(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월19일
(11) 등록번호 10-2615744
(24) 등록일자 2023년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
C12N 15/1062 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7017165
(22) 출원일자(국제) 2018년11월16일
심사청구일자 2020년06월15일
(85) 번역문제출일자 2020년06월15일
(65) 공개번호 10-2020-0075028
(43) 공개일자 2020년06월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/061592
(87) 국제공개번호 WO 2019/099882
국제공개일자 2019년05월23일
(30) 우선권주장
62/588,914 2017년11월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2008536473 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
난트바이오 인코포레이티드
미국, 캘리포니아, 컬버 시티, 제퍼슨 불러바드 9920 (우: 90232)
(72) 발명자
올슨, 앤더스
미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920
(74) 대리인
이대호, 박건홍

전체 청구항 수 : 총 77 항　　　　심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 mRNA 디스플레이 항체 라이브러리 및 방법(mRNA DISPLAY ANTIBODY LIBRARY AND METHODS)

(57) 요 약

복수의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 고 다양성 핵산 라이브러리의 조성물, 방법 및 용도가 제시된다. 고 다양성 핵산 라이브러리는 (1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리를 포함하거나 이로부터 유래되며, 이들 각각은 복수의 구성원을 포함한다. 바람직하게는, 서브-라이브러리의 각각의 구성원은 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_L 서브-라이브러리의 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부는 재조합되어 발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성하며, 발현 라이브러리의 각각의 구성원은 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩한다.

대 표 도

PDB#	VH 유형	CDR1	CDR2	CDR-H3	H3 길이	κ 유형	CDRL3	κ55
2qsc	3-64	FNFSSYVMH	SAISSDGETTY	R[illegible]Y-NAFDV	14	k1-33	QQYDNLGDLSF	[illegible]55
4zyp	3-30	FSFSHYAMH	AVISYDGENTY	R[illegible]RI-YGMDV	14	k1-33	QQYDNLPPLTF	[illegible]55
4zs6	3-11	FSLSDYYMN	AYISSSSGYTN	R[illegible]RD-GYYKH	12	k1-33	QQYDKL--PTF	[illegible]55
1igm	3-23	FTFNIFVMS	SGVFGSGGNTD	KH[illegible]V-TGFDS	12	k1-33	QQYQNLP-LTF	[illegible]55
1dfb	3-9	FTFNDYAMH	SGISWDSSSIG	KG[illegible]D-VAFDI	17	k1-5	QQYNSY---SF	[illegible]55
4ers	3-30	FTFSSYGMH	AVMYYDGSNKD	R[illegible]KD-YGLDV	19	k1-17	LQHNSNP-LTF	[illegible]55
4u6v	3-13	FTFSSHDMH	GIGTAG-DTYY	R[illegible]RY-YGMDV	14	k1-5	KQYADYW--TF	[illegible]55
1dee	3-30	FTFSGYGMH	ALISYDESNKY	KV[illegible]F-APNDY	12	k1-39	QQSYSAP-RTF	Q55
2r56	3-23	FTFRHHGMT	ASLSGSGTKTH	KA[illegible]R-GYFDL	12	k1-16	QQYHSYP-WTF	Q55
2uzi	3-48	FTFSTFSMN	SYISRTSKTIY	RGR...FFDY	6	k1-39	QQSVMIP-MTF	Q55
1dql	3-30	FTFSSYAMH	AVISSDGGNKY	RGNP-GGGDY	14	k1-33	QQNSNW---TF	Q55
4py8	3-30	FTFRMYATH	ALISYDGSNKY	R[illegible]LG-GIMDV	13	k1-12	QQANSFP-LTF	Q55
3idx	3-30	FTFRNYAMH	ALIKYDGRNKY	R[illegible]IG-YGPDY	19	k1-33	QQHQNVPLTTF	Q55
4nzu	3-30	FTFGSYAFH	AFISYNGSSKY	RAPD-GAFGY	16	k1-39	QHYDDFP-ISF	A55
무작위화 계획:		[illegible]	[illegible]	[illegible]	10-16	k1-33	[illegible]	[illegible]

(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/54 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

복수의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 고 다양성 핵산 라이브러리를 생성하는 방법으로서,

(1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리를 생성시키거나 제공하는 단계로서, 상기 서브-라이브러리 (1) 내지 (3) 각각이 복수의 구성원을 포함하고; 상기 서브-라이브러리의 각각의 구성원이 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함하고, 상기 무작위 카세트는 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성되는, 단계; 및

발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성시키기 위하여 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_L 서브-라이브러리의 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부를 재조합하는 단계를 포함하고,

상기 발현 라이브러리가 복수의 발현 라이브러리 구성원을 포함하고, 각각의 발현 라이브러리 구성원이 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하고,

상기 별개의 항체 또는 항체 단편은 scFv를 포함하는,

방법.

청구항 2

제1항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR1의 일부 및 V_H CDR2의 일부 중 적어도 하나에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 적어도 V_H CDR1의 일부 및 V_H CDR2의 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR2의 적어도 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR3의 적어도 일부에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 2개의 무작위 카세트가 상이한 길이를 갖는 펩티드를 인코딩하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 펩티드가 10 내지 20개의 아미노산 범위의 길이를 갖는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_L CDR3의 일부에 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 공통 서열을 갖는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 발현 라이브러리 구성원 각각이 복수의 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 재조합이 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 및 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 중 하나의 구성원의 적어도 일부를 분리시키는 단계 및 이들을 함께 융합시켜 V_H 도메인 라이브러리에서 V_H 도메인 라이브러리 구성원을 형성시키는 단계를 포함하고, 상기 V_H 도메인 라이브러리가 복수의 V_H 도메인 라이브러리 구성원을 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 일부를 분리시키는 단계 및 V_L 서브-라이브러리의 구성원의 일부와 V_H 도메인 라이브러리 구성원 중 하나를 융합시켜 발현 라이브러리 구성원을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 구성원의 일부가 링커를 인코딩하는 서열을 통해 커플링되는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 링커가 글리신-풍부 펩티드인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 재조합이 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 및 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 중 하나의 구성원의 적어도 일부를 분리시키는 단계 및 이들을 함께 융합시켜 발현 라이브러리 구성원의 제1 그룹을 형성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 발현 라이브러리 구성원의 제2 그룹을 추가로 포함하고, 상기 제2 그룹이 V_L 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 일부를 포함하는 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 scFv를 갖는 IgG1을 작제하기 위해 발현 라이브러리 구성원을 서브클로닝하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 제1 및 제2 그룹 각각으로부터 하나의 구성원을 각각 서브클로닝하여 재조합 V_H 및 V_L 도메인을 갖는 IgG1을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 리간드에 대한 친화성, pH 민감성 및 종 교차반응성 중 적어도 하나에 기초하여 발현 라이브러리 구성원의 서브셋을 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 50 nM 미만의 Kd로 리간드에 결합하는 scFv를 인코딩하는 발현 라이브러리 구성원의 서브셋을 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항에 있어서,

발현 라이브러리 구성원을 mRNA 단편으로 전사시키는 단계; 및

mRNA 단편의 3'-말단에서 퓨로마이신 분자를 커플링시키는 단계를 추가로 포함하는,

방법.

청구항 24

(1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리를 포함하는 복수의 핵산 라이브러리를 갖는 조성물로서,

상기 서브-라이브러리 (1) 내지 (3) 각각이 복수의 구성원을 포함하고; 그리고

상기 서브-라이브러리의 각각의 구성원이 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함하고,

상기 무작위 카세트는 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성되고,

발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성하기 위해 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_L 서브-라이브러리의 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부를 조합하고, 상기 발현 라이브러리는 다수의 발현 라이브러리 구성원을 포함하고, 각각의 발현 라이브러리 구성원은 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하고, 상기 별개의 항체 또는 항체 단편은 scFv를 포함하는,

조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 가요성 펩티드 링커를 인코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 서브-라이브러리 (1) 내지 (3) 중 적어도 하나가 가요성 펩티드 링커를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물.

청구항 27

제24항에 있어서, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 중 제 1V_H-CDR3 서브-라이브러리가 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 중 제2 V_H-CDR3 서브-라이브러리와 상이한 길이를 갖는 조성물.

청구항 28

제24항에 있어서, 복수의 축퇴성 염기 위치가 적어도 2개의 축퇴성 염기 위치인 조성물.

청구항 29

제24항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR1의 일부 및 V_H CDR2의 일부 중 적어도 하나에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 30

제24항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 적어도 V_H CDR1의 일부 및 V_H CDR2의 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 31

제24항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR2의 적어도 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 32

제24항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR3의 적어도 일부에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 33

제24항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_L CDR3의 일부에 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 34

제24항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 2개의 무작위 카세트가 상이한 길이를 갖는 펩티드를 인코딩하는 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 펩티드가 10 내지 20개의 아미노산 범위의 길이를 갖는 조성물.

청구항 36

제24항에 있어서, 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 컨센서스 서열을 포함하는 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

제24항에 있어서, 복수의 V_H 도메인 라이브러리 구성원을 갖는 V_H 도메인 라이브러리를 추가로 포함하고, 상기 V_H 도메인 라이브러리 구성원 각각이 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 일부 및 V_H-CDR3 서브-라이브러리 중 하나의 구성원의 적어도 일부를 포함하는 조성물.

청구항 39

고 다양성 핵산 라이브러리를 생성시키기 위한 용도를 갖는 제24항 내지 제36항; 또는 제38항; 중 어느 한 항의 조성물.

청구항 40

복수의 라이브러리 구성원을 갖는 고 다양성 핵산 라이브러리 조성물로서,

각각의 라이브러리 구성원이 각각 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 재조합 핵산을 포함하고, 상기 무작위 카세트는 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성되고;

상기 복수의 무작위 카세트가 (1) VH-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 VH-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) VL 서브-라이브러리로부터의 임의의 2개의 라이브러리로부터의 적어도 2개의 구성원으로부터 유래되고; 그리고

상기 서브-라이브러리 각각이 복수의 구성원을 포함하고, 상기 라이브러리 구성원은 scFv를 인코딩하는;

조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR1의 일부 및 V_H CDR2의 일부 중 적어도 하나에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 42

제40항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR2의 적어도 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 43

제40항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR2의 적어도 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 44

제40항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR3의 적어도 일부에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 45

제40항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_L CDR3의 일부에 무작위 카세트를 포함하는 조성물.

청구항 46

제40항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 2개의 무작위 카세트가 상이한 길이를 갖는 펩티드를 인코딩하는 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 펩티드가 10 내지 20개의 아미노산 범위의 길이를 갖는 조성물.

청구항 48

제40항에 있어서, 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 컨센서스 서열을 포함하는 조성물.

청구항 49

삭제

청구항 50

제40항에 있어서, 복수의 라이브러리 구성원이 복수의 무작위 카세트 중 2개 사이에 링커를 포함하는 조성물.

청구항 51

제40항에 있어서, 각각의 라이브러리 구성원이 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 조성물.

청구항 52

제40항에 있어서, 복수의 라이브러리 구성원이 리간드에 대한 친화성, pH 민감성 및 종 교차반응성 중 적어도 하나에 기초하여 순위가 매겨지는 조성물.

청구항 53

제40항에 있어서, 라이브러리 구성원의 서브셋이 50 nM 미만의 Kd로 리간드에 결합하는 scFv를 인코딩하는 조성물.

청구항 54

제40항에 있어서, 라이브러리 구성원이 mRNA 단편이고, 각각이 3'-말단에서 퓨로마이신과 커플링되는 조성물.

청구항 55

암 네오에피토프에 대한 치료 재조합 항체를 생성시키기 위한 용도를 갖는 제40항 내지 제48항; 또는 제50항 내지 제53항; 중 어느 한 항의 조성물.

청구항 56

재조합 항체를 생성시키는 방법으로서,

(1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리를 생성시키거나 제공하는 단계로서, 상기 서브-라이브러리 (1) 내지 (3) 각각이 복수의 구성원을 포함하고;

상기 서브-라이브러리의 각각의 구성원이 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함하고, 상기 무작위 카세트는 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성되는, 단계;

V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_L 서브-라이브러리의 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부를 재조합하여 발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성시키는 단계로서, 상기 발현 라이브러리가 복수의 발현 라이브러리 구성원을 포함하고, 각각의 발현 라이브러리 구성원이 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하고, 상기 별개의 항체 또는 항체 단편은 scFv를 포함하는, 단계; 및

발현 라이브러리 구성원을 사용하여 재조합 항체 또는 이의 단편을 생성하는 단계를 포함하는,

방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 재조합 항체 또는 이의 단편이 발현 라이브러리 구성원을 항체 벡터로 서브클로닝함으로써 생성되는 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 항체 또는 이의 단편이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 방법:

(a) 전체 면역글로불린 분자;

(b) scFv;

(c) 모노클로날 항체;

(d) 인간 항체;

(e) 인간화된 항체;

(f) 키메라 항체;

(g) Fab 단편;

(h) Fab' 단편;

(i) F(ab')2;

(j) Fv; 및

(k) 디설파이드 결합 Fv.

청구항 59

제57항에 있어서, 항체 벡터가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함하는 방법:

(b) 인간 IgG 1 불변 도메인;

(c) 인간 IgG2 불변 도메인;

(d) 인간 IgG3 불변 도메인;

(e) 인간 IgG4 불변 도메인; 및

(f) 인간 IgA 불변 도메인.

청구항 60

제56항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR1의 일부 및 V_H CDR2의 일부 중 적어도 하나에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 61

제56항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 적어도 V_H CDR1의 일부 및 V_H CDR2의 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 62

제56항에 있어서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR2의 적어도 일부에 해당하는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 63

제56항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_H CDR3의 적어도 일부에 해당하는 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 64

제56항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 V_L CDR3의 일부에 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 65

제56항에 있어서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 2개의 무작위 카세트가 상이한 길이를 갖는 펩티드를 인코딩하는 방법.

청구항 66

제56항에 있어서, 펩티드가 10 내지 20개의 아미노산 범위의 길이를 갖는 방법.

청구항 67

제56항에 있어서, 서브-라이브러리의 복수의 구성원이 컨센서스 서열을 포함하는 방법.

청구항 68

제56항에 있어서, 발현 라이브러리 구성원 각각이 복수의 무작위 카세트를 포함하는 방법.

청구항 69

제56항에 있어서, 재조합이 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 및 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 중 하나의 구성원의 적어도 일부를 분리시키는 단계 및 이들을 함께 융합시켜 V_H 도메인 라이브러리에서 V_H 도메인 라이브러리 구성원을 형성시키는 단계를 포함하고, 상기 V_H 도메인 라이브러리가 복수의 V_H 도메인 라이브러리 구성원을 포함하는 방법.

청구항 70

제56항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 일부를 분리시키는 단계 및 V_L 서브-라이브러리의 구성원의 일부와 V_H 도메인 라이브러리 구성원 중 하나를 융합시켜 발현 라이브러리 구성원을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, V_L 서브-라이브러리의 구성원의 일부가 링커와 커플링되는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 링커가 글리신-풍부 펩티드인 방법.

청구항 73

제56항에 있어서, 재조합이 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 및 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 중 하나의 구성원의 적어도 일부를 분리시키는 단계 및 이들을 함께 융합시켜 발현 라이브러리 구성원의 제1 그룹을 형성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 발현 라이브러리 구성원의 제2 그룹을 추가로 포함하고, 상기 제2 그룹이 V_L 서브-라이브러리의 구성원의 적어도 일부를 포함하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 제1 및 제2 그룹 각각으로부터 하나의 구성원을 각각 서브클로닝하여 재조합 V_H 및 V_L 도메인을 갖는 IgG1을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 76

제56항에 있어서, 리간드에 대한 친화성, pH 민감성 및 종 교차반응성 중 적어도 하나에 기초하여 발현 라이브러리 구성원의 서브셋을 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 50 nM 미만의 Kd로 리간드에 결합하는 scFv를 인코딩하는 발현 라이브러리 구성원의 서브셋을 선택하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 78

제56항에 있어서, 무작위 카세트가 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성되는 방법.

청구항 79

항원을 제1항 내지 제21항; 제23항; 또는 제56항 내지 제78항; 중 어느 한 항의 방법에 의해 작제된 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 항원에 대해 100 nM 이하의 친화성을 갖는 고 친화성 결합제를 분리시키는 방법.

청구항 80

SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택되는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성된 재조합 핵산 단편.

