



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0124594
(43) 공개일자 2023년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0781 (2010.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
C12N 5/0635 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7021168
(22) 출원일자(국제) 2021년12월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/064769
(87) 국제공개번호 WO 2022/140494
국제공개일자 2022년06월30일
(30) 우선권주장
63/130,044 2020년12월23일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
첸 강
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
쉬 에르강
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

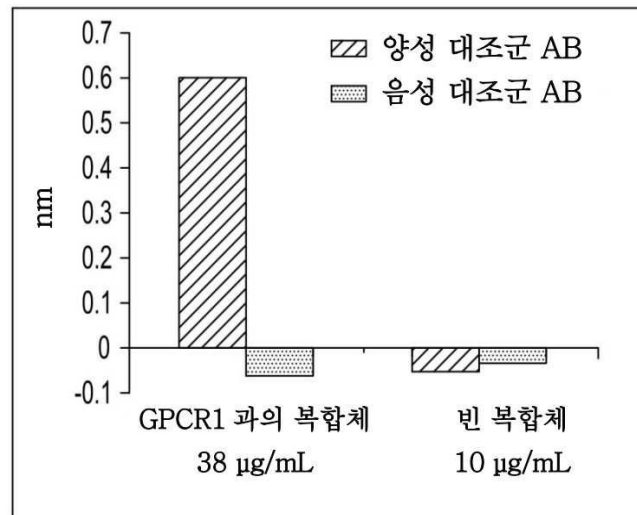
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 막관통 단백질 및 이를 생산하는 세포에 결합하는 항체를 수득하는 방법

(57) 요약

본 개시는 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 세포를 수득하는 방법, 이러한 세포로부터 항체를 생성하는 방법, 막관통 단백질 및 이의 단편에 대한 항체, 및 상기 항체를 암호화하는 핵산을 개시한다. 보다 구체적으로, 본 개시는, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 사용에 기초하여 막관통 단백질에 결합함으로써, 상기 막관통 단백질 항원을 세포에 제시하는 항체를 발현하는 항체를 생성하는 세포를 수득하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 33/6845 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

(72) 발명자

리 웬-위

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
내

수 데이비드

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
내

파르 글렌

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
내

밥 로버트

미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소우 밀 리버
로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
내

명세서

청구범위

청구항 1

관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 획득하는 방법으로서, 상기 방법은:

- (a) 상기 관심 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 항체 생성 세포의 집단을 접촉시켜 상기 관심 막관통 단백질이 상기 세포 표면 상의 항체에 결합할 수 있게 하는 단계; 및
- (b) 상기 관심 막관통 단백질에 결합된 세포를 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 복합체는 적어도 하나의 막 스캐폴드 단백질에 의해 둘러싸인 디스크이드 인지질 이중층을 형성하는 복수의 지질을 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체 생성 세포의 집단은 비장, 림프절, 말초 혈액, 골수, 또는 이들의 조합으로부터 획득되는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체 생성 세포의 집단은 말초 혈액 세포, B 세포, 혈장 세포, 혈장 세포 골수종, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 항체 생성 세포의 집단은 B-세포를 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체 생성 세포는 이전에 관심 막관통 단백질에 대해 면역화된 포유동물로부터 획득되는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 포유동물은 관심 막관통 단백질의 적어도 일부를 암호화하는 핵산, 또는 관심 막관통 단백질의 적어도 일부를 사용해 면역화된 비인간 포유동물인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 비인간 포유동물은 유전적으로 조작된, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 내인성 유전자로부터 관심 막관통 단백질을 발현하지 않는, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 인간 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열 및 인간 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 마우스인, 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 관심 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 막관통 단백질의 비인간 상동체 또는 막관통 단백질의 비인간 상동체를 암호화하는 핵산으로 번역화된, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 단계 (b)에서 수집된 세포는 인간 막관통 단백질 및 막관통 단백질의 비인간 상동체에 결합하는 항체를 발현하는, 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 관심 키메라 막관통 단백질 또는 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 번역화되었고, 여기에서 상기 키메라 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 일부 및 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 단계 (b)에서 수집된 세포는 인간 막관통 단백질 상에 위치한 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는, 방법.

청구항 17

제8항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 키메라 막관통 단백질이되, 상기 키메라 단백질은 비인간 막관통 단백질의 일부에 작동가능하게 연결된 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 인간 막관통 단백질 또는 인간 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 번역화된, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 단계 (b)에서 수집된 세포는 키메라 막관통 단백질의 인간 부분에 결합하는 항체를 발현하는, 방법.

청구항 20

제8항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 막관통 단백질의 절단된 형태로 번역화된, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은 막관통 단백질의 전장 형태 또는 이를 암호화하는 핵산으로 번역화된, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 막관통 단백질의 절단된 형태는 상기 막관통 단백질의 전장 형태의 N-말단 도메인 또는 C-말단 도메인을 함유하지 않는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 막관통 단백질의 절단된 형태는 세포의 루프를 포함하고, 여기에서 단계 (b)에서 수집된 세포는 상기 막관통 단백질의 절단된 형태의 세포의 루프 상에 위치한 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는, 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 단계 (a)는 항체 생성 세포의 집단을 적어도 하나의 차단제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 적어도 하나의 차단제는 관심 막관통 단백질의 일부에 결합하는 폴리펩티드인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 폴리펩티드는 관심 막관통 단백질의 N-말단 도메인 또는 관심 막관통 단백질의 C-말단 도메인에 결합하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 막관통 단백질은 세포의 루프를 포함하고, 여기에서 단계 (b)에서 수집된 세포는 상기 관심 막관통 단백질의 세포의 루프 상에 위치한 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는, 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 항체 생성 세포의 집단은 관심 막관통 단백질을 포함하는 상기 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화된 포유동물로부터 수득되며, 상기 복합체는 제1 검출 가능한 표지를 추가로 포함하고, 여기에서 관심 막관통 단백질은 제2 검출 가능한 표지를 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 적어도 하나의 차단제는 (i) 상기 제1 검출 가능한 표지에 결합하는 제1 차단제 및 (ii) 상기 제2 검출 가능한 표지에 결합하는 제2 차단제를 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 적어도 하나의 차단제는 막 스캐폴드 단백질에 결합하는 제3 차단제를 포함하는, 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 G-단백질 결합 수용체(GPCR) 단백질, 테트라스파닌 단백질, 및 이온 채널 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 GPCR 단백질인, 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 이온 채널 단백질인, 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 테트라스파닌 단백질인, 방법.

청구항 35

제1항에 있어서, 복합체는 검출 가능한 표지에 접합된 적어도 하나의 막 스캐폴드 단백질을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 관심 막관통 단백질에 결합된 세포를 수집하는 단계는:

관심 막관통 단백질에 대한 세포의 결합을 검출하는 단계;

관심 막관통 단백질에 결합되지 않은 세포로부터 관심 막관통 단백질에 결합된 세포를 분리하는 단계; 및

상기 결합된 세포를 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 검출 가능한 표지는 비오틴인, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 검출하는 단계는:

단계 (b)의 세포를 스트렙타비딘-피코에리트린(PE-스트렙타비딘)으로 인큐베이션하는 단계; 및
형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용하여 결합된 세포를 식별하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 검출 가능한 표지는 형광 분자인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 검출하는 단계는 FACS를 사용하여 결합된 세포를 식별하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

제1항에 있어서, (i) 단계 (b)에서 수집된 세포로부터, 상기 세포에 의해 발현된 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및 상기 세포에 의해 발현된 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 단리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 단계 (i)에 이어서:

(ii) 단계 (i)에서 단리된, 중쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산, 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 도입하기 위해 숙주 세포를 형질감염시키는 단계; 및
(iii) 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 발현하는 조건 하에서, 단계 (ii)로부터 숙주 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 단계 (ii)에서의 숙주 세포는 중쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 발현 벡터, 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 발현 벡터로 형질감염되는, 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 숙주 세포는 포유류 세포인, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 포유류 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포인, 방법.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득된, 항체.

청구항 47

제46항에 있어서, 항체는 G-단백질 결합 수용체 단백질(GPCR), 테트라스파닌 단백질, 및 이온 채널 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 관심 막관통 단백질에 결합하는, 항체.

청구항 48

제47항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 GPCR 단백질인, 항체.

청구항 49

제47항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 이온 채널 단백질인, 항체.

청구항 50

제47항에 있어서, 관심 막관통 단백질은 테트라스파닌 단백질인, 항체.

청구항 51

제46항에 있어서, 항체는 세포에서 관심 막관통 단백질의 기능을 조절하는, 항체.

청구항 52

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 포유류 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포는 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 단편을 발현하는, 포유류 숙주 세포.

청구항 53

제52항에 있어서, 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포인, 포유류 숙주 세포.

청구항 54

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는, 하나 이상의 세제의 존재 하에 제공된 지질, 막 스캐폴드 단백질, 및 관심 막관통 단백질을 혼합하는 단계, 및 관심 막관통 단백질을 포함하는 복합체의 형성을 유도하도록 상기 하나 이상의 세제를 제거하는 단계에 의해 형성되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 그 내용 전체가 참조로서 본원에 통합되는 2020년 12월 23일에 출원된 미국 특허 가출원 제 63/130,044호로부터의 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 참조에 의한 서열 목록의 통합

[0004] 2021년 12월 7일에 생성되고, EFS-Web을 통해 미국 특허 상표청에 제출된 36526_10465W001_SequenceListing.txt로 명명된 30 KB의 ASCII 텍스트 파일 내 서열 목록이 참조로써 본원에 포함된다.

[0005] 기술 분야

[0006] 본 개시는 대체적으로 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 세포, 이를 생성하는 방법, 막관통 단백질 및 이의 단편에 대한 항체, 및 항체를 암호화하는 핵산에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시는, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 사용에 기초하여 막관통 단백질에 결합함으로써 막관통 단백질 항원을 세포에 제시하는 항체를 발현하는 항체를 생성하는 세포를 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] G-단백질 결합 수용체(GPCR) 및 이온 채널과 같은 막관통 단백질은 모든 FDA 승인 소분자 약물의 거의 절반의 표적이지만, 현재까지 치료용으로 승인된 항체는 거의 없다. Santo, 등, *Nat. Rev. Drug Disc.* 16:19 (2017) 참조. 일반적으로, 항체 또는 항체-생성 세포를 스크리닝하기 위해 사용된 방법이 비효율적이었거나, 막관통 단백질에 결합하는 항체를 수득할 수 없었다. 예를 들어, 엑소좀, 바이러스 유사 입자, 및 프로테올리포솜에서와 같이, 다중스판 막관통 단백질의 담체 내로의 단리 및 포장은, 충분한 양의 생물학적 활성 단백질 또는 입체적으로 정확한 막관통 단백질이 존재하는지의 여부에 대해 불확실성을 남긴다. 또한, GPCR-발현 세포는 스크리닝 시약으로서 매우 성공적이지 않았으며, 막-중식 막관통 단백질로부터 유래된 작은 펩티드는 이들의 형태학적 맥

락의 결여로 인해 관련 항체를 수득하는 데 있어서 거의 성공적이지 않았다. 이와 같이, 막관통 단백질에 대한 항체를 수득하고 생성하기 위한 새로운 방법이 필요하다.

발명의 내용

- [0008] 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용하여 막관통 단백질 항원을 항체에 제시하는 막관통 단백질에 대한 항체를 수득하는 방법이 본원에 개시된다. 본 방법은 관심 막관통 단백질을 포함하는 복합체뿐만 아니라, 자연 발생 세포의 막에서 흔히 발견되는 지질 및 막 스캐폴드 단백질을 사용하여, 항체에 대한 그의 자연 형태의 막관통 단백질을 제시한다. 이와 같이, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는, 예를 들어, 세포의 도메인 또는 이의 일부분과 같은, 자연에서 접근 가능한 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 항체의 특정 하위 집합(또는 항체를 발현하는 세포)의 식별 및 이로부터의 수집을 위해 본 개시된 방법에 사용된다. 따라서, 본 방법은 특정 항체가 관심 막관통 단백질의 원하는 부분을 인식하는지의 여부를 확인하기 위해, 부위 지향 돌연변이 유발에 의한 에피토프-특이적 항체의 시간 소모적 스크리닝, 식별 및 선택, 및 다른 공지된 기술에 대한 필요성을 우회한다.
- [0009] 일 양태에서, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 제공하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 항체 생성 세포의 집단을 접촉시키는 단계를 포함하는, 관심 막관통 단백질에 대한 항체 또는 이의 항체를 발현하는 세포 집단을 수득하는 방법이 제공된다.
- [0010] 일부 구현예에서, 본 방법은, 복합체에 의해 제시된 막관통 단백질 항원과 세포의 표면 상의 항체 간의 결합을 허용하고 결합된 항체 생성 세포를 수집하기 위해, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 항체 생성 세포의 집단을 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0011] 일부 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 하나의 특정 유형의 조직, 기관 또는 세포로부터 세포로 이루어진 세포의 균질한 집단이다. 다른 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 둘 이상의 특정 유형의 조직, 기관 또는 세포로부터 세포로 이루어진 세포의 비균질 집단이다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 비장, 림프절, 골수 또는 다른 기관 중 하나 이상으로부터의 조직-유래 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체-생성 세포의 집단은 림프구를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체-생성 세포의 집단은 혈액 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 말초 혈액 세포, B 세포, 혈장 세포, 혈장 세포 골수종, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 항체-생성 세포의 집단은 B 세포의 집단이다. 일 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 메모리 B 세포로 구성된다. 일 구현예에서, 항체-생성 세포의 집단은, 예를 들어 하이브리도마와 같은 재조합 세포를 포함한다.
- [0012] 일부 구현예에서, 본 방법은 동물로부터 항체 생성 세포의 집단을 수득하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 관심 막관통 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산 면역원으로 면역화한 후 관심 막관통 단백질에 대한 항체를 생성하는 동물로부터 수득된다. 특정 구현예에서, 동물 또는 면역화된 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 포유동물은 마우스, 랫트, 염소, 인간, 햄스터, 돼지, 원숭이 또는 기니피그이다. 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이 아니다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스, 랫트 또는 염소이다. 특정 구현예에서, 포유동물은 마우스이다. 본 방법의 또 다른 구현예에서, 포유동물은 예를 들어, 면역원에 노출된 인간과 같은 인간이다.
- [0013] 일부 경우에, 동물은 면역화된다. 특정 구현예에서, 면역화된 동물은 유전적으로 조작된다. 예를 들어, 동물이 내인성 유전자좌로부터 관심 막관통 단백질을 발현하지 않도록, 해당 동물은 유전적으로 조작될 수 있다. 특정 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄(IgL) 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 예를 들어 마우스, 염소 또는 랫트와 같은 비인간 포유동물이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은 인간 면역글로불린 중쇄 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함하고, 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 유전자가 또한 결여되어 있다. 특정 구현예에서, 면역화된, 유전적으로 조작된 동물은 마우스 또는 랫트, 예를 들어, 인간화 IgH 유전자좌 및/또는 인간화 Igκ 경쇄 유전자좌를 포함하는 VELOCIMMUNE[®] 마우스이다. 일부 구현예에서, 면역화된 유전적으로 조작된 동물은 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자가 결여된 인간화 IgH 유전자좌 및 인간화 Igκ 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스이다. 일 구현예에서, 유전적으로 조작된 마우스는 인간 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 람다 경쇄(Igλ) 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함한다. 특정 구현예에서, 유전적으로 조작된 마우스는 인간 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 람다 경쇄(Igλ) 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하고, 또한 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자가 결여되어 있다.

- [0014] 일부 구현예에서, 항체 생성 세포는 관심 막관통 단백질 번역원으로 번역화된 동물로부터 수득된다. 특정 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질의 적어도 일부를 암호화하는 핵산, 또는 관심 막관통 단백질의 적어도 일부를 사용해 번역화되었다. 일부 구현예에서, 동물은 관심 전장 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 번역화되었다. 다른 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질의 일부를 암호화하는 핵산으로 번역화되었다. 특정 구현예에서, 핵산은 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 암호화하지 않는다. 다른 구현예에서, 동물은, 예를 들어, 플라스미드, 발현 벡터, 바이러스 유사 입자(VLP), 세포, 엑소좀 및 리포솜과 같은 핵산을 발현할 수 있는 담체에 포함되는 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산으로 번역화되었다. 일부 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부로 번역화되었다. 특정 구현예에서, 동물은 관심 전장 막관통 단백질로 번역화되었다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질 번역원은 절단되고, 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질 또는 핵산 번역원은 표지, 마커 또는 특징부와 같은 하나 이상의 검출 가능한 요소를 포함하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 번역원은 검출 가능한 표지를 포함한다. 특정 구현예에서, 검출 가능한 표지는 FLAG-태그, 히스티딘 태그(His-tag), Avi-태그, BirA-태그 또는 이들의 조합이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질 번역원은 FLAG-태그 및 His-태그를 갖는다. 특정 구현예에서, 검출 가능한 표지 또는 표지들은 번역원의 아미노-말단 또는 카르복시-말단에 위치한다. 특정 구현예에서, 동물은 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 포함된 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부분으로 번역화되었다.
- [0015] 특정 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 일부에 작동가능하게 연결된 관심 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열로 번역화된다. 비인간 상동체는, 예를 들어, 인간, 침팬지, 붉은털 원숭이, 토끼, 말, 양, 랫트, 마우스, 개, 닭 또는 염소로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 또한, 예를 들어, His-태그, FLAG-태그, Avi-태그 또는 Bir-A-태그와 같은 검출 가능한 요소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 일부에 작동가능하게 연결된 관심 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질 또는 이의 일부로 번역화된다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은, 예를 들어, His-태그, FLAG-태그, Avi-태그 또는 Bir-A-태그와 같은 검출 가능한 요소를 포함한다.
- [0016] 일부 경우, 동물은, 예를 들어, 단백질 또는 펩티드, DNA 또는 RNA와 같은 핵산 서열, 변형된 단백질 또는 암호화 DNA, VLP 및 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 같은 둘 이상의 번역원으로 번역화된다.
- [0017] 방법은, 항체-생성 세포의 집단을 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 접촉시켜 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체-생성 세포의 집단을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0018] 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 적어도 하나의 막 스캐폴드 단백질(MSP) 및 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 적어도 하나의 MSP 및 복수의 지질을 포함한다. 특정 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 적어도 2개 또는 정확히 2개의 MSP를 포함한다. 다른 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 3개 이상의 MSP를 포함한다. 일부 경우, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질은 MSP1E3D1, MSP1D1, MSP2N3 및 MSP2N2와 같은 적어도 하나의 막 스캐폴드 단백질을 포함한다. 일 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 2개의 MSP1E3D1 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, MSP는 동일하다. 다른 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 MSP는 서로 상이하다.
- [0019] 일부 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 표지, 마커 또는 특징부와 같은 검출 가능한 요소를 포함하는 적어도 하나의 표지된 MSP를 함유한다. 특정 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 2개의 표지된 MSP 및 지질 이중층을 함유한다. 일부 구현예에서, MSP 단백질은 형광단과 같은 검출 가능한 표지를 포함한다. 특정 구현예에서, 검출 가능한 요소는 복합체의 MSP 중 하나 이상에 위치하는 BirA-태그 또는 Avi-태그이다. 예시적인 구현예에서, 하나 이상의 MSP는 MSP를 화학적으로 비오티닐화하거나 Avi-태그를 MSP 코딩 서열에 유전적으로 도입함으로써 비오티닐화된다.
- [0020] 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 또한 스펅고지질 및/또는 인지질과 같은 복수의 지질을 포함한다. 복합체의 지질 이중층은 단일 유형의 지질 또는 다수의 유형의 지질로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 해당 막 스캐폴드 단백질(들) 주위에 디스크-형상의 "디스크이드" 인지질 이

중층을 형성하는 지질을 포함한다. 특정 구현예에서, 지질 이중층은 다음의 지질 중 하나 이상으로 구성된다: 스펅고미엘린, 포스파티딜콜린, 및 이의 유도체. 특정 구현예에서, 지질 이중층은 1-디올레오일 포스파티딜콜린(DOPC), 1-팔미토일 2-올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜콜린(SOPC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 및 포스파티딜세린(PS), 및 포스파티딜이노시톨(PI), 또는 이들의 조합으로 구성된다. 예시적인 구현예에서, 지질 이중층은 복수의 POPC 인지질을 포함한다.

[0021] 본 방법에 사용하기 위한 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 또한, 적어도 하나의 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하며, 이는 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체에 결합할 수 있는 항원으로서 복합체에 의해 세포 집단에 제시된다. 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질은 적어도 하나의 세포의 도메인 및 적어도 하나의 막관통 도메인을 갖는 자연 발생 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질은 인간 단백질이다. 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 마우스, 랫트, 영장류, 햄스터, 박테리아, 바이러스 단백질 등과 같은 비인간 단백질이다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 그의 자연 발생 형태로부터 변형된다. 예시적인 변형된 관심 막관통 단백질은 이들의 천연 아미노산 서열에 대한 다음의 변경 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 아미노산 치환, 아미노산 결실, 아미노산 삽입. 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어 전장 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단 도메인과 같은 막관통 단백질의 일부를 결실시키도록, 즉 "절단"되도록 변형된다. 일부 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 혼입된 관심 막관통 단백질은 아미노-말단, 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 막관통 도메인 중 하나 이상, 하나 이상의 세포내 도메인, C-말단 또는 이들의 조합에서의 안정화 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 리간드-활성화 단백질이며, 이에 의해 관심 막관통 단백질은 리간드의 존재 또는 부재 시에 형태를 변화시킨다(즉, 활성 및 비활성 상태를 가짐). 또 다른 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 혼입된 관심막관통 단백질은 키메라 단백질이며, 이는 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 일부에 작동가능하게 연결된 관심 인간 막관통 단백질의 일부를 포함한다. 소정의 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어, His-태그, FLAG-태그, Avi-태그 또는 Bir-A-태그 또는 이들의 조합과 같은 검출 가능한 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질은 His-태그 및 FLAG-태그를 포함한다.

[0022] 특정 경우, 관심 막관통 단백질은 GPCR 단백질, 테트라스파닌 단백질, 또는 이온 채널 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어, CCR5, ADORA2A, ADRB3, C3AR1, ADRA2A, GLP1R, CCR4, CCR8 및 CXCR4와 같은 GPCR 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 CCR5 또는 이의 일부이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 ADORA2A 또는 이의 일부이다. 소정의 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 ADORA2A 또는 이의 일부이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 C3AR1 또는 이의 일부이다.

[0023] 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어, TSPAN 1 내지 TSPAN19, TSPAN21, TSPAN23, TSPAN 31, TSPAN 32, TSPAN 33, UPK1B, PRPH2, CD151, CD53, CD37, CD82, CD63, CD81, CD9, CD82, CD63, CLND6 및 CLND9와 같은 테트라스파닌이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 CD63 또는 이의 일부이다. 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 예를 들어, 전압 관문 이온 채널 단백질과 같은 이온 채널 단백질이다. 특정 구현예에서, 전압 관문 이온 채널 단백질은 전압 의존성 칼슘 채널 또는 전압 관문 칼륨 채널 단백질이다. 일부 구현예에서, 이온 채널 단백질은 칼슘-활성화 칼륨 채널 단백질, 나트륨 채널 단백질, 칼슘 채널 단백질 또는 염화물 채널이다. 본 방법의 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어, BKCa, MaxiK, Sk, Nav1, CACNG1, CAV, CIC, 또는 일시적 수용체 전위 채널 단백질(TRP)과 같은 이온 채널 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 Nav1 또는 이의 일부이다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 Nav1.7 또는 이의 일부이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 CACNG1 또는 이의 일부이다.

[0024] 본 방법의 특정 구현예에서, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질은 항체 생성 세포의 세포 표면 상의 항체에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는, 예를 들어, 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인과 같은 관심 막관통 단백질의 특정 도메인에 위치한 에피토프(관심 막관통 단백질 상에 존재하는 결합 도메인)에 결합한다. 특정 구현예에서, 항체는 관심 막관통 단백질의 N-말단 도메인의 세포외 부분 상에 위치한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 관심 막관통 단백질의 세포외 루프 또는 관심 막관통 단백질의 C-말단 도메인의 세포외 부분에 위치한 에피토프에 결합한다. 특정 구현예에서, 항체는 관심 막관통 단백질의 C-말단 도메인에 위치한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 관심 막관통 단백질의 세포외 루프 상에 위치한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 관심 막관통 단백질의 세포내 도메인 상에 위치한 에피토프에 결합한다.

[0025] 본 방법은 또한, 관심 세포 표면 단백질 또는 바이오마커에 결합하는 검출 가능한 요소와 항체 생성 세포의 집단을 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역화된 동물로부터 수득된 항체 생성 세포의 이중 집단은, 예를 들어, IgG와 같은 B 세포 표면 단백질에 결합하는 형광 표지된 항체와 접촉될 수 있다. 그런 다음, 항

체 생성 세포 B 세포의 하위 집합은 항체와 B 세포 사이의 결합을 검출하는 단계 및 결합된 세포를 집단으로부터 분리하는 단계에 의해 해당 집단으로부터 수득될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 세포가 관심 막관통 단백질을 함유하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 접촉되는 동시에 B 세포 표면 단백질에 결합하는 형광 표지된 항체와 접촉될 수 있거나, 해당 세포는 상이한 시간에 접촉될 수 있다.

[0026] 특정 구현예에서, 본 방법은 또한 항체 생성 세포의 집단을 차단제와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 생성 세포의 집단은 관심 막관통 단백질의 일부, MSP 단백질의 일부, 또는 His-태그 또는 FLAG-태그와 같은 검출 가능한 마커를 인식하거나 이에 결합하는 펩티드 또는 화합물과 같은 분자와 접촉될 수 있다. 이러한 구현예에서, 항체 생성 세포는 차단제(들)와 차단제 상에 위치한 에피토프에 결합하는 항체 생성 세포에 의해 생산된 항체 간의 결합을 허용하기 위해 하나 이상의 차단제와 함께 인큐베이션된다.

[0027] 본 방법은 또한 결합된 세포로부터 미결합 물질 또는 세포를 제거하는 일정 기간 동안 항체 생성 세포와 같은 세포 집단을 세척하는 단계를 포함할 수 있다.

[0028] 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질에 존재하는 결합 도메인(에피토프)과 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합이 검출될 수 있고, 막관통 단백질에 결합된 항체 생성 세포가 수집될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 결합은 관심 막관통 단백질의 형태 변화, 세포에서의 관심 막관통 단백질의 활성화 또는 비활성화에 의해, 또는 하나 이상의 검출 가능한 마커의 사용에 의해 검출된다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질 항원에 결합된 항체를 제시하는 항체 생성 세포는 형광 활성화 세포 분류(FACS)와 같은 단일 세포 단리를 위한 고-처리 기술을 사용하여 집단 중 다른 항체 생성 세포로부터 검출되고 분리될 수 있다. 일 구현예에서, FACS는, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질에 결합된 단일 항체 생성 세포를 식별하고 분리하는 데 사용되며, 지질 이중층 막관통 단백질 복합체는, 그 안에 포함된 관심 복합체 또는 막관통 단백질에 부착된 검출 가능한 표지에 의해 방출되는 신호를 검출한다. 특정 구현예에서, 신호는 다음의 검출 가능한 표지 중 하나 이상에 의해 방출된다: 비오틴/스트렙타비딘-PE 복합체 또는 형광 분자.

[0029] 본 방법은 또한 항체 생성 세포로부터 항체 또는 항체 코딩 핵산을 수득하거나 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0030] 특정 구현예에서, 항체(예를 들어, 유전자) 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산은 항체 생성 세포로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 핵산은 항체의 가변 도메인을 암호화한다. 특정 구현예에서, 핵산은 항체 중쇄 또는 이의 단편을 암호화한다. 다른 구현예에서, 핵산은 항체 경쇄 또는 이의 단편을 암호화한다. 특정 경우, 항체 생성 세포로부터 분리된 핵산은 전장 항체를 암호화한다. 일부 구현예에서, 본 방법은, 항체 생성 세포로부터, 해당 세포에 의해 발현된 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산, 및 해당 세포에 의해 발현된 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 분리하는 단계를 포함한다.

[0031] 이러한 방법의 특정 구현예에서, 항체를 암호화하는 핵산은 숙주 세포에서 발현된다. 일부 구현예에서, 핵산을 포함하는 숙주 세포는 전장 항체를 발현하는 조건 하에서 배양되고, 이어서 항체가 생성되고 추가 사용을 위해 분리될 수 있다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 가변 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 가변 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 가변 중쇄(V_H) 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 V_H 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 가변 경쇄(V_L) 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 V_L 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 및 항체의 V_L 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 V_H 도메인 및 V_L 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다.

[0032] 따라서, 본 개시의 일 양태에서, 본 개시의 방법을 사용하여 분리된 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체의 가변 중쇄(V_H) 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체의 가변 경쇄(V_L) 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체의 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 및 항체의 V_L 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하는 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 진핵 세포이다. 소정의 구현예에서, 세포는 포유류 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 다음의 세포 유형 중 하나 이상일 수 있다: 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(예를 들어, CHO K1,

DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예를 들어, COS-7), 신장(예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431(표피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, 및 MMT 세포 및 종양 세포. 소정의 구현예에서, 세포는 CHO 세포이다.

