

Generation and Next Generation Sequencing-based Characterization of a Large Human Combinatorial Antibody Library

Hye Lim Choi ¹, Ha Rim Yang ¹, Ha Gyeong Shin ¹, Kyusang Hwang ¹, Ji Woong Kim ², Ji Hyun Lee ¹, Taehoon Ryu ³, Yushin Jung ³ and Sukmook Lee ^{1,4,5,*}

¹ Department of Biopharmaceutical Chemistry, Kookmin University, Seoul 02707, Republic of Korea

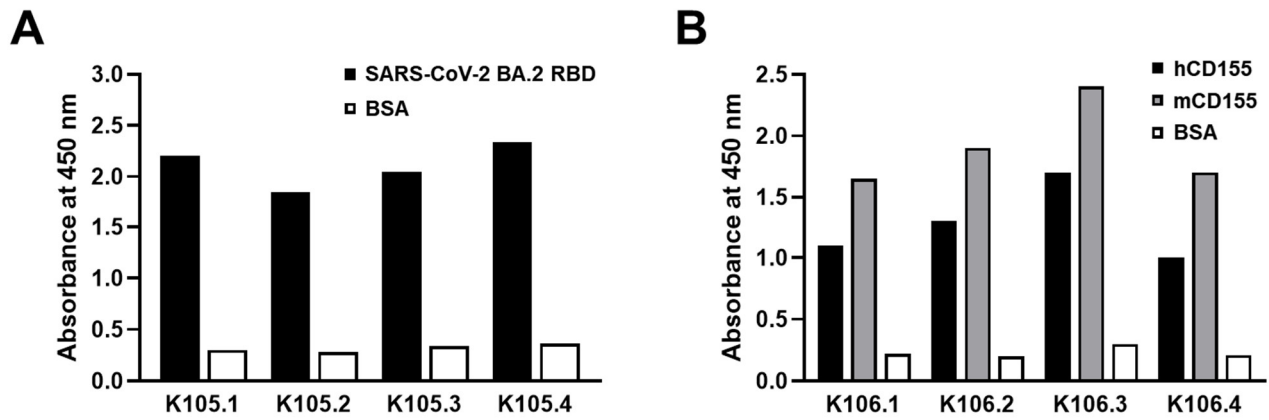
² Department of Chemistry, Kookmin University, Seoul 02707, Republic of Korea

³ ATG Lifetech Inc., Seoul 08507, Republic of Korea

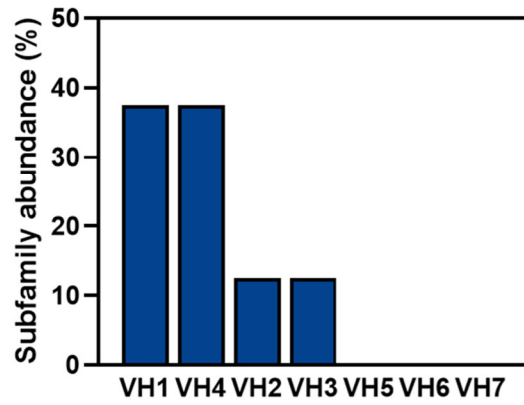
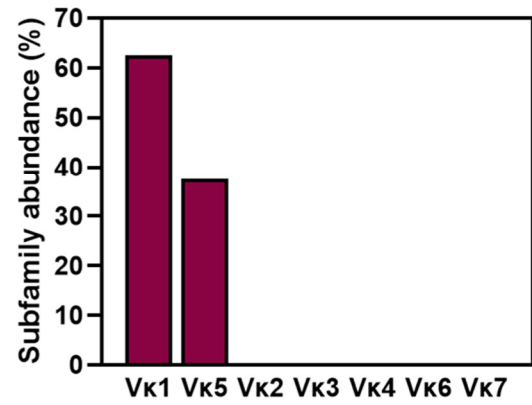
⁴ Department of Applied Chemistry, Kookmin University, Seoul 02707, Republic of Korea

⁵ Antibody Research Institute, Kookmin University, Seoul 02707, Republic of Korea

* Correspondence: lees2018@kookmin.ac.kr; Tel.: +82-2-910-6763



Supplementary Figure S1. Specific binding of the selected scFvs to target antigens. Phage ELISA was performed to verify the reactivity of the selected scFvs to SARS-CoV-2 BA.2 RBD (A) or the cross-species reactivity of the selected scFvs to human and mouse CD155 (hCD155 and mCD155) (B). Bovine serum albumin (BSA) was used as a negative control.

A**B**

Supplementary Figure S2. Abundance of each variable domain subfamily observed in the scFvs selected from the constructed library. Following the germline classification of the antibody sequences selected from the library, each VH (A) and Vκ (B) subfamily was depicted as percentage bar graphs.

Supplementary Table S1. Primers used for the construction of human combinatorial antibody library.

