

(30) 우선권주장

61/090,111 2008년08월19일 미국(US)

61/170,029 2009년04월16일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 제1 핵산 분자;
- (b) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드; 및
- (c) 제1 핵산 분자의 일부에 대해 상보성인 핵산 서열을 포함하는 제2 핵산 분자를 포함하고, 여기서, 제1 핵산 분자는 제2 핵산 분자에 상보성 핵산 염기 짝짓기(pairing)를 통해 결합되고, 여기서, 제2 핵산 분자는 폴리펩타이드에 비-공유결합으로 결합된 X-디스플레이 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 제2 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 고 친화성 리간드; 및
- (b) 펩타이드 수용체에 결합된 리간드 수용체를 추가로 포함하며, 여기서, 고 친화성 리간드는 리간드 수용체에 결합되고 펩타이드 수용체는 폴리펩타이드에 공유결합으로 결합된 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 제2 고 친화성 리간드를 추가로 포함하며, 여기서, 제2 고 친화성 리간드가 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합되고, 여기서, 제2 고 친화성 리간드가 리간드 수용체에 결합된 복합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 펩타이드 수용체가 제2 고 친화성 리간드에 링커를 통해 결합된 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 링커가 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 복합체.

청구항 6

제4항에 있어서, 링커가 폴리시알산 링커를 포함하는 복합체.

청구항 7

제2항에 있어서, 리간드 수용체가 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

- (a) 제2 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 리간드 수용체; 및
- (b) 펩타이드 수용체에 결합된 고 친화성 리간드를 추가로 포함하며, 여기서, 리간드 수용체가 고 친화성 리간

드에 결합되어 있고 펩타이드 수용체가 폴리펩타이드의 C-말단에 공유결합으로 결합된 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 제2 핵산 분자의 일부에 대해 상보성인 핵산 서열을 포함하는, 제3 핵산 분자를 추가로 포함하며, 여기서, 제3 핵산 분자가 제2 핵산 분자에 상보성 핵산 염기 짝짓기를 통해 결합되고, 여기서, 제3 핵산 분자가 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합되며, 여기서, 펩타이드 수용체가 폴리펩타이드에 공유결합으로 결합된 복합체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 분자가 측쇄된 핵산 분자인 복합체.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 핵산 분자가 제1 핵산 분자의 역 전사용 프라이머로서 작용할 수 있는 복합체.

청구항 12

- (a) 제1 고 친화성 리간드에 공유결합으로 결합된, 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 핵산 분자;
- (b) 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드;
- (c) 펩타이드 수용체에 결합된 리간드 수용체를 포함하며, 여기서, 고 친화성 리간드가 리간드 수용체에 결합되고 펩타이드 수용체가 폴리펩타이드의 C-말단에 공유결합으로 결합된 X-디스플레이 복합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 리간드 수용체가 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된 복합체.

청구항 14

제12항에 있어서, 제2 고 친화성 리간드를 추가로 포함하며, 여기서, 제2 고 친화성 리간드가 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합되고, 여기서, 제2 고 친화성 리간드가 리간드 수용체에 결합된 복합체.

청구항 15

- (a) 제1 고 친화성 리간드에 공유결합으로 결합된, 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 핵산 분자;
- (b) 제2 고 친화성 리간드에 공유결합으로 결합된 제1 리간드; 및
- (c) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드(여기서, 폴리펩타이드는 제2 리간드 수용체를 포함한다)를 포함하며, 여기서, 제1 고 친화성 리간드가 제1 리간드 수용체에 결합되고, 제2 고 친화성 리간드가 제2 리간드 수용체에 결합된 X-디스플레이 복합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 고 친화성 리간드 또는 제2 고 친화성 리간드가 바이오틴인 복

합체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 고 친화성 리간드 또는 제2 고 친화성 리간드가 FK506, 메토티렉세이트, PPI-2458, 바이오틴, 히루딘, ZFVp(O)F, 플루오레세인-바이오틴, ABD(알부민 결합 도메인), 18bp DNA, RNase A, 클로로알칸, 아틸(베타-아미노 에틸)케톤, 및 단백질 A를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 리간드 수용체 또는 제2 리간드 수용체가 FKBP12, 디하이드로 폴레이트 리덕타제, 메티오닌 아미노펩티다제, 이합체성 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 사합체, 트롬빈, 카복시펩티다제, 1가 Ab, HSA(알부민), Zn 핑거(finger), hRI(RNase 억제제), 돌연변이된 할로알칸 데할로게나제, 할로태그, 및 소르타제를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 리간드 수용체 또는 제2 리간드 수용체가 스프렙타비딘인 복합체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩타이드가 항체, VH 도메인, VL 도메인, Fab 단편, 일본쇄항체, 나노바디(nanobody), 유니바디(unibody), 아드빅틴, 아피바디(affibody), DARPin, 안티칼린, 아비머, ¹⁰Fn3 도메인, 및 베르사바디를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 21

- (a) 고 친화성 리간드에 공유결합으로 부착된, 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 핵산 분자; 및
- (b) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드(여기서, 폴리펩타이드는 리간드 수용체를 포함한다)를 포함하고, 여기서, 리간드는 리간드 수용체에 결합된 X-디스플레이 복합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 리간드가 FK506이고 리간드 수용체가 FKBP의 FK506-결합 도메인인 복합체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 분자가 ssRNA, ssDNA, ssDNA/RNA 하이브리드 dsDNA, 및 dsDNA/RNA 하이브리드로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 분자의 폴리펩타이드-암호화 서열이 골격내(in-frame) 정

지 코돈을 함유하지 않는 복합체.

청구항 25

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩타이드가 결합 단백질인 복합체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 단백질이 항체의 VH 또는 VL 도메인인 복합체.

청구항 27

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 복합체가 리보솜을 함유하지 않는 복합체.

청구항 28

복합체의 적어도 일부가 상이한 폴리펩타이드-암호화 서열을 함유하는, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 X-디스플레이 복합체 다수를 포함하는 라이브러리.

청구항 29

- (a) 제1 핵산 링커에 대해 상보성인 서열 성분을 포함하는 mRNA 서열의 라이브러리를 제공하는 단계;
- (b) 제1 고 친화성 리간드에 작동적으로 연결된 제1 핵산 링커를 제공함으로써 제1 핵산 링커가 상보성 핵산 염기 짝짓기를 통해 mRNA에 결합하도록 하는 단계;
- (c) 펩타이드 수용체에 작동적으로 연결된 제2 고 친화성 리간드를 제공하는 단계;
- (d) 적어도 2개의 결합 부위를 가진 리간드 수용체를 제공함으로써 리간드 수용체가 제1 고 친화성 리간드 및 제2 고 친화성 리간드에 결합하도록 하는 단계; 및
- (e) mRNA의 해독이 일어나도록 함으로써 펩타이드 수용체가 해독된 단백질에 결합하여 mRNA를 단백질에 연결시키는 핵산-폴리펩타이드 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, X-디스플레이 복합체의 라이브러리를 생산하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, mRNA를 핵산-폴리펩타이드내 복합체내 제1 핵산 링커를 프라이머로서 사용하여 역 전사시킴으로써 DNA/DNA 하이브리드가 형성되도록 하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, mRNA를 분해하고 상보성 DNA 쇄를 합성함으로써 핵산-폴리펩타이드 복합체내에 DNA/DNA 하이브리드를 형성시킴을 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, mRNA가 TMV 인헨서를 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, mRNA가 C_μ 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제29항에 있어서, mRNA가 FLAG 태그를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제29항에 있어서, mRNA가 SA 디스플레이 서열을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제29항에 있어서, mRNA가 A20 테일을 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 핵산-폴리펩타이드 복합체의 라이브러리.

청구항 38

- (a) 제29항에 따른 핵산-폴리펩타이드 복합체의 라이브러리를 제공하는 단계;
- (b) 라이브러리와 목적한 항원을 접촉시키는 단계;
- (c) 라이브러리로부터 목적한 항원과 결합하는 적어도 하나의 핵산-폴리펩타이드 복합체를 선택하는 단계; 및
- (d) 선택된 핵산-폴리펩타이드 복합체의 폴리펩타이드-암호화 서열을 분리하는 단계를 포함하여, 목적하는 항원에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 선택하는 방법.

청구항 39

- (a) 제38항에 따른 방법을 사용하여 선택된 폴리펩타이드-암호화 서열을 제공하는 단계; 및
- (b) 폴리펩타이드-암호화 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드를 발현시키는 단계를 포함하는, 목적한 항원에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 생산하는 방법.

청구항 40

제29항에 따른 방법에 의해 선택된, 목적한 항원에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 41

- (a) 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 제1 핵산 분자;

- (b) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드;
- (c) 제1 핵산 분자의 일부에 대해 상보성인 핵산 서열을 포함하는 제2 핵산 분자;
- (d) 제2 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 제1 고 친화성 리간드;
- (e) 제1 리간드 수용체; 및
- (f) 하나 이상의 연결 분자를 통해 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된 제2 고 친화성 리간드를 포함하며, 여기서, 제1 핵산 분자가 제2 핵산 분자에 상보성 핵산 염기 짝짓기를 통해 결합되고, 여기서, 제1 고 친화성 리간드가 제1 결합 부위에서 리간드 수용체에 비공유결합으로 결합되며, 여기서, 제2 리간드가 제2 결합 부위에서 리간드 수용체에 비공유결합으로 결합되고, 여기서, 하나 이상의 연결 분자가 폴리에틸렌 글리콜 분자인 X-디스플레이 복합체.

청구항 42

제41항에 있어서, 제1 고 친화성 리간드가 바이오틴이고, 리간드 수용체가 스트렙타비딘, 이합체성 스트렙타비딘, 및 사합체성 스트렙타비딘을 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 43

제41항에 있어서, 제2 고 친화성 리간드가 바이오틴이고, 리간드 수용체가 스트렙타비딘, 이합체성 스트렙타비딘, 및 사합체성 스트렙타비딘을 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 44

제41항에 있어서, 제1 고 친화성 리간드 또는 제2 고 친화성 리간드가 FK506, 메토티렉세이트, PPI-2458, 바이오틴, 히루딘, ZFVp(O)F, 플루오레세인-바이오틴, ABD (알부민 결합 도메인), 18bp DNA, RNase A, 클로로알칸, 아릴(베타-아미노 에틸)케톤 및 단백질 A를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 45

제41항에 있어서, 제2 리간드 수용체를 추가로 포함하는 복합체.

청구항 46

제45항에 있어서, 제2 리간드 수용체가 FKBP12, 디하이드로폴레이트 리덕타제, 메티오닌 아미노펩티다제, 이합체성 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 사합체, 트롬빈, 카복시펩티다제, 1가 Ab, HSA(알부민), Zn 핑거, hRI(RNase 억제제), 돌연변이된 할로알칼 데할로게나제, 할로태그, 및 소르타제를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 47

제41항에 있어서, 펩타이드 수용체가 푸로마이신인 복합체.

청구항 48

제41항에 있어서, 제1 또는 제2 핵산 분자가 소랄렌을 추가로 포함하는 복합체.

청구항 49

제41항에 있어서, 폴리펩타이드가 항체, VH 도메인, VL 도메인, Fab 단편, 일본쇄 항체, 나노바디, 유니바디, 아드넥틴, 아피바디, DARPin, 안티칼린, 아비머, ¹⁰Fn3 도메인, 및 베르사바디를 포함하는 그룹 중에서 선택되는 복합체.

청구항 50

- (a) 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 제1 고 친화성 리간드;
- (b) 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된 제2 고 친화성 리간드; 및
- (c) 2개 이상의 리간드 결합 부위를 포함하는 리간드 수용체를 포함하며; 여기서, 제1 및 제2 리간드는 인접한 리간드 결합 부위에서 리간드 수용체에 결합되는 이중양기능성(heterobifunctional) 복합체.

청구항 51

제50항에 있어서, 제1 고 친화성 리간드 및 제2 고 친화성 리간드가 동일한 복합체.

청구항 52

제50항에 있어서, 제1 고친화성 리간드 및 제2 고 친화성 리간드가 바이오틴인 복합체.

청구항 53

제50항에 있어서, 핵산 분자가 소랄렌 잔기를 포함하는 복합체.

청구항 54

제50항에 있어서, 펩타이드 수용체가 푸로마이신인 복합체.

청구항 55

제50항에 있어서, 리간드 수용체가 다합체성 단백질인 복합체.

청구항 56

제50항에 있어서, 리간드 수용체가 스트렙타비딘인 복합체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 단백질 및 핵산의 바람직한 특성을 선택하여 개발하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0002] 관련 출원

[0003] 본 출원은, 이의 내용이 본원에 참조로 인용된, 2008년 7월 25일자로 출원된 미국 가특허원 제61/083813호, 2008년 8월 19일자로 출원된 미국 가특허원 제61/090111호, 및 2009년 4월 16일자로 출원된 미국 가특허원 제 61/170029호에 대한 우선권을 주장한다.

배경 기술

[0004] 디스플레이 및 선택 기술의 사용시, 보다 큰 다양성으로의 접근은 보다 큰 친화성, 특이성, 안정성 및/또는 기타 바람직한 특성을 갖는 분자를 보다 효과적으로 선택하도록 한다는 것이 잘 공지되어 있다.

[0005] 개발되어온 과거의 방법은 파아지 디스플레이, 리보솜 디스플레이, CIS 디스플레이 및 mRNA 디스플레이를 포함한다. 최근에, 생체내 스크리닝을 사용하여 분자를 확인하는데 관심이 증가되고 있다[참조: J Control Release. 2003 Aug 28;91(1-2):183-6]. 당해 시도는 파아지 디스플레이의 사용으로 가능하게 달성되어 왔지만, 파아지 디스플레이 기술에 의해 제한된 다양성을 겪게 된다. 리보솜 또는 mRNA 디스플레이는 RNA 종의 불안정성으로 인하여 이러한 적용에 실패할 수 있다. 따라서, DNA-단백질 융합체의 개발이 당해 종의 증가된 안정성으로 인해, 매우 바람직할 수 있다.

[0006] 3가지 유형의 DNA-단백질 융합체가 기술되어 있다. CIS 디스플레이는 시험관내 전사/해독시 커플링되는 부위를 사용하여 전사 및 해독되는 동안 DNA에 공유 결합하는 dsDNA 결합 단백질을 생성하는 하나의 방법이다[참조: PNAS, 101(9): 2806-2810]. 그러나, 당해 기술의 주요 한계 중 하나는, 합성된 단백질이 전사/해독 과정 동안 근처에 있는 특정의 이웃하는 DNA에 결합함으로써 미스-태그된(mis-tagged) 융합체를 생성할 수 있다는 것이다. 두번째 방법은, 쿠르츠(Kurz) 및 로쎬(Lohse)의 방법이다[참조: Chembiochem. 2001 Sep 3;2(9):666-72]. 당해 방법은 해독된 단백질과 공유결합하여 RNA상의 공유결합성 부가물에서 리보솜 휴지기(ribosome pause)를 생성하며, 역 전사용 프라이머로서 제공될 수 있는 다기능성 종을 사용하여 mRNA와의 공유결합성 부가물을 형성하는 것을 포함한다. 당해 방법의 한계는 소랄렌을 사용한 RNA와의 공유결합성 연결 단계의 비효율성이다. 세번째 방법은 요네자와(Yonezawa) 등의 방법[참조: Nucleic Acids Res. 2003 October 1; 31(19): e118.]이다. 당해 방법에서, 스트렙타비딘을 암호화하는 DNA 및 다양한 펩타이드의 영역은 바이오티닐화되어, 해독 머신을 가진 합성 미세구내에 위치되고 해독됨으로써 스트렙타비딘(사합체)이 바이오티닐화된 DNA에 결합하게 될 것이다. 당해 방법의 한계는, 수득되는 종이 사합체이며, 이것이 하나의 입자 상에서의 다수의 결합 종으로 인해 친화성 선택에 문제가 있을 수 있다는 것이다(재결합 효과).

[0007] 본원에서는 핵산 및 단백질 사이에 비공유결합성 부착을 사용할 수 있고 DNA-단백질 융합체를 형성하도록 할, 요구되는 핵산 단백질 융합체를 생성하기 위한 간단하고, 효율적인 방법이 기술되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 발명의 요약

[0009] 본 발명은 단백질 및 핵산의 바람직한 특성을 선택하여 개발하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 각종 양태에서, 본 발명은 핵산 또는 변형된 핵산에 연결된 소 분자를 포함한다. 다른 양태는 아미노산이 변형된 펩타이드를 포함하는, 폴리펩타이드를 생산하는 방법, 바람직한 특성을 가진 집단의 개개의 구성원을 선택할 수 있는 검정, 및 특성이 개선된 폴리펩타이드의 새로운 변이를 생성하는 방법을 포함한다.

[0010] 하나의 측면에서 본 발명은

[0011] (a) 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 제1 핵산 분자;

[0012] (b) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드; 및

[0013] (c) 제1 핵산 분자의 일부에 대해 상보성인 핵산 서열을 포함하는 제2 핵산 분자를 포함하며, 여기서, 제1 핵산 분자는 제2 핵산 분자에 상보성 핵산 염기 짝짓기(pairing)을 통해 결합되고, 제2 핵산 분자는 폴리펩타이드에 비-공유결합으로 결합된 이중양기능성 복합체(heterobifunctional complex)를 제공한다.

[0014] 일부 양태에서, 당해 이중양기능성 복합체는 추가로:

- [0015] (a) 제2 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 고 친화성 리간드; 및
- [0016] (b) 펩타이드 수용체에 결합된 리간드 수용체를 포함하며, 여기서, 고 친화성 리간드는 리간드 수용체에 결합되고 펩타이드 수용체는 폴리펩타이드에 공유결합으로 결합된다. 일부 양태에서, 당해 이중양기능성 복합체는 또한 제2 고 친화성 리간드를 포함하며, 여기서, 제2 고 친화성 리간드는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합되고, 여기서, 제2 고 친화성 리간드는 리간드 수용체에 결합된다. 일부 양태에서, 당해 이중양기능성 복합체내 펩타이드 수용체는 제2 고 친화성 리간드에 링커를 통해 결합된다. 하나의 바람직한 양태에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 다른 바람직한 양태에서, 링커는 또한 폴리시알산 링커를 포함한다. 일부 양태에서, 당해 이중양기능성 복합체내 리간드 수용체는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된다.
- [0017] 일부 양태에서, 당해 이중양기능성 복합체는 추가로:
- [0018] (a) 제2 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 리간드 수용체; 및
- [0019] (b) 펩타이드 수용체에 결합된 고 친화성 리간드를 포함하며, 여기서, 리간드 수용체는 고 친화성 리간드에 결합되고 펩타이드 수용체는 폴리펩타이드의 C-말단에 공유결합으로 결합된다.
- [0020] 다른 양태에서, 당해 이중양기능성 복합체는 추가로 제2 핵산 분자의 일부에 대해 상보성인 핵산 서열을 포함하는, 제3 핵산 분자를 포함하며, 여기서, 제3 핵산 분자는 제2 핵산 분자에 상보성 핵산 염기 짝짓기를 통해 결합되며, 여기서, 제3 핵산 분자는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합되고, 여기서, 펩타이드 수용체는 폴리펩타이드에 공유결합으로 결합된다.
- [0021] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체내 제2 핵산 분자는 측쇄 핵산 분자이다. 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체내 제2 핵산 분자는 제1 핵산 분자의 역 전사용 프라이머로서 작용할 수 있다.
- [0022] 다른 측면에서, 본 발명은
- [0023] (a) 제1 고 친화성 리간드에 공유결합으로 결합된 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 핵산 분자;
- [0024] (b) 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드;
- [0025] (c) 펩타이드 수용체에 결합된 리간드 수용체를 포함하며, 여기서, 고 친화성 리간드가 리간드 수용체에 결합되고 펩타이드 수용체가 폴리펩타이드의 C-말단에 공유결합으로 결합된 X-디스플레이 복합체(예를 들면, 핵산 폴리펩타이드 복합체)를 제공한다.
- [0026] 일부 양태에서, 당해 X-디스플레이 복합체내 리간드 수용체는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된다. 일부 양태에서, 당해 X-디스플레이 복합체는 추가로 제2 고 친화성 리간드를 포함하며, 여기서, 제2 고 친화성 리간드는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합되고, 여기서, 제2 고 친화성 리간드는 리간드 수용체에 결합된다.
- [0027] 다른 측면에서, 본 발명은
- [0028] (a) 제1 고 친화성 리간드에 공유결합으로 결합된, 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 핵산 분자;
- [0029] (b) 제2 고 친화성 리간드에 공유결합으로 결합된 제1 리간드 수용체; 및
- [0030] (c) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드(여기서, 폴리펩타이드는 제2 리간드 수용체를 포함한다)를 포함하고, 여기서, 제1 고 친화성 리간드는 제1 리간드 수용체에 결합되며, 제2 고 친화성 리간드는 제2 리간드 수용체에 결합된 X-디스플레이 복합체를 제공한다.
- [0031] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체에 결합된 제1 또는 제2 고 친화성 리간드는 바이오틴이다.
- [0032] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체에 결합된 제1 또는 제2 고 친화성 리간드는 FK506, 메토티렉세이트, PPI-2458, 바이오틴, 히루딘, ZFVp(O)F, 글루오레세인-바이오틴, ABD(알부민 결합 도메인), 18bp DNA, RNAse A, 클로로알칸, 아릴(베타-아미노 에틸)케톤, 및 단백질 A를 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0033] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체내 제1 또는 제2 리간드 수용체는 FKBP12, 디하이드로폴레이트 리덕타제, 메티오닌 아미노펩티다제, 이합체성 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 사합체, 트롬빈, 카복시펩티다제, 1가 Ab, HSA(알부민), Zn 핑거(finger), hRI(RNase 억제제), 돌연변이된 할로알칸 데할로케나제, 할로태그, 및 소르타제를 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0034] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체내 제1 또는 제2 리간드 수용체는 스트렙타비딘이다.

- [0035] 일부 양태에서, 위에서 기술된 폴리펩타이드는 항체, VH 도메인, VL 도메인, Fab 단편, 일본쇄 항체, 나노바디(nanobody), 유니바디(unibody), 아드넥틴, 아피바디(affibody), DARPin, 안티칼린, 아비머, ¹⁰Fn3 도메인, 및 베르사바디를 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0036] 다른 측면에서, 본 발명은
- [0037] (a) 리간드에 공유결합으로 부착된, 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 핵산 분자; 및
- [0038] (b) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드(여기서, 폴리펩타이드는 리간드 수용체를 포함한다)를 포함하고, 여기서, 리간드는 리간드 수용체에 결합된 X-디스플레이 복합체를 제공한다.
- [0039] 일부 양태에서, X-디스플레이 복합체에 결합된 리간드는 FK506이고 핵산-폴리펩타이드 복합체내 리간드 수용체는 FKBP의 FK506-결합 도메인이다.
- [0040] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체에 결합된 제1 핵산 분자는 ssRNA, ssDNA, ssDNA/RNA 하이브리드 dsDNA, 및 dsDNA/RNA 하이브리드로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0041] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체에 결합된 제1 핵산 분자의 폴리펩타이드-암호화 서열은 골격내(in-frame) 정지 코돈을 함유하지 않는다.
- [0042] 일부 양태에서, 위에서 기술된 폴리펩타이드는 결합 단백질이다. 하나의 바람직한 양태에서, 결합 단백질은 항체의 VH 또는 VL 도메인이다.
- [0043] 일부 양태에서, 위에서 기술된 핵산-폴리펩타이드 복합체는 리보솜을 함유하지 않는다.
- [0044] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 위에서 기술된 X-디스플레이 복합체 다수를 포함하는 라이브러리를 제공하며, 여기서, 복합체의 적어도 일부는 상이한 폴리펩타이드-암호화 서열을 함유한다.
- [0045] 다른 측면에서, 본 발명은
- [0046] - 제1 핵산 링커에 대해 상보성인 서열 성분을 포함하는 mRNA 서열의 라이브러리를 제공하는 단계
- [0047] - 제1 고 친화성 리간드에 공유결합으로 연결된 제1 핵산 링커를 제공함으로써 제1 핵산 링커가 상보성 핵산 염기 짝짓기를 통해 mRNA에 결합하도록 하는 단계
- [0048] - 펩타이드 수용체에 작동적으로 연결된 제2 고 친화성 리간드를 제공하는 단계
- [0049] - 적어도 2개의 결합 부위를 가진 리간드 수용체를 제공함으로써 리간드 수용체가 제1 고 친화성 리간드 및 제2 고 친화성 리간드에 결합하도록 하는 단계
- [0050] - mRNA의 해독이 일어나도록 함으로써 펩타이드 수용체가 해독된 단백질에 결합하여 mRNA를 단백질에 연결시키는 핵산-폴리펩타이드 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 핵산-폴리펩타이드 복합체의 라이브러리 방법을 제공한다.
- [0051] 일부 양태에서, 당해 방법은 추가로 X-디스플레이 복합체내 제1 핵산 링커를 프라이머로서 사용하여 mRNA가 역전사되도록 함으로써 DNA/RNA 하이브리드를 형성시킴을 포함한다.
- [0052] 하나의 바람직한 양태에서, 당해 방법은 또한
- [0053] - mRNA를 분해하고 상보성 DNA 쇄를 합성함으로써 핵산-폴리펩타이드 복합체내에 DNA/DNA 하이브리드를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0054] 일부 양태에서, 라이브러리내 mRNA는 TMV 인헨서를 추가로 포함한다.
- [0055] 일부 양태에서, 라이브러리내 mRNA는 C_μ 서열을 추가로 포함한다.
- [0056] 일부 양태에서, 라이브러리내 mRNA는 FLAG 태그를 추가로 포함한다.
- [0057] 일부 양태에서, 라이브러리내 mRNA는 SA 디스플레이 서열을 추가로 포함한다.
- [0058] 일부 양태에서, 라이브러리내 mRNA는 A20 테일을 추가로 포함한다.
- [0059] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 본 발명에 기술된 방법에 의해 생산된 핵산-폴리펩타이드 복합체의 라이브러리를 제공한다.

- [0060] 다른 측면에서, 본 발명은 또한
- [0061] (a) 본 발명에 기술된 X-디스플레이 복합체의 라이브러리를 제공하는 단계;
- [0062] (b) 라이브러리를 목적인 항원과 접촉시키는 단계;
- [0063] (c) 라이브러리로부터 목적인 항원에 결합하는 적어도 하나의 X-디스플레이를 선택하는 단계; 및
- [0064] (d) 선택된 X-디스플레이 복합체의 서열을 암호화하는 폴리펩타이드를 분리하는 단계를 포함하여, 목적인 항원에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 선택하는 방법을 제공한다.
- [0065] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 본 발명에 기술된 방법에 의해 확인된 서열을 암호화하는 폴리펩타이드를 발현 환경내로 도입함으로써 암호화된 폴리펩타이드를 생산함을 포함하여, 목적인 항원에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0066] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 본 발명에 기술된 방법에 의해 선택된, 목적인 항원에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다.
- [0067] 다른 측면에서, 본 발명은 또한
- [0068] (a) 폴리펩타이드-암호화 서열을 포함하는 제1 핵산 분자;
- [0069] (b) 제1 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드;
- [0070] (c) 제1 핵산 분자의 일부에 대해 상보성인 핵산 서열을 포함하는 제2 핵산 분자;
- [0071] (d) 제2 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 제1 고 친화성 리간드;
- [0072] (e) 제1 리간드 수용체; 및
- [0073] (f) 하나 이상의 연결 분자를 통해 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된 제2 고 친화성 리간드를 포함하며, 여기서, 제1 핵산 분자가 제2 핵산 분자에 상보성 핵산 염기 짝짓기를 통해 결합되고, 여기서, 제1 고친화성 리간드가 제1 결합 부위에서 리간드 수용체에 비공유결합으로 결합되며, 여기서, 제2 리간드가 제2 결합 부위에서 리간드 수용체에 비공유결합으로 결합되고, 여기서, 하나 이상의 연결 분자가 폴리에틸렌 글리콜 분자인 X-디스플레이 복합체를 제공한다.
- [0074] 일부 양태에서, 당해 복합체내 제1 고 친화성 리간드는 바이오틴이고, 리간드 수용체는 스트렙타비딘, 이합체성 스트렙타비딘, 및 사합체성 스트렙타비딘을 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0075] 일부 양태에서, 당해 복합체내 제2 고 친화성 리간드는 바이오틴이고, 리간드 수용체는 스트렙타비딘, 이합체성 스트렙타비딘, 및 사합체성 스트렙타비딘을 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0076] 일부 양태에서, 당해 복합체내 제1 또는 제2 고 친화성 리간드는 FK506, 메토티렉세이트, PPI-2458, 바이오틴, 히루딘, ZFVp(O)F, 플루오레세인-바이오틴, ABD(알부민 결합 도메인), 18bp DNA, RNase A, 클로로알칸, 아릴(베타-아미노 에틸)케톤 및 단백질 A를 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0077] 일부 양태에서, 당해 복합체는 제2 리간드 수용체를 추가로 포함한다.
- [0078] 일부 양태에서, 위에서 기술된 복합체내 제2 리간드 수용체는 FKBP12, 디하이드로폴레이트 리덕타제, 메티오닌 아미노펩티다제, 이합체성 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 사합체, 트롬빈, 카복시펩티다제, 1가 Ab, HSA(알부민), Zn 핑거, hRI(RNase 억제제), 돌연변이된 할로알칼 데할로게나제, 할로태그, 및 소르타제를 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0079] 일부 양태에서, 당해 복합체내 펩타이드 수용체는 푸로마이신이다.
- [0080] 일부 양태에서, 당해 복합체내 제1 또는 제2 핵산 분자는 소랄렌을 추가로 포함한다.
- [0081] 일부 양태에서, 폴리펩타이드는 항체, VH 도메인, VL 도메인, Fab 단편, 일본쇄 항체, 나노바디, 유니바디, 아드넥틴, 아피바디, DARPin, 안티칼린, 아비머, ¹⁰Fn3 도메인, 및 베르사바디를 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0082] 다른 측면에서, 본 발명은
- [0083] (a) 핵산 분자에 공유결합으로 결합된 제1 고 친화성 리간드;

- [0084] (b) 펩타이드 수용체에 공유결합으로 결합된 제2 고 친화성 리간드; 및
- [0085] (c) 2개 이상의 리간드 결합 부위를 포함하는 리간드 수용체를 포함하며; 여기서, 제1 및 제2 리간드가 인접한 리간드 결합 부위에서 리간드 수용체에 결합된 이중양기능성 복합체를 제공한다.
- [0086] 일부 양태에서, 당해 복합체내 제1 및 제2 고 친화성 리간드는 동일하다.
- [0087] 일부 양태에서, 당해 복합체내 제1 및 제2 고 친화성 리간드는 바이오틴이다.
- [0088] 일부 양태에서, 당해 복합체내 핵산 분자는 소랄렌 잔기를 포함한다.
- [0089] 일부 양태에서, 당해 복합체내 펩타이드 수용체는 푸로마이신이다.
- [0090] 일부 양태에서, 당해 복합체내 리간드 수용체는 다합체성 단백질이다.
- [0091] 일부 양태에서, 당해 복합체내 리간드 수용체는 스트렙타비딘이다.

과제의 해결 수단

- [0092] 본 발명은 단백질 및 핵산의 바람직한 특성을 선택하여 발전시키기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 당해 방법은 본원에서 "X-디스플레이"로서 언급되거나 스트렙타비딘이 사용되는 일부 양태에서 "SA 디스플레이"로 언급될 수 있다. 각종 양태에서, 본 발명은 핵산 또는 변형된 핵산에 연결된 소 분자를 포함한다. 다른 양태는 변형된 아미노산을 가진 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 방법, 바람직한 특성을 가진 집단의 개개의 구성원을 선택할 수 있는 검정, 및 특성이 개선된 폴리펩타이드의 새로운 변이를 생성하는 방법을 포함한다.
- [0093] "선택"은 집단내 다른 분자들로부터 분자를 실질적으로 분할함을 의미한다. 본원에 사용된 것으로서, "선택" 단계는 선택 단계 후 집단내 바람직하지 않은 분자에 비해 바람직한 분자를 적어도 2-배, 일부 양태에서, 3-배, 5-배, 10-배, 20-배, 바람직하게는 30-배, 보다 바람직하게는 100-배 및 가장 바람직하게는 1000-배로 풍부하게 제공한다. 선택 단계는 특정 수의 횟수만큼 반복할 수 있으며, 상이한 유형의 선택 단계를 제공된 시도내에서 조합시킬 수 있다.
- [0094] "단백질"은 하나 이상의 펩타이드 결합에 의해 결합된 특정의 2개 이상의 천연적으로 존재하거나 변형된 아미노산을 의미한다. "단백질" 및 "펩타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0095] "RNA"는 2개 이상의 공유결합으로 결합된, 천연적으로 존재하거나 변형된 리보뉴클레오타이드의 서열을 의미한다. 당해 용어내에 포함된 변형된 RNA의 하나의 예는 포스포로티오에이트 RNA이다.
- [0096] "DNA"는 2개 이상의 공유결합으로 결합된, 천연적으로 존재하거나 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드의 서열을 의미한다.
- [0097] "핵산"은 특정의 2개 이상의 공유결합으로 결합된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 의미한다. 본원에 사용된 것으로서, 당해 용어는 제한없이, DNA, RNA 및 PNA를 포함한다. 용어 "핵산"은 변형된 핵산을 포함할 수 있으며, 따라서, 핵산 및 변형된 핵산은 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0098] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "뉴클레오타이드 유사체" 또는 "뉴클레오타이드 유도체" 또는 "변형된 핵산"은 5-프로피닐 피리미딘(즉, 5-프로피닐-dTTP 및 5-프로피닐-dTCP), 7-테아자 푸린(즉, 7-테아자-dATP 및 7-테아자-dGTP)를 말한다. 뉴클레오타이드 유사체는 염기 유사체를 포함하며 데옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드의 변형된 형태를 포함한다.
- [0099] "펩타이드 수용체"는 리보소움 펩티딜 트랜스퍼라제 기능의 촉매 활성화에 의해 자라는 단백질 쇄의 C-말단에 가해질 수 있는 특정 분자를 의미한다. 통상적으로 이러한 분자는 (i) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드-유사 잔기[예를 들면, 아데노신 또는 아데노신 유사체(N-6 아미노 위치에서 디-메틸화가 허용될 수 있다)], (ii) 아미노산 또는 아미노산-유사 잔기[예를 들면, 특정의 20D- 또는 L-아미노산 또는 이의 특정의 아미노산 유사체(예를 들면, O-메틸 타이로신 또는 Ellman et al., Meth. Enzymol. 202:301, 1991에 기술된 특정 유사체), 및 (iii) 2개(예를 들면, 3' 위치에서 또는 적어도 바람직하게는 2' 위치에서 에스테르, 아마이드 또는 케톤 연결)사이의 연결을 함유하며; 바람직하게는, 당해 연결은 천연의 리보뉴클레오타이드 구조로부터 환의 주름을 현저히 교란하지 않는다. 펩타이드 수용체는 또한 친핵체를 소유할 수 있으며, 당해 친핵체는 아미노 그룹, 하이드록실 그룹 또는 설프하이드릴 그룹일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 펩타이드 수용체는 뉴클레오타이드

드 모사체, 아미노산 모사체 또는 결합된 뉴클레오타이드-아미노산 구조의 모사체로 구성될 수 있다.

