，其中所述 R4 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R5 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R2、R3、R6、R7 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。
14. 根据权利要求 11-13 中任一项所述的方法，其中所述 R6 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R7 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R1、R2、R3、R4、R5 及 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。
15. 根据权利要求 11-14 中任一项所述的方法，其中所述 R8 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端：能够与所述 R1 经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别并连接；并且不与所述 R2、R3、R4、R5、R6 及 R7 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端彼此识别或连接。
16. 根据权利要求 11-15 中任一项所述的方法，其中所述 R1，R2，R3，R4，R5、R6、R7 和 R8 中的任一项经限制性内切核酸酶切割后产生的末端为非回文序列。
17. 根据权利要求 11-16 中任一项所述的方法，其中所述 R1，R2，R3，R4，R5、R6、R7 和 R8 中的两项或更多项能够被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。
18. 根据权利要求 11-17 中任一项所述的方法，其中所述 R2 与所述 R3 相同。

权 利 要 求 书

19. 根据权利要求 11-18 中任一项所述的方法, 其中所述 R4 与所述 R5 相同。
20. 根据权利要求 11-19 中任一项所述的方法, 其中所述 R6 与所述 R7 相同。
21. 根据权利要求 11-20 中任一项所述的方法, 其中所述 R8 与所述 R1 相同。
22. 根据权利要求 11-21 中任一项所述的方法, 其中所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 能够被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。
23. 根据权利要求 11-22 中任一项所述的方法, 其中所述 R6 和 R7 能够被相同的限制性内切核酸酶识别及切割。
24. 根据权利要求 11-23 中任一项所述的方法, 其中所述限制性内切核酸酶选自 SfiI, BsmBI 和 Esp3I。
25. 根据权利要求 11-24 中任一项所述的方法, 其中所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 能够被 SfiI 识别及切割。
26. 根据权利要求 11-25 中任一项所述的方法, 其中所述 R6 和 R7 能够被 BsmBI 和/或 Esp3I 识别及切割。
27. 根据权利要求 11-26 中任一项所述的方法, 其中所述 R1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。
28. 根据权利要求 11-27 中任一项所述的方法, 其中所述 R2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的核酸序列。
29. 根据权利要求 11-28 中任一项所述的方法, 其中所述 R3 包含 SEQ ID NO: 2 所示的核酸序列。
30. 根据权利要求 11-29 中任一项所述的方法, 其中所述 R4 包含 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列。
31. 根据权利要求 11-30 中任一项所述的方法, 其中所述 R5 包含 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列。
32. 根据权利要求 11-31 中任一项所述的方法, 其中所述 R6 包含 SEQ ID NO: 4 所示的核酸序列。
33. 根据权利要求 11-32 中任一项所述的方法, 其中所述 R7 包含 SEQ ID NO: 4 所示的核酸序列。
34. 根据权利要求 11-33 中任一项所述的方法, 其中所述 R8 包含 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列。
35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的方法, 其中所述轻链或轻链片段包含轻链可变区部分和/或轻链恒定区部分。
36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的方法, 其中所述重链或重链片段包含重链可变区部分和/或重链恒定区部分。
37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其片段包括 Fab, Fab', (Fab)₂ 和/或(Fab')₂。
38. 根据权利要求 1-37 中任一项所述的方法, 其中 7) 中所述展示用连接产物的连接转化效率为至少 10⁸ 个克隆/μg 多核苷酸。
39. 根据权利要求 1-38 中任一项所述的方法, 其中 2) 包括使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述第一多核苷酸进行酶切处理, 使经酶切处理的所述第一多核苷酸与轻链存储载

