



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0047653
(43) 공개일자 2008년05월30일

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01) *C07K 14/465* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0117355

(22) 출원일자 2006년11월27일

심사청구일자 2006년11월27일

(71) 출원인

재단법인서울대학교산학협력재단

서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지

주식회사 옵티팜솔루션

충청남도 천안시 정거읍 송남리 48 충청남도농축산물류센터

창원대학교 산학협력단

경남 창원시 사림동 9 창원대학교내

(72) 발명자

김진규

경남 창원시 사림동 9 창원대학교 미생물학과 32호관 203호

한재용

서울시 관악구 신림9동 서울대학교 농생명공학부
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭, 양부현, 윤여강

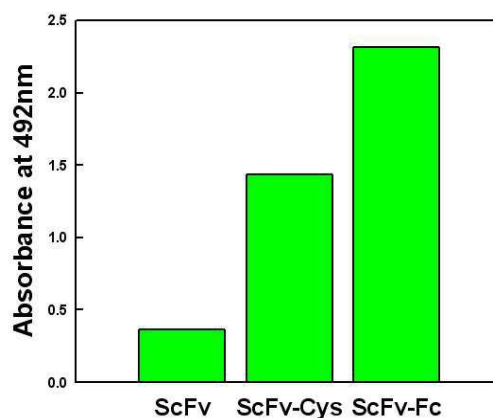
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 조류 유래 재조합 s c F v 항체의 결합 친화도를증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 중사슬의 가변성 부위, 링커 및 경사슬의 가변성 부위를 포함하는 조류 유래 scFv를 수득하는 단계; (b) 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 시스테인 잔기를 추가적으로 결합시키거나 또는 상기 scFv의 C-말단에 인간 IgG의 Fc 부위를 추가적으로 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 시스테인 잔기가 결합된 scFv 두 분자를 상기 시스테인 잔기를 통하여 이황화 결합을 형성시키거나 또는 상기 인간 IgG의 Fc 부위가 결합된 scFv 두분자를 이황화 결합을 시켜 다이머 형태의 scFv를 수득하는 단계를 포함하는 조류 유래 재조합 scFv(single chain variable fragment) 항체의 항원에 대한 친화도를 증가시키는 방법, 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체, 그리고 용해성(soluble) 조류 유래 재조합 scFv 항체의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

카즈미 사사이

일본, 오사카 599-8531, 사카이, 오사카현대학농업
생물과학대학원 수의학내과 수의학과

박명선

경남 창원시 사림동 9번지 창원대학교 미생물학과

한범구

서울 성북구 돈암동 한심아파트 170동 1803호

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 조류 유래 재조합 scFv(single chain variable fragment) 항체의 항원에 대한 친화도를 증가시키는 방법:

- (a) 중사슬의 가변성 부위, 링커 및 경사슬의 가변성 부위를 포함하는 조류 유래 scFv를 수득하는 단계;
- (b) 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 시스테인 잔기를 추가적으로 결합시키거나 또는 상기 scFv의 C-말단에 인간 IgG의 Fc 부위를 추가적으로 결합시키는 단계; 및
- (c) 상기 시스테인 잔기가 결합된 scFv 두 분자를 상기 시스테인 잔기를 통하여 이황화 결합을 형성시키거나 또는 상기 인간 IgG의 Fc 부위가 결합된 scFv 두분자를 이황화 결합을 시켜 다이머 형태의 scFv를 수득하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조류는 닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거위, 꿩 또는 비둘기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 scFv는 에이메리아(*Eimeria*) 포자소체 표면 항원에 대한 결합 친화도를 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 추가적으로 삽입되는 시스테인 잔기는 상기 scFv의 C-말단에 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 추가적으로 삽입되는 시스테인 잔기는 GlyGlyCysGlyGly 아미노산 서열 형태로 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 추가적으로 삽입되는 인간 IgG의 Fc 부위는 상기 scFv의 C-말단에 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)로부터 생성된 다이머 형태의 scFv는 단계 (a)에서의 scFv와 비교하여 항원 친화도가 최소 2.5배 증가된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

서열목록 제2서열, 제9서열, 제13서열, 제17서열 또는 제21서열의 중사슬 가변성 부위, 서열목록 제4서열, 제11서열, 제15서열, 제18서열 또는 제23서열의 경사슬 가변성 부위, 상기 중사슬 가변성 부위 및 경사슬 가변성 부위를 연결하는 링커를 포함하는 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체에 있어서, 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 시스테인 잔기가 추가적으로 결합되어 있거나 또는 상기 scFv의 C-말단에 인간 IgG의 Fc 부위가 추가적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 재조합 scFv 항체는 중사슬 가변성 부위-링커-경사슬 가변성 부위의 순서로 되어 있는 것을 특징으로 하는 조류 유래 재조합 scFv 항체.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 추가적으로 삽입되는 시스테인 잔기는 상기 scFv의 C-말단에 결합되는 것을 특징으로 하는 조류 유래 재조합 scFv 항체.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 추가적으로 삽입되는 시스테인 잔기는 GlyGlyCysGlyGly 아미노산 서열 형태로 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 결합하는 것을 특징으로 하는 조류 유래 재조합 scFv 항체.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 재조합 scFv 항체는 상기 시스테인 잔기를 통하여 이황화 결합 되어 있거나 또는 상기 인간 IgG의 Fc 부위를 통하여 이황화 결합 되어 있는 다이머 형태의 scFv인 것을 특징으로 하는 조류 유래 재조합 scFv 항체.

청구항 13

제 8 항에 있어서, 상기 중사슬 가변성 부위는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어져 있고, 상기 경사슬 가변성 부위는 서열목록 제4서열의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조류 유래 재조합 scFv 항체.

청구항 14

상기 제 8 항 내지 제 13 항 어느 한 항의 조류 유래 재조합 scFv 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 중사슬 가변성 부위는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드 서열.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 경사슬 가변성 부위는 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드 서열.

청구항 17

제 14 항에 있어서, 상기 GlyGlyCysGlyGly 아미노산 서열은 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드 서열.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 상기 인간 IgG의 Fc 부위는 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드 서열.

청구항 19

다음의 단계를 포함하는 용해성(soluble) 조류 유래 재조합 scFv 항체의 제조방법:

- (a) (i) 상기 제 14 항의 scFv 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 (i)의 서열의 업스트림에 리더 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 상기 (i)의 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환 하는 단계;
- (b) 상기 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 scFv 항체를 발현하는 단계; 그리고,
- (c) 숙주세포의 파쇄 없이 배양액으로부터 재조합 scFv 항체를 회수하는 단계.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 리더 서열은 pel B, gene III 또는 ompA의 리더 서열인 것을 특징으로 하는 용해성 재조합 scFv 항체의 제조방법.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 상기 프로모터는 ρ^{Δ} 프로모터, *trp* 프로모터 및 *lac* 프로모터 및 T7 프로모터로 구성된 군 으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용해성 재조합 scFv 항체의 제조방법.

청구항 22

제 19 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 원핵세포인 것을 특징으로 하는 용해성 재조합 scFv 항체의 제조방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 원핵 세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 용해성 재조합 scFv 항체의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <9> 본 발명은 조류 유래 재조합 scFv 항체에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 항원 친화도가 향상된 조류 유래 재조합 scFv 항체에 관한 것이다.
- <10> 조류 유래 재조합 scFv 항체는, 조류의 질병 또는 질환의 치료 또는 진단의 목적으로 개발되고 있다. 대표적인 예로서, 에이메리아 (*Eimeria*) 속에 속하는 장내 기생충, 예컨대 에이메리아 아세르부리나 (*Eimeria acervulina*)에 의해 유발되는 조류 콕시듐증 (coccidiosis)은 가금 산업에서 상당한 경제적 손실을 초래하는 질병이며, 이를 치료하기 위한 항체 치료제로서 scFv 항체가 개발되었다(대한민국 특허 제0490669호, 대한민국 특허 제0569161호, 미합중국 특허 제4,710,377호).
- <11> 그러나, 현재까지 개발된 조류 유래 scFv 항체들은 항원에 대한 친화도 측면에서 개선할 측면이 있으나, 이에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.
- <12> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌 및 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <13> 본 발명자들은 조류 유래 scFv 항체의 항체 친화도(affinity, avidity)를 향상시킬 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 조류 유래 scFv 항체에 추가적으로 시스테인 잔기를 삽입하거나 인간 IgG(immunoglobulin)의 Fc 부위를 삽입하여 이황화 결합을 형성시켜 scFv 항체를 다이머 형태로 제조하면, 항원에 대한 친화도가 크게 향상됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- <14> 따라서, 본 발명의 목적은 조류 유래 재조합 scFv(single chain variable fragment) 항체의 항원에 대한 친화도를 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.
- <15> 본 발명의 다른 목적은 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체를 제공하는 데 있다.
- <16> 본 발명의 또 다른 목적은 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 제공하는 데 있다.
- <17> 본 발명의 다른 목적은 용해성(soluble) 조류 유래 재조합 scFv 항체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <18> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성 및 작용

- <19> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 조류 유래 재조합 scFv(single chain variable

fragment) 항체의 항원에 대한 친화도를 증가시키는 방법을 제공한다: (a) 중사슬의 가변성 부위, 링커 및 경사슬의 가변성 부위를 포함하는 조류 유래 scFv를 수득하는 단계; (b) 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 시스테인 잔기를 추가적으로 결합시키거나 또는 상기 scFv의 C-말단에 인간 IgG의 Fc 부위를 추가적으로 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 시스테인 잔기가 결합된 scFv 두 분자를 상기 시스테인 잔기를 통하여 이황화 결합을 형성시키거나 또는 상기 인간 IgG의 Fc 부위가 결합된 scFv 두 분자를 이황화 결합을 시켜 다이머 형태의 scFv를 수득하는 단계.

- <20> 본 발명자들은 조류 유래 scFv 항체의 항체 친화도(affinity, avidity)를 향상시킬 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 조류 유래 scFv 항체에 추가적으로 시스테인 잔기를 삽입하거나 인간 IgG(immunoglobulin)의 Fc 부위를 삽입하여 이황화 결합을 형성시켜 scFv 항체를 다이머 형태로 제조하면, 항원에 대한 친화도가 크게 향상됨을 확인하였다.
- <21> 본 발명은 조류 유래 재조합 scFv 항체에 적용되는 것을 특징으로 한다. 본 명세서에서 용어 “조류 유래 재조합 scFv 항체”는 조류 특히 닭에 항원을 면역화시켜 제조된 단일클론항체의 중사슬 가변성 부위 및 경사슬 가변성 부위의 서열을 이용하여 제조된 scFv 항체를 의미한다.
- <22> 조류 유래 scFv 항체는, 조류에 적용되는 치료 또는 예방용 scFv 항체를 효율적으로 개발할 수 있도록 한다는 측면에서 매우 중요하지만, 조류 유래 scFv 항체의 항원 친화도를 개선하려는 연구는 거의 없었다. 더욱이, 조류 유래 scFv 항체를 다이머 형태로 변형시켜 항원에 대한 친화도를 개선하는 보고는 아직까지 없다.
- <23> 본 발명은 조류 유래 scFv 항체를 다이머 형태로 변형시켜 항원에 대한 친화도를 개선한 최초의 발명이다.
- <24> 본 발명은 다양한 종류의 조류 scFv 항체에 적용될 수 있으며, 바람직하게는, 닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거위, 꿩 또는 비둘기의 scFv 항체에 적용되며, 가장 바람직하게는 닭 scFv 항체에 적용 된다.
- <25> 본 발명의 방법은 다양한 항원에 대한 scFv 항체에 적용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 재조합 scFv 항체는 조류에서 에이메리아(*Eimeria*), 보다 바람직하게는 조류의 콕시듐증을 유발시키는 에이메리아 아세르부리나(*Eimeria acervulina*), 에이메리아 티넬라(*Eimeria tenella*), 에이메리아 맥시마(*Eimeria maxima*), 에이메리아 콕시디아(*Eimeria coccidia*), 에이메리아 미티스(*Eimeria mitis*), 에이메리아 프래콕스(*Eimeria praecox*), 에이메리아 브루네티(*Eimeria brunetti*), 에이메리아 네카트릭스(*Eimeria necatrix*), 에이메리아 미바티(*Eimeria mivati*) 또는 에이메리아 하가니(*Eimeria hagani*), 가장 바람직하게는 에이메리아 아세르부리나(*Eimeria acervulina*), 에이메리아 테넬라(*Eimeria tenella*) 또는 에이메리아 티넬라(*Eimeria tenella*)의 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 항체이다.
- <26> 본 발명의 첫 번째 단계에 따르면, 중사슬의 가변성 부위, 링커 및 경사슬의 가변성 부위를 포함하는 조류 유래 scFv를 수득한다.
- <27> 본 발명의 scFv 항체는 기본적으로, “경사슬의 가변성 부위(V_L)-링커-중사슬의 가변성 부위(V_H)” 또는 “중사슬의 가변성 부위(H_L)-링커-경사슬의 가변성 부위(L_H)”로 이루어져 있다.
- <28> 본 발명의 재조합 scFv 항체에서, 중사슬의 가변성 부위에는 조류 유래 다양한 서열이 이용될 수 있으며, 예를 들어, 본 발명의 재조합 scFv 항체가 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 항체인 경우, 본 발명자들에 의해 개발된 서열목록 제2서열, 제9서열, 제13서열, 제17서열 또는 제21서열을 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 재조합 scFv 항체에서, 중사슬의 가변성 부위는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- <29> 본 발명의 재조합 scFv 항체에서, 중사슬의 가변성 부위에는 조류 유래 다양한 서열이 이용될 수 있으며, 예를 들어, 본 발명의 재조합 scFv 항체가 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 항체인 경우, 본 발명자들에 의해 개발된 서열목록 제4서열, 제11서열, 제15서열, 제18서열 또는 제23서열을 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 재조합 scFv 항체에서, 경사슬의 가변성 부위는 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- <30> 상기 중사슬 가변성 부위 및 경사슬 가변성 부위의 아미노산 서열은 본 발명자들에 의해 출원된 대한민국 특허 제0490669호에 상세하게 개시되어 있으며, 상기 특허문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- <31> 본 발명의 재조합 scFv 항체에서, 상기 링커는 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위를 인위적으로 연결하는 작용을 하는 일정 길이의 아미노산 서열을 의미한다. 본 발명의 재조합 scFv 항체에 포함되는 링커는 당업계에 공지

