



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104011074 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201280060807. 3 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2012. 12. 19 *C07K 16/00* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *C12N 15/10* (2006. 01)
11194861. 8 2011. 12. 21 EP *C12N 15/63* (2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014. 06. 10
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/076155 2012. 12. 19
(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/092716 EN 2013. 06. 27
(71) 申请人 弗·哈夫曼 - 拉罗切有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72) 发明人 S·霍格 E·科佩茨基
D·奥斯特勒 S·西伯尔
G·蒂芬塔勒
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书1页 说明书19页
序列表15页

(54) 发明名称

用于克隆和表达关联抗体可变区基因区段的快速方法

(57) 摘要

在本文中报道的方法中, 在未中间分离和分析克隆的中间质粒的情况下进行编码抗体可变域的核酸区段的分离, 并将分离的核酸区段插入到真核表达质粒中。因此, 在本文中报道的方法中, 不需要例如通过分析分离的经转化的大肠杆菌细胞来中间克隆、分离和分析中间质粒。

1. 用于产生抗体的方法,其包括以下步骤:
 - 从真核细胞的培养基中回收所述抗体,所述真核细胞包含编码所述抗体的核酸,其中编码所述抗体的核酸通过以下方式获得
 - 在 PCR 中将单链 cDNA 作为模板扩增编码关联可变域的核酸,所述单链 cDNA 获自抗体分泌 B 细胞的 RNA,和
 - 通过不依赖于连接的克隆,将编码可变域的核酸插入到真核表达质粒中,其中分别将编码抗体轻链可变域和重链可变域的核酸库用于所述插入。
2. 用于产生抗体的方法,其包括以下步骤:
 - 培养用编码所述抗体的表达质粒转染的真核细胞,其中已经用表达质粒库转染了所述真核细胞,所述表达质粒库由转化了质粒库的大肠杆菌细胞制备,
 - 从所述真核细胞或培养基中回收抗体。
3. 根据权利要求 1 的方法,其特征在于所述 B 细胞是兔 B 细胞。
4. 根据权利要求 1 或 3 中任一项的方法,其特征在于所述 B 细胞是单个沉积的 B 细胞。
5. 根据权利要求 1 或 3 或 4 中任一项的方法,其特征在于培养所述 B 细胞约 7 天。
6. 根据权利要求 1 和 3 至 5 中任一项的方法,其特征在于所述 B 细胞及其子代从单细胞开始,在与饲养细胞共培养的 7 天中产生了多于 20ng/ml 的抗体。
7. 根据权利要求 1 和 3 至 6 中任一项的方法,其特征在于所述 PCR 引物具有 SEQ ID NO:5 和 6 或 SEQ ID NO:7 或 8 的核酸序列。
8. 根据权利要求 1 和 3 至 7 中任一项的方法,其特征在于在所述 PCR 之后去除所述 PCR 引物。
9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项的方法,其特征在于通过测序和不依赖于连接的克隆,将所述核酸片段插入到所述表达质粒中。
10. 根据权利要求 1 和 3 至 9 中任一项的方法,其特征在于将约 300ng 核酸用于所述插入反应。
11. 根据权利要求 1 至 11 中任一项的方法,其特征在于通过将所述编码可变域的核酸测序并不依赖于连接地克隆到无可变域的扩增的表达质粒中,来获得所述表达质粒。
12. 根据权利要求 11 的方法,其特征在于在所述扩增之前线性化所述质粒。

用于克隆和表达关联抗体可变区基因区段的快速方法

[0001] 本文中报道了用于从单一抗体产生 B 细胞开始,分离(克隆、表达和选择)抗体的方法,其中所述方法的各个步骤都在允许鉴定具有期望的特异性的抗体的溶液中进行。

发明背景

[0002] 为了获得分泌单克隆抗体的细胞,由 Koehler 和 Milstein 研发的杂交瘤技术是广泛使用的。但在杂交瘤技术中,仅可以融合和增殖一部分获自经免疫的实验动物的 B 细胞。B 细胞的来源一般是经免疫的实验动物的器官如脾。

[0003] Zubler 等人在 1984 年开始研发用于获得分泌单克隆抗体的细胞的不同方法(参见例如 Eur. J. Immunol. 14(1984) 357-363, J. Exp. Med. 160(1984) 1170-1183)。其中从经免疫的实验动物的血液中获得 B 细胞,并在包含细胞因子的饲养混合物的存在的情况下与鼠 EL-4B5 饲养细胞共培养。使用该方法,10-12 天共培养后,可以获得多达 50ng/ml 的抗体。

[0004] Weitkamp, J. -H. 等人 (J. Immunol. Meth. 275(2003) 223-237) 报道了从单一抗原特异性 B 细胞中产生针对轮状病毒的重组人单克隆抗体,所述单抗原特异性 B 细胞是用荧光病毒样颗粒选择的。US2006/0051348 中报道了产生针对多个关联抗原 (cognate antigen) 的多个分离的抗体的方法。W02008/144763 和 W02008/045140 中分别报道了针对 IL-6 的抗体及其用途,以及用于获得抗原特异性 B 细胞的克隆群体的培养方法。US2007/0269868 中报道了用于获得抗原特异性 B 细胞的克隆群体的培养方法。Masri 等人 (在 Mol. Immunol. 44(2007) 2101-2106 中) 报道了在大肠杆菌中克隆和表达功能性 Fab 片段,其获自针对炭疽毒素的单个人淋巴细胞。W02007/031550 中报道了用于制备免疫球蛋白文库的方法。

[0005] W02010/056898 中报道了从记忆 B 细胞中快速表达和克隆人单克隆抗体。Jin 等人 (Jin, A. 等人, Nature Medicine 15(2009) 1088-1093) 报道了用于从人外周血中筛选抗原特异性的抗体产生细胞的快速且有效的单细胞操作方法。Lightwood 等人 (Lightwood, D. J. 等人, J. Immunol. Meth. 316(2006) 133-143) 报道了通过以下方式产生抗体:针对抗原淘选 B 细胞,之后原位培养,并对从抗原阳性孔中全部收获的细胞直接进行 RT-PCR。

[0006] 发明概述

[0007] 在本文报道的方法中,在未中间分离和分析克隆的中间质粒/盒的情况下,进行编码抗体(轻链和重链)可变域的核酸片段或区段的分离,并将分离的核酸片段或区段插入到真核表达盒(每一盒分别用于一个轻链和重链)中。因此,在本文报道的方法中,不需要例如通过分析分离的经转化的大肠杆菌细胞,来中间克隆、分离和分析中间质粒/盒,因此,产生了更快的方法。

[0008] 本文中报道的一个方面是用于分离编码抗体的关联可变域的核酸的方法,其包括以下步骤:

[0009] - 在 RT-PCR 中使用获自抗体分泌 B 细胞的 RNA 作为模板合成单链 cDNA,

[0010] - 在 PCR 中扩增编码可变域的核酸,并借此分离编码抗体的关联可变域的核酸片段,

- [0011] 其中在 PCR 后去除 PCR 引物。
- [0012] 在一个实施方案中,在不分离和分析中间核酸的情况下进行该方法。
- [0013] 本文中报道的一个方面是用于产生抗体的方法,其包括以下步骤:
- [0014] - 培养包含编码抗体的核酸的真核细胞,和
- [0015] - 从细胞或培养基中回收抗体,
- [0016] 其中编码抗体的核酸通过以下方式获得
- [0017] - 在 RT-PCR 中使用获自抗体分泌 B 细胞的 RNA 作为模板合成单链 cDNA,
- [0018] - 在 PCR 中扩增编码可变域的核酸,和
- [0019] - 将编码可变域的核酸插入到一个或多个真核表达质粒中。
- [0020] 在一个实施方案中,在 PCR 后去除 PCR 引物。
- [0021] 在一个实施方案中,在不分离和分析中间核酸的情况下进行该方法。
- [0022] 本文中报道的一个方面是用于产生抗体的方法,其包括以下步骤:
- [0023] - 培养用编码抗体重链和轻链的一个或多个表达质粒转染的真核细胞,其中从转化了质粒库的大肠杆菌细胞制备所述一个或多个表达质粒,
- [0024] - 从细胞或培养基中回收抗体。
- [0025] 本文报道的一个方面是用于产生抗体的方法,其包括以下步骤:
- [0026] - 从真核细胞的培养基中回收抗体,所述真核细胞包含编码抗体的核酸,
- [0027] 其中编码抗体的核酸通过以下方式获得
- [0028] - 在 PCR 中将单链 cDNA 作为模板扩增编码关联可变域的核酸,所述单链 cDNA 获自抗体分泌 B 细胞的 RNA,和
- [0029] - 通过不依赖于连接的克隆,将编码可变域的核酸插入到真核表达质粒中,
- [0030] 其中分别将编码抗体轻链和重链可变域的核酸库用于所述插入。
- [0031] 在一个实施方案中,该方法包括第一步:
- [0032] - 使用 RNA 作为模板合成单链 cDNA,所述 RNA 获自抗体分泌 B 细胞。
- [0033] 在一个实施方案中,在 PCR 后去除 PCR 引物。
- [0034] 在一个实施方案中,在不分离和分析中间核酸的情况下进行该方法。
- [0035] 本文报道的一个方面是用于产生抗体的方法,其包括以下步骤:
- [0036] - 培养用编码抗体的表达质粒转染的真核细胞,其中已经用表达质粒库转染了所述真核细胞,所述表达质粒库由转化了质粒库的大肠杆菌细胞制备,
- [0037] - 从细胞或培养基中回收抗体。
- [0038] 在一个实施方案中,编码抗体的核酸通过以下方式获得
- [0039] - 在 PCR 中将单链 cDNA 作为模板扩增编码关联可变域的核酸,所述单链 cDNA 获自抗体分泌 B 细胞的 RNA,和
- [0040] - 通过不依赖于连接的克隆,将编码可变域的核酸插入到真核表达质粒中。
- [0041] 在一个实施方案中,该方法包括第一步:
- [0042] - 使用 RNA 作为模板合成单链 cDNA,所述 RNA 获自抗体分泌 B 细胞。
- [0043] 在一个实施方案中,在 PCR 后去除 PCR 引物。
- [0044] 在一个实施方案中,在不分离和分析中间核酸的情况下进行该方法。
- [0045] 在全部方面的一个实施方案中,B 细胞是兔 B 细胞。

