



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월29일

(11) 등록번호 10-1404512

(24) 등록일자 2014년05월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2007-7014725
- (22) 출원일자(국제) 2006년01월05일
심사청구일자 2010년12월06일
- (85) 번역문제출일자 2007년06월27일
- (65) 공개번호 10-2007-0092242
- (43) 공개일자 2007년09월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2006/050059
- (87) 국제공개번호 WO 2006/072620
국제공개일자 2006년07월13일
- (30) 우선권주장
60/641,144 2005년01월05일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2001083525 A1

- (73) 특허권자
에프-스타 바이오테크놀로지셰 포르숨스 운드 엔트 비클롱스게스.엠.베.하.
오스트리아 에이-1230 비엔나 가스트게브가세 5-13
- (72) 발명자
뤼커 플로리안
오스트리아 비엔나 A-1170 몬티가세 6
우즈니아-크노프 코르다나
오스트리아 비엔나 A-1180 페터 요르단 스트라세 163/2/1
힘러 고트프리트
오스트리아 비엔나 A-1180 콜로레도가세 29/10
- (74) 대리인
하상구, 하영욱

전체 청구항 수 : 총 48 항

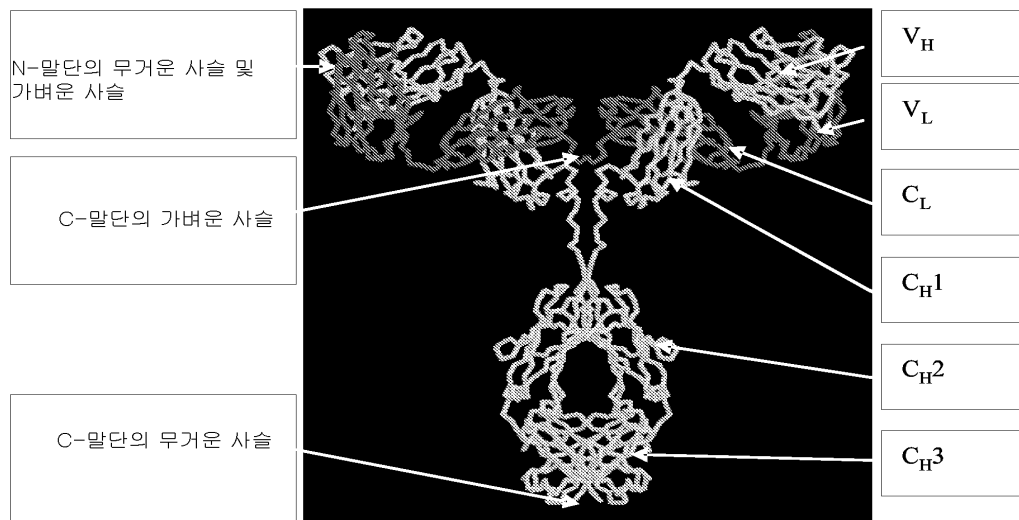
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **상보성 결정부위와 다른 분자의 부위에서 처리된 결합성을 갖는 합성 면역글로불린 영역**

(57) 요약

본 발명은 상기 면역글로불린의 구조적 루프부위에서 하나 이상의 개질을 포함하고, 항원의 에피토프에 상기 면역글로불린의 결합을 결정하는 면역글로불린을 처리하는 방법으로서, 상기 미개질된 면역글로불린은 상기 에피토프에 상당히 결합하지 않고, 상기 단계는 -하나 이상의 구조적 루프부위를 포함하는 면역글로불린을 코드화한 핵산을 제공하는 단계, -상기 하나 이상의 구조적 루프 부위에 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 개질하는 단계, -발현계에 상기 개질된 핵산을 운반하는 단계, -상기 개질된 면역글로불린을 발현하는 단계, -에피토프와 상기 발현된 개질된 면역글로불린을 접촉하는 단계, -상기 개질된 면역글로불린이 상기 에피토프에 결합 여부를 결정하는 단계를 포함하는 방법, 또한 개질된 면역글로불린을 제공한다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

개질된 구조적 루프 부위를 포함하는 면역글로불린을 제작하여 비-CDR 결합 자리를 제공하고, 항원의 에피토프에 대한 상기 면역글로불린의 결합을 결정하는 방법으로서:

미개질된 구조적 루프 부위는 상기 에피토프에 유의적으로 결합하지 않고,

- 하나 이상의 구조적 루프 부위를 포함하는 면역글로불린을 코드하는 핵산을 제공하는 단계,
- 상기 구조적 루프 부위의 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 돌연변이유발에 의해 개질하는 단계로서, 상기 개질은
 - a) 랜덤, 세미랜덤, 위치 지정 랜덤, 스캐닝 돌연변이 발현 및 조합적 접근으로 이루어지는 군에서 선택되는 돌연변이유발 방법에 의한 것이거나, 또는
 - b) 하나 이상의 구조적 루프에 대해 항원의 에피토프에 결합하는 자리를 제공하는 것인 개질하는 단계,
- 발현계에 개질된 핵산을 전달하는 단계,
- 개질된 면역글로불린을 발현시키는 단계,
- 발현된 개질 면역글로불린을 항원의 에피토프와 접촉시키는 단계, 및
- 개질된 면역글로불린이 상기 에피토프와 결합하는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 항원은 알레르겐, 종양 관련 항원, 자가 항원, 효소, 박테리아 항원, 진균 항원, 바이러스 항원 및 원생동물의 항원으로 이루어진 군에서 선택되는 분자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은, 면역글로불린의 하나 이상의 구조적 루프 부위에 있어서의 하나 이상의 개질을 통해서 하나 이상의 제 1 분자 및 하나 이상의 제 2 분자에 특이적으로 결합하는 다특이성이며, 상기 제 2 분자는 알레르겐, 종양 관련 항원, 자가 항원, 효소, 박테리아 항원, 진균 항원, 바이러스 항원 및 원생동물의 항원으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 분자는 EpCAM, 종양 관련 당단백질-72(TAG-72), 종양 관련 항원 CA 125, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), 루이스 Y 관련 탄수화물을 발현하는 종양 관련 항원, 암 배아 항원(CEA), CEACAM5, HMGF PEM, 접액소 MUC1, MUC18 및 사이토케라틴 종양 관련 항원, 박테리아 항원, 바이러스 항원, 알레르겐, 플루오레세인, 리소자임, 툴 유사 수용체 9, 에리스로포이에틴, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD33(p67 단백질), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마; TNF-알파, TNF베타2, TNF.알파., TNF알파베타,

TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, TRAIL 수용체-1, A1 아테노신 수용체, 림포톡신 베타 수용체, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, 인테그린 베타1, 인테그린 베타2, 인테그린 알파4/베타7, 인테그린 알파2, 인테그린 알파3, 인테그린 알파4, 인테그린 알파5, 인테그린 알파6, 인테그린 알파v, 알파V베타3 인테그린, FGFR-3, 케라티노사이트 성장 인자, VLA-1, VLA-4, L-셀렉틴, anti-Id, E-셀렉틴, HLA, HLA-DR, CTLA-4, T세포 수용체, B7-1, B7-2, VNR인테그린, TGF 베타1, TGF베타2, 에오타신1, BlyS(B-림프구 자극인자), 상보체 C5, IgE, 인자 VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR(ErbB-1), Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB-4), 조직 인자, VEGF, VEGFR, 엔도텔린 수용체, VLA-4, 혈액형 항원과 같은 탄수화물 및 관련 탄수화물, Galii-글리코실화, 가스트린, 가스트린 수용체, 종양 관련 탄수화물, 합텐 NP-cap 또는 NIP-cap, T 세포 수용체 알파/베타, E-셀렉틴, 디곡신, 태반 알칼리성 포스파타아제(PLAP) 및 고환 PLAP 유사 알칼리성 포스파타아제, 트랜스페린 수용체, 헤파라나제 I, 인간 심장 미오신, 당단백질 IIb/IIIa(GPIIb/IIIa), 인간 사이토메갈로 바이러스(HCMV) gH 외피 당단백질, HIV gp120, HCMV, 호흡기 세포 융합 바이러스 RSV F, RSVF Fgp, VNR 인테그린, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, HIV IIIB gp120 V3 루프, 호흡기 세포 융합 바이러스(RSV) Fgp, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV) gD 당단백질, HSV gB 당단백질, HCMV gB 외피 당단백질, 클로스트리듐 퍼프린젠스 독소 및 그 프라그먼트로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 FcRn에 대한 결합 특이성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 작동체 분자(effector molecule)에 대한 결합 특이성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 면역글로불린 또는 그 일부의 무거운 사슬을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 면역글로불린의 하나 이상의 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 구조적 루프로 연결된 면역글로불린 영역의 2개의 베타 가닥으로 이루어지는 미니영역, 단일 면역글로불린 가변 영역 또는 단일 사슬 Fv를 포함하는 하나 이상의 단일 영역 또는 그 일부를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 Fab 프라그먼트, Fc 프라그먼트, 단일 면역글로불린 영역, 단일 사슬 CH3 이량체(scCH3), scCH2, scCH1/CL 및 전체 길이 면역글로불린으로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 Fab 프라그먼트, Fc 프라그먼트 또는 전체 길이 면역글로불린을 포함하고, CH1, CH2, CH3, CH4, CL 및 그 조합의 군에서 선택되는 불변 영역을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 아미노산 7~21, 아미노산 25~39, 아미노산 41~81, 아미노산 83~85, 아미노산 89~103 및 아미노산 106~117(여기에서, 넘버링은 IMGT에 따른다.)로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열 내의 아미노산 위치 중 하나에 개질을 포함하는 CH1, CH2, CH3 또는 CH4의 구조적 루프 부위 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 Ig-카파 또는 Ig-람다 중 어느 하나를 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 아미노산 8~18, 아미노산 27~35, 아미노산 42~78, 아미노산 83~85, 아미노산 92~100, 아미노산 108~117 및 아미노산 123~126(여기에서, 넘버링은 IMGT에 따른다.)으로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열 내의 아미노산 위치 중 하나에 개질을 포함하는 Ig-카파 또는 Ig-람다의 구조적 루프 부위 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 아미노산 8~20, 아미노산 44~50, 아미노산 67~76 및 아미노산 89~101(여기에서, 넘버링은 IMGT에 따른다.)로 이루어지는 군에서 선택되는 아미노산 서열 내의 아미노산 위치 중 하나에 개질을 포함하는 가변 영역의 구조적 루프 부위 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 인간, 인간화, 키메라, 쥐과 또는 낙타 면역글로불린인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4 및 IgM으로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질은 뉴클레오티드 치환을 야기하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 개질된 뉴클레오티드 서열은 5'-NNS-3', 5'-NNN-3' 또는 5'-NNK-3' 서열을 갖는 하나 이상의 뉴클레오티드

반복 유닛을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 박테리아 숙주, 이스트 세포, 식물 세포, 동물 세포, 식물 및 동물로 이루어지는 군에서 선택되는 숙주에서 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 4 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린의 분자에 대한 특이적 결합은 효소 결합 면역흡착제 분석(ELISA), 표면 플라즈몬 공명 분석, 포화 이동차 핵 자기 공명 분광, 전이 NOE(trNOE) 핵 자기 공명 분광, 경쟁 분석, 조직 결합 분석, 생 세포 결합 분석 및 세포 추출물 분석으로 이루어지는 군에서 선택되는 결합 분석에 의해 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질된 면역글로불린은 유기 분자, 효소 라벨, 방사성 라벨, 착색 라벨, 형광체 라벨, 색원체 라벨, 발광체 라벨, 합텐, 디콕시제닌, 비오틴, 금속 착체, 금속, 콜로이드 금 및 그 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는 라벨에 콘쥬게이트되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

생체내 반감기가 연장된 분자의 제조방법으로서:

제 6 항에 기재된 개질된 면역글로불린을 도입하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

작동체 기능을 갖는 분자의 제조방법으로서:

제 7 항에 기재된 개질된 면역글로불린을 도입하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

개질된 면역글로불린은 항원의 에피토프에 결합하고, 미개질된 구조적 루프 부위는 상기 에피토프에 유의적으로 결합하지 않는 개질된 구조적 루프 부위를 갖는 면역글로불린을 포함하는 라이브러리의 제조 방법으로서:

- 하나 이상의 구조적 루프 부위를 포함하는 면역글로불린을 코딩하는 핵산을 제공하는 단계,
- 돌연변이유발 방법에 의해서 상기 구조적 루프 부위의 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 개질하는 단계,
- 개질된 면역글로불린의 라이브러리를 제조하는 단계, 및
- 항원의 에피토프에 결합하는 면역글로불린의 수를 상기 라이브러리 내에서 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 라이브러리의 제조 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

하나 이상의 구조적 루프를 개질하여 상기 에피토프에 대한 새로운 결합 자리를 제공하는 것을 특징으로 하는 라이브러리의 제조 방법.

청구항 29

제 27 항 또는 제 28 항에 있어서,

상기 개질은 상기 하나 이상의 구조적 루프 부위 중 6개 이상의 아미노산 위치에서의 돌연변이를 야기하는 것을

특징으로 하는 라이브러리의 제조 방법.

청구항 30

제 27 항 또는 제 28 항에 기재된 라이브러리의 제조 방법에 의해 얻어지는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

상기한 10개 이상의 개질된 면역글로불린을 포함하는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 32

제 30 항에 있어서,

상기 에피토프에 결합하는 상이한 10개 이상의 개질된 면역글로불린을 포함하는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 33

제 30 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 구조적 루프에 의해 연결된 면역글로불린 영역의 2개의 베타 가닥으로 이루어지는 미니영역, 단일 가변 영역 또는 단일 사슬 Fv를 포함하는 하나 이상의 단일 영역 또는 그 일부를 포함하는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 34

제 30 항에 있어서,

상기 개질된 구조적 루프 부위는 CH1, CH2, CH3, CH4 및 CL로 이루어지는 군에서 선택되는 면역글로불린 불변 영역의 구조적 루프 부위인 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 35

제 30 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 Fab 프라그먼트, Fc 프라그먼트 또는 전체 길이 면역글로불린을 포함하고, CH1, CH2, CH3, CH4, CL 및 그 조합으로 이루어지는 군에서 선택되는 면역글로불린 불변 영역을 함유하는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 36

제 30 항에 있어서,

상기 개질된 구조적 루프 부위는 Ig-카파 또는 Ig-람다 중 어느 하나의 구조적 루프 부위인 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 37

제 30 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 개질된 구조적 루프 부위를 갖는 가변 영역을 함유하는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 38

제 30 항에 있어서,

면역글로불린의 단백질 라이브러리인 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 39

제 30 항에 있어서,

상기 라이브러리는 숙주의 표면에 표시되는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

상기 숙주는 포유류, 박테리아, 곤충 또는 이스트 세포로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 41

제 30 항에 있어서,

상기 라이브러리는 파지, 파지미드 또는 바이러스로 표시되는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 42

제 30 항에 있어서,

면역글로불린의 핵산 라이브러리인 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 43

제 30 항에 있어서,

상기 라이브러리는 시험관내 디스플레이 기술에 의해 표시되는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 44

분자의 특이적 검출 방법으로서:

(a) 제 30 항에 기재된 개질된 면역글로불린의 라이브러리를 상기 분자를 함유하는 시험 샘플에 접촉시키는 단계, 및

(b) 형성된 특정의 개질된 면역글로불린/분자 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

분자에 결합하는 개질된 면역글로불린을 특이적으로 단리하는 방법으로서:

(a) 제 30 항에 기재된 개질된 면역글로불린의 라이브러리를 상기 분자를 함유하는 시험 샘플에 접촉시키는 단계,

(b) 형성된 특정의 개질된 면역글로불린/분자 복합체를 분리하는 단계, 및

(c) 상기 복합체로부터 상기 개질된 면역글로불린을 단리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 면역글로불린 또는 그 일부의 가벼운 사슬을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 면역글로불린의 하나 이상의 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질은 뉴클레오티드 결실을 야기하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 개질은 뉴클레오티드 삽입을 야기하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 개질된 면역글로불린을 처리하고 제조하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0002] 일반적인 분야는 특이한 결합성을 부여하기 위한 단백질의 처리이다. 더 구체적으로 여기에 관련있는 처리된 단백질은 면역글로불린(항체)이고, 더욱 더 구체적으로는 면역글로불린의 1개의 영역 또는 2개의 영역, 또는 단일 영역의 조합이다. 면역글로불린의 특이한 결합성은 항원과 같은 다른 분자와의 상호작용을 제어하기 때문에 중요한 특성이고, 진단 및 치료 적용에 유용한 면역글로불린을 제공한다.

배경 기술

[0003] 여기에서 기본적인 항체구조는 예로서 완전한 IgG1 면역글로불린을 사용해서 설명한다.

[0004] 2개의 동일한 무거운(H) 사슬 및 2개의 동일한 가벼운(L) 사슬을 결합해서 Y형 항체분자를 형성한다. 무거운 사슬은 각각 4개의 영역을 갖는다. 아미노 말단의 가변영역(VH)은 Y의 끝에 있다. 이들은 Y'의 줄기를 토대로 3개의 불변 영역:CH1, CH2 및 카르복시 말단 CH3으로 이어진다. 짧은 스트레치, 스위치는 무거운 사슬 가변 영역과 불변 영역을 연결한다. 힌지(hinge)는 CH2와 CH3(Fc프로그먼트)를 항체의 나머지(Fab프로그먼트)에 연결한다. 하나의 Fc와 2개의 동일한 Fab프로그먼트는 완전한 항체 분자에 있어서 힌지의 단백질 가수분해 분할에 의해 생성될 수 있다. 가벼운 사슬은 2개의 영역, 가변 영역(VL) 및 불변 영역(CL)으로 이루어지고, 스위치로 분리된다.

[0005] 힌지부위에 디설피드 결합은 2개의 무거운 사슬을 연결한다. 가벼운 사슬은 부가적인 디설피드 결합에 의해 무거운 사슬에 결합된다. Asn 연결 탄수화물 부분은 면역글로불린의 급에 따라 불변 영역에서의 다른 위치에 부착된다. IgG1에 대해 힌지부위에 Cys235와 Cys238 쌍사이에 2개의 디설피드 결합은 2개의 무거운 사슬에 결합한다. 가벼운 사슬은 CH1 영역에 Cys229와 CL영역에 Cys214 사이에 2개의 부가적인 디설피드 결합에 의해 무거운 사슬에 결합된다. 탄수화물 부분은 각 CH2의 Asn306에 부착하고, Y줄기에 벌지(bulge)라고 하는 것을 생성한다.

[0006] 이들 특성은 충분한 기능적인 결과를 갖는다. 무거운 사슬과 가벼운 사슬의 가변 영역 (VH)와 (VL)은 항원과 반응하는 위치인 Y의 "끝"에 있다. 이 분자의 끝은 아미노산 서열의 N-말단이 위치한 측에 있다. Y의 줄기는 보체의 활성화 및 Fc 수용체와 상호작용과 같은 작동체 기능, 또는 ADCC 및 ADCP을 효율적으로 조정하기 위한 방법으로 추정된다. CH2와 CH3 영역은 작동체 단백질과 상호작용을 용이하게 하는 것으로 생각된다. 아미노산 서열의 C-말단은 그 끝쪽의 반대측에 위치되고, 그 Y의 "바닥"이라고 칭할 수 있다. 완전한 IgG1의 구조는 도1a에 설명된다.

[0007] 람다(λ) 및 카파(κ)라고 하는 2개의 형태의 가벼운 사슬은 항체에서 발견된다. 주어진 면역글로불린 중 하나는 λ 사슬 또는 κ 사슬이고, 각각인 것은 아니다. λ 또는 κ 가벼운 사슬을 갖는 항체 사이에 기능적인 차이는 발견되지 않는다.

[0008] 주요한 인간 면역글로불린류 모노머의 구조적 조직은 도1b에 표시된다. 부류는 그 각각의 무거운 사슬의 서열 및 조성이 다르다. IgM 및 IgE는 힌지 영역이 부족하지만 각각은 추가의 무거운 사슬영역(CH4)를 함유한다. 그 사슬을 연결한 디설피드 결합(라인)의 수 및 위치는 아이소타입 사이에 차이가 있다. 이들은 N-연결 탄수화물기의 분포도 다르고, 기호로는 원으로 표시된다.

[0009] 항체분자의 각 영역은 압축된 역평행 베타 배열로 서로 대향해서 단단히 채워진 2개의 베타 시트의 유사한 구조를 갖는다. 이 유지된 구조는 면역글로불린 접힘이라고 한다. 불변 영역의 면역글로불린 접힘은 4-가닥 시트(4-stranded sheet)에 대향해서 채워진 3-가닥 시트(3-stranded sheet)를 함유한다. 이 접힘은 각 시트의 베타 가닥 사이의 수소결합, 내부의 대향 시트의 잔기 사이의 소수성 결합, 및 시트 사이의 디설피드 결합에 의해 안정화된다. 3가닥 시트는 C, F 및 G 가닥으로 이루어지고, 4가닥 시트는 A, B, E 및 D 가닥을 갖는다. 문자 A부터 G는 면역글로불린 접힘의 아미노산 서열에 따라서 베타 가닥의 서열위치를 나타낸다.

[0010] 가변 영역의 접힘은 4가닥 및 5가닥의 2개의 시트로 배열된 9개의 베타 가닥을 갖는다. 5가닥 시트는 불변 영역의 3가닥 시트와 구조적으로 동족이고, 추가의 가닥 C' 및 C"을 함유한다. 나머지 가닥(A, B, C, D, E, F, G)은 불변 영역의 면역글로불린 접힘에 있어서 대응하는 것으로서 동일한 위상 및 유사한 구조를 갖는다. 디설피드 결합은 불변 영역에서와 같이 대향 시트인 가닥 B와 F를 연결한다. 도2에서 면역글로불린 접힘이 면역글로불린의 불변 영역 및 가변 영역에 대해서 도시된다.

[0011] 가벼운 및 무거운 면역글로불린 사슬의 가변 영역은 3개의 초가변루프, 또는 상보적 결정 부위(CDRs)를 함유한다. V영역의 3개의 CDR(CDR1, CDR2, CDR3)은 베타 배열의 하나의 끝에 밀집한다. CDR은 면역글로불린 접힘의 베타 가닥 B-C, C'-C", 및 F-G을 연결하는 루프이다. CDR의 잔기는 하나의 면역글로불린 분자 마다 다르고, 각 항

체에 항원특이성을 부여한다.

