

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 7월 21일 (21.07.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/114567 A1

- (51) 국제특허분류:
C40B 50/02 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/000320
- (22) 국제출원일: 2016년 1월 13일 (13.01.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0006358 2015년 1월 13일 (13.01.2015) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University - Industry Collaboration Foundation) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 심현보 (SHIM, Hyun Bo); 06005 서울시 강남구 압구정로 29길 23, 210동 702호, Seoul (KR). 김지혜 (KIM, Ji Hye); 22782 인천시 서구 신헌로 22-1, 다동 301호, Incheon (KR). 백설련 (BAI, Xuelian); 04106 서울시 마포구 고산길 24-13, 202호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한일국제특허사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

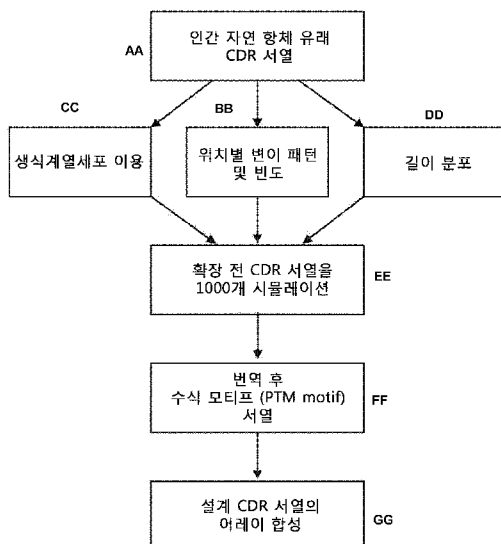
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING NOVEL ANTIBODY LIBRARY AND LIBRARY PREPARED THEREBY

(54) 발명의 명칭: 신규 항체 라이브러리 제조방법 및 이로부터 제조된 라이브러리



AA ... Human natural antibody-derived CDR sequence
BB ... Location-specific modification pattern and frequency
CC ... Use of germ-line cells
DD ... Length distribution
EE ... Simulation of 1000 pre-expansion CDR sequences
FF ... Post-translational modification (PTM) motif sequence
GG ... Array synthesis of designed CDR sequence

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing a novel antibody library and a library prepared thereby. The antibody library prepared according to the present invention contains antibodies having excellent physical properties against a plurality of antigens, thereby having functional diversity and containing a plurality of unique sequences, and thus can be favorably used as an antibody library.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 항체 라이브러리 제조방법 및 이로부터 제조된 라이브러리에 관한 것이다. 본 발명에 의해 제조된 항체 라이브러리는 다수의 항원에 대해 우수한 물성을 가지는 항체들을 포함하여, 기능적 다양성을 가질 뿐 아니라 고유서열을 다수 포함하는 등 항체 라이브러리로서 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2016/114567 A1



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규 항체 라이브러리 제조방법 및 이로부터 제조된 라이브러리

기술분야

- [1] 본 발명은 신규 항체 라이브러리 제조방법 및 이로부터 제조된 라이브러리에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 파지 표면제시 (phage display) 기법은 박테리아를 숙주로 하는 박테리오파지(bacteriophage)를 유전적으로 조작하여 유전형(유전자)와 표현형(단백질)이 하나의 파지 입자를 통해 연결되도록 만드는 기법이다. 이 경우 유전형으로서의 유전자는 파지 유전자의 일부로 삽입되며, 표현형으로서의 단백질은 그 단백질의 유전자가 들어있는 파지 입자의 표면에 제시된다. 이러한 유전형과 표현형의 물리적 결합은 단백질 공학에서 매우 중요한 개념이며, 표현형으로 나타나는 성질에 의해 선택된 단백질 클론의 유전자를 쉽게 획득하여 복제, 증폭, 분석 및 조작할 수 있도록 해 준다.
- [3]
- [4] 항체는 특별히 파지 표면제시 기법이 매우 유용하게 적용된 예이다. 매우 높은 다양성을 가지는 항체 라이브러리를 파지의 표면에 제시한 후 표면흡착된 항원과 결합시키면, 항원에 선택적으로 결합하는 항체 클론의 유전자를 획득할 수 있다. 이는 실험동물을 거치지 않고 항체를 얻는 매우 효과적인 방법이며, 특히 임의의 항원에 대한 인간항체를 얻을 수 있으므로 인체에서의 면역반응이 적은 치료용 항체 신약 등의 개발에 매우 높은 활용성을 가진다. 높은 결합친화도를 가지는 좋은 항체를 획득하기 위해서는 라이브러리의 품질이 중요하며, 특히 라이브러리의 크기와 기능적 다양성 및 클론의 품질이 중요하다.
- [5]
- [6] 라이브러리의 크기는 그로부터 선택되는 항체의 품질을 결정하는 가장 중요한 요소 중 하나이다. 항체 라이브러리의 항원 결합부위는 이론적으로 어떤 특정 항원에도 경도되지 않은 무작위적 다양성을 가지며, 순전히 우연에 의해 특정 항원에 선택적으로 결합하는 항체가 무작위적 다양성 중에서 나타나게 된다. 따라서 라이브러리의 크기가 커질수록, 즉 라이브러리 내의 서로 다른 항체의 숫자가 증가할수록, 우연에 의해 높은 선택성 및 친화도를 가지는 항체가 발견될 확률이 높아지는 것이다. 일반적으로 최소 10^8 이상의 크기가 필요한 것으로 인식되고 있으며, 많은 수의 항체 라이브러리가 10^9 - 10^{11} 정도의 크기를 가지고 있다.
- [7]
- [8] 라이브러리의 기능적 다양성은, 라이브러리를 이루는 클론들 중 실제로 항체를

발현할 수 있는 클론의 비율이다. 라이브러리의 크기가 크더라도 기능적 다양성이 낮으면 실질적인 라이브러리 크기는 줄어들게 된다. 기능적 다양성이 낮아지는 이유는 대부분 라이브러리 구축 과정에서 DNA 합성 및 증폭의 오류로 인한 것이다. 항체 라이브러리는 여러 단계의 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 구축되는데, 이 때 효소 및 반응의 특성상 필연적으로 낮은 빈도의 오류가 발생하게 되며 이러한 오류가 축적이 되면 최종 라이브러리의 기능적 다양성이 떨어지게 된다. 또한 특히 합성 라이브러리의 경우, 염기 합성반응의 효율성 문제 때문에 오류가 도입될 가능성이 높아지기도 한다. 이렇듯 기능적 다양성의 문제는 특히 합성 라이브러리에서 두드러지는 경향이 있으며 대부분의 합성 라이브러리는 이러한 문제점을 회피하기 위한 설계상의 고려를 해야만 한다.

[9]

[10] 라이브러리를 이루는 개별 클론들의 품질, 즉 발현성과 안정성 및 면역유발성(immunogenicity) 등도 항체 라이브러리의 성능을 결정하는 요소 중 하나이다. 항체공학적으로 우수한 클론을 선별하기 위해서는 합성 항체라이브러리의 설계단계에서부터 이러한 요소들이 고려되어야 한다. 특히 인공적 다양성을 기존의 항체유전자에 도입하는 단계에서, 생성된 다양성이 항체 골격과의 적합성(compatibility)을 가지도록 설계하여야 하며, 자연 항체(natural antibody)의 아미노산 서열로부터의 급격한 변화는 인공합성 항체의 적합성과 안정성 등을 저해할 위험이 있다. 따라서 인공적 다양성을 설계할 때 자연적 다양성을 효율적으로 모방하는 것은 합성 항체 라이브러리의 설계와 구축에 있어 매우 중요하다. 또한 다양한 서열의 항체들로 이루어진 항체 라이브러리에는, 당화(glycosylation)이나 산화, 이성질체화, 탈아미드화 등의 원치 않는 단백질의 변형을 일으킬 수 있는 부위가 포함될 수 있으며, 이는 항체의 물성과 산업적 개발과정에 나쁜 영향을 줄 수 있다.

[11]

[12] 동물의 체내에서 항체가 만들어질 때, 유전체 내에 존재하는 수십~수백개의 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자의 재조합을 통해 매우 큰 다양성을 가지는 항체 서열들이 생성되며, 이들 중에서 특정 항원에 반응하는 항체가 선택된다. 선택된 항체는 초돌연변이(hypermutation) 과정을 거쳐 항원에 대한 결합력이 향상되며, 최종적으로 숙성(mature) 항체가 도출된다. 따라서 각 숙성 항체의 서열, 특히 항원과 결합하는 상보성 결정부위(CDR)의 서열은 생식계열 유전자 서열로부터 유래하되, 재조합 및 돌연변이 과정을 통해 생식계열 CDR 서열과는 다른 다양한 서열들이 만들어지게 된다. 합성 항체 라이브러리의 설계에서는 이러한 과정을 통해 만들어진 CDR 서열을 모사하여 자연유래 항체서열과 유사하게 제작하는 전략의 수립이 필요하다.

[13]

자연유래 항체 제작방법은 하나의 항체를 만드는데 과한 노력과 시간이 요구됨에 따라 합성 항체 라이브러리를 이용하고자 하는 시도가 최근에 주목받고 있다. 그러나, 기존 합성 항체 라이브러리는 CDR에 해당하는 변이

구역을 무작위로 합성하여 제작하였는바 실질적으로 항체로서 기능하는 비율이 낮거나 그 효율이 보장되지 않는 문제점이 있었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명자들은 효율적이고 빠른 과정을 통해 자연항체의 서열과 유사하고 우수한 물성을 가지는 항체들로 이루어진, 기능적 다양성이 높은 고품질의 합성 인간항체 라이브러리를 구축하고자 노력한 결과, 합성 항체 라이브러리를 자연유래 항체의 CDR 서열을 분석하여 서열을 구성한 다음 합성하여 자연항체의 서열과 유사하고 우수한 물성을 가지는 항체들로 이루어진 라이브러리 구축하였음을 확인함에 따라, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명의 목적은 항체의 상보성 결정부위(complementarity Determining Regions, CDRs) 서열을 개별적으로 설계하는 단계; 및 상기 설계한 서열을 가지는 상보성 결정부위들을 포함하는 항체를 합성하여 라이브러리를 제조하는 단계를 포함하는, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 라이브러리를 제작하는 방법에 의해 제조된 항체 라이브러리를 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [17] 본 발명에 의해 제조된 항체 라이브러리는 다수의 항원에 대해 우수한 물성을 가지는 항체들을 포함하여, 기능적 다양성을 가질 뿐 아니라 고유서열을 다수 포함하는 등 항체 라이브러리로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 CDR 부위의 설계에 대한 개념을 나타낸 모식도이다.
- [19] 도 2는 6개의 비조합 다양화 CDR(non-combinatorially diversified CDRs)을 이용한 scFv 라이브러리 제조방법을 나타낸 모식도이다. 설계된 CDR 서열이 있는 올리고뉴클레오타이드의 풀(pool)이 배열 생성되고 PCR을 통해 증폭된다. 각 CDR 위치에 대한 단일 CDR 라이브러리(6개의 CDR 중 하나만 다양화된 scFv 라이브러리)를 제조하고, CDR 레퍼토리가 in-frame 서열인 것을 확인하기 위한 scFv의 C 말단 HA-태그에 결합하는 항-HA 항체를 이용하여 패닝하였다.
- [20] 도 3은 본 발명의 항체 라이브러리에 scFv가 발현되는지 여부를 확인하기 위하여, 라이브러리로부터 셀렉션 전 scFv 클론을 무작위로 선택하여 HA 태그를 이용하여 발현을 확인한 도면이다. 구체적으로 92개의 클론을 무작위로 선택하여 배양 및 IPTG 처리하고 용출물에서 전장 scFV 발현 여부를 항-HA 항체로 확인한 결과이며, 총 92개 중 58개에서 발현이 확인되었다 (63%).
- [21] 도 4는 본 발명의 항체 라이브러리 제조 단계를 도식화한 모식도이다.
- [22] 도 5a는 본 발명의 항체 라이브러리 중 특히 OL (odd-lambda) 라이브러리로부터 임의의 클론들을 선택하고 scFv 유전자를 PCR 기법으로 증폭한 후, DNA를

정제하여 서열분석한 결과를 개시하고 있는 도이다.

- [23] 도 5b는 본 발명의 항체 라이브러리 중 특히 EL (even-lambda) 라이브러리로부터 임의의 클론들을 선택하고 scFv 유전자를 PCR 기법으로 증폭한 후, DNA를 정제하여 서열분석한 결과를 개시하고 있는 도이다.
- [24] 도 5c는 본 발명의 항체 라이브러리 중 특히 OK (odd-kappa) 라이브러리로부터 임의의 클론들을 선택하고 scFv 유전자를 PCR 기법으로 증폭한 후, DNA를 정제하여 서열분석한 결과를 개시하고 있는 도이다.
- [25] 도 5d는 본 발명의 항체 라이브러리 중 특히 EK (even-kappa) 라이브러리로부터 임의의 클론들을 선택하고 scFv 유전자를 PCR 기법으로 증폭한 후, DNA를 정제하여 서열분석한 결과를 개시하고 있는 도이다.
- [26] 도 6은 라이브러리의 설계 및 실제 CDR 레퍼토리의 고유 CDR 서열의 빈도에 관한 그래프이다. 실제 제조된 scFv 라이브러리의 NGS 분석으로부터 발견한 CDR 서열과 설계된 CDR 레퍼토리에서 각 고유 CDR 서열이 발생한 빈도를 XY 분포 그래프로 표시하였다. 그래프 내의 각 점은 고유 CDR 서열을 의미한다. 한편, CDR-H3 서열은 대부분의 서열이 설계된 레퍼토리에서 오직 한번만 발생하기 때문에 분석하지 않았다.
- [27] 도 7은 제조된 라이브러리의 다양한 도메인 서열 중복도를 나타낸 도이다. Illumina MiSeq 플랫폼 상의 300 bp paired-end 서열분석을 통해 셀렉션되지 않은 라이브러리의 다양한 도메인 서열을 수득하고, 다양한 도메인 서열에 대한 중복회수(n)를 분석하였다. V_H 및 V_λ 의 약 98% 및 V_κ 의 약 88.5% 서열이 단 한번 발견되었다 (n = 1).
- [28] 도 8은 설계된 CDR 및 실제 CDR의 길이 분포를 나타낸 도이다. (a) CDR-H2, L1 (kappa 및 lambda), 및 L3 (kappa 및 lambda)은 다양한 길이의 서열을 포함한다. 설계된 레퍼토리에서의 길이 분포와 차세대 서열분석(Next generation sequencing, NGS)에서 분석된 길이 분포의 비교를 통하여, 짧은 CDR이 실제 라이브러리에서 선호됨을 시사하는 결과를 얻었다. (b) 짧은 CDR에 대한 선호성은 다른 CDR에 비해 넓은 길이 다양성 범위를 가지는 CDR-H3에서 특히 분명하게 보여졌다. (a) 및 (b) 둘 모두에서, 청색 막대("설계")는 설계 레퍼토리에서 각 CDR 길이의 빈도수를 보여주며, 주황색 막대("라이브러리 내 확인")는 제조된 라이브러리의 차세대 서열분석(Next generation sequencing, NGS)을 통해 확인된 각 CDR 길이의 빈도수를 보여준다.
- [29] 도 9는 CDR-H3의 아미노산 분포를 나타낸 도이다. 자연 인간 항체(N), 설계된 레퍼토리(D), 및 실제 제조된 라이브러리(L)의 CDR-H3의 각 위치별 아미노산 분포를 나타내고 있다. 각 중첩막대는 각기 다른 길이의 CDR-H3의 각 Kabat 위치에서의 아미노산 빈도의 총합을 나타내고 있다. 각기 다른 길이를 가지는 모든 CDR-H3에 대해서, 마지막 세 개의 아미노산 잔기를 각각 100j, 101 및 102로 표시하였다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [30] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양태는 항체의 상보성 결정부위(complementarity Determining Regions, CDRs) 서열을 개별적으로 설계하는 단계; 및 상기 설계한 서열을 가지는 상보성 결정부위들을 포함하는 항체를 합성하여 라이브러리를 제조하는 단계를 포함하는, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [31] 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 항체 라이브러리를 구성하는 항체의 상보성 결정부위를 이루는 중쇄 상보성 결정부위 1(CDR-H1), 중쇄 상보성 결정부위 2(CDR-H2), 중쇄 상보성 결정부위 3(CDR-H3), 경쇄 상보성 결정부위 1(CDR-L1), 경쇄 상보성 결정부위 2(CDR-L2) 및 경쇄 상보성 결정부위 3(CDR-L3)은 다양성(polymorphism)을 가지는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [32] 한편, 상기 상보성 결정부위 서열 중 경쇄를 설계하는 경우에 해당 경쇄는 카파(kappa) 경쇄 및/또는 람다(lambda) 경쇄일 수 있다.
- [33] 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-H1, CDR-H2, CDR-L1 또는 CDR-L2에 대하여 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 i) 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자 사용빈도, ii) 각 아미노산 위치별로 체세포 초돌연변이에 의한 각 20종의 아미노산으로의 변이 빈도, iii) 상보성 결정부위 서열의 길이별 빈도 또는 iv) 이들의 조합을 분석하여 계산된 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [34] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-L3에 대하여
- [35] a) 상기 상보성 결정부위의 N 말단으로부터 7개 내지 8개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 i) 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자 사용빈도, ii) 각 아미노산 위치별로 체세포 초돌연변이에 의한 각 20종의 아미노산으로의 변이 빈도, iii) 상보성 결정부위 CDR-L3 서열의 길이별 빈도 또는 iv) 이들의 조합을 분석하여 계산된 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하고;
- [36] b) 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 2개 내지 3개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 각 아미노산 위치별 빈도를 분석하여 계산된 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것이며;
- [37] 상기 CDR-L3는 9개 내지 11개의 아미노산으로 이루어지고, 상기 빈도 분석은 각 길이별로 나누어 분석하며, 상기 CDR-L3 서열의 설계는 설계하고자 하는 CDR-L3의 길이와 동일한 아미노산 길이를 가지는 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위 CDR-L3를 분석한 결과를 기반으로 설계하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.

- [38] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 상보성 결정부위 서열 중 경쇄를 설계하는 경우에 해당 경쇄는 카파(kappa) 경쇄 또는 람다(lambda) 경쇄인 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [39] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-H3에 대하여
- [40] a) 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 3개의 아미노산을 제외한 서열들은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하고;
- [41] b) 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 3개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 해당 3개의 아미노산 서열의 위치별 빈도를 분석하여 계산된 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것이며;
- [42] 상기 CDR-H3는 9개 내지 20개의 아미노산으로 이루어지고, 상기 빈도 분석은 각 길이별로 나누어 분석하며, 상기 CDR-H3 서열의 설계는 설계하고자 하는 CDR-H3의 길이와 동일한 아미노산 길이를 가지는 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위 CDR-H3를 분석한 결과를 기반으로 설계하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [43] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 상보성 결정부위 아미노산 서열을 설계한 후 설계된 서열에서 N-당화, 이성질체화, 탈아미드화, 절단, 산화가 일어날 수 있는 서열을 배제하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [44] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 상보성 결정부위 아미노산 서열을 설계한 후 설계한 서열을 폴리뉴클레오티드로 역번역한 후, 번역된 폴리뉴클레오티드 5' 및 3' 말단에 각각 해당하는 인간항체 생식계열(germline) 유전자의 가변영역 골격부위 서열을 연결한 올리고뉴클레오티드 서열을 설계하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [45] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 항체는 VH3-23 (Genebank accession No. Z12347), VK3-A27 (Genebank accession No. X93639), VL1g(GenBank accession No. Z73663) 또는 이들의 단편으로부터 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [46] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, 경쇄 상보성 결정부위를 설계함에 있어 카파 경쇄와 람다 경쇄에 대하여 각각 CDR을 설계하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [47] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 카파 경쇄와 람다 경쇄에 대하여 각 경쇄 가변영역을 설계시, 카파 경쇄의 CDR은 VK3-A27의 카파 경쇄 골격부위와 연결하여 조립하고, 람다 경쇄의 CDR은 VL1g의 람다 경쇄 골격부위와 연결하여 조립하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.
- [48] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, Fc

단편, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 단일 가변도메인 항체 및 Fv로 이루어진 군에서 선택된 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.