된 어떠한 링커도 사용 가능하다. 적합한 링커의 선택에 대한 방법은, George 등, *Protein Engineering* 15:871-879(2003)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예시적인 링커는 다음 표 1에 정리되어 있으며, 이에 대한 상세한 설명은 대한민국 특허 제0569161호에 상세하게 설명되어 있으며, 상기 특허문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

표 1

<32> 링커의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열

링커	서열
LK 링커	5 '-GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGA GGC GGT TCA-3' Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20LK 링커	5'-GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly GGT GGT GGT TCT-3' Gly Gly Gly Ser
EK 링커	5'-GGC TCT ACT TCC GGT AGC GGC AAA CCC GGG AGT GGT GAA GGT AGC ACT Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr AAA GGT-3' Lys Gly
12EK 링커	5'-GGC TCT ACT TCC GGT AAA CCC AGT GAA GGT AAA GGT-3' Gly Ser Thr Ser Gly Lys Pro Ser Glu Gly Lys Gly

<33> 상기와 같은 구조의 재조합 scFv 항체는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 제조될 수 있으며, 예시적으로 다음과 같이 제조될 수 있다. 항원을 닭에 면역화 하여 비장세포를 얻고, 이를 닭 마이엘로마 세포주에 융합시켜 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 얻는다. 이어, 상기 하이브리도마 세포주로부터 총 mRNA를 얻고 이로부터 cDNA를 합성한 다음 적합한 프라이머를 이용하여 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위를 PCR 증폭한다. 그런 다음, 상기 증폭된 단일클론 항체의 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위 (V_H 및 V_L) cDNA를 이용하여 오버랩-연장 PCR(Horton,R.M. et al., *Gene*, 77:61-68(1989))을 실시하여, V_L-링커-V_H 또는 V_H-링커-V_L 증폭물을 얻는다.

<34> 상기 과정에서 얻은 조류 유래 scFv 항체에 시스테인 잔기를 추가적으로 결합시키거나 또는 인간 IgG의 Fc 부위를 추가적으로 결합시키는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다.

<35> 예를 들어, 시스테인 잔기의 삽입은 적합한 프라이머 서열을 이용함으로써, V_L-링커-V_H 또는 V_H-링커-V_L-코딩 뉴클레오타이드 서열을 증폭하는 과정에서 삽입시킬 수 있다. 이에 대한 구체적인 예는 하기 실시예 8에 기재되어 있다.

<36> 인간 IgG의 Fc 부위의 삽입은, 예를 들어, 인간 IgG의 Fc 부위-코딩 서열을 가지는 벡터에 상기 V_L-링커-V_H 또는 V_H-링커-V_L 증폭물을 삽입시켜 클로닝하여 얻을 수 있다. 이에 대한 구체적인 예는 하기 실시예 9에 기재되어 있다.

<37> 상기 추가적으로 삽입되는 시스테인 잔기는 이황화 결합 위치를 제공하며, scFv 항체의 다양한 위치, 즉 N-말단, C-말단, 중사슬 가변성 부위 또는 경사슬 가변성 부위에 결합될 수 있다. 바람직하게는, scFv 항체의 N-말단 또는 C-말단에 결합되며, 가장 바람직하게는 scFv의 C-말단에 결합된다. 만일, 상기 scFv 항체의 C-말단 이외에 다른 위치에 삽입되면, 다이머 형태의 scFv 항체가 잘 제조되지 않는다.

<38> 추가적인 시스테인 잔기는 시스테인 잔기 단독 또는 다른 펩타이드 서열과 함께 scFv 항체에 삽입될 수 있다. 가장 바람직하게는, 시스테인 잔기는 GlyGlyCysGlyGly 아미노산 서열 형태로 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단, 가장 바람직하게는 C-말단에 결합한다.

<39> 본 발명에서 다른 다이머화 전략으로 이용하는 것은, 인간 IgG의 Fc 부위이다. 본 명세서에서 용어 "IgG의 Fc"는 CH₁, CH₂ 및 힌지 부위를 포함하는 IgG의 일부 서열을 의미한다. IgG의 Fc 부위는 다양한 이소타입, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4에서 얻을 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 IgG의 Fc 부위는

IgG1의 Fc 부위이다.

- <40> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 추가적으로 삽입되는 인간 IgG의 Fc 부위는 상기 scFv의 C-말단에 결합된다. 인간 IgG의 Fc 부위가 삽입된 scFv 분자들 사이의 이황화 결합은 Fc 부위 중에서 힌지 부위에 있는 시스테인 잔기들 사이에 이루어진다.
- <41> 상기의 Cys 잔기 또는 인간 IgG의 Fc 부위의 삽입과 조류 유래 재조합 scFv 항체 사이의 이황화결합에 의한 다 이머 형성에 의해, 조류 유래 재조합 scFv 항체의 항원에 대한 친화도는 극적으로 향상된다. 이황화결합은 산 화 조건(oxidizing conditions)을 제공하여 이루어진다. 예를 들어, 재조합 scFv 항체를 *E. coli*의 페리플라 즈 공간(산화성 환경을 갖는다)에 발현시키면 자연적으로 이황화 결합이 형성될 수 있다.
- <42> 바람직하게는, 상기 단계 (c)로부터 생성된 다이머 형태의 scFv는 단계 (a)에서의 scFv와 비교하여 항원 친화도 가 최소 2.5배 증가된다. 보다 바람직하게는 2.5-7배, 보다 더 바람직하게는 3-6배, 가장 바람직하게는 3.3-5.4배 증가된다.
- <43> Cys 잔기의 삽입에 의한 항원 친화도는 상승은, 바람직하게는 2.5-4배, 보다 바람직하게는 3-4배, 가장 바람직 하게는 약 3.3배이다.
- <44> 인간 IgG의 Fc 부위의 삽입에 의한 항원 친화도는 상승은, 바람직하게는 3-7배, 보다 바람직하게는 4-6배, 가장 바람직하게는 약 5.4배이다. 인간 IgG의 Fc 부위가 조류 유래 scFv 항체에 삽입되는 경우, 항원 친화도가 향 상될 뿐만 아니라, 인 비보 안정성 및 혈액에서의 반감기가 크게 증가하며, 또한 단백질 G 컬럼 또는 단백질 A 컬럼에 의한 scFv 항체의 정제가 매우 용이하게 되는 이점도 있다. 또한, 인간 IgG의 Fc 부위가 조류 유래 scFv 항체에 결합된 형태는 인간의 면역글로블린과 조류의 면역글로블린 서열이 서로 결합되어 있는 하이브리드 (hybrid) 항체로서의 중요성도 갖는다.
- <45> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열, 제9서열, 제13서열, 제17서열 또는 제21서열의 중 사슬 가변성 부위, 서열목록 제4서열, 제11서열, 제15서열, 제18서열 또는 제23서열의 경사슬 가변성 부위, 상 기 중사슬 가변성 부위 및 경사슬 가변성 부위를 연결하는 링커를 포함하는 에이메리아 포자소체 표면항원에 특 이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체에 있어서, 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 시스테인 잔기가 추가적으로 결합되어 있거나 또는 상기 scFv의 C-말단에 인간 IgG의 Fc 부위가 추가적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체를 제공한다.
- <46> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상술한 본 발명의 조류 유래 재조합 scFv 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이 드 서열을 제공한다.
- <47> 본 발명의 조류 유래 재조합 scFv 항체는 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하며, 종래의 scFv 항체와 비교 하여 크게 향상된 항원 친화도를 나타낸다.
- <48> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 scFv 항체는 중사슬 가변성 부위-링커-경사슬 가변성 부위의 순서로 되어 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 추가적으로 삽입되는 시스테인 잔기는 상기 scFv의 C-말단에 결합되어 있다.
- <49> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 추가적으로 삽입되는 시스테인 잔기는 GlyGlyCysGlyGly 아미노산 서 열 형태로 상기 scFv의 N-말단 또는 C-말단에 결합한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 추가적으 로 삽입되는 인간 IgG의 Fc 부위는 상기 scFv의 C-말단에 결합된다.
- <50> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 재조합 scFv 항체는 상기 시스테인 잔기를 통하여 이황화 결합 되어 있거나 또는 상기 인간 IgG의 Fc 부위를 통하여 이황화 결합 되어 있는 다이머 형태의 scFv이다.
- <51> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 scFv 항체에 있어서 중사슬 가변성 부위는 서열목록 제 2서열의 아미노산 서열을 포함하며, 경사슬 가변성 부위는 서열목록 제4서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- <52> 보다 바람직하게는, 본 발명의 재조합 항체는, “서열목록 제2서열의 중사슬 가변성 부위-링커-서열목록 제4서 열의 경사슬 가변성 부위” 형태를 가지며, 상기 가변성 부위의 C-말단에 "GGCGG"가 결합되어 있거나 또는 인간 IgG Fc 부위가 결합되어 있는 것이다. 보다 더 바람직하게는, 상기 링커는 하기 표 2에 기재된 EK 링커이다. EK 링커는 “서열목록 제2서열의 중사슬 가변성 부위-링커-서열목록 제4서열의 경사슬 가변성 부위” 로 이루어 진 scFv의 용해성(solubility)을 크게 향상시키는 이점이 있다.
- <53> 본 명세서에서 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미

