



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월05일

(11) 등록번호 10-1498588

(24) 등록일자 2015년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/62 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7008302(분할)

(22) 출원일자(국제) 2004년01월22일

심사청구일자 2013년05월02일

(85) 번역문제출일자 2013년04월01일

(65) 공개번호 10-2013-0048269

(43) 공개일자 2013년05월09일

(62) 원출원 특허 10-2005-7013639

원출원일자(국제) 2004년01월22일

심사청구일자 2008년12월30일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2004/000844

(87) 국제공개번호 WO 2004/065540

국제공개일자 2004년08월05일

(30) 우선권주장

60/441,307 2003년01월22일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

Tommy Nilsson 등. The EMBO Journal. Vol. 10, No. 12, 페이지 3567-3575 (1991)\*

Kelley W. Moremen 등. The Journal of Cell Biology. Vol. 115, No. 6, 페이지 1521-1534 (1991)

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

로슈 글리카트 아게

스위스 술리 렌-취리히 체하-8952 바기슈트라쎄 18

(72) 발명자

우마나 파블로

스위스 체하-8046 취리히 캐페르홀츠슈트라쎄 262

브륀커 페터

스위스 체하-8335 히트나우 부르그비젠후트라쎄

3체

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희

전체 청구항 수 : 총 59 항

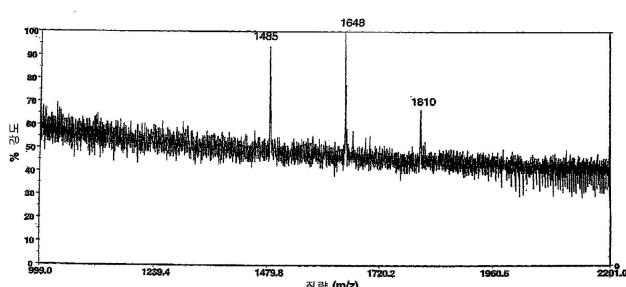
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 융합 구성체와 Fc 수용체 결합 친화도 및 이펙터 기능이 증가된 항체를 생성하기 위한 이의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 단백질의 글리코실화 조작에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은, 향상된 치료 성능을 가지는 폴리펩ти드를 생성하기 위한 숙주 세포의 글리코실화 조작에 있어서, 증가된 Fc 수용체 결합 및 증가된 이펙터 기능을 가지는 항체를 포함하고, 효소 활성을 가지며 융합 구성물을 포함하는 핵산 분자 및 그것의 용도에 관한 것

(뒷면에 계속)

**대 표 도**

이다.

[색인어]

글리코실화 조작, Fc 수용체 결합, 이펙터 기능

(72) 발명자

**페라라 클라우디아**

스위스 체하-8004 취리히 할빌슈트라쎄 27

**주터 토비아스**

스위스 체하-5400 바이테 가쎄 13

---

(30) 우선권주장

60/491,254 2003년07월31일 미국(US)

60/495,142 2003년08월15일 미국(US)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

융합 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리 핵산으로서, 상기 융합 폴리펩티드가  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III (GnT III) 또는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제 (GalT) 활성을 갖고, 상기 융합 폴리펩티드가 만노시다제 I (Man I), 만노시다제 II (Man II),  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I (GnT I),  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II (GnT II), 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종성(heterologous) 골지 주체 폴리펩티드(Golgi resident polypeptide)의 골지 편재 도메인(Golgi localization domain)을 포함하는 단리 핵산.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 GnT III 활성을 갖고, 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GnT III 촉매 도메인을 포함하는 단리 핵산:

```

Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu
Pro Glu Asp Thr Thr Glu Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro Gly Thr
Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys Thr Lys Val Ala Glu Gly Ser Ser
Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro Met Arg His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Arg
Gly Thr Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro Ser Cys Gly Val
Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys Glu Arg Leu Val pro Arg Glu Val Pro Arg
Arg Val Ile Asn Ala Ile Asn His Glu Phe Asp Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu
Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Pro
Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val
Phe Leu Asp His Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu Arg Thr
Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp
Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu
Pro Phe Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro Gly Thr Leu Glu
Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg
Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val
Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly
Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln Asn Gly Asp Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys
Arg Asp Leu Asn Tyr Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr Gln Gln Glu
Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln
Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Tyr Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Gly Arg Arg Asn
Gln Gly Ser Asp Gly Arg Ser Ser Ala Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Thr Glu Gly Pro Glu Gln
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu.

```

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 GalT 활성을 갖고, 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GalT 촉매 도메인을 포함하는 단리 핵산:

Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Glu Asp Asp Ile Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 골지 편재 도메인은 Man II 또는 GnT I의 편재 도메인인 단리 핵산.

#### 청구항 5

융합 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리 핵산으로서, 상기 융합 폴리펩티드는 GnT III 활성을 갖고, 상기 융합 폴리펩티드는 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 단리 핵산.

#### 청구항 6

융합 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리 핵산으로서, 상기 융합 폴리펩티드는 GnT III 활성을 갖고, 상기 융합 폴리펩티드는 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 단리 핵산.

#### 청구항 7

융합 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 단리 핵산으로서, 상기 융합 폴리펩티드는 GalT 활성을 갖고, 상기 융합 폴리펩티드는 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 단리 핵산.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 단리 핵산을 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 9

제8항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 10

GnT III 또는 GalT 활성을 갖고, Man I, Man II, GnT I, GnT II 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종성(heterologous) 골지 주재 폴리펩티드(Golgi resident polypeptide)의 골지 편재 도메인(Golgi localization domain)을 갖는 융합 폴리펩티드의 제조 방법으로서,

제9항에 따른 숙주 세포를 상기 융합 폴리펩티드를 암호화하는 상기 핵산의 발현을 허용하는 조건 하에서 배지에서 배양하는 단계; 및

얻어지는 배양물로부터 상기 융합 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는 제조 방법.

#### 청구항 11

숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드의 글리코실화 프로파일을 변형시키는 방법으로서, 제8항의 발현 벡터를 상기 숙주 세포 내로 도입하는 단계를 포함하고, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드는 IgG의 Fc 영역을 포함하고, 상기 융합 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를

변형시키도록 발현되는 방법.

### 청구항 12

숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드의 글리코실화 프로파일을 변형시키는 방법으로서, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 핵산을 상기 숙주 세포 내로 도입하는 단계를 포함하고, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드는 IgG의 Fc 영역을 포함하고, 상기 융합 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를 변형시키도록 발현되는 방법.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 IgG의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질 또는 전체 항체 분자인 방법.

### 청구항 14

GnT III 또는 GaIT 활성, 및 Man I, Man II, GnT I, GnT II 및 α1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종성(heterologous) 골지 주재 폴리펩티드(Golgi resident polypeptide)의 골지 편재 도메인(Golgi localization domain)을 갖는 융합 폴리펩티드.

### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 GnT III 활성을 갖고, 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GnT III 촉매 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드:

```

Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu
Pro Glu Asp Thr Thr Glu Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro Gly Thr
Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys Thr Lys Val Ala Glu Gly Ser Ser
Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro Met Arg His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Gly Arg
Gly Thr Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro Ser Cys Gly Val
Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys Glu Arg Leu Val pro Arg Glu Val Pro Arg
Arg Val Ile Asn Ala Ile Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu
Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Pro
Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val
Phe Leu Asp His Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gin Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu Arg Thr
Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp
Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu
Pro Phe Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Trp Lys Gln Pro Gly Thr Leu Glu
Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg
Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val
Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly
Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln Asn Gly Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys
Arg Asp Leu Asn Tyr Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr Gln Gln Glu
Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln
Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Tyr Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Arg Arg Asn
Gln Gly Ser Asp Gly Arg Ser Ser Ala Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Thr Glu Gly Pro Glu Gln
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu.

```

### 청구항 16

제14항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 GaIT 활성을 갖고, 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GaIT 촉매 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드:

Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, 상기 골지 편재 도메인은 Man II 또는 GnT I의 골지 편재 도메인인 응합 폴리펩티드.

#### 청구항 18

GnT III 활성을 갖고, 서열번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 응합 폴리펩티드.

#### 청구항 19

GnT III 활성을 갖고, 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 응합 폴리펩티드.

#### 청구항 20

GaIT 활성을 갖고, 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 응합 폴리펩티드.

#### 청구항 21

(a) GnT III 활성을 갖고, Man I, Man II, GnT I, GnT II 및 a 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종성(heterologous) 골지 주재 폴리펩티드(Golgi resident polypeptide)의 골지 편재 도메인(Golgi localization domain)을 포함하는 응합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 제 1 발현 벡터, 및

(b) Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 제 2 발현 벡터를 포함하는 단리 숙주 세포.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 23

제21항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의하여 제조된 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 제 3 발현 벡터를 더 포함하는 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포에 의하여 제조된 상기 폴리펩티드는 IgG의 Fc 영역을 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 24

단리 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를 변형시키도록, 융합 폴리펩티드를 암호화하는 1 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 단리 숙주 세포이고,

상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드의 Fc 영역이 IgG의 Fc 영역이고,

상기 융합 폴리펩티드가 GnT III 또는 GaIT 활성을 갖고, Man I, Man II, GnT I, GnT II 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종성(heterologous) 골지 주재 폴리펩티드(Golgi resident polypeptide)의 골지 편재 도메인(Golgi localization domain)을 포함하는 단리 숙주 세포.

### 청구항 25

제24항에 있어서, GaIT 활성을 갖는 상기 융합 폴리펩티드는 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GaIT 촉매 도메인을 포함하는 단리 숙주 세포:

```

Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val
Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp
Cys Val Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys Tyr Trp
Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala
Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr
Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg
Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro Asn Asn
Tyr Trp Gly Trp Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile
Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu
Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn
Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile
Thr Pro Ser.

```

### 청구항 26

단리 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를 변형시키도록, GnT III 활성을 갖고 Man I, Man II, GnT I, GnT II 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 1 이상의 핵산 및 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 1 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 단리 숙주 세포이고,

상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 IgG의 Fc 영역을 포함하는 단리 숙주 세포.

### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 단리 숙주 세포.

### 청구항 28

제21항 내지 제24항, 및 제26항 및 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GnT III 활성을 갖는 융합 폴리펩티드가 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GnTIII 촉매 도메인을 포함하는 단리 숙주 세포:

Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu Pro Glu Asp Thr Thr Glu Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro Gly Thr Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys Thr Lys Val Ala Glu Gly Ser Ser Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro Met Arg His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Gly Arg Gly Thr Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro Ser Cys Gly Val Pro Thr Val Val Gin Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys Glu Arg Leu Val pro Arg Glu Val Pro Arg Arg Val Ile Asn Ala Ile Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Pro Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val Phe Leu Asp His Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu Arg Thr Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu Pro Phe Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro Gly Thr Leu Glu Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln Asn Gly Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys Arg Asp Leu Asn Tyr Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr Gln Gln Glu Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Tyr Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Arg Arg Asn Gln Gly Ser Asp Gly Arg Ser Ser Ala Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Thr Glu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu.

### 청구항 29

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드가 IgG의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질 또는 전체 항체 분자인 단리 숙주 세포.

### 청구항 30

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 상기 변형의 결과 증가된 Fc 수용체 결합 친화도를 나타내는 단리 숙주 세포.

### 청구항 31

제30항에 있어서, 상기 Fc 수용체가 Fc $\gamma$  활성화 수용체인 단리 숙주 세포.

### 청구항 32

제30항에 있어서, 상기 Fc 수용체가 Fc $\gamma$  RIIIA 수용체인 단리 숙주 세포.

### 청구항 33

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 상기 변형의 결과로서 증가된 이펙터(effecter) 기능을 나타내고, 상기 증가된 이펙터 기능은 증가된 Fc-매개 세포성 세포독성, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다형핵 세포에 대한 증가된 결합, 아폽토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 증가된 수지상 세포 성숙, 및 증가된 T 세포 프라이밍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 단리 숙주 세포.

### 청구항 34

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골지 편재 도메인이 Man II 또는 GnT I의 편재 도메인인 단리 숙주 세포.

**청구항 35**

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및 식물 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 단리 숙주 세포.

**청구항 36**

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포, 및 하이브리도마 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 단리 숙주 세포.

**청구항 37**

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 비-푸코실화된 올리고사카라이드의 증가된 비율을 갖는 단리 숙주 세포.

**청구항 38**

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 이등분된 (bisected) 올리고사카라이드의 증가된 비율을 갖는 단리 숙주 세포.

**청구항 39**

제38항에 있어서 상기 이등분된 (bisected) 올리고사카라이드가 하이브리드 또는 복합체인 단리 숙주 세포.

**청구항 40**

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 항-CD20 항체, 키메릭 항-인간 신경모세포종 단일클론 항체 chCE7, 키메릭 항-인간 신장 세포 암종 단일클론 항체 chG250, 키메릭 항-인간 결장, 폐, 및 유방 암종 단일클론 항체 ING-1, 인간화 항-인간 17-1A 항원 단일클론 항체 3622W94, 인간화 항-인간 직장결장 종양 항체 A33, GD3 갱글리오시드에 대해 유도된 항-인간 흑색종 항체 R24, 키메릭 항-인간 편평상피-세포 암종 단일클론 항체 SF-25, 항-인간 EGFR 항체, 항-인간 EGFRvIII 항체, 항-인간 PSMA 항체, 항-인간 PSCA 항체, 항-인간 CD22 항체, 항-인간 CD30 항체, 항-인간 CD33 항체, 항-인간 CD38 항체, 항-인간 CD40 항체, 항-인간 CD45 항체, 항-인간 CD52 항체, 항-인간 CD138 항체, 항-인간 HLA-DR 변형 항체(variant antibody), 항-인간 EpCAM 항체, 항-인간 CEA 항체, 항-인간 MUC1 항체, 항-인간 MUC1 코어 단백질 항체, 항-인간 이상 글리코실화 MUC1 항체, ED-B 도메인을 함유하는 인간 피브로네틴 변이체에 대한 항체, 및 항-인간 HER2/neu 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 단리 숙주 세포.

**청구항 41**

a. 인간 IgG의 Fc 영역을 포함하는 당 조작된 폴리펩티드의 제조를 허용하는 조건 하에서, GnT III 또는 GaIT 활성을 갖고 Man I, Man II, GnT I, GnT II 및 a 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종 성 골지 주체 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 1 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 융합 폴리펩티드가 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 당 조작된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를 변형시키도록 발현되는 단계; 및

b. 상기 당 조작된 폴리펩티드를 단리하는 단계

를 포함하는, 숙주 세포에서 당 조작된 폴리펩티드를 제조하는 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 GaIT 활성을 갖는 융합 폴리펩티드는 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GaIT 촉매 도메인을 포함하는 방법:

Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser.

#### 청구항 43

a. IgG의 Fc 영역을 포함하는 당 조작된 폴리펩티드의 제조를 허용하는 조건 하에서, GnT III 활성을 갖고 Man I, Man II, GnT I, GnT II 및 a 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 이종성 골지 주체 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 1 이상의 핵산 및 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 1 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기 융합 폴리펩티드가 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 당 조작된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를 변형시키도록 발현되는 단계

를 포함하는, 숙주 세포에서 당 조작된 폴리펩티드를 제조하는 방법.