[0100] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "X-디스플레이 복합체", "핵산-폴리펩타이드 복합체" 및 "핵산-단백질 융합체"는 상호교환가능하며, 직접 또는 간접적으로 핵산 및 핵산에 의해 암호화된 단백질(또는 펩타이드 또는 이의 단편)의 상호작용으로부터 형성된 복합체를 언급함을 의미한다. 일부 예에서, X-디스플레이 복합체는 "디스플레이 복합체" 또는 "디스플레이 융합체"로 언급될 수 있으며 당해 분야의 숙련가들은, 이것이 본원에서 언급될 수 있는 다른 유형의 디스플레이 시스템과 혼동되지 않을 수 있는 사용 측면에서 이해될 것이다. 일부 양태에서, 핵산은 RNA, 예를 들면, mRNA이다. 다른 바람직한 양태에서, 핵산은 DNA 또는 cDNA이다. 따라서, 목표가 DNA를 함유하는 복합체를 디스플레이하는 것인 일부 양태에서, X-디스플레이 복합체는 "DNA-단백질 융합체" 또는 "DNA-디스플레이 융합체"로 불릴 수 있다. 용어 "융합체"의 사용은, 핵산이 펩타이드 또는 단백질에 공유결합으로 부착되어 있음을 암시하거나 제한하지 않음을 주목하는 것이 중요하다. 일부 양태에서, RNA 또는 DNA는 변형되거나 변경될 수 있다. 바람직한 양태에서, 핵산과 단백질사이의 상호작용은 비공유결합성(예를 들면, 상호작용은 본원에 기술된 바와 같은 바이오틴/스트렙타비딘 상호작용, 링커 분자 등에 의해 중재될 수 있다)이다. 바람직한 양태에서, 핵산은 mRNA 또는 변형된 mRNA이다.

[0101] "변경된 기능"은 분자의 기능에 있어서 정성적이거나 정량적인 변화를 의미한다.

[0102] 본원에 사용된 것으로서, "결합 파트너"는 목적한 DNA-단백질 융합체의 일부에 대해 특이적인, 공유결합 또는 비-공유결합 친화성을 갖는 특정 분자를 의미한다. 결합 파트너의 예는 항원/항체 쌍, 단백질/억제제 쌍, 수용체/리간드 쌍(예를 들면, 호르몬 수용체/펩타이드 호르몬 쌍과 같은 세포 표면 수용체/리간드 쌍), 효소/기질 쌍(예를 들면, 키나제/기질 쌍), 렉틴/탄수화물 쌍, 올리고머 또는 헤테로올리고머성 단백질 응집체, DNA 결합 단백질/DNA 결합 부위 쌍, RNA/단백질 쌍, 및 핵산 중복체, 헤테로중복체 또는 연결된 쇠, 및 X-디스플레이 복합체의 특징의 일부와 하나 이상의 공유결합성 또는 비-공유결합성 결합(예를 들면, 디설파이드 결합)을 형성할 수 있는 특정 분자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0103] "고체 지지체"는, 친화성 복합체가 직접 또는 간접적으로(예를 들면, 다른 항체 또는 단백질 A와 같은 다른 결합 파트너 중간체를 통해) 결합될 수 있거나, 친화성 복합체가 봉매될 수 있는(예를 들면, 수용체 또는 채널을 통해), 특정 컬럼(또는 컬럼 물질), 비드, 시험 튜브, 미세액가 디쉬, 고체 입자(예를 들면, 아가로즈 또는 세파로즈), 미세칩(예를 들면, 규소, 규소-유리 또는 금 칩) 또는 막(예를 들면, 리포솜 또는 비히클의 막)을 의미하나, 이에 한정되지 않는다.

[0104] X-디스플레이 복합체를 중재하기 위한 핵산 또는 변형된 핵산 링커

[0105] 본 발명의 하나의 측면에서 핵산(예를 들면, 천연의 mRNA 또는 변형된 mRNA)는 핵산의 3' 말단에서 하이브리드화되는 핵산 또는 변형된 핵산 링커("NA 링커")의 사용에 의해 해당 말단에서 자체의 암호화된 단백질에 부착될 수 있다. 이러한 양태에서, NA 링커는 링커내에서 역전된 극성을 지니므로써 효과적으로 2개의 3' 말단을 가지며, 이중 비-하이브리드화된 말단은 폴리펩타이드 단백질에 고 친화성으로 공유결합 또는 비공유결합으로 결합할 수 있는 푸로마이신 또는 관련 유사체 또는 소 분자에 부착되어 있다. 따라서, 일부 양태에서, X-디스플레이 복합체는 단백질 및 핵산과 NA 링커의 상호작용에 의해 형성된다.

[0106] 일부 양태에서, NA 링커는 소랄렌 링커이다. 일부 바람직한 양태에서, 링커는 XB-PBI이다. 일부 양태에서, XB-DDB가 사용될 수 있다. 일부 바람직한 양태에서, 링커(예를 들면, PBI 링커 또는 DDB 링커)는 고 친화성 리간드(예를 들면, 바이오틴)에 부착되는데, 즉, 링커는 고 친화성 리간드를 포함한다.

[0107] 일부 양태에서, 핵산(예를 들면, 천연의 mRNA 또는 변형된 mRNA)은 펩타이드 수용체 또는 고 친화성 리간드에 추가로 부착된 NA 링커에 가교 결합될 수 있다. 이러한 가교-결합은 당해 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해서도 달성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 이의 전문이 참조로 인용된 미국 특허 제6416950호는 이러한 가교결합을 제조하는 방법을 기술하고 있다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제6416950호의 도 9 내지 13).

[0108] 추가의 양태에서, 본 발명은 링커내에 역전된 5'-3' 극성을 가진 이중 기능 NA 링커를 포함함으로써, 핵산, 예를 들면, mRNA 또는 변형된 mRNA 주형에 하이브리드화할 수 있으며, 여기서, 하이브리드화는 암호화 영역의 mRNA 외부의 한쪽 3' 말단에서 일어나고, 여기서, 핵산/변형된 링커는 폴리펩타이드 단백질에 대해 공유결합으로 또는 고 친화성으로 결합할 수 있는 소 분자, 또는 푸로마이신 또는 이의 기능성 유사체(예를 들면, 이에 한정되지 않는, 피라졸로피리미딘)과 같은 펩타이드 수용체를 이의 다른 3' 말단상에서 수반한다.

- [0109] 몇몇 양태에서, 핵산, 바람직하게는, mRNA 또는 변형된 mRNA는 3' 말단에서 NA 링커에 대해 하이브리드화되며, NA 링커 자체는 펩타이드(또는 변형된 폴리펩타이드)에 공유결합성 결합 또는 고 친화성 비공유결합성 결합을 통해 공유결합으로 또는 고 친화성으로 결합되어 있다.
- [0110] 추가의 양태에서, NA 링커는 mRNA를 역전사하기 위한 프라이머로서 제공될 수 있다.
- [0111] 추가의 양태는 자체의 "5' 말단"(인용에서, 이는 3' 극성을 효과적으로 가짐으로써 중합화를 지시하기 때문이다)에서 역 극성 핵산 부위를 수반하는 NA 링커에 작동적으로 연결된 암호화 핵산을 포함함으로써, 이는 줄기 루프(stem loop) 구조를 통해 자체의 3' 말단상에 푸로마이신 또는 관련 유사체 또는 소 분자를 수반하는 NA 링커에 결합하는 자체의 능력 외에, 암호화 핵산 주형상에 중합화용 프라이머로서 제공될 수 있다.(참조: 도 2 및 3).
- [0112] 일부 양태에서, 암호화 핵산은 측쇄 NA 링커에 작동적으로 연결되며, 여기서, NA 링커 중 일부는 암호화 핵산의 3' 말단에 대해 상보성이다(참조: 도 5). 측쇄 NA 링커를 생성하는 어떠한 분야의 인지된 수단도 고려된다. 측쇄 점은 NA 링커내 어떠한 위치에서도 존재할 수 있다. 이러한 측쇄 NA 링커는 또한 이들이 결합되는 암호화 핵산, 예를 들면, mRNA의 역 전사용 프라이머로서 제공될 수 있다.
- [0113] 일부 양태에서, 암호화 핵산은 측쇄 NA 링커에 작동적으로 연결되며, 여기서, 링커는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 부착된다(참조: 도 6).
- [0114] 일부 양태에서, NA 링커는 잠겨진(locked) 핵산(LNA), 예를 들면, 리보뉴클레오사이드가 2'-산소 및 4'-탄소 원자사이에 메틸렌 단위와 연결된 비사이클릭 핵산을 포함한다. 특수 양태에서, 암호화 핵산에 대해 상보성인 NA 링커의 영역은 LNA를 포함함으로써, 적어도 부분적으로, 핵산 이분쇄 안정성을 증가시킨다[참조: Kaur et al. (2006). Biochemistry 45 (23): 7347-55].

[0115] 리간드/수용체 연결

- [0116] 다른 측면에서, X-디스플레이 복합체(예를 들면, 암호화 핵산 및 암호화된 폴리펩타이드)는 자체의 인지체 결합 파트너(리간드 수용체)에 대해 고 친화성 또는 고 친화성 리간드의 공유결합성 결합을 통해 형성된다. 이러한 양태에서, 핵산은 고 친화성 리간드에 공유결합 또는 비공유결합으로 연결되어, 최종적으로 리간드 수용체에 비공유결합 또는 공유결합으로 결합할 수 있다. 바람직한 양태에서, 상호작용은 비공유결합성이다. 일부 양태에서, 리간드 수용체는 또한 제2의 고 친화성 리간드와 연합되며, 이는 최종적으로 펩타이드 수용체에 연결된다.
- [0117] 고 친화성 리간드/리간드 수용체 쌍의 비-제한적 예는 FK506/FKBP12, 메토티렉세이트/디하이드로폴레이트 리덕타제, 및 PPI-2458/메티오닌 아미노펩티다제 2를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 리간드/리간드 수용체 쌍의 추가의 비-제한적인 예는 표 1에 나타난다. 일부 양태에서, 리간드/리간드 수용체 쌍은 바이오틴/스트렙타비딘이다. 단합체성 스트렙타비딘, 이합체성 스트렙타비딘, 사합체성 스트렙타비딘 및 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 이의 변이체를 포함하나, 이에 한정되지 않는 어떠한 형태의 스트렙타비딘도 본 발명의 방법에서 사용하기 위해 고려된다. 일부 양태에서, 리간드 수용체는 사합체성 스트렙타비딘이다. 특수 양태에서, 사합체성 스트렙타비딘은 화학적으로 가교-결합되어 안정성을 증가시킨다.

표 1

[0118] 고 친화성 리간드/리간드 수용체 쌍의 비-제한적인 예

| 고 친화성 리간드 | 리간드 크기 | 리간드 수용체 | 수용체 크기 | K _d 또는 K _i | 참조 |
|-----------------------|-----------|------------|--------|----------------------------------|-------------------------------|
| 바이오틴 | 소 분자 | 스트렙타비딘 사합체 | 53kDa | 1-20fM | |
| 히루딘 | 65aa 펩타이드 | 트로핀 | 36kDa | 20fM | |
| ZFV ^p (O)F | 트리펩타이드 | 카복시펩티다제 | | 10-27fM | Biochemistry 1991, 30:8165-70 |
| 플루오레세인-바이오틴 | | 1가 Ab | | 48fM | PNAS 2000, 97:10701-5 |

| | | | | | |
|----------------------|-----------|-------------------------|-------------|-------------|--|
| ABD(알부민 결합 도메인) | 46aa | HSA(알부민) | | 50-500fM | Prot. Eng. Des. Select. 2008, 21:515-27 |
| 18bp DNA | | Zn 핑거 | 6 Zn 핑거 도메인 | 2fM | PNAS 1998, 95:2812-17 |
| RNAse A | 13kDa | hRI(RNase 억제제) | 50kDa | 290 aM-1 fM | JMB 2007, 368:434-449 |
| 클로로알칸 | | 돌연변이된 할로알칸 데할로게나제, 할로태그 | 프로메가 | 비가역성 | ACS Chem.Bio 2008, 3:373-82 |
| 억제제 아틸(베타-아미노 에틸) 케톤 | 소 분자 | 소르타제 | | 비가역성 | JBC 2007, 282:23129 소르타제 유전자의 확인 미국 특허 제7101692호 |
| 단백질 A | 항체 Fc 도메인 | | | 1fM | |

- [0119] 일부 양태에서, 고 친화성 리간드는 핵산(리간드/핵산 분자)에 공유결합으로 연결된다. 핵산에 고 친화성 리간드를 연결하는 어떠한 분야의 인지된 방법도 고려된다. 하나의 양태에서, 고 친화성 리간드는 mRNA 분자의 3' 말단에 공유결합으로 연결된다
- [0120] 일부 양태에서, 고 친화성 리간드 수용체 분자는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 연결되며, 이는 최종적으로 리보솜의 펩티딜 트랜스퍼라제 활성에 의해 해독된 단백질에 공유결합으로 연결될 수 있다(참조: 도 8). 펩타이드 수용체에 대한 고 친화성 리간드 수용체의 연결은 직접적일 수 있거나 링커 분자를 통할 수 있다. 링커 분자를 인지하는 어떠한 분야도 본 발명의 방법에서 사용하기 위해 고려된다. 하나의 양태에서, 고 친화성 리간드 수용체는 폴리에틸렌 글리콜 링커 분자를 사용하여 펩타이드 수용체에 연결된다.
- [0121] 일부 양태에서, 고 친화성 리간드는 펩타이드 수용체에 공유결합으로 연결되며, 이는 최종적으로 리보솜의 펩티딜 트랜스퍼라제 활성에 의해 해독된 단백질에 공유결합으로 연결될 수 있다(참조: 도 9). 일부 바람직한 양태에서, 이러한 리간드/펩타이드 수용체 분자는 다량체성 리간드 수용체, 예를 들면, 사합체성 스트렙타비딘을 통해 리간드/핵산 분자에 비-공유결합으로 연결될 수 있다. 펩타이드 수용체에 대한 고 친화성 리간드의 공유결합성 연결은 직접적일 수 있거나 링커 분자를 통할 수 있다. 어떠한 분야의 인지된 링커도 본 발명의 방법에서 사용하기 위해 고려된다. 특수 양태에서, 고 친화성 리간드는 펩타이드 수용체에 폴리에틸렌 글리콜 링커 분자를 사용하여 연결된다.
- [0122] 일부 양태에서, 리간드 수용체 분자는 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 융합된다(참조: 도 4 및 10). 이러한 융합은 화학적 가교결합제를 사용하여 화학적으로 또는 유전적으로 수행될 수 있다. 리간드 수용체 분자는 어떠한 영역에서도 암호화된 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 특수 양태에서, 리간드 수용체 분자는 암호화된 폴리펩타이드의 N 말단 영역에 유전적으로 융합된다.
- [0123] 일부 양태에서, 제1 리간드 수용체 분자는 제2(비-인지체) 고 친화성 리간드에 공유결합으로 연결되어 있다. 이러한 양태에서, 제1 리간드 수용체 분자는 핵산에 공유결합으로 연결된 인지체 제1 고 친화성 리간드에 결합될 수 있다. 제2 고 친화성 리간드는 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 융합된 인지체 제2 리간드 수용체에 결합될 수 있다.
- [0124] 바람직한 양태에서, 리간드 수용체 분자, 바람직하게는 다가 리간드 수용체(예를 들면, 다가 스트렙타비딘)은 mRNA 분자에 대해 상보성인 핵산에 공유결합으로 연결된, 제1 고 친화성 리간드(예를 들면, 바이오틴)에 비공유결합으로 결합한다. 다가 리간드 수용체는 또한 펩타이드 수용체(예를 들면, 푸로마이신)에 공유결합으로 연결된, 제2 고 친화성 리간드(예를 들면, 바이오틴)에 공유결합으로 결합한다. 제2 고 친화성 리간드는 펩타이드 수용체에 직접적으로 또는 링커(하기 기술한 바와 같이, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜)를 통해 연결될 수 있다. 바람직한 양태에서, 제1 고 친화성 리간드에 부착된 핵산은 mRNA의 3' 말단에 대해 상보성이다. 핵산(예를 들어, NA 링커내 핵산)은 X-디스플레이 복합체의 핵산(예를 들면, mRNA)을 암호화하는 단백질에 안정하게 결합하기에 적어도 충분히 길 수 있다. 일부 양태에서, 제1 고 친화성 리간드에 부착된 핵산은, 길이가 15 내지 100개 뉴클레오타이드, 길이가 15 내지 80개 뉴클레오타이드, 길이가 15 내지 50개 뉴클레오타이드, 길이가

5 내지 40개 뉴클레오타이드, 길이가 15 내지 30개 뉴클레오타이드, 길이가 15 내지 20개 뉴클레오타이드, 길이가 10 내지 20개 뉴클레오타이드, 또는 길이가 15 내지 18개 뉴클레오타이드이다. 일부 양태에서, 제1 고 친화성 리간드에 부착된 핵산은, 길이가 15개 뉴클레오타이드, 길이가 18개 뉴클레오타이드, 길이가 20개 뉴클레오타이드, 길이가 30개 뉴클레오타이드, 길이가 50개 뉴클레오타이드, 길이가 70개 뉴클레오타이드, 길이가 80개 뉴클레오타이드 또는 길이가 87개 뉴클레오타이드이다.

[0125] 본 발명의 몇몇 양태는 mRNA 또는 변형된 mRNA, 푸로마이신 또는 유사체 또는 소 분자에 작동적으로 연결된 NA, 및 함께 mRNA에 의해 암호화되어 연결된 mRNA-폴리펩타이드 복합체를 형성하는 폴리펩타이드를 안정하게 연결하는 방법을 포함한다.

[0126] 바람직한 양태에서, NA 링커는 mRNA-폴리펩타이드 복합체 상에서 핵산의 제2 쇄를 중합시켜 폴리펩타이드에 연결된 핵산 이본쇄를 형성하기 위한 프라이머로서 사용된다. 바람직한 양태에서, 중합화는 DNA(또는 변형된 DNA) 하이브리드를 형성하기 위한 역 전사이다.

[0127] 본 발명의 몇가지 양태는 바람직한 결합 특성을 가진 리간드를 제공하고, 복합체를 리간드와 접촉시키며, 결합하지 않은 복합체를 제거하고, 리간드에 결합된 복합체를 회수하는 다수의 명백한 X-디스플레이 복합체를 포함하는 방법을 포함한다.

[0128] 본 발명의 몇가지 방법은 핵산 분자 및/또는 단백질의 발진을 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명은 회수된 복합체의 핵산 성분을 증폭시켜 핵산의 서열에 변이를 도입시킴을 포함한다. 다른 양태에서, 당해 방법은 또한 증폭되고 변화된 핵산으로부터 폴리펩타이드를 해독하고, 이들을 함께 핵산/변형된 링커를 사용하여 연결시키고, 이들을 리간드와 접촉시켜 결합된 복합체의 다른 새로운 집단을 선택함을 포함한다. 본 발명의 몇가지 양태는, 선택된 mRNA를 변이를 지니도록 재생산하고, 해독하며 다시 선택용 인지체 단백질에 연결시키는 시험관내 발진의 과정, 특히 반복된 과정에서 선택된 단백질-mRNA 복합체를 사용한다.

[0129] 링커 잔기

[0130] 일부 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 링커 잔기(위에서 기술한 NA 링커와는 별개로)를 사용한다. 일부 양태에서, 링커 잔기를 사용하여 핵산을 펩타이드 수용체에 연결할 수 있다. 다른 양태에서, 링커 잔기를 사용하여 고 친화성 리간드(예를 들면, 바이오틴) 또는 리간드 수용체(예를 들면, 스트렙타비딘)를 펩타이드 수용체에 연결할 수 있다. 다른 양태에서, 링커 잔기를 사용하여 핵산을 고 친화성 리간드에 연결할 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "링커 잔기"는 하나 이상의 잔기 또는 소단위를 포함할 수 있다.

[0131] 일부 바람직한 양태에서, 링커 잔기는 폴리에테르 골격을 갖는 화합물의 종인 폴리(알킬렌 옥사이드) 잔기이다. 본 발명에서 사용하는 폴리(알킬렌 옥사이드) 종은 예를 들면, 직쇄- 및 측쇄- 종을 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리(에틸렌 글리콜)은 말단에 추가의 반응성, 활성화가능하거나 불활성인 잔기를 포함하거나 포함하지 않을 수 있는, 반복된 에틸렌 옥사이드 소단위로 이루어진 폴리(알킬렌 옥사이드)이다. 이중양기능성인 직쇄 폴리(알킬렌 옥사이드) 종의 유도체는 또한 당해 분야에 공지되어 있다. 일부 양태에서, 링커 잔기는 5 내지 50개 소단위의 폴리(알킬렌 옥사이드), 10 내지 30개 소단위의 폴리(알킬렌 옥사이드), 10 내지 20개 단위의 폴리(알킬렌 옥사이드), 15 내지 20개 단위의 폴리(알킬렌 옥사이드), 또는 일부 양태에서, 18개 소단위의 폴리(알킬렌 옥사이드)로 구성될 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 특정 수의 링커 잔기가 여전히 X-디스플레이 복합체를 형성할 수 있는 한 사용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0132] 폴리(에틸렌 글리콜)링커는 폴리(에틸렌 글리콜)("PEG") 및 메톡시-PEG("mPEG") 유도체를 포함하는, PEG 골격 또는 mPEG 골격을 가진 잔기이다. 광범위한 PEG 및 mPEG 유도체가 당해 분야에 공지되어 있으며 상업적으로 시판된다. 예를 들어, 넥타르 인코포레이션(Nektar, Inc., 미국 알라바마 헌트스빌 소재)은 친핵성 반응 그룹, 카복실 반응 그룹, 친핵적으로 활성화된 그룹(예를 들면, 활성 에스테르, 니트로페닐 카보네이트, 이소시아네이트, 등), 설프하이드릴 선택성 그룹(예를 들면, 말레이미드), 및 헤테로작용성(PEG 또는 mPEG의 양쪽 말단에 2개의 반응성 그룹을 갖는), 바이오틴 그룹, 비닐 반응성 그룹, 실란 그룹, 인지질 그룹 등을 임의로 갖는 개질 그룹 또는 링커로서 유용한 PEG 및 mPEG 화합물을 제공한다.

[0133] 다른 양태에서, 링커 잔기는 당해 분야에 인지된 핵산 또는 다른 어떠한 링커일 수 있다. 예를 들면, 폴리시알산(PSA) 및 PSA 유도체가 사용될 수 있다(참조: 미국 특허 제5,846,951호, 미국 특허 공보 제US20080262209호 및 PCT 특허원 W02005/016973호 및 WO-A-01879221호, 이들 모두는, 전문이 본원에 참조로 인용되어 있다).

- [0134] 비록 바람직한 펩타이드 수용체가 푸로마이신이라고 해도, 푸로마이신과 유사한 방식으로 작용하는 다른 화합물도 사용될 수 있다. 단백질 수용체용으로 다른 가능한 선택은 피라졸로피리미딘 또는 어떠한 관련된 유도체 및 tRNA-유사 구조, 및 당해 분야에 공지된 다른 화합물을 포함한다. 이러한 화합물은 아미노산 뉴클레오타이드, 페닐알라닌-아데노신(A-Phe), 타이로실 아데노신(A-Tyr), 및 알라닐 아데노신(A-Ala)과 같은 아데닌 또는 아데닌-유사 화합물에 연결된 아미노산, 및 페닐알라닌 3' 데옥시 3' 아미노 아데노신, 알라닐 3' 데옥시 3' 아미노 아데노신 및 타이로실 3' 데옥시 3' 아미노 아데노신과 같은 아미드-연결된 구조를 지닌 어떠한 화합물도 포함하나, 이에 한정되지 않으며; 이들 화합물 중 어느 것에서도, 어떠한 천연적으로-존재하는 L-아미노산 또는 이들의 유사체가 사용될 수 있다. 또한, 결합된 tRNA-유사 3' 구조-푸로마이신 접합체를 또한 본 발명에서 사용할 수 있다.
- [0135] 해독 시스템
- [0136] 본 발명의 몇가지 양태는, mRNA가 방출 인자들을 결여한 시험관내 해독 시스템내에서 해독되는 바람직한 방법을 이용한다. 이에 의해, 리보솜은 정지 코돈에서 지체되어, 푸로마이신 또는 유사체 또는 소 분자가 폴리펩타이드 단백질에 공유결합으로 또는 고 친화성으로 결합하도록 하는 시간을 허용한다.
- [0137] 본 발명의 일부 양태에서, mRNA는, 적어도 하나의 방출 인자의 기능이 방출 인자 억제제에 의해 억제되는 시험관내 해독 시스템에서 해독된다. 적합한 억제제는 항-방출 인자 항체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0138] 당해 방법은 바람직하게는 시험관내 해독 시스템을 사용하여 수행되므로, 변형된 아미노산이 해독 기관내로 도입되어 화학적 변형을 지닌 폴리펩타이드를 창조할 수 있다는 것이 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0139] 망상적혈구 용해질 시스템, 맥아 추출 시스템 또는 기타 적합한 시험관내 전사 시스템과 같은 각종의 시험관내 해독 시스템을 사용할 수 있다. 하나의 바람직한 양태에서 PURESystem(cosmobio.co.jp/export_e/products/proteins/products_PGM_20060907_06.asp)이 사용된다. 세포-유리된 연속-유동(CFCF) 해독 시스템[참조: Spirin et al. (1988) Science 242: 1162]을 사용하여 라이브러리 구성원의 총 수율, 또는 경우에 따라, 사용 편의성을 증가시킬 수 있다. 정적인 시험관내 단백질 합성 시스템을 사용할 수 있다. 당해 시스템에서, 단백질 합성은 일반적으로 1시간 후에 중지하므로 라이브러리의 창조를 위한 시간 간격을 제한한다. CFCF 기술의 장점은, 단백질의 높은 수준 및 장기간 합성이 보다 크고 보다 다양한 단백질-RNA 복합체의 라이브러리를 생성할 수 있다는 것이다. CFCF 기술은 연장된 기간, 24시간 또는 그 이상에 걸쳐 단백질의 고-수준 합성을 위한 방법으로서 스피린(Spirin) 및 공동-연구자에 의해 기술되었다. 또한, CFCF 기술은 해독된 장치로부터 새로이-합성된 단백질의 분획화를 초래함으로써 이것이 단백질-핵산 복합체를 신속하게 분해하도록 한다. CFCF 기술의 다른 적용은 펩타이드를 합성하기 위한 효율적인 방법을 포함한다. 예를 들어, 고-친화성으로 표적에 결합하는 펩타이드-용합체의 확인 후, 유리 펩타이드를 CFCF 기술을 사용하여 직접 합성하고 결합 검정에 사용할 수 있다.
- [0140] 폴리뉴클레오타이드를 폴리펩타이드(즉, 표현형)에 연결시키기 위한 다른 세포-유리된 기술, 예를 들면, Profusion™(참조: 예를 들면, 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제6,348,315호; 제6,261,804호; 제6,258,558호; 및 제6,214,553호)을 또한 사용할 수 있다.
- [0141] 프로모터 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열, 인헨서 서열, 마커 유전자 및 적절하게는 다른 서열을 포함하는 적절한 조절 서열을 함유하는 적합한 벡터를 선택하거나 작제할 수 있다. 벡터는 경우에 따라, 특수 발현 또는 시험관내 해독 시스템용의 플라스미드, 바이러스, 예를 들면, 파아지, 또는 파아지미드일 수 있다. 추가의 세부사항은 예를 들면, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press를 참조한다. 예를 들면, 핵산 작제물의 제조, 돌연변이유발, 서열분석, DNA의 세포내로의 도입 및 유전자 발현, 및 단백질의 분석시 핵산의 조작을 위한 많은 공지된 기술 및 프로토콜이 문헌[참조: Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992]에 상세히 기술되어 있다. 삼브룩(Sambrook) 등 및 아우스벨(Ausubel) 등의 기술내용은 본원에 참조로 인용된다.
- [0142] 일부 양태에서, 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터는, 예를 들면, 발현될 DNA가 PCR 증폭된 DNA쇄 내에서만 존재하는 경우, 사용되지 않는다.
- [0143] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은, 모두 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제7,078,197호, 제

6,429,300호, 제5,922,545호, 제7,195,880호, 제6,416,950호, 제6,602,685호, 제6,623,926호, 제6,951,725호, 또는 미국 특허원 제11/543,316호, 제10/208,357호에 기술된 방법 및/또는 조성물을 사용할 수 있다.

[0144] 하나의 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 결합시키기에 충분한 3' 해독되지 않은 RNA의 영역 및 완전한 정지 코돈을 함유하는 mRNA는 방출 인자를 결합하는 시험관내 해독 시스템(예를 들면, PURESystem, cosmobio.co.jp/export_e/products/proteins/products_PGM_20060907_06.asp)에서 해독된다. 방출 인자는 펩티딜-tRNA에서 에스테르 결합의 가수분해 및 리보솜으로부터 새로이 합성된 단백질의 방출을 개시한다. 방출 인자의 부재하에서, 리보솜은 여전히 mRNA 상에서 지체될 것이다. 다음 DNA 올리고뉴클레오타이드를 혼합물에 가한다. 당해 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 3' 말단에 상보성이며 펩타이드 수용체 종을 리보솜내로 전달하여 결합된 해독된 단백질과의 공유 부가물을 형성할 수 있는 링커와 함께 기능화된다. 일부 양태에서, 이는 가해진 NA 링커이다. 링커의 부착 부위는 3' 말단을 제외한 올리고뉴클레오타이드를 따라 어느 곳에도 존재할 수 있다. 링커는 리보솜내로 이르기엔 충분한 길이가 되어야 할 필요가 있다. 부가물을 형성하는 종은 바람직하게는 푸로마이신 또는 피라졸로피리미딘 또는 어떠한 관련된 유도체이다.

[0145] 링커의 신생(nascent) 단백질에 대한 공유결합성 첨가 후, EDTA를 가하여 리보솜을 방출시키고, mRNA-올리고뉴클레오타이드-단백질 종을 후속적으로 분리하여, 역 전사에 적용시켜 DNA-단백질 융합체를 창조한다. 최종적으로 DNA의 제2 쇠를 특정 DNA 폴리머라제를 사용하여 가한다. 이러한 양태에서, 비록 mRNA-올리고뉴클레오타이드(예를 들면, NA 링커) 종이 공유결합으로 부착될 수 있다고 해도, NA 링커는 X-디스플레이 복합체내 어떠한 중재자 종에 공유결합으로 부착될 필요가 없다(예를 들어, 바이오틴/스트렙타비딘이 mRNA를 단백질에 브릿지하는데 사용되는 경우).

[0146] 수득되는 DNA-단백질 융합체는 생체내 또는 시험관내 스크리닝 또는 진단 적용에 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0147] 용도

[0148] 본 발명의 방법 및 조성물은, 단백질 기술이 사용되어 치료학적, 진단학적 또는 산업적 문제를 해결하는 어떠한 영역에서도 상업적 적용을 갖는다. 당해 X-디스플레이 기술은 존재하는 단백질을 개선시키거나 변경시키고 바람직한 기능을 가진 신규 단백질을 분리하는데 유용하다. 이들 단백질은 천연적으로 존재하는 서열일 수 있거나, 천연적으로 존재하는 서열의 변경된 형태일 수 있거나, 부분적으로 또는 완전한 합성 서열일 수 있다.

[0149] 본 발명의 방법을 사용하여 면역결합체, 예를 들면, 항체, 이의 결합 단편 또는 유사체, 일본쇄 항체, 촉매 항체, VL 및/또는 VH 영역, Fab 단편, Fv 단편, Fab' 단편, Dab 등과 같은 폴리펩타이드를 개발하거나 또는 개선시킬 수 있다. 일부 양태에서, 개선시킬 폴리펩타이드는 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 도메인을 갖는 특성의 폴리펩타이드, 예를 들면, 인터페론, 단백질 A, 안키린, A-도메인, T-세포 수용체, 피브로넥틴 III, 감마-크리스탈린, MHC 부류 분자의 항원 결합 도메인(예를 들면, CD8의 알파 및 베타 항원 결합 도메인), 유비퀴틴, 면역글로불린 상과의 구성원, 및 본원에서 참조로 인용된, 문헌[참조: Binz, A. et al. (2005) Nature Biotechnology 23:1257 및 Barclay (2003) Semin Immunol. 15(4):215-223]에서 고찰되는 바와 같은 많은 다른 것들을 지닌 특정 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 양태에서, 사람 면역 레퍼토리오로부터 기원한 면역글로불린 라이브러리와 유사하게, 단일 라이브러리는 스캐폴드로서 많은 상이한 V-영역 서열을 사용하지만, 이들은 모두 기본적인 면역글로불린 폴딩을 공유한다. 일부 양태에서, 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 폴딩은 이황화물 결합에 의해 함께 유지된 몇가지(예를 들면, IgG의 경쇄 C-도메인의 경우에 7개)의 항-평행한 β-쇌를 포함하는 2개의 β-시트(sheet)를 포함하는 장벽 유형(barrel shape)의 단백질 구조이다. 따라서, 특성의 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 단백질, 이의 부위 또는 단편의 개선 또는 선택이 고려된다.

[0150] 다른 적용에서, 본원에 기술된 X-디스플레이 기술은 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 도메인을 가지거나 가지지 않을 수 있는 특수 결합(예를 들면, 리간드 결합) 특성을 가진 단백질의 분리에 유용하다. 고도의 특수한 결합 상호작용을 나타내는 단백질은 비-항체 인지 시약으로서 사용되어 X-디스플레이 기술이 전통적인 모노클로날 항체 기술을 능가하도록 할 수 있다. 당해 방법에 의해 분리된 항체-유형의 시약은, 전통적인 항체가 이용되는, 진단 및 치료학적 적용을 포함하는 어떠한 영역에서도 사용될 수 있다.

[0151] 바람직한 양태에서, 당해 방법은 면역결합체, 예를 들면, 항체 분자의 가변 영역 및/또는 CDR의 영역, 즉, 중쇄(VH)로부터의 쇠 및 경쇄(VL)로부터의 쇠인, 2개 쇠의 가변 영역으로 이루어진 항원 결합 활성화에 관여하는 구조

의 개선을 목표로 할 것이다. 바람직한 항원-결합 특성이 확인되면, 가변 영역(들)을 IgG, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE와 같은 적절한 항체 부류로 가공할 수 있다. 당해 방법을 사용하여 사람 면역결합체 및/또는 다른 종류로부터의 면역결합체, 예를 들면, 특정의 포유동물 또는 비-포유동물 면역결합체, 낙타 항체, 상어 항체 등을 개선시키고/시키거나 선택할 수 있다.

[0152] 본 발명을 사용하여 특정의 다수 질병을 치료하기 위한 사람 또는 사람화된 항체(또는 이의 단편)를 개선시킬 수 있다. 당해 적용에서, 항체 라이브러리를 개발하여 시험관내에서 스크리닝하여, 세포-융합 또는 파아지 디스플레이와 같은 기술에 대한 요구도를 제거한다. 하나의 중요한 적용에서, 본 발명은 일본쇄 항체 라이브러리를 개선시키는데 유용하다[참조: Ward et al., Nature 341:544 (1989); 및 Goulot et al., J. Mol. Biol. 213:617 (1990)]. 당해 적용을 위해, 다양한 영역을 사람 공급원(수용체의 가능한 역 면역 반응을 최소화시키기 위하여)으로부터 삭제할 수 있거나 전체적으로 무작위처리된 카세트(라이브러리의 복잡성을 최대화하기 위하여)를 함유할 수 있다. 개선된 항체 분자를 스크리닝하기 위해, 후보물 분자의 혼주물을 표적 분자에 대한 결합에 대해 시험한다. 이후에, 선택이 하나의 라운드에서 다음 라운드로 진행되면서 보다 높은 수준의 스트링전시(stringency)를 결합 단계에 적용한다. 스트링전시를 증가시키기 위하여, 다수의 세척 단계, 과량의 경쟁자 농도, 완충제 조건, 결합 반응 시간의 길이, 및 면역화 매트릭스의 선택을 변경시킬 수 있다. 일본쇄 항체를 표준 항체를 설계하기 위해 간접적으로 또는 치료요법을 위해 직접적으로 사용할 수 있다. 이러한 항체는 항-자가면역 항체의 분리, 면역 제어, 및 AIDA와 같은 바이러스 질병용 백신의 개발시 다수의 강력한 적용을 갖는다.

