

Cmyc tag 펩타이드에 특이적인 9E10 VHH 나노바디의 개발[§]

김진규*^{ID} · 한승희 · 김수현 · 홍선나

창원대학교 자연과학대학 생명보건학부

The development of 9E10 VHH nanobody specific to cmyc tag peptide[§]

Jin-Kyoo Kim*^{ID}, Seung Hee Han, Soo Hyun Kim, and Seon Na Hong

Division of BioHealth Science, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Republic of Korea

(Received August 24, 2022; Revised September 13, 2022; Accepted September 13, 2022)

Based on structure of murine 9E10 antibody bound to cmyc tag peptide antigen, It was found that the complementarity determining region 3 of the heavy chain variable region of the 9E10 antibody consists of 18 long amino acids, which dominantly involves in cmyc tag peptide binding. This finding led us to engineer heavy chain variable domain of original mouse-derived 9E10 antibody into a camelid 9E10 nanobody. Since the camelid antibody consists only of a heavy chain variable domain with a size of only about 15 kDa and high solubility, it is called as 9E10 VHH nanobody. To produce 9E10 VHH nanobody, the cDNA for the heavy chain variable domain of murine 9E10 antibody was extracted from the hybridoma 9E10 cell line and its translated amino acids sequences was aligned with the camelid heavy chain variable domain sequences to replace mismatched murine amino acids with camelid amino acids. After completion of cloning of each gene into pUC119 expression vector, both original murine 9E10 heavy chain variable domain and 9E10 VHH nanobody were expressed and purified as a soluble protein in *Escherichia coli*. As expected, only camelid 9E10 VHH nanobody was expressed as a soluble protein. It showed the cmyc tag peptide binding activity in both enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot. In addition, the range of dissociation constant for the interaction with the cmyc tag peptide was determined from 4.43×10^{-7} to 4.77×10^{-6} M by using bio-layer interferometry.

Keywords: bio-layer interferometry, camelid, cmyc tag peptide, heavy chain variable domain, VHH nanobody

낙타과(camelid)에서 발견되는 중 사슬(heavy chain) 항체(Hamers-Casterman *et al.*, 1993)는 경 사슬(light chain)을 포함하지 않으므로 중 사슬 가변 부위(heavy chain variable domain, VH)만으로 항원과 결합하는 특징을 갖는다. 이러한 낙타과 항체의 특징을 활용하여 VH 도메인만으로 제조된 재조합 항체를 VHH (heavy chain variable domain of heavy chain antibody)로 표시하며 분자량이 15 kDa에 불과하므로 나노바디(nanobody)라 불린다(Supplementary data Fig. S1).

인간 또는 생쥐 항체의 VH는 VL과 결합하여 항원과 결합하는 가변 부위를 구성한다. 이때 VL과 결합하는 VH의 접점 부위(interface)는 일반적으로 비극성을 띠는 소수성 아미노산들로 구성되어 있다. 이에 반해 VHH는 VL이 존재하지 않아 물 분자가 접근할 수 있는 친수성 환경에 노출되므로 안정적인 구조를 갖기 위해 극성 또는 전하를 띠는 친수성 아미노산들이 VH interface를 구성하는 것으로 알려져 있다(Fig. 1) (Sheriff and Constantine, 1996). 즉 인간 또는 생쥐의 VH의 접점 부위를 구성하는 소수성 아미노산들을 친수성 아미노산들로 낙타화시킨(camelized) VHH는 친수성이 향상되어 대장균에서 생산량(yield)을 높일 수 있는 것으로 알려지고 있다(Tanha *et al.*, 2001, 2006). 한편 낙타 중 사슬 항체의 또 다른 특징은 항원과 직접 결합하는 초 가변 부위 3 (complementarity determining region 3, CDR3)가 인간 또는 생쥐보다 비교적 긴 loop 구조를 형성하여 항원 결합 접촉면적(antigen binding surface)을 증가시켜 VL의 결핍으로 인해 감소될 수 있는 항원 결합부위를 보완하여 항원 결합력을 유지하는 것으로 알려져 있다(Desmyter *et al.*, 1996).

