



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0117931
(43) 공개일자 2012년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7023732
(22) 출원일자(국제) 2011년02월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년09월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/024554
(87) 국제공개번호 WO 2011/100566
국제공개일자 2011년08월18일
(30) 우선권주장
61/304,251 2010년02월12일 미국(US)
61/437,889 2011년01월31일 미국(US)

(71) 출원인
온코메드 파마슈티칼스, 인크.
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 체사피크 드라이브 800
(72) 발명자
거니, 오스틴, 엘.
미국 94114 캘리포니아주 샌프란시스코 다이아몬드 스트리트 946
라제틱, 알렉산드라, 엘. 엘.
미국 95120 캘리포니아주 산호세 에코 릿지 코트 1256
본드, 크리스토퍼, 제이.
미국 94403 캘리포니아주 산마테오 30쓰 애비뉴 511
(74) 대리인
양영준, 양영환

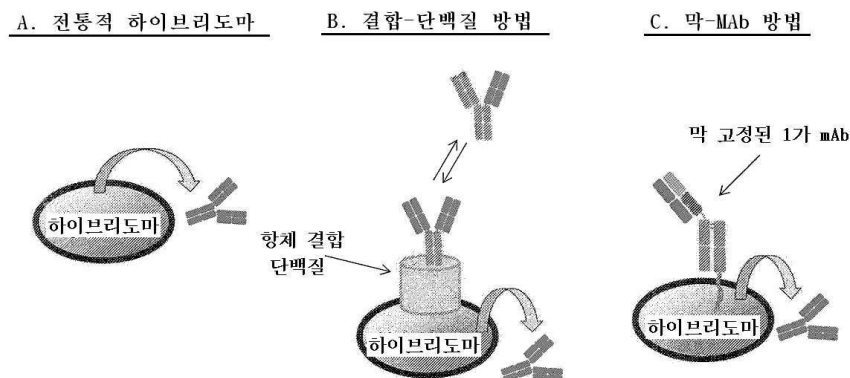
전체 청구항 수 : 총 216 항

(54) 발명의 명칭 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 확인 및 분리하는 방법

(57) 요약

본 발명은 신규 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 포함하는 세포에 관한 것이다. 상기 폴리펩타이드 및 세포는 특이적인 생물학적 기능을 가진 단백질을 생산하는 세포를 확인하고/하거나 분리하는 방법에 사용된다. 특히, 상기 방법은 항원-특이적 모노클로날 항체를 생산하는 세포를 확인, 선택 및 분리하기 위해 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포외 부분; 및
(b) 비-면역글로불린 막형단 부분을 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역이 적어도 하나의 힌지 영역을 추가로 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역이 Fc 영역을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역이 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 또는 이들의 임의의 아형인 것인 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역이 IgG1 또는 IgG2인 것인 폴리펩타이드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역이 인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역인 것인 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역이 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역인 것인 폴리펩타이드.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역이 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막형단 부분이 CD4, CD8, 클래스 I MHC, 클래스 II MHC, CD19, T-세포 수용체 α 및 β 사슬, CD3, 제타(zeta) 사슬, ICAM1(CD54), ICAM2, ICAM3, ICAM4, ICAM5, CD28, CD79a, CD79b 및 CD2로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 막형단 도메인의 부분을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막형단 부분이 서열번호 13 또는 서열번호 16을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 막-결합되고, 면역글로불린 중쇄 영역이 세포 표면에서 발현되는 것인 폴리펩타이드.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 부위를 갖지 않는 것인 폴리펩타이드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제2폴리펩타이드와 이중이합체 분자를 형성할 수 있는 폴리펩타이드.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 15

제13항 또는 14항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄를 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄가 면역글로불린 경쇄와 결합되어 있는 것인 폴리펩타이드.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 20

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성할 수 있는 폴리펩타이드.

청구항 21

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 이중이합체 항체 분자를 형성하기 위한 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 중쇄 영역과 적어도 하나의 이황화결합을 형성할 수 있는 폴리펩타이드.

청구항 22

제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중이합체 항체 분자가 하나의 항원-결합 부위를 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 분비된 항체와 결합하지 않는 폴리펩타이드.

청구항 24

서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 25

서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 26

서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32와 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 27

서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 28

본질적으로 SEQ ID:30, 서열번호 31 또는 서열번호 32로 구성된 폴리펩타이드.

청구항 29

서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 29에 의해 인코딩(encoding)된 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩타이드를 포함하는 항체 분자.

청구항 31

제30항에 있어서, (a) 면역글로불린 중쇄; 및 (b) 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함하는 항체 분자.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 Fc 영역과 적어도 하나의 이항화결합을 형성하는 것인 항체 분자.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원 결합 부위를 포함하는 항체 분자.

청구항 34

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 35

서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 29와 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 36

서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 29의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 기재된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 기재된 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 39

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩타이드 또는 항체 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 40

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 기재된 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 세포를 트랜스펙션시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 트랜스펙션된 세포가 상기 폴리펩타이드를 발현하는 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 세포가 일시적으로 트랜스펙션되는 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 43

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 세포가 안정적으로 트랜스펙션되는 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 44

제40항에 있어서, 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포의 게놈에 혼입되는 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 45

제40항, 제41항, 제43항 또는 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드가 안정적으로 발현되는 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 46

제40항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 상기 세포의 표면에서 발현되는 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 47

제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 표면에서의 상기 폴리펩타이드의 발현을 검출하는 단계를 포함하는, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 48

제40항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 표면에서 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 49

제40항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 포유류 세포인 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 50

제40항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 무린(murine) 세포인 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 51

제40항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 인간 세포인 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 52

제40항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 융합 파트너 세포주인 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 53

제40항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 Sp2/0, Sp2/0-Ag14, YB2/0, K6H6/B5, NS-1, F0, Y3/Ag 1.2.3, P3X63Ag8.653, HEK-293, 293T 및 CHO로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 숙주 세포 생산 방법.

청구항 54

제40항 내지 제53항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 숙주 세포.

청구항 55

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 기재된 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 56

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩타이드 또는 항체 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 57

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드 또는 항체 분자를 발현하는 숙주 세포.

청구항 58

제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 숙주 세포.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드가 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 60

제58항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 61

제58항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄를 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 62

제58항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드가 면역글로불린 경쇄를 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 63

제58항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체를 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 64

제58항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드가 항체인 것인 숙주 세포.

청구항 65

제58항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 이중이합체 분자를 형성하기 위해 제2폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성하는 것인 숙주 세포.

청구항 66

제58항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 이중이합체 항체 분자를 형성하기 위해 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍과 적어도 하나의 이황화결합을 형성하는 것인 숙주 세포.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍이 단일 항원 결합 부위를 형성하는 것인 숙주 세포.

청구항 68

제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중이합체 분자가 상기 세포의 표면에서 발현되고, 단일 항원 결합 부위를 포함하는 것인 숙주 세포.

청구항 69

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중이합체 분자가 분비된 항체와 결합하지 않는 것인 숙주 세포.

청구항 70

제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 기재된 세포를 항체-생산 세포와 융합시키는 단계를 포함하는, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 융합된 세포가 상기 세포의 표면에 이중이합체 항체 분자를 발현하는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 항체-생산 세포의 집단인 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 면역화된 동물로부터 유래되는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 74

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 나이브(naive) 동물로부터 유래되는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 75

제70항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 B-세포, 형질 세포, 하이브리도마, 골수종 및 제조합 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 76

제70항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 마우스 세포인 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 77

제70항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 인간 세포인 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 78

제70항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 81

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체 분자를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 82

제78항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 DNA 라이브러리를 포함하는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 면역화된 동물의 세포로부터 생성되는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 84

제82항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 나이브(naive) 라이브러리인 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 85

제82항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 cDNA 라이브러리인 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 86

제70항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합된 세포가 복수의 이중융합체 항체 분자를 발현하는 하이브리도마 세포의 집단을 포함하는 것인, 하이브리도마 세포의 생산 방법.

청구항 87

제70항 내지 제86항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 하이브리도마 또는 하이브리도마 라이브러리.

청구항 88

세포 라이브러리를 생산하는 방법으로서, 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 복수의 폴리뉴클레오타이드로 제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 기재된 세포를 트랜스펙션시키는 단계를 포함하는, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 트랜스펙션된 세포가 이중융합체 분자를 발현하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 이중융합체 분자가 상기 트랜스펙션된 세포의 표면에서 발현되는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 91

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 92

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 93

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 94

제88항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 95

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체 분자를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 96

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하며, 상기 복수의 폴리펩타이드의 각각의 폴리펩타이드가 (a) 면역글로불린 Fc 영역 및 (b) 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 97

제88항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 DNA 라이브러리를 포함하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 면역화된 동물의 세포로부터 생성되는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 99

제97항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 나이트 라이브러리인 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 100

제97항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 cDNA 라이브러리인 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 101

제97항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 무작위 폴리펩타이드 라이브러리를 인코딩하는 것인, 세포 라이브러리의 생산 방법.

청구항 102

제88항 내지 제101항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 세포 라이브러리.

청구항 103

특정 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법으로서, 하이브리도마 세포의 집단을 생산하기 위해 항체-생산 세포와 제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 기재된 세포를 융합시키는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 상기 하이브리도마 세포가 상기 세포의 표면에서 이중융합체 항체 분자를 발현하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 105

제103항 또는 제104항에 있어서, 상기 하이브리도마 세포의 집단을 검출 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 하이브리도마 세포를 확인하는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 107

제105항 또는 제106항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 108

제103항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 항체-생산 세포의 집단인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 109

제103항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 면역화된 동물로부터 유래되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 110

제103항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 나일브 동물로부터 유래되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 111

제103항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 B-세포, 형질세포, 하이브리도마, 골수 종 및 재조합 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 112

제103항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 마우스 세포인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 113

제103항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 인간 세포인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 114

제103항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포가 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 116

제114항 또는 제115항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리

펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 117

제114항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체 분자를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 118

제114항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 DNA 라이브러리를 포함하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 면역화된 동물의 세포로부터 생성되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 120

제118항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 나이트 라이브러리인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 121

제118항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 cDNA 라이브러리인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 122

제103항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체가 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 또는 항체 단편인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 123

제103항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체가 단일특이성(monospecific) 항체 또는 이특이성(bispecific) 항체인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 124

제103항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체가 1가(monovalent) 항체인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 125

제103항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체가 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 126

제103항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체가 IgG1 또는 IgG2 항체인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 127

제105항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 단백질 또는 이의 단편인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 128

제105항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 관심 항원인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 129

제105항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 표지되어 있는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 검출 분자가 형광단, 발색단 또는 자성 화합물로 표지되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 131

제106항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 세포를 확인하는 단계는 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 행하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 132

제107항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 세포를 분리하는 단계는 FACS에 의해 행하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 133

특정 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법으로서, 제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 기재된 세포를 적어도 하나의 폴리펩타이드를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드로 트랜스펙션시키는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 트랜스펙션된 세포가 상기 세포의 표면에서 이중이합체 항체 분자를 발현하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 135

제133항 또는 제134항에 있어서, 상기 트랜스펙션된 세포를 검출 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 확인하는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 137

제135항 또는 제136항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 138

제133항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드가 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 140

제138항 또는 제139항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 141

제138항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체 분자를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 142

제138항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드가 DNA 라이브러리를 포함하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 143

제142항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 면역화된 동물의 세포로부터 생성되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 144

제142항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 나이트 라이브러리인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 145

제142항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 cDNA 라이브러리인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 146

제133항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드가 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 또는 항체 단편인 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 147

제133항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드가 단일특이성 항체 또는 이특이성 항체인 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 148

제133항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드가 1가 항체인 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 149

제133항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드가 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형인 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 150

제133항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드가 IgG1 또는 IgG2 항체인 폴리펩타이드를 인코딩하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 151

제135항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 단백질 또는 이의 단편인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 152

제135항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 관심 항원인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 153

제135항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 표지되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 154

제153항에 있어서, 상기 검출 분자가 형광단, 발색단 또는 자성 화합물로 표지되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 155

제136항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 확인하는 단계는 유 세포분석에 의해 행해지는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 156

제137항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 단계는 FACS에 의해 행해지는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 157

특정 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법으로서, 항체-생산 세포를 포함하는 세포 라이브러리를 제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 기재된 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 트랜스펙션시키는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 158

제157항에 있어서, 상기 트랜스펙션된 세포가 상기 세포의 표면에서 이중이합체 항체 분자를 발현하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 159

제157항 또는 제158항에 있어서, 상기 트랜스펙션된 세포를 검출 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 160

제159항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 확인하는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 161

제159항 또는 제160항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 162

제151항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 라이브러리가 B-세포, 형질세포, 하이브리도마, 골수 종 및 재조합 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 163

제151항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 라이브러리가 하이브리도마 라이브러리인 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 164

제151항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 라이브러리가 마우스 세포를 포함하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 165

제151항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 라이브러리가 인간 세포를 포함하는 것인, 특정 항체를 생산하는 세포의 확인 방법.

청구항 166

제103항 내지 제165항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 확인된 세포에 의해 생산된 항체.

청구항 167

제107항 내지 제132항, 제137항 내지 제156항 및 제161항 내지 제165항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 분리된 세포에 의해 생산된 항체.

청구항 168

각 세포가 (a) 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 기재된 제1폴리펩타이드; 및 (b) 면역글로불린 중쇄를 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함하고,

상기 두 폴리펩타이드가 이종이합체 분자를 형성할 수 있는 것인, 세포 라이브러리.

청구항 169

제168항에 있어서, 상기 이종이합체 분자가 상기 세포의 표면에서 발현되는 것인 세포 라이브러리.

청구항 170

제168항 또는 제169항에 있어서, 각 세포가 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함하는 것인 세포 라이브러리.

청구항 171

제168항 또는 제169항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체 분자를 포함하는 것인 세포 라이브러리.

청구항 172

제168항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이종이합체 분자가 단일 항원-결합 부위를 포함하는 것인 세포 라이브러리.

청구항 173

각 세포가 (a) 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 제1폴리펩타이드; 및 (b) CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함하고,

상기 두 폴리펩타이드가 이종이합체 분자를 형성할 수 있는 것인, 세포 라이브러리.

청구항 174

제173항에 있어서, 상기 이종이합체 분자가 상기 세포의 표면에서 발현되는 것인 세포 라이브러리.

청구항 175

제173항 또는 제174항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 것인 세포 라이브러리.

청구항 176

제173항 또는 제174항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체 분자를 포함하는 것인 세포 라이브러리.

청구항 177

제173항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 무작위 생성된 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 것인 세포 라이브러리.

리.

청구항 178

세포 라이브러리를 스크리닝하는 방법으로서, 제168항 내지 제177항 중 어느 한 항에 기재된 세포 라이브러리를 검출 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 179

제178항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 확인하는 단계를 포함하는, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 180

제178항 또는 제179항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 181

제178 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 단백질 또는 이의 단편인 것인, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 182

제178항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 관심 항원인 것인, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 183

제178항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 세포 표면 수용체, 리간드, 항체 또는 이들의 단편인 것인, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 184

제178항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 소분자인 것인, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 185

제178항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자가 표지되는 것인, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 186

제179항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 확인하는 단계는 유세포분석에 의해 행해지는 것인, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 187

제180항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 단계는 FACS에 의해 행해지는 것인, 세포 라이브러리의 스크리닝 방법.

청구항 188

제178항 내지 제187항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 확인된 세포.

청구항 189

제178항 내지 제187항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 분리된 세포.

청구항 190

숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현을 조절하는 방법으로서, 숙주 세포를 (a) 면역글로불린을 인코딩하는 DNA, 및 (b) 과량의 관련없는 DNA로 트랜스펙션시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 191

제190항에 있어서, 상기 면역글로불린을 인코딩하는 DNA와 관련없는 DNA의 비가 1:10 내지 1:1,000,000인 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 192

제190항 또는 제191항에 있어서, 상기 면역글로불린을 인코딩하는 DNA가 플라스미드 DNA이고, 상기 관련없는 DNA가 플라스미드 DNA인 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 193

제190항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩타이드 또는 제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 기재된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 194

제190항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린이 면역글로불린 중쇄를 포함하는 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 195

제190항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 면역글로불린 경쇄를 포함하는 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 196

제190항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린이 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 항체 분자인 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 197

제190항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린을 인코딩하는 DNA가 DNA 라이브러리인 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 198

제197항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 면역화된 동물의 세포로부터 생성되는 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 199

제197항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 나일브 동물의 세포로부터 생성되는 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 200

제197항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리가 cDNA 라이브러리인 것인, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 201

제190항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포를 검출 분자와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 202

제201항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 숙주 세포를 확인하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 203

제201항 또는 제202항에 있어서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 숙주 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 표면에서의 이중이합체 항체 분자의 발현 조절 방법.

청구항 204

(a) (i) 제1 이합체화 도메인을 포함하는 세포외 부분; 및 (ii) 막횡단 부분을 포함하는 제1폴리펩타이드; 및
(b) 제2 이합체화 도메인을 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함하는 이중이합체 분자.

청구항 205

제204항에 있어서, 상기 제1 이합체화 도메인이 면역글로불린 불변 영역인 것인 이중이합체 분자.

청구항 206

제204항 또는 제205항에 있어서, 상기 제1 이합체화 도메인이 면역글로불린 중쇄 불변 영역인 것인 이중이합체 분자.

청구항 207

제204 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 이합체화 도메인이 면역글로불린 불변 영역인 것인 이중이합체 분자.

청구항 208

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 이합체화 도메인이 면역글로불린 중쇄 불변 영역인 것인 이중이합체 분자.

청구항 209

제204항에 있어서, 상기 제1폴리펩타이드가 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩타이드를 포함하는 것인 이중이합체 분자.

청구항 210

제204항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 이중이합체 분자.

청구항 211

제204항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 것인 이중이합체 분자.

청구항 212

제204항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄를 포함하는 것인 이중이합체 분자.

청구항 213

제212항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄가 면역글로불린 경쇄와 결합되어 있는 것인 이중이합체 분자.

청구항 214

제204항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2폴리펩타이드가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경

쇄를 갖는 단쇄 번역글로불린을 포함하는 것인 이중이합체 분자.

청구항 215

제204항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1폴리펩타이드가 상기 제2폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성하는 것인 이중이합체 분자.

청구항 216

제204항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 항원-결합 부위를 포함하는 이중이합체 분자.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은, 미국 가출원 번호 제61/304,251호(출원일: 2010년 2월 12일) 및 미국 가출원 번호 제61/437,889호(출원일: 2011년 1월 31일)에 대한 우선권의 이득을 주장하며, 이들 기초출원은 각각 그들의 전문이 참조로서 본원에 포함된다.

[0003] 발명의 기술분야

[0004] 본 발명의 분야는 일반적으로 신규한 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 포함하는 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 확인하고/하거나 분리하는 방법에 상기 폴리펩타이드를 이용하는 것에 관한 것이다. 상기 방법은 항원-특이적 모노클로날 항체를 생산하는 세포를 확인하고 분리하기 위해 사용될 수 있다.

배경 기술

[0005] 1970년대에 모노클로날 항체 기술이 개발된 이후, 모노클로날 항체는 점점 더 중요한 치료제 부류가 되어가고 있다. 하이브리도마 기술은 여전히 모노클로날 항체를 생산하기 위해 가장 보편적으로 사용되는 방법이다. 모노클로날 항체는 정상적인 항체를 생성하는 B-세포를 무한증식 골수종 세포 또는 기타 무한증식 세포와 융합함으로써 만들어진다. 모노클로날 항체 개발의 과정은 통상적으로 관심 항원에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하기 위해 상청액(supernatant)을 스크리닝하는 몇몇 순환적 과정을 포함한다.

[0006] 관심 항원에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 확인은 전형적으로 ELISA 스크리닝에 의해 달성된다. 하이브리도마 라이브러리로부터 무작위 하이브리도마 클론의 풀(pool)에 의해 생성된 상청액은 스크리닝될 수 있다. 이러한 방법은 개별 클론을 분리하기 위해 양성(positive) 풀의 제한적 희석에 이어 모든 클론들을 다시 스크리닝할 필요가 있기 때문에 한계를 가지고 있다. 일부 경우에서, 하이브리도마 라이브러리는 첫번째 단계로서 제한 희석에 의해 클로닝되며, 이는 스크리닝할 엄청난 수의 개별 클론을 발생시킨다. 제한 희석 단계를 포함하는 모든 방법은 시간소모적이고 매우 노동집약적이기 때문에 문제가 있다. 또한, 어떤 경우에는 바람직한 클론이 하이브리도마 라이브러리 중 극도로 낮은 백분율로 존재할 수 있으며, 이는 극히 적은 수의 클론의 확인을 어렵게 만든다. 또한, ELISA 스크리닝 방법은 단일 항원에 대한 결합 활성을 확인한다. 모노클로날 항체가 하나 이상의 항원과 결합하는 지를 결정하기 위해서는, 다중의 연속적인 ELISA 스크리닝이 상이한 개별 항원으로 수행되어야만 한다.

[0007] 만약 항체를 생산하는 세포가 항체-생산 세포 자체를 직접 확인할 수 있는 형태(예, 세포의 표면)로 항체를 보유하게 된다면 유리할 것이다. 이러한 방법은 파아지 디스플레이(phage display) 기술이 매우 성공적이었던 이유 중 하나이다. 사실, 정상 B-세포는 막-결합된 번역글로불린을 만들고 이 분자는 항원과의 결합에 반응하여 신호를 전달하는 B-세포 수용체 복합체의 핵심 구성요소이다. 천연의 막-결합된 항체의 존재는 직접적으로 하이브리도마를 분리하려는 시도에서 이전에 활용되어 왔다(참조: Parks et al. 1979, *PNAS*, 76:1962-1966). 그러나, 막-결합된 항체의 극도로 낮은 수준은 상기 방법을 제한적으로 활용하도록 만들었다. 몇몇 다른 기술들이 추가적인 이러한 목적을 위해 개발되어 왔다. 한 방법은 "분비 포획 보고 웹(secretion capture report web, SCRWB)으로, 이 방법은 비오틴화된 아가로스 미적(microdroplet)으로 세포를 캡슐화시키고, 이어서 상기 점적 현탁액을 아비딘 및 비오틴화된 항-마우스 IgG와 함께 인큐베이션하는 것이다. 아비딘은 상기 비오틴화된 아가로스 및 비오틴화된 항-마우스 항체 사이에 연결다리 역할을 하여 상기 세포에 의해 분비되는

항체를 트랩(trap)하기 위한 상기 점적 내에 포획 부위를 형성한다. 이러한 항체-함유 미적은 수용체에 결합하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있고(예, 형광-태그된(tagged) 항원), 상기 미적은 유세포분석에 의해 분리될 수 있다(참조: Kenney et al., 1995, *Nature Biotechnology* 8:787-90; Gray et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:155-63). 다른 방법들은 세포의 표면에 분비된 단백질 또는 항체를 일시적으로 포획하는 능력에 기초한 것들이다. "포획된" 단백질 또는 항체는 리포터 분자(예, 형광-태그된 항원)의 결합에 의해 세포 표면에서 검출될 수 있고, 예를 들어 유세포분석에 의해 분리될 수 있다(참조: 미국특허번호 제6,919,183호 및 제7,166,423호; 및 미국출원번호 제2010/0009866호).

[0008]

상기 기술들 각각은 제한점을 가지고 있다. 아가로스 미적 기술은 기술적으로 어렵고 아가로스 미적을 생성시키기 위한 특별한 장치를 필요로 한다. 또한 세포들이 캡슐화 과정에 대해 민감할 수 있다. 세포 표면 포획 방법은 관심 하이브리도마 세포에 의해 생산된 항체와 다른 하이브리도마 세포에 의해 생산된 항체를 충분히 구별하지 못한다. 이웃하는 세포들 사이에 관심 항체 또는 단백질의 확산은 문제가 될 수 있다. 예를 들어, 항체는 상기 항체를 생산했던 세포 상의 포획 분자로부터 분리 및 확산되어 다른 항체를 생산하는 세포에 의해 "포획"될 수 있다. 따라서 일부 경우에 있어서, 상기 방법은 발현 세포로부터의 단백질 또는 항체의 확산을 감소시키기 위해 고 점성도 배지를 필요로 한다. 추가로, 하이브리도마에 의해 생산된 모든 항체가 실제로 상기 세포 표면에서 포획되는 것은 아니며, 이러한 잉여 항체는 배지로 분비되어 다른 무작위 하이브리도마 세포 상의 포획 분자에 쉽게 결합할 수 있다. 따라서, 항원-특이적 모노클로날 항체를 생산하는 세포를 확인하고 선택하기 위한 새롭고/새롭거나 향상된 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0009]

본 발명은 신규 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 포함하는 세포뿐만 아니라 폴리펩타이드를 생산하는 세포를 확인하고/하거나 선별하기 위해 상기 폴리펩타이드, 세포 및 세포 라이브러리를 사용하는 방법에 대해 기술한다. 특히, 상기 방법은 항원-특이적 모노클로날 항체를 생산하는 세포를 확인하고 분리하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 단일 항원-결합 부위를 포함하는 막-결합된 이중이합체 분자를 세포의 표면에서 발현시키는 접근법을 제공한다. 상기 단일 항원-결합 부위는 상기 세포에 의해 생산된 항체의 결합 특이성을 나타낸다. 상기 이중이합체 분자는 분비된 항체와 "결합"하지 않으며, 따라서 다른 세포의 표면에 결합되거나 제시되는 하나의 세포에 의해 생산된 항체와의 문제점은 제한적이거나 문제점이 존재하지 않는다. 본원에 기술되는 바와 같은 상기 방법 및 작제물은 "막-MAb" 또는 "막-MAb 기술" 및 "막-MAb 작제물"로 언급된다. 상기 신규 폴리펩타이드 작제물은 이합체화 도메인 및 면역글로불린 또는 비-면역글로불린 단백질로부터의 막횡단 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 신규 폴리펩타이드 작제물은 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 면역글로불린 또는 비-면역글로불린 단백질로부터의 막횡단 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 신규 폴리펩타이드 작제물은 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 GPI(글리코실포스파티딜이노시톨)-막 앵커를 포함한다. 세포가 상기 폴리펩타이드 및, 예를 들어, 면역글로불린 중쇄 둘 모두를 발현하는 경우, 상기 폴리펩타이드들은 상기 세포의 표면에서 발현되는 1가 항체를 포함하는 이중이합체 분자를 생산하기 위해 결합된다. 상기 이중이합체 분자는 항체-결합 단백질이 아니며, 이에 따라 분비된 항체에 결합되거나 포획되지 않는다. 막-MAb 방법의 비제한적 예는 도 1C에 도시되어 있다. 이는 전통적인 하이브리도마 기술(도 1A) 및 표면 포획 방법의 일례(도 1B)와 비교된다.

[0010]

하나의 양상에서, 본 발명은 제2폴리펩타이드와 이중이합체 분자를 형성할 수 있는 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서 제1폴리펩타이드는 막-결합된 것이고 상기 이중이합체 분자는 세포의 표면에서 발현된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) 이합체화 도메인을 포함하는 세포의 부분, 및 (b) 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이합체화 도메인은 Fc 영역, 면역글로불린 불변 영역, 류신 지퍼(leucine zipper) 또는 이소류신 지퍼(isoleucine zipper)를 포함하나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 이합체화 도메인은 수용체, 인테그린 또는 이합체 또는 다합체 구조를 일반적으로 형성할 수 있는 임의의 분자로부터 유래할 수 있다. 상기 이합체화 도메인은, 예를 들어, 면역글로불린, LFA-1, GPIIIb/IIIa, 신경성장인자(NGF), 뉴로트로핀-3(NT-3), 인터류킨-8(IL-8), IL-8 수용체, 혈관내피성장인자(VEGF), 뇌유래 신경영양인자(BDNF), Fos, Jun, NFkB, Ras, CD4, Bcl-2, Myc 및 Met로부터 유래할 수 있다.

[0011]

일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분, 및 (b) 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분; 및 (b) 비-면역글로불린 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 힌지(hinge) 영역, CH2 및 CH3 도메인의 적어도 일부분을 포함한다. 일부

구체예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형(subtype)으로부터 유래한다. 특정 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 IgG1 또는 IgG2 항체로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8을 포함한다.