청구항 81

SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택되는 핵산 서열을 갖는 합성 핵산 혼합물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2017년 11월 20일에 출원된 일련 번호 62/588,914를 갖는 공동 계류중인 미국 가 특허 출원에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] **발명의 분야**

[0003] 본 발명의 분야는 초고-다양성(ultrahigh-diversity) 항체 라이브러리를 위한 조성물 및 방법으로, 특히 재조합 고친화성 결합제를 생성하기 위한 mRNA 디스플레이 라이브러리 및 mRNA 디스플레이 라이브러리의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 배경 설명은 본 발명의 이해에 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본원에 제공된 임의의 정보가 선행 기술이거나 본원에 청구된 발명과 관련이 있거나, 구체적 또는 암시적으로 언급된 임의의 간행물이 선행 기술임을 인정하는 것은 아니다.

[0005] 본원의 모든 간행물 및 특허 출원은 각각의 개별적 간행물 또는 특허 출원이 구체적 및 개별적으로 참조로서 포함되는 것으로 지정되는 것과 동일한 정도로 참조로서 포함된다. 포함된 참고문헌에서의 용어의 정의 또는 사용이 본원에 제공된 상기 용어의 정의와 불일치하거나 상반되는 경우, 본원에 제공된 상기 용어의 정의가 적용되며, 참고문헌에서의 상기 용어의 정의는 적용되지 않는다.

[0006] 고친화성의 특정 항체 또는 결합 분자를 이용하여 종양 항원 또는 네오에피토프(neoepitope)를 표적화하는 것은 암 환자를 치료하기 위한 효과적인 방법으로 입증되었다. 오믹스(omics) 데이터 분석을 통한 생체 내, 시험관 내 또는 인 실리코(*in silico*)를 통해 점점 더 많은 환자 특이적 및/또는 암 특이적 종양 항원 및/또는 네오에피토프가 확인됨에 따라, 안정적이고, 가용성이고, 기능적이며, 적응 가능한 항체 또는 결합제를 선택할 가능성이 높은 항체 라이브러리 또는 디스플레이 라이브러리의 생성 요구가 커졌다. 고친화성의 특정 항체 또는 결합 분자는 천연 항체 푸울(pool) 중에서 확인되거나 이로부터 유래될 수 있으나, 상기 확인되거나 유래된 천연 항체 또는 결합제는 상기 항원 또는 네오에피토프에 대한 노출 빈도 또는 강도에 따라 상기 천연 항체의 다양성이 제한될 수 있음에 따라 효과적이거나 특이적이지 않을 수 있다.

[0007] 상기 문제를 해결하기 위한 한 접근법에서, 재조합 파지 디스플레이 라이브러리가 사용될 수 있다. 상기 접근법은 합리적으로 높은 다양성을 갖는 라이브러리의 생성을 가능하게 하지만, 결합제에 대한 많은 라운드의 농축이 종종 요구되며, 이는 노동 집약적이고 시간 소모적이다. 또한, 비교적 큰 다양성에도 불구하고, 결합제는 이상적이지 못한 친화성 및 안정성을 갖는 경향이 있다. 더 나아가, 다양성은 전형적으로 라이브러리 부피, 형질감염 효율 등과 같은 실제 고려사항에 의해 제한된다. 상기 및 다른 접근법이, 예를 들어, WO 2006/072773호에 기재된 바와 같은 다중 인공 선택압을 이용하여 추가로 최적화될 수 있다. 상기 방법은 안정성 특징을 개선시킬 수 있으나, 상당한 양의 라이브러리 조작 및 시간이 필요하다.

[0008] 또 다른 접근법에서, mRNA 디스플레이가 수행될 수 있다. 여기서, 후보 결합 분자(전형적으로, scFv)를 인코딩하는 mRNA 서열은 이의 3'-말단에서 퓨로마이신 분자와 커플링되고, mRNA 서열에 의해 인코딩된 펩티드는 시험관 내 번역을 통해 생성되어, mRNA를 mRNA에 의해 인코딩된 단백질에 직접 커플링시킨 융합 생성물을 생성한다. 그러나, 현재의 mRNA 디스플레이 기술은 유리하게는 형질감염 한계와 관련된 문제를 피하고, 적어도 개념적으로 더 높은 다양성을 허용하지만, 구조 온전성 또는 안정성과 관련된 문제, 비교적 낮은 친화성 및/또는 교차반응성의 문제가 여전히 남아 있다. mRNA 디스플레이로부터 scFv의 적어도 선택된 결합 특징을 추가로 개선시키기 위해, VH-CDR3 스펙트라타이핑(spectratyping) 분석이 수행되었다(문헌[*Protein Engineering, Design & Selection*, 2015, vol. 28 no. 10, pp. 427-435] 참조). 그러나, 상기 공정은 반복 분석을 필요로 하며, 모든 항원에 대해 생산적이지 않을 수 있다.

[0009] 따라서, mRNA 디스플레이 및 다른 방법을 이용하여 후보 결합제를 생성하고 확인하는 방법은 공지되어 있지만, 높은 구조적 온전성/안정성, 낮은 친화성 및/또는 낮은 교차반응성을 갖는 결합제를 갖는 고 다양성 라이브러리는 달성하기 어려운 것으로 남아 있다. 따라서, 안정한 재조합 고 친화성 결합제의 신속한 생성을 위한 mRNA 디스플레이의 개선된 조성물, 방법 및 용도가 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0010] 본 발명의 주제는 다양한 생체분자, 특히 암 항원 또는 네오에피토프에 대한 안정적이고, 가용성이며, 기능적인 항체 또는 결합제의 신뢰성 있고 효율적인 확인을 가능하게 하는 복수의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 고

다양성 핵산 라이브러리의 다양한 조성물, 이에 대한 방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 따라서, 상기 주제의 일 양태는 복수의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 고 다양성 핵산 라이브러리를 생성하는 방법을 포함한다. 이러한 방법에서, 각각 복수의 구성원을 갖는 3개의 서브-라이브러리인 (1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리가 생성되거나 제공된다. 3개의 서브-라이브러리의 각각의 구성원은 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함한다. 3개의 라이브러리 중 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부는 재조합되어 발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성하며, 이는 복수의 발현 라이브러리 구성원을 갖는다. 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 각각의 발현 라이브러리 구성원. 바람직한 구현예에서, 발현 라이브러리 구성원은 mRNA 단편으로 전사되고, 이는 이후 3'-말단에서 퓨로마이신 분자와 커플링된다.

[0011] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 복수의 핵산 라이브러리를 갖는 조성물을 고려한다. 복수의 핵산 라이브러리는 (1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리를 포함한다. 서브-라이브러리 (1) 내지 (3) 각각은 복수의 구성원을 포함하며, 서브-라이브러리의 각각의 구성원은 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함한다.

[0012] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 고 다양성 핵산 라이브러리를 생성하기 위한 상기 조성물의 용도를 고려한다.

[0013] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 복수의 라이브러리 구성원을 갖는 고 다양성 핵산 라이브러리 조성물을 고려한다. 고 다양성 핵산 라이브러리 구성원은 각각 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 복수의 무작위 카세트를 포함하는 재조합 핵산을 포함한다. 복수의 무작위 카세트는 (1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리로부터의 임의의 2개의 라이브러리로부터의 적어도 2개의 구성원으로부터 유래된다.

[0014] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 암 네오에피토프에 대한 치료 재조합 항체를 생성시키기 위한 고 다양성 핵산 라이브러리의 용도를 고려한다.

[0015] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 재조합 항체를 생성하는 방법을 고려한다. 이러한 방법에서, 각각 복수의 구성원을 갖는 3개의 서브-라이브러리인 (1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리가 생성되거나 제공된다. 3개의 서브-라이브러리의 각각의 구성원은 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함한다. 3개의 라이브러리 중 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부는 재조합되어 발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성하며, 이는 복수의 발현 라이브러리 구성원을 갖는다. 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 각각의 발현 라이브러리 구성원. 이후, 상기 방법은 발현 라이브러리 구성원을 사용하여 재조합 항체 또는 이의 단편을 계속 생성한다.

[0016] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 상기 기재된 방법에 의해 작제된 조성물에 항원을 접촉시킴으로써 항원에 대해 100 nM 이하의 친화성을 갖는 고 친화성 결합제를 분리하는 방법을 고려한다.

[0017] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 하기 제공된 표 1 또는 표 2로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성된 재조합 핵산 단편을 고려한다.

[0018] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 본 발명자는 하기 제공된 표 1 또는 표 2로부터 선택된 핵산 서열을 갖는 합성 핵산 혼합물을 고려한다.

[0019] 본 발명의 주제의 다양한 목적, 특징, 양태 및 장점은 첨부 도면과 함께 바람직한 구현예의 하기 상세한 설명으로부터 보다 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 VH3/Vk1 쌍을 사용한 하나의 예시적인 무작위화 전략을 예시한다.

도 2는 중쇄 CDR1 및 CDR2에서 서열 무작위화를 위한 예시적 위치를 예시한다.

도 3은 중쇄 CDR3에서의 예시적인 서열 무작위화를 예시한다.

도 4는 좌측에 핵산 서열 및 우측에 아미노산 선택을 갖는 경쇄 CDR3에서의 예시적인 서열 무작위화를

예시한다.

도 5는 다수의 재조합 핵산 세그먼트의 무작위 카세트를 분리하고 조합함에 의한 하이브리드 핵산 요소의 예시적인 생성을 예시한다.

도 6은 αB7-$H4_{801}$의 안정한 단백질 발현을 나타내는 단일 피크를 나타내는 크기 배제 크로마토그래피 결과를 제시한다.

도 7은 상업적 항체와 비교하여 αB7-$H4_{801}$의 유사한 분자 거동을 나타내는 모세관 전기영동 소듐 도데실 설페이트(CE-SDS) 데이터를 제시한다.

도 8은 시험관 내 선택된 αB7-H4 항체의 B7-H4에 대한 결합을 나타내는 그래프를 제시한다.

도 9는 시험관 내 선택된 αB7-H4 결합제 및 αPD-L1 결합제의 기능 분석 그래프를 제시한다.

도 10은 αB7-H4 scFv 및 αB7-H4 IgG1의 결합 친화성을 나타내는 그래프를 제시한다.

도 11은 호중구 크기 변화를 측정함에 의한 IL-8 활성 검정 및 이의 결과를 제시한다.

도 12는 증가하는 호중구 크기의 IL-8 활성에 대한 αIL-8항체의 중화 효과를 나타내는 막대 그래프를 제시한다.

도 13은 호중구 이동을 억제함에 의한 IL-8 활성에 대한 αIL-8 항체의 중화 효과를 나타내는 막대 그래프에 제시된 IL-8 활성 검정 및 이의 결과를 제시한다.

도 14는 선택된 항원 표적과 관련하여 본원에 제시된 mRNA 디스플레이 라이브러리 조성물을 사용한 예시적 결과를 제시한다.

도 15는 scFv 대 IgG로 구성된 선택된 결합제의 친화성을 도시하는 예시적 그래프를 제시하며, 여기서 결합제는 본원에 제시된 mRNA 디스플레이 라이브러리 조성물을 사용하여 확인되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명자는 이제 고 다양성 핵산 라이브러리의 구성원에 의해 인코딩된 항체 또는 이의 단편의 선택된 도메인의 표적화된 다양화를 이용하여 고 다양성 핵산 라이브러리를 작제함으로써 특이적이고 효과적인 재조합 항체 또는 이의 단편이 생성되거나 확인될 수 있음을 발견하였다. 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자는 이제 항체/결합제의 하나 이상의 도메인 또는 서브도메인이 미리 선택될 수 있고, 미리 선택된 도메인 또는 서브도메인에서 무작위 카세트를 사용하여 복수의 핵산 서브-라이브러리가 생성될 수 있음을 발견하였다. 본 발명자는 서브-라이브러리의 구성원이 재조합되어 라이브러리 구성원 사이에서 높은 다양성을 허용하면서도, 암 항원 또는 네오에피토프(바람직하게는, 암 특이적, 환자 특이적 네오에피토프 또는 신생항원)에 대해 생체 내에서 사용되는 경우 안정적이고, 가용성고, 기능적이며, 적응 가능한 항체/결합제를 확인할 더 높은 가능성을 제공하는 고 다양성 핵산 라이브러리를 작제할 수 있다는 것을 추가로 발견하였다.

[0022] 실제로, 그리고 하기에 보다 상세히 제시되는 바와 같이, 본원에 제시된 라이브러리는 전형적으로 단일 또는 2-통과 농축으로 임의의 항원에 대한 적어도 하나의 결합제의 분리를 가능하게 하며, 상기 결합제는 100 nM 이하, 더욱 전형적으로 10 nM 이하의 K_d를 갖는다. 또한, 고려되는 시스템 및 방법은 scFv 라이브러리가 통상적인 라이브러리 작제물에 비해 모두 상당히 감소된 기간 내에 적어도 10^9, 적어도 10^{10}, 적어도 10^{11}, 적어도 10^{12}, 적어도 10^{13}, 적어도 10^{14}, 적어도 10^{15} 또는 적어도 10^{16}개의 별개의 라이브러리 구성원의 다양성을 갖는 것을 가능하게 한다. 따라서, 항체 발견 속도가 실질적으로 증가되는 것이 인지되어야 한다.

[0023] 본원에서 사용되는 용어 "종양"은 인체에서 하나 이상의 해부학적 위치에 존재하거나 발견될 수 있는 하나 이상의 암 세포, 암 조직, 악성 종양 세포 또는 악성 종양 조직을 나타내며 이와 상호교환적으로 사용된다.

[0024] 본원에서 사용되는 용어 "결합하다"는 10^{-6}M 이하 또는 10^{-7}M 이하의 K_D를 갖는 고 친화성을 갖는 2개의 분자 사이의 상호작용을 나타내며, 용어 "인지하다" 및/또는 "검출하다"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0025] 본원에서 사용되는 용어 "제공하다" 또는 "제공하는"은 제조, 생성, 배치, 사용 가능, 또는 사용 준비를 하는 임의의 행위를 나타내며 이를 포함한다.

[0026] 핵산 서브-라이브러리의 작제

[0027] 일반적으로, 항체의 구조적 성분(중쇄, 경쇄, 불변 도메인, 가변 도메인)은 이의 기능과 밀접하게 관련된다. 예를 들어, 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 도메인은 함께 항체에 특이성을 제공하는 에피토프 결합 도메인을 구성한다. V_H 및 V_L 각각은 항원에 대한 특이성에 기초하여 독특한 아미노산 서열을 갖는 3개의 상보성 결정 영역(CDR, CDR1 내지 3)을 포함한다. 따라서, 항체를 생성하거나 확인하기 위한 재조합 핵산 라이브러리는 V_H 및 V_L의 CDR을 인코딩하는 서열을 무작위화함으로써 생성될 수 있는 것이 이전에 고려되었다. 그러나, 본 발명자는 V_H 및 V_L의 모든 CDR의 완전한 무작위화가 라이브러리에 큰 다양성을 제공할 수 있지만, 모든 무작위화된 V_H 및 V_L이 재조합되어 항체(예를 들어, IgG1 등)를 형성하는 경우에 가용성이거나 안정적으로 발현될 수 있는 것은 아님에 따라 무작위 서열의 모든 조합을 생성시키고 모든 무작위화 조합을 스크리닝하는 데 있어서 비효율성을 또한 발생시키는 것을 발견하였다. 또한, 가능한 라이브러리 구성원의 매우 큰 수로 인해 전체 다양성 공간을 커버하는 것은 실용적이지 않다.

[0028] 따라서, 본 발명자는 V_H 및 V_L의 서브도메인이 상이한 항체(또는 항체를 인코딩하는 유전자)의 V_H 또는 V_L 사이에서 일반적으로 공통적인 프레임워크 영역 및 최종 펩티드 생성물(예를 들어, scFv, IgG1 등)의 안정성 및/또는 용해도에 유의하게 영향을 미치지 않고 적어도 부분적으로 또는 완전히 무작위화될 수 있는 표적화된 다양화 영역의 2개의 부류로 나뉠 수 있음을 고려한다. 바람직하게는, V_H의 표적화된 다양화 영역은 CDR1, CDR2-n(CDR2의 N-말단 측), CDR2-c(CDR2의 C-말단 측) 및 CDR3의 적어도 일부를 포함한다. 추가의 바람직한 양태에서, V_L의 표적화된 다양화 영역은 CDR3의 적어도 일부를 포함한다.

