



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03811298.1

[43] 公开日 2005 年 8 月 10 日

[11] 公开号 CN 1653335A

[22] 申请日 2003.4.16 [21] 申请号 03811298.1

[30] 优先权

[32] 2002.4.17 [33] US [31] 60/373,558

[86] 国际申请 PCT/US2003/011936 2003.4.16

[87] 国际公布 WO2003/088911 英 2003.10.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.17

[71] 申请人 罗伯特欧·克瑞

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 罗伯特欧·克瑞

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 7 页 说明书 21 页 附图 26 页

[54] 发明名称 免疫球蛋白通用文库

[57] 摘要

本发明描述了所感兴趣免疫球蛋白的文库，所述文库含有突变的所感兴趣免疫球蛋白，其中单个的预定氨基酸在所感兴趣免疫球蛋白的一个或多个互补决定区的一个或多个位点上被取代。所述文库含有一系列子文库，其中预定的氨基酸在所感兴趣免疫球蛋白的六个互补决定区(CDR)中的每一个上以及 CDR 的每一个可能的组合变体上“步移”，得到包含突变免疫球蛋白的子文库，其中所述突变免疫球蛋白在每个 CDR 的一个或多个位点上具有预定的氨基酸，总体来说在每一个 CDR 的每一个位点上都具有预定的氨基酸。本发明进一步包括通用文库，所述通用文库中对于作为单个的预定氨基酸的每一个天然存在的氨基酸都含有一个这样的文库，一共是二十个文库；而且还包括编码所述文库的核苷酸文库。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种所感兴趣的¹原型免疫球蛋白文库，包括突变的所感兴趣免疫球蛋白，其中单个预定氨基酸在所感兴趣免疫球蛋白的一个或多个互补决定区的一个或多个位点被取代，所述文库包括子文库，所述文库包括：
 - a) 含有所感兴趣原型球蛋白的子文库，
 - b) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中一个的一个或多个位点处被取代，六个互补决定区中的每个都有一个子文库，因而总共有 6 个子文库；
 - c) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中两个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的两个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；
 - d) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中三个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的三个的组合都有一个子文库，因而总共有 20 个子文库；
 - e) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中四个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的四个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；
 - f) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中五个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的五个的组合都有一个子文库，因而总共有 6 个子文库；

g) 含有突变免疫球蛋白的子文库,其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的全部六个互补决定区的一个或多个位点处被取代,

其中每个含有突变免疫球蛋白的子文库,都含有其中预定氨基酸在所述预定氨基酸被引入的互补决定区的每个位点都存在至少一次的突变免疫球蛋白。

2. 权利要求 1 的文库,其中所述所感兴趣免疫球蛋白是催化性抗体。
3. 权利要求 1 的文库,其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgG。
4. 权利要求 1 的文库,其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgM。
5. 权利要求 1 的文库,其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgA。
6. 权利要求 1 的文库,其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgD。
7. 权利要求 1 的文库,其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgE。
8. 权利要求 1 的文库,其中所述所感兴趣免疫球蛋白是免疫球蛋白的一个 Fab 片段。
9. 权利要求 1 的文库,其中所述感兴趣免疫球蛋白是一种单链免疫球蛋白。
10. 一种所感兴趣的 原型免疫球蛋白的通用文库,包括:

二十个单个的预定氨基酸文库,该文库由二十个天然存在的氨基酸中每一个氨基酸的单个预定氨基酸文库组成,其中每个单个预定氨基酸文库都包括突变的所感兴趣免疫球蛋白,其中单个预定氨基酸用步移法突变引入到突变免疫球

蛋白的一个或多个位点处，其中每个单个预定氨基酸文库都含有一组子文库，所述含有子文库的文库包括：

a) 含有所感兴趣的 原型球蛋白的子文库，

b) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区 其中一个的一个或多个位点处被取代，六个互补决定区中的每个都有一个子文库，因而总共有 6 个子文库；

c) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区 其中两个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的两个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；

d) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区 其中三个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的三个的组合都有一个子文库，因而总共有 20 个子文库；

e) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区 其中四个的一个或多个位点处被替换，每种可能的六个互补决定区中的四个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；

f) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区 其中五个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的五个的组合都有一个子文库，因而总共有 6 个子文库；

g) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的所有六个互补决定区的一个或多个位点处被取代，

其中每个含有突变免疫球蛋白的子文库，都含有其中预定氨基酸在所述预定氨基酸被引入的互补决定区的每个位点都存在至少一次的突变免疫球蛋白。

11. 一种所感兴趣的原型免疫球蛋白文库，包括编码突变的所感兴趣的免疫球蛋白的核苷酸，其中单个预定氨基酸在所感兴趣免疫球蛋白的一个或多个互补决定区的一个或多个位点被取代，所述文库含有子文库，所述文库包括：

a) 含有所感兴趣的原型球蛋白的子文库，

b) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中一个的一个或多个位点处被取代，六个互补决定区中的每个都有一个子文库，因而总共有 6 个子文库；

c) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中两个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的两个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；

d) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中三个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的三个的组合都有一个子文库，因而总共有 20 个子文库；

e) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中四个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的四个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；

f) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中五个的一个或多个位

点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的五个的组合都有一个子文库，因而总共有 6 个子文库；

g) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的所有六个互补决定区的一个或多个位点处被取代，

其中每个含有突变免疫球蛋白的子文库，都含有其中预定氨基酸在所述预定氨基酸被引入的互补决定区的每个位点都存在至少一次的突变免疫球蛋白。

12. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是一种催化性抗体。
13. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgG。
14. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgM。
15. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgA。
16. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgD。
17. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是 IgE。
18. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是一种免疫球蛋白的一个 Fab 片段。
19. 权利要求 11 的文库，其中所述所感兴趣免疫球蛋白是一种单链免疫球蛋白。

20. 一种所感兴趣的原型免疫球蛋白的通用文库，包括：

二十个单个预定氨基酸文库，所述文库由二十个天然存在的氨基酸中每一个的单个预定氨基酸文库组成，其中每个单个预定氨基酸文库都含有编码突变的所感兴趣免疫球蛋白的核苷酸，其中单个预定氨基酸用步移法突变引入到突变免疫球蛋白的一个或多个位点处，其中每个单个预定氨基酸文库都含有一组子文库，所述含有子文库的文库包括：

a) 含有所感兴趣的原型球蛋白的子文库，

b) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中一个的一个或多个位点处被取代，六个互补决定区中的每个都有一个子文库，因而总共有 6 个子文库；

c) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中两个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的两个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；

d) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中三个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的三个的组合都有一个子文库，因而总共有 20 个子文库；

e) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中四个的一个或多个位点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的四个的组合都有一个子文库，因而总共有 15 个子文库；

f) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的六个互补决定区其中五个的一个或多个位

点处被取代，每种可能的六个互补决定区中的五个的组合都有一个子文库，因而总共有6个子文库；

g) 含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在所述免疫球蛋白的所有六个互补决定区的一个或多个位点处被取代，

其中每个含有突变免疫球蛋白的子文库，都含有其中预定氨基酸在所述预定氨基酸被引入的互补决定区的每个位点都存在至少一次的突变免疫球蛋白。

免疫球蛋白通用文库

相关申请

本申请要求保护 2002 年 4 月 17 日申请的美国临时申请 No. 60/373,558 的权利。在此引入上述申请的全文作为参考。

发明背景

在蛋白质和功能研究中诱发突变是一种强有力的工具。可以在编码所感兴趣蛋白质的克隆基因的核苷酸序列中进行突变，所修饰的基因可以进行表达以产生蛋白质突变体。将野生型蛋白和所产生的突变体蛋白的性质进行比较，就有可能识别出对于蛋白的结构完整性和/或生化功能，例如其结合和/或催化活性所必须的单个氨基酸或氨基酸域。可以用一个蛋白产生多个突变体，但是要选择能提供信息的或具有所希望性质的突变体是很困难的，即使所选择的突变体包含的突变完全是在推定的蛋白的重要区域（例如在蛋白活性位点或其周围的区域）。例如，特定氨基酸的取代，缺失或插入都可以对蛋白质造成局部的或整体的影响。目前仍然需要能够系统评价蛋白突变效果的方法。

发明简述

本发明涉及所感兴趣免疫球蛋白的文库。所述的文库建立在所感兴趣的原型球蛋白的基础上，可以通过对原型球蛋白进行步移法突变获得。在一个实施方案中，本发明的单个预定氨基酸文库包括突变的所感兴趣免疫球蛋白，其中单个预定氨基酸在所感

兴趣免疫球蛋白的一个或多个互补决定区的一个或多个位点处被取代；所述文库包含一系列子文库，包括：a) 一个含有所感兴趣原型免疫球蛋白的子文库；b) 六个含有突变免疫球蛋白的子文库（所感兴趣免疫球蛋白的六个互补决定区中的每一个都有一个子文库），其中预定氨基酸只在该免疫球蛋白的六个互补决定区其中一个的一个或多个位点被取代；c) 15 个含有突变免疫球蛋白的子文库（每种可能的六个互补决定区之中的两个的组合都有一个子文库），其中预定氨基酸在六个互补决定区其中两个的一个或多个位点被取代；d) 20 个含有突变免疫球蛋白的子文库（每种可能的六个互补决定区之中的三个的组合都有一个子文库），其中预定氨基酸在六个互补决定区其中三个的一个或多个位点被取代；e) 15 个含有突变免疫球蛋白的子文库（每种可能的六个互补决定区之中的四个的组合都有一个子文库），其中预定氨基酸在六个互补决定区其中的四个的一个或多个位点被取代；f) 六个含有突变免疫球蛋白的子文库（每种可能的六个互补决定区之中的五个的组合都有一个子文库），其中预定氨基酸在六个互补决定区其中五个的一个或多个位点被取代；以及 g) 一个含有突变免疫球蛋白的子文库，其中预定氨基酸在全部六个互补决定区中的一个或多个位点被取代。每个含有突变免疫球蛋白的子文库都含有其中预定氨基酸在所述预定氨基酸被引入的互补决定区的每个位点上出现至少一次的突变免疫球蛋白。

预定氨基酸选自于 20 个天然存在的氨基酸。所感兴趣免疫球蛋白可以是整个免疫球蛋白，或者是免疫球蛋白的一个 Fab 片段，或者是免疫球蛋白的一条链。所感兴趣免疫球蛋白可以是免疫球蛋白的五种类型（IgG, IgM, IgA, IgD 或 IgE）中的任何一种。在一个实施方案中，所感兴趣的免疫球蛋白是催化性抗体。

本发明进一步涉及所感兴趣原型免疫球蛋白的通用文库，其中该通用文库包括 20 个上述的“单个预定氨基酸”文库，20 个天然存在的核苷酸中每一个都具有一个文库。本发明还涉及编码此单个预定氨基酸文库的核苷酸文库，以及编码通用文库的核苷酸文库。

这里所说的文库含有容易识别的突变免疫球蛋白，使得可以对所感兴趣原型免疫球蛋白的结合区域，以及每个特定的预定氨基酸在结合区域活性中所起的作用进行系统分析。所述文库可以为能改变所感兴趣免疫球蛋白与其抗原的相互作用的特定突变提供特定的信息，其中所述的相互作用包括在不同的互补决定区的氨基酸之间的多种相互作用，同时所述文库可避免与分析任意突变所产生的突变体相关的问题。

附图简述

图 1A-1B 显示了 GP-120 单链 FV 的全序列，包括核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 和编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。

