Immune Network Vol. 1, No. 1, 2001

Review

항체: 치료제로서의 부활

서울대학교 의과대학, 생화학교실 암연구소[1], 서울대학교 의과대학 생화학교실, 암연구소; 국립암센터 기초의학연구부[2]

정 홍 근[1]·정 준 호[2]

Resurrection of antibody as a therapeutic drug

Hong Keun Chung[1], Junho Chung[2]

Department of Biochmietry and cancer Research Institute, Seoul National University Collage of Madicine, Department of Biochmietry, cancer Research Institute, Seoul National University Collage of Madicine and Department of Basic Science, National Cancer Center

Currently 18 monoclonal antibodies were approved by FDA for injection into humans for therapeutic or diagnostic purpose. And 146 clinical trials are under way to evaluate the efficacy of monoclonal antibodies as anti-cancer agents, which comprise 9 % of clinical trials in cancer therapy field. When considering a lot of disappointment and worries existed in this field during the past 15 years, this boom could be called as resurrection. Antibodies have several merits over small molecule drug. First of all it is easier and faster in development, as proper immunization of the target proteins usually raises good antibody response. The side effects of antibodies are more likely to be checked out in immunohistomchemical staining of whole human tissues. Antibody has better pharmacokinetics, which means a longer half-life. And it is non-toxic as it is purely a "natural drug. Vast array of methods was developed to get the recombinant antibodies to be used as drug. The mice with human immunoglobulin genes were generated. Fully human antibodies can be developed in fast and easy way from these mice through immunization. These mice could make even human monoclonal antibodies against any human antigen like albumin. The concept of combinatorial library was also actively adopted for this purpose. Specific antibodies can be screened out from phage, mRNA, ribosomal library displaying recombinant antibodies like single chain Fvs or Fabs. Then the coding genes of these specific antibodies are obtained from the selected protein-gene units, and used for industrial scale production. Both naïve and immunized libraries are proved to be effective for this purpose. In post-map arena, antibodies are receiving another spotlight as molecular probes against numerous targets screened out from functional genomics or proteomics. Actually many of these antibodies used for this purpose are already human ones. Through alliance of these two actively growing research areas, antibody would play a central role in target discovery and drug development.

Key Words: antibody, drug

제약산업의 현재

제약 산업은 2000년 기준으로 1450억 달러(약 2000조)를 상회하는 규모에 이르렀으며(1), 전세계 경제의 상

책임저자: 정홍근, 서울대학교 의과대학 생화학교실
110-799, 서울시 종로구 연건동 28
Tel: 02)740-8243, Fax: 02)744-4534
E-mail: hkchung@snu.ac.kr

당부분을 차지하는 고 부가 가치 산업으로 자리잡았다. 2000년 7월 24일자 Forbe지에 의하면, Merck (38위), Procter & Gamble (47위), Nestle (49위), Pfizer (50위), Johnson & Johnson (56위), El du Pont de Nemours (58위), Roche Group (79위), Novartis Group (85위), Bristol-Myer Squibb (98위) 등 총 9개의 제약 산업 회사가 세계 100대 기업에 포함되어 있고, 이들 기업의 1999년 총 판매액이 2,550억 달러에 이르고 있다. 또한 올해에 들어서 Pfizer는 Viagra의 획기적인 판매고에 힘입어 세계 4위의 기업으로 단숨에 도약하였다. 이러한 규모의 제약 기업을 가지지 못한 우리나라와 같은 후발 OECD 국가는 사실상 국제 경제의 10% 이상에 이르는 부분을 포기하고 있는 셈이며, 제약 산업의 규모가 1996년~2000년의 5년 사이에 2 배로 증가하였음을 감안할 때 (2), 이러한 국가적 손실은 앞으로 점점 확대될 것이다.