[0029] 이와 같이, 본 발명의 주제의 하나의 예시적이고 특히 바람직한 양태에서, V_H 및/또는 V_L의 하나 이상의 표적화된 다양화 영역에서 하나 이상의 무작위 서열 카세트를 포함하는 재조합 핵산을 생성함으로써 핵산 라이브러리가 생성될 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 본 발명자는 단일 서브-라이브러리의 부피가 신속하거나 적절한 스크리닝을 처리하기에 실행 불가능하거나 비효율적으로 만들 수 있는 단일 서브-라이브러리에서의 너무 많은 무작위화된 재조합 서열을 피하면서 무작위화된 표적화 다양화 영역 내에서 각각의 서브-라이브러리가 다양성을 보유하도록 하는 상이한 표적화된 다양화 영역 내에 상이한 세트의 무작위 서열 카세트를 갖는 3개의 상이한 서브-라이브러리를 고려한다. 또한, 표적화된 다양화 영역 사이의 보존된 영역은 최대 안정성 및 용해도를 위해 선택되거나 설계된다.

[0030] 일 구현예에서, 서브-라이브러리는 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리를 포함한다. V_H-CDR1/2 서브-라이브러리는 V_H CDR1의 적어도 일부 및/또는 V_H CDR2의 일부에 해당하는 하나 이상의 무작위 서열 카세트를 갖는 복수의 재조합 핵산(예를 들어, 재조합 DNA)을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, V_H CDR1의 일부에 해당하는 무작위 카세트는 무작위 카세트가 재조합 핵산의 영역에 위치하는 것을 의미하며, 여기서 CDR1 부분을 인코딩하는 서열은 천연 항체의 V_H 도메인과 적어도 구조적 또는 기능적으로 유사한 V_H 도메인의 부분을 인코딩하도록 존재해야 한다. 예를 들어, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 하기와 같은 구조를 가질 수 있다(무작위화 영역은 밑줄로 표시되고, 고정된 서열 영역은 괄호 속에 존재한다):

[0031] 5'- (프로모터 -5' UTR - FW1) + <u>CDR1</u> + (FW2) + <u>CDR2</u> + (FW3 - CDR3 - FW4)

[0032] 본원에서 사용되는 바와 같이, UTR은 비번역 영역을 나타내고, FW는 프레임워크 영역을 나타낸다(예를 들어, FW1은 제2 프레임워크 영역(FW2)과 구별될 수 있는 제1 프레임워크 영역이다). 이러한 구조에서, 무작위 서열 카세트는 CDR1 또는 CDR2, 또는 바람직하게는 CDR1 및 CDR2 둘 모두의 영역에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, CDR2의 영역에 하나 초과의 무작위 서열 카세트, 바람직하게는 2개의 무작위 서열 카세트가 삽입될 수 있다: CDR2-n(CDR2의 5'-말단 측) 및 CDR-c(CDR2의 3'-말단 측).

[0033] 서브-라이브러리는 또한 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리를 포함할 수 있다. V_H-CDR3의 서브-라이브러리 각각은 V_H CDR3의 적어도 일부에 해당하는 하나 이상의 무작위 서열 카세트를 갖는 복수의 재조합 핵산(예를 들어, 재조합 DNA)을 포함한다. V_H-CDR1/2 서브-라이브러리와 유사하게, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 하기와 같은 구조를 가질 수 있다(무작위화 영역은 밑줄로 표시되고, 고정된 서열 영역은 괄호 속에 존재한다):

[0034] 5'- (프로모터 - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) - CDR3 - (FW4)

[0035] 바람직하게는, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 및/또는 V_H-CDR3 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 고정된 서열(예를 들어, 프로모터 - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3, FW4)은 고정된 서열이 가장 발현 가능하고 단일쇄 가변 단편(scFv), scFv의 변형된 형태, 전장 면역글로불린 또는 면역글로불린의 일부로서 발현된 펩티드를 포함하는 다수의 포맷으로 적응 가능하도록 천연 항체(예를 들어, 다양한 항원에 대한 IgG1) 중에서 가장 공통적이고/이거나 보존된 서열을 사용하도록 선택된다. 따라서, 바람직한 구현예에서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 재조합 핵산 및 V_H-CDR3 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 고정된 서열은 서로 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90% 동일(공유)하다.

[0036] 서브-라이브러리는 또한 V_L 서브-라이브러리를 포함할 수 있다. V_L 서브-라이브러리는 V_L CDR3의 적어도 일부에 해당하는 하나 이상의 무작위 서열 카세트를 갖는 복수의 재조합 핵산(예를 들어, 재조합 DNA)을 포함한다. V_H-CDR1/2 서브-라이브러리와 유사하게, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 하기와 같은 구조를 가질 수 있다(무작위화 영역은 밑줄로 표시되고, 고정된 서열 영역은 괄호 속에 존재한다):

[0037] 5'- (프로모터 - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) - CDR3 - (FW4)

[0038] 바람직하게는, V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 고정된 서열은 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 또는 V_H-CDR3 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 것과 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90% 동일(공유)하다.

[0039] 임의의 무작위화 서열이 무작위 서열 카세트를 생성하는 것으로 간주될 수 있지만, 본 발명자는 V_H의 CDR1, CDR2, CDR3 및 V_L 도메인의 CDR3에 대한 전략화된 무작위 서열 카세트가 결합 펩티드(예를 들어, scFv 등)로서 발현되는 경우 높은 복잡성 및 큰 잠재성의 결합 표면을 제공할 것으로 고려한다. 예를 들어, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 CDR1, CDR2에 대한 전략화된 무작위 서열 카세트는 카세트 당 3개 이하, 바람직하게는 2개 이하, 더욱 바람직하게는 1개의 무작위 서열(카세트 당 3개 이하, 2개 이하 또는 1개의 무작위 아미노산을 인코딩함)을 갖는 반-무작위 서열 카세트일 수 있다. 무작위 카세트에서 무작위 서열의 위치는 카세트 내의 무작위 아미노산에 따라 달라질 수 있다. 또 다른 예에서, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 CDR3에 대한 전략화된 무작위 서열 카세트는 카세트 당 4개 이상, 바람직하게는 5개 이상, 더욱 바람직하게는 6개 이상의 무작위 서열(카세트 당 4개 이상, 바람직하게는 5개 이상 또는 더욱 바람직하게는 6개 이상의 무작위 아미노산을 인코딩함)이 존재하도록 더욱 무작위화된 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, V_L 서브-라이브러리의 CDR3에 대한 전략화된 무작위 서열 카세트는 카세트 당 4개 이상, 바람직하게는 5개 이상, 더욱 바람직하게는 6개 이상의 무작위 서열(카세트 당 4개 이상, 바람직하게는 5개 이상 또는 더욱 바람직하게는 6개 이상의 무작위 아미노산을 인코딩함)이 존재하도록 더욱 무작위화된 서열을 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 주제의 특히 바람직한 양태에서, 본 발명자는 서브-라이브러리에 대한 바람직한 무작위 서열 카세트가 표 1(V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 및 V_H-CDR3 서브-라이브러리) 및 표 2(V_L 서브-라이브러리)에 제시된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성될 수 있음을 고려한다. **표 1 및 2**에 제시된 바와 같이, 각각의 올리고뉴클레오티드는 IUPAC 모호성 코드로 제시된 축퇴성 코드를 갖는 무작위 서열(강조됨)을 포함한다. 예를 들어, CDR1 무작위 서열 카세트에 대한 하나의 올리고뉴클레오티드는 "A/G,A/C/G,T"를 나타내는 무작위 서열 "RVT"를 포함하며, 이의 조합은 트레오닌(T), 알라닌(A), 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 세린(S) 또는 글리신(G) 중 하나를 인코딩할 수 있다. 축퇴성 코돈에 의해 인코딩된 아미노산의 선택은 우측에 도시되며, X로 표시된다.

[0041] 추가적으로 그리고 바람직하게는, V_H-CDR3 서브-라이브러리에 대한 무작위 서열 카세트는 상이한 길이의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, V_H-CDR3 서브-라이브러리에 대한 무작위 서열 카세트는 10 내지 30개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 25개의 아미노산, 더욱 바람직하게는 10 내지 20개의 아미노산의 임의의 길이일 수 있다. 따라서, 표 1에 제시된 바와 같이, V_H-CDR3 서브-라이브러리에 대한 무작위 서열 카세트를 생성시키기 위한 올리고뉴클레오티드는 D/G-R/L 및 A/G를 인코딩하는 서열 사이에 "NNK"(G/A/T/C, G/A/T/C, G/T를 나타냄)의 다양한 반복(예를 들어, 4 내지 10개 반복)을 포함할 수 있다(또한 도 3 참조). 경쇄 서열의 생성 및 다양성이 도 4에 예시적으로 제시된다.

[0042] [표 1]

V_H CDR1	SEQ ID NO.1: GGCTTAGGTCTCATTTC**RVT**AGTTACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,D,**S**,G
	SEQ ID NO.2: GGCTTAGGTCTCATTTCTCT**RVK**TACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,K,D,E, **S**,R,G
	SEQ ID NO.3: GGCTTAGGTCTCATTTCTCTAGTTAC**KKG**ATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=G,W,L,V
	SEQ ID NO.4: GGCTTAGGTCTCATTTCTCTAGTTAC**WMT**ATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,Y,T,N
	SEQ ID NO.5: GGCTTAGGTCTCATTTCTCTAGTTACGCTATG**AVT**TGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T,N
V_H CDR2-n	SEQ ID NO.6: GGCTTAGGTCTCGTTCA**THC**ATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,F,S
	SEQ ID NO.7: GGCTTAGGTCTCGTTCA**VKT**ATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=V,G,I,S,L,R
	SEQ ID NO.8: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATT**YGG**GGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,R
	SEQ ID NO.9: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATT**DAT**GGTAATGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D+N53
	SEQ ID NO.101: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGT**WMT**AGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,S,T,N
	SEQ ID NO.11: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGT**KGG**AGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,G
	SEQ ID NO.12: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTGGT**RRT**GGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,S,N
V_H CDR2-c	SEQ ID NO.13: GGCTTAGGTCTCGTGGA**RVK**AGTACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T,**G,**A,N,K,D,E
	SEQ ID NO.14: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGT**NAT**ACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D,H
	SEQ ID NO.15: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGT**RVA**ACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,K,R,E,A,G
	SEQ ID NO.16: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTAGTACT**YRT**TACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,N,S,H,R
V_H CDR3	SEQ ID NO.17: GGCTTAGGTCTCTCCGT**GRTCKC(NNK)nGST**TTCGCGAGACGAGGTCTGAACGG	**(D,G)-(R,L)-** **(Xaa=4-10)-(A,G)**

[0043]

[0044] [표 2]

V_L CDR3	SEQ ID NO.18: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVIDSGCCTTWCACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	$Q-X_1-X_2-X_3-X_4-P-X_5$ X_1=Y,D,L,A,H,S,F,R,T,W,G X_2=Y,N,D,S,T,A X_3=S,N,T,A,D,G X_4=Y,F,A,L,T,S,H,W,I,N,R,V,D,G X_5=L,Y,W,F,R
	SEQ ID NO.19: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTDSGCCTTWCACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.20: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTNWTCCTTWCACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.21: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTNWTCCTTWCACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.22: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVIDSGCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.23: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTDSGCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.24: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTNWTCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.25: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTNWTCCTYKGACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	

[0045]

[0046] 가장 전형적으로, 표 1 및 2에 제시된 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 DNA로 제공되며, 이는 고정된 서열 영역을 포함하는 백본(예를 들어, V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산 등에 대해 5'- (프로모터 - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) - (FW4))에 삽입되기 위해 DNA 중합효소 I(클레노우 단편)를 사용하여 이중 가닥 DNA 단편으로 전환될 수 있다. 또한, 표 1 및 2에 제시된 올리고뉴클레오티드는 또한 상보성 올리고뉴클레오티드와 함께 존재하여 중합효소를 사용하지 않고 이중 가닥 핵산을 형성하는 것으로 또한 고려된다.

[0047] 일부 구현예에서, 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 또한 재조합 핵산에 의해 인코딩된 펩티드가 단백질 태그에 대한 결합제를 사용하여 분리될 수 있도록 단백질 태그를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 바람직한 단백질 태그는 FLAG 태그(서열 모티프 DYKDDDDK를 가짐), Myc 태그(서열 모티프 EQKLISEEDL을 가짐) 및 HA-태그를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 태그는 신호를 강화시키거나 검출을 증가시키기 위해 반복될 수 있다(예를 들어, FLAG 태그의 3개 반복(3X FLAG) 등).

[0048] 서브-라이브러리의 재조합 핵산에 삽입된 일부 무작위 서열 카세트는 프레임 시프트, 논센스 돌연변이, 및 재조합 핵산에 의해 인코딩된 펩티드의 구조를 불안정화시키는 서열(들)을 도입할 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명자는 불안정하거나 미스폴딩된 펩티드를 인코딩하는 임의의 재조합 핵산이 라이브러리로부터 제거될 수 있도록 서브-라이브러리의 재조합 핵산이 시험관 내에서 시험되는 것을 고려한다. 예를 들어, V_H-CDR3 서브-라이브러리 또는 V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 CDR 서열과 독립적으로 면역글로불린의 V_H3 도메인 또는 $V_L(V\kappa)$ 도메인의 구조화된 에피토프에 각각 결합하는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 단백질 A 또는 피네골디아 마그나(*Finegoldia magna*)의 단백질 L에 대한 이의 결합 친화성에 대해 시험될 수 있다.

[0049] 단백질 A 또는 단백질 L에 대한 결합 친화성에 의해 재조합 핵산을 스크리닝하기 위한 임의의 적합한 방법이 고려된다. 예시적인 일 구현예에서, 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 시험관 내 전사에 의해 mRNA로 전사되고, mRNA의 3'-말단은 퓨로마이신에 커플링(공유적으로 연결)된다. 퓨로마이신 커플링된 mRNA는 퓨로마이신 커플링된 mRNA로부터 전사된 펩티드가 퓨로마이신을 통해 mRNA와 커플링되도록 시험관 내에서 번역된다. 다음으로, 펩티드는 단백질 A 또는 단백질 L에 효과적으로 결합하는 펩티드를 확인하기 위해 단백질 A 또는 단백질 L과 접촉된다. 바람직하게는, 10^{-6}M 이하, 바람직하게는 10^{-7}M 이하의 K_D를 갖는 친화성으로 단백질 A 또는 단백질 L에 결합하는 펩티드가 선택되고 분리된다. 단백질 A 또는 단백질 L에 대한 고 친화성을 갖는 펩티드가 분리되면, 분리된 펩티드의 cDNA는 퓨로마이신 및 펩티드와 커플링된 mRNA의 시험관 내 역전사를 통해 생성될 수 있다. 분리된 펩티드의 이렇게 생성된 cDNA는 이후 무작위 서열 카세트로서 삽입되어 V_H-CDR3 서브-라이브러리 또는 V_L 서브-라이브러리의 선택된 재조합 핵산을 생성할 수 있다. 대안적으로, 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 mRNA의

형태로 존재할 수 있으며, 이는 재조합 핵산(DNA 포맷)을 위한 시험관 내 전사 단계가 필요하지 않을 수 있도록 선택적으로 퓨로마이신 분자와 사전 커플링되는 것이 또한 고려된다.

[0050] 서브-라이브러리로부터의 scFv 라이브러리의 작제

[0051] 본 발명자는 또한 서브-라이브러리의 적어도 2개의 재조합 핵산(구성원)이 재조합 scFv 핵산을 형성하기 위해 재조합될 수 있는 것을 고려한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 2개의 재조합 핵산(구성원) 각각은 상이한 서브-라이브러리로부터 선택된다. 예를 들어, 하나의 재조합 핵산은 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_L 서브-라이브러리 각각으로부터 선택될 수 있다. 다른 예를 들어, 하나의 재조합 핵산은 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_L 서브-라이브러리 중 2개 각각으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 서브-라이브러리로부터 선택된 재조합 핵산(들) 중 적어도 하나, 더욱 바람직하게는 모두는 상기 기재된 바와 같이 친화성 결합 스크리닝을 통해 사전 선택된다.