생쥐의 단일 클론 항체 9E10은 원래 인간 c-myc 유전자

*For correspondence. E-mail: jkkim@changwon.ac.kr;
Tel.: +82-55-213-3485; Fax: +82-55-213-3480

[§]Supplemental material for this article may be found at
<http://www.kjom.org/main.html>

가 돌연변이되어 발생한 종양 단백질(oncoprotein)의 펩타이드 G (amino acid residue 408-439)를 구성하는 아미노산 (AEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA)들로 합성된 펩타이드를 항원으로 사용하여 개발되어졌다(Evan *et al.*, 1985). 그러므로 단일 클론 항체 9E10는 암 연구에 있어 c-myc 종양 단백질의 탐지에 활용되거나 또는 발현 분포의 연구 등에 필요한 면역조직화학(immunohistochemistry)에 널리 활용되어 졌다. 더욱이 9E10 항체가 직접 결합하는 특정 아미노산 배열(epitope: EQKLISEEDLL)들이 밝혀진 이후(Munro and Pelham, 1986) 다양한 단백질들의 아미노말단 또는 카르복시말단에 이 epitope 펩타이드를 affinity tag (cmyc tag)으로 융합하여 다양한 숙주세포에서 발현시키게 되었다. 이때 cmyc tag 펩타이드가 태그 된 단백질들의 발현 유무는 면역조직화학, 효소면역분석법(ELISA) 및 Western blot (LaVallie and McCoy, 1995) 등으로 분석하였다. 이는 9E10항체가 cmyc

tag 펩타이드와 결합함으로써 펩타이드가 태그 된 단백질들까지도 탐지할 수 있는 원리를 활용한 것이다. 한편 2008년에 보고되어진 cmyc 펩타이드와 생쥐 9E10항체 복합체(complex)의 결정 구조(PDB ID: 2OR9) (Supplementary data Fig. S2)를 분석해보면 생쥐 9E10 항체는 중 사슬 초가변 부위3 (CDR3)가 18개 아미노산으로 구성된 long loop 구조를 나타내고 있으며 중 사슬 가변 부위(VH)가 경 사슬 가변 부위(VL)에 비해 압도적으로 cmyc tag 펩타이드와 결합하는 특징을 관찰할 수 있었다(Supplementary data Fig. S2 and Table S1) (Krauß *et al.*, 2008). 즉 생쥐의 9E10 항체는 VL이 항원 결합에 거의 관여하지 않고 VH가 주로 항원 결합에 관계하여 낙타과 VHH 나노바디의 특징을 나타내고 있다. 또한 높은 친수성을 갖는 VHH 나노바디로 변화시키기 위해 생쥐 9E10 VH의 소수성 아미노산들을 낙타의 VHH 아미노산들로 모두 낙타화 하였다 (Fig. 1A). 9E10 VHH 나노바디는 SWISS-MODEL web server