#### 청구항 44

제43항에 있어서, 상기 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 45

제41항, 제43항 및 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩티드는 하기 폴리펩티드 서열을 포함하는 GnTIII 측면 도메인을 포함하는 방법:

Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu  
 Pro Glu Asp Thr Thr Glu Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro Gly Thr  
 Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys Thr Lys Val Ala Glu Gly Ser Ser  
 Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro Met Arg His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Gly Arg  
 Gly Thr Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro Ser Cys Gly Val  
 Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys Glu Arg Leu Val pro Arg Glu Val Pro Arg  
 Arg Val Ile Asn Ala Ile Asn Ile Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu  
 Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Pro  
 Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val  
 Phe Leu Asp His Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu Arg Thr  
 Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp  
 Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu  
 Pro Phe Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro Gly Thr Leu Glu  
 Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg  
 Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val  
 Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly  
 Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln Asn Gly Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys  
 Arg Asp Leu Asn Tyr Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr Gln Gln Glu  
 Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln  
 Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Tyr Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Arg Arg Asn  
 Gln Gly Ser Asp Gly Arg Ser Ser Ala Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Thr Glu Gly Pro Glu Gln  
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu.

#### 청구항 46

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 폴리펩티드가 IgG의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질 또는 전체 항체 분자인 방법.

#### 청구항 47

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골지 편재 도메인은 마노시다제 II 또는 GnTI의 편재 도메인인 방법.

#### 청구항 48

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 제조된 상기 폴리펩티드가 상기 변형의 결과 증가된 Fc 수용체 결합 친화도를 나타내는 방법.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 상기 Fc 수용체가 Fc 활성화 수용체인 방법.

#### 청구항 50

제48항에 있어서, 상기 Fc 수용체가 Fc $\gamma$ RIIIA 수용체인 방법.

#### 청구항 51

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당 조작된 폴리펩티드가 상기 변형의 결과로서 증가된 Fc-매개된 이팩터 기능을 가지며, 상기 증가된 이팩터 기능은 증가된 Fc-매개 세포성 세포독성, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다형핵 세포에 대한 증가된 결합, 아폽토

시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 증가된 수지상 세포 성숙, 및 증가된 T 세포 프라이밍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 52

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 포유동물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및 식물 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 53

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포가 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 콜수종 세포, P3X63 마우스 콜수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 및 하이브리도마 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 54

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된, 증가된 이펙터 기능을 갖도록 조작된 당 조작된 폴리펩티드로서, 상기 증가된 이펙터 기능은 증가된 Fc-매개 세포성 세포독성, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다형핵 세포에 대한 증가된 결합, 아폽토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 증가된 수지상 세포 성숙, 및 증가된 T 세포 프라이밍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 당 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 55

종양, 암종, 유방암, 방광암, 망막아종, 난소의 유두낭샘암종, 빌리스 종양, 및 소세포 폐암의 치료, 및 자가 면역 질환, 면역매개 저혈소판증, 급성 특발성 혈소판 감소성 자반증, 만성 특발성 혈소판 감소성 자반증, 피부 균염, 시든햄 무도증, 루푸스 신염, 류마티스열, 다선증후군, 헤노흐-센라인 자반증, 연쇄상구균 감염후 신염, 결절성 홍반, 다카야스 동맥염, 애디슨 질환, 다형홍반, 결절다발동맥염, 강직성 척추염, 구드페스츄어 증후군, 혈전혈관염, 원발성 담즙성 간경변증, 하시모토 갑상선염, 갑상선증독증, 만성 활동성 간염, 다발성근염 및 피부근염, 다발연골염, 심상성 천포창, 웨게너 육아종증, 막성 신증, 근위축성 측삭 경화증, 척수로, 다발성 근육통, 악성 빈혈, 급성 진행 사구체신염 및 섬유성 폐렴, 염증 반응, 염증성 피부 질환, 건선, 아토피성 피부염, 전신성 경화증 및 동맥경화증, 크론병, 궤양성 직장염, 염증성 장 질환 관련 반응, 호흡 곤란 증후군, 성인 호흡 곤란 증후군(ARDS), 피부염, 뇌막염, 뇌염, 포도막염, 직장염, 사구체신염, 알레르기성 질환, 습진, 천식, 만성 염증성 반응 및 T-세포의 침습을 동반하는 질환, 죽상동맥경화, 백혈구흡착결핍증, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 당뇨병, 1형 당뇨병, 인슐린 의존성 당뇨병, 다발성 경화증, 레이노 증후군, 자가 면역 갑상선염, 알러지성 뇌척수염, 쇠그렌 증후군, 소아 당뇨병, 시토카인 및 T-림프구에 의하여 매개되는 급성 및 지연 과민증 관련 면역 반응, 결핵, 유육종증, 다발성 근염, 육아종증, 혈관염, 애디슨 질환에 수반되는 악성 빈혈, 백혈구 누출을 동반하는 질환, 중추신경계(CNS) 염증 질환, 다발성 장기 손상 증후군, 용혈성 빈혈, 크라이오글로빈 혈증, 쿰스(Coombs) 양성 빈혈, 중증근무력증, 항사구체기저막항체 질환, 항인지질 증후군, 알러지성 신경염, 그레이브스씨병, 람버트-이튼 근무력증 증후군, 유천포창, 천포창, 자가 면역 다내분비병증, 라이터병, 근육강직 증후군, 베체트병, 거대세포 동맥염, 면역 복합체 신염, IgA 신증, IgM 다신경병증, 면역 혈소판 감소성 자반증(ITP), 자가 면역 혈소판 감소증을 B-세포 고갈의 약리학적 기작에 기초하여 치료하기 위한, 제54항의 당 조작된 폴리펩타이드 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.

#### 청구항 56

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 당 조작된 폴리펩티드로서, 상기 당 조작된 폴리펩티드가 항-CD20 항체, 키메릭 항-인간 신경모세포종 단일클론 항체 chCE7, 키메릭 항-인간 신장 세포 암종 단일클론 항체 chG250, 키메릭 항-인간 결장, 폐, 및 유방 암종 단일클론 항체 ING-1, 인간화 항-인간 17-1A 항원 단일클론 항체 3622W94, 인간화 항-인간 직장결장 종양 항체 A33, GD3 캉글리오시드에 대해 유도된 항-인간 흑색 종 항체 R24, 키메릭 항-인간 편평상피-세포 암종 단일클론 항체 SF-25, 항-인간 EGFR 항체, 항-인간 EGFRvIII 항체, 항-인간 PSMA 항체, 항-인간 PSCA 항체, 항-인간 CD22 항체, 항-인간 CD30 항체, 항-인간 CD33 항체, 항-인간 CD38 항체, 항-인간 CD40 항체, 항-인간 CD45 항체, 항-인간 CD52 항체, 항-인간 CD138 항체, 항-인간 HLA-DR 변형 항체, 항-인간 EpCAM 항체, 항-인간 CEA 항체, 항-인간 MUC1 항체, 항-인간 MUC1 코어 단백질 항체, 항-인간 이상 글리코실화 MUC1 항체, ED-B 도메인을 함유하는 인간 피브로네틴 변이체에 대한 항체 및 항-

인간 HER2/neu 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항체인 당 조작된 폴리펩티드.

**청구항 57**

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 당 조작된 폴리펩티드로서, 상기 당 조작된 폴리펩티드가 상기 폴리펩티드의 Fc 영역 내 비-푸코실화된 올리고사카라이드의 증가된 비율을 가지는 당 조작된 폴리펩티드.

**청구항 58**

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 당 조작된 폴리펩티드로서, 상기 당 조작된 폴리펩티드가 상기 폴리펩티드의 Fc 영역 내 이등분된 올리고사카라이드의 증가된 비율을 가지는 당 조작된 폴리펩티드.

**청구항 59**

제58항에 있어서, 상기 이등분된 올리고사카라이드가 하이브리드 또는 복합체인 당 조작된 폴리펩티드.

**청구항 60**

삭제

**청구항 61**

삭제

**청구항 62**

삭제

**청구항 63**

삭제

**청구항 64**

삭제

**청구항 65**

삭제

**청구항 66**

삭제

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

삭제

**청구항 69**

삭제

**청구항 70**

삭제

**청구항 71**

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

청구항 241

삭제

청구항 242

삭제

청구항 243

삭제

청구항 244

삭제

청구항 245

삭제

청구항 246

삭제

청구항 247

삭제

청구항 248

삭제

청구항 249

삭제

청구항 250

삭제

청구항 251

삭제

청구항 252

삭제

청구항 253

삭제

청구항 254

삭제

청구항 255

삭제

청구항 256

삭제

청구항 257

삭제

청구항 258

삭제

청구항 259

삭제

청구항 260

삭제

청구항 261

삭제

청구항 262

삭제

청구항 263

삭제

청구항 264

삭제

청구항 265

삭제

청구항 266

삭제

청구항 267

삭제

청구항 268

삭제

청구항 269

삭제

청구항 270

삭제

청구항 271

삭제

청구항 272

삭제

청구항 273

삭제

청구항 274

삭제

청구항 275

삭제

청구항 276

삭제

청구항 277

삭제

청구항 278

삭제

청구항 279

삭제

**청구항 280**

삭제

**청구항 281**

삭제

**청구항 282**

삭제

**청구항 283**

삭제

**청구항 284**

삭제

**청구항 285**

삭제

**청구항 286**

삭제

**명세서****기술분야**

[0001]

본 발명은 단백질의 글리코실화 공학 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 융합 구성체를 비롯하여 촉매 활성을 갖는 핵산 분자와, Fc 수용체 결합 및 이펙터(effecter) 기능이 증가된 항체를 비롯한 치료 성질이 향상된 폴리펩티드를 제조하기 위한 숙주 세포의 글리코실화 공학에서의 이의 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002]

당단백질은 인간, 기타 진핵 유기체 및 일부 원핵 생물에서, 촉매작용, 신호전달, 세포-세포 연락과, 분자 인식 및 회합을 비롯한 여러 가지 필수 기능을 매개한다. 당단백질은 진핵 유기체에서 비세포질 단백질의 대부분을 구성한다. (Lis et al., Eur. J Biochem. 218:1-27 (1993)). 치료 목적으로 다수의 당단백질이 개발되어 왔으며, 지난 20년간 분비된 천연 당단백질의 재조합 형태가 생물공학 산업의 주요 산물이었다. 그 예에는 에리트로포이에틴(EPO), 치료용 단일클론 항체(치료용 mAb), 조직 플라스미노겐 활성화인자(tPA), 인터페론- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 및 인간 응모막 성선자극호르몬(hCG)이 포함된다. (Cumming et al., Glycobiology 1:115-130 (1991)).

[0003]

올리고사카라이드 성분은 물리적 안정성, 프로테아제 공격에 대한 내성, 면역계와의 상호작용, 약동학 및 특이적 생물학적 활성을 비롯하여 치료용 당단백질의 효능과 관련된 성질에 유의적인 영향을 줄 수 있다. 그러한 성질은 올리고사카라이드의 존재 또는 부재에 따라 달라질 뿐 아니라, 그 특정 구조에 따라서도 달라질 수 있다. 올리고사카라이드 구조와 당단백질 기능 사이에 어떤 통칙을 정할 수 있다. 예를 들어, 어떤 올리고사카라이드 구조는 특이적 탄수화물 결합 단백질과의 상호작용을 통해 혈류로부터 당단백질을 신속하게 제거하는데 관여하는 반면에, 다른 올리고사카라이드는 항체에 의해 결합되어 목적하지 않는 면역 반응을 촉발할 수 있다. (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)).

[0004]

포유동물 세포는 인간에게 적용하기 위한 가장 적합한 형태로 단백질을 글리코실화시키는 능력이 있기 때문에 치료용 당단백질의 제조를 위한 바람직한 숙주이다. (Cumming et al., Glycobiology 1:115-30 (1991); Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)). 박테리아는 단백질을 거의 글리코실화시키는 일이 없으며, 효모, 사상균, 곤충류 및 식물 세포와 같은 다른 타입의 공통 숙주는 혈류로부터의 신속한 제거와 관련된 글리코실화 폐단, 바람직하지 않은 면역 상호작용 및, 일부 특별한 경우 감소된 생물학적 활성을 초래한다. 포유동물

세포 중에서는 중국산 햄스터 난소(CHO) 세포가 지난 20년간 가장 범용되어 왔다. 적절한 글리코실화 패턴을 제공하는 것 외에, 이들 세포는 유전자적으로 안정하고, 고도로 생산적인 클론 세포주를 일관성 있게 생성할 수 있다. 무혈청 배지를 사용하여 단순 생물반응기에서 고 밀도로 상기 세포를 배양할 수 있으며, 안전하고 재현가능한 생물공정을 개발할 수 있다. 통용되는 다른 동물 세포는 어린 햄스터 신장(BHK) 세포, NS0- 및 SP2/0-마우스 골수종 세포를 포함한다. 더욱 최근에서는, 트랜스게닉 동물로부터의 생성이 시험된 바 있다. (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)).

[0005] 모든 항체는 단백질 조립, 분비 또는 기능 활성에 다양하게 영향을 주는 중쇄 불변부 내의 보존 위치에서 탄수화물 구조를 포함하는데, 각 이소타입은 N-결합된 탄수화물 구조의 특징적인 배열을 갖는다. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). 부착된 N-결합 탄수화물의 구조는 프로세싱 정도에 따라 상당히 달라지며, 높은 만노스, 다중 분지된 비안테너리(biantennary) 복합체 올리고사카라이드를 포함할 수 있다. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). 통상적으로, 단일클론 항체도 복수의 당형태로서 존재하도록 특정 글리코실화 부위에 부착된 코어 올리고사카라이드 구조를 이종 프로세싱한다. 마찬가지로, 세포주에 따라 항체 글리코실화에 큰 차이가 있으며, 상이한 배양 조건 하에서 배양되는 소정 세포주에 대해서도 약간의 차이가 관찰되는 것으로 확인된 바 있다. (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5 (8):813-22 (1995)).

[0006] 비접합 단일클론 항체(mAb)는, 미국 식품 의약국이 CD20 양성 B-세포, 저등급 또는 여포성 비호지킨 림프종의 치료를 위한 리툭시맙(Rituximab) (Rituxan<sup>TM</sup>; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, and Genentech Inc., San Francisco, CA), 진행성 유방암의 치료를 위한 트라스투주맙(Trastuzumab) (Herceptin<sup>TM</sup>; Genentech Inc.) (Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)), 재발 급성 골수성 백혈병의 치료를 위한 켐투주맙(Gemtuzumab) (Mylotarg<sup>TM</sup>, Celltech/WyethAyerst), B 세포 만성 림프성 백혈병의 치료를 위한 아лем투주맙(Alemtuzumab) (CAMPATH<sup>TM</sup>, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG)을 승인한 것으로부터 입증되는 바와 같이, 암 치료에 유용한 의약이다. 이들 제품의 성공은 그 효능뿐 아니라 뛰어난 안전성 프로필에 달려있다(Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)). 이들 약물의 성공에도 불구하고, 현재 비접합된 mAb 요법에 의해 통상적으로 제공되는 것보다 더 높은 특이적 항체 활성을 얻는 데 많은 관심이 집중되고 있다.