- [0012] 항체분자의 끝에 VL 및 VH 영역은 6개의 CDR(각 영역에 3개)이 항원의 특이성 결합에 대한 표면(또는 구멍)을 만드는데 협동하도록 밀접하게 채워진다. 항체의 자연 항원 결합자리는 가벼운 사슬 가변영역의 B-C, C'-C", 및 F-G 가닥과, 무거운 사슬 가변영역의 B-C, C'-C", 및 F-G 가닥을 연결하는 루프로 이루어진다.
- [0013] 설계로서 단백질의 3D 구조를 사용해서, 많은 단백질의 표면에 위치한 아미노산 잔기를 단백질의 중심구조를 스캐폴드로서 사용하여 랜덤화한다. 이러한 방법의 예는 참조로 여기에 포함된 하기 참조문헌에 기재되거나 검토되어 있다: Nygren PA, Uhlen M., *Curr Opin Struct Biol.* (1997) 7:463-9; Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stump MT, Briand C, Forrer P, Grutter MG, Pluckthun A. *Nat Biotechnol.* (2004) 22: 575-82; Vogt M, Skerra A. *Chembiochem.* (2004) 5:191-9; US 6,562,617.
- [0014] 이 방법의 기본적인 원리는 많은 단백질이 루프, 턴, 랜덤 코일 등의 구조에 의해 서로 연결되는 베타 시트 또는 알파 헬릭스 등의 2차 구조 요소의 특정 배열에 의해 형성된 안정한 코어를 갖는다는 관찰을 토대로 한다. 일반적으로 이들 후자의 3개의 구조 요소는 단백질의 전체의 구조에 비해 덜 중요하고, 이들 구조 요소의 아미노산 잔기는 빈번히 단백질의 일반적인 접힘을 파괴하지 않은채로 교환될 수 있다. 이 설계 원리에 대해 자연적으로 발생하는 예는 항체의 CDR이다. 인공적인 예(artificial example)는 리포칼린, 엔키린 및 다른 단백질 스캐폴드를 들 수 있다.
- [0015] 자연 면역글로불린에서 CDR 루프가 아닌 루프는 항원 결합 또는 에피토프 결합 특이성을 갖지 않지만, 전체의 면역글로불린 분자 및/또는 그 작동체(effector)의 정확한 접힘 또는 다른 기능에 기여하므로 본 발명이 목적으로 하는 구조적 루프로 불린다.
- [0016] 미국특허 제6,294,654호에 있어서, 힌지 부위와 가변부위 사이의 CH1 영역의 항체(Ab)의 비-CDR 루프에 펩티드 항원이 포함될 수 있는 개질된 항체가 만들어지고, 얻어진 Ab는 펩티드 항원이 MHC II 내의 APC의 표면에 제시되어 면역 반응을 제공하도록 APC에 취해질 수 있다는 것이 개시되어 있다. 이들 삽입된 펩티드가 에피토프이고 캐리어 분자의 전체구조는 중요하지 않다. 라스(ras) 펩티드는 면역글로불린의 (비-CDR)루프에 위치될 수 있고, 면역글로불린은 여전히 분비될 수 있다는 것이 입증되어 있다. 면역글로불린이 적절하게 접히지 않으면 면역글로불린이 분비되는 것을 방해하는 세포에는 엄격한 "품질관리"가 존재하며, 그 루프의 아미노산 서열을 변경하는 것은 세포가 부정확하다고 감지하는 구조로 단백질을 접히게 해서 열화시킬 수 있다. 따라서 상술한 예 이외에, 면역글로불린의 상태를 변화시키지 않고 구조적인 루프를 더 변경하는 것은 곤란하다.
- [0017] 미국 특허 출원 2004/0101905호에는 목적 결합위치 및 Fc 작동체 펩티드를 포함하는 결합분자가 기재되어 있다. Fc 작동체 펩티드는 작동체 분자(effector molecule)와 상호작용하는 펩티드이다. 면역글로불린 프라그먼트의 CH1-영역의 비-CDR루프안으로의 작동체 펩티드의 삽입이 나타나 있다.
- [0018] Fc 작동체 펩티드는 항체의 비-CDR 루프에서 자연스럽게 발생하는 구조이어서, 면역글로불린에 다른 등가의 위치상에 그래프트 된다면 면역글로불린의 구조를 방해하지 않는다고 기대된다.
- [0019] 이 개시된 것에 따른 비-CDR 루프에 그래프트된 모든 펩티드는 다른 구조적 환경에 의해 비활성화될 가능성이 높음에도 불구하고, 선택되고 있다.
- [0020] 기능과 분비가 중요하기 때문에 면역글로불린의 접힘구조를 방해하지 않는 것이 중요하므로, 그 구조 및 기능을 보유해야만 하는 루프에 펩티드를 삽입하는 것은 곤란하다는 것이 상기 기재된 종래의 문헌에 기재되어 있다.
- [0021] 미국특허 출원 2004/0132101 및 2005/0244403에는 작동체 리간드에 결합 친화도를 변경하고, 항체의 구조적 루프에 대한 자연 리간드인 돌연변이 면역글로불린이 기재되어 있다. 이 실시형태에서, 전체의 면역글로불린 분자에 걸쳐서 각종 영역에 많은 돌연변이체는 전체의 항체의 작동체 기능에 영향을 미치는 것이 기재되어 있다.
- [0022] 다른 종래의 문헌에서는 기존의 항원 결합자리를 조작하여, 신규한 결합특성을 도입하기 위해 면역글로불린 유사 스캐폴드를 지금까지 사용해 왔다. 그러나, 지금까지 CDR 부위만이 항원 결합을 위해 처리되고, 즉 면역글로불린 접힘(fold)의 경우, 자연 항원 결합자리를 결합 친화성 또는 특이성을 변화시키기 위해 변경해 왔다. 이러한 조작된 면역글로불린의 여러 상이한 포맷이 기재된 많은 공지문헌이 존재하며, 단일 사슬 Fv프라그먼트(ScFv) 또는 Fab프라그먼트의 형태로 파지 입자의 표면에 나타내거나 또는 각종 원핵생물 또는 진핵생물 발현계에 가용적으로 발현된다. 이 분야에서 대표저자중에는 Greg Winter, Andreas Pluckthun 및 Hennie Hoogenboom이 있다.

발명의 상세한 설명

- [0023] 본 발명의 목적은 신규한 항원 결합자리가 도입된 면역글로불린, 및 상기 면역글로불린을 처리하고 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 상기 면역글로불린의 구조적 루프부위에서 하나 이상의 개질을 포함하고, 항원의 에피토프에 상기 면역글로불린의 결합을 결정하는 면역글로불린을 처리하는 방법으로서, 상기 미개질된 면역글로불린은 상기 에피토프에 특이적으로 결합하지 않고, 상기 단계는:
 - [0025] -하나 이상의 구조적 루프부위를 포함하는 면역글로불린을 코드하는 핵산을 제공하는 단계,
 - [0026] -상기 하나 이상의 구조적 루프 부위에 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 개질하는 단계,
 - [0027] -발현계에 상기 개질된 핵산을 운반하는 단계,
 - [0028] -상기 개질된 면역글로불린을 발현하는 단계,
 - [0029] -에피토프와 상기 발현된 개질된 면역글로불린을 접촉하는 단계,
 - [0030] -상기 개질된 면역글로불린이 상기 에피토프에 결합하는지의 여부를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0031] 특히 본 발명은 알레르겐, 종양관련 항원, 자가항원, 효소, 박테리아 항원, 진균항원, 원생동물 항원 및 바이러스 항원으로 이루어진 군에서 선택된 항원의 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역글로불린을 처리하는 방법에 관한 것이다. 구조적 루프 부위에 개질을 통해 면역글로불린은 에피토프에 처리된 결합할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 면역글로불린은 동일한 항원 또는 다른 항원 중 하나인, 서로 다른, 적어도 2개의 이러한 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0032] 예를 들면, 본 발명에 따른 방법은 하나 이상의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역글로불린을 처리하고 상기 면역글로불린의 하나 이상의 구조적 루프 부위에 하나 이상의 개질단계를 포함하고, 하나 이상의 제2 에피토프에 상기 하나 이상의 루프 부위의 특이적 결합을 결정하며, 상기 에피토프는 상기 기재된 것처럼 항원의 군으로부터 선택되는 것으로, 상기 미개질 구조적 루프 부위(비-CDR 부위)는 하나 이상의 제2 에피토프에 특이적으로 결합되지 않고, 그 단계:
 - [0033] -하나 이상의 구조적 루프부위를 포함하는 하나 이상의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역글로불린을 코드하는 핵산을 제공하는 단계,
 - [0034] -상기 핵산으로 코드되는 하나 이상의 상기 루프부위의 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 개질하는 단계,
 - [0035] -발현계에 상기 개질된 핵산을 운반하는 단계,
 - [0036] -상기 개질된 면역글로불린을 발현하는 단계,
 - [0037] -상기 하나 이상의 제2 에피토프와 발현 및 개질된 면역글로불린을 접촉하는 단계,
 - [0038] -상기 개질된 면역글로불린이 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는지의 여부를 결정하는 단계를 포함하는 것을 말한다.
- [0039] 본 발명에 따른 방법은 상기 면역글로불린의 하나 이상의 구조적 루프부위에 하나 이상의 개질단계, 및 알레르겐, 종양관련항원, 자가항원, 효소, 박테리아 항원, 진균항원, 바이러스 항원 및 원생동물의 항원으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 항원에 상기 하나 이상의 루프 부위의 특이한 결합을 결정하는 단계에 관한 것으로서, 미개질된 구조적 루프 부위를 함유하는 면역글로불린은 상기 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합되지 않는다.
- [0040] 개질되는 본 발명에 따른 "면역글로불린"(여기서 사용된 것처럼, 면역글로불린 및 항체 용어는 서로 바뀌어 사용할 수 있다)이란, 예를 들면 항원, 작동체 분자/단백질의 에피토프에 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상의 특이적 결합 자리에 모노 또는 다특이성, 또는 다가 결합성을 나타낼 수 있다. 본 발명에 따른 면역글로불린은 기술적으로 수용되는 기능적 프라그먼트, 예를 들면 Fc, Fab, ScFv, CH/CL 영역의 단쇄 이량체, Fv 또는 다른 유도체 또는 면역글로불린의 조합, 가변부위의 무거운 및 가벼운 사슬의 영역(예를 들면, Fd, V1, Vk, Vh) 및 완전한 항체의 일정한 부위, 예를 들면 CH1, CH2, CH3, CH4, C1 및 Ck, 또한 구조적인 루프에 의해 연결된 면역글로불린 영역의 2개의 베타 가닥으로 이루어진 미니 영역이다.

- [0041] "면역글로불린", "개질된 면역글로불린" 또는 "본 발명에 따른 면역글로불린"이란 면역글로불린의 유도체도 포함하는 것으로 이해한다. 유도체는 본 발명의 하나 이상의 면역글로불린 및/또는 본 발명의 면역글로불린의 임의의 영역 또는 미니영역은 하나 이상의 다른 단백질(예를 들면 다른 면역글로불린, 리간드, 스캐폴드 단백질, 효소 독소 등)의 임의의 위치에 융합될 수 있는 융합단백질의 임의의 조합이다. 본 발명의 면역글로불린의 유도체는 공유결합, 정전기적 상호작용, 디설피드 결합 등의 각종 화학적 방법에 의해 다른 물질과 결합해서 얻어질 수 있다.
- [0042] 면역글로불린에 결합된 다른 물질은 지질, 탄수화물, 핵산, 유기 및 무기 분자 또는 그 임의의 조합(예를 들면, PEG, 전구약물 또는 약물)이어도 좋다. 또한, 유도체는 동일한 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린이지만, 비자연 또는 화학적 개질 아미노산에서 전부 또는 일부로 만들어진다.
- [0043] 본 발명에 따른 처리된 분자는 융합 단백질 또는 유도체 뿐만 아니라 자립형 단백질로서 유용하고, 가장 일반적으로 더 큰 항체 구조의 일부이거나 전체의 항체분자 또는 그 일부, 예를 들면 Fab프래그먼트, Fc 프래그먼트, Fv 프래그먼트 및 다른 것에 대해 이러한 방법으로 융합된다. 1특이성, 2특이성, 3특이성이고, 동시에 더 특이성을 가질 수 있는 분자를 생성하기 위해 단백질을 처리하는데 사용할 수 있고, 이러한 분자의 계획적인 이용의 필요성에 따라서 동시에 결합의 균형을 조절하고 미리 선택할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따라서, 모든 종류의 알레르겐, 종양관련 항원, 자가항원, 효소, 박테리아 항원, 진균항원, 원생동물 항원 및 바이러스 항원의 항원에 대한 결합부위 또는 항원결합자리를 주어진 항체구조의 구조적 루프내에 도입할 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 "항원"이란 면역글로불린의 CDR 루프 부위와 상호작용하거나 상호작용할 수 있다고 공지된 분자 또는 구조를 의미한다. 선행기술의 구조적 루프부위는 항원과 상호작용하지 않지만, 전체적 구조 및/또는 작동체 분자의 결합에 다소 기여한다.
- [0046] 본 발명에 따른 "알레르겐, 종양관련 항원, 자가항원, 효소, 박테리아 항원, 진균항원, 원생동물 항원 및 바이러스 항원"이란 면역학적으로 관련된 것, 즉 자연 또는 단클론 항체에 의해 인식할 수 있는 것이면, 항체구조에 의해 인식될 수 있는 모든 알레르겐 및 항원, 및 이러한 분자의 프래그먼트(특히 일반적으로 "에피토프(예를 들면 B세포 에피토프)"로 칭하는 하부구조)를 들 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 "에피토프"란 본 발명의 결합영역 또는 면역글로불린에 특이적 결합상대를 완벽하게 보완하거나 특이적 결합상대의 일부인 분자구조를 의미한다.
- [0048] 화학적으로 에피토프는 탄수화물, 펩티드, 지방산, 무기물질 또는 그 유도체로 이루어진 것 중 하나 및 그 임의의 조합이어도 좋다. 에피토프가 폴리펩티드이면, 펩티드내에 보통 3개 이상의 아미노산, 바람직하게는 8-50개의 아미노산, 보다 바람직하게는 10-20개의 아미노산을 포함한다. 펩티드의 길이의 상한은 중요하지 않고, 폴리펩티드 서열의 대략 전체길이를 포함할 수 있다. 에피토프는 선형 또는 배좌형 에피토프 중 하나일 수 있다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 사슬의 제1 서열의 하나의 세그먼트로 이루어진다. 선형 에피토프는 인접하거나 겹쳐질 수 있다. 배좌형 에피토프는 폴리펩티드의 접힘에 의해 함께 3차 구조를 형성하는 발생된 아미노산으로 구성되고, 아미노산은 선형 서열로 서로 인접할 필요는 없다.
- [0049] 구체적으로 에피토프는 진단상의 관련분자의 적어도 일부, 즉 샘플에 에피토프의 유무는 질병 또는 건강상태 중 하나, 또는 제조시 처리상태 또는 환경 및 음식상태에 정성적 또는 정량적으로 관련되어 있다. 에피토프는 치료상 관련분자의 적어도 일부, 즉 질병의 과정을 변화시키는 특이성 결합 영역에 의해 목표로 될 수 있는 분자이어도 좋다.
- [0050] 바람직하게 "알레르겐, 종양관련 항원, 자가항원, 효소, 박테리아 항원, 진균항원, 원생동물 항원 및 바이러스 항원"은 면역학적으로 또는 치료상으로 적절하거나 적절할 수 있다고 이미 증명된 이들 알레르겐 또는 항원이고, 특히 임상 효능이 시험된 것이다.
- [0051] 한편, 본 발명의 다른 형태에 따라서 다른 결합 능력도 구조적 루프 부위, 예를 들면 약물 또는 효소와 같은 작은 분자, 효소 또는 효소물질의 촉매자리, 또는 효소물질의 전이 상태 유사물의 결합능력에 도입될 수 있다.
- [0052] 바람직하게 구조적 루프의 새로운 항원결합자리는 미개질 면역글로불린에 대해 성질이 다르다. 따라서 작동체 분자 또는 Fc 수용체 같은 목표물은 본 발명에 따른 결합분자 및 면역글로불린의 특이성에서 제외하는 것이 바람직하다.
- [0053] 바람직하게 구조적 루프의 새로운 항원결합자리는 선택된 핵산에 의해 코드되는 면역글로불린의 치환, 결실 및/

또는 삽입에 의해 도입된다.

- [0054] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에 따라서 하나 이상의 뉴클레오티드의 개질은 상기 핵산에 의해 코드되는 면역글로불린의 치환, 결실 및/또는 삽입을 초래한다.
- [0055] 하나 이상의 루프부위의 개질은 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입을 일으키고, 바람직하게는 점 돌연변이, 전체 루프의 교환이고, 보다 바람직하게는 아미노산의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 최대 30 개의 변경이다.
- [0056] 또한 바람직하게는 자리 지정 랜덤 돌연변이(site directed random mutation)이다. 이 방법으로, 상기 루프의 하나 이상의 특정 아미노산 잔기는 이러한 구조적 루프에 랜덤하게 발생된 삽입물을 사용해서 교환하거나 도입한다. 또한 바람직하게는 조합한 접근방법을 사용하는 것이다.
- [0057] 적어도 하나의 루프 부위는 랜덤, 반랜덤, 또는 특히 자리 지정 랜덤 돌연변이 생성 방법에 의해 돌연변이되거나 개질되는 것이 바람직하다. 이들 방법은 본 발명의 면역글로불린의 소망의 위치에 아미노산을 개질하는데 사용할 수 있다. 이들의 경우에, 위치는 랜덤하게 선택되거나, 단순한 규칙을 사용해서 아미노산을 변경한다. 예를 들면 모든 잔기는 알라닌으로 돌연변이될 수 있고, 알라닌 스캐닝이라고 칭한다. 이러한 방법은 고수준의 서열 다양성을 선별하기 위해 선택 방법을 사용한 더 세련된 공학적 접근방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 서열 5'-NNS-3', 5'-NNN-3' 또는 5'-NNK-3'을 갖는 하나 이상의 뉴클레오티드 반복단위를 포함하는 랜덤하게 개질된 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0058] 랜덤하게 개질된 핵산 분자는 상기 동일한 반복단위를 포함해도 좋고, 모든 공지의 자연스럽게 발생한 아미노산에 대해 코드한다.
- [0059] 종래에 공지된 것처럼, 예를 들면 과지 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 세포표면 디스플레이 등의 표시방법을 포함하는 특정 결합특성 및 친화도를 갖는 단백질의 식별 및 분리에 대해 사용될 수 있는 다양한 선택방법이 있다. 항체 변이체의 생성 및 선별방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 항체 분자 생물학, 발현, 정제 및 선별의 일반적인 방법은 Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; 및 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76에 기재된 항체공학에 기재되어 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 "구조적 루프" 또는 "비-CDR-루프"은 하기 방법으로 이해될 수 있다:면역글로불린은 소위 면역글로불린 접힘을 갖는 영역으로 이루어져 있다. 기본적으로, 역평행의 베타 시트는 루프에 의해 연결되어 압축된 역평행성 베타 배럴을 형성한다. 가변부위에서, 본래 영역의 루프의 일부는 항체의 특이성, 즉 항원에 대한 결합성에 기여한다. 이들 루프는 CDR 루프라고 칭한다. 항체 영역의 모든 다른 루프는 분자의 구조 및/또는 작동체의 기능에 다소 기여한다. 이들 루프는 구조적 루프 또는 비-CDR-루프로써 여기에 정의된다.
- [0061] 개질된 면역글로불린(및 항상 하기 전체의 명세서에 걸쳐서 포함한다:면역글로불린 프라그먼트)을 코드하는 핵산분자는 숙주세포에 클론화되고, 발현되어 그 결합 특이성에 대해 분석될 수 있다. 이들 실험은 공지된 절차를 사용해서 행하고, 본 발명에서의 용도를 찾아낼 수 있는 다양한 방법은 Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 3.sup.rd Ed.(Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), 및 Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons)에 기재되어 있다. 본 발명의 개질된 면역글로불린을 코드하는 핵산은 상기 면역글로불린을 발현하기 위해 발현벡터에 포함될 수 있다. 발현벡터는 일반적으로 실시가능하게 연결된 면역글로불린을 포함하고, 제어 또는 규제 서열, 선택가능한 마커(marker), 임의의 융합 상대 및/또는 추가적인 요소와 기능적 관계에 놓인다. 본 발명의 개질 면역글로불린은 핵산으로 변형된 숙주세포를 배양하여 생성할 수 있고, 바람직하게는 개질된 면역글로불린의 발현을 유도 또는 야기하기 위한 적당한 조건하에서, 개질 면역글로불린을 코드하는 핵산을 함유하는 발현 벡터이다. 숙주에 외생 핵산 분자를 도입하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 사용된 숙주에 의해 변한다. 물론 개질 면역글로불린의 발현에 대해 무세포성 또는 세포가 없는 발현계도 사용할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 개질된 면역글로불린은 발현후 정제하거나 분리된다. 개질된 면역글로불린은 당업자에게 공지된 다양한 방법으로 분리하거나 정제할 수 있다. 표준 정제방법은 크로마토그래피방법, 전기영동, 면역학적, 침전, 투석, 여과, 농축 및 크로마토분화방법 등을 들 수 있다. 정제는 특별한 융합 상대에 의해 가능해지는 경우가 많다. 예를 들면, 항체는 GST기능이 사용되면 글루타티온 수지를 사용해서 정제할 수 있고, His-tag를 사용하면 Ni⁺² 친화성 크로마토그래피를 사용해서 정제할 수 있고, flag-tag를 사용하면 anti-flag 항체를 고정시킬 수 있다. 적당한 정제방법에 있어서, 일반적인 지식에 대해 Antibody Purification:Principles

and Practice, 3.sup.rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, Ny, 1994를 참조한다. 물론 숙주의 표면, 특히 박테리아, 곤충 또는 이스트 세포의 표면 또는 파지 또는 바이러스의 표면에 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린을 발현시킬 수도 있다.

[0063] 개질된 면역글로불린은 시험관내 분석, 생체내 및 세포기반 분석 및 선택방법을 사용하는 것을 포함한 다양한 방법을 사용해서 선별하지만, 이들로 제한되지 않는다. 자동화 및 높은 처리능력 선별 방법은 선별절차에 이용할 수 있다. 선별은 용합 상대 또는 라벨, 예를 들면 효소, 면역라벨, 동위원소 라벨, 또는 형광성 또는 비색분석색소 등의 작은 분자 라벨 또는 광유전성 분자를 사용할 수 있다.

[0064] 바람직한 실시형태에서, 면역글로불린의 기능적 및/또는 생물물리학적 특성은 시험관내 분석으로 선별된다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 기능성, 예를 들면 반응에 촉매작용을 미치는 그 능력 또는 그 목표물에 대한 결합 친화성에 대해 선별한다.