[0153] 하기에 상세한 바와 같이, 광범위한 항체 단편 및 항체 모사체 기술이 현재 개발되어 있고 당해 분야에 광범위하게 공지되어 있다. 도메인 항체, 나노바디 및 유니바디와 같은 다수의 이들 기술이 전통적인 항체 구조의 단편 또는 이에 대한 다른 변형을 사용한다 해도, 이들이 전통적인 항체 결합을 모사하면서, 이로부터 생성되고 명백한 메카니즘을 통해 기능하는 결합 구조를 사용하는, 아드넥틴, 아피바디, DARPin, 안티칼린, 아비머 및 베르사바디와 같은 변형 기술이 또한 존재한다. 이들 변형 구조 중 일부는 본원에 참조로 인용된 문헌[참조: Gill and Damle (2006) 17: 653-658]에서 고찰된다. 위에서 언급한 항체 유도체 및 결합체 모두는 본 발명의 방법에 의해 개선되고/되거나 선택될 수 있다. 일부 양태에서, 나노바디, 유니바디, 아드넥틴, 아피바디, DARPin, 안티칼린, 아비머 및 베르사바디를 생성하기 위한 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 초기 결합 단백질 발견하여 이후 이를 본 발명에 따른 방법에 따라 이로부터 생산하여 선택할 수 있는 라이브러리의 생성을 위한 기본으로 제공할 수 있다. 달리, 당해 분야에 이미 공지된 결합체를 직접 사용하여 본원에 기술된 방법과 함께 사용하기 위한 새로운 라이브러리를 창조할 수 있다.

[0154] 일부 양태에서, 본원에 기술된 방법은 도메인 항체(dAb)의 개선을 표적으로 할 것이다. 도메인 항체는 사람 항체의 중쇄(VH) 또는 경쇄(VL)의 가변 영역에 상응하는, 항체의 가장 작은 작용적 결합 단위이다. 도메인 항체는, 분자량이 대략 13kDa이다. 도만티스(domantis)는 완전한 사람 VH 및 VH dAb의 일련의 거대하고 고도로 작용성인 라이브러리(각각의 라이브러리에서 백억개 이상의 상이한 서열)를 개발하여, 당해 라이브러리를 치료학적 표적에 대해 특이적인 dAb를 선택하는데 사용한다. 많은 통상적인 항체와는 대조적으로, 도메인 항체는 세균, 효모 및 포유동물 세포 시스템에서 잘 발현된다. 도메인 항체 및 이의 생산 방법의 추가의 세부사항은, 각각 이의 전문이 본원에 참조로 인용된, 미국 특허 제6,291,158호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,172,197호; 제6,696,245호; 미국 특허원 일련 번호 제2004/0110941호; 유럽 특허원 제1433846호 및 유럽 특허 제0368684호 및 제0616640호; WO05/035572호, WO04/101790호, WO04/081026호, WO04/058821호, WO04/003019호 및 WO03/002609호를 참조로 하여 취득할 수 있다.

[0155] 다른 양태에서, 본원에 기술된 방법은 나노바디의 개선을 표적으로 할 것이다. 나노바디는 천연적으로 존재하는 중쇄 항체의 독특한 구조 및 기능적 특성을 함유하는 항체-기원한 치료학적 단백질이다. 당해 중쇄 항체는 단일의 가변 도메인(VHH) 및 2개의 고정 도메인(CH2 및 CH3)를 함유한다. 중요하게는, 클로닝되고 분리된 VHH 도메인은 원래의 중쇄 항체의 완전한 항원-결합 특성을 지닌 완벽하게 안정한 폴리펩타이드이다. 나노바디는 사람 항체의 VH 도메인과 고도로 상동성을 가지며 또한 활성의 어떠한 손실없이 추가로 사람화될 수 있다. 중요하게는, 나노바디는 낮은 면역원성 효능을 가지며, 이는 나노바디 납 화합물을 사용한 영장류 연구에서 확인되었다.

[0156] 나노바디는 소 분자 약물의 중합한 특성을 갖는 통상의 항체의 장점을 결합한다. 통상의 항체와 유사하게, 나노바디는 높은 표적 특이성, 이들의 표적에 대해 높은 친화성 및 낮은 고유 독성을 나타낸다. 그러나, 소 분자 약물과 유사하게 이들은 효소를 억제하고 수용체 틈(cleft)에 용이하게 접근할 수 있다. 또한, 나노바디는 극도로 안정하여, 주사 외의 수단으로 투여할 수 있으며(참조: 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 WO

04/041867호) 제조하기 용이하다. 나노바디의 다른 장점은 이들의 작은 크기의 결과로서 일반적이지 않거나 숨겨진 에피토프를 인지하고, 이들의 독특하고 3-차원적인 약물 체재 유연성으로 인하여 단백질 표적의 강(cavity) 또는 활성 부위내로 고 친화성 및 선택성으로 결합하고, 반감기 및 약물 발견의 용이성 및 속도를 조절하는 것을 포함한다.

[0157] 나노바디는 단일 유전자에 의해 암호화되며 대부분의 모든 원핵 및 진핵 숙주, 예를 들면, 이. 콜라이(E. coli)(참조: 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제6,765,087호), 곰팡이[예를 들면, 아스퍼길러스(Aspergillus) 또는 트리코데르마(Trichoderma)] 및 효모[예를 들면, 사카로마이세스(Saccharomyces), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 한세놀라(Hansenula) 또는 피키아(Pichia)](참조: 예를 들면, 이의 전문이 본원에서 참조로 인용된 미국 특허 제6,838,254호)에서 효율적으로 생산된다. 생산 과정은 조절가능(scalable)하며 다수-킬로그램의 양의 나노바디가 생산된다. 나노바디는 통상의 항체와 비교하여 보다 우수한 안정성을 나타내므로, 이들은 긴 반감기, 즉시 사용 용액으로 제형화될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법을 사용하여 이들의 표적 분자에 대한 나노바디의 친화성을 개선시킬 수 있다.

[0158] 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 나노바디(또는 본원에 기술된 다른 결합제/면역결합제)를 생성할 수 있다. 이러한 결합제는 이후에 본 발명의 방법에 따라 생산되고 선택될 수 있는 라이브러리의 생성을 위한 기본으로서 제공될 수 있다. 예를 들면, 나노클론 방법(참조: 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 W006/079372호)은 B-세포의 자동화된 고-배출 선택을 기초로 하는, 바람직한 표적에 대한 나노바디를 생성하기 위한 독점적인 방법이며 본 발명의 내용에서 사용될 수 있다. 나노클론 방법으로부터 나노바디의 성공적인 선택은 본원에 기술된 방법에 의해 추가로 개선될 수 있는 초기 세트의 나노바디를 제공할 수 있다.

[0159] 다른 양태에서, 본원에 기술된 방법은 유니바디의 개선을 표적으로 할 것이다. 유니바디는 다른 항체 단편 기술이지만, 이는 IgG4 항체의 힌지 영역의 제거를 기초로 한다. 힌지 영역의 제거는 필수적으로 전통적인 IgG4 항체의 크기의 1/2이고 IgG4 항체의 2가 결합 영역이 아닌 1가 결합 영역을 갖는 분자를 초래한다. IgG4 항체가 불활성이어서 면역 시스템과 상호작용하지 않으며, 이는, 면역 반응이 요구되지 않는 질병의 치료에 유리할 수 있고 이러한 장점은 유니바디에 인계되어 있음이 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 유니바디는 이들이 결합한 세포를 억제하거나 무반응(silence)이도록 기능하나 사멸시키지 않을 수 있다. 또한, 암 세포에 대한 유니바디 결합은 이들이 증식하도록 자극하지 않는다. 또한, 유니바디는 전통적인 IgG4 항체의 크기의 약 1/2이므로, 이들은 매우 유리한 효능으로 보다 큰 고품종양 전체에 우수하게 분포될 수 있다. 유니바디는 전체 IgG4 항체와 유사한 비율로 항체로부터 청소되며 이들의 항체에 대해 전체 항체와 유사한 친화성으로 결합할 수 있다. 유니바디의 추가의 세부사항은, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 특허공개 W02007/059782호를 참조하여 수득할 수 있다.

[0160] 다른 양태에서, 본원에 기술된 방법은 피브로넥틴 또는 아드넥틴 분자의 개선을 표적으로 할 것이다. 아드넥틴 분자는 피브로넥틴 단백질의 하나 이상의 도메인으로부터 기원한 가공된 결합 단백질이다(참조: Ward M., and Marcey, D., callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/fibro/fibro.htm). 통상적으로, 피브로넥틴은 3개의 상이한 단백질 모듈, 제I형, 제II형, 및 제III형 모듈로 이루어진다. 피브로넥틴의 기능의 구조를 참조하기 위해서는, 본원에 참조로 인용된, 문헌[참조: Pankov and Yamada (2002) J Cell Sci. 115(Pt 20):3861-3, Hohenester and Engel (2002) 21:115-128, 및 Lucena et al. (2007) Invest Clin.48:249-262]을 참조한다.

[0161] 기원하는 조직에 따라서, 피브로넥틴은 예를 들면, ¹Fn3, ²Fn3, ³Fn3, 등으로 주목될 수 있는 다수의 제III형 도메인을 함유할 수 있다. ¹⁰Fn3 도메인은 인테그린 결합 모티프를 함유하며 또한 베타 쇠를 연결하는 3개의 루프를 함유한다. 이들 루프는 IgG 중쇄의 항원 결합 루프에 상응하는 것으로 고려될 수 있으며, 이들은 본원에서 하기 논의된 방법에 의해 변경되어 목적인 표적에 특이적으로 결합하는 피브로넥틴 및 아드넥틴 분자를 선택할 수 있다. 개발될 아드넥틴 분자는 또한 단순한 단합체성 ¹⁰Fn3 구조 외에 ¹⁰Fn3 관련 분자의 중합체로부터 기원할 수 있다.

[0162] 비록 천연의 ¹⁰Fn3 도메인이 통상적으로 인테그린에 결합한다고 해도, 아드넥틴 분자가 되도록 채택된 ¹⁰Fn3 단백질은 목적인 항원에 결합하도록 변경된다. 따라서, 당해 분야의 숙련자에게 이용가능한 방법을 사용하여 본 발명의 방법과 혼용성인 ¹⁰Fn3 변이체 및 돌연변이체 서열(이에 의해 라이브러리 형성)을 창조할 수 있다. 예를 들어, ¹⁰Fn3내 변경을 오류 빈발(error prone) PCR, 부위-지시된 돌연변이유발, DNA 셔플링(shuffling) 또는 본

원에 언급된 다른 유형의 재조합적 돌연변이유발을 포함하나, 이에 한정되지 않는 당해 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해서도 제조할 수 있다. 하나의 예에서, ¹⁰Fn3 서열을 암호화하는 DNA의 변이체를 시험관내에서 직접 합성할 수 있다. 달리, 천연의 ¹⁰Fn3 서열을 표준 방법을 사용하여 게놈으로부터 분리하거나 클로닝할 수 있으며(예를 들면, 본원에 참조로 인용된 미국 특허원 제20070082365호에서와 같이 수행), 이후에 당해 분야에 공지된 돌연변이유발 방법을 사용하여 돌연변이시킬 수 있다.

[0163] 하나의 양태에서, 표적 단백질은 컬럼 수지 또는 미세역가 플레이트내 웰과 같은 고체 지지체 상에 고정시킬 수 있다. 이후에, 표적을 본원에 기술한 것으로서 강력한 결합 단백질 또는 X-디스플레이 복합체의 라이브러리와 접촉시킨다. 라이브러리는 ¹⁰Fn3 서열의 돌연변이유발/무작위화 또는 ¹⁰Fn3 루프 영역(베타 쇠는 아님)의 돌연변이유발/무작위화에 의해 야생형 ¹⁰Fn3로부터 기원한 ¹⁰Fn3 클론 또는 아드넥틴 분자를 포함할 수 있다. 선택/돌연변이유발 과정은, 표적에 대해 충분한 친화성을 갖는 결합체가 수득될 때까지 반복할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 아드넥틴 분자는 아드넥서스(Adnexus)에 의해 사용된 PROfusion™ 기술[브리스톤-마이어스 스쿼브 캄파니(Briston-Myers Squibb company) 제공]을 사용하여 가공할 수 있다. PROfusion 기술은 위에서 언급한 기술을 기초로 하여 창조되었다[참조: 예를 들면, Roberts & Szostak (1997) 94:12297-12302]. 변경된 ¹⁰Fn3 도메인의 라이브러리를 생성하고 본 발명으로 사용될 수 있는 적절한 결합체를 선택하는 방법은 다음 미국 특허 및 특허원 서류에 완전히 기술되어 있고 본원에서 참조로 인용되어 있다: 미국 특허 제7,115,396호; 제6,818,418호; 제6,537,749호; 제6,660,473호; 제7,195,880호; 제6,416,950호; 제6,214,553호; 제6623926호; 제6,312,927호; 제6,602,685호; 제6,518,018호; 제6,207,446호; 제6,258,558호; 제6,436,665호; 제6,281,344호; 제7,270,950호; 제6,951,725호; 제6,846,655호; 제7,078,197호; 제6,429,300호; 제7,125,669호; 제6,537,749호; 제6,660,473호; 및 미국 특허원 제20070082365호; 제20050255548호; 제20050038229호; 제20030143616호; 제20020182597호; 제20020177158호; 제20040086980호; 제20040253612호; 제20030022236호; 제20030013160호; 제20030027194호; 제20030013110호; 제20040259155호; 제20020182687호; 제20060270604호; 제20060246059호; 제20030100004호; 제20030143616호; 및 제20020182597호. 또한 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 다음 문헌의 방법을 참조한다: Lipovsek et al. (2007) Journal of Molecular Biology 368: 1024-1041; Sergeeva et al. (2006) Adv Drug Deliv Rev. 58:1622-1654; Petty et al. (2007) Trends Biotechnol. 25: 7-15; Rothe et al. (2006) Expert Opin Biol Ther. 6:177-187; 및 Hoogenboom (2005) Nat Biotechnol. 23:1105-1116.

[0164] 본 발명의 방법을 사용하여 개선시킬 수 있는 추가의 분자는 사람 피브로넥틴 모듈 ¹Fn3-⁹Fn3 및 ¹¹Fn3-¹⁷Fn3 및 비-사람 동물 및 원핵세포로부터의 관련 Fn3 모듈을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 테나신 및 운둘린과 같이, ¹⁰Fn3에 대해 서열 상동성을 갖는 다른 단백질로부터의 Fn3 모듈도 또한 사용할 수 있다. 면역글로불린-유사 폴딩을 갖는(그러나 V_H 도메인과 관련되지 않는 서열을 갖는) 다른 예시적인 단백질은 N-카드헤린, ICAM-2, 티틴, GCSF 수용체, 사이토킨 수용체, 글리코시다제 억제제, E-카드헤린 및 항생제 색단백질을 포함한다. 관련 구조를 갖는 추가의 도메인은 마이엘린 막 부착 분자 PO, CD8, CD4, CD2, 제I 부류 MHC, T-세포 항원 수용체, CD1, C2 및 VCAM-1의 I-세트 도메인, 마이오신-결합 단백질 C의 I-세트 면역글로불린 폴딩, 마이오신-결합 단백질 H의 I-세트 면역글로불린 폴딩, 텔로킨의 I-세트 면역글로불린-폴딩, 텔리킨, NCAM, 트위친, 뉴로글리안, 성장 호르몬 수용체, 적혈구형성인자 수용체, 프롤락틴 수용체, GC-SF 수용체, 인터페론-감마 수용체, 베타-갈락토시다제/글루쿠로니다제, 베타-글루쿠로니다제 및 트랜스글루타미나제로부터 기원할 수 있다. 달리, 하나 이상의 면역글로불린-유사 폴딩을 포함하는 어떠한 다른 단백질을 이용하여 본원에 기술된 방법에 의해 개선시킬 수 있는 아드넥틴-유사 결합 잔기를 생성시킬 수 있다. 이러한 단백질은 예를 들면, 프로그램 SCOP를 사용하여 확인할 수 있다[참조: Murzin et al., J. Mol. Biol. 247:536 (1995); Lo Conte et al., Nucleic Acids Res. 25:257 (2000)].

[0165] 다른 양태에서, 본 발명의 방법을 사용하여 아피바디 분자를 개선시킬 수 있다. 아피바디 분자는 스타필로코쿠스 단백질 A의 IgG-결합 도메인 중 하나로부터 기원한, 58개-아미노 잔기 단백질 도메인을 기초로 하는 친화성 단백질의 신규 부류를 나타낸다. 이들 3개의 나선 다발 도메인은, 이로부터 목적한 분자를 표적화하는 아피바디 변이체가 파아지 디스플레이 기술을 사용하여 선택될 수 있는, 조합 파아지미드 라이브러리의 작제를 위한 스캐폴드(scaffold)로서 사용되어 왔다[참조: Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α-helical bacterial receptor domain,

Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55]. 당해 분야에 공지된 방법으로 생산될 수 있는 유사한 라이브러리는 본원에 기술된 X-디스플레이 기술을 사용하여 선택할 수 있다. 이들의 낮은 분자량(6kDa)과 조합된 아피타디 분자의 단순하고 강한 구조는 예를 들면, 검출 시약(참조: Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J Immunol Methods 2002;261:199-211)으로서 및 수용체 상호작용을 억제(참조: Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7)하기 위한 광범위한 적용에 적합하도록 한다. 아피타디 및 이의 생산 방법의 추가의 세부사항은, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제5,831,012호를 참조로 취득할 수 있다.

[0166] 다른 양태에서, 본 발명의 방법은 DARPin을 개선시키는데 사용될 수 있다. DARPin(설계된 안키린 반복 단백질)은 비-항체 폴리펩타이드의 결합능을 발휘하도록 개발된 항체 모사체 DRP(설계된 반복 단백질) 기술의 하나의 예이다. 안키린 또는 루이신-풍부한 반복 단백질과 같은 반복 단백질은 항체와는 달리 세포내 및 세포외에서 발생하는 편재된 결합 분자이다. 이들의 독특한 모듈 구조는 반복 구조 단위(반복물)를 특징으로 하며, 이들은 함께 쌓여서 다양한 모듈성 표적-결합 표면을 나타내는 연장된 반복 도메인을 형성한다. 이러한 모듈방식을 기초로 하여, 고도로 다양화된 결합 특이성을 갖는 폴리펩타이드의 조합 라이브러리가 생성될 수 있다. 당해 방법은 가변적인 표면 잔기 및 반복 도메인내로의 이들의 무작위적인 조립을 나타내는 자가-혼용성 반복물의 컨센서스(consensus) 설계를 포함한다.

[0167] DARPins은 세균 발현 시스템내에서 매우 고 수율로 생산될 수 있으며, 이들은 대부분의 공지된 적합한 단백질에 속한다. 사람 수용체, 사이토킨, 키나제, 사람 프로테아제, 바이러스 및 막 단백질을 포함하는 광범위한 표적 단백질에 대한 고도의 특이적이고, 고-친화성인 DARPin을 선택한다. 단일-자리 나노몰 내지 피코몰 범위의 친화성을 갖는 DARPin을 취득할 수 있다.

[0168] DARPins은 ELISA, 샌드위치 ELISA, 유동 세포측정 검정(FACS), 면역조직화학(IHC), 칩 적용, 친화성 정제 또는 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 포함하는 광범위한 적용에서 사용되어 왔다. DARPins은 또한 예를 들면, 녹색 형광 단백질(GFP)에 융합된 세포내 마커 단백질로서 세포내 구획에서 고도로 활성인 것으로 입증되었다. DARPin은 또한 바이러스 도입을 pM 범위의 IC50으로 억제하는데 사용되었다. DARPin은 단백질-단백질 상호작용을 차단하는데 이상적일 뿐만 아니라, 효소로 억제한다. 프로테아제, 키나제 및 전달체가 가장 흔히 알로스테릭(allosteric) 억제 모드로 성공적으로 억제되어 왔다. 종양에서 매우 빠르고 특이적인 농축 및 혈액에 대한 매우 유리한 종양 비는, DARPin이 생체내 진단학적 또는 치료학적 시도에 적합하도록 한다.

[0169] DARPin 및 기타 DRP 기술에 관한 추가의 정보는 미국 특허원 공보 제2004/0132028호 및 국제 특허공개공보 WO 02/20565호서 찾을 수 있으며, 이들 둘다, 본원에서 이의 전문이 참조로 인용된다.

[0170] 다른 양태에서, 본 발명의 방법은 안티칼린을 개선시키는데 사용될 수 있다. 안티칼린은 추가의 항체 모사체 기술이지만, 당해 경우에 결합 특이성은 사람 조직 및 체액에서 천연적으로 및 풍부하게 발견되는 저 분자량 단백질의 계열인, 리포칼린으로부터 기원한다. 리포칼린은 화학적으로 민감하거나 불용성인 단백질의 생리학적 수송 및 저장과 관련한 생체내 기능 범위를 수행하기 위해 발전되어 왔다. 리포칼린은 단백질의 하나의 말단에서 4개의 루프를 지지하는 고도로 보존된 β -장벽을 포함하는 강한 고유 구조를 갖는다. 이들 루프는 개개 리포칼린사이에 결합 특이성에 있어서 변화를 고려한 분자의 당해 부분에서 결합 포켓(pocket) 및 구조적 차이에 대한 입구를 형성한다.

[0171] 보존된 β -시트 구조에 의해 지지된 고가변성 루프의 전체 구조는 면역글로불린을 상기시키나, 리포칼린은 단일 면역글로불린 도메인보다 제한적으로 보다 큰 160 내지 180개 아미노산의 단일 폴리펩타이드 쇄로 구성된, 크기의 측면에서 항체와는 현저히 상이하다.

[0172] 리포칼린을 클로닝하여 이들의 루프를 가공함으로써 안티칼린을 창조한다. 구조적으로 다양한 안티칼린의 라이브러리가 생성되었으며 안티칼린 디스플레이는 결합 기능의 선택 및 스크리닝에 이은, 원핵 또는 진핵세포 시스템에서 추가의 분석을 위한 가용성 단백질의 발현 및 생산을 허용한다. 이러한 안티칼린 라이브러리는 본 발명의 X-디스플레이 기술에 따라 사용될 수 있다. 연구들은, 사실상 특정 사람 표적 단백질에 대해 특이적인 안티칼린이 개발되어 분리되고 나노몰 이상 범위의 결합 친화성이 취득될 수 있음을 성공적으로 입증하여 왔다.

[0173] 안티칼린은 또한 이중 표적화 단백질, 소위, 듀오칼린으로 체제화될 수 있다. 듀오칼린은 표준 제조 과정을 사

용하여 하나의 용이하게 생산된 단합체성 단백질내에 2개의 별도의 치료학적 표적을 결합시키는 한편 이의 2개의 결합 도메인의 구조적 배향에 관계없이 표적 특이성 및 친화성을 유지한다. 본 발명의 방법에 의해 선택된 안티칼린은 듀오칼린 분자로 조립될 수 있다.

[0174] 단일 분자를 통한 다수 표적의 모듈화는 하나 이상의 원인 인자를 포함하는 것으로 공지된 질병에서 특히 유리할 수 있다. 또한, 듀오칼린과 같은 2- 또는 1-가 결합 체제는 질병에서 세포 표면 분자를 표적화하거나, 신호 전달 경로에 있어 작용 효과를 증대하거나, 세포 표면 수용체의 결합 및 집단을 통해 증가된 내재화 효과를 유도하는데 있어서 매우 강력하다. 또한, 듀오칼린의 높은 고유 안정성은 단합체성 안티칼린에 대해 혼용성이어서 듀오칼린에 대한 유연한 제형 및 전달 효능을 제공한다. 안티칼린에 대한 추가의 정보는, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제7,250,297호 및 국제 특허출원 공보 WO 99/16873호에서 찾을 수 있다.

[0175] 다른 양태에서, 본 발명의 방법은 아비머를 개선시키는데 사용될 수 있다. 본 발명의 내용에서 유용한 다른 항체 모사체 기술은 아비머이다. 아비머는 결합 및 억제 특성을 갖는 멀티도메인 단백질을 생성하는, 시험관내 엑손 셔플링 및 파아지 디스플레이에 의해 사람 세포의 수용체 도메인의 거대 계열로부터 발전된다. 다수의 독립적인 결합 도메인의 연결은 통상의 단일-에피토프 결합 단백질과 비교하여 항원항체결합력을 창조하고 개선된 친화성 및 특이성을 초래하는 것으로 밝혀졌다. 다른 강력한 장점은 에스케리키아 콜라이내에서 다중표적-특이적인 분자의 단순하고 효율적인 생산, 개선된 열안정성 및 프로테아제에 대한 내성을 포함한다. 소-나노물 친화성을 갖는 아피머가 각종 표적에 대해 획득되었으며, 이들은 또한 본원에 기술된 방법에 의해 개선될 수 있다.

[0176] 아비머에 대한 추가의 정보는, 이들 모두 이의 전문이 본원에 참조로 인용된, 미국 특허원 공보 제2006/0286603호, 제2006/0234299호, 제2006/0223114호, 제2006/0177831호, 제2006/0008844호, 제2005/0221384호, 제2005/0164301호, 제2005/0089932호, 제2005/0053973호, 제2005/0048512호, 제2004/0175756호에서 찾을 수 있다.

[0177] 다른 양태에서, 본 발명의 방법은 베르사바디를 개선시키는데 사용될 수 있다. 베르사바디는 본 발명의 내용에서 사용될 수 있는 다른 항체 모사체 기술이다. 베르사바디는, 시스테인이 >15%인 3 내지 5 kDa의 소 단백질이며, 통상의 단백질이 가진 소수성 코어를 대체하여 고 이황화물 밀도의 스캐폴드를 형성한다. 소수성 코어를 포함하는, 다수의 소수성 아미노산을 소수의 이황화물로 대체하면 보다 작고, 보다 친수성(응집 및 비-특이적인 결합 없이)이며, 프로테아제 및 열에 대해 보다 내성이고, MHC 발현에 대부분 기여하는 잔기가 소수성이기 때문에 보다 낮은 밀도의 T-세포 에피토프를 갖는 단백질이 생성된다. 이들 특성 4개 모두는 면역원성에 영향을 미치는 것으로 잘 공지되어 있으며, 함께 이들은 면역원성에 있어서 큰 감소를 유발하는 것으로 예측된다.

[0178] 베르사바디의 관찰은 예측하지 않은 낮은 면역원성을 나타내는 것으로 알려진 거머리, 뱀, 거미, 전갈, 뱀 및 아네모네에 의해 생산된 천연의 주사가능한 생약제로부터 기원한다. 선택된 천연의 단백질 계열로부터 출발하여, 크기를 설계하고 스크리닝함에 의해, 소수성, 단백질분해성 항원 프로세싱 및 에피토프 밀도가 천연의 주사가능한 단백질에 대한 평균보다 더욱 낮은 수준으로 최소화된다.

[0179] 베르사바디의 구조가 제공되면서, 이들 항체 모사체는 다중-원자가, 다중-특이성, 반감기 메카니즘의 다양성, 조직 표적화 모듈 및 항체 Fc 영역의 부제를 포함하는 다재다능한 체제를 부여한다. 또한, 베르사바디는 이. 콜라이내에서 고 수율로 제조될 수 있으며, 이들의 친수성 및 작은 크기로 인하여, 베르사바디는 고도로 가용성이고 고 농도로 제형화될 수 있다. 베르사바디는 예상치못하게 열 안정성(이들은 비등할 수 있다)이며 연장된 반감기를 부여한다. 본원에 기술된 결합제의 품질 모두(예를 들면, 열 안정성, 염 안정성, 반감기, 면역원성, 표적 친화성 등)은 본원에 기술된 디스플레이 및 선택 방법(X-디스플레이 방법)에 의해 개선될 수 있다.

[0180] 베르사바디에 관한 추가의 정보는, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허원 공보 제2007/0191272호에서 찾을 수 있다.

[0181] 다른 양태에서, 본 발명의 방법은 SMIPTM 분자를 개선시키는데 사용될 수 있다. SMIPsTM[소 모듈러 면역약제-트루비온 약제(Trubion Pharmaceuticals)]는 표적 결합, 효과기 작용, 생체내 반감기, 및 발현 수준을 유지하고 최적화하기 위해 가공되었다. SMIPs는 3개의 명백한 모듈러 도메인으로 이루어진다. 첫째로, 이들은 특이성을 부여하는 특정 단백질(예를 들면, 세포 표면 수용체, 일본쇄 항체, 가용성 단백질 등)로 이루어질 수 있는 결합 도메인을 함유한다. 둘째로, 이들은 결합 도메인과 효과기 도메인사이에 유연성 링커로서 제공되고, 또한 SMIP 약물의 다합체화를 조절하는데 도움을 주는 힌지 도메인을 함유한다. 최종적으로, SMIPs는 Fc 도메인 또는 다른 특이적으로 설계된 단백질을 포함하는 각종 분자로부터 기원할 수 있는 효과기 도메인을 함유한다. 상이한

결합, 힌지 및 효과기 도메인의 다양성을 갖는 SMIP의 단순한 작제를 허용하는 설계의 모듈 방식은 신속하고 통상화된 약물 설계를 제공한다. SMIP™ 분자의 결합 도메인은 또한 본원에 기술된 방법(예를 들면, X-디스플레이 방법)에 따른 디스플레이 및 선택에 적합한 라이브러리에 대한 기초로서 제공될 수 있다.

[0182] 이들을 설계하는 방법의 예를 포함하는 SMIP에 대한 추가의 정보는 문헌[참조: Zhao et al. (2007) Blood 110:2569-77] 및 다음 미국 특허원 제20050238646호; 제20050202534호; 제20050202028호; 제20050202023호; 제20050202012호; 제20050186216호; 제20050180970호; 및 제20050175614호에서 찾을 수 있다.

[0183] 위에서 제공된 항체 단편 및 항체 모사체 기술의 상세한 기술은 본 명세서의 내용에서 사용될 수 있는 모든 기술들의 포괄적인 목록인 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 및 또한 제한하지 않고, 이의 전문이 본원에 의해 참조로 인용된 문헌[참조: Qui et al., Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007)]에 요약된 것으로서 상보성 결정 영역의 융합과 같은 대체 폴리펩타이드-계 기술을 포함하는 각종의 추가의 기술을 본 발명의 내용에서 사용할 수 있다.

[0184] 본원에 기술된 X-디스플레이 복합체(예를 들면, 핵산-단백질 융합체 또는 DNA-단백질 융합체)를 앞서 기술된 특정 적용에 사용할 수 있거나 RNA-단백질 융합을 위해 고려할 수 있다. 상업적 용도는 시험관내 발전 기술[참조: 예를 들면, Szostak et al., 미국 특허원 제09/007,005호 및 미국 특허원 제09/247,190호; Szostak et al., WO98/31700호; Roberts & Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) vol. 94, p. 12297-12302)], 세포 mRNA로부터 기원한 cDNA 라이브러리의 스크리닝(참조: 예를 들면, Lipovsek et al., 1998년 8월 17일자로 출원된 미국 특허원 제60/096,818호), 및 단백질-단백질 상호작용을 기초로 한 새로운 유전자의 클로닝(참조: Szostak et al., 미국 특허원 제09/007,005호 및 미국 특허원 제09,247,190호; Szostak et al., WO98/31700호), 및 단백질 디스플레이 실험에서 이들 융합체의 용도(참조: Kuimelis et al., 미국 특허원 제60/080,686호 및 미국 특허원 제09/282,734호)를 통한 바람직한 특성을 갖는 폴리펩타이드의 분리를 포함한다. 본 발명의 X-디스플레이 복합체(예를 들면, DNA-단백질 융합체)는 이미 기술되어 있거나, 이의 전문이 모두 본원에 참조로 인용된, 미국 특허 제6,416,950호; 제6,429,300호; 제6,194,550호; 제6,207,446호; 및 제6,214,553호에 기술된 것들과 같은 앞서 기술된 디스플레이 기술을 위해 고려된 어떠한 적용을 위해서도 사용될 수 있다. 이들 X-디스플레이 복합체(예를 들면, DNA-단백질 융합체)는 특히 약제 및 농업 분야에서 어떠한 적절한 치료학적, 진단학적 또는 조사 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0185] 새로운 촉매의 분리

[0186] 본 발명은 또한 신규 촉매 단백질을 선택하는데 사용될 수 있다. 시험관내에서 선택 및 발전이 신규한 촉매 RNA 및 DNA의 분리를 위해 이미 사용되어 왔고, 본 발명에서, 신규 단백질 효소의 분리를 위해 사용된다(비-제한적인 예로서, 다당류를 보다 유용한 생연료로 전환시키는 것과 같이, 중합체의 보다 작고 보다 즉시 유용한 부산물로의 도입 메카니즘을 수행하기에 적합한 효소가 단순히 나열을 위해 제공된다). 당해 시도의 하나의 특수 예에서, 촉매는 촉매 전이 상태의 화학적 동족체에 결합시키기 위해 선택함으로써 간접적으로 분리할 수 있다. 다른 특수 예에서, 직접적인 분리는 기질과의 공유 결합 형성(예를 들면, 친화성 태그에 대해 연결된 기질을 사용하여)에 대해 선택하거나 분해(예를 들면, 특이적인 결합을 파괴하는 능력에 대해 선택함으로써 고체 지지체로부터 라이브러리의 촉매 구성원을 유리시킴에 의해)에 의해 수행할 수 있다.

[0187] 새로운 촉매의 분리에 대한 당해 시도는 촉매 항체 기술보다 적어도 2개의 중요한 장점을 갖는다[참조: Schultz et al., J. Chem. Engng. News 68:26 (1990)]. 첫째로, 촉매 항체 기술에서, 초기 혼주물은 일반적으로 면역 글로불린 폴딩에 제한되며; 대조적으로 X-디스플레이 복합체(DNA-단백질 융합체)의 개시 라이브러리는 복잡하게 무작위적일 수 있거나 제한없이, 공지된 효소 구조 또는 단백질 스캐폴드의 변이체로 이루어질 수 있다. 또한, 촉매 항체의 분리는 일반적으로 해독 상태 반응 유사체에 대한 결합에 이어 활성 항체에 대한 시험실적 스크리닝에 의해 초기 선택에 의존하며; 다시 대조적으로, 촉매작용에 대한 직접적인 선택은 RNA 라이브러리를 사용하여 앞서 입증된 바와 같이, X-디스플레이 라이브러리 시도를 사용하여 가능하다. 단백질 효소를 분리하기 위한 대체 시도에서, 해독-상태-동족체 및 직접적인 선택 시도가 결합될 수 있다.

[0188] 당해 방법에 의해 수득된 효소는 매우 가치가 있다. 예를 들어, 개발될 개선된 화학적 과정을 허용하는 신규의 효과적인 산업적 촉매에 대한 강력한 요구가 현재 존재한다. 본 발명의 주요 장점은, 선택이 임의 조건에서 수행될 수 있고, 예를 들면, 생체내 상태에 제한되지 않는다는 것이다. 따라서, 본 발명은 예정된 환경, 예를 들면, 승온, 승압 또는 용매 농도의 환경에서 작용화하면서, 고도로 특이적인 형질전환(및 이에 의해 바람직하지

많은 부산물의 형성을 최소화시킬 수 있는)을 수행할 수 있는 신규 효소 또는 존재하는 효소의 개선된 변이체의 분리를 용이하게 한다.