[0052] 가장 전형적으로, 재조합 scFv 핵산은 서브-라이브러리로부터 재조합 핵산의 일부를 재조합함으로써 작제될 수 있다. 이러한 구현예에서, 재조합 핵산의 일부는 재조합 핵산에 삽입된 무작위 서열 카세트를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 제1 단계로서, V_H-CDR1/2 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 일부는 5'-[<u>CDR1</u> + (FW2) + <u>CDR2</u>]-3'(무작위 서열 카세트는 밑줄로 표시됨), 바람직하게는 5'-(FW1의 일부)-[<u>CDR1</u> + (FW2) + <u>CDR2</u>]-(FW3의 일부)-3', 더욱 바람직하게는 5'- (프로모터 -5' UTR - FW1) + <u>CDR1</u> + (FW2) + <u>CDR2</u> + (FW3의 일부)-3' 또는 5'- (프로모터 -5' UTR - FW1) + <u>CDR1</u> + (FW2) + <u>CDR2</u> + (작은 링커)-3'일 수 있다. 유사하게, 예를 들어, V_H-CDR3 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 일부는 5'- [<u>CDR3</u>] - 3'(무작위 서열 카세트는 밑줄로 표시됨), 바람직하게는 5'- (FW3의 일부) - <u>CDR3</u> - (FW4의 일부)-3', 더욱 바람직하게는 5'- (FW3의 일부) - <u>CDR3</u> - (FW4)-3', 또는 5'- (작은 링커) - <u>CDR3</u> - (FW4)-3'일 수 있다. V_H-CDR1/2 서브-라이브러리 및 V_H-CDR3 서브-라이브러리로부터의 재조합 핵산의 일부는 이후 분리되고(예를 들어, PCR에 의함), 재조합되어(예를 들어, 제한-라이게이션 방법을 통해 융합되고, 재조합 PCR을 통해 생성되고, 기타 등등) V_H 도메인 재조합 핵산을 형성할 수 있다. 따라서, 전형적으로, V_H 도메인 재조합 핵산은 5'- 프로모터 - 5' UTR - FW1 + <u>CDR1</u> + FW2 + <u>CDR2</u> + FW3 - <u>CDR3</u> -FW4 -3'(무작위 서열 카세트는 밑줄로 표시됨)의 구조로 존재할 것이다. 선택적으로, V_H 도메인 재조합 핵산은 또한 상기 기재된 바와 같이 이의 3'-말단에 단백질 태그(예를 들어, FLAG 태그, Myc 태그, HA 태그 등)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 생성된 V_H 도메인 재조합 핵산은 V_H 도메인 라이브러리 구성원으로서 V_H 도메인 라이브러리에 배치될 수 있다.

[0053] 이렇게 형성된 V_H 도메인 재조합 핵산은 V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산과 추가로 재조합되어 재조합 scFv 핵산을 형성할 수 있다. 도 5는 서브-라이브러리로부터 서열을 재조합하는 하나의 예시적 방법을 제시한다. 제시된 바와 같이, 또한 전형적으로, V_H 도메인 재조합 핵산의 일부 및 V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 일부는 하나의 재조합 scFv 핵산으로 융합된다. 예를 들어, V_H 도메인 재조합 핵산의 일부는 5'- 프로모터 - [5' UTR - FW1 + <u>CDR1</u> + FW2 + <u>CDR2</u> + FW3 - <u>CDR3</u> -FW4 -3'(바람직하게는, 이의 3'-말단에 단백질 태그를 인코딩하는 임의의 핵산이 없음)를 포함할 수 있고, V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 일부는 FW1' + CDR1 + FW2' + CDR2 + FW3' - <u>CDR3</u> - FW4'(프로모터 및 5'-UTR이 없음)를 포함할 수 있어, V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산은 V_H 도메인 재조합 핵산의 일부의 3'-말단에 융합될 수 있다. 따라서, 전형적인 재조합 scFv 핵산은 5'- 프로모터 - [5' UTR - FW1 + <u>CDR1</u> + FW2 + <u>CDR2</u> + FW3 - <u>CDR3</u> -FW4]V_H- [FW1' + CDR1 + FW2' + CDR2 + FW3' - <u>CDR3</u> - FW4']V_L-3'의 구조로 존재할 것이다. V_H 도메인 재조합 핵산의 일부 및 V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 일부는 이들이 단일 폴리펩티드를 인코딩하도록 동일한 리딩 프레임에 배치되는 것이 매우 바람직하다.

[0054] 바람직하게는, V_H 도메인 재조합 핵산의 일부 및 V_L 서브-라이브러리의 재조합 핵산의 일부는 2개의 부분 사이에 링커(짧은 펩티드 스페이서 단편)를 인코딩하는 핵산을 통해 융합된다. 링커 또는 스페이서에 대한 임의의 적합한 길이 및 순서의 펩티드 서열이 사용될 수 있다. 그러나, 링커 펩티드의 길이는 3 내지 30개의 아미노산, 바람직하게는 5 내지 20개의 아미노산, 더욱 바람직하게는 5 내지 15개의 아미노산인 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명자는 글리신-풍부 서열(예를 들어, gly-gly-ser-gly-gly 등)이 V_H 및 V_L 도메인 사이에 scFv의 가요성을 제공하기 위해 사용되는 것을 고려한다.

[0055] 선택적으로, 재조합 scFv 핵산은 또한 상기 기재된 바와 같이 이의 3'-말단에 단백질 태그(예를 들어, FLAG 태그, Myc 태그, HA 태그 등)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 생성된 재조합 scFv 핵산은 발현 라이브러리 구성원으로서 발현 라이브러리에 배치될 수 있다.

[0056] 일부 구현예에서, 이렇게 형성된 재조합 scFv 핵산은 하나 이상의 관심 리간드(예를 들어, 암 항원, 네오에피토프 등)에 대한 이의 결합 친화성, 안정성, pH 민감성 및/또는 종 교차반응성에 기초하여 추가로 스크리닝되고/되거나 순위가 매겨진다. 예를 들어, 재조합 scFv 핵산에 의해 인코딩된 scFv 펩티드의 안정성은 시간 경과에 따른 펩티드의 크기를 측정하는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분석될 수 있다. 다른 예를 들어, 재조합 scFv 핵산에 의해 인코딩된 scFv 펩티드의 pH 민감성 및 결합 친화성은 상이한 완충액 조건(pH, 온도 등)에서 scFv 펩티드를 하나 이상의 리간드와 접촉시킴으로써 분석될 수 있다.

[0057] 발현 라이브러리로부터 원하는 재조합 scFv 핵산의 분석 및 추가 분리를 위해, 본 발명자는 재조합 scFv 핵산이 선택적으로 mRNA의 3'-말단에서 퓨로마이신 분자와 사전 커플링되는 mRNA의 형태로 존재할 수 있음을 고려한다. 퓨로마이신 커플링된 mRNA는 이후 퓨로마이신 커플링된 mRNA로부터 전사된 펩티드가 퓨로마이신을 통해 mRNA와 커플링되도록 시험관 내에서 번역될 수 있다. 이후, 펩티드는 선택적으로 상이한 완충액 조건(pH, 온도 등)에서 하나 이상의 리간드와 접촉된다. 바람직하게는, pH 5.0 내지 8.0, 바람직하게는 pH 6.0 내지 8.0, 더욱 바람직하게는 pH 6.5 내지 8.0에서 10^{-6}M 이하, 바람직하게는 10^{-7}M 이하의 K_D를 갖는 친화성으로 리간드에 결합하는 펩티드가 선택되고 분리된다. 리간드(들)에 대한 고 친화성을 갖는 펩티드가 분리되면, 분리된 펩티드의 cDNA는 퓨로마이신 및 펩티드와 커플링된 mRNA의 시험관 내 역전사를 통해 생성될 수 있다.

[0058] 또한, 재조합 scFv 핵산에 의해 인코딩된 분리된 펩티드의 이렇게 생성된 cDNA는 면역글로불린의 일부에 이식되고 이를 대체하여 재조합 면역글로불린 또는 이의 단편을 형성할 수 있다. 예를 들어, 이렇게 생성된 cDNA는 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역이 분리된 펩티드에 의해 형성된 scFv로 대체될 수 있도록 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 백본과 융합될 수 있다. 대안적으로, 본 발명자는 또한 재조합 scFv 핵산의 V_H 부분(또는 V_H 도메인 재조합 핵산으로부터 유래됨) 및 V_L 부분(또는 재조합 scFv 핵산으로부터 유래됨)이 면역글로불린의 일부에 이식되고 이를 대체하여 재조합 면역글로불린 또는 이의 단편을 형성할 수 있는 것을 고려한다. 예를 들어, 재조합 scFv 핵산의 V_H 부분(또는 V_H 도메인 재조합 핵산으로부터 유래됨) 및 V_L 부분(또는 재조합 scFv 핵산으로부터 유래됨)은 면역글로불린 중쇄 불변 영역 또는 경쇄 불변 영역의 백분과 각각 융합되어 원하는 리간드에 특이적인 가변 영역을 갖는 면역글로불린을 형성한다.

[0059] 이들 예에서, 면역글로불린은 면역글로불린의 상이한 유형을 구성하기 위해 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY) 및 임의의 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)의 중쇄 또는 불변 도메인을 포함할 수 있는 것이 고려된다. 또한, "항체"는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이 맥락에서, 고려되는 시스템 및 방법은 분리된 V_H 및 V_L 도메인을 원하는 종(예를 들어, 인간)의 항체의 나머지에 이식함으로써 종-특이적 항체의 생성을 가능하게 한다는 것이 인지되어야 한다. 또 다른 예에서, 이렇게 생성된 cDNA는 면역글로불린의 다른 부분을 인코딩하는 핵산과 융합되어 면역글로불린의 단편을 형성할 수 있다. 이러한 예에서, 면역글로불린의 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2, 디설파이드 결합된 Fv(sdFv) 및 Fv일 수 있는 것이 고려된다. 본 발명자는 이렇게 생성된 cDNA의 일부가 면역글로불린의 다른 부분을 인코딩하는 핵산과 융합되어 V_H 세그먼트 및/또는 V_L 세그먼트를 포함하는 임의의 단편을 형성할 수 있는 것을 추가로 고려한다.

[0060] 또한, 본 발명자는 scFv 부분이 또한 다양한 단백질 및 비-단백질 분자에 대한 표적화 존재물로서 사용될 수 있음을 고려한다. 예를 들어, scFv 부분은 ALT-803 타입 분자에 커플링(전형적으로 키메라 단백질로서 커플링)되어 특이적 표적화 능력을 갖는 TxM 존재물을 형성할 수 있다(예를 들어, 문헌[*J Biol Chem*. 2016 Nov 11;291(46):23869-23881] 참조). 또 다른 예에서, scFv 부분은 약물이 담체에 커플링되는 종양 미세환경의 특정 위치로 하나 이상의 약물의 표적 특이적 전달을 가능하게 하는 담체 단백질(예를 들어, 알부민)에 커플링될 수 있다.

[0061] 본 발명자는 무작위 서열의 표적화된 다양화를 통해 서브-라이브러리를 작제하고/하거나 서브-라이브러리의 구성원을 사전 선택함으로써, 발현 라이브러리가 불안정하거나, 결합하지 않거나, 미스폴딩된 서열을 제거함으로써 다양성의 최소 희생으로 대략 10^{12}의 복잡성을 달성할 수 있는 것을 추가로 고려한다. 따라서, 발현 라이브러리를 생성시키기 위한 상기 기재된 접근법은 의미있는 크기의 서열 복잡성을 제공하지만, 이는 적은 부피로 결

합제/항체를 스크리닝하는 데 실용적이다. 또한, 발현 라이브러리를 생성하기 위한 상기 기재된 접근법은 결합제/항체의 스크리닝 절차를 단순화시켰다. 전통적으로, 결합 도메인(또는 모티프)를 인코딩하는 임의의 핵산 서열(예를 들어, 무작위화된 서열)의 시험관 내 검증은 F_{ab} 도메인으로 전환된 핵산 서열을 필요로 하였고, 이이서 관심 리간드를 이용한 풀-다운(pull-down) 검정을 통해 시험될 수 있었다. 본원에 제시된 방법은 핵산 서열을 F_{ab} 도메인으로 전환시키지 않고 친화성(예를 들어, Kd 값), pH 민감성 및 종 교차반응성(예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 검정 등을 통함)에 의한 순위매김을 통해 결합 도메인(또는 모티프)을 인코딩하는 핵산 서열의 시험관 내 검증을 가능하게 한다. 또한, 안정성 및 민감성에 기초한 각각의 라이브러리로부터의 구성원의 사전 선택은 원하는 결합제/scFv/항체 도메인이 보다 신속하고 효율적으로 확인될 수 있도록 라이브러리에서 시험될 푸울을 감소시킨다. 따라서, 본 발명자는 또한 시험관 내 번역 후 라이브러리 구성원이 고체상 결합된 항원에 대해 스크리닝되는 mRNA 디스플레이 기술을 이용하여 고 다양성 푸울로부터 고 친화성 결합제(예를 들어, 나노몰 및 피코몰 K_d를 가짐)의 분리를 위한 방법을 고려한다. 결합제가 확인되면, 이들은 하기에 추가로 기재되는 바와 같이 친화성 및 K_{on}/K_{off} 특징과 관련하여 표면 플라즈몬 공명 분광법에 의해 추가로 특성규명될 수 있다. 상이한 관점에서 볼 때, 고려되는 시스템 및 방법은 생체 내 면역계와 완전히 독립적인 과정에서 결합제의 신속한 검출 및 scFv 또는 항체의 생성을 가능하게 한다.

[0062] <u>실시예</u>

[0063] 효율을 유지하면서 다양성을 최대화하기 위해 표적화된 다양화 영역(들)을 확인하기 위한 임의의 적합한 다양화 계획이 고려될 수 있지만, 본 발명자는 VH3/Vk1이 면역글로불린의 다양한 도메인 중에서 무작위화를 위한 우수한 후보 영역 중 하나일 수 있고, VH3가 훨씬 더 안정적이고 가용성인 VH 도메인으로 고려되고, 경쇄의 Vk1이 안정적이고 가용성인 것을 발견하였다. 따라서, VH3/Vk1 무작위화 쌍은 보다 효율적으로 전체 크기 면역글로불린으로 전환될 것으로 고려된다. 따라서, 본 발명자는 VH3 및 Vk1 프레임워크를 사용하여 사전 선택 전략을 개발하였다. **도** 1은 VH3/Vk1 쌍을 사용한 하나의 예시적인 무작위화 전략을 제시한다. 하나의 항원에 특이적인 적어도 14개의 면역글로불린 분자의 단백질 서열이 비교되고 분석된다. 14개의 면역글로불린 분자 중에서 가장 안정하고 보존된 서열이 프레임워크로 사용되고, 가변 서열의 유전자좌는 무작위화된 서열 및 무작위화 정도(예를 들어, 완전 무작위, 부분적 무작위 등)로 사용하도록 분석된다.

[0064] 무작위화 전략에 기초하여, 본 발명자는 V_H 도메인의 CDR1, CDR2-n, CDR2-c(**도** 2 참조) 및 V_H 도메인의 CDR3(**도** 3 참조)에 대해 표적화된 다양화된 서열(무작위화 서열, 무작위 올리고)을 추가로 생성하였다. V_H 도메인의 CDR1, CDR2-n, CDR2-c, CDR3 및 V_L 도메인의 CDR3의 무작위 올리고를 사용하여 재조합 scFv 핵산을 생성시키는 방법이 상기에 기재되어 있으며, **도** 4의 개략도에 또한 제시되어 있다. 고 다양성 라이브러리를 **도** 5에 예시적으로 제시되고, 상기에서 더욱 상세히 논의된 바와 같이 작제하였다.

[0065] 도 1 내지 5에 기재된 바와 같은 표적화된 다양화 계획 및 재조합 scFv 핵산을 생성시키는 방법을 이용하여, 본 발명자는 고 다양성 라이브러리를 생성시키고, 이로부터 재조합 α-B7-$H4_{801}$(α-B7-H4, 클론 번호 801) 결합제를 분리시켰다. 재조합 α-B7-$H4_{801}$의 안정성을 15분에 걸쳐 분석적 크기 배제 크로마토그래피로 결정하여 항체의 임의의 분해 또는 변형을 평가하였다. **도** 6에 제시된 바와 같이, α-B7-$H4_{801}$의 용리액은 임의의 유의하게 더 작은 피크 없이 단일 피크를 나타내며, 이는 상기 기재된 방법에 의해 생성된 α-B7-$H4_{801}$ 결합제가 scFv 또는 높은 안정성을 갖는 항체를 생성할 수 있음을 나타낸다.