Primer name	5' to 3' Sequence
<i>Primers for VH germline genes</i>	
HSCVH1-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
HSCVH2-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG
HSCVH35-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTGCAGCTGGTGSAGTCTGG
HSCVH3a-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTG
HSCVH4-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
HSCVH4a-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG
VH1 Fw	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTCCAGCTKGTRCAGTCTGG
VH1 Fw_2	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGGTGAATCTGG
VH157 Fw	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGGTGGARTCTGG
VH2 Fw	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCTG
VH4 Fw	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCG
VH6 Fw	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
HSCG1234-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACCGATGGGCCCTTGGTGGARG
HSCM-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTAAGGGTTGGGGCGGATGCACTCCC
<i>Primers for Vk germline genes</i>	
HSCK1-F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCC
HSCK24-F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACYCAGTCTCC
HSCK3-F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGWTGACRCAGTCTCC
HSCK5-F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCACACTCACGCAGTCTCC
VK1 Fw	GGGCCCAGGCGGCCGACATCCRGDTGACCCAGTCTCC
VK3 Fw	GGGCCCAGGCGGCCGAAATTGTRWTGACRCAGTCTCC
VK5 Fw	GGGCCCAGGCGGCCGAAACGACACTCACGCAGTCTC
VK246 Fw	GGGCCCAGGCGGCCGATATTGTGMTGACBCAGWCTCC
Vk-2 Fw	GGGCCCAGGCGGCCGATGTTGTGATGACYCAG
Vk-4 Fw	GGGCCCAGGCGGCCGACATCGTGATGACCCAGT
Vk-1 Fw_2	GGGCCCAGGCGGCCGCCATCCGGTTGACCCAGT
HSCJK140-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATSTCCACCTTGGTCCC
HSCJK20-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
HSCJK30-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATATCCACTTTGGTCCC
HSCJK50-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTAATCTCCAGTCGTGTC

Supplementary Table S2. The percentage of pairing of germline V and J gene segments in each VH and V κ of the constructed library.

