(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0104149
(43) 공개일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0781 (2010.01) *A01K 67/027* (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 5/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0635 (2013.01)
A01K 67/0278 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7025204
(22) 출원일자(국제) 2017년02월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년08월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/016521
(87) 국제공개번호 WO 2017/136734
국제공개일자 2017년08월10일
(30) 우선권주장
62/291,217 2016년02월04일 미국(US)

(71) 출원인
트리아니, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 샌프란시스코 피프쓰 애비뉴 1515 (우: 94122)
(72) 발명자
킬린, 니겔
미국 캘리포니아 샌프란시스코 피프쓰 애비뉴 1515 (우: 94122)
하센힌들, 크리스토프
미국 캘리포니아 샌프란시스코 피프쓰 애비뉴 1515 (우: 94122)
드엉, 바오
미국 캘리포니아 샌프란시스코 피프쓰 애비뉴 1515 (우: 94122)
(74) 대리인
황이남

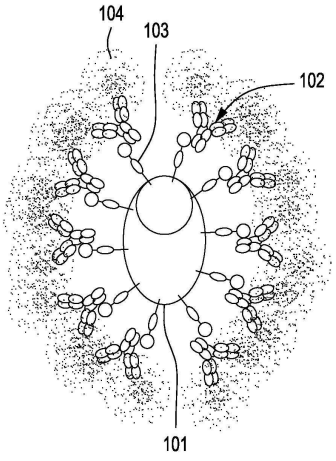
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **면역글로불린의 증대된 생성**

(57) 요 약

본 발명은 트랜스제닉 포유동물을 포함한 트랜스제닉 동물뿐만 아니라, 형질세포에서 내인성으로 생성된 분비된 면역글로불린 분자의 세포 표면 포획을 허용하는 형질세포를 생성시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1c



(52) CPC특허분류
C07K 14/315 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
C12N 5/12 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/01 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/02 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포 표면에서 내인성으로 생성된 면역글로불린 분자와 결합하고 상기 분자를 유지하고 표출할 수 있는 막-결합된 면역글로불린-포획 분자를 발현할 수 있는 항체-분비 세포의 생성 방법으로, 상기 항체-분비 세포 또는 항체-분비 세포의 선조내에 프로모터, 면역글로불린-결합 펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 및 세포 표면 구속 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 벡터를 도입시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 면역글로불린-결합 펩티드가 면역글로불린에 대한 친화성을 자연적으로 갖는 하나 이상의 세균성 단백질로부터 유래되는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 세균성 단백질이 단백질 A 또는 단백질 G인 방법.

청구항 4

제 2 항의 방법에 의해 생성된 항체-분비 세포로부터 유래된 면역글로불린 분자 전체 또는 그의 일부.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 면역글로불린-결합 펩티드가, 또 다른 면역글로불린의 임의의 부분에 대해 친화성을 갖는 면역글로불린의 하나 이상의 가변 도메인으로부터 유래되는 방법.

청구항 6

제 5 항의 방법에 의해 생성된 항체-분비 세포로부터 유래된 면역글로불린 분자 전체 또는 그의 일부.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 항체-분비 세포가 하이브리도마 세포 또는 B 림프구 계통의 세포인 방법.

청구항 8

제 7 항의 방법에 의해 생성된 세포로부터 유래된 면역글로불린 분자 전체 또는 그의 일부.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 프로모터가 구성적 프로모터인 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

프로모터가 항원 충돌에 앞서 B 세포 발생 동안 항체-분비 세포에서 면역글로불린-포획 분자를 최소의 발현으로 우선적으로 발현하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 프로모터가 B 림프구-유도된 성숙 단백질 1, 신데칸 1, 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼 패밀리 멤버 17, 또는 퓨코실트랜스퍼라제 1 유전자 중에서 선택되는 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 프로모터가 유도성 프로모터인 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 유도성 프로모터가 테트라사이클린-반응성 프로모터 또는 타목시펜-반응성 프로모터인 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 세포 표면 구속 펩티드가 막횡단 펩티드인 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 막횡단 펩티드가 인간 림프구 활성화 유전자 3, 인간 CD58, 래트 CD2 또는 인간 CD7로부터 유래되는 방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 세포 표면 구속 펩티드가, 번역-후 변형되어 면역글로불린-결합 펩티드를 항체-분비 세포의 세포 표면에 구속시킬 수 있는 펩티드 서열인 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, C-말단 펩티드 서열이 형질막에 대한 글리코실포스파티딜이노시톨 결합을 매개하는 방법.

청구항 18

제 1 항에 있어서, 핵산 벡터가 줄기 구조(stalk structure)를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함하는 방법.

청구항 19

제 1 항에 있어서, 핵산 벡터가 리포터 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함하는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 리포터 펩티드가 형광 펩티드인 방법.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 핵산 벡터가 IRES 서열 또는 피코르나바이러스 2A 리보솜 스킵 서열을 더 포함하는 방법.

청구항 22

제 1 항에 있어서, 핵산 벡터가 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함하는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 핵산 벡터가 줄기 구조를 암호화하는 핵산 서열 및 IRES 서열 또는 피코르나바이러스 2A 리보솜 스킵 서열에 연결된 리포터 펩티드를 더 포함하는 방법.

청구항 24

제 1 항의 방법에 의해 생성된 항체-분비 세포.

청구항 25

제 24 항의 항체-분비 세포로부터 유래된 면역글로불린 분자 전체 또는 그의 일부.

청구항 26

제 1 항에 있어서, 항체-분비 세포를 대규모 항체 생산에 사용하는 방법.

청구항 27

세포 표면 구속 부분 및 면역글로불린-결합 부분을 포함하는 면역글로불린-포획 분자를 암호화하는 유전자를 포

함하는 항체-분비 세포를 포함하는 유전자 변형된 동물로, 상기 면역글로불린-포획 분자가 상기 항체-분비 세포의 세포 표면에서 내인성으로 생성된 면역글로불린 분자와 결합하고, 상기 분자를 유지하고 표출할 수 있는 유전자 변형된 동물.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 항체-분비 세포가 면역글로불린-포획 분자를 구성적으로 발현하는 유전자 변형된 동물.

청구항 29

제 27 항에 있어서, 항체-분비 세포가 생체내에서, 시험관내에서 또는 생체외에서 면역글로불린-포획 분자를 발현하도록 유도될 수 있는 유전자 변형된 동물.

청구항 30

제 27 항에 있어서, 상기 동물이 포유동물인 유전자 변형된 동물.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 포유동물이 설치류인 유전자 변형된 동물.

청구항 32

제 30 항에 있어서, 설치류가 마우스 또는 래트인 유전자 변형된 동물.

청구항 33

항체-분비 세포의 세포 표면에서 면역글로불린 분자와 결합하고 상기 분자를 유지하고 표출할 수 있는 막-결합된 면역글로불린-포획 분자를 발현시키기 위한 벡터로, 프로모터, 면역글로불린-결합 펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 및 세포 표면 구속 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 신호 펩티드, 줄기 구조, 및 IRES 서열 또는 피코르나바이러스 2A 리보솜 스킵 서열에 연결된 리포터 펩티드를 암호화하는 핵산 서열들을 더 포함하는 벡터.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2016년 2월 4일자로 출원된 USSN 62/291,217에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 단클론 항체의 생성을 위한 항원-특이성 항체-분비 세포의 신속한 선별 방법을 포함한, 면역글로불린 분자의 생성에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 하기의 논의에서 배경기술 및 도입을 목적으로 몇몇 논문 및 방법을 기재한다. 본 명세서에 들어 있는 것 중 어느 것도 종래 기술의 "인정"으로 해석하지는 않는다. 출원인은 적합한 경우, 본 명세서에서 참조한 논문 및 방법이 적용 가능한 법률 조항하에서 종래 기술을 구성하지 않음을 입증할 권리를 명백히 보유한다.

[0004] 단클론 항체는 다양한 분자 형태의 항원들과 결합하는 그의 절묘한 능력으로 인해 생물의학 연구, 임상 진단학에, 및 치료제로서 광범위하게 사용되어 온 중요한 생물학제제이다. 약물 개발에서, 단클론 항체는, 감염인자를 막는데 통상적으로 관련된 강력한 면역학적 기능과 관련있는 바람직한 약동학을 나타내기 때문에, 종종 선택되는 분자이다. 더욱 또한, 실험 동물은 신체 중에 자연적으로 존재하지 않는 임의의 표적 분자에 대한 특이적인 항체 응답을 쉽게 증가시킬 수 있으며, 이는 항체 생성을 대안의 전략에 비해 비교적 위험성이 낮고 비용-효율적인 접근법으로 만든다.

[0005] 하이브리도마 기술이 사십 년보다 더 이전에 개발되었지만, 현재에도 상기 기술은 여전히 항원-특이성 단클론 항체의 생성에 가장 널리 사용되는 기법이다. 상기 접근법에서, 동물(전형적으로 설치류 또는 토끼)을 먼저 관

심 항원으로 면역시킨다. 이어서 상기 항원에 대해 수용체 특이성을 갖는 상기 면역된 동물 중에서 B 림프구가 활성화되고, 클론에 의해 확대되며, 항체-분비 세포(antibody-secreting cell, ASCs)로 분화하게 된다. 이어서 상기 면역된 동물을 죽이고, 이들 동물로부터 단리된 ASCs는 배양물 중에서 무기한 생존할 수 없기 때문에, 상기 세포를 종종 악성 형질 세포(예를 들어, 골수종 또는 형질세포종 세포)와의 융합에 의해 불멸화시켜, 하이브리도마라 칭하는 하이브리드 세포를 생성시킨다. 이어서 상기 하이브리도마 세포를 선별하고, 상기 관심 항원에 대해 반응성을 갖는 항체를 분비하는 그의 능력에 대해 선택하며, 이는 종종 수회 라운드의 제한 희석 및 배양물에서의 증식을 수반한다.

[0006] 한편으로, 상기 ASCs를 개별적으로 분류할 수 있으며, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(각각 V_H 및 V_L)을 암호화하는 유전자를 시험관내에서 상기 ASCs를 증식시킬 필요 없이 직접 클로닝할 수 있다. 이어서 상기 V_H- 및 V_L-암호화 DNA 단편을 각각 목적하는 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 대한 엑손 서열을 함유하는 발현 벡터내로 서브클로닝한다. 이어서 발현 벡터의 각 V_H 및 V_L 쌍을 상기 단클론 항체를 발현하도록 세포주내로 형질감염시키고, 후속으로 상기 항체를 상기 관심 항원을 인식하는 그의 능력에 대해 선별한다.

[0007] 하이브리도마 또는 단-세포 클로닝 기법을 사용하여 관심 항원에 대한 단클론 항체를 생성시키는 궁극적인 성공에도 불구하고, 상기 두 기법 모두의 효율은 노동-집약적인 선별 및 선택 공정에 의해 방해를 받는다. 이는 오직 상기 항원-특이성 ASCs를 골수종 세포와의 융합 또는 단-세포 클로닝에 대해서만 사전-선택할 수 없었기 때문이다. B 림프구가 항원 충돌(antigen encounter)에 응답하여 ASCs로 분화할 때, 항원 수용체의 막-결합된 형태는 분비된 형태에 유리하게 하향-조절된다. 따라서, 항원 수용체의 세포 표면 발현에 근거한 선택 방법, 예를 들어 자기 또는 유식-세포측정 분류는 항원-특이성 ASCs를 선택하기 위한 도구로서 잘 작용하지 않는다. 이러한 ASCs를 사전-선택하는 능력의 결여로 인해, 하이브리도마 및 단-세포 클로닝 기법 모두에서 선별된 세포의 단지 작은 분획만이 관심 항원에 대해 특이성을 갖는 단클론 항체를 생성시킨다.

[0008] 미국특허 제 7,148,040 B2 호는 항원 수용체의 세포 표면 발현에 근거한 선택 기법에 의해 하이브리도마 선별 효율을 개선시키기 위해 하이브리도마 세포상의 항원 수용체의 막-결합된 형태를 발현시키는 방법을 제공한다. 상기 접근법에서, 골수종 세포를 CD79A 및 CD79B (또한, Igα 및 Igβ로서도 각각 공지됨)를 암호화하는 발현 구조물로 형질감염시킨다. CD79A 및 CD79B는 B 세포상의 세포 표면 발현 및 항원 수용체의 신호전달 기능 모두에 필요한 이종이량체로서 발현된다. B 림프구가 ASCs로 분화함에 따라, 이들은 CD79A 및 CD79B 발현을 하향-조절하며, 따라서 상기 세포 표면상의 항원 수용체 발현의 상실에 기여한다. 그러므로, CD79A 및 CD79B의 발현을 재-도입시키는 것은 상기 하이브리도마상의 항원 수용체의 막-결합된 형태의 증가된 재현을 허용한다. 상기 전략은 하이브리도마 선별 및 선택의 노동을 감소시키는데 일조하지만, 오직 상기 항원-특이성 ASCs를 골수종 세포와의 융합에 대해서만 사전-선택할 수 있다면, 그 효율은 크게 개선될 수 있을 것이다. 더욱이, 상기 명시된 방법은 분류된 단세포로부터 직접적인 V_H 및 V_L 클로닝 기법을 사용하여 단클론 항체 생성의 효율을 증가시키는 전략을 제공하지 못한다.

[0009] 생체내에서 ASCs에 의한 CD79A 및 CD79B 발현의 재-도입 또한 상기 세포 표면상에서 항원 수용체의 발현을 증가시키기 위한 실현 가능한 전략을 제공할 수 없다. CD79A 및 CD79B 발현은 B 림프구 발생 중 엄격하게 조절되기 때문에, 생체내에서 그의 발현 수준의 변경은 B 림프구 생존, 기능, 및/또는 항원 수용체 선택에 엄청난 결과를 가져올 수 있다. 더욱이, ASCs상의 항원 수용체는 면역원과의 그의 활성적인 관여로 인해 ASCs 단리 때에 내면화되기 쉬우며, 따라서 마우스의 안락사 시에 면역 응답은 여전히 진행 중이다. 대신에 신호전달-결함 돌연변이체 CD79A 및 CD79B를 ASCs상에서 발현시켜 항원 수용체 내면화를 방지한다면, 이들 분자의 돌연변이체 형태가 생체내에서 ASCs 생존 및 기능에 부정적인 영향을 미치는 우성-음성 효과를 나타내는지의 여부는 철저히 검토되지 않은 채로 남아 있다. 마지막으로, 생체내에서의 강화된 발현과 관련된 상기 언급된 문제들을 피하기 위해 생체외에서 ASCs상에서 CD79A 및 CD79B를 발현시키는 것은, ASCs가 현재 이용 가능한 대부분의 방법에 의해 유전자를 전달할 수 있는 것은 아니기 때문에, 실용적인 전략이 아니다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 항원-특이성 ASCs에 대한 보다 효율적인 선별 방법은 충족되지 않은 중요한 요구이다. 본 명세서에서 제공하는 방법 및 조성물이 상기 중요한 요구를 충족시킨다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 요약은 하기 상세한 설명에 추가로 기재되는 개념의 선택을 간략화된 형태로 도입하기 위해 제공한다. 본 요약은 특허청구된 발명의 요지의 핵심 또는 필수적인 특징을 한정하고자 하는 것이 아니며, 특허청구된 발명의 요지의 범위를 제한하는데 사용하고자 하는 것도 아니다. 특허청구된 발명의 요지의 다른 특징, 세부사항, 유용성 및 장점들은, 첨부된 도면에 예시되고 첨부된 특허청구범위에 정의된 태양들을 포함하여 하기에 작성된 상세한 설명으로부터 자명할 것이다.

[0012] 본 발명은 면역글로불린 분자의 증대된 생성을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 ASCs의 표면에서 IgG, IgA, IgE 및 IgM 아이소타입의 분자들을 포함하여, 분비된 면역글로불린 분자의 포획을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 ASCs내에서 내인성으로 생성된 면역글로불린 분자를 포획하고 그의 세포 표면상에 표출할 수 있는 조작된 ASCs를 포함하는 트랜스제닉 동물, 예를 들어 트랜스제닉 포유동물도 포함한다.

[0013] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 항원-유도된 분화에 앞서 B 세포 발생의 단계들에서 최소의 발현으로 ASCs상에서 우선적으로 면역글로불린-포획 분자를 발현하는 발현 시스템을 사용하여, 단백질 A 및/또는 단백질 G와 같은 세균성 단백질(들)로부터 유래된 하나 이상의 면역글로불린-결합 부분 또는 도메인을 포함하는 조작된 면역글로불린-포획 분자의 제한된 구성적 발현을 제공한다.

[0014] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 항원-유도된 분화에 앞서 B 세포 발생의 단계들에서 최소의 발현으로 ASCs상에서 우선적으로 면역글로불린-포획 분자를 발현하는 발현 시스템을 사용하여, 면역글로불린에 대해 특이성을 갖는 단-쇄 항체를 포함하는 조작된 면역글로불린-포획 분자의 제한된 구성적 발현을 제공한다.

[0015] 상기 조작된 ASCs는, 상기 세표 표면에 구속되고 면역글로불린 분자(또한, 본 명세서에서 사용하는 바와 같이, "면역글로불린" 또는 "항체")와 형질막에서 상기 면역글로불린 분자를 고정화시키기에 충분한 친화성으로 선택적으로 결합하는 능력을 갖는 면역글로불린-포획 분자를 발현한다. ASCs는 초당 수 천개의 면역글로불린 분자를 분비하므로, 주어진 ASCs상의 면역글로불린-포획 분자는 다른 ASCs에 의해 분비된 면역글로불린보다는 상기 ASCs에 의해 분비된 면역글로불린 분자로 주로 포화된다. 세포 표면 면역글로불린-포획 분자를 암호화하는 유전자의 발현은, 발현되는 특정한 단클론 면역글로불린 분자에 근거한 ASCs의 식별 수단을 제공한다.