를 갖으며, 폴리뉴클레오타이드에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

- <54> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 서열목록 제2서열, 제9서열, 제13서열, 제17서열 및 제21서열의 중사슬 가변성 부위를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열목록 제1서열, 제8서열, 제12서열, 제16서열 및 제20서열이다. 또한, 서열목록 제4서열, 제11서열, 제15서열, 제18서열 및 제23서열의 경사슬 가변성 부위를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열목록 제3서열, 제10서열, 제14서열, 제17서열 및 제22서열이다.
- <55> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 GlyGlyCysGlyGly 아미노산 서열은 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 인간 IgG의 Fc 부위는 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다.
- <56> 보다 바람직하게는, 재조합 scFv 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 “서열목록 제1서열의 중사슬 가변성 부위 코딩 서열-링커-서열목록 제3서열의 경사슬 가변성 부위 코딩 서열” 형태를 가지며, 상기 가변성 부위의 3'-말단에 서열목록 제5서열의 뉴클레오타이드 서열이 결합되어 있거나 또는 서열목록 제6서열의 뉴클레오타이드 서열이 결합되어 있는 것이다. 보다 더 바람직하게는, 상기 링커는 하기 표 2에 기재된 EK 링커 코딩 서열이다.
- <57> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 용해성(soluble) 조류 유래 재조합 scFv 항체의 제조방법을 제공한다: (a) (i) 상기 본 발명의 scFv 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 (i)의 서열의 업스트림에 리더 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 상기 (i)의 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환 하는 단계; (b) 상기 형질전환된 숙주 세포를 배양하여 scFv 항체를 발현하는 단계; 그리고, (c) 숙주세포의 파쇄 없이 배양액으로부터 재조합 scFv 항체를 회수하는 단계.
- <58> 본 명세서에서 용어 “용해성 조류 유래 재조합 scFv 항체”는 물 용매에 대하여 용해성을 나타내며 발현되는 재조합 scFv 항체를 의미하며, 봉입체(inclusion body)를 형성하지 않는 것을 의미한다.
- <59> 본 발명의 방법에 따르면, scFv 항체에 인간 IgG Fc 부위가 결합된 조류 유래 재조합 scFv 항체를 높은 용해도로 안정되게 수득할 수 있다.
- <60> 본 발명의 방법의 다른 특징은 활성 상태의 용해성 scFv 항체를 숙주세포의 파쇄 없이 수득한다는 것이다. 이러한 특징은 보다 완전한 활성 상태의 재조합 scFv 항체를 높은 수율로 얻을 수 있게 한다. 더욱이, 본 발명의 방법에 따르면, 숙주세포, 특히 *E. coli*와 같은 원핵세포에서의 발현의 문제점인 봉입체 (inclusion body)의 형성 없이 활성 상태의 용해성 scFv 항체를 얻을 수 있다.
- <61> 본 발명에서 이용되는 발현벡터는 scFv 재조합 항체가 숙주세포 외로 분비되는 것을 용이하게 하기 위하여 리더 서열을 포함한다. 상기 리더 서열은, 바람직하게는, *pel B*, *gene III* 또는 *ompA*의 리더 서열이다.
- <62> 본 발명의 제조방법에서 이용되는 숙주 세포는 발현 벡터의 발현에 통상적으로 이용되는 진핵 세포 및 원핵 세포 모두 가능하나, 바람직하게는 원핵세포이고, 보다 바람직하게는 상업적으로 구입이 용이한 대장균 또는 바실러스 등이며, 대장균이 이용되는 경우에는 BMH71-18 또는 BL21(DE) 등이 이용될 수 있다.
- <63> 한편, 본 발명의 벡터가 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 바람직하게는 강한 프로모터, 예컨대 p_L^{λ} 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, T7 프로모터 등을 포함하며, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는 바람직하게는 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)를 포함한다. 바람직하게는, 상기 프로모터는 p_L^{λ} 프로모터, *trp* 프로모터 및 *lac* 프로모터 또는 T7 프로모터이다. 이와 같은 프로모터는 scFv 항체를 코딩하는 서열과 작동적으로 연결되어 있다. 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 scFv 항체를 코딩하는 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.
- <64> 또한, scFv 발현용 벡터는 그로부터 발현되는 scFv의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합되어 있는 것이 바람직하다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제, 말토스 결합 단백질, FLAG 및 6x His

(hexahistidine) 등이 있고, 가장 바람직하게는 6x His이며, 그 이유는 이러한 추가적인 서열은 항원성이 없고, 단백질 즉 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위의 폴딩을 방해하지 않기 때문이다. 상기 정제를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제된다.

- <65> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼을 이용하여 소망하는 scFv 재조합 항체를 신속하고 용이하게 얻을 수 있다.
- <66> 또한, 본 발명에서 이용되는 발현 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 앰피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있고, 바람직하게는 비용의 측면을 고려하여 앰피실린 또는 겐타마이신 내성 유전자가 있다.
- <67> 본 발명의 방법에 있어서, 상기 형질전환 단계는 발현 벡터를 숙주 세포 내로 운반시켜 실시된다. 상기 형질전환 방법은 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 발마드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 발현 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.
- <68> 숙주 세포 내로 주입된 발현 벡터는 숙주 세포 내에서 발현되어 목적의 scFv 항체를 얻게 된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 발현 벡터가 *lac* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.
- <69> 본 발명의 방법에 있어서, 상기 회수 단계는 세포성장 동안 또는 세포성장이 종료된 후에 실시할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 회수는 scFv 항체를 순수한 형태, 즉 정제된 형태로 얻는 것이다. 예를 들어, scFv 항체를 형질전환된 박테리아에서 대량으로, 전형적으로 프로모터 발현 유도를 통하여 (물론, 발현은 컨스티튜티브(constitutive)하게 할 수 있다), 발현시키는 경우, 단백질은 당업계에 공지된 일반적 정제방법을 통해 정제될 수 있다. 정제방법은, 예컨대, 암모늄 설페이트에 의한 분획화 (fractionation), 크기 구별 여과 (한외여과) 및 컬럼 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 포함한다.
- <70> 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- <71> (i) 본 발명의 방법은 조류 유래 재조합 scFv 항체의 항원 친화도를 크게 개선시킬 수 있다.
- <72> (ii) 본 발명의 방법에 따르면, 높은 용해도로 봉입체를 형성시키지 않으면서 조류 유래 재조합 scFv 항체를 얻을 수 있다.
- <73> (iii) 본 발명의 재조합 scFv 항체 중, 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체는 기존에 개발된 어떠한 재조합 scFv 항체보다 항원에 대한 친화도가 높다.
- <74> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <75> **실시예 1: 실험 닭의 사육**
- <76> 생식 가능한 난자로서 수득한 화이트 레그혼 교잡 (SC^R)의 수정된 난자를 상업적으로 구입 가능한 브리더 (Hyline International, USA)로부터 얻었고, 상기 수정 난자를 미합중국, 메릴랜드 주의 기생충 면역생물학 실험실 (Parasite Immunobiology Laboratory)에서 부화시켰으며, 3 주령까지 부화기에서 유지하였고, 이어, 와이어 군집 케이지에서 유지하였다. 닭은 깨끗한 와이어-바닥 케이지에서 사육 하였다. 실험 대상의 닭은 특정

병원체에 노출되지 않도록 주의하였다. 음식과 물에 대해서는 무제한적으로 접근 가능하도록 하였다.

<77> **실시예 2: 포자 소체(sporozoites) 항원의 준비**

<78> 에이메리아 아세르부리나(*Eimeria acervulina*, USDA 균주, 미합중국), 에이메리아 맥시마(*E. maxima*, USDA 균주, 미합중국) 및 에이메리아 티넬라(*E. tenella*, USDA 균주, 미합중국)의 포자 난모 세포를 수집하여 헵크스 균형 염 용액(Hank's balanced salt solution: HBSS) 내의 0.125% (w/v) 트립신 (Sigma, USA) 및 1% 토로데옥시콜리산을 포함하는 용액 (pH 7.6) 내에서 41°C에서 10분 동안 상기 난모 세포를 5% CO₂ 항온기에서 엑시스싱팅 (excysting)하여 포자소체를 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 포자소체를 DEAE-셀룰로오스 컬럼 (DE52; Whatman Paper Ltd., USA)을 이용하여 세포 조각들로부터 분리하여 순수하게 포자소체만을 수득하였다. 수득한 포자소체(10⁹/ml)을 드라이아이스를 이용하여 6회 얼림-해동을 실시한 다음, 실온까지 가온하였다. 이어, 포자소체를 Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Heat System, USA)를 이용하여 4°C에서 초음파 처리하여, 포자소체의 표면 항원을 수득하였다.

<79> **실시예 3: 균주 및 배지**

<80> *Escherichia coli* BMH 71-18 (미합중국 텍사스 주립대학 서던웨스턴 미디칼 센타의 E. Sally Ward 박사로부터 구입)이 클로닝 및 단백질 발현을 위해 사용되었다. 균배양을 위한 배지는 2 X TY (1% 이스트 추출물; DIFCO, 1% 트립톤; DIFCO, 0.5% NaCl; Sigma, 20% 글루코스; Sigma, pH 7.0)를 사용하였으며, 플라스미드 선별을 위해서는 최종 농도가 100 µg/ml가 되도록 앰피실린 스톱 용액 (100mg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

<81> **실시예 4: 닭 B-세포 하이브리도마 세포주 6D12의 제조**

<82> 실시예 4-1: CD8⁺ 세포의 준비

<83> 비장을 6-8 주령의 상기 I의 SC 닭으로부터 얻고, 주사기 플런저로 스크린체를 통하여 HBSS 내에서 부수었다. 단일의 세포 현탁액을 히스토패이크 1077 밀도구배 배지 (Sigma) 상에 놓고 1,800 rpm으로 20분 동안 실온에서 원심분리 하였다. 이어, 경계면에 있는 림프구를 파스테르 피펫으로 수득하고 HBSS 내에서 3회 세척하였다. CD8⁺ T 세포 하이브리도마는 비장 림프구와 R 1/5 닭 T 림프종 세포 (미합중국, Animal and Natural Resources Institute, Parasite Biology, Epidemiology, Systemic Laboratory, Lillehoj 박사로부터 구입)를 폴리에틸렌 글리콜 4,000에서 융합하여 얻고, 하이브리도마 세포를 10% 우태아 혈청 및 히포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT, Sigma)이 함유된 IMDM에서 재현탁 한 다음, 96-웰 마이크로배양 플레이트에 플레이팅 하였다. 10-14일이 경과한 다음, 성장을 나타내는 웰을 24-웰 플레이트에 플레이팅 하고, 10% 우태아 혈청 및 히포크산틴-티미딘이 함유된 IMDM에서 성장시켰다. 하이브리도마 세포가 집합성을 나타낼 때, Lillehoj et al., *Eur. J. Immun.* 18:2059-2065(1988)에 개시된 방법에 따라 CD8 항원을 검출할 수 있는 단일클론 항체를 이용하여 포지티브 웰의 세포의 반을 플로우 시토메트리로 분석 하였다. 염색된 세포를 EPICS 프로필 II 플로우 시토메트리 (Coulter Cooperation, Hialeah, Florida)를 이용하여 분석 하였다. 각각의 하이브리도마에 대하여, 10⁴ 생존 세포를 분석 하였다. CD8⁺ T 세포 하이브리도마는 공급 세포로서 조사한 비장 세포 (2 x 10⁶/웰)를 이용하여 제한 희석으로 클로닝 하였다 (Lillehoj et al., *Eur. J. Immun.* 18:2059-2065(1988)). CD8⁺ 항원을 발현하는 하이브리도마 세포를 성장시키고, 일부분은 다른 실험을 위하여 냉동 하였다.