图 2 显示了图 1A-1B 所示的 GP-120 scFV 基因的总装配示意图。

图 3 总结了通过本发明的方法得到的 scFV 基因文库，以及每个单独的文库产生的基因变体数目。

图 4 是图 2 所示的装配示意图中所使用的寡核苷酸集合。

图 5A-5B 是以多种不同的组合在 Fv 的单个 CDR 中引入三个 (3) 靶核苷酸，Ser, His 和 Asp 所用的寡核苷酸集合。集合序列用 IUPAC 混合碱基命名法给出，以大写字母表示，R=A 或者 G，Y=C 或者 T，M=A 或者 C，K=G 或者 T，S=C 或者 G，W=A 或

者 T; H=A 或者 C 或者 T, B=C 或者 G 或者 T, V=A 或者 C 或者 G, D=A 或者 G 或者 T。

图 6 是生成 GP-120 scFV 文库所进行的 VL 和 VH 基因装配策略, 其中六个 CDR 区域中的三个(3)同时进行突变以多种(8)不同的组合 (L1 到 L8) 生成选定的氨基酸 (Ser, His 和 Asp)。

图 7A-7B 是第一个 VL 区域 (6 个 CDR 区域中的第一个) 的 20 个单个寡核苷酸库, 每一个库都相应于 20 个天然氨基酸中的一个。

图 8A-8B 是第二个 VL 区域 (6 个 CDR 区域中的第二个) 的 20 个单个寡核苷酸库, 每一个库都相应于 20 个天然氨基酸中的一个。

图 9A-9B 是第三个 VL 区域 (6 个 CDR 区域中的第三个) 的 20 个单个寡核苷酸库, 每一个库都相应于 20 个天然氨基酸中的一个。

图 10A-10B 是第一个 VH 区域 (6 个 CDR 区域中的第四个) 的 20 个单个寡核苷酸库, 每一个库都相应于 20 个天然氨基酸中的一个。

图 11A-11B 是第二个 VH 区域 (6 个 CDR 区域中的第五个) 的 20 个单个寡核苷酸库, 每一个库都相应于 20 个天然氨基酸中的一个。

图 12A-12B 是第三个 VH 区域 (6 个 CDR 区域中的第六个) 的 20 个单个寡核苷酸库, 每一个库都相应于 20 个天然氨基酸中的一个。

图 13A-13D 是单个氨基酸的 CDR 库的分组。

发明详述

本发明涉及所感兴趣免疫球蛋白的文库，包括含有编码免疫球蛋白的核苷酸的文库，以及含有免疫球蛋白自身的文库。这里所说的“免疫球蛋白”是一种抗体蛋白，可以应答并结合特定的抗原。已知有五种，或者五类免疫球蛋白：IgG，IgM，IgA，IgD 和 IgE(参见，例如，Dictionary of Cell and Molecular Biology, Third Edition)。免疫球蛋白的基本形式是 IgG 形式：它包括两个相同的重链(H)和两个相同的轻链(L)，通过二硫键以“Y”的形状连接起来。重链包含四个区，包括三个恒定区(C_H)和一个可变区(V_H)。轻链具有一个恒定区(C_L)和一个可变区(V_L)。

每个重链可变区和每个轻链可变区都含有三个高度可变的环，也叫作互补决定区(CDR)。抗原结合位点(F_V)区(也称为“结合袋(binding pocket)”)包括这样的六个高度可变(CDR)环(三个在免疫球蛋白重链可变区(V_H)，三个在轻链可变区(V_L))。每个免疫球蛋白分子的 CDR 的残基与其它免疫球蛋白分子都不同，这使的抗原对于每个抗体都是特异的。

下面对每种免疫球蛋白进行简单描述。

免疫球蛋白 G (IgG)

IgG 是一类经典的免疫球蛋白；IgG 的分子量大约是 150 kD。如上所述，IgG 由两个相同的轻链和两个相同的重链组成。IgG 分子可以被蛋白水解为两个 Fab 片段和一个 Fc 片段。Fab 包括抗原结合位点(轻链和重链的可变区)，轻链的恒定区，重链的三

个恒定区中的一个。Fc 区域由其余的重链的固定区组成；它含有细胞结合位点和补体结合位点。

免疫球蛋白 M (IgM)

IgM 分子（分子量是大约 970kD）是由五个 IgG 类型的单体连接起来，在 J 链的辅助下，形成一个环形的五聚体。IgM 可结合补体；与细胞表面相结合的单个 IgM 分子可以溶解该细胞。IgM 在免疫反应中通常先于 IgG 并且第一个产生。

免疫球蛋白 A (IgA)

IgA 是一类在哺乳动物的血清和细胞外分泌物中发现的免疫球蛋白。在分泌物中，IgA 以 IgG 类型的单体的二聚体的形式存在（二聚体的分子量大约为 400 kD），通过短的 J 链连接起来，并且连接到分泌肽或转运肽上；在血清中，它们以单体的形式存在（分子量大约为 170 kD）。IgA 是对消化道和呼吸道感染提供局部免疫的主要方式。

免疫球蛋白 D (IgD)

IgD（分子量大约为 184 kD）在血清中的量很少，但是它是 B-淋巴细胞表面的主要免疫球蛋白，其中它起着抗原识别的作用。它的结构与 IgG 类似，但是重链是 类型的。

免疫球蛋白 E (IgE)

IgE（分子量大约为 188 kD）与即时的超敏感反应和寄生虫感染相关。它们在血清中的量很少，大部分是与具有 IgE 特异性的 Fc 受体（Fc R）的肥大细胞和嗜碱细胞结合。IgE 中碳水化合物含量很高，也存在于细胞外分泌物中。其重链是 类型的。

在优选的实施方案中，所感兴趣免疫球蛋白是 IgG 类免疫球蛋白。这里所说的“所感兴趣免疫球蛋白”指完整的免疫球蛋白（即含有两个完整的重链和两个完整的轻链的免疫球蛋白）。可选择地，所感兴趣免疫球蛋白也可以指免疫球蛋白的一部分（即含有少于两个完整重链和两个完整轻链的免疫球蛋白），其中所述部分含有免疫球蛋白的可变区（例如 Fab 片段，或者 Fv 片段）。在另一个实施方案中，所感兴趣免疫球蛋白也可以是含有，例如，由连接子区域连接起来的一个重链和一个轻链，或者一个单链 Fv 片断的“单链的”或是“单链”免疫球蛋白。在一个实施方案中，例如，所感兴趣免疫球蛋白可以将三个轻链可变区和三个重链可变区连接起来（例如用连接子区域），形成一个单链 Fv 免疫球蛋白。如果需要，所感兴趣免疫球蛋白可以与大分子偶联。在一个实施方案中，它可以与一个蛋白，例如一种酶，毒素或细胞因子偶联。例如，蛋白水解酶可以与免疫球蛋白分子偶联，这样可以直接对特异的蛋白进行酶催化作用，例如用于溶解血栓的纤维蛋白，或者用于抗病毒治疗的病毒胞衣蛋白和 RNA。与免疫球蛋白偶联的毒素可以直接针对癌细胞（参见，例如，Antibody Engineering. R. Kontermann, S. Dubel (Eds.). Springer Lab manual. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg (2001), Chapter 41."Stabilization Strategies and Application of recombinant Fvs and Fv Fusion proteins". By U. Brinkmann, pp. 593-615. 等），细胞因子（IL2 等等）可以用于抗炎症用途。

所感兴趣免疫球蛋白可以来自于任何能产生抗体的物种，优选是哺乳动物，特别是人；可选择地，所感兴趣免疫球蛋白可以是来自于抗体氨基酸数据库的嵌合抗体或“共有区”结构或规范结构（参见，例如 Kabat 等，J Immunol 1991 Sep 1; 147 (5): 1709-19）。所感兴趣免疫球蛋白可以是野生型的免疫球蛋白（例如，从组织中分离出来的或者可以从组织中分离出来的免疫球蛋白

白，例如在哺乳动物，特别是人的合适的生理学样品（例如血，血清等）中存在的免疫球蛋白）。可选择地，所感兴趣免疫球蛋白可以是修饰的免疫球蛋白（例如向已知的野生型免疫球蛋白的一个或多个可变区和/或恒定区中引入突变）。在另一个实施方案中，所感兴趣免疫球蛋白可以是合成的免疫球蛋白（例如用重组DNA方法制备的，而不是从组织中分离出来的）。在优选的实施方案中，所感兴趣免疫球蛋白是人免疫球蛋白。

在本发明的一个实施方案中，所感兴趣免疫球蛋白是一种催化性抗体。免疫球蛋白可以是催化性的，或者可以通过本文所述的方法向免疫球蛋白的可变区域（Fv区域）的结合位点引入合适的氨基酸使其催化活性得到提高。例如，可以在抗体的Fv区域的高度可变区段生成模仿丝氨酸蛋白酶的催化三联体，并对其蛋白水解活性进行筛选。具有代表性的催化性抗体包括氧化还原酶，转移酶，水解酶，裂解酶，异构酶和连接酶；这一类别包括蛋白酶，糖酶，脂肪酶，加双氧酶和过氧化物酶，以及其它酶。这些酶和其它酶可以用于卫生保健，化妆品，食品，酿造，洗涤剂，环境（例如废水处理），农业，制革，纺织品以及其它化学过程，例如诊断和治疗，脂肪、碳水化合物和蛋白的转化，有机污染物的降解和化学物质的合成领域中的酶催化的转化。例如，可以制备具有溶解血纤维蛋白活性的，或者具有抵抗感染所必需的病毒结构，例如病毒胞衣蛋白的活性的治疗有效的蛋白酶。这样的蛋白酶可用于抗血栓形成试剂或者可抵抗病毒例如 AIDS，鼻病毒，流感病毒或肝炎病毒的抗病毒试剂。可选择地，在另一个实施例中，加氧酶（例如双加氧酶），一类在进行芳香环或其它双键的氧化时需要辅因子的酶，在工业上可用于生物制浆过程，将生物物质转化为燃料或其它化学物质，废水污染物的转化，煤的生物处理，和危险有机化合物的解毒。

本发明的文库涉及所感兴趣的单个原型免疫球蛋白。所述的“原型”免疫球蛋白是所有下述突变免疫球蛋白的基础免疫球蛋白（或者上述的 Fab 片段）。

步移法突变

要制备本发明的文库，可以对原型免疫球蛋白进行“步移法突变”。步移法突变在美国专利 5,830,650 和 5,798,208 中有详细描述，在此引入其全文作为参考。虽然在除免疫球蛋白之外的其它蛋白和多肽中同样也可以使用步移法突变，但本文中所述的是所感兴趣免疫球蛋白的突变。

在步移法突变中，在免疫球蛋白的感兴趣的预定区域（或者几个预定区域）的每个位点引入单个预定氨基酸至少一次（即向免疫球蛋白的一个或多个高度可变环（CDR）中引入），从而产生一组（文库）免疫球蛋白。得到的免疫球蛋白（这里称为“突变免疫球蛋白”）与原型不同，它们是将单个预定氨基酸引入免疫球蛋白的一个或多个 CDR 中的一个或多个位点，而在“天然”或是“野生型”中氨基酸与原型免疫球蛋白中相同位点的氨基酸相同。突变的免疫球蛋白组包括单个突变免疫球蛋白，其中所感兴趣的预定区域的每个位点上都有单个突变免疫球蛋白；因此，每个突变免疫球蛋白在所感兴趣的预定区域（例如 CDR）的每个位点都具有原型免疫球蛋白中具有的氨基酸，或者是预定氨基酸，所有突变免疫球蛋白的混合物包含所有可能的变体。

预定氨基酸可以是天然存在的氨基酸。二十个天然存在的氨基酸彼此的差别仅在于它们的侧链不同。每条侧链对化学性质都有影响，使得每个氨基酸的性质都是唯一的（参见，例如，Principles of Protein Structure, 1988, by G. E. Schulz 和 R. M. Schirner, Springer-Verlag）。典型的极性和中性侧链是 Cys, Ser,