[0012] 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 면역글로불린 또는 비-면역글로불린 단백질로부터의 막횡단 도메인의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 인간 단백질로부터 유래한다. 특정 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 마우스 단백질로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 B-세포 면역글로불린 단백질로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 마우스 B-세포 면역글로불린 단백질로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 인간 B-세포 면역글로불린 단백질로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 CD4, CD8, 클래스 I MHC, 클래스 II MHC, CD19, T-세포 수용체 α 및 β 사슬, CD3, 제타 사슬, ICAM1 (CD54), ICAM2, ICAM3, ICAM4, ICAM5, CD28, CD79a, CD79b 및 CD2로 구성된 군으로부터 선택된 단백질로부터 유래한다. 특정 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 CD4 단백질로부터 유래한다. 특정 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 마우스 CD4 단백질로부터 유래한다. 특정 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 인간 CD4 단백질로부터 유래한다. 특정 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 서열번호 13 또는 서열번호 16을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 세포내 도메인(ICD)을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 서열번호 14, 서열번호 15 또는 서열번호 17을 포함한다.

[0013] 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 GPI-막 앵커를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 GPI-막 앵커는 CD52, CD55, CD58 및 CD59로 구성된 군으로부터 선택된 단백질로부터 수득된다.

[0014] 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 검출 또는 "리포터(reporter)" 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 또는 리포터 분자는 형광 단백질, 생체발광 단백질 또는 이들의 변이체이다. 특정 구체예에서, 상기 검출 또는 리포터 분자는 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 이의 변이체이다.

[0015] 따라서 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 IgG CH2CH3 영역 및 막횡단 도메인을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 IgG CH2CH3 불변 영역, 막횡단 도메인 및 GFP를 포함한다.

[0016] 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 막-결합되고, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 상기 세포의 표면에서 발현된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하지 않는다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 항원-결합 부위를 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 제2폴리펩타이드와 이중이합체 분자를 형성할 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄 둘 모두를 갖는 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 제2폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성할 수 있다.

[0017] 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 서열번호 10, 서열번호 12 또는 서열번호 28을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 26을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 9, 서열번호 11 또는 서열번호 29를 포함하는 서열에 의해 인코딩(encoding), 즉, 암호화된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 24, 서열번호 25 또는 서열번호 27을 포함하는 서열에 의해 인코딩된다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 폴리펩타이드를 발현시킨다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 폴리펩타이드를 생산한다.

[0018] 또 다른 양상에서, 본 발명은 이중이합체 폴리펩타이드 분자를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 폴리펩타이드 분자는 (a) (i) 이합체화 도메인을 포함하는 세포외 부분 및 (ii) 막횡단 부분을 포함하는 제1폴리펩타이드, 및 (b) 이합체화 도메인을 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 면역글로불린 중쇄를 포함하는 제1폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 면역글로불린 중쇄를 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역

글로불린 경쇄 둘 모두를 갖는 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제1폴리펩타이드는 상기 제2폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성한다.

[0019] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 폴리펩타이드를 포함하는 항체 분자를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 분자는 이중이합체 분자이다. 특정 구체예에서, 상기 항체 분자는 (a) 면역글로불린 중쇄 및 (b) 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 분자는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 면역글로불린을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 분자의 상기 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 Fc 영역과 적어도 하나의 이황화결합을 형성한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 분자는 단일 항원-결합 부위(예컨대, 1가)를 포함한다.

[0020] 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 9, 서열번호 11 또는 서열번호 29를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 24, 서열번호 25 또는 서열번호 27을 포함한다. 일부 구체예에서, 벡터는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 본원에 기술된 폴리펩타이드 또는 항체 분자 중 임의의 것을 포함한다.

[0021] 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드를 포함하는 숙주 세포 및 상기 숙주 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포를 생산하는 방법은 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분 및 (b) 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 세포를 트랜스펙션시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 폴리펩타이드를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 일시적으로 트랜스펙션된다. 다른 구체예에서, 상기 세포는 안정적으로 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 폴리펩타이드의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 세포의 표면에서 상기 폴리펩타이드의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 상기 세포의 표면에서 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 분리하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 포유류 세포(예컨대, 인간 또는 마우스 세포)이다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 융합 파트너 세포주이다.

[0022] 일부 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 방법에 의해 생산된 숙주 세포를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 것을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 본원에 기술된 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 폴리펩타이드를 발현시키며, 여기서 상기 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분 및 (b) 막횡단 부분을 포함한다.

[0023] 또 다른 양상에서, 본 발명의 상기 세포는 막-결합된 이중이합체 분자를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 (a) (i) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분 및 (ii) 막횡단 부분을 포함하는 막-결합된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드; 및 (b) 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드를 인코딩하는 적어도 하나의 추가적인 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 항체를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 단쇄 항체를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드는 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드는 돌연변이화된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 상기 세포로부터 분리된다. 다른 구체예에서, 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 막-결합된 이중이합체 분자를 형성하기 위해 상기 추가적인 폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성한다.

[0024] 하나의 양상에서, 본 발명은 상기 세포의 표면에서 막-결합된 이중이합체 분자를 발현하는 하이브리도마 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 하이브리도마 세포를 생산하는 방법은 세포들과 항체-생산 세포를 융합시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포들은 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분 및 (b) 막횡단 부분을 포함하는 막-결합된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 융합된 하이브리도마 세포들은 상기 세포들의 표면에서 이중이합체 항체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 항체-생산 세포들의 집단이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세

포는 나이브(naive) 동물로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 면역화된 동물로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 B-세포, 형질세포, 하이브리도마, 골수종 및 재조합 세포를 포함하나, 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 복수의 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드는 무작위 생성된 폴리펩타이드 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 cDNA 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 융합된 세포는 복수의 이중이합체 항체 분자를 발현하는 하이브리도마 세포들의 집단을 포함한다.

[0025] 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 방법 중 임의의 방법에 의해 제조된 하이브리도마 또는 하이브리도마 라이브러리를 제공한다.

[0026] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드를 포함하는 세포 라이브러리 및 상기 세포 라이브러리를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 세포 라이브러리를 생산하는 방법은 복수의 폴리뉴클레오타이드로 세포를 트랜스펙션시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분 및 (b) 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 복수의 트랜스펙션된 세포의 표면에서 이중이합체 분자를 발현시킨다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드의 각 폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드는 복수의 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드의 각 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 Fc 영역 및 (b) 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 복수의 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포로부터 생성된다. 다른 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 복수의 무작위 생성된 폴리펩타이드를 인코딩한다. 다른 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서 각 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 Fc 영역 및 (b) 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함한다.

[0027] 하나의 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 방법 중 임의의 방법에 의해 제조된 세포 라이브러리를 제공한다.

[0028] 또 다른 양상에서, 본 발명은 특이적 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법은 하이브리도마 세포들의 집단을 생산하기 위해 세포들을 항체-생산 세포와 융합시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포의 부분 및 (b) 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 하이브리도마 세포들은 상기 세포들의 표면에서 이중이합체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 검출 분자(예컨대, 관심 표적)와 하이브리도마 세포들의 집단을 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 하이브리도마 세포들을 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 나이브 동물로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포들은 면역화된 동물로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포들은 인간 세포들이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포들은 마우스 세포들이다. 특정 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 B-세포, 형질세포, 하이브리도마, 골수종 또는 재조합 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 복수의 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 면역글로불린을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 다른 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 동물의 세포들로부터 생성된다. 일부 구체

예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포들로부터 생성된다.

- [0029] 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포들에 의해 제조된 상기 항체는 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 또는 항체 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형이다.
- [0030] 일부 구체예에서, 상기 검출 분자(예컨대, 관심 표적)는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 특정 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들은 유세포분석에 의해 확인된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들은 형광-활성화 세포 분류(FACS)에 의해 분리된다.
- [0031] 일부 구체예에서, 특이적 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법은 세포들을 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드로 트랜스펙션시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포들은 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포외 부분 및 (b) 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포들은 상기 세포들의 표면에서 이중이합체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 트랜스펙션된 세포들을 검출 분자(예컨대, 관심 표적)와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 다른 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 동물의 세포들로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포들로부터 생성된다.
- [0032] 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 또는 항체 단편인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형인 폴리펩타이드를 인코딩한다.
- [0033] 일부 구체예에서, 상기 검출 분자(예컨대, 관심 표적)는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 특정 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들은 유세포분석에 의해 확인된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들은 FACS에 의해 분리된다.
- [0034] 일부 구체예에서, 특이적 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법은 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포외 부분 및 (b) 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 세포 라이브러리를 트랜스펙션시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포 라이브러리는 항체-생산 세포들을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포들은 상기 세포들의 표면에서 이중이합체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 트랜스펙션된 세포들을 검출 분자(예컨대, 관심 표적)와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 하이브리도마 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 나이브 동물로부터 유래된 세포들을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 면역화된 동물로부터 유래된 세포들을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 인간 세포들을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 마우스 세포들을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 B-세포, 형질세포, 하이브리도마, 골수종 또는 재조합 세포들을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 복수의 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 면역글로불린을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 다른 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 동물의 세포들로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포들로부터 생성된다.
- [0035] 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리에 의해 제조된 상기 항체는 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 또는 항체 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리에 의해 제조된 항

기 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형이다.

[0036] 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 특정 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들은 유세포분석에 의해 확인된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들은 FACS에 의해 분리된다.

[0037] 하나의 양상에서, 본 발명은 세포 라이브러리를 제공하며, 각 세포는 (a) 본원에 기술된 막-결합된 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함하는 제1폴리펩타이드 및 (b) 면역글로불린 중쇄를 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 두 폴리펩타이드들은 이종이합체 분자를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 이종이합체 분자는 상기 세포의 표면에서 발현된다. 일부 구체예에서, 각 세포는 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 갖는 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이종이합체 분자는 단일 항원-결합 부위를 포함한다.

[0038] 일부 구체예에서, 본 발명은 세포 라이브러리를 제공하며, 각 세포는 (a) 본원에 기술된 막-결합된 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함하는 제1폴리펩타이드 및 (b) CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 두 폴리펩타이드들은 이종이합체 분자를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 이종이합체 분자는 상기 세포의 표면에서 발현된다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 Fc 영역 및 (b) 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 (a) 이항화결합을 형성할 수 있는 영역 및 (b) 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 (a) 이항화결합을 형성할 수 있는 영역 및 (b) 돌연변이화된 폴리펩타이드를 포함한다.

[0039] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 세포 라이브러리 중 임의의 것을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 세포 라이브러리를 스크리닝하는 상기 방법은 상기 세포 라이브러리를 검출 분자(예컨대, 관심 표적)와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합되어 있는 상기 세포들을 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 소분자 화합물이다. 특정 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 유세포분석에 의해 확인된다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 FACS에 의해 분리된다.

[0040] 또 다른 양상에서, 본 발명은 항체를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 스크리닝하는 상기 방법은 본원에 기술된 상기 세포들 또는 세포 라이브러리들을 검출 분자(예컨대, 관심 표적)와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 스크리닝하는 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 스크리닝하는 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포들을 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 스크리닝하는 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 확인된 상기 세포들로부터 상기 항체를 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 소분자 화합물이다. 특정 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 세포들은 유세포분석에 의해 확인된다. 특정 구체예에서, 상기 세포들은 FACS에 의해 분리된다.

[0041] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 방법 중 임의의 방법에 의해 생산, 확인되고/되거나 분리된 항체들을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 다른 하이브리도마 방법들과 비교한 막-MAb 기술의 개략도이다. 도 1A는 모노클로날 항체가 하이브리도마로부터 분비되는 것을 나타낸 전형적인 하이브리도마를 도시한 것이다. 도 1B는 세포 표면에서 항체-결합 단백질 또는 "포획 단백질"(예컨대, Fc 수용체 또는 단백질 A)을 발현시키는 하이브리도마를 도시한 것이다. 상기 개략도는 모노클로날 항체가 상기 하이브리도마로부터 분비됨을 나타낸다. 그러나, 상기 하이브리도마는 세포 표면에서 항체, 즉 상기 세포에 의해 분비된 항체뿐만 아니라 다른 세포들에 의해 생산된 항체와도 결합할 수 있는 항체-결합 단백질을 가지고 있다. 도 1C는 막-MAb 방법의 한 비제한적인 구체예를 도시한 것이다. 상

기 하이브리도마는 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍과 공유적으로 연결된 막-결합된 폴리펩타이드를 포함하는 이중이합체 분자를 발현시킨다. 상기 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍은 상기 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체를 나타내는 단일 항원-결합 부위를 형성한다.

도 2는 융합에 사용하기 위한 막-MAb 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 생성에 관한 것이다. 무린 하이브리도마 융합 파트너 세포주 SP2/0-Ag14를 막-MAb(mIgG1) 작제물로 안정적으로 트랜스펙션시켰다. 그 결과 수득된 세포주를 SP2/0-MT라 표기하였다. 도 2A는 아아이소타입(isotype) 음성 대조 항체(좌측 패널) 및 항-FLAG 항체(우측 패널)을 이용하여 SP2/0-MT 세포에서 막-MAb(mIgG1) 작제물의 세포 표면 발현에 대한 유세포분석 결과를 도시한 것이다. 상기 막-MAb(mIgG1) 작제물은 상기 폴리펩타이드가 항-FLAG 항체에 의해 검출될 수 있도록 해주는 FLAG 태그(tag)를 가지고 있다. 도 2B는 상기 SP2/0-MT 세포주의 5개 서브클론(subclone)에서의 막-MAb(mIgG1)의 세포 표면 발현에 대한 유세포분석 결과를 도시한 것이다.

도 3은 다중 표적에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하기 위한 막-MAb 기술의 활용에 관한 것으로, SP-2/0 세포들과 무린 FZD5 및 FZD8로 면역화된 마우스로부터 분리된 세포들의 융합에 의해 제조된 막-MAb 하이브리도마 라이브러리의 유세포분석 플롯(plot)을 도시한 것이다. 상기 세포들을 표지된 FZD5 및 FZD8 단백질과 함께 인큐베이션하고 분석하였다. 제조합 FZD5 단백질을 Alexa Fluor 488로 표지하였고, 제조합 FZD8 단백질은 Alexa Fluor 647로 표지하였다. FZD5 및 FZD8 둘 모두에 결합한 것으로 나타나는 하이브리도마 세포들을 확인하였다("FZD5/8 DP"로 표지된 박스 구역; DP = 이중 양성).

도 4는 DDR2에 대한 항체를 생산하는 세포들을 확인하기 위한 막-MAb 기술의 활용에 관한 것으로, 기존의 DDR2 하이브리도마 라이브러리 내로 막-MAb(mIgG1) 작제물의 트랜스펙션에 의해 제조된 막-MAb 하이브리도마 라이브러리의 유세포분석 플롯을 도시한 것이다. 상기 세포를 표지된 DDR2 단백질 및 항-FLAG 항체와 함께 인큐베이션하고 분석하였다. 제조합 DDR2 단백질을 Alexa Fluor 488로 표지하였고, 상기 항-FLAG 항체는 피코에리트린(PE)으로 표지하였다. "DDR2 Pos"로 표지된 박스 구역이 DDR2 및 상기 항-FLAG 항체에 결합한 것으로 나타난 하이브리도마 세포들이다.

도 5는 293-hMT 안정 클론의 유세포분석 결과를 도시한 것이다. HEK-293 세포를 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물로 안정적으로 트랜스펙션시켰다. 14개 클론이 GFP 발현에 대해 스크리닝되었다.

도 6은 막-MAb 작제물을 사용한 세포-기반 항체 디스플레이의 개략도이다. 도 6A는 막-MAb(hIgG2) 및 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물을 도시한 것이다. 도 6B는 본원에서 MAbLib 작제물로서 언급된 단쇄 항체 백터를 도시한 것이다. 항체 라이브러리의 생성이 원활하도록 하기 위해, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 독특한 제한 부위에 인접시켰다. 도 6C는 HEK-293 세포의 표면에서 발현된 막-MAb(hIgG2)-GFP 분자를 도시한 것이다. 도 6D는 HEK-293 세포의 표면 상의 이중이합체 분자의 비제한적인 구체예를 도시한 것이다. 상기 이중이합체 분자는 단쇄 항체 분자와 연결된 막-MAb(hIgG2)-GFP 단백질이다.

도 7은 HEK-293 세포의 표면에서 이중이합체 항체 분자의 발현에 관한 분석을 도시한 것이다. 다양한 농도의 항-DLL4 항체 sc21M18 플라스미드(plasmid) DNA를 상기 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물(-X-)과 조합하여 HEK-293 세포를 트랜스펙션시키기 위해 사용하였다. 대조군은 트랜스펙션되지 않은 세포(-◆-), sc21M18 DNA만으로 트랜스펙션시킨 세포(-▲-) 및 막-MAb(hIgG2)-GFP DNA만으로 트랜스펙션시킨 세포(-■-)이다. 세포들은 48시간 동안 배양하고, 수확하여 FACS에 의해 항체 특이적 항원(hDLL4-Fc)를 사용하여 스크리닝하였다. 결과는 평균 형광 강도(MFI)로 나타내었다.

도 8은 항체 분자의 디스플레이를 조절하기 위한 담체 플라스미드의 사용에 대한 분석을 도시한 것이다. 항-DLL4 항체 플라스미드 DNA를 다양한 비로 과량의 관련없는 항체 플라스미드 DNA(sc18R5)와 혼합하고, HEK-293 세포를 트랜스펙션시키기 위해 사용하였다. 세포들을 48시간 동안 인큐베이션하고, 수확하여 FACS에 의해 스크리닝하였다. 표면에서 항-DLL4 항체를 스크리닝하기 위해, hDDL4-rFc를 항원으로 사용하였고(-◆-), hJag-rFc 단백질을 대조군으로 사용하였다(-■-). 결합된 항원을 PE-표지된 항-토끼 Fc 항체를 사용하여 검출하였고, 또한 대조군으로 단독으로 사용하였다(-▲-). 표면에서 항-DLL4 항체를 발현하는 세포의 백분율을 FACS에 의해 결정하였다.

도 9는 항-DLL4 항체를 발현하는 세포의 선별 및 부화(enrichment)를 도시한다. 항-DLL4 항체 플라스미드 DNA 및 관련없는 항체 플라스미드 DNA를 1:100,000 (sc21M18:sc18R5)의 비의 혼합물로 HEK-293 세포를 트랜스펙션시켰다. 세포들을 4 라운드(round)로 분류하고, 각 라운드에서 표면에서 항-DLL4 항체를 발현하는 세포의 백분율을 FACS에 의해 결정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명은 세포의 표면에 이중이합체 분자를 형성할 수 있는 폴리펩타이드를 포함하여, 신규한 막-결합된 폴리펩타이드를 제공한다. 관련된 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 상기 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포 및 세포 라이브러리가 또한 제공된다. 상기 폴리펩타이드를 포함하는 숙주 세포를 생산하고 특이적인 개별 세포를 확인하고 분리하기 위해 상기 세포들을 사용하는 방법이 추가로 제공된다.
- [0044] 막-MAb(mIgG1), 막-MAb(hIgG2) 및 막-MAb(hIgG2)-GFP를 포함하여, 신규한 막-결합된 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 작제물을 생성하였다(실시예 1). 상기 신규한 막-결합된 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 생산하였다. 무린 융합 파트너 세포주인 SP2/0-Ag14 세포를 막-MAb(mIgG1) 작제물로 트랜스펙션시킴으로써 세포주 SP2/0-MT를 생성하였다(실시예 2). 인간 배아 신장-유래 세포주인 HEK-293 세포를 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물로 트랜스펙션시킴으로써 세포주 293-hMT를 생성하였다(실시예 5). SP2/0-MT 세포를 면역화된 동물로부터 유래된 세포와의 융합에 사용하여 상기 세포 표면에서 이중이합체 항체 분자를 발현하는 하이브리도마 라이브러리를 생산하였다. 상기 막-결합된 항체 분자를 사용하여 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 세포를 검출하고 분리하였다(실시예 3). 상기 신규한 폴리펩타이드 막-MAb(mIgG1)을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 확립된 하이브리도마 라이브러리를 트랜스펙션시키고, 그 결과 트랜스펙션된 세포는 표면에 이중이합체 항체 분자를 발현하는 것으로 나타났다. 막-결합된 항체 분자를 사용하여 표적 항원에 특이적으로 결합된 항체를 생산하는 세포를 검출하고 분리하였다(실시예 4). 하이브리도마 융합 방법과 트랜스펙션 방법 둘 모두를 사용하여, 막-MAB 기술은 무작위로 선별된 클론(0.6% 및 8% 양성)에 비해 분리된 항원-특이적 양성 클론의 백분율(91% 및 84% 양성)에서의 극적 증가를 발생시켰다. 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물을 항-DLL4 항체를 인코딩하는 DNA와 함께 HEK-293 세포를 트랜스펙션시켰다. 유세포분석에 의한 분석은 DLL4 항원과 결합된 트랜스펙션된 세포의 표면에서 이중이합체 분자가 존재하는 것으로 나타났다(실시예 7). 막 MAB 기술을 이용한 유효성 연구는 항-DLL4 항체를 포함하는 이중이합체 분자를 발현하는 세포가 세포 집단에서 선별될 수 있음을 보여주었으며, 여기서 다른 항체는 상당한 초과량으로 발현되었다(실시예 9).
- [0045] I. 정의
- [0046] 본 발명의 이해를 원활히 하기 위해, 많은 용어 및 구를 하기에 정의한다.
- [0047] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내에 적어도 하나의 항원 인지 부위 또는 항원-결합 부위를 통해, 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질 또는 이들의 조합물과 같은 표적을 인지하고 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 말한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 온전한 폴리클로날 항체, 온전한 모노클로날 항체, 항체 단편(예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편), 단쇄 Fv(scFv) 돌연변이, 전체로서 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 단쇄 면역글로불린 분자, 적어도 두 개의 온전한 항체로부터 생성된 이특이적 항체와 같은 다중특이적 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 항체의 항원 인지 부위를 포함하는 융합 단백질, 및 항체가 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 항원 인지 부위를 포함하는 임의의 다른 개질된 면역글로불린 분자를 포함한다. 추가적으로, 용어 "항체"는 단 하나의 결합 부위만을 가진 1가 항체 분자를 포함한다. 항체는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 언급되는 중쇄 불변 도메인의 확인을 기초로 하여, 면역글로불린의 5가지 주요 클래스, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 또는 이들의 서브클래스(subclass)(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 중 어느 하나일 수 있다.
- [0048] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 말한다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다를 수 있음에도 불구하고, 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 두 개의 불변 도메인인 CH2 및 CH3와 힌지 영역의 적어도 일부분을 포함한다.
- [0049] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부분을 말하며, 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 말한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이성 항체가 포함되나 이에 한정되지 아니한다.
- [0050] 용어 항체의 "가변 영역"은 항체 경쇄의 가변 영역 단독 또는 항체 중쇄의 가변 영역 단독 또는 이들의 조합을 말한다. 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역은 "과가변 영역"으로도 알려져 있는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역으로 구성되어 있다. 각 사슬 내 상기 CDR들은 상기 프레임워크 영역에 의해 서로 근접하여 고정되어 있고, 다른 사슬로부터의 CDR들과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다.

CDR을 결정하는 적어도 두 가지 기술이 존재한다: (1) 교차-종 서열 가변성(cross-species sequence variability)에 기초한 접근법(참조: Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., National Institutes of Health, Bethesda Md.); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학 연구에 기초한 접근법(참조: Al-Lazikani et al., 1997, *J. Molec. Biol.* 273:927-948). 추가적으로, CDR 결정을 위해 상기 두 가지 접근법을 조합하여 사용할 수 있다.

- [0051] 용어 "모노클로날 항체"는 단일 항원결정인자 또는 에피토프의 고도로 특이적인 인지 및 결합에 관여하는 동종성 항체 집단을 말한다. 이것은 상이한 항원결정인자들에 대한 상이한 항체들의 혼합물을 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체와 대조적인 것이다. 용어 "모노클로날 항체"는 온전한 전장 모노클로날 항체뿐만 아니라 항체 단편(예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편), scFv 변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인지 부위를 포함하는 어떤 다른 개질된 면역글로불린 분자를 포함한다. "모노클로날 항체"는 하이브리도마 생산, 파아지 선별, 재조합 발현 및 트랜스제닉 동물을 포함하나 이에 한정되지 않는 많은 기술들에 의해 제조된 항체를 말한다.
- [0052] 용어 "인간화된 항체"는 최소한 비-인간(예컨대, 무린) 서열을 포함하는 특이적인 면역글로불린 사슬, 키메라 면역글로불린 또는 이들의 단편인 비-인간(예컨대, 무린) 항체의 형태를 말한다.
- [0053] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생산된 항체 또는 당 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 제조된 인간에 의해 생산되는 항체에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 말한다. 인간 항체에 대한 상기 정의에는 온전하거나 전장인 항체, 이들의 단편, 및/또는, 예를 들어, 무린 경쇄 폴리펩타이드 및 인간 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체와 같은 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 포함된다.
- [0054] 용어 "키메라 항체"는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 둘 이상의 종으로부터 유래한 항체를 말한다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 가변 영역은 바람직한 특이성, 친화성 및/또는 성능을 가진 한 종의 포유동물(예컨대, 마우스, 래트, 토끼)로부터 유래된 항체의 가변 영역에 상응하는 반면, 불변 영역은 해당 종에서 면역 반응이 유도되는 것을 피하기 위해 다른 종(통상 인간)으로부터 유래한 항체의 서열과 상동이다.
- [0055] 용어 "에피토프" 및 "항원결정인자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 특정 항체에 의해 인지되어 특이적으로 결합될 수 있는 항원의 부분을 말한다. 항원이 폴리펩타이드인 경우, 에피토프는 인접한 아미노산(종종 "선형 에피토프"로 언급됨) 및 단백질의 4차 폴딩에 의해 병치된 비인접 아미노산(종종 "입체형태 에피토프"로 언급됨) 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성시 보유되는 반면, 4차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 단백질 변성시 전형적으로 소실된다. 에피토프는 전형적으로 유일한 공간적 입체형태로 적어도 3개, 더욱 일반적으로는 적어도 5개 또는 8개 내지 10개의 아미노산을 포함한다.
- [0056] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "비-면역글로불린"은 항체 면역글로불린 사슬이 아닌 폴리펩타이드를 말한다. 본원에 사용된 바와 같은 "비-면역글로불린"은 상기 면역글로불린 상과의 다른 일원들을 포함한다.
- [0057] 용어 "특이적으로 결합한다" 및 "특이적인 결합하는"은, 결합제 또는 항체가 관련없는 단백질을 포함하는, 대안적인 물질 보다는 에피토프 또는 단백질에 더 빈번하게, 더 신속하게, 보다 장기간, 더 큰 친화성으로 또는 이들의 일부 조합형태로 반응하거나 연결되는 것을 의미한다. 특정 구체예에서, "특이적으로 결합한다"는, 예를 들어, 항체가 약 0.1mM 또는 그 미만의 K_D로 단백질에 결합하나, 더욱 일반적으로는 약 1μM 미만의 K_D로 단백질에 결합하는 것을 의미한다. 특정 구체예에서, "특이적으로 결합한다"는 항체가 적어도 약 0.1μM 또는 그 미만, 적어도 약 0.01μM 또는 그 미만, 또는 적어도 약 1nM 또는 그 미만의 K_D로 단백질에 결합하는 것을 의미한다. 다양한 종에서 동종성 단백질들 사이의 서열 동일성 때문에, 특이적 결합은 한 개 종 이상에서 특정 단백질을 인지하는 항체를 포함할 수 있다(예컨대, 마우스 FZD 및 인간 FZD). 마찬가지로, 상기 폴리펩타이드 서열의 특정 영역에서 다양한 단백질들 사이의 동종성 때문에, 특이적 결합은 하나 이상의 단백질(예컨대, 인간 FZD5 및 인간 FZD8)을 인지하는 항체(또는 다른 폴리펩타이드 또는 작용제)를 포함할 수 있다. 제1 표적에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 모이어티는 제2 표적에 특이적으로 결합할 수 있거나 결합하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 이와 같이, "특이적 결합"은 (배타적 결합을 포함할 수 있을지라도) 배타적 결합, 즉 단일 표적에 대한 결합을 필수적으로 요구하는 것은 아니다. 따라서, 특정 구체예에서 항체는 하나 이상의 표적에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 다중 표적들은 상기 항체 상의 동일한 항원-결합 부위에 의해 결합될 수 있다. 예를 들어, 특정 예에서 항체는 두 개의 동일한 항원-결합 부위를 포함할 수 있으며, 상기 부위 각각은 둘 또는 그 초과 단백질 상의 동일한 에피토프와 특이적으로 결합한다. 일반적으로, 필수적

인 것은 아니지만 결합이라고 언급하는 것은 특이적인 결합을 의미한다.