[0065] 분석은 색원체, 형광성, 발광성 또는 동위원소의 라벨을 포함한 다양한 검지방법을 사용할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0066] 종래에 공지된 것처럼, 선별방법의 부분사항은 라이브러리의 바람직한 개체에 대해 선택한 것이다. 여기서 방법은 "선택방법"으로 칭하고, 이들 방법은 개질된 면역글로불린을 선별하는 본 발명의 이용방법을 발견한다. 면역글로불린 라이브러리는 선택방법을 사용해서 선별하는 경우, 일부 선택 기준을 충족한 바람직한 라이브러리의 개체만이 번식, 분리 및/또는 관찰된다. 평가되는 것처럼, 이러한 방법은 가장 적합한 변이체만이 관찰되기 때문에 라이브러리 개체의 적합성을 개별적으로 분석하는 방법에 의해 선별할 수 있는 것보다 큰 라이브러리를 선별할 수 있다. 그것을 코드하는 핵산을 갖는 항체의 기능인 유전자형과 면역글로불린의 표현형을 공유 또는 비공유로 연결하는 임의의 방법, 기술, 또는 용합 상대에 의해 선택할 수 있다. 예를 들면, 선택방법으로서 유전자 III 단백질에 라이브러리 개체를 융합시키는 파지 디스플레이가 사용될 수 있다. 이렇게 하여, 일부기준, 예를 들면 면역글로불린 목표물에 결합 친화성을 충족하는 개질된 면역글로불린의 선택 또는 분리는 그것을 코드하는 핵산을 선택하거나 분리할 수도 있다. 일단 분리하면, 이어서 유전자 또는 개질된 면역글로불린을 코드하는 유전자를 증폭할 수 있다. 패닝(panning)이라고 하는 분리 및 증폭 공정을 반복하고, 라이브러리에 바람직한 항체 변이체를 풍부하게 할 수 있다. 부착된 핵산의 핵산 서열은 유전자 식별을 가능하게 한다.

[0067] 다양한 선택방법은 면역글로불린 라이브러리를 선별하는 본 발명의 이용방법을 발견할 수 있는 종래의 기술이다. 이들은 선택적인 파지 감염(Malmborg 등, 1997, J Mol Biol 273: 544-551) 등의 파지 디스플레이(Phage display of peptides and antibodies:a laboratory manual, Kay 등, 1996, Academic Press, San Diego, Calif., 1996; Lowman 등, 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317) 및 그 유도체, 선택적으로 감염성인 파지(Krebber 등, 1997, J Mol Biol 268:619-630) 및 지연 감염성 패닝(Benhar 등, 2000, J Mol Biol 301:893-904), 박테리아(Georgiou 등, 1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiou 등, 1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Lee 등, 2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Jun 등, 1998, Nat Biotechnol 16:576-80), 이스트(Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557) 및 포유류 세포(Whitehorn 등, 1995, Bio/technology 13:1215-1219)에 대한 디스플레이 등의 세포 표면 디스플레이(Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399), 또한 폴리습 디스플레이(Mattheakis 등, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:9022-9026), 리보솜 디스플레이(Hanes 등, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942), mRNA 디스플레이(Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-12302; Nemoto 등, 1997, FEBS Lett 414:405-408) 및 리보솜-비활성 디스플레이 시스템(Zhou 등, 2002, J AM Chem Soc 124, 538-543) 등의 시험관내의 디스플레이 기술(Amstutz 등, 2001, Curr Opin Biotechnol 12:400-405)을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0068] 본 발명의 이용방법을 발견할 수 있는 다른 선택방법은 페리플라즘 발현 및 사이토메트릭 선별(Chen 등, 2001, Nat Biotechnol 19:537-542), 항체 프라그먼트 상보성 시험(Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344; Pelletier 등, 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146) 및 선택모드(Visintin 등, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11723-11728)에 사용된 이스트 2개의 하이브리드 선별(Fields & Song, 1989, Nature 340:245-246)을 포함하는 생체내 방법과 같은 디스플레이에 의존하지 않는 방법을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 다른 실시형태에서, 발현백터상의 특정 서열에 결합하는 용합상대에 의해 선택이 가능하고, 이로써 용합상대 및 관련된 Fc 변이체 라이브러리 개체와 이들을 코드하는 핵산을 공유 또는 비공유로 연결한다. 예를 들면, PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702 및 PCT WO 02/07466는 본 발명에서 사용을 발견할 수 있는 용합 상대 및 기술이 기

재하고 있다. 다른 실시형태에서, 항체의 발현은 세포의 일부 성장, 재생산, 또는 생존 이점을 부여한다면 생체 내의 선택을 할 수 있다.

[0069]

"방향적 진화"로 칭하는 일부의 선택 방법은 선택하는 중에 때때로 새로운 돌연변이를 포함하는 바람직한 서열의 짝지움 또는 증식을 포함하는 것이다. 당업자에 의해 평가된 것처럼, 방향적 진화방법은 라이브러리에 가장 바람직한 서열의 식별을 용이하게 할 수 있고 선별된 서열의 다양성을 증가시킬 수 있다. 다양한 방향적 진화 방법은 항체변이체를 선별하기 위한 본 발명에 있어서의 이용방법을 발견할 수 있는 종래의 기술이고, DNA 셔플링(shuffling)(PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3), 엑손 셔플링(U.S.Pat. No. 6,365,377; Kolkman & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol 19:423-428), 패밀리 셔플링(Cramer 등, 1998, Nature 391:288-291; U.S.Pat. No. 6,376,246), RACHITT.TM.(Coco 등, 2001, Nat Biotechnol 19:354-359; PCT WO 02/06469), STEP 및 시험관내의 재조합의 랜덤 갑작(Zhao 등, 1998, Nat Biotechnol 16:258-261; Shao 등, 1998, Nucleic Acids Res 26:681-683), 유전자 조합을 증대한 엑소뉴클리즈(U.S.Pat.No. 6,352,842; U.S.Pat. No.6,361,974), 유전자 부위 포화 돌연변이.TM.(U.S.Pat.No.6,358,709), 유전자 재조합.TM.(U.S.Pat.No.6,358,709), SCRATCHY(Lutz 등, 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248-11253), DNA 단편화 방법(Kikuchi 등, Gene 236:159-167), 단일 가닥 DNA 셔플링(Kikuchi 등, 2000, Gene 243:133-137) 및 AMESystem.TM.방향적 진화 항체 공학 기술(Applied Molecular Evolution)(U.S.Pat.No.5,824,514; U.S.Pat.No.5,817,483;U.S.Pat.No.5,814,476; U.S.Pat.No.5,763,192; U.S.Pat.No.5,723,323)을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0070]

바람직한 실시형태에서, 항체 변이체는 하나 이상의 세포 기반 또는 시험관내의 분석을 사용해서 선별된다. 이러한 분석에 대해 정제된 또는 미정제된 개질 면역글로불린은 일반적으로 세포가 각각의 면역글로불린 또는 라이브러리에 속하는 면역글로불린의 풀에 노출되도록 외생으로 첨가한다. 이들 분석은 일반적으로 면역글로불린의 기능, 즉 그 목표물에 결합하는 항체의 능력을 토대로 하고, 일부 생화학적 결과, 예를 들면 작동체 기능, 리간드/수용체 결합 억제, 아포토시스 등을 증재하지만, 항상 그런 것은 아니다. 이러한 분석은 항체에 대한 세포의 반응, 예를 들면 세포 생존, 세포 사멸, 세포 모폴로지의 변화 또는 자연 유전자 또는 보고자 유전자(reporter gene)의 세포의 발현 등의 전사 활성화를 조절하는 것을 수반하는 경우가 많다. 예를 들면 이러한 분석은 ADCC, ADCP 또는 CDC를 이끌어내는 항체 변이체의 능력을 측정할 수 있다. 일부 분석에 대해, 추가적인 세포 또는 성분은, 즉 목표 세포와 더불어 예를 들면 혈청 보체 또는 단핵 백혈구(PBMCs), NK세포, 대식 세포 등의 작동체 세포가 첨가될 필요가 있다. 이러한 추가적인 세포는 임의의 유기체, 바람직하게는 인간, 생쥐, 쥐, 토끼 및 원숭이 유래일 수 있다. 면역글로불린은 목표물을 발현하는 특정 세포 라인의 아포토시스를 일으킬 수 있고, 또는 분석에 첨가되는 면역세포에 의해 목표세포에 대한 공격을 증재할 수 있다. 세포사멸 또는 변형을 조정하는 방법은 종래의 기술이고, 색소, 면역화학적, 세포화학 및 방사성 반응물의 이용을 들 수 있다. 예를 들면 카스파아제 염색 분석은 아포토시스를 측정할 수 있고, 방사성 물질 또는 알라마 블루 등의 형광성 색소의 빨아올림 또는 방출은 세포성장 또는 활성을 조정할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, DELFIA.RTM.EuTDA계 세포 독성 분석(Perkin Elmer,MA)을 사용할 수 있다. 또한 죽거나 손상된 표적 세포를 하나 이상의 자연적인 세포내 성분, 예를 들면 락테이트 탈수소효소의 방출을 측정하여 조정할 수 있다. 전사 활성화는 세포 기반 분석에서의 기능을 분석하는 방법으로 제공할 수 있다. 이 경우에, 상방으로 조절할 수 있는 자연유전자 또는 면역글로불린에 대한 분석에 의해 반응은 조정될 수 있고, 예를 들면 특정 인터류킨의 방출을 측정하거나, 또는 선택적으로 리포터 구축을 통해 리드아웃할 수 있다. 세포 기반 분석은 개질된 면역글로불린의 존재에 대한 반응으로 세포의 모폴로지 변화의 측정을 수반한다. 이러한 분석의 세포타입은 원핵생물 또는 진핵생물이어도 좋고, 종래에 공지된 다양한 세포라인을 사용해도 좋다. 선택적으로 세포기반 선별은 변이체를 코드하는 핵산으로 형질변환되거나 감염된 세포를 사용해서 행해진다. 즉 항체 변이체는 세포에 외생으로 첨가되지 않는다. 예를 들면 하나의 실시형태에서, 세포기반 선별은 세포 표면 디스플레이를 이용한다. 융합상대는 세포표면상에 개질된 면역글로불린의 디스플레이를 가능하게 하는 것을 사용할 수 있다(Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399).

[0071]

바람직한 실시형태에서, 개질된 면역글로불린의 면역원은 하나 이상의 세포 기반 분석을 사용해서 실험적으로 결정할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 생체의부에서 T세포 활성 분석은 면역원을 실험적으로 정량화하는데 사용된다. 이 방법에서, 적합공여체 유래의 항원 제공 세포 및 살아있는 T세포는 1회 이상 관심의 펩티드 또는 전체 항체로 면역성 테스트를 한다. 그 다음에 T세포 활성화는 많은 방법을 사용해서 검지할 수 있고, 예를 들면 사이토카인의 생성을 조정하거나 삼중수소 티미딘의 흡수를 측정한다. 가장 바람직한 실시형태에서, Elispot 분석을 사용해서 인터페론 감마 생성을 조정한다(Schmittel 등, 2000, J.Immunol.Meth., 24:17-24).

[0072]

본 발명의 개질된 면역글로불린의 생물학적 특성은 세포, 조직 및 전체 유기체 실험을 특징으로 한다. 종래에 공지된 것처럼, 질병 또는 질병모델에 대한 치료에 대한 약물의 효능을 측정하거나, 약물의 약물동력학, 독성

및 다른 특성을 측정하기 위해 약물을 생쥐, 쥐, 토끼, 개, 고양이, 돼지 및 원숭이 등을 포함하는 동물에 종종 시험하지만, 이들로 제한되지 않는다. 상기 동물은 질병모델로 칭해도 좋다. 치료는 종종 누드 생쥐, SCID 생쥐, 이종이식 생쥐 및 이식 유전자의 생쥐(녹인(knockin) 및 녹아웃(knockout) 등) 등의 생쥐에 종종 시험하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 실험은 치료법으로 사용될 항체의 가능성을 결정하기 위한 중요한 자료를 제공할 수 있다. 임의의 유기체, 바람직하게는 포유류를 시험에 사용할 수 있다. 예를 들면 원숭이는 그 유전자가 인간과 유사하기 때문에, 적당한 치료모델일 수 있고, 따라서 본 발명의 개질된 면역글로불린의 효능, 독성, 약물동력학 또는 다른 특성을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 인간의 시험은 약물로서의 승인을 위해 궁극적으로 필요로 되고, 물론 이들 실험이 계획된다. 따라서 본 발명의 개질된 면역글로불린은 인간에게 시험되어 그 치료효능, 독성, 면역원, 약물동력학 및/또는 다른 임상특성을 결정할 수 있다.

[0073] 본 발명의 개질된 면역글로불린은 광범위한 항체 생성물의 용도를 발견할 수 있다. 한 실시형태에서, 진단, 산업적 화합물 또는 연구 반응물로서, 바람직하게는 치료법으로서 본 발명의 항체 변이체가 예비 또는 분석용으로 치료 또는 예방에 사용된다. 항체 변이체는 단클론 또는 다클론인 항체 조성물에서의 용도를 발견할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 개질된 면역글로불린은 목표의 항원을 갖는 목표의 세포, 예를 들면 암세포를 죽이는데 사용된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 개질된 면역글로불린은 예를 들면 사이토카인 또는 사이토카인 수용체를 대하여 목표의 항원을 차단, 대항 또는 공격하는데 사용된다. 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 개질된 면역글로불린은 목표의 항원을 차단, 대항 또는 공격하고 목표의 항원을 갖는 목표 세포를 죽이는데 사용된다.

[0074] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 개질된 면역글로불린은 성장인자 또는 성장인자 수용체를 차단, 대항 또는 공격하고 목표의 항원을 갖거나 필요로 하는 목표세포를 죽이는데 사용된다. 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 개질된 면역글로불린은 효소 및 효소물질을 차단, 대항 또는 공격하는데 사용한다.

[0075] 본 발명의 개질된 면역글로불린은 각종 치료목적으로 사용할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 개질된 면역글로불린을 포함하는 항체가 환자에 투여되어 특정 장애를 치료한다. 본 발명의 목적의 "환자"는 인간 및 다른 동물을 들 수 있고, 바람직하게는 포유류이고, 가장 바람직하게는 인간이다. 여기서 "특정장애"는 본 발명의 개질된 면역글로불린을 포함하는 약학적 성분의 투여에 의해 개선될 수 있는 장애를 의미한다.

[0076] 하나의 실시형태에서, 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린은 단지 환자에게 투여되는 치료상 활성 제제이다. 선택적으로, 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린은 세포독성제, 화학요법제, 사이토카인, 성장저해제, 항호르몬제, 키나아제 저해제, 항혈관형성약제, 심장보호제 또는 다른 치료제 등을 포함하는 하나 이상의 다른 치료제와 조합해서 투여되지만 이들로 제한되지 않는다. 개질된 면역글로불린은 하나 이상의 다른 치료제 요법과 동시에 투여될 수 있다. 예를 들면 본 발명의 항체 변이체는 화학요법, 방사능 치료 또는 화학요법과 방사능 치료 둘다에 따라 환자에게 투여할 수 있다. 한 실시형태에서, 본 발명의 개질된 면역글로불린은 하나 이상의 항체와 함께 투여할 수 있고, 본 발명의 항체 변이체를 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 본 발명의 다른 실시형태에 따라서, 본 발명의 개질된 면역글로불린 및 하나 이상의 다른 항암 치료를 사용해서 생체외부에서 암세포를 치료할 수 있다. 이러한 생체외부에서 치료는 골수이식, 특히 자가골수이식에 사용할 수 있다고 고려된다. 물론 본 발명의 항체는 수술 등의 더욱 다른 치료방법과 함께 사용될 수 있다고 고려된다.

[0077] 다양한 다른 치료제는 본 발명의 개질된 면역글로불린과 투여하는 용도를 발견할 수 있다. 한 실시형태에서, 개질된 면역글로불린은 혈관성장을 막거나, 일부 방해하는 화합물인 항혈관형성약제와 함께 투여된다. 항혈관형성 인자는, 예를 들면 작은 분자 또는 단백질, 예를 들면 항체, Fc 융합 또는 사이토카인이어도 좋고, 혈관형성을 촉진하는데 관련된 성장인자 또는 성장인자 수용체에 결합한다. 여기서 바람직한 항혈관형성 인자는 혈관내피성장인자(VEGF)에 결합한 항체이다. 다른 실시형태에서, 개질된 면역글로불린은 적응면역반응을 유도하거나 향상시키는 치료제, 예를 들면 CTLA-4를 목표물로 하는 항체와 함께 투여된다. 다른 실시형태에서, 개질된 면역글로불린은 티로신 키나아제 저해제와 함께 투여되고, 티로신 키나아제의 티로신 키나아제 활성을 어느 정도 저해하는 분자이다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 개질된 면역글로불린은 사이토카인과 함께 투여된다. 여기서 사용된 "사이토카인"은 케모카인 등을 포함하는 세포내 중재자로서 다른 세포상에 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질의 포괄적인 용어를 의미한다.

[0078] 약학적인 성분은 본 발명의 개질된 면역글로불린 및 하나 이상의 치료적 활성 제제를 처방하는 것으로 고려된다. 본 발명의 항체 변이체의 처방은 소량의 순도를 갖는 상기 면역글로불린과 선택적인 약학적으로 수용 가능한 캐리어, 첨가제 또는 안정제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16판, Osol, A.Ed.,1980)를 동결건조분말 제형 또는 수용액상으로 혼합하여 저장소에 조제된다. 시험관내의 투약에 사용될 처방은 멸균한 것이 바

람직하다. 이것은 멸균 여과 막을 통한 여과 또는 다른 방법에 의해 용이하게 달성된다. 여기에 개시된 개질된 면역글로불린 및 다른 치료상 활성제제는 면역 리포솜으로 처방되고 그리고/또는 미소캡슐에 트랩해도 좋다.

[0079] 본 발명의 개질된 면역글로불린을, 바람직하게는 멸균의 수용액상의 형태로 포함하는 약학적 성분의 투여는 구강내, 피하내, 정맥내, 비강내, 귀내에, 경피상, 국부적(예를 들면 겔, 연고, 로션 크림 등), 복막내, 근육내, 폐내(예를 들면 Aradigm으로 부터 시판된 흡입가능 기술 AERx™, 또는 Inhale Therapeutics로부터 시판되는 폐내의 운반 시스템 Inhance™), 질, 비경구, 직장, 또는 안구내를 포함하는 다양한 방법으로 행해질 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0080] 여기서 사용된, "특이적 결합"은 분자의 이중의 집단에 관심의 동족리간드의 한정적인 결합반응으로 칭한다. 따라서 설계된 조건하(예를 들면 면역글로불린의 경우 면역측정 조건), 특정 항체는 그 입자 "목표물"에 결합하여 시료에 존재하는 다른 분자에 상당량 결합하지 않는다. 항체의 CDR에 비해, 개질된 구조적 루프 부위는 항원 또는 분자 결합 단백질 부분이고 이와같은 항원은 아니다.

[0081] "발현계"란 작동가능한 결합의 소량의 코드서열 및 제어서열을 함유하는 핵산분자를 칭하고, 이들 서열로 변형되거나 감염된 숙주는 코드된 단백질을 생성할 수 있다. 변형시키기 위해, 발현계는 벡터상에 포함되지만; 관련 DNA도 숙주 염색체에 포함될 수 있다.

[0082] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라서, 발현계는 벡터를 포함한다. 종래에 공지된 임의의 발현 벡터는 이 목적에 대해 적당한 것으로 사용될 수 있다.

[0083] 개질된 면역글로불린은 숙주, 바람직하게는 박테리아, 이스트, 식물세포, 동물세포 또는 식물 또는 동물에서 발현된다.

[0084] 포유류 세포(동물세포), 식물세포, 박테리아(예를 들면 *Basillus subtilis*, *Escherichia Coli*), 곤충세포 및 이스트(예를 들면, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*) 등을 포함하는 폭넓은 적당한 숙주세포가 사용되어 개질된 면역글로불린을 발현할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들면 본 발명에서 용도를 찾을 수 있는 다양한 세포 라인인 American Type Culture Collection으로부터 이용가능한, ATCC 세포 라인 범주에 기재되어 있다. 더욱이 식물과 동물은 본 발명에 따른 면역글로불린의 발현에 대한 숙주로서 이용될 수 있다. 도입벡터 또는 카세트 뿐만 아니라 발현은 사용된 숙주에 따라서 선택될 수 있다.

[0085] 물론 무세포성 또는 세포가 없는 단백질 발현계도 사용할 수 있다. 충분한 양의 단백질을 생성하는 시험관내의 전사/해석 단백질 발현 플랫폼은 세포 기반 발현계에 일반적으로 관련된 실험실의 상류 및 하류 단계(예를 들면 숙주세포 변형, 배양 또는 용해)가 필요 없는 무세포 단백질 발현의 많은 이점을 제공한다.

[0086] 본 발명의 다른 형태는 면역글로불린 제조 또는 그 약학제제의 제조 방법에 관한 것이고, 상기 면역글로불린의 구조적 루프부위에 하나 이상의 개질단계를 포함하고, 항원의 에피토프에 상기 면역글로불린의 결합을 결정하는 것으로, 상기 비개질 면역글로불린은 상기 에피토프에 상당히 결합하지 않고, 그 단계는:

- [0087] -하나 이상의 루프부위를 포함하는 면역글로불린을 코드하는 핵산을 제공하는 단계,
- [0088] -하나 이상의 상기 루프부위의 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 개질하는 단계,
- [0089] -발현계에 상기 개질된 핵산을 운반하는 단계,
- [0090] -상기 개질된 면역글로불린을 발현하는 단계,
- [0091] -상기 발현되는 개질 면역글로불린과 에피토프를 접촉하는 단계,
- [0092] -상기 에피토프에 상기 개질된 면역글로불린이 결합하는지의 여부를 결정하는 단계, 및
- [0093] -상기 에피토프에 결합하는 개질된 면역글로불린을 제공하고, 선택적으로 약학 제제를 완성하는 단계를 포함한다.