[0066] 본 발명자는 재조합 α-B7-$H4_{801}$이 다른 상업적으로 이용 가능한 α-B7-H4 항체(Rituxan®, LEAF®)와 실질적으로 유사한 항체 성분을 포함하는 것을 발견하였다. 재조합 α-B7-$H4_{801}$ 및 2개의 상업적으로 이용 가능한 α-B7-H4 항체(Rituxan®, LEAF®)의 단편을 모세관 전기영동 소듐 도데실 설페이트(CE-SDS)를 통해 분석하였다. **도** 7에 제시된 바와 같이, 재조합 α-B7-$H4_{801}$ 항체 및 2개의 상업적으로 이용 가능한 α-B7-H4 항체(Rituxan®, LEAF®) 단편의 CE-SDS 분리는 각각 경쇄(중간 피크) 및 글리코실화된 중쇄(우측 피크)에 해당하는 2개의 현저한 피크를 나타낸다. 좌측 피크는 CE-SDS 분석을 위한 10 Kd 표준 마커의 위치를 나타낸다.

[0067] 본 발명자는 다양한 재조합 α-B7-H4 항체가 표적 리간드에 대한 상이한 결합 특성(예를 들어, 친화성, 특이성 등)을 나타낼 수 있음을 추가로 발견하였다. **도** 8은 평균 형광 강도(MFI)에 의해 측정된 B7-H4 발현 293T 세포와의 결합에 대해 시험되는 2개의 재조합 α-B7-H4 항체인 α-B7-$H4_{801}$ 및 α-B7-$H4_{817}$을 제시한다. 결과는 α-

B7-H4$_{801}$ 항체가 α-B7-H4$_{817}$ 항체와 비교하여 B7-H4 발현 293T 세포에 대한 더 높은 결합 친화성을 가지는 것을 제시하며, 이는 상이하게 무작위화된 CDR 도메인이 리간드에 대한 상이한 결합 친화성을 제공할 수 있음을 나타낸다. 가장 우측의 패널은 비특이적 인간 IgG1(hIgG1)을 이용한 대조군 실험을 제시한다.

[0068] 흐름세포측정법을 사용하여 항원 제시 세포(APC) 상에서 발현된 리간드(B7-H4)에 대한 특이적 및 효과적 결합을 결정하기 위해 재조합 α-B7-H4 항체를 추가로 시험하였다. **도 9**에 제시된 바와 같이, 재조합 α-B7-H4 항체는 B7-H4 리간드에 특이적으로 결합할 수 있었고(비특이적 동형 결합으로부터 피크를 분리함), 이는 재조합 α-B7-H4 항체가 완전히 기능적임을 나타낸다.

[0069] 본 발명자는 또한 B7-H4에 대한 scFv 펩티드(scFv B7-H4$_{801}$) 및 scFv B7-H4$_{801}$과 동일한 scFv 펩티드에 의해 생성된 재조합 α-B7-H4 항체(IgG α-B7-H4$_{801}$)가 표면 플라즈몬 공명 검정을 이용하여 기능적으로 동등한 것을 발견하였다. 이러한 검정에서, Flag-태깅된 scFv B7-H4$_{801}$은 표면 결합된 뉴트라비딘과 커플링된 α-Flag 비오티닐화된 항체를 통해 표면에 고정된다. 이후, 표면 고정된 scFv B7-H4$_{801}$ 펩티드는 B7-H4를 포함하는 분석물과 접촉된다. 유사한 검정을 α-B7-H4 항체로 수행하였다. **도 10** 및 **표 3**에 제시된 바와 같이, scFv B7-H4$_{801}$ 및 IgG α-B7-H4$_{801}$은 B7-H4와 실질적으로 유사한 친화성 및 결합 특징을 나타내며, 이는 이들이 기능적으로 동등한 것을 나타낸다. 또한, 시험관 내 번역된 펩티드(scFv)의 결합 친화성은 펩티드를 항체 백본에 이식하지 않고 직접 측정될 수 있으므로, 발현 라이브러리에서 더 많은 재조합 scFv 핵산이 효율적으로 스크리닝될 수 있다.

[0070] [표 3]

	Ka	Kd	KD	Res sd
IgG	$1.2e^{6}$	$2.0e^{-4}$	175 pm	0.391
scFv	$1.2e^{6}$	$1.7e^{-4}$	141 pm	0.353

[0071]

[0072] V$_{H}$의 CDR1 내지 3 및 V$_{L}$의 CDR3에서 다양한 무작위 서열 카세트를 갖는 B7-H4에 대한 복수의 scFv 펩티드 중에서, 본 발명자는 특정 도메인(특이적 무작위 서열 카세트)에서의 유사성이 scFv 펩티드가 리간드에 대한 유사한 결합 특징을 갖도록 할 수 있는지의 여부를 시험하였다. 5개의 scFv 펩티드(801, 802, 905, 906 및 817)를 B7-H4에 대한 이들의 결합 친화성에 대해 시험하였다. 이들 중에서, 표 4에 제시된 바와 같이, 4개의 scFv 펩티드(클론 801, 802, 905, 906)는 유사한 CDR3 서열을 갖는다. V$_{H}$의 CDR3에서 유사한 무작위 서열 카세트를 갖는 4개의 scFv 펩티드는 25℃ 및 37℃ 둘 모두에서 B7-H4에 대한 유사한 결합 친화성을 나타내며(표 5에 제시된 바와 같음), 이는 적어도 B7-H4에 대한 scFv 펩티드에서, V$_{H}$의 CDR3 내의 서열이 리간드에 대한 결합에서 중요할 수 있음을 나타낸다.

[0073] [표 4]

클론	CDR1	CDR2	CDR3	CDR L3
801	NSYAMH (SEQ ID NO:26)	AISGNGGSTR (SEQ ID NO:27)	DRFRKVHG (SEQ ID NO:28)	DATFPL (SEQ ID NO:29)
802	GSYAMH (SEQ ID NO:30)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:31)	DLYRRVHG (SEQ ID NO:32)	DYGFPL (SEQ ID NO:33)
905	SSYLMH (SEQ ID NO:34)	VISGSGGSTR (SEQ ID NO:35)	DLYRRVAG (SEQ ID NO:36)	DYALPL (SEQ ID NO:37)
906	SNYAMH (SEQ ID NO:38)	AISGNGGSTH (SEQ ID NO:39)	DRFRRVYG (SEQ ID NO:40)	DYTFPL (SEQ ID NO:41)
817	SSYAMH (SEQ ID NO:42)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:43)	GRWSKWG (SEQ ID NO:44)	TDNFPY (SEQ ID NO:45)

[0074]

[0075] [표 5]

온도	scFv	ka	kd	KD
25°C	801	1.20E+06	2.00E-04	174 pM
	802	4.50E+05	2.40E-05	54 pM
	905	4.10E+05	1.20E-04	290 pM
	906	1.70E+05	1.00E-05	59 pM
37°C	801	6.10E+05	7.30E-04	1.2 nM
	802	5.70E+05	5.50E-04	1.0 nM
	905	5.80E+05	9.70E-04	1.7 nM
	906	2.80E+05	3.80E-04	1.4 nM

[0076]

[0077] 본 발명자는 또한 서브-라이브러리 및 발현 라이브러리를 사용하여 인터루킨-8(IL-8)에 결합하는 복수의 scFv 펩티드(scFv IL-8)를 생성시켰고, 상이한 조건(온도 및 pH)에서 IL-8에 대한 친화성을 시험하였다. 예시적 scFv IL-8 펩티드 및 다양한 조건에서 측정된 이들의 결합 친화성이 표 6에 제시된다. 표 6에 제시된 클론 중에서, 클론 49-7, 49-1 및 49-12는 유사한 V_H CDR3 서열을 함유하고, 클론 49-19, 49-37 및 49-25는 유사한 V_H CDR3 서열을 함유한다. 또한, 클론 49-3 및 43-2는 유사한 V_H CDR3 서열을 함유한다. B7-H4에 대한 scFv 펩티드와 대조적으로, 본 발명자는 scFv IL-8 펩티드의 결합 친화성이 V_H의 CDR3에서 무작위 서열의 유사성에 결정적으로 의존하지 않을 수 있음을 발견하였다. 예를 들어, 클론 49-18, 49-37 및 49-25는 유사한 V_H CDR3 서열을 함유하는 반면, 이들 서열의 결합 친화성(K_D X 10^{-9} M로 측정된 단위)은 0.894 X 10^{-9} M 내지 25 X 10^{-9} M 사이에서 가변적이다.

[0078] [표 6]

클론	카운트	25°C	pH 6	25°C	pH 6	37°C
49-31	1/36	0.012	0.0025			
49-22	3/36	0.113	0.328			
49-7	1/36	0.166	0.462			
49-32	1/36	0.239	0.714			
49-34	1/36	0.618	0.342			
49-18	1/36	0.894	2.23			
49-3	4/36	1.26	6.68	2.14	3.14	9.19
43-2	5/16	1.41	1.3	0.79	0.96	0.89
49-37	1/36	1.46	4.01			
43-12	3/16	1.5	11.04			
49-10	6/36	1.65	8.58	2.21	8.7	3.45
49-1	1/36	2.66	6.13			
49-6	1/36	4.8	17.6			
49-12	3/36	10.1	11.9			
49-25	2/36	25	7.26			

[0079]

[0080] 본 발명자는 호중구 크기를 측정함으로써 scFv IL-8이 IL-8을 효과적으로 포획하여 IL-8의 효과를 중화시킬 수 있는지의 여부를 추가로 시험하였다. 일반적으로, 호중구는 (도 11에 제시된 바와 같이) IL-8에 의해 자극시 확대된다(예를 들어, 더 큰 직경을 갖는 등등). 본 발명자는 호중구 확대에 대한 상기 IL-8 효과가 재조합 α-IL-

8 항체(도 12에 제시된 바와 같은 mAb αIL-8_{201}, 좌측 상단 그래프) 또는 여러 scFv IL-8 펩티드(도 12에 제시된 바와 같은 αIL-$8_{\#2}$, αIL-8_{49-3}, αIL-8_{49-10}, 하단 그래프)의 첨가시 대부분 폐기될 수 있는 것을 발견하였고, 이는 scFv IL-8 펩티드가 배지에서 유리 IL-8에 결합함으로써 IL-8의 효과를 효과적으로 중화시킬 수 있음을 나타낸다.

[0081] IL-8은 호중구가 IL-8 방출 부위(예를 들어, 감염 부위)로 이동하도록 하는 호중구 화학주성 인자이다. scFv IL-8 펩티드의 기능적 효과를 평가하기 위해, 호중구를 다공성 막을 갖는 삽입물의 바닥에 배치하고, IL-8에 의해 끌어당겨진 호중구가 다공성 막을 통해 삽입물로부터 배지로 통과 이동(trans-migrate)할 수 있도록 다양한 농도의 IL-8을 포함하는 배지에 배치하였다. 도 13에 제시된 바와 같이, 배지에서 IL-8 농도를 증가시킴으로써 이동된 호중구의 수가 증가하였다. 흥미롭게도, 상기 IL-8 효과는 scFv IL-8 펩티드(αIL-8_{43-2}) 또는 scFv IL-8 펩티드로부터 유래된 재조합 IL-8 항체(mAb αIL-8_{201})의 첨가시 거의 완전히 폐기되었다.

[0082] 도 14는 본원에 제시된 바와 같이 mRNA 디스플레이 라이브러리를 사용하여 분리된 다양한 scFv에 대한 추가 실험 데이터를 도시한다. 보다 구체적으로, 각각의 데이터 포인트는 하단에 표시된 표적에 대한 scFv를 나타내며, 각각의 scFv에 대한 친화성 값이 결정되었다. 용이하게 관찰될 수 있는 바와 같이, (동일한) 라이브러리는 다양한 별개의 표적에 대한 다수의 고 친화성 결합제를 발생시켰으며, 결합제 모두는 마이크로M 이하였고, 많은 결합제는 나노M 이하의 친화성 범위였다. 또한, 본 발명자는 또한 인간 IgG에 CDR 이식시 scFv의 친화성이 보존될 수 있는지의 여부를 연구하였다. 도 15는 인간 IgG1 스캐폴드에 이식된 선택된 scFv에 대한 29개의 CDR 이식 실험에 대한 예시적 결과를 도시한다. 도 15의 결과로부터 관찰될 수 있는 바와 같이, 인간화된 IgG1 항체는 높은 특이성 및 친화성(전형적으로, 하나의 크기 정도 내)을 유지하였다.

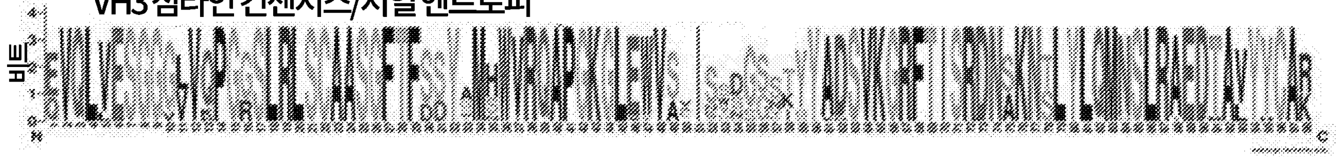
[0083] 이미 기재된 것 이외에 더 많은 변형이 본원의 본 발명의 개념을 벗어남이 없이 가능함이 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 주제는 첨부된 청구항의 범위를 제외하고는 제한되지 않는다. 또한, 명세서 및 청구항 둘 모두를 해석함에 있어서, 모든 용어는 문맥과 일치하는 가능한 가장 넓은 방식으로 해석되어야 한다. 특히, 용어 "포함하다" 및 "포함하는"은 배타적이지 않은 방식으로 요소, 성분 또는 단계를 언급하는 것으로 해석되어야 하며, 이는 언급된 요소, 성분 또는 단계가 명백히 언급되지 않은 다른 요소, 성분 또는 단계와 함께 존재하거나, 이용되거나, 조합될 수 있음을 나타낸다. 본원의 설명 및 하기 청구항 전체에서 사용되는 단수 용어의 의미는 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 또한, 본원의 설명에서 사용되는 "내(in)"의 의미는 문맥이 명백히 달리 나타내지 않는 한 "내" 및 "상(on)"을 포함한다. 본 명세서의 청구항이 A, B, C.... 및 N으로 구성된 군으로부터 선택되는 것 중 적어도 하나를 나타내는 경우, 상기 원문은 A + N, 또는 B + N 등이 아니라 상기 군으로부터 하나의 요소만 필요한 것으로 해석되어야 한다.