[0007] 간단한 생산 공정을 유지하고 유의적이고 바람직하지 않은 부작용을 잠재적으로 피하면서 효능을 크게 증가시키는 한 방법은, 올리고사카라이드 성분을 조작하여 mAb의 세포 매개의 천연 이펙터 기능을 향상시키는 것이다. (Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). 암 면역요법에 가장 범용되는 항체인 IgG1 타입 항체는 각 CH2 도메인 내의 Asn297에서 보존된 N-결합 글리코실화 부위를 갖는 당단백질이다. Asn297에 결합된 2개의 복합체 비안테너리 올리고사카라이드가 CH2 도메인 사이에 매립되어, 폴리펩티드 골격과 광범위하게 접촉하게 되고, 이의 존재는 항체가 항체 의존성 세포매개형 세포독성(ADCC)과 같은 이펙터 기능을 매개하는 데 필수적이다. (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

[0008] 본 발명자들은 이등분된(biseected) 올리고사카라이드의 형성을 촉매화하는 글리코실트랜스퍼라제인  $\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)을 중국산 햄스터 난소(CHO) 세포에서 과다발현시키면 조작된 CHO 세포가 생성하는 신경아세포종 키메릭 단일클론 항체(chCE7)의 시험관내 ADCC 활성이 유의적으로 증가되는 것을 이미 확인한 바 있다. (Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999), 국제 공개 공보 WO 99/54342 참조, 각 문헌의 전문이 참고 인용됨). 항체 chCE7은 친화도 및 특이성이 높지만, GnTIII 효소가 결여되어 있는 표준 산업용 세포주에서 생성되는 경우 효능이 거의 없어서 임상적으로 유용하지 않은 비접합된 mAb의 거대 클래스에 속한다(Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). 이 연구는 GnTIII를 발현하도록 항체 생산 세포를 조작하여 ADCC 활성을 크게 증가시킬 수 있으며, 또한 그 결과 이등분되고 비-푸코실화된 올리고사카라이드를 비롯한 불변부 (Fc)-회합되고, 이등분된 올리고사카라이드가 천연 항체에서 발견되는 수준 이상의 비율로 증가된다는 것을 보여준 첫 연구이다.

[0009] 다수의 연구 결과는 Fc-수용체-의존성 메카니즘이 종양에 대한 세포독성 항체의 작용에 실질적인 원인이 됨을 시사하며, 종양에 대한 최적 항체는 활성화 Fc 수용체에 우선적으로 결합하고 억제성 파트너 Fc $\gamma$ RIIB에 최소로 결합한다는 것을 보여준다(Clynes, R. A., et al., *Nature Medicine* 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A. M.,

and Ravetch, J. V., J. Exp. Med. 195 (12):1653-1659 (2002년 6월). 예를 들어, 하나 이상의 연구 결과는 특히 Fc $\gamma$ RIIIa 수용체가 항체 요법의 효능과 강하게 연관되어 있음을 시사한다. (Cartron, G., et al., Blood 99 (3):754-757 (2002년 2월)). 이 연구로부터, Fc $\gamma$ RIIIa 동형접합성인 환자는 이형접합성인 환자보다 리툭시맙에 대한 반응이 더욱 양호하다는 것이 확인되었다. 연구진들은 이러한 우수한 반응은 Fc $\gamma$ RIIIa에 대한 항체의 생체내 결합이 더욱 양호하여, 그 결과 림프종 세포에 대한 ADCC 활성이 양호해지기 때문이라고 결론을 내렸다. (Cartron, G., et al., Blood 99(3):754-757 (2002년 2월)).

[0010] 종종, 성공적인 항암 단일클론 항체는, ADCC 외에, 세포 신호전달 캐스케이드를 활성화시키거나 또는 성장 인자에의 접근을 차단하여 표적 세포 생존, 증식 또는 세포사를 조절하는 Fc-독립적인 직접적 신호전달 메카니즘을 유도한다. (Selenko, N., et al., J Clin. Immunol. 22 (3):124-130 (2002)). 예를 들어, CD20<sup>+</sup> B 세포를 리툭시맙으로 처리하면 Mab-유도된 세포자가사멸(apoptosis)의 유도 및 보체 매개된 세포용해와 ADCC를 유도하는 것으로 확인된 바 있다. (Selenko, N., et al., J. Clin. Immunol. 22 (3):124-130 (2002)). 또한, 림프종 세포의 리툭시맙 유도된 세포자가사멸은 세포를 죽일 뿐 아니라 항원 제시 수지상 세포(DC)에 의한 림프종 세포 유도된 웨პ티드의 흡수 및 교차 제시를 촉진하며, DC의 성숙을 유도하고, 특이적 세포독성 T 림프구(CTL)를 생성한다.

## 발명의 내용

### 발명의 개요

[0012] 본 발명자들은 Fc 수용체 결합 친화도 및 이펙터 기능이 증가된 항체의 대단한 치료 잠재력을 인식하여, 항체 Fc 영역의 글리코실화 프로필의 조작을 포함하는 항체 제조 방법을 개발하였다.

[0013] 본 발명은 폭넓게는 숙주 세포를 글리코조작하여(glycoengineering) 그 숙주 세포에 의해 생성된 하나 이상의 폴리펩티드의 글리코실화 프로필을 변경하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 사용하여 푸코실화 감소를 비롯한 Fc 영역에서의 글리코실화 변형을 포함하는 치료용 항체를 제조할 수 있는데, 상기 항체는 글리코실화 변형의 결과 이펙터 기능 증가 및/또는 Fc 수용체 결합 증가를 나타낸다. 본 발명의 글리코조작된 항체는 환자의 종양 치료에 특히 유용하다. 하나의 구체예에서, 본 발명의 숙주 세포는 GnT III 촉매 활성을 또는 GaIT 촉매 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 발현하도록 글리코조작된다. 바람직한 구체예에서, 융합 구성체는 인간 Man II 촉매 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및/또는 GnT II 촉매 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자와 함께 동시발현된다. 또 다른 구체예에서는, Man II 촉매 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 발현이 증가되도록 글리코조작된 숙주 세포로 본 발명의 글리코조작된 폴리펩티드를 생성한다.

[0014] 따라서, 하나의 측면에서 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산에 관한 것으로서, 상기 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III("GnT III") 활성을 가지며, 골지 주재(Golgi resident) 폴리펩티드의 골지 편재 도메인(localization domain)을 포함한다. 하나의 구체예에서, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함한다. 추가의 구체예에서, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I ("GnT I")의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II("GnT II")의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인, 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직한 구체예에서, 단리 핵산 서열은 도 24 또는 도 25에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 단리 핵산 서열은 도 24 또는 도 25에 제시된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 단리 핵산 서열은 도 24 또는 도 25의 아미노산 서열과 80% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산에 관한 것으로서, 상기 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제 ("GalT") 활성을 가지며, 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다. 하나의 구체예에서, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제의 촉매 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제의 편재 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I ("GnT I")의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II ("GnT II")의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인, 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산을 포함하는 발현 벡터에

관한 것으로서, 상기 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을 가지며, 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다. 하나의 구체예에서, 발현 벡터는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하며, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인, 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것으로서, 상기 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제 활성을 가지며, 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다. 하나의 구체예에서, 발현 벡터는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제의 촉매 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하고, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, (1,2)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인, 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III ("GnT III") 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포에 관한 것으로서, 상기 숙주 세포가 생성한 폴리펩티드는 전체 항체 분자, Fc 영역을 포함하는 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역과 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된다. 하나의 구체예에서, GnT III 활성을 갖는 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인과 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인, 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제("GnT") 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포에 관한 것으로서, 상기 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드는 전체 항체 분자, Fc 영역을 포함하는 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역과 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된다. 하나의 구체예에서, GnT 활성을 갖는 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-갈락토실트랜스퍼라제의 촉매 도메인과 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인, 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다.

[0021] 바람직하게는, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II 또는  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I, 또는 대안적으로 갈락토실트랜스퍼라제로부터 유래한 것이다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을 갖고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드에 관한 것이다. 하나의 구체예에서, 본 발명의 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인, (1,2)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 발명은  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제 활성을 갖고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드에 관한 것이다. 하나의 구체예에서, 본 발명의 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제의 촉매 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0024] 바람직하게는, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II 또는  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I ("GnT I"), 또는 대안적으로, 갈락토실트랜스퍼라제("GnT")로부터 유래한 것이다.

[0025]

또 다른 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 발현되는 조건 하에 배지 중에 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 생성된 배양물로부터 융합 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는,  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 하나의 구체예에서, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 융합 폴리펩티드는 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인 및 a1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다.

[0026]

또 다른 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 발현되는 조건 하에 배지 중에 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 생성된 배양물로부터 융합 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는,  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 하나의 구체예에서, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제의 촉매 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 융합 폴리펩티드는 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인 및 a1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다.

[0027]

바람직하게는, 골지 편재 도메인은 만노스 II 또는  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I, 또는 갈락토실트랜스퍼라제("GALT")로부터 유래된 것이다.

[0028]

추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 핵산 또는 발현 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 숙주 세포가 생성한 폴리펩티드의 글리코실화 프로필을 변형시키는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 폴리펩티드는 IgG 또는 이 폴리펩티드의 Fc 영역을 포함하는 이의 단편이다. 특히 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드는 IgG1 또는 이 폴리펩티드의 Fc 영역을 포함하는 이의 단편이다. 대안적으로, 폴리펩티드는 인간 IgG의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질이다.

[0029]

또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 전체 항체 분자, Fc 영역을 포함하는 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성된 군에서 선택된 폴리펩티드를 생성시키는 조건 하에,  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성, 또는 대안적으로  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제 ("GALT") 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계[이 때, 상기 융합 폴리펩티드는 상기 숙주 세포가 생성한 상기 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현됨]; 및 (b) 상기 폴리펩티드를 단리하는 단계를 포함하는, 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생성하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 또는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제("GALT")의 촉매 도메인을 포함하고, 만노시다제 II의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인 및 a1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 추가로 포함한다. 바람직한 구체예에서, 그러한 변형 결과 숙주 세포가 생성한 폴리펩티드는 이벡터 기능 및/또는 Fc 수용체 결합이 증가되어 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 이벡터 기능 증가는 Fc-매개된 세포매개형 세포독성 증가, NK 세포에의 결합 증가, 대식세포에의 결합 증가, 단핵구에의 결합 증가, 다형핵 세포에의 결합 증가, 세포자가사멸률을 유도하는 직접적인 신호 전달 증가, 수지상 세포 성숙 증가 및/또는 T 세포 프라이밍 증가이며, Fc 수용체 결합 증가는 Fc $\gamma$  RIIIA와 같은 Fc 활성화 수용체에의 결합 증가이다. 바람직하게는, 이벡터 기능 증가 및/또는 Fc 수용체 결합 증가를 나타내는 폴리펩티드는 항체, 항체 단편, 또는 면역글로불린 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로서, Fc 영역에서 비푸코실화된 올리고사카라이드의 비율이 증가되어 있다.

[0030]

또 다른 측면에서, 본 발명은 항체, Fc 영역을 포함하는 항체 단편, 또는 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물, 암과 같은 종양 또는 다른 질병의 치료에서의 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 하나의 구체예에서, 치료는 필요한 환자(예, 인간)에게 약학 조성물의 치료 유효량을 투여하여 B 세포를 고갈시키는 것이다.

[0031]

또 다른 측면에서, 본 발명은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III (GnT III) 활성을 갖고 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터; 및 만노시다제 II(Man II) 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 GnTIII의 촉매 도메인을 포함하고, 골지 편재 도

메인은 Man II의 편재 도메인, GnTI의 편재 도메인, GnTII의 편재 도메인, ManI의 편재 도메인 및  $\alpha$ -1,6-코어-푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다. 하나의 구체예에서, 숙주 세포는 GnTII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터를 추가로 포함한다. 융합 폴리펩티드, Man II 활성을 갖는 폴리펩티드 및 GnTII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 각각 별도의 발현 벡터 또는 동일한 발현 벡터 내에 있을 수 있다.

[0032] 추가의 측면에서, 본 발명은  $\beta$ (1,4)-갈락토실트랜스퍼라제(GaIT) 활성을 갖고 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터; 및 만노시다제 II(Man II) 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 GnTIII의 촉매 도메인을 포함하고, 골지 편재 도메인은 Man II의 편재 도메인, GnTI의 편재 도메인, GnTII의 편재 도메인, ManI의 편재 도메인 및  $\alpha$ -1,6-코어-푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다. 하나의 구체예에서, 숙주 세포는 GnTII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터를 추가로 포함한다. 융합 폴리펩티드, Man II 활성을 갖는 폴리펩티드 및 GnTII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 각각 별도의 발현 벡터 또는 동일한 발현 벡터 내에 있을 수 있다.

[0033] 추가의 측면에서, 본 발명은 GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을, 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 조작된 숙주 세포에 관한 것으로서, 상기 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편, 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된다.

[0034] 추가의 구체예에서, 본 발명은 GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산, Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 GnTII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을, 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 조작된 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편, 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된다.

[0035] 추가의 측면에서, 본 발명은 GaIT 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을, 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 조작된 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편, 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된다.

[0036] 추가의 측면에서, 본 발명은 GaIT 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산, Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 GnTII 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을, 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 조작된 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포가 생성하는 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편, 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된다.

[0037] 추가의 측면에서, 본 발명은 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 GnT III 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를, 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된 폴리펩티드를 생성할 수 있는 조건 하에 배양하는 단계[이 때, 상기 융합 폴리펩티드는 상기 숙주 세포가 생성한 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현됨]; 및 상기 폴리펩티드를 단리하는 단계를 포함한다.

[0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 GaIT 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를, 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된 폴리펩티드를 생성할 수 있는 조건 하에 배양하는 단계[이 때, 상기 융합 폴리펩티드는 상기 숙주 세포가 생성한 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현됨]; 및 상기 폴리펩티드를 단리하는 단계를 포함한다.

[0039] 추가의 측면에서, 본 발명은 숙주 세포에서 Fc-매개된 세포매개형 세포독성이 증가된 폴리펩티드를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 GaIT를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 Man II를 코딩하는 하나 이상의 핵산을

발현하도록 조작된 숙주 세포를, 전체 항체 분자, 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 항체 단편으로 이루어진 군에서 선택된 폴리펩티드를 생성할 수 있는 조건 하에 배양하는 단계[이 때, GaIT 또는 Man II 중 하나 또는 둘다는 그 발현 레벨이 상기 숙주 세포가 생성한 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분하고, 상기 폴리펩티드는 그러한 변형 결과 Fc-매개된 세포매개형 세포독성 증가를 나타냄]; 및 Fc-매개된 세포매개형 세포독성이 증가된 상기 폴리펩티드를 단리하는 단계를 포함한다.