[0094] 특히 본 발명은 상기 면역글로불린의 하나 이상의 구조적 루프 부위에 하나 이상의 개질을 포함하고, 알레르겐, 종양관련 항원, 자가항원, 효소, 박테리아 항원, 진균항원, 원생동물 항원 및 바이러스 항원으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 제2 분자에 하나 이상의 루프부위의 특이적 결합을 결정하는 하나 이상의 제1 분자에 특이적으로 결합한 다특이성 면역글로불린 또는 그 약학제제를 제조하는 방법에 관한 것으로, 미개질된 구조적 루프부위를 함유하는 면역글로불린은 하나 이상의 제2 분자에 특이적으로 결합하지 않고, 그 단계는:

- [0095] -하나 이상의 구조적 루프부위를 포함하는 하나 이상의 제1 분자에 특이적으로 결합하는 면역글로불린을 코드하는 핵산을 제공하는 단계,
- [0096] -상기 핵산으로 코드된 하나 이상의 상기 루프부위의 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 개질하는 단계,
- [0097] -발현계에 상기 개질된 핵산을 운반하는 단계,
- [0098] -상기 개질된 면역글로불린을 발현하는 단계,
- [0099] -상기 하나 이상의 제2 분자와 발현된 개질된 면역글로불린을 접촉하는 단계,
- [0100] -상기 개질된 면역글로불린이 제2 분자에 특이적으로 결합하는지의 여부를 결정하는 단계
- [0101] -상기 하나 이상의 제2 분자에 특이적으로 결합한 개질된 면역글로불린을 제공하는 단계 및 선택적으로 약학적 체제를 완성하는 단계를 포함한다.
- [0102] 특이적 결합 쌍의 개체에 하나 이상의 특이성 처리가 바람직하다(Kufer 등, (2004) Trends in Biotechnology, 22권, 238-244쪽).
- [0103] 다특이성, 예를 들면 2특이성, 단클론 항체 또는 항체 프라그먼트를 생성하려고 하는 수많은 시도가 있었다. 2개의 다른 폴리펩티드 사슬(무거운 사슬 및 가벼운 사슬)로 이루어지는 2특이성 항체의 생성에 있어서 하나의 문제는 혼합물에 소량의 2특이성 분자에서 분리되어야 하는 많은 분자의 다양한 조합을 일으키는 하나의 세포에 4개의 다른 사슬(2개의 무거운 사슬 및 2개의 가벼운 사슬)을 발현시킬 필요성이다. 그 유사성 때문에, 이들 분자의 분리가 곤란하고 고가이다. 많은 방법이 사용되어 이러한 소망하지 않는 접합의 발생을 최소화 시켰다 (Carter(2001) Journal of Immunological Methods, 248권, 7-15쪽).
- [0104] 이 문제의 하나의 해결책은 예를 들면 서로 연결된 2개의 ScFv 또는 소위 디아바디(diabodies)의 제조와 같은 2개의 특이성을 갖는 하나의 폴리 펩티드 사슬을 제조하는 것이다. 이러한 분자는 자연 분자의 접합에서 멀리 떨어져 있어 생성하는 것이 매우 곤란하다고 나타내고 있다(LeGall 등 (2004) Protein Engineering, Design & Selection, 17권, 357-366쪽).
- [0105] 2특이성 항체의 현재의 설계의 다른 문제점은 모항체가 각각의 결합 상대(예를 들면, IgG)에 2가로 결합되어 있어도, 얻어진 2특이성의 항체는 각각의 결합 상대의 각각에 대해 1가라는 사실이다.
- [0106] 본 발명의 바람직한 다특이성 분자는 이들 문제를 해결한다:
- [0107] 하나의 폴리펩티드 사슬로 2특이성 분자의 발현이 가능하고(2개의 결합 특이성을 갖는 개질된 Ig 영역, 실시예 참조), 2개의 항체의 폴리펩티드 사슬의 발현 보다 달성하는 것이 더 용이하다(Cabilly 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277(1984)).
- [0108] 제2 특이성은 2개의 다른 무거운 사슬 또는 다른 가벼운 사슬이 필요하지 않은 분자의 비가변부에 위치한다는 사실에 기인해서 분자와 같은 항체(즉, 2개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 것)로서 생성할 수도 있다. 따라서, 2개의 사슬을 잘못된 결합할 가능성은 없다.
- [0109] 본 발명의 항체는 무거운 사슬과 가벼운 사슬로 이루어지고, 특이적 결합 상대에 결합한, 가변부위를 함께 형성하고, 제2 특이성은 무거운 사슬 또는 가벼운 사슬 중 하나의 임의의 구조적 루프의 개질된 루프에 의해 형성될 수 있다. 결합자리는 구조적으로 인접되어 있을 수 있는 하나 이상의 비-CDR 루프로 형성될 수 있다 (무거운 사슬 또는 가벼운 사슬 중 하나 또는 둘다).
- [0110] 개질된 항체 또는 유도체는 완벽한 항체 또는 항체 프라그먼트(예를 들면, Fab, CH1-CH2, CH2-CH3)이어도 좋다.
- [0111] 결합상대에 1가 또는 다가, 또는 설계에 따라 다른 결합상대에 다른 원자가로도 결합할 수 있다.
- [0112] 무거운 및 가벼운 사슬의 비-CDR 부위에 특이적 결합자리의 선택 및 설계에 이용가능한 많은 다양한 루프가 있기 때문에, 상기 문제없이 2개 이상의 특이성을 갖는 항체 유도체를 설계할 수 있다.
- [0113] 하나의 폴리펩티드 사슬내에 특이적 결합 영역은 펩티드 링커의 유무에 따라 연결될 수 있다.
- [0114] 일부 항체 급은 다특이성, 특히 본래 2특이성으로 간주될 수 있다:이들은 항원(일반적으로 예를 들면 이질적인 구조 또는 암 관련 구조 중 하나인 것)에 가변부위를 갖고 결합하고 Fc부(예를 들면, 다양한 면역세포 또는 완전한 단백질상에 Fc 수용체)를 갖고 Fc 작동체 분자에 결합해서 ADCC, ADCP 또는 CDC 등의 영향을 미칠 수

있다.

- [0115] Fc 작동체 분자는 면역글로불린 분자(IgG1에 대해, CH2와 CH3영역으로 이루어진다)의 Fc부에 결합하고 많은 방법은 당조작 기술(US 6,602,684) 또는 Fc에 직접적으로 처리(US 2005/0054832) 또는 Fc의 외부에 간접적으로 처리(US 2005/02444403)하는 단백질 조작 중의 하나로 항체 분자의 Fc부의 결합의 개선에 의해 작동체 기능을 최적화하는 것이 기재되어 있다. Fc 수용체에 Fc 부위의 결합 및/또는 Cq1 등의 완전한 단백질에 결합은 이러한 기술에 의해 변경되었다. 보통 이러한 Fc-작동체 분자에 대한 결합 친화성은 개선된 작동체 기능에 서로 관계가 있기 때문에 개선이 요구된다.
- 현재의 발명에 따라, 자연 Fc 결합 부위 외부에 Fc 작동체 분자에 결합한 항체를 설계할 수 있다. "자연" Fc-작동체 분자 결합에 수반된 루프 이외에 항체 영역에 개선된 루프는 라이브러리에서 선택될 수 있고 하나 이상의 Fc-작동체 분자에 결합하도록 설계한다. 이러한 추가적인 Fc-작동체 분자 결합 자리를 갖는 항체는 특정 Fc-작동체 분자 또는 Fc 작동체 분자를 표시하는 작동체 세포에 친화력이 더 커져 당조작 항체 보다 훨씬 더 큰 효과를 갖거나 다른 방법으로 Fc 부위를 개선할 수 있다. 그러나 본 발명의 특정 실시형태에 대해, 개선된 주어진 항체의 작동체 특성은 직접 변화되지 않고 본 발명에 따른 구조적 루프에 변경에 의해 영향을 받지 않은 채로 있다.
- [0116] 삭제
- [0117] 항체 프라그먼트는 전체 항체에 비해 특정한 이점을 갖는다. 프라그먼트는 보통 양호한 생체내 분포 특성을 가져 더 용이하게 생성할 수 있다. 그러나 대부분의 항체 프라그먼트는 작동체 기능이 부족하게 설계되고 시험관 내 반감기가 불충분하다(Holliger P 등, Nat Biotechnol(2005), 23:1126-36).
- [0118] CH1나 C κ 또는 C λ 영역은, 작동체 기능을 중재하지 않고, 이는 Fab가 ADCC, ADCP 또는 CDC를 표시하지 않는 이유이다. WO 02/44215에는 항체의 항원 결합자리 및 펩티드 결합 Fc-작동체 분자로 이루어진 결합분자가 기재되어 있다. 이러한 방법으로 작동체 기능을 표시하는 항체 프라그먼트는 구성될 수 있다. 펩티드는 Fc 작동체 분자에 결합하는 항원 결합 또는 펩티드의 능력을 파괴하지 않는 위치에서 결합분자에 포함된다.
- [0119] 그러나 본 발명에 따라서, Fc 작동체 분자에 대한 결합은 면역글로불린 영역의 고정된 스캐폴드내에 랜덤 루프 서열의 라이브러리에서 결합한 Fc-작동체 분자에 대해 선택하는 개선된 면역글로불린 영역에서 행해질 수 있다. 따라서 Ig 영역 스캐폴드 외부에 Fc 작동체 분자에 결합하지 않는 특정 루프 서열에 대해 선택할 수 있다. 본 발명에 기인하는 폴리펩티드는 100개 이상의 아미노산으로 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0120] 본 발명에 따른 이러한 영역의 잠재적인 작동체 기능에 대해서 선택하기 위해, 돌연변이 CH1, C κ 또는 C λ 영역의 라이브러리는 Fc 수용체 및/또는 C1q 등의 보체 인자에 대한 결합에서 선택할 수 있다.
- [0121] 이러한 영역(예를 들면 CH1, CH2, CH3, CH4, C κ 또는 C λ)으로 이루어지거나 함유하는 분자의 시험관내의 반감기를 증가시키기 위해, FcRn에 대한 결합은 돌연변이의 라이브러리, 예를 들면 본 발명에 따른 CH1-, CH2-, CH3-, CH4-, C κ - 또는 C λ -영역에서 선택할 수 있다.
- [0122] 선택에 대한 FcRn-수용체는 각각의 수용체를 자연스럽게 발현하거나 각 수용체의 세포외부의 발현 및 정제에 의해 세포의 표면에 제공될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 FcRn에 대한 제1 선별은 시험관내에서 더 시험할 수 있는 돌연변이의 영역을 선택할 수 있고, FcRn 수용체를 발현하는 세포에 결합에 의한 FACS 실험을 더 특징 지을 수 있다. 예를 들면 표면 플라즈몬 공명 방법과 함께 각종 재조합 FcRn에 결합, 아이소폼 및 알로타입의 친화성 순위를 더 특징으로 한다.
- [0123] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라서 면역글로불린은 인간 또는 쥐과의 기원이다.
- 개질된 면역글로불린은 각종 목적, 특히 약학적 성분으로 사용될 수 있으므로 상기 면역글로불린은 인간 또는 쥐과 기원인 것이 바람직하다. 물론, 개질된 면역글로불린은 인간화될 수 있거나 괴물 면역글로불린일 수 있다.
- [0124] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에 따라서, 인간 면역글로불린은 IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgM으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0125] 쥐과 면역글로불린은 IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3 및 IgM으로 이루어진 군에서 선택하는 것이 바람직하다.

- [0126] 개질된 면역글로불린은 상기와 동일한 면역글로불린 급 중 에서 유래될 수 있다.
- [0127] 면역글로불린은 면역글로불린 또는 그 일부의 무거운 사슬 및/또는 가벼운 사슬을 함유하는 것이 바람직하다.
- [0128] 개질된 면역글로불린은 하나 이상의 가변영역 및/또는 일정영역에서 무거운 사슬 및/또는 가벼운 사슬을 포함할 수 있다.
- [0129] 본 발명에 따른 면역글로불린은 면역글로불린 또는 미니영역을 포함하는 그 일부의 하나 이상의 불변 영역 및/또는 하나 이상의 가변영역을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0130] 일정영역은 면역글로불린 분자의 일정부분의 면역글로불린 접힘 유닛이고, 또한 일정부위의 영역(예를 들면, CH1, CH2, CH3, CH4, Ck, Cl)으로 칭한다.
- [0131] 가변영역은 면역글로불린의 가변부의 면역글로불린의 접힘 유닛이고, 또한 가변부위의 영역(예를 들면, Vh, Vk, Vl, Vd)으로 칭한다.
- [0132] 본 발명에 따른 바람직한 면역글로불린은 하나 이상의 루프 부위를 가진, CH1, CH2, CH3, CH4, I_{gk}-C, I_{gl}-C 이루어진 군에서 선택된 불변 영역 또는 미니영역을 포함하는 그 일부로 이루어지고, 상기 하나 이상의 루프부위는 하나 이상의 개질된 루프 부위를 형성하는 하나 이상의 아미노산 개질을 포함하고, 상기 하나 이상의 개질된 루프 부위는 항원의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0133] 본 발명에 따른 다른 바람직한 면역글로불린은 하나 이상의 루프 부위를 가진, 무거운 사슬 또는 가벼운 사슬의 가변영역 또는 미니영역을 함유하는 그 일부로 이루어지고, 상기 하나 이상의 루프 부위는 하나 이상의 개질된 루프 부위를 형성하는 하나 이상의 아미노산 개질을 포함하고, 상기 하나 이상의 개질 루프 부위는 항원의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0134] 바람직한 실시형태에 따라서, 불변 영역은 CH1, CH2, CH3, CH4, I_{gk}-C, I_{gl}-C 및 그 조합의 군에서 선택된다.
- [0135] 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린은 하나 이상의 일정영역(예를 들면, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 10개 이상의 영역)을 포함할 수 있다. 1개 이상의 영역이 개질된 면역글로불린에 존재하면, 이들 영역은 동일한 타입 또는 가변타입(예를 들면, CH1-CH1-CH2, CH3-CH3)이어도 좋다. 물론 싱글 영역의 오더는 임의의 종류(예를 들면, CH1-CH3-CH2, CH4-CH1-CH3-CH2)이어도 좋다.
- [0136] 면역글로불린의 아미노산 서열의 모든 넘버링은 IMGT 넘버링 스킴에 따른다(IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc 등, 1999, Nucleic Acids Res. 27:209-212; Ruiz 등, 2000, Nucleic Acids Res. 28:219-221; Lefranc 등, 2001, Nucleic Acids Res. 29:207-209; Lefranc 등, 2003, Nucleic Acids Res.31:307-310; Lefranc 등, 2005, Dev Comp Immunol 29:185-203).
- [0137] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에 따라서, CH1, CH2, CH3 및 CH4의 개질된 루프 부위는 아미노산 7-21, 아미노산 25-39, 아미노산 41-81, 아미노산 83-85, 아미노산 89-103 및 아미노산 106-117를 포함한다.
- [0138] 인간 기원 I_{gk}-C 및 I_{gl}-C의 루프부위는 아미노산 8-18, 아미노산 27-35, 아미노산 42-78, 아미노산 83-85, 아미노산 92-100, 아미노산 108-117 및 아미노산 123-126을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0139] 쥐과 기원의 I_{gk}-C 및 I_{gl}-C의 루프부위는 아미노산 8-20, 아미노산 26-36, 아미노산 43-79, 아미노산 83-85, 아미노산 90-101, 아미노산 108-116 및 아미노산 122-125를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0140] 인간 기원의 면역글로불린의 가변영역의 구조적 루프 부위는 아미노산 8-20, 아미노산 44-50, 아미노산 67-76 및 아미노산 89-101를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0141] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라서, 쥐과 기원의 면역글로불린의 가변영역의 구조적 루프 부위는 아미노산 6-20, 아미노산 44-52, 아미노산 67-76 및 아미노산 92-101를 포함한다.
- [0142] 각각의 면역글로불린의 상기와 동일한 아미노산 부위는 개질될 루프 부위를 포함한다.
- [0143] 본 발명에 따른 면역글로불린은 낙타기원의 것이 바람직하다.
- [0144] 낙타 항체는 하나의 무거운 사슬만 포함하고 가벼운 사슬 및 무거운 사슬로 이루어진 정상적인 항체와 동일한 항원 친화성을 갖는다. 따라서 낙타항체는 예를 들면 인간항체보다 훨씬 작고, 더 큰 단백질은 통과할 수 없는 밀집한 조직을 통과시켜 항원에 도달할 수 있다. 더욱이 비교적 평이함, 높은 친화성 및 특이성, 및 활성자리에

도달해서 상호작용하는 포텐셜, 낙타의 무거운 사슬 항체는 임상적으로 가치있는 화합물의 설계, 제조 및 적용에서 보통의 항체에 비해 이점을 나타낸다.

- [0145] 낙타 기원의 면역글로불린은 CH1, CH2 및 CH3로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 불변 영역을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0146] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라서, 낙타 면역글로불린의 CH1, CH2 및 CH3의 루프부위는 아미노산 8~20, 아미노산 24~39, 아미노산 42~78, 아미노산 82~85, 아미노산 91~103 및 아미노산 108~117를 포함한다.
- [0147] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라서 개질된 면역글로불린의 분자에의 특이적 결합은 면역학적 분석, 바람직하게는 효소 결합 면역흡착제 분석(ELISA), 표면 플라즈몬 공명 분석, 포화 이동 차이 핵 자기 공명 분광, 전사 NOE(trNOE) 핵자기공명 분광, 경쟁분석, 조직 결합분석, 살아있는 세포 결합분석 및 세포 추출물 분석으로 이루어진 군에서 선택된 결합분석에 의해 결정된다.
- [0148] 결합분석은 종래에 공지된, FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) 및 BRET(Bioluminescence Resonance Energy Transfer)계 분석, AlphaScreen.TM.(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay), Scintillation Proximity Assay, ELISA(효소결합 면역흡착제 분석), SPR(표면 플라즈몬 공명, 또한 BIACORE.RTM.으로 공지), 등온적정열량계, 시차주사열량계, 겔전기영동 및 겔여과를 포함한 크로마토그래피 등을 포함하는 다양한 방법을 사용해서 행해지지만, 이들로 제한되지 않는다. 이들 및 다른 방법은 일부 용합 상대 또는 라벨을 이용할 수 있다.
- [0149] 개질된 면역글로불린은 유기분자, 효소 라벨, 방사성 라벨, 착색된 라벨, 형광체 라벨, 색원체 라벨, 발광체 라벨, 합텐, 디곡시제닌, 비오틴, 금속착체, 금속, 콜로이드 금 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 라벨에 콘쥬게이트하는 것이 바람직하다.
- [0150] 개질된 면역글로불린은 예를 들면 결합분석(예를 들면 ELISA) 및 결합연구에 상기 콘쥬게이트의 단순한 검지를 할 수 있는 다른 분자에 콘쥬게이트할 수 있다.
- [0151] 본 발명의 다른 형태는 하나 이상의 루프부위와, CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Ig1-C 또는 미니영역을 포함하고 그 일부로 이루어진 군에서 선택된 불변 영역 또는 그 조합으로 이루어진 면역글로불린에 관한 것이고, 하나 이상의 루프부위는 하나 이상의 개질된 루프부위에 형성한 하나 이상의 아미노산 개질을 포함하는 것으로, 상기 하나 이상의 개질된 루프 부위는 항원의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0152] 하나 이상의 개질된 항체 영역(=비가변서열 또는 구조적 루프를 통해 특정 대상에 결합)를 항체, 항체프로그래먼트, 가용성 수용체, 리간드 또는 다른 개질 항체영역일 수 있는 하나 이상의 다른 결합 분자와 분자로 결합하는 것이 바람직하다.
- [0153] 분자는 단백질 분자, 핵산 및 탄수화물로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0154] 개질된 면역글로불린의 루프부위는 임의의 종류의 결합분자, 특히 단백질의 분자, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 핵산, 글리칸, 탄수화물, 지질, 작은 유기 분자, 무기분자에 특이적으로 결합한다. 물론, 개질된 면역글로불린은 2개 이상의 루프부위를 포함하여 각 루프부위가 다른 분자 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0155] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따라서, 개질된 구조적 루프 부위에 결합한 분자는 종양관련항원, 특히 EpCAM, 종양관련 당단백질-72(TAG-72), 종양관련항원 CA 125, 전립선 특이 막 항원(PSMA), 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), 루이스 Y 관련 탄수화물을 발현하는 종양관련 항원, 암배아 항원(CEA), CEACAM5, HMFG PEM, 점액소 MUC1, MUC18 및 사이토케라틴 종양 관련 항원, 박테리아 항원, 바이러스 항원, 알레르겐, 플루오레세인, 리소자임, 툴 유사 수용체 9, 에리스로포이에틴, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD33(67쪽 단백질), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마; TNF-알파, TNF베타2, TNF.알파., TNF알파베타, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, TRAIL 수용체-1, A1 아테노신 수용체, 림포톡신 베타 수용체, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, 인테그린 베타1, 인테그린 베타2, 인테그린 알파4/베타7, 인테그린 알파2, 인테그린 알파3, 인테그린 알파4, 인테그린 알파5, 인테그린 알파6, 인테그린 알파 v, 알파V 베타 3 인테그린, FGFR-3, 케라티노사이트 성장 인자, VLA-1, VLA-4, L-셀렉틴, anti-Id, E-셀렉틴, HLA, HLA-DR, CTLA-4, T세포 수용체, B7-1, B7-2, VNR인테그린, TGF베타1, TGF베타2, 에오타신 1, BLys(B-립프구 자극인자), 보체 C5, IgE, 인자 VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR(ErbB-1),

Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB4), 조직 인자, VEGF, VEGFR, 엔도텔린 수용체, VLA-4, 혈액형 항원과 같은 탄수화물, 및 관련 탄수화물, Galili-글리코실화, 가스트린, 가스트린 수용체, 종양관련 탄수화물, 합텐 NP-cap 또는 NIP-cap, T 세포 수용체 알파/베타, E-셀렉틴, 디곡신, 태반 알칼리성 포스파타아제(PLAP) 및 고환 PLAP 유사 알칼리성 포스파타아제, 트랜스페린 수용체, 헤파라나제 I, 인간 심장 미오신, 당단백질 IIb/IIIa(GPIIb/IIIa), 인간 사이토 메갈로 바이러스(HCMV) gH 외피 당단백질, HIV gp120, HCMV, 호흡기 세포융합 바이러스 RSV F, RSVF Fgp, VNR 인테그린, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, HIV IIIB gp120 V3 루프, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) Fgp, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV) gD 당단백질, HSV gB 당단백질, HCMV gB 외피 당단백질, 클로스트리듐 퍼프린젠스 독소 및 그 프라그먼트로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0156] 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린은 상기 개시된 분자 중 하나에 결합하는 것이 바람직하다. 이들 분자는 알레르겐도 포함한다.

[0157] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에 따라서, CH3의 15~17, 29~34, 85.4~85.3, 92~94, 97~98 및/또는 108~110의 위치의 아미노산 잔기가 개질된다.

[0158] 본 발명에 따른 면역글로불린의 개질은 제거, 치환 또는 삽입이 바람직하다.

[0159] 본 발명에 따라서, 적어도 하나, 바람직하게는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 15의 아미노산을 제거, 다른 아미노산(또한 개질된 아미노산과 함께)으로 치환, 또는 면역글로불린의 루프부위에 삽입한다. 그러나 면역글로불린의 루프부위에 삽입된 아미노산 최대 개수는 30개를 초과하지 않고, 바람직하게는 아미노산 25개, 보다 바람직하게는 20개 이다. 아미노산의 치환 및 삽입은 본 발명의 적용에 개시된 것처럼, 공지된 방법에 의해 랜덤하게 발생하는 것이 바람직하다.