Post-Map 시대의 제약 산업

2001년 2월 16일자 science 지에 Celera사가, 아울러 비슷한 시기에 The International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC)이 Nature 지에 인간 전체 유전체의 염기서열을 발표하였다(3). 이러한 인간유전체 사업 완성이 미치고 있는 가장 큰 영향은 신약을 개발하는 데 필요한 기간과 비용을 획기적으로 낮추어 주는 것이다. 2001년 1월 Millennium Pharmaceutical inc. (MLNM) 과 Bayer AG가 새로운 항암제 하나에 대한 Phase I 임상실험을 시작한다고 발표하였다. 이 첫번째 genome drug candidate 는 인간 유전체 database와 Zeus라는 로봇을 이용하여 8개월 만에 product testing을 완료하였다. 이것은 과거의 product testing 과정인 2년 8개월에서 무려 2년을 단축시킨 것이다. 또한 통상적으로 5,000 ~ 10,000 개 정도의 물질을 검색하여 5개 정도의 신약후보물질을 탐색해 낼 수 있었던 과거에 비하여, 검색하여야 하는 물질의 수를 500개 정도로 줄일 수 있어서 비용을 상당부분 절감할 수 있었다. 따라서 이러한 전략은 새로운 신약 개발의 패러다임으로 인식되고 있다(3). 이러한 신속한 신약개발을 위하여 MLNM은 gene analysis software를 이용하여 3,000 ~ 5,000개의 druggable protein을 발견하고, Zeus를 이용하여 정상 조직과 암 조직에서 각 목표 mRNA의 expression level을 확인하였으며, 최종적으로 목표 분자에 결합하는 small molecule을 찾아내게 되었다.

생명과학(Biotechnology), 생물학적 약품의 약진

신약 개발을 위한 목표 분자의 검색과 검증에서 패러다임 자체의 변화가 온다고 하여도, 기존의 small molecule drug 위주의 신약 개발 체제가 유지된다고 하면, 후발국가 혹은 기업의 입지는 상당히 좁을 수 밖에 없다. 하지만 근래에 이러한 small molecule drug 위주의 제약 시장이 큰 변화를 겪고 있다. 즉 소위 생물학적 약품 (biological drug)의 시장이 급격히 성장하고 있기 때문이다. 생물학적 약품을 주로 생산하는 가장 큰 생명과학 기업인 Amgen의 경우, 자본 규모가 최대의 제약회사이며 세계 38위인 기업인 Merck의 1/3 이상을 넘어섰으며, 작년 이익 규모 또한 Merck의 1/10 이상이 되었고, 종업원 1인당 이익은 Merck를 능가하였고, 연구투자 규모는 Merck의 40%에 이르고 있다. 이러한 신약 물질 자체의 변화로 인하여 기존 제약 업체와 같이 small molecule drug에 대한 많은 기술 축적이 없이도 많은 벤처기업이 제약 업계에 참여할 수 있는 기회가 열리고 있다. 실제로 미국의 경우 500억 달러 미만의 자본규모를 지닌 제약관련 생명과학 기업이 80개를 넘어서고 있다(4). 이것은 몇몇 거대 제약 기업으로 대표되는 과거 제약 업계에는 거의 상상할 수 없었던 엄청난 변화이며, 우리와 같은 후발 국가에게는 큰 기회라고 볼 수 있다.

항체 : 새로운 약품 소재

생물학적 약품의 소재로 부각되기 시작한 대표적 물질중의 하나가 항체 이다. 1990년대 후반부터 재조합 항체 (recombinant antibody)는 신약 개발의 중요한 소재로 부각되기 시작하였다. 현재 FDA의 허가를 받아 판매하고 있는 치료용 항체 신약은 12개, 진단 목적의 인체 투여용 항체 신약은 6개이다 (Table I). 또한 1998년도를 기준으로 할 때 Genentech, Amgen, Chiron, Centocor, Biogen, Synergen, Alza, Genetics Institute, Gensia Pharm, Immunex 등 미국의 주요 biotechnology 회사들이 개발하고 있는 신약 후보 물질 168개중에서 항체 약품은 무려 78개 (46%)를 차지하고 있다. 예를 들어 좀 더 자세히 살펴보면 생명공학 제약회사인 Genentech의 2001년 4월 17일자 product pipeline에는 20개 신약이 임상실험중인 것으로 되어있으며, 이중 9개가 재조합 항체이다. 또한 미국 국립암센터의 CancerNet (http://