도면

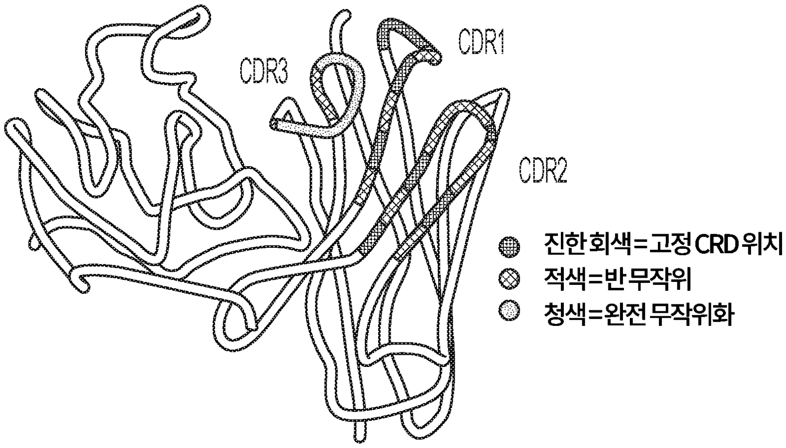
도면1

PDB#	VH 유형	CDR1	CDR2	CDR-H3	H3 길이	κ 유형	CDRL3	κ55
2qsc	3-64	FNFSSYVMH	SAISSDGETTY	R[illegible]Y-NAFDV	14	k1-33	QQYDNLGDLSF	[illegible]55
4zyp	3-30	FSFSHYAMH	AVISYDGENTY	R[illegible]RI-YGMDV	14	k1-33	QQYDNLPPLTF	[illegible]55
4zs6	3-11	FSLSDYYMN	AYISSSSGYTN	R[illegible]RD-GYYKH	12	k1-33	QQYDKL--PTF	[illegible]55
1igm	3-23	FTFNIFVMS	SGVFGSGGNTD	KH[illegible]V-TGFDS	12	k1-33	QQYQNLP-LTF	[illegible]55
1dfb	3-9	FTFNDYAMH	SGISWDSSSIG	KG[illegible]D-VAFDI	17	k1-5	QQYNSY---SF	[illegible]55
4ers	3-30	FTFSSYGMH	AVMYYDGSNKD	R[illegible]KD-YGLDV	19	k1-17	LQHNSNP-LTF	[illegible]55
4u6v	3-13	FTFSSHDMH	GIGTAG-DTYY	R[illegible]RY-YGMDV	14	k1-5	KQYADYW--TF	[illegible]55
1dee	3-30	FTFSGYGMH	ALISYDESNKY	KVKF-APNDY	12	k1-39	QQSYSAP-RTF	Q55
2r56	3-23	FTFRHHGMT	ASLSGSGTKTH	KAKR-GYFDL	12	k1-16	QQYHSYP-WTF	Q55
2uzi	3-48	FTFSTFSMN	SYISRTSKTIY	RGR...FFDY	6	k1-39	QQSVMIP-MTF	Q55
1dql	3-30	FTFSSYAMH	AVISSDGGNKY	RGNP-GGGDY	14	k1-33	QQNSNW---TF	Q55
4py8	3-30	FTFRMYATH	ALISYDGSNKY	R[illegible]LG-GIMDV	13	k1-12	QQANSFP-LTF	Q55
3idx	3-30	FTFRNYAMH	ALIKYDGRNKY	R[illegible]IG-YGPDY	19	k1-33	QQHQNVPLTTF	Q55
4nzu	3-30	FTFGSYAFH	AFISYNGSSKY	RAPD-GAFGY	16	k1-39	QHYDDFP-ISF	A55
무작위화 계획:		FTFZZYZMZ	AZIZZZGZZTZ	ZZZZn-ZFDV	10-16	k1-33	QQZZZZP-ZTF	Z55

VH3 점라인 컨센서스/서열 엔트로피



도면2



CDR1 및 2

• CDR1

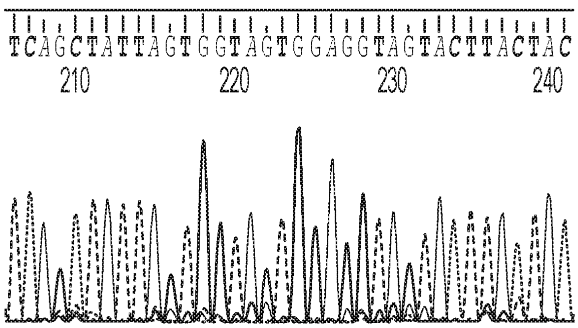
```
GGCTTA GGTCTC A TTTC RVTAGTTACGCTATGCAT TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=TANDSG
GGCTTA GGTCTC A TTTC TCTRVKTACGCTATGCAT TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=TANKDESRG
GGCTTA GGTCTC A TTTC TCTAGTTACKKGATGCAT TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=GWLV
GGCTTA GGTCTC A TTTC TCTAGTTACWMTATGCAT TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=SYTN
GGCTTA GGTCTC A TTTC TCTAGTTACGCTATGAVT TGGG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=STN
```

• CDR2-n

```
GGCTTA GGTCTC G TTCA THCATTAGTGGTAGTGGA C GAGACG AGGTCTGAACGG X=YFS
GGCTTA GGTCTC G TTCA VKTATTAGTGGTAGTGGA C GAGACG AGGTCTGAACGG X=VGISLR
GGCTTA GGTCTC G TTCA GCTATTYGGGGTAGTGGA C GAGACG AGGTCTGAACGG X=WR
GGCTTA GGTCTC G TTCA GCTATTDATGGTAATGGA C GAGACG AGGTCTGAACGG X=YND+N53
GGCTTA GGTCTC G TTCA GCTATTAGTWMTAGTGGA C GAGACG AGGTCTGAACGG X=YSTN
GGCTTA GGTCTC G TTCA GCTATTAGTKGGAGTGGA C GAGACG AGGTCTGAACGG X=WG
GGCTTA GGTCTC G TTCA GCTATTAGTGGTRRTGGA C GAGACG AGGTCTGAACGG X=DGSN
```

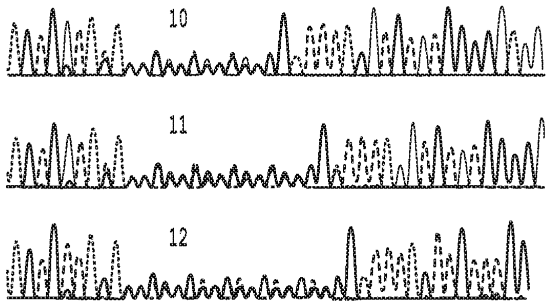
• CDR2-c

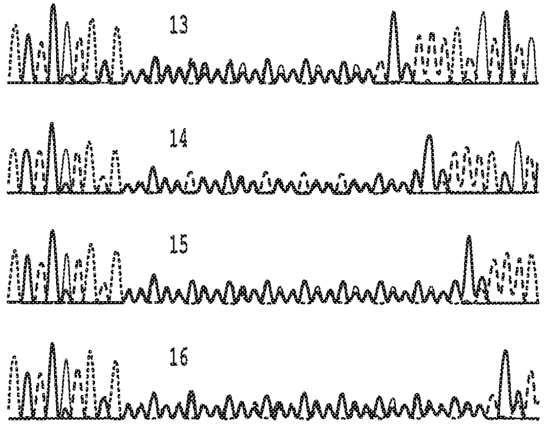
```
GGCTTA GGTCTC G TGGA RVKAGTACTTAC TACG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=STGANKDE
GGCTTA GGTCTC G TGGA GGTNATACTTAC TACG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=YNDH
GGCTTA GGTCTC G TGGA GGTRVAACTTAC TACG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=TKREAG
GGCTTA GGTCTC G TGGA GGTAGTACTVRT TACG C GAGACG AGGTCTGAACGG X=DGNSHR
```



도면3

사전 선택된 영역으로부터 조립된 7 scFv 라이브러리의 시퀀싱된 PCR 생성물





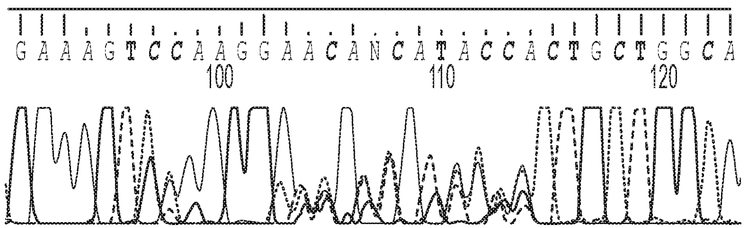
CDR3 길이	BsaI				G/D R/L	Xaa	G/A			BsmBI		복잡성 DNA	복잡성 단백질
10	GGCTTA	GGTCTC	T	CCGT	GRT CKC	(NNK) 4	GST	TTCG	C	GAGACG	AGGTCTGAACGG	$8x10^{6}$	$1x10^{6}$
11	GGCTTA	GGTCTC	T	CCGT	GRT CKC	(NNK) 5	GST	TTCG	C	GAGACG	AGGTCTGAACGG	$3x10^{8}$	$3x10^{7}$
12	GGCTTA	GGTCTC	T	CCGT	GRT CKC	(NNK) 6	GST	TTCG	C	GAGACG	AGGTCTGAACGG	$9x10^{9}$	$5x10^{8}$
13	GGCTTA	GGTCTC	T	CCGT	GRT CKC	(NNK) 7	GST	TTCG	C	GAGACG	AGGTCTGAACGG	$3x10^{11}$	$1x10^{10}$
14	GGCTTA	GGTCTC	T	CCGT	GRT CKC	(NNK) 8	GST	TTCG	C	GAGACG	AGGTCTGAACGG	$9x10^{12}$	$2x10^{11}$
15	GGCTTA	GGTCTC	T	CCGT	GRT CKC	(NNK) 9	GST	TTCG	C	GAGACG	AGGTCTGAACGG	$3x10^{14}$	$4x10^{12}$
16	GGCTTA	GGTCTC	T	CCGT	GRT CKC	(NNK) 10	GST	TTCG	C	GAGACG	AGGTCTGAACGG	$9x10^{15}$	$8x10^{13}$

도면4

CDR L3

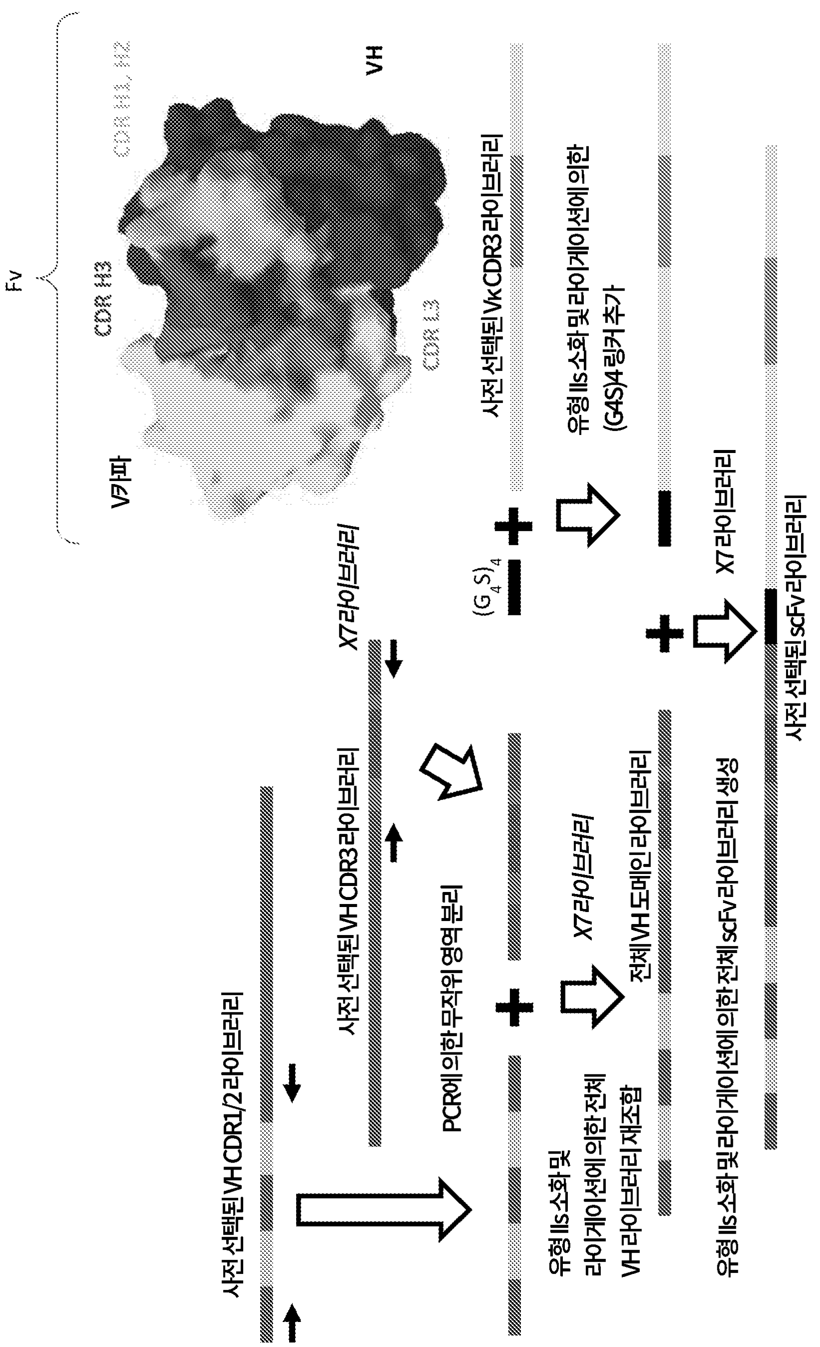
RANDL3-1
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT DSG CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG
RANDL3-2
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT DSG CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG
RANDL3-3
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT NWT CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG
RANDL3-4
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT NWT CCT TWC ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG
RANDL3-5
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT DSG CCT YKG ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG
RANDL3-6
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT DSG CCT YKG ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG
RANDL3-7
GGCTTA GGTCTC T GCAG DSG DMT RVT NWT CCT YKG ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG
RANDL3-8
GGCTTA GGTCTC T GCAG BWT DMT RVT NWT CCT YKG ACTT C GAGACG AGGTCTGAACGG

Q Q {Y D L A H S F R T W G} {Y N D S T A} {S N T A D G} {Y F A L T S H W I N R V D G} P {L Y W F R} T

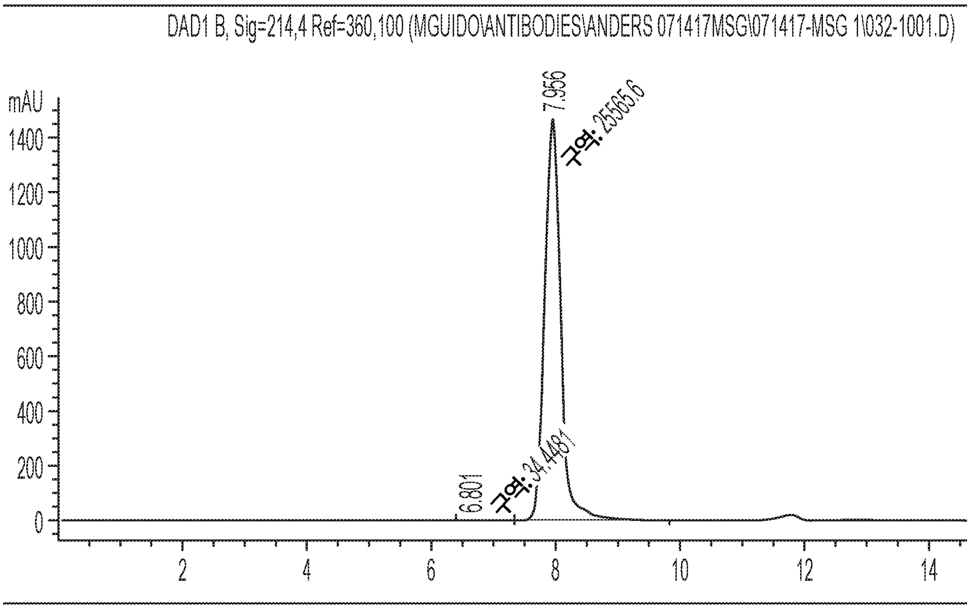


(역상보체)