<84> 실시예 4-2: 하이브리도마 세포주 6D-12의 제조

<85> CD8⁺ 림프구에 대하여 결합 특이성을 나타내는 콕시디아 항원에 대한 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 제조하기 위하여, 우선, 에이메리아 아세르부리나로부터 얻은 상기 III의 항원으로 전흡착된 10⁸ CD8⁺ T 세포를 6-12 주령의 상기 I의 SC 닭에 근육내 주사 하였다. 상기 전흡착은 10% 우태아 혈청이 함유된 IMDM 1 ml 내에서 CD8⁺ 림프구와 상기 실시예 2-1의 혼합 항원을 2시간 동안 37°C에서 항온 처리하여 실시하였고, 이어 3회 세척한 다음, 10⁸ CD8⁺ T 세포를 HBSS 0.5 ml에서 재현탁하고, 프로인드 불완전 보조액으로 유탕액화 한 다음, 6-12 주령의 상기 I의 SC 닭에 근육내 주사 하였다. 동일한 제제를 이용하여 두 번째 주사를 실시하였고, 추가적인 면역화는 보조제 없는 상기 제제를 이용하여 정맥내 주사를 1 주일 간격으로 실시하여 이루어졌다. 최종적인 부스팅은 세포 융합 3일 전에 정맥내 주사를 하여 실시하였다. 이어, 하이브리도마의 제조는 Nishinaka et al.에 의해 제시된 방법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다 (Nishinaka, S. et al., *J. Immunol.*

Methods., 139:217-222(1991); 및 Nishinaka, S. et al., *J. Vet. Med. Sci.*, 58:1053-1056(1996)): 최종 면역화를 실시한 다음 3일 후에, 비장의 단일 세포 현탁액을 피콜-페이크 밀도 구배를 이용하여 500 g에서 20℃에서 20분 동안 원심분리 하여 얻었다. 세포 융합은 Lillehoj, H.S. et al., *Poul. Sci.*, 73:1685-1693(1994)에 개시된 방법에 따라, R27H4 비분비 닭 마이엘로마 세포주 (일본국, NKK Corporation, Biotechnology Development Center의 Nishinaka S. 박사로부터 구입)를 이용하여 폴리에틸렌 글리콜 4000 (Sigma)에서 실시 하였다. 융합된 세포를 10% 우태아 혈청과 HAT이 함유된 IMDM에서 현탁하고, 96-웰 마이크로배양 플레이트에 플레이트링 하였다. 2주 경과한 다음, ELISA 방법에 따라, 고체 상에 고정된 포자 소체 항원으로 하이브리드 클론을 스크리닝 하였다. 목적의 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마는 공급 세포로서 조사한 비장 세포 (2×10^6 /웰)를 이용하여 제한 희석으로 클로닝 하였다. 이렇게 얻은 하이브리도마 세포를 "6D-12" 라 명명 하였다.

<86> **실시예 5: mRNA의 분리**

<87> 콕시디아 항원에 대해 특이성을 갖는 약 1×10^7 개의 하이브리도마 "6D12" 세포를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 제거하고 세포 펠릿을 모았다. 세포 펠릿을 5 ml의 PBS로 현탁한 다음, 다시 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 다음, 상등액을 제거하고 세포 펠릿을 모았다. 0.4 ml의 차가운 라이시스 완충액 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1% 트리톤 X-100)을 넣고 세포 펠릿을 현탁하고 얼음위에 놓고 5분간 방치하였다. 현탁된 세포를 14,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하여 상등액을 SDS-페놀 유착액 (50 μ l 10% SDS, 200 μ l 페놀/클로로포름)과 잘 섞어준 후 다시 페놀/클로로포름, 14,000rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하여 상등액을 400 μ l 페놀/클로로포름과 잘 혼합하였다. 다시 14,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하여 상등액을 소듐 아세테이트가 최종농도 0.3 M이 되게 하고 상등액 부피의 2.5배의 차가운 100% 에탄올을 넣고 잘 섞어준 후, -20℃에서 8시간 동안 둔 다음, 14,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 RNA를 침전시키고 상등액을 버렸다. 다시 차가운 70% 에탄올 500 μ l를 첨가해 펠릿을 세척하였다. 이렇게 하여 얻은 RNA 펠릿을 50 μ l의 RNase-결여 증류수에 용해하여 총 mRNA를 얻었다.

<88> **실시예 6: cDNA 합성 및 중합효소 연쇄반응(PCR)**

<89> 하이브리도마 클론으로부터 얻어진 mRNA로부터 cDNA를 합성 할 때는 역전사 시스템 (Promega)을 사용하여 제조자의 방법대로 cDNA를 합성하였다. 4 μ l mRNA 및 4 μ l RNase-결여 물 (DEPC 처리수)를 혼합하고 65℃에 30분간 항온처리한 다음, 여기에 4 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l 역전사 10x 완충액, 2 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l Oligo(dT), 1 μ l RNasin 및 2 μ l 역전사효소를 넣고 42℃에서 1.5시간 항온처리하고, 90℃에서 5분간 항온처리 하였다. 합성된 cDNA의 증폭은 PCR을 이용하여 실시하였다. PCR 반응은 2 μ l의 주형 cDNA, 1 μ l의 5'-프라이머, 1 μ l의 3'-프라이머, 2 μ l의 2 mM dNTPs (Promega), 2 μ l의 10x PCR 반응완충액 (Promega; 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 0.1% 젤라틴), 1 μ l의 Taq DNA 중합효소(5 unit/ μ l; Promega) 및 11 μ l의 초순수 증류수(Mili-Q)로 구성되었다. PCR 증폭반응에 사용된 프라이머 전부(참조: 표 1)는 10 pmol/ μ l의 농도로 준비하여 PCR에 사용하였다. PCR은 ASTEC PC708을 이용하여 94℃;30초, 55℃;30초 및 72℃;1분을 주기로 하여 총 30 주기로 실시되었다.

표 2

<90> 닭 단일클론항체의 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위의 증폭을 위한 프라이머

중사슬	서열
CKVHBACK	5'-gcc gtg acg ttg gac gag tcc-3'
CKVHFOR	5'-gga gga gac gat gac ttc ggt-3'
경사슬	
CKVLBACK	5'-gcg ctg act cag ccg tcc tcg-3'
CKVLFOR	5'-tag gac ggt cag ggt tgt ccc-3'

<91> PCR 생성물을 pGEM-T 벡터 (Promega, USA)를 이용하여 클로닝하였고, 클로닝된 cDNA의 서열 결정은 거대-다이 종결자 사이클 시퀀싱 레디 키트(PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 ABI 377 자동 서열 결정기로 하였다. 닭 단일클론항체의 중사슬 및 가변성 부위에 대한 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열목록 제1서열 및 제3서열에 기재되어 있다. 또한, 닭 단일클론항체의 중사슬 및 가변성 부위에 대한 아미노산 서열은 각각 서

열목록 제2서열 및 제4서열에 기재되어 있다.

<92> 실시예 7: 재조합 scFv 유전자의 제조

<93> 상기 증폭된 단일클론 항체의 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위 (V_H 및 V_L) cDNA를 이용하여 오버랩-연장 PCR (Horton, R.M. et al., Gene, 77:61-68(1989))을 실시하여 가변성 부위 재조합체를 증폭 하였다. 다음과 같이 PCR을 실시하여 VL-링커-VH (LH 재조합체) 및 VH-링커-VL (HL 재조합체) 증폭물을 얻었다: 10x Taq 중합효소 완충액 $5\mu\text{l}$, 25 mM MgCl_2 $2.4\mu\text{l}$, 5 mM dNTP $3\mu\text{l}$, VH 및 VL의 cDNA 각 $1\mu\text{l}$, 10 pM 5'-프라이머와 3'-프라이머 각 $2.5\mu\text{l}$ 및 3차 멸균 증류수 $36.6\mu\text{l}$ 에 $1\mu\text{l}$ 의 Taq 중합효소를 혼합하여 $94^\circ\text{C}; 1\text{분}$, $55^\circ\text{C}; 1\text{분}$ 및 $72^\circ\text{C}; 3\text{분}$ 을 주기로 하여 총 30 주기로 실시하였다.

<94> PCR 증폭물은 가변성 부위 유전자 이외에 중간에 링커를 포함한다. 링커는 일정한 아미노산 조성을 갖는 올리고펩타이드로서, 중사슬 및 경사슬의 가변성 부위를 연결하여 항체의 기능을 하도록 한다. 상기 증폭된 PCR 산물을 SfiI 또는 NotI 제한효소 자리를 포함하는 scFv(single chain variable fragment) 프라이머를 이용하여 상기한 방법과 동일하게 PCR을 실시하였고, 95°C 4분 동안 1 사이클, 60°C 1분, 72°C 1분 및 94°C 1분의 조건으로 30 사이클, 최종 연장 반응은 72°C 에서 7분 동안 실시하였다. 이용된 프라이머의 염기 서열은 5'-gtcctcgcaactgcgccagccgggcatggccgctgacgttgacgagtc-3' (역방향 프라이머, 밑줄은 SfiI 제한 효소 자리이다) 및 5'-ggccacctttgcgccgctaggacggtcagggttgccc-3' (전방향 프라이머, 밑줄은 NotI 제한효소 자리이다)이다. 재증폭된 산물을 SfiI 및 NotI (Promega, USA)로 절단한 다음, 5' Pel B 리더 서열 및 3' 헥사히스티딘 표지를 포함하고 pUC 119로부터 유래된 scFv 발현 벡터에 클로닝 하였다(참조: Kim, J.K. et al., Eur. J. Immunol., 24:542-548(1994)).

표 3

<95> 링커의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열

링커	서열
EK 링커	5'-GGC TCT ACT TCC GGT AGC GGC AAA CCC GGG AGT GGT GAA GGT AGC ACT Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr AAA GGT-3' Lys Gly

<96> 실시예 8: Cys 말단 부위의 삽입

<97> 위에서 클로닝한 모 scFv 유전자를 주형으로 하여 도 1의 그림과 같이 VL 부위의 말단에 “GGCGG”가 발현되도록 하기 위해 다음과 같은 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다. “GGCGG”에 해당하는 뉴클레오타이드 서열은 ggc ggt tgc ggc ggg이다.

<98> 역방향 프라이머는 5'-gtc ctc gca actgcgccagccgggcatggccgctgacgttgacgagtc-3'(밑줄은 SfiI 제한 효소 자리)을 이용하였으며 전방향 프라이머는 5'-gag tca ttc tgc ggc cgc ggt gac ccc gcc gca acc gcc tag gac ggt cag ggt tgt ccc-3'를 이용하였다(밑줄은 NotI 제한효소 자리). 재증폭된 PCR 산물을 SfiI 및 NotI(Promega, USA)로 절단한 다음, 5' Pel B 리더 서열 및 3' 헥사히스티딘 표지를 포함하고 pUC 119로부터 유래된 scFv 발현 벡터로 클로닝 하였다.

<100> 실시예 9: 인간 Fc 부위의 삽입

<101> 위에서 클로닝한 모 scFv 유전자를 주형으로 하여 역방향 프라이머로서 5'-gtcctcgcaactgcgccagccgggcatggccgctgacgttgacgagtc-3'(밑줄은 NcoI 제한 효소 자리이다)를 이용하였으며, 전방향 프라이머로서 5'-agc ttc gaa ttc cat ggt tag gac ggt cag ggt tgt ccc-3'(밑줄은 NcoI 제한 효소 자리)을 이용하여 PCR 증폭 반응을 실시하였다. 재증폭된 PCR 산물을 NcoI (Promega, USA)으로 절단한 다음, 5' Pel B 리더 서열, 인간의 IgG1 hinge-Fc 염기서열 및 3' 헥사히스티딘 표지를 포함하고 있는 pUC 119 발현 벡터로 클로닝 하여(참조: Kim, J.K. et al., Eur. J. Immunol., 24:542-548(1994)) 도 2와 같은 ScFv-human IgG1 Fc (hinge를 포함하는) 형태의 발현벡터를 구축하였다. 본 발명에서 이용된 인간의 hinge-Fc에 해당하는 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 서열목록 제6서열 및 제7서열에 기재되어 있다.