[0046] 在全部方面的一个实施方案中, B 细胞是单个沉积的 B 细胞。

[0047] 在全部方面的一个实施方案中, B 细胞已培养了大约 7 天。

[0048] 在全部方面的一个实施方案中, B 细胞及其子代从单细胞开始, 在与饲养细胞共培养 7 天中产生了多于 20ng/ml 的抗体。

[0049] 在全部方面的一个实施方案中, PCR 引物具有 SEQ ID NO:5 和 6 或 SEQ ID NO:7 或 8 的核酸序列。

[0050] 在全部方面的一个实施方案中, 通过测序和不依赖于连接的克隆, 将核酸片段插入到表达质粒中。

[0051] 在全部方面的一个实施方案中, 将约 300ng 的核酸用于插入反应。

[0052] 在全部发明的一个实施方案中, 将核酸库用于插入。

[0053] 在全部方面的一个实施方案中, 通过将编码可变域的核酸测序并不依赖于连接地克隆到无可变域的扩增的表达质粒中, 来获得表达质粒。

[0054] 在全部方面的一个实施方案中, 质粒是在扩增之前线性化的。

[0055] 发明详述

[0056] 定义

[0057] “亲和力”指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明, 如本文中所示, “结合亲和力”指固有的结合亲和力, 其反映了结合对成员(例如抗体和抗原)之间 1:1 的相互作用。通常可以将分子 X 与其配偶体 Y 的亲和力表示为解离常数(Kd)。可以通过本领域已知的常规方法, 包括本文中所述的那些方法测量亲和力。下文描述了用于测量结合亲和力的具体的说明性和示例性实施方案。

[0058] 如本申请中所用, 术语“氨基酸”指一组羧基 α -氨基酸, 其可以直接或者以前体形式由核酸编码。各个氨基酸都由三个核苷酸组成的核酸编码, 所以称为密码子或碱基三联体。每一氨基酸由至少一种密码子编码。这称作“遗传密码的简并性”。如本申请中所用, 术语“氨基酸”指天然存在的羧基 α -氨基酸, 其包含丙氨酸(三字母密码: ala, 单字母密码: A)、精氨酸(arg, R)、天冬酰胺(asn, N)、天冬氨酸(asp, D)、半胱氨酸(cys, C)、谷氨酰胺(gln, Q)、谷氨酸(glu, E)、甘氨酸(gly, G)、组氨酸(his, H)、异亮氨酸(ile, I)、亮氨酸(leu, L)、赖氨酸(lys, K)、甲硫氨酸(met, M)、苯丙氨酸(phe, F)、脯氨酸(pro, P)、丝氨酸(ser, S)、苏氨酸(thr, T)、色氨酸(trp, W)、酪氨酸(tyr, Y)和缬氨酸(val, V)。

[0059] 在本文中, 术语“抗体”以其广义使用, 并包括多种抗体结构, 其包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如, 双特异性抗体)和只要表现出期望的抗原结合活性的抗体片段。

[0060] “抗体片段”指非完整抗体的分子, 其包含完整抗体的一部分, 所述部分与完整抗体结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如 scFv)、单结构域抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0061] 抗体的“类型”指抗体的重链所拥有的恒定域或恒定区的类型。例如在人类中存在 5 种主要的抗体类型: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 并且还可以将它们中的几种细分成亚类(同种型), 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将对应于不同类型的免疫球蛋白的

重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0062] 术语“抗体可变域的关联对”指获自单一抗体分泌 B 细胞的抗体可变域对,即在哺乳动物由于与免疫原性分子接触而导致的免疫应答期间已经配对产生了所述可变域对或者在展示方法中已经随机组装成所述可变域对。

[0063] 试剂,例如药物制剂的“有效量”指在所需的时间内,对于实现期望的治疗或预防结果有效的量(以剂量表示)。

[0064] 如本文中所用,术语“表达”指细胞内发生的转录和/或翻译以及分泌过程。可以基于细胞中存在的相应的 mRNA 的量来测定细胞中目的核酸序列的转录水平。例如,可以通过 qPCR 或 RT-PCR 或者通过 Northern 杂交(参见 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)) 定量由目的序列转录的 mRNA。可以通过多种方法定量由核酸编码的多肽,所述方法例如, ELISA、测定多肽的生物学活性或者应用独立于该活性的测定法例如使用识别或者与多肽结合的免疫球蛋白进行的蛋白质印迹或者放射免疫测定法(参见 Sambrook 等人, (1989), 上文)。

[0065] “表达盒”指含必需的调控元件,例如启动子和聚腺苷酸化位点的构建体,用于表达至少在细胞中含有的核酸。

[0066] 术语“表达机器”指参与基因表达步骤的细胞的酶、辅因子等的总和,所述基因表达从核酸或基因的转录步骤开始(即也称为“基因表达机器”)直到由该核酸编码的多肽的翻译后修饰。表达机器例如包括以下步骤:DNA 转录成前 mRNA、前 mRNA 剪切成成熟的 mRNA、将 mRNA 翻译成多肽,以及多肽的翻译后修饰。

[0067] “表达质粒”是提供用于在宿主细胞中表达所包含的结构基因所需全部元件的核酸。通常,表达质粒包含(例如大肠杆菌的)原核质粒增殖单位(其包含复制起点)、选择标记、真核选择标记,以及用于表达目的结构基因的一个或多个表达盒,每一表达盒包含启动子、结构基因,以及包括多腺苷酸化信号的转录终止子。基因表达通常位于启动子的控制之下,并且该结构基因与启动子“有效连接”。相似地,如果调控元件调节核心启动子的活性,那么调控元件和核心启动子是有效连接的。

[0068] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已经引入外源核酸的细胞,并包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”、“转染子”、“转化的细胞”和“转染的细胞”,不考虑传代的次数,所述宿主细胞包括最初转化的细胞及其衍生的子代。子代在核酸含量方面可以与亲本细胞不完全相同,可以含有突变。本文包括经筛选或选择的具有与原始转化细胞相同的功能或生物学活性的突变型子代。

[0069] 术语“细胞”包括原核细胞(其用于质粒的增殖)和真核细胞(其用于核酸的表达)。在一个实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在一个实施方案中,哺乳动物细胞选自 CHO 细胞(例如 CHO K1、CHO DG44)、BHK 细胞、NS0 细胞、Sp2/0 细胞、HEK293 细胞、HEK293EBNA 细胞、PER. C6 细胞和 COS 细胞。

[0070] “人抗体”是拥有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人类或人类细胞产生的抗体的氨基酸序列或者来自使用人抗体谱产生的非人来源的抗体的氨基酸序列或对应于其他人抗体编码序列。人抗体的这种定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0071] “个体”或“受试者”是脊椎动物。在一个实施方案中，脊椎动物是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，驯养的动物（例如，牛、绵羊、猫、狗和马）、灵长类动物（例如，人类和非人灵长类动物如猴）、兔和啮齿类动物（例如，小鼠和大鼠）。在某些实施方案中，个体或受试者是人类。在其他实施方案中，个体或受试者是兔。