[49] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 하기 1) 내지 6) 중 어느 하나 이상에 해당하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다:

[50] 1) 상기 중쇄의 CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열을 사용;

[51] 2) 상기 중쇄의 CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의 아미노산 서열을 사용;

[52] 3) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열을 사용;

[53] 4) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열을 사용;

[54] 5) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열로써 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열을 사용; 및

[55] 6) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열을 사용.

[56] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 하기 1) 내지 2) 중 어느 하나 이상에 해당하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다:

[57] 1) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열을 사용; 및

[58] 2) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열을 사용.

[59] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도는 항체서열 데이터베이스의 분석을 통해 알아낸 자연인간항체에서의 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도를 모사한 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.

[60] 본 발명의 다른 양태는, 상기 항체 라이브러리를 제작하는 방법에 의해 제조된 항체 라이브러리를 제공한다.

[61] 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 항체 라이브러리는 하기 1) 내지 9) 중 하나 이상에 해당하는 것인, 항체 라이브러리를 제공한다:

[62] 1) 중쇄의 CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열을 사용;

- [63] 2) 중쇄의 CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의 아미노산 서열을 사용;
- [64] 3) 중쇄의 CDR-H3는 길이가 아미노산 9개 내지 20개이며, 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도가 자연인간항체 서열들의 CDR-H3의 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 모사한 형태;
- [65] 4) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열을 사용;
- [66] 5) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열을 사용;
- [67] 6) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열을 사용;
- [68] 7) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열을 사용;
- [69] 8) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열을 사용; 및
- [70] 9) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열을 사용.
- [71] 또 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 상기 1) 내지 2) 및 4) 내지 9)의 경우 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도는 항체서열 데이터베이스의 분석을 통해 알아낸 자연인간항체에서의 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도를 모사한, 항체 라이브러리를 제공한다.

[72]

[73] 상기 본 발명을 설명함에 있어, 사용되는 용어를 하기 정의하였다.

[74]

[75] A. 정의

[76]

[77] "파지표면제시 (phage display)"는 M13 박테리오파지의 유전자를 조작하여 그 표면단백질 중 하나의 유전자에 외부단백질의 유전자를 융합하고, 생산된 파지의 표면단백질에 외부단백질이 융합되어 파지의 표면에 제시되는 기법이다. 단백질을 표면제시하는 경우 흔히 gIII 유전자의 5' 쪽에 외부유전자를 융합한다.

[78]

- [79] "항체"는 목표항원에 특이적으로 결합하는 단백질을 의미하며, 다클론 항체 및 단일클론항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다. 특히, 항체는 경쇄(light chain)과 중쇄(heavy chain)이 각각 2개씩 모여 이루어지는 헤테로테트라머이며 각각의 사슬은 아미노산 서열이 가변적인 가변도메인(variable domain)과 일정한 서열을 가지는 고정도메인(constant domain)으로 이루어질 수 있으나, 상기 형태에 제한되지 않는다.
- [80] 본 발명에서 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하며, 항체 단편을 포함할 수 있다. 항체 단편은 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fc 단편, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 단일 가변도메인 항체 및 Fv 등을 포함하며 항체의 항원 결합 형태를 포함한다. 상기 Fc 단편은 Fc 수용체와 같은 세포 표면 수용체와 결합할 수 있는 항체의 말단 부위를 의미하며, 항체의 두 개의 중쇄의 2번 또는 3번째 보존 도메인(constant domain)으로 구성된다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중쇄 Fv(dsFv, disulfide-stabilized variable fragment)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv, single chain variable fragment)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역(VH)과 경쇄의 가변 영역(VL)이 공유 결합으로 연결되어 있다. 단일 가변도메인 항체는 중쇄 또는 경쇄 가변도메인 하나만으로 이루어진 항체조각을 의미한다.
- [81] 본 발명의 항체는 재조합 단일 사슬 Fv 단편(scFv)을 포함하며, 이가(bivalent) 또는 양특이성 분자, 디아바디(Diabody), 트리아바디(Triabody) 및 테트라바디(Tetrabody)를 모두 제한없이 포함한다.
- [82]
- [83] "상보성 결정부위" (Complementarity determining region, CDR)는 가변도메인의 경쇄와 중쇄에 각각 3개씩 존재하는 부위이며 가변도메인 중에서도 아미노산 서열의 가변성이 특히 높은 부분으로 이러한 높은 가변성에 의해 다양한 항원에 대해 특이적 항체가 찾아질 수 있다. 중쇄의 상보성 결정부위 3개를 아미노 말단부터 카르복실 말단방향으로 차례로 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3라 하며, 경쇄의 상보성 결정부위 3개를 아미노 말단부터 카르복실 말단방향으로 차례로 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3라 한다. 하나의 항체에서 이 여섯 개의 상보성 결정부위가 모여 항원 결합부위를 형성한다.

[84]

[85] "골격 부위"는 가변도메인 서열 중 상보성 결정부위를 제외한 나머지 부위를 말하며, 상보성 결정부위에 비해 서열의 가변성 및 다양성이 낮고 일반적으로 항원-항체 반응에 참여하지 않는 부위를 의미한다.

[86]

[87] "면역글로불린"은 항체와 구조적 특성이 동일하며, 항원특이성이 없는 항체유사분자와 항체를 포함하는 개념이다.

[88]

[89] "생식계열 면역글로불린 유전자"는 동물의 생식세포에 존재하는, B 세포로 분화되어 면역글로불린 유전자의 재조합이나 체세포 초돌연변이(somatic hypermutation) 과정을 거치지 않은 항체 유전자이며, 그 수는 동물의 종에 따라 다르나 보통 수십 내지 수백개이다.

[90]

[91] "숙성 항체"는 B 세포 분화를 통해 생식계열 면역글로불린 유전자들의 재조합, 또는 재조합과 체세포 초돌연변이 과정을 거쳐 만들어진 항체 유전자로부터 발현된 항체 단백질이다.

[92]

[93] "단일사슬단편항체(single-chain Fv, scFv)"는 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변도메인을 15개 내외의 아미노산이 연결된 펩타이드 사슬로 이루어진 연결부위(linker)로 연결한 단백질이다. 경쇄가변도메인 - 연결부위 - 중쇄가변도메인, 또는 중쇄가변도메인 - 연결부위 - 경쇄가변도메인의 순서 모두 가능하며, 원 항체와 동일 혹은 유사한 항원특이성을 가진다. 연결부위는 주로 글리신(glycine)과 세린(serine)으로 이루어진 친수성의 유연한 펩타이드 사슬로서 "(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃"의 15개의 아미노산 서열 혹은 유사한 서열이 주로 사용될 수 있다.

[94]

[95] "항체 라이브러리"는 서로 다른 서열을 가지는 다양한 항체 유전자들의 집합이다. 항체라이브러리로부터 임의의 항원에 대해 특이적 항체를 분리하기 위해서는 매우 높은 다양성이 요구되며, 일반적으로 10^9 내지 10^{11} 개의 서로 다른 항체 클론들로 이루어진 라이브러리가 구축되어 사용된다. 이러한 항체라이브러리를 이루는 항체 유전자는 파지미드(phagemid) 벡터에 클로닝되어 대장균에 트랜스폼 된다.

[96]

[97] "파지미드(phagemid)" 벡터는 파지복제시작점(phage origin of replication)을 가지는 플라스미드 DNA이다. 통상적으로 항생제내성유전자를 선택 마커(selection marker)로 가지고 있다. 파지표면제시에 사용되는 파지미드 벡터의 경우 M13 파지의 gIII 유전자 혹은 그 일부가 포함되어 있으며, 라이브러리 유전자는 gIII 유전자의 5' 말단에 라이게이션(ligation)되어

대장균에서 융합단백질로서 발현된다.

[98]

[99] "보조파지(helper phage)"는 파지미드가 파지 입자로 조립되도록 필요한 유전정보를 제공하는 파지이다. 파지미드에는 파지 유전자 중 gIII 혹은 그 일부만이 존재하므로 파지미드로 형질전환된 대장균을 보조파지로 감염시켜 나머지 파지 유전자를 공급하게 된다. M13K07 혹은 VCSM13 등의 종류가 있으며 대부분 카나마이신(kanamycin) 등 항생제 내성 유전자를 포함하여 보조파지에 감염된 대장균을 선택할 수 있도록 하고 있다. 또한 조립신호(packaging signal)에 결합이 있으므로 보조파지 유전자보다 파지미드 유전자가 선별적으로 파지입자 속으로 조립된다.

[100]

[101] "패닝"은 파지 표면에 디스플레이된 항체 등 단백질의 라이브러리로부터 특정 분자에 결합하는 클론만을 선택적으로 증폭시키는 과정을 뜻한다. 표면에 고정된 표적분자에 파지 라이브러리를 가하여 결합을 유도하고, 결합하지 않은 파지 클론을 세척하여 제거한 후, 결합된 파지 클론들만을 용출하여 다시 대장균 숙주에 감염시키고 보조 파지를 이용하여 표적 결합 파지 클론들을 증폭하는 절차를 거친다. 대부분 이러한 과정을 3 내지 4회 혹은 그 이상 반복하여 결합 클론의 비율을 최대한 높게 된다.

[102]

[103] **B. 라이브러리의 설계, 구축 및 검증**

[104]

[105] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 항체의 상보성 결정부위(complementarity Determining Regions, CDRs) 서열을 개별적으로 설계하는 단계; 및 상기 설계한 서열을 가지는 상보성 결정부위들을 포함하는 항체를 합성하여 라이브러리를 제조하는 단계를 포함하는, 항체 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.

[106]

[107] 본 발명에 기술된 방법을 이용해 인간항체 라이브러리를 구축하고 그로부터 임의의 항원에 대한 인간항체를 얻을 수 있다. 항체 라이브러리는 골수, 비장, 혈액 등에 포함된 B 세포로부터 그 다양성을 얻는 방법과 인공적인 설계와 합성을 통해 다양성을 얻는 방법으로 구축될 수 있으며 본 발명은 합성 인간항체 라이브러리의 구축 및 검증을 제공한다.

[108]

[109] 파지 표면제시 항체라이브러리는 면역 글로불린 분자의 일부인 Fab 혹은 scFv 단편의 형태로 구축되어 진다. 이들 단편은 150 kDa 크기의 면역 글로불린보다 작기 때문에 단백질 공학적인 조작의 효율성을 기할 수 있으며, 면역 글로불린 분자와 동일한 항원선택성을 가진다. 본 발명에서는 25 kDa 크기를 가지는 scFv 단편을 이용한 라이브러리를 구축하였으며, 구체적으로 면역 글로불린의 VH

도메인과 VL 도메인을 15개의 아미노산으로 이루어진 사슬 즉 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ 로 연결한 하나의 폴리펩티드 사슬이다.

[110]

[111] 합성 라이브러리의 구축을 위해서는 라이브러리 서열의 설계가 선행되어야 한다. 비교적 높은 골격 다양성을 가지는 B세포 유래 항체 라이브러리 혹은 자연항체 라이브러리(natural antibody library)와 달리, 합성 항체라이브러리는 한 개 혹은 제한된 개수의 골격 서열을 기반으로 구축된다.

[112] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 제작된 항체 라이브러리는 두 개의 골격을 가진다. 구체적으로 라이브러리를 이루는 모든 클론들이 인간 면역글로불린의 VH3-23 유전자와 VK3-A27 유전자가 연결부위로 이어진 scFv, 혹은 VH3-23 유전자와 VL1g 유전자가 연결부위로 이어진 scFv를 골격으로 가지도록 구축하였으며, 이 중 상보성 결정부위에 인공적 다양성을 도입하여 라이브러리를 구축하였다. 즉 상기 라이브러리의 골격에 다양한 상보성 결정부위(CDR) 서열을 삽입하여 scFv 항체 라이브러리를 제작하였다.

[113]

[114] 구체적으로 본 발명의 항체 라이브러리는 항체 라이브러리를 구성하는 항체의 상보성 결정부위를 이루는 중쇄 상보성 결정부위 1(CDR-H1), 중쇄 상보성 결정부위 2(CDR-H2), 중쇄 상보성 결정부위 3(CDR-H3), 경쇄 상보성 결정부위 1(CDR-L1), 경쇄 상보성 결정부위 2(CDR-L2) 및 경쇄 상보성 결정부위 3(CDR-L3)은 다양성(polymorphism)을 가지는 것일 수 있다.

[115] 특히, 본 발명에서 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-H1, CDR-H2, CDR-L1 또는 CDR-L2에 대하여 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 i) 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자 사용빈도, ii) 각 아미노산 위치별로 체세포 초돌연변이에 의한 각 20종의 아미노산으로의 변이 빈도, iii) 상보성 결정부위 서열의 길이별 빈도 또는 iv) 이들의 조합을 분석하여 계산된 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것일 수 있다.

[116] 한편, 본 발명은 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-L3에 대하여 a) 상기 CDR-L3 상보성 결정부위의 N 말단으로부터 7개 내지 8개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 i) 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자 사용빈도, ii) 각 아미노산 위치별로 체세포 초돌연변이에 의한 각 20종의 아미노산으로의 변이 빈도, iii) 상보성 결정부위 CDR-L3 서열의 길이별 빈도 또는 iv) 이들의 조합을 분석하여 계산된 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하고;

[117] b) 상기 CDR-L3 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 2개 내지 3개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 각 아미노산 위치별 빈도를 분석하여 계산된 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것이며;

[118] 상기 CDR-L3는 9개 내지 11개의 아미노산으로 이루어지고, 상기 빈도 분석은 각 길이별로 나누어 분석하며, 상기 CDR-L3 서열의 설계는 설계하고자 하는

CDR-L3의 길이와 동일한 아미노산 길이를 가지는 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위 CDR-L3를 분석한 결과를 기반으로 설계하는 것일 수 있다.

- [119] 아울러, 본 발명은 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-H3에 대하여 a) 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 3개의 아미노산을 제외한 서열들은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하고;
- [120] b) 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 3개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 해당 3개 아미노산 서열의 위치별 빈도를 분석하여 계산된 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것이며;
- [121] 상기 CDR-H3는 9개 내지 20개의 아미노산으로 이루어지고, 상기 빈도 분석은 각 길이별로 나누어 분석하며, 상기 CDR-H3 서열의 설계는 설계하고자 하는 CDR-H3의 길이와 동일한 아미노산 길이를 가지는 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위 CDR-H3를 분석한 결과를 기반으로 설계하는 것일 수 있다.
- [122]
- [123] 본 발명에서 본 발명의 라이브러리 중쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로써, CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열이며, CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의 아미노산 서열일 수 있다. 한편, CDR-H3의 설계에 있어서는 생식계열 CDR 서열을 사용하지 않고, 그 길이를 아미노산 9개 내지 20개로 하여, 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도가 자연인간항체 서열들의 CDR-H3의 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 모사하도록 할 수 있다.
- [124] 또한, 본 발명의 라이브러리 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로, 램다 경쇄 또는 카파 경쇄를 가질 수 있으며, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열이고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열일 수 있다. 한편, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열일 수 있다.
- [125] 한편, 본 발명의 램다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열이고, 램다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열일 수 있다. 한편, 램다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열일 수 있다.
- [126] 상기 항체 라이브러리를 제작하는 방법, 특히 본 발명의 항체 라이브러리에 포함되는 CDR-H1, CDR-H2, CDR-L1 및 CDR-L2에 대한 설계를 하는 방법은 하기 1) 내지 6) 중 어느 하나 이상에 해당할 수 있다:
- [127] 1) 상기 중쇄의 CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열을 사용;
- [128] 2) 상기 중쇄의 CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의

- 아미노산 서열을 사용;
- [129] 3) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열을 사용;
- [130] 4) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열을 사용;
- [131] 5) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열로써 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열을 사용; 및
- [132] 6) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열을 사용.
- [133] 또한, 상기 항체 라이브러리를 제작하는 방법, 특히 본 발명의 항체 라이브러리에 포함되는 CDR-L3에 대한 설계를 하는 방법은 하기 1) 내지 2) 중 어느 하나 이상에 해당할 수 있다:
- [134] 1) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열을 사용; 및
- [135] 2) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열을 사용.
- [136] 상기 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도는 항체서열 데이터베이스의 분석을 통해 알아낸 자연인간항체에서의 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도를 모사한 것일 수 있다.
- [137]
- [138] 본 발명의 구체적인 실시예에서 본 발명의 라이브러리 중쇄 CDR 설계에 사용된 생식계열 CDR 서열은, CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열이며, CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의 아미노산 서열이었다. 중쇄의 CDR-H3의 설계에 있어 그 길이를 아미노산 9개 내지 20개로 하여, 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도가 자연인간항체 서열들의 CDR-H3의 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 모사하도록 설계하였다.
- [139] 또한, 본 발명의 라이브러리 경쇄 CDR 설계에 사용된 생식계열 CDR 서열로, 람다 경쇄 또는 카파 경쇄 중에서 먼저 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열이고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열이었다. 한편, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호

210 내지 236의 아미노산 서열이었다.

- [140] 한편, 본 발명의 람다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열이고, 람다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열이었다. 한편, 람다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열이었다.

[141]

- [142] 본 발명의 항체 라이브러리 제조방법에서 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, 경쇄 상보성 결정부위를 설계함에 있어 카파 경쇄와 람다 경쇄에 대하여 각각 CDR을 설계할 수 있으며, 카파 경쇄와 람다 경쇄에 대하여 각 경쇄 가변영역을 설계시, 카파 경쇄의 CDR은 VK3-A27의 카파 경쇄 골격부위와 연결하여 조립하고, 람다 경쇄의 CDR은 VL1g의 람다 경쇄 골격부위와 연결하여 조립하는 것일 수 있다.

- [143] 본 발명에서 "모사"란 아미노산 서열 등의 발현 빈도 또는 변이 빈도 등을 반영하여 랜덤으로 시뮬레이션하여 서열을 설계하는 것을 의미하며, 자연항체, 특히 인간유래 숙성 항체의 아미노산의 발현 빈도 또는 변이 빈도를 모사한다는 의미를 내포하고 있다.

[144]

- [145] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상보성 결정부위의 다양성은 알려진 인간항체들의 CDR 서열의 특성을 분석하고 시뮬레이션하여 인간항체 CDR과 유사한 서열적 다양성을 가지도록 설계하였다. 구체적으로, 먼저 IMGT 데이터베이스 (<http://imgt.org>)로부터 8,846개의 인간 면역글로불린 중쇄 가변부위 (VH), 3,110개의 카파 경쇄 가변부위 (VK), 2,440개의 람다 경쇄 가변부위 (VL) 서열을 다운로드하여 CDR 서열을 추출하였다. 다음으로, V-base (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php>)에 있는 인간항체 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자의 CDR 서열들과 상기 IMGT 데이터베이스에서 추출된 숙성(mature) CDR 서열들을 비교 분석하여, i) 각 숙성 CDR서열에 가장 가까운 생식계열 CDR 서열을 찾고, 이로부터 각 숙성 CDR에 일어난 돌연변이의 위치, 종류, 빈도를 확인하고 ii) 각 생식계열 CDR이 숙성 인간항체에서 사용되는 빈도를 계산하여 이용하였다.

- [146] 먼저, 재조합이 일어나지 않고 체세포 초돌연변이만 일어나는 중쇄 및 경쇄의 CDR1과 CDR2에 대해서는 컴퓨터를 이용한 시뮬레이션을 통하여, 인간 생식계열 CDR 서열에 가상의 돌연변이를 도입하여 인간유래 숙성 항체의 CDR과 유사한 서열 및 생식계열 CDR 사용빈도를 가지도록 CDR 서열들을 설계하였다. 각 CDR 별로 1,500개의 시뮬레이션된 서열들이 설계되었다.