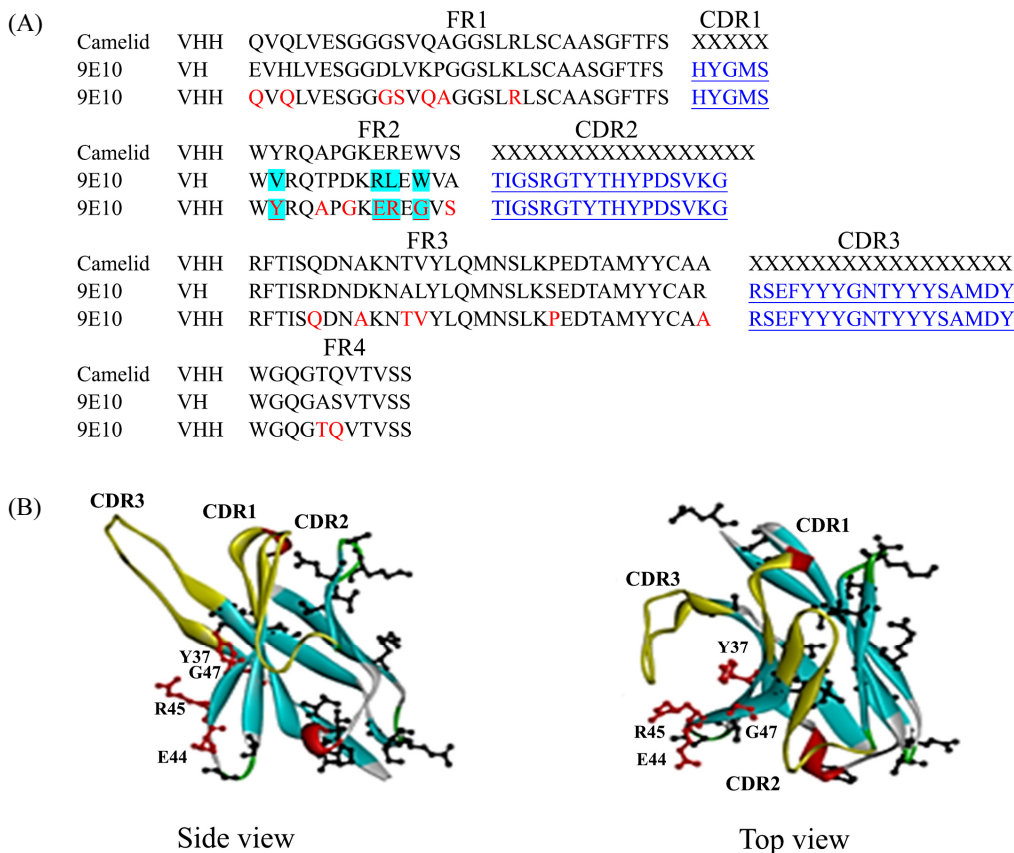


Fig. 1. (A) Amino acid sequence alignments of Camelid VHH, 9E10 VH and 9E10 VHH nanobody and (B) positions of amino acids at the VH/VL interfaces in the 9E10 VHH nanobody. Red letters represent substituted amino acids and blue amino acids represent complementarity determining regions (CDRs) which are directly involved in antigen binding in (A). The amino acids in framework regions (FRs) form the structural backbone. In addition, the four amino acids (Y37, E44, R45, and G47) underlined in blue are also shown in (A). (B) Yellow colored loops represent three CDRs (CDR1, CDR2, and CDR3). In addition, the side chain of four amino acids (Y37, E44, R45, and G47) located in the VH/VL interfaces are shown as red stick shape. The number of each amino acid was determined by Kabat numbering (Kabat *et al.*, 1991).

(<https://swissmodel.expasy.org/>)에 의해 3차 구조를 결정하고 낙타화 하기 위해 치환된 아미노산들의 위치를 3차원적으로 확인하였다(Fig. 1B). 즉 치환된 22개 아미노산들 중에 18개는 주로 9E10 VHH 나노바디의 표면에 존재하여 친수성 및 입체장애(steric hindrance)를 최소화하였다. 특히 VH/VL 접점 부위에 존재하는 4개의 아미노산들(V37, R44, L45 및 W47) 중에서 2개의 비극성 아미노산들(V37과 L45)은 극성 또는 양전하를 갖는 아미노산들(Y37, R45)들로 치환되어 친수성을 향상시켰으며 R44는 E44로 치환되어 친수성을 유지하여 9E10 VHH 나노바디의 3차 구조를 안정화하였다. 한편 W47은 G47로 치환하여 아미노산의 곁사슬(side chain)의 크기를 줄여 단백질 접힘(protein folding)에 미칠 수 있는 입체 장애를 최소화하였다(Fig. 1B). 친수성으로 인한 수용성 증가 효과를 확인하기 위해 Protein-Sol web server (<https://protein-sol.manchester.ac.uk>)를 사용하여 9E10 VH와 9E10 VHH 나노바디의 수용성(solubility) (Hebditch *et al.*, 2017)을 결정한 결과 9E10 VHH 나노바디(solubility: 0.527)가 9E10 VH(solubility: 0.463)보다

높게 나타났으며 ExPASy web server (<https://web.expasy.org/protparam/>)를 사용하여 소수성(hydrophobicity)을 결정한 결과 역시 9E10 VHH 나노바디(hydrophobicity: -0.563)가 9E10 VH(hydrophobicity: -0.555)보다 낮게 계산되어 낙타화 된 9E10 VHH 나노바디의 친수성(hydrophilicity)이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 결론적으로 이러한 9E10 VHH 나노바디의 수용성과 친수성의 증가는 9E10 VHH 나노바디가 9E10 VH 보다 대장균에서 좀 더 안정적인 발현을 하여 생산량(yield)을 향상시킬 수 있을 것으로 예상하였다.