[0033] 개시된 방법의 이들 및 다른 목적, 특징 및 장점은 첨부된 도면과 함께 취해진 해당 방법의 다양한 양태에 대한 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도면의 간단한 설명

도 1a 및 도 1b는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질이 관심 막관통 단백질을 인식하는 항체에 특이적으로 결합하고 개시된 방법을 사용하여 시험관 내에서 검출 가능하다는 것을 입증한다. 각각 검출 가능한 Bir-A 표지를 함유하고, 제1 예시적인 관심 막관통 단백질(GPCR1과의 복합체)을 함유하는, 적어도 2개의 막 스캐폴드 단백질을 갖는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를, GPCR1에 결합하는 것으로 알려진 예시적인 항체(양성 대조군 AB) 및 GPCR 단백질에 결합하지 않는 이소형 대조군 단일클론 항체(mab)(음성 대조군 AB)에 결합하는 능력에 대해, 관심 막관통 단백질을 포함하지 않는 대조군 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(빈 복합체)와 비교하였다. (A) 히스토그램은, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 막관통 단백질이 양성 대조군 항체에 특이적으로 결합하지만(0.6 nm), 항-GPCR1 항체와 빈 복합체 사이(-0.05 nm), 음성 대조군 항체와 GPCR1 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 사이(-0.06 nm), 또는 음성 대조군 항체와 빈 단백질 사이(-0.03 nm)에는 결합하지 않는다는 것을 입증하는 옥텟 검정의 결과를 도시한다. (B) 막관통 단백질을 갖거나 갖지 않는 비오틴화된 지질 이중층 막 단백질 복합체를 스트렙타비딘이 연결된 플레이트에 제공하는 단계, 및 이에 이어지는 GPCR1(양성 대조군 AB) 또는 음성 대조군 항체에 결합하는 것으로 알려진 항체와 함께 배양하는 단계에 의해, 관심 막관통 단백질을 함유하지 않는 비오틴화 지질 이중층 막관통 스캐폴드 단백질 복합체(빈 복합체)로부터 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(GPCR1을 갖는 복합체)를 검출하고 분리하는 능력을 분석하였다. 히스토그램은 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질은 양성 대조군 항체에 특이적으로 결합하지만 음성 대조군 항체에는 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

도 2a 내지 도 2f는 예시적인 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의, 유동 세포 계측법에 의한 검출 및 분리를 입증한다. 면역화되지 않은 대조군 마우스(A, C, E) 및 제1 관심 막관통 단백질(GPCR1, B), 제2 관심 막관통 단백질(GPCR2, D), 또는 제3 관심 막관통 단백질(GPCR3 F)을 암호화하는 DNA의 주사에 의해 면역화된 유전적으로 조작된 마우스로부터, 비장세포를 수확하고 분리하였다. 각각의 예시적인 관심 막관통 단백질(항원 결합 세포)에 특이적인 항체를 발현하는 B 세포(표면 IgG 양성 세포)의 집단을 검출하고, 형광 표지로 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG)에 염색하는 단계, 및 세포 집단을 예시적인 막관통 관심 단백질 중 하나를 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 접촉시키는 단계에 의한 FACS를 사용하여 이를 수집하였다. (A) 대조군 마우스로부터 수득된 100만개의 비장세포 중 단 2개의 B 세포만이 존재하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 제1 관심 막관통 단백질에 비특이적으로 결합되었다(직사각형). (B) 예시적인 제1 관심 GPCR 막관통 단백질(GPCR1)에 특이적인 항체를 발현하는 100만 개의 B 세포 중 11개가 본 방법을 사용하여 검출되었다(직사각형). (C) 대조군 마우스로부터 수득된 100만개의 비장세포 중 단 2개의 B 세포만이 존재하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 제2 관심 막관통 단백질에 비특이적으로 결합되었다(직사각형). (D) 예시적인 제2 관심 GPCR 막관통 단백질(GPCR2)에 특이적인 항체를 발현하는 100만 개의 B 세포 중 78개가 본 방법을 사용하여 검출되었다(직사각형). (E) 존재하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 제3 관심 막관통 단백질에 비특이적으로 결합된 11개의 B 세포만이(직사각형) 대조군 마우스로부터의 100만개의 비장세포로부터 수득되었다. (F) 예시적인 제3 관심 GPCR 막관통 단백질(GPCR3)에 특이적인 항체를 발현하는 100만 개의 B 세포 중 65개가 본 방법을 사용하여 검출되었다(직사각형).

도 3은 막관통 단백질 항원을 제시하도록 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용하여 항체 생성 세포로부터 분리된 항체는, 사용된 면역원의 유형과 무관하게 예시적인 제2 관심 GPCR 막관통 단백질에 특이적으로 결합한다는 것을 보여준다. 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용하여, 관심 막관통 단백질(DNA) 또는 정제된 관심 막관통 단백질(단백질)을 암호화하는 DNA로 면역화된 유전적으로 조작된 마우스로부터 항체 생성 세포를 수득하고, 스크리닝을 위해 항체를 생성하였다. 관심 전장 막관통 단백질 항원을 세포에서 발현시키고(TMB 과발현), 항원 발현 세포를 TMB(모세포) 중 하나를 암

호화하는 DNA로 형질감염되지 않은 대조군 세포와 비교하였다. 그런 다음, 세포를 항체와 함께 인큐베이션하여 예시적인 관심 막관통 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 식별하였다. 파선 위의 항체는 관심 막관통 단백질에 결합할 수 있었다. 대조적으로, 양의 대조군 항체(사각형) 및 음의 대조군 항체(삼각형)와 비교하여 나타난 바와 같이, 파선 아래의 항체는 약한 결합제이거나 관심 막관통 단백질에 결합할 수 없었다.

도 4는 세포 표면에서 발현된 관심 막관통 단백질 항원에 대한 결합을 스크리닝하기 위해 발현된, 개시된 방법을 사용하여 항체 생성 세포로부터 단리된 항체를 나타낸다. n-말단에서 절단된 형태의 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용하여, 면역화된 유전적으로 조작된 마우스로부터 항체 생성 세포를 수득하고, 스크리닝을 위해 항원 및 항체를 생성하였다. 관심 항원의 막관통 단백질의 절단된 형태가 세포에서 발현되거나(과발현된 절단된 TMB), 관심 항원의 전장 형태의 막관통 단백질이 세포에서 발현되었으며(과발현된 전장 TMB), 세포를 항체와 함께 인큐베이션하여 예시적인 관심 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하는 경우, 항원 발현 세포를 절단된 TMB 항원 또는 전장 TMB(모세포)를 암호화하는 DNA로 형질감염되지 않은 대조군 세포와 비교하였다(박스).

표의 간단한 설명

표 1: 면역화된 마우스로부터의 다양한 막관통 단백질에 대해, 세포 표면 항체를 발현하는 세포로부터의 항체 단리. 내인성 유전자로부터 관심 막관통 단백질의 발현을 방지하도록 유전적으로 조작된 마우스(항원 없는 유전적으로 변형된 마우스) 또는 내인성 유전자로부터 관심 막관통 단백질을 발현하는 유전적으로 조작된 마우스(유전적으로 변형된 마우스)를 관심 막관통 단백질을 암호화하는 DNA(DNA), 막관통 단백질의 변형된 형태를 암호화하는 DNA(변형된 DNA), 정제된 막관통 단백질(단백질), 관심 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(항원을 갖는 복합체) 또는 이의 조합으로 면역화시켰다. 본원에 개시된 분류 방법(세포 분류 및 항원을 갖는 복합체)을 사용하여 수집된 항체 생성 세포, 및 항체를 세포로부터 단리하고, 표준 하이브리도마 기술(하이브리도마)을 사용하여 수득된 세포로부터 단리된 항체와 비교하였다. 분석된 막관통 단백질 각각에 대해, 표준 하이브리도마 기술과 비교하여, 관심 막관통 단백질을 제시하는 지질 이중층 막관통 스캐폴드 단백질 복합체로 세포를 분류함으로써, 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체의 더 높은 백분율을 항체 생성으로부터 수득하였다.

표 2: 관심 막관통 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 수득할 수 있는 세포 분류 전략의 비교. 분석된 예시적인 관심 막관통 단백질, 즉 GPCR1 또는 이온 채널 2를 암호화하는 내인성 마우스 유전자를 갖거나(VI) 갖지 않은(VI-KO) 유전적으로 조작된 마우스에게 다음의 면역원 중 하나 이상을 주사하여 면역화시켰다: 관심 막관통 단백질을 암호화하는 DNA(DNA), 정제된 막관통 단백질(단백질), 관심 막관통 단백질을 발현할 수 있는 바이러스 유사 입자(VLP) 또는 이들의 조합(VLP 및 DNA). 그런 다음, 면역화된 마우스로부터 수득된 B 세포를 다음의 분류 체계 중 하나를 사용하여 분류하였다: 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(TMB를 갖는 복합체), VLP 또는 정제된 막관통 단백질(단백질). 그런 다음, 분류 체계에 결합된 항체를 생성한 세포를 수집하고, 비교를 위해 각 세포로부터 항체를 생성하였다.

표 3: 관심 인간 막관통 단백질을 암호화하는 DNA(DNA) 또는 정제된 인간 막관통 단백질(단백질) 중 하나로 면역화한, 유전적으로 조작된 마우스로부터 수득된 항체 생성 세포로부터 생성된 항체의 비교로서, 각각의 마우스로부터 수득된 세포를 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(TMB를 갖는 복합체)를 사용하여 분류함. 제공된 데이터는 5개의 대표적인 면역화 캠페인의 결과이다.

표 4: 2개의 상이한 예시적인 관심 막관통 단백질의 마우스 상동체를 발현하지 않는 유전적으로 변형된 마우스(VI-KO)로부터의 항체 생성 세포의 단리 및 항체의 생성으로서, 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 입증하기 위한 상이한 면역 전략의 비교는 관심 막관통 단백질의 마우스 상동체(마우스 TMB) 및 관심 막관통 단백질의 인간 상동체(인간 TMB)에 결합하는 교차 반응성 항체를 수득하는 데 사용될 수 있음. 제공된 데이터는 TMB1에 대한 4개의 대표적인 면역화 캠페인과 TMB2에 대한 4개의 대표적인 면역화 캠페인의 조합이다.

표 5: 예시적인 관심 막관통 단백질의 마우스 상동체를 발현하지 않는 유전적으로 변형된 마우스(VI-KO)로부터의 항체 생성 세포의 단리 및 항체의 생성으로서, 이는 A 인간 TMB2 단백질(인간 TMB2)을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 갖는 유전적으로 변형된 마우스의 면역화를 입증하며, 인간 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(인간 TMB2를 갖는 복합체) 및/또는 마우스 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(마우스 TMB2를 갖는 복합체)를 이용한 항체 생성 B 세포의 분류는 마우스 TMB2 및 인간 TMB2 단백질 상동체에 결합할 수 있는 교차 반응성 항체, 및 인간 TMB2 단백질에 특이적인 항

체를 발현하는 항체 생성 B 세포를 식별하였다. 제공된 데이터는 2개의 대표적인 면역화 캠페인의 조합이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 세포에 의해 생성된 항체에 막관통 단백질 항원을 제시하기 위해 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 이용하는 방법이 본원에 개시된다. 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부 뿐만 아니라, 자연 발생 세포의 막에서 흔히 발견되는 지질 및 막 스캐폴드 단백질을 포함하며, 따라서 그의 자연 형태의 항체에 대해 막관통 단백질 항원을 제시한다. 이와 같이, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는, 예를 들어, 세포의 도메인과 같은, 자연에서 접근 가능한 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 집단 중 항체의 특정 하위 집합(또는 항체를 발현하는 세포)를 식별 및 수집하기 위한 본 방법에 사용된다.
- [0036] 임의의 이론에 구속되지 않고, 본원에 개시된 방법은, 동물을 면역화하는 단계, 및 관심 막관통 항원을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용한 면역화된 동물로부터 항체 생성 세포를 단리하는 단계는, 형태적으로 정확한 막관통 단백질 상에서 에피토프에 특이적인 항체를 생성하는 세포를 식별할 수 있다는 것을 개시한다.
- [0037] 또한, 항체 및 항체 암호화 핵산은, 예를 들어, FACS와 같은 단일 세포 단리 및 수집 기술에 의해 항체 생성 세포로부터 직접 단리될 수 있다. 따라서, 본 개시는 또한 항체 생성 세포의 집단으로부터 막관통 단백질에 대한 친화도를 갖는 항체를 수득하기 위한 효과적이고 효율적인 방법을 제공한다. 본 방법은 특정 항체가 관심 막관통 단백질의 원하는 부분을 인식하는지의 여부를 확인하기 위해, 부위 지향 돌연변이 유발에 의한 에피토프-특이적 항체의 시간 소모적 스크리닝, 식별 및 선택, 및 다른 공지된 기술에 대한 필요성을 우회한다.
- [0038] 본 개시의 일 양태에서, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 제공하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 항체 생성 세포의 집단을 접촉시키는 단계를 포함하는, 관심 막관통 단백질에 대한 항체 또는 이의 항체를 발현하는 세포 집단을 수득하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 본 방법은, 막관통 단백질(즉, 항원)과 세포 표면 상의 항체 간의 결합, 및 세포 집단 내의 결합된 항체 생성 세포를 수집하는 것을 허용하기 위해, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 동물로부터 수득된 항체 생성 세포의 집단을 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0039] 다음의 설명에서는, 용어의 사용과 관련하여 특정 규칙을 따를 것이다. 대체적으로, 본원에서 사용되는 용어는 당업자에게 공지된 용어의 의미와 일관되게 해석되도록 의도된다. 본 개시를 실시함에 있어서, 당 기술분야의 기술 범위 내에 있는 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학에서의 많은 종래의 기술이 사용된다. 이들 기술은, 예를 들어, 다음의 문헌에서 보다 상세히 기술된다: Molecular Cloning: a Laboratory Manual 제4판, J.F. Sambrook 및 D.W. Russell 편집, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012; Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Melvyn Little 편집, Cambridge University Press 2009; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait 편집, 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney 편집, 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel 등 편집, 1987, 주기적 업데이트); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis 등 편집, 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas 등, 2001). 제조업체의 지침을 포함하여, 당업자에게 널리 알려지고 당업자에 의해 신뢰되는, 표준 프로토콜을 포함하는 이들 참조 및 다른 참조의 내용은 본 개시의 일부로서 참조되며 본원에 통합된다.
- [0040] 항체 생성 세포를 생성하기 위한 면역화
- [0041] 동물의 면역화는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, E. Harlow 및 D. Lane "Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor" (1988); Malik 및 Lillehoj, Antibody techniques: Academic Press, 1994, CA를 참조한다. 예를 들어, 면역원은 보조제와 함께 또는 이를 갖지 않고 정맥 내 또는 복강 내 주사를 포함하되 이에 한정되지 않는 다양한 경로를 통해 포유류와 같은 동물에게 직접 투여될 수 있으며, 여기에서 보조제는 면역 반응의 자극에 도움을 줄 수 있다. 당업계에 공지된 보조제는 Freund 보조제, MPL+TDM 보조제 시스템(Sigma), 또는 RIBI(무라밀 디펩티드)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. O'Hagan, Vaccine Adjuvant, Human Press, (2000) NJ를 참조한다. 용어 "면역원"은 항원 특이적 항체가 숙주의 면역 반응에 의해 생성되는 항원(예를 들어, 관심 막관통 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산)을 포함하는 조성물을 지칭한다. 용어 "항원"은 항체 또는 이의 단편과 같은 결합제에 의해 결합될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 지칭한다. 또한, 항원은 각 항원의 에피토프에 결합할 수 있는 항체를 생성하여 사용될 수 있다.
- [0042] 면역원은 숙주 동물에게 단백질, 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열, 펩티드 단편, 단백질-융합제

로서 투여되거나, 관심 면역원-암호화 유전자 또는 단백질 면역원 또는 이의 펩티드 단편을 함유하는 담체에 의해 투여될 수 있다. 면역화 과정은 숙주로부터 면역 반응을 유도할 수 있고, 생체 내에서 숙주의 세포 발현 기구를 사용하여 항원(예컨대, 관심 막관통 단백질)을 발현할 수 있다.

[0043] 다양한 면역화 기술이 당업계에 공지되어 있고, 본 방법을 수행하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 동물은 면역원, 예컨대 관심 막관통 단백질의 적어도 일부를 암호화하는 핵산, 관심 막관통 단백질의 적어도 일부, 이러한 핵산, 관심 막관통 단백질 또는 그의 일부를 포함하는 담체를 사용하는 주사에 의해 면역화될 수 있다.

[0044] 일부 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산으로 면역화된다. 소정의 구현예에서, 동물은 관심 전장 마우스 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 면역화된다. 특정 구현예에서, 동물은 관심 전장 인간 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 면역화된다. 다른 구현예에서, 동물은 관심 전장 비인간 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 면역화된다. 특정 구현예에서, 동물은 관심 전장 마우스 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 면역화된다.

[0045] 용어 "핵산" 또는 "핵산 서열" 또는 "뉴클레오타이드 서열"은 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이의 중합체를 지칭한다. 해당 용어는, 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며 참조 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는, 합성, 자연 발생 및 비-자연 발생인, 공지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 결합을 함유하는 핵산을 포함한다. 용어 "핵산 암호화" 또는 "암호화하는 핵산"은 펩티드, 단백질, 검출 가능한 요소 또는 표지, 및/또는 조절 요소와 같은 아미노산의 서열을 암호화하는 DNA 또는 RNA 서열을 지칭한다. "유전자"는 하나 이상의 폴리펩티드, 단백질 또는 효소의 전부 또는 일부를 포함하는 아미노산의 서열을 암호화하는 DNA 핵산 서열을 지칭하며, 이는, 예를 들어 유전자 또는 유전자 산물이 발현되는 조건에 영향을 미치는, 인트론, 및 조절 DNA 서열, 예컨대 프로모터 또는 인핸서 서열, 5'-미변역 영역, 또는 3'-미변역 영역을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0046] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 펩티드 결합을 통해 연결된 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 것으로 본원에서 사용된다. 해당 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 이에 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공적인 화학적 모방체일 뿐만 아니라, 자연 발생 아미노산 중합체 및 비-자연 발생 아미노산 중합체에 대한 것인 아미노산 중합체를 포함한다. 용어 "단백질"은 큰 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 본 개시에서, 단백질은 전장 단백질 또는 내인성 단백질일 수 있다. 용어 "펩티드"는 일반적으로, 예를 들어, 단백질 또는 폴리펩티드의 단편 또는 부분과 같은 짧은 폴리펩티드를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드 또는 단백질의 "단편" 또는 "부분"은 전장 폴리펩티드 또는 단백질 발현 산물보다 더 작은 폴리펩티드의 임의의 부분을 지칭한다. 단편 또는 부분은 전장 단백질로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거된 전장 단백질의 "절단" 또는 결실 유사체일 수 있다. 예를 들어, 본 개시에서, 펩티드는 "절단된 단백질" 또는 "단백질의 일 부분" 또는 "단백질의 단편"으로서 기술될 수 있다. 특정 경우, 관심 막관통 단백질의 "부분"은 관심 막관통 단백질의 적어도 전체 막관통 부분을 포함한다. "절단된 단백질"은 전장 단백질의 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는 관심 막관통 단백질의 일부일 수 있다. 합성 폴리펩티드, 펩티드 및 단백질은, 예를 들어, 자동화된 폴리펩티드 합성기를 사용하거나 당업계에 공지된 재조합 기술에 의해 합성될 수 있다.

[0047] 용어 "막관통 단백질" 및 "관심 대상 막관통 단백질"은 세포 또는 세포기관의 막에 부착되고 매립되는 이의 단백질 또는 폴리펩티드 부분을 의미하는 것으로서 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 따라서, 막관통 단백질은 막을 통과하는 단백질이며, 따라서 도메인에 걸쳐 있는 적어도 하나의 막으로 구성된다. 일부 경우에, 막관통 단백질은 또한 적어도 하나의 세포질 도메인 및/또는 적어도 하나의 세포외 도메인을 포함한다. 세포질 도메인(들)은 아미노-말단 도메인, 카르복시-말단 도메인, 및 세포내 루프 도메인 중 하나 이상일 수 있다. 세포외 도메인(들)은 아미노-말단 도메인, 카르복시-말단 도메인, 및 세포외 루프 도메인 중 하나 이상일 수 있다. 일부 경우, 관심 막관통 도메인의 세포외 도메인은 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 막관통 단백질은 원핵 생물, 진핵 생물 및 바이러스를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 유기체로부터 유래된 자연 발생 단백질일 수 있다. 특정 구현예에서, 막관통 단백질은 인간, 침팬지, 붉은털 원숭이, 토끼, 말, 양, 랫트, 마우스, 개, 닭 또는 염소 단백질일 수 있다. 일부 경우, 막관통 단백질은 인간, 마우스, 랫트 또는 영장류 막관통 단백질과 같은 포유류 단백질이다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 인간 단백질이다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 비-인간 단백질이다. 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 마우스 단백질이다.

[0048] 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 본원에 기술된 바와 같이 변형된다. 예시적인 변형된 관심 막관통 단백질은 이들의 천연 아미노산 서열에 대한 다음의 변경 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 아미노산 치환, 아미노산

결실, 아미노산 삽입. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어 전장 단백질의 n-말단 및/또는 c-말단 도메인과 같은 막관통 단백질의 일부를 결실시키도록, 즉 "절단"되도록 변형된다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 아미노-말단, 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 막관통 도메인 중 하나 이상, 하나 이상의 세포내 도메인, c-말단 또는 이들의 조합에서의 안정화 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 막관통 단백질은 키메라 막관통 단백질이다. 특정 구현예에서, 변형된 관심 막관통 단백질은, 예를 들어, His-태그, FLAG-태그, Avi-태그 또는 Bir-A-태그와 같은 검출 가능한 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 His-태그 및 FLAG-태그를 포함한다.

[0049] 일부 구현예에서, 막관통 단백질은 리간드-활성화 단백질이며, 이에 의해 막관통 단백질은 리간드의 존재 또는 부재 시에 형태를 변화시킨다(즉, 활성 및 비활성 상태를 가짐). 예를 들어, 리간드-활성화 막관통 단백질은 세포내 또는 세포외 도메인 상에서 리간드에 결합할 수 있음으로써, 결합은 세포에서 신호 전달을 조절하는 막관통 단백질의 하나 이상의 도메인에서의 구조적 변화를 유도한다. 일부 경우, 관심 막관통 단백질은 용질 운반체 수송체(SLC), 수용체, 키나아제 활성을 갖는 수용체, 클래스 I 성장 인자 수용체, G-단백질 결합 수용체(GPCR), 이온 채널 단백질 또는 테트라스파닌이다. 특정 경우, 관심 막관통 단백질은 GPCR 단백질, 테트라스파닌 단백질, 또는 이온 채널 단백질이다. 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 SLC 단백질이다.

[0050] 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 GPCR 단백질이다. 본 방법에 사용하기 위한 GPCR은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Foord 등, *Pharmacol. Rev.* (2005) 57:279-288을 참조하며, 이는 그 전체 내용이 참조로서 본원에 통합된다. 따라서, GPCR은 아데노신 수용체, β -아드레날린 수용체, 뉴로텐신 수용체, 무스카린산 수용체, 5-하이드록시트립타민 수용체, 아드레노 수용체, 아나필라독소 수용체, 안지오텐신 수용체, 아펠린 수용체, 봄베신 수용체, 브라디키닌 수용체, 칸나비노이드 수용체, 케모카인 수용체, 콜레시스토키닌 수용체, 도파민 수용체, 엔도텔린 수용체, 유리 지방산 수용체, 담즙산 수용체, 갈라닌 수용체, 모틸린 수용체, 그렐린 수용체, 당단백질 호르몬 수용체, GnRH 수용체, 히스타민 수용체, KiSS1-유도 펩티드 수용체, 류코트리엔 및 리폭신 수용체, 리소포스포지질 수용체, 멜라닌-농축 호르몬 수용체, 멜라노코르틴 수용체, 멜라토닌 수용체, 뉴로메딘 U 수용체, 뉴로펩티드 수용체, N-포르밀펩티드 패밀리 수용체, 니코틴산 수용체, 오피오이드 수용체, 옹신-유사 수용체, 오렉신 수용체, P2Y 수용체, 펩티드 P518 수용체, 혈소판 활성화 인자 수용체, 프로키네틴 수용체, 프로락틴 방출 펩티드 수용체, 프로스타노이드 수용체, 프로테아제-활성화 수용체, 릴렉신 수용체, 소마토스타틴 수용체, SPC/LPC 수용체, 타키키닌 수용체, 미량 아미노 수용체, 트리오트로핀 방출 호르몬 수용체, 우로텐신 수용체, 바소프레신/옥시토신 수용체, 오픈 GPCR, 칼시토닌 수용체, 코르티코트로핀 방출 인자 수용체, 글루카곤 수용체, 부갑상선 수용체, VIP/PACAP 수용체, LNB7TM 수용체, GABA 수용체, 메타보트로픽 글루타메이트 수용체, 및 칼슘 센서 수용체 중 어느 하나일 수 있다.

[0051] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어, CCR5, ADORA2A, ADRB3, C3AR1, ADRA2A, GLP1R, CCR4, CCR8 및 CXCR4와 같은 GPCR 단백질이다. 특정 구현예에서, 막관통 단백질은 다음의 GPCR 단백질로부터 선택되는 GPCR 단백질이다: CCR5, ADORA2A, ADRB3, C3AR1, ADRA2A, GLP1R, CCR4, CCR8 또는 CXCR4. 일 구현예에서, 막관통 단백질은 CCR5이다. 또 다른 구현예에서, 막관통 단백질은 ADORA2A이다. 다른 구현예에서, 막관통 단백질은 C3AR1이다. 또 다른 구현예에서, 막관통 단백질은 ADRA2A이다. 다른 구현예에서, 막관통 단백질은 GLP1R이다.

[0052] 일부 경우, 막관통 단백질은 테트라스파닌이다. 소정의 경우, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어, TSPAN 1 through TSPAN19, TSPAN21, TSPAN23, TSPAN 31, TSPAN 32, TSPAN 33, UPK1B, PRPH2, CD151, CD53, CD37, CD82, CD81, CD9, CD63, TCD63, CLND6 및 CLND9와 같은 테트라스파닌이다. 일부 구현예에서, 막관통 단백질은 CD63이다. 또 다른 구현예에서, 막관통 단백질은 CLND6이다. 다른 구현예에서, 막관통 단백질은 CLND9이다.

[0053] 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 이온 채널 단백질이다. 일 구현예에서, 이온 채널 단백질은 전압 관문 이온 채널 단백질이다. 특정 구현예에서, 전압 관문 이온 채널 단백질은 전압 의존성 칼슘 채널 감마-1 서브유닛(CACNG1) 또는 전압 관문 칼륨 채널 단백질, 예컨대, 예를 들어, KVS 또는 KIRS이다. 다른 구현예에서, 이온 채널 단백질은 칼슘 활성화 칼륨 채널 단백질(예를 들어, BKCa, MaxiK 또는 Sk), 예를 들어, Nav1 단백질(예를 들어, 전압 관문 채널 알파 서브유닛 9(NaV1.7)과 같은 전압 관문 나트륨 채널 단백질, 전압 관문 채널 알파 서브유닛 2(NaV1.2)), 칼슘 채널 단백질(예를 들어, CAV1.2) 또는 염화물 채널 단백질(예를 들어, CIC)이다. 일부 구현예에서, 이온 채널 단백질은 일시적 수용체 전위 채널(TRP) 단백질이다. 특정 구현예에서, TRP는 표준 막관통 도메인(TRPC), 바닐로이드 수용체(TRPV), 멜라스타틴(TRPM), 폴리스티닌(TRPP), 뮤콜리핀(TRPML) 또는 아난키린 막관통 단백질 1(TRPA1), 예컨대 표준 TRP(TRPC), 바닐로이드 수용체(TRPV), 멜라스타틴(TRPM), 폴리스티닌(TRPP), 뮤콜리핀(TRPML), 안키린 막관통 단백질 1(TRPA1)이다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은

BKCa, MaxiK, Sk, NAV 1.7, CACNG1, CAV, CIC, 또는 TRP이다.

[0054] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 전압 관문 나트륨 채널 단백질이다. 전압-관문 나트륨 채널의 계열은 막관통 분절 및 세포외 루프 영역에서 50%의 아미노산 동일성을 갖는 9개의 공지된 구성원을 가진다. 이들 채널의 단백질은 Nav1.1 내지 Nav1.9로 명명되고, 일반적으로 "Nav1 단백질"로 지칭되며, Nav1.1 내지 Nav1.9를 암호화하는 유전자 명칭은 *Scn1a* 내지 *Scn11a*로 지칭된다. 각각의 Nav1 단백질은 4개의 반복 도메인을 가지며, 이들 각각은 6개의 막-스패닝 분절을 함유한다. 제4 세그먼트는 고도로 보존되고 채널의 전압 센서로서 작용한다. 이러한 채널의 전압 감도는 제4 분절 내의 모든 제3 위치에 위치한 양성 아미노산에 기인한다(Nicholls 등, (2012) "From Neuron to Brain", 제5판, p86, 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 막관통 전압의 변화에 의해 자극될 경우, 이러한 분절은 세포막의 세포의 측면을 향해 이동하여, 채널이 이온에 투과성이 될 수 있게 한다. 이온은 2개의 영역으로 파쇄될 수 있는 기공을 통해 전도된다. 기공의 더 많은 외부(즉, 더 많은 세포외) 부분은 4개의 도메인 각각의 제5 및 제6 막관통 분절("P-루프"로도 알려짐) 사이의 영역에 의해 형성된다. 이 영역은 기공의 더 좁은 부분이며, 그의 이온 선택도를 담당한다. 기공의 내부 부분(즉, 더 많은 세포질)은 4개의 도메인의 조합된 제5 및 제6 막관통 분절에 의해 형성된다. 보다 구체적으로, 인간 Nav1.1 단백질은 수탁 번호 P35498.2에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 인간 Nav1.2 단백질은 수탁 번호 Q99250.3에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 인간 Nav1.3 단백질은 수탁 번호 Q9NY46.2에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 인간 Nav1.4 단백질은 수탁 번호 P35499.4에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 인간 Nav1.5 단백질은 수탁 번호 Q14524.2에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 인간 Nav1.6 단백질은 수탁번호 Q9UQD0.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 인간 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 Q15858.3에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 인간 Nav1.8 단백질은 수탁 번호 Q9Y5Y9.2에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 그리고 인간 Nav1.9 단백질은 수탁 번호 Q9UI33.2에 제시된 아미노산 서열에 해당한다.