权 利 要 求 书

体片段连接形成轻链存储连接产物，并将所述轻链存储连接产物导入所述第一细菌中以获得所述轻链组件细菌文库；其中所述轻链存储载体包含所述 R1 和 R2，并且通过使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述轻链存储载体进行酶切处理而获得所述轻链存储载体片段。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述轻链存储载体源自 pUC 载体。
41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中所述 pUC 载体为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体。
42. 根据权利要求 40-41 中任一项所述的方法，其中所述 pUC 载体为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。
43. 根据权利要求 39-42 中任一项所述的方法，其中所述识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。
44. 根据权利要求 39-43 中任一项所述的方法，其中 2) 包括使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述第三多核苷酸进行酶切处理，使经酶切处理的所述第三多核苷酸与重链存储载体片段连接形成重链存储连接产物，并将所述重链存储连接产物导入所述第三细菌中以获得所述重链组件细菌文库；其中所述重链存储载体包含所述 R5 和 R6，并且通过使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述重链存储载体进行酶切处理而获得所述重链存储载体片段。
45. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述重链存储载体源自 pUC 载体。
46. 根据权利要求 45 所述的方法，其中所述 pUC 载体为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体。
47. 根据权利要求 45-46 中任一项所述的方法，其中所述 pUC 载体为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。
48. 根据权利要求 44-47 中任一项所述的方法，其中所述重链存储载体中包含且仅包含一个 BsmBI 的识别位点。
49. 根据权利要求 44-48 中任一项所述的方法，其中所述识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶包括 SfiI，BsmBI 和/或 Esp3I。
50. 根据权利要求 1-49 中任一项所述的方法，其中 2) 包括使所述第二多核苷酸与载体片段连接形成连接子存储载体，并将所述连接子存储载体导入所述第二细菌中以获得所述连接子组件细菌。
51. 根据权利要求 50 所述的方法，其中所述连接子存储载体中包含所述 R3 和 R4。
52. 根据权利要求 50-51 中任一项所述的方法，其中用于构建所述连接子存储载体的所述载体片段源自 pUC 载体。
53. 根据权利要求 52 所述的方法，其中所述 pUC 载体为 pUC19 载体或源自 pUC19 载体。

权 利 要 求 书

54. 根据权利要求 52-53 中任一项所述的方法, 其中所述 pUC 载体为 pMD19-T 载体或源自 pMD19-T 载体。
55. 根据权利要求 1-54 中任一项所述的方法, 其中 4) 包括使用识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶对所述轻链组件质粒进行酶切处理, 从而获得所述经释放的 LC。
56. 根据权利要求 55 所述的方法, 其中所述识别所述 R1 和 R2 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。
57. 根据权利要求 1-56 中任一项所述的方法, 其中 4) 包括使用识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶对所述重链组件质粒进行酶切处理, 从而获得所述经释放的 HC。
58. 根据权利要求 57 所述的方法, 其中所述识别所述 R5 和 R6 的限制性内切核酸酶包括 SfiI, BsmBI 和/或 Esp3I。
59. 根据权利要求 1-58 中任一项所述的方法, 其中 4) 包括使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶对所述连接子存储载体进行酶切处理, 从而获得所述经释放的连接子。
60. 根据权利要求 1-58 中任一项所述的方法, 其中 4) 包括由所述连接子存储载体获得扩增产物, 所述扩增产物包含所述连接子、所述 R3 以及所述 R4; 并且使用识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶对所述扩增产物进行酶切处理, 从而获得所述经释放的连接子。
61. 根据权利要求 1-60 中任一项所述的方法, 其中所述识别所述 R3 和 R4 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。
62. 根据权利要求 1-61 中任一项所述的方法, 其中 5) 包括使用识别所述 R7 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理以释放所述展示载体片段。
63. 根据权利要求 62 所述的方法, 其中所述识别所述 R7 和 R8 的限制性内切核酸酶包括 SfiI, BsmBI 和/或 Esp3I。
64. 根据权利要求 1-63 中任一项所述的方法, 其中所述展示载体源自 pComb3x 载体。
65. 根据权利要求 11-64 中任一项所述的方法, 其中使用识别所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后, 将获得三个不同的酶切片段。
66. 根据权利要求 65 所述的方法, 其中所述识别所述 R1、R2、R3、R4、R5 和 R8 的限制性内切核酸酶包括 SfiI。
67. 根据权利要求 11-66 中任一项所述的方法, 其中使用识别所述 R6 和 R7 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后, 使所述展示载体线性化。
68. 根据权利要求 67 所述的方法, 其中所述识别所述 R6 和 R7 的限制性内切核酸酶包括 BsmBI 和/或 Esp3I。
69. 根据权利要求 11-68 中任一项所述的方法, 其中使用识别所述 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7 和 R8 的限制性内切核酸酶对所述展示载体进行酶切处理后, 将获得四个不同的酶切片段。

