



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0142248
(43) 공개일자 2015년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0070695
(22) 출원일자 2014년06월11일
심사청구일자 2014년06월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김영완
서울특별시 송파구 백제고분로22길 19-27 (삼전동) 301호
백세환
서울특별시 광진구 아차산로 552 극동아파트 10동 503호
장준혁
경기도 화성시 동탄반석로 277 예당마을우미린제 일풍경채아파트 115동 3201호
(74) 대리인
특허법인 플러스

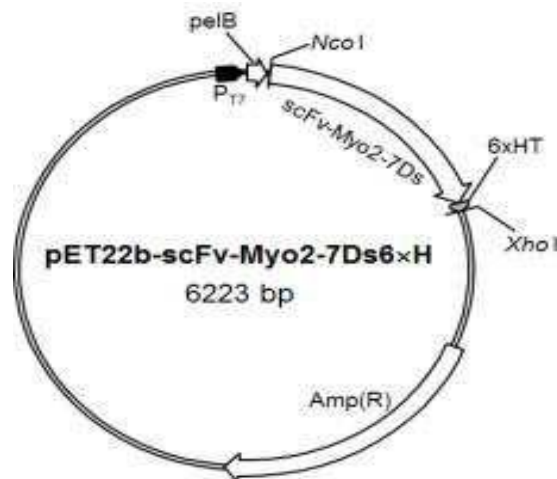
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 단일클론항체 단쇄가변분절 유전자 및 이를 발현한 재조합단백질

(57) 요약

본 발명은 마이오글로빈의 농도 변화를 인식할 수 있는 단일클론항체 단쇄가변분절(single-chain variable fragment)에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 가지는 재조합항체 scFv의 유전자 및 이의 발현에 관한 것이며, 재조합항체 scFv는 가역반응성을 특징으로하는 항체로서 심근경색 발병의 초기 바이오마커(biomarker)인 마이오글로빈(myoglobin) 농도 변화를 인식하여 연속진단 방법에 활용할 수 있는 가능성을 제시한다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013K000249
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신기술융합형성장동력사업
연구과제명 연속 나노진단 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2009.09.01 ~ 2014.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 18을 포함하고 마이오글로빈에 결합하는 scFv 형태의 재조합항체.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 재조합항체의 V_L 는 서열번호 19를 포함하고,

상기 재조합항체의 V_H 는 서열번호 20을 포함하는 것인 재조합항체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 재조합항체가 가역반응성을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합항체.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 가역반응성은 마이오글로빈 농도에 의한 것인 재조합항체.

청구항 5

제 1항 내지 4항에서 선택되는 어느 한 항의 재조합항체 또는 상기 재조합항체가 담체에 고정화된 재조합항체를 이용한 마이오글로빈 농도 변화의 연속진단 방법.

청구항 6

제 1항 내지 4항에서 선택되는 어느 한 항의 재조합항체를 코딩하는 유전자.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 15를 포함하는 유전자

청구항 8

제 7항에 따른 상기 유전자를 포함하는 재조합벡터.

청구항 9

제 7항에 따른 상기 벡터로 형질전환된 대장균.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 마이오글로빈의 농도 변화를 인식할 수 있는 단일클론항체 단쇄가변분절(single-chain variable fragment, 이하 'scFv')의 개발에 관한 것으로, 구체적으로 심근경색 발병의 초기 바이오마커인 마이오글로빈(myoglobin)의 농도 변화를 인식할 수 있는 인체 유래 마이오글로빈 특이 scFv 유전자 및 이를 발현한 재조합항체에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

급성 질병 중 급성 심근경색(Acute myocardial infarction, 이하 'AMI')은 전 세계적으로 사망률이 높은 질병 중 하나이다. AMI는 심근 허혈이나 심장으로의 혈류량 감소 등으로 발생하는 질병으로 심장세포의 정상적인 기능과 항상성을 유지하기 위한 회복작이 정상적으로 일어나지 않게 하고, 장시간 한계치를 벗어난 허혈은 심장

세포의 영구적인 손상이나 죽음을 초래하게 하므로 조기 진단이 필요하다(Boersma et al, 2003, *Lancet*. 361: 847-58).

[0003] 지금까지 AMI를 진단하기 위한 바이오마커(biomarker)는 creatine kinase-MB isoform (CK-MB) (Blomberg et al, 1975, *Am. J. Med.* 59: 464-69), (Ishikawa et al, 1997, *Clin. Chem.* 43: 467-75), cardiac troponin-I (cTnI) (Antman et al, 1996, *N. Engl. J. Med.* 335: 1342-9), heart type fatty acid binding protein (HFABP) (Glatz et al, 1998, *Biochim. Biophys. Acta.* 961: 148-52), (Kakoti et al, 2013, *Biosens. Bioelectron.* 43: 400-11), glycogenphosphorylase BB (Krause et al, 1996, *Mol. Cell Biochem.* 160-161: 289-295), 그리고 마이오글로빈(Hayes et al, 2009, *Analyst.* 134: 533-41) 5 가지가 확인되었다. 5 가지의 바이오마커 중 마이오글로빈은 AMI 발병 후 1시간 이내에 혈청에서 농도가 증가되는 바이오마커이기 때문에 AMI의 조기 진단을 위한 적절한 바이오마커로 인식되고 있다(Bruins et al, 2013, *Int J. Cardiol.* 168:5355-62).

[0004] 급성 심근경색을 진단하고 재발을 방지하기 위해서는 질병의 바이오마커에 대한 조기 검출과 지속적인 모니터링이 요구되고, 바이오마커의 검출 및 모니터링을 위한 의학용 진단 도구들은 대부분 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트나 면역센서와 같은 항체를 이용한 면역학적 측정에 기반을 두고 있다. 면역학적 측정은 인체의 혈청 내에서 해당 질병의 바이오마커를 인식할 수 있으나 대부분의 항체는 항체-항원 복합체를 형성하여 매우 느린 탈착 반응속도를 보여주기 때문에 농도 변동에 대한 연속적인 모니터링을 목적으로 용이하게 사용할 수 없는 문제점이 있다(Peak et al, 1997, *Biotechnol. Bioeng.* 56:221-31).