[0072] “有效连接”指两个或者多个组分的并列，其中所述组分在允许它们以期望的方式发挥作用的关系中。例如，如果启动子和 / 或增强子顺式发挥作用，以调控或调节所连接序列的转录，那么它们与编码序列是有效连接的。通常但并非必须“有效连接”的 DNA 序列是邻接的，根据需要邻接地并且在（可读）框内连接两种蛋白质编码区如分泌前导序列和多肽。然而，尽管有效连接的启动子通常位于编码序列的上游，但并非必须与所述编码序列邻接。增强子不必是邻接的。如果增强子增加编码序列的转录，那么增强子与编码序列是有效连接的。有效连接的增强子可以位于编码序列的上游、内部或下游，并且离启动子相当远。如果聚腺苷酸化位点位于编码序列的下游，使得转录经编码序列一直进行到聚腺苷酸化序列，那么所述聚腺苷酸化位点与编码序列是有效连接的。如果翻译终止密码子位于编码序列的下游（3' 端），使得翻译经编码序列一直进行至终止密码子并终止于此，那么所述翻译终止密码子与外显子核酸序列是有效连接的。通过本领域已知的重组方法，例如使用 PCR 方法和 / 或通过合适的限制位点连接来实现连接。如果不存在合适的限制位点，那么根据常规实践，可以使用合成的寡核苷酸接头。

[0073] 术语“肽接头”指天然和 / 或合成来源的氨基酸序列。它们由线性氨基酸链组成，其中 20 个天然存在的氨基酸是单体结构单元。肽接头具有 1 至 50 个氨基酸长度，在一个实施方案中 1 至 28 个氨基酸长度，在另外的实施方案中 2 至 25 个氨基酸长度。肽接头可以含有重复的氨基酸序列或者天然存在的多肽的序列。通过允许多肽正确折叠且合适地呈现，接头具有确保相互连接的多肽可以执行其生物学活性的功能。在一个实施方案中，肽接头富含甘氨酸、谷氨酰胺和 / 或丝氨酸残基。这些残基例如以多达 5 个氨基酸的小重复单元排列，例如 GS (SEQ ID NO:1)、GGS (SEQ ID NO:2)、GGGS (SEQ ID NO:3) 和 GGGGS (SEQ ID NO:4)。小的重复单元可以重复 1 至 5 次。在多肽单元的氨基端和 / 或羧基端，可以添加多达 6 个额外的随机天然存在的氨基酸。其他合成的肽接头由重复 10 至 20 次的单个氨基酸组成，并且在氨基端和 / 或羧基端可以包含多达 6 个额外的随机天然存在的氨基酸。全部肽接头都可以由核酸分子编码，因此可以重组地表达。由于接头本身是肽，所以通过接头连接的多肽通过两个氨基酸之间形成的肽键与接头连接。

[0074] 相对于参考肽序列的“氨基酸序列百分比 (%) 同一性”定义为比对序列且引入空位后，候选序列的氨基酸残基中与参考多肽序列的氨基酸残基中相同的氨基酸残基的百分比，根据需要，实现最大的序列百分比同一性，并且不将任何保守替换考虑为序列同一性的一部分。可以以本领域中已知的多种方式，例如使用公众可用的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件实现用于测定氨基酸序列百分比同一性的比对。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数，包括在全长的待比较序列上实现最大比对所需的任何算法。为此，使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生氨基酸序列百分比同一性。Genentech, Inc. 已经创作了 ALIGN-2 序列比较计算机程序，在 U. S. Copyright Office, Washington D. C., 20559 处使用用户文档存档了源编码，并且已经以 U. S. Copyright Registration No. TXU510087 注册。ALIGN-2 程序可从 Genentech, Inc., South San

Francisco, California 公开获得, 或者可以编译自源编码。应当编译用于 UNIX 运行系统, 包括数字 UNIX V4.0D 的 ALIGN-2 程序。ALIGN-2 程序设定了全部序列比较参数, 并且不需要更改。

[0075] 在将 ALIGN-2 应用于氨基酸序列比较的情况下, 给定氨基酸序列 A 与给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列百分比同一性 (可备选地表述为与给定氨基酸序列 B 具有或者包含一定的氨基酸序列百分比同一性的给定氨基酸序列 A) 可计算如下:

[0076] $100 \times \text{分数 } X/Y$

[0077] 其中 X 是通过序列比对程序 ALIGN-2 进行的 A 和 B 的程序比对中, 评分为同一性匹配的氨基酸残基的数目, 其中 Y 是 B 中氨基酸残基的总数。应当理解, 其中氨基酸序列 A 的长度并不等于氨基酸序列 B 的长度, A 与 B 的氨基酸序列百分比同一性并不等于 B 与 A 的氨基酸序列百分比同一性。除非另外指明, 如前一段中所述, 使用 ALIGN-2 计算机程序获得本文中所使用的全部氨基酸序列百分比同一性值。

[0078] “多肽”是由肽链连接的氨基酸组成的聚合物, 所述多肽可以是天然或合成产生的。可以将少于约 25 个氨基酸残基的多肽称为“肽”, 而将由两个或多个多肽组成的分子或者包含 100 个氨基酸残基以上的一个多肽的分子称为“蛋白质”。多肽还可以包含非氨基酸组分, 例如糖基、金属离子或羧酸酯。非氨基酸组分可以通过细胞添加, 并且可以根据细胞的类型而改变, 其中多肽是表达的。在本文中, 根据多肽的氨基酸骨架结构或编码所述氨基酸骨架的核酸来定义多肽。附加物如糖基通常并不指明, 但仍可以存在。

[0079] “结构基因”指没有信号序列的基因区域, 即编码区。

[0080] 术语“可变区”或“可变域”指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变域 (分别为 VH 和 VL) 通常具有相似的结构, 其中每一结构域包含 4 个保守的构架区 (FR) 和三个超变区 (HVR) (参见例如, Kindt, T. J. 等人, *Kuby Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., N. Y. (2007), 第 91 页)。单个 VH 或 VL 结构域足以赋予抗原结合特异性。此外, 可以使用来自结合抗原的抗体的 VH 或 VL 结构域分离结合特定抗原的抗体, 以分别筛选互补的 VL 或 VH 结构域的文库 (参见例如, Portolano, S. 等人, *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T. 等人, *Nature* 352 (1991) 624-628)。

[0081] 术语“变体”指亲本氨基酸序列的变体, 其包含一个或多个氨基酸替换、添加或缺失。

[0082] 术语“载体”指能使与其连接的另一核酸增殖的核酸分子。该术语包括这样的载体, 其为自我复制的核酸结构或掺入到已经引入所述载体的宿主细胞的基因组中。某些载体能指导与它们有效连接的核酸的表达。在本文中, 将此类载体称为“表达载体”。

[0083] 本文中报道的方法的一般步骤

[0084] 免疫

[0085] 通常将非人动物, 例如小鼠、兔、仓鼠和大鼠作为评价基于抗体的治疗的动物模型。还可以使用在特定疾病之后仍存活的、患慢性病的或者近期针对特定疾病接种了疫苗的人类的 B 细胞。

[0086] 在本文报道的方法中, 可以使用获自例如小鼠、大鼠、仓鼠、兔、绵羊、骆马或人类的 B 细胞。在一个实施方案中, 小鼠是 NMRI- 小鼠或 balb/c- 小鼠。在另一个实施方案中, 仓鼠选自亚美尼亚仓鼠 (*Cricetulus migratorius*)、中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*) 和叙

利亚仓鼠 (*Mesocricetus auratus*)。在特定的实施方案中,仓鼠是亚美尼亚仓鼠。在一个实施方案中,兔选自新西兰 (NZW) 白兔、Zimmermann-兔 (ZIKA)、Alicia-突变系兔、basilea 突变系兔、用人免疫球蛋白基因座转基因的兔、兔 IgM 敲除的兔及其杂交育种。

[0087] 在一个实施方案中,挑选的用于免疫的实验动物,例如小鼠、仓鼠、大鼠和兔不大于 12 周。

[0088] B 细胞的来源和分离

[0089] 实验动物或人类的血液提供了抗体产生 B 细胞的高度多样性。由其获得的 B 细胞分泌的抗体在 CDR 内具有几乎不相同或者重叠的氨基酸序列,因此所述抗体显示出高度的多样性。

[0090] 在一个实施方案中,来自实验动物或人类的,例如血液的 B 细胞获自免疫后 4 天至免疫后或者最近一次加强免疫后至少 9 天。在本文报道的方法中,该时间跨度允许高度的灵活性。在该时间跨度中,提供最具亲和力 (affine) 抗体的 B 细胞有可能从脾迁移至血液中 (参见例如 Paus, D. 等人, *JEM*203 (2006) 1081 - 1091 ;Smith, K. G. S. 等人, *The EMBO J.* 16 (1997) 2996 - 3006 ;Wrarmert, J. 等人, *Nature*453 (2008) 667-672)。