[0189] 시험관내 상호반응 트랩

[0190] X-디스플레이 기술은 또한 cDNA 라이브러리를 스크리닝하고 단백질-단백질 상호작용을 기초로 새로운 유전자를 스크리닝하는데 유용하다. 당해 방법에 의해, cDNA 라이브러리를 바람직한 공급원(예를 들면, 문헌: Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons and Greene Publishing Company, 1994의 방법에 의해; 특히 5과 참조)으로부터 생성된다. 후보물 cDNA 각각은 X-디스플레이 복합체(예를 들면, DNA-단백질 융합체)로 본원에 기술된 기술을 사용하여 제형화할 수 있으며, 특수 분자와 상호작용하는 이들 복합체의 능력(또는 이들 융합체의 개선된 버전)을 이후에 시험한다.

[0191] 상호작용 단계가 시험관내에서 발생한다는 사실은 비특이적인 경쟁인자, 온도 및 이온 조건을 사용하여 반응 스트링전시의 조심스런 조절을 허용한다. 가수분해가능하지 않은 유사체(예를 들면, ATP 대 ATPγS)를 사용한 정상 소 분자의 변경은 동일한 분자의 상이한 이형태체를 구별하는 선택을 제공한다. 당해 시도는, 선택된 결합 파트너의 핵산 서열이 관련되어 있으므로 용이하게 분리될 수 있기 때문에 많은 단백질의 클로닝 및 기능적 확인 둘다에 유용하다. 또한, 당해 기술은 특정의 사람 유전자의 기능 및 상호작용을 확인하는데 유용하다.

[0192] 당해 방법을 또한 사용하여 개선된 반응기, 친화성 또는 가용성을 위해 폴리펩타이드 리간드를 개발하거나 개선시킬 수 있다. 본원에 기술된 X-디스플레이 복합체(예를 들면, DNA-단백질 융합체)는 분자 발전 및 인지 시도를 포함하는 바람직한 단백질에 대한 어떠한 선택 방법에서도 사용될 수 있다. 예시적인 선택 방법은, 모두 본원에 참조로 인용된, 초스타크(Szostak) 등의 미국 특허원 제09/007,005호 및 미국 특허원 제09/247,190호; 초스타크 등의 W098/31700호; 문헌[참조: Roberts & Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) vol. 94, p. 12297-12302]; 리포브섹(Lipovsek) 등의 미국 특허원 제60/096,818호 및 미국 특허원 제09/374,962호; 및 쿠이멜리스(Kuimelis) 등의 미국 특허원 제60/080,686호 및 미국 특허원 제09/282,734호에 기술되어 있다.

[0193] 라이브러리 생성, 스크리닝 및 친화성 성숙

[0194] 일부 양태에서, 펩타이드 또는 유전자 라이브러리를 스크리닝하여 바람직한 품질(예를 들면, 특수 항원에 대한 결합)을 갖거나 본 발명의 방법에 따라 개선되거나 변형된 펩타이드를 확인할 수 있다. 관련 양태에서, 본원에 기술된 방법으로 생산되거나 선택된 특수 펩타이드는 또한 친화성 성숙 또는 돌연변이유발에 의해 관련 펩타이드 또는 핵산의 라이브러리를 생산하도록 변경될 수 있다. 자체로서, 본 발명의 하나의 측면은 항원에 결합하는 능력, 보다 높은 결합 친화성 등과 같은 바람직한 품질을 갖는 강력한 펩타이드(또는 이러한 펩타이드를 암호화하는 핵산)를 확인하기 위한 거대 라이브러리의 스크리닝을 포함할 수 있다. 당해 분야에 공지되거나 본원에 기술된 라이브러리 생성 및 표적 선택을 위한 어떠한 방법도 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0195] 본원에 기술된 방법에 따라(예를 들면, 적절한 태그, 상보성 서열 등을 가하기 위한), 당해 분야에 공지된 라이브러리 생성 방법을 사용하여 본원에 기술된 방법과 함께 사용하기에 적합한 라이브러리를 창조할 수 있다. 라이브러리 생성을 위한 일부 방법은, 본원에 참조로 인용된, 미국 특허원 제09/007,005호 및 제09/247,190호; 초스타크 등의 W0989/31700호; 문헌[참조: Roberts & Szostak (1997) 94:12297-12302]; 미국 특허원 제60/110,549호, 미국 특허원 제09/459,190호, 및 W0 00/32823호에 기술되어 있다.

[0196] 하나의 양태에서, 라이브러리는 VH 도메인, 바람직하게는 사람 VH 도메인을 포함할 것이다. 특정 세포를 라이브러리 공급원으로서 사용할 수 있다. 일부 바람직한 양태에서, 라이브러리를 세포 공급원은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 비장세포 또는 골수 세포(예를 들면, 특정 유형의 공여자 세포로부터의 라이브러리에서 수득할 수 있는 VH 라이브러리 다양성을 기술하는 도 36 참조)일 수 있다.

[0197] 본 발명의 방법이 대체 양식으로 사용될 수 있음은 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법 중 하나에 의해 선택된 핵산 또는 단백질은 이로부터 과정을 다시 시작할 수 있는 신규 라이브러리의 생성을 위한 기초로서 제공될 수 있다. 이러한 순서도의 예는 도 22에 나타나 있으며, 여기서, 선택의 1회 라운드의 생성물이 새로운 라이브러리를 재생하기 위해 사용된다.

[0198] 본원에 기술된 X-디스플레이 방법론은, 분자내 이황화물 결합이 선택 동안 펩타이드내에 존재하는 조건하에서 수행될 수 있다. 다른 양태에서, 이황화물 결합의 형성은 경우에 따라, 방지될 수 있다. 출발 라이브러리는

예를 들면, 직접적인 DNA 합성에 의해, 시험관내 또는 생체내 돌연변이 유발을 통해 획득할 수 있거나, 당해 분야에 공지된 어떠한 유용한 개시 라이브러리를 사용할 수 있다. 예를 들면, 본원에 인용된 문헌들 및 모두 본원에 이의 전문이 참조로 인용된 다음 문헌들에 기술된 라이브러리 및 상기 라이브러리의 제조 방법을 본 발명에 따라 사용할 수 있다: 미국 특허 제5,922,545호, 제7,074,557호.

[0199] 바람직한 양태에서, 라이브러리는 VH 또는 VL 라이브러리이다. 표 2는 VH 도메인을 증폭시키기 위해 사용될 수 있는 예시적인 프라이머의 비-제한적인 세트를 제공한다.

표 2

[0200] VH 도메인 X-디스플레이 라이브러리 생성을 위한 예시적인 프라이머. R = A/G, Y = C/T, K = G/T, M = A/C, S = G/C, W = A/

| 표적 영역 | 프라이머 세부사항 | 프라이머 서열 | 서열 번호 |
|----------|---------------------|--|-------|
| CD1 | IgM, cDNA 합성, 21mer | ACAGGAGACGAGGGGAAAAG | 1 |
| CD1 | IgG, cDNA 합성, 20mer | GCCAGGGGAAGACCGATGG | 2 |
| CD1 | IgA, cDNA 합성, 22mer | GAGGCTCAGCGGAAGACCTTG | 3 |
| CD1 | Vk, cDNA 합성, 21mer | CAACTGCTCATCAGATGGCGG | 4 |
| CD1 | VI, cDNA 합성, 21mer | CAGTGTGGCCTTGTGGCTTG | 5 |
| CD2 | PCR 3' IgM, 21mer | GGTTGGGGCGGATGCACTCCC | 6 |
| CD2 | PCR 3' IgG, 21mer | CGATGGGCCCTTGGTGGARGC | 7 |
| CD2 | PCR 3' IgA, 21mer | CTTGGGGCTGGTCGGGGATGC | 8 |
| CD2 | PCR 3' Vk, 21mer | AGATGGTGCAGCCACAGTTCG | 9 |
| JD1-3CD2 | PCR 3' VI, 42mer | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGGACGGTSASCTTGGTCCC | 10 |
| JD7CD2 | PCR 3' VI, 42mer | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGGAGGACGGTCAGCTGGGTGCC | 11 |
| VH1a | PCR5' VH1, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTGGTGCAGTCTG | 12 |
| VH1b | PCR5' VH1, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTGGTGCAGTCTG | 13 |
| VH1c | PCR5' VH1, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGSAGGTCAGCTGGTACAGTCTG | 14 |
| VH1d | PCR5' VH1, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCARATGCAGCTGGTGCAGTCTG | 15 |
| VH2 | PCR5' VH2, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGRTCACCTGAAGGAGTCTG | 16 |
| VH3a | PCR5' VH3, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGGAGTCTG | 17 |
| VH3b | PCR5' VH3, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTGGTGGAGTCTG | 18 |
| VH3c | PCR5' VH3, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGGAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG | 19 |
| VH4a | PCR5' VH4, 42mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGSTGCAGCTGCAGGAG | 20 |
| VH4b | PCR5' VH4, 45mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTACAGCAGTGG | 21 |
| VH5 | PCR5' VH5, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGCAGTCTG | 22 |
| VH6 | PCR5' VH6, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG | 23 |
| VH7 | PCR5' VH7, 46mer | CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTGGTGAATCTG | 24 |
| linkVk1a | PCR5' VK1, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGRACATCCAGATGACCCAG | 25 |
| linkVk1b | PCR5' VK1, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGMCATCCAGTTGACCCAG | 26 |
| linkVk1c | PCR5' VK1, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGCCATCCRGATGACCCAG | 27 |
| linkVk1d | PCR5' VK1, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGTCATCTGGATGACCCAG | 28 |
| linkVk2a | PCR5' VK2, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACCCAG | 29 |
| linkVk2b | PCR5' VK2, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGATRTTGTGATGACTCAG | 30 |
| linkVk3a | PCR5' VK3, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAATGTGTTGACRCAG | 31 |
| linkVk3a | PCR5' VK3, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAATAGTGATGACGCAG | 32 |
| linkVk3a | PCR5' VK3, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAATGTAATGACACAG | 33 |
| linkVk4 | PCR5' VK4, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGTGATGACCCAG | 34 |
| linkVk5 | PCR5' VK5, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCAGCAG | 35 |
| linkVk6a | PCR5' VK6, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAAATGTGCTGACTCAG | 36 |
| linkVk6b | PCR5' VK6, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGATGTTGTGATGACACAG | 37 |
| linkVL1a | PCR5' VL1, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGTGCTGACKCAG | 38 |
| linkVL1b | PCR5' VL1, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGTGCTGACGCAG | 39 |
| linkVL2 | PCR5' VL2, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAG | 40 |
| linkVL3a | PCR5' VL3, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCCTATGWGCTGACTCAG | 41 |

| | | | |
|-----------|--------------------|--|----|
| linkVL3b | PCR5' VL3, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCCTATGAGCTGACACAG | 42 |
| linkVL3c | PCR5' VL3, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCTTCTGAGCTGACTCAG | 43 |
| linkVL3d | PCR5' VL3, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTCCTATGAGCTGATGCAG | 44 |
| linkVL4 | PCR5' VL4, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGCYTGTGCTGACTCAA | 45 |
| linkVL5 | PCR5' VL5, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGSCTGTGCTGACTCAG | 46 |
| linkVL6 | PCR5' VL6, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGAATTTTATGCTGACTCAG | 47 |
| linkVL7 | PCR5' VL7, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGRCTGTGGTGACTCAG | 48 |
| linkVL8 | PCR5' VL8, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGACTGTGGTGACCCAG | 49 |
| linkVL4/9 | PCR5' VL4/9, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCWGCTGTGCTGACTCAG | 50 |
| linkVL10 | PCR5' VL10, 48mer | GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGCAGGCTGACTCAG | 51 |

- [0201] 바람직한 양태에서, 라이브러리의 핵산 작제물은 T7 프로모터를 함유한다. 라이브러리내 핵산은 당해 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해 조작하여 핵산, 이의 해독 생성물, 또는 X-디스플레이 복합체의 생산, 선택 또는 정제에 유용한 적절한 프로모터, 인헨서, 스페이서 또는 태그를 가할 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, 라이브러리내 서열은 TMV 인헨서, FLAG 태그를 암호화하는 서열, SA 디스플레이 서열 또는 폴리아데닐화 서열 또는 시그날을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 핵산 라이브러리 서열은 또한 RNA 또는 DNA 서열의 공급원을 확인하기 위한 독특한 공급원 태그를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 핵산 라이브러리 서열은 혼주물 태그를 포함할 수 있다. 혼주물 태그는 특수 라운드의 선택 동안 선택된 서열을 확인하는데 사용될 수 있다. 이는 예를 들면, 다수의 선택 라운드로부터의 서열이 이들이 기원하는 선택 라운드의 트랙의 손실없이 단일 수행에서 혼주되어 서열분석되도록 할 것이다.
- [0202] 이후에, 이분쇄 DNA 라이브러리를 시험관내에서 전사시켜 본원에 기술된 바와 같이, 펩타이드 수용체에 연합시킨다. 하나의 바람직한 양태에서, NA 링커 또는 고 친화성 리간드에 부착된 NA 링커(예를 들면, 바이오티닐화된 NA 링커)를 어닐링(예를 들면, DDB-1)시킨다. 일부 양태에서, NA 링커는 mRNA에 광가교결합된다. 특수 양태에서, 리간드 수용체, 예를 들어, 스트렙타비딘을 이후에 로딩한다. 추가의 양태에서, 펩타이드 수용체에 부착된 제2 고 친화성 리간드는 스트렙타비딘에 결합된다. 일부 양태에서, 제2의 고 친화성 리간드/펩타이드 수용체는 바이오틴-푸로마이신 링커, 예를 들면, BPP이다.
- [0203] 이후에, 시험관내 해독을 수행하며 여기서, 펩타이드 수용체는 인접한 해독 생성물과 반응한다.
- [0204] 정제 후 결과는 펩타이드-핵산 X-디스플레이 복합체의 라이브러리이다. 이러한 X-디스플레이 복합체는 이후에 바람직한 양태에서, 정제된 후 역 전사될 수 있다. X-디스플레이 복합체는 당해 분야에 공지된 어떠한 방법, 예를 들면, 친화성 크로마토그래피, 컬럼 크로마토그래피, 밀도 구배 원심분리, 친화성 태그 포획 등에 의해 정제될 수 있다. 바람직한 양태에서, 올리고-dT 셀룰로즈 정제가 사용되며, 여기서, X-디스플레이 복합체는 폴리-A 테일을 갖는 mRNA를 포함하도록 설계된다. 이러한 양태에서, 올리고-dT는 컬럼 또는 정제 장치내에서 셀룰로즈에 공유결합된다. 올리고-dT는 X-디스플레이 복합체내 mRNA의 폴리-A 테일과 상보성 염기 짝짓기에 관여함으로써 정제 장치를 통해 이의 진행을 방해한다. X-디스플레이 복합체는 물 또는 완충제로 후에 용출시킬 수 있다.
- [0205] 역 전사는 바람직한 양태에서, NA 링커, 고 친화성 리간드, 리간드 수용체, 펩타이드 수용체(가능하게는 제2의 고 친화성 리간드에 연결된) 또는 이의 일부 작동가능한 조합과의 연합을 통해 전사된 펩타이드에 비공유결합으로 연결된다.
- [0206] 이후에, 수득되는 정제된 X-디스플레이 복합체는 RNase로 처리하여 나머지 mRNA를 분해한 후, 제2 쇠 DNA 합성에 의해 완전한 cDNA를 생성한다. 바람직한 양태에서, NA 링커내 핵산은 역 전사용 프라이머로서 제공될 수 있음에 주목한다. 따라서, cDNA는 고 친화성 리간드 및 X-디스플레이 복합체의 일부에 부착된 채로 잔존한다.
- [0207] X-디스플레이 복합체는 또한, 고려되는 경우로서, X-디스플레이 복합체가 가공되어 태그를 함유하는 경우, 추가로 정제될 수 있다. 당해 분야에 공지된 어떠한 태그도 X-디스플레이 복합체를 정제하는데 사용할 수 있다. 예를 들면, 다른 것들 중에서 FLAG 태그, myc tac, 히스티딘 태그(His 태그), 또는 HA 태그를 사용하는 것이 가능하다. 바람직한 양태에서, FLAG 태그를 암호화하는 서열을 원래의 DNA 서열내로 가공함으로써 최종의 전사된 단백질은 FLAG 태그를 함유한다.
- [0208] 이후에, 수득되는 X-디스플레이 복합체를 당해 분야에 공지된 어떠한 선택 방법을 사용하여 선택한다. 바람직한 양태에서, 친화성 선택이 사용된다. 예를 들면, 바람직한 결합 표적 또는 항원을 친화성 컬럼에서 사용하기

위한 고체 지지체상에 고정시킬 수 있다. 친화성 크로마토그래피에 유용한 방법의 예는, 모두 이의 전문이 본원에 참조로 인용된, 미국 특허 제4,431,546호, 제4,431,544호, 제4,385,991호, 제4,213,860호, 제4,175,182호, 제3,983,001호, 제5,043,062호에 기술되어 있다. 결합 활성은 표준 면역검정 및/또는 친화성 크로마토그래피로 평가할 수 있다. 촉매적 기능, 예를 들면, 단백질분해적 기능을 위한 X-디스플레이 복합체의 스크리닝은 예를 들면, 미국 특허 제5,798,208호에 기술된 표준 헤모글로빈 플라크 검정을 사용하여 달성할 수 있다. 치료학적 표적에 결합하는 후보물 펩타이드(예를 들면, 항체, 일본 쇠 항체 등)의 능력의 측정은 예를 들면, 제공된 표적 또는 항원에 대한 항체의 결합 속도를 측정하는, 비아코어 장치를 사용하여 시험관내에서 검정할 수 있다.

[0209] 바람직한 양태에서, 선택된 X-디스플레이 복합체는 DNA 성분의 서열분석에 의해 확인할 수 있다. 당해 분야에 공지된 어떠한 서열분석 기술, 예를 들면, 454 서열분석, 상거(Sanger) 서열분석, 합성에 의한 서열 분석, 또는 모두 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제5547835호, 제5171534호, 제5622824호, 제5674743호, 제4811218호, 제5846727호, 제5075216호, 제5405746호, 제5858671호, 제5374527호, 제5409811호, 제5707804호, 제5821058호, 제6087095호, 제5876934호, 제6258533호, 제5149625호에 기술된 방법을 사용할 수 있다.

[0210] 일부 양태에서, 선택을 수회 수행하여 보다 높은 친화성 결합체를 확인하고 또한 경쟁적 결합체 또는 보다 강력한 스트링전시 세척 조건을 사용하여 실행할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 본원에 기술된 과정의 변형을 사용할 수 있음을 인지할 것이다.

[0211] 바람직한 양태에서, 본 발명의 방법은 도 14에 요약된 바와 같이 수행된다.

[0212] 다른 바람직한 양태에서, X-디스플레이 복합체는 도 13 또는 도 16에 묘사된 바와 같이 설계된다.

[0213] 본 발명의 펩타이드 또는 이의 모사체를 함유하는 약제학적 조성물

[0214] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성되고, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제형화된, 펩타이드 하나 또는 이들의 조합(예를 들면, 2개 이상의 상이한 펩타이드)를 함유하는 조성물, 예를 들면, 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 조합 치료요법에서 투여될 수 있는데, 즉, 다른 제제와 조합될 수 있다. 예를 들어, 조합 치료요법은 특수 질병 또는 증상을 치료하는데 유용한 다른 적절한 약제와 조합된 본 발명의 펩타이드 또는 이의 모사체를 포함할 수 있다.

[0215] 본원에 사용된 것으로서, "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 혼용성인 특성의 및 모든 용매, 분산 매질, 피복제, 항세균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 상피 투여(예를 들면, 주사 또는 주입에 의해)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉, 본 발명의 펩타이드 또는 이의 모사체를 물질내에 피복하여 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 다른 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호할 수 있다.

[0216] 본 발명의 약제학적 화합물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용되는 염"은 모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 보유하며 어떠한 바람직하지 않는 독성 효과를 부여하지 않는 염을 말한다[참조: 예를 들면, Berge, S.M., et al.(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19]. 이러한 염의 예는 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 산 부가 염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 인산 등과 같은 비독성 무기산, 및 지방족 모노- 및 디카복실산, 페닐-치환된 알카노산, 하이드록시 알카노산, 방향족산, 지방족 및 방향족 실폰산 등과 같은 비독성 유기산으로부터 기원한 것들을 포함한다. 염기 부가 염은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토 금속으로부터 기원한 것들 및 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 클로린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 비독성 유기 아민으로부터 기원한 것들을 포함한다.

[0217] 특수 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 선택된 펩타이드 또는 이의 모사체는 물 속에 염화나트륨과 함께 용해시켜 생리학적 등장 염 조건을 달성할 수 있다.

[0218] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은), 및 이의 적합한 혼합물, 올리브 오일과 같은 야채 오일, 및 에틸렌 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 피복 물질을 사용하고, 분산제의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하고, 표면활성제를 사용함으로써 유지시킬 수 있다.

- [0219] 이들 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 항원보강제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 예방은 멸균 공정 및 각종 항세균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 혼입물들에 의해 보증할 수 있다. 당, 염화나트륨 등과 같은 등장성 제제를 조성물내로 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가 가능한 약제 형태의 연장된 흡수도 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제의 혼입에 의해 가져올 수 있다.
- [0220] 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 일시적인 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당해 분야에 공지되어 있다. 특정의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 비혼용성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 약제학적 조성물에서 이의 사용이 고려된다. 보체 활성 화합물을 또한 조성물내로 혼입시킬 수 있다.
- [0221] 정제, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제의 고체 용량형은 장 피복물 또는 약제학적 제형 분야에 잘-공지된 다른 피복물과 같은 피복물 및 외층(shell)으로 제조할 수 있다. 이들은 임의로 유백화제를 함유할 수 있거나 이들이 활성 성분(들) 만을 또는 바람직하게는 장관의 특정 부위에 임의로, 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 봉입 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 펩타이드는 또한 경우에 따라 하나 이상의 부형제로 미세-봉입된 형태일 수 있다.
- [0222] 치료학적 조성물은 통상적으로 멸균성이어야 하고 제조 및 저장 조건하에서 안정하여야 한다. 조성물은 액체, 미세유제, 리포솜 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 주문된 구조로 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유하는 용매 또는 분산 매질, 및 이의 적합한 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 피복물을 사용하고, 분산액의 경우에 요구된 입자 크기를 유지시키고 표면활성제를 사용함으로써 유지시킬 수 있다. 많은 경우에, 등장성 제제, 예를 들면, 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 다가알코올, 또는 염화나트륨을 포함할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물내에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성할 수 있다.
- [0223] 액제로서 제형화된 조성물은 예를 들면, 적절한 양의 염을 함유하도록 액제를 제조함으로써 눈에 점적으로 투여하기에 적합하도록 제조할 수 있다.
- [0224] 본 발명의 방법으로 선택된 펩타이드 또는 이의 모사체를 함유하는 리포솜은 문헌[참조: Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-3692 (1985), Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030-4034 (1980), EP 제52,322호, EP 제36,676호; EP 제88,046호; EP 제143,949호; EP 제142,641호; 일본 특허원 제83-118008호, 및 EP 제102,324호, 및 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호, 이의 내용은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다]에 기술된 바와 같이 잘 공지된 방법 중 어느 것에 따라 제조할 수 있다. 리포솜은, 액체 함량이 약 10mol 퍼센트의 콜레스테롤, 바람직하게는 10 내지 40mol 퍼센트 콜레스테롤 범위인 작은(약 200 내지 800 Å) 단층(unilamellar) 유형일 수 있으며, 선택된 비율은 최적 펩타이드 치료요법에 대해 조절된다. 그러나, 본 기재내용을 읽으면, 리포솜 외에 인지질 소포를 또한 사용할 수 있음이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 것이다.
- [0225] 멸균 주사가 가능한 액제는 상기 열거한 성분들 중 하나 또는 이들의 조합과 함께 적절한 용매 속에서 요구되는 양의 활성 화합물을 혼입시킨 후, 경우에 따라, 멸균 미세여과함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산제는 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거한 것들로 부터의 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균 소포내로 혼입함으로써 제조한다. 멸균 주사가 가능한 액제를 제조하기 위한 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 활성 성분과 이의 앞서 멸균-여과된 용액으로부터의 추가의 바람직한 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조: lyophilization)이다.
- [0226] 단일 용량형을 생산하기 위해 담체 물질과 합해될 수 있는 활성 성분의 양은 치료하는 대상체, 및 특수 투여 방식에 따라 변할 것이다. 담체 물질과 합하여 단일 용량형을 생산할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료학적 효과를 생산하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서, 당해 양은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께, 약 0.01 내지 약 99%의 활성 성분, 바람직하게는, 약 0.1 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1 내지 약 30%의 활성 성분의 범위일 것이다.
- [0227] 용량 섭생은 최적의 바람직한 반응(예를 들면, 치료학적 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어, 단일의 거환을 투여할 수 있거나, 몇개의 분할된 투여량을 시간에 걸쳐 투여할 수 있거나 치료 상황의 급박성에 의해 처방되는 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 투여 용이성 및 용량의 균일성을 위해 비경구 조성

물을 용량 단위 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 용량 단위 형은 치료되는 대상체에 대해 단일의 용량으로 적합한 생리학적으로 구별되는 단위를 말하며; 각각의 단위는 요구된 약제학적 담체와 연합된 바람직한 치료학적 효과를 생산하도록 고정된 활성 화합물의 예정된 양을 함유한다. 본 발명의 용량 단위 형을 위한 명세는 (a) 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성할 특수 치료학적 효과 및 (b) 개인에서 민감성을 치료하기 위한 활성 화합물과 같은 화합 분야에서 고유한 제한에 의해 및 이에 따라 직접 좌우된다.

[0228] 본 발명의 펩타이드 또는 이의 모사체의 투여를 위해, 용량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 및 보다 일반적으로 0.01 내지 5 mg/kg의 숙주 체중의 범위이다. 예를 들어, 용량은 0.3 mg/kg의 체중, 1 mg/kg의 체중, 3 mg/kg의 체중, 5 mg/kg의 체중 또는 10 mg/kg의 체중 또는 1 내지 10 mg/kg의 범위일 수 있다. 예시적인 치료 섭생은 주당 1회 투여, 매 2주당 1회, 매 3주당 1회, 매 4주당 1회, 1개월에 1회, 매 3개월당 1회 또는 매 3 내지 6개월당 1회 투여를 포함한다. 본 발명의 잔기를 위한 바람직한 용량 섭생은 정맥내 투여를 통해 1 mg/kg의 체중 또는 3 mg/kg의 체중을 포함하며, 항체는 다음 투여 계획중 하나를 사용하여 제공된다: (i) 6회의 투여에 대해 매 4주마다, 이후 매 3개월마다; (ii) 매 3주마다; (iii) 3 mg/kg의 체중으로 1회 이후 1 mg/kg의 체중으로 매 3주마다.

[0229] 달리, 본 발명의 방법에 의해 선택된 펩타이드 또는 이의 모사체를 서방성 제형으로 투여할 수 있으며, 이 경우 보다 적은 투여 횟수가 요구된다. 용량 및 횟수는 환자에서 투여된 물질의 반감기에 따라 변한다. 투여 용량 및 횟수는, 치료가 예방학적인지 또는 치료학적인지에 따라 변할 것이다. 예방학적 적용의 경우, 비교적 적은 용량을 장기간의 기간에 걸쳐 비교적 흔하지않은 간격으로 투여한다. 일부 환자는 이들의 나머지 생애동안 치료를 계속 제공받는다. 치료학적 적용시, 질병의 진행이 감소되거나 종결되고, 바람직하게는 환자가 질병의 증상의 부분적이거나 완전한 완화를 나타낼 때까지, 비교적 짧은 기간에 비교적 고 용량이 때때로 요구된다. 이후에, 환자에게 예방학적 섭생으로 투여될 수 있다.

[0230] 본 발명의 약제학적 조성물 중 활성 성분 및 소 분자의 실제 용량 수준은 환자에게 유해함이 없이, 특수 환자, 조성물 및 투여 모드에 대한 바람직한 치료학적 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 변할 수 있다. 선택된 용량 수준은 사용된 본 발명의 특수 조성물, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특수 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용된 특수 조성물과 함께 사용된 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료하는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강상태 및 이전 의학 기록, 및 의학 분야에 잘 공지된 유사 인자를 포함하는 각종 약력학적 인자에 의존할 것이다.

[0231] 본 발명의 방법에 의해 선택된 펩타이드 또는 이의 모사체의 "치료학적 유효 용량"은 바람직하게는 질병 증상의 중증도에 있어서의 감소, 질병 증상이 없는 기간의 횟수 및 기간에 있어서의 증가, 또는 질병 고통으로 인한 장애 또는 곤란의 예방을 초래한다. 예를 들어, 종양의 치료의 경우, "치료학적 유효 용량"은 바람직하게는 치료하지 않는 대상체에 비해 세포 성장 또는 종양 성장을 적어도 약 10% 또는 20%, 보다 바람직하게는 적어도 약 40%, 심지어 보다 바람직하게는 적어도 약 60%, 및 여전히 보다 바람직하게는 적어도 약 80% 억제한다. 종양 성장을 억제하기 위한 화합물의 능력은 사람 종양에 있어서 효능의 예측치인 동물 모델 시스템에서 평가할 수 있다. 달리, 조성물의 이러한 특성은 숙련자에게 공지된 검정에 의한 시험관내 억제와 같은, 억제하는 화합물의 능력을 시험함으로써 평가할 수 있다. 치료학적 유효량의 치료학적 화합물은 대상체에서 종양 크기를 감소시키거나, 또한 증상을 완화시킬 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 대상체의 체격, 대상체의 증상의 중증도, 및 선택된 특수 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자들을 기초로 하여 이러한 양을 측정할 수 있을 것이다.

[0232] 본 발명의 조성물은 당해 분야에 공지된 하나 이상의 각종 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여할 수 있다. 숙련가에 의해 인지되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 유형은 바람직한 결과에 따라 변할 것이다. 본 발명의 결합 잔기에 대한 바람직한 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척수 또는 예를 들면, 주사 또는 주입에 의한 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, 어절 "비경구 투여"는 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 일반적으로 주사에 의한 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 관절강내, 안와내, 심장내, 피내, 경피내, 경기관, 피하, 피부밑, 관절내, 피막밑, 지주막하, 척주관속, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0233] 달리, 본 발명의 펩타이드 또는 이의 모사체를 국소, 표피와 같은, 비-경구 경로 또는 점막내 투여 경로, 예를 들면, 비강내, 경구, 질내, 직장내, 설하 또는 국소를 통해 투여할 수 있다.

[0234] 활성 화합물은 삽입물(implant), 경피 패취 및 미세캡셀화 전달 시스템을 포함하는, 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해가능한, 생혼화성 중합체, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가무수물, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제형의 많은

제조 방법은 특허되어 있거나 당해 분야의 숙련자에게 일반적으로 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978].

[0235] 치료학적 조성물은 당해 분야에 공지된 의학 장치를 사용하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 바람직한 양태에서, 본 발명의 치료학적 조성물은 미국 특허 제5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제4,596,556호에 기술된 장치와 같은, 침이 없는 피하 주사 장치로 투여할 수 있다. 본 발명에 유용한 잘-공지된 이식물 및 모듈의 예는 의약을 조절된 속도로 조제하기 위한 이식가능한 미세-주입 펌프를 기술하고 있는 미국 특허 제4,487,603호, 의약을 피부를 통해 투여하기 위한 치료학적 장치를 기술하고 있는 미국 특허 제4,486,194호; 의약을 정밀한 주입 속도로 전달하기 위한 의약 주입 펌프를 기술하고 있는 미국 특허 제4,447,233호; 연속적인 약물 전달을 위한 다양한 유동 이식가능한 주입 장치를 기술하고 있는 미국 특허 제4,447,224호; 다중-챔버 구획을 갖는 삼투압 약물 전달 시스템을 기술하고 있는 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투압 약물 전달 시스템을 기술하고 있는, 미국 특허 제4,475,196호를 포함한다. 이들 특허들은 본원에 참조로 인용된다. 이식물, 전달 시스템 및 모듈과 같은 많은 다른 것들은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0236] 도 1은 본원에 기술된 방법론의 하나의 양태를 나타낸다.

도 2는 cDNA를 편리하게 프리임(prime) 할 수 있고 반대쪽 말단상에 푸로마이신 또는 유도체 또는 소 분자를 수반할 수 있는 2개의 3' 말단을 갖는 역전된 극성 프라이머인 진전된 프라이머를 사용하는 방법론을 나타낸다.

도 3은 줄기 루프 다양성이 있고 역으로 중복되어 cDNA를 편리하게 프라이밍할 수 있는 진전된 프라이머를 사용하는 방법론을 나타낸다.

도 4는, FK506 소 분자가 연결된 핵산에 비 공유결합으로 결합함으로써 개선된(발전된) 표현형(폴리펩타이드)를 이의 암호화 유전형(핵산)과 연결시킬 수 있는 FK12BP 단백질에 폴리펩타이드가 융합된, 항체 중쇄 가변 영역의 구조/기능을 개선시키거나 발전시키는데 사용되는 방법론의 하나의 양태를 나타낸다.

도 5는 측쇄 올리고뉴클레오타이드 링커 및 공유결합으로 부착된 펩타이드 수용체를 포함하는 상보성 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 시험관내 디스플레이 방법론의 하나의 양태를 나타낸다.

도 6은 펩타이드 수용체에 공유결합으로 부착된, 측쇄 올리고뉴클레오타이드 링커를 사용하는 시험관내 디스플레이의 방법론의 하나의 양태를 나타낸다.

도 7은 고 친화성 리간드 및 리간드 수용체를 사용하는 시험관내 디스플레이의 방법론의 하나의 양태를 나타낸다.

도 8은, 리간드 수용체가 펩타이드 수용체에 공유결합으로 연결된, 고 친화성 리간드 및 리간드 수용체를 사용하는 시험관내 디스플레이의 방법론의 하나의 양태를 나타낸다.

도 9는, 리간드 수용체가 펩타이드 수용체에 비-공유결합으로 연결된, 고 친화성 리간드 및 리간드 수용체를 사용하는 시험관내 디스플레이의 방법론의 하나의 양태를 나타낸다.

도 10은 고 친화성 리간드 및 리간드 수용체를 사용하는 시험관내 디스플레이의 방법론의 하나의 양태를 나타내며, 여기서, 제1 리간드 수용체 분자는 제2(비-인지체) 고 친화성 리간드에 공유결합으로 연결되어 있고, 여기서, 제1 리간드 수용체 분자는 핵산에 공유결합으로 연결된 인지체 제1 고 친화성 리간드에 결합할 수 있으며, 여기서, 제2 고 친화성 리간드는 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 융합된 인지체 제2 리간드 수용체에 결합할 수 있다.

도 11은 고 친화성 리간드 및 리간드 수용체를 사용하는 시험관내 디스플레이의 방법론의 하나의 양태에서 사용된 개개 성분들의 비-제한적 예를 나타낸다.

도 12는 고 친화성 리간드 및 리간드 수용체를 사용한 시험관내 디스플레이의 방법론의 하나의 양태를 위한 핵산/단백질 복합체의 비-제한적인 조립 순서를 나타낸다.