[0005] 최근에는 항원과의 부착 반응뿐만 아니라 탈착 반응 또한 신속하게 이루어지는 항체들이 면역화 초기 과정에서 개발되었다. 이러한 성질을 가진 항체들은 ‘가역반응성 항체’라고 명명되고 높은 부착반응속도(k_{on}) 및 탈착반응속도(k_{off})를 가지는 것을 특징으로 한다. 이러한 특징을 가진 가역반응성 항체는 항원의 농도 변화에 따라 항체-항원 반응의 정도가 달라져 면역 센서의 재활용 및 분석물질의 농도 변화에 대한 연속 모니터링을 용이하게 할 수 있는 가능성을 지니고 있다(Cho et al, 2011, *Analyst.* 136: 1374-9), (Peak et al, 2011, *Analyst.* 136: 4268-76), (Peak et al, 2013, *Biosens. Bioelectron.* 40: 38-44).

[0006] 가역반응성 항체 중 IgG 형태의 Anti-human 마이오글로빈 단일클론항체를 개발하여 마이오글로빈을 항원으로 모니터링 할 수 있는 미세유체소자 비표지 센서에 적용되었다(Kim et al, 2012, *Anal. Biochem.* 420: 54-60). 그러나, IgG 형태의 항체 생산을 위해 사용하는 하이브리도마(hybridoma) 기술은 수 차례 계대 배양이 요구되고, 장시간의 배양 기간의 필요성 및 생산 비용이 고가인 단점이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Peak et al, 1997, *Biotechnol. Bioeng.* 56:221-31
(비특허문헌 0002) Kim et al, 2012, *Anal. Biochem.* 420: 54-60

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 IgG 형태의 Anti-human 마이오글로빈 단일클론 항체 생산의 문제점을 해결한 scFv 형태의 재조합항체 유전자를 제작하고, 이를 발현시키는 것을 목적으로 한다. 또한 scFv 형태의 재조합항체의 가역반응성 특징을 이용한 AMI의 연속진단 방법의 실현을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명에서는 상기 목적을 달성하기 위하여 마이오글로빈과 결합하는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 scFv 형태의 재조합항체를 제공한다.

[0010] 본 발명의 scFv 재조합항체는 마이오글로빈 농도에 따른 가역반응성을 특징으로 하는 가역반응성 항체로서 질병의 연속진단에 적합한 항체로 제공된다.

[0011] 본 발명은 scFv 재조합항체를 발현하기 위해 상기 scFv 재조합항체를 코딩하는 유전자를 제공한다. 상기 유전자

제공을 위해 하이브리도마 세포의 염기서열 분석 및 PCR을 통해 유전자 클로닝을 수행한다.

[0012] 본 발명은 scFv 재조합항체를 코딩하는 유전자를 발현시키기 위해 상기 유전자를 포함한 발현 벡터를 제작하고, 상기 발현 벡터로 형질전환된 대장균을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 scFv 형태의 재조합항체는 마이오글로빈의 농도에 따라 가역반응성을 가지는 가역반응성 항체로서, AMI의 바이오마커인 마이오글로빈의 농도 변화를 감지하여 상기 AMI의 연속진단에 이용할 수 있다.

[0014] 또한 본 발명의 상기 scFv 재조합항체가 가지는 특징인 가역반응성은 용이한 재생화 과정을 통해 연속진단이 가능할 수 있어, 비용 절감 및 생산 시간이 단축되며, 항체의 아미노산 구조와 가역반응성과의 상관관계에 대한 용이한 분석에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 하이브리도마 Myo2-7Ds 세포를 이용해 합성한 cDNA의 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 scFv-Myo2-7Ds 유전자를 함유한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 His-tag 또는 His-tag 및 protein A가 융합된 재조합항체 scFv의 발현시스템을 나타낸 것이다. (A)는 His-tag가 융합된 재조합항체 scFv의 발현시스템이고, (B)는 His-tag 및 protein A가 융합된 재조합항체 scFv의 발현시스템이다.

도 4는 재조합 벡터 pET22b-scFv-Myo2-7Ds6×H의 개열지도를 나타낸 것이다.

도 5는 scFv-Myo2-7Ds6×H-ProA 유전자를 포함한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 재조합 벡터 pscFv-Myo2-7Ds6×H-ProA의 개열지도를 나타낸 것이다.

도 7는 대장균에서 생산된 재조합항체 scFv-Myo2-7Ds를 정제한 후 SDS-PAGE 및 western blot을 한 결과를 나타낸 것이다. (A)는 SDS-PAGE의 결과이고, (B)는 western blot의 결과이다.

도 8는 고정화된 마이오글로빈 항원에 대한 재조합항체 scFv-Myo2-7Ds 및 단일클론항체 IgG-Myo2-7Ds의 ELISA 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 재조합항체 scFv-Myo2-7Ds 및 단일클론항체 IgG-Myo2-7Ds와 마이오글로빈 항원의 부착 및 탈착을 통한 반응 동역학 측정 결과를 나타낸 것이다. (A)는 scFv-Myo2-7Ds의 동역학 측정 결과이고, (B)는 IgG-Myo2-7Ds의 동역학 측정 결과이다.

도 10은 재조합항체 scFv-Myo2-7Ds 및 단일클론항체 IgG-Myo2-7Ds의 반복적인 부착 및 탈착 반응을 나타내고 이를 통한 반응 동역학 측정 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명인 마이오글로빈의 농도변화를 인지하는 재조합항체 scFv에 대하여 더욱 자세하게 설명한다.

[0017] 본 발명에 기재되는 용어 중 정의되지 않는 용어는 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 사용하는 의미로 이해된다.

[0018] 본 발명에서 '가역반응성'은 부착속도만 빠르고 탈착속도는 느린 일반 항체와는 달리 빠른 부착속도와 탈착속도를 동시에 가짐으로써 항체와 항원간의 부착 반응뿐만 아니라 탈착 반응 또한 신속하게 이루어지는 성질을 의미한다.

[0019] 본 발명에서 '가역반응성 항체'는 상기 가역반응성을 가지는 항체를 의미한다.