[0058] 용어 "폴리펩타이드" 및 "펩타이드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 임의의 길이의 아미노산들의 중합체를 말한다. 상기 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 개질된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산에 의해 중단되어 있을 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 또는 개입, 예를 들어, 이황화결합 형성, 당화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 표지 성분과의 컨주게이션과 같은 임의의 다른 조작과 개질에 의해 개질된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한 상기 정의에는, 예를 들어, 아미노산(예를 들어, 비천연 아미노산을 포함)의 하나 또는 그 초과와 유사체뿐만 아니라 당 분야에 공지된 다른 개질을 포함하는 폴리펩타이드가 포함된다. 본 발명의 상기 폴리펩타이드 중 적어도 일부는 항체에 기초한 것이기 때문에, 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 단쇄 또는 연결된 사슬로서 발생할 수 있는 것으로 이해된다.

[0059] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 말하며, DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 개질된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 이의 유사체와 같은 개질된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 상기 뉴클레오타이드 구조에 대한 개질은 상기 폴리뉴클레오타이드의 어셈블리 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 상기 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 표지 성분과의 컨주게이션에 의해서와 같이, 어셈블리 이후 추가로 개질될 수 있다.

[0060] "고 엄격성의 조건"은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 고온을 이용하거나(예를 들어, 50°C에서 0.015M 염화나트륨/0.0015M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 사용); (2) 하이브리드화 동안, 포름아미드와 같은 변성제를 이용하거나(예를 들어, 42°C에서 0.1% 소형알부민을 갖는 50%(v/v) 포름아미드/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/750mM 염화나트륨 및 75 mM 시트르산나트륨을 함유하는 pH 6.5의 50mM 인산나트륨 완충액을 사용); (3) 42°C에서 50% 포름아미드, 5x SSC(0.75M NaCl, 0.075M 시트르산나트륨), 50mM 인산나트륨(pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5x 덴하르트 용액(Denhardt's solution), 초음파처리된 연어 정자 DNA(50 μ g/ml), 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 설페이트를 이용하고, 0.2x SSC(염화나트륨/시트르산나트륨)로 42°C에서의 세척 및 55°C에서 50% 포름아미드에서의 세척에 이어, 55°C에서 EDTA를 함유하는 0.1x SSC로 구성된 고-엄격성의 세척을 후속하는 것과 동일할 수 있다.

[0061] 둘 또는 그 초과와 핵산 또는 폴리펩타이드의 맥락에서 용어 "동일한" 또는 "백분율 동일성"은, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존성 아미노산 치환을 고려하지 않고 최대 대응에 대해 비교되고 정렬되는 경우(필요시, 갭(gap)을 도입), 동일하거나 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 특정된 백분율을 가진 둘 또는 그 초과와 서열 또는 서브서열(subsequence)을 말한다. 상기 "백분율 동일성"은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하거나, 시각적 검사에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열을 정렬시키기 위해 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어는 당업자에게 널리 알려져 있다. 상기 방법에는 BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit 및 GCG 프로그램이 포함되나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 두 개의 핵산 또는 폴리펩타이드는 실질적으로 동일하며, 이는 서열 비교 알고리즘을 사용하거나 시각적 검사에 의해 측정시 최대 대응에 대해 비교되고 정렬되는 경우, 이들이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 및 일부 구체예에서는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 가짐을 의미한다. 일부 구체예에서, 동일성은 길이상 적어도 약 10, 적어도 약 20, 적어도 약 40 내지 60, 적어도 약 60 내지 80개 잔기 또는 이들 사이의 임의의 정수 값으로 상기 서열의 영역에 걸쳐 존재한다. 일부 구체예에서, 동일성은 적어도 약 90 내지 100개 잔기와 같이 60 내지 80개 잔기 보다 더 긴 영역에 걸쳐 존재하며, 일부 구체예에서, 상기 서열은 뉴클레오타이드 서열의 코딩 영역과 같은 비교되는 서열 전장에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

[0062] "보존성 아미노산 치환"은 하나의 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가진 또 다른 아미노산 잔기로 대체된 것을 말한다. 유사한 측쇄를 가진 아미노산 잔기들의 패밀리는 염기성 측쇄(예컨대, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예컨대, 아스파르트산, 글루타민산), 비전하 극성 측쇄(예컨대, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예컨대, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지 측쇄(예컨대, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예컨대, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하여, 당 분야에서 정의되어 있다. 예를 들어, 티로신을 페닐알라닌으로 치환하는 것은 보존성 치환으로 여겨진다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩타이드 및 항체의 서열에서 보존성 치환은 항원(들), 즉 상기 폴리펩타이드 또는 항체가 결합하는 하나 또는 그 초과와 단백질에, 상기 아미노산 서

열을 포함하는 상기 폴리펩타이드 또는 항체가 결합하는 것을 제거하지 않는다. 항원 결합을 제거하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존성 치환을 확인하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다.

[0063] 용어 "백터"는 숙주 세포에서 관심있는 하나 또는 그 초과 유전자(들) 및 서열(들)을 운반하고 바람직하게는 발현시킬 수 있는 작제물을 말한다. 백터의 예에는 바이러스 백터, 네이키드(naked) DNA 또는 RNA 발현 백터, 플라스미드, 코스미드 또는 파아지 백터, 양이온성 촉합 작용제와 연결된 DNA 또는 RNA 발현 백터, 및 리포솜에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 백터가 포함되나, 이에 한정되지 아니한다.

[0064] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "트랜스펙션"은 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 말한다. 세포는 외인성 DNA가 세포막 내부로 도입되었을 때 "트랜스펙션"된다.

[0065] "분리된" 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 백터, 세포 또는 조성물은 천연에서 발견되지 않는 형태의 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 백터, 세포 또는 조성물이다. 분리된 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 백터, 세포 또는 조성물은 더 이상 천연에서 발견되는 형태가 아닌 정도로 정제된 것들을 포함한다. 일부 구체예에서, 분리된 항체, 폴리뉴클레오타이드, 백터, 세포 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같은, "실질적으로 순수한"은 적어도 50% 순수한(즉, 오염물질이 없는), 더욱 바람직하게는 적어도 90% 순수한, 더욱 바람직하게는 적어도 95% 순수한, 더욱 바람직하게는 적어도 98% 순수한, 더욱 바람직하게는 적어도 99% 순수한 물질을 말한다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같은, "동물"은 마우스, 래트, 햄스터, 다른 설치류, 토끼, 염소, 개, 고양이, 비-인간 영장류, 인간 및 동등물을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 동물(예컨대, 포유류)을 말한다.

[0068] 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 구에서 사용된 "및/또는"은 A 및 B 둘 모두; A 또는 B; A(단독) 및 B(단독)을 포함시키고자 한 것이다.

[0069] 상세한 설명 및 청구항에서 사용된 바와 같은, 단수형은 문맥상 명백하게 달리 서술하지 않는 한 복수형을 포함한다.

[0070] 어디든지 구체예는 언어 "포함하는"과 함께 본원에서 기술되며, 그렇지 않다면 "구성된" 및/또는 "본질적으로 구성된" 용어로 기술된 유사한 구체예가 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

[0071] II. 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드

[0072] 본 발명은 세포의 표면에 발현된 세포외 부분을 포함하는, 막-결합된 신규한 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) 이합체화 도메인을 포함하는 세포외 부분, 및 (b) 막횡단 부분을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, 이합체화 도메인은 두 개의 폴리펩타이드 사이의 상호작용을 촉진할 수 있는 임의의 도메인이다. 적합한 이합체화 도메인은 소수성 잔기가 규칙적으로 이격되어 있어 각 단백질의 소수성 잔기들의 상호작용에 의한 이합체 형성을 가능케 하는 양친매성 알파 헬릭스를 가진 단백질의 이합체화 도메인을 포함한다. 적합한 이합체화 도메인은 이황화결합의 형성을 통해 이합체의 형성을 가능케 하는 시스테인 잔기를 가진 단백질의 이합체화 도메인을 포함한다. 이합체화 도메인에는 면역글로불린 불변 영역, 류신 지퍼, 이소류신 지퍼 및 GCN4 지퍼가 포함될 수 있으나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포외 부분, 및 (b) 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) 이합체화 도메인을 포함하는 세포외 부분, 및 (b) GPI-앵커링된 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 세포외 부분, 및 (b) GPI-앵커링된 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 CH2, CH3, 및/또는 CH4로부터 선택되는 적어도 하나의 불변 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 힌지 영역의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 힌지 영역, CH2 및 CH3를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 항체 또는 이들의 아형으로부터 취득된다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 IgG1 또는 IgG2로부터 취득된다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 IgG2로부터 취득된다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 인간 면역글로불린 중쇄 영역으로부터 취득된다. 다른 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 영역으로부터 취득된다.

- [0073] 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 항체 가변 영역을 포함하지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 항원-결합 부위를 갖지 않는다.
- [0074] 상기 폴리펩타이드는 상기 폴리펩타이드의 막횡단 부분 또는 GPI-막 앵커에 의해 적어도 부분적으로 세포막에 앵커링된다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 타입 I 막횡단 단백질로부터 취득된다. 타입 I 막횡단 단백질은 N-말단이 상기 막의 외부에 있도록 위치되어 있다. 타입 I 막횡단 단백질은 단일 패스(pass)(이는 상기 단백질이 막을 단 한번 통과함을 의미한다) 또는 다중-패스(이는 상기 단백질이 막을 수 차례 통과함을 의미한다)일 수 있다. 상기 막횡단 부분은 면역글로불린 및 비-면역글로불린 단백질을 포함하는 다양한 공급원으로부터 취득될 수 있으나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 CD4, CD8, 클래스 I MHC, 클래스 II MHC, CD19, T-세포 수용체 α 및 β 사슬, CD3, 제타 사슬, ICAM1 (CD54), ICAM2, ICAM3, ICAM4, ICAM5, CD28, CD79a, CD79b 및 CD2를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 면역글로불린 상과 중 일부인 단백질로부터 얻어진다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 인간 단백질로부터 취득된다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 무린 단백질로부터 취득된다. 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분은 인간 CD4로부터 취득된다.
- [0075] 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 세포내 도메인의 적어도 일부분을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포내 도메인은 상기 막횡단 부분이 취득되는 것과 동일한 단백질로부터 취득된다. 일부 구체예에서, 상기 세포내 도메인은 상기 막횡단 부분이 취득되는 상기 단백질과는 상이한 단백질로부터 취득된다. 일부 구체예에서, 상기 세포내 도메인은 개질된다. 일부 구체예에서, 상기 세포내 도메인은 개질되어 상기 도메인의 정상적인 기능이 제거되거나 불활성화된다. 개질에는 단백질 결합 부위의 제거, 활성화 부위의 제거 또는 저해, 및 인산화 부위의 제거 또는 저해가 포함되나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 인간 CD4로부터의 막횡단 및 세포내 도메인 영역을 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 인간 CD4로부터의 막횡단 및 세포내 도메인 영역을 포함하며, 여기서 상기 세포내 도메인은 개질된다. 일부 구체예에서, 상기 세포내 도메인은 Ick 단백질 결합 부위를 제거하기 위해 개질된다.
- [0076] 일부 구체예에서, 상기 막횡단 부분 또는 세포내 도메인을 가진 막횡단 부분은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 및 서열번호 17로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 세포내 도메인을 가진 상기 막횡단 부분은 서열번호 15이다.
- [0077] 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 GPI-막 앵커에 의해 세포막에 앵커링된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 상기 전형적인 소수성 C-말단 아미노산 잔기가 상기 프로펩타이드로부터 절단되고 상기 폴리펩타이드의 C-말단이 글리코실포스파티딜이노시톨과 공유적으로 연결되어 있는 GPI 연결에 의해 세포막에 앵커링된다. 상기 GPI의 소수성 지질 모이어티는 상기 세포막에서 상기 폴리펩타이드를 보유한다. 일부 구체예에서, GPI 연결과 관련있는 상기 분자의 소수성 C-말단 부분은 CD52, CD55, CD58, CD59 및 다른 유사 단백질로부터 취득된다.
- [0078] 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 막-결합되어 있고, 세포의 표면에서 발현된 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 이중이합체 분자를 형성하기 위해 제2폴리펩타이드와 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 단쇄 분자로서 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 경쇄는 면역글로불린 중쇄와 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같은, "면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍"은 하나의 폴리펩타이드에 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄 둘 모두를 포함하는 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍은 단일 항원-결합 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 이중이합체 항체 분자를 형성하기 위해 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍과 연결되어 있으며, 여기서 상기 이중이합체 항체 분자는 하나의 단일 항원-결합 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 항체 분자는 1가 항체이다.
- [0079] 본 발명의 폴리펩타이드는 비-공유적 연결 또는 공유적 연결을 포함하지만 이에 한정되지 아니하는 임의의 많은 수단에 의해 제2폴리펩타이드와 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 이온결합과 같은 비-공유적 결합에 의해 제2폴리펩타이드와 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 이황화결합과 같은 공유적 결합에 의해 제2폴리펩타이드와 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 제2폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 제2폴리펩타이드와 하나의 이황화결합을 형성한다. 다른 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 제2폴리펩타이드와 두 개의 이황화결합을 형성한다. 다른 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 제2폴리펩타이드와 3개 또는 4개의 이황화결합을 형성한다.

다른 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 이중이합체 항체 분자를 형성하기 위해 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 면역글로불린 중쇄 불변 영역과 적어도 하나의 이황화결합을 형성할 수 있다.

[0080] 일부 구체예에서, 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 이중이합체 분자를 형성하기 위해 제2폴리펩타이드와 이황화결합을 형성할 수 있다. 이들의 디자인에 의해, 상기 폴리펩타이드는 일반적으로 이미 이중이합체 또는 동종이합체 분자의 일부인 폴리펩타이드와 이황화결합을 형성할 수 없다. 상기 폴리펩타이드는 일반적으로 분비된 항체 분자와 이황화결합을 형성할 수 없다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드 분비된 항체에 결합하지 않는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 상기 이중이합체 분자는 항체에 결합하지 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 상기 이중이합체 분자는 분비된 항체에 결합하지 않는다.

[0081] 일부 구체예에서, 본 발명은 (a) CH2 및 CH3를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역; 및 (b) 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) CH2 및 CH3를 포함하는 인간 IgG2 중쇄 불변 영역; 및 (b) 인간 CD4 막횡단 부분을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) CH2 및 CH3를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역; (b) 막횡단 부분; 및 (c) 형광 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) CH2 및 CH3를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역; (b) CD4 막횡단 부분; 및 (c) 형광 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 (a) CH2 및 CH3를 포함하는 인간 IgG2 중쇄 불변 영역; (b) 인간 CD4 막횡단 부분; 및 (c) 형광 분자를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 형광 분자는 GFP이다.

[0082] 일부 구체예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역; 및 (b) 서열번호 13 또는 서열번호 16을 포함하는 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 16을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 17의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 13을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 15의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 4를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 16을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 4를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 17의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 4를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 13을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 4를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 15의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 6를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 16을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 6를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 17의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 6를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 13을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 6를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 15의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 8을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 16을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 8을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 17의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 8을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 13을 포함하는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 8을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 서열번호 15의 막횡단 부분을 포함한다.

[0083] 일부 구체예에서, 본 발명은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8과 적어도 약 80% 서열 동일성을 지닌 아미노산 서열, 및 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 또는 서열번호 17과 적어도 약 80% 서열 동일성을 지닌 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 지닌 아미노산 서열, 및 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 또는 서열번호 17과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 지닌 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2와 적어도 약 95% 동일성을 가진 아미노산 서열 및 서열번호 14 또는 서열번호 15와 적어도 약 95% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 4와 적어도 약 95% 동일성을

가진 아미노산 서열 및 서열번호 14 또는 서열번호 15와 적어도 약 95% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 6와 적어도 약 95% 동일성을 가진 아미노산 서열 및 서열번호 14 또는 서열번호 15와 적어도 약 95% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 8과 적어도 약 95% 동일성을 가진 아미노산 서열 및 서열번호 14 또는 서열번호 15와 적어도 약 95% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0084] 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 10, 서열번호 12 또는 서열번호 28과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 10, 서열번호 12 또는 서열번호 28과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 서열번호 10, 서열번호 12 또는 서열번호 28을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0085] 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 상기 단백질의 운반에 관여하는 신호 서열을 포함한다. 신호 서열(또한 신호 펩타이드 또는 선도 서열로 언급됨)은 신생 폴리펩타이드의 N-말단에 위치되어 있다. 이들은 소포체에 대해 상기 폴리펩타이드를 표적화하고, 상기 단백질들은 이들의 목적지, 예를 들어 소기관의 내부 공간, 막 내부, 세포의 외막 또는 분비를 통한 세포 외부로 분류된다. 대부분의 신호 서열들은 상기 단백질이 상기 소포체로 운반된 이후에 신호 펩티다아제에 의해 상기 단백질로부터 절단된다. 상기 폴리펩타이드로부터 상기 신호 서열의 절단은 일반적으로 상기 아미노산 서열의 특정 부위에서 일어나고, 상기 신호 서열 내의 아미노산 잔기에 의존적이다. 일반적으로 하나의 특이적인 절단 부위가 존재함에도 불구하고, 하나 이상의 절단 부위가 신호 펩티다아제에 의해 인지되고/되거나 사용되어 상기 폴리펩타이드의 비-동종성 N-말단을 생성시킨다. 예를 들어, 신호 서열 내에 상이한 절단 부위의 사용은 상이한 N-말단 아미노산을 가진 폴리펩타이드의 발현을 야기시킬 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서 본원에 기술된 바와 같이 상기 폴리펩타이드는 상이한 N-말단을 가진 폴리펩타이드의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 N-말단은 길이상 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산만큼 상이하다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 실질적으로 동종성이며, 즉, 상기 폴리펩타이드는 동일한 N-말단을 가지고 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드의 상기 신호 서열은 하나 또는 그 초과(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 등)의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드의 상기 신호 서열은 하나의 절단 부위가 우세하도록 함으로써 실질적으로 하나의 N-말단을 가진 동종성 폴리펩타이드가 되도록 하는 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함한다. 신호 펩티다아제 절단 부위를 예측하기 위해 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어는 당 분야에 널리 공지되어 있으며 공개적으로 이용가능하다(예컨대, SignalP 소프트웨어).

[0086] 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 26과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 26과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드(신호 서열 절단 전)는 서열번호 22, 서열번호 23, 또는 서열번호 26을 포함한다.

[0087] 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97% 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 32를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 본질적으로 서열번호 32로 구성된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 30을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 본질적으로 서열번호 30으로 구성된다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 31을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 본질적으로 서열번호 31로 구성된다. 특정 아미노산으로 "본질적으로 구성되거나" 특정 아미노산으로 "본질적으로 구성되어 있는" 폴리펩타이드는 일부 구체예에서 추가적인 아미노산이 상기 폴리펩타이드의 기능에 실질적으로 영향을 주지 않는 한 하나 또는 그 초과(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 그 초과)의 추가적인 아미노산을 포함할 수 있다. 특정 아미노산으로 "본질적으로 구성되거나" 특정 아미노산으로 "본질적으로 구성되어 있는" 폴리펩타이드는 일부 구체예에서 결실 아미노산이 상기 폴리펩타이드의 기능에 실질적으로 영향을 주지 않는 한 하나 또는 그 초과(예컨대, 1, 2, 3, 4 또는 그 초과)의 아미노산이 감소할 수 있다.

[0088] 일부 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함하는 항체 분자를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 분자는 면역글로불린 중쇄를 포함하는 제2폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 분자는 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체 분자는 면

역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함하는 제2폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 항체는 단일 항체 결합 부위(즉, 1가 항체)를 포함한다.

[0089] 일부 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함하는 이중이합체 분자를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 이합체화 도메인을 포함하는 제2폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 단일 항체 결합 부위(즉, 1가 항체)를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 (a) 이합체화 도메인을 포함하는 세포의 부분 및 막횡단 부분을 포함하는 제1폴리펩타이드, 및 (b) 이합체화 도메인을 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함하는 이중이합체 분자를 제공한다. 특정 구체예에서, 상기 제1 및 제2 이합체화 도메인은 동일하다. 특정 구체예에서, 상기 제1 및 제2 이합체화 도메인은 상이하다.

[0090] 일부 구체예에서, 이중이합체 분자는 (a) (i) 제1 이합체화 도메인을 포함하는 세포의 부분 및 (ii) 막횡단 부분을 포함하는 제1폴리펩타이드; 및 (b) 제2 이합체화 도메인을 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 면역글로불린 불변 영역인 제1 이합체화 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 면역글로불린 중쇄 불변 영역인 제1 이합체화 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 면역글로불린 불변 영역인 제2 이합체화 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 면역글로불린 중쇄 불변 영역인 제2 이합체화 도메인을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함하는 제1폴리펩타이드를 포함한다.

[0091] 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드는 당 분야에 공지된 적합한 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 방법들의 범위는 직접적인 단백질 합성 방법에서부터 폴리펩타이드 서열을 인코딩하는 DNA 서열을 작제하여 이 서열을 적합한 숙주에서 발현시키는 방법에 이른다. 일부 구체예에서, DNA 서열은 관심 야생형 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 분리하거나 합성함으로써 재조합 기술을 사용하여 작제된다. 임의로, 상기 서열은 상기 서열의 기능적 변이체를 제공하기 위해 부위-특이적 돌연변이유발법에 의해 돌연변이될 수 있다.

[0092] 일부 구체예에서, 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하여 화학적 합성에 의해 작제될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 바람직한 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 기초하고, 상기 관심 재조합 폴리펩타이드가 생성되는 상기 숙주 세포에 적합한 코돈을 선택함으로써 디자인될 수 있다. 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 합성하기 위해 표준 방법들을 적용할 수 있다. 예를 들어, 역-번역된 유전자를 작제하기 위해 완전한 아미노산 서열이 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 특정 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 올리고머를 합성할 수 있다. 예를 들어, 바람직한 폴리펩타이드의 부분들을 코딩하는 몇몇 짧은 올리고뉴클레오타이드가 합성된 다음 라이게이션될 수 있다. 상기 개별 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 상보적 어셈블리를 위한 5' 또는 3' 오버행(overhang)을 포함한다.

[0093] 일단 어셈블리되면(재조합 기술, 화학적 합성 또는 다른 방법에 의함), 관심 특정 폴리펩타이드를 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현 벡터 내로 삽입되고, 바람직한 숙주 내에서 상기 폴리펩타이드의 발현을 위해 적합한 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 적당한 어셈블리는 뉴클레오타이드 서열분석, 제한효소 매핑(mapping), 및/또는 적합한 숙주 내에서 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드의 발현에 의해 확인될 수 있다. 당 분야에 널리 공지되어 있는 바와 같이, 숙주 내 트랜스팩션된 유전자를 높은 발현 수준으로 수득하기 위해서, 상기 유전자는 선택된 발현 숙주 내에서 기능하는 전사 및 번역 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야만 한다.

[0094] 특정 구체예에서, 재조합 발현 벡터가 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA를 증폭하고 발현하기 위해 사용된다. 예를 들어, 재조합 발현 벡터는 포유류, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동가능하게 연결된, 폴리펩타이드를 인코딩하는 합성 또는 cDNA-유래된 DNA 단편을 가진 복제가능한 DNA 작제물일 수 있다. 전사 단위는 일반적으로 (1) 조절 요소 또는 유전자 발현에서 역할을 갖는 요소들, 예를 들어, 전사 프로모터 및/또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조적 또는 코딩 서열, 및 (3) 적당한 전사 및 번역 개시 및 종료 서열의 어셈블리를 포함한다. 조절 요소는 전사를 제어하기 위한 오퍼레이터 서열을 포함할 수 있다. 숙주내에서 복제하는 능력은 통상적으로 복제 기점에 의해 부여되며, 형질전환체의 인지를 용이하게 하는 선별 유전자가 추가적으로 혼입될 수 있다. DNA 영역은 서로

에 대해 기능적으로 관련되는 경우에 "작동적으로 연결된" 것이다. 예를 들어, 신호 펩타이드(분비 선도서열)에 대한 DNA는 상기 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전구체로서 발현되는 경우에 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되거나; 프로모터가 상기 서열의 전사를 제어하는 경우에 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 리보솜 결합 부위가 번역이 허용되는 위치를 점하고 있는 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 효모 발현 시스템에서 사용하기 위해 의도된 구조적 요소는 숙주 세포에 의해 번역된 단백질의 세포외 분비를 가능하도록 하는 선도 서열을 포함한다. 대안적으로, 재조합 단백질이 선도 또는 운반 서열 없이 발현되는 경우에는 N-말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 상기 잔기는 최종 산물을 제공하기 위해 발현된 재조합 단백질로부터 나중에 선택적으로 절단될 수 있다.

[0095] 발현 벡터 및 제어 요소의 선택은 숙주의 선택에 의존한다. 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주를 위해 유용한 발현 벡터는, 예를 들어, SV40, 소 파필로마 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 제어 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 박테리아 숙주를 위해 유용한 발현 벡터는 pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체, 및 M13과 같은 더 폭넓은 숙주 범위 플라스미드 및 다른 필라멘트형(filamentous) 단일-가닥 DNA 파아지를 포함하는 E. 콜리(E. coli)로부터의 플라스미드와 같은 공지된 박테리아 플라스미드를 포함한다.

[0096] 진핵 숙주를 위한 일부 발현 벡터는 상기 숙주 게놈 내로 혼입되는 능력을 가질 수 있고, 진핵 숙주를 위한 일부 발현 벡터는 염색체의 실체로서 핵 내에 지속될 수 있다. 일부 구체예에서, 에피솜 벡터는 세포 당 다수의 복제수(copy)로 트랜스팩션시켜 관심 폴리뉴클레오타이드의 높은 발현 및/또는 더 높은 트랜스팩션 효율을 야기하는 장점을 제공할 수 있다.

[0097] 본원에 기술된 바와 같은 상기 폴리펩타이드의 발현을 위해 적합한 숙주 세포는 적절한 프로모터의 제어 하에 원핵세포, 효모, 곤충 또는 보다 고등한 진핵 세포를 포함한다. 원핵세포는 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 E. 콜리 또는 바실러스를 포함한다. 보다 고등한 진핵 세포는 하기 기술하는 바와 같은 포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 또한 무세포(cell-free) 번역 시스템이 사용될 수 있다.

[0098] 다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템이 재조합 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용된다. 일부 구체예에서, 포유동물 세포에서 재조합 단백질의 발현은 상기 단백질이 일반적으로 정확하게 폴딩되고, 적절하게 개질되고 완전하게 기능하기 때문에 선호된다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예에는 COS-7(원숭이 신장-유래), L-929(뮤린 섬유아세포-유래), C127(뮤린 지방암-유래), 3T3(뮤린 섬유아세포-유래), CHO(차이니스 햄스터 난소-유래), HEK-293(인간 배아 신장-유래), HeLa(인간 자궁경부암-유래) 및 BHK(햄스터 신장 섬유아세포-유래) 세포주를 포함하나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 세포주의 변이체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 293T세포는 SV40 라지 T-항원(Large T-antigen)을 발현하는 HEK-293 세포로, 이는 SV40 복제 기점을 포함하는 트랜스팩션된 플라스미드의 에피솜 복제를 가능하게 한다. 포유동물 발현 벡터는 복제 기점과 같은 비-전사 요소, 적합한 프로모터 및 발현될 유전자에 연결된 인핸서, 및 다른 5' 또는 3' 측면의 비-전사 서열, 및 필수적인 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위와 같은 5' 또는 3' 비-번역 서열, 및 전사 종료 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 배칼로바이러스 시스템은 곤충 세포에서 이중성 단백질의 생산을 위해 사용된다. 상기 방법 및 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다(참조: 예컨대 Luckow and Summers, 1988, *Bio/Technology*, 6:47).

[0099] 특정 구체예에서, 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드는 분리된다. 특정 구체예에서, 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드는 실질적으로 순수하다.

[0100] 숙주 세포에 의해 발현된 상기 단백질은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 상기 방법에는 크로마토그래피(예컨대, 이온교환, 친화성 및 크기 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 분별 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 다른 표준 기술이 포함된다. 헥사-히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트 서열 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제와 같은 친화성 태그는 적절한 친화성 컬럼을 거쳐 지나가면서 쉽게 정제될 수 있도록 상기 단백질에 결합될 수 있다. 분리된 단백질은 또한 단백질분해, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 핵자기공명 및 x-선 결정학과 같은 기술을 사용하여 물리적으로 특징규명될 수 있다.