[0160] 본 발명에 따른 면역글로불린은 EpCam이 상기 면역글로불린, SEQ ID No.20에 결합할 때, 플루오레세인이 상기 면역글로불린, SEQ ID No.22, 24, 26, 28, 30 또는 32에 결합할 때, 리소자임이 상기 면역글로불린, SEQ ID No.34, 36, 38 또는 40에 결합할 때, TLR9가 상기 면역글로불린 및 SEQ ID No.42에 결합할 때, 리소자임 및/또는 에리스로포이에틴이 상기 면역글로불린에 결합할 때 CH3 부위는 SEQ ID No.16 또는 SEQ ID No.18을 포함하는 것을 특징으로 하는 특정 실시형태에 의한 것이다.

[0161] 본 발명의 특정 실시형태에 따라서, 면역글로불린은 리소자임 및 gp41이 상기 면역글로불린에 결합할 때 SEQ ID No.44 또는 SEQ ID No.46을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0162] 개질된 면역글로불린은 유기분자, 효소라벨, 방사성 라벨, 착색된 라벨, 형광체 라벨, 색원체 라벨, 발광체 라벨, 합텐, 디곡시제닌, 비오틴, 금속착체, 금속, 콜로이드 금 및 그 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 라벨 또는 리포터 분자에 콘쥬게이트하는 것이 바람직하다.

[0163] 상기 기재된 것과 같은 라벨에 콘쥬게이트하는 개질된 면역글로불린은, 예를 들면 진단방법에 사용될 수 있다.

[0164] 본 발명의 다른 형태는 본 발명에 따른 면역 글로불린의 용도 또는 능동면역에 대한 백신을 조제하기 위해 본 발명에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 본 발명에 따른 면역 글로불린의 용도에 관한 것이다. 따라서 면역글로불린은 항원성 약물로서 백신을 처방하는데 사용하거나 백신처방에 사용하기 위한 항원구조를 찾아내거나 획득하는데 사용된다.

[0165] 본 발명의 다른 형태는 본 발명에 따른 면역글로불린의 용도 또는 면역글로불린의 단백질 라이브러리를 조제하기 위해 본 발명에 따른 방법에 의해 얻어질 수 있는 본 발명에 따른 면역글로불린의 용도에 관한 것이다.

[0166] 그러나 본 발명의 다른 형태는 분자를 특이적으로 결합하고 그리고/또는 검지하는 방법에 관한 것이고, 그 단계는:

[0167] (a)본 발명에 따라서 개질된 면역글로불린 또는 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 개질된 면역글로불린을 상기 분자를 함유하는 것으로 생각되는 테스트 시료와 접촉하는 단계, 및

[0168] (b)특정 면역글로불린/분자 착제의 잠재적 형성을 검지하는 단계를 포함한다.

[0169] 본 발명의 다른 형태는 특이적으로 분자를 분리하기 위한 방법에 관한 것이고, 그 단계는:

[0170] (a)본 발명에 따른 개질된 면역글로불린 또는 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 개질된 면역글로불린을 상기 분자를 함유하는 시료와 접촉하는 단계,

[0171] (b)형성된 특이적 면역글로불린/분자 착제를 분리하는 단계,

- [0172] (c)상기 착체에서 분자를 선택적으로 분리하는 단계를 포함한다.
- [0173] 본 발명에 따른 면역글로불린은 특이적으로 시료에서 분자를 분리하는데 사용할 수 있다. 다특이성 면역글로불린이 사용되는 경우, 하나 이상의 분자는 시료에서 분리될 수 있다. 예를 들면 분리될 분자에 결합할 수 있는, 그 위에 고정된 한정량의 결합상대(즉, 개질된 면역글로불린)와 균일한 표면을 갖는 매트릭스를 발생시킬 수 있기 때문에, 이러한 방법으로 개질된 면역글로불린을 사용하는 것이 특히 유리하다. 반대로 1특이성 결합 상대를 사용하면, 하나의 결합상대가 매트릭스에 동일한 효율로 결합하지 않기 때문에 균일한 매트릭스가 발생할 수 없다.
- [0174] 본 발명의 다른 형태는 목표물에 화합물을 약물표적화하기 위한 방법에 관한 것이고, 그 단계는:
- [0175] (a)본 발명에 따른 개질된 면역글로불린 또는 상기 화합물에 특이적으로 결합할 수 있는 본 발명에 따른 방법에 의해 얻어질 수 있는 개질된 면역글로불린을 접촉하는 단계,
- [0176] (b)상기 목표물에 면역글로불린/화합물 착체를 운반하는 단계를 포함한다.
- [0177] 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린은 CDR 및/또는 목표물에 개질된 루프부위에 결합된 하나 이상의 화합물을 운반하는데 사용될 수 있다. 이러한 면역글로불린은 질병치료의 과정에 바람직한 활성의 자리에 치료물질을 약물표적화하는데 사용될 수 있다.
- [0178] 본 발명의 다른 형태는 본 발명에 따른 면역글로불린 또는 본 발명에 따른 방법에 의해 얻어질 수 있는 본 발명에 따른 면역글로불린을 포함하는 단백질 라이브러리에 관한 것이다.
- [0179] 상기 라이브러리를 구축하기 위한 바람직한 방법은 상기 및 이 실시예에서 찾아낼 수 있다. 본 발명에 따른 라이브러리는 별개의 분자에 결합한 면역글로불린을 확인하는데 사용할 수 있다.
- [0180] 특히 본 발명은 본 발명에 따른 면역글로불린 또는 면역글로불린 유도체의 설계를 위해 본 발명에 따른 방법에 의해 얻어질 수 있는 면역글로불린을 포함한 단백질 라이브러리의 용도에 관한 것이다. 기존의 면역글로불린은 하나 이상의 개질된 루프와, 적어도 10, 바람직하게는 100, 더 바람직하게는 1000, 더 바람직하게는 10000, 더 바람직하게는 100000, 가장 바람직하게는 1000000 이상의 변이체 영역의 각 영역의 단백질 라이브러리를 사용해서 항원결합자리를 임의의 영역 또는 미니영역에 도입해서 변경할 수 있다. 이어서, 라이브러리는 특정 항원에 결합하기 위해 선별된다. 소망의 특성에 대한 분자의 특성화 후 선택된 영역 또는 미니영역은 원래의 면역글로불린에 유전공학기술에 의해 클론화되어 야생형 부위로 대체된다. 또한 루프의 DNA코드화 또는 돌연변이된 아미노산의 코드화한 DNA를 변경시켜서 특정 항원의 추가적인 결합 자리와 면역글로불린을 얻을 수 있다.
- [0181] 돌연변이된 자리의 선택, 항원 특이 구조적 루프는 원래의 면역글로불린의 구조 및 추가적인 결합 자리의 목적에 따라 다르다. 예를 들면 원래 분자는 작동체 기능의 방해 없이 추가적인 항원 결합 자리를 삽입할 필요가 있는 완전한 면역글로불린이면, 변경될 루프는 Fc-작동체 또는 분자에 대한 자연결합상대인 CH2 및 CH3에서 면역글로불린으로부터 선택될 수 있다. 원래의 면역글로불린이 Fab이면, 가벼운 사슬 또는 무거운 사슬의 불변 영역 또는 각각의 가변영역의 루프의 개질이 가능하다. 라이브러리를 생성하기 위해 하나 이상의 영역의 하나 이상의 구조적 루프에 돌연변이를 갖는 돌연변이 기원 분자의 라이브러리를 제조할 수 있다. 완전한 돌연변이된 기원 분자와의 선택이 개질된 구조적 루프와 항원결합의 선택으로서 입체적으로 이로운 개질을 전달하기 때문에 일부 이점을 가질 수 있고, 다른 특성에 대해 시험하면 돌연변이된 면역글로불린을 표시할 필요가 있다.
- [0182] 돌연변이된 영역 또는 미니영역의 단백질 라이브러리 또는 영역의 융합분자의 크기 요건(즉 변이체 단백질의 수)은 과제에 따라 다르다. 일반적으로 항원결합자리를 발생시키는 라이브러리는 처음부터 개질된 구조적 루프로 이루어지는 이미 기존의 처리된 항원결합자리를 더 개질하기 위해 사용된 라이브러리 보다 클 필요가 있다 (예를 들면, 치환도를 향상시키거나 항원에 미세한 특이성을 변화시키는 것).
- [0183] 본 발명은 복수의 면역글로불린, 예를 들면 일정한 또는 가변영역, 미니영역 및/또는 미니영역에 함유된 하나 이상의 구조적 루프 부위를 포함한 면역글로불린 라이브러리 또는 핵산 라이브러리, 또는 이를 코드하는 핵산 분자에 관한 것이다. 라이브러리는 다른 개질의 개체를 함유하고, 복수는 하나 이상의 구조적 루프 부위에 개질에 의해 정의된다. 핵산 라이브러리는 적어도 10개의 다른 개체(하나의 아미노산 교환을 일으킨다)를 포함하는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 100, 보다 바람직하게는 1000 또는 10000개의 다른 개체를 포함한다(예를 들면, 임의화 전략 또는 결합의 기술에 의해 설계된다). 적어도 1000000 또는 적어도 10000000 등의 훨씬 더 다양화된 개체의 개체수가 바람직하다.
- [0184] 본 발명의 더욱 다른 형태는 다특이성 면역글로불린을 발생하기 위해 본 발명에 따른 2개 이상의 라이브러리에

서 선택된 2개의 다른 영역 또는 미니영역의 조합이다. 이들 선택된 특정 면역글로불린은 서로 조합하고 다른 분자와 조합하고, 유사하게 빌딩블록에 조합하여 소망의 특성을 얻기 위해 영역 또는 미니영역의 최적의 서열을 설계한다.

[0185] 또한 본 발명에 따른 하나 이상의 개질 면역글로불린은 단백질 구조의 파괴없이 가능한 단백질의 각종 또는 모든 다른 자리에 도입될 수 있다. 이러한 "영역 서플링"방법에 의해 새로운 라이브러리가 생성되어 소망의 특성을 다시 선택할 수 있다.

[0186] 바람직한 라이브러리는 본 발명에 따른 면역글로불린의 영역, 미니영역 또는 그 유도체로 이루어진 군에서 선택된 면역글로불린을 함유한다 .

[0187] 본 발명의 바람직한 실시형태는 항원에 결합하기 위해 본 발명에 따라서 개질되는 하나 이상의 면역글로불린 영역 및 구조적 루프부위를 포함한 항원에 결합한 분자(항원결합분자)이고, 상기 결합분자는 항체의 가변영역을 포함하지 않는다. 항체활성에 사용가능한 다른 부분을 포함할 수 있지만(예를 들면, 자연 또는 개질된 작동체 부위(서열); 항체의 "자연"결합부위, 즉 자연스럽게 발생한 위치에서 가변영역이 부족하다. 본 발명에 따른 이들 항원결합분자는 본 발명의 분자에 항체의 특이적 결합 활성이 없지만, 구조적 루프 부위에 새롭게 도입한 특이적 결합활성을 갖는 상기 기재된 이점을 갖는다.

[0188] 바람직하게, 본 발명에 따른 이들 항원결합분자는 CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C 및 그 조합을 포함하고; 상기 조합은 본 발명에 따라서 개질된 2개 이상, 바람직하게는 4개 이상, 특히 6개 이상의 불변 영역 및 1개 이상의 구조적 루프부위를 포함한다. 바람직하게 이들 구조적 루프 부위는 본 발명에 따라서 개질된 구조적 루프 부위를 통해 연결되거나 2개의 불변 영역 사이에 자연스럽게 존재하는 구조적 루프이다. 본 발명에 따른 이들 항원 결합 분자의 실시형태는 본 발명에 따른 구조적 루프에 하나 이상의 개질과 항체의 Fc 부위로 이루어진다. 또한 본 발명에 따른 항원 결합분자에 대해서도 구조적 루프에 새로운 항원 결합자리가 임의의 방법, 즉 임의의 방법에 의해 루프의 하나 이상의 아미노산 잔기를 교환하거나 임의로 발생된 삽입물을 이러한 구조적 루프에 도입함으로써 도입된다. 또한, 바람직하게는 조합 접근방법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0189] 다른 형태에 따라서, 본 발명은 미개질된 면역글로불린에 항원결합자리에 이물질질을 갖고 하나 이상의 구조적 루프에 포함된 개질된 면역글로불린에 관한 것이다. "이물질"이란 항원결합자리가 면역글로불린의 특정 부위로 자연스럽게 형성되지 않고, 면역글로불린의 자연스러운 결합상대가 아닌 이물질 결합 상대를 항원결합자리에 결합하는 것을 의미한다. 이것은 Fc 수용체 또는 면역계의 작동체 등의 결합 상대는 항원결합자리 이물질에 의해 미개질 면역글로불린에 결합된다고 고려되지 않는 것을 의미한다.

[0190] 바람직하게 항원은 병원체 항원, 종양관련항원, 효소, 물질, 자가항원, 유기분자 또는 알레르겐으로 이루어진 군에서 선택된다. 보다 바람직하게 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원 또는 진핵생물 또는 파지의 병원체 유래의 항원에서 선택된다. 바람직한 바이러스 항원은 HAV-, HBV-, HCV-, HIV I-, HIV II-, 파코바이러스-, 인플루엔자-, HSV-, 간염 바이러스, 플라비바이러스, 웨스트나일바이러스, 에볼라 바이러스, 수두 바이러스, 천연두 바이러스, 홍역바이러스, 포진바이러스, 아데노바이러스, 유두종 바이러스, 폴리오마바이러스, 파코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 폴리오바이러스, 에코바이러스, 일본뇌염 바이러스, 뎅기열 바이러스, 진드기 매개뇌염 바이러스, 황열병 바이러스, 코로나바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 라크로세 바이러스, 라사 바이러스, 광견병 바이러스, 로타바이러스 항원; 바람직하게는 박테리아 항원은 슈도모나스-, 미코박테리움-, 스태필로코커스-, 살모넬라-, 수막구균-, 보렐리아-, 리스테리아, 나이세리아, 클로스트리듐, 에스캐리키아-, 레지오넬라-, 바실러스-, 락토바실러스-, 연쇄상구균-, 엔테로코커스-, 코리네박테리움-, 노카르디아-, 로도코커스-, 모락셀라-, 부루셀라-, 캄필박터, 카르디오 박테리움-, 프란시셀라, 헬리코박터, 헤모필러스, 클레브시엘라-, 시겔라-, 여시니아-, 비브리오-, 클라미디아-, 렙토스피라-, 리케차-, 미코박테리움, 트레포네마-, 바르토넬라항원을 들 수 있다. 바람직한 병원체 진핵생물의 진핵생물 항원은 지아르디아, 톡소플라스마, 시클로스포라, 크립토스포리디움, 트리키넬라, 이스트, 칸디다, 아스퍼질러스, 크립토코커스, 블래스토마이시스, 히스토플라스마, 코시디오이드에서 항원을 들 수 있다.

[0191] 본 발명에 따른 바람직한 면역글로불린은 적어도 2개의 항원결합자리, 제1의 에피토프에 결합하는 제1 자리, 및 제2의 에피토프에 결합하는 제2자리를 포함한다.

[0192] 바람직한 실시형태에 따라서, 본 발명의 면역글로불린은 적어도 2개의 루프 부위, 제1 에피토프에 결합하는 제1 루프 부위 및 제2에피토프에 결합하는 제2루프 부위를 포함한다. 적어도 제1의 또는 적어도 제2의 루프 부위 중 하나 또는 둘다는 구조적 루프를 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 면역글로불린은 본 발명에 따른 필수요소를

함유하는 기능인 종래에 공지된 그 프라그먼트를 들 수 있다:본 발명에 따라서 개질된 구조적 루프 부위.

- [0193] 바람직하게는 본 발명에 따라서 번역글로불린은 2개 이상의 번역글로불린 영역, 또는 미니영역을 포함하는 그 일부로 이루어지고, 각 영역은 하나 이상의 항원 결합 자리를 함유한다.
- [0194] 또한, 하나 이상의 일정한 부위의 영역 및/또는 하나 이상의 번역글로불린의 가변부위의 영역, 또는 미니영역을 포함하는 일부를 포함하는 본 발명에 따른 번역글로불린이 바람직하다. 따라서 예를 들면 C-말단부위에 개질된 가변영역 또는 개질된 CH1 부위에 연결된 가변영역, 예를 들면 개질 CH1 미니 영역은 바람직한 실시형태 중 하나이다.
- [0195] 본 발명에 따른 바람직한 번역글로불린은 미개질된 영역과 50% 이상 상동인 영역을 포함한다.
- [0196] "상동"이란 폴리펩티드가 그 제1, 제2 또는 제3 구조에 상응하는 위치에 동일한 또는 보존된 잔기를 갖는 것을 나타낸다. 상기 용어는 상동의 폴리펩티드를 코드하는 2개 이상의 뉴클레오티드 서열로도 확대해석된다.
- [0197] "상동의 번역글로불린 영역"이란 여기에 개시된 것처럼 전체길이의 자연 서열 번역글로불린 영역 서열 또는 전체 길이의 번역글로불린 영역 서열의 임의의 다른 프라그먼트에 대해 약 50% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 본 발명에 따른 번역글로불린영역을 의미한다. 바람직하게는 상동의 번역글로불린 영역은 여기서 개시된 것처럼, 자연 번역글로불린 영역 서열, 또는 전체길이의 번역글로불린 영역 서열의 임의의 다른 구체적으로 정의된 프라그먼트에 대해, 약50% 이상의 아미노산 서열 동일성, 바람직하게는 약 55% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 약 60% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 약 65% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 약 70% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 약 75% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 약 80% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 약 85% 이상의 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 약 90% 이상의 아미노산 서열 동일성, 바람직하게는 약 95% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는다.
- [0198] 여기서 확인된 번역글로불린 영역 서열에 대해 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"이란 특정 번역글로불린 영역 서열에 아미노산 잔기와 동일한 후보서열 중 아미노산 잔기의 비율로서 정의하고, 필요에 따라서 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하고 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존 치환을 고려하지 않는다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 예를 들면 고속연기술인 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어 등의 시판 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 다양한 방법으로 달성할 수 있다. 당업자는 정렬을 측정하기 위한 적당한 변수를 결정할 수 있고, 비교된 서열의 전체길이에 비해 최대 정렬을 달성할 필요가 있는 임의의 알고리즘을 포함한다.
- [0199] % 아미노산 서열 동일성 값은 WU-BLAST-2 컴퓨터 프로그램(Altschul 등, Methods in Enzymology 266:460-480(1996))을 사용해서 하기 기재된 것처럼 얻을 수 있다. 대부분의 WU-BLAST-2 검색 매개변수는 디폴트값으로 설정한다. 디폴트값으로 설정하지 않는 것, 즉 조절 가능한 매개변수는 하기 값으로 설정한다:overlap span=1, overlap 분율=0.125, 워드 쓰레드홀드(T)=11, 및 스코어링(scoring) 매트릭스=BLOSUM62로 설정하였다. WU-BLAST-2를 사용할 때, % 아미노산 서열 동일성 값은 WU-BLAST-2에 의해 결정된 (a)자연 번역글로불린 영역에서 유래된 서열을 갖는 관심의 번역글로불린 영역의 아미노산 서열과 관심의 아미노산 서열의 비교(즉, 관심의 번역글로불린 영역은 미개질된 번역글로불린 영역일 수 있는 것과 비교) 사이에 맞는 동일한 아미노산 잔기의 수를 (b)관심 of 번역글로불린 영역의 임의적이지 않은 부분의 아미노산 잔기의 총수로 나눔으로써 결정한다. 예를 들면 "아미노산 서열 B에 80% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖거나 갖는 아미노산 서열 A를 포함하는 폴리펩티드"에서, 아미노산 서열A는 관심의 비교 아미노산 서열이고, 아미노산 서열 B는 관심의 번역글로불린 영역의 아미노산 서열이다.
- [0200] 본 발명에 따른 번역글로불린의 바람직한 실시형태에서 2특이성 항체 또는 2특이성 하나의 사슬 항체이다. 더욱 바람직한 것은 번역글로불린은 2특이성 영역 또는 미니영역을 포함한 그 일부를 포함하는 것이다.
- [0201] 본 발명에 따른 번역글로불린은 번역글로불린에 대해 종래에 공지된 임의의 목적을 위해 사용하지만 본 발명에 의해 도입된 특이성 조합에 따라서도 적용할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 번역글로불린은 치료 및 예방의 용도(예를 들면, 능동 또는 수동 면역치료); 제재 및 분석 용도 및 진단에 사용하는 것이 바람직하다.
- [0202] 본 발명의 다른 형태는:
- [0203] (a)하나 이상의 구조적 루프에 포함된 번역글로불린에 항원 결합자리 이물질을 갖는 개질된 번역글로불린, 및