VH	IGHJ 1-01	IGHJ 2-01	IGHJ 3-01	IGHJ 3-02	IGHJ 4-01	IGHJ 4-02	IGHJ 4-03	IGHJ 5-01	IGHJ 5-02	IGHJ 6-01	IGHJ 6-02	IGHJ 6-03	IGHJ 6-04
IGHV1-18	0.012	0.009	0.019	0.085	0.003	0.350	0.001	0.003	0.078	0.001	0.105	0.043	0.002
IGHV1-2	0.017	0.012	0.028	0.099	0.004	0.573	0.002	0.006	0.170	0.003	0.151	0.061	0.001
IGHV1-24	0.003	0.004	0.004	0.027	0.000	0.049	0.000	0.000	0.019	0.000	0.030	0.007	0.000
IGHV1-3	0.005	0.008	0.017	0.037	0.003	0.194	0.001	0.003	0.082	0.000	0.054	0.037	0.001
IGHV1-38-4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV1-45	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
IGHV1-46	0.013	0.010	0.011	0.094	0.003	0.387	0.001	0.004	0.088	0.001	0.080	0.030	0.000
IGHV1-58	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.008	0.000	0.000	0.002	0.000	0.003	0.001	0.000
IGHV1-69	0.044	0.065	0.064	0.239	0.007	0.745	0.002	0.014	0.214	0.003	0.388	0.148	0.002
IGHV1-69-2	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.009	0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000
IGHV1-8	0.055	0.014	0.006	0.040	0.001	0.176	0.009	0.001	0.054	0.000	0.048	0.030	0.000
IGHV1/OR15-1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV1/OR15-2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV1/OR15-3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV2-26	0.028	1.005	0.100	0.412	0.009	1.968	0.003	0.018	1.493	0.007	1.150	0.218	0.004
IGHV2-5	0.293	0.486	0.562	1.893	0.097	13.331	0.236	0.147	2.455	0.003	1.274	0.448	0.009
IGHV2-70	0.008	0.025	0.094	0.293	0.011	0.984	0.002	0.033	0.340	0.001	0.269	0.106	0.002
IGHV2-70D	0.004	0.041	0.097	0.426	0.008	1.424	0.002	0.046	0.218	0.001	0.389	0.060	0.005
IGHV3-11	0.005	0.013	0.015	0.041	0.002	0.216	0.000	0.004	0.028	0.000	0.044	0.022	0.001
IGHV3-13	0.001	0.019	0.002	0.011	0.000	0.036	0.000	0.000	0.006	0.000	0.012	0.004	0.000
IGHV3-15	0.008	0.007	0.006	0.028	0.001	0.196	0.002	0.002	0.025	0.000	0.047	0.011	0.000
IGHV3-20	0.000	0.002	0.001	0.003	0.000	0.018	0.000	0.000	0.004	0.000	0.004	0.004	0.000
IGHV3-21	0.003	0.006	0.008	0.031	0.002	0.160	0.000	0.002	0.024	0.000	0.041	0.017	0.000
IGHV3-22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV3-23	0.021	0.035	0.030	0.112	0.012	0.737	0.001	0.012	0.091	0.000	0.133	0.050	0.001
IGHV3-30	0.026	0.028	0.026	0.095	0.007	0.648	0.001	0.007	0.086	0.000	0.134	0.054	0.001
IGHV3-30-3	0.010	0.007	0.008	0.049	0.002	0.193	0.001	0.001	0.035	0.000	0.066	0.016	0.000
IGHV3-33	0.007	0.032	0.007	0.074	0.004	0.269	0.001	0.003	0.039	0.001	0.075	0.008	0.000
IGHV3-35	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV3-43	0.001	0.002	0.003	0.003	0.001	0.049	0.000	0.001	0.006	0.000	0.009	0.008	0.000
IGHV3-43D	0.001	0.001	0.002	0.003	0.001	0.025	0.000	0.001	0.004	0.000	0.015	0.004	0.000
IGHV3-47	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV3-48	0.007	0.014	0.015	0.055	0.004	0.280	0.000	0.005	0.041	0.000	0.052	0.025	0.000
IGHV3-49	0.007	0.005	0.003	0.018	0.001	0.126	0.000	0.003	0.020	0.000	0.024	0.018	0.000
IGHV3-52	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV3-53	0.004	0.008	0.008	0.030	0.001	0.110	0.000	0.001	0.016	0.000	0.032	0.010	0.000
IGHV3-64	0.001	0.002	0.002	0.004	0.000	0.031	0.000	0.000	0.004	0.000	0.005	0.002	0.000
IGHV3-64D	0.000	0.004	0.001	0.004	0.000	0.028	0.000	0.001	0.002	0.000	0.012	0.000	0.000
IGHV3-66	0.004	0.004	0.006	0.015	0.001	0.073	0.000	0.001	0.008	0.000	0.012	0.010	0.000
IGHV3-69-1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000
IGHV3-7	0.012	0.009	0.007	0.033	0.002	0.231	0.000	0.003	0.034	0.000	0.044	0.021	0.000
IGHV3-71	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV3-72	0.008	0.005	0.006	0.026	0.002	0.073	0.000	0.000	0.006	0.000	0.013	0.005	0.000
IGHV3-73	0.001	0.003	0.003	0.015	0.002	0.075	0.000	0.000	0.014	0.000	0.008	0.007	0.000
IGHV3-74	0.004	0.011	0.008	0.033	0.001	0.177	0.000	0.002	0.030	0.000	0.048	0.010	0.000
IGHV3-9	0.019	0.032	0.030	0.112	0.003	0.439	0.004	0.006	0.050	0.000	0.095	0.047	0.000
IGHV3-NL1	0.001	0.001	0.001	0.003	0.000	0.016	0.000	0.000	0.002	0.000	0.003	0.001	0.000
IGHV3/OR16-10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV3/OR16-8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV4-28	0.000	0.002	0.000	0.006	0.000	0.017	0.000	0.001	0.008	0.000	0.005	0.001	0.000
IGHV4-30-2	0.003	0.014	0.010	0.025	0.002	0.118	0.000	0.002	0.040	0.000	0.020	0.005	0.000