[0020] 가역반응성 항체는 부착반응속도(k_{on}) 및 탈착반응속도(k_{off})를 가지는 항체로서, 구체적으로 $k_{on} > 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 이고, $k_{off} > 10^{-3} s^{-1}$ 인 부착 및 탈착 반응속도상수를 가지진다. 상기 가역반응성 항체가 상기와 같은 특징을 가지는 이유는 빠른 부착 및 탈착 속도로 인해 항원의 농도 변화에 따른 항원-항체 복합체 형성 반응의 평형이 빠르게 이동될 수 있기 때문이다. 상기의 이유로 인해 항원이 존재하는 조건에서는 항원-항체 복합체를 형성하는 반응이 이루어지나, 항원이 없는 세척액에 의하여 항원이 쉽게 떨어져 나가는 특징을 보이게 된다. 따라서, 가역반응성

항체를 이용하는 경우 항원을 항체로부터 탈착시키기 위한 세척액을 소량만 사용하여도 항체의 재생화가 이루어지며, 시료를 연속적으로 흘려주어 항원의 농도 변화에 따라 항원-항체의 복합체 형성의 반응 정도를 변화시킬 수 있다.

[0021] 본 발명인 재조합항체 scFv는 마이오글로빈을 항원으로 인식하여 결합하는 항체로서, V_H 및 V_L 을 포함하고 이들을 연결하는 linker로 구성되어 있다. 구체적으로, 서열번호 18는 상기 scFv의 전체 아미노산 서열을 나타내고, 서열번호 19는 상기 V_L 의 아미노산 서열을 나타내며 서열번호 20은 상기 V_H 의 아미노산 서열을 나타낸다. 상기 서열번호 18의 119에서 134까지의 서열인 GGGSGGGSGGGGS는 V_H 와 V_L 을 이어주는 linker의 아미노산 서열을 나타내며, 상기 linker는 임의의 아미노산 서열로 구성될 수 있고, 상기 서열번호 18과 같이 특정 위치에 한정되는 것은 아니다. 상기 V_H 및 V_L 의 DNA 염기서열은 Mouse유래 V_H 및 V_L 의 도메인과 매우 높은 상동성(Homology)을 보여준다. 하기의 표 1은 서열번호 18의 아미노산 서열과 동일하며, 구체적으로 scFv 재조합항체의 아미노산 서열의 각 부분의 특징을 나타낸다. 보다 구체적으로 하기의 표 1은 V_H , V_L 및 linker의 아미노산 뿐만 아니라, CDR(complementarity determining region)부분도 나타내고 있다.

[0022] [표 1]

```

      CDR2- $V_H$ 
KWMGWINTETGEPTYADDF TGRFAFSLVTSASTAYLQITNLKNE
      CDR3- $V_H$  (GGGGS)×3 linker
TATYFCARRFTTTTWFAYWGQGLTVTVSAGGGSGGGSGGGSG
      CDR1- $V_L$ 
VLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIVHSSGNTYLEWYLQKPG
      CDR2- $V_L$ 
QSPRFLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDLGVY
      CDR3- $V_L$ 
YCFQGSHPYTFEGGGTKLEIK
    
```

[0023]

[0024] 본 발명인 재조합항체 scFv는 가역반응성을 가지는 것을 특징으로 하는 항체로서, 상기 가역반응성은 마이오글로빈의 농도변화에 따라 나타난다.

[0025] 본 발명인 재조합항체 scFv는 가역반응성 항체로서 면역학적 측정에 기반을 둔 질병의 연속진단에 활용될 가능성을 제시한다. 구체적으로, 상기 scFv가 가지는 가역반응성 특징에 의한 면역 센서의 재활용뿐만 아니라 분석하고자 하는 물질의 농도 변화에 대한 연속 모니터링을 용이하게 할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 scFv는 AMI 발생시 초기 바이오마커인 마이오글로빈을 항원으로 하므로, 마이오글로빈과 항원-항체 복합체를 형성하여 AMI의 조기 진단이 가능하고 마이오글로빈의 농도 감소에 따라 탈착되어 마이오글로빈의 농도 변화에 따른 연속진단이 가능하게 할 수 있다.

[0026] 본 발명인 재조합항체 scFv를 코딩하는 유전자는 서열번호 15를 포함하는 유전자로서, 하이브리도마 세포로부터 합성된 complementary DNA를 통해 제작된다. 상기 유전자 염기서열의 분석결과는 단일클론항체 IgG의 V_H 및 V_L 유전자의 염기서열과 매우 높은 상동성을 보여준다.

[0027] 본 발명인 재조합항체 scFv를 코딩하는 유전자를 발현시키기 위해서 상기 유전자를 포함하는 재조합벡터 및 상기 벡터가 형질전환된 대장균이 이용된다. 구체적으로, 상기 벡터는 상기 유전자를 제작한 후 제한효소 처리에 의해 발현벡터에 결합되어 대장균에 형질전환되어 회수된다. 회수된 상기 벡터는 대장균에 형질전환되고 상기 벡터로 형질전환된 균주의 선별 및 배양에 의하여 본 발명인 상기 재조합항체 scFv가 생산된다.

[0028] 본 발명의 실시를 위해 하기의 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명하며, 하기의 실시예는 본 발명을 실시하기 위한 예시이므로 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] <실시예 1> Myo2-7 Ds 하이브리도마 세포를 이용한 scFv-Myo2-7Ds6 × H 항체 가변부위의 염기서열 분석

[0030] 2주 간격으로 2차례에 걸쳐 50 μ l씩 면역원을 주입하여 면역화시킨 Mouse로부터 얻어낸 지라세포(splenocyte)와 골수종 암세포(myeloma)를 융합하여 만든 하이브리도마 Myo2-7Ds 세포(Kim et al, 2012, *Anal. Biochem.* 420: 54-60)로부터 트라이졸(Trizol) 시약 (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 이용하여 분리해 낸 Total RNA를

template로서 이용하여 complementary DNA(이하 'cDNA')를 합성하였다. 상기 반응은 Generacer kit(Invitrogen)를 이용하여 실시되었다. Heavy chain 및 light chain의 가변부위를 포함하는 DNA 절편을 증폭하기 위한 정방향 프라이머로는 cDNA 합성시 사용된 정방향 generacer 프라이머 (서열번호 1, Generacer kit 제공)을 사용하였다. 상기 cDNA 를 통해 Heavy chain의 가변부위를 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위해서, Immunogenetics (IMGT.org) database에서 얻어진 Mouse 유래 IgG 항체 (V00818, J00475, V00786, X01857, J00453, V00825, V00763, J00479, X00915)의 heavy chain의 아미노산 서열을 분석하여 아미노산서열 상동성에 따라 5개의 그룹으로 나누고 각 그룹에 속하는 항체의 불변부위에 보존되어 있는 아미노산 서열 (Group 1, ESQSFPNVF; group 2, ESARNPTIY; group 3, GDKKEPDMF; group 4, ASIRNPQLY; group 5, AKTTPPSVY) 을 참조하여 해당 아미노산 서열을 암호화 하는 degenerate 프라이머인 역방향 프라이머를 각각 제작하였다 (서열번호 2-6). 상기 cDNA 를 통해 Light chain의 가변부위를 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위해서 Mouse IgG kappa, lambda light chain 불변부위에 보존되어 있는 아미노산 서열을 참조하여 degenerate 프라이머인, 역방향 CL-kappa 및 lambda-Rv 프라이머를 제작하였다 (서열번호 7, 8). 상기 제작된 프라이머들은 하기 표 2와 같다.