- [0204] (b)상기 항원의 에피토프를 함유한 결합분자를 함유하는 결합 상대의 키트에 관한 것이다.
- [0205] 본 발명에 따른 이 키트의 이러한 결합분자는 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린의 결합 특이성을 확인하는데 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 이 키트의 결합 분자를 사용하여, 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린의 효능을 결정할 수 있다.
- [0206] 여기에 정의된 효능은 그 항원에 대한 개질된 분자의 결합성이다. 결합은 품질관리목적을 위해 사용된 특이성 및/또는 친화성 및/또는 결합활성에 대해 정량적으로 및/또는 정성적으로 결정할 수 있다.
- [0207] 더욱이, 본 발명에 따른 키트의 결합분자는 구조적 루프중 다른 개질을 갖는 적어도 10개, 바람직하게는 100개 이상, 보다 바람직하게는 1000개 이상, 더 바람직하게는 10000개 이상, 특히 바람직하게는 100000개의 면역글로불린으로 이루어진 라이브러리로부터 본 발명에 따른 개질된 면역글로불린을 선택하는데 사용할 수 있다.
- [0208] 본 발명에 따라서, 본 발명의 중요한 특성 중 하나는 면역글로불린 영역의 처리가 항원 결합에 정상적으로 수반되지 않는 부위, 즉 항체의 CDR 이외에 부위에서 발생하는 것이다. 면역글로불린 영역의 특이적 접힘은 CDR과 구조적으로 유사한 부위에 랜덤 돌연변이를 도입할 수 있지만, 서열의 위치가 다르다는 것이 관찰되었다. 본 발명에 의해 확인된 부위는, CDR 처럼 면역글로불린 접힘의 베타 가닥을 연결하는 루프 부위이다.
- [0209] 더 구체적으로 인간의 IgG1 CH3 영역의 베타 가닥 A-B와 E-F를 연결한 루프에 랜덤 돌연변이를 도입하여, 돌연변이된 CH3영역이 톨 유사 수용체 9-펩티드(TLR-9) 또는 계란 리소자임 중 하나에 특이적으로 결합하는 것을 선택하였고, 이것은 정상적으로 인지되지 않고 인간의 IgG1의 CH3 영역에 의해 결합된 각각 펩티드 및 단백질인 것이 기재되어 있다. 본 발명자들에 의해 도입된 돌연변이체는 야생형 서열 중 선택된 아미노산 잔기가 랜덤하게 선택한 잔기로 대체되는 돌연변이를 포함하고, 상기 기재된 루프에 추가의 아미노산 잔기의 삽입도 포함한다.
- [0210] 분석에 의해 면역글로불린의 임의의 급 및 임의의 종류로부터 면역글로불린 유래의 면역글로불린 영역은 이 처리타입을 따른다. 또한 본 발명의 목표로 된 특정 루프가 조각될 뿐만 아니라, 면역글로불린 영역에 임의의 루프 연결 베타 가닥은 동일한 방법으로 조각될 수 있다.
- [0211] 임의의 유기체 및 면역글로불린의 임의의 급 유래의 처리된 면역글로불린 영역은 그와 같이(단일 영역) 또는 더 큰 분자의 부분 중 어느 하나로 본 발명에 따라서 사용할 수 있다. 예를 들면 완전한 면역글로불린의 일부일 수 있고, 따라서 6CDR 및 새로운 처리 항원 결합 부위에 의해 형성된 "정상" 항원결합부위를 갖는다. 이와같이 다 특이성, 예를 들면 2특이성, 면역글로불린이 발생할 수 있다. 처리된 면역글로불린 영역은 임의의 융합 단백질의 일부일 수 있다. 이들 처리된 면역글로불린 영역의 용도는 면역글로불린 용도의 일반적인 분야에 있다.
- [0212] 하기 면역글로불린의 영역은 여기서 면역글로불린 영역으로 이해된다:
- [0213] IgG, IgD 및 IgA에 대해:VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3
- [0214] IgM 및 IgE에 대해:VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3, CH4
- [0215] 1. 단일의 면역글로불린 영역은, 일측, 즉 베타 가닥 B-C, D-E 또는 F-G(많은 패턴에 의해 커버된 가변영역을 제외, "팁") 또는 베타 가닥 A-B, C-D, (가변영역의 경우에 C-C' 및 C''-D) 또는 E-F("바닥") 중 하나를 연결한 루프에서 임의로 선택한다. 하나의 루프 또는 루프의 임의의 조합은 임의로 선택할 수 있다. 잔기는 변경, 제거할 수 있거나 또는 추가적인 잔기를 삽입할 수 있다.
- [0216] 2. 단일의 면역글로불린 영역은 양측, 팁 및 바닥에서 임의로 선택했다.
- [0217] 3. 단일의 랜덤 영역 중 하나를 함유하는 임의의 단백질, 예를 들면:
- [0218] a)하나 또는 양측에 임의로 선택한 "단쇄 CH3"이량체(scCH3), scCH2, scCH1/CL
- [0219] b)"바닥", 즉 CDR의 반대측에 임의로 선택한 단쇄 Fv
- [0220] c)"바닥", 즉 CH1와 CL영역의 C-말단에 임의로 선택한 Fab 프라그먼트
- [0221] d)하나 또는 양측에 임의로 선택한 Fc 프라그먼트(즉, CH2-CH3로 이루어진 단백질)
- [0222] e)Fc의 바닥에 임의로 선택한 완전한 면역글로불린
- [0223] f)다른 적당한 영역

- [0224] 단일의 영역의 제1 이점은: 낙타 VH 분자("나노바디", www.ablynx.com 참조)를 활성화하는데 사용하는 모든 주장과 매우 유사하다. 임의로 선택한 면역글로불린 영역은 매우 작은 단백질(삽입된 아미노산 잔기의 수에 따른 분자량 약 12-15kDa)이어서 종래의 항체 또는 scFv와 Fab 같은 항체 프라그먼트에 비해 하기 이점: 혼하지 않은 또는 숨겨진 에피토프를 인식, 단백질 목표물의 구멍 또는 활성자리에 결합, 제조의 용이 및 많은 다른 이점을 갖는다. 양측에 임의로 선택한 면역글로불린 영역의 경우, 2가 또는 2특이성 분자가 발생할 수 있다. 융합단백질의 부분은 추가적인 결합성이 있기 때문에, 단일 영역의 주요한 이점은 임의의 다른 단백질에 처리될 수 있다.
- [0225] 임의의 발현체는 단백질을 만드는데 사용할 수 있는 것이 고려된다. 여기에 기재된 것처럼 단일영역에 대한 유사체는 낙타 유래 항체에서 발견할 수 있고, VL이 아닌 VH만을 갖는다. 이들 단백질에서 3개의 CDR("정상"항체가 항원결합을 조래하는 경우에서의 6개 대신).
- [0226] 하기 특허문헌은 그 전체에 기재된 것처럼 참조로 여기에 포함된다:
- [0227] 미국 특허 6,294,654호에는 비-CDR 루프 부위에 항원을 포함하는 개질된 면역글로불린 분자가 기재되어 있다.
- [0228] 미국 특허 5,844,094호에는 목표물 결합 폴리펩티드가 기재되어 있다.
- [0229] 미국 특허 5,395,750호에는 소정의 항원에 결합한 단백질을 생성하는 방법이 기재되어 있다.
- [0230] 미국 특허 2004/0071690호에는 고친화성 다가 및 다특이성 제재가 기재되어 있다.
- [0231] 미국 특허 2004/0018508호에는 대리의 항체 및 조제방법 및 그 용도가 기재되어 있다.
- [0232] 미국 특허 2003/0157091호에는 다기능 단백질이 기재되어 있다.
- [0233] 미국 특허 2003/0148372호에는 다른 리간드와 파지 디스플레이 라이브러리를 선별하는 방법이 기재되어 있다.
- [0234] 미국 특허 2002/0103345호에는 2특이성 면역글로불린 유사 항원 결합 단백질 및 조제방법이 기재되어 있다.
- [0235] 미국 특허 2004/0097711호에는 면역글로불린 슈퍼패밀리 단백질이 기재되어 있다.
- [0236] 미국 특허 2004/0082508호에는 분비된 단백질이 기재되어 있다.
- [0237] 미국 특허 2004/0063924호에는 분비된 단백질이 기재되어 있다.
- [0238] 미국 특허 2004/0043424호에는 면역글로불린 슈퍼패밀리 단백질이 기재되어 있다.
- [0239] 미국 특허 5,892,019호에는 단일 유전자 코딩된 면역글로불린의 조제가 기재되어 있다.
- [0240] 미국 특허 5,844,094호에는 표적 결합 폴리펩티드가 기재되어 있다.
- [0241] 본 발명은 제한없이 하기 특성 및 실시예에 대해 더 설명한다.

도면의 간단한 설명

- [0242] 도1a는 완전한 IgG1의 구조를 도시한다. 영역은 화살표로 나타낸다.
- [0243] 도1b는 주요한 인간 면역글로불린 아이소타입 모노머의 구조적 조직을 도시한다. 디설피드 결합은 선으로 표시하고, N-연결 탄수화물기는 원으로 표시한다.
- [0244] 도2는 면역글로불린의 불변 영역(왼쪽) 및 가변영역(오른쪽)에 대한 면역글로불린 접힘을 도시한다. 베타 가닥은 화살표로 나타낸다.
- [0245] 도3은 본 발명에 따른 처리된 CH3 영역의 분자모델을 표시하고, 임의로 선택한 부분은 용매 접근가능한 면으로 나타낸다. 표면은 원으로 표시한다.
- [0246] 도4는 돌연변이된 CH3 영역의 집합에 대해 사용된 프라그먼트의 제조에 사용된 PCR의 개략도를 나타낸다. PCR 프라이머는 그 각각의 5'-3' 배향으로 화살표로 나타내고, 수직라인은 돌연변이된 유전자의 집합에 사용된, 도입된 제한자리에 근접한 위치를 나타낸다. 하기 제한자리는 PCR 프라그먼트:CH3LNCO:NcoI;CH3LSAC 및 CH3CSAC:SacI;CH3CHIN 및 CH3RHIN:HindIII;CH3RNOT:NotI의 결합에 대한 프라이머에 함유된다.
- [0247] 도5는 현재의 적용의 면역글로불린 영역이 사용될 수 있는 방법의 일부 실시예를 도시한다. 임의로 선택한 영역은 별모양으로 표시한다. 한 분자에 임의로 선택한 영역의 특이성은 동일하거나 다를 수도 있다.
- [0248] 도6은 2특이성 처리된 CH3 영역의 설계의 개략도를 표시한다. 프라이머의 이름은 박스에 주어지고 화살표는 프

라이머가 연장되는 방향을 나타낸다. 사선의 박스는 이 구조에서 임의로 선택한 부위의 상대적인 위치를 나타내고, 수직라인의 박스는 클론 C24의 발생에 도입된 부위의 상대적인 위치를 나타내고, 클로닝 절차에서 사용된 자리의 제한이 주어진다.

[0249] 도7은 2특이성 처리된 CH3 영역의 설계의 개략도를 표시한다. 뉴클레오티드 서열 및 그 해석은 2특이성 처리된 CH3 영역의 기본적인 설계를 표시한다. 그린박스는 클론 C24를 생성하기 위해 서열이 랜덤화된 부위를 나타내면 서 Red 서열은 2특이성 구조를 생성하기 위해 랜덤화된 영역을 나타낸다.

[0250] 도8은 여기에 개시된 서열의 서열목록을 나타낸다.

[0251] 실시예1: CH3 라이브러리 구축 및 파지 표면 디스플레이

[0252] 엔트리 10QO.Pdb로서 Brookhaven 자료에 공개된 IgG1 Fc 프라그먼트의 결정구조는 돌연변이된 CH3 영역의 설계를 돕기위해 사용되었다.

[0253] CH3 라이브러리의 구축에 대해 기본으로서 사용되었던 서열은 SEQ ID No.1에 주어진다. 이 서열에서, 제1의 아미노산은 Brookhaven 자료 엔트리 1oqo.pdb의 사슬A의 프롤린 343에 상응한다. 1oqo.pdb에 함유된 마지막 잔기는 SEQ ID No.1의 세린 102이다. 1oqo.pdb의 구조의 상세한 분석후 베타 가닥을 연결한 루프를 형성하는 잔기의 외관검사에 의해 잔기 17, 18 및 19를 임의로 선택하는 것을 결정하고, 71, 72, 73, 76 및 77 뿐만 아니라 베타 가닥 A-B를 연결한 루프의 부분이고, SEQ ID No.1의 베타 가닥 E-F를 연결한 루프의 부분이다. 용매 접근가능한 표면에 의해 나타난 임의로 선택한 부분을 갖는 처리된 CH3 영역의 분자모델은 도3에 도시된다. 처리된 유전자는 얻은 PCR 생성물의 걸찰에 의해 행해진 일련의 PCR 반응에 의해 생성되었다. 걸찰을 용이하게 하기 위해, SEQ ID No.1을 코드하는 뉴클레오티드 서열의 일부 코돈을 변경하여 아미노산 서열을 변경시키지 않고 제한 자리를 생성한다(잠재성 돌연변이). pelB 분비신호를 갖는 골격에 클론 벡터 pHEN1(Nucleic Acids Res.1991, Aug 11; 19(15):4133-7. 섬유형과지의 표면에 멀티서브유닛 단백질:항체(Fab) 무거운 사슬 및 가벼운 사슬을 표시하기 위한 방법론. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G)에 삽입하기 위해, Met-Ala를 코드하는 추가의 뉴클레오티드 잔기는 서열의 5'끝에 부착하여 NcoI 제한 자리를 생성한다. 랜덤화 잔기에 대해 코돈 NNS(IUPAC 코드, S는 C 또는 G를 의미한다)는 자연스럽게 발생하는 아미노산 20개를 모두 코드하는 것을 선택하지만 3개의 스탱 코돈 중 2개를 피한다. 처리된 서열은 SEQ ID No.3에 아미노산 서열 및 SEQ ID No.2의 뉴클레오티드 서열로서 주어진다. SEQ ID No.3의 X 문자는 임의로 선택한 아미노산 잔기를 나타낸다. 돌연변이된 CH3 영역의 집합에 사용된 PCR 프라이머의 서열은 SEQ ID No.4 내지 9로 주어진다. 도4는 돌연변이된 유전자의 집합에서 생성된 PCR 프라그먼트 및 그것에 사용된 프라이머의 개략도를 표시한다.

[0254] 인간의 단클론 항체 3D6의 무거운 사슬의 cDNA(Felgenhauer M, Kohl J, Ruker F. 인간의 단클론 항체 특이성의 H- 및 L-사슬의 V-부위를 HIV-1-gp41로 코드한 cDNA의 뉴클레오티드 서열. Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25; 18(16):4927)는 PCR 반응에 주형으로 사용되었다. 3개의 PCR 생성물은 SacI 및/또는 HindIII 각각과 함께 소화되고 함께 걸찰되었다. 걸찰 생성물은 NcoI와 NotI와 함께 ej 소화되고 표면 디스플레이 파지미드 벡터 pHEN1로 걸찰하고, 이전에 NcoI와 NotI와 함께 소화되었다. 많은 선택된 클론은 제한분석 및 DNA 서열에 의해 제어하고, 계획된 것처럼 삽입물을 함유하고, 정확하게 삽입된 임의로 선택한 서열을 포함하는 것이 발견되었다. 하기 파지조제의 단계에 대해 표준 프로토콜이 행해졌다. 간단히, 걸찰혼합물은 전기천공법에 의해 E.coli TG1 세포로 유전자 변형되었다. 이어서 파지세포는 헬퍼 파지 M13-K07과 함께 E.coli TG1 세포에서 방출되었다. 그 다음에 파지입자는 물에 용해해서 패닝에 의한 선택에 사용하는 2단계의 PEG/NaCl로 배양 상청액에서 침전시키거나, 선택적으로 -80°C에서 보존했다.

[0255] 실시예2:CH3+3 라이브러리의 구축

[0256] 이 라이브러리는 CH3 라이브러리와 동일한 방법으로 구축하고 클론화했다. 이 구조의 아미노산 서열은 SEQ ID No.10, SEQ ID No.11에서 상응하는 뉴클레오티드 서열에 제공되고, 구조에 사용된 프라이머는 SEQ ID No.4-7, SEQ ID No.9 및 SEQ ID No.12이었다.

[0257] 실시예3: CH3+5 라이브러리의 구축

[0258] 이 라이브러리는 CH3 라이브러리와 동일한 방법으로 구축하고 클론화했다. 이 구조의 아미노산 서열은 SEQ ID No.13, SEQ ID No.14에 상응하는 뉴클레오티드 서열로 제공되고, 구조에 사용된 프라이머는 SEQ ID No.4-7, SEQ ID No.9 및 SEQ ID No.15이었다.

[0259] 실시예4:TLR-9 펩티드에 대한 CH3-파지 라이브러리의 패닝

[0260] 표준 프로토콜에 따라서 3회의 패닝 라운드를 행했다. 간단히 하기 방법을 적용했다. 톨 유사 수용체 9(TLR-9)의 서열의 합성 펩티드 표시부로 Maxisorp 96-well plates(Nunc)를 도포했다. 하기 농도의 용해된 펩티드를 갖는 하기 용액을 웰(0.1M Na-카르보네이트 버퍼, pH 9.6)당 200 μ l 첨가했다:

- [0261] 1회 패닝 라운드:1mg/ml TLR-9 펩티드
- [0262] 2회 패닝 라운드:500 μ g/ml TLR-9 펩티드
- [0263] 3회 패닝 라운드:100 μ g/ml TLR-9 펩티드

[0264] 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 배양한 후 웰 당 200 μ l로 2% 분유(M-PBS)로 실온에서 1시간 동안 블로킹했다.

[0265] 그 다음에 표면 디스플레이 파지 라이브러리를 파지 현탁액 100 μ l 와 4% 분유(M-PBS) 100 μ l를 첨가해서 바운드 펩티드와 반응시킨 후, 실온에서 45분간 교반하고, 90분간 교반하지 않고 배양했다.

[0266] 언바운드 파지 입자는 하기와 같이 세정제거했다. 1회 패닝 라운드 후:10 \times 300 μ l T-PBS, 5 \times 300 μ l PBS;2회 패닝 라운드 후:15 \times 300 μ l T-PBS, 10 \times 300 μ l PBS;3회 패닝 라운드 후:20 \times 300 μ l T-PBS, 20 \times 300 μ l PBS.

[0267] 0.1M 글리신, pH 2.2의 웰 당 200 μ l를 첨가하고, 실온에서 30분간 교반하면서 배양하여 바운드 파지 입자를 용리하였다. 이어서 2M Tris-Base 60 μ l를 첨가하여 파지 현탁액을 중화시킨 후, 용리된 파지 0.5ml와 기하급수적으로 증가하는 배양액 10ml를 혼합해서 E.coli TG1 세포로 감염시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양했다. 마지막으로 감염된 박테리아는 1% 글루코오스와 100 μ g/ml의 암피실린을 갖는 TYE 매체에 평판배양하고 30 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양했다.

표 1

TLR-9에 대한 3회 교반-패닝을 통한 3회 패닝을 통한 선택된 클론의 특성

라운드	패닝 용액 농도	클론 수	클론 다양성
1st	1 mg/ml	6x10 ⁷	2x10 ³
2nd	0.5 mg/ml	4x10 ⁷	2x10 ³
3rd	0.1 mg/ml	4x10 ⁷	6x10 ³

[0268]

[0269] 실시예5:가용성 발현용 TLR-9에 대해 선택된 CH3 돌연변이체의 선택된 클론의 클로닝

[0270] 3회 패닝 라운드를 통해 선택된 파지에서 파지미드 DNA를 미디 제조로 분리했다. 돌연변이된 CH3 부위를 코드하는 DNA는 PCR로 배지 증폭하고 NcoI-NotI를 삽입된 NotI 제한 자리를 갖는 E.coli 발현벡터 pBAD/Myc-His(Invitrogen 제품)인 벡터 pNOTBAD/Myc-His로 클론화했다. 결합된 구조는 전기천공법으로 E.coli LMG194 세포(Invitrogen 제품)으로 유전자 변형시키고 1% 글루코오스와 암피실린의 TYE 매체에서 30 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 성장시켰다. 선택된 클론은 암피실린을 갖는 2xYT 매체 200 μ l에서 접종하고, 30 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 성장시키고 L-아라비노스를 0.1% 농도로 첨가하여 유도했다.16 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 발현 후, 세포를 원심분리에 의해 채취하고 pH 8.0의 Na-보레이트 버퍼 100 μ l로 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 처리하여 원형질막의 추출물을 조제했다. ELISA에서 원형질막의 추출물 50 μ l를 사용했다(하기 참조).

[0271] 실시예6: 선택된 클론 TLR-9에 대해 선택된 CH3 돌연변이체의 ELISA를 ELISA로 TLR-9 펩티드에 대한 특이성 결합에 대해 분석했다.

[0272] 도포:Microtiter 플레이트(NUNC, Maxisorp 제품), 웰 당 100 μ l, TLR-9 펩티드 20 μ g/ml의 0.1M Na-카르보네이트 버퍼, pH 9.6, 37 $^{\circ}$ C, 1시간

[0273] 세정:3x 200 μ l PBS

[0274] 블로킹: 1% BSA-PBS, 실온에서 1시간

[0275] 세정:3x 200 μ l PBS

[0276] 원형질막 추출물 결합:원형질막 추출물 50 μ l, 2% BSA-PBS 50 μ l, 실온에서 하룻밤

- [0277] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0278] 1번째 항체:anti-His4(Qiagen), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰당 100 μ l
- [0279] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0280] 2번째 항체:goat anti mouse*HRP(SIGMA), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰 당 100 μ l
- [0281] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0282] 검출:Na-시트레이트/포스페이트 버퍼 중 OPD 3mg/ml, pH 4.5, 30% H₂O₂ 0.4 μ l
- [0283] 정지:3M H₂SO₄ 100ml
- [0284] 흡수 리딩: 492/620nm
- [0285] 처음에, 높은 신호의 예비 ELISA를 제공하는 클론은 상술한 것과 동일한 조건에서 20ml 체적에서 배양했다. 이 원형질막 추출물은 상술한 것처럼 배양체적의 1/20으로 분리하고 ELISA로 시험하여(상기와 동일) 확인했다.

표 2

ELISA 확인 결과

	항원 있음	항원 없음
클론	A _{492/620} 4회 리딩	A _{492/620} 1회 리딩
A67	0.0435	0.019
B54	0.0937	0.051
C67	0.0295	0.013

- [0286]
- [0287] 대조군(항원만)(12개의 평행 리딩):0.0115
- [0288] 실시예7: 계란 리소자임에 대한 CH3 및 CH3+5- 파지 라이브러리의 패닝
- [0289] 3회 패닝 라운드를 행했다. Maxisorp 96-well plates(Nunc)를 웰당 하기 용액 200 μ l를 첨가해서 계란 리소자임을 도포했다.
- [0290] 1회 패닝 라운드:2mg/ml HEL
- [0291] 2회 패닝 라운드:1mg/ml HEL
- [0292] 3회 패닝 라운드:1mg/ml HEL
- [0293] 37 $^{\circ}$ C, 1시간동안 배양한 후 웰당 200 μ l로 2% 분유(M-PBS)로 실온에서 1시간 동안 블록킹했다.
- [0294] 그 다음에 표면 디스플레이 파지 라이브러리를 파지 현탁액 100 μ l 와 4% 분유(M-PBS) 100 μ l를 첨가해서 바운드 계란 리소자임을 반응시킨 후, 실온에서 45분간 교반하고, 90분간 교반하지 않고 배양했다.
- [0295] 언바운드 파지 입자는 하기와 같이 세정제거했다.
- [0296] 1회 패닝 라운드:10 \times 300 μ l T-PBS, 5 \times 300 μ l PBS;
- [0297] 2회 패닝 라운드:15 \times 300 μ l T-PBS, 10 \times 300 μ l PBS;
- [0298] 3회 패닝 라운드:20 \times 300 μ l T-PBS, 20 \times 300 μ l PBS.
- [0299] 0.1M 글리신, pH 2.2의 웰 당 200 μ l를 첨가하고, 실온에서 30분간 교반하면서 배양하여 바운드 파지 입자를 용리하였다. 이어서 2M Tris-Base 60 μ l를 첨가하여 파지 현탁액을 중화시킨 후, 용리된 파지 0.5ml와 기하급수적으로 증가하는 배양액 10ml를 혼합해서 E.coli TG1 세포로 감염시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양했다. 마지막으로 감염된 박테리아는 1% 글루코오스와 100 μ g/ml의 암피실린으로 TYE 매체에 평판배양하고 30 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양했다.