IGHV4-30-4	0.008	0.034	0.017	0.079	0.008	0.386	0.001	0.011	0.118	0.000	0.076	0.037	0.001
IGHV4-31	0.011	0.067	0.048	0.164	0.027	0.673	0.002	0.013	0.174	0.001	0.283	0.019	0.001
IGHV4-34	0.188	0.715	0.434	1.062	0.073	10.667	0.013	0.053	2.424	0.024	2.629	0.480	0.011
IGHV4-38-2	0.046	0.124	0.053	0.229	0.018	1.116	0.003	0.014	0.313	0.001	0.181	0.079	0.002
IGHV4-39	0.092	0.204	0.097	0.574	0.038	3.059	0.009	0.048	0.983	0.002	0.679	0.212	0.003
IGHV4-4	0.024	0.058	0.046	0.189	0.015	1.089	0.002	0.024	0.285	0.001	0.294	0.035	0.001
IGHV4-55	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGHV4-59	0.035	0.281	0.079	0.390	0.018	1.447	0.003	0.068	0.507	0.001	0.537	0.113	0.002
IGHV4-61	0.017	0.091	0.030	0.159	0.008	0.835	0.001	0.033	0.204	0.001	0.195	0.070	0.004
IGHV4/OR15-8	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.015	0.000	0.001	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000
IGHV5-10-1	0.001	0.006	0.005	0.029	0.001	0.053	0.000	0.000	0.017	0.000	0.036	0.001	0.002
IGHV5-51	0.019	0.039	0.046	0.266	0.005	0.615	0.002	0.009	0.140	0.000	0.151	0.051	0.001
IGHV6-1	0.478	0.456	0.216	1.917	0.039	8.102	0.011	0.061	1.228	0.003	2.979	0.124	0.005
IGHV7-4-1	0.007	0.013	0.020	0.036	0.001	0.264	0.002	0.003	0.067	0.000	0.044	0.035	0.000
IGHV7-81	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Vκ	IGKJ1-01	IGKJ2-01	IGKJ2-02	IGKJ2-03	IGKJ2-04	IGKJ3-01	IGKJ4-01	IGKJ4-02	IGKJ5-01
IGKV1-12	0.099	0.219	0.005	0.005	0.001	0.431	0.657	0.009	1.021
IGKV1-13	0.032	0.073	0.001	0.001	0.000	0.337	0.562	0.001	1.128
IGKV1-16	0.089	0.139	0.003	0.003	0.001	0.355	0.448	0.002	0.872
IGKV1-17	0.150	0.165	0.006	0.004	0.001	0.208	0.512	0.003	0.333
IGKV1-27	0.120	0.080	0.002	0.002	0.000	0.617	0.535	0.002	0.319
IGKV1-33	0.069	0.500	0.009	0.017	0.005	1.198	1.646	0.006	2.321
IGKV1-37	0.004	0.021	0.000	0.009	0.000	0.021	0.047	0.000	0.199
IGKV1-39	0.635	1.099	0.035	0.034	0.012	1.617	1.551	0.012	2.776
IGKV1-5	0.627	0.507	0.017	0.024	0.008	0.347	0.749	0.005	0.617
IGKV1-6	0.123	0.128	0.002	0.001	0.000	0.069	0.241	0.001	0.080
IGKV1-8	0.142	0.146	0.002	0.001	0.001	0.395	0.525	0.003	0.564
IGKV1-9	0.104	0.290	0.008	0.010	0.003	0.919	0.958	0.005	2.695
IGKV1-NL1	0.068	0.078	0.002	0.001	0.000	0.093	0.137	0.000	0.545
IGKV1/OR-3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGKV1/OR-4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGKV1/OR10-1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGKV1/OR2-1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGKV1/OR2-108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
IGKV1D-12	0.010	0.041	0.002	0.000	0.000	0.089	0.137	0.001	0.246
IGKV1D-13	0.009	0.072	0.000	0.000	0.000	0.087	0.109	0.000	0.093
IGKV1D-16	0.018	0.027	0.001	0.001	0.000	0.046	0.087	0.000	0.205
IGKV1D-17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGKV1D-43	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000	0.115	0.026	0.000	0.093
IGKV1D-8	0.005	0.007	0.000	0.000	0.000	0.003	0.007	0.000	0.010
IGKV2-18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001
IGKV2-24	0.069	0.196	0.003	0.002	0.000	0.152	0.181	0.000	0.489
IGKV2-28	0.244	0.547	0.054	0.007	0.005	1.364	1.022	0.005	2.025
IGKV2-29	0.020	0.051	0.002	0.001	0.000	0.078	0.126	0.000	0.189
IGKV2-30	0.340	0.622	0.016	0.008	0.002	1.339	0.849	0.002	2.042
IGKV2-4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGKV2-40	0.011	0.059	0.001	0.007	0.000	0.034	0.051	0.000	0.156
IGKV2D-18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IGKV2D-24	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.002
IGKV2D-26	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.009	0.000	0.001
IGKV2D-29	0.148	0.302	0.004	0.003	0.001	0.724	0.810	0.002	0.831
IGKV2D-30	0.017	0.039	0.000	0.001	0.000	0.091	0.058	0.000	0.206
IGKV3-11	0.102	0.182	0.005	0.003	0.005	0.874	1.164	0.003	1.640

IGKV3-15	0.462	0.723	0.022	0.012	0.005	0.848	1.449	0.014	1.641
IGKV3-20	1.164	1.695	0.056	0.030	0.009	2.969	2.976	0.009	3.316
IGKV3-7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001
IGKV3/OR2-268	0.004	0.008	0.000	0.000	0.000	0.011	0.016	0.000	0.016
IGKV3D-11	0.001	0.003	0.000	0.000	0.000	0.007	0.006	0.000	0.022
IGKV3D-15	0.049	0.082	0.003	0.001	0.001	0.076	0.192	0.002	0.359
IGKV3D-20	0.065	0.108	0.004	0.001	0.001	0.274	0.405	0.002	0.496
IGKV4-1	1.555	2.195	0.058	0.026	0.023	4.017	5.313	0.027	6.065
IGKV5-2	0.701	1.520	0.013	0.175	0.003	1.413	1.012	0.004	0.120
IGKV6-21	0.008	0.015	0.000	0.000	0.000	0.027	0.033	0.000	0.209
IGKV6D-21	0.003	0.007	0.000	0.001	0.000	0.003	0.008	0.000	0.015
IGKV6D-41	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
IGKV7-3	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000

The percentages of all the pairing of germline V and J gene segments having cut-off ≥ 0.001 are represented. In case of the pairing of the gene segments cut-off < 0.001 were expressed as 0.000.