- [147] 다음으로, 재조합 및 체세포 초돌연변이가 일어나는 경쇄의 CDR3에 대하여, 카파 경쇄의 경우 첫 7개의 아미노산에 대해서 CDR1 및 CDR2에서와 동일한 작업을 수행하고, 끝의 2개 혹은 3개의 아미노산 서열은 숙성 인간항체의 카파

경쇄 CDR3에서의 서열빈도를 조사하여 총 9개 혹은 10개 아미노산으로 이루어진 1,500개의 서열들을 설계하였다. 람다 경쇄의 경우 첫 7개 혹은 8개의 아미노산에 대하여 CDR1 및 CDR2에서와 동일한 작업을 수행하고, 끝의 2개 혹은 3개의 아미노산 서열은 숙성 인간항체의 람다 경쇄 CDR3에서의 서열빈도를 조사하여 총 9개, 10개, 혹은 11개 아미노산으로 이루어진 1,500개의 서열들을 설계하였다.

[148] 마지막으로, 재조합 및 체세포 초돌연변이가 일어나는 중쇄의 CDR3에서는 VDJ 재조합 및 접합부위 유연성(junctional flexibility), P-첨가(P-addition), N-첨가(N-addition) 등의 기전에 의하여 생식계열 서열의 확인이 어려운 경우가 많으므로 다른 CDR 같은 분석이 곤란함에 따라, 우선 길이별로 9개에서 20개의 아미노산 길이의 숙성 인간항체 CDR-H3 서열을 나누어 분석하여, 각 길이의 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 분석하여 시뮬레이션 하였다. 다만 마지막 3개의 아미노산 서열은 J 유전자로부터 유래하는 경우가 대부분이므로 각 CDR-H3 길이별로 자주 사용되는 최대 8개의 삼(3)아미노산 서열을 숙성항체에서의 사용빈도를 고려하여 설계하였다 (도 1).

[149] 특히, 중쇄의 CDR-H3를 설계하는데 있어 자연인간항체의 CDR-H3의 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도는 항체서열 데이터베이스의 분석을 통해 알아낼 수 있으며, 대표적으로 IMGT database (<http://www.imgt.org>)에 취합된 항체서열을 분석할 수 있다.

[150]

[151] 한편, 본 발명의 항체 라이브러리를 제조하는 방법은 상기 상보성 결정부위 아미노산 서열을 설계한 후 설계된 서열에서 N-당화, 이성질체화, 탈아미드화, 절단, 산화가 일어날 수 있는 서열을 배제하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[152] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, CDR 서열의 설계시, 다음의 번역후 변형(post translational modification) 서열을 포함하는 것들을 배제하였다. 단백질의 번역후 변형은 단백질의 기능 및 물성에 영향을 줄 수 있으므로 항체 라이브러리의 설계시 가능한 한 배제하는 것이 유리하다. 상기 번역 후 변형 서열에는, N-당화(N-glycosylation) 서열, 즉 Asp-Xaa-Ser/Thr (Asp: 아스파라긴산, Xaa: 시스테인을 제외한 임의의 19종의 아미노산, Ser/Thr: 세린 혹은 트레오닌) 서열, 이성질체화(isomerization) 서열, 탈아미드화(deamidation) 서열, 절단(cleavage) 서열 및 산화(oxidation) 서열을 제외하였다.

[153]

[154] 한편, 본 발명의 항체 라이브러리를 제조하는 방법은 상기 상보성 결정부위 아미노산 서열을 설계한 후 설계한 서열을 폴리뉴클레오티드로 역번역한 후, 번역된 폴리뉴클레오티드 5' 및 3' 말단에 각각 해당하는 인간항체 생식계열(germline) 유전자의 가변영역 골격부위 서열을 연결한 올리고뉴클레오티드 서열을 설계하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

- [155] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 설계된 CDR의 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열로 역번역하였으며 CDR 서열의 양 옆에 항체 가변부위의 골격부위 서열을 더하여 100개의 뉴클레오티드로 이루어진 올리고뉴클레오티드 서열들을 최종설계하였다. 총 19,836개의 서열을 설계하고, 이를 배열 합성(array synthesis)법을 통하여 올리고뉴클레오티드 혼합물의 형태로 합성하였다 (미국 텍사스주 휴스턴 소재 LC Sciences사).
- [156]
- [157] 본 발명의 항체 라이브러리를 제조하는 방법에서 항체는 항체 라이브러리 제작의 골격으로 VH3-23, VK3-A27, VL1g 또는 이들의 단편으로부터 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 VH3-23는 Genebank accession No. Z12347에 해당하는 것일 수 있고, VK3-A27는 Genebank accession No. X93639에 해당하는 것일 수 있으며, VL1g는 GenBank accession No. Z73663에 해당하는 것일 수 있다.
- [158] 구체적인 일 실시예로 본 발명에서는 항체 라이브러리 제작의 골격으로 사용하기 위하여 코돈 최적화된 scFv 유전자들을 합성하였으며 (미국 뉴저지 주 피스카타웨이 시 소재 Genscript 사), 이 유전자들은 생식계열 유전자인 VH3-23와 VK3-A27, 또는 VH3-23과 VL1g가 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃의 연결부위로 연결된 scFv 유전자들로 pUC57 벡터에 클로닝되어있으며 파지미드 벡터로의 클로닝을 위해 pComb3X 벡터와 호환되는 두 개의 SfiI 제한효소 부위가 포함된다. 라이브러리 제작의 편의를 위하여, pUC57 벡터에 클로닝된 이 유전자들을 pComb3X 벡터로도 클로닝하여 PCR의 주형으로 사용하였다. 골격으로 사용하기 위한 용도이므로 이 유전자들은 서열적 다양성이 없는 단일서열들이며, 포유동물세포에서 발현이 향상되도록 코돈이 최적화되었으나 PCR 과정에서의 비특이적 어닐링(annealing)을 방지하기 위하여 아미노산 서열에 변화가 없는 범위에서 일부 최적화 DNA서열에 변화를 가하였다(서열번호 19 및 서열번호 20).
- [159]
- [160] 본 발명의 항체 라이브러리를 제조하는 방법에서 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, Fc 단편, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 단일 가변도메인 항체 및 Fv로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [161] 특히, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 scFv 항체 라이브러리를 제작하였으며, 제작한 라이브러리로부터 scFv의 발현을 확인하였다 (도 2). 항체 라이브러리의 구축을 검증하기 위하여, 또한 scFv의 서열을 분석하였다. 라이브러리로부터 임의의 클론들을 선택하고 scFv 유전자를 PCR 기법으로 증폭한 후, DNA를 정제하여 서열분석을 의뢰하였다. 서열분석 결과, 설계한 대로 다양한 서열과 길이를 가지는 CDR들이 라이브러리를 이루는 scFv 클론들에 도입되어 있음을 확인할 수 있다(도 3). 구체적인 서열분석 결과, 18개의 scFv 서열들 중 절단(아스파라긴산-프롤린)서열이 PCR 오류로 도입된

1건을 제외하면 배제하고자 하였던 번역후 변형 서열들이 존재하지 않는 것을 확인하였다. 이에 비하여 인간 유래 숙성항체의 각 CDR에서의 이러한 번역후 변형을 유발할 수 있는 서열들의 존재비율을 분석한 결과 중쇄의 CDR-H1에서 5.7%, CDR-H2에서 39.7%, CDR-H3에서 34.5%, 카파 경쇄의 CDR-L1에서 12.6%, CDR-L2에서 0.6%, CDR-L3에서 15.9%, 람다 경쇄의 CDR-L1에서 8.3%, CDR-L2에서 6.4%, CDR-L3에서 24.0% 발견되었다. 이로부터 설계의도대로 번역후 변형이 최소화될 수 있는 항체 라이브러리가 구축되었음을 확인하였다.

[162]

[163] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 항체 라이브러리를 제작하는 방법에 의해 제조된 항체 라이브러리를 제공한다.

[164] 본 발명의 항체 라이브러리는 CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열로써 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열을 사용할 수 있으며, CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의 아미노산 서열을 사용할 수 있다. 한편, CDR-H3의 설계에 있어 그 길이를 아미노산 9개 내지 20개로 하여, 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도가 자연인간항체 서열들의 CDR-H3의 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 모사하여 설계된 것일 수 있다.

[165] 본 발명의 항체 라이브러리는 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄 또는 카파 경쇄를 사용할 수 있으며, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열을 사용할 수 있고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열을 사용하여 제작된 것일 수 있다. 아울러, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열을 사용하여 제작된 것일 수 있다.

[166] 한편, 본 발명의 항체 라이브러리는 람다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열로써 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열을 사용할 수 있고, 람다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열을 사용하여 제작된 것일 수 있다. 아울러, 람다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열을 사용하여 제작된 것일 수 있다.

[167] 구체적으로, 본 발명의 항체 라이브러리는 하기 1) 내지 9) 중 하나 이상에 해당하는 것인, 항체 라이브러리일 수 있다:

[168] 1) 중쇄의 CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열을 사용;

[169] 2) 중쇄의 CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의 아미노산 서열을 사용;

[170] 3) 중쇄의 CDR-H3는 길이가 아미노산 9개 내지 20개이며, 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도가 자연인간항체 서열들의 CDR-H3의 길이별

빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 모사한 형태;

- [171] 4) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열을 사용;
- [172] 5) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열을 사용;
- [173] 6) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열을 사용;
- [174] 7) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열을 사용;
- [175] 8) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열을 사용; 및
- [176] 9) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열을 사용.
- [177] 특히, 본 발명은 상기 1) 내지 2) 및 4) 내지 9)의 경우 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도는 항체서열 데이터베이스의 분석을 통해 알아낸 자연인간항체에서의 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도를 모사한, 항체 라이브러리일 수 있다.
- [178] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 형질전환된 대장균 라이브러리를 배양하고 VCSM13 보조 파지(helper phage)로 감염시켜 scFv 클론이 표면제시된 항체파지 라이브러리를 얻었다. 이 라이브러리를 통하여 라이소자임(Hen egg white lysozyme, HEWL) 및 AIMP1(101-192) 항원에 대하여 항원특이적 항체를 선별하는 패닝 실험을 통해 항체파지 라이브러리의 기능성을 검증한 결과, HEWL 항원에 대하여 188개의 클론들을 ELISA로 스크리닝하여 배경신호 대비 3배 이상의 결합신호를 보이는 ELISA 양성 클론들을 150개 확인하였으며 이 중 16개를 서열분석하여 5개의 고유 서열을 발견하였다. 또한, AIMP1(101-192)에 대하여 94개의 클론들을 ELISA로 스크리닝하여 배경신호 대비 3배 이상의 결합신호를 보이는 ELISA 양성 클론들을 18개 확인하였으며 이 중 5개를 서열분석하여 2개의 고유 서열을 발견하였다.
- [179]
- [180] 본 항체 라이브러리 설계 및 구축기술을 이용하여, 복수의 인간 생식계열 변이클로날 가변부위 유전자를 골격으로 하는 개선된 라이브러리를 제작할 수 있다.
- [181] 즉, 본 발명에 기술된 항체 라이브러리가 중쇄, 카파 경쇄, 람다 경쇄당 각

1개씩의 골격(각각 VH3-23, VK3-A27, VL1g)을 사용하면서 여기에 서로 다른 다양한 생식계열 면역글로불린 유전자로부터 유래하는 CDR에 돌연변이를 도입한 합성 CDR을 삽입한 설계방식을 따라 제조될 수 있을 뿐만 아니라, 개선된 설계를 통하여 복수의 다양한 생식계열 면역글로불린 가변부위의 골격 유전자를 기반으로 하여 여기에 각 해당 골격과 동일한 유전자군의 생식계열 면역글로불린 유전자로부터 유래하는 CDR에 돌연변이를 도입한 합성 CDR을 각각 도입함으로써 골격과 CDR의 연결 조합이 자연 인간유래 항체와 유사하게 제작된 라이브러리를 얻을 수 있다.

- [182] 또한 항체 라이브러리 제작과정에서 CDR의 길이에 따른 합성 및 증폭효율의 차이로 인하여 짧은 CDR이 선호되는 편향성을 해결하기 위하여, CDR 길이별로 서브 라이브러리를 각각 제작한 후 자연 인간항체에서 발견되는 CDR 길이분포와 유사한 비율로 혼합하여 최종 라이브러리를 제작하는 것이 가능하다.

[183]

- [184] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 항체 라이브러리를 제작하는 방법에 의해 제조된 항체 라이브러리로부터 제작된 항체를 제공한다.

- [185] 본 발명에서 항체, 항체 라이브러리 등은 상기 설명한 바와 같다.

발명의 실시를 위한 형태

- [186] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[187]

- [188] 실시예 1: 항체 라이브러리 구축

[189]

- [190] 본 발명은 합성 인간항체 라이브러리를 구축하고자 하였으며, 특히, 본 발명에서는 25 kDa 크기를 가지는 scFv 단편을 이용한 항체 라이브러리를 구축하였으며, 구체적으로 본 발명의 항체는 면역글로불린의 VH 도메인과 VL 도메인을 15개의 아미노산으로 이루어진 사슬 즉 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ 로 연결하여 제작하였다.

- [191] 합성 라이브러리의 구축을 위해서는 라이브러리 서열의 설계가 선행되어야 함에 따라 본 발명자들은 하기와 같이 서열을 설계하였다.

[192]

- [193] 1-1. 항체 라이브러리 골격 서열 설계

- [194] 비교적 높은 골격 다양성을 가지는 B세포 유래 항체 라이브러리 혹은 자연항체 라이브러리(natural antibody library)와 달리, 합성 항체라이브러리는 한 개 혹은 제한된 개수의 골격 서열을 기반으로 구축된다. 본 발명에서는 두 개의 항체 골격을 이용하여 항체 라이브러리를 제조하였다.

- [195] 구체적으로 본 발명의 항체 라이브러리를 이루는 모든 클론들이 인간 면역글로불린의 VH3-23 유전자와 VK3-A27 유전자가 연결부위로 이어진 scFv, 혹은 VH3-23 유전자와 VL1g 유전자가 연결부위로 이어진 scFv를 골격으로 가지며, 이 중 상보성 결정부위에 인공적 다양성을 도입하여 라이브러리를 구축하였다. 이에 사용한 골격 서열은 하기 표 1과 같다.

[196] [표1]

골격 형태	서열
(VH3-23)-linker-(Vk3-A27)	5'-gaagtgcagctgctggaaagtgagggtggactggtgcagcctggcggcagcctgcgcctgagctgtgccgccagcggattcaccttcagc<u>NNNNNNNN</u> <u>NNNNNNNN</u>tgggttcgccaagcacctggcaaaggcctggaatgggtg <u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>cgctttaccatcagccgcgataacagca aaaacaccctgtatctgcagatgaacagcctgcgcgccgaggacaccgcagt ctactactgt<u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>tggggacaaggtactctgg tgaccgtgagcagcgggtggaggaggtagcggaggtggatctggaggt ggaggtagtgaaatcgtgctgaccagagccctggcacctgagcctgagcc ctggcgaacgcgcaacactgtcatgc<u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>tg gtatcagcagaaaccaggtcaggctccacgtctgctgatctat<u>NNNNNNNN</u> <u>NNNNNNNN</u>ggcatccctgatcgcttctcaggatctggaagcggtagccg atcttacctgacctcagccgcctggaacctgaggactttgccgtgtattattgt <u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>ttcggtcagggcactaaagtggaaatca aa-3'(서열 번호 50) N'-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXXX XXWVRQAPGKGLEWVXXXXXRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKXXXXXXWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPG ERATLSCXXXXXXWYQQKPGQAPRLLIYXXXXXXGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCXXXXXXF GQGTKVEIK-C'(서열 번호 51)

(VH3-23)-linker-(V11g)	5'-gaagtgcagctgctggaaagtggaggtggactggtgcagcctggcggcagcctgcgcctgagctgtgccgccagcggattcaccttcagc<u>NNNNNNNN</u> <u>NNNNNNNN</u>tggttcgccaagcacctggcaaaggcctggaatgggtg <u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>cgctttaccatcagccgcgataacagca aaaacaccctgtatctgcagatgaacagcctgcgcgccgaggacaccgcagt ctactactgt<u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>tggggacaaggtactctgg tgaccgtgagcagcgggtggaggaggtagcggaggtggatctggaggt ggaggttagtcagagcgtgctgaccagcctcctagcgcctccggtacaccag gacagcgcgtgactattagctgt<u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>tgttac cagcaactgcctggaactgcacctaagctgctgatctat<u>NNNNNNNNNN</u> <u>NNNNNN</u>ggcgtgcctgatcgcttttagcggtagcaaatcaggcaccagcg ccagcctggccatcagcggccttcgctccgaagatgaagccgattattattgt<u>N</u> <u>NNNNNNNNNNNNNNNNNN</u>tttgggtggcggtagcaagctgaccgtgctg- 3'(서열번호 52) N'-EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSXXX XXWVRQAPGKGLEWVXXXXXRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKXXXXXWGQGLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPG QRVTISCXXXXXWYQQLPGTAPKLLIYXXXXXGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCXXXXX FGGGTKLTVL-C'(서열번호 53)
------------------------	--

[197]

[198] 상기 표의 핵산서열에서 N는 임의의 핵산, 아미노산 서열에서 X는 임의의 아미노산을 의미하고 밑줄친 부위가 CDR이고, 볼드체로 표시된 부위가 링커(연결부위)이다.

[199]

[200] 1-2. 항체 라이브러리 상보성 결정부위(CDR) 서열 설계

[201] 상기의 항체 라이브러리의 골격에 다양한 상보성 결정부위(CDR) 서열을 삽입하여 scFv 항체 라이브러리를 제작하였다. 상보성 결정부위의 다양성은 알려진 인간항체들의 CDR 서열의 특성을 분석하고 시뮬레이션하여 인간항체 CDR과 유사한 서열적 다양성을 가지도록 설계되었다. 그 구체적인 방법은 다음과 같다.

[202]

[203] - IMGT 데이터베이스 (<http://imgt.org>)로부터 8,846개의 인간 면역글로불린 중쇄 가변부위 (V_H), 3,110개의 카파 경쇄 가변부위 (V_K), 2,440개의 람다 경쇄 가변부위 (V_λ) 서열을 다운로드하여 CDR 서열을 추출하였다.

[204] 다운로드한 가변부위 서열들은 각 가변부위의 3개의 CDR이 모두 존재하는,

서로 동일하지 않은 서열들이다. CDR을 추출하기 위하여
<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#cdrid> 에 있는 규칙을 사용하였다.

[205]

[206] - V-base(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php>)에 있는 인간항체 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자의 CDR 서열들과 상기 IMGT 데이터베이스에서 추출된 숙성(mature) CDR 서열들을 비교 분석하여,

[207] (i) 각 숙성 CDR서열에 가장 가까운 생식계열 CDR 서열을 찾고, 이로부터 각 숙성 CDR에 일어난 돌연변이의 위치, 종류, 빈도를 확인하고 (ii) 각 생식계열 CDR이 숙성 인간항체에서 사용되는 빈도를 확인하였다.

[208] 본 발명의 라이브러리 중쇄 CDR 설계에 사용된 생식계열 CDR 서열로써, CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열이며, CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지 121의 아미노산 서열을 사용하였다. 한편, CDR-H3의 설계에 있어서는 생식계열 CDR 서열을 사용하지 않고, 그 길이를 아미노산 9개 내지 20개로 하여, 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도가 자연인간항체 서열들의 CDR-H3의 길이별 빈도 및 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 모사하도록 하였다.