[0040] 다른 측면에서, 본 발명은 숙주 세포 내에서 폴리펩티드를 생성하는 방법에 관한 것인데, 이 방법은

[0041] (a) 면역글로불린의 Fc 영역의 균등 영역을 포함하는 융합 단백질, 전체 항체 분자 및 항체 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드의 생성을 가능하게 하는 조건 하에서  $\alpha$ -만노시다제 II 활성을 보유하는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 상기  $\alpha$ -만노시다제 II 활성을 보유하는 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 생성된 상기 폴리펩티드의 Fc 영역내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현시키는 것인 단계; 및

[0042] (b) 상기 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드를 분리하는 단계

[0043] 를 포함한다.

[0044] 다른 측면에서, 본 발명은 면역글로불린의 Fc 영역의 균등 영역을 포함하는 융합 단백질, 전체 항체 분자 및 항체 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드의 생성을 가능하게 하는 조건 하에서  $\alpha$ -만노시다제 II 활성을 보유하는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포에 관한 것으로, 상기  $\alpha$ -만노시다제 II 활성을 보유하는 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 생성된 상기 폴리펩티드의 Fc 영역내의 올리고사카라이드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현시키는 것인 숙수 세포에 관한 것이다.

[0045] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기한 바와 같은 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드, 특히 상기 변형된 올리고사카라이드로 인해 증가된 이펙터 기능 및/또는 증가된 Fc 수용체 결합을 보유하는 항체에 관한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 BHK에서 생성된 변형되지 않은(글리코조작되지 않은)(non-glycoengineered) 재조합 항-CD20 IgG1 항체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포는 항체 발현 벡터 pETR1502로 트랜스펙션(transfection)시켰다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 2는 야생형("wt") GnTIII를 코딩하는 핵산으로 조작된 BHK에서 생성된 글리코조작된 재조합 항-CD20 IgG1 항체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포는 항체 발현 벡터 pETR1502와 GnTIII 발현 벡터 pETR1166으로 동시 트랜스펙션시켰다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 3은 GnTIII 활성을 보유하는 융합 폴리펩티드("G1-GnTIII")를 코딩하는 핵산으로 조작되고 GnTI-골지 편재 도메인에 의해 편재된 BHK에서 생성된 글리코조작된 재조합 항-CD20 IgG1 항체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포는 항체 발현 벡터 pETR1502와 GnTIII 발현 벡터 pETR1425로 동시에 트랜스펙션시켰다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 4는 GnTIII 활성을 보유하는 융합 폴리펩티드("M2-GnTIII")를 코딩하는 핵산으로 조작되고 골지 알파-만노시다제 II(Man II)-골지 편재 도메인에 의해 편재된 BHK에서 생성된 글리코조작된 재조합 항-CD20 IgG1 항체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포는 항체 발현 벡터 pETR1502와 GnTIII 발현 벡터 pETR1506으로 동시에 트랜스펙션시켰다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 5는 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 변형되지 않은(글리코조작되지 않은) 재조합 항-CD20 IgG1 항체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포는 항체 발현 벡터 pETR1502로 트랜스펙션시켰다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 6은 GnIII 활성을 보유하는 융합 폴리펩티드("M2-GnTIII")를 코딩하는 핵산으로 조작되고 골지 알파-만노시다제 II(Man II)-골지 편재 도메인에 의해 편재된 HEK293-EBNA에서 생성된 글리코조작된 재조합 항-CD20 IgG1 항

체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포는 항체 발현 벡터 pETR1520과 GnTIII 발현 벡터 pETR1519로 동시 트랜스펙션시켰다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 7은 GnIII 활성을 보유하는 융합 폴리펩티드("M2-GnTIII")를 코딩하는 핵산으로 조작되고 골지 알파-만노시다제II(Man II)-골지 편재 도메인에 의해 편재된 HEK293-EBNA에서 생성된 글리코조작된 재조합 항-CD20 IgG1 항체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포는 항체 발현 벡터 pETR1520과 GnTIII 발현 벡터 pETR1519로 동시 트랜스펙션시켰다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다. (a) 추가로 효소 처리하지 않은 PNGaseF-방출 올리고사카라이드의 올리고사카라이드 프로필. (b) EndoH를 이용하여 추가로 분해한 PNGaseF-방출 올리고사카라이드의 올리고사카라이드 프로필.

\*도 8(a)는 올리고사카라이드의 EndoH-촉매화 분해의 모식도이다. EndoH는 하이브리드(및 이등분된 하이브리드)를 분해할 수 있으나, 복합체 올리고사카라이드 또는 이등분된 복합체 올리고사카라이드는 분해할 수 없다. 도 8(b)는 복합체 올리고사카라이드 및 하이브리드형 올리고사카라이드를 구분함으로써, Endo-H 처리가 PNGaseF 처리 결과 최초로 얻어진 MALDI/TOF-MS 스펙트럼에서 동일한 m/z 비율을 보유하는 올리고사카라이드 피크에 대한 구조적 할당(structural assignments)을 가능하게 함을 나타내고 있다.

\*도 9는 "G1-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 변형되지 않은 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 항체-의존성 세포매개형 세포독성(ADCC)을 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 BHK 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 3에 나타냈으며, 변형되지 않은 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 1에 나타냈다. 표적 세포(T)는 SKW6.4 인간 림프아구 세포였다. 이펙터 세포(E)는 새롭게 분리한 인간 PBMC였다. 25:1의 E:T 비는 최대 방출(항체 대신 세정제를 사용함) 및 자연 방출(항체 대신 배양 배지를 사용함) 대조군에 대한 락테이트 데하이드로제나제(LDH) 방출에 의해 세포독성을 측정하는 4-시간 항온처리 ADCC 분석에서 사용하였다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다.

도 10은 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 변형되지 않은 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 항체-의존성 세포매개형 세포독성(ADCC)을 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 HEK293-EBNA 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 6에 나타냈으며, 변형되지 않은 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 5에 나타냈다. 표적 세포(T)는 SKW6.4 인간 림프아구 세포였다. 이펙터 세포(E)는 새롭게 분리한 인간 PBMC였다. 25:1의 E:T 비는 최대 방출(항체 대신 세정제를 사용함) 및 자연 방출(항체 대신 배양 배지를 사용함) 대조군에 대한 락테이트 데하이드로제나제(LDH) 방출에 의해 세포독성을 측정하는 4-시간 항온처리 ADCC 분석에서 사용하였다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다.

도 11은 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 "wt-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 항체-의존성 세포매개형 세포독성(ADCC)을 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 BHK 세포에서 생성하였다. M2-GnTIII-글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 4에 나타냈으며, wt-GnTIII-글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 2에 나타냈다. 표적 세포(T)는 SKW6.4 인간 림프아구 세포였다. 이펙터 세포(E)는 새롭게 분리한 인간 PBMC였다. 25:1의 E:T 비는 최대 방출(항체 대신 세정제를 사용함) 및 자연 방출(항체 대신 배양 배지를 사용함) 대조군에 대한 락테이트 데하이드로제나제(LDH) 방출에 의해 세포독성을 측정하는 4-시간 항온처리 ADCC 분석에서 사용하였다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다.

도 12는 NK 세포 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체에 대한 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 "wt-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 결합을 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 HEK293-EBNA 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 6에 나타냈으며, 변형되지 않은 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 5에 나타냈다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다. 표면 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포는 Fc 감마 RIIc 수용체를 생성하지 않는 것으로 공지된 유전형(즉, Fc 감마 RIIc 코딩 서열내에 프레임내 종결 코돈을 함유하는 유전자 변이체에 대한 동종접합체)의 공여체로부터 분리하였다. FITC-표지된 항-인간 IgG 항체 단편을 이용하는 FACS에 의해 측정된 기하학적 평균 형광 세기는 NK 세포에 결합된 재조합 항체의 양에 따라 증가한다. 상기 분석에서 검출된 결합은 경쟁적인 Fc 감마 RIIIa-특이성 항체 단편의 이용에 의해 입증되는 바와 같이 Fc 감마 RIIIa 특이적이다(도 13 참조).

도 13은 농도가 증가하는 경쟁적인 항-Fc 감마 RIII 항체 단편의 존재 하에 NK 세포 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체에 대한 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 변형되지않은 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 결합을 나타낸다. 두 가지 재조합 항체는 모두 HEK293-EBNA 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 6에 나타냈으며, 변형되지않은 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 5에 나타냈다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였으나, 경제된 NK 세포는 경쟁적인 3G8-Fab2 항-Fc 감마 RIII 항체 단편의 농도를 증가시켜 그 농도를 변화시키면서(그래프를 참조할 것) 재조합 항체(최종 농도는 항상  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 임)와 동시에 항온처리하였다. 표면 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포는 Fc 감마 RIIc 수용체를 생성하지 않는 것으로 공지된 유전형(즉, Fc 감마 RIIc 코딩 서열 내에 프레임내 종결 코돈을 함유하는 유전자 변이체에 대한 동종접합체)의 공여체로부터 분리하였다. FITC-표지된 항-인간 IgG 항체 단편을 이용하는 FACS에 의해 측정된 기하학적 평균 형광 세기는 NK 세포에 결합된 재조합 항체의 양에 따라 증가한다.

도 14는 피브로넥틴의 ED-B+ 동형태(isoform)를 인식하는 재조합 IgG1 "L19" 항체로부터 유도되고 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 중성 올리고사카라이드 혼합물 dm1 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. (a) 항체 발현 벡터 pETR1546dm1로 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 변형되지 않은 항체. (b) 항체 발현 벡터 pETR1546 및 GnIII 발현 벡터 pETR1519로 동시에 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 M2-GnTII-글리코조작된 항체. 두 가지 항체 모두는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 이은, 버퍼를 인산염 완충 염수(PBS)를 교환하는 수퍼택스200 매트릭스(Amersham) 상에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 배양 배지로부터 정제하였다. 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 15는 Raji 인간 림프종 세포 상에서 Fc 감마 RIIb 수용체에 대한 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-ED-B+ 피브로넥틴 IgG1 항체 대 변형되지않은 재조합 항-ED-B+피브로넥틴 IgG1 항체의 결합을 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 HEK293-EBNA 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 14b에 나타냈으며, 변형되지않은 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 14a에 나타냈다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다. FITC-표지된 항-인간 IgG 항체 단편을 이용하는 FACS에 의해 측정된 기하학적 평균 형광 세기는 Raji B-세포 림프종 세포에 결합된 재조합 항체의 양에 따라 증가한다.

도 16은 상이한 공여체로부터 유래한 NK 세포 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체에 대한 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 변형되지않은 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 결합을 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 HEK293-EBNA 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 6에 나타냈으며, 변형되지않은 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 5에 나타냈다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다. 표면 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포는 Fc 감마 RIIc 수용체를 생성하지 않는 것으로 공지된 유전형(즉, Fc 감마 RIIc 코딩 서열내에 프레임내 종결 코돈을 함유하는 유전자 변이체에 대한 동종접합체)의 공여체로부터 분리하였다. 2가지 공여체는 Fc 감마 RIIIa 수용체의 158V-"더 높은-친화도" 변이체에 대한 동종접합체로서 공통유전자를 갖는 것들이다. 다른 두개의 공여체는 Fc 감마 RIIa 수용체의 158V-"더 높은-친화도" 및 158F-"더 낮은-친화도" 변이체에 대한 158V/F 이종접합체로서 공통유전자를 갖는 것들이다. FITC-표지된 항-인간 IgG 항체 단편을 이용하는 FACS에 의해 측정된 기하학적 평균 형광 세기는 NK 세포에 결합된 재조합 항체의 양에 따라 증가한다. 상기 분석에서 검출된 결합은 경쟁적인 Fc 감마 RIIIa-특이성 항체 단편의 이용에 의해 입증되는 바와 같이 Fc 감마 RIIIa 특이적이다(도 13 참조).

도 17은 (a) BHK-1502-28 (야생형) 및 (b) 클론 BHK-1502-28-11 (M2-GnTIII-글리코조작된) 안정한 키메릭 항-CD20 IgG1 항체-생tjd 세포주의 절두형 CD4(tCD4) 발현의 FACS 분석을 나타낸다. tCD4의 발현은 pETR1537 GnIII 발현 벡터내 IRES 요소에 의해 M2-GnTIII 발현에 작동가능하게 연결되어 있으며, 따라서 GnTIII 발현에 대한 간접적인 마커로 사용된다. 평균 및 기하학적 평균 형광 세기는 각각 글리코조작된 경우 27.6 및 19.9 였으며, 야생형 세포주의 경우 4.7 및 4.1이다.

도 18은 BHK-1502-28-11 세포주에 의해 생성된 M2-GnTIII-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체로부터 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포주, 항체 정제 및 올리고사카라이드 제조 및 분석은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재되어 있다.

도 19는 BHK-1502-28-11 세포주에 의해 생성된 M2-GnTIII-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체로부터 PNGaseF-방출 올리고사카라이드 및 EndoH에 의한 추가 분해에 의해 유도된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼이다. 세포주, 항체 정제 및 올리고사카라이드 제조 및 분석은 실시예 1의 재료 및 방법

부분에 기재되어 있다.

도 20은 NK 세포 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체에 대한 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 변형되지않은 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 결합을 나타낸다. 글리코조작된 항체의 글리코실화 프로필은 도 18 및 도 19에 나타냈다. 결합 분석은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재한 바와 같이 수행하였다. 표면 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포는 Fc 감마 RIIc 수용체를 생성하지 않는 것으로 공지된 유전형(즉, Fc 감마 RIIc 코딩 서열내에 프레임내 종결 코돈을 함유하는 유전자 변이체에 대한 동종 접합체)의 공여체로부터 분리하였다. FITC-표지된 항-인간 IgG 항체 단편을 이용하는 FACS에 의해 측정된 기하학적 평균 형광 세기는 NK 세포에 결합된 재조합 항체의 양에 따라 증가한다. 상기 분석에서 검출된 결합은 경쟁적인 Fc 감마 RIIIa-특이성 항체 단편의 이용에 의해 입증되는 바와 같이 Fc 감마 RIIIa 특이적이다(도 13 참조).

도 21은 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체 대 변형되지않은 재조합 항-CD20 키메릭 IgG1 항체의 보체-매개된 분해(CML)를 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 HEK293-EBNA 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 6에 나타냈으며, 변형되지않은 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 5에 나타냈다. 표적 세포(T)는 SKW6.4 인간 림프아구 세포였다. 분석을 위해 인간 보체를 사용하였다. 분해는 LDH 방출에 의해 측정하였다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다.