도면5

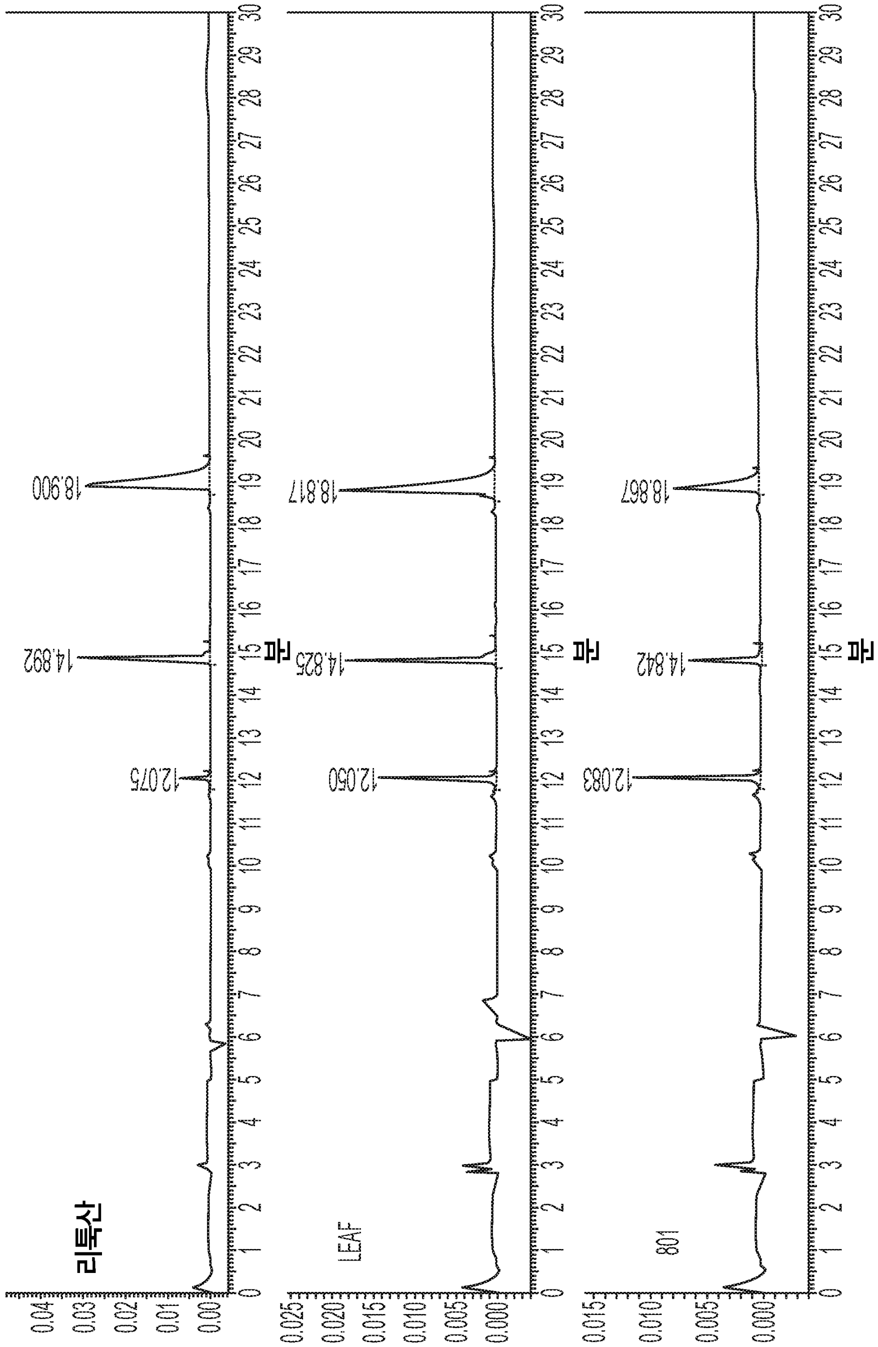

Fv
V카파
CDR H3
CDR L3
CDR H1, H2
VH
사전 선택된 VH CDR1/2 라이브러리
사전 선택된 VH CDR3 라이브러리
X7 라이브러리
PCR에 의한 무작위 영역 분리
유형 IIs 소화 및
라이게이션에 의한 전체
VH 라이브러리 재조합
X7 라이브러리
전체 VH 도메인 라이브러리
(G4S)4
사전 선택된 VκCDR3 라이브러리
유형 IIs 소화 및 라이게이션에 의한
(G4S)4 링커 추가
X7 라이브러리
유형 IIs 소화 및 라이게이션에 의한 전체 scFv 라이브러리 생성
사전 선택된 scFv 라이브러리

도면6

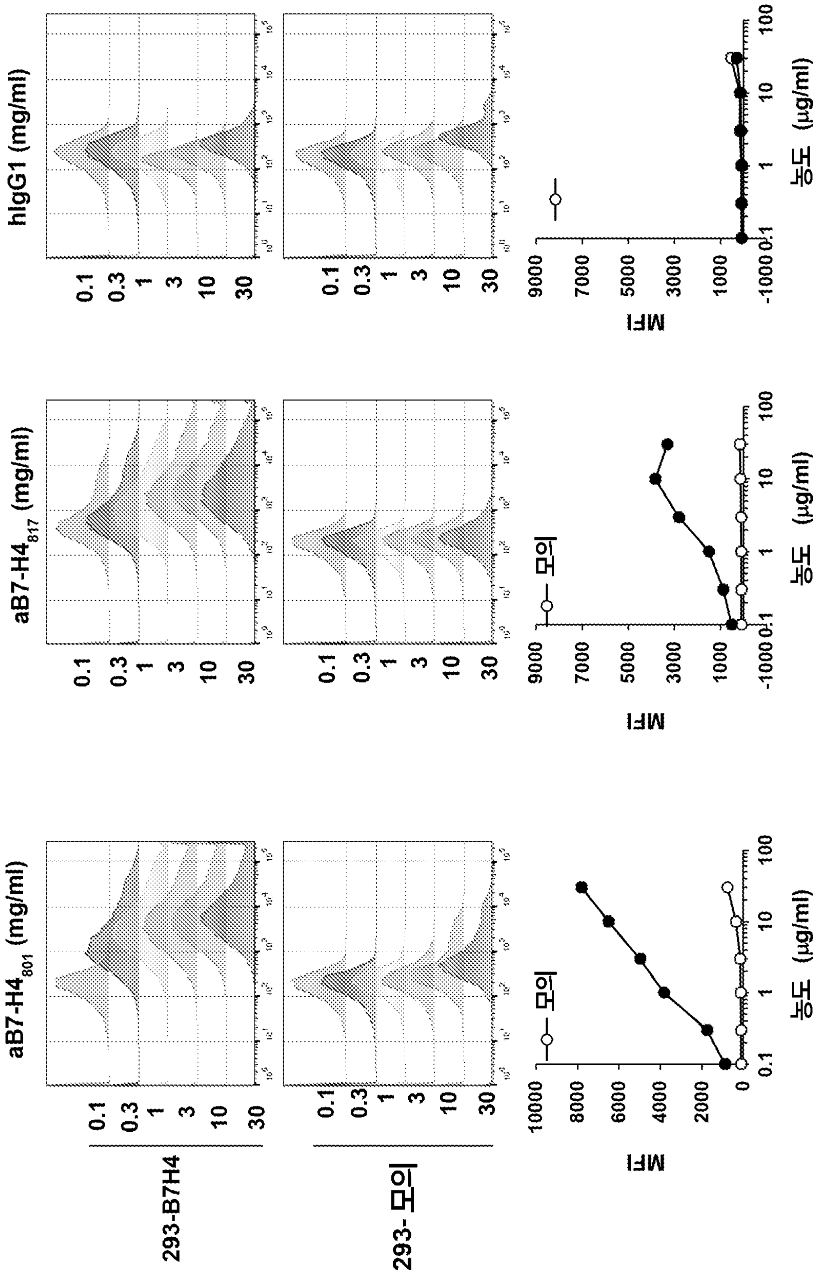


피크 번호	체류시간 [분]	유형	폭 [분]	구역 [mAU*s]	높이 [mAU]	구역 %
1	6.719	MF	0.4504	49.97571	1.84921	0.1062
2	7.911	FM	0.3160	4.69964e4	2478.48633	99.8938

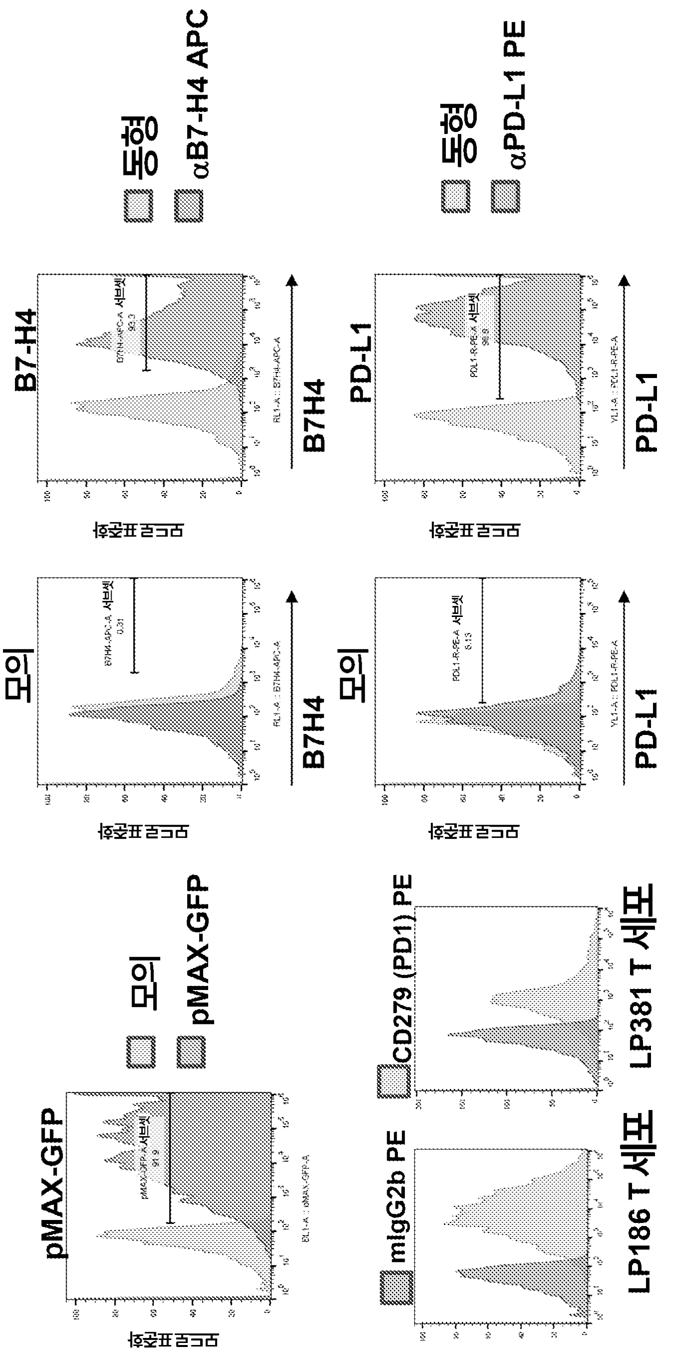
도면7


리툭산
12.075
14.892
18.900
LEAF
12.060
14.825
18.817
801
12.083
14.842
18.867
분

도면8

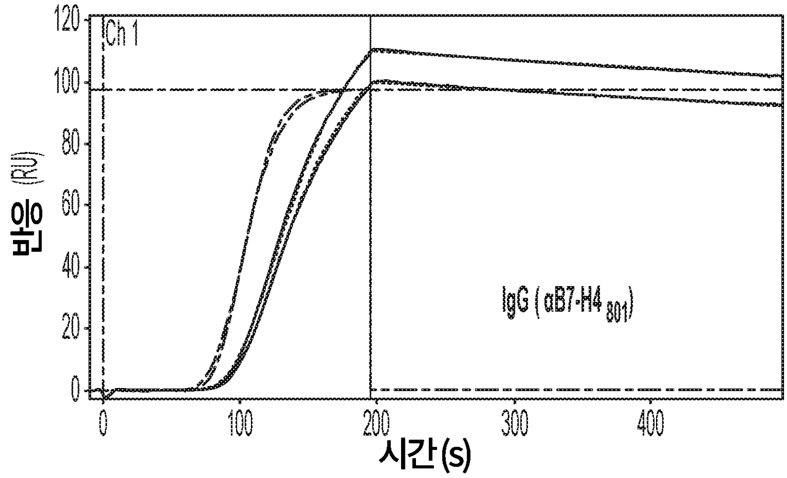

aB7-H4801 (mg/ml)
aB7-H4817 (mg/ml)
hIgG1 (mg/ml)
293-B7H4
293-모의
0.1
0.3
1
3
10
30
MFI
모의
농도 (μg/ml)

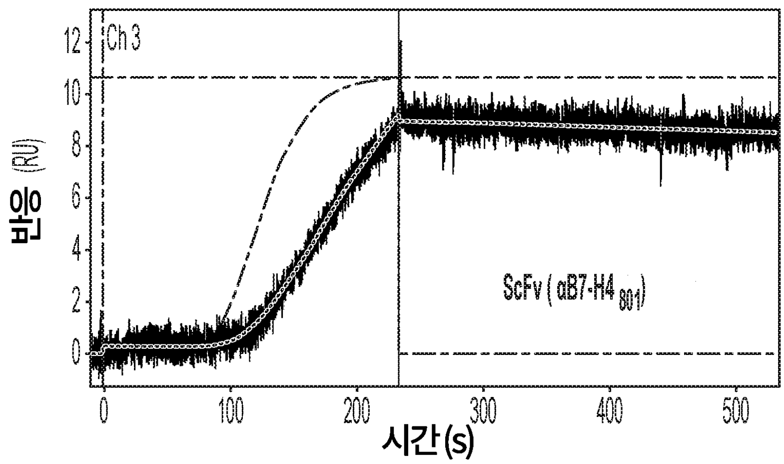
도면9



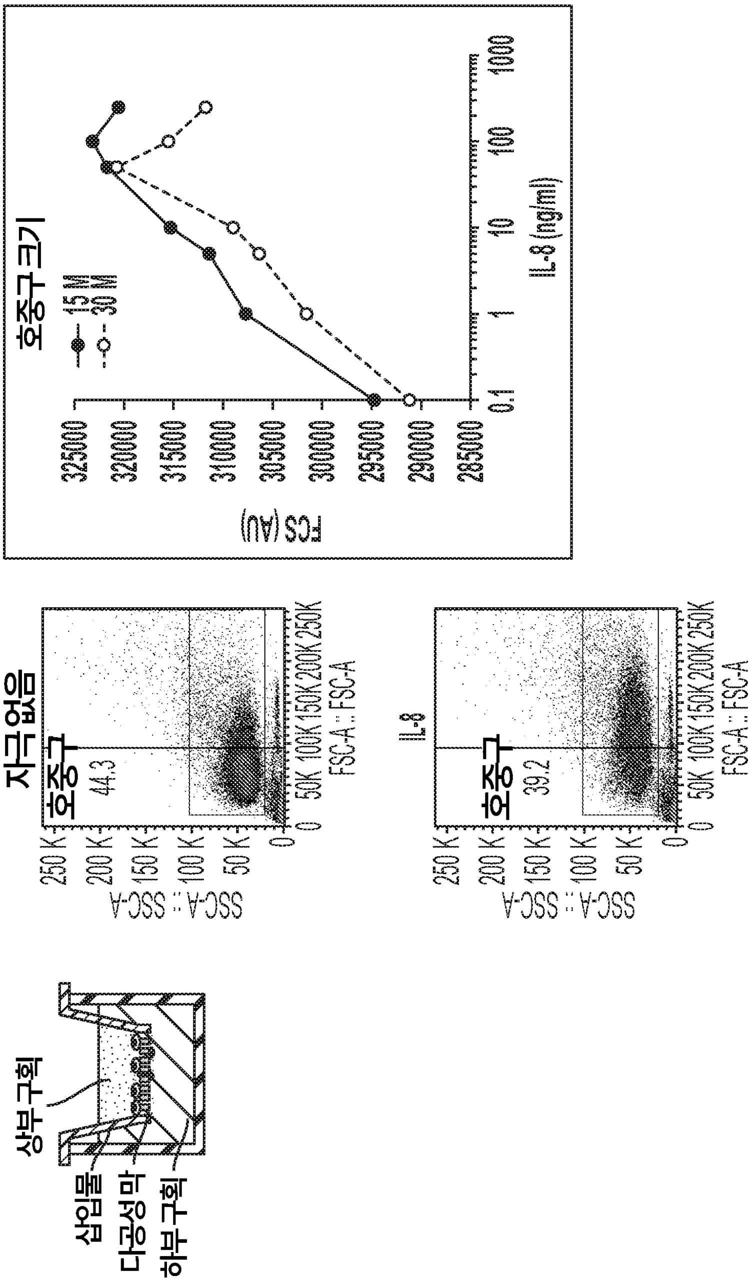
pMAX-GFP
모의
pMAX-GFP
B7-H4
모의
B7H4
동형
αB7-H4 APC
PD-L1
PD-L1
αPD-L1 PE
mIgG2b PE
CD279 (PD1) PE
LP186 T 세포
LP381 T 세포