Thr, Asn, Gln 和 Tyr 的侧链。Gly 也可以看作是这一组中的边界成员。Ser 和 Thr 对氢键的形成起着重要作用。Thr 在 碳原子处具有不对称性, 因此只有一种立体异构体可以使用。氨基酸 Gln 和 Asn 也可以形成氢键, 氨基基团作为氢供体, 羧基基团作为受体。Gln 比 Asn 多一个 CH₂ 基团, 这使得其极性基团更具柔性, 并且减少了和主链之间的相互作用。Tyr 具有一个极性很强的羟基 (酚的 OH), 因此在高 pH 值的时候可以解离。Tyr 有点类似带有电荷的侧链; 其氢键非常稳固。

在蛋白质分子的表面和内部都具有中性极性酸。内部残基常常在彼此之间或者与多肽骨架之间形成氢键。Cys 可以形成二硫桥键。组氨酸 (His) 具有一个杂环的芳香环侧链, 其 pK 值为 6.0。在生理 pH 范围内, 在从溶液中摄取了一个氢离子以后, 它的咪唑环可以是不带电荷的或者是带电荷的。由于这两种状态都是稳定可存在的, His 对于催化性化学反应非常有用, 存在于许多酶的活性中心处。

Asp 和 Glu 在生理 pH 下是带负电荷的。由于它们的侧链较短, Asp 的羧基基团比其主链更具刚性; 这可以解释为何许多催化位点的羧基基团都是由 Asp 而不是 Glu 提供的。带电荷的酸通常存在于蛋白表面。

Lys 和 Arg 通常存在于表面。它们具有长的并且具柔性的侧链。在溶液中是不稳定的, 它们促进了蛋白质球的溶解。在某些情况下, Lys 和 Arg 参与形成内部盐桥, 或者它们可帮助进行催化。由于它们暴露在蛋白质表面, Lys 是一种较常受到酶攻击的残基, 酶的作用可改变侧链或者切割 Lys 残基羧基末端处的肽链。

使用步移法突变, 可以制备编码每个突变免疫球蛋白的一组核苷酸 (例如 cDNA)。在一个实施方案中, 编码突变免疫球蛋

白的核苷酸可以通过将编码非步移法突变靶定的免疫球蛋白区域（例如恒定区）的核苷酸序列和编码步移法靶定的免疫球蛋白区域（例如 CDR）的核苷酸序列连接起来制备获得。例如，在一个实施方案中，编码突变免疫球蛋白的核苷酸可以通过将编码免疫球蛋白恒定区的核苷酸序列与编码可变区域的核苷酸序列连接起来制备获得。可选择地，在另一个实施例中，编码突变免疫球蛋白的核苷酸可以通过将编码恒定区的核苷酸序列，编码部分在步移法突变中不改变的可变区域的核苷酸序列（例如在 CDR 之外的寡核苷酸），和编码 CDR 的核苷酸序列（例如含有编码预定氨基酸的核苷酸的寡核苷酸）连接起来制备获得。在另一个实施方案中，编码 CDR 的核苷酸序列（例如含有编码预定氨基酸的核苷酸的寡核苷酸）可以单独被插入到编码原型免疫球蛋白的核苷酸中，以取代编码高度可变环（CDR）氨基酸序列的核苷酸序列。如果需要的话，编码 CDR 的核苷酸序列可以含有侧翼的限制性酶识别位点（参见，例如美国专利 No. 4, 888, 286），或者可以使用天然存在的限制酶识别位点。然后通过将其克隆至合适的限制性酶位点引入寡核苷酸混合物。

例如，可以制备寡核苷酸混合物，其中每一个寡核苷酸都编码原型免疫球蛋白的一个 CDR（或者原型免疫球蛋白的一部分 CDR），或者用编码预定氨基酸的核苷酸代替 CDR 中的一个或多个天然氨基酸。寡核苷酸混合物可以通过合成产生，其中在寡核苷酸的每个位点引入合成原型球蛋白中存在的氨基酸所需的核苷酸或者（替换该核苷酸）预定氨基酸的密码子所需的合适的核苷酸。寡核苷酸混合物的合成可以通过自动 DNA 合成仪进行，其中 DNA 合成仪程序设定为将一种核苷酸送入到反应室中（例如在原型免疫球蛋白的编码 CDR 的核苷酸位点处的核苷酸），或者将一种不同的核苷酸递送入反应室中（在原型球蛋白的该位点处不存在的核苷酸），或者送入两种核苷酸的混合物以产生不仅

含有编码原型免疫球蛋白 CDR 的寡核苷酸，而且含有编码突变免疫球蛋白 CDR 的寡核苷酸的寡核苷酸混合物。

例如，总共 10 种试剂容器，其中的四个含有单个碱基，剩余的 6 个含有所有可能的 4 个碱基中的两个碱基的混合物，可用于合成步移法突变过程的任何寡核苷酸混合物。例如 DNA 合成仪可以设计为含有下述十个室：

表 1: 自动 DNA 合成的合成子

室	合成子
1	A
2	T
3	C
4	G
5	(A+T)
6	(A+C)
7	(A+G)
8	(T+C)
9	(T+G)
10	(C+G)

利用这样的排布，在序列任何位点的任何核苷酸都可以被任何一种两个核苷酸的组合所取代。可选择地，如果可以在寡核苷酸合成仪的管子中进行单个碱基的混合，该仪器就可以通过编制程序从两个或多个纯碱基库中产生所需要的核苷酸比例。

在一个实施方案中，两种核苷酸（即野生型核苷酸和非野生型核苷酸）在反应中的浓度几乎相同，使在所述位点处将每一个

核苷酸引入序列的机会相同。可选择地，两种核苷酸浓度的比例可以改变，以增加一种或另一种核苷酸引入寡核苷酸的可能性。浓度比例的改变（这里称为“掺杂（doping）”）在美国专利申请序列号 No. 60/373, 686, Attorney Docket No. 1551.2002-000，其名称为“'Doping' in Walk-through Mutagenesis”，以及美国专利申请序列号 No. __/_____, Attorney Docket No. 1551. 2002-001，其名称为“'Doping'in Walk-through Mutagenesis”以及与该申请同时提交的文件中有更详细的描述；在此引入这些专利申请的全文作为参考。

在另一个实施方案中，可以使用固相-氰乙基亚磷酰胺化学方法代替自动 DNA 合成方法产生上述的寡核苷酸（参见美国专利 4,725, 677）。

可选择地，在另一个实施方案中，可以使用核糖体表达方法（参见，例如，Hanes 和 Pluckthun, "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937-4942 (1997); Roberts 和 Szostak, "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-12302 (1997); Hanes 等, "Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library elected and evolved by ribosome display", Nature Biochemistry 18: 1287-1292 (2000)）。

如上所述，可以用这些寡核苷酸制备含有编码突变免疫球蛋白的核苷酸的文库，然后用标准方法从这些核苷酸产生含有突变免疫球蛋白的文库。例如，可以将编码突变免疫球蛋白的核苷酸引入宿主细胞进行表达（参见，例如，Huse, W. D.等, Science 246: 1275 (1989); Viera, J.等, Meula. Eyizynaol. 153: 3 (1987)）。例如，核苷酸可以在大肠杆菌表达系统中进行表达（参见，例如，

Pluckthun, A.等 Skerra, A., Meth. Enzymol. 178: 476-515 (1989); Skerra, A.等, Biotechnology 9 : 23-278 (1991)) 它们可以通过在培养基中和/或在细菌细胞质中分泌来进行表达(参见,例如, Better, M.等 Horwitz, A., Meth. Enzymol. 178: 476 (1989)); 可选择地, 它们可以在别的组织例如酵母或哺乳动物细胞(例如骨髓瘤或杂交瘤细胞)中表达。

本领域普通技术人员应当了解, 可以使用多种表达方法生成本文所述的文库。通过将所述基因(文库)与其它遗传元件, 例如启动子, 终止子, 和其它有助于转录和翻译的合适序列融合, 可以在体外进行表达(核糖体展示技术), 如 Pluckthun 等所述(Pluckthun, A.和 Skerra, A., Meth. Enzymol. 178: 476-515 (1989))。类似地, 可以进行噬菌体展示, 细菌表达, 杆状病毒感染的昆虫细胞, 真菌(酵母), 植物和哺乳动物细胞表达(Antibody Engineering. R. Kontermann, S. Dubel (Eds.). Springer Lab manual. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg (2001), Chapter 1, "Recombinant Antibodies by S. Dubel 和 R. E. Kontennan. pp. 4-16)。scFV 文库也可以和其它基因融合以产生具有结合分子(Fv)和其它功能, 例如催化, 细胞毒性等等的嵌合蛋白(Antibody Engineering. R. KONTERMAN, S. Dubel (Eds.). Springer Lab manual. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg (2001), Chapter 41. Stabilization Strategies and Application of recombinant Fvs and Fv Fusion proteins. By U. Brinkmann, pp. 593-615)。

通用文库的制备

要产生所感兴趣免疫球蛋白的文库, 对原型免疫球蛋白进行单个预定氨基酸的步移法突变, 得到含有编码突变免疫球蛋白(以及编码原型免疫球蛋白)的单个核苷酸文库。可以翻译核苷酸文库以生成含有突变免疫球蛋白的氨基酸文库(这里称为“单

个预定氨基酸文库”)。每个单个预定氨基酸文库都含有 64 个子文库，其中预定的氨基酸在所感兴趣免疫球蛋白的每个高度可变环 (CDR) (也就是重链可变区的三个高度可变环 (VH1, VH2 和 VH3), 以及轻链可变区的三个高度可变环 (VL1, VL2 和 VL3)) 上“步移”。所得到的免疫球蛋白包括在每个 CDR 的一个或多个位点具有预定氨基酸，总体上在每个 CDR 的每个位点都具有预定氨基酸的突变免疫球蛋白。单个预定氨基酸在六个高度可变环 (CDR) 的每一个上“步移”；然后在每种可能的 CDR 的组合变体 (两个, 三个, 四个等等) 上步移。可能的组合变化如表 2 所示。

表 2: 每个单个预定氨基酸文库的子文库

子文库	高度可变区 (CDR) 的数目	文库的数目
A	1	6 (VH1, VH2, VH3, VL1, VL2 或 VL3)
B	2	15 (所有可能的 2 个的组合)
C	3	20 (所有可能的 3 个的组合)
D	4	15 (所有可能的 4 个的组合)
E	5	6 (所有可能的 5 个的组合)
F	6	1 (VH1, VH2, VH3, VL1, VL2 和 VL3)

总共 63 个子文库。第 64 个子文库包括原型免疫球蛋白。

要制备所感兴趣原型免疫球蛋白的“通用”文库，对于二十个天然氨基酸中的每一个都要对原型免疫球蛋白进行单个预定氨基酸的步移法突变，得到 20 个“单个预定氨基酸文库”，如上

所述。这些 20 个“单个预定氨基酸文库”总体形成所感兴趣免疫球蛋白的通用文库。

因此，总体上，所感兴趣免疫球蛋白通用文库包含 20 个（单个预定氨基酸）文库，其中每个文库都包含 64 个子文库，一共有 1208 个文库。

文库的使用

这里所说的文库含有可以对原型免疫球蛋白的结合区域，特别是可以对特定的预定氨基酸对结合区域影响进行系统分析和全面分析。所述文库避免了与任意突变所产生的突变体性质的控制和预测相关的问题；它可以为能改变所感兴趣免疫球蛋白与其抗体之间的相互作用的特定突变提供特定的信息，其中所述相互作用包括不同的互补决定区的氨基酸之间的多种相互作用。