도 22는 인간 상피 성장 인자 수용체(EGFR)를 인식하는 재조합 키메릭 IgG1 "C225" 항체로부터 유도되고, HEK293-EBNA 세포에서 생성된 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼을 나타낸다. (a) 항체 발현 벡터 pURSI28로 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 변형되지않은 항체. (b) 항체 발현 벡터 pETRURSI28 및 GnTIII 발현 벡터 pETR1519로 동시 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 M2-GnTIII-글리코조작된 항체. 두 가지 항체 모두는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 이은, 버퍼를 인산염 완충 염수(PB S)를 교환하는 수퍼덱스200 매트릭스(아메르샴) 상에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 배양 배지로부터 정제하였다. 올리고사카라이드는 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 23은 "M2-GnTIII"-글리코조작된 재조합 항-EGFR 키메릭 IgG1 "C225" 항체 대 변형되지않은 재조합 항-EGFR 키메릭 IgG1 "C225" 항체의 항체-의존성 세포매개형 세포독성(ADCC)을 나타낸다. 두 가지 항체는 모두 HEK293-EBNA 세포에서 생성하였다. 글리코조작된 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 22b에 나타냈으며, 변형되지 않는 항체의 생성 및 글리코실화 프로필은 도 22a에 나타냈다. 표적 세포(T)는 A431 인간 판상 암종 세포(ECACC No. 85090402)였다. 이벡터 세포(E)는 새롭게 분리된 인간 PBMC였다. 25:1의 E:T 비는 최대 방출(항체 대신 세정제를 사용함) 및 자연 방출(항체 대신 배양 배지를 사용함) 대조군에 대한 락테이트 데하이드로게나제(LDH) 방출에 의해 세포독성을 측정하는 4-시간 항온처리 ADCC 분석에서 사용하였다. 분석법에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다.

도 24는 본 발명의 만노시다제 II-GnIII 융합 폴리펩티드의 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 25는 본 발명의 GnT-I-GnT-III 융합 폴리펩티드의 핵산 서열 및 아미노산 서열 각각을 나타낸다.

도 26은 항체 발현 벡터 pETR1520으로 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 변형되지않은 재조합 C2B8 항-CD20 키메릭 IgG1 항체("Cwt") 유래의 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼을 나타낸다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 5의 재료 및 방법 부분에 기재한 바와 같이 제조하고 분석하였다.

도 27은 항체 발현 벡터 pETR1520 및 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현 벡터(pETR1519)로 동시 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 글리코조작된 재조합 C2B8 항-CD20 키메릭 IgG1 항체("Cbtr") 유래의 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼을 나타낸다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 5의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분석하였다. (A) 추가의 효소 처리 없이 PNGaseF-방출 올리고사카라이드의 올리고사카라이드 프로필. (B) EndoH로 추가 분해한 PNGaseF-방출 올리고사카라이드의 올리고사카라이드 프로필.

도 28은 항체 발현 벡터 pETR1520, 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현 벡터(pETR1519) 및 만노시다제 II 폴리펩티드 발현 벡터(pCLF9)로 동시 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 글리코조작된 재조합 C2B8 항-CD20 키메릭 IgG1 항체("Cm") 유래의 중성 올리고사카라이드 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼을 나타낸다. 항체는 배양 배지로부터 정제하였으며, 올리고사카라이드는 실시예 5의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 제조하고 분

석하였다. (A) 추가의 효소 처리 없이 PNGaseF-방출 올리고사카라이드의 올리고사카라이드 프로필. (B) EndoH로 추가 분해한 PNGaseF-방출 올리고사카라이드의 올리고사카라이드 프로필.

도 29는 HEK293-EBNA 세포 내에서 Man II-GnTIII 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 글리코조작된 키메릭 항-CD20 항체에 의해 매개된 항체-의존성 세포매개형 세포독성(ADCC)을 나타내는데, 상기 GnTIII 촉매 도메인은 Man II 골지 편재 도메인에 의해 편재되며, 상기 Man II-GnTIII-코딩 핵산은 스스로 발현되거나(항체 Cbrt), 또는 Man II를 코딩하는 핵산(Cm)과 함께 항체 생성 세포에서 동시발현된다. Cwt는 항체 발현 벡터 pETR1520으로 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 변형되지않은 재조합 C2B8 항-CD20 키메릭 IgG1 항체("Cwt")이다. 분석에 대한 상세한 내용은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재하였다.

도 30은 HEK293-EBNA 세포 내에서 Man II-GnTIII 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 발현에 의해 글리코조작된 키메릭 항-CD20 항체의 Fc 감마 RIIIa 수용체 결합을 나타내는데, 이때 상기 GnTIII 촉매 도메인은 Man II 골지 편재 도메인에 의해 편재되며, 상기 Man II-GnTIII-코딩 핵산은 스스로 발현되거나(항체 Cbrt), 또는 Man II를 코딩하는 핵산(Cm)과 함께 항체 생성 세포에서 동시발현된다. Cwt는 항체 발현 벡터 pETR1520으로 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 변형되지않은 재조합 C2B8 항-CD20 키메릭 IgG1 항체("Cwt")이다. 결합 분석은 실시예 1의 재료 및 방법 부분에 기재된 바와 같이 수행하였다. 표면 상에서 Fc 감마 RIIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포는 Fc 감마 RIIc 수용체를 생성하지 않는 것으로 공지된 유전형(즉, Fc 감마 RIIc 코딩 서열내에 프레임 내 종결 코돈을 함유하는 유전자 변이체에 대한 동종접합체)의 공여체로부터 분리하였다. FITC-표지된 항-인간 IgG 항체 단편을 이용하는 FACS에 의해 측정된 기하학적 평균 형광 세기는 NK 세포에 결합된 재조합 항체의 양에 따라 증가한다. 상기 분석에서 검출된 결합은 경쟁적인 Fc 감마 RIIIa-특이성 항체 단편의 이용에 의해 입증되는 바와 같이 Fc 감마 RIIIa 특이적이다(도 13 참조).

도 31은 HEK293-EBNA 세포 내에서 Man II-GnTIII 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 글리코조작된 키메릭 항-CD20 항체의 보체 매개된 세포독성을 나타내는데, 이때 상기 GnTIII 촉매 도메인은 Man II 골지 편재 도메인에 의해 편재되며, 상기 Man II-GnTIII-코딩 핵산은 스스로 발현되거나(항체 Cbrt), 또는 Man II를 코딩하는 핵산(Cm)과 함께 항체 생성 세포에서 동시발현된다. Cwt는 항체 발현 벡터 pETR1520으로 트랜스펙션시킨 HEK293-EBNA 세포에서 생성된 변형되지않은 재조합 C2B8 항-CD20 키메릭 IgG1 항체("Cwt")이다.

도 32(A-C)는 발현 벡터 pCLF9(A), pETR1842(B) 및 pETR1843(C)을 나타낸다.

도 33(A 및 B)은 융합 단백질 Man II-GaIT(A) 및 GaIT(B)를 위한 발현 벡터를 나타낸다.

도 34는 상기 항체의 Fc 부분에 결합된 것으로 확인된 구조물의 상대적인 비율(백분율) 및  $\alpha$ -만노시다제 II의 존재 하에서 생성된 항-CD20 단일 클론 항체의 올리고사카라이드 프로필을 나타낸다.

도 35(A 및 B)는 상기 항체의 Fc 부분에 결합된 것으로 확인된 구조물의 상대적인 비율(백분율) 및 융합 단백질 Man II-GaIT의 존재 하에서 생성된 항-CD20 단일 클론 항체의 올리고사카라이드 프로필을 나타낸다. PNGaseF(A) 및 EndoH(B) 분해 후의 올리고사카라이드 프로필.

도 36은 야생형 항체보다 더 높은 친화도로 Fc  $\gamma$ RIIIA 수용체에 결합하는  $\alpha$ -만노시다제 II(Man II)의 존재 하에서 생성된 항체를 나타낸다.

도 37은 글리코조작된 키메릭 항-CD20

에 의해 매개된 항체 의존성 세포매개형 세포독성을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 본원에 사용한 용어들은 당업계에서 통용되는 용어이며, 달리 정의하지 않으면 다

[0048] 음과 같은 의미로 사용된 것이다.

[0049] 본원에 사용한 용어 "항체(antibody)"는 전체적인 항체 분자를 포괄하는 의미로 사용된 것이며, 단일 클론, 다중 클론 및 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 뿐 아니라 Fc 영역을 보유하는 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 대한 균등 영역을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

[0050] 본원에 사용한 용어 "Fc 영역(Fc region)"은 IgG 중쇄의 C-말단 영역을 의미한다. IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계는 약간 가변적임에도 불구하고, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 카르복실 말단에 대해 Cys226 위치의 아미노산으로부터 신장되는 것으로 정의한다.

[0051]

본원에 사용한 용어 면역글로불린의 Fc 영역의 균등 영역(region equivalent to the Fc region of an immunoglobulin)은 면역글로불린의 Fc 영역의 자연발생하는 대립유전자 변이체 뿐만 아니라 이팩터 기능(예를 들어, 항체 의존성 세포매개형 세포독성)을 매개하는 면역글로불린의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 치환, 부가 또는 결실을 일으키는 변경을 보유하는 변이체를 포함한다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 생물학적 기능의 실질적인 상실 없이 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실될 수 있다. 이러한 변이체는 활성에 대한 최소한의 효과를 보유하도록 당업계에 공지된 일반적인 방법으로 선택할 수 있다[참조: 예를 들어, Bowie, J. U. 등, *Science* 247: 1306-10 (1990)].

[0052]

본원에 사용한 용어 "β(1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성"을 보유하는 융합 단백질(a fusion polypeptide "having β(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III activity")은 N-결합된 올리고사카라이드의 트리만노실 코어의 β-결합된 만노사이드에 대한 β-1,4-결합에서 N-아세틸글루코스아민(GlcNAc) 잔기의 첨가를 촉진할 수 있는 융합 폴리펩티드를 의미한다. 이는 사용량(dose) 의존성의 존재 또는 부재 하에서 특정 생물학적 분석법으로 측정한 바와 같이, 국제 생화학 및 분자생물학 연맹의 목록 위원회(NC-IUBMB)에 따라 β-1,4-만노실-글리코단백질 4-베타-N-아세틸글루코스아미닐-트랜스퍼라제(EC 2.4.1.144)로도 공지된 β(1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 활성과 유사한(동일할 필요는 없음) 효소 활성을 나타내는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 사용량 의존성이 존재하는 경우, 사용량 의존성은 β(1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 사용량 의존성과 동일할 필요는 없고, 오히려 β(1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III와 비교하여 소정 활성에서의 사용량 의존성과 실질적으로 유사하다(즉, 후보 폴리펩티드는 β(1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III에 대해 더 큰 활성 또는 약 25배 이하의 활성, 바람직하게는 약 10배 이하의 활성, 가장 바람직하게는 3배 이하의 활성을 나타낼 것이다).

[0053]

본원에 사용한 용어 "β(1,4)-갈락토실트랜스퍼라제 활성" 또는 "GalT 활성"을 보유하는 융합 폴리펩티드(a fusion polypeptide "having β(1,4)-galactosyltransferase activity" or "having GalT activity")는 UDP 갈락토즈로부터 N-결합된 올리고사카라이드에서 확인된 비환원 말단 GlcNAc에 갈락토즈 잔기의 첨가를 촉진할 수 있는 융합 폴리펩티드를 의미한다. 이는 사용량 의존성의 존재 또는 부재 하에서 특정 생물학적 분석법으로 측정한 바와 같이, 국제 생화학 및 분자생물학 연맹의 목록 위원회(NC-IUBMB)에 따라 Gal:GlcNAc 이는 사용량(dose) 의존성의 존재 또는 부재 하에서 특정 생물학적 분석법으로 측정한 바와 같이, 국제 생화학 및 분자생물학 연맹의 목록 위원회(NC-IUBMB)에 따라 Gal:GlcNAc β-1,4-만노실-글리코단백질 4-베타-N-아세틸글루코스아미닐-트랜스퍼라제(EC 2.4.1.38)로도 공지된 β(1,4)-갈락토실트랜스퍼라제의 활성과 유사한(동일할 필요는 없음) 효소 활성을 나타내는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 사용량 의존성이 존재하는 경우, 사용량 의존성은 β(1,4)-갈락토실트랜스퍼라제 III의 사용량 의존성과 동일할 필요는 없고, 오히려 β(1,4)-갈락토실트랜스퍼라제 III와 비교하여 소정 활성에서의 사용량 의존성과 실질적으로 유사하다(즉, 후보 폴리펩티드는 β(1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III에 대해 더 큰 활성 또는 약 25배 이하의 활성, 바람직하게는 약 10배 이하의 활성, 가장 바람직하게는 3배 이하의 활성을 나타낼 것이다).

[0054]

본 발명의 참조용 뉴클레오티드 서열에 예를 들어 95% 이상 "동일한(identical)" 뉴클레오티드 서열을 보유하는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 참조용 뉴클레오티드 서열과 동일함을 의미하나, 상기 폴리뉴클레오티드가 각각 100개의 뉴클레오티드 당 5개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있는 경우는 제외한다. 환연하면, 참조용 뉴클레오티드 서열에 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 보유하는 폴리뉴클레오티드를 얻기 위해, 참조용 서열의 뉴클레오티드의 5% 이하는 결실되거나, 또는 다른 서열로 치환될 수 있거나, 또는 참조용 서열에서 총 뉴클레오티드 중 5% 이하의 다수의 뉴클레오티드가 참조용 서열 내로 삽입될 수 있다. 의문 서열(query sequence)은 도 24 또는 도 25에 나타낸 전체 서열일 수 있다.

[0055]

실질적인 문제로서, 임의의 특정 핵산 분자 또는 폴리펩티드가 본 발명의 뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩티드 서열에 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한지 여부는 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 통상적으로 결정할 수 있다. 의문 서열(본 발명의 서열)과 전체적인 서열 정렬로도 칭하는 대상 서열 사이의 최적의 전체적인 매치를 결정하기 위한 바람직한 방법은 Brutlag 등, *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990)의 알고리즘에 기초한 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정할 수 있다. 서열 정렬에서, 의문 서열 및 대상 서열은 둘 다 DNA 서열이다. RNA 서열은 U를 T로 전환함으로써 비교할 수 있다. 상기 전체적인 서열 정렬의 결과는 동일성(%)으로 나타낸다. 동일성(%)을 계산하기 위해 DNA 서열의 FASTDB 정렬에서 사용한 바람직한 파라미터는 다음과 같다: 매트릭스(Matrix) = Unitary, k-tuple = 4, 미스매치 패널티(Mismatch Penalty) = 1, 조이닝 패널티(Joining Penalty) = 30, 무작위화 그룹 길이(Randomization Group Length) = 0, 컷오프 스코어(Cutoff Score) = 1, 갭 패널티(Gap Penalty) = 5, 갭 사이즈 패널티(Gap Size Penalty) = 0.05, 윈도우 크기(Window

Size) = 500 또는 대상 서열의 길이(어느 한쪽은 더 짧다).

[0056] 내부 결실이 아니라 5' 또는 3' 결실로 인해 의문 서열보다 대상 서열이 더 짧은 경우, 결과에 대한 수작업 수정이 이루어져야만 한다. 그 이유는 FASTDB 프로그램은 동일성(%)을 계산할 때 대상 서열의 5' 및 3' 절단을 설명하지 않기 때문이다. 의문 서열에 비해 5' 또는 3' 단부에서 절단된 대상 서열에 있어서, 동일성(%)은 의문 서열의 총 염기의 백분율로서 매칭/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 및 3'에 존재하는 의문 서열의 염기의 수를 계산함으로써 정정한다. 뉴클레오티드가 매칭/정렬되는지 여부는 FASTDB 서열 정렬의 결과에 의해 결정된다. 이어서, 이 백분율은 동일성(%)으로부터 감하고, 특정 파라미터를 이용하는 상기 FASTDB 프로그램으로 계산하여 최종 동일성(%) 스코어를 얻을 수 있다. 이 정정된 스코어는 본 발명의 목적을 위해 사용된 것이다. FASTDB 정렬에 의해 나타난 바와 같이, 의문 서열과 매치/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 및 3' 염기 이외의 염기만이 동일성(%) 스코어를 수작업으로 조정하는 목적을 위해 계산된다.