[0101] 일부 구체예에서, 배양 배지 내로 재조합 단백질을 분비하는 발현 시스템으로부터의 상청액은 상업적으로 이용 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Milipore Pellicon 초여과 유닛(ultrafiltration unit)을 사용하여 우선 농축될 수 있다. 상기 농축 단계 이후에, 상기 농축액은 적합한 정제 매트릭스에 적용될 수 있다. 일부 구체예에서, 음이온 교환 수지, 예를 들어, 펜던트(pendant) 다이에틸아미노에틸(DEAE) 기를 가진 매트릭스 또는 기질이 사용될 수 있다. 상기 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로오스 또는 단

백질 정제에 보편적으로 사용되는 다른 형태일 수 있다. 일부 구체예에서, 양이온 교환 단계가 이용될 수 있다. 적합한 양이온 교환제는 설포프로필 또는 카르복시메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 일부 구체예에서, 하이드록시아파타이트(HT) 매질, 비제한적인 예로, 세라믹 하이드록시아파타이트가 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 소수성 RP-HPLC 매질, 예컨대, 팬던트 메틸 또는 다른 지방족 기를 가진 실리카 겔을 이용하는 하나 또는 그 초과와 역상 HPLC 단계가 단백질을 추가로 정제하기 위해 이용될 수 있다. 상기 정제 단계 중 일부 또는 전부는 다양한 조합으로 동종성 재조합 단백질을 제공하기 위해 이용될 수 있다.

[0102] 특정 구체예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 GPI-막 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 구절 "폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드"는 상기 폴리펩타이드에 대해 유일한 코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 뿐만 아니라 추가적인 코딩 및/또는 비-코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명의 상기 폴리뉴클레오타이드는 RNA의 형태로 존재하거나 DNA의 형태로 존재할 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하고; 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 단일-가닥인 경우에는 코딩 가닥 또는 비-코딩(안티-센스) 가닥일 수 있다.

[0103] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 10을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 12를 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 28을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 26을 포함하는 (신호 서열을 가지거나 가지지 않은) 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 30을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 31을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32를 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 30의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 31의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 32의 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0104] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 9, 서열번호 11 또는 서열번호 29의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 24, 서열번호 25 또는 서열번호 27의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 29의 폴리뉴클레오타이드와 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 적어도 약 95% 동일한, 일부 구체예에서, 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0105] 또한 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 27 또는 서열번호 29와 하이브리드화되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 하이브리드화는 높은 엄격한 조건 하에서 일어난다.

[0106] 특정 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 숙주 세포로부터 폴리펩타이드의 발현 및/또는 분비시 도움을 주는 폴리뉴클레오타이드와 동일한 판독 프레임에 융합된 성숙한 폴리펩타이드에 대한 코딩 서열을 포함한다. 예를 들어, 선도 또는 신호 서열은 상기 세포 표면으로 폴리펩타이드의 운반 및 상기 폴리펩타이드가 분비 단백질인 경우 상기 세포로부터의 분비를 제어하기 위한 서열로서 기능한다. 선도 서열(또는 신호 서열)을 가진 상기 폴리펩타이드는 프레단백질(preprotein)이고, 상기 폴리펩타이드의 성숙한 형태를 생산하기 위해 상기 숙주 세포에 의해 절단된 선도 서열을 가질 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 또한 추가적인 5' 아미노산 잔기가 부가된 성숙 단백질인 프로단백질(proprotein)을 인코딩할 수 있다. 프로서열(prosequence)을 가진 성숙 단백질은 프로단백질이고, 상기 단백질의 비활성 형태이다. 일단 상기 프로서열이 절단되면 활성 성숙 단백질이 남게 된다.

[0107] 특정 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 상기 발현된 폴리펩타이드의 정제 및/또는 확인이 가능하도록 해주는 마커(marker) 또는 태그 서열과 동일한 판독 프레임에 융합된 성숙 폴리펩타이드에 대한 상기 코딩 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 박테리아 숙주가 사용되는 경우, 상기 마커 서열은 상기 성숙 폴리펩

타이드의 정제에 위해 제공되는 pQE-9 벡터에 의해 제공되는 핵사-히스티딘 태그일 수 있다. 다른 구체예에서, 포유동물 숙주(예컨대, COS-7 세포)가 사용되는 경우, 상기 마커 서열은 인플루엔자 혈구응집소(hemagglutinin, HA) 단백질로부터 유래된 혈구응집소(HA) 태그일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 마커 서열은 "FLAG"이며, 이는 다른 친화성 태그와 함께 사용될 수 있는 서열 DYKDDDDK(서열번호 17)의 펩타이드이다.

[0108] 본 발명은 추가로, 예를 들어, 상기 폴리펩타이드의 단편, 유사체 및/또는 유도체를 인코딩하는 상기 본원에 기술된 폴리뉴클레오타이드의 변이체에 관한 것이다.

[0109] 특정 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드와 적어도 80% 동일한, 적어도 85% 동일한, 적어도 90% 동일한, 적어도 95% 동일한, 일부 구체예에서는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가진 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0110] 본원에 사용되는 바와 같이, 상기 구절의 참조 뉴클레오타이드 서열과, 예를 들어, 적어도 95% "동일한" 뉴클레오타이드 서열을 가진 폴리뉴클레오타이드는, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열이 상기 참조 뉴클레오타이드 서열의 각 100개 뉴클레오타이드 마다 5개까지의 점 돌연변이를 포함할 수 있음을 제외하고는 상기 참조 서열과 동일함을 의미한다. 달리 말하면, 참조 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가진 폴리뉴클레오타이드를 획득하기 위해, 상기 참조 서열 내 상기 뉴클레오타이드의 5%까지가 결실되거나 또 다른 뉴클레오타이드로 치환될 수 있거나, 상기 참조 서열 내 총 뉴클레오타이드 중 5%까지의 수많은 뉴클레오타이드가 상기 참조 뉴클레오타이드 서열 내에 삽입될 수 있다. 상기 참조 서열의 이러한 돌연변이는 상기 참조 뉴클레오타이드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또는 상기 말단 위치 사이, 상기 참조 서열 내 개별적으로 뉴클레오타이드 사이에 또는 상기 참조 서열 내 하나 또는 그 초과인 인접한 그룹에 배치된 어느 곳에서 일어날 수 있다.

[0111] 상기 폴리뉴클레오타이드 변이체는 코딩 영역, 비-코딩 영역 또는 둘 모두에 변화를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 변이체는 "침묵(silent)" 치환, 첨가 또는 결실을 생성시키나, 인코딩된 폴리펩타이드의 특성 또는 활성을 변화시키지 않는 변화를 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리펩타이드 변이체는 상기 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)에 기인한 "침묵" 치환을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 변이체는 다양한 이유, 예를 들어, 특정 숙주에 대해 코돈 발현을 최적화(예컨대, E. 콜리와 같은 박테리아 숙주에 바람직하도록 인간 mRNA에서 코돈을 변화시킴)하기 위해 생성될 수 있다.

[0112] 특정 구체예에서, 본원에 기술된 상기 폴리뉴클레오타이드는 분리된다. 특정 구체예에서, 본원에 기술된 상기 폴리뉴클레오타이드는 실질적으로 순수하다.

[0113] 본원에 기술된 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 세포가 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 발현 벡터는 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 상기 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 상기 폴리뉴클레오타이드 분자에 의해 인코딩된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 상기 폴리뉴클레오타이드 분자에 의해 인코딩된 폴리펩타이드를 생산한다.

[0114] III. 세포

[0115] 본 발명은 또한 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포 및 상기 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 본원에 기술된 상기 세포를 제조하기 위해 사용되는 상기 세포(예컨대, 숙주 세포)는 모든 포유동물 세포, 세포주 및 세포 배양액을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 마우스, 래트 또는 다른 설치류와 같은 포유류, 또는 인간 또는 원숭이와 같은 영장류로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 무린 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 인간 세포이다. 다른 구체예에서, 상기 세포는 포유동물 생식 세포 또는 체세포이다. 다른 구체예에서, 상기 세포는 일차 세포 배양액 또는 무한증식 세포주이다. 상기 포유동물 세포는 전형적으로는 세포 배양액에서 성장된다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 고정 표면에 부착한다. 다른 구체예에서, 상기 세포는 현탁액에서 성장된다.

[0116] 매우 다양한 숙주 세포들이 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 트랜스펙션될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 SP2/0, SP2/0-Ag14, NS/0, YB2/0, K6H6/B5, NS-1, FO, Y3/Ag 1.2.3, P3X63Ag8.653, 다른 골수종, 하이브리도마, 차이니스 햄스터 난소 세포(CHO), HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장 세포(BHK), CV-1 세포, 3T3 세포, L 세포, TC7 세포 및 인간 배아 신장 세포(HEK-293 및 293T)를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 무한증식 진핵 세포일 것이다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 공지된 융합 파트너 세포주이다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 높은 수준의 항체 발현 및 선별 배지에 민감하도록 효율적으로 융합된 무한증식 세포

주이다. 상기 세포주에는 SP2/0, SP2/0-Ag14, YB2/0, K6H6/B5, NS-1, FO, Y3/Ag 1.2.3 및 P3X63Ag8.653이 포함될 수 있으나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 면역글로불린 사슬을 발현하지 않는 골수종세포이다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 하이브리도마 또는 하이브리도마 라이브러리이다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 인간 세포이다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 HEK-293 세포 또는 이의 변이체(예컨대, 293T 세포)이다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 CHO 세포이다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 뮌헨 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 SP2/0 또는 이의 변이체(예컨대, SP2/0-Ag14)이다.

[0117] 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하는 세포는 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 본원에 기술된 상기 폴리뉴클레오타이드, 벡터 및/또는 작제물은 다양한 방법에 의해 적합한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 발현하는 포유동물 세포를 수득하기 위해 벡터를 이용하는 트랜스펙션 또는 감염이 사용된다.

[0118] 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 트랜스펙션에 의해 세포 내로 도입된다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션은 일시적 발현으로, 통상적으로 제한된 시간 동안 상기 트랜스펙션된 폴리펩타이드를 발현시킨다. 다른 구체예에서, 상기 트랜스펙션은 상기 트랜스펙션된 폴리펩타이드의 영구적 발현을 야기하는 적합한 트랜스펙션이다. 일부 구체예에서, 안정한 트랜스펙션은 세포내 게놈 내로 삽입 DNA의 혼입에 의해 수행된다. 일부 구체예에서, 상기 안정한 트랜스펙션은 상기 삽입 DNA의 에피솜 유지 및 복제를 야기한다.

[0119] DNA는 보편적인 트랜스펙션 기술을 통해 진핵 세포내로 도입될 수 있다. 용어 "트랜스펙션"은 외래 폴리뉴클레오타이드(예컨대, DNA)를 숙주 세포 내로 도입시키기 위한 당업자에게 공지된 다양한 기술을 말한다. 상기 기술에는 인산칼슘 또는 염화칼슘 공동-침전(co-precipitation), DEAE-텍스트란-매개 트랜스펙션, 리포솜-매개 트랜스펙션, 전기천공(electroporation) 및 마이크로인젝션(microinjection)이 포함되나 이에 한정되지 아니한다. 숙주 세포를 트랜스펙션시키기 위한 상기 방법 및 다른 적합한 방법은 많은 표준 실험실 매뉴얼에서 찾아볼 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 리포솜-매개 트랜스펙션 또는 "리포펙션(lipofection)"을 사용하여 트랜스펙션된다. 리포펙션은 지질-기재 트랜스펙션 기술로, 여기서 핵산은 지질-기재 트랜스펙션 시약과 연결되어 상기 핵산의 타이탄 조밀화와 보호를 야기한다. 상기 리포펙션의 주요 장점은 높은 효율성, 폭넓은 범위의 세포 유형에 모든 유형의 핵산을 트랜스펙션시키는 능력, 사용 용이성, 재생산성 및 낮은 독성이다. 추가적으로, 리포펙션은 일시적, 안정적, 공동-트랜스펙션, 연속적 또는 다중 트랜스펙션을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 모든 트랜스펙션 적용에 대해 적합하다.

[0120] 일부 구체예에서, 상기 세포는 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드를 발현하는 폴리뉴클레오타이드로 안정적으로 트랜스펙션된다. 포유동물 세포의 안정적 트랜스펙션을 위해, 사용된 발현 벡터 및 트랜스펙션 기술에 의존하여, 단지 세포의 소량 분획만이 이들의 게놈내로 DNA를 혼입시킬 수 있는 것이 공지되어 있다. 에피솜 벡터를 사용한 포유동물 세포의 트랜스펙션에 있어서, 세포의 더 많은 분획이 상기 DNA를 혼입시키고 유지할 수 있다. 상기 세포들을 확인하고 선별하기 위해, 선별 마커(예컨대, 항생제에 대한 내성)를 인코딩하는 유전자가 일반적으로 관심 상기 유전자(들)에 따라 상기 숙주 세포 내로 도입된다. 다양한 선별 마커는 G418, 하이그로마이신 및 메토폭세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여하는 것들을 포함한다. 선별 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 폴리펩타이드를 인코딩하는 것과 동일한 벡터 상에 숙주 세포내로 도입될 수 있거나, 개별 벡터 상에 도입될 수 있다. 상기 도입된 폴리뉴클레오타이드로 안정적으로 트랜스펙션된 세포는 약물 선별에 의해 확인될 수 있다(예컨대, 선별 마커 유전자가 혼입된 세포는 생존하는 반면 다른 세포는 죽을 것이다).

[0121] 일부 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 벡터에 의해 세포 내로 도입된다. 벡터는 염색체의 요소로서 독립적으로 복제되거나 복제될 수 없는 비리온(virion) 또는 바이러스-유사 입자를 생성하는 바이러스 게놈으로부터 유래될 수 있다. 바람직한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 비리온 입자는 감염에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 바이러스 벡터는 세포 게놈 내로 혼입된다. 포유동물 세포의 형질전환을 위한 바이러스 벡터에는 SV40 벡터, 및 파필로마바이러스, 아데노바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 백시니아 바이러스, 및 라우스육종 바이러스와 같은 레트로바이러스, 또는 몰로니 뮌헨 백혈병(Moloney murine leukemia) 바이러스와 같은 마우스 백혈병 바이러스에 기초한 벡터를 포함하나 이에 한정되지 아니한다.

[0122] 또한 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 본원은 본원에 기술된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 세포를 트랜스펙션시키는 것을 포함하여, 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 폴리펩타이드를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 일시적으로 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 안정

적으로 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 폴리펩타이드를 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드는 상기 세포의 게놈 내로 혼입된다. 일부 구체예에서, 폴리펩타이드를 인코딩하는 상기 트랜스펙션된 폴리뉴클레오타이드는 상기 세포에서 안정적으로 발현된다. 다른 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 상기 트랜스펙션된 세포의 표면에서 발현된다.

[0123] 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 폴리펩타이드의 발현을 검출하는 것을 추가로 포함한다. 상기 트랜스펙션된 세포는 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 상기 폴리펩타이드의 발현에 대해 분석될 수 있다. 사용될 수 있는 상기 분석법에는 비아코어(Biacore) 분석법, 유세포분석, FACS 분석법, 면역형광법, 면역세포화학법, 웨스턴 블롯 분석법, 방사면역분석법, ELISA, "샌드위치" 면역분석법, 면역침전 분석법, 침전 반응, 겔 확산 침전 반응, 면역확산 분석법, 응집반응 분석법, 상보적-고정 분석법(complement-fixation assay), 면역방사측정법, 형광면역분석법 및 단백질 A 면역분석법과 같은 기술을 사용하는 경쟁 및 비-경쟁 분석 시스템이 포함되나 이에 한정되지 아니한다. 상기 분석법은 일상적인 것이고 당 분야에 널리 공지되어 있다(참조: Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

[0124] 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 세포의 표면에서 상기 폴리펩타이드의 발현을 검출하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 검출 분자와 접촉된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 대한 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 형광단 또는 발색단으로 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 유세포분석을 사용하여 상기 폴리펩타이드의 발현을 검출하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 유세포분석에 의해 상기 검출 분자에 결합된 상기 세포를 확인하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, 구절 "검출 분자"에는 검출 분자의 집단이 포함되나 이에 한정되지 아니한다. 예를 들어, 검출 분자는 항체의 용액 또는 단백질 또는 단백질 단편의 용액일 수 있다. 유사하게, 구절 "검출 분자에 의해 결합된 세포"에는 수많은 검출 분자에 의해 결합된 세포가 포함되나 이에 한정되지 아니한다.

[0125] 유세포분석 및 FACS는 당업자에게 공지된 기술들이다. 유세포분석은 세포로부터 특이적인 다중-파라미터 데이터를 생성하는 플루오로크롬(fluorochrome) 분자의 빛 분산, 빛 여기 및 방출의 원리를 사용한다. 유세포분석은 상기 세포가 감지점을 거쳐 하나씩 스트림(stream)으로 흐름에 따라 세포 상에서 측정을 수행한다. 유세포분석은 형광-활성화된 세포 분류 또는 FACS에 의해 세포 집단의 정제 또는 개별 세포의 분리를 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 초 당 10 내지 20,000개의 세포로 분석된다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 초 당 1,000 내지 10,000개의 세포로 분석된다. 특정 구체예에서, 상기 세포는 초 당 100 내지 1,000개의 세포로 분석된다. 일부 구체예에서, 약 1×10^6 내지 1×10^8 개의 세포가 분석된다. 일부 구체예에서, 약 1×10^6 개의 세포가 분석된다. 특정 구체예에서, 약 5×10^6 개의 세포가 분석된다. 일부 구체예에서, 약 1×10^7 개의 세포가 분석된다. 일부 구체예에서, 약 2.5×10^7 개의 세포가 분석된다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 분석되고 분류된다. 예를 들어, 약 2.5×10^7 개의 세포가 FACS 장치를 통해 운행되어 분석된다. 표적 세포는 약 8개의 96 웰(well)의 웰 내로 분류될 수 있고, 600 내지 700개의 개별 클론이 분리될 수 있다. 따라서, 유세포분석의 사용은 다수의 세포를 신속하게 스크리닝하도록 해준다. 유사하게, FACS의 사용은 신속한 방식으로 다수의 세포를 검출하고 분류하고 개별 세포를 분리하도록 해준다.

[0126] 일부 구체예에서, 세포를 생산하는 상기 방법은 본원에 기술된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 세포를 트랜스펙션시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 폴리펩타이드를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 세포의 표면에서 상기 폴리펩타이드의 발현을 검출하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 선별하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 검출 분자와 접촉된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 대한 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 표적(예컨대, 단백질 또는 이의 단편)이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 형광단 또는 발색단으로 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 유세포분석에 의해 상기 검출 분자에 결합된 세포를 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 FACS에 의해 상기 검출 분자에 결합된 세포를 분리하는 것을 포함한다.

[0127] 따라서, 본 발명은 본원에 기술된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 본원에 기술된 방법 중 임의의 방법에 의해 생산된다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 본원에 기술된 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 구체

예에서, 상기 세포는 본원에 기술된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 비-면역글로불린 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 막-결합되고 상기 세포의 표면에서 발현된다.

[0128] 본 발명은 또한 이중이합체 분자를 생산하는 세포를 제공한다. 상기 이중이합체 분자는 막-결합되고, 상기 세포 표면에서 발현되며, 상기 세포로부터 분비되지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 본원에 기술된 폴리펩타이드를 포함하며, 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 항체이다.

[0129] 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 제2폴리펩타이드와 공유적으로 연결된 막-결합된 폴리펩타이드이며, 여기서 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역, 및 (b) 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 이황화결합을 형성함으로써 제2폴리펩타이드와 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 상기 이중이합체 분자를 형성하기 위해 제2폴리펩타이드와 적어도 하나의 이황화결합을 형성한다.

[0130] 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 면역글로불린 중쇄와 공유적으로 연결된 막-결합된 폴리펩타이드이며, 여기서 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 중쇄 불변 영역, 및 (b) 막횡단 부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 이황화결합을 형성함으로써 상기 면역글로불린 중쇄와 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 막-결합된 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄와 적어도 하나의 이황화결합을 형성한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄는 면역글로불린 경쇄와 쌍을 이루어, 상기 중쇄 가변 영역 및 상기 경쇄 가변 영역은 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄 둘 모두를 가진 단쇄 면역글로불린의 일부이다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 1가 항체 분자이다. 일부 구체예에서, 세포의 표면에서 발현된 상기 이중이합체 분자는 분비된 항체와 결합하지 않는다.

[0131] 따라서, 일부 구체예에서, 세포는 (a) CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 비-면역글로불린 막횡단 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드; 및 (b) 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드를 인코딩하는 적어도 하나의 추가적인 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드는 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 추가적인 폴리펩타이드는 상기 세포로부터 분비될 수 있는 항체이다. 특정 구체예에서, 세포의 표면에서 발현된 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 분비된 항체와 결합하지 않는다.

[0132] 본 발명은 또한 하이브리도마 세포 및 하이브리도마를 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 하이브리도마는 본원에 기술된 폴리펩타이드 및/또는 이중이합체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 하이브리도마 세포를 생산하는 방법은 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하는 세포와 항체-생산 세포를 융합시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 융합된 하이브리도마 세포는 상기 세포의 표면 상에서 이중이합체 항체 분자를 발현한다. 항체-생산 세포는 B-세포, 형질세포, 골수종, 하이브리도마 및 제조합 세포를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 항체 분자를 생성할 수 있거나 생성하는 임의의 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 상기 융합된 세포에 면역글로불린 중쇄를 제공하며, 여기서 상기 면역글로불린 중쇄는 상기 세포에 의해 발현된 상기 폴리펩타이드를 가진 이중이합체 분자를 형성한다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 상기 융합된 세포에 면역글로불린 경쇄를 제공하며, 여기서 상기 면역글로불린 경쇄는 항원-결합 부위를 형성하기 위해 면역글로불린 중쇄와 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 상기 융합된 세포에 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 제공하며, 여기서 상기 단쇄 면역글로불린은 상기 세포에 의해 발현된 상기 폴리펩타이드를 가진 이중이합체 분자를 형성한다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 마우스 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 인간 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 항체-생산 세포들의 집단이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 면역화된 동물로부터 분리된 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 나일브 동물로부터 분리된 세포이다. 다른 구체예에서,

상기 항체-생산 세포는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포로부터 생성된다. 다른 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이트 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 cDNA 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 복수의 이중이합체 항체 분자를 발현하는 하이브리도마 세포의 집단(예컨대, 라이브러리)를 생산한다. 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 하이브리도마 또는 하이브리도마 라이브러리가 또한 제공된다.

[0133] 본 발명은 또한 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드를 포함하는 이중이합체 분자를 발현하는 세포 라이브러리를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 세포 라이브러리를 생산하는 방법은 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 복수의 폴리뉴클레오타이드로 트랜스펙션시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 이중이합체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 상기 트랜스펙션된 세포의 표면 상에서 발현된다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하며, 여기서 각 폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 Fc 영역, 및 무작위 생성된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포로부터 생성된다. 다른 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이트 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 라이브러리는 나이트 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 cDNA 라이브러리이다. 특정 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 무작위 폴리펩타이드 라이브러리를 인코딩한다. 본원에 기술된 방법 중 임의의 방법에 의해 제조된 세포 라이브러리가 또한 제공된다.

[0134] 본 발명은 또한 본 발명의 신규 폴리펩타이드를 발현하고 또한 항체를 생산하는 세포를 제공한다. 또한 상기 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 세포는 본 발명의 폴리펩타이드, 본원에 기술된 바와 같은 항체 및/또는 이중이합체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 항체-생산 세포는 본원에 기술된 상기 신규 폴리펩타이드 중 임의의 것을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 폴리펩타이드를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 세포의 표면 상에서 이중이합체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 상기 폴리펩타이드 및 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄는 단일 항원-결합 부위를 형성하기 위해 면역글로불린 경쇄와 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린 중쇄는 단쇄 면역글로불린의 일부이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 하이브리도마 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 하이브리도마이다.

[0135] 본 발명은 또한 본원에 기술된 바와 같은 상기 신규 폴리펩타이드를 포함하는 세포 라이브러리를 제공한다. 일부 구체예에서, 세포 라이브러리 내 각 세포는 (a) CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 막횡단 부분을 포함하는 제1폴리펩타이드; 및 (b) 면역글로불린 중쇄를 포함하는 제2폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 상기 두 폴리펩타이드는 이중이합체 분자를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 두 폴리펩타이드는 공유적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 두 폴리펩타이드는 적어도 하나의 이황화결합을 형성한다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 상기 세포의 표면 상에서 발현된다. 일부 구체예에서, 각 세포는 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 단쇄 면역글로불린이다. 일부 구체예에서, 상기 이중이합체 분자는 단일 항원-결합 부위를 포함한다.

[0136] 본 발명은 또한 항체가 아닌 폴리펩타이드를 확인하고/하거나 선별하는 방법을 제공한다. 상기 폴리펩타이드에는 세포 표면 수용체 또는 이의 단편, 가용성 수용체 또는 이의 단편, 세포 표면 리간드 또는 이의 단편, 및 가용성 리간드 또는 이의 단편이 포함될 수 있으나 이에 한정되지 아니한다. 상기 폴리펩타이드는 단백질의 돌연

변이화되거나 유도체화된 형태를 포함할 수 있다. 상기 폴리펩타이드는 무작위생성된 폴리펩타이드, 예를 들어, 무작위생성된 폴리펩타이드 라이브러리를 포함할 수 있다.

[0137] 일부 구체예에서, 세포 라이브러리 내 각 세포는 (a) CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 막횡단 부분을 포함하는 제1폴리펩타이드; 및 (b) 제2폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 두 폴리펩타이드는 공유적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 상기 두 폴리펩타이드는 적어도 하나의 이황화결합을 형성한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역을 포함하며, 여기서 상기 두 폴리펩타이드는 이중이합체 분자를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 Fc 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2폴리펩타이드는 무작위생성된 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 제2폴리펩타이드는 (a) 면역글로불린 Fc 영역 및 (b) 무작위생성된 폴리펩타이드를 포함한다.

[0138] 무작위생성된 폴리펩타이드 또는 무작위 폴리펩타이드 라이브러리(및 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드)는 완전히 무작위생성되거나 이들은 이들의 무작위화에 있어서 편향될 수 있다. 당업자에 공지된 임의의 방법에는 상기 뉴클레오타이드 및/또는 펩타이드의 화학적 합성을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 방법을 포함하여, 무작위생성된 폴리펩타이드 또는 무작위 펩타이드 라이브러리를 생성하기 위해 사용될 수 있다(참조: 미국특허출원 제2003/0170753호 및 국제특허출원 WO 00/20574호).

[0139] 본원에 기술된 상기 세포 라이브러리는 특정 폴리펩타이드를 생산하는 세포에 대해 스크리닝될 수 있다. 따라서, 본원에서는 본원에 기술된 세포 라이브러리를 검출 분자와 접촉시키는 것을 포함하는 세포 라이브러리를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 확인하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 것을 추가로 포함한다. 상기 검출 분자에는 단백질, 탄수화물, 소분자 및 이들의 변이체가 포함될 수 있으나 이에 한정되지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 세포 표면 수용체, 항체, 리간드 또는 이들의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 형광단, 발색단 또는 자성 화합물로 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포는 유세포분석에 의해 확인된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포는 FACS에 의해 분리된다.

[0140] IV. 항체 또는 폴리펩타이드를 확인, 선별 및/또는 분리하는 방법

[0141] 관심 항원에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 확인은 전형적으로 세포 상청액의 ELISA 스크리닝에 의해 수행된다. 상기 상청액은 단일 세포(제한 희석) 클로닝 기술에 의해 분리된 무작위 세포에 의해 생성될 수 있다. 또는 상기 상청액은 하이브리도마 라이브러리로부터 하이브리도마 세포의 풀(pool)에 의해 생성될 수 있으며, 이에 의해 ELISA-양성 풀로부터의 상기 세포는 단일 세포 클로닝에 의해 서브-클로닝되고 분리되어야 한다. 이러한 방법은 많은 제한을 갖는다. 첫 번째 경우에서, "단일 세포" 배양액을 포함하는 다수의 플레이트는 ELISA-양성 클론을 찾아내기 위해 스크리닝되어야 한다. 하이브리도마 풀 스크리닝의 경우에, 각 ELISA-양성 풀은 관심 상기 하이브리도마의 순수한 클론을 분리하기 위해 제한 희석 클로닝에 의해 추가로 분리되어야 한다. 상기 방법 모두는 노동 집약적이고 시간 소모적이다. 추가로, 일부 경우에 있어서 상기 바람직한 클론은 상기 하이브리도마 라이브러리의 극도로 낮은 백분율로 나타날 수 있으며, 이는 극소량의 클론의 확인을 어렵게 만든다. 추가적으로, 상기 ELISA 스크리닝 접근법은 단일 항원에 대한 결합 활성을 확인하는 것이다. 개별 하이브리도마 클론이 하나 이상의 항원에 결합할 수 있는 모노클로날 항체를 생산하는 지를 평가하기 위해서는, 다중의 연속적인 ELISA가 수행될 필요가 있다.