<102> 실시예 10: scFv 항체의 발현 및 정제

<103> 형질전환체를 제조하기 위하여, *E. coli* BMH71-18의 단일 집락을 따서 5 ml 2x TY (트립톤 0.01%, 이스트 추출물 0.01%, NaCl 0.005%)에 접종하여 37℃에서 하룻밤 진탕 배양 후 200 ml 2x TY에 500 μ l의 배양액을 접종하였다. 그런 다음, 600 nm에서 흡광도가 0.4-0.6이 될 때까지 37℃에서 진탕배양시켜 얼음에 꽂아두었다가 차게 한 배양액을 4℃에서 6000 rpm으로 10분간 원심분리하여, 상등액을 제거하고 펠릿을 4℃에서 보관된 TfBI 20 ml에 현탁시켜 얼음에 10분간 꽂아두었다가 6000 rpm에 10분간 원심분리시켰다. 상등액을 제거하고, 펠릿을 2 ml의 TfBI에 다시 현탁하여 마이크로 튜브에 600 μ l씩 분주하여 -70℃ 딥프리즈에 보관하였다. 이렇게 준비된 컴피턴트 세포 100 μ l와 상기 발현백터 10 μ l를 섞어 얼음에 30분간 방치해서 형질전환을 시켰다. 완전한 형질전환을 위해서 42℃에서 2분간 방치했다. 1 ml의 2x TY 배지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 진탕 배양시키고, 이어 2x TY 평판배지에 골고루 도말하여 37℃에서 밤새도록 배양시켰다. scFv 유전자를 가진 클론을 확인하기 위하여 PCR 스크리닝을 수행하였다. 이때 scFv의 5'-말단 앞부분의 백터 서열을 가지는 5'-프라이머와 scFv의 3'-말단서열을 포함하는 3'-프라이머를 이용하여 증폭함으로써 scFv의 방향성과 크기를 확인할 수 있었다. 재조합체의 PCR 스크리닝에는 5'-GCC GTG ACG TTG GAC GAG TCC-3' 및 5'-TAG GAC GGT CAG GGT TGT CCC-3' 프라이머를 이용하였다. 우선 선별된 단일집락을 200 μ l의 3차 멸균 증류수에 끊어서 넣고, 100℃에서 15분간 가열하여 세포를 파쇄시키고 1400 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 DNA 주형으로 이용하여 PCR을 수행하였다. 10x Taq 증합효소 완충액 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 1 μ l, 2 mM dNTP 2 μ l, DNA 주형 10 μ l, 10 pM 5'-프라이머와 3'-프라이머 각 1 μ l 및 3차 멸균 증류수 2 μ l에 1 μ l의 Taq 증합효소를 섞어서 94℃;30초, 55℃;30초, 72℃;1분을 주기로 하여 총 30 주기로 실시하였다

<104> 형질전환된 *E. coli* BMH71-18 세포를, 100 μ g/ml 암피실린 (Sigma, USA)과 0.5% (w/v) 글루코오스를 포함하는 50 ml의 2X TY에서 하룻밤 동안 30℃에서 일정한 교반을 하면서 배양하였다. 이어, 배양된 세포를 6,000 rpm에서 10분 동안 실온에서 원심분리하여 세포를 수집하고, 20 ml의 2X TY에 재현탁하고 원심분리하였다. 그런 다음, 수거된 세포를 100 μ g/ml 암피실린과 0.25 mM IPTG (이소프로필- β -D-티오갈락토피라노시드) (Gold Biotechnology, USA)를 포함하는 50 ml 2X TY에 재현탁시키고, 180 rpm으로 교반하면서 25℃에서 5.5시간 동안 유전자 발현을 유도하였다. 배양액을 얼음에 10분 동안 정치시킨 후, 원심분리하였다. 수거된 세포를 배양액 0.4배 부피의 차가운 TES 용액 (200 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM 수크로오스; Sigma, 0.1 mM EDTA)에 재현탁하고, 얼음에서 1시간 방치시켰다. 이어, 10,000 rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 PBS 완충액으로 밤새 투석하였다. 투석된 TES 용액내의 단백질을 Ni+NTA 아가로스를 이용한 고정화-금속 친화성 크로마토그래피 시스템 (Qiagen)에 적용하고, 레진 부피 20배의 TN 완충액 (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl)로 세척하고, 이어 TN 완충액 (0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 0.5 M NaCl)로 세척하였다. 그 다음 250 mM 이미다졸을 적용시켜 재조합 단백질을 용출하였다.

<105> 도 3에서 볼 수 있듯이, 약 35 kDa(scFv 항체에 해당), 70 kDa(다이머 형태의 scFv-Cys 항체에 해당) 및 100 kDa(ScFv-Fc에 해당) 크기의 재조합 scFv 항체의 발현을 확인할 수 있다.

<106> 한편, 본 정제과정에서, 형질전환 세포의 파쇄 과정이 없는 바, 이는 본 발명에 의해 구축된 유전자 재조합체에서, scFv의 N-말단에 PelB 리더 서열이 융합되어 있기 때문에, 숙주세포인 *E. coli*의 페리플라즈 공간으로 scFv가 분비되며, 분비된 단백질은 정제과정에서의 삼투압 쇼크 (TES 용액에 의한)에 의해 용해성 scFv로 배양액으로 분비되기 때문이다.

<107> 실시예 9: 웨스턴 블롯팅에 의한 다이머 형성 확인

<108> 상기 형질전환체의 5 ml 배양액에 8 M 우레아를 처리하여 얻은 시료 20 μ l를 SDS-PAGE 한 다음, 젤로부터 니트로셀룰로오스 막으로 단백질을 이동시키기 위해, SEMI-PHOR 전이 키트(Hoeffer scientific instrument)을 사용하였다. 젤에서 막으로의 단백질 이동을 위한 이동 완충액은 SDS-PAGE 완충액 50 ml에 50 ml의 메탄올과 200 ml의 3차 멸균 증류수를 첨가하여 사용하였다. 단백질이 이동된 막은 10 ml의 블로킹 완충액(3% BSA가 함유된 PBS; Sigma) 내에 담겨져 1시간 동안 교반되었다. 이어서 2회에 걸쳐 10 ml PBS로 10분간 상온에서 세척하였다. 그런 다음, 항-His6-호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRPO) (1:1000으로 희석)(Sigma)를 40분 동안 실온에서 처리하고, PBS로 세척하였다. 그리고 나서, HRPO 염색용액(3 mg 4-클로로- α -나프톨, 10 ml 메탄올, 40 ml PBS 및 50 μ l 30% H₂O₂)에 막을 함침시켜 발색시킨 후 증류수로 세척하였다.

<109> 도 3에서 확인할 수 있듯이, 제조된 scFv는 시스테인-시스테인 결합의 저해제인 β -머캅토에탄올(mercaptoethanol) 처리 유/무에 따라 다이머의 형성을 확인할 수 있었다. 즉 SDS-PAGE (패널 A) 및 웨스턴

블롯팅분석(패널 B)의 결과 모두에서, 제조된 scFv는 시스테인-시스테인 결합의 저해제인 β -머캅토에탄올치리를 하지 않은 경우 약 25 kDa(레인 1: scFv 항체), 50 kDa(레인 2: 다이머 형태의 scFv-Cys) 및 100 kDa(레인 3: scFv-Fc) 크기의 재조합 scFv 항체의 발현을 확인할 수 있다. 그러나 β -머캅토에탄올을 가한 경우에는 다이머를 형성하는 시스테인잔기의 이황화결합(disulfide bond)이 분해 되어 분자량이 반으로 감소함을 알 수 있다. 즉 25 kDa(레인 4: scFv 항체, 레인 5: scFv-Cys) 및 50 kDa(scFv-Fc) 크기의 재조합 scFv 항체의 발현을 확인할 수 있다.

<110> 한편, 링커 부위에 시스테인 잔기를 추가한 scFv 항체 및 scFv의 VL 부위 말단에 시스테인 잔기 단독을 추가한 scFv 항체는 다이머 형성이 잘 되지 않았다(테이터 미제시).

<111> **실시예 10: ELISA 법에 의한 분석**

<112> 평판 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 0.1 M 소듐 카보네이트 완충액 (pH 9.6) 내에서 에이메리아 항원 (10 μ g/ml) 100 μ l로 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하고, 0.05% 트윈-20 (PBS-T)를 포함하는 PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 이어, 웰을 1% 우혈청 알부민 (BSA; Sigma)를 포함하는 PBS 200 μ l로 1시간 동안 실온에서 블로킹한 다음, PBS-1% BSA 내의 상기 수득한 재조합 항체 (100 μ g/ml) 100 μ l를 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 그런 다음, PBS-T로 3회 세척하고, PBS-1% BSA에서 1:3,000으로 희석된 호스래디쉬 페록시다제(HRPO)-접합 폴리히스티딘 단일클론 항체(Sigma) 100 μ l/웰을 첨가한 다음, 실온에서 40분 동안 항온 처리하고, 4회 세척하였다. 페록시다제 활성은 0.05 M 포스페이트-시트레이트 완충액 (pH 5.0)에서 ABTS (Sigma) 및 H₂O₂와 반응시켜 검출하였다. 광학밀도는 마이크로타이터 플레이트 판독기 (Molecular Devices)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

<113> 도 4에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 의해 제작된 scFv 항체, scFv-cys, scFv-FcH의 순서로 항원에 대한 반응 (즉 친화도) 정도의 차이를 확인할 수 있다. 다이머 형성 이전의 scFv 항체와 비교하여 scFv-cys는 항원에 대한 친화도가 약 3.3배 정도 크게 증가하였다. 또한, 인간 Fc 부위를 결합시킨 ScFv-Fc의 경우, scFv 항체와 비교하여 항원에 대한 친화도가 약 5.4배 정도 매우 크게 증가하였다.

<114> **실시예 11: 웨스턴 블롯팅 방법을 이용하여 scFv-cys의 에이메리아 항원 탐지 분석**

<115> 실시예 2에서 준비된 에이메리아 항원(*Eimeria tenella*) 10 μ g을 SDS-PAGE 한 다음, 젤로부터 니트로셀룰로오스 막으로 단백질을 이동시키기 위해, SEMI-PHOR 전이 키트(Hoeffer scientific instrument)을 사용하였다. 젤에서 막으로의 단백질 이동을 위한 이동 완충액은 SDS-PAGE 완충액 50 ml에 50 ml의 메탄올과 200 ml의 3차 멸균 증류수를 첨가하여 사용하였다. 단백질이 이동된 막은 10 ml의 블로킹 완충액(3% BSA가 함유된 PBS; Sigma) 내에 담겨져 1시간 동안 교반되었다. 이어서 2회에 걸쳐 10 ml PBS로 10분간 상온에서 세척하였다. 그런 다음, 6D12 scFv-cys 다이머 항체 10 μ g을 1:500으로 희석하여 40분 동안 실온에서 처리하고, PBS로 세척하였다. 그리고 나서, 항-His6-호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRPO) (1:1000으로 희석)(Sigma)를 40분 동안 실온에서 처리하고, PBS로 세척하였다. HRPO 염색용액(3 mg 4-클로로- α -나프톨, 10 ml 메탄올, 40 ml PBS 및 50 μ l 30% H₂O₂)에 막을 함침 시켜 발색시킨 후 증류수로 세척하였다.

<116> 도 5에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 scFv-cys 다이머 항체가 분자량이 약 70 kDa인 에이메리아 항원을 탐지하고 있음을 알 수 있다.

<117> **실시예 12: ELISA 방법을 이용하여 scFv 및 scFv-cys의 항원결합능 분석**

<118> 평판 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 PBS 완충액 (pH 7.4) 내에서 에이메리아 항원 (10 μ g) (도 6 패널 A) 또는 에이메리아 항원을 연속적으로 희석(6, 3, 1.2, 0.6, 0.3, 0.15 μ g)하여 (도면 6 패널 B) 100 μ l로 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하고 0.05% 트윈-20 (PBS-T)를 포함하는 PBS (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 이어, 웰을 1% 우혈청 알부민 (BSA; Sigma)를 포함하는 PBS 200 μ l로 1시간 동안 실온에서 블로킹한 다음, PBS-1% BSA 내의 상기 수득한 재조합 항체 scFv 또는 scFv-cys를 같은 분자수가 되도록 연속적으로 희석하거나(0.6, 0.4, 0.2, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 nmole)(도 6 패널 A)하여 100 μ l를 첨가하고 도 6 패널 B 경우에는 scFv 또는 scFv-cys 일정양(5 μ g) 100 μ l를 첨가하고(도 6 패널 B), 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 그런 다음, PBS-T로 3회 세척하고, PBS-1% BSA에서 1:3,000으로 희석된 호스래디쉬 페록시다제(HRPO)-접합 폴리히스티딘 단일클론 항체(Sigma) 100 μ l/웰을 첨가한 다음, 실온에서 40분 동안 항온 처리하고, 4회 세척하였다. 페록시다제 활성은 0.05 M 포스페이트-시트레이트 완충액 (pH 5.0)에서 ABTS (Sigma) 및 H₂O₂와 반응시켜 검출하였다. 광학밀도는 마이크로타이터 플레이트 판독기 (Molecular Devices)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

<119> 도 6 패널 A의 경우에는 일정양의 에이메리아 항원을 코팅하고 scFv 및 scFv-cys 다이머 항체의 몰수(분자수)를 달리하여 항원결합능을 측정하였고 도 6 패널 B의 경우에는 에이메리아 항원의 양을 달리하여 코팅하고 일정양의 scFv 및 scFv-cys를 이용하여 항원결합능을 측정하였다. 도 6 패널 A 및 B 모두의 경우에서 scFv보다 scFv-cys 다이머가 항원결합능이 2배 이상 증가되었음(도 4와 결과 일치)을 볼 수 있다.