[0016] 몇몇 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는, 비제한적으로 인간 림프구-활성화 유전자 3(human Lymphocyte-Activation Gene 3, LAG3)와 같은 막횡단(transmembrane) 단백질로부터 유래된 펩티드 서열에 의해 막에 구속된다. 다른 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는, 예를 들어 글리코실포스파티딜이노시톨(glycosylphosphatidylinositol, GPI)에 의한 번역-후 변형을 통해 형질막에 구속된다. 이들 태양 중 일부에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는 지지, 가요성, 및 세포외 공간내로의 연장된 돌출을 위한 긴 줄기를 추가로 포함한다.

[0017] 몇몇 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자의 발현은 생체내에서 또는 시험관내에서 발생된 ASCs에서 고도로 발현되는 인간 또는 마우스 유전자로부터 유래된 프로모터에 의해 구동된다. 다른 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는 생체내에서 또는 시험관내에서 테트라사이클린 시스템과 같은 유도성 시스템에 의해 발현된다. 일부 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자의 발현은 발현 벡터 중의 내부 리보솜 진입 부위 서열(internal ribosomal entry site sequence, IRES) 또는 피코르나바이러스 2A 리보솜 스킵 서열을 통해, 리포터 유전자, 예를 들어 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)의 발현에 연결된다.

[0018] 본 발명은 또한 ASCs상에서 면역글로불린-포획 분자를 발현하는 비-인간 트랜스제닉 동물의 생성 방법도 제공한다. 상기 방법은 면역글로불린-포획 분자-암호화 유전자를 비-인간 척추동물의 게놈내에 도입시킴을 포함하며, 여기에서 상기 도입된 유전자는 숙주 ASCs상에서 상기 면역글로불린-포획 분자의 구성적 또는 유도성 발현을 제공한다. 일부 태양에서, 상기 트랜스제닉 동물은 설치류, 바람직하게는 마우스이다. 다른 태양에서, 상기 트랜스제닉 동물은 조류, 바람직하게는 닭이다. 특히 바람직한 태양에서, 상기 트랜스제닉 동물은, 예를 들어 미국특허 공보 제 2013/0219535 호(내용 전체가 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은, 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 암호화하는 인간 유전자를 발현하고, 이들 유전자의 마우스 버전이 결여된 마우스이다.

[0019] 본 발명은 ASCs의 표면상에 포획된 특이적인 면역글로불린을 표출하는 상기 ASCs로부터 특정한 특이성의 면역글로불린을 암호화하는 유전자를 단리하는 방법을 추가로 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한 본 발명의 조작된 세포로부터 관심 항체의 식별을 위한 라이브러리도 제공한다. 본 발명의 방

법 및 조성물을 사용하여 생성된 항체 라이브러리는 관심 표적에 선택적으로 결합하는 항체의 선별 및 생성을 촉진하는 수단을 제공한다. 따라서 상기와 같은 라이브러리는 임상, 진단 및 연구 환경에 사용하기 위한 단클론 항체의 단리를 증대시킨다.

[0021] 본 발명의 이점은 면역글로불린 특이성의 측정을 형광 표지된 항원에의 결합 및 유식 세포측정 또는 현미경적 과정과 같은 확립된 기법을 사용하여 이룰 수 있는 것이다. 상기와 같은 과정은 희귀한 항원-특이성 세포의 식별과 단리, 및 상기 단리된 세포로부터 재배열된 면역글로불린 유전자의 클로닝에서 증대된 효율을 허용한다.

[0022] 이들 및 다른 태양, 목적 및 특징을 하기에서 보다 상세하게 설명한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1A, 1B 및 1C는 세포 표면상에 면역글로불린-포획 분자가 없는 분비성 ASCs(도 1A), ASCs의 표면상에 면역글로불린-포획 분자 및 포획된 면역글로불린 분자(즉, 항체)를 갖는 ASCs(도 1B), 및 ASCs상에서 발현된 면역글로불린-포획 분자에 의해 유지되는 항체에 대한 표지된 항원의 결합(도 1C)의 삽화이다.

도 2A는 면역글로불린-포획 분자의 하나의 실시태양을 암호화하는 DNA 벡터의 부분을 묘사하는 도식적 다이어그램이다. 도 2B는 ASCs 표면상에서 면역글로불린-포획 분자로서 발현된 도 2A의 실시태양의 간략화된 삽화이다.

도 3A는 면역글로불린-포획 분자의 대안적인 실시태양을 암호화하는 DNA 벡터의 부분을 묘사하는 도식적 다이어그램이다. 도 3B는 ASCs 표면상에서 면역글로불린-포획 분자로서 발현된 도 3A의 실시태양의 간략화된 삽화이다.

도 4A, 4B 및 4C는 세포 표면상에 면역글로불린-포획 분자가 없는 분비성 ASCs(도 4A), ASCs의 표면상에 면역글로불린-포획 분자 및 면역글로불린(즉, 항체)을 갖는 ASCs(도 4B, 또한 도 3B에 상세히 묘사된 바와 같은), 및 ASCs상에서 발현된 면역글로불린-포획 분자에 결합된 표지된 항원(도 4C)의 삽화이다.

도 5A는 면역글로불린-포획 분자의 예시적인 실시태양을 암호화하는 DNA 벡터의 부분을 묘사하는 도식적 다이어그램이다. 도 5B는 본 발명의 방법에 따른 형질감염된 RPMI 8226(ATCC(등록상표) CCL-155(상표)) 인간 세포의 세포 표면상에서 분비된 면역글로불린 분자의 유지의 결과를 도시하는 2개의 유식 세포측정 산포도를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 정의

[0025] 본 명세서에 사용된 용어들은 당해 분야의 통상적인 숙련가들에 의해 이해되는 바와 같은 분명하고 통상적인 의미를 나타내고자 한다. 하기의 정의들은 독자가 본 발명을 이해하는데 도움이 되도록 하였지만, 구체적으로 지시되지 않는 한 상기와 같은 용어들의 의미를 변화시키거나 또는 달리 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0026] "항체-분비 세포" 또는 "ASCs"는, 항원-경험 B 세포로부터 분화되었고 다량의 면역글로불린 분자를 발현할 뿐만 아니라 분비하는 능력을 획득한 세포를 지칭한다. ASCs는 동물 중의 형질아세포 및 단명 또는 장수 형질세포뿐만 아니라, B 세포 배양물로부터 시험관내에서 발생된 형질아세포 및 형질세포를 포함한다.

[0027] "포획 분자"는 전체 관심 분자 또는 그의 일부에 선택적으로 결합하는 영역을 함유하는 임의의 부분이다.

[0028] "포획"은 하나의 분자와 막-결합된 포획 분자간의 영속적인 상호작용에 기인한 세포 표면에서 상기 분자의 선택적인 결합 및 고정화를 지칭한다.

[0029] "세포 표면"은 세포의 형질막, 즉 대부분이 세포외 공간에 직접 노출되고 세포외(세포간 포함) 공간 중의 세포 및 단백질 모두와의 접촉에 이용될 수 있는 세포의 상기 부분을 지칭한다.

[0030] "미성숙 B 세포"는 B 세포 분화의 중간 단계의 세포를 지칭하며, 상기 단계 동안 조혈모세포는, 성숙하지만 아직 항원-미경험인 B 세포로 되게 하는 유전자 프로그래밍을 겪는다. "성숙한" B 세포는 항원에 의해 활성화시, 기억 세포 또는 항체-분비 세포로의 분화뿐만 아니라 클론 확대가 가능한, 항원-미경험 B 세포를 지칭한다.

[0031] "면역글로불린"은 전체 항체 분자이든 그의 일부이든 간에 항체를 지칭한다. 인간을 포함한 대부분의 척추동물에서, 항체는 통상적으로, 각각 동일한 경(L)쇄와 쌍을 이루는 2개의 동일한 중(H)쇄의 이량체로서 존재한다. H 및 L 쇄 모두의 N-말단은 함께 특유의 항원-결합 특이성을 갖는 H-L 쌍을 제공하는 가변 도메인(각각 V_H 및 V_L)으로 이루어진다. 상기 H 쇄의 불변 영역은 아이소타입(또는 항체 부류)에 따라 힌지와 함께 또는 힌지 없

이 3 내지 4개의 면역글로불린 도메인(C_H1 내지 C_H4로도 칭한다)으로 이루어진다. 마우스에서, 상기 아이소타입은 IgM, IgD, IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a 또는 IgG2c, IgE, 및 IgA이다. 상기 경쇄 불변 영역은 κ 또는 λ 면역글로불린 도메인(Cκ 또는 Cλ로도 칭한다) 중 어느 하나로 이루어진다. 마우스 및 인간 모두에서, κ 경쇄의 존재가 개인내 면역글로불린의 전체 풀 중에서 λ 경쇄의 존재에 비해 우세하다. 몇몇 포유동물, 예를 들어 경쇄 발현을 결함성으로 만든 카멜리드 또는 동물에서, 면역글로불린은 오직 중쇄만으로 이루어질 수도 있다. 경쇄의 결여에도 불구하고, 상기 면역글로불린은 또한 본 발명에 기재된 면역글로불린 중쇄에 결합하도록 설계된 면역글로불린-포획 분자에 의해 세포 표면상에서 효율적으로 유지된다. 추가로, 면역글로불린은 부분적이든 전체적이든 간에, 비통상적인 항체, 예를 들어 2016년 8월 24일자로 출원된 USSN 15/246,181(내용 전체가 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같이, 2개 이상의 V_H 및/또는 V_L 도메인으로 이루어지는 이중특이성 항체를 지칭할 수 있다. 마지막으로, 면역글로불린은 또한 항체의 부분, 특히 항체 불변 영역, 및 또 다른 단백질의 부분으로 이루어지는 하이브리드 분자를 지칭한다. 본 발명에 기재된 면역글로불린-포획 분자를 또한 세포 표면에서의 표출을 위해 하이브리드 면역글로불린 분자를 유지하도록 설계하고 조작할 수 있다.

[0032] "면역글로불린-포획 분자"는 세포 표면에서 면역글로불린 분자(즉, 면역글로불린 또는 항체)와 결합하고, 상기 분자를 유지하고 표출할 수 있는 형질막-결합된 분자를 지칭한다.

[0033] "면역글로불린 상과" 또는 "IgSF" 분자는 항체 분자에서 발견되는 면역글로불린 도메인과 구조적으로 유사한 면역글로불린 폴드(Ig 폴드)를 갖는 분자를 지칭한다.

[0034] "트랜스유전자"란 용어는 본 명세서에서 세포의 게놈내에 인공적으로 삽입되었거나 삽입되려고 하는 유전물질을 설명하는데 사용한다.

[0035] "트랜스제닉 동물"은 그의 세포의 일부 중에 염색체 또는 염색체외 요소로서 존재하거나 또는 그의 생식세포계열 DNA 내에(즉, 그의 세포의 대부분 또는 전부의 게놈 서열 중에) 안정하게 통합된 외인성 핵산 서열을 갖는 비-인간 동물, 대개는 설치류, (다른 동물들도 고려되지만) 특히 마우스 또는 래트와 같은 포유동물을 지칭한다.

[0036] "벡터" 또는 "발현 구조물"은 자기-복제든 아니든, 세포를 형질전환시키거나, 형질도입시키거나 또는 형질감염시키는데 사용될 수 있는 플라스미드, 바이러스, 및 임의의 DNA 또는 RNA 분자를 포함한다.

[0037] 발명의 상세한 설명

[0038] 본 명세서에 기재된 기법들의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 유기 화학, 중합체 기술, 분자 생물학(재조합 기법 포함), 세포 생물학, 생화학, 및 서열분석 기술(이들은 당해 분야의 숙련가들의 기술내에 있다)의 통상적인 기법 및 설명을 사용할 수 있다. 상기와 같은 통상적인 기법은 폴리뉴클레오티드의 중합체 배열 합성, 하이브리드화 및 결찰, 및 표지를 사용하는 하이브리드화의 검출을 포함한다. 적합한 기법의 구체적인 예시는 본 명세서의 실시예들을 참조할 수 있다. 그러나, 다른 균등한 통상적인 과정들도 물론 사용할 수 있다. 상기와 같은 통상적인 기법 및 설명을 하기의 문헌들과 같은 표준 실험 매뉴얼에서 찾을 수 있다: Green, et al., Eds. (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (Vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), *Genetic Variation: A Laboratory Manual*; Dieffenbach, Dveksler, Eds. (2007), *PCR Primer: A Laboratory Manual*; Sambrook and Russell (2006), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 및 Green and Sambrook (2012), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (모두 콜드 스프링 하버 레보라토리 프레스(Cold Spring Harbor Laboratory Press)로부터); Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4th Ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Lehninger, *Principles of Biochemistry* 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; and Berg et al. (2002) *Biochemistry*, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.; Nagy, et al., Eds. (2003) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., *Immunology Methods Manual* (Lefkovits ed., Academic Press 1997); *Gene Therapy Techniques, Applications and Regulations From Laboratory to Clinic* (Meager, ed., John Wiley & Sons 1999); M. Giacca, *Gene Therapy* (Springer 2010); *Gene Therapy Protocols* (LeDoux, ed., Springer 2008); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, eds., John Wiley & Sons 1998); 및 *Mammalian Chromosome Engineering - Methods and Protocols* (G. Hadlaczky, ed., Humana Press 2011)(이들은 모두 내용 전체가 모든 목적을 위해 본 명세서에 참고로 인용된다).

[0039] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "하나의" 및 "상기"는 문맥상 명백히 달리 지시

되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함함에 유의한다. 따라서, 예를 들어 "면역글로불린"에 대한 언급은 하나 이상의 상기와 같은 면역글로불린을 지칭하며, "상기 방법"에 대한 언급은 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 균등한 단계 및 방법 등에 대한 언급을 포함한다.

[0040] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 통상적인 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 언급된 모든 공보는 현재 기재된 발명과 관련하여 사용될 수 있는 장치, 제형 및 방법을 설명 및 개시할 목적으로 참고로 인용된다.

[0041] 일련의 값이 제공되는 경우, 상기 범위의 상한 및 하한 사이의 각 사이 값 및 임의의 다른 서술되거나 또는 상기 서술된 범위 중의 사이 값이 본 발명내에 포함되는 것으로 이해한다. 이들 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 상기 보다 작은 범위 중에 독립적으로 포함될 수 있으며, 상기 서술된 범위에서 임의의 구체적으로 제외된 한계를 조건으로, 본 발명내에 또한 포함된다. 상기 서술된 범위가 상기 한계 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 상기 포함된 한계 중 어느 하나 또는 둘 다를 제외한 범위도 또한 본 발명에 포함된다.

[0042] 하기의 설명에서, 본 발명의 보다 철저한 이해를 제공하기 위해 다수의 구체적인 세부사항들을 제시한다. 그러나, 본 발명을 이들 구체적인 세부사항들 중 하나 이상 없이도 실시할 수 있음은 당해 분야의 숙련가에게 자명할 것이다. 다른 경우에, 주지된 특징 및 당해 분야의 숙련가들에게 주지된 과정은 본 발명을 모호하게 하는 것을 피하기 위해 기재하지 않았다.

[0043] 발명의 일반적인 내용

[0044] 항체-분비 세포(ASCs)는 통상적으로 이들이 그의 형질막상에서 발현 및 분비하는 면역글로불린을 표출하지 않으며, 이는 세포 표면 표지화에 근거한 매우 진보된 기법들, 예를 들어 자기 및 유식-세포측정 분류를 항원-특이성 ASCs의 선택 방법으로서 적용할 수 없게 한다. 본 발명은 분비된 면역글로불린 분자(또한 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "면역글로불린" 또는 "항체")의 세포 표면 제시에 근거한 ASCs의 효율적인 선별을 허용하는 시스템의 필요로 탄생하였다. 구체적으로, 본 발명은 분비 세포, 예를 들어 ASCs 또는 하이브리도마(이들은 통상적으로 높은 수준의 막-결합된 면역글로불린을 발현하지 않거나, 또는 자연적으로 그들의 세포 표면상에서 면역글로불린을 유지하는 능력을 갖지 않는다)의 표면에서 면역글로불린을 유지 및 고정화시킬 수 있는 면역글로불린-포획 분자를 발현하기 위한 수단을 제공한다. ASCs는 다량의 면역글로불린(초당 수 천개의 분자)을 발현하고 방출한다(가령, 문헌[Mitchell, *Advances in Immunology* 28:451-511 (1979)]을 참조한다). 따라서, 이들 세포상에서 발현된 면역글로불린-포획 분자는 다른 세포에 의해 분비된 면역글로불린보다는 상기 세포로부터 생성된 면역글로불린으로 주로 포화된다. 따라서 상기 면역글로불린-포획 분자는 이들이 포획한 면역글로불린 분자에 대해 높은 친화성 및 낮은 해리속도를 가져야 한다. 본 발명은 낮은 해리속도를 갖는 상기와 같은 고-친화성 면역글로불린-포획 분자의 발현을 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

[0045] ASCs를 그의 세포 표면상에 내인성으로 생성된 면역글로불린을 포획하도록 조작하는 것은 각각의 ASCs가 생산하는 항체의 항원 특이성을 구별하고, 목적하는 면역글로불린을 분비하는 ASCs를 그렇지 않은 ASCs로부터 분리시키는 손쉬운 수단을 제공한다. 구별은, 예를 들어 당해 분야에 공지된 충분히-확립된 과정에 의해 세포의 식별 및 정제를 용이하게 하는 물질(예를 들어, 자기, 비오틴화된, 형광, 방사성 또는 효소 분자)로 표지된 항원을 사용함으로써 수행할 수 있다.