Table I. The list of FDA-approved antibody drug

Antibody	Antigen	Indication
Therapeutic use		
OKT3	CD3	Acute kidney transplantation
Digibind	Digoxin	Digoxin poisoning
Herceptin	HER- 2	Metastatic.breast cancer
Panorex	CA 17-1A	Colorectal cancer
Remicade	TNFa	Crohn's disease
Reopro	Platelet	Ischemic cardiac complication
Syangis	RSV	RSV infection
Zenapax	IL2 R-a	Kindney transplantation rejec
Basiliximab	IL2 R-a	Acute organ rejection
Rituxan	CD20	Non-Hodgkin's lymphoma
Mylotarg	CD33	Relapsed CD33-positive AML
Campath	CD52	B-cell CLL
***In vivo* diagnostic use**		
CEA Scan		
LeukoScan		
OncoScint CR/OV		
ProstaScint		
RIGSCAN CR49		
Verluma		

cancernet.nci.nih.gov/trialsrch.shtml)에 2001년 4월 17일자로 등록되어 있는 총 1,647개의 치료제 부문 임상실험 중에서 항체 관련 clinical trial은 모두 146개로서 전체의 9%를 차지하고 있다. 과거 5~6년 전만 하더라도 항체 약품의 시장 규모는 2010년에 5억 달러 수준에 이를 것으로 추정되었으나 이미 작년에 항체 약품 시장은 20억 달러를 넘어섰고, 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정되고 있다(5).

항체 약품의 장점

항체를 이용한 신약개발이 활발해지는 이유는 세 가지로 정리가 가능하다. 첫째, 약품의 개발기간이 짧으며, 투자비용이 작다. 항체는 정제된 혹은 부분 정제된 단백질을 면역하면 쉽게 생성되고, 이후 면역원성을 낮추기 위한 인간화 (humanization) 과정만 거치면 된다. 최근에는 유전자재조합 생쥐를 이용하여 처음부터 인간 단세포군 항체를 생성하는 방법도 개발되었다. 따라서 복잡한 합성 및 검색과정을 필요로 하는 저 분자량 약품 (small molecule drug)에 비하여 빨리 제조할 수 있는 장점이 있다. 이러한 특성은 약품 개발기간을 줄이고자 노력하고 있는 제약회사에게는 무엇보다도 매력적인 장점이다. 둘째, 부작용 (side effect)을 쉽게 예측할 수 있다. 여러 종류의 부가기 (additional group)를 첨가한 후에 체내 분포를 보아야하는 기존의 저 분자량 약품에 비하여 면역화학염색기법을 통하여 쉽게 항체의 체내 분포를 볼 수 있기 때문이다. 저 분자량 약품의 체내 분포는 부가기에 의하여 영향을 받기 때문에 아무래도 그 체내 분포를 정확히 예측하기가 어렵다. 따라서 인체에 투여하였을 경우에 예측하지 못하였던 부작용이 나타나기도 한다. 또한 이러한 항체의 정확한 체내 분포 자료는 항체가 결합하는 항원이 체내에서 담당하는 생물학적 역할에 대한 분석을 가능하게 하고, 이러한 자료의 축적은 새로운 약품 개발 목표분자를 추적할 수 있도록 해준다. 셋째로 항체는 생약 (natural drug) 이라는 점이다. 항체는 인체 내에 이미 상당량 존재하고 있는 단백질로서 그 존재에 의해 인체가 거의 영향을 받지 않는다는 큰 장점이 있다. 항체의 체내에서의 반감기 (half life)는 저 분자량 약품에 비하여 압도적으로 길어서 환자에게 친화적이다.