[209] 한편, 본 발명의 라이브러리 경쇄 CDR 설계에 사용된 생식계열 CDR 서열로, 램다 경쇄 또는 카파 경쇄를 가질 수 있으며, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열이고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열이었다. 한편, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열이다.

[210] 한편, 본 발명의 램다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열이고, 램다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열이었다. 한편, 램다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열이다.

[211]

[212] - 재조합이 일어나지 않고 체세포 초돌연변이만 일어나는 중쇄 및 경쇄의 CDR1과 CDR2에 대해서 다음과 같은 작업을 수행하였다. 즉 컴퓨터를 이용한 시뮬레이션을 통하여, 인간 생식계열 CDR 서열에 가상의 돌연변이를 도입하여 인간유래 숙성 항체의 CDR과 유사한 서열 및 생식계열 CDR 사용빈도를 가지도록 CDR 서열들을 설계하였다. 각 CDR 별로 1,500개의 시뮬레이션된 서열들이 설계되었다.

[213]

[214] - 재조합 및 체세포 초돌연변이가 일어나는 경쇄의 CDR3에 대하여, 카파 경쇄의 경우 첫 7개의 아미노산에 대해서 CDR1 및 CDR2에서와 동일한 작업을 수행하고, 끝의 2개 혹은 3개의 아미노산 서열은 숙성 인간항체의 카파 경쇄

CDR3에서의 아미노산 빈도를 조사하여 총 9개 혹은 10개 아미노산으로 이루어진 1,500개의 서열들을 설계하였다. 램다 경쇄의 경우 첫 7개 혹은 8개의 아미노산에 대하여 CDR1 및 CDR2에서와 동일한 작업을 수행하고, 끝의 2개 혹은 3개의 아미노산 서열은 숙성 인간항체의 램다 경쇄 CDR3에서의 아미노산 빈도를 조사하여 총 9개, 10개, 혹은 11개 아미노산으로 이루어진 1,500개의 서열들을 설계하였다.

[215]

[216] -구체적으로, 대표적으로 수행했던 상기 CDR-L3 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 2개 내지 3개의 아미노산 서열의 빈도수는 하기 표 2와 같았다.

[217] [표2]

아미 노산	CDR-L3(%)												
	카파 CDR-L3길 이 9		카파 CDR-L3길이 10			람다 CDR-L3길 이 9		람다 CDR-L3길이 10			람다 CDR-L3길이 11		
	8번 째	9번 째	8번 째	9번 째	10 번 째	8번 째	9번 째	8번 째	9번 째	10 번 째	9번 째	10 번 째	11 번 째
A	0.4	2.5	1.2	0.0	0.4	12.8	0.6	3.7	2.5	1.0	13.2	1.2	0.6
C	0.7	0.0	0.2	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.3	0.0
D	0.4	0.1	0.2	0.8	0.0	0.6	0.0	2.9	0.2	0.0	0.8	0.5	0.0
E	0.2	0.0	0.2	0.4	0.0	1.1	0.0	0.2	1.0	0.0	0.5	1.9	0.0
F	7.2	0.0	0.4	10.1	0.0	0.0	0.0	1.2	3.4	0.0	2.9	0.8	0.0
G	1.5	0.3	2.8	1.8	0.2	5.6	0.0	2.9	4.9	0.0	32.9	5.7	0.0
H	2.1	0.1	0.4	1.4	0.2	0.6	0.0	4.7	0.7	0.0	26.5	0.2	0.0
I	6.2	0.2	0.6	9.3	0.4	1.7	6.7	2.7	0.2	6.9	0.2	0.0	2.8
K	0.2	0.0	0.2	0.4	0.0	1.7	0.0	0.7	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0
L	22.7	0.3	7.5	14.1	0.2	2.8	3.9	3.2	16.4	3.9	6.8	6.5	5.2
M	0.1	0.1	2.8	0.0	0.2	0.6	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.4	0.0
N	1.7	0.1	0.0	1.2	0.2	0.6	0.0	14.7	0.0	0.0	0.3	0.5	0.0
P	7.6	0.3	59.4	0.0	0.0	1.1	0.0	2.2	0.5	0.0	2.5	8.9	0.0
Q	4.9	0.0	2.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.7	1.2	0.0	1.3	1.7	0.0
R	16.2	0.1	14.7	1.6	0.0	4.5	0.0	1.5	7.8	0.0	1.4	7.0	0.0
S	0.8	2.8	4.4	1.2	4.0	0.6	0.0	8.1	0.7	0.0	2.9	2.7	0.0
T	0.4	92.8	2.0	0.6	94.1	1.7	0.0	47.5	0.2	0.0	1.3	0.0	0.0
V	1.1	0.3	0.6	3.8	0.0	42.5	88.8	0.5	25.2	88.2	2.3	29.7	91.4
W	10.9	0.0	0.2	27.5	0.0	9.5	0.0	0.0	22.8	0.0	0.1	18.4	0.0
Y	14.9	0.0	0.0	23.8	0.0	5.6	0.0	2.5	10.3	0.0	4.2	13.1	0.0

[218]

[219] 이에 따라, CDR-L3의 경우에는 생식계열 CDR 서열을 기반으로 앞쪽 7개(길이 11을 가지는 람다 경쇄 CDR-L3의 경우는 8개) 아미노산 서열을 고른 후, 그 후에 2 또는 3개의 아미노산을 상기 표 2의 빈도수를 기반으로 덧붙였다. 이는 V-J 재조합에 따라 CDR-L3의 C-말단 부위의 서열이 생식계열 서열에서 유래하지 않는 경우가 많고 불확정성이 높기 때문이다.

[220]

[221] - 재조합 및 체세포 초돌연변이가 일어나는 중쇄의 CDR3에서는 VDJ 재조합 및 접합부위 유연성(junctional flexibility), P-첨가(P-addition), N-첨가(N-addition) 등의 기전에 의하여 생식계열 서열의 확인이 어려운 경우가 많으므로 다른 CDR 같은 분석이 불가하다.

[222]

이에 따라 길이별로 9개에서 20개의 아미노산 길이의 CDR-H3 서열을 분석하여, 각 길이의 각 위치에서의 아미노산 사용빈도를 분석하여 시뮬레이션하였다. 다만 마지막 3개의 아미노산 서열은 J 유전자로부터 유래하는 경우가 대부분이므로 각 CDR-H3 길이별로 자주 사용되는 최대 8개의 삼(3)아미노산 서열을 숙성항체에서의 사용빈도를 고려하여 설계하였다.

[223]

항원-항체반응에서 CDR-H3의 기여도는 다른 CDR들보다 더 크므로, 다른 CDR보다 많은 수의 CDR-H3 서열을 설계하였다. 한 번의 배열합성에 3,918개의 올리고뉴클레오타이드 서열을 합성할 수 있어서, CDR-H3의 길이에 따라 짝수와 홀수로 나누어 각각 3,918개씩 총 7,836개의 서열을 설계하였다. 즉 CDR-H3의 길이가 9,11,13,15,17,19개인 것들을 함께 합성하고, 10,12,14,16,18,20개인 것들을 함께 합성하도록 설계하였다.

[224]

[225] 상기 서술한, 설계된 CDR들의 가짓수는 중복서열을 고려하지 않은 것으로, 실제 동일한 서열들이 중복되는 것을 제외하면 실제 고유 CDR은 하기 표 3와 같이 측정되었다.

[226]

[227] [표3]

scFv 라이브러리

CDR	H1	H2	H3	K1	K2	K3	L1	L2	L3
전체	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500
고유	502	1,300	7,526	657	202	920	678	279	1,015

[228]

[229] 상기 CDR 부위의 설계에 대한 개념설명이 도 1에 제시되어 있다.

[230]

[231] - 중쇄, 카파 경쇄, 람다 경쇄에 각각 3개씩의 CDR이 있으며, 총합 9개의 CDR이

있다. 이 중에 중쇄의 첫 번째 CDR (CDR-H1)과 카파 및 람다 경쇄의 두 번째 CDR (CDR-L2)를 제외한 나머지 CDR들은 인간유래 항체에서의 길이의 다양성이 크기 때문에, 다양한 길이를 가지도록 설계되었다. 구체적으로 중쇄의 CDR-H2는 16개 혹은 17개의 아미노산, 카파 경쇄의 CDR-L1은 11,12,16개의 아미노산, 람다 경쇄의 CDR-L1은 11,13,14개의 아미노산, 카파 경쇄의 CDR-L3은 9,10개의 아미노산, 람다 경쇄의 CDR-L3은 9,10,11개의 아미노산, 중쇄의 CDR-H3은 9개에서 20개의 아미노산을 가질 수 있도록 설계하였으며, 각 길이를 가지는 CDR 수의 비율은 인간유래항체에서의 각 길이의 비율을 따랐다.

[232]

[233] 1-3. 항체 라이브러리 상보성 결정부위(CDR) 서열 배제 서열

[234] CDR 서열의 설계시, 다음의 번역후 변형(post translational modification) 서열을 포함하는 것들을 배제하였다. 단백질의 번역후 변형은 단백질의 기능 및 물성에 영향을 줄 수 있으므로 항체 라이브러리의 설계시 가능한 한 배제하는 것이 유리하다.

[235]

[236] - N-당화 (N-glycosylation) 서열, 즉 Asp-Xaa-Ser/Thr (Asp: 아스파라긴산, Xaa: 시스테인을 제외한 임의의 19종의 아미노산, Ser/Thr: 세린 혹은 트레오닌) 서열을 배제하였다.

[237]

[238] - 이성질체화 (isomerization) 서열을 제외하였다. 단백질 내의 아스파라긴산은 수용액 상태에서 자발적으로 느리게 이소아스파라긴산(isoaspartic acid)으로 이성질체화할 수 있음이 알려져 있으며, 이 반응의 속도는 특히 아스파라긴산의 C-말단에 위치하는 아미노산 잔기에 의해 영향을 받는다. 이 잔기가 글리신일 경우 특히 이성질체화 속도가 빨라짐이 알려져 있으므로, 아스파라긴산-글리신 서열을 가지는 CDR 서열들을 배제하였다.

[239]

[240] - 탈아미드화 (deamidation) 서열을 제외하였다. 단백질 내의 아스파라긴은 수용액 상태에서 자발적으로 느리게 아스파라긴산으로 탈아미드화할 수 있음이 알려져 있으며, 이 반응의 속도는 특히 아스파라긴의 C-말단에 위치하는 아미노산 잔기에 의해 영향을 받는다. 이 잔기가 글리신일 경우 특히 탈아미드화 속도가 빨라짐이 알려져 있으므로, 아스파라긴-글리신 서열을 가지는 CDR 서열들을 배제하였다.

[241]

[242] - 절단(cleavage) 서열을 제외하였다. 단백질을 이루는 펩타이드 결합은 수용액 상태에서 서서히 절단되며, 특히 아스파라긴산-프롤린 서열에서 이러한 절단이 더 빠르게 일어나므로 아스파라긴산-프롤린 서열을 가지는 CDR 서열들을 배제하였다.

[243]

- [244] - 산화(oxidation) 서열을 제외하였다. 단백질을 이루는 아미노산 20종 중 여러 개가 산화적 변형을 일으킬 수 있음이 알려져 있으며, 특히 이 중에서 황을 포함하는 시스테인과 메티오닌이 상대적으로 쉽게 산화된다. 따라서 기본적으로 시스테인과 메티오닌이 포함된 CDR 서열들을 배제하되, 생식계열 유전자의 CDR 내에 이미 우세하게 존재하는 메티오닌의 경우는 배제하지 않았다. 구체적으로 중쇄의 CDR-H1의 34번 잔기나 CDR-H3의 100번 잔기가 이에 해당한다.
- [245]
- [246] - 설계된 CDR의 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열로 역번역하였으며 CDR 서열의 양 옆에 항체 가변부위의 프레임워크 서열을 더하여 100개의 뉴클레오티드로 이루어진 올리고뉴클레오티드 서열들을 최종설계하였다. 총 19,836개의 서열을 설계하고, 이를 배열 합성(array synthesis)법을 통하여 올리고뉴클레오티드 혼합물의 형태로 합성하였다 (미국 텍사스주 휴스턴 소재 LC Sciences사).
- [247]
- [248] 합성된 올리고뉴클레오티드 혼합물에서 각 CDR들을 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 증폭하였으며, 이 때 사용된 프라이머 조합을 하기 표 4에 개시하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 섭씨 94도, 2분; (섭씨 94도, 30초/섭씨 56도, 30초/섭씨 72도, 30초) 25회 반복; 섭씨 72도, 7분. PCR 반응의 주형으로 1.6 나노그램의 올리고뉴클레오티드 혼합물이 사용되었으며, 프라이머는 각각 600 nM 농도이고 dNTP는 0.8 mM, 중합효소는 Taq (2.5 유닛), 반응 부피는 100마이크로리터이다. 반응 완료후 2% 아가로스 젤에서 전기영동으로 분리한 후 약 100 염기쌍 (base pair, bp) 크기에 해당하는 DNA 밴드로부터 DNA를 추출, 정제한다.

[249] [표4]

CDR	프라이머	서열 (5' -> 3')
CDR-H1	OPALS-h1-f(서열번호 1)	CAGCGGATTCACCTTCAGC
	OPALS-h1-b(서열번호 2)	AGGTGCTTGGCGAACCCA
CDR-H2	OPALS-h2-f(서열번호 3)	GGCCTGGAATGGGTGAGC
	OPALS-h2-b(서열번호 4)	GCGGCTGATGGTAAAGCG
CDR-H3-odd/even	OPALS-h3-f(서열번호 5)	GGACACCGCAGTCTACTACT
	OPALS-h3-b(서열번호 6)	CACCAGAGTACCTTGTCCT
CDR-L1 카파	OPALS-k1-f(서열번호 7)	CGCGCAACACTGTCATGC
	OPALS-k1-b(서열번호 8)	TGGAGCCTGACCTGGTTTC
CDR-L2 카파	OPALS-k2-f(서열번호 9)	CCAGGTCAGGCTCCACGT
	OPALS-k2-b(서열번호 10)	ACCGCTTCCAGATCCTGAG
CDR-L3 카파	OPALS-k3-f(서열번호 11)	CTGGAACCTGAGGACTTTG
	OPALS-k3-b(서열번호 12)	ACTTTAGTGCCCTGACCG
CDR-L1 람다	OPALS-l1-f(서열번호 13)	GCGCGTGACTATTAGCTGT
	OPALS-l1-b(서열번호 14)	AGGTGCAGTTCCAGGCAGT
CDR-L2 람다	OPALS-l2-f(서열번호 15)	GCCTGGAAGTGCACCTAAG
	OPALS-l2-b(서열번호 16)	GCCTGATTTGCTACCGCTA

CDR-L3 람다	OPALS-13-f(서열번호 17)	CTTCGCTCCGAAGATGAAG
	OPALS-13-b(서열번호 18)	GTCAGCTTGGTACCGCCA

[250]

[251]

항체 라이브러리 제작의 골격으로 사용하기 위하여 코돈 최적화된 scFv 유전자들을 합성하였으며 (미국 뉴저지 주 피스카타웨이 시 소재 Genscript 사), 이 유전자들은 생식계열 유전자인 VH3-23와 VK3-A27, 또는 VH3-23과 VL1g가 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃의 연결부위로 연결된 scFv 유전자들로 pUC57 벡터에 클로닝되어있으며 파지미드 벡터로의 클로닝을 위해 pComb3X 벡터와 호환되는 두 개의 SfiI 제한효소 부위가 포함된다. 라이브러리 제작의 편의를 위하여, pUC57 벡터에 클로닝된 이 유전자들을 pComb3X 벡터로도 클로닝하여 PCR의 주형으로 사용하였다. 골격으로 사용하기 위한 용도이므로 이 유전자들은 서열적 다양성이 없는 단일서열들이며, 포유동물세포에서 발현이 향상되도록 코돈이 최적화되었으나 PCR 과정에서의 비특이적 어닐링(annealing)을 방지하기 위하여 아미노산 서열에 변화가 없는 범위에서 일부 최적화 DNA서열에 변화를 가하였다. 이들(cFv VH3-23_linker_VK3-A27, scFv VH3-23_linker_VL1g)의 서열은 각각 서열번호 19 및 서열번호 20에 개시하였다.

[252]

[253]

1-4. CDR 라이브러리 제작

[254]

코돈 최적화된 scFv 골격의 다양한 절편들을 PCR을 통하여 증폭하고, 이를 역시 PCR 증폭된 CDR 부위 DNA와 중첩연장(overlap extension) PCR을 통하여 연결함으로써 하나의 CDR에만 다양성을 가지는 단일 CDR 라이브러리들을 제작하였다.

[255]

PCR 조건은 위와 동일하며, 다만 썬씨 72 °C에서의 연장 시간은 예측되는 DNA 절편 결과물의 길이에 따라 30초, 1분, 혹은 1분 30초로 조정하였다. 구체적으로 예측되는 길이가 500 염기쌍 이하인 경우는 30초, 500에서 1,000 염기쌍 사이인 경우는 1분, 1,000에서 1,500 염기쌍 사이인 경우에는 1분 30초의 연장 시간을 사용하였다. 이 과정들 및 이에 사용된 프라이머 서열들을 하기 표 5 및 표 6에 정리하였다.