[표 2]

	서열	서열번호
정방향 generacer 프라이머	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'	1
역방향 프라이머 CH-Gp1-Rv	5'-GAAGACATTTGGGAAGGACTGACTCTC-3	2
역방향 프라이머 CH-Gp2-Rv	5'-GTAGATGGTGGGATTTCTCGCAGACTC-3'	3
역방향 프라이머 CH-Gp3-Rv	5'-GAACATATCAGGTTCTTCTTATCACC-3'	4
역방향 프라이머 CH-Gp4-Rv	5'-GTAGAGCTGAGGGTTCCTGATAGAGGC-3'	5
역방향 프라이머 CH-Gp5-Rv	5'-ATAGACNGATGGGGSTGTGTYGTTKTRGC-3'	6
역방향 프라이머 CL-kappa-Rv	5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGCATCAGC-3'	7
역방향 프라이머 CL-lambda-Rv	5'-GASWGWKGGMGWRGACTTGGGCTGRCC-3'	8

상기 합성된 cDNA 0.5 μ l에 대해 상기 정방향 generacer 프라이머 10 pmole/2.5 μ l와 상기 표 2와 같이 제작된 각 역방향 프라이머 10 pmole/2.5 μ l를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하였다. 상기 PCR산물의 전기영동 결과를 도1에 나타내었다. 레인 1은 서열번호 1과 2의 조합으로 증폭한 결과이며, 레인 2는 서열번호 1과 3의 조합, 레인 3은 서열번호 1과 4의 조합, 레인 4는 서열번호 1과 5의 조합, 레인5는 서열번호 1과 6의 조합, 레인 6은 서열번호 1과 7의 조합, 레인 7은 서열번호 1과 8의 조합을 각각 나타낸다. 상기 Heavy chain의 가변부위는 역방향 프라이머 CH-Gp5-Rv를 이용한 반응에서, 상기 Light chain의 가변부위는 역방향 프라이머 CL-kappa-Rv를 이용한 반응에서 각각 성공적으로 약 500 bp의 PCR 산물이 증폭되었음을 확인하였다(도 1). 상기 PCR 조건은 하기 표 3에 기재된 바와 같다.

[표 3]

단계 (STEP)	온도	반응시간
first denaturation	95℃	5 min
Second denaturation	95℃	1 min
Annealing	55℃	2 min
Extension	72℃	1 min
Cycle	Go to deneturation	30 cycles
Final extension	72℃	7 min

상기 PCR 산물은 회수를 진행한 뒤 PCR2.1 Top10 벡터(Invitrogen)에 클로닝되었으며 이어 숙주세포인 E.coli Top10(Invitrogen)에 형질전환을 실시하였다. 확보된 형질전환체를 이용하여 PCR 산물이 삽입된 재조합 플라스미드를 회수하였으며 IMGT database를 참조하여 DNA 염기서열 분석을 실시한 결과 각 PCR 산물이 Mouse 유래

V_H , V_L 도메인과 매우 높은 Homology를 보여주었다.

<실시예 2> 염기서열 분석 데이터를 이용한 scFv-Myo2-7Ds 유전자의 제작 및 클로닝

상기 V_H 와 V_L 유전자 단편의 염기서열 분석 데이터를 참조하여 scFv-Myo2-7Ds 재조합항체의 제조하기 위한 프라이머를 제작하였다. 먼저, 상기 V_H 유전자 단편을 증폭하기 위해 정방향 프라이머 scFv-Mb2-7H-Nc-fw(서열번호 9)와 역방향 프라이머 scFv-Mb2-7H-link-rev(서열번호 10)를 제작하였다. 다음으로 상기 V_L 유전자 단편을 증폭하기 위해 정방향 프라이머 scFv-Mb2-7L-link-fw(서열번호 11)와 역방향 프라이머 scFv-Mb2-7L-Xh-rev(서열번호 12)를 제작하였다. 상기 각각의 가변부위 유전자 단편 증폭을 위해 제조된 프라이머는 하기 표 4와 같다.

[표 4]

	서열	서열번호
정방향 프라이머 scFv-Mb2-7H-Nc-fw	5'-AGTACCATGGCCCAGATCCAGTTGGTGCAG-3'	9
역방향 프라이머 scFv-Mb2-7H-link-rev	5'- GCCACCTGAACCGCCACCACCGCTACCGCCACCGCCGA TGTTTTGATGACCCAACTCCA-3'	10
정방향 프라이머 scFv-Mb2-7L-link-fw	5'- GGTAGCGGTGGTGGCGGTTTCAGGTGGCGGCGGTAGCG ATGTTTTGATGACCCAACTCCA-3'	11
역방향 프라이머 scFv-Mb2-7L-Xh-rev	5'-AGCATCCTCGAGTTTTATTTCAG -3	12

