



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0011950  
(43) 공개일자 2008년02월11일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0072732

(22) 출원일자 2006년08월01일

심사청구일자 2006년08월01일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

오상석

서울시 용산구 이태원동 34-107

정준호

경상북도 포항시 북구 용흥동 우방아파트 116-109

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김석현

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 아미그달린에 대한 단클론 항체

(57) 요약

본 발명은 아미그달린에 대한 단클론 항체에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 아미그달린에 대한 단클론 항체의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역, 경쇄 및 중쇄, 단클론 항체, 상기 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체, 상기 형질전환체를 배양하여 아미그달린에 대한 단클론 항체를 생산하는 방법 및 상기 단클론 항체를 포함하는 검출용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 단클론 항체는 시료 내의 아미그달린을 특이적으로 인식하여 이를 검출 및 정량하는데 유용하다.

대표도 - 도2



(72) 발명자  
**정덕화**  
경상남도 진주시 평거동 들말홍한아파트 106-1304  
**조아연**  
서울시 서대문구 창천동 100-29, 아르치빌 2 302

**박재영**  
전라남도 순천시 낙안면 동내리 202  
**이수정**  
서울시 강서구 화곡2동 161-23

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|        |                                           |
|--------|-------------------------------------------|
| 과제고유번호 | 202061-03-1-SB010                         |
| 부처명    | 농림부                                       |
| 연구사업명  | 농림기술개발사업                                  |
| 연구과제명  | 항체생산과 면역 분석법에 의한 농산물 잔류 위해물질신속간편 분석 Kit개발 |
| 주관기관   | 이화여자대학교                                   |
| 연구기간   | 2002년 10월 15일 ~ 2005년 10월 14일             |

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 구조를 가지는 아미그달린에 대한 단클론 항체의 경쇄 가변영역;

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

상기식에서, CDR1, CDR2 및 CDR3는 서열번호 21 내지 24에 CDR로 표시된 아미노산 서열이고

FR1, FR2, FR3, FR4는 포유동물로부터 유래한 4개의 구조영역을 나타낸다.

### 청구항 2

제1항의 경쇄 가변영역 및 경쇄 불변영역으로 이루어진 아미그달린에 대한 단클론 항체의 경쇄.

### 청구항 3

하기 구조를 가지는 아미그달린에 대한 단클론 항체의 중쇄 가변영역;

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

상기식에서, CDR1, CDR2 및 CDR3는 서열번호 25 내지 29에 CDR로 표시된 아미노산 서열이고

FR1, FR2, FR3, FR4는 포유동물로부터 유래한 4개의 구조영역을 나타낸다.

### 청구항 4

제3항의 중쇄 가변영역 및 중쇄 불변영역으로 이루어진 아미그달린에 대한 단클론 항체의 중쇄.

### 청구항 5

제1항 및 제3항의 가변영역을 포함하는 아미그달린에 대한 단클론 항체.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 서열번호 21로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 27로 기재되는 중쇄 가변영역; 서열번호 22로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 28로 기재되는 중쇄 가변영역; 서열번호 23로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 26으로 기재되는 중쇄 가변영역; 서열번호 24로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 25로 기재되는 중쇄 가변영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 경쇄 및 중쇄 가변영역을 포함하는 아미그달린에 대한 단클론 항체.

### 청구항 7

제1항의 경쇄 가변영역을 코딩하며 서열번호 30 내지 서열번호 33으로 기재되는 유전자

### 청구항 8

제3항의 중쇄 가변영역을 코딩하며 서열번호 34 내지 서열번호 38로 기재되는 유전자.

### 청구항 9

제1항의 경쇄 가변영역 및 제3항의 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

### 청구항 10

제9항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

### 청구항 11

제10항의 형질전환체를 배양하여 아미그달린에 대한 단클론 항체를 생산하는 방법.

### 청구항 12

제5항의 단클론 항체를 포함하는 아미그달린 검출용 조성물.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <4> 본 발명은 아미그달린에 대한 단클론 항체에 관한 것이다.
- <5> 구체적으로 본 발명은 아미그달린에 대한 단클론 항체의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역, 경쇄 및 중쇄, 단클론 항체, 상기 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체, 상기 형질전환체를 배양하여 아미그달린에 대한 단클론 항체를 생산하는 방법 및 상기 단클론 항체를 포함하는 검출용 조성물에 관한 것이다.
- <6> 아미그달린(Amygdalin; D-mandelonitrile- $\beta$ -D gentiobioside; 라세틸; 비타민 B17으로 알려져 있음)은 청산배당체(cyanogenic glycoside)로서, 항암제, 진해제(鎮咳濟) 및 정종치료(淨腫治療)에 쓰이는 약물로 오랫동안 인정되어 왔다.
- <7> 아미그달린은 식품산업에서 널리 사용되고 있는 아몬드, 살구, 체리 및 복숭아 등의 인(仁; kernel) 혹은 다른 장미과(Rosaceae)속 식물의 종자, 뿌리 그리고 과일 등에 함유되어 있으며(Campa, C. et al., J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 739, 95-100), 상기 인(仁)에는 건조중량 그램 당 대략 50~150 $\mu$ mol의 청산배당체(cyanogenic glycoside)를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Nout, M. J. R., et al., Int. J. Food Microbiol. 24, 407-412.).
- <8> 한편, 아미그달린은 그 자체로는 독성을 나타내지 않으나, 종자류나 견과류가 부수지거나 습기를 머금게 되거나 또는 위장기관 내에서 머무를 때(incubated) 가수분해되어 시안화물(cyanide)을 생성한다. 이렇게 생성된 시안화물은 림프 및 문맥순환계(portal circulation)로 흡수된다. 일단, 말초순환계에 시안화물이 존재하게 되면 시안화물은 세포에 흡수되어  $Fe^{3+}$ (ferric iron)과 함께 세포 산화효소들(시토크롬 산화효소 등)을 저해한다.
- <9> 상기 시토크롬 산화효소의 저해는 산화성 인산화 반응의 언커플링(uncoupling)을 유도하고 그 결과로써, 일차적으로 세포의 산소결핍이 발생한다. 이러한 증상으로는 메스꺼움, 구토, 두통, 어지럼, 시아노제(cyanosis), 간손상, 저혈압, 열, 의식장애 그리고 코마까지 나타날 수 있다.
- <10> 몇몇 종자류나 견과류는 사람에게 심각한 시안화물 중독을 유발할 수 있을 정도의 아미그달린을 포함하고 있는데, 실제로 살구씨를 섭취한 아이들에게 있어서 시안화물 중독으로 인한 사망이 보고된 바 있다.
- <11> 한편, 암 치료제로서의 아미그달린 및 그의 독성에 관한 연구로는 아미그달린과 베타-글리코시다제 병용투여시 항암효과 및 그의 치사율이 증가하며(Gostomski F. E., The effects of amygdalin on the krebs-2 carcinoma and adult and fetal dub mice., Biological studies, 1978), 6명의 암환자에게 아미그달린을 정맥 및 경구투여시 경구투여에 의해서만 그의 독성이 나타난다는 보고가 있다(Moertel, C.G. et al., A Pharmacologic and toxicological study of amygdalin, JAMA, 245, 6, 1981). 또한 랫(rat)의 복강내에 5일간 아미그달린 투여시 40% 치사율을 나타내며, 아미그달린을 랫에 600mg/kg 경구투여시 시안화물(cyanide) 혈중농도 4.5ug/ml에서 치사한다는 보고가 있다(Carter, J. H. et al., Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin induced toxicity. Biochemical Pharmacology, 29, 301, 1980). 아미그달린을 경구투여시 시안화물 독성으로 호흡장애, 중추신경계 및 심장장애와 5%의 치사율을 가져왔다는 보고가 있으며(Schmidt, E.S. et al., Laetrile toxicity studies in dogs. JAMA, 239, 10, 1978), 아미그달린 경구투여시 저산소증, 저혈압증 및 호흡장애 등의 유해작용을 가져온다는 보고 등이 있다(Ortega, J.A., Acute cyanide poisoning following administration of laetrile enemas. The Journal of Pediatrics, 93, 1059, 1978 ).
- <12> 따라서, 종자류나 견과류 같은 식품 또는 혈액 내의 아미그달린을 검출하고 정량하는 것은 청산배당체의 중독을 방지하여 생명을 구하는 수단(life-saving measure)으로서 매우 중요하다 할 수 있다.
- <13> 지금까지 개발된 청산배당체를 검출 및 정량하는 방법으로는 역상 액체 크로마토그래피, GC-MS(gas chromatography-mass spectrometry) 등이 개발되었다. 하지만 이러한 공정은 복잡하고, 정교한 장비를 필요로

하는 문제점이 있었다.

<14> 한편, 단클론 항체(Monoclonal Antibody)는 하나의 항원 결정기에만 반응하고, 분자구조가 동일한 한 종류의 항체이므로, 여러가지 종류의 항체가 혼합되어 교차반응성을 나타낼 수 있는 다클론항체에 비해 특이적이고 정밀한 결과를 얻을 수 있다.

<15> 이에 본 발명자들은 식품이나 혈액과 같은 시료 내 아미그달린을 검출 및 정량하기 위한 방법을 연구하던 중 아미그달린에 대한 단클론 항체를 개발하고 상기 항체가 아미그달린만을 특이적으로 인식함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 따라서, 본 발명의 목적은 아미그달린을 특이적으로 인식하는 단클론 항체의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역, 경쇄와 중쇄 및 단클론 항체, 상기 단클론 항체의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체, 상기 형질전환체를 배양하여 아미그달린에 대한 단클론 항체의 생산하는 방법 및 항체를 포함하는 아미그달린 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

<17> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아미그달린을 특이적으로 인식하는 단클론 항체의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역을 제공한다.

<18> 또한, 본 발명은 상기 경쇄 가변영역과 경쇄 불변영역으로 이루어진 경쇄 및 상기 중쇄 가변영역과 중쇄 불변영역으로 이루어진 중쇄를 제공한다.

<19> 또한 본 발명은 아미그달린을 특이적으로 인식하는 단클론 항체를 제공한다.