[256] [표5]

산출물명	DNA 주형	프라이머	
단일 CDR 라이브러리 제작을 위한 골격부위 PCR			
1	VH3-23/VL1g-pUC57	pUC57-b	OPALS-H1-rc-b
2	VH3-23/VL1g-pUC57	pUC57-b	OPALS-H2-rc-b
3	VH3-23/VL1g-pUC57	pUC57-b	OPALS-H3-rc-b
4	VH3-23/VL1g-pUC57	pUC57-b	OPALS-L1-rc-b
5	VH3-23/VL1g-pUC57	pUC57-b	OPALS-L2-rc-b
6	VH3-23/VL1g-pUC57	pUC57-b	OPALS-L3-rc-b
7	VH3-23/VL1g-pComb3X	OPALS-H1-rc-f	pC3X-b
8	VH3-23/VL1g-pComb3X	OPALS-H2-rc-f	pC3X-b
9	VH3-23/VL1g-pComb3X	OPALS-H3-rc-f	pC3X-b
10	VH3-23/VL1g-pComb3X	OPALS-L1-rc-f	pC3X-b
11	VH3-23/VL1g-pComb3X	OPALS-L2-rc-f	pC3X-b
12	VH3-23/VL1g-pComb3X	OPALS-L3-rc-f	pC3X-b
13	VH3-23/VK3-A27-pComb3X	OPALS-K1-rc-f	pC3X-b
14	VH3-23/VK3-A27-pComb3X	OPALS-K2-rc-f	pC3X-b
15	VH3-23/VK3-A27-pComb3X	OPALS-K3-rc-f	pC3X-b
26	VH3-23/VK3-A27-pUC57	pUC57-b	OPALS-K1-rc-b
27	VH3-23/VK3-A27-pUC57	pUC57-b	OPALS-K2-rc-b
28	VH3-23/VK3-A27-pUC57	pUC57-b	OPALS-K3-rc-b
단일 CDR 라이브러리 제작			

H1	1 + CDR-H1 + 7	pC3x-b	pUC57-b
H2	2 + CDR-H2 + 8		
Odd	3 + CDR-H3-odd + 9		
Even	3 + CDR-H3-even + 9		
$\lambda 1$	4 + CDR-L1-람다 + 10		
$\lambda 2$	5 + CDR-L2-람다 + 11		
$\lambda 3$	6 + CDR-L3-람다 + 12		
$\kappa 1$	26 + CDR-L1-카파 + 13		
$\kappa 2$	27 + CDR-L2-카파 + 14		
$\kappa 3$	28 + CDR-L3-카파 + 15		

[257] [표6]

프라이머	서열(5'→3')
OPALS-H1-rc-f (서열번호 21)	TGGGTTCGCCAAGCACCT
OPALS-H2-rc-f (서열번호 22)	CGCTTTACCATCAGCCGC
OPALS-H3-rc-f (서열번호 23)	GGGACAAGGTACTCTGGTG
OPALS-L1-rc-f (서열번호 24)	ACTGCCTGGAAGTGCACCT
OPALS-L2-rc-f (서열번호 25)	TAGCGGTAGCAAATCAGGC
OPALS-L3-rc-f (서열번호 26)	TGGCGGTACCAAGCTGAC
OPALS-K1-rc-f (서열번호 27)	GAAACCAGGTCAGGCTCCA
OPALS-K2-rc-f (서열번호 28)	CTCAGGATCTGGAAGCGGT
OPALS-K3-rc-f (서열번호 29)	CGGTCAGGGCACTAAAGT
OPALS-H1-rc-b (서열번호 30)	GCTGAAGGTGAATCCGCTG
OPALS-H2-rc-b (서열번호 31)	GCTCACCCATTCCAGGCC
OPALS-H3-rc-b (서열번호 32)	AGTAGTAGACTGCGGTGTCC
OPALS-L1-rc-b (서열번호 33)	ACAGCTAATAGTCACGCGC
OPALS-L2-rc-b (서열번호 34)	CTTAGGTGCAGTTCCAGGC
OPALS-L3-rc-b (서열번호 35)	CTTCATCTTCGGAGCGAAG
OPALS-K1-rc-b (서열번호 36)	GCATGACAGTGTTGCGCG
OPALS-K2-rc-b (서열번호 37)	ACGTGGAGCCTGACCTGG
OPALS-K3-rc-b (서열번호 38)	CAAAGTCCTCAGGTTCCAG
pC3x-b (서열번호 39)	AACCATCGATAGCAGCACCG
pUC57-b (서열번호 40)	TTCGCCATTTCAGGCTGCG

[258]

[259] 제작된 단일 CDR 라이브러리는 1% 아가로즈 젤 전기영동을 통해 분리 정제하였고, 이를 SfiI 제한효소로 썬서 50 °C에서 12시간 이상 처리하여 절단한 후, 역시 SfiI 제한효소로 같은 방식으로 절단한 pComb3X 파지미드 벡터와 라이게이션 하였다. 1 µg의 벡터와 1 µg의 scFv DNA를 T4 라이게이즈 1,000 유닛이 첨가된 50 µl의 T4 라이게이즈 완충용액에서 16시간 상온 반응하였다. 반응물에는 5 µl의 3M 아세트산 소듐 (pH 5.2)과 110 µl의 에탄올을 첨가하여 썬서 영하 20 °C에서 1시간 이상 DNA를 침전시키고, 침전된 DNA를 원심분리하여 차가운 70% 에탄올로 세척하고 20 µl의 멸균순수에 용해하였다. 이것을 ER2537 대장균에 전기천공법으로 트랜스폼하고 암피실린 항생제를

함유하는 배지에서 12 내지 16시간 배양하여 단일 CDR 라이브러리를 획득하였다.

[260]

[261] 단일 CDR 라이브러리를 제작한 목적은 합성된 CDR 올리고뉴클레오타이드 내에 존재하는 뉴클레오타이드의 삽입/결손/치환 등으로 일어나는 부정확하고 번역 조기종결(early translational termination)을 일으키는 CDR 서열들을 제거하기 위해서이다. 단일 CDR 라이브러리가 형질전환된 대장균을 배양하고, 대수기(log phase)일 때 보조 파지와 카나마이신을 차례로 첨가 후 밤새 배양하여 파지 라이브러리를 얻었다. 이를 면역시험관(immunotube) 표면에 흡착된 항-HA 항체에 대하여 1회 패닝하여 HA-태그를 발현하는 파지 클론만을 선별하였다. HA-태그는 9개의 아미노산(YPYDVDPYA)으로 이루어진 짧은 펩타이드 서열로 pComb3X 파지미드 벡터의 SfiI 클로닝 위치의 3' 말단에 위치하며, 따라서 발현된 scFv 단백질의 C-말단에 존재하게 된다. 올리고뉴클레오타이드의 화학적 합성법의 단계적 효율성은 완벽하지 않으므로, 합성된 CDR 올리고뉴클레오타이드 중에는 번역 조기종결을 일으키는 삽입/결손/치환이 생긴 서열들이 다수 존재하게 되고, 이들을 포함하는 파지 클론들은 HA-태그를 가질 수 없으므로 패닝에 의해 제거된다. 결과적으로 이 과정을 통해 결함이 없는 CDR 서열들을 선별할 수 있다.

[262]

[263] 1-5. scFv 항체 라이브러리 제작

[264] 선별된 CDR 서열들은 전술한 조건에 따라 PCR을 통해 증폭되었고, 증폭된 DNA 단편들은 다시 중첩 연장 PCR을 통해 경쇄와 중쇄 가변부위로 조합되었다. 경쇄 가변부위에 연결부위를 중첩연장 PCR로 연결하고, 이를 다시 중쇄 가변부위와 중첩연장 PCR로 조합하여 최종적으로 scFv 유전자 라이브러리를 획득하였다. 본 최종 CDR 라이브러리를 제작하기 위한 PCR 과정을 도 2에 도식화하였다(도 2). 이 과정들 및 이에 사용된 프라이머 서열들을 하기 표 7 및 표 8에 정리하였다.

[265] [표7]

산출물명	주형	프라이머	
선택된 CDR과 연결부위의 증폭			
VH-CDR1	H1	pC3x-f	OPALS-H2-rc-b
VH-CDR2	H2	OPALS-H1-rc-f	OPALS-H3-rc-b
VH-CDR3-odd	Odd	OPALS-H2-rc-f	OPALS-FR4-b
VH-CDR3-even	Even		
VL-CDRλ1	λ1	OPALS-L1-f	OPALS-L2-rc-b
VL-CDRλ2	λ2	OPALS-L1-rc-f	lFR3-b
VL-CDRλ3	λ3	lFR3-f	pC3x-b
Linker-λ	OPALS-lambda	OPALS-FR4-f	OPALS-L1-rc-b
VL-CDRκ1	κ1	kFR1-f	OPALS-K2-rc-b
VL-CDRκ2	κ2	OPALS-K1-rc-f	OPALS-K3-rc-b
VL-CDRκ3	κ3	OPALS-K2-rc-f	pC3x-b
Linker-κ	OPALS-kappa	OPALS-FR4-f	kFR1-b
경쇄 및 중쇄 가변부위의 증폭			
VH-Odd	VH-(CDR1+CDR2+CDR3-odd)	pC3x-f	OPALS-FR4-b
VH-Even	VH-(CDR1+CDR2+CDR3-even)		
VL-Lambda	VL-(CDRλ1+λ2+λ3)	OPALS-L1-f	pC3x-b
VL-Kappa	VL-(CDRκ1+κ2+κ3)	OPALS-K1-f	
경쇄 가변부위와 연결부위의 연결			
λ	VL-Lambda+linker-λ	OPALS-FR4-f	pC3x-b
κ	VL-Kappa+linker-κ		
ScFv 라이브러리 제작을 위한 최종 PCR			

Oλ	VH-Odd+λ	pC3-seq	dp-seq
Eλ	VH-Even+λ		
Oκ	VH-Odd+κ		
Eκ	VH-Even+κ		

[266] [표8]

프라이머	서열(5'→3')
pC3x-f (서열번호 41)	GCACGACAGGTTTCCCGAC
IFR3-f (서열번호 42)	CTGGCCATCAGCGGCCTTC
IFR3-b (서열번호 43)	CTGGGTCAGCACGATTTC
kFR1-f (서열번호 44)	GAAATCGTGCTGACCCAG
kFR1-b (서열번호 45)	CTGGGTCAGCACGATTTC
OPALS-FR4-f (서열번호 46)	CTGGTGACCGTGAGCAGC
OPALS-FR4-b (서열번호 47)	GCTGCTCACGGTCACCAG
pC3-seq (서열번호 48)	GTGAGCGGATAACAATTGA
dp-seq (서열번호 49)	AGAAGCGTAGTCCGGAACG

[267]

[268] scFv 유전자 라이브러리는 전술한 방법대로 SfiI 제한효소로 절단하고 pComb3X 벡터에 라이게이션한 후 ER2537 대장균에 트랜스폼하여 scFv 라이브러리를 완성하였다. 구체적으로 CDR-H3의 아미노산 개수(길이)가 짝수인 것과 홀수인 것을 따로 제작하고, 카파 경쇄와 람다 경쇄를 따로 제작하여 이들을 PCR 조합하여 라이게이션-트랜스폼하였으므로 총 4개의 서브 라이브러리가 만들어졌다. 이를 각각 OL (odd-lambda), EL (even-lambda), OK (odd-kappa), EK (even-kappa) 라이브러리로 칭하였으며, 각각의 라이브러리로 형질전환된 박테리아 역가(titer), 즉 라이브러리의 크기가 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.9×10^8 , 3.7×10^8 로 총합 8.3×10^8 크기인 1차 라이브러리, 총합 10^{10} 에 이르는 2차 라이브러리를 제작하였다. 제작된 OL 라이브러리, EL 라이브러리의 서열비교를 도 5a에 표시하였으며, OK 라이브러리, EK 라이브러리의 서열비교를 도 5b에 표시하였다.

[269]

[270] 각 서브 라이브러리로부터 24개씩의 클론을 임의로 선택하여 그 박테리아를 배양하고, IPTG로 scFv 항체의 발현을 유도한 후 섭씨 30 °C에서 밤새 배양하였다. 이로부터 수크로즈 완충용액을 이용한 삼투 충격법(osmotic shock)으로 페리플라즈م 추출물(periplasmic extract)를 얻은 후 이것을 1 μl씩 니트로셀룰로즈 박막에 가하였다. 박막을 건조시킨 후 3% 탈지분유 완충용액에

담가 블로킹하고, 항 HA 항체-HRP(horseradish peroxidase)를 1시간 동안 결합시킨 후 세척하였다. 루미놀을 이용하여 HA-태그의 존재여부를 검출함으로써 scFv의 발현을 확인하였다 (도 3).

[271]

[272] 본 실시예 1의 항체 라이브러리 제조 단계를 도식화한 결과는 도 4에 정리하였다.

[273]

[274] 실시예 2: 서열 분석

[275]

[276] 제조된 라이브러리에 반영된 CDR 설계의 정확도를 측정하기 위해, 상기 라이브러리의 차세대 서열분석(Next generation sequencing, NGS)을 수행하였다. 수백만 개의 CDR 서열을 분석하고 설계 서열과 비교하였다(표 9).

[277] [표9]

CDR 라이브러리의 차세대 서열분석

CDR	H1	H2	H3	K1	K2	K3	L1	L2	L3
제조된 서열 수(x 10 ⁶)	4.75	4.70	4.53	2.58	2.31	2.52	2.14	2.12	2.09
인프레임 %	91.3	89.7	90.3	92.2	91.6	93.2	91.5	78.7	90.7
설계 길이 %	89.4	88.4	85.6	87.1	82.3	90.7	84.6	56.2	89.4
설계 서열 %	80.9	52.0	51.8	62.4	70.3	74.3	56.2	47.6	67.2
proofreading 전인프레임%	85.7	50.0	67.9	53.3	44.4	66.7	38.5	31.3	66.7
설계 커버리지 %	100	100	97.3	99.8	100	99.9	100	100	100

[278]

[279] 비록 긴 CDR에 대해서는 고유 서열의 대부분이 전체 설계서열 중 오직 한번 또는 두번만 반복되도록 설계되어 정량 계수(r^2)가 상대적으로 낮으나, 제조된 라이브러리에는 설계된 서열의 거의 전부가 커버된 것을 확인하였으며, 각 설계된 CDR 서열의 발생 빈도 또한 실제 라이브러리에 나타났다(도 6). 당연하게도, 해당 라이브러리는 제조 오류에 따라 어느 설계 서열과도 매칭되지 않은 저-빈도 CDR 서열을 많이 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 이 중에는 핵산 첨가 또는 결실 등에 의해서 프레임 시프트가 일어난 비-기능(non-functional) 서열이 포함되어 있었다. 항-HA 항체를 이용한 단일-CDR 라이브러리의 proofreading 패닝을 통해서 비-기능 CDR 서열을 제거하였으며, proofreading 패닝 전에 활성 인프레임 CDR 서열의 비율은 31

내지 86 %인데 비하여, proofreading 패닝 이후에는 대략 90에서 93% 정도임을 확인하였다. 다만, CDR-L2만 약 79%에 불과했으나 이는 중첩 PCR의 부정확한 어닐링 때문이었던 것으로 사료된다. 설계된 길이에 비교한 CDR 서열의 비율은 약 82 내지 91 %(CDR-L2는 약 56%)였다.

[280] 종합적으로, V_H , V_K , 및 V_L 서열의 약 75%는 종결 코돈없는 다양한 기능 도메인들이었고, 라이브러리에서 기능성 scFv 클론은 약 55%에 이르는 것으로 추정되었다. 이러한 추정은 무작위적으로 선택한 라이브러리 클론에 대한 닷-블랏 어세이 결과와 일치하였다. 닷-블랏을 위하여 셀렉션되지 않은 라이브러리로부터 무작위적으로 선택된 scFv 클론의 페리플라즘 추출물을 니트로셀룰로즈 막에 블랏팅을 하였고, 및 추출물 상의 수용성 발현 scFv의 존재를 C 말단의 HA 태그를 측정하여 확인하였다. 그 결과 수용성 발현 scFv 클론은 대략 60% 가량되었다(도 3).

[281] NGS 데이터로부터 다양한 도메인 중에서 고유한 도메인이 분석되었다. 종결 코돈을 포함하지 않는 각 heavy, 카파 및 람다의 다양한 도메인 서열 약 1.3×10^6 개를 분석하였으며, V_H 의 98%, V_K 의 89% 및 V_L 의 98%이 반복되지 않았다(도 7).

[282] 전체 서열 중에서 상이한 다양한 도메인 서열의 수의 %는 V_H , V_K , 및 V_L 각각이 99%, 92% 및 99%였다. 한편, 이러한 수치를 기 보고된 다른 항체 라이브러리들의 CDR-H3에서의 고유도(uniqueness)인 97 내지 98%에 비교하였을 때, 셀렉션되지 않은 라이브러리 내의 scFv 클론 중에서 중복도는 그다지 심각하지 않음을 시사한다.

[283]

[284] 제조된 라이브러리에서 CDR 길이의 분포, 특히 CDR-H3 길이의 분포는 설계와 상이하였고, 긴 CDR에 비교해서 짧은 길이의 CDR이 현저히 높은 빈도로 나타났다(도 8). 이는 일부분 올리고뉴클레오타이드 어레이 제조 과정에서 프레임 시프트가 일어나거나 조기 스탑 코돈이 도입되는 등의 부정확함 때문인 것으로 사료된다. 이러한 오류는 긴 CDR을 제조하는 동안에 더 자주 발생하고 그들 중 대부분은 항-HA-태그 항체를 이용한 단일 CDR 라이브러리 proofreading 패닝 동안에 제거되기 때문에, 라이브러리에서 긴 CDR이 더 많이 제거되는 원인일 것으로 사료된다. 또한, 짧은 CDR을 가진 scFv가 항-HA-태그 항체에 대한 패닝에 의해서 우선적으로 선별 및 증폭되었을 가능성도 있다.

[285]

[286] 라이브러리 CDR 서열과 자연 CDR 서열간의 유사도를 가장 가까운 생식 CDR 서열로부터 각 CDR 서열의 아미노산 변이 수를 분석하여 측정하였다. CDR을 자연 체세포 초돌연변이(SHM) 패턴을 시뮬레이션하여 설계되었기 때문에, 설계 서열은 자연 유사도가 매우 높을 것이 예상되었다. 이에 따라, 설계 CDR 서열과 자연 CDR 서열 간에 CDR 서열 당 평균 변이 횟수를 비교하였다(표 10).

[287] [표10]

CDR 서열의 유사 인간 생식 CDR 서열로부터 평균 아미노산 변이수

CD R	H1	H2		K1			K2	K3		L1			L2	L3		
길 이	5	16	17	11	12	16	7	9	10	11	13	14	7	9	10	11
설 계	0.75	2.14	2.55	1.0	1.1	1.8	0.4	0.7	0.6	1.0	1.1	0.9	0.6	0.8	1.1	0.7
비- 설 계	1.84	4.30	3.67	2.7	3.4	3.8	2.0	1.5	1.4	2.8	3.2	2.7	1.8	1.6	2.1	1.4
자 연	0.82	2.09	2.37	1.0	1.2	0.9	0.4	0.7	0.5	0.9	1.1	1.0	0.6	0.8	1.1	0.7
				8	9	3	9	2	4	5	0	0	6	8	4	5

[288]

[289] 제조 오류에 의하여 설계 서열 중 어느 것과도 매치되지 않는 라이브러리 CDR(비-설계 CDR) 서열을 분석할 때, 가장 유사한 생식계열 CDR 서열로부터의 평균 아미노산 변이 수는 설계 CDR 서열의 평균 아미노산 변이 수에 비해서 평균 1 내지 2 아미노산만 차이났다. 이러한 결과는 라이브러리의 CDR 서열이 인간 생식 CDR 서열로부터 오직 적은 수의 변이만을 포함하고 있으며, 자연 인간 항체의 CDR 서열과 매우 유사함을 시사한다. CDR-H3에 대해, 각 위치의 아미노산 분포를 분석하였다 (도 9). 자연 인간 항체, 시뮬레이션된 레파토리 및 제조 라이브러리의 CDR-H3 사이에서 아미노산 분포 패턴이 유사함이 확인되었으며, 이는 라이브러리 CDR의 높은 자연-유사도를 보여주고 있다.

[290]

[291] 예측한 대로, 상기 CDR에서 바람직하지 않은 번역-후 수식(Post-translation modification, PTM) 모티프의 발생 빈도가 자연 인간 항체 CDR보다 현저히 낮았다. 다만, 각각 5개 및 7개의 아미노산으로 이루어져 짧고 자연 인간 항체에서 상대적으로 적은 PTM 모티프를 가지고 있는 CDR-H1 및 CDR-L2는 예외였다 (표 11).

[292] [표11]

라이브러리 및 자연 인간 항체의 CDR에서 번역-후 수식 비율

모티프	CDR	H1	H2	H3	K1	K2	K3	L1	L2	L3
Asp-Gly	라이브러리	0.05	0.31	0.66	0.03	0.34	0.10	0.32	3.41	0.34
	자연	0.08	10.79	6.45	6.03	0.32	0.09	0.28	0.30	1.98
Asn-Gly	라이브러리	0.04	0.62	0.32	0.05	0.63	0.12	0.60	4.51	0.32
	자연	0.02	5.96	3.03	4.54	0.53	0.50	0.06	0.12	7.61
Asp-Pro	라이브러리	0.01	0.16	0.25	0.04	0.08	0.10	0.04	0.20	0.05
	자연	0.00	2.40	10.13	0.00	0.04	0.14	0.11	0.00	0.66
N-glyc	라이브러리	0.66	1.91	2.77	1.35	1.46	1.00	1.97	0.94	1.30
	자연	0.59	0.78	7.73	0.61	0.07	1.69	6.74	0.30	8.20
Met	라이브러리	0.35	1.03	1.80	0.90	0.55	0.29	1.78	0.70	1.70
	자연	0.06	2.72	9.04	0.88	0.11	12.36	0.39	0.18	0.86
Cys	라이브러리	0.30	1.96	0.49	1.30	0.64	0.77	2.10	0.87	1.29
	자연	0.35	17.50	1.46	0.92	0.18	1.19	0.61	0.24	1.98
총 PTM	라이브러리	1.36	5.44	5.87	3.60	3.58	2.32	6.16	10.48	4.81
	자연	1.09	36.70	32.92	12.55	1.23	15.56	8.08	1.13	20.70

[293]

[294] 상이한 CDR에서 PTM 모티프는 독립적으로 발생하는 것으로 가정했을 때,

라이브러리의 scFv 서열에서 최소한 하나의 PTM 모티프 발생 확률이 대략 20 내지 30 %이고 70 내지 80%의 클론은 PTM 모티프 없는 것으로 추정된다. 이에 반해, 자연 유래의 경우에는 PTM 모티프를 가지지 않은 scFv의 비율이 24 내지 27 %에 불과하다.