Supplementary Table S3. The percentage of amino acid composition at each position in HCDRs of the constructed library.

Position	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
H31	1.58	0.10	4.97	0.32	0.06	16.58	0.27	0.68	0.29	0.06	0.05	9.96	0.40	0.03	1.83	36.73	25.66	0.20	0.00	0.23
H32	4.88	0.20	1.81	0.19	1.38	7.54	2.87	0.64	0.28	0.38	0.02	15.03	1.31	0.09	1.86	23.85	4.80	0.34	0.01	32.52
H33	7.13	0.24	2.78	1.19	1.20	27.60	0.82	0.62	0.67	0.29	0.03	3.30	0.99	0.21	5.66	16.94	3.12	0.63	3.21	23.34
H34	11.09	0.43	0.37	0.79	1.11	1.40	0.76	6.67	0.03	2.09	20.28	0.26	0.10	0.05	0.13	0.74	0.80	19.79	21.61	11.49
H35	12.28	2.13	0.49	0.02	0.70	24.31	7.54	0.41	0.05	0.15	0.05	4.87	0.18	0.22	3.29	22.90	5.22	0.70	4.73	9.77
H35a	0.53	0.39	0.07	0.03	0.05	4.13	0.02	0.08	0.00	0.83	0.43	0.31	0.02	0.00	0.21	2.90	0.52	48.67	40.79	0.02
H35b	3.58	0.22	0.85	0.00	0.04	43.06	1.05	0.41	0.03	0.04	0.00	23.34	0.04	0.00	0.31	23.23	2.72	0.61	0.00	0.47
H50	1.29	0.21	0.78	17.58	1.91	3.89	6.13	3.29	1.09	16.73	0.27	2.03	0.04	0.46	19.57	7.73	1.79	4.33	2.90	7.99
H51	0.28	0.01	0.01	0.00	1.06	0.12	0.01	75.92	0.05	1.37	1.68	0.13	0.02	0.00	0.06	0.65	14.23	4.38	0.00	0.03
H52	0.42	0.17	6.14	0.11	8.17	0.42	2.52	2.32	1.19	0.49	0.04	18.46	0.04	0.17	1.27	8.64	1.11	0.22	0.62	47.46
H52a	3.45	0.12	0.71	0.36	2.97	5.35	1.36	0.21	0.18	0.28	0.01	1.32	22.74	1.22	0.65	7.78	3.21	0.46	3.83	43.78
H52b	0.16	0.04	0.31	0.35	0.03	1.94	0.01	0.12	7.38	0.64	5.03	0.55	0.01	0.18	79.53	1.69	1.47	0.04	0.48	0.05
H52c	40.34	0.01	3.76	0.25	0.51	5.69	0.37	2.09	0.46	0.65	0.02	2.20	4.02	0.00	1.03	9.20	25.80	3.49	0.01	0.11
H53	0.49	0.12	5.37	0.39	0.53	2.83	19.22	1.60	0.32	0.43	0.29	4.28	0.93	0.86	0.73	22.96	0.91	0.32	24.31	13.11
H54	0.53	0.04	21.72	0.56	1.95	9.87	0.24	0.56	11.65	0.39	0.04	12.15	0.05	0.38	2.35	32.97	4.09	0.22	0.01	0.23
H55	0.79	0.04	27.66	0.91	0.07	47.65	0.14	0.10	0.08	0.05	0.02	1.29	0.05	0.01	0.66	5.43	0.64	0.35	13.60	0.45
H56	1.44	0.14	25.47	6.49	0.77	2.78	1.25	1.41	0.96	0.18	0.06	8.33	0.15	0.33	2.24	29.30	6.94	0.63	0.01	11.12
H57	3.35	0.00	0.23	1.47	0.29	0.14	0.44	3.01	28.54	0.12	0.15	10.00	1.57	0.65	1.19	2.30	44.76	0.49	0.00	1.29
H58	0.61	0.07	13.93	2.11	3.86	1.54	2.22	0.73	2.26	0.25	0.10	24.11	0.14	0.31	20.35	7.00	1.86	0.44	0.05	18.07
H59	0.01	0.19	0.30	0.01	1.25	0.05	1.12	0.08	0.05	0.15	0.00	0.46	0.05	0.14	0.03	1.06	0.04	0.07	0.00	94.92
H60	27.95	0.04	0.32	0.22	0.02	0.65	0.26	0.48	0.55	0.18	0.07	35.21	0.31	0.03	1.74	29.09	1.78	1.03	0.00	0.07
H61	2.40	0.00	8.31	1.12	0.07	0.67	0.13	0.33	0.11	2.00	0.07	0.09	57.18	7.00	0.31	1.45	9.66	9.07	0.02	0.01
H62	0.64	0.02	0.10	0.05	0.59	0.59	0.04	0.02	5.71	0.07	0.04	0.62	0.98	0.09	0.40	89.36	0.48	0.02	0.00	0.18