权 利 要 求 书

70. 根据权利要求 69 所述的方法，其中所述识别所述 R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7 和 R8 的限制性内切核酸酶包括 SfiI, BsmBI 和/或 Esp3I。
71. 根据权利要求 1-70 中任一项所述的方法，其中 2) 包括对所述轻链组件细菌文库，所述连接子组件细菌和/或所述重链组件细菌文库进行取样检测，以确定所述轻链组件细菌文库，所述连接子组件细菌和/或所述重链组件细菌文库的库容量和/或质量。
72. 根据权利要求 1-71 中任一项所述的方法，其中所述轻链组件细菌文库包含至少 10^6 个不同的克隆。
73. 根据权利要求 1-72 中任一项所述的方法，其中所述重链组件细菌文库包含至少 10^7 个不同的克隆。
74. 根据权利要求 1-73 中任一项所述的方法，其中所述轻链组件细菌文库中有效克隆的比例为至少约 70%。
75. 根据权利要求 1-74 中任一项所述的方法，其中所述重链组件细菌文库中有效克隆的比例为至少约 70%。
76. 根据权利要求 1-75 中任一项所述的方法，其中 2) 包括根据所述轻链组件细菌文库，所述连接子组件细菌，和/或所述重链组件细菌文库的容量和/或质量测算所述展示细菌文库的容量和/或质量。
77. 根据权利要求 1-76 中任一项所述的方法，其中所述展示细菌文库包含至少 10^{10} 个不同的克隆。
78. 根据权利要求 1-77 中任一项所述的方法，其中所述展示细菌文库中有效克隆的比例为至少约 70%。
79. 根据权利要求 1-78 中任一项所述的方法，其中由样品材料获得所述第一多核苷酸和所述第三多核苷酸。
80. 根据权利要求 79 所述的方法，其中所述样品材料包括源自外周血淋巴细胞样品的材料。
81. 根据权利要求 80 所述的方法，其中所述外周血淋巴细胞为人外周血淋巴细胞。
82. 根据权利要求 79-81 中任一项所述的方法，其中所述样品材料包括源自所述样品的总 RNA 和/或 mRNA。
83. 根据权利要求 1-82 中任一项所述的方法，其中 8) 包括使所述展示细菌文库与辅助噬菌体接触来制备所述噬菌体文库。
84. 通过权利要求 1-83 中任一项所述的方法产生的噬菌体文库。
85. 根据权利要求 84 所述的噬菌体文库，其包含至少 10^{10} 个不同的克隆。
86. 根据权利要求 84-85 中任一项所述的噬菌体文库，其能够展示至少 10^{10} 种不同的抗体或抗体