표 3

표 3: 실시예 7의 선별된 클론의 가용성 발현을 위한 ELISA 결과 요약

클론 번호	항체 농도 (µg/ml)	OD ₄₉₂ 값	OD ₆₂₀ 값
1A	2	-	4.7×10 ⁻³
1B	1	1.29×10 ⁻³	8.0×10 ⁻³
1C	1	5.71×10 ⁻³	4.8×10 ⁻³

표 4

표 4: 실시예 7의 선별된 클론의 가용성 발현을 위한 ELISA 결과 요약

클론 번호	항체 농도 (µg/ml)	OD ₄₉₂ 값	OD ₆₂₀ 값
1A	2	8.3×10 ⁻³	2.9×10 ⁻³
1B	1	2.1×10 ⁻³	2.6×10 ⁻³
1C	1	5.4×10 ⁻³	1.2×10 ⁻³

실시예8:가용성 발현용 실시예7의 선택된 클론의 클로닝

가용성 발현용 선택된 클론의 클로닝은 TLR-9에 대해 선택된 CH3 돌연변이체에 대해 상기와 같이 행하였다.

실시예9:실시예7의 선택된 클론의 가용성 발현

선택된 클론의 가용성 발현은 TLR-9에 대해 선택된 CH3 돌연변이체에 대해 상기와 같이 행하였다. 원형질막 추출물은 예비 ELISA(프로토콜 실시예 10 참조)로 시험했다.

처음에, 높은 신호의 예비 ELISA를 제공하는 클론은 상술한 것과 동일한 조건으로 20ml 체적에서 배양했다. 이 원형질막 추출물은 상술한 것처럼 배양체적의 1/20으로 분리하고 ELISA로 시험하여(상기와 동일) 확인했다.

실시예10:계란 리소자임에 대해 선택된 CH3 돌연변이체의 ELISA

도포:Microtiter 플레이트(NUNC, Maxisorp 제품), 웰 당 100µl, PBS 중 계란 리소자임 100µg/ml, 37°C, 1시간

세정:3x 200µl PBS

블록킹: 1% BSA-PBS, 실온에서 1시간

세정:3x 200µl PBS

원형질막 추출물 결합:원형질막 추출물 50µl, 2% BSA-PBS 50µl, 실온, 하룻밤

세정:3x 200µl PBS

1번째 항체:anti-His4(Qiagen), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰당 100µl

세정:3x 200µl PBS

2번째 항체:goat anti mouse*HRP(SIGMA), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰당 100µl

세정:3x 200µl PBS

검출:Na-시트레이트/포스페이트 버퍼 중 OPD 3mg/ml, pH 4.5, 30% H₂O₂ 0.4µl

정지:3M H₂SO₄ 100ml

흡수 리딩: 492/620nm

표 5

표 5: 원형질막 추출물, 산화제 및 환원제에 의한 ELISA 결과

그룹	원형질막 추출물	
	A _{414nm} (414nm)	A _{490nm} (490nm)
B12	0.296	0.012
D13	0.415	0.096
D46	0.298	0.011

[0321]

[0322]

대조군(항원만)(12개의 평행 리딩):0.1763

표 6

표 6: 원형질막 추출물, 산화제 및 환원제에 의한 ELISA 결과

그룹	200	100	50	20	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
(ng/ml)										
결과										
B12	0.707	0.532	0.432	0.297	0.192	0.130	0.146	0.049	0.034	0.015
D46	0.312	0.161	0.342	0.220	0.132	0.068	0.049	0.052	0.021	0.012
D13	0.312	0.686	0.371	0.366	0.231	0.174	0.171	0.062	0.042	0.016
- (nc)	0.449	0.360	0.165	0.072	0.036	0.023	0.017	0.013	0.009	0.007

[0323]

[0324]

nc: 원형질막 추출물이 첨가되지 않음

[0325]

계란 리소자임은 anti-his₄ 항체와 반응하여 비교적 높은 대조군이 관찰된다.

표 7

표 7: 계란 리소자임, 산화제 및 환원제에 의한 ELISA 결과

그룹	원형질막 추출물	
	A _{414nm} (414nm)	A _{490nm} (490nm)
A13	0.197	0.016
A56	0.461	0.019
B12	0.533 (5.33%)	
B20	0.184	0.016
B66	0.535	0.019
B40	0.706	0.051
C24	0.352	0.072
D22	0.147	0.012
C22	0.439	0.017
D37	0.360	0.026
D40	0.552	0.034
D56	0.362	0.019

[0326]

[0327]

대조군(항원만)(12개의 평행 리딩):0.1334

- [0328] 계란 리소자임은 anti-his₄ 항체와 반응하여 비교적 높은 대조군이 관찰된다.
- [0329] 실시예11:CL 라이브러리
- [0330] Fab 프라그먼트의 결정구조(인간 단클론 항체 3D6의 Fab 구조를 사용한다:RSCB 단백질 자료 은행 (<http://www.rcsb.org/pdb/>) Entry 1DFB.PDB(He XM 등. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992년 8월 1일; 89(15):7154-8) 및 이 단백질의 제2 구조 및 제3구조의 컴퓨터 보조 분석(예를 들면 단백질 장치는 이 목적에 대해 사용된다(<http://molvis.sdsc.edu/protexpl/frntdoor.htm>))의 외관 검사는 CL영역 스키펴드의 베타 가닥과 연결한 루프 부위에 위치된 잔기를 확인할 수 있다. 이들 잔기는 아미노산 8~18, 아미노산 27~35, 아미노산 42~78, 아미노산83~85, 아미노산 92~100, 아미노산108~117 및 아미노산123~126(IMG T 넘버링 시스템에 따른 넘버링(Lefranc MP 등, Nucleic Acids Res. 2005년 1월 1일; 33(Database Issue):D593-7; Lefranc MP 등. Dev Comp Immunol. 2005; 29(3):185-203))을 포함한다.
- [0331] 보다 구체적으로 잔기 11, 12, 14~18 및 92~95는 인간의 CL 영역(SEQ ID No.48)내에서 임의로 선택한다. 상대적 코돈의 위치를 뉴클레오티드 서열 5'-NNS-3'에 의해 코드한 PCR 프라이머와 코드화 서열의 PCR 증폭에 의해 임의로 선택하고, 3개의 스태프 코돈 중 2개를 피하면서 20개 아미노산 모두 잠재적으로 코드한다. 라이브러리 삽입은 2개의 분리 PCR 반응에 의해 증폭되고, 2개의 PCR 프라그먼트는 PCR프라이머에 의해 잠재성 돌연변이체로 도입된 HpyCH4IV 제한 자리를 통해 함께 결합된다. 프라이머는 파지 디스플레이 벡터 pHEN(Hoogenboom HR 등. Nucleic Acids Res.1991년 8월 11일; 19(15):4133-7)에 클론화하기 위해 엔도뉴클레아제 제한자리 NcoI 및 NotI 각각을 더 제공한다. CL 영역의 C-말단 시스테인은 파지 디스플레이에 포함되지 않지만, 개질된 CL 클론이, 예를 들면 Fab 프라그먼트를 만드는데 사용할 때 나중에 첨가될 수 있다.
- [0332] PCR 증폭에 대한 주형으로, 삽입물로서 인간 단클론 항체의 완전한 가벼운 사슬을 함유하는 pRcCMV-3D6LC(Ruker F 등. Ann N Y Acad Sci. 1991년 12월 27일; 646:212-9) 등의 플라스미드를 사용한다.
- [0333] CL 영역의 92와 95 위치 사이에 삽입된 추가적인 잔기를 함유하는 CL+3(SEQ ID No.50, 51) 및 CL+5(SEQ ID No.52, 53) 라이브러리에 대해, 프라이머 CLRHPY3 및 CLRHPY5는 프라이머 CLRHPY 대신에 각각 사용된다.
- [0334] 구조의 N-말단에 pelB 리더 서열을 부착시키는 pHEN1의 NcoI 자리로 클론화시키는 PCR 및 결합의 최종생성물의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 이하에 표시된다(SEQ ID No. 48, 49):

+3 M K Y L L P T A A A G L L L L A A
 1 ATGAAATACC TATGCGCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC

NcoI

+3 Q P A M A V A A P S V F I F P P
 51 CCAGCCGGCC ATGGCCGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT

+3 S Q A S V V C L L N
 101 CTNNSNNSCA GNNSNNSNNS NNSNNSGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT

+3 N F Y P R E A K V Q W K V D N A L
 151 AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATAACGCCCT

+3 Q S G N S Q E S V T E Q D S K D
 201 CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA

HpyCH4IV

+3 S T Y S L S S T L T L Y E
 251 GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGT TGNNNSNNSN SNNSTACGAG

+3 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
 301 AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC

NotI

+3 V T K S F N R G E A A A
 351 CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGGC GCGCCGA

[0335]

[0336]

CL 라이브러리용 프라이머 목록:

cllnco: 5'-cttaccatgg ccgtggctgc accatctgtc ttcattctcc cgc-
 catctnn snnscagnns nnsnnsnnsn nsgcctctgt tgtgtgc-3' (SEQ ID No.
 56)

cllhpy: 5'-tgacaacgtc aggggtgctgc tgaggc-3' (SEQ ID No. 57)

clrhpy: 5'-tcagaacggt gnnsnnsnns nnstacgaga aacacaaagt c-3'
 (SEQ ID No. 58)

clrhpy3: 5'-tcagaacggt gnnsnnsnns nnsnnsnnsn nstacgagaa
 acacaaagtc-3' (SEQ ID No. 59)

[0337]

clrhpy5: 5'-tcagaacggt gnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnsta
 cgagaaacac aaagtc-3' (SEQ ID No. 60)

clrnot: 5'-catcgcgccc gcctctcccc tgttgaagct c-3' (SEQ ID No.
 61)

[0338]

[0339]

많은 선택된 라이브러리 클론(파지미드 벡터 pHEN1에 클론화된 돌연변이된 CL 영역)은 계획된 것처럼 삽입물을

함유한 DNA 서열 및 제한분석에 의해 제어되고, 정확하게 삽입된 임의로 선택된 서열을 포함한다. 파지 조제의 하기 단계에 대해, 표준 프로토콜을 행한다. 간단히 결찰혼합물은 전기천공법에 의해 E.coli TG1 세포로 유전자 변형된다. 이어서 파지입자는 헬퍼 파지 M13-K07과 함께 E.coli TG1 세포에서 방출되었다. 그 다음에 파지입자는 물에 용해해서 패닝에 의한 선택에 사용하는 2단계의 PEG/NaCl로 배양 상청액에서 침전시키거나, 선택적으로 -80°C에서 보존할 수 있다.

[0340] 실시예12:CH1 라이브러리

[0341] Fab 프라그먼트의 결정구조의 외관검사(인간 단클론 항체 3D6의 Fab 구조를 사용한다:RSCB 단백질 자료 은행 Entry 1DFB.PDB) 및 이 단백질의 제2 구조 및 제3구조의 컴퓨터 보조 분석(단백질 장치는 이 목적에 대해 사용된다)은 CH1영역 스키펴드의 베타 가닥과 연결한 루프 부위에 위치한 잔기를 확인할 수 있다. 이들 잔기는 아미노산 7~21, 아미노산 25~39, 아미노산 41~81, 아미노산83~85, 아미노산 89~103, 및 아미노산 106~117(IMGt 넘버링 시스템에 따른 넘버링)을 포함한다.

[0342] 보다 구체적으로 잔기 12-19 및 93-100는 인간의 CH1 영역(SEQ ID No.54,55)내에 임의로 선택한다. 상대적 코돈의 위치를 뉴클레오티드 서열 5'-NNS-3'에 의해 코드한 PCR 프라이머와 코드화 서열의 PCR 증폭에 의해 임의로 선택하고, 3개의 스탱 코돈 중 2개를 피하면서 20개 아미노산 모두 잠재적으로 코드한다. 라이브러리 삽입은 2개의 분리 PCR 반응에 의해 증폭되고, 2개의 PCR 프라그먼트는 CH1 영역에 자연스럽게 발생하는 BstEII 제한자리를 통해 함께 결찰된다. 프라이머는 파지 디스플레이 벡터 pHEN에 클론화하기 위해 엔도뉴클레아제 제한자리 NcoI 및 NotI 각각을 제공한다. CH1 영역의 C-말단 시스테인은 파지 디스플레이에 포함되지 않지만, 개질된 CH1 클론이, 예를 들면 Fab 프라그먼트를 만드는데 사용할 때 나중에 첨가될 수 있다.

[0343] PCR 증폭에 대한 주형으로, 삽입물로서 인간 단클론 항체의 완전한 무거운 사슬을 함유하는 pRcCMV-3D6HC 등의 플라스미드를 사용한다.

[0344] 구조의 N-말단에 pe1B 리더 서열의 부착시키는 pHEN1의 NcoI 자리로 클론화시키는 PCR 및 결찰의 최종생성물의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 이하에 표시된다(SEQ ID No. 54, 55):

+3 M K Y L L P T A A A G L L L L A A
 1 ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC

NcoI

+3 Q P A M A A S T K G P S V F P L
 51 CCAGCCGGCC **ATGG**CCGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG

+3 A P S S A L G C L
 101 CACCCTCCTC CNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSGCCCT GGGCTGCCTG

+3 V K D Y F P E P V T V S W N S G A
 151 GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC

+3 L T S G V H T F P A V L Q S S G
 201 CCTGACCAGC GCGGTGCACA CCTTCCCGGC TGTCTACAG TCCTCAGGAC

BstEII

+3 L Y S L S S V V T V P
 251 TCTACTCCCT CAGCAGCGT **G GTGACC**GTGC CCNNSNNSN SNNSNNSNNS

+3 T Y I C N V N H K P S N T K V D
 301 NNSACCTACA TCTGCAACGT GAATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA

NotI

+3 K K V E P K S A A A
 351 CAAGAAAGTT GAGCCCAAAT CT **GCGGCCGC** A

[0345] CH1 라이브러리용 프라이머 목록:

CH1LNC0: 5'-acgtccatgg ccgcctccac caagggccca tcggtcttcc
 ccctggcacc ctctccnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsn sgccctgggc tgcctg-
 gtc-3' (SEQ ID No. 62)

CH1LBST: 5'-ggcacggtca ccacgctgct gag-3' (SEQ ID No. 63)

CH1RBST: 5'-agcgtggtga ccgtgccnn snnsnnsnns nnsnnsnnsa
 cctacatctg caacgtgaat c-3' (SEQ ID No. 64)

CH1RNOT: 5'-catagcggcc gcagatttgg gctcaacttt cttgtc-3' (SEQ
 ID No. 65)

[0346]

[0347]

많은 선택된 라이브러리 클론(파지미드 벡터 pHEN1에 클론화된 돌연변이된 CH1 영역)은 계획된 것처럼 삽입물을 함유한 DNA 서열 및 제한분석에 의해 제어되고, 정확하게 삽입된 임의로 선택된 서열을 포함한다. 파지 조제의 하기 단계에 대해, 표준 프로토콜을 행한다. 간단히 결찰혼합물은 전기천공법에 의해 E.coli TG1 세포로 유전자 변형된다. 이어서 파지입자는 헬퍼 파지 M13-K07과 함께 E.coli TG1 세포에서 방출되었다. 그 다음에 파지입자는 물에 용해해서 패닝에 의한 선택에 사용하는 2단계의 PEG/NaCl로 배양 상청액에서 침전시키거나, 선택적으로 -80°C에서 보존했다.

[0348]

실시예13:계란 리소자임에 대해 CH1 파지 라이브러리의 패닝(HEL)

[0349]

CH1 파지 라이브러리와 3회 패닝 라운드를 행했다(실시예 12 참조). Maxisorp 96-well plates(Nunc)를 웰당 하기 용액 200μl를 첨가하고 용해된 계란 리소자임을 하기 농도로 도포했다.

- [0350] 1회 패닝 라운드:2mg/ml HEL
- [0351] 2회 패닝 라운드:1mg/ml HEL
- [0352] 3회 패닝 라운드:1mg/ml HEL
- [0353] 37℃에서 1시간동안 배향한 후 웰당 200 μ l로 2% 분유(M-PBS)로 실온에서 1시간 동안 블록킹했다.
- [0354] 그 다음에 표면 디스플레이 파지 라이브러리를 파지 현탁액 100 μ l 와 4% 분유(M-PBS) 100 μ l를 첨가해서 바운드 계란 리소자임을 반응시킨 후, 실온에서 45분간 교반하고, 90분간 교반하지 않고 배양했다.
- [0355] 언바운드 파지 입자는 하기와 같이 세정제거했다.
- [0356] 1회 패닝 라운드:10 \times 300 μ l T-PBS, 5 \times 300 μ l PBS;
- [0357] 2회 패닝 라운드:15 \times 300 μ l T-PBS, 10 \times 300 μ l PBS;
- [0358] 3회 패닝 라운드:20 \times 300 μ l T-PBS, 20 \times 300 μ l PBS.
- [0359] 0.1M 글리신, pH 2.2의 웰 당 200 μ l를 첨가하고, 실온에서 30분간 교반하면서 배양하여 바운드 파지 입자를 용리하였다. 이어서 2M Tris-Base 60 μ l를 첨가하여 파지 현탁액을 중화시킨 후, 용리된 파지 0.5ml와 기하급수적으로 증가하는 배양액 10ml를 혼합해서 E.coli TG1 세포로 감염시키고, 37℃에서 30분간 배양했다. 마지막으로 감염된 박테리아는 1% 글루코오스와 100 μ g/ml의 암피실린을 갖는 TYE 매체에 평판배양하고 30℃에서 하룻밤 배양했다.
- [0360] 가용성 발현용 리소자임에 대해 선택된 CH1 돌연변이의 선택된 클론의 클로닝
- [0361] 3회 패닝 라운드를 통해 선택된 파지에서 파지미드 DNA를 미디 제조로 분리했다. DNA 코드 돌연변이 CH1 영역은 PCR로 배치 증폭하고 NcoI-NotI를 삽입된 NotI 제한 자리를 갖는 E.coli 발현벡터 pBAD/Myc-His(Invitrogen 제품)인 벡터 pNOTBAD/Myc-His로 클론화하여 클로닝을 용이하게 하였다. 결합된 구조는 전기천공법으로 E.coli LMG194 세포(Invitrogen 제품)으로 유전자변형시키고 1% 글루코오스와 암피실린의 TYE 매체에서 30℃에서 하룻밤 성장시켰다. 선택된 클론은 암피실린을 갖는 2xYT 매체에서 접종하고, 30℃에서 하룻밤 성장시키고 L-아라비노스를 0.1% 종말농도로 첨가하여 유도했다. 16℃에서 하룻밤 발현 후, 세포를 원심분리에 의해 채취하고 pH 8.0의 Na-보레이트 버퍼 100 μ l로 4℃에서 하룻밤 처리하여 원형질막의 추출물을 조제했다. ELISA에서 원형질막의 추출물 50 μ l를 사용했다.
- [0362] 처음에, 높은 신호의 예비 ELISA를 제공하는 클론은 상술한 것과 동일한 조건으로 20ml 체적에서 배양했다. 이 원형질막 추출물은 상술한 것처럼 배양체적의 1/20으로 분리하고 ELISA로 시험하여(상기와 동일) 확인했다.
- [0363] 계란 리소자임에 대해 선택된 CH1 돌연변이의 ELISA
- [0364] 도포:Microtiter 플레이트(NUNC, Maxisorp 제품), 웰 당 100 μ l, PBS 중 계란 리소자임 100 μ g/ml, 37℃, 1시간
- [0365] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0366] 블록킹: 1% BSA-PBS, 실온에서 1시간
- [0367] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0368] 원형질막 추출물 결합:원형질막 추출물 50 μ l, 2% BSA-PBS 50 μ l, 실온, 하룻밤
- [0369] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0370] 1번째 항체:anti-His₄(Qiagen), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰당 100 μ l
- [0371] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0372] 2번째 항체:goat anti mouse*HRP(SIGMA), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰당 100 μ l
- [0373] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0374] 검출:Na-시트레이트/포스페이트 버퍼 중 OPD 3mg/ml, pH 4.5, 30% H₂O₂ 0.4 μ l
- [0375] 정지:3M H₂SO₄ 100ml

- [0376] 흡수 리딩: 492/620nm
- [0377] 클론은 그 ELISA 신호가 대조군 신호의 적어도 3배 일때 포지티브로 해석된다.
- [0378] 실시예14:계란 리소자임에 대한 CL 파지 라이브러리의 패닝(HEL)
- [0379] CL 파지 라이브러리로 3회 패닝 라운드를 행했다(실시예 11 참조). Maxisorp 96-well plates(Nunc)를 웰당 하기 용액 200 μ l를 첨가하고 용해된 계란 리소자임을 하기 농도로 도포했다.
- [0380] 1회 패닝 라운드:2mg/ml HEL
- [0381] 2회 패닝 라운드:1mg/ml HEL
- [0382] 3회 패닝 라운드:1mg/ml HEL
- [0383] 37 $^{\circ}$ C, 1시간동안 배향한 후 웰당 200 μ l로 2% 분유(M-PBS)로 실온에서 1시간 동안 블로킹했다.
- [0384] 그 다음에 표면 디스플레이 파지 라이브러리를 파지 현탁액 100 μ l 와 4% 분유(M-PBS) 100 μ l를 첨가해서 바운드 계란 리소자임을 반응시킨 후, 실온에서 45분간 교반하고, 90분간 교반하지 않고 배양했다.
- [0385] 언바운드 파지 입자는 하기와 같이 세정제거했다.
- [0386] 1회 패닝 라운드:10 \times 300 μ l T-PBS, 5 \times 300 μ l PBS;
- [0387] 2회 패닝 라운드:15 \times 300 μ l T-PBS, 10 \times 300 μ l PBS;
- [0388] 3회 패닝 라운드:20 \times 300 μ l T-PBS, 20 \times 300 μ l PBS.
- [0389] 0.1M 글리신, pH 2.2의 웰 당 200 μ l를 첨가하고, 실온에서 30분간 교반하면서 배양하여 바운드 파지 입자를 용리하였다. 이어서 2M Tris-Base 60 μ l를 첨가하여 파지 현탁액을 중화시킨 후, 용리된 파지 0.5ml와 기하급수적으로 증가하는 배양액 10ml를 혼합해서 E.coli TG1 세포로 감염시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양했다. 마지막으로 감염된 박테리아는 1% 글루코오스와 100 μ g/ml의 암피실린을 갖는 TYE 매체에 평판배양하고 30 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양했다.
- [0390] 가용성 발현용 리소자임에 대해 선택된 CL 돌연변이체의 선택된 클론의 클로닝
- [0391] 3회 패닝 라운드를 통해 선택된 파지에서 파지미드 DNA를 미디 제조로 분리했다. DNA 코드 돌연변이 CL 영역은 PCR로 배치 증폭하고 NcoI-NotI를 삽입된 NotI 제한 자리를 갖는 E.coli 발현벡터 pBAD/Myc-His(Invitrogen 제품)인 벡터 pNOTBAD/Myc-His로 클론화하여 클로닝을 용이하게 하였다. 결합된 구조는 전기천공법으로 E.coli LMG194 세포(Invitrogen 제품)으로 유전자 변형시키고 1% 글루코오스와 암피실린의 TYE 매체에서 30 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 성장시켰다. 선택된 클론은 암피실린을 갖는 2xYT 매체 200ml에서 접종하고, 30 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 성장시키고 L-아라비노스를 0.1% 종말 농도로 첨가하여 유도했다. 16 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 발현 후, 세포를 원심분리에 의해 채취하고 pH 8.0의 Na-보레이트 버퍼 100 μ l로 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 처리하여 원형질막의 추출물을 조제했다. ELISA에서 원형질막의 추출물 50 μ l를 사용했다.
- [0392] 처음에, 높은 신호의 예비 ELISA를 제공하는 클론은 상술한 것과 동일한 조건으로 20ml 체적에서 배양했다. 이 원형질막 추출물은 상술한 것처럼 배양체적의 1/20으로 분리하고 ELISA로 시험하여(상기와 동일) 확인했다.
- [0393] 계란 리소자임에 대해 CL 돌연변이의 ELISA
- [0394] 도포:Microtiter 플레이트(NUNC, Maxisorp 제품), 웰 당 100 μ l, PBS 중 계란 리소자임 100 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 1시간
- [0395] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0396] 블로킹: 1% BSA-PBS, 실온에서 1시간
- [0397] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0398] 원형질막 추출물 결합:원형질막 추출물 50 μ l, 2% BSA-PBS 50 μ l, 실온에서, 하룻밤
- [0399] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0400] 1번째 항체:anti-His₄(Qiagen), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰당 100 μ l
- [0401] 세정:3x 200 μ l PBS