[0055] 이러한 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 Nav1 단백질이다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 Nav1.7이다. Nav1.7은 후근 신경절, 교감신경, 슈반 세포 및 신경내분비 세포에서의 통각(통증) 뉴런에서 발현된다. Nav1.7은 막 흥분성의 중요한 성분이며 통증의 감각에 중요하다. 인간 *SCN9A* 유전자의 기능 획득 돌연변이는 통증 증후군과 관련이 있는 반면, 기능 상실 돌연변이는 통증에 대한 심각한 둔감성과 관련이 있다. Nav1.7은, 다음의 14개 동물 종으로부터의 Nav1.7 단백질의 예시적인 상동체 서열의 정렬로부터 명백한 바와 같이, 종에 걸쳐 고도로 보존된다. 인간 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 Q15858.3에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 침팬지 Nav1.7 상동체는 수탁번호 XP_016804947.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 붉은털 원숭이 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 XP_014965766.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 순다 플라잉 여우원숭이 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 XP_008588371.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 소 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 NP_001104257.2에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 양 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 XP_004004679.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 아라비아 낙타 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 XP_010980767.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 살인고래 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 XP_004267302.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 말 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 XP_001496473.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 개 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 XP_022270547.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 마우스 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 Q62205.2에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 랫트 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 Q08562.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 토끼 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 Q28644.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 그리고 닭 Nav1.7 단백질은 수탁 번호 NP_001280211.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다.

[0056] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 인간 Nav1.7이다. 또 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 마우스 Nav1.7이다.

[0057] 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 Nav1.2이다. Nav1.2는 중앙 뉴런 및 말초 뉴런에서 발현된다. 인간 *SCN2A* 유전자(Nav1.2를 암호화함)에서의 돌연변이는 여러 발작 장애 및 자폐 스펙트럼 장애와 관련이 있다. Nav1.2은, 14개 동물 종으로부터의 Nav1.2 단백질의 예시적인 서열의 정렬로부터 명백한 바와 같이, 종에 걸쳐 고도로 보존된다. 배열에 포함된 예시적인 서열에 대한 수탁 번호는 다음과 같다: 인간 Nav1.2 상동체는 수탁 번호 Q99250.3에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 침팬지 Nav1.2 상동체는 수탁 번호 XP_003820970.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 붉은털 원숭이 Nav1.2 단백질은 수탁 번호 XP_001100368.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 순다 플라잉 여우원숭이 Nav1.2 단백질은 수탁 번호 XP_008582720.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 소 Nav1.2 단백질은 수탁 번호 NP_001137581.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 양 Nav1.2 단백질은 수탁 번호 XP_014948870.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 아라비아 낙타 Nav1.2 단백질은 수탁 번호 XP_010980763.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 살인고래 Nav1.2 단백질은 수탁 번호 XP_004283641.1에

제시된 아미노산 서열에 해당한다; 말 NaV1.2 단백질은 수탁 번호 XP_014588001.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 마우스 NaV1.2 단백질은 수탁 번호 NP_001092768.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 랫트 NaV1.2 단백질은 수탁 번호 P04775.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 토끼 NaV1.2 단백질은 수탁 번호 XP_008256915.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 닭 NaV1.2 단백질은 수탁 번호 NP_001280210.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다; 그리고 녹색 바다거북 NaV1.2 단백질은 수탁 번호 XP_007056690.1에 제시된 아미노산 서열에 해당한다.

[0058] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 인간 NaV1.2 상동체이다. 또 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 마우스 NaV1.2 상동체이다.

[0059] 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 CACNG1 단백질이다. 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 인간 CACNG1 단백질이다. 또 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 비인간 CACNG1 단백질이다.

[0060] 특정 경우, 관심 막관통 단백질은 SLC 단백질이다. SLC 단백질은 특성화되어 있으며, 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 그 전체 내용이 참조로서 본원에 통합되는 Lin, L. 등, *Nat. Rev. Drug Disc.* (2015) 14:8 pp. 543-560에 기술된 바와 같이, 수백 개의 인간 막에 걸친 SLC 단백질이 확인되었으며, 이들은 수많은 SLC 단백질 계열로 구성된다. 따라서, 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은, 예를 들어 다음과 같은 SLC 단백질이다: SLC01A2, SLC01B1, SLC01B3, SLC01B7, SLC01C1, SLC02A1, SLC02B1, SLC03A1, SLC04A1, SLC04C1, SLC05A1, SLC06A1, SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A3, SLC2A4, SLC2A5, SLC2A6, SLC2A7, SLC2A8, SLC2A9, SLC2A10, SLC2A11, SLC2A12, SLC2A13, SLC2A14, SLC3A1, SLC3A2, SLC4A1, SLC4A2, SLC4A3, SLC4A4, SLC4A5, SLC4A7, SLC4A8, SLC4A9, SLC4A10, SLC4A11, SLC5A1, SLC5A2, SLC5A3, SLC5A4, SLC5A5, SLC5A6, SLC5A7, SLC5A8, SLC5A9, SLC5A10, SLC5A11, SLC5A12, SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10P, SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17, SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20, SLC6A21P, SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14, SLC7A15P, SLC8A1, SLC8A2, SLC8A3, SLC8B1, SLC9A1, SLC9A2, SLC9A3, SLC9A4, SLC9A5, SLC9A6, SLC9A7, SLC9A8, SLC9A9, SLC9B1, SLC9B2, SLC9C1, SLC9C2, SLC10A1, SLC10A2, SLC10A3, SLC10A4, SLC10A5, SLC10A6, SLC10A7, SLC11A1, SLC11A2, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A4, SLC12A5, SLC12A6, SLC12A7, SLC12A8, SLC12A9, SLC13A1, SLC13A2, SLC13A3, SLC13A4, SLC13A5, SLC14A1, SLC14A2, SLC15A1, SLC15A2, SLC15A3, SLC15A4, SLC15A5, SLC16A1, SLC16A2, SLC16A3, SLC16A4, SLC16A5, SLC16A6, SLC16A7, SLC16A8, SLC16A9, SLC16A10, SLC16A11, SLC16A12, SLC16A13, SLC16A14, SLC17A1, SLC17A2, SLC17A3, SLC17A4, SLC17A5, SLC17A6, SLC17A7, SLC17A8, SLC17A9, SLC18A1, SLC18A2, SLC18A3, SLC18B1, SLC19A1, SLC19A2, SLC19A3, SLC20A1, SLC20A2, SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC22A4, SLC22A5, SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8, SLC22A9, SLC22A10, SLC22A11, SLC22A12, SLC22A13, SLC22A14, SLC22A15, SLC22A16, SLC22A17, SLC22A18, SLC22A20P, SLC22A23, SLC22A24, SLC22A25, SLC22A31, SLC23A1, SLC23A2, SLC23A3, SLC23A4P, SLC24A1, SLC24A2, SLC24A3, SLC24A4, SLC24A5, SLC25A1, SLC25A2, SLC25A3, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, UCP1, UCP2, UCP3, SLC25A10, SLC25A11, SLC25A12, SLC25A13, SLC25A14, SLC25A15, SLC25A16, SLC25A17, SLC25A18, SLC25A19, SLC25A20, SLC25A21, SLC25A22, SLC25A23, SLC25A24, SLC25A25, SLC25A26, SLC25A27, SLC25A28, SLC25A29, SLC25A30, SLC25A31, SLC25A32, SLC25A33, SLC25A34, SLC25A35, SLC25A36, SLC25A37, SLC25A38, SLC25A39, SLC25A40, SLC25A41, SLC25A42, SLC25A43, SLC25A44, SLC25A45, SLC25A46, SLC25A47, SLC25A48, MTCH1, MTCH2, SLC25A51, SLC25A52, SLC25A53, SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A10, SLC26A11, SLC27A1, SLC27A2, SLC27A3, SLC27A4, SLC27A5, SLC27A6, SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1, SLC29A2, SLC29A3, SLC29A4, SLC30A1, SLC30A2, SLC30A3, SLC30A4, SLC30A5, SLC30A6, SLC30A7, SLC30A8, SLC30A9, SLC30A10, SLC31A1, SLC31A2, SLC32A1, SLC33A1, SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3, SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC35A4, SLC35A5, SLC35B1, SLC35B2, SLC35B3, SLC35B4, SLC35C1, SLC35C2, SLC35D1, SLC35D2, SLC35D3, SLC35E1, SLC35E2A, SLC35E2B, SLC35E3, SLC35E4, SLC35F1, SLC35F2, SLC35F3, SLC35F4, SLC35F5, SLC35F6, SLC35G1, SLC35G2, SLC35G3, SLC35G4, SLC35G5, SLC35G6, SLC36A1, SLC36A2, SLC36A3, SLC36A4, SLC37A1, SLC37A2, SLC37A3, SLC37A4, SLC38A1, SLC38A2, SLC38A3, SLC38A4, SLC38A5, SLC38A6, SLC38A7, SLC38A8, SLC38A9, SLC38A10, SLC38A11, SLC39A1, SLC39A2, SLC39A3, SLC39A4, SLC39A5, SLC39A6, SLC39A7, SLC39A8, SLC39A9, SLC39A10, SLC39A11, SLC39A12, SLC39A13, SLC39A14, SLC40A1, SLC41A1, SLC41A2, SLC41A3, RHAG, RHBG, RHCG, SLC43A1, SLC43A2, SLC43A3, SLC44A1, SLC44A2, SLC44A3, SLC44A4, SLC44A5, SLC45A1, SLC45A2, SLC45A3, SLC45A4, SLC46A1, SLC46A2, SLC46A3, SLC47A1, SLC47A2, SLC48A1, FLVCR1, FLVCR2, SLC49A3, SLC49A4, SLC50A1, SLC51A, SLC51B, SLC52A1, SLC52A2, SLC52A3, XPR1, MPC1, MPC2, MPC1L, LETM1, LETM2,

LETMD1, SFXN1, SFXN2, SFXN3, SFXN4, SFXN5, NIPA1, NIPA2, NIPAL1, NIPAL2, NIPAL3, NIPAL4, MAGT1, TUSC3, MFSD2A, MFSD2B, MFSD4A, MFSD4B, MFSD5, ANKH, SPNS1, SPNS2, SPNS3, TMEM165, NPC1, NPC1L1, SLC66A1, SLC66A2, SLC66A3, CTNS, 및 MPDU1.

- [0061] 용어 "내인성"은 숙주 유기체에서 자연적으로 발현되거나 세포, 조직 또는 유기체 내에서 유래되는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 또는 다른 조성물을 지칭한다. "외인성"은 세포, 조직 또는 유기체 외부에서 유래하거나 특정 숙주 유기체에 대해 외래인 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 다른 조성물을 지칭한다.
- [0062] 본 방법의 일부 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질의 일부를 암호화하는 핵산으로 면역화된다. 특정 구현예에서, 핵산은 관심 전장 막관통 단백질의 절단된 버전을 암호화한다. 일부 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하지 않는다.
- [0063] 일부 구현예에서, 동물은 핵산을 발현할 수 있는 담체에 포함된 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산으로 면역화된다. 면역화에 사용하기 위한 담체의 비제한적인 예는, 벡터, 예컨대 플라스미드, 발현 벡터뿐만 아니라 바이러스-유사 입자(VLP), 세포, 예컨대 조사된 세포, 엑소좀 및 리포좀을 포함한다. 용어 "벡터"는 코딩 정보를 숙주 세포에 전달하는 데 사용되는 임의의 분자(예를 들어, 핵산, 플라스미드 또는 바이러스)를 지칭하는 데 사용된다. 벡터의 예는, 숙주 세포에서 특정 핵산의 전사를 허용하는 일련의 특정 핵산 요소를 갖는, 재조합적으로 또는 합성적으로 생성된 핵산 작제물인 "발현 벡터"이다. 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스, 또는 핵산 단편의 일부일 수 있다. 특정 경우, 발현 벡터는 프로모터에 작동가능하게 연결된 전사될 핵산을 포함한다. 용어 "작동가능하게 연결된"은, 핵산 발현 조절 서열(예컨대, 예를 들어 프로모터, 또는 전사 인자 결합 부위의 어레이)과 제2 핵산 서열 간의 기능적 연결을 의미하며, 여기에서 발현 조절 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 유도한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터로 면역화된다. 특정 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 면역화된다. 일 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산을 포함하는 플라스미드로 면역화된다.
- [0065] 일부 경우, 면역원은, 시간 경과에 따르는 하나 이상의 주사, 예컨대 정맥내 주사 또는 복강내 주사에 의해 숙주 동물에게 투여된다. 특정 구현예에서, 면역원은 1, 2, 3, 4회 이상의 주사에 의해 숙주 포유동물에게 투여된다. 특정 구현예에서, 면역원은 3회의 별도 주사에 의해 투여된다.
- [0066] 동물에게 투여되는 면역원의 양은 공지된 방법을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0067] 일부 경우, 핵산 면역원은, 적어도 0.1 mg/mL, 적어도 0.5 mg/mL, 적어도 1.0 mg/mL, 적어도 1.5 mg/mL, 적어도 2.0 mg/mL, 적어도 3.0 mg/mL, 적어도 4.0 mg/mL, 적어도 5.0 mg/mL, 적어도 6.0 mg/mL, 적어도 7.0 mg/mL, 적어도 8.0 mg/mL, 적어도 9.0 mg/mL, 적어도 9.5 mg/mL, 적어도 10.0 mg/mL, 적어도 10.5 mg/mL 또는 이를 초과하는 농도로 동물에게 주입된다. 특정 구현예에서, 핵산 면역원은, 0.5 mg/mL 내지 20 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 15 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 12 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 11 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 15 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 5 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 4 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 3 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 2 mg/mL, 2.0 mg/mL 내지 12 mg/mL, 5.0 mg/mL 내지 12 mg/mL, 7.0 mg/mL 내지 12 mg/mL, 8.0 mg/mL 내지 12 mg/mL, 8.0 mg/mL 내지 11 mg/mL, 9.0 mg/mL 내지 11 mg/mL, 또는 9.5 mg/mL 내지 10.5 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다. 특정 구현예에서, 핵산 면역원은, 0.5 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.9 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3.0 mg/mL, 3.5 mg/mL, 4.0 mg/mL, 4.5 mg/mL, 5.0 mg/mL, 5.5 mg/mL, 6.0 mg/mL, 6.5 mg/mL, 7.0 mg/mL, 7.5 mg/mL, 8.0 mg/mL, 8.5 mg/mL, 9.0 mg/mL, 9.5 mg/mL, 10.0 mg/mL, 10.5 mg/mL, 11.0 mg/mL, 11.5 mg/mL, 12.0 mg/mL, 12.5 mg/mL, 13.0 mg/mL, 13.5 mg/mL, 14.0 mg/mL, 14.5 mg/mL, 15.0 mg/mL, 15.5 mg/mL, 또는 이를 초과하는 농도로 동물에게 주입된다. 특정 구현예에서, 핵산 면역원은 1.6 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다. 일 구현예에서, 핵산 면역원은 10 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다.
- [0068] 일부 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부로 면역화된다. 소정의 구현예에서, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부는 인간으로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 동물은 관심 비인간 막관통 단백질로 면역

화된다. 일부 구현예에서, 동물은 관심 전장 마우스 막관통 단백질을 암호화하는 핵산으로 면역화된다. 일부 구현예에서, 동물은 관심 전장 막관통 단백질로 면역화된다. 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 절단된다. 일부 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하지 않는다. 다른 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 일 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하지 않는다.

[0069] 특정 경우, 단백질 또는 펩티드 면역원은, 적어도 0.1 mg/mL, 적어도 0.2 mg/mL, 적어도 0.3 mg/mL, 적어도 0.4 mg/mL, 적어도 0.5 mg/mL, 적어도 0.6 mg/mL, 적어도 0.7 mg/mL, 적어도 0.8 mg/mL, 적어도 0.9 mg/mL, 적어도 1.0 mg/mL, 적어도 2.0 mg/mL, 적어도 3.0 mg/mL, 적어도 4.0 mg/mL, 적어도 5.0 mg/mL, 적어도 10.0 mg/mL 또는 이를 초과하는 농도로 동물에게 투여된다. 특정 구현예에서, 단백질 또는 펩티드 면역원은, 0.1 mg/mL 내지 20 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 15 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 8.0 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 7.0 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 6.0 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 3.0 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 2.0 mg/mL, 0.1 mg/mL 내지 1.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 10.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 7.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 6.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 3 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 2 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 1 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 10.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 7.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 3.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 2.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 1.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 3.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 2.0 mg/mL, 2.0 mg/mL 내지 10.0 mg/mL, 5.0 mg/mL 내지 10.0 mg/mL을 포함하는 농도로 동물에게 주입된다. 특정 경우, 단백질 또는 펩티드 면역원은, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.35 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.45 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.55 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.65 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.85 mg/mL, 0.9 mg/mL, 0.95 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3.0 mg/mL, 3.5 mg/mL, 4.0 mg/mL, 4.5 mg/mL, 5.0 mg/mL, 5.5 mg/mL, 6.0 mg/mL, 6.5 mg/mL, 7.0 mg/mL, 7.5 mg/mL, 8.0 mg/mL, 8.5 mg/mL, 9.0 mg/mL, 9.5 mg/mL, 10.0 mg/mL, 12.0 mg/mL, 15.0 mg/mL, 20.0 mg/mL 또는 이를 초과하는 농도로 동물에게 투여된다. 특정 구현예에서, 단백질 또는 펩티드 면역원은 0.9 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다. 일 구현예에서, 단백질 또는 펩티드 면역원은 0.5 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다. 또 다른 구현예에서, 단백질 또는 펩티드 면역원은 1.9 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다. 특정 구현예에서, 단백질 또는 펩티드 면역원은 2.5 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다.

[0070] 특정 구현예에서, 동물은 관심 키메라 막관통 단백질 또는 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열로 면역화된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "키메라"는 단백질을 암호화하는 단백질 또는 핵산을 지칭하며, 이의 일부는 상이한 종으로부터 유래된다. 예를 들어, 키메라 단백질은 하나 이상의 인간 도메인 및 적어도 하나의 비인간 도메인을 가질 수 있거나, 그 반대일 수 있다. 키메라 단백질을 암호화하는 핵산은, 예를 들어, 단백질의 적어도 하나의 도메인을 암호화하는 비인간 유전자에 작동가능하게 연결된 단백질의 하나 이상의 도메인을 암호화하는 인간 유전자를 가질 수 있다.

[0071] 비제한적인 일례에서, 키메라 핵산은 막관통 단백질의 상이한 부분을 암호화하는 마우스 유전자의 일부에 작동가능하게 연결된 막관통 단백질의 제1 부분을 암호화하는 인간 유전자의 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 동물은 인간 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 암호화하는 인간 유전자 서열 및 막관통 단백질의 마우스 상동체로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인을 암호화하는 마우스 유전자 서열을 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화된다. 또 다른 구현예에서, 동물은 인간 막관통 단백질로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인을 암호화하는 DNA 및 막관통 단백질의 마우스 상동체의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 암호화하는 DNA를 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화된다. 일 구현예에서, 동물은 인간 막관통 단백질로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 암호화하는 유전자 서열 및 막관통 단백질의 마우스 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 암호화하는 서열을 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화된다. 특정 구현예에서, 동물은 인간 막관통 단백질로부터의 아미노-말단 도메인을 암호화하는 유전자 서열 및 막관통 단백질의 마우스 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 암호화하는 유전자 서열을 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화된다. 특정 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 또한, 예를 들어, His-태그, FLAG-태그, Avi-태그 또는 Bir-A-태그와 같은 검출 가능한 요소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하도록 변형된다.

- [0072] 일부 구현예에서, 동물은 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 일부에 작동가능하게 연결된 관심 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질로 번역화된다. 일부 구현예에서, 동물은 관심 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 막관통 단백질의 마우스 상동체로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인을 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질로 번역화된다. 일부 구현예에서, 동물은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 막관통 단백질의 마우스 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질로 번역화된다. 일부 구현예에서, 동물은 인간 막관통 단백질로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인 및 막관통 단백질의 마우스 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질로 번역화된다. 일부 구현예에서, 동물은 인간 막관통 단백질로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인 및 막관통 단백질의 마우스 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함하는 관심 키메라 막관통 단백질로 번역화된다. 특정 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 또한, 예를 들어, His-태그, FLAG-태그, Avi-태그 또는 Bir-A-태그와 같은 검출 가능한 요소를 포함한다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 His-태그 및 FLAG-태그를 포함한다.
- [0073] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질 또는 핵산 번역원은 변형된다. 일부 구현예에서, 번역원은 변형된 관심 막관통 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA로서, 하나 이상의 안정화 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 막관통 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산은 표지, 마커 또는 특징부와 같은 하나 이상의 검출 가능한 요소를 포함한다. 일 구현예에서, 변형된 번역원은 검출 가능한 표지를 포함하는 관심 막관통 단백질이다. 특정 구현예에서, 검출 가능한 표지는 FLAG-태그, Avi-태그, 히스티딘 태그(His-태그), BirA-태그 또는 이들의 조합이다. 특정 구현예에서, 검출 가능한 표지 또는 표지들은 막관통 단백질 번역원의 아미노-말단 또는 카르복시-말단에 위치한다. 일 구현예에서, 막관통 단백질 번역원은 카르복시-말단에 부착된 FLAG-태그 및 His-태그를 갖는다.
- [0074] 본 방법에 사용하기 위한 단백질은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부는 적절한 핵산에 의해 암호화되고 세포에서 발현될 수 있다. 관심 막관통 단백질을 암호화하는 적절한 핵산 분자는 당업계에 공지된 바와 같이, 표준 클로닝 기술, 부위 지향 돌연변이 유발 및 PCR을 사용하여 제조될 수 있다. 적절한 발현 시스템은, 예를 들어, 박테리아 또는 효모에서의 구성적 또는 유도성 발현 시스템, 바큘로바이러스, 썬리키 삼립 바이러스 및 렌티바이러스와 같은 바이러스 발현 시스템, 또는 곤충 또는 포유류 세포에서의 일시적 형질감염을 포함한다. 적절한 숙주 세포는, 대장균, *락토코쿠스 락티스*, *사카로미세스 세레비시아에*, *슈조사카로미세스 폼베*, *피키아 파스토리스*, *스포도프테라 프루기페르다* 및 *트리콜루시아니* 세포를 포함한다. 적절한 포유류 숙주 세포는 HEK 293, COS, CHO, NSO, DT40을 포함한다. 적절한 곤충 숙주 세포는 Sf9 및 S2 세포를 포함한다.
- [0075] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 단백질 번역원은 세포에서 발현되고, 번역원 단백질은 세포에 의해 생성되고, 번역화를 위한 정제된 단백질 번역원을 제공하도록 정제된다.
- [0076] 특정 구현예에서, 동물은 예를 들어, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체, VLP, 세포, 엑소좀 및 리포솜과 같은 담체에 포함된 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부로 번역화될 수 있다.
- [0077] "지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체"는 적어도 하나의 막 스캐폴드 단백질(MSP)과의 복합체, 즉 이에 의해 결합된 지질 이중층을 포함하는 조성물을 의미한다. 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 기술된 바 있다. 예를 들어, Inagaki, S. 등, Biophysical Characterization of Membrane Proteins in Nanodiscs. Methods (2013) 59(3):287-300을 참조하며, 그 전체 내용은 본원에 참조로서 명시적으로 포함된다. 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는, 예를 들어, 2개의 막 스캐폴드 단백질에 의해 둘러싸이고 안정화된 디스코이드 인지질 이중층으로서 형성될 수 있다. 임의의 이론에 구속되지 않고, 복합체 형성 및 기능은 MSP 대 지질 비율 및 MSP의 길이에 의해 조절된다. 예를 들어, 지질 대 MSP 비율은 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 동질 또는 이종 집단을 생성하도록 조정될 수 있다. 또한, 천연-유사 환경을 제공하기 위해, MSP 단백질은 막관통 단백질 또는 관심 단백질 및 지질 이중층 형성 모두를 위한 공간을 제공하는 복합체를 형성하기에 충분히 커야 한다.
- [0078] 본원에서 사용되는 용어 "막 스캐폴드 단백질" 또는 "MSP"는, 예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참조로서 통합되는 Schuler, M. 등의 *Methods Mol Biol.* 2013 ; 974: 415-433에 기술된 바와 같은 양친수성 아포지질단백질 A-I(Apo-AI)로부터 유래된 양친수성 나선형 단백질의 부류를 지칭한다. 막 스캐폴드 단백질은 지질 소수성 테일과 접촉하는 나선의 내부 측면에 소수성 잔기를 포함하는 양친매성 나선 및 바깥쪽으로 배향된(지질로부터 멀어지는) 친수성 잔기를 포함한다. 막 스캐폴드 단백질은, 다양한 크기의 지질 이중층 MSP 복합체의 형성을 가능하게 하는, MSP 아미노산 서열의 일부에서의 하나 이상의 나선 도메인의 결실 또는 삽입을 통한 상이한 크기의 단

백질일 수 있다. MSP의 구조 및 기능은 지질 결합 단백질의 사포신 계열과 구별되는 것으로 이해된다.

[0079] 일부 경우, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 다음의 예시적인 MSP로부터 선택되는 적어도 하나의 막 스캐폴드 단백질을 포함한다: MSP1, MSP2, MSP1E1, MSP1E2, MSP1E3, MSP1E3D1, MSP1D1, MSP1D2, MSP2N1, MSP2N3 및 MSP2N2.

[0080] 일부 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 구조 FX-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 12]을 포함하는 MSP1이고, 여기에서 FX는 아미노산 서열 MGHHHHHHIEGR [서열번호 1]을 갖는 막 스캐폴드 단백질의 N-말단 도메인이고, H1은 아미노산 서열 LKLLDNWDSVTSTFSKLREQLG [서열번호 2]를 갖는 헬릭스(Helix) 1이고, H2는 아미노산 서열 PVTQEFWDNLEKETEGLRQEMS [서열번호 3]을 갖는 헬릭스 2이고, H3은 아미노산 서열 KDLEEVKAKVQ [서열번호 4]를 갖는 헬릭스 3이고, H4는 아미노산 서열 PYLDDFQKKWQEEMELYRQKVE [서열번호 5]를 갖는 헬릭스 4이고, H5는 아미노산 서열 PLRAELQEGARQKLHELQEKLS [서열번호 6]을 갖는 헬릭스 5이고, H6은 아미노산 서열 PLGEEMRDRARAHVDALRTHLA [서열번호 7]을 갖는 헬릭스 6이고, H7은 아미노산 서열 PYSDELQRQLAARLEALKENG [서열번호 8]을 갖는 헬릭스 7이고, H8은 아미노산 서열 ARLAEYHAKATEHLSTLSEKAK [서열번호 9]을 갖는 헬릭스 8이고, H9는 아미노산 서열 PALEDLRQGLL [서열번호 10]을 갖는 헬릭스 9이고, H10은 아미노산 서열 PVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ [서열번호 11]을 갖는 헬릭스 10이다. 일부 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 구조 FX-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 13]를 포함하는 MSP2이다. 일부 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 MSP1 아미노산 서열 내에 삽입된 22개 아미노산 양친매성 나선체 중 하나 이상을 포함하는 연장된 막 스캐폴드 단백질이다. 이러한 일 구현예에서, 확장된 막 스캐폴드 단백질은 구조 FX-H1-H2-H3-H4-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 14]를 포함하는 MSP1E1이며, 이에 의해 MSP1의 아미노산 서열은 중복된 "H4"를 가짐으로써 연장된다. 또 다른 구현예에서, 확장된 막 스캐폴드 단백질은 구조 FX-H1-H2-H3-H4-H3-H4-H5-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 15]를 포함하는 MSP1E2이며, 이에 의해 MSP1의 아미노산 서열은 중복된 "H4-H5"를 가짐으로써 연장된다. 또 다른 구현예에서, 확장된 막 스캐폴드 단백질은 구조 FX-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 16]을 포함하는 MSP1E3이며, 이에 의해 MSP1의 아미노산 서열은 중복된 "H4-H5-H6"를 가짐으로써 연장된다.

[0081] 특정 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 구조 TEV- H1Δ(1-11)- H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열 번호 17]을 포함하는 MSP1D1이고, 여기에서 TEV는 아미노산 서열 MGHHHHHHHH DYDIPTTENLYFQG [서열 번호 18]를 갖는 변형된 N-말단 도메인이고, H1Δ(1-11)은 아미노산 서열 STFSKLREQLG [서열번호 19]를 갖는 절단된 H1 나선형 도메인이다. 일부 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 구조 TEV-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 20]을 포함하는 MSP1D2이다. 다른 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 구조 TEV-H1Δ(1-11)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT- H1Δ(1-11)- H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 21]를 포함하는 MSP2N1이다. 다른 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 구조 TEV- H1Δ(1-11)- H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT- H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열번호 22]를 포함하는 MSP2N2이다. 또 다른 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질은 구조 TEV-H1Δ(1-11)-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10-GT- H1Δ(1-17)- H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10 [서열 번호 24]을 갖는 MSP2N3이며, 이에 의해, H1Δ(1-17)은 아미노산 서열 REQLG [서열번호 23]을 갖는 절단된 H1 나선형 도메인이 된다.

[0082] 특정 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 2개의 MSP를 포함한다. 일 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 벨트형 방식으로 2개의 MSP(예를 들어, 2개의 MSP 분자)로 둘러싸인 디스크이드 인지질 이중층이다. 일 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 MSP1E3D1의 2개의 분자로 둘러싸인 디스크이드 인지질 이중층이다.

