

(45) 공고일자 2020년05월07일
(11) 등록번호 10-2108589
(24) 등록일자 2020년04월29일

- (73) 특허권자
백시넥스 인코포레이티드
미국 뉴욕 로체스터 마운트 호프 애브뉴 1895 (우: 14620)
- (72) 발명자
스미쓰 어네스트 에스.
미국 14519 뉴욕주 온타리오 보스턴 로드 328
판디나 트래시
미국 14612 뉴욕주 로체스터 티마론 트레일 115
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김태홍, 김진희

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 특이적 면역글로불린 유전자 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 세포의 선별을 촉진하는 융합 단백질

본 발명은 진핵 생물 세포 내에서 번역글로불린 분자를 발현시키는 고효율의 방법에 관한 것이다. 본 발명은, 특히 진핵 생물 세포 내에서의 발현을 위하여 3 분자 재조합 방법을 이용함으로써 번역글로불린 중쇄 및 경쇄 라이브리리를 제조하는 방법과도 관련되어 있다. 본 발명은 또한 항원 특이적 번역글로불린 분자와 이의 항원 특이적 단편을 선별 및 스크리닝하는 방법도 제공한다. 본 발명은 또한 항원 특이적 번역글로불린 분자를 제조, 스크리닝 및 선별하기 위한 키트도 제공한다. 마지막으로 본 발명은 본원에 제공된 방법에 의해 제조된 번역글로불린 분자와 이의 항원 특이적 단편을 제공한다.

(서열번호 1)

이중 밑줄 - H5 프로모터
단일 밑줄 - 리더 펩티드
파도 모양 밑줄 - 대표적 중쇄 가변 영역
굵은 밑줄 - IgG CH1 도메인
밑줄 표시가 안 된 부분 - 백시니아 A56R
밑줄 이발릭체 - BssHIII 및 BstEII 가변 유전자 클로닝 위치

(72) 발명자

크로이 레슬리 에이.

미국 14480 뉴욕주 레이크빌 스톤 힐 로드 5899

파리스 마크

미국 14586 뉴욕주 웨스트 헨리에타 피츠패트릭 트
레일 94

조더리 마우리스

미국 14534 뉴욕주 피츠포드 우드랜드 로드 44

목사 안젤리카

미국 14534 뉴욕주 피츠포드 레인브룩 드라이브 14

키르크 르네

미국 14469 뉴욕주 블룸필드 बैप티스트 힐 로드
7474

(30) 우선권주장

61/639,046 2012년04월26일 미국(US)

61/732,776 2012년12월03일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

항원 특이적 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 방법으로서,

(a) 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 백시니아 라이브러리를, 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 숙주 세포군에 도입하는 단계로서, 재조합 백시니아 라이브러리는 다수의 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 백시니아 바이러스 벡터 내 구축된 폴리뉴클레오타이드의 제1 라이브러리를 포함하고, 상기 백시니아 바이러스 벡터는 (1) 중쇄 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드, (2) 상기 CH1 도메인의 하류에 위치하는, 백시니아 바이러스 세포외 외피보유 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질 A56R의 줄기 영역, 경막 도메인 및 세포내 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드, 및 (3) 상기 CH1 도메인의 상류에 위치하는, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 제3 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인 단계;

(b) 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 상기 숙주 세포군에 도입하는 단계로서, 면역글로불린 융합 단백질이 숙주 세포 내 면역글로불린 경쇄와 조합되어 EEV의 표면상에서 발현될 수 있는 면역글로불린 분자의 항원 결합 도메인을 형성할 수 있는 것인 단계;

(c) 숙주 세포로부터 EEV의 방출을 허용하는 단계;

(d) 방출된 EEV를 상청액으로부터 수집하는 단계;

(e) 방출된 EEV를 항원과 접촉시키는 단계; 및

(f) EEV의 막 표면상에서 발현되고 상기 항원에 특이적인 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드를 회수하는 단계

를 포함하는, 항원 특이적 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(g) 단계 (f)에서 회수된 폴리뉴클레오타이드를, 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 제2 숙주 세포군에 도입하는 단계;

(h) 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 상기 숙주 세포군에 도입하는 단계;

(i) 숙주 세포로부터 세포외 외피보유 바이러스(EEV)의 방출을 허용하는 단계;

(j) 방출된 EEV를 상청액으로부터 수집하는 단계;

(k) 방출된 EEV를 항원과 접촉시키는 단계; 및

(l) EEV의 막 표면상에서 발현되고 상기 항원에 특이적인 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드를 회수하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 단계 (g)~(l)을 1회 이상 반복하여, 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 융합 폴리펩티드의 일부로서 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드를 농축하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 제1 라이브러리로부터 회수된 폴리뉴클레오티드를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드 분절은 중쇄 CH2 도메인, 중쇄 CH3 도메인 또는 이의 조합을 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 제1 폴리펩티드 분절은 인간 IgG 불변 영역, 또는 이의 일부를 포함하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 제2 폴리펩티드 분절이 A56R인 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 제2 폴리펩티드 분절이 서열 번호 11의 아미노산 215~421 또는 서열 번호 30의 아미노산 447~653을 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)의 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 각각 백시니아 바이러스 벡터에 포함되는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)의 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 플라스미드 벡터에 포함되는 방법.

청구항 13

(a) 백시니아 바이러스 A56R 단백질의 줄기 영역, 경막 도메인 및 세포내 도메인에 융합된 인간 IgG1의 CH1 도메인인, 서열 번호 11의 아미노산 117~421로 구성되는 폴리펩티드 분절, 또는 (b) 백시니아 바이러스 A56R 단백질의 줄기 영역, 경막 도메인 및 세포내 도메인에 융합된 인간 IgG1의 전체 불변 영역인, 서열 번호 30의 아미노산 117~653으로 구성되는 폴리펩티드 분절의 N-말단에 융합된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 도메인을 포함하는 융합 단백질로서, 상기 융합 단백질은 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(EEV) 바이러스 입자의 표면에 발현될 수 있고, 상기 융합 단백질은 경쇄 가변 도메인과 조합되는 경우 기능적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 형성할 수 있는 것인 융합 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, EEV의 표면에 융합 폴리펩티드의 발현을 촉진하기 위한 신호 펩티드를 추가로 포함하는 융합 단백질.

청구항 15

제13항 또는 제14항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제15항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 17

제15항의 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스.

청구항 18

제17항의 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 숙주 세포.

청구항 19

상이한 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 다수의 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 라이브러리를 포함하는 재조합 백시니아 라이브러리로서, 각각의 면역글로불린 융합 폴리펩티드는, N 말단에서 C 말단 순으로, 중쇄 가변 도메인에 융합된 CH1 불변 도메인에 융합된 EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절을 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드의 라이브러리는 백시니아 바이러스 벡터 내에 구축되고, 상기 라이브러리 내 각각의 폴리뉴클레오티드는 하기의 성분:

- (a) 중쇄 IgG CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드;
- (b) 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드의 하류에 위치하는, 백시니아 바이러스 A56R EEV 특이적 막 단백질의 줄기 영역, 경막 도메인 및 세포내 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드; 및
- (c) 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드의 상류에 위치하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 제3 폴리뉴클레오티드

를 포함하고,

면역글로불린 융합 단백질이 백시니아 EEV 입자의 표면에 발현될 수 있고, 상기 융합 단백질은 면역글로불린 경쇄와 조합되어 면역글로불린 분자의 항원 결합 도메인을 형성할 수 있는 것인 재조합 백시니아 라이브러리.

청구항 20

제19항에 있어서, 각각의 면역글로불린 융합 폴리펩티드는 EEV의 표면에 다수의 면역글로불린 융합 폴리펩티드의 발현을 촉진하기 위한 신호 펩티드를 추가로 포함하는 재조합 백시니아 라이브러리.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 면역글로불린 융합 폴리펩티드는 각각 서열 번호 11의 아미노산 117~421의 N-말단에 융합된 VH 또는 이의 단편을 포함하는 재조합 백시니아 라이브러리.

청구항 22

제19항 또는 제20항에 있어서, (a)의 제1 폴리뉴클레오티드는 전장 인간 IgG 불변 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 재조합 백시니아 라이브러리.

청구항 23

제22항에 있어서, 면역글로불린 융합 폴리펩티드는 각각 서열 번호 30의 아미노산 117~653의 N-말단에 융합된 VH 또는 이의 단편을 포함하는 재조합 백시니아 라이브러리.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원들에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 그 내용들이 각각 본원에 그 자체로 참고 문헌으로 인용되어 있는 미국 가 명세서 특허 출원 제 61/639,046호(2012년 4월 26일 출원), 미국 가 명세서 특허 출원 제 61/732,776호(2012년 12월 3일 출원) 및 미국 정규 특허 출원 제 13/844,388호(2013년 3월 15일 출원)의 우선권의 이익을 주장하고 있다.

[0003] 전자 제출된 서열 목록에 대한 기술

[0004] 본원에 첨부된 ASCII 텍스트 파일로 전자 제출된 서열 목록의 내용(파일 명: "1843...071PC02_SequenceListing_ascii.txt"; 파일 크기: 30,863 바이트; 생성일: 2013년 4월 25일)은 그 자체로 참고 문헌으로 인용되어 있다.

[0005] 본 발명의 분야

[0006] 본 발명은, 백시니아 바이러스 입자, 예를 들어 EEV 비리온, 및/또는 숙주 세포 상에 면역글로불린 분자들을 발현시키는 고효율의 방법, 백시니아 바이러스 입자, 예를 들어 EEV 비리온, 및/또는 진핵생물에서 발현시키기 위한 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 라이브러리의 제조 방법, 특이적 항원과 결합하는 면역글로불린의 단리 방법, 그리고 이와 같은 방법들 중 임의의 방법에 의해 생산된 면역글로불린에 관한 것이다. 본 발명은 또한 백시니아 바이러스 입자, 예를 들어 EEV 비리온, 또는 숙주 세포 상에 면역글로불린 분자들을 발현시키는데 사용되는 융합 단백질에 관한 것이기도 하다.

배경 기술

[0007] 면역글로불린 생산

[0008] 특정된 특이성을 가지는 항체들은 다양한 치료 분야에서 그 수요가 점점 늘고 있다. 인간을 치료하는데 사용되는 유용한 항체를 제조하기 위하여 다수의 방법이 사용되고 있다. 이와 같은 항체로서는, 예를 들어 파지 전사 라이브러리와 같은 라이브러리나, 유전자 이식 동물로부터 선별된 키메라 항체 및 인간화 항체와, 전 인간 항체 (fully human antibody)를 포함한다. 박테리오파지에서 구성된 면역글로불린 라이브러리는 비 면역화 개체 (naive individual) 또는 특이적으로 면역화된 개체의 항체 생산 세포로부터 유래할 수 있으며, 본질적으로는 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 신규하고 다양한 쌍을 포함할 수 있다. 이러한 전략은 고유의 레퍼토리상 한계에 지장 받는 것은 아니지만, 발현된 면역글로불린 단편의 상보성 결정 영역(CDR)들은 박테리아 세포 내에서 합성되어 적당히 폴딩(folding)되어야만 한다. 그러나, 다수의 항원 결합부들은 박테리아 세포 내에서 융합 단백질로서 올바르게 조립되기가 쉽지 않다. 뿐만 아니라, 해당 단백질은 진핵생물의 정상적인 번역 후 변형을 거치지 않을 것이다. 결과적으로, 이와 같은 방법은 얻어질 수 있는 항체 특이성에 상이한 선택적 필터(selective filter)를 제공한다. 대안적으로 전 인간 항체들은 진핵생물 계 내 라이브러리(예를 들어 효모 전사 라이브러리), 레트로바이러스 전사 라이브러리로부터 분리될 수 있거나, 또는 DNA 바이러스, 예를 들어 폭스 바이러스 내에서 발현되어 분리될 수 있다. 예를 들어 그 자체로서 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있는 미국 특허 제 7,858,559호를 참조하시오.

[0009] 본 발명은 백시니아 바이러스, 즉 외피보유 포유동물 바이러스 표면상에 전 인간 항체의 라이브러리가 효율적으로 발현될 수 있도록 해준다. 파지 전사의 경우와 유사하게, 각각의 백시니아 비리온이 단일 면역글로불린, 예

를 들어 항체 또는 scFv를 자체의 표면에 발현하게 되는 조건들이 활용된다.

[0010] 그러나, 본 발명에 따르면 특이적 항체들을 코딩하는 재조합 바이러스를 선별하기 위해 백시니아-MAb 바이러스의 라이브러리를 스크리닝하는, 패닝(panning) 및 자성 비드 기반 방법을 다수가 개발되었다. 항체가 포유동물 세포에 감염을 통해 도입되면, 항체는 새로 생산되는 바이러스 내에 통합되어 들어갈 뿐만 아니라, 숙주 세포의 표면에도 전시된다. 이를 통하여, 무 세포 패닝 계 내에서 백시니아-MAb 바이러스가 선별될 수 있다는 이점들과, 이에 수반하여 고 특이성 및 항체 최적화를 이를 세포 기반 스크리닝이 달성될 수 있다는 이점을 모두 가지는 효율적 선별 전략이 구현될 수 있다.

[0011] 이는, 단일 scFv는 발현시키지 라이브러리는 발현시키지 않는 해당 분야의 다른 기술들과는 상이하다. 뿐만 아니라, 다른 기술들은 유전자 치료법을 위하여 scFv를 통한 백시니아 감염을 전용(redirect)하도록 디자인되지만, 항체를 발견하는데에는 사용되지 않는다. 또한 본 발명의 기술은, IMV 대신에 EEV를 사용하고, 상이한 융합 단백질들(예를 들어 A56R)을 사용한다는 점에서 기존의 기술과 상이하다.

발명의 내용

[0012] **발명의 개요**

[0013] 임의의 양태에서, 본원에 개시된 사항은 (a) 중쇄 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절과, (b) 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(extracellular enveloped virus; EEV) 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0014] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질은 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편을 포함하는 제3 폴리펩티드 분절을 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, 백시니아 EEV 특이적 막 단백질은 A56R이다.

[0015] 임의의 양태에서, 본원에 개시된 사항은 (a) 인간 중쇄 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절과, (b) 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 웨스턴 리저브 백시니아(Western Reserve Vaccinia) 바이러스 균주로부터 유래하는 A56R의 108-314번 아미노산을 코딩하는, 서열 번호 10의 뉴클레오티드를 포함한다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 11의 서열의 215-421번 아미노산을 코딩한다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 11의 서열의 215-421번 아미노산을 코딩하는 서열 번호 10의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0016] 임의의 양태에서, 본원에 개시된 사항은 (a) 인간 중쇄 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절과, (b) 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0017] 임의의 양태에서, 본원에 개시된 사항은 (a) 인간 중쇄 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절과, (b) 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본원에 개시된 사항은 상기 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0018] 다른 양태에서, 본원에 개시된 사항은 면역글로불린 융합 폴리펩티드 다수 개를 코딩하는, 백시니아 바이러스 벡터 내에서 구성된 폴리뉴클레오티드의 제1 라이브러리를 포함하는 재조합 백시니아 라이브러리에 관한 것인데, 여기서 상기 백시니아 바이러스 벡터는 (a) 중쇄 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절을 암호화하는 제1 폴리뉴클레오티드와, (b) CH1 도메인의 하류에 위치하는 백시니아 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드, 그리고 (c) CH1 도메인의 상류에 위치하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 제3 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 하나의 구체예에서, 제1 라이브러리는 EEV의 표면에 융합 폴리펩티드가 발현되는 것을 촉진하는 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, EEV 특이적 막 단백질은 A56R이다. 다른 구체예에서, 백시니아 EEV 특이적 막 단백질은 A56R이다. 다른 구체예에서, 제2 폴리펩티드 분절은 EEV 특이적 막 단백질의 세포외 도메인 또는 이의 일부를 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, 제2 폴리펩티드 분절은 EEV 특이적 막 단백질의 세포내 도메인 또는 이의 일부를 추가로 포함한다. 임의의 구체예에서, 융합 단백질은 웨스턴 리저브 백시니아 바이러스 균주로부터 유래하는 A56R의 108-314번 폴리펩티드 서열 아미노산에 상응하는, 서열 번호 11의 아미노산을 포함한다. 임의의 구체예에서, 융합 단백질은 서열 번호 11의 서열의 215-421번 아미노산을 포함한다. 임의의 구체예에서, 융합 단백질은 웨스턴 리저브 백시니아 바이러스 균주로부터 유래하는 A56R의 108-314번 폴리펩티드 서열 아미노

산인, 서열 번호 11의 서열의 215~421번 아미노산을 포함한다.

[0019] 다른 양태에서, 본원에 개시된 사항은 항원 특이적 면역글로불린의 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 방법으로서, 다음과 같은 단계들을 포함하는 방법에 관한 것이다: (a) 면역글로불린 융합 단백질들을 코딩하는, 특허청구범위 제13항 내지 제18항 중 어느 하나의 항의 제1 라이브러리가, 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 숙주 세포군에 도입되는 단계; (b) 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 하나 이상이 숙주 세포군에 도입되어, 면역글로불린 융합 단백질이 면역글로불린 경쇄와 합하여짐으로써 면역글로불린 분자의 항원 결합 도메인이 형성될 수 있는 단계; (c) 숙주 세포로부터 세포외 외피보유 바이러스(EEV)의 방출이 허용되는 단계; (d) 방출된 EEV가 상청액으로부터 수집되는 단계; (e) 방출된 EEV가 항원과 접촉하는 단계; 그리고 (f) EEV의 막 표면에 발현되었으며 항원에 특이적인, 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드들이 회수되는 단계.

[0020] 하나의 구체예에서, 항원 특이적 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 방법은 다음과 같은 단계들을 추가로 포함한다: (g) 상기 단계 (f)에서 회수된 폴리뉴클레오타이드가, 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 제2 숙주 세포군에 도입되는 단계; (h) 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 하나 이상이 숙주 세포군에 도입되는 단계; (i) 숙주 세포로부터 세포외 외피보유 바이러스(EEV)의 방출이 허용되는 단계; (j) 방출된 EEV가 상청액으로부터 수집되는 단계; (k) 방출된 EEV와 항원이 접촉되는 단계; 그리고 (l) EEV의 막 표면에 발현되었으며 항원에 특이적인, 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드들이 회수되는 단계.

[0021] 임의의 구체예에서, 상기 단계 (g)~(l)은 1회 이상 반복 수행되며, 그로 인하여 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 융합 폴리펩티드의 일부로서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드들이 증량(농축)(enrich)된다.

[0022] 임의의 구체예에서, 제1 라이브러리로부터 회수된 폴리뉴클레오타이드는 분리된다.

[0023] 다른 양태에서, 본원에 개시된 사항은 항원 특이적 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 방법으로서, 다음과 같은 단계들을 포함하는 방법에 관한 것이다: (a) 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 숙주 세포군에 제1 라이브러리가 도입되는 단계; (b) 숙주 세포군에 제2 라이브러리가 도입됨으로써, 상기 제2 라이브러리는 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 다수 개를 포함하고, 여기서 면역글로불린 융합 폴리펩티드는 면역글로불린 경쇄와 조합되어 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을 형성할 수 있게 되는 것인 단계; (c) 숙주 세포로부터 면역글로불린 융합 폴리펩티드의 발현이 허용되는 단계; (d) 숙주 세포로부터 면역글로불린 융합 폴리펩티드가 수집되는 단계; (e) 수집된 면역글로불린 융합 폴리펩티드와 항원이 접촉되는 단계; 그리고 (f) 항원에 특이적인 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드들이 회수되는 단계.

[0024] 하나의 구체예에서, 항원 특이적 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 방법은 다음과 같은 단계들을 추가로 포함한다: (g) 상기 단계 (f)에서 회수된 폴리뉴클레오타이드가, 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 제2 숙주 세포군으로 도입되는 단계; (h) 폴리뉴클레오타이드의 제2 라이브러리가 제2 숙주 세포군으로 도입되는 단계; (i) 숙주 세포로부터 면역글로불린 융합 폴리펩티드의 발현이 허용되는 단계; (j) 숙주 세포로부터 면역글로불린 융합 폴리펩티드가 수집되는 단계; (k) 수집된 면역글로불린 융합 폴리펩티드와 항원이 접촉되는 단계; 그리고 (l) 항원에 특이적인 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드들이 회수되는 단계.

[0025] 임의의 구체예에서, 상기 단계 (g)~(l)은 1회 이상 반복 수행되며, 그로 인하여 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 융합 폴리펩티드의 일부로서, 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드들이 증량된다.

[0026] 하나의 구체예에서, 항원 특이적 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 방법은 제1 라이브러리로부터 회수된 제3 폴리뉴클레오타이드들이 분리되는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은, pJEM1 플라스미드 요소와 이의 각각의 서열들(서열 번호 1)을 보여주는 것이다.

도 2는, 제조할 백시니아 바이러스를 사용하여 라이브러리를 선별하기 위한 일반적 전략을 도시한 것이다.

도 3의 A~C는, H2124-A56R + L517을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포(B), 또는 2408-A56R-scFv를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포(C)를 C35 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를, 야생형(WT) 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포(A)를 C35 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터와 비교하여 보여주는 것이다.

도 4의 A~B는, C35 특이적 융합 단백질을 포함하는 EEV("A56R EEV"라 표시됨), 대조군 EEV("L517 + G7000-A56R EEV"라 표시됨) 및 C35 특이적 항체를 발현하는 EEV(표준적인 막 결합 IgG1 형태; "mbg EEV")와, C35/항-Vac HRP(A) 및 C35/항-Fab(B)의 ELISA 결합 결과들을 보여주는 것이다.

도 5의 A~D는, C35 결합에 대한 용균 반 평판 분석 결과(결합 개시 후 2시간 경과 시(A) 및 밤새 결합을 진행한 후(B))와, VEGF 결합에 대한 용균 반 평판 분석 결과(결합 개시 후 2시간 경과 시(A) 및 밤새 결합을 진행한 후(B))를 보여주는 것이다.

도 6은, CD100 항체 선별 전략을 도시한 것이다.

도 7은, CD100 클론 C20의 VH 서열(서열 번호 19)과, 재조합 백시니아 라이브러리 선별에 의해 동정된, 상기 CD100 클론 C20과 동일한 VH 클론의 VH 서열의 배열을 보여주는 것이다.

도 8은, 경쇄 L48, L116 및 L9021을 사용하여 Her2.3.2 및 Her2.3.3을 선별하기 위해 C35 및 Her2 염색 결과를 유동 세포 분석하여 나타낸 것이다.

도 9는, Her2 항체 선별 전략을 도시한 것이다.

도 10은, Her2.3.2 및 Her2.3.3 선별을 위해 C35 + 항His 및 Her2 + 항His를 유동 세포 분석한 결과를 보여주는 것이다.

도 11은, Her2 클론 B10의 VH 서열(서열 번호 20)과, 재조합 백시니아 라이브러리 선별에 의해 동정된, 상기 Her2 클론 B10과 동일한 VH 클론의 VH 서열의 배열을 보여주는 것이다.

도 12는, "Fab", "TR" 및 "IgG-감마 중쇄" 구성체의 도해를 보여주는 것이다.

도 13은, 8000-Fab L8000을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들을 C35 염색 및 Her2 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여주는 것이다.

도 14는, 8000-IgG L8000을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, 8000-TR L8000을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B)을, C35 염색 및 Her2 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여주는 것이다.

도 15는, H2124-IgG를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, H2124-TR L517을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B)을, C35 염색 및 Her2 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여주는 것이다.

도 16은, CD100 Lib10.3의 유동성 분석에 대한 제어를 보여주는 것이다. 본 도면은, 2368을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, 8000을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B)을, Her2 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 17은, 토실 선별된 CD100 Lib10.3의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, L223을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, L151을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B), 그리고 L9021을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(C)을, Her2 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 18은, 토실 선별된 CD100 Lib10.3의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, L48을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, L7110을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B), 그리고 L122를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(C)을, Her2 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 19는, 토실 선별된 CD100 Lib10.3의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, L116을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, L214를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B), 그리고 L3-1을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(C)을, Her2 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 20은, ProG 선별된 CD100 Lib10.3의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, L223을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, L151을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B), 그리고 L9021을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(C)을, Her2 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 21은, ProG 선별된 CD100 Lib10.3의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, L48을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, L7110을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B), 그리고 L122를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(C)을, Her2 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 22는, ProG 선별된 CD100 Lib10.3의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, L116을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, L214를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B), 그리고 L3-1을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(C)을, Her2 염색 및 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 23은, CD100 Lib10.3/L3-1의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, 8000을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, 2368을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B)을, 예비 복합 Her2 염색 및 2단계 CD100 염색, 그리고 예비 복합 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 24는, CD100 Lib10.3토실/L3-1의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, 예비 분류된 토실 선별 CD100 Lib10.3을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, 분류된 토실 선별 CD100 Lib10.3을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B)을, 예비 복합 Her2 염색, 2단계 CD100 염색 및 예비 복합 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 25는, CD100 Lib10.3ProtG/L3-1의 유동성 분석에 대한 결과를 보여주는 것이다. 본 도면은, 예비 분류된 ProtG 선별 CD100 Lib10.3을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, 분류된 ProtG 선별 CD100 Lib10.3을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B)을, 예비 복합 Her2 염색, 2단계 CD100 염색 및 예비 복합체 CD100 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여준다.

도 26은, 저캣(Jurkat) 세포 상 CD100(CD100+) 및 BxPC3 세포 상 CD100의 mAb 2050, 2063 및 2110에 대한 특이성을 보여주는 유동 세포 분석 결과들을 보여주는 것이다.

도 27은, CD100 특이적 항체를 3개(mAb2050, mAbC2063 및 mAbC2110)와 함께 이루어진, huCD100-His 코팅 평판(A) 및 헤모글로빈 코팅 평판(B)에 대한 ELISA 결과들을, 양성 대조군 및 음성 대조군의 경우와 비교하여 보여주는 것이다.

도 28은, 백시니아 전사 방법 이후 특이적 Ig-H/Ig-L을 동정하는 방법을 개략적으로 보여주는 것이다.

도 29는, Her2 특이적 클론 D5를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(A)과, Her2 특이적 클론 D8을 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(B), 그리고 Her2 특이적 클론 H2를 발현하는 EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 HeLa 세포들(C)을, C35 염색 및 Her2 염색하여 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석한 데이터를 보여주는 것이다.

도 30은, Her2 특이적 항체 3개(mAb8287, mAb8290 및 mAb9298)에 대한 ELISA 결과들을 보여주는 것이다.

도 31은, mAb8289, mAb8293 및 mAb8297의 SKBR3 세포 상 Her2(Her2++)에 대한 특이성을 보여주는 유동 세포 분석 결과를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

본 발명은 넓게 EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절과의 융합체로서, 세포의 외피 보유 백시니아 바이러스(EEV)의 표면에 전사되는 기능성 항원 특이적 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편(즉 항원 결합 단편)을 진핵생물 계 내에서 동정 및/또는 생산하는 방법에 관한 것이다. 뿐만 아니라, 본 발명은 항원 특이적 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 이러한 면역글로불린 분자 또는 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드들의 복합 발현 라이브러리들로부터 동정하는 방법에 관한 것이기도 한데, 여기서 상기 라이브러리는 EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분

절과의 융합체로서 세포의 외피보유 백시니아 바이러스(EEV)의 표면에 전시된 상태로 진핵생물 계 내에서 구성 및 스크리닝된다. 추가의 구체예는 (a) 인간 중쇄 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분질과, (b) 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질의 세포외 및 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분질을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 추가의 구체예에서, 본원에 개시된 융합 단백질은 결합 분자, 예를 들어 면역글로불린 또는 이의 일부, 예를 들어 중쇄 가변 영역의 항원 특이적 부분으로서, 적당한 면역글로불린 경쇄와 쌍을 이룰 때 목표로 하는 항원과 결합하게 되는 항원 특이적 부분을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 하나의 양태는, EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분질과의 융합체로서 세포의 외피보유 백시니아 바이러스(EEV)의 표면에 전시되는 복합 면역글로불린 라이브러리들을 진핵생물 계 내에서 구성하는 것이다.

[0030] 용어 "하나" 또는 "하나의" 실체란, 해당 실체가 하나 이상인 경우를 말하는 것으로서; 예를 들어 "하나의 면역글로불린 분자"는 해당 면역글로불린 분자가 하나 이상인 경우를 말하는 것으로 이해되는 것이 주목되어야 할 것이다. 그러므로, 용어들 "하나"(또는 "하나의"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 호환되어 사용될 수 있다.

[0031] 용어 "진핵생물" 또는 "진핵생물 유기체"는, 동물, 식물 및 원생 생물 계, 예를 들어 원생 동물, 진균, 효모, 녹조류, 단세포 식물, 다세포 식물, 그리고 모든 동물들, 즉 척추 동물 및 무척추 동물에 속하는 모든 유기체들을 포함하는 의도로 사용되고 있다. 상기 용어는 박테리아나 바이러스는 포함하지 않는다. "진핵생물 세포"는, 단수 "진핵생물 세포"뿐만 아니라 복수 "진핵생물들"을 포함하는 의도로 사용되는 것이며, 진핵생물로부터 유래하는 세포들도 포함한다.

[0032] 용어 "척추 동물"은, 단수 "척추 동물"뿐만 아니라 복수 "척추 동물들"을 포함하는 의도로 사용되는 것이며, 포유 동물 및 조류뿐만 아니라 어류, 파충류 및 양서류도 포함한다.

[0033] 용어 "포유동물"은 단수 "포유동물"뿐만 아니라 복수 "포유동물들"을 포함하는 의도로 사용되는 것으로서, 인간; 영장류, 예를 들어 유인원, 원숭이, 오랑우탄 및 침팬지; 개과 동물, 예를 들어 개와 늑대; 고양이과 동물, 예를 들어 고양이, 사자 및 호랑이; 말과 동물, 예를 들어 말, 당나귀 및 얼룩말, 식용 동물, 예를 들어 소, 돼지 및 양; 유제류, 예를 들어 사슴 및 기린; 설치류, 예를 들어 마우스, 래트, 햄스터 및 기니아 피그; 그리고 곰을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 임의의 구체예에서, 포유동물은 인간 피혜체이다.

[0034] 용어 "조직 배양" 또는 "세포 배양" 또는 "배양" 또는 "배양하는 것"이란, 세포 구조의 보존, 세포 기능의 보존, 추가적으로는 분화, 또는 이것들 3가지 모두가 허용되는 조건 하에서 식물 또는 동물 조직이나 세포가 시험관 내에서 유지 또는 생장하는 것을 말한다. "1차 조직 세포들"은 조직, 즉 유기체 내에서 동일한 기능을 수행하는 동일한 종류의 세포군으로부터 직접 취하여진 세포들이다. 예를 들어 이와 같은 조직 세포들이 단백 분해 효소인 트립신으로 처리되면, 상기 조직 세포들은, 배양 평판 상에 접종되었을 때 생장하거나 세포 구조를 유지하는 각각의 1차 조직 세포들로 해체된다.

[0035] 용어 "폴리뉴클레오티드"란, 핵산 또는 구성체(construct)에 존재하는, 임의의 핵산 분절(segment) 또는 핵산 분자, 예를 들어 DNA 또는 RNA 단편들 하나 이상을 말한다. "면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드"란, 이와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 조절 요소, 예를 들어 프로모터 또는 전사 종결 인자를 코딩할 수 있거나, 또는 폴리펩티드 또는 단백질의 특이적 요소, 예를 들어 분비 신호 펩티드 또는 기능성 도메인을 코딩할 수 있다.

[0036] 본원에 사용된 용어 "동정"이란, 원하는 분자, 예를 들어 원하는 특이성 또는 기능을 가지는 면역글로불린 분자들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가, 이와 같은 분자 다수 개 또는 이 분자의 라이브러리로부터 분별되는 방법을 말한다. 동정 방법으로서 "선별"과 "스크리닝"을 포함한다. 본원에 사용된 "선별" 방법이란, 원하는 분자들이 라이브러리로부터 직접 분리될 수 있는 방법을 말한다. 예를 들어 본원에 개시된 하나의 선별 방법에 있어서, 원하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포는, 용해 작업이 수행되었을 때 숙주 세포의 나머지와 결합하고 있던 기관으로부터 방출됨으로 인해, 라이브러리의 나머지 부분을 포함하는 숙주 세포들로부터 직접 분리된다. 본원에 사용된 "스크리닝" 방법은, 원하는 분자를 포함하는 풀을 대상으로 원하는 해당 분자가 검출될 수 있는 분석법이 실시되는 방법이다. 이후 해당 분자가 검출되는 풀의 분취액은, 원하는 분자가 매우 많이 증량된 풀이 얻어질 때까지 계속해서 더욱 적은 양의 풀(상기 분취액의 풀과 유사하게 분석됨)로 나누어진다.

[0037] 면역글로불린. 본원에 사용된 "면역글로불린 분자"란, 완전체 2 분자형 면역글로불린, 즉 일반적으로 4개의 "서브유닛 폴리펩티드"(동일한 중쇄 2개와 동일한 경쇄 2개)를 포함하는 면역글로불린으로서 정의된다. 몇몇 경우

에 있어서, 예를 들어 양의 종으로부터 유래하거나 양의 면역글로불린을 기반으로 조작된 면역글로불린 분자로서, 완전체 면역글로불린 분자는 경쇄는 포함하지 않고 오로지 중쇄만으로 이루어질 수 있다. 예를 들어 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448(1993)]을 참조하시오. 그러므로 "면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드"란, 단일 중쇄 폴리펩티드 또는 단일 경쇄 폴리펩티드를 의미한다. 면역글로불린 분자는 또한 "항체"라고도 칭하여지는데, 이 용어들은 본원에서 호환되어 사용된다. "분리된 면역글로불린"이란, 단백질이나 다른 물질이 있는 환경으로부터 실질적으로 분리된 것으로서, 특이적 항원과 결합하는 면역글로불린 분자 하나 또는 면역글로불린 분자 2개 이상을 말한다.