[0046] 도 1A, 1B 및 1C는 하나의 예시적인 실시태양에서 본 발명의 원리를 예시한다. 도 1A에 묘사된 바와 같이, 항체-분비 세포(ASCs)(101)는 통상적으로 면역글로불린 분자의 막-결합된 형태를 발현하지도 않고, 그의 세포 표면상에서 상기 면역글로불린 분자(즉 항체)(102)의 분비된 형태를 유지하지도 않는다. 본 발명은 ASCs의 세포 표면상에서 면역글로불린-포획 분자(103)의 발현을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명에 따라, 소포체에서의 상기 면역글로불린 분자의 합성 및 후속적인 분비를 위한 소낭 중의 패키징 중에, 또는 분비후 곧바로, 일부 면역글로불린 분자(102)를 도 1B에 묘사된 바와 같이 면역글로불린-포획 분자(103)에 의해 세포 표면상에서 유지시킨다. 이어서 표지된 항원(104)(예를 들어, 형광-표지된 항원)을 도 1C에 묘사된 바와 같이, 상기 ASCs의 세포 표면상의 면역글로불린-포획 분자(103)의 면역글로불린-결합 부분에 결합된 면역글로불린 분자(항체)(102)에 결합되게 한다. 이어서 항원-특이성 ASCs를 상기 세포 표면상에 포획된 면역글로불린-포획 분자(102)의 면역글로불린-결합 부분에 결합된 표지된 항원(104)에 의해 식별한다. 상기 ASCs상에 결합하는 항원의 검출은, 예를 들어 형광단 또는 다른 리포터 분자로 직접 표지된 항원을 사용하여 수행한다. 이어서 표지된 항원과 결합하는 ASCs를, 예를 들어 당해 분야에 공지된 세포-분류 기법에 의해 정제한다.

[0047] 이어서 특정한 항원에 특이적인 항체를 발현하는 상기 정제된 ASCs는 골수종 또는 형질세포종 세포와의 융합에

의해 고정화시키거나, 또는 면역글로불린을 암호화하는 서열의 라이브러리의 생성을 위해 핵산(DNA 또는 mRNA)의 공급원으로서 직접 사용할 수 있다.

[0048] 정제된 ASCs로부터의 라이브러리는 한정된 특이성(즉, 상기 정제 공정에 사용되는 항원에 대한 특이성)의 항체를 암호화하는 재배열된 면역글로불린 유전자를 함유한다. 상기 V_H 및 V_L 유전자를 생물정보학 데이터 마이닝과 결합된 심층 서열분석에 의해 상기 항원-특이성 ASCs로부터 식별할 수 있다(예를 들어, 문헌[Haessler and Reddy, Methods in Molecular Biology 1131:191-203 (2014)]을 참조한다). 한편으로, 상기 항원-특이성 ASCs를 개별적으로 분류할 수 있다. 이어서 각 ASCs 특유의 V_H 및 V_L 도메인을 확립된 RT-PCR 또는 단-세포 클로닝에 적응된 cDNA 단부의 5' 고속 증폭(5' RACE) 기법을 통해 클로닝한다(리뷰를 위해서, 예를 들어 문헌[Tiller, et al., New Biotechnology 5:453-7 (2011)]을 참조한다). 더욱 또 다른 대안에서, 상기 V_H 및 V_L 서열을 미국특허 제 9,328,172 호; 미국특허 제 8,309,035 호; 및 미국특허 제 8,309,317 호에 기재된 방법 및 물질을 사용하여 식별할 수 있다.

[0049] 면역글로불린-포획 분자

[0050] 세포 표면에서 발현되는 본 발명의 면역글로불린-포획 분자는 적어도 2개의 성분을 포함하며, 바람직한 실시태양에서 하기에 상세히 기재하는 바와 같이 추가적인 성분들을 포함할 수도 있다. 간단한 형태로, 상기 면역글로불린-포획 분자는 세포 표면 구속(cell surface tether) 성분 및 면역글로불린-결합 성분을 포함한다. 상기 세포 표면 구속 성분은 세포 표면 막 중에 상기 발현된 면역글로불린-결합 성분을 구속하거나 고정시키는 막횡단 펩티드 도메인을 포함하거나, 또는 상기 세포 표면 구속 성분은 상기 면역글로불린-결합 성분을 화학 결합을 통해 세포 표면막에 구속되게 하는 화학적 부분(예를 들어, 글리코실포스파티딜이노시톨)을 포함할 수 있다. 이들 성분 외에, 본 발명의 면역글로불린-포획 분자는 줄기 성분, 하나 이상의 링커 성분, 및/또는 리포터 펩티드를 포함할 수 있다.

[0051] 하나의 실시태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는 자연적으로 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역에 대해 친화성을 갖는 하나 이상의 세균성 단백질로부터 유래된 하나 이상의 면역글로불린-결합 도메인 또는 부분으로 이루어진다. 상기와 같은 면역글로불린-결합 단백질은 비제한적으로 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 단백질 A, 그룹 C 및 G 스트렙토코커스(*Streptococci*)로부터의 단백질 G, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터의 단백질 H, 또는 펩토스트렙토코커스 마그너스(*Peptostreptococcus magnus*)로부터의 단백질 L을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는 2개 이상의 상이한 세균성 단백질로부터 유래된 2개 이상의 면역글로불린-결합 도메인을 포함하는 하이브리드 분자로서 발현된다. 일례로서, 상기 포획 분자는 단백질 G로부터의 2개의 면역글로불린-결합 도메인 및 단백질 A로부터의 2개의 면역글로불린-결합 도메인을 함유하는 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 상기 실시태양의 일부 태양에서, 상기 세균성 면역글로불린-결합 단백질 도메인 중 하나 이상을, 예를 들어 진핵생물 세포에서의 글리코실화 또는 다른 번역-후 변형을 위해 잠재적인 부위를 제거하거나, 몇몇 면역글로불린 아이소타입에 대한 친화성을 개선시키거나, 또는 코돈 최적화에 의해 포유동물 세포에서 번역 효율을 개선시키기 위해 변형시킨다.

[0052] 또 다른 실시태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는 단-쇄 가변 단편(single-chain variable fragment, scFv)으로 이루어진다. 상기 scFv는 또 다른 면역글로불린 분자(예를 들어, 모든 쥐 IgG 아이소타입 중에 존재하는 공통적인 에피토프)의 중쇄 또는 경쇄 불변 영역에 대한 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주로부터 유래된 V_H 및 V_L 도메인의 융합 단백질로서 발현된다. 일부 태양에서, 상기 scFv 포획 분자는 어느 한 순서로 글리신/세린-풍부 링커 서열에 의해 V_L 도메인에 직렬로 연결된 V_H 도메인을 포함한다. 상기 글리신/세린-풍부 링커 서열은 비제한적으로 $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$ [서열번호 29에서와 같이] 또는 $(Gly\text{-}Ser)_n$ [서열번호 28에서와 같이]의 반복을 포함한다.

[0053] 일부 실시태양에서, 막횡단 도메인을 암호화하는 폴리펩티드 서열을, 세포 표면상에 상기 면역글로불린-포획 분자를 구속시키기 위해서 상기 면역글로불린-결합 도메인에 융합시킨다. 바람직하게는 상기 실시태양에서, 상기 막횡단 도메인은 불활성이며(세포 신호전달 기능이 결여됨) 내면화되기 쉽지 않다. 상기와 같은 막횡단 도메인은 인공 서열, 또는 주 조직적합성 부류 I(MHC I)로부터의 동기, IgSF 분자, 예를 들어 림프구-활성화 유전자 3(LAG3 또는 CD223), 또는 임의의 종의 임의의 다른 막횡단 단백질(단백질 번역시 형질막에 자연적으로 삽입된다)일 수 있다.

[0054] 다른 실시태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는, 상기 면역글로불린-결합 도메인 외에, 예를 들어 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)(이때 GPI는 상기 면역글로불린-포획 분자의 구속 부분으로서 작용한다)에 의한 번역-후 변형을 위한 C-말단 펩티드 서열을 함유한다. GPI는 포스포에탄올아민기, 트리만노실-비아세틸화된 글루코스아민(Man_3-GlcN) 코어, 및 상기 단백질을 형질막에 구속시키는 포스파티딜이노시톨기를 포함하는 통상적인 번역-후 부분이다. 상기 GPI의 포스포에탄올아민기를 포스포디에스테르 결합을 통해 단백질 C-말단에 연결한다. 상기 GPI 구속 서열은 상기 번역-후 공정에 의해 상기 ASCs 형질막에 자연적으로 고정되는 단백질의 C-말단으로 이루어질 수 있다. 표 3은 상기 면역글로불린-포획 분자를 구성하는데 사용될 수 있는 예시적인 GPI 구속 또는 고정 서열을 나열한다.

[0055] 몇몇 실시태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자는 구조적 유연성 및 지지뿐만 아니라, 세포외 공간으로의 증가된 노출을 위해 "줄기" 구조를 함유한다. 상기 세포 표면은 다양한 분자들이 편재하여 모여있기 때문에, 상기 면역글로불린-포획 분자상에 포획된 면역글로불린은 입구에서부터 세포외 공간 중의 그의 동족 항원까지 상기 ASCs 표면상의 다른 분자들에 의해 차단될 수도 있다. 따라서, 상기 면역글로불린-포획 분자 중에 긴 줄기가 포함되면, 상기 표출된 면역글로불린에 의한 항원 결합을 손상시키는 임의의 입체 장애를 완화시킬 수 있다. 본 발명의 바람직한 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자의 줄기는 하나 이상의 IgSF 단백질로부터 유래된 하나 이상의 면역글로불린 도메인을 포함한다. 이들 도메인의 예는 비제한적으로 CD2, CD4 또는 CD22의 면역글로불린 도메인을 포함한다. 추가로, 상기 면역글로불린-포획 분자의 줄기는 2개 이상의 서브유닛의 거대분자 복합체로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 상기 ScFv-함유 포획 분자의 줄기는 IgG 분자의 힌지 영역뿐만 아니라 C_H2 및 C_H3 도메인으로 이루어질 수 있으며; 따라서 상기 면역글로불린-포획 분자는 동종이량체로서 발현된다.

[0056] 면역글로불린-포획 분자의 발현

[0057] 본 발명의 몇몇 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자의 발현은 ASCs에서 고도로 발현되지만, 미성숙 B 세포 또는 항원-미경험 성숙 B 세포에서는 발현되지 않는 유전자로부터 유래된 프로모터에 의해 구동된다. 이들 유전자는 비제한적으로 B 림프구-유도된 성숙 단백질 1(*B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1, Blimp1*), 신데칸 *1*(*Syndecan 1, Sdc1*), 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 17(*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 17, Tnfrsf17*), 및 퓨코실트랜스퍼라제 1(*Fucosyltransferase 1, Fut1*)을 포함한다. ASCs 발현을 위해 선택된 유전자는 마우스 기원의 것이거나, 또는 상기 유전자가 적합하게 보존된 발현 패턴을 보이는 또 다른 종으로부터의 것일 수 있다.

[0058] 몇몇 다른 태양에서, 상기 면역글로불린-포획 분자의 발현은 유도성 프로모터, 예를 들어 테트라사이클린- 또는 타목시펜(tamoxifen)-유도성 시스템에 의해 구동된다. 상기 유도성 프로모터를 사용하여 직접적으로 또는 Cre와 같은 리콤비나제의 발현을 통해 간접적으로 상기 면역글로불린-포획 분자의 발현을 구동한다(예를 들어, 문헌[Albanese, et al., *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13:129-141 (2002)]; 문헌[Sakai, *Methods in Molecular Biology*, 1142:33-40 (2014)]을 참조한다). ASCs에서의 상기와 같은 유도성 발현은 트랜스제닉 동물에서 또는 ASCs의 배양 도중 뿐만 아니라 하이브리도마 배양 단계에서 시험관내에서 수행된다.

[0059] 세포 표면상에서 상기 면역글로불린-포획 분자를 발현시키기 위해서, 소포체에서의 단백질 번역을 위해 신호 펩티드를 포함시킨다. 상기 신호 펩티드는 공통 서열 또는 세포 표면 또는 분비된 단백질의 부분으로서 자연적으로 존재하는 것일 수 있다. 본 발명의 바람직한 태양에서, 상기 신호 펩티드는 면역글로불린 중쇄[서열번호 5-7에서와 같은] 또는 경쇄 단백질[서열번호 1-3에서와 같은]의 것으로부터 유래된다.

[0060] 일부 태양에서, 상기 발현 벡터는 상기 면역글로불린-포획 분자 외에, 리포터 단백질, 예를 들어 GFP, 적색 형광 단백질(RFP) 등에 대한 개방-판독 프레임을 포함할 수 있다. 상기 발현 구조물 중의 리포터 유전자는 예를 들어 IRES 서열 또는 피코르나바이러스 2A 리보솜 스킵 서열을 통해 상기 면역글로불린-포획 분자에 연결된다. 상기 리포터 유전자의 발현은 항원-특이성 ASCs를 분류하기 위한 항원 선택과 병용할 때 개선된 순도를 허용한다.

[0061] 상기 면역글로불린-포획 분자의 발현을 위해 제공되는 트랜스유전자는 상기 면역글로불린-포획 분자에 대한 암호화 서열을 ASCs에서 고도로 발현되는 유전자(예를 들어, *Blimp1* 또는 *Tnfrsf17*)를 함유하는 게놈 DNA의 큰 조각내로 삽입시킴으로써 생성된다. 상기 삽입은 암호화 단편의 단부에 달린 서열에 의해 매개되는 상동성 재조합에 의해, 또는 다른 표준 분자 생물학 접근법에 의해 수행할 수 있다. 상기 게놈 DNA의 큰 조각들이 세균성 인공 염색체 벡터내에, 예를 들어 상업적으로 또는 공개적으로 이용 가능한 게놈 DNA 라이브러리로부터 수득될 수 있는 이들 벡터내에 상기의 DNA의 조각들이 함유될 수 있다.

[0062] 상기 면역글로불린-포획 분자를 발현하는 트랜스제닉 마우스(또는 다른 동물)를, 본 명세의 관독시 당해 분야의 숙련가들에 의해 이해되는 바와 같이, 공지된 기법을 사용하여 필요한 기술과 함께 임의의 설비에 의해 생성시킬 수 있다. 상기 트랜스유전자를 지니는 동물의 분석을 표준 방법, 예를 들어 면역형광 현미경검사, 유식 세포측정 및/또는 면역블럿팅을 사용하여 수행한다.

[0063] 도 2A 및 2B에 하나의 실시태양에 따른 면역글로불린-포획 분자의 트랜스유전자(201) 및 발현 구조물(202)을 예시한다. 상기 트랜스유전자(201)는 사이에 있는 인트론(203)[서열번호 5-7]과 함께 2개의 엑손을 포함한다. 첫 번째 엑손 및 두 번째 엑손의 시작은 리더 펩티드(예를 들어, V_H 리더 펩티드)를 암호화한다. 상기 리더 펩티드-암호화 서열과 연속적으로 하기의 성분들을 암호화하는 서열들이 이어진다: 하나 이상의 세균성 단백질로부터 유래된 하나 이상의 면역글로불린-결합 도메인(204)[예를 들어, 서열번호 8-11 중에서 선택된 서열], 글리신/세린-풍부 링커(205)[예를 들어, 서열번호 12 또는 13 중에서 선택된 서열], "줄기" 구조 또는 영역(206)[예를 들어, 서열번호 14-16 중에서 선택된 서열], 및 막횡단 도메인(207)[예를 들어, 서열번호 17-20 중에서 선택된 서열]. 단백질 번역에 이어서, 상기 리더 펩티드가 상기 면역글로불린-포획 분자(202)로부터 절제되고, 이는 형질막(212)에 구속된 세포 표면 단백질로서 발현된다. 도시된 면역글로불린-포획 분자(202)의 각 성분들(208 내지 211)은 면역글로불린-결합 도메인(208)[예를 들어, 서열번호 24-27 중에서 선택된 서열], 글리신/세린-풍부 링커(209)[예를 들어, 서열번호 28 또는 29 중에서 선택된 서열], 줄기(210)[예를 들어, 서열번호 30-32 중에서 선택된 서열], 및 막횡단 도메인(211)[예를 들어, 서열번호 33-36 중에서 선택된 서열]이다.

[0064] 도 2A에 예시된 면역글로불린-포획 분자(도 2B에 예시된 발현된 구조물을 갖는다)의 성분들에 대한 예시적인 핵산 서열을 표 1에 나열한다. 상기 면역글로불린-포획 분자를, 표 1로부터의 각 성분에 대해 가능한 다수의 옵션들 중 하나의 서열을 함께 도 2A에 묘사된 순서로(즉 N-말단에서부터 C-말단으로) 조합함으로써 조립할 수 있다. 예를 들어, 작은 면역글로불린-포획 분자는 줄기 없이 단백질 G의 단지 2개의 면역글로불린-결합 도메인, $(글리신-세린)_3$ 링커, 및 막횡단 도메인으로 이루어질 수 있는 반면; 보다 큰 것은 5개의 단백질 A 면역글로불린-결합 도메인뿐만 아니라 4개의 단백질 G 면역글로불린-결합 도메인, $(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_3$ 링커, 6개의 면역글로불린 폴드로 구성된 인간 CD22 줄기, 및 긴 인간 CD7 막횡단 도메인을 함유할 수 있다.