权 利 要 求 书

片段。

87. 筛选抗体或抗体片段的方法，其包括使用根据权利要求 84-86 中任一项所述的噬菌体文库。

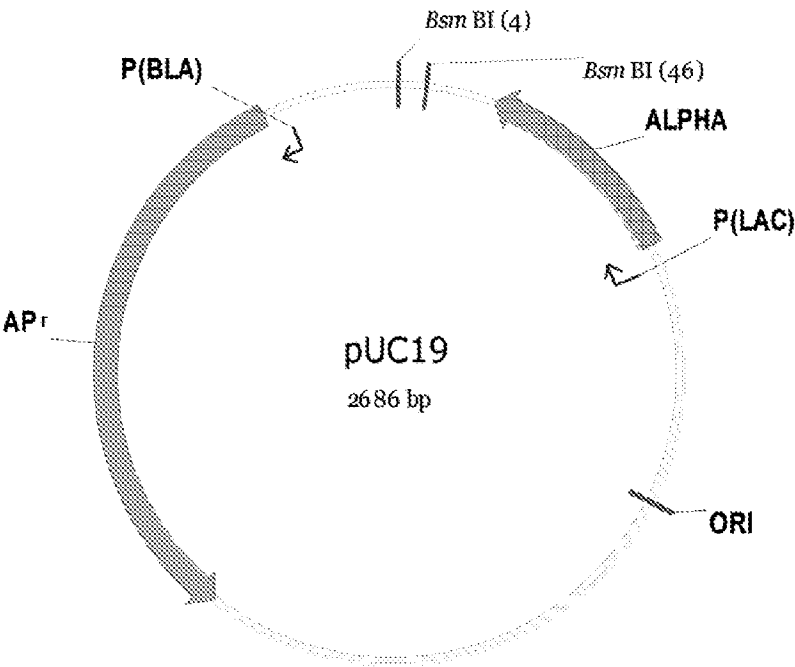


图 1

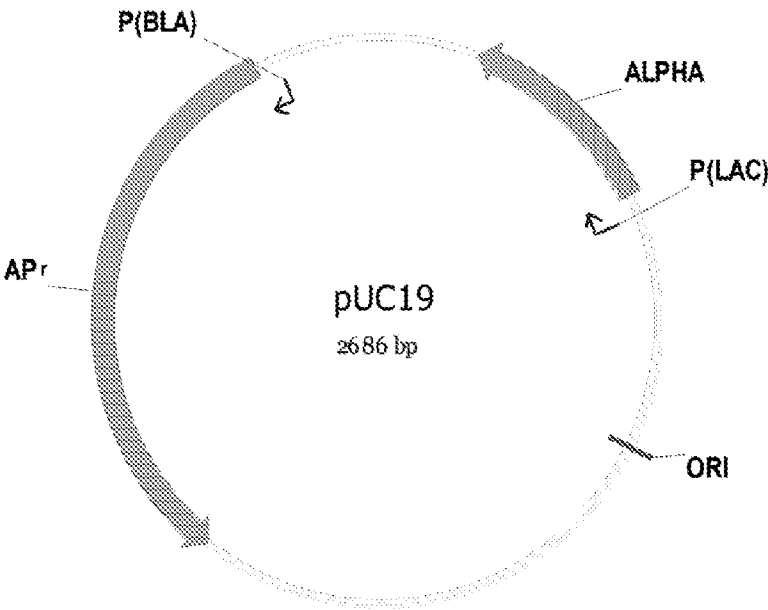


图 2

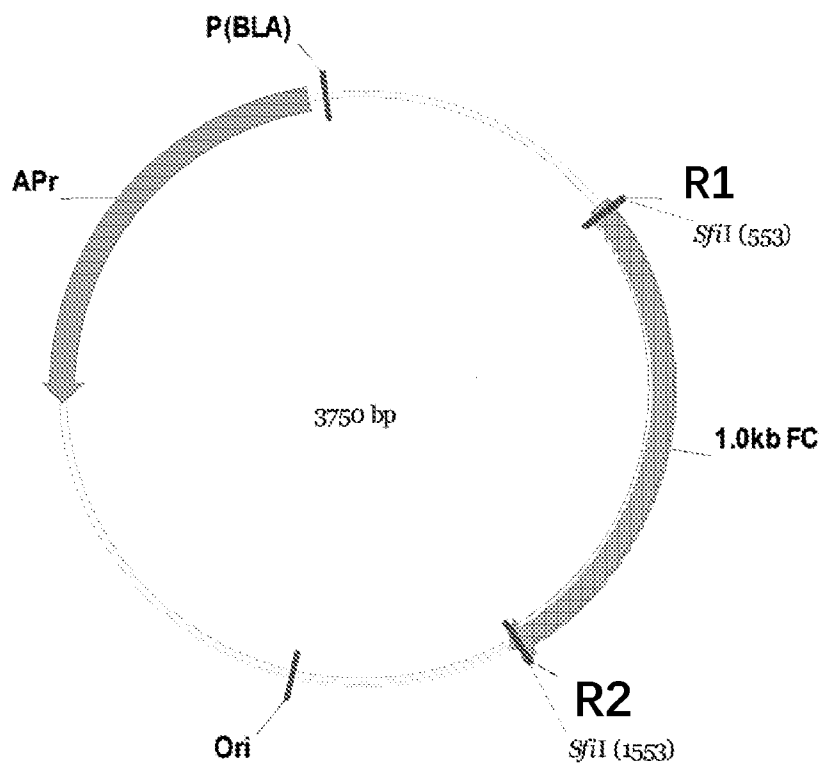


图 3

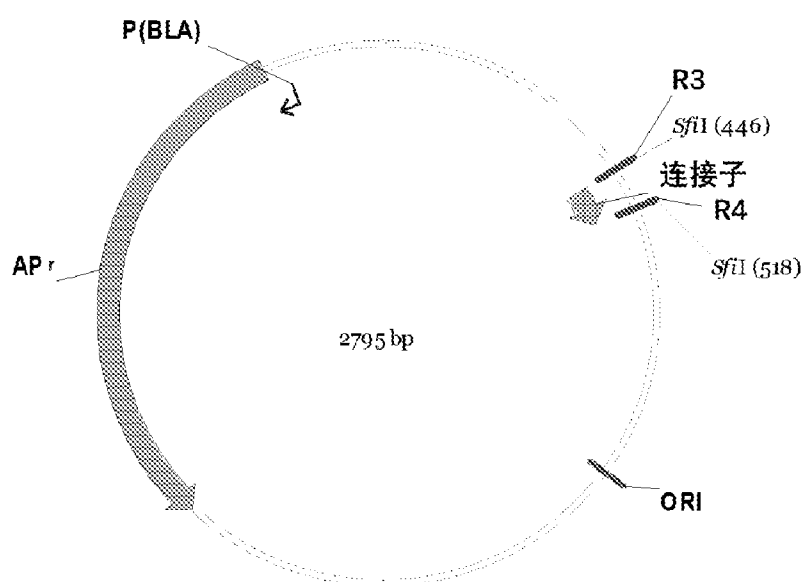


图 4

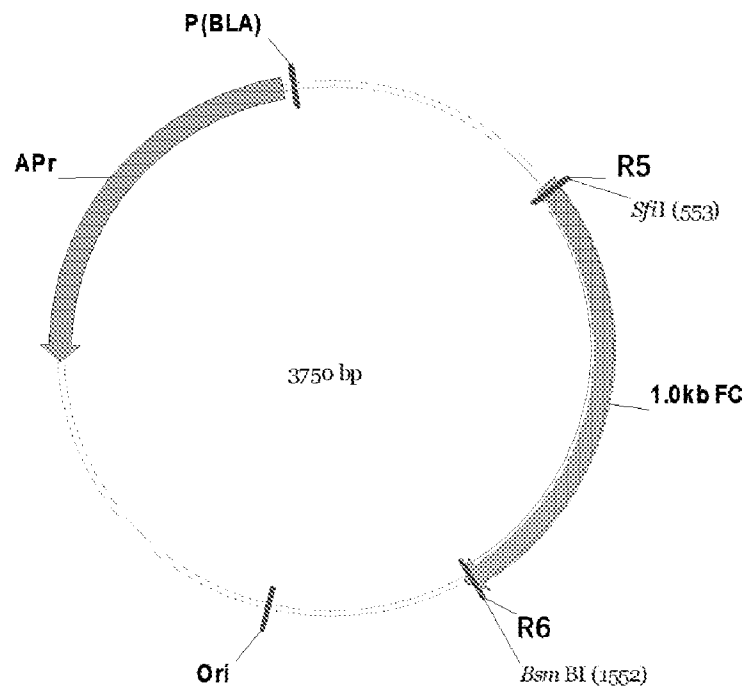


图 5

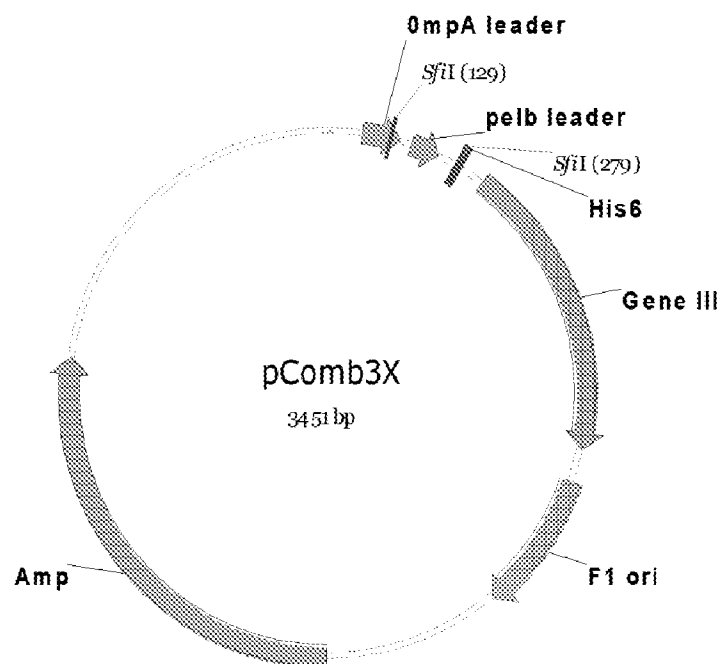


图 6

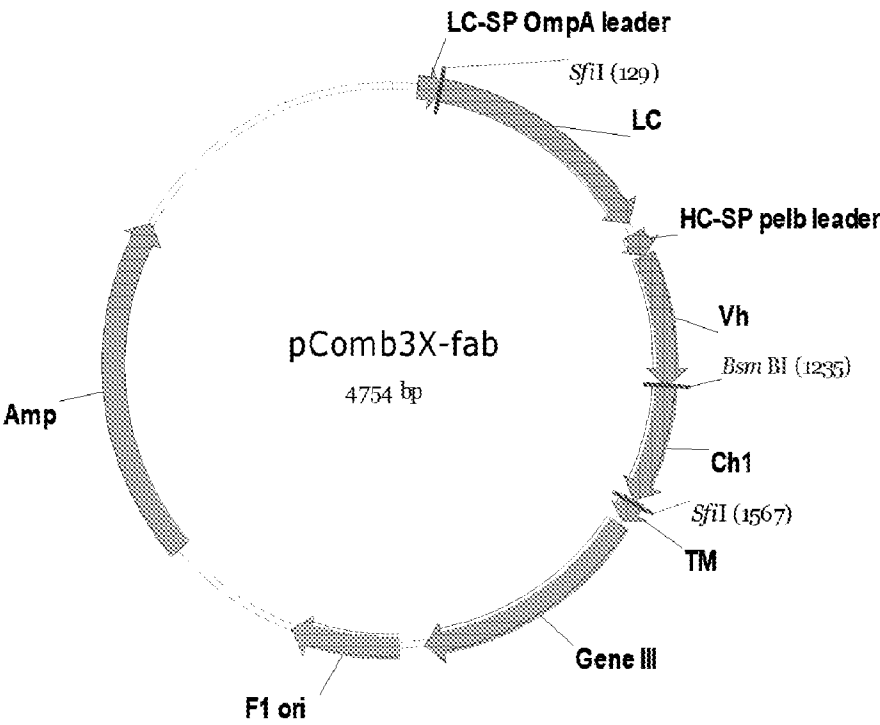


图 7

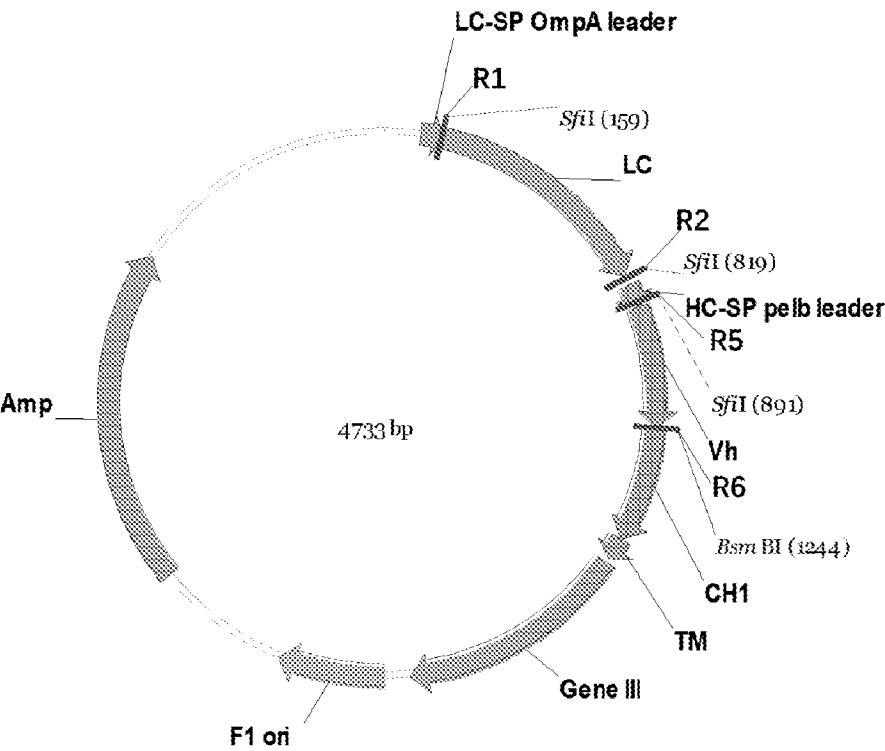


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/085706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C40B 50/06(2006.01)i; C40B 40/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C40B; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI and Keywords: 噬菌体, 抗体, 展示, 文库 etc.; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science and Keywords: phage, antibody, display, library etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018002952 A2 (GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.) 04 January 2018 (2018-01-04) the abstract, and claims 3-27	1-87