[0038] 면역글로불린 분자의 "군(class)"을 결정하는 중쇄는 서브유닛 폴리펩티드 2개 중 크기가 더욱 큰 것으로서, 가변 영역과 불변 영역을 포함한다. "중쇄"란, 분비된 전장 중쇄 형으로서 세포로부터 방출된 것을 의미하거나, 또는 막에 결합하고 있는 중쇄 형으로서 막에 펼쳐져 있는 도메인을 포함하는 것, 예를 들어 EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절과의 융합체를 의미한다. 면역글로불린 "군"이란, 숙주 내에서 상이한 기능을 발휘하는 넓은 의미의 면역글로불린 군을 말한다. 예를 들어 인간 면역글로불린은 5개의 군, 즉 γ 중쇄를 포함하는 IgG, μ 중쇄를 포함하는 IgM, α 중쇄를 포함하는 IgA, ϵ 중쇄를 포함하는 IgE, 그리고 δ 중쇄를 포함하는 IgD로 분류될 수 있다.

[0039] "경쇄"란, 중쇄의 아미노 말단부와 결합하는, 크기가 더욱 작은 면역글로불린 서브유닛을 의미한다. 중쇄의 경우와 마찬가지로 경쇄도 가변 영역과 불변 영역을 포함한다. 상이한 종류의 경쇄가 2개 존재하는데(κ 및 λ), 이것들의 쌍은 다양한 중쇄들 중 임의의 것의 쌍과 결합하여 면역글로불린 분자를 형성할 수 있다.

[0040] 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드는 통상 불변 영역과 가변 영역을 포함한다. 대부분의 종에서 중쇄 가변 영역, 즉 VH 도메인과, 경쇄 가변 영역, 즉 VL 도메인은 서로 결합하여 "상보성 결정 영역" 즉 CDR(항원의 에피토프를 특이적으로 인지하는 면역글로불린 분자의 일부)을 형성한다. 중쇄 및 경쇄 불변 영역과 결합하는 가변 영역의 거대 레퍼토리는 동물에서 항체 생산 세포가 분화됨에 따라서, 소정의 가변 영역을 코딩하는 유전자가 생산되는 일련의 생식 세포주 DNA 분절의 재배열을 통해 생산된다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역들의 추가 변이는 분화된 세포 내에서의 체세포 돌연 변이를 통해 일어난다. 면역글로불린 분자의 구조와 생체 내 생산은 면역학 분야의 당업자들에 의해 잘 이해되고 있다. 면역글로불린 다양성 발생에 관하여 간결하게 검토된 바는, 예를 들어 본원에 그 자체로서 참고 문헌으로 인용되어 있는 문헌[Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)(이하, "Harlow") 및 Roitt, et al, Immunology Gower Medical Publishing, Ltd., London (1985)(이하, "Roitt")]에서 확인될 수 있다.

[0041] 본원에 사용된 면역글로불린 분자의 "항원 특이적 단편"이란, 항원과의 결합 능력을 보유하는 면역글로불린 분자의 임의의 단편 또는 변이체를 말한다. 항원 특이적 단편으로서는 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 면역글로불린(예를 들어 중쇄 또는 이의 일부, 그리고 경쇄 또는 이의 일부가 융합된 것), 이황화 결합 Fvs(sdFv), 다이아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), scFv 미니바디(minibody), Fab 미니바디, 그리고 이량체 scFv와, VL 및 VH 도메인을, 특이적 CDR이 형성되는 형태로 포함하는 기타 임의의 단편을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 항원 특이적 면역글로불린 단편은 가변 영역(들)만을 단독으로 포함할 수 있거나, 또는 이 가변 영역(들)과 중쇄 상의 불변 영역 전부 또는 일부, 예를 들어 CH1, CH2, CH3 도메인, 그리고 경쇄 상의 경쇄 불변 도메인, 예를 들어 C _{κ} 또는 C _{λ} 도메인 또는 이의 일부를 함께 포함할 수 있다. 임의의 양태에서, 본원에 개시된 융합 단백질은 EEV 특이적 막 단백질, 예를 들어 A56R의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절에 융합된 CH1 불변 도메인에 융합된 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0043] 임의의 양태에서, 본 발명은 단독으로 또는 협력하여 항원 특이적 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 동정, 즉 선별 또는 대안적으로 스크리닝하는 방법과 연관되어 있다. 임의의 구체예에서, 관심 항원 특이성을 가지는 면역글로불린 분자를 선별하는 방법이 제공되는데, 여기서 면역글로불린 또는 항체는 EEV의 표면에 전시되고, 이 EEV는 분리되며, 면역글로불린의 일부, 예를 들어 VH부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 분리된다.

[0044] 임의의 양태에서, 항원 특이적 면역글로불린 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 선별하는 방법이 제공되는데, 이 방법은 (1) 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 숙주 세포군에 폴리뉴클레오티드의 제1 라이브러리를 도입하는 단계를 포함한다. 상기 라이브러리는 면역글로불린 융합 폴리펩티드 다수 개를 코딩하는 백시니아 바이러스 벡터, 예를 들어 EEV 벡터 내에서 구성될 수 있으며, 이 백시니아 바이러스 벡터는 (a) 인간 중쇄 CH1 도메

인, 예를 들어 CH1-감마 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드, (b) 백시니아 바이러스 막 단백질의 세포외 도메인 및 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절, 예를 들어 EEV 특이적 막 단백질, 예를 들어 A56R의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드, 그리고 (c) 면역글로불린 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 제3 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 방법은 또한 (2) 경쇄, 예를 들어 공지된 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 하나 또는 면역글로불린 경쇄를 각각 코딩하는 폴리뉴클레오티드 다수 개를 포함하는 제2 라이브러리가 숙주 세포군에 도입되는 단계를 추가로 포함한다. 일단 면역글로불린 융합 폴리펩티드가 숙주 세포군으로 도입되면, 이 면역글로불린 융합 폴리펩티드는 면역글로불린 경쇄와 합하여져 면역글로불린 분자의 항원 결합부를 형성할 수 있으며, 이 경우 상기 면역글로불린 분자는, 선별 가능한 입자, 예를 들어 숙주 세포에 의해 생산되어 주변 배지로 방출되는 EEV 비리온의 표면에 발현 또는 "전사"될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 숙주 세포로부터 방출된 EEV로서, 예를 들어 평판 또는 비드, 예를 들어 단백질 G 비드, 스트렙타비딘 비드 또는 토실화된 비드와의 항원 특이적 결합에 의해 관심 항원과 결합하는 EEV를 선별하는 방법을 추가로 제공한다. 그 다음, 관심 항원 결합 도메인을 발현하는 EEV는 회수되어 신규 숙주 세포들을 재감염하는데 사용될 수 있으며, 이로 인해 관심 항원과 결합하는 면역글로불린의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 EEV는 증식하게 된다. 이후, 폴리뉴클레오티드는 회수될 수 있다. 본 발명의 방법은 반복 수행될 수 있는데, 이로써 관심 중쇄 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 증량될 수 있다.

[0045] 그 다음, 관심 항원과 결합하는 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드 융합 단백질을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절에 융합되는 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드들의 라이브러리가 존재하는 숙주 세포로 운반되어, 여기에서 (EEV 융합 단백질 또는 이것 외의 형태로서) 발현될 수 있으며, 이로써 상기 제1 단계에서 동정된 중쇄 가변 영역과 합하여질 때, 특이적 항원을 인지하는 기능성 면역글로불린 분자 또는 이의 단편을 형성하는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 동정될 수 있는 것이다.

[0046] 본원에 사용된 "라이브러리"란, 폴리뉴클레오티드들의 대표적인 속(genus), 즉, 예를 들어 단일 동물 종, 조직류, 기관 또는 세포 류로부터의 기원함으로 인해 연관되어 있는 폴리뉴클레오티드들의 하나의 군을 말하는데, 여기서 라이브러리는 총체적으로 폴리뉴클레오티드의 소정의 속에 속하는 상이한 종들 2개 이상을 포함한다. 폴리뉴클레오티드 라이브러리는 폴리뉴클레오티드의 소정의 속에 속하는 상이한 종들 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개 이상을 포함할 수 있다. 상기 속은 관련된 분자들, 예를 들어 면역글로불린 가변 영역, 예를 들어 인간 면역글로불린 VH 도메인 또는 VL 도메인일 수 있다. VH 및 VL 도메인은 가변 도메인의 전체 레퍼토리를 나타낼 수 있거나, 아니면 이미 항원 특이적일 수 있다(예를 들어 동일한 항원에 특이적일 수 있다). 더욱 특히, 라이브러리는 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드, 즉 중쇄 서브유닛 폴리펩티드 또는 경쇄 서브유닛 폴리펩티드 다수 개를 코딩할 수 있다. 이와 같은 내용에 있어서, "라이브러리"는 공통 속의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 이때 상기 속은 임의의 유형 및 군의 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고, 예를 들어 라이브러리는 인간 μ , γ -1, γ -2, γ -3, γ -4, α -1, α -2, ϵ 또는 δ 중쇄, 또는 인간 κ 또는 λ 경쇄를 코딩할 수 있다. 비록 임의의 라이브러리 하나를 이루는 각 구성원은 동일한 중쇄 또는 경쇄 불변 영역을 코딩할 수 있지만, 이 라이브러리는 총체적으로 상이한 가변 영역 2개 이상, 또는 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개 이상(즉 공통 불변 영역과 결합하는 가변 영역 "다수 개")을 포함할 수 있다.

[0047] 다른 구체예에서, 라이브러리는 가변 영역, 예를 들어 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역을 포함하거나 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 둘다를 포함할 수 있는 면역글로불린 단쇄 단편 다수 개를 코딩할 수 있다.

[0048] 하나의 양태에서, 본원에는 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드들의 라이브러리를 제조하는 방법이 제공되어 있다. 또한 진핵 생물 발현 벡터, 예를 들어 EEV에서 융합 단백질로서 구성되는 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드의 라이브러리들도 추가로 제공되는데, 여기서 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드는 EEV 특이적 막 단백질, 예를 들어 A56R의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절에 융합된다.

[0049] "수용체 세포" 또는 "숙주 세포" 또는 "세포"란, 본원에 기술된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 라이브러리들이 도입되는 세포 또는 세포군을 의미한다. 본원에 개시된 라이브러리에 적당한 숙주 세포로서는 백시니아 바이러스 감염성을 허용하는 진핵 생물 세포가 있다. 적당한 세포주는 척추 동물, 포유동물, 설치류, 마우스, 영장류 또는 인간 세포 또는 세포주일 수 있다.

- [0050] "숙주 세포군(population)"이란, 본원에 제공된 바와 같은 "라이브러리"가 도입되어 발현될 수 있는 배양 세포 군을 의미한다. 본원에 기술된 바와 같은 EEV 라이브러리용 숙주 세포는 백시니아 바이러스 감염성을 허용할 수 있다. 본 발명의 숙주 세포는 부착성일 수 있는데, 다시 말해서 본 발명의 숙주 세포는 고체 기판에 부착되어 성장하거나, 또는 현탁액 중에 존재할 수 있다.
- [0051] 전술된 바와 같이, 면역글로불린 분자를 동정하기 위한 임의의 방법은 (예를 들어 VH-CH1-A56R 융합 단백질을 코딩하는) 폴리뉴클레오타이드의 "제1" 라이브러리가 숙주 세포군에 도입되는 단계와, (예를 들어 VL부를 코딩하는) 폴리뉴클레오타이드의 "제2" 라이브러리가 동일한 숙주 세포군에 도입되는 단계를 포함한다. 제1 라이브러리 및 제2 라이브러리는 상보성인데, 다시 말해서 만일 "제1" 라이브러리가 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 코딩하면, "제2" 라이브러리는 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 코딩할 것이고, 이로 인하여 숙주 세포군에서 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편이 조립될 수 있으며, 그 결과 면역글로불린은 EEV 표면상에 전시 또는 발현된다.
- [0052] 본원에 기술된 라이브러리들에 포함된 폴리뉴클레오타이드들은 "전사 제어 영역과의 작동 가능한 결합"을 통하여 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 핵산 분자들이 기능적 관계를 이루며 배치될 때, 소정의 폴리뉴클레오타이드 중 핵산 분자 하나 이상은 "작동 가능하도록 결합"한다. 이와 같은 관계는 적당한 분자들(예를 들어 전사 활성 인자 단백질들, 중합 효소 등)이 조절 서열(들)에 결합할 때, 코딩 영역의 발현을 허용하는 방식으로 연결되는 조절 서열(들)과 폴리펩티드 코딩 영역 사이에 존재할 수 있다. "전사 제어 영역"으로서는 프로모터, 인핸서, 작동 인자 및 전사 종결 신호를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 또한 자체의 전사를 유도하는 폴리뉴클레오타이드와 함께 포함된다. 예를 들어 만일 프로모터가 핵산 분자의 전사를 진행시킬 수 있다면, 이 프로모터는 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자와 작동 가능하도록 결합한 것일 것이다. 일반적으로 "작동 가능하도록 결합"이란, DNA 서열들이 폴리뉴클레오타이드 내에서 연속적으로 존재하거나 가까이 연결되어 있음을 의미한다. 그러나 몇몇 전사 제어 영역들, 예를 들어 인핸서는 연속적으로 존재할 필요가 없다.
- [0053] "제어 서열" 또는 "제어 영역"이란, 특정 숙주 유기체 내에서 작동 가능하도록 결합되어 있는 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 진행 생물 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및/또는 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0054] 다양한 전사 제어 영역들이 당 업자들에게 알려져 있다. 이하 더욱 자세히 기술될 것이지만, 적당한 전사 제어 영역들은 폭스 바이러스 감염 세포의 세포질 내에서 작용을 할 수 있는 프로모터들을 포함한다.
- [0055] 임의의 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은 융합 단백질은, 예를 들어 면역글로불린 불변 도메인, 예를 들어 CH1, C-카파 또는 C-람다 도메인에 면역글로불린 가변 도메인을 연결하는/연결하거나 EEV 특이적 막 단백질, 예를 들어 A56R의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절에 불변 도메인을 연결하는 링커를 포함할 수 있다. 링커는, 예를 들어 약 5개 이상, 약 10개 이상 또는 약 15개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다. 적당한 링커는 당 업자에 의해 동정될 수 있다.
- [0056] 본원에 개시된 융합 단백질이 중쇄 불변 영역, 예를 들어 CH1 도메인을 포함하는 경우, 임의의 중쇄 불변 영역, 예를 들어 척추 동물, 예를 들어 조류, 어류 또는 포유동물로부터 유래하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역, 예를 들어 인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역(이에 한정되는 것은 아님)이 이용될 수 있다. 예를 들어 인간 면역글로불린 중쇄 또는 이의 일부, 예를 들어 CH1 도메인은 μ 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgM 면역글로불린의 중쇄, γ -1 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgG1 면역글로불린의 중쇄, γ -2 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgG2 면역글로불린의 중쇄, γ -3 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgG3 면역글로불린의 중쇄, γ -4 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgG4 면역글로불린의 중쇄, α -1 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgA1 면역글로불린의 중쇄, α -2 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgA2 면역글로불린의 중쇄, ϵ 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgE 면역글로불린의 중쇄, 또는 δ 중쇄 또는 이의 단편, 즉 IgD 면역글로불린의 중쇄일 수 있다.
- [0057] 본원에 기술된 바와 같은 막 결합 융합 단백질은 입자, 예를 들어 백시니아 바이러스 입자(또는 비리온), 예를 들어 EEV 입자(또는 비리온)의 표면에, 중쇄 폴리펩티드에 융합된 경막 도메인에 의해 고정될 수 있다. 임의의 구체예에서, 경막 도메인은 EEV 특이적 막 단백질, 즉 세포의 외피보유 백시니아 바이러스의 표면에는 발현되거나 세포 내 백시니아 바이러스 입자에는 발현되지 않는 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절의 일부이다. 임의의 구체예에서, EEV 특이적 막 단백질은 A56R, 즉 백시니아 HA 단백질이다. "세포내 도메인", "세포질 도메인", "세포 기질 영역" 또는 본원에서 호환되어 사용되고 있는 관련 용어들은, 세포 내부에 존재하는 용

합 폴리펩티드의 일부를 의미한다.

- [0058] 융합 단백질 또는 기타 라이브러리 단백질이 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 구체예들에서, 임의의 동물 종으로부터 유래하는 임의의 면역글로불린 경쇄, 예를 들어 척추 동물, 예를 들어 조류, 어류 또는 포유동물로부터 유래하는 면역글로불린 경쇄, 예를 들어 인간 면역글로불린 경쇄, 예를 들어 인간 κ 및 λ 경쇄가 사용될 수 있다. 경쇄는 중쇄와 결합하여 면역글로불린 분자의 항원 결합 단백질을 이룰 수 있다.
- [0059] 본원에 기술된 바와 같은 중쇄 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리의 각 구성원은, (a) 라이브러리의 구성원 모두에 공통되는 면역글로불린 불변 영역, 예를 들어 CH1 도메인, 예를 들어 감마 또는 뮤 CH1 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제1 핵산 분자, (b) 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질(예를 들어 A56R)의 세포의 도메인 및 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제2 핵산 분자로서, (이것과 직접 융합되거나 링커에 의해 연결된) 제1 핵산 분자의 바로 하류 쪽에 인-프레임(in-frame) 상태로 존재하는 제2 핵산 분자, 그리고 (c) 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 제3 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제3 핵산 분자로서, (이것과 직접 융합되거나 링커에 의해 연결된) 제1 핵산 분자의 바로 상류 쪽에 인-프레임 상태로 존재하는 제3 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0060] 본원에 기술된 바와 같은 경쇄 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리의 각 구성원은 (a) 라이브러리의 모든 구성원에 공통된 면역글로불린 불변 영역, 예를 들어 C-카파 또는 C-람다 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제1 핵산 분자, (b) 백시니아 세포의 외피보유 바이러스(EEV) 특이적 막 단백질(예를 들어 A56R)의 세포의 도메인 및 경막 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제2 핵산 분자로서, (이것과 직접 융합되거나 링커에 의해 연결된) 제1 핵산 분자의 바로 하류 쪽에 인-프레임 상태로 존재하는 제2 핵산 분자, 그리고 (c) 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 폴리펩티드 분절을 코딩하는 제3 핵산 분자로서, (이것과 직접 융합되거나 링커에 의해 연결된) 제1 핵산 분자의 바로 상류 쪽에 인-프레임 상태로 존재하는 제3 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0061] EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절에 융합되지 않는 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 라이브러리는, 기능성 항원 결합 면역글로불린 단편을 생산하기 위해 "상보성인" 면역글로불린 사슬을 제공하도록 숙주 세포를 공동 감염시키는데 사용될 수 있다. 이와 같은 라이브러리는, 예를 들어 미국 특허 제 7,858,559호에 상세히 기술되어 있다.
- [0062] 중쇄 또는 경쇄 가변 영역들을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리들은 다수 개, 즉 2개 이상, 또는 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 또는 10^9 개 이상의 상이한 가변 영역을 포함할 수 있다. 당 업자에게 널리 알려진 바와 같이, 경쇄 가변 영역은, 각각이 경쇄 VL부, 특히 V κ 부 또는 V λ 부와, 경쇄 J부, 특히 J κ 부 또는 J λ 부를 포함하는, 재배열된 핵산 분자들에 의해 코딩된다. 이와 유사하게, 중쇄 가변 영역은, 각각이 중쇄 VH부, D부 및 J부를 포함하는, 재배열된 핵산 분자들에 의해 코딩된다. 이와 같은 재배열은 세포가 분화할 때 DNA 수준에서 일어난다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산 분자는, 특정 에피토프에 대한 특이성을 가지는 항체를 발현하도록 최종적으로 분화된 성숙한 B 세포 및 혈장 세포로부터, 예를 들어 PCR에 의해 얻어질 수 있다. 뿐만 아니라, 만일 특이적 항원에 대한 항체가 요망되면, 가변 영역은, 상기 항원으로 면역화됨으로써 해당 항원과 상호 작용을 하는 항체 가변 영역을 생산하게 되었거나 이 항체 가변 영역의 레퍼토리가 증폭된 동물의 성숙한 B 세포 및 혈장 세포로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, 만일 더욱 다양한 라이브러리가 요망되면, 가변 영역은, 면역글로불린 유전자의 재배열을 마쳤으며 항원(자기 항원 또는 비자기 항원)에는 아직 노출되지 않은 전구체 세포, 예를 들어 전구 B 세포 및 미성숙 B 세포로부터 분리될 수 있다. 예를 들어 가변 영역은 RT-PCR에 의해 정상 인간의 골수(다수의 공여자로부터 풀링된 골수)로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, 가변 영역은 합성에 의해 제조된 것, 예를 들어 실험실에서 합성 올리고뉴클레오타이드를 생산함으로써 제조될 수 있거나, 또는 생식 세포 계열 DNA를 시험관 내 조작하여 면역글로불린 유전자들을 재배열함으로써 유도될 수 있다.
- [0063] 면역글로불린 불변 영역 및 가변 영역을 코딩하는 각각의 제1 핵산 분자 및 제2 핵산 분자 이외에, 전술된 바와 같은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 라이브러리의 각 구성원은, 가변 영역을 코딩하는 핵산 분자의 바로 상류 쪽에 인-프레임 상태로 존재하는 신호 펩티드를 코딩하는 부가의 핵산 분자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] "신호 펩티드"란, 예를 들어 신생 면역글로불린 폴리펩티드 서브유닛의 숙주 세포 표면으로의 운반을 유도하는 폴리펩티드 서열을 의미한다. 신호 펩티드는 당 업계에서 "신호 서열", "리더 서열", "분비 신호 펩티드" 또는 "분비 신호 서열"이라고도 칭하여진다. 신호 펩티드는 보통 완전체 또는 "미성숙" 폴리펩티드의 일부로서 발현되며, 통상적으로는 N-말단에 위치한다.

- [0065] 본 발명의 숙주 세포를 비롯한 모든 세포는 구성적 분비 경로[운반을 앞 두고 분비된 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드를 비롯한 단백질이 세포로부터 분비되는 경로]를 갖는다. 이러한 단백질은 변형이 일어날 수 있는 ER-골지 가공 경로를 거치게 된다. 만일 단백질 상에서 추가의 신호들이 검출되지 않으면, 단백질은 숙주 세포 또는 바이러스 입자, 예를 들어 EEV 비리온의 표면에 발현되는 완전체 막 구성 성분으로서 삽입 또는 분비되도록 세포의 표면으로 이동될 것이다. 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드의 막 결합형은 처음에 분비형이 겪었던 경로와 동일한 경로를 따라서 ER 내강을 통과하게 되는데, 다만 상기 막 결합형 폴리펩티드는 정지-운반 신호 또는 "경막 도메인"이 존재함으로 인해 ER 막에 남게 된다. 경막 도메인은 알파 나선 형태를 취하고, 약 20개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, 소수성이고, 막을 가로질러 존재하는 구획이다. 막에 매립되어 있던 단백질들은 원형질막의 인지질 이중 층에 고정된다. 분비되는 단백질의 경우와 마찬가지로, 경막 단백질의 N-말단부는 막을 관통하여 ER의 내강으로 배출될 때 절단되는 신호 펩티드를 갖는다.
- [0066] 새로이 합성된 면역글로불린 중쇄들은, BiP(Hsp70 분자 샤페론 과의 일원)라고 불리는 샤페론 단백질(chaperone protein)에 의해 ER 내부에 체류하게 된다. 중쇄 CH1 도메인과 이 중쇄의 파트너 경쇄 CL 도메인이 쌍을 이루면, BiP는 해리되고, 폴딩이 완결되며, 이황화 결합이 형성될 뿐만 아니라, 조립된 항체는 ER로부터 배출된다. 그 다음, 항체는 세포의 정상 분비 경로를 통해 골지를 거쳐 세포 표면으로 운반되고, 여기에서 분비되거나 (만일 항체가 경막 도메인을 갖는다면) 표면에 머무르게 되는 것이다. 문헌[Daniel et al., Molecular Cell 34:635-36(2009)]을 참조하시오.
- [0067] 본원에 제공된 적당한 신호 펩티드는 자연 발생 면역글로불린 신호 펩티드, 즉 자연 발생 중쇄 또는 경쇄 전사체의 일부인 서열에 의해 코딩되는 자연 발생 면역글로불린 신호 펩티드이거나, 아니면 전사체 일부와 작동 가능하게 결합하고 있는 것으로서, 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드의 분비를 유도하는 능력을 보유하는 서열의 기능성 유도체일 수 있다. 대안적으로 이중 신호 펩티드 또는 이의 기능성 유도체가 사용될 수 있다. 임의의 양태에서, 신호 펩티드는 백시니아 바이러스 A56R 단백질 또는 이의 기능성 유도체의 것일 수 있다.
- [0068] 다른 양태에서, 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드 라이브러리의 구성원들은 이중 폴리펩티드를 코딩하는 부가의 핵산 분자들을 추가로 포함할 수 있다. 이와 같이 이중 폴리펩티드를 코딩하는 부가의 핵산 분자는, 면역글로불린 가변 도메인이나 불변 도메인, 또는 EEV 특이적 막 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 상류 쪽이나 하류 쪽에 존재할 수 있다.
- [0069] 부가의 핵산 분자에 의해 코딩되는 이중 폴리펩티드는 구조 서열(rescue sequence)일 수 있다. 구조 서열은 면역글로불린이나 이의 단편, 또는 이 면역글로불린이나 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 정제 또는 분리하기 위하여 사용될 수 있는 서열이다. 그러므로, 예를 들어 펩티드 구조 서열은 정제 서열, 예를 들어 6-His 태그(Ni 친화성 컬럼에 사용) 및 에피토프 태그(검출, 면역 침전 또는 FACS(형광 활성화 세포 분류)에 사용)를 포함한다. 적당한 에피토프 태그는 myc(시판중인 9E10 항체와 함께 사용), 박테리아 효소 BirA의 BSP 바이오틴화 표적 서열, flu 태그, LacZ 및 GST를 포함한다. 부가의 핵산 분자는 또한 펩티드 링커를 코딩할 수도 있다.
- [0070] 본원에 개시된 다양한 라이브러리들에 포함된 폴리뉴클레오티드들은 적당한 숙주 세포에 도입될 수 있다. 적당한 숙주 세포는, 예를 들어 세포 자체의 표면에 부착되는 면역글로불린 분자를 발현할 수 있거나, 또는 백시니아 바이러스의 감염성을 허용하는 것을 특징으로 할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 당 업자들에게 널리 알려져 있는 방법에 의해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오티드가 바이러스 벡터, 예를 들어 백시니아 바이러스의 일부일 경우, 폴리뉴클레오티드는 표준 감염법에 의해서 숙주 세포로 편리하게 도입될 수 있다.
- [0071] 폴리뉴클레오티드의 제1 라이브러리 및 제2 라이브러리는 임의의 순서로 또는 동시에 숙주 세포로 도입될 수 있다. 예를 들어 만일 상기 폴리뉴클레오티드의 제1 라이브러리 및 제2 라이브러리 둘 다가 백시니아 바이러스 벡터 내에서 구성되면, 이 백시니아 바이러스가 감염성이든 불활성화된 것이든 간에, 상기 벡터는 동시 감염에 의해 혼합물로서 도입될 수 있거나, 아니면 연속 감염 방식으로 도입될 수 있다. 만일 상기 제1 라이브러리 및 제2 라이브러리 중 어느 하나가 백시니아 바이러스 벡터 내에서 구성되고, 다른 하나는 플라스미드 벡터 내에서 구성된다면, 백시니아 바이러스 벡터 내에서 구성된 라이브러리가 먼저 도입된 후 나머지 라이브러리가 도입된다.
- [0072] 폴리뉴클레오티드의 제1 라이브러리 및 제2 라이브러리가 숙주 세포로 도입됨에 따라서, 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편의 EEV 표면에 발현이 허용된다. "발현이 허용되는 것"이란, 숙주 세포 내에 도입된 벡터들이, 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드의 전사 및 번역을 진행하는 것이 허용되고, 이로써 숙주 세포가, 조립이 완성된 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을, EEV 특이적 막 단백질의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드 분절과의 융합체로서 막 표면으로 운반할 수 있게 되는 것을 의미한다. 통상적으로 발현이 허

용되기 위해서는, 폴리뉴클레오티드가 도입된 숙주 세포가, 발현이 진행되기에 적당한 조건 하에서 항은 처리되는 것이 필요하다. 이와 같은 조건과, 발현이 진행되는 데 필요한 시간은 숙주 세포 및 벡터의 선택에 따라서 달라질 것이며, 이에 대해서는 당업자들에게 널리 알려져 있다.

[0073] 임의의 구체예에서, 자체의 표면에 면역글로불린 분자가 발현될 수 있거나, 세포 배지로 분비될 가용성 면역글로불린이 발현될 수 있게 된 숙주 세포 및/또는 배시니아 비리온은 이후 항원과 접촉하게 된다. 본원에 사용된 "항원"이란, 항체, 면역글로불린 분자 또는 이 분자의 항원 특이적 단편과 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 말한다. "특이적으로 결합함"이란, 항원이 항체의 CDR과 결합하는 것을 의미한다. CDR과 특이적으로 상호 작용하는 항원의 일부는 "에피토프" 또는 "항원 결정기"라고 한다. 항원은 에피토프를 하나 포함할 수 있지만, 통상적으로 항원은 에피토프를 2개 이상 포함하며, 항원의 크기, 형태 및 종류에 따라서 임의의 수의 에피토프를 포함할 수 있다.

[0074] 항원은 통상 펩티드 또는 폴리펩티드인데, 임의의 분자 또는 화합물일 수도 있다. 예를 들어 유기 화합물, 예를 들어 디니트로페놀, 즉 DNP, 핵산, 탄수화물, 또는 이와 같은 화합물들 중 임의의 것의 혼합물(펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하거나 포함하지 않는 혼합물)이 적당한 항원일 수 있다. 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프의 최소 크기는 약 4~5개 아미노산인 것으로 생각된다. 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프는 아미노산을 7개 이상, 9개 이상, 또는 약 15개 이상~약 30개 포함할 수 있다. CDR은 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드를, 이 펩티드 또는 폴리펩티드 자체의 3차원 형태로서 인지할 수 있기 때문에, 에피토프를 포함하는 아미노산은 연속적일 필요가 없으며, 심지어 몇몇 경우에는 동일한 펩티드 사슬 상에 존재하지 않을 수도 있다. 본 발명에 있어서, 펩티드 또는 폴리펩티드 항원은 아미노산 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 그리고 약 15~약 30개로 이루어진 서열을 포함할 수 있다. 임의의 구체예에서, 항원성 에피토프를 포함하거나 이 에피토프로 이루어진 펩티드 또는 폴리펩티드의 길이는, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100개 이상 아미노산 잔기이다. 항원은 임의의 형태를 취할 수 있고, 예를 들어 용액 중에 용해되어 유리된 채 존재할 수도 있으며, 또는 임의의 기관에 부착될 수도 있다. 적당한 기관은 본원에 개시되어 있다. 임의의 구체예에서, 항원은 항원 발현 배시니아 바이러스, 예를 들어 EEV 비리온의 일부일 수 있다(이하 더욱 상세히 기술됨).

[0075] 임의의 항원에 특이적인 면역글로불린 분자는 본원에 개시된 방법들에 따라서 제조될 수 있다. 임의의 구체예에서, 항원은 "자기" 항원, 즉 면역글로불린 분자가 생산된 종과 동일한 종으로부터 유래하는 항원이다. 예를 들어 인간 종양 항원에 대해 생성된 인간 항체를 제조하는 것이 요망될 수 있다. 기타 요망되는 "자기" 항원으로서는 시토킨, 수용체, 리간드, 당단백질 및 호르몬을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 감염성 제제상 항원에 대하여 유도된 항체는 또한 본원에 개시된 방법들에 의해서 동정 및 선별될 수도 있다. 이와 같은 항원의 예로서는 박테리아 항원, 바이러스 항원, 기생체 항원 및 진균 항원을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 면역글로불린 분자가 EEV 표면에 발현되는 임의의 선별 및 스크리닝 방법에 있어서, 전술된 바와 같이 생산된 재조합 EEV 비리온은, 항원(EEV 표면에 발현된 면역글로불린 분자의 CDR을 특이적으로 인지하는 항원)이 CDR과 결합하도록 함으로써, 항원과 특이적으로 결합하는 재조합 EEV 비리온이, 항원과 결합하지 않는 EEV 비리온과 구별되도록 만드는 방법을 통하여, 항원과 "접촉"하게 된다. 항체의 항원 특이적 결합 도메인을 발현하는 재조합 EEV 비리온이 항원과 상호 작용하도록 하는 임의의 방법이 포함된다. 예를 들어 만일 EEV 비리온이 현탁액 중에 존재하고, 항원은 고체 기관에 부착되어 존재한다면, 항원과 특이적으로 결합하는 재조합 EEV 비리온은 고체 기관상에 포집될 것이며, 이로써 항원과 결합하지 않는 비리온들은 씻겨나가게 될 것이고, 또한 항원과 결합하는 재조합 EEV 비리온은 추후 회수될 것이다. 재조합 EEV 비리온이 항원과 접촉될 수 있도록 만드는 방법은 본원에 개시되어 있다.