<20> 또한, 본 발명은 상기 단클론 항체의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 제공한다.

<21> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

<22> 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터가 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

<23> 또한, 본 발명은 상기 단클론 항체를 포함하는 아미그달린 검출용 조성물을 제공한다.

<24> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<25> 본 발명은 하기 구조를 가지는 아미그달린에 대한 단클론 항체의 경쇄 가변영역을 제공한다.

<26> FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

<27> 상기식에서, CDR1, CDR2 및 CDR3는 서열번호 21 내지 24에 CDR로 표시된 아미노산 서열이고

<28> FR1, FR2, FR3, FR4는 포유동물로부터 유래한 4개의 구조영역을 나타낸다.

<29> 또한, 본 발명은 상기 경쇄 가변영역과 경쇄 불변영역으로 이루어진 아미그달린에 대한 단클론 항체의 경쇄를 제공한다.

<30> 본 발명은 하기 구조를 가지는 아미그달린에 대한 단클론 항체의 중쇄 가변영역을 제공한다.

<31> FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

<32> 상기식에서, CDR1, CDR2 및 CDR3는 서열번호 25 내지 29에 CDR로 표시된 아미노산 서열이고

<33> FR1, FR2, FR3, FR4는 포유동물로부터 유래한 4개의 구조영역을 나타낸다.

<34> 또한, 본 발명은 상기 중쇄 가변영역과 중쇄 불변영역으로 이루어진 아미그달린에 대한 단클론 항체의 중쇄를 제공한다.

<35> 본 발명에서 "CDR(Complementarity Determining Region)" 또는 "상보성결정영역"은 항원결합부위를 형성하기 위한 2차원 공간에서 병렬로 위치한 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 말한다.

<36> 본 발명에서 "FR(Framework Region)" 또는 "구조영역"은 항체의 가변영역 중 비교적 보존되는 영역으로써 대부분  $\beta$ -시이트 구조를 가진다. 상기 FR은 포유동물로부터 유래한 것이며, 바람직하게는 마우스, 토끼,

가금류 및 인간으로부터 유래한 것이다.

<37> 본 발명에서 "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역  $V_H$  및 3개의 불변 영역  $C_H1$ ,  $C_H2$  및  $C_H3$ 를 포함하는 전체 길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 일컫는다.

<38> 본 발명에서 "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역  $V_L$  및 불변 영역  $C_L$ 을 포함하는 전체 길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 일컫는다.

<39> 본 발명에서 "경쇄 불변영역" 및 "중쇄 불변영역"은 포유동물로부터 유래한 것이며, 바람직하게는 마우스, 토끼, 가금류 및 인간으로부터 유래한 것이다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 항체의 경쇄 불변영역 및 중쇄 불변영역을 사용하였다.

<40> 본 발명은 아미그달린에 대한 단클론 항체를 제공한다.

<41> 바람직하게는, 서열번호 21로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 27로 기재되는 중쇄 가변영역; 서열번호 22로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 28로 기재되는 중쇄 가변영역; 서열번호 23로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 26으로 기재되는 중쇄 가변영역; 서열번호 24로 기재되는 아미노산 서열의 경쇄 가변영역 및 서열번호 25로 기재되는 중쇄 가변영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 경쇄 및 중쇄 가변영역을 포함하는 아미그달린에 대한 단클론 항체를 제공한다.

<42> 본 발명에서 "단클론 항체"는 아미그달린에 대한 단클론 항체로서, 전체 항체 형태일 뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ), 엡실론( $\epsilon$ ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1( $\gamma 1$ ), 감마2( $\gamma 2$ ), 감마3( $\gamma 3$ ), 감마4( $\gamma 4$ ), 알파1( $\alpha 1$ ) 및 알파2( $\alpha 2$ )를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 타입을 가진다 (cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).

<43> 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역( $C_H1$ )을 가지는 구조로 1개의 항원 결합부위를 가진다. Fab'는 중쇄  $C_H1$  도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')<sub>2</sub> 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루고 있다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 국제 공개특허 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. dsFv(이쇄 Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 scFv(단쇄 Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C 말단에서 바로 연결되어 있어서 dsFv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다.

<44> 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')<sub>2</sub>단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다. 본 발명에서 항체는 바람직하게는 Fab 형태이거나 전체 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변 영역은 감마( $\gamma$ ), 뮤( $\mu$ ), 알파( $\alpha$ ), 델타( $\delta$ ) 또는 엡실론( $\epsilon$ ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.

<45> 또한, 본 발명의 항체는 키메라 항체 또는 키메라 항체의 면역원성을 더욱 감소시키기 위한 인간화 항체(humanized antibody) 또는 CDR-이식항체(CDR-grafted antibody) 일 수 있다.

<46> 키메라(chimeric) 항체란 항체 가변영역(variable domain)은 인간 이외의 동물(예를 들면, 마우스, 토끼, 가금류 등)에서 유래하고, 항체 불변 영역(constant domain)은 인간에서 유래한 항체를 의미한다. 이러한 키메라 항체는 당업계에서 공지된 유전자 재조합 등의 방법으로 제조될 수 있다.

<47> 인간화 항체(humanized antibody) 또는 CDR-이식항체(CDR-grafted antibody)는 동물유래 단클론 항체의 높은 친화도와 특이성은 유지하도록 하고 인체 내에서의 면역유발능을 감소시키기 위하여, 동물유래 단클

론 항체의 항원결합영역(Complementarity determining region; CDR)을 인간항체에 이식시켜 제조되는 항체를 의미하며, 항원에 대한 친화도와 인체내에서의 면역유발 정도를 고려하여 인간화시키는 정도를 선택할 수 있다.

- <48> 또한, 본 발명은 아미그달린에 대한 단일항체의 경쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 제공한다. 바람직하게는 서열번호 30 내지 서열번호 33으로 기재되는 경쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- <49> 또한 본 발명은 아미그달린에 대한 단일항체의 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 제공한다. 바람직하게는 서열번호 34 내지 서열번호 38로 기재되는 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- <50> 상기 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역 유전자의 염기서열은 변형될 수 있다. 일부가 결실, 부가, 비보존적 또는 보존적 치환, 또는 이들의 조합에 의해 상이한 서열을 갖는 유전자 변형체가 포함된다.
- <51> 본 발명은 아미그달린에 대한 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- <52> 본 발명에서 "벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있으며, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- <53> 본 발명에서 "재조합 발현 벡터"란 항체 또는 항체 단편의 발현, 생성 및 단리를 목적으로 상기 벡터와 제한 효소 절단부위에서 이형의 핵산 서열, 구체적으로 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산 서열과 작동적으로 연결된 벡터를 의미한다.
- <54> 항체 또는 항체 단편을 발현하는 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환(cotransformation) 및 표적 형질전환(targeted transformation)을 통하여 숙주 세포로 도입된다. 전자는 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 각각의 벡터 DNA를 동시에 숙주 세포로 도입한 뒤 경쇄와 중쇄를 모두 발현하는 세포를 선별하는 방법이고 후자는 경쇄(또는 중쇄)를 함유하는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하고 경쇄를 발현하는 선별된 세포를 중쇄(또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환 하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별하는 방법이다. 본 발명에서는 경쇄와 중쇄가 모두 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템을 이용하여 상기 항체를 제공한다.
- <55> 본 발명의 일 실시예에서는, Fab 형태의 항체를 제작하기 위해서 래빗 유래의 경쇄 가변영역( $V_L$ , 이하 " $V_L$ "이라고 함)과 인간의 경쇄 불변영역( $C_k$ , 이하 " $C_k$ "이라고 함) 및 래빗 유래의 중쇄 가변영역( $V_H$ , 이하 " $V_H$ "이라고 함)과 인간의 첫 번째 불변 영역 도메인( $C_{H1}$ )의 아미노산을 코딩하는 유전자를 삽입한 벡터를 이용하였다. 바람직하게는 pComb3XSS 벡터, 보다 바람직하게는 중쇄의 첫 번째 아미노산인 글루타민을 유지시켜 주기 위하여 벡터의 *Xho*I 위치 앞에 있는 아미노산 서열 EVQL(글루탐산-발린-글루타민-루이신)을 QVQL(글루타민-발린-글루타민-루이신)으로 변형하고/하거나 가용성 Fab를 발현시키기 위해서는 geneIII를 제거한 pComb3XSS 벡터를 사용하였다. 상기 벡터는 lacZ 프로모터를 가지고 시그널 펩타이드는 OmpA와 pelB 가지는 것을 특징으로 하며, 단백질 정제 등을 용이하게 할 목적으로 벡터에 HA 코딩 부위(HA coding region)있음을 특징으로 한다. 상기 pComb3XSS 벡터는 공지되어있다(gene bank, accession no. AF268281).
- <56> 본 발명에 따라 Fab 형태의 아미그달린에 대한 항체를 발현하는 플라스미드 pComb3XSS 1-3, pComb3XSS 1-5, pComb3XSS 2-7, pComb3XSS 3-12, pComb3XSS 4-4 벡터가 제작되었다.
- <57> 상기 벡터의 숙주 세포로는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*)와 같은 원핵 숙주 세포를 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 이. 콜라이이고 보다 바람직하게는 이. 콜라이 XL-1 Blue, 이. 콜라이 BL21(DE3), 이. 콜라이 JM109, 이. 콜라이 DH 시리즈, 이. 콜라이 TOP10, 이. 콜라이 TG1, 이. 콜라이 HB101 및 이. 콜라이 ER2738이나 이로 제한되는 것은 아니고 가장 바람직하게는 이. 콜라이 ER2738이다

<58> 또한, 아미그달린에 대한 단클론 항체를 생산하기 위한 적합한 숙주 세포로는 아스퍼질러스 속(*Aspergillus species*)과 같은 진균, 피키아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포가 이용될 수 있다. 또한, 식물, 포유동물로부터 유래한 세포도 이용될 수 있다. 바람직하게는 원숭이 신장 세포(COS7:monkey kidney cells)세포, NSO 세포, SP2/0, 차이니즈 햄스터 난소(CHO:chinese hamster ovary)세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK:baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 293 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<59> 이. 콜라이등의 미생물을 이용하는 경우 생산성은 동물세포 등에 비하여 높은 편이나 당화(glycosylation) 문제로 인해 완전한(intact) Ig 형태의 항체 생산에는 바람직하지 않으나 Fab나 Fv등의 생산에는 사용될 수 있다.