재조합 항체

마우스 단세포군 항체를 직접 환자에게 투여하였을

때 직면하였던 가장 큰 문제는, 항체가 비자아 (non-self)로 인지되어 HAMA(human anti-mouse immunoglobulin antibody)의 생성이 유도되고, 반복 주사시에는 hypersensitivity shock이 유도될 수 있다는 점이었다. 면역원성 (immunogenicity)을 감소시키기 위하여, 마우스 단세포군 항체의 heavy chain constant region과 light chain constant region을 사람 항체로 치환시킨 복합항체 (chimeric antibody)가 등장하게 되었다(Fig. 1). 이러한 복합항체의 면역원성을 더욱 감소시키기 위하여 복합항체 variable region 중에서 framework 부분을 인간 유래의 것으로 치환한 항체인 인간화 항체 (humanized antibody) 혹은 CDR-이식항체 (CDR-grafted antibody)도 개발되었다(Fig. 1). 최근 영국 Biovation Limited 사는 이러한 항체 variable region에서 면역원성이 있는 부분만을 골라내어 면역원성이 없어지도록 아미노산 잔기를 치환하는 방법을 개발하였다. 이러한 과정을 de-immunization이라고 부른다. 항체 분자 전체 대신 항체의 일부만을 투여하는 방법도 활발히 이용되고 있다. 예를 들면 ReoPro는 Fab 분절로 이루어진 항체 약품이다. 또한 heavy chain variable region과 light chain variable region을 $(Gly4Ser1)^5$ 등의 linker로 연결시킨 scFv (single chain variable fragment)도 개발되었다(Fig. 2). 이 scFv는 그 크기가 항체 분자의 1/6에 불과하여 조직투과성이 뛰어나면서 동시에 항원 반응성을 유지하는 가장 작은 unit 이다. 또한 항체 분자 전체보다는 상대적으로 그 안정성이 떨어지고, 반감기가 짧은 특성이 있어서 진단용으로 주로 쓰여질 수 있을 것으로 추정되고 있다. 항체에 독소, 방사선 동위원소, 화학요법제재 등을 결합하여 투여할 수도 있다. 독소와 결합된 경우에는 재조합 면역독소(recombinant immunotoxin)라고 부른다(Fig. 2). 방사선 동위원소와 결합한 항체는 사람에게 투여후 gamma camera로 scanning하면 암의 크기, 전이 여부 등을 쉽게 알 수 있다. 이러한 진단법을 radioimmunoscintigraphy라고 부른다. 이후 항체에 치료용의 radioactive compound를 tagging하면, 쉽게 radioimmunotherpay를 시도할 수 있다. 아울러 Mylotarg의 경우와 같이 화학요법제재를 항체에 결합하여 인체에 투여할 수도 있다.

재조합 항체의 제조

현재까지 개발된 인간 항체를 제조하는 방법은 크게 네 가지로 대별될 수 있다. 최근에 가장 각광을 받고 있는 방법은 인간 항체 유전자를 가진 생쥐에게 항원을 면역한 뒤, 항원과 결합하는 항체를 분비하는 plasma cell만을 분리하고, 이 세포로부터 항체 유전자를 분리해낸 다음, CHO 세포 등에서 overexpression 시키는 방법이다. 최근에는 B lymphocyte 자체를 불멸화 시키는 방법 (SLAM, selected lymphocyte antibody method technology)도 개발되어 사용되고 있다(6-9). 특히 2000년 5월 22일 인간 항체 유전자를 가진 XenoMouse를 개발한 Abgenix사와 항체 관련 진단 시약 회사인 Abott사가 이러한 방법을 이용하여 인간화 항체를 공동개발하기로 하면서 이러한 방식이 가장 촉망받는 인간항체 생산법으로 떠오르고 있다. 한편 Medarex와 일본의 KIRIN 사 역시 공동으로 이러한 인간 항체 유전자 생쥐를 개발하였다. 가장 고전적으로 인간화 항체를 얻는 방법은 마우스 단세포군 항체를 먼저 제조하고, 이 단세포군 항체의 X-ray cryatal 구조를 얻은 다음, 이 구조와 비슷한 사람