- [0402] 2번째 항체:goat anti mouse*HRP(SIGMA), 1% BSA-PBS에 1:1000, 실온에서 90분, 웰당 100 μ l
- [0403] 세정:3x 200 μ l PBS
- [0404] 검출:Na-시트레이트/포스페이트 버퍼 중 OPD 3mg/ml, pH 4.5, 30% H₂O₂ 0.4 μ l
- [0405] 정지:3M H₂SO₄ 100ml
- [0406] 흡수 리딩: 492/620nm
- [0407] 클론은 그 ELISA 신호가 대조군 신호의 적어도 3배 일때 포지티브로 해석된다.
- [0408] 실시예15:양측에 임의로 선택된 면역글로불린 영역의 구축(2 특이성 처리된 CH3 영역)
- [0409] 이 실시예는 2개의 결합 특이성을 갖는 처리된 면역글로불린 영역을 설명한다.
- [0410] 이 처리된 면역글로불린 영역의 설계는 하기 방법을 포함한다:
- [0411] · 리소자임에 특이적으로 결합한 C_H3+5라이브러리에서 유도된, 처리된 C_H3 영역, 클론 C24(실시예10 참조)는 개시점으로 사용되었다.
- [0412] · 임의로 선택된 잔기는 면역글로불린 접합의 β 가닥을 연결하고, 클론 C24를 생성시킬 때 돌연변이되었던 잔기에 비해 영역의 반대측에 놓인 개질된 CH3 영역에서 확인되었다.
- [0413] · PCR 프라이머는 상기 C_H3, C_H3+3 및 C_H3+5 라이브러리에 기재된 것과 유사한 절차로 처리된 면역글로불린 영역의 합성 및 이들 잔기의 임의로 선택을 가능하도록 설계하였다.
- [0414] 임의로 선택된 위치를 함유한 4개의 PCR 생성물이 결합되었고 전체길이 삽입물은 PCR에 의해 증폭되었다. 이어서 이들은 NcoI-NotI 자리를 통해 pHEN-1에 클론화되고 E.coli TG-1 세포로 유전자 변형되어 약 10⁸ 콜로니의 라이브러리를 구축했다. 20개의 임의로 선택한 콜로니를 서열화였고 임의로 선택된 위치가 각각 돌연변이된 것을 발견했다. 또한 "야생형"(C24) 서열은 관찰되지 않았다. 파지 라이브러리는 하기 표준 프로토콜에 따라 생성되고 6.32 \times 10¹⁰TU/ml의 파지 역가를 얻었다.
- [0415] 2특이성을 시험하기 위해, 주로 계란 리소자임에 대해 처리된 본래 특이성을 보유하는 것을 기대하면서 재조합 인간의 에리스로포이에틴(rhEPO)를 제2의 항원으로 선택하였다. rhEPO-반응성 파지는 4회 패닝 라운드에서 선택되었다. 돌연변이 후 계란 리소자임에 여전히 결합된 C24 클론의 집단을 보존하기 위해, 이어서 rhEPO에 대한 선택의 제1회 라운드가 계란 리소자임(PBS중 1mg/ml)에 대한 파지 집단의 패닝의 라운드에 의해 행해졌다. rhEPO 200 μ l는 다음의 패닝 라운드에 농도를 감소시키면서 pH 9.6의 0.1M Na-카르보네이트 버퍼에 microtitre plate(Maxisorp, Nunc)의 5개의 웰에 도포했다(표 참조). 2% M-PBS로 블록킹한 후에, 블록킹제재 파지는 실온에서 2시간동안 결합시켰다. T-PBS로 20회 세정하고 PBS로 20회 세정한 후, 0.1M 글리신, pH 2.2로 용리하고, 2M Tris로 중화했다. 용리된 파지를 즉시 사용하여 기하급수적으로 성장하는 TG-1을 감염시켰다. 감염된 세포를 암 피실린 함유 매체에 선택했다. 파지입자를 다른 패닝 라운드에 사용되고 PEG로 농축된 헬퍼 파지 M13-K07로 증복감염될 때 배양 상청액에서 방출되었다. 입력 및 방력 파지수는 모든 패닝 라운드 후에 E.coli의 변형유닛으로 결정되었다(표8)

표 8

패닝 라운드	항원	파지 입력(TU/ml)	파지출력(TU/ml)
1	rhEPO, 500 μ g/ml	6.32 x 10 ¹⁰	1.9x10 ⁵
2	lysozyme, 1 mg/ml	6.16x10 ¹⁵	4.53x10 ¹⁰
3	rhEPO, 100 μ g/ml	6.07x10 ¹⁵	6.78x10 ¹⁰
4	rhEPO, 50 μ g/ml	8.42x10 ¹⁵	3.0x10 ¹¹
5	rhEPO, 50 μ g/ml	5.12x10 ¹⁵	4.28x10 ¹⁰

[0416]

[0417] 얻은 콜로니는 플레이트에서 박리하고, 암피실린을 갖는 2xYT 에서 배양하고 그 플라스미드 DNA를 미디 제조로 분리시켰다. 삼입물을 PCR로 증폭한 후 벡터 pNOTBAD로 서브클론화하고 E.coli주 E104로 유전자 변형시켰다. 4 × 72 콜로니를 암피실린을 갖는 2xYT 200 μ l에 배양하고 하기 시간동안 0.1% L-아라비노스로 유도했다. 16 $^{\circ}$ C에서 24시간 후, 이들을 Na-보레이트 버퍼, pH 8.0 200 μ l로 4 $^{\circ}$ C에서 6시간동안 용해하고 원형질막 추출물을 ELISA에서 사용했다.

[0418] ELISA에 대해 Maxisorp plate는 pH 9.6의 0.1M Na-카르보네이트 버퍼에 PBS(20 μ g/ml) 또는 rhEPO에 계란 리소자임을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 각각 도포했다. 1% BSA-PBS로 블로킹한 후, 동일한 블로킹 재제에 원형질막 추출물을 하룻밤 결합시켰다. anti-His-(4) 항체와 goat anti-mouse IgG 항체로 결합을 나타내고, HRP(계란 리소자임 검출에 대해) 또는 AP(rhEPO 검출에 대해)와 콘주게이트되어 있다. OPD 전환(HRP)의 색반응은 1.25M H₂SO₄으로 정지한 후 492/620nm에서 읽고, pNPP 전환(AP)은 405/620nm에서 읽었다. 가망있는 흡광도를 갖는 14개의 클론을 선택하여 20-ml-범위에서 발현하였다. 16 $^{\circ}$ C에서 24시간 아라비노스 도입후, 세포를 Na-보레이트 버퍼 1ml에서 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 수집하고 용해하고, 용해물을 ELISA에 사용하였다. ELISA는 상기와 같이 4개의 평행에서 행하였고 원형질막 추출물과 항원없이 웰은 네가티브 제어로 사용되었다. 결과(표9)는 SEQ ID No.42, 43에 따라서 클론과 함께 얻어졌다.

표 9

	A . . .	0.139	0.110	0.018
	A . . .	0.135	0.135	0.030

[0419] 실시예16:처리된 C_{H3}영역은 Fab 유사 포맷에서 2특이성을 제공한다

[0421] 이 실시예에서 사용된 구조에서, 항체의 V_L과 V_H 사슬은 처리된 C_{H3} 영역으로 융합된다.

[0422] HIV-1의 gp41상에 에피토프를 인식하는 인간의 단클론 항체 3D6의 VL 및 VH 부위(He XM 등. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 89:7154-8.; Kohl. J 등. Ann N Y Acad Sci. 1991 646:106-14.; Felgenhauer M 등. Nucleic Acids Res. 1990 18:4927)는 계란 리소자임에 특이적으로 결합한 처리된 C_{H3} 영역 클론 C24의 융합 상대로서 사용되었다.

[0423] 디설피드 결합을 통해 VL-CH3/VH-CH3 이량체의 형성을 촉진하기 위해, 잔기 Ser-Cys는 C24 서열의 C-말단에 첨가되었다.

[0424] 2개의 사슬, 3D6VL-C24와 3D6VH-C24의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 각각은 SEQ ID No.47, 46 및 SEQ ID No.45,44 각각에 제공된다.

[0425] 프라이머는 코드화 부위를 결합하는데 사용된 동시에 제한 자리(잠재성 돌연변이)를 도입한 코드 부위를 증폭시키도록 설계하였다. 이 유전자의 발현에 대해, Pichia pastoris 발현계가 선택되었다. 구조체는 적당한 Pichia pastoris 발현 벡터에 클론화되었다:3D6VL-C24는 pPIC9K(최종명:pPIC9K3LC)에 클론화되고, 3D6VH-C24(최종명:pPICZ3HC)는 pPICZalphaA에 클론화되었다. 구조체 pPICZ3HC는 Bgl II로 선형화되고 Pichia pastoris GS115로 유전자 변형되고 변형체는 지오신 함유 고체 매체상에 선택되었다. 이어서 변형체 중 하나는 Sal I-선형 구조 pPIC9K3LC에 대해 숙주세포로 사용되었다. 2중 변형체는 RDB 매체상에 선택되었다.

[0426] 클론은 YPG 매체 30ml에 접종하고 OD₆₀₀=10까지 성장시키고, BMMY 매체에 1% 메탄올을 첨가하여 유도했다. 이 유도는 16 $^{\circ}$ C에서 36시간 계속하였다. 원심분리에 의해 상청액을 제거하고, 이어서 약 10배 농축되었다. 재조합 단백질의 존재는 anti-His(4) 항체를 갖는 웨스턴 블롯으로 확인하고 약 50-100 μ g/l 초기 배양액의 농도로 평가되었다.

[0427] 처음의 기능적 시험은 10x 농축된 상청액으로 행하였다. 처음에 Maxisorp plate의 웰에 PBS 중 계란 리소자임 20 μ g/ml 또는 pH 9.6의 0.1M Na-카르보네이트 버퍼중 항체 3D6의 에피토프 20 μ g/ml를 각각 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안

도포하였다. 3D6 에피토프는 제조함으로써 생성된 GST 융합 단백질의 형태로 사용되었다. 1% BSA-PBS로 블로킹후, 농축된 상청액을 동일한 블로킹 제제에서 하룻밤 결합시켰다. anti-His-(4) 항체와 goat anti-mouse 항체로 결합을 나타내고, HRP와 콘주게이트되고, 492/620nm에서 OPD 전환에 기인하는 색반응으로 시각화되었다(표10).

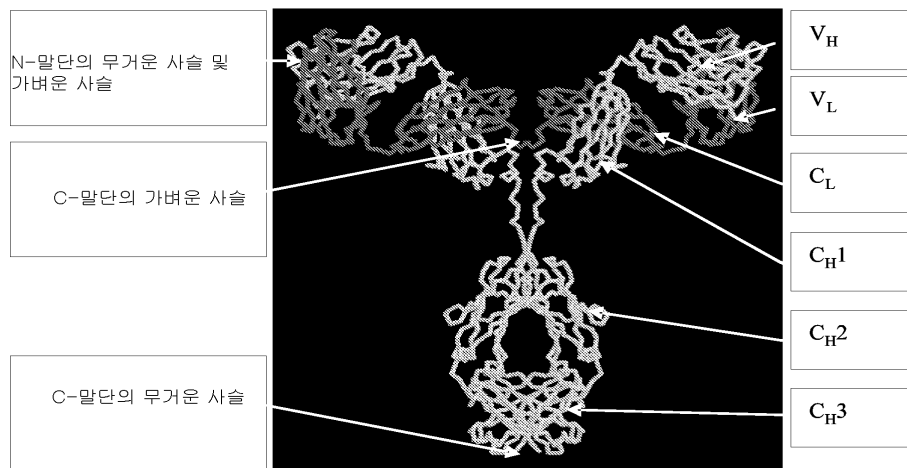
표 10

항체	SA 스폰트 (A _{492nm})	 (492nm)	 (620nm)
3D6 스폰트	0.198	0.003	0.043
3D6 에피토프	0.061	0.001	0.007

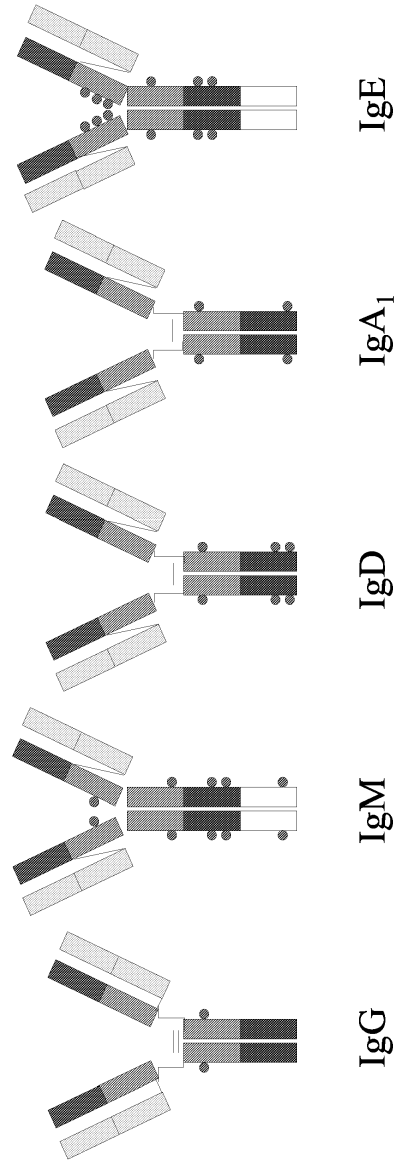
[0428]

도면

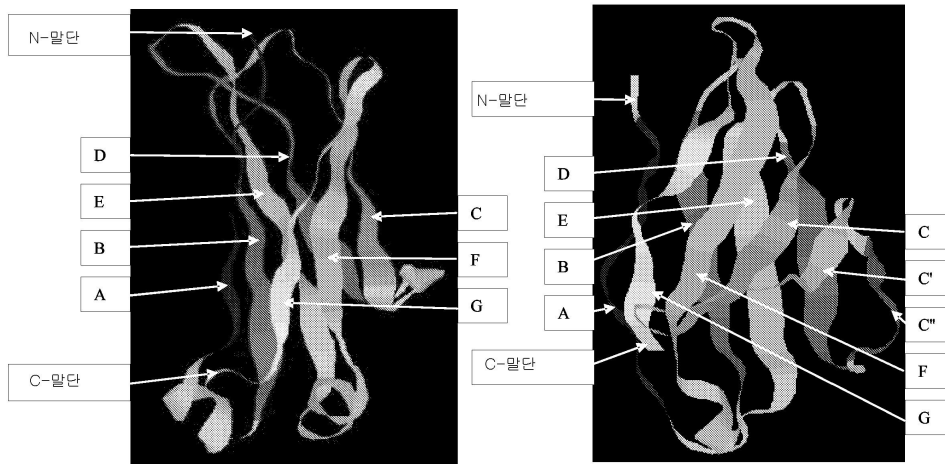
도면1a



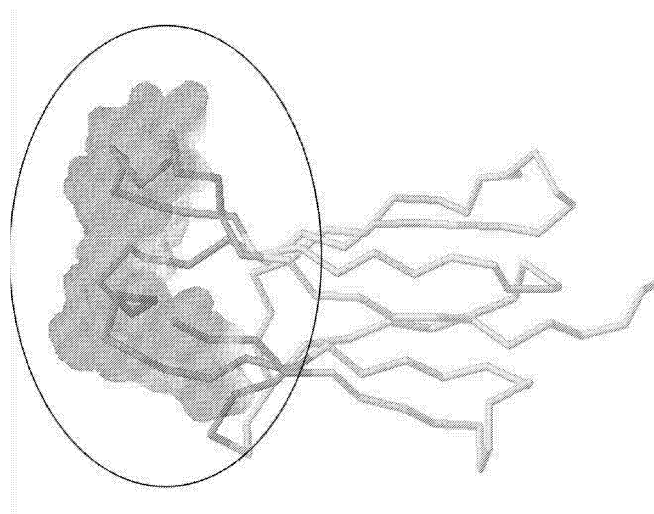
도면1b



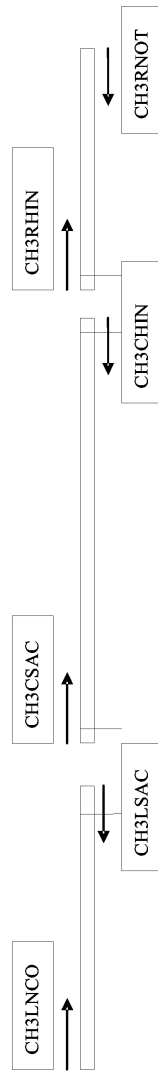
도면2



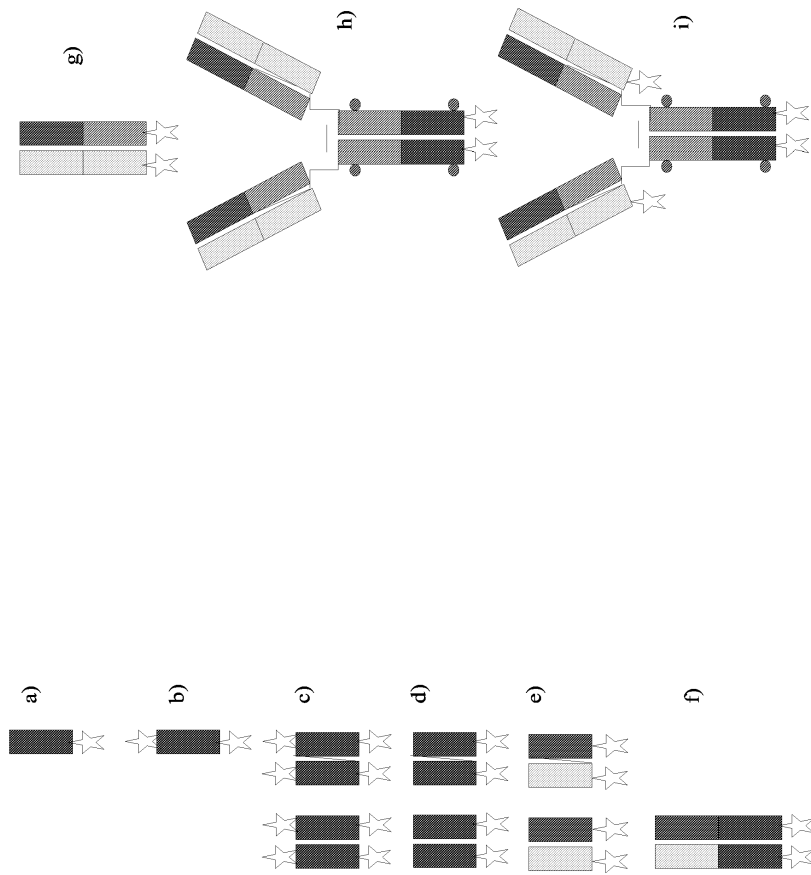
도면3



도면4



도면5




```

+3 R E P Q V Y T L P P S R D E L V S L T C L V K G F
1 NNSCGAGAAC CAGAGTGTA CACCTGCC CCATCCCGTG ACAGCTCNN SNNNSCAA GTGAGCTGA CCTGCTGT GAAAGGCTC NNSNNSNSN
NNSGCTCTTG GTCTCCACAT GTGGGACGGG GGTAGGGCAC TGCTCGAGNN SNNNSGTT CAGTCGGACT GGACGGAGCA CTTTCCGAAG NNSNNSNSN

+3 I A V E W E S N G Q P E N N Y K T P P V L D S D G
101 NSATCGCCGT GGAGTGGAG AGCAATGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCC CCGTCTAGA CTCCGACGGC NNSNNSNSN NSHNSFCCTT
NSTAGCGGCA CCTCACCCCT TCGTTACCCG TCGGCCCTTT GTTGATGTTT TGGTGGGAG GGCAAGACT GAGGCTGCC NNSNNSNSN NSNNSAGGAA

+3 F L Y S K L T V R W G N V F S C S V M L H N H Y T
201 CTTCCTCTAC AGCAAGCTTA CCGTGNNSNN SNNNSGTTG NNSNSGGG ACGTCTTCTC ATGCAAGCTG ATGNNSNSN NSCTGCACAA CCACTACACA
GAGGAGATG TCGTTCGAAT GGCACNNSNN SNNSTCCACC NNSNNSCCCT TCCAGAGAG TACGTCACAC TACNNSNSN NSGACGTGT GGTGATGTGT

+3 Q K S L S L S P G K A A A
301 CAGAGAGCC TCCTCCCTGTC TCCGGGTAAA GCGGCCGCA
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG AGGCCCATTT CGCGGGCGT

```

서열목록

서열목록제출서에 첨부하여 제출