실시예 1의 상기 cDNA에 대해 표 4의 scFv-Mb2-7H-Nc-fw를 정방향 프라이머로, 표 4의 scFv-Mb2-7H-link-rev를 역방향 프라이머로 이용하였고, 상기 표 3에 따라 PCR반응을 수행하여 PCR 산물(V_H -Linker)을 얻었다. 마찬가지로 실시예 1의 상기 cDNA에 대해 표 4의 scFv-Mb2-7L-link-fw를 정방향 프라이머로, 표 4의 scFv-Mb2-7L-Xh-rev를 역방향 프라이머로 이용하여 상기 표 3에 따라 PCR 반응을 수행하여 PCR 산물(Linker- V_L)을 얻었다. 상기 얻어진 두 PCR 산물 V_H -Linker와 Linker- V_L 를 섞고 프라이머 없이 상기 표 3에 따라 7 cycle의 PCR 반응을 수행하여 두 PCR 산물을 조립하였다. 이 후 하나로 조립된 완전한 크기의 유전자 단편을 증폭하기 위해 반응액에 정방향 프라이머 scFv-Mb2-7H-Nc-fw와 역방향 프라이머 scFv-Mb2-7L-Xh-rev를 넣어주었다. 이 후 표 3에 따라 23 cycle의 PCR 반응을 진행하여 본 발명이 제공하는 Anti-human 마이오글로빈 단일클론 항체의 가변부위만을 암호화하는 scFv 유전자를 함유한 PCR 산물을 획득하였다. 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 약 700 bp임을 확인하였다(서열번호 16). 상기 scFv 유전자의 DNA 단편을 NcoI과 XhoI으로 절단한 후, 이를 동일한 제한효소로 처리한 pET-22b(+) 발현 벡터(Novagen)와 라이게이션한 뒤 E.coli Top10에 형질전환하여 재조합 벡터 pET22b-scFv-Myo2-7Ds6×H를 회수하였다. 전기영동 결과는 도 2에 나타내었으며, 재조합 scFv의 발현시스템은 도 3-(A)에 나타내었고, 상기 pET22b-scFv-Myo2-7Ds6×H의 벡터의 개열지도는 도 4에 나타내었다.

<실시예 3> 정제과정 개선을 위해 protein A 태그가 융합된 scFv-Myo2-7Ds 유전자의 제작 및 클로닝

정제 과정을 개선하기 위해 protein A 태그가 융합된 scFv-Myo-27Ds의 유전자(도 3-(B))를 제작한다. 상기 protein A 태그가 융합된 유전자 제작을 위해 정방향 프라이머 MbScFv-Nh-Fw(서열번호 13)와 역방향 프라이머 MbScFv-Nc-Rv(서열번호 14)를 제조하였다. 상기 프라이머는 하기 표 5와 같다.

[표 5]

	서열	서열번호
정방향 프라이머 MbScFv-Nh-Fw	5'-CAGCCAGCCGCTAGCCAGATCCAGTTG-3'	13
역방향 프라이머 MbScFv-Nc-Rv	5'-GTTAGCAGCCGGATCTCCATGGTGGTG-3'	14

상기 실시예 1의 pET22b-scFv-Myo2-7Ds6×HT에 대해 상기 정방향 프라이머 MbScFv-Nh-Fw와 역방향 프라이머 MbScFv-Nc-Rv를 이용하여 상기 표 3에 따라 PCR 반응을 실시하였다. 상기 PCR 수행을 통해 상기 scFv-Myo2-7Ds를 암호화하는 유전자를 포함하는 PCR 산물을 획득하였으며, 전기영동을 통하여 상기 PCR 산물의 크기가 약 700 bp임을 확인하였고 결과는 도 5에 나타내었다. 상기 PCR 산물은 NheI과 NcoI으로 절단한 뒤 동일한 제한효소로 처리한 plg20m-sc1 벡터(Brigido et al, 1993, *J. Immunol.* 150: 469-79)에 라이게이션 하였으며 E.coli Top10

에 형질전환을 실시하였다.

[0047] 상기 확보된 형질전환체로부터 재조합 벡터를 회수하였으며 DNA 염기서열 분석을 실시하여 PCR error가 없는 clone을 선별하고 이를 pscFv-Myo2-7Ds6×H-ProA로 명명하였다. 상기 pscFv-Myo2-7Ds6×H-ProA 벡터는 상기 scFv-Myo2-7Ds 유전자의 C-말단 부위에 6개의 Histidine 잔기와 Protein A의 유전자가 순차적으로 위치하도록 제작(서열번호 17)되었으며 상기 벡터의 개열지도도 도 6에 나타내었다.

[0048] <실시예 4> scFv-Myo2-7Ds6 항체의 생산과 정제

[0049] 4-1: 재조합항체의 생산

[0050] 상기 제조한 재조합 벡터 pscFv-Myo2-7Ds6×H-ProA를 E.coli BL21(DE3)(Novagen)에 형질전환시킨 후 암피실린 내성여부를 확인하여 상기 벡터가 형질전환된 균주를 선별하였다. 선별한 형질전환체는 암피실린 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 0.2% glycerol이 함유된 LB 액체 배지 3 L에 접종하고 37℃에서 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 최종농도 0.2 mM로 첨가하여 30℃에서 15 시간 배양하였다.

[0051] 4-2: 재조합항체의 정제

[0052] 상기에서 실시예 4-1에서 배양한 E.coli를 4℃에서 8000×g의 조건으로 20 분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 상기 회수된 균체를 TST 완충용액 (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20)으로 현탁한 뒤, 상기 현탁한 균체를 초음파 분쇄하였으며, 10,000 ×g, 4℃의 조건으로 20 분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 회수한 세포 파쇄액은 정제를 위해 IgG sepharose 6 fast flow resin(GE healthcare, Uppsala, Sweden) 충전 컬럼에 주입하고 10 배 볼륨의 TST 완충용액을 흘려 주어 washing 해주었다. 재조합 scFv-Myo2-7Ds6×H-ProA 항체는 0.5 M acetate 완충용액 (pH 3.4)을 이용하여 용리시켜 주었으며, 바로 1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 9.1)을 이용하여 중화시켜주었다. 상기 용리 분획은 Amicon Ultra-4 filter unit(Millipore, Temecula, USA)을 이용하여 농축을 실시한 뒤 phosphate buffered saline (PBS) 완충용액으로 투석을 해주었다. ProA 태그의 Autocleavage를 유도하기 위해 상기 scFv-Myo2-7Ds6×H-ProA 항체를 4℃에서 1 일주일 동안 보관한 뒤, Sephadex HR-200 컬럼(GE healthcare)을 이용한 크기배제크로마토그래피(GPC)를 이용하여 30 kDa 크기의 scFv-Myo2-7Ds6×H 항체를 분리, 확보하였으며 농축 후 PBS 완충용액으로 투석을 실시하여 정제를 완료하였다.