[0142] 본 발명의 상기 신규 폴리펩타이드, 세포 및 세포 라이브러리는 관심 항원 또는 표적에 대해 특이적인 항체를 생산하는 세포를 확인하고 분리하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법은 하이브리도마 세포의 집단을 생산하기 위해, 본원에 기술된 바와 같은 신규 폴리펩타이드를 포함하는 세포와 항체-생산 세포를 융합하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 하이브리도마 세포는 상기 세포의 표면 상에서 이중이합체 항체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 하이브리도마 세포의 집단을 검출 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 하이브리도마 세포를 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 표적이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다.

- [0143] 일부 구체예에서, 항체 분자를 생산하는 하이브리도마 세포는 "패닝(panning)"으로서 당업자에 공지된 친화성 선별의 형태를 사용하여 확인된다. 상기 세포는 검출 분자(예컨대, 관심 항원)와 함께 인큐베이션되고, 상기 검출 분자에 의해 확인된 세포가 분리된다. 상기 분리된 세포로부터 면역글로불린 DNA가 증폭되어 세포 내로 재도입된다. 상기 세포는 상기 검출 분자와 함께 다시 인큐베이션되고 검출 분자에 의해 결합된 세포가 분리된다. 하나 또는 그 초과 라운드의 선별과정은 관심 상기 표적에 대해 바람직한 특이성을 가진 항체 또는 이의 단편이 부화(enrichment)되도록 할 수 있다. 따라서, 바람직한 항체 분자를 발현하는 극소량의 세포는 거대한, 고도로 다양한 집단으로부터 선택될 수 있다.
- [0144] 본원에 기술한 바와 같이, 일부 구체예에서 본 발명의 상기 폴리펩타이드는 CH2 및 CH3를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 및 막횡단 부분을 포함한다. 상기 폴리펩타이드는 상기 세포의 표면에서 발현된 이종이합체 항체 분자를 형성하기 위해 상기 항체-생산 세포에 의해 발현된 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍과 공유적으로 연결될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 이종이합체 항체 분자는 단일 항원-결합 부위를 포함하며 1가 항체이다. 개별 세포 상의 상기 이종이합체 분자의 상기 단일 항원-결합 부위는 상기 개별 세포에 의해 생산되고 분비된 상기 항체의 결합 특이성을 대표하는 것이다. 따라서, 관심있는 특이적 항원에 결합하는 이종이합체 항체 분자를 가진 세포를 확인하는 것은 또한 동일한 결합 특이성을 가진 분비된 항체를 생산하는 상기 세포의 분리를 가능하도록 해준다.
- [0145] 상기 항체-생산 세포는 상기 세포가 항체를 자연적으로 생산(예컨대, B-세포)하거나, 상기 세포가 재조합 수단에 의해 항체를 제조(예컨대, 트랜스펙션된 세포)하든 간에, 항체를 생산하는 임의의 세포일 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 B-세포, 형질세포, 하이브리도마, 골수종 또는 재조합 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 마우스 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 인간 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 항체-생산 세포들의 집단이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 면역화된 동물로부터 유래한다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 나이브 동물로부터 유래한다.
- [0146] 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 라이브러리이다. 다른 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 cDNA 라이브러리이다.
- [0147] 본원에 제공된 상기 방법은 상기 항체-생산 세포에 의해 생산된 항체의 타입에 제한되지 아니한다. 따라서, 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체는 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 단쇄 항체 또는 항체 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체는 단일특이성 항체 또는 다중특이성 항체(예컨대, 이특이성 항체)이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체는 IgG1 또는 IgG2 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체는 IgG2 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 무린 항체이다. 일부 구체예에서, 상기 항체-생산 세포에 의해 제조된 상기 항체는 인간화된 항체이다. 다른 구체예에서, 상기 항체는 인간 항체이다.
- [0148] 일부 구체예에서, 특이적 항체를 생산하는 세포를 확인하는 상기 방법은 본원에 기술된 신규 폴리펩타이드를 포함하는 세포를 적어도 하나의 추가적인 폴리펩타이드를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드로 트랜스펙션시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 세포의 표면에서 이종이합체 항체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 트랜스펙션된 세포를 검출 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 트랜스펙션된 세포를 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 표적이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다.
- [0149] 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩하는 복수의 폴리뉴

클레오타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄를 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 경쇄를 추가로 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 면역글로불린을 포함하는 복수의 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 복수의 폴리뉴클레오타이드는 DNA 라이브러리를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나이브 라이브러리이다. 다른 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 cDNA 라이브러리이다.

[0150] 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 단쇄 항체 또는 항체 단편인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 단일특이성 항체 또는 다중특이성 항체(예컨대, 이특이성 항체)인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 항체 또는 이들의 아형인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 IgG1 또는 IgG2 항체인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 IgG2 항체인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 무린 항체인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 일부 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 인간화된 항체인 폴리펩타이드를 인코딩한다. 다른 구체예에서, 상기 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 인간 항체인 폴리펩타이드를 인코딩한다.

[0151] 일부 구체예에서, 특이적 항체를 생산하는 세포를 확인하는 방법은 세포 라이브러리를 본원에 기술된 상기 신규 폴리펩타이드 중 임의의 것을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 트랜스펙션시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포 라이브러리는 항체-생산 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 트랜스펙션된 세포는 상기 세포의 표면에 이중이합체 항체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 트랜스펙션된 세포를 검출 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 트랜스펙션된 세포를 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 표적이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다.

[0152] 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 B-세포, 형질세포, 하이브리도마, 골수종 또는 재조합 세포이다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 하이브리도마 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 마우스 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포 라이브러리는 인간 세포를 포함한다.

[0153] 일부 구체예에서, 본원에서는 특이적 항체를 분비하지만 상기 분비된 항체의 결합 특이성을 나타내는 단일 항원-결합 부위를 포함하는 1가 이중이합체 항체 분자를 세포 표면에서 발현시키는 세포 또는 하이브리도마를 생산하는 방법을 제공한다. 상기 이중이합체 항체 분자, 및 따라서 상기 항체-생산 세포는 검출 분자를 사용하여 확인될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 항원이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 형광단, 발색단 또는 자성 화합물로 표지된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자와 결합된 상기 세포는 유세포 분석에 의해 확인된다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자와 결합된 상기 세포는 FACS에 의해 분리된다.

[0154] 본 발명의 상기 신규 폴리펩타이드, 세포 및 세포주는 관심 항원 또는 표적에 대해 특이적인 항체를 스크리닝하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 스크리닝하는 방법은 본원에 기술된 상기 세포 또는 세포 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 세포(예컨대, 세포 라이브러리)는 상기 세포의 표면에서 이중이합체 분자를 발현한다. 본원에 기술된 바와 같이, 상기 세포의 표면에서 발현된 상기 이중이합체 분자는 상기 세포에 의해 생산된 항체의 결합 부위와 동일한 결합 부위를 포함한다. 일부 구체예에서, 특이적 항체를 스크리닝하는 상기 방법은 상기 세포를 검출 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 검출 분자에 의해 결합된 이중이합체 분자를 발현하는 세포는 상기 검출 분자에 특이적인 항체 분자를 발현한다. 일부 구체예에서, 상기 스크리닝 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 스크리닝 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포를 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 스크리닝 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 세포에 의해 생산된 상기 항체를 분리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 관심 표적이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 단백질 또는 이의 단편이다. 일부 구체예에서, 상기 검출 분자는 표지된다.

- [0155] 일부 구체예에서, 막-MAb 기술을 사용하는 특이적 항체에 대한 스크리닝은 선별의 반복적 라운드 후 증폭을 포함한다. 예를 들어, 세포(예컨대, 293-hMT 세포 또는 293T-hMT 세포)는 라이브러리 DNA로 트랜스펙션된다. 임의의 한 트랜스펙션을 위해 사용된 DNA의 양 및 세포의 수는 상기 라이브러리 및/또는 라이브러리 다양성에 의존할 것이다. 일단 트랜스펙션되면, 세포를 배양하여 24시간 내지 48시간 동안 성장시킨다. 그런 다음 세포를 수확, 세척하고 표적 분자(예컨대, 관심 항원)로 스크리닝한다. 상기 스크리닝 분자는 직접적으로 표지될 수 있거나 표지된 제2 분자에 의해 검출될 수 있다. 표지된 세포는 당업자에 공지된 방법, 예를 들어 FACS 또는 자성 비드를 사용함으로써 분석되고/되거나 분류된다. 상기 분류된 세포로부터 플라스미드 DNA를 추출하고 증폭한다. 플라스미드 DNA는 임의의 널리-공지된 방법에 의해 추출되고 정제될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 DNA는 페놀/클로로포름 혼합물을 사용하여 추출된 다음 에탄올 침전될 수 있다. 그런 다음 정제된 플라스미드 DNA는 박테리아를 형질전환시키기 위해 사용되고 상기 분리된 DNA를 증폭시킨다. 또는 DNA는 세포로부터 분리되어 당업자에 공지된 PCR 방법에 의해 특이적 영역이 증폭될 수 있다. PCR 산물은 박테리아를 형질전환시키고 상기 플라스미드를 증폭시키기 위해 사용되는 상기 숙주 플라스미드 내로 다시 서브클로닝된다. 임의의 방법을 사용하여 첫 번째 선별을 통해 얻어진 증폭된 라이브러리는 새로운 세포(예컨대, 293-hMT 또는 293T-hMT 세포)를 트랜스펙션시키기 위해 사용되며 동일한 표적 또는 항원을 사용한 후속 선별 라운드를 수행한다. 관심 표적 또는 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 집단이 부화(enrichment)될 때까지 상기 방식으로 다수 라운드의 선별을 수행한다.
- [0156] 일단 상기 라이브러리가 특이적 항체 분자의 집단에 대해 부화되면, DNA를 분리하여 박테리아를 형질전환시키기 위해 사용한다. 단일 콜로니를 취하여 플라스미드 DNA를 분리한다. 상기 클론의 플라스미드를 가용성 항체의 생산을 위한 포유동물 세포(예컨대, 모(parental) HEK-293 또는 모 293T 세포)를 트랜스펙션시키기 위해 사용한다. 그런 다음 수득된 항체를 ELISA, FACS 및 또는 비아코어에 의해 바람직한 표적에 대한 특이적 결합에 대해 시험한다.
- [0157] 플라스미드를 이용한 포유동물 세포의 일시적 트랜스펙션은 일반적으로 세포 당 다중 복제수의 플라스미드를 생성시킨다. 세포 당 상기 복제수는 100 내지 10,000 범위일 수 있다. 세포 당 상기 절대적 수는 트랜스펙션 프로토콜, 트랜스펙션 시약, 플라스미드 품질, 플라스미드 크기 및 세포 밀도를 포함하지만 이에 한정되지 아니하는 다양한 요인에 의존한다. 세포 표면-디스플레이된 항체의 라이브러리를 생성함에 있어서, 상기 세포 내로 도입되는 항체-인코딩 플라스미드(또는 Ab 라이브러리 플라스미드)의 양을 조절하는 것이 바람직하다. 일부 구체예에서, 세포 내 Ab 라이브러리 플라스미드의 플라스미드 복제수를 조절하기 위해, 개별적인 "담체" 플라스미드가 사용될 수 있다. 상기 담체 플라스미드는 상기 Ab 라이브러리 플라스미드와 혼합되고, 이용가능한 "플라스미드 스페이스(plasmid space)" 중 일부를 흡수할 수 있다. 따라서 일부 구체예에서, 상기 세포에 의해 흡수되는 Ab 라이브러리 플라스미드의 수를 조절하기 위해, 담체 플라스미드를 다양한 비로 상기 Ab 라이브러리 플라스미드와 혼합한 다음 세포를 트랜스펙션시킨다.
- [0158] 일부 구체예에서, 숙주 세포의 표면에서 폴리펩타이드의 발현을 조절하는 방법은 숙주 세포를 (a) 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA, 및 (b) 과량의 관련없는 DNA로 트랜스펙션시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 이중이합체 항체 분자이다. 따라서 일부 구체예에서, 숙주 세포의 표면에서 이중이합체 항체 분자의 발현을 조절하는 방법은 숙주 세포를 (a) 면역글로불린을 인코딩하는 DNA, 및 (b) 과량의 관련없는 DNA로 트랜스펙션시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 면역글로불린을 인코딩하는 DNA 대 관련없는 DNA의 비는 1:10 내지 1:1,000,000이다. 일부 구체예에서, 면역글로불린을 인코딩하는 DNA 대 관련없는 DNA의 비는 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000, 또는 그 사이의 임의의 비이다. 일부 구체예에서, 면역글로불린을 인코딩하는 상기 DNA는 플라스미드 DNA이고, 상기 관련없는 DNA는 플라스미드 DNA이다. 일부 구체예에서, 상기 숙주 세포는 본원에 기술된 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린은 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 면역글로불린은 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 가진 단쇄 항체 분자이다. 일부 구체예에서, 면역글로불린을 인코딩하는 상기 DNA는 DNA 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 면역화된 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 나일브 동물의 세포로부터 생성된다. 일부 구체예에서, 상기 DNA 라이브러리는 cDNA 라이브러리이다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 숙주 세포와 검출 분자를 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 숙주 세포를 확인하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 검출 분자에 의해 결합된 상기 숙주 세포를 분리하는 것을 포함한다.
- [0159] 본 발명은 또한 본원에 기술된 상기 방법 중 임의의 방법에 의해 확인되고/되거나, 선별되고/되거나 분리된 세

포에 의해 생산된 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 본원에 기술된 상기 방법 중 임의의 방법에 의해 분리된 세포에 의해 생산된 항체를 제공한다.

[0160] V. 항체

[0161] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 상기 신규 폴리펩타이드 및 세포는 관심 표적(예컨대, 항원)에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하고/하거나, 선별하고/하거나, 분리하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 세포의 표면에서 발현된 상기 이중이합체 항체 분자는 단일 항원-결합 부위를 형성하는 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 포함한다. 상기 단일 항원-결합 부위는 상기 세포에 의해 생산되고 분리되는 상기 항체에 대한 상기 항원-결합 부위와 동일하고/하거나 대표한다.

[0162] 본원에 제공된 상기 폴리펩타이드, 세포 및 방법은 생산되는 항체의 타입을 제한하지 아니한다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 모노클로날 항체이다. 모노클로날 항체는 당업자에게 공지되어 있는 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다(참조: Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495). 일부 구체예에서, 마우스, 램스터 또는 다른 적절한 숙주 동물은 관련있는 항원(예컨대, 정제된 펩타이드 단편, 전장 재조합 단백질, 융합 단백질 등)의 다수의 피하, 복강내 또는 정맥내 주사에 의해 면역화된다. 상기 항원은 키펀 림프 헤모시아닌(KLH) 또는 혈청 알부민과 같은 담체 단백질에 임의로 컨쥬게이션될 수 있다. 상기 항원(담체 단백질을 가지거나 가지지 않음)은 멸균 염수에 희석되어 일반적으로 안정적인 에멀전(emulsion)을 형성하기 위해 애쥬번트(예컨대, 완전 또는 불완전 프로인트 애쥬번트(Freund's Adjuvant))와 결합된다. 일부 구체예에서, 상기 면역화 항원은 인간 단백질 또는 이의 일부분일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 면역화 항원은 마우스 단백질 또는 이의 일부분일 수 있다. 일부 구체예에서, 마우스는 인간 항원으로 면역화된다. 일부 구체예에서, 마우스는 마우스 항원으로 면역화된다. 일부 구체예에서, 분리된 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 분리된 림프구는 비-특이적으로 활성화된다. 일부 구체예에서, 상기 분리된 림프구는 마우스 림프구이다. 일부 구체예에서, 상기 분리된 림프구는 인간 림프구이다.

[0163] 면역화 및/또는 활성화 다음에, 림프구는 분리되고 하이브리도마를 생산하기 위해, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 적합한 세포주와 융합된다. 하이브리도마를 생산하기 위해 사용된 상기 세포주는 본원에 기술된 신규 폴리펩타이드를 발현하는 상기 세포주 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 하이브리도마 세포는 당 분야에 공지된 바와 같이 특화된 배지를 사용하여 선별되고, 융합되지 않은 림프구 및 융합 세포는 상기 선별 과정에서 생존하지 못한다. 일부 구체예에서, 선별된 항원에 대해 특이적인 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마는 면역침전, 면역블로팅 및 시험관내 결합 분석(예컨대, 유세포분석(FACS), 효소결합면역흡착측정(ELISA), 방사면역측정법(RIA)을 포함하지만 이에 한정되지 아니하는 다양한 기술들에 의해 확인될 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 세포는 본원에 기술된 바와 같은 상기 기술들 중 임의의 기술을 사용하여 이중이합체 항체 분자의 일부로서 상기 세포의 표면에서 발현된 상기 항원 결합 부위에 기초하여 직접적으로 선별된다. 하이브리도마는 표준 방법(참조: Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986)을 사용하여 시험관내 배양 또는 동물내 복수(ascites)와 같은 생체내에서 증식될 수 있다. 상기 모노클로날 항체는 친화성 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 전기영동 및 투석을 포함하지만 이에 한정되지 아니하는 당 분야의 표준 방법에 따라 상기 배양 배지 또는 복수액(ascites fluid)으로부터 정제될 수 있다.

[0164] 대안적으로, 모노클로날 항체는 당업자에게 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다(참조: 미국특허 번호 제4,816,567호). 일부 구체예에서, 모노클로날 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 상기 유전자를 특이적으로 증폭시키는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 RT-PCR과 같은 기술을 사용하여, 성숙 B-세포 또는 하이브리도마 세포로부터 분리된다. 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드의 서열은 통상적인 서열분석 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 상기 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드는 적합한 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 상기 발현 벡터는 E. 콜리, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장 세포(HEK) 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포가 트랜스펙션 되었을 때 상기 모노클로날 항체를 생산하며, 상기 발현 벡터는 그렇지 않은 경우 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는다. 일부 구체예에서, 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드로 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 영역 및 막횡단 부분을 포함하는 상기 폴리펩타이드를 발현하는 본 발명의 상기 세포를 트랜스펙션시킨다.

[0165] 재조합 모노클로날 항체 또는 이의 단편은 바람직한 종의 CDR을 발현하는 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 또한 분리될 수 있다(참조: McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson et al., 1991, *Nature*,

352:624-628; 및 Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).

- [0166] 모노클로날 항체를 인코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드(들)은 대안적인 항체를 생성시키기 위해 재조합 DNA 기술을 사용하여 추가로 개질될 수 있다. 일부 구체예에서, 예를 들어, 마우스 모노클로날 항체의 경쇄 및 중쇄의 상기 불변 도메인은 1) 예를 들어, 키메라 항체를 생성하기 위한 인간 항체의 상기 영역 또는 2) 융합 항체를 생성하기 위한 비-면역글로불린 폴리펩타이드에 대해 치환될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 불변 영역은 모노클로날 항체의 바람직한 항체 단편을 생성하기 위해 트렁케이션(truncation)되거나 제거된다. 상기 가변 영역의 부위-특이적 또는 고-밀도 돌연변이유발은 모노클로날 항체의 특이성, 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 최적화시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 CDR의 부위-특이적 돌연변이유발은 모노클로날 항체의 특이성, 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 최적화시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0167] 일부 구체예에서, 상기 항체는 인간화된 항체이다. 전형적으로, 인간화된 항체는 상보성 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 바람직한 특이성, 친화성 및/또는 능력을 가진 비-인간 종(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린이다. 일부 구체예에서, 인간 면역글로불린의 상기 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 바람직한 특이성, 친화성 및/또는 능력을 가진 비-인간 면역글로불린으로부터의 상응하는 프레임워크 영역 잔기로 대체된다. 일부 구체예에서, 상기 인간화된 항체는 항체 특이성, 친화성 및/또는 능력을 개량하고 최적화하기 위해 상기 Fv 프레임워크 영역 내 및/또는 상기 대체된 비-인간 잔기 내 추가적인 잔기의 치환에 의해 추가로 개질될 수 있다. 일반적으로, 상기 프레임워크 영역의 전부, 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 컨센서스(consensus) 서열의 가변 도메인인 반면 상기 인간화된 항체는 상기 비-인간 면역글로불린에 상응하는 CDR의 전부, 또는 실질적으로 전부를 포함하는 적어도 하나, 및 전형적으로는 두 개 또는 세 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이다. 일부 구체예에서, 상기 인간화된 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 일부분을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 인간화된 항체는 인간 피검자에게 투여시 항원성 및 HAMA(인간 항-마우스 항체) 반응을 감소시킬 수 있기 때문에 치료학적으로 사용된다. 당업자는 공지된 기술에 따라 면역원성이 감소된 기능적인 인간화된 항체를 수득할 수 있을 것이다(참조: 미국특허번호 제5,225,539호; 제5,585,089호; 제5,693,761호; 및 제5,693,762호).
- [0168] 특정 구체예에서, 상기 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 직접적으로 제조될 수 있다. 표적 항원에 특이적인 항체를 생산하는, 시험관내에서 면역화되거나 면역화된 개체로부터 분리된, 무한증식 인간 B 림프구가 생성될 수 있다. 대안적으로, 인간 항체는 파아지 라이브러리로부터 선별될 수 있으며, 여기서 파아지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다(참조: Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; 및 Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). 항체 파아지 라이브러리의 생성 및 사용을 위한 기술들은 또한 미국특허번호 제5,969,108호; 제6,172,197호; 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,300,064호; 제6,653,068호; 제6,706,484호; 및 제7,264,963호; 및 참고문헌(참조: Rothe et al., 2008, *J. Mol. Bio.*, 376:1182-1200)에 기술되어 있다. 친화성 성숙 방법 및 사슬 셔플링(shuffling) 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 고친화성 인간 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다(참조: Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783).
- [0169] 또한 인간 항체는 내인성 면역글로불린 생산 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리(repertoire)를 면역화시에 생산할 수 있는 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 트랜스제닉 마우스에서 제조될 수 있다. 이러한 접근법은 미국특허번호 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호에 기술되어 있다.
- [0170] 특정 구체예에서, 상기 항체는 이특이적 항체이다. 이특이적 항체는 적어도 두 개의 상이한 에피토프를 특이적으로 인지하고 결합할 수 있다. 상기 상이한 에피토프는 동일한 분자 내에 또는 상이한 분자 상에 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 제1 항원 표적을 발현하는 상기 세포에 대해 세포내 방어 메커니즘에 중점을 두도록, 제1 항원 표적뿐만 아니라 백혈구(예컨대, CD2, CD3, CD28 또는 B7) 또는 Fc 수용체(예컨대, CD64, CD32 또는 CD16) 상의 효과기 분자와 같은 제2 항원 표적을 특이적으로 인지하고 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 항체는 특정 표적 항원을 발현하는 세포로 세포독성제를 유도하는데 사용될 수 있다. 이들 항체는 항원-결합 아암(arm) 및 EOTUBE, DPTA, DOTA 또는 TETA와 같은 세포독성제 또는 방사성핵종 킬레이트제(radionuclide chelator)에 결합하는 아암을 보유하고 있다.
- [0171] 이특이성 항체를 제조하기 위한 기술들은 당업자에게 공지되어 있다(참조: Millstein et al., 1983, *Nature*,

305:537-539; Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymol*, 121:120; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.*, 175:217-225; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol*, 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; 및 미국 특허번호 제5,731,168호). 이특이성 항체는 온전한 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 둘 이상의 결합가를 가진 항체가 또한 고려된다. 예를 들어, 삼특이성 항체가 제조될 수 있다(참조: Tutt et al., 1991, *J. Immunol*, 147:60). 따라서, 특정 구체예에서, 상기 항체는 다중특이성이다.

[0172] 일부 구체예에서, 본원에 기술된 상기 항체는 단일 유전자 작제물로부터 생산된 단쇄 면역글로불린이다(참조: Lee et al., 1999, *Molecular Immunology*, 36:61-71). 상기 단쇄 면역글로불린은 전체로서 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, 상기 경쇄의 카르복실 말단은 Gly-Ser 링커 펩타이드를 통해 상기 중쇄의 아미노 말단에 결합하며, 여기서 상기 경쇄는 가변 영역 및 불변 영역을 포함하고, 상기 중쇄는 가변 영역 및 CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 이들 단쇄 면역글로불린은 이합체 항체 분자를 형성한다.

[0173] 특정 구체예에서, 본원에 기술된 상기 항체 또는 다른 폴리펩타이드는 단일특이성일 수 있다.

[0174] 특정 구체예에서, 상기 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 온전한 항체와는 상이한 기능 또는 능력을 가질 수 있고; 예를 들어, 항체 단편은 종양 침습을 증가시킬 수 있다. 온전한 항체의 단백질분해를 포함하나 이에 한정되지 아니하는, 항체 단편의 생성을 위한 다양한 기술들이 공지되어 있다. 일부 구체예에서, 항체 단편은 항체 분자의 펩신 분해에 의해 생성된 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체 단편은 F(ab')₂ 단편의 이황화결합을 환원시킴으로써 생성된 Fab 단편을 포함한다. 다른 구체예에서, 항체 단편은 파파인 및 환원제로 상기 항체 분자를 처리함으로써 생성된 Fab 단편을 포함한다. 특정 구체예에서, 항체 단편은 재조합적으로 생성된다. 일부 구체예에서, 항체 단편은 Fv 또는 단쇄 Fv(scFv) 단편을 포함한다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 E. 콜리 또는 다른 숙주 세포에서 발현되어 분비될 수 있으며, 이는 이들 단편의 대량 생산을 가능하게 해준다. 일부 구체예에서, 항체 단편은 본원에 논의된 바와 같이 항체 파아지 라이브러리로부터 분리된다. 예를 들어, Fab 발현 라이브러리의 작제를 위한 방법(참조: Huse et al., 1989, *Science*, 246:1275-1281)이 사용될 수 있으며, 이는 단백질 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 동족체에 대해 바람직한 특이성을 가진 모노클로날 Fab 단편의 신속하고 효과적인 확인이 가능하도록 해준다. 일부 구체예에서, 항체 단편은 미국특허번호 제5,641,870호에 기술된 바와 같이 선형 항체 단편이다. 특정 구체예에서, 항체 단편은 단일특이성 또는 이특이성이다. 특정 구체예에서, 상기 항체는 scFv이다. 소정의 표적 항원에 대해 특이적인 단쇄 항체의 생산을 위해 다양한 기술들이 사용될 수 있다(참조: 미국특허번호 제4,946,778호).

[0175] 특히 항체 단편의 경우에 있어서, 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체를 개질시키는 것이 더욱 바람직할 수 있다. 이는, 예를 들어, 상기 항체 단편에서 적절한 영역의 돌연변이에 의해 상기 항체 단편 내로 샐비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 혼입시키거나, 이후 상기 항체 단편과 말단 또는 중간에서 이후에 융합되는 펩타이드 태그 내로 상기 에피토프를 혼입시킴으로써(예컨대, DNA 또는 펩타이드 합성에 의해) 수행될 수 있다(참조: 미국특허번호 제6,096,871호 및 제6,121,022호).

[0176] 본 발명의 목적을 위해, 개질된 항체 또는 이의 단편은 상기 특이적 항원과 결합하는 상기 항체의 연결을 위해 제공하는 임의의 형태의 가변 영역을 포함할 수 있는 것으로 인지되어야 한다. 이와 관련하여, 상기 가변 영역은 체액성 반응이 시작되도록 유도하고 바람직한 항원에 대한 면역글로불린을 생성할 수 있는 임의의 형태의 포유류로부터 유래될 수 있다. 이와 같이, 상기 개질된 항체의 상기 가변 영역은, 예를 들어, 인간, 무린, 비-인간 영장류(예컨대, 시노물구스(cynomolgus) 원숭이, 마카크(macaque) 등) 또는 토끼 유래일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 개질된 면역글로불린의 상기 가변 영역 및 불변 영역은 인간 유래이다. 다른 구체예에서, 양립성 항체의 상기 가변 영역(일반적으로 비-인간 공급원으로부터 유래된)은 상기 분자의 결합 특성을 향상시키고 면역원성을 감소시키기 위해 조작되거나 특이적으로 맞춰질 수 있다. 이러한 점에서, 본 발명에서 유용한 가변 영역은 인간화될 수 있거나 그렇지 않다면 투입된 아미노산 서열의 포함을 통해 변경될 수 있다.

[0177] 특정 구체예에서, 상기 중쇄 및 경쇄 둘 모두 내 상기 가변 도메인은 하나 또는 그 초과 CDR의 적어도 부분적 대체, 및 필요한 경우, 부분적인 프레임워크 영역 대체 및 서열 개질에 의해 변경된다. 상기 CDR은 상기 프레임워크 영역이 유래되는 상기 항체와 동일한 클래스 또는 심지어 서브클래스의 항체로부터 유래될 수 있음에도 불구하고, 상기 CDR은 상이한 클래스의 항체 및 바람직하게는 상이한 종으로부터의 항체로부터 유래될 것으로 예상된다. 상기 CDR 모두를, 하나의 가변 도메인이 또 다른 가변 도메인에 상기 항원 결합 능력을 전달하는 상기 공여 가변 영역으로부터의 모든 CDR로 대체하는 것을 필요하지 않을 수 있다. 오히려, 상기 항원 결합 부위의 활성을 유지하기 위해 필요한 상기 잔기들을 전달하는 것만 필요할 수 있다.