[0057] 예를 들어, 90개 염기의 대상 서열을 100개 염기의 의문 서열에 정렬시켜 동일성(%)을 결정한다. 결실은 대상 서열의 5' 단부에서 일어나며, 따라서 FASTDB 정렬은 5' 단부에서 최초 10개의 염기의 매치/정렬을 나타내지 않는다. 10개의 쌍을 이루지 않은 염기들은 상기 서열의 10%(5' 및 3' 단부에서 매칭되지 않은 염기의 수/의문 서열의 염기의 총 수)를 나타내며, 따라서 10%는 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 동일성(%) 스코어로부터 감한다. 남아있는 90개의 염기가 완벽하게 매칭되는 경우, 최종 동일성(%)은 90%가 된다. 다른 예에서, 90개 염기의 대상 서열을 100개 염기의 의문 서열과 비교한다. 이때, 결실은 내부 결실이며, 따라서 의문 서열에 매치/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 또는 3' 상에 염기는 존재하지 않는다. 이 경우, FASTDB에 의해 계산된 동일성(%)은 수작업으로 정정하지 않는다. 다시 한번, 의문 서열에 매치/정렬되지 않은 대상 서열의 단지 5' 및 3' 염기만 수작업으로 정정한다. 본 발명의 목적을 위해 다른 수작업 정정은 수행하지 않는다.

[0058] 본 발명의 의문 아미노산 서열에, 예를 들어 95% 이상 "동일한" 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드란, 대상(subject) 폴리펩티드의 아미노산 서열이, 대상 폴리펩티드 서열이 의문 아미노산 서열의 각 100개 아미노산당 5개 이하의 아미노산 변경을 포함할 수 있는 것을 제외하고는 의문 서열과 동일하다는 것을 의미한다. 다시 말해서, 의문 아미노산 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 얻기 위해서는, 대상 서열 내의 아미노산 잔기의 최대 5%가 삽입되거나 결실되거나 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 기준 서열의 이러한 변경은 기준 아미노산 서열의 아미노 말단 위치 또는 카르복시 말단 위치에서 또는 상기 양 말단 위치 사이의 어느 곳에서나 일어날 수 있으며, 기준 서열 내의 잔기들 사이에 개별적으로 또는 기준 서열 내의 하나 이상의 인접 기들로 산재될 수 있다.

[0059] 실제로, 임의의 특정 폴리펩티드가 기준 폴리펩티드와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 지는 공지된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적인 방식으로 결정할 수 있다. 의문 서열(본 발명의 서열)과 대상 서열 간의 최적의 전반적 매치를 결정하는 바람직한 방법, 글로벌 서열 정렬이라고도 불리는 이 방법은 문헌[Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)]의 알고리즘에 기초하여 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정할 수 있다. 서열 정렬에서 의문 서열과 대상 서열은 양 뉴클레오티드 서열 또는 양 아미노산 서열이 된다. 상기 글로벌 서열 정렬의 결과는 퍼센트 동일성으로 표시된다. FASTDB 아미노산 정렬에서 사용되는 바람직한 파라미터는 다음과 같다: 매트릭스 = PAM 0, k-터플 = 2, 미스매치 패널티 = 1, 접합 패널티 = 20, 무작위화 그룹 길이 = 0, 컷오프 점수 = 1, 윈도우 크기 = 서열 길이, 캡 패널티 = 5, 캡 크기 패널티 = 0.05, 윈도우 크기 = 500 또는 대상 아미노산 서열의 길이 중 더 짧은 것.

[0060] 내부 결실에 의한 것이 아니라 N-말단 또는 C-말단 결실로 인하여 대상 서열이 의문 서열보다 더 짧다면, 결과를 수작업으로 보정해야 한다. 이는 FASTDB 프로그램이 전체 퍼센트 동일성을 계산할 때 대상 서열의 N-말단 및 C-말단 절두를 고려하지 못하기 때문이다. 의문 서열에 대하여, N-말단 및 C-말단에서 절두된 대상 서열의 경우, 퍼센트 동일성은 의문 서열의 총 염기의 백분율로서, 상응하는 대상 잔기와 매치/정렬되지 않는, 대상 서열의 N-말단 및 C-말단인 의문 서열의 잔기의 수를 계산하여 보정한다. 잔기가 매치/정렬되는 지는 FASTDB 서열 정렬의 결과에 의해 결정한다. 그 후 이 백분율을 특정 파라미터를 사용하여 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산한 퍼센트 동일성으로부터 감하여 최종 퍼센트 동일성 점수를 얻는다. 이러한 최종 퍼센트 동일성 점수는 본 발명의 목적을 위해 사용되는 점수이다. 의문 서열과 매치/정렬되지 않는, 대상 서열의 N-말단 및 C-말단 쪽 잔기만이 퍼센트 동일성 점수를 수작업으로 조정하는 목적에 고려된다. 즉, 단지 의문 잔기만이 대상 서열의 가장 먼 N-말단 및 C-말단 잔기 바깥에 위치한다.

[0061] 퍼센트 동일성을 결정하기 위해, 예를 들어 90개 아미노산 잔기의 대상 서열을 100개 잔기의 의문 서열과 정렬 시킨다. 결실은 대상 서열의 N-말단에서 발생하며, 따라서 FASTDB 정렬은 N-말단의 처음 10개 잔기의 매칭/정렬

은 나타내지 않는다. 10개의 부정합 잔기가 서열의 10%(매치되지 않는 N-말단 및 C-말단에서의 잔기의 수/의문서열 내의 총 잔기의 수)를 나타내기 때문에, FASTDB 프로그램에 의해 계산된 퍼센트 동일성 점수로부터 10%를 감한다. 남아있는 90개의 잔기가 완전히 매치될 경우, 최종 퍼센트 동일성은 90%가 될 것이다. 또 다른 예로서, 90개 잔기의 대상 서열을 100개 잔기의 의문 서열과 비교한다. 이때 결실은 내부 결실이며, 따라서 대상 서열의 N-말단 또는 C-말단에는 의문 서열과 매치/정렬되지 않는 잔기가 존재하지 않는다. 이 경우, FASTDB에 의해 계산된 퍼센트 동일성은 수작업으로 보정하지 않는다. 다시 한번, 의문 서열과 매치/정렬되지 않는, FASTDB 정렬에서 나타난 바와 같이, 대상 서열의 N-말단 및 C-말단 바깥에 위치하는 잔기만을 수작업으로 보정한다. 본 발명의 목적상 다른 어떠한 수작업 보정도 행하지 않는다.

[0062] 본원에서 사용되는, 본 발명의 핵산 서열에 "엄격한 조건 하에 하이브리드화하는" 핵산이란 50% 포름알데히드, 5x SSC(750 mM NaCl, 75 mM 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 7.6), 5x 텐하르트 용액, 10% 텍스트란 설레이트 및 20  $\mu$ g/ml 변성 전단 엔터 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 42°C에서 밤새 항온처리한 후 약 65°C 0.1x SSC에서 필터를 세척한 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0063] 본원에서 사용되는 골지 편재 도메인이란 용어는 골지 복합체 내에 위치하도록 고정시키는 역할을 하는 골지 주제 폴리펩티드의 아미노산 서열을 의미한다. 일반적으로 편재 도메인은 효소의 아미노 말단 "테일(tail)"을 포함한다.

[0064] 본원에서 사용되는 "이펙터 기능"이란 용어는 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변형체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 의미한다. 항체 이펙터 기능의 예로는 Fc 수용체 결합 친화력, 항체 의존성 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 식작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체 매개 항원 흡수, 세포 표면 수용체의 하향 조절 등을 포함하나 이에 국한되는 것은 아니다.

[0065] 본원에서 사용되는 "조작하다(engineer)", "조작된(engineered)", "조작하는(engineering)" 및 "글리코실화 조작(glycosylation engineering)"이란 용어는 자연 발생 폴리펩티드 또는 이의 단편의 글리코실화 패턴을 임의로 조작하는 것을 포함하는 것으로 간주된다. 글리코실화 조작은 세포 내에서 발현된 당단백의문 글리코실화를 변경시키기 위한, 올리고사카라이드 합성 경로의 유전자 조작을 비롯하여 세포의 글리코실화 소기관의 대사적 조작을 포함한다. 또한, 글리코실화 조작은 글리코실화에 대한 돌연변이 및 세포 환경의 영향을 포함한다.

[0066] 본원에서 사용되는 "숙주 세포"란 용어는 항체, 항체 단편 및 융합 단백질을 비롯하여 단백질, 단백질 단편, 또는 소정의 웨티드의 변형된 당형태를 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 유형의 세포계를 포함한다. 일반적으로, 숙주 세포는 최적화된 수준의 GnT III를 발현하도록 조작된다. 숙주 세포는 배양된 세포, 몇 가지 예를 들면 포유동물의 배양된 세포, 예컨대 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및 식물 세포를 포함하나, 형질전환 동물, 형질전환 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포 역시 포함한다.

[0067] 본원에서 사용되는 "Fc-매개 세포매개형 세포독성"이란 용어는 인간 Fc 영역을 포함하는 가용성 Fc-융합 단백질에 의해 매개되는 세포독성 및 항체 의존성 세포독성을 포함한다. 이것은 "인간 면역 이펙터 세포"에 의한 "항체 표적화된 세포"의 용해를 초래하는 면역 메카니즘이다.

[0068] "인간 면역 이펙터 세포"는 그 표면 상에 Fc 수용체를 디스플레이하는 백혈구의 집단으로서, 이를 세포는 상기 수용체를 통해 항체 또는 Fc-융합 단백의문 Fc 영역에 결합하여 이펙터 기능을 수행한다. 그러한 집단은 비제한적으로 말초혈 단핵구(PMBC) 및/또는 자연 킬러(NK) 세포를 포함할 수 있다.

[0069] "항체 표적화된 세포"란 항체 또는 Fc-융합 단백질에 의해 결합된 세포이다. 항체 또는 Fc-융합 단백질은 Fc 영역의 N-말단 단백질 부분을 통해 표적 세포에 결합한다.

[0070] 본원에서 사용되는 "증가된 Fc-매개 세포매개형 세포독성"이란 용어는 상기에 정의된 Fc-매개 세포매개형 세포독성의 메카니즘에 의해, 표적 세포를 둘러싸는 매질 내에서 주어진 시간 내에 주어진 항체 또는 Fc-융합 단백질 농도에서 용해되는 "항체 표적화된 세포" 수의 증가, 및/또는 Fc-매개 세포매개형 세포독성의 메카니즘에 의해 주어진 시간 내에 주어진 수의 "항체 표적화된 세포"를 용해시키는 데 필요한, 표적 세포를 둘러싼 매질 내에서의 항체 또는 Fc-융합 단백의문 농도의 감소로서 정의된다. Fc-매개 세포매개형 세포독성의 증가는, 당분야에 공지된 동일한 표준 제법, 정제법, 제형화법 및 저장법을 이용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생성되나, 본원에서 기술하는 방법에 의해 글리코실트랜스퍼라제 GnTIII를 발현하도록 조작된 숙주 세포에 의해서는 생성되지 않는, 동일한 항체 또는 Fc-융합 단백질에 의해 매개되는 세포독성에 상대적인 것이다.

[0071] "증가된 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 갖는 항체"란 당분야에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 결정되는 바

와 같은 증가된 ADCC를 갖는 항체를 의미한다. 한 가지 허용되는 시험관내 ADCC 분석은 다음과 같다:

[0072] 1) 상기 분석은 항체의 항원 결합 영역에 의해 인식되는 표적 항원을 발현하는 것으로 알려진 표적 세포를 이용한다.

[0073] 2) 상기 분석은 무작위로 선택된 건강한 공여체의 혈액으로부터 분리된 인간 말초혈 단핵구(PBMC)를 이펙터 세포로서 사용한다.

[0074] 3) 상기 분석은 하기 프로토콜에 따라 수행된다:

[0075] i) 표준 밀도 원심분리법을 이용하여 PBMC를 분리하여 RPMI 세포 배양 배지에서  $5 \times 10^6$  세포/ml로 혼탁시킨다.

[0076] ii) 표준 조직 배양법에 의해 표적 세포를 배양하고, 90% 이상의 생존율을 갖는 지수 성장 단계로부터 세포를 회수하고, RPMI 세포 배양 배지로 세척하고, 100 마이크로 큐리의  $^{51}\text{Cr}$ 로 표지화하고, 세포 배양 배지로 2회 세척하고,  $10^5$  세포/ml의 밀도로 세포 배양 배지에 재현탁시킨다.

[0077] iii) 상기 최종 표적 세포 혼탁액  $100 \mu\text{l}$ 을 96웰 미량적정 평판의 각 웰로 이전한다.

[0078] iv) 항체를 세포 배양 배지에  $4000 \text{ ng/ml} \sim 0.04 \text{ ng/ml}$ 로 연속 희석시키고, 생성된 항체 용액  $50 \mu\text{l}$ 을 96웰 미량적정 평판 내의 표적 세포에 첨가하여 상기 전체 농도 범위를 포함하는 다양한 항체 농도에서 삼중으로 테스트한다.

[0079] v) 최대 방출(MR) 대조군의 경우, 표지화된 표적 세포를 포함하는 평판 내의 3개의 추가 웰에 항체 용액(상기 iv번) 대신에 비이온성 세제(Nonidet, Sigma, St. Louis)의 2%(V/V) 수용액을 첨가한다.

[0080] vi) 자발 방출(SR) 대조군의 경우, 표지화된 표적 세포를 함유하는 평판 내의 3개의 추가 웰에 항체 용액(상기 iv번) 대신에 RPMI 세포 배양 배지  $50 \mu\text{l}$ 을 첨가한다.

[0081] vii) 이어서 96웰 미량적정 평판을  $50 \times \text{g}$ 에서 1분간 원심분리하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 1 시간 동안 항온처리한다.

[0082] viii) 이펙터:표적 세포의 비가 25:1이 되도록, PBMC 혼탁액(상기 i번)  $50 \mu\text{l}$ 을 각 웰에 첨가하고, 평판을  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  대기 하의 항온처리기에 4 시간 동안 넣어 둔다.

[0083] ix) 각 웰로부터 무세포 상청액을 회수하고, 감마 카운터를 사용하여 실험적으로 방출된 방사능 활성(ER)을 정량한다.