[0053] 재조합 벡터 pscFv-Myo2-7Ds6×H-ProA로 형질전환시킨 E.coli BL21(DE3)에서 생산한 scFv-Myo2-7Ds의 정제단계별 시료의 전기영동의 결과를 도 7에 나타내었다. 상기 도 7의 SM은 size marker이고, 레인 1은 형질전환체를 초음파 분쇄하여 수득한 세포 파쇄액이고, 레인 2는 IgG 친화 크로마토그래피로(affinity chromatography) 정제한 후 수득한 정제 농축액, 레인 3은 상기의 Autocleavage 후 수득한 상등액, 레인 4는 크기 배제 크로마토그래피(Size-Exclusion Chromatography) 후 수득한 scFv-Myo2-7Ds 재조합항체이다. 도 7에 나타난 바와 같이, 상기 재조합항체는 IgG 친화 크로마토그래피와 Autocleavage 유도 및 크기배제크로마토그래피 과정을 통하여 효율적으로 정제된 것을 확인할 수 있었으며, SDS-PAGE상에서 상기 scFv-Myo2-7Ds의 크기는 약 30 kDa의 분자량을 나타내어 scFv-Myo2-7Ds의 아미노산 서열(서열번호 18)로부터 유추할 수 있는 분자량과 유사한 값을 나타내었다.

[0054] <실시예 5> Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 이용한 재조합항체의 친화도 측정

[0055] 본 발명의 scFv-Myo2-7Ds 재조합항체의 마이오글로빈 항원에 대한 친화도를 측정하고 IgG-Myo2-7Ds 단일클론 항체의 친화도와 비교하기 위해 EIA/RIA (immunoassay/radioimmunoassay) 8-well strip(Corning, New York, US A)에 0.1 μg 의 휴먼 마이오글로빈 항원을 각각 고정화시켜준 뒤 1% BSA(bovin serum albumin)/PBS(Phosphate based saline) 완충용액(pH 7.4) 200 μL 를 이용하여 37℃에서 1시간동안 blocking을 실시하였다. 상기 항원이 고정화된 well은 그 후 0.1% Tween 20이 함유된 1% BSA/PBST 완충용액을 이용하여 5차례 위상(washing)을 실시하였고 상기 실시예 4-2에 따라 얻어진 scFv-Myo2-7Ds 재조합항체와 IgG-Myo2-7Ds 단일클론항체를 정해진 농도로 희석하여 상기 well에 분주하고 37℃에서 1시간동안 항원-항체간 반응을 유도하였다. 항원과 반응한 항체의 양을 측정하기 위해 1:500의 비율로 희석된 Anti-Histag Mouse 1차 항체와 1:2500의 비율로 희석된 HRP(horseradish peroxidase) conjugated Anti-Mouse Goat IgG 2차 항체(Promega, Madison, USA)를 차례대로 이용하여 37℃에서 1시간 동안 반응을 실시하였다. 이 후 상기 well에 TMB(tetramethylbenzidine) 기질을 200 μL 씩 분주하여 상온에서 15 분간 발색을 유도한 뒤 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0056] ELISA를 통하여 측정된 scFv-Myo2-7Ds 재조합항체와 IgG-Myo2-7Ds 단일클론 항체의 친화도를 도 8에 그래프로 나타내었으며, scFv-Myo2-7Ds 항체가 IgG-Myo2-7Ds 항체에 비교하여 유사한 친화도를 유지하고 있음을 확인할

수 있었다.

[0057] <실시예 6> 반응동역학 분석을 통한 가역반응성 확인

[0058] 상기 실시예 4-2에 따라 얻어진 scFv-Myo2-7Ds 재조합항체의 부착반응과 탈착반응에 대한 반응 동역학을 측정하기 위해 비표지 센서 시스템인 Octet red 기기(ForteBio, MenloPa가, USA)를 이용하였다. 먼저 PBS 완충용액을 이용하여 마이오글로빈 항원을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석해준 다음 30℃에서 15 분간 Aminopropylsilane disposal 센서 팁(ForteBio)의 표면에 고정화 시켜주었으며 항원이 고정화되지 않은 여분의 센서 팁 표면은 0.5% Casein 이 함유된 PBS 완충용액을 이용하여 Blocking 시켜주었다. 마이오글로빈이 고정화된 센서 팁은 부착 반응을 위해 0.5% Casein-PBS 완충용액을 이용하여 희석한 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 용액 속에 넣어져 반응이 유도되었으며 그 후 0.5% Casein이 함유된 PBS 완충용액 속으로 다시 되돌아가 탈착 반응이 유도되었다.

[0059] Octet red를 이용한 scFv-Myo2-7Ds 재조합항체의 반응동역학 측정 결과를 도 9에 나타내었다. 상기 도 9의 결과로부터 항원이 고정화된 팁의 항체 용액에서는 항원-항체 반응에 의해 신호가 증가하였으며, 항체가 없는 0.5% Casein-PBS 완충용액으로 이동하면 항체가 항원에서 떨어지면서 신호가 급격하게 감소하는 가역반응성을 보임을 확인하였다.

[0060] 상기 scFv-Myo2-7Ds의 가역반응성 측정 결과를 통해 scFv-Myo2-7Ds도 IgG-Myo2-7Ds와 같은 가역반응성 특징을 가지는 것을 확인할 수 있다. 하기의 표 6은IgG-Myo2-7Ds 및 scFv-Myo2-7Ds의 결합 반응 동역학 상수 비교를 나타내고, 반복적인 부착 및 탈착이 IgG-Myo2-7Ds와 같이 가능함을 도 10에 나타내었다.

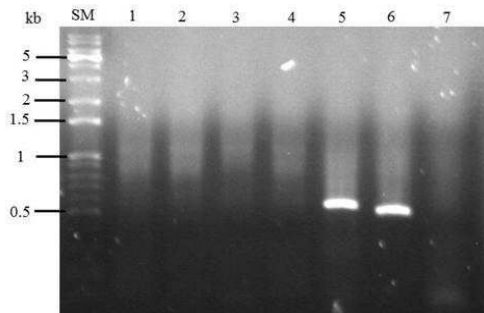
[0061] [표 6]

	부착속도(k_{on}) $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	탈착속도(k_{off}) s^{-1}	부착평형상수(K_A) M^{-1}
Anti-Myo IgG	2.95×10^5	6.68×10^{-3}	4.41×10^8
Anti-Myo scFv	2.42×10^5	2.89×10^{-3}	8.37×10^7

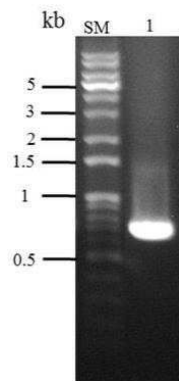
[0062]