[0091] 可以用本领域技术人员已知的任何方法获得来自实验动物或人类的血液的 B 细胞。例如,可以使用密度梯度离心 (DGC) 或红细胞裂解 (裂解)。与裂解相比,密度梯度离心提供了更高的总产率,即 B 细胞克隆的数目。除通过密度梯度离心获得细胞外,在共培养步骤中分裂和培养了大量的细胞。与使用不同方法获得的细胞相比,通过密度梯度离心获得的分泌抗体的浓度也更高。因此,在一个实施方案中,通过密度梯度离心提供 B 细胞群体。

[0092] mRNA 的分离、克隆和测序

[0093] 从 B 细胞中分离总 mRNA,并转录成 cDNA。使用特异性引物,可以扩增编码关联 VH 和 VL 区的核酸。使用本文中报道的方法,几乎未获得相同的序列。因此,该方法提供了与相同抗原结合的高度多样性抗体。

[0094] 在一个实施方案中,本文中报道的方法用于产生包含关联抗体可变域的抗体。在一个实施方案中,关联抗体可变域来自单个 B 细胞。

[0095] 可以提供引物,以扩增获自 NMRI-小鼠、亚美尼亚仓鼠、Ba1b/c-小鼠、叙利亚仓鼠、兔、大鼠、绵阳、驼马和人类的 B 细胞的编码 VH 的核酸。

[0096] 本文中报道的一个方面是用于产生抗体的方法,其包括以下步骤:

[0097] a) 在单独的容器 (在一个实施方案中,容器是多孔板的孔) 中,从染色的 B 细胞群体 (在一个实施方案中,用 1 至 3 种或者 2 至 3 种荧光染料对 B 细胞染色) 中沉积单个 (成熟的) B 细胞 (获自实验动物或人类的血液或淋巴器官),

[0098] b) 在饲养细胞和饲养混合物 (在一个实施方案中,饲养细胞是 EL-4B5 细胞,在一个实施方案中,饲养混合物是天然的 TSN (来自与 B 细胞所来源的物种相同的实验动物的胸腺细胞的培养物的上清液),在一个实施方案中,饲养混合物是合成的饲养混合物) 存在的情况下培养沉积的各个 B 细胞,

[0099] c) 通过反转录 PCR (RT-PCR) 和核苷酸测序,测定特异性结合的抗体的轻链可变域和重链可变域的氨基酸序列,从而获得编码单克隆抗体轻链可变域和重链可变域的核酸,

[0100] d) 在各个 HC 和 LC 表达盒中培养包含编码可变轻链和可变重链的核酸的细胞,并

从细胞和细胞培养上清液中回收抗体,从而产生抗体。

[0101] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0102] a) 提供(成熟)B 细胞群体(获自实验动物或人类的血液或淋巴器官),

[0103] b) 用至少一种荧光染料(在一个实施方案中,使用 1 至 3 种或者 2 至 3 种荧光染料)对 B 细胞群体的细胞染色,

[0104] c) 在单独容器(在一个实施方案中,容器是多孔板的孔)中沉积染色的 B 细胞群体的单细胞,

[0105] d) 在饲养细胞和饲养混合物(在一个实施方案中,饲养细胞是 EL-4B5 细胞,在一个实施方案中,饲养混合物是天然的 TSN(来自与 B 细胞所来源的物种相同的实验动物的胸腺细胞的培养物的上清液),在一个实施方案中,饲养混合物是合成的饲养混合物)存在的情况下培养沉积的各个 B 细胞,

[0106] e) 测定各个 B 细胞的培养物中分泌的抗体的结合特异性,

[0107] f) 分离分泌具有期望的结合特异性的抗体的 B 细胞的总 RNA,

[0108] g) 用对轻链可变域和重链可变域特异的引物,用 polyA⁺ 提取的 mRNA 进行 RT-PCR,

[0109] h) 测定特异性结合抗体的轻链可变域和重链可变域的氨基酸序列,

[0110] i) 将编码单克隆抗体轻链可变域和重链可变域的核酸引入用于表达抗体的各个表达盒中,

[0111] j) 将核酸引入到细胞中,

[0112] k) 培养细胞,并从细胞或细胞培养上清液中回收抗体,从而产生抗体。

[0113] 具体的实施方案

[0114] 在本文报道的方法中,在未中间分离和分析克隆的中间质粒的情况下,进行编码抗体(轻链和重链)可变域的核酸区段的分离,并将分离的核酸区段插入到真核表达质粒(每一表达盒分别用于一个轻链和重链)中。因此,在本文报道的方法中,不需要例如通过分析分离的经转化的大肠杆菌细胞,来中间克隆、分离和分析中间盒/质粒。在一个实施方案中,在未中间分离和分析克隆的中间质粒的情况下进行本文中报道的方法。

[0115] 已经发现,在本文中报道的方法中,可将特异性聚合酶链反应后获得的编码抗体的重链和轻链可变域的各个核酸片段分别插入到真核表达构建体中(每一真核表达构建体用于一个链),并在不需要中接种(plating)的情况下进行放大,所述中接种用于挑选和分析获自经转化的细菌的单个克隆的质粒 DNA。

[0116] 通常,将限制酶切割位点分别设计到正义和反义引物中,以允许将 PCR 片段插入到合适设计的表达载体中。然而,连接过程的相对高度混杂导致了相当大的数量的各个质粒克隆,其含未插入核酸片段(“空载体”)、含以错误方向插入的核酸片段或者仅含待克隆核酸的不完全片段。该问题通常通过将连接反应物接种在固体培养基上,通过分离各个细菌克隆解决。然后挑选这些细菌克隆中的几个,培养于液体培养物中,并且针对所插入的核酸片的方向和完整性,分析这些克隆中含有的各个质粒。然后选择一个正确装配的质粒并进一步扩增,以用于例如所编码的多肽的重组表达。尽管该方法是一种用于克隆小的有限数量的 DNA 片段的多次测试的方法,但由于需要挑选、扩增和分析源自如上所述的单个克隆的质粒 DNA,所以当需要克隆大量的核酸片段时,该方法是繁琐、费力和费时的。

[0117] 因此,已经发现,可以在不需要中间分离和分析单个克隆的情况下,在一个连贯的

工作流程中进行从 DNA 片段的最初产生以及克隆到表达载体中直到重组表达通过各个质粒载体编码的多肽的整个工作流程。已经发现,将不依赖于连接的克隆作为一种方法应用于改进上述工作流程是有利的。因此,在一个实施方案中,通过不依赖于连接的克隆插入到真核表达质粒中。

[0118] 不依赖于连接的克隆同样不需要比通过限制和连接的常规克隆更高效,即在该意义上不需要获得的各个克隆的数目显著更高。但由于该方法基于互补单链 DNA 突出端的序列特异性退火,而不是用于装配复杂分子的酶促连接,所以该方法包含了待克隆的各个核酸片段的显著更长的互补单链端。因此,与通过限制酶产生的 2-4 个核苷酸对比,在不依赖于连接的克隆中通常使用包括 15-30 个核苷酸的单链核苷酸突出端。此外,由于在不依赖于连接的克隆中不存在连接酶,所以不会发生空载体的再连接。因此,在不依赖于连接的克隆中,就大小、方向和完整性而言,增加了核酸片段正确插入到载体的比例,而且同时减少了完全不含插入核酸片段的“空的”再连接载体的比例,以及含缺损 DNA 片段的质粒的频率。事实上,通过不依赖于连接的克隆获得的克隆产物的分析显示,全部质粒分子的 90% 以上都含有以正确方向全长插入的核酸。

[0119] 已经发现,由于绝大多数由此产生的全部质粒分子都含有正确插入的核酸片段,所以可以在液体培养物中培养并放大转化细菌的整个库,而不需要将转化的细菌接种在固体培养基上、分离单个克隆,以及分析和分离各个质粒 DNA 克隆的中间步骤。使用本文中报道的方法,可以实现所需时间和劳动的减少。使用此种改进的方法,可以进行该过程的自动化。

[0120] 下表概述了经典方法与本文中报道方法之间的差异。可以看出,所需步骤的数目可以减少 40% 以上。

[0121] 表

[0122]

经典方法	不依赖于连接的方法
产生和纯化 PCR 片段	产生和纯化 PCR 片段
制备用于连接的载体	制备用于退火的载体
限制酶处理	T4-DNA 聚合酶处理
纯化 DNA 插入物	-
将片段与制备的载体连接	将片段与制备的载体退火
转化到感受态细菌中	转化到感受态细菌中
接种到固体培养基上并培养	在液体培养物中大批培养
挑选各个菌落(克隆)	-
在液体培养物中培养克隆	-