[0078] 항원과 특이적으로 결합하는 재조합 EEV 비리온이 회수된 후, 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오티드들은 이와 같은 EEV 비리온으로부터 회수될 수 있다. "회수"란, 원하지 않는 성분들로부터 원하는 성분을 대충 분리하는 것을 의미한다. 예를 들어 항원과 결합하는 재조합 EEV 비리온은, 이 비리온 자체와 항원 코팅 고체 기관, 예를 들어 자성 비드(이후 자석이 사용되어 분리될 수 있음)의 부착성을 바탕으로 "회수"될 수 있다.

[0079] 폴리뉴클레오티드의 회수는 당 업자들에게 알려져 있는 임의의 표준적 방법에 따라서 이루어질 수 있다. 임의의 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 항원과 결합한 감염성 EEV 비리온을 수득함으로써 회수된다.

[0080] 당 업자들에게 용이하게 이해될 바와 같이, 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 동정

되기 위해서는 전술된 선별 과정이 2 라운드 이상 수행될 필요가 있을 수 있으며, 반드시 전술된 바와 같은 스크리닝 과정이 2 라운드 이상 수행되어야 할 것이다. 선별 과정의 단일 라운드만으로는 반드시 원하는 제1 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 순수한 세트가 분리될 수 있는 것은 아니며; 제1 라운드 이후에 제조된 혼합물 중에는 원하는 폴리뉴클레오티드가 증량될 수 있지만, 이 혼합물은 또한 표적이 아닌 삽입 서열들로 오염되어 있을 수도 있다. 그러므로, 전술된 바와 같은 제1 선별 단계는 1회 이상 반복될 수 있거나 반복되어야 하고, 이로써 원하는 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 증량된다. 본 구체예의 제1 단계를 반복하기 위해서, 전술된 바와 같이 회수된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 EEV는 감염을 통하여 숙주 세포군으로 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 제2 라이브러리도 또한, 예를 들어 라이브러리 내 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 상보적 면역글로불린 분자(예를 들어 경쇄)를 발현할 수 있는 백시니아 바이러스를 이용하는 감염을 통해 이와 같은 숙주 세포에 도입되기도 하며, 이로써 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편의, 재조합 EEV 비리온 막 표면상에서의 발현이 허용된다. 재조합 EEV 비리온들은 유사하게 항원과 접촉하며, 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오티드들은 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 발현하는 EEV 비리온으로부터 또다시 회수된다. 이와 같은 단계들은 1회 이상 반복 실시될 수 있으며, 그 결과, 면역글로불린 분자의 일부 또는 이의 항원 특이적 단편으로서 항원과 특이적으로 결합하고/결합하거나 원하는 기능상의 특징을 갖는 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는, 제1 라이브러리 유래 폴리뉴클레오티드들이 증량될 수 있다.

[0081] 전술된 바와 같이 제1 라이브러리로부터 유래하는, 원하던 폴리뉴클레오티드가 적당히 증량됨에 따라서, 회수된 폴리뉴클레오티드들은 "단리(분리)"되는데, 즉 회수된 폴리뉴클레오티드들은 이것들이 존재하던 원래의 환경으로부터 실질적으로 격리되고, 항원 특이적 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하지 않는, 라이브러리 내 폴리뉴클레오티드들로부터 대충 분리된다. 예를 들어 클로닝된 후 벡터 내에 포함되게 된 폴리뉴클레오티드는 분리된 것으로 간주된다. 예를 들어 경쇄와 합하여질 때 동일한 항원과 특이적으로 결합하는 상이한 면역글로불린 융합 폴리펩티드 2개 이상은 본원에 기술된 방법들에 의해 회수될 수 있다는 것이 이해된다. 그러므로 동일한 항원에 결합하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 혼합물도 "분리된 것"으로 간주한다. 분리된 폴리뉴클레오티드에 관한 추가의 예로서는 이중 숙주 세포 내에 유지되는 것들, 재조합 백시니아, 예를 들어 EEV 비리온 내에 유지되는 것들, 또는 용액 중 (부분적으로나 실질적으로) 정제된 DNA 분자들을 포함한다. 그러나, 혼합된 라이브러리의 구성원으로서, 예를 들어 항원 특이적 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩함으로써 인하여 라이브러리의 다른 클론들로부터 분리되지 않는 클론 내에 포함된 폴리뉴클레오티드는, 본 발명의 목적에 비추어 보았을 때 "분리되지 않은 것"이다. 예를 들어 바이러스 벡터 내에 포함된 폴리뉴클레오티드는 그것이 회수된 후, 그리고 임의로는 용균 반 정제 후에는 "분리된 것"이라 할 수 있다.

[0082] 만일 항원이 에피토프를 2개 이상 포함할 수 있고 몇몇 상이한 면역글로불린 분자들이 임의의 소정 에피토프와 결합할 수 있다면, 몇몇 적당한 폴리뉴클레오티드(예를 들어 2개, 3개, 4개, 5개, 10개 또는 100개 이상의 폴리뉴클레오티드)는 이와 같은 구체예의 제1 단계로부터 회수될 수 있으며, 이 폴리뉴클레오티드 모두는, 미리 선별된 폴리뉴클레오티드 또는 제2 라이브러리의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 적당한 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드와 합하여질 때 관심 항원과 특이적으로 결합할 수 있는, 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 형성하게 될 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩할 수 있음이 고려된다. 제1 라이브러리로부터 회수된 상이한 폴리뉴클레오티드들 각각은 별도로 분리될 것임이 고려된다.

[0083] 이와 같은 구체예의 제2 단계에서, 하나 이상의 적당한 폴리뉴클레오티드가 제1 라이브러리로부터 분리되면, 제1 라이브러리로부터 분리된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 면역글로불린 융합 폴리펩티드(들)와 결합하여, 관심 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 형성할 수 있는 면역글로불린 서브유닛 폴리펩티드를 코딩하는 제2 라이브러리에서 폴리뉴클레오티드 하나 이상이 동정된다.

[0084] 본원에는 항원 결합 분자를 발현하기 위한 백시니아 바이러스 벡터가 제공되어 있는데, 이 경우 상기 항원 결합 분자, 예를 들어 면역글로불린 중쇄 가변 영역 및 CH1은 EEV 특이적 막 단백질과의 융합체로서 발현된다. 임의의 구체예에서, 중쇄는 EEV 융합체로서 회수될 수 있으며, 경쇄의 라이브러리 또는 미리 선별된 경쇄 각각은 백시니아 바이러스 또는 기타 벡터, 예를 들어 플라스미드 벡터 내에서 가용성 단백질로서 발현될 수 있다.

[0085] 임의의 양태에 있어서, 가용성 상보성 사슬, 예를 들어 경쇄를 발현하는 바이러스는 4'-아미노메틸-트리옥살렌(소랄렌)이 처리된 후 자외선(UV) 광선에 노출됨으로써 불활성화될 수 있다. 소랄렌 및 UV로 인한 바이러스의 불활성화는 당 업자들에게 널리 알려져 있다. 예를 들어 그 자체로서 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있는 문헌 [Tsung, K., et al, J Virol. 70:165-171 (1996)]을 참조하시오.

- [0086] 진핵 생물 세포 내에서 번역글로불린 서브유닛 폴리펩티드(이 폴리펩티드를 구성하는 하나의 서브유닛은 EEV 특이적 막 단백질과의 융합체로서 발현됨)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드들의 라이브러리 2개로부터 번역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편이 조립 및 발현되는 능력은 다양한 특이성을 가지는 번역글로불린 분자 또는 이의 항원 특이적 단편을 2단계로 선별하는 것의 기반이 될 수 있다는 점에서, 박테리아 계 내에서 단일 사슬 항체를 생산하는 방법에 비하여 유의적 개선점을 제공한다.
- [0087] *백시니아 EEV 벡터*. 폭스 바이러스는 DNA 바이러스들 중에서 유일무이하게 숙주 세포의 핵 외부에 있는 세포질 내에서만 복제하는 것이다. 복제 주기 동안 백시니아 바이러스는 외막이 상이한 4가지의 감염성 형태, 즉 세포 내 성숙 비리온(IMV), 세포 내 외피보유 비리온(IEV), 세포 결합 외피보유 비리온(CEV) 및 세포의 외피보유 비리온(EEV)을 생산한다. IMV는 하나의 지단백 막으로 이루어져 있는 반면에, CEV와 EEV는 둘 다 2개의 막 층으로 둘러싸여 있으며, IEV는 3개의 외피를 가진다는 것이 우세한 견해이다. EEV는 숙주 세포의 원형질막으로부터 탈락(shedding)되고, EEV 막은 후기 골지(trans-Golgi)로부터 유래한다.
- [0088] 감염 후, 바이러스는 자체의 막(들)을 잃게 되고, DNA/단백질 코어는 미세 소관을 따라서 세포 내로 운반된다. 초기 백시니아 mRNA에 의해 코딩되는 단백질(여기서, "초기"란 DNA 복제 이전(pre-DNA replication)으로서 정의됨)은 백시니아 코어를 감싸고 있던 외피를 벗겨낸 다음 DNA 복제를 개시한다. 이와 같은 복제는 본질적으로 ER의 위에 형성되는, "바이러스 공장(viral factory)"이라고 불리는 실체에서 진행된다. 미성숙 비리온(IV)은 바이러스 공장에서 조립된 후 가공을 거쳐 IMV(세포 내 성숙 바이러스)가 된다. IMV는 ER로부터 유래하는 막을 갖는다. 대다수의 IMV들은 세포 용해를 통해 세포로부터 방출된다. 일부 IMV들은 미세 소관 위에서 후기 골지 네트워크 또는 초기 엔도솜의 막에 의해 포장되는 위치로 이동하게 된다. IMP 입자들이 이중 막에 의해 포장되면 IEV(세포 내 외피보유 바이러스)라고 불리는 백시니아의 한 형태가 생성된다. 이후, 상기 IEV는 미세 소관 위에서 세포 표면으로 이동한다. 외부 IEV 막은 세포질 막과 융합되고, 그 결과 세포 표면에서는 CEV(세포 결합 외피보유 바이러스)가 노출된다. CEV는 숙주 세포로부터의 액틴 중합을 통해 이웃하는 세포를 감염시킬 수 있거나, 또는 상기 바이러스는 EEV로서 방출될 수 있다. 예를 들어 문헌[Kim L. Roberts and Geoffrey L. Smith. Trends in Microbiology 16(10):472-479 (2008); Geoffrey L. Smith, et al., Journal of General Virology 83:2915-2931 (2002)]을 참조하시오.
- [0089] 바이러스 코딩 단백질 6개 이상이 EEV 외피의 구성 성분인 것으로 보고되었다. 이와 같은 단백질들 중 4개(A33R, A34R, A56R 및 B5R)는 당 단백질이고, 다른 하나(A36R)는 글리코실화되지 않은 경막 단백질이며, 나머지 하나(F13L)는 팔미틸화된 표면 막 단백질이다. 예를 들어 문헌[Lorenzo et al., Journal of Virology 74(22):10535 (2000)]을 참조하시오. 감염이 일어나는 동안, 상기 단백질들은 골지 복합체로 이동되며, 여기서 단백질들은, 추후 세포의 배지로 이동되어 방출되는 감염성 바이러스 내에 통합되어 들어간다. 본원에 제공된 바와 같이, 번역글로불린 융합 폴리펩티드, 예를 들어 가변 중쇄는, 예를 들어 EEV 특이적 막 단백질, 예를 들어 A56R과의 융합 단백질로서 EEV 막에 결합한다.
- [0090] 본원에 제공된 EEV 융합 단백질은 임의의 적당한 백시니아 바이러스 내에서 발현될 수 있다. 임의의 구체예에서, EEV 융합 단백질을 코딩하는 DNA는 백시니아 바이러스 게놈의 한 영역(백터의 생장과 복제에 필수적이지 않은 영역)으로 삽입될 수 있으며, 이로써 감염성 바이러스가 생산되는 것이다. 비록 백시니아 바이러스 게놈의 다양한 불필수 영역이 특성 규명되어 있긴 하지만, 가장 널리 사용되는 외래 유전자 삽입 위치는, 게놈 내 HindIII J 단편 내에 존재하는 티미딘 키나제 위치이다.
- [0091] 번역글로불린 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 라이브러리는 백시니아 바이러스 벡터에 삽입되어, 폭스 바이러스로 감염된 세포의 세포질 내에서 기능을 발휘하는 전사 제어 영역과 작동 가능하게 결합한 상태가 된다.
- [0092] 폭스 바이러스 전사 제어 영역은 프로모터와 전사 종결 신호를 포함한다. 폭스 바이러스 내 유전자 발현은 일시적으로 조절되고, 초기, 중기 및 후기 유전자들은 다양한 구조를 갖게 된다. 임의의 폭스 바이러스 유전자는 구성적으로 발현되고, 이와 같은 "초기-후기" 유전자들에 대한 프로모터는 혼성 구조를 보유한다. 합성 초기-후기 프로모터도 개발되어 있다. 예를 들어 문헌[Hammond J.M., et al, J. Virol. Methods 66: 135-8 (1997); Chakrabarti S., et al., Biotechniques 25:1094-7 (1997)]을 참조하시오. 본원에 개시된 구체예에 있어서, 임의의 폭스 바이러스 프로모터가 사용될 수 있지만, 선택된 숙주 세포 및/또는 선별 방식을 바탕으로 초기, 후기 또는 구성적 프로모터가 사용되는 것이 요망될 수 있다. 임의의 구체예에서, 구성적 프로모터가 사용된다. 본원에 기술된 방법에 사용되기 적당한 프로모터는 초기/후기 7.5kd 프로모터이거나, 또는 초기/후기 H5 프로모터(또는 이의 변이체)이다.

[0093] 3 분자 재조합 방법. 라이브러리가 높은 효율 및 역가로 생산되는 구성 방법 및 스크리닝 방법이 백시니아에 대해서는 존재하지 않았기 때문에, 폭스 바이러스 벡터, 예를 들어 백시니아 바이러스는 통상적으로 미지의 관심 유전자를 복합 라이브러리로부터 미리 동정하는데 사용되지는 못하였다. 백시니아 바이러스 내에서 이중 단백질을 발현시키는 표준적인 방법들로서는, 생체 내 상동 재조합법 및 시험관 내 직접 결합법을 포함한다. 상동 재조합법이 사용되면, 재조합 바이러스 생산 효율은 약 0.1% 이하의 범위에 있게 된다. 비록 직접 결합법을 이용하는 재조합 바이러스 생산의 효율이 더 높긴 하지만, 달성되는 역가는 비교적 낮다. 그러므로 백시니아 바이러스 벡터가 사용되는 것은 단백질 발현 및 백신 개발을 목적으로 미리 분리된 DNA를 클로닝하는 것에 제한되었다.

[0094] 문헌[Zauderer, PCT 공개 공보 WO 제00/028016호 및 미국 특허 제7,858,559호]에 개시된 3 분자 재조합 방법은 백시니아 바이러스 내에서 라이브러리를 생산하는 고효율 및 고 역가 생산 방법이다. 본 발명의 발명자는 3 분자 재조합 방법을 실시함으로써 90% 이상의 효율과, 직접 결합법에 의해 달성되는 역가보다 2배 이상 높은 역가로 재조합 바이러스를 생산해 냈다.

[0095] 임의의 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은 면역글로불린 융합 폴리펩티드를 발현할 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리는 폭스 바이러스 벡터, 예를 들어 백시니아 바이러스 벡터 내에서 3 분자 재조합법에 의해 구성될 수 있다.

[0096] 임의의 구체예에서, 융합 폴리펩티드 라이브러리를 생산하기 위해 사용되는 운반 플라스미드가 제공되는데, 이 플라스미드는 백시니아 바이러스 H5 프로모터와의 작동 가능하게 결합함으로 인하여, 면역글로불린 중쇄 CH1 및 백시니아 바이러스 A56R 단백질의 적어도 경막 부를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 예시적 벡터로서는 프로모터를 포함하는 다음과 같은 서열(본원에서는 서열 번호 1이라 명명됨)을 포함하는 pJEM1이 있다:

AAAAATGAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTTAAATGAAAGCGAGAAATAATCAT
 AATTTCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTACCAACAGTACAGCGCGCACTCCG
 AGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGCAGCCTGGCGAGACCGTGAGGATCAGCTGC
 AAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGCAAGGG
 CCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCTACCTACGCCGCCGACTTCAAGA
 GGAGGTTCACTTCAGCCTGGAGACCAGCGCCAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAACCTGAAG
 AACGACGACACCGCCACCTACTTCTGCGCCAAGTACCCTCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTA
 CTTGACGCTGTGGGGCGCCGCCACCAAGGTCACCGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGG
 TCTTCCCGCTGGCACCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
 AAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCA
 CACCTTCCCGGCTGCTCTAGCTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTG
 GACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGATTATGAAGAATACTCCACAGA
 GTTGATTGTAAATACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAAATACTATCTGGATCTACACATTCAC
 CGGAAACTAGTTCTAAGAAACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCTCGTATTCGAAATC
 GCGACTCCGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATACAGACACCGTCACATACACTAGTGA
 TAGCATTAAATACAGTAAGTGATCATCTGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATTA
 CTGATAAAGAAGATCATACAGTTACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGA

[0097] ATTGTCCTACTATAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATAC
 AGTACCACCAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTAATAAACCAAGGACTTTG
 TAGAAATATTTGGTATTACCGCATTAATTATATTGTCGGCCGTGGCAATTTTCTGTATTACATAT
 TATATATATAATAACGTTACGTAATAACAAAACAGAGAACAAGTCTAG

[0098] [이중 밀줄: H5 프로모터

[0099] 단일 밀줄: 리더 펩티드

[0100] 파도 모양 밀줄: 대표적인 중쇄 가변 영역

[0101] 굵은 밀줄: IgG CH1 도메인

[0102] 밀줄 표시가 안 된 부분: 백시니아 A56R

[0103] 굵은 이탤릭체 부분: BssHII 및 BstEII 가변 유전자 클로닝 위치]

[0104] 여러 가지 상이한 PCR 증폭 중쇄 가변 영역들은 특유의 BssHII 및 BstEII 위치(상기 굵은 이탤릭체로 표시된 부분)에 인-프레임 상태로 삽입될 수 있다.

[0105] 플라스미드 pJEM1은 미국 특허 제7,858,559호에 기술된 p7.5/tk의 유도체이다. pJEM1은, 미국 특허 제

7,858,559호에 기술된 바와 같이 재조합을 가능하게 하는 백시니아 게놈과 상동성인 측접 영역들을 보유한다. 그러나, pJEM1은, p7.5/tk 내 발현 카세트(프로모터 및 발현된 서열들) 대신에 다음과 같은 요소들을 포함한다:

[0107] 백시니아 바이러스 H5 프로모터

[0108] 리더 펩티드

[0109] 가변 중쇄 클로닝용 5' BssHII 클로닝 위치

[0110] 중쇄 가변 영역

[0111] 가변 중쇄 클로닝용 3' BstEII 클로닝 위치

[0112] IgG CH1 도메인

[0113] 백시니아 A56R

[0114] 이와 같은 요소들은 도 1과 서열 번호 1에 나열되어 있다. 이 카세트는 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0115] 다른 구체예에서, 본 발명의 운반 플라스미드(백시니아 바이러스 p7.5 프로모터와의 작동 가능한 결합을 통해, 면역글로불린 카파 경쇄 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드)는, 다음과 같은 서열 (본원에서는 서열 번호 2로 명명됨)을 포함하는 pVKE이다:

GGCCAAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGGCCGCCCATGGGA
TGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGC**GTGCACTTGAC**
TCGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGTCGAC

[0116]

[0117] PCR 증폭된 카파 경쇄 가변 영역은, 특유의 ApaLI 및 XhoI 위치(상기에서 굵게 표시된 부분)에 인-프레임 상태로 삽입될 수 있다.

[0118] 더욱이, pVKE는, 전술된 바와 같이 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오티드가 선별될 때 플라스미드 벡터에 제2 라이브러리의 폴리뉴클레오티드가 포함되는 것이 요망되는 구체예들에서 사용될 수 있다.

[0119] 다른 구체예에서, 본 발명의 운반 플라스미드(백시니아 바이러스 p7.5 프로모터와의 작동 가능한 결합을 통해, 면역글로불린 람다 경쇄 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드)는, 다음과 같은 서열 (본원에서는 서열 번호 3으로 명명됨)을 포함하는 pVLE이다:

GGCCAAAAATTGAAAACTAGATCTATTTATTGCACGCGGCCGCCCATGGGA
TGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGC**GTGCACTTGA**
CTCGAG**AAGCTT**ACCGTCTACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC
TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGTCGAC

[0120]

[0121] PCR 증폭된 람다 경쇄 가변 영역은, 특유의 ApaLI 및 HindIII 위치(상기에서 굵게 표시된 부분)에 인-프레임 상태로 삽입될 수 있다.

[0122] 뿐만 아니라, pVLE는, 전술된 바와 같이 제1 라이브러리의 폴리뉴클레오티드가 선별될 때 플라스미드 벡터에 제2 라이브러리의 폴리뉴클레오티드가 포함되는 것이 요망되는 구체예들에서 사용될 수 있다.

[0123] 본 발명이 실시됨에 있어서는, 달리 특정되어 있지 않은 한, 당 업계의 기술 범위 내에 있는 통상의 기술들, 즉 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 유전자 이식 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학 분야의 기술이 이용될 것이다. 이와 같은 기술들은 문헌에 상세히 설명되어 있다. 예를 들어 문헌[Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al, ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. 미국 특허 제4,683,195호; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J.

Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); and in Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)]을 참조하시오.

[0124] 항체 조작에 관한 일반적인 원리들은 문헌[Antibody Engineering, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995)]에 제공되어 있다. 단백질 조작에 관한 일반적인 원리들은 문헌[Protein Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D., et al, Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995)]에 제공되어 있다. 항체 및 항체-헵텐 결합에 관한 일반적인 원리들은 문헌[Nisonoff, A., Molecular Immunology, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); and Steward, M.W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY (1984)]에 제공되어 있다. 뿐만 아니라, 당 업계에 알려져 있긴 하지만 자세히 공지되어 있지는 않은 면역학 분야의 표준 방법들은 일반적으로 문헌[Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al. (eds), Basic and Clinical -Immunology (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., New York (1980)]에 기술된 바에 따라서 수행된다.

[0125] 면역학의 일반적인 원리들이 제공된 표준 참고 논문들로서는 문헌들[Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., et al., eds., Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R., et al, eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984)]을 포함한다.

[0126] 실시예

[0127] 실시예 1

[0128] CH1-A56R 융합 단백질의 제조

[0129] 제조용 백신이나 바이러스의 세포 표면상에 발현된 특이적 면역글로불린 분질의 선별을 촉진하기 위해 중쇄 융합 단백질을 구성하였다.

[0130] 웨스턴 리저브 백신이나 바이러스로부터 유래하는 A56R의 세포외 경막 도메인에 융합된 C 감마의 인간 중쇄 CH1 도메인(본원에서는 CH1-A56R이라 명명)과, C35 특이적 VH(H2124)를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 발현 벡터를 이하 기술된 방법에 의해서 구성하였다.

[0131] *pJEM1*. 인간의 감마 면역글로불린 불변 영역(CH1), 백신이나 A56R의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과, 인간 중쇄 가변 영역(예를 들어 H2124)을 삽입하기 위한 카세트를 포함하는 발현 벡터(본원에서는 "pJEM1"이라 명명됨)를 구성하였다. 간단히 말해서, 본원에 그 자체로서 참고 문헌으로 인용되어 있는 PCT 공개 공보 WO 제 00/028016호에 기술된 바와 같이 제조된 p7.5/tk를 다음과 같은 방법에 의해 pJEM1으로 전환하였다.

[0132] *IgG CH1*. 캘리포니아 팔로 알토에 소재하는 클론테크(Clonetech)사로부터 시판되는 스마트™ 레이스 cDNA 증폭 키트(SMART™ RACE cDNA Amplification Kit)를 사용하여, 골수 RNA로부터 인간 IgG 중쇄를 코딩하는 cDNA를 분리하였다. 5' 프라이머 huC γ -1-5B[5' ATTAGGATCC GGTCACCGTC TCCTCAGCC 3' (서열 번호 4)] 및 3' 프라이머 huC γ -1-3S[5' ATTAGTCGAC TCATTACCC GGAGACAGGG AGAG 3' (서열 번호 5)]를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생성물은 다음과 같은 요소들을 포함하였다: BamHI-BstEII-(VH의 111-113번 아미노산들을 코딩하는 뉴클레오티드)-(C γ 1의 114-478번 아미노산들을 코딩하는 뉴클레오티드)-TGA-SalI. 이 생성물을 pBluescriptII/KS의 BamHI 및 SalI 위치에 서브클로닝하였으며, 아미노산 서열에 변이를 일으키지 않고, C γ 1의 CH1 도메인 내 191번 및 192번 아미노산에 상응하는 제2 BstEII 위치를 위치 배향 돌연 변이 유발법(site-directed mutagenesi

s)을 통해 제거하였다. 플라스미드 pBluescriptII/KS를 BstEII 및 SalI로 분해하고, 크기가 더욱 작은 DNA 단편(약 1kb)를 겔 상에서 정제하였다. 그 다음, 상기 크기가 더욱 작은 단편을, 정 프라이머(forward primer) CH1(F)-5'-CAAGGGACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC-3' (서열 번호 6)(BstEII 제한 위치는 이탤릭체에 밑줄을 쳐서 표시함)와 역 프라이머(reverse primer)CH1(R) 5'-AACTTCTGTGCCACCTTGGTGTG-3' (서열 번호 7)을 사용하는 PCR 반응에서 주형으로 사용하였다. 생성된 PCR 생성물(약 320 염기쌍)을 겔 상에서 정제하였다.

[0133] 전장 IgG. 캘리포니아 팔로 알토에 소재하는 클론테크사로부터 시판되는 스마트™ 레이스 cDNA 증폭 키트를 사용하여, 골수 RNA로부터 인간 IgG 중쇄를 코딩하는 cDNA를 분리하였다. 5' 프라이머 huC γ 1-5B(서열 번호 4) 및 3' 프라이머 huC γ 1-3S(서열 번호 5)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생성물은 다음과 같은 요소들을 포함하였다: BamHI-BstEII-(VH의 111~113번 아미노산들을 코딩하는 뉴클레오티드)-(C γ 1의 114~478번 아미노산들을 코딩하는 뉴클레오티드)-TGA-SalI. 이 생성물을 pBluescriptII/KS의 BamHI 및 SalI 위치에 서브클로닝하였으며, 아미노산 서열에 변이를 일으키지 않고, C γ 1의 CH1 도메인 내 191번 및 192번 아미노산에 상응하는 제2 BstEII 위치를 위치 배향 돌연 변이 유발법을 통해 제거하였다. 플라스미드 pBluescriptII/KS를 BstEII 및 SalI로 분해하고, 전장 IgG1에 상응하는 DNA 단편(993 염기쌍)을 겔 상에서 정제하였다.

[0134] A56R(길이가 더욱 긴 형태의 것). 줄기, 경막 및 세포내 도메인을 포함하는 백시니아 바이러스(웨스턴 리저브) 유래 A56R 헤마글루티닌 단백질의 108~314번 아미노산을 코딩하는 DNA 단편(유전자 은행 기탁 번호 YP_233063)을, 정 프라이머 A56R(F) 5'-CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAG-3' (서열 번호 8) 및 역 프라이머 A56R(R) 5'-TATAGTCGACCTAGACTTTGTTCTCTGTTTGTATTACG-3' (서열 번호 9)(SalI 제한 위치는 이탤릭체에 밑줄을 쳐서 표시함)을 사용하여, 분리된 웨스턴 리저브 백시니아 바이러스 DNA로부터 증폭하였다. 생성된 PCR 생성물(약 660 염기쌍)을 겔 상에서 정제하였다.

[0135] A56R(길이가 더욱 짧은 형태의 것). 줄기, 경막 및 세포내 도메인을 포함하는 백시니아 바이러스(웨스턴 리저브) 유래 A56R 헤마글루티닌 단백질의 240~314번 아미노산을 코딩하는 DNA 단편(유전자 은행 기탁 번호 YP_233063)을, 정 프라이머 A56R(F2): 5'-CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTACCACCGATGATGCGGATCTTTATG A-3' (서열 번호 21) 및 역 프라이머 A56R(R): (서열 번호 9)를 사용하여, 분리된 웨스턴 리저브 백시니아 바이러스 DNA로부터 증폭하였다. 생성된 PCR 생성물(약 263 염기쌍)을 겔 상에서 정제하였다.

[0136] Fab 구성체(길이가 더욱 긴 형태를 갖는 A56R을 포함하는 IgG CH1). 320 염기쌍 단편 및 660 염기쌍 단편을, A56R(R)(서열 번호 9)(3' 생성물용)과 함께, 정 프라이머 CH1(F)(서열 번호 6) 및 역 프라이머 CH1(R2): 5'-ACAAAAGTATTGGTAATCGTGCATAACTTTCTTGTCACCTTGGTGTG-3' (서열 번호 22)(5' 생성물용) 및 A56R(F)(서열 번호 8)를 사용하는 SOE PCR에 의해 합하였다. 이와 같은 2개의 생성물을 합하여 약 980 염기쌍인 융합 단편을 제조하였다. 이 단편을 BstEII 및 SalI으로 분해하였으며, 이때 생성된 934 염기쌍 단편을 겔 상에서 정제하였다.

[0137] TR 구성체(길이가 더욱 짧은 형태를 갖는 A56R을 포함하는 전장 IgG1). 993 염기쌍 단편 및 263 염기쌍 단편을, A56R(R):(서열 번호 9)(3' 생성물용)와 함께, 정 프라이머 CH1(F):(서열 번호 6) 및 역 프라이머 A56R(R2): 5'-TCATAAAGATCCGCATCATCGGTGTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC-3' (서열 번호 23)(5' 생성물용) 및 A56R(F3): 5'-GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAACACCGATGATGCGGATCTTTATGA-3' (서열 번호 24)를 사용하는 SOE PCR에 의해 합하였다. 이와 같은 2개의 생성물을 합하여 약 1256 염기쌍인 융합 단편을 제조하였다. 이 단편을 BstEII 및 SalI으로 분해하였으며, 이때 생성된 1235 염기쌍 단편을 겔 상에서 정제하였다.

[0138] FL 구성체(길이가 더욱 긴 형태를 갖는 A56R을 포함하는 전장 IgG1). 993 염기쌍 단편 및 660 염기쌍 단편을, A56R(R):(서열 번호 9)(3' 생성물용)와 함께, 정 프라이머 CH1(F):(서열 번호 6) 및 역 프라이머 A56R(R3): 5'-TATCAGTGTCAATTTGTAGTTGATGTTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC-3' (서열 번호 25)(5' 생성물용) 및 A56R(F4): 5'-GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAACATCAACTACAAATGACACTGATA-3' (서열 번호 26)을 사용하는 SOE PCR에 의해 합하였다. 이와 같은 2개의 생성물을 합하여 약 1653 염기쌍인 융합 단편을 제조하였다. 이 단편을 BstEII 및 SalI으로 분해하였으며, 이때 생성된 1632 염기쌍 단편을 겔 상에서 정제하였다.

[0139] 플라스미드 p7.5/tk도 BstEII 및 SalI으로 분해하였으며, 이때 생성된, 크기가 더욱 큰 단편(약 5.7kb)을 겔 상에서 정제하였다. 그 다음, 상기 2개의 BstEII/SalI 단편을 결합하여 pJEM1 플라스미드를 만들었다.

[0140] pJEM1은 재조합을 가능하게 하는 백시니아 게놈에 상동성인 측접 영역들을 보유한다. 그러나, pJEM1은, p7.5/tk 내 발현 카세트(프로모터 및 발현된 서열들) 대신에 다음과 같은 요소들을 포함한다: 백시니아 바이러스 H5 프로모터; 리더 펩티드; 5' BssHII 클로닝 위치(가변 중쇄 클로닝용); 중쇄 가변 영역; 3' BstEII 클로닝 위치(가변 중쇄 클로닝용); IgG CH1 도메인; 그리고 백시니아 A56R. 이와 같은 pJEM1의 요소들의 서열을 도 1에 서열

번호 1로서 도시하였다.

[0141] C35에 특이적인 중쇄 가변 영역(H2124)을, pJEM1의 BssHII 및 BstEII 위치에 삽입하여, VH(H2124)-CH1-A56R 융합 구성체를 만들었다. pJEM1 내에 제조된 VH(H2124)-CH1-A56R 융합 구성체에 대한 뉴클레오티드 서열과 아미노산 서열을 이하에 각각 보였다.