결정된 9E10 VH와 9E10 VHH 나노바디 아미노산 배열(Fig. 1A)을 근거로 하여 각각의 유전자 배열을 추정하여 유전자 합성(Bioneer)을 하였다. 합성된 두 종류의 유전자를 주형으로 하여 각각에 특이적인 프라이머(Supplementary data Table S2)에 의해 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭한 결과 예상한대로 381 bp를 나타내었다(Fig. 2B). 증폭된 9E10 VH와 9E10 VHH 나노바디 PCR 산물은 *Sfi*I과 *Not*I의 제한효소를 이용하여 자체 제작한 단백질 발현용 pUC119

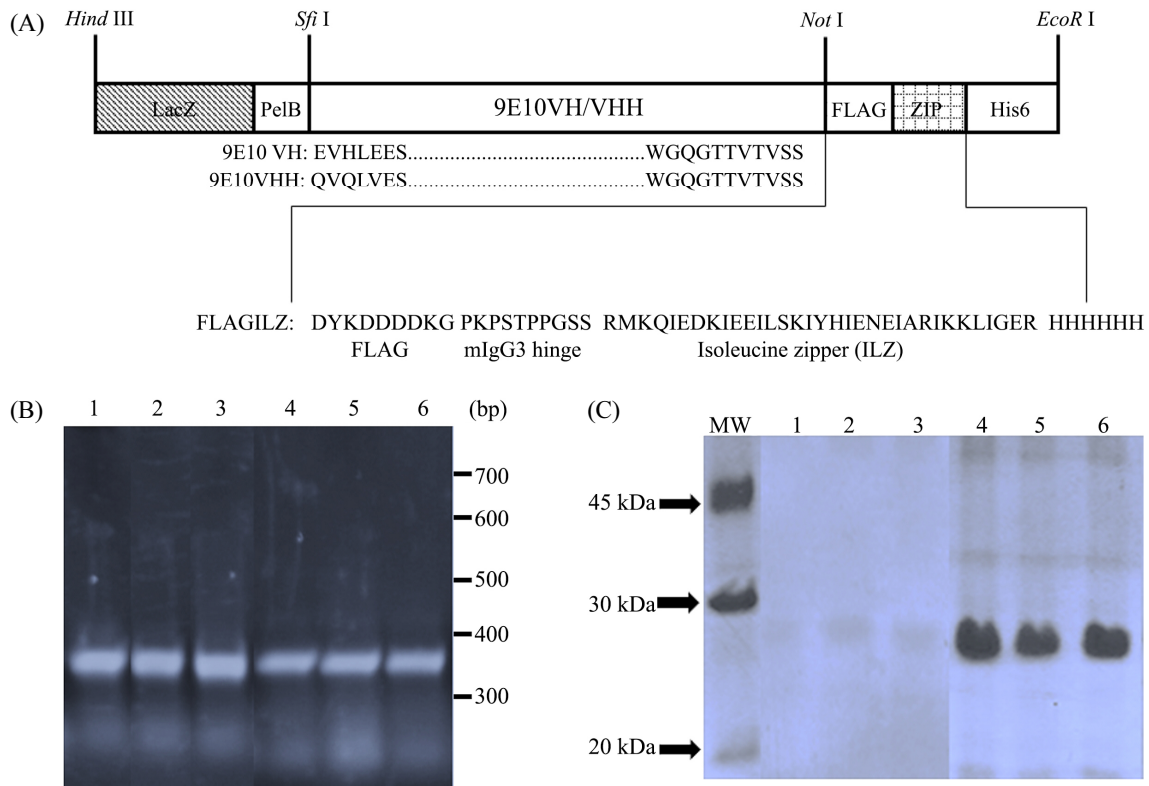


Fig. 2. (A) Schematic diagram of pUC119 expression vector and (B) PCR amplification and (C) SDS-PAGE of 9E10 VH and 9E10 VHH nanobody. The pUC119 expression vector contains 5'-*pelB* leader sequence, isoleucine zipper motif and 3'-hexahistidine tag at C-terminus. The murine IgG3 hinge domain was inserted for the connection of 9E10 VH and VHH nanobody to isoleucine zipper domain. In addition, the FLAG tag was used to detect antigen binding activity in ELISA and Western blot. (B) 9E10 VH (Lanes 1-3) and 9E10 VHH nanobody (Lanes 4-6) genes amplified by PCR were cloned into pUC119 expression vector by *Sfi* I-*Not* I double digestions. (C) 9E10 VH (Lanes 1-3) and 9E10 VHH nanobody (Lanes 4-6) expressed in *Escherichia coli* (BMH-71-18) were purified by Nickel agarose column and analyzed in 15% polyacrylamide gel under heated reducing condition.