[0084] x) 식  $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$ 에 따라 각 항체 농도에 대하여 특이적 용해의 백분율을 계산한다. 상기 식에서 ER은 해당 항체 농도에 대하여 정량된 평균 방사능 활성(상기 ix번 참조)이고, MR은 MR 대조군(상기 v번 참조)에 대하여 정량된 평균 방사능 활성(상기 ix번 참조)이고, SR은 SR 대조군(vi번 참조)에 대하여 정량된 평균 방사능 활성(상기 ix번 참조)이다.

[0085] 4) "증가된 ADCC"는 상기 테스트된 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특이적 용해의 최대 백분율에 있어서의 증가, 및/또는 상기 테스트된 항체 농도 범위 내에서 관찰된 특이적 용해의 최대 백분율의  $1/2$ 에 도달하는 데 요구되는 항체의 농도에 있어서의 감소로서 정의된다. ADCC의 증가는 상기 분석에 의해 측정 시, 당분야에 공지된 동일한 표준 제법, 정제법, 제형화법 및 저장법을 이용하여 동일 유형의 숙주 세포에 의해 생성되나, 글리코실트랜스퍼라제 GnTIII를 과발현하도록 조작된 숙주 세포에 의해서는 생성되지 않는, 동일한 항체에 의해 매개되는 ADCC에 상대적인 것이다.

[0086] 본원에서 사용되는 "항-CD20 항체"란 용어는 통상적으로 인간 B 럼프구 제한 분화 항원 Bp35(흔히 CD20이라 불림)로서 명명되는, 35,000 달톤의 세포 표면 비글리코실화된 인단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 의미한다.

[0087] 본 발명은  $\beta(1,4)-\text{N}-\text{아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III}(GnTIII)$  활성 또는 대안으로  $\beta(1,4)-\text{갈락토실트랜스퍼라제}(GalT)$  활성을 보유하고 골지 주체 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 신규한 융합 폴리펩티드를 발현하도록 항체 생성 세포를 조작하면, 증가된 Fc 수용체 결합 친화력 및 증가된 이펙터 기능을 갖는 항체가 생성된다는 발견에 기초한 것이다. 대안으로, 증가된 이펙터 기능 및/또는 증가된 Fc 수용체 결합능을 갖는 항체는  $\alpha$ -만노시다제 II 촉매 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 발현을 증가시키도록 항체 생성 세포를 조작함으로써 얻을 수 있다. 바람직한 구체예에서, GnTIII 또는 GalT 활성을 갖는 융합 구성체를

Man II 또는 GnTII를 코딩하는 핵산 분자와 동시에 발현시킬 수 있다.

[0088] 따라서 본 발명의 한 구체예는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산에 관한 것으로, 상기 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII) 활성을 보유하며 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 융합 단백질은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함하고, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II의 편재 도메인이다. 또 다른 구체예에서 골지 편재 도메인은 GaIT의 편재 도메인이다.

[0089] 바람직하게는, 단리 핵산은 도 24 및 서열 번호 14에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함하고, 골지 편재 도메인은  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I(GnTI)의 편재 도메인이다. 바람직하게는, 핵산은 도 25 및 서열 번호 12에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 선택적으로, 또 다른 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인이 사용될 수 있다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 골지 편재 도메인은  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인, 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0090] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 도 24 및 서열 번호 15 또는 도 25 및 서열 번호 13에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 염격한 조건 하에 도 24 및 서열 번호 14 또는 도 25 및 서열 번호 12에 나타낸 뉴클레오티드 서열로 이루어진 뉴클레오티드 서열의 하이브리드화 프로브에 하이브리드화하는 서열을 포함하는 단리 핵산을 포함한다. 본 발명은 또한 도 24 및 서열 번호 14 또는 도 25 및 서열 번호 12에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 단리 핵산에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 도 24 및 서열 번호 15 또는 도 25 및 서열 번호 13의 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산에 관한 것이다. 본 발명은 또한 보존적 아미노산 치환을 갖는, 도 24 및 서열 번호 15 또는 도 25 및 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리 핵산을 포함한다.

[0091] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 전술한 바와 같은 본 발명의 단리 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0092] 또 다른 구체예에서, 본 발명은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을, 또는 대안으로  $\beta(1,4)$ -N-갈락토실트랜스퍼라제("GaIT") 활성을 보유하고, 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함한다. 특히 바람직한 구체예에서, 융합 단백질은 만노스 II 또는  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I(GnTI)의 골지 편재 도메인을 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 골지 편재 도메인은 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인 및  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다. 본 발명의 융합 폴리펩티드는 상기 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 발현을 가능하게 하는 조건 하에 배지에서 본 발명의 숙주 세포를 배양하고, 생성된 배양물로부터 상기 융합 폴리펩티드를 회수하는 것에 의해 제조할 수 있다.

[0093] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 또는 벡터를 숙주 세포로 도입하는 것을 포함하는, 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드의 글리코실화 프로필을 변경시키는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 변경된 폴리펩티드는 IgG, 또는 Fc 영역을 포함하는 이의 단편이다. 가장 바람직하게는, 폴리펩티드는 IgG1, 또는 Fc 영역을 포함하는 이의 단편이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 변경된 폴리펩티드는 인간 IgG의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질이다.

[0094] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 및 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 한 구체예에서, 본 발명은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을, 또는 대안으로  $\beta(1,4)$ -N-갈락토실트랜스퍼라제("GaIT") 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을, 상기 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변경시키기에 충분한 양으로 발현시키도록 조작된 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편, 및 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직한 구체예에서, 상기 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드는 IgG 또는 이의 단편이다. 가장 바람직하게는, 상기 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드는 IgG1 또는 이의 단편이다. 선택적으로, 상기 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드는 인간 IgG(예, IgG1)의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질이다.

[0095]

본 발명의 숙주 세포에 의해 생성된 변경된 폴리펩티드는 변경으로 인하여 증가된 Fc 수용체 결합 친화력 및/또는 증가된 이펙터 기능을 나타낸다. 바람직하게는, 증가된 Fc 수용체 결합 친화력은 Fc γRIIa 수용체와 같은 Fc γ 활성화 수용체에 대한 증가된 결합이다. 증가된 이펙터 기능은 바람직하게는 다음 중 하나 이상의 증가이다: 증가된 항체 의존성 세포독성, 증가된 항체 의존성 세포 식작용(ADCP), 증가된 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 증가된 면역복합체 매개 항원 흡수, 증가된 Fc-매개 세포매개형 세포독성, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 다형핵 세포(PMN)에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 표적 결합된 항체의 증가된 교차결합, 아톱토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 증가된 수지상 세포 성숙 및 증가된 T 세포 프라이밍.

[0096]

특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 숙주 세포는 CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포이며, 상기 숙주 세포에 의해 생성된 폴리펩티드는 IDEC-C2B8과 같은 항-CD20 항체이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 키메라 항-인간 EGFR 모노클로날 항체 C225이다.

[0097]

본 발명의 숙주 세포는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 것 이외에도 항체 분자, 기능성 Fc 영역을 보유하는 항체 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 하나 이상의 절단된(transected) 핵산을 더 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 하나 이상의 절단된 핵산은 항-CD20 항체, 키메라 항-인간 신경모세포종 모노클로날 항체 chCE7, 키메라 항-인간 신세포 암종 모노클로날 항체 chG250, 키메라 항-인간 결장, 폐 및 유방 암종 모노클로날 항체 ING-1, 인간화된 항-인간 17-1A 항원 모노클로날 항체 3622W94, 인간화된 항-인간 결장직장 종양 항체 A33, GD3 강글리오사이드 R24에 대해 유도된 항-인간 흑색종 항체, 키메라 항-인간 편평상피세포 암종 모노클로날 항체 SF-25, 항-인간 EGFR 항체, 항-인간 EGFRvIII 항체, 항-인간 PSMA 항체, 항-인간 PSCA 항체, 항-인간 CD22 항체, 항-인간 CD30 항체, 항-TAG72 항체, 항-고분자량 흑색종 관련 항원(HMWMAA) 항체, 항-GD3 강글리오사이드 항체, 항-GD2 강글리오사이드 항체, 항-GM2 강글리오사이드 항체, 항-인간 강글리오사이드 항체, 항-EGFRvIII 항체, 항-인테그린 항체, 항-CD80 항체, 항-LeY 항체, 항-뮤신 항체, 항-MUC18 항체, 항-인간 CD33 항체, 항-인간 CD38 항체, 항-인간 CD40 항체, 항-인간 CD45 항체, 항-인간 CD52 항체, 항-인간 CD138 항체, 항-인간 HLA-DR 변형체 항체, 항-인간 EpCAM 항체, 항-인간 CEA 항체, 항-인간 MUC1 항체, 항-인간 MUT 1 코어 단백질 항체, 항-인간 비정상 글리코실화 MUC1 항체, ED-B 도메인을 포함하는 인간 피브로네틴 변형체에 대한 항체, 또는 항-인간 HER2/neu 항체를 코딩한다.

[0098]

본 발명은 또한 (a)  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III 활성을, 또는 대안으로  $\beta(1,4)$ -N-갈락토실트랜스퍼라제("GalT") 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를, 전체 항체 분자, 기능성 Fc 영역을 보유하는 항체 단편, 및 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 폴리펩티드의 생성을 허용하는 조건 하에 배양하는 단계로서, GnTIII 활성을 갖는 상기 융합 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 생성된 상기 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드를 변경시키기에 충분한 양으로 발현되는 것인 단계 및 (b) 상기 폴리펩티드를 분리하는 단계를 포함하는, 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생성하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 융합 단백질은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III의 촉매 도메인을 포함한다. 특히 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 더 포함한다. 바람직하게는, 골지 편재 도메인은 만노시다제 II 또는  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I(GnTI)의 편재 도메인이다. 대안으로, 골지 편재 도메인은 만노시다제 I의 편재 도메인,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II의 편재 도메인 및  $\alpha 1-6$  코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인으로 이루어진 군에서 선택된다. 본 발명의 방법에 의해 생성된 폴리펩티드는 증가된 Fc 수용체 결합 친화력 및/또는 증가된 이펙터 기능을 갖는다. 바람직하게는, 증가된 이펙터 기능은 다음 중 하나 이상이다: 증가된 Fc-매개 세포매개형 세포독성(증가된 항체 의존성 세포독성을 포함함), 증가된 항체 의존성 세포 식작용(ADCP), 증가된 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 증가된 면역복합체 매개 항원 흡수, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다형핵 세포에 대한 증가된 결합, 아톱토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 표적 결합된 항체의 증가된 교차결합, 증가된 수지상 세포 성숙 또는 증가된 T 세포 프라이밍. 증가된 Fc 수용체 결합 친화력은 바람직하게는 Fc γRIIa와 같은 Fc 활성화 수용체에 대한 증가된 결합이다.

[0099]

또 다른 구체예에서, 본 발명은 폴리펩티드의 Fc 영역 내에 증가된 비율의 이등분된 올리고사카라이드를 갖는, 본 발명의 방법에 의해 생성된 폴리펩티드에 관한 것이다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 폴리펩티드는 상기 변경으로 인하여 Fc 영역 내에 증가된 비율의 비푸코실화 올리고사카라이드를 갖는다. 비푸코실화 올리고사카라이드는 하이브리드 또는 복합체 유형일 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 숙

주 세포 및 방법에 의해 생성된 폴리펩티드는 Fc 영역 내에 증가된 비율의 이등분 및 비푸코실화된 올리고사카라이드를 갖는다. 이등분 및 비푸코실화된 올리고사카라이드는 하이브리드 또는 복합체일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 방법은 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드의 15% 이상, 보다 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 25% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 35% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 보다 바람직하게는 45% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 55% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 65% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상이 비푸코실화된 폴리펩티드를 생성하는 데 이용될 수 있다. 본 발명의 방법은 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드의 15% 이상, 보다 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 25% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 35% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 보다 바람직하게는 45% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 55% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 65% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상이 이등분된 폴리펩티드를 생성하는 데 이용될 수 있다. 또한 본 발명의 방법은 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드의 15% 이상, 보다 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 25% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 35% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 보다 바람직하게는 45% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 55% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 65% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상이 이등분되고 비푸코실화된 폴리펩티드를 생성하는 데 이용될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 폴리펩티드의 Fc 영역 내의 올리고사카라이드의 15% 이상, 보다 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 25% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 35% 이상이 이등분된 하이브리드 비푸코실화된 것인 폴리펩티드를 생성하는 데 이용될 수 있다.

[0100] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된, 증가된 이펙터 기능 및/또는 증가된 Fc 수용체 결합 친화력을 갖도록 조작된 항체에 관한 것이다. 바람직하게는, 증가된 이펙터 기능은 다음 중 하나 이상이다: 증가된 Fc-매개 세포매개형 세포독성(증가된 항체 의존성 세포독성을 포함함), 증가된 항체 의존성 세포 식작용(ADCP), 증가된 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 증가된 면역복합체 매개 항원 흡수, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 다형핵 세포에 대한 증가된 결합, 아폽토시스를 유도하는 증가된 직접 신호전달, 표적 결합된 항체의 증가된 교차결합, 증가된 수지상 세포 성숙 또는 증가된 T 세포 프라이밍. 바람직한 구체예에서, 증가된 Fc 수용체 결합 친화력은 Fc 활성화 수용체, 가장 바람직하게는 Fc $\gamma$ RIIIa에 대한 증가된 결합이다. 본 발명은 또한 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 융합 단백질 및 Fc 영역을 포함하는 항체 단편에 관한 것이다. 그러한 항체 단편 및 융합 단백질은 증가된 Fc 수용체 결합 친화력 및/또는 증가된 이펙터 기능을 나타낸다.

[0101] 본 발명은 또한 항체, Fc 영역을 보유하는 항체 단편, 및 본 발명의 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 갖는 융합 단백질과 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0102] 본 발명은 또한 암 치료 방법에 있어서의 상기한 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 본 발명의 약학 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

[0103] 본 발명은 또한  $\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III(GnT III) 활성을 보유하고 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터; 및 만노시다제 II(Man II) 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 만노시다제 II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 동일한 또는 별개의 발현 벡터 상에 존재한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 GnT III의 촉매 도메인을 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 골지 편재 도메인은 Man II,  $\beta$ (1,2)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I,  $\beta$ (1,2)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II, 만노시다제 I 또는 a 1,6-N 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및 식물 세포로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직하게는, 숙주 세포는 CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세

포, 또는 하이브리도마 세포이다.

[0104] 본 발명은 또한  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III(GnT III) 활성을 보유하고 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터; 만노시다제 II(Man II) 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터; 및  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II(GnT II) 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자, Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 GnT II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 동일한 또는 별개의 발현 벡터 상에 존재한다. 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 하나의 발현 벡터 상에 존재하고, Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자와 GnT II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 동일한 발현 벡터 상에 존재하는 것 역시 바람직하다. Man II를 코딩하는 핵산 분자가 하나의 발현 벡터 상에 존재하고, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자와 GnT II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 동일한 발현 벡터 상에 존재하는 것 역시 바람직하다. 또 다른 구체예에서, GnT II가 하나의 발현 벡터 상에 존재하고, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자와 Man II 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 동일한 발현 벡터 상에 존재한다.