<60> 본 발명에서 숙주 세포로의 "형질전환"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기천공법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘( $\text{CaPO}_4$ ) 침전, 염화 칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 예를 들어 염화칼슘법을 이용하는 칼슘 처리 또는 전기천공법은 일반적으로 원핵세포에 대해 사용된다(Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용한 형질감염은 특정 식물 세포의 형질전환에 사용된다(Shaw et al., 1983, Gene, 23:315) 국제 공개특허(WO 89/05859). 세포벽이 없는 포유동물 세포의 경우, 인산칼슘 침전법을 사용할 수 있다(Graham et al, 1978, Virology, 52:456-457). 포유동물 숙주 세포로의 형질전환의 일반적인 방법 및 특징은 미국 특허 제4,399,216호에 기재되어 있다. 효모 내로의 형질전환은 일반적으로 반 솔링겐(Van Solingen) 등의 문헌(Van Solingen et al., 1977, J. Bact., 130:946) 및 히시아오(Hsiao) 등의 문헌(Hsiao et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 76:3829)의 방법에 따라 수행된다. 구체적으로 본 발명에서는 이. 콜라이에는 전기천공법을 이용하여 항체 단편을 발현하는 벡터를 세포안으로 형질전환하였다.

<61> 본 발명은 상기 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역의 유전자를 포함하고 본 발명의 항체를 발현할 수 있는 발현 벡터; 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체; 형질전환체를 적절한 조건하에서 배양하고, 상기 숙주 세포 배양물(예를 들어 형질전환체의 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 항체의 제조방법을 제공한다.

<62> 상기 항체 제조에서 형질전환체의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 이러한 다양한 배양 방법은 다양한 문헌(예를 들면, James et al., Biochemical Engineering, Prentice-Hall International Editions)에 개시되어 있다. 세포의 성장방식에 따라 현탁배양과 부착배양을 배양방법에 따라 회분식과 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다. 배양에 사용되는 배지는 특정한 균주의 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다. 동물세포 배양은 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예에는, 포도당, 자당, 유당, 과당(fructose), 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리셀 및 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원의 예에는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아추출물, 옥수수 침지액(CSL), 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원이 포함된다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는, 인산이수소칼륨, 인산수소 이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 배양 중에 수산화암모늄, 수산화 칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 20 °C 내지 45 °C, 바람직하게는 25 °C 내지 40 °C이다.

<63> 형질전환체를 배양하여 수득한 항체는 정제하지 않은 상태로 사용될 수 있으며 추가로 다양한 통상의

방법, 예를 들면 투석, 염 침전 및 크로마토그래피 등을 이용하여 고순도로 정제하여 사용될 수 있다. 그 중에서 크로마토그래피를 이용하는 방법이 가장 많이 사용되며, 컬럼의 종류와 순서의 선택에는 어느 경우에도 적용될 수 있는 법칙은 없고 항체의 특성, 배양방법 등에 따라 이온교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에서 선택할 수 있다.

<64> 본 발명의 단클론 항체는 아미그달린만을 특이적으로 인식하므로 시료내의 아미그달린을 검출하는데 사용할 수 있다. 상기 시료는 식품 또는 혈액이며, 상기 식품은 특히 종자유나 견과류일 수 있다.

<65> 따라서, 본 발명은 본 발명의 단클론 항체를 포함하는 아미그달린 검출용 조성물을 제공한다.

<66> 본 발명에 따른 상기 검출용 조성물은 본 발명의 단클론 항체 및 면역학적 분석에 사용되는 시약이 포함될 수 있다. 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 항원-항체 결합을 원리로 하는 공지의 모든 정량분석방법에 사용되는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 상기 정량분석방법의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 면역블롯팅, 면역침전법, 효소면역분석법, 단백질 칩, 래피드 어레이 및 마이크로 어레이 방법 등이 있다.

<67> 상기에서 적합한 담체로는 이에 한정되지는 않으나 가용성 담체, 예컨대 당 분야에 공지된 생리화적으로 허용되는 완충액들 중 어느 한 가지(예를 들어, PBS) 또는 불용성 담체, 예컨대 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교텍스트란, 폴리사카라이드, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

<68> 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지로는 효소, 형광물질, 발광물질 및 방사성 물질 등을 사용할 수 있다. 효소로는 과산화효소(oxidase), 알카라인 포스파타제(alkaline phosphatase), D-갈락토시다아제, 글루코스 옥시다아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있으며, 형광물질로는 플루오르신 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 피코빌린(phycobilin) 단백질, 로다민(rhodamine), 피코에리트린(phycoerythrin), 피코시아닌(phycocyanin) 및 오르토프탈릭 알데히드(orthophthalic aldehyde)등을 사용할 수 있다. 발광물질로는 이소루미놀(isolumino), 루시게닌(lucigenin) 등을 사용할 수 있으며, 방사성 물질로는  $^{131}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  등을 사용할 수 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

<69> 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 단클론 항체를 이용하여 효소면역흡착법(ELISA)으로 검출하는 방법이 예시되어 있다. 즉, 아미그달린-난알부민을 플레이트에 코팅하고, 아미그달린 용액을 첨가하여 아미그달린과 아미그달린-난알부민을 결합시킨 다음 아미그달린에 대한 Fab형태의 단클론 항체(primary antibody)를 결합시켰다. 상기 항체와 결합하는 이차항체(enzyme conjugated secondary antibody)를 반응시킨 후 ABTS를 넣어 발색시켜 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 Fab형태의 단클론 항체는 아미그달린을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 1 참조). 따라서, 본 발명의 항체는 시료 속에 함유되어 있는 아미그달린을 검출하는데 있어서 ELISA 등에 사용될 수 있음을 확인하였다.

<70> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### <71> <실시예 1>

##### <72> 아미그달린(Amygdalin) 접종 및 혈청 제조

<73> 아미그달린-KLH(A-Yeon Cho *et al.*, *Molecules and Cells*, Vol.21, No. 2, 308~313, 2006) 5 $\mu\text{g}$ 을 보조제(adjuvant, Sigma)와 섞어 면역을 수행하였다.

<74> 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아미그달린-KLH/PBS 2 $\text{ml}$ 을 보조제(adjuvant)와 섞은 후 토끼 한 마리당 1 $\text{mL}$ 씩 피하에 3~4군데로 나누어 면역하였다. 면역 주기는 3주로 하였으며 면역할 때 마다 귀의 동맥에서 피를 뽑아 상온에서 1시간, 4°C에서 12~14시간 방치하여 혈액응고가 일어나도록 한 뒤 4°C, 3000rpm, 25분 동안 원심분리하여 상층부의 혈청을 얻었다.

#### <75> <실시예 2>

##### <76> 아미그달린 특이적 항체 발현 확인

- <77> a) 효소면역흡착법(ELISA)
- <78> 96 웰 플레이트에 난(卵)알부민(ovalbumin)이 결합된 아미그달린을 넣고 4℃에서 밤새 두어 웰 바닥에 코팅하였다. 3% BSA/TBS로 37℃, 1시간 동안 블러킹하고, 래빗 혈청을 블러킹 용액에 희석하여 37℃, 1시간 동안 반응시켰다. HRP가 결합된 항-래빗 IgG 항체(HRP conjugated anti-rabbit IgG antibody(PIERCE)를 3% BSA/TBS에 1:5000으로 희석하여 반응시키고 0.05% TBST(Tris-Buffered Saline Tween-20)로 씻은 후 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonic acid) 로 발색시켜 결과를 관찰하였다.
- <79> b) 경쟁적 효소면역측정법(Competitive ELISA)
- <80> 96 웰 플레이트에 아미그달린-OVA를 코팅한 후, 3% BSA/TBS 로 37℃ 에서 1시간 동안 블러킹하였다. 블러킹 후 래빗 혈청에 정제된 아미그달린을 섞어주고 37℃, 1시간 동안 반응시켰다. HRP가 결합된 항-래빗 IgG 항체 (HRP conjugated anti-rabbit IgG antibody)를 반응시키고 0.05% TBST로 씻어 준 후 ABTS 발색 결과를 관찰하였다.
- <81> <실시예 3>
- <82> 아미그달린에 대한 항체 라이브러리 제조
- <83> <3-1> RNA 추출 및 cDNA 합성
- <84> a) RNA 추출
- <85> 6개월간 면역한 토끼를 CO<sub>2</sub> 가스로 질식사시킨 후 복강을 열고 비장을 꺼내어 차가운 TRI 용액 (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA) 10ml에 넣었다. 골수는 뒷다리의 뼈에서 꺼내어 비장과 마찬가지로 TRI 용액 10ml에 넣어 RNA의 분해를 막았다. 조직을 채균하고 상온에서 5분 인큐베이션 한 후, TRI 용액 20ml을 다시 첨가하고 4℃, 3500 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액에 3ml BCP(1-Bromo-3-chloropropane) 를 가하고, 15초 잘 섞어 준 후 상온에서 15분 인큐베이션 하였다. 4℃, 12000rpm으로 15분 원심분리한 다음 상층액에 15ml 이소프로판올(isopropanol)을 가하고 15초간 볼텍스, 상온에서 10분간 인큐베이션 하였다. 4℃, 12000rpm, 10분간 원심분리한 후 상층액은 버리고 남아 있는 펠렛에 75% 에탄올 30ml을 넣고, 4℃, 12000rpm, 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 펠렛을 말린 후 500℃ RNase-프리 워터 (RNase-free water)에 펠렛을 녹였다.
- <86> b) LiCl 침전
- <87> RNA 300 $\mu$ l 를 멸균된 튜브로 옮기고 7.5M LiCl 32 $\mu$ l를 넣은 후 잘 섞어 얼음에서 2시간 동안 반응시켰다. 2시간 후 4℃, 12000rpm으로 40분 동안 원심분리하고 펠렛을 RNase 프리 워터(RNase-free water) 300 $\mu$ l에 녹인 후 상동 조건으로 침전시켰다. 같은 조건으로 다시 원심분리한 후, 상층액을 버리고 3M 소듐 아세테이트 30 $\mu$ l, -20℃ 에탄올 600 $\mu$ l을 첨가한 후 잘 섞어서 -20℃에서 30분간 반응시켰다. 4℃, 12000rpm, 30분간 원심분리 한 후 펠렛을 -20℃의 70% 에탄올 500 $\mu$ l로 씻어준 뒤 100 $\mu$ l의 RNase-프리 워터에 녹여서 보관하였다.
- <88> c) cDNA 합성
- <89> RNA 5 $\mu$ g, dNTP 믹스 1 $\mu$ l, 올리고-dT(oligo-dT) 1 l, RNase-프리 워터를 섞은 후(to 10 $\mu$ l) 65℃에서 5분 반응시키고 얼음에 1분 이상 두었다. 10x RT 버퍼 2 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l, 0.1M DTT 2 $\mu$ l, RNase 저해제(RNase inhibitor) 1 $\mu$ l을 넣고 살짝 섞어 준 다음 42℃에서 2분 동안 반응시키고 SuperScript RT(역전사효소) 1 $\mu$ l을 넣어 주고 42℃에서 밤새 반응시켰다. 70℃에서 15분간 반응시킨 뒤 얼음에서 식히고, RNase H 1 $\mu$ l를 넣고 37℃ 20분간 인큐베이션하여 여분의 RNA들을 제거하였다.
- <90> <3-2> 오버랩 익스텐션 PCR(Overlap extension PCR)에 의한 Fab 증폭
- <91> Fab 체인 염기서열(래빗의 카파( $\kappa$ ) 또는 람다( $\lambda$ ) 경쇄, 중쇄)들을 각각 부위에 특정한 프라이머들을 이용하여 증폭시키고, 오버랩 익스텐션 PCR 방법으로 Fab 라이브러리(library)를 제작하였다.
- <92> a) 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역의 증폭
- <93> 상기 실시예<3-1>에서 제조한 cDNA를 주형으로 하여 경쇄 가변영역의 k 체인 ( $V_k$  이하, " $V_k$ "이라고 함)은 9개 조합의 프라이머, 중쇄 가변영역( $V_H$ , 이하 " $V_H$ "이라고 함)은 4개 조합의 프라이머, 경쇄 가변영역의 체인( $V_\lambda$