도 13은 바람직한 X-디스플레이 복합체의 설계를 나타낸다.

도 14는 VH 라이브러리를 제조하고, 디스플레이 복합체를 조립하며, 디스플레이 복합체를 선택하고 정제하기 위한 예시적인 개략도를 나타낸다.

도 15는 VH 라이브러리를 위한 시료 단일 클론을 나타낸다. 나열은 전사 및 해독 개시 서열, VH 서열, Cu 서열, FLAG 태그 서열, 링커(예를 들면, NA 링커)에 대해 상보성인 DNA 분절을 나타낸다.

도 16은 디스플레이 방법론의 바람직한 양태의 단계들을 나타낸다.

도 16A는 우선 상보성 쇠 짝짓기 및 소랄렌 연결을 통해 링커/RT 프라이머(NA 링커)에 부착된 mRNA 분자(적절한 링커, 태그, 상보성 영역 및 폴리-A 테일을 함유)를 포함하는 X-디스플레이 복합체를 묘사한다. NA 링커는 또한 스트렙타비딘 분자와 연합된 바이오틴(B) 분자에 공유결합으로 결합되어 있다. 스트렙타비딘은 해독된 단백질에 부착된 푸로마이신에 공유결합으로 자체 결합된, 제2 바이오틴 분자와 연합되어 있다.

도 16A는 역 전사(단계 1) 및 RNA 분해(단계 2)를 묘사한다. 도 16B는 DNA/RNA 하이브리드를 창조하기 위한 제 2 쇠 합성(단계 4)를 묘사한다. 도 16B의 최종 묘사는 최종의 dsDNA X-디스플레이 복합체(즉, X-디스플레이 복합체)이다.

도 17은 강력한 라이브러리 구성원 및 일부 양태에서, 프라이머가 454 서열분석과 함께 사용될 수 있는 방법을 나타낸다.

도 18은 VH 라이브러리 구성원의 예시적인 분절을 나타낸다.

도 19는 디스플레이 라이브러리 구성원의 예시적인 분절을 나타내며 프라이머로부터의 말단 서열을 추가로 나타낸다(참조: 도 17).

도 20은 디스플레이 라이브러리 구성원의 예시적인 분절을 나타내며 또한 프라이머로부터 TMV UTR 및 C-mu 영역의 예시적인 서열을 제공한다.

도 21은 서열분석을 위해 선택된 클론을 증폭시키기 위한 프라이머의 가능한 정렬을 나타낸다.

도 22는 선택을 통해 라이브러리로부터 본 발명의 하나의 양태의 진행을 나타내며, 당해 방법을 반복함으로써 하나의 라운드에서 선택된 핵산/단백질이 X-디스플레이 복합체 형성 및 선택의 후속적인 라운드들을 위한 라이브러리를 생성하는데 사용될 수 있음을 나타낸다.

도 23은 수회의 선택 라운드를 라이브러리를 재생하거나 선택 생성물을 증폭하지 않고 사용하는 본 발명의 하나의 양태를 나타낸다.

도 24는 mRNA로부터 VH 및 VL 라이브러리 설계의 하나의 방법을 나타낸다.

도 25는, 친화성 선택시 사용된 표적 분자가 고체 지지체 상에 고정되는 선택 방법의 하나의 예시적인 양태를 나타낸다.

도 26은, 친화성 선택에 사용된 표적 분자가 세포 표면상에서 발견되는 선택 방법의 하나의 예시적인 양태를 나타낸다. 당해 양태에서, 디스플레이 복합체는 복합체를 발현하지 않는 세포에 대해 선택되며(예를 들면, 세포에 결합하지만 목적한 표적에 결합하지 않는 복합체를 제거하기 위하여), 이후 목적한 표적(즉, 특이적인 결합 인자를 확인하기 위해)을 발현하는 세포에 대해 선택된다.

도 27은, 공급원 태그가 핵산(예를 들면, 암호화된 DNA의 공급원을 확인하기 위하여) 및 상이한 선택 라운드들로부터 핵산을 태그하기 위해 사용된 암호화 고정 공급원(예를 들면, 하나의 서열분석 수행을 위한 상이한 선택 라운드들로부터 핵산을 혼주하는 경우 유용한)내로 혼입되는 DNA X-디스플레이 복합체(즉, DNA-단백질 융합체)를 나타낸다.

도 28은 DNA X-디스플레이 복합체(즉, DNA-단백질 융합체) 및 N6 프라이머의 첨가를 나타낸다.

도 29는 서열 분석 개략도의 하나의 양태를 나타내는 흐름도 차트를 나타낸다.

도 30은 mRNA 전사, 정제 및 가교결합 과정의 예시적인 결과를 나타낸다.

도 31은 mRNA 전사, 정제 및 스트렙타비딘 로딩 과정의 예시적인 결과를 나타낸다.

도 32는 RNaseH 처리 및 용출 과정 후 예시적인 결과를 나타낸다.

도 33은 RNaseH 처리 및 용출 과정 후 예시적인 결과를 나타낸다.

도 34는 RT-PCR 및 2nd 쇠 합성 과정 후 예시적인 결과를 나타낸다.

도 35는 하나의 서열분석 수행내로 다수의 선택 라운드를 혼주하도록 하는 라이브러리 설계에 사용될 수 있는 혼주물 태그화를 나타낸다.

도 36은 VH 라이브러리의 제조를 위한 예시적인 공여자 세포를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0237] 본 발명을 또한 다음 실시예에서 나타내며, 이는 제한하는 것으로 고려되지 않아야 한다.

[0238] **예시**

[0239] 실시예 전체에서, 다음 물질 및 방법이 달리 기술하지 않는 한 사용된다.

[0240] **물질 및 방법**

[0241] 일반적으로, 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 당해 분야의 기술내에 있고 문헌[참조: 예를 들면, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); DNA Cloning, Vols. 1 and 2, (D.N. Glover, Ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, Ed. 1984); PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucage, Ed. John Wiley & Sons (1999) (Editor); Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure, Neidle, Ed., Oxford Univ Press (1999); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Academic Press (1990); PCR Essential Techniques: Essential Techniques, Burke, Ed., John Wiley & Son Ltd (1996); Ike PCR Technique: RT-PCR, Siebert, Ed., Eaton Pub. Co. (1998); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Bioogy), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992); Large-Scale Mammalian Cell; Culture Technology, Lubiniecki, A., Ed., Marcel Dekker, Pub., (1990)]에 설명된 화학, 분자 생물학, 재조합체 DNA 기술, PCR 기술, 면역학(특히, 예를 들면, 항체 기술), 발현 시스템(예를 들면, 세포-유리된 발현, 과학자 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 및 대량화), 및 모든 필수적인 세포 배양의 통상의 기술을 사용한다.

[0242] 본 발명의 조성물 및 방법은 일부 양태에서, 예를 들면, 본원에 참조로 인용된, 미국 특허 제7,195,880호; 제 6,951,725호; 제7,078,197호; 제7,022,479호, 제6,518,018호; 제7,125,669호; 제6,846,655호; 제6,281,344호; 제6,207,446호; 제6,214,553호; 제6,258,558호; 제6,261,804호; 제6,429,300호; 제6,489,116호; 제6,436,665호; 제6,537,749호; 제6,602,685호; 제6,623,926호; 제6,416,950호; 제6,660,473호; 제6,312,927호; 제5,922,545호; 제6,194,550호; 제6,207,446호; 제6,214,553호; 및 제6,348,315호에 기술되어 있다.

[0243] **실시예**

[0244] 본 기술내용을 추가로 제한하는 것으로 고려되지 않는, 다음 실시예로 또한 나타낸다.

[0245] **실시예 1: 미가공(naive) 항체 라이브러리의 설계 및 작제**

- [0246] 세포 공급원
- [0247] mRNA는 라이브러리의 다양성을 보증하기 위하여, 총 624명의 상이한 건강한 개인의 전 골수(10명의 공여자), 비장세포(13명의 공여자) 및 말초 단핵 세포(601명의 공여자)로부터 획득하였다. VH 라이브러리의 고정된 다양성은 10^9 내지 10^{10} 이고 VL 라이브러리는 10^6 내지 10^7 이다.
- [0248] 라이브러리 작제
- [0249] RT-PCR을 VH 및 VL 라이브러리 작제에 사용하였다.
- [0250] 제1 채 cDNA를 IgM, IgG 및 IgA(CD1, CD1 및 CD1)의 H 채 고정 영역, 및 카파 및 람다(CD1 및 CD1)의 L 채 고정 영역으로부터의 특수 프라이머를 사용하여 합성하였다.
- [0251] 가변 H 채 라이브러리 작제를 위해, 다수의 센스 프라이머(변성 프라이머)를 VH1-7 계열 구성원의 FR1 영역으로부터 상부 UTR 서열(VH1-7UTR)을 사용하여 설계하였다. VH에 대한 안티-센스 프라이머를 cDNA 합성을 위한 프라이머(CD2, CD2 및 CD2)에 대해 찾은 고정 영역으로부터 설계하였다. 가변 경쇄 라이브러리 작제를 위해, 다수의 센스 프라이머를 링커 서열의 상부 12개 아미노산을 지닌 각각의 계열의 VD 및 VD FR1 영역으로부터 설계하여 일본쇄 Fv 서플링을 허용하였다. D 및 D 유전자 증폭용 항-센스 프라이머를 동일한 CD2 하부를 지닌 CD1(CD2) 또는 JD에 대해 찾은 고정 영역으로부터 설계하였다. 모든 IgM 및 IgG 계열의 조립된 scFv는 경우에 따라 하부 말단에서 동일한 CD2를 가질 것이다.
- [0252] VH 라이브러리 작제를 위해, PCR을 CD2, CD2, CD2 및 VH1-7 UTR을 B 세포의 모든 3개의 공급원에 대한 개개의 쌍으로 사용하여 수행하고 겔 정제하였다. 정제한 후, 3개의 공급원으로부터 증폭시킨 개개의 계열을 혼주시키고 7개(VH1-7)의 IgM 라이브러리, 7개(VH1-7)의 IgG 라이브러리 및 7개의 IgA 라이브러리(VH1-7)를 생성하였다. VL 라이브러리 작제를 위해, PCR을 CD2 및 VD 또는 JCD2 혼합물 및 3개의 B 세포 공급원에 대해 VD를 사용하여 수행하였다. 겔 정제 후, 상이한 공급원으로부터의 VD 및 VD 라이브러리를 혼주하여 VD 및 VD 라이브러리를 생성하였다.
- [0253] 라이브러리 변형
- [0254] IgM, IgG, IgA VH 라이브러리 및 VL 라이브러리를 또한 변형시켜 5' 말단에서 시험관내 전사, 해독 시그널 서열 및 3' 말단에서 태그 서열을 수반하도록 하였다. 이들 VH 라이브러리를 스트랩타비딘 디스플레이 라이브러리로 제조하도록 준비하였다.
- [0255] 라이브러리 작제용 올리고 서열
- [0256] 표 2에 설정된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 VH 및 VL X-디스플레이 라이브러리를 생성하였다.
- [0257] 실시예 2: 스트랩타비딘 디스플레이 라이브러리의 생산 및 사용
- [0258] 당해 실시예는 본 발명의 스트랩타비딘 디스플레이 라이브러리의 생산 및 사용을 기술한다.
- [0259] 물질 및 방법
- [0260] 일반적으로, 본 발명의 실시는, 달리 나타내지 않는 한, 화학, 분자 생물학, 재조합체 DNA 기술, 면역학(특히, 예를 들면, 항체 기술)의 통상의 기술, 및 폴리펩타이드 제조의 표준 기술을 사용할 수 있다[참조: 예를 들면, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); 및 Current

Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992)].

- [0261] 완충제
- [0262] 10X 화학적 연결 완충제: 250 mM 트리스 pH7 및 1M NaCl
- [0263] 1X 올리고 dT 결합 완충제: 100 mM 트리스 pH8, 1M NaCl, 및 0.05% 트리톤 X-100
- [0264] 2X 올리고 dT 결합 완충제: 200 mM 트리스 pH8, 2M NaCl, 및 0.1% 트리톤 X-100
- [0265] 1X flag 결합 완충제: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 및 0.025% 트리톤 X-100 또는
- [0266] 1X PBS 및 0.025% 트리톤 X-100
- [0267] 5X flag 결합 완충제: 250 mM HEPES, 750 mM NaCl, 및 0.125% 트리톤 X-100 또는 5X PBS 및 0.125% 트리톤 X-100

- [0268] 사용된 시약의 공급원
- [0269] 메가스크립트(Megascript) T7: 암비온(Ambion)[제조원 오스틴(Austin), 텍사스 소재] PH 1334
- [0270] 레틱 분해물(Retic lysate) IVT: 암비온(오스틴, 텍사스 소재) PH1200
- [0271] UC 마스터 혼합물-met: 암비온(오스틴, 텍사스 소재) PH 1223G
- [0272] 슈퍼스크립트(Superscript) II RNaseH-RT: 인비트로젠(Invitrogen)(미국 캘리포니아 칼스바드 소재) #18064-014
- [0273] NAP-25 컬럼: 아머삼 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)(미국 캘리포니아 서니베일 소재) #17-0852-01
- [0274] 올리고 dT 셀룰로즈 제7형: 아머삼 파마시아 바이오테크(미국 캘리포니아 서니베일 소재) #27-5543-03
- [0275] 항-flag M2 아가로즈 친화성 겔: 시그마(Sigma)(미국 미네소타 세인트 루이스 소재) #A2220
- [0276] flag 펩타이드: 시그마(미국 미네소타 세인트 루이스 소재) #F3290
- [0277] dNTP: 아머삼 파마시아 바이오테크(미국 캘리포니아 서니베일 소재) #27-2035-01
- [0278] 허큘라제 핫스타트(Herculase Hotstart) DNA 폴리머라제: 스트라타젠(Stratagene)(미국 캘리포니아 라 졸라 소재) 600312-51
- [0279] 미니 스핀 컬럼: 바이오라드(Biorad)(미국 캘리포니아주 허큘레스 소재) #732-6204
- [0280] 초순수(Ultrapure) BSA: 암비온(미국 캘리포니아 포스터 시티 소재) #2616
- [0281] 셰어드(Sheared) 연어 정자 DNA: 암비온(미국 캘리포니아 포스터 시티 소재) #9680
- [0282] 링커: PBI, DDB, BPP: 트리링크 바이오테크놀로지스, 인코포레이티드(Trilink BioTechnologies, Inc.)(미국 캘리포니아 산 디에고 소재)
- [0283] H₂O: 옴니퓨어(OmniPur)(미국 뉴저지 김스타운 소재) #9610
- [0284] 2M KCl: Usb(미국 오하이오 클리브랜드 소재) #75896
- [0285] 1M MgCl₂: Usb(미국 오하이오 클리브랜드 소재) #78641
- [0286] 0.5M EDTA: Usb(미국 오하이오 클리브랜드 소재) #15694
- [0287] 1M 트리스 pH8: Usb(미국 오하이오 클리브랜드 소재) #22638
- [0288] 1M 트리스 pH7: Usb(미국 오하이오 클리브랜드 소재) #22637
- [0289] 5M NaCl: Usb(미국 오하이오 클리브랜드 소재) #75888

- [0290] 1M HEPES: Usb(미국 오하이오 클리브랜드 소재) #16924
- [0291] 퀴아릭 겔 추출 키트: 퀴아겐(Qiagen)(미국 캘리포니아 발렌시아가 소재) #28706
- [0292] 6% TBE-우레아 겔: 인비트로젠(Invitrogen)(미국 캘리포니아 칼스바드 소재) EC6865BOX
- [0293] 4-16% NativePAGE 겔: 인비트로젠(미국 캘리포니아 칼스바드)
- [0294] 특수 시약 제조
- [0295] 올리고 dT 셀룰로즈(최종 농도: 100 mg/ml)
- [0296] 2.5 g의 올리고 dT 셀룰로즈를 25 ml의 0.1N NaOH와 50 ml의 튜브 속에서 혼합하였다. 혼합물을 1500 rpm에서 3분 동안 회전시킨 후, 수득되는 상층액을 버린다. 올리고 dT 셀룰로즈를 함유하는 수득되는 펠렛을 25 ml의 1X 올리고 dT 결합 완충제로 세척한 후 1500 rpm에서 3분 동안 회전시켜 다시 침전시켰다. 수득되는 상층액을 다시 펠렛으로부터 분리하여 버렸다. 이 세척 단계를 3회 이상 반복하였다. 마지막 세척 후, 수득되는 상층액의 pH를 측정하였다. pH는 세척 완충제(~ pH 8.5)과 동일하여야 한다. 이후에, 올리고 dT 셀룰로즈를 함유하는 펠렛을 상층액으로부터 분리하고 25 ml의 1X 올리고 dT 결합 완충제 속에 4°C에서 저장하기 전에 재-현탁시켰다.
- [0297] M2 아가로즈 제조
- [0298] 25 ml의 M2 아가로즈 슬러리를 50 ml의 튜브로 이전시켰다. 5분 동안 1000 RPM에서 벡크만 원심분리기(Beckman centrifuge) 속에서 회전시킨 후, 상층액을 분리하여 버렸다. M2 아가로즈를 함유하는 수득되는 펠렛을 하나의 컬럼 용적의 글리신 10mM pH 3.5으로 재-현탁시키고 5분 동안 1000 RPM에서 회전시켰다. 수득되는 현탁액을 다시 버렸다. 이후에, 아가로즈 펠렛을 하나의 컬럼 용적의 1X flag 결합 완충제로 재-현탁시켰다. 혼합물을 5 분동안 1000 RPM에서 회전시키고 수득되는 현탁액을 버렸다. 당해 세척 단계를 3회 반복한 후, 펠렛을 하나의 컬럼 용적의 1X 결합 완충제(1 mg/ml의 BSA 및 100µg/ml의 sssDNA 함유)와 함께 재-현탁하였다. 혼합물을 1 시간 동안 또는 밤새 4°C에서 텀블링시켜 2ml 분획 중 분취량으로 분리하고 4°C에서 저장하였다.
- [0299] VH 라이브러리의 증폭
- [0300] VH 라이브러리를 증폭시키기 위한 예시적인 방법을 하기에 제공한다:
- [0301] 프라이머:
- [0302] 5' 프라이머: S7(T7TMVUTR)
- [0303] 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA-3'(서열 번호: 52)
- [0304] 5'-프라이머: S7a(T7TMVUTR AUG)
- [0305] 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAATG-3'(서열 번호: 53)
- [0306] 3' 프라이머: XB-S5-1(Cµ flagA20 + 서열이 가해진 SA 디스플레이)
- [0307] 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAT AGC GGA TGC TAA GGA CGA CTGTGTCGTCGTCCTTGTAGTC GGTGGGGCGGATGACTCCC-3'(서열 번호: 54)
- [0308] 역 프레임 1(프라이머에 대해 상보성인 암호화 쇄의 해독):
- [0309] 1 G S A S A P T D Y K D D D D K S S L A S A I (정지) K K K K K K (서열 번호: 55)
- [0310] 반응물 설정:

| | | |
|--------|------------------------------|------------|
| [0311] | 10X 헤르쿨라제 완충제(제조원: 스트라타젠) | 50 μ l |
| [0312] | 10 mM dNTP | 10 μ l |
| [0313] | S7 (5 μ M) | 20 μ l |
| [0314] | S5-1 (5 μ M) | 20 μ l |
| [0315] | VH 라이브러리 (1 내지 6 계열) | 40 ng |
| [0316] | H ₂ O | X μ l |
| [0317] | 헤르쿨라제(제조원: 스트라타젠) | 10 μ l |
| [0318] | ----- | |
| [0319] | 500 μ l (50 μ l/반응물) | |

[0320] 온도 주기 프로그램:

| | | |
|--------|----------|-------|
| [0321] | 95°C/3분 | 1 주기 |
| [0322] | 95°C/30분 | ┌ |
| [0323] | 50°C/30초 | 20 주기 |
| [0324] | 72°C/1분 | └ |
| [0325] | 72°C/10분 | 1 주기 |

[0326] 50°C의 T_m은 대략치이며 PCR 프라이머의 선택에 의존한다.

[0327] 라이브러리 정제:

[0328] 증폭된 VH 라이브러리 DNA를 2% 아가로스 겔상에서 분리하였다. 400bp 밴드를 겔 단면으로부터 퀴아퀵 겔 추출 키트(Qiaquick Gel Extraction Kit)(제조원: 퀴아젠 #28706, 캘리포니아 발렌시아가 소재)를 사용하여 DNA 추출용 UV 광하에서 절단하고 300 μ l의 H₂O 속에서 재구성하였다. 5 μ l의 정제된 DNA를 2% E-겔 상에서 전기영동에 적용하였다. 당해 회수율은 ~80%로 예측되었다.

[0329] 전사

[0330] 반응물 설정(MEGAscript kitTM, 암비온 PH 1334, 미국 캘리포니아 포스터 시티 소재)

[0331] 제1 라운드의 라이브러리 생산을 위해, 완전한 규모의 RNA 전사(500 μ l)가 추천된다. 반응 용적은 후기 라운드에서 규모 축소될 수 있다.

| | | |
|--------|---------------------------|-------------|
| [0332] | PCR 생성물 (5 내지 10 μ g) | 200 μ l |
| [0333] | 10X 반응 완충제 | 50 μ l |
| [0334] | ATP (75 mM) | 50 μ l |
| [0335] | CTP (75 mM) | 50 μ l |
| [0336] | GTP (75 mM) | 50 μ l |
| [0337] | UTP (75 mM) | 50 μ l |
| [0338] | T7 폴리머라제 | 50 μ l |

[0339]

500 μ l

총

[0340]

항온처리

[0341]

상기와 같은 반응 혼합물을 37°C에서 1 내지 2시간 동안, 또는 바람직하게는 밤새 항온처리하였다.

[0342]

정제

[0343]

예시적인 정제 방법은 하기 제공된 NAP-25 컬럼상에서의 분획화이다. NAP 10 및 NAP 5 컬럼을 소 규모 생산의 정제를 위해 사용할 수 있으며, 이 경우, 분획 용적은 상응하게 변할 수 있다.

[0344]

NAP-25 컬럼을 사용하는 정제 과정의 경우, 25 μ l의 Dnase I을 매 500 μ l의 전사 반응물에 가할 수 있다. 혼합물은 37°C에서 5분 동안 항온처리 한 후, 500 μ l의 페놀-클로로포름-이소아밀알코올을 혼합물에 가한 경우, 페놀 추출할 것이다. 이후에, 혼합물을 30초 동안 와동시킬 수 있다. 혼합물을 5분 동안 원심분리한 후, 수성 상을 회수할 수 있다. 당해 수성 상의 로딩 전에, NAP-25 컬럼은 10 mL dH₂O 점적을 컬럼에 떨어뜨려 예비-세척할 수 있다. 이후에, 추출된 전사 혼합물을 세척 컬럼에 로딩하고 컬럼내로 수행할 수 있다. 이후에, 800 μ l의 dH₂O를 컬럼에 가하고 통과액을 수집할 수 있다. 당해 용출 과정을 5회(E1-E5) 반복하고 수집된 시료내 RNA 농도를 분광광도계 상에서 A₂₆₀으로 측정할 수 있다. 2 μ l의 시료를 2% E-겔 내지 QC 상에서 전기영동에 적용시킬 수 있다. 대부분의 RNA를 함유하는 분획을 연결(E3는 소량을 함유하고, E4는 피크 분획이며, E5는 RNA 및 유리된 NTP의 혼합물을 함유한다)에 사용할 수 있다.

[0345]

RNA의 농도를 교정하기 위해, 5 μ l의 각각의 용출물을 995 μ l의 H₂O과 혼합물의 OD를 측정하기 전에 혼합할 수 있다.

[0346]

OD X 40 X 800 μ l X 1000

[0347]

RNA의 nmol = -----

[0348]

330 X 400 X 5 μ l

[0349]

대체 RNA 정제 과정(LiCl 침전)은 하기에 예시한다:

[0350]

500 μ l의 10 M LiCl을 매 500 μ l의 전사 반응물에 가한 후 당해 혼합물을 -20°C에서 30분 내지 1시간 동안 냉동시켰다. 이후에, 혼합물을 원심분리에 최대 속도로 20분 동안 적용시킬 수 있다. 수득되는 상층액은 버려질 것이며, 펠렛은 50 μ l의 3M NaOAc 및 50 μ l의 dH₂O 속에 재현탁시킬 수 있다. 표준 EtOH 침전을 수행할 수 있다. 수득되는 펠렛을 100 μ l의 dH₂O 속에 용해하고 RNA 농도를 퀴빗(Qubit)을 사용하여 측정할 수 있다.

[0351]

광교연결

[0352]

2개 유형의 소랄렌 연결인자를 사용한다: 스트랩타비딘 조립에 사용될 바이오틴 잔기를 함유하는 2'0-Me RNA 링커 PBI 및 DNA 링커 DDB-1.

[0353]

XB-PBI (SA/DNA 디스플레이 링커 OMe RNA/DNA):

[0354]

5'-(소랄렌 C6) u agc gga (바이오틴-dT)gc uaa ggA CGA -3'

- [0355] XB-DDB-1 (DNA 디스플레이 링커):
- [0356] 5'-(소랄렌 C6) (C7-NH2-EZ 바이오틴) T AGC GGA TGC TAA GGA CGA -3'
- [0357] 소랄렌 C6
- [0358] u, a, g, c = 2-MeO-RNA
- [0359] A, C, G = 표준 테옥시 아미디트
- [0360] C7-NH2-아미노 스페이서 7
- [0361] EZ-바이오틴, 피어스 EZ-연결 TFP-스페이서-바이오틴
- [0362] 역 프레임 1(암호화 쇠내에서 나타나는 것으로서 링커 영역의 해독): S S L A S A
- [0363] **링커는 광-민감성이며 알루미늄 호일 등으로 광으로부터 보호될 필요가 있다.
- [0364] 반응물 설정에서, 링커/RNA의 비는 1.5:1(최대) 내지 1.1:1(충분)일 수 있다.
- [0365] 1 라운드 반응에서, 대규모 생산(1 내지 2 nmol의 RNA)이 충분한 다양성을 회수하기 위해 제안된다. 말기 라운드에서, RNA 도입은 100 내지 600 pmol로 감소될 수 있다.
- [0366] RNA 1 nmol
- [0367] 링커 (1mM) 1.1 μ l
- [0368] 10 X 화학적 연결 완충제 10 μ l
- [0369] -----
- [0370] 첨가된 dH₂O 100 μ l가 되도록 하는 양(10 pmol RNA /최종 μ l)
- [0371] (연결 반응물 중 RNA의 최종 농도는 3 내지 15 pmol/ μ l에서 작업한다. 연결 반응물 용적은 변할 수 있다.)
- [0372] PCR 열순환기내에서 어닐링하기 위해, 시료를 85°C에서 30초 동안 및 4°C에서 0.3°C/초의 속도로 향온처리할 수 있다.
- [0373] 조사를 위해, 1 μ l의 100 mM DTT를 어닐링된 연결 혼합물에 가할 수 있다. 혼합물을 0.5 ml의 에펜도르프 튜브 (eppendorf tube)의 얇은 벽에 이전시키거나 동일한 PCR 튜브 속에 유지시킬 수 있다. 조사 과정은 수동유지된 다중과장 UV 램프[제조원: 유브리피 닷 컴(Uvp.com), 캘리포니아 업랜드 소재, #UVGL-25]를 사용하여 "장 과장"(365 nm)에서 6분 동안 실온으로 수행할 수 있다. 약 50 내지 90%의 RNA가 정제 요구도로 연결될 것으로 예측될 것이다.
- [0374] 연결된 RNA의 QC를 위해, 시료를 전기 영동을 위해 6% TBU 겔에 적용시켜 연결 효능을 점검할 수 있다. 상세하게는, 6% TBU 겔을 300V하에 15분 동안 예비-수행한 후, 콤비(comb)를 제거하고 웰을 완전히 플러싱할 수 있다. 이후에, 각각의 웰의 경우 약 10 내지 15pmol의 유리되거나 연결된 RNA를 2X 로딩 완충제(전사 키트로부터의)과 혼합하고 함께 90°C에서 3분 동안 가열한 후, 빙상에서 급냉시킬 수 있다. 이후에, 예비-가열된 유리 및 연결된 RNA 둘다를 전기영동을 위해 300V에서 예비-가열된 겔의 벽에 청색 염료가 바닥에 도달할 때까지 로딩시킬 수 있다.
- [0375] 예시적인 실험을 도 30에서와 같이 수행하였다. 상세하게는, KDR mRNA를 시험관내 전사시키고 LiCl 침전에 의해 반응물로부터 정제하였다. 1 당량의 PBI 링커를 mRNA 시료에 85°C로 가열한 후 X-연결 완충제 속에서 4°C까지 서서히 냉각시킴으로써 어닐링하였다. DTT를 1 mM의 최종 농도로 가하였다. 시료를 365 nm의 과장에서 상이한 양의 시간 동안 향온처리한 후, 6% TBU 변성 겔 상에서 분해하였다. 상은 겔의 UV 음영이다. 도 30에 나타난 바와 같이, 가교결합은 5분 조사 후 관측된다(레인 7). 추가로 6분 조사를 광교차연결에 사용하였다.
- [0376] 스트렙타비딘의 로딩
- [0377] 스트렙타비딘은 이의 리간드 바이오틴을 예상외의 고 친화성, 10⁻¹⁵ M의 Kd로 결합시키는 현저한 안정한 사합체

단백질이다.

- [0378] A. PBI 링커 사용
- [0379] RNA에 대한 PBI 링커의 O-Me RNA 일부의 고 T_m으로 인하여, 원래의 100 mM NaCl 완충제(1x X-연결 완충제에서와 같이)를, 물로 5 내지 10x 희석시킨, 10 내지 20 mM 염에 대해 희석하는 것이 추천된다. 1/2 내지 1/4 당량의 스트렙타비딘[제조원: 프로자임(Prozyme), 미국 캘리포니아 산 린드로 소재] 용액을 PBS 또는 1x X-연결 완충제, 예를 들면, 4 μM X-연결된 RNA에 대해 1 내지 2 μM의 최종 농도의 스트렙타비딘 속에 가할 수 있다. 이후에, 1 μl의 RNAsine을 가하고 혼합물을 48°C에서 가열 블록 속에서 1시간 동안 항온처리할 수 있다.
- [0380] B. DDB 링커 사용
- [0381] DDB 링커는 모든-DNA 분자이며, 1x X-연결 완충제(100 mM NaCl)의 희석이 요구되지 않는다. DDB 링커는 우수한 SA 로딩에 추천될 수 있으며 단지 1.5 내지 2x 과량의 가교결합된 mRNA 만을 스트렙타비딘에 대해 사용하는 것이 가능하다. 1/2 또는 1:1.5 당량의 스트렙타비딘(제조원: 프로자임, 미국 캘리포니아 산 린드로 소재) 용액을 PBS 또는 1x X-연결 완충제 속에, 예를 들면, 4 μM X-연결된 RNA에 대해 2 내지 2.5 μM의 최종 농도의 스트렙타비딘을 가할 수 있다. 이후에, 1 μl의 RNAsine를 가하고 혼합물을 48°C에서 열 블록 속에서 1시간 동안 항온처리할 수 있다.
- [0382] 각각의 경우(A 또는 B), 적어도 50% 초과 및 80% 이하의 스트렙타비딘이 로딩되는 것으로 예측될 수 있다.
- [0383] 푸로마이신 링커 BPP의 로딩
- [0384] BPP: 5' 바이오틴-BB Cy3-(스페이서 18)4-CC Pu
- [0385] BPP-8: 5' 바이오틴-BB Cy3-(스페이서 18)8-CC Pu
- [0386] Cy3 염료
- [0387] 4 또는 8 단위의 스페이서 18
- [0388] Pu = 푸로마이신-CPG
- [0389] A BPP 링커는 3' 말단에서 푸로마이신, 펩타이드 수용체 분자를 함유한다(펩타이드 수용체는 리보솜의 A 부위로 도입되어 인접한 폴리펩타이드 쇄의 COOH 말단에 공유결합으로 커플링된다). 링커는 각각의 X-연결된 mRNA 분자상에 로딩된 스트렙타비딘 분자에 결합하는 5' 말단에서 바이오틴을 갖는다. 당해 펩타이드 수용체는 당해 mRNA(표현형)에 의해 암호화된 단백질에 대해 궁극적으로 mRNA(유전자형)의 비-공유결합으로 강력히 연합할 수 있을 것이다. 각각의 버전의 BPP 링커(보다 짧은 4x 스페이서-18 또는 보다 긴 8x 스페이서-18)는 가시화를 위해 형광성 Cy-3 염료 잔기(여기: 550, 방사: 570 nm)를 함유한다. 다른 형광성 염료, 예를 들면, 플루오레세인, BODIPY, Cy-5, 로다민 등을 Cy-3 대신 사용할 수 있다.
- [0390] 상세하게는, 1 당량의 상응하는 BPP 링커(스트렙타비딘의 양에 상대적 양)를 로딩된 트랩타비딘-mRNA 조립에 가할 수 있다. 혼합물을 15분 동안 실온에서 항온처리할 수 있다. 스트렙타비딘에 대해 거의 100%의 BPP 링커가 결합에 대해 예측될 수 있다.
- [0391] 예시적인 실험을 도 31에서와 같이 수행하였다. 상세하게는, KDR mRNA를 시험관내 전사하고 LiCl 침전에 의해 반응물로부터 정제하였다. 1 당량의 PBI 또는 DDB 링커를 mRNA 시료에 85°C로 가열한 후, 100 mM NaCl을 함유하는 1x X-연결 완충제 속에서 4°C로 서서히 냉각시켜 어닐링하였다. PBI-x-연결된 mRNA의 시료를 이후에 5x 희석시켜 20 mM의 최종 NaCl 농도가 되도록 하였다. DDB-x-연결된 mRNA의 시료를 희석하지 않고 사용하였다. 스트렙타비딘 로딩을 위해, 약 1/2 당량의 스트렙타비딘을 각각의 시료에 가한 후, 실온 또는 50°C에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이후에, BPP-Cy3 링커를 각각의 시료에 스트렙타비딘과 동일한 양으로 가하였다. 실온에서 15분 항온처리한 후, 수득되는 조립을 4 내지 16% NativePage 상에서 분해하였다.
- [0392] 임의 단계: 올리고 dT 컬럼상에서 SA 조립의 정제

[0393] mRNA는 20 As의 테일을 함유하므로, 이는 당해 단계에서 올리고 dT 컬럼 상에서 정제할 수 있다. 당해 정제는 절대적으로 필수적이지 않으나, 다음 단계에서 융합 수율을 어느 정도 개선시킬 수 있다.