从菌落中分离质粒 DNA	-
分析来自菌落的质粒 DNA	-
在液体培养物中培养正确的克隆	-
分离质粒 DNA	分离质粒 DNA
用表达质粒转染真核细胞	用表达质粒转染真核细胞

[0123] - 备注 :不需要进行

[0124] 可以使用免疫实验动物后的任一时间点获得的 B 细胞进行本文中报道的方法。

[0125] 可以在免疫后初期进行本文中报道的方法,以便可以早在第一次免疫实验动物后三周分离编码第一抗体的核酸。

[0126] 由于来源于兔 B 细胞的杂交瘤导致较差地产生克隆,所以本文中报道的方法尤其适合于分离来自兔 B 细胞的编码可变域的核酸片段。此外,通常使用的骨髓瘤融合配偶体的内源性轻链转录物会干扰来自兔衍生杂交瘤的编码可变域的核酸片段的分离。

[0127] 与经典方法比较,本文中报道的方法更快。

[0128] 在一个实施方案中,B 细胞是人类 B 细胞、小鼠 B 细胞、大鼠 B 细胞、兔 B 细胞、仓鼠 B 细胞或者来源于转基因动物的 B 细胞。在一个实施方案中,B 细胞是兔 B 细胞、人类 B 细胞或者来源于转基因动物的 B 细胞。

[0129] 转基因动物是这样的动物,其中内源性 Ig 基因座已经失活或者去除,并且所述动物包含活化的或者有功能的人 Ig 基因座。

[0130] 在一个实施方案中,B 细胞是经免疫的实验动物的 B 细胞。

[0131] 在一个实施方案中,B 细胞是经免疫的人个体或者在患病后仍存活的人个体或者患慢性病的人的 B 细胞。

[0132] 在一个实施方案中,B 细胞是单个沉积的抗体分泌 B 细胞。

[0133] 在一个实施方案中,培养 B 细胞 6 至 8 代。

[0134] 在一个实施方案中,培养 B 细胞直到获得约 10 至约 100 个细胞。

[0135] 在一个实施方案中,培养 7 天后 B 细胞产生了约 10ng/ml 的抗体。在一个实施方案中,培养 7 天后 B 细胞产生了约 20ng/ml 的抗体。

[0136] 已经发现,如果使用产生少于 10ng/ml 抗体的 B 细胞,那么也可以进行本文中报道的方法,但扩增效率较低。

[0137] 在一个实施方案中,通过 RT-PCR 分离和 / 或扩增编码可变域的核酸片段。

[0138] 在一个实施方案中,编码轻链可变域的核酸片段和编码重链可变域的核酸片段是关联核酸。在一个实施方案中,从相同的细胞和 / 或其子代中分离编码重链和轻链可变域的核酸片段。

[0139] 在一个实施方案中,B 细胞是兔 B 细胞,并且使用 SEQ ID NO:5 (AAGCTTGCCACCATGGA GACTGGGCTGCGCTGGCTTC) 和 SEQ ID NO:6 (CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG) 的引物分离编码重链可变域的核酸。

[0140] 在一个实施方案中,B 细胞是兔 B 细胞,并且使用 SEQ ID NO:7 (AAGCTTGCCACCATGGA

CAYGAGGGCCCCACTC) 和 SEQ ID NO:8 (CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC) 的引物分离编码轻链可变域的核酸。

[0141] 类似地,可以设计用于扩增例如大鼠、小鼠或人类免疫球蛋白 V 结构域基因区段的引物。在一个实施方案中,引物针对第一构架区中的序列。参见例如 van Dongen, J. J. M., 等人 Leukemia17(2003)2257 ;Widhopf, G. F., 等人 Blood111(2008)3137 ;Fais, F., 等人 J. Clin. Invest. 102(1998)1515for human B-cells ;对于鼠 B 细胞,参见例如 Wang, Z., 等人 J. Immunol. Methods. 233(2000)167 ;Jones, T. 和 Bendig, M., Bio/Technology90(1991)88。

[0142] 在一个实施方案中,去除 PCR 引物后,在不纯化的情况下使用扩增的核酸。

[0143] 在一个实施方案中,去除全部 PCR 引物后,在不纯化的情况下使用扩增的核酸。

[0144] 在一个实施方案中,通过测序和不依赖于连接的克隆 (SLIC),将编码可变域的核酸插入到真核表达质粒中。

[0145] 在一个实施方案中,插入不需要限制酶切割位点。

[0146] 在一个实施方案中,插入不需要磷酸酶处理核酸片段。

[0147] 在一个实施方案中,整合不需要酶促连接。

[0148] 在一个实施方案中,在不存在用于产生单链延伸的核苷酸的情况下应用 T4DNA 聚合酶。

[0149] 在一个实施方案中,在插入步骤中使用约 200ng 的核酸 (= PCR 产物)。在一个实施方案中,使用约 100ng 的核酸。在一个实施方案中,使用约 50ng 的核酸。

[0150] 在一个实施方案中,质粒与核酸的比例为约 1:2 (w/w)。在一个实施方案中,在插入步骤中使用约 100ng 的质粒和约 200ng 的核酸。

[0151] 在一个实施方案中,该方法是高通量方法。

[0152] 在一个实施方案中,针对至少 10 个 B 细胞克隆平行进行该方法。

[0153] 在一个实施方案中,从扩增产物开始直到重组表达抗体的方法的效率超过 50%。

[0154] 已经发现,在本文中报道的方法中尤其适合于应用从大肠杆菌细胞库中获得的核酸库,所述大肠杆菌细胞库含装配的和 / 或扩增的分别用于抗体轻链和重链的抗体表达质粒。因此,可以将单个克隆的核酸扩增期间的潜在误差拉平或者掩盖或者降低至背景水平。

[0155] 在一个实施方案中,核酸是从大肠杆菌细胞库中获得的核酸库,所述大肠杆菌细胞库含装配的和 / 或扩增的分别用于抗体轻链和重链的抗体表达质粒。

[0156] 已经发现,必须在测序步骤之前去除 PCR 引物或者也必须纯化 PCR 产物。该分离 / 纯化增加了测序效率。

[0157] 已经发现,有利的是扩增质粒的主链,其不包括编码可变域的核酸。

[0158] 在一个实施方案中,在扩增之前线性化载体 (或质粒) 主链从其扩增的质粒。在一个实施方案中,在扩增之前,通过使用两种或多种不同的限制酶线性化质粒。

[0159] 在一个实施方案中,用甲基化依赖的限制酶,例如 DpnI 消化扩增产物。

[0160] 这允许随后的方法步骤更灵活且效率更高。

[0161] 在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0162] - 从已免疫的实验动物的抗体产生 B 细胞中提取总 RNA,

[0163] - 从提取的 polyA⁺mRNA 合成 / 反转录单链 cDNA,

[0164] - 使用物种特异性引物进行 PCR,

- [0165] - 去除 PCR 引物 / 纯化 PCR 产物,
- [0166] - 任选地测序 PCR 产物,
- [0167] - 用 T4 聚合酶温育 PCR 产物,
- [0168] - 线性化和扩增质粒 -DNA,
- [0169] - 用 T4 聚合酶温育扩增的质粒 -DNA,
- [0170] - 测序编码可变域的核酸并将其不依赖于连接地克隆到扩增的质粒中,
- [0171] - 从转化了质粒的大肠杆菌细胞库中制备质粒,
- [0172] - 使用前述步骤中制备的质粒转染真核细胞,
- [0173] - 表达抗体。

[0174] 在一个实施方案中,使用 SEQ ID NO:9 (GTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTG) 和 SEQ ID NO:10 (CCCTCRTGTCCATGGTGGCAAGCTTCCTCTGTGTTTCAGTGCTG) 的引物扩增编码轻链的质粒主链 DNA。

[0175] 在一个实施方案中,使用 SEQ ID NO:11 (TGGGAACCTCGGGCACCCCTACCAATGG) 和 SEQ ID NO:12 (GCCCAGTCTCCATGGTGGCAAGCTTCCTCTGTGTTTCAGTGCTG) 的引物扩增编码重链的质粒主链 DNA。

[0176] 提供了以下实施例和序列列表,以帮助理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求中描述。应当理解,在不背离本发明精神的情况下可以对所述方法进行修改。

[0177] 序列:

