



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0160130
(43) 공개일자 2022년12월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7037513
- (22) 출원일자(국제) 2021년03월26일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년10월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2021/083248
- (87) 국제공개번호 WO 2021/190631
국제공개일자 2021년09월30일
- (30) 우선권주장
202010228279.4 2020년03월27일 중국(CN)

- (71) 출원인
디디바이오. 코퍼레이션 엘티디.,(상하이)
중국 상하이 201210 푸둥 미들 가오케 로드넘버
1976 빌딩 1 4스 플로어 스위트 에이 401
- (72) 발명자
저우, 첸
중국 상하이 201210 푸둥 미들 가오케 로드넘버
1976 빌딩 1 4스 플로어 스위트 에이 401
- (74) 대리인
이처영, 장제한

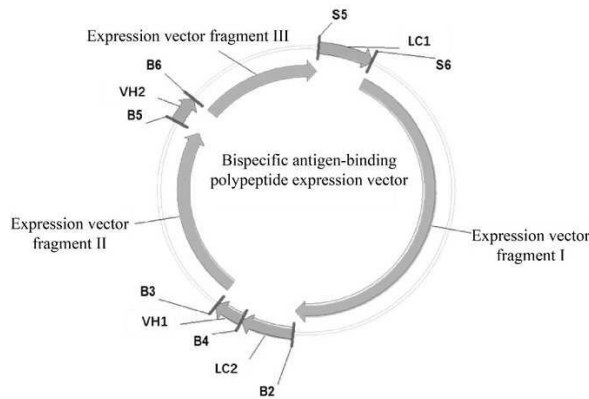
전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 **포유동물 세포 및 벡터의 표면에 이중특이항체를 디스플레이하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드 발현 벡터 및 상기 방법에 따라 생산된 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 구축하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 특정 결합 말단을 갖는 7개의 핵산 단편을 얻기 위해 특정 인식 효소 절단 부위(specific recognition enzyme cutting site)의 제한 엔도뉴클레아제를 이용해 처리하는 단계 및 상기 핵산 단편을 방향적으로 결합(ligating)하는 단계를 포함한다. 본 발명은 추가로, 발현 벡터를 사용하여 폴리펩타이드 디스플레이 라이브러리를 확립하는 방법을 제공한다. 상기 디스플레이 라이브러리는 항체 또는 그 단편을 효과적으로 스크리닝하는 데 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터의 구축 방법:

- a) 5'에서 3' 방향으로 S5-LC1-S6을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- b) 5'에서 3' 방향으로 B4-VH1-B3을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- c) 5'에서 3' 방향으로 B2-LC2-B4를 포함하는 제3 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- d) 5'에서 3' 방향으로 B5-VH2-B6을 포함하는 제4 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- e) 5'에서 3' 방향으로 S6-발현 벡터 단편 I-B2를 포함하는 제5 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- f) 5'에서 3' 방향으로 B3-발현 벡터 단편 II-B5를 포함하는 제6 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- g) 5'에서 3' 방향으로 B6-발현 벡터 단편 III-S5를 포함하는 제7 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계;
- h) 상기 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 제3 폴리뉴클레오티드, 제4 폴리뉴클레오티드, 제5 폴리뉴클레오티드, 제6 폴리뉴클레오티드 및 제7 폴리뉴클레오티드를 각각 S5, S6, B4, B3, B2, B5 및 B6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 특이적으로 절단하여 절단된 제1 폴리뉴클레오티드, 절단된 제2 폴리뉴클레오티드, 절단된 제3 폴리뉴클레오티드, 절단된 제4 폴리뉴클레오티드, 절단된 제5 폴리뉴클레오티드, 절단된 제6 폴리뉴클레오티드 및 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계; 및
- i) 절단된 제1 폴리뉴클레오티드, 절단된 제2 폴리뉴클레오티드, 절단된 제3 폴리뉴클레오티드, 절단된 제4 폴리뉴클레오티드, 절단된 제5 폴리뉴클레오티드, 절단된 제6 폴리뉴클레오티드 및 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 혼합하여 이들이 방향적으로 결합되고 고리화되어 발현 벡터를 형성할 수 있도록 하는 단계;

상기 LC1은 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제1 경쇄를 암호화하고, VH1은 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제1 중쇄 가변 영역을 암호화하고, 제1 경쇄는 제1 중쇄 가변 영역에 결합하여 제1 표적을 인식하기 위한 제1 Fab를 형성할 수 있고,

상기 LC2는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제2 경쇄를 암호화하고, VH2는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제2 중쇄 가변 영역을 암호화하고, 제2 경쇄는 제2 중쇄 가변 영역에 결합하여 제2 표적을 인식하기 위한 제2 Fab를 형성할 수 있으며,

상기 B2, B3, B4, B5, B6, S5 및 S6은 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 B2를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B3, B4, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 B3를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B4를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된

말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B3, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B3, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B6를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B3, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 S5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B6, B3 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 S6를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B6, S5 및 B3 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제한 엔도뉴클레아제는 SfiI 및 BsmBI로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B2, B3, B4, B5 및 B6이 BsmBI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 S5 및 S6이 SfiI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B2가 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B3가 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B4가 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B5가 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B6이 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 S5가 서열번호 6로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 S6이 서열번호 7로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제1 폴리뉴클레오티드를 제1 박테리아에 도입하여 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 방법은 상기 제1 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 LC1 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 LC1 저장 결찰 생성물을 제1 박테리아에 도입하여 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 방법은 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 경쇄 성분 플라스미드를 획득하고, 상기 제1 경쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제1 폴리뉴클레오티드

를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 방법은 상기 S5 및 S6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제1 경쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제1 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제2 폴리뉴클레오티드를 제2 박테리아에 도입하여 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 방법은 상기 제2 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 VH1 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 VH1 저장 결찰 생성물을 제2 박테리아에 도입하여 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 방법은 상기 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 중쇄 성분 플라스미드를 획득하고, 상기 제1 중쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제2 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 방법은 상기 B4 및 B3을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제1 중쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제2 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제3 폴리뉴클레오티드를 제3 박테리아에 도입하여 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 방법은 상기 제3 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 LC2 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 LC2 저장 결찰 생성물을 제3 박테리아에 도입하여 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 방법은 상기 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제3 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 경쇄 성분 플라스미드를 획득하고, 상기 제2 경쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제3 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 방법은 상기 B2 및 B4를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제2 경쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제3 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제4 폴리뉴클레오티드를 제4 박테리아에 도입하여 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 방법은 상기 제4 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 VH2 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 VH2 저장 결찰 생성물을 제4 박테리아에 도입하여 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 방법은 상기 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제4 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 중쇄 성분 플라스미드를 획득하고, 상기 제2 중쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제4 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 방법은 상기 B5 및 B6를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제2 중쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제4 폴리뉴클레오티드를 수득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제5 폴리뉴클레오티드를 제5 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 방법은 상기 제5 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 I 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제5 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리로부터 제5 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I을 획득하고, 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I로부터 절단된 제5 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 방법은 상기 S6 및 B2를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 디스플레이

단편 성분 플라스미드 I을 분해하여 절단된 제5 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제6 폴리뉴클레오티드를 제6 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 방법은 상기 제6 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 II 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제6 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리로부터 제6 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II를 획득하고, 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II로부터 절단된 제6 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 방법은 상기 B3 및 B5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II를 분해하여 절단된 제6 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제7 폴리뉴클레오티드를 제7 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 방법은 상기 제7 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 III 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제7 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리로부터 제7 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III를 획득하고, 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III로부터 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 구축방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 방법은 상기 B6 및 S5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III를 분해하여 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 47

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리, LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리, VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리, VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리, 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리, 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리 및/또는 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 동결 보존하는 단계를 포함하는 구축방법.

청구항 48

제20항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성분 벡터는 pUC 벡터로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 pUC 벡터는 pUC19 벡터 또는 pUC19 벡터로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 50

제19항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 51

제23항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 52

제27항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 53

제31항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터는 10개 이상의 상이한 클론을 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드, 제3 폴리뉴클레오타이드 및/또는 제4 폴리뉴클레오타이드는 샘플 물질로부터 수득되는 것임을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 샘플 물질은 특이적 항원을 표적화하는 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것인 구축방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 항체 또는 그 항원 결합 단편이 PD-1 및/또는 PD-L1을 표적화하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방향적 결합은 리가아제를 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 리가아제는 T4 DNA 리가아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 구축방법.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터.

청구항 61

제60항의 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 이용하여 제조된(established) 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 디스플레이 라이브러리.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 라이브러리는 포유동물 세포 디스플레이 라이브러리인 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 63

제60항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 10개의 상이한 이중특이적 항체 또는 그의 항체 단편을 디스플레이할 수 있는 라이브러리.

청구항 64

제61항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 라이브러리를 이용하는 단계를 포함하는, 항체 또는 그 단편 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 생물의학 분야에 관한 것으로, 구체적으로 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 구축하는

[0001]

방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 이중특이항체를 개발하는 기존의 방법은 일반적으로 두 개의 표적에 대한 특이항체를 개별적으로 스크리닝 (screening)한 후, 특정항체의 한 그룹과 다른 그룹의 항체를 짝지어(pairing) 발현 및 정제한 후, 물리화학적 또는 생물학적 활성 등을 분석 및 시험하는 방식으로 이루어진다. 기존의 방법은 많은 스크리닝 시간, 고비용, 긴 사이클 타임, 장기 보존 시 심각한 품질 저하 등의 문제가 있어 공업적 대량 생산의 요구를 충족시키기 어렵다.

[0003] 따라서, 품질을 제어하면서도 간단한 조작으로 공업적 대량 생산의 요구를 충족시킬 수 있는 이중특이적 항체를 스크리닝하는 방법이 시급히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 세포(예를 들어, 포유동물 세포)의 표면 상에 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드(예를 들어, 이중특이적 항체)를 디스플레이하는 방법을 제공한다. 먼저, 상이한 성분(예를 들어, 2개 이상의 상이한 표적에 대한 항원 결합 폴리펩타이드 또는 그 단편, 발현 벡터 성분)을 발현할 수 있는 박테리아 라이브러리를 구축하고, 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 형성하기 위하여 방향적으로 결합(ligate)될 수 있는 상응하는 벡터 단편을 수득하기 위해, 특정 제한 부위에서 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 원하는 성분을 절단한다. 발현 벡터는 세포 내로 전달되어 세포가 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드를 디스플레이할 수 있도록 하고, 상기 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 발현 정도 및 각 항원에 대한 그 결합 친화도를 직접 분석할 수 있다. 본 발명의 방법을 사용함으로써, 이중특이적 항원 결합 단백질은 포유동물 세포의 표면에서 성공적으로 발현될 수 있고, 다수의 펩타이드 사슬이 동시에 발현될 수 있다. 벡터는 어떠한 구조적 형태의 이중특이적 항원 결합 단백질의 발현 및 스크리닝에 적용할 수 있어, 이중특이적 항체 약물의 스크리닝 및 개발을 촉진하고 약물 성공률을 향상시킬 수 있다.

[0005] 일 관점에서 본 발명은 다음 단계를 포함하는 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터의 구축 방법을 제공한다:

[0006] a) 5'에서 3' 방향으로 S5-LC1-S6을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0007] b) 5'에서 3' 방향으로 B4-VH1-B3을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0008] c) 5'에서 3' 방향으로 B2-LC2-B4를 포함하는 제3 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0009] d) 5'에서 3' 방향으로 B5-VH2-B6을 포함하는 제4 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0010] e) 5'에서 3' 방향으로 S6-발현 벡터 단편 I-B2를 포함하는 제5 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0011] f) 5'에서 3' 방향으로 B3-발현 벡터 단편 II-B5를 포함하는 제6 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0012] g) 5'에서 3' 방향으로 B6-발현 벡터 단편 III-S5를 포함하는 제7 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 단계;

[0013] h) 상기 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드, 제3 폴리뉴클레오타이드, 제4 폴리뉴클레오타이드, 제5 폴리뉴클레오타이드, 제6 폴리뉴클레오타이드 및 제7 폴리뉴클레오타이드를 각각 S5, S6, B4, B3, B2, B5 및 B6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 특이적으로 절단하여 절단된 제1 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제2 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제3 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제4 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제5 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제6 폴리뉴클레오타이드 및 절단된 제7 폴리뉴클레오타이드를 수득하는 단계; 및

[0014] i) 절단된 제 1 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제 2 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제 3 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제 4 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제 5 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제 6 폴리뉴클레오타이드 및 절단된 제 7 폴리뉴클레오타이드를 혼합하여 이들이 방향적 결찰 및 고리화되어 발현 벡터를 형성할 수 있도록 하는 단계;

- [0015] 상기 LC1은 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제1 경쇄를 암호화하고, VH1은 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제1 중쇄 가변 영역을 암호화하고, 제1 경쇄는 제1 중쇄 가변 영역에 결합하여 제1 표적을 인식하기 위한 제1 Fab를 형성할 수 있고,
- [0016] 상기 LC2는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제2 경쇄를 암호화하고, VH2는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제2 중쇄 가변 영역을 암호화하고, 제2 경쇄는 제2 중쇄 가변 영역에 결합하여 제2 표적을 인식하기 위한 제2 Fab를 형성할 수 있으며,
- [0017] 상기 B2, B3, B4, B5, B6, S5 및 S6은 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위임.
- [0018] 특정 실시 양태에서, 상기 B2를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B3, B4, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는다.
- [0019] 특정 실시 양태에서, 상기 B3를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는다.
- [0020] 특정 실시 양태에서, 상기 B4를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B3, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는다.
- [0021] 특정 실시 양태에서, 상기 B5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B3, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는다.
- [0022] 특정 실시 양태에서, 상기 B6를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B3, S5 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는다.
- [0023] 특정 실시 양태에서, 상기 S5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B6, B3 및 S6 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는다.
- [0024] 특정 실시 양태에서, 상기 S6를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 말단은 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2, B4, B5, B6, S5 및 B3 중 어느 하나의 특이적 절단으로부터 생성된 말단을 인식하지 않거나 상호 간 연결되지 않는다.
- [0025] 특정 실시 양태에서, 상기 제한 엔도뉴클레아제는 SfiI 및 BsmBI로부터 선택된다.
- [0026] 특정 실시 양태에서, 상기 B2, B3, B4, B5 및 B6이 BsmBI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있다.
- [0027] 특정 실시 양태에서, 상기 S5 및 S6은 SfiI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있다.
- [0028] 특정 실시 양태에서, 상기 B3가 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0029] 특정 실시 양태에서, 상기 B4가 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0030] 특정 실시 양태에서, 상기 B5가 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0031] 특정 실시 양태에서, 상기 B6이 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0032] 특정 실시 양태에서, 상기 S5가 서열번호 6로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 특정 실시 양태에서, 상기 S6이 서열번호 7로 표시되는 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제1 폴리뉴클레오티드를 제1 박테리아에 도입하여 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제1 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 LC1 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 LC1 저장 결찰 생성물을 제1 박테리아에 도입하여 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 경쇄 성분 플라스미드를 획득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 제1 경쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제1

폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 S5 및 S6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제1 경쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제1 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.

[0035] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제2 폴리뉴클레오티드를 제2 박테리아에 도입하여 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제2 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 VH1 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 VH1 저장 결찰 생성물을 제2 박테리아에 도입하여 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 중쇄 성분 플라스미드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 제1 중쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제2 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 B4 및 B3을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제1 중쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제2 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.

[0036] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제3 폴리뉴클레오티드를 제3 박테리아에 도입하여 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제3 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 LC2 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 LC2 저장 결찰 생성물을 제3 박테리아에 도입하여 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제3 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 경쇄 성분 플라스미드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제2 경쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제3 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 B2 및 B4를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제2 경쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제3 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.

[0037] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제4 폴리뉴클레오티드를 제4 박테리아에 도입하여 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함

[0038] 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제4 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 VH2 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 VH2 저장 결찰 생성물을 제4 박테리아에 도입하여 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제4 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 중쇄 성분 플라스미드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제2 중쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제4 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 B5 및 B6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제2 중쇄 성분 플라스미드를 분해하여 절단된 제4 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.

[0039] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제5 폴리뉴클레오티드를 제5 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제5 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 I 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제5 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리로부터 제5 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I을 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I로부터 절단된 제5 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 S6 및 B2를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I을 분해하여 절단된 제5 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.

[0040] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제6 폴리뉴클레오티드를 제6 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제6 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 II 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제6 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리로부터 제6 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II로부터 절단된 제6 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 B3 및 B5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 디스플레이

이 단편 성분 플라스미드 II를 분해하여 절단된 제6 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.

- [0041] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제7 폴리뉴클레오티드를 제7 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 제7 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 III 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제7 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리로부터 제7 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III로부터 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 B6 및 S5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III를 분해하여 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.
- [0042] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리, LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리, VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리, VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리, 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리, 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리 및/또는 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 동결 보존하는 단계를 포함한다.
- [0043] 특정 실시 양태에서, 상기 성분 벡터는 pUC 벡터로부터 유래된다.
- [0044] 특정 실시 양태에서, 상기 pUC 벡터는 pUC19 벡터 또는 pUC19 벡터로부터 유래된다.
- [0045] 특정 실시 양태에서, 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함한다.
- [0046] 특정 실시 양태에서, 상기 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함한다.
- [0047] 특정 실시 양태에서, 상기 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함한다.
- [0048] 특정 실시 양태에서, 상기 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리는 10개 이상의 상이한 클론을 포함한다.
- [0049] 특정 실시 양태에서, 상기 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터는 10개 이상의 상이한 클론을 포함한다.
- [0050] 특정 실시 양태에서, 상기 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 제3 폴리뉴클레오티드 및/또는 제4 폴리뉴클레오티드는 샘플 물질로부터 획득된다.
- [0051] 특정 실시 양태에서, 상기 샘플 물질은 특이적 항원을 표적화하는 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0052] 특정 실시 양태에서, 상기 항체 또는 그 항원 결합 단편이 PD-1 및/또는 PD-L1을 표적화한다.
- [0053] 특정 실시 양태에서, 상기 방향적 결합은 리가아제를 이용하여 이루어진다.
- [0054] 특정 실시 양태에서, 상기 리가아제는 T4 DNA 리가아제를 포함한다.
- [0055] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터를 제공한다.
- [0056] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터를 이용하여 제조된 (established) 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리를 제공한다.
- [0057] 특정 실시 양태에서, 상기 라이브러리는 포유동물 세포 디스플레이 라이브러리이다.
- [0058] 특정 실시 양태에서, 상기 라이브러리는 적어도 10개의 상이한 이중특이적 항체 또는 그의 항체 단편을 디스플레이할 수 있다.
- [0059] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 라이브러리를 이용하는 단계를 포함하는, 항체 또는 그 단편 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0060] 당업자는 하기 상세한 설명을 통해 본 발명의 기타 측면 및 이점을 용이하게 통찰할 수 있다. 하기의 상세한 설명에는 본 발명의 예시적 실시 양태만 도시 및 설명된다. 본 발명의 내용은 본 발명과 관련된 발명의 사상 및 범위를 벗어나 당업자가 개시된 구체적 실시 양태를 변경할 수 없게 한다. 따라서, 본 발명의 도면 및 명세서의 설명은 예시적일 뿐 제한적인 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 본 발명과 관련된 구체적 특징은 청구 범위에 설명된 바와 같다. 하기의 상세한 예시적 실시 양태 및 도면을 통해 본 발명과 관련된 특징 및 이점을 보다 잘 이해할 수 있다. 도면에 대한 간략한 설명은 다음과 같다.
 - 도 1은 본 발명의 이중특이적 항원 결합 폴리펩티드 발현 벡터의 구조를 나타낸다;
 - 도 2는 본 발명의 구체적 예시로서 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드 발현 벡터의 구조를 나타낸다;
 - 도 3은 세포 표면에서 본 발명의 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 발현을 나타낸다;
 - 도 4A 내지 도 4J는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드가 용량 의존적 방식으로 항원에 결합함을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0062] 본 발명의 실시 양태는 특정한 구체적 실시예를 통해 하기에서 설명되며, 통상의 지식을 가진 자라면 본 명세서에 개시된 내용을 통해 본 발명의 기타 이점 및 효과를 쉽게 이해할 수 있다.

[0063] 용어 정의

- [0064] 본 발명에서, 용어 "저장 결합 생성물"은 일반적으로 분해(ligate)된 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터의 염기와 결합시켜 형성된 생성물을 지칭한다. 본 발명에서, 폴리뉴클레오티드는 리가제(예를 들어, DNA 리가제)에 의해 동일한 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 포함하는 성분 벡터와 결합되어 저장 결합 생성물을 얻을 수 있다.

- [0065] 본 출원에서, 용어 "성분 벡터"는 일반적으로 표적 핵산(예를 들어, 본 출원의 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 제3 폴리뉴클레오티드, 제4 폴리뉴클레오티드, 제5 폴리뉴클레오티드, 제6 폴리뉴클레오티드 및 제7 폴리뉴클레오티드)을 함유할 수 있고 표적 핵산을 세포 내로 도입하는데 사용될 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 용어 "벡터"는 플라스미드, 바이러스, 코스미드(cosmid) 및 인공 염색체(artificial chromosome)를 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다. 일반적으로 조작된 벡터는 복제 기점, 제한 부위 및 선택 가능한 마커를 포함할 수 있다. 벡터는 일반적으로 뉴클레오티드 서열, 일반적으로 DNA 서열이다. 경우에 따라, 본 발명의 성분 벡터는 플라스미드 벡터, 예를 들어 pUC 플라스미드 벡터로부터 유래될 수 있다. 다른 예를 들면, pUC 벡터는 pUC19 벡터이거나 pUC19 벡터로부터 유래될 수 있다.

- [0066] 본 출원에서, 용어 "도입(introduction)"은 일반적으로 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 삽입하는 과정을 말하며, 이는 "형질감염(transfection)", "형질전환(transformation)" 또는 "형질도입(transduction)"을 포함할 수 있다. 용어 "도입"은 진핵 세포 또는 원핵 세포에 도입하는 것을 포함할 수 있다. 즉, 뉴클레오티드는 세포에 들어갈 수 있고 자율 레플리콘(autonomous replicon)으로 전환될 수 있다. 세포는 숙주 세포일 수 있다. 도입된 세포는 대상체의 1차 세포 및 그 자손을 포함한다. 세포는 원핵 세포일 수 있으며, 예를 들어 박테리아 세포일 수 있다.

- [0067] 본 발명에서, 용어 "항체"는 일반적으로 특정 항원을 특이적으로 인식 및/또는 중화할 수 있는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 기본 4-사슬 항체 단위는 두 개의 동일한 경쇄와 두 개의 동일한 중쇄로 구성된 이중사량체 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 상기 중쇄 불변 영역은 일반적으로 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL을 포함한다. 상기 VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(framework regions)(FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보적 결정 영역(complementary determining regions)(CDR)이라고 하는 다중 초가변 영역(multiple hypervariable regions)으로 더 세분화될 수 있다. 상기 VH 및 VL은 각각 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다. 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다.

- [0068] 본 발명에서, 용어 "이중특이적 결합 폴리펩타이드"는 일반적으로 적어도 2개의 상이한 항원(예시로, 제1 표적과 제2 표적)에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 지칭하며, 이는 적어도 제1 표적을 인식하기 위한 제1 Fab 및 제2 표적을 인식하기 위한 제2 Fab를 포함한다.

- [0069] 본 출원에서, 용어 "Fab"는 일반적으로 하나의 중쇄의 가변 영역 도메인(VH) 및 하나의 중쇄의 제1 불

변 도메인(CH1)과 함께 온전한(intact) L 사슬(VL 및 CL을 포함할 수 있음)로 구성된 항원 결합 단편을 의미한다. 각 Fab는 단일 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 상기 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드는 제1 Fab 및 제2 Fab를 포함할 수 있다. 용어 "제1 Fab"는 일반적으로 제1 경쇄를 제1 중쇄 가변 영역에 결합함으로써 형성되는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제1 표적을 인식할 수 있는 Fab를 일반적으로 지칭한다. 용어 "제2 Fab"는 일반적으로 제2 경쇄를 제2 중쇄 가변 영역에 결합시켜 형성되는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제2 표적을 인식할 수 있는 Fab를 의미한다.

[0070] 본 발명에서, 용어 "LC"는 일반적으로 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 경쇄 또는 경쇄 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 본 발명에서, 상기 경쇄 또는 경쇄 단편은 동일하거나 유사한 항체의 중쇄에 결합하는 능력을 가질 수 있다. 본 출원에서, 경쇄 또는 경쇄 단편은 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함할 수 있다. 상기 경쇄 불변 영역은 카파형과 람다형으로 나눌 수 있다. 상기 경쇄는 또한 카파 불변 영역(C-κ)에 연결된 람다 가변 영역(V-λ) 또는 람다 불변 영역(C-λ)에 연결된 카파 가변 영역(V-κ)을 갖는 경쇄를 포함한다. 본 발명의 경쇄는 온전한 경쇄 및 그 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 여기서, 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드(즉, 제1 경쇄)에서 제1 표적의 제1 Fab를 인식하는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 LC1이라 할 수 있고, 제2 Fab를 인식하는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드(즉, 제2 경쇄)에서 두 번째 표적의 LC2는 LC2로 지칭될 수 있다.

[0071] 본 발명에서, 용어 "VH"는 일반적으로 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 본 출원에서, 중쇄 가변 영역은 동일하거나 유사한 항체의 경쇄 또는 그의 항원 결합 단편에 결합하는 능력을 가질 수 있다. 상기 중쇄 가변 영역은 중쇄(H) CDR1, 프레임(FR) 2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함하는 영역일 수 있다. 본 출원의 중쇄 가변 영역은 온전한 중쇄 가변 영역 및 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 여기서, 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드(즉, 제1 중쇄 가변영역)에서 제1 표적의 제1 Fab를 인식하는 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 VH1으로 지칭될 수 있고, 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드(즉, 제2 중쇄 가변 영역)에서 제2 표적의 제2 Fab를 인식하는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 VH2로 지칭될 수 있다.

[0072] 본 출원에서, 용어 "방향성 결합(ligation)"은 일반적으로 한 방향 또는 하나의 서열에서 상이한 폴리뉴클레오타이드의 순차적인 결합을 지칭한다. 용어 "결찰"은 동일한 의미에서 용어 "결합"과 상호호환적으로 사용될 수 있다. 본 출원에서 폴리뉴클레오타이드의 방향적 결합은 한 절단 부위를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 절단하여 인식하지 못하는 점착성 말단을 형성하거나 다른 절단 부위를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제와 서로 결합함으로써 보장(ensure)될 수 있다. 상기 방향성 결합은 리가아제, 예를 들어 DNA 리가아제를 사용하는 것을 포함할 수 있다.

[0073] 본 발명에서, 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 일반적으로 함께 연결된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 지칭한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 10, 100, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10,000, 100,000를 포함하는 임의 길이의 중합체일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 결합을 포함할 수 있다. 본 발명의 용어, "폴리뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 중 어느 하나 또는 두 뉴클레오타이드의 변형된 형태를 의미할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 선형일 수 있다.

[0074] 본 출원에서, 용어 "고리화"는 일반적으로 다수의 폴리뉴클레오타이드를 말단에서 말단으로 연결하여 원형의 형태를 형성하는 과정을 지칭한다. 예를 들어, 본 발명에서 절단된 제1 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제2 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제3 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제4 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제5 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제6 폴리뉴클레오타이드 및 절단된 제7 폴리뉴클레오타이드는 고리화되어 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 형성할 수 있다.

[0075] 본 발명에서 용어 "클론"은 일반적으로 콜로니의 수를 의미한다. 예를 들어, 상기 클론은 박테리아 라이브러리(예시로, LC1 경쇄 구성요소 박테리아 라이브러리, LC2 경쇄 구성요소 박테리아 라이브러리, VH1 중쇄 구성요소 박테리아 라이브러리 및/또는 VH2 중쇄 구성요소 박테리아 라이브러리) 또는 발현 벡터의 콜로니 수일 수 있다. 어떤 경우에는 상기 클론은 박테리아 라이브러리에 있는 다른 콜로니의 수일 수 있다. 일부 경우에, 상기 클론은 단일 클론에 의해 생성된 자손 집단의 수일 수 있다.

[0076] 본 출원에서, 용어 "절단된 폴리뉴클레오타이드"는 일반적으로 제한 엔도뉴클레아제로 처리된 후 생성된 점착성 말단(sticky ends)을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0077] 본 발명에서, 용어 "제한 엔도뉴클레아제"는 일반적으로 이중 가닥 DNA를 절단하는 효소를 지칭한다.

상기 제한 엔도뉴클레아제는 DNA 리가아제에 결합할 수 있는 돌출된 단일 가닥 DNA로 점착성 말단을 생성할 수 있다. 본 출원에서, 상기 제한 엔도뉴클레아제는 인식 및 제한 절단의 효과를 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 제한 엔도뉴클레아제의 절단 부위는 인식 부위로부터 일정한 거리에 있다. 예를 들어, 상기 제한 엔도뉴클레아제는 SfiI 및 BsmBI로부터 선택될 수 있다.

[0078] 본 발명에서, 용어 "특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제..."라는 용어는 일반적으로 특정 인식 부위의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드만 인식할 수 있고, 자신의 인식부위의 염기서열과 다른 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 인식하지 못하는 제한 엔도뉴클레아제를 의미한다.

[0079] 본 발명에서, 용어 "특이적으로 절단한다"는 용어는 일반적으로 특정 인식 부위의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드만이 절단될 수 있고, 인식부위와 다른 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 절단될 수 없음을 의미한다.

[0080] 본 출원에서, 용어 "상응하는 제한 엔도뉴클레아제"는 일반적으로 동일한 핵산 서열을 인식하고 절단할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제를 지칭한다. 상기 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 인식 및 절단 후에 생성된 말단은 일반적으로 서로를 인식하거나 결합할 수 있다.

[0081] 본 발명에서, 용어 "디스플레이"는 일반적으로 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 포함하는 세포에서, 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 발현을 가능하게 하는 것을 지칭한다.

[0082] 본 발명에서, 용어 "성분 플라스미드"는 일반적으로 박테리아 라이브러리 내의 박테리아로부터 수득되고 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 제3 폴리뉴클레오티드, 제4 폴리뉴클레오티드, 제5 폴리뉴클레오티드, 제6 폴리뉴클레오티드, 및/또는 제7 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 플라스미드를 지칭한다. 상기 성분 플라스미드는 또한 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 포함할 수 있다.

[0083] 본 발명에서, 용어 "포함하다(comprise)"는 일반적으로 명시적으로 지정된 특징을 포함하지만 다른 요소를 배제하지 않는 것을 의미한다.

[0084] 본 발명에서, 용어 "약"은 일반적으로 명시된 값 이상 또는 이하의 0.5%-10% 범위 내에서 변화하는 것을 의미하며, 예를 들어, 지정된 값을 기준으로 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5% 또는 10%를 초과 또는 미만하는 값을 가짐을 의미한다.

[0085] **상세한 설명**

[0086] 일 관점에서, 본 발명은 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 구축하는 방법을 제공한다.

[0087] 폴리뉴클레오티드의 획득

[0088] 상기 방법은 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 제3 폴리뉴클레오티드, 제4 폴리뉴클레오티드, 제5 폴리뉴클레오티드, 제6 폴리뉴클레오티드, 및/또는 제7 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계를 포함할 수 있다.

[0089] 1) 제한 부위

[0090] 상기 폴리뉴클레오티드는 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 상기 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위의 서열은 항원 결합 폴리펩타이드 또는 그의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 포함되지 않도록 설계된다. 본 발명의 제한 엔도뉴클레아제는 각각 S5, S6, B4, B3, B2, B5 및 B6을 특이적으로 인식할 수 있다. 여기서, B2, B3, B4, B5, B6, S5 및 S6은 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있다.

[0091] 본 발명에서 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위는 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 그 이상의 제한 엔도뉴클레아제에 의해 특이적으로 인식될 수 있다. 일부 경우에, 상기 제한 엔도뉴클레아제는 SfiI 및 BsmBI에서 선택될 수 있다. 다른 경우에, 다른 실행 가능한 제한 엔도뉴클레아제도 선택될 수 있다.

[0092] 일부 경우에, 상기 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위는 SfiI에 의해 특이적으로 인식되고 절단되는 부위일 수 있다. 예를 들어, 상기 인식 부위는 각각 S5 및 S6이라고 할 수 있다. 예를 들어, 상기 S5는 서열 번호 6에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예를 들면, 상기 S6은 서열번호 7에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0093] 상기 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위는 BsmBI에 의해 특이적으로 인식되고 절단되는 부위일 수

있다. 예를 들어, 상기 인식부위는 각각 B2, B3, B4, B5 및 B6이라고 할 수 있다. 예를 들어, B2는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 다른 예를 들어, B3은 서열번호 2에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예를 들어, B4는 서열번호 3에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0094] 또 다른 예를 들어, B5는 서열번호 4에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예를 들면, B6은 서열번호 5에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0095] 본 발명에서 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위는 상기에 열거된 인식 부위를 포함하지만 이에 제한되지 않음을 분명히 한다. 목록에 없는 다른 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위와 제한 엔도뉴클레아제에 대한 다른 인식 부위를 포함할 수 있다. 단, 표적 서열(예를 들어, 항원 결합 폴리펩타이드 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)의 원치 않는 인식 또는 절단을 일으키지 않아야 한다.

[0096] 2) 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드

[0097] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드, 제3 폴리뉴클레오타이드, 제4 폴리뉴클레오타이드, 제5 폴리뉴클레오타이드, 제6 폴리뉴클레오타이드 및 제7 폴리뉴클레오타이드)는 또한 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 또는 그 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 LC1, VH1, LC2, VH2를 포함할 수 있다.

[0098] 본 발명에서, 상기 LC1은 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 제1 경쇄를 암호화할 수 있고, 상기 VH1은 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 제1 중쇄 가변 영역을 암호화할 수 있고, 상기 제1 경쇄는 상기 제1 중쇄 가변 영역에 결합하여 제1 표적을 인식하기 위한 제1 Fab를 형성할 수 있다. 본 발명에서, 상기 LC2은 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 제2 경쇄를 암호화할 수 있고, 상기 VH2은 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 제2 중쇄 가변 영역을 암호화할 수 있고, 상기 제2 경쇄는 상기 제2 중쇄 가변 영역에 결합하여 제2 표적을 인식하기 위한 제2 Fab를 형성할 수 있다. 일부 경우에, 상기 제1 표적 및 제2 표적은 항원일 수 있다.

[0099] 본 발명에서, 상기 제1 Fab는 제2 Fab에 결합하여 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드를 형성할 수 있다.

[0100] 본 출원의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드, 제3 폴리뉴클레오타이드, 제4 폴리뉴클레오타이드, 제5 폴리뉴클레오타이드, 제6 폴리뉴클레오타이드 및 제7 폴리뉴클레오타이드)는 발현 벡터 단편, 예컨대 발현 벡터 단편 I, 발현 벡터 단편 II 및 발현 벡터 단편 III을 포함할 수 있다. 상기 발현 벡터 단편 I, 발현 벡터 단편 II 및 발현 벡터 단편 III의 원하는 길이 또는 유형은 발현될 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드 또는 그 단편의 길이 또는 성질, 및 제한 부위의 길이 또는 성질에 따라 각각 선택될 수 있다.

[0101] 경우에 따라, 상기 발현 벡터 단편 I, 발현 벡터 단편 II 및 발현 벡터 단편 III은 표적 유전자를 발현할 수 있는 어느 하나의 벡터의 벡터 단편으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 상기 발현 벡터 단편 I, 발현 벡터 단편 II 및 발현 벡터 단편 III은 디스플레이 벡터 pDGB4의 단편으로부터 유래될 수 있다(pDGB4와 관련하여, Ivan Zhou, et al., "Four-way ligation for construction of a mammalian cell-based full-length antibody display library", Acta Biochim Biophys Sin 2011, 43: 232-238).

[0102] 본 출원의 발현 벡터 단편(예: 발현 벡터 단편 I, 발현 벡터 단편 II 및 발현 벡터 단편 III)은 원하는 기능에 따라 당업자에 의해 발현 벡터 단편에서 조정될 수 있는 프로모터, 인핸서, 신호 펩티드 및 스크리닝 마커(예를 들어, 효소 인식 부위, 저항성 유전자, 리포터 유전자, 스크리닝 유전자 등이 포함)를 포함하나 이에 제한되지 않는 특정 기능(특정 기능을 가진 상기 염기서열의 삽입/치환 및/또는 삭제)을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 발현 벡터 단편은 상이한 뉴클레오타이드 서열을 얻기 위해 다양한 경우에 따라 조정될 수 있다.

[0103] 본 발명에서, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 S5-LC1-S6을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 S5 및 S6은 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있고, 상기 LC1은 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제1 경쇄를 암호화할 수 있다. 경우에 따라 상기 S5 및 S6은 각각 SfiI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 S5는 서열번호 6에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 S6은 서열번호 7에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0104] 상기 제2 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로 B4-VH1-B3을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 B4 및 B3은 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있고, 상기 VH1은 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제1 중쇄 가변 영역을 암호화할 수 있다. 경우에 따라 상기 B4 및 B3은 각각 BsmBI에 의해 특이적으로

로 인식되고 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 B4는 서열번호 3에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 B3은 서열번호 2에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0105] 상기 제3 폴리뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 B2-LC2-B4를 포함할 수 있고, 여기서, 상기 B2 및 B4는 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있고, 상기 LC2는 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 제2 경쇄를 암호화할 수 있다. 경우에 따라 상기 B2와 B4가 각각 BsmBI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 B2는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 B4는 서열번호 3에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0106] 상기 제4 폴리뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 B5-VH2-B6을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 B5 및 B6은 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있고, VH2는 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 제2 중쇄 가변 영역을 암호화할 수 있다. 경우에 따라 상기 B5 및 B6이 각각 BsmBI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 B5는 서열번호 4에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 B6은 서열번호 7에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0107] 상기 제5 폴리뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 S6-발현 벡터 단편 I-B2를 포함할 수 있고, 여기서, 상기 S6 및 B2는 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있다. 경우에 따라 상기 S6이 SfiI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있고, 상기 B3은 BsmBI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 S6은 서열번호 7에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 B2는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0108] 상기 제6 폴리뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 B3-발현 벡터 단편 II-B5를 포함할 수 있고, 여기서, 상기 B3 및 B5는 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있다. 경우에 따라, 상기 B3와 B5가 각각 BsmBI에 의해 특이적으로 인식되고 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 B3은 서열번호 2에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 B5는 서열번호 4에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0109] 상기 제7 폴리뉴클레오티드는 5'에서 3' 방향으로 B6-발현 벡터 단편 III-S5를 포함할 수 있고, 여기서, 상기 B6 및 S5는 각각 독립적으로 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위일 수 있다. 경우에 따라, 상기 B6은 BsmBI에 의해 특이적으로 인식 및 절단될 수 있으며, 상기 S5는 SfiI에 의해 특이적으로 인식 및 절단될 수 있다. 예를 들어, 상기 B6은 서열번호 5에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있고, 상기 S5는 서열번호 6에 기재된 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0110] 본 발명의 상기 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 제3 폴리뉴클레오티드 및/또는 제4 폴리뉴클레오티드는 샘플 물질로부터 수득될 수 있다. 일부 경우에, 상기 샘플 물질은 특정 항원을 표적으로 하는 항체 또는 그 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 상기 항원은 PD-1, PD-L1, LAG-3, CD47, CD3을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 면역원성 단편 또는 결정인자일 수 있다. 예를 들어, 상기 항체 또는 그 항원 결합 단편은 PD-1 및/또는 PD-L1을 표적으로 한다.

[0111] 본 발명의 방법은 상기 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 제3 폴리뉴클레오티드, 제4 폴리뉴클레오티드, 제5 폴리뉴클레오티드, 제6 폴리뉴클레오티드 및 제7 폴리뉴클레오티드)를 박테리아에 도입하는 단계를 포함할 수 있다.

[0112] 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 양성 박테리아를 스크리닝하기 위해, 폴리뉴클레오티드는 또한 신호 펩티드, 예를 들어 자연 내성 유전자를 발현하는 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 한 예에서, 상기 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 3'-말단은 폴리뉴클레오티드의 5'-말단에 있는 제한 부위에 결합할 수 있다. 경우에 따라, 상기 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 3' 말단 부분에 적절한 제한 부위를 도입하기 위해 의도치 않은 돌연변이(unintentional mutation)를 이용하여 염기서열이 변경될 수 있지만 상기 신호 펩티드의 아미노산 서열은 그대로 유지된다. 예를 들어, 상기 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 8, 서열번호 10 및 서열번호 12 중 어느 하나에 기재된 핵산 서열을 포함하거나; 대안적으로, 상기 신호 펩티드는 서열번호 9, 서열번호 11 및 서열번호 13 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0113] 상기 폴리뉴클레오티드는 long PCR, hot start PCR, qPCR, RT-PCR 및 등은 증폭(isothermal amplification)을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는 당업계의 통상적인 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 경우에, 프라이머는 각각 표적 단편(예를 들어, LC1, VH1, LC2, VH2, 발현 벡터 단편 I, 발현 벡터 단편 II 및 발현 벡터 단편 III)의 서열에 따라 설계될 수 있으며, 이어서 이를 증폭용 주형으로 사용하여 폴리뉴클레오티드를 수득할 수 있다. 예를 들어, 상기 LC1 증폭용 프라이머는 서열번호 20 및 서열번호 21 중 어느 하나에

기재된 염기서열을 포함할 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 LC2 증폭용 프라이머는 서열번호 22 및 서열번호 23 중 어느 하나에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 VH1 증폭용 프라이머는 서열번호 24 및 서열번호 25 중 어느 하나에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 VH2 증폭용 프라이머는 서열번호 26 및 서열번호 27 중 어느 하나에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 발현 벡터 단편 I 증폭용 프라이머는 서열번호 14 및 서열번호 15 중 어느 하나에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 발현 벡터 단편 II 증폭용 프라이머는 서열번호 16 및 서열번호 17 중 어느 하나에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 발현 벡터 단편 III을 증폭하기 위한 프라이머는 서열번호 18 및 서열번호 19 중 어느 하나에 기재된 염기서열을 포함할 수 있다.

- [0114] 박테리아 라이브러리 구축
- [0115] 폴리뉴클레오티드를 얻은 후 박테리아에 별도로 도입하여 박테리아 라이브러리를 얻을 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 하기 단계를 추가로 포함할 수 있다:
- [0116] 제1 폴리뉴클레오티드를 제1 박테리아에 도입하여 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계;
- [0117] 제2 폴리뉴클레오티드를 제2 박테리아에 도입하여 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계;
- [0118] 제3 폴리뉴클레오티드를 제3 박테리아에 도입하여 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계;
- [0119] 제4 폴리뉴클레오티드를 제4 박테리아에 도입하여 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계;
- [0120] 제5 폴리뉴클레오티드를 제5 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계;
- [0121] 제6 폴리뉴클레오티드를 제6 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계; 및
- [0122] 제7 폴리뉴클레오티드를 제7 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계.
- [0123] 일부 경우에, 상기 폴리뉴클레오티드는 저장 결찰(ligation) 생성물을 형성하기 위해 성분 벡터에 삽입될 수 있다. 일부 경우에, 상기 폴리뉴클레오티드는 PCR 클로닝을 사용하여 성분 벡터에 삽입될 수 있다. 상기 성분 벡터는 플라스미드 벡터(예시로, pBR322, pUC 벡터), 파지 벡터(예시로, M13 벡터, λ 벡터), 파지 유래 플라스미드(예시로, 파지미드, 코스미드), 및 박테리아 인공 염색체(BAC)를 포함할 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 성분 벡터는 pUC 벡터로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 상기 성분 벡터는 pUC19 벡터이거나 pUC19 벡터로부터 유래될 수 있다.
- [0124] 그런 다음, 상기 저장 결찰(ligation) 생성물을 박테리아에 도입하여 박테리아 라이브러리를 얻을 수 있다.
- [0125] 본 발명에서, 상기 방법은 상기 제1 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 LC1 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 LC1 저장 결찰 생성물을 제1 박테리아에 도입하여 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.
- [0126] 상기 방법은 상기 제3 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 LC2 저장 결찰 생성물을 형성하는 단계, 및 상기 LC2 저장 결찰 생성물을 제3 박테리아에 도입하여 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리를 획득하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에 상기 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.

- [0127] 상기 방법은 상기 제2 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 VH1 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 VH1 저장 결찰 생성물을 제2 박테리아에 도입하여 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.
- [0128] 상기 방법은 상기 제4 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 VH2 저장 결찰 생성물을 형성 하고, 상기 VH2 저장 결찰 생성물을 제4 박테리아에 도입하여 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.
- [0129] 상기 방법은 상기 제5 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 I 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제5 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.
- [0130] 상기 방법은 상기 제6 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 II 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제6 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.
- [0131] 상기 방법은 제7 폴리뉴클레오티드를 성분 벡터에 삽입하여 발현 벡터 단편 III 저장 결찰 생성물을 형성하고, 상기 저장 결찰 생성물을 제7 박테리아에 도입하여 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.
- [0132] 본 발명에서, 상기 방법은 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리, LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리, VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리, VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리, 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리, 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리 및 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리를 동결보존하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0133] 본 발명에서, 상기 방법은 박테리아 라이브러리를 획득한 후 박테리아 라이브러리로부터 폴리뉴클레오티드를 포함하는 성분 플라스미드를 획득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0134] 일부 경우에, 상기 방법은 상기 LC1 경쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 경쇄 성분 플라스미드를 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 제1 경쇄 성분 플라스미드는 또한 S5 및 S6을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 방법은 LC2 경쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제3 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 경쇄 성분 플라스미드를 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 제2 경쇄 성분 플라스미드는 또한 B2 및 B4를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 방법은 상기 VH1 중쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 경쇄 성분 플라스미드를 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 제1 중쇄 성분 플라스미드는 또한 B4 및 B3을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 방법은 상기 VH2 중쇄 성분 박테리아 라이브러리로부터 제4 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 중쇄 성분 플라스미드를 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 제2 중쇄 성분 플라스미드는 또한 B5 및 B6을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 I 박테리아 라이브러리로부터 제5 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I을 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I은 또한 S6 및 B2를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 II 박테리아 라이브러리로부터

터 제6 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II를 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II는 또한 B3 및 B5를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 방법은 상기 발현 벡터 성분 III 박테리아 라이브러리로부터 제7 폴리뉴클레오티드를 포함하는 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III를 획득하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III는 또한 B6 및 S5를 포함할 수 있다.

[0135] 절단된 폴리뉴클레오티드의 획득

[0136] 본 발명의 상기 방법은 h) 상기 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드, 제3 폴리뉴클레오타이드, 제4 폴리뉴클레오타이드, 제5 폴리뉴클레오타이드, 제6 폴리뉴클레오타이드 및 제7 폴리뉴클레오타이드를 제한 엔도뉴클레아제로 특이적으로 절단하여 절단된 제1 폴리뉴클레오타이드, 절단된 제2 폴리뉴클레오티드, 절단된 제3 폴리뉴클레오티드, 절단된 제4 폴리뉴클레오티드, 절단된 제5 폴리뉴클레오티드, 절단된 제6 폴리뉴클레오티드 및 절단된 제7 폴리뉴클레오타이드를 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0137] 일부 경우에, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 성분 플라스미드를 얻은 후, 상기 방법은 상기 성분 플라스미드로부터 절단된 폴리뉴클레오타이드를 획득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우에, 상기 플라스미드는 절단된 폴리뉴클레오티드를 얻기 위해 제한 엔도뉴클레아제로 소화될 수 있다. 상기 방법은 제1 경쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제1 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계; 제2 경쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제2 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계; 제1 중쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제3 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계; 제2 중쇄 성분 플라스미드로부터 절단된 제4 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계; 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I로부터 절단된 제5 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계; 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II로부터 절단된 제6 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계; 및 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III로부터 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 획득하는 단계를 포함한다.

[0138] 일부 경우에, 상기 제1 경쇄 성분 플라스미드는 상기 S5 및 S6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 분해되어 절단된 제1 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다.

[0139] 일부 경우에, 상기 제1 중쇄 성분 플라스미드는 상기 B4 및 B3을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 분해되어 절단된 제2 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다.

[0140] 일부 경우에, 상기 제2 경쇄 성분 플라스미드는 상기 B2 및 B4를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 분해되어 절단된 제3 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다.

[0141] 일부 경우에, 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 I은 상기 S6 및 B2를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 분해되어 절단된 제5 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다.

[0142] 일부 경우에, 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 II는 상기 B3 및 B5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 분해되어 절단된 제6 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다.

[0143] 일부 경우에, 상기 디스플레이 단편 성분 플라스미드 III는 상기 B6 및 S5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 분해되어 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 얻을 수 있다.

[0144] 제한 엔도뉴클레아제로 분해된 후, 상기 성분 플라스미드의 3'-말단 및/또는 5'-말단에서 점착성 말단이 생성될 수 있다.

[0145] 어떤 경우에, 상기 B2를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B2의 특이적 절단으로부터 생성된 말단은 B3, B4, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단으로부터 생성된 말단과 서로 인식하지 않거나 서로 연결되지 않는다. 대신에, B2를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단은 B2를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단과만 인식하거나 서로 연결될 수 있다.

[0146] 어떤 경우에, 상기 B3를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B3의 특이적 절단으로부터 생성된 말단은 B2, B4, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단으로부터 생성된 말단과 서로 인식하지 않거나 서로 연결되지 않는다. 대신에, B3를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단은 B3를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단과만 인식하거나 서로 연결될 수 있다.

[0147] 어떤 경우에, 상기 B4를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B4의 특이적 절단으로부터

생성된 말단은 B2, B3, B5, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단으로부터 생성된 말단과 서로 인식하지 않거나 서로 연결되지 않는다. 대신에, B4를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단은 B4를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단과만 인식하거나 서로 연결될 수 있다.

[0148] 어떤 경우에, 상기 B5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 B5의 특이적 절단으로부터 생성된 말단은 B2, B4, B3, B6, S5 및 S6 중 어느 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단으로부터 생성된 말단과 서로 인식하지 않거나 서로 연결되지 않는다. 대신에, B5를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단은 B5를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단과만 인식하거나 서로 연결될 수 있다.

[0149] 어떤 경우에, 상기 S5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 S5의 특이적 절단으로부터 생성된 말단은 B2, B4, B5, B6, B3 및 S6 중 어느 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단으로부터 생성된 말단과 서로 인식하지 않거나 서로 연결되지 않는다. 대신에, S5를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단은 S5를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단과만 인식하거나 서로 연결될 수 있다.

[0150] 어떤 경우에, 상기 S6를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 S6의 특이적 절단으로부터 생성된 말단은 B2, B4, B5, B6, B3 및 S5 중 어느 하나의 상응하는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단으로부터 생성된 말단과 서로 인식하지 않거나 서로 연결되지 않는다. 대신에, S6를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단은 S6를 특이적으로 인식할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단 후에 생성된 말단과만 인식하거나 서로 연결될 수 있다.

[0151] 결찰(ligation)에 의한 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드 발현 벡터의 획득

[0152] 본 발명에서, 상기 방법은 i) 절단된 제1 폴리뉴클레오티드, 절단된 제2 폴리뉴클레오티드, 절단된 제3 폴리뉴클레오티드, 절단된 제4 폴리뉴클레오티드, 절단된 제5 폴리뉴클레오티드, 절단된 제6 폴리뉴클레오티드 및 절단된 제7 폴리뉴클레오티드를 혼합하여 이들이 방향적으로 결합되고 고리화되어 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터를 형성할 수 있도록 하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 절단된 폴리뉴클레오티드는 동일한 비율로 혼합될 수 있고, 세포(예를 들어, 포유동물 세포) 내로 도입될 수 있다. 이어서, 콜로니는 원하는 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 서열을 함유하는 발현 벡터를 결정하기 위한 서열분석 (sequencing)을 위해 분류된다.

[0153] 예를 들어, 도 1에 나타낸 것처럼 상기 발현 벡터의 구조는 7개의 절단된 폴리뉴클레오티드가 방향적으로 결합되고 고리화되어 형성된다. 상기 S6를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 제1 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 S6를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 후 제5 폴리뉴클레오티드의 5'말단과 서로 인식되거나 연결될 수 있다. 상기 B2를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 제5 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 B2를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 후 제3 폴리뉴클레오티드의 말단과 서로 인식되거나 연결될 수 있다. 상기 B4를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 제3 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 B4를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 후 제2 폴리뉴클레오티드의 5'말단과 서로 인식되거나 연결될 수 있다. 상기 B3을 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 제2 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 B3을 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 후 제6 폴리뉴클레오티드의 5'말단과 서로 인식되거나 연결될 수 있다. 상기 B5를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 제6 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 B5를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 후 제4 폴리뉴클레오티드의 5'말단과 서로 인식되거나 연결될 수 있다. 상기 B6을 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 제4 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 B6을 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 후 제7 폴리뉴클레오티드의 5'말단과 서로 인식되거나 연결될 수 있다. 상기 S5를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 제7 폴리뉴클레오티드의 3'-말단은 S5를 특이적으로 인식하는 제한효소에 의해 특이적으로 절단된 후 제1 폴리뉴클레오티드의 5'말단과 서로 인식되거나 연결될 수 있다.

[0154] 어떤 경우에, 상기 방향적 결합에 리가아제를 사용하는 것이 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 리가아제는 T4 DNA 리가아제를 포함할 수 있다.

[0155] 상기 이중특이적 항원-결합 폴리펩타이드 발현 벡터는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11,

적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.

[0156] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법에 따라 생산된 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터를 제공한다. 상기 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 클론을 포함할 수 있다.

[0157] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 발현 벡터를 이용하여 제조된 (established) 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 포유동물 세포 디스플레이 라이브러리일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 이중특이적 항체 또는 그의 항체 단편을 디스플레이할 수 있다.

[0158] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 라이브러리를 사용하는 것을 포함할 수 있는 항체 또는 그 항체 단편의 스크리닝 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 디스플레이 라이브러리는 포유동물 세포 디스플레이 라이브러리일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 라이브러리는 적어도 10개(예를 들어, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 또는 그 이상)의 상이한 이중특이적 항체 또는 그의 항체 단편을 디스플레이할 수 있다. 일부 경우에, 상기 항체 또는 그 항체 단편은 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 라이브러리로부터 포유동물 세포를 선택하고, 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드를 안정적으로 발현하는 세포주를 확립한 다음, 스크리닝하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 표면 상의 이중특이적 항원-결합 폴리펩티드의 발현 및 적어도 2개의 항원에 대한 그 특이적 친화성은 FACS를 사용하여 분석될 수 있다.

[0159] 어떠한 이론에도 제한되지 않고, 하기의 실시예는 본 발명의 용합 단백질 및 이의 제조 방법 및 용도를 예시하기 위한 것일 뿐, 본 출원의 발명 범위를 제한하기 위해 사용되지 않는다.

[0160] **실시예**

[0161] **실시예 1 이중특이적 항원 결합 폴리펩티드 발현 벡터의 구축**

[0162] 1.1 샘플 재료의 획득

[0163] 도 2에 도시된 바와 같은 이중특이적 항원 결합 폴리펩티드 발현 벡터를 구축하기 위해, PD-1-표적화 항체 펌브롤리주맵(Pembrolizumab), PD-L1-표적화 항체 아테졸리주맵(Atezolizumab) 및 pDGB4 벡터를 실시예로 선택하였다. 펌브롤리주맵 경쇄의 염기서열은 서열번호 28, 펌브롤리주맵 중쇄 가변영역의 염기서열은 서열번호 29, 아테졸리주맵 경쇄의 염기서열은 서열번호 30, 아테졸리주맵 중쇄 가변영역의 염기서열은 서열번호 31 그리고 pDGB4 벡터의 염기서열은 서열번호 32로 각각 표시된다.

[0164] 1.2 제한 부위의 설계

[0165] 제한효소 BsmBI 및 SfiI에 따라 5개의 BsmBI 인식 부위(B2, B3, B4, B5 및 B6)의 서열과 2개의 SfiI 인식 부위(S5 및 S6)의 서열을 설계하였으며, 그 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

제한 부위	핵산 서열
B2	서열번호 1
B3	서열번호 2
B4	서열번호 3
B5	서열번호 4
B6	서열번호 5
S5	서열번호 6
S6	서열번호 7

[0167] 1.3 신호 펩티드의 선택

[0168] 천연 항체 유전자를 발현하는 3개의 신호 펩티드를 선택했다. 여기서 sp1은 LC2의 5'-말단에, sp2는 VH2의 5'-말단에, sp3는 LC1의 5'-말단에 위치한다. 상기 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 3'-말단 부분에 적절한 제한 부위를 도입하기 위해, 3개의 코딩된 신호 펩티드의 염기서열은 의도치 않은 돌연변이에 의해 변경되었지만 상기 신호 펩티드의 아미노산 서열은 변함없이 유지되었다. 그 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

신호 펩티드	서열
sp1 핵산 서열	서열번호 8
sp1 아미노산 서열	서열번호 9
sp2 핵산 서열	서열번호 10
sp2 아미노산 서열	서열번호 11
sp3 핵산 서열	서열번호 12
sp3 아미노산 서열	서열번호 13

[0170] 1.4 폴리뉴클레오티드의 획득

[0171] 프라이머는 각각 PD-1을 인코딩하는 경쇄(LC1) 및 중쇄 가변 영역 서열(VH1), PD-L1의 경쇄(LC2) 및 중쇄 가변 영역(VH2), 및 3-구획(three-segment) 벡터 pDGB4(세 개의 구획은 각각 발현 벡터 단편 I, 발현 벡터 단편 II 및 발현 벡터 단편 III임)의 핵산 서열에 대해 설계되었으며, 프라이머의 5'-말단에는 제한 부위가 포함되어 있다. 또한, 상기 LC1, LC2-VH1 및 LC2에 대한 발현 프레임워크(expression frameworks)는 각각 발현을 위한 CMV 프로모터에 의해 구동되었다. 상기 프라이머는 하기 표 3에 나타난 서열로 합성하였다.

표 3

폴리뉴클레오티드	주형(Template)	정방향 프라이머	역방향 프라이머
LC1	PD1-LC(서열번호 28)	P7(서열번호 20)	P8(서열번호 21)
VH1	PD1-VH(서열번호 29)	P11(서열번호 24)	P12(서열번호 25)
LC2	PDL1-LC(서열번호 30)	P9(서열번호 22)	P10(서열번호 23)
VH2	PDL1-VH(서열번호 31)	P13(서열번호 26)	P14(서열번호 26)
발현 벡터 단편 I	pDGB4(서열번호 32)	P1(서열번호 14)	P2(서열번호 15)
발현 벡터 단편 II	pDGB4(서열번호 32)	P3(서열번호 16)	P4(서열번호 17)
발현 벡터 단편 III	pDGB4(서열번호 32)	P5(서열번호 18)	P6(서열번호 19)

[0173] 7개의 폴리뉴클레오티드를 PCR(LA Taq, Takara Co., 회사의 제품 설명서에 따라 수행)로 증폭하였고, 사용된 템플릿 및 프라이머 서열은 상기 표 3에 나타내었다. PCR 생성물은 정제 및 겔 전기영동("Molecular Cloning: A Laboratory Manual"의 지침에 따라 작동됨)에 의한 회수 후에 각각 얻었다. TA 클로닝 방법(TA cloning kit, Takara Co.에서 구입)을 이용하여 PCR 산물을 pUC19 플라스미드 벡터에 삽입하여 저장 결찰 생성물을 얻었다. DH5a 컴피턴트 박테리아(Takara Co.)를 저장 벡터 생성물로 형질전환시키고 플레이트 상에서 37°C에서 밤새 배양하였다. 콜로니를 서열분석을 위해 보낸 후 원하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 박테리아를 얻었다. 즉, LC1을 함유하는 제1 폴리뉴클레오티드, VH1을 함유하는 제2 폴리뉴클레오티드, LC2를 함유하는 제3 폴리뉴클레오티드, VH2를 함유하는 제4 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 단편 I을 함유하는 제5 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 단편 II를 함유하는 제6 폴리뉴클레오티드 및 발현 벡터 단편 III을 함유하는 제7 폴리뉴클레오티드를 포함하는 박테리아를 얻었다. 상기 박테리아는 나중에 사용하기 위해 박테리아 라이브러리로 냉동보존될 수 있다.

[0174] 1.5 분해(Digestion)

[0175] 상기 실시예 1.4의 박테리아 라이브러리에서 박테리아의 플라스미드를 각각 플라스미드 추출 키트(Axygen에서 구입)를 이용하여 추출하였다. 그런 다음 상기 플라스미드 벡터는 제한 엔도뉴클레아제 BsmBI 및 SfiI로 절단되고, 제1 폴리뉴클레오티드는 S5 및 S6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단되며, 제2 폴리뉴클레오티드는 B4 및 B3을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단되고, 제3 폴리뉴클레오티드

드는 B2 및 B4를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단되며, 제4 폴리뉴클레오티드는 B5 및 B6을 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단되고, 제5 폴리뉴클레오티드는 S6 및 B2를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단되며, 제6 폴리뉴클레오티드는 B3 및 B5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단되고, 제7 폴리뉴클레오티드는 B6 및 S5를 특이적으로 인식하는 제한 엔도뉴클레아제로 절단되었다. 그 후 전기영동으로 분리 및 정제하여 7개의 절단된 폴리뉴클레오티드를 얻었다.

[0176] 1.6 발현 벡터의 획득

[0177] 상기 실시예 1.5에서 얻은 7개의 절단된 폴리뉴클레오티드를 동일한 분자 비율로 혼합하고, 여기에 리가아제를 첨가하여 방향적으로 결합하고 고리화하여 발현 벡터를 형성하였다. 상기 발현 벡터를 DH5a 컴피턴트(competent) 박테리아(Takara, 제조사 지시에 따라 작동)에 옮기고, 항생제가 없는 2YT 배지에서 37°C, 250rpm으로 60분간 진탕 배양한 후, 암피실린 내성 플레이트(ampicillin-resistant plate)(Thermo, Cat# 240845)에 옮겨 37°C에서 밤새 성장시켰다. 콜로니를 시퀀싱을 위해 분류하고 정확한 서열을 포함하는 발현 벡터를 얻었다. 상기 발현 벡터를 FCHO 세포로 옮겨 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드를 안정적으로 발현하는 세포주를 확립(establish)함으로써 세포 디스플레이 라이브러리를 얻었다.

[0178] 실시예 2 세포 표면 상의 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 발현

[0179] 상기 실시예 1.6의 세포 라이브러리로부터의 세포를 부착 배양하였다. 특정 농도에 도달한 후, 분산된 세포를 0.5mM EDTA-PBS로 분해하고, 원심분리에 의해 상기 세포를 수집하였다. 상기 수집된 세포를 염색 완충액(2% FBS-PBS)으로 현탁시키고, 5e4 cell/50ul per well의 세포밀도로 96-웰 플레이트(96-well plate)에 분배하였다. 실험 조건에 따라 하기 열거된 1-3 종류의 형광 표지된 항체 또는 항원을 웰에 첨가하고 잘 혼합하고 30분 동안 얼음에서 인큐베이션하였다. 그 후, 염색 완충액을 200ul/well로 첨가한 후 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하였다. 형광 표지된 항원/항체가 첨가되지 않은 웰을 음성 대조군으로 설정하였다.

[0180] PEK는 세포 표면에 카파 경쇄가 존재하는지 여부를 검출한 PE-표지된 마우스 항-인간 카파 경쇄 항체; FITC-G는 세포 표면에 IgG 중쇄가 존재하는지 여부를 검출한 FITC 표지된 마우스 항인간 IgG 중쇄 항체; FITC-Ag1는 세포 표면에 디스플레이된 항체가 PD1 항원에 결합할 수 있는지 여부를 검출한 FITC 표지된 PD1 항원; FITC-Ag2는 세포 표면에 디스플레이된 항체가 PDL1 항원에 결합할 수 있는지 여부를 검출한 FITC 표지된 PDL1 항원을 의미한다.

[0181] 실험 결과는 도 3에 나타나며 세포 표면에 발현된 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드가 있음을 보여준다.

[0182] 1. 염색 음성 대조군은 PE 신호 또는 FITC 신호가 없고;

[0183] 2. PEK 단일 염색에서는 50% 이상의 세포가 PE 신호를 가지고, 이는 카파 경쇄의 발현을 나타내며;

[0184] 3. FITC-G 단일 염색에서는 50% 이상의 세포가 FITC 신호를 가지고, 이는 IgG 중쇄의 발현을 나타내며;

[0185] 4. PEK+FITC-G 이중 염색에서는 50% 이상의 세포가 PE와 PFITC의 이중 신호를 가지고, 이는 Kappa 경쇄와 IgG 중쇄가 모두 발현되었음을 나타내며;

[0186] 5. PEK+FITC-Ag1 이중 염색에서는 50% 이상의 세포가 PE와 PFITC의 이중 신호를 가지고, 이는 세포 표면에 발현된 항체가 PD1 항원에 결합할 수 있음을 나타내며;

[0187] 6. PEK+FITC-Ag2 이중 염색에서는 26% 이상의 세포에서 PE와 PFITC의 이중 신호를 나타내고 세포 표면에 발현된 항체가 PDL1 항원에 결합할 수 있음을 나타낸다;

[0188] 7. PEK+FITC-Ag1+FITC-Ag2 삼중염색에서 54% 이상의 세포가 PE와 PFITC의 이중 신호를 보였다. 이중 양성 세포의 비율의 증가는 4%에 그쳤지만, 이중 양성 세포 인구는 오른쪽으로 이동했고, 이는 FITC 형광 신호가 강화되었음을 나타내며, 이는 PD1 및 PDL1 항원 모두에 세포 표면에 디스플레이된 항체의 결합으로 인한 형광 신호의 중첩 결과로 생각된다.

[0189] 실시예 3 용량 의존적 방식(dose-dependent manner)을 통한, 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드의 항원에 대한 결합

[0190] 상기 실시예 2의 방법에 따라, 이중특이적 항원 결합 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 각 상이한 농도를 갖는 FITC-표지된 PD1 항원(FAg1, 0.3 μl, 1 μl, 3.3 μl) 및 FITC-표지된 PDL1 항원(FAg2, 0.3 μl, 1 μl,

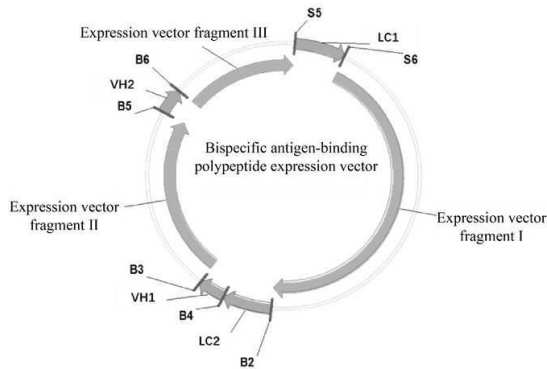
3.3 μ l)과 공동 배양하고, 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하였다.

[0191] 그 결과 항원 농도가 증가함에 따라 세포 집단이 우측으로 이동하고 FAg 증가에 따라 형광 신호가 증가하여, 이중특이적 항체가 두 항원 모두에 대해 용량 의존성을 나타냄을 확인하였다(도 4).

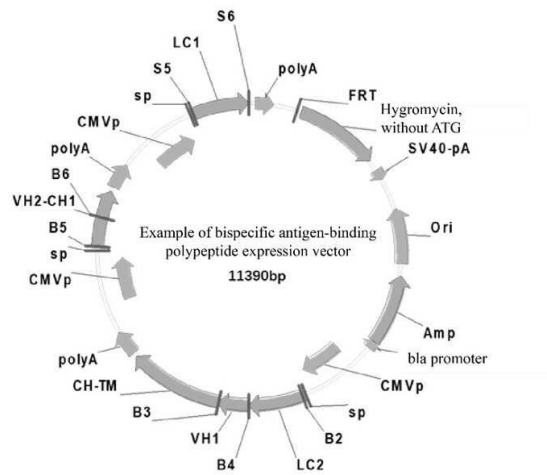
[0192] 도 4에서, 각각 A는 염색 음성 대조군 없음; B는 PEK 단일 염색; C는 FAg1 단일 염색; D는 FAg2 단일 염색; E는 PEK+0.3 μ l FAg1; F는 PEK+1 μ l FAg1; G는 PEK+3.3 μ l FAg1; H는 PEK+0.3 μ l FAg2; I는 PEK+1 μ l FAg2; J는 PEK+3.3 μ l Ag2에 대한 실험 결과를 나타낸다.

도면

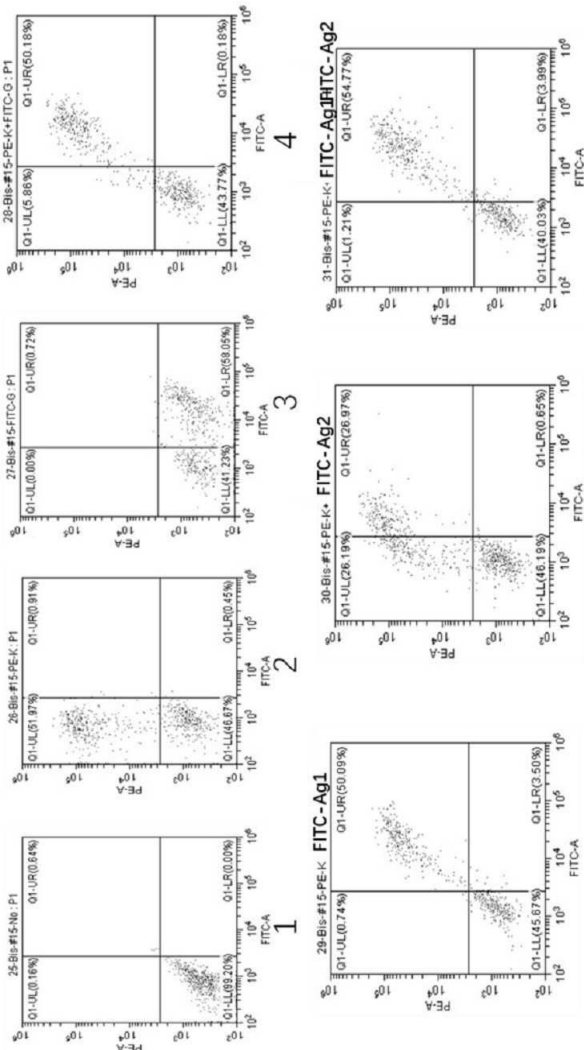
도면1



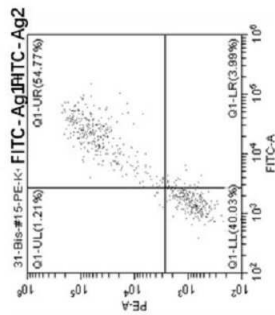
도면2



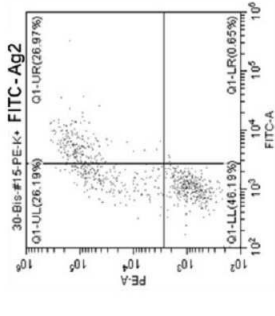
도면3



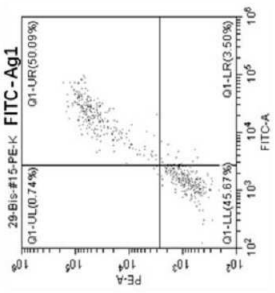
4



5

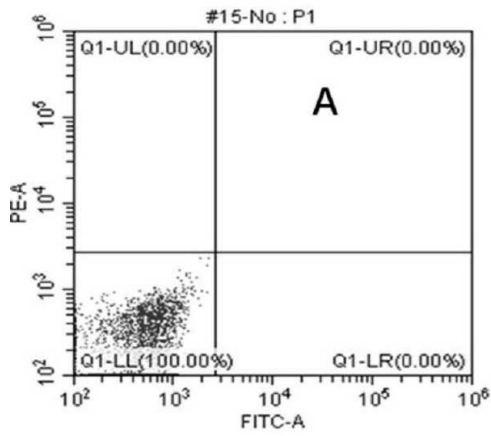


6

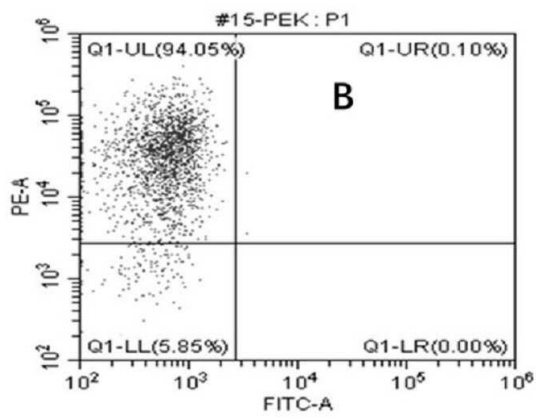


7

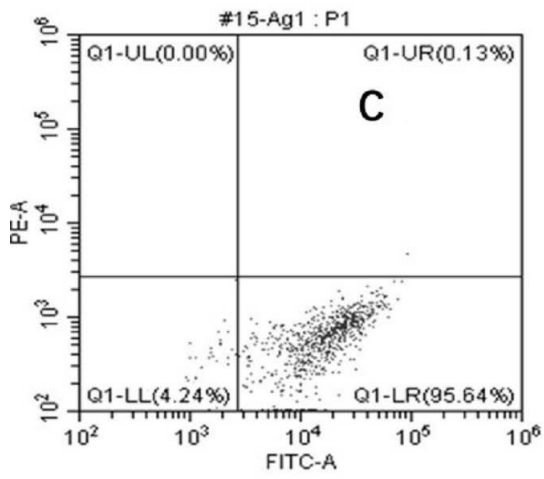
도면4a



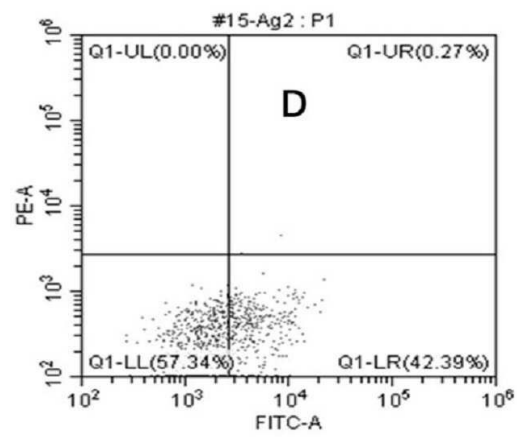
도면4b



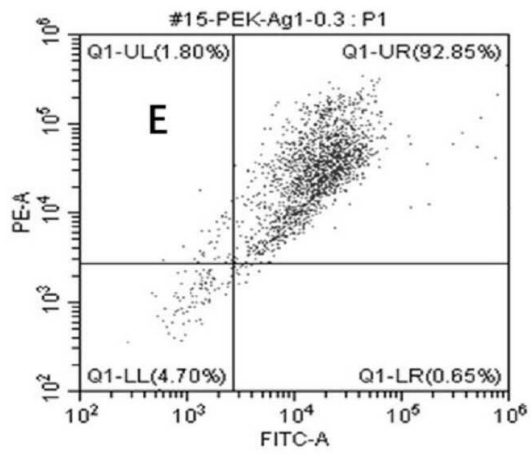
도면4c



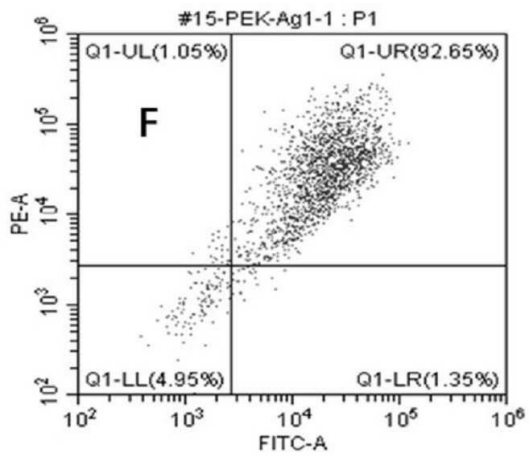
도면4d



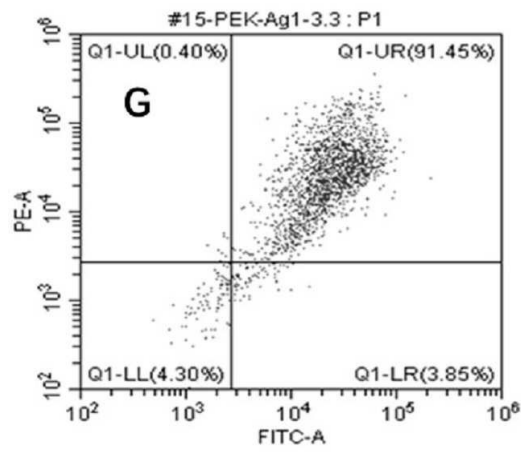
도면4e



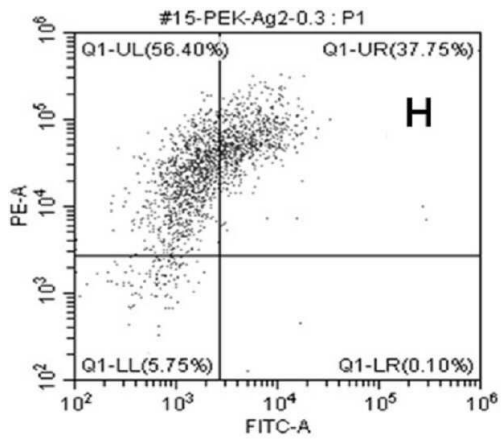
도면4f



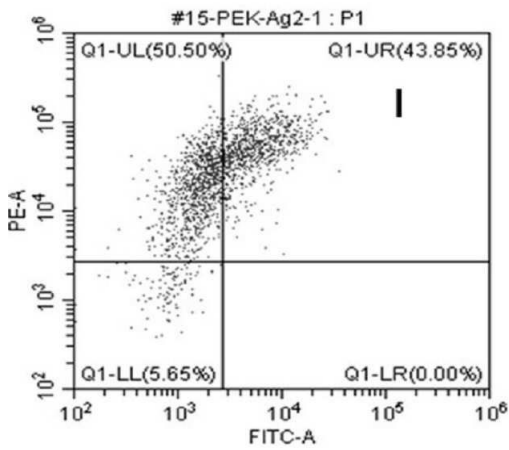
도면4g



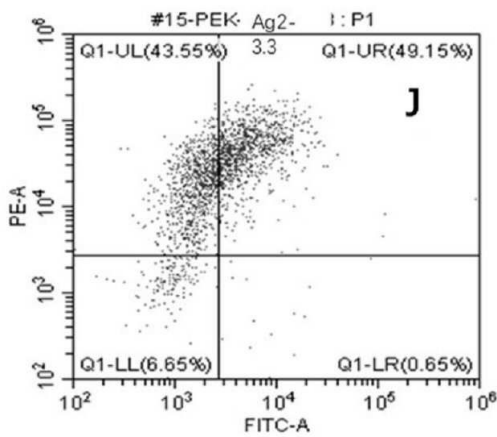
도면4h



도면4i



도면4j



서열 목록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.