H63	0.13	0.01	0.00	0.05	8.89	0.05	0.11	0.14	0.00	66.80	0.65	0.00	0.17	0.10	0.12	0.04	0.01	22.67	0.01	0.03
H64	0.22	0.00	0.11	3.02	0.00	0.18	0.12	0.02	74.73	0.10	0.37	1.36	0.02	10.80	7.30	0.38	1.16	0.05	0.04	0.02
H65	0.17	0.07	0.87	0.38	0.02	21.71	0.06	0.12	0.02	0.01	0.01	2.94	0.13	0.00	1.26	65.33	6.82	0.04	0.01	0.01
H95	6.36	0.45	12.36	5.68	1.11	18.56	3.11	4.86	1.52	4.24	1.37	1.32	1.49	2.46	12.94	8.04	5.89	5.82	1.00	1.42
H96	4.61	0.42	4.08	3.69	2.05	12.97	2.34	3.57	2.38	7.80	0.86	2.60	10.05	3.04	13.84	8.12	5.87	4.98	1.84	4.89
H97	5.83	1.65	5.14	2.80	3.14	17.11	2.91	3.51	1.44	4.78	1.32	2.81	5.73	1.72	8.57	9.63	5.61	5.84	1.87	8.59
H98	7.29	1.34	6.15	2.40	2.80	16.77	1.44	3.39	0.69	3.68	1.17	3.27	3.55	1.53	5.99	11.66	6.81	6.37	3.25	10.45
H99	7.98	1.33	5.40	2.07	3.60	15.78	1.59	2.39	0.92	4.64	1.07	3.23	2.76	1.27	4.80	14.47	6.97	5.12	2.97	11.65
H100	7.41	0.95	6.13	1.81	5.16	16.17	1.38	2.86	1.29	4.04	1.11	2.80	2.69	1.07	4.24	14.05	5.77	5.56	5.29	10.22
H100a	6.82	1.48	6.16	1.61	6.92	15.29	2.18	2.15	0.90	5.44	1.42	3.19	4.21	1.02	3.81	12.80	5.25	4.38	3.52	11.44
H100b	5.81	1.93	4.50	1.58	9.81	15.07	1.47	2.30	0.91	3.96	1.42	3.80	3.88	1.03	3.92	10.81	4.76	4.30	6.70	12.05
H100c	5.34	1.74	4.68	1.41	12.01	11.96	2.10	2.25	1.00	5.85	1.38	3.46	4.02	0.70	3.72	8.62	4.42	4.53	5.13	15.67
H100d	5.97	2.70	4.18	2.03	12.45	11.04	2.25	1.59	1.08	4.11	1.60	3.14	4.20	0.61	3.54	7.84	3.88	3.79	4.42	19.59
H100e	3.79	1.63	3.44	0.86	17.66	10.28	2.23	1.31	0.98	5.26	3.27	3.18	3.69	1.17	4.26	6.08	2.26	2.55	6.91	19.18
H100f	4.51	1.77	3.67	0.93	18.58	9.98	1.55	1.32	1.19	4.14	5.08	3.82	3.95	0.57	4.07	5.18	1.83	1.96	3.57	22.33
H100g	4.55	0.40	2.92	0.82	21.78	12.18	3.61	1.54	1.38	3.91	5.07	2.44	3.19	0.68	3.16	3.02	2.51	2.26	3.97	20.60
H100h	5.27	0.38	2.27	1.59	25.47	11.06	1.69	1.08	1.12	3.49	7.26	2.64	2.91	0.81	1.98	2.97	2.07	1.40	3.65	20.89
H100i	4.78	0.53	2.64	0.43	24.58	12.93	1.68	1.33	0.27	3.62	11.45	4.29	1.67	0.24	0.65	1.97	0.82	1.81	4.86	19.43
H100j	5.30	0.25	0.30	0.06	32.66	9.95	0.73	0.60	0.06	4.46	21.95	0.26	1.26	0.06	0.38	0.76	0.64	1.23	6.51	12.61
H100k	0.05	0.30	0.04	0.03	61.53	0.07	0.03	1.72	0.04	4.56	28.04	0.04	0.22	0.05	0.07	0.76	0.27	1.93	0.07	0.21
H101	1.34	0.03	85.50	1.97	0.30	3.32	1.00	0.14	0.16	0.90	0.06	0.97	0.45	0.99	0.41	0.69	0.38	0.61	0.17	0.62
H102	0.47	0.58	1.22	0.18	3.61	0.23	2.50	10.22	0.13	4.19	0.37	1.43	11.23	0.21	0.28	5.87	0.66	17.55	0.07	39.00

The percentages of the amino acid composition at each position in HCDRs having cut-off ≥ 0.01 are represented. In case of the amino acid compositions cut-off < 0.01 were expressed as 0.00.