벡터로 클로닝 하였다(Park *et al.*, 2011). 본 발현벡터는 *Lac Z* promoter를 사용하여 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 가하여 대장균 BMH 71-18 (Kim *et al.*, 1994)의 전사를 유도하게 하였고 3'말단에 FLAG tag peptide (DYKDDDDKG), Isoleucine zipper domain (ILZ)과 His6 (HHHHHH)를 융합시켜 발현율을 높이고 발현된 단백질의 탐지 및 정제를 가능케 하였다(Fig. 2A). 클로닝된 발현벡터로 대장균 BMH 71-18를 형질 전환하여 이전 논문에서 보고된 방법으로 단백질 발현 및 정제를 시도하였다(Kim and Kim, 2020). 즉 IPTG를 이용하여 단백질 발현을 유도하였으며 발현된 세포 침전물을 8 M Urea를 처리하여 용해시킨 다음 상등액을 회수하여 발현된 단백질들의 카르복시 말단의 hexahistidine (His6)을 Ni^{2+} -NTA-agarose column (Qiagen)에 결합시킨 다음 세척한 후 250 mM imidazole을 첨가하여 칼럼에 결합된 단백질들을 용출시켜 정제하였다. 정제된 9E10 VH와 9E10 VHH 나노바디 단백질들은 각각 SDS-PAGE에 전기영동하고 Coomassie 용액으로 염색하여 발현 유무를 확인한 결과 예상한 대로 9E10 VHH 나노바디만 수용성 단백질로 발현됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C).

정제된 9E10 VHH 나노바디의 기능 검증을 하기 위해 첫째, 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 시도하였는데 즉 cmyc tag peptide 항원이 카르복시말단에 태그된 단백질(Streptavidin tagged with cmyc peptide)을 순차적으로 희석시켜 96-well ELISA plate를 coating한 다음 1차 항

체로 9E10 VHH 나노바디를 반응시키고 2차 항체로 anti-FLAG antibody conjugated HRPO를 차례로 처리하여 기질(2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt: ABTS) diammonium salt (Sigma-Aldrich)의 발색여부를 ELISA plate reader (Biochrome)로 흡광도를 측정한 결과 coating시킨 항원 농도에 비례해서 흡광도를 나타내어 9E10 VHH nanobody의 항원특이적 결합을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 둘째, Western blot으로 9E10 VHH nanobody의 항원 결합력을 결정하였다. 즉 nitrocellulose membrane에 cmyc peptide가 태그된 Streptavidin을 nitrocellulose membrane에 전기영동으로 부착시킨 후 ELISA와 같은 순서로 1차 및 2차 항체를 처리하고 기질(Diaminobenzidine, DAB) (Sigma-Aldrich)의 발색 유무를 관찰한 결과 역시 9E10 VHH nanobody의 항원 결합력을 결정할 수 있었다(Fig. 3B). 셋째, 역시 보고되어진 논문(Kim and Kim, 2020; Kim *et al.*, 2020)과 같은 방법으로 bio-layer interferometry (BLI)를 이용한 Blitz (Forte Bio) 장치를 사용하여 항원-항체 결합력을 나타내는 kinetic curve (Fig. 4A)를 얻고 이 curve로부터 결합속도상수(k_{on})와 해리속도상수(k_{off})를 측정하고 최종적으로 해리평형상수(K_D)를 측정하였다(Fig. 4). 즉 9E10 VHH 나노바디의 cmyc tag 펩타이드 항원에 대한 kinetic curves를 분석한 결과 9E10 VHH 나노바디는 His1K biosensor에 고정된 cmyc tag 펩타이드 항원에 결합력을 나타내어 결합 kinetic curves를 얻어 9E10 VHH 나노바