- [0178] 상기 가변 영역의 변화에도 불구하고, 당업자는 본 발명의 상기 개질된 항체가 항체들(예컨대, 전장 항체 또는 이의 항원-결합 단편)을 포함할 것임을 인지할 것이며, 천연 또는 변경되지 않은 불변 영역을 포함하는 대략적으로 동일한 면역원성을 가진 항체와 비교하는 경우, 증가된 종양 국소화, 증가된 종양 침습, 감소된 혈청 반감기 또는 증가된 혈청 반감기와 같은 바람직한 생화학적 특성을 제공하기 위해 상기 항체에서 하나 또는 그 초과 의 상기 불변 영역 도메인의 적어도 일부분은 결실되거나 그렇지 않으면 변경된다. 일부 구체예에서, 상기 개질된 항체의 상기 불변 영역은 인간 불변 영역을 포함한다. 상기 불변 영역의 개질에는 하나 또는 그 초과 의 도메인에 하나 또는 그 초과 의 아미노산의 첨가, 결실 또는 치환이 포함된다. 본원에 기술된 상기 개질된 항체는 상기 3개의 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 또는 CH3) 중 하나 또는 그 초과, 및/또는 상기 경쇄 불변 도메인(CL)에 대한 변경 또는 개질을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 또는 그 초과 의 도메인은 상기 개질된 항체의 상기 불변 영역으로부터 부분적으로 또는 전체적으로 결실된다. 일부 구체예에서, 상기 전체 CH2 도메인은 제거된다(Δ CH2 작제물). 일부 구체예에서, 누락된 불변 영역 도메인은 전형적으로 상기 부재 불변 영역에 의해 제공된 일부 분자 유연성을 제공하는 짧은 아미노산 스페이서(예컨대, 10 aa 잔기)에 의해 대체된다.
- [0179] 특정 구체예에서, 상기 개질된 항체는 상기 항체의 힌지 영역과 직접적으로 상기 CH3 도메인을 융합시키도록 조작된다. 다른 구체예에서, 펩타이드 스페이서는 상기 힌지 영역과 상기 개질된 CH2 및/또는 CH3 도메인 사이에 삽입된다. 예를 들어, 작제물은 발현될 수 있으며, 여기서 상기 CH2 도메인은 결실되고, 남아있는 상기 CH3 도메인(개질되거나 개질되지 않음)은 5 내지 20 아미노산 스페이서와 함께 상기 힌지 영역에 연결된다. 상기 스페이서는 상기 불변 도메인의 상기 조절 요소가 자유롭게 접근가능하도록 유지하거나 상기 힌지 영역이 유연하게 유지되는 것을 보장하기 위해 추가될 수 있다. 그러나, 아미노산 스페이서는 일부 경우에서 상기 작제물에 대해 면역원성인 것으로 확인되고 원치않는 면역 반응을 유도할 수 있음을 알아야 한다. 따라서, 특정 구체예에서, 상기 작제물에 추가된 임의의 스페이서는 상기 개질된 항체의 바람직한 생물학적 품질을 유지하도록 상대적으로 비-면역원성일 것이다.
- [0180] 일부 구체예에서, 상기 개질된 항체는 불변 도메인의 일부 결실, 또는 소수 또는 심지어 단일 아미노산의 치환만을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 CH2 도메인의 선별된 영역에서 단일 아미노산의 돌연변이는 실질적으로 Fc 결합을 감소시킴으로써 종양 국소화 및/또는 종양 침습을 증가시키기에 충분할 수 있다. 유사하게, 조절되는 특이적 효과기 기능(예컨대, 보체 C1q 결합)을 제어하는 하나 또는 그 초과 의 불변 영역 도메인의 일부분을 간단히 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 상기 불변 영역의 이러한 부분적 결실은 상기 대상 불변 영역 도메인과 관련된 다른 바람직한 기능들을 온전히 남겨두면서, 상기 항체의 선별된 특성(혈청 반감기)를 향상시킬 수 있다. 또한 상기에서 언급한 바와 같이, 상기 기술된 항체의 불변 영역은 생성되는 작제물의 프로파일을 향상시키는 하나 또는 그 초과 의 아미노산의 돌연변이 또는 치환을 통해 개질될 수 있다. 이와 관련하여, 상기 개질된 항체의 형태 및 면역원성 프로파일을 실질적으로 유지하면서, 보존된 결합 부위에 의해 제공되는 상기 활성화(예컨대, Fc 결합)를 저해할 가능성이 있을 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 개질된 항체는 효과기 기능을 감소시키거나 증가시키는 것과 같은 바람직한 특성을 향상시키거나 더 많은 세포독소 또는 탄수화물 결합 부위를 제공하기 위해 상기 불변 영역에 하나 또는 그 초과 의 아미노산의 첨가를 포함한다.
- [0181] 상기 불변 영역이 몇몇 효과기 기능들을 매개한다는 것은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, IgG 또는 IgM 항체(항원에 결합된)의 상기 Fc 영역에 보체의 C1 성분의 결합은 상기 보체 시스템을 활성화시킨다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 옵소닌화(opsonization) 및 용해에 있어 중요하다. 상기 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하고, 또한 자가면역 과민반응에 관여될 수 있다. 추가적으로, 항체의 상기 Fc 영역은 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 세포에 결합할 수 있다. IgG(감마 수용체), IgE(엡실론 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)를 포함하는, 상이한 클래스의 항체에 대해 특이적인 수많은 Fc 수용체들이 존재한다. 세포 표면에 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 항체-코팅된 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 청소, 킬러 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용해(ADCC), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생산의 제어를 포함하는 수많은 중요하고 다양한 생물학적 반응들을 유발한다.
- [0182] 특정 구체예에서, 상기 항체는 투여된 항체의 생물학적 프로파일에 차례차례 영향을 끼치는 변경된 효과기 기능을 제공한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화(점 돌연변이 또는 다른 수단을 통해)는 순환하는 개질된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시킴으로써 종양 국소화 및/또는 침습을 증가시킬 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 불변 영역 개질은 상기 항체의 혈청 반감기를 증가시키거나 감소시킨다. 일부 구체예에서, 상기 불변 영역은 이황화결합 또는 올리고당류 모이어티를 제거하여 향상된 종양 국소화 및/또는 침습이 가능하도록 개질된다.
- [0183] 특정 구체예에서, 항체는 하나 또는 그 초과 의 효과기 기능을 가지지 않는다. 일부 구체예에서, 상기 항체는

어떠한 항체-의존 세포매개 세포독성(ADCC) 활성 및/또는 어떠한 보체-의존 세포독성(CDC) 활성도 갖지 않는다. 특정 구체예에서, 상기 항체는 Fc 수용체 및/또는 보체 인자와 결합하지 않는다. 특정 구체예에서, 상기 항체는 어떠한 효과기 기능도 갖지 않는다.

[0184] 본 발명은 본원에 기술된 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체, 또는 이들의 항체 단편과 실질적으로 동종성인 변이체 및 등가물을 추가로 포함한다. 이들은, 예를 들어, 보존성 치환 돌연변이, 즉 유사한 아미노산에 의한 하나 또는 그 초과 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0185] 실시예

[0186] 실시예 1

[0187] 면역글로불린 불변 영역-CD4 작제물의 생성

[0188] 뮤린 IgG1의 신호 서열, FLAG 에피토프 태그, 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인 및 인간 CD4의 막횡단 도메인(TM) 및 세포내 도메인(ICD)을 포함하도록, 막-MAb(mIgG1)로 언급되는 작제물을 디자인하였다. 인간 IgG2의 신호 서열, FLAG 에피토프 태그, 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인 및 인간 CD4의 막횡단 도메인(TM) 및 세포내 도메인(ICD)을 포함하도록, 막-MAb(hIgG2)로 언급되는 제2 작제물을 디자인하였다. 인간 IgG2의 신호 서열, FLAG 에피토프 태그, 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 도메인, 인간 CD4의 막횡단 도메인(TM) 및 세포내 도메인(ICD) 및 C-말단에 녹색 형광 단백질(GFP)을 포함하도록, 막-MAb(hIgG2)-GFP로 언급되는 제3 작제물을 디자인하였다(도 6A).

[0189] 각 작제물에 사용된 힌지 영역의 부분을 경쇄 쌍 형성에 관여하는 시스테인의 C-말단에 상기 잔기들을 포함하도록 디자인하였다. 상기 막-MAb(mIgG1) 작제물을 신호 서열-FLAG-mIgG1(힌지-CH2-CH3)-hCD4(TM/ICD)의 순서로 디자인하였고, 이는 서열번호 24(뉴클레오타이드 서열) 및 서열번호 22(신호 서열을 가진 아미노산 서열)에 제시되어 있다. 상기 막-MAb(hIgG2) 작제물을 신호 서열-FLAG-hIgG2(힌지-CH2-CH3)-hCD4(TM/ICD)의 순서로 디자인하였고, 이는 서열번호 25(뉴클레오타이드 서열) 및 서열번호 23(신호 서열을 가진 아미노산 서열)에 제시되어 있다. 상기 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물을 신호 서열-FLAG-hIgG2(힌지-CH2-CH3)-hCD4(TM/ICD)-GFP의 순서로 디자인하였고, 이는 서열번호 27(뉴클레오타이드 서열) 및 서열번호 26(신호 서열을 가진 아미노산 서열)에 제시되어 있다. 상기 막-MAb(hIgG2) 및 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물들을 lck 단백질 결합 부위를 제거하기 위해 CD4 세포내 도메인 내에 개질을 갖도록 디자인하였다. 상기 작제물들을 화학적 합성에 의해 생성시켰고, 표준 기술에 의해 포유동물 발현 벡터 플라스미드 내로 클로닝하였다.

[0190] 실시예 2

[0191] 세포주의 생성

[0192] 뮤린 하이브리도마 융합 파트너 세포주 SP2/0-Ag14를 실시예 1에 기술된 막-MAb(mIgG1)로 안정적으로 트랜스펙션시켰다. 2×10^6 SP2/0 세포를 프로그램 L-013에 대한 제조사 지침에 따라 Amaxa(등록상표) Nucleofection Kit V(Lonza)를 사용하여 2 μ g의 막-MAb(mIgG1) 작제물로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후에, 상기 세포를 0.8mg/ml G418 하에 정치시켜 선별하였고, 배양액에서 증식시켰다. 트랜스펙션한 지 2주 후에, 상기 세포를 막-MAb(mIgG1) 작제물의 세포 표면 발현에 대하여 FACS 분석에 의해 특성규명하였다. 이들 세포를 SP2/0-MT로 표기하였다. 5×10^6 개의 트랜스펙션된 세포를 형광단-표지된 항-FLAG 항체 또는 아이소타입 음성 대조 항체(10 μ g/ml)와 함께 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 세포를 세척하고, DMEM/10% FBS에 재현탁시키고, 유세포분석에 의해 분석하였다. 도 2A는 음성 대조 항체(좌측 패널) 및 항-FLAG 항체를 사용하여 검출된 바와 같은 막-MAb(mIgG1) 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 수(우측 패널)에 대한 유세포분석 결과를 보여준다.

[0193] 막-MAb(mIgG1) 작제물을 발현하는 세포를 96 웰 플레이트 내로 웰 당 1개 세포로 FACS에 의해 분류하였고 0.5mg/ml G418로 선별하면서 배양액에서 성장시켰다. 10일 후에 각 웰로부터의 상기 세포 클론을 상기 기술한 바와 같이 유세포분석에 의해 막-MAb(mIgG1) 작제물의 발현에 대해 분석하였고 5개 서브-클론을 선별하였다. 도 2B에 도시한 바와 같이 서브클론 SP2/0-MT.3이 막-MAb(mIgG1) 작제물을 최고 수준으로 발현시키는 것으로 관찰되었다.

[0194] 실시예 3

[0195] 하이브리도마 분리를 위한 막-MAb 기술의 용도

[0196] 뮤린 프리즐드(Frizzled) 5(FZD5) 및 뮤린 프리즐드 8(FZD8)의 fri-도메인의 재조합 폴리펩타이드 단편을 항체

생산을 위한 항원으로 사용하기 위해 생성시켰다. 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 FZD5(서열번호 19)의 아미노산 27-157 및 FZD8(서열번호 20)의 아미노산 28-158을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 분리하였다. 상기 폴리뉴클레오타이드를 프레임 내(in-frame) N-말단에서 히스티딘-태그와 라이게이션시키고, 곤충 세포에서 배클로바이러스-매개 발현을 위한 운반 플라스미드 벡터 내로 클로닝하였다. 표준 트랜스펙션, 감염 및 세포 배양 프로토콜을 사용하여 상응하는 FZD 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 곤충 세포를 생산하였다.

[0197] 마우스(n=3)를 표준 기술을 사용하여 FZD5 및 FZD8 항원 단백질을 사용하여 면역화시켰다. 개별 마우스로부터 혈액을 항원 인지에 대한 면역화 개시 이후 약 70일에 ELISA 및 FACS 분석을 사용하여 스크리닝하였다. 최고의 항체 역가를 가진 동물 2마리를 최종 항원 부스트(boost)를 위해 선별하였고, 그 후에 비장 세포를 분리하였다. 상기 분리된 비장세포를 표준 하이브리도마 융합 기술을 사용하여 실시예 2에 기술된 상기 SP2/0-MT 세포주와 융합시켰다. 수득된 하이브리도마 라이브러리를 54L1이라 명명하였다.

[0198] 라이브러리 54L1을 표지된 FZD5 및 표지된 FZD8 폴리펩타이드를 사용하여 스크리닝하였다. 표지된 FZD5에 대해, 퓨린-His-태그된 fri-도메인 FZD5를 제조사의 프로토콜(InVitrogen/Molecular Probes)에 따라 15:1의 염료:단백질 비로 Alexa Fluor(상표명) 488 염료와 컨주게이션시켰다. 표지된 FZD8에 대해, 퓨린 His-태그된 fri-도메인 FZD8을 제조사의 프로토콜(InVitrogen/Molecular Probes)에 따라 15:1의 염료:단백질 비로 Alexa Fluor(상표명) 647 염료와 컨주게이션시켰다. 1×10^7 세포/ml로 상기 하이브리도마 세포를 실온에서 30분 동안 Alexa Fluor(상표명) 488-표지된 FZD5($10 \mu\text{g/ml}$) 및 Alexa Fluor 647-표지된 FZD8($10 \mu\text{g/ml}$)과 함께 인큐베이션하였다. 상기 세포를 세척하고, DMEM/10% FBS에 재현탁시키고, 유세포분석에 의해 분석하였다(도 3 참조). Alexa Fluor 488-표지된 FZD5 및 Alexa Fluor 647-표지된 FZD8 둘 모두에 의해 결합된 개별 하이브리도마 세포를 96 웰 조직 배양 플레이트 내로 웰 당 1개 세포로 FACS에 의해 분류하였다. 대조군으로서, 상기 54L1 라이브러리로부터의 개별 세포를 96 웰 조직 배양 플레이트 내로 웰 당 1개 세포로 무작위 분류하였다. 상기 플레이트를 10일 동일 배양시켜 상기 하이브리도마 세포가 증식되도록 하였고, 각 웰로부터의 상청액을 FZD5 및 FZD8 단백질 둘 모두와 결합할 수 있는 항체의 존재에 대해 스크리닝하였다.

[0199] FACS에 의한 스크리닝을 위해, HEK-293 세포를 FZD5 또는 FZD8의 전장 cDNA 클론을 인코딩하는 발현 벡터 및 트랜스펙션 마커 GFP를 사용하여 공동-트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션시킨 지 24시간 내지 48시간 후에, HEK-293 세포를 수집하고 상기 항-FZD5/8 하이브리도마 상청액 또는 대조 IgG와 함께 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 상기 세포를 세척하고 결합된 일차 항체를 형광 발색단에 컨주게이션된 항-마우스 이차 항체를 사용하여 검출하였다. 그런 다음 표지된 세포를 FACS로 분석하여 나이트 FZD5 및/또는 FZD8의 세포 표면 발현을 특이적으로 인지한 항체를 확인하였다.

[0200] 상기 SP2/0-MT 융합 파트너 세포주 및 상기 막-MAb 기술을 사용하여, FZD5 및 FZD8과 결합할 수 있는, 576개 클론 중 526개 클론(91%)을 선별하였다. 대조적으로, 무작위 클론에 대한 상기 대조 라이브러리 스크리닝에서는, FZD5 및 FZD8과 결합할 수 있는, 1,705개 클론 중 단지 11개 클론(0.6%)이 선별되었다(표 1 참조). 따라서, 막-MAb 기술의 사용은 FZD5 및 FZD8에 특이적인 하이브리도마의 확인을 극적으로 증가시켰다.

표 1

	FACS 양성/시험된 전체 클론	양성 세포 백분율
무작위 클론	11/1705	0.6%
분류된 클론	526/576	91%

[0202] 도 3에 도시된 바와 같이, 라이브러리 54L1 내 세포 중 낮은 백분율만이 FZD5, FZD8, 또는 FZD5 및 FZD8 둘 모두에 결합하는 것으로 나타났다. 상기 막-MAb 기술은 FZD5 및 FZD8 둘 모두에 결합된 항체를 생산하는 세포의 직접적인 확인 및 선별을 가능하게 해준다. 단지 FZD5 또는 단지 FZD8에만 결합하는 항체를 생산하는 세포가 또한 상기 막-MAb 기술에 의해 선별될 수 있음은 당업자에게 자명한 것이다.

[0203] 실시예 4

[0204] 하이브리도마를 분리하기 위한 막-MAb 기술의 용도

[0205] 인간 DDR2의 세포외 도메인의 재조합 폴리펩타이드 단편을 항체 생산을 위한 항원으로서 사용하기 위해 생성시켰다. 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 DDR2(서열번호 21)의 아미노산 1 내지 399를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 분리하였다. 상기 폴리뉴클레오타이드를 프레임 내(in-frame) N-말단에 히스티딘-태그와 라이게이션

시키고 곤충 세포에서 배칼로바이러스-매개 발현을 위해 운반 플라스미드 벡터 내로 클로닝하였다. 표준 트랜스펙션, 감염 및 세포 배양 프로토콜을 사용하여 상응하는 DDR2 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 곤충 세포를 생산하였다.

[0206] 마우스(n=3)를 표준 기술을 사용하여 정제된 DDR2 항원 단백질을 사용하여 면역화시켰다. 개별 마우스로부터 혈액을 항원 인지에 대한 면역화 개시 이후 약 70일에 ELISA 및 FACS 분석을 사용하여 스크리닝하였다. 최고의 항체 역가를 가진 동물 2마리를 최종 항원 부스트에 대해 선별하였고, 그 후에 비장 세포를 분리하여 표준 하이브리도마 융합 기술에 의해 DDR2 하이브리도마 라이브러리를 생산하기 위해 사용하였다.

[0207] 상기 DDR2 라이브러리 중 일부분을 상기 막-MAb(mIgG1) 작제물(실시예 1에 기술됨)을 사용하여 트랜스펙션시켰다. 상기 라이브러리를 프로그램 L-013에 대한 제조사의 지침에 따라 Amaxa(등록상표) Nucleofection Kit V(Lonza)를 사용하여 트랜스펙션시켰다. 3×10^7 개의 세포를 30 μ g의 막-MAb(mIgG1) 작제물("막-MAb 라이브러리")을 사용하여 트랜스펙션시켰다. 24시간 후에, 상기 트랜스펙션된 세포를 표지된 DDR2 폴리펩타이드를 사용하여 스크리닝하였다. 표지된 DDR2에 대해, DDR2 폴리펩타이드(상기 제조된 바와 같음)를 제조사의 프로토콜(InVitrogen/Molecular Probes)에 따라 15:1의 염료:단백질 비로 Alexa Fluor(상표명) 488 카르복실산 숙신이미드 에테르 염료와 컨주게이션시켰다. 1×10^7 세포/ml로 상기 막-MAb 라이브러리를 얼음 위에서 30분 동안 Alexa Fluor 488-표지된 DDR2(20 μ g/ml) 및 PE-표지된 항-FLAG 항체(10 μ g/ml)와 함께 배양하였다. 상기 세포를 세척하였고, DMEM/10% FBS에 재현탁하였고, 유세포분석에 의해 분석하였다. 도 4에 도시된 바와 같이 상기 라이브러리에서 상기 세포 중 낮은 백분율만이 DDR2 및 항-FLAG 항체에 결합하는 것으로 나타났다.

[0208] Alexa Fluor 488-표지된 DDR2 및 PE-표지된 항-FLAG 항체에 의해 결합된 개별 하이브리도마 세포를 96 웰 조직 배양 플레이트 내로 웰 당 1개 세포로 FACS에 의해 분류하였다. 동일한 라이브러리로부터의 무작위 개별 세포를 대조군으로서 96 웰 조직 배양 플레이트의 웰 내로 침착시켰다. 상기 플레이트를 10일 동안 인큐베이션하여 하이브리도마 세포가 증식되도록 하였고, 후속하여 각 웰로부터의 상청액을 전장 DDR2 단백질에 결합할 수 있는 항체의 존재에 대해 스크리닝하였다.

[0209] FACS에 의한 스크리닝을 위해, HEK-293 세포를 DDR2의 전장 cDNA 클론을 인코딩하는 발현 벡터 및 트랜스펙션 마커 GFP를 사용하여 공동-트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션시킨 지 24시간 내지 48시간 후에, HEK-293 세포를 수집하여 항-DDR2 하이브리도마 상청액 또는 대조 IgG와 함께 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 상기 세포를 세척하고 결합된 일차 항체를 형광 발색단과 컨주게이션된 항-마우스 이차 항체를 사용하여 검출하였다. 그런 다음 표지된 세포를 FACS로 분석하여 천연 DDR2의 세포 표면 발현을 특이적으로 인지하는 항체를 확인하였다.

[0210] 상기 막-MAb 기술을 사용하여 DDR2에 결합할 수 있는 168개 클론 중 141개 클론(84%)을 선별하였다. 대조적으로, 무작위 클론에 대한 상기 대조 라이브러리 스크리닝에서는 DDR2에 결합할 수 있는 202개 클론 중 단지 16개 클론(8%)이 선별되었다(표 2 참조). 따라서, 막 MAb 기술의 사용은 항원 특이적 항체를 생산하는 세포의 확인을 극적으로 증가시켰다.

표 2

[0211]	FACS 양성/시험된 전체 클론	양성 세포 백분율
무작위 클론	16/202	8%
분류된 클론	141/168	84%

[0212] 실시예 5

[0213] 293-hMT 세포주의 생성

[0214] HEK-293 세포를 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물을 사용하여 안정적으로 트랜스펙션시켜 막-MAb(hIgG2)-GFP 폴리펩타이드(실시예 1에 기술되고 도 6C에 도시됨)를 안정적으로 발현하는 세포를 생성하였다. 5×10^6 HEK-293 세포를 제조사 지침에 따라 FuGENE 트랜스펙션 시약(Roche, 인디애나폴리스, 인디애나주)을 사용하여 8 μ g의 막-MAb(hIgG2)-GFP를 사용하여 트랜스펙션시켰다. 24시간 후에, 상기 세포를 0.8mg/ml G418 하에 정치시켜 선별하고 배양액에서 증식시켰다. 트랜스펙션시킨 지 2주 후에, 상기 세포를 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물의 발현에 대해 FACS 분석에 의해 특성구명하였다. 상기 트랜스펙션된 세포의 서브클론을 GFP 발현에 대해 스크리닝하였고, 10개 클론의 유세포분석 결과를 도 5에 도시하였다.

- [0215] 실시예 6
- [0216] 단일 유전자 항체 작제물 및 라이브러리
- [0217] 모(parental) 항체 골격(scaffold)을, 항체 경쇄의 불변 영역의 카르복실 말단이 (GGGGS)₆ 펩타이드 링커를 통해 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결되어 있는, 단일 단백질 또는 단쇄 항체(scAb) 작제물로서 디자인하였다. 힌지 영역 내 시스테인 잔기를 보유시켜 두 개의 중쇄 사이 또는 하나의 중쇄 및 막-MAb 작제물 사이에 이황화결합이 가능하도록 하였다. 상기 단일 유전자 항체의 경쇄는 가변 영역 및 인간 불변 영역을 인코딩한다. 상기 단일 유전자 항체의 중쇄는 가변 영역 및 인간 IgG CH1, CH2 및 CH3 도메인을 인코딩한다. 상기 단쇄 항체를 생산하기 위해 발현 벡터를 작제하였고, MAbLib 작제물로서 본원에 언급하였다. 상기 벡터를, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역이 각각 독특한 제한 부위에 의해 인접되어 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역의 제거 및 새롭고 상이한 가변 영역의 삽입이 가능하도록 디자인하였다(도 6B 참조). 상기 MAbLib 작제물은 매우 다양한 단쇄 항체(scAb) 라이브러리를 생성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0218] 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 당업자에게 널리 공지되어 있는 방법에 의해 인간 cDNA로부터 PCR 증폭시켰다. 제한 부위 EcoRv 또는 BsiWI를 포함하는 프라이머를 경쇄 가변 영역을 위한 PCR 반응에 사용하였다. 제한 부위 MfeI 또는 BlnI를 포함하는 프라이머를 중쇄 가변 영역을 위한 PCR 반응에 사용하였다. 경쇄 가변 영역을 포함하는 PCR 산물을 정제하고, EcoRv 및 BsiWI로 절단하였고, 유사하게 절단시킨 모 MAbLib 벡터(상기 기술됨) 내로 클로닝하였다. 이로써 경쇄 가변 영역에 다양성을 가진 scAb 라이브러리를 생성하였다. 후속하여, 중쇄 가변 영역을 포함하는 PCR 산물을 정제하고, MfeI 및 BlnI로 절단하였고, 다양한 경쇄 가변 영역을 포함하는 유사하게 절단시킨 scAb 라이브러리 내로 클로닝하였다. 이로써 경쇄 및 중쇄 가변 영역 둘 모두에 다양성을 가진 scAb 라이브러리를 생성하였다. 상기 중쇄 가변 영역이 상기 경쇄 가변 영역의 삽입 이전에 상기 모 MAbLib 벡터 내로 삽입될 수 있음은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0219] 실시예 7
- [0220] HEK-293 세포의 표면 상에 이중이합체 항체 분자의 발현
- [0221] 세포의 표면 상에 이중이합체 항체 분자의 형성에 대한 유효성 입증을 위해, HEK-293 세포를 항-DLL4 단쇄 항체를 인코딩하는 DNA 및 막-MAb(hIgG2)-GFP 단백질을 인코딩하는 DNA를 사용하여 트랜스펙션시켰다. 21M18 경쇄, (GGGGS)₆ 링커, 21M18 가변 중쇄 및 CH1 도메인을 인코딩하는 합성 폴리뉴클레오타이드를 디자인하였다. 상기 폴리뉴클레오타이드를 DNA2.0(Menlo Park CA)에 의해 합성하고 MAbLib 내로 클로닝하여 상기 실시예 6에 기술된 바와 같은 단쇄 21M18 항체(sc21M18)를 인코딩하는 벡터를 생성시켰다(sc21M18 서열번호 33, 뉴클레오타이드 서열; 서열번호 34, 아미노산 서열). 항-hDLL4 항체 21M18은 미국특허번호 제7,750,124호에 기존에 기술되어 있다. sc21M18 플라스미드 DNA를 농도 범위(25, 250, 2,500 및 25,000ng/ml)에 따라 트랜스펙션시키고 세포를 48시간 후에 수확하였다. 대조군으로서, sc21M18 DNA 단독(-▲-), 막-MAb(hIgG2)-GFP DNA 단독(-■-)을 사용하여 트랜스펙션시키거나, 트랜스펙션시키지 않았다(-◆-). 상기 세포의 표면 상에 기능적인 항-DLL4 항체 분자의 검출을 위해, 트랜스펙션된 세포를 hDLL4-rFc 융합 단백질과 함께 인큐베이션하였다. 결합된 hDLL4-rFc를 PE-표지된 항-토끼 Fc 항체를 사용하여 검출하였다. 세포를 FACS에 의해 분석하였고, 상기 세포 집단의 평균 형광 강도(MFI)를 결정하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 항-DLL4 sc21M18 DNA 및 막-MAb(hIgG2) DNA(-X-)를 사용하여 트랜스펙션된 세포들만 DLL4-rFc 단백질에 특이적으로 결합되는 기능적 결합 부위를 가진 막 결합된 분자를 발현하였다.
- [0222] 실시예 8
- [0223] 항체 분자의 디스플레이를 조절하기 위한 담체 플라스미드의 용도
- [0224] 플라스미드를 사용한 포유동물 세포의 일시적 트랜스펙션은 일반적으로 세포 당 플라스미드의 다수의 복제수(copy)를 야기한다. 세포 당 상기 복제수는 100 내지 10,000의 범위일 수 있다. 세포 당 상기 절대적 수는 트랜스펙션 프로토콜, 트랜스펙션 시약, 플라스미드 품질, 플라스미드 크기 및 세포 밀도를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 다양한 요인에 의존한다. 일부 구체예에서, 세포 표면-디스플레이된 항체의 라이브러리를 생성시킴에 있어서, 상기 세포 내로 도입되는 항체-인코딩 플라스미드(또는 Ab 라이브러리 플라스미드)의 양을 조절하는 것이 바람직하다. 세포 내 Ab 라이브러리 플라스미드의 플라스미드 복제수를 조절하기 위해, 개별적 "담체" 플라스미드를 사용한다. 상기 담체 플라스미드는 상기 Ab 라이브러리 플라스미드와 혼합되어 어느 정도 이용가능한 "플라스미드 스페이스(plasmid space)"를 흡수한다. 상기 세포에 의해 흡수되는 Ab 라이브러리 플라스미

드의 수를 조절하기 위해, 담체 플라스미드를 다양한 비로 상기 Ab 라이브러리 플라스미드와 혼합한 다음 세포를 트랜스펙션시켰다.