<120> **실시예 13: 면역조직화학 및 공초점 레이저 현미경을 이용한 scFv-cys 다이머 항체의 항원 결합능 확인**

<121> PBS에 들어 있는 에이메리아 항원(*Eimeria tenella*)을 실리콘 처리된 유리 슬라이드 위에 떨어뜨린 뒤 공기 중에서 건조시키고 차가운 메탄올로 2분 동안 고정하였다. 고정된 유리 슬라이드를 PBS로 3회 세척하고 본 발명의 재조합 항체를 가하여 30분간 상온에서 반응시키거나 4℃ 항습장치 하에서 밤새 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3회 세척하고 FITC(fluorescein isothiocyanate) 또는 HRP가 결합된 토끼 항-토끼 IgG(1:1000, Sigma)로 30분에서 약 12시간 동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 세척한 뒤 글라이세롤 완충액을 처리하였다. 슬라이드를 공초점 레이저 스캐닝 현미경 또는 실체현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

<122> 도 7은 공초점 현미경으로 관찰한 항원의 사진으로 에이메리아가 닭의 장에 기생하는데 중요한 역할을 하는 에이메리아 종의 표면항원이 형광염색된 것을 보여주고 있다. 이는 에이메리아 표면(apical surface)항원에 scFv-cys가 결합함을 직접적으로 보여주고 있으며 이는 위의 재조합항체가 에이메리아의 닭의 장에 기생하는 기능을 중화시킬수 있음을 암시한다.

<123> 도 8은 닭에 에이메리아 항원을 감염(infection)시킨 후 96 시간 후 닭의 소장을 채취하여 1차 항체로 scFv-cys를 이용하고 2차항체로 호스래디쉬 페록시다제(HRP)-접합 폴리히스티딘 단일클론 항체를 이용하여 전염되어진 소장조직을 면역조직염색한 실체현미경 사진이다. 에이메리아가 전염되어 기생하고 있는 닭의 장 조직이 염색되어 있음을 보여주고 있으며 따라서 도 7과 도 8 역시 본 발명의 scFv-cys 다이머 항체가 에이메리아 표면항원에 높은 친화도로 결합함을 보여주고 있다.

발명의 효과

<124> 위에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 조류 유래 재조합 scFv(single chain variable fragment) 항체의 항원에 대한 친화도를 증가시키는 방법, 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체, 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 용해성(soluble) 조류 유래 재조합 scFv 항체의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 조류 유래 재조합 scFv 항체의 항원 친화도를 크게 개선시킬 수 있으며, 높은 용해도로 봉입체를 형성시키지 않으면서 조류 유래 재조합 scFv 항체를 제공할 수 있다. 본 발명의 재조합 scFv 항체 중, 에이메리아 포자소체 표면항원에 특이적으로 결합하는 조류 유래 재조합 scFv 항체는 기존에 개발된 어떠한 재조합 scFv 항체보다 항원에 대한 친화도가 높다.

<125> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명의 조류 유래 재조합 scFv 항체의 항원 결합 친화도를 높이기 위한 본 발명의 전략을 간략하게 보여준다. 시스테인 잔기의 추가적인 삽입에 의한 다이머화에 의해 조류 유래 재조합 scFv 항체의 항원 결합 친화도를 크게 향상시킨다.

<2> 도 2는 본 발명의 조류 유래 재조합 scFv 항체의 항원 결합 친화도를 높이기 위한 본 발명의 또 다른 전략을 간략하게 보여준다. 인간 IgG의 Fc 부위의 추가적인 삽입에 의한 다이머화에 의해 조류 유래 재조합 scFv 항체의 항원 결합 친화도를 크게 향상시킨다. 도면에서, CkScFv는 "VH-링커-VL"을 나타내며, H.FcH는 인간 IgG의 Fc 부위를 나타낸다.

<3> 도 3은 도 1 및 도2의 방법에 의해 제조된 재조합 scFv 항체에 대한 SDS-PAGE 결과 (패널 A) 및 웨스턴 블롯팅 결과 (패널 B)이다. 다이머의 형성을 확인할 수 있다. β-머캅토에탄올을 처리하지 않은 경우(레인 1-3)와 처리하였을 때(레인 4-6)의 비교를 통해 다이머가 형성된 것을 확인할 수 있다. 레인 1과 4는 scFv, 레인 2와 5는 scFv-Cys, 레인 3과 6은 scFv-Fc에 해당한다.

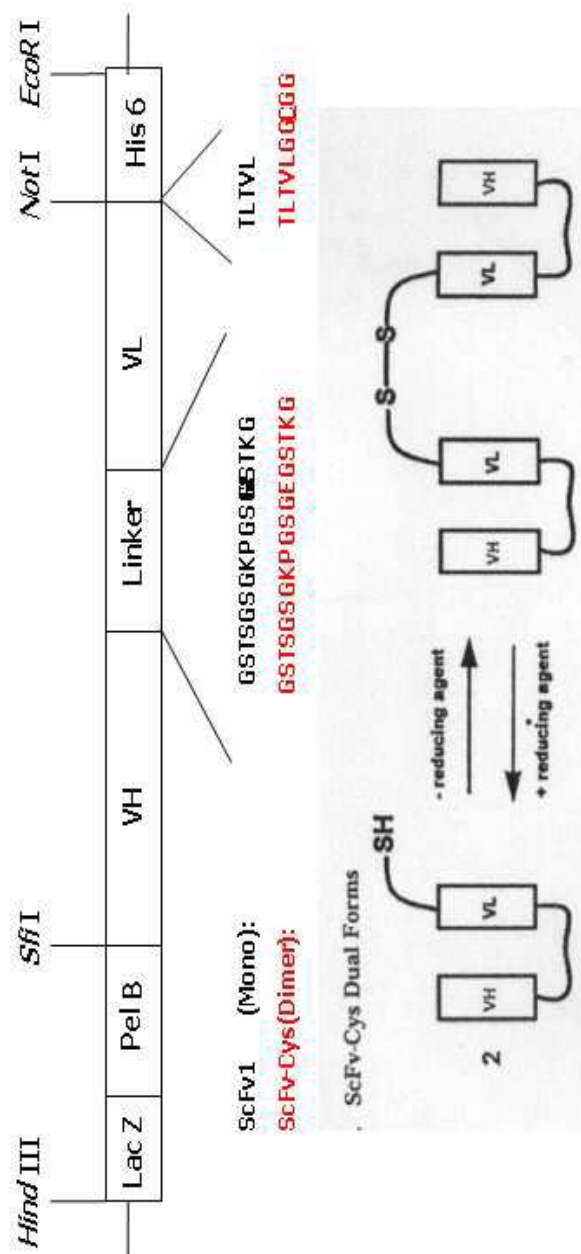
<4> 도 4는 시스테인 잔기의 삽입 또는 인간 IgG의 Fc 부위의 삽입에 의해 제조된 본 발명의 재조합 scFv 항체(다이

며 형태)의 항원(에이메리아의 포자소체 표면항원)에 대한 친화도(결합능)를 보여주는 ELISA 분석 결과이다.

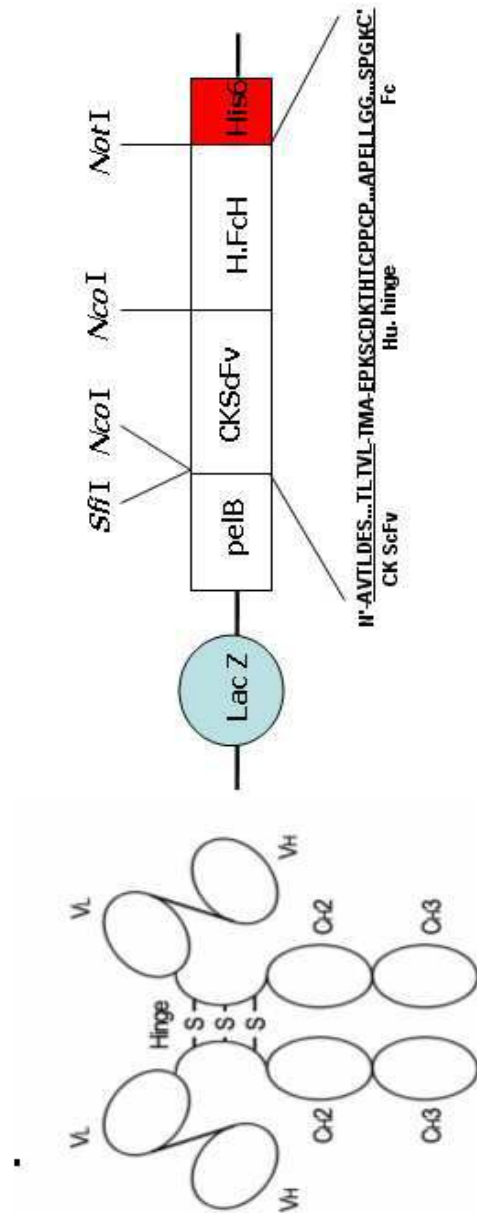
- <5> 도 5는 에이메리아 티넬라(*Eimeria tenella*) 항원에 대한 본 발명의 재조합 scFv 다이머의 결합 양상을 보여주는 웨스턴 블롯팅 분석 사진이다. 본 발명의 재조합 scFv 다이머가 3개 이상의 항원과 결합하고 있음을 확인할 수 있다.
- <6> 도 6은 항원 및 항체 농도에 따른 종래의 모노머 scFv 항체 및 본 발명의 다이머 scFv 항체의 결합능의 차이를 ELISA로 분석한 결과이다.
- <7> 도 7은 에이메리아 티넬라 균주에 본 발명의 재조합 항체를 처리한 뒤 형광이 표지된 2차 항체를 이용하여 항체의 결합 여부를 확인한 사진이다.
- <8> 도 8은 닭을 에이메리아 티넬라로 감염시킨 후 96 시간 뒤 소장의 맹장 부위에 기생하는 에이메리아 티넬라에 본 발명의 재조합 항체가 결합하는 지 여부를 확인한 사진이다.