도면10

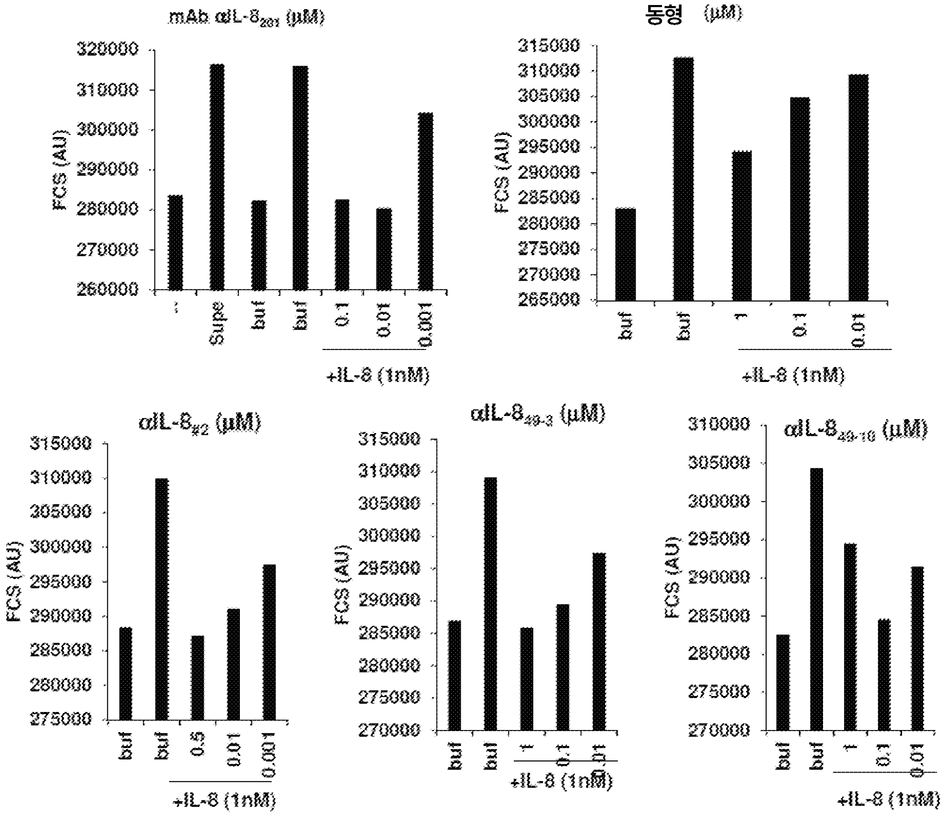




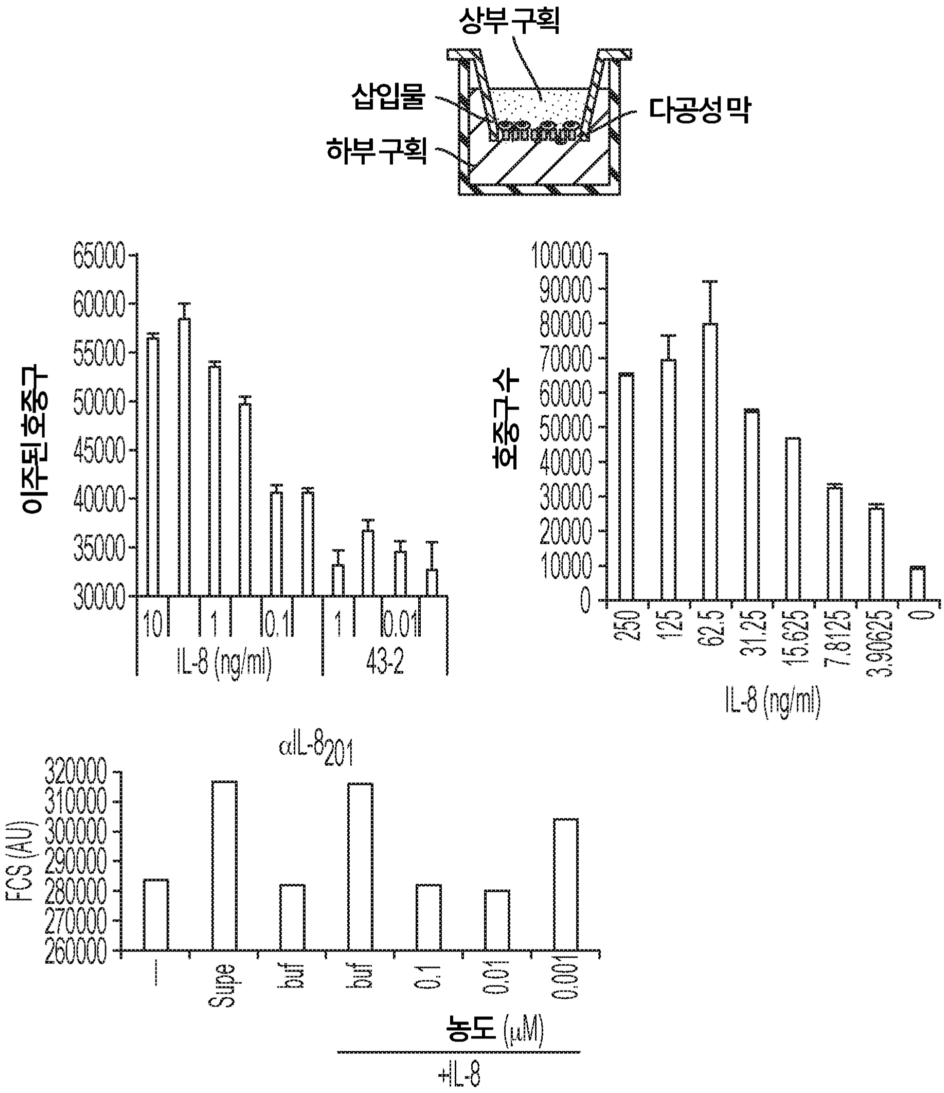
도면11


호중구 크기
15 M
30 M
FCS (AU)
IL-8 (ng/ml)
자극 없음
호중구
44.3
IL-8
호중구
39.2
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
상부 구획
삽입물
다공성 막
하부 구획

도면12

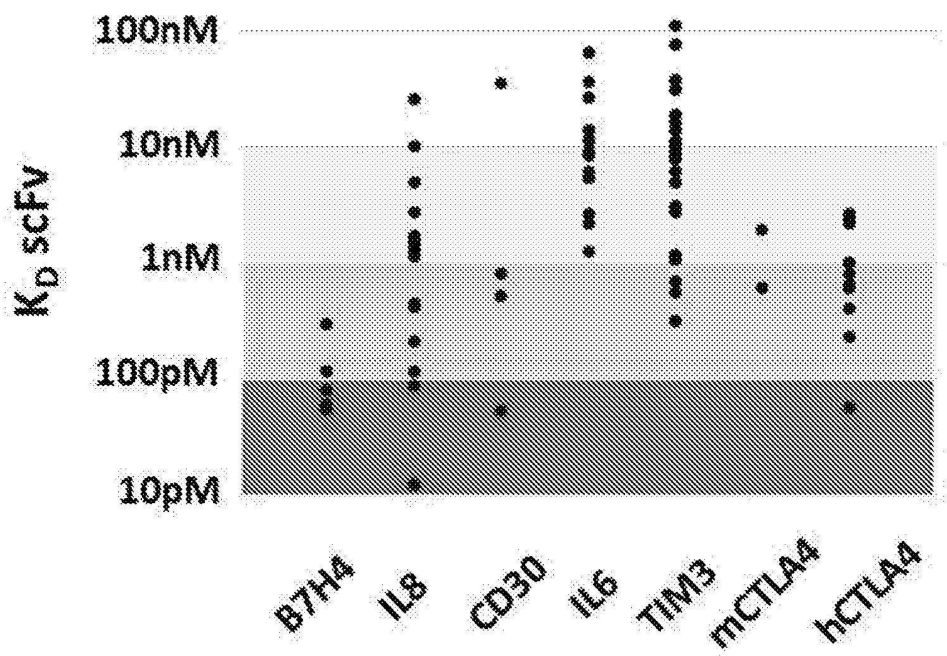

mAb αIL-8201 (μM)
320000
310000
300000
290000
280000
270000
260000
FCS (AU)
Supe
buf
buf
0.1
0.01
0.001
+IL-8 (1nM)
동형 (μM)
315000
310000
305000
300000
295000
290000
285000
280000
275000
270000
265000
FCS (AU)
buf
buf
1
0.1
0.01
+IL-8 (1nM)
αIL-8#2 (μM)
315000
310000
305000
300000
295000
290000
285000
280000
275000
FCS (AU)
buf
buf
0.5
0.01
0.001
+IL-8 (1nM)
αIL-849-3 (μM)
315000
310000
305000
300000
295000
290000
285000
280000
275000
270000
FCS (AU)
buf
buf
1
0.1
0.01
+IL-8 (1nM)
αIL-849-10 (μM)
310000
305000
300000
295000
290000
285000
280000
275000
270000
FCS (AU)
buf
buf
1
0.1
0.01
+IL-8 (1nM)

도면13


상부 구획
삽입물
다공성막
하부 구획
이주된 호중구
65000
60000
55000
50000
45000
40000
35000
30000
10
1
0.1
1
0.01
IL-8 (ng/ml)
43-2
호중구 수
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
250
125
62.5
31.25
15.625
7.8125
3.90625
0
IL-8 (ng/ml)
αIL-8201
FCS (AU)
320000
310000
300000
290000
280000
270000
260000
—
Supe
buf
buf
0.1
0.01
0.001
농도 (μM)
+IL-8

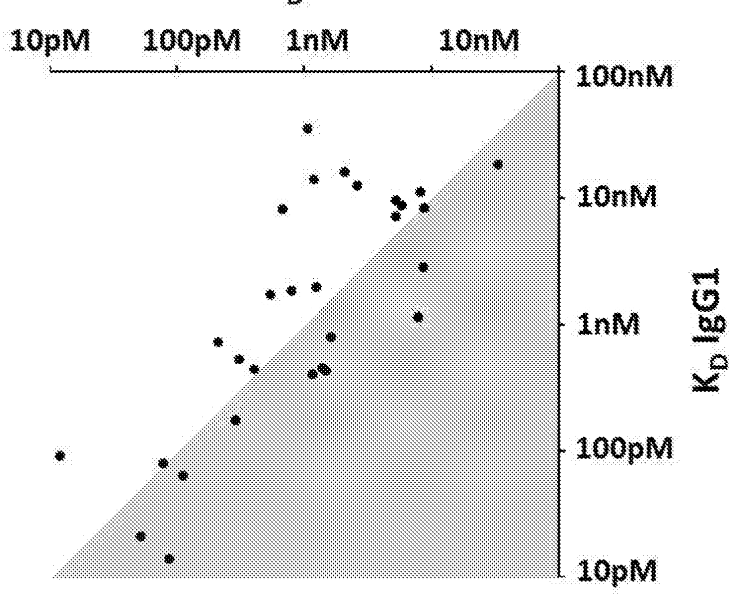
도면14

시험관 내 scFv 발현으로부터의 SPR에 의한 K_D 스크린



도면15

IgG1 전환: 현재까지 시험된 모든 29개의 적중이 기능적임



서 열 목 록

<110> NantBio, Inc.

<120> mRNA DISPLAY ANTIBODY LIBRARY AND METHODS

<130> 102538.0050PCT

<150> US62/588,914

<151> 2017-11-20

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR1

<400> 1

ggcttaggtc tcatttcrvt agttacgcta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR1

<400> 2

ggcttaggtc tcatttctct rvktacgcta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 3

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR1

<400> 3

ggcttaggtc tcatttctct agttackkga tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 4

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR1

<400> 4

ggcttaggtc tcatttctct agttacwmta tgcattgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 5

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR1

<400> 5

ggcttaggtc tcatttctct agttacgcta tgavttgggc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 6

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-n

<400> 6

ggcttaggtc tcgttcathc attagtggta gtggacgaga cgaggtctga acgg 54

<210> 7

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-n

<400> 7

ggcttaggtc tcgttcavkt attagtggta gtggacgaga cgaggtctga acgg 54

<210> 8

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-n

<400> 8

ggcttaggtc tcgttcagct attyggggta gtggacgaga cgaggtctga acgg 54

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-n

<400> 9

ggcttaggtc tcgttcagct attdatggta atggacgaga cgaggtctga acgg 54

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-n

<400> 10

ggcttaggtc tcgttcagct attagtwmta gtggacgaga cgaggtctga acgg 54

<210> 11

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-n

<400> 11

ggcttaggtc tcgttcagct attagtkgga gtggacgaga cgaggtctga acgg 54

<210> 12

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence for VH CDR2-n

<400> 12

ggcttaggtc tcgttcagct attagtggtr rtggacgaga cgaggtctga acgg 54

<210> 13

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-c

<400> 13

ggcttaggtc tcgtggarvk agtacttact acgcgagacg aggtctgaac gg 52

<210> 14

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-c

<220><221> misc_feature

<222>

(21)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 14

ggcttaggtc tcgtggaggt natacttact acgcgagacg aggtctgaac gg 52

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-c

<400> 15

ggcttaggtc tcgtggaggt rvaacttact acgcgagacg aggtctgaac gg 52

<210> 16

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR2-c

<400> 16

ggcttaggtc tcgtggaggt agtactvrtt acgcgagacg aggtctgaac gg 52

<210> 17

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VH CDR3

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(25)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 17

ggcttaggtc tctccgtgrt ckcnnkngst ttcgcgagac gaggtctgaa cgg 53

<210> 18

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<400> 18

ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtdsgc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 19

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<400> 19

ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtdsgc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 20

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<220><221> misc_feature

<222> (27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 20

ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtnwtc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 21

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<220><221> misc_feature

<222> (27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 21

ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtnwtc cttwcacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 22

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<400> 22

ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtdsgc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 23

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<400> 23

ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtdsgc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 24

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<220><221> misc_feature

<222> (27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 24

ggcttaggtc tctgcagdsg dmtrvtnwtc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 25

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence for VL CDR3

<220><221> misc_feature

<222> (27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 25

ggcttaggtc tctgcagbwt dmtrvtnwtc ctykgacttc gagacgaggt ctgaacgg 58

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 801 CDRH1

<400> 26

Asn Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 801 CDRH2

<400> 27

Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Arg

1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 801 CDRH3

<400> 28

Asp Arg Phe Arg Lys Val His Gly

1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 801 CDRL3

<400> 29

Asp Ala Thr Phe Pro Leu

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 802 CDRH1

<400> 30

Gly Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 802 CDRH2

<400> 31

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg

1 5 10

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 802 CDRH3

<400> 32

Asp Leu Tyr Arg Arg Val His Gly

1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 802 CDRL3

<400> 33

Asp Tyr Gly Phe Pro Leu

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 905 CDRH1

<400> 34

Ser Ser Tyr Leu Met His

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 905 CDRH2

<400> 35

Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg

1 5 10

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 905 CDRH3

<400> 36

Asp Leu Tyr Arg Arg Val Ala Gly

1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 905 CDRL3

<400> 37

Asp Tyr Ala Leu Pro Leu

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 906 CDRH1

<400> 38

Ser Asn Tyr Ala Met His

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 906 CDRH2

<400> 39

Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr His

1 5 10

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 906 CDRH3

<400> 40

Asp Arg Phe Arg Arg Val Tyr Gly

1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 906 CDRL3

<400> 41

Asp Tyr Thr Phe Pro Leu

1 5

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 817 CDRH1

<400> 42

Ser Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 817 CDRH2

<400> 43

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Arg

1 5 10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 817 CDRH3

<400> 44

Gly Arg Trp Ser Lys Trp Gly

1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Clone 817 CDRL3

<400> 45

Thr Asp Asn Phe Pro Tyr

1 5

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】청구범위

【보정세부항목】청구항 1

【변경전】

복수의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 고 다양성 핵산 라이브러리를 생성하는 방법으로서,

(1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리를 생성시키거나 제공하는 단계로서, 상기 서브-라이브러리 (1) 내지 (3) 각각이 복수의 구성원을 포함하고; 상기 서브-라이브러리의 각각의 구성원이 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함하고,고, 상기 무작위 카세트는 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성되는, 단계; 및

발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성시키기 위하여 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_l 서브-라이브러리의 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부를 재조합하는 단계를 포함하고,

상기 발현 라이브러리가 복수의 발현 라이브러리 구성원을 포함하고, 각각의 발현 라이브러리 구성원이 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하고,

상기 별개의 항체 또는 항체 단편은 scFv를 포함하는,

방법.

【변경후】

복수의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 고 다양성 핵산 라이브러리를 생성하는 방법으로서,

(1) V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, (2) 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 (3) V_L 서브-라이브러리를 생성시키거나 제공하는 단계로서, 상기 서브-라이브러리 (1) 내지 (3) 각각이 복수의 구성원을 포함하고; 상기 서브-라이브러리의 각각의 구성원이 복수의 축퇴성 염기 위치를 갖는 적어도 하나의 무작위 카세트를 포함하고, 상기 무작위 카세트는 SEQ ID NO:1 내지 SEQ ID NO:25로부터 선택된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성되는, 단계; 및

발현 라이브러리에서 발현 라이브러리 구성원을 형성시키기 위하여 V_H-CDR1/2 서브-라이브러리, 복수의 V_H-CDR3 서브-라이브러리 및 V_L 서브-라이브러리의 적어도 2개의 구성원의 적어도 일부를 재조합하는 단계를 포함하고,

상기 발현 라이브러리가 복수의 발현 라이브러리 구성원을 포함하고, 각각의 발현 라이브러리 구성원이 별개의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하고,

상기 별개의 항체 또는 항체 단편은 scFv를 포함하는,

방법.