可以用合适的方法对所述文库进行筛选以得到具有特定性质的特定免疫球蛋白。例如，可以通过合适的底物转换检测确定催化活性，可以通过标准免疫检测和/或亲和层析确定结合活性。也可以利用细胞需要所需的活性才能够生长的特点来设计这些活性的检测方法。例如，在筛选具有特定活性的免疫球蛋白，如降解毒性物质的能力的时候，将致死量的毒性物质加入到营养层中，使得只有表达出降解毒性化合物的活性的细胞才能够生长（Wasserfallen, A., Reikik, M., 和 Harayama, S., *Biotechnology* 9: 296-298 (1991)）。文库也可以用于筛选其它活性，例如靶定或破坏病原体的能力。这些活性的检测可以通过将所感兴趣的病原体暴露于抗体中，选择能证明所需性质（例如杀死病原体）的抗体。

与 CDR 区域中的特定氨基酸的效果相关的信息，不管是单个还是多个氨基酸取代，都可以提供有关给定氨基酸的特定效

果，如和抗体和抗原之间的亲合力和特异性（抗体的成熟和最优化）的独特信息。

除此之外，在抗体（免疫球蛋白）分子的结合区域的特定氨基酸的富集提供了新的能够和各种新抗原相互作用的新序列（氨基酸域），以便于发现抗体。

下述实施例之目的是举例说明本发明，而并非限制本发明的保护范围。在此引入所有引用文献的全文作为参考。

实施例

A 材料与方法

下述实施例举例说明了通过步移法突变（WTM）进行的基因文库的合成，包括设计和合成通用氨基酸文库。这些文库的构建是基于人抗 HIV GP120 单克隆抗体的氨基酸序列，特别是它的 Fv（VL 和 VH）区域，设计为单链（scFV）。GP-120 单克隆抗体的 VL 和 VH 区域的氨基酸序列得自出版物公开的序列（Antibody Engineering. R. KONTERMAN, S. Dubel (Eds.). Springer Lab manual. Spriger-Verlag. Berlin, Heidelberg (2001), Chapter 1, "Recombinant Antibodies" by S. Dubel and R. E. Konterman. pp. 4-16）。

图 1A-1B 显示了单链 GP-120 Fv（scFv）的全序列。通过将 VL 基因的 C 末端至 VH 基因的 N 末端的序列人为地与编码合成肽（G4S）₃（Huston, JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margulis MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber EC, Crea R, 和 Opperman H, Protein engineering of antibody binding site: recovery of specific activity in an anti- digioxin single-chain Fv analogue produced in E. Coli. Proc Nat Acad Sci USA 85,

5879-5883,1988 ; Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Pope SH, Riordan GS 和 Witlow M, Single-chain antigen binding proteins. Science 242,423-426, 1988.) 的 DNA 序列连接起来得到完整的 DNA 序列。用 Kabat 等所述的方法计算 VL 和 VH 氨基酸序列(Kabat EA, Wu TT, Reid-Miller M, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C, (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest. 5th Edition. US Department Of Health and Human Services, Public Service, NIH.)。CDR 区域 (L1, L2, L3 和 H1, H2, H3) 用大写表示。

将 VL 和 VH 的 DNA 序列重新设计为使用大肠杆菌中最常用的氨基酸密码子。而且, 序列中包含有几种限制性酶切位点, 以方便地进行限制性酶切分析。scFV 基因序列中还含有 5-粘性末端 (XbaI, Hindis, 和 Sal I) 和末端的两个密码子 (TAA, TAG) 以方便地用商业可获得的质粒进行克隆, 测序和表达。

GP-120 scFV 基因的总装配方案由合成的寡核苷酸确定, 显示在图 2 中。完整的装配包括独立装配的 VL 和 VH 基因的融合 (连接)。这是通过使适当重叠的合成寡核苷酸进行酶催化反应 (T4 连接酶) 得到的, 如图 4 所示。通过制备性凝胶电泳分离 VL 和 VH 基因, 并且进一步在存在连接酶的条件下在编码连接子 (G4S) 3 的合成寡核苷酸 (#174, 175, 177 和 189) 的辅助下将它们连接起来, 得到 scFV 构建体。

根据供应商提供的操作手册在 Eppendorf D-300 合成仪上进行寡核苷酸合成。每种寡核苷酸都通过凝胶电泳纯化, 快速通过交联葡聚糖 mini 层析柱进行以脱盐, 然后以 5 O. D. /ml 的浓度单独储存。

在标准条件下进行 VL 和 VH 基因的酶法连接(Maniatis 等), 其中所有的 VL 和 VH 寡核苷酸, 除了上链和下链的 5' 末端, 首先用 T4 激酶磷酸化, 然后在存在 T4 连接酶和 ATP 的条件下以等摩尔的浓度进行基因的装配。在存在过量 (10x) 的寡连接子的条件下将等摩尔的 VL 和 VH 连接起来以进行 scFV 的最终装配。最终的 scFV 首先在存在 NTP 和片段#201 和#103 的条件下用 DNA 聚合酶进行扩增, 然后用制备性凝胶电泳纯化。

scFV 基因的正确性通过 DNA 测序分析来证实, 使用 Applied Biosystems 自动 DNA 测序仪, 根据供应商提供的标准方法操作。

要生成在 scFV 蛋白的某些 CDR 区域含有选定氨基酸的 GP-120 scFv 基因文库, 应设计相应于靶 CDR 区域的合成寡核苷酸库, 并且根据步移突变法的规则使用 Eppendorf D300 合成仪进行合成 (如本文所述; 参见美国专利 5,830,650 和 5,798,208, 在此引入其全文作为参考)。

图 5 显示了用于在 Fv 的单个 CDR 中以多种可能的组合引入三个靶核苷酸, SER, HIS 和 ASP 的寡核苷酸库的示例。所述寡核苷酸库是通过在化学合成过程中将等量的活化核苷氨基磷酸酯混合起来得到的。图 5 中的库序列是用 IUPAC 混合碱基命名法给出的 (用大写字母表示, R=A 或 G, Y=C 或 T, M=A 或 C, K=G 或 T, S=C 或 G, W=A 或 T; H=A 或 C 或 T, B=C 或 G 或 T, V=A 或 C 或 G, D=A 或 G 或 T)。

图 6 显示了为生成 GP-120 scFV 文库所采用的 VL 和 VH 基因装配策略, 其中六个 CDR 区域中的三个 (3) 同时进行突变以生成多种 (8) 不同组合 (L1 到 L8) 的所选定的单个氨基酸 (Ser, His 和 Asp)。

图 3 显示了通过上述策略获得的 scFV 基因文库，以及每个单个文库中基因变体的数目。

单个的 scFV 文库可以克隆到合适的测序和/或表达质粒中。相应地也可以进行测序分析和基因表达。在此实施例中，使用 pFLAG 作为测序质粒，用质粒 pCANTAB 5E 在大肠杆菌中表达 scFV 基因文库（胞质间间隙）。

B. 通用氨基酸文库的设计和合成。

使用上述方法，六个 CDR 的每一个都可以设计 20 个单个的寡核苷酸库，其中每个寡核苷酸库都相应于 20 个天然氨基酸中的一个，如图 7-12 所示。根据这些寡核苷酸库，相应于每个选定氨基酸（20 个天然氨基酸中的任何一个）的六个（6）库都可以以任何可能的组合排布对进行 scFV 基因的相应 CDR 区域进行诱变。

图 13 显示了单个氨基酸的 CDR 库的分组。这六个库可以以任何组合方式使用，从单个的 CDR 替换（六个单个文库）到全饱和（全部六个 CDR 区域都进行了突变），以及其中的任意组合，如上所述。

所得到文库中的每一个（全部文库加上一个野生型序列共 63 个）都可以仅仅含有用于提供选定氨基酸的寡核苷酸库，从而在 scFv 基因的六个 CDR 区域中形成系统的分布，如上所述。通过这种合成方案得到的基因文库普遍含有一个选定的氨基酸，所述氨基酸在六个 CDR 区域中以任意组合方式分布，该文库可以作为一个整体，也可以是分离的文库。

虽然本发明描述了具体细节，并且描述了优选的实施方案，但是本领域技术人员应当理解，形式上和细节上的变化都不背离由权利要求所定义的本发明的精神和保护范围。

TAC	CGT	TTC	TCT	<i>AAC</i>	<i>TTC</i>	<i>GTT</i>	<i>ATC</i>	<i>CAC</i>	TGG	GTT	CGT	CAG	GCC	CCG
ATG	GCA	AAG	AGA	<i>TTG</i>	<i>AAG</i>	<i>CAA</i>	<i>TAG</i>	<i>GTG</i>	ACC	CAA	GCA	GTC	CGG	GGC
186														180
<i>G</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>W</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>W</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>Y</i>	<i>N</i>	<i>G</i>
GGC	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	GTT	GGT	TGG	ATC	AAC	CCT	TAC	AAC	GGC
CCG	GTC	CCA	GAC	CTT	ACC	CAA	CCA	ACC	TAG	TTG	GGA	ATG	TTG	CCG
181														195
<i>N</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>F</i>	<i>Q</i>	<i>D</i>	<i>R</i>	<i>V</i>	<i>T</i>	<i>V</i>	<i>T</i>
AAC	AAA	GAG	TTC	TCT	GCT	AAA	TTC	CAG	GAC	CGT	GTT	ACC	GTT	ACC
TTG	TTT	CTC	AAG	AGA	CGA	TTT	AAG	GTG	CTG	GCA	CAA	TGG	CAA	TGG
198														210
<i>R</i>	<i>D</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>Y</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>L</i>
CGT	GAC	CCG	TCT	ACC	AAC	ACC	GCT	TAC	ATG	GAG	CTC	TCT	TCT	CTG
GCA	CTG	GGC	AGA	TGG	TTG	TGG	CGA	ATG	TAC	CTC	GAG	AGA	AGA	GAC
211														225
<i>R</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>R</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>P</i>
CGT	TCT	GAA	GAC	ACG	GCC	GTT	TAC	TAC	TGC	GCT	CGT	GTG	GGT	CCT
GCA	AGA	CTT	CTG	TGC	CGG	CAA	ATG	ATG	ACG	CGA	GCA	CAA	CCA	GGA
228														250
<i>Y</i>	<i>S</i>	<i>W</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>P</i>	<i>Q</i>	<i>D</i>	<i>N</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>M</i>	<i>D</i>	<i>V</i>
TAC	TCT	TGG	GAC	GAC	TCT	CCT	CAG	GAC	AAC	TAC	TAC	ATG	GAC	GTT
ATG	AGA	ACC	CTG	CTG	AGA	GGA	GTG	CTG	TTG	ATG	ATG	TAC	CTG	CAA
251														275
<i>W</i>	<i>G</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>L</i>	<i>V</i>	<i>T</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	STOP	STOP
TGG	GGT	CAG	GGC	ACT	CTG	GTT	ACC	GTT	TCT	TCT	GAA	TTC	TAA	TAG
ACC	CCA	GTC	CCG	TGA	GAC	CAA	TGG	CAA	AGA	AGA	CTT	AAG	ATT	ATC
278														
<i>S</i>	<i>R</i>	<i>T</i>	<i>S</i>											
TCT	AGA	ACT	AGT	C-3'										
AGA	TCT	TGA	TCA	GAGCT 5'										