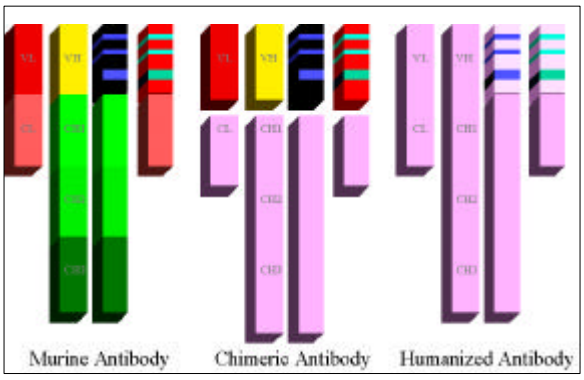

Fig. 1 The structure of chimeric and humanized antibody

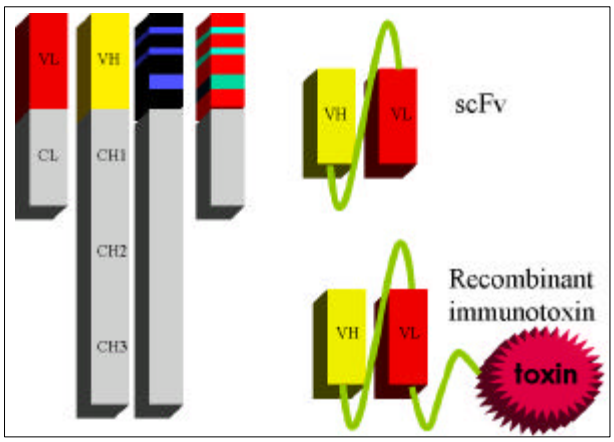

Fig. 2 The structure of scFv and recombinant immunotoxin

항체를 template로 하여 PCR을 이용한 유전자 제조방법을 통하여 마우스 단세포군 항체의 항원 결합부위를 사람 항체로 옮겨오는 방법이다. 그러나 이 방법은 마우스 단세포군 항체의 구조를 결정하는 작업이 필요하고, 제조한 사람항체의 항원에 대한 친화도가 마우스 단세포군 항체에 비하여 떨어지는 경우에 trial-and-error를 통하여 항원에 대한 친화도 (affinity)를 높여야하므로 상대적으로 시간과 인력을 많이 필요로 하는 단점이 있다(10-11). 하지만 이러한 방식의 인간화 항체 제조는 항체의 구조 및 항원과 항체의 결합 방식 등에 대한 많은 정보를 제공하여 주는 장점이 있다.

Combinatorial phage display library 기법을 이용하는 방법도 있다. 이 방법은 생쥐, 가토, 닭 등에 항원을 면역하고 비장 (spleen), 골수 (bone marrow) 등에서 항체 유전자를 PCR로 증폭하여 얻은 다음, phage display vector를 이용하여 phage coat에 항체를 display하고 항원에 결합하는 phage 만을 panning을 통하여 골라내는 방법이다. 이후 항원에 결합하는 항체 variable region의 유전자 구조를 밝히고, 이를 이용하여 가장 비슷한 framework region 유전자를 가진 사람 항체를 찾아낸 다음, CDR grafting과 동시에 차이가 나는 아미노산 잔기를 diversify 한 antibody library를 제조하고, 항원에 대한 panning을 통하여 가장 친화도가 높은 사람 항체를 찾아내는 방법이다(12). 이러한 방법은 대량 투자가 필요하지 않고, 제조에 드는 비용이 적으며, 실험실 수준에서 쉽게 인간화 항체를 개발할 수 있다는 장점이 있다. 아울러 이러한 방법은 complex antigen, 즉 세포막 (plasma membrane) 등에 존재하는 다수의 항원 혹은 인체내 biological fluid 등에 존재하는 항원 복합체 등에 대한 항체를 검색하는데 있어서 다른 인간화 항체 제조법에 비하여 유리한 것으로 보고되고 있다. 최근에는 가토에 항원을 면역하여 항체 가변 영역 (variable region)은 가토 유래이고 불변 영역 (constant region)은 사람 유래인 chimeric Fab를 phage 표면에 display하는 combinatorial rabbit/human chimeric Fab phage display library를 제조하는 방법이 부각되고 있다. 이후 이 library로부터 항원과 결합하는 항체를 panning을 통하여 찾아내면 chimeric 항체를 얻게 된다. 마우스 보다 가토를 선호하게 된 이유는 두 가지이다. 우선 가변 영역 유전자의 다양성을 유도하는 immunoglobulin gene rearrangement mechanism으로 가토의 경우는 마우스에서 볼 수 없는 gene conversion mechanism을 가지고 있어서 좀 더 높은 친화도의 항체를 얻을 가능성이 높다(13). 둘째로 최근에 각종 유전자 조작 마우스를 이용한 각종 질병모델이 등장하면서 마우스 항원과 사람 항원 모두에 결합하는 항체의 필요성이 절실하게 되었기 때문이다. 이 항체들의 가변영역의 아미노산 sequence와 가장 비슷한 framework region을 지닌 사람 항체를 찾아낸 다음, CDR grafting을 시도하게 된다. 이때 CDR grafting에서 CDR이 아닌 framework내의 몇몇 중요한 아미노산 잔기 (14)들은 동시에 grafting을 하게되는데 이 잔기를 대상으로 library를 만들고 항원에 대한 panning을 통하여 높은 친화도의 인간화 항체를 얻을 수 있다.