도면

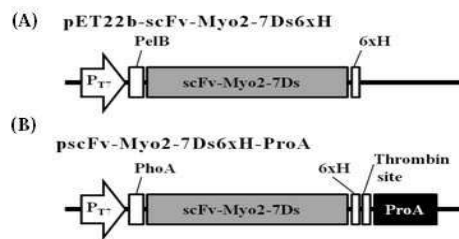
도면1



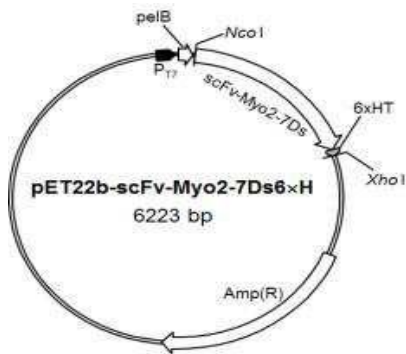
도면2



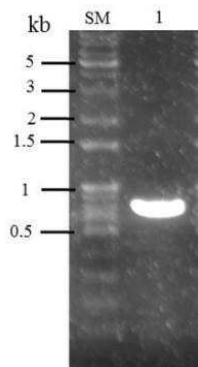
도면3



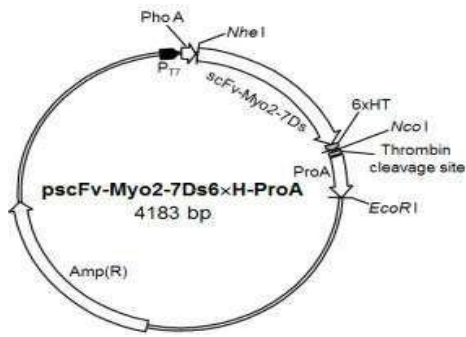
도면4



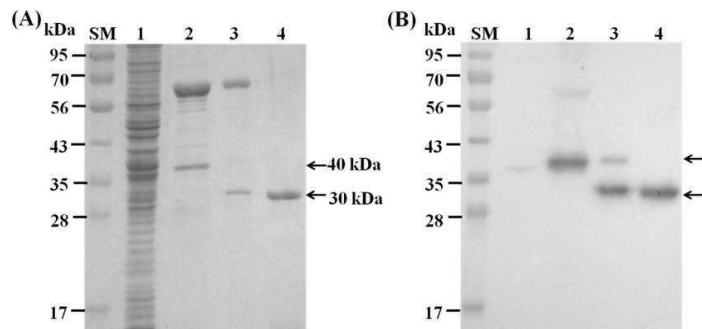
도면5



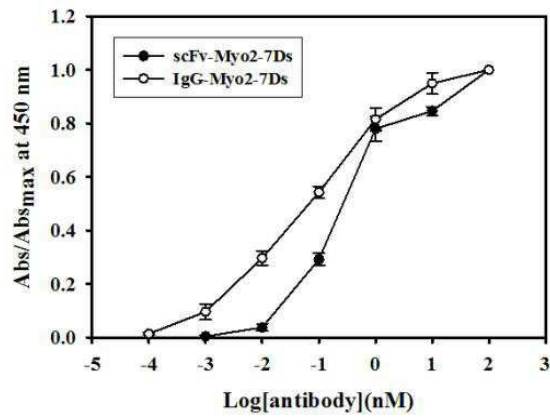
도면6



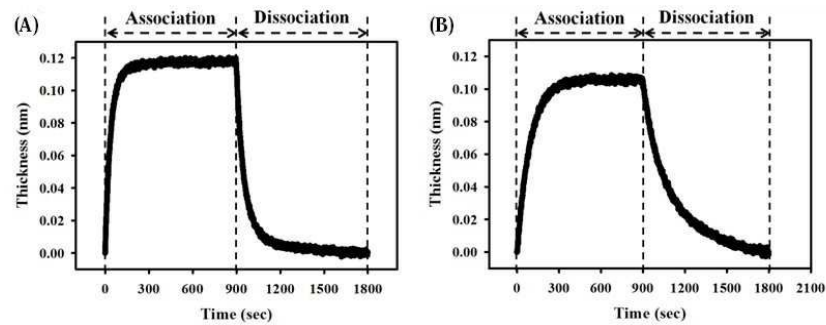
도면7



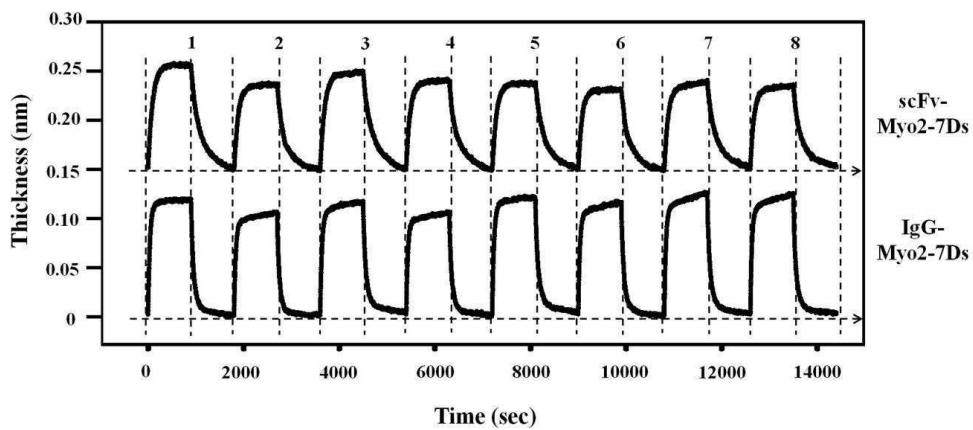
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> KOREA UNIVERSITY
- <120> a scFv gene and its recombinant protein of monoclonal antibody
- <130> 01-01
- <160> 20

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward generacer primer

<400> 1

cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer CH-Gp1-Rv

<400> 2

gaagacattt gggaaggact gactctc 27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer CH-Gp2-Rv

<400> 3

gtagatgggtg ggatttctcg cagactc 27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer CH-Gp3-Rv

<400> 4

gaacatatca ggttccttct taccac 27

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer CH-Gp4-Rv

<400> 5

gtagagctga gggttcctga tagaggc

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer CH-Gp5-Rv

<400> 6

atagacngat ggggstgtyg ttktrgc

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer CL-kappa-Rv

<400> 7

gatggataca gttggtgcag catcagc

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer CL-lamda-Rv

<400> 8

gaswgwkggm gwracttgg gctgrcc

27

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer scFv-Mb2-7H-Nc-fw

<400> 9

agtaccatgg cccagatcca gttggtgcag

30

<210> 10

<211> 60

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer scFv-Mb2-7H-link-rev

<400> 10
 gccacctgaa cgcaccac cgctaccgcc accgccgatg tttgatgac ccaaactcca 60
 60

<210> 11
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer scFv-Mb2-7L-link-fw