[295]

[296] 실시예 3: 항원을 이용한 라이브러리 패닝 및 스크리닝

[297]

[298] 제조된 라이브러리는 이의 기능성을 확인하기 위하여, 4가지 항원에 대해서 패닝을 수행하였다. 플라스틱 표면에 고정된 항원에 대한 패닝을 4번 반복한 후 다수의 타겟-결합 scFv 클론들을 분리하였다. 3번째 또는 4번째 패닝으로부터 분리된 콜로니들을 ELISA를 통해 스크리닝하고, 양성 신호를 보이는 클론 중 일부를 서열분석하였다(표 12).

[299] [표12]

항원에 대한 라이브러리의 패닝 및 스크리닝

항원	패닝 횟수	ELISA 양성 수/스크리닝 수	고유 서열/전체 분석 서열	Kappa/lambda
AIMP1	3	10/94	6/6	1/5
SerRS	4	16/94	3/14	0/14
hEpCAM-ECD	4	18/94	3/15	3/12
HER3-ECD	4	46/188	6/16	8/8
HEW Lysozyme	4	151/188	6/13	1/12

[300]

[301] 테스트된 항원의 숫자와 서열분석된 클론의 수가 경쇄 클래스 선호성을 일반화하기에는 충분하지 않았으나, 분리된 클론의 대부분은 람다 경쇄 클래스(lambda light chain class)였다. 파지 항체 라이브러리로부터 특정 경쇄 패밀리/클래스를 가지는 클론에 대한 우선 선택선(preferential selection)이 기준에 알려졌으며, 특정 V_H - V_L 도메인의 선호 우선 쌍(preferential pairing)과 서브-라이브러리의 기능 길이상 차이에 기여하였다. 커다란 자연 scFv 라이브러리의 항원-유래 파지 표시 선택선 이후에 람다 경쇄 강한 선호성도 알려졌으며, 이는 람다 쇠 선호성이 특정 항체 라이브러리의 특징이라기 보다 scFv 라이브러리의 파지 표시 선택선의 보편적인 현상임을 시사한다.

[302]

[303] 라이브러리로부터 분리된 ELISA-양성 scFv 클론 중 일부의 결합 에너지를 SPR을 이용하여 분석하였다(표 13).

[304] [표13]

SPR에 의해 측정된 셀렉션된 목적-특이적 scFv 클론의 결합 동력학 상수

항원-클론	$K_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$K_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$
HER3-G3	6.8×10^5	2.8×10^{-3}	4.2×10^{-9}
HER3-C5	1.2×10^5	1.0×10^{-3}	8.1×10^{-9}
HER3-D11	7.8×10^4	5.3×10^{-3}	6.8×10^{-8}
HEWL-B6	1.1×10^5	5.3×10^{-3}	4.8×10^{-8}
HEWL-F8	5.8×10^4	1.9×10^{-3}	3.3×10^{-8}
HEWL-B2	1.1×10^6	3.0×10^{-3}	2.8×10^{-9}
HEWL-G7	1.4×10^5	3.2×10^{-3}	2.4×10^{-8}
SRS-A3	2.7×10^4	1.8×10^{-3}	6.7×10^{-8}
SRS-C4	9.5×10^4	1.3×10^{-3}	1.4×10^{-8}
SRS-D8	6.5×10^4	1.4×10^{-3}	2.2×10^{-8}

[305]

[306] 3개의 상이한 항원에 대한 10개의 scFv들에 대한 해리 상수 (K_d)가 10^{-9} 내지 10^{-7} M 범위로 측정되었다.

[307]

[308] 셀렉션되지 않은 라이브러리의 NGS 결과를 패닝 이후에 라이브러리로부터 선택된 고유 scFv의 서열과 비교하였다. 패닝 과정이 설계된 CDR 서열의 비율 또는 CDR 잔기당 평균 변이 횟수를 현저히 바꿔주는 것은 아닌 것으로 나타났다 (표 14).

[309] [표14]

패닝 셀렉션 전후의 CDR 및 FR(framework region, 골격부위)의 변이

CDR 또는 FR	H1	H2	H3	K1	K2	K3	L1	L2	L3	V _H FR	V _K FR	V _L FR
셀렉션 전 서열 중 설계된 서열의 비율(%)	80.9	52.0	51.8	62.4	70.3	74.3	56.2	47.6	67.2			
셀렉션 후 서열 중 설계된 서열의 비율(%)	92.0	48.3	64.5	57.1	60.0	83.3	60.0	60.0	60.0			
잔기당 평균변이 수 셀렉션 전	0.21	0.18	N/A	0.13	0.11	0.06	0.11	0.12	0.13	0.0067	0.0144	0.0187
잔기당 평균변이 수, 셀렉션 후	0.17	0.17	N/A	0.14	0.10	0.09	0.14	0.11	0.10	0.0018	0.0019	0.0046

[310]

[311] 올리고뉴클레오타이드 합성 또는 PCR 과정에서의 오류에 의한 추가적인 CDR 다양성은 라이브러리의 다양성에 큰 영향을 주지 않음을 확인할 수 있다. 한편, 골격부위(framework region, FR)에서 변이 빈도가 패닝 셀렉션 이후에 감소하는 것을 확인하였다.

[312]

[313] **실시예 4: 라이브러리 구체적 구축 확인**

[314]

[315] 상기 실시예 1-5을 통한 항체 라이브러리의 구축을 검증하기 위하여, scFv의 서열을 분석하였다. 각 서브 라이브러리로부터 임의의 클론들을 선택하고 scFv 유전자를 PCR 기법으로 증폭한 후, DNA를 정제하여 서열분석을 의뢰하였다. 서열분석 결과가 도 5에 제시되어 있으며, 설계한 대로 다양한 서열과 길이를 가지는 CDR들이 라이브러리를 이루는 scFv 클론들에 도입되어 있음을 확인할 수 있다.

- [316] 구체적 서열분석 결과, 18개의 scFv 서열들 중 절단(아스파라긴산-프롤린)서열이 PCR 오류로 도입된 1건을 제외하면 배제하고자 하였던 번역후 변형 서열들이 존재하지 않는 것을 확인하였다. 이에 비하여 인간유래 숙성항체의 각 CDR에서의 이러한 번역 후 변형을 유발할 수 있는 서열들의 존재비율을 분석한 결과 중쇄의 CDR-H1에서 5.7%, CDR-H2에서 39.7%, CDR-H3에서 34.5%, 카파 경쇄의 CDR-L1에서 12.6%, CDR-L2에서 0.6%, CDR-L3에서 15.9%, 람다 경쇄의 CDR-L1에서 8.3%, CDR-L2에서 6.4%, CDR-L3에서 24.0% 발견되었다. 이로부터 설계의도대로 번역후 변형이 최소화될 수 있는 항체 라이브러리가 구축되었음을 확인하였다.
- [317]
- [318] 형질전환된 대장균 라이브러리를 배양하고 VCSM13 보조 파지(helper phage)로 감염시켜 scFv 클론이 표면제시된 항체파지 라이브러리를 얻었다 (H.Y. Yang et al., Mol. Cells 2009, 27, 225-235). 이 라이브러리는 1 ml 당 10^{12} 이상의 콜로니형성단위 (colony forming unit, CFU)를 포함한다. 이를 사용하여 라이소자임(Hen egg white lysozyme, HEWL) 및 AIMP1(101-192) 항원에 대하여 항원특이적 항체를 선별하는 패닝 실험을 통해 아래와 같이 항체파지 라이브러리의 기능성을 검증하였다. 이후 면역시험관(immunotube)에 10 µg/ml 농도의 항원 용액을 첨가하여 1시간동안 시험관 표면에 단백질을 흡착시킨 후 탈지분유 3% 완충용액을 시험관에 첨가하여 항원이 흡착되지 않은 표면을 보호하였다.
- [319] 상기 시험관을 비운 후 여기에 탈지분유 3% 완충용액에 분산된 10^{12} CFU의 항체파지 라이브러리를 넣어 1-2 시간 동안 항원과 결합시켰다. 비특이적으로 결합한 파지를 TBST (tris buffered saline - tween20) 용액으로 3회 씻어낸 후, 남아있는 항원특이적 파지 항체를 100 mM 트리에틸아민 용액을 이용하여 용리하였다.
- [320] 상기 용리된 파지를 1.0M 농도의 Tris-HCl 버퍼 (pH 7.8)로 중화시킨 후 ER2537 대장균에 37 °C에서 1시간 감염시키고, 감염된 대장균을 암피실린과 2% 포도당을 함유하는 LB (Luria-Bertani) 한천배지에 도포하여 37 °C에서 배양하였다.
- [321] 다음날 배양된 대장균을 5 mL의 SB (super broth) 배양액에 현탁하고 15% 글리세롤을 첨가하여 -80 °C에 보관하고, 50 µl를 20 mL의 SB-암피실린 용액에 접종하여 37 °C에서 배양하였다.
- [322] 상기 배양액의 600 나노미터 광선의 흡광도가 0.5가 되면 10^{11} PFU (플라크 형성단위)의 VCSM13 보조파지를 넣고 서서히 교반하며 37 °C에서 배양하였다. 1시간 후 카나마이신 70 µg/ml을 첨가하고 30 °C에서 빠르게 교반하며 (220 rpm) 밤새 배양하였다. 다음날 배양액을 원심분리한 후, 상층액에 5 ml의 5x PEG 침전용액 (20% w/v PEG8000, 15% w/v NaCl)을 넣어 혼합하였다. 혼합액을 얼음에서 30분 이상 두어 파지를 침전시키고, 이를 원심분리하여 300 µl의

PBS에 분산시켰다. 다시 파지 용액을 원심분리하여 맑은 상층액만 취하고, 여기에 700 마이크로리터의 3% 탈지분유 완충용액을 섞고 이를 이용하여 위의 패닝 과정을 반복함으로써 항원특이적 클론을 농축시켰다. 3 내지 4회 정도의 반복적인 패닝 후 항체유전자를 포함하는 대장균을 암피실린과 2% 포도당을 함유하는 LB 한천배지에 도포, 배양하여 단일 콜로니들을 얻고, 이를 200 μ l SB-암피실린 용액에 접종, 배양한 후 IPTG로 유도하여 scFv 단백질을 대장균의 페리플라즘(periplasm)에서 발현유도하였다.

[323]

[324] 대장균으로부터 수크로즈 완충용액을 이용한 삼투 충격법(osmotic shock)으로 페리플라즘 추출물(periplasmic extract)를 얻은 후, 이를 ELISA 기법을 사용하여 항원과 scFv와의 결합을 확인하는 데 사용하였다 (H.Y. Yang et al., Mol. Cells 2009, 27, 225-235). 결합한 scFv는 항-HA 항체-HRP와 테트라메틸벤지딘(TMB) 기질을 이용하여 검출하였다. 이로부터 확인된 항원특이적 항체 클론은 염기서열 분석법을 통해 분석하였다.

[325] HEWL 항원에 대하여 188개의 클론들을 ELISA로 스크리닝하여 배경신호 대비 3배 이상의 결합신호를 보이는 ELISA 양성 클론들을 150개 확인하였으며 이 중 16개를 서열분석하여 5개의 고유 서열을 발견하였다. AIMP1(101-192)에 대하여 94개의 클론들을 ELISA로 스크리닝하여 배경신호 대비 3배 이상의 결합신호를 보이는 ELISA 양성 클론들을 18개 확인하였으며 이 중 5개를 서열분석하여 2개의 고유 서열을 발견하였다.

[326]

[327] 상기 내용을 종합하면, 본 발명에 의해 제조된 항체 라이브러리는 다수의 항원에 대해 우수한 물성을 가지는 항체들을 포함하여, 기능적 다양성을 가질 뿐 아니라 고유서열을 다수 포함하는 등 항체 라이브러리로써 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[328]

[329] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당 업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[330]

청구범위

- [청구항 1] 항체의 상보성 결정부위(complementarity Determining Regions, CDRs) 서열을 개별적으로 설계하는 단계; 및 상기 설계한 서열을 가지는 상보성 결정부위들을 포함하는 항체를 합성하여 라이브러리를 제조하는 단계를 포함하는, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항체 라이브러리를 구성하는 항체의 상보성 결정부위를 이루는 중쇄 상보성 결정부위 1(CDR-H1), 중쇄 상보성 결정부위 2(CDR-H2), 중쇄 상보성 결정부위 3(CDR-H3), 경쇄 상보성 결정부위 1(CDR-L1), 경쇄 상보성 결정부위 2(CDR-L2) 및 경쇄 상보성 결정부위 3(CDR-L3)은 다양성(polymorphism)을 가지는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-H1, CDR-H2, CDR-L1 또는 CDR-L2에 대하여 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 i) 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자 사용빈도, ii) 각 아미노산 위치별로 체세포 초돌연변이에 의한 각 20종의 아미노산으로의 변이 빈도, iii) 상보성 결정부위 서열의 길이별 빈도 또는 iv) 이들의 조합을 분석하여 계산된 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-L3에 대하여
- a) 상기 상보성 결정부위의 N 말단으로부터 7개 내지 8개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 i) 생식계열(germline) 면역글로불린 유전자 사용빈도, ii) 각 아미노산 위치별로 체세포 초돌연변이에 의한 각 20종의 아미노산으로의 변이 빈도, iii) 상보성 결정부위 CDR-L3 서열의 길이별 빈도 또는 iv) 이들의 조합을 분석하여 계산된 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하고;
 - b) 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 2개 내지 3개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 각 아미노산 위치별 빈도를 분석하여 계산된 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것이며;
- 상기 CDR-L3는 9개 내지 11개의 아미노산으로 이루어지고, 상기 빈도 분석은 각 길이별로 나누어 분석하며, 상기 CDR-L3 서열의 설계는 설계하고자 하는 CDR-L3의 길이와 동일한 아미노산 길이를 가지는 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위 CDR-L3를 분석한 결과를 기반으로 설계하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 상보성 결정부위 서열 중 경쇄를 설계하는 경우에

해당 경쇄는 카파(kappa) 경쇄 또는 람다(lambda) 경쇄인 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.

- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상보성 결정부위 서열의 개별적인 설계시, CDR-H3에 대하여
- 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 3개의 아미노산을 제외한 서열들은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 각 아미노산 위치별 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하고;
 - 상기 상보성 결정부위의 C 말단으로부터 3개의 아미노산 서열은 실제 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위의 해당 3개 아미노산 서열의 위치별 빈도를 분석하여 계산된 빈도를 반영하여 모사한 서열을 설계하는 것이며;
- 상기 CDR-H3는 9개 내지 20개의 아미노산으로 이루어지고, 상기 빈도 분석은 각 길이별로 나누어 분석하며, 상기 CDR-H3 서열의 설계는 설계하고자 하는 CDR-H3의 길이와 동일한 아미노산 길이를 가지는 인간유래 숙성 항체의 상보성 결정부위 CDR-H3를 분석한 결과를 기반으로 설계하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 상보성 결정부위 아미노산 서열을 설계한 후 설계된 서열에서 N-당화, 이성질체화, 탈아미드화, 절단, 산화가 일어날 수 있는 서열을 배제하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 상보성 결정부위 아미노산 서열을 설계한 후 설계한 서열을 폴리뉴클레오티드로 역번역한 후, 번역된 폴리뉴클레오티드 5' 및 3' 말단에 각각 해당하는 인간항체 생식계열(germline) 유전자의 가변영역 골격부위 서열을 연결한 올리고뉴클레오티드 서열을 설계하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 항체는 VH3-23 (Genebank accession No. Z12347), VK3-A27 (Genebank accession No. X93639), VL1g(GenBank accession No. Z73663) 또는 이들의 단편으로부터 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM, IgG, Fc 단편, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv로 이루어진 군에서 선택된 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.
- [청구항 11] 제3항에 있어서, 하기 1) 내지 6) 중 어느 하나 이상에 해당하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법:
- 상기 중쇄의 CDR-H1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 54 내지 84의 아미노산 서열을 사용;
 - 상기 중쇄의 CDR-H2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 85 내지

121의 아미노산 서열을 사용;

3) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 122 내지 145의 아미노산 서열을 사용;

4) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 146 내지 165의 아미노산 서열을 사용;

5) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L1에 대한 생식계열 CDR 서열로써 서열번호 166 내지 189의 아미노산 서열을 사용; 및

6) 상기 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L2에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 190 내지 209의 아미노산 서열을 사용.

[청구항 12] 제4항에 있어서, 하기 1) 내지 2) 중 어느 하나 이상에 해당하는 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법:

1) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 카파 경쇄를 사용하고, 카파 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 210 내지 236의 아미노산 서열을 사용; 및

2) 경쇄 CDR 설계에 사용하는 생식계열 CDR 서열로 람다 경쇄를 사용하고, 람다 경쇄의 CDR-L3에 대한 생식계열 CDR 서열은 서열번호 237 내지 252의 아미노산 서열을 사용.

[청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도는 항체서열 데이터베이스의 분석을 통해 알아낸 자연인간항체에서의 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도를 모사한 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.

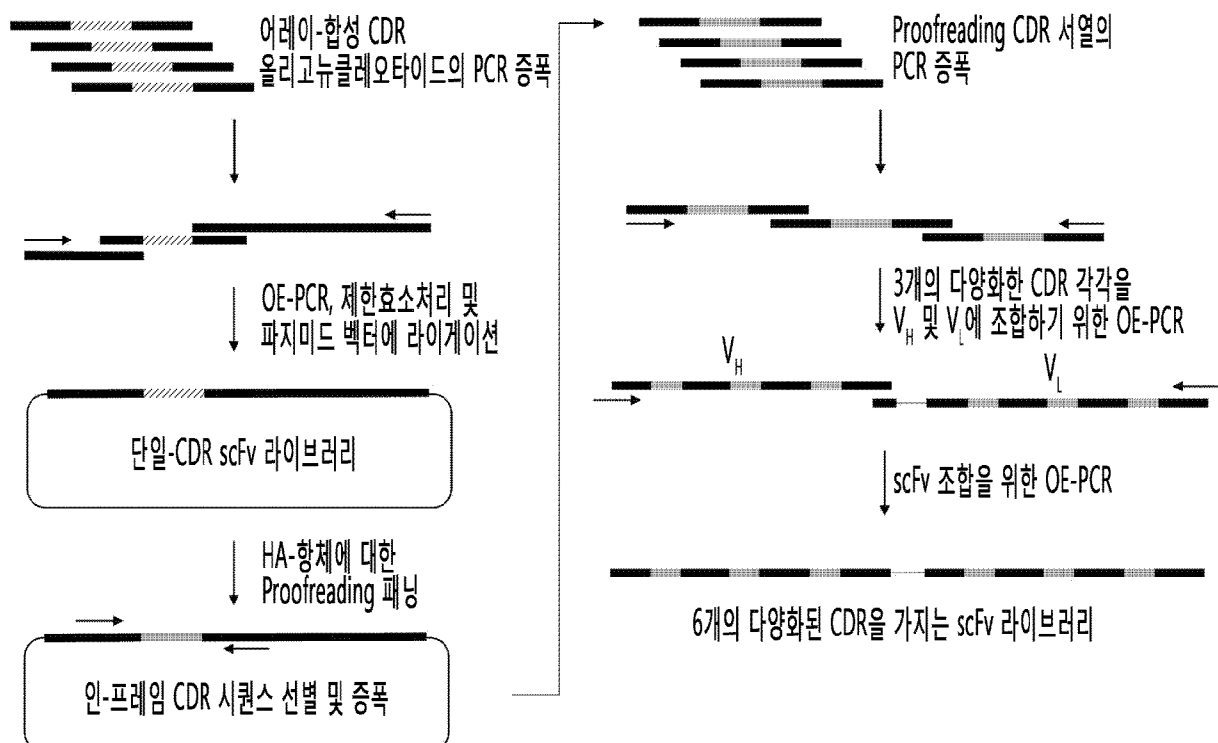
[청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도는 항체서열 데이터베이스의 분석을 통해 알아낸 자연인간항체에서의 각 생식계열 CDR 서열의 사용빈도를 모사한 것인, 항체 라이브러리를 제작하는 방법.