이하, " $V_{\lambda}$ "이라 함)은 1 조합의 프라이머를 이용하여 1차 PCR(1st round PCR)을 수행하였다(하기 표 1 참조).

<94> 각각 60pmol의 서열번호 1 및 서열번호 13 로 표시되는 프라이머, 0.5 $\mu$ g cDNA, 10 $\mu$ l 10xPCR 버퍼, 8 $\mu$ l 2.5mM dNTP mixture, 0.5 $\mu$ l Taq 폴리머라제를 혼합하고 증류수를 100 $\mu$ l까지 첨가하였다.

<95> PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하여 주형 DNA를 전변성시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 15초; 56 $^{\circ}$ C에서 30초; 및 72 $^{\circ}$ C에서 90초를 1 사이클로 하여 총 30회 반복 수행하였다. 이후, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응시켰다.

표 1

| 증폭부위          | 프라이머 | 염기서열                                          | 서열번호 |
|---------------|------|-----------------------------------------------|------|
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGMTGACCCAGACTCCA         | 1    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCACATTGGTGCC     | 4    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGMTGACCCAGACTCCA         | 1    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGGATCTCCAGCTCGGTCCC    | 5    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGMTGACCCAGACTCCA         | 1    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGACACCACCTCGGTCCC     | 6    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGATMTGACCCAGACTCCA         | 2    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCACATTGGTGCC     | 4    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGATMTGACCCAGACTCCA         | 2    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGGATCTCCAGCTCGGTCCC    | 5    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGATMTGACCCAGACTCCA         | 2    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGACACCACCTCGGTCCC     | 6    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGACTGAA         | 3    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCACATTGGTGCC     | 4    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGACTGAA         | 3    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGGATCTCCAGCTCGGTCCC    | 5    |
| $V_{\kappa}$  | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGACTGAA         | 3    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGACACCACCTCGGTCCC     | 6    |
| $V_{\lambda}$ | 정방향  | GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGTCGCCCTC       | 7    |
|               | 역방향  | AGATGGTGCAGCCACAGTTCGGCCTGTGACGGTCAGCTGGGTCCC | 8    |
| $V_H$         | 정방향  | GCTGCCCAACCAGCCATGGCCAGTCGGTGAGGAGTCCRG       | 9    |
|               | 역방향  | CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGAYGGTGACCAGGGTGCC | 13   |
| $V_H$         | 정방향  | GCTGCCCAACCAGCCATGGCCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAG     | 10   |
|               | 역방향  | CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGAYGGTGACCAGGGTGCC | 13   |
| $V_H$         | 정방향  | GCTGCCCAACCAGCCATGGCCAGTCGYTGAGGAGTCCGGG      | 11   |
|               | 역방향  | CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGAYGGTGACCAGGGTGCC | 13   |
| $V_H$         | 정방향  | GCTGCCCAACCAGCCATGGCCAGSAGCAGCTGRTGGAGTCCGG   | 12   |
|               | 역방향  | CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGAYGGTGACCAGGGTGCC | 13   |

<97> b) 인간의 불변 영역(human constant region) 증폭

<98> 인간의 항체 불변 영역(Constant region) 중 경쇄 불변영역  $\kappa$  체인( $C_{\kappa}$ ; 이하, " $C_{\kappa}$ "이라고 함)영역을 증폭하기 위하여, 20 ng pComb3XTT 벡터(Phage Display: A laboratorial manual. Plainview, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001), 각각 60pmol의 서열번호 14 및 서열번호 15로 표시되는 프라이머, 10  $\mu$ l 10 x PCR 버퍼, 2 $\mu$ l 10mM dNTP mixture, 0.5 $\mu$ l Taq 폴리머라제를 혼합하고 증류수를 100 $\mu$ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 90초의 반응을 20회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치하였다.

<99> 한편, 인간 중쇄 불변영역( $C_H1$ , 이하 " $C_H1$ "이라고 함)을 증폭하기 위하여, 20ng pComb3XTT, 각각 60pmol의 서열번호 16 및 서열번호 17로 표시되는 프라이머, 10 $\mu$ l 10xPCR 버퍼, 2 $\mu$ l 10mM dNTP mixture, 0.5 $\mu$ l Taq 폴리머라제를 혼합하고 증류수를 100 $\mu$ l까지 첨가하였다. 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C

에서 30초, 72℃에서 90초의 반응을 20회 반복한 후, 72℃에서 10분간 정치하였다.

표 2

| 증폭부위            | 프라이머 | 염기서열                     | 서열번호 |
|-----------------|------|--------------------------|------|
| C <sub>k</sub>  | 정방향  | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC | 14   |
|                 | 역방향  | GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC    | 15   |
| C <sub>H1</sub> | 정방향  | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC | 16   |
|                 | 역방향  | AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC    | 17   |

c) 래빗 항체의 가변영역과 인간항체의 불변영역의 연결

a)단계에서 합성한 래빗 V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>을 b)단계에서 합성한 인간의 불변 영역(human constant region) DNA와 오버랩 익스텐션 PCR(2nd round PCR) 로 연결하여 중쇄 절편(heavy chain fragment)와 경쇄 절편(light chain fragment)을 얻었다.

V<sub>K</sub>, V<sub>L</sub> 는 C<sub>K</sub> 와 오버랩핑(overlapping) 하였으며 V<sub>H</sub> 는 C<sub>H1</sub> 과 오버랩핑(overlapping)하였다.

PCR 반응은 각각 30pmol의 서열번호 15, 17, 18 및 서열번호 19로 표시되는 프라이머, 100ng DNA template each, 5μl 10xPCR 버퍼, 1μl 10mM dNTP mixture, 0.3μl Taq 폴리머라제를 혼합하고 증류수를 50μl까지 첨가한 다음 94℃에서 10분 동안 가열하여 주형 DNA를 전변성시킨 후, 94℃에서 15초; 56℃에서 30초; 및 72℃에서 2분을 1 사이클로 하여 총 25회 반복 수행하였다. 이후, 최종적으로 72℃에서 10분 동안 반응시켰다.

표 3

| 증폭부위 | 프라이머 | 염기서열                                     | 서열번호 |
|------|------|------------------------------------------|------|
| VL   | 정방향  | GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC | 18   |
|      | 역방향  | GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC                    | 15   |
| Fd   | 정방향  | GCTGCCCAACCAGCCATGGCC                    | 19   |
|      | 역방향  | AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC                    | 17   |

d) 경쇄와 중쇄의 연결

경쇄와 중쇄를 오버랩 익스텐션 PCR 기법으로 이어 붙여 (3rd round PCR) 키메릭 Fab 라이브러리(library)를 만들었다.

PCR 반응은 각각 30pmol의 서열번호 18 및 서열번호 20 로 표시되는 프라이머, 100ng DNA template each, 5μl 10xPCR 버퍼, 1μl 10mM dNTP mixture, 0.5μl Taq 폴리머라제를 혼합하고 증류수를 50μl까지 첨가한 다음 94℃에서 10분 동안 가열하여 주형 DNA를 전변성시킨 후, 94℃에서 15초; 56℃에서 30초; 및 72℃에서 3분을 1 사이클로 하여 총 25회 반복 수행하였다. 이후, 최종적으로 72℃에서 10분 동안 반응시켰다.