[0225] 상기 트랜스펙션 및 Ab-인코딩 플라스미드의 디스플레이에 대한 담체 플라스미드의 효과를 시험하였다. 상기 기술된 단쇄 항-DLL4 항체(sc21M18)를 다양한 비의 담체 플라스미드를 사용하여 트랜스펙션시켰다. 본 연구에서, 상기 담체 플라스미드는 관련없는 단일 단백질 항체(sc18R5)를 인코딩하였다. 또한 상기 세포를 막-MAb(hIgG2)-GFP 작제물을 사용하여 트랜스펙션시켰다. 상기 세포 내 Ab 라이브러리 플라스미드의 농도는 항-DLL4 항체 분자의 표면 발현 수준으로부터 추정될 수 있다. 약 5×10^6 HEK-293 세포를 플라스미드 DNA를 사용하여 트랜스펙션시키고 48시간 후에 수확하였다. 상기 플라스미드 DNA는 sc21M18 및 sc18R5의 혼합물이었으며, 여기서 sc21M18 대 sc18R5의 비는 sc18R5의 1배 내지 10,000배 초과(1, 10, 100, 1,000 또는 10,000배 초과)로 다양하였다. 상기 세포 표면 상에서의 기능적인 항-DLL4 항체 분자의 검출을 위해, 트랜스펙션된 세포를 hDLL4-rFc 융합 단백질과 함께 인큐베이션하였다. 결합된 hDLL4-rFc를 PE-표지된 항-토끼 Fc 항체를 사용하여 검출하였다. 항-DLL4 항체를 발현한 세포의 백분율을 FACS 분석에 의해 결정하였다. 또한 세포를 대조 항체(hJag-rFc, -■-) 또는 단독 PE-표지된 항-토끼 Fc 항체(-▲-)와 함께 배양하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 담체 플라스미드 DNA의 양은 트랜스펙션된 세포의 표면 상에서 항-DLL4 항체를 발현하는 세포의 백분율에 명백한 효과를 가지고 있었다.

[0226] 실시예 9

[0227] 항체 라이브러리를 스크리닝하는 방법

[0228] 상기 막-MAb 기술 및 선별 방법의 유효성 입증을 위해 항-DLL4 항체 sc21M18 플라스미드 DNA를 사용하여 연구를 수행하였다. sc21M18 플라스미드 DNA를 관련없는 항체 sc18R5 플라스미드 DNA와 혼합하였으며, 여기서 상기 sc18R5 DNA는 100,000-배 초과량이였다. HEK-293 세포를 7.5×10^{-6} μ g sc21M18 플라스미드 DNA, 0.75 μ g sc18R5 플라스미드 DNA, 14.3 μ g의 담체 플라스미드(카나마이신 플라스미드) 및 막-MAb(hIgG2)-GFP를 인코딩하는 15 μ g의 플라스미드를 사용하여 트랜스펙션시켰다. 세포를 48시간 후에 수확하였다. 상기 세포 표면 상에 기능적인 항-DLL4 항체의 검출을 위해, 트랜스펙션된 세포를 hDLL4-rFc 융합 단백질과 함께 인큐베이션하였다. 결합된 hDLL4-rFc를 PE-표지된 항-토끼 Fc 항체를 사용하여 검출하였다. 표지된 세포를 FACS에 의해 분석하고 분류하여 항-DLL4 항체 발현 세포를 확인하고 분리하였다. hJag-rFc 항원은 상기 항-DLL4 항체에 의해 인지되지 않을 것이기 때문에, 대조군으로서 hJag-rFc를 사용하였다. FACS-분류된 세포로부터의 플라스미드 DNA를 분리하고 박테리아에서 증폭시켰다. 상기 증폭된 플라스미드 DNA(담체 플라스미드 및 막-MAb(hIgG2)-GFP를 인코딩하는 플라스미드와 조합)를 사용하여 신선한 HEK-293 세포를 트랜스펙션시키고 또 다른 라운드의 선별을 수행하였다. 이러한 증폭 및 선별 과정을 4 라운드 반복하였으며, FACS 결과는 도 9에 도시되어 있다. 표 3은 선별의 각 라운드 후에 항-DLL4 항체의 발현에 대해 양성인 세포의 백분율을 보여준다. 본 연구를 통해 상기 sc21M18 DNA가 관련없는 항체 DNA의 배경에서 고도로 희석되었다는 사실에도 불구하고, 항-DLL4 항체를 발현하는 세포가 4 라운드의 선별에 걸쳐 확인되고 부화(enrichment)되었음이 입증되었다.

표 3

[0229]

라운드	플라스미드 농도(μ g)				% 항-DLL4 항체 양성 세포		
	sc21M18 또는 이전 라운드	sc18R5	카나마이신	MAB(hIgG2)	hDLL4-rFc	hJag1-rFc	항원 없음
1	7.5×10^{-6}	0.75	14.3	15	0.1	0.23	ND
2	0.75 라운드 1	0	15	15	0.23	0.78	0.002
3	0.75 라운드 2	0	15	15	0.9	0.08	ND
4a	0.75 라운드 3	0	15	15	2.9	0.14	0.08
4b	7.0 라운드 3	0	0	0	32.8	0.43	0.0012

- [0230] 실시예 10
- [0231] 항-VEGF 항체 라이브러리의 생성 및 293-hMT 세포주의 트랜스펙션
- [0232] 상기 실시예 6 및 실시예 7에 기술된 sc21M18을 발현하는 MAbLib 작제물 및 인간 혈관내피세포 성장 인자 (hVEGF)로 면역화된 마우스로부터의 면역글로불린 cDNA를 사용하여 항체 라이브러리를 생성시켰다. Balb/c 마우스 3마리를 hVEGF의 복강내 주사에 의해 면역화시켰다. 최초 주사는 완전 프로인트 애쥬번트 내 hVEGF를 포함하였다. 후속 주사는 불완전 프로인트 애쥬번트 내 hVEGF를 포함하였다. 4회 복강내 주사 모두를 3개월 동안 수행하였다. 마우스들을 꼬리 혈관 정맥 주사에 의해 PBS 중 hVEGF로 최종 주사하였다. 상기 최종 주사한 지 1주일 후에 비장 및 림프절을 상기 면역화된 마우스로부터 수집하였다. RNA를 분리하고 cDNA를 생성하였다. 뮤린 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 DNA를 PCR에 의해 증폭시키고, 분리하여 정제하였다. 상기 PCR 산물을 MfeI 및 B1pI을 사용하여 절단하고, 유사하게 절단시킨 sc21M18 작제물 내로 클로닝함으로써, 서열번호 33의 중쇄 가변 영역을 hVEGF 면역화된 마우스로부터의 복수의 뮤린 중쇄 가변 영역으로 대체하였다. 상기 라이브러리에 대해, 상기 21M18 경쇄는 불변 영역을 보유하였다.
- [0233] 21M18 경쇄를 복수의 인간 카파 사슬 가변 영역으로 대체하는 것을 제외하고는 상기 기술된 라이브러리와 유사하게 제2 VEGF 라이브러리를 작제하였다. 인간 카파 사슬 가변 영역을 인간 카파 사슬 특이적 프라이머를 사용하여 풀링된 인간 cDNA로부터 PCR 증폭하였다. 상기 PCR 산물을 분리하고, 정제하고, EcoRV 및 BsiWI를 사용하여 절단하고, 상기 제1 VEGF 라이브러리로부터의 유사하게 절단된 플라스미드 DNA 내로 클로닝함으로써, 상기 21M18 경쇄 가변 영역을 대체하였다.
- [0234] 293-hMT 세포를 상기 두 항-VEGF 항체 라이브러리들을 이용하여 트랜스펙션시켰다.
- [0235] 본원에 기술된 상기 실시예 및 구체예는 단지 예시적 목적을 위한 것이고 이를 고려한 다양한 개질 및 변경이 당업자에게 제안될 것이고 본 발명의 사상 및 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0236] 본원에 인용된 모든 공개문헌, 특허 및 특허출원은 각 개별 공개문헌, 특허 또는 특허출원이 참조로서 포함되는 것으로 명확하게 그리고 개별적으로 표시되는 바와 같이 동일하게 모든 목적을 위해 이의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.

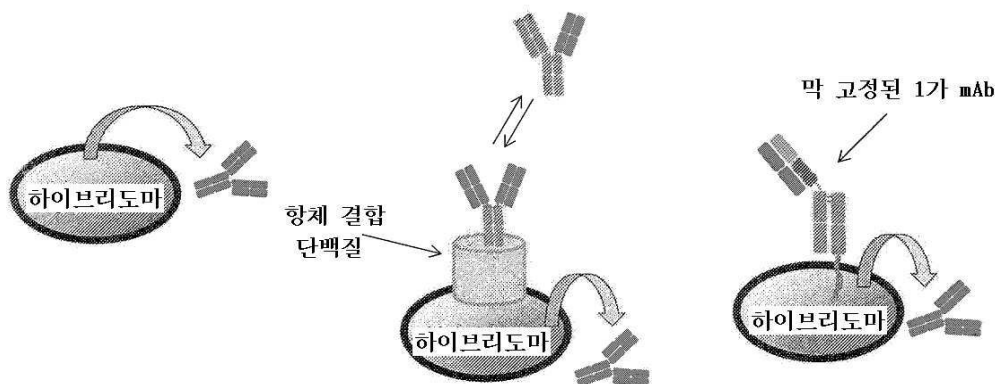
도면

도면1

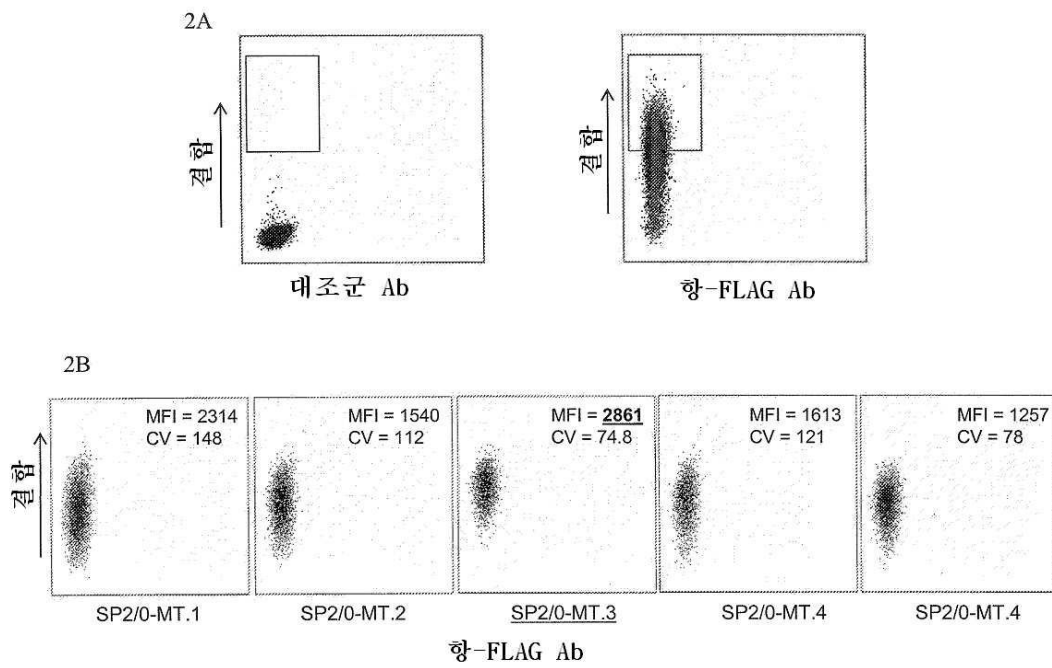
A. 전통적 하이브리도마

B. 결합-단백질 방법

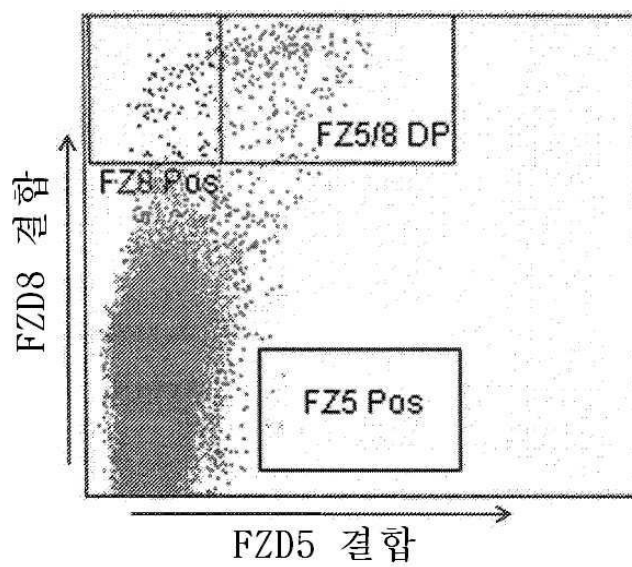
C. 막-MAb 방법



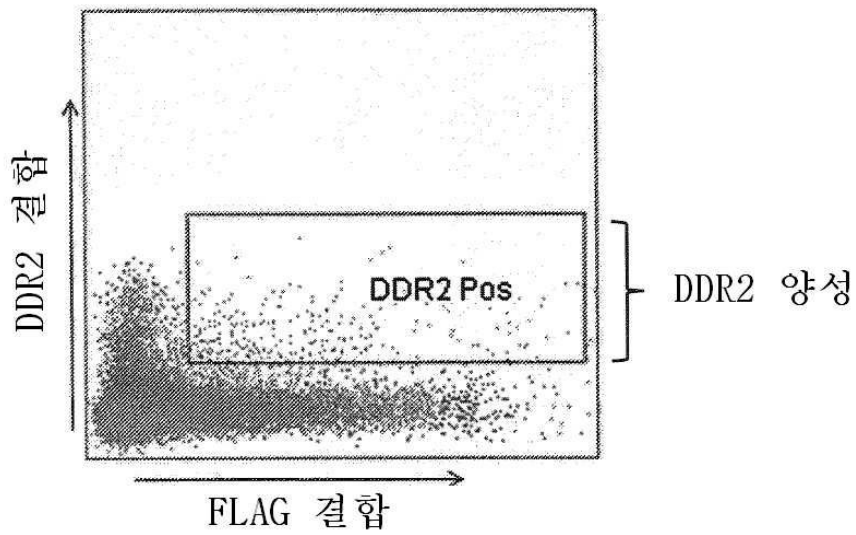
도면2



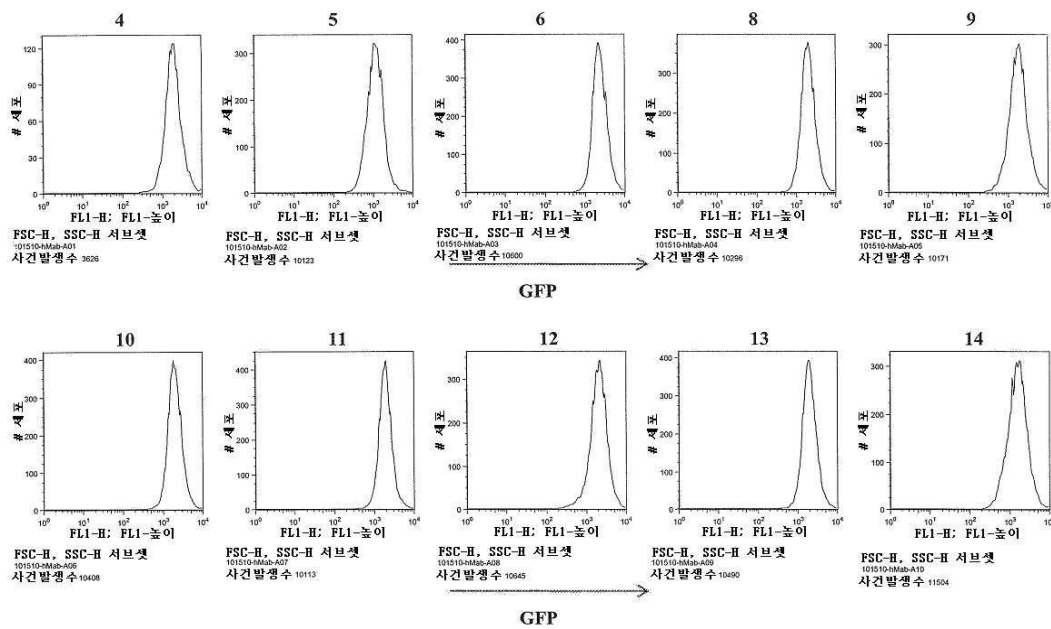
도면3



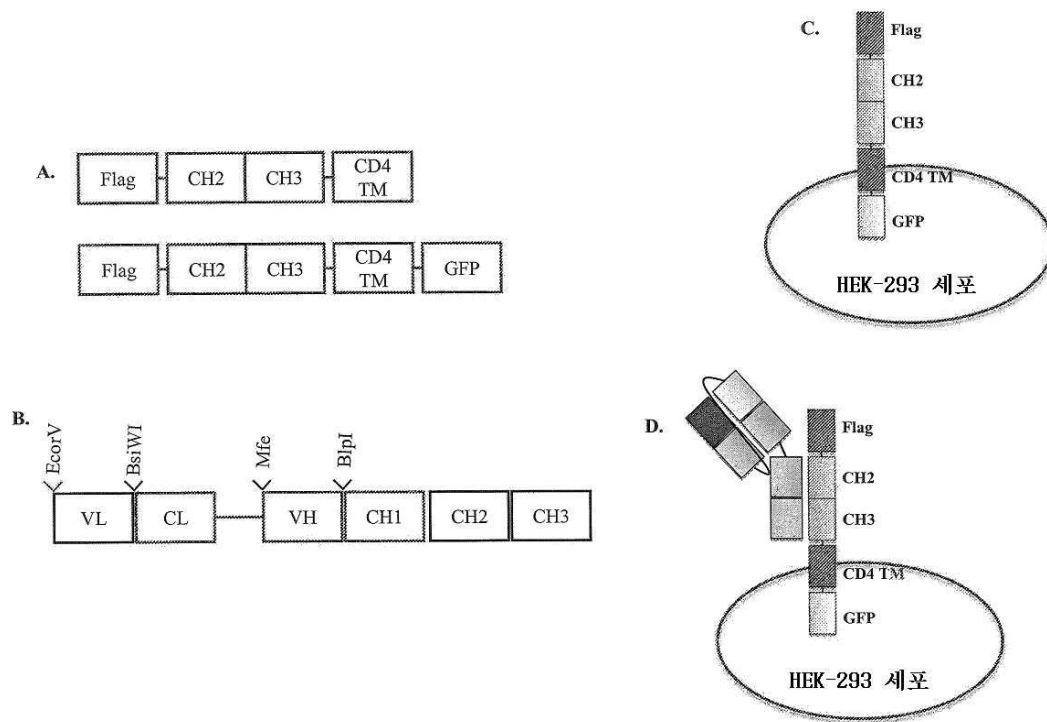
도면4



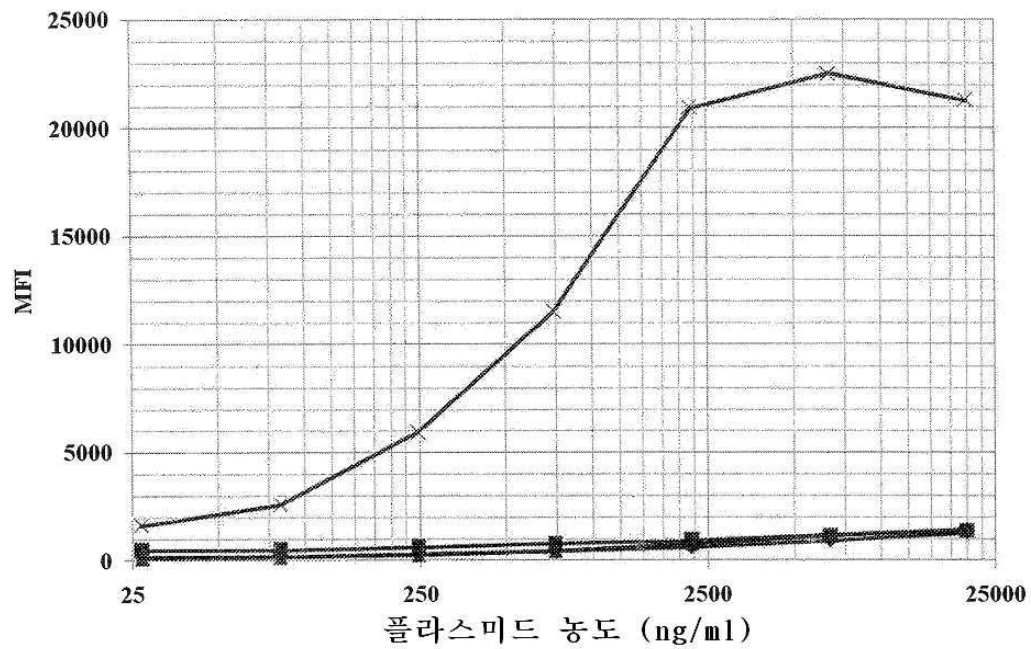
도면5



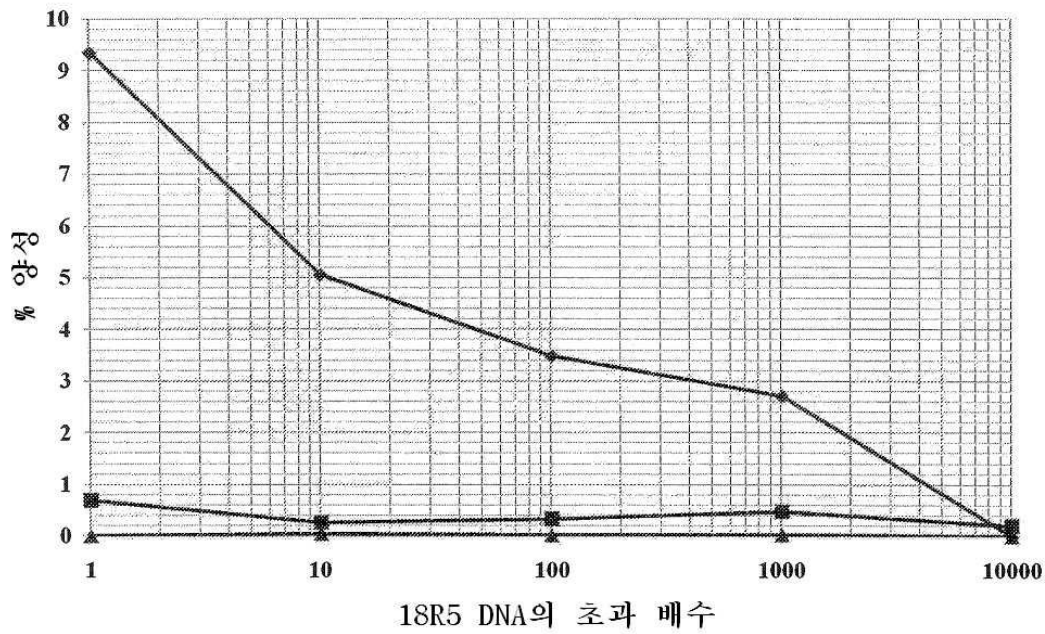
도면6



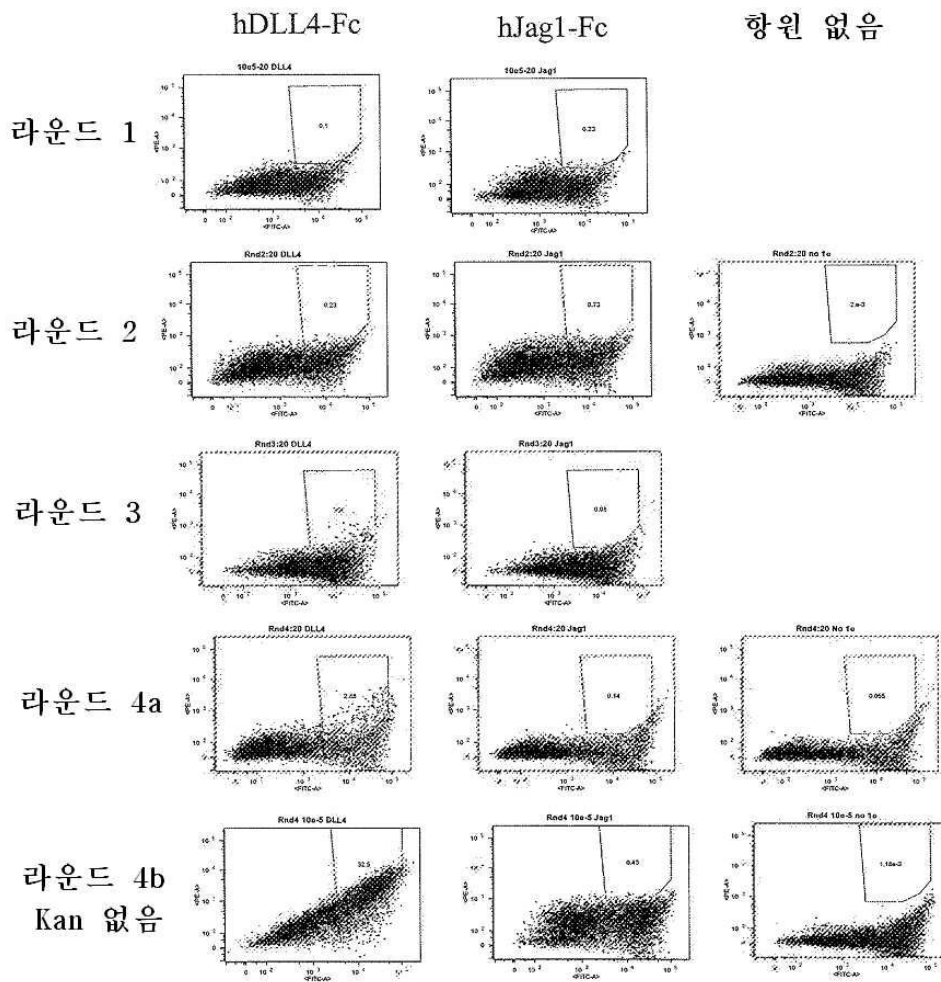
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> OncoMed Pharmaceuticals, Inc.

GURNEY, Austin L.

LAZETIC, Alexandra L.L.

BOND, Christopher J.