[0083] 일부 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 소정의 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 적어도 2개의 표지된 막 스캐폴드 단백질 및 복수의 지질을 함유한다. 특정 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 2개의 표지된 막 스캐폴드 단백질 및 지질 이중층을 함유한다. 일부 구현예에서, 표지된 막 스캐폴드 단백질은 동일하거나 상이하다. 검출 가능한 라벨은 당업계에서 공지된 임의의 검출 가능한 라벨일 수 있다. 예를 들어, 검출 가능한 표지는 형광 분자, His-태그 및 FLAG-태그를 포함한다. 예시적인 구현예에서, 막 스캐폴드 단백질(들) 중 하나 이상은 비오틴화화를 위한 Bir-A 태그 또는 Avi-태그와 같은 검출 가능한 마커로 표지된다. 특정 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 모든 MSP는 비오틴화된다. 비오틴화화는, 예를 들어, 막 스캐폴드 단백질(들)을 화학적으로 비오틴화하거나, Avi-태그 또는 Bir-A 태그를 MSP 핵산 코딩 서열에 유전적으로 도입하고 공지된 기술을 사용하여 변형된 단백질을 생산함으로써 수행될 수 있다.

[0084] 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 지질 이중층 부분은 재구성된다. 지질은, 예를 들어, 스핑고리피드

및/또는 인지질과 같은 지질의 이중층을 형성할 수 있다. 복합체의 지질 조성물은, 예를 들어, 복합체에 포함될 특정 막관통 단백질 또는 관심 단백질의 천연 세포 유형에 기초하여 달라질 수 있다. 예를 들어, 대장균 막은 70 내지 80% 포스파티딜 에탄올아민, 15 내지 20% 포스파티딜 글리세롤 및 5% 카디오리핀을 포함하는 한편, 랫트 간세포 막은 14 내지 20% 포스파티딜 에탄올아민, 32 내지 47% 포스파티딜 콜린, 8% 포스파티딜 이노시톨, 4 내지 8% 포스파티딜 세린, 및 13 내지 14% 스프링고메이린으로 구성된다. Inagaki, S. 등, *Methods* (2013) 59(3):287-300을 참조한다. 따라서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 지질 조성물은 단일 유형의 지질 또는 단일 유형 초과 지질을 포함할 수 있다. 소정의 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 형성하는 지질은 합성적 또는 재조합적으로 생성된 지질이다.

[0085] 일부 구현예에서, 지질 이중층은 다음의 지질 중 하나 이상으로 구성된다: 스프링고미엘린, 포스파티딜콜린, 및 이의 유도체. 특정 구현예에서, 지질 이중층은 다음으로 구성된다: 1-디올레오일 포스파티딜콜린(DOPC), 1-팔미토일 2-올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜콜린(SOPC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 및 포스파티딜세린(PS), 팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포-(1'-rac-글리세롤)(POPG), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린(POPS), 및 포스파티딜이노시톨(PI) 또는 이들의 조합. 특정 구현예에서, 지질 이중층은 복수의 POPC 인지질을 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 다음의 지질 중 하나 이상을 복수로 포함하는 막 스캐폴드 단백질(들) 주위에 디스크 형태의 인지질 이중층을 형성하는 지질을 포함한다: POPC, POPG 및 POPS. 특정 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 2개의 스캐폴드 단백질 주위에 디스크 형태의 인지질 이중층을 형성하는 복수의 POPC 지질을 포함한다. 이러한 일 구현예에서, MSP 대 지질의 비율은 1:100 내지 1:150, 1:110 내지 1:140, 1:120 내지 1:140, 1:120 및 1:140, 1:120 내지 1:130, 및 1:125 내지 1:135를 포함한다. 다른 구현예에서, MSP 대 지질의 비율은 1:100, 1:110, 1:111, 1:112, 1:113, 1:114, 1:115, 1:116, 1:117, 1:118, 1:119, 1:120, 1:121, 1:122, 1:123, 1:124, 1:125, 1:126, 1:127, 1:128, 1:129, 1:130, 1:131, 1:132, 1:133, 1:134, 1:135, 1:136, 1:137, 1:138, 1:139, 1:140, 1:141, 1:142, 1:143, 1:144, 1:145, 1:146, 1:147, 1:148, 1:149 또는 1:150을 포함한다.

[0087] 소정의 경우, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 또한 적어도 하나의 항원을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부이다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질, 절단된 관심 키메라 막관통 단백질, 관심 키메라 막관통 단백질이다. 일부 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 적어도 전체 막관통 부분을 포함한다. 다른 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 일 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 절단된 단백질은 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, 항원은 관심 키메라 막관통 단백질, 또는 본원에 기술된 바와 같은 이의 일부이다.

[0088] 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부와 같은 항원을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 항원의 단일 분자(예를 들어, 지질 이중층 MSP 복합체 또는 나노디스크당 막관통 단백질 또는 이의 일부의 하나의 카피)를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 항원의 다중 분자(예를 들어, 지질 이중층 MSP 복합체 또는 나노디스크당 막관통 단백질 또는 이의 일부의 다중 카피)를 포함한다.

[0089] 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 것을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 형성은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참조로서 통합되는, Bayburt TH 등, *Arch Biochem Biophys.*(2006) 450:215-222를 참조한다. 대체적으로, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 형성은, 지질, MSP, 및 해당하는 경우, 막관통 단백질을 혼합함으로써 복합체를 자체 조립하는 것을 포함한다. 일반적으로, 막관통 단백질은 하나 이상의 세제를 사용하여 정제된다. 일부 구현예에서, 정제된 막관통 단백질은 지질 및 MSP와 혼합되어 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, 정제된 막관통 단백질은 (예를 들어, 세제 가용화 분획으로서의) 하나 이상의 세제의 존재 시에 제공되고, 지질 및 MSP와 혼합되고, 그런 다음 하나 이상의 세제가 제거되어 복합체 구조의 형성

을 유도한다.

- [0090] 일부 경우, 정제 단계는 관심 단백질을 포함하는 복합체를 관심 단백질을 포함하지 않는 것(즉, 빈 복합체)으로부터 분리하는 데 사용될 수 있다. 정제는 복합체에 포함된 관심 막관통 단백질 상에 하나 이상의 검출 가능한 표지, 예컨대 친화도 태그를 혼입시키고, 하나 이상의 표지를 선택함으로써 달성될 수 있다. 친화성 태그로서 사용하기 위한 예시적인 검출 가능한 표지는, 고정 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)에 의해 인식될 수 있는 His-태그, FLAG M1 항-FLAG 면역친화성 크로마토그래피에 대한 FLAG-태그, 및 1D4 수지를 사용하는 1D4 태그를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 크기 배제 크로마토그래피는 또한, 예를 들어, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 존재를 식별하고/하거나 확인하기 위한 SDS 페이지 및 웨스턴 블롯팅 분석을 수행함으로써 사용될 수 있다. 관심 막관통 단백질 및 MSP 둘 모두를 검출할 수 있는 표지를 포함하는 구현예에서, MSP 상의 적어도 하나의 표지 및 관심 막관통 단백질 상의 하나의 표지는 상이할 수 있다.
- [0091] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 함유하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 우선적으로 관심 막관통 단백질을 세제(예컨대, 예를 들어, N-도데실-b-D-말토시드(DDM))에 용해시킨 다음, 콜레이트-용해화된 인지질 및 막 스캐폴드 단백질과 혼합하고, 이에 이어서 세제를 제거함으로써 형성될 수 있다. 일부 예에서, 세제는 정제된 관심 막관통 단백질을 통합하는 디스크 형태 지질 이중막 막 스캐폴드 단백질 복합체의 조립을 가능하게 하는 바이오피드를 사용하여 혼합물로부터 추출될 수 있다. 그런 다음, 관심 막관통 단백질을 포함하는 디스크 형태 지질 이중막 스캐폴드 단백질 복합체는 친화도 정제 비드를 사용하여 막관통 단백질을 포함하지 않는 디스크 형태 지질 이중막 막 스캐폴드 단백질 복합체로부터 분리될 수 있다. 이는, 예를 들어, 관심 막관통 단백질이 그의 c-말단 또는 n-말단에 상응하는 "태그" 서열을 함유하는 경우, 항-"태그" 항체(예를 들어, FLAG-태그, His-태그, HA-태그 등, 이러한 태그는 당업계에 공지되어 있음)를 갖는 비드이다. 크기 배제 크로마토그래피에 의해 추가의 정제가 이루어질 수 있다.
- [0092] 특정 경우, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 내장된 면역원은, 적어도 0.1 mg/mL, 적어도 0.2 mg/mL, 적어도 0.3 mg/mL, 적어도 0.4 mg/mL, 적어도 0.5 mg/mL, 적어도 0.6 mg/mL, 적어도 0.7 mg/mL, 적어도 0.8 mg/mL, 적어도 0.9 mg/mL, 적어도 1.0 mg/mL, 적어도 2.0 mg/mL, 적어도 3.0 mg/mL, 적어도 4.0 mg/mL, 적어도 5.0 mg/mL, 적어도 10.0 mg/mL 또는 이를 초과하는 농도로 동물에게 투여된다. 특정 구현예에서, 면역원은, 0.2 mg/mL 내지 20 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 15 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 10 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 7.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 10 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 4.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 3.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 2.0 mg/mL, 또는 2.0 mg/mL 내지 5.0 mg/mL를 포함하는 농도로 동물에게 주입된다. 특정 구현예에서, 면역원은, 0.5 mg/mL, 0.55 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.65 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.85 mg/mL, 0.9 mg/mL, 0.95 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3.0 mg/mL, 3.5 mg/mL, 4.0 mg/mL, 4.5 mg/mL, 5.0 mg/mL, 5.5 mg/mL, 6.0 mg/mL, 6.5 mg/mL, 7.0 mg/mL, 7.5 mg/mL, 8.0 mg/mL, 8.5 mg/mL, 9.0 mg/mL, 9.5 mg/mL, 10.0 mg/mL, 12.0 mg/mL, 15.0 mg/mL, 20.0 mg/mL, 또는 이를 초과하는 농도로 동물에게 주입된다. 일 구현예에서, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 내장된 관심 막관통 단백질 면역원은 0.5 mg/mL의 농도로 동물에게 주입된다.
- [0093] 특정 구현예에서, 동물은 방사선 조사된 세포와 같은 면역원을 발현하는 세포로 면역화될 수 있다. 특정 일 구현예에서, 동물은 본원에 기술된 바와 같은 관심 막관통 단백질, 이의 변형된 버전, 또는 이의 일부를 발현하는 세포로 면역화될 수 있다.
- [0094] 일부 구현예에서, 동물은, 해당 동물에서 관심 있는 막관통 단백질을 발현하는 VLP 또는 엑소솜으로 면역화될 수 있다. 특정 구현예에서, 동물은, 관심 막관통 단백질, 이의 변형된 버전, 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산을 포함하는 VLP로 면역화될 수 있다.
- [0095] 일부 경우, 동물은, 예를 들어, 단백질 또는 펩티드, 변형된 단백질 또는 펩티드, 핵산, 변형된 핵산, VLP 및 본원에 개시된 바와 같은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 같은 둘 이상의 면역원으로 면역화된다.
- [0096] 면역화될 동물은 임의의 동물일 수 있다. 소정의 구현예에서, 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 포유동물은 마우스, 랫트, 염소, 인간, 햄스터, 돼지, 원숭이 또는 기니피그이다. 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이 아니다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스, 랫트 또는 염소이다. 특정 구현예에서, 포유동물은 마우스이다. 또 다른 구현예에서, 포유동물은 예를 들어, 면역원에 노출된 인간과 같은 인간이다.

- [0097] 일부 구현예에서, 번역화된 동물은 유전적으로 조작된다. 유전자 변형은 단백질을 암호화하는 유전자를 결실시키거나 차단하는 데 사용되는 것과 같은 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 동물이 내인성 유전자좌로부터 관심 막관통 단백질(즉, 항원)을 발현하지 않도록(예를 들어, 녹아웃되도록), 해당 동물은 유전적으로 조작될 수 있다. 예로서, 유전적으로 조작된 비인간 포유동물은, 예를 들어, 내인성 마우스 막관통 단백질의 유전자좌에 대한 유전적 변형 또는 내인성 유전자의 불활성화(예를 들어, 전체적 또는 부분적인 결실)의 결과로서, 관심 내인성 마우스 막관통 단백질을 발현할 수 없는 마우스이다.
- [0098] 특정 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은 (예를 들어, 교배 또는 다중 유전자 표적화 전략을 통해) 그의 게놈에 다음을 포함되는, 예를 들어 마우스, 염소 또는 쥐와 같은 비인간 포유동물이다: (i) 하나 이상의 인간 가변 중쇄 유전자 분절을 포함하는 인간화 면역글로불린 중쇄 유전자좌; (ii) 하나 이상의 인간 가변 경쇄 유전자 분절을 포함하는 인간화 면역글로불린 경쇄 유전자좌(e.g., k 및/또는 l). 본원에서 사용된 용어 "인간화"는 인간 서열을 포함하도록 변형된 것을 포함한다. 예를 들어, 인간화 유전자좌는 인간 서열(예를 들어, 유전자 분절 또는 유전자)을 포함하도록 변형된 유전자좌(예를 들어, 내인성 유전자좌)이다.
- [0099] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은, 예를 들어, 마우스, 염소 또는 랫트와 같은 비인간 포유동물로서, 이들의 게놈에 하나 이상의 인간 가변 중쇄 유전자 분절을 포함하는 인간화 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함한다.
- [0100] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은, 예를 들어, 마우스, 염소 또는 랫트와 같은 비인간 포유동물로서, 이들의 게놈에 하나 이상의 인간 가변 경쇄 유전자 분절을 포함하는 인간화 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함한다.
- [0101] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은, 예를 들어, 마우스, 염소 또는 랫트와 같은 비인간 포유동물로서, 이들의 게놈에 하나 이상의 인간 가변 경쇄 유전자 분절을 포함하는 인간화 면역글로불린 경쇄 유전자좌(예를 들어, k 및/또는 l)를 포함한다. 일 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은 하나 이상의 인간 카파 가변 (V_k) 유전자 분절을 포함하는 인간화 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은 하나 이상의 인간 람다 가변 (V_l) 유전자 분절을 포함하는 인간화 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함한다.
- [0102] 일부 구현예에서, 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역(VH)을 암호화하는 핵산 서열 및/또는 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역(VL)을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 유전적으로 조작된 동물은 또한 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 유전자가 결여될 수 있다.
- [0103] 다른 경우, 동물은 관심 막관통 단백질의 내인성 상동체를 발현하는 "야생형" 동물이다.
- [0104] 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는, 특히, 중쇄를 포함하는 항체를 생성하며, 각각의 중쇄는 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스) 중쇄 불변 도메인에 작동 가능하게 연결된 인간 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는, 특히, 면역글로불린을 포함하는 항체를 생성하며, 각각의 면역글로불린은 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스) 중쇄 불변 도메인에 작동 가능하게 연결된 인간 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는, 특히, κ 경쇄를 포함하는 항체를 생성하며, 각각의 κ 경쇄는 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스) κ 경쇄 불변 도메인에 작동 가능하게 연결된 인간 κ 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는, 특히, λ 경쇄를 포함하는 항체를 생성하며, 각각의 λ 경쇄는 인간 λ 경쇄 불변 도메인에 작동 가능하게 연결된 인간 λ 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는, 특히, 경쇄를 포함하는 항체를 생성하며, 각각의 경쇄는 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스) κ 경쇄 불변 도메인에 작동 가능하게 연결된 인간 λ 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는, 특히, λ 경쇄를 포함하는 항체를 생성하며, 각각의 λ 경쇄는 설치류(예를 들어, 랫트 또는 마우스) λ 경쇄 불변 도메인에 작동 가능하게 연결된 인간 λ 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0105] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 비인간 포유류(예를 들어, 랫트 또는 마우스)는 예를 들어, 미국 특허 제 8,502,018호, 제8,642,835호, 제8,697,940호, 제8,791,323호, 제9,226,484호, 및 W02019/113065호에 기술된 바와 같으며, 이들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 교배("breeding" 또는 "cross" 또는 "cross-breeding")는 당업계에서 쉽게 이용할 수 있는 프로토콜에 따라 수행될 수 있으며; 예를 들어, JoVE Science

Education Database. *Lab Animal Research, Fundamentals of Breeding and Weaning*, JoVE, Cambridge, MA, (2018) (영상자료); *Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice*, A Jackson Laboratory Resource Manual, ©2007 The Jackson Laboratory를 참조하고; 이들 모두는 참조로서 본원에 통합된다. 대안적으로, 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌는 인간화 IgH 유전자좌 및/또는 인간화 Igκ 유전자좌를 포함하는 ES 세포 내로 조작될 수 있고, 생성된 ES 세포는 유전적으로 조작된 동물을 생성하는 데 사용되거나, 인간화 Igλ 경쇄 유전자좌를 포함하는 유전적으로 조작된 동물은 인간화 IgH 유전자좌 및/또는 인간화 Igκ 유전자좌를 포함하는 또 다른 유전적으로 조작된 동물과 교배될 수 있다. 인간화 IgH 유전자좌 및/또는 인간화 Igκ 유전자좌를 포함하는 다양한 유전적으로 조작된 동물, 예를 들어, VELOCIMMUNE® 계통(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 제8,502,018호 및/또는 제8,642,835호 참조), XENOMOUSE™ 계통(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 Mendez, M.J. 외, 1997, Nat. Genetics 15(2):146-56 및 Jakobovits, A. 외, 1995, Ann. NY Acad. Sci. 764:525-35)이 공지되어 있다.

[0106] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 동물은 미국 특허 번호 9,796,788; 9,969,814; 미국 특허 출원 공개 번호 2011/0195454 A1, 2012/0021409 A1, 2012/0192300 A1, 2013/0045492 A1, 2013/0185821 A1, 2013/0302836 A1; 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2011/097603, WO 2012/148873, WO 2013/134263, WO 2013/184761, WO 2014/160179, WO 2014/160202에 설명된 바와 같은 한정된 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함하며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 설치류 동물은, 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는, W02019/113065, W02017214089, US20180125043 및 미국 특허 제9,035,128호; 제9,066,502호; 제9,163,092호; 제9,150,662호; 제9,334,333호; 제9,006,511호; 제9,029,628호; 제9,206,261호; 제9,012,717호; 제9,394,373호; 제9,206,262호; 제9,206,263호; 제9,226,484호; 제9,540,452호; 및 제9,399,683호에 기술된 바와 같은 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0107] 일단 동물이 면역화되면, 면역원에 대한 동물의 면역 반응은 항원-특이적 면역분석법을 사용하여 모니터링된다. 동물에서의 체액성 면역 반응은 관심 막관통 단백질(항원)에 특이적인 혈청 내 항체의 역가에 기초하여 결정될 수 있다. 항체 역가를 결정하기 위해, ELISA 및 유세포 계측법 기반 검정(예를 들어, David H. Margulies, *Induction of Immune Responses, Current Protocols in Immunology*, 89, 1, (2.0.1-2.0.3) (2010); Henri V. van der Heyde 등, "Analysis of antigen-specific antibodies and their isotypes in experimental malaria," *Cytometry*, Vol. 71A (4): 242-250 (2007); 이들 둘 모두는 본원에 참조로서 포함됨)을 포함하는 다양한 분석법을 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 검정은 세포 표면에서 관심 막관통 단백질을 발현하거나 이를 발현하도록 조작된 세포를 사용하며, 항체 역가는 세포에 대한 항체 결합을 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0108] 적절한 면역 반응이 달성되면, 면역화된 동물로부터 세포 집단을 수집한다. 세포는 면역화된 동물의 비장, 림프절, 골수 및 말초 혈액을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 공급원으로부터 수집될 수 있다. 일 구현예에서, 세포는 면역화된 동물의 비장에서부터 수득된 세포의 집단, 즉 비장세포의 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 면역화된 동물의 상이한 조직, 기관 또는 영역의 세포를 함유하는 이질적인 세포 집단이다. 특정 구현예에서, 세포 집단은 면역화된 동물의 비장과 같은 일 기관으로부터 수득되는 균질한 세포 집단이다. 일 구현예에서, 세포 집단은 비장, 림프절 및 골수 중 하나 이상으로부터의 조직 유래 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 세포 집단은 면역화된 동물의 혈액으로부터 수득된다.

[0109] 면역화된 동물로부터 수집된 세포는 (B 세포 활성화의 결과로서) 또는 재조합 기술 및 유전자 조작의 결과로서 (하이브리도마 세포와 같은) 항체를 자연적으로 발현하는 세포를 지칭하는 "항체 생성 세포"를 포함한다. 따라서, 용어 "항체 생성 세포"는 림프구와 같은 면역 세포를 포함한다. 특정 비제한적인 실시예에서, 림프구는 항체를 발현하는 메모리 B 세포, 형질 모세포 및 말단으로 분화된 형질 세포뿐만 아니라, 항체를 발현하도록 조작된 하이브리도마 및 비-림프구 세포와 같은 재조합 세포를 포함하는 항원-의존성 B 세포 계통일 수 있다. 또한, "항체 생성 세포"는 발현된 항체가 세포막에 결합되거나 고정되는 세포, 즉 세포 표면 항체뿐만 아니라 항체를 분비하는 세포를 포함한다.

[0110] 특정 구현예에서, 항체 생성 세포 집단은 면역화된 동물의 비장, 림프절, 골수 또는 말초 혈액으로부터 유래한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포 집단은 말초 혈액 세포, B 세포, 혈장 세포, 혈장 세포 골수종, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체-생성 세포의 집단은, 예를 들어 하이브리도마와 같은 재조합 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은, 예를 들어, B 세포와 같은 림프구의 집단이다. 일 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 메모리 B 세포로 이루어진다.

[0111] 또한, 일부 경우, 추가의 항체 생성 세포는 본 개시의 방법에 의해 수득된 항체 생성 세포의 시작 집단으로부터

유래될 수 있다. 이와 같이, 세포주, 혈장 세포, 메모리 B 세포, 하이브리도마, 혈장 세포 골수종 및 재조합 항체-발현 세포는 항체 생성 세포로부터 유래되거나 수득될 수 있다. 예를 들어, 항체 생성 세포는 하이브리도마를 만들기 위해 골수종 세포에 융합되거나, 바이러스(예를 들어, EBV)에 감염된 것과 같이, 달리 불멸화되거나, 특정 B 세포 유형에 의해 발현된 단백질 마커에 기초한 세포 분류 기술에 의해 분화될 수 있다.

[0112] 특정 구현예에서, 용어 "항체 생성 세포"는 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 세포를 의미한다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체는 세포 표면 상에 위치한다. 특정 경우, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 이중 집단이며, 하나 이상의 항원에 대한 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 함유한다. 특정 일 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 이중 집단이며, 관심 막관통 단백질 및 적어도 하나의 다른 항원에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 함유한다. 다른 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 균질한 집단일 수 있으며, 이는 하나의 항원에만 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 균질한 집단이며, 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 함유한다.

[0113] 표 1 내지 표 5에 나타난 바와 같이, 다양한 상이한 면역원 및 면역원의 조합으로 동물을 면역화한 결과, 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 집단을 포함하는 항체 생성 세포가 생성되었다. 표 1 내지 표 5는 또한 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 유전자를 발현하지 않는 유전적으로 조작된 동물의 면역화가 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 생성하였음을 입증한다.

[0114] *관심 막관통 단백질에 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 수집.*

[0115] 본원에 기술된 바와 같이, 막관통 단백질에 대한 항체의 생성에 대한 장애물은 관심 막관통 단백질에 대한 항체를 생성하는 항체 또는 세포에 충분한 양의 형태적으로 정확한 막관통 단백질 항원을 제공할 수 없다는 것을 포함한다. 예를 들어, 정제된 내인성 막관통 단백질은 그의 천연 막 환경으로부터 단리될 때 형태적으로 손상되며, 현재의 지질 기반 및 세포 기반 막 제제는 높은 수준의 비특이적 결합을 초래하며, 따라서 제형화하기 어렵고, 종종 겹히거나 부적절하게 접힌 막관통 단백질 항원의 하위 집합을 제공한다.

[0116] 본 개시는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용하여 막관통 단백질 항원을 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체에 제시함으로써 이러한 장애물을 극복한다. 보다 구체적으로, 본 개시는 관심 막관통 단백질을 포함하는 복합체뿐만 아니라, 자연 발생 세포의 막에서 흔히 발견되는 지질 및 막 스캐폴드 단백질을 사용하여, 항체에 대한 그의 자연 형태의 막관통 단백질을 제시한다. 이와 같이, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는, 자연에서 접근 가능한 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 집단 중 항체의 특정 하위 집합(또는 항체를 발현하는 세포)를 식별 및 수집하기 위한 본 방법에 사용된다.

[0117] 일단 관심 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체가 형성되면, 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 집단을 검출하고 단리하기 위한 분류 체계로서 복합체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 항체 생성 세포의 이중 집단은 본원에 기술된 바와 같이 면역화된 포유동물로부터 수득될 수 있고, 그런 다음 항체 생성 세포의 집단은 세포에 의해 생성된 항체에 대한 관심 막관통 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 접촉될 수 있다. 그런 다음, 항체 생성 세포의 복합체 및 집단을 인큐베이션하여 해당 복합체에 의해 제시된 막관통 단백질과 세포에 의해 생산된 항체 간의 결합을 허용할 수 있다. 그런 다음, 항체와 관심 막관통 단백질 간의 결합을 검출할 수 있고, 결합된 세포를 추가 사용을 위해 수집할 수 있다.

[0118] 일부 경우, 면역화된 동물로부터 수득된 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 이중 집단일 수 있으며, 이는 둘 이상의 항원에 대한 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 이중 집단이며, 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 특정 항체 생성 세포 및 적어도 하나의 다른 항원에 결합하는 항체를 발현하는 특정 항체 생성 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 이중 집단은, 적어도 0.01%, 적어도 0.1%, 적어도 0.5%, 적어도 1.0%, 적어도 1.5%, 적어도 2.0%, 적어도 3.0%, 적어도 4.0%, 적어도 5.0%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80, 적어도 90%, 또는 그 이상의 관심 막관통 단백질을 발현하는 항체 생성 세포로 구성된다.

[0119] 다른 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 균질한 집단일 수 있으며, 이는 하나의 항원에만 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 세포의 균질한 집단이며, 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 함유한다. 특정 구

현예에서, 항체 생성 세포의 균질한 집단은, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 이상의 관심 단백질을 발현하는 항체 생성 세포로 구성된다.

[0120] 특정 구현예에서, B 세포는 항체 생성 B 세포의 집단을 제공하기 위해, 항체 생성 세포가 수득되는 동시에 면역화된 동물로부터 수득된 세포의 이중 집단으로부터 검출되고 수집될 수 있다. 일부 구현예에서, B 세포는 이중 세포 집단으로부터 항체를 생성하는 세포를 수득하기 전에 면역화된 동물로부터 수득된 세포의 이중 집단으로부터 수득될 수 있다. 또 다른 구현예에서, B 세포는 면역화된 동물로부터 수득된 항체 생성 세포의 집단에서 검출됨으로써, 항체 생성 B 세포의 집단으로서 수득될 수 있다.

[0121] 특정 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질에 대한 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포는 면역화된 동물로부터 수득되고 세포 표면 B 세포 마커에 기초하여 FACS에 의해 분리된 세포의 이중 집단에서 검출될 수 있다.

[0122] B 세포 마커는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, FACS의 사용을 통해 검출될 수 있는 적용 가능한 B 세포 마커는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, CD1, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27, CD30, CD38, CD40, CD78, CD80, CD138, CD319, TLR4, IL-6, PDL-2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, IL-10 및 TGF β . 특정 구현예에서, B 세포는 IgG, IgM 또는 이들의 조합에 특이적인 표지를 사용하여 검출될 수 있다. 일 구현예에서, 항체 생성 B 세포는 IgG에 특이적인 항체를 사용하여 검출된다.

[0123] 특정 구현예에서, 면역화 후, 비장세포는 면역화된 동물로부터 수확된다. 적혈구를 제거한 후, 면역화된 동물 유래의 IgG⁺-항원-양성 B 세포의 집단은 본원에 기술된 방법을 사용하여 이중 세포 집단으로부터 분리된다. 예를 들어, 비장세포를 항-IgG 항체와 접촉시키고 세척하여 과량의 미결합 세포 및 항체를 제거한다. 그런 다음, 표지된 B 세포 마커(예컨대, 항-IgG 항체)에 결합하는 형광 항체(즉, 이차 항체)로 세포를 염색한다. 그런 다음, 염색된 세포를 유세포 계측법에 의해 분석하고, 본원에 기술된 바와 같이 추가 사용을 위해 분리할 수 있다.

[0124] 본 방법의 일부 구현예에서, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 관심 항원에 대한 체액 면역성을 갖는 것으로 알려진 포유동물로부터 수확된다. 이어서, 관심 항원을 인식하는 항체를 발현하는 IgG⁺ 항원-양성 B 세포는 본 개시의 방법에 따라 추가 처리를 위해 분리될 수 있다.

[0125] 본 방법의 일부 구현예에서, 항체 생성 세포의 집단은 항체 생성 B 세포를 포함한다. 이러한 일 구현예에서, 항체 생성 집단은 관심 막관통 단백질에 대한 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포를 포함하며, 이는 면역화된 동물로부터 수득된 이중 세포의 집단에서 검출될 수 있고 관심 막관통 단백질 및 예를 들어 B 세포 표면 마커에 결합하는 항체와 같은, B 세포 마커에 결합하는 분자를 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 세포의 이중 집단을 접촉시킴으로써 분리될 수 있다. 예를 들어, 면역화 후에, 비장세포를 면역화된 동물로부터 수확한다. 적혈구를 제거한 후, 이중 세포 집단에서 항-IgG 항체와 IgG⁺-양성 B 세포 간의 결합을 허용하기 위해, 표지된 항-IgG 항체와 함께 이중 세포 집단을 인큐베이션한다. 표지된 항-IgG 항체와 함께 인큐베이션을 수행하는 동시에, 또는 그 이후에, 또는 그 전에, 세포의 이중 집단을 세포에 의해 생성된 항체에 대한 막관통 단백질의 결합을 허용하기 위해 관심 막관통 단백질을 제시하는 표지된 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션한다. 그런 다음, 관심 막관통 단백질에 대한 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 집단은, 예를 들어, 표지된 항-IgG 항체(B 세포) 및 표지된 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 둘 모두에 결합된 세포를 검출하고 분리(수집)하기 위한 유세포 계측법에 의해 수득될 수 있다.