[0142] VH(H2124)-CH1-A56R Fab 생산 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열 번호 10):

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA
GACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGCTACTCCATCACCAGCGGCTATT
TCTGGAAGTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTA
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTCAAAAATAGGGTC

[0143] ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAACTACCGGGTTT
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGAT
TATGAAGAATACTCCACAGAGTTGATTGTAAATACAGATAGTGAATCGACTA
TAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTCACCGGAAACTAGTTCTAAGAA
ACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCGGTATTCGAAATCGCGACTC
CGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATAACAGACACCGTCACATACAC
TAGTGATAGCATTAAATACAGTAAGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGAC
GAGACTCCGGAACCAATTACTGATAAAGAAGATCATAAGTTACAGACACTG
TCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGAATTGTCACTACTAAATCAACC
ACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATACAGTACCAC
CAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGA
CTTTGTAGAAATATTTGGTATTACCGCATTAAATTATATTGTCGGCCGTGGCAA
TTTTCTGTATTACATATTATATATAATAAACGTTACGTAAATACAAAACA
GAGAACAAAGTCTAG

[0144]

[0145] VH(H2124) 및 CH1 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에는 밑줄을 쳐서 표시하였으며, A56R 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에는 이중으로 밑줄을 쳐서 표시하였다.

[0146] VH(H2124)-CH1-A56R Fab 생산 융합 단백질의 아미노산 서열(서열 번호 11):

QVQLQOWGAGLLKPSETLSLTCAVYGYSTSGYFWNWIROPKGLEWI
GYISYDGSSNSNPSTKLRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGTTGFA
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
TSTTNDTDKVDYEEYSTELIVNTDSESTIDILSGSTHSPETSSKKPDYIDNSNCSSV
FEIATPEPITDNVEDHTDITVYTSDSINTVSASSGESTTDETPETDKEDHTVTDI

[0147]

VSYTIVSTSSGIVTTKSTDDADLYDTYNDNDTPPTTVGGSTTSISNYKTKDFVE
IFGITALIILSAVAIFCITYIYNKRSRKYKTENKV.

[0148]

[0149] VH(H2124) 및 CH1 도메인의 아미노산 서열에는 밑줄을 쳐서 표시하였으며, A56R 도메인의 아미노산 서열에는 이중으로 밑줄을 쳐서 표시하였다.

[0150] VH(H2124)-IgG-A56R TR 구성체 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열 번호 27):

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA
GACCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGCTACTCCATCACCAGCGGCTATT
TCTGGAAGTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTA
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTCAAAAATAGGGTC
ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAACTACCGGGTTT
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC
CCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC

[0151]

CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAACCAACCGATGATG
CGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATACAGTACCACCAACTACTGTA
GGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGACTTTGTAGAAA
TATTTGGTATTACCGCATTAATTATATTGTCGGCCGTGGCAATTTTCTGTATTA
CATATTATATATATAATAAACGTTACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGT
CTAG

[0152]

[0153] VH(H2124) 및 전장 Ig 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에는 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 더욱 짧은 형태를 갖는 A56R 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에는 이중으로 밑줄을 쳐서 표시하였다.

[0154] VH(H2124)-IgG-A56R TR 구성체 융합 단백질의 아미노산 서열(서열 번호 28):

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGYSITSGYFNNWIROPKGLLEWI
GYISYDGSSNSNPSTKLRVTISRDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARGTTGFA
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKTTDDADLYDTYNDNDTVPTTVGGSTTSISNYKTKDFVEI
FGITALIILSAVAIFCITYIYNKRSRKYKTENKV.

[0155]

[0156] VH(H2124) 및 전장 Ig 도메인의 아미노산 서열에는 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 더욱 짧은 형태를 갖는 A56R 도메인의 아미노산 서열에는 이중으로 밑줄을 쳐서 표시하였다.

[0157] VH(H2124)-IgG-A56R FL 구성체 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열 번호 29):

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA
GACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGCTACTCCATCACCAGCGGCTATT
TCTGGAAGTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTA
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTCAAAAATAGGGTC

[0158]

ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAACTACCGGGTTT
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC
CCACCGTGCCCGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAAGTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
CCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAACCATCAACTACAA
ATGACACTGATAAAGTAGATTATGAAGAATACTCCACAGAGTTGATTGTAAA
TACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTAC
CGGAACTAGTCTTAAGAAACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCG
GTATTGAAAATCGCGACTCCGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATA
CAGACACCGTCACATACACTAGTGATAGCATTAAATACAGTAAGTGCATCATC
TGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATTACTGATAAAGAAGAT
CATACAGTTACAGACACTGTCTCATACTACAGTAAGTACATCATCTGGAAT
TGTCACACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATG
ATAATGATACAGTACCACCAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAG
CAATTATAAAACCAAGGACTTTGTAGAAATATTTGGTATTACCGCATTAATTA

[0159]

TATTGTCGGCCGTGGCAATTTCTGTATTACATATTATATATAATAAACGTT
CACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGTCTAG.

[0160]

[0161]

VH(H2124) 및 전장 Ig 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에는 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 더욱 긴 형태를 갖는 A56R 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에는 이중으로 밑줄을 쳐서 표시하였다.

[0162] VH(H2124)-IgG-A56R FL 구성체 융합 단백질의 아미노산 서열(서열 번호 30):

QVQLQOWGAGLLKPSETLSLTCAVYGYSTSGYFWNWIRPPGKGLEWI
GYISYDGSNSNPSTLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGTTGFA
YWGQGTLLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKTSSTNDTDKVDYEEYXSTELIVNTDSESTIDIILSGTHSPETS
SKKPDYIDNSNCSVFEIATPEPITDNVEDHTDTVTYTSDSINTVSASSGESTTDET
PEPITDKEDHTVTDVSYTTVSTSSGIVTTKSTDDADLYDTYNDNDVTPPTTVG
GSTTSISNYKTKDFEVEIFGITALLSAVAIFCITYYYINKRSRKYKTENKV

[0163]

[0164] VH(H2124) 및 전장 Ig 도메인의 아미노산 서열에는 밑줄을 쳐서 표시하였으며, 더욱 긴 형태를 갖는 A56R 도메인의 아미노산 서열에는 이중으로 밑줄을 쳐서 표시하였다.

[0165] 실시예 2

[0166] A56R 융합 단백질의 HeLa 세포 표면상 발현

[0167] 면역글로불린 융합 구성체, 가변 중쇄(H2124) CH1-A56R(상기 실시예에 기술됨) 및 Ig-K("A56R H + L") 또는 scFv-A56R("A56R scFv")를 발현하는 재조합 EEV 백시니아 바이러스로 HeLa 세포를 감염 또는 공동 감염시켰다. 재조합 EEV 백시니아 바이러스를 사용하는 세포 감염과, 후속 라이브러리선별 단계에 대한 일반적 전략을 도 2에 도시하였다. 본 실시예에서는 라이브러리를 사용하는 대신에, VH(H2124) CH1-A56R 융합체를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스와 Ig-K(A56R H + L)를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스로 HeLa 세포를 공동 감염시켰거나, 또는 scFv-A56R을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스로 상기 HeLa 세포를 감염시켰다. EEV 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 세포들의 C35 염색 및 CD100 염색에 대해 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석을 수행하였다. 요약하면, CD100-His 1 μ g/ml 또는 C35-His 1 μ g/ml를 샘플에 첨가한 다음 이를 30분 동안 얼음 상에서 항온 처리하였다. 이후, 세포를 세정하고 나서, 여기에 항 his APC를 첨가하였으며, 샘플을 30분 동안 얼음 상에서 항온 처리한 후, 샘플을 세정한 다음, 고정 및 분석하였다. FACS 데이터를 도 3의 A~C에 보였다. 결과들은, A56R 융합 단백질이 세포 표면에 발현되었음을 보여준다.

[0168] EEV 형태의 클론들을 대상으로도 ELISA 테스트를 수행하였다. 정제된 C35 단백질을 96-웰 ELISA 평판[닝-맥시솔프 96 웰 평판 바닥 면역 평판(Nunc-MaxiSorp 96 well flat bottom immune plate) Cat#439454] 상에 탄산염 완충액 중 1 μ g/ml의 농도로 코팅하였다. 상기 평판을 세정하고 나서, 1 \times PBS, 10% FBS로 블로킹(blocking)하였다. 그 다음, 1 \times PBS/10% FBS/0.05% Tween-20으로 희석한 소랄렌 불활성화 EEV를 상기 평판의 지정된 웰들에 가한 다음, 결합을 진행시켰다. 토끼 항 백시니아-HRP 접합 항체(AbCam Catalog#28250)를 사용하여 바이러스 입자를 검출하고 나서, 항체를 1 \times PBS/10% FBS/0.05% Tween-20 중에 1:2000으로 희석하였다. 그 다음, TMB 기판(호오스래디쉬 퍼옥시다제(HRP) 활성 측정용)을 상기 평판에 가하고 나서; 발색 반응을 진행시켰으며, 동 부피의 H₂SO₄ 2N을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 평판을 ELISA 평판 판독기로 판독하였으며, 그 결과들을 도 4의 A에 보였다. 두 번째 ELISA를 이용하여 검출용 Fab가 결합하였는지를 확인하였는데, 이 경우 조건은, 2차 항체는 염소 항 인간 IgG F(ab')₂-HRP가 접합된 것(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) 카탈로그#109-036-097)을 스톱 항체의 1:10,000으로 희석하여 사용하였으며, 희석 완충액으로서는 1 \times PBS/10% FBS/0.05% Tween-20을 사용하였다는 점을 제외하고는 전술된 바와 동일하였다. 결과들을 도 4의 B에 보였다. 양 평판상 웰들 중 양성 반응을 보였던 웰들에서는, 백시니아 바이러스 비리온 존재 하에 항체 구성체가 발현되었음이 확인되었다. 도 3의 A 및 B에 보인 바와 같이, C35 특이적 융합 단백질을 함유하는 EEV("A56R EEV"라 표시됨)는 C35와 결합하였던 반면, 대조군("L517 + G7000-A56R EEV"), 즉 비 C35 결합 EEV는 C35와 결합하지 않았으며, 표준 막 결합 IgG1 형태를 한 C35 특이적 항체 함유 EEV("mbg EEV")도 C35와 결합하지 않았다. 데이터는, 항체가 A56R과 함께 발현되었을 때 EEV가 항원과 특이적으로 결합함을 입증하였다.

[0169] 실시예 3

[0170]

평판 기반 및 용액 기반 융합 단백질 선별

[0171]

공지의 C35 및 VEGF 결합 분자와 A56R의 융합체를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스를, 패닝 기반 분석법을 통해 표적 분자와의 결합 여부에 대해 테스트하였다. C35에 특이적인 것으로 알려진 면역글로불린 분자를 발현하는 재조합 EEV(scFv2408-A56R, H2124-L517-A56R 이중 유전자, 그리고 L517 + H2124-A56R 공동 감염) 또는 VEGF에 특이적인 것으로 알려진 면역글로불린 분자를 발현하는 재조합 EEV(L7000 + H7000-A56R)를, BSC1 세포 내에서 증식시켰다(약 24시간 동안). H2124-L517-A56R 이중 유전자(double gene)는, Ig-H 및 Ig-K 유전자가 동일한 바이러스에 의해 상기 이중 유전자로부터 코딩되었고, Ig-H 및 Ig-K 유전자는 H2124-A56R 공동 감염에 사용된 별도의 바이러스들에 의해 코딩되었다는 점을 제외하고는 L517 + H2124-A56R과 동일한 항체를 생산하였다.

[0172]

EEV 형태를 갖는 클론을 용균 반 분석법에 의해 테스트하였다. 멸균 96-웰 ELISA 평판을 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ C35 또는 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF로 코팅하였다. EEV를 함유하는 "순(neat)"(희석되지 않은) 상청액을 연속적으로 희석하여 $1:10$ ~ $1:10^6$ 희석액을 만들었다. 다양한 바이러스 구성체 $100\mu\text{l}$ 를 지정된 웰들에 가하고, 2시간 동안 또는 밤새도록 결합 반응을 진행시켰다(실온). 세포를 PBS로 10회 세정하여 미결합 EEV를 제거한 다음, 각각의 웰에 약 25,000개의 BSC1 세포를 첨가한 후, 평판을 37°C 에서 밤새도록 항온 처리하였다. 웰들을 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 용균 반이 형성되었는지를 확인하였다. 도 5의 A~D는, 2시간 및 밤새도록 처리한 후의 C35 결합과, 2시간 및 밤새도록 처리한 후의 VEGF 결합에 대한 용균 반 평판 분석 결과들을 보여주는 것이다. 이 결과들은, A56R 융합 단백질들이 백시니아 비리온들의 표면에 발현되었음을 보여주었다. 뿐만 아니라, 이 결과들은 EEV 상에 발현된 A56R 융합체를 사용하여 생산된 공지의 결합 분체들이 자체의 특이적 표적들과 결합할 수 있었음을 보여준다.

[0173]

그 다음, 스트렙타비딘 비드, 프로테인 G 비드 또는 토실 활성화 비드를 사용하여 비드 기반 선별을 수행하였다.

[0174]

스트렙타비딘(SAV) 비드 선별: mAb 2408을 발현하는 재조합 EEV(H2124-A56R + L517 (C35 특이적)) 또는 mAb 7000을 발현하는 재조합 EEV(H7000-A56R + L7000 (VEGF 특이적))를 사용하여 자성 비드 기반 선별에 대해 테스트를 수행하였다. T175 플라스크 2개에서 HeLa 세포들을 다양한 바이러스 구성체로 2일에 걸쳐 감염시킨 후 상청액을 수집하였으며, 세포를 펠릿으로 만들었다. SA-600 회전자에서 1시간 동안 회전시켜($15,000\text{rpm}$) EEV를 펠릿으로 만들었다. EEV 펠릿을 10% FBS가 보충된 DMEM 1ml 중에 재현탁하였다. 각각의 재조합 바이러스에 대해서, 상청액 $500\mu\text{l}$ ($\sim 10^7$ pfu)를 사용하였다. 그 다음, 바이오틴-C35 $1\mu\text{g}$ 을 함유하는 DMEM $500\mu\text{l}$ 를 각각의 샘플에 첨가하였다[그 결과, 부피 1ml 이고 농도 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 용액이 제조됨]. 이 용액을 냉장실 내에 넣고 2시간 동안 회전자 상에서 항온 처리하였다. M280 스트렙타비딘(SAV) 자성 비드 $200\mu\text{l}$ 를 EEV/C35 용액에 첨가하였다[이때 SAV 비드의 농도는 바이오틴-C35가 모두 결합하기 충분할 정도로 높아서 세정 단계는 필요하지 않았음]. 용액을 실온에서 20분 동안 회전시켜, 비드들이 바이오틴-C35와 결합하도록 하였다. 전술된 바와 같이 제조된 바이러스 구성체를 비드에 가하였다. 자석을 사용하여 비드들을 수집하였으며, 미결합 바이러스는 별도로 수집하였다. 비드를 PBS 1ml 로 5회 세정하였다. 미결합 바이러스가 함유된 세정액 전부를 모았다("미결합"). 비드를 자석으로부터 떼어냈다. 여기에 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml 를 가하고 나서, 용액을 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). 상기 "미결합" 및 "결합"에 대해 역가를 측정하였다. 그 결과들을 표 1에 보았다. 결과들은, C35 특이적인 2408 항체를 발현하는 EEV는 비드에 결합하였던 반면에, VEGF 특이적인 7000 항체를 발현하는 EEV는 비드에 결합하지 않았음을 보여준다.

표 1

바이오틴-C35 및 SAV 자성 비드를 사용한 C35 특이적 mAb의 선별

바이러스	역가	결합 %
MAb 7000 미결합	1.45×10^7	
MAb 7000 결합	1.2×10^4	0.1%
MAb 2408 미결합	7.6×10^6	
MAb 2408 결합	7.7×10^6	50%

[0175]

[0176]

L517을 발현하는 EEV를 $\text{moi} = 1$ 로 설정한 다음, 혼합물과 함께 HeLa를 공동 감염시키고, H2124-A56R을 발현하는

EEV를 H7000-A56R로 $1:10^4$ 및 $1:10^5$ 으로 희석시켜, 스파이킹 실험(Spiking experiment)을 수행하였다(스파이킹 조건당 T175 Hela 하나). 요약하면, EEV를 수득한 다음, EEV 함유 상청액 $500\mu\text{l}$ (5×10^6 pfu)를 각각의 스파이킹에 사용하였다. 바이오틴-hC35 $1\mu\text{g}$ 을 함유하는 DMEM $500\mu\text{l}$ 를 각각의 샘플에 첨가하였다(부피 1ml , 농도 $1\mu\text{g}/\text{ml}$). 전술된 SAV-비드(M280) 선별 방법을 이용하여 결합 및 미결합 용액을 수집하였다. 결합 바이러스를 T75 플라스크 내 BSC1 상에 증식시켰다.

[0177] 각각의 스파이킹 실험에서 수집된 결합 및 미결합 샘플을 대상으로 증량 여부에 대해 유동 세포 분석으로 테스트하였다. 스파이킹 실험으로부터 얻어진 결과들은, 비드가 10^{-4} 및 10^{-5} 로 명백히 증량되었으며, 비드 선별 방법이 평판 선별 방법보다 더욱 효율적이었음을 보여주었다(데이터는 제시하지 않음).

[0178] SAV 비드에 대해 전술된 바와 유사한 방법을 사용하여, 상이한 비드들, 즉 프로테인 G 비드(다이날(Dynal)) 및 토실 활성화 비드(다이날)를 대상으로도 테스트를 수행하였다. 선별 분석시에는 다음과 같이 미리 동정된 항체들을 사용하였다: MAb 2408(C35 특이적 항체, H2124 + L517을 포함하는 인간화된 1F2 항체), MAb 2368(CD100 특이적 항체, 미국 특허 출원 제2010/0285036호에 기술됨), mAb 7000(베바시주맵의 VEGF 특이적 부모 항체) 및 mAb 8000(트라스투주맵의 Her2 특이적 부모 항체).

[0179] 프로테인 G 비드 선별: 6웰 평판 내에서 Hela 세포를 소규모로 감염시켜 생산된 EEV(역가: 약 $5 \times 10^5/\text{ml}$)를 사용하였다. 2368-A56R을 발현하는 EEV(H2090-A56R + L512, VH 및 VL은 둘 다 백시니아에서 발현됨)(바이러스 1ml (약 5×10^5 pfu)) 및 2408-A56R 발현 EEV(H2124-A56R + L517, VH 및 VL은 둘 다 백시니아에서 발현됨)(바이러스 1ml (약 5×10^5 pfu))를 사용하여 프로테인 G 비드 선별에 대해 테스트를 수행하였다. 프로테인 G에 결합한 CD100은 다음과 같이 제조하였다: 자성 프로테인 G 비드 $300\mu\text{l}$ (샘플당 표준량의 2배)를 사용하였으며, 자석으로 풀 다운(pull down)을 실시하였다. 상기 비드에 PBS $600\mu\text{l}$ 와 CD100-Fc $18\mu\text{l}$ (약 $36\mu\text{g}$)를 첨가한 후, 이를 실온에서 20분 동안 항온 처리하여(회전자 상에서 진행), CD100-Fc가 프로테인 G 비드에 결합하도록 하였다. 비드를 자석으로 풀 다운한 후, PBS 1ml 로 1회 세정하였다. 그 다음, 비드를 10% FBS가 보충된 DMEM $300\mu\text{l}$ 중에 재현탁하였다. 각각의 바이러스 샘플에 CD100-Fc/Pro G 비드 $100\mu\text{l}$ (Pro-G 비드 표준량의 약 2배)를 첨가하여, CD100-Fc가 약 $12\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 하였다. 용액을 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 비드 $550\mu\text{l}$ (약 50%)를 제거하고 나서, 미결합물을 표준 PBS(1ml) 세정(5회)에 의해 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml 를 첨가하고 나서, 용액을 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다. 나머지 $550\mu\text{l}$ 는 실온에서 계속해서 1.5시간 더 항온 처리하였으며(총 소요 시간: 3.5시간), 그 다음에는 4°C 에서 18시간 동안 항온 처리하였고, 이후 전술된 바와 같이 수득하였다.

[0180] 토실 활성화된 비드의 선별: 상기 프로테인 G 비드 선별 실험에서 사용된 것과 동일한 2408(C35 특이적) 및 2368(CD100 특이적) 항체를 발현하는 EEV를 토실 활성화 자성 비드 선별에 사용하였다. C35-His $100\mu\text{g}$ 을 PBS 또는 ELISA 코팅 완충액(CB) 중에서 토실 활성화된 자성 비드에 접합하였다. 용액을 37°C 에서 밤새도록 항온 처리하고 나서, 37°C 에서 1시간 동안 PBS, 10% FBS, 0.5% BSA로 블로킹하였다. 비드를 1회 세정한 다음, 10% FBS가 보충된 DMEM $160\mu\text{l}$ 중에 재현탁하였다. 각각의 비드 샘플 $50\mu\text{l}$ 씩을 각각의 바이러스 샘플에 첨가하였으며, 이를 5시간 동안 실온에서 항온 처리하였다. 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 미결합물을 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml 를 첨가하고 나서, 비드를 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다.

[0181] CD100-His $100\mu\text{g}$ 을 PBS 중에서 토실 활성화된 자성 비드에 접합한 후, C35 항체 선별 분석에 대해 전술된 바와 동일한 방법으로 CD100 항체 선별 분석을 실시하였다[2368-A56R(바이러스 1ml (약 5×10^5 pfu)) 및 2408-A56R(바이러스 1ml (약 5×10^5 pfu)) 사용].

[0182] 프로테인 G 비드 선별을 통해 얻어진 결과들을 표 2에 보였으며, 토실 활성화된 비드 선별을 통해 얻어진 결과들을 표 3과 표 4에 보였다.

표 2

CD100-Fc 및 프로테인 G 비드를 사용한 CD100 특이적 mAb의 선별

바이러스/결합시간	샘플	역가	결합 %
MAb 2408 - 2 시간	미결합	100,000	
MAb 2408 - 2 시간	결합	360	0.36%
MAb 2368 - 2 시간	미결합	64,000	
MAb 2368 - 2 시간	결합	88,000	58%
MAb 2368 - 밤새도록	미결합	130,000	
MAb 2368 - 밤새도록	결합	90,000	41%
MAb 2408 - 밤새도록	미결합	320,000	
MAb 2408 - 밤새도록	결합	160	0.05%

[0183]

표 3

C35 토실 활성화된 비드를 사용한 C35 특이적 mAb의 선별

바이러스	샘플	역가	결합 %
MAb 2408	미결합	96,000	
MAb 2408	결합	160,000	61%
MAb 2368	미결합	240,000	
MAb 2368	결합	1,600	0.6%
MAb 2408	미결합	97,000	
MAb 2408	결합	140,000	59%

[0184]

표 4

CD100-His 토실 활성화된 비드를 사용한 CD100 특이적 mAb의 선별

바이러스	샘플	역가	결합 %
MAb 2408	미결합	384,000	
MAb 2408	결합	480	0.1%
MAb 2368	미결합	264,000	
MAb 2368	결합	232,000	46.7%

[0185]

[0186] 실시예 4

[0187] CH1-A56R 융합 단백질 라이브러리 제조

[0188] 면역글로불린 분절을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 라이브러리를 다음과 같이 제조하였다. 상업적 공급업체(라이프 테크놀로지스)로부터 구입한 골수 RNA(100명 이상의 공여자로부터 얻음)를 사용하여 제조한 백시니아 라이브러리("비 면역화 중 A56R 융합체(naive Heavy A56R fusion)"라 칭함)를 제조하였다. 인간 면역글로불린 감마 또는 뮤 중 어느 하나의 불변 영역에 특이적인 안티센스 프라이머들을 사용하여 역전사를 수행하였다. 이로부터

생성된 cDNA를 PCR의 주형으로 사용하였는데, 이 경우 2개의 센스 프라이머 중 하나는 인간 가변 영역 중쇄 틀 부 1이 시작되는 부위에 결합하여, 여기에 BssHII 제한 위치를 도입하였으며, 이와 함께 다양한 생식 계열 인간 J 분절에 결합하여, 여기에 BstEII 제한 위치를 도입하는 안티센스 프라이머들의 풀도 사용하였다. 이와 같은 프라이머들의 서열들은 다음과 같았다:

센스 VH 3: AATATGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
(서열번호 12)

센스 VH 3a: AATATGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG
(서열번호 13)

안티센스 JH 1: GAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCA
(서열번호 14)

안티센스 JH 2: GAGACGGTGACCAGGGTGCCACGGCCCCA
(서열번호 15)

안티센스 JH 3: GAGACGGTGACCATTGTCCCTTGGCCCCA
(서열번호 16)

안티센스 JH 4/5: GAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCA
(서열번호 17)

안티센스 JH 6: GAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCA
(서열번호 18)

[0189]

[0190]

제조합 백시니아 바이러스를 생산하기 위해서, 상기와 같이 생성된 PCR 생성물들을 전술된 pJEM1 플라스미드에 클로닝하였다. 특히 본원에 개시된 인간 면역글로불린 가변 중쇄 발현 카세트는, 인간 면역글로불린 불변 도메인 부 CH1, 그리고 백시니아 바이러스 완전체 막 단백질 A56R cDNA와 인-프레임 상태로 클로닝되었다. 라이브러리를 발현시킴으로써 생성된 단백질은 면역글로불린 중쇄 가변 분절, 중쇄 CH1, 그리고 백시니아 EEV의 표면에 발현된 A56R 단백질의 일부를 포함하는 융합 단백질이었다.

[0191]

도 2에 도시된 바와 같이 백시니아 패닝을 수행하기 위해, 공지의 Ig-L 라이브러리를 발현하는 백시니아 또는 Ig-L 라이브러리를 발현하는 백시니아 바이러스(본원에 그 자체로서 참고 문헌으로 인용되어 있는 미국 특허 제 7,858,559호에 이미 개시되어 있음)와 함께 A56R 융합 라이브러리를 사용하였다.

[0192]

실시예 5

[0193]

CD100 항체 선별을 위한 CH1-A56R 융합 단백질 라이브러리 스크리닝

[0194]

이전 실시예에 기술된, 비 면역화 중 A56R 융합 라이브러리("라이브러리 3"이라고도 칭함)로부터 유래한 클론 약 1,200,000개와 경체 클론들(L48, L116 및 L9021)을 사용하여 신규 CD100 항체 선별을 수행하였다.

[0195]

전술된 바와 같은 경체와 융합 라이브러리를 발현하는 EEV로 T-175 HeLa 세포를 감염시키고 나서(2일), 상청액을 수득하고, 이를 느린 회전 속도로 2회 회전시켜 펠릿으로 만든 다음, EEV를 15,000rpm에서 1시간 동안 회전시켜 펠릿으로 만들었다. EEV를, 10% FBS가 보충된 DMEM 3ml에 재현탁하였다.

[0196]

제1 라운드 선별. 2368-A56R을 발현하는 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu))와 2408-A56R을 발현하는 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu))를 대조군으로 사용하였으며, 라이브러리 3(바이러스 1ml(약 10^8 pfu))을 선별 분석용으로 사용하였다. 우선, 프로테인 G 비드 300 μ l(샘플당 표준량의 2배)를 자석으로 풀 다운한 다음, 비드에 PBS 600 μ l와 CD100-Fc 18 μ l(36 μ g)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 20분 동안 항온 처리하여(회전자 상에서 진행됨), CD100-Fc가 프로테인 G 비드와 결합하도록 만들었다. 비드를 자석으로 풀 다운한 후, 이를 PBS 1ml로 1회 세정한 다음, 10% FBS가 보충된 DMEM 300 μ l 중에 재현탁하였다.

[0197]

그 다음, 샘플당 CD100-Fc/Pro G 100 μ l(CD100-Fc 약 12 μ g/ml)를 EEV(2408 및 2368 대조군과, 라이브러리 3)에

첨가한 후, 이를 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 비드 550 μ l(약 50%)를 제거한 다음, 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 미결합 바이러스를 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1 ml를 첨가하고 나서, 용액을 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다. 이와 같이 "2시간 항온 처리"가 수행된 샘플들은 45분 경과후 첨가된 메틸 셀룰로스로 역가가 측정되었다. 결합 라이브러리로부터 회수된 비드를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[이와 같이 2시간 동안 이루어지는 제1 라운드 선별은 "CD100 3.1A"라 칭함]. 나머지 비드 550 μ l(약 50%)를 계속해서 실온에서 1.5시간 더 항온 처리하였으며(총 소요 시간: 3.5 시간), 이후에도 4℃에서 18시간 항온 처리하였다("밤새도록 항온처리"). 미결합 바이러스를 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml를 첨가하고 나서, 용액을 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다. 결합 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[이와 같이 밤새도록 이루어지는 제1 라운드 선별은 "CD100 3.1B"라 칭함]. 결과들을 표 5에 보였다.

표 5

CD100 Ab의 제1 라운드 선별

바이러스/결합시간	샘플	역가	결합 %
2408-2 시간	미결합	100,000	
2408-2 시간	결합	360	0.36%
2368-2 시간	미결합	64,000	
2368-2 시간	결합	88,000	58%
라이브러리 3.1A-2시간	미결합	22,000,000	
라이브러리 3.1A-2 시간	결합	20,000	~0.1%
2408-밤새도록	미결합	130,000	
2408-밤새도록	결합	90,000	41%
2368-밤새도록	미결합	320,000	
2368-밤새도록	결합	160	0.05%
라이브러리 3.1B-밤새도록	미결합	56,000,000	
라이브러리 3.1B-밤새도록	결합	17,000	0.03%

[0198]

[0199] 라이브러리 3.1A와 3.1B는 BSC1 상에서 잘 증식하였으며, 수득률 및 역가도 잘 나왔다(각각 1ml당 약 2×10^7).

[0200] 제2 라운드 선별. 6월 평판 내에서 HeLa 세포를 소규모로 감염시켜 생산된 EEV(역가: 약 5×10^5 /ml)를 사용하였다. 라이브러리 3.1A 및 3.1B를 풀링하여 하나의 샘플로 합하였다. 2368-A56R 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)), 2408-A56R 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)) 및 3.1A/B 라이브러리 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)) 각각을 프로테인 G 비드 300 μ l(샘플당 표준량의 2배)와 합하였다. 비드에 PBS 600 μ l와 CD100-Fc 18 μ l (36 μ g)를 가하였다. 이 용액을 실온에서 20분 동안 항온 처리하여(회전자 상에서 진행됨), CD100-Fc를 프로테인 G 비드와 결합시켰다. 제1 라운드에 대해 기술된 바와 같이 비드를 세정한 후 재현탁하였다. 샘플당 CD100-Fc/Pro G 100 μ l(1ml당 CD100-Fc 약 12 μ g)를 바이러스 샘플에 첨가하고, 이를 실온에서 4.5시간 동안 항온 처리하였다. "미결합" 및 "결합"을 수집한 후 역가를 측정하였다. 결합 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증폭시켰다[제2 라운드 선별을 "CD100 3.2"라 칭함]. 제2 라운드 선별의 결과들을 표 6에 보였다.

표 6

CD100 Ab에 대한 제2 라운드 선별

바이러스-항원	샘플	역가	결합 %
2408-CD100-Fc	미결합	384,000	
2408- CD100-Fc	결합	780	0.2%
2368- CD100-Fc	미결합	264,000	
2368- CD100-Fc	결합	224,000	46%
라이브러리 3.2-CD100-Fc	미결합	780,000	
라이브러리 3.2-CD100-Fc	결합	5,000	0.6%

[0201]

[0202]

라이브러리 3.2는 BSC1 상에서 잘 증식하였으며, 수득물 및 역가도 잘 나왔으며(약 3×10^7 /ml), 양성 세포 소 군집이 얻어졌다. 선별의 세 번째 라운드를 수행하였다.

[0203]

제3 라운드 선별. "라이브러리 3.2A"(제1 라운드 및 제2 라운드의 CD100-Fc/Pro G)를 사용하여, 전술된 바와 동일한 방법으로 선별의 제3 라운드를 수행하였다. 결합된 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[이때의 제3 라운드 선별을 "CD100 3.3A"라 칭함]. 제3A 라운드 선별의 결과들을 유동 세포 분석에 의해 테스트하였다. 전술된 방법에 따라서, PBS 중 토실 활성화된 자성 비드에 접합된 CD100-His 100 μ g를 사용하여 두 번째 제3 라운드 선별을 수행하였다. 선별을 위해 샘플당 50 μ l를 첨가하였는데, 이때 CD100 3.3A[2368-A56R 발현 바이러스(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)), 2408-A56R 발현 바이러스(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)) 및 3.2A 발현 바이러스(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu))]에 대해서 사용된 양과 동일한 양으로 바이러스를 사용하였다. 용액을 실온에서 4시간 동안 항온 처리하였다. "미결합" 및 "결합"을 수집한 후 역가를 측정하였다. 결합 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[제3 라운드 토실 활성화 선별을 "CD100 3.3B"라 칭함]. 제3B 라운드 선별의 결과들을 유동 세포 분석에 의해 테스트하였다. CD100 항체 선별 전략을 요약한 도해를 도 6에 도시하였다.