Display vehicle로 phage 이외의 것들이 많이 사용되기 시작한 것도 언급할 만한 일이다. 우선 mRNA-protein fusion 방법이 있다(15). 이것은 mRNA에 puromycin이 포함된 linker를 결합시키고 난 후, in-vitro translation을 하여 mRNA가 translation된 단백질의 C-terminal에 결합하도록 한다. 이러한 상태에서는 mRNA와 protein이 complex 상태로 연결되어 있기 때문에, protein interaction을 이용하여 목표 단백질과 결합하는 항체 단백질 complex를 얻은 후 그 유전자를 PCR을 통하여 증폭해낸다. 이러한 유전자로부터 in-vitro transcription 및 in-vitro translation을 거치면 다시 complex가 만들어진다. 이러한 selection cycle을 몇 회 반복하여 얻은 항체 유전자는 항체의 대량생산에 바로 쓰일 수 있다. 이러한 mRNA-protein fusion system의 장점은 우선 library construction이 상대적으로 쉽고, library size가 크며, 항체 개발이외의 molecular interaction에도 쉽게 사용할 수 있다는 점이다. Messenger RNA가 ribosome에 결합하여 translation 된 후, ribosome에서 release되는 것을 저해하여 단백질이 mRNA와 ribosome을 매개로 결합되게 한 ribosomal display 법도 역시 널리 사용되기 시작하고 있다(16).

또한 Cambridge Antibody Technology (CAT) 등의 biotech 회사들과 몇 연구자들은 소위 premade antibody library의 제조에 매진하고 있다. 이것은 면역과정 없이 무작위로 인간으로부터 항체 유전자를 얻은 뒤, 적어도 1×10^{11} 이상의 diversity를 가진 사람 항체 naive library를 제작하여 적정 친화도 ($kd < 1\times 10^{-7}$)를 지닌 항체를 panning을 통하여 검색해내는 방법이다(17). 또는 완전히 synthetic CDR을 지닌 human antibody phage display library로부터 항원과 결합하는 항체를 panning을 통하여 찾아내는 방법도 최근에 보고되었다(18).

항체 약품의 전망

항체를 이용한 약품개발에서 해결하여야 하는 가장 큰 문제점은 대량생산과 정제법이 아직 확고히 뿌리내리지 못하고 있다는 점이다. 현재 항체의 생산을 위해서는 *E. coli* 등의 prokaryote를 이용하는 방법, yeast, CHO 세포, transgenic animal, plant를 이용하는 방법 등이 다양하게 이용되고 있다. 가장 가능성이 높아 보이는 방법은 tobacco, corn 등의 plant를 이용한 대량 생산이다. 식물에서 생산된 항체를 plantibody라고 부른다. 이러한 방법이 빠른 시간내에 범용화되면 쉽고 싸게 항체를 대량생산 할 수 있을 것으로 예측하고 있다.