[0394] 조립 정제

[0395] 등 용적의 2X 올리고 dT 결합 완충제(200 mM 트리스, pH 8, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1% 트리톤)를 제조된 mRNA-SA 조립에 가할 수 있다. 이후에, 올리고-dT 셀룰로스를 혼합물(100 mg의 처리된/세척된 올리고 dT 셀룰로즈(1 mL의 슬러리)가 1 nmol까지의 RNA 도입을 포획하는데 충분하다)에 가한 후 4°C에서 30 내지 60분 동안 록킹(rocking)할 수 있다. 혼합물을 벤치 톱(bench top) 원심분리기 속에서 1500 rpm으로 3분 동안 4°C에서 회전시킬 수 있다. 수득되는 상층액을 버릴 것이다. 수득되는 펠렛은 700 μl의 올리고 dT 세척 완충제(100 mM 트리스 pH 8, 1M NaCl, EDTA 비함유, 0.05% 트리톤 x-100) 속에 재현탁시키고, 점적/회전 컬럼[제조원: 바이오 라드(BioRad) #732-6204, 미국 캘리포니아 헤르쿨레스 소재] 상에 로딩한 후 원심분리기 속에서 1000 rpm으로 10초 동안 회전시켰다. 컬럼을 700μl의 올리고 dT 세척 완충제로 세척하고 1000 rpm에서 10초 이상 동안 회전시킬 수 있다. 세척 단계는 8회 반복할 수 있다(각각의 세척 동안, 원심분리 rpm 및 시간은, 이것이 세척 완충제를 통해 회전시키기 어려운 경우 증가시킬 수 있으나 1500rpm을 초과하지는 않는다). 5μl의 최종 세척액을 계수를 위해 수집할 수 있다. 이후에, mRNA-SA 조립을 dH₂O로 용출시킬 수 있다. 60 μl의 dH₂O를 E1에 대해, 이후 1500 rpm에서 10초 동안(계수를 위해 5μl 사용) 회전시켜 사용할 수 있다. E2의 경우, 500 μl의 dH₂O를 컬럼에 가할 수 있다. 실온에서 5분 동안 항온처리한 후, E2를 4000 rpm에서 20초(계수를 위해 5μl 사용) 동안 회전시킨 후 수집할 수 있다. E3의 경우, 300 μl의 dH₂O를 가하고 컬럼과 함께 5분 동안 실온에서 항온처리할 수 있다. 이후에, E3를 4000 rpm에서 20초 동안(계수를 위해 5μl 사용) 회전시켜 수집할 수 있다. 당해 실시 예에서, E2는 80%의 mRNA-SA 조립을 함유한다.

[0396] 해독

[0397] 해독 용적은 RNA 도입 양에 따라 변할 수 있다. 예시적인 조건은 다음에 제시된다:

[0398] 해독 설정 (300 μl)

| | | |
|--------|---------------------------------------|----------------------|
| [0399] | RNA-SA 조립 120 pmol + H ₂ O | 82 μl (또는 300 μl 이하) |
| [0400] | 아미노산 마스타 혼합(-met) | 15 μl |
| [0401] | 10 mM 메티오닌 | 3 μl |
| [0402] | 분해물 | 200 μl |

[0403] -----

[0404] 총 용적 300 μl

[0405] 혼합물은 30°C에서 수욕 또는 항온처리기(물 블록) 속에서 45분 내지 1시간 동안 항온처리할 수 있다.

[0406] 융합체 형성

[0407] 100 μl의 2M KCl (500 mM 최종)을 20 μl의 1M MgCl₂ (50 mM 최종)과 혼합시키고 실온에서 1시간 동안 항온처리할 수 있다. 수득되는 혼합물을 임의로 냉동시키고 -20°C에서 수일 까지 저장할 수 있다. 또한, 냉동은 어느 정도 융합 수율을 개선시킨다.

[0408] 이후에, 50 μl의 0.5M EDTA를 당해 혼합물에 가하여 리보솜을 분해하고 리보솜-유리된 융합체(QC의 경우 10 μl 저장)를 생산할 수 있다.

[0409] 선택을 위한 예시적인 해독 규모로서, 1 라운드의 경우 1.2 nmol RNA (10 x 300 μl), 2 라운드의 경우 600 pmol RNA (5 x 300 μl) 및 3 라운드의 경우 120 내지 600 pmol RNA(1 내지 5 x 300 μl) 등이다.

- [0410] 올리고 dT 셀룰로즈: PBI 링커에 의한 융합체 정제
- [0411] 올리고 dT 정제는 RNA 융합 분자(및 RNA)의 정제를 허용하며 시험관내 해독에 의해 생성된 유리된 단백질 분자를 제거한다. 당해 과정 및 다음 역 전사 단계는, PBI 링커 조립이 해독되는 경우 사용할 수 있다. DDB-링커 조립의 경우에, 상이한 과정이 추천된다.
- [0412] 융합체 정제
- [0413] 동 용적의 2X 올리고 dT 결합 완충제(200 mM 트리스, pH 8, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1% 트리톤)를 해독/융합 혼합물에 가할 수 있다. 올리고-dT 셀룰로즈 [100 mg 처리된/세척된 올리고 dT 셀룰로즈(1 mL의 슬러리)는 해독/융합물을 1 nmol 이하의 RNA 도입까지 포획하는데 충분하다]를 이후에 혼합물에 가한 후 4°C에서 30 내지 60 분 동안 가할 수 있다. 벤치 탑 원심분리 속에서 1500 rpm으로 3분 동안 4°C에서 회전시킨 후, 수득되는 상층액을 버릴 것이다. 수득되는 펠렛은 700 μ l의 올리고 dT 세척 완충제(100 mM 트리스 pH 8, 1M NaCl, EDTA 비함유, 0.05% 트리톤 x-100) 속에 재현탁시키고 점적/회전 컬럼(제조원: 바이오라드 #732-6204, 미국 캘리포니아 헤르쿨레스 소재)상에 로딩한 후, 원심분리기 속에서 1000 rpm으로 10초 동안 회전시켰다. 수득되는 펠렛은 700 μ l의 올리고 dT 세척 완충제 속에 재현탁시킨 후 1000 rpm에서 10초 동안 회전시켜 펠렛을 재침전시킬 수 있다. 당해 세척 단계는 8회(각각의 세척 동안, 원심분리 rpm 및 시간은, 세척 완충제를 통한 회전이 어려울 경우 증가시킬 수 있으나, 1500rpm을 초과하지 않는다) 반복할 수 있다. 5 μ l의 최종 세척액을 계수를 위해 수집할 수 있다. 세척 후, dH₂O를 용출에 사용할 수 있다. 예를 들면, 60 μ l의 dH₂O를 E1에 대해 사용한 후, 1500 rpm에서 10초(계수를 위해 5 μ l 사용) 동안 회전시킬 수 있다. E2의 경우, 500 μ l의 dH₂O를 컬럼에 가할 수 있다. 실온에서 5분 동안 항온처리한 후, E2를 4000 rpm에서 20초(계수를 위해 5 μ l 사용) 동안 회전시킬 수 있다. E3의 경우, 300 μ l의 dH₂O를 컬럼에 가하고 컬럼과 함께 5분 동안 실온에서 항온처리할 수 있다. 이후에, E3를 4000 rpm에서 20초(계수를 위해 5 μ l 사용) 동안 회전시킨 후 수집할 수 있다. 당해 실시예에서, E2는 80%의 mRNA-SA 조립을 함유한다.
- [0414] 융합 과정의 평가:
- [0415] 올리고 dT 셀룰로즈로부터의 융합체의 용출은 또한 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면, 겔-전기영동, 플루오레세인 밀도계 또는 방사표지된 계수 등에 의해 분석할 수 있다.
- [0416] 역 전사: PBI 링커
- [0417] RNA-cDNA 하이브리드를 RNA의 2차 구조를 안정화시키고 감소시키며 선택 후 PCR용 주형으로서 제공하기 위해 제조한다. PBI 링커의 경우에, 역전사가 외부 프라이머(S6)로서 바람직하나, 링커의 4개의 3' 뉴클레오타이드가 DNA이므로, 보다 낮은 효능이 PBI 링커 자체로부터 수행될 수 있다. 비록, 본 발명자가 이러한 목적을 위해, 상이한 모든-DNA 링커, DDB를 사용하지만, 이는 조립을 DNA-디스플레이된 양식으로 강력하게 전환시킬 수 있다.
- [0418] 외부 RT 프라이머:
- [0419] XB-S6-1: 5'-TTAAAT AGC GGA TGC TAA GGA CGA CTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTC GGTGGGGCGGATGCACTCCC-3'(서열 번호: 56)
- [0420] 역 프레임 1: G S A S A P T D Y K D D D D K S S L A S A I (정지)(서열 번호: 57)
- [0421] 반응물 설정: (인비트로젠 역 전사 키트)
- [0422] 올리고-dT 용출물을 10000 rpm에서 30초 동안 회전시켜 잔류성 셀룰로즈를 제거할 수 있다. μ l
- [0423] 회전으로부터 E2 + E3 상층액: 800 μ l (총 <1000 pmol)

[0424] (겔 상에서 전기영동을 위해 수집된 10 내지 20 μ l의 E2)

[0425] RT 프라이머 (S6-1) 1mM 1 μ l (1000 pmol)

[0426] 5x 제1 쇠 완충제 220 μ l

[0427] 0.1 M DTT 11 μ l(최종 1 mM)

[0428] 25 mM dNTPs 22 μ l (각각 최종 0.5 mM)

[0429] 슈퍼스크립트(Superscript) II 25 μ l

[0430] H₂O 21 μ l

[0431] -----

[0432] 총 1100 μ l

[0433] 37°C에서 45 내지 60분 동안 항온처리(겔 상에서 수행하기 위해 10 μ l 제거).

[0434] QC: cDNA 합성은 NativePage를 사용한 겔 전기영동에 의해 모니터링할 수 있으며 Cy-3 염료의 형광성으로 검출할 수 있다.

[0435] 역 전사 및 RNaseH 분해물과 커플링된, 올리고 dT 셀룰로즈에 의한 융합체 정제: DDB 링커

[0436] 올리고 dT 정제 및 역 전사를 mRNA-SA 조립과 DDB 링커 속에서 컬럼 상에서 수행함으로써 본 발명자는 DNA-디스플레이된 융합체를 생성한다. 당해 경우에, DDB는 RT 프라이머로서 제공된다. 동일한 과정을 내부 RT 프라이머로서 제공되도록 설계되나, DDB에 비해 효능이 보다 낮은 것으로 입증된, PBI 링커에 적용시킬 수 있다.

[0437] DNA-디스플레이된 융합체는 뉴클레아제 분해에 대해 큰 안정성을 입증하며 세포-계 및 생체내 선택을 위해 사용된다.

[0438] 올리고 dT 셀룰로즈 상에서 융합체 고정화

[0439] 등 용적의 2X 올리고 dT 결합 완충제(200 mM 트리스, pH 8, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1% 트리톤)를 해독/융합체 혼합물에 가할 수 있다. 올리고-dT 셀룰로즈[100 mg의 처리된/세척된 올리고 dT 셀룰로즈(1 mL의 슬러리)가 해독/융합체를 1 nmol RNA 도입물까지 포획하는데 충분하다]를 4°C에서 30 내지 60분 동안 로킹하기 전에 가할 수 있다. 벤치 탑 원심분리 속에서 1500 rpm으로 3분 동안 4°C에서 회전시킨 후, 수득되는 상층액을 버릴 것이다. 수득되는 펠렛은 700 μ l의 올리고 dT 세척 완충제(100 mM 트리스 pH 8, 1M NaCl, EDTA 비함유, 0.05% 트리톤 x-100) 속에 재현탁시키고 점적/회전 컬럼(제조원: 바이오라드 #732-6204, 미국 캘리포니아 헤르쿨레스 소재)상에 로딩한 후, 원심분리기 속에서 1000 rpm으로 10초 동안 회전시킨다. 컬럼을 700 μ l의 올리고 dT 세척 완충제로 세척한 후, 1000 rpm에서 10초 동안 회전시킨다. 수득되는 펠렛을 8회(각각의 세척 동안, 원심분리 rpm 및 시간은, 세척 완충제를 통한 회전이 어려울 경우 증가시킬 수 있으나, 1500rpm을 초과하지 않는다) 반복할 수 있다. 5 μ l의 최종 세척물을 계수를 위해 수집할 것이다.

[0440] 올리고 dT 셀룰로즈 상에서 역 전사

[0441] 고정된 융합체를 갖는 올리고 dT 수지를 1x 제1 쇠 완충제(별도로 제조) 속에서 평형화시킬 수 있다. 완충제는 수지로부터 융합체의 용출을 방지하는, 75 mM KCl 및 3 mM MgCl₂를 함유한다.

[0442] 혼합물을 역 전사를 위해 다음과 같이 제조한 후 37 내지 39°C에서 60 내지 75분 동안 항온처리할 수 있다.

[0443] 물 695 μ l

[0444] 5x 제1 쇠 완충제 200 μ l

[0445] 0.1 M DTT 10 μ l(최종 1mM)

- [0446] 25 mM dNTP 40 μ l(각각 최종 1mM)
- [0447] 슈퍼스크립트 II 50 μ l
- [0448] RNasin 5 μ l
- [0449] -----
- [0450] 총 1000 μ l
- [0451] (당해 실시예에서, 외부 RT 프라이머는 가하지 않는다. dNTPs 및 SSII 역전사 효소의 양은 증가된다)
- [0452] 당해 단계에서, 바이오틴 잔기에 공유결합으로 결합되어 최종적으로 스트렙타비딘-BPP-융합체 샌드위치에 비-공유결합으로 강력하게 부착된 cDNA의 쇠를 제조하여 DNA-디스플레이된 융합체에 대한 전구체를 형성시킨다.
- [0453] RNA 쇠의 RNase H 분해 및 올리고 dT 셀룰로스로부터 용출
- [0454] 역 전사 단계 후, 동일한 컬럼에 상응하는 양의 RNase H를 가할 수 있다[1000 μ l의 상기 기술된 반응물에 대해 10 μ l의 RNase H (2 U/ μ l, 제조원: 인비트로젠, 미국 캘리포니아 칼스바드 소재)를 가할 수 있다]. 37 $^{\circ}$ C에서 추가로 1시간 동안 항온처리한다.
- [0455] 일-본쇄 DNA-융합체를 올리고 dT 컬럼을 2000 rpm에서 1시간 동안 회전시킴으로써 용출시킨 후 500 μ l의 1x 제1쇄 완충제로 세척할 수 있다. 당해 실시예에서, 대략 80 내지 95%의 물질이 컬럼으로부터 용출될 수 있다.
- [0456] 예시적인 실험을 도 32 및 33에서와 같이 수행하였다. 도 32에 나타난 바와 같이, DNA 디스플레이 조립(DDB 링커와 연결된 mRNA-x)를 RRL 속에서 1시간 동안 30 $^{\circ}$ C에서 200nM의 mRNA 농도로 해독하였다. 생성물을 올리고-dT 컬럼(라인 2 내지 3) 상에 로딩하였다. 컬럼을 1x 올리고-dT 완충제로 수회 세척한 후 1x RT 완충제로 2회 세척하고, dNTPs 및 SSII RT를 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 첨가하였다. RNaseH 처리를 또한 다른 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 컬럼을 회전(회전 여과기)하여 용출시켰다. 라인 4 및 5에서, PBI 링커와 함께 조립된 mRNA를 상기와 유사하게 해독한 후, 올리고 dT 수지로 처리하고 5 mM 트리스 pH 7.0으로 용출하였다.
- [0457] 도 33에서, DNA 디스플레이 조립[DDB 링커와 연결된 mRNA-x, 라인 1, 2, 및 3, 또는 BPP 링커와 연결된 mRNA-x, 라인 4 및 5(BPP-8 링커)]를 RRL 속에서 1시간 동안 30 $^{\circ}$ C에서 200 nM의 mRNA 농도에서 해독하였다. 생성물을 올리고-dT 컬럼상에 로딩하였다. 당해 컬럼을 1x 올리고-dT 완충제로 수회 세척한 후 1x RT 완충제로 2회 세척하고, 이어서 dNTP 및 SSII RT를 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 가하였다. RNaseH 처리를 또한 다른 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 이후에, 컬럼을 회전(회전 여과기)시켜 용출하였다. 융합체를 항 Flag M2 아가로스(라인 2, 3 및 5) 상에서 정제하였다.
- [0458] 2nd 쇠 합성 및 DNA-디스플레이 융합체 조립의 완성
- [0459] XB_S7 (T7TMVUTR2 42-mer; VH IgM, IgG 라이브러리 둘다에 대한 5'-PCR 프라이머):
- [0460] 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA-3'(서열 번호: 52)
- [0461] XB_S7a(추가적 ATG를 갖는 T7TMV 프라이머 45 mer는 Tm을 3 $^{\circ}$ C까지 개선시킨다):
- [0462] 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAATG-3'(서열 번호: 58)
- [0463] 앞서의 단계로부터의 용출물에, 추가적 dNTPs 및 SSII RT를 1 내지 1.5 당량의 TMV-T7 프라이머 S7 또는 S7a와 함께 가할 수 있다.
- [0464] 예시적인 반응물은 위에서 기술한 바와 같이, 1500 μ l 반응물 당 추가적 시약을 혼합함을 포함한다:
- [0465] S7 또는 S7a 1 내지 1.5 당량
- [0466] SSII RT 10 μ l
- [0467] dNTP 10 μ l
- [0468] 혼합물을 추가로 1시간 동안 37 내지 39 $^{\circ}$ C에서 항온처리할 수 있다. 2nd 쇠를 합성한 후, DNA 디스플레이된 융

합체 조립을 완성한 후 항 FLAG 항체 수지상에서 추가로 정제하고, 융합체를 세포-계 또는 생체내 선택을 위해 사용할 수 있다.

[0469] 예시적인 실험을 도 34에 나타낸다. mRNA 조립은 다음과 같이 수행하였다: 4 μ M RNA 및 4 μ M 링커(DDB 또는 PBI)를 85 내지 4°C에서 1x X-연결 완충제 속에서 어닐링한 후; DTT를 1 mM 및 UV 365에 6분 동안 가하였다. 이후에, SA를 0.67x X-연결 완충제 중 1:2의 비(2 μ M에서 최종 mRNA 및 1 μ M에서 SA)로 48°C에서 1시간 동안 로딩하였다. 푸로마이신 Cy3 링커(BPP-4 xC18 스페이서)를 1 μ M에서 조립에 10분 동안 실온에서 가하였다. 올리고 dT 정제는 수행하지 않았다. 다음 RT 반응을 다음과 같이 수행하였다: 슈퍼스크립트 II(SSII)를 42°C에서 3개 조건을 사용하는 표준 RT: 단지 PBI 조립 중 RT 프라이머로서 DDB, RT 프라이머로서 PBI 및 S6(외부 프라이머).

[0470] 각각의 RT 반응물을 RNase H (2 U)로 1시간 동안 37°C에서 처리하였다. 또한 제2 쇄를 Y7 프라이머(T7-TMV) 1:1 및 추가의 SSII RT 효소 및 추가의 dNTP를 1시간 동안 42°C [쿠르츠(Kurtz)로부터 취한 조건, Chembiochem 2001]에서 가하여 합성하였다.

[0471] FLAG-태그 정제

[0472] Flag 정제로 완전한 길이의 단백질 분자 만이 회수되며 시험관내 해독에 의해 생성된 어떠한 유리된 RNA 및 트렁케이티드(truncated) 단백질 분자도 제거된다.

[0473] 결합 및 세척:

[0474] 500 μ l의 M2 아가로즈(1x 결합 완충제 속에서 예비-스트리핑되고 예비-차단된 10 mM Gly pH 3.5) 현탁액을 2 ml의 튜브에 이전시킬 수 있다. 원심분리기 속에서 1500 rpm으로 1분 동안 회전시킨 후, 수득되는 상층액을 버릴 것이다. 아가로즈는 또한 1 ml의 flag 결합 완충제로 2회 세척할 수 있다. 이후에, 세척된 M2-아가로즈를 제조된 화학적으로 변형된 라이브러리(계수를 위해 5 μ l 사용) 및 1/4 라이브러리 용적의 5X flag 결합 완충제와 혼합하고 4°C에서 1시간 동안 밤새 록킹하였다. 원심분리기 속에서 1500 rpm에서 1분 동안 회전시킨 후, 수득되는 상층액을 신선한 튜브로 이전시키며, 수득되는 M2 아가로즈 펠렛은 0.7 ml의 flag 결합 완충제 속에 재현탁시키고 점적 회전 컬럼 상에 로딩할 것이다. 로딩된 컬럼을 원심분리기 속에서 1000 rpm으로 10초 동안 회전시킨 후 0.7 ml의 flag 결합 완충제로 6회 세척한 후, 1000 rpm에서 10초 동안 회전시킬 것이다. 이후에, 컬럼을 0.7 ml의 1x 결합 완충제로 2회 세척한 후, 1000 rpm에서 10초(5 μ l의 최종 세척액을 계수를 위해 수집할 수 있다) 동안 회전시킬 수 있다.

[0475] 용출:

[0476] 1X 결합 완충제 중 100 μ g/ml FLAG 펩타이드 500 μ l를 컬럼에 가할 수 있다. 5분 동안 항온처리한 후, 컬럼을 3000 rpm에서 회전시킨 후 용출물을 수집할 수 있다. 용출 과정을 300 μ l의 flag 펩타이드(5 μ l의 각각의 용출물을 계수를 위해 수집할 수 있다)를 사용하여 반복할 수 있다.

[0477] 회수의 평가:

[0478] 통상적으로 회수율은 대략 10 내지 30%일 수 있다. 회수는 형광성 또는 당해 분야에 공지된 다른 방법으로 측정할 수 있다.

[0479] PCR

[0480] 목적에 따라, Taq 폴리머라제 또는 고 정확성 폴리머라제를 증폭에 사용할 수 있다. 소규모의 PCR이 증폭에 걸쳐서 일반적으로 유발된 PCR 인공물을 방지하기 위한 PCR 주기 점검용으로 추천된다.

[0481] 반응물 설정:

| | | |
|--------|------------------------------|-------------|
| [0482] | 10X 헤르쿨라제 완충제(제조원: 스트라타젠) | 2.5 μ l |
| [0483] | 10 mM dNTP | 0.5 μ l |
| [0484] | T7 TMV UTR (5 μ M) | 1 μ l |
| [0485] | C μ 2f1agA20 (5 μ M) | 1 μ l |
| [0486] | 주형 | 2.5 μ l |
| [0487] | H ₂ O | 17 μ l |
| [0488] | 헤르쿨라제(제조원: 스트라타젠) | 0.5 μ l |
| [0489] | ----- | |
| [0490] | | 25 μ l |

[0491] 주목: 앞서의 단계에서, 예를 들면, 유동-통과, 최종 세척에서 수집된 분획, 용출물 1 및 용출물 2를 PCR용 주형으로서 사용할 수 있다. 상세하게는, 2.5 내지 5 μ l의 주형을 당해 PCR 반응에, 특히 조기 선택 라운드(예를 들면, 라운드 1 내지 3)에 대해 사용할 수 있다. 그러나, 이는 사용하지 않는 것이 유리할 수 있다. 예시적인 PCR 조건은 하기 나열한다:

| | | |
|--------|--------------|---------------------------------|
| [0492] | 95°C로 3분 동안 | 1 주기 |
| [0493] | 95°C로 30초 동안 | ┐ |
| [0494] | 50°C로 30초 동안 | X 주기 (X= 시그날에 따라 15, 20, 또는 25) |
| [0495] | 72°C로 1분 동안 | └ |
| [0496] | 72°C로 5분 동안 | 1 주기 |

[0497] Tm에서 주목: Tm은 프라이머에 대해 교정된다. 당해 실시예에서, 프라이머는 50 °C 보다 높거나 52 내지 65 °C 의 Tm을 가질 수 있다.

[0498] PCR 반응 후, 5 μ l의 반응 혼합물을 2% E-겔 상에서 전기영동을 위해 사용할 수 있다. 크기가 ~400 bp인 주요 밴드가 겔 상에 있는 것으로 예측될 수 있다. 소-규모 PCR의 품질이 허용될 경우, 나머지 용출물을 유사한 조건하에서 대규모 PCR용 주형으로서 사용할 수 있다.

[0499] DNA 정제:

[0500] 때때로, PCR 생성물을 정제하는 것이 요구될 수 있다. 전기영동 후, PCR 생성물(400bp 밴드)를 함유하는 2% 아가로즈 겔상에서 겔 단면을 UV 광하에 절단할 수 있다. 이후에, DNA를 Qiaquick 겔 추출 키트(제조원: 퀴아젠 #28706, 미국 캘리포니아 발렌시아가 소재)을 사용하여 겔 단면으로부터 추출할 수 있다. 5 μ l의 정제된 DNA를 2% E-겔 상에서 전기영동을 위해 사용할 수 있다. 일반적으로 ~80%의 회수율이 예측될 수 있다.

[0501] 454 서열분석용 태그화: DNA 디스플레이

[0502] 비-중복 선택 단계에서 개개의 분자의 태그화를 위해, 다음 2nd 쇠 프라이머를 사용한다:

[0503] GCCTCCCTCGGCCATCAGNNNNNGGACAATTACTATTTACAATTACA ATG (서열 번호: 59)

[0504] 당해 프라이머는 TMV 서열, 454 연결인자 서열 및 N6 무작위 태그를 함유한다. 3' 말단(제2의 454 연결인자를 함유, 유전자-특이적인 부분의 Tm은 50.4°C이다)용의 상응하는 PCR 프라이머 GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAGCGGATGCTAAGCACGA (서열 번호: 60)

[0505] 암플리콘 제제는 연결인자 프라이머 만을 사용하여 수행한다:

[0506] 전방: Tm 64.7 °C

[0507] GCCTCCCTCGGCCATCAG (서열 번호: 61)

[0508] 역방: Tm 65.7 °C

[0509] GCCTTGCCAGCCCGCTCAG (서열 번호: 62)

[0510] 둘다의 Tm은 대략 65 °C이므로, RACE 유형의 PCR이 3' 프라이머에 대해 가능하다.

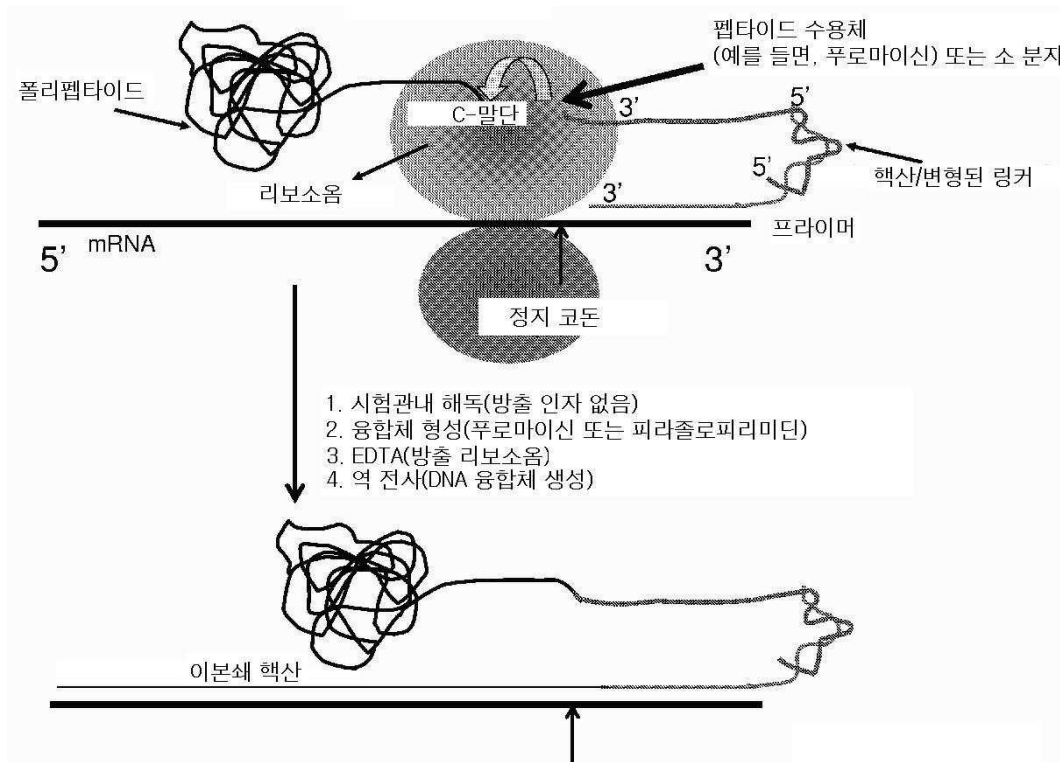
[0511] 등량체

[0512] 본 발명의 다수의 변형 및 변경 양태가 앞서의 기술의 측면에서 당해 분야의 숙련가에게 익숙할 것이다. 따라서, 당해 기술은 당해 분야의 숙련가에게 본 발명을 수행하기 위한 최상 방식을 교시하려는 목적 및 나열의 목적 만으로 간주되어야 한다. 구조의 세부사항은 본 발명의 취지를 벗어남이 없이 실질적으로 변할 수 있으며, 첨부된 청구의 범위내에 있는 모든 변형의 배타적인 사용도 보존된다. 본 발명은 첨부된 청구의 범위에 의해 요구되는 정도 및 적용가능한 법률의 정도로만 한정되어야 한다.

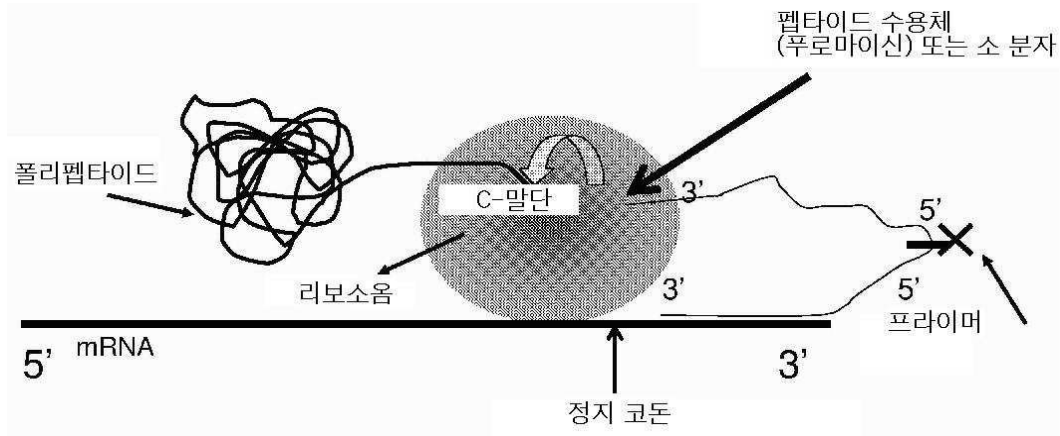
[0513] 특허, 특허원, 문헌, 도서, 논문, 학위논문, 웹 페이지, 도면 및/또는 첨부물을 포함하는, 본 출원에 인용된 모든 문헌 및 유사 물질은, 이러한 문헌 및 유사 물질의 체제에 상관없이, 이의 전문이 참조로 표현하여 인용된다. 정의된 용어, 용어 용도, 기술된 기술 등을 포함하는, 하나 이상의 인용된 문헌 및 유사한 물질이 본 출원과 상이하거나 배치되는 경우, 본 출원이 조절한다. 이러한 등량체는 다음 청구의 범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