[0204]

유동 세포 분석 염색은, CD100 3.3A/B의 클론들이 L116과 쌍을 이루는 양성 군집들이 아마도 존재할 것임을 암시하였다. 3.3A(n = 27) 및 3.3B(n = 30)로부터 유래한 용균 반을 골라내어, 24웰 평판 내 BSC1 상에서 3일 동안 증식시켰다(웰 당 1 용균 반). 24웰 평판 내 HeLa 세포들을, 증식된 각각의 용균 반의 3분의 1로 감염시켰다. 또한 상기 세포를 L116으로도 공동 감염시켰다(moi = 1)(대조군: 2368, 2408 및 미감염 HeLa 상청액). EEV를 2일 동안 생육시킨 다음, 수득하고 나서, 소랄렌과 조사(장파장 UV 광선; PLWUV)로 불활성화시켰다. 바이러스를 CD100(2 μ g/ml) 및 C35(2 μ g/ml)가 코팅된 평판에 결합시켰다[밤새도록, 웰 당 EEV 50 μ l 및 ELISA 블로킹 완충액 50 μ l 사용].

[0205]

항체 결합은 항 Fab-HRP를 첨가함으로써 확인하였다. 2개의 클론(3.3.C20 및 3.3.C27)은 CD100에 잘 결합하였는데, 이것들을 서열 결정하였다. 유동 세포 분석을 통해 특이성과 친화성에 대해 상기 클론들을 더 특성 규명하였다. 상기 클론들을 T75 내 BSC1 상에서 증식시킨 후, 역가를 측정하였다. 3.3A/B(L116 포함)로 감염시킨 세포를 CD100으로 분류하였다. 분류된 세포(150개 세포)로부터 유래하는 바이러스를 증식시키고 나서, 역가를 측정 한 다음, 유동 세포 분석으로 테스트하였다(CD100-His 100 μ g/ml: 얼음에서 30분 방치, PBS 5ml로 세정 후, 항 HIS-APC 및 항 Fab-FITC로 세정: 얼음에서 30분 방치). 클론 20과 클론 27은 둘 다 CD100과 결합하였다(유동 세포 분석을 통해 확인됨).

[0206]

고 친화성 CD100 VH 클론 2개(3.3.C20 및 3.3.C27)가 L116과 쌍을 이룰 때의 서열들은 동일하였다. 상기 클론 2개의 서열을 배열한 것을 도 7에 보였다. 가변 중쇄의 아미노산 서열은 다음과 같았다(VH CDR1-3에는 밑줄을 칩):

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFIPTDYLSWIRQAPGKGPEWLSYI
SSYSRYTNYADSVKGRFTISRDNTRNSIYLQMNNLRVEDTAVYYCARAGSYGY
WGQGTILVT (서열번호 19)

[0207]

[0208]

[0209]

[0210]

[0211]

[0212]

[0213]

[0214]

[0215]

[0216]

[0217]

[0218]

실시에 6

Her2 항체 선별을 위한 CH1-A56R 융합 단백질 라이브러리 스크리닝

비 면역화 중 A56R 융합 라이브러리("라이브러리 3"이라고도 칭함)로부터 유래하는 약 1,200,000개의 클론과 경쇄 클론들(L48, L116 및 L9021)을 사용하여, 신규 Her2 항체에 대한 선별을 수행하였다. 라이브러리는, 전술된 CD100 선별을 위해 사용된 것과 동일한 것이었다.

제1 라운드 선별. 라이브러리 3(바이러스 1ml(약 10^8 pfu))을 본 선별에 사용하였다. 우선, PBS 100 μ l와 Her2-Fc(R&D 시스템즈(R&D Systems)) 100 μ l(=10 μ g)를, 프로테인 G 비드에 가하였다. 이 용액을 실온에서 25분 동안 항온 처리하여(교반자 상에서 진행), Her2-Fc와 프로테인 G 비드를 결합시켰다. 비드를 자석으로 풀 다운한 다음, PBS 1ml로 1회 세척하고 나서, 10% PBS가 보충된 DMEM 100 μ l로 재현탁하였다.

그 다음, Her2-Fc/Pro G 100 μ l(Her2-Fc 약 10 μ g/ml)를 라이브러리 3 1ml에 첨가하고 나서, 실온에서 4시간 동안 항온 처리하였다. 비드를 제거하였으며, 미결합 바이러스를 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml를 첨가하고 나서, 용액을 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다. 결합 라이브러리로부터 회수된 비드를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[이와 같은 제1 라운드 선별을 "Her2.3.1"이라 칭함].

제2 라운드 선별. 증식된 Her2.3.1의 역가를 측정하고 나서, 6웰 평판 틀 내에서 증식시킨 다음(L48, L116 및 L9021과 공동 감염), 전술된 방법들을 사용하여 Her2-Fc/ProG 선별 주기를 더 진행시켰다. 결합된 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[이와 같은 제2 라운드 선별을 "Her2.3.2"라 칭함].

제3 라운드 선별. 증식된 Her2.3.2의 역가를 측정하고 나서, 6웰 평판 틀 내에서 다시 증식시킨 다음(L48, L116 및 L9021과 공동 감염), 전술된 방법들을 사용하여 Her2-Fc/ProG 선별 주기를 더 진행시켰다. 결합된 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[이와 같은 제3 라운드 선별을 "Her2.3.3"이라 칭함]. Her2.3.2 및 Her2.3.3 선별 결과들을 유동 세포 분석으로 테스트하였다. 이 실험에서는, C35-His 3 μ g/ml 또는 Her2-His 10 μ g/ml를, 항 His-APC MAB와 함께 얼음 상에서 30분 동안 항온 처리하여 복합체를 만들었다. 그 다음, 세포에 항 Fab-FITC를 가하고 나서, 항원-항 His 복합체를 가하였다(30분 동안 얼음 상에서 진행). 이후, 세포를 PBS 2ml, 0.5% BSA, 2mM EDTA로 세정하였다. 이어서, 여기에 항 his-APC와 항 Fab-FITC를 첨가하였으며(30분 동안 얼음 상에서 진행), 세포를 세정 및 고정시킨 다음, 유동 세포 분석법을 실시하였다. 도 8에 보인 바와 같이, Her2 특이적 항체의 경쇄 3개는 모두 증량되었다.

제4 라운드 선별. 6웰 평판 틀 내 HeLa 세포들을, Her2.3.3 및 L116으로만 공동 감염시켰으며, EEV는 전술된 바와 같이 분리하였고, 전술된 방법에 따라 Her2-Fc/ProG 선별 주기를 더 진행시켰다. 결합된 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다(제4 라운드 선별을 "Her2.3.4"라 칭함). Her2 항체 선별 전략을 요약한 도해를 도 9에 도시하였다.

Her2.3.3 및 Her2.3.4 선별 결과들을 전술된 염색 방법을 이용하여 유동 세포 분석을 통해 테스트하였다. 대조군 H8000-A56R + L8000을 사용하였다[8000 = 키메라 4D5; 트라스투주맵의 마우스 부모].

유동 세포 분석 결과들은, 3.3 및 3.4 샘플들 중 군집이 2가지 존재함을 보여주었다. Her2 3.4 샘플로 HeLa 세포를 공동 감염시켰으며, 샘플을 Her2 결합에 대해 염색한 후, 양성 세포들을 분류하였다. 분류된 샘플로부터 클론들을 골라낸 후, 스크리닝된 용균 반 30개를 Her2.3.4/Sort로부터 골라내고, 다시 24웰 평판 내 BSC1 상에서 2일 동안 증식시켰다(웰 당 용균 반 하나). 24웰 평판 내 HeLa 세포들을, 증식된 각각의 용균 반의 3분의 1로 감염시켰다. 또한 상기 세포를 L116으로도 공동 감염시켰다(moi = 1)(대조군: 8000, 2368, 2408 및 미감염 HeLa 상청액). EEV를 3일 동안 증식시킨 다음, 수득하고 나서, PLWUV로 불활성화시켰다. 바이러스를 CD100(2 μ g/ml) 및 Her2(2 μ g/ml)가 코팅된 평판에 결합시켰다[참새도록, 웰 당 EEV 50 μ l 및 ELISA 블로킹 완충액 50 μ l 사용]. 결과들을 도 10에 보였다.

항체 결합은 항 Fab-HRP를 첨가함으로써 확인하였다. 5개의 양성 클론은 Her2에 잘 결합하는 것으로 동정되었으며, 이것들을 서열 결정하였다. 5개 클론은 모두 동일한 서열을 가졌다(도 11 참조). 클론 B10의 VH 서열을 이

하에 보였다.

[0219] Her2 B10 클론 서열:

EVQLLESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFAFNYYALSWVRQAPGRGLKWVS
AISP DGDYIYYADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMTSLGAEDTALYYCARQNNVR
DGAVAGPLDHWGQGTLVT (서열번호 20)

[0221] 실시예 7

[0222] C35 항체 선별을 위한 CH1-A56R 융합 단백질 라이브러리 스크리닝

[0223] 비 면역화 중 A56R 융합 라이브러리("라이브러리 3"이라고도 칭함)로부터 유래하는 약 1,200,000개의 클론과 경쟁 클론(L48, L116 및 L9021)을 사용하여, 신규 C35 항체에 대한 선별을 수행하였다. 라이브러리는, 전술된 CD100과 Her2 선별을 위해 사용된 것과 동일한 것이었다.

[0224] 제1 라운드 선별. C35 100 μ g을, PBS 또는 ELISA 코팅 완충액(CB) 중 토실 활성화된 자성 비드에 접합시켰다. 이 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 항온 처리한 후, PBS, 10% FBS, 0.5% BSA로 1시간 동안 블로킹하였다(37 $^{\circ}$ C). 비드를 1회 세정한 후, 10% FBS가 보충된 DMEM 160 μ l 중에 재현탁하였다. 각각의 비드 샘플 50 μ l씩을 각각의 바이러스 샘플에 첨가하고 나서, 실온에서 3.5시간 동안 항온 처리하였다. 미결합 바이러스를 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml를 첨가하고 나서, 비드를 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다.

[0225] 결합된 라이브러리를 T75 내 HeLa 상에서 증식시켰다[제1 라운드 선별을 "C35 3.1"이라 칭함]. C35 3.1 라운드 결과들을 유동 세포 분석에 의해 테스트하였다. C35 3.1에서는 결합이 일어났지만, 그 정도는 작았다(데이터는 보이지 않음).

[0226] 제2 라운드 선별. 증식된 C35 3.1의 역가를 측정한 다음, 이를 6웰 평판 틀 내에서 재조합 EEV를 증식시키는데 사용하였으며(L48, L116 및 L9021과 함께 C35 3.1을 공동 감염시킴; 역가 = 약 5×10^5 /ml), 전술된 방법에 따라서 토실 활성화 C35 선별 주기를 더 진행시켰다. 제1 라운드에서와 같이 용액을 실온에서 3.5시간 동안 항온 처리하는 대신에, 3시간 동안 항온 처리하였다. 결합 및 미결합 바이러스의 역가를 표 7에 보였다. 결합 라이브러리를 T75 내 HeLa 상에서 증식시켰으며(제2 라운드 선별을 "C35 3.2"이라 칭함), 결합은 전술된 바와 같이 유동 세포 분석을 통해 테스트하였다.

표 7

CD35 Ab에 대한 제2 라운드 C35-His/토실 활성화 선별

바이러스	샘플	역가	결합 %
2368	미결합	684,000	
2368	결합	1600	0.2%
2408	미결합	600,000	
2408	결합	168,000	28%
라이브러리 C35 3.2	미결합	972,000	
라이브러리 C35 3.2	결합	10,400	1%

[0228] 제3 라운드 선별. 증식된 C35 3.2의 역가를 측정하였으며, 또한 이것을 6웰 평판 틀 내에서 재조합 EEV를 증식시키는데 사용하였으며(L48, L116 및 L9021과 함께 공동 감염시킴; 역가 = 약 5×10^5 /ml), 제2 라운드에 대해 전술된 방법에 따라서 토실 활성화 C35 선별 주기를 더 진행시켰다. 결합 및 미결합 바이러스의 역가를 표 8에 보였다. 결합 라이브러리를 T75 내 HeLa 상에서 증식시켰으며, C35와의 결합은 전술된 바와 같이 유동 세포 분석을 통해 테스트하였다(제3 라운드 선별을 "C35 3.3"이라 칭함).

표 8

CD35 Ab에 대한 제3 라운드 C35-His/토실 활성화 선별

바이러스	샘플	역가	결합 %
2368	미결합	400,000	
2368	결합	480	0.1%
2408	미결합	228,000	
2408	결합	108,000	47%
라이브러리 C35 3.3	미결합	540,000	
라이브러리 C35 3.3	결합	2600	0.5%

[0229]

[0230]

C35 3.3 유래 클론들을 스크리닝하여, 제4 라운드 선별도 수행할 수 있었다. 유동 세포 분석에 의해 양성 클론들을 특성 규명할 것이며, 이것들을 대상으로 특이성, 친화성 및 기능에 대해 테스트할 것이다.

[0231]

실시예 8

[0232]

중쇄 또는 경쇄를 발현하는 백시니아 바이러스의 선택적 증식

[0233]

중쇄 면역글로불린 또는 경쇄 면역글로불린 중 어느 하나를 보유하는 별도 재조합 백시니아 바이러스를 사용하는 조합 감염(combinatorial infection)은, 선별용 항체들을 발현하는데 효과적인 방법이다. 그러나, 선별 후 증식과 수득이 행해지는 동안에는 중쇄 함유 바이러스와 경쇄 함유 바이러스를 분리할 기구가 현재로서는 존재하지 않는다. 그러므로, 중쇄 감염과 경쇄 감염 둘 다가 1 이상의 복잡도(complexity)로 행하여지고, 선별 후 디콘볼루션(deconvolution)이 필요한 경우에서와 같이 중쇄 함유 백시니아 바이러스와 경쇄 함유 백시니아 바이러스를 별도로 증식시킬 수 있는 것이 유리할 것이다. 이러한 이유로, 약물 선별 마커와 결합한 중쇄 또는 경쇄(네오마이신 내성 마커를 갖게 된 중쇄 및 하이그로마이신 내성 마커를 갖게 된 경쇄)를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스가 제조되었다. 다음과 같은 실험은, 중쇄 함유 재조합 백시니아 바이러스 또는 경쇄 함유 재조합 백시니아 바이러스 각각을 선택적으로 증식시키는 것의 유용함을 입증해준다.

[0234]

BSC1 세포들을 6웰 평판들의 15개 웰에 접종하였다(웰 당 1.25×10^6 개 세포 및 웰 당 2.5ml). 그 다음날, 선별을 위해서 하이그로마이신 또는 G418의 연속 희석 액을 표 9에 따라서 제조하였다. DMEM-2.5는 2.5% FBS를 포함하는 DMEM을 나타낸다.

[0235] [표 9a]

하이그로마이신 희석액 제조

하이그로마이신 희석 [스톡] = 50 mg/ml						
	1	2	3	4	5	6
	0.2 mg/ml	0.1 mg/ml	0.08 mg/ml	0.04 mg/ml	0.02 mg/ml	0.01 mg/ml
배양액 필요부피 (ml)	6	6	12	0.5 X (일련희석)	0.5 X (일련희석)	0.5 X (일련희석)
하이그로마이신 첨가량(μl):	24	12	19.2	DMEM-2.5 6ml에	DMEM-2.5 6ml에	DMEM-2.5 6ml에
DMEM-2.5으로의 첨가량 (ml):	5.976	5.988	5.9808	3 6ml 첨가	4 6ml 첨가	5 6ml 첨가

[0236]

[0237] [표 9b]

G418 희석액 제조

G418 희석 [스톡] = 100 mg/ml						
	1	2	3	4	5	6
	2.0 mg/ml	1.0 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	0 mg/ml
배양액 필요부피(ml)	5	5	5	5	5	5
G418 첨가량(μl):	200	DMEM-2.5 5ml에	DMEM-2.5 5ml에	DMEM-2.5 5ml에	DMEM-2.5 5ml에	DMEM-2.5 5ml
DMEM-2.5 으로의 첨가량(ml):	10	1 5ml 첨가	2 5ml 첨가	3 5ml 첨가	4 5ml 첨가	

[0238]

[0239] 제3일에, BSC1 세포를, MOI = 3인 야생형 백시니아 바이러스, 또는 각각의 선별 마커들을 함유하는 백시니아 바이러스(VHE H5 LX-IRES-HYGRO 또는 VHE H5 HX-A56R NEO)로 감염시켰다. 그 다음, 하이그로마이신과 G418 희석액을 평판 웰들에 동시에 가하였다. 항생제를 함유하지 않는 DMEM-2.5를 대조군 웰에 가하였다. 웰 당 부피 0.65ml의 매질 중에서 감염을 수행하였으며, 세포를 37℃에서 항온 처리하였다. 2시간 경과 후, 매질의 부피를 웰 당 2.65ml로 증가시키고 나서, 여기에 하이그로마이신 또는 G418을 추가로 보충하여 약물 함유 웰 내 목표 농도를 유지시켰다. 이러한 동안 새 BSC1 세포를 12웰 평판에 접종하여(웰 당 2×10^5 개 세포) 감염 후 역가를 측정하였다.

[0240] 감염 후 24시간 경과시, 모든 샘플들을 15ml들이 원추형 원심 분리용 튜브에 수득하여 넣었으며, 동결-해동을 3회 반복한 다음, 와류 회전(vortexing)을 하고 나서, 다시 DMEM-2.5 1.8ml에 현탁하였다(조심스럽게 와류 회전 시킴). 샘플들에 2분 동안 최대 세기로 초음파 처리한 다음, 이 샘플들을 2.0ml들이 사르슈테트 튜브(Sarstedt tube)로 옮겨 담았다. 7.5ml들이 폴리프로필렌 튜브 내 각각의 샘플에 대해 일련의 희석액들을 제조하였다. 우선, 원래 샘플 30μl를 각각의 샘플로부터 취한 다음, 이를 무 항생제 DMEM-2.5와 합하여 최종 부피를 3000μl가 되게 만들었다($1:10^2$ 희석). 그 다음, 여기에 $1:10^2$ 희석액 30μl를 또 첨가하여 두 번째 최종 부피를 3000μl가

되도록 하여 $1:10^4$ 희석액을 만들었다. 그 다음, 계속해서 일련의 $1:10$ 희석을 수행함으로써 $1:10^5 \sim 1:10^9$ 희석액을 만들었다. 생물 안전 작업대 내에서 5ml 튜브를 사용하여 모든 희석액을 와류 회전시켰다.

[0241] 이후, 분석 웰 당 각각의 역가 희석액 0.333ml씩을 두 군데로 나누어 분배함으로써 각각의 샘플로부터 유래한 6개 희석액($1:10^4 \sim 1:10^9$)을 이용하여 역가 평판들 내 BSC1 세포들을 감염시켰다. 여기서, 역가를 산정하기 위한 팩터는 2개의 웰 내 용균 반 총수를 0.66ml로 나눈 값이다. 감염물을 37℃에서 2시간 이상 동안 항온 처리하였다. 흡착 및 감염을 시작한 지 2시간이 경과한 후, 각각의 웰에 DMEM-2.5를 1ml 더 첨가하였다.

[0242] 감염 후 48시간 경과시 크리스탈 바이올렛을 12웰 역가 평판에 가하였다. 지름 1mm 이상인 용균 반들만을 계수하였다. 딸 용균 반들은 계수에서 배제하였다.

[0243] 결과들을 표 10에 보였다. 하이그로마이신 내성 실험에서 하이그로마이신 0.01~0.08mg/ml는, 네오마이신 내성 마커와 결합한 중쇄를 발현하는 백시니아 바이러스의 증식은 유의적으로 억제하였으나, 하이그로마이신 농도가 0.1mg/ml에서 0.2mg/ml로 증가할 때까지 하이그로마이신 내성 마커와 결합한 중쇄를 발현하는 백시니아 바이러스의 증식은 거의 억제하지 않았거나 아예 억제하지 않았다(단, 0.04mg/ml 데이터 점에서는 예외). 이와 유사하게, 네오마이신 내성 실험에서 G418 0.125~2mg/ml은 야생형 백시니아 바이러스의 증식을 유의적으로 억제하였으나, 네오마이신 내성 마커에 결합한 중쇄를 발현하는 백시니아 바이러스의 증식에 대한 억제 효과는 거의 발휘되지 않았다.

[0244] [표 10a]

하이그로마이신 내성 실험 결과

하이그로마이신 내성		
샘플 ID	역가	억제%
하이그로 0.2mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	2.20E+07	53.0
하이그로 0.1mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	1.70E+07	63.6
하이그로 0.08mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	4.47E+07	4.5
하이그로 0.04mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	2.77E+07	40.9
하이그로 0.02mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	4.66E+07	0.4
하이그로 0.01mg/ml VKE H5 LX-IRES-HYGRO	5.98E+07	-27.9
하이그로 0.08mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.43E+06	89.1
하이그로 0.04mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.66E+06	88.1
하이그로 0.02mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.70E+06	87.9
하이그로 0.01mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	6.86E+06	69.3
[항생제무첨가] VKE H5 LX-IRES-HYGRO	3.86E+07	하이그로마이신 대조군 #1
[항생제무첨가] VKE H5 LX-IRES-HYGRO	5.49E+07	하이그로마이신 대조군 #2
[항생제무첨가] VHE H5 HX-A56R NEO	2.23E+07	네오마이신 대조군

[0245]

[0246] [표 10b]

네오마이신 내성 실험 결과

네오마이신 내성		
샘플 ID	역가	억제%
G418 0.125 mg/ml WT	1.58E+07	60.8
G418 0.25 mg/ml WT	8.26E+06	79.4
G418 0.5 mg/ml WT	2.54E+06	93.7
G418 1 mg/ml WT	1.36E+06	96.6
G418 2 mg/ml WT	1.59E+05	99.6
G418 0.125 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.88E+07	-26.7
G418 0.25 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.11E+07	-36.7
G418 0.5 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.41E+07	-50.0
G418 1 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.18E+07	-40.0
G418 2 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3.03E+07	-33.3
G418 0 mg/ml WT	4.02E+07	네오마이신 대조군 #1
G418 0 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2.27E+07	네오마이신 대조군 #2

[0247]

[0248] 그러므로, 내부 리보솜 유입점(IRES)을 통해 결합한 약품 내성 마커와 면역글로불린을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스는 해당 약품으로 처리되었을 때 숙주 세포가 사멸하는 것을 막아주었다. 이로써, 재조합시 바이러스 내 사슬 특이적 증식과 야생형 백시니아 바이러스에 대한 선별이 가능하다.

[0249] 실시예 9

[0250] HeLa 세포의 표면상 A56R 융합 단백질의 발현

[0251] 12웰 평판에서 HeLa 세포를, 면역글로불린 융합 구성체를 발현하는 재조합 EEV 백시니아 바이러스, 가변 중(H8000) CH1-A56R 및 L8000 Ig-K(이것들은 함께 항체의 Fab 단편("Fab")을 코딩함)을 발현하는 재조합 EEV 백시니아 바이러스, 가변 중(H8000) FL-A56R 및 L8000 Ig-K(이것들은 함께 전장 ("FL") IgG를 코딩함)을 발현하는 재조합 EEV 백시니아 바이러스, 가변 중(H8000) FL-절두형-A56R 및 L8000 Ig-K(이것들은 함께 길이가 더욱 짧은 A56R("TR")을 가지는 전장 IgG를 코딩함)을 발현하는 재조합 EEV 백시니아 바이러스, 가변 중(H2124) FL-A56R 및 L517 Ig-K(2408 "FL")을 발현하는 재조합 EEV 백시니아 바이러스, 그리고 가변 중(H2124) FL-절두형-A56R 및 L517 Ig-K(2408 "TR")을 발현하는 재조합 EEV 백시니아 바이러스로 공동 감염시켰다. "Fab", "TR" 및 "IgG" 구성체들을 보이는 도해를 도 12에 보였다. 재조합 백시니아 바이러스로 감염된 세포의 C35 염색 및 Her2 염색에 대해 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석을 수행하였다. 약 18시간 경과 후, 세포를 C35-His/His-APC, Her2-His/His-APC, 그리고 항 Fab-FITC로 염색한 후; 이를 캔토(Canto) 상에서 유동 분석법으로 검출하였다. 요약하면, 세포를 트립신으로 처리하여 샘플당 2개로 나누었는데; 이것들을 세정 완충액 2ml로 세정한 후; 샘플 2개 중 하나에 Her2-His 10μg/ml 또는 C35-His 4μg/ml를 가하고 나서, 30분 동안 얼음 상 항온 처리하였다. 그 다음, 세포를 세정한 후, 여기에 항 His APC를 첨가하였으며, 이 샘플들을 얼음 상에서 30분 동안 항온 처리하고, 2차 검출 시약인 항 Fab-FITC로 염색한 후, 샘플들을 세정 및 고정(1:100PI와 0.5% 파라포름알데히드 사용, 얼음 상에서 20분 동안 진행)한 후, 캔토를 사용하여 유동 분석법으로 분석하였다. FACS 데이터를 도 13-15에 보였다. 이와 같은 결과들은, Fab 또는 전장 IgG를 발현하는 A56R 융합 단백질들이 세포 표면에 발현되었고, 오로지 A56R의 경막 도메인과 세포내 도메인만이 IgG를 표면 발현하는데 필요함을 보여주는 것이다.

[0252]

실시에 10

[0253]

용액 기반 Vac-Ig 선별

[0254]

토실 활성화된 비드의 선별. L517과 함께, C35 특이적(H2124) "Fab", "FL" 및 "TR" VH를 발현하는 EEV로 6웰 평판 내 HeLa 세포를 공동 감염시키고 나서, 감염 후 약 48시간 경과시, 이를 1200rpm에서 회전시켜 상청액 (EEV)을 수집함으로써 상청액으로부터 EEV를 수집하였다. 대조군으로서 Her2 특이적 H8000-Fab 및 L8000을 동일한 방법으로 제조하였다. 비드 선별을 위해서, C35-His 100 μ g을 PBS 중 토실 활성화된 자성 비드에 접합하였다. 이 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 항온 처리하였으며, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 PBS, 10% FBS, 0.5% BSA로 블로킹하였다. 비드들을 1회 세정한 후, 10% FBS가 보충된 DMEM 160 μ l 중에 재현탁하였다. 각각의 비드 샘플 50 μ l를 각각의 바이러스 샘플에 첨가한 다음, 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 미결합 EEV를 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml를 첨가하고 나서, 비드를 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다.

[0255]

표 11에 보인 바와 같이, Fab 및 FL 융합 단백질 둘 다의 C35 특이적 구성체를 발현하는 백시니아 바이러스를 선별하였으며, 또한 이때 TR 융합 단백질을 포함하는 구성체는 선별하지 않았다. 이 데이터는, 일부 세포의 A56R 서열은 EEV로의 통합에 필요함을 암시하는 것이다.

표 11

토실 활성화된 비드 선별 결과

바이러스	결합%
MAb 2408-Fab	24%
Mab 2408-FL	18%
Mab 2408-TR	2.3%
Mab 8000-Fab	0.8%

[0256]

[0257]

실시에 11

[0258]

CD100 항체 선별을 위한 CH1-A56R 융합 단백질 라이브러리 스크리닝

[0259]

비 면역화 VH 및 합성 VH 서열의 조합을 포함하는 클론 약 7,000,000개로 이루어진 중쇄 라이브러리를 사용하는, 새로운 CD100 항체들에 대한 선별을 A56R-Fab 벡터에서 수행하였다. EEV 표면에 Ig 라이브러리를 발현하는 백시니아를 생산하기 위해서, 경쇄 클론 9개(카파 사슬: L48, L116, L122, L7110 및 L9021; 그리고 람다 사슬: L3-1, L151, L214 및 L223)의 각테일과 함께, A56R 융합 라이브러리("라이브러리 10"이라고도 칭함)로 1×10^9 개의 HeLa 세포를 공동 감염시켰다. 중쇄 바이러스의 총 moi는 1이었으며, 경쇄 바이러스의 총 moi는 1이었는데, 각각의 경쇄는 가하여진 전체 경쇄 바이러스의 약 9분의 1을 포함하였다.

[0260]

현탁액 중에서 생육하는 HeLa-S 세포를 2일 동안 감염시켰으며, 이후 상청액을 수득하고, 이를 느린 회전 속도로 2회 회전시켜 펠렛으로 만든 다음, EEV를 F16/F250 회전자 내에서 13,000rpm으로 1시간 동안 펠렛으로 만들었다. 10% FBS가 보충된 DMEM 3ml 중에 EEV를 재현탁시켰으며, 이 현탁액 1ml를 사용하여 CD100 특이적 항체를 선별하였다.

[0261]

제1 라운드 선별. 2368-A56R 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)) 및 2408-A56R 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu))는 대조군으로, 그리고 라이브러리 10(바이러스 1ml(약 10^8 pfu))은 선별 분석용으로 사용하였다. 우선, 단백질 G 비드 300 μ l(샘플당 표준량의 2배)를 자석으로 풀 다운한 다음, 비드에 PBS 600 μ l 및 CD100-Fc 18 μ l(= 36 μ g)를 가하였다. 용액을 실온에서 20분 동안 항온 처리하였으며(회전자 상에서 진행됨), 그 결과 CD100-Fc는 단백질 G 비드와 결합하게 되었다. 비드를 자석으로 풀 다운한 다음, PBS 1ml로 1회 세정하고 나서, 10% FBS가 보충된 DMEM 300 μ l 중에 재현탁하였다.

[0262]

그 다음, 샘플당 CD100-Fc/Pro G 100 μ l(CD100-Fc 약 12 μ g/ml)를 EEV(2408 및 2368 대조군, 그리고 라이브러리 10)에 첨가한 후, 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 미결합 바이러스를 제거하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml를 첨가하고 나서, 용액을 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다. 결과들을 표 12에 보였다. 결합한 바이러스를 T175 플라스크 내에서 3일 동안 BSC1 세포 상 증식시켰다.

표 12

토실 활성화된 비드 선별 결과

바이러스	선별	역가(미결합)	역가(결합)	결합%
라이브러리_10	CD100-Fc	1.5x10 ⁸	2.2x10 ⁶	0.15
2368	CD100-Fc	72,000	37,000	34
2408	CD100-Fc	338,400	80	0.12

[0263]

[0264]

상기 결과들은, 라이브러리 10.1이 BSC1 상에서 잘 증식하였으며, 수득률 및 역가도 잘 나왔음을 보여주는 것이다.

[0265]

제2 라운드 선별. 셀 스택커(Cell Stacker) 내에서 HeLa 세포를 2일 동안 감염시킨 다음(각각 moi = 1), 전술된 바와 같이 수득하여, 라이브러리 10.1과 경쇄 9개를 포함하는 신선한 분취액으로부터 EEV를 생산하였다. 수득된 바이러스를 반으로 나누었는데, 이 경우 50%는 ProG 비드 상에서 선별되었으며, 나머지 50%는 CD100 코팅된 토실 활성화 비드 상에서 선별되었다.

[0266]

ProG 비드를 사용하는 제2 라운드 선별. 2368-A56R 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)), 2408-A56R 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu)) 및 10.1 라이브러리 발현 EEV(바이러스 1ml(약 5×10^5 pfu))를 선별용으로 사용하였다. Pro-G 비드에 PBS 600 μ l와 CD100-Fc 18 μ l(36 μ g)를 가하였다. 이 용액을 실온에서 20분 동안 항온 처리하여(회전자 상에서 진행됨), CD100-Fc를 프로테인 G 비드와 결합시켰다. 제1 라운드에 대해 전술된 바와 같이 비드를 세정한 후 재현탁하였다. 샘플당 CD100-Fc/Pro G 100 μ l(CD100-Fc 1ml당 약 12 μ g)를 바이러스 샘플에 첨가하고, 이를 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. "미결합" 및 "결합"을 수집한 후 역가를 측정하였다. 결합 라이브러리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[제2 라운드 선별을 "CD100 10.2/ProG"라 칭함]. 제2 라운드 선별의 결과들을 표 13a에 보였다. 결합한 바이러스를 T175 플라스크 내 BSC1 상에서 3일 동안 증식시켰다.

[0267]

토실 활성화된 비드를 사용하는 제2 라운드 선별. 상기 프로테인 G 비드 선별 실험에서 사용된 것과 동일한, 2408(C35 특이적) 및 2368(CD100 특이적) 및 라이브러리 10 항체를 발현하는 EEV를 토실 활성화 자성 비드 선별에 사용하였다. PBS 중에서 CD100-His 100 μ g을, 토실 활성화된 자성 비드에 접합하였다. 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 항온 처리하고 나서, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 PBS, 10% FBS, 0.5% BSA로 블로킹하였다. 비드를 DMEM, 10% FBS으로 1회 세정한 다음, 10% FBS가 보충된 DMEM 160 μ l 중에 재현탁하였다. 각각의 비드 샘플 50 μ l씩을 각각의 바이러스 샘플에 첨가하고 나서, 이를 2시간 동안 실온에서 항온 처리하였다. 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 미결합 바이러스를 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml를 첨가하고 나서, 비드를 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다. 결합 바이러스를 T175 플라스크 내 BSC1 상에서 3일 동안 증식시켰다. 제2 라운드 선별의 결과들을 표 13b에 보였다.

[0268] [표 13a]

CD100 Ab에 대한 제2 라운드 선별 (프로테인 G 비드 선별)

바이러스	선별	역가(미결합)	역가(결합)	결합%
라이브러리_10.1 프로테인 G	CD100-Fc	4.4x10 ⁷	67,000	0.15
2368	CD100-Fc	104,400	66,000	38.7
2408	CD100-Fc	240,000	80	0.03

[0269]

[0270] [표 13b]

CD100 Ab에 대한 제2 라운드 선별 (토실 활성화된 비드 선별)

바이러스	선별	역가(미결합)	역가(결합)	결합%
라이브러리_10.1 토실	CD100-His	2.4x10 ⁷	113,000	0.47
2368	CD100-His	56,400	106,000	34.4
2408	CD100-His	354,000	0	0

[0271]

[0272] 이와 같은 제2 라운드 결과들은, 라이브러리 10.2/ProG 및 10.2/토실 둘 다는 BSC1 상에서 잘 증식하였음을 보여주는 것이다.