<400> 11
 ggtagcgggtg gtggcgggtc aggtggcggc ggtagcgatg tttgatgac ccaaactcca 60
 60

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer scFv-Mb2-7L-Xh-rev

<400> 12
 agcatcctcg agttttatct ccag 24

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer MbScFv-Nh-fw

<400> 13
 cagccagccg ctagccagat ccagttg 27

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer MbScFv-Nc-Rv

<400> 14

g t t a g c a g c c g g a t c t c c a t g g t g g t g

27

<210> 15

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv-Myo2-7Ds DNA sequence

<400> 15

c a g a t c c a g t t g g t g c a g t c t g g a c c t g a g c t g a a g a a g c c t g g a g a g a c a g t c a a g a t c

60

t c c t g c a a g g c t t c t g g t t a t a c t t c a c a g a c t a t t c a a t a c t g g g t g a g g c a g g c t

120

c c a g a a a a g g g t t t a a a g t g a t g g g c t g g a t a a c a c t g a g a c t g g t g a g c c a a c a t a t

180

g c a g a t g a c t t c a c g g g a c g g t t g c c t t c t c t t t g g a a c c t c t g c c a g c a c c g c c t a t

240

t t g c a g a t c a c c a a c c t c a a a a t g a g g a c a c g g c t a c a t a t t c t g t g c t a g a c g a t t t

300

a c t a c g a c t a c c t g g t t t g c t t a c t g g g g c c a a g g g a c t c t g g t c a c t g t c t c t g c a g g c

360

g g t g g c g g t a g c g g t g g t g g c g g t t c a g g t g g c g g t a g c g a t g t t t t g a t g a c c c a a

420

a c t c c a c t c t c c c t g c c t g t c a g t c t t g g a g a c a g c c t c c a t c t c t t g c a g a t c t a g t

480

c a g a a c a t t g t a c a t a g t a g t g g a a a c a c c t a t t t a g a a t g g t a c c t t c a g a a c c a g g c

540

c a g t c t c c a a g g t t c c t g a t c t a t a a g t t t c c a a c c g a t t t t c t g g g g t c c c a g a c a g g

600

t t c a g t g g c a g t g g a t c a g g a c a g a t t t c a c t c a a g a t c a g c a g a g t g g a g g c t g a g

660

g a t c t g g g a g t t t a t t a c t g c t t t c a a g t t c a c a t g t t c g t a c a c g t t c g g a g g g g g g

720

a c c a a g c t g g a a t a a a a c t c g a g

744

<210> 16

<211> 783

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv-Myo2-7Ds6xH DNA sequence

<400> 16

c a g a t c c a g t t g g t g c a g t c t g g a c c t g a g c t g a a g a a g c c t g g a g a g a c a g t c a a g a t c

60

t c c t g c a a g g c t t c t g g t t a t a c t t c a c a g a c t a t t c a a t a c t g g g t g a g g c a g g c t

120

c c a g a a a a g g g t t t a a a g t g a t g g g c t g g a t a a c a c t g a g a c t g g t g a g c c a a c a t a t

180

g c a g a t g a c t t c a c g g g a c g g t t g c c t t c t c t t t g g a a c c t c t g c c a g c a c c g c c t a t

240

ttgcagatca ccaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc tagacgattt	300
actacgacta cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgcaggc	360
ggtggcggta gcggtggtgg cggttcaggt ggcggcggta gcgatgtttt gatgacccaa	420
actccactct ccctgcctgt cagtccttga gatcaagcct ccatctcttg cagatctagt	480
cagaacattg tacatagtag tggaaacacc tatttagaat ggtaccttca gaaaccaggc	540
cagtctccaa ggttcctgat ctataaagt tccaaccgat tttctggggc cccagacagg	600
ttcagtggca gtggatcagg gacagatttc aactcaaga tcagcagagt ggaggctgag	660
gatctgggag tttattactg ctttcaaggt tcacatgttc cgtacacgtt cggagggggg	720
accaagctgg aaataaaact cgagcaccac caccaccacc atggactggt tccgcgtgga	780
tct	783
<210> 17	
<211> 975	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> scFv-Myo2-7Ds6xH-ProA DNA sequence	
<400> 17	
cagatccagt tgggtcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca gactattcaa tacactgggt gaggcaggct	120
ccagaaaagg gtttaaagt gatgggctgg ataaactg agactggtga gccaacatat	180
gcagatgact tcacgggacg gtttgccctc tctttggaaa cctctgccag caccgcctat	240
ttgcagatca ccaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc tagacgattt	300
actacgacta cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgcaggc	360
ggtggcggta gcggtggtgg cggttcaggt ggcggcggta gcgatgtttt gatgacccaa	420
actccactct ccctgcctgt cagtccttga gatcaagcct ccatctcttg cagatctagt	480
cagaacattg tacatagtag tggaaacacc tatttagaat ggtaccttca gaaaccaggc	540
cagtctccaa ggttcctgat ctataaagt tccaaccgat tttctggggc cccagacagg	600
ttcagtggca gtggatcagg gacagatttc aactcaaga tcagcagagt ggaggctgag	660
gatctgggag tttattactg ctttcaaggt tcacatgttc cgtacacgtt cggagggggg	720
accaagctgg aaataaaact cgagcaccac caccaccacc atggactggt tccgcgtgga	780
tctggtgac cgaaagctga caacaattc aacaagaac acaaaatgc tttctatgaa	840
atcttacatt tacctaacct aaatgaagaa caacgcaatg gtttcatcca aagcttaaaa	900

gatgacccaa gccaaagcgc taacctttta gcagaagcta aaaagctaaa tgatgcacaa 960

gcacacaaaag cttaa 975

<210> 18

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv-Myo2-7Ds6 amino acid sequence

<400> 18

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser

130 135 140

Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

145 150 155 160

Gln Asn Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu

165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Phe Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn

180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 195 200 205
 Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys

245

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL regions of scFv-Myo2-7Ds6 amino acid sequence

<400> 19

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

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

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH regions of scFv-Myo2-7Ds6 amino acid sequence
 <400> 20
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Thr Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Phe Thr Thr Thr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115