CDR区域用斜体和大写表示

图 1B

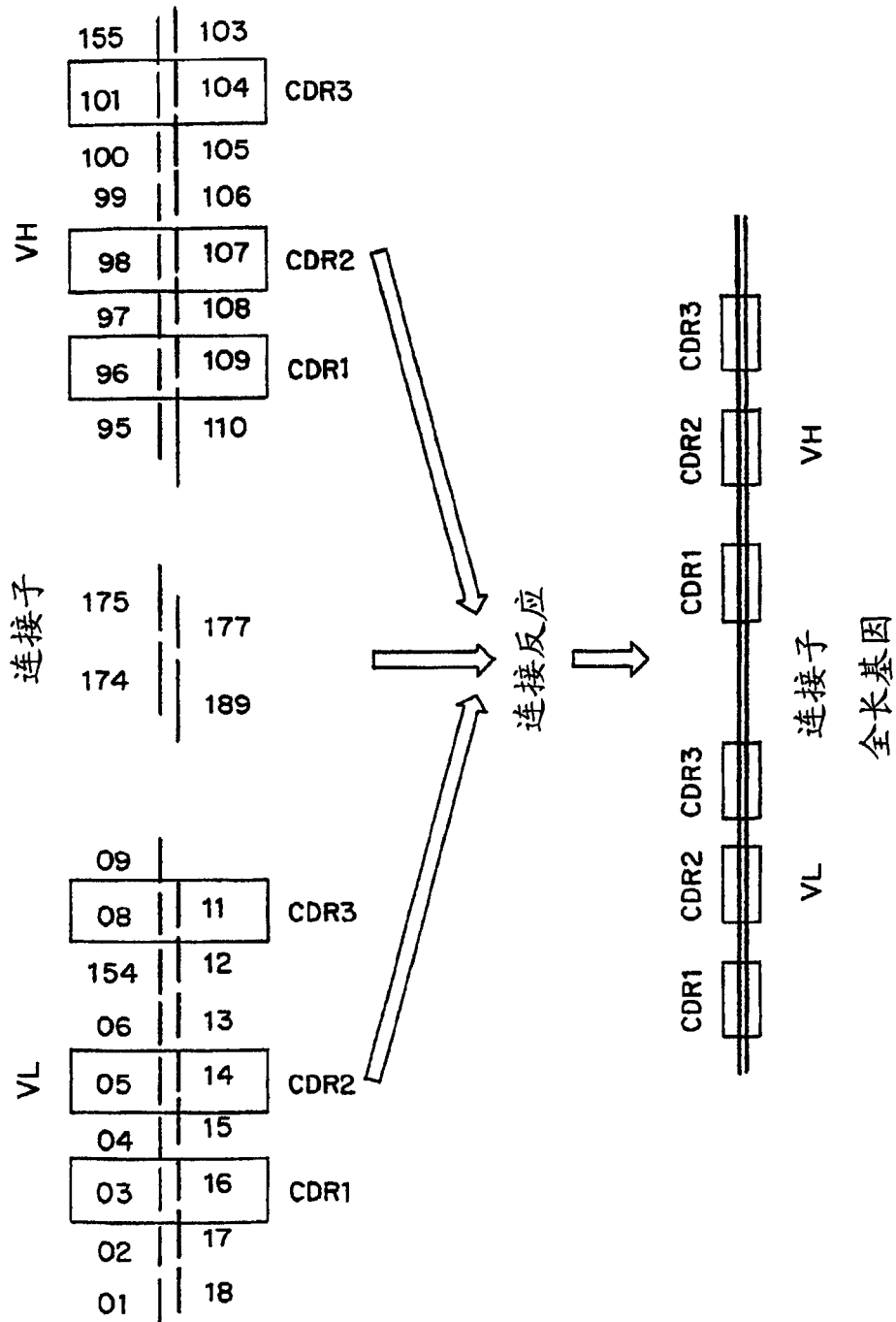
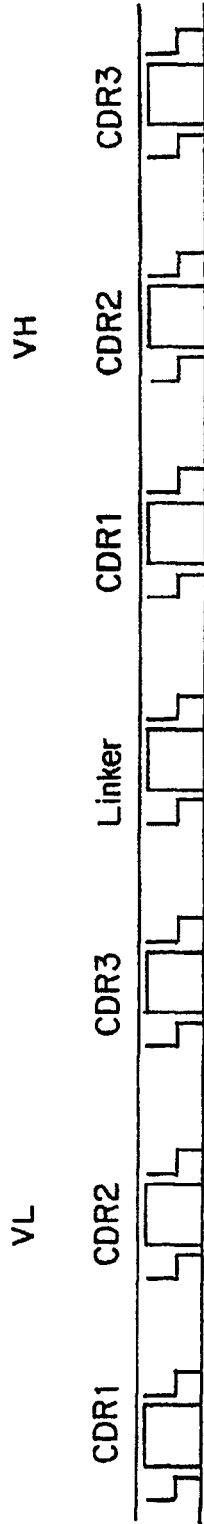


图 2



人抗体scFv文库(L)

VL	Linker	VH	Variants:
HL1: VL(S,D,H)	VH(W.T.)	$3.3 \cdot 10^{10}$	
HL2: VL(S,O,O)	VH(H,O,D)	$8.2 \cdot 10^9$	
HL3: VL(O,D,O)	VH(H,S,O)	$1.6 \cdot 10^{10}$	
HL4: VL(O,O,H)	VH(O,S,D)	$1.1 \cdot 10^{15}$	
HL5: VL(S,D,O)	VH(H,O,O)	$6.4 \cdot 10^7$	
HL6: VL(O,D,H)	VH(O,S,O)	$8.5 \cdot 10^{12}$	
HL7: VL(S,O,H)	VH(O,O,D)	$4.3 \cdot 10^{12}$	
HL8: VL(W.T.)	VH(H,S,D)	$2.2 \cdot 10^{12}$	

图 3

VI 寡核苷酸 (5-3)		上链		下链		H1 寡核苷酸		上链		下链		Inher 寡核苷酸	
1	CTA	GAA	TGG	CTG	AAC	TGA	GTA	AGC	GGT	GAA	GTC	GGC	GGC
2	COG	TCT	CTG	CTG	TCT	TCT	GTA	TTC	AGT	AGT	GTT	GCT	CGT
3	ATC	ACC	TGG	TGG	ATC	TGC	GAA	ATC	CGG	ATC	CGG	AGG	CTG
4	TAC	CAG	ATC	CAG	AAA	CGG	AGC	ATC	AGC	AAA	CGG	AGC	AGA
5	CTG	ATC	ATC	TAC	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	AGA
6	GGT	GTA	COG	TCT	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	CGC	AGA
154	ACT	TCA	COG	TGA	CAG	TAC	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	AGA
8	AAG	TAC	TAC	TGC	CAG	GGC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AGA
9	TTC	GGC	CAG	GGC	ACT	CTG	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AGA
11	GCC	CTG	GCC	GAA	GGT	GCC	GTA	AGC	GGT	GAA	GTC	GGC	GGC
12	GCA	GTA	GTA	GAA	AGC	AGC	GAA	TTC	AGT	AGT	GTT	GCT	CGT
13	GGA	GGG	TGA	TGC	CAG	AGC	AGC	ATC	CGG	ATC	CGG	AGG	CTG
14	TCA	CGG	TAC	AGC	AGA	AGC	AGC	ATC	AGC	AAA	CGG	AGC	AGA
15	GTA	GAT	CAG	CAG	TTT	CGG	AGC	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	AGA
16	CTG	CTG	GTA	CCA	AGC	AGC	AGC	ATC	AGC	AAA	CGG	AGC	AGA
17	GCA	GGT	GAT	GGT	AAC	AGC	AGC	ATC	AGC	AAA	CGG	AGC	AGA
18	ACA	GAG	AAG	ACG	GAG	AGC	ACT	TCA	TCA	AAA	CGG	AGC	AGA
95	COG	GGT	GCT	TCT	GTT	GCT	AAA	AGC	GGT	AAA	AGC	GGT	GGT
96	TAC	CGT	TTC	CTG	AGC	CTG	AAA	AGC	GGT	AAA	AGC	GGT	GGT
97	TGG	GTT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
98	GAA	GGT	GTT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
100	ACA	TGG	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
101	TAC	TGG	GCT	GGT	GCT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
103	TCG	AGA	CTA	GTT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT
104	GCC	CTG	ACC	CCA	CTA	CTA	CTA	CTA	CTA	CTA	CTA	CTA	CTA
105	ACG	AGC	GCA	GTA	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
106	AGA	GCT	CCA	TGT	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA	AGA
107	AAC	GAT	AAC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
108	AAC	AGC	CCA	CTC	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG
109	ACG	AGC	AAC	CCA	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
110	AGA	GAA	ACG	GTA	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
174	GGC	GGT	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC
175	CGT	CGT	GAA	CAG	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
177	AGA	AGC	ACC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
189	CCC	TCC	CCA	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC

CDR相关寡聚体 (大写)



文库 #1 (VL: Ser-1, Asp-2, His-3 / VH: W.T.)

VL 寡聚体. Linker. VH 寡聚体

1	174	95
2	175	96
19-Ser-1	177	97
4	189	98
20-Asp2	99	99
6	100	100
154	101	101
21-His-3	155	155
9	103	103
24-His-3	104	104
12	105	105
13	106	106
23-Asp2	107	107
15	108	108
22-Ser-1	109	109
17	110	110
18		

文库 #2 (VL: Ser-1 / VH: His-1, Asp-3)

VL 寡聚体 连接子 VL 寡聚体

1	174	95
2	175	112-His 1
19-Ser-1	177	97
4	189	98
5	99	99
6	100	100
154	114-Asp-3	
8	155	155
9	103	103
11	117-Asp-3	
12	105	105
13	106	106
14	107	107
15	108	108
22-Ser-1	115-His-1	
17	110	110
18		

文库 #3 (VL: Asp-2 / VH: His-1, Ser-2)

VL 寡聚体 连接子 VH 寡聚体

1	174	95
2	174	112-His-1
3	177	97
4	189	113-Ser-2
20-Asp-2	99	99
6	100	100
154	101	101
8	155	155
9	103	103
11	104	104
12	105	105
12	106	106
23-Asp-2	116-Ser-2	
15	108	108
16	115-His-1	
17	110	110
18		

文库 #4 (VL: His-3 / VH: Ser-2, Asp-3)

VL 寡聚体 连接子 VH 寡聚体

1	174	95
2	175	96
3	177	97
4	189	113-Ser-2
5	99	99
6	100	100
154	114-Asp-3	
21-His-3	155	155
9	103	103
24-His-3	117-Asp-3	
12	105	105
13	106	106
14	116-Ser-2	
15	108	108
16	109	109
17	110	110
18		

文库 #5 (VL: Ser-1, Asp-2 / VH: His-1)

VL 寡聚体 ...Linker. VH 寡聚体

1	174	95
2	175	112-His-1
19-Ser-1	177	97
4	189	98
20-Asp-2	99	99
6	100	100
154	101	101
8	155	155
9	103	103
11	104	104
12	105	105
13	106	106
23-Asp-2	107	107
15	108	108
22-Ser-1	115-His-1	
17	110	110
18		

文库 #6 (VL: Asp-2, His-3 / VH: Ser-2)

VL 寡聚体 连接子 VH 寡聚体

1	174	95
2	175	96
3	177	97
4	189	113-Ser-2
99	99	99
20-Asp-2	100	100
6	101	101
154	102	102
21-His-3	103	103
9	104	104
24-His-3	105	105
12	106	106
13	116-Ser-2	
23-Asp-2	108	108
15	109	109
16	110	110
17		
18		

文库 #7 (VL: Ser-1, His-3, VH: Asp-3)

VL 寡聚体 连接子 VH 寡聚体

1	174	95
2	175	96
3	177	97
4	189	98
99	99	99
5	100	100
6	114-Asp-3	
154	155	155
21-His-3	103	103
9	117-Asp-3	
12	105	105
13	106	106
14	107	107
15	108	108
16	109	109
17	110	110
18		