Supplementary Table S4. The average percentage of amino acid composition in HCDR3 of the constructed library.

Amino acid composition (%)																			
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
4.9	1.0	8.5	1.7	14.0	11.6	1.9	2.5	0.9	4.4	5.0	2.6	3.7	1.0	4.2	7.0	3.5	4.3	3.5	13.7

Supplementary Table S5. The percentage of amino acid composition at each position in LCDRs of the constructed library.

Position	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
L24	0.01	0.00	0.00	0.12	0.00	0.65	0.02	0.02	23.25	0.04	0.10	0.04	0.01	5.57	69.13	0.10	0.46	0.01	0.46	0.00
L25	64.08	0.04	0.01	0.01	0.02	0.14	0.00	0.01	0.00	0.01	0.04	0.00	0.38	0.01	0.00	33.85	0.99	0.41	0.00	0.01
L26	0.03	0.07	0.03	0.00	0.00	0.84	0.01	0.04	0.01	0.01	0.00	0.56	0.01	0.00	0.31	97.29	0.78	0.00	0.00	0.00
L27	0.00	0.00	0.04	1.78	0.00	0.03	1.60	0.00	0.08	0.51	0.00	0.00	0.15	94.47	1.26	0.01	0.00	0.01	0.00	0.04
L27a	0.12	0.05	0.13	0.00	0.07	0.80	0.03	0.44	0.04	0.01	0.01	2.81	0.12	0.00	1.32	88.72	5.13	0.03	0.02	0.15
L27b	0.14	0.00	0.01	0.00	0.14	0.02	0.01	5.62	0.00	46.89	0.00	0.00	0.12	0.00	0.01	0.00	0.01	47.00	0.00	0.00
L27c	0.39	0.01	0.00	0.27	4.17	0.06	0.05	0.61	0.02	77.31	0.10	0.00	0.04	0.20	0.17	0.67	0.06	15.78	0.01	0.08
L27d	0.28	0.10	3.07	0.07	3.11	0.16	27.79	0.01	0.61	0.51	0.00	2.65	0.10	0.73	0.51	4.89	0.06	0.04	0.28	55.03
L27e	0.30	0.05	0.51	0.25	0.11	1.76	0.15	0.71	0.23	0.07	0.05	4.61	0.25	0.01	5.32	80.11	5.18	0.12	0.01	0.22
L27f	2.12	0.03	1.44	0.09	1.33	0.27	0.03	0.08	0.02	0.19	0.00	0.16	3.92	0.02	0.03	88.08	0.60	0.41	0.00	1.16
L28	1.05	0.02	19.52	0.14	0.46	15.05	0.41	1.71	0.52	0.68	0.02	23.63	0.12	0.01	0.48	21.25	2.38	12.16	0.00	0.40
L29	0.44	0.02	0.58	0.11	0.35	14.47	0.09	38.36	0.84	0.77	0.14	18.55	0.11	0.02	0.81	10.77	1.42	11.98	0.00	0.16
L30	1.03	0.04	3.29	0.38	0.27	4.76	0.79	0.66	20.05	0.22	0.18	11.06	0.08	0.37	5.87	42.93	2.60	0.45	0.13	4.86
L31	0.46	0.02	4.44	0.13	0.14	1.41	0.64	1.35	1.58	0.05	0.06	40.45	0.12	0.06	2.91	29.75	15.54	0.15	0.02	0.72
L32	1.59	0.61	4.85	0.15	4.62	0.18	2.54	0.03	0.42	0.50	0.01	6.98	0.03	0.30	0.36	4.72	0.20	0.04	6.59	65.30
L33	0.01	0.00	0.00	0.00	1.01	0.00	0.00	0.64	0.00	94.41	1.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.01	2.28	0.01	0.01
L34	62.38	0.04	5.39	0.12	0.23	3.99	1.02	0.26	0.05	0.07	0.01	18.27	0.06	0.02	0.03	3.22	1.66	1.21	0.00	1.96
L50	19.17	0.06	15.94	5.40	0.18	20.53	0.29	0.05	6.96	5.06	0.23	0.23	0.11	0.67	1.04	1.62	1.74	0.64	19.56	0.54
L51	80.09	0.00	0.04	0.13	0.03	5.07	0.01	1.13	0.02	0.39	0.02	0.03	0.25	0.00	0.02	0.98	3.23	8.55	0.00	0.00
L52	0.50	0.03	0.02	0.00	1.08	0.02	0.02	0.09	0.00	0.08	0.00	0.05	0.23	0.00	0.01	94.90	2.58	0.05	0.01	0.33
L53	0.77	0.01	0.73	0.05	0.15	0.39	0.63	2.23	1.81	0.07	0.07	23.93	0.04	0.29	2.25	25.54	40.13	0.24	0.01	0.66