A	CN 101720368 A (SINOMAB BIOSCIENCE LIMITED) 02 June 2010 (2010-06-02) the abstract, and claim 1	1-87
A	CN 102732974 A (BIOTECH PHARMA CO., LTD.) 17 October 2012 (2012-10-17) the abstract, and claim 1	1-87
A	Cen X. et al. "Construction of a Large Phage Display Antibody Library by In Vitro Package and In Vivo Recombination" <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> , Vol. 71, No. 5, 13 May 2006 (2006-05-13), entire document	1-87

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 2020

Date of mailing of the international search report

27 July 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/085706

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/085706

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018002952	A2	04 January 2018	WO	2018002952	A3	01 March 2018
				JP	2019526618	A	19 September 2019
				EP	3475700	A4	04 March 2020
				EP	3475700	A2	01 May 2019
				KR	20190039691	A	15 April 2019
				AU	2017289987	A1	17 January 2019
CN	101720368	A	02 June 2010	WO	2008112640	A3	03 September 2009
				US	2010137156	A1	03 June 2010
				WO	2008112640	A2	18 September 2008
CN	102732974	A	17 October 2012	CN	102732974	B	15 January 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/085706

A. 主题的分类

C40B 50/06 (2006.01) i; C40B 40/02 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C40B; C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNABS, CNTXT, CNKI 和关键词: 噬菌体, 抗体, 展示, 文库, 等; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science 和关键词: phage, antibody, display, library, 等

C. 相关文件

类 型*

引用文件, 必要时, 指明相关段落

相关的权利要求

A

WO 2018002952 A2 (GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD) 2018年 1月 4日 (2018 - 01 - 04)
摘要, 权利要求3-27

1-87

A

CN 101720368 A (中国抗体制药有限公司) 2010年 6月 2日 (2010 - 06 - 02)
摘要, 权利要求1

1-87

A

CN 102732974 A (百泰生物药业有限公司) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17)
摘要, 权利要求1

1-87

A

Cen X. 等. "Construction of a large phage display antibody library by in vitro package and in vivo recombination."
Appl Microbiol Biotechnol, 第71卷, 第5期, 2006年 5月 13日 (2006 - 05 - 13),
全文

1-87

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 7月 10日

国际检索报告邮寄日期

2020年 7月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

杨振宇

电话号码 86-(10)-62412204

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/085706

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
WO	2018002952	A2	2018年 1月 4日	WO	2018002952	A3	2018年 3月 1日		
				JP	2019526618	A	2019年 9月 19日		
				EP	3475700	A4	2020年 3月 4日		
				EP	3475700	A2	2019年 5月 1日		
				KR	20190039691	A	2019年 4月 15日		
				AU	2017289987	A1	2019年 1月 17日		
CN	101720368	A	2010年 6月 2日	WO	2008112640	A3	2009年 9月 3日		
				US	2010137156	A1	2010年 6月 3日		
				WO	2008112640	A2	2008年 9月 18日		
CN	102732974	A	2012年 10月 17日	CN	102732974	B	2014年 1月 15日		