아직 널리 실용화되지는 않았지만 catalytic antibody 영역도 언급할 만한 가치가 있다. 즉 아직까지 존재하지 않았던 새로운 종류의 효소를 항체의 구조를 이용하여 창조하는 일이다. 이러한 일이 범용화 될 경우 우선 높은 압력과 온도를 필요로 하는 화학공정이 상대적으로 안전한 온도과 압력에서 큰 부산물 없이 이루어 질 수 있을 것이다. 의학적으로는 인체내의 여러 독소, 마약 등을 선택적으로 분해하는 catalytic antibody가 개발되어 인체에 투여될 수 있을 것이다. 또한 이러한 catalytic antibody의 개념은 prodrug의 개념과 병행하여 발전하고 있음에 관심을 기울일 필요가 있다. 즉 항상 두 개의 antigen binding pocket이 존재하는 항체에서 한 pocket은 특정 항원과 결합하게 하고 다른 한 pocket은 catalytic function을 가지도록 design한 후 prodrug을 인체에 투여하면 특정 조직이나 세포 주위에서만 prodrug이 drug으로 변하게 할 수 있다. 이러한 일이 가능해지면 현재 독성이 강한 화학요법제의 투여량을 획기적으로 줄여서 부작용을 없애면서도 암 조직에는 상대적으로 높은 농도의 항암제 농도가 유지되도록 하는 것이 가능해 질 것이다.

참 고 문 헌

1. Playing with pain killers Newsweek April 9, 145-159, 2000
2. 500 hundreds International Corporation Forbes July 24th, 2000
3. Genomania meets the bottom line, Science 291; 1193-1203, 2001
4. Convergence, The Biotechnology industry reports, 2001 Business Week, March 6th, 2000
5. Nicholson IC, Zou X, Popov AV, Cook GP, Corps EM, Humphries S, Ayling C, Goyenechea B, Xian J, Taussig MJ, Neuberger MS, Bruggemann M Antibody repertoires of four- and five-feature translocus mice carrying human immunoglobulin heavy chain and kappa and lambda light chain yeast artificial chromosomes. J Immunol 163; 6898-906, 1999
6. Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, Tanaka S, Sato K, Oshimura M, Ishida I Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 97; 722-727, 2000
7. Russell ND, Corvalan JR, Gallo ML, Davis CG, Pirofski La.Production of protective human antipneumococcal antibodies by transgenic mice with human immunoglobulin loci. Infect Immun 68;1820-1826, 2000
8. Michael L. Gallo, Vladimir E. Ivanov, Aya Jakobovits, and C. Geoffrey Davis. The human immunoglobulin loci introduced into mice: V (D) and J gene segment usage similar to that of adult humans European Journal of Immunology 30: 534-540, 2000
9. Co MS, Landolfi NF, Nagy JO, Tan JH, Vexler V, Vasquez M, Roark L, Yuan S, Hinton PR, Melrose J, Klingbeil C, Queen C, Berg EL. Properties and pharmacokinetics of two humanized antibodies specific for L-selectin. Immunotechnology 4(3-4):253-266, 1999
10. He X-Y, Xu Z, Melrose J, Mullowney A, Vasquez M., Queen C, Vexler V, Klingbeil C, Co MS, and Berg EL Humanization and pharmacokinetics of a mouse monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin has now been published in Journal of Immunology 160, 1029-1035, 1998
11. Rader C, Ritter G, Nathan S, Elia M, Gout I, Jungbluth AA, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Barbas CF 3rd The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies. J Biol Chem 275; 13668-13676, 2000
12. Raaphorst FM, Raman CS, Nall BT, Teale JM Molecular mechanisms governing reading frame choice of immunoglobulin diversity genes. Immunol Today Jan;18; 37-43, 1997

13. Foote J, Winter G Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol 224;487-499, 1992
14. Hammond PW, Alpin J, Rise CE, Wright MC, Kreider BL. *in vitro* selection and characterization of Bcl-XL binding proteins from a mix of tissue-specific mRNA display libraries. J Biol Chem 2001 Mar 30; [epub ahead of print]
15. Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A, Pluckthun A. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display Nat Biotechnol 18; 1287-1292, 2000
16. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nat Biotechnol 14; 309-314, 1996
17. Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, Hoess A, Wolle J, Pluckthun A, Virnekas B Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. 296; 57-86, 2000
18. Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, Hoess A, Wolle J, Pluckthun A, Virnekas B. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J Mol Biol 296; 57-86, 2000