[0273] 제3 라운드 선별. 전술된 방법과 동일한 방법을 통하여 선별의 제3 라운드를 수행하였다. 10.2/ProG는 CD100-Fc/ProG(제3 라운드용)로 선별하였으며, 10.2/토실은 CD100-His/토실(제3 라운드용)로 선별하였다. 2일에 걸쳐 T175 내에서 HeLa 세포를 감염시킴으로써(moi = 1), 10.2/ProG와, 9개의 경쇄를 포함하는 신선한 분취액으로부터 EEV를 생산하였으며(각각 전체 중쇄 및 전체 경쇄 재조합 바이러스에 대해 생산), 전술된 바와 같이 수득하였다. 2일에 걸쳐 T175 플라스크 내에서 HeLa 세포를 감염시킴으로써(moi = 1), 10.2/토실과, 9개의 경쇄를 포함하는 신선한 분취액으로부터 EEV를 생산하였으며(각각 전체 중쇄 및 전체 경쇄 재조합 바이러스에 대해 생산), 전술된 바와 같이 수득하였다. 역가를 표 14a~14b에 보였다.

[0274] [표 14a]

CD100 Ab에 대한 제3 라운드 선별 (프로테인 G 비드 선별)

바이러스	선별	역가(미결합)	역가(결합)	결합%
라이브러리_10.2 프로테인 G	CD100-Fc	2.5x10 ⁷	364,000	1.44
2368	CD100-Fc	84,000	58,000	48.5
2408	CD100-Fc	99,600	0	0

[0275]

[0276] [표 14b]

CD100 Ab에 대한 제3 라운드 선별 (토실 활성화된 비드 선별)

바이러스	선별	역가(미결합)	역가(결합)	결합%
라이브리_10.2 토실	CD100-His	8.2x10 ⁶	6,100	0.074
2368	CD100-His	69,600	108,000	60.8
2408	CD100-His	121,000	0	0

[0277]

[0278]

결합한 라이브리를 T75 내 BSC1 상에서 증식시켰다[제3 라운드 선별을 "CD100 10.3ProG 및 CD100 10.3/토실"이라 칭함]. 제3 라운드 선별의 결과들을 유동 세포 분석을 통해 테스트하였다.

[0279]

본 실험에서, 10.3 선별 샘플들의 분취액을 각각의 경쇄로 개별 공동 감염시킨 다음, CD100 및 Her2와의 결합에 대해 테스트하였다. HeLa 세포를 감염시켰다(moi = 1). 하룻밤 지나고 나서, 감염된 세포들을 수득하여 CD100 결합 및 Her2 결합(대조군)을 위해 염색하였다. 세포를 트립신으로 처리한 후, 얼음 냉각 유동 완충액(FB 1× PBS, 0.5% BSA, 2mM EDTA)으로 세정한 다음, 3가지 상이한 검출 방법 각각으로 검출하였다. 제1 검출 방법(2단계 방법)에서, 얼음 상 FB 중에서 세포를 10ug/ml huCD100-His와 함께 30분 동안 항온 처리한 후, FB 2ml로 세정하고 나서, 1:500(2ug/ml) FITC 표지된 염소-Fab 항 인간 Fab와 혼합된 마우스 항 6XHis-APC 1:50(2ug/ml)와 함께 얼음 상에서 30분 동안 항온 처리하였다. 제2 검출 방법과 제3 검출 방법(예비 복합체화 방법)에 있어서는, hu CD100-His 10ug/ml 또는 huHer2-His 10ug/ml 중 어느 하나를 얼음 상 FB 중에서 마우스 항 6XHis-APC 1:50(2ug/ml)과 30분 동안 예비 항온 처리한 다음, 이 혼합물을 1:500(2ug/ml) GtFab 항 huFab-FITC와 함께 세포에 첨가하고 나서, 얼음 상에서 30분 동안 항온 처리하였다. 검출 시약과 함께 항온 처리한 후, 세포를 FB 2ml로 1회 세정한 후, 0.5% 파라포름알데히드 중에 재구성하고 나서, 얼음 상에서 20분 동안 항온 처리하였다. FACS 캔토 상에서 20,000 이벤트만큼 판독하였다. 그 결과들을 도 16~22에 보였다.

[0280]

유동 세포 분석 염색은, CD100 10.3/ProG 및 토실에 있어서 세포를 대부분의 경쇄들과 쌍을 이루게 하였을 때, CD100 결합 세포의 양성 군집이 나타났음을 보여주었다. 특히 L3-1도 함께 공동 감염시켰을 때 강력하게 양성 반응을 보이는 군집이 관찰되었다.

[0281]

특이적 VH를 분리하기 위해서, HeLa 세포들을 10.3/ProG 또는 10.3/토실로 별도로 감염시켰으며, 이때 L3-1을 공동 감염시켰다. 밤새도록 감염시킨 후, 세포를 수득하여, 전술된 바와 같은 예비 복합체화 방법으로 CD100 결합에 대해 염색하였다. 그 다음, 항원 결합 세포들을 세포 분류를 통해 분리하였다. 분류 후 바이러스를 동결/해동에 의해 세포로부터 방출시키고 나서, 바이러스를 BSC1 세포 상에서 증식시켰다. 분리 EEV-VH 사슬의 증식된 샘플을 대상으로 증량 여부를 테스트하였다(분석 유동 검정법에 의한). 이 검정법에 있어서, 증식된 분류 CD100 10.3 샘플 분취액을 L3-1 경쇄로 공동 감염시킨 다음, 전술된 2단계 예비 복합체화 방법을 통해 CD100 및 Her2에 대한 결합을 테스트하였다. 결과들을 도 23~25에 보였다.

[0282]

증식 후, 바이러스를 수득하고 나서, 키아젠 DNA 블러드 미니 키트(Qiagen DNA blood mini kit)(cat# 51 104)를 사용하여 바이러스 분취액으로부터 DNA를 추출하였다. 다음과 같은 중쇄 특이적 프라이머들을 사용하여, 정제된 DNA를 PCR 증폭시켰다: 프라이머 428; 5'-GATATATTAAAGTCGAATAAAGTG-3'(서열 번호 31) 및 프라이머 430; 5'-GACATCACATAGTTTGTTC-3'(서열 번호 32). 이때 생성된 PCR 생성물을, 분비된 전장 인간 IgG1(EFVH)을 포함하는 플라스미드 벡터에 클로닝한 다음, 생성된 콜로니들에 포함된 V 유전자를 대상으로 서열 결정을 실시하였다. 서열 결정 결과에 대한 요약을 표 15에 보였다. 10.3/ProG로부터 얻어진 클론들 188개를 서열 결정하여 44개의 특유 클론들을 동정하였으며, 10.3/토실로부터 얻어진 클론들 188개를 서열 결정하여 44개의 특유 클론들을 동정하였다.

표 15

특유 클론들 요약

스크리닝	서열결정된 클론		ELISA에 의한 결합률
	특유	서열들	
10.3/ProG	188	44	56.8%
10.3/tosyl	188	46	60.9%

[0283]

[0284]

VL3-1을 코딩하는 플라스미드 벡터와 함께, 특유 중쇄 각각에 대한 플라스미드 DNA로 CHO 세포를 공동 형질 감염시켜 도입하였으며(리포펙타민 2000 사용, 3일), 이후 매질 중에 포함된 항체를 CD100에 대한 특이성에 대해서 테스트하였다[CD100+ 저켓 세포 상 유동 세포 분석 및 ELISA에 의함(각각 도 26 및 도 27의 A-B 참조)]. 유동 세포 분석을 위하여, 실험용 항체를 유동 완충액(1×PBS, 0.5%BSA, 2mM EDTA) 중에서 1:400 또는 [2.5ug/ml]의 Gt 항 Hu Fc-다이라이트(Dylight) 649의 2차 항체와 함께 예비 항은 처리하였다(1ug/ml). 저켓 세포들을 96 평판 내 웰 당 250,000개씩 접종하고 나서, 미리 만들어 놓은 Ab 복합체와 함께 얼음 상에서 30분 동안 항은 처리하였다. 그 다음, 세포를 유동 완충액 200uL로 2회 세정한 후, 1× 요오드화프로피듐(PI) 및 0.5% 파라포름알데히드와 함께 20분 동안 항은 처리하였다. 세포를 FACS 캔토 상에서 검출하였는데, 이때 생 세포 군집에 대해 10,000 이벤트만큼 게이팅(gating)하여 판독하였다. 전체적으로 75개 이상의 특유 항체들이 CD100에 특이적인 것으로 확인되었다[ELISA 또는 유동 세포 분석을 통해 확인됨].

[0285]

실시에 12

[0286]

Her2 항체 선별을 위한 CH1-A56R 융합 단백질 라이브러리의 스크리닝

[0287]

비 면역화 VH 서열과 합성 VF1 서열을 조합하여 포함하는 클론 약 3,000,000개로 이루어진 중쇄 라이브러리를, IRES-네오마이신과의 융합체로서 A56R-Fab 벡터 내에서 생산하였다. EEV 표면상에 Ig 라이브러리를 발현하는 백시니아를 생산하기 위해서, 하이그로마이신 내성 유전자를 함유하는 카파 경쇄 클론 1,000개의 라이브러리와 함께, A56R 융합 라이브러리("라이브러리 9"라고도 칭함)로 HeLa 세포 5×10^9 개를 공동 감염시켰다. 경쇄 라이브러리는 인간의 골수(비 면역화)로부터 분리된 VK 서열들로 이루어졌다. 중쇄 바이러스의 총 moi는 1이었으며, 경쇄 바이러스의 총 moi는 1이었다.

[0288]

현탁액 중에서 생육하는 HeLa-S 세포를 2일 동안 감염시켰으며, 이후 상청액을 수득하여, 느린 회전 속도로 2회 회전시킴으로써 펠렛으로 만든 다음, EEV를 F16/F250 회전자 내에서 13,000rpm으로 1시간 동안 회전시켜 펠렛으로 만들었다. 10% FBS가 보충된 DMEM 3ml 중에 EEV를 재현탁시켰으며, 이 현탁액 1ml를 사용하여 Her2/neu 특이적 항체를 선별하였다.

[0289]

제1 라운드 선별. 라이브러리 9를 본 선별을 위해 사용하였다. 우선, PBS 100μl와 Her2-Fc 24ug을 프로테인 G 비드 600u1에 가하였다. 이 용액을 실온에서 20분 동안 항은 처리하여(교반자 상에서 진행), Her2-Fc가 프로테인 G 비드와 결합하도록 하였다. 자석으로 비드를 풀 다운 하고 나서, PBS 1ml로 1회 세정하였으며, 이후 10% FBS가 보충된 DMEM 400μl 중에 재현탁하였다.

[0290]

그 다음, Her2-Fc/Pro G 100μl(Her2-Fc 약 6μg/ml)를 라이브러리 9 1ml에 첨가한 후, 실온에서 2시간 동안 항은 처리하였다. 유사한 양만큼의 비드를 양성 대조군인 MAb 8000 EEV와 음성 대조군인 MAb 2408 EEV에 가하였다. 비드를 분리해낸 후, 표준 PBS(1ml) 세정(5회)을 통하여 미결합 바이러스를 수집하였다. 자석으로부터 비드를 분리해낸 후, 2.5% FBS가 보충된 DMEM 1ml를 첨가하고 나서, 용액을 새로 준비한 튜브에 옮겨 담았다("결합"). "미결합" 및 "결합"의 역가를 측정하였다(표 16 참조). 결합한 라이브러리로부터 회수된 비드를, 1mg/ml G418의 존재 하에 T175 플라스크 3개 내에서 BSC1 상 증식시켰다. 이 증식을 통하여 중쇄 재조합 바이러스를 선별해 냈다(제1 라운드 선별을 "Her.9.1"이라 칭함).

표 16

Her2 Ab에 대한 제1 라운드 선별

바이러스	선별	역가(미결합)	역가(결합)	결합%
라이브러리 9	Her2-Fc	1.4×10^9	4.6×10^6	0.32
2408	Her2-Fc	1.2×10^5	180	0.14
8000	Her2-Fc	3×10^5	7.2×10^4	19.3

[0291]

[0292]

제2 라운드 선별. 증식된 Her.9.1의 역가를 측정하고 나서, 2개의 셀 스택커 내에서 2일 동안 Her.9.1 VH와, VK1000 라이브러리의 신선한 분취액으로 HeLa 세포를 공동 감염시킴으로써 선별의 제2 라운드를 수행하였다. 전술된 바와 같이 바이러스를 수득한 후, 전술된 방법을 이용하여 Her2-Fc/ProG 선별 주기를 더 진행시켰다. 결합 바이러스의 50%는 G418 1mg/ml이 포함된 T175 플라스크 2개(중쇄 선별용) 내 BSC1 상에서 증식되었으며, 결합 바이러스의 나머지 50%는 하이그로 0.030mg/ml이 포함된 T175 플라스크 2개(경쇄 선별용) 내 BSC1 상에서 증식되었다. 역가를 측정한 결과를 표 17에 보였다. 증식된 바이러스를 Her.9.2/VH 및 Her 9.2/VK로 명명하였다.

표 17

Her2 Ab에 대한 제2 라운드 선별

바이러스	선별	역가(미결합)	역가(결합)	결합%
Her2.9.Rd1 +VK	Her2-Fc	1.76×10^8	1.9×10^5	0.1
2408	Her2-Fc	1.4×10^5	80	0.1
8000	Her2-fc	3.3×10^5	6.2×10^4	16

[0293]

[0294]

제3 라운드 선별. 증식된 Her.9.2/VH 및 Her.9.2/VK의 역가를 측정하고 나서, 셀 스택커 내에서 2일 동안 상기 Her.9.2/VH 및 Her.9.2/VK로 HeLa 세포를 공동 감염시켰으며, EEV를 전술된 바와 같이 정제하고, 전술된 방법을 이용하여 Her2-Fc/ProG 선별 주기를 더 진행시켰다.

[0295]

결합 바이러스의 50%는 G418 1mg/ml이 포함된 T175 플라스크(중쇄 선별용) 내 BSC1 상에서 증식하였으며, 결합 바이러스의 나머지 50%는 하이그로 0.030mg/ml이 포함된 T175 플라스크(경쇄 선별용) 내 BSC1 상에서 증식되었다. 증식된 바이러스를 Her.9.3/VH 및 Her 9.3/VK로 명명하였다.

[0296]

Her.9.3/VH 및 Her 9.3/VK 내 Her2 특이적 항체에 대한 선별은 유동 세포 분석에 의해 테스트되었다. HeLa 세포를 밤새도록 Her9.3/VH 및 Her9.3/VK로 공동 감염시켰으며($\text{moi} = 1$), 그 다음 Her2와의 결합에 대해 염색하였는데, 이때 대조군 항원(C35)과의 결합은 이루어지지 않았다. 본 실험에서, C35-His 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 Her2-His 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 항 His-APC 항체와 함께 얼음 상에서 30분 동안 항을 처리한 결과, 복합체가 생성되었다. 그 다음, 여기에 항 Fab-FITC를 첨가하고, 또 상기 세포에 항원-항 His 복합체를 30분에 걸쳐 첨가하였다(얼음 상에서 진행됨). 이후, 세포를 2ml PBS, 0.5% BSA, 2nM EDTA로 세정하였다. 세포를 고정하고 나서, 유동 세포 분석을 수행하였다. 데이터는, VH 및 VK 둘 다 증가되었음을 보여주었다.

[0297]

추가 증량을 수행하기 위해서, 새로 준비한 HeLa 세포를 9.3VH 및 VK로 감염시켰으며(각각의 경우 $\text{moi} = 1$), 세

포를 전술된 바와 같이 염색한 다음, 항원 결합 세포들을 분류하였다. 동결/해동 주기를 3회 진행하여, 분류된 세포로부터 바이러스를 방출시켰는데, 바이러스의 50%는 G418 1mg/ml이 포함된 T75 플라스크(중쇄 선별용) 내 BSC1 상에서 증식되었으며, 바이러스의 나머지 50%는 하이그로 0.030mg/ml이 포함된 T75 플라스크(경쇄 선별용) 내 BSC1 상에서 증식되었다. 증식된 바이러스의 역가를 측정한 뒤, 이 바이러스를 Her.9.3 VH/Sort 및 Her 9.3/VK/Sort로 명명하였다.

[0298] 유동 세포 분석을 통하여 Her.9.3/VH/Sort 및 Her 9.3/VK/Sort 내 Her2 특이적 항체에 대한 선별을 테스트하였다. Hela 세포를 밤새도록 Her9.3/VH/sort 및 Her9.3/VK/sort로 공동 감염시킨 후(moi = 1), Her2와의 결합에 대해 염색하였는데, 이때 대조군 항원(C35)과의 결합은 이루어지지 않았다. 본 실험에서, C35-His 3μg/ml와 Her2-His 6μg/ml를 항 His-APC 항체와 함께 얼음 상에서 30분 동안 항을 처리한 결과, 복합체가 생성되었다. 그 다음, 여기에 항 Fab-FITC를 첨가하고, 또 상기 세포에 항원-항 His 복합체를 30분에 걸쳐 첨가하였다(얼음 상에서 진행됨). 이후, 세포를 2ml PBS, 0.5% BSA, 2nM EDTA로 세정하였다. 세포를 고정하고 나서, 유동 세포 분석을 수행하였다. 데이터는, VH 및 VK 둘 다가 증량되었음을 보여주었다.

[0299] VH 및 VK의 항원 특이적 쌍을 고정하기 위하여, Her.9.3/VH/sort 및 Her 9.3/VK/sort를 Hela 세포에 공동 감염시킨 후(moi = 1), Her2 결합에 대해 전술된 바와 같이 염색하였다. 세포를 다시 분류하였으나, 이번에는 감염된 세포 각각을 96웰 평판의 웰 각각에 분류하여 넣었다. 항원 결합 분류된 세포 각각은 특이적 VK와 특이적 VH의 고정 항원 특이적 쌍을 포함하였다. 분류 후, 세포를 동결/해동시켰으며, 이후 바이러스를 96웰 평판 내 BSC1 상에서 증식시켰는데, 이때 하나의 세포로부터 유래하는 바이러스는 하나의 수용 웰 내에서 증식시켰다. 5일 경과 후, 평판들을 동결/해동시키고 나서, 각각의 웰에 담겨 있던 바이러스 분취액으로, 96웰 평판 내 Hela 세포를 감염시켰다. 각각의 웰에 담겨 있던 바이러스는 VH 및 VK의 혼합물을 포함하였으며, Hela 세포의 감염은 표면 IgG의 발현 및 항원 결합을 달성하였다. 밤새도록 결합을 진행시킨 후, 전술된 바와 같이 세포들을 수집하여, Her2 결합에 대해 염색하였다(도 28).

[0300] 스크리닝 1 평판으로부터, 특이적 클론 26개를 동정하였다. 이와 같은 클론들을 반복하여 테스트한 결과, 이 클론들은 Her2와는 결합하나 C35와는 결합하지 않는다는 것이 입증되었다(유동 세포 분석에 의함). 대표적 클론 3개(D5, D8 및 H2)를 도 29의 A~C에 보였다. 그 다음, 바이러스로부터 DNA를 추출하고 나서, 이 바이러스에 포함되어 있는 VH 및 VK 유전자들을, VH 및 VK 특이적 프라이머들을 사용하는 PCR로 증폭시킨 후, 포유동물 발현 벡터에 클로닝하였더니, 이 발현 벡터들은 전장 IgG1 및 전장 카파를 발현하였다. 그 다음, VH 및 VK 유전자들의 서열 결정을 실시하였다. 서열 결정을 통하여, 상기 클론 26개는 특유 항체 15개를 포함하게 되었다. 이후, IgG 및 카파 발현 플라스미드를 공동 형질 감염시킴으로써 이 항체들을 CHO 세포 내에서 발현시켰으며, 이로부터 3일 경과 후 세포 상청액으로부터 항체를 수득하였다. 항체를 ELISA로 정량하고 나서, ELISA와 유동 세포 분석을 통해 SKBR3 세포(Her2++) 상에서의 특이성에 대하여 테스트하였다. ELISA 및 유동 세포 분석에 의해 특이성을 갖는 것으로 확인된 항체들에 대한 대표적 데이터를 도 30과 도 31에 각각 보였다.

[0301] 단일 세포 분류 및 스크리닝을 반복 실시함으로써, 본원에 개시된 방법에 따라 제조된 추가의 클론들을 사용하여 추가의 신규 항 Her2 항체들을 동정하였다.

[0302] ***

[0303] 본 발명은, 본 발명의 개별 양태들을 단지 예시하기 위한 의도로 제공된 특정 구체예에 의해 정해지는 범위로 제한되지는 않을 것이며, 기능상 동등한 임의의 구성체, 바이러스 또는 효소는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 실제로 본원에 기술되었으며 보인 구체예 이외에, 본 발명의 다양한 변형예들은 전술된 발명의 상세한 설명과 이하 첨부된 도면들을 통해 당 업자들에게 명백해질 것이다. 이와 같은 변형예들은 첨부된 특허청구범위 내에 포함될 것이다.

[0304] 본 명세서에 예시된 모든 공보와 특허 출원은, 개별 공보 또는 특허 출원 각각이 참고 문헌으로 인용되었다고 구체적이면서 개별적으로 특정된 것과 동일한 정도로 참고 문헌으로 인용되어 있다. 미국 특허 출원 제 08/935,377호(1997년 9월 22일 출원) 및 미국 특허 출원 제60/192,586호(2000년 3월 28일 출원)에 개시된 사항과 청구항들은 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있다.

도면

도면1

"pJEM1"

```

AAAAATGAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAAT
TCCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCGCGCTCCGAGATCCAG
CTGGTGCAGAGCGGCTCTGAGCTGAAGCAGCCTGGCGAGACCGTGAGGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGC
TACACCTTACCAACTACGGCATGAAGTGGTGAAGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGC
TGGATCAACACCTACACCGCGAGCCTACCTACGCCGCCGACTTCAAGAGGAGGTTACCTTCAGCCTG
GAGACCAGCGCCAGCAGCGCTACCTGCAGATCAGCAACCTGAAGAACGACGACACCGCCACCTACTTC
TGCGCCAAGTACCTTCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCGCCGGCACCACG
GTCAACCTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCGTCGACCTCTCCAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGG
AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTTACATCTGCAACGTGAATCAC
AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGATTAT
GAAGAACTACTCCACAGAGTTGATTGTAATACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAACTATCTGGA
TCTACACATTACCGGAAACTAGTTCTAAGAAACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCGGTA
TTCGAAATCGGACTCCGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATACAGACCCGTCACATACACT
AGTGATAGCATTAATACAGTAAGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATT
ACTGATAAGAAGATCATACAGTTACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGAATT
GTCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATACAGTACCA
CCAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGACTTGTAGAAATATTT
GGTATTACCGCATTAATTATATTGTCGCGCTGGCAATTTTCTGTATTACATATTATATATAATAA
CGTTACCGTAAATACAAACAGAGAACAAGTCTAG
(서열번호 1)
    
```

이중 밀줄 - H5 프로모터

단일 밀줄 - 리더 펩티드

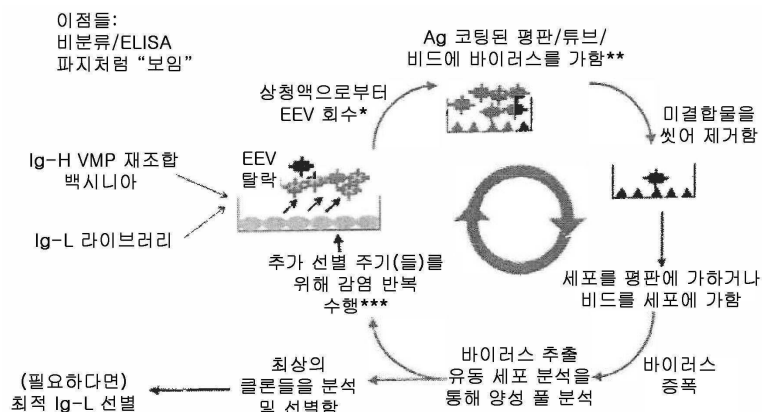
파도 모양 밀줄 - 대표적 중쇄 가변 영역

굵은 밀줄 - IgG CH1 도메인

밀줄 표시가 안 된 부분 - 백시니아 A56R

굵은 이탤릭체 - BssHII 및 BstEII 가변 유전자 클로닝 위치

도면2

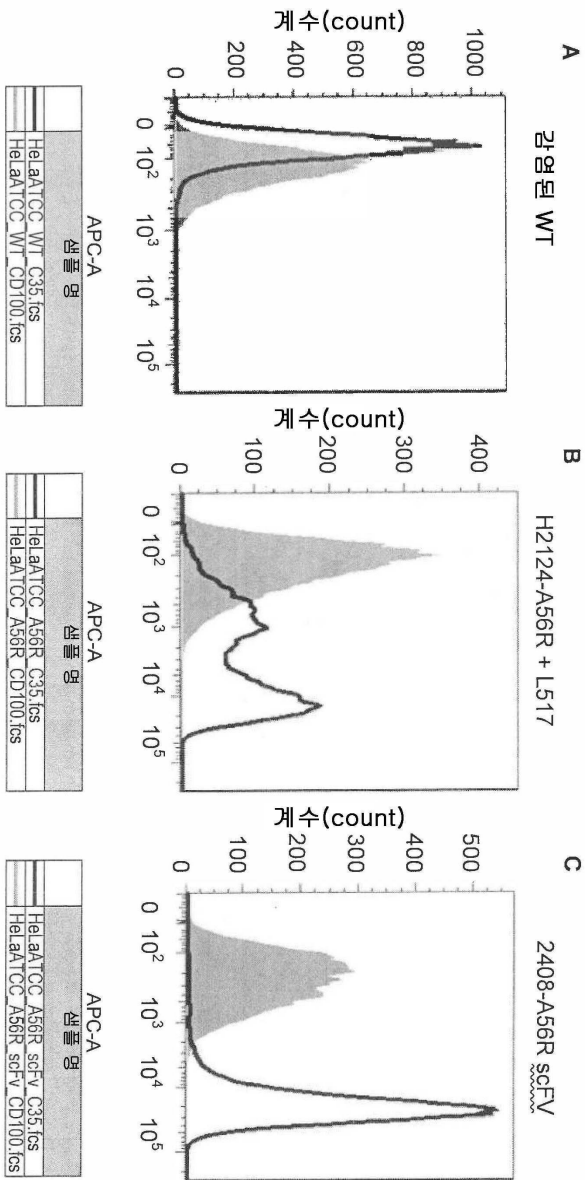


*IMV의 경우: 세포를 회수하고, 균질화하고, 파편을 스프인 아웃시켜 처리함

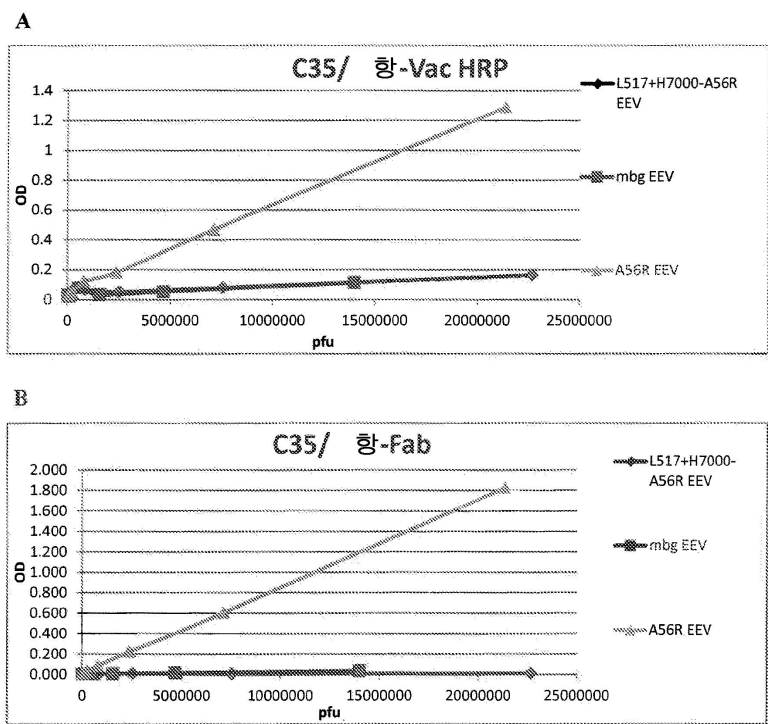
**방혈(depletion) 단계가 사용될 수 있었음

***최종 단계로서 세포 분류 단계가 추가될 수 있었음

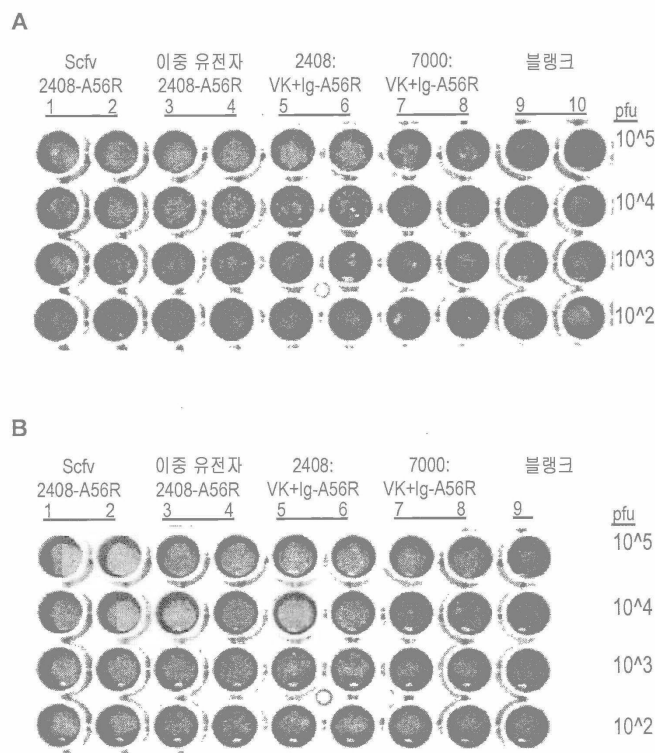
도면3



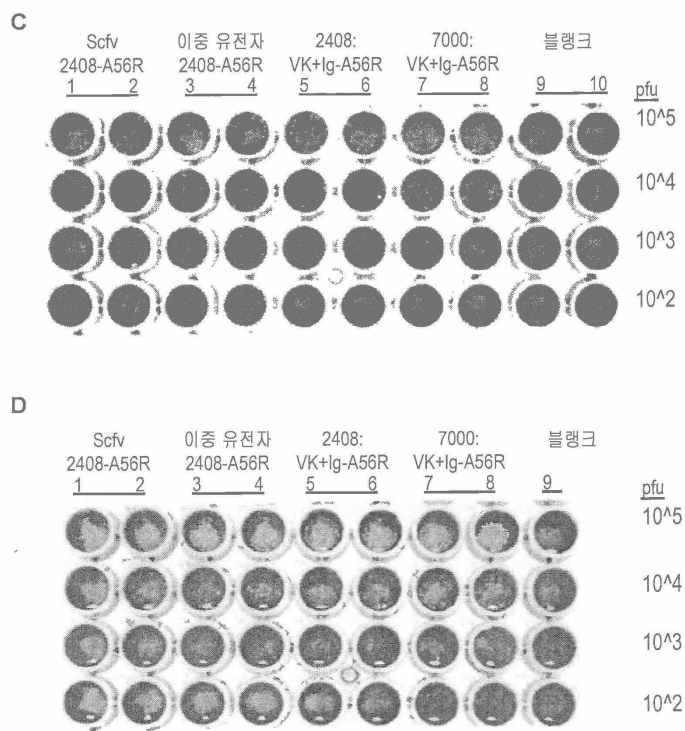
도면4



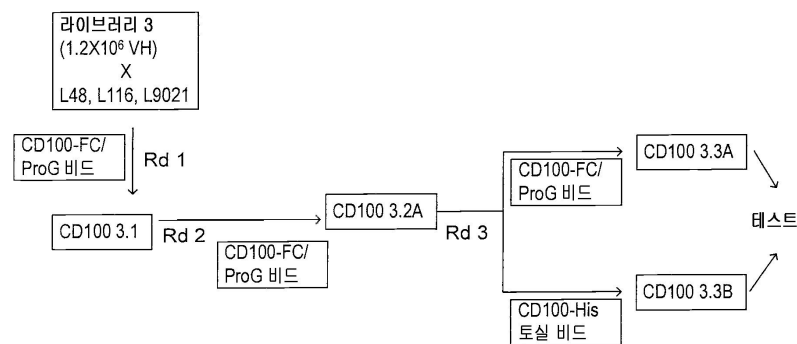
도면5a



도면5b



도면6



도면7

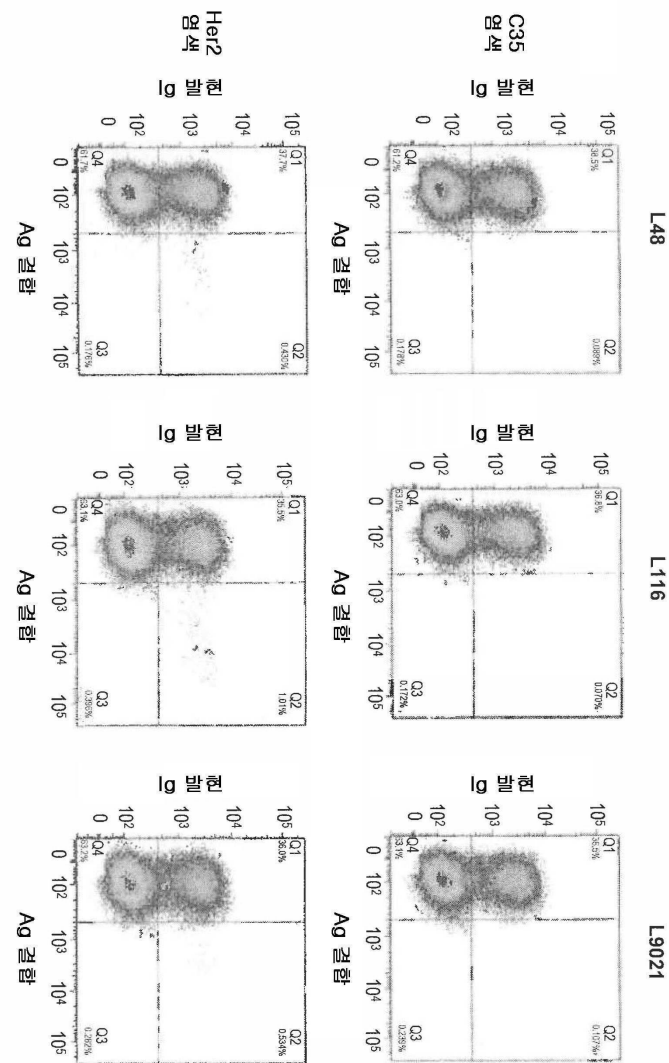
배열:

>VH3-11

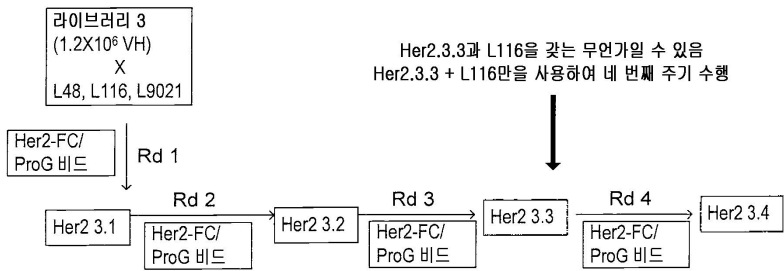
동일성 = 81/98 (82%), 양성 = 88/98 (89%)

C. 20: 1 EVQLVESGGGLV~~PKGGSLRLSCAASGFI~~FDYYLSWIRQAPGKGPEWL~~SYIS~~SYRYTNY 60
+VQLVESGGGLV~~PKGGSLRLSCAASGF~~F+DYY+SWIRQAPGKG EW+SYISS Y
VH311: 1 QVQLVESGGGLV~~PKGGSLRLSCAASGFT~~SDYYMSWIRQAPGKLEWVS~~YIS~~SSGSIYY 60
C. 20: 61 ADSVKGRFTISRDN~~TANSI~~Y~~LMNNLR~~VEDTAVYYCAR 98 (서열 번호 19)
ADSVKGRFTISRDN +NS+Y~~LMN~~+LR EDTAVYYCAR
VH311: 61 ADSVKGRFTISRDN~~AKNS~~Y~~LMN~~SLRAEDTAVYYCAR 98

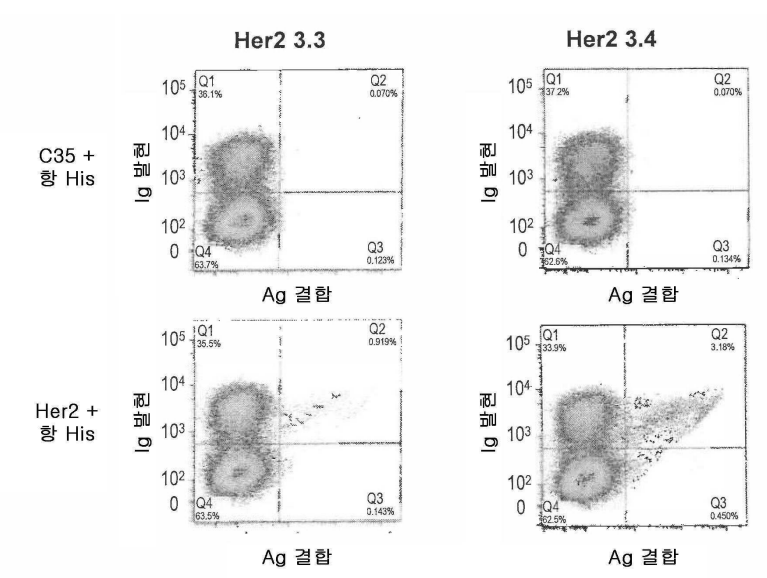
도면8



도면9



도면10



도면11

Her2 B10 클론 서열

EVQLLESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFAFNYYALSWVRQAPGRLKWVSAISPDGDIYYADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMTSLGAEDTALYYCARQNNVRDGAAGPLDHWGQGLVT

>IGHV3-23*01

동일성 = 77/98 (78%), 양성 = 85/98 (86%)

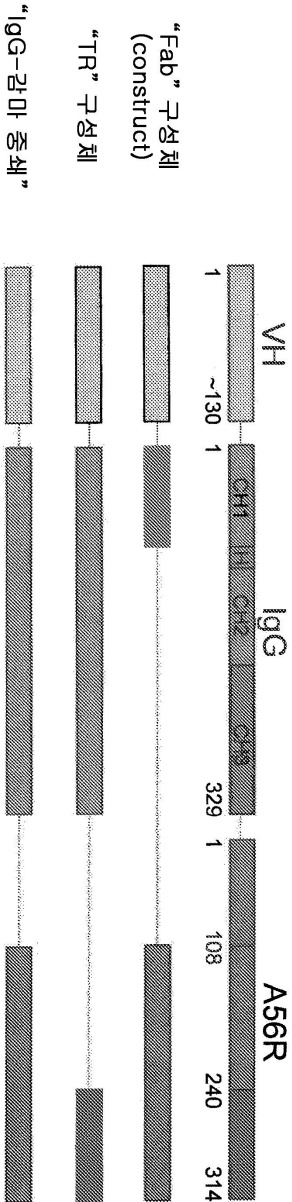
B10 : 1 EVQLLESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFAFNYYALSWVRQAPGRLKWVSAISPDGDIYY 60
EVQLLESGGG VQPGGSLRLSCAASG F++YA+SWVRQAPG+GL+WVSAIS G YY

VH323: 1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYY 60

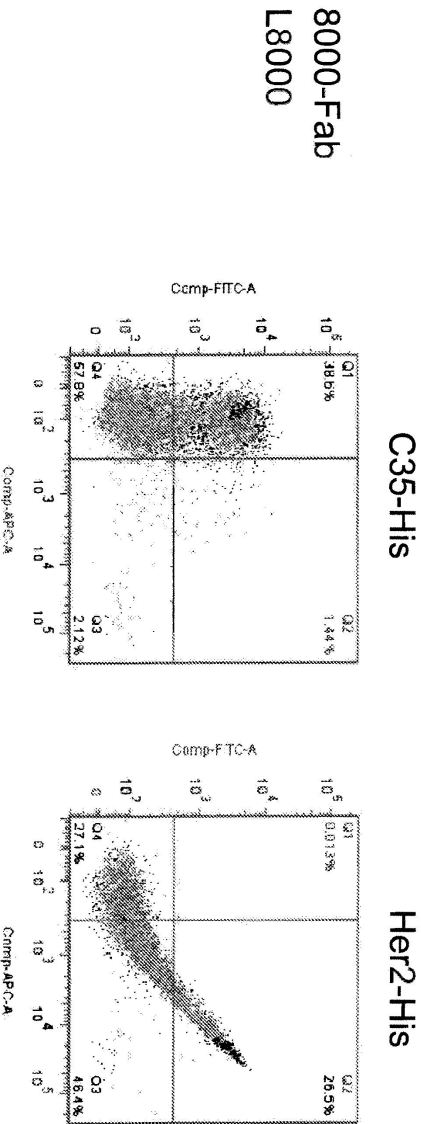
B10 : 61 ADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMTSLGAEDTALYYCAR 98 (서열 번호 20)
ADSVKGRF SRDNS+N L LQM SL AEDTA+YYCA+

VH323: 61 ADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRADTAVYYCAK 98

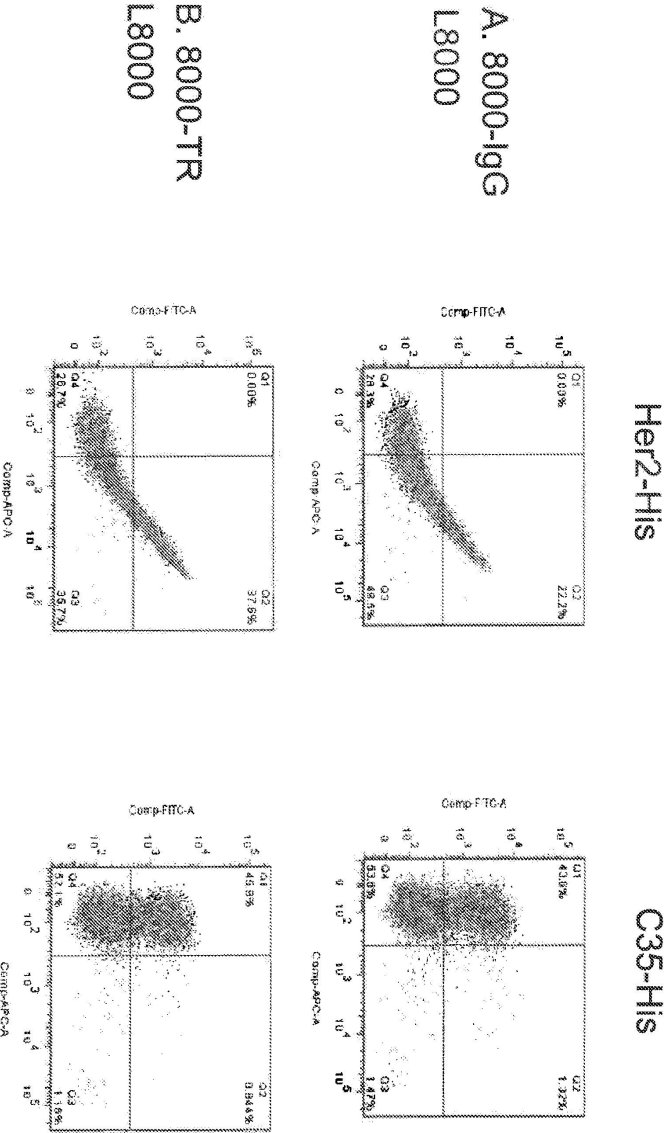
도면12



도면13



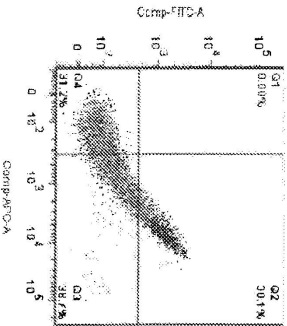
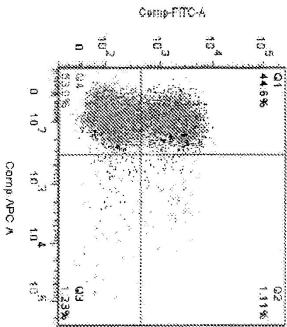
도면14



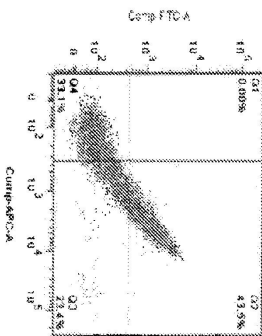
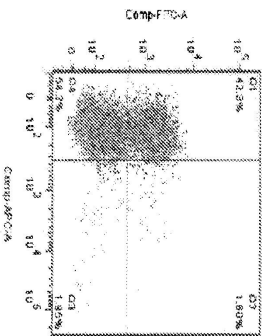
Her2-His

C35-His

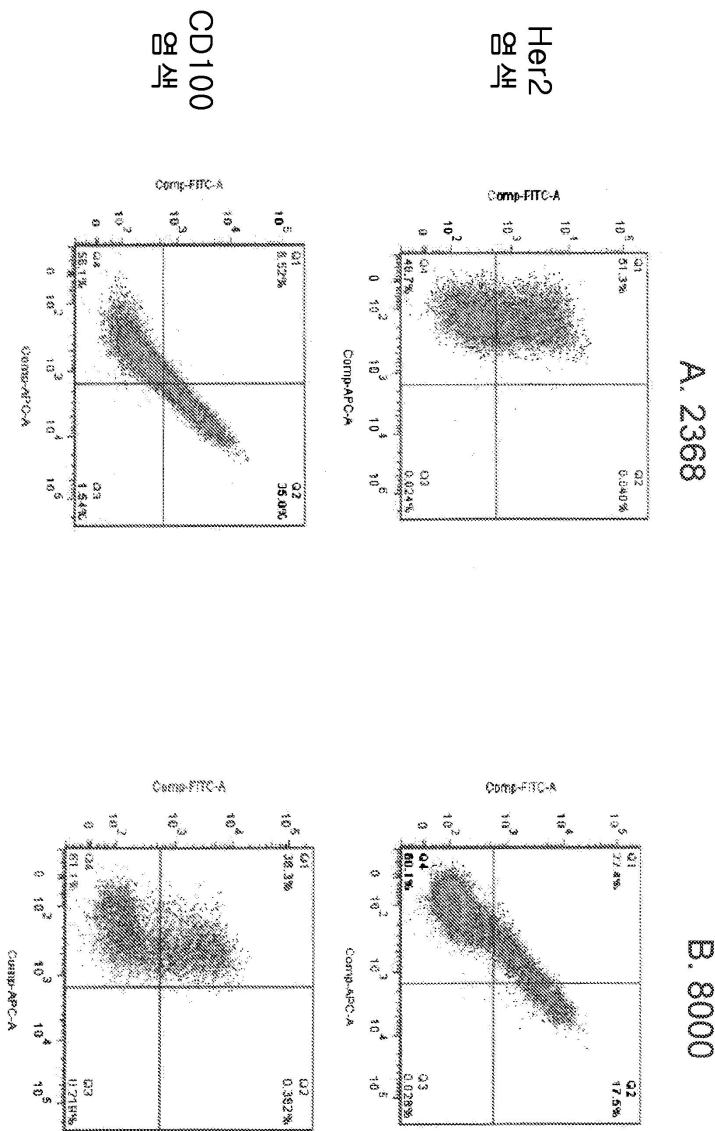
A. H2124-IgG
L517



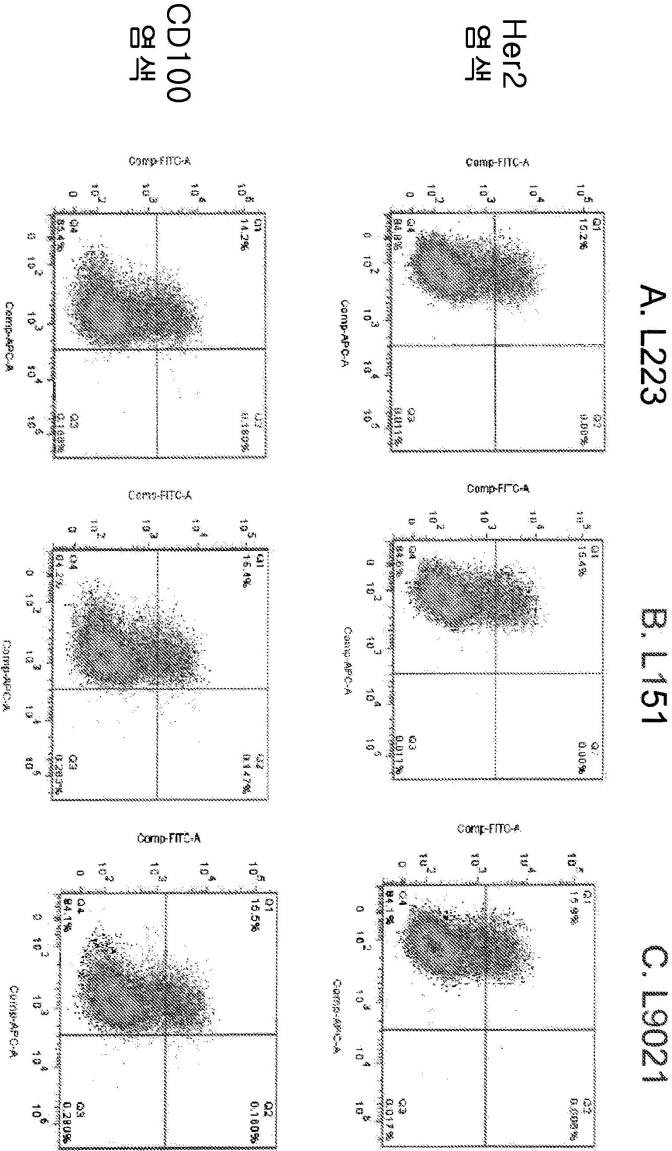
B. H2124-TR
L517



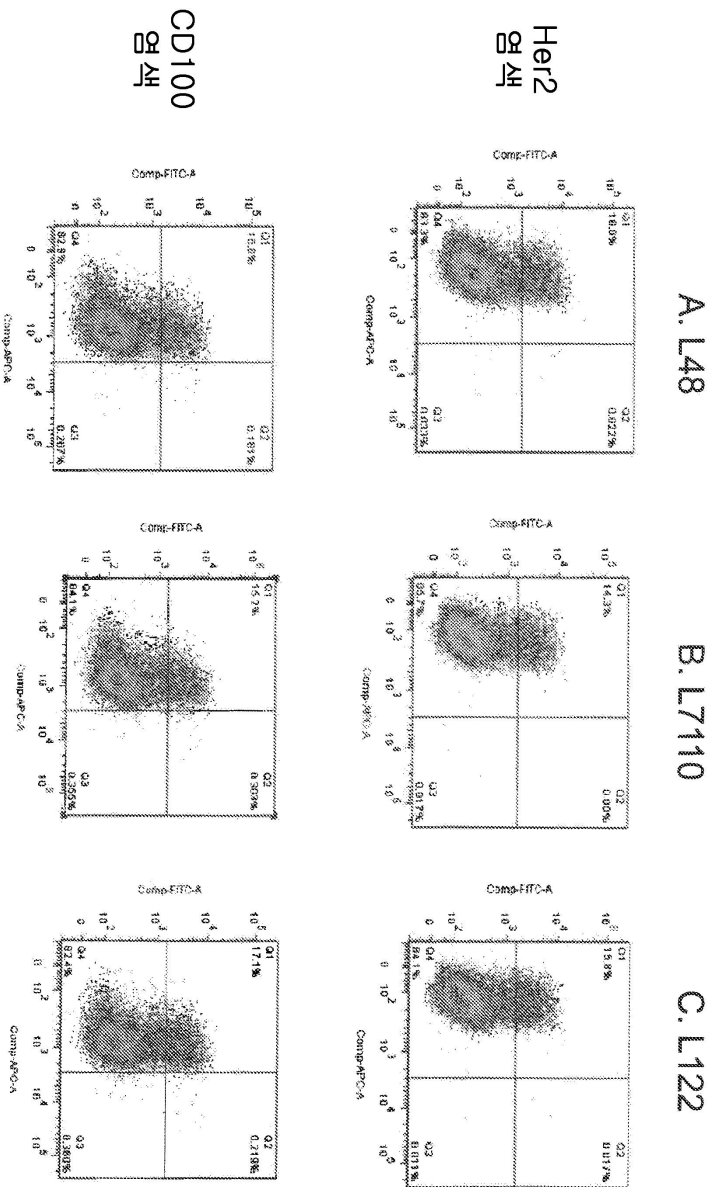
도면16



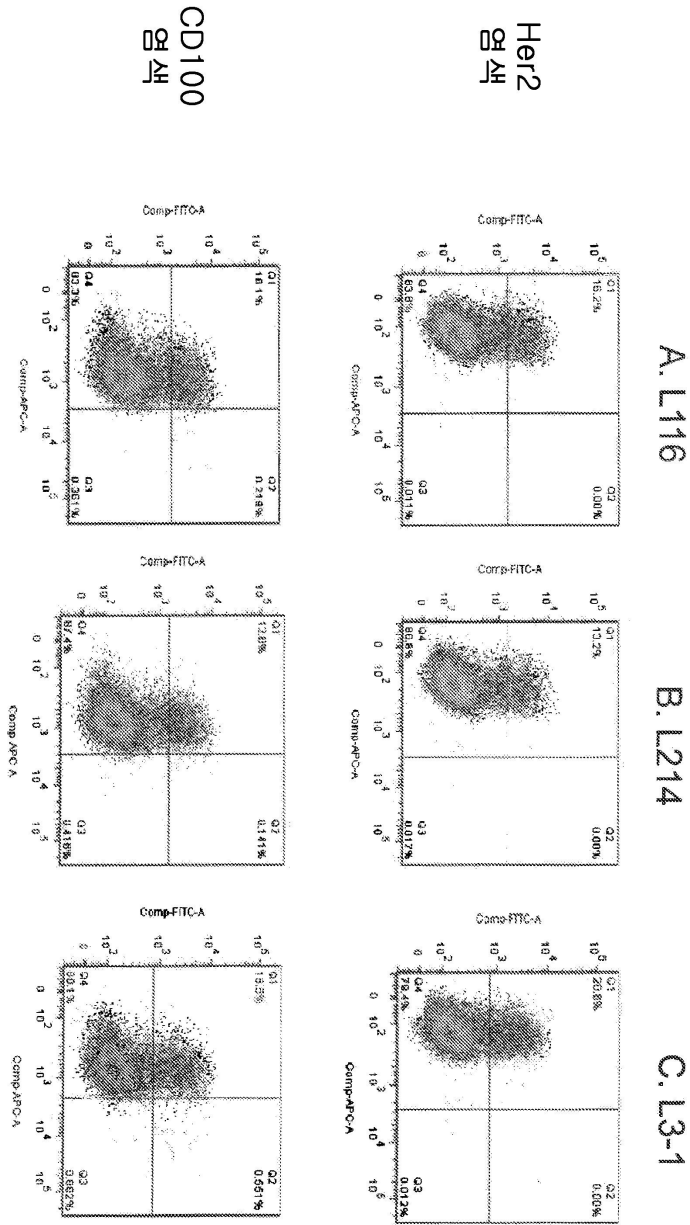
도면17



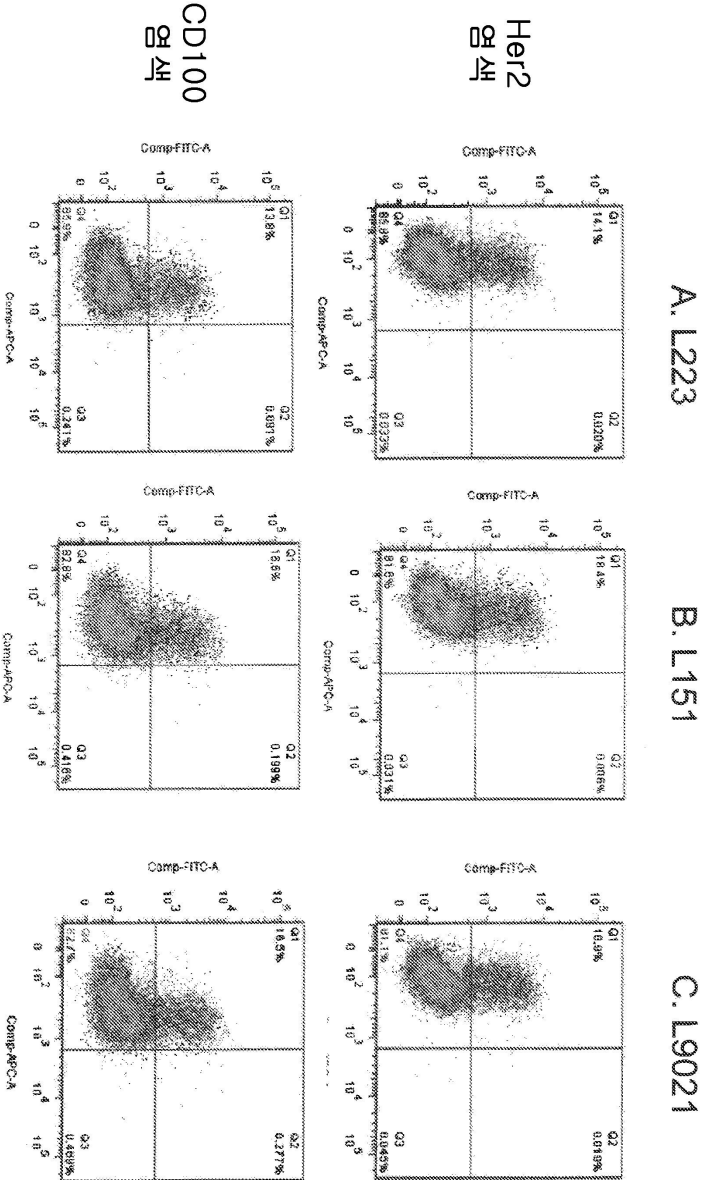
도면18



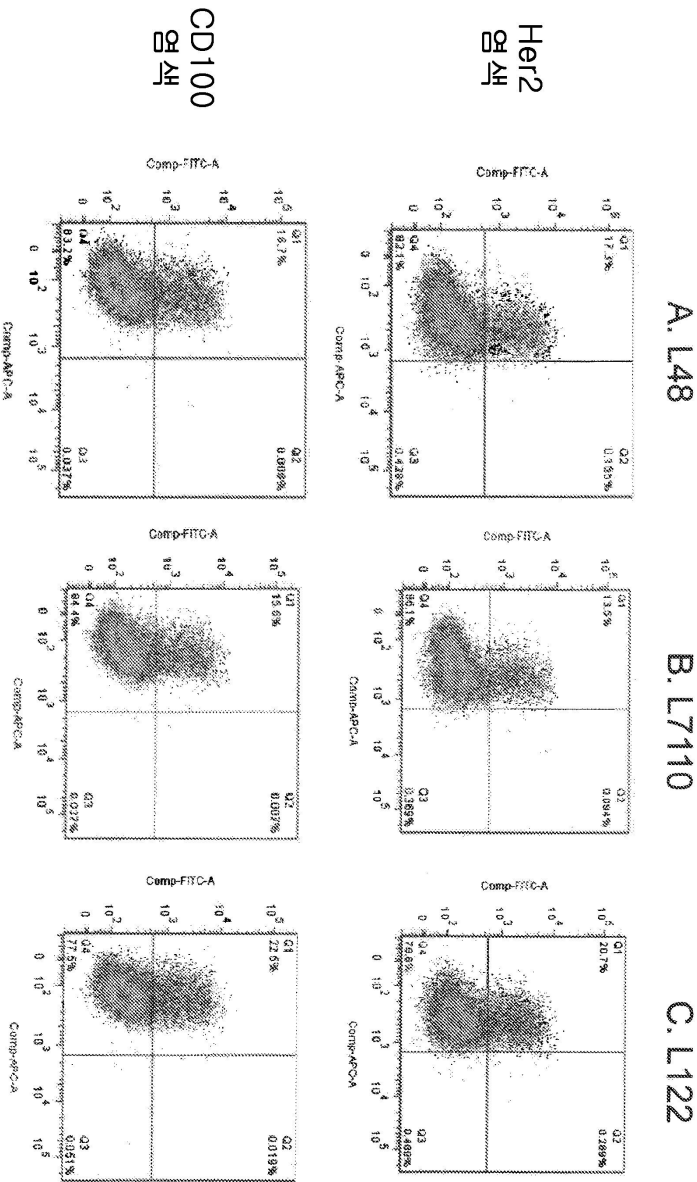
도면19



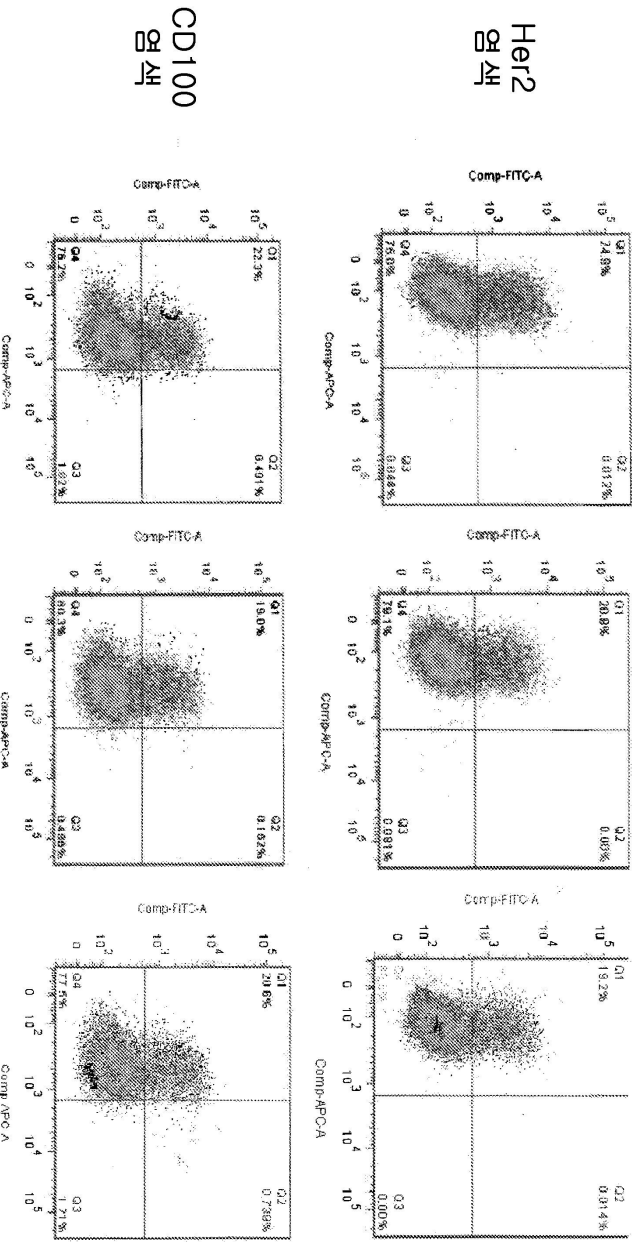
도면20



도면21

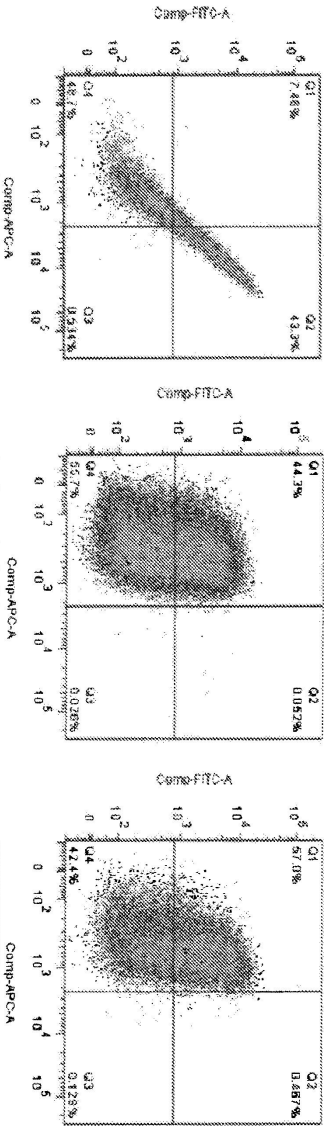


22면도

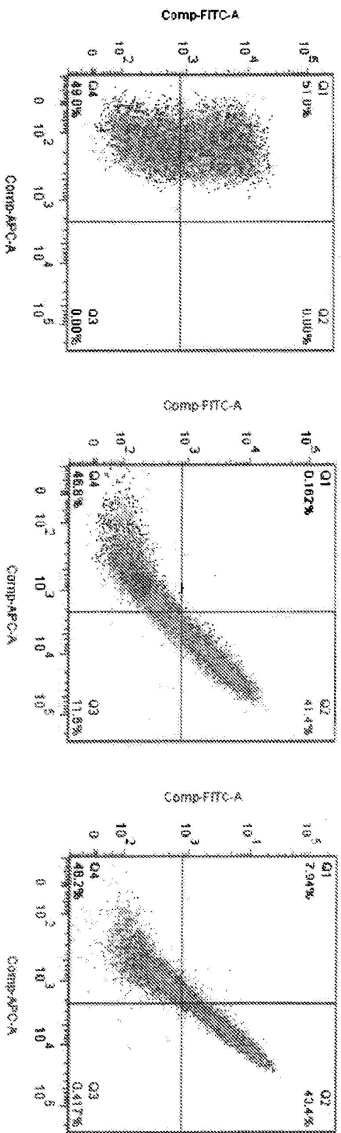


예비 복합체(precomplex) Her2 2단계 CD100 예비 복합체 CD100

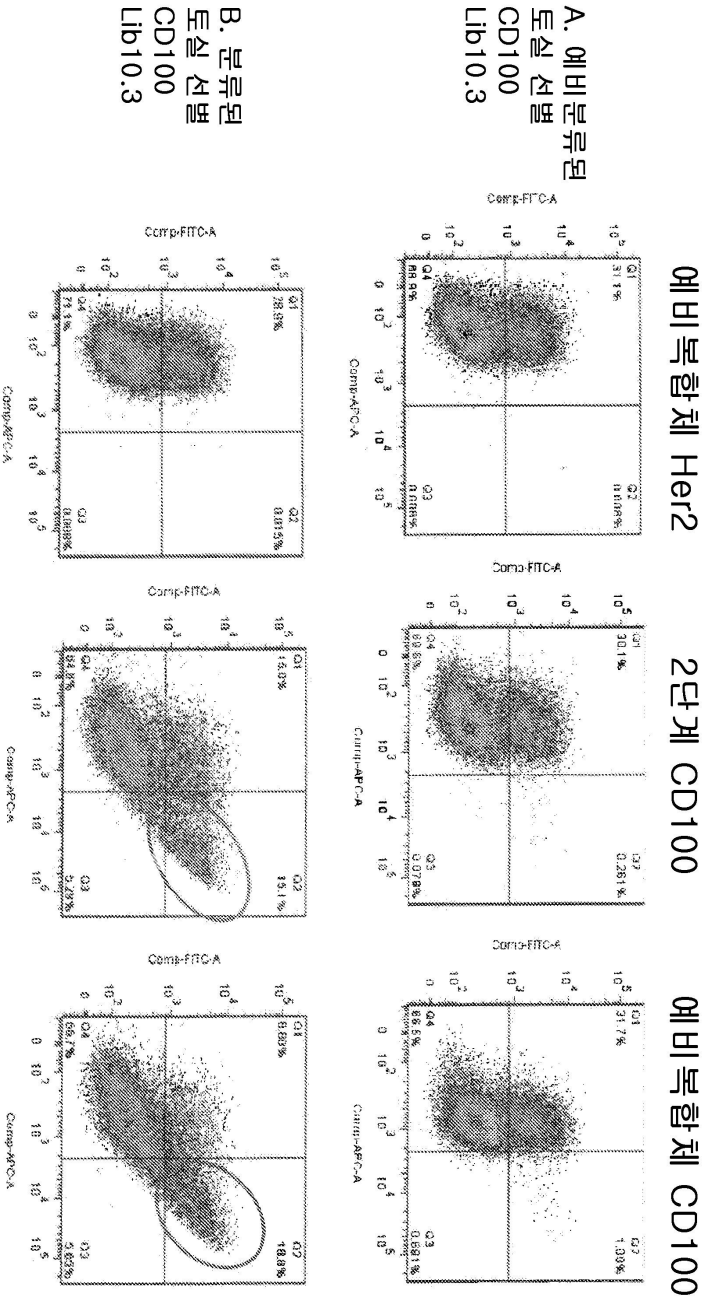
A.
8000



B.
2368



도면24

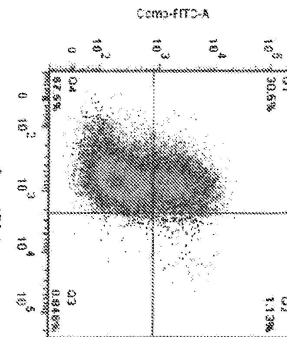
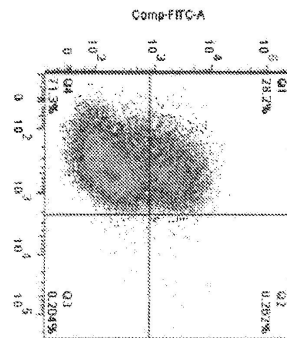
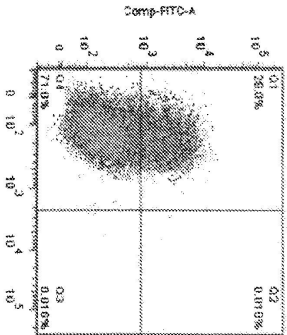