- [0178] SEQ ID NO:1 连接肽 1
- [0179] SEQ ID NO:2 连接肽 2
- [0180] SEQ ID NO:3 连接肽 3
- [0181] SEQ ID NO:4 连接肽 4
- [0182] SEQ ID NO:5 重链可变域分离引物 1 (rb-VH3-23-Slic-s001 引物)
- [0183] SEQ ID NO:6 重链可变域分离引物 2 (rb-CH1rev-2 引物)
- [0184] SEQ ID NO:7 轻链可变域分离引物 1 (rb-V- κ -Slic-s001 引物)
- [0185] SEQ ID NO:8 轻链可变域分离引物 1 (rbCk1-rev2 引物)
- [0186] SEQ ID NO:9 轻链质粒扩增引物 1 (8011-Slic-s001 引物)
- [0187] SEQ ID NO:10 轻链质粒扩增引物 2 (8000-Slic-as002 引物)
- [0188] SEQ ID NO:11 重链质粒扩增引物 1 (8001-Slic-s001 引物)
- [0189] SEQ ID NO:12 重链质粒扩增引物 2 (8001-Slic-as002 引物)
- [0190] SEQ ID NO:13 rb-V- κ -HindIII 引物
- [0191] SEQ ID NO:14 rb-C- κ -NheI 引物
- [0192] SEQ ID NO:15 rb-CH1rev-1 引物
- [0193] SEQ ID NO:16 rbVH3-23for3 引物
- [0194] SEQ ID NO:17 bcPCR-huC γ -rev 引物
- [0195] SEQ ID NO:18 bcPCR-FHLC-1 前导序列 -fw 引物
- [0196] SEQ ID NO:19 bcPCR-huC κ -rev 引物
- [0197] SEQ ID NO:20 bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-as 引物
- [0198] SEQ ID NO:21 bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-s 引物

- [0199] SEQ ID NO:22 bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-s 引物
- [0200] SEQ ID NO:23 bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-as 引物
- [0201] SEQ ID NO:24 SLIC-hu-VH 通用 -for 引物
- [0202] SEQ ID NO:25 SLIC-hu-VH6-for 引物
- [0203] SEQ ID NO:26 hu-CHI γ -rev 引物
- [0204] SEQ ID NO:27 SLIC-huVk2-for 引物
- [0205] SEQ ID NO:28 SLIC-huVk3-for 引物
- [0206] SEQ ID NO:29 SLIC-huVk5-for 引物
- [0207] SEQ ID NO:30 SLIC-huVk7-for 引物
- [0208] SEQ ID NO:31 SLIC-huVk8-for 引物
- [0209] SEQ ID NO:32 SLIC-huVk1long-for 引物
- [0210] SEQ ID NO:33 SLIC-huVk2longw-for 引物
- [0211] SEQ ID NO:34 huCk-rev 引物
- [0212] SEQ ID NO:35 SLIC-huV11-for 引物
- [0213] SEQ ID NO:36 SLIC-huV12-for 引物
- [0214] SEQ ID NO:37 SLIC-huV13-for 引物
- [0215] SEQ ID NO:38 SLIC-huV14-for 引物
- [0216] SEQ ID NO:39 SLIC-huV15-for 引物
- [0217] SEQ ID NO:40 SLIC-huV16-for 引物
- [0218] SEQ ID NO:41 SLIC-huV17-for 引物
- [0219] SEQ ID NO:42 SLIC-huV18-for 引物
- [0220] SEQ ID NO:43 SLIC-huV19-for 引物
- [0221] SEQ ID NO:44 SLIC-huV λ 10-for 引物
- [0222] SEQ ID NO:45 huCl-1-rev 引物
- [0223] SEQ ID NO:46 huIg-PCR- 载体引物 -as
- [0224] SEQ ID NO:47 huIg-PCR- 载体引物 -VH-s
- [0225] SEQ ID NO:48 huIg-PCR- 载体引物 -as κ
- [0226] SEQ ID NO:49 huIg-PCR- 载体引物 -VK-s
- [0227] SEQ ID NO:50 huIg-PCR- 载体引物 -as λ
- [0228] SEQ ID NO:51 huIg-PCR- 载体引物 -VL-s

实施例：

[0229] 实施例 1：

[0230] 关联抗体可变区基因区段的克隆和表达

[0231] a) RNA 提取

[0232] 通过加入 100 μ l 含 10 μ l/ml2- 巯基乙醇的 RLT 缓冲液裂解细胞, 并通过重复地用移液器吹吸混合。将裂解物直接用于 RNA 分离或者在制备 RNA 前冷冻储存于 -20°C 。使用总 RNA 分离试剂盒 NucleoSpin (Total RNA Isolation Kit NucleoSpin) (Machery&Nagel), 根据厂商说明制备 RNA。

[0233] b) 第一链 cDNA 合成

[0234] 使用 Super Script III 第一链合成 SuperMix (Super Script III first-strand synthesis SuperMix) (Invitrogen), 根据厂商说明, 通过反转录 mRNA 产生 cDNA。在第一步中, 将 6 μ l 分离的 mRNA、1 μ l 退火缓冲液以及 1 μ l (50 μ M) oligo dT 混合, 在 65°C 温育 5 分钟, 然后立即放置在冰上约 1 分钟。随后, 在冰上加入 10 μ l 2x 第一链反应混合物 (First-Strand Reaction Mix) 和 SuperScript™ III/RNaseOUT™ 酶混合物 (SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix)。混合后, 在 50°C 温育反应物 50 分钟。通过在 85°C 温育 5 分钟终止反应。终止后, 将反应混合物放置于冰上。

[0235] c) 聚合酶链反应 (PCR)

[0236] 使用 AccuPrime Pfx SuperMix (Invitrogen), 根据厂商说明实施聚合酶链反应。在分开的反应中扩增轻链和重链可变区。使用与靶抗体表达载体具有 25bp 重叠的 PCR 引物 (0.2 μ M/ 反应)。PCR 后, 将 8 μ l 的 PCR 反应混合物用于 48 孔 eGels (Invitrogen) 分析。

[0237] d) PCR 产物的纯化

[0238] 使用 NucleoSpin® 96 Extract II 试剂盒 (NucleoSpin® 96 Extract II kit) (Machery&Nagel), 根据厂商说明去除残余的 PCR 引物。

[0239] e) 序列测定

[0240] 通过测序 PCR 产物获得编码抗体重链可变域和轻链可变域的 DNA 序列。

[0241] f) 质粒 -DNA 的制备

[0242] 首先通过限制酶消化线性化质粒 DNA, 其待用作编码抗体重链和轻链可变域的 PCR 产物克隆的接受者。随后, 通过制备的琼脂糖电泳纯化线性化的质粒 DNA, 并从凝胶中提取所述质粒 DNA (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen)。将纯化的质粒 DNA 作为模板加入到 PCR 方案中, 所述 PCR 方案使用与待克隆的 PCR 产物具有重叠 (20-25bp) 的引物。使用 AccuPrime Pfx SuperMix (Invitrogen) 实施 PCR。

[0243] g) 克隆

[0244] 使用 Haun, R. S., 等人 (BioTechniques 13(1992) 515-518) 和 Li, M. Z., 等人 (Nature Methods 4(2007) 251-256) 所述的“不依赖于位点和连接的克隆”方法 (SLIC), 将 PCR 产物克隆到表达载体中。在 dNTP 不存在的情况下, 在 25°C 用 0.5U T4DNA 聚合酶 (Roche Applied Sciences, Mannheim, 德国) / 每 1 μ g DNA 处理纯化的载体和插入物 45 分钟, 以产生匹配的突出端。通过加入十分之一反应体积的 10mM dCTP 溶液 (Invitrogen) 终止反应。将 T4 处理的载体和插入 DNA 片段以 1:2 (w/w) (例如 100ng:200ng) 的质粒:插入物比例合并, 并通过在 37°C 加入 RecA Protein (New England Biolabs) 和 10x RecA 缓冲液重组 30 分钟。随后, 使用标准的化学转化方法, 将 5 μ l 每一产生的重链和轻链表达质粒用于转化 MultiShot Strip Well TOP10 化学感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen)。再生 (在 37°C 度振荡经转化的大肠杆菌细胞 45 分钟) 后, 将全部转化混合物转移到每孔含 2ml 补充了氨苄青霉素的 LB 培养基的 DWP96 (深孔板) 中。在 37°C, 在振荡器中培养细胞 20 小时。在以后的步骤中, 使用 NucleoSpin96 Plasmid Mini Kit (Macherey&Nagel) 纯化编码免疫球蛋白重链和轻链的质粒 DNA, 用选定的限制酶消化, 并在 48 孔 eGels (Invitrogen) 上分析所述质粒 DNA。平行地, 制备用于储存的甘油原种。