도면

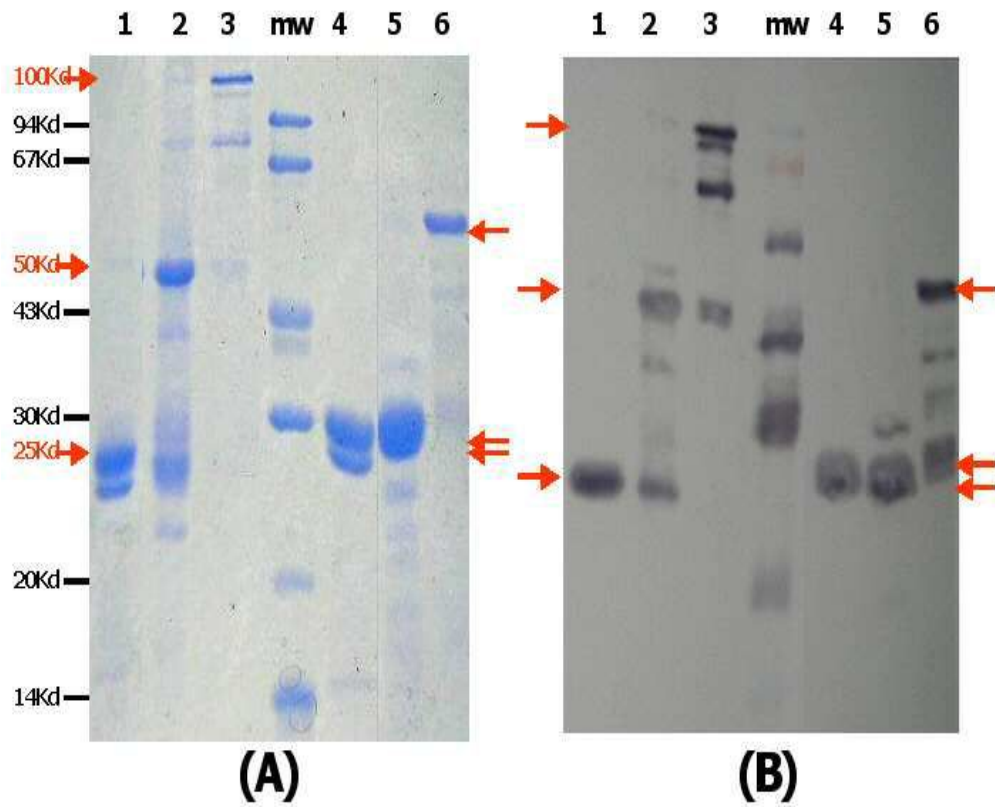
도면1



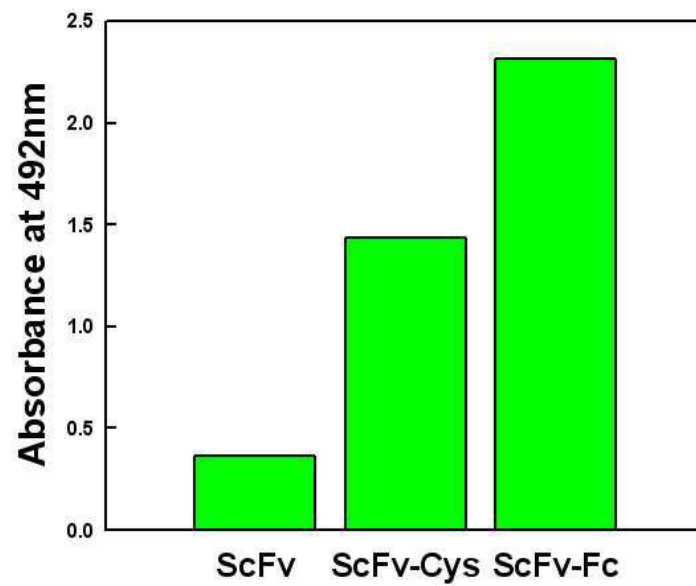
도면2



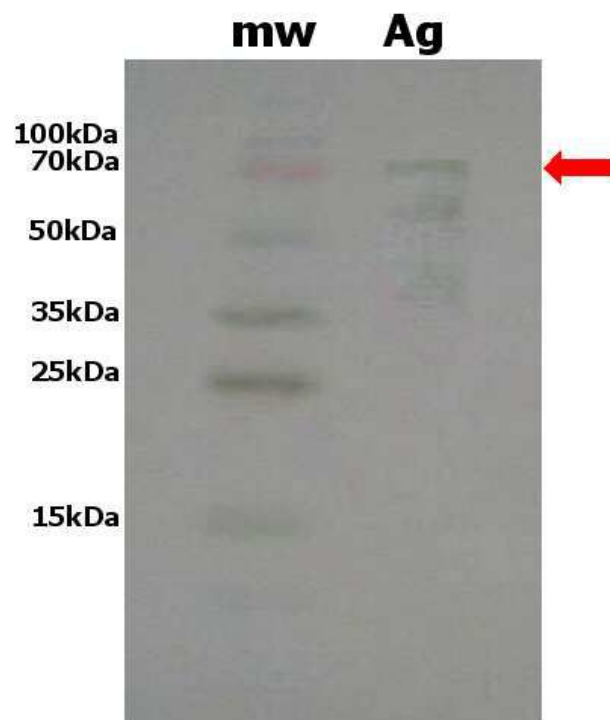
도면3



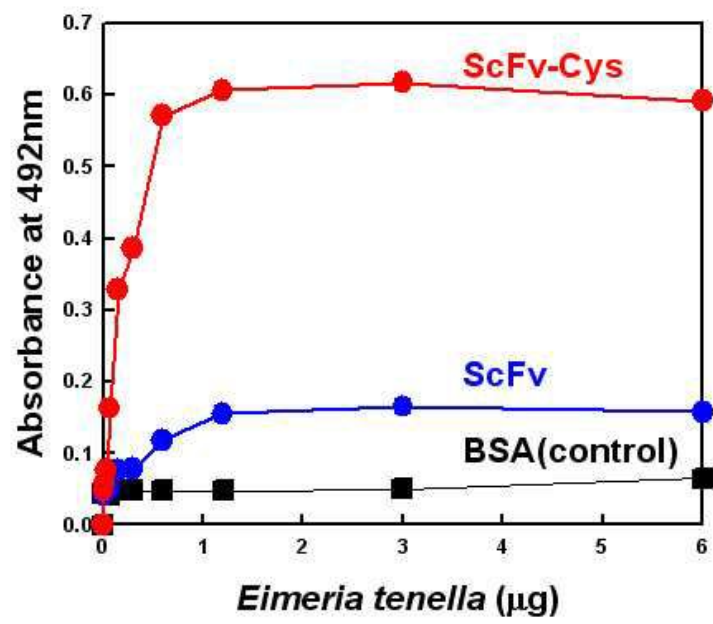
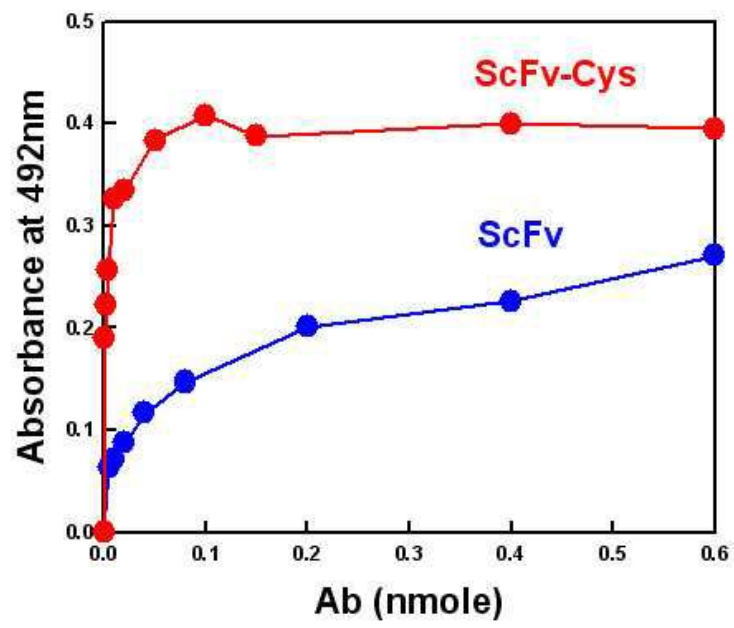
도면4



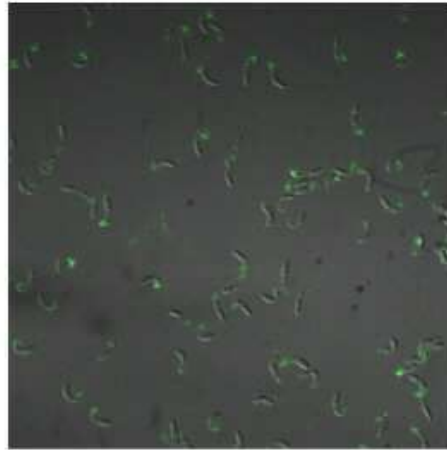
도면5



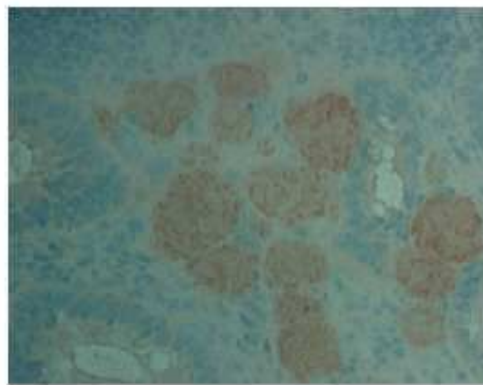
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Avicore Biotechnology Institute, Inc.
<120> Methods for Enhancing a Binding Affinity of Recombinant scFv Antibodies Derived from Avians
- <160> 23
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
<211> 381
<212> DNA
<213> chicken hybridoma cell line 6D-12
- <220>
<221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 1

gcc gtg acg ttg gac gag tcc ggg ggc ggc ctc cag acg ccc gga aga 48
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Arg
1 5 10 15

gcg ctc agc ctc gtc tgc aag gcc tcc ggg ttc acc ttc agc agt tat 96
Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc atg gtc tgg gtg cga cag gcg ccc ggc aag ggg ctg gaa tac gtc 144
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

gct gaa att atc aca act ggt aga gac aca tgg tat ggg acg gcg gtg 192
Ala Glu Ile Ile Thr Thr Gly Arg Asp Thr Trp Tyr Gly Thr Ala Val
50 55 60

aag ggc cgt gcc acc atc tcg agg gac aac ggg cag agt aca gtg agg 240
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
65 70 75 80

ctg cag ctg aac aac ctc agg gct gaa gac acc ggc atc tac tac tgc 288
Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc aaa tgc agt tat gag tgt act agt agt tgt tgg ggt tat act gat 336
Ala Lys Cys Ser Tyr Glu Cys Thr Ser Ser Cys Trp Gly Tyr Thr Asp
100 105 110

atg atc gac gca tgg ggc cac ggg acc gaa gtc atc gtc tcc tcc 381
Met Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> chicken hybridoma cell line 6D-12

<400> 2

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ile Thr Thr Gly Arg Asp Thr Trp Tyr Gly Thr Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Cys Ser Tyr Glu Cys Thr Ser Ser Cys Trp Gly Tyr Thr Asp
100 105 110

Met Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 309
<212> DNA
<213> chicken hybridoma cell line 6D-12

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(309)

<400> 3
gcg ctg act cag ccg tcc tcg gtg tca gca aac ctg gga gga acc gtc 48
Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val
1 5 10 15

aag atc acc tgc tcc ggg agt agt ggc agc tat ggc tgg tat cag cag 96
Lys Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Gly Ser Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

aag tca cct ggc agt gcc cct gtc act gtg atc tat tac aac gac aag 144
Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asp Lys
35 40 45

aga ccc tcg gac atc cct tca cga ttc tcc ggt tcc aaa tcc ggc tcc 192
Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser
50 55 60

acg ggc aca tta acc atc act ggg gtc caa gcc gag gac gag gct gtc 240
Thr Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val
65 70 75 80

tat ttc tgt gag agt aca gac tac agt agt act gat ata ttt ggg gcc 288
Tyr Phe Cys Glu Ser Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Asp Ile Phe Gly Ala
85 90 95

ggg aca acc ctg acc gtc cta 309
Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100

<210> 4
<211> 103
<212> PRT
<213> chicken hybridoma cell line 6D-12

<400> 4
Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Ser Ser Gly Ser Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asp Lys
35 40 45

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Glu Ser Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Asp Ile Phe Gly Ala
85 90 95

Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100

<210> 5
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cysteine residue incorporating sequence

<400> 5
 ggcggttgcg gcggg 15

<210> 6
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> human IgG1 Fc region encoding sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(696)

<400> 6
 gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca 48
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc 96
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg 144
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg 192
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln 65 70 75 80	240
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln 85 90 95	288
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala 100 105 110	336
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gca aaa ggg cag ccc Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro 115 120 125	384
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag ctg acc Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Thr 130 135 140	432
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser 145 150 155 160	480
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 165 170 175	528
aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 180 185 190	576
agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe 195 200 205	624
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys 210 215 220	672
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aag Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 225 230	696

<210> 7
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 7
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 8
<211> 369
<212> DNA
<213> chicken hybridoma cell line 2-1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(369)