표 4

| 증폭부위 | 프라이머 | 염기서열                                     | 서열번호 |
|------|------|------------------------------------------|------|
|      | 정방향  | GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC | 18   |
|      | 역방향  | GAGGAGGAGGAGGAGGAGAGAAGCGTAGTCCGGAACGTC  | 20   |

### <3-3> 벡터 DNA 제조

라이브러리 구축에 사용할 벡터로는 pComb3XSS를 선택하였다. pComb3XSS 플라스미드 DNA를 *E. coli* ER2738 계통(New England Biolabs Inc., Hitchin, Hertfordshire, SG4 OTY, England, UK)에 전기천공(electroporation)에 의해 도입한 후, 500ml SB 배지에서 배양하여 QIA필터 플라스미드 맥시 키트(filter plasmid maxi kit; QIAGEN, GmBH, Hilden, Germany)로 벡터 DNA를 대량으로 얻었다.

### <3-4> 벡터 DNA와 PCR산물의 제한효소 처리

상기 <3-3>의 PCR 산물과 pComb3XSS 벡터를 *Sfi* I 제한효소로 50℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 65℃, 15분 동안 열처리로 불활성화(heat inactivation)시키고, PCR 산물은 1% 아가로스 겔, 벡터는 0.6% 아가로스 겔을 사용하여 전기영동한 후 벡터 DNA, 제한효소 처리한 PCR 산물을 분리하여 정제하였다.

### <3-5> 라이게이션(Ligation) 및 전기천공(electroporation)

1.4μg 벡터 DNA, 1.4μg PCR 산물, 5x 리가아제 버퍼 40μl, T4 리가아제 10μl, 증류수로 200μl가 되게 섞고 상온에서 밤새 반응시킨 다음 에탄올 침전하여 펠렛을 15μl 증류수에 녹였다. 상기 라이게이션한 DNA 시료 15μl를 컴페턴트 셀(competent cell) ER2738 400μl에 넣고 전기천공하였다. 종배양(seed culture)에는 SOC 배지 (Salt-Optimized + Carbon) 5ml을 사용하였다. ER cell(New England Biolabs Inc., Hitchin, Hertfordshire, SG4 OTY, England, UK)을 1시간 동안 37℃에서 배양한 후 2μl는 LB-카르베니실린(carbenicillin) 플레이트에 플레이팅하여 라이브러리 크기를 계산하고 나머지 배지에는 헬퍼 파지(helper phage)를 넣어 파지 라이브러리를 구축하였다.

## <실시예 4>

### 아미그달린에 특이적인 항체의 패닝(Panning)

#### <4-1> 파지 라이브러리의 증폭(Phage library amplification)

상기 실시예 3에서 전기천공(Electroporation)한 5ml 세포 배양물을 37℃, 250rpm에서 1시간 동안 배양한 다음 SB 배지 (Super broth) 10ml, 50mg/ml 카르베니실린(carbenicillin) 6μl을 넣어주고 37℃, 250rpm, 1시간 동안 다시 배양하였다. 카르베니실린(carbenicillin) 9μl를 넣고 추가로 1시간 더 배양한 후, VCSM13 헬퍼 파지 (Stratagene) 2ml, SB 배지 183ml, 카르베니실린(carbenicillin) 185ml을 넣고 300rpm으로 2시간 배양하였다. 50mg/ml 카나마이신(kanamycin)을 280μl 넣어 주고 밤새 배양하였다. 4℃에서 4000rpm, 15분간 원심분리하여 (Beckman JA-10 rotor) 상층액을 옮기고, 상층액에 PEG 8g, NaCl 6g을 넣은 후 5분간 37℃에서 300rpm으로 흔들어서 녹였다. 30분간 얼음에 두어 인큐베이션 한 후 4℃에서 9000rpm, 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 1% BSA/TBS 2ml로 파지 펠렛을 재현탁하고, 0.2μm 필터로 이물질들을 제거하였다.

#### <4-2> 마그네틱 비드를 이용한 패닝(Panning)

a) 마그네틱 비드-아미그달린 결합체(Magnetic bead-amygdalin conjugation) 제조.

마그네틱 비드(Magnetic bead)와 아미그달린-OVA(Conjugation 방법은 Dynalbiotech.com 참조.), PBS (Phosphate Buffered Saline), 3M 암모늄 설페이트를 섞어준 후 37℃에서 24 시간 동안 비드가 가라앉지 않도록 흔들어 주면서 인큐베이션하여 비드 표면에 아미그달린-OVA가 코팅되도록 하였다. 인큐베이션 후 MPC(magnetic particle concentrator)를 이용하여 혼합물 안의 비드를 모으고, 상층액을 제거한 후 3% BSA/PBS를 넣고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 블리킹하였다. 전처리(Pre-clearing)를 하기 위한 비드는 아미그달린 대신 5% BSA/PBS와 섞어 37℃, 24시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 비드를 살짝 씻어 준 후 소듐 아자이드를 첨가한 PBS에 재현탁하여 4℃에서 보관하였다.

b) 패닝(Panning)

첫번째 패닝(panning)에서는 전-세척(pre-clearing) 과정을 거치지 않고 패닝을 진행하였다. 상기 a)에서 제조한 Fab를 표면발현하고 있는 파지 용액을 준비한 마그네틱 비드(magnetic bead)와 섞어 볼텍스 2.5 정도의 강도로 37℃에서 2시간 동안 흔들어 주며 인큐베이션한 후, 0.05% PBST(Phosphate Buffered Saline Tween-20) 500ml로 1회 씻어 주었다. MPC(magnetic particle concentrator)를 사용하여 비드(bead)를 모은 후, 상층액을 제거하고 10mg/ml 트립신을 30μl 넣고 37℃ 10분간 인큐베이션하여 비드에 결합한 파지를 일루션(elution)하였다. 후에 다시 트립신 30μl을 넣어주어 2회에 걸쳐 파지들을 일루션(elution)하였다.

SB 배지에 OD600이 1이 될 때까지 ER 세포를 배양한 후 ER 배양액 2ml에 일루션된 파지 용액을 넣어주고 15분간 감염(infection)시킨 후, SB배지 6ml, 100mg/ml 카르베니실린(carbenicillin) 1.6 μl을 넣고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 다시 카르베니실린(carbenicillin) 2.4μl을 넣어주고 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, SB배지 90ml, 헬퍼 파지(helper phage) 2ml, 카르베니실린(carbenicillin) 46μl을 넣어주고 1.5~2시간 더 37℃에서 배양하였다. 마지막으로 50mg/ml 카나마이신(kanamycin) 140μl을 넣어준 후 37℃ 배양조에서 밤새 배양하였다. 다음날 4℃에서 4000rpm, 15분간 원심분리하여 (Beckman JA-10 rotor) 상층액을 옮기고, 상층액에

PEG 4g, NaCl 3g을 넣은 후 5분간 37℃에서 300rpm으로 흔들어 녹였다. 30분간 얼음에 두어 인큐베이션 한 후 4℃에서 9000rpm, 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다.

원심분리용 용기안의 액체를 완전히 제거한 후 1% BSA/TBS 2ml로 파지 펠렛을 재현탁하고, 0.2um 필터로 이물질들을 제거한 후 전-세척된 비드(pre-clearing bead)에 파지 용액을 넣어 37℃에서 한 시간 동안 흔들어주어 비특이적으로 결합된 결합체(nonspecific binder)들을 1차적으로 제거하였다. 세척된 파지용액(Cleared phage solution)을 아미그달린이 결합된 비드에 넣어 패닝을 4차까지 TBST 세척 회수를 점차 늘려 가면서 진행하였다.

#### <실시예 5>

#### 효소면역흡착법(ELISA)에 의한 아미그달린에 대한 결합특이성을 나타내는 파지 선별

##### <5-1> 파지 클론의 제조

네 번째 패닝(panning)에서 나온 아웃풋 파지(output phage) 중 무작위로 파지 클론들을 취하여 50ug/ml 카르베니실린(carbenicillin)-SB 배지 2ml에 넣은 후 37℃, 300rpm에서 4시간 동안 배양하였다. 헬퍼 파지와 항생제를 각 배지에 넣어준 후 하룻밤동안 배양하였다. 배양 후 각 배지에서 1ml을 에펜도르프 튜브로 옮겨 테이블 탑(table top)으로 원심분리하여 클론들에 대한 파지 상층액(phage supernatant)을 준비하였다.

##### <5-2> 효소면역흡착법(ELISA)

아미그달린에 대한 결합특이성을 효소면역흡착법(ELISA)으로 확인하였다.

먼저, 아미그달린-난알부민(Amygdalin-ovalbumin), KLH(keyhole limpet hemocyanin), 항-HA 항체, BSA(bovine serum albumin), 난알부민을 96 웰 플레이트에 넣어 주고 4℃에서 웰에 코팅하였다. 코팅한 용액들을 제거하고 3% BSA/PBS 150μl로 블러킹한 후에 상기 <5-1>에서 제조한 파지 용액(phage solution) 50μl와 37℃에서 2시간 동안 반응시키고, HRP가 결합된 항-인간 Fab 항체(HRP-conjugated anti-human Fab antibody)와 37℃에서 한 시간 동안 반응시켰다. 3차 증류수로 10회 씻어준 후 ABTS를 넣어 발색시켜 405nm에서의 흡광도를 관찰하였다. 도 1에서 파지의 존재를 나타내는 실험군은 아무것도 코팅하지 않은 웰에 파지용액을 넣고 배양한 다음 HRP가 결합된 항-Fab 항체(HRP conjugated anti-Fab antibody)와 반응시킨 것으로서 용액안에 파지가 존재하고 있는지의 여부를 알아보기 위한 실험군이다. 상기 아미그달린-난알부민은 파지클론이 아미그달린에 특이적으로 반응하는지 알아보기 위해 사용한 것이고(아미그달린-난알부민 실험군), KLH, BSA, 난알부민은 파지클론이 면역에 사용한 KLH에, 패닝에 사용한 BSA 및 난알부민에 반응하는 것이 아닌지 검증하기 위하여 사용한 것이다(KLH 실험군, BSA 실험군, 난알부민 실험군).

실험결과 도 1에 나타난 바와 같이, 모든 클론이 난알부민, BSA(bovine serum albumin), KLH(keyhole limpet hemocyanin)에는 반응하지 않고, 아미그달린-난알부민에 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.