[0126] 일부 경우에, 본 방법은 본원에 기술된 바와 같은 동물을 면역화하는 단계를 포함한다.

[0127] 예를 들어 항체 생성 세포 집단과 같은 세포 집단을 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 접촉 또는 배양하는 단계를 포함하는 경우, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는, 적어도 0.1 mg/mL, 적어도 0.2 mg/mL, 적어도 0.3 mg/mL, 적어도 0.4 mg/mL, 적어도 0.5 mg/mL, 적어도 0.6 mg/mL, 적어도 0.7 mg/mL, 적어도 0.8 mg/mL, 적어도 0.9 mg/mL, 적어도 1.0 mg/mL, 적어도 2.0 mg/mL, 적어도 3.0 mg/mL, 적어도 4.0 mg/mL, 적어도 5.0 mg/mL, 적어도 10.0 mg/mL 또는 이를 초과하는 농도로 세포 배지에 제공된다. 특정 구현예에서, 복합체는, 0.2 mg/mL 내지 20.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 15.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 10 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 7.0 mg/mL, 0.2 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 10.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 7.0 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 5.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 10.0 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 7.0 mg/mL, 또는 1.0 mg/mL 내지 5.0 mg/mL를 포함하는 농도로 동물에게 세포에 제공된다. 특정 구현예에서, 복합체는, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.55 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.65 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.85 mg/mL, 0.9

mg/mL, 0.95 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.8 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3.0 mg/mL, 3.5 mg/mL, 4.0 mg/mL, 4.5 mg/mL, 5.0 mg/mL, 5.5 mg/mL, 6.0 mg/mL, 6.5 mg/mL, 7.0 mg/mL, 7.5 mg/mL, 8.0 mg/mL, 8.5 mg/mL, 9.0 mg/mL, 9.5 mg/mL, 10.0 mg/mL, 12.0 mg/mL, 15.0 mg/mL, 20.0 mg/mL 또는 이를 초과하는 농도로 세포에 제공된다.

[0128] 본 방법의 일 양태에서, 면역화된 동물은 비인간 동물 또는, 관심 인간 막관통 단백질 또는 이의 일부, 이와 동일하거나 이들의 조합을 암호화하는 핵산 서열로 면역화된, 예를 들어 마우스 또는 랫트와 같은 유전적으로 조작된 비인간 동물이다.

[0129] 본 방법의 특정 구현예에서, 비인간 동물 또는 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 전장 인간 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열, 또는 이들의 조합으로 면역화되고, 비장 세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 인간 막관통 단백질(항원)과 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타아비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴-표지된 (예를 들어, Bir-A) 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타아비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 전장 인간 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0130] 본 방법의 일부 구현예에서, 비인간 동물 또는 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 전장 인간 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열, 또는 이들의 조합으로 면역화되고, 비장 세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 절단된 인간 막관통 단백질과 같은 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 인간 막관통 단백질(항원)의 부분 상의 에피토프와 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타아비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타아비딘 결합을 가능하게 하며, 세포는 이에 이어서 세척될 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 복합체에 의해 제시된 항원 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0131] 관심 막관통 단백질의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질을 포함하는 방법의 구현예에서, 복합체에 의해 제시된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 본원에 기술된 바와 같은 절단된 막관통 단백질이다. 특정 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 적어도 전체 막관통 부분을 포함한다. 특정 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 절단된 단백질은 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 특정 일 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하지 않는다.

[0132] 본 방법의 다른 양태에서, 예를 들어 마우스 또는 랫트와 같은 비인간 동물 또는 유전적으로 조작된 비인간 동물은 관심 전장 인간 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 또는 이들의 조합으로 면역화된다. 비장세포를 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)로부터 분리하고, B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 세포는 또한 관심 인간 막관통 단백질의 일부 및 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 일부를 포함하는 키메라 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 키메라 막관통 단백질(항원)의 인간 부분과 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 키메라 막관통 단백질 상의 인간 부분 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성

B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0133] 관심 키메라 막관통 단백질의 사용을 포함하는 방법의 구현예에서, 키메라 단백질은 본원에 기술된 바와 같은 2 개의 상이한 종으로부터의 관심 막관통 단백질의 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키메라 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 하나 이상의 부분에 작동가능하게 연결된 인간 막관통 단백질의 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다. 일부 경우, 키메라 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 비인간 상동체는, 예를 들어 마우스, 랫트, 염소, 햄스터, 돼지, 침팬지, 말, 양, 원숭이 및 기니피그와 같은 임의의 비인간 동물일 수 있다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스, 랫트 또는 염소이다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스이다.

[0134] 본 방법의 예시적인 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 관심 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 아미노-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 아미노-말단 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 아미노-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 포함한다.

[0135] 본 방법의 다른 양태에서, 예를 들어 마우스 또는 랫트와 같은 비인간 동물 또는 유전적으로 조작된 비인간 동물은 관심 전장 인간 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 또는 이들의 조합으로 면역화된다. 비장세포를 면역화된 비인간 동물로부터 분리하고, B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 세포는 또한 막관통 단백질의 비인간 상동체를 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 비인간 막관통 단백질(항원)과 세포에 의해 생성된 교차 반응성 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 비인간 막관통 단백질 및 관심 인간 막관통 단백질에 존재하는 에피토프에 결합하는 교차 반응성 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0136] 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체 또는 이의 일부분의 용도를 포함하는 본 방법의 구현예에서, 비인간 상동체는 임의의 비인간 유기체일 수 있다. 비인간 유기체의 특정 예는 비인간 포유동물, 파충류, 어류, 박테리아, 곤충 및 바이러스를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 비인간 단백질은 마우스, 랫트, 염소, 햄스터, 돼지, 침팬지, 말, 양, 원숭이 및 기니피그로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 비인간 단백질 상동체는 마우스, 랫트 또는 염소로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 비인간 상동체는 관심 막관통 단백질의 마우스 상동체이다.

[0137] 본 방법의 일부 구현예에서, 비인간 동물 또는 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는, 관심 전장 인간 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열 또는 이의 조합으로 면역화되고, 비장 세포는 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)로부터 분리되고 관심 전장 인간 막관통의 일부(펩티드 차단제)와 함께 인큐베이션되어, 펩티드 차단제와 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 세포는 또한 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션되어, B 세포의 집단을 식별하고, 전장 막관통 단백질을 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께, 복합체에 의해 제시된 전장 관심 막관통 단백질(항원)과 집단에서 미결합된 나머지 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티닌(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 세척하여, 펩티드 차단제에 결합된 모든 세포, 결합되지 않은 과량의 PE-스트렙타비딘 및 B 세포 마커에 대한 표지된 항체를 분류로부터 제거할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에

의해 검출되어, 펩티드 차단제에 상응하는 부분에 존재하지 않는 관심 전장 인간 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0138] 차단제의 사용을 포함하는 방법의 구현예에서, 차단제는 예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드, 화합물과 같은 임의의 분자일 수 있다. 이러한 구현예에서, 차단제는 관심 막관통 단백질의 일부에 상응하는 폴리펩티드 또는 펩티드, MSP 단백질의 일부에 상응하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 His-태그 또는 Flag-태그와 같은 검출 가능한 마커일 수 있다. 일부 구현예에서, 차단제는 검출 가능한 표지를 포함한다. 다른 구현예에서, 차단제는 검출 가능한 표지를 포함하지 않는다. 일 구현예에서, 차단제는 관심 막관통 단백질의 펩티드 또는 폴리펩티드 부분이며, 이는 차단제와 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 허용하기 위해 항체 생성 세포의 집단과 함께 인큐베이션될 수 있다. 일 구현예에서, 차단제는 절단된 관심 막관통 단백질이다. 특정 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및 카르복시-말단 부분에 상응하는 폴리펩티드이다. 특정 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 일 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 차단제는 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 차단제는 MSP 단백질의 펩티드 또는 폴리펩티드 부분이며, 이는 차단제와 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 허용하기 위해 항체 생성 세포의 집단과 함께 인큐베이션될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 차단제는 MSP 또는 관심 막관통 단백질 상에 위치하는 펩티드 또는 폴리펩티드 검출 가능 마커이며, 이는 차단제와 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 허용하기 위해 항체 생성 세포의 집단과 함께 인큐베이션될 수 있다.

[0139] 본 방법의 다른 양태에서, 예를 들어 마우스 또는 랫트와 같은 비인간 동물 또는 유전적으로 조작된 비인간 동물은 관심 전장 인간 막관통 단백질의 일부, 이를 암호화하는 핵산 또는 이들의 조합(면역원)으로 면역화된다.

[0140] 일부 구현예에서, 비장세포를 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)로부터 분리하고, B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 세포는 또한 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 전장 막관통 단백질(항원)과 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 면역원 상에 존재하거나 면역원에 의해 암호화되는 아미노산 서열 또는 도메인에 상응하는 관심 항원의 전장 인간 막관통 단백질의 일부에 위치한 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0141] 본 방법의 다른 구현예에서, 비인간 동물 또는 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 전장 인간 막관통 단백질의 일부, 이를 암호화하는 핵산 서열 또는 이들의 조합(면역원)으로 면역화되고, 비장세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 면역원으로서 사용되는 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 인간 막관통 단백질(항원)의 일부 상의 에피토프와 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 하며, 세포는 이에 이어서 세척될 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 복합체에 의해 제시된 항원 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0142] 관심 막관통 단백질의 일부의 사용을 포함하는 본 방법의 구현예에서, 막관통 단백질의 일부는 펩티드 또는 폴리펩티드이며, 관심 전장 막관통 단백질을 포함하지 않는다. 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질의 일부는 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는 변형된 막관통 단백질일 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 관심 막관통 단백질은 절단된 막관통 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 관심 막관통 단백질의 일부는 검출 가능한 표지를 포함한다. 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질의 부분은 검출 가능한 표지를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 적어도 전체 막관통 부분을 포함한다. 소정의 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심

전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 절단된 단백질은 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하지 않는다.

[0143] 본 방법의 또 다른 양태에서, 내인성 유전자로부터 관심 막관통 단백질을 발현하지 않는 유전적으로 조작된 동물은 관심 비인간 막관통 단백질 또는 이의 일부, 이를 암호화하는 핵산 서열 또는 이들의 조합으로 면역화된다.

[0144] 관심 비인간 막관통 단백질 및 유전적으로 조작된 동물은 동일하거나 상이한 동물로부터 유래될 수 있다. 관심 비인간 막관통 단백질은 임의의 비인간 유기체로부터 유래될 수 있다. 비인간 유기체의 비제한적인 예는 비인간 포유동물, 파충류, 어류, 박테리아, 곤충 및 바이러스를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 비인간 막관통 단백질은, 예를 들어, 마우스, 랫트, 염소, 햄스터, 돼지, 침팬지, 말, 양, 원숭이 및 기니피그와 같은 동물로부터 유래된다. 특정 일 구현예에서, 비인간 동물은 포유동물이다. 다른 구현예에서, 비인간 막관통 단백질은 마우스, 랫트 또는 염소로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스이다.

[0145] 본 방법의 특정 구현예에서, 유전적으로 조작된 동물은, 예를 들어 마우스 또는 랫트와 같은 비인간 동물이며, 이는 관심 전장 비인간 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 또는 이들의 조합(면역원)으로 면역화된다. 비장 세포를 면역화된 유전적으로 조작된 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)로부터 분리하고, B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 세포는 또한 전장 비인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질(항원)과 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴-표지된 (예를 들어, Bir-A) 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 전장 비인간 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0146] 본 방법의 다른 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 전장 비인간 막관통 단백질, 이를 조합을 암호화하는 핵산 서열 또는 이들의 조합(면역원)으로 면역화되고, 비장 세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 관심 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 인간 막관통 단백질(항원)과 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴-표지된 (예를 들어, Bir-A) 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 비인간 막관통 단백질 및 관심 전장 비인간 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 교차 반응성 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0147] 본 방법의 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 전장 비인간 막관통 단백질, 이를 조합을 암호화하는 핵산 서열 또는 이들의 조합(면역원)으로 면역화되고, 비장 세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 절단된 막관통 단백질과 같은 전장 비인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질(항원)의 부분 상의 에피토프와 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 하며, 세포는 이에 이어서 세척될 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 복합체에 의해 제시된 항원 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0148] 관심 막관통 단백질의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질을 포함하는 방법의 구현예에서, 복합체

에 의해 제시된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질을 포함하지 않는다. 일 구현예에서, 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는 절단된 막관통 단백질이다. 특정 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 적어도 전체 막관통 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단된 단백질은 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 특정 일 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 절단된 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하지 않는다. 일 구현예에서, 절단된 관심 막관통 단백질은 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하지 않는다.

[0149] 본 방법의 특정 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 전장 비인간 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열, 또는 이들의 조합으로 면역화되고, 비장세포는, 면역화된 동물로부터 단리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 관심 막관통 단백질의 비인간 상동체의 일부 및 관심 인간 막관통 단백질을 포함하는 키메라 막관통 단백질을 포함하는 비오틀닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 키메라 막관통 단백질(항원)의 비인간 부분과 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 키메라 막관통 단백질 상의 비인간 부분 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0150] 관심 키메라 막관통 단백질의 사용을 포함하는 방법의 구현예에서, 키메라 단백질은 본원에 기술된 바와 같은 2개의 상이한 종으로부터의 관심 막관통 단백질의 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키메라 막관통 단백질은 막관통 단백질의 비인간 상동체의 하나 이상의 부분에 작동가능하게 연결된 인간 막관통 단백질의 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다. 일부 경우, 키메라 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 비인간 상동체는, 예를 들어 마우스, 랫트, 염소, 햄스터, 돼지, 침팬지, 말, 양, 원숭이 및 기니피그와 같은 임의의 비인간 동물일 수 있다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스, 랫트 또는 염소이다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스이다.

[0151] 본 방법의 예시적인 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 아미노-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 아미노-말단 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 아미노-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 포함한다.

[0152] 본 방법의 다른 양태에서, 예를 들어 마우스 또는 랫트와 같은 유전적으로 조작된 비인간 동물은 관심 전장 비인간 막관통 단백질의 일부, 이를 암호화하는 핵산 또는 이들의 조합(면역원)으로 면역화된다.

[0153] 이러한 예시적인 일 구현예에서, 비장세포를 면역화된 유전적으로 조작된 동물로부터 단리하고, B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 세포는 또한 전장 비인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틀닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 전장 막관통 단백질(항원)과 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 면역원 상에 존재하거나 면역원에 의해 암호화되는 아미노산 서열 또는 도메인에 상응하는 관심 항원의 전장 비인간 막관통 단백질의 일부에 위치한 에피토프에 결합하는 항

체를 발현하는 항체생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0154] 본 방법의 다른 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 전장 비인간 막관통 단백질의 일부(면역원)로 면역화되고, 이와 동일하거나 이들의 조합을 암호화하는 핵산 서열, 및 비장세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 단리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 면역원으로서 사용되는 비인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 인간 막관통 단백질(항원)의 일부 상의 에피토프와 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 복합체에 의해 제시된 항원 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0155] 본 방법의 또 다른 양태에서, 내인성 유전자로부터 관심 막관통 단백질을 발현하지 않는 유전적으로 조작된 동물은 관심 키메라 막관통 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산으로 면역화된다.

[0156] 관심 키메라 막관통 단백질의 사용을 포함하는 경우, 키메라 단백질은 본원에 기술된 바와 같은 2개의 상이한 종으로부터의 관심 막관통 단백질의 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키메라 막관통 단백질은 막관통 단백질의 비인간 상동체의 하나 이상의 부분에 작동가능하게 연결된 인간 막관통 단백질의 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다. 일부 경우, 관심 키메라 막관통 단백질은 관심 인간 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인에 작동 가능하게 연결된 세포외 루프 도메인을 포함한다. 비인간 상동체는, 예를 들어 마우스, 랫트, 염소, 햄스터, 돼지, 침팬지, 말, 양, 원숭이 및 기니피그와 같은 임의의 비인간 동물일 수 있다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스, 랫트 또는 염소이다. 특정 구현예에서, 비인간 포유동물은 마우스이다.

[0157] 본 방법의 예시적인 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 관심 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인 및/또는 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 아미노-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 아미노-말단 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 인간 막관통 단백질으로부터의 아미노-말단 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인 및 카르복시-말단 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 관심 키메라 막관통 단백질은 막관통 도메인에 작동 가능하게 연결된 비인간 상동체로부터의 하나 이상의 세포외 루프 도메인을 포함하고, 막관통 단백질의 비인간 상동체로부터의 아미노-말단 도메인을 포함한다.

[0158] 본 방법의 특정 일 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 인간 막관통 단백질의 일부 및 막관통 도메인의 비인간 상동체의 일부를 포함하는 키메라 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열, 또는 이들의 조합으로 면역화되고, 비장세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 단리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 관심 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(항원)와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 인간 항원과 관심 키메라 막관통 단백질에 특이적인 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 키메라 막관통 단백질 상의 인간 부분 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0159] 본 방법의 또 다른 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 인간 막관통 단백질의 일부 및 관심 막관통 도메인의 비인간 상동체의 일부를 포함하는 키메라 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열, 또는 이들의 조합으로 면역화되고, 비장세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어,

랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 관심 전장 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(항원)와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 인간 항원과 관심 키메라 막관통 단백질의 인간 부분에 특이적인 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 키메라 막관통 단백질 상의 인간 부분 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0160] 본 방법의 다른 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 인간 막관통 단백질의 일부 및 관심 막관통 도메인의 비인간 상동체의 일부를 포함하는 키메라 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열, 또는 이들의 조합으로 면역화되고, 비장세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 관심 전장 비인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(항원)와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 비인간 항원과 관심 키메라 막관통 단백질의 비인간 부분에 특이적인 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 키메라 막관통 단백질 상의 비인간 부분 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0161] 본 방법의 또 다른 구현예에서, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어, 마우스 또는 랫트는 관심 인간 막관통 단백질의 일부 및 관심 막관통 도메인의 비인간 상동체의 일부를 포함하는 키메라 막관통 단백질, 이를 암호화하는 핵산 서열, 또는 이들의 조합으로 면역화되고, 비장세포는, 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)에서 분리되고, B 세포 집단을 식별하기 위해 B 세포 마커에 대한 표지된 항체(예를 들어, 형광색소 표지된 항-IgG 항체)와 함께 인큐베이션된다. 세포는 또한 관심 전장 비인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(항원)와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 비인간 항원과 관심 키메라 막관통 단백질의 비인간 부분에 특이적인 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 그런 다음 세포를 세척할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 키메라 막관통 단백질 상의 비인간 인간 부분 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0162] 본 방법의 또 다른 양태에서, 비인간 동물 또는, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어 마우스 또는 랫트는, 관심 전장 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화된다.

[0163] 본 방법의 일부 구현예에서, 비인간 동물 또는, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어 마우스 또는 랫트는, 관심 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화된다. 비장세포는 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)로부터 분리되고, 복합체에 포함된 각각의 MSP 단백질 및 복합체에 포함되거나 관심 막관통 단백질에 부착된 각각의 검출 가능한 마커, 예컨대 His-태그 또는 Flag-태그에 상응하는 하나 이상의 차단제와 함께 인큐베이션되어, 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 세포에 의해 생성된 항체와 차단제 사이의 결합을 가능하게 한다. 또한, B 세포 마커에 대해 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 세포를 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 그런 다음, 세포는 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 전장 막관통 단백질(항원)과 집단 중 남아있는 미결합 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 세척하여, 차단제펩티드 차단제에 결합된 모든 세포, 결합되지 않은 과량의 PE-스트렙타비딘 및 B 세포 마커에 대한 표지된 항체를 분류로부터 제거할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 전장 인간 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0164] 본 방법의 일 구현예에서, 비인간 동물 또는, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어 마우스 또는 랫트는, 관심 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화된다. 비장세포는 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)로부터 분리되고, 복합체에 포함된 각각의 MSP 단백

질 및 복합체에 포함되거나 관심 막관통 단백질에 부착된 각각의 검출 가능한 마커, 예컨대 His-태그 또는 Flag-태그에 상응하는 하나 이상의 차단제와 함께 인큐베이션되어, 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 세포에 의해 생성된 항체와 차단제 사이의 결합을 가능하게 한다. 또한, B 세포 마커에 대해 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 세포를 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 그런 다음, 세포는 인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 전장 막관통 단백질(항원)의 일부와 집단 중 남아있는 미결합 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 세척하여, 차단제펩티드 차단제에 결합된 모든 세포, 결합되지 않은 과량의 PE-스트렙타비딘 및 B 세포 마커에 대한 표지된 항체를 분류로부터 제거할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 복합체에 의해 제시된 관심 전장 인간 막관통 단백질의 일부 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0165] 본 방법의 다른 구현예에서, 내인성 유전자로부터 관심 막관통 단백질을 발현하지 않는, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어 마우스 또는 랫트는, 관심 전장 비인간 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화된다. 비장세포는 면역화된 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스)로부터 분리되고, 복합체에 포함된 각각의 MSP 단백질 및 복합체에 포함되거나 관심 막관통 단백질에 부착된 각각의 검출 가능한 마커, 예컨대 His-태그 또는 FLAG-태그에 상응하는 하나 이상의 차단제와 함께 인큐베이션되어, 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 세포에 의해 생성된 항체와 차단제 사이의 결합을 가능하게 한다. 또한, B 세포 마커에 대해 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 세포를 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 그런 다음, 세포들을 전장 인간 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하여, 관심있는 전장 막관통 단백질(항원)에 의해 제시된 복합체 및 집단에서 나머지 미결합 세포에 의해 생산된 항체 간의 결합을 허용한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 세척하여, 차단제펩티드 차단제에 결합된 모든 세포, 결합되지 않은 과량의 PE-스트렙타비딘 및 B 세포 마커에 대한 표지된 항체를 분류로부터 제거할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 전장 비인간 막관통 단백질 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0166] 본 방법의 일부 구현예에서, 내인성 유전자로부터 관심 막관통 단백질을 발현하지 않는, 유전적으로 조작된 비인간 동물, 예컨대, 예를 들어 마우스 또는 랫트는, 관심 전장 비인간 막관통 단백질의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화된다. 비장세포는 면역화된 동물로부터 분리되고, 복합체에 포함된 각각의 MSP 단백질 및 복합체에 포함되거나 관심 비인간 막관통 단백질의 일부에 부착된 각각의 검출 가능한 마커, 예컨대 His-태그 또는 FLAG-태그에 상응하는 하나 이상의 차단제와 함께 인큐베이션되어, 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 세포에 의해 생성된 항체와 차단제 사이의 결합을 가능하게 한다. 또한, B 세포 마커에 대해 표지된 항체(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 항체)와 함께 세포를 인큐베이션하여 B 세포의 집단을 식별한다. 그런 다음, 세포는 전장 비인간 막관통 단백질의 일부 또는 관심 전장 비인간 막관통 단백질(항원)을 포함하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션되어, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질과 집단 중 남아있는 미결합 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 가능하게 한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 세척하여, 차단제펩티드 차단제에 결합된 모든 세포, 결합되지 않은 과량의 PE-스트렙타비딘 및 B 세포 마커에 대한 표지된 항체를 분류로부터 제거할 수 있다. 결합된 B 세포로부터의 PE 형광 및 신호(예를 들어, 형광색소-표지된 항-IgG 신호)는 FACS에 의해 검출되어, 관심 전장 비인간 막관통 단백질의 일부 상의 에피토프에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 균질한 집단을 식별하고 수집할 수 있게 한다.

[0167] 차단제의 사용을 포함하는 방법의 구현예에서, 차단제는 예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드, 화합물과 같은 임의의 분자를 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 차단제는 관심 막관통 단백질의 일부에 상응하는 폴리펩티드 또는 펩티드, MSP 단백질의 일부에 상응하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 His-태그 또는 FLAG-태그와 같은 검출 가능한 마커일 수 있다. 일부 구현예에서, 차단제는 검출 가능한 표지를 포함한다. 다른 구현예에서, 차단제는 검출 가능한 표지를 포함하지 않는다. 일 구현예에서, 차단제는 관심 막관통 단백질의 펩티드 또는 폴리펩티

드 부분이며, 이는 차단제와 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 허용하기 위해 항체 생성 세포의 집단과 함께 인큐베이션될 수 있다. 일 구현예에서, 차단제는 절단된 관심 막관통 단백질이다. 특정 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 하나 이상의 세포외 루프 도메인, 아미노-말단 및 카르복시-말단 부분에 상응하는 폴리펩티드이다. 특정 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 아미노-말단 부분을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 카르복시-말단 부분을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 일 구현예에서, 차단제는 관심 전장 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 차단제는 관심 막관통 단백질의 세포외 도메인, 예컨대 N-말단 세포외 도메인, C-말단 세포외 도메인, 및/또는 관심 막관통 단백질의 하나 이상의 막에 걸쳐 있는 도메인 사이의 세포외 루프 도메인을 포함하는 절단된 단백질이다. 또 다른 구현예에서, 차단제는 MSP 단백질의 펩티드 또는 폴리펩티드 부분이며, 이는 차단제와 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 허용하기 위해 항체 생성 세포의 집단과 함께 인큐베이션될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 차단제는 MSP 또는 관심 막관통 단백질 상에 위치하는 펩티드 또는 폴리펩티드 검출 가능 마커이며, 이는 차단제와 차단제 상에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 생성 세포에 의해 생성된 항체 간의 결합을 허용하기 위해 항체 생성 세포의 집단과 함께 인큐베이션될 수 있다.

[0168] 개시된 방법은 관심 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 항원에 결합된 항체 생성 세포를 검출, 분류 및 수집하는 단계를 포함한다. 검출, 분류 및 수집하는 단계는 합쳐지거나, 별개의 단계로서 수행될 수 있다. 검출, 분류 및/또는 수집하는 단계는 복합체 상에서 하나 이상의 검출 가능한 표지의 검출을 통해 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질에 의해 결합된 세포를 식별하는 단계를 포함할 수 있다. 그런 다음, 결합된 세포를 미결합 세포로부터 분리하고(즉, 분류하고) 추가 사용을 위해 선택할 수 있다.

[0169] 일부 구현예에서, 항체 생성 세포와 관심 막관통 단백질을 제공하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 사이의 상호작용은 관심 막관통 단백질의 형태 변화에 의해 검출되고, 세포에서 관심 막관통 단백질의 활성화 또는 비활성화, 또는 검출 가능한 표지(예를 들어, 형광 분자, 플러그 태그, His-태그)를 사용하여 관심 막관통 단백질을 함유하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 결합된 세포를 식별하고 포획한다. 검출은 표지에 특이적인 항체로 면역 염색하거나 표지에 결합하는 시약으로 직접 면역염색함으로써 수행될 수 있다. 다수의 검출 키트 및 기술은 당업계에 공지되어 있다.

[0170] 본 방법의 특정 구현예에서, 세포는, 미결합 항원을 제거하기 위해 약 5분 내지 약 60분의 기간 동안 완충액으로 세척되며; 총 10분 내지 120분의 다중 세척, 예를 들어 10분씩 3회 세척 또는 30분 1회 세척; 각각 10 내지 15분씩 2 내지 4회 세척이 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 약 10분, 또는 약 15분 또는 약 20분, 또는 약 25분, 또는 약 30분, 또는 약 35분, 또는 약 40분, 또는 약 45분, 또는 약 50분, 또는 약 55분, 또는 약 60분 기간 동안 1회 세척을 포함하는 기간동안 세포를 세척하는 단계가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세척 당 각각 약 5분, 또는 약 10분, 또는 약 15분, 또는 약 20분, 또는 약 25분, 또는 약 30분 동안 2회 세척을 포함하는 기간 동안 세포를 세척하는 단계가 사용될 수 있다. 추가적인 세척 간격이 고려되며, 이는 본질적으로 본원에 기술된 것과 동등하다.

[0171] 일부 구현예에서, 검출, 분류 및 수집하는 단계는, 막관통 단백질 특이적 항체를 발현하는 단일 항체 생성 세포를 검출, 분류 및 선택할 수 있도록, 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 사용하여 수행된다. 유세포 계측법에 의한 단일 세포 단리를 위한 프로토콜은 공지되어 있다(Huang, J. 등, 2013, 상기 참조). 예를 들어, 표지된(예를 들어, 형광 표지된) 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(또는 형광 표지된 스트렙타비딘/비오틴화 항원)에 의해 제시된 항원에 결합하는 세포는 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 세포(즉, 관심 막관통 단백질)로서 검출되고 식별될 수 있으며, 그런 다음 96-웰 또는 384-웰 플레이트 상의 개별 웰에서 수집될 수 있다.

[0172] 일단 수집되면, 단일 항체 생성 세포는 후속 DNA 제조를 위해 공통 세포 배양 기술에 의해 전파될 수 있다. 대안적으로, 항체 유전자는 단일 항체 생성 세포로부터 직접적으로 증폭되고, 이어서 DNA 벡터에 클로닝될 수 있다.

[0173] 단일 항체 생성 세포는 당업계에 공지된 대안적인 방법에 의해 분류되고 수집될 수 있으며, 이는 수동 단일 세포 선택, 제한된 희석 및 흡착된 항원의 B 세포 패닝이 포함되지만 이에 한정되지 않으며, 이들 모두는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Rolink 등, J Exp Med (1996)183:187-194; Lightwood, D. 등, J. Immunol. Methods (2006) 316(1-2):133-43을 참조한다.