예비복합체 Her2

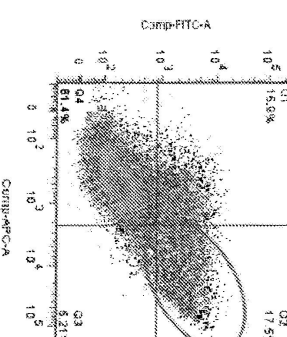
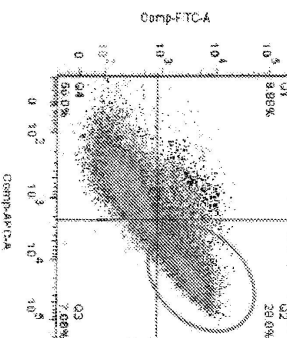
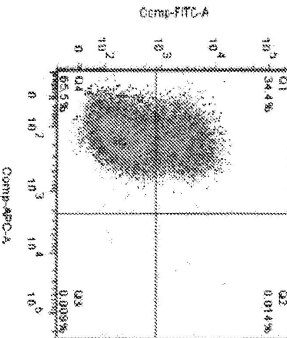
2단계 CD100

예비복합체 CD100

A. 예비분류된
ProtG 선별
CD100
Lib10.3

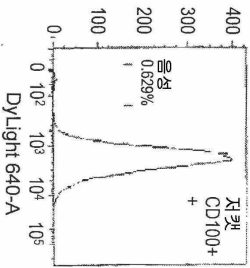


B. 분류된
ProtG 선별
CD100
Lib10.3

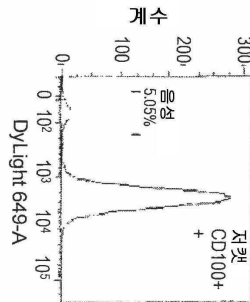


- mAb 2050 VH5-51 항성
- mAb 2063 VH3-30 비면역회(naive)
- mAb 2110 VH3-7 비면역회(naive)
- BxPC3 상의 배경(background)에 대해 낮은 결함을 갖는 지켓(Jurkat) 세포 상의 전면 CD100에 특이적

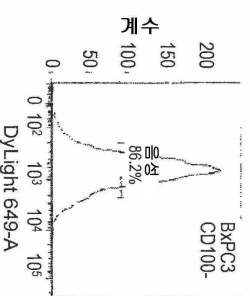
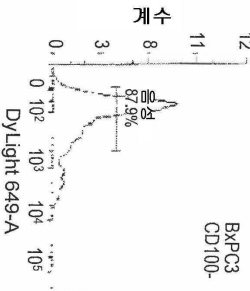
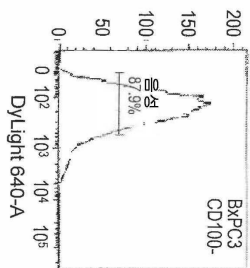
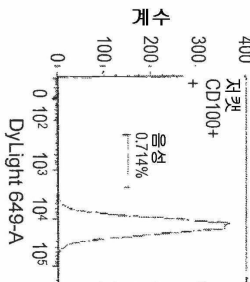
A. mAb2050

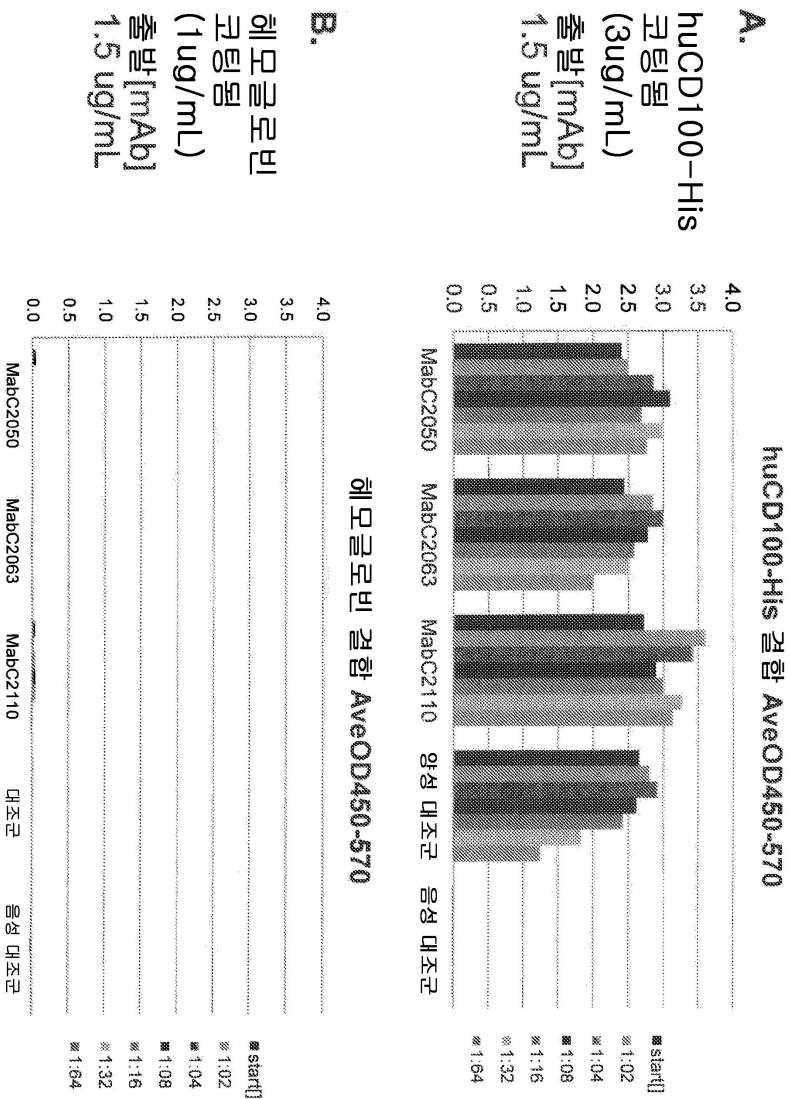


B. mAb2063

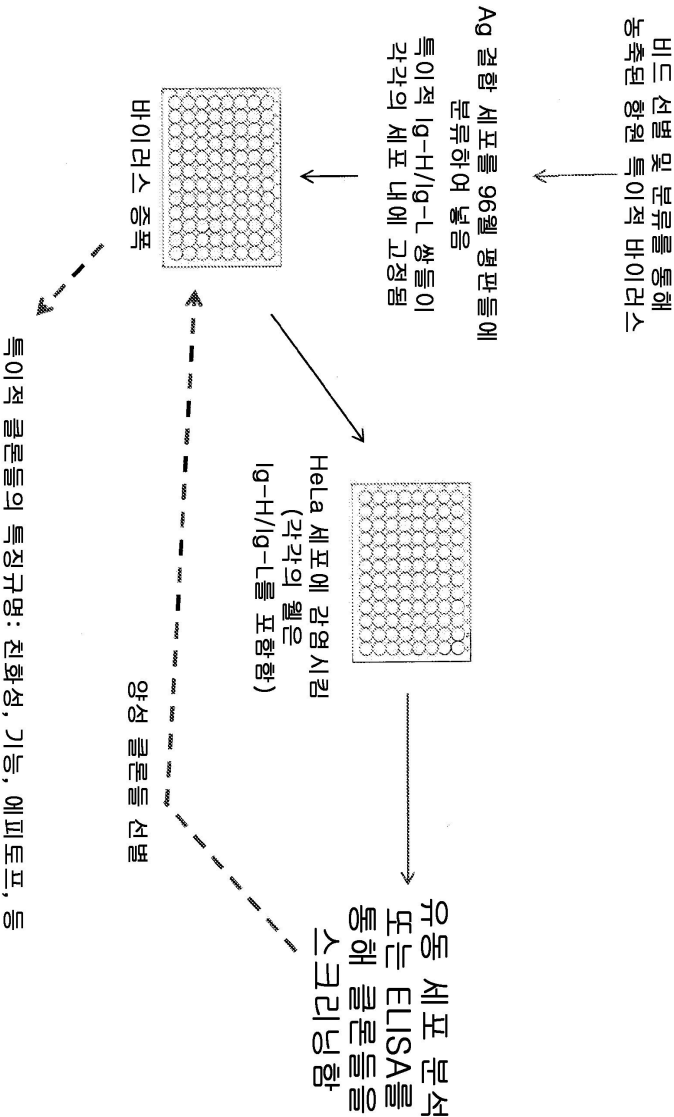


C. mAb2110



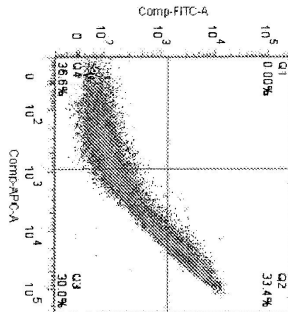
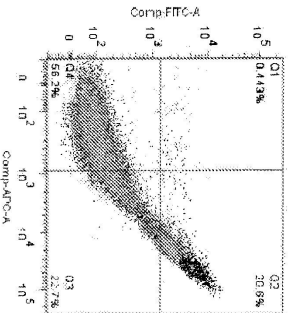
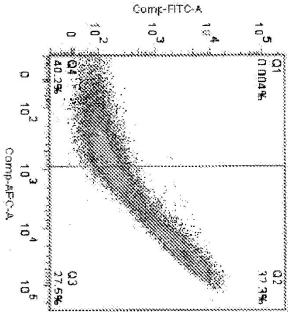


도면28

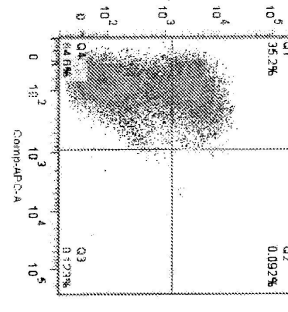
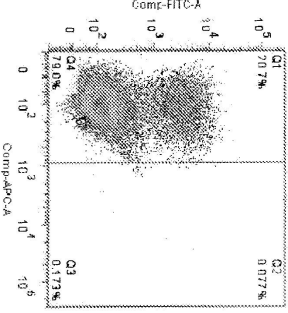
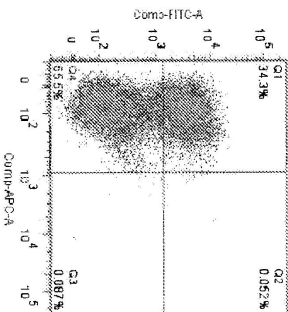


29면도

Her2
염색



C35
염색

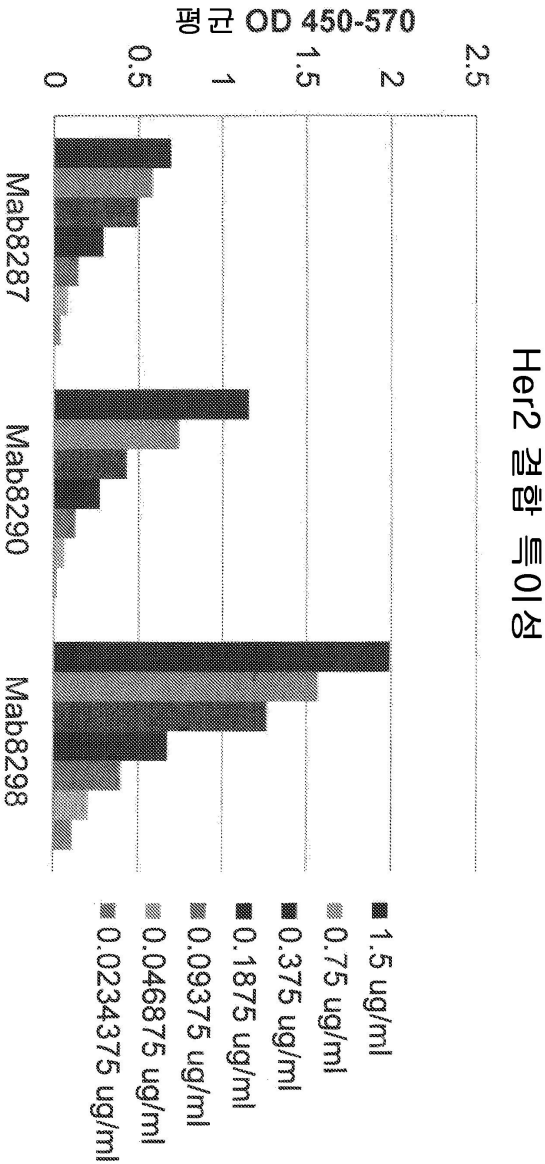


A. 3.D5

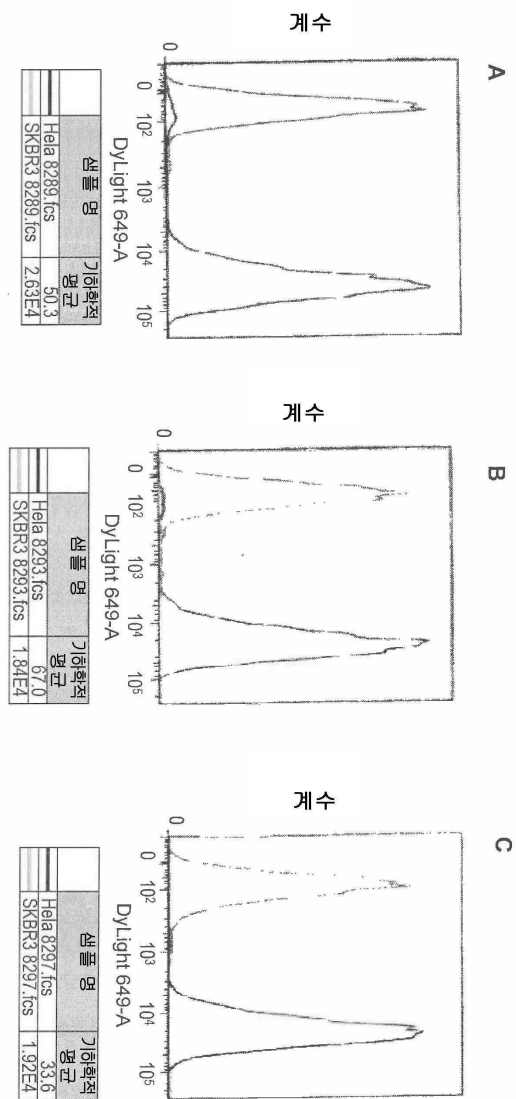
B. 3.D8

C. 3.H2

도면30



도면31



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> VACCINEX, INC.
- <120> FUSION PROTEINS TO FACILITATE SELECTION OF CELLS INFECTED WITH
SPECIFIC IMMUNOGLOBULIN GENE RECOMBINANT VACCINIA VIRUS
- <130> 1843.071PC02/EJH/BNC
- <140> To Be Assigned
- <141> Herewith
- <150> US 13/844,388
- <151> 2013-03-15
- <150> US 61/732,776

<151> 2012-12-03
 <150> US 61/639,046
 <151> 2012-04-26
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1416
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> pJEM1 transfer plasmid

<400> 1

```

aaaaaatgaa aataaataca aaggttcttg agggtttgtt taaattgaaa gcgagaaata      60
atcataaatt ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggc      120
gcgcactccg agatccagct ggtgcagagc ggccctgagc tgaagcagcc tggcgagacc      180
gtgaggatca gctgcaaggc cagcggctac accttcacca actacggcat gaactgggtg      240
aagcaggccc ctggcaaggg cctgaagtgg atgggctgga tcaacaccta caccggcgag      300
cctacctacg ccgccgactt caagaggagg ttcaccttca gcctggagac cagcgccagc      360
accgcctacc tgcagatcag caacctgaag aacgacgaca ccgccaccta cttctgcgcc      420

aagtaccctc actactacgg cagcagccac tggctacttc acgtgtgggg cgccggcacc      480
acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcacccctc      540
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc      600
gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg      660
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctacgcagcg tcgtgaccgt gccctccagc      720
agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg      780
gacaagaaag ttacatcaac tacaatgac actgataaag tagattatga agaatactcc      840

acagagttga ttgtaaatac agatagtga tgcactatag acataatact atctggatct      900
acacattcac cggaaactag ttctaagaaa cctgattata tagataattc taattgctcg      960
tcggtattcg aaatcgcgac tccggaacca attactgata atgtagaaga tcatacagac     1020
accgtcatat acactagtga tagcattaat acagtaagtg catcatctgg agaatccaca     1080
acagacgaga ctccggaacc aattactgat aaagaagatc atacagttac agacactgtc     1140
tcatacacta cagtaagtac atcatctgga attgtcacta ctaaatcaac caccgatgat     1200
    
```

gcggatcttt atgatacgt acaatgataat gatacagtac caccaactac ttaggcggt 1260

agtacaacct ctattagcaa ttataaaacc aaggactttg tagaaatatt tggattacc 1320

gcattaatta tattgtcggc cgtggcaatt ttctgtatta catattatat atataataaa 1380

cgttcacgta aatacaaac agagaacaaa gtctag 1416

<210> 2

<211> 446

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> pVKE transfer plasmid

<400> 2

ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgagg ccgcccattg gatggagctg 60

tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggcgtgcac ttgactcgag atcaaacgaa 120

ctgtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 180

ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 240

aggtggataa cgcctccaa tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca 300

aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac 360

acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct 420

tcaacagggg agagtgttag gtcgac 446

<210> 3

<211> 455

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> pVLE transfer plasmid

<400> 3

ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgagg ccgcccattg gatggagctg 60

tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggcgtgcac ttgactcgag aagcttaccg 120

tcctacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcacttccc gccatctgat gagcagttga 180

aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag 240

tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc 300

aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagaccct gacgtgagc aaagcagact 360

acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca 420

caaagagctt caacagggga gagggttagg tcgac 455

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 5' primer huC?1-5B:

<400> 4

attaggatcc ggtcaccgtc tcctcagcc 29

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 3' primer huC?1-3S:

<400> 5

attagtcgac tcatttacg gagacaggga gag 33

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> CH1(F):

<400> 6

caagggaccc tggtcaccgt ctctcagcc tcc 33

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> CH1(R):

<400> 7

aactttcttg tccaccttg tggtg 25

<210> 8

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> A56R(F):

<400> 8

caacaccaag gtggacaaga aagttacatc aactacaaat gacactgata g 51

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> A56R(R):

<400> 9

tatagtcgac ctagactttg ttctctgttt tgtatttacg 40

<210> 10

<211> 1266

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> VH (H2124)-CH1-A56R Fab Product Fusion Protein

<400> 10

caggtgcagc tgcagcagtg gggcgagga ctgctgaagc ctagcgagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggcta ctccatcacc agcggctatt tctggaactg gatccgccag 120

ccccaggga aggggctgga gtggattggg tacatcagct acgacggcag cagcaactcc 180

aacctatctc tcaaaaatag gggtcacaatc agcagagaca cctccaagaa ccagttctcc 240

ctgaagctga gctctgtgac cgccgccgac accgctgtgt attactgtgc cagaggaact 300

accgggtttg cttactgggg ccaagggacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 360

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420

ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 480

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtectac agtcctcagg actctactcc 540

ctcagcagcg tcgtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 600

gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttacatcaac tacaaatgac 660

actgataaag tagattatga agaatactcc acagagtga ttgtaaatac agatagtga 720

tcgactatag acataatact atctggatct acacattcac cggaaactag ttctaagaaa 780

cctgattata tagataatc taattgctcg tcggtattcg aaatcgcgac tccggaacca 840

attactgata atgtagaaga tcatacagac accgtcacat aactagtga tagcattaat 900

acagtaagtg catcatctgg agaatccaca acagacgaga ctccggaacc aattactgat 960

aaagaagatc atacagttac agacactgtc tcatacacta cagtaagtac atcatctgga 1020
attgtcacta ctaaataaac caccgatgat gcggatcttt atgatacgt aatgataat 1080
gatacagtac caccaactac ttaggcgggt agtacaacct ctattagcaa ttataaaacc 1140

aaggactttg tagaaatatt tgggtattacc gcattaatta tattgtcggc cgtggcaatt 1200
ttctgtatta catattatat atataataaa cgttcacgt aatacaaaac agagaacaaa 1260
gtctag 1266

<210> 11

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH (H2124)-CH1-A56R Fab Product Fusion Protein

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Ser Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

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

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

 275 280 285
 Thr Asp Thr Val Thr Tyr Thr Ser Asp Ser Ile Asn Thr Val Ser Ala
 290 295 300
 Ser Ser Gly Glu Ser Thr Thr Asp Glu Thr Pro Glu Pro Ile Thr Asp
 305 310 315 320
 Lys Glu Asp His Thr Val Thr Asp Thr Val Ser Tyr Thr Thr Val Ser
 325 330 335
 Thr Ser Ser Gly Ile Val Thr Thr Lys Ser Thr Thr Asp Asp Ala Asp

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

Phe Cys Ile Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asn Lys Arg Ser Arg Lys Tyr Lys

405

410

415

Thr Glu Asn Lys Val

420

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sense VH 3 primer

<400> 12

aatatgcgcg cactccgagg tgcagctggt ggagtctgg 39

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Sense VH 3a primer

<400> 13

aatatgcgcg cactccgagg tgcagctgtt ggagtctgg 39

<210> 14

<211> 29

<212>

> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Antisense JH 1 primer

<400> 14

gagacggtga ccagggtgcc ctggcccca 29

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Antisense JH 2 primer

<400> 15

gagacggtga ccagggtgcc acggcccca 29

<210> 16

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Antisense JH 3 primer
 <400> 16
 gagacggtga ccattgtccc ttggcccca 29

<210> 17
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Antisense JH 4/5 primer
 <400> 17
 gagacggtga ccagggttcc ctggcccca 29

<210> 18
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Antisense JH 6 primer
 <400> 18
 gagacggtga ccgtggtccc ttggcccca 29

<210> 19
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> variable heavy chain
 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

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

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ser Ile Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Her2 B10 clone

<400> 20

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

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Gly Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Asn Asn Val Arg Asp Gly Ala Val Ala Gly Pro Leu Asp
100 105 110
His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
115 120

<210> 21

<211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> A56R(F2)
 <400> 21
 caacaccaag gtggacaaga aagttaccac cgatgatgcg gatctttatg a 51

<210> 22
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> CH1 (R2):
 <400> 22
 acaaaagtat tggtaatcgt gtcataactt tcttgccac cttggtgttg 50

<210> 23
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> A56R(R2):
 <400> 23
 tcataaagat ccgcatcatc ggtggtttta cccggagaca gggagaggct c 51

<210> 24
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> A56R(F3):
 <400> 24
 ggcctctcc ctgtctccgg gtaaaaccac cgatgatgcg gatctttatg a 51

<210> 25
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> A56R(R3):
 <400> 25

tatcagtgtc attttagt tt gatgttttac ccggagacag ggagaggctc 50

<210> 26

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> A56R (F4):

<400> 26

gagcctctcc ctgtctccgg gtaaaacatc aactacaaat gacactgata 50

<210> 27

<211> 1566

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> VH (H2124)-IgG-A56R TR Construct

<400> 27

caggtgcagc tgcagcagtg gggcgcagga ctgctgaagc ctacgcagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggcta ctccatcacc agcggctatt tctggaactg gatccgccag 120

ccccaggga aggggctgga gtggattggg tacatcagct acgacggcag cagcaactcc 180

aaccatctc tcaaaaatag ggtcacaatc agcagagaca cctccaagaa ccagtctctc 240

ctgaagctga gctctgtgac cgccgccgac accgctgtgt attactgtgc cagaggaact 300

accgggtttg cttactgggg ccaagggacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 360

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420

ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540

ctcagcagcg tcgtgacctg gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 600

gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagccaa atcttgtgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggagggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320

tcctgtctc cgggtaaac caccgatgat gcggatcttt atgatacgtg caatgataat 1380
gatacagtac caccaactac tgtaggcggg agtacaacct ctattagcaa ttataaaacc 1440
aaggactttg tagaaatatt tggattacc gcattaatta tattgtcggc cgtggcaatt 1500
ttctgtatta catattatat atataataaa cgttcacgta aatacaaac agagaacaaa 1560
gtctag 1566

<210> 28

<211> 521

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> VH (H2124)-IgG-A56R TR Construct

<400> 28

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

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

65	70	75	80
Leu	Lys	Leu	Ser
Ser	Val	Thr	Ala
Ala	Asp	Thr	Ala
Val	Tyr	Tyr	Cys
85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Thr
Thr	Gly	Phe	Ala
Tyr	Trp	Gly	Gln
Gly	Thr	Leu	Val
100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser
Ala	Ser	Thr	Lys
Gly	Pro	Ser	Val
Phe	Pro	Leu	Ala
115	120	125	

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Thr

435 440 445
Asp Asp Ala Asp Leu Tyr Asp Thr Tyr Asn Asp Asn Asp Thr Val Pro

450 455 460
Pro Thr Thr Val Gly Gly Ser Thr Thr Ser Ile Ser Asn Tyr Lys Thr

465 470 475 480
Lys Asp Phe Val Glu Ile Phe Gly Ile Thr Ala Leu Ile Ile Leu Ser

485 490 495
Ala Val Ala Ile Phe Cys Ile Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asn Lys Arg Ser

500 505 510
Arg Lys Tyr Lys Thr Glu Asn Lys Val

515 520

<210> 29

<211> 1962

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> VH (H2124)-IgG-A56R FL Construct

<400> 29

caggtgcagc tgcagcagtg gggcgcagga ctgctgaagc ctagcgagac cctgtccctc	60
acctgcgctg tctatggcta ctccatcacc agcggctatt tctggaactg gatccgccag	120
ccccagggga aggggctgga gtggattggg tacatcagct acgacggcag cagcaactcc	180
aaccatctc tcaaaaatag ggtcacaatc agcagagaca cctccaagaa ccagttctcc	240
ctgaagctga gctctgtgac cgccgccgac accgctgtgt attactgtgc cagaggaact	300
accgggtttg cttactgggg ccaagggacc ctggtcaccg tctctcagc ctccaccaag	360

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
 ctgggcagcg tggtaacgga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtcgtg gaactcagcg 480
 gccctgacca gcggcggtga caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
 ctgagcagcg tcgtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 600
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 720
 ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780

 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggagggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
 aaggctctca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcctgtgct ggactccgac 1200

 ggctccttct tcctctacag caagtcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
 gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
 tcctgtctc cgggtaaaac atcaactaca aatgacactg ataaagtaga ttatgaagaa 1380
 tactccacag agttgattgt aaatacagat agtgaatcga ctatagacat aatactatct 1440
 ggatctacac attcaccgga aactagtctt aagaaacctg attatataga taatttctaat 1500
 tgctcgtcgg tattcgaaat cgcgactccg gaaccaatta ctgataatgt agaagatcat 1560
 acagacaccg tcacatacac tagtgatagc attaatacag taagtgcac atctggagaa 1620

 tcacaaacag acgagactcc ggaaccaatt actgataaag aagatcatac agttacagac 1680
 actgtctcat acactacagt aagtacatca tctggaattg tcactactaa atcaaccacc 1740
 gatgatgcgg atctttatga tacgtacaat gataatgata cagtaccacc aactactgta 1800
 ggcggtagta caacctctat tagcaattat aaaaccaagg actttgtaga aatatttgg 1860
 attaccgcat taattatatt gtcggccgtg gcaattttct gtattacata ttatatatat 1920
 aataaacgtt cagtaaaata caaacagag aacaaagtct ag 1962

 <210> 30
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> VH (H2124)-IgG-A56R FL Construct

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Ser Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Ser

435 440 445

Thr Thr Asn Asp Thr Asp Lys Val Asp Tyr Glu Glu Tyr Ser Thr Glu

450 455 460

Leu Ile Val Asn Thr Asp Ser Glu Ser Thr Ile Asp Ile Ile Leu Ser

465 470 475 480

Gly Ser Thr His Ser Pro Glu Thr Ser Ser Lys Lys Pro Asp Tyr Ile

485 490 495
Asp Asn Ser Asn Cys Ser Ser Val Phe Glu Ile Ala Thr Pro Glu Pro

500 505 510
Ile Thr Asp Asn Val Glu Asp His Thr Asp Thr Val Thr Tyr Thr Ser

515 520 525
Asp Ser Ile Asn Thr Val Ser Ala Ser Ser Gly Glu Ser Thr Thr Asp

530 535 540
Glu Thr Pro Glu Pro Ile Thr Asp Lys Glu Asp His Thr Val Thr Asp

545 550 555 560
Thr Val Ser Tyr Thr Thr Val Ser Thr Ser Ser Gly Ile Val Thr Thr

565 570 575
Lys Ser Thr Thr Asp Asp Ala Asp Leu Tyr Asp Thr Tyr Asn Asp Asn

580 585 590
Asp Thr Val Pro Pro Thr Thr Val Gly Gly Ser Thr Thr Ser Ile Ser

595 600 605
Asn Tyr Lys Thr Lys Asp Phe Val Glu Ile Phe Gly Ile Thr Ala Leu

610 615 620
Ile Ile Leu Ser Ala Val Ala Ile Phe Cys Ile Thr Tyr Tyr Ile Tyr

625 630 635 640
Asn Lys Arg Ser Arg Lys Tyr Lys Thr Glu Asn Lys Val

645 650

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> heavy chain specific primer 428

<400> 31

gatatattaa agtcgaataa agtg

24

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> heavy chain specific primer 430

<400> 32

gacatcacat agtttagttg c

21