한편, 파지 라이브러리 구축시(phage library construction) 사용된 벡터에 HA 코딩 부위가 있어서 아미그달린 항체를 발현하는 파지는 외피 단백질 부분에 HA를 발현하기 때문에 항-HA 항체에 높은 친화력을 나타낸다. 도 1에서는 아미그달린에 특이적인 항체를 선별하기 위하여 아미그달린-난알부민 외에 항-HA 항체를 사용하여 ELISA하였으며, 그 결과 아미그달린-난알부민 외에도 항-HA 항체실험군에서 높은 흡광도를 나타냄을 알 수 있었다(항-HA항체 실험군).

또한, 1차 항체로 사용한 파지가 플레이트 바닥에 고정된(immobilization) 된 아미그달린-난알부민 뿐만 아니라 용액에 녹아있는 형태의 프리 아미그달린(free amygdalin)과 반응하는지를 알아보기 위해 파지 용액에 파우더 상태의 아미그달린을 섞어서 경쟁효과(competition effect)를 측정하였는데, 프리 아미그달린(free amygdalin)을 첨가하지 않았을 때와 비교하여 405 nm에서의 흡광도가 감소한 것으로 보아, 용액안의 파지가 결합되지(conjugation) 되지 않은 상태의 아미그달린 즉, 프리 아미그달린과 반응함을 알 수 있었다(아미그달린-난알부민 실험군에 프리 아미그달린 첨가한 실험군).

#### <실시예 6>

#### 선별된 클론들의 염기서열 분석

<142> 상기 <실시예 5>에서 아미그달린(amygdalin)에 특이적으로 반응하는 것으로 판단되는 클론 1-3, 1-5, 2-7, 3-12, 4-4를 선발하고, 이를 pComb3XSS 1-3, pComb3XSS 1-5, pComb3XSS 2-7, pComb3XSS 3-12, pComb3XSS 4-4로 명명하였다. 상기 클론들을 선택하여 파지미드(phagemid)를 추출하고, 중쇄와 경쇄를 염기서열 분석한 다음 얼라이먼트(alignment)하였다. 각 클론의 경쇄의 가변영역의 아미노산 서열을 도 2에 나타내었으며, 중쇄의 가변영역을 도 3에 나타내었다.

<143> 아미노산 서열 분석결과, 경쇄 및 중쇄에 있어서 4개의 구조영역(framework region; FR)과 3개의 상보성결정영역(complementarity determining region; CDR)을 결정할 수 있었다.

### 발명의 효과

<144> 본 발명의 항체는 아미그달린을 특이적으로 인식할 수 있으므로 아미그달린을 검출하는데 유용하다.

<145> 또한, 상기 항체의 가변영역을 암호화하는 유전자는 혈액 내의 아미그달린을 검출하는 인간화 항체를 개발하는데 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

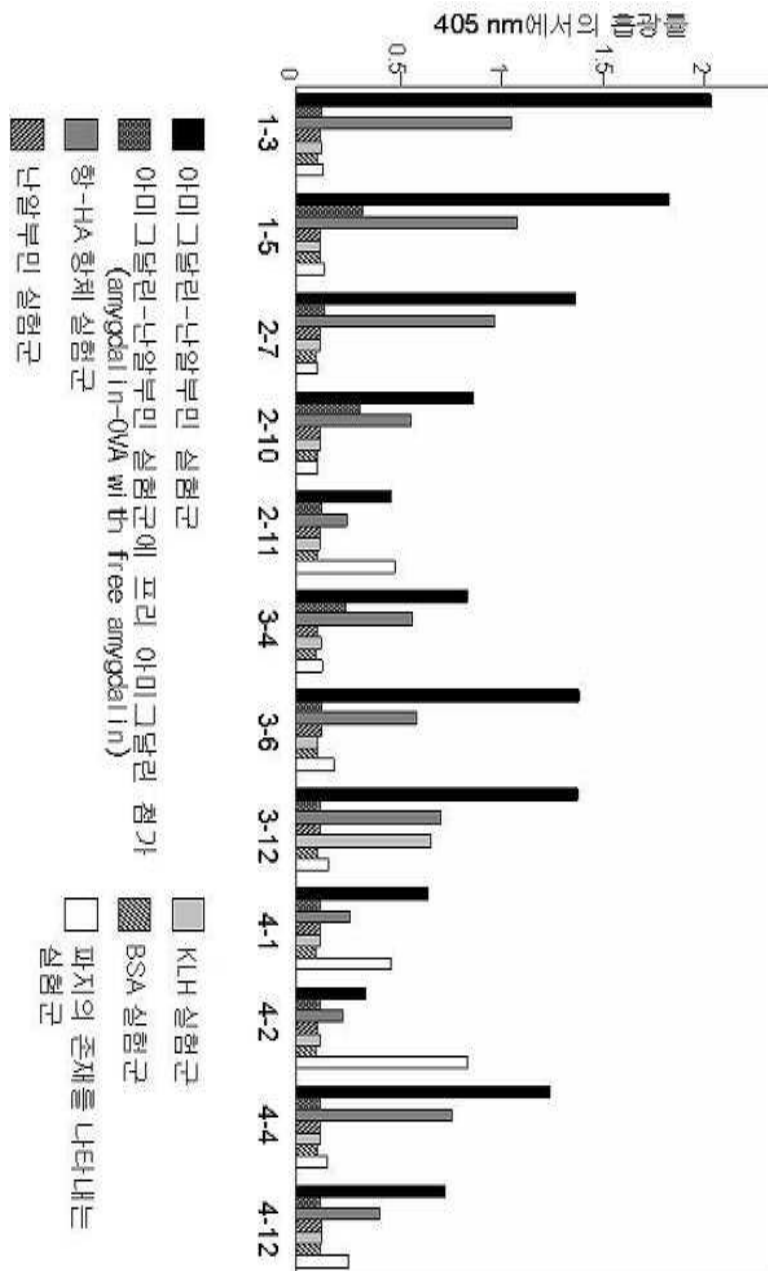
<1> 도 1은 항체 라이브러리에서 선발한 파지의 아미그달린에 대한 특이성을 효소면역흡착법(ELISA)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

<2> 도 2는 아미그달린에 대한 항체의 경쇄의 가변영역의 아미노산 서열 및 구조영역(Framework Region, FR), 상보성결정영역(Complementarity Determining Region, CDR)을 나타낸 것이다.

<3> 도 3은 아미그달린에 대한 항체의 중쇄의 가변영역의 아미노산 서열 및 구조영역(Framework Region, FR), 상보성결정영역(Complementarity Determining Region, CDR)을 나타낸 것이다.

도면

도면1



|     | FR1  | CDR1                                                     | FR2                |
|-----|------|----------------------------------------------------------|--------------------|
| 1-5 | ---- | AGSLRGQAAELDLTQTPSPVSAVGGTVTIDCASSQTVSNRLSWFQOKPGQPPK    |                    |
| 2-7 |      | METHSLRGQAAELVMTTQTPSPVSAVGGAVTISCASSQSVNNLLSWFQOKPGQPPK |                    |
| 4-4 | ---- | HASLRGQAAELDLTQTPSPVSAVGGTVTIDCASSQTVSNRLSWFQOKPGQPPK    |                    |
| 1-3 | ---- | GCSLRGQAAELDLTQTPSPVSAVGGTVTIDCASSQTVSNRLSWFQOKPGQPPK    |                    |
|     | CDR2 | FR3                                                      | CDR3               |
|     |      |                                                          | FR4                |
| 1-5 |      | LLIH RASHLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQGYG          | GDHVAFGGTELE       |
| 2-7 |      | LLIY RASRLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISEVQCDDAATYYCQGYG          | TEINFGGTELE        |
| 4-4 |      | LLIH RASHLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQGYG          | GDHVAFGGTELE       |
| 1-3 |      | LLIH RASHLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQGYG          | GDHVAFGGTELE       |
|     |      |                                                          |                    |
| 1-5 |      | ILRTVAAPSVFI                                             | PPSDEQLKSGTASVCLLN |
| 2-7 |      | ILRTVAAPSVFI                                             | PPSDEQLKSGTASVCLLN |
| 4-4 |      | ILRTVAAPSVFI                                             | PPSDEQLKSGTASVCLLN |
| 1-3 |      | ILRTVAAPSVFI                                             | PPSDEQLKSGTASVCLLN |

도면2

도면3

|      | FR1                                                           | CDR1 | FR2  |
|------|---------------------------------------------------------------|------|------|
| 1-3  | LARCHQWPWPSRWSPGETWSSLRSTPSLTLTCTASGFSFSSYWMYWM/RQAPGKGLEWIA  |      |      |
| 4-4  | EYSLPPAMETAQSVEESGGDLVKPEGSLTCTASGFSFSSYWMYWM/RQAPGKGLEWIA    |      |      |
| 1-5  | IYSLPPAMETAQSVEESGGDLVKPEGSLTCTASGFSFSSYWMYWM/RQAPGKGLEWIA    |      |      |
| 2-7  | DYSLPPAMETAQSLEESGGDLVKPEGSLTCTASGFSFSSYWMYWM/RQAPGKGLEWIA    |      |      |
| 3-12 | NYSLPPAMETAQSLEESGGDLVKPEGSLTCTKASGFSFSSYWMYWM/RQAPGKGLEWIG   |      |      |
|      | CDR2                                                          | FR3  | CDR3 |
| 1-3  | CIDIGG-- DRTYYANWAKGRFTISKTSSTVTLQMETTRRLTAADTATYFCARDGVGSVAF |      |      |
| 4-4  | CIDIGG-- DRTYYANWAKGRFTISKTSSTVTLQMETTRRLTAADTATYFCARDGVGSVAF |      |      |
| 1-5  | CIDIGG-- DRTYYANWAKGRFTISKTSSTVTLQMETTRRLTAADTATYFCARDGVGSVAF |      |      |
| 2-7  | CIDIGG-- DRTYYANWAKGRFTISKTSSTVTLQMETTRRLTAADTATYFCARDGVGSVAF |      |      |
| 3-12 | CIDIGS-- DTDHYASWAKGRFSISKTSSTVTLQLN-- SLTAADGTYFCARDGVGSVAF  |      |      |
|      | FR4                                                           |      |      |
| 1-3  | SIGLWGPGLVTSS                                                 |      |      |
| 4-4  | SIGLWGPGLVTSS                                                 |      |      |
| 1-5  | SIGLWGPGLVTSS                                                 |      |      |
| 2-7  | SIGLWGPGLVTSS                                                 |      |      |
| 3-12 | AIALWGPGLVTSS                                                 |      |      |