<120> Methods for Identifying and Isolating Cells Expressing A
Polypeptide

<130> 2293.068PC02

<140> PCT/US2011/024554

<141> 2011-02-11

<150> 13/025,733

<151> 2011-02-11

<150> 61/437,889

<151> 2011-01-31

<150> 61/304,251

<151> 2010-02-12

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211

> 666

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IgG1 constant region

<400> 1

ggttgtaagc cttgcatatg tacagtccca gaagtatcat ctgtcttcat cttccccca 60

aagcccaagg atgtgctcac cattactctg actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac 120

atcagcaagg atgatccga ggtccagttc agctggtttg tagatgatgt ggagggtcac 180

acagctcaga cgcaacccc ggaggagcag ttcaacagca ctttccgctc agtcagtga 240

cttcccatca tgcaccagga ctggctcaat ggcaaggagt tcaaatgcag ggtcaacagt 300

gcagctttcc ctgccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaggcag accgaaggct 360

ccacaggtgt acaccattcc acctccaag gagcagatgg ccaaggataa agtcagtctg 420

acctgcatga taacagactt cttccctgaa gacattactg tggagtggca gtggaatggg 480
cagccagcgg agaactacaa gaacactcag cccatcatgg acacagatgg ctcttacttc 540
gtctacagca agctcaatgt gcagaagagc aactgggagg caggaaatac tttcacctgc 600
tctgtgttac atgagggcct gcacaaccac catactgaga agagcctctc ccactctcct 660
ggtaaa 666

<210> 2

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse IgG1 constant region

<400> 2

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe

1 5 10 15

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro

20 25 30

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val

35 40 45

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr

50 55 60

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu

65 70 75 80

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys

85 90 95

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

100 105 110

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro

115 120 125

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile

130 135 140

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly

145 150 155 160

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp

165 170 175
 Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp

180 185 190
 Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His

195 200 205
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

210 215 220
 <210> 3
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mouse IgG2a constant region
 <400> 3

atcaagccct gtctccatg caaatgccca gcacctaacc tcttgggtgg accatccgtc 60

ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 120

tgtgtggtgg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 180

aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc 240

cgggtggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtgga ggaagtcaaa 300

tgcaaggtea acaacaaaga cctgccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa 360

gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 420

aaacaggtea ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 480

tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 540

gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 600

aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 660

ttctcccga ctccgggtaa a 681

<210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mouse IgG2a constant region
 <400> 4

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly

1 5 10 15

 Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 35 40 45
 Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 50 55 60
 His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
 65 70 75 80

 Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
 85 90 95
 Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 130 135 140

 Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 180 185 190
 Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
 195 200 205

 His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 5
 <211> 675

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG1 constant region

<400> 5

actcacacat gccacacgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc	60
ttcccccaaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	120
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	180
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	240
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcagg	300
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	360
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgga atgagctgac caagaaccag	420
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	480
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	540
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	600
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctccc	660
ctgtctccgg gtaaa	675

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG1 constant region

<400> 6

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro	
1 5 10 15	
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser	
20 25 30	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp	
35 40 45	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn	
50 55 60	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	
65 70 75 80	

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
100 105 110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
165 170 175
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
180 185 190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220
Lys
225
<210> 7
<211> 669
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Human IgG2 constant region
<400> 7
tgtgtcgagt gccaccttg cccagcacca cctgtggcag gaccttcagt ctctctcttc 60
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg 120
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagtttaatt ggtatgtcga cggcgtggag 180
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacatt cagggtgggtc 240
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtg 300

tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaacatct ccaaaaccaa agggcagccc 360

agagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 420

agcctgacct gcctggtgaa gggattttat ccttccgaca tcgccgtgga gtgggagagc 480

aatgggcagc ctgagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 540

tttttctgt attccaaact caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 600

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 660

tcccctgga 669

<210> 8

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG2 constant region

<400> 8

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser

1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

35 40 45

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

100 105 110

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

115 120 125

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

130 135 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 145 150 155 160
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 165 170 175
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

 180 185 190
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 195 200 205
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220

<210> 9

<211> 873

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mIgG1-hCD4 construct without signal sequence and without FLAG tag

<400> 9

gcgatcgagg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtccag aagtatcatc tgtcttcac 60

ttcccccaa agccaagga tgtgtcacc attactctga ctctaaggt cacgtgtgtt 120

gtggtagaca tcagcaagga tgatcccgag gtccagtcca gctggtttgt agatgatgtg 180

gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgaggaggcagt tcaacagcac ttccgctca 240

gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt ccaatgcagg 300

gtcaacagtg cagctttccc tgccccatc gaaaaacca tctccaaaac caaaggcaga 360

ccgaaggctc cacagggtga caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa 420

gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag 480

tggaatgggc agccagcgga gaactacaag aacactcagc ccatcatgga cacagatggc 540

tcttacttcg tctacagcaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact 600

ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gacgtctcc 660

cactctcctg gtaaaggcgc cgccatggcc ctgattgtgc tggggggcgt cgccggcctc 720

ctgcttttca ttgggctagg catcttcttc tgtgtcaggt gccggcaccg aaggcgccaa 780

gcagagcgga tgtctcagat caagagactc ctcaagtgaga agaagacctg ccagtgcct 840

caccggtttc agaagacatg tagccccatt tag 873

<210> 10

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mIgG1-hCD4 construct without signal sequence and without FLAG tag

<400> 10

Ala Ile Ala Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser

1 5 10 15

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr

20 25 30

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp

35 40 45

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr

50 55 60

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser

65 70 75 80

Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

85 90 95

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys

100 105 110

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr

115 120 125

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr

130 135 140

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln

145 150 155 160

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met

165 170 175

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys

180 185 190

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu

195 200 205

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
 210 215 220
 Lys Gly Arg Ala Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His
 245 250 255
 Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser
 260 265 270
 Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser
 275 280 285

Pro Ile

290

<210> 11

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4 construct without signal sequence and without FLAG

tag

<400> 11

gcgatcgga acggatgtgt cgagtgccca ccttgcccag caccacctgt ggcaggacct 60
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccg gaccttgag 120
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt taattggtat 180
 gtcgacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 240
 acattcaggg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 300
 tacaagtga aggtgtccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 360
 accaaagggc agcccagaga accacagggtg tacacctgc ccccatccg ggaggagatg 420

 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtgaagggt tttatcttc cgacatgcc 480
 gtggagtggg agagcaatgg gcagcctgag aacaactaca agaccacacc tccatgctg 540
 gactccgacg gtccttctt cctgtattcc aaactaccg tggacaagag caggtggcag 600
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgagctc tgcacaacca ctacacacag 660
 aagagcctct cctgtcccc tggaaagggg cgcgcatgg ccctgattgt gctggggggc 720
 gtcgccggcc tctgtctttt cattgggctc ggcatcttct tctgtgtccg ctgccggcac 780

cgacgccgcc aagcagagcg gatgtctcag atcaagagac tcctcagtga gaagaagacc 840

gcacagtgcc ctcaccggtt tcagaagaca ttagcccca ttttag 885

<210> 12

<211> 294

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4 construct without signal sequence and without FLAG tag

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (281)..(281)

<223> CD4 Intracellular domain region is modified, amino acid change

<400> 12

Ala Ile Ala Asn Gly Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro

1 5 10 15

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala

100 105 110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

 210 215 220
 Leu Ser Pro Gly Lys Gly Arg Ala Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val
 245 250 255
 Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys
 260 265 270
 Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln Cys Pro His Arg Phe Gln

 275 280 285
 Lys Thr Cys Ser Pro Ile

290

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD4 TM

<400> 13

Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile

1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile Phe Phe

20

<210> 14

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD4 TM-ICD

<400>

14

Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile

1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln

20 25 30

Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr

35 40 45

Cys Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

50 55 60

<210> 15

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD4 TM-ICD

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> CD4 Intracellular domain region is modified, amino acid change

<400> 15

Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile

1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln

20 25 30

Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr

35 40 45

Ala Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

50 55 60

<210> 16

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse CD4 TM

<400> 16

Phe Leu Ala Cys Val Leu Gly Gly Ser Phe Gly Phe Leu Gly Phe Leu

1 5 10 15

Gly Leu Cys Ile Leu Cys

20

<210> 17

<211> 62

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse CD4 TM-ICD

<400> 17

Phe Leu Ala Cys Val Leu Gly Gly Ser Phe Gly Phe Leu Gly Phe Leu

1 5 10 15

Gly Leu Cys Ile Leu Cys Cys Val Arg Cys Arg His Gln Gln Arg Gln

20 25 30

Ala Ala Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr

35 40 45

Cys Gln Cys Pro His Arg Met Gln Lys Ser His Asn Leu Ile

50 55 60

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG tag

<400> 18

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 19

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human FZD5 Fri-domain sequence (Amino acids 27-157)

<400> 19

Ala Ser Lys Ala Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg
1 5 10 15
Gly Ile Gly Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp
20 25 30
Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val
35 40 45
Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Met Tyr
50 55 60
Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys Arg
65 70 75 80
Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met Arg Gln
85 90 95
Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg Leu Pro Val
100 105 110
Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Ser Glu
115 120 125
Ala Thr Thr
130
<210> 20
<211> 131
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Human FZD8 Fri-domain sequence (Amino acids 28-158)
<400> 20
Ala Ser Ala Lys Glu Leu Ala Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Leu Cys
1 5 10 15
Lys Gly Ile Gly Tyr Asn Tyr Thr Tyr Met Pro Asn Gln Phe Asn His
20 25 30
Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu
35 40 45
Val Glu Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Lys Phe Phe Leu Cys Ser Met
50 55 60

Tyr Thr Pro Ile Cys Leu Glu Asp Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Cys

65 70 75 80

Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Arg

85 90 95

Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Asp Arg Met Arg Cys Asp Arg Leu Pro

100 105 110

Glu Gln Gly Asn Pro Asp Thr Leu Cys Met Asp Tyr Asn Arg Thr Asp

115 120 125

Leu Thr Thr

130

<210> 21

<211> 399

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human DDR2 Amino acids 1-399

<400> 21

Met Ile Leu Ile Pro Arg Met Leu Leu Val Leu Phe Leu Leu Leu Pro

1 5 10 15

Ile Leu Ser Ser Ala Lys Ala Gln Val Asn Pro Ala Ile Cys Arg Tyr

20 25 30

Pro Leu Gly Met Ser Gly Gly Gln Ile Pro Asp Glu Asp Ile Thr Ala

35 40 45

Ser Ser Gln Trp Ser Glu Ser Thr Ala Ala Lys Tyr Gly Arg Leu Asp

50 55 60

Ser Glu Glu Gly Asp Gly Ala Trp Cys Pro Glu Ile Pro Val Glu Pro

65 70 75 80

Asp Asp Leu Lys Glu Phe Leu Gln Ile Asp Leu His Thr Leu His Phe

85 90 95

Ile Thr Leu Val Gly Thr Gln Gly Arg His Ala Gly Gly His Gly Ile

100 105 110

Glu Phe Ala Pro Met Tyr Lys Ile Asn Tyr Ser Arg Asp Gly Thr Arg

115 120 125
 Trp Ile Ser Trp Arg Asn Arg His Gly Lys Gln Val Leu Asp Gly Asn
 130 135 140
 Ser Asn Pro Tyr Asp Ile Phe Leu Lys Asp Leu Glu Pro Pro Ile Val
 145 150 155 160
 Ala Arg Phe Val Arg Phe Ile Pro Val Thr Asp His Ser Met Asn Val
 165 170 175
 Cys Met Arg Val Glu Leu Tyr Gly Cys Val Trp Leu Asp Gly Leu Val

 180 185 190
 Ser Tyr Asn Ala Pro Ala Gly Gln Gln Phe Val Leu Pro Gly Gly Ser
 195 200 205
 Ile Ile Tyr Leu Asn Asp Ser Val Tyr Asp Gly Ala Val Gly Tyr Ser
 210 215 220
 Met Thr Glu Gly Leu Gly Gln Leu Thr Asp Gly Val Ser Gly Leu Asp
 225 230 235 240
 Asp Phe Thr Gln Thr His Glu Tyr His Val Trp Pro Gly Tyr Asp Tyr

 245 250 255
 Val Gly Trp Arg Asn Glu Ser Ala Thr Asn Gly Tyr Ile Glu Ile Met
 260 265 270
 Phe Glu Phe Asp Arg Ile Arg Asn Phe Thr Thr Met Lys Val His Cys
 275 280 285
 Asn Asn Met Phe Ala Lys Gly Val Lys Ile Phe Lys Glu Val Gln Cys
 290 295 300
 Tyr Phe Arg Ser Glu Ala Ser Glu Trp Glu Pro Asn Ala Ile Ser Phe

 305 310 315 320
 Pro Leu Val Leu Asp Asp Val Asn Pro Ser Ala Arg Phe Val Thr Val
 325 330 335
 Pro Leu His His Arg Met Ala Ser Ala Ile Lys Cys Gln Tyr His Phe
 340 345 350
 Ala Asp Thr Trp Met Met Phe Ser Glu Ile Thr Phe Gln Ser Asp Ala
 355 360 365

Ala Met Tyr Asn Asn Ser Glu Ala Leu Pro Thr Ser Pro Met Ala Pro

370 375 380

Thr Thr Tyr Asp Pro Met Leu Lys Val Asp Asp Ser Asn Thr Arg

385 390 395

<210> 22

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mIgG1-hCD4 construct with signal sequence and with FLAG tag

<400> 22

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys

20 25 30

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ala Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr

35 40 45

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

50 55 60

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp

65 70 75 80

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp

85 90 95

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

100 105 110

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp

115 120 125

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro

130 135 140

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala

145 150 155 160

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp

165 170 175
Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile
180 185 190
Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
195 200 205
Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys

210 215 220
Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
225 230 235 240
Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
245 250 255
Ser His Ser Pro Gly Lys Gly Arg Ala Met Ala Leu Ile Val Leu Gly
260 265 270
Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys

275 280 285
Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile
290 295 300
Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg Phe
305 310 315 320
Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

325

<210> 23

<211> 331

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4 construct with signal sequence and with FLAG tag

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (318)..(318)

<223> CD4 Intracellular domain region is modified, amino acid change

<400> 23

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1 5 10 15

Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys
 20 25 30
 Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ala Asn Gly Cys Val Glu Cys Pro Pro
 35 40 45
 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 50 55 60
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 65 70 75 80
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 85 90 95
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 100 105 110
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 115 120 125
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 145 150 155 160
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 165 170 175
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 180 185 190
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 195 200 205
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 210 215 220
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 225 230 235 240
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 245 250 255
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Arg Ala Met Ala Leu

260 265 270
 Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly
 275 280 285
 Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg
 290 295 300

Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln Cys
 305 310 315 320
 Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
 325 330

<210> 24

<211> 984

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mIgG1-hCD4 construct with signal sequence and with FLAG tag

<400> 24

atgtctgcac ttctgatcct agctcttggt ggagctgcag ttgctgacta caaagaccat 60

gacgggtgatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg acgatgacaa ggcgatcgcg 120

ggttgtaagc ctgcatatg tacagtccca gaagtatcat ctgtcttcat cttccccca 180

aagcccaagg atgtgtcac cattactctg actcctaagg tcacgtgtgt tgtggtagac 240

atcagcaagg atgatccga ggtccagttc agctgggttg tagatgatgt ggagggtcac 300

acagctcaga cgcaacccc ggaggagcag ttcaacagca ctttccgctc agtcagtga 360

cttcccatca tgcaccagga ctggctcaat ggcaaggagt tcaaatgcag ggtcaacagt 420

gcagctttcc ctgccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaggcag accgaaggct 480

ccacaggtgt acaccattcc acctccaag gagcagatgg ccaaggataa agtcagtctg 540

acctgcatga taacagactt cttccctgaa gacattactg tggagtggca gtggaatggg 600

cagccagcgg agaactacaa gaacactcag cccatcatgg acacagatgg ctcttacttc 660

gtctacagca agctcaatgt gcagaagagc aactgggagg caggaaatac tttcacctgc 720

tctgtgttac atgagggcct gcacaaccac catactgaga agagcctctc ccactctcct 780

ggtaaagggc gcgccatggc cctgattgtg ctggggggcg tcgccgcct cctgcttttc 840

attgggctag gcatcttctt ctgtgtcagg tgccggcacc gaaggcgcca agcagagcgg 900

atgtctcaga tcaagagact cctcagtgag aagaagacct gccagtgcc tcaccggttt 960

cagaagacat gtagcccat ttag 984

<210> 25

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4 construct with signal sequence and with FLAG tag

<400> 25

atgtctgcac tctgtatcct cgctctcggt ggagctgcag ttgttgacta caaagacat 60

gacggagatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg acgatgacaa ggcgatcgcg 120

aacggatgtg tcgagtgcac accttgccca gcaccacctg tggcaggacc ttcagtcttc 180

ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 240

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt ttaattggta tctcgacggc 300

gtggagggtgc ataattgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacattcagg 360

gtggtcagcg tcttcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 420

aaggtgtcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggga 480

cagcccagag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 540

caggtcagcc tgacctgcct ggtgaaggga ttttatcctt ccgacatcgc cgtggagtgg 600

gagagcaatg ggcagcctga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 660

ggctccttct tctgtattc caaactcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac 720

gtcttctcat gtccgtgat gcatgaggt ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 780

tccctgtccc ctggaaagg ggcgccatg gcctgattg tgctgggggg cgtcgccggc 840

ctctgtctt tcattgggt cggtatctt tctgtgtcc gctgccgga ccgacgccgc 900

caagcagagc ggatgtctca gatcaagaga ctctcagtg agaagaagac cgcacagtgc 960

cctcaccggt ttcagaagac atgtagcccc atttag 996

<210> 26

<211> 570

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4-GFP construct with signal sequence and with FLAG tag

<400> 26

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Asp

1

5

10

15

Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys
 20 25 30
 Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ala Asn Gly Cys Val Glu Cys Pro Pro
 35 40 45
 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 50 55 60
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 65 70 75 80
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 85 90 95
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 100 105 110
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 115 120 125
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 145 150 155 160
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 165 170 175
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 180 185 190
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 195 200 205
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 210 215 220
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 225 230 235 240
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 245 250 255
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Arg Ala Met Ala Leu

260 265 270
 Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly
 275 280 285
 Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg
 290 295 300
 Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln Cys

 305 310 315 320
 Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile Met Val Ser Lys Gly
 325 330 335
 Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
 340 345 350
 Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
 355 360 365
 Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys

 370 375 380
 Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val
 385 390 395 400
 Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
 405 410 415
 Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
 420 425 430
 Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly

 435 440 445
 Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 450 455 460
 Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His
 465 470 475 480
 Lys Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
 485 490 495
 Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp

 500 505 510

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
515 520 525
Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
530 535 540
Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
545 550 555 560
Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
565 570

<210> 27

<211> 1716

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4-GFP construct with signal sequence and with FLAG tag

<400> 27

atgtctgcac tctgatacct cgctctcggt ggagctgcag ttgctgacta caaagacat	60
gacggagatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg acgatgacaa ggcgatcgcg	120
aacggatgtg tcgagtcccc accttgccca gcaccacatg tggcaggacc ttcagtcttc	180
ctcttcccc caaaaccaa ggacacccct atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	240
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt ttaattggta tgtcgacggc	300
gtggaggatgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacattcagg	360
gtggtcagcg tctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	420
aaggtgtcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaagg	480
cagcccagag aaccacaggt gtacacccct ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	540
caggtcagcc tgacctgct ggtgaaggga tttatcctt cgcacatgc cgtggagtgg	600
gagagcaatg ggcagcctga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac	660
ggctccttct tctgtattc caaactcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac	720
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagacctc	780
tcctgtccc ctggaaagg ggcgccaatg gcctgattg tgcgggggg cgtcgccggc	840
ctctgcttt tcattgggt cggcatcttc ttctgtgtcc gtcgccgga ccgacgccgc	900
caagcagagc ggtgtctca gatcaagaga ctctcagtg agaagaagac cgcacagtgc	960
cctcaccggt ttcagaagac atgtagcccc attatggtga gcaaggcgga ggagctgttc	1020
accggggtgg tgccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc	1080

gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc 1140

accaccggca agctgccctg gccctggccc accctcgtga ccaccttgac ctacggcgtg 1200

cagtgtctcg cccgctaccc cgaccacatg aagcagcacg actttttcaa gtccgccatg 1260

cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc 1320

cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcac 1380

gacttcaagg aggacggcaa catctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac 1440

aaggtctata tcaccgccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagaccgc 1500

cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccgccac 1560

ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcaccagtc cgccctgagc 1620

aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg gtctgtctgg agttcgtgac cgccgccggg 1680

atcactctcg gcatggacga gctgtacaag tagtag 1716

<210> 28

<211> 528

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4-GFP construct without signal sequence and without FLAG

tag

<400> 28

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser

1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

35 40 45

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

100	105	110	
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
115	120	125	
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
130	135	140	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
145	150	155	160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp			
165	170	175	
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
180	185	190	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
195	200	205	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
210	215	220	
Gly Arg Ala Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu			
225	230	235	240
Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg			
245	250	255	
Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu			
260	265	270	
Lys Lys Thr Ala Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro			
275	280	285	
Ile Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile			
290	295	300	
Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser			
305	310	315	320
Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe			
325	330	335	
Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr			
340	345	350	

Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met
 355 360 365
 Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln
 370 375 380
 Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala
 385 390 395 400

Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys
 405 410 415
 Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu
 420 425 430
 Tyr Asn Tyr Asn Ser His Lys Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys
 435 440 445
 Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
 450 455 460

Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
 465 470 475 480
 Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala
 485 490 495
 Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
 500 505 510
 Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 515 520 525

<210> 29

<211> 1590

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIgG2-hCD4-GFP construct without signal sequence and without FLAG
 tag

<400> 29

tgtgtcgagt gccaccttg cccagcacca cctgtggcag gaccttcagt ctctctcttc 60
 cccccaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 120
 gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagtttaatt ggtatgtcga cggcgtggag 180

gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacatt cagggtggtc 240
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaagggtg 300

tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaacatct ccaaaaccaa agggcagccc 360
agagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 420
agcctgacct gcctgggtgaa gggattttat cttccgaca tcgccgtgga gtgggagagc 480
aatgggcagc ctgagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 540
ttcttctgt attccaaact caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 600
tcatgtctcg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 660
tccccggaa aggggcgcgc catggccctg attgtgctgg ggggcgtcgc cggcctcctg 720

cttttcattg ggctcggcat cttcttctgt gtccgctgcc ggcaccgacg ccgccaagca 780
gagcggatgt ctcagatcaa gagactctc agtgagaaga agaccgcaca gtgccctcac 840
cggtttcaga agacatgtag ccccatatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcacgggg 900
gtggtgcccc tcttggtcga gctggacggc gacgtaaagc gccacaagtt cagcgtgtcc 960
ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgacce tgaagttcat ctgcaccacc 1020
ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacct tgacctacgg cgtgcagtgc 1080
ttcgcccgt accccgacca catgaagcag cacgacttct tcaagtcgc catgcccga 1140

ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactaaa gacccgcgcc 1200
gaggtgaagt tcgaggcgca caccctggtg aaccgcatcg agctgaagg catcgacttc 1260
aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaaggtc 1320
tatatcaccg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagac ccgccacaac 1380
atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac 1440
ggccccgtgc tgetgccga caaccactac ctgagcacc agtccgcct gagcaaagac 1500
cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgcgc cgggatcact 1560

ctcggcatgg acgagctgta caagtagtag 1590

<210> 30
<211> 555
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> hIgG2-hCD4-GFP construct, mature protein
<400> 30
Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr

1 5 10 15
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ala Asn Gly Cys Val Glu Cys Pro
 20 25 30
 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

 35 40 45
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 50 55 60
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 65 70 75 80
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 85 90 95
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

 100 105 110
 Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 115 120 125
 Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 130 135 140
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 145 150 155 160
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

 165 170 175
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 195 200 205
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 210 215 220
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

 225 230 235 240
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Arg Ala Met Ala
 245 250 255

Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu
 260 265 270
 Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu
 275 280 285
 Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln
 290 295 300
 Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile Met Val Ser Lys
 305 310 315 320
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 325 330 335
 Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 340 345 350
 Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 355 360 365
 Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly
 370 375 380
 Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
 385 390 395 400
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 405 410 415
 Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 420 425 430
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 435 440 445
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 450 455 460
 His Lys Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 465 470 475 480
 Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 485 490 495
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu

500 505 510
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 515 520 525
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 530 535 540
 Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 545 550 555

<210> 31

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mIgG1-hCD4 construct, mature protein

<400> 31

Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ala Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
 20 25 30
 Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 35 40 45

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 50 55 60
 Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
 65 70 75 80
 Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 85 90 95
 Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
 115 120 125
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
 130 135 140
 Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys

145 150 155 160
 Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
 165 170 175

 Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
 180 185 190
 Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
 195 200 205
 Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
 210 215 220
 Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
 225 230 235 240

 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Gly Arg Ala Met Ala Leu Ile Val Leu
 245 250 255
 Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe
 260 265 270
 Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln
 275 280 285
 Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg
 290 295 300

 Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
 305 310
 <210> 32
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hIgG2-hCD4 construct, mature protein
 <400> 32
 Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ala Asn Gly Cys Val Glu Cys Pro
 20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

35

40

45

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

50

55

60

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

65

70

75

80

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

85

90

95

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

100

105

110

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

115

120

125

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys

130

135

140

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

145

150

155

160

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

165

170

175

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

180

185

190

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

195

200

205

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

210

215

220

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

225

230

235

240

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Arg Ala Met Ala

245

250

255

Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu

260

265

270

Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu

275 280 285
 Arg Met Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Ala Gln

290 295 300
 Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

305 310 315

<210> 33
 <211> 2142
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MAbLib construct (sc21M18 sequence)
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(60)
 <223> signal
 <400> 33

atggtactcc aaaccaagt attcatctcg ctgctgttgt ggattagcgg agcgtatgga 60
 gatatcgta tgacacagtc accggactcg cttgcagtat cgctcggcga gagggccacc 120

atttcgtgtc gcgttcaga gtcagtcgat aactacggga tctcgtttat gaagtggttt 180
 cagcagaagc ccggacaacc accgaagtig ctcatctacg cggcttcaaa tcaggggtca 240
 ggggtccctg acagatttcc cggtccggt tccggtacag atttcacgct gaccatctcg 300
 tcgtgcagg ccgaggacgt ggccgtgtat tactgccagc agtcaaaaga ggtccctgg 360
 acttttgggg gtgggacgaa agtggagatc aagcgtacgg tggcggcacc ttcagtgttt 420
 atcttcccgc cgtccgacga acagcttaag tccggtacgg cgtcggtagt ctgcctgctg 480
 aacaatttct atcccaggga agcgaagta caatggaagg tcgacaatgc cctccagagc 540

gggaatagcc aagaatcggc cacagaacag gattcgaagg actcaacgta tagcctttcg 600
 tccacactta cactctcgaa agctgactat gagaagcata aggtctatgc atgtgaagtc 660
 actcatcaag gtctttcgtc gcccgtaacc aagagcttca accgcggaga gtgtggagga 720
 ggtgtggat caggcgggtg tgggtcggga gggggtggca gcggaggagg gggatccggt 780
 ggagggggta gcgggggagg agggagccag gtgcaattgg tgcagtccgg ggcagaagtg 840
 aagaagcctg gcgcgtcagt gaagatcagc tgcaaagcct cggggtattc ctttacagca 900
 tactacattc actgggtcaa acaggcgcca ggacaggggt tggagtggat tggatacatt 960

tcctcgtaca acggggccac gaactacaat cagaaattca aaggacgggt gacgtttact 1020

acggacacca gcacttcgac ggcgtacatg gagcttcgat cactccggtc cgatgacacg 1080
gctgtatact actgtgccag agattatgat tatgatgtgg gaatggacta ctggggacag 1140
gggacattgg taacagttag ctcagccagc acaaagggcc ctagcgtctt ccctctggcc 1200
ccctgcagca ggagcaccag cgagagcaca gccgccctgg gctgcctggt caaggactac 1260
ttccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac tcaggcgtc tgaccagcgg cgtgcacacc 1320
ttcccagctg tcttacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 1380

tccagcaact tcggcaccca gacctacacc tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc 1440
aaggtggaca agacagtga gcgcaaatgt tgtgtcaggt gccaccctg cccagcacca 1500
cctgtggcag gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac 1560
tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtgggt gtggacgtga gccacgaaga ccccagggtc 1620
cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag 1680
gagcagttca acagcacgtt ccgtgtgggt agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg 1740
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaagggt tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag 1800

aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1860
tccccggagg agatgaccaa gaaccagggt agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctac 1920
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1980
acacctccca tgctggactc cgacgggtcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 2040
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcattgtccg tgatgcatga ggctctgcac 2100
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 2142

<210> 34

<211> 714

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAbLib construct (sc21M18 sequence)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> signal

<400> 34

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
260 265 270

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys

275 280 285
 Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Tyr Ile His
 290 295 300

 Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
 305 310 315 320
 Ser Ser Tyr Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg
 325 330 335
 Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 340 345 350
 Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
 355 360 365

 Tyr Asp Tyr Asp Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 370 375 380
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 385 390 395 400
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 405 410 415
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 420 425 430

 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 435 440 445
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
 450 455 460
 Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 465 470 475 480
 Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 485 490 495

 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 500 505 510
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 515 520 525

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
530 535 540

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
545 550 555 560

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
565 570 575

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
580 585 590

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
595 600 605

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
610 615 620

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
625 630 635 640

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
645 650 655

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
660 665 670

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
675 680 685

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
690 695 700

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710