文库 #8 (VL: W.T. / VH: His-1, Ser-2, Asp-3)

VL 寡聚体 连接子 VH 寡聚体

1	174	95
2	175	112-His-1
3	177	97
4	189	113-Ser-2
99	99	99
5	100	100
6	114-Asp-3	
154	155	155
8	103	103
9	117-Asp-3	
11	105	105
12	106	106
13	118-Ser-2	
14	107	107
15	115-His-1	
16	110	110
17		
18		



VL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.A. 野生型DNA	S	TCT	CAC	TCT	ATC	CGT	TCT	CGT	CGT	GTT	A	GCT
可变区 CDR 野生型DNA	R	GXX KCT	GXX SMC	GXX KCT	GXX RYC	GXX SST	GXX KCT	GXX SST	GXX SST	GXX GVT	XXX GCT	XXX GCT
A.A.	S	GXX	GXX	GXX	GXX	GXX	GXX	GXX	GXX	GXX	XXX	XXX
野生型DNA	KST	KST	SRC	KST	RKC	SGT	KST	SGT	SGT	GKT	GST	GST
1 ALA	GTX	GTX	GTX	GTX	GXX	GTX	GTX	GTX	GTX	XXX	XTX	XTX
GCX	KYT	KYT	SWC	KYT	RTC	SKT	KYT	SKT	SKT	GTT	GVT	GVT
2 GLY	XTA	XTA	XTX	XTG	CXX	XTX	XTA	XTX	XTX	CXX	CTX	CTX
GGX	TYW	TYW	CWC	TYK	MTC	CKT	TYW	CKT	CKT	STT	SYT	SYT
3 VAL	ATX	ATX	ATX	ATX	XXX	ATX	ATX	ATX	ATX	AXX	ATX	ATX
GTX	WYT	WYT	MWC	WYT	ATC	MKT	WYT	MKT	MKT	RTT	RYT	RYT
4 LEU	TTX	XTX	TTX	XTX	TOX	TTX	XTX	TTX	TTX	TOX	TTX	TTX
CTX/ITag	TYT	TYT	YWC	TYT	WTC	YKT	TYT	YKT	YKT	KTT	KYT	KYT
5 ILE	XAX	XAX	TXX	XAX	TAX	TAX	XAX	TAX	TAX	TAX	TAX	TAX
ATCA	TMT	TMT	YAC	TMT	WWC	YRT	TMT	YRT	YRT	KWV	KMT	KMT
6 PHE	XGG	XGG	TGG	XGG	TGG	TXG	XGG	TXG	TXG	TGG	TGG	TGG
TTcl	TSK	TSK	YRS	TSK	WKS	YBK	TSK	YBK	YBK	KKK	KSK	KSK
7 TYR	ATG	ATG	ATG	ATG	XXG	ATG	ATG	ATG	ATG	AXG	ATG	ATG
Tact	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
8 TRP	XGX	XGX	TGX	XGX	TGX	TXX	XGX	TXX	TXX	TGX	TGX	TGX
TGG	TSK	TSK	YRC	TSK	WKC	YBT	TSK	YBT	YBT	KKT	KST	KST
9 MET	XXX	XXX	AGX	XXX	XGX	AXX	XXX	AXX	AXX	AGX	TOX	TOX
ATG	TCT	TCT	MRC	TCT	AKC	MGT	TCT	MGT	MGT	RKT	KCT	KCT
10 CYS	AXX	AXX	ACX	AXX	XCX	ACX	AXX	ACX	ACX	ACX	AOX	AOX
TGcl	MGT	MGT	MHC	WCT	AYC	MST	WCT	MST	MST	RYT	RCT	RCT
11 SER	CGX	CGX	XGX	CGX	XGG	XXX	CGX	XXX	XXX	CGX	CGX	CGX
TCX, Aglc	YST	YST	CRG	YST	AKS	CGT	YST	CGT	CGT	SKT	SKT	SKT
12 THR	XXX	XXX	XGX	CGX	XGG	XXX	CGX	XXX	XXX	CGX	CGX	CGX
ACX	CGT	CGT	CRG	YST	AKS	CGT	YST	CGT	CGT	SKT	SKT	SKT
13 ARG	CGX	CGX	XGX	CGX	XGG	XXX	CGX	XXX	XXX	CGX	CGX	CGX
AGag	CGT	CGT	CRG	YST	AKS	CGT	YST	CGT	CGT	SKT	SKT	SKT

7A

14 LYS AA ₂ g	AAA MRW	AAG WMK	AAA WMW	AAG MRK	AAA MRK	AAG RWK	AAG RMK	2(34)
15 HIS CA _{1c}	XAX CRT	CAX YMT	CAX YMT	XAX CRT	XAX CRT	CAX SWT	CAX SMT	2(18)
16 PRO CCX	XCX CST	CXX YCT	CXX YCT	XCX CST	XCX CST	CCX SYT	CXX SCT	2(14)
17 GLU GA ₂ g	GAG SRK	GAA KMW	GAG KMK	GAG SRW	GAG SRK	XAA GWW	XAA GMW	2(33)
18 ASP GA ₁ c	GAX SRT	GAX KMT	GAX KMT	GAX SRT	GAX SRT	XAX GWT	XAX GMT	2(21)
19 GLN CA ₂ g	XAG CRK	CAA YMW	CAG YMK	XAG CRK	XAG CRK	CAG SWK	CAG SMK	2(30)
20 ASN AA ₁ c	AAx MRT	AAx WMT	AAx WMT	AAx MRT	AAx MRT	AAx RWT	AAx RMT	2(22)



7B

VL		A.A. 野生型DNA						
可变区 CDR2 野生型DNA		1	2	3	4	5	6	7
VL A.A.	野生型DNA	G	V	S	N	R	A	S
1 ALA GCX	GGT	GTT	TCT	AAC	CGT	GCT	TCT	
2 GLY GGX	XCX GST	GXX GCT	GXX KCT	GCX RMC	GXX SST	XXX GCT	GXX KCT	2(8)
3 VAL GTX	XXX GGT	GXX GKT	GGX KST	GGX RRC	GXX SGT	XGX GST	GGX KST	2(9)
4 LEU CTX/TTag	XTX GKT	XXX GTT	GTX KYT	GTX RWC	GTX SKT	XTX GYT	GTX KYT	2(10)
5 ILE ATtca	CTX SKT	CXX STT	XTA TYW	CTX MWC	XTX CKT	CTX SYT	CTX YYT	2(12)
6 PHE TTct	ATX RKT	AXX RTT	ATX WYT	XTX AWC	ATX MKT	ATX RYT	ATX WYT	2(12)
7 TYR TAct	TTX KKT	TXX KTT	XTX TYT	TTX WWC	TTX YKT	TTX KYT	XTX TYT	2(11)
8 TRP TGG	TAX KWT	TAX KWT	XAX TMT	TXX WAC	TAX YRT	TAX KMT	XAX TMT	2(11)
9 MET ATG	TXG K GK	TGG KKK	XGG TSK	TGG WRS	TXG Y GK	TGG KSK	XGG TSK	2(17)
10 CYS	ATG RKK	AXG RTK	ATG WYK	XTG AWS	ATG MKK	ATG RYK	ATG WYK	2(19)
	TXX	TGX	XGX	TGX	TXX	TGX	XGX	2(10)

图 8A

TGct	1	2	3	4	5	6	7
11 SER TCX, AGtc	KGT AXX RGT	KKT AGX RKT	TST XXX TCT	WRC XGX ARC	YGT AXX MGT	KST TXX KCT	TST XXX TCT
12 THR ACX	ACX RST	ACX RYT	AXX WCT	XCX AMC	ACX MST	AXX RCT	AXX WCT
13 ARG CGX, AGag	CXX SGT	CGX SKT	CGX YST	CGX MRC	XXX CGT	CGX SST	CGX YST
14 LYS Aaa.g	AAA RRW	AAG RWK	AAA WMW	XXG AAS	AAG MRK	AAA RMW	AAG WMI
15 HIS CAtc	CAX SRT	CAX SWT	CAX YMT	CXX MAC	XAX CRT	CAX SMT	CAX YMT
16 PRO CCX	CCX SST	CCX SYT	CXX YCT	CCX MMC	XCX CST	CXX SCT	CXX YCT
17 GLU GAag	XAG GRK	XAA GWW	GAG KMK	GXA RAM	GAA SRW	XAG GMK	GAA KMW
18 ASP GAct	XAX GRT	XAX GWT	GAX KMT	GXX RAG	GAX SRT	XAX GMT	GAX KMT
19 GLN CAag	CAG SRK	CAG SWK	CAA YMW	CXG MAS	XAG CRK	CAA SMW	CAA YMW
20 ASN AAct	AAX RRT	AAX RWT	AAX WMT	XXX AAC	AAX MRT	AAX RMT	AAX WMT
	G GGT	V GTT	S TCT	N AAC	R CGT	A GCT	S TCT

图 8B

VL CD3	Q	1 V	2 Y	3 G	4 A	5 S	6 S	7 Y	8 T	9
A.A. 野生型DNA	CAG	GTT	TAG	GGT	GCT	TCT	TCT	TAC	ACC	
1 ALA GCX	GCX SMG	XCX GYT	GCX KMG	XCX GST	XXX GCT	GXX KCT	GXX KCT	GCX KMC	GXX RCC	2(11)
2 GLY GGX	GGX SRG	XGX GKT	GGX KRG	XXX GGT	XGX GST	GGX KST	GGX KST	GGX KRC	GGX RSC	2(14)
3 VAL GTX	GTX SWG	XXX GTT	GTX KMG	XTX GKT	XTX GYT	GTX KYT	GTX KYT	GTX KWC	GTX RYC	2(14)
4 LEU CTX/TTag	XTX CWG	CXX STT	XTX TWG	CTX SKT	CTX SYT	XTA TYW	XTG TYM	CTX YWC	CTX MYC	2(15)
5 ILE ATLca	ATT MWK	AXX RTT	ATC WWS	ATX RKT	ATX RYT	ATX WYT	ATX WYT	ATX WWG	XTX AYC	2(18)
6 PHE TTcl	TTC YWS	TXC KTT	XTC TWS	TTX KKT	TTX KYT	XTX TYT	XTX TYT	XTX TWC	TTX WYC	2(15)
7 TYR Tact	TXC YAS	TAX KWT	XXC TAS	TAX KRT	TAX KMT	XAX TMT	XAX TMT	XXX TAC	TAX WMC	2(13)
8 TRP TGG	TGX YRG	TGG KKK	XGX TRG	TGX KGG	TGG KSK	XGG TSK	XGG TSK	XGG TRS	TGG WSS	2(20)
9 MET ATG	ATX MWG	AXG RTK	ATX WWG	ATG RKK	ATG RYK	ATG WYK	ATG WYK	ATG WWS	XGG ASS	2(24)
10 CYS TGcl	TGC YRS	TGX KKT	XTC TWS	TXC KGT	TGX KST	XGX TST	XGX TST	XGX TRC	TGX WSC	2(15)
11 SER TCX, Aglc	TCX YMG	TCX KYT	XCX TMG	AXX RGT	TXC KGT	XXX TCT	XXX TCT	XCX TMC	TXC WCC	2(10)
12 THR ACX	ACX MMG	ACX RYT	ACX WMG	ACX RST	AXX RGT	AXX WCT	AXX WCT	ACX WMC	XXX ACC	2(13)