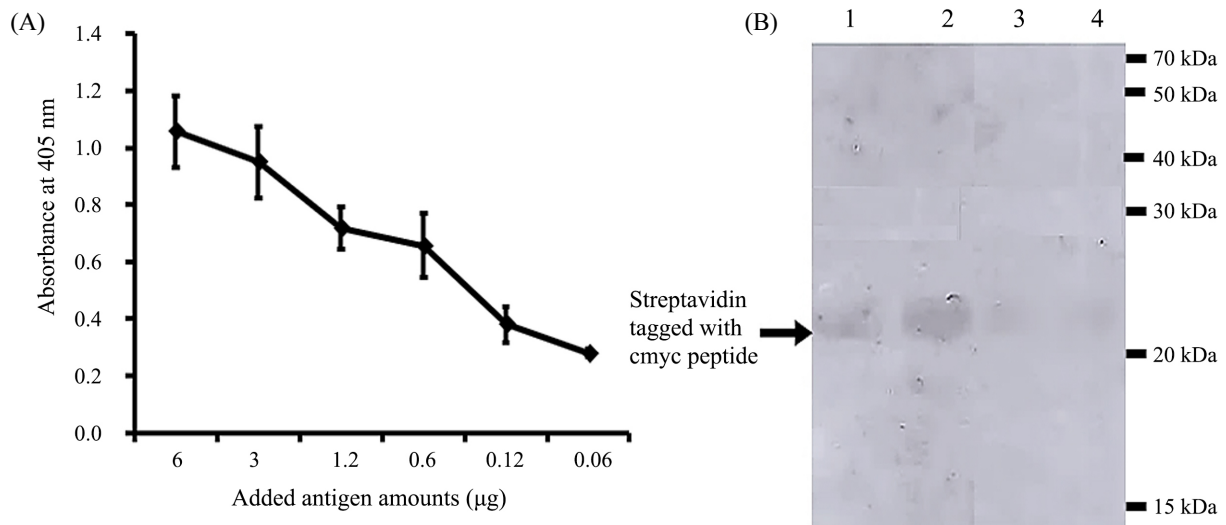


Fig. 3. ELISA and Western blot for antigen binding activity of 9E10 VHH nanobody. Serially 10-fold diluted streptavidin tagged with cmyc peptide antigen (0.06–6 µg) were coated into 96-well plate for ELISA (A). Two micrograms of same antigen were transferred onto nitrocellulose membrane for Western blot (B). 9E10 VHH nanobody was added as a primary antibody and followed by addition of anti-FLAG antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRPO) as a secondary antibody in both ELISA and Western blot. Final color development with ABTS and DAB substrate was carried out for ELISA and Western blot individually. In Western blot (B), 9E10 VHH nanobody was used as a primary antibody (Lanes 1–2) and PBS was used as a negative control (Lanes 3–4).

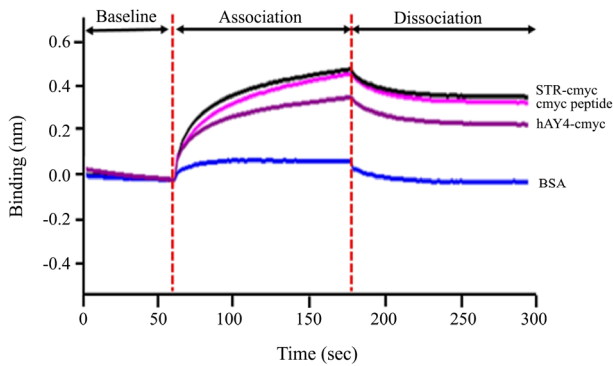


Fig. 4. Dissociation constant (KD) determination of 9E10 VHH nanobody by bio-layer interferometry. The purified 9E10 VHH nanobody was pre-concentrated using a Pierce protein concentrator with 10 kDa MWCO (Sigma Aldrich). The Dissociation constant (K_D) was measured using an Anti-Penta-HIS (HIS1K) Biosensor (Forte Bio) chip while continuously stirring at room temperature at 1,000 rpm. Kinetic analysis was performed by first hydrating the HIS1K biosensor chip in Nano-pure water for 10 min and equilibrating for 60 sec in PBS to establish an initial baseline, then loading the HIS1K biosensor tip into 3 different cmyc-tagged antigens (STR-cmyc, cmyc peptide, and hAY4-cmyc) and BSA (10 μ g/ml) dissolved in PBS (240 sec). Thereafter, a new baseline (90 sec) was established, followed by the addition of each antigen-loaded biosensor to wells containing 9E10 VHH and PBS only to measure binding (120 sec) and dissociation (120 sec) steps. The dissociation constant (K_D) of 9E10 VHH was determined using Blitz Pro 1.2.1.5 software based on the generated kinetic curve.