[0245] h) 在真核细胞中转染和表达重组抗体

[0246] 在 37℃, 在含 8% CO₂ 的大气中, 在 F17 培养基 (Gibco) 中以 120rpm 振荡培养 HEK293 细胞。在转染前一天分传细胞, 并以 0.7-0.8x10⁶ 细胞/ml 的密度接种。转染当天, 在 48 孔深孔板中, 用悬浮在 1 μl 1293-free 培养基 (Novagen) 和 80 μl OptiMEM[®] 培养基 (Gibco) 中的 0.5 μg HC 质粒和 0.5 μg LC 质粒转染 2ml 体积中的 1-1.5x10⁶ HEK293 细胞。在 37℃ 和 8% CO₂ 下, 以 180rpm 培养培养物 7 天。7 天后, 收获培养上清液, 过滤并分析抗体含量和特异性。

[0247] 实施例 2

[0248] B 细胞生产力对比扩增效率

[0249] 已经发现, 应当基于在饲养细胞, 例如 EL4-B5 细胞和 Zubler 混合物存在的情况下, 通过培养单个沉积的 B 细胞获得的表达产率 (抗体滴度) 选择用于本文中报道方法的 B 细胞。如下表所示, 获得的表达产率应当高于特定的阈值。

[0250] 表: 在单细胞培养上清液中, 取决于兔 IgG 浓度的成功序列产生

	兔 IgG [ng/ml]	% HC 序列	% LC 序列
[0251] 实验 1	<20ng/ml	0 % (0/14)	0 % (0/14)
实验 2	>20ng/ml	85 % (52/61)	85 % (52/61)

[0252] 实施例 3

[0253] 引物

[0254] 用于表达兔抗体的 B 细胞的 B 细胞 PCR 的引物

[0255] 引物对 1:

[0256] LC- 引物

[0257] -rb-V-κ -HindIII_s (SEQ ID NO:13):

[0258] GATTAAGCTTATGGACAYGAGGGCCCCCACTC

[0259] -rb-C-κ -NheI_s (SEQ ID NO:14):

[0260] GATCGCTAGCCCTGGCAGGCGTCTCRCTCTAACAG

[0261] HC- 引物

[0262] -rb-CH1rev-1 (SEQ ID NO:15):

[0263] GCAGGGGGCCAGTGGGAAGACTG

[0264] -rbVH3-23for3 (SEQ ID NO:16):

[0265] caccatggagactgggctgcgctggcttc

[0266] 引物对 2:

[0267] LC- 引物

[0268] -rb-V-κ -Slic-s001 (SEQ ID NO:18):

[0269] AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC

[0270] -rbCk1-rev2 (SEQ ID NO:19):

[0271] CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

[0272] HC- 引物

- [0273] -rb-VH3-23-Slic-s001 (SEQ ID NO:20) ;
- [0274] AAGCTTGCcaccatggagactgggctgcgctggcttC
- [0275] -rb-CH1rev-2 (SEQ ID NO:21) ;
- [0276] CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
- [0277] 用于扩增重链表达质粒主链的引物 ;
- [0278] -8001-Slic-s001 (SEQ ID NO:22) ;
- [0279] TGGGAACCTCGGGCACCCCTACCAATGG
- [0280] -8001-Slic-as002 (SEQ ID NO:23) ;
- [0281] GCCCAGTCTCCATGGTGGCAAGCTTCTCTGTGTTTCAGTGCTG
- [0282] 用于扩增 κ 轻链表达质粒主链的引物 ;
- [0283] -8011-Slic-s001 (SEQ ID NO:24) ;
- [0284] GTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTG
- [0285] -8000-Slic-as002 (SEQ ID NO:25)
- [0286] CCCTCRTGTCCATGGTGGCAAGCTTCTCTGTGTTTCAGTGCTG
- [0287] 用于表达人抗体的兔 B 细胞 (来源于转基因兔) 的 B 细胞 PCR 的引物
- [0288] 用于扩增重链可变域的引物
- [0289] HC-Up
- [0290] -rb-VH3-23-Slic-s001 (SEQ ID NO:20) ;
- [0291] AAGCTTGCcaccatggagactgggctgcgctggcttC
- [0292] -bcPCR-huC γ -rev (SEQ ID NO:17) ;
- [0293] CCCCCAGAGGTGCTCTTGA
- [0294] 用于扩增轻链可变域的引物
- [0295] -bcPCR-FHLC- 前导序列 -fw (SEQ ID NO:18) ;
- [0296] ATGGACATGAGGGTCCCCGC
- [0297] -bcPCR-huC κ -rev (SEQ ID NO:19) ;
- [0298] GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC
- [0299] 用于扩增重链质粒主链的引物 ;
- [0300] -bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-as (SEQ ID NO:20) ;
- [0301] CAGCCCAGTCTCCATGGTGGCAAGCTTCTCTGTGTTTCAGTGCTG
- [0302] -bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-s (SEQ ID NO:21) ;
- [0303] CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG
- [0304] 用于扩增 κ 轻链质粒主链的引物 ;
- [0305] -bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-s (SEQ ID NO:22) ;
- [0306] GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
- [0307] -bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-as (SEQ ID NO:23) ;
- [0308] GCGGGGACCCTCATGTCCATGGTGGCAAGCTTCTCTG
- [0309] 用于来自人供体的 B 细胞的 B 细胞 PCR 的引物
- [0310] 用于扩增重链可变域的引物
- [0311] -SLIC-hu-VH 通用 -for (SEQ ID NO:24) ;

- [0312] AGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAGGTGCAGCTGKTGSAGTCTGS
- [0313] -SLIC-hu-VH6-for (SEQ ID NO:25) ;
- [0314] AGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCAGGTRCAGCTGCAGSAGTC
- [0315] -hu-CHI γ -rev (SEQ ID NO:26) ;
- [0316] GTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTT
- [0317] 用于扩增 κ 轻链可变域的引物
- [0318] -SLIC-huVk2-for (SEQ ID NO:27) ;
- [0319] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGATGTTGTGATGACTCAGTCT
- [0320] -SLIC-huVk3-for (SEQ ID NO:28) ;
- [0321] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
- [0322] -SLIC-huVk5-for (SEQ ID NO:29) ;
- [0323] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGACATCGTGATGACCCAG
- [0324] -SLIC-huVk7-for (SEQ ID NO:30) ;
- [0325] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
- [0326] -SLIC-huVk8-for (SEQ ID NO:31) ;
- [0327] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGAWRTTGTGMTGACKCAGTCTCC
- [0328] -SLIC-huVk11long-for (SEQ ID NO:32) ;
- [0329] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGACATCCRGWTGACCCAGTCT
- [0330] -SLIC-huVk21ongw-for (SEQ ID NO:33) ;
- [0331] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCGATRTTGTGATGACYCAGWCT
- [0332] -huCk-rev (SEQ ID NO:34) ;
- [0333] AACTCTCCCCTGTTGAAGCTC
- [0334] 用于扩增 λ 轻链可变域的引物
- [0335] -SLIC-huV11-for (SEQ ID NO:35) ;
- [0336] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGTCTGTGYTGACKCAG
- [0337] -SLIC-huV12-for (SEQ ID NO:36) ;
- [0338] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGTCTGCCCTGACTCAG
- [0339] -SLIC-huV13-for (SEQ ID NO:37) ;
- [0340] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCTCTATGAGCTGAYWCAG
- [0341] -SLIC-huV14-for (SEQ ID NO:38) ;
- [0342] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGCYTGCTGACTCAA
- [0343] -SLIC-huV15-for (SEQ ID NO:39) ;
- [0344] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGSCTGTGCTGACTCAG
- [0345] -SLIC-huV16-for (SEQ ID NO:40) ;
- [0346] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCAATTTTATGCTGACTCAG
- [0347] -SLIC-huV17-for (SEQ ID NO:41) ;
- [0348] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGRCTGTGGTGACTCAG
- [0349] -SLIC-huV18-for (SEQ ID NO:42) ;
- [0350] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGACTGTGGTGACCCAG

- [0351] -SLIC-huV19-for (SEQ ID NO:43) ;
[0352] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCWGCCTGTGCTGACTCAG
[0353] -SLIC-huV1lambda10-for (SEQ ID NO:44) ;
[0354] TAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTCCCAGGCAGGGCTGACTCAG
[0355] -huCl-1-rev (SEQ ID NO:45) ;
[0356] TCTCCACGGTGCTCCCTTC
[0357] 用于扩增人免疫球蛋白表达质粒的引物
[0358] 重链表达质粒主链的扩增
[0359] -huIg-PCR- 载体引物 -as (SEQ ID NO:46) ;
[0360] GGAATGCACACCTGTAGCTGTTGCTA
[0361] -huIg-PCR- 载体引物 -VH-s (SEQ ID NO:47) ;
[0362] AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
[0363] κ 轻链表达质粒主链的扩增
[0364] -huIg-PCR- 载体引物 -as κ (SEQ ID NO:48) ;
[0365] GGAATGCACACCTGTAGCTGTTGCTA
[0366] -huIg-PCR- 载体引物 -VK-s (SEQ ID NO:49) ;
[0367] GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
[0368] λ 轻链表达质粒主链的扩增 ;
[0369] -huIg-PCR- 载体引物 -as λ (SEQ ID NO:50) ;
[0370] GGAATGCACACCTGTAGCTGTTGCTA
[0371] -huIg-PCR- 载体引物 -VL-s (SEQ ID NO:51) ;
[0372] GAAGGGAGCACCGTGGAGA