서열목록

- <110>

Ewha University Industry Collaboration Foundation
- <120>

Monoclonal Antibodies against Amygdalin
- <160>

38
- <170>

Kopatent In 1.71
- <210>

1
- <211>

38
- <212>

DNA
- <213>

Artificial Sequence

<220>

<223> V kappa 5' sense primer

<400> 1

gggccccaggc ggccgagctc gtgmtgaccc agactcca

38

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V kappa 5' sense primer

<400> 2

gggccccaggc ggccgagctc gatmtgaccc agactcca

38

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V kappa 5' sense primer

<400> 3

gggccccaggc ggccgagctc gtgatgaccc agactgaa

38

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V kappa 5' reverse primer

<400> 4

agatggtgca gccacagttc gtttgatttc cacattggtg cc

42

<210> 5  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Vkappa 5' reverse primer

<400> 5  
 agatgggtgca gccacagttc gtaggatctc cagctcggtc cc 42

<210> 6  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Vkappa5' reverse primer

<400> 6  
 agatgggtgca gccacagttc gtttgacsac cacctcggtc cc 42

<210> 7  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Vlamba 5' sense primer

<400> 7  
 gggcccaggc ggccgagctc gtgctgactc agtcgcctc 40

<210> 8  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> V lambda 3'reverse primer

<400> 8

agatggtgca gccacagttc ggcctgtgac ggtcagctgg gtccc

45

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH 5'sense primer

<400> 9

gctgccaac cagccatggc ccagtcggtg gaggagtccr gg

42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH 5' sense primer

<400> 10

gctgccaac cagccatggc ccagtcggtg aaggagtccg ag

42

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH 5' sense primer

<400> 11

gctgccaac cagccatggc ccagtcgytg gaggagtccg gg

42

<210> 12  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> VH5' sense primer

<400> 12  
 gctgcccaac cagccatggc ccagsagcag ctgrtggagt ccgg 44

<210> 13  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> VH5' reverse primer

<400> 13  
 cgatggggccc ttggtggagg ctgargagay ggtgaccagg gtgcc 45

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Ckappa 5' sense primer

<400> 14  
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc 24

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Ckappa 3' reverse primer

<400> 15  
ggccatggct ggttgggcag c 21

<210> 16  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CH1 5' sense primer

<400> 16  
gcctccacca agggcccatc ggtc 24

<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CH1 3' reverse primer

<400> 17  
agaagcgtag tccggaacgt c 21

<210> 18  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Sense primer for PCR assembly of rabbit VL sequences with the human Ckappa PCR product

<400> 18  
gaggaggagg aggaggaggc ggggcccagg cggccgagct c 41

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sense primer for PCR assembly of rabbit VH sequences with the human CH1 PCR product

<400> 19  
 gctgcccaac cagccatggc c 21

<210> 20  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Reverse primer for PCR assembly of chimeric light-chain sequences with chimeric heavy-chain (Fd) sequences

<400> 20  
 gaggaggagg aggaggagag aagcgtagtc cggaacgtc 39

<210> 21  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino acid sequence of VL region of clone of 1-5

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (-9)..(-1)  
 <223> leader sequence

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (1)..(23)  
 <223> FR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (24)..(36)  
 <223> CDR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (37)..(51)  
 <223> FR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (52)..(58)  
 <223> CDR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (59)..(90)  
 <223> FR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (91)..(101)  
 <223> CDR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (102)..(111)  
 <223> FR4

<400> 21  
 Ala Gly Ser Leu Arg Gly Gln Ala Ala Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr  
 -9 -5 1 6

Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys  
 11 16 21

Gln Ser Ser Gln Thr Val Val Ser Asn Asn Arg Leu Ser Trp Phe Gln  
 26 31 36

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Arg Ala Ser His  
41 46 51

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
56 61 66 71

Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr  
76 81 86

Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Gly Asp His Val Ala Phe Gly Gly Gly  
91 96 101

Thr Glu Leu Glu Ile Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
106 111 116

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
121 126 131

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
136 141 146 151

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
156 161 166

<210> 22  
<211> 180  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of VL region of clone 2-7

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (-15)..(-1)  
<223> leader sequence

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (1)..(21)

<223> FR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (22)..(34)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (35)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50)..(56)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (57)..(88)

<223> FR3

<220>

<221> DOMAIN

<222> (89)..(99)

<223> CDR3

<220>

<221> DOMAIN

<222> (100)..(109)

<223> FR4

<400> 22

Met Glu Thr His Ser Leu Arg Gly Gln Ala Ala Glu Leu Val Met Glu  
-15 -11 -6 -1

Thr Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Gly Gly Ala Val  
4 9 14

Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Val Asn Asn Asn Leu Leu

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 19                                                              | 24  | 29  |
| Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr |     |     |
| 34                                                              | 39  | 44  |
| Arg Ala Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser |     |     |
| 49                                                              | 54  | 59  |
| Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Glu Val Gln Cys Asp |     |     |
| 69                                                              | 74  | 79  |
| Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Gly Thr Glu Ile Asn |     |     |
| 84                                                              | 89  | 94  |
| Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro |     |     |
| 99                                                              | 104 | 109 |
| Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr |     |     |
| 114                                                             | 119 | 124 |
| Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys |     |     |
| 129                                                             | 134 | 139 |
| Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu |     |     |
| 149                                                             | 154 | 159 |
| Ser Val Thr Glu                                                 |     |     |
| 164                                                             |     |     |

<210> 23  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino acid sequence of VL region of clone4-4

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (-9)..(-1)  
 <223> leader sequence

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (1)..(23)  
 <223> FR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (24)..(36)  
 <223> CDR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (37)..(51)  
 <223> FR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (52)..(58)  
 <223> CDR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (59)..(90)  
 <223> FR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (91)..(101)  
 <223> CDR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (102)..(111)  
 <223> FR4

<400> 23  
 His Ala Ser Leu Arg Gly Gln Ala Ala Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr  
 -9 -5 1 6

Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys  
 11 16 21

Gln Ser Ser Gln Thr Val Val Ser Asn Asn Arg Leu Ser Trp Phe Gln  
26 31 36

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Arg Ala Ser His  
41 46 51

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
56 61 66 71

Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr  
76 81 86

Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Gly Asp His Val Ala Phe Gly Gly Gly  
91 96 101

Thr Glu Leu Glu Ile Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
106 111 116

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
121 126 131

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
136 141 146 151

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
156 161 166

<210> 24  
<211> 176  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of VL region of clone 1-3

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (-9)..(-1)  
<223> leader sequence

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (1)..(23)  
 <223> FR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (24)..(36)  
 <223> CDR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (37)..(51)  
 <223> FR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (52)..(58)  
 <223> CDR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (59)..(90)  
 <223> FR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (91)..(101)  
 <223> CDR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (102)..(111)  
 <223> FR4

<400> 24  
 Gly Cys Ser Leu Arg Gly Gln Ala Ala Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr  
 -9 -5 1 6

Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys  
11 16 21

Gln Ser Ser Gln Thr Val Val Ser Asn Asn Arg Leu Ser Trp Phe Gln  
26 31 36

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Arg Ala Ser His  
41 46 51

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
56 61 66 71

Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr  
76 81 86

Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Gly Asp His Val Ala Phe Gly Gly Gly  
91 96 101

Thr Glu Leu Glu Ile Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
106 111 116

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
121 126 131

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
136 141 146 151

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
156 161 166

<210> 25  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of VH region of clone1-3

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (1)..(41)  
<223> FR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (42)..(46)  
 <223> CDR1

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (47)..(60)  
 <223> FR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (61)..(77)  
 <223> CDR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (78)..(110)  
 <223> FR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (111)..(122)  
 <223> CDR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (123)..(133)  
 <223> FR4

<400> 25  
 Leu Ala Arg Cys His Gln Pro Trp Pro Ser Arg Trp Arg Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Thr Trp Ser Ser Leu Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Leu Thr Cys  
 20 25 30

Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Tyr Trp Val  
 35 40 45

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Asp Ile  
50 55 60

Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr  
85 90 95

Arg Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly  
100 105 110

Val Gly Ser Val Ala Phe Ser Ile Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser  
130

<210> 26  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequenc of VH region of clone 4-4

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (1)..(41)  
<223> FR1

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (42)..(46)  
<223> CDR1

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (47)..(60)  
<223> FR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (61)..(77)  
 <223> CDR2

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (78)..(110)  
 <223> FR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (111)..(122)  
 <223> CDR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (123)..(133)  
 <223> FR4

<400> 26  
 Glu Tyr Ser Leu Pro Pro Ala Met Glu Thr Ala Gln Ser Val Glu Glu  
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys  
 20 25 30

Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Tyr Trp Val  
 35 40 45

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Asp Ile  
 50 55 60

Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr  
 85 90 95

Arg Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Val Gly Ser Val Ala Phe Ser Ile Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |

Val Thr Val Ser Ser  
130

<210> 27  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of VH region of clone 1-5

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (1)..(41)  
<223> FR1

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (42)..(46)  
<223> CDR1

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (47)..(60)  
<223> FR2

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (61)..(77)  
<223> CDR2

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (78)..(110)  
<223> FR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (111)..(122)  
 <223> CDR3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (123)..(133)  
 <223> FR4

<400> 27  
 Ile Tyr Ser Leu Pro Pro Ala Met Glu Thr Ala Gln Ser Val Glu Glu  
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys  
 20 25 30

Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Tyr Trp Val  
 35 40 45

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Asp Ile  
 50 55 60

Gly Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr  
 85 90 95

Arg Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly  
 100 105 110

Val Gly Ser Val Ala Phe Ser Ile Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
 115 120 125