[청구항 15] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 항체 라이브러리.

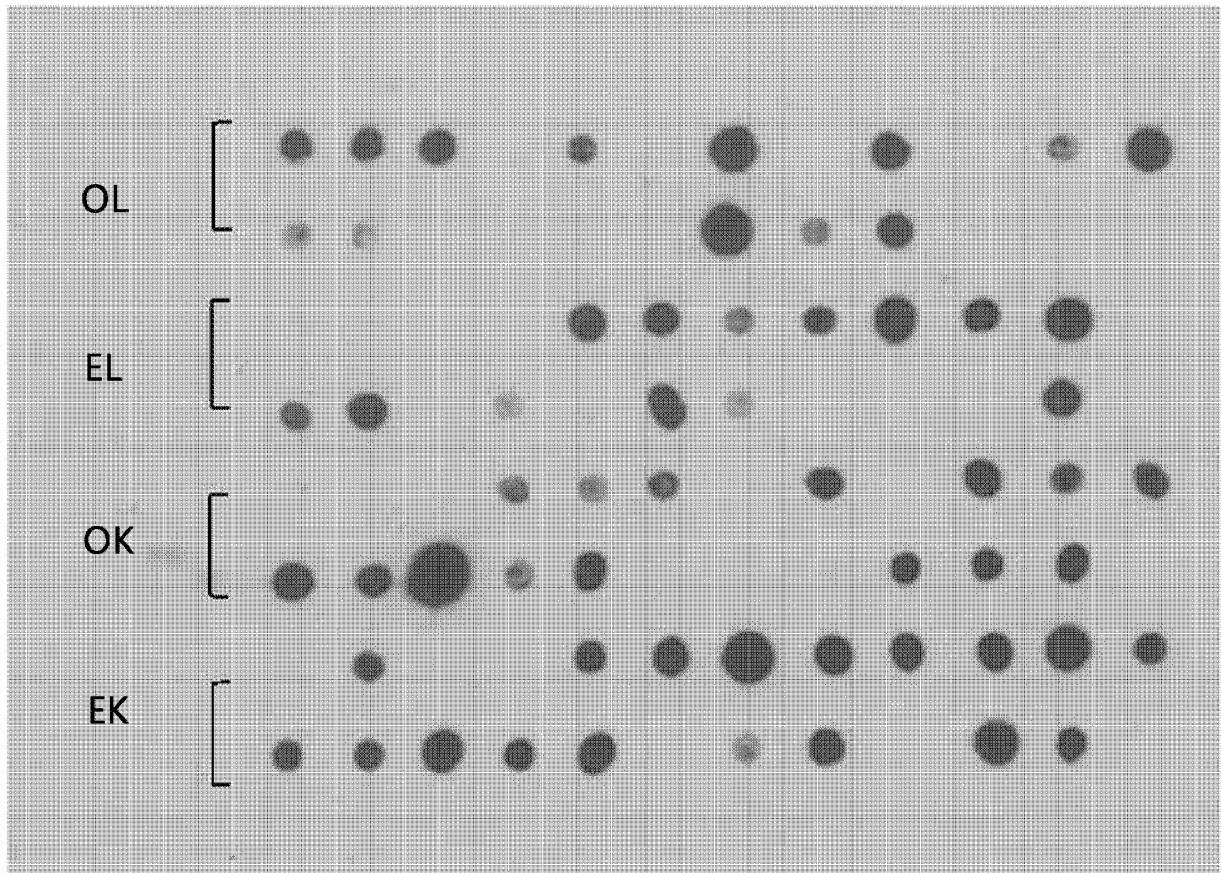
[도 1]

숙성항체 CDR 서열	돌연변이	생식계열 CDR 서열	생식계열 CDR 서열	빈도	시뮬레이션 CDR 서열	생식계열 CDR 서열	시뮬레이션된 돌연변이
SYAMN	-----	SYAMN	DHYMD	77	IYGMH	SYGMH	I-----
SYAMN	-----	SYAMN	DYAMH	476	SYSMN	SYSMN	-----
SYAMN	-----	SYAMN	DYAMS	237	SYSMN	SYSMN	-----
SYAMN	-----	SYAMN	DYGMS	105	SYSMN	SYSMN	-----
SYAMN	-----	SYAMN	DYTMH	75	TYSMN	SYSMN	T-----
SYAMN	-----	SYAMN	DYYMH	216	TYSMN	SYSMN	T-----
SYAMN	-----	SYAMN	DYYMS	137	SYSMN	SYSMN	-----
SYAMN	-----	SYAMN	ELSMH	48	TYSMN	SYSMN	T-----
AYAIN	A--L-	SYAMN	GSAMH	64	NYSMN	SYSMN	N-----
EYAMN	E-----	SYAMN	GYMH	233	THSMN	SYSMN	TH---
FYAMN	F-----	SYAMN	GYWS	585	SYSMN	SYSMN	-----
SFAMN	-F---	SYAMN	NAVMS	231	TFSMN	SYSMN	TF---
SFAMN	-F---	SYAMN	SNMS	31	SYSMN	SYSMN	-----
GYAMN	G-----	SYAMN	SNYS	123	TYSMN	SYSMN	T-----
GYAMN	G-----	SYAMN	SSAVQ	22	SYSMN	SYSMN	-----
GYAFN	G--F-	SYAMN	SYAIS	548	SYSMN	SYSMN	-----
IYAMN	I-----	SYAMN	SYAMH	314	SYSMN	SYSMN	-----
IYAMN	I-----	SYAMN	SYAMN	257	SYSMT	SYSMN	-----T
IYAMN	I-----	SYAMN	SYAMS	304	SYSMN	SYSMN	-----
KYAMN	K-----	SYAMN	SYDIN	253			
KYAMN	K-----	SYAMN	SYDMH	44			
			SYGIS	293			
			SYGMH	482			

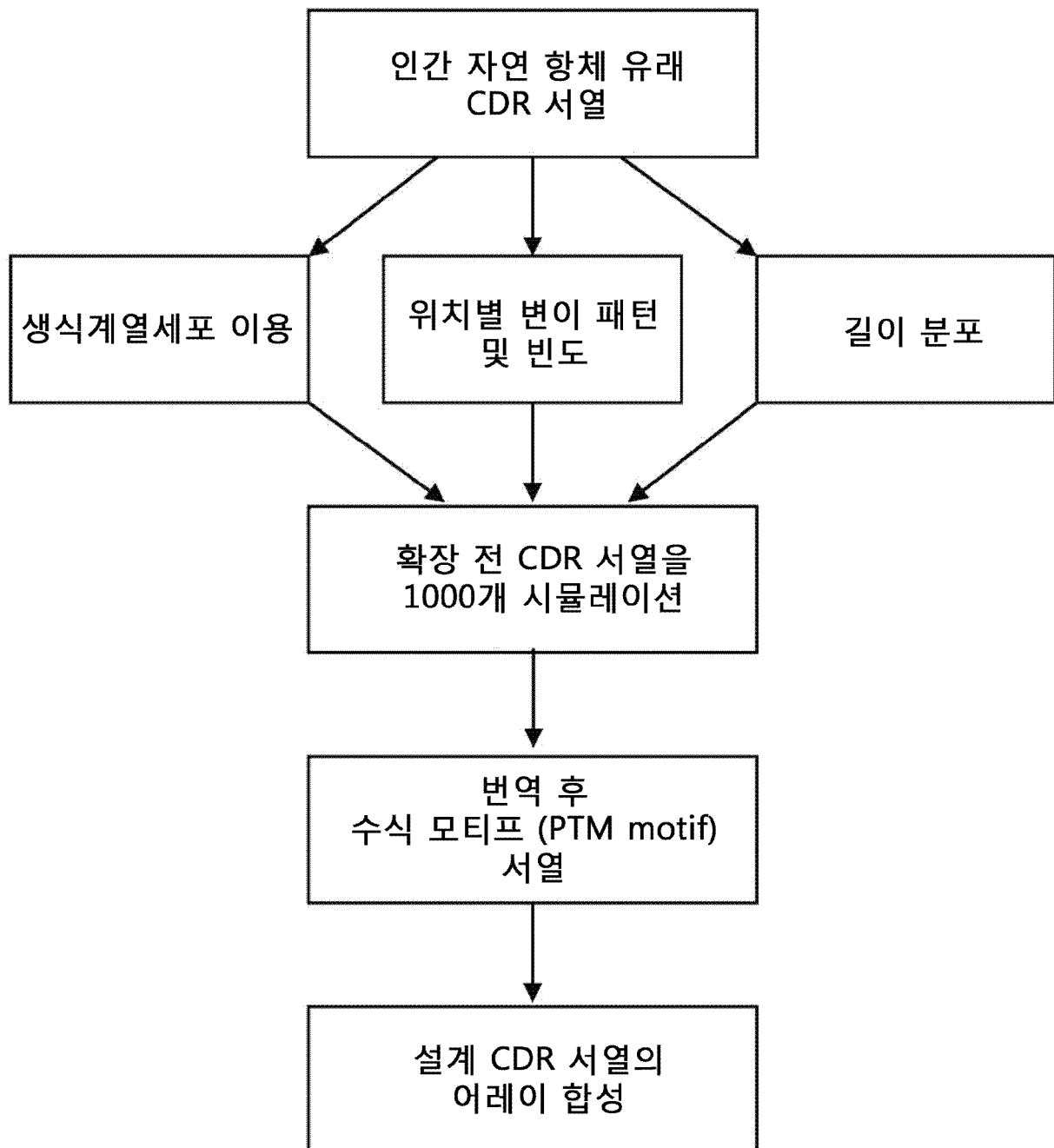
[도 2]



[도3]



[도4]



Section 1

Section 2

Section 3

Section 4

```

(205)      10      20      30      40      50
(201) ASLAISGLRSEDEADYYQSSYTS--SSPVVFGGGTKLTVLGQAGQHNNNNNN
(192) ASLAISGLRSEDEADYYQSSADS--SGWVFGGGTKLTVLGQAGQHNNNNNN
(194) ASLAISGLRSEDEADYYCAANDDSLSPVFGGGTKLTVLGQAGQHNNNNNN
(201) ASLAISGLRSEDEADYYQSSYDS--TKGVVFGGGTKLTVLGQAGQHNNNNNN
(205) ASLAISGLRSEDEADYYQSSYDS SSGWVFGGGTKLTVLGQAGQHNNNNNN

```

[도5b]

EL 라이브러리 서열

Section 1

```

(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYDINWVRQAPGKGLEWVSIIYPGDSDIRYSPRFQGRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSMYRSWVRQAPGKGLEWVRIIYPGDSOTIYSRFQSRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYINWVRQAPGKGLEWVSISGSGGKTIYADSVHGRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSCYIMHWVRQAPGKGLEWVEYISSSRITIIYADSVKSRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYIMKWVRQAPGKGLEWVSEINHGCTANYKPSIKSRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSY I WVRQAPGKGLEWVS I G T YAPSV SRF

```

Section 2

```

(69) TISRDNSEKNTLYLQMNISLRAEDTAVYYWIPQSTTGHSL LQGGTILVTVS SGGGGSGGGSGGGGSQS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNISLRAEDTAVYYWITADEYDFE--INGGGTILVTVS SGGGGSGGGSGGGGSQS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNISLRAEDTAVYYCARDDVGHF--INGGGTILVTVS SGGGGSGGGSGGGGSQS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNISLRAEDTAVYYCARDRNAALD--YMGOSTILVTVS SGGGGSGGGSGGGGSQS
(68) TISRDNSEKNTLYLQMNISLRAEDTAVYYCARCNSVMD--YMGOSTILVTVS SGGGGSGGGSGGGGSQS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNISLRAEDTAVYYCAR D INGGGTILVTVS SGGGGSGGGSGGGGSQS

```

Section 3

```

(137) VLTQPPSASGTFGORVTISCTG---DKLGN---VYTHWYQQLPGTAPKLLIYSTNNHNS-----G
(135) VLTQPPSASGTFGORVTISCTGTSSDVGOY---NYTHWYQQLPGTAPKLLIYKDSERFSGLPDRTSG
(135) VLTQPPSASGTFGORVTISCTG---NNIGS---KSMHWYQQLPGTAPKLLIYQDNRRFSQMPDRFSG
(135) VLTQPPSASGTFGORVTISCTG--HARDY-LSGN--PAQILQLPGTAPKLLIYEDSKAPSG-VHRTSG
(134) VLTQPPSASGTFGORVTISCTG---NNIGT---KSMHWYQQLPGTAPKLLIYRTNNHNSQMPDRFSG
(137) VLTQPPSASGTFGORVTISCTG IG K VSWYQQLPGTAPKLLIY DS RFSQVP RFSG

```

Section 4

```

(205) SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAANDSLSGYVFGGGTKLTVLQAGQHHHHHH
(191) SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCOSYDSSENV--VFGGGTKLTVLQAGQHHHHHH
(199) SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCOSYDSSENV--VFGGGTKLTVLQAGQHHHHHH
(196) SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCOSYDSSENV--VFGGGTKLTVLQAGQHHHHHH
(198) SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCOSYDSSENV--VFGGGTKLTVLQAGQHHHHHH
(195) SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCOSYDSSENV--VFGGGTKLTVLQAGQHHHHHH
(205) SKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCOSYDSSENV--VFGGGTKLTVLQAGQHHHHHH

```

[도5c]

OK 라이브러리 서열

Section 1

(1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYRSHWVRQAPGKGLEWVSAIFPGDSHTRYSPSTQGRF
 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYRSHWVRQAPGKGLEWVSEITASG-SINYNPSINTAF
 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSG-YRHWVRQAPGKGLEWVSDIRYEGSNKYVADSVNGRF
 (1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYRSHWVRQAPGKGLEWVSDI GS I YAPSLKGRF

Section 2

(69) TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFISN--YFDYWGQGTILVTVSSGGGSGGGGSGGGGSG
 (68) TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAAFITYTFDYWGQGTILVTVSSGGGSGGGGSGGGGSG
 (68) TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALRGFTN----YWGQGTILVTVSSGGGSGGGGSGGGGSG
 (69) TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG AAF FDYWGQGTILVTVSSGGGSGGGGSGGGGSG

Section 3

(137) IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSG
 (135) IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSG
 (136) IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQTISS-YLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGIPDRFSGSGSG
 (132) IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQIISN-YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGIPDRFSGSGSG
 (137) IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSISS YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGIPDRFSGSGSG

Section 4

(205) TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP YTFGQGTKVEIKGQAGQHNNHHH
 (203) TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-QTFGQGTKVEIKGQAGQHNNHHH
 (199) TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYNSYP-YTFGQGTKVEIKGQAGQHNNHHH
 (205) TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP YTFGQGTKVEIKGQAGQHNNHHH

[도5d]

EK 라이브러리 서열

Section 1

```

(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYYNWVRQAPGKGLEWVSISGSSLNYYIYADSLKGRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMHWVRQAPGKGLEWVSEIYHS-GSTNYPDELKSRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYQTHWVRQAPGKGLEWVSEIYHS-GSTNYPDELKSRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSNYGISEWVRQAPGKGLEWVSNINTNTGNPTIYAQGFIERF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVININAGTGNPTIYAQGFIERF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSNYMTNWVRQAPGKGLEWVSYISPESSIIYYAESVNGRF
(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSWIS STGS YA SLKGRF

```

Section 2

```

(69) TISRDNSEKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK GIGKAINRYTDVWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
(68) TISRDNSEKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK TP---QSSNEDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
(68) TISRDNSEKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK SNYGFVLPALDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK PPSRWYTGMDVWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYWDM-----VLWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK SVYCYKG--FDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGS
(69) TISRDNSEKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK LDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGS

```

Section 3

```

(137) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISN-YLAWYQKPKQAPRLLIYAASSLQTCIPDRFSGSGS
(133) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISN-YLAWYQKPKQAPRLLIY---SPATCIPDRFSGSGS
(136) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISN-SYLAWYQKPKQAPRLLIYQASSRATGIPDRFSGSGS
(137) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISN-SYLAWYQKPKQAPRLLIYQASSRATGIPDRFSGSGS
(128) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISN-IYYEINWYQKPKQAPRLLIYQASSRATGIPDRFSGSGS
(135) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISN-YLAWYQKPKQAPRLLIYQASSRATGIPDRFSGSGS
(137) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISN-YLAWYQKPKQAPRLLIYQASSRATGIPDRFSGSGS