디의 결합속도상수(k_{on})를 결정한 결과 $6.92 \times 10^2 \sim 5.62 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 를 나타내었으며 해리속도상수(k_{off})에서는 $2.34 \times 10^{-3} \sim 3.3 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ 를 나타내었다. 이 결과에 의해 종합적인 결합력을 의미하는 해리평형상수(K_D)를 결정해보면 $4.43 \times 10^{-7} \sim 4.77 \times 10^{-6} \text{ M}$ 로 결정되어 9E10 VHH 나노바디의 cmyc tag peptide 항원에 대한 결합력을 재확인하였다(Table 1). 그러나 보고된 모 항체 9E10 (Schiweck *et al.*, 1997)의 해리평형상수 $7.5 \times 10^{-8} \sim 8 \times 10^{-8} \text{ M}$ 에 비해 높게 나타났는데 이는 분자량의 차이(15 kDa vs. 150 kDa), VL의 결핍, VHH로 치환된 아미노산들이 구조의 안정도에 영향을 미쳐 모 항체보다 높은 해리평형상수 즉 낮은 항원 결합력을 나타낸 것으로 추정된다.

Table 1. Cmyc peptide binding constant (KD) determination of 9E10 VH and 9E10 VHH. After collection of kinetic curve shown in Fig. 4, The k_{on} , k_{off} , and K_d values which showed kinetic binding parameters for the interactions of 9E10 VHH with each cmyc antigens was determined. The STR-cmyc represents streptavidin protein linked cmyc peptide and hAY4-cmyc represents hAY4 antibody (Lee *et al.*, 2010) tagged with cmyc peptide. Bovine serum albumin (BSA) was used as a negative control. ND means it was not determined.

Antigen	Antibody	$k_{on} (\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	$k_{off} (\text{S}^{-1})$	$K_d (\text{M})$
STR-cmyc	9E10 VHH	5.62×10^3	2.68×10^{-3}	5.62×10^{-6}
Cmyc peptide	9E10 VHH	5.28×10^3	2.34×10^{-3}	4.43×10^{-7}
hAY4-cmyc	9E10 VHH	6.92×10^2	3.3×10^{-3}	4.77×10^{-6}
BSA	9E10 VHH	ND	ND	ND

결론적으로 본 논문은 소수성이 높아 대장균에서 재조합 항체를 생산할 때 발현율이 낮은 생쥐 항체의 중쇄 가변 부위 (VH) 유전자를 높은 친수성에 의해 수용성이 증가 되어 발현율이 높은 낙타 VHH 나노바디의 중쇄 가변 부위 유전자로 치환시켜 대장균에서 발현율을 증가시키는 항체공학 기술을 수행한 연구이다. 그러나 여전히 소수성이 존재하여 발현된 항체의 구조에 영향을 미치는 변성 환경(Urea)에서만 정제 가능하여 항체의 항원 결합력이 낮은 K_D 값을 나타내었다. 그러므로 친수성을 좀 더 증가시키기 위해 구조상 항체구조 표면에 위치하여 친수성에 영향을 미칠 수 있는 아미노산들을 더 치환시켜 발현율을 향상시키고 최종적으로 항원 결합력을 증가시키는 연구를 추가적으로 진행할 예정이다.