图 9A

13 ARG CGX, AGag	XGX CRG	CGX SYT	CGX YRG	CXX SGT	CGX SST	CGX YST	CGX YST	CGX YST	CGX YRC	CGX MSC	2(16)
14 LYS AAa.g	AXX MAG	AAA RWW	AXX WAG	AAA RRW	AAA RMW	AAG WMK	AAG WMK	AAG WMK	AXG WAS	XAG AMS	2(21)
15 HIS CAIc	XXT CAK	CAX SWT	CXT YAK	CAX SRT	CAX SMT	CAX YMT	CAX YMT	CAX YMT	CXX YAC	CAX MMC	2(16)
16 PRO CCX	XCX CMG	CCX SYT	CCX YMG	CCX SST	CXX SCT	CXX YCT	CXX YCT	CXX YCT	CCX YMC	CXX MCC	2(13)
17 GLU GAa.g	GXX SAG	XAG GWK	GXX KAG	XAG GRK	XAG GMK	GAA KMW	GAA KMW	GAA KMW	GXA KAM	GAG RMS	2(19)
18 ASP GAct	GXC SAS	XAX GWT	GXC KAS	XAX GRT	XAX GMT	GAX KMT	GAX KMT	GAX KMT	GXX KAC	GAX RMC	2(15)
19 GLN CAag	XXX CAG	CAG SWK	CXX YAG	CAG SRK	CAG SMK	CAG YMK	CAG YMK	CAG YMK	CXA YAM	CAG MMS	2(21)
20 ASN AAAct	AXC MAS	AAx RWT	AXC WAS	AAx RRT	AAx RMT	AAx WMT	AAx WMT	AAx WMT	AAx WAX	AAx AMC	2(17)
											平均 2(15)
											32,768

图 9B

可变区 CDR1 野生型DNA	VH AA	N	1	2	3	4	5
		AAC	F TTC	V GTT	I ATC	H CAC	
1 ALA GCX		GCX RMC	GCX KYC	XCX GYT	GCX RYC	GCX SMC	2(9)
2 GLY GGX		GGX RRC	GGX KKC	XGX GKT	GGX RKC	GGX SRC	2(9)
3 VAL GTX		GTX RWC	GXX KTC	XXX GTT	GXX RTC	GTX SWC	2(6)
4 LEU CTX/TTag		CTX MWC	CXX YTC	CXX STT	CXX MTC	XTX CWC	2(6)
5 ILE ATtca		XTX AWC	AXX WTC	AXX RTT	XXX ATC	ATX MWC	2(5)
6 PHE TTct		TTX WWC	XXX TTC	TXX KTT	TXX WTC	TTX YWC	2(6)
7 TYR TAct		TXX WAC	XAX TWC	TAX KWT	TAX WWC	TXX YAC	2(7)
8 TRP TGG		TGG WRS	XGG TKS	TGG KKK	TGG WKS	TGG YRS	2(14)
9 MET ATG		XTG AWS	AXG WTS	AXG RTK	XXG ATS	ATG MWS	2(10)
10 CYS TGct		TGX WRC	XGX TKC	TGX KKT	TGX WKC	TGX YRC	2(9)
11 SER TCX, AGtc		XGX ARC	XCX TYC	TCX KYT	XGX AKC	TCX YMC	2(7)
12 THR ACX		XCX AMC	ACX WYC	ACX RYT	XCX AYC	ACX MMC	2(8)
13 ARG CGX, AGag		CGX MRC	CGX YKC	CGX SKT	CGX MKC	XGX CRC	2(9)
14 LYS AAa,g		XXG AAS	AAA WWM	AAA RWW	XAG AWS	AXA MAM	2(11)
15 HIS		CXX	CAX	CAX	CAX	XXX	2(7)

图 10A

	CAtc	MAC	YWC	SWT	MWC	CAC	
16	PRO CCX	CCX MMC	CCX YYC	CCX SYT	CCX MYC	XCX CMC	2(9)
17	GLU GAag	GXG RAS	GAA KWM	XAA GWW	GAX RWC	GXG SAS	2(12)
18	ASP GAct	GXX RAC	GAX KWC	XAX GWT	GAX RWC	GXX SAC	2(7)
19	GLN CAag	CXG MAS	CAA YWM	CAG SWK	CAG MWS	XXG CAS	2(12)
20	ASN AAct	XXX AAC	AAX WWC	AAX RWT	XAX AWC	AXX MAC	2(6)

 10B

VL	A.A. 野生型DNA	VH A.A.	可変区 CDR.2 野生型DNA													
			W	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
	1 ALA		TGG	I	N	P	Y	N	G	N	K	E				
	GCX		ATC	AAC	GXX	GXX	TAC	AAC	GCT	GXX	AAA	GAG				
	2 GLY		GXX	RMC	SCT	KMC	KMC	RMC	GST	RMC	RMA	GMC				
	GGX		RKC	GGX	GGX	GGX	GGX	GGX	XXX	GGX	GGX	XGX				
	3 VAL		GTX	RRC	SST	KRC	KRC	RRC	GGT	RRC	RRA	GRG				
	GTX		RTC	GTX	GTX	GTX	GTX	GTX	XTX	GTX	RWA	XTX				
	4 LEU		CXX	RWC	SYT	KWC	KWC	RWC	GKT	RWC	RWA	GWG				
	CTX/JTtag		CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	CTC	TTG	TTX				
	5 ILE		MTC	MYC	CYT	YWC	YWC	MWC	SKT	MWC	WWR	KWG				
	ATICb		XXX	XTX	ATX	ATX	ATX	XTX	ATX	XTX	XTX	ATC				
	6 PHE		ATC	AWC	MYT	WWC	WWC	AWC	RKT	AWC	AWA	RWS				
	TTcl		TXX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTT	TTT				
	7 TYR		WTC	WXC	YTT	TWC	TWC	WXC	KKT	WXC	WWM	KWK				
	TAct		TAX	TXX	TAX	XXX	XXX	TXX	TAX	TXX	TXC	TXC				
	8 TRP		WWC	WAC	YMT	TAC	TAC	WAC	KRT	WAC	WAM	KAS				
	TGG		TGG	TGG	TGG	XGG	XGG	TGG	TXG	TGG	TGG	TGX				
	9 MET		WKS	WRS	YSK	TRS	TRS	WRS	KGK	WRS	WRR	KRG				
	ATG		XXG	XTG	ATG	ATG	ATG	XTG	ATG	XTG	XTG	ATX				
	10 CYS		WKG	AWS	MYK	WWS	WWS	AWS	RKK	AWS	AWR	RWG				
	TGcl		XXC	TGX	TGX	XGX	XGX	TGX	TXX	TGX	TGC	TGC				
	11 SER		TGS	WRC	YST	TRC	TRC	WRC	KGT	WRC	WRM	KRS				
	TCX, AGlc		XCX	XGX	TXX	XCX	XCX	XGX	AXX	XGX	XGC	TCX				
	12 THR		TSG	ARC	YCT	TMC	TMC	ARC	RRGT	ARC	ARM	KMG				
	ACX		ACX	XCX	AXX	ACX	ACX	XCX	ACX	XCX	XCX	ACX				
	13 ARG		WSG	AMC	MCT	WMC	WMC	AMC	RST	AMC	AMA	RMG				
	CGX, AGag		AXX	CGX	XGX	CGX	CGX	CGX	CXX	CGX	CGX	CGX				
	14 LYS		WGG	MKC	CST	YRC	YRC	MRC	SGT	MRC	MRA	SRG				
	AAa.g		AAX	XAA	AAA	AXG	AXG	XAA	AAA	CXX	XXX	AXX				
			WRG	AWM	MMW	WAS	WAS	AAM	RRW	MAC	AAA	RAG				

图 11A

	11	12	13	14	15	16	17
F	S	A	K	F	Q	D	
TTC	TCT	GCT	AAA	TTC	CAG	GAC	
GCX	GXX	XXX	GCX	GCX	GCX	XCX	2(27)
KYC	KCT	GCT	RMA	KYC	SMG	GMC	
GGX	GGX	XGX	GGX	GGX	GGX	XGX	2(28)
KKC	KST	GST	RRA	KKC	SRG	GRC	
GXX	GTX	XTX	GTX	GXX	GTX	XTX	2(28)
KTC	KYT	GYT	RWA	KTC	SWG	GWC	
XXA	CTX	CTX	TTX	XXG	TTX	CTX	2(32)
TTM	YYT	SYT	WWA	TTS	YWG	SWC	
AXX	ATX	ATX	XTX	AXX	ATC	ATX	2(29)
WTC	WYT	RYT	AWA	WTC	MWS	RWC	
XXX	XTX	TTX	TTT	XXX	TTC	TTX	2(31)
TTC	TYT	KYT	WWW	TTC	YWS	KWC	
XAX	XAX	TAX	TXC	XAX	TXC	TXX	2(25)
TWC	TMT	KMT	WAM	TWC	YAS	KAC	
XGG	XGG	TGG	TGG	XGG	TGX	TGG	2(41)
TKS	TSK	KSK	WRR	TKS	YRG	KRS	
AXG	ATG	ATG	XTG	AXG	ATX	ATG	2(40)
WTS	WYK	RYK	AWR	WTS	MWG	RWS	
XGX	XGX	TGX	TGT	XGX	TGC	TGX	2(32)
TKC	TST	KST	WRW	TKC	YRS	KRC	
XCX	XXX	TXX	XGC	XCX	TCX	TCX	2(21)
TYC	TCT	KCT	ARM	TYC	YMG	KMC	
ACX	AXX	AXX	XCX	ACX	ACX	ACX	2(25)
WYC	WCT	RCT	AMA	WYC	MMG	RMC	
CGX	CGX	CGX	XGX	CGX	XGX	CGX	2(29)
YKC	YST	SST	ARA	YKC	CRG	SRC	
AAG	AAA	AAA	XXX	AAA	AXX	AXG	2(31)
WWS	WMW	RMW	AAA	WWM	MAG	RAS	