Val Thr Val Ser Ser  
 130

<210> 28  
 <211> 135  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequenc of VH region of clone 2-7

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(41)

<223> FR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (42)..(46)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (47)..(60)

<223> FR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (61)..(79)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (80)..(112)

<223> FR3

<220>

<221> DOMAIN

<222> (113)..(124)

<223> CDR3

<220>

<221> DOMAIN

<222> (125)..(135)

<223> FR4

<400> 28  
 Asp Tyr Ser Leu Pro Pro Ala Met Glu Thr Ala Gln Ser Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys  
 20 25 30

Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Asn Tyr Trp Ile Tyr Trp Val  
 35 40 45

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Asp Ile  
 50 55 60

Gly Ser Gly Met Glu Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg  
 65 70 75 80

Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu  
 85 90 95

Thr Thr Arg Leu Thr Val Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 100 105 110

Asp Gly Val Gly Ser Val Ala Phe Ser Ile Gly Leu Trp Gly Pro Gly  
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser  
 130 135

<210> 29  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino acid sequence of VH region of clone 3-12

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (1)..(41)  
 <223> FR1

<220>  
 <221> DOMAIN

<222> (42)..(46)  
<223> CDR1

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (47)..(60)  
<223> FR2

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (61)..(77)  
<223> CDR2

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (78)..(108)  
<223> FR3

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (109)..(120)  
<223> CDR3

<220>  
<221> DOMAIN  
<222> (121)..(131)  
<223> FR4

<400> 29  
Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Ala Met Glu Thr Ala Gln Ser Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys  
20 25 30

Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Tyr Trp Val  
35 40 45

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asp Ile  
50 55 60

Gly Ser Asp Thr Asp His Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Ser  
65 70 75 80

Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu  
85 90 95

Thr Ala Ala Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Val Gly  
100 105 110

Gly Ala Gly Phe Ala Ile Ala Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr  
115 120 125

Val Ser Ser  
130

<210> 30  
<211> 528  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VL region of clone 1-5

<400> 30  
gccggcagcc tgcgcggcca ggccgccgag ctggacctga cccagacccc cagccccgtg 60  
  
agcgccgccc tggcgggcac cgtgaccatc gactgccaga gcagccagac cgtggtgagc 120  
  
aacaaccgcc tgagctggtt ccagcagaag cccggccagc cccccaagct gctgatccac 180  
  
cgcgccagcc acctggccag cggcgtgccc agccgcttca agggcagcgg cagcggcacc 240  
  
cagttcacc ctgaccatcag cggcgtgcag tgcgacgacg ccgccaccta ctactgccag 300  
  
ggctactacg gcgaccacgt ggccttcggc ggcggcaccg agctggagat cctgcgcacc 360  
  
gtggccgccc ccagcgtgtt catcttcccc cccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc 420  
  
gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc taccgccgag agccaaggt gcagtgaag 480

gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc caggagagcg tgaccgag 528

<210> 31  
<211> 540  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VL region of clone 2-7

<400> 31  
atggagaccc acagcctcgc cggccaggcc gccgagctgg tgatggagac cacccagacc 60

cccagccccg tgagcgccag cgtgggcggc gccgtgacca tcagctgcca gagcagccag 120

agcgtggtga acaacaacct gctgagctgg ttccagcaga agcccgcca gcccccaag 180

ctgctgatct accgcgccag cgcctggcc agcggcgtgc ccagccgctt caagggcagc 240

ggcagcggca cccagttcac cctgaccatc agcgaggtgc agtgcgacga cgccgccacc 300

tactactgcc agggctacta cggcaccgag atcaacttcg gcggcggcac cgagctggag 360

atcctgcgca ccgtggccgc cccagcgtg ttcatcttcc ccccgagcga cgagcagctg 420

aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag 480

gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag 540

540

<210> 32  
<211> 528  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VL region of clone 4-4

<400> 32  
cagccagcc tgcgcggcca ggccgccgag ctggacctga cccagacccc cagccccgtg 60  
  
agcgcgcgcg tgggcggcac cgtgaccatc gactgccaga gcagccagac cgtggtgagc 120  
  
aacaaccgcc tgagctgggt ccagcagaag cccggccagc cccccaagct gctgatccac 180  
  
cgcgccagcc acctggccag cggcgtgccc agccgcttca agggcagcgg cagcggcacc 240  
  
cagttaccc tgaccatcag cggcgtgcag tgcgacgacg ccgccaccta ctactgccag 300  
  
ggctactacg gcgaccacgt ggccttcggc ggccggcaccg agctggagat cctgcgcacc 360  
  
gtggccgccc ccagcgtgtt catcttcccc cccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc 420  
  
gccagcgtgg tgtccctgct gaacaacttc taccgccgag agccaaggt gcagtgaag 480  
  
gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc caggagagcg tgaccgag 528

<210> 33  
<211> 527  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VL region of clone 1-3

<400> 33  
ggctgcagcc tgcgcggcca ggccgccgag ctggacctga cccagacccc cagccccgtg 60  
  
agcgcgcgcg tgggcggcac cgtgaccatc gactgccaga gcagccagac cgtggtgagc 120  
  
aacaaccgcc tgagctgggt ccagcagaag cccggccagc cccccaagct gctgatccac 180  
  
cgcgccagcc acctggccag cggcgtgccc agccgcttca agggcagcgg cagcggcacc 240  
  
cagttaccc tgaccatcag cggcgtgcag tgcgacgacg ccgccaccta ctactgccag 300  
  
ggctactacg gcgaccacgt ggccttcggc ggccggcaccg agctggagat cctgcgcacc 360

gtggcgcgcc ccagcgtgtt catcttcccc ccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc 420

gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc taccgccg aggccaaagt gcagtggaag 480

gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc caggagagcg tgaccga 527

<210> 34  
<211> 399  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VH region of clone 1-3

<400> 34  
ctggcccgt gccaccagcc ctggcccagc cgctggcgca gcccggcgga gacctggagc 60

agcctgcgca gacccccag cctgacctg acctgcaccg ccagcggctt cagcttcagc 120

agcagctact ggatctactg ggtgcgccag gccccggca agggcctgga gtggatcgcc 180

tgcctcgaca tcggcggcga ccgcacctac tacgccaact gggccaaggg ccgcttcacc 240

atcagcaaga ccagcagcac caccgtgacc ctgcagatgg agaccaccg cctgaccgcc 300

gccgacaccg ccacctactt ctgcgccgc gacggcgtgg gcagcgtggc cttcagcatc 360

ggcctgtggg gccccggcac cctggtgacc gtgagcagc 399

<210> 35  
<211> 398  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VH region of clone 4-4

<400> 35

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| gagtacagcc tgccccccgc catggagacc gccagagcg tggaggagag cggcggcgac | 60  |
| ctggtgaagc ccgagggcag cctgacctg acctgcaccg ccagcggctt cagcttcagc | 120 |
| agcagctact ggatctactg ggtgcgccag gccccggca agggcctgga gtggatcgcc | 180 |
| tgcacgaca tcggcggcga ccgcacctac tacgccaact gggccaaggc ccgcttcacc | 240 |
| atcagcaaga ccagcagcac caccgtgacc ctgcagatgg agaccaccg cctgaccgcc | 300 |
| gccgacaccg ccacctactt ctgcgccgc gacggcgtgg gcagcgtggc cttcagcatc | 360 |
| ggcctgtggg gccccggcac cctggtgacc gtgagcag                        | 398 |

<210> 36  
 <211> 399  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Nucleotide sequence encoding VH region of clone 1-5

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 36                                                         |     |
| atctacagcc tgccccccgc catggagacc gccagagcg tggaggagag cggcggcgac | 60  |
| ctggtgaagc ccgagggcag cctgacctg acctgcaccg ccagcggctt cagcttcagc | 120 |
| agcagctact ggatctactg ggtgcgccag gccccggca agggcctgga gtggatcgcc | 180 |
| tgcacgaca tcggcggcga ccgcacctac tacgccaact gggccaaggc ccgcttcacc | 240 |
| atcagcaaga ccagcagcac caccgtgacc ctgcagatgg agaccaccg cctgaccgcc | 300 |
| gccgacaccg ccacctactt ctgcgccgc gacggcgtgg gcagcgtggc cttcagcatc | 360 |
| ggcctgtggg gccccggcac cctggtgacc gtgagcagc                       | 399 |

<210> 37  
 <211> 404

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VH region of clone 2-7

<400> 37  
gactacagcc tgccccccgc catggagacc gccagagcc tggaggagag cggcggcgac 60  
  
ctggtgaagc ccgagggcag cctgaccctg acctgcaccg ccagcggctt cagcttcagc 120  
  
agcaactact ggatctactg ggtgcgccag gccccggca agggcctgga gtggatcgcc 180  
  
tgcacgaca tcggcagcgg catggagacc acctactacg ccaactgggc caagggccgc 240  
  
ttcacatca gcaagaccag cagcaccacc gtgaccctgc agatggagac caccgcctg 300  
  
accgtggcgc acaccgccac ctacttctgc gcccgcgacg gcgtgggcag cgtggccttc 360  
  
agcatcgcc tgtggggccc cggcaccctg gtgaccatca gcag 404

<210> 38  
<211> 393  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding VH region of clone 3-12

<400> 38  
aactacagcc tgccccccgc catggagacc gccagagcc tggaggagag cggcggcgac 60  
  
ctggtgaagc ccgagggcag cctgaccctg acctgcaagg ccagcggctt cagcttcagc 120  
  
agcagctact ggatctactg ggtgcgccag gccccggca agggcctgga gtggatcgcc 180  
  
tgcacgaca tcggcagcga caccgaccac tacgccagct gggccaaggg ccgcttcagc 240  
  
atcagcaaga ccagcagcac caccgtgacc ctgcagctga acagcctgac cgccgccgac 300

accggcacct acttctgcgc ccgcgacggc gtgggcggcg ccggttcgc catgcacctg 360

tggggccccg gcacctggt gaccgtgagc agc 393