[0373] 实施例 4

[0374] 与单个克隆比较的库

[0375] 如实施例 1 中所述, 扩增抗体可变域基因区段, 并克隆到各个表达载体中。为了测定来源于库克隆的序列相对于挑选自单个菌落的常规克隆的序列的保真性, 将转化混合物分成两半; 将一半常规接种, 以产生单个菌落, 而将另一半直接培养为库-培养物。随后, 制备来自库转化的大肠杆菌细胞以及来自挑选自常规平板的单个菌落的质粒, 并测定克隆的可变区基因区段的序列。如下表中所示, 80% 至 100% 之间克隆衍生的质粒含有正确的可变区基因区段, 其与获自库转化的序列相同。

[0376]

B-cell 克隆号	最高丰度 LC 序列的数目/ 序列的总数	最高丰度 HC 序列的数 目/序列的总数
5	10/11	8/12
6	11/12	12/12
10	2/2	8/12
35	6/6	7/12
38	11/12	12/12
39	9/11	10/12
42	3/5	11/12
50	6/6	6/7

[0377] 获自经测序的库培养的细胞的编码 VH 和 VL 的核酸序列与获自经测序的各个克隆的序列的最高丰度序列相同。

[0001]

序列表

- <110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司
- <120> 用于克隆和表达关联抗体可变区基因区段的快速方法
- <130> 30785 WO
- <150> EP 11194861.8
- <151> 2011-12-21
- <160> 51
- <170> PatentIn 版本 3.5
- <210> 1
- <211> 2
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 连接肽 1
- <400> 1
- Gly Ser
1
- <210> 2
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 连接肽 2
- <400> 2
- Gly Gly Ser
1
- <210> 3

[0002]

<211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 连接肽 3

<400> 3

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 连接肽 4

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IIC 分离引物

<400> 5

aagcttgcca ccatggagac tgggetgcgc tggettc

37

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0003]

<220>		
<223>	HC 分离引物 2	
<400>	6	
	ccattggtga gggtgcccga g	21
<210>	7	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	LC 分离引物 1	
<400>	7	
	aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc	34
<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	LC 分离引物 2	
<400>	8	
	cagagtrctg ctgaggttg aggtac	26
<210>	9	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	LC 质粒扩增引物 1	
<400>	9	
	gtacctacaa cctcagcagc actctg	26
<210>	10	

[0004]

- <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> LC 质粒扩增引物 2

 <400> 10
 ccctcrtgtc catggtggca agcttcctct gtgttcagtg ctg 43
- <210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> HC 质粒扩增引物 1

 <400> 11
 tgggaacteg ggcacctca ccaatgg 27
- <210> 12
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> HC 质粒扩增引物 2

 <400> 12
 gcccagtcctc catggtggca agcttcctct gtgttcagtg ctg 43
- <210> 13
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> rb-V-K-HindIII_s引物

 <400> 13

[0005]

gattaagctt atggacayga gggccccac tc 32

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> rb-C-K -NheIas 引物

<400> 14

gatcgttagc cctggcagc gtctcctct aacag 35

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> rb-CH1rev-1 引物

<400> 15

gcagggggcc agtgggaaga ctg 23

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> rbVH3-23for3 引物

<400> 16

caccatggag actgggctgc getggettc 29

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

[0006]

<220>		
<223>	bcPCR-huCy -rev 引物	
<400>	17	
	ccccagagg tgctcttgga	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	bcPCR-FHLC-前导序列-fw 引物	
<400>	18	
	atggacatga ggtccccgc	20
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	bcPCR-huCK -rev 引物	
<400>	19	
	gatttcaact gctcatcaga tgge	24
<210>	20	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-as 引物	
<400>	20	
	cagcccagte tccatggtgg caagettect ctgtgttcag tgctg	45
<210>	21	

[0007]

- <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> bcPCR-hu-HC-10600-SLIC-s 引物

 <400> 21
 ctccaagagc acctctgggg gcacag 26

 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-s 引物

 <400> 22
 gccatctgat ggcagttga aatc 24

 <210> 23
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> bcPCR-hu-LC-10603-SLIC-as 引物

 <400> 23
 gggggaccc tcatgtccat ggtggcaagc ttctcttg 38

 <210> 24
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> SLIC-hu-VH 通用-for 引物

 <400> 24

[0008]

agcaacagct acaggtgtgc attccgaggt gcagctgktg sagtctgs 48

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SLIC-hu-VH6-for 引物

<400> 25

agcaacagct acaggtgtgc attcccaggt rcagctgcag sagtc 45

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hu-CH1γ -rev 引物

<400> 26

gtccaccttg gtgttgctgg gctt 24

<210> 27

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SLIC-huVκ2-for 引物

<400> 27

tagcaacagc tacaggtgtg cattccgatg ttgtgatgac teagtct 47

<210> 28

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

[0009]

- <220>
 <223> SLIC-huVk3-for 引物

 <400> 28
 tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaaa ttgtgwtgac reagtct 47
- <210> 29
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> SLIC-huVk5-for 引物

 <400> 29
 tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaca tegtgatgac ccag 44
- <210> 30
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> SLIC-huVk7-for 引物

 <400> 30
 tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaaa ttgtgetgac teagtct 47
- <210> 31
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> SLIC-huVk8-for 引物

 <400> 31
 tagcaacagc tacaggtgtg cattccgawr ttgtgmtgac kcagtctcc 49
- <210> 32

[0010]

- <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> SLIC-huVk1long-for 引物

 <400> 32
 tagcaacagc tacaggtgtg cattccgaca tccrgwtgac ccagtct 47
- <210> 33
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> SLIC-huVk2longw-for 引物

 <400> 33
 tagcaacagc tacaggtgtg cattccgatr ttgtgatgac ycagwct 47
- <210> 34
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> huCk-rev 引物

 <400> 34
 acactctccc ctgttgaagc tc 22
- <210> 35
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> SLIC-huV11-for 引物

 <400> 35

[0011]

tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagt ctgtggtgac kcag	44
<210> 36	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SLIC-huV12-for 引物	
<400> 36	
tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagt ctgcctgac teag	44
<210> 37	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SLIC-huV13-for 引物	
<400> 37	
tagcaacagc tacaggtgtg cattcctcct atgagctgay wcag	44
<210> 38	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SLIC-huV14-for 引物	
<400> 38	
tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagc ytgigtgac teaa	44
<210> 39	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0012]

- <220>
 <223> SLIC-huV15-for 引物
- <400> 39
 tagcaacagc tacaggtgtg cattcccags ctgtgtgac tcag 44
- <210> 40
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> SLIC-huV16-for 引物
- <400> 40
 tagcaacagc tacaggtgtg cattccaatt ttatgtgac tcag 44
- <210> 41
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> SLIC-huV17-for 引物
- <400> 41
 tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagr ctgtgtgac tcag 44
- <210> 42
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> SLIC-huV18-for 引物
- <400> 42
 tagcaacagc tacaggtgtg cattcccaga ctgtgtgac ccag 44
- <210> 43

[0013]

- <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> SLIC-huV19-for 引物

 <400> 43
 tagcaacagc tacaggtgtg cattcccwgc ctgtgetgac tcag 44
- <210> 44
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> SLIC-huVA 10-for 引物

 <400> 44
 tagcaacagc tacaggtgtg cattcccagg cagggetgac tcag 44
- <210> 45
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> huCl-1-rev 引物

 <400> 45
 tetccacggt getcccttc 19
- <210> 46
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> huIg-PCR-载体引物-as

 <400> 46

[0014]

ggaatgcaca cctgtagctg ttgcta 26

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> huIg-PCR-载体引物-VH-s

<400> 47

aagcccagca acaccaaggt ggac 24

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> huIg-PCR-载体引物-as K

<400> 48

ggaatgcaca cctgtagctg ttgcta 26

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> huIg-PCR-载体引物-VK-s

<400> 49

gagcttcaac aggggagagt gt 22

<210> 50

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

[0015]

<220>

<223> huIg-PCR-载体引物-as λ

<400> 50

ggaatgeaca cctgtagctg ttgcta

26

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> huIg-PCR-载体引物-VL-s

<400> 51

gaagggagca ccgtggaga

19