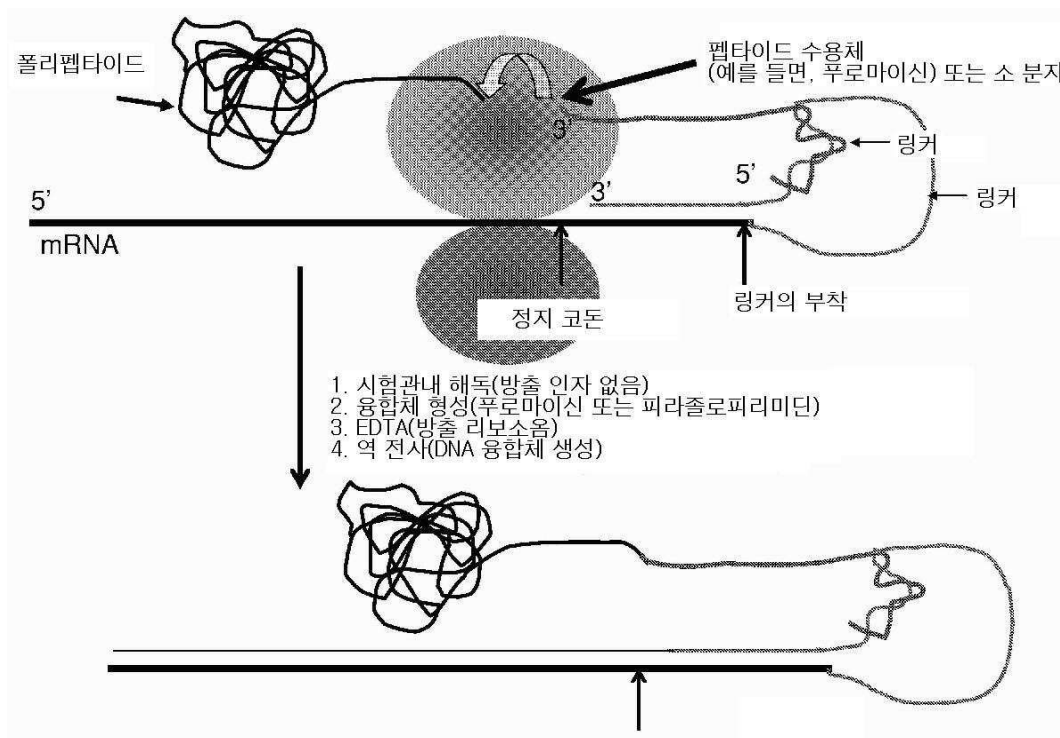
도면1



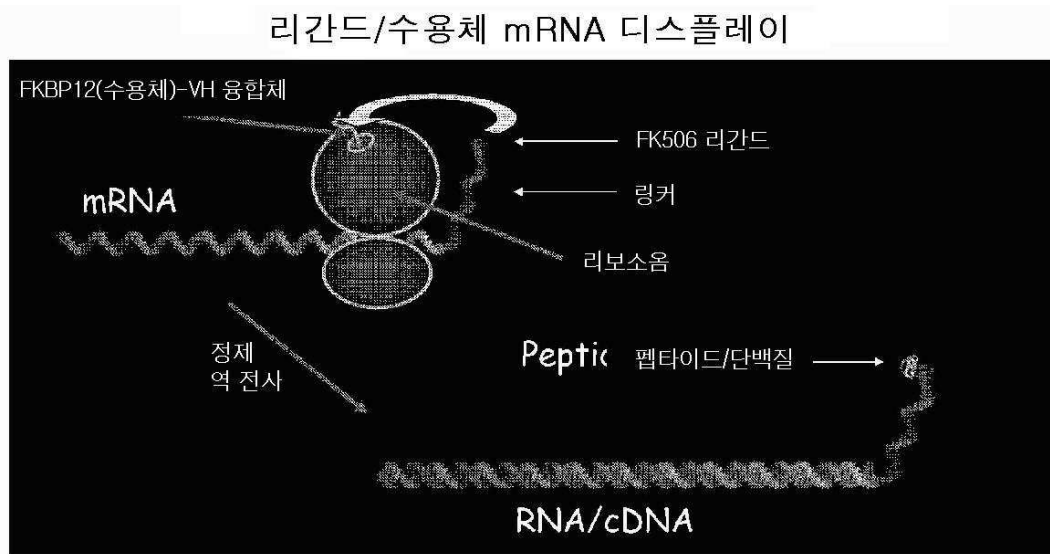
도면2



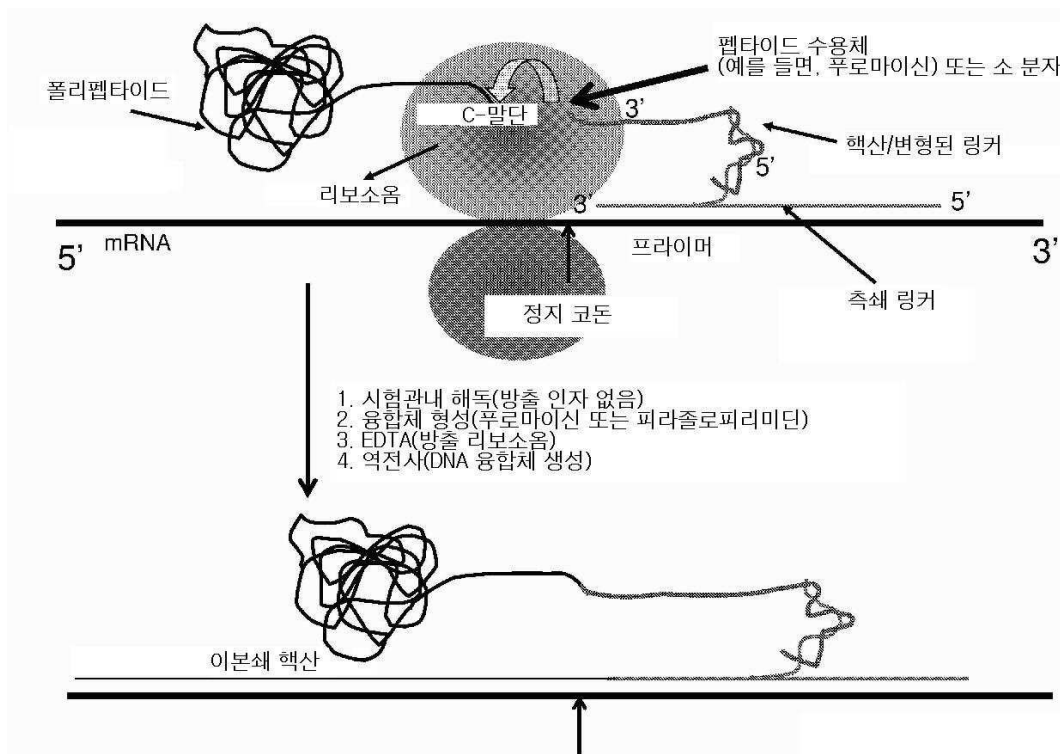
도면3



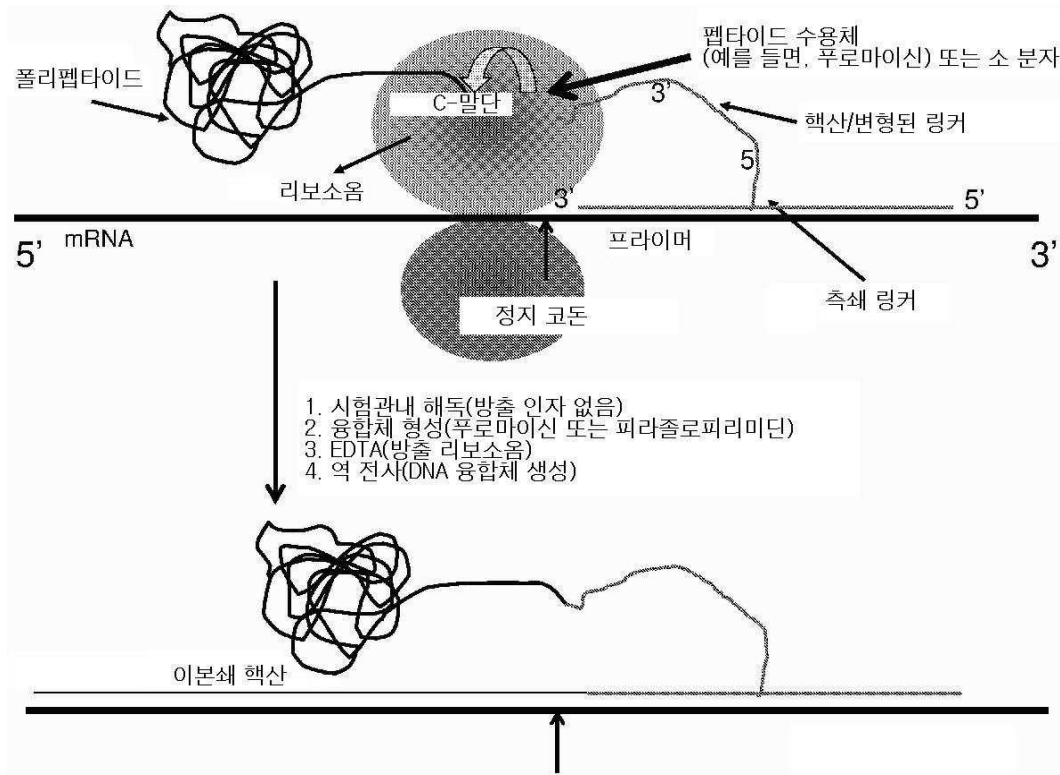
도면4



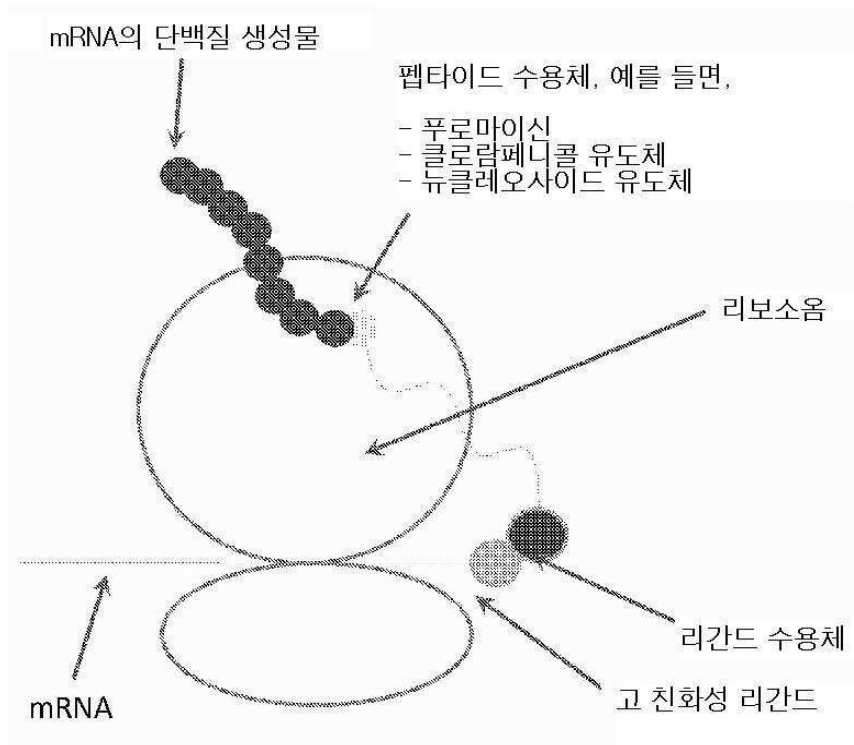
도면5



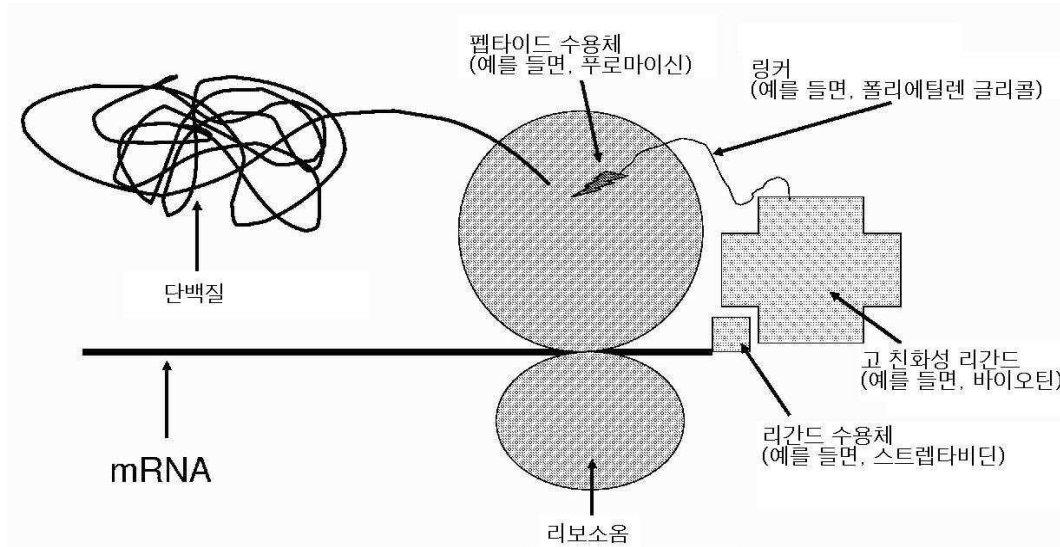
도면6



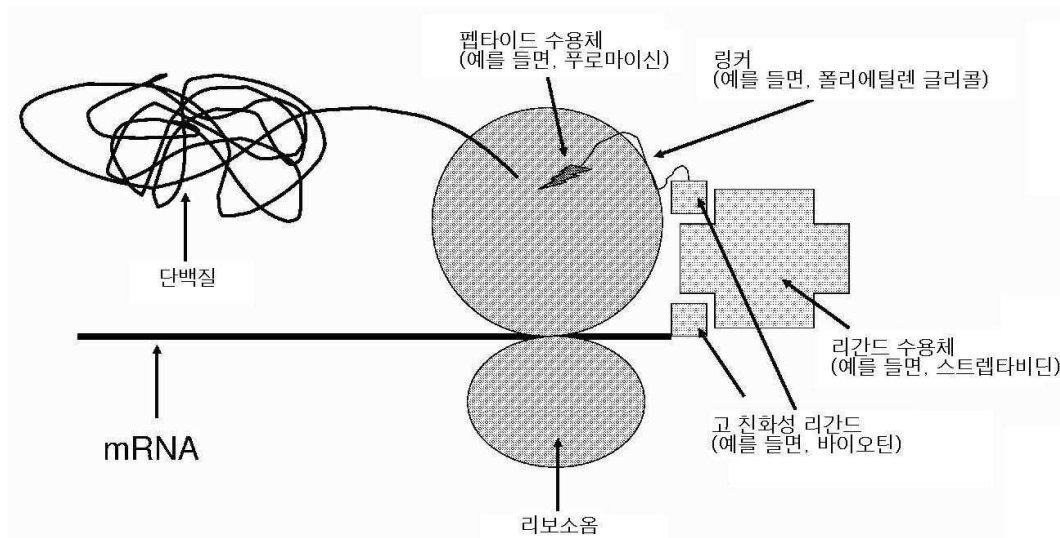
도면7



도면8

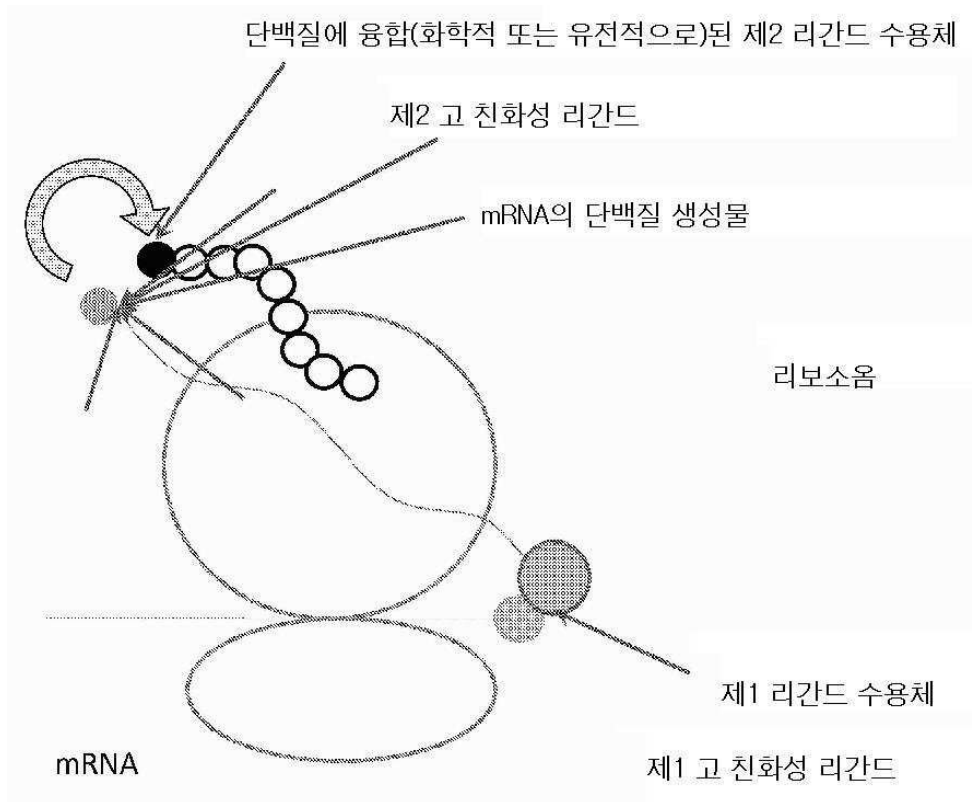


도면9

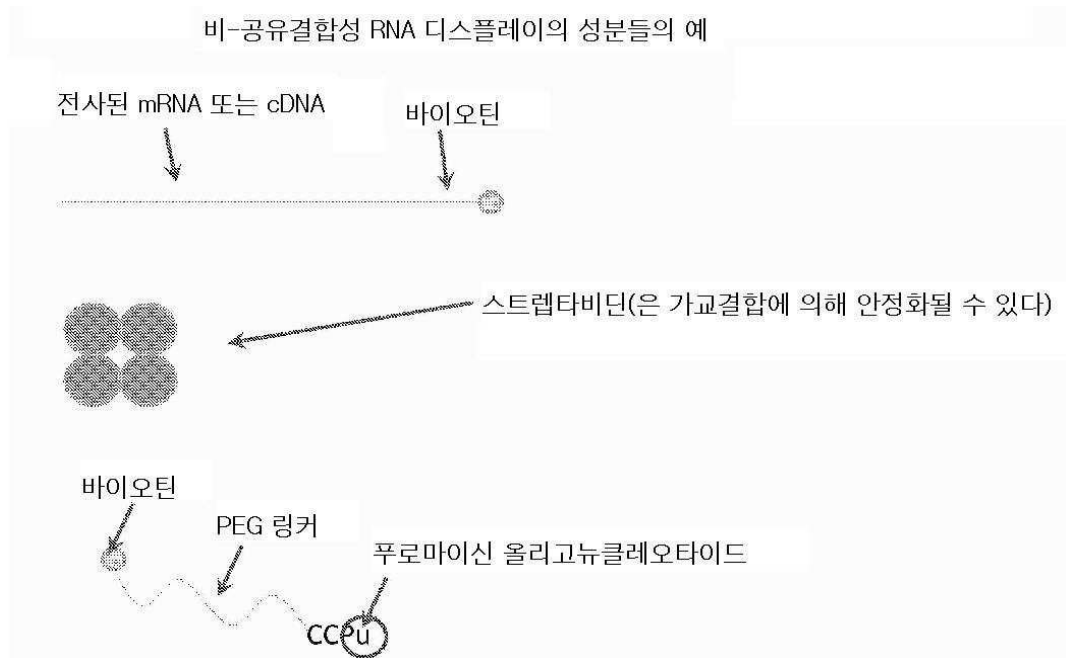


수용체는 다합체성이다. 리간드-RNA는 하나의 부위에 결합한다.
 리간드-링커는 수용체 상에서 제2 부위에 결합한다. 수용체는 리보솜을 지체시킨다.

도면10

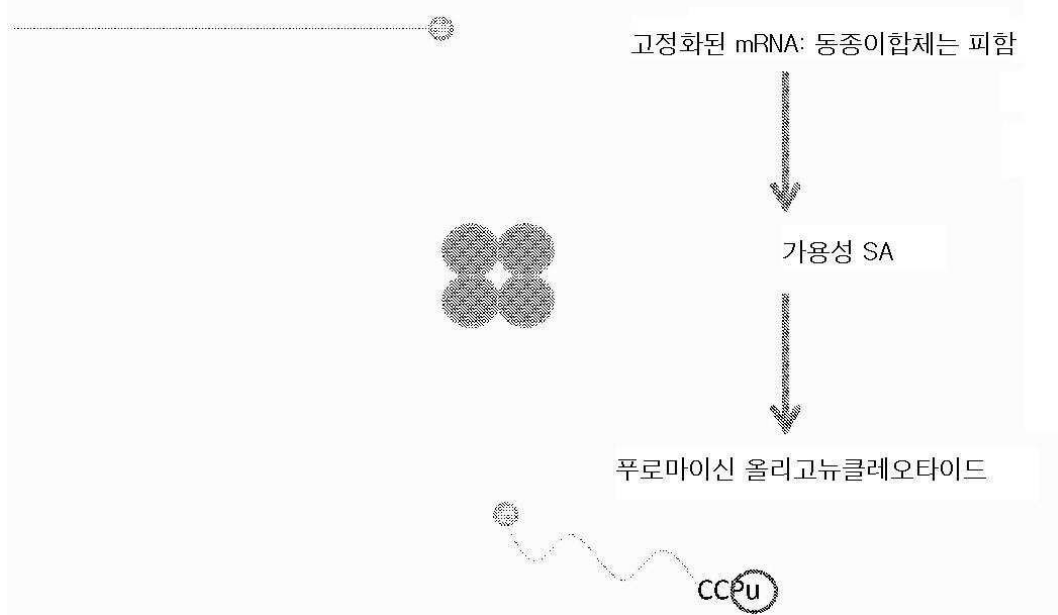


도면11

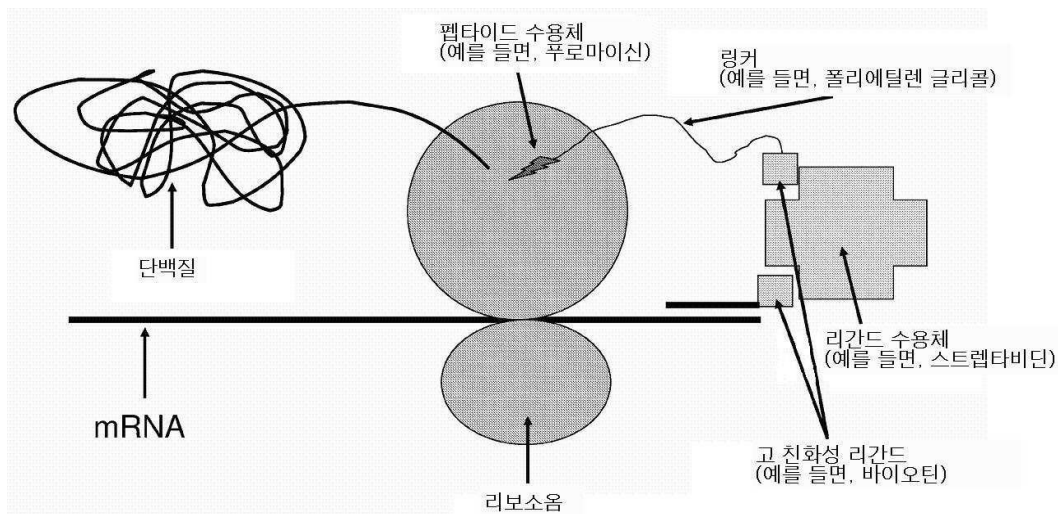


도면12

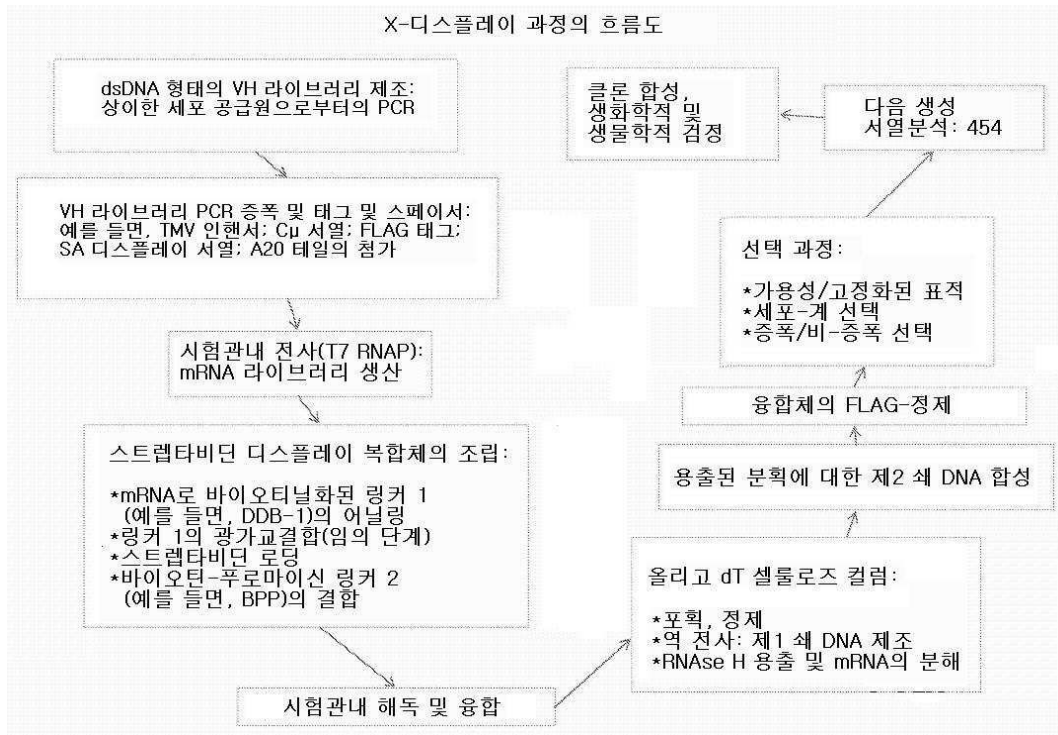
푸로마이신 올리고뉴클레오타이드를 사용한 비-공유결합성 RNA 디스플레이의 조립 순서의 예