```

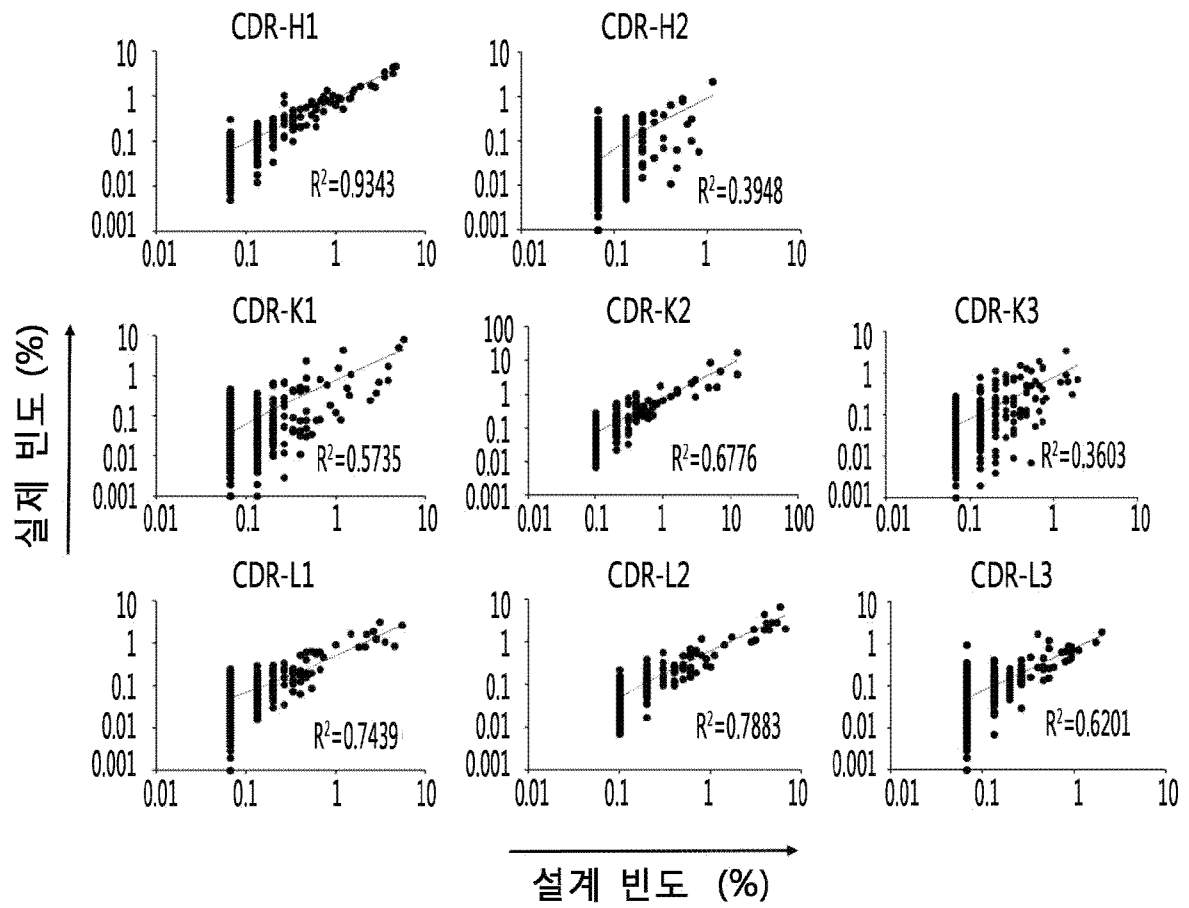
Section 4

```

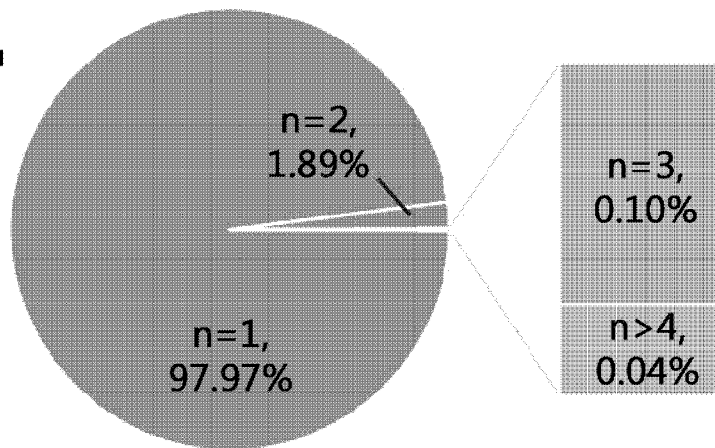
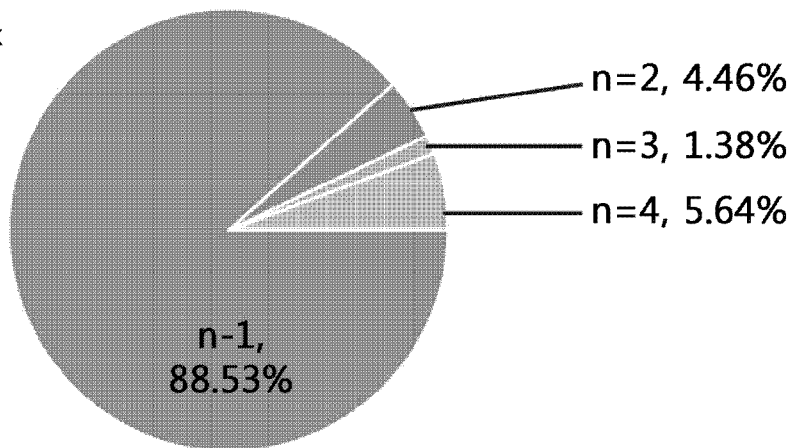
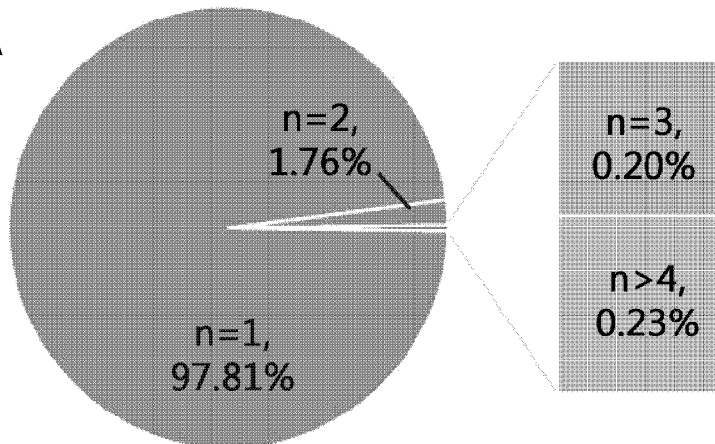
(205) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYAN-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN
(204) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGS-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN
(197) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGS-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN
(204) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYV-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN
(205) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYV-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN
(195) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYV-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN
(202) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYV-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN
(205) GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYV-STPYTFGQGTKEIKQAGQHNNNNNN

```

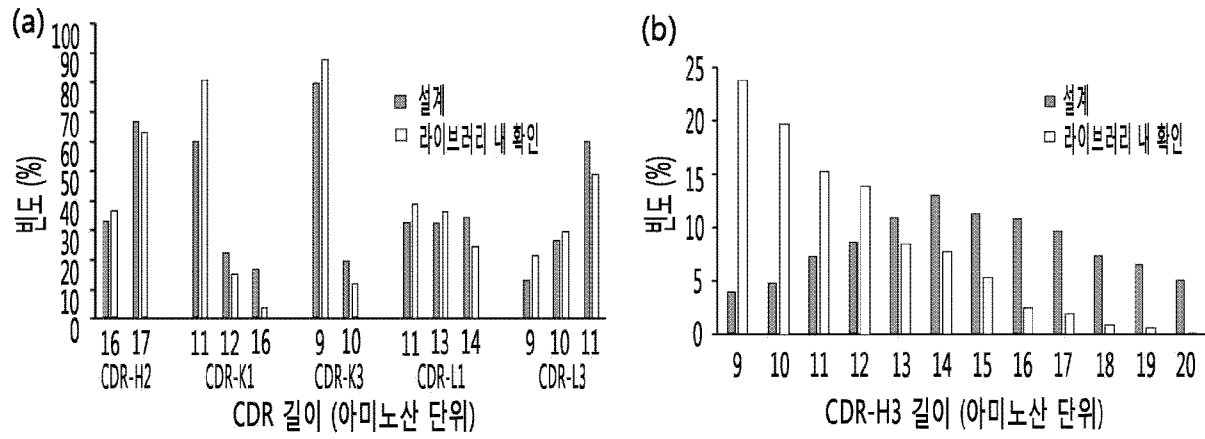
[도6]



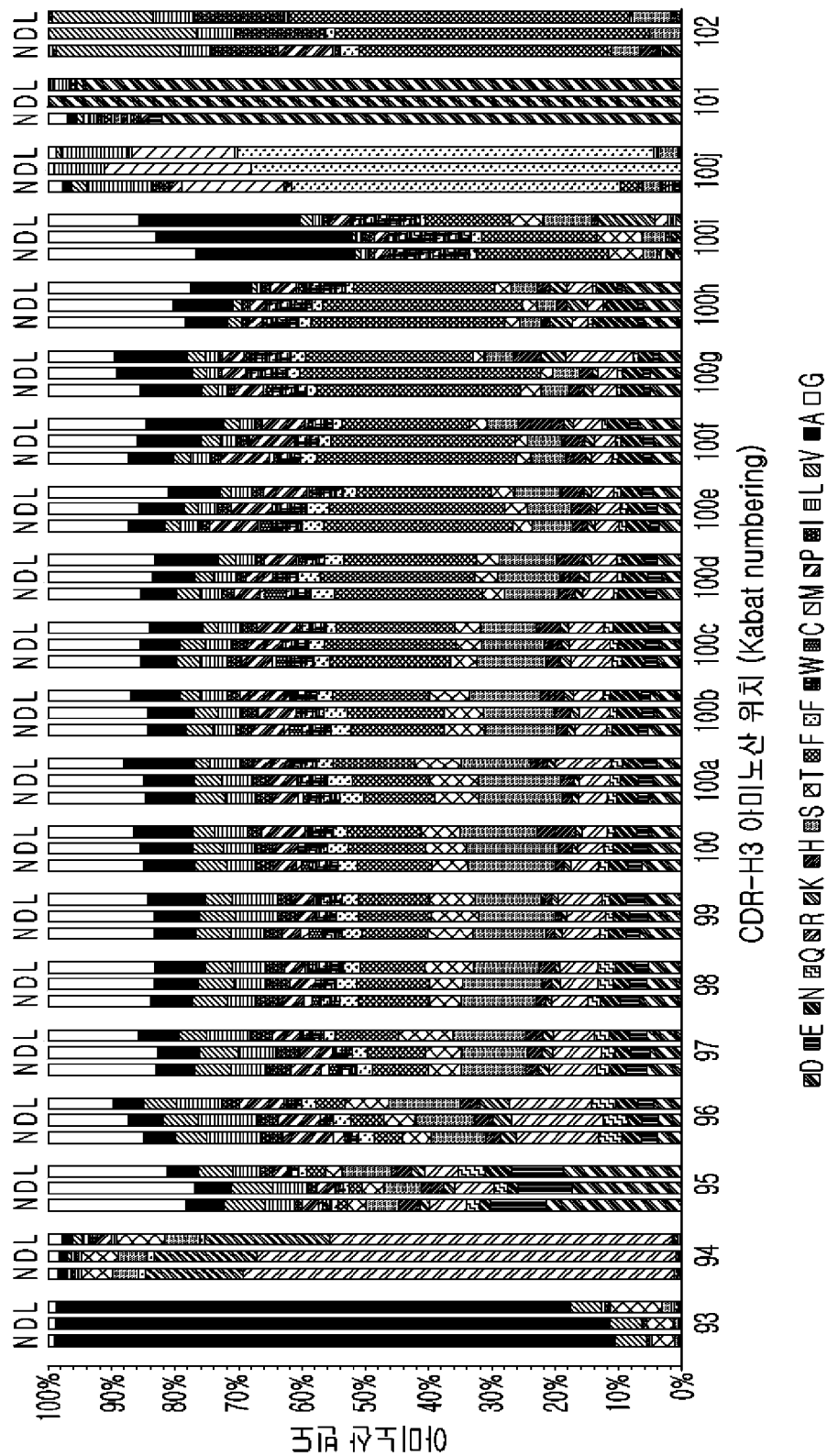
[도7]

 V_H  V_K  V_λ 

[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/000320**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C40B 50/02(2006.01)i, C40B 40/10(2006.01)i, C07K 16/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C40B 50/02; C40B 10/00; C12N 5/06; C40B 40/10; C40B 40/08; C07H 21/00; C12Q 1/68; C40B 40/02; C40B 30/04; C07K 16/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: antibody library, complementarity-determining regions(CDRs), design, light chain, medium chain, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009-0318297 A1 (CAPPUCILLI, G. et al.) 24 December 2009 See abstract; claims 53-64; paragraphs [0014], [0017], [0089], [0133]-[0137], [0149] and [0189].	1-2,5,7-10,15
A		3-4,6,11-14
X	US 2011-0245108 A1 (CREA, R. et al.) 06 October 2011 See abstract; claims 107-121; paragraphs [0016], [0028], [0065], [0071]; figure 1.	1-2,5,7-10,15
A		3-4,6,11-14
A	US 2006-0057632 A1 (SHIMIZU, N. et al.) 16 March 2006 See abstract; claims 1-5.	1-15
A	US 2012-0058906 A1 (SMIDER, V. et al.) 08 March 2012 See abstract; claims 306-311.	1-15
A	US 2010-0099103 A1 (HSIEH, C.-M. et al.) 22 April 2010 See abstract; claims 1-5.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 MAY 2016 (13.05.2016)

Date of mailing of the international search report

13 MAY 2016 (13.05.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/000320

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0318297 A1	24/12/2009	CA 2627075 A1	18/05/2007
		EP 1966374 A2	10/09/2008
		EP 1966374 B1	13/02/2013
		ES 2402576 T3	06/05/2013
		JP 2009-515516 A	16/04/2009
		JP 2012-097107 A	24/05/2012
		JP 5791496 B2	07/10/2015
		US 8716195 B2	06/05/2014
		WO 2007-054816 A2	18/05/2007
		WO 2007-054816 A3	04/10/2007
US 2011-0245108 A1	06/10/2011	BR P10513135 A	29/04/2008
		CA 2572961 A1	09/02/2006
		EP 1781680 A2	09/05/2007
		EP 1781680 B1	20/01/2016
		JP 2008-536473 A	11/09/2008
		JP 5143551 B2	13/02/2013
		MX 2007000103 A	11/05/2007
		WO 2006-014498 A2	09/02/2006
		WO 2006-014498 A3	01/03/2007
US 2006-0057632 A1	16/03/2006	AT 384129 T	15/02/2008
		AU 2002-366039 A1	10/06/2003
		EP 1457559 A1	15/09/2004
		EP 1457559 A4	12/10/2005
		EP 1457559 B1	16/01/2008
		JP 4171844 B2	29/10/2008
		US 8178320 B2	15/05/2012
		WO 03-044198 A1	30/05/2003
US 2012-0058906 A1	08/03/2012	AU 2009-313551 A1	14/05/2010
		AU 2009-313551 B2	17/12/2015
		AU 2009-313560 A1	14/05/2010
		CA 2742968 A1	14/05/2010
		CA 2742969 A1	14/05/2010
		EP 2356146 A1	17/08/2011
		EP 2356270 A1	17/08/2011
		JP 2012-508016 A	05/04/2012
		JP 2012-508017 A	05/04/2012
		JP 5882058 B2	09/03/2016
		US 2011-0318339 A1	29/12/2011
		US 9221902 B2	29/12/2015
		WO 2010-054007 A1	14/05/2010
		WO 2010-054010 A1	14/05/2010
US 2010-0099103 A1	22/04/2010	AU 2009-298501 A1	08/04/2010
		CA 2736430 A1	08/04/2010
		CN 102227440 A	26/10/2011
		EP 2340256 A2	06/07/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/000320

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 2340256 A4	21/03/2012
		JP 2012-504416 A	23/02/2012
		KR 10-2011-0061629 A	09/06/2011
		MX 2011003380 A	21/04/2011
		NZ 591543 A	30/11/2012
		RU 2011117213 A	10/11/2012
		TW 201028432 A	01/08/2010
		US 8404445 B2	26/03/2013
		WO 2010-039852 A2	08/04/2010
		WO 2010-039852 A3	29/07/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C40B 50/02(2006.01)i, C40B 40/10(2006.01)i, C07K 16/00(2006.01)i																										
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C40B 50/02; C40B 10/00; C12N 5/06; C40B 40/10; C40B 40/08; C07H 21/00; C12Q 1/68; C40B 40/02; C40B 30/04; C07K 16/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항체 라이브러리, 상보성 결정부위(CDRs), 설계, 경제, 중쇄, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3																										
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2009-0318297 A1 (CAPPUCILLI, G. 등) 2009.12.24 요약; 청구항 53-64; 단락 [0014], [0017], [0089], [0133]-[0137], [0149] 및 [0189] 참조.</td> <td>1-2, 5, 7-10, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>3-4, 6, 11-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2011-0245108 A1 (CREA, R. 등) 2011.10.06 요약; 청구항 107-121; 단락 [0016], [0028], [0065], [0071]; 도면 1 참조.</td> <td>1-2, 5, 7-10, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>3-4, 6, 11-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2006-0057632 A1 (SHIMIZU, N. 등) 2006.03.16 요약; 청구항 1-5 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012-0058906 A1 (SMIDER, V. 등) 2012.03.08 요약; 청구항 306-311 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010-0099103 A1 (HSIEH, C.-M. 등) 2010.04.22 요약; 청구항 1-5 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	US 2009-0318297 A1 (CAPPUCILLI, G. 등) 2009.12.24 요약; 청구항 53-64; 단락 [0014], [0017], [0089], [0133]-[0137], [0149] 및 [0189] 참조.	1-2, 5, 7-10, 15	A		3-4, 6, 11-14	X	US 2011-0245108 A1 (CREA, R. 등) 2011.10.06 요약; 청구항 107-121; 단락 [0016], [0028], [0065], [0071]; 도면 1 참조.	1-2, 5, 7-10, 15	A		3-4, 6, 11-14	A	US 2006-0057632 A1 (SHIMIZU, N. 등) 2006.03.16 요약; 청구항 1-5 참조.	1-15	A	US 2012-0058906 A1 (SMIDER, V. 등) 2012.03.08 요약; 청구항 306-311 참조.	1-15	A	US 2010-0099103 A1 (HSIEH, C.-M. 등) 2010.04.22 요약; 청구항 1-5 참조.	1-15
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																								
X	US 2009-0318297 A1 (CAPPUCILLI, G. 등) 2009.12.24 요약; 청구항 53-64; 단락 [0014], [0017], [0089], [0133]-[0137], [0149] 및 [0189] 참조.	1-2, 5, 7-10, 15																								
A		3-4, 6, 11-14																								
X	US 2011-0245108 A1 (CREA, R. 등) 2011.10.06 요약; 청구항 107-121; 단락 [0016], [0028], [0065], [0071]; 도면 1 참조.	1-2, 5, 7-10, 15																								
A		3-4, 6, 11-14																								
A	US 2006-0057632 A1 (SHIMIZU, N. 등) 2006.03.16 요약; 청구항 1-5 참조.	1-15																								
A	US 2012-0058906 A1 (SMIDER, V. 등) 2012.03.08 요약; 청구항 306-311 참조.	1-15																								
A	US 2010-0099103 A1 (HSIEH, C.-M. 등) 2010.04.22 요약; 청구항 1-5 참조.	1-15																								
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																										
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																										
국제조사의 실제 완료일 2016년 05월 13일 (13.05.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 05월 13일 (13.05.2016)																								
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김동석 전화번호 +82-42-481-5405 																								

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0318297 A1	2009/12/24	CA 2627075 A1 EP 1966374 A2 EP 1966374 B1 ES 2402576 T3 JP 2009-515516 A JP 2012-097107 A JP 5791496 B2 US 8716195 B2 WO 2007-054816 A2 WO 2007-054816 A3	2007/05/18 2008/09/10 2013/02/13 2013/05/06 2009/04/16 2012/05/24 2015/10/07 2014/05/06 2007/05/18 2007/10/04
US 2011-0245108 A1	2011/10/06	BR PI0513135 A CA 2572961 A1 EP 1781680 A2 EP 1781680 B1 JP 2008-536473 A JP 5143551 B2 MX 2007000103 A WO 2006-014498 A2 WO 2006-014498 A3	2008/04/29 2006/02/09 2007/05/09 2016/01/20 2008/09/11 2013/02/13 2007/05/11 2006/02/09 2007/03/01
US 2006-0057632 A1	2006/03/16	AT 384129 T AU 2002-366039 A1 EP 1457559 A1 EP 1457559 A4 EP 1457559 B1 JP 4171844 B2 US 8178320 B2 WO 03-044198 A1	2008/02/15 2003/06/10 2004/09/15 2005/10/12 2008/01/16 2008/10/29 2012/05/15 2003/05/30
US 2012-0058906 A1	2012/03/08	AU 2009-313551 A1 AU 2009-313551 B2 AU 2009-313560 A1 CA 2742968 A1 CA 2742969 A1 EP 2356146 A1 EP 2356270 A1 JP 2012-508016 A JP 2012-508017 A JP 5882058 B2 US 2011-0318339 A1 US 9221902 B2 WO 2010-054007 A1 WO 2010-054010 A1	2010/05/14 2015/12/17 2010/05/14 2010/05/14 2010/05/14 2011/08/17 2011/08/17 2012/04/05 2012/04/05 2016/03/09 2011/12/29 2015/12/29 2010/05/14 2010/05/14
US 2010-0099103 A1	2010/04/22	AU 2009-298501 A1 CA 2736430 A1 CN 102227440 A EP 2340256 A2	2010/04/08 2010/04/08 2011/10/26 2011/07/06

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2340256 A4	2012/03/21
		JP 2012-504416 A	2012/02/23
		KR 10-2011-0061629 A	2011/06/09
		MX 2011003380 A	2011/04/21
		NZ 591543 A	2012/11/30
		RU 2011117213 A	2012/11/10
		TW 201028432 A	2010/08/01
		US 8404445 B2	2013/03/26
		WO 2010-039852 A2	2010/04/08
		WO 2010-039852 A3	2010/07/29