[0065] 면역글로불린-포획 분자의 또 다른 실시태양의 발현 구조물 및 분자 구조를 도 3A 및 3B에 예시한다. 본 발명의 상기 실시태양에서, 트랜스유전자(301)는 유사하게, 사이에 있는 인트론(303)과 함께 2개의 엑손에 의해 암호화되는 리더 서열, 이어서 면역글로불린 분자의 일부(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 보존된 부분)에 대한 특이성을 갖는 scFv의 성분들: V_H(304), 글리신/세린-풍부 링커(305), 및 V_L(306)을 암호화하는 서열을 포함한다. 상기 면역글로불린-포획 분자의 세포외 공간내로의 연장된 돌출을 위해서, 면역글로불린 분자의 Fc 단편(308)뿐만 아니라 힌지(307)를 포함하는 줄기를 암호화하는 서열을 상기 scFv-암호화 서열에 붙인다. 최종적으로, 막횡단 도메인을 암호화하는 하나 이상의 엑손(309)을 또한 상기 발현 구조물(301)에 포함시킨다. 도 3B에 2개의 서브유닛의 동종이량체로서 발현된 면역글로불린-포획 분자(302)(각각의 서브유닛은 힌지(313)에 연결된 scFv의 V_L(310) 도메인, 글리신/세린-풍부 링커(311), 및 V_H(312) 도메인으로 이루어진다) 및 면역글로불린 분자의 Fc(314)를 도시한다. 상기 면역글로불린-포획 분자의 면역글로불린-결합 부분의 2개의 서브유닛은 각 쇄의 힌지 영역(313)에서 디설파이드 결합을 통해 공유 결합된다. 상기 발현된 면역글로불린-포획 분자는 막횡단 도메인(315)에 의해 형질막(316)내로 구속되거나 고정된다.

[0066] 도 4는 면역글로불린-포획 분자의 scFv 실시태양에 의한 세포 표면상의 면역글로불린-포획 분자의 제시를 예시한다. 앞서 입증된 바와 같이, 항체-분비 세포(401)는 통상적으로 항원 수용체의 막-결합된 형태를 발현하지 않으며 이들이 분비하는 면역글로불린 분자(402)를 세포 표면상에 표출시키는 능력이 없다. 상기 면역글로불린-포획 분자(403)의 scFv 버전의 발현은 상기 면역글로불린 분자(402) 중 일부를, 상기가 소포체에서 합성되고 후속적으로 분비를 위해 소낭에서 패키징될 때, 또는 그의 분비 후 곧바로 세포 표면상에서 유지되게 한다. 이어서 항원-특이성 ASCs를, 상기 세포 표면상에 포획된 면역글로불린 분자(402)에 대한 항원(404)의 결합에 의해 식별한다. 상기 ASCs상의 항원 결합의 검출은 형광단 또는 임의의 다른 리포터 분자에 의해 직접 표지된 항원을 사용하여 수행한다.

[0067] 트랜스제닉 세포 라이브러리

[0068] ASCs 표면상의 관심 항체를 식별하기 위해 본 발명의 트랜스제닉 세포를 사용하여 발현 라이브러리, 바람직하게는 낮은 복잡성의 라이브러리를 생성시킨다. 따라서 본 발명은 또한 ASCs상에서 발현된 항원-특이성 항체의 식별을 위한 본 발명의 세포 기술을 사용하여 생성된 항체 라이브러리를 포함한다.

[0069] 트랜스제닉 동물

[0070] 본 발명은 또한 ASCs의 세포 표면상에서 면역글로불린-포획 분자를 발현하도록 변형시킨 트랜스제닉 동물을 제공한다.

[0071] 바람직한 태양에서, 본 발명의 트랜스제닉 동물은 인간 면역글로불린 영역을 추가로 포함한다. 다수의 방법들이 약물 발견을 목적으로 내인성 마우스 면역글로불린 영역을 인간 면역글로불린 서열로 교체시켜 부분적인 또는 완전한-인간 항체를 생성시키기 위해 개발되었다. 상기와 같은 마우스의 예는, 예를 들어 미국특허 제 7,145,056 호; 미국특허 제 7,064,244 호; 미국특허 제 7,041,871 호; 미국특허 제 6,673,986 호; 미국특허 제 6,596,541 호; 미국특허 제 6,570,061 호; 미국특허 제 6,162,963 호; 미국특허 제 6,130,364 호; 미국특허 제 6,091,001 호; 미국특허 제 6,023,010 호; 미국특허 제 5,593,598 호; 미국특허 제 5,877,397 호; 미국특허 제 5,874,299 호; 미국특허 제 5,814,318 호; 미국특허 제 5,789,650 호; 미국특허 제 5,661,016 호; 미국특허 제 5,612,205 호; 및 미국특허 제 5,591,669 호에 기재된 것들을 포함한다.

[0072] 항체 V_H 및 V_L 도메인을 암호화하는 엑손은 생식세포계열 DNA에 존재하지 않는다. 대신에, 각각의 V_H 또는 V_L 엑손을 각각 H 쇄 유전자 좌 중에 존재하는 무작위로 선택된 V, D 및 J 유전자, 또는 경쇄 유전자 좌 중의 무작위로 선택된 V 및 J 유전자의 재조합에 의해 생성시킨다. 상기 H 쇄 유전자 좌 중에 다수의 V, D 및 J 유전자 뿐만 아니라 각각의 L 쇄 유전자 좌 중에 다수의 V 및 J 유전자가 존재하며, 따라서 이는 H 쇄 VDJ 재배열의 순열이 L 쇄 VJ 유전자 재배열의 순열과 조합될 때, 개인당 막대한 항체 다양성 레퍼토리가 생성되게 한다.

[0073] 특히 바람직한 태양에서, 본 발명의 트랜스제닉 동물은 동시 계류중인 미국 공보 제 2013/0219535 호(내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같다. 상기와 같은 트랜스제닉 동물은 도입된 부분적인 인간 면역글로불린 영역을 포함하는 게놈을 가지며, 여기에서 상기 내인성 비-인간 V, D 및 J 유전자 암호화 서열은 내인성 비암호화 서열의 변경 없이 인간 기원의 것들로 교체되었다. 바람직하게, 본 발명의 트랜스제닉 세포 및 동물은 내인성 면역글로불린 유전자의 일부 또는 전부가 제거된 게놈을 갖는다.

[0074] 다른 태양들에서, 본 발명의 트랜스제닉 동물은 조류, 바람직하게는 닭이다.

[0075] 항체 생성에서의 용도

[0076] 시험관내 세포 배양은 다수의 치료학적 생물공학 산물 생산의 토대였으며, 세포 중 단백질 생성물의 생산 및 지지 배지내로의 방출을 수반한다. 배양물에서 성장하는 세포로부터 시간에 따른 단백질 생산의 양 및 질은 다수의 인자들, 예를 들어 세포 밀도, 세포주기 단계, 단백질의 세포 생합성 속도, 세포 생육성 및 증식을 지지하는데 사용되는 배지의 조건, 및 배양물에서 세포의 장수에 따라 변한다. (예를 들어, 문헌[Fresney, *Culture of Animal Cells*, Wiley, Blackwell (2010)]; 및 문헌[*Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*, Ozturk and Ha, Eds., CRC Press, (2006)]을 참조한다).

[0077] 몇몇 생성물, 예를 들어 단클론 항체에 대해서, 상기 생성물을 실제로 생산하는 세포의 존재 및 단백질-발현 효율의 증대가 효율적인 단백질 생산의 핵심 태양이다. 항체를 분비하는 ASCs의 표면상에서의 상기 항체의 포획은 상기 세포의 면역글로불린 특이성을 근거로 ASCs를 구별하는 기회를 제공하며, 이는 차례로 다양한 용도를 위해 항체의 생산을 최적화하고 증대시킬 기회를 제공한다.

[0078] 실시예

[0079] 하기의 실시예들은 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 본 발명의 수행 및 사용 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되며, 이들은 발명자들이 그의 발명으로서 간주하는 것의 범위를 제한하지도 않고, 하기의 실험들이 모두 또는 오직 수행되는 실험만을 나타내거나 의미하고자 하는 것도 아니다. 당해 분야의 숙련가들은 광범위하게 기재되는 바와 같은 본 발명의 기술사상 또는 범위로부터 이탈됨이 없이 구체적인 실시태양들에 나타낸 바와 같은 본 발명에 대해 다양한 변화 및/또는 변형을 수행할 수 있음을 알 것이다. 따라서 본 실시태양들은 모든 면에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주해야 한다.

[0080] 사용되는 용어 및 숫자(예를 들어, 벡터, 양, 온도 등)에 관하여 정확성을 보장하기 위한 노력이 수행되었지만, 일부 실험 오류 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이며, 온도는 섭씨이고, 압력은 대기압 또는 대기압에 가까운 압력이다.

[0081] 실시예 1: 최소 단백질 G-함유 막-결합된 면역글로불린-포획 분자의 발현

[0082] 줄기 없이 면역글로불린-포획 분자의 작은 막-결합된 형태를 암호화하는 발현 벡터를 직접적인 DNA 합성 또는

표준 분자 클로닝 기법에 의해 생성시킨다. 상기 벡터(501)의 단백질-암호화 부분의 다이어그램을 도 5A에 도시한다. 상기 발현 벡터는 인간 LAG3(또는 CD223) 단백질(506)[서열번호 17]로부터 유래된 막에 걸쳐 있는 도메인에 의해 세포 표면에 구속된 스트렙토코커스 단백질 G(504)[서열번호 8]의 2개의 면역글로불린-결합 도메인을 암호화한다. Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser 서열(505)[서열번호 28]로 이루어지는 짧은 링커를 암호화하는 DNA의 단편을 단백질 G 면역글로불린-결합 도메인(504)을 암호화하는 DNA 단편과 막횡단 도메인(506) 사이에 놓아, 상기 발현된 단백질에 구조적 유연성을 제공한다. 최종적으로, 신호 펩티드(리더 펩티드)(503)를 암호화하는 서열을 상기 구조물에 포함시켜 상기 면역글로불린-포획 분자를 그의 생합성 동안 소포체의 내강내로 압출되게 한다. 본 실시예의 신호 펩티드 서열은 그의 고유 인트론(503)[서열번호 1-3]을 포함하는 면역글로불린 경쇄 가변(V_L) 유전자 조각으로부터 유래된다. 상기 프로모터를 (502)로 나타낸다. 본 실시예에서 면역글로불린-포획 분자를 포함하는 다양한 성분들의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 각각 표 1 및 표 2에 명시한다.

[0083] 상기 발현 벡터를 일렉트로포레이션과 같은 통상적으로 입수할 수 있는 방법을 사용하여 다양한 골수종, 하이브리도마 또는 다른 세포주내로 형질감염시킨다. 이어서 상기 형질감염된 세포를 막 단백질 분획의 면역형광 현미경검사, 유식 세포측정, 및/또는 면역블럿팅과 같은 과정을 사용하여 상기 면역글로불린-포획 분자의 표면 발현에 대해 검사한다. 상기 세포를 상기 형질감염된 세포에 의해 생성되거나 그에 부가된 면역글로불린을 유지하는 상기 세포 표면 면역글로불린-포획 분자의 능력에 대해 상기 과정들의 부분집합을 사용하여 추가로 분석한다.

[0084] 도 5B는 형질세포종 세포주에서 상기 작은 면역글로불린-포획 분자의 발현 및 세포 표면상에서 면역글로불린 분자를 유지하는 그의 능력을 예시한다. 인간 RPMI 8226(ATCC(등록상표) CCL-155(상표)) 세포를 *Blimp1* 프로모터(502)의 조절하에서 상기 면역글로불린-포획 분자(501)를 암호화하는 DNA 플라스미드로 형질감염시켰다. 상기 세포를 또한 마우스 IgG를 암호화하는 플라스미드로 동시-형질감염시켰다. 형질감염되지 않은 세포(상부, (507))에 비해, 상기 형질감염된 세포들(기부, (508))은 세포 표면상에서 포획된 면역글로불린을 나타낸다.

[0085] 이어서 트랜스제닉 동물을 ASCs 상에서 단백질 G를 함유하는 막-결합된 면역글로불린-포획 분자를 발현하도록 생성시키고, ASCs상의 면역글로불린을 포획하는 상기 트랜스유전자-암호화된 분자의 능력을 표준 유식 세포측정에 의해 상기 트랜스제닉 마우스로부터 채취한 ASCs상에서 직접 측정한다.

[0086] 실시예 2: 줄기를 함유하는 단백질 G-함유 막-결합된 면역글로불린-포획 분자의 발현.

[0087] 긴 줄기를 함유하는 면역글로불린-포획 분자의 막-결합된 형태를 암호화하는 발현 벡터를 직접 DNA 합성 또는 표준 분자 클로닝 기법에 의해 생성시킨다. 상기 발현 벡터는 스트렙토코커스 단백질 G[서열번호 9]의 C-말단 절반으로부터 유래된 3개의 면역글로불린-결합 도메인을 암호화한다. Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser[서열번호 28] 서열로 이루어지는 짧은 링커, 인간 CD22 단백질[서열번호 16]로부터 유래된 6개의 면역글로불린 도메인으로 이루어지는 줄기 및 인간 CD58[서열번호 18]로부터 유래된 막횡단 도메인을 암호화하는 DNA 단편들을 상기 벡터의 면역글로불린-결합 도메인-암호화 DNA 단편에 붙인다. 최종적으로, 신호 펩티드(리더 펩티드)를 암호화하는 서열을 상기 면역글로불린-포획 분자의 전체 개방-판독 프레임 앞에 놓아, 그의 생합성 동안 소포체의 내강내로의 상기 번역된 단백질의 압출을 허용한다. 본 실시예에서 상기 신호 펩티드를 암호화하는 서열들은 면역글로불린 중쇄 가변(V_H) 유전자 조각으로부터 유래하며, 그의 고유 인트론[서열번호 5-7]을 포함한다. 본 실시예에서 상기 면역글로불린-포획 분자를 포함하는 성분들의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들을 각각 표 1 및 표 2에 명시한다.

[0088] 상기 발현 벡터를 일렉트로포레이션과 같은 통상적으로 입수 가능한 방법을 사용하여 다양한 골수종, 하이브리도마 또는 다른 세포주내로 형질감염시킨다. 이어서 상기 형질감염된 세포를 상기 세포막 단백질 분획의 면역형광 현미경검사, 유식 세포측정 및 면역블럿팅과 같은 과정을 사용하여 상기 단백질 G 분자의 표면 발현에 대해 검사한다. 상기 세포를 상기 형질감염된 세포에 의해 생성되거나 그에 부가된 면역글로불린을 포획하는 상기 세포 표면 단백질 G의 능력에 대해 상기 과정들의 부분집합을 사용하여 추가로 분석한다.

[0089] 이어서 트랜스제닉 동물을 ASCs에서 단백질 G, CD22 및 CD58 융합으로 이루어지는 막-결합된 면역글로불린-포획 분자를 발현하도록 생성시키고, ASCs상의 면역글로불린을 포획하는 상기 트랜스유전자-암호화된 분자의 능력을 표준 유식 세포측정에 의해 상기 트랜스제닉 마우스로부터 채취한 ASCs상에서 직접 측정한다.

[0090] 실시예 3: GPI 번역-후 변형에 의해 막에 고정된 단백질 G-함유 면역글로불린-포획 분자의 발현

[0091] 스트렙토코커스 단백질 G로부터 유래된 2개의 면역글로불린-결합 도메인을 암호화하는 발현 벡터를 합성한다.

상기 발현 벡터에서 상기 단백질 G-암호화 서열의 하류에, Gly/Ser-풍부 링커 서열, 인간 CD4의 2개의 면역글로불린 도메인으로 이루어지는 줄기, 및 GPI 고정 서열을 암호화하는 DNA 단편들을 포함시킨다. 최종적으로, 신호 펩티드 서열(리더 서열)을 상기 구조물에 포함시켜 그의 생합성 동안 소포체의 내강내로의 상기 번역된 단백질의 압출을 허용한다. 본 실시예에서 상기 신호 펩티드를 암호화하는 서열들은 면역글로불린 경쇄 가변(V_L) 유전자 조각으로부터 유래하며 그의 고유 인트론을 포함한다. 본 실시예에서 상기 면역글로불린-포획 분자를 포함하는 성분들의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들을 각각 표 1 및 표 2에 명시한다. 상기 GPI 고정 서열을 표 3에 명시한다.

[0092] 상기 발현 벡터를 일렉트로포레이션과 같은 통상적으로 입수 가능한 방법을 사용하여 다양한 골수종, 하이브리도마 또는 다른 세포주내로 형질감염시킨다. 이어서 상기 형질감염된 세포를 상기 세포막 단백질 분획의 면역형광 현미경검사, 유식 세포측정 및 면역블럿팅과 같은 과정을 사용하여 상기 단백질 G 분자의 표면 발현에 대해 검사한다. 상기 세포를 상기 형질감염된 세포에 의해 생성되거나 그에 부가된 면역글로불린을 포획하는 상기 세포 표면 단백질 G의 능력에 대해 상기 과정들의 부분집합을 사용하여 추가로 분석한다.

[0093] 이어서 트랜스제닉 동물을 ASCs에서 GPI-고정된 면역글로불린-포획 분자를 발현하도록 생성시키고, ASCs의 표면상의 면역글로불린을 포획하는 상기 트랜스유전자-암호화된 분자의 능력을 표준 유식 세포측정에 의해 상기 트랜스제닉 마우스로부터 채취한 ASCs상에서 직접 측정한다.

[0094] 실시예 4: 면역글로불린 불변 영역에 특이적인 항체로부터 유래된 막-결합된 scFv의 발현.

[0095] 면역글로불린의 불변 도메인에 특이적인 scFv를 암호화하는 발현 벡터를 표준 분자 클로닝 또는 직접적인 DNA 합성에 의해 생성시킨다. 본 실시예에서, 단쇄 항체는 마우스 카파 경쇄의 불변 도메인에 특이적이며, 이는 정상적인 마우스에서 발견되는 항체의 90%를 초과하여 존재한다. 상기 scFv를 암호화하는 엑손은 V_L, 링커 및 V_H 서열[각각 서열번호 43-48에 명시됨]을 포함한다. 상기 발현 벡터에서 상기 scFv-암호화 서열의 하류에, 상기 분비된 형태의 힌지 영역, C_H2 도메인 및 C_H3 도메인으로 이루어지는 래트 IgG1의 Fc 부분을 암호화하는 연속적인 서열을 포함시킨다. 상기 래트 IgG1 Fc-암호화 서열을 [서열번호 49]에 명시한다. 상기 벡터는 또한 [서열번호 50-54]에 명시된, 마우스 주 조직적합성 복합체 I 부류 단백질(b 일배체형으로부터의 마우스 K 분자)의 막횡단 도메인을 암호화하는 서열을 포함한다.

[0096] 상기 발현 벡터를 일렉트로포레이션과 같은 통상적으로 입수 가능한 방법을 사용하여 다양한 골수종, 하이브리도마 및 다른 세포주내로 형질감염시킨다. 상기 형질감염된 세포를 상기 세포막 단백질 분획의 면역형광 현미경검사, 유식 세포측정 및 면역블럿팅과 같은 과정을 사용하여 상기 단쇄 항체 분자의 표면 발현에 대해 검사한다. 상기 세포를 상기 형질감염된 세포에 의해 생성되거나 그에 부가된 면역글로불린을 포획하는 상기 세포 표면 단쇄 항체 분자의 능력에 대해 상기 과정들의 부분집합을 사용하여 추가로 분석한다.

[0097] 트랜스제닉 동물을 ASCs상에서 scFv-함유 면역글로불린-포획 분자를 발현하도록 생성시키고, ASCs의 표면상의 면역글로불린을 포획하는 상기 트랜스유전자-암호화된 분자의 능력을 표준 유식 세포측정에 의해 상기 마우스로부터 채취한 ASCs상에서 직접 측정한다.

[0098] 실시예 5: 관심 항원에 대한 단클론 항체를 생산하는 ASCs를 단리하기 위한 면역글로불린-포획 분자를 발현하는 트랜스제닉 동물의 용도.

[0099] 트랜스제닉 마우스를 인간 *TNFRSF17* 유전자의 프로모터, 예를 들어 실시예 1 내지 4에서와 같은 면역글로불린-포획 분자의 암호화 서열, IRES 서열 및 GFP를 함유하는 세균성 인공 염색체 벡터를 사용하여 생성시킨다. 다수의 트랜스제닉 창시자 계통으로부터 비장, 림프절, 및 골수를 수확하고, 처리하고, 표준 유식 세포측정에 의해 면역글로불린-포획 분자뿐만 아니라 GFP의 발현에 대해서 분석한다. 이어서 상기 트랜스제닉 마우스로부터의 GFP-양성 세포를 모으고, 분류하고, 면역글로불린을 분비하는 그의 능력에 대해서 효소-결합된 면역스폿(ELISPOT)에 의해 확인한다. 검출 가능한 수준의 GFP 및 상기 면역글로불린-포획 분자를 안정하게 발현하는 트랜스제닉 계통을 번식을 위해 선택한다.

[0100] 다 자란 트랜스제닉 마우스를 관심 항원으로 면역시킨다. 비장뿐만 아니라 적절한 림프절을 상기 면역된 마우스로부터 단리하고, 처리하고, 유식 세포측정 분석을 위해 염색하였다. 추가로, 상기 단리된 세포에 대해 상기 유식 세포측정 염색 동안 항원 결합을 수행한다. 상기 항원을 형광단으로 또는 표지된 아비딘, 스트렙트아비딘 또는 유사한 시스템과 함께 사용하기 위해 비오틴으로 직접 표지한다. ASCs를 GFP-양성 염색뿐만 아니라 항원-양성 염색을 근거로 분류한다.

[0101] 이어서 상기 정제된 ASCs를 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 친숙한 확립된 방법을 사용하여 골수종 세포에 융합시켜 하이브리도마 세포를 생성시킨다. 본 발명에서, 상기 면역글로불린-포획 분자를 발현시키기 위해 제공된 방법은 또한 상기 세포 표면상에 포획된 항원의 양성 염색뿐만 아니라 GFP 발현에 근거한 하이브리도마 세포의 선별을 허용한다.

[0102] 한편으로, 상기 정제된 ASCs를 개별적으로 분류하고, 그의 V_H 및 V_L 도메인을 암호화하는 유전자를 RT-PCR 또는 단세포에 적응된 5' RACE 기법을 통해 클로닝한다. 상기 클로닝된 V_H- 및 V_L- 암호화 서열을, 각각 목적하는 중쇄 및 경쇄의 불변 영역을 암호화하는 서열을 함유하는 발현 벡터내에 서브클로닝한다. 상기 V_H- 및 V_L-발현 벡터를 HEK-293T 또는 CHO 세포주내로 형질감염시키고, 분비된 단클론 항체들을 항원 결합 및 다른 기능에 대해 추가로 시험한다.

[0103] [표 1]

[0104] 예시적인 핵산 서열들

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
1	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_L 리더 엑손 1	도 2A, 203 도 3A, 303 도 5A, 503	ATGGACATCAGGGCTCCTGCTCAGTTTCT TGGCATCTTGTTGCTCTGGTTTCCAG
2	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_L 인트론	도 2A, 203 도 3A, 303 도 5A, 503	GTAAAATGAACTAAAATGGGAATTTCAC TGTAAGTGTTGACAGGCATTTGGGGACT GTGTTCTTTTATCATGCTTACCTTTGTAG ATATTCATTATGTCTCCACTCCTAG
3	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_L 리더 엑손 2	도 2A, 203 도 3A, 303 도 5A, 503	GTGCCAGATGTGACATCCAGATG
4	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 FLAG+Myc 태그	도 2A, 203 도 3A, 303 도 5A, 503	GACTACAAGGATGACGACGACAAGGGCA GCGGCGAACAGAAGCTGATTTCGGAGGA GGACCTG
5	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_H 리더 엑손 1	도 2A, 203 도 3A, 303 도 5A, 503	ATGGGATGGAGCTGTATCATGCTCTTCTT GGCAGCAACAGCTACAG
6	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_H 인트론	도 2A, 203 도 3A, 303 도 5A, 503	GTAAGGGGCTCACAGTAGCAGGCTTGAG GTCTGGACATATACATGGGTGACAATGA CATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
7	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_H	도 2A, 203 도 3A, 303 도 5A, 503	GTGTCCACTCCCAGGTCCAACTG
8	Ig-결합 도메인 2-도메인 단백질 G	도 2A, 204 도 5A, 504	GGTACCCCAGCCGTGACCACCTACAAGC TCGTCATCAACGGAAAGACGCTCAAGGG CGAAACCACTACCAAGGCGGTGGATGCC GAAACCGCCGAAAAGGCCTTCAAGCAGT ACGCTAACGACAATGGGGTGGACGGAGT CTGGACGTACGATGATGCCACCAAGACT TTCACCGTGACCGAAGTGAACACTCCGG CCGTCACCACTTATAAGCTCGTGATCAAC GGGAAAACCCTGAAGGGAGAGACTACCA CAAAGGCCGTGGATGCTGAGACTGCAGA GAAGGCGTTCAAACAGTACGCCAACGAC

[0105]

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
			AACGGCGTGGACGGCGTCTGGACCTACG ATGACGCCACTAAGACCTTCACTGTGAC CGAA
9	Ig-결합 도메인 3-도메인 단백질 G	도 2A, 204 도 5A, 504	ATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTAA GACTGACACTTACAAATTAATCCTTAATG GTAAAACATTGAAAGGCGAAACAACTAC TGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAA AAAGTCTTCAAACAATACGCTAACGACA ACGGTGTTGACGGTGAATGGACTTACGA CGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTG AAAAACCAGAAGTGATCGATGCGTCTGA ATTAACACCAGCCGTGACAACTTACAAA CTTGTTATTAATGGTAAAACATTGAAAG GCGAAACAACTACTGAAGCTGTTGATGC TGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAA TACGCTAACGACAACGGTGTTGACGGTG AATGGACTTACGACGATGCGACTAAGAC CTTTACAGTTACTGAAAAACCAGAAGTG ATCGATGCGTCTGAATTAACACCAGCCG TGACAACTTACAAACTTGTTATTAATGGT AAAACATTGAAAGGCGAAACAACTACTA AAGCAGTAGACGCAGAAACTGCAGAAA AAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAA CGGTGTTGATGGTGTTTGGACTTATGATG ATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACTGA A
10	Ig-결합 도메인 2-도메인 단백질 A + 2-도메인 단백질 G	도 2A, 204 도 5A, 504	GTGGATAACAAGTTCAACAAGGAACAGC AGAACGCCTTTTACGAGATTCTGCATCTG CCCAACCTGAATGAGGAACAGCGGAACG CATTCATTCAGTCTCTGAAGGATGATCCT AGCCAGTCGGCCAACCTCCTGGCTGAAG CAAAGAAGCTGAACGATGCCCAAGCGCC CAAAGTGGACAACAAGTTTAACAAGGAG CAGCAGAATGCTTTCTACGAGATCCTGC ACCTCCCGAATCTGAACGAGGAGCAGAG AAACGCCTTCATCCAATCACTGAAGGAC GACCCGTCACAGTCCGCCAACCTTCTGGC GGAAGCCAAGAAACTGAACGACGCCCAG GCGCCAAAGGTGGACGGATCCGGGTCCG GCAGCGGTACCCCAGCCGTGACCACCTA CAAGCTCGTCATCAACGGAAAGACGCTC AAGGGCGAAACCACTACCAAGGCGGTGG ATGCCGAAACCGCCGAAAAGGCCTTCAA GCAGTACGCTAACGACAATGGGGTGGAC GGAGTCTGGACGTACGATGATGCCACCA AGACTTTCACCGTGACCGAAGTGAACAC

[0106]

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
			TCCGGCCGTCACCACTTATAAGCTCGTGA TCAACGGGAAAACCCTGAAGGGAGAGAC TACCACAAAGGCCGTGGATGCTGAGACT GCAGAGAAGGCGTTCAAACAGTACGCCA ACGACAACGGCGTGGACGGCGTCTGGAC CTACGATGACGCCACTAAGACCTTCACT GTGACCGAA
11	Ig-결합 도메인 5-도메인 단백질 A + 4-도메인 단백질 G	도 2A, 204 도 5A, 504	GCCAATGCCGCCCAGCACGACGAGGCTC AGCAGAACGCATTCTACCAGGTGCTGAA CATGCCAAACCTCAACGCCGATCAGCGC AATGGTTTCATTCAGTCCCTGAAGGACG ATCCGAGCCAGTCAGCTAACGTGCTCGG GGAGGCCCAAAAGCTGAATGACTCCCAG GCGCCGAAGGCCGACGCCCAGCAAAACA ACTTCAACAAGGATCAGCAATCCGCCTT CTATGAAATCCTGAATATGCCTAACCTGA ACGAAGCTCAGCGGAACGGGTTCATCCA GAGCCTTAAGGACGACCCTAGCCAGTCC ACCAACGTGCTGGGGGAGGCCAAGAAAC TTAACGAATCCCAGGCCCCGAAGGCGGA CAACAACTTTAACAAGGAACAGCAGAAC GCCTTTTACGAGATCCTCAACATGCCGAA CCTCAACGAGGAACAGCGCAACGGTTTC ATCCAGTCCCTGAAGGACGATCCATCCC AGTCCGCCAACCTGTTGAGCGAGGCGAA GAAGCTGAATGAGTCCCAAGCCCCCAAG GCTGACAACAAGTTCAATAAGGAACAAC AGAATGCCTTCTACGAAATTCTGCACTTG CCCAATCTGAACGAGGAGCAGCGCAACG GCTTCATCCAATCTCTGAAAGACGACCC GTCGCAGTCGGCCAACTTGCTGGCCGAA GCCAAGAAGCTCAACGACGCTCAGGCCC CTAAGGCCGACAACAAGTTCAACAAAGA GCAACAGAACGCGTTCTACGAGATTCTC CACTTGCCGAACCTGACCGAAGAACAAC GGAACGGATTCATTCAGAGCCTGAAGGA TGACCCTTCGGTGTCAAAGGAGATCCTG GCAGAAGCCAAAAAGCTGAACGATGCCC AGGCACCAAAGGAAGAGGACAACAACA AGCCGGGCGACCCGAGGATCTCCGAAGC CACTGATGGGCTGTCCGATTTTCTGAAGT CACAGACTCCTGCTGAGGACACCGTGAA GTCCATCGAGCTCGCCGAGGCCAAGGTG CTGGCCAACCGGGAGCTGGATAAGTACG GAGTGTCCGACTACTACAAAAACCTGAT TAACAACGCCAAGACTGTGGAAGGAGTG AAGGCATTGATCGATGAAATCCTGGCGG

[0107]

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
			CGCTCCCAAAAACCGACACCTACAAACT GATTCTCAACGGAAAGACGCTGAAGGGG GAAACTACCACCGAAGCGGTGGACGCCG CCACCGCCGAAAAGGTGTTTAAGCAGTA TGCTAACGACAACGGTGTCGACGGAGAG TGGACCTACGACGACGCCACTAAGACTT TCACCGTGACCGAGAAGCCCGAGGTCAT CGACGCGAGCGAGCTCACTCCCGCCGTG ACCACCTACAAGCTGGTCATCAATGGAA AGACTCTGAAGGGCGAAACTACTACTGA AGCCGTGGATGCGGCAACCGCCGAGAAA GTGTTCAAGCAATACGCAAACGATAACG GGGTGGACGGAGAGTGGACCTACGACGA TGCCACAAAGACCTTCACCGTCACCGAA AAGCCCGAAGTGATCGACGCTTCCGAAC TGACGCCGGCCGTGACAACTTACAAGCT CGTCATTAACGGAAAGACCCTTAAGGGC GAAACCACGACCAAGGCAGTGGACGCCG AAACTGCCGAGAAGGCGTTCAAGCAGTA CGCCAACGACAACGGCGTGGACGGAGTG TGGACTTACGATGATGCGACCAAGACGT TCACTGTGACCGAGATGGTCACCGAAGT GCCG
12	Gly/Ser 링커	도 2A, 205 도 3A, 305 도 5A, 505	GGATCCGGCTCCGGATCC
13	Gly/Ser 링커	도 2A, 205 도 3A, 305 도 5A, 505	GGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGC TCGGGAGGCGGAGGCTCG
14	줄기 래트 CD2	도 2A, 206 도 5A, 506	GAGATGGTGTCCAAGCCGATGATCTACT GGGAGTGTTCCAACGCGACTCTGACCTG TGAAGTGCTGGAGGGAACCGACGTGGAA CTGAAGCTGTACCAGGGTAAAGAACATC TGCGGTCGTTGCGCCAAAAGACCATGAG CTACCAGTGGACCAACTTGCGGGCGCCT TTCAAGTGCAAAGCCGTCAATAGAGTGT CCCAGGAGAGCGAAATGGAGGTCGTGAA CTGCCCCGAAAAGGGACTG
15	줄기 래트 CD4	도 2A, 206 도 5A, 506	TCAACTTCCATCACCGCCTACAAGAGCG AGGGAGAGAGCGCCGAGTTTTCCTTCCC CCTGAACCTGGGCGAAGAAAGCCTCCAG GGAGAACTGCGCTGGAAGGCAGAAAAG GCCCCAAGCTCTCAGTCCTGGATCACCTT CAGCCTGAAGAACCAGAAGGTGTCCGTG

[0108]

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
			CAGAAGTCCACTTCAAACCCGAAGTTCC AGCTCTCCGAAACCCTCCCTCTGACCCTG CAAATCCCTCAAGTGTCGCTGCAATTCGC GGGGAGCGGAAATCTGACTCTGACTCTT GACCGGGGCATCTTGTACCAGGAGGTGA ACCTGGTGGTCATGAAGGTGACCCAGCC CGATAGCAACACCCTGACCTGTGAAGTG ATGGGACCCACGTCCCCGAAGATGCGGC TCATTCTGAAGCAGGAGAACCAGGAGGC TCGGGTGTCCAGACAGGAAAAGGTCATC CAAGTGCAGGCCCCGGAAGCCGGCGTGT GGCAGTGCCTGCTGTCCGAGGGAGAGGA AGTCAAGATGGACTCGAAAATCCAGGTG CTGTCCAAAGGGCTGAACCAGACTATG
16	줄기 인간 CD22	도 2A, 206 도 5A, 506	GAAAGGCCTTTTCCACCTCATATCCAGCT CCCTCCAGAAATTCAAGAGTCCCAGGAA GTCACTCTGACCTGCTTGCTGAATTTCTC CTGCTATGGGTATCCGATCCAATTGCAGT GGCTCCTAGAGGGGGTTCCAATGAGGCA GGCTGCTGTCACCTCGACCTCCTTGACCA TCAAGTCTGTCTTCACCCGGAGCGAGCTC AAGTTCTCCCCACAGTGGAGTCACCATG GGAAGATTGTGACCTGCCAGCTTCAGGA TGCAGATGGGAAGTTCCTCTCCAATGAC ACGGTGCAGCTGAACGTGAAGCACACCC CGAAGTTGGAGATCAAGGTCACTCCCAG TGATGCCATAGTGAGGGAGGGGGACTCT GTGACCATGACCTGCGAGGTCAGCAGCA GCAACCCGGAGTACACGACGGTATCCTG GCTCAAGGATGGGACCTCGCTGAAGAAG CAGAATACATTCACGCTAAACCTGCGCG AAGTGACCAAGGACCAGAGTGGGAAGTA CTGCTGTCAGGTCTCCAATGACGTGGGCC CGGGAAGGTCGGAAGAAGTGTTCCTGCA AGTGCAGTATGCCCCGGAACCTTCCACG GTTCAGATCCTCCACTCACCGGCTGTGGA GGGAAGTCAAGTCGAGTTTCTTTGCATGT CACTGGCCAATCCTCTTCCAACAAATTAC ACGTGGTACCACAATGGGAAAGAAATGC AGGGAAGGACAGAGGAGAAAGTCCACA TCCCAAAGATCCTCCCCTGGCACGCTGG GACTTATTCCTGTGTGGCAGAAAACATTC TTGGTACTGGACAGAGGGGCCCGGGAGC TGAGCTGGATGTCCAGTATCCTCCCAAG AAGGTGACCACAGTGATTCAAAACCCCA TGCCGATTCGAGAAGGAGACACAGTGAC CCTTTCCTGTAACTACAATTCCAGTAACC

[0109]

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
			CCAGTGTTACCCGGTATGAATGGAAACC CCATGGCGCCTGGGAGGAGCCATCGCTT GGGGTGCTGAAGATCCAAAACGTTGGCT GGGACAACACAACCATCGCCTGCGCAGC TTGTAATAGTTGGTGCTCGTGGGCCTCCC CTGTCGCCCTGAATGTCCAGTATGCCCCC CGAGACGTGAGGGTCCGGAAAATCAAGC CCCTTTCCGAGATTCACTCTGGAAACTCG GTCAGCCTCCAATGTGACTTCTCAAGCAG CCACCCCAAAGAAGTCCAGTTCTTCTGG GAGAAAAATGGCAGGCTTCTGGGGAAAG AAAGCCAGCTGAATTTTGACTCCATCTCC CCAGAAGATGCTGGGAGTTACAGCTGCT GGGTGAACAACTCCATAGGACAGACAGC GTCCAAGGCCTGGACACTTGAAGTGCTG TATGCACCCAGGAGGCTGCGTGTGTCCA TGAGCCCGGGGGACCAAGTGATGGAGGG GAAGAGTGCAACCCTGACCTGTGAGAGC GACGCCAACCCTCCCGTCTCCCACTACAC CTGGTTTGACTGGAATAACCAAAGCCTC CCCTACCACAGCCAGAAGCTGAGATTGG AGCCGGTGAAGGTCCAGCACTCGGGTGC CTACTGGTGCCAGGGGACCAACAGTGTG GGCAAGGGCCGTTCGCCTCTCAGCACCC TCACCGTCTACTATAGCCCGGAGACC
17	막관통 도메인 인간 LAG3	도 2A, 207 도 5A, 507	GCGCCTGGAGCGCTGCCGGCCGGTCATC TGTTGTTGTTCCTGACCCTGGGGGTGCTG TCACTGCTGCTGCTCGTGACCGGGGCATT CGGTTTCCACCTGTGGAGAAGGCAGTGG CGGTAG
18	막관통 도메인 인간 CD58	도 2A, 207 도 5A, 507	CATTCCCGGCACCGCTACGCGCTGATTCC GATTCCTCTGGCCGTGATCACCACCTGTA TCGTGCTCTACATGAACGGTATCCTGAAA TGCGACAGAAAGCCCGACAGGACTAACA GCAATTAG
19	막관통 도메인 래트 CD2	도 2A, 207 도 5A, 507	CCGCTGTACCTGATCGTGGGGGTGTCAG CCGGCGGTCTGCTGCTCGTGTTCTTCGGG GCACTGTTCATCTTCTGCATTTGCAAGAG GAAGAAGCGGTAG
20	막관통 도메인 인간 CD7	도 2A, 207 도 5A, 507	CCACCCCGGGCGTCCGCACTGCCGGCGC CCCCTACCGGAAGCGCGCTGCCCGATCC GCAAACCGCCAGCGCCCTGCCTGACCCG CCCGCGGCTAGCGCCTTGCCTGCCGCACT GGCCGTGATTTCATTCCTGCTGGGTCTGG GGCTCGGGGGTGGCCTGCGTGTTGGCACG GACTCAGATCAAGAAGCTGTGCTCCTGG AGAGACAAAAACTCCGCCGCCTGTGTGG

[0110]

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
			TGTACGAGGACATGTCACACTCGAGGTG CAATACCCTGTCCTCGCCGAACCAGTACC AGTAG

[0111]

[0112] [표 2]

[0113] 예시적인 펩티드 서열들

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
21	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_L 리더 엑손		MGWSCIMLFLAATATGVHSQVQL
22	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 FLAG+Myc 태그		DYKDDDDKGSGEQKLISEEDL
23	리더 엑손 1/인트론/ 엑손 2/태그 V_H 리더 엑손		MDIRAPAQFLGILLLWFPGARCDIQM
24	Ig-결합 도메인 2-도메인 단백질 G	도 2B, 208	GTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYA NDNGVDGVWTYDDATKTFTVTEVNTPAVTTYKLVINGKT LKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWTYDDATK TFTVTE
25	Ig-결합 도메인 3-도메인 단백질 G	도 2B, 208	IDEILAALPKTDTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEK VFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEKPEVIDASELT PAVTTYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYAND NGVDGEWTYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKL VINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWT YDDATKTFTVTE
26	Ig-결합 도메인 2-도메인 단백질 A + 2-도메인 단백질 G	도 2B, 208	VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPS QSANLLAEAKKLNDAQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLP NLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPKV DGSGSGSGTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAE KAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTEVNTPAVTTYK LVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGVDGVW TYDDATKTFTVTE
27	Ig-결합 도메인 5-도메인 단백질 A + 4-도메인 단백질 G	도 2B, 208	ANAAQHDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDP SQSANVLGEAQKLNDSQAPKADAQQNNFNKDQQSAFYEI LNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQ APKADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKD DPSQSANLLSEAKKLNESQAPKADNKFNKEQQNAFYEIL HLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQA PKADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDD PSVSKEILAEAKKLNDAQAPKEEDNNKPGDPRISEATDG LSDFLKSQTPAEDTVKSIELAEAKVLANRELDKYGVSDY YKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPKTDTYKLILNGKT

[0114]

서열 번호	설명	상응하는 구조	서열
			LKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATK TFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTE AVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEKP EVIDASELTPAVTTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAE KAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTEMVTEVP
28	Gly/Ser 링커	도 2B, 209	GSGSGS
29	Gly/Ser 링커	도 2B, 209	GGGGSGGGGSGGGGS
30	줄기 래트 CD2	도 2B, 210	EMVSKPMIYWECSNATLTCEVLEGTDVELKLYQGKEHLR SLRQKTMSYQWTNLRAPFKCKAVNRVSQESEMEVVNCPE KGL
31	줄기 래트 CD4	도 2B, 210	STSITAYKSEGESAEFSFPLNLGEESLQGELRWKAEKAP SSQSWITFSLKNQKVSVQKSTSNPKFQLSETLPLTLQIP QVSLQFAGSGNLTLTLDRGILYQEVNLVVMKVTQPDSNT LTCEVMGPTSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAPE AGVWQCLLSEGEEVKMDSKIQVLSKGLNQTM
32	줄기 인간 CD22	도 2B, 210	MKVTQPDSNTLTCEVMGPTSPKMRLILKQENQEARVSRQ EKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGEEVKMDSKIQVLSKGLNQ TM
33	막관통 도메인 인간 LAG3	도 2B, 211	APGALPAGHLLLFLTLGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQWR
34	막관통 도메인 인간 CD58	도 2B, 211	HSRHRYALIPIPLAVITTCIVLYMNGILKCDRKPDRTNS N
35	막관통 도메인 래트 CD2	도 2B, 211	PLYLIVGVSAGGLLLVFFGALFIFCICKRKKR
36	막관통 도메인 인간 CD7	도 2B, 211	PPRASALPAPPTGSALPDPQTASALPDPPAASALPAALA VISFLLGLGLGVACVLARTQIKKLCSWRDKNSAACVVYE DMSHSRCNTLSSPNQYQ

[0115]

[0116] [표 3]

[0117] GPI 고정 서열들

서열 번호	설명	서열
37	인간 CD59	GAATTCCTTGAAAATGGTGGGACATCCTTATCAGAGAAAACAGTTCTTCTGCTGG TGACTCCATTTCTGGCAGCAGCCTGGAGCCTTCATCCC
38	인간 CD59	EFLENGGTSLSEKTVLLLVTPFLAAAWSLHP
39	인간 CD24	ACCAATGCCACAACAAAGGCAGCAGGGGGAGCACTCCAGTCAACAGCAAGTTTGT TTGTCGTGTCACTGAGTCTCTTGCATCTTTATTCA
40	인간 CD24	TNATTKAAGGALQSTASLFVVSLSLLHLYS
41	인간 CNTN1 (콘택틴 1)	GTCTCCCAGGTGAAAATTTCAGGAGCCCCTACCCTCTCCCCATCCCTCCTGGGTT TGCTGCTGCCCGCCTTTGGCATTCTCGTGTATCTGGAGTTC
42	인간 CNTN1 (콘택틴 1)	VSQVKISGAPTLSPSLLGLLLPAFGILVYLEF

[0118]

[0119] [표 4]

[0120] 실시예 4 서열들

서열 번호	설명	서열
43	V_L 리더 엑손 1	ATGGAATCACAGACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTG
44	V_L 인트론	GTAAGAAATTTAAAGTATTAAAACCTTTTCAAAGTTTCATCTTTGTGGTAAGAAA TTTGCAATATGTGCCAGTGTGTAATATTTCTTACATAATAAATTTGTGACAGTAT GATAAGGACATTTAAATGAAAAATTTCGACTGTTGTTATAATCTATGTCTGTGTA TCTATGAATTTTCACTGCCTATTAATTATTACAG
45	VL 리더 서열의 V_L 엑손 2 단부	GTGCCTGTGCA
46	V_L 엑손 2	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTGTGTCTCTGGGAGACACAG TCACTATTACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTTGGGATTTATGTAAACTGGTTCCA GCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAGGCGTATGATTTATCGTGCAACGAACTTGGCA GATGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTAGGTCTGGATCAGATTATTCTCTCA CCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGATGTGGCAGACTATCACTGTCTACAGTATGA TGAGTATCCATTCACGTTCGGATCCGGGACGAAGTTGGAAATAAAACGG
47	V_L 엑손 2 링커	GGAGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGCTCGGGAGGCGGAGGCTCG
48	V_H 엑손 2	CAGGTACAGCTGAAAGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGCAGCCCTCACAGACCCTGT CTCTCACCTGCACTGTCTCTGGACTCTCATTAATCAGTTATGGTGTAAGTTGGGC TCGCCAGCCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGCAGCAATATCAAGTGGTGGA AGCACATATTATAATTCAGTTCTCACATCTCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCT CCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGAAGACACAGCCAT TTACTTCTGTACCAGAGAACTCTGGGACTACTATGATTACTGGGGCCAAGGAGTC ATGGTCACAGTCTCCTCA

[0121]

서열 번호	설명	서열
49	엑손 2-래트 IgG1 Fc	GCTGAAACAACAGCCCCCAGAAACCCGGGAGGTGATTGCAAGCCTTGTATATGTA CAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAAGATGTGCT CACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTAGCCAGGAC GATCCCGAGGTCCATTTCAGCTGGTTTGTAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTC AGACTCGACCACCAGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACT CCCCATCCTGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAGGACGTTCAGATGCAAGGTCACC AGTGCAGCTTTCCCATCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAACCCGAAGGCAGAA CACAAGTTCCGCATGTATACACCATGTCACCTACCAAGGAAGAGATGACCCAGAA TGAAGTCAGTATCACCTGCATGGTAAAAGGCTTCTATCCCCCAGACATTTATGTG GAGTGGCAGATGAACGGGCAGCCACAGGAAAACTACAAGAACACTCCACCTACGA TGGACACAGATGGGAGTTACTTCCTCTACAGCAAGCTCAATGTGAAGAAGGAAAA ATGGCAGCAGGGAAACACGTTCACGTGTTCTGTGCTGCATGAAGGCCTGCACAAC CACCATACTGAGAAGAGTCTCTCCCACTCCCCCGGT
50	마우스 MHC I ($H2K^b$) 막관통 도메인의 엑손 2 부분	AAAGAGCCTCCTCCATCCACTGTCTCCAACATGGCGACCGTTGCTGTTCTGGTTG TCCTTGGAGCTGCAATAGTCACTGGAGCTGTGGTGGCTTTTGTGATGAAGATGAG AAGGAGAAACACAG
51	인트론	GTAGGAAAGGGCAGAGTCTGAGTTTTCTCTCAGCCTCCTTTAGAGTGTGCTCTGC TCATCAATGGGGAACACAGGCACACCCCACATTGCTACTGTCTCTAACTGGGTCT GCTGTCAGTTCTGGGAACTTCCTAGTGTCAAGATCTTCCTGGAACTCTCACAGCT TTTCTTCTCACAG
52	마우스 MHC I ($H2K^b$) 막관통 도메인의 엑손 3-부분	GTGGAAAAGGAGGGGACTATGCTCTGGCTCCAG
53	인트론	GTTAGTGTGGGGACAGAGTTGTCCTGGGGACATTGGAGTGAAGTTGGAGATGATG GGAGCTCTGGGAATCCATAATAGCTCCTCCAGAGAAATCTTCTAGGTGCCTGAGT TGTGCCATGAAATGAATATGTACATGTACATATGCATATACATTTGTTTTGTTTT ACCCTAG
54	마우스 MHC I ($H2K^b$) 막관통 도메인의 엑손 4-단부	GCTCCCAGACCTCTGATCTGTCTCTCCCAGATTGTAAAGGTGACACTCTAGGGTC TGATTGGGGAGGGGCAATGTGGACATGA
55	V_L 리더	MESQTQVLMFLLLWVSGACA
56	V_L	DIQMTQSPSSMSVSLGDTVTITCRASQDVGIYVNWFQQKPGKSPRRMIY 래트 N LADGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDVADYHCLQYDEYPFTFGSGTKLEIKR
29	링커	GGGGSGGGGSGGGGS
57	V_H	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGLSLISYGVSWARQPPGKGLEWIAAISSGG STYYNSVLTSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCTRELWDYYDYWGQGV MVTVSS

[0122]

서열 번호	설명	서열
58	래트 IgG1 Fc	AETTAPRNPGGDCKPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISQD DPEVHFSWFVDDVEVHTAQTRPPEEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTFRCKVT SAAFPSPIEKTISKPEGRTQVPHVYTMSPTKEEMTQNEVSITCMVKGFYPPDIYV EWQMNGQPQENYKNTPPTMDTDGSYFLYSKLNVKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHN HHTEKSLSHSPG
59	마우스 MHC I ($H2K^b$) 막관통 도메인	KEPPPSTVSNMATVAVLVVLGAAIVTGAVVAFVMKMRRRNTGGKGGDYALAPGSQ TSDLSLPDCKGDTLGSDWGGAMWT

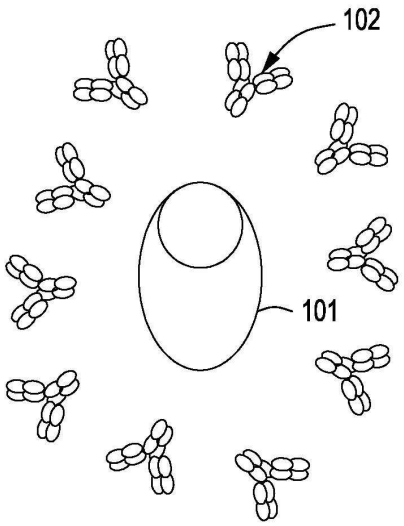
[0123]

[0124] 상기는 단지 본 발명의 원리들을 예시한다. 당해 분야의 숙련가들은, 본 명세서에 명백히 기재하거나 도시되지는 않았지만, 본 발명의 원리를 구현하고 그의 기술사상 및 범위내에 포함되는 다양한 배열들을 고안할 수 있음을 알 것이다. 더욱 또한, 본 명세서에 인용된 모든 실시예 및 조건부 표현은 주로 본 발명의 원리 및 발명자들에 의해 기여된 개념을 이해함에 있어서 독자를 도와 상기 기술을 더 나아가게 하고자 하며, 이들 실시예 및 표현은 상기와 같이 구체적으로 인용된 실시예 및 조건으로 제한되지 않는 것으로 이해해야 한다. 더욱이, 본 발명의 원리, 태양 및 실시태양뿐만 아니라 그의 구체적인 예들을 인용하는 본 명세서의 모든 진술은 그의 구조적 및 기능적 균등물을 모두 포함하고자 한다. 추가로, 상기와 같은 균등물은 현재 공지된 균등물 및 차후에

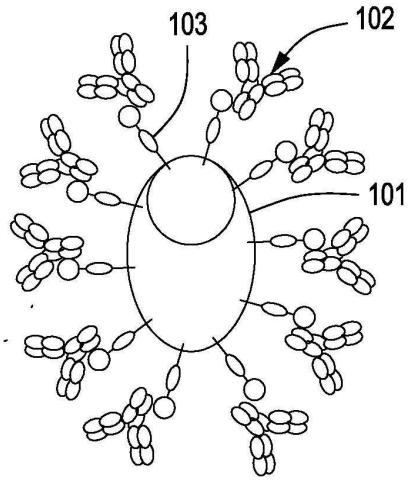
개발되는 균등물, 즉 구조와 상관 없이 동일한 기능을 수행하도록 개발된 임의의 요소를 모두 포함한다. 따라서, 본 발명의 범위를 본 명세서에 도시되고 기재된 예시적인 실시태양들로 제한하고자 하지 않는다. 오히려, 본 발명의 범위 및 기술사상은 첨부된 특허청구범위에 의해서 구현된다. 하기의 특허청구범위에서, "수단"이란 용어가 사용되지 않는 한, 상기 중에 인용된 특징 또는 요소 중 어느 것도 35 U.S.C. §112, ¶6에 따라 수단 플러스 기능 제한으로서 해석해서는 안 된다.

도면

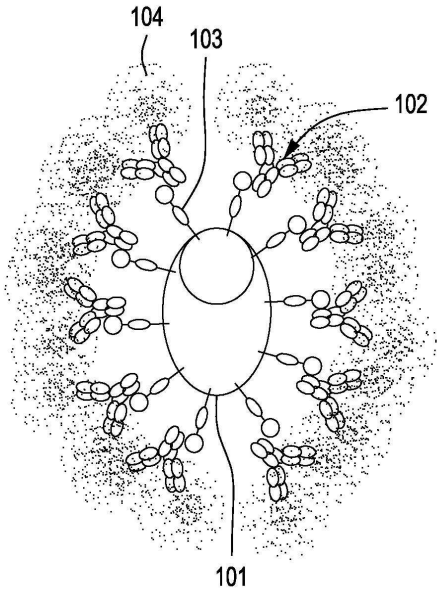
도면1a



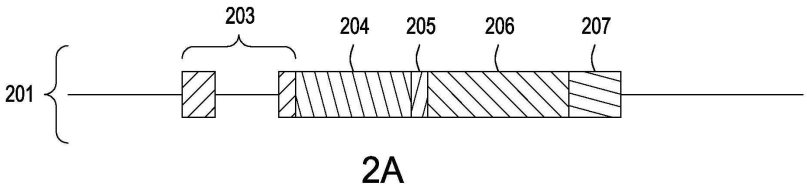
도면1b



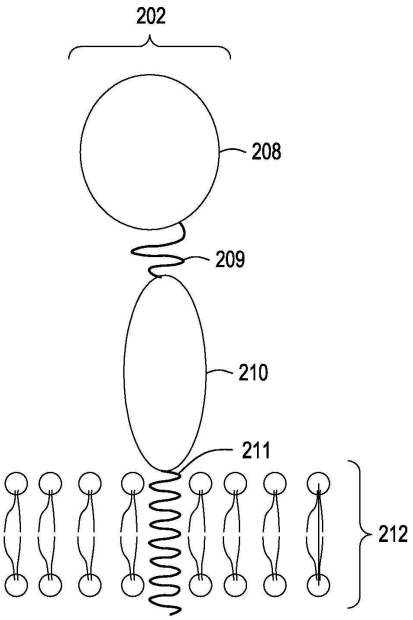
도면1c



도면2

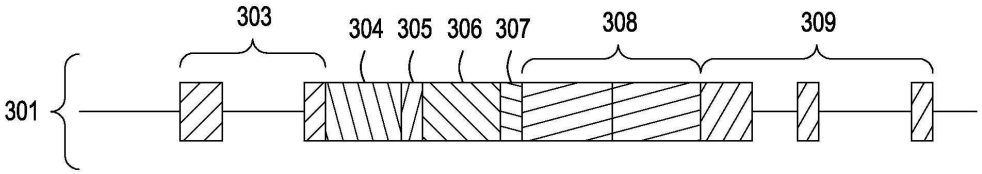


2A

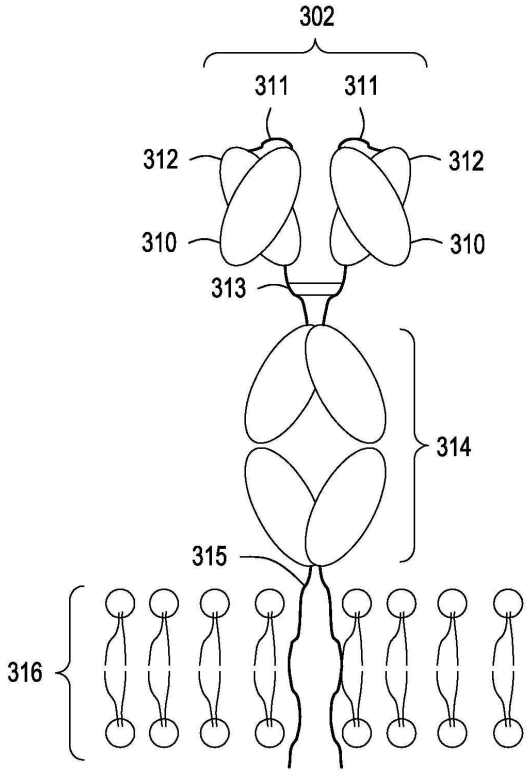


2B

도면3

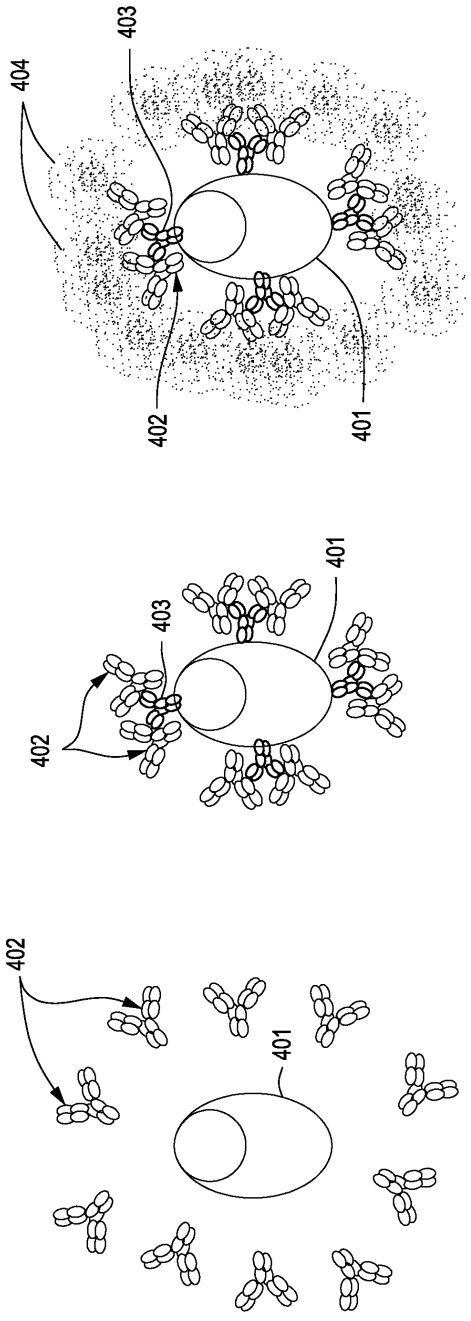

303
304
305
306
307
308
309
301

3A

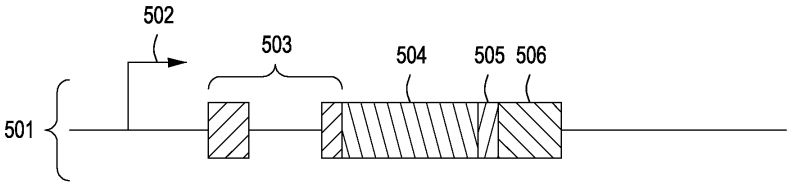

302
311
311
312
312
310
310
313
314
315
316

3B

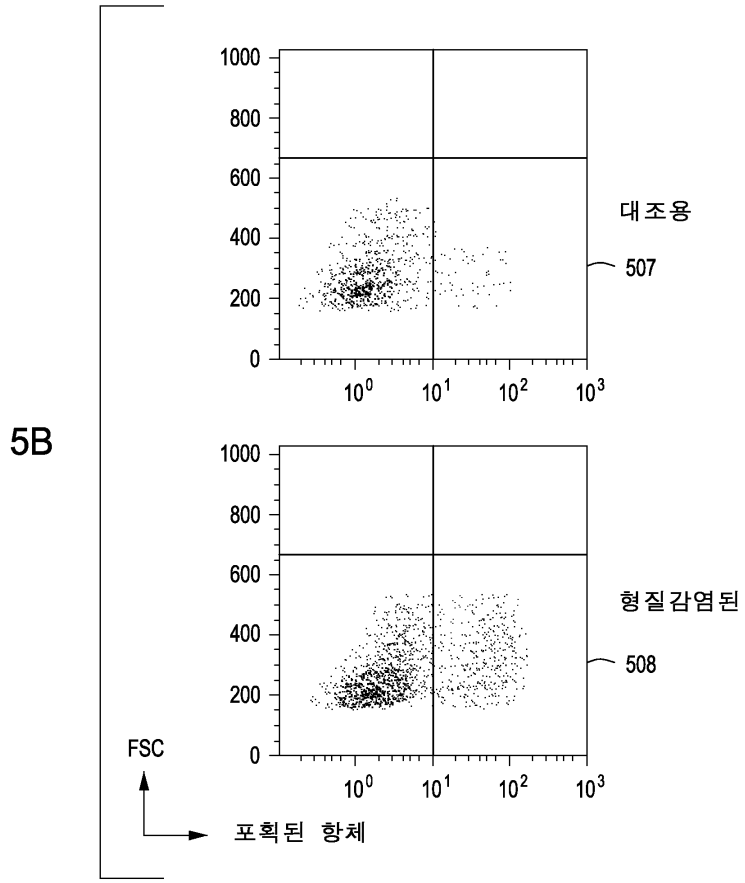
도면4



도면5



5A



5B

서 열 목 록

<110> Trianni, Inc.

<120> Enhanced Production of Immunglobulins

<130> TRIA008US

<150> 62/291,217

<151> 2016-02-04

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 55

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggacatca gggctcctgc tcagtttctt ggcatcttgt tgctctggtt tccag 55

<210> 2

<211> 110

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gtaaaatgaa ctaaaatggg aatttcactg taagtgttga caggcatttg gggactgtgt 60

tcttttatca tgcttacctt tgtagatatt cattatgtct ccactcctag 110

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtgccagatg tgacatccag atg 23

<210> 4

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader Exon1/Intron/Exon 2/TagsFLAG+Myc Tags

<400> 4

gactacaagg atgacgacga caagggcagc ggcgaacaga agctgatttc ggaggaggac 60

ctg 63

<210> 5

<211> 46

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgggatgga gctgtatcat gctcttcttg gcagcaacag ctacag 46

<210> 6

<211> 82

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gtaaggggct cacagtagca ggcttgaggt ctggacatat acatgggtga caatgacatc 60

cactttgcct ttctctccac ag 82

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gtgtccactc ccaggtccaa ctg 23

<210> 8

<211> 369

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 8

ggtaccccag ccgtgaccac ctacaagctc gtcatcaacg gaaagacgct caagggcgaa 60

accactacca aggcggtgga tgccgaaacc gccgaaaagg ccttcaagca gtacgctaac 120

gacaatgggg tggacggagt ctggacgtac gatgatgcca ccaagacttt caccgtgacc 180

gaagtgaaca ctccggccgt caccacttat aagctcgtga tcaacgggaa aaccctgaag 240

ggagagacta ccacaaaggc cgtggatgct gagactgcag agaaggcgtt caaacagtac 300

gccaacgaca acggcgtgga cggcgtctgg acctacgatg acgccactaa gaccttcact 360

gtgaccgaa 369

<210> 9

<211> 621

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 9

atagatgaaa ttttagctgc attacctaag actgacactt acaaattaat ccttaatggt 60

aaaacattga aaggcgaaac aactactgaa gctgttgatg ctgctactgc agaaaaagtc 120

ttcaaacaat acgctaacga caacggtgtt gacggtgaat ggacttacga cgatgcgact 180

aagaccttta cagttactga aaaaccagaa gtgatcgatg cgtctgaatt aacaccagcc 240

gtgacaactt acaaacttgt tattaatggt aaaacattga aaggcgaaac aactactgaa 300

gctgttgatg ctgctactgc agaaaaagtc ttcaaacaat acgctaacga caacggtgtt 360

gacggtgaat ggacttacga cgatgcgact aagaccttta cagttactga aaaaccagaa 420

gtgatcgatg cgtctgaatt aacaccagcc gtgacaactt acaaacttgt tattaatggt 480

aaaacattga aaggcgaaac aactactaaa gcagtagacg cagaaactgc agaaaaagcc 540

ttcaaacaat acgctaacga caacggtgtt gatggtgttt ggacttatga tgatgcgact 600

aagaccttta cggtaactga a 621

<210> 10

<211> 741

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 10

gtggataaca agttcaacaa ggaacagcag aacgcctttt acgagattct gcatctgccc 60

aacctgaatg aggaacagcg gaacgcattc attcagtctc tgaaggatga tcctagccag 120

tcggccaacc tcctggctga agcaaagaag ctgaacgatg cccaagcgcc caaagtggac 180

aacaagttta acaaggagca gcagaatgct ttctacgaga tcctgcacct cccgaatctg 240

aacgaggagc agagaaacgc cttcatccaa tcactgaagg acgacccgtc acagtccgcc 300

aaccttctgg cggaagccaa gaaactgaac gacgcccagg cgccaaaggt ggacggatcc 360

gggtccggca gcggtacccc agccgtgacc acctacaagc tcgtcatcaa cggaaagacg 420

ctcaagggcg aaaccactac caaggcggtg gatgccgaaa ccgccgaaaa ggccttcaag 480

cagtacgcta acgacaatgg ggtggacgga gtctggacgt acgatgatgc caccaagact 540

ttcaccgtga ccgaagtgaa cactccggcc gtcaccactt ataagctcgt gatcaacggg 600

aaaaccctga agggagagac taccacaaag gccgtggatg ctgagactgc agagaaggcg 660

ttcaaacagt acgccaacga caacggcgtg gacggcgtct ggacctacga tgacgccact 720

aagaccttca ctgtgaccga a 741

<210> 11

<211> 1681

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 11

aaacctcaac gccgatcagc gcaatggttt cattcagtcc ctgaaggacg atccgagcca 60

gtcagctaac gtgctcgggg aggcccaaaa gctgaatgac tcccaggcgc cgaaggccga 120

cgcccagcaa aacaacttca acaaggatca gcaatccgcc ttctatgaaa tcctgaatat 180

gcctaacctg aacgaagctc agcggaacgg gttcatccag agccttaagg acgaccctag 240

ccagtccacc aacgtgctgg gggaggccaa gaaacttaac gaatcccagg ccccgaaggc 300

ggacaacaac tttaacaagg aacagcagaa cgccttttac gagatcctca acatgccgaa 360

cctcaacgag gaacagcgca acggtttcat ccagtccctg aaggacgatc catcccagtc 420

cgccaacctg ttgagcgagg cgaagaagct gaatgagtcc caagccccca aggctgacaa 480

caagttcaat aaggaacaac agaatgcctt ctacgaaatt ctgcacttgc ccaatctgaa 540

cgaggagcag cgcaacggct tcatccaatc tctgaaagac gacccgtcgc agtcggccaa 600

cttgctggcc gaagccaaga agctcaacga cgctcaggcc cctaaggccg acaacaagtt 660

caacaaagag caacagaacg cgttctacga gattctccac ttgccgaacc tgaccgaaga 720

acaacggaac ggattcattc agagcctgaa ggatgaccct tcggtgtcaa aggagatcct 780

ggcagaagcc aaaaagctga acgatgccca ggcaccaaag gaagaggaca acaacaagcc 840

gggcgacccg aggatctccg aagccactga tgggctgtcc gattttctga agtcacagac 900

tcctgctgag gacaccgtga agtccatcga gctcgccgag gccaaggtgc tggccaaccg 960

ggagctggat aagtacggag tgtccgacta ctacaaaaac ctgattaaca acgccaagac 1020

tgtggaagga gtgaaggcat tgatcgatga aatcctggcg gcgctcccaa aaaccgacac 1080

ctacaaactg attctcaacg gaaagacgct gaaggggaa actaccaccg aagcggtgga 1140

cgccgccacc gccgaaaagg tgtttaagca gtatgctaac gacaacggtg tcgacggaga 1200

gtggacctac gacgacgcca ctaagacttt caccgtgacc gagaagcccg aggtcatcga 1260

cgcgagcgag ctcactcccg ccgtgaccac ctacaagctg gtcatcaatg gaaagactct 1320

gaagggcgaa actactactg aagccgtgga tgcggcaacc gccgagaaag tgttcaagca 1380

atacgcaaac gataacgggg tggacggaga gtggacctac gacgatgcca caaagacctt 1440

caccgtcacc gaaaagcccg aagtgatcga cgcttccgaa ctgacgccgg ccgtgacaac 1500

ttacaagctc gtcattaacg gaaagaccct taagggcgaa accacgacca aggcagtgga 1560

cgccgaaact gccgagaagg cgttcaagca gtacgccaac gacaacggcg tggacggagt 1620

gtggacttac gatgatgcga ccaagacgtt cactgtgacc gagatggtca ccgaagtgcc 1680

g 1681

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gly/Ser linker

<400> 12

ggatccggct ccggatcc 18

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gly/Ser linker

<400> 13

ggaggcggag gcagcggagg cggtggctcg ggaggcggag gctcg 45

<210> 14

<211> 243

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 14

gagatggtgt ccaagccgat gatctactgg gagtgttcca acgcgactct gacctgtgaa 60

gtgctggagg gaaccgacgt ggaactgaag ctgtaccagg gtaaagaaca tctgcggtcg 120

ttgcgccaaa agaccatgag ctaccagtgg accaacttgc gggcgccttt caagtgcaaa 180

gccgtcaata gagtgtccca ggagagcgaa atggaggtcg tgaactgccc cgaaaaggga 240

ctg 243

<210> 15

<211> 561

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 15

tcaacttcca tcaccgccta caagagcgag ggagagagcg ccgagttttc cttccccctg 60

aacctgggcg aagaaagcct ccagggagaa ctgcgctgga aggcagaaaa ggccccaagc 120

tctcagtcct ggatcacctt cagcctgaag aaccagaagg tgtccgtgca gaagtccact 180

tcaaacccga agttccagct ctccgaaacc ctccctctga ccctgcaaat ccctcaagtg 240

tcgctgcaat tcgcggggag cggaaatctg actctgactc ttgaccgggg catcttgtac 300

caggaggtga acctggtggt catgaaggtg acccagcccg atagcaacac cctgacctgt 360

gaagtgatgg gacccacgtc cccgaagatg cggctcattc tgaagcagga gaaccaggag 420

gctcgggtgt ccagacagga aaaggtcatc caagtgcagg ccccggaagc cggcgtgtgg 480

cagtgcctgc tgtccgaggg agaggaagtc aagatggact cgaaaatcca ggtgctgtcc 540

aaagggctga accagactat g 561

<210> 16

<211> 1638

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gaaaggcctt ttccacctca tatccagctc cctccagaaa ttcaagagtc ccaggaagtc 60

actctgacct gcttgctgaa tttctcctgc tatgggtatc cgatccaatt gcagtggctc 120

ctagaggggg ttccaatgag gcaggctgct gtcacctcga cctccttgac catcaagtct 180

gtcttcaccc ggagcgagct caagttctcc ccacagtgga gtcaccatgg gaagattgtg 240

acctgccagc ttcaggatgc agatgggaag ttcctctcca atgacacggt gcagctgaac 300

gtgaagcaca ccccgaagtt ggagatcaag gtcactccca gtgatgccat agtgagggag 360

ggggactctg tgaccatgac ctgcgaggtc agcagcagca acccggagta cacgacggta 420

tcctggctca aggatgggac ctcgctgaag aagcagaata cattcacgct aaacctgcgc 480

gaagtgacca aggaccagag tgggaagtac tgctgtcagg tctccaatga cgtgggcccg 540

ggaaggtcgg aagaagtgtt cctgcaagtg cagtatgccc cggaaccttc cacggttcag 600

atcctccact caccggctgt ggagggaagt caagtcgagt ttctttgcat gtcactggcc 660

aatcctcttc caacaaatta cacgtggtac cacaatggga aagaaatgca gggaaggaca 720

gaggagaaag tccacatccc aaagatcctc ccctggcacg ctgggactta ttcctgtgtg 780

gcagaaaaca ttcttggtac tggacagagg ggcccgggag ctgagctgga tgtccagtat 840

cctcccaaga aggtgaccac agtgattcaa aaccccatgc cgattcgaga aggagacaca 900

gtgacccttt cctgtaacta caattccagt aaccccagtg ttacccggta tgaatggaaa 960

ccccatggcg cctgggagga gccatcgctt ggggtgctga agatccaaaa cgttggctgg 1020

gacaacacaa ccatcgcctg cgcagcttgt aatagttggt gctcgtgggc ctcccctgtc 1080

gccctgaatg tccagtatgc cccccgagac gtgagggtcc ggaaaatcaa gccccctttcc 1140

gagattcact ctggaaactc ggtcagcctc caatgtgact tctcaagcag ccaccccaaa 1200

gaagtccagt tcttctggga gaaaaatggc aggcttctgg ggaaagaaag ccagctgaat 1260

tttgactcca tctccccaga agatgctggg agttacagct gctgggtgaa caactccata 1320

ggacagacag cgtccaaggc ctggacactt gaagtgctgt atgcacccag gaggctgcgt 1380

gtgtccatga gcccggggga ccaagtgatg gaggggaaga gtgcaaccct gacctgtgag 1440

agcgacgcca accctcccgt ctcccactac acctggtttg actggaataa ccaaagcctc 1500

ccctaccaca gccagaagct gagattggag ccggtgaagg tccagcactc gggtgcctac 1560

tggtgccagg ggaccaacag tgtgggcaag ggccgttcgc ctctcagcac cctcaccgtc 1620

tactatagcc cggagacc 1638

<210> 17

<211> 120

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gcgcctggag cgctgccggc cggtcatctg ttgttgttcc tgaccctggg ggtgctgtca 60

ctgctgctgc tcgtgaccgg ggcattcggt ttccacctgt ggagaaggca gtggcggtag 120

120

<210> 18

<211> 123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

cattcccggc accgctacgc gctgattccg attcctctgg ccgtgatcac cacctgtatc 60

gtgctctaca tgaacggtat cctgaaatgc gacagaaagc ccgacaggac taacagcaat 120

tag 123

<210> 19

<211> 99

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 19

ccgctgtacc tgatcgtggg ggtgtcagcc ggcggtctgc tgctcgtgtt cttcggggca 60

ctgttcatct tctgcatttg caagaggaag aagcggtag 99

<210> 20

<211> 288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

ccaccccggg cgtccgcact gccggcgccc cctaccggaa gcgcgctgcc cgatccgcaa 60

accgccagcg ccctgcctga cccgcccgcg gctagcgcct tgcctgccgc actggccgtg 120

atttcattcc tgctgggtct ggggctcggg gtggcctgcg tgttggcacg gactcagatc 180

aagaagctgt gctcctggag agacaaaaac tccgccgcct gtgtggtgta cgaggacatg 240

tcacactcga ggtgcaatac cctgtcctcg ccgaaccagt accagtag 288

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Gly Trp Ser Cys Ile Met Leu Phe Leu Ala Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu
20

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader Exon1/Intron/Exon 2/TagsFLAG+Myc Tags

<400> 22

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile
1 5 10 15

Ser Glu Glu Asp Leu
20

<210> 23

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Asp Ile Arg Ala Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met

20 25

<210> 24

<211> 123

<212>

PRT

<213> Escherichia coli

<400> 24

Gly Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr

1 5 10 15

Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu

20 25 30

Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp

35 40 45

Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Val Asn Thr

50 55 60

Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys

65 70 75 80

Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala

85 90 95

Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr

100 105 110

Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu

115 120

<210> 25

<211> 207

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 25

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

1 5 10 15

Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val

20 25 30

Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn

35 40 45

Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu

85 90 95

Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys

100 105 110

Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp

115 120 125

Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr

165 170 175

Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly

180 185 190

Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu

195 200 205

<210> 26

<211> 247

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 26

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn

50 55 60
Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
65 70 75 80
Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
85 90 95
Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
100 105 110
Gln Ala Pro Lys Val Asp Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Pro Ala
115 120 125

Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu
130 135 140
Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys
145 150 155 160
Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp
165 170 175
Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Val Asn Thr Pro Ala Val Thr
180 185 190
Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr

195 200 205
Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr
210 215 220
Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr
225 230 235 240
Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
245

<210> 27
<211> 581
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 27

Ala Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln

1 5 10 15

Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln

50 55 60

Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn

65 70 75 80

Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu

85 90 95

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys

100 105 110

Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu

115 120 125

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu

130 135 140

Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln

145 150 155 160

Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala

165 170 175

Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr

180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe

195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala

210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys

225 230 235 240

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

290 295 300
Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ser Gln
305 310 315 320
Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys
325 330 335
Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
340 345 350
Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
355 360 365

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

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

Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala
500 505 510

Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly
515 520 525
Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr
530 535 540
Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly
545 550 555 560
Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Met
565 570 575
Val Thr Glu Val Pro
580

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Gly/Ser linker
<400> 28
Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Gly/Ser Linker
<400> 29
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 30
<211> 81
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 30

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

65 70 75 80
Leu

<210> 31
<211> 187
<212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 31
Ser Thr Ser Ile Thr Ala Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Ser Ala Glu Phe
1 5 10 15
Ser Phe Pro Leu Asn Leu Gly Glu Glu Ser Leu Gln Gly Glu Leu Arg
20 25 30
Trp Lys Ala Glu Lys Ala Pro Ser Ser Gln Ser Trp Ile Thr Phe Ser
35 40 45

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

Pro Asp Ser Asn Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Gly Pro Thr Ser Pro

115 120 125

Lys Met Arg Leu Ile Leu Lys Gln Glu Asn Gln Glu Ala Arg Val Ser

130 135 140

Arg Gln Glu Lys Val Ile Gln Val Gln Ala Pro Glu Ala Gly Val Trp

145 150 155 160

Gln Cys Leu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Val Lys Met Asp Ser Lys Ile

165 170 175

Gln Val Leu Ser Lys Gly Leu Asn Gln Thr Met

180 185

<210> 32

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10 15

Gly Pro Thr Ser Pro Lys Met Arg Leu Ile Leu Lys Gln Glu Asn Gln

20 25 30

Glu Ala Arg Val Ser Arg Gln Glu Lys Val Ile Gln Val Gln Ala Pro

35 40 45

Glu Ala Gly Val Trp Gln Cys Leu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Val Lys

50 55 60

Met Asp Ser Lys Ile Gln Val Leu Ser Lys Gly Leu Asn Gln Thr Met

65 70 75 80

<210> 33

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly His Leu Leu Leu Phe Leu Thr Leu

1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His
20 25 30

Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg
35

<210> 34

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala Val Ile
1 5 10 15

Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu Lys Cys Asp Arg
20 25 30

Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn
35 40

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 35

Pro Leu Tyr Leu Ile Val Gly Val Ser Ala Gly Gly Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Phe Phe Gly Ala Leu Phe Ile Phe Cys Ile Cys Lys Arg Lys Lys Arg
20 25 30

<210> 36

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Pro Pro Arg Ala Ser Ala Leu Pro Ala Pro Pro Thr Gly Ser Ala Leu
1 5 10 15

Pro Asp Pro Gln Thr Ala Ser Ala Leu Pro Asp Pro Pro Ala Ala Ser

20 25 30

Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly

35 40 45

Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala Arg Thr Gln Ile Lys Lys Leu Cys

50 55 60

Ser Trp Arg Asp Lys Asn Ser Ala Ala Cys Val Val Tyr Glu Asp Met

65 70 75 80

Ser His Ser Arg Cys Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Gln Tyr Gln

85 90 95

<210> 37

<211> 93

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gaattccttg aaaatggtgg gacatcctta tcagagaaaa cagttcttct gctggtgact 60

ccatttctgg cagcagcctg gagccttcat ccc 93

<210> 38

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Glu Phe Leu Glu Asn Gly Gly Thr Ser Leu Ser Glu Lys Thr Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Val Thr Pro Phe Leu Ala Ala Ala Trp Ser Leu His Pro

20 25 30

<210> 39

<211> 90

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

accaatgcca caacaaaggc agcaggggga gcactccagt caacagcaag tttgtttgtc 60

gtgtcactga gtctcttgca tctttattca 90

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Thr Asn Ala Thr Thr Lys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Gln Ser Thr Ala

1 5 10 15

Ser Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Leu Leu His Leu Tyr Ser

20 25 30

<210> 41

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gtctcccagg tgaaaatttc aggagcccct accctctccc catccctcct gggtttgctg 60

ctgcccgcct ttggcattct cgtgtatctg gagttc 96

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Val Ser Gln Val Lys Ile Ser Gly Ala Pro Thr Leu Ser Pro Ser Leu

1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu Leu Pro Ala Phe Gly Ile Leu Val Tyr Leu Glu Phe

20 25 30

<210> 43

<211> 49

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atggaatcac agacccaggt cctcatgttt cttctgctct gggtatctg 49

<210> 44

<211> 199

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

gtaagaaatt taaagtatta aaacctttc aaagtttcat ctttgtggta agaaatttgc 60

aatatgtgcc agtgtgtaat atttcttaca taataaattt gtgacagtat gataaggaca 120

tttaaatgaa aaatttcgac tgttgttata atctatgtct gtgtatctat gaattttcac 180

tgcctattaa ttattacag 199

<210> 45

<211> 11

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

gtgcctgtgc a 11

<210> 46

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

gacattcaga tgacccagtc tccatcctcc atgtctgtgt ctctgggaga cacagtcact 60

attacttgcc gggcaagtca ggacgttggg atttatgtaa actggttcca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctaggcgtat gatttatcgt gcaacgaact tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtaggtc tggatcagat tattctctca ccatcagcag cctggagtct 240

gaagatgtgg cagactatca ctgtctacag tatgatgagt atccattcac gttcggatcc 300

gggacgaagt tggaaataaa acgg 324

<210> 47

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

ggaggcggag gcagcggagg cggtggctcg ggaggcggag gctcg 45

<210> 48

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

caggtacagc tgaaagagtc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac cctgtctctc 60

acctgcactg tctctggact ctcattaatc agttatggtg taagttgggc tcgccagcct 120

ccagggaagg gtctggagtg gattgcagca atatcaagtg gtggaagcac atattataat 180

tcagttctca catctcgact gagcatcagc agggacacct ccaagagcca agttttctta 240

aaaatgaaca gtctgcaaac tgaagacaca gccatttact tctgtaccag agaactctgg 300

gactactatg attactgggg ccaaggagtc atggtcacag tctcctca 348

<210> 49

<211> 696

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 49

gctgaaacaa cagcccccag aaacccggga ggtgattgca agccttgtat atgtacaggc 60

tcagaagtat catctgtctt catcttcccc ccaaagccca aagatgtgct caccatcact 120

ctgactccta aggtcacgtg tgttgtggta gacattagcc aggacgatcc cgaggtccat 180

ttcagctggt ttgtagatga cgtggaagtc cacacagctc agactcgacc accagaggag 240

cagttcaaca gcactttccg ctcagtcagt gaactcccca tcctgcacca ggactggctc 300

aatggcagga cgttcagatg caaggtcacc agtgcagctt tcccatcccc catcgagaaa 360

accatctcca aacccgaagg cagaacacaa gttccgcatg tatacaccat gtcacctacc 420

aaggaagaga tgacccagaa tgaagtcagt atcacctgca tggtaaaagg cttctatccc 480

ccagacattt atgtggagtg gcagatgaac gggcagccac aggaaaacta caagaacact 540

ccacctacga tggacacaga tgggagttac ttcctctaca gcaagctcaa tgtgaagaag 600

gaaaaatggc agcagggaaa cacgttcacg tgttctgtgc tgcatgaagg cctgcacaac 660

caccatactg agaagagtct ctcccactcc cccggt 696

<210> 50

<211> 124

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 50

aaagagcctc ctccatccac tgtctccaac atggcgaccg ttgctgttct ggttgtcctt 60

ggagctgcaa tagtcactgg agctgtggtg gcttttgtga tgaagatgag aaggagaaac 120

acag 124

<210> 51

<211> 178

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 51

gtaggaaagg gcagagtctg agttttctct cagcctcctt tagagtgtgc tctgctcatc 60

aatggggaac acaggcacac cccacattgc tactgtctct aactgggtct gctgtcagtt 120

ctgggaactt cctagtgtca agatcttcct ggaactctca cagcttttct tctcacag 178

<210> 52

<211> 33

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 52

gtggaaaagg aggggactat gctctggctc cag 33

<210> 53

<211> 172

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 53

gttagtgtgg ggacagagtt gtcctgggga cattggagtg aagttggaga tgatgggagc 60

tctgggaatc cataatagct cctccagaga aatcttctag gtgcctgagt tgtgccatga 120

aatgaatatg tacatgtaca tatgcatata catttgtttt gttttaccct ag 172

<210> 54

<211> 83

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 54

gctcccagac ctctgatctg tctctcccag attgtaaagg tgacactcta gggtctgatt 60

ggggaggggc aatgtggaca tga 83

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Ala Cys Ala
20

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Tyr
20 25 30

Val Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Arg Met Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr His Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 57

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Ile Ser Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ala Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Ser Val Leu Thr

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Thr

85 90 95

Arg Glu Leu Trp Asp Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 232

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 58

Ala Glu Thr Thr Ala Pro Arg Asn Pro Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu

65 70 75 80

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His

85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala

100 105 110

Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg
115 120 125

Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met
130 135 140
Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn
165 170 175
Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
180 185 190
Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr

195 200 205
Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
210 215 220
Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
225 230
<210> 59
<211> 79
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 59
Lys Glu Pro Pro Pro Ser Thr Val Ser Asn Met Ala Thr Val Ala Val
1 5 10 15
Leu Val Val Leu Gly Ala Ala Ile Val Thr Gly Ala Val Val Ala Phe

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