<400> 8
gcc gtg acg ttg gac gag tcc ggg ggc ggc ctc cag acg ccc gga gga 48
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

gcg ctc agc ctc gtc tgc aag gcc tcc ggg ttc acc ttc agc agc cat 96
Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

ggc atg atg tgg gtg cga cag acg ccc ggc aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Met Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcg ggt att agc aac act ggt act tac acg tac tac gcg ccg gcg gtg 192
Ala Gly Ile Ser Asn Thr Gly Thr Tyr Thr Tyr Ala Pro Ala Val
50 55 60

aag ggc cgt gcc acc atc tcg agg gac aac ggg cag agc aca gtg agg 240
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
65 70 75 80

ctg cag ctg aac aac ctc agg gct gag gac acc ggc acc tac tac tgc 288
Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc aaa ggt ggt gct tat tgt gct ggt tgt ggt ggt gac atc gac gca 336
Ala Lys Gly Gly Ala Tyr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Asp Ile Asp Ala

100 105 110

tgg ggc cac ggg acc gaa gtc atc gtc tcc tcc 369
Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 123
<212> PRT
<213> chicken hybridoma cell line 2-1

<400> 9
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Met Met Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Asn Thr Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Ala Tyr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Asp Ile Asp Ala
100 105 110

Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 324
<212> DNA
<213> chicken hybridoma cell line 2-1

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 10

gcg ctg act cag ccg tcc tcg gtg tca gca aac cca gga gaa acc gtc 48
Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

aag atc acc tgc tcc ggg ggt ggc agc tac gct gga agt tac tat tat 96
Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

ggc tgg tac cag cag aag gca cct gcc agt gcc cct gtc act gtg atc 144
Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Ala Ser Ala Pro Val Thr Val Ile
35 40 45

tat gac aac acc aac aga ccc tcg aac atc cct tca cga ttc tcc ggt 192
Tyr Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

tcc cta tcc ggc tcc aca aac aca tta acc atc act ggg gtc caa gtc 240
Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val
65 70 75 80

gag gac gag gct gtc tat tac tgt ggg agc ttc gac agc agt tat gtt 288
Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ser Phe Asp Ser Ser Tyr Val
85 90 95

ggt ata ctt ggg gcc ggg aca acc ctg acc gtc cta 324
Gly Ile Leu Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> chicken hybridoma cell line 2-1

<400> 11

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ser Phe Asp Ser Ser Tyr Val
85 90 95

Gly Ile Leu Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 12
<211> 372
<212> DNA
<213> chicken hybridoma cell line 5D11

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 12
gcc gtg acg ttg gac gag tcc ggg ggc ggc ctc cag acg ccc gga gga 48
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

gcg ctc agc ctc gtc tgc aag gcc tcc ggg ttc gac ttc agc agt tac 96
Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

gac atg att tgg gtg cga cag gcg ccc ggc aag ggg ctg gaa tac gtc 144
Asp Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

gcg ggt att aga agt gat ggt agt agc ata tac tac ggg gcg gcg gtg 192
Ala Gly Ile Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Gly Ala Ala Val
50 55 60

aag ggc cgt gcc acc atc tcg agg gac aac ggg cag agc act ctg agg 240
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Arg
65 70 75 80

ctg cag ctg aac aac ctc agg gct gag gac acc ggc acc tat tac tgc 288
Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc aaa agt tct tat ggt agt tgg aga ggt tct act ggt gac atc gac 336
Ala Lys Ser Ser Tyr Gly Ser Trp Arg Gly Ser Thr Gly Asp Ile Asp
100 105 110

gca tgg ggc cac ggg acc gaa gtc atc gtc tcc tcc 372
Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 124
<212> PRT
<213> chicken hybridoma cell line 5D11

<400> 13
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

Ala Gly Ile Arg Ser Asp Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Gly Ala Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Arg
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Ser Tyr Gly Ser Trp Arg Gly Ser Thr Gly Asp Ile Asp
100 105 110

Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 312
 <212> DNA
 <213> chicken hybridoma cell line 5D11

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(312)

<400> 14
 gcg ctg act cag ccg tcc tcg gtg tca gca aac ctg gga gaa acc gtc 48
 Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Glu Thr Val
 1 5 10 15

gaa atc acc tgc tcc ggg ggc agg tat agg tat ggc tgg tat cag cag 96
 Glu Ile Thr Cys Ser Gly Gly Arg Tyr Arg Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

aag tca tet ggc agt gcc cct gtc act gtg atc tat gac aac gac aag 144
 Lys Ser Ser Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Asp Asn Asp Lys
 35 40 45

aga ccc tcg gac atc cct tca cga ttc tcc ggt tcc aaa tcc gac tcc 192
 Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Asp Ser
 50 55 60

acg ggc aca tta acc atc act ggg gtc caa gcc gag gac gag gct gtc 240
 Thr Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val
 65 70 75 80

tat tac tgt ggg aat gca gac aac aat act tac gat cct ata ttt ggg 288
 Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Asn Asn Thr Tyr Asp Pro Ile Phe Gly
 85 90 95

gcc ggg aca acc ctg acc gtc cta 312
 Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
 100

<210> 15
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> chicken hybridoma cell line 5D11

<400> 15
 Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Glu Thr Val

1 5 10 15

Glu Ile Thr Cys Ser Gly Gly Arg Tyr Arg Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30

Lys Ser Ser Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Asp Asn Asp Lys
 35 40 45

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Asp Ser
 50 55 60

Thr Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val
 65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Asn Asn Thr Tyr Asp Pro Ile Phe Gly
 85 90 95

Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
 100

<210> 16
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> chicken hybridoma cell line 13C8

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(372)

<400> 16
 gcc gtg acg ttg gac gag tcc ggg ggc ggc ctc cag acg ccc gga gga 48
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
 1 5 10 15

ggg ctc agc ctc gtc tgc aag ggc tcc ggg ctc gac ttc agc agt tat 96
 Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Leu Asp Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gcc atg ggt tgg gtg cga cag gca ccc ggc aag ggg ctg gaa ttc gtc 144
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45

gcg ggt att aaa aaa aat gat ggt agt tgg aca aac tac gcg ccg gcg 192
 Ala Gly Ile Lys Lys Asn Asp Gly Ser Trp Thr Asn Tyr Ala Pro Ala

50	55	60														
gtg	cag	ggc	cgt	gcc	acc	atc	tcg	agg	gac	aac	ggg	caa	agc	aca	gtg	240
Val	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Gly	Gln	Ser	Thr	Val	
65					70					75					80	
agg	ctg	cag	ctg	aac	aac	ctc	agg	gct	gac	gac	acc	ggc	atc	tac	gtc	288
Arg	Leu	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Asp	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr	Val	
				85					90					95		
tgc	acc	aga	gat	gtt	aat	agt	ggg	tac	cct	gat	gct	gct	gac	atc	gac	336
Cys	Thr	Arg	Asp	Val	Asn	Ser	Gly	Tyr	Pro	Asp	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	
			100					105					110			
gca	tgg	ggc	cac	ggg	acc	gaa	gtc	atc	gtc	tcc	tcc					372
Ala	Trp	Gly	His	Gly	Thr	Glu	Val	Ile	Val	Ser	Ser					
		115					120									
<210>	17															
<211>	124															
<212>	PRT															
<213>	chicken hybridoma cell line 13C8															
<400>	17															
Ala	Val	Thr	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Thr	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Gly	Leu	Ser	Leu	Val	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val	
		35					40					45				
Ala	Gly	Ile	Lys	Lys	Asn	Asp	Gly	Ser	Trp	Thr	Asn	Tyr	Ala	Pro	Ala	
	50					55					60					
Val	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Gly	Gln	Ser	Thr	Val	
65					70					75					80	
Arg	Leu	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Asp	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr	Val	
				85					90					95		
Cys	Thr	Arg	Asp	Val	Asn	Ser	Gly	Tyr	Pro	Asp	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	

100	105	110	
Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser			
115	120		
<210>	18		
<211>	324		
<212>	DNA		
<213>	chicken hybridoma cell line 13C8		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(324)		
<400>	18		
gcg ctg act cag ccg tcc tcg gtg tca gca aac ctg gga gga acc gtc		48	
Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val			
1 5 10 15			
aag atc acc tgc tcc ggg ggc agc tat ggc tat ggc tgg ttc cag cag		96	
Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Tyr Gly Tyr Gly Trp Phe Gln Gln			
20 25 30			
aag tca cct ggc agt gcc cct gtc cct gtg atc tac tgg aac aac aag		144	
Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Trp Asn Asn Lys			
35 40 45			
aga ccc tcg gac atc cct tca cga ttc tcc ggt tcc aaa tcc ggc tcc		192	
Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser			
50 55 60			
aca gcc aca tta acc atc act ggg gtc cga gcc gag gac gag gct gtc		240	
Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Glu Asp Glu Ala Val			
65 70 75 80			
tat tac tgt ggg aat gca gac agc aat act gct gat agt gat tat gtt		288	
Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Ser Asn Thr Ala Asp Ser Asp Tyr Val			
85 90 95			
ggt ata ttt ggg gcc ggg aca acc ctg acc gtc cta		324	
Gly Ile Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu			
100 105			

<210> 19
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> chicken hybridoma cell line 13C8

<400> 19
 Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val
 1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Tyr Gly Tyr Gly Trp Phe Gln Gln
 20 25 30

Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Pro Val Ile Tyr Trp Asn Asn Lys
 35 40 45

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser
 50 55 60

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Glu Asp Glu Ala Val
 65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Ser Asn Thr Ala Asp Ser Asp Tyr Val
 85 90 95

Gly Ile Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 20
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> chicken hybridoma cell line 8C3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(375)

<400> 20
 gcc gtg acg ttg gac gag tcc ggg ggc ggc ctc cag acg ccc gga gga 48
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
 1 5 10 15

ggg ctc agc ctc gtc tgc aag gcc tcc ggg ttc tct atc ggc ggt tac 96
 Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30

atc atg cac tgg gtg cgc cag acg cct gga aag ggg ctg gaa tac gtt 144
Ile Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

gca ggt att gat gct ggt ggt ggt agc aca tac tac ggg gcg gcg gtg 192
Ala Gly Ile Asp Ala Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Ala Ala Val
50 55 60

cag ggc cgt gcc acc gtc tcg agg gac aac ggg cag agc aca ctg agg 240
Gln Gly Arg Ala Thr Val Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Arg
65 70 75 80

ctg cag ctg aac aac ctc agg ctg gag gac acc ggc acc tac ttc tgc 288
Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Leu Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

gcc aaa gct tct cgg tgt ggc tat gat tgg tgt tct gct gat aac atc 336
Ala Lys Ala Ser Arg Cys Gly Tyr Asp Trp Cys Ser Ala Asp Asn Ile
100 105 110

gac gca tgg ggc cac ggg acc gaa gtc atc gtc tcc tcc 375
Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21
<211> 125
<212> PRT
<213> chicken hybridoma cell line 8C3

<400> 21
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Gly Gly Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

Ala Gly Ile Asp Ala Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Ala Ala Val
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Val Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Arg
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Leu Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Ser Arg Cys Gly Tyr Asp Trp Cys Ser Ala Asp Asn Ile
100 105 110

Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 22
<211> 315
<212> DNA
<213> chicken hybridoma cell line 8C3

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(315)

<400> 22
gcg ctg act caa ccg tcc tcg gtg tca gcg atc ccg gga gaa acc gtc 48
Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ile Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

gag atc acc tgc tcc ggg ggt aac aac tac tat ggc tgg tat cag cag 96
Glu Ile Thr Cys Ser Gly Gly Asn Asn Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

aaa tca cct ggc agt gcc cct gtc act gtg atc tac tac aac aac aag 144
Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys
35 40 45

aga ccc tcg gac atc cct tca cga ttc tcc ggt tcc aaa ccc ggc tcc 192
Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Pro Gly Ser
50 55 60

aca aac aca tta acc atc act ggg gtc cga gcc gag gac gag gct gtc 240
Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Glu Asp Glu Ala Val
65 70 75 80

tat ttc tgt ggt gcc tgg gaa agt agt cct att tat gtt ggt ata ttt 288
Tyr Phe Cys Gly Ala Trp Glu Ser Ser Pro Ile Tyr Val Gly Ile Phe

85

90

95

ggg gcc ggg aca acc ctg acc gtc cta
Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

315

<210> 23
<211> 105
<212> PRT
<213> chicken hybridoma cell line 8C3

<400> 23
Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ile Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Glu Ile Thr Cys Ser Gly Gly Asn Asn Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys
35 40 45

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Pro Gly Ser
50 55 60

Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Glu Asp Glu Ala Val
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Gly Ala Trp Glu Ser Ser Pro Ile Tyr Val Gly Ile Phe
85 90 95

Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105