- [0174] 관심 막관통 단백질에 대한 항체를 발현하는 항체 생성 세포로부터 수득된 핵산으로부터의 항체 생성
- [0175] 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생성되고 수득된 항체 생성 세포로부터 단리될 수 있다.
- [0176] 일부 구현예에서, 핵산은 가변 도메인, 불변 도메인 또는 이들의 조합과 같은 항체의 단편을 암호화한다. 특정 구현예에서, 항체 생성 세포로부터 단리된 핵산은 항체의 가변 도메인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산은 항체 중쇄 또는 이의 단편을 암호화한다. 다른 구현예에서, 핵산은 항체 경쇄 또는 이의 단편을 암호화한다.
- [0177] 특정 경우, 항체 생성 세포로부터 단리된 핵산은 숙주 세포에서 발현된다. 예를 들어, 항체 생성 세포로부터 단리된 핵산은 포유류 세포, 박테리아 세포 또는 곤충 세포와 같은 숙주 세포에서 발현(예를 들어, 클로닝 및 재조합적으로 재생)될 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 핵산을 발현하는 조건 하에서 배양되고, 이어서 항체 또는 이의 일부가 생성되고 추가 사용을 위해 단리될 수 있다. 단리된 핵산으로부터 항체를 생산하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 이러한 방법 중 어느 하나는 본 개시와 함께 사용될 수 있다.
- [0178] 일부 구현예에서, 하나 이상의 진술한 핵산을 포함하는 숙주 세포는 진장 항체를 발현하는 조건 하에서 배양되고, 이어서 항체가 생성되고 추가 사용을 위해 단리될 수 있다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 가변 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 가변 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다. 다른 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 가변 중쇄(V_H) 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 V_H 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다. 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 가변 경쇄(V_L) 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 V_L 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 항체의 V_H 도메인을 암호화하는 핵산 및 항체의 V_H 도메인을 암호화하는 핵산을 포함하고, 세포는 V_H 도메인 및 V_L 도메인을 발현하는 조건 하에서 배양된다.
- [0179] 일부 구현예에서, DNA는 숙주로부터 단리되어 항체를 재조합적으로 생산할 수 있다. 대체적으로, 면역글로불린 가변 중쇄 및 가변 경쇄(즉, V_H , V_L , V_K 및 V_Λ)를 암호화하는 유전자 또는 핵산은 항체 생성 세포로부터 단리된 핵산을 사용하는 RT-PCR 프로토콜을 사용하여 회수될 수 있다. 이들 RT-PCR 프로토콜은 공지되어 있으며, 예를 들어, Wang 등, *J. Immunol. Methods* (2000) 244:217-225에 기술된 바와 같은 종래의 기술로 알려져 있으며, 본원에서 기술된다.
- [0180] 일단 회수되면, 항체 암호화 유전자 또는 핵산은 IgG 중쇄 및 경쇄 발현 벡터에 클로닝될 수 있고, 숙주 세포의 형질감염을 통해 발현될 수 있다. 예를 들어, 항체 암호화 유전자 또는 핵산은 추가 클로닝(DNA의 증폭)을 위해 또는 세포에서의 (안정적 또는 일시적인) 발현을 위해 복제 가능한 벡터 내에 삽입될 수 있다. 다수의 벡터, 특히 발현 벡터가 이용 가능하거나, 유전자 또는 핵산을 암호화하는 항체의 발현을 조절하는 데 필요한 적절한 조절 요소를 포함하도록 조작될 수 있다.
- [0181] 본 개시의 문맥에서 발현 벡터는, 본원에 기술된 바와 같은, 염색체, 비-염색체 및 합성 핵산 벡터(적절한 발현 조절 요소 세트를 포함하는 핵산 서열)를 포함하는, 임의의 적합한 벡터일 수도 있다. 이러한 벡터의 예는 SV40의 유도체, 세균 플라스미드, 파아지 DNA, 바콜로바이러스, 효모 플라스미드, 플라스미드 및 파지 DNA의 조합에서 유도된 벡터, 및 바이러스 핵산(RNA 또는 DNA) 벡터를 포함한다.
- [0182] 일 구현예에서, 핵산 분자는 예를 들어, 선형 발현 요소(예를 들어, Sykes 및 Johnston, *Nat Biotech* (1997) 12:355-59에 기술된 바와 같음), 압축된 핵산 벡터(예를 들어, 미국 특허 제6,077,835호에 개시된 바와 같음), 또는 pBR322, pUC 19/18과 같은 플라스미드 벡터를 포함하는 네이키드 DNA 또는 RNA 벡터 중에 포함된다. 이러한 핵산 및 그의 용도는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,589,466호 및 미국 특허 제5,973,972호 참조).
- [0183] 특정 구현예에서, 발현 벡터는 효모 계통에서의 발현에 적합한 벡터일 수 있다. 효모 체계에서의 발현에 적합한 어떠한 벡터도 사용될 수도 있다. 적절한 벡터는, 예를 들어, 효모 알파 인자, 알코올 산화효소 및 PGH와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터를 포함하는 벡터를 포함한다. F. Ausubel 등 편집, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987); 및 Grant 등, *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)을 참조한다.
- [0184] 특정 구현예에서, 벡터는 항체의 중쇄를 암호화하는 핵산 분자(또는 유전자) 및 항체의 경쇄를 암호화하는 핵산 분자(또는 유전자)를 포함하되, 항체는 본 개시의 방법에 의해 수득된 항체 생성 세포에 의해 생성된다. 대체적

으로, 벡터는 관심 단백질을 암호화하는 핵산 분자(또는 유전자)를 포함하되, 핵산 분자(또는 유전자)는 숙주 세포에서의 발현에 적합한 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된다.

- [0185] 벡터의 선택은 사용될 숙주 세포에 부분적으로 의존한다. 숙주 세포는 원핵 또는 진핵(대체적으로 포유류) 기원의 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0186] 전장 항체 핵산 서열 또는 유전자는 후속하여 적절한 벡터 또는 벡터에 클로닝될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대안적으로, 단리된 항체의 Fab 영역은 임의의 이소형의 불변 영역과 일치하는 벡터 또는 벡터들 내에 클로닝될 수 있다. 따라서, 임의의 불변 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 중쇄 불변 영역, 또는 키메라 중쇄 불변 영역을 포함하는 단리된 항체의 작제에 사용될 수 있다. 이러한 불변 영역은 항체의 의도된 용도에 따라 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있다. 또한, 항체 가변 영역 또는 Fab 영역은 ScFv, 디아바디 등과 같은 다른 포맷으로 단백질을 발현시키기 위해 적절한 벡터(들)에서 클로닝될 수 있다.
- [0187] 이와 같이, 본 개시는 또한 관심 막관통 단백질에 특이적인 전장 항체를 포함하는 핵산 분자를 암호화하는 포유류 숙주 세포를 제공하며, 여기에서 항체 암호화 핵산 또는 유전자는 본 방법에 따라 수득된 항체 생성 세포로부터 단리되었다. 일 구현예에서, 일차 항체 생성 세포는 면역화된 포유동물로부터 수득된 이중 세포 집단으로부터 단리된 B 세포였다.
- [0188] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 박테리아 또는 효모 세포이다. 일부부 실시예에서, 숙주 세포는 포유류 세포이다. 다른 구현예에서, 숙주 세포는 예를 들어, 중국 햄스터 난소 세포(CHO), 예컨대, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO 세포; COS (예를 들어, COS-7); 줄기 세포; 망막 세포; Vero 세포; CV1 세포; 신장 세포, 예컨대, 예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, aHaK, BHK21 세포; HeLa 세포; HepG2 세포; WI38; MRC 5; Colo25; HB 8065; HL-60; Jurkat 또는 Daudi 세포; A431(상피) 세포; CV-1, U937, 3T3 또는 L-세포; C127 세포, SP2/0, NS-0 또는 MMT 세포, 종양 세포, 및 전술한 세포 중 어느 하나로부터 유래된 세포주일 수 있다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 CHO K1 세포이다.
- [0189] 항체 및 항체는 당업계에 공지된 용어로서, 면역계의 항원 결합 단백질을 지칭한다. 본원에서 지칭되는 바와 같이, 용어 "항체"는 전반적으로, 항원 결합 영역, 및 "항원 결합 부분" 또는 "항원 결합 영역"이 유지되는 이의 임의의 단편, 또는 단일 사슬, 예를 들어, 이의 단쇄 가변 단편(scFv)을 갖는, 전장 항체를 포함한다. "전장 항체"는 이항화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 불변 영역(CH)으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 이루어진다. VH와 VL 영역은, 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 보다 보존적인 영역이 중간에 끼어 있는 상보성 결정 영역(CDR)으로 명명된 추가변 영역으로 추가로 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단에서 카르복시 말단의 방향으로 다음 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR으로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 함유한다.
- [0190] 본원에서 나타낸 바와 같이, 본 개시는 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 수득하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 항체 생성 세포로부터 수득된 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 특성화될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 생성된 항체 중 어느 하나의 결합 친화도, 인식된 특이적 에피토프 또는 기능적 능력이 측정될 수 있다.
- [0191] "결합 친화도"는 대체적으로 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 간의 비공유 상호작용의 합의 강도를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원(예를 들어, 항체 및 항원) 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화도를 지칭한다. 결합 파트너에 대한 해당 분자의 친화도는 대체적으로 해리 평형 상수(KD 또는 K_D)로 나타낼 수 있다. K_D (몰, M) 값과 결합 친화도 사이에는 역관계가 있으므로, K_D 값(M)이 작을수록, 이의 결합 에피토프에 대한 분자의 결합 친화도는 더 높다.
- [0192] 용어 "보다 높은 친화도" 또는 "고친화도"는 대체적으로 항원에 보다 강하게 결합하고/하거나 보다 빠르게 결합하고/하거나 보다 오래 유지되는 항체를 지칭한다. 일반적으로, 고친화도 항체는 강한 결합 상호작용으로 인해, 원하는 효과를 달성하는 데 있어서 보다 낮은 항원 농도(M)를 필요로 한다. 역으로, 용어 "저친화도" 및 "보다 낮은 친화도"는 다른 결합 분자(예를 들어, 항체)와 비교했을 때, 분자와 그의 결합 파트너 사이의 상호작용을

형성하는 능력의 감소와 같은, 보다 약한 결합을 반영하는 데 사용되는 용어이다. 따라서, 저친화도 결합 분자는 다른 결합 분자와 비교했을 때 더 큰 K_D 값을 갖고/갖거나 항원에 늦게 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있을 것이다.

- [0193] 용어 " k_d "(초^{-1} 또는 $1/\text{초}$)는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도 상수, 또는 항체, Ig, 항체-결합 단편, 또는 분자 상호작용의 해리 속도 상수를 지칭한다. 이 값은 또한 $k\text{-off}$ 값으로도 지칭된다.
- [0194] 용어 " k_a "($M^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ 또는 $1/M$)는 특정 항체-항원 상호작용의 결합 속도 상수, Ig, 항체-결합 단편, 또는 분자 상호작용의 결합 속도 상수를 지칭한다.
- [0195] 용어 " KD " 또는 " K_D "(M)는 특정 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수, 또는 항체, Ig, 항체-결합 단편, 또는 분자 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭한다. 평형 해리 상수는 k_a 를 k_d 로 나누어서 구한다.
- [0196] 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에서 공지되어 있으며, 이들 중 어느 것도 본 개시의 목적을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항원에 대한 항체의 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들어, BIACORE™ 또는 용액 친화도 ELISA에 의해 측정될 수 있다.
- [0197] 일부 구현예에서, 관심 있는 막관통 단백질에 대한 항체의 결합은 막관통 단백질이 발현되는 세포 내에서 (시험관 내, 생체 외 또는 생체 내) 기능적 활성을 부여하거나, 관심 막관 단백질과 항체의 결합은 관심 막관통 단백질의 내인성 리간드의 존재 또는 부재 하에서 관심 막관통 단백질의 정상적인 기능적 활성을 조절한다.
- [0198] 특정 구현예에서, 관심 막관통 단백질에 대한 항체는 막관통 단백질 기능의 길항제이다. 길항제 항체는 항원의 활성 부위(즉, 관심 막관통 단백질)에 대해 유도되고 막관통 단백질 또는 막관통 단백질 자체에 대한 천연 리간드의 활성을 억제할 수 있는 항체를 의미한다. 예를 들어, 항원에 대한 항체의 결합은 관심 막관통 단백질의 내인성 기능을 감소시키거나 억제할 것이다. 비제한적인 일례에서, 길항제 항체는 관심 막관통 단백질에 결합할 수 있고, 막관통 단백질, 수용체 활성화 등에 대한 리간드 결합을 방해함으로써 막관통 단백질 기능을 조절할 수 있다.
- [0199] 또 다른 구현예에서, 관심 막관통 단백질에 대한 항체는 막관통 단백질 작용제이다. 작용제 항체는, 천연 리간드 자체의 부재 하에 관심 막관통 단백질(즉, 항원)을 활성화시킬 수 있는 항체를 의미하며, 여기에서 작용제 항체는 관심 막관통 단백질의 기능적 활성을 유도할 수 있다. 예를 들어, 항원에 대한 항체의 결합은 관심 막관통 단백질의 내인성 기능을 유도하거나 증가시킬 수 있다. 비제한적인 일례에서, 작용제 항체는 관심 막관통 단백질에 결합할 수 있고, 예를 들어 단백질의 형태 변경에 의해 단백질 또는 수용체를 활성화함으로써 막관통 단백질 기능을 조절할 수 있다.
- [0200] 항체 결합 및 막관통 단백질 기능을 측정하기 위한 검정은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 막관통 단백질 내재화, 형태 변화, 인산화, 리간드 결합 등을 측정하기 위한 검정은 당업계에 공지되어 있다.
- [0201] 본 명세서는 다음의 실시예들에 의해 추가로 예시되며, 이들 실시예는 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 모든 인용된 참조 문헌(문헌 참조, 발행된 특허 및 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 공개된 특허 출원을 포함함)의 내용은 그 전체가 본원에 참조로서 명백하게 포함된다.
- [0202] 실시예
- [0203] 실시예 1: 항체 생성 세포의 생성 및 수집.
- [0204] 표 1에 나타난 바와 같이, 비교를 위해, 여러 면역화 캠페인을 개시하여 마우스에서의 면역 반응을 생성하고 관심 항원에 대한 항체를 생성하는 세포(항체 생성 세포)를 생성하였다. 그런 다음, 본원에 기술된 방법에 따라 항체 생성 세포를 수집하였다.
- [0205] 대체적으로, 마우스는 다음과 같은 면역원의 주사에 의해 면역화되었다: 예컨대, 예를 들어, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 암호화하는 DNA, 정제된 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부, 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체, 관심 막관통 단백질 또는 관심 막관통 단백질을 암호화하는 DNA를 발현하는 케이블을 함유하는 바이러스-유사 입자(VLP), 또는 이들의 조합. 일부 경우, 면역원은 인간 막관통 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA였다. 다른 경우, 관심 키메라 막관통 단백질, 절단된 형태의 막관통 단백질, 변형된 관심 막관통 단백질 또는 이를 암호화하는 DNA로 마우스를 면역화하였다.

- [0206] 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 막관통 단백질을 다음과 같이 생성하였다. 대체적으로, 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 변형시켜 막관통 단백질의 카르복시 말단에 부착된 FLAG-태그 및 히스티딘-태그(10x-His 태그)를 포함시켰다. 변형된 뉴클레오티드 서열은 Sf9 또는 Expi293 세포(Thermo Fisher Scientific)에서 발현되었다. 그런 다음, N-도데실-β-D-말토시드(DDM) 세제를 사용해 세포를 용해시키고, 변형된 막관통 단백질을 함유하는 세제 가용성 분획을 얻기 위해 이를 원심분리하였다. 그런 다음, 변형된 단백질을, 변형된 막관통 단백질에 결합된 항-FLAG 친화도 비드를 이용한 친화도 정제를 사용하여 세제 가용성 분획으로부터 분리하였다. 그런 다음, 친화도 비드 및 단백질을 세척하고 결합된 막관통 단백질을 용리하고 수집하였다. SDS-PAGE 겔 전기영동 및 웨스턴 블롯팅을 사용하여 정제된 막관통 단백질의 단리를 확인하였다.
- [0207] 정제된 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 형성하였다. 정제된 막관통 단백질을 DDM 및 콜레스테릴 헤미숙신네이트 트리스 염(CHS)으로 이루어진 세제 혼합물에 포함시켰다. 이러한 막관통 단백질 및 세제 혼합물을 1 대 130의 막 스캐폴드 단백질 대 변형된 MSP1E3D1 막 스캐폴드 단백질을 함유하는 지질 혼합물로 합쳤으며, 이는, 비오틀화를 위해 카르복시 말단에 Bir-A 태그를 포함하고, 나트륨 콜레이트 완충액에 용해된 포스포티딜콜린(1-팔미토실-2-올레오일-글리세로-3-포스포콜린) 지질을 포함하여, 막관통 단백질, 세제, 막 스캐폴드 단백질, 지질 및 1 대 20의 비율로 정제된 막 스캐폴드 단백질 대 막 스캐폴드 단백질을 포함하는 완충액으로 이루어진 최종 혼합물을 생성한다. 그런 다음, 관심 단일 막관통 단백질을 통합하는 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 조립을 용이하게 하기 위해 비드를 사용하여 최종 혼합물로부터 세제를 추출하였다. 그런 다음, 추가 사용을 위한 관심 막관통 단백질을 혼입시킨 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 수득하기 위해, 관심 막관통 단백질을 혼입시킨 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를, 10x-His 태그 친화도 정제 및/또는 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 관심 막관통 단백질을 포함하지 않는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로부터 분리하였다.
- [0208] 면역화되는 마우스는 다양하였다. 특정 코호트에서, 관심 막관통 단백질이 내인성 유전자로부터 발현되지 않도록 마우스를 유전적으로 조작하였다. 다른 코호트에서, 마우스는 야생형 마우스였으며, 관심 막관통 단백질의 마우스 상동체를 발현하였다. 일부 코호트에서, 마우스는, 이들 모두의 전체 내용이 참조로서 본원에 통합되는, 미국 특허 제8,502,018호, 제8,642,835호, 제8,697,940호, 제8,791,323호, 제9,226,484호, 및 W02019/113065에 제시된 바와 같이 유전적으로 조작되었다. 일부 코호트에서, 예를 들어, 이들 각각의 전체 내용이 참조로서 본원에 통합되는, 미국 특허 제8,502,018호 및/또는 제8,642,835호에 기술된 바와 같이, 면역화된 유전적으로 조작된 마우스는 VELOCIMMUNE[®] 마우스(Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY)였다. 대체적으로, 면역화에 사용된 VELOCIMMUNE[®] 마우스는 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하며, 또한 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자가 결여될 수 있다. 특정 코호트에서, 인간화 IgH 유전자좌 및/또는 인간화 Igκ 유전자좌를 포함하는 VELOCIMMUNE[®] 마우스를 면역화하였다. 일부 코호트에서, 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자가 결여된, 인간 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 람다 경쇄(Igλ) 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전적으로 조작된 마우스에게 면역원을 주입하였다.
- [0209] 항체 면역 반응은 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 발현하도록 조작된 세포를 사용하는 세포 결합 분석으로 모니터링하였다. 일단 면역화된 마우스에서 원하는 면역 반응이 식별되면, 이들의 비장을 수확하였다. 비장 세포를 수득하고 적혈구 세포를 용해에 의해 제거하였다.
- [0210] 하이브리도마가 형성되고 사용되는 경우, 비장세포를 수확하고 마우스 골수종 세포와 융합시켜 이들의 생존력을 보존하고 하이브리도마 세포주를 형성하였다. 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고 선별하여 관심 막관통 단백질에 대한 항체를 생성하는 세포주를 식별하였다.
- [0211] 항체 생성 세포 또한 항원-양성 B 세포로 분리되었다. 마우스를 면역화시킨 후, 비장을 수확하였다. 비장세포를 수득하고 적혈구 세포를 용해에 의해 제거하였다. 그런 다음, 비장세포를 IgG와 같은 B 세포 표면 마커에 특이적인 형광색소 표지된 항체로 염색하여 B 세포를 식별하였다.
- [0212] 이에 이어서, 대체적으로, 항체 생성 B 세포의 집단은 B 세포를 공지된 분류 세제 중 하나, 예컨대 정제된 막관통 단백질 또는 이의 일부, 관심 키메라 막관통 단백질, 절단된 관심 막관통 단백질, VLP 또는 엑소좀의 관심 막관통 단백질, 또는 관심 막관통 단백질 또는 이의 일부를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 접촉시킴으로써 식별되고, 관심 막관통 단백질이 B 세포의 표면 상에 존재하는 항체에 결합하는 것을 가능하게 한다. 그런 다음, FACS를 사용하여 결합된 B 세포를 수집하여 관심 막관통 단백질에 항체를 발현하는 항체 생성

B 세포의 집단을 획득하였다. 복합체를 갖지 않는 샘플(대조군)에서, FACS를 통해 펩티드 또는 바이러스 유사 입자(VLP)로 분류를 수행하여 B 세포의 이중 집단으로부터 항체 생성 B 세포를 획득하였다. 복합체를 갖는 샘플에서, FACS를 통해 형광 표지된 복합체로 분류를 수행하여 항체 생성 B 세포를 획득하였다. 여기에서, B 세포를, 관심 막관통 단백질을 함유하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거하였다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거하였다. 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 세포 집단을 식별하기 위해 FACS에 의해 B 세포 샘플의 PE 형광을 분석하였다.

[0213] 실시예 2. 항체 생성 세포의 집단으로부터의 항체 생성

[0214] 비교를 위해, 종래의 하이브리도마 기법 또는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 포함하거나 포함하지 않는 세포 분류를 사용하여 스크리닝을 위해 항체를 단리하였다. 항체 생성 B 세포의 집단으로부터의 단일 세포를 384-웰 플레이트 상의 개별 웰에서 단리하였다. 이러한 단리된 항체 생성 B 세포로부터의 항체 유전자의 RT-PCR을, 그 전체 내용이 본원에 참조로서 통합되는, Wang 및 Stollar *Journal of Immunology Methods* (2000) 244: 217-225에 기술된 방법에 따라 수행하였다. 간략하게, 각각의 단일 항체 생성 B 세포에 대한 cDNA를 역전사효소(RT) 반응(SuperscriptTM III, Invitrogen)을 통해 합성하였다. 그런 다음, 각각의 생성된 RT 생성물을 분할하고 2개의 384-웰 플레이트 상의 2개의 상응하는 웰로 옮겼다. 생성된 RT 산물의 한 세트를 인간 IgG 중쇄 가변 영역 리더 서열에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 및 마우스 중쇄 불변 영역에 특이적인 3' 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 먼저 증폭시켜 앰플리콘을 형성하였다. 그런 다음, 인간 IgG 중쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 1에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 세트 및 인간 IgG 중쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 4에 특이적인 3' 퇴화 프라이머 세트를 사용하여 PCR에 의해 앰플리콘을 다시 증폭시켰다. 생성된 RT 산물의 다른 세트를 인간 카파 또는 람다 경쇄 가변 영역 리더 서열에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 및 마우스 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역에 특이적인 3' 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 먼저 증폭시켜 앰플리콘을 형성하였다. 그런 다음, 인간 카파 또는 람다 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 1에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 세트 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 4에 특이적인 3' 퇴화 프라이머 세트를 사용하여 PCR에 의해 앰플리콘을 다시 증폭시켰다. 중쇄 및 경쇄 PCR 산물을 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄 불변 영역을 각각 함유하는 항체 벡터 내에 클로닝하였다. 재조합 인간 IgG1 항체를 CHO 세포의 일시적 형질감염으로 생산하였다.

[0215] 항체 생성 세포로부터 획득된 항체의 일차 스크린을 세포 결합에 대해 시험하였다. 관심 막관통 단백질과 각각의 항체 간의 결합의 해리 상수를 BiacoreTM T200(GE Healthcare) 상에서 측정하였다. 다양한 조건 하에서의 여러 캠페인의 결과는 관심 막관통 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용하는 세포 분류가 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 식별하는 데 가장 성공적이었음을 나타냈다. 표 1 참조.

[표 1]

관심 막관통 단백질(항원)	플랫폼	항원 제시 전략	면역원	마우스 계통	항원에 결합하는 항체의 총 #	항원에 결합하는 항체의 %
GPCR3	세포 분류	항원을 갖는 복합체	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	118	20.0
GPCR3	하이브리도마	NA	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	156	3.5
GPCR3	세포 분류	항원을 갖는 복합체	변형된 DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	63	20.6
GPCR3	하이브리도마	NA	변형된 DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	252	6.5
GPCR4	세포 분류	항원을 갖는 복합체	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	313	80.5
GPCR4	하이브리도마	NA	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	89	5.6
GPCR4	세포 분류	항원을 갖는 복합체	변형된 DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	213	48.4
GPCR4	하이브리도마	NA	변형된 DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	2002	36.1
GPCR5	세포 분류	항원을 갖는 복합체	DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	57	11.6
GPCR5	하이브리도마	NA	DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	315	7.0

[0216]

GPCR5	세포 분류	항원을 갖는 복합체	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	124	70.5
GPCR5	하이브리도마	NA	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	299	15.4
이온 채널 2	세포 분류	항원을 갖는 복합체	단백질	유전적으로 변형된 마우스	70	39.8
이온 채널 2	하이브리도마	NA	단백질	유전적으로 변형된 마우스	308	4.3
이온 채널 2	세포 분류	항원을 갖는 복합체	단백질	유전적으로 변형된 마우스	92	69.7
이온 채널 2	하이브리도마	NA	단백질	유전적으로 변형된 마우스	43	2.4
GPCR6	세포 분류	항원을 갖는 복합체	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	53	18.9
GPCR6	하이브리도마	NA	단백질	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	8	1.0
GPCR6	세포 분류	항원을 갖는 복합체	변형된 DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	22	9.6
GPCR6	하이브리도마	NA	변형된 DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	10	0.6
GPCR1	세포 분류	항원을 갖는 복합체	DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	42	11.9
GPCR1	하이브리도마	NA	DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	82	4.4

[0217]

이온 채널 1	세포 분류	항원을 갖는 복합체	DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	156	14.8
이온 채널 1	하이브리도마	NA	DNA	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	19	0.3
테트라스파닌 1	세포 분류	항원을 갖는 복합체	DNA, 단백질, 항원을 갖는 복합체	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	81	29
테트라스파닌 1	하이브리도마	NA	DNA, 단백질, 항원을 갖는 복합체	항원이 없는 유전적으로 변형된 마우스	162	8

[0218]

[0219]

[0220]

실시예 3. 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 포함되는 관심 막관통 단백질과 항체 간의 결합 검출

본 실시예에서, 예시적인 인간 막관통 단백질(GPCR1)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 변형시켜 GPCR1 단백질을 서열의 카르복시 말단에 FLAG-태그 및 His-태그(10x-His 태그)를 부착하고, 변형된 뉴클레오타이드 서열을 세포에서 발현시키고 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하였다. 그런 다음, 예시적인 관심 GPCR1 막관통 단백질을 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내에 혼입시키고, 관심 GPCR1 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 실시예 1에 기술된 바와 같이 정제하였다.

[0221]

관심 GPCR1 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 결합하는 공지된 항-GPCR1 항체의 능력은 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이 옥텟 검정에 의해 확인되었다. 구체적으로, GPCR1 막관통 단백질을 포함하는 38 $\mu\text{g/mL}$ 의 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체, 또는 GPCR1이 없는 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 대조군 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(빈 복합체)를 고정화된 항-GPCR1 항체(양성 대조군 AB) 또는 이소형 대조군 항체(음성 대조군 AB)가 있는 플레이트에 제공하였다.

[0222]

양성 대조군(항-GPCR1) 항체와 GPCR1 막관통 단백질을 포함하는 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 사이(0.6 nm)에서 결합이 검출되었고, 항-GPCR1 항체와 빈 복합체 사이(-0.05 nm), 음성 대조군 항체와 GPCR1 막관통 단백질을 포함하는 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 사이(-0.06 nm), 또는 음성 대조군 항체와 빈 복합체 사이(-0.03 nm) 사이에서는 결합이 검출되지 않았다. 도 1a 참조. 복합체 자체가 아닌, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질이 관심 막관통 단백질에 대한 항체에 결합한다는 것을 확인함.

[0223]

관심 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체가 대조군 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 비오틴화 대조군 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(빈 복합체)로부터 검출될 수 있고 분리될 수 있다는 것을 확인하기 위해, GPCR1 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(GPCR1을 갖는 복합체) 또는 대조군 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 비오틴화 대조군 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(빈 복합체)를, 복합체 중 막 스캐폴드 단백질에 부착된 Bir-A 태그에 스트렙타비딘이 결합할 수 있도록 스트렙타비딘이 연결된 플레이트에 제공하였다. 그런 다음, 플레이트를 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-GPCR1 항체(양성 대조군 AB) 또는 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 이소형 대조군 항체(음성 대조군 AB)와 함께 인큐베이션하였다. 도 1b 참조.

[0224]

먼저, 도 1b는 관심 GPCR1 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 및 비오틴화 대조군 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체가 복합체 내의 막 스캐폴드 단백질 각각에 부착된 Bir-A 태그에 대한 스트렙타비딘 결합에 의해 검출되고 분리될 수 있음을 입증한다. 이는, 연결된 스트렙타비딘과 GPCR1 막관통 단백질(3.0 nm) 및 비오틴화 빈 복합체(0.69 nm)를 포함하는 비오틴화 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 둘 모두 간의 결합을 검출함으로써 도시된다.

[0225]

양성 대조군(항-GPCR1) 항체와 스트렙타비딘 플레이트에 연결된 GPCR1 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 사이(0.69 nm)에서는 결합이 검출되었으나, 항-GPCR1 항체와 비오틴화 빈 복합체 사이(-0.04 nm), 음성 대조군 항체와 막관통 단백질을 포함하는 비오틴화 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 사이(-0.05 nm), 또는 음성 대조군 항체와 빈 비오틴화 복합체 사이

(-0.06 nm) 사이에서는 결합이 검출되지 않았다. 도 1b를 참조하면, 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 스트랩타비딘 플레이트에 연결되어 항-GPCR1 항체에 특이적으로 결합하지만, 대조군 항체에는 결합하지 않음을 입증한다.

[0226] 실시예 4. 예시적인 관심 막관통 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 수득.

[0227] 제1, 제2 및 제3 예시적인 인간 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 변형시켜 막관통 단백질의 카르복시 말단에 FLAG 태그 및 His 태그(10x-His 태그)를 부착하고, 변형된 뉴클레오티드 서열을 세포에서 발현시키고 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하였다. 제1, 제2 또는 제3 예시적인 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 Bir-A 표지된 막 스캐폴드 단백질을 사용하여 생성하고, 실시예 1 및 3에 기술된 바와 같이 정제하였다.