적 요

Cmyc tag 펩타이드 항원에 결합한 생쥐 9E10 항체의 구조에 근거하여 9E10 항체의 중 사슬 가변 부위내의 3번째 초 가변 부위가 긴 18 개의 아미노산으로 구성되어 있으며 cmyc tag 펩타이드 결합에 압도적으로 관계함을 알게 되었다. 이러한 발견은 우리로 하여금 생쥐 9E10 항체의 중 사슬 가변 부위를 낙타과 9E10 나노바디로 변화시키게 하였다. 낙타과 항체는 약 15 kDa 정도의 크기와 높은 수용성을 갖는 중쇄 가변 도메인만으로 구성되어 있어 VHH 나노바디로 불린다. 9E10 VHH 나노바디를 생산하기 위해 생쥐 하이브리도마 9E10 세포로부터 9E10 항체의 중 사슬 가변 부위 도메인 cDNA를 추출하였으며 이 도메인의 해독된 아미노산들을 낙타 중 사슬 가변 부위 도메인의 아미노산들과 나란히 배열시켜 일치되지 않은 생쥐의 아미노산들을 낙타과 아미노산들로 치환하였다. 생쥐의 9E10 중 사슬 가변 부위 도메인과 낙타화된 9E10 VHH nanobody는 각각의 유전자들을 pUC119 발현벡터로 클로닝한 후 대장균에서 발현되고 수용성 단백질로 정제되었다. 예상한대로, 낙타화된 9E10 나노바디만 수용성 단백질로 생산

되었다. 본 항체는 효소면역분석법과 Western blot에서 cmyc tag 펩타이드에 대한 결합력을 나타내었다. 또한 bio-layer interferometry 방법을 사용하여 cmyc tag와 상호작용에 대한 해리평형상수(K_D)는 4.43×10^{-7} M~ 4.77×10^{-6} M로 결정되었다.

감사의 말

이 논문은 2021~2022년도 창원대학교 자율연구과제 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MHD, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans S, and Wyns L.** 1996. Crystal structure of a camel single-domain vh antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 803-811.
- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, and Bishop JM.** 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3610-3616.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, Bendahman N, and Hammers R.** 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448.
- Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, and Warwicker J.** 2017. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics* **33**, 3098-3100.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, and Foeller C.** 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edn., NIH Publication no. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Washington DC, USA.
- Kim JK and Kim TH.** 2020. The improved antigen-binding activity of biosimilar remicade ScFv antibodies by fusion of the leucine zipper domain. *J. Life Sci.* **30**, 1012-1020.
- Kim JK, Kim TH, and Kwon SW.** 2020. The development of di/trimeric biosimilar humira single-chain Fv antibody fused to leucine zipper or isoleucine zipper. *Korean J. Microbiol.* **56**, 193-205.
- Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, and Ward ES.** 1994. Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Immunol.* **24**, 542-548.
- Krauß N, Wessner H, Welfle K, Welfle H, Scholz C, Seifert M, Zubow K, Aÿ J, Hahn M, Scheerer P, et al.** 2008. The structure of the anti-cmyc antibody 9E10 Fab fragment/epitope peptide complex reveals a novel binding mode dominated by the heavy chain hypervariable loops. *Proteins* **73**, 552-565.
- LaVallie ER and McCoy JM.** 1995. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 501-506.
- Lee SH, Park DW, Sung ES, Park HR, Kim JK, and Kim YS.** 2010. Humanization of an agonistic anti-death receptor 4 single chain variable fragment antibody and avidity-mediated enhancement of its cell death-inducing activity. *Mol. Immunol.* **47**, 816-824.
- Munro S and Pelham HR.** 1986. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291-300.
- Park DW, Kim ED, Kim SH, Han JY, and Kim JK.** 2011. The development of dimerized chicken recombinant Single-chain Fv (ScFv) antibody using leucine zipper motif. *Korean J. Microbiol.* **47**, 328-334.
- Schiweck W, Buxbaum B, Schätzlein C, Neiss HG, and Skerra A.** 1997. Sequence analysis and bacterial production of the anti-cmyc antibody 9E10: the V_H domain has an extended CDR-H3 and exhibits unusual solubility. *FEBS Lett.* **414**, 33-38.
- Sheriff S and Constantine KL.** 1996. Redefining the minimal antigen-binding fragment. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 733-736.
- Tanha J, Nguyen TD, Ng A, Ryan S, Ni F, and MacKenzie R.** 2006. Improving solubility and refolding efficiency of human V_Hs by a novel mutational approach. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 503-509.
- Tanha J, Xu P, Chen Z, Ni F, Kaplan H, Narang SA, and MacKenzie CR.** 2001. Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. *J. Biol. Chem.* **276**, 24774-24780.