 11C

可变区 VH CDR3 野生型DNA	A.A	V GTT	1 G GGT	2 P CCT	3 Y TAC	4 S TCT	5 W TGG	6 D GAC	7 D GAC	8 S TGT	9 P CCT	10 P CCT	11 Q CAG	11 D GAC	12 N AAC	13 Y TAC	14 Y TAC	15	
1 ALA		XCX	XCX	GXX	GXX	GXX	GCX	XCX	XCX	GXX	GXX	GXX	GXX	XCX	GCX	GCX	GCX	GCX	
GCX		GYT	GST	SCT	KMC	KCT	KSG	GMC	GMC	KCT	SCT	SCT	SMG	XCX	GCX	GCX	GCX	GCX	
2 GLY		XGX	XXX	GGX	GGX	GGX	GGX	XGX	XGX	GGX	GGX	GGX	GGX	XGX	GCX	GCX	GCX	GCX	
GGX		GKT	GGT	SST	KRC	KST	KGG	GRC	GRC	KST	SST	SST	SRG	GRC	RRC	RRC	RRC	RRC	
3 VAL		GTX	GTX	GTX	GTX	GTX	GTX	XTX	XTX	GTX	GTX	GTX	GTX	XTX	GTX	GTX	GTX	GTX	
GTX		GTT	GKT	SYT	KWC	KYT	KYG	GWC	GWC	GTX	SYT	SYT	SWG	XTX	RWC	RWC	RWC	RWC	
4 LEU		CXX	CTX	XTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	XTX	XTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	
CTX/TTag		STT	SKT	CYT	YWC	YTT	TKG	SWC	SWC	YTT	CYT	CYT	SWG	CTX	MXG	MXG	MXG	MXG	
5 ILE		AXX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	ATX	
ATLca		RIT	RKT	MYT	WVC	WYT	WKS	RWC	RWC	WYT	MYT	MYT	MWS	RWC	AWC	AWC	AWC	AWC	
6 PHE		TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	TTX	
TTId		KIT	KKT	YTT	TKS	TKS	TKS	KWC	KWC	YTT	YTT	YTT	YWS	KWC	WVC	WVC	WVC	WVC	
7 TYR		TAX	TAX	TAX	TAX	TAX	TAX	TXX	TXX	TAX	TAX	TAX	TXX	TXX	TXX	TXX	TXX	TXX	
TAd		KWT	KRT	YMT	TAC	TMT	TRS	KAC	KAC	TMT	YMT	YMT	YAS	KAC	WAC	WAC	WAC	WAC	
8 TRP		TGG	TXG	TGG	XGG	XGG	XGG	TGG	TGG	XGG	TGG	TGG	TGX	TGG	TGG	TGG	TGG	TGG	
TGG		KIK	KGK	YSK	TRS	TSK	TGG	KRS	KRS	TSK	YSK	YSK	YRG	KRS	WRS	WRS	WRS	WRS	
9 MET		AXG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATX	ATG	XTG	XTG	XTG	XTG	
ATG		RTK	RKK	MYK	WWS	WYK	WKG	RWS	RWS	WYK	MYK	MYK	MWG	ATG	AWS	AWS	AWS	AWS	
10 CYS		TGX	TXX	TGX	XGX	XGX	XGX	TGX	TGX	XGX	TGX	TGX	TGC	TGX	TGX	TGX	TGX	TGX	
TGd		KKT	KGT	YST	TRS	TST	TGS	KRC	KRC	TST	YST	YST	YRS	KRC	WRC	WRC	WRC	WRC	
11 SER		TCX	AXX	TXX	XCX	XXX	XCX	TCX	TCX	XXX	TXX	TXX	TCX	TCX	WRC	WRC	WRC	WRC	
TCX, AGC		KYT	RGT	YCT	TMC	TCT	TSG	KMC	KMC	TCT	YCT	YCT	YMG	TCX	ARC	ARC	ARC	ARC	
12 THR		ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ACX	ARC	ARC	ARC	ARC	
ACX		RYT	RST	MCT	WMC	WCT	WSG	RMC	RMC	WCT	MCT	MCT	MMG	RMC	AMC	AMC	AMC	AMC	
13 ARG		CGX	CXX	XGX	CGX	CGX	CGX	CGX	CGX	CGX	XGX	XGX	XGX	CGX	CGX	CGX	CGX	CGX	
CGX, AGag		SKT	SGT	CST	YRC	YST	YGG	SRC	SRC	YST	CST	CST	CRG	SRC	MRC	MRC	MRC	MRC	
14 LYS		AAA	AAG	AAA	AXA	AAG	AXA	AXA	AXA	AAG	AAG	AAG	AXX	AXA	XXG	XXG	XXG	XXG	
AAa,9		RWW	RRK	MMW	WAM	WMK	WGG	RAM	RAM	WMK	MMK	MMK	MAG	AXA	XXG	XXG	XXG	XXG	
15 HIS		CAX	CAX	XAX	CXX	CAX	CAC	CXX	CXX	CAX	XAX	XAX	XXC	CXX	XXC	XXC	XXC	XXC	
CAIC		SWT	SRT	CMT	YAC	YMT	YRS	SAC	SAC	YMT	CMT	CMT	CAS	CXX	MAC	MAC	MAC	MAC	
16 PRO		CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	
CCX		SYT	SST	CCT	YMC	YCT	YSG	SMC	SMC	YCT	CCT	CCT	CMG	CCX	CCX	CCX	CCX	CCX	
17 GLU		XAG	XAA	GAG	GAG	GAG	GAG	XXG	XXG	GAG	GAG	GAG	GXX	XXG	XXG	XXG	XXG	XXG	
GAag		GWK	GRW	SMK	KAM	KWK	KRG	GAS	GAS	KWK	SMK	SMK	SAG	XXG	GXX	GXX	GXX	GXX	
18 ASP		XAX	XAX	GAX	GAX	GAX	GAX	XXX	XXX	GAX	GAX	GAX	SAS	XXX	RAS	RAS	RAS	RAS	
GAcl		GWT	GRT	SMT	KAC	KMT	KRS	GAC	GAC	KMT	SMT	SMT	SAS	XXX	RAC	RAC	RAC	RAC	
19 GLN		CAG	CAA	XAG	CXA	CAA	CXG	SAS	SAS	CAG	XAG	XAG	XXX	CXG	CXG	CXG	CXG	CXG	
CAag		SWK	SRW	GMK	YMW	YMW	YRG	SAS	SAS	YMK	GMK	GMK	CAG	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	
20 ASN		AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx	AAx
AAcl		RWT	RRT	MMT	WAC	WMT	WRS	RAC	RAC	WMT	MMT	MMT	MAS	RAC	AAC	AAC	AAC	AAC	



12A

M	16	17	18
ATG	D GAC	V GTT	
GCX	XCX	XCX	2(25)
RYG	GMC	GYT	
GGX	XGX	XGX	2(27)
RSG	GRC	GKT	
GXX	XTX	XGX	2(28)
RTG	GWC	GKT	
TXX	CTX	CXX	2(30)
WTG	SWC	STT	
XXC	ATX	AXX	2(34)
ATS	RWC	RTT	
TXC	TTX	TXX	2(30)
WTS	KWC	KTT	
TAC	TXX	TAX	2(24)
WWS	KAC	KWT	
TGX	TGG	TGG	2(43)
WKG	KRS	KKK	
XXX	ATG	AXG	2(47)
ATG	RWS	RTK	
TGC	TGX	TGX	2(31)
WKS	KRC	KKT	
TCX	TCX	TCX	2(24)
WYG	KMC	KYT	
XAX	ACX	ACX	2(30)
AWG	RMC	RYT	
XGX	CGX	CGX	2(30)
AKG	SRC	SKT	
XAX	AXA	AAA	2(41)
AWG	RAM	RWW	
CAC	CXX	CAX	2(27)
MWS	SAC	SWT	
CCX	CCX	CCX	2(29)
MYG	SMC	SYT	
GAX	XXG	XAA	2(35)
RWG	GAS	GWW	
GAC	XXX	XAX	2(24)
RWS	GAC	GWT	
CAX	CXG	CAG	2(39)
MWG	SAS	SWK	
XAC	AXX	AAX	2(28)
AWS	RAC	RWT	
		平均	2(31)

 12B

VH	CDR-1	P-H-1	AMJC	YSG	SYT	YMC	NYC	CYC	CMC	YSG	SMC	SST	SMC	MMM	YGT	SMG	YMC	YTC	SCT	MMM	YMC	YMC	CMG	SMC	SMC	SYT		
	CDR-2	P-H-2	YSG	AMJC	SYT	YMC	CCT	NYC	CMC	YSG	SMC	SST	SMC	MMM	YGT	SMG	YMC	YTC	SCT	MMM	YMC	YMC	CMG	SMC	SMC			
	CDR-3	P-H-3	AMJC	YSG	SYT	YMC	CCT	NYC	CMC	YSG	SMC	SST	SMC	MMM	YGT	SMG	YMC	YTC	SCT	MMM	YMC	YMC	CMG	SMC	SMC			
通用文库																												
VL	CDR-1	E-L-1	SRK	GRK	SAG	GRK	SAS	RAM	KMK	SRW	GRK	SRW	GRW	KMW	KMW	SRK	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	
	CDR-2	E-L-2	SRK	GRK	SAG	GRK	RAM	SRW	KMK	SRW	GRK	SRW	GRW	KMW	KMW	SRK	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	
	CDR-3	E-L-3	SRK	GRK	SAG	GRK	RAM	SRW	KMK	SRW	GRK	SRW	GRW	KMW	KMW	SRK	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	
通用文库																												
VH	CDR-1	E-H-1	RAS	KRG	GRW	GRW	RWC	KAM	SAS	KAM	RAM	GRW	GRW	RAM	RAM	GAG	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	
	CDR-2	E-H-2	RAS	KRG	GRW	GRW	RWC	KAM	SAS	KAM	RAM	GRW	GRW	RAM	RAM	GAG	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	
	CDR-3	E-H-3	RAS	KRG	GRW	GRW	RWC	KAM	SAS	KAM	RAM	GRW	GRW	RAM	RAM	GAG	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	GRW	
通用文库																												
ASP (D)	CDR-1	D-L-1	SRT	GRT	SAS	SAS	SAC	RAC	GRT	KMT	KMT	SRY	KMT	SRT	RMC	SRT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	
	CDR-2	D-L-2	SRT	GRT	SAS	SAS	RAC	RAC	GRT	KMT	KMT	SRY	KMT	SRT	RMC	SRT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	
	CDR-3	D-L-3	SRT	GRT	SAS	SAS	RAC	RAC	GRT	KMT	KMT	SRY	KMT	SRT	RMC	SRT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	GWT	
通用文库																												
VL	CDR-1	Q-L-1	CRK	SRK	CAG	SRK	CAS	MAS	SRK	YMK	YMK	CRK	YMK	YMK	YMK	CRK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK
	CDR-2	Q-L-2	CRK	SRK	CAG	SRK	CAS	MAS	SRK	YMK	YMK	CRK	YMK	YMK	YMK	CRK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK
	CDR-3	Q-L-3	CRK	SRK	CAG	SRK	CAS	MAS	SRK	YMK	YMK	CRK	YMK	YMK	YMK	CRK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK	YMK
通用文库																												
VH	CDR-1	Q-H-1	MAS	YRG	SMK	SMK	MWS	CMK	YAM	YMK	YMK	SRK	SAS	MAM	YRG	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK
	CDR-2	Q-H-2	MAS	YRG	SMK	SMK	MWS	CMK	YAM	YMK	YMK	SRK	SAS	MAM	YRG	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK
	CDR-3	Q-H-3	MAS	YRG	SMK	SMK	MWS	CMK	YAM	YMK	YMK	SRK	SAS	MAM	YRG	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK	SAS	SRK
通用文库																												
VL	CDR-1	N-L-1	BRT	RRT	MAS	MAS	MAC	AAC	RRT	WAS	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT
	CDR-2	N-L-2	BRT	RRT	MAS	MAS	MAC	AAC	RRT	WAS	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT
	CDR-3	N-L-3	BRT	RRT	MAS	MAS	MAC	AAC	RRT	WAS	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT	WRT
通用文库																												
VH	CDR-1	N-H-1	AAC	YRS	RWT	RWT	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC
	CDR-2	N-H-2	AAC	YRS	RWT	RWT	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC
	CDR-3	N-H-3	AAC	YRS	RWT	RWT	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC	AWC



13D

专利名称(译)	免疫球蛋白通用文库		
公开(公告)号	CN1653335A	公开(公告)日	2005-08-10
申请号	CN03811298.1	申请日	2003-04-16
[标]发明人	罗伯特欧克瑞		
发明人	罗伯特·克瑞		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/00 C07K16/10 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/1063 C07K2317/622 C07K2317/565 C07K2317/21		
优先权	60/373558 2002-04-17 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了所感兴趣免疫球蛋白的文库，所述文库含有突变的所感兴趣免疫球蛋白，其中单个的预定氨基酸在所感兴趣免疫球蛋白的一个或多个互补决定区的一个或多个位点上被取代。所述文库含有一系列子文库，其中预定的氨基酸在所感兴趣免疫球蛋白的六个互补决定区(CDR)中的每一个上以及CDR的每一个可能的组合变体上“步移”，得到包含突变免疫球蛋白的子文库，其中所述突变免疫球蛋白在每个CDR的一个或多个位点上具有预定的氨基酸，总体来说在每一个CDR的每一个位点上都具有预定的氨基酸。本发明进一步包括通用文库，所述通用文库中对于作为单个的预定氨基酸的每一个天然存在的氨基酸都有一个这样的文库，一共是二十个文库；而且还包括编码所述文库的核苷酸文库。