[0228] 비장세포는 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자가 결여된 인간화 IgH 유전자와 및/또는 인간화 IgK 유전자를 포함하는 유전적으로 변형된 VELOCIMMUNE[®] 마우스로부터 수확하였다. 면역화되지 않은 대조군 마우스 또는 다음의 주사에 의해 면역화된 유전적으로 변형된 마우스로부터 세포를 단리하였다: 제1 관심 막관통 단백질(GPCR1), 제2 관심 막관통 단백질(GPCR2), 또는 제3 관심 막관통 단백질(GPCR3)을 암호화하는 DNA. 여기에서, 각각의 마우스를 유전적으로 변형시켰다. 각각의 마우스로부터 수집된 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, 막관통 단백질을 내부에 매립하여 함유하는 0.2 mg/ml 내지 5.0 mg/mL의 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거하였다. 이어서, 세포를 PE-스트랩타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트랩타비딘 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트랩타비딘을 제거하였다. 대조군 마우스 및 면역화된 마우스로부터의 세포 집단의 PE 형광을 FACS에 의해 검출하여, 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 B-세포의 집단을 식별하였다. 도 2a 내지 도 2f 참조.

[0229] 대조군 세포 1백만 개 중 단지 2개의 B 세포만이 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 GPCR1 막관통 단백질에 비특이적으로 결합하였으며(도 2a, 직사각형), 이는 관심 막관통 단백질을 함유하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체가 막관통 단백질 항원에 대한 항체를 생성하는 세포를 검출하고 단리하기 위한 매우 특이적인 분류 제제임을 입증한다. 이에 비해, 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 제1 관심 막관통 단백질에 결합된 항체 생성 B 세포 100만 개 중 11개가 본 방법을 사용하여 검출되었다(도 2b, 직사각형).

[0230] 도 2c에 도시된 바와 같이, 대조군 마우스로부터 수득된 100만개의 비장세포 중 2개의 B 세포가 제2 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 대한 비특이적 결합제로서 검출되었다(직사각형). 대조적으로, 도 2d에 도시된 바와 같이, 예시적인 제2 관심 GPCR 막관통 단백질(GPCR2)에 특이적인 항체를 발현하는 100만 개의 B 세포 중 78개가 본 방법을 사용하여 검출되었다(직사각형).

[0231] 또 다른 실시예에서, 제3 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 비특이적으로 결합된 11개의 B 세포만이(직사각형) 대조군 마우스로부터의 수확된 100만개의 비장세포로부터 수득되었다. 도 2e 참조. 한편, 면역화된 유전적으로 변형된 마우스로부터 수확한 비장세포로부터, 100만 개의 B 세포 중 65개가 예시적인 제3 관심 GPCR 막관통 단백질(GPCR3)에 특이적인 일차-항체를 발현하는 것으로 검출되고, 수득되었다.

[0232] 실시예 5. 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체의 사용을 포함하는 분류 방법에 대한 공지된 세포 분류 전략의 비교.

[0233] 당업계에서 공지된 항체 생성 세포를 수득하기 위한 방법의 유용성을 본원에 개시된 본 발명의 방법과 비교하기 위해, 예시적인 관심 인간 막관통 단백질을 암호화하는 DNA를 실시예 1에 따라 정제하였다. 관심 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 마우스 코호트를 면역화하기 위해, 정제된 인간 DNA를, 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자를 발현하거나 발현하지 않는 유전자 조작된 VELOCIMMUNE[®] 마우스에 주입하였다. 관심 막관통 단백질로 면역화된 코호트의 경우, 예시적인 제1 인간 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 세포에서 발현시키고, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하고, 주사에 의해 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자를 발현하거나 발현하지 않는 유전자 조작된 VELOCIMMUNE[®] 마우스에 직접 투여하였다.

[0234] 특정 코호트에서, 마우스를 VLP로 면역화시켰다. 관심 인간 막관통 단백질을 암호화하는 DNA를 함유하는 플라스미드를 생성하고 바이러스 세포에서 발현시켰다. 지질입자를 바이러스 세포에서 자가 조립하고, 페길화(PEG) 침전에 의해 발아가 발생되면 이를 바이러스 세포로부터 분리하고 정제한 다음, 동형접합성 원심분리 및 바이러스 세포 배지의 분획화를 수행하였다. 면역화를 위해 공지된 기술을 사용하여 정제된 VLP를 마우스에 주입하였다.

[0235] 비교를 위해, 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자를 갖거나(VI) 갖지 않는(VI-KO), 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전적으로 조작된 VELOCIMUNE[®] 마우스를, 표 2에 제시된 바와 같이, 주사로 면역화하였다.

[0236] 다음으로, 표 2에 기술된 분류 전략을 사용하여 항체 생성 B 세포의 집단을 분리하였다. 특히, 면역화된 유전적으로 변형된 마우스로부터 비장세포를 수집하였다. 표 2에 기술된 바와 같이, 수집된 비장 세포는 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색되었고, 이와 동시에, 비장 세포는 0.2 mg/ml 내지 5.0 mg/mL의 바이오티닐화 막관통 단백질 관심 분류제(단백질), 또는 관심 막관통 단백질을 포함하는 0.2 mg/ml 내지 5.0 mg/mL의 바이오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(TMB를 갖는 복합체), 또는 2.0 mg/mL 내지 20 mg/mL의 비오틴 표지 VLP 분류 제제(VLP)와 함께 인큐베이션되었다. 그런 다음 세포를 세척하여 미결합 분류 제제를 제거하였다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 스트렙타비딘이 각각의 비오틴(Bir-A) 표지된 분류 제제에 결합할 수 있게 하였다. 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거하고, B 세포 샘플의 PE 형광을 FACS로 분석하여, 분류 제제에 의해 제시된 관심 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 이질적인 세포 집단 중 B 세포를 식별하였다.

[0237] 그런 다음, 관심 막관통 단백질에 결합된 B-세포를 생성하는 단일 항체를 실시예 2에 제시된 바와 같이 384-웰 플레이트 상의 개별 웰에 분리하였다. B 세포로부터의 항체 유전자의 RT-PCR을 Wang 및 Stollar *Journal of Immunology Methods* (2000) 244: 217-225에 기술된 방법에 따라 수행하였다. 간략하게, 각각의 단일 B 세포에 대한 cDNA를 역전사효소(RT) 반응(Superscript[™] III, Invitrogen)을 통해 합성하였다. 그런 다음, 각각의 생성된 RT 생성물을 분할하고 2개의 384-웰 플레이트 상의 2개의 상응하는 웰로 옮겼다. 생성된 RT 산물의 한 세트를 인간 IgG 중쇄 가변 영역 리더 서열에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 및 마우스 중쇄 불변 영역에 특이적인 3' 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 먼저 증폭시켜 앰플리콘을 형성하였다. 그런 다음, 인간 IgG 중쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 1에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 세트 및 인간 IgG 중쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 4에 특이적인 3' 퇴화 프라이머 세트를 사용하여 PCR에 의해 앰플리콘을 다시 증폭시켰다. 생성된 RT 산물의 다른 세트를 인간 카파 또는 람다 경쇄 가변 영역 리더 서열에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 및 마우스 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역에 특이적인 3' 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 먼저 증폭시켜 앰플리콘을 형성하였다. 그런 다음, 인간 카파 또는 람다 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 1에 특이적인 5' 퇴화 프라이머 세트 및 인간 카파 또는 람다 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 4에 특이적인 3' 퇴화 프라이머 세트를 사용하여 PCR에 의해 앰플리콘을 다시 증폭시켰다. 중쇄 및 경쇄 PCR 산물을 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄 불변 영역을 각각 함유하는 항체 벡터 내에 클로닝하였다. 제조한 인간 IgG1 항체를 CHO K1 세포의 일시적 형질감염으로 생성하고, 이를 관심 막관통 단백질에 결합하는 능력에 대해 분석하였다.

[표 2]

막관통 단백질 (TMB)	마우스 계통	# 마우스	면역원	분류 제제	TMB에 결합하는 항체의 총 #
GPCR1	VI	9	VLP 및 DNA	VLP	없음
GPCR1	VI	9	단백질	단백질	176
GPCR1	VI-KO	3	DNA	TMB를 갖는 복합체	42
이온 채널 2	VI-KO	15	단백질	단백질	1
이온 채널 2	VI-KO	14	단백질	단백질	1
이온 채널 2	VI-KO	4	단백질	TMB를 갖는 복합체	236
이온 채널 2	VI-KO	4	단백질	TMB를 갖는 복합체	167

[0238]

- [0239] 표 2는, 사용된 면역원과는 독립적으로, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 이용하여 막관통 단백질을 제시하는 항체 생성 세포를 수득하는 방법이 관심 막관통에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 항체를 더 많이 검출한다는 것을 입증한다.
- [0240] 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자를 발현하지 않고 막관통 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 분류된 유전적으로 변형된 마우스(VI-KO)로부터 수득된 내용과 비교했을 때, 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자를 발현하는 유전자 변형 마우스(VI)로부터 수득된 정제된 막관통 단백질 분류 체제로 분류된 세포는 관심 막관통 단백질에 결합하는 더 많은 항체를 생성하였다. 그러나, 분석될 때, VI 마우스로부터 생성된 항체는 기능적 결합체가 아니었다. 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질을 사용하여 막관통 단백질을 제시하는 항체 생성 세포를 수득하는 방법은 막관통 단백질의 기능적으로 관련된 에피토프에 결합하는 항체를 수득한다는 것을 입증한다.
- [0241] 실시예 6. 예시적인 제2 관심 GPCR 막관통 단백질에 결합하는 항체의 생성 및 단리.
- [0242] GPCR2 단백질의 카르복시 말단에 부착된 FLAG 태그 및 10x-His 태그를 포함시키도록, 예시적인 제2 관심 GPCR 막관통 단백질(GPCR2)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 실시예 1에 제시된 바와 같이 변형시켰다. 또한, 다음의 안정화 돌연변이를 막관통 단백질 내에 도입하였다: 아미노산 치환: A2a-T4L-델타, 그 전체 내용이 본원에 참조로서 명시적으로 포함되는, Veli-Pekka Jaakola 등, *Science*, 2008, Nov 21; 322(5905) pp. 1211-1217에 기술된 바와 같음. 변형된 GPCR2 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 클로닝하고 Sf9 세포에서 발현시켰다. 그런 다음, 세포를 용해시키고, 변형된 GPCR2 막관통 단백질을 실시예 1에서와 같이 수득하고 정제하였다.
- [0243] 다음으로, 변형된 인간 GPCR2 막관통 단백질을 함유하는 디스크 형태 지질 이중막 스캐폴드 단백질 복합체를 실시예 1 및 본원에서 제시된 바와 같이 생성하였다.
- [0244] 표 3에 나타난 바와 같이, 유전적으로 변형된 GPCR2 녹아웃 마우스, 즉, 관심 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자가 결여된 인간화 IgH 유전자좌 및 인간화 Igκ 유전자좌를 포함하는 VELOCIMMUNE[®] 마우스를, 안정화 돌연변이를 포함하는 변형된 인간 GPCR2 단백질을 암호화하는 외인성 DNA(DNA 면역원)의 주입 또는 안정화 돌연변이를 포함하는 변형된 인간 GPCR2 단백질(단백질 면역원)의 주입으로 면역화하였다.
- [0245] 각각의 마우스로부터 비장세포를 수집하고, 이를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, 막관통 단백질을 내부에 매립하여 함유하는 0.2 mg/ml 내지 5.0 mg/mL의 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거하였다. 이어서, 세포를 PE-스트렙트아비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙트아비딘 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거하였다. 대조군 마우스 및 면역화된 마우스로부터의 세포 집단의 PE 형광을 FACS에 의해 검출하여, 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 예시적인 제2 관심 GPCR 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 B-세포의 집단을 식별하였다.
- [0246] 그런 다음, 관심 막관통 단백질에 결합된 B 세포를 생성하는 단일 항체를 384 웰 플레이트 상의 개별 웰에 단리하고, DNA를 암호화하는 항체를 각 세포로부터 단리하고, 추가 분석을 위해 실시예 2에 제시된 바와 같이 항체를 생성하였다.
- [0247] 도 3은 항체 생성 세포를 수득하기 위한 본 발명의 방법이, 사용된 면역원의 유형과 무관하게, 관심 막관통에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 검출한다는 것을 입증한다. 특히, 개시된 방법에 따른 관심 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 사용하여, 관심 막관통 단백질(DNA) 또는 정제된 관심 막관통 단백질(단백질)을 암호화하는 DNA로 면역화된 유전적으로 조작된 마우스로부터 항체 생성 세포를 수득하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 스크리닝을 위해 항체를 생성하였다. 표준 형질감염 기술을 사용하여 관심 전장 막관통 단백질 항원을 293개의 세포에서 발현시키고(TMB 과발현), 293개의 항원 발현 세포를 예시적인 관심 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 형질감염되지 않은 293개의 대조군 세포(모세포)와 비교하였다. 그런 다음, 세포 표면 상의 항원과 예시적인 관심 막관통 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 간의 결합을 가능하게 하도록 세포를 항체와 함께 배양하였다. 5개의 상이한 면역화된 마우스로부터 수득된 항체 생성 세포로부터 생성된 세포 결합 항체를 식별하기 위해, MSD(Meso scale diagnostics) 면역분석을 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 마우스 1, 3, 4 및 5를 정제된 인간 GPCR2 막관통 단백질로 면역화하고, 마우스 2는 인간 GPCR2 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화하였다. 파선 위의 항체는 관심 막관통 단백질에 결합할 수 있었다. 대조적으로, 양의 대조군 항체(사각형) 및 음의 대조군 항체(삼각형)와 비교하여 나타난 바

와 같이, 파선 아래의 항체는 약한 결합제이거나 관심 막관통 단백질에 결합할 수 없었다.

[0248] 해당 결과는, 마우스가 관심 막관통 단백질 또는 관심 막관통 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화되었는지의 여부와 상관없이, 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 항체 생성 세포가 관심 막관통 단백질에 결합할 수 있는 충분한 양의 항체를 생성하였다는 것을 입증한다.

[0249] 표 3에 나타난 바와 같이, 막관통 단백질을 제시하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(TMB를 갖는 복합체)를 사용하여 각각의 면역화된 마우스로부터 B 세포를 수득하고, 수집된 B 세포의 하위 집합으로부터 항체를 생성하고, 면역분석으로 관심 항원에 결합하는 능력에 대해 항체를 시험하였다. 관심 막관통 단백질(항원)에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포는, 마우스가 막관통 단백질을 암호화하는 DNA 또는 정제된 막관통 단백질을 사용하여 면역화되었는지의 여부에 관계없이, 본 발명의 방법을 사용하여 풍부하게 수득되었다.

[표 3]

마우스	면역원	분류 제제	# 항체 생성 세포	# 시험된 항체	# 항원 결합 항체	% 항원에 결합하는 항체
1	단백질	TMB 를 갖는 복합체	723	141	59	42
2	DNA	TMB 를 갖는 복합체	561	140	88	63
3	단백질	TMB 를 갖는 복합체	880	141	98	70
4	단백질	TMB 를 갖는 복합체	1040	141	99	70
5	단백질	TMB 를 갖는 복합체	640	141	102	72
합계			3844	704	446	63

[0250]

[0251] 실시예 7. 관심 막관통 단백질의 특정 도메인에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 수득.

[0252] 본 발명의 방법은 또한 관심 막관통 단백질의 특정 도메인에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 데 사용되었다.

[0253] 제1 예에서, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제되고 단리된, 막관통 단백질의 카르복시 말단에 FLAG-태그 및 His-태그(10x-His 태그)를 부착하기 위해 전장 인간 막관통 단백질(전장 TMB)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 변형시켰다. 또한, N-말단의 세포외 부분이 누락된 절단된 인간 막관통 단백질(절단된 TMB)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 변형시켜 막관통 단백질의 카르복시-말단에 FLAG-태그 및 His-태그(10x-His 태그)를 부착하고, 변형된 뉴클레오티드 서열을 세포 내에서 발현시키고 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하였다. 절단된 TMB를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 Bir-A 표지된 막 스캐폴드 단백질을 사용하여 생성하고, 실시예 1 및 3에 기술된 바와 같이 정제하였다. 여기에서, 절단된 TMB 단백질은 야생형 인간 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 C-말단 도메인의 각각을 포함하지만, 세포외 N-말단 도메인을 포함하지 않는다. 따라서, 절단된 TMB를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체는 야생형 인간 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인만을 세포에 제시한다.

[0254] 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전적으로 조작된 VELOCIMUNE[®] 마우스를 전장 TMB를 암호화하는 DNA로 면역화하였다. 면역 반응을 모니터링하고, 면역화된 마우스로부터 비장세포를 수확하였다. 각각의 마우스로부터 수집된 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, 내부에 매립된 절단된 TMB를 제시하는 0.2 mg/ml 내지 5.0 mg/mL의 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하여, 절단된 TMB의 세포외 도메인 상의 에피토프와 B 세포 표면 상의 항체 간의 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거하였다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 하였다. 그런 다

음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거하였다. 마우스로부터 수집된 세포 집단의 PE 형광을 FACS로 검출하여 관심 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인에 특이적인 항체를 발현하는 B 세포의 집단을 식별하였다.

[0255] 이어서, 관심 막관통 단백질에 결합된 B 세포를 생성하는 단일 항체를 384 웰 플레이트 상의 개별 웰에 단리하고, DNA를 암호화하는 항체를 각 세포로부터 단리하고, 추가 분석을 위해 실시예 2에 제시된 바와 같이 항체를 생성하였다.

[0256] 도 4에 도시된 바와 같이, 예시적인 관심 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인에 위치한 에피토프에 결합하는 항체를 본 발명의 방법을 사용하여 수득하였다(박스).

[0257] 또 다른 경우, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제되고 단리된, 막관통 단백질의 카르복시 말단에 FLAG 태그 및 His 태그(10x-His 태그)를 부착하기 위해 전장 인간 막관통 단백질(전장 TMB)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 변형시켰다. 또한, 인간 막관통 단백질의 일부(TMB-단편)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 생성하고, TMB-단편 뉴클레오티드 서열을 세포에서 발현시키고, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제한다. 여기에서, TMB-단편 폴리펩티드 TMB는 관심 전장 막관통 단백질의 N-말단 부분에 상응한다.

[0258] 전장 TMB를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 Bir-A 표지된 막 스캐폴드 단백질을 사용하여 생성하고, 실시예 1 및 3에 기술된 바와 같이 정제하였다.

[0259] 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전적으로 변형된 VELOCIMMUNE[®] 마우스를 전장 TMB 또는 정제된 전장 TMB 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화하였다. 면역 반응을 모니터링하고, 면역화된 마우스로부터 비장세포를 수확한다. 각 마우스로부터 수집된 비장세포를 TMB-단편과 함께 인큐베이션하여, 전장 TMB의 N-말단에 위치한 에피토프에 특이적인 세포의 표면 상의 항체와 TMB-단편 간의 결합을 가능하게 하였다. 이 단계는 전장 TMB의 N-말단 도메인의 에피토프에 특이적인 항체를 발현하는 모든 항체 생성 세포가, 내장된 전장 TMB를 함유하는 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 전장 TMB에 결합하는 것을 효과적으로 차단한다. 그런 다음 세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 라벨로 염색하여 비장세포 집단 중의 항체 생성 B 세포를 식별하고, 또한 전장 TMB를 포함하는 0.2 mg/ml 내지 5.0 mg/mL 비오틴화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하여, 전장 TMB의 세포외 루프 도메인 상의 에피토프와 항체 생성 B 세포 표면 상의 항체 간의 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거한다. 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오틴(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트렙타비딘 및 분류물로부터의 TMB-단편에 결합된 세포를 제거한다. 마우스로부터 수집된 세포 집단의 PE 형광을 FACS로 검출하여 관심 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 집단을 식별하였다.

[0260] 이어서, 관심 막관통 단백질에 결합하는 B 세포를 생성하는 단일 항체를 384 웰 플레이트 상의 개별 웰에 단리하고, DNA를 암호화하는 항체를 각 세포로부터 단리하고, 추가 분석을 위해 실시예 2에 제시된 바와 같이 항체를 생성하였다.

[0261] 또 다른 경우, 관심 인간 막관통 단백질의 일부 및 관심 막관통 단백질의 마우스 상동체의 일부로 구성된 관심 키메라 막관통 단백질이 관심 막관통 단백질의 특정 도메인에 위치한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 데 사용된다.

[0262] 여기에서, 키메라 막관통 단백질은 관심 막관통 단백질의 마우스 상동체의 일부에 작동가능하게 연결된 관심 인간 막관통 단백질의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 생성하는 단계, 및 추가로 뉴클레오티드 서열을 변형시켜 키메라 막관통 단백질의 카르복시 말단에 FLAG 태그 및 His 태그(10x-His 태그)를 부착하는 단계에 의해 생성된다. 그런 다음, 실시예 1에 제시된 바와 같이 뉴클레오티드 서열을 정제하고 단리한다. 또한, 키메라 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 세포에서 발현되고, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제되어 표지된 관심 키메라 막관통 단백질(키메라-TMB)을 생성된다. 이러한 경우, 관심 키메라 막관통 단백질은, 막관통 단백질의 마우스 상동체에 상응하는 N-말단과 세포외 루프 도메인, 막관통 도메인, 및 관심 인간 막관통 단백질에 상응하는 세포내 C-말단 도메인을 갖는다.

[0263] 또한, 야생형 인간 막관통 단백질(인간-TMB)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 변형시켜 막관통 단백질의 카르복시 말단에 FLAG 태그 및 His 태그(10x-His 태그)를 부착하고, 이를 정제하고 단리한 다음, 인간 막관통 단백

질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 세포에서 발현시키고, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제한다.

- [0264] 인간-TMB 또는 키메라-TMB를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 Bir-A 표지된 막 스캐폴드 단백질을 사용하여 생성하고, 실시예 1 및 3에 기술된 바와 같이 정제하였다.
- [0265] 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전적으로 변형된 VELOCIMMUNE[®] 마우스를 인간-TMB 또는 정제된 인간-TMB 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화하였다. 면역 반응을 모니터링하고, 면역화된 마우스로부터 비장세포를 수확한다. 각각의 마우스로부터 수집된 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, 키메라-TMB를 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하여, 복합체에 의해 제시된 키메라-TMB의 인간 부분 상의 에피토프와 B 세포 표면 상의 항체 간의 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거한다.
- [0266] 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티닌(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트렙타비딘 및 분류물로부터의 TMB-단편에 결합된 세포를 제거한다. 마우스로부터 수집된 세포 집단의 PE 형광을 FACS로 검출하여 관심 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 집단을 식별하였다.
- [0267] 이러한 면역화 및 분류 전략은 키메라-TMB의 마우스 부분에 위치한 인간-TMB의 에피토프에 특이적인 항체를 발현하는 모든 항체 생성 B 세포를 효과적으로 제거한다.
- [0268] 또 다른 면역화 및 분류 전략에서, 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전적으로 변형된 VELOCIMMUNE[®] 마우스를 키메라-TMB 또는 정제된 키메라-TMB 단백질을 암호화하는 DNA로 면역화하였다. 면역 반응을 모니터링하고, 면역화된 마우스로부터 비장세포를 수확한다. 각각의 마우스로부터 수집된 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, 인간-TMB를 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하여, 복합체에 의해 제시된 인간-TMB의 세포외 부분 상에 위치하는 에피토프와 B 세포 표면 상의 항체 간의 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거한다.
- [0269] 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티닌(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 분류물로부터 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거한다. 마우스로부터 수집된 세포 집단의 PE 형광을 FACS로 검출하여 관심 인간 막관통 단백질의 세포외 루프 도메인에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 집단을 식별하였다.
- [0270] 이러한 특정 면역화 및 분류 전략은 또한 키메라-TMB의 마우스 부분에 위치한 에피토프에 특이적인 항체를 발현하는 모든 항체 생성 B 세포를 효과적으로 제거한다.
- [0271] 이어서, 실시예 2에 제시된 바와 같은 항체의 생성 및 분석을 위해, 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질에 결합하는 단일 항체 생성 B 세포를 384 웰 플레이트 상의 개별 웰에 단리하고, DNA를 암호화하는 항체를 각 세포로부터 단리하였다.
- [0272] 실시예 8. 관심 막관통 단백질에 특이적인 교차 반응성 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 수득.
- [0273] 본 발명의 방법은 또한 예시적인 관심 막관통 단백질의 마우스 및 인간 형태 둘 모두를 인식하는 항체를 생성하는 데 사용되었다.
- [0274] 2개의 상이한 예시적인 인간 막관통 단백질인 인간 TMB1 및 인간 TMB2를 암호화하는 핵산을 변형시켜 FLAG 태그 및 His 태그(10x-His 태그)를 각각의 인간 막관통 단백질 아미노산 서열의 카르복시 말단에 부착시키고, 이를 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하였다. 또한, 2개의 인간 막관통 단백질 각각의 마우스 상동체인 마우스 TMB1 및 마우스 TMB2를 암호화하는 핵산을 변형시켜 FLAG 태그 및 His 태그(10x-His 태그)를 각각의 마우스 막관통 단백질 아미노산 서열의 카르복시 말단에 부착시키고, 변형된 뉴클레오타이드 서열을 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하였다. 다음으로, 인간 TMB1, 인간 TMB2, 마우스 TMB1 및 마우스 TMB2를 각각 암호화하는 핵산을 각각 세포에서 발현시키고, 각 단백질을 실시예 1에 제시된 바와 같이 단리하고 정제하였다. 인간 TMB1 단백질, 인간 TMB2 단백질, 마우스 TMB1 단백질 및 마우스 TMB2 단백질 중 하나를 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단

백질 복합체를 Bir-A 표지 막 스캐폴드 단백질을 사용하여 생성하고, 실시예 1에 기술된 바와 같이 정제하였다.

[0275] 관심 막관통 단백질에 대한 내인성 마우스 상동체를 발현하지 않는, 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전자 조작된 VELOCIMUNE[®] 마우스(즉, 마우스 TMB1 또는 마우스 TMB2)를, 마우스 또는 인간 막관통 단백질을 암호화하는 외인성 DNA의 주입, 또는 표 4에 제시된 인간 TMB1 단백질 및 마우스 TMB2 단백질을 암호화하는 외인성 DNA의 조합의 주입으로 면역화하였다.

[0276] 면역 반응을 모니터링하고, 면역화된 마우스로부터 비장세포를 수확하였다. 각각의 마우스로부터 수집된 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, 특정 인간 TMB 단백질 또는 특정 마우스 TMB 단백질 중 하나를 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(인간 TMB를 갖는 복합체 또는 마우스 TMB를 갖는 복합체)와 함께 인큐베이션하여, 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질과 B 세포 표면 상의 항체 간의 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거하고, PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티닌(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 분류물로부터 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거하였다. 마우스로부터 수집된 세포 집단의 PE 형광을 FACS로 검출하여 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 집단을 식별하였다.

[0277] 이어서, 관심 막관통 단백질에 결합된 B 세포를 생성하는 단일 항체를 384 웰 플레이트 상의 개별 웰에 단리하고, DNA를 암호화하는 항체를 각 세포로부터 단리하고, 추가 분석을 위해 실시예 2에 제시된 바와 같이 항체를 생성하였다.

[0278] 표 4에 나타난 바와 같이, 유전적으로 변형된 마우스를 마우스 TMB1만을 암호화하는 DNA로 면역화하고, 인간 TMB1 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 항체 생성 B 세포를 분류하여, 마우스 TMB1 및 인간 TMB1 단백질에 결합할 수 있는 교차 반응성 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포를 식별하였다.

[0279] 또한, 유전적으로 변형된 마우스를 마우스 TMB1 단백질을 암호화하는 DNA 및 인간 TMB1 단백질을 암호화하는 DNA로 함께 면역화하고, 인간 TMB1 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 또는 마우스 TMB1 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 중 하나로 항체 생성 B 세포를 분류하여, 마우스 TMB1 및 인간 TMB1 단백질에 결합할 수 있는 교차 반응성 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포를 식별하였다.

[0280] 표 4는 또한, 유전적으로 변형된 마우스를 마우스 TMB2 단백질만을 암호화하는 DNA로 면역화하고, 인간 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 항체 생성 B 세포를 분류하거나, 마우스 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 항체 생성 B 세포를 분류하여, 마우스 TMB2 및 인간 TMB2 단백질에 결합할 수 있는 교차 반응성 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포를 식별하는 것을 나타낸다. 유전적으로 변형된 마우스를 인간 TMB2 단백질만을 암호화하는 DNA로 면역화하고, 인간 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 항체 생성 B 세포를 분류하거나, 마우스 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 항체 생성 B 세포를 분류하여, 마우스 TMB1 및 인간 TMB1 단백질에 결합할 수 있는 교차 반응성 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포를 또한 식별하였다.

[표 4]

마우스	면역원	항원 제시 전략	# 항체 생성 세포	# 시험된 항체	# 항원 결합 항체	% 항원에 결합하는 항체
VI-KO	DNA 마우스 TMB1	인간 TMB1 을 갖는 복합체	240	131	15	11
VI-KO	DNA 마우스 TMB1 및 DNA 인간 TMB1	마우스 TMB1 을 갖는 복합체	97	66	3	5
VI-KO	DNA 마우스 TMB1 및 DNA 인간 TMB1	인간 TMB1 을 갖는 복합체	111	66	3	5
VI-KO	DNA 마우스 TMB2	인간 TMB2 를 갖는 복합체	257	146	42	29
VI-KO	DNA 마우스 TMB2	마우스 TMB2 를 갖는 복합체	624	166	4	2
VI-KO	DNA 인간 TMB2	인간 TMB2 를 갖는 복합체	736	213	77	36
VI-KO	DNA 인간 TMB2	마우스 TMB2 를 갖는 복합체	309	125	25	20

[0281]

[0282]

실시예 9. 막관통 단백질을 함유하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화된 마우스로부터의 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 수득.