L54	0.00	0.01	0.00	0.00	0.24	0.13	0.01	0.02	0.06	37.68	0.08	0.01	0.05	0.02	60.40	0.41	0.09	0.28	0.51	0.00
L55	32.87	0.00	5.38	27.45	3.54	0.59	1.17	0.12	0.99	0.47	0.01	0.08	0.39	23.71	0.48	0.10	0.11	2.39	0.01	0.15
L56	1.74	0.06	0.16	0.03	0.41	1.00	0.03	0.46	0.07	0.07	0.05	0.93	3.07	0.00	0.83	60.40	30.45	0.11	0.00	0.12
L89	0.02	0.05	0.00	0.12	0.03	0.02	3.07	0.10	0.19	5.34	13.19	0.13	0.06	77.04	0.16	0.17	0.06	0.21	0.00	0.04
L90	0.01	0.01	0.03	0.64	0.00	0.02	4.46	0.01	1.52	0.44	0.01	0.34	0.08	91.17	0.71	0.18	0.06	0.08	0.02	0.23
L91	7.31	0.69	0.97	0.05	2.88	5.75	4.75	0.38	0.01	4.38	0.08	0.65	0.12	0.09	5.65	10.58	2.24	0.65	0.02	52.73
L92	1.28	0.21	9.53	0.90	1.67	12.88	2.58	2.80	2.00	5.49	0.11	16.85	0.02	0.28	1.06	6.85	6.00	0.86	0.09	28.54
L93	0.97	0.04	4.19	1.00	0.29	3.39	5.61	1.69	1.04	0.66	0.10	17.49	0.14	7.47	2.63	42.49	9.40	0.45	0.05	0.90
L94	3.47	0.08	0.48	0.05	8.01	0.57	0.47	2.64	0.08	7.84	0.30	1.18	1.76	0.09	0.53	18.03	23.26	1.53	16.21	13.42
L95	0.52	0.00	0.03	0.08	0.41	0.23	0.29	0.12	0.03	4.13	0.10	0.02	88.41	0.49	1.33	2.72	0.48	0.42	0.12	0.05
L95a	3.71	0.29	0.18	0.81	0.80	3.52	1.15	0.85	0.34	9.20	1.52	0.06	57.68	3.01	6.86	7.32	1.30	0.87	0.18	0.35
L95b	7.60	0.05	0.81	10.27	0.87	20.33	0.05	3.02	1.24	8.76	7.69	0.51	5.15	0.90	10.40	10.02	6.35	4.47	1.29	0.22
L95c	1.48	0.00	0.98	2.95	1.62	24.84	0.06	19.50	0.19	4.21	3.65	0.36	18.19	0.08	1.07	11.25	7.65	1.53	0.14	0.25
L95d	6.90	0.04	44.57	0.76	0.09	4.45	0.04	0.22	0.13	4.14	0.71	0.09	9.71	0.00	0.22	24.80	0.49	2.27	0.00	0.36
L95e	0.36	0.00	3.21	0.00	0.36	17.86	0.00	0.00	0.00	0.71	10.36	0.00	52.50	1.79	0.36	10.36	1.43	0.71	0.00	0.00
L95f	0.00	0.00	15.69	9.80	7.84	3.92	0.00	0.00	0.00	0.00	41.18	0.00	9.80	0.00	0.00	3.92	7.84	0.00	0.00	0.00
L96	0.44	0.32	0.36	0.21	12.67	1.36	1.33	20.60	0.19	27.82	0.20	0.61	8.12	1.15	5.01	1.21	0.56	4.45	3.84	9.58
L97	1.46	0.01	0.06	0.01	0.20	0.29	0.10	0.52	0.06	0.67	0.04	0.26	0.48	0.01	0.18	2.30	93.14	0.21	0.00	0.00

The percentages of the amino acid composition at each position in LCDRs having cut-off ≥ 0.01 are represented. In case of the amino acid compositions cut-off < 0.01 were expressed as 0.00.

Supplementary Table S6. The average percentage of amino acid composition in LCDR3 of the constructed library.

Amino acid composition (%)																			
A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
2.4	0.1	5.4	1.8	2.5	6.6	1.6	3.5	0.5	5.6	5.3	2.6	16.8	12.2	2.4	10.1	10.7	1.2	1.5	7.1

Supplementary Table S7. Primers used for the generation of scFv sequences.

Primer name	5' to 3' Sequence
RSC-F	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCCAGGCGGCCGAGCTC
RSC-F_2	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCCAGGCGGCC
RSC-B	GAGGAGGAGGAGGAGGAGCCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTG