



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0107295
(43) 공개일자 2014년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/26 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7016981
(22) 출원일자(국제) 2012년12월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년06월20일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/076163
(87) 국제공개번호 WO 2013/092720
국제공개일자 2013년06월27일
(30) 우선권주장
11195375.8 2011년12월22일
유럽특허청(EPO)(EP)
12179029.9 2012년08월02일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌자체스트라체 124
(72) 발명자
쾰스만 페터 미하엘
독일 82392 하바흐 임 조넨탈 20
크너트겐 헨드릭
독일 82377 쾰츠베르크 아가테-플라이쓰너-백 16
(74) 대리인
특허법인코리아나

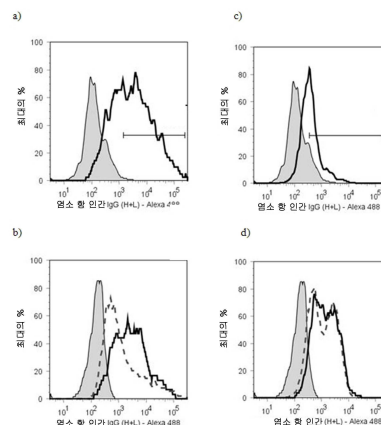
전체 청구항 수 : 총 171 항

(54) 발명의 명칭 **진핵 세포용 전장 항체 표시 시스템 및 그것의 용도**

(57) 요약

하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 발현 세포의 선별 방법이 본원에서 보고된다: (a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 세포 집단의 각각의 세포는 렌티바이러스 핵산에 의해 인코딩되고, 둘 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 둘 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 막-결합 전장 항체를 표시함, 및 (b) 표시된 막-결합 전장 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계, 여기서 렌티바이러스 바이러스 입자 집단의 각각의 렌티바이러스 바이러스 입자는 막-결합 항체의 발현을 위한 EV71-IRES 를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함함.

대표도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

단계를 포함하는 이중특이적 항체 발현 세포의 선별 방법:

(a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 각각의 렌티 바이러스 바이러스 입자는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하고, 바이시스트로닉 발현 카세트는 EV71-IRES 의 상류에 있는 홀- 또는 녹-좌위에 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산 및 EV71-IRES 의 하류에 있는 각각의 다른 좌위에 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 포함하고, 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있고, 진핵 세포는 공통 경쇄를 발현하고, 중쇄 중 하나 또는 둘다 그들의 C-말단에서 막관통 도메인을 추가로 포함함, 및

(b) 표시된 막-결합 전장 이중특이적 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, EV71-IRES 의 하류에 있는 중쇄만이 그것의 C-말단에서 막관통 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 분비 세포의 선별 방법:

(a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 각각의 렌티 바이러스 바이러스 입자는 분비형 이중특이적 항체를 인코딩하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하고, 바이 시스트로닉 발현 카세트는 EV71-IRES 의 상류에 있는 홀- 또는 녹-좌위에 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산 및 EV71-IRES 의 하류에 있는 각각의 다른 좌위에 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 포함하고, 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있고, 진핵 세포는 공통 경쇄를 발현함, 및

(b) 분비된 전장 이중특이적 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 집단의 각각의 세포가 단일 전장 이중특이적 항체를 표시 또는 분비하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 단계 중 하나 이상을 제 1 단계로서 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 관심의 항원으로 트랜스제닉 동물을 면역화하는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함, 및/또는
- 면역화된 실험 동물의 B-세포를 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해 선별하는 단계, 및/또는
- 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계.

청구항 6

제 1 항 내지 제 2 항 또는 제 4 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 을 수행하고, 임의로 제 1 중쇄의 막관통-도메인이 존재하는 경우 그것을 벡터의 제한 절단 및 재결합에 의

해 제거하여, 제 2 서플 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝하는 단계.

청구항 7

제 1 항 내지 제 2 항 또는 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 프로모터,
- 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- 임의로 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산,
- EV71-IRES,
- 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 8

제 3 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 프로모터,
- 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 가, 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 개의 상이한 항원에 또는 동일한 항원 상의 2 개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 짝 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

하기 단계를 포함하는 항체 발현 세포의 선별 방법:

(a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 세포 집단의 각각의 세포는 막-결합 전장 항체를 표시하고, 항체의 둘 이상의 사슬은 바이시스트로닉 발현 카세트에 의해 인코딩되고, 항체는 하나 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합함, 및

(b) 표시된 막-결합 전장 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계,

여기서 렌티바이러스 바이러스 입자 집단의 각각의 렌티바이러스 바이러스 입자는 막-결합 항체의 발현을 위한 EV71-IRES 를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함함.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 렌티바이러스 바이러스 입자 집단의 렌티바이러스 바이러스 입자의 각각의 바이시스트로닉 발현 카세트가 하나 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 부모 항체의 상이한 변이체를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 프로모터,
- 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- 스플라이싱가능한 인트론, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 24

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 프로모터,
- 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- 임의로 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산,
- EV71-IRES,
- 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 25

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 프로모터,
- 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 그것의 C-말단에서 scFv 에 연결된 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- 스플라이싱가능한 인트론, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 26

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- 프로모터,
- 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 그것의 C-말단에서 scFab 에 연결된 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- 스플라이싱가능한 인트론, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 27

제 21 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 집단의 각각의 세포가 막-결합 전장 항체를 표시하고, 전장 항체를 분비하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 21 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 집단의 각각의 세포가 단일 전장 항체를 표시하고 분비하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 21 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항원에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 21 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 가 단일특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 21 항 내지 제 22 항 또는 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 가, 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 21 항 내지 제 22 항 또는 제 25 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 4 가, 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제 21 항 내지 제 28 항 또는 제 31 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 개의 상이한 항원에 또는 동일한 항원 상의 2 개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제 31 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 짝 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 31 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제 21 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제 21 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제 21 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 21 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제 21 항 내지 제 39 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 21 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 21 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제 21 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트:

- 프로모터,
- 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- 스플라이싱가능한 인트론, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 45

5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트:

- 프로모터,
- 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 46

제 44 항 또는 제 45 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 님 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 47

제 44 항 내지 제 46 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 48

제 44 항 내지 제 47 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 49

제 44 항 내지 제 48 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 50

제 44 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 51

제 44 항 내지 제 50 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 52

제 44 항 내지 제 51 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 53

제 44 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 54

제 44 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 55

제 44 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

청구항 56

제 44 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 따른 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포.

청구항 57

제 56 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 세포 내로 형질도입된 것을 특징으로 하는 진핵 세포.

청구항 58

제 56 항 또는 제 57 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.

청구항 59

제 58 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.

청구항 60

5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

- 프로모터,
- 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- 스플라이싱가능한 인트론, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 61

5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이스스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

- 프로모터,
- 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- EV71-IRES,
- 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.

청구항 62

제 60 항 또는 제 61 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 63

제 60 항 내지 제 62 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 64

제 60 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 65

제 60 항 내지 제 64 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 66

제 60 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 67

제 60 항 내지 제 66 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 68

제 60 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 69

제 60 항 내지 제 68 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 70

제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터를 포함하는 진핵 세포.

청구항 71

제 70 항에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 세포 내로 형질도입된 것을 특징으로 하는 진핵 세포.

청구항 72

제 70 항 또는 제 71 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.

청구항 73

제 72 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.

청구항 74

전장 항체의 표시 또는 분비 또는 둘다를 위한 진핵 세포 집단을 생성하기 위한, 제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터의 용도.

청구항 75

제 74 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 76

제 75 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 77

제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터를 각각 포함하는 둘 이상의 렌티바이러스 입자를 포함하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리로서, 각각의 벡터에 의해 인코딩되는 항체가 하나 이상의 아미노산에서 서로 상이한 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 78

제 77 항에 있어서, 벡터 라이브러리가 1,000 ~ 1,000,000 개의 상이한 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 79

제 77 항 또는 제 78 항에 있어서, 벡터 라이브러리의 벡터에 의해 인코딩되는 항체가 항체의 CDR 중 하나 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 상이한 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 80

제 79 항에 있어서, CDR 이 중쇄 CDR3 인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 81

제 77 항 내지 제 80 항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 벡터 라이브러리가 부모 발현 벡터의 하나 이상의 CDR 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 무작위화에 의해 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 82

제 77 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항에 있어서, 렌티바이러스 발현 벡터 라이브러리가 2 개의 상이한 절반 항체를 인코딩하는 핵산의 조합에 의해 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 83

제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토포에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 B-세포의 풀로부터 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 84

제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 풀로부터 선택되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 85

제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 HCVR 인코딩 핵산 및 단일 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 HCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 HCVR 인코딩 핵산이 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 86

제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 LCVR 인코딩 핵산 및 단일 HCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 LCVR 인코딩 핵산이 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 87

제 77 항 내지 제 86 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포가 B-세포의 클론 집단인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 88

제 77 항 내지 제 87 항 중 어느 한 항에 있어서, 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성을 생성하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리:

(a):

(i) B-세포의 아집단으로부터 RNA 를 분리하는 단계,

(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

(iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 1 풀을 증폭하는 단계;

(iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 2 풀을 증폭하는 단계; 및

(v) DNA 분자의 제 1 풀의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 풀의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;

또는 (b):

(i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 분리하는 단계,

(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

(iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;

(iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;

(v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 1 풀을 생성하는 단계,

(vi) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 2 푸울을 생성하는 단계, 및
(vii) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;
또는 (c):

(i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,
(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
(iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
(iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
(v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및
(vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 2 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계;
또는 (d):

(i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,
(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
(iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
(iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
(v) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및
(vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 1 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계.

청구항 89

제 77 항 내지 제 88 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 90

제 77 항 내지 제 89 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 91

제 77 항 내지 제 90 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 92

제 77 항 내지 제 91 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

청구항 93

제 44 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 따른 바이시스트로닉 발현 카세트 또는 제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터를 각각 포함하는 둘 이상의 진핵 세포를 포함하는 진핵 세포 라이브러리로

서, 각각의 세포에 의해 발현되는 항체가 하나 이상의 아미노산에서 서로 상이한 진핵 세포 라이브러리.

청구항 94

제 77 항 내지 제 92 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터 라이브러리를 포함하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 95

제 94 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리의 각각의 진핵 세포가 단일 항체를 발현하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 96

제 94 항 또는 제 95 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리의 각각의 진핵 세포가 단일 항체를 표시하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 97

제 94 항 내지 제 96 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 항체의 라이브러리를 발현하는 진핵 세포 집단이고, 인코딩 핵산이 번역화된 동물의 B-세포의 집단에서 유래하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 98

제 97 항에 있어서, B-세포가 하나 이상의 관심의 항원에 대한 그의 특이성에 대해 예비선별되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 99

제 94 항 내지 제 98 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 각각의 세포가 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 인코딩하는 제 1 발현 카세트 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 인코딩하는 제 2 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 100

제 94 항 내지 제 99 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 각각의 세포가 제 1 항원에 결합하는 제 1 전장 항체 경쇄 및 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 발현 카세트 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체 경쇄 및 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 101

제 94 항 내지 제 100 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 각각의 세포가 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 전장 항체 중쇄 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단이고, 진핵 세포가 공통 경쇄를 발현하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 102

제 94 항 내지 제 102 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 낫 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 103

제 94 항 내지 제 101 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 104

제 94 항 내지 제 103 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 105

제 94 항 내지 제 104 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 106

제 94 항 내지 제 105 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 107

제 94 항 내지 제 106 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단이 하기로부터 선택되는 공급원에서 유래하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리: (a) 혈액; (b) 2차 림프 기관, 특히 비장 또는 림프절; (c) 골수; 및 (d) 기억 B-세포를 포함하는 조직.

청구항 108

제 107 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단이 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 109

제 94 항 내지 제 108 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 포유동물, 특히 랫트, 마우스, 토끼, 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 110

제 109 항에 있어서, 동물이 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 111

제 94 항 내지 제 110 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계; 및
- (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계.

청구항 112

제 94 항 내지 제 111 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 담체를 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 코팅하는 단계;
- (b) 단리된 B-세포의 집단을 담체와 접촉시키고, B-세포가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기를 통해 담체에 결합하도록 하는 단계;
- (c) 미결합 B-세포를 제거하는 단계, 여기서 특히 담체는 비드를 포함하거나 더욱 특히 그것으로 이루어지고, 더욱더 특히 비드는 상자성 비드임; 및
- (d) 상자성 비드로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 회수하는 단계.

청구항 113

제 94 항 내지 제 112 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 FACS 소팅에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 114

제 94 항 내지 제 113 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.

청구항 115

제 94 항 내지 제 114 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계;
- (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계; 및
- (c) 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 B-세포를 선별하는 단계, 여기서 특히 하나 이상의 부가적 파라미터에 대한 선별은 하기임

(i) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 양성 선별: B 세포 특이적 마커, 특히 CD19 또는 B220 의 존재, 및 B-세포의 생활력; 및/또는

(ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.

청구항 116

제 94 항 내지 제 115 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별하는 것이 클래스 전환된 B-세포, 특히 IgM- 및/또는 IgD-음성 B-세포, 가장 특히 IgM- 및 IgD-음성 B-세포에 대해 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 117

제 94 항 내지 제 116 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 제 1 형광 염료로 표지되어 있고, 특히 형광 염료는 Alexa 647 nm, Alexa 488 또는 Alexa 546 nm 임;
- (b) 단리된 B-세포의 집단의 세포를 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체와 접촉시키는 단계, 여기서 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체는 제 2 및/또는 제 3 형광 염료로 표지되어 있고, 제 2 및/또는 제 3 형광 염료는 제 1 형광 염료가 방출하는 형광의 파장과 상이한 파장에서 형광을 방출함; 및
- (c) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 그러나 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체에 결합되지 않은 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.

청구항 118

제 94 항 내지 제 117 항 중 어느 한 항에 있어서, 라이브러리가 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리이고, 라이브러리를 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 내로 도입하는 것이 진핵, 특히 포유류 세포를 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리로 감염시킴으로써 수행되고, 더욱 특히 감염이 감염 다중

도 10 이하, 특히 1 이하, 더욱 특히 0.2 이하, 가장 특히 0.1 이하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 119

제 118 항에 있어서, 감염 다중도가 약 0.1 인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 120

제 94 항 내지 제 119 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 단리가 FACS 소팅에 의해 수행되고, 하나의 구현예에서 세포의 단리가 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

(a) 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 염색하는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및

(b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.

청구항 121

제 94 항 내지 제 120 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 것이 세포를 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 추가로 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 122

제 94 항 내지 제 121 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 하기 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

(a) 하나 이상의, 특히 정확하게는 하나의, 개별 세포를 진핵 세포, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 존재 하에 배양하는 단계;

(b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 능력을 확인하는 단계.

청구항 123

제 94 항 내지 제 122 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는, 특히 및, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 하기로부터 선택되는 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리: (a) BHK 21 세포, 특히 ATCC CCL-10; (b) Neuro-2a 세포; (c) HEK-293T 세포, 특히 ATCC CRL-11268; (d) CHO-K1 세포, 특히 ATCC CRL-62; 및 (e) HEK293 세포.

청구항 124

제 94 항 내지 제 123 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 CHO-K1 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지고, 더욱 특히 발현 라이브러리나 렌티바이러스 발현 라이브러리인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 125

하기 단계를 포함하는 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 세포의 선별 방법:

(a) 임의로 B-세포의 집단으로부터 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 분비하는 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단을 선별하는 단계,

(b) 하기 단계에 의해 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 단계, 여기서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체들의 변이체를 인코딩함,

(i) 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 여기서 생성은 B-세포의 아집단으로부터 DNA 분자의 풀을 증폭시키는 단계 또는 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 단일 항체를 인코딩하는 DNA로부터 인코딩 핵산 서열의 무작위화에 의해 DNA 분자의 라이브러리를 생성하는 단계를 포함함, 및

- (ii) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 다수의 DNA 분자를 클로닝하는 단계;
- (c) 진핵 세포 집단을 렌티바이러스 발현 라이브러리의 일원을 각각 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자의 집단으로 형질도입하는 단계;
- (d) 진핵 포유류 세포의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체를 표시하는 단계; 및
- (e) 진핵 세포 집단으로부터 세포를 분리하는 단계, 여기서 세포는 그것의 표면에 표시된 항체가 관심의 항원 또는 항원들 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별됨.

청구항 126

하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 (2 개의 관심의 항원에 특이적으로 결합함) 를 발현하는 세포의 선별 방법:

- (a) 하기 단계에 의해 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 단계, 여기서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 이중특이적 항체의 변이체를 인코딩함,

- (i) 단일 이중특이적 항체를 인코딩하는 DNA 로부터 인코딩 핵산 서열의 무작위화에 의해 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 및

- (ii) 막-결합 형태로서 전장 이중특이적 항체의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 다수의 DNA 분자를 클로닝하는 단계;

- (b) 진핵 세포 집단을 렌티바이러스 발현 라이브러리의 일원을 각각 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자의 집단으로 형질도입하는 단계;

- (c) 진핵 포유류 세포의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체를 표시하는 단계; 및

- (d) 진핵 세포 집단으로부터 세포를 분리하는 단계, 여기서 세포는 그것의 표면에 표시된 항체가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별됨.

청구항 127

제 125 항 또는 제 126 항에 있어서, 방법이 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 것을 포함하고, 다수의 DNA 분자를 생성하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (1) B-세포의 아집단으로부터 중쇄 가변 영역 (HCVR) 을 인코딩하는 DNA 분자의 제 1 푸울을 증폭하는 단계; 및
- (2) B-세포의 아집단으로부터 경쇄 가변 영역 (LCVR) 을 인코딩하는 DNA 분자의 제 2 푸울을 증폭하는 단계;
- (3) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 LCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자 및 HCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자의 조합을 클로닝하는 단계.

청구항 128

제 125 항 내지 제 127 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 것을 포함하고, 다수의 DNA 분자를 생성하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (1) 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 HCVR 을 인코딩하는 DNA 분자 및 LCVR 을 인코딩하는 DNA 분자를 증폭하는 단계, 및
- (2) 하나 이상의 코돈을 무작위화함으로써 HCVR 을 인코딩하는 DNA 분자 및/또는 LCVR 을 인코딩하는 DNA 분자를 무작위화하여, HCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자 및 LCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계;
- (3) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 LCVR 을 인코딩하는 무작위화된 다수의 DNA 분자 및 HCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자의 조합을 클로닝하는 단계.

청구항 129

제 125 항 내지 제 128 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 것을 포함하고, 생성이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(i) 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 생성은 하기 단계를 포함함:

- (1) B-세포의 아집단으로부터 mRNA 를 분리하는 단계;
 - (2) mRNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
 - (3) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 1 푸울을 증폭하는 단계; 및
 - (4) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 2 푸울을 증폭하는 단계;
- (ii) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 DNA 분자의 제 1 및 제 2 푸울의 DNA 분자의 쌍을 클로닝하는 단계.

청구항 130

제 125 항 내지 제 129 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 것을 포함하고, 생성이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(i) 하나 또는 둘의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 생성은 하기 단계를 포함함:

- (1) 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 mRNA 를 분리하는 단계;
 - (2) mRNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
 - (3) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계; 및
 - (4) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
 - (5) 제 1 및/또는 제 2 DNA 분자를 무작위화하여, DNA 분자의 제 1 푸울 및 DNA 분자의 제 2 푸울을 생성하는 단계,
- (ii) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 DNA 분자의 제 1 및 제 2 푸울의 DNA 분자의 쌍을 클로닝하는 단계.

청구항 131

제 125 항 내지 제 130 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 132

제 131 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 133

제 125 항 내지 제 132 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 양, 엘크, 사슴, 당나귀, 물 사슴, 밍크, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 고양이, 랫트, 햄스터, 기니피그, 및 마우스로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 하나의 구현 예에서 동물이 마우스, 랫트 또는, 영장류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 134

제 125 항 내지 제 133 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 비-인간 영장류 또는 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 135

제 125 항 내지 제 134 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스제닉 동물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 136

제 125 항 내지 제 135 항 중 어느 한 항에 있어서, B-세포를 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별하여 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별함으로써 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 137

제 125 항 내지 제 136 항 중 어느 한 항에 있어서, B-세포를 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별하여 단리된 B-세포의 집단으로부터 단일 B-세포를 선별함으로써 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 138

제 125 항 내지 제 137 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포가 클론 B-세포 집단인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 139

제 125 항 내지 제 138 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포 또는 클론 B-세포 집단의 단리된 mRNA로부터 가변 도메인 인코딩 핵산을 증폭하고, 증폭된 mRNA를 cDNA로 전사함으로써 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 140

제 125 항 내지 제 139 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 B-세포의 풀로부터 획득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 141

제 125 항 내지 제 140 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 획득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 획득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 풀로부터 선택되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 142

제 125 항 내지 제 140 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 HCVR 인코딩 핵산 및 단일 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 획득되는 HCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 HCVR 인코딩 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 143

제 125 항 내지 제 142 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 LCVR 인코딩 핵산 및 단일 HCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단

일 B-세포로부터 수득되는 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 LCVR 인코딩 핵산이 수득되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 144

제 125 항 내지 제 143 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포가 B-세포의 클론 집단인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 145

제 125 항 내지 제 144 항 중 어느 한 항에 있어서, 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성을 생성하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a):

(i) B-세포의 아집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,

(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

(iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 1 푸울을 증폭하는 단계;

(iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 2 푸울을 증폭하는 단계; 및

(v) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;

또는 (b):

(i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,

(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

(iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;

(iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;

(v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 1 푸울을 생성하는 단계,

(vi) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 2 푸울을 생성하는 단계, 및

(vii) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;

또는 (c):

(i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계;

(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

(iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;

(iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;

(v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및

(vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 2 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계;

또는 (d):

(i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,

(ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

- (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- (v) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 풀을 생성하는 단계, 및
- (vi) DNA 분자의 풀의 하나의 일원 및 제 1 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계.

청구항 146

제 125 항 내지 제 145 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 무작위로 조합함으로써 항원-특이적 항체의 변이성이 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 147

제 125 항 내지 제 146 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단이 하기로부터 선택되는 공급원에서 유래하는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리: (a) 혈액; (b) 2 차 림프 기관, 특히 비장 또는 림프절; (c) 골수; 및 (d) 기억 B-세포를 포함하는 조직.

청구항 148

제 147 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단이 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리.

청구항 149

제 125 항 내지 제 148 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 포유동물, 특히 랫트, 마우스, 토끼, 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리.

청구항 150

제 149 항에 있어서, 동물이 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리.

청구항 151

제 125 항 내지 제 150 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계; 및
- (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계.

청구항 152

제 125 항 내지 제 151 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리:

- (a) 담체를 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 코팅하는 단계;
- (b) 단리된 B-세포의 집단을 담체와 접촉시키고, B-세포가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기를 통해 담체에 결합하도록 하는 단계;
- (c) 미결합 B-세포를 제거하는 단계, 여기서 특히 담체는 비드를 포함하거나 더욱 특히 그것으로 이루어지고, 더욱더 특히 비드는 상자성 비드임; 및
- (d) 상자성 비드로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 회수하는 단계.

청구항 153

제 125 항 내지 제 152 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 FACS 소팅에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 154

제 125 항 내지 제 153 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.

청구항 155

제 125 항 내지 제 154 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계;
- (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계; 및
- (c) 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 B-세포를 선별하는 단계, 여기서 특히 하나 이상의 부가적 파라미터에 대한 선별은 하기임
 - (i) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 양성 선별: B 세포 특이적 마커, 특히 CD19 또는 B220 의 존재, 및 B-세포의 생활력; 및/또는
 - (ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.

청구항 156

제 125 항 내지 제 155 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별하는 것이 클래스 전환된 B-세포, 특히 IgM- 및/또는 IgD-음성 B-세포, 가장 특히 IgM- 및 IgD-음성 B-세포에 대해 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 157

제 125 항 내지 제 156 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 제 1 형광 염료로 표지되어 있고, 특히 형광 염료는 Alexa 647 nm, Alexa 488 또는 Alexa 546 nm 임;
- (b) 단리된 B-세포의 집단의 세포를 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체와 접촉시키는 단계, 여기서 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체는 제 2 및/또는 제 3 형광 염료로 표지되어 있고, 제 2 및/또는 제 3 형광 염료는 제 1 형광 염료가 방출하는 형광의 파장과 상이한 파장에서 형광을 방출함; 및
- (c) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 그러나 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체에 결합되지 않은 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.

청구항 158

제 125 항 내지 제 157 항 중 어느 한 항에 있어서, 라이브러리가 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리이고, 라이브러리를 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 내로 도입하는 것이 진핵, 특히 포유류 세포를 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리로 감염시킴으로써 수행되고, 더욱 특히 감염이 감염 다중도 10 이하, 특히 1 이하, 더욱 특히 0.2 이하, 가장 특히 0.1 이하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 159

제 158 항에 있어서, 감염 다중도가 약 0.1 인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 160

제 125 항 내지 제 159 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 단리가 FACS 소팅에 의해 수행되고, 하나의 구현예에서 세포의 단리가 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 염색하는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.

청구항 161

제 125 항 내지 제 160 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 것이 세포를 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 추가로 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 162

제 161 항에 있어서, 하나 이상의 부가적 파라미터가 하기로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (i) 세포의 생활력에 대한 양성 선별; 및/또는
- (ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.

청구항 163

제 125 항 내지 제 162 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 하기 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:

- (a) 하나 이상의, 특히 정확하게는 하나의, 개별 세포를 진핵 세포, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 존재 하에 배양하는 단계;
- (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 능력을 확인하는 단계.

청구항 164

제 125 항 내지 제 163 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는, 특히 및, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 하기로부터 선택되는 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리: (a) BHK 21 세포, 특히 ATCC CCL-10; (b) Neuro-2a 세포; (c) HEK-293T 세포, 특히 ATCC CRL-11268; (d) CHO-K1 세포, 특히 ATCC CRL-62; 및 (e) HEK293 세포.

청구항 165

제 125 항 내지 제 164 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 CHO-K1 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지고, 더욱 특히 발현 라이브러리나 렌티바이러스 발현 라이브러리인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

청구항 166

하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:

- 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,

- 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 벌크 소트에 의함),
- 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서플 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응, SEQ ID NO: 6 ~ SEQ ID NO: 10 의 프라이머 중 하나 이상 또는 전부 및 SEQ ID NO: 11 의 프라이머를 사용하는 좁 사슬에 대한 하나 및 SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 4 의 프라이머 중 하나 이상 또는 전부 및 SEQ ID NO: 5 의 프라이머를 사용하는 홀 사슬에 대한 하나; 결찰: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 홀-좌위 내로 막관통 도메인 없이, 즉 EV71-IRES 의 상류에 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 좁-좌위 내로 막관통 도메인과 함께, 즉 EV71-IRES 의 하류에,
- 바이러스 생성, 공통 경쇄를 안정적으로 발현하는 포유류 세포의 감염, 포유류 세포의 표면에 표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,
- 예를 들어 SEQ ID NO: 29 및 SEQ ID NO: 30 의 프라이머를 사용하는, EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (TM 도메인을 갖지 않음) 의 PCR 및 제 2 서플 벡터 내로 막관통 도메인 없이 클로닝,
- 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.

청구항 167

하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:

- 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 벌크 소트에 의함),
- 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서플 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응; 결찰: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 홀-좌위 내로 막관통-도메인과 함께, 즉 EV71-IRES 의 상류에, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 좁-좌위 내로 막관통 도메인과 함께, 즉 EV71-IRES 의 하류에,
- 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 포유류 세포 막-표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,
- EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 및 제 2 서플 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝; 벡터의 제한 절단 및 재결찰에 의한 제 1 중쇄의 막관통-도메인의 제거,
- 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 이중특이적 항체의 선별.

청구항 168

하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:

- 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 벌크 소트에 의함),
- 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서플 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응; 결찰: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 제 1 서플 벡터 내로 홀-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 또는 없이, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 제 2 서플 벡터 내로 좁-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 또는 없이, 그러나 하나 이상은 막관통 도메인을 가짐,
- 바이러스 생성 (제 1 서플 벡터에 대해 하나 및 제 2 서플 벡터에 대해 하나), 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 제 1 바이러스 및 제 2 바이러스에 의한 순차적 감염, 포유류 세포의 표면에 표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,

- 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 PCR 및 제 3 서틀 벡터 내로 바이시스트로닉 발현 유닛 내에 막관통 도메인 및 EV71-IRES 없이 클로닝,
- 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.

청구항 169

하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 이중특이적 항체의 표시 및 그러한 진핵 세포의 선별에 의한 또한 이중특이적 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:

- 제 1 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 제 1 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 면역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함,
- 제 2 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 제 2 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 면역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현하고,

제 1 항원 및 제 2 항원은 상이함,

- 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해, 제 1 및 제 2 면역화된 실험 동물의 B-세포를 선별하는 단계,
- 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,

- 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 상류에 홀- 또는 좁-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 결합, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 동일한 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES 의 하류에 각각의 다른 좌위 내로 막관통 도메인과 함께 결합, 즉 IRES 의 상류에 있는 중쇄가 홀-좌위를 갖는 경우 IRES 의 하류에 있는 중쇄는 좁-좌위를 갖고 그 반대로 그러함, 여기서 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 상이함,

- 바이러스 생성,

- 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,

- 이중 표지된 형질도입된 세포의 FACS 에 의한 표면에 이중특이적 항체를 표시하는 세포의 선별,

- EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 및 제 2 서틀 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝; 벡터의 제한 절단 및 재결합에 의한 제 1 중쇄의 막관통-도메인의 제거,

- 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.

청구항 170

하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 이중특이적 항체의 표시 및 그러한 진핵 세포의 선별에 의한 또한 이중특이적 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:

- 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 면역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함,

- 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해, 면역화된 실험 동물의 B-세포를 선별하는 단계,

- 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,

- 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 하류에 중쇄 좌위 내로 막관통 도메인과 함께 결합, 여기서 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터는 IRES 의 상

류에 공통 경쇄 인코딩 핵산을 포함함,

- 바이러스 생성,
- 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- 항원 특이적 표지된 형질도입된 세포의 FACS 에 의한, 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의한, 표면에 항체를 표시하는 세포의 선별,
- 셔틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 선별된 세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,
- 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 셔틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 상류에 홀- 또는 늑-좌위 내로 막관통 도메인 없이 결합, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 동일한 셔틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES 의 하류에 각각의 다른 좌위 내로 막관통 도메인 없이 결합, 즉 IRES 의 상류에 있는 중쇄가 홀-좌위를 갖는 경우 IRES 의 하류에 있는 중쇄는 늑-좌위를 갖고 그 반대도 그러함, 여기서 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있음,
- 바이러스 생성,
- 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- 이중특이적 항체를 분비하는 세포의 선별.

청구항 171

항체의 생성을 위한, 제 1 항 내지 제 170 항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 선택되는 세포의 용도.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 모노클로날 항체, 특히 그러한 항체를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 하나 이상의 관심의 항원(들)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체, 특히 전장 모노클로날 항체, 특히 이중특이적 모노클로날 항체를 그것의 표면에 발현 및 표시하는 진핵 세포의 생성 및 선별 방법을 제공한다.

배경기술

- [0002] 공지된 재조합 항체 단리 방법은 파지 표시 (Hogenboom, Methods Mol. Biol. 178 (2002) 1-37), 리보솜/mRNA 표시 (Lipovsek and Plueckthun, J. Immunol. Method 290 (2004) 51-67) 및 미생물 세포 표시 (Boder and Wittrup, Nat. Biotechnol. 15 (1997) 553-557) 이다.
- [0003] 포유류 세포 내에서 전체 항체의 백시니아 바이러스-매개 발현에 기초하는 스크리닝 시스템이 US 2002/0123057 에 보고되어 있다. 또다른 스크리닝 시스템은 포유류 세포 내에서 항체의 세포 표면 발현에 기초한다 (Ho 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 9637-9642).
- [0004] 파지 표시는 단일 패닝 라운드 (panning round) 에서 10¹² ~ 10¹³ 클론의 스크리닝을 허용하지만 (Barbas III 등, (eds.), Phage Display - A Laboratory manual, Cold Spring Harbour Press, (2001)), 세포 포르مان트 (formant) 당 하나의 항체에서 포유류 스크리닝 절차의 처리율은 약 10⁶ ~ 10⁷ 클론의 동시 분석으로 한정된다.
- [0005] 세포 표시는 Higuchi 등에 의해 COS 세포에서 기재되어 있다 (J. Immunol. Meth. 202 (1997) 193-204). Beerli 등은 BHK 세포에서 항원-특이적 B-세포로부터 생성되는 Sindbis 바이러스-기반 scFv 세포 표면 표시 라이브러리를 보고한다 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105 (2008) 14336-14341). Ho 및 Pastan 은 HEK293 세포 (scFv) 를 사용하는 방법을 보고한다 (Methods Mol. Biol. 562 (2009) 99-113). 림프구 표시는 Alonso-Camino 등에 의해 보고되었다 (PLoS One. 4 (2009) e7174). Zhou 등은 HEK293 세포를 사용하는 방법을 보고한다 (Acta Biochim. Biophys. Sin. 42 (2010) 575-584). Zhou 등은 Flp-In 시스템을 보고한다 (MAbs. 2 (2010) 508-518).

[0006] Taube, R. 등 (PLOS One 3 (2008) e3181) 은 인간 세포 및 렌티바이러스 바이러스 입자의 표면에서의 인간 항체의 안정적 발현을 보고한다.

[0007] WO 2007/047578 에서 항체 라이브러리의 세포 표시가 보고되어 있다.

발명의 내용

[0008] 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자를 사용함으로써 진핵 세포에서 전장 항체가 발현 및 표시될 수 있다고 밝혀졌다. 본원에서 보고되는 렌티바이러스 바이러스 입자를 사용하는 진핵 세포에서의 전장 항체의 발현은 항체 경쇄 및 항체 중쇄의 발현 카세트 또는 2 개의 항체 중쇄의 발현 카세트를 연결하는 EV71 의 IRES (내부 리보솜 진입 자리) 엘리먼트를 사용함으로써 가능하다.

[0009] 렌티바이러스 벡터 내에 항체 경쇄 발현 카세트 및 항체 중쇄 발현 카세트가 존재하는 경우, 항체 중쇄 발현 카세트는 C-말단 항체 도메인을 인코딩하는 엑손 뒤에 비-구성 스플라이스 자리를 포함하여, 가용성 항체 중쇄 외에 또한 막-결합 항체 중쇄를 발현하는 수단을 제공하여, 막-결합 전장 항체의 표시를 초래할 수 있다.

[0010] 렌티바이러스 벡터 내에 2 개의 항체 중쇄 발현 카세트가 존재하는 경우, 둘다가 또는 오직 제 2 항체 중쇄 발현 카세트만 C-말단 항체 도메인을 인코딩하는 엑손 뒤에 막관통 도메인을 인코딩하는 엑손을 포함하여, 막-결합 전장 항체의 표시를 초래할 수 있다.

[0011] 또한 본원에서 제공되는 것은 그것의 표면에 항체, 특히 전장 모노클로날 항체를 발현 및 표시하는 진핵 세포의 생성 및 선별 방법이다.

[0012] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터이다:

- [0013] - 프로모터,
- [0014] - 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0015] - EV71-IRES,
- [0016] - 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0017] - 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0018] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커.

[0019] 본원에서 보고되는 이러한 렌티바이러스 벡터는 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터이며, 여기서 2 개의 발현 카세트를 분리하는 IRES 는 EV71-IRES 이다.

[0020] 렌티바이러스 발현 시스템 내의 바이시스트로닉 발현 카세트로 전장 항체를 발현하는데 오직 EV71-IRES 만이 사용될 수 있다고 밝혀졌다.

[0021] 스플라이싱가능한 인트론을 제공함으로써 본원에서 보고되는 발현 벡터로부터 가용성 형태의 항체 중쇄 뿐만 아니라 막-결합 형태의 항체 중쇄가 발현될 수 있다.

[0022] 가용성 형태 및 막-결합 형태의 항체 중쇄의 발현에 의해 세포는 한편으로는 전장 항체를 분비하고, 이는 예를 들어 ELISA 에서 시험될 수 있고, 동시에 그것의 표면에 막-결합 형태의 전장 항체를 표시하고, 이는 예를 들어 단일 세포 클론의 단리를 가능케 하는 FACS 에 의한 세포의 선별에 사용될 수 있다.

[0023] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터이다:

- [0024] - 프로모터,
- [0025] - 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0026] - EV71-IRES,
- [0027] - 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- [0028] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커.

- [0029] 본원에서 보고되는 이러한 렌티바이러스 벡터는 2 개의 상이한 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터이며, 여기서 2 개의 발현 카세트를 분리하는 IRES 는 EV71-IRES 이다.
- [0030] 막-결합 형태의 항체 중쇄의 발현에 의해 세포는 그것의 표면에 막-결합 형태의 전장 항체를 표시하고, 이는 예를 들어 단일 세포 클론의 단리를 가능케 하는 FACS 에 의한 세포의 선별에 사용될 수 있다.
- [0031] 하나의 구현예에서 항체는 항원에 특이적으로 결합하는 항체이다. 따라서, 하나의 구현예에서 항체 또는 항체 인코딩 핵산은, 각각, 항원에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별된 B-세포로부터 수득된다.
- [0032] 하나의 구현예에서 항체는 2 가 단일특이적 항체이다. 하나의 구현예에서 항체는 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0033] 하나의 구현예에서 항체는 2 가 이중특이적 항체이다. 하나의 구현예에서 항체는 2 개의 상이한 항원에 또는 동일한 항원 상의 2 개의 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0034] 하나의 구현예에서 항체는 4 가 이중특이적 항체이다. 하나의 구현예에서 항체는 2 개의 상이한 항원에 또는 동일한 항원 상의 2 개의 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0035] 하나의 구현예에서 발현 벡터는 렌티바이러스 (발현) 벡터이다.
- [0036] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 본원에서 보고되는 발현 벡터를 각각 포함하는 둘 이상의 렌티바이러스 입자를 포함하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리이며, 여기서 각각의 벡터에 의해 인코딩되는 항체는 하나 이상의 아미노산에서 서로 상이하다.
- [0037] 하나의 구현예에서 벡터 라이브러리는 1,000 ~ 1,000,000 개의 상이한 발현 벡터를 포함한다.
- [0038] 하나의 구현예에서 벡터 라이브러리의 벡터에 의해 인코딩되는 항체는 항체의 가변 도메인 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 상이하다.
- [0039] 하나의 구현예에서 벡터 라이브러리의 벡터에 의해 인코딩되는 항체는 항체의 CDR 중 하나 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 상이하다. 하나의 구현예에서 CDR 은 중쇄 CDR3 이다.
- [0040] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 본원에서 보고되는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포이다. 하나의 구현예에서 바이시스트로닉 발현 카세트는 세포 내로 형질도입되었다.
- [0041] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 본원에서 보고되는 바이시스트로닉 발현 카세트 또는 벡터를 각각 포함하는 둘 이상의 진핵 세포를 포함하는 진핵 세포 라이브러리이며, 여기서 각각의 세포에 의해 발현되는 항체는 하나 이상의 아미노산에서 서로 상이하다.
- [0042] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리는 1,000 ~ 1,000,000 개의 상이한 포유류 세포를 포함한다.
- [0043] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리의 세포에 의해 발현되는 항체는 항체 가변 도메인 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 상이하다.
- [0044] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리의 진핵 세포에 의해 인코딩되는 항체는 항체의 CDR 중 하나 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 상이하다. 하나의 구현예에서 CDR 은 중쇄 CDR3 이다.
- [0045] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 본원에서 보고되는 벡터 라이브러리를 포함하는 진핵 세포 라이브러리이다.
- [0046] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리의 진핵 세포는 단일 항체를 발현 및 표시한다.
- [0047] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리의 진핵 세포는 단일 항체를 표시한다.
- [0048] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리는 항체의 라이브러리를 발현하는 진핵 세포 집단이며, 여기서 인코딩 핵산은 면역화된 동물의 B-세포에서 유래한다. 하나의 구현예에서 B-세포는 관심의 항원에 대한 그의 특이성에 대해 예비선별된다.
- [0049] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리는 각각의 세포가 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 인코딩하는 제 1 발현 카세트 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 인코딩하는 제 2 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단이다.
- [0050] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리는 각각의 세포가 제 1 항원에 결합하는 제 1 전장 항체 경쇄 및 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 발현 카세트 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체 경쇄 및

제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포 집단이다.

- [0051] 하나의 구현예에서 진핵 세포 라이브러리는 각각의 세포가 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 전장 항체 중쇄 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단이며, 여기서 진핵 세포는 공통 경쇄를 발현한다.
- [0052] 하나의 구현예에서 제 1 전장 항체 중쇄는 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄는 낚 돌연변이를 포함한다.
- [0053] 하나의 구현예에서 제 1 전장 항체 경쇄는 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄는 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄는 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄는 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함한다.
- [0054] 하나의 구현예에서 발현 벡터 라이브러리는 부모 발현 벡터의 하나 이상의 CDR 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 무작위화에 의해 획득된다.
- [0055] 하나의 구현예에서 발현 벡터 라이브러리는 2 개의 상이한 절반 항체의 조합에 의해 획득된다.
- [0056] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하나 이상의, 특히 2 개의, 관심의 항원(들)에 특이적으로 결합하는 항체의 단리 또는 선별 방법이다.
- [0057] 본원에 보고된 스크리닝 방법은 "세포 당 하나의 항체" 포맷으로 수행될 수 있다고 밝혀졌으며, 이는 스크리닝을 하나의 단일 라운드의 선별로 완료될 수 있게 하므로 유리하다.
- [0058] 본원에서 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 세포의 생성, 선별, 및/또는 단리 방법이 보고된다.
- [0059] 하나의 구현예에서 항체는 모노클로날 전장 항체이다. 하나의 구현예에서 항체는 이중특이적 모노클로날 전장 항체이다.
- [0060] 본원에서 보고되는 방법은 선별된 세포로부터 항체의 가변 영역 또는 전체 항체의 클로닝을 허용한다.
- [0061] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 본원에서 보고되는 방법으로 선택되는 항체의 재조합 생성 방법이다.
- [0062] 하나의 구현예에서 전장 항체는 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함한다.
- [0063] 본원에서 보고되는 방법은 완전 중 특이적 형태의, 특히 완전 인간 항체로서의, 요망되는 특이성을 갖는 항체의 재조합 생성을 허용한다.
- [0064] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 세포의 선별 방법이다:
- [0065] (a) 임의로 B-세포의 집단으로부터 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 분비하는 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단을 선별하는 단계,
- [0066] (b) 하기에 의해 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 단계, 여기서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체들의 변이체를 인코딩함,
- [0067] (i) 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 여기서 생성은 B-세포의 아집단으로부터 DNA 분자의 풀을 증폭시키는 단계 또는 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 단일 항체를 인코딩하는 DNA로부터 인코딩 핵산 서열의 무작위화에 의해 DNA 분자의 라이브러리를 생성하는 단계를 포함함, 및
- [0068] (ii) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 다수의 DNA 분자를 클로닝하는 단계;
- [0069] (c) 진핵 세포 집단을 렌티바이러스 발현 라이브러리의 일원을 각각 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자의 집단으로 형질도입하는 단계;
- [0070] (d) 진핵 포유류 세포의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체를 표시하는 단계; 및
- [0071] (e) 진핵 세포 집단으로부터 세포를 단리하는 단계, 여기서 세포는 그것의 표면에 표시된 항체가 관심의 항원 또는 항원들 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별됨.
- [0072] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 (2 개의 관심의 항원에 특이적으로 결

합합)를 발현하는 세포의 선별 방법이다:

- [0073] (a) 하기에 의해 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 단계, 여기서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 이중특이적 항체의 변이체를 인코딩함,
- [0074] (i) 단일 이중특이적 항체를 인코딩하는 DNA로부터 인코딩 핵산 서열의 무작위화에 의해 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 및
- [0075] (ii) 막-결합 형태로서 전장 이중특이적 항체의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 다수의 DNA 분자를 클로닝하는 단계;
- [0076] (b) 진핵 세포 집단을 렌티바이러스 발현 라이브러리의 일원을 각각 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자의 집단으로 형질도입하는 단계;
- [0077] (c) 진핵 포유류 세포의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체를 표시하는 단계; 및
- [0078] (d) 진핵 세포 집단으로부터 세포를 분리하는 단계, 여기서 세포는 그것의 표면에 표시된 항체가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별됨.
- [0079] 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터와 조합된 렌티바이러스 발현 라이브러리의 사용은 높은 스크리닝 효율을 허용한다.
- [0080] 하나의 구현예에서 방법은 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 것을 포함하고, 다수의 DNA 분자를 생성하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0081] (1) B-세포의 아집단으로부터 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 인코딩하는 DNA 분자의 제 1 푸울을 증폭하는 단계; 및
- [0082] (2) B-세포의 아집단으로부터 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 인코딩하는 DNA 분자의 제 2 푸울을 증폭하는 단계;
- [0083] (3) 동시에 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 LCVR을 인코딩하는 다수의 DNA 분자 및 HCVR을 인코딩하는 다수의 DNA 분자의 조합을 클로닝하는 단계.
- [0084] 하나의 구현예에서 방법은 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 것을 포함하고, 다수의 DNA 분자를 생성하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0085] (1) 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 HCVR을 인코딩하는 DNA 분자 및 LCVR을 인코딩하는 DNA 분자를 증폭하는 단계, 및
- [0086] (2) 하나 이상의 코돈을 무작위화함으로써 HCVR을 인코딩하는 DNA 분자 및/또는 LCVR을 인코딩하는 DNA 분자를 무작위화하여, HCVR을 인코딩하는 다수의 DNA 분자 및 LCVR을 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계;
- [0087] (3) 동시에 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 LCVR을 인코딩하는 무작위화된 다수의 DNA 분자 및 HCVR을 인코딩하는 다수의 DNA 분자의 조합을 클로닝하는 단계.
- [0088] 하나의 구현예에서 방법은 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 것을 포함하고, 생성하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0089] (i) 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 여기서 생성은 하기 단계를 포함함:
- [0090] (1) B-세포의 아집단으로부터 mRNA를 분리하는 단계;
- [0091] (2) mRNA를 cDNA로 전사하는 단계;
- [0092] (3) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA로부터 DNA 분자의 제 1 푸울을 증폭하는 단계; 및
- [0093] (4) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA로부터 DNA 분자의 제 2 푸울을 증폭하는 단계;
- [0094] (ii) 동시에 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES

연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 DNA 분자의 제 1 및 제 2 푸울의 DNA 분자의 쌍을 클로닝하는 단계.

- [0095] 하나의 구현예에서 방법은 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 것을 포함하고, 생성하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0096] (i) 하나 또는 둘의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 생성은 하기 단계를 포함함:
- [0097] (1) 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 mRNA 를 분리하는 단계;
- [0098] (2) mRNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0099] (3) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계; 및
- [0100] (4) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0101] (5) 제 1 및/또는 제 2 DNA 분자를 무작위화하여, DNA 분자의 제 1 푸울 및 DNA 분자의 제 2 푸울을 생성하는 단계,
- [0102] (ii) 동시에 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 DNA 분자의 제 1 및 제 2 푸울의 DNA 분자의 쌍을 클로닝하는 단계.
- [0103] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 (2 개의 관심의 항원에 특이적으로 결합함) 를 발현하는 세포의 선별 방법이다:
- [0104] (a) 하기에 의해 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 단계, 여기서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 이중특이적 항체의 중쇄의 변이체를 인코딩함,
- [0105] (i) 단일 이중특이적 항체의 중쇄를 인코딩하는 DNA 로부터 인코딩 핵산 서열의 무작위화에 의해 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 및
- [0106] (ii) 이중특이적 항체의 2 개의 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 다수의 DNA 분자를 클로닝하는 단계, 여기서 EV71-IRES 의 하류에 있는 핵산은 C-말단 막관통 도메인을 갖는 항체 중쇄를 인코딩함;
- [0107] (b) 임의의 항체 중쇄와 함께 항원 결합 자리를 형성할 수 있는 항체 경쇄를 발현하는 진핵 세포의 집단을 렌티바이러스 발현 라이브러리의 일원을 각각 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자의 집단으로 형질도입하는 단계;
- [0108] (c) 진핵 포유류 세포의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체를 표시하는 단계; 및
- [0109] (d) 진핵 세포 집단으로부터 세포를 분리하는 단계, 여기서 세포는 그것의 표면에 표시된 항체가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별됨.
- [0110] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 진핵 세포의 표면에 전장 항체를 표시하기 위한 렌티바이러스 발현 벡터이다.
- [0111] 하나의 구현예에서 발현 벡터는 신호 펩티드, EV71-IRES, 막관통 영역 및, 임의로, 탐지 태그를 인코딩하는 DNA 엘리먼트를 포함한다.
- [0112] 하나의 구현예에서 발현 벡터는 발현 벡터 내로 전장 항체 중쇄 및 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 DNA 분자의 클로닝, 특히 배향 특이적 클로닝을 허용하는 제한 자리를 포함한다.
- [0113] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 본원에서 보고되는 발현 벡터를 포함하는 발현 라이브러리이다.
- [0114] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 본원에서 보고되는 발현 벡터를 포함하는 또는 본원에서 보고되는 발현 라이브러리의 하나 이상의 일원을 포함하는 진핵 세포이다.
- [0115] 본원에서 보고되는 방법에 의해 생성되는 모노클로날 항체는 연구 목적, 진단 목적 또는 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0116] 하나의 구현예에서 진핵 세포는 포유류 세포 또는 효모 세포이다. 하나의 구현예에서 포유류 세포는 CHO 세

포 또는 HEK 세포이다.

- [0117] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 항체 발현 세포의 선별 방법이다:
- [0118] (a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 세포 집단의 각각의 세포는 렌티바이러스 핵산에 의해 인코딩되고, 하나 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 막-결합 전장 항체를 표시함, 및
- [0119] (b) 표시된 막-결합 전장 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계,
- [0120] 여기서 렌티바이러스 바이러스 입자 집단의 각각의 렌티바이러스 바이러스 입자는 막-결합 항체의 발현을 위한 EV71-IRES 를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함함.
- [0121] 하나의 구현예에서 렌티바이러스 바이러스 입자 집단의 렌티바이러스 바이러스 입자의 각각의 바이시스트로닉 발현 카세트는 하나 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 부모 항체의 상이한 변이체를 인코딩한다.
- [0122] 하나의 구현예에서 바이시스트로닉 발현 카세트는 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함한다:
- [0123] - 프로모터,
- [0124] - 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0125] - EV71-IRES,
- [0126] - 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0127] - 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0128] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커.
- [0129] 하나의 구현예에서 진핵 세포 집단의 각각의 세포는 막-결합 전장 항체를 표시하고, 전장 항체를 분비한다.
- [0130] 하나의 구현예에서 진핵 세포 집단의 각각의 세포는 단일 전장 항체를 표시하고 분비한다.
- [0131] 하나의 구현예에서 항체는 이중특이적 항체이다.
- [0132] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터이다:
- [0133] - 프로모터,
- [0134] - 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0135] - EV71-IRES,
- [0136] - 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0137] - 막-결합 항체 및 분비형 항체의 동시 생성을 위한 대안적으로 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0138] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커.
- [0139] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터이다:
- [0140] - 프로모터,
- [0141] - 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0142] - EV71-IRES,
- [0143] - 5'- 에서 3'-방향으로 제 2 전장 항체 중쇄 및 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 제 2 핵산.
- [0144] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 전장 항체를 표시 및 분비 또는 표시하는 진핵 세포의 집단의 생성을 위한 이전 양상에 따른 렌티바이러스 벡터의 용도이다.
- [0145] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 발현 세포의 선별 방법이다:

- [0146] (a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 각각의 렌티 바이러스 바이러스 입자는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하고, 바이시스트로닉 발현 카세트는, EV71-IRES 의 상류에 있는, 홀- 또는 노-좌위에 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산, 및 EV71-IRES 의 하류에 있는, 각각의 다른 좌위에 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 포함하고, 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있고, 진핵 세포는 공통 경쇄를 발현하고, 중쇄 중 하나 또는 둘다는 그들의 C-말단에서 막관통 도메인을 추가로 포함함, 및
- [0147] (b) 표시된 막-결합 전장 이중특이적 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계.
- [0148] 하나의 구현예에서 오직 EV71-IRES 의 하류에 있는 중쇄만이 그것의 C-말단에 막관통 도메인을 포함한다.
- [0149] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 분비 세포의 선별 방법이다:
- [0150] (a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 각각의 렌티 바이러스 바이러스 입자는 분비형 이중특이적 항체를 인코딩하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하고, 바이시스트로닉 발현 카세트는 EV71-IRES 의 상류에 있는 홀- 또는 노-좌위에 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산 및 EV71-IRES 의 하류에 있는 각각의 다른 좌위에 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 포함하고, 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있고, 진핵 세포는 공통 경쇄를 발현함,
- [0151] (b) 분비된 전장 이중특이적 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계.
- [0152] 하나의 구현예에서 방법은 제 1 단계로서 하기를 포함한다:
- [0153] - 관심의 항원으로 트랜스제닉 동물을 면역화하는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함.
- [0154] 하나의 구현예에서 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0155] - FACS 에 의한 벌크 소팅 (sorting) 에 의해 면역화된 실험 동물의 B-세포를 선별하는 단계.
- [0156] 하나의 구현예에서 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0157] - 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝 (directed cloning) 을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계.
- [0158] 하나의 구현예에서 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0159] - EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 을 수행하고, 벡터의 제한 절단 및 재결합에 의해 제 1 중쇄의 막관통-도메인을 제거하여 막관통-도메인 없이 제 2 서플 벡터 내로 클로닝하는 단계.
- [0160] 본원에서 보고되는 모든 구현예는 본 발명의 모든 양상을 참조할 것이고, 임의의 가능한 조합으로 조합될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0161] 본원에서, 항체 합성 및 가공 (폴딩, 디설피드 결합 형성, 글리코실화 등) 에 통상 관여하는 모든 세포 성분들이 생리적 형태 및 농도로 입수가능함을 보장하는, 그것의 자연 환경, 즉 포유류 세포의 분비 경로에서의, 전장 항체의 발현을 사용하는 선별 방법이 보고된다.

[0162] 일반적 양상

- [0163] 당업자에게 알려진 바와 같이 재조합 DNA 기술의 사용은 핵산 및/또는 폴리펩티드의 수많은 유도체의 생성을 가능케 한다. 그러한 유도체는, 예를 들어, 하나의 개별 또는 여러 위치에서 치환, 변경, 교환, 결실, 또는 삽입에 의해 수식될 수 있다. 수식 또는 유도체화는, 예를 들어, 자리 지정 돌연변이유발을 이용하여 수행될 수 있다. 그러한 수식은 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있다 (예를 들어 Sambrook, J. 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999) 참조). 재조합 기술의 사용은 당업자가 다양한 숙주 세포를 이중 핵산(들)로 형질전환하는 것을 가능케 한다. 상이한 세포의 전사 및 번역, 즉 발현, 기구는 동일한 엘리먼트를 사용하지만, 상이한 종에 속하는 세포는 특히 소위 코돈 사용법이 상이할 수 있다. 그에 따라 동일한 폴리펩티드 (아미노산 서열에 관하여) 가

상이한 핵산(들)에 의해 인코딩될 수 있다. 또한, 유전자 코드의 축퇴로 인해, 상이한 핵산이 동일한 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다.

[0164] 재조합 DNA 기술의 사용은 핵산 및/또는 폴리펩티드의 수많은 유도체의 생성을 가능케 한다. 그러한 유도체는, 예를 들어, 하나의 개별 또는 여러 위치에서 치환, 변경, 교환, 결실, 또는 삽입에 의해 수식될 수 있다. 수식 또는 유도체화는, 예를 들어, 자리 지정 돌연변이유발을 이용하여 수행될 수 있다. 그러한 수식은 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있다 (예를 들어 Sambrook, J. 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999); Hames, B.D., and Higgins, S.J., Nucleic acid hybridization - a practical approach, IRL Press, Oxford, England (1985) 참조).

[0165] 재조합 기술의 사용은 당업자가 다양한 숙주 세포를 이중 핵산(들)로 형질전환하는 것을 가능케 한다. 상이한 세포의 전사 및 번역, 즉 발현, 기구는 동일한 엘리먼트를 사용하지만, 상이한 종에 속하는 세포는 특히 소위 코돈 사용법이 상이할 수 있다. 그에 따라 동일한 폴리펩티드 (아미노산 서열에 관하여) 가 상이한 핵산(들)에 의해 인코딩될 수 있다. 또한, 유전자 코드의 축퇴로 인해, 상이한 핵산이 동일한 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다.

[0166] **정의**

[0167] "친화도 성숙된" 항체는, 변경을 보유하지 않는 부모 항체와 비교되게, 하나 이상의 과가변 영역 (HVR) 내에 항원에 대한 항체의 친화도에 개선을 초래하는 하나 이상의 변경을 보유하는 항체를 언급한다.

[0168] 본원에서 용어 "항체" 는 가장 넓은 의미로 사용되며, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 및 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.

[0169] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 출처 또는 종에서 유래하지만, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 출처 또는 종에서 유래하는 항체를 언급한다.

[0170] 항체의 "클래스" 는 그것의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 언급한다. 항체의 5 개의 주요 클래스 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 이 존재하고, 이들 중 여럿은 서브클래스 (아이스타입), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂ 로 추가로 분류될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 호칭된다.

[0171] 본원에서 사용되는 용어 "발현" 은 세포 내에서 일어나는 전사 및/또는 번역 과정을 언급한다. 세포 내에서 관심의 핵산 서열의 전사의 수준은 세포 내에 존재하는 상응하는 mRNA 의 양에 기초하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 관심의 서열로부터 전사된 mRNA 는 RT-PCR 에 의해 또는 노던 혼성화 (Northern hybridization) 에 의해 정량화될 수 있다 (상기 Sambrook 등, 1999 참조). 관심의 핵산에 의해 인코딩되는 폴리펩티드는 다양한 방법에 의해, 예를 들어 ELISA 에 의해, 폴리펩티드의 생물학적 활성에 대해 검정함으로써, 또는 그러한 활성으로부터 독립적인 검정, 예컨대 폴리펩티드를 인식하고 결합하는 면역글로불린을 사용하는 웨스턴 블롯팅 (Western blotting) 또는 방사선면역검정법을 이용함으로써 정량화될 수 있다 (상기 Sambrook 등, 1999 참조).

[0172] "발현 카세트" 는, 세포 내에서 적어도 함유된 핵산의 발현을 위한, 필수적 조절 엘리먼트, 예컨대 프로모터 및 폴리아데닐화 자리를 함유하는 구축물을 언급한다.

[0173] "발현 벡터" 는 숙주 세포 내에서 포함된 구조 유전자(들)의 발현을 위한 모든 요구되는 엘리먼트를 제공하는 핵산이다. 전형적으로, 발현 플라스미드는, 복제 기점, 및 선별 마커를 포함하는, 예를 들어 대장균 (E. coli) 에 대한, 원핵생물 플라스미드 증식 유닛, 진핵생물 선별 마커, 및 프로모터, 구조 유전자, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 전사 종결자를 각각 포함하는 관심의 구조 유전자(들)의 발현을 위한 하나 이상의 발현 카세트를 포함한다. 유전자 발현은 보통 프로모터의 제어 하에 놓여지고, 그러한 구조 유전자는 프로모터에 "작동가능하게 연결되어 있다" 고 말해진다. 유사하게, 조절 엘리먼트가 코어 프로모터의 활성을 조정하는 경우 조절 엘리먼트 및 코어 프로모터는 작동가능하게 연결되어 있다.

[0174] 본원에서 용어 "Fc 영역" 은 불변 영역의 일부 이상을 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 그 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 에서부터, 또는 Pro230 에서부터, 중쇄의 카르복시-말단까지 이른다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 라이신 (Lys447) 은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 다르게 명시되지 않으면, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 번호지정은 Kabat, E.A. 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

(1991), NIH Publication 91-3242 에 기재된, EU 인덱스로도 호칭되는, EU 번호지정 시스템에 따른다.

- [0175] 용어 "골격" 또는 "FR" 은 과가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 언급한다. 가변 도메인의 FR 은 일반적으로 4 개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4 로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL) 에서 다음 서열로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0176] 용어 "전장 항체", "온전한 항체", 및 "전체 항체" 는 본원에서 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에 정의된 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 언급할 때 호환되게 사용된다.
- [0177] "유전자" 는 예를 들어 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있는 염색체 또는 플라스미드의 분절인 핵산을 나타낸다. 코딩 영역, 즉 구조 유전자 외에, 유전자는 기타 기능적 엘리먼트 예를 들어 신호 서열, 프로모터(들), 인트론, 및/또는 종결자를 포함한다.
- [0178] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주", 및 "숙주 세포 배양물" 은 호환되게 사용되고, 외인성 핵산이 내부에 도입된 세포를 언급하며, 그러한 세포의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포" 를 포함하며, 1차 형질전환된 세포 및 계대수에 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 부모 세포와 핵산 내용에서 완전히 일치하지 않을 수 있으며, 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래의 형질전환된 세포에서 스크리닝 또는 선별된 바와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 여기에 포함된다.
- [0179] "인간 항체" 는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 기타 인간 항체-인코딩 서열을 이용하는 비-인간 출처에서 유래하는 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다.
- [0180] "인간화" 항체는 비-인간 HVR 로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR 로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 언급한다. 특정 구현예에서, 인간화 항체는 실질적으로 모든 하나 이상, 전형적으로 2 개의, 가변 도메인을 포함할 것이며, 이때 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR) 은 비-인간 항체의 HVR 에 해당하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 은 인간 항체의 FR 에 해당한다. 인간화 항체는 인간 항체에서 유래하는 항체 불변 영역의 일부 이상을 임의로 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어, 비-인간 항체의 "인간화 형태" 는 인간화를 겪은 항체를 언급한다.
- [0181] 본원에서 사용되는 용어 "과가변 영역" 또는 "HVR" 은 서열에서 과가변이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("과가변 루프") 를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 각각 언급한다. 일반적으로, 천연 4-사슬 항체는 6 개의 HVR 을 포함한다; VH 에 3 개 (H1, H2, H3), 및 VL 에 3 개 (L1, L2, L3). HVR 은 일반적으로 과가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역 영역" (CDR) 으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 최고 서열 가변성을 갖고/거나 항원 인식에 관여한다. 예시적 과가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3) 에서 발생한다 (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917). 예시적 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3) 은 L1 의 아미노산 잔기 24-34, L2 의 50-56, L3 의 89-97, H1 의 31-35B, H2 의 50-65, 및 H3 의 95-102 에서 발생한다 (Kabat, E.A. 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242). VH 에서의 CDR1 을 제외하고, CDR 은 과가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 일반적으로 포함한다. CDR 은 항원과 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기", 또는 "SDR" 을 또한 포함한다. SDR 은 단축된-CDR, 또는 a-CDR 로 호칭되는 CDR 의 영역 내에 함유되어 있다. 예시적 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3) 은 L1 의 아미노산 잔기 31-34, L2 의 50-55, L3 의 89-96, H1 의 31-35B, H2 의 50-58, 및 H3 의 95-102 에서 발생한다 (Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633). 다르게 언급되지 않으면, HVR 잔기 및 가변 도메인 내의 기타 잔기 (예를 들어, FR 잔기) 는 본원에서 상기 Kabat 등에 따라 번호지정된다.
- [0182] "내부 리보솜 진입 자리" 또는 "IRES" 는 IRES 의 5' 에 있는 유전자로부터 독립적인 번역 개시를 기능적으로 촉진하고 동물 세포 내에서 단일 전사물로부터 2 개의 시스트론 (오픈 리딩 프레임) 이 번역되는 것을 허용하는 서열을 기술한다. IRES 는 그것의 바로 하류 (하류는 본원에서 3' 와 호환되게 사용됨) 에 있는 오픈 리딩 프레임의 번역을 위한 독립적 리보솜 진입 자리를 제공한다. 다시시스트론성, 즉 mRNA 로부터 순차적으로 번역되는 여러 개의 상이한 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는 박테리아 mRNA 와는 달리, 동물 세포의 대부분의 mRNA 는 단일시스트론성이고 오직 하나의 단백질의 합성에 대해 코딩한다. 진핵 세포 내의 다시시스트론성 전사물의 경우, 번역은 5' 끝 번역 개시 자리로부터 개시하여 제 1 종결 코돈에서 종결할 것이고, 전사물은 리보솜으

로부터 방출되어, mRNA 내의 첫번째 인코딩된 폴리펩티드만의 번역을 초래할 것이다. 진핵 세포에서, 전사물 내의 두번째 또는 후속 오픈 리딩 프레임에 작동가능하게 연결된 IRES 를 갖는 다시스트론성 전사물은 하류 오픈 리딩 프레임의 순차적 번역을 허용하여 동일한 전사물에 의해 인코딩되는 둘 이상의 폴리펩티드를 생성한다. 벡터 구축에서 IRES 엘리먼트의 사용은 이전에 기재된 바 있으며, 예를 들어, Pelletier, J. 등, Nature 334 (1988) 320-325; Jang, S.K. 등, J. Virol. 63 (1989) 1651-1660; Davies, M.V. 등, J. Virol. 66 (1992) 1924-1932; Adam, M.A. 등, J. Virol. 65 (1991) 4985-4990; Morgan, R.A. 등 Nucl. Acids Res. 20 (1992) 1293-1299; Sugimoto, Y. 등, Biotechnology 12 (1994) 694-698; Ramesh, N. 등, Nucl. Acids Res. 24 (1996) 2697-2700; 및 Mosser, D.D. 등, BioTechniques 22 (1997) 150-152) 을 참조한다.

[0183] 본원에 사용되는 용어 "모노클로날 항체" 는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 획득된 항체를 언급하며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체들은 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합하며, 예를 들어, 자연 발생적 돌연변이를 함유하거나 또는 모노클로날 항체 제제의 생성 동안 발생하는 일반적으로 소량으로 존재하는 가능한 변이체 항체는 제외한다. 전형적으로 상이한 결정인자 (에피토프) 를 향하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자를 향한다. 따라서, "모노클로날" 이란 수식어는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 획득되는 항체의 특질을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는, 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-표시 방법, 및 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 (transgenic) 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 모노클로날 항체를 제조하기 위한 상기 방법 및 기타 예시적 방법들은 본원에 기재되어 있다.

[0184] 본원에서 사용되는 "핵산" 은 개별 뉴클레오타이드 (또한 염기로 호칭됨) a, c, g, 및 t (또는 RNA 에서 u) 로 이루어지는 중합체성 분자, 예를 들어 DNA, RNA, 또는 그의 변형물을 언급한다. 이러한 폴리뉴클레오타이드 분자는 자연 발생적 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 합성 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 하나 이상의 자연 발생적 폴리뉴클레오타이드 분자와 하나 이상의 합성 폴리뉴클레오타이드 분자의 조합일 수 있다. 또한 이러한 정의에 포함되는 것은 하나 이상의 뉴클레오타이드가 변화된 (예를 들어 돌연변이유발에 의해), 결실된, 또는 부가된 자연 발생적 폴리뉴클레오타이드 분자이다. 핵산은 단리되거나, 또다른 핵산 내에, 예를 들어 발현 카세트, 플라스미드, 또는 숙주 세포의 염색체 내에 편입될 수 있다. 핵산은 마찬가지로 개별 뉴클레오타이드로 이루어지는 그것의 핵산 서열에 의해 특징지어진다.

[0185] 예를 들어 폴리펩티드의, 아미노산 서열을 이러한 아미노산 서열을 인코딩하는 상응하는 핵산 서열로 전환하는 절차 및 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 그러므로, 핵산은 개별 뉴클레오타이드로 이루어지는 그것의 핵산 서열에 의해 그리고 마찬가지로 그에 의해 인코딩되는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 의해 특징지어진다.

[0186] 본원에서 사용되는 "핵산" 은 또한 재조합 생산될 수 있는 폴리펩티드를 인코딩하는 자연 발생적 또는 일부 또는 완전 비-자연 발생적 핵산을 언급한다. 핵산은 화학적 방법에 의해 단리 또는 합성되는 DNA-조각으로 구성될 수 있다. 핵산은 또다른 핵산 내에, 예를 들어 발현 플라스미드 또는 진핵생물 숙주 세포의 게놈/염색체 내에 편입될 수 있다. 플라스미드는 서열 및 발현 플라스미드를 포함한다. 전형적으로, 플라스미드는 각각 원핵생물 내에서 플라스미드의 복제 및 선별을 위한, 복제 기점 (예를 들어 ColE1 복제 기점) 및 선별 마커 (예를 들어 암피실린 또는 테트라사이클린 저항성 유전자) 를 포함하는 원핵생물 증식 유닛을 또한 포함할 것이다.

[0187] "작동가능하게 연결된" 은 둘 이상의 구성요소의 병렬배치를 언급하며, 여기서 그렇게 기술된 성분들은 그들이 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서가 시스 위치에서 연결된 서열의 전사를 제어 또는 조정하는 작용을 하는 경우 프로모터 및/또는 인핸서는 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 일반적으로, 그러나 비필수적으로, "작동가능하게 연결된" DNA 서열은 인접해 있고, 2개의 단백질 인코딩 영역 예컨대 분비형 리더 및 폴리펩티드를 연결할 필요가 있는 경우, 인접해 있고 (리딩) 프레임 내에 있다. 그러나, 작동가능하게 연결된 프로모터는 일반적으로 코딩 서열의 상류에 위치하지만, 그것과 반드시 인접해 있을 필요는 없다. 인핸서는 인접해 있을 필요가 없다. 인핸서가 코딩 서열을 전사를 증가시키는 경우 인핸서는 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 작동가능하게 연결된 인핸서는 코딩 서열의 상류에, 내부에 또는 하류에 그리고 프로모터로부터 상당히 먼 곳에 위치할 수 있다. 폴리아데닐화 자리가 코딩 서열의 하류 말단에 위치하여 코딩 서열을 통해 폴리아데닐화 서열까지 진행되는 경우 폴리아데닐화 자리는 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 번역 종결 코돈이 코딩 서열의 하류 말단 (3' 말단) 에 위치하여 번역이 코딩 서열을 통해 종결 코돈까지 진행하고 거기에서 종결하는 경우 번역 종결 코돈은

엑손 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 연결은 당업계에 공지된 재조합 방법에 의해, 예를 들어, PCR 기법을 사용하여 및/또는 편리한 제한 자리에서의 절찰에 의해 달성된다. 편리한 제한 자리가 존재하지 않는 경우, 통상의 관습에 따라 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 사용된다.

[0188] "다시스트론성 전사 유닛" 은 1 개 초과와 구조 유전자가 동일한 프로모터의 제어 하에 놓인 전사 유닛이다.

[0189] 본원에서 사용되는 용어 "폴리아데닐화 신호" (polyA 신호) 는 특정 핵산 서열 분절의 일차 전사물의 절단 및 폴리아데닐화를 유도하는데 사용되는 핵산 서열을 나타낸다. 폴리아데닐화 신호를 포함하는 3' 비번역 영역은 SV40 에서 유래하는 폴리아데닐화 신호를 포함하는 3' 비번역 영역, 소 성장 호르몬 (bGH) 에 대한 유전자, 면역글로불린 유전자, 및 티미딘 키나제 유전자 (tk, 예를 들어 단순 포진 티미딘 키나제 폴리아데닐화 신호) 로 이루어지는 군으로부터 선별될 수 있다.

[0190] "프로모터" 는 그것이 작동가능하게 연결되어 있는 유전자/구조 유전자 또는 핵산 서열의 전사를 제어하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 언급한다. 프로모터는 RNA 폴리머라제 결합 및 전사 개시를 위한 신호를 포함한다.

사용되는 프로모터는 선택된 서열의 발현이 고려되는 숙주 세포의 세포 유형에서 기능을 발휘할 것이다. 여러가지 상이한 출처로부터의 구성성 (constitutive), 유도성 (inducible) 및 억제성 (repressible) 프로모터를 포함하는 다수의 프로모터가 당업계에 잘 공지되어 있고 (진뱅크 (BenBank) 와 같은 데이터베이스에서 확인할 수 있고), 클로닝된 폴리뉴클레오타이드로서, 또는 클로닝된 폴리뉴클레오타이드 내에 존재하는 엘리먼트로서 입수가능하다 (예를 들어, ATCC 와 같은 기탁기관 뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별 공급처로부터).

[0191] "프로모터"는 구조 유전자의 전사를 유도하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 전형적으로, 프로모터는 구조 유전자의 전사 시작 자리에 인접한, 유전자의 5' 비-코딩 또는 비번역 영역에 위치한다. 전사의 개시에서 기능을 발휘하는 프로모터 내의 서열 엘리먼트는 종종 공통 뉴클레오타이드 서열을 특징으로 한다. 이들 프로모터 엘리먼트는 RNA 폴리머라제 결합 자리, TATA 서열, CAAT 서열, 분화-특이적 엘리먼트 (DSE; McGehee, R.E. 등, Mol. Endocrinol. 7 (1993) 551), 시클릭 AMP 응답 엘리먼트 (CRE), 혈청 응답 엘리먼트 (SRE; Treisman, R., Seminars in Cancer Biol. 1 (1990) 47), 글루코코티코이드 응답 엘리먼트 (GRE), 및 기타 전사 인자, 예컨대 CRE/ATF (O'Reilly, M.A. 등, J. Biol. Chem. 267 (1992) 19938), AP2 (Ye, J. 등, J. Biol. Chem. 269 (1994) 25728), SP1, cAMP 응답 엘리먼트 결합 단백질 (CREB; Loeken, M.R., Gene Expr. 3 (1993) 253) 및 옥타머 인자 (일반적으로, Watson 등, (eds.), Molecular Biology of the Gene, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. (1987)), 및 Lemaigre, F.P. and Rousseau, G.G., Biochem. J. 303 (1994) 1-14 참조) 에 대한 결합 자리를 포함한다. 프로모터가 유도성 프로모터인 경우, 전사 속도는 유도제에 응답하여 증가한다. 대조적으로, 프로모터가 구성성 프로모터인 경우 전사 속도는 유도제에 의해 조절되지 않는다. 억제성 프로모터도 공지되어 있다. 예를 들어, c-fos 프로모터는 성장 호르몬이 세포 표면 위의 그것의 수용체에 결합되었을 때 특이적으로 활성화된다. 테트라사이클린 (tet) 에 의해 조절되는 발현은 예를 들어, CMV 프로모터에 이어서 2 개의 Tet-오퍼레이터 (operator) 자리로 이루어지는 인공 하이브리드 프로모터에 의해 달성될 수 있다. Tet-리프레서는 2 개의 Tet-오퍼레이터 자리에 결합하여 전사를 차단한다. 유도제인 테트라사이클린을 첨가하였을 때, Tet-리프레서가 Tet-오퍼레이터 자리로부터 방출되고 전사가 진행된다 (Gossen, M. and Bujard, H., PNAS 89 (1992) 5547-5551). 메탈로티오네인 및 열 충격 프로모터를 포함하는 다른 유도성 프로모터에 대해서는 예를 들어, 상기 Sambrook 등의 문헌 및 Gossen 등, Curr. Opin. Biotech. 5 (1994) 516-520 을 참조한다. 진핵생물 프로모터 중에서 고도 발현을 위한 강력한 프로모터로서 확인된 진핵생물 프로모터는 SV40 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, 라우스 육종 바이러스 장말단 반복부, 차이니스 햄스터 연장 인자 1 알파 (CHEF-1, 예를 들어, US 5,888,809 참조), 인간 EF-1 알파, 유비퀴틴 및 인간 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터 (CMV IE) 이다.

[0192] "프로모터" 는 구성성 또는 유도성일 수 있다. 프로모터만을 사용하였을 때 얻어지는 발현 수준을 증가시키기 위해 프로모터와 함께 인핸서 (enhancer) (즉, 프로모터에 작용하여 전사를 증가시키는 시스-작용 DNA 엘리먼트) 가 작용할 필요가 있을 수 있고, 상기 인핸서는 전사 조절 엘리먼트로서 포함될 수 있다. 종종, 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 인핸서 서열도 포함할 것이다 (예를 들어, CMV 또는 SV40).

[0193] 용어 "전사 종결자" 는 RNA 폴리머라제에게 mRNA 합성 종결 신호를 제공하는 50-750 염기쌍 길이의 DNA 서열을 나타낸다. 특히 강력한 프로모터를 사용하는 경우 RNA 폴리머라제가 통과해서 해독하는 것을 방지하기 위해 발현 카세트의 3' 말단에 매우 효율적인 (강력한) 종결자가 권장된다. 비효율적인 전사 종결자는 오페론-유사 mRNA 의 형성을 초래할 수 있으며, 이는 원치 않는, 예를 들어 플라스미드-코딩된, 유전자 발현의 원인이 될

수 있다.

- [0194] 본 발명의 범위 내에서, 트랜스펙팅된 세포는 당업계에 공지된 실질적으로 임의의 종류의 트랜스펙션 방법으로 취득될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 전기천공법 또는 미세주입법을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 대안적으로, 리포펙션 시약 예컨대 FuGENE 6 (Roche Diagnostics GmbH, Germany), X-tremeGENE (Roche Diagnostics GmbH, Germany), 및 LipofectAmine (Invitrogen Corp., USA) 이 사용될 수 있다. 더욱 대안적으로, 핵산은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 아데노-연관 바이러스에 기초하는 적당한 바이러스 벡터 시스템에 의해 세포 내로 도입될 수 있다 (Singer, O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 5313-5314).
- [0195] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인" 은 항체를 항원에 결합시키는데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 언급한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 (각각 VH 및 VL) 은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4 개의 보존된 골격 영역 (FR) 및 3 개의 과가변 영역 (HVR) 을 포함한다 (예를 들어, Kindt, T.J. 등, Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y.(2007), page 91 참조). 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 제공하기에 충분할 수 있다. 게다가, 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 특정 항원에 결합하는 항체가 단리될 수 있다 (예를 들어, Portolano, S. 등, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. 등, Nature 352 (1991) 624-628 참조).
- [0196] 용어 "벡터" 는 그것이 연결되는 또다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 언급한다. 상기 용어는 자가-복제 핵산 구조로서의 벡터 뿐만 아니라, 그것이 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 편입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 그것이 작동가능하게 연결되어 있는 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 그러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터" 로 언급된다.
- [0197] 용어 "동물" 은 항체를 생성할 수 있는 면역계를 포함하는 유기체를 나타낸다. 하나의 구현예에서 동물은 어류, 양서류, 조류, 파충류, 및 포유동물, 특히 우제목, 설치류 및 영장류로부터 선택된다. 하나의 구현예에서 동물은 양, 엘크, 사슴, 당나귀, 물 사슴, 밍크, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 고양이, 랫트, 햄스터, 기니피그, 및 마우스로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 하나의 구현예에서 동물은 마우스, 랫트 또는, 영장류이다. 하나의 구현예에서 동물은 비-인간 영장류 또는 인간이다. 하나의 구현예에서 동물은 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스제닉 동물이다.
- [0198] 경쇄 가변 영역 (LCVR) 은 각각의 동물의 생식선 유전자에서 유래하는 재배열된 핵산 분자에 의해 인코딩된다. 경쇄 가변 영역은 카파 LCVR 또는 람다 LCVR 이다.
- [0199] 하나의 구현예에서 경쇄 가변 영역은 인간 카파 LCVR 이다. 하나의 구현예에서 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 12 ~ 18 중 하나 이상과 SEQ ID NO: 19 의 프라이머 조합, 및 실시예 11 에 기재된 PCR 조건을 사용하여 인간 B-세포 또는 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스제닉 동물의 B-세포로부터 증폭될 수 있는 핵산 (DNA) 에 의해 인코딩되는 경쇄 가변 영역이다.
- [0200] 하나의 구현예에서 경쇄 가변 영역은 인간 람다 LCVR 이다. 하나의 구현예에서 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 20 ~ 27 중 하나 이상과 SEQ ID NO: 28 의 프라이머 조합, 및 실시예 11 에 기재된 PCR 조건을 사용하여 인간 B-세포 또는 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스제닉 동물의 B-세포로부터 증폭될 수 있는 핵산 (DNA) 에 의해 인코딩되는 가변 영역이다.
- [0201] 중쇄 가변 영역 (HCVR) 은 각각의 동물의 생식선 유전자에서 유래하는 재배열된 핵산 분자에 의해 인코딩된다. 하나의 구현예에서 중쇄 가변 영역은 인간 중쇄 가변 영역이다. 하나의 구현예에서 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 1 ~ 4 중 하나 이상과 SEQ ID NO: 5 의 프라이머 조합, 및 실시예 11 에 기재된 PCR 조건을 사용하여 인간 B-세포 또는 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스제닉 동물의 B-세포로부터 증폭될 수 있는 핵산 (DNA) 에 의해 인코딩되는 중쇄 가변 영역이다.
- [0202] 중쇄 가변 영역 (HCVR) 은 각각의 동물의 생식선 유전자에서 유래하는 재배열된 핵산 분자에 의해 인코딩된다. 하나의 구현예에서 중쇄 가변 영역은 인간 중쇄 가변 영역이다. 하나의 구현예에서 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 6 ~ 10 중 하나 이상과 SEQ ID NO: 11 의 프라이머 조합, 및 실시예 11 에 기재된 PCR 조건을 사용하여 인간 B-세포 또는 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스제닉 동물의 B-세포로부터 증폭될 수 있는 핵산 (DNA) 에 의해 인코딩되는 중쇄 가변 영역이다.

- [0203] **항체**
- [0204] 제조합 모노클로날 항체의 제조 방법이 본원에서 제공된다. 항체는 단일특이적 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 1 가 항체, 및 다가 항체 (예를 들어 2 가 항체) 와 같은 다양한 구조를 가질 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0205] 특정 구현예에서, 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체가, 예를 들어, US 4,816,567; 및 Morrison, S.L. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855 에 기재되어 있다. 하나의 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이에서 유래하는 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 클래스 또는 서브클래스가 부모 항체의 클래스 또는 서브클래스로부터 변환된 "클래스 전환된" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 조각을 포함한다.
- [0206] 특정 구현예에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 인간화되어 인간에 대한 면역원성은 감소되지만, 여전히 부모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유한다. 일반적으로, 인간화 항체는 내부의 HVR, 예를 들어, CDR (또는 그의 일부) 은 비-인간 항체에서 유래하고, FR (또는 그의 일부) 은 인간 항체 서열에서 유래하는 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 임의로 인간 불변 영역의 일부 이상을 또한 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화성을 회복 또는 개선하도록, 인간화 항체 내의 일부 FR 잔기가 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체) 로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.
- [0207] 인간화 항체 및 그의 제조 방법이, 예를 들어, Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 에서 리뷰되어 있고, 또한 예를 들어, Riechmann, I. 등, Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; US 5,821,337, US 7,527,791, US 6,982,321, 및 US 7,087,409; Kashmiri, S.V. 등, Methods 36 (2005) 25-34 (SDR (a-CDR) 그래프팅을 기재함); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 ("재포장 (resurfacing)" 을 기재함); Dall'Acqua, W.F. 등, Methods 36 (2005) 43-60 ("FR 서플링" 을 기재함); 및 Osbourn, J. 등, Methods 36 (2005) 61-68 및 Klimka, A. 등, Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (FR 서플링에 대한 "인도되는 선별 (guided selection)" 접근을 기재함) 에 기재되어 있다.
- [0208] 인간화에 사용될 수 있는 인간 골격 영역은 하기를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다: "최적-적합 (best-fit)" 방법을 사용하여 선별된 골격 영역 (예를 들어, Sims, M.J. 등, J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 서브그룹의 인간 항체의 공통 서열에서 유래하는 골격 영역 (예를 들어, Carter, P. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; 및 Presta, L.G. 등, J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632 참조); 인간 성숙 (체세포 돌연변이된) 골격 영역 또는 인간 생식선 골격 영역 (예를 들어, Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 참조); 및 스크리닝 FR 라이브러리에서 유래하는 골격 영역 (예를 들어, Baca, M. 등, J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684 및 Rosok, M.J. 등, J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618 참조).
- [0209] 특정 구현예에서 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374 및 Lonberg, N., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 450-459 에 일반적으로 기술되어 있다.
- [0210] 인간 항체는 항원 공격에 응답하여 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 그러한 동물은 전형적으로 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하며, 이러한 인간 면역글로불린 유전자좌는 내인성 면역글로불린 유전자좌를 대신하거나, 염색체외에 존재하거나, 동물의 염색체 내로 무작위로 편입되어 있다. 그러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 면역글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화되었다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하기 위한 방법의 리뷰에 대해, Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125 및 또한, 예를 들어, US 6,075,181 및 US 6,150,584 (XENOMOUSE™ 기술을 기재함); US 5,770,429 (HuMab® 기술을 기재함); US 7,041,870 (K-M MOUSE® 기술을 기재함), 및 US 2007/0061900 (VelociMouse® 기술을 기재함) 을 참조한다. 그러한 동물에 의해 생성된 온전한 항체로부터의 인간 가변 영역은, 예를 들어, 상이한 인간 불변 영역과 조합함으로써 추가로 수식될 수 있다.
- [0211] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인

간 미엘로마 및 마우스-인간 헤테로미엘로마 세포주가 기재된 바 있다 (예를 들어, Kozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; 및 Boerner, P. 등, J. Immunol. 147 (1991) 86-95 참조). 인간 B-세포 하이브리도마 기술에 의해 생성된 인간 항체도 또한 Li, J. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562 에 기술되어 있다. 부가적 방법은, 예를 들어, US 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 제조를 기재함) 및 Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (인간-인간 하이브리도마를 기재함) 에 기재된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (Trioma technology) 은 또한 Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937 및 Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191 에 기재되어 있다.

[0212] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 표지 라이브러리로부터 선별된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 그러한 가변 도메인 서열은 그 후 원하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선별하기 위한 기술이 아래 기재되어 있다.

[0213] 항체는 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대한 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 표지 라이브러리를 생성하고 상기 라이브러리를 원하는 결합 특성을 보유하는 항체에 대해 스크리닝하기 위한 다양한 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 방법은, 예를 들어, Hoogenboom, H.R. 등, Methods Mol. Biol. 178 (2002) 1-37 에서 리뷰되어 있고, 또한 예를 들어, McCafferty, J. 등, Nature 348 (1990) 552-554; Clackson, T. 등, Nature 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. 등, J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. and Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. 등, J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. 등, J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472; 및 Lee, C.V. 등, J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132 에 기재되어 있다.

[0214] 특정 파지 표지 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리가 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 에 의해 별도로 클로닝되고, 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합되고, 이것이 그 후 Winter, G. 등, Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455 에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 조각을 단일-사슬 Fv (scFv) 조각으로서 또는 Fab 조각으로서 표시한다. 면역화된 공급원으로부터 얻은 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 높은-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, Griffiths, A.D. 등, EMBO J. 12 (1993) 725-734 에 기재된 바와 같이 나이브 (naive) 레퍼토리를 클로닝하여 (예를 들어, 인간으로부터) 임의의 면역화 없이 광범위한 비-자가 및 또한 자가 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 마지막으로, Hoogenboom, H.R. and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388 에 기재된 바와 같이 나이브 라이브러리는 또한 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 분절을 클로닝하고, 고도 가변 CDR3 영역을 인코딩하고 시험관내 재배열을 달성하기 위해 랜덤 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 합성적으로 제조될 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 공개공보는, 예를 들어, US 5,750,373, 및 US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936, 및 US 2009/0002360 을 포함한다.

[0215] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 조각은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 조각으로 간주된다.

[0216] 특정 구현예에서, 본원에서 제공되는 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 2 개 이상의 상이한 자리에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 구현예에서, 결합 특이성 중 하나는 제 1 항원에 대한 것이고, 다른 하나는 상이한 제 2 항원에 대한 것이다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 동일한 항원의 2 개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 항원을 발현하는 세포로 세포독성제를 국소화시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 조각으로서 제조될 수 있다.

[0217] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2 개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 동시-발현 (Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, 및 Traunecker, A. 등, EMBO J. 10 (1991) 3655-3659 참조), 및 "넵-인-홀 (knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, US 5,731,168 참조) 을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다중특이적 항체는 또한, 항체 Fc-이종이합체 분자를 제조하기 위한 정전 스티어링 (steering) 효과를 조작하고 (WO 2009/089004); 2 개 이상의 항체 또는 조각을 가교결합시키고

(예를 들어, US 4,676,980, 및 Brennan, M. 등, Science 229 (1985) 81-83 참조); 류신 지퍼를 사용하여 이중 특이적 항체를 생성하고 (예를 들어, Kostelny, S.A. 등, J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553 참조); 이중 특이적 항체 조각을 제조하기 위한 "다이아바디" 기술을 사용하고 (예를 들어, Holliger, P. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448 참조); 단일-사슬 Fv (sFv) 이합체를 사용하고 (예를 들어 Gruber, M. 등, J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374 참조); 예를 들어, Tutt, A. 등, J. Immunol. 147 (1991) 60-69 에 기재된 바와 같이 삼중 특이적 항체를 제조함으로써 제조될 수 있다.

[0218] "옥토퍼스 (Octopus) 항체" 를 포함하여, 3 개 이상의 기능성 항원 결합 자리를 갖는 조작된 항체도 또한 본원에 포함된다 (예를 들어 US 2006/0025576 참조).

[0219] 항체 또는 조각은 또한 WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792, 또는 WO 2010/145793 에 기재된 바와 같은 다중 특이적 항체일 수 있다.

[0220] **방법**

[0221] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 항체가 글리코실화되는 정도를 변경, 즉 증가 또는 감소시키는데 사용된다.

[0222] 항체가 Fc-영역을 포함하는 경우, 그에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유류 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로, 일반적으로 Fc-영역의 CH2 도메인의 Asn297 에 N-연결에 의해 부착되어 있는 분지형 바이안테너리 (biantennary) 올리고당을 포함한다 (예를 들어, Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32 참조). 올리고당은 다양한 탄수화물, 예를 들어, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산, 뿐만 아니라, 바이안테너리 올리고당 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc 에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 발명의 항체 중 올리고당의 수식은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 창조하기 위해 수행될 수 있다

[0223] 하나의 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 Fc-영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스를 결여하는 탄수화물 구조를 갖는 항체의 생산을 초래한다. 예를 들어, 그러한 항체 중 푸코스의 양은 1 % ~ 80 %, 1 % ~ 65 %, 5 % ~ 65 % 또는 20 % ~ 40 % 일 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들어 WO 2008/077546 에 기재된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분광분석법에 의해 측정되는 Asn 297 에 부착된 모든 당구조 (예를 들어 복합, 하이브리드 및 하이 만노스 구조) 의 합계에 대한 Asn297 에서의 당 사슬 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297 은 Fc-영역 내의 위치 297 (Fc-영역 잔기의 Kabat 에 따른 EU 번호지정) 주위에 위치하는 아스파라긴 잔기를 나타낸다; 그러나, Asn297 은 또한 항체 내의 작은 서열 변이로 인해 위치 297 의 상류 또는 하류의 약 ± 3 아미노산, 즉, 위치 294 와 300 사이에 위치할 수도 있다. 그러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다 (예를 들어, US 2003/0157108; US 2004/0093621 참조). "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 관한 문헌의 예는 하기를 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki, A. 등, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. 등, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. 탈푸코실화 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka, J. 등, Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108; 및 WO 2004/056312, 특히 실시예 11 에서), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, Yamane-Ohnuki, N. 등, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. 등, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; 및 WO 2003/085107 참조) 를 포함한다.

[0224] 특정 구현예에서, 제공된 방법은, 예를 들어, 항체의 Fc-영역에 부착된 바이안테너리 올리고당이 GlcNAc 에 의해 이등분되어 있는, 이등분된 올리고당을 갖는 항체를 생산하는데 사용될 수 있다. 그러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 그러한 항체 변이체의 예는, 예를 들어, WO 2003/011878; US 6,602,684; 및 US 2005/0123546 에 기재되어 있다. Fc-영역에 부착된 올리고당 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 포함하는 항체 변이체가 또한 생산될 수 있다. 그러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 그러한 항체 변이체는, 예를 들어, WO 1997/30087; WO 1998/58964; 및 WO 1999/22764 에 기재되어 있다.

[0225] 항체는, 예를 들어, US 4,816,567 에 기재된 바와 같은, 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생산될 수 있다.

핵산은 항체의 VL 을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH 를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄) 을 인코딩할 수 있다. 추가의 구현예에서, 그러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터) 가 제공된다. 추가의 구현예에서, 그러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 하나의 그러한 구현예에서, 숙주 세포는 하기를 포함한다 (예를 들어, 하기로 형질전환되었다): (1) 항체의 VL 을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH 를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL 을 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 벡터 및 항체의 VH 를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제 2 벡터. 하나의 구현예에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이나이스 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프양 세포 (예를 들어, YO, NSO, Sp2/0) 또는 인간 배아 신장 세포 (HEK293) 이다. 하나의 구현예에서, 위에 제공된 바와 같은, 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하고, 임의로 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지) 로부터 항체를 회수하는 것을 포함하는 항체 제조 방법이 제공된다.

[0226] 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 인코딩하는 핵산이 분리되고, 숙주 세포에서의 후속 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입된다. 그러한 핵산은 종래의 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 용이하게 분리 및 서열분석될 수 있다.

[0227] 항체-인코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는, 특히 글리코실화 및 Fc-영역 효과기 기능이 필요하지 않을 때, 박테리아에서 생산될 수 있다. 박테리아에서의 항체 조각 및 폴리펩티드의 발현에 대해, 예를 들어, US 5,648,237, US 5,789,199, 및 US 5,840,523 을 참조한다; 또한 대장균에서의 항체 조각의 발현을 기재하는 Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C.(ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254 를 참조한다. 발현 후, 항체는 가용성 분획 중 박테리아 세포 페이스트로부터 분리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다.

[0228] 원핵생물 외에도, 진핵 미생물 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항체-인코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이며, 글리코실화 경로가 "인간화" 되어 일부 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체의 생성을 초래하는 진균 및 효모 균주를 포함한다 (Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; 및 Li, H. 등, Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215 참조).

[0229] 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물) 에서 유래한다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 특히 스포도프테라 프루기페르다 (Spodoptera frugiperda) 세포의 트랜스펙션을 위해, 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 수많은 바칼로바이러스 균주가 동정되었다.

[0230] 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다 (예를 들어, US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978, 및 US 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서의 항체 생성을 위한 PLANTIBODIES™ 기술을 기재함) 참조).

[0231] 척추동물 세포가 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 적응시킨 포유류 세포주가 유용할 것이다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 기타 예는 SV40 (COS-7) 로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인; 인간 배아 신장 라인 (예를 들어, Graham, F.L. 등, J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74 에 기재된 293 또는 293 세포); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어, Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252 에 기재된 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 경부암 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방암 (MMT 060562); 예를 들어, Mather, J.P. 등, Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68 에 기재된 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 기타 유용한 포유류 숙주 세포주는 차이나이스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR 음성 (DHFR(-)) CHO 세포 (Urlaub, G. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); 및 골수종 세포주 예컨대 YO, NSO 및 Sp2/0 를 포함한다. 항체 생성에 적합한 특정 포유류 숙주 세포주의 리뷰에 대해, 예를 들어, Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C.(ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268 을 참조한다.

[0232] **발명의 구체적 구현예**

[0233] 요망되는 특이성을 갖는 항체를 발현하는 세포의 선별 방법 뿐만 아니라 그러한 항체의 생성 방법이 여기에서

보고된다.

- [0234] 다양한 스크리닝 방법으로 항체를 동정하는 것이 가능함에도 불구하고, 생성 규모에서의 후속 성장은 단백질 발현의 제약, 부정확한 폴딩 및/또는 부정확한 번역후 수식 뿐만 아니라 부정확한 항체 조립, 예컨대 동종이합체 형성에 의해 방해받을 수 있다.
- [0235] 항원 결합 조각과 대조적으로 전장 항체는 여러 부가적 특색을 가지며, 예컨대 연장된 혈청 반감기 (시간 또는 일과 비교되는 주), 2 차 면역 기능의 지지, 예컨대 ADCC, CDC, FcRn 결합이다.
- [0236] 하나의 구현예에서 항체는 하나의 관심의 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0237] 하나의 구현예에서 항체는 2 개의 상이한 항원에 또는 동일한 항원 상의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0238] 일반적으로 관심의 항원은 단백질 항원, 비-단백질 항원 또는 합텐이다. 관심의 항원은 하나의 구현예에서 (a) 미생물 또는 병원체의 항원, (b) 종양 항원, (c) 자기-항원, 및 (d) 알레르겐으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0239] 종양 항원은 항체에 의해 결합될 수 있는 종양 또는 암과 연관되는 화합물, 예컨대 펩티드이다. 종양 항원은 암 세포로부터, 예를 들어, Cohen 등, Cancer Research, 54 (1994) 1055 에 기재된 바와 같이, 암 세포의 조추출물을 제조함으로써, 항원을 부분적으로 정제함으로써, 재조합 기술에 의해 또는 공지된 항원의 데 노보 (de novo) 합성에 의해 제조될 수 있다. 종양 항원은 전체 종양 또는 암 폴리펩티드 또는 그의 항원성 부분을 포함한다. 그러한 항원은 재조합적으로 또는 당업계에 공지된 임의의 기타 수단에 의해 분리 및 제조될 수 있다. 암 또는 종양은 담도암; 뇌암; 유방암; 자궁암; 융모암종; 대장암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 상피내 신생물; 림프종; 간암; 폐암 (예를 들어 소세포 및 비-소세포); 흑색 종; 신경아세포종; 구강암; 난소암; 췌장암; 전립선암; 직장암; 육종; 피부암; 고환암; 갑상선암; 및 신장암,뿐만 아니라 다른 암종 및 육종을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0240] 용어 "항원 결정기" 는 B-림프구에 의해 특이적으로 인식되는 항원의 부분을 나타낸다. B-림프구는 항체 생성에 의해 외래 항원 결정기에 응답한다.
- [0241] 포유류 세포 상에 표시된 항체에 관한 항원 결합의 특이성은 하나의 구현예에서 기본적으로 본원에서 실시예 12 에 제시된 바와 같은 형광 검정법으로 측정되며, 여기서 형광 신호 강도는 항체 표시 세포에 결합된 항원의 양과 상관관계가 있다. 포유류 세포 상에 표시된 항체는, 형광 신호 강도가 대조군 세포에 대해 탐지된 신호보다 높을 때, 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다. 하나의 구현예에서 신호는 대조군 세포의 신호보다 2 배 이상 높다.
- [0242] 용어 "발현 라이브러리" 는 동일한 유형의 다수의 발현 벡터를 나타내며, 여기서 개별 발현 벡터는 상이한 항체를 발현한다. 하나의 구현예에서 발현 라이브러리는 바이러스 발현 라이브러리이다. 하나의 구현예에서 발현 라이브러리는 렌티바이러스 발현 라이브러리이다.
- [0243] 용어 "감염 다중도" (MOI) 는 바이러스, 특히 렌티바이러스, 발현 라이브러리 내의 감염 바이러스 입자의 수와 바이러스에 노출된 세포의 수 사이의 비율을 나타낸다.
- [0244] 요망되는 특이성의 항체를 발현하는 세포를 생성, 선별, 및/또는 분리하는 방법이 본원에서 보고된다.
- [0245] 더욱 상세히, 방법은 하기를 포함한다:
- [0246] 전장 항체를 인코딩하는 핵산의 제공
- [0247] 하나의 구현예에서 B-세포를 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별하여 분리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별함으로써 핵산이 획득된다.
- [0248] 하나의 구현예에서 B-세포를 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별하여 분리된 B-세포의 집단으로부터 단일 B-세포를 선별함으로써 핵산이 획득된다.
- [0249] 하나의 구현예에서 단일 B-세포는 클론 B-세포 집단이다.
- [0250] 하나의 구현예에서 단일 B-세포 또는 클론 B-세포 집단의 분리된 mRNA 로부터 가변 도메인 인코딩 핵산을 증폭하고, 증폭된 mRNA 를 cDNA 로 전사함으로써 핵산이 획득된다.

- [0251] 렌티바이러스 발현 라이브러리의 생성
- [0252] 본원에서 보고되는 및 본원에서 보고되는 방법에서 사용되는 렌티바이러스 발현 벡터는 가용성 및 막-결합 형태로 전장 항체의 발현을 위한 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 벡터이다. 가용성 및 막-결합 형태의 항체를 동시에 제공함으로써 표면 표시된 항체에 기초하여 항체 발현 세포가 선별될 수 있고, 예를 들어 분비형 항체를 사용하여 결합 특이성에 대해 항체가 시험될 수 있다.
- [0253] 포유류 세포 상에서 전장 항체를 발현 및 표시하는 경우 동일한 발현 카세트로부터 가용성 및 막-결합 형태를 발현하기 위해 스플라이싱가능한 핵산을 추가로 포함하는 바이시스트로닉 발현 구축물을 사용할 필요가 있음이 밝혀졌다.
- [0254] 바이러스 입자 내에 효율적으로 패키징되기 위해 렌티바이러스 발현 벡터의 크기가 제한된다는 사실로 인해, 그리고 전장 항체가 발현 및 표시되어야 한다는 사실로 인해, 막관통 인코딩 핵산은 또한 단축되고 크기가 감소되어야 한다.
- [0255] 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성은 하기에 의해 생성될 수 있다:
- [0256] (i) 하나의 구현예에서 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 B-세포의 풀로부터 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산을 사용하여 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성이 생성된다.
- [0257] (ii) 하나의 구현예에서 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 풀로부터 선택되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성이 생성된다.
- [0258] 하나의 구현예에서 단일 B-세포는 B-세포의 클론 집단이다.
- [0259] 하나의 구현예에서 하나 이상의 코돈은 HCVR 또는 LCVR 의 CDR 내에 있다. 하나의 구현예에서 CDR 은 CDR3 이다. 하나의 구현예에서 CDR3 은 HCDR3 이다.
- [0260] (iii) 하나의 구현예에서 상이한 HCVR 인코딩 핵산 및 단일 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 HCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 HCVR 인코딩 핵산이 수득된다.
- [0261] 하나의 구현예에서 단일 B-세포는 B-세포의 클론 집단이다.
- [0262] 하나의 구현예에서 하나 이상의 코돈은 HCVR 의 CDR 내에 있다. 하나의 구현예에서 CDR 은 CDR3 이다.
- [0263] (iv) 하나의 구현예에서 상이한 LCVR 인코딩 핵산 및 단일 HCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 LCVR 인코딩 핵산이 수득된다.
- [0264] 하나의 구현예에서 단일 B-세포는 B-세포의 클론 집단이다.
- [0265] 하나의 구현예에서 하나 이상의 코돈은 LCVR 의 CDR 내에 있다. 하나의 구현예에서 CDR 은 CDR3 이다.
- [0266] 하나의 구현예에서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성 생성은 하기 단계를 포함한다
- [0267] (a):
- [0268] (i) B-세포의 아집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,
- [0269] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0270] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 1 풀을 증폭하는 단계;
- [0271] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 2 풀을 증폭하는 단계; 및

- [0272] (v) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;
- [0273] 또는 (b):
- [0274] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,
- [0275] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0276] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0277] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0278] (v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 1 푸울을 생성하는 단계,
- [0279] (vi) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 2 푸울을 생성하는 단계, 및
- [0280] (vii) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;
- [0281] 또는 (c):
- [0282] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,
- [0283] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0284] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0285] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0286] (v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및
- [0287] (vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 2 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계;
- [0288] 또는 (d):
- [0289] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,
- [0290] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0291] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0292] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0293] (v) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및
- [0294] (vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 1 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계.
- [0295] 분비형 폴리펩티드를 생성하기 위해, 관심의 구조 유전자는 "신호 서열" 또는 "리더 펩티드" 를 인코딩하는 DNA 분절을 포함한다. 신호 서열은 새로 합성된 폴리펩티드를 ER 막으로 인도하고 폴리펩티드는 ER 막을 통하여 분비를 위해 발송될 수 있다. 단백질이 ER 막을 횡단하는 동안 신호 서열은 신호 펩티다제에 의해 절단된다. 신호 서열의 기능에 관하여, 숙주 세포의 분비 기관에 의한 인지가 필수적이다. 그러므로 사용되는 신호 서열은 숙주 세포의 단백질 및 분비 기관의 효소에 의해 인지되어야 한다.
- [0296] 렌티바이러스 발현 라이브러리의 생성에 사용되는 렌티바이러스 발현 벡터는 분비형 및 막-결합 형태의 항체의 발현을 가능하게 해준다. 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산 (인트론) 및 추가로 막관통 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드를 인코딩하는 엑손에 항체 중쇄의 C-말단 불변 도메인을 연결시킴으로써 막-결합 형태가 발현된다.
- [0297] 본 출원에서 사용되는 용어 "GPI-앵커" 는 폴리펩티드 또는 단백질의 C-말단에 부착된 번역후 수식을 나타낸다. "GPI-앵커" 는 하나 이상의 에탄올아민 포스페이트 잔기, 트리만노시드, 글루코사민 잔기, 및 이노시톨 인지

질을 포함하는 코어 구조를 갖는다. 이러한 코어 구조에도 불구하고 GPI-앵커는 보통 어느 정도의 미세이질성(microheterogeneity)을 보유하므로, GPI-앵커를 갖는 단백질은 통상적으로 상이한 측쇄 수식을 갖는 동일한 코어 구조의 상동 GPI-앵커를 갖는 단백질의 혼합물이다.

[0298] 용어 "GPI-앵커에 대한 신호 펩티드"는 GPI-앵커가 부착될 하나의 아미노산, 임의적 스페이스 펩티드, 및 소수성 펩티드로 이루어지는 폴리펩티드 또는 단백질의 C-말단 아미노산 서열을 나타낸다. 이러한 신호 펩티드의 거의 전부, 즉 임의적 스페이스 펩티드 및 소수성 펩티드는 번역후에 GPI-트랜스아미나제에 의해 제거되고, GPI-앵커의 코어 에탄올아민 포스페이트의 아미노기와 GPI-앵커가 부착되는 아미노산 사이에 결합이 형성된다.

[0299] 본 출원에서 사용되는 용어 "막관통 도메인"은 DNA 수준에서 하나 이상의 엑손에 의해 인코딩되고 세포외, 막관통, 및 세포내 영역을 포함하는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다. 막관통 도메인은 일반적으로 하기 3개의 구별되는 구조 영역을 포함한다: N-말단 세포외 영역, 중심 보존 막관통 스트레치, 및 C-말단 세포질 영역. 하나의 구현예에서 막관통 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 세포외 영역 및 막관통 영역을 포함한다. 막관통 도메인은 세포내 또는 세포질 영역을 부가적으로 포함한다.

[0300] 용어 "대안적으로 스플라이싱가능한 핵산"은 5' 스플라이스 공여 자리로 시작하고 3' 스플라이스 수용 자리로 끝나는 핵산을 나타낸다. 이러한 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산은 상응하는 프리-mRNA로부터 스플라이싱 제거되지 않는 비-코딩 영역, 예컨대, 예를 들어, 번역글로블린 중쇄 CH3 또는 CH4 도메인을 인코딩하는 엑손 후의 인트론을 포함한다. 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산의 5' 스플라이스 공여 자리에서의 "대안적 스플라이싱 사건"은 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산이 프리-mRNA로부터 스플라이싱 제거되는지 여부 또는 그것이 적어도 부분적으로 유지되고 성숙(가공된) mRNA에 포함되는지 여부의 결정 사건이다.

[0301] 본원에서 사용되는 용어 "대안적 스플라이싱" 및 그의 문법적 등가물은 단일 프리-mRNA로부터 하나 이상의 인트론의 상이한 가공으로 인해 상이한 성숙 mRNA가 수득될 수 있고 그에 따라 폴리펩티드의 상이한 동형이 발현될 수 있는 진행 세포 내의 과정을 나타낸다. 본 발명의 하나의 구현예에서 생성된 프리-mRNA 중 단일, 즉 단 하나의 인트론이 대안적으로 스플라이싱될 수 있다. 또다른 구현예에서 제 2 핵산이 대안적으로 스플라이싱될 수 있다. 추가의 구현예에서 제 2 핵산은 대안적으로 스플라이싱가능한 인트론을 포함한다. 상이한 가공은 "예/아니오" 결정이며, 즉 대안적 스플라이싱 과정에서 가공되는 인트론, 즉 "대안적으로 스플라이싱가능한 핵산"은 적어도 부분적으로 보유되거나 또는 스플라이싱 제거되거나 둘 중 하나이다. 이는 상이한 엑손을 초래하는 분지점 메카니즘으로 이해되지 않아야 한다. 그것은 실제로 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산이 스플라이싱 제거되거나 또는 성숙 mRNA에서 적어도 부분적으로 유지되거나 둘 중 하나인 메카니즘이다. 이러한 메카니즘에 의해 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산 및, 그에 따라, 그안에 포함되는 인 프레임 번역 종결 코돈은 보유되거나 또는 제거되거나 둘 중 하나이다.

[0302] 대안적 스플라이싱은 진행 세포 내의 조절 메카니즘이다. 대안적 스플라이싱에 의해 동일한 프리-mRNA로부터 성숙 mRNA 내의 엑손의 상이한 조합이 수득되어, 동일한 DNA에 의해 인코딩되는 복수의 상이한 단백질을 초래할 수 있다.

[0303] 대안적 스플라이싱을 가능하게 하기 위해 항체 중쇄의 C-말단 도메인을 인코딩하는 마지막 엑손에는 인 프레임 번역 종결 코돈이 부재해야 한다.

[0304] 용어 "인 프레임 번역 종결 코돈"은 핵산의 선행 코딩 영역에 관한 해독 프레임의 프레임쉬프트 없이 핵산의 코딩 영역의 뒤를 잇는, 즉 번역 동안 코딩 영역을 종결하는 번역 종결 코돈(TAA, TAG, 또는 TGA)을 나타낸다. 인 프레임 번역 종결 코돈은 핵산의 선행 코딩 영역에 작동가능하게 연결되어 있다.

[0305] 용어 "인 프레임 번역 종결 코돈의 부재"는 지정된 핵산 내의 번역 종결 코돈(TAA, TAG, 또는 TGA)의 부재 및/또는 핵산의 코딩 영역의 내부 또는 말단에서 발견될 수 있으나, 1 또는 2개의 염기쌍 쉬프트로 인해 가공되는 mRNA의 번역 동안 인지되지 않고(즉 아웃-오브-프레임, 작동가능하게 연결되지 않고) 그에 따라 번역 과정에서 코딩 영역을 종결시키지 않는 번역 종결 코돈의 존재를 나타낸다.

[0306] "스플라이싱가능한 핵산"은 적어도 5' 스플라이스 공여 자리, 3' 스플라이스 수용 자리, 및 보통 수용 자리의 20-50 염기 상류에 위치하는 소위 분지 자리를 특징으로 한다. 이러한 구성은 RNA 스플라이싱 동안 프리-mRNA로부터 5' 스플라이스 공여 자리에서부터 3' 스플라이스 수용 자리까지 핵산의 인지 및 절제에 영향을 미친다. 스플라이싱 단계 동안 성숙 mRNA가 생성되며, 이러한 성숙 mRNA로부터 폴리펩티드 또는 단백질이 번역된다. 본 발명의 하나의 구현예에서 하나 이상의 핵산, 바람직하게는 제 2 핵산은, 부가적 조절 엘리먼트, 예컨대 인 프레임 종결 코돈을 함유하는 스플라이싱가능한 핵산이다.

- [0307] 그러나 스플라이싱 과정은 배타적이지 않다. 예를 들어, 인트론이 프리-mRNA 가공 동안 프리-mRNA로부터 제거되지 않고, 그에 따라 적어도 부분적으로 성숙 mRNA에 포함되는 것이 가능하다. 인 프레임 종결 코돈이 이러한 "임의로" 포함되는 인트론에 존재하는 경우, 이러한 종결 코돈에서 번역이 중단되고, 인코딩된 폴리펩티드의 변이체가 생성된다.
- [0308] 인트론의 인지 및 절제는 종종 프리-mRNA 내의 부가적 시스-작용 엘리먼트에 의해 조절된다. 이들 엘리먼트는 기능 및 위치로 인해 엑손 스플라이스 인핸서 (ESE), 엑손 스플라이스 사일런서 (ESS), 인트론 스플라이스 인핸서 (ISE), 또는 인트론 스플라이스 사일런서 (ISS)로 각각 언급된다 (Black, D.L., Annu. Rev. Biochem. 72 (2003) 291-336).
- [0309] 대부분의 진핵생물 유전자의 게놈 DNA는 인트론-엑손-구성을 갖는다. 예를 들어, 분비형 형태의 번역글로불린 중쇄의 C-말단 도메인 (즉, 각각, CH3 또는 CH4)을 인코딩하는 엑손 내에 5' 스플라이스 공여 자리가 존재한다.
- [0310] 이러한 스플라이스 공여 자리가 중쇄 프리-mRNA의 가공에서 효과적이지 않은 경우, 종결 코돈을 보유하는, 이러한 엑손에 뒤따르는 인트론은, 적어도 부분적으로 성숙 mRNA 내에 보유된다. 그 후 mRNA는 CH3 또는 CH4 도메인으로 끝나고 가용성 번역글로불린을 나타내는 번역글로불린 중쇄로 번역된다. 이는 번역글로불린 분비 세포 내에서의 번역글로불린 중쇄 유전자에 대한 주 (major) 가공 경로이다.
- [0311] 이러한 스플라이스 공여 자리가 번역글로불린 중쇄 프리-mRNA의 가공에서 효과적인 경우, 구성 인트론, 및, 이에 따라 종결 코돈이 제거된다. 따라서 번역은 번역글로불린 중쇄의 C-말단 도메인 뒤에서 중단되지 않는다. 게다가, 번역은 뒤를 잇는 막관통 도메인을 인코딩하는 엑손으로 계속된다. 번역글로불린 중쇄 유전자에 대한 이러한 부 (minor) 가공 경로는 번역글로불린 생성 세포의 세포 표면에 표시되는 원형질-막-결합 번역글로불린 형태를 초래한다.
- [0312] 이러한 과정은 "대안적 스플라이싱"으로 언급되고, 이러한 과정에서 임의로 제거되는 핵산 (즉, 인트론)은 "대안적으로 스플라이싱가능한 핵산"으로 언급된다.
- [0313] 이중 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 핵산이 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산에 의해/을 통해 적어도 막관통 도메인의 조각을 인코딩하는 핵산 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드를 인코딩하는 핵산에 연결된 경우, 즉 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산이 이들 2개의 핵산 사이에 위치하고, 그에 의해 이들 3개의 핵산이 작동가능하게 연결되는 경우, 이중 폴리펩티드 또는 단백질의 하기 2개의 변이체가 발현된다: 가용성 변이체, 즉 오직 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 변이체, 및 원형질-막-결합 변이체, 즉 폴리펩티드 또는 단백질 및 막관통 도메인 또는 GPI-앵커 둘다를 포함하는 변이체.
- [0314] 예를 들어, 진핵 세포 내에서의 번역글로불린 중쇄의 재조합 발현 동안 게놈 인트론-엑손-구성을 갖는 핵산 또는 오직 코딩 영역만을 함유하는 핵산, 즉 cDNA가 이용된다. 두 경우 모두 핵산은 번역글로불린 중쇄의 C-말단 도메인을 인코딩하는 엑손 뒤의 종결 코돈으로 끝난다. 그 후 게놈 구성에서 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산 및 뒤를 잇는 막관통 도메인을 포함하는 인트론 및 엑손이 생략된다. 그러므로 그러한 핵산으로는 오직 가용성 번역글로불린 중쇄만 수득된다.
- [0315] 번역글로불린 또는 그의 조각의 재조합 발현 동안 번역글로불린 중쇄 유전자의 게놈 구성이 적어도 부분적으로 유지되는 경우, 즉 C-말단 도메인을 인코딩하는 엑손 뒤의 인트론 (즉, 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산) 및 뒤를 잇는 막관통 도메인을 인코딩하는 엑손(들)이 유지되는 경우, 대안적 스플라이싱이 가능하다. 대안적 스플라이싱 사건에서 CH3- 또는 CH4-도메인 인코딩 엑손의 3' 말단 코돈 및 종결 코돈, 각각은 인트론 서열로서/로 제거되고, 코딩 영역, 즉 해독 프레임이 그것의 3' 말단에서 부가적으로 유지된 엑손(들)에 의해 신장된 상이한 성숙 mRNA가 대신 생성된다. 이러한 mRNA는 부가적 3' 엑손(들)에 의해 인코딩되는 부가적 막관통 도메인을 함유하는 C-말단에서 확장된 번역글로불린 중쇄, 또는 그의 조각으로 번역된다. 이러한 신장된 번역글로불린 중쇄는 번역글로불린의 조립 동안 편입되어 원형질-막-결합 번역글로불린을 초래한다. 현재 놀랍게도 그러한 본 발명에 따른 핵산에 의해 이중 폴리펩티드를 생성하는 트랜스펙션된 세포가 선별될 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 방법론은 일반적으로 적용가능하고 번역글로불린에 제한되지 않는다. 이러한 방법론을 실시하기 위해 인 프레임 종결 코돈 없는 이중 폴리펩티드의 재조합 발현을 위한 핵산은 인 프레임 번역 종결 코돈 및 폴리아데닐화 자리를 포함하는 번역글로불린에서 유래하는 대안적으로 스플라이싱가능한 핵산에 작동가능하게 연결되고 그 핵산과 인 프레임이어야 한다. 뒤를 잇는 제 3 핵산은 또한 가변적이고, 막관통 도메인 또는 그의 조각을 인코딩하는 임의의 핵산 뿐만 아니라 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드를 인코딩하는 임의의

핵산으로부터 선택될 수 있다. 이들 엘리먼트, 즉 폴리펩티드를 이코딩하는 핵산, 대안적으로 스플라이싱 가능한 핵산, 및 막관통 도메인 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드를 인코딩하는 핵산은 상이한 유전자 뿐만 아니라 상이한 유기체로부터 선택되고 조합될 수 있다. 유일한 전제조건은 대안적으로 스플라이싱 가능한 핵산 내의 번역 종결 코돈이 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 해독 프레임과 인 프레임이도록, 즉 번역 종결 코돈이 리보솜에 의해 인지되어 번역이 종결되도록 3 개의 핵산이 조합되는 것이다.

- [0316] 일반적으로 말하면, 대안적 스플라이싱에 의해 임의로 가용성 형태의 이중 폴리펩티드의 C-말단의 분획이 프리-mRNA로부터 인트론의 일부로서 제거된다/될 수 있다. 이러한 분획은 임의로 분비형의 3' 말단 코돈, 3' 비번역 영역, 및 종결 코돈을 포괄한다. 그러므로, 5' 스플라이스 공여 자리로 시작하고 제거되는 3' 스플라이스 수용 자리로 끝나는 핵산은 임의로 대안적으로 가공되지 않은 변이체의 C-말단과 중복된다/중복될 수 있다.
- [0317] 하나의 구현예에서 제 1 핵산이 번역글로불린 중쇄를 인코딩하는 경우 제 1 핵산은 게놈 조직화 번역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함한다. 하나의 구현예에서 제 3 핵산은 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드를 인코딩하여, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩된다. 또다른 구현예에서 막관통 도메인은 M1-M2-엑손-융합물, 즉 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손에 의해 인코딩되는 번역글로불린 막관통 도메인이다. 하나의 구현예에서 번역글로불린 막관통 도메인은 cDNA에 의해 인코딩된다.
- [0318] 번역글로불린 중쇄 유전자의 적어도 부분적으로 유지된 전체적 게놈 구성을 갖는 핵산을 숙주 세포 내로 도입함으로써, 한편으로는 가용성 이중 폴리펩티드를 다른 한편으로는 원형질-막-결합 이중 폴리펩티드를 발현하는 세포가 수득된다. 예를 들어, 2 개의 번역글로불린 변이체를 수득하기 위해, 즉 대안적 스플라이싱을 가능하게 하기 위해, 번역글로불린 중쇄 유전자의 전체 게놈 구성, 즉 모든 인트론 및 엑손을 유지할 필요는 없다. 대안적 스플라이스 자리를 기능적 형태로 유지할 것만 요구된다.
- [0319] "기능적 스플라이스 자리"는 5' 스플라이스 공여 자리 및 3' 스플라이스 수용 자리를 포함하는 핵산 서열이며, 이에 의해 프리-mRNA로부터 개재하는 핵산 서열의 절제가 가능하다. 인트론의 인지 및 절제는 종종 프리-mRNA 상의 부가적 시스-작용 엘리먼트에 의해 조절된다. 이들 엘리먼트는 기능 및 위치로 인해 엑손 스플라이스 인핸서 (ESE), 엑손 스플라이스 사일런서 (ESS), 인트론 스플라이스 인핸서 (ISE), 또는 인트론 스플라이스 사일런서 (ISS)로 각각 언급된다 (Black, D.L., Annu. Rev. Biochem. 72 (2003) 291-336, 이는 본원에 참조로 포함됨).
- [0320] 폴리펩티드의 원형질-막-결합 변이체는 그것을 발현하는 세포에 확고히 연결되어 있다. 그러므로 원형질-막-결합 변이체는 이중 폴리펩티드 또는 단백질, 예를 들어 번역글로불린의 발현을 위한 핵산으로 성공적으로 트랜스펙션된 세포를 단리하는 마커로서 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서 폴리펩티드는 번역글로불린이다. 하나의 구현예에서 번역글로불린은 IgG, IgE, 및 IgA로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0321] 방법의 다음 단계에서 DNA 분자의 쌍이 렌티바이러스 발현 벡터 내로 클로닝된다.
- [0322] 그 후 렌티바이러스 발현 라이브러리는 포유류 세포의 제 1 집단 내로 도입된다. 형질도입된 세포는 그것의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리의 항체를 표시한다. 형질도입된 세포의 라이브러리로부터 (즉, 포유류 세포의 제 1 집단으로부터) 하나 이상의 세포가 그의 표면에 표시된 항체의 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별된다.
- [0323] 하나의 구현예에서 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체이다.
- [0324] 하나의 구현예에서 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 전장 항체이다.
- [0325] 포유류 세포의 표면에 표시되는 항체는 막관통 영역을 포함하는 전장 항체로서 발현된다.
- [0326] 포유류 세포에 의해 배양 배지 내로 분비되는 항체는 분비형 항체 전장 항체이다.
- [0327] 하나의 구현예에서 발현 라이브러리, 특히 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 전장 항체를 인코딩하고, 여기서 항체는 분비형 항체로서 및 막관통 영역을 포함하는 막-결합 항체로서 발현된다.
- [0328] 하나의 구현예에서 항원-특이적 항체의 변이성은 상이한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 무작위로 조합함으로써 증가된다.
- [0329] 가변 영역의 클로닝은 당업계에 일반적으로 알려진 표준 절차이고, 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 토끼, 및 닭

을 포함하는 다양한 종에 대해 기술된 바 있다. 리뷰에 대해 Barbas III 등, (eds.), Phage Display - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press (2001), 특히 그 중 챕터 Andris-Widhopf 등, Generation of Antibody Libraries: PCR Amplification and Assembly of Light- and Heavy-chain Coding Sequences 를 참조한다. Andris-Widhopf 등은 앞서 언급된 종의 가변 영역 코딩 영역 (VR 코딩 영역), 특히 HCVR 코딩 영역 또는 LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 개시한다. 게다가, HCVR 코딩 영역 또는 LCVR 코딩 영역, 특히 인간 HCVR 코딩 영역 또는 LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 올리고뉴클레오타이드는 당업자에 의해 데이터베이스 예컨대, 예를 들어, Immunogenetics (<http://imgt.cines.fr/>), Kabat (www.kabatdatabase.com), 및 Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)로부터 입수가 가능한 항체 코딩 영역의 알려진 서열을 비교함으로써, 그리고 프라이머 디자인에 적합한 공통 서열을 식별함으로써 디자인될 수 있다.

분자 생물학 분야의 일반적 지식, 앞서 언급된 매뉴얼 (Barbas III 등, (eds.) Phage Display - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press (2001)) 및 그안에 언급된 참고문헌에 기초하여, 당업자는 HCVR 코딩 영역 또는 LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 디자인할 수 있고, 여기서 하나의 구현예에서 프라이머는 증폭 산물의 클로닝에 적합한 제한 자리를 포함한다. VR 을 증폭 및 클로닝하기 위한 추가 전략이 Sblattero, D. and Bradbury, A., Immunotechnology 3 (1998) 271-278 및 Weitkamp 등, J. Immunol. Meth. 275 (2003) 223-237 에 기재되어 있다.

[0330] 하나의 구현예에서 가변 영역 핵산은 렌티바이러스 발현 벡터 내에서 규정된 방향으로 조립된 코딩 영역의 클로닝을 가능하게 하는 제한 자리 (RS) 를 포함한다. 하나의 구현예에서, 제한 자리는 서로 구별되고, 그들 중 하나 이상은 단일-가닥 오버행 ("스틱키 엔드") 을 형성함으로써, 방향성 클로닝을 가능하게 한다. 하나의 구현예에서 RS 는 8 이상의 염기 쌍 길이이고, Ascl, FseI, NotI, PacI, PmeI, SfiI 및 Swal 의 목록으로부터 선택되나 그에 제한되지 않는 "회귀 절단" 제한 효소에 의해 인지된다.

[0331] 인간 HCVR, 인간 카파 LCVR 및 인간 람다 LCVR 코딩 영역은 PCR 에 의해 프레임워크 1 및 4 영역을 각각 어닐링하는 특정 센스 및 안티센스 프라이머의 혼합물을 사용하여 증폭된다. 프라이머의 주된 세트가 여기에서 기재되어 있다: Sblattero, D. and Bradbury A., Immunotechnology 3 (1998) 271-278. HCVR, 카파 LCVR 및 람다 LCVR 코딩 서열의 증폭을 위한 안티센스 프라이머의 특정 믹스의 사용에 대한 대안으로서, 감마, 카파 및 람다 불변 영역에서 어닐링하는 하나의 안티센스 프라이머가 각각 사용될 수 있다.

[0332] 특정 가변 영역 (VR) 코딩 영역의 후속 클로닝의 효율은 B-세포의 아집단의 전사체 (transcriptome) 를 사전-증폭시킴으로써, 특히 Zhu 등, BioTechniques 30 (2001) 892-897 에 기재된 주형 스위치 프로토콜을 사용함으로써, 향상될 수 있다. 그러나, 전사체의 사전-증폭은 특정 회귀 cDNA 종의 가능한 소실 및 서열 오류의 가능한 축적과 견줘 볼 필요가 있다.

[0333] 하나의 구현예에서, RNA 의 cDNA 로의 전사는 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단의 전사체의 사전-증폭 단계를 포함하고, 여기서 사전-증폭은 하기 단계를 포함한다:

[0334] (a) RNA 에 함유된 폴리아데닐화 mRNA 를 단일 가닥 cDNA 로 선택적으로 전사하는 단계; 및

[0335] (b) 단일 가닥 cDNA 로부터 이중 가닥 cDNA 를 증폭하는 단계.

[0336] 하나의 구현예에서 이중 가닥 cDNA 의 증폭은 SEQ ID NO: 1 ~ 11 의 올리고뉴클레오타이드 중 하나 이상을 사용하여 실시된다. 하나의 구현예에서 PCR 사이클의 수는 20 미만, 15 미만, 10 ~ 14, 또는 약 14 이다.

[0337] 하나의 구현예에서 DNA 분자의 푸울, 특히 DNA 분자의 제 1 및/또는 제 2 푸울은 또한 독립적 PCR 반응에서 수득된 DNA 분자를 푸올링함으로써 생성된다.

[0338] 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물 및/또는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 VR 코딩 영역, 특히 HCVR 코딩 영역 또는 LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 정확히 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드를 포함하거나 그것으로 이루어진다.

[0339] 하나의 구현예에서 DNA 분자의 푸울, 특히 DNA 분자의 제 1 및/또는 제 2 푸울의 생성은 반응에서 1 쌍 초과인 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 단일 반응으로 실시된다.

[0340] 하나의 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물은 인간 HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0341] 하나의 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물은 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 둘 이상의, 특히 모든, 올리고뉴클레오타이드를 포함한다 SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 11.

- [0342] 하나의 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다 카파 LCVR 코딩 영역, 특히 인간 LCVR 코딩 영역.
- [0343] 하나의 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 카파 LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 특히 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 SEQ ID NO: 12 ~ SEQ ID NO: 19 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 둘 이상의, 특히 모든, 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0344] 하나의 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 람다 LCVR 코딩 영역, 특히 인간 람다 LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0345] 하나의 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 람다 LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 추가로 특히 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 특히 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 SEQ ID NO: 20 ~ SEQ ID NO: 28 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 둘 이상의, 특히 모든, 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0346] 하나의 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 혼합물, 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물 또는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물은 VR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 총량의 프라이머를 포함하고, 여기서 총량에 함유된 모든 정방향 프라이머 및 모든 역방향 프라이머는 등물비이다.
- [0347] 하나의 구현예에서 발현 라이브러리, 특히 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체는 정확히 하나의 LCVR 을 포함한다.
- [0348] 항체의 세포 표면 표시를 보장하기 위해, 항체 사슬은 세포, 특히 포유류 세포의 소포체를 통하는 분비 경로로 항체 사슬을 인도하는 신호 펩티드를 갖도록 발현되고, 여기서 특히 신호 펩티드는 각각의 항체 사슬의 N-말단에 위치하고, 추가로 특히 신호 펩티드는 세포, 특히 포유류 세포 내에서의 가공 및 수송 동안 항체 사슬로부터 절단 제거된다. 게다가, 항체 중쇄는 세포 막에 항체를 고정시키는 막관통 영역을 갖도록 특정 분획으로 발현된다. 매우 특히, 막관통 영역은 항체 중쇄의 C-말단에 위치하고, 항체를 세포의 외부 표면에 부착된 상태로 유지시킨다. 세포 막에 항체를 고정시키는 것은 또한, 예를 들어, GPI-링킹 (Moran & Caras, The Journal of Cell Biology 115 (1991) 1595-1600) 에 의해 달성될 수 있다.
- [0349] 단백질을 진행 세포의 분비 경로로 인도하는 신호 펩티드는 당업계에 일반적으로 알려져 있고, 예를 들어, Nielsen 등, Protein Engineering 10 (1997) 1-6 에 개시되어 있다.
- [0350] 하나의 구현예에서, 신호 펩티드는 분비형 또는 타입 I 막관통 단백질에서 유래한다.
- [0351] 하나의 구현예에서, 신호 펩티드는 분비형 단백질 예컨대 혈청 단백질 패밀리를 (알부민, 트랜스페린, 지질단백질, 면역글로불린), 세포외 매트릭스 단백질 (콜라겐, 피브로넥틴, 프로테오글리칸), 펩티드 호르몬 (인슐린, 글루카곤, 엔도르핀, 엔세팔린, ACTH), 소화 효소 (트립신, 키모트립신, 아밀라제, 리보뉴클레아제, 데옥시리보뉴클레아제) 또는 우유 단백질 (카제인, 락탈부민) 의 일원에서 유래한다.
- [0352] 하나의 구현예에서, 신호 펩티드는 면역글로불린, 특히 경쇄 가변 영역에서 유래한다.
- [0353] 하나의 구현예에서 신호 펩티드는 마우스 Ig 카파 경쇄 신호 펩티드에서 유래한다.
- [0354] 하나의 구현예에서, 막관통 영역은 내재 막 단백질에서 유래한다.
- [0355] 하나의 구현예에서, 막관통 영역은 타입 I 막관통 단백질에서 유래하는 내부 중단-전달 막-앵커 서열 (Do 등, Cell 85 (1996) 369-78; Mothes 등, Cell 89 (1997) 523-533) 예컨대 세포 부착 분자 (인테그린, 뮤신, 카드헤린), 렉틴 (Sialoadhesin, CD22, CD33), 또는 수용체 티로신 키나제 (인슐린 수용체, EGF 수용체, FGF 수용체, PDGF 수용체) 이다.
- [0356] 하나의 구현예에서 막관통 영역은 클래스 G 의 인간 막-결합 면역글로불린의 막관통 영역이다.
- [0357] 하나의 구현예에서, 막관통 영역은 수용체 티로신 키나제, 더욱 특히 인간 혈소판-유래 성장 인자 수용체 (hPDGFR), 가장 특히 hPDGFR B 사슬 (접근 번호 NP 002600) 에서 유래한다.
- [0358] 하나의 구현예에서 막관통 영역은 인간 PDGFR 베타 사슬에서 유래한다.

- [0359] 렌티바이러스는 포유류, 조류, 양서류, 파충류 및 곤충 세포를 포함하는 광범위한 숙주 세포에서 기능할 수 있다. 그들의 게놈은 바이러스 게놈의 핵산에 의해 인코딩되는 이중 단백질을 포함하는 단백질의 다량 발현을 유도할 수 있는 엘리먼트를 포함한다.
- [0360] 구조 및 비-구조 바이러스 단백질의 발현은 분리되고, 구조 단백질은 패키징 세포주 또는 헬퍼 바이러스 레플리콘 중 하나에 의해 제공될 수 있다. 하나의 구현예에서, 발현 라이브러리는 별개의 렌티바이러스 RNA 레플리콘에 기초한다. 하나의 구현예에서 하나의 레플리콘은 비구조 단백질을 인코딩하고, 다른 레플리콘은 구조 단백질을 인코딩한다.
- [0361] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단은 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 증가된 역가로 나타내는 동물에서 유래한다. 동물의 혈액 중 관심의 항원에 결합하는 항체의 역가는 당업계에 일반적으로 알려진 방법에 의해, 예를 들어 ELISA 에 의해 측정될 수 있다.
- [0362] 하나의 구현예에서 동물은 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 노출되거나 노출된 적이 있고, 여기서 특히 노출은 자연적 노출, 병원체에 의한 감염 또는 면역화를 통해 이루어진다.
- [0363] 하나의 구현예에서 동물은 병원체에 의해 감염되거나 감염된 적이 있고, 여기서 병원체는 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기를 포함한다.
- [0364] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단은 면역원성 조성물로 면역화된 동물에서 유래하고, 여기서 면역원성 조성물은 하기를 포함하거나 또는 대안적으로 하기로 이루어진다: (a) 관심의 항원; (b) 관심의 항원의 조각; 및 (c) 관심의 항원의 항원 결정기.
- [0365] 당업계에 알려진 임의의 면역원성 조성물, 특히 강한 면역 반응을 생성하는 조성물이 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 예시적 면역원성 조성물은 바이러스-유사 입자 (VLP), 특히 RNA 박테리오파지의 VLP 를 포함하는 조성물이다. 유용한 면역원성 조성물이 WO 2006/097530, WO 2006/045796, WO 2006/032674, WO 2006/027300, WO 2005/117963, WO 2006/063974, WO 2004/084939, WO 2004/085635, WO 2005/068639, WO 2005/108425, WO 2005/117983, WO 2005/004907, WO 2004/096272, WO 2004/016282, WO 2004/009124, WO 2003/039225, WO 2004/007538, WO 2003/040164, WO 2003/031466, WO 2004/009116, 및 WO 2003/024481 에 보고되어 있다.
- [0366] 하나의 구현예에서, 동물의 면역화는 면역원성 조성물로 실시되고, 여기서 면역원성 조성물의 면역원성은 면역 자극성 물질, 특히 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 가장 특히, 예를 들어, WO 2003/024481, WO 2005/004907 및 WO 2004/084940 에 개시된, 비-메틸화 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드에 의해 향상된다.
- [0367] 하나의 구현예에서 비-메틸화 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드는 G10 (WO 2005/004907 의 SEQ ID NO: 54) 이다.
- [0368] 하나의 구현예에서 면역원성 조성물에 의한 동물의 면역화는 면역원성 조성물을 동물에게 적어도 3 회, 특히 3 ~ 6 회, 1 주 이상의 간격으로, 특히 2 주 ~ 3 개월의 간격으로 투여함으로써 실시된다.
- [0369] 하나의 구현예에서 동물의 면역화는 단일 투여 당 적어도 100 μ g, 특히 200 μ g ~ 1000 μ g 의 면역원성 조성물을 동물에게 투여함으로써 실시된다.
- [0370] 하나의 구현예에서 면역원성 조성물은 아주반트, 특히 프로인트 완전 또는 불완전 아주반트 또는 알루미늄 (alum) 을 포함한다.
- [0371] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단은 하기로부터 선택되는 공급원에서 유래한다: (a) 혈액; (b) 2 차 림프 기관, 특히 비장 또는 림프절; (c) 골수; 및 (d) 기억 B-세포를 포함하는 조직. 하나의 구현예에서 공급원은 혈액이다. 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 포함하거나 특히 그것으로 이루어진다.
- [0372] 하나의 구현예에서, 동물은 포유류 또는 조류이다.
- [0373] 하나의 구현예에서, 동물은 하기로 이루어지는 군으로부터 선택된다: (a) 인간; (b) 마우스; (c) 토끼; (d) 닭; 및 (e) 랫트.
- [0374] 하나의 구현예에서, 동물은 포유동물, 특히 랫트, 마우스, 토끼, 또는 인간이다.
- [0375] 하나의 구현예에서 동물은 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼 또는 인간이다.

- [0376] 항원 특이적 항체의 스크리닝 및 클로닝 효율은 항원 특이적 B-세포를 농축시킴으로써 현저히 증가될 수 있다. B-세포를 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별하여 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별하는 방법은 당업계에 일반적으로 알려져 있다. 이들 방법은 단리된 B-세포의 집단에 함유된 항원-특이적 B-세포와 관심의 항원과의 상호작용에 기초한다.
- [0377] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0378] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계; 및
- [0379] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계.
- [0380] 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별하는 방법은 항원-커버된 담체에 대한 B-세포의 결합 및 FACS 소팅이고, WO 2004/102198 에 기재된 바와 같다.
- [0381] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0382] (a) 담체를 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 코팅하는 단계;
- [0383] (b) 단리된 B-세포의 집단을 담체와 접촉시키고, B-세포가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기를 통해 담체에 결합하도록 하는 단계;
- [0384] (c) 미결합 B-세포를 제거하는 단계, 여기서 특히 담체는 비드를 포함하거나 더욱 특히 그것으로 이루어지고, 더욱더 특히 비드는 상자성 비드임; 및
- [0385] (d) 상자성 비드로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 회수하는 단계.
- [0386] 하나의 구현예에서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것은 FACS 소팅에 의해 수행된다.
- [0387] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0388] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- [0389] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [0390] 하나의 구현예에서 형광 염료는 (a) PerCP, 알로피코시아닌 (APC), (b) 텍사스 레드, (c) 로다민, (d) Cy3, (e) Cy5, (f) Cy5.5, (f) Cy7, (g) 알렉사 플루오르 염료 (Alexa Fluor Dyes), 특히 Alexa 647 nm 또는 Alexa 546 nm (h) 피코에리트린 (PE), (i) 녹색 형광 단백질 (GFP), (j) 탠덤 염료 (tandem dye) (예를 들어 PE-Cy5), 및 (k) 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0391] 하나의 구현예에서 형광 염료는 Alexa 647 nm 또는 Alexa 546 nm 이다.
- [0392] 하나의 구현예에서 형광 염료에 의한 화합물, 특히 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기의 라벨링은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해, 특히 형광 염료를 화합물에 커플링하여 화합물을 직접 라벨링함으로써 실시되며, 여기서 커플링은 공유 뿐만 아니라 비-공유 결합을 통해 실현될 수 있다. 대안적으로, 형광 염료에 의한 화합물, 특히 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기의 라벨링은 화합물을 제 2 화합물, 특히 항체에 결합시킴으로써 간접적으로 실시되며, 여기서 제 2 화합물은 형광 염료를 포함한다.
- [0393] B-세포의 아집단은, 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 능력 외에, 클로닝이 의도되는 면역글로불린을 발현하는 그러한 유형의 B-세포에 특이적인 부가적 마커에 대해 추가로 선별될 수 있다. 대안적으로, 바라지 않은 유형의 면역글로불린을 주로 발현하는 특정 바라지 않은 유형의 B-세포가 배제될 수 있다. 부가적으로, 생활력 마커 예컨대, 예를 들어, PI (프로피듐 아이오다이드) 또는 7-AAD (7-아미노-악티노마이신) 을 적용하여 생활력 있는 세포에 대해 선별할 수 있다. 추가로 부가적으로 또는 대안적으로, 세포사멸사 마커, 예컨대, 예를 들어, YO-PRO-1 또는 Annexin V 가 적용되어 사망한 또는 세포사멸사한 세포를 분류해 낼 수 있다.

- [0394] 게다가, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별함에 있어서 B-세포 특이적 마커, 특히 CD19 또는 B220의 존재에 대한 양성 선별을 포함시키는 것이 유리하다.
- [0395] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0396] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계;
- [0397] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계; 및
- [0398] (c) 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 B-세포를 선별하는 단계, 여기서 특히 하나 이상의 부가적 파라미터에 대한 선별은 하기임
- [0399] (i) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 양성 선별: B 세포 특이적 마커, 특히 CD19 또는 B220의 존재, 및 B-세포의 생활력; 및/또는
- [0400] (ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.
- [0401] 하나의 구현예에서 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별하는 것은 클래스 전환된 B-세포, 특히 IgM- 및/또는 IgD-음성 B-세포, 가장 특히 IgM- 및 IgD-음성 B-세포에 대해 선별하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0402] 하나의 구현예에서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것은 하기 단계를 포함한다:
- [0403] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 제 1 형광 염료로 표지되어 있고, 특히 형광 염료는 Alexa 647 nm, Alexa 488 또는 Alexa 546 nm 임;
- [0404] (b) 단리된 B-세포의 집단의 세포를 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체와 접촉시키는 단계, 여기서 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체는 제 2 및/또는 제 3 형광 염료로 표지되어 있고, 제 2 및/또는 제 3 형광 염료는 제 1 형광 염료가 방출하는 형광의 파장과 상이한 파장에서 형광을 방출함; 및
- [0405] (c) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 그러나 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체에 결합되지 않은 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [0406] 후속 스크리닝 과정의 효율을 위해 절대 필수적이지는 않지만, 표면에 항체를 발현 및 표시하는 각각의 세포는 약 하나, 특히 정확하게는 하나의, 단일 항체 종을 포함하는 것이 유리하며, 여기서 특히 각각의 세포는 상이한 항체 종을 포함한다. 이는 "세포 당 하나의 항체" 포맷으로 언급된다.
- [0407] 세포 당 하나의 항체 포맷은, 예를 들어, 바이러스 발현 라이브러리, 특히 렌티바이러스 발현 라이브러리를 사용함으로써, 그리고 발현 라이브러리, 즉 바이러스 입자를 표시에 사용되는 세포 HEK293의 집단 내로 도입/형질도입할 때 진행, 특히 포유류 세포의 수 당 바이러스 입자의 낮은 비율을 선택함으로써 달성될 수 있다.
- [0408] 하나의 구현예에서 발현 라이브러리는 바이러스 발현 라이브러리, 특히 렌티바이러스 발현 라이브러리이고, 발현 라이브러리를 진행, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 내로 도입하는 것은 진행, 특히 포유류 세포를 바이러스 발현 라이브러리, 특히 렌티바이러스 발현 라이브러리로 감염시킴으로써 수행되고, 더욱 특히 감염은 감염 다중도 10 이하, 특히 1 이하, 더욱 특히 0.2 이하, 가장 특히 0.1 이하에서 수행된다. 하나의 구현예에서 감염 다중도는 약 0.1 이다.
- [0409] 하나의 구현예에서 세포의 단리는 FACS 소팅에 의해 수행된다. 하나의 구현예에서 세포의 단리는 하기 단계를 포함한다:
- [0410] (a) 진행, 특히 포유류 세포의 제 1 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 염색하는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- [0411] (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.

- [0412] 하나의 구현예에서 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 것은 세포를 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 추가로 선별하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서 하나 이상의 부가적 파라미터는 하기로부터 선택된다
- [0413] (i) 세포의 생활력에 대한 양성 선별; 및/또는
- [0414] (ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.
- [0415] 음성 선별은 또한 하나 이상의, 특히 하나의, 바라지 않은 항원(들)의 결합에 대한 음성 선별을 포함할 수 있다. 바라지 않은 항원(들)에 결합하는 항체를 발현하는 세포와의 경쟁에서 이기기 위해, 스크리닝에서, 특히 비-라벨링된 포맷의, 바라지 않은 항원(들)을 임의로 포함시키는 것은 당업자의 기술에 속한다.
- [0416] 하나의 구현예에서 방법은 하기 단계를 추가로 포함한다:
- [0417] (a) 하나 이상의, 특히 정확하게는 하나의, 개별 세포를 진핵 세포, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 존재 하에 배양하는 단계;
- [0418] (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 능력을 확인하는 단계.
- [0419] 하나의 구현예에서 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는, 특히 및, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단은 하기로부터 선택되는 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어진다: (a) BHK 21 세포, 특히 ATCC CCL-10; (b) Neuro-2a 세포; (c) HEK-293T 세포, 특히 ATCC CRL-11268; (d) CHO-K1 세포, 특히 ATCC CRL-62; 및 (e) HEK293 세포.
- [0420] 하나의 구현예에서 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단은 CHO-K1 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지고, 더욱 특히 발현 라이브러리는 렌티바이러스 발현 라이브러리이다.
- [0421] 관심의 항체를 표시하는 개별 세포는 당업계에 일반적으로 알려진 방법 (예를 들어 Weitkamp 등, J. Immunol. Meth. 275 (2003) 223-237 참조) 을 사용하여 세포에 표시된 항체의 가변 영역을 포함하는 항체를 클로닝 및 재조합 발현하는데 사용될 수 있다. 원칙적으로, 항체를 임의의 알려진 형태로 (항체의 상이한 형태에 대해 Hollinger & Hudson, Nature Biotechnology 23 (2005) 참조), 특히 IgG 로서, 가장 특히 완전 인간 IgG 로서 발현시키는 것이 가능하다.
- [0422] 따라서, 하기 단계를 포함하는, 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 생성 방법이 본원에서 보고된다:
- [0423] (a) 본원에서 보고되는 방법에 따라 항체 발현 세포를 단리하는 단계;
- [0424] (b) 단리된 세포로부터 RNA 를 수득하는 단계;
- [0425] (c) RNA 로부터 항체를 인코딩하는 cDNA 를 합성하는 단계;
- [0426] (d) cDNA 를 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계;
- [0427] (e) 세포 내에서 항체를 발현시키는 단계; 및
- [0428] (f) 항체를 정제하는 단계.
- [0429] 하나의 구현예에서 항체는 LCVR 및 HCVR 을 포함하고, 여기서 특히 HCVR 및 LCVR 은 동일한 개별 세포에서 유래한다.
- [0430] 하나의 구현예에서 cDNA 의 합성은 RNA 로부터 단일 가닥 cDNA 를 합성하는 단계를 포함한다.
- [0431] 하나의 구현예에서 cDNA 의 합성은 단일 가닥 cDNA 로부터 cDNA 를 증폭시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 특히 증폭은 하기를 사용하여 실시된다
- [0432] i) 프라이머로서 SEQ ID NO: 1 ~ 4 의 올리고뉴클레오타이드 및 SEQ ID NO: 5 의 올리고뉴클레오타이드 중 하나, 또는
- [0433] ii) 프라이머로서 SEQ ID NO: 6 ~ 10 의 올리고뉴클레오타이드 및 SEQ ID NO: 11 의 올리고뉴클레오타이드 중 하나.

- [0434] 하나의 구현예에서 융합 산물의 발현은 포유류 세포, 특히 CHO-K1 세포 및 HEK293 세포 내에서 실시된다.
- [0435] 항체를 면역글로불린으로서, 특히 중 특이적 면역글로불린으로서, 가장 특히 마우스, 랫트, 토끼, 닭 또는 인간 면역글로불린으로서, 가장 특히 완전 인간 면역글로불린으로서 발현시킴으로써 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법이 본원에서 보고된다.
- [0436] 하기 단계를 포함하는 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법이 본원에서 보고된다:
- [0437] (a) 본원에서 보고되는 방법에 따라 항체 발현 세포를 단리하는 단계;
- [0438] (b) 세포로부터 RNA 를 수득하는 단계;
- [0439] (c) RNA 로부터 cDNA 를 합성하는 단계;
- [0440] (d) cDNA 로부터 세포에 의해 발현되는 항체의 가변 영역 (VRs) 을 인코딩하는 DNA 를 증폭시키는 단계;
- [0441] (e) DNA 를 포함하는 발현 구축물을 생성하는 단계, 여기서 발현 구축물은 세포에 의해 발현되는 항체의 하나 이상의 VR 을 인코딩함;
- [0442] (f) 발현 구축물을 세포 내에서 발현시키는 단계.
- [0443] 하나의 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0444] (a) 위에 기재된 방법에 따라 항체 발현 세포를 단리하는 단계;
- [0445] (b) 세포로부터 RNA 를 수득하는 단계;
- [0446] (c) RNA 로부터 cDNA 를 합성하는 단계;
- [0447] (d) cDNA 로부터 세포에 의해 발현되는 항체의 HCVR 을 인코딩하는 제 1 DNA 를 증폭시키는 단계;
- [0448] (e) 제 1 DNA 를 포함하는 제 1 발현 구축물을 생성하는 단계, 여기서 제 1 발현 구축물은 중쇄 불변 영역 (HCCR) 및 HCVR 을 포함하는 중쇄 면역글로불린을 인코딩함;
- [0449] (f) cDNA 로부터 세포에 의해 발현되는 항체의 LCVR 을 인코딩하는 제 2 DNA 를 증폭시키는 단계;
- [0450] (g) 제 2 DNA 를 포함하는 제 2 발현 구축물을 생성하는 단계, 여기서 제 2 발현 구축물은 경쇄 불변 영역 (LCCR) 및 LCVR 을 포함하는 경쇄 면역글로불린을 인코딩함;
- [0451] (h) 세포 내에서 제 1 발현 구축물 및 제 2 발현 구축물을 발현시키는 단계.
- [0452] 추가의 바람직한 구현예에서 HCCR, HCVR, LCCR 및 LCVR 은 인간 기원이다.
- [0453] 하나의 구현예에서 발현 구축물, 제 1 발현 구축물 및/또는 제 2 발현 구축물은 소수성 리더 서열, 특히 중 특이적 소수성 리더 서열, 가장 특히 인간 소수성 리더 서열을 추가로 인코딩한다. 하나의 구현예에서 제 1 발현 구축물은 인간 중쇄 소수성 리더 서열을 추가로 인코딩한다. 하나의 구현예에서 제 2 발현 구축물은 인간 경쇄 소수성 리더 서열을 추가로 인코딩하고, 여기서 인간 경쇄 소수성 리더 서열은 (a) 인간 카파 경쇄 소수성 리더 서열; 및 (b) 인간 람다 경쇄 소수성 리더 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0454] 하나의 구현예에서 cDNA 의 합성은 RNA 로부터 단일 가닥 cDNA 를 합성하는 단계를 포함한다.
- [0455] 하나의 구현예에서 cDNA 의 합성은 단일 가닥 cDNA 로부터 cDNA 를 합성하는 단계를 포함한다.
- [0456] 하나의 구현예에서 HCCR 은 인간 HCCR, 특히 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간 HCCR 이다: (a) 인간 감마 1 HCCR; (b) 인간 감마 2 HCCR; 및 (c) 인간 감마 4 HCCR.
- [0457] 하나의 구현예에서 LCCR 은 인간 LCCR, 특히 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 인간 LCCR 이다: (a) 인간 카파 LCCR; 및 (b) 인간 람다 LCCR.
- [0458] 하나의 구현예에서 제 1 DNA 의 증폭은 HCVR 특이적 프라이머로 실시된다.
- [0459] 하나의 구현예에서 제 2 DNA 의 증폭은 LCVR 특이적 프라이머로 실시되며, 여기서 특히 LCVR 특이적 프라이머는 카파 LCVR 특이적 프라이머 및 람다 LCVR 특이적 프라이머로부터 선택된다. 하나의 구현예에서 LCVR 특이적 프라이머는 카파 LCVR 특이적 프라이머이며, 여기서 특히 카파 LCVR 특이적 프라이머는 SEQ ID NO: 12 ~ SEQ ID NO: 18 로부터 선택되는 임의의 하나와 SEQ ID NO: 19 의 조합이다. 하나의 구현예에서 LCVR 특이적 프라이

머는 램다 LCVR 특이적 프라이머이며, 여기서 특히 램다 LCVR 특이적 프라이머는 SEQ ID NO: 20 ~ SEQ ID NO: 27로부터 선택되는 임의의 하나와 SEQ ID NO: 28의 조합이다.

- [0460] 하나의 구현예에서 LCCR은 인간 카파 LCCR이며, 여기서 LCVR은 인간 카파 LCVR이다. 하나의 구현예에서 LCCR은 인간 램다 LCCR이며, 여기서 LCVR은 인간 램다 LCVR이다.
- [0461] 원칙적으로, 중쇄 및 경쇄를 포함하는 면역글로불린은 동일한 세포에서 2개의 상이한 발현 벡터를 발현시킴으로써 재조합 생성될 수 있다. 대안적으로, 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 발현 구축물은 단일 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 따라서, 하나의 구현예에서 제 1 발현 구축물 및 제 2 발현 구축물의 발현은 제 1 발현 구축물을 제 1 발현 벡터의 일부로서 발현시키고 제 2 발현 구축물을 제 2 발현 벡터의 일부로서 발현시키는 것을 포함하고, 여기서 제 1 발현 벡터 및 제 2 발현 벡터는 세포에 동시에 트랜스펙션된다. 하나의 구현예에서 제 1 발현 구축물 및 제 2 발현 구축물의 발현은 제 1 발현 구축물 및 제 2 발현 구축물을 동일한 발현 벡터의 일부로서 발현시키는 것을 포함한다.
- [0462] 중 특이적, 특히 인간, 항체의 발현을 위해 발현 카세트는 중, 특히 인간의 HCCR 또는 LCCR, 및 상응하는 리더 서열을 인코딩하고 상응하는 VR 코딩 영역을 삽입시킬 수 있게 하는 제한 자리를 포함하도록 생성된다. 하나의 구현예에서 제 1 발현 구축물의 생성은 제 1 DNA를 제 1 발현 카세트 내로 클로닝하는 단계를 포함하며, 여기서 제 1 발현 카세트는 HCCR, 및, 특히, HCCR 소수성 리더 서열을 인코딩한다. 하나의 구현예에서 제 2 발현 구축물의 생성은 제 2 DNA를 제 2 발현 카세트 내로 클로닝하는 단계를 포함하며, 여기서 제 2 발현 카세트는 LCCR, 및, 특히, LCCR 소수성 리더 서열을 인코딩한다.
- [0463] 하나의 구현예에서 항체는 하기로부터 선택되는 형태로 발현된다: (a) 단일 사슬 항체, 특히 scFv; (b) 다이아바디; (c) Fab 조각; (d) F(ab')₂ 조각; 및 (e) 특히 IgG, IgA, IgE, IgM, 및 IgD로부터 선택되는, 전장 항체. 하나의 구현예에서 항체는 완전 인간 항체이다.
- [0464] 하나의 구현예에서 항체는 IgG 클래스의 전체 항체로서, 특히 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로서 발현된다; 특히 항체는 인간 항체, 가장 특히 완전 인간 항체이다.
- [0465] 항체의 발현은 당업계에 공지된 임의의 진행 발현 시스템에서 실시될 수 있다. 전형적으로 그리고 특히, 항체의 발현은 진행 세포에서 실시되며, 여기서 더욱 특히 진행 세포는 효모 세포, 곤충 세포 및 포유류 세포로부터 선택된다. 하나의 구현예에서 항체의 발현은 포유류 세포에서 실시되며, 여기서 특히 포유류 세포는 HEK 세포, CHO 세포, COS 세포로부터 선택된다. 매우 특히 포유류 세포는 CHO 세포이다.
- [0466] 진행, 특히 포유류 세포의 표면에 전장 항체를 표시하기 위한 발현 벡터가 본원에서 추가로 보고된다. 발현 벡터는 하나의 구현예에서 바이러스 발현 벡터, 더욱 특히 렌티바이러스 발현 벡터이다. 하나의 구현예에서 발현 벡터는 신호 펩티드, 막관통 영역을 인코딩하는 DNA 엘리먼트를 포함하고, 여기서 발현 벡터는 발현 벡터 내로 항체 가변 영역을 인코딩하는 DNA 분자를 클로닝, 특히 방향 특이적 클로닝할 수 있게 하는 제한 자리를 포함한다. 추가의 바람직한 구현예에서 발현 벡터는 N-말단에서부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항체 중쇄, 및 막관통 영역을 포함하는 막-결합 항체를 발현할 수 있게 하는 방향으로 DNA 엘리먼트 및 제한 자리를 포함한다.
- [0467] 본원에서 보고되는 발현 벡터를 포함하는 발현 라이브러리, 특히 전장 항체를 발현하는 발현 라이브러리가 본원에서 보고된다.
- [0468] 본원에서 보고되는 발현 벡터를 포함하는 또는 본원에서 보고되는 발현 라이브러리의 하나 이상의 표본을 포함하는 진행, 특히 포유류 세포가 본원에서 보고된다.
- [0469] 항체 최적화/성숙 방법이 본원에서 추가로 보고된다. 방법은 특히 작은 내지 중간 크기의 다양성, 즉 400개 초과 변이체를 스크리닝하는데 적합하다. 방법은 포유류 세포, 특히 HEK293 세포를 사용하여 실시될 수 있다.
- [0470] 세포 표시에 의해 본원에서 보고되는 방법은
- [0471] - HEK293 세포 내에서/상에서 전장 항체의 발현 및 표시를 가능하게 하고;
- [0472] - 제한된 자원을 요구하는 효율적 과정을 가능하게 하고;
- [0473] - 모든 항체 변이체가 하나의 튜브에서 수득되는 경제적 원 튜브 프로세스 (economic one tube process)를 가능하게 하고;

- [0474] - 항체 성숙을 가능하게 하고; 및
- [0475] - 특정 생성 모드 예를 들어 인간 공여자로부터의, 또는 합성 DNA-올리고머를 사용하는 PCR 에 좌우되지 않는, 고가 라이브러리의 생성을 가능하게 한다.
- [0476] 최근 몇 년 동안 발달된 B-세포 기반 항체 생성 및 스크리닝 방법은 포유류 세포에서 디자인된/조작된/천연, IgG-기반 항체 라이브러리를 생성 및 스크리닝하는 새로운 방법을 제공한다.
- [0477] 103 ~ 106 의 다양성을 갖는 전장 항체의 디자인된/조작된/중간 다양성 포유류 세포 라이브러리의 사용 방법이 본원에서 보고된다.
- [0478] 106 개 이하 변이체의 라이브러리 크기는 하기를 허용한다
- [0479] - 1.000 경쇄 및 1.000 중쇄의 표시 (106 개의 상이한 항체를 초래함);
- [0480] - 단일 사슬의 서플링 및 다른 것은 일정하게 유지하는 것 (106 개의 가능한 변이체를 초래함);
- [0481] - 단일 CDR 의 성숙 (106 개의 변이체는 4 ~ 5 아미노산 위치의 무작위화를 가능하게 함 (위치 마다 19 아미노산 길이 변이체, 모든 아미노산에는 Cys 가 없음: 4 아미노산 위치가 무작위화되는 경우 130.000 변이체)).
- [0482] 막-결합 및 분비 형태로 발현되는 전장 IgG 를 사용하는 방법이 본원에서 보고된다.
- [0483] 항체 서열의 사용자-기반/무작위 디자인을 가능하게 하는 방법이 본원에서 보고된다.
- [0484] 항체 변이체의 FACS-기반 패닝 및/또는 스크리닝을 사용하는 방법이 본원에서 보고된다.
- [0485] 본원에서 보고되는 방법은 사전-선별된 인간 공여자-유래 항체 경쇄 및 중쇄 서열, 예를 들어 PCR 에 의해 생성된 인간 B-세포 유래 항체 서열의 조립에 사용될 수 있다.
- [0486] 하나의 구현예에서 B-세포는 혈액으로부터 유래/수득/단리된다.
- [0487] 본원에서 보고되는 방법은 예를 들어 개별 (단일) CDR 의 경쇄 서플링 또는 수식/무작위화에 의한 항체의 친화도, 종 교차-반응성, pH-의존적 항원 결합과 같은 항원 결합 특성의 성숙에 사용될 수 있다.
- [0488] 본원에서 보고되는 방법은 사전-선별된 인간 공여자-유래 항체 경쇄 및 중쇄 서열 (예를 들어 PCR 에 의해 단리된 인간 종양 B-세포 유래 항체 서열) 의 조립에 사용될 수 있다.
- [0489] 본원에서 보고되는 방법은 합리적으로 디자인된 항체 서열 (예를 들어 촉매성 항체, 전구-항체) 의 시험 및 조립에 사용될 수 있다. 따라서, 본원에서 보고되는 방법은 특정 서열 특색의 도입에 의한 항체 조작에 사용될 수 있다.
- [0490] 본원에서 보고되는 방법은 항체의 인간화를 위해, 예를 들어 고전적 CDR 그래프팅 접근법이 실패하는 경우 및/또는 1,000 또는 10,000 개의 변이체의 시험이 요구되는/의도되는 경우 역돌연변이의 확인을 위해 사용될 수 있다.
- [0491] 본원에서 보고되는 방법은 항체의 생물물리학적 및/또는 생화학적 특성 (예를 들어 안정성, 집합 경향) 의 최적화에 사용될 수 있다.
- [0492] 본원에서 보고되는 방법은 항체 발현 및/또는 분비의 최적화에 사용될 수 있다.
- [0493] 본원에서 보고되는 방법에서 사용되는 CDR 인코딩 핵산 또는 가변 도메인 인코딩 핵산 또는 B-세포는 면역화된 동물, 또는 질환에서 살아남은 동물, 또는 현재 활성 질환을 갖는 동물, 또는 인간 IgG 좌위를 갖는 트랜스제닉 동물, 또는 순수한 동물로부터 수득될 수 있다.
- [0494] 가변 도메인 내의 CDR 인코딩 핵산은 모두 자연 발생적 가변 도메인 (동물의 면역화 후 수득되는 것을 포함함) 에서 유래할 수 있거나, 또는 자연 발생적 CDR 와 합성 CDR 사이에서 혼합될 수 있거나, 또는 단독으로 합성 CDR 일 수 있다.
- [0495] 예를 들어 무작위화된 CDR3 인코딩 핵산을 포함하는 라이브러리는 개별 일원이 인코딩된 CDR3 의 길이에서 다양하고/거나 (예를 들어 4 ~ 25 아미노산 잔기 길이), 종결 코돈의 사용이 회피되고/거나, 시스테인 잔기의 발생이 회피되고/거나, 글리코실화 자리가 회피되고, 불안정 서열 모티브가 회피되고/거나, 각각의 위치에서 인간 CDR3 영역에 대한 4 개의 가장 흔한 아미노산 잔기가 무작위화된 라이브러리일 수 있다.

- [0496] 다양성 생성 모듈은 하기에서 다양할 수 있다
- [0497] - 무작위화된 CDR, 예를 들어 무작위화된 CDR3 (인간 CDR3 길이를 반영하는 서열 디자인, 정지-코돈 부재, 시스템 부재, N-글리코실화 자리 부재, 불안정 모티브 부재); 및/또는
- [0498] - 디자인된 CDR, 예를 들어 디자인 또는 기존 서열에 기초하는 "이성적" 서열 변이체; 및/또는
- [0499] - 공여자 CDR 또는 가변 도메인 (인간 공여자, 번역화된 동물 유래).
- [0500] 다양성 모듈은 PCR 또는 유전자 합성에 의해 생성될 수 있고, 발현 벡터 내로의 클로닝은 고전적 절찰 또는 서열 및 절찰 독립적 클로닝 (SLIC) 을 통해 실행될 수 있다.
- [0501] 발현 시스템에서 단일 특이성의 항체는 단일 세포에 의해 생성 및 표시된다. 이는 일시적 시스템에서 MOI (렌티바이러스 또는 바크맘 (bacmam)) 를 조절하여 바이러스 감염을 사용하여 또는 안정적 시스템에서 단일 재조합 사건 (LoxP, FLP) 에 의해 달성될 수 있다. 발현 시스템은 막-결합형 및/또는 분비형 전장 항체의 높은 수준의 발현을 보장해야 한다.
- [0502] 라이브러리 일원의 스크리닝은 패닝을 통한 히트의 단리에 의해 및/또는 FACS 선별에 의해 실시될 수 있다. 분비형 항체의 스크리닝은 상청액에서 실시될 수 있다. 선별된 클론의 가변 도메인 인코딩 핵산은 PCR 에 의해 단리된다.
- [0503] 따라서, FACS 및/또는 비드-기반 방법에 의한 (예를 들어 친화도개선된) 결합체의 항원-주도 농축 방법이 본원에서 보고된다.
- [0504] **본원에서 보고되는 세포 표시 방법**
- [0505] 전장 항체 라이브러리의 표시 방법:
- [0506] 다양성 생성 모듈, 예컨대 항체의 무작위화된 CDR3 인코딩 핵산 서열을 포함하는 DNA 라이브러리가 본원에서 보고되는 렌티바이러스 표시 벡터 내로 도입된다.
- [0507] 렌티바이러스 표시 벡터 및 요구되는 헬퍼 플라스미드를 포함하는 다양성 생성 모듈이 감염성 바이러스 입자의 생성을 위한 발현 시스템 내로 도입된다.
- [0508] 바이러스-함유 상청액의 단리 및 바이러스 로드의 정량화 (예를 들어 형질도입 실험에 의해 또는 RT-PCR 을 통해) 후에 포유류 세포, 예컨대 HEK293 세포가, MOI 를 조정하여 라이브러리 생성을 위해 형질도입되어, 라이브러리의 막-결합 일원을 표시하는 동시에 라이브러리의 가용성 일원을 분비하는 세포가 수득된다.
- [0509] 예를 들어 친화도, 중 교차-반응성, pH-의존적 항원 결합에 관하여, 사전결정된 특성을 갖는 항체 변이체를 표시하는 세포를 식별 및 선별하기 위해 개별 라이브러리 일원은 라이브러리의 막-결합 일원에 기초하여 스크리닝된다.
- [0510] 다음 단계에서 선별된 세포는 클론 세포 집단을 수득하기 위해 단일 세포로서 침적되거나, 또는 세포의 푸울로서 침적된다. 그 후 침적된 세포는 배양되어 항체 변이체를 생성한다. 분비형 항체 변이체는 후속 특성 분석, 예컨대 1 차 스크리닝에 사용될 수 있다.
- [0511] 첫번째 스크리닝에서 선별된 클론 또는 집단은 장기배양 배양된다.
- [0512] 그 후 가변 도메인 인코딩 핵산이 단리된다.
- [0513] 이중특이적 항체 라이브러리의 표시 방법:
- [0514] 이중특이적 항체는 일반적으로 동일한 항원 상의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 또는 상이한 항원 상의 2 개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 분자이다.
- [0515] 상이한 이중특이적 항체 포맷이 알려져 있다.
- [0516] 본원에서 보고되는 방법에서 사용될 수 있는 예시적 이중특이적 항체 포맷은 하기이다
- [0517] - 크로스맵 포맷: 제 1 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 결합 자리 및 제 2 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 결합 자리를 포함하는 전장 IgG 항체, 여기서 개별 사슬은 다음과 같다
- [0518] - 경쇄 1 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인)

- [0519] - 경쇄 2 (가변 경쇄 도메인 + 중쇄 CH1 도메인)
- [0520] - 중쇄 1 (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이를 포함하는 CH3)
- [0521] - 중쇄 2 (가변 중쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인 + 힌지 + CH2 + 홑 돌연변이를 포함하는 CH3);
- [0522] - 1-팔 단일 사슬 포맷: 제 1 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 결합 자리 및 제 2 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 결합 자리를 포함하는 항체, 여기서 개별 사슬은 다음과 같다
- [0523] - 경쇄 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인)
- [0524] - 조합된 경/중쇄 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인 + G4S-링커 + 가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홑 돌연변이를 포함하는 CH3)
- [0525] - 중쇄 (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이를 포함하는 CH3);
- [0526] - 2-팔 단일 사슬 포맷: 제 1 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 결합 자리 및 제 2 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 결합 자리를 포함하는 항체, 여기서 개별 사슬은 다음과 같다
- [0527] - 조합된 경/중쇄 1 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인 + G4S-링커 + 가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이를 포함하는 CH3)
- [0528] - 조합된 경/중쇄 2 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인 + G4S-링커 + 가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홑 돌연변이를 포함하는 CH3);
- [0529] - 공통 경쇄 이중특이적 포맷: 제 1 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 결합 자리 및 제 2 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 결합 자리를 포함하는 항체, 여기서 개별 사슬은 다음과 같다
- [0530] - 경쇄 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인)
- [0531] - 중쇄 1 (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이를 포함하는 CH3)
- [0532] - 중쇄 2 (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홑 돌연변이를 포함하는 CH3).
- [0533] - 4 가 scFv 포맷: 제 1 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 결합 자리 및 제 2 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 결합 자리 (scFv) 를 포함하는 이중특이적 4 가 항체, 여기서 개별 사슬은 다음과 같다
- [0534] - 경쇄 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인)
- [0535] - 조합된 중쇄 - scFv (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + CH3 + G4S-링커 + scFv).
- [0536] - 4 가 scFab 포맷: 제 1 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 결합 자리 및 제 2 에피토프 또는 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 결합 자리 (scFv) 를 포함하는 이중특이적 4 가 항체, 여기서 개별 사슬은 다음과 같다
- [0537] - 경쇄 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인)
- [0538] - 조합된 중쇄 - scFab (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + CH3 + G4S-링커 + scFab).
- [0539] 앞서 개요를 나타낸 이중특이적 항체 포맷에 대한 발현 카세트의 엘리먼트의 구조는 다음과 같다 (5' 에서 3' 방향으로, 또한 도 7 참조):
- [0540] - 크로스맵 포맷:
- [0541] [5'-LTR + 패키징 엘리먼트 + RRE] - [hCMV 프로모터] - [경쇄 1 또는 2] - [IRES] - [중쇄 1 또는 2] - [WPRE + 3'-LTR];
- [0542] - 1-팔 단일 사슬 포맷:
- [0543] 1) [5'-LTR + 패키징 엘리먼트 + RRE] - [hCMV 프로모터] - [경쇄] - [IRES] - [중쇄] - [WPRE + 3'-LTR], 및/또는
- [0544] 2) [5'-LTR + 패키징 엘리먼트 + RRE] - [hCMV 프로모터] - [조합된 경/중쇄] - [WPRE + 3'-LTR];

- [0545] - 2-팔 단일 사슬 포맷:
- [0546] [5'-LTR + 패키징 엘리먼트 + RRE] - [hCMV 프로모터] - [조합된 경/중쇄 1 또는 2] - [WPRE + 3'-LTR];
- [0547] - 공통 경쇄 이중특이적 포맷:
- [0548] 1) [5'-LTR + 패키징 엘리먼트 + RRE] - [hCMV 프로모터] - [중쇄 1] - [IRES] - [중쇄 2] - [WPRE + 3'-LTR],
및/또는
- [0549] 2) [hCMV 프로모터] - [경쇄] - [bGH polyA];
- [0550] - 4 가 scFv 포맷:
- [0551] 1) [5'-LTR + 패키징 엘리먼트 + RRE] - [hCMV 프로모터] - [중쇄] - [IRES] - [경쇄] - [WPRE + 3'-LTR];
- [0552] - 4 가 scFab 포맷:
- [0553] 1) [5'-LTR + 패키징 엘리먼트 + RRE] - [hCMV 프로모터] - [중쇄] - [IRES] - [경쇄] - [WPRE + 3'-LTR].
- [0554] 진핵 세포의 표면 상의 전장 항체의 표시 및 세포의 선별을 위한 워크플로우가 아래 기재되어 있다:
- [0555] 제 1 단계에서 본원에서 보고되는 요구되는 발현 벡터(들)은 표시될 이중특이적 항체 포맷에 기초하여 구축된다.
- [0556] 그 후 2 개의 독립적 바이러스 입자가 각각의 항체 절반에 대해 생성된다. 세포가 셔틀 벡터 및 헬퍼 플라스미드로 트랜스펙션되어 복제 무능이나 감염성인 바이러스 입자를 생성한다.
- [0557] 표시 라이브러리의 생성을 위해 하기 중 하나가 실시된다
- [0558] - 포유류 세포가 각각의 항체 부분을 인코딩하는 2 개의 바이러스 입자 둘다로 낮은 MOI (감염 다중도) 로 감염 되거나, 또는
- [0559] - 포유류 세포가 제 1 항체 절반을 인코딩하는 바이러스 입자로 낮은 MOI 로 감염되고, 후속적으로 세포가 제 2 항체 절반에 대한 바이러스 입자로 감염되거나, 또는
- [0560] - 공통 경쇄를 안정적으로 발현하는 포유류 세포가 2 개의 중쇄를 인코딩하는 바이러스 입자로 감염된다.
- [0561] 그 후 이중특이적 모노클로날 항체를 발현하는 형질도입된 세포가 선별/농축된다.
- [0562] 이중특이적 항체를 발현하는 항원 결합 세포가 예를 들어 FACS 를 사용하여 단일 세포로서 또는 푸울로서 소팅 (침적) 된다.
- [0563] 소팅된 세포는 배양되고 증식된다.
- [0564] 그 후 이중특이적 항체를 발현하는 FACS 소팅되고 배양된 세포의 세포 상청액 중 분비형 항체의 기능적 스크리닝이 실시된다.
- [0565] 그 후 기능적 이중특이적 항체를 발현하는 세포의 선발이 실시된다.
- [0566] 마지막으로 조합된 경쇄 및 중쇄 발현 카세트가 PCR 및 DNA-시퀀싱에 의해 클로닝된다.
- [0567] 단일 표적에 대항하는 이중특이적 항체에 대한 발현 벡터의 생성을 위해 토끼 또는 마우스가 표적 단백질을 재조합적으로 또는 자연적으로 발현하는 재조합 표적 단백질을 또는 세포로 면역화된다. 비장 세포 또는 말초 혈액 세포가 면역화 후에 수집되고, RNA 가 제조된다. 항원 특이적 B-세포는 형광 라벨링된 항원을 선별 마커로서 사용하여 별크로서 FACS 에 의해 농축될 수 있다. 그 후 cDNA 가 생성되고, 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인이 PCR 에 의해 증폭되고 본원에서 보고되는 전장 IgG 를 위한 표시 벡터 내로 또는 발현 및 생성을 위한 발현 벡터 내로 결합된다.
- [0568] 공통 경쇄 항체의 생성을 위해 트랜스제닉 토끼가 위에 기재된 바와 같이 면역화된다. 트랜스제닉 토끼는 녹아웃 (knocked out) 토끼 IgM 및 카파 Ig 좌위를 갖는다. 녹아웃 토끼 Ig 좌위는 인간 경쇄 및 중쇄 유전자를 포함하는 인간 Ig 좌위로 대체된다. 경쇄 유전자는 이미 트랜스제닉 Ig 좌위에서 완전히 재배열되어 이들 토끼로부터 수득되는 모든 B-세포에서 단일 경쇄의 발현을 초래한다. 중쇄 이식유전자는 재배열되지 않는다. 중쇄는 J- 및 D-요소를 갖는 가변 유전자의 무작위 재배열, 체세포 초돌연변이 및 유전자 전환을 통해 고도로 다양하다 (예를 들어 WO 2005/007696 참조).

- [0569] 바이러스 입자의 생성을 위해 서플 벡터 (= 본원에서 보고되는 렌티바이러스 표시 벡터)가 헬퍼 플라스미드와 함께 HEK293 세포 내로 동시트랜스펙션된다 (예를 들어 셀펙틴 (Cellfectin)에 의한 트랜스펙션). 바이러스 입자 함유 상청액이 원심분리에 의해 수집된다. 감염성 바이러스 입자의 수가 적정량의 바이러스 스톱으로 HEK293 세포를 형질도입하여 시험될 수 있다. 항체 발현 HEK293 세포의 수는 FACS에 의해 계수된다.
- [0570] 항체 발현 및 표시 HEK293 세포의 생성을 위해 낮은 MOI의 서플 벡터 함유 바이러스로 세포가 감염된다. 특정 항체를 발현하는 세포가 형광 라벨 항원으로 라벨링된 후에 FACS에 의해 별크로서 선별되고 소팅된다. 단리 후에 경쇄 및 중쇄의 항원 특이적 조합이 PCR에 의해 IRES를 포함하는 하나의 조각으로서 단리되며, 즉 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 동족 조합이 보존된다.
- [0571] 절반-항체 라이브러리의 생성을 위해 PCR-DNA 조각 (항원 특이적 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩함)이 농 및 홀 발현 벡터 내에 결합된다. 농 및 홀 구축물 둘 모두에 대해 바이러스 입자가 앞서 기재된 바와 같이 생성된다.
- [0572] 이중특이적 항체의 표시를 위해 상이한 바이러스로 형질도입하여 농 및 홀 기반 항체 중쇄 둘 모두를 발현하는 HEK293 세포가 생성된다. 소팅/선별을 위해 가용성, 형광 라벨 항원이 세포에 첨가된다. 세포가 여러 번 세정되어 2가 결합체에 대해 선별된다 (2개의 항체 팔에 결합된 항원의 더 느린 오프-레이트). 긴 반감기 결합체가 FACS에 의해 단일 세포로서 소팅된다.
- [0573] 기능적 이중특이적 항체의 스크리닝을 위해 배양된 HEK293 세포의 상청액 중 분비형 항체가 기능적 검정에서, 세포 기반 또는 비-세포 기반으로 시험된다 (예를 들어 수용체 인산화, 증식, 세포자멸사의 유도). 선별된 클론으로부터 기능적 활성 항체의 경쇄 및 중쇄가 HEK293 세포로부터 PCR에 의해 클로닝된다.
- [0574] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 진행 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법이다:
- [0575] - 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- [0576] - 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 별크 소트에 의함),
- [0577] - 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서플 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응, SEQ ID NO: 6 ~ SEQ ID NO: 10의 프라이머 중 하나 이상 또는 전부 및 SEQ ID NO: 11의 프라이머를 사용하는 농 사슬에 대한 하나 및 SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 4의 프라이머 중 하나 이상 또는 전부 및 SEQ ID NO: 5의 프라이머를 사용하는 홀 사슬에 대한 하나; 결합: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 홀-좌위 내로 막관통 도메인 없이, 즉 EV71-IRES의 상류에 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 농-좌위 내로 막관통 도메인과 함께, 즉 EV71-IRES의 하류에,
- [0578] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 안정적으로 발현하는 포유류 세포의 감염, 포유류 세포의 표면에 표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론)의 별크 소트,
- [0579] - EV71-IRES를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (TM 도메인을 갖지 않음)의 PCR 및, 예를 들어 SEQ ID NO: 29 및 SEQ ID NO: 30의 프라이머를 사용하여, 제 2 서플 벡터 내로 막관통 도메인 없이 클로닝,
- [0580] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.
- [0581] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 진행 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법이다:
- [0582] - 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- [0583] - 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 별크 소트에 의함),
- [0584] - 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서플 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응; 결합: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 홀-좌위 내로 막관통-도메인과 함께, 즉 EV71-IRES의 상류에, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 농-좌위 내로 막관통 도메인과 함께, 즉 EV71-IRES의 하류에,
- [0585] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 포유류 세포 막-표시된 이중특이적 항체의 선별

(오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,

- [0586] - EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 및 제 2 서플 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝; 벡터의 제한 절단 및 재결합에 의한 제 1 중쇄의 막관통-도메인의 제거,
- [0587] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 이중특이적 항체의 선별.
- [0588] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법이다:
- [0589] - 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- [0590] - 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 벌크 소트에 의함),
- [0591] - 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서플 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응; 결찰: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 제 1 서플 벡터 내로 홀-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 또는 없이, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 제 2 서플 벡터 내로 홑-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 또는 없이, 그러나 하나 이상은 막관통 도메인을 가짐,
- [0592] - 바이러스 생성 (제 1 서플 벡터에 대해 하나 및 제 2 서플 벡터에 대해 하나), 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 제 1 바이러스 및 제 2 바이러스에 의한 순차적 감염, 포유류 세포의 표면에 표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,
- [0593] - 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 PCR 및 제 3 서플 벡터 내로 바이시스트로닉 발현 유닛 내에 막관통 도메인 및 EV71-IRES 없이 클로닝,
- [0594] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.
- [0595] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 이중특이적 항체의 표시 및 그러한 진핵 세포의 선별에 의한 또한 이중특이적 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법이다:
- [0596] - 제 1 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 제 1 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 면역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함,
- [0597] - 제 2 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 제 2 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 면역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현하고,
- [0598] 제 1 항원 및 제 2 항원은 상이함,
- [0599] - 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해, 제 1 및 제 2 면역화된 실험 동물의 B-세포를 선별하는 단계,
- [0600] - 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,
- [0601] - 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 상류에 홀- 또는 홑-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 결찰, 및 동일한 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES 의 하류에 각각의 다른 좌위 내로 막관통 도메인과 함께 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 결찰, 즉 IRES 의 상류에 있는 중쇄가 홀-좌위를 갖는 경우 IRES 의 하류에 있는 중쇄는 홑-좌위를 갖고 그 반대도 그러함, 여기서 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 상이함,
- [0602] - 바이러스 생성,
- [0603] - 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- [0604] - 이중 표시된 형질도입된 세포의 FACS 에 의한 표면에 이중특이적 항체를 표시하는 세포의 선별,

- [0605] - EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 및 제 2 서틀 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝; 벡터의 제한 절단 및 재결합에 의한 제 1 중쇄의 막관통-도메인의 제거,
- [0606] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.
- [0607] 본원에서 보고되는 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 이중특이적 항체의 표시 및 그러한 진핵 세포의 선별에 의한 또한 이중특이적 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법이다:
- [0608] - 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 면역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함,
- [0609] - 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해, 면역화된 실험 동물의 B-세포를 선별하는 단계,
- [0610] - 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,
- [0611] - 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 하류에 중쇄 좌위 내로 막관통 도메인과 함께 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 결합, 여기서 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터는 IRES 의 상류에 공통 경쇄 인코딩 핵산을 포함함,
- [0612] - 바이러스 생성,
- [0613] - 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- [0614] - 항원 특이적 표지된 형질도입된 세포의 FACS 에 의한, 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의한, 표면에 항체를 표시하는 세포의 선별,
- [0615] - 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 선별된 세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,
- [0616] - 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 상류에 홀- 또는 늑-좌위 내로 막관통 도메인 없이 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 결합, 및 동일한 서틀 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES 의 하류에 각각의 다른 좌위 내로 막관통 도메인 없이 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 결합, 즉 IRES 의 상류에 있는 중쇄가 홀-좌위를 갖는 경우 IRES 의 하류에 있는 중쇄는 늑-좌위를 갖고 그 반대로도 그러함, 여기서 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있음,
- [0617] - 바이러스 생성,
- [0618] - 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- [0619] - 이중특이적 항체를 분비하는 세포의 선별.
- [0620] 모든 양상의 하나의 구현예에서 B-세포가 동일한 경쇄를 발현하는 실험 동물, 즉 모든 B-세포가 오직 단일 경쇄를 발현하는 실험 동물은 트랜스제닉 실험 동물이다. 하나의 구현예에서 트랜스제닉 실험 동물은 녹아웃 IgM 및 카파 Ig 좌위를 가지며, 이 좌위는 인간 경쇄 및 중쇄 유전자를 포함하는 인간 Ig 좌위로 대체되며, 여기서 경쇄 유전자는 트랜스제닉 Ig 좌위에서 완전히 재배열되고 중쇄 이식유전자는 재배열되지 않는다. 이러한 구현예에서 중쇄는 J- 및 D-요소를 갖는 가변 유전자의 무작위 재배열, 체세포 초돌연변이 및 유전자 전환을 통해 고도로 다양하다.
- [0621] 모든 양상의 하나의 구현예에서 공통 경쇄 이중특이적 항체는 comprises 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 결합 자리 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 결합 자리를 포함하며, 여기서 개별 사슬은 다음과 같다
- [0622] - 경쇄 (가변 경쇄 도메인 + 경쇄 카파 불변 도메인),
- [0623] - 제 1 중쇄 (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 홀 돌연변이를 포함하는 CH3),

- [0624] - 제 2 중쇄 (가변 중쇄 도메인 + CH1 + 힌지 + CH2 + 좁 돌연변이를 포함하는 CH3).
- [0625] 본원에서 보고되는 모든 양상의 하나의 구현예에서 B-세포로부터 중쇄 가변 영역의 증폭에 사용되는 프라이머는 i) SEQ ID NO: 5 의 프라이머와 조합된 SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 4 의 프라이머, 및/또는 ii) SEQ ID NO: 11 의 프라이머와 조합된 SEQ ID NO: 6 ~ SEQ ID NO: 10 의 프라이머이다.
- [0626] 본원에서 보고되는 모든 양상의 하나의 구현예에서 B-세포로부터 경쇄 (카파) 가변 영역의 증폭에 사용되는 프라이머는 SEQ ID NO: 19 의 프라이머와 조합된 SEQ ID NO: 12 ~ SEQ ID NO: 18 의 프라이머이다.
- [0627] 본원에서 보고되는 모든 양상의 하나의 구현예에서 B-세포로부터 경쇄 (람다) 가변 영역의 증폭에 사용되는 프라이머는 SEQ ID NO: 28 의 프라이머와 조합된 SEQ ID NO: 20 ~ SEQ ID NO: 27 의 프라이머이다.
- [0628] 본원에서 보고되는 모든 양상의 하나의 구현예에서 HEK 세포로부터 중쇄 가변 영역의 증폭에 사용되는 프라이머는 SEQ ID NO: 30 의 프라이머와 조합된 SEQ ID NO: 29 의 프라이머이다.
- [0629] 표지 벡터:
- [0630] 기본 렌티바이러스 발현 벡터에서 오직 제한된 용량의 항체 인코딩 핵산이 이용가능하며, 이는 5'-LTR 에서부터 3'-LTR 까지 약 9 kb 초과와 벡터가 렌티바이러스 바이러스 입자 내로 패키징될 수 없기 때문이다. 5'-LTR 에서부터 CMV-프로모터 (2.7 kb) 까지 및 WPRE 엘리먼트에서부터 3'-LTR (1.5 kb) 까지의 영역은 4.2 kb 크기를 커버한다 (실시예 1). 최대 4.8 kb 가 바이러스 생성 효율을 감소시키지 않으면서 편입될 수 있다.
- [0631] 더욱 상세하게는 최대 약 4800 bp 가 기본 벡터 내로 편입될 수 있는데, 이는 바이러스 역가가 4800 bp 한계에 걸쳐 매 1000 bp 마다 반감되기 때문이다.
- [0632] EV71-IRES 를 통해 커플링하는 조합된 발현 경쇄 및 중쇄에 대한 발현 카세트가 사용되어 DNA 인서트 (insert) 를 단축할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 경쇄에 대한 인코딩 핵산이 중쇄의 인코딩 핵산 앞에 사용된다.
- [0633] 하나의 구현예에서 EV71-IRES 는 SEQ ID NO: 31 의 서열을 갖는다.
- [0634] 2 개의 인코딩 핵산의 커플링되는 발현에 엔테로바이러스 71 (EV71) 의 IRES 가 특히 적합하다는 것이 밝혀졌다. 뇌심근염 바이러스 (EMCV), 마우스 Gtx, 인간 ELF4g 에서 유래하는 IRES 엘리먼트는 EV71-IRES 엘리먼트의 효율의 15 % 미만의 효율을 갖는다.
- [0635] 바이시스트로닉 발현 엘리먼트의 발현은 인트론 A 를 포함하는 인간 CMV-프로모터에 의해 추진된다. 바이시스트로닉 발현 엘리먼트는 분비형 (즉, 가용성) 및 막-결합 형태의 전장 인간 또는 인간화 또는 키메라 또는 비-인간 동물 유래 항체를 인코딩한다.
- [0636] 편입물의 엘리먼트는 생성된 항체에 따라 하기 크기를 갖는다:
- [0637] i) 오직 막-결합형 항체:
- | | |
|------------------------|-------------------|
| hCMV 인트론 A | 1100 bp (선택적) |
| LC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지) | 750 bp (cDNA) |
| EV71-IRES | 650 bp |
| HC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지) | 1450 bp (cDNA) |
| 단축된 TM 도메인 (M1/M2 융합물) | 215 bp (cDNA) |
| 총 | 4165 bp (3065 bp) |
- [0638]
- [0639] ii) 막-결합형 및 분비형 항체 (1):
- | | |
|--------------------------|----------------|
| LC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지) | 750 bp (cDNA) |
| EV71-IRES | 650 bp |
| HC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지) | 1450 bp (cDNA) |
| TM 도메인 (인트론 6+M1/M2 융합물) | 1517 bp (cDNA) |
| 총 | 4367 bp |
- [0640]

[0641] iii) 막-결합형 및 분비형 항체 (2):

LC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	750 bp (cDNA)
EV71-IRES	650 bp
HC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1450 bp (cDNA)
TM 도메인 (인트론 6+M1/M2 융합물)	1517 bp (cDNA)
퓨로마이신-내성	600 bp
총	4967 bp

[0642]

[0643] iv) IRES 가 없는 막-결합형 및 분비형 항체 (2):

LC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	750 bp (cDNA)
bGH polyA 신호 서열	230 bp
hCMV-프로모터	600 bp
HC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1450 bp (cDNA)
TM 도메인 (인트론 6+M1/M2 융합물)	1517 bp (cDNA)
bGH polyA 신호 서열	230 bp
총	4777 bp

[0644]

[0645] 하나의 구현예에서 bGH polyA 신호 서열 은 SEQ ID NO: 32 의 서열을 갖는다. 하나의 구현예에서 hCMV 프로모터는 SEQ ID NO: 33 의 서열을 갖는다.

[0646] 하나의 구현예에서 인트론6+M1/M2 융합물은 SEQ ID NO: 34 의 서열을 갖는다.

[0647] v) 막-결합 2 중쇄 (KiH):

HC1 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1450 bp (cDNA)
단축된 TM 도메인 (M1/M2 융합물)	215 bp (cDNA)
EV71-IRES	650 bp
HC2 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1450 bp (cDNA)
단축된 TM 도메인 (M1/M2 융합물)	215 bp (cDNA)
총	3980 bp

[0648]

[0649] vi) 단일 막-결합 2 중쇄 (KiH):

HC1 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1450 bp (cDNA)
EV71-IRES	650 bp
HC2 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1450 bp (cDNA)
단축된 TM 도메인 (M1/M2 융합물)	215 bp (cDNA)
총	3765 bp

[0650]

[0651] vii) 막-결합 scFv 포맷:

LC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	750 bp (cDNA)
EV71-IRES	650 bp
HC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1400 bp (cDNA)
scFv (링커를 포함함)	750 bp
단축된 TM 도메인 (M1/M2 융합물)	215 bp (cDNA)
총	3765 bp

[0652]

[0653] viii) 막-결합 scFab 포맷:

LC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	750 bp (cDNA)
EV71-IRES	650 bp
HC 인코딩 핵산 (개시에서 종결까지)	1400 bp (cDNA)
scFab (링커를 포함함)	1470 bp
단축된 TM 도메인 (M1/M2 융합물)	215 bp (cDNA)
총	4485 bp

[0654]

[0655] 하나의 구현예에서 M1/M2 융합은 SEQ ID NO: 35 의 서열을 갖는다.

- [0656] EV71-IRES 가 바이시스트로닉 발현 엘리먼트를 사용하여 (백터 크기를 작게 유지하여) 중쇄 및 경쇄의 조합된 발현을 허용한다는 것이 밝혀졌다.
- [0657] EV71-IRES 엘리먼트에 의한 중쇄 발현 카세트에 대한 경쇄 발현 카세트의 연결을 사용하여 증가된 발현 (생산성) 이 수득될 수 있다는 것이 밝혀졌다:
- [0658] - IRES 가 없는 px5068: 100 % 항체 발현 (레퍼런스)
- [0659] - Gtx-IRES (합성): 3 %
- [0660] - EV71-IRES: 80 %
- [0661] - ELF4G-IRES: 5 %
- [0662] - EMCV-IRES: 11 %
- [0663] 대안적 스플라이스 앵커가 사용되어 막-결합형 및 분비형 항체 둘 모두의 동시 발현을 추진할 수 있다는 것이 밝혀졌다.
- [0664] 독특한 제한 자리가 편입되어 PCR 에 의해 생성된 가변 경쇄 및 중쇄 인코딩 핵산의 도입을 허용할 수 있었다.
- [0665] 모든 인간 프레임워크를 증폭할 수 있는 축퇴된 프라이머 (호환성 제한 자리를 가짐) 가 사용되었다.
- [0666] 본원에서 보고되는 방법으로 예를 들어 인간화에 의해 또는 친화도 성숙에 의해 또는 면역화 캠페인 동안 수득되는 상이한 항체에서 유래하는 상이한 결합 특이성의 조합에 의한 모노클로날 항체의 조합인 이중특이적 항체가 식별될 수 있다.
- [0667] 본원에서 보고되는 방법으로 다수의 이중특이적 항체가 생성되고 상승작용적 조합의 확인을 위해 스크리닝될 수 있다.
- [0668] **본원에서 보고되는 본 발명의 예시적 항목은 다음과 같다**
- [0669] 1. 하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 발현 세포의 선별 방법:
- [0670] (a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진행 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 각각의 렌티 바이러스 바이러스 입자는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하고, 바이시스트로닉 발현 카세트는 EV71-IRES 의 상류에 있는 홀- 또는 늑-좌위에 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산 및 EV71-IRES 의 하류에 있는 각각의 다른 좌위에 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 포함하고, 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있고, 진행 세포는 공통 경쇄를 발현하고, 중쇄 중 하나 또는 둘다는 그들의 C-말단에서 막관통 도메인을 추가로 포함함, 및
- [0671] (b) 표시된 막-결합 전장 이중특이적 항체의 특성에 따라 진행 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계.
- [0672] 2. 제 1 항에 있어서, EV71-IRES 의 하류에 있는 중쇄만이 그것의 C-말단에서 막관통 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0673] 3. 하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 분비 세포의 선별 방법:
- [0674] (a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진행 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 각각의 렌티 바이러스 바이러스 입자는 분비형 이중특이적 항체를 인코딩하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하고, 바이 시스트로닉 발현 카세트는 EV71-IRES 의 상류에 있는 홀- 또는 늑-좌위에 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산 및 EV71-IRES 의 하류에 있는 각각의 다른 좌위에 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 포함하고, 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있고, 진행 세포는 공통 경쇄를 발현함, 및
- [0675] (b) 분비된 전장 이중특이적 항체의 특성에 따라 진행 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계.
- [0676] 4. 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 진행 세포 집단의 각각의 세포가 단일 전장 이중특이적 항체를 표시 또는 분비하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0677] 5. 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 단계 중 하나 이상을 제 1 단계로서 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- [0678] - 관심의 항원으로 트랜스제닉 동물을 면역화하는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함, 및/또는
- [0679] - 면역화된 실험 동물의 B-세포를 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해 선별하는 단계, 및/또는
- [0680] - 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계.
- [0681] 6. 제 1 항 내지 제 2 항 또는 제 4 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0682] - EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 을 수행하고, 임의로 제 1 중쇄의 막관통-도메인이 존재하는 경우 그것을 벡터의 제한 절단 및 재결합에 의해 제거하여, 제 2 서플 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝하는 단계.
- [0683] 7. 제 1 항 내지 제 2 항 또는 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0684] - 프로모터,
- [0685] - 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0686] - 임의로 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산,
- [0687] - EV71-IRES,
- [0688] - 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- [0689] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0690] 8. 제 3 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0691] - 프로모터,
- [0692] - 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0693] - EV71-IRES,
- [0694] - 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산.
- [0695] 9. 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 가, 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0696] 10. 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 개의 상이한 항원에 또는 동일한 항원 상의 2 개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0697] 11. 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 낚 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0698] 12. 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0699] 13. 제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0700] 14. 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0701] 15. 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

- [0702] 16. 제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0703] 17. 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0704] 18. 제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0705] 19. 제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0706] 20. 제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0707] 21. 하기 단계를 포함하는 항체 발현 세포의 선별 방법:
- [0708] (a) 렌티바이러스 바이러스 입자 집단으로 형질도입하여 진핵 세포 집단을 생성하는 단계, 여기서 세포 집단의 각각의 세포는 막-결합 전장 항체를 표시하고, 항체의 둘 이상의 사슬은 바이시스트로닉 발현 카세트에 의해 인코딩되고, 항체는 하나 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합함, 및
- [0709] (b) 표시된 막-결합 전장 항체의 특성에 따라 진핵 세포 집단으로부터 세포를 선별하는 단계,
- [0710] 여기서 렌티바이러스 바이러스 입자 집단의 각각의 렌티바이러스 바이러스 입자는 막-결합 항체의 발현을 위한 EV71-IRES 를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함함.
- [0711] 22. 제 21 항에 있어서, 렌티바이러스 바이러스 입자 집단의 렌티바이러스 바이러스 입자의 각각의 바이시스트로닉 발현 카세트가 하나 이상의 항원 또는 동일한 항원 상의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 부모 항체의 상이한 변이체를 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0712] 23. 제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0713] - 프로모터,
- [0714] - 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0715] - EV71-IRES,
- [0716] - 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0717] - 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0718] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0719] 24. 제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0720] - 프로모터,
- [0721] - 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0722] - 임의로 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산,
- [0723] - EV71-IRES,
- [0724] - 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- [0725] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0726] 25. 제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0727] - 프로모터,

- [0728] - 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0729] - EV71-IRES,
- [0730] - 그것의 C-말단에서 scFv 에 연결된 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0731] - 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0732] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0733] 26. 제 21 항 또는 제 22 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0734] - 프로모터,
- [0735] - 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0736] - EV71-IRES,
- [0737] - 그것의 C-말단에서 scFab 에 연결된 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0738] - 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0739] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0740] 27. 제 21 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 집단의 각각의 세포가 막-결합 전장 항체를 표시하고, 전장 항체를 분비하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0741] 28. 제 21 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 집단의 각각의 세포가 단일 전장 항체를 표시하고 분비하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0742] 29. 제 21 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항원에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0743] 30. 제 21 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 가 단일특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0744] 31. 제 21 항 내지 제 22 항 또는 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 가, 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0745] 32. 제 21 항 내지 제 22 항 또는 제 25 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 4 가, 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0746] 33. 제 21 항 내지 제 28 항 또는 제 31 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2 개의 상이한 항원에 또는 동일한 항원 상의 2 개의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0747] 34. 제 31 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 짝 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0748] 35. 제 31 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0749] 36. 제 21 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0750] 37. 제 21 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0751] 38. 제 21 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0752] 39. 제 21 항 내지 제 38 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는

방법.

- [0753] 40. 제 21 항 내지 제 39 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0754] 41. 제 21 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0755] 42. 제 21 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0756] 43. 제 21 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0757] 44. 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트:
- [0758] - 프로모터,
- [0759] - 전장 항체 경쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0760] - EV71-IRES,
- [0761] - 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0762] - 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0763] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0764] 45. 5'- 에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트:
- [0765] - 프로모터,
- [0766] - 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0767] - EV71-IRES,
- [0768] - 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- [0769] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0770] 46. 제 44 항 또는 제 45 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 짝 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0771] 47. 제 44 항 내지 제 46 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0772] 48. 제 44 항 내지 제 47 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0773] 49. 제 44 항 내지 제 48 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0774] 50. 제 44 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0775] 51. 제 44 항 내지 제 50 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0776] 52. 제 44 항 내지 제 51 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.

- [0777] 53. 제 44 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0778] 54. 제 44 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0779] 55. 제 44 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [0780] 56. 제 44 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 따른 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포.
- [0781] 57. 제 56 항에 있어서, 바이시스트로닉 발현 카세트가 세포 내로 형질도입된 것을 특징으로 하는 진핵 세포.
- [0782] 58. 제 56 항 또는 제 57 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.
- [0783] 59. 제 58 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.
- [0784] 60. 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터:
- [0785] - 프로모터,
- [0786] - 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0787] - EV71-IRES,
- [0788] - 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산,
- [0789] - 스플라이싱가능한 인트론, 및
- [0790] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0791] 61. 5'-에서 3'-방향으로 하기를 포함하는 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터:
- [0792] - 프로모터,
- [0793] - 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 핵산,
- [0794] - EV71-IRES,
- [0795] - 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 핵산, 및
- [0796] - 막관통 도메인 또는 GPI-앵커를 인코딩하는 핵산.
- [0797] 62. 제 60 항 또는 제 61 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.
- [0798] 63. 제 60 항 내지 제 62 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.
- [0799] 64. 제 60 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.
- [0800] 65. 제 60 항 내지 제 64 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.
- [0801] 66. 제 60 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.
- [0802] 67. 제 60 항 내지 제 66 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.

- [0803] 68. 제 60 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA 에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.
- [0804] 69. 제 60 항 내지 제 68 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체, 특히 인간 항체인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터.
- [0805] 70. 제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터를 포함하는 진핵 세포.
- [0806] 71. 제 70 항에 있어서, 렌티바이러스 벡터가 세포 내로 형질도입된 것을 특징으로 하는 진핵 세포.
- [0807] 72. 제 70 항 또는 제 71 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.
- [0808] 73. 제 72 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포.
- [0809] 74. 전장 항체의 표시 또는 분비 또는 둘다를 위한 진핵 세포 집단을 생성하기 위한, 제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터의 용도.
- [0810] 75. 제 74 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 용도.
- [0811] 76. 제 75 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 용도.
- [0812] 77. 제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터를 각각 포함하는 둘 이상의 렌티바이러스 입자를 포함하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리로서, 각각의 벡터에 의해 인코딩되는 항체가 하나 이상의 아미노산에서 서로 상이한 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0813] 78. 제 77 항에 있어서, 벡터 라이브러리가 1,000 ~ 1,000,000 개의 상이한 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0814] 79. 제 77 항 또는 제 78 항에 있어서, 벡터 라이브러리의 벡터에 의해 인코딩되는 항체가 항체의 CDR 중 하나 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 상이한 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0815] 80. 제 79 항에 있어서, CDR 이 중쇄 CDR3 인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0816] 81. 제 77 항 내지 제 80 항 중 어느 한 항에 있어서, 발현 벡터 라이브러리가 부모 발현 벡터의 하나 이상의 CDR 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 무작위화에 의해 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0817] 82. 제 77 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항에 있어서, 렌티바이러스 발현 벡터 라이브러리가 2 개의 상이한 절반 항체를 인코딩하는 핵산의 조합에 의해 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0818] 83. 제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 B-세포의 풀로부터 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0819] 84. 제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 수득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 풀로부터 선택되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0820] 85. 제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 HCVR 인코딩 핵산 및 단일 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 HCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 HCVR 인코딩 핵산이 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0821] 86. 제 77 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 LCVR 인코딩 핵산 및 단일 HCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2 개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2 개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생

성하는 단일 B-세포로부터 수득되는 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 LCVR 인코딩 핵산이 수득되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.

- [0822] 87. 제 77 항 내지 제 86 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포가 B-세포의 클론 집단인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0823] 88. 제 77 항 내지 제 87 항 중 어느 한 항에 있어서, 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성을 생성하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리:
- [0824] (a):
- [0825] (i) B-세포의 아집단으로부터 RNA 를 분리하는 단계,
- [0826] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0827] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 1 푸울을 증폭하는 단계;
- [0828] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 2 푸울을 증폭하는 단계; 및
- [0829] (v) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;
- [0830] 또는 (b):
- [0831] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 분리하는 단계,
- [0832] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0833] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0834] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0835] (v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 1 푸울을 생성하는 단계,
- [0836] (vi) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 2 푸울을 생성하는 단계, 및
- [0837] (vii) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;
- [0838] 또는 (c):
- [0839] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 분리하는 단계,
- [0840] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0841] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0842] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0843] (v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및
- [0844] (vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 2 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계;
- [0845] 또는 (d):
- [0846] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 분리하는 단계,
- [0847] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0848] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0849] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2

혼합물을 사용하여 cDNA로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;

- [0850] (v) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 풀을 생성하는 단계, 및
- [0851] (vi) DNA 분자의 풀의 하나의 일원 및 제 1 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계.
- [0852] 89. 제 77 항 내지 제 88 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄를 인코딩하는 핵산이 게놈 조직화 면역글로불린 중쇄 유전자의 모든 엑손 및 하나를 제외한 나머지 모든 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0853] 90. 제 77 항 내지 제 89 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 막관통 도메인의 조각 또는 GPI-앵커에 대한 신호 펩티드이고, 막관통 도메인의 조각이 단일 엑손에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0854] 91. 제 77 항 내지 제 90 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 게놈 개재 인트론 없는 단일 엑손의 M1-M2-엑손-융합물에 의해 인코딩되는 면역글로불린 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0855] 92. 제 77 항 내지 제 91 항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 cDNA에 의해 인코딩되는 것을 특징으로 하는 렌티바이러스 벡터 라이브러리.
- [0856] 93. 제 44 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 따른 바이시스트로닉 발현 카세트 또는 제 60 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터를 각각 포함하는 둘 이상의 진핵 세포를 포함하는 진핵 세포 라이브러리로서, 각각의 세포에 의해 발현되는 항체가 하나 이상의 아미노산에서 서로 상이한 진핵 세포 라이브러리.
- [0857] 94. 제 77 항 내지 제 92 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터 라이브러리를 포함하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0858] 95. 제 94 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리의 각각의 진핵 세포가 단일 항체를 발현하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0859] 96. 제 94 항 또는 제 95 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리의 각각의 진핵 세포가 단일 항체를 표시하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0860] 97. 제 94 항 내지 제 96 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 항체의 라이브러리를 발현하는 진핵 세포 집단이고, 인코딩 핵산이 면역화된 동물의 B-세포의 집단에서 유래하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0861] 98. 제 97 항에 있어서, B-세포가 하나 이상의 관심의 항원에 대한 그의 특이성에 대해 예비선별되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0862] 99. 제 94 항 내지 제 98 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 각각의 세포가 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 인코딩하는 제 1 발현 카세트 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체를 인코딩하는 제 2 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0863] 100. 제 94 항 내지 제 99 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 각각의 세포가 제 1 항원에 결합하는 제 1 전장 항체 경쇄 및 제 1 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 1 발현 카세트 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체 경쇄 및 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 제 2 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0864] 101. 제 94 항 내지 제 100 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포 라이브러리가 각각의 세포가 제 1 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 전장 항체 중쇄 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체 중쇄를 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 진핵 세포의 집단이고, 진핵 세포가 공통 경쇄를 발현하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0865] 102. 제 94 항 내지 제 102 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 중쇄가 홀 돌연변이를 포함하고, 제 2 항체 중쇄가 낚 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0866] 103. 제 94 항 내지 제 101 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 전장 항체 경쇄가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 1 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하거나, 제 2 전장 항체 경쇄

가 불변 도메인으로서 CH1 도메인을 포함하고 제 2 전장 항체 중쇄가 제 1 불변 도메인으로서 CL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

- [0867] 104. 제 94 항 내지 제 103 항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체가 인간 기원의, 특히 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 클래스의, 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0868] 105. 제 94 항 내지 제 104 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0869] 106. 제 94 항 내지 제 105 항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0870] 107. 제 94 항 내지 제 106 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단이 하기로부터 선택되는 공급원에서 유래하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리: (a) 혈액; (b) 2 차 림프 기관, 특히 비장 또는 림프절; (c) 골수; 및 (d) 기억 B-세포를 포함하는 조직.
- [0871] 108. 제 107 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단이 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0872] 109. 제 94 항 내지 제 108 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 포유동물, 특히 랫트, 마우스, 토끼, 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0873] 110. 제 109 항에 있어서, 동물이 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0874] 111. 제 94 항 내지 제 110 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
 - [0875] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계; 및
 - [0876] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계.
- [0877] 112. 제 94 항 내지 제 111 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
 - [0878] (a) 담체를 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 코팅하는 단계;
 - [0879] (b) 단리된 B-세포의 집단을 담체와 접촉시키고, B-세포가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기를 통해 담체에 결합하도록 하는 단계;
 - [0880] (c) 미결합 B-세포를 제거하는 단계, 여기서 특히 담체는 비드를 포함하거나 더욱 특히 그것으로 이루어지고, 더욱더 특히 비드는 상자성 비드임; 및
 - [0881] (d) 상자성 비드로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 회수하는 단계.
- [0882] 113. 제 94 항 내지 제 112 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 FACS 소팅에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0883] 114. 제 94 항 내지 제 113 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
 - [0884] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
 - [0885] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [0886] 115. 제 94 항 내지 제 114 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
 - [0887] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계;
 - [0888] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를

선별하는 단계; 및

- [0889] (c) 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 B-세포를 선별하는 단계, 여기서 특히 하나 이상의 부가적 파라미터에 대한 선별은 하기임
- [0890] (i) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 양성 선별: B 세포 특이적 마커, 특히 CD19 또는 B220 의 존재, 및 B-세포의 생활력; 및/또는
- [0891] (ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.
- [0892] 116. 제 94 항 내지 제 115 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별하는 것이 클래스 전환된 B-세포, 특히 IgM- 및/또는 IgD-음성 B-세포, 가장 특히 IgM- 및 IgD-음성 B-세포에 대해 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0893] 117. 제 94 항 내지 제 116 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [0894] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 제 1 형광 염료로 표지되어 있고, 특히 형광 염료는 Alexa 647 nm, Alexa 488 또는 Alexa 546 nm 임;
- [0895] (b) 단리된 B-세포의 집단의 세포를 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체와 접촉시키는 단계, 여기서 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체는 제 2 및/또는 제 3 형광 염료로 표지되어 있고, 제 2 및/또는 제 3 형광 염료는 제 1 형광 염료가 방출하는 형광의 파장과 상이한 파장에서 형광을 방출함; 및
- [0896] (c) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 그러나 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체에 결합되지 않은 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [0897] 118. 제 94 항 내지 제 117 항 중 어느 한 항에 있어서, 라이브러리가 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리이고, 라이브러리를 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 내로 도입하는 것이 진핵, 특히 포유류 세포를 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리로 감염시킴으로써 수행되고, 더욱 특히 감염이 감염 다중도 10 이하, 특히 1 이하, 더욱 특히 0.2 이하, 가장 특히 0.1 이하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0898] 119. 제 118 항에 있어서, 감염 다중도가 약 0.1 인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0899] 120. 제 94 항 내지 제 119 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 단리가 FACS 소팅에 의해 수행되고, 하나의 구현예에서 세포의 단리가 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [0900] (a) 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 염색하는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- [0901] (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [0902] 121. 제 94 항 내지 제 120 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 것이 세포를 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 추가로 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0903] 122. 제 94 항 내지 제 121 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 하기 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [0904] (a) 하나 이상의, 특히 정확하게는 하나의, 개별 세포를 진핵 세포, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 존재 하에 배양하는 단계;
- [0905] (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 능력을 확인하는 단계.
- [0906] 123. 제 94 항 내지 제 122 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는, 특히 및, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 하기로부터 선택되는 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지

는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리: (a) BHK 21 세포, 특히 ATCC CCL-10; (b) Neuro-2a 세포; (c) HEK-293T 세포, 특히 ATCC CRL-11268; (d) CHO-K1 세포, 특히 ATCC CRL-62; 및 (e) HEK293 세포.

- [0907] 124. 제 94 항 내지 제 123 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는 진핵, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 CHO-K1 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지고, 더욱 특히 발현 라이브러리가 렌티바이러스 발현 라이브러리인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0908] 125. 하기 단계를 포함하는 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 세포의 선별 방법:
- [0909] (a) 임의로 B-세포의 집단으로부터 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 분비하는 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단을 선별하는 단계,
- [0910] (b) 하기 단계에 의해 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 단계, 여기서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체들의 변이체를 인코딩함,
- [0911] (i) 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 여기서 생성은 B-세포의 아집단으로부터 DNA 분자의 풀을 증폭시키는 단계 또는 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 단일 항체를 인코딩하는 DNA로부터 인코딩 핵산 서열의 무작위화에 의해 DNA 분자의 라이브러리를 생성하는 단계를 포함함, 및
- [0912] (ii) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 다수의 DNA 분자를 클로닝하는 단계;
- [0913] (c) 진핵 세포 집단을 렌티바이러스 발현 라이브러리의 일원을 각각 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자의 집단으로 형질도입하는 단계;
- [0914] (d) 진핵 포유류 세포의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체를 표시하는 단계; 및
- [0915] (e) 진핵 세포 집단으로부터 세포를 단리하는 단계, 여기서 세포는 그것의 표면에 표시된 항체가 관심의 항원 또는 항원들 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별됨.
- [0916] 126. 하기 단계를 포함하는 이중특이적 항체 (2 개의 관심의 항원에 특이적으로 결합함) 를 발현하는 세포의 선별 방법:
- [0917] (a) 하기 단계에 의해 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 단계, 여기서 렌티바이러스 발현 라이브러리의 각각의 일원은 이중특이적 항체의 변이체를 인코딩함,
- [0918] (i) 단일 이중특이적 항체를 인코딩하는 DNA로부터 인코딩 핵산 서열의 무작위화에 의해 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 및
- [0919] (ii) 막-결합 형태로서 전장 이중특이적 항체의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 다수의 DNA 분자를 클로닝하는 단계;
- [0920] (b) 진핵 세포 집단을 렌티바이러스 발현 라이브러리의 일원을 각각 포함하는 렌티바이러스 바이러스 입자의 집단으로 형질도입하는 단계;
- [0921] (c) 진핵 포유류 세포의 표면에 렌티바이러스 발현 라이브러리에 의해 인코딩되는 항체를 표시하는 단계; 및
- [0922] (d) 진핵 세포 집단으로부터 세포를 단리하는 단계, 여기서 세포는 그것의 표면에 표시된 항체가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선별됨.
- [0923] 127. 제 125 항 또는 제 126 항에 있어서, 방법이 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 것을 포함하고, 다수의 DNA 분자를 생성하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0924] (1) B-세포의 아집단으로부터 중쇄 가변 영역 (HCVR) 을 인코딩하는 DNA 분자의 제 1 풀을 증폭하는 단계; 및
- [0925] (2) B-세포의 아집단으로부터 경쇄 가변 영역 (LCVR) 을 인코딩하는 DNA 분자의 제 2 풀을 증폭하는 단계;
- [0926] (3) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 LCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자 및 HCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자의 조합을 클로닝하는 단계.
- [0927] 128. 제 125 항 내지 제 127 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 것을 포함하고, 다수의 DNA 분자를 생성하는 것이 하

기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- [0928] (1) 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 HCVR 을 인코딩하는 DNA 분자 및 LCVR 을 인코딩하는 DNA 분자를 증폭하는 단계, 및
- [0929] (2) 하나 이상의 코돈을 무작위화함으로써 HCVR 을 인코딩하는 DNA 분자 및/또는 LCVR 을 인코딩하는 DNA 분자를 무작위화하여, HCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자 및 LCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계;
- [0930] (3) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 LCVR 을 인코딩하는 무작위화된 다수의 DNA 분자 및 HCVR 을 인코딩하는 다수의 DNA 분자의 조합을 클로닝하는 단계.
- [0931] 129. 제 125 항 내지 제 128 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 것을 포함하고, 생성이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0932] (i) 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 생성은 하기 단계를 포함함:
- [0933] (1) B-세포의 아집단으로부터 mRNA 를 분리하는 단계;
- [0934] (2) mRNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0935] (3) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 1 풀을 증폭하는 단계; 및
- [0936] (4) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 2 풀을 증폭하는 단계;
- [0937] (ii) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 DNA 분자의 제 1 및 제 2 풀의 DNA 분자의 쌍을 클로닝하는 단계.
- [0938] 130. 제 125 항 내지 제 129 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 렌티바이러스 발현 라이브러리를 생성하는 것을 포함하고, 생성이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0939] (i) 하나 또는 둘의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 다수의 DNA 분자를 생성하는 단계, 생성은 하기 단계를 포함함:
- [0940] (1) 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 mRNA 를 분리하는 단계;
- [0941] (2) mRNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;
- [0942] (3) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계; 및
- [0943] (4) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;
- [0944] (5) 제 1 및/또는 제 2 DNA 분자를 무작위화하여, DNA 분자의 제 1 풀 및 DNA 분자의 제 2 풀을 생성하는 단계,
- [0945] (ii) 가용성 뿐만 아니라 막-결합 형태로서 전장 항체 경쇄 및 전장 항체 중쇄의 발현을 위한 EV71-IRES 연결된 바이시스트로닉 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 발현 벡터 내로 DNA 분자의 제 1 및 제 2 풀의 DNA 분자의 쌍을 클로닝하는 단계.
- [0946] 131. 제 125 항 내지 제 130 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포 또는 효모 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0947] 132. 제 131 항에 있어서, 포유류 세포가 CHO 세포 또는 HEK 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0948] 133. 제 125 항 내지 제 132 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 양, 엘크, 사슴, 당나귀, 물 사슴, 밍크, 말, 소, 돼지, 염소, 개, 고양이, 랫트, 햄스터, 기니피그, 및 마우스로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 하나의 구현예에서 동물이 마우스, 랫트 또는, 영장류인 것을 특징으로 하는 방법.

- [0949] 134. 제 125 항 내지 제 133 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 비-인간 영장류 또는 인간인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0950] 135. 제 125 항 내지 제 134 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 인간 면역글로불린 좌위를 포함하는 트랜스제닉 동물인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0951] 136. 제 125 항 내지 제 135 항 중 어느 한 항에 있어서, B-세포를 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별하여 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별함으로써 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0952] 137. 제 125 항 내지 제 136 항 중 어느 한 항에 있어서, B-세포를 하나 또는 둘의 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별하여 단리된 B-세포의 집단으로부터 단일 B-세포를 선별함으로써 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0953] 138. 제 125 항 내지 제 137 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포가 클론 B-세포 집단인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0954] 139. 제 125 항 내지 제 138 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포 또는 클론 B-세포 집단의 단리된 mRNA로부터 가변 도메인 인코딩 핵산을 증폭하고, 증폭된 mRNA를 cDNA로 전사함으로써 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0955] 140. 제 125 항 내지 제 139 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 B-세포의 풀로부터 획득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0956] 141. 제 125 항 내지 제 140 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원, 또는 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 획득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 획득되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 풀로부터 선택되는 HCVR 및 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0957] 142. 제 125 항 내지 제 140 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 HCVR 인코딩 핵산 및 단일 LCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 획득되는 HCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 HCVR 인코딩 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0958] 143. 제 125 항 내지 제 142 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 LCVR 인코딩 핵산 및 단일 HCVR 인코딩 핵산의 쌍을 사용하여 렌티바이러스 벡터 라이브러리의 다양성이 생성되고, 하나의 항원, 또는 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하거나, 동일한 항원의 2개의 상이한, 비-중복 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 단일 B-세포로부터 획득되는 LCVR 인코딩 핵산의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 상이한 LCVR 인코딩 핵산이 획득되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0959] 144. 제 125 항 내지 제 143 항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 B-세포가 B-세포의 클론 집단인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0960] 145. 제 125 항 내지 제 144 항 중 어느 한 항에 있어서, 렌티바이러스 발현 라이브러리의 다양성을 생성하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- [0961] (a):
- [0962] (i) B-세포의 아집단으로부터 RNA를 단리하는 단계,
- [0963] (ii) RNA를 cDNA로 전사하는 단계;
- [0964] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA로부터 DNA 분자의 제 1 풀을 증폭하는 단계;
- [0965] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제 2

혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 DNA 분자의 제 2 푸울을 증폭하는 단계; 및

[0966] (v) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;

[0967] 또는 (b):

[0968] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,

[0969] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

[0970] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;

[0971] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;

[0972] (v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 1 푸울을 생성하는 단계,

[0973] (vi) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 제 2 푸울을 생성하는 단계, 및

[0974] (vii) DNA 분자의 제 1 푸울의 하나의 일원 및 DNA 분자의 제 2 푸울의 하나의 일원의 쌍을 제공하는 단계;

[0975] 또는 (c):

[0976] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계;

[0977] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

[0978] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;

[0979] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;

[0980] (v) 제 1 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및

[0981] (vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 2 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계;

[0982] 또는 (d):

[0983] (i) 단일 B-세포로부터, 또는 B-세포의 클론 집단으로부터 RNA 를 단리하는 단계,

[0984] (ii) RNA 를 cDNA 로 전사하는 단계;

[0985] (iii) HCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드의 제 1 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 1 DNA 분자를 증폭하는 단계;

[0986] (iv) LCVR 코딩 영역을 증폭할 수 있는 둘 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드의 제 2 혼합물을 사용하여 cDNA 로부터 제 2 DNA 분자를 증폭하는 단계;

[0987] (v) 제 2 DNA 분자의 하나 이상의 코돈을 무작위화하여 DNA 분자의 푸울을 생성하는 단계, 및

[0988] (vi) DNA 분자의 푸울의 하나의 일원 및 제 1 DNA 분자의 쌍을 제공하는 단계.

[0989] 146. 제 125 항 내지 제 145 항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 무작위로 조합함으로써 항원-특이적 항체의 변이성이 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

[0990] 147. 제 125 항 내지 제 146 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포 또는 B-세포의 클론 집단이 하기로부터 선택되는 공급원에서 유래하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리: (a) 혈액; (b) 2 차 림프 기관, 특히 비장 또는 림프절; (c) 골수; 및 (d) 기억 B-세포를 포함하는 조직.

[0991] 148. 제 147 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단이 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

[0992] 149. 제 125 항 내지 제 148 항 중 어느 한 항에 있어서, 동물이 포유동물, 특히 랫트, 마우스, 토끼, 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.

- [0993] 150. 제 149 항에 있어서, 동물이 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼 또는 인간인 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [0994] 151. 제 125 항 내지 제 150 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [0995] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계; 및
- [0996] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계.
- [0997] 152. 제 125 항 내지 제 151 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [0998] (a) 담체를 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 코팅하는 단계;
- [0999] (b) 단리된 B-세포의 집단을 담체와 접촉시키고, B-세포가 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기를 통해 담체에 결합하도록 하는 단계;
- [1000] (c) 미결합 B-세포를 제거하는 단계, 여기서 특히 담체는 비드를 포함하거나 더욱 특히 그것으로 이루어지고, 더욱더 특히 비드는 상자성 비드임; 및
- [1001] (d) 상자성 비드로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 회수하는 단계.
- [1002] 153. 제 125 항 내지 제 152 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 FACS 소팅에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [1003] 154. 제 125 항 내지 제 153 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [1004] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- [1005] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [1006] 155. 제 125 항 내지 제 154 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [1007] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계;
- [1008] (b) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 단계; 및
- [1009] (c) 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 B-세포를 선별하는 단계, 여기서 특히 하나 이상의 부가적 파라미터에 대한 선별은 하기임
- [1010] (i) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 양성 선별: B 세포 특이적 마커, 특히 CD19 또는 B220 의 존재, 및 B-세포의 생활력; 및/또는
- [1011] (ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.
- [1012] 156. 제 125 항 내지 제 155 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단을 선별하는 것이 클래스 전환된 B-세포, 특히 IgM- 및/또는 IgD-음성 B-세포, 가장 특히 IgM- 및 IgD-음성 B-세포에 대해 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리.
- [1013] 157. 제 125 항 내지 제 156 항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 B-세포의 집단으로부터 B-세포의 아집단 또는 단일 B-세포를 선별하는 것이 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진핵 세포 라이브러리:
- [1014] (a) 단리된 B-세포의 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기와 접촉시키는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 제 1 형광 염료로 표지되어 있고, 특히 형광 염료는 Alexa 647 nm, Alexa 488 또는 Alexa 546 nm 임;

- [1015] (b) 단리된 B-세포의 집단의 세포를 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체와 접촉시키는 단계, 여기서 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체는 제 2 및/또는 제 3 형광 염료로 표지되어 있고, 제 2 및/또는 제 3 형광 염료는 제 1 형광 염료가 방출하는 형광의 파장과 상이한 파장에서 형광을 방출함; 및
- [1016] (c) 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 결합된 그러나 항-IgM 및/또는 항-IgD 항체에 결합되지 않은 B-세포의 집단 또는 단일 B-세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [1017] 158. 제 125 항 내지 제 157 항 중 어느 한 항에 있어서, 라이브러리가 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리이고, 라이브러리를 진행, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 내로 도입하는 것이 진행, 특히 포유류 세포를 바이러스 라이브러리, 특히 렌티바이러스 라이브러리로 감염시킴으로써 수행되고, 더욱 특히 감염이 감염 다중도 10 이하, 특히 1 이하, 더욱 특히 0.2 이하, 가장 특히 0.1 이하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리.
- [1018] 159. 제 158 항에 있어서, 감염 다중도가 약 0.1 인 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리.
- [1019] 160. 제 125 항 내지 제 159 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 단리가 FACS 소팅에 의해 수행되고, 하나의 구현예에서 세포의 단리가 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리:
- [1020] (a) 진행, 특히 포유류 세포의 제 1 집단을 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기로 염색하는 단계, 여기서 관심의 항원 또는 그의 조각 또는 항원 결정기는 형광 염료로 표지되어 있음; 및
- [1021] (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 단계.
- [1022] 161. 제 125 항 내지 제 160 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 개별 세포를 FACS 소팅에 의해 분리하는 것이 세포를 하나 이상의 부가적 파라미터에 대해 추가로 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리.
- [1023] 162. 제 161 항에 있어서, 하나 이상의 부가적 파라미터가 하기로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리:
- [1024] (i) 세포의 생활력에 대한 양성 선별; 및/또는
- [1025] (ii) 하기로부터 선택되는 파라미터에 대한 음성 선별: IgM 항체의 존재; IgD 항체의 존재, 세포사 마커의 존재, 및 세포자멸사 마커의 존재.
- [1026] 163. 제 125 항 내지 제 162 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 하기 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리:
- [1027] (a) 하나 이상의, 특히 정확하게는 하나의, 개별 세포를 진행 세포, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 존재 하에 배양하는 단계;
- [1028] (b) 관심의 항원, 또는 그의 조각 또는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 진행, 특히 포유류 세포의 제 2 집단의 능력을 확인하는 단계.
- [1029] 164. 제 125 항 내지 제 163 항 중 어느 한 항에 있어서, 진행, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는, 특히 및, 진행, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 하기로부터 선택되는 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리: (a) BHK 21 세포, 특히 ATCC CCL-10; (b) Neuro-2a 세포; (c) HEK-293T 세포, 특히 ATCC CRL-11268; (d) CHO-K1 세포, 특히 ATCC CRL-62; 및 (e) HEK293 세포.
- [1030] 165. 제 125 항 내지 제 164 항 중 어느 한 항에 있어서, 진행, 특히 포유류 세포의 제 1 집단 및/또는 진행, 특히 포유류 세포의 제 2 집단이 CHO-K1 세포를 포함하거나 특히 그것으로 이루어지고, 더욱 특히 발현 라이브러리가 렌티바이러스 발현 라이브러리인 것을 특징으로 하는 진행 세포 라이브러리.
- [1031] 166. 하기 단계를 포함하는 진행 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:
- [1032] - 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- [1033] - 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 벌크 소트에 의함),
- [1034] - 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서플 백터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2

개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응, SEQ ID NO: 6 ~ SEQ ID NO: 10 의 프라이머 중 하나 이상 또는 전부 및 SEQ ID NO: 11 의 프라이머를 사용하는 놓 사슬에 대한 하나 및 SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 4 의 프라이머 중 하나 이상 또는 전부 및 SEQ ID NO: 5 의 프라이머를 사용하는 홀 사슬에 대한 하나; 결찰: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 홀-좌위 내로 막관통 도메인 없이, 즉 EV71-IRES 의 상류에 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 놓-좌위 내로 막관통 도메인과 함께, 즉 EV71-IRES 의 하류에,

- [1035] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 안정적으로 발현하는 포유류 세포의 감염, 포유류 세포의 표면에 표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,
- [1036] - 예를 들어 SEQ ID NO: 29 및 SEQ ID NO: 30 의 프라이머를 사용하는, EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (TM 도메인을 갖지 않음) 의 PCR 및 제 2 서틀 벡터 내로 막관통 도메인 없이 클로닝,
- [1037] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.
- [1038] 167. 하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:
- [1039] - 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- [1040] - 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 벌크 소트에 의함),
- [1041] - 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서틀 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응; 결찰: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 홀-좌위 내로 막관통-도메인과 함께, 즉 EV71-IRES 의 상류에, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 놓-좌위 내로 막관통 도메인과 함께, 즉 EV71-IRES 의 하류에,
- [1042] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 포유류 세포 막-표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,
- [1043] - EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 및 제 2 서틀 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝; 벡터의 제한 절단 및 재결찰에 의한 제 1 중쇄의 막관통-도메인의 제거,
- [1044] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 이중특이적 항체의 선별.
- [1045] 168. 하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 항체의 표시 및 세포의 선별에 의한 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:
- [1046] - 트랜스제닉 토끼와 같은 실험 동물의 면역화,
- [1047] - 항원-특이적 B-세포의 선별 (FACS, 벌크 소트에 의함),
- [1048] - 중쇄 인코딩 핵산의 PCR 증폭: 서틀 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의 폴리머라제 연쇄 반응; 결찰: 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 제 1 서틀 벡터 내로 홀-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 또는 없이, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 제 2 서틀 벡터 내로 놓-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 또는 없이, 그러나 하나 이상은 막관통 도메인을 가짐,
- [1049] - 바이러스 생성 (제 1 서틀 벡터에 대해 하나 및 제 2 서틀 벡터에 대해 하나), 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 제 1 바이러스 및 제 2 바이러스에 의한 순차적 감염, 포유류 세포의 표면에 표시된 이중특이적 항체의 선별 (오프-레이트 스크리닝에 의함), FACS 를 사용하는 히트 (포유류 세포 클론) 의 벌크 소트,
- [1050] - 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산의 PCR 및 제 3 서틀 벡터 내로 바이시스트로닉 발현 유닛 내에 막관통 도메인 및 EV71-IRES 없이 클로닝,
- [1051] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.
- [1052] 169. 하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 이중특이적 항체의 표시 및 그

러한 진핵 세포의 선별에 의한 또한 이중특이적 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:

- [1053] - 제 1 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 제 1 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 번역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함,
- [1054] - 제 2 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 제 2 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 번역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현하고,
- [1055] 제 1 항원 및 제 2 항원은 상이함,
- [1056] - 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해, 제 1 및 제 2 번역화된 실험 동물의 B-세포를 선별하는 단계,
- [1057] - 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,
- [1058] - 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 상류에 홀- 또는 늑-좌위 내로 막관통 도메인과 함께 결찰, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 동일한 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES 의 하류에 각각의 다른 좌위 내로 막관통 도메인과 함께 결찰, 즉 IRES 의 상류에 있는 중쇄가 홀-좌위를 갖는 경우 IRES 의 하류에 있는 중쇄는 늑-좌위를 갖고 그 반대도 그러함, 여기서 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 상이함,
- [1059] - 바이러스 생성,
- [1060] - 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- [1061] - 이중 표지된 형질도입된 세포의 FACS 에 의한 표면에 이중특이적 항체를 표시하는 세포의 선별,
- [1062] - EV71-IRES 를 포함하는 완전한 제 1 중쇄 인코딩 핵산 및 제 2 중쇄의 가변 도메인 인코딩 핵산 (2.2 kbp) 의 PCR 및 제 2 서플 벡터 내로 막관통-도메인 없이 클로닝; 벡터의 제한 절단 및 재결찰에 의한 제 1 중쇄의 막관통-도메인의 제거,
- [1063] - 바이러스 생성, 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 감염, 세포의 단일 세포 소트, 상청액 중 이중특이적 항체의 스크리닝, 및 이중특이적 항체의 선별.
- [1064] 170. 하기 단계를 포함하는 진핵 세포의 표면에 공통 경쇄를 포함하는 전장 이중특이적 항체의 표시 및 그러한 진핵 세포의 선별에 의한 또한 이중특이적 항체의 선별을 위한 워크플로우/방법:
- [1065] - 실험 동물, 하나의 구현예에서 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 토끼가 관심의 항원, 하나의 구현예에서 세포의 수용체 도메인으로 번역화되는 단계, 여기서 실험 동물의 B-세포는 동일한 경쇄를 발현함,
- [1066] - 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의해, 번역화된 실험 동물의 B-세포를 선별하는 단계,
- [1067] - 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 B-세포의 중쇄 인코딩 핵산을 수득하는 단계,
- [1068] - 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 하류에 중쇄 좌위 내로 막관통 도메인과 함께 결찰, 여기서 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터는 IRES 의 상류에 공통 경쇄 인코딩 핵산을 포함함,
- [1069] - 바이러스 생성,
- [1070] - 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- [1071] - 항원 특이적 표지된 형질도입된 세포의 FACS 에 의한, 하나의 구현예에서 FACS 에 의한 벌크 소팅에 의한, 표면에 항체를 표시하는 세포의 선별,
- [1072] - 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로의 지정 클로닝을 가능케 하는 독특한 제한 자리를 도입하는 2 개의 별개의/순차적 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 개별 PCR 증폭에 의해 각각의 선별된 세포의 중쇄 인코딩 핵산을

수득하는 단계,

- [1073] - 제 1 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES, 하나의 구현예에서 EV71-IRES 의 상류에 홀- 또는 늑-좌위 내로 막관통 도메인 없이 결합, 그리고 제 2 중쇄 가변 도메인 인코딩 핵산을 동일한 서플 벡터/렌티바이러스 발현 벡터 내로 IRES 의 하류에 각각의 다른 좌위 내로 막관통 도메인 없이 결합, 즉 IRES 의 상류에 있는 중쇄가 홀-좌위를 갖는 경우 IRES 의 하류에 있는 중쇄는 늑-좌위를 갖고 그 반대도 그러함, 여기서 제 1 중쇄 가변 도메인은 제 1 항원에 결합하고 제 2 가변 도메인은 제 2 항원에 결합하고, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일 또는 상이할 수 있음,
- [1074] - 바이러스 생성,
- [1075] - 공통 경쇄를 발현하는 포유류 세포의 바이러스에 의한 감염,
- [1076] - 이중특이적 항체를 분비하는 세포의 선별.
- [1077] 171. 항체의 생성을 위한, 제 1 항 내지 제 170 항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 선택되는 세포의 용도.
- [1078] 하기 실시예, 서열 및 도면은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되며, 본 발명의 진정한 범위는 첨부된 청구항에 제시되어 있다. 본 발명의 정신에서 벗어나지 않으면서 변형이 만들어질 수 있다고 이해된다.
- [1079] **서열**
- [1080] SEQ ID NO: 01 ~ 30 PCR 프라이머
- [1081] SEQ ID NO: 31 EV71-IRES
- [1082] SEQ ID NO: 32 bGH polyA 신호 서열
- [1083] SEQ ID NO: 33 인간 CMV 프로모터
- [1084] SEQ ID NO: 34 인트론 6+M1/M2 서열
- [1085] SEQ ID NO: 35 M1/M2 서열
- [1086] SEQ ID NO: 36 ~ 39 PCR 프라이머.
- [1087] **도면**
- [1088] **도 1** GFP 의 IRES-연결된 발현의 FACS-점도표; a) gtx-IRES, b) EV71-IRES, c) ELF4G-IRES, d) EMCV-IRES.
- [1089] **도 2** 항체 LC 및 HC 의 IRES-연결된 발현의 비교; a) gtx-IRES, b) EV71-IRES, c) ELF4G-IRES, d) EMCV-IRES; 아래쪽 도면: 발현 구축물의 도식.
- [1090] **도 3** 트랜스펙션 후 24 시간에 수득된 일시적 트랜스펙션된 HEK293 세포의 FACS 히스토그램;
- [1091] a) pLVX M#2 에 의한 일시적 트랜스펙션 (막-결합형 IgG): 회색으로 칠한 히스토그램: 자가형광 펙틴 (fectin) 대조군, 점선 히스토그램: 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포, 실선 히스토그램: pLVX M#2 에 의한 트랜스펙션 후 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포;
- [1092] b) pLVX MS#5 에 의한 일시적 트랜스펙션 (막-결합형 및 분비형): 회색으로 칠한 히스토그램: 자가형광 펙틴 대조군, 점선 히스토그램: 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포, 실선 히스토그램: pLVX MS#5 에 의한 트랜스펙션 후 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포.
- [1093] **도 4** 형질도입 후 96 시간에 수득된 바이러스 형질도입된 HEK293 세포의 FACS 히스토그램;
- [1094] a) pLVX M#2 바이러스에 의한 바이러스 형질도입: 회색으로 칠한 히스토그램: 자가형광 폴리브렌 대조군, 점선 히스토그램: 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포, 실선 히스토그램: pLVX M#2 바이러스에 의한 형질도입 후 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포;
- [1095] b) pLVX MS#5 바이러스에 의한 바이러스 형질도입: 회색으로 칠한 히스토그램: 자가형광 펙틴 대조군, 점선 히스토그램: 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포, 실선 히스토그램: pLVX MS#5 바이러스에 의한 형질도입 후 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 염색된 세포.
- [1096] **도 5** 새로 수집된 렌티바이러스 상청액에 의한 형질도입 후 96 시간에 유동 세포분석법을 사용하는 렌티바

이러스 스톡 용액의 적정에 의한 렌티바이러스 역가의 측정.

- [1097] **도 6** 형질도입 직후 및 형질도입 후 각각 14 또는 28 일에 바이러스 형질도입된 HEK293 세포의 FACS 히스토그램;
- [1098] a) pLVX M#2 바이러스에 의한 바이러스 형질도입 후 96 시간에 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 접합체 양성 HEK293 세포의 소팅 (뒤쪽 막대기모양 부분): 회색으로 칠한 히스토그램: 폴리브렌 대조군; 실선 히스토그램: 형질도입된 세포주;
- [1099] b) pLVX M#2 바이러스에 의한 형질도입 후 최초 소트 후 14 및 28 일에 FACS 염색에 의한 소팅된 세포의 재분석: 회색으로 칠한 히스토그램: 폴리브렌 대조군; 점선 히스토그램: 첫번째 소트 후 14 일에 두번째로 분석된 형질도입된 세포주; 실선 히스토그램: 첫번째 소트 후 28 일에 두번째로 분석된 형질도입된 세포주;
- [1100] c) 세포 pLVX MS#5 에 의한 바이러스 감염 후 96 시간에 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 접합체 양성 HEK293 의 소팅 (뒤쪽 막대기모양): 회색으로 칠한 히스토그램: 폴리브렌 대조군; 실선 히스토그램: 형질도입된 세포주;
- [1101] d) pLVX MS#5 바이러스에 의한 형질도입 후 최초 소트 후 14 및 28 일에 FACS 염색에 의한 소팅된 세포의 재분석: 회색으로 칠한 히스토그램: 회색으로 칠한 히스토그램: 폴리브렌 대조군; 점선 히스토그램: 첫번째 소트 후 14 일에 두번째로 분석된 형질도입된 세포주; 실선 히스토그램: 첫번째 소트 후 28 일에 두번째로 분석된 형질도입된 세포주.
- [1102] **도 7** 이중특이적 항체 발현 카세트.
- [1103] **도 8** Alexa-488 항원 접합체로 라벨링된 세포의 FACS 소팅에 의한 막 결합형 항체를 표시하는 HEK293A 세포의 회수.
- [1104] **도 9** pLVX M#2 또는 MS#5 양성 소팅된 세포 (푸울-소트) 로부터의 상청액의 ELISA 결과.
- [1105] **도 10** 단일 침적된 FACS 양성 세포의 FACS, ELISA 에 의한 비교 분석의 결과.
- [1106] **도 11** 2 개의 상이한 항원을 지향하는 IgG 의 막-결합 발현을 위한 플라스미드를 보유하는 2 개의 바이러스의 존재 하에 감염된 세포의 염색의 결과:
- [1107] (A) 왼쪽 막대기 - 단일 세포 수준: 항원 1 양성 세포; 오른쪽 막대기: 항원 2 양성 세포; 하이 소트 게이트에서 MOI 100 의 경우 이중 감염이 탐지가능하지 않음; y-축: 생활력 (scatter)/부모의 싱글렛-빈도 (singlets-freq.);
- [1108] (B) 왼쪽 막대기 - 푸울 수준: 항원 1 양성 세포; 중간 막대기: 항원 2 양성 세포; 오른쪽 막대기: 항원 1 및 항원 2 양성 세포.
- [1109] **도 12** 상이한 렌티바이러스 입자로 형질도입된 세포의 FACS 분석: 왼쪽 - IRES 를 포함하지 않는 pLVX MS, 막-결합형 및 분비형 전장 항체의 발현을 위한 2 개의 hCMV 프로모터를 함유하는 분리된 발현 카세트; 중간 - IRES 를 포함하는 pLVX MS, 막-결합형 및 분비형 전장 항체의 발현을 위한 하나의 hCMV 프로모터를 포함하는 하나의 바이시스트로닉 발현 카세트; 오른쪽 - IRES 를 포함하는 pLVX M, 막-결합 전장 항체의 발현을 위한 하나의 hCMV 프로모터를 포함하는 하나의 바이시스트로닉 발현 카세트.
- [1110] **도 13** 렌티바이러스 발현 벡터의 크기 (bp) 에 따른 TU/ml 의 FACS 분석; 왼쪽 막대기 - TU/ml; 오른쪽 막대기 - 렌티바이러스 발현 벡터의 크기 (bp).
- [1111] **도 14** 벡터 맵 pLVX-puro.
- [1112] **도 15** 벡터 맵 pLVX M#2.
- [1113] **도 16** 벡터 맵 pLVX MS#5.
- [1114] **도 17** 막관통 도메인을 포함하지 않거나 하나 포함하는 항체를 인코딩하는 이중특이적 표시 벡터로 트랜스펙션된 HEK293 세포의 FACS 분석; V1.1: M-B(놉)-IRES-M-B(홀) (양쪽 결합체 중쇄 상에 막 앵커), V1.2: M-B(놉)-IRES-M-N(홀) (양쪽 중쇄, 결합체 및 비-결합체 상에 막 앵커), V1.3: M-N(놉)-IRES-B(홀) (오직 비-결합체 상에 막 앵커), V1.4: B(놉)-IRES-M-N(홀) (오직 비-결합체 상에 막 앵커), V1.5: M-N(놉)-IRES-M-N(홀) (오직 비-결합체, 양쪽 중쇄 상에 막 앵커), V1.6 B(홀)-IRES-M-N(놉) (비-결합체 상에 막 앵커, 놉 및 홀 교환

됨); 1: 대조군 1 - 오직 펙틴, 2: 대조군 2 - 오직 공통 LC, 3: V1.1 M-B-IRES-M-B + 공통 LC, 4: V1.2 M-B-IRES-M-N + 공통 LC, 5: V1.3 M-N-IRES-B + 공통 LC, 6: V1.4 B-IRES-M-N + 공통 LC, 7: V1.5 M-N-IRES-M-N + 공통 LC, 8: V1.6 B- (홀)-IRES-M-N(놉) + 공통 LC.

[1115] 실시예 1

[1116] 벡터 pLVX M#2 및 pLVX MS#5 의 구축

[1117] 서틀 벡터: MCS, PPGK 프로모터 및 퓨로마이신 내성 유전자의 제거.

[1118] 플라스미드 내로 막관통 도메인을 갖는 경쇄 - EV71-IRES - 중쇄 - 대안적 스플라이스 엘리먼트의 삽입.

[1119] 출발 서틀 벡터는 하기 엘리먼트를 포함한다:

	요소	공급원
1	5' LTR	인간 면역 결핍 바이러스-1
2	PBS (프라이머 결합 자리)	유인원 바이러스 40
3	psi (ψ)	인간 면역 결핍 바이러스-1
4	RRE	인간 면역 결핍 바이러스-1
5	cPPT	인간 면역 결핍 바이러스
6	PCMV IE	인간 거대 세포 바이러스
7	MCS	합성
8	PPGK	사카로마이세스 세레비시애
9	퓨로마이신	스트렙토마이세스 알보니게르
10	WPRE	간염 바이러스
11	3' LTR	인간 면역 결핍 바이러스-1
12	pUC 기점	대장균
13	암피실린	대장균

[1121] 플라스미드 pLVX M#2 는 하기 엘리먼트를 포함한다:

	요소	공급원
1	5' LTR	인간 면역 결핍 바이러스-1
2	PBS (프라이머 결합 자리)	유인원 바이러스 40
3	psi (ψ)	인간 면역 결핍 바이러스-1
4	RRE	인간 면역 결핍 바이러스-1
5	cPPT	인간 면역 결핍 바이러스
6	PCMV IE	인간 거대 세포 바이러스
7	IgG 경쇄	인간
8	EV71-IRES	EV71 바이러스
9	IgG 중쇄	인간
10	WPRE	간염 바이러스
11	3' LTR	인간 면역 결핍 바이러스-1
12	pUC 기점	대장균
13	암피실린	대장균

[1123] 플라스미드 pLVX MS#5 는 하기 엘리먼트를 포함한다:

	요소	공급원
1	5' LTR	인간 면역 결핍 바이러스-1
2	PBS (프라이머 결합 자리)	유인원 바이러스 40
3	psi (ψ)	인간 면역 결핍 바이러스-1
4	RRE	인간 면역 결핍 바이러스-1
5	cPPT	인간 면역 결핍 바이러스
6	PCMV IE	인간 거대 세포 바이러스
7	IgG 경쇄	인간
8	EV71-IRES	EV71 바이러스
9	대안적 스플라이스 경막 도메인 (M1/2) 을 갖는 IgG 중쇄	인간
10	WPRE	간염 바이러스
11	3' LTR	인간 면역 결핍 바이러스-1
12	pUC 기점	대장균
13	암피실린	대장균

[1124]

[1125] 실시예 2

[1126] 감염성 바이러스의 생성

[1127] 3.75×10^5 Lenti-X™ 293T 세포를 6-웰 플레이트의 각각의 웰 내에 파종하고, 밤새 배양했다. 다음 날 각각의 웰에 20 μ l Lipofectamine™ 2000 트랜스펙션 시약 (Invitrogen cat.no.: P/N 52887) 을 사용하여 2.5 μ g pLVX M#2 또는 pLVX MS#5 및 12.75 μ l Lenti-X HTX 패키징 믹스 (Clontech 631248) 로 세포를 동시트랜스펙션 했다. 24 시간의 인큐베이션 후에 배지를 교환했다. 트랜스펙션 후 48 시간에 바이러스 함유 상청액을 수집했다.

[1128]

[1129] 실시예 3

HEK293 세포의 일시적 트랜스펙션

[1130] 1×10^5 Lenti-X™ 293T 세포를 24-웰에 파종하고, 밤새 배양했다. 다음 날 각각의 웰에서 0.9 μ g pLVX M#2 또는 pLVX MS#5 및 2.7 μ l Lipofectamine™ 2000 트랜스펙션 시약 (Invitrogen cat.no.: P/N 52887) 으로 세포를 트랜스펙션 했다. 트랜스펙션 후 24 시간에 염소 항 인간 IgG (H+L) - Alexa 488 접합체 (Invitrogen cat.no. A11013) 로 염색을 실시하고, FACS 분석을 실시했다.

[1131] 결과가 도 3 에 나타나 있다.

[1132] 실시예 4

HEK293 세포의 바이러스 형질도입

[1134] 바이러스 감염 / 형질도입

[1135] 48-웰 플레이트의 웰에 파종된 1.5×10^4 HEK293A 세포를 밤새 배양했다. 다음 날 완전 배지를 제거하고, 8 μ g/ml 폴리브렌의 존재 하에 300 μ l 미희석 바이러스 함유 상청액으로 세포를 감염시켰다. 24 시간의 인큐베이션 후에 배지를 교환했다. 트랜스펙션 후 96 시간에 염소 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 접합체 (Invitrogen cat.no. A11013) 로 세포의 염색을 실시하고, FACS 분석을 실시했다.

[1136] 결과가 도 4 에 나타나 있다.

[1137] 렌티바이러스 역가의 측정

[1138] 새로 수집된 렌티바이러스 상청액으로 형질도입 후 96 시간에 유동 세포분석법을 사용하여 렌티바이러스 스톱 용액을 측정함으로써 렌티바이러스 역가를 측정했다.

	렌티바이러스 희석률	%양성 세포	TU / ml
pLVX M#2 (막-결합)	1:1	95%	6.3E+04
	1:2	81%	1.2E+05
	1:5	49%	1.6E+05
	1:10	26%	1.9E+05
	1:25	12%	2.0E+05
pLVX MS#5 (막-결합 및 스플라이스)	1:1	42%	2.8E+04
	1:2	20%	2.9E+04
	1:5	9%	2.9E+04
	1:10	6%	4.5E+04
	1:25	4%	6.1E+04

역가를 하기 식으로 계산했다:

$$TU / ml = F * c * D / V$$

식 중,

F = 양성 세포의 빈도

C = 형질도입시 웰 내의 세포의 총 수 (예를 들어 200,000 세포)

V = 접종물의 부피 ml (0.3 ml)

D = 렌티바이러스 희석률

TU = 형질도입 유닛

결과가 도 5 에 나타나 있다.

실시예 5

바이러스 형질도입된 HEK293 세포주의 안정성

바이러스 생성 및 바이러스 감염/형질도입을 이전 실시예 2 및 4 에 기재된 바와 같이 실시했다.

소팅된 세포를 6-웰 플레이트 또는 T75 웨이커 플라스크 내에서 증식시켰다. 80 % 컨플루언스에서 세포의 분할을 실시했다. FACS 염색을 위해 1×10^5 세포를 100 μ l 총 부피의 10 μ g/ml 염소 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 접합체와 함께 인큐베이션했다.

장기간 안정성의 측정을 선택 압력 없이 실시했다. 상응하는 FACS 히스토그램이 도 6 에 나타나 있다.

실시예 6

막-결합 항체를 표시하는 세포 및 야생형 세포의 혼합물의 소팅

HEK293A 야생형 세포를 벡터 pLVX M#2 (day 28) 로 안정적으로 형질도입된 HEK293A 세포와 혼합하고, 250 μ l 10 μ g/ml Alexa 488 커플링된 항원으로 염색하고, 24-웰 마이크로타이터 플레이트 내에서 Alexa 488 양성 세포의 FACS 분석 및 소팅을 실시했다.

소팅 후 4 일에, 24-웰 마이크로타이터 플레이트의 웰 내의 모든 세포, 즉 약 1×10^5 세포를 50 μ l 10 μ g/ml Alexa 488 커플링된 항원으로 염색하고, 그에 뒤따라 FACS 분석을 실시했다.

결과가 도 8 에 나타나 있다.

실시예 7

배양 상청액 내로 소팅된 세포 (막-결합 IgG 양성) 의 IgG 분비

소팅된 세포를 6-웰 마이크로타이터 플레이트 또는 T75 플라스크 내에서 증식시켰다. 80 % 컨플루언스에서 세포의 분할을 실시했다. 95 % 컨플루언스인 세포로부터의 상청액을 IgG ELISA 에 사용했다. 결과가 하기 표 및 도 9 에 나타나 있다.

[1162] 표: pLVX M#2 또는 MS#5 양성 소팅된 세포 (푸울-소트) 로부터의 상청액의 ELISA 결과

	포획: 비오틴. 염소 항-인간 IgG, Fcγ Frag Spec		포획: 비오틴. IL18-R-Fc
	계수 평균	농도 [ng/ml]	계수 평균
WDHL 푸울-소트 pLVX M # 2	4.79E + 04	< MIN	3.0E + 04
WDHL 푸울-소트 pLVX MS # 5	9.96E + 06	317.4	3.6E + 06
푸울-소트 pLVX M # 2	3.79E + 04	< MIN	1.9E + 04
푸울-소트 pLVX MS # 5	1.20E + 07	557.3	4.8E + 06
Hek293A 배양 배지	2.06E + 04	< MIN	7.4E + 03

[1163]

[1164] 실시예 8

[1165] 막-결합 항체 및 분비형 항체의 상관관계

[1166] 바이러스 생성

[1167] 3.75×10^5 Lenti-X™ 293T 세포를 6-웰 플레이트의 각각의 웰에 파종하고, 밤새 배양했다. 다음 날 각각의 웰에 20 μ l Lipofectamine™ 2000 트랜스펙션 시약 (Invitrogen cat.no.: P/N 52887) 을 사용하여 2.5 μ g pLVX MS#5 및 12.75 μ l Lenti-X HTX 패키징 Mix (Clontech 631248) 로 세포를 동시트랜스펙션했다. 24 시간의 인큐베이션 후에 배지를 교환했다. 트랜스펙션 후 48 시간에 바이러스 함유 상청액을 수집했다.

[1168] 바이러스 감염 / 형질도입

[1169] 24-웰 플레이트의 웰에 파종된 3×10^4 Hek293A 세포를 밤새 배양했다. 다음 날 완전 배지를 제거하고, 8 μ g/ml 폴리브렌의 존재 하에 600 μ l 미희석 또는 1:25 희석 바이러스 함유 상청액으로 세포를 감염시켰다. 24 시간의 인큐베이션 후에 배지를 교환했다. 염소 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 접합체 (Invitrogen cat.no.: A11013) 로 세포의 염색을 실시하고, 형질도입 후 96 시간에 FACS 분석을 실시하고, 개별 세포를 96-웰 플레이트의 웰 내로 소팅했다.

[1170] 하기 3 개의 세포 집단이 단일 소팅되었다:

[1171] - pLVX MS#5 미희석 바이러스 감염된 세포, 하이 소트 게이트

[1172] - pLVX MS#5 미희석 바이러스 감염된 세포, 로우 소트 게이트

[1173] - pLVX MS#5 1:25 희석 바이러스 감염된 세포, 로우 소트 게이트.

[1174] 소팅된 세포를 96-웰 플레이트로부터 95 % 컨플루언스에서 성장시키고, 24 웰 플레이트 내로 증식시켰다. FACS 염색을 위해 5×10^4 세포를 100 μ l 총 부피의 10 μ g/ml 염소 항-인간 IgG (H+L) 항체-Alexa 488 접합체와 함께 인큐베이션했다. LC 에 대한 PCR 분석 (터치다운 PCR) 을 위해 소팅된 세포로부터 RNA 를 단리했다.

[1175] 도 10 에 결과가 나타나 있다.

[1176] 비교 분석으로부터 항-인간 IgG (H+L) 항체 Alexa 488 로 염색된 단일 세포 클론의 FACS 분석 및 각각의 소트 게이트의 하나의 단일 세포 클론으로부터의 배양 상청액의 인간 IgG ELISA 가 둘다 세포의 선별에 사용될 수 있고, 그에 의해 FACS 를 위해 대조군 샘플에 대한 지수 2 초과가 역치로서 사용될 수 있다는 것을 알 수 있다 (결과가 또한 하기 표에 나타나 있다).

표.

	클론의 #	인간 IgG ELISA 계수 (RLU) 평균	인간 IgG 농도 (ng/ml)	대조군에 대한 FACS 지수 (1=비결합, 2=결합)	경쇄 (Lc) 에 대한 터치다운 PCR
pLVX MS#5 미회석 소트게이트 하이	1	3979272	>62,5	1124,2	++++
	2	17898500	43,3	18,7	++++
	3	9632206	>62,5	56,7	++++
	4	9461668	>62,5	6,2	++++
	9	9566852	>62,5	58,5	++++
pLVX MS#5 미회석 소트게이트 하이	1	218076	< MIN	1,2	-
	2	180654	< MIN	1,0	-
	3	179118	< MIN	1,4	-
	4	39302	3,2	1,2	+
	5	164588	< MIN	1,3	-
	6	174238	< MIN	1,4	-
	7	50222	3,5	1,0	-
	8	177218	< MIN	1,3	-
	9	173048	< MIN	1,6	-
	10	8597740	>62,5	2,0	++++
	11	9288676	>62,5	6,0	++++
	12	81202	4,3	1,3	+
	13	188344	< MIN	1,6	-
	14	48562	3,4	1,2	-
	15	39204	3,2	1,1	-
pLVX MS#5 1:25 회석 소트게이트 로우	1	-57642	< MIN	1,1	-
	2	-66350	< MIN	1,1	-
	3	528	< MIN	1,0	-
	4	-77158	< MIN	1,2	-
	5	-73694	< MIN	0,8	-
	6	2458	< MIN	1,2	-
	7	-83110	< MIN	1,4	-
	8	-76824	< MIN	1,6	-
	9	35162	3,1	1,1	-
	10	8447052	>62,5	5,3	++++
	11	37314	3,1	1,5	-
	12	1338	< MIN	1,3	-
	13	666	< MIN	1,3	-
	14	1728	< MIN	1,6	-
	15	414	< MIN	1,7	+

실시예 9

2 개의 바이러스의 존재 하의 상이한 항체의 플라스미드에 의한 감염

pLVX mAb1-M 및 pLVX mAb2-M 푸울의 혼합물의 존재 하에 세포를 형질도입했다. 상이한 PCR 산출된 MOI 값 (1000, 100, 및 40) 으로 세포를 형질도입했다. 형질도입 후에 단일 소팅된 세포 클론 (IgG+) 을 mAb1-항원-Alexa 488 접합체 및 mAb2-항원-Cy5 접합체와 함께 인큐베이션하여 염색했다.

결과가 또한 도 11 에 나타나 있다.

실시예 10

상이한 전장 IgG 렌티바이러스 벡터에 의한 세포의 감염

하기 렌티바이러스 발현 벡터로 실시예 2 에서 보고된 바와 같이 바이러스를 생성했다:

- IRES 를 포함하지 않는 pLVX MS, 막-결합형 및 분비형 전장 항체의 발현을 위한 2 개의 hCMV 프로모터 함유 분리된 발현 카세트

- IRES 를 포함하는 pLVX MS, 막-결합형 및 분비형 전장 항체의 발현을 위한 하나의 hCMV 프로모터를 포함하는 하나의 바이시스트로닉 발현 카세트

- IRES 를 포함하는 pLVX M, 막-결합 전장 항체의 발현을 위한 하나의 hCMV 프로모터를 포함하는 하나의 바이시스트로닉 발현 카세트.

실시예 4 에 기재된 바와 같이 이들 3 개의 벡터를 포함하는 회석 바이러스로 세포를 형질도입했다. 형질도입된 세포를 항-인간 IgG (HtL) 항체 Alexa 488 접합체로 염색한 후에 FACS 에 의해 분석했다. 결과가 도 12 및 13 에 나타나 있다.

실시예 11

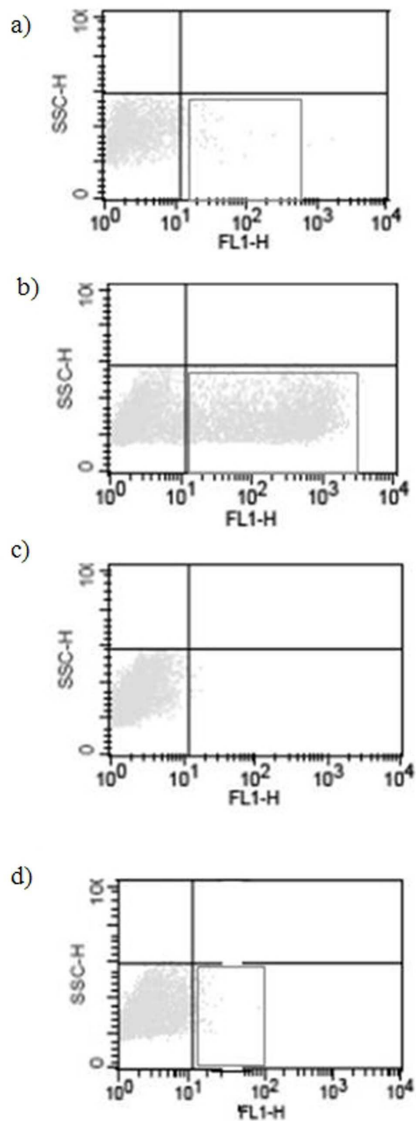
- [1191] **B-세포로부터 핵산의 증폭**
- [1192] 총 RNA 를 항원-특이적 B-세포로부터 단리한다. CDS 올리고뉴클레오타이드 (5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN-3', SEQ ID NO: 36) 를 프라이머로서, SMART II 올리고뉴클레오타이드 (5'-d[AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC] r[GGG]-3', SEQ ID NO: 37) 를 전환 주형으로 서, 주형 전환 프로토콜 (Zhu 등, BioTechniques 30 (2001) 892-897) 을 사용하여 PowerScript™ 역전사 효소 (Clontech) 로 단일-가닥 cDNA 를 생성한다. 총 부피 200 μ l 의 Advantage2 폴리머라제 믹스 (Clontech) 및 앵커 프라이머 (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3', SEQ ID NO: 38) 를 사용하여 14 사이클의 PCR 에 의해 cDNA 를 벌크-증폭시킨다. 이중-가닥 cDNA 를 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen) 로 정제한다.
- [1193] 홀 구축물에 대한 1 개의 센스 프라이머 (SEQ ID NO: 5) + 4 개의 안티센스 프라이머 (SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 4) 및 늑 구축물에 대한 1 개의 센스 프라이머 (SEQ ID NO: 11) + 5 개의 안티센스 프라이머 (SEQ ID NO: 6 ~ SEQ ID NO: 10) 의 등물 믹스로 중쇄 가변 영역 코딩 서열을 증폭시키고; 7 개의 센스 프라이머 (SEQ ID NO: 12 ~ SEQ ID NO: 18) 의 등물 믹스 + 1 개의 안티센스 프라이머 (SEQ ID NO: 19) 의 등물 믹스로 카파 경쇄 가변 영역 코딩 서열을 증폭시키고; 8 개의 센스 프라이머 (SEQ ID NO: 20 ~ SEQ ID NO: 27) 의 등물 믹스 + 1 개의 안티센스 프라이머 (SEQ ID NO: 28) 의 등물 믹스로 람다 경쇄 가변 영역 코딩 서열을 증폭시킨다.
- [1194] IRES 를 통해 연결된 홀 및 늑 중쇄의 코딩 영역을 프라이머 SEQ ID NO: 29 및 SEQ ID NO: 30 을 사용하여 증폭시킬 수 있다.
- [1195] **실시예 12**
- [1196] **형광-활성화 세포 소팅에 의한 특이적 결합 항체 표시 세포의 농축**
- [1197] 서브컨플루언트 (80 %) HEK 세포를 전장 항체 라이브러리 또는 음성 대조군으로서의 빈 바이러스 벡터로 0.2 의 감염 다중도 (MOI) 로 감염시킨다. 5 시간 후에, 세포를 세포 해리 완충액 (Sigma) 으로 떼어내고, 세정하고 염색한다. 세포의 절반을 Alexa 647 nm-라벨링된 항원 (4 μ g/ml) 으로 30 분 동안 염색한다. 나머지 세포를 Alexa 546 nm-라벨링된 항원 (4 μ g/ml) 및 토끼로부터의 항-렌티바이러스 혈청 (희석률 1:6000) 로 30 분 동안 염색하고, 뒤이어 Cy5-라벨링된 당나귀 항-토끼 IgG (1 μ g/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 로 20 분 동안 염색한다. 그 후 모든 세포를 세정하고, 여과하고 프로피디움 요오드화물 (PI) 로 염색하여 죽은 세포를 배제한다. FACS Vantage SE 유동 세포분석기 (Becton Dickinson) 에서, 각각, Alexa 647 nm-양성, PI-음성 및, Alexa 546 nm-양성, 렌티바이러스-양성, PI-음성 세포에 대해 단일 세포 소팅을 실시한다.
- [1198] 각각의 세포를 50 % 컨플루언트 HEK 피더 세포를 함유하는 24-웰 플레이트의 웰 내로 소팅한다. 바이러스 스프레드 후 (소팅 후 2-3 일), 감염된 세포를 FACS 분석에 의해 항원 결합에 대해 시험한다.
- [1199] **실시예 13**
- [1200] **이중특이적 항체 세포 표면 발현에 대한 막 앵커의 영향**
- [1201] 1×10^5 HEK293A 세포를 24-웰 플레이트의 웰에 과중하고, 밤새 배양했다. 다음 날 0.5 μ g 공통 경쇄 벡터 및 0.5 μ g 의 2 개의 상이한 중쇄의 발현을 추진하는 V1.1 ~ V1.5 서틀 벡터로 세포를 동시트랜스펙션했다. 중쇄 B 는 공통 경쇄와 조합하여 항원에 결합하지만, 중쇄 N 은 공통 경쇄와 조합하여 항원에 결합하지 않는다.
- [1202] 염소 항 인간 IgG (H+L) - Alexa 488 접합체 (Invitrogen cat.no. A11013) 및 비오티닐화 항원 및 스트렙타비딘-PE (SA-PE) 로 이중 염색을 실시했다. 트랜스펙션 후 48 시간에 FACS 분석을 실시했다.
- [1203] 이용된 서틀 벡터는 하기와 같다:
- [1204] V.1.1: M-B(늑)-IRES-M-B(홀) (양쪽 결합체 중쇄 상에 막 앵커)
- [1205] V.1.2: M-B(늑)-IRES-M-N(홀) (양쪽 중쇄, 결합체 및 비-결합체 상에 막 앵커)
- [1206] V.1.3: M-N(늑)-IRES-B(홀) (오직 비-결합체 상에 막 앵커)
- [1207] V.1.4: B(늑)-IRES-M-N(홀) (오직 비-결합체 상에 막 앵커)
- [1208] V.1.5: M-N(늑)-IRES-M-N(홀) (오직 비-결합체, 양쪽 중쇄 상에 막 앵커)

[1209] V.1.6: B(홀)-IRES-M-N(놉) (비-결합체 상에 막 앵커, 놉 및 홀 교환됨)

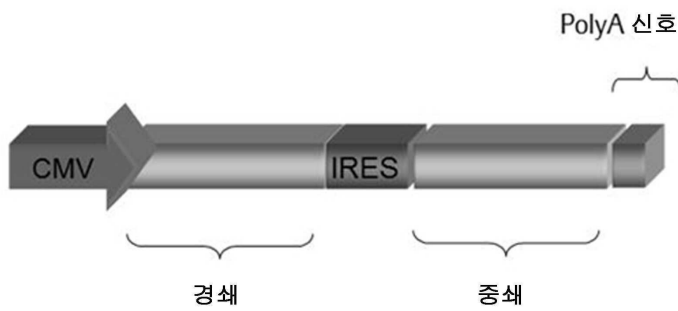
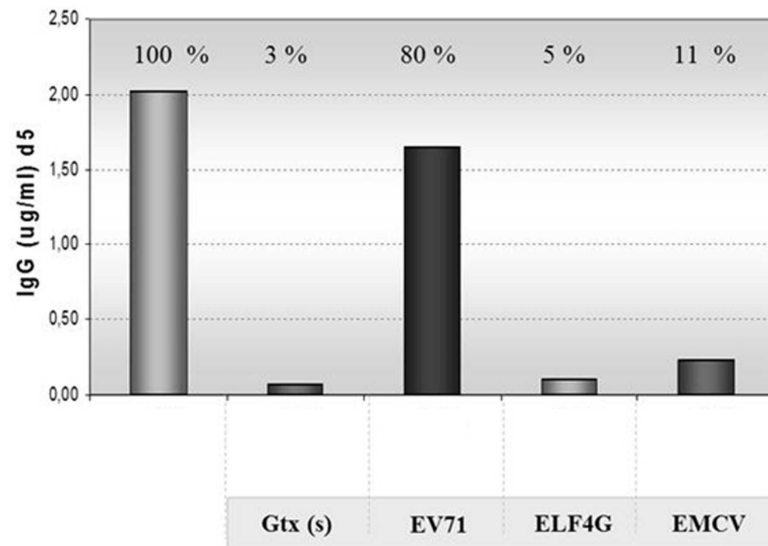
[1210] 놉-인투-홀 기술로 양쪽 중쇄가 이중이합체를 형성할 때 비-결합 항체 부분 (N) 상의 막관통 앵커는 세포 표면에 결합 항체 부분 B 를 표시하기에 충분하며 (V1.4, 도 17), 이는 단일 막관통 앵커가 2 개의 상이한 중쇄 및 공통 경쇄로 이루어지는 전체 IgG 를 세포 표면에 표시하는데 충분하다는 것을 시사한다.

도면

도면1

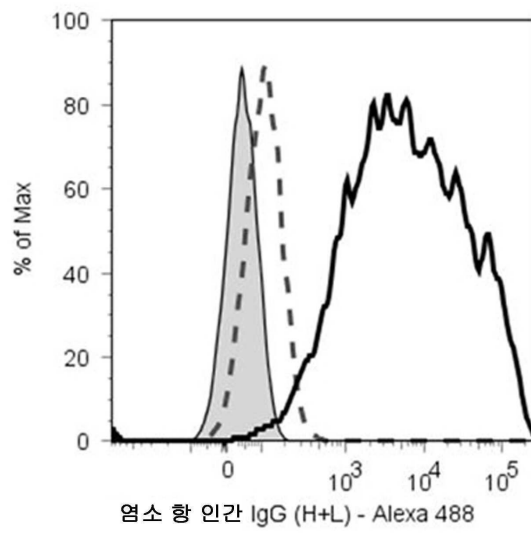


도면2

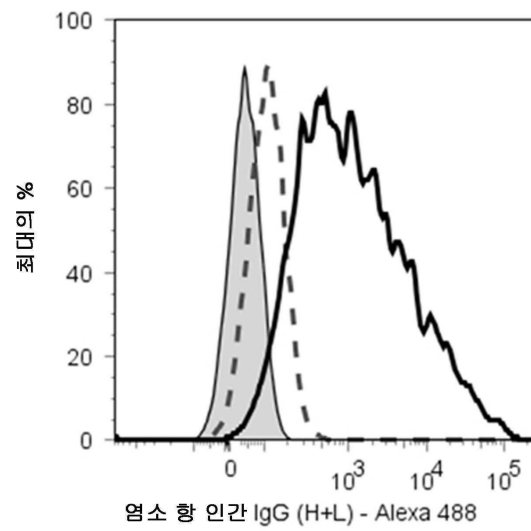


도면3

a)

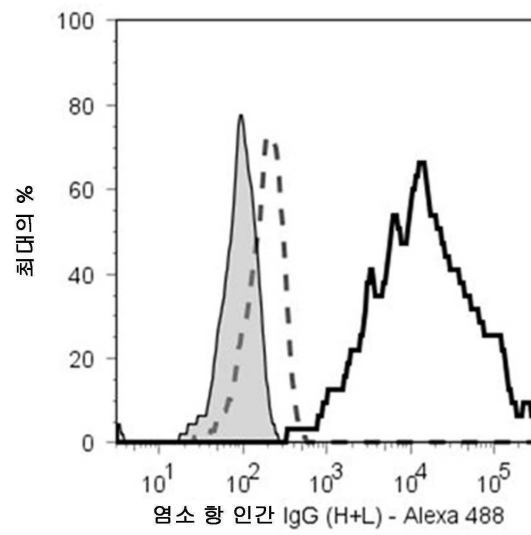


b)

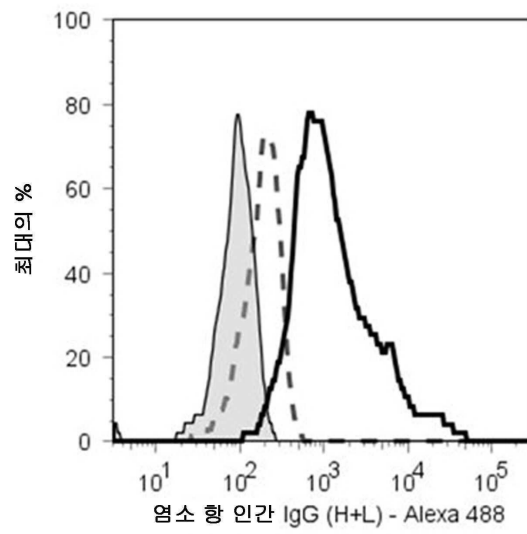


도면4

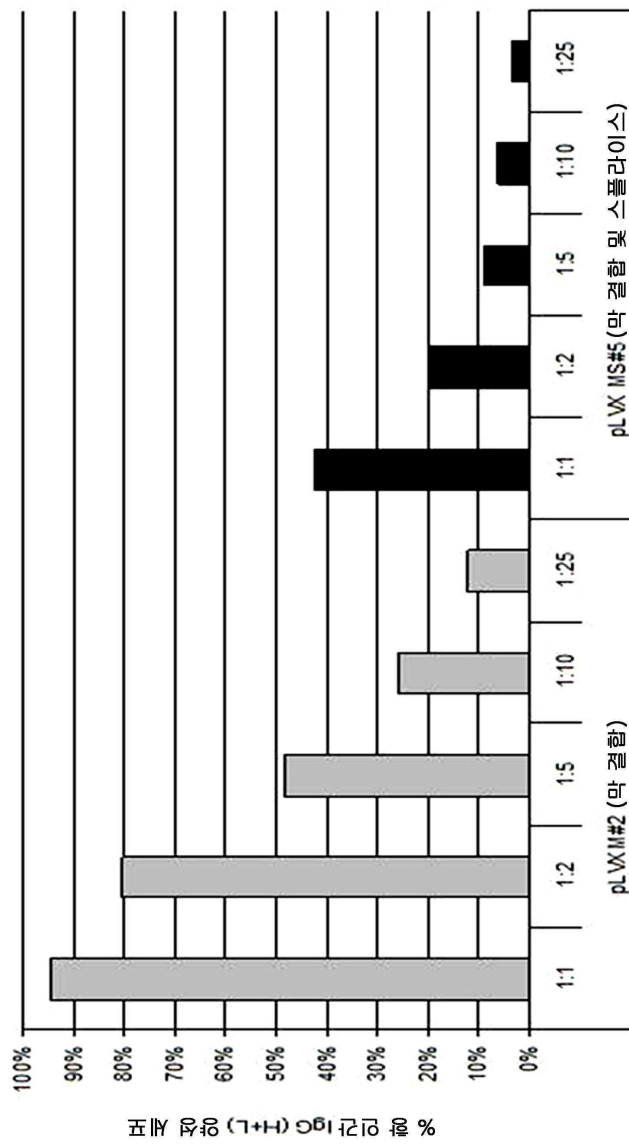
a)



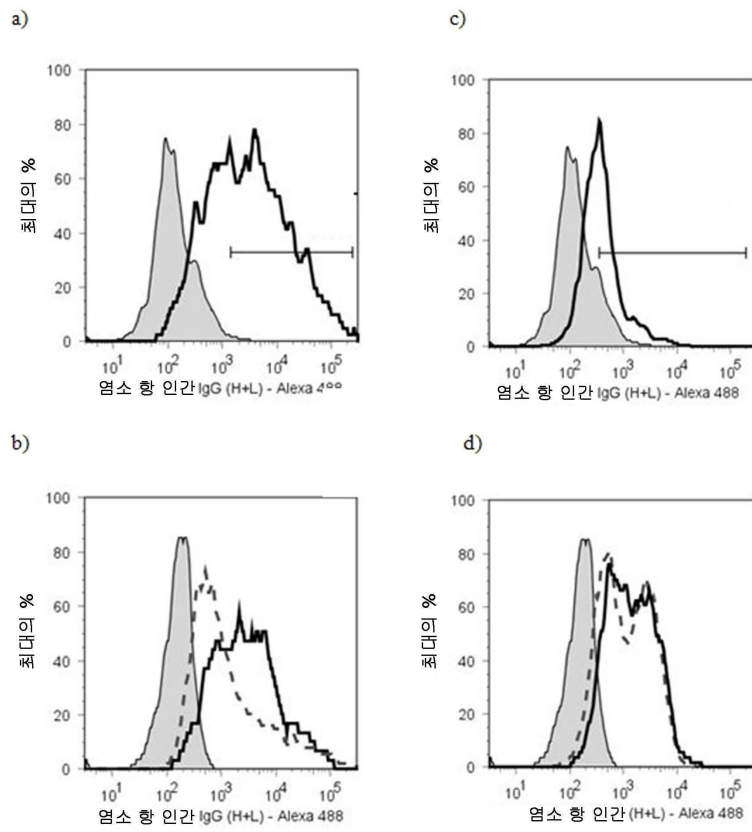
b)



도면5

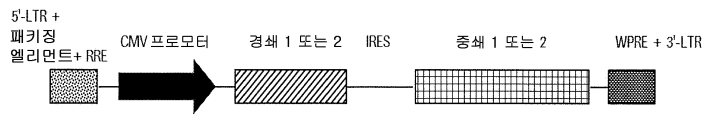


도면6

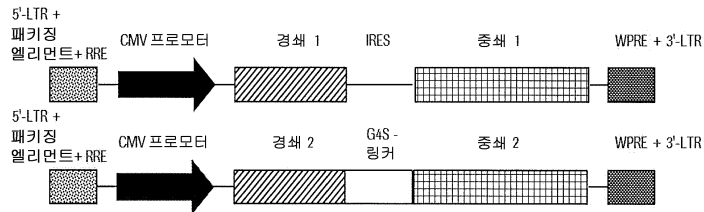


도면7i

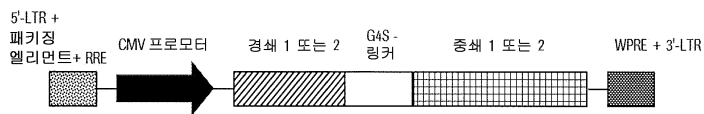
크로스맵



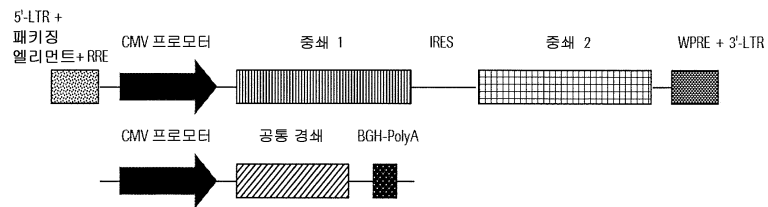
1-팔 단일 사슬 Fab



2-팔 단일 사슬 Fab



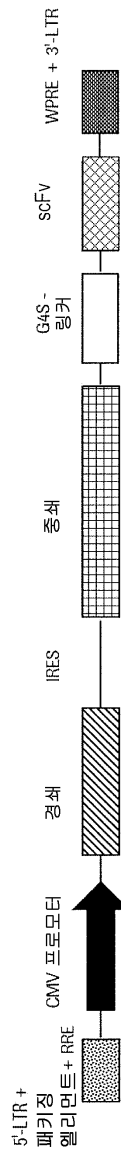
공통 경쇄 이중특이적



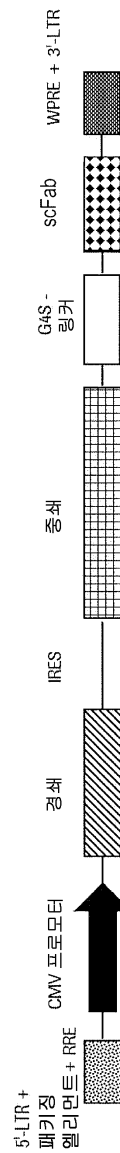
도면7ii

(계속)

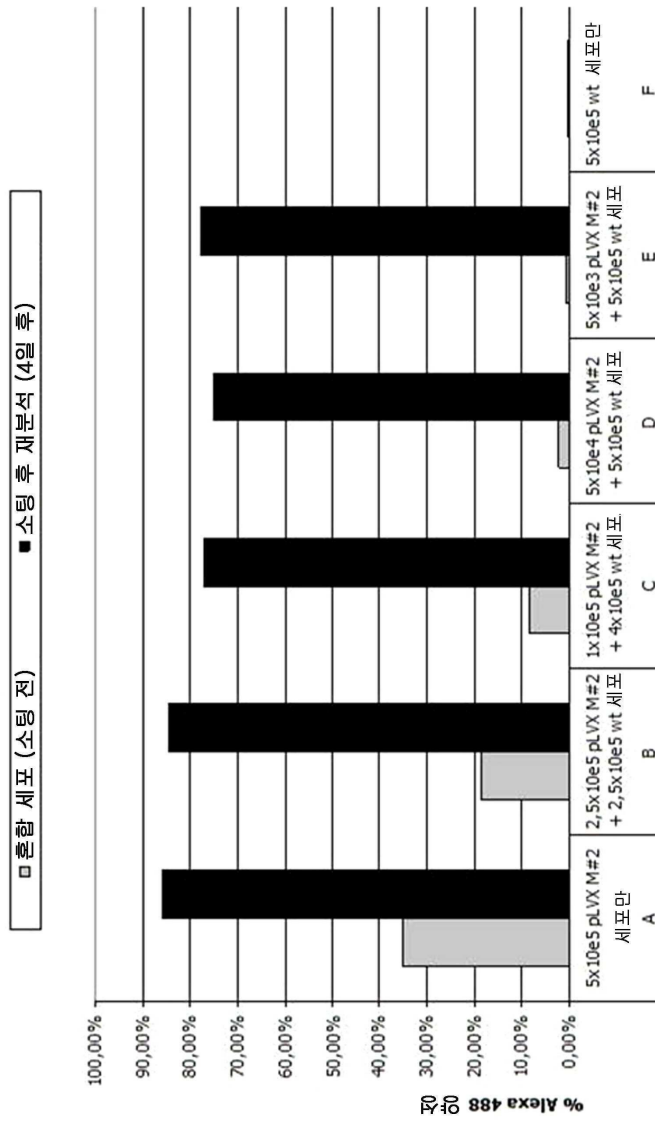
4가 scFv 포맷



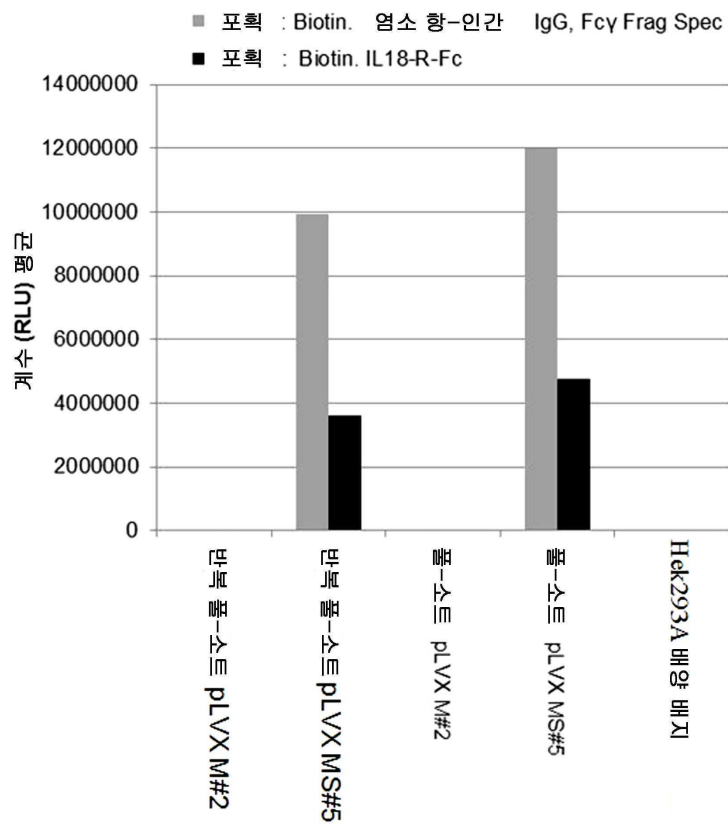
4가 scFab 포맷



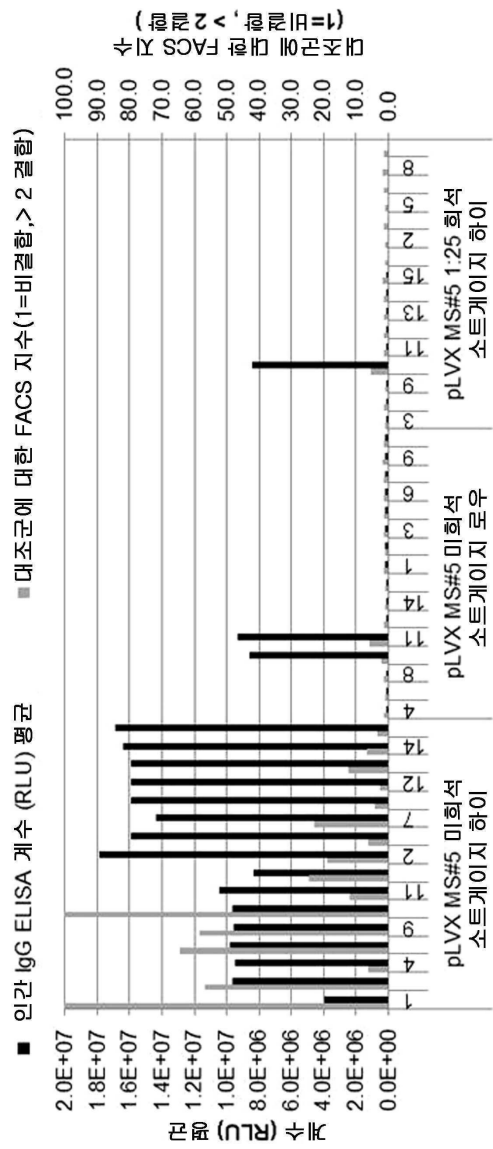
도면8



도면9

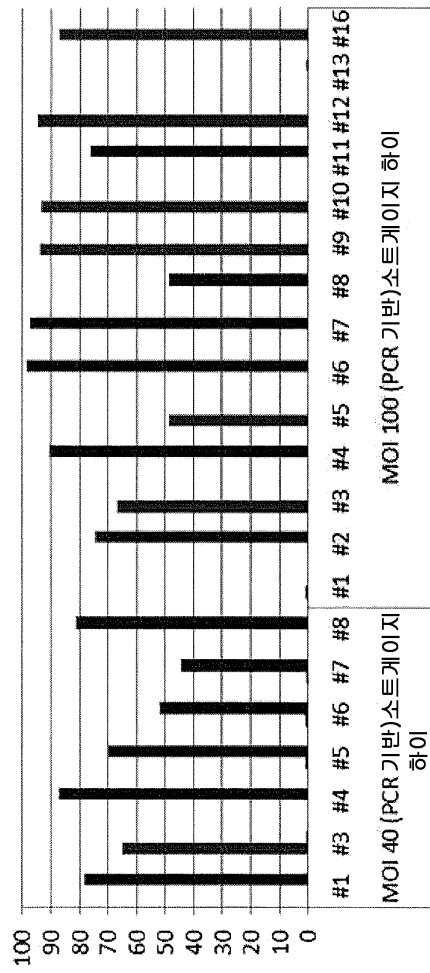


도면10



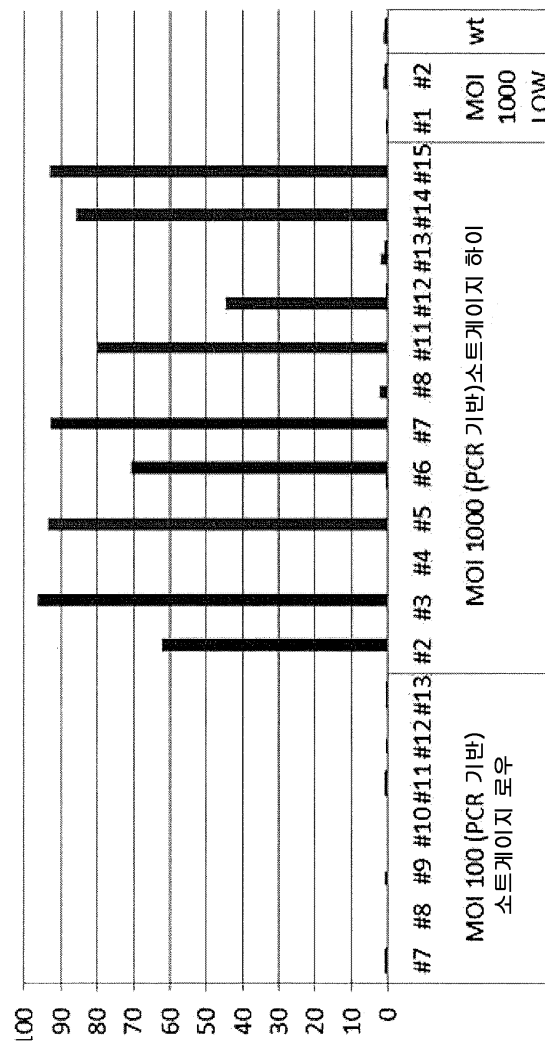
도면11i

(A)



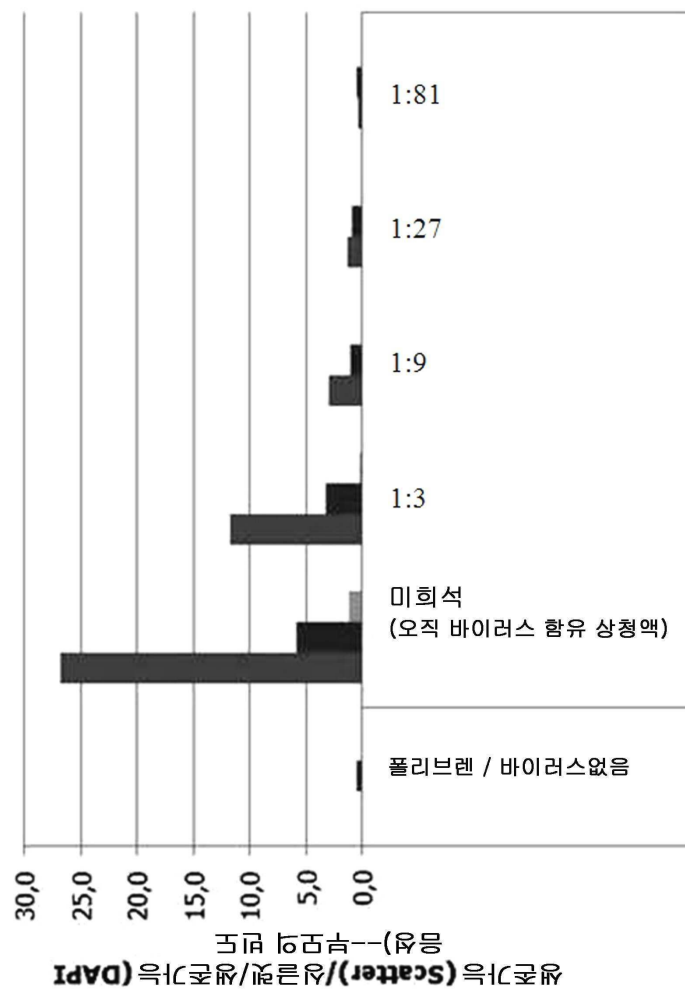
도면11ii

(A) 계속

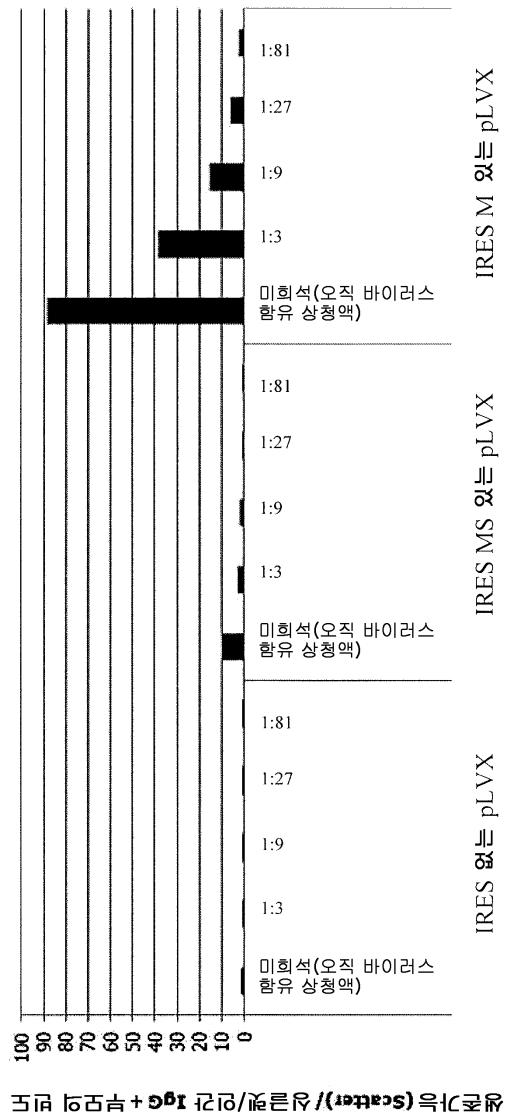


도면11iii

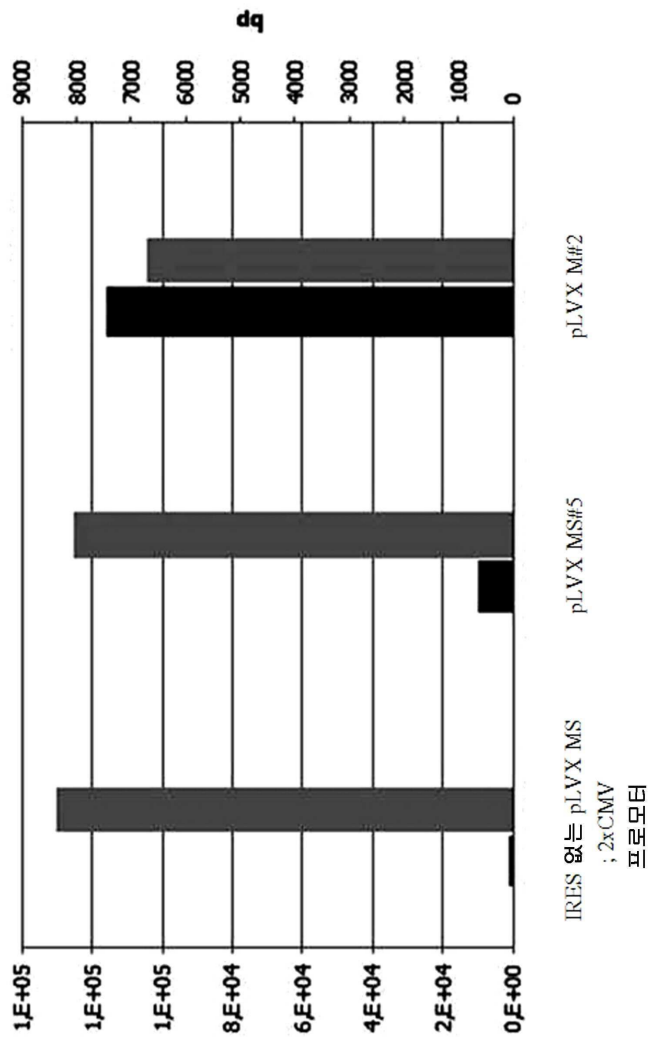
(B)



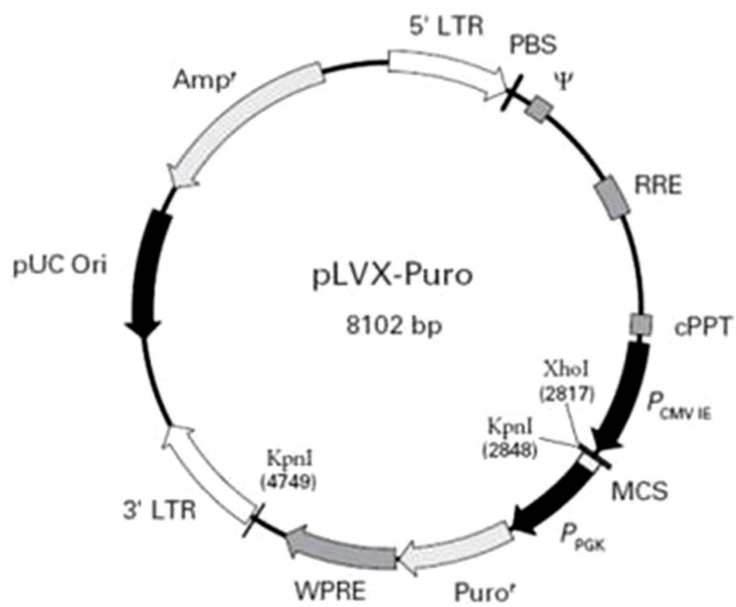
도면12



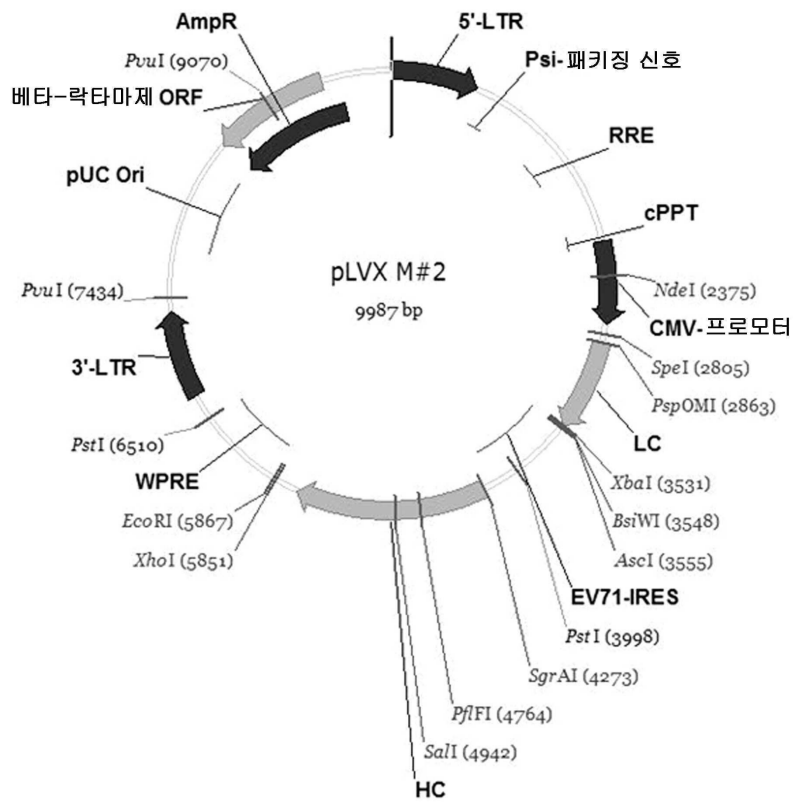
도면13



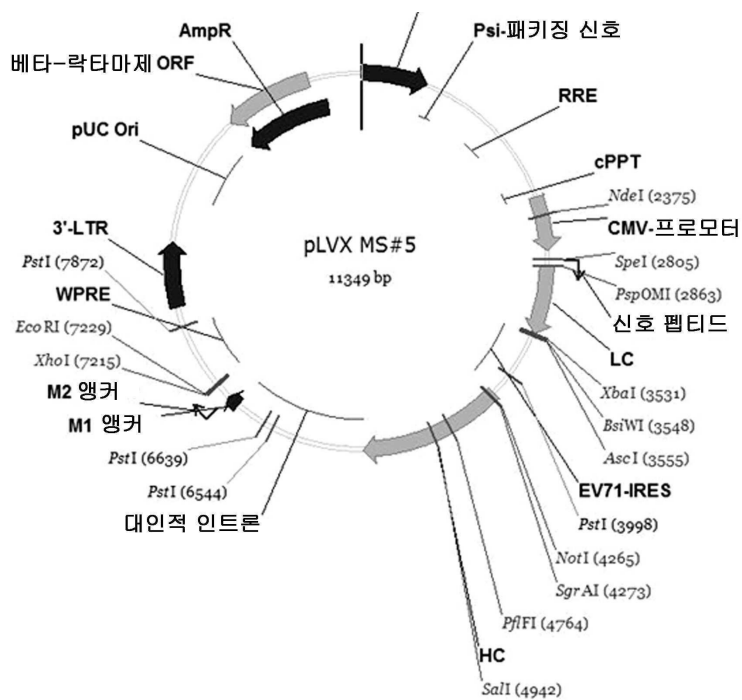
도면14



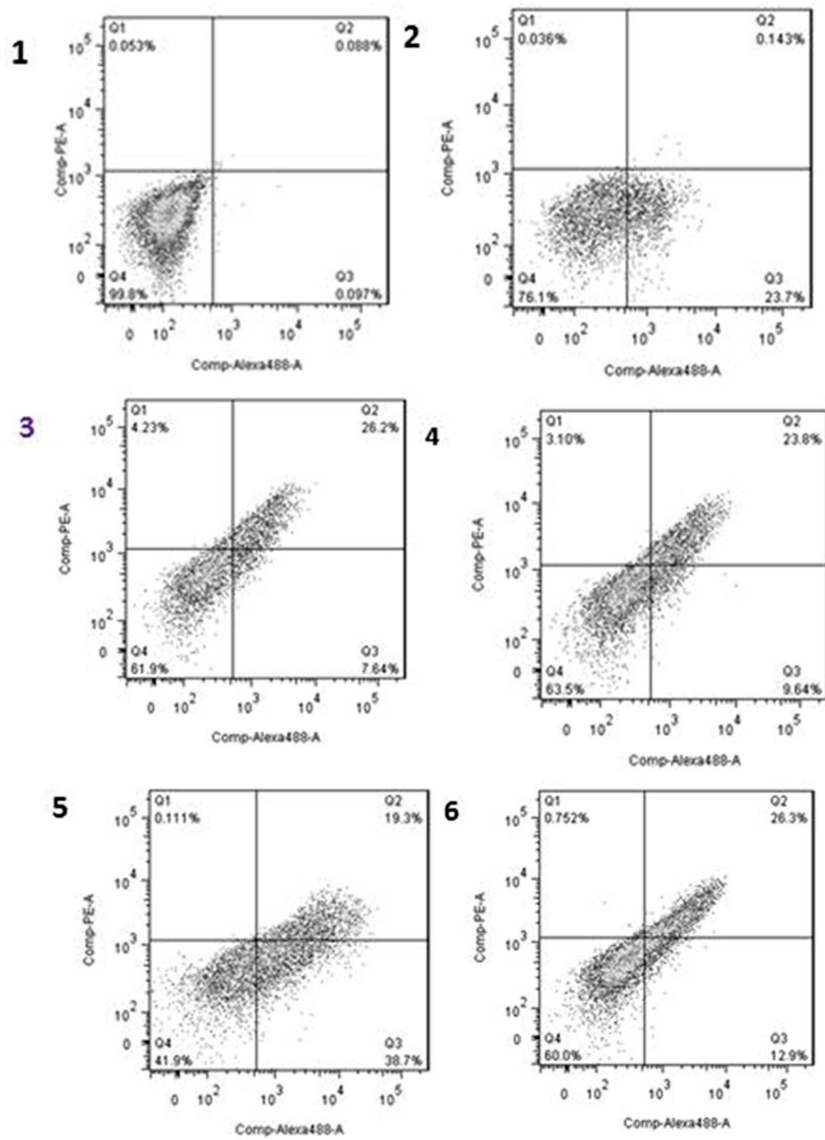
도면15



도면16

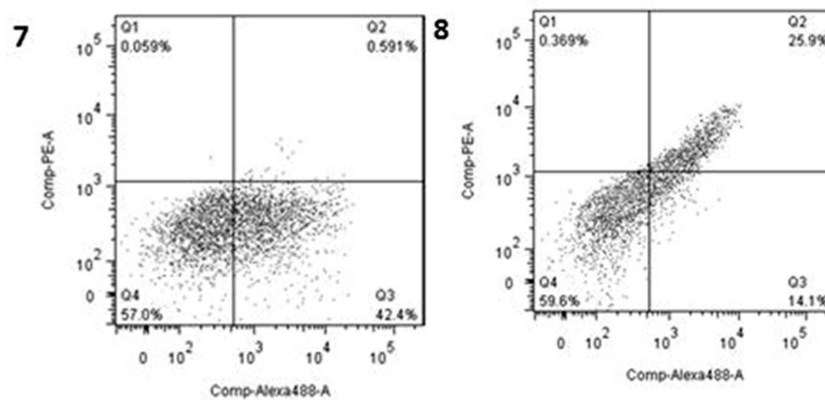


도면17i



도면17ii

(계속)



서 열 목록

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Full length antibody display system for eukaryotic cells and its
use

<130> 30800 WO

<150> EP11195375.8

<151> 2011-12-22

<150> EP12179029.9

<151> 2012-08-02

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 1

tgatatatgc tagctgagga gacggtgacc agggt 35

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 2

tgatatatgc tagctgagga gacagtgacc agggt 35

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 3

tgatatatgc tagctgaaga gacggtgacc attgt 35

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	PCR primer	
<400>	4	
tgatatatgc tagctgagga gacggtgacc gtggt		35
<210>	5	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	5	
ctgttcgggc ccacagcgag gtgcagctgk tgsagtctgs		40
<210>	6	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	6	
agtatatact cgagacggtg accagggtgc cctggc		36
<210>	7	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	7	
agtatatact cgagacagtg accagggtgc cacggc		36
<210>	8	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	8	
agtatatact cgagacggtg accattgtcc cttggc		36
<210>	9	
<211>	36	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 9
 agtatatact cgagacgggtg accagggttc cctggc 36
 <210> 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 10
 agtatatact cgagacgggtg accgtggtcc cttggc 36
 <210> 11
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 11
 ctggtggcgg ccgccaccgg cgcccacagc gaggtgcagc tgktgsagtc tgs 53
 <210> 12
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 12
 gcagccacag gggcccactc cgacatccrg wtgaccagtc ct 42
 <210> 13
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 13
 gcagccacag gggcccactc cgatgttgtg atgactcagtc ct 42

<210> 14
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 14
 gcagccacag gggcccactc cgaaattgtg wtgacrcagt ct 42
 <210> 15
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 15
 agctacaggg gccactccg atrttgtgat gacycagwct 40
 <210> 16
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 16
 gcagccacag gggcccactc cgacatcgtg atgaccag 39

 <210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 17
 agctacaggg gccactccg aaattgtgct gactcagtct 40
 <210> 18
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 18

gcagccacag gggcccactc cgawrttgtg mtgackcagt ctcc	44
<210> 19	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 19	
tgggggcact ttctagatca acactctccc ctgttgaagc tc	42
<210> 20	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 20	
gcagccacag gggcccactc ccagtctgtg ytgackcag	39
<210> 21	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 21	
gcagccacag gggcccactc ccagtctgcc ctgactcag	39
<210> 22	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 22	
gcagccacag gggcccactc ccagcytgtg ctgactcaa	39
<210> 23	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	PCR primer	
<400>	23	
gcagccacag	gggcccactc	ccagsctgtg ctgactcag 39
<210>	24	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	24	
gcagccacag	gggcccactc	ccagrcctgtg gtgactcag 39
<210>	25	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	25	
gcagccacag	gggcccactc	ccagactgtg gtgaccag 39
<210>	26	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	26	
gcagccacag	gggcccactc	ccwgctgtg ctgactcag 39
<210>	27	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	27	
gcagccacag	gggcccactc	ccaggcaggg ctgactcag 39
<210>	28	
<211>	42	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	28	
acattctgta cgtacgactg tcttctccac ggtgctccct tc		42
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	29	
gatcagcact gaacacagag g		21
<210>	30	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCr primer	
<400>	30	
ggaaacacgc tagggccttt cg		22
<210>	31	
<211>	655	
<212>	DNA	
<213>	Enterovirus 71	
<400>	31	
ggcgcgcccc cgaagtaact tagaagctgt aatcaacga tcaatagcag gtgtggcaca		60
ccagtcatac cttgatcaag cacttctgtt tccccggact gagtatcaat aggctgctcg		120
cgcggctgaa ggagaaaacg ttcgttacc gaccaactac ttcgagaagc ttagtaccac		180
catgaacgag gcaggggtgtt tcgctcagca caaccccgat gtagatcagg ctgatgagtc		240
actgcaaccc ccatgggcga ccatggcagt ggctgcgttg gcggcctgcc catggagaaa		300
tccatgggac gctctaattc tgacatgggtg tgaagagcct attgagctag ctggtagtcc		360
tccggccctt gaatgcggct aatcctaact gcggagcaca tgctcacaaa ccagtgggtg		420
gtgtgtcgta acgggcaact ctgcagcgga accgactact ttgggtgtcc gtgtttcctt		480
ttattcctat attggctgct tatggtgaca atcaaaaagt tgttaccata tagctattgg		540

attggccatc cgggtgtgcaa cagggaatt gtttacctat ttattggttt tgtaccatta 600
 tcactgaagt ctgtgatcac tctcaaattc attttgaccc tcaacacaat caaac 655
 <210> 32
 <211> 225
 <212> DNA
 <213> Bos taurus
 <400> 32
 ctgtgccttc tagttgccag ccactctgtt tttgccctc ccccgctcct tccttgaccc 60
 tggaagggtc cactccact gtcttttct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt 180
 gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtagggctc tatgg 225
 <210> 33
 <211> 608
 <212> DNA
 <213> Human cytomegalovirus
 <400> 33
 gttagacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60
 gcccatatat ggagtccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgct ggctgaccgc 120
 ccaacgaccc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
 atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc 300
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
 tattagtcat cgctattagc atgggatgc ggttttgca gtacatcaat gggcgtggat 420
 agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccacccat tgacgtcaat gggagtgtgt 480
 tttagcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactcgcc ccattgacgc 540
 aaatgggcgg taggcgtgta cggtagggagg tctatataag cagagctccg ttagtgaac 600
 gtcagatc 608
 <210> 34
 <211> 1517
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> intron 6 + M1/M2

<400> 34

glaaatgagt gcgacggccg gcaagccccc gctccccggg ctctcgcggt cgcacgagga 60
tgcttggcac gtaccccttg tacatacttc cggggcgcgc agcatggaaa taaagcaccc 120
agcgctgccc tggcccccctg cgagactgtg atggttcttt ccacgggtca ggccgagtct 180
gaggcctgag tggcatgagg gaggcagagc gggctccact gtccccacac tggcccaggc 240
tgtgcagggtg tgcttgggcc gcctaggggtg gggctcagcc aggggctgcc ctccggcaggg 300
tgggggattt gccagcgtgg ccctccctcc agcagcacct gccctgggct gggccacggg 360

aagccctagg agcccttggg gacagacaca cagcccttgc ctctgtagga gactgtcctg 420
ttctgtgagc gccctgtcct ccgacctcca tgccactcg ggggcatgcc tagtccatgc 480
gcgtagggac aggccctccc tcacctatct acccccacgg cactaacccc tggcagccct 540
gcccagcctc gcacccacat ggggacacaa ccgactcctg gggacatgca ctctcgcccc 600
ctgtggaggg actgggtccag atgccacac acacactcag cccagaccg ttcaacaaac 660
cccgcactga ggttggccgg ccacacggcc accacacaca cactgtcacg cctcacacac 720
ggagcttcac ccgggcgaac cgcacagcac ccagaccaga gcaaggctcct cgcacacgtg 780

aacactcctc ggacacaggc cccacagagc cccacgcggc acctcaaggc ccacgagccg 840
ctcggcagct tctccacttg ctgaccagct cagacaaacc cagccctcct ctcaaaagt 900
gccccctgag ccgccacaca cacacaggcc cccacacaca ggggaacaca cgccacgtca 960
cgtccctggc actggccccc ttccaatac agcccttccc tgcagctgag gtcacatgag 1020
gtgtgggctt caccatcctc ctgccctctg ggcctcaggg agggacacgg gagacgggga 1080
gtgggtcctg ctgagggcca ggcctctatc tagggccggg tgtctggctg agtcccgggg 1140
ccaaagctgg tgcccagggc gggcagctgt ggggagctga cctcaggaca ctgttggccc 1200

atccccggcg gccctacat cctggccccc gccacagagg gaatcacccc cagaggccca 1260
agcccagggg gacacagcac tgaccacccc ctctctgtcc agagctgcaa ctggaggaga 1320
gctgtgcgga ggcgcaggac ggggagctgg acgggctgtg gacgaccatc accatcttca 1380
tcacactctt cctgctaagc gtgtgctaca gtgccaccgt caccttcttc aaggtgaagt 1440
ggatcttctc ctcggtggtg gacctgaagc agaccatcgt ccccgactac aggaacatga 1500
taaggcaggg ggcctag 1517

<210> 35

<211> 216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M1/M2

<400> 35

gagctgcaac tggaggagag ctgtgcggag ggcgaggacg gggagctgga cgggctgtgg 60

acgaccatca ccatcttcat cacactcttc ctgctaagcg tgtgctacag tgccaccgtc 120

accttcttca aggtgaagtg gatcttctcc tcggtggtgg acctgaagca gaccatcgtc 180

cccgactaca ggaacatgat aaggcagggg gcctag 216

<210> 36

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<220><221> misc_feature

<222> (57)

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

<400> 36

aagcagtggg aacaacgcag agtacttttt tttttttttt tttttttttt tttttvn 57

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 37

aagcagtggg aacaacgcag agtacgcggg 30

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 38

aagcagtggg atcaacgcag agt 23

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 39

ctagaagtcg gcggtgtttc

20