[0283]

관심 막관통 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체가 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 세포를 수득하기 위한 면역원으로서 사용될 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, 예시적인 인간 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 그의 카르복시 말단에 부착된 FLAG 태그 및 His 태그 (10x-His 태그)를 포함하는 인간 TMB2를 실시예 8에 기술된 바와 같이 생성하고 정제하였다. 변형된 인간 TMB2 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 세포에서 발현시키고, 변형된 TMB2 단백질을 실시예 8에 제시된 바와 같이 단리하고 정제하였다. 인간 TMB2 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 Bir-A 표지된 막 스캐폴드 단백질을 사용하여 생성하고, 실시예 8에 기술된 바와 같이 정제하였다.

[0284]

또한, His 태그를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 변형된 인간 TMB2 단백질에 부착된 FLAG 태그를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 생성하였고, 세포에서 별도로 발현시키고, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하여 FLAG-펩티드 및 HIS-펩티드를 각각 수득하였다. 다음으로, 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 포함된 막 스캐폴드 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 생성하고, 세포에서 별도로 발현시키고, 실시예 1에 제시된 바와 같이 정제하여 MSP-펩티드를 수득하였다.

[0285]

표 5로부터 입증된 바와 같이, 관심 막관통 단백질에 대한 내인성 마우스 상동체를 발현하지 않는, 인간 면역글로불린 중쇄(IgH) 및 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 유전자 조작된 VELOCIMMUNE[®] 마우스(즉, 마우스 TMB2)를, 0.54 mg/mL의 인간 TMB2 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(인간 TMB2를 갖는 복합체)의 주입으로 면역화하였다. 면역 반응을 모니터링하고, 면역화된 마우스로부터 비장세포를 수확하였다. 각각의 마우스로부터 수집된 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, MSP-펩티드, FLAG-펩티드 및 HIS-펩티드와 함께 인큐베이션하여, MSP-펩티드, FLAG-펩티드 및 HIS-펩티드와, 각각의 MSP-펩티드, FLAG-펩티드 및 HIS-펩티드 상에 위치한 에피토프에 특이적인 B 세포 표면 상의 항체 간의 결합을 가능하게 하였다. 이러한 단계는 복합체에 의해 제시된 인간 TMB2 단백질 이외의 복합체의 요소에 특이적인 항체를 발현하는 모든 항체 생성 B 세포를 효과적으로 차단한다.

[0286] 후속적으로, 남아있는 B 세포를 인간 TMB2 단백질 또는 마우스 TMB2 단백질 중 하나를 포함하는 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체(인간 TMB2를 갖는 복합체 또는 마우스 TMB2를 갖는 복합체)와 함께 인큐베이션하여, 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 관심 막관통 단백질과 B 세포 표면 상의 항체 간의 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거하고, PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티닌(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 하였다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 분류물로부터 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거하였다. 마우스로부터 수집된 세포 집단의 PE 형광을 FACS로 검출하여 관심 막관통 단백질에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포의 집단을 식별하였다.

[0287] 이어서, 관심 막관통 단백질에 결합된 B 세포를 생성하는 단일 항체를 384 웰 플레이트 상의 개별 웰에 단리하고, DNA를 암호화하는 항체를 각 세포로부터 단리하고, 추가 분석을 위해 실시예 2에 제시된 바와 같이 항체를 생성하였다.

[0288] 표 5에 나타난 바와 같이, 유전적으로 변형된 마우스를 인간 TMB2 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화하고, 인간 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 항체 생성 B 세포를 분류하여, 마우스 TMB2 및 인간 TMB2 단백질에 결합할 수 있는 교차 반응성 항체, 및 인간 TMB2 단백질에 특이적인 항체를 발현하는 항체 생성 B 세포를 식별하였다. 추가적으로, 유전적으로 변형된 마우스를 인간 TMB2 단백질을 포함하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 면역화하고, 마우스 TMB2 단백질을 제시하는 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체로 항체 생성 B 세포를 분류하여, 마우스 TMB2 및 인간 TMB2 단백질에 결합할 수 있는 교차 반응성 항체만을 발현하는 항체 생성 B 세포를 식별하였다.

[표 5]

마우스	면역원	항원 제시 전략	총 # 수집된 항체 생성 세포	# 분석된 항체 생성 세포	# 시험된 항체	# 항원 결합 항체	% 항원에 결합하는 항체
VI-KO	인간 TMB2를 갖는 복합체	인간 TMB2를 갖는 복합체	1370	666	116	32	28
VI-KO	인간 TMB2를 갖는 복합체	마우스 TMB2를 갖는 복합체	102	102	78	10	13

[0289] 실시예 10. 예시적인 관심 SLC 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 항체 생성 세포의 생성, 및 세포로부터 SLC 단백질 특이적 항체의 수득.

[0291] 예시적인 SLC 단백질의 N 말단에 부착된 FLAG 태그 및 10x-His 태그를 포함시키도록, 예시적인 제1 관심 SLC 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 실시예 1에 제시된 바와 같이 변형시켰다. 변형된 SLC 막관통 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 발현 벡터 내로 클로닝되고 Sf9 세포에서 발현된다. 그런 다음, 세포를 용해시키고, 변형된 SLC 막관통 단백질을 실시예 1에 기술된 바와 같이 수득하고 정제하였다.

[0292] 다음으로, 변형된 인간 SLC 막관통 단백질을 함유하는 디스크 형태 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체를 실시예 1 및 본원에서 제시된 바와 같이 생성하였다.

[0293] 실시예 1에 기술된 바와 같이, 유전적으로 변형된 SLC 녹아웃 마우스, 즉, 관심 SLC 막관통 단백질을 암호화하는 내인성 마우스 유전자가 결여된 인간화 IgH 유전자좌 및 인간화 Igk 유전자좌를 포함하는 VELOCIMMUNE[®] 마우스를, 변형된 인간 SLC 단백질을 암호화하는 외인성 DNA의 주입 및 변형된 인간 SLC 단백질의 주입으로 면역화하였다.

[0294] 각각의 면역화된 마우스로부터 수집된 비장세포를 B 세포 마커(즉, 항-IgG 항체)에 대한 형광 표지로 염색하고, 동시에, 막관통 단백질을 내부에 매립하여 함유하는 0.2 mg/ml 내지 5.0 mg/mL의 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체와 함께 인큐베이션하였다. 그런 다음, 세포를 세척하여 미결합 복합체를 제거한다. 이어서, 세포를 PE-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하여 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체 내의 비오티닌(Bir-A) 표지된 막 스캐폴드 단백질 각각에 스트렙타비딘 결합을 가능하게 한다. 그런 다음, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하여 과량의 PE-스트렙타비딘을 제거한다. 대조군 마우스 및 면역화된 마우스로부터의

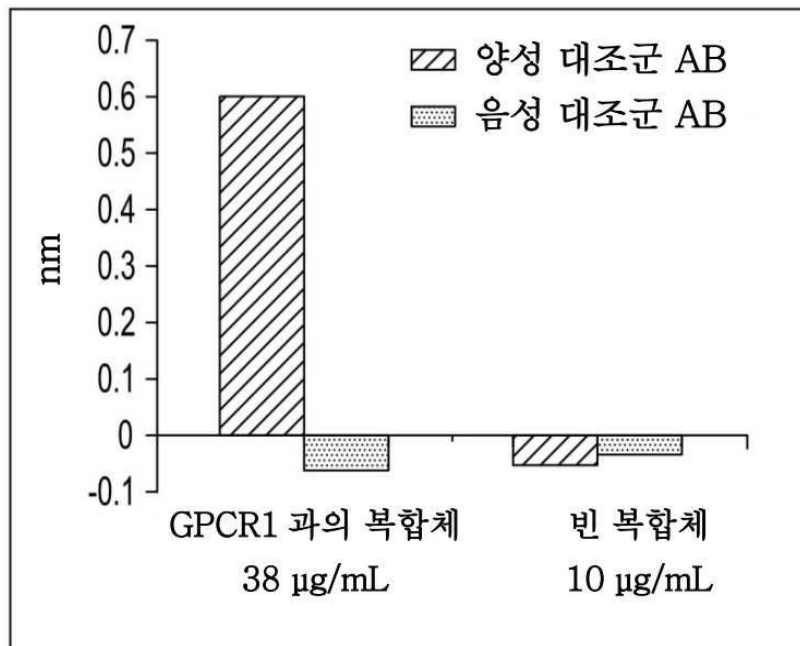
세포 집단의 PE 형광을 FACS에 의해 검출하여, 비오티닐화 지질 이중층 막 스캐폴드 단백질 복합체에 의해 제시된 예시적인 관심 SLC 막관통 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 B-세포의 집단을 식별하였다.

[0295] 이어서, 관심 SLC 막관통 단백질에 결합된 B 세포를 생성하는 단일 항체를 384 웰 플레이트 상의 개별 웰에 단리하고, DNA를 암호화하는 항체를 각 세포로부터 단리하고, 추가 분석을 위해 실시예 2에 제시된 바와 같이 항체를 생성하였다.

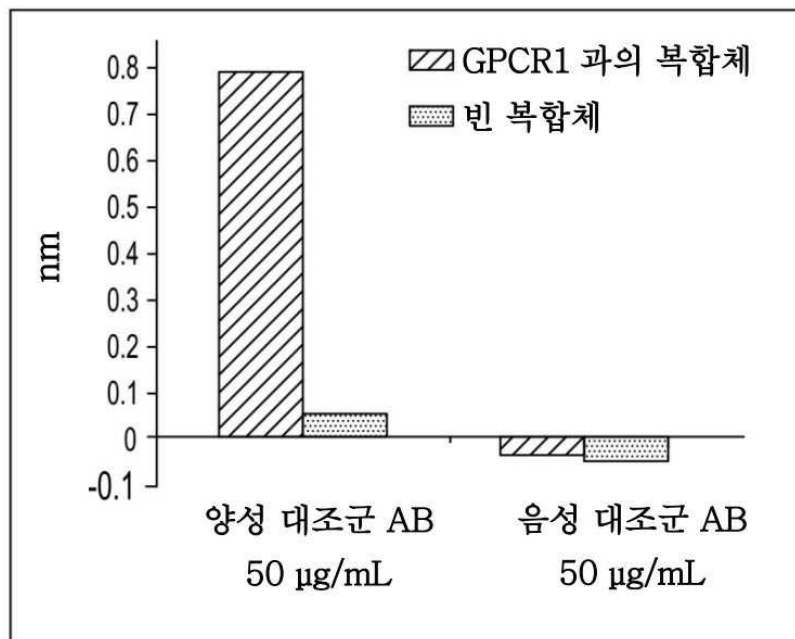
[0296] 본 개시의 여러 양태가 본원에 설명되고 도시되었지만, 동일한 목적을 달성하기 위해 대안적인 양태가 당업자에 의해 영향을 받을 수 있다. 따라서, 첨부된 청구범위는 본 개시의 진정한 사상 및 범주 내에 속하는 모든 이러한 대안적인 양태를 포함하는 것으로 의도된다.

도면

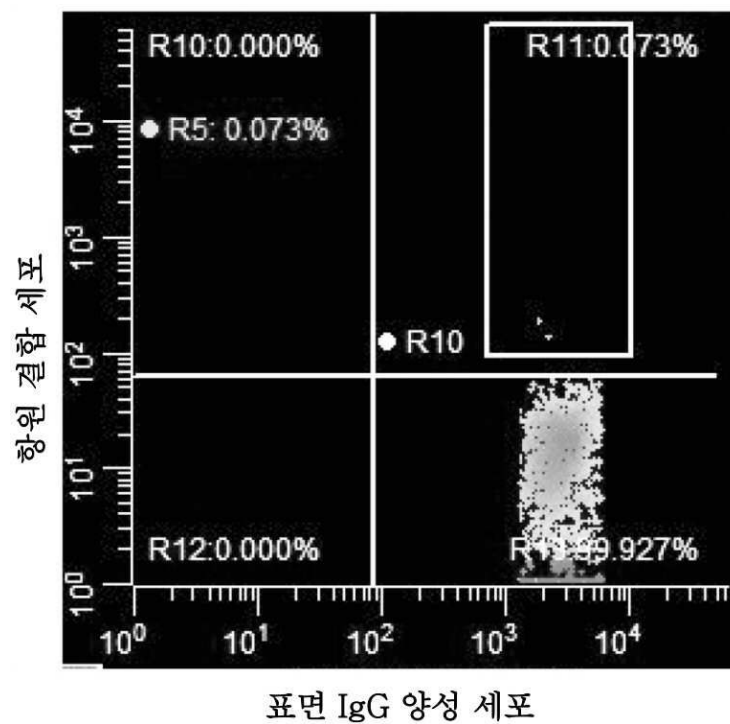
도면1a



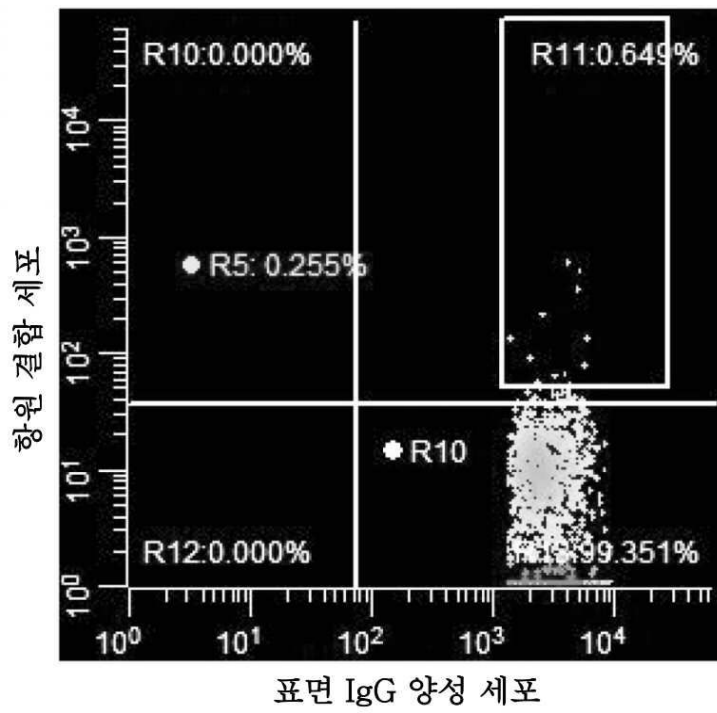
도면1b



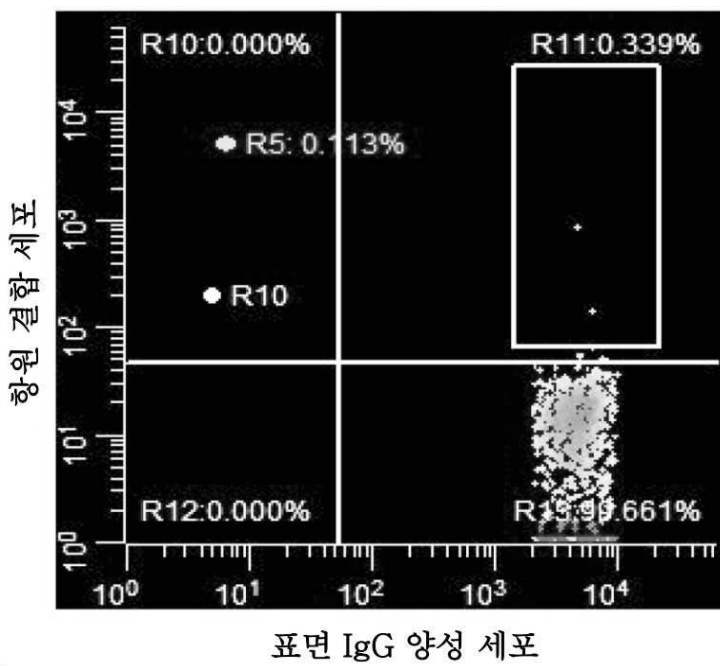
도면2a



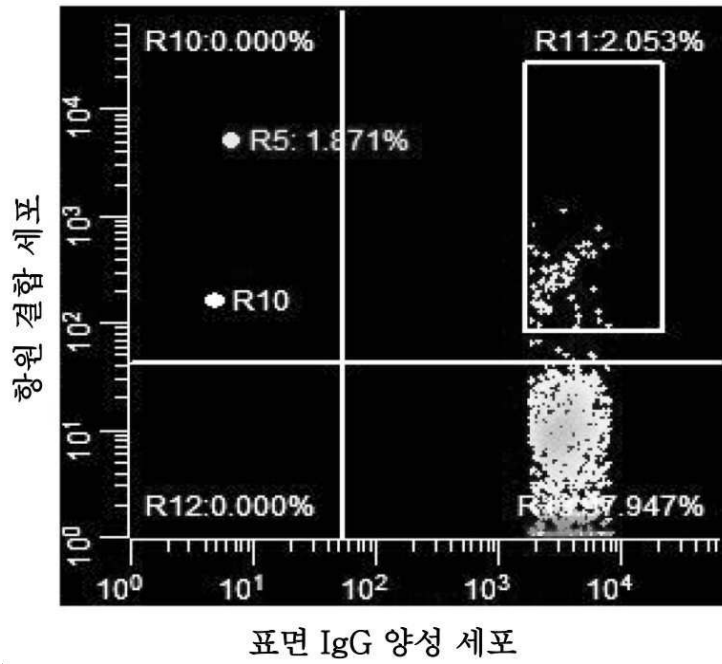
도면2b



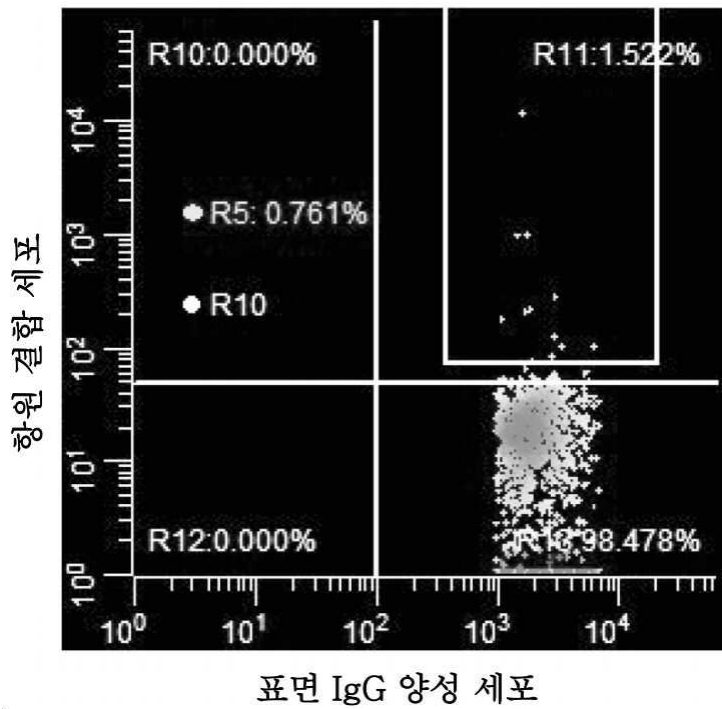
도면2c



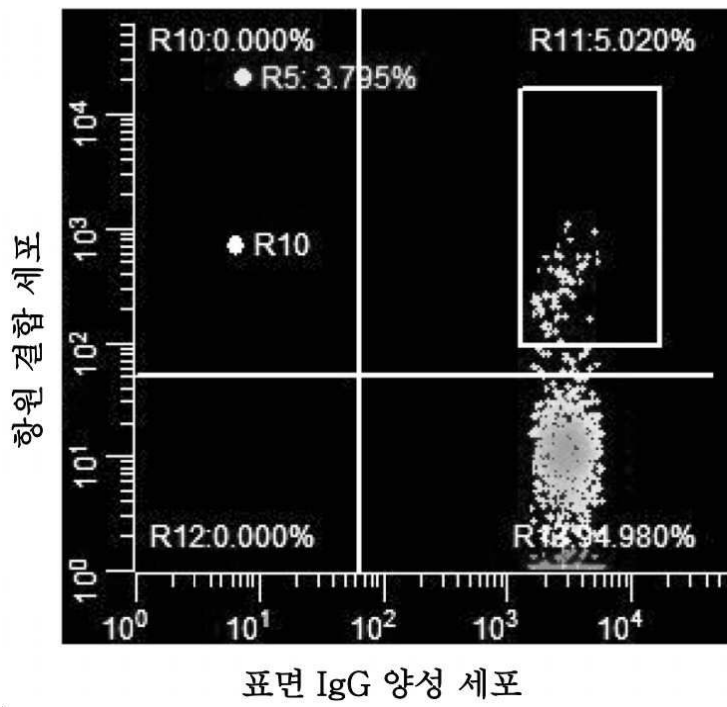
도면2d



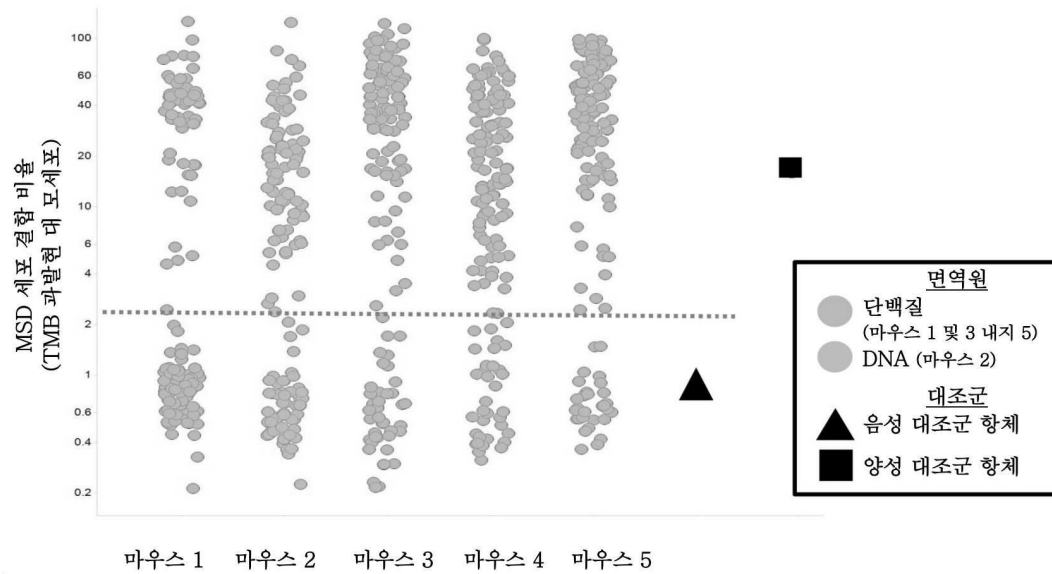
도면2e



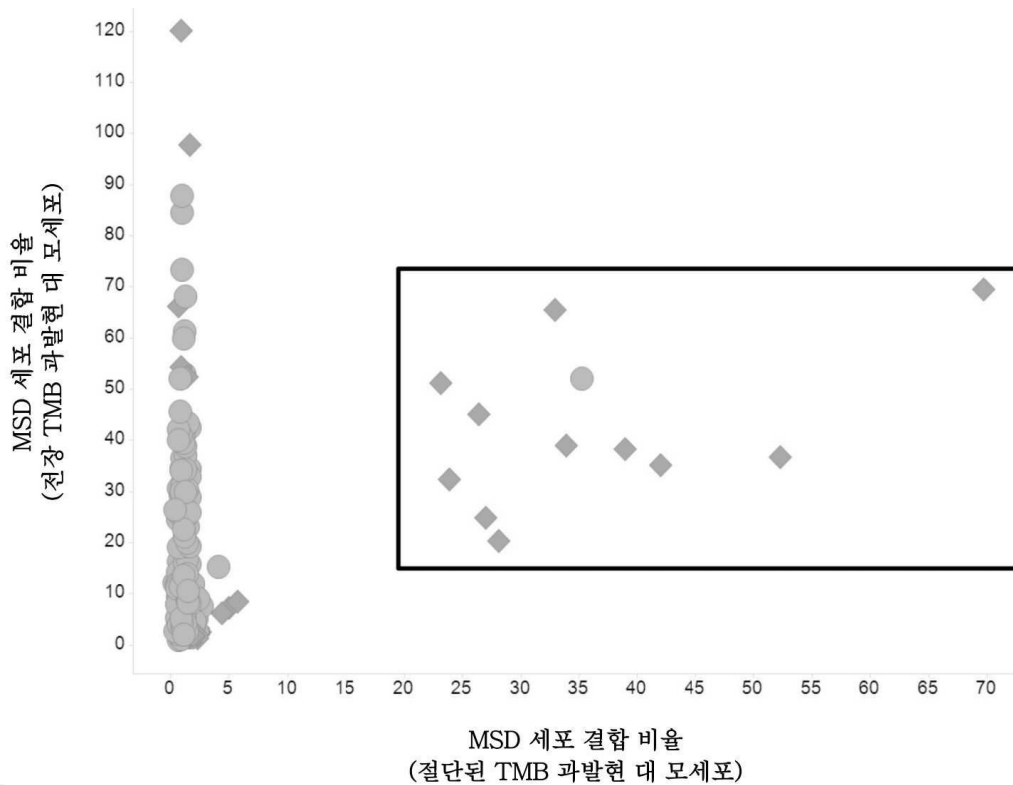
도면2f



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> METHODS FOR OBTAINING ANTIBODIES THAT BIND TRANSMEMBRANE PROTEINS
AND CELLS THAT PRODUCE THE SAME

<130> 36526 (10465W001)

<150> 63/130,044

<151> 2020-12-23

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 1

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg

1 5 10

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 2

Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys

1 5 10 15

Leu Arg Glu Gln Leu Gly

20

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 3

Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly

1 5 10 15

Leu Arg Gln Glu Met Ser

20

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 4

Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln

1 5 10

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 5

Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu

1 5 10 15

Tyr Arg Gln Lys Val Glu

20

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 6

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

1 5 10 15

Leu Gln Glu Lys Leu Ser

20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 7

Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala

1 5 10 15

Leu Arg Thr His Leu Ala

20

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 8

Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala

1 5 10 15

Leu Lys Glu Asn Gly Gly

20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 9

Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr

1 5 10 15

Leu Ser Glu Lys Ala Lys

20

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 10

Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 11

Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu

1 5 10 15

Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

20

<210> 12

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 12

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu

1 5 10 15

Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu

115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala

130 135 140

Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu

145 150 155 160

Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala

165 170 175

Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu

180 185 190

Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys

195 200 205

Leu Asn Thr Gln

210

<210> 13

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 13

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu

1 5 10 15

Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu

115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala

130 135 140

Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu

145 150 155 160

Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala

165 170 175

Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu

180 185 190

Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys

195 200 205

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

 Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln
 275 280 285
 Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys
 290 295 300
 Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg
 305 310 315 320
 Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro
 325 330 335

 Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu
 340 345 350
 Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr
 355 360 365
 Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp
 370 375 380
 Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe
 385 390 395 400

 Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
 405 410

 <210> 14
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic peptide
 <400> 14

Met Gly His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu
1 5 10 15
Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln
20 25 30
Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr
35 40 45
Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala
50 55 60
Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu
65 70 75 80
Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln
85 90 95
Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro
100 105 110
Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu
115 120 125
Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg
130 135 140
Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu
145 150 155 160
Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly
165 170 175
Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser
180 185 190
Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205
Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu
210 215 220
Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
225 230

<210> 15

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 15

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu

1 5 10 15

Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100 105 110

Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr

115 120 125

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

130 135 140

Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu

145 150 155 160

Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu

165 170 175

Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu

180 185 190

Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys

195 200 205

Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu

210 215 220
 Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val
 225 230 235 240
 Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

245 250 255

<210> 16

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 16

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

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

Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu
 115 120 125
 Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln
 130 135 140
 Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu
 145 150 155 160
 Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu

165 170 175
 Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp
 180 185 190
 Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg
 195 200 205
 Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu
 210 215 220
 Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu
 225 230 235 240

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

<210> 17

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 17

Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr
 1 5 10 15

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

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

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

Leu Asn Thr Gln
210

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 18

Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr
1 5 10 15

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
20

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 19

Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly

1 5 10

<210> 20

<211> 201

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 20

Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr

1 5 10 15

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn

20 25 30

Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu

35 40 45

Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys

50 55 60

Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu

65 70 75 80

Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala

100 105 110

His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu

115 120 125

Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly

130 135 140

Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr

145 150 155 160

Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu

165 170 175

Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu

180 185 190

Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

195 200

<210> 21

<211> 403

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 21

Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr

1 5 10 15

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu

115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala

130 135 140

Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu

145 150 155 160

Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala

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

 Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu
 225 230 235 240
 Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys
 245 250 255
 Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met
 260 265 270
 Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu
 275 280 285

 Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu
 290 295 300
 Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg
 305 310 315 320
 Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala
 325 330 335
 Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr
 340 345 350

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

<210> 22

<211> 392

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 22

Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr

1 5 10 15

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu

115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala

130 135 140

Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu

145 150 155 160

Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala

165 170 175

Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu

180 185 190

Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys

195 200 205

Leu Asn Thr Gln Gly Thr Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu
 210 215 220
 Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu
 225 230 235 240
 Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys
 245 250 255

 Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg
 260 265 270
 Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu
 275 280 285
 Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His
 290 295 300
 Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg
 305 310 315 320

 Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala
 325 330 335
 Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu
 340 345 350
 Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu
 355 360 365
 Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu
 370 375 380

 Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
 385 390
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic peptide
 <400> 23
 Arg Glu Gln Leu Gly
 1 5

<210> 24

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic peptide

<400> 24

Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr

1 5 10 15

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu

115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala

130 135 140

Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu

145 150 155 160

Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala

165 170 175

Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu

180 185 190

Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys

195 200 205

Leu Asn Thr Gln Gly Thr Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu

210

215

220

Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met

225

230

235

240

Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp

245

250

255

Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys

260

265

270

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

275

280

285

His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp

290

295

300

Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr

305

310

315

320

Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys

325

330

335

Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu

340

345

350

His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu

355

360

365

Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu

370

375

380

Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

385

390

395