도면13



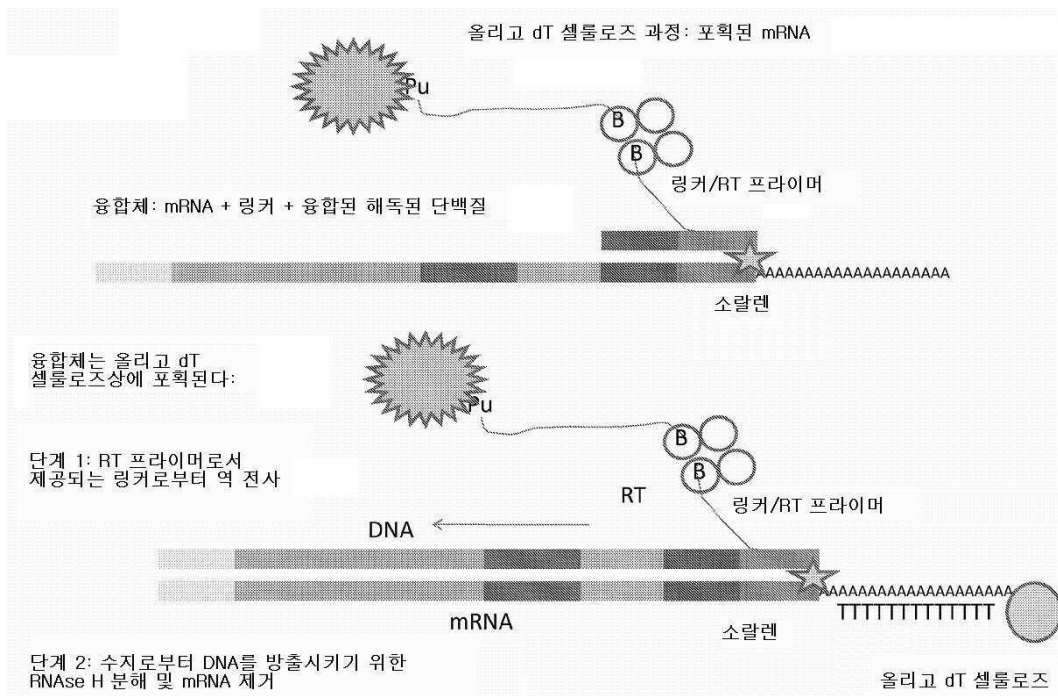
도면14



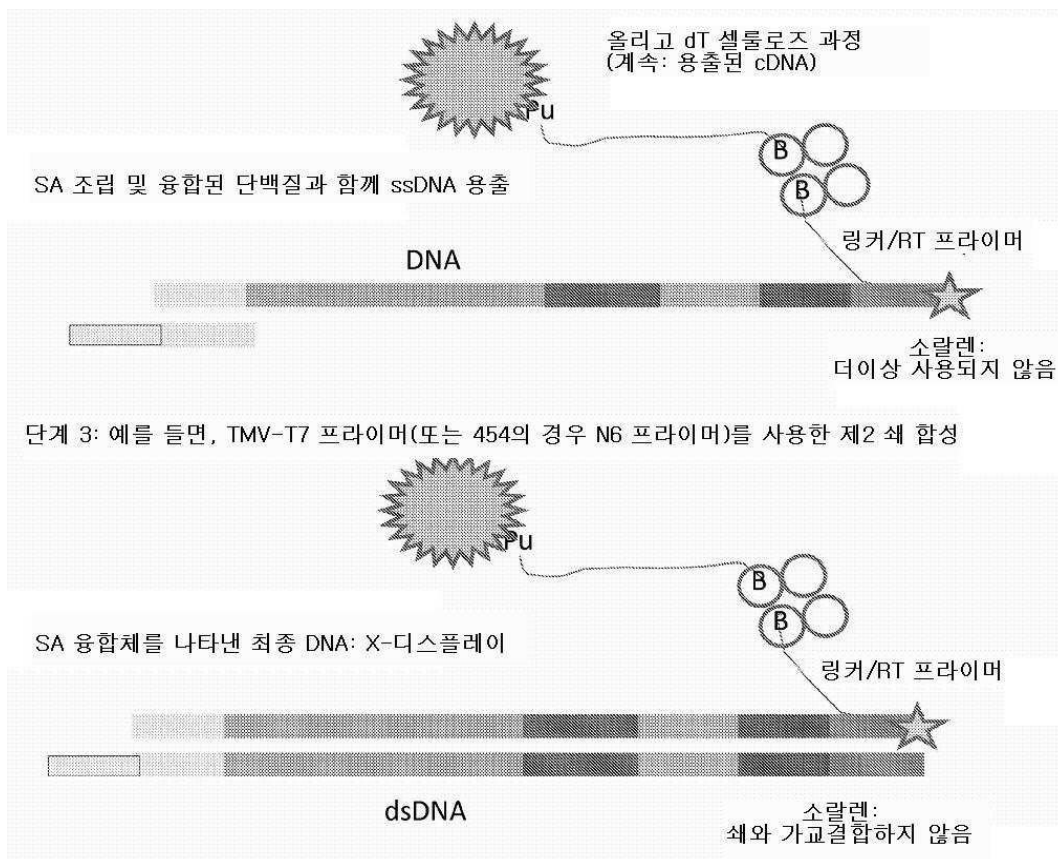
도면15



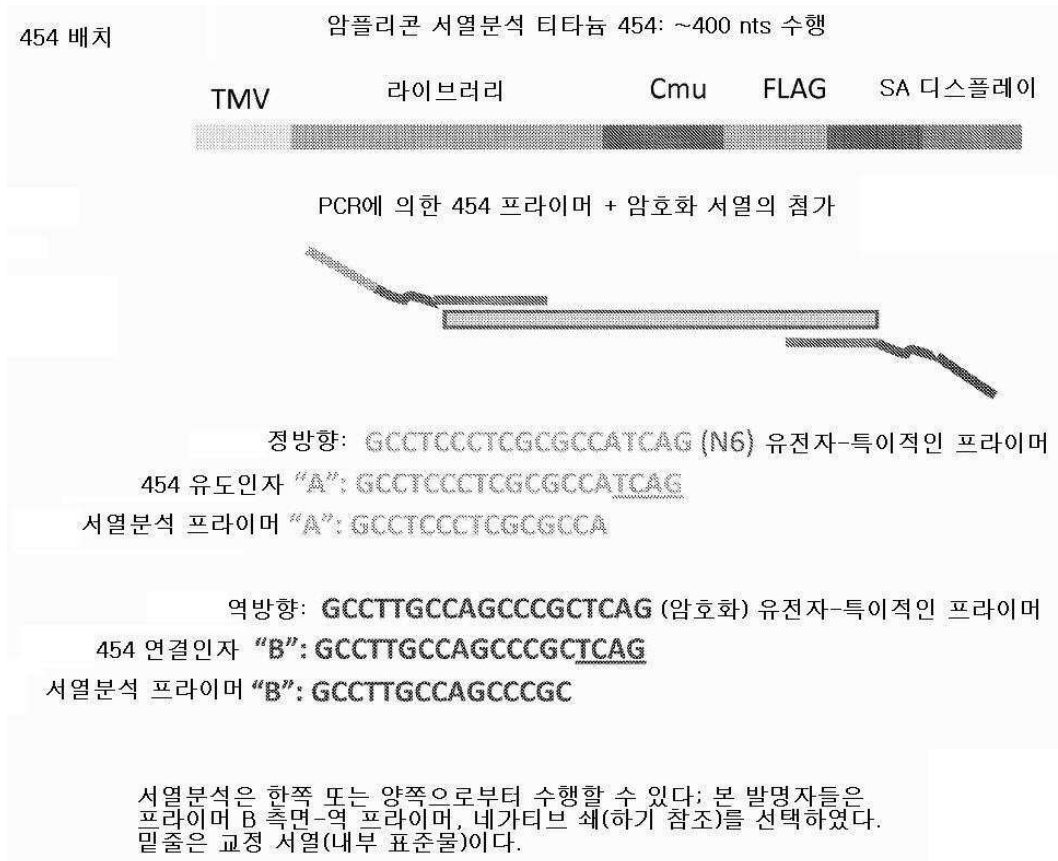
도면16a



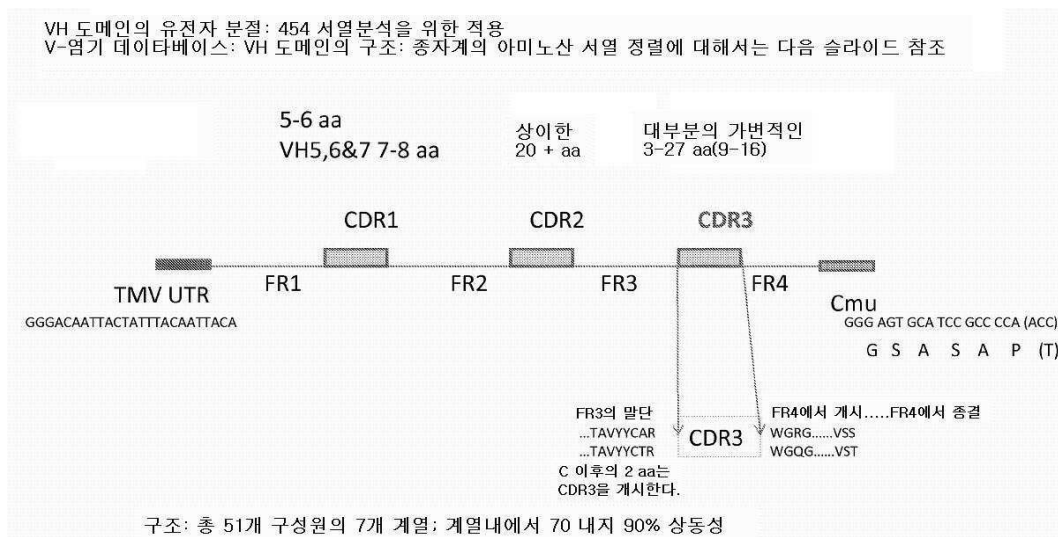
도면16b



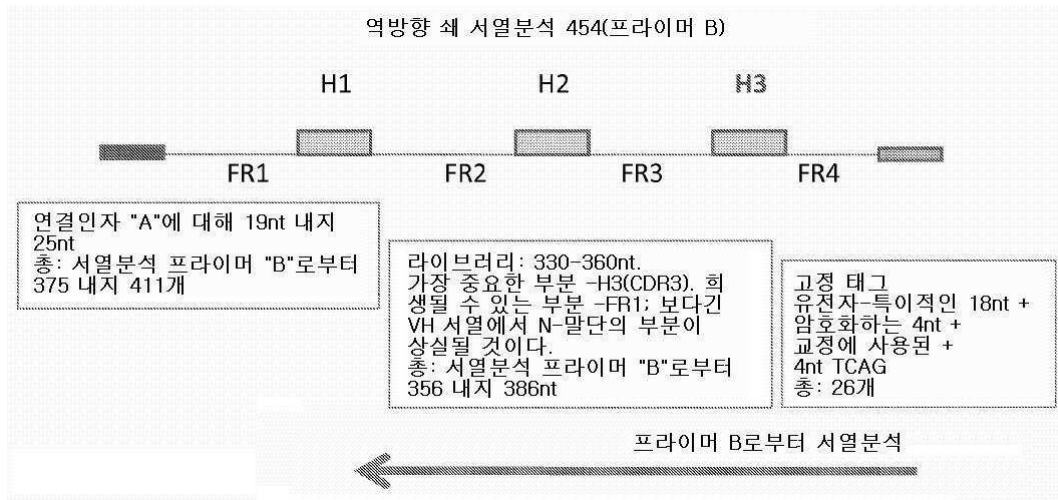
도면17



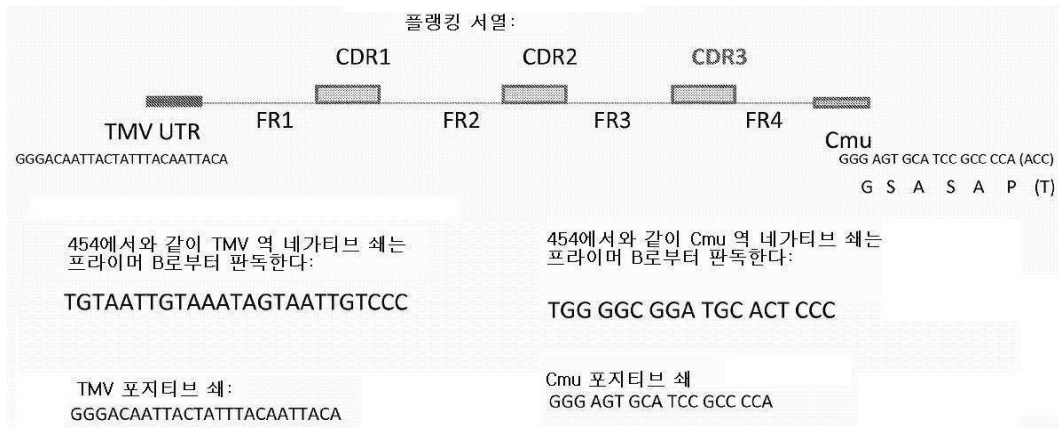
도면18



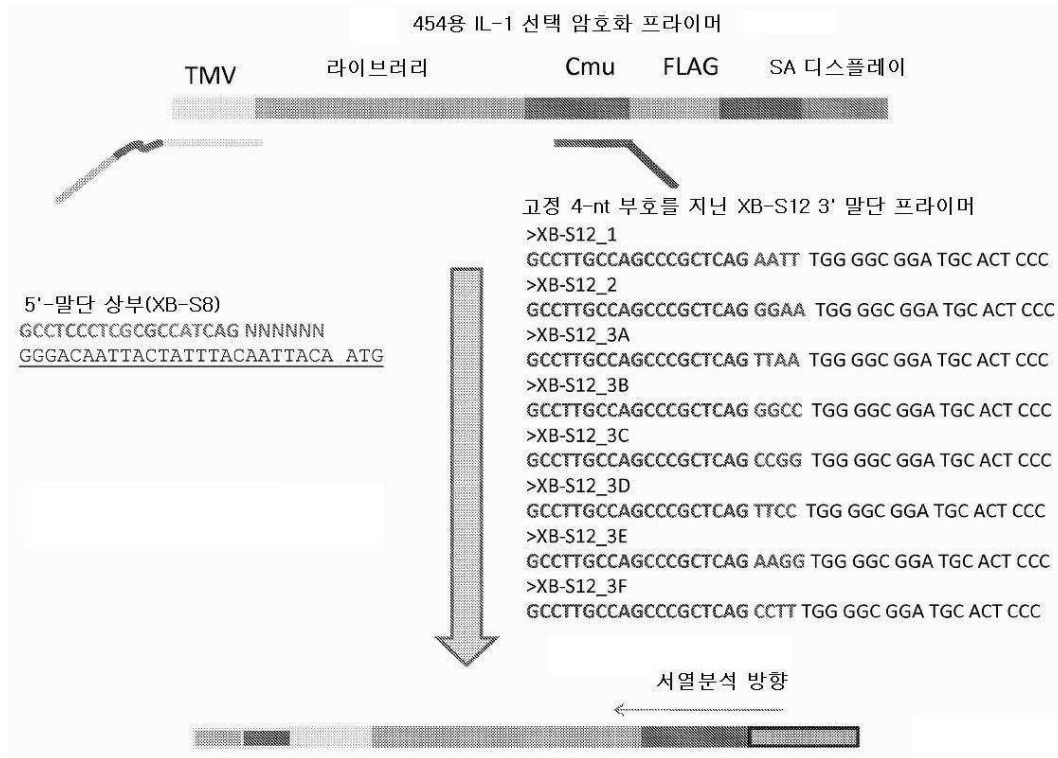
도면19



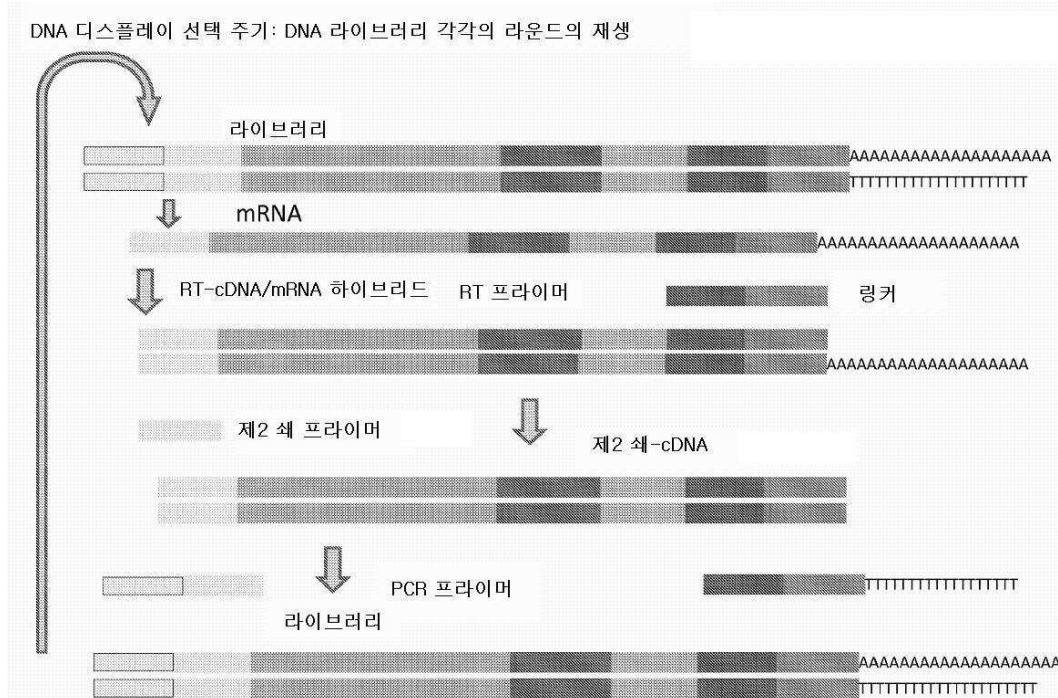
도면20



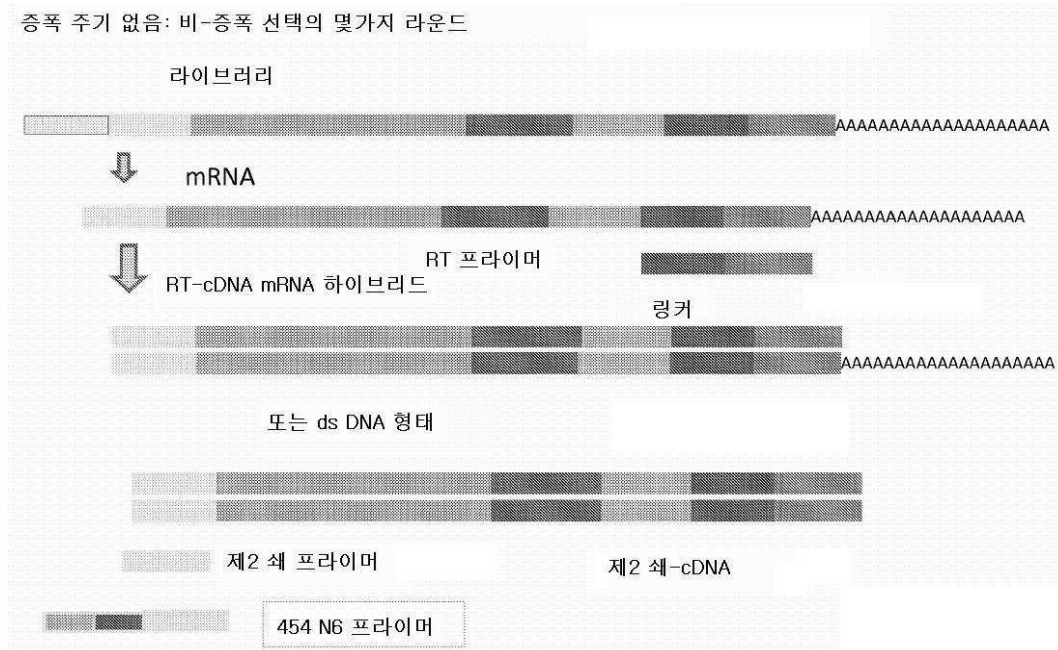
도면21



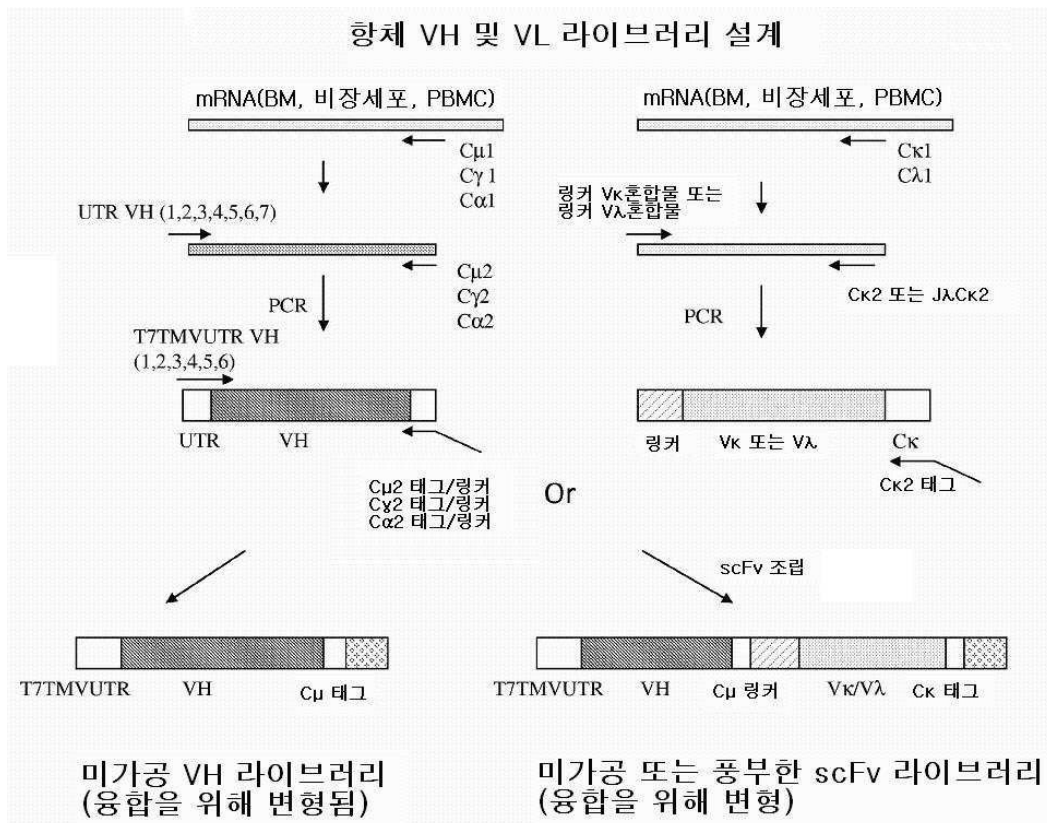
도면22



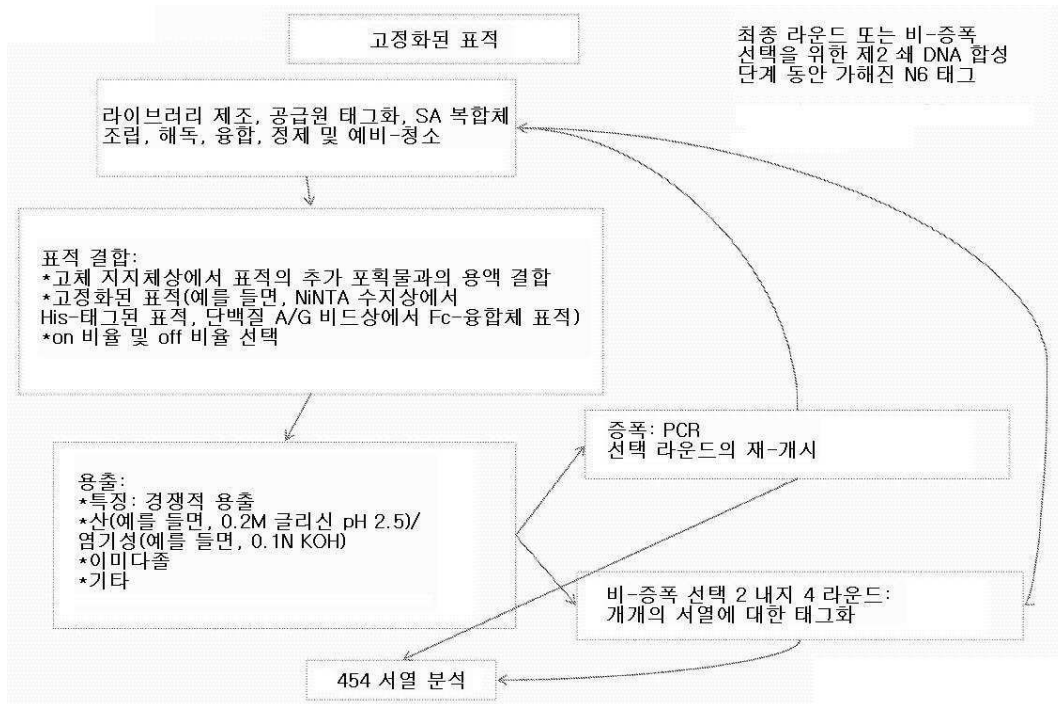
도면23



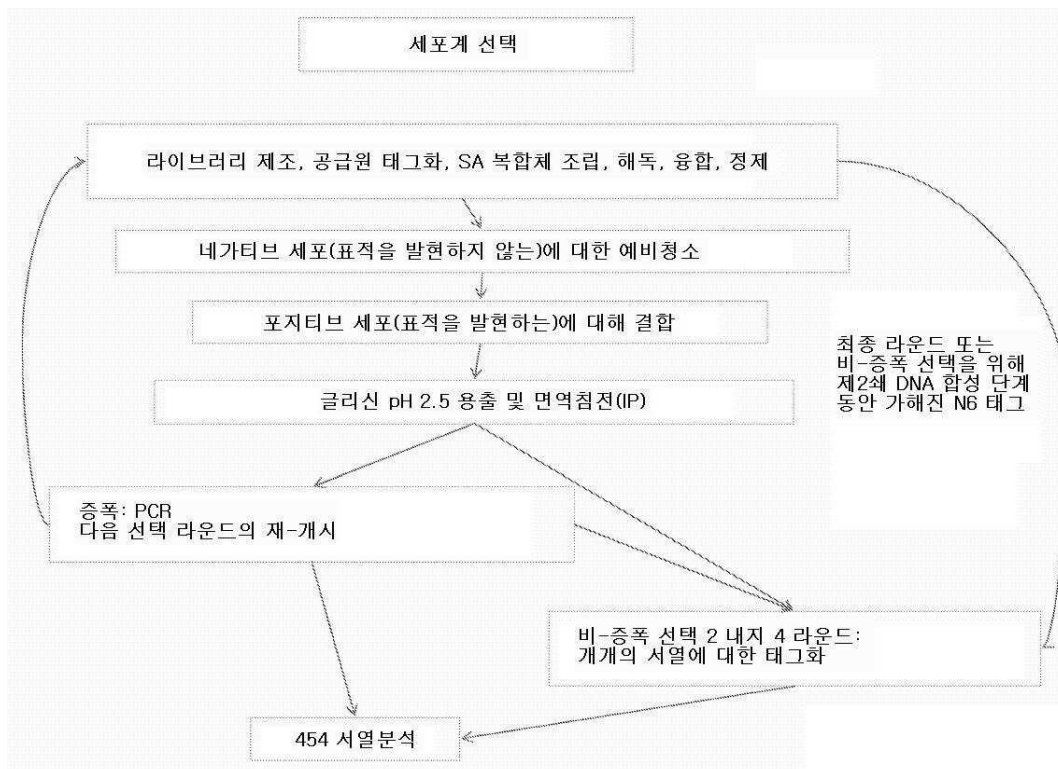
도면24



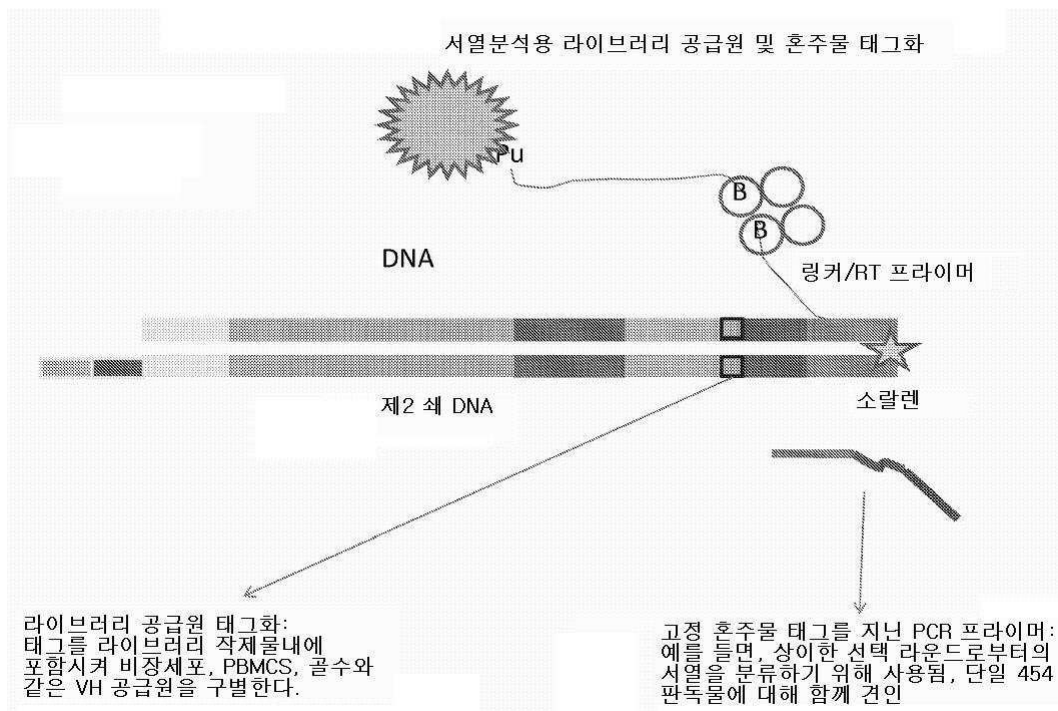
도면25



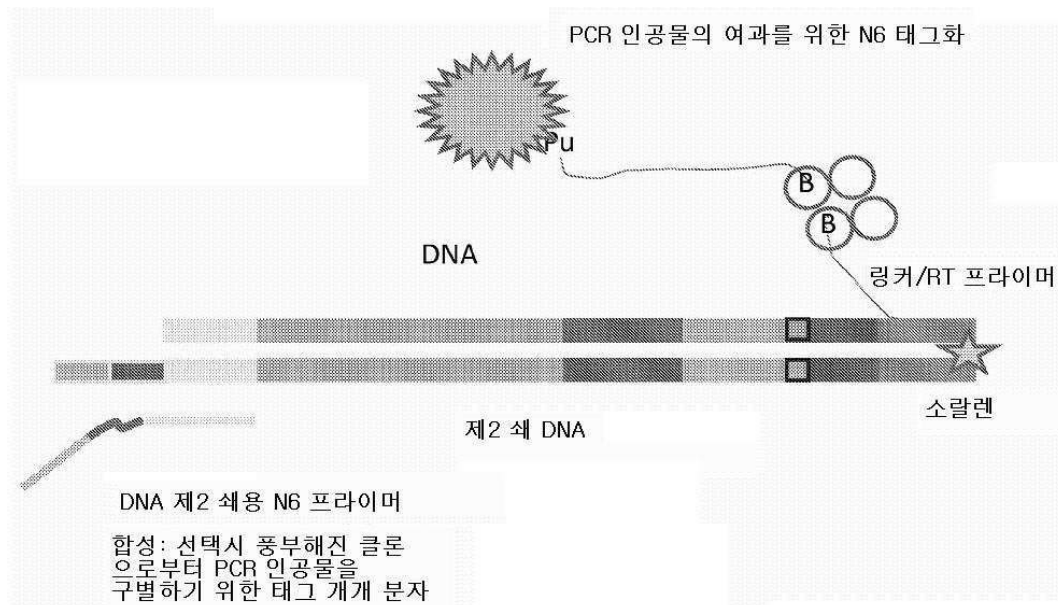
도면26



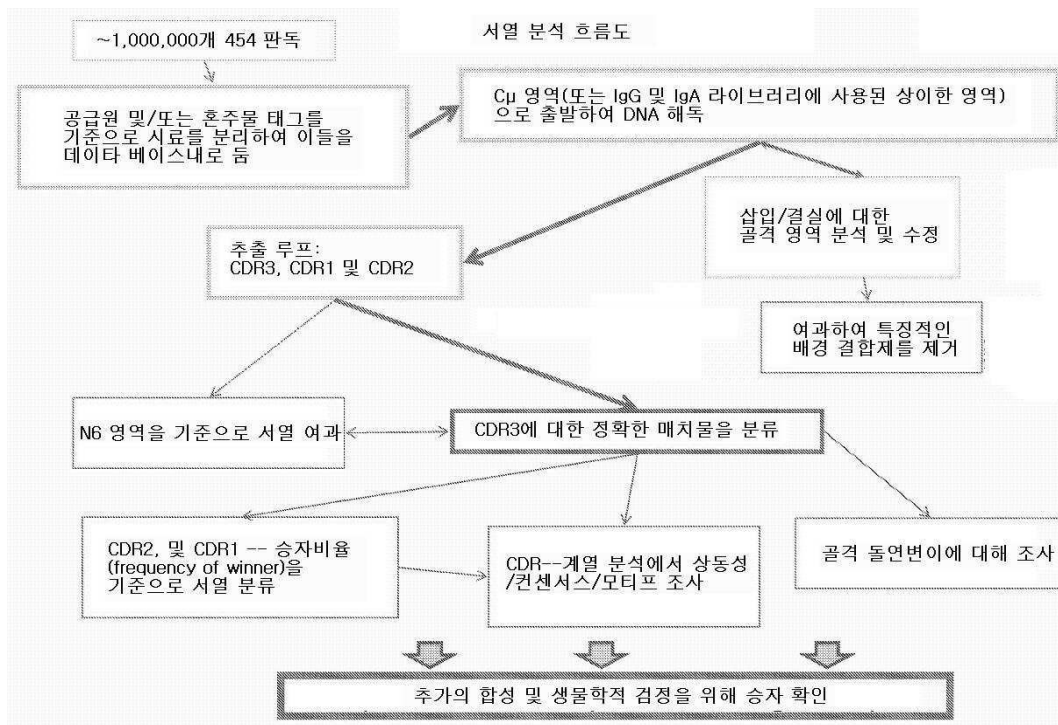
도면27



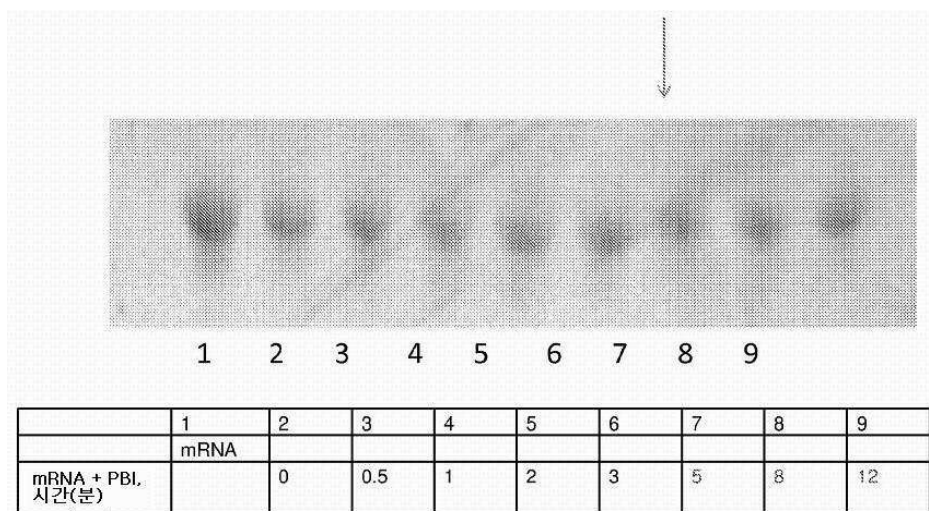
도면28



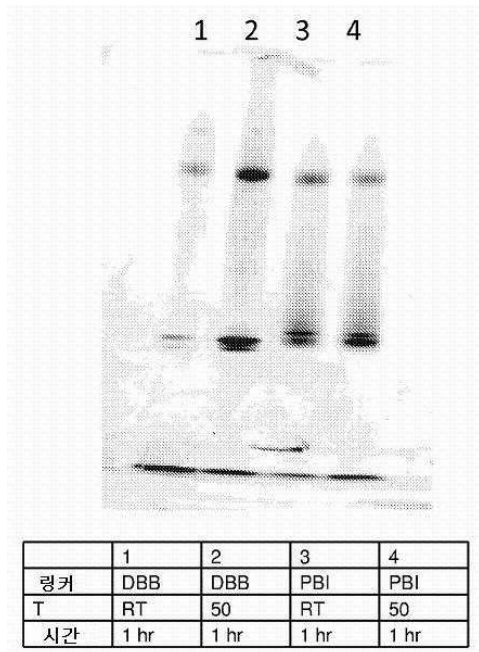
도면29



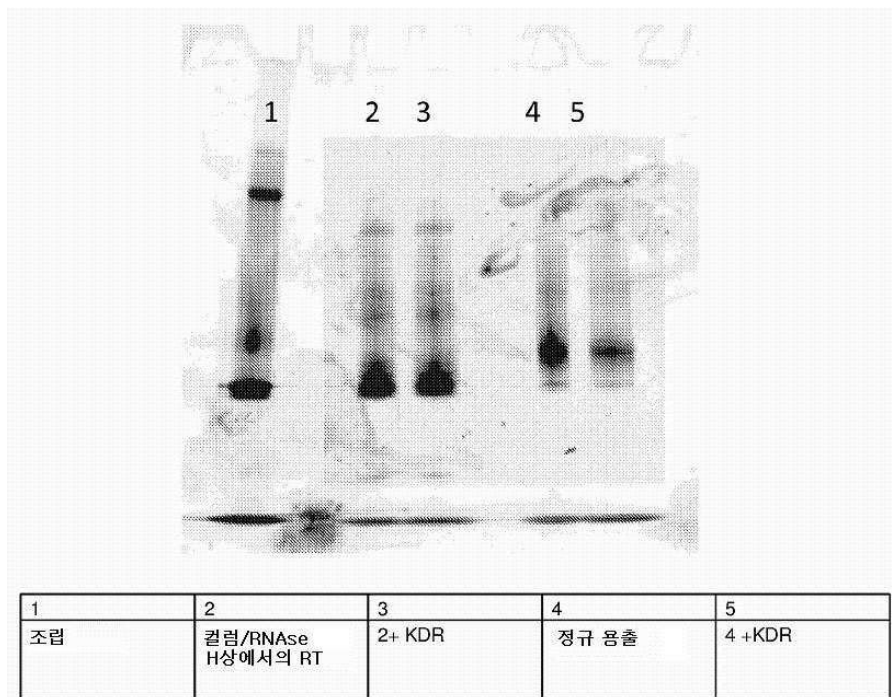
도면30



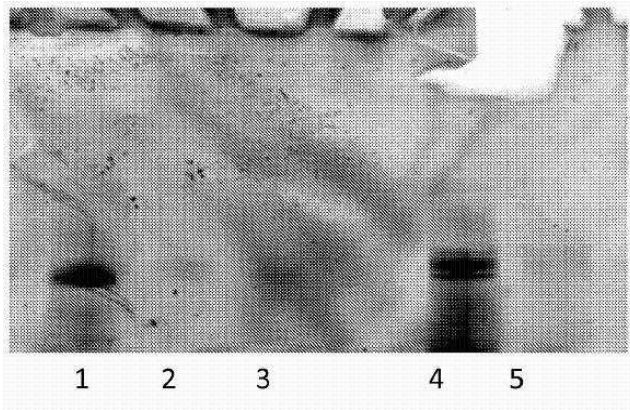
도면31



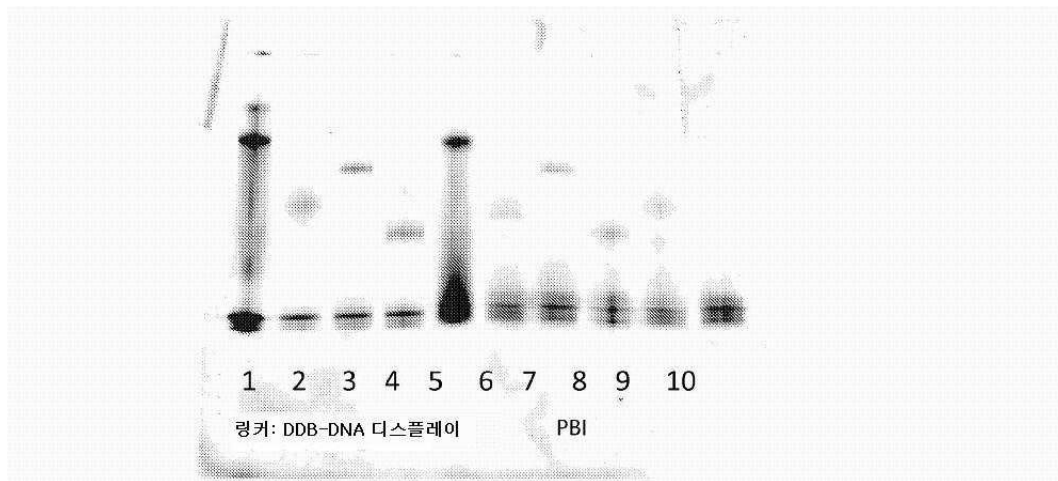
도면32



도면33



도면34



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------|-----|-----|--------|------|-----|-----|--------|------|-----|--------|
| 링커 | DDB | DDB | DDB | DDB | PBI | PBI | PBI | PBI | PBI | PBI |
| 조건 | 조립 | RT | RNaseH | 제2 섹 | 조립 | RT | RNaseH | 제2 섹 | RT | RNaseH |
| RT 프라이머 | | DDB | DDB | DDB | | PBI | PBI | PBI | S6 | S6 |
| 제2 섹 프라이머 | | | | Y7 | | | | Y7 | | |

<130> IPA110084
 <150> US61/083,813
 <151> 2008-07-25
 <150> US61/090,111
 <151> 2008-08-19
 <150> US61/170,029
 <151> 2009-04-16
 <160> 62
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgM cDNA
 <400> 1
 acaggagacg agggggaaaa g 21
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> IgG cDNA
 <400> 2
 gccaggggga agaccgatgg 20
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgA cDNA
 <400> 3
 gaggctcagc gggaagacct tg 22
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Vk cDNA

<400> 4
caactgctca tcagatggcg g 21
<210> 5
<211
> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> V1 cDNA
<400> 5
cagtgtggcc ttgttgctt g 21
<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR 3' IgM
<400> 6
ggttggggcg gatgcactcc c 21
<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR 3' IgG
<400> 7
cgatgggccc ttgttgarg c 21
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PCR 3' IgA
<400> 8
cttgggctg gtcgggatg c 21
<210> 9
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR 3' Vk
 <400> 9
 agatggtgca gccacagttc g 21
 <210> 10
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> J 1-3C
 <400> 10
 agatggtgca gccacagttc gtaggacggt sascttggtc cc 42

 <210> 11
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> J 7C
 <400> 11
 agatggtgca gccacagttc ggaggacggt cagctgggtg cc 42
 <210> 12
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH1a
 <400> 12
 caattactat ttacaattac aatgcaggtk cagctggtgc agtctg 46
 <210> 13
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH1b
 <400> 13
 caattactat ttacaattac aatgcaggtc cagcttgtgc agtctg 46

 <210> 14

<211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH1c
 <400> 14
 caattactat ttacaattac aatgsaggtc cagctggtac agtctg 46
 <210> 15
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH1d
 <400> 15
 caattactat ttacaattac aatgcaratg cagctggtgc agtctg 46
 <210> 16
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH2
 <400> 16
 caattactat ttacaattac aatgcagrtc accttgaagg agtctg 46

 <210> 17
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH3a
 <400> 17
 caattactat ttacaattac aatggargtg cagctggtgg agtctg 46
 <210> 18
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH3b
 <400> 18
 caattactat ttacaattac aatgcaggtg cagctggtgg agtctg 46

<210> 19
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH3c
 <400> 19
 caattactat ttacaattac aatggaggtg cagctgttgg agtctg 46

<210> 20
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH4a
 <400> 20
 caattactat ttacaattac aatgcagstg cagctgcagg ag 42

<210> 21
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH4b
 <400> 21
 caattactat ttacaattac aatgcaggtg cagctacagc agtgg 45

<210> 22
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH5
 <400> 22
 caattactat ttacaattac aatggargtg cagctggtgc agtctg 46

<210> 23
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH6

<400> 23
caattactat ttacaattac aatgcaggta cagctgcagc agtcag 46

<210> 24
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> VH7
<400> 24
caattactat ttacaattac aatgcaggtg cagctggtgc aatctg 46

<210> 25
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> linkVk1a
<400> 25
ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg racatccaga tgaccag 48

<210> 26
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> linkVk1b
<400> 26
ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg gmatccagt tgaccag 48

<210> 27
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> linkVk1c
<400> 27
ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg gccatccrga tgaccag 48

<210> 28
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> linkVk1d
 <400> 28
 ggccggaggtg gctctggcgg tggcggatcg gtcatttga tgaccag 48

<210> 29
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> linkVk2a
 <400> 29
 ggccggaggtg gctctggcgg tggcggatcg gatatttga tgaccag 48

<210> 30
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> linkVk2b
 <400> 30
 ggccggaggtg gctctggcgg tggcggatcg gatrttga tgactcag 48

<210> 31
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> linkVk3a
 <400> 31
 ggccggaggtg gctctggcgg tggcggatcg gaaattgtg tgaccag 48

<210> 32
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> linkVk3a
 <400> 32
 ggccggaggtg gctctggcgg tggcggatcg gaaatagtga tgaccag 48

<210> 33
 <211> 48

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVk3a
 <400> 33
 ggccgagggtg gctctggcgg tggcggatcg gaaattgtaa tgacacag 48
 <210> 34
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVk4
 <400> 34
 ggccgagggtg gctctggcgg tggcggatcg gacatcgtga tgaccag 48

 <210> 35
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVk5
 <400> 35
 ggccgagggtg gctctggcgg tggcggatcg gaaacgacac tcacgcag 48
 <210> 36
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVk6a
 <400> 36
 ggccgagggtg gctctggcgg tggcggatcg gaaattgtgc tgactcag 48
 <210> 37
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVk6b
 <400> 37
 ggccgagggtg gctctggcgg tggcggatcg gatgttga tgacacag 48

<210> 38
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL1a
 <400> 38
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg cagtctgtgc tgackcag 48
 <210> 39
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL1b
 <400> 39
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg cagtctgtgy tgaccgag 48
 <210> 40
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL2
 <400> 40
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg cagtctgccc tgactcag 48

 <210> 41
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL3a
 <400> 41
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg tcctatgwgc tgactcag 48
 <210> 42
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL3b
 <400> 42

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg tcctatgagc tgacacag 48

<210> 43

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linkVL3c

<400> 43

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg tcttctgagc tgactcag 48

<210> 44

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linkVL3d

<400> 44

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg tcctatgagc tgatgcag 48

<210> 45

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linkVL4

<400> 45

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg cagcytgtgc tgactcaa 48

<210> 46

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linkVL5

<400> 46

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcg cagsctgtgc tgactcag 48

<210> 47

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linkVL6
 <400> 47
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg aattttatgc tgactcag 48
 <210> 48
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL7
 <400> 48
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg cagrctgtgg tgactcag 48
 <210> 49
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL8
 <400> 49
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg cagactgtgg tgaccag 48
 <210> 50
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL4/9
 <400> 50
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg cwgcctgtgc tgactcag 48
 <210> 51
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linkVL10
 <400> 51
 ggccggagggtg gctctggcgg tggcggatcg caggcagggc tgactcag 48
 <210> 52
 <211> 42
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 52
 taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta ca 42

<210> 53
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 53
 taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta caatg 45

<210> 54
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 54
 ttttttttt ttttttttt aaatagcggg tgctaaggac gacttgtcgt cgtcgtcctt 60
 gtagtcggtt ggggcggatg cactccc 87

<210> 55
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Frame 1
 <400> 55
 Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala Ser Ala Ile Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 20 25

<210> 56
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> XB-S6-1
 <400> 56
 ttaaatacgcg gatgctaagg acgacttgtc gtcgtcgtcc ttgtagtcgg ttggggcgga 60
 tgcactccc 69

<210> 57
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Frame 1
 <400> 57

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala Ser Ala Ile
 20

<210> 58
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XB_S7a

<400> 58
 taatacgact cactataggg acaattacta ttacaatta caatg 45

<210> 59
 <211> 53

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 59
 gcctccctcg cgccatcagn nnnnngggac aattactatt tacaattaca atg 53

<210> 60
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 60
gccttgccag cccgctcagt agcggatgct aagcacga 38
<210> 61
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward
<400> 61
gcctcctcg cgccatcag 19

<210> 62
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse
<400> 62
gccttgccag cccgctcag 19