[0105] 추가 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제(GaIT) 활성을 가지고 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하며; 또한 본 발명은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 만노시다제 II(Man II) 활성을 가진다. 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 만노시다제 II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 동일한 발현 벡터 또는 별도의 발현 벡터 상에 존재한다. 바람직하게, 융합 폴리펩티드는 GaIT의 촉매 도메인을 포함한다. 추가 구체예에서, 골지 편재 도메인은 Man II,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II, 만노시다제 I 또는  $\alpha$ 1,6-코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인이다. 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 식물 세포로 구성된 군에서 선택한다. 바람직하게, 숙주 세포는 CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포, 또는 하이브리도마 세포이다.

[0106] 추가 측면에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 융합 폴리펩티드는  $\beta(1,4)$ -갈락토실트랜스퍼라제(GaIT) 활성을 가지고 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하며; 또한 본 발명은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 만노시다제 II(Man II) 활성을 가지며; 또한 본 발명은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II(GnT II) 활성을 가진다. 바람직하게, 각 핵산은 동일한 발현 벡터 상에 존재한다. 별도의 구체예에서, 각 핵산 분자는 별도의 벡터 상에 존재한다. 본 발명은 또한 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 하나의 발현 벡터 상에 존재하고, Man II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 GnT II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 동일한 발현 벡터 상에 존재함을 제공한다. 본 발명은 또한 Man II를 코딩하는 핵산 분자가 하나의 발현 벡터 상에 존재하고, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 GnT II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 동일한 발현 벡터 상에 존재하고, 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 Man II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 동일한 발현 벡터 상에 있음을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 GaIT의 촉매 도메인을 포함한다. 더 바람직한 구체예에서, 골지 편재 도메인은 Man II,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 II, 만노시다제 I 또는  $\alpha$ 1,6-N 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인이다.

[0107] 본 발명은 또한 GnTIII 활성을 가지는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 Man II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산이 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성되는 군에서 선택된다.

[0108] 본 발명은 또한 GnTIII 활성을 가지는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산, Man II를 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 GnT II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산이 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 유전자 조

작된 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성되는 군에서 선택된다.

[0109] 본 발명은 GaIT 활성을 가지는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 ManII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산이 숙주 세포에 의해 생산되는 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 추가로 제공하며, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성되는 군에서 선택된다.

[0110] 별도의 구체예에서, 본 발명은 또한 GaIT 활성을 가지는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산, ManII 를 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 GnTII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산이 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드는 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성된 군에서 선택된다. 바람직하게, 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드는 변형의 결과로서 증가된 Fc 수용체 결합 친화력을 나타낸다. 추가 바람직한 구체예에서, 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드는 변형의 결과로서 증가된 효과기 기능을 나타낸다. 바람직하게 증가된 효과기 기능은 증가된 Fc-매개성 세포의 세포독성, NK 세포에 대한 증가된 결합, 대식세포에 대한 증가된 결합, 다행핵 세포에 대한 증가된 결합, 단핵구에 대한 증가된 결합, 아폽토시스(apoptosis)를 유도하는 증가된 직접 신호, 증가된 수상돌기 세포 성숙, 및/또는 증가된 T 세포 프라이밍(priming) 중 하나 이상이다.

[0111] 추가 구체예에서, 본 발명은 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성된 군에서 선택된 폴리펩티드의 생산을 허용하는 조건 하에서, GnTIII 활성을 가지는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 ManII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 폴리펩티드를 분리하는 단계를 포함하며, 여기서 융합 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현된다. 바람직하게, 숙주 세포는 GnTII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된다. 추가 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 GnTIII의 촉매 도메인을 포함한다. 더 바람직한 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 또한 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함한다. 바람직하게, 골지 편재 도메인은 만노시다제II,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I, 만노시다제 I,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제II 또는  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인이다. 바람직하게, 폴리펩티드는 상기 변형의 결과로서 증가된 효과기 기능을 가진다.

[0112] 본 발명은 또한 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성된 군에서 선택된 폴리펩티드의 생산을 허용하는 조건 하에서, GaIT 활성을 가지는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 ManII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 폴리펩티드를 분리하는 단계를 포함하며, 여기서 융합 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현된다. 추가 구체예에서, 숙주 세포는 또한 GnTII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현시키기 위해 유전자 조작된다. 바람직하게, 융합 폴리펩티드는 GaIT의 촉매 도메인을 포함한다. 또한 융합 폴리펩티드는 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 바람직하게, 골지 편재 도메인은 만노시다제II,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 I, 만노시다제 I,  $\beta(1,2)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제II 또는  $\alpha$ 1-6 코어 푸코실트랜스퍼라제의 편재 도메인이다. 바람직하게, 폴리펩티드는 상기 변형의 결과로서 증가된 효과기 기능을 가진다. 구체적으로, 바람직한 구체예에서, 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드는 이 폴리펩티드의 Fc 영역에서 이분된 비푸코실화 올리고사카리드 비가 증가한다. 바람직하게, 이분된 비푸코실화 올리고사카리드는 하이브리드이다. 더 바람직하게, 이분된 비푸코실화 올리고사카리드는 복합체다. 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드의 Fc 영역 중 올리고사카리드 약 10%~95% 이상이 이분된 비푸코실화된다. 특히 본 발명의 글리코조작된 폴리펩티드의 Fc 영역 중 올리고사카리드 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%가 이분된 비푸코실화인 것이 바람직하다.

[0113] 추가 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 유전자 조작된 항체가 증가된 효과기 기능을 가진

다는 것을 제공한다.

[0114] 추가 구체예에서, 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 유전자 조작된 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 바람직하게, 본 발명의 약학 조성물은 약학적 허용 담체를 포함한다.

[0115] 본 발명은 또한 본 발명의 약학 조성물의 치료적 유효량을, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 종양의 치료 방법을 제공한다.

[0116] 본 발명은 또한 숙주 세포에서 증가된 Fc-매개성 세포의 세포독성을 가지는 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 전체 항체 분자, 항체 단편으로 구성된 군에서 선택된 폴리펩티드의 생산을 허용하는 조건 하에서, GaIT를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 ManII를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 증가된 Fc-매개성 세포의 세포 독성을 가지는 폴리펩티드를 분리하는 단계를 포함하며, 여기서 GaIT 또는 ManII 중 하나 또는 둘 다의 발현 수준은 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분하고, 폴리펩티드는 변형의 결과로서 증가된 Fc-매개성 세포의 세포 독성을 가진다. 추가 바람직한 구체예에서, GaIT의 발현 수준은 Fc-매개성 세포의 세포 독성을 가지는 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 항체 분자 또는 항체 단편을 생산한다.

[0117] 본 발명은 또한 숙주 세포에서 증가된 Fc-매개성 세포의 세포독성을 가지는 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 전체 항체 분자, 항체 단편으로 구성된 군에서 선택된 폴리펩티드의 생산을 허용하는 조건 하에서, GaIT를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 ManII를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 증가된 Fc-매개성 세포의 세포독성을 가지는 폴리펩티드를 분리하는 단계를 포함하며, 여기서 GaIT 또는 ManII 중 하나 또는 둘 다의 발현 수준은 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분하며, 폴리펩티드는 변형의 결과로서 증가된 Fc-매개성 세포의 세포독성을 가진다. 바람직한 구체예에서, 상기 숙주 세포는 또한 GnT III를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하며, 여기서 GnTIII는 숙주 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현되고, 폴리펩티드는 변형의 결과로서 증가된 Fc-매개성 세포의 세포독성을 가진다. 바람직하게, GaIT, ManII 또는 GnTIII 중 하나 이상의 발현 수준은 폴리펩티드의 Fc 영역에서 이분된 올리고사카리드를 형성하기에 충분하다. 더 바람직하게, Fc 영역 중 전체 올리고사카리드에 대한 Fc 영역 중 이분된 올리고사카리드의 비는 약 25, 35, 45, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 또는 95% 이상이다. 바람직하게, Fc 영역 중 전체 올리고사카리드에 대한 Fc 영역 중 이분된 올리고사카리드의 비는 약 45% 이상이다. 바람직한 구체예에서, 이분된 올리고사카리드는 복합체 또는 하이브리드다. 바람직하게, 숙주 세포는 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 식물 세포이다. 더 바람직하게, 숙주 세포는 식물 세포이다.

[0118] 다른 측면에서, 본 발명은 숙주 세포에서 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은,

[0119] a. 전체 항체 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질로 구성된 군에서 선택된 폴리펩티드의 생산을 허용하는 조건 하에서,  $\alpha$ -만노시다제II 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계(여기서,  $\alpha$ -만노시다제II 활성을 가지는 상기 폴리펩티드는 상기 숙주 세포에 의해 생산되는 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서 올리고사카리드를 변형시키기에 충분한 양으로 발현됨); 및

[0120] b. 상기 숙주 세포에 의해 생산된 상기 폴리펩티드를 분리하는 단계

[0121] 를 포함한다.

[0122] 본 발명은 또한 상기 변형된 올리고사카리드으로 인해 증가된 효과기 기능 및/또는 증가된 Fc 수용체 결합을 가지는 폴리펩티드(특히, 항체) 뿐 아니라 질병(특히, 종양)을 치료하기 위한 치료 조성물로의 이의 용도에 관한 것이다.

#### 글리코실화 패턴의 변형이 바람직한 단백질을 코딩하는 핵산의 확인 및 생성

[0123] 본 발명은 증가된 Fc 수용체 결합 친화력, 바람직하게는 Fc 활성화 수용체, 및/또는 항체-의존성 세포의 세포 독성을 비롯한 증가된 효과기 기능을 가지는, 항체, Fc 영역을 함유하는 항체 단편 및 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질의 단백당형 생산을 위한 숙주 세포 시스템의 생성 방법 및 용도를 제공한다. 표적 에피토프의 확인 및 잠재적 치료 가치를 가진 항체의 생성을 위해 글리코실화 패턴의 변형이 바람직하고, 이를 각각의 코딩 핵산 서열의 분리는 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0125]

당업자에 알려진 다양한 절차는 소정의 에피토프를 표적으로 하는 항체를 생산하는 데 유용할 수 있다. 상기 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 인간화, 완전한-인간, 단일 쇄, Fab 단편 및 ScFv, Fab, VH, IgG 발현 라이브러리에서 생성된 단편을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 항체는, 예를 들어 진단 제제 또는 치료 제제로 유용할 수 있다. 치료 제제로서, 중성화 항체, 즉 리간드, 기질 또는 어댑터 분자와 결합하기 위해 경쟁하는 것들이 특히 바람직하다.

[0126]

항체 생산을 위해, 비제한적으로 토키, 마우스, 래트 등을 비롯한 다양한 숙주 동물은 소정의 표적 단백질을 주입하여 면역화된다. 폴리클로날 항체는 적절한 항원 및 보조제를 다발성 피하(sc) 또는 복강내(ip)로 주입하여 동물에서 생성할 수 있다. 비제한적으로 프로인트(Freund's)(완전 및 불완전), 미네랄 젤(예, 수산화알루미늄), 표면 활성 성분(예, 리소레시틴, 플루로닉(pluronic) 폴리올, 다가음이온, 웨티드, 사포닌, 오일 에멀션, 키홀림펫 헤모시아닌, 디니트로페놀, 및 잠재적으로 유용한 인간 보조제(예, BCG(바실레 칼메테-구에린)) 및 코리네박테리움 파르퓸(*Corynebacterium parfum*)을 비롯하여, 숙주 종(species)에 따라 면역 반응을 증가시키기 위해 다양한 보조제를 사용할 수 있다. 동물은 항원, 면역원성 접합체, 또는 단백질 100 g 또는 5 g 또는 프로인트 완전 보조제 3 부피를 가진 접합체(각각 토키 또는 마우스에 대해)를 합하고 다양한 부위에서 피내로 용액을 주입시킨 유도체에 대해 면역화된다. 1달 뒤, 동물은 다양한 부위에서의 피하 주사로 인해 프로인트 보조제 중 웨티드 또는 접합체의 1/5~1/10 초기량으로 증가된다. 7~14일 후, 동물은 출혈하고, 항체 역가에 대해 혈청을 분석한다. 동물은 역가 평탄역까지 증가된다. 바람직하게, 동물은 동일한 항원의 접합체와 함께 증가하지만, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교제를 통해 접합된다. 접합체는 또한 단백질 융합으로 재조합 세포 배양으로 제조할 수 있다.

[0127]

소정의 표적에 대한 모노클로날 항체는 배양으로 연속 세포주에 의해 항체 분자를 생산하기 위해 제공하는 임의의 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 이는 문헌 [Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-97(1975), the human B-cell hybridoma technique(Kosbor et al., *Immunology Today* 4: 72(1983); Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2026-30(1983)]에 처음 기재된 하이브리도마 기법 및 EBV-하이브리도마 기법(Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 77-96(Alan R. Liss, Inc., 1985))을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 적절한 생물학적 활성의 인간 항체 분자로부터의 유전자와 함께 적절한 항원 특이성의 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 스플라이싱하여 "키메라 항체"(Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6851-55(1984); Neuberger et al., *Nature* 312: 604-08(1984); Takeda et al., *Nature* 314: 452-54(1985))를 생산하기 위해 개발한 기법을 사용할 수 있다. 이러한 기법은 또한 다른 포유동물의 항체 분자로 구성된 키메라 항체를 생산하는 데 사용될 수 있다. 대안으로, 단일 쇄 항체의 생산을 위해 기재한 기법(미국 특허 제4,946,778호)은 소정의 특이성을 가지는 단일 쇄 항체를 생산하는 데 적용할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 글리코조작된 인간화 항체에 관한 것이다. 인간화 항체를 제조하는 기법은, 예를 들어 미국 특허 제6,180,320호에서 문헌 [Queen et al.,]에 개시되며, 이는 본원에서 그 전문이 참고 인용된다.

[0128]

소정의 표적 단백질의 특이성 결합 부위를 함유하는 항체 단편은 공지된 기법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 단편은 항체 분자의 웨신 침지로 생성할 수 있는  $F(ab')_2$  단편 및  $F(ab')_2$  단편의 이황 가교를 환원시켜 생성할 수 있는 Fab 단편을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 대안으로, Fab 발현 라이브러리를 구성하여 (Huse et al., *Science* 246: 1275-81(1989)) 소정의 표적 단백질에 대해 소정의 특이성을 가진 모노클로날 Fab 단편을 빠르고 쉽게 확인할 수 있다.

[0129]

글리코실화 패턴의 변형이 바람직한 항체 또는 항체 단편을 일단 확인했다면, 코딩 핵산 서열은 당업자에게 잘 알려져 있는 기법을 사용하여 확인하고 분리한다.

[0130]

#### a. 변형된 글리코실화 패턴을 가진 단백질의 생산을 위한 세포주의 생성

[0131]

본 발명은 변형된 글리코실화 패턴을 가지는 단백질의 생산을 위한 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 특히, 본 발명은 개선된 치료적 가치를 가지는 단백질의 단백당형의 생성을 위한 숙주 세포 시스템을 제공한다. 그러므로, 한 측면에서, 본 발명은, 예를 들어  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리웨티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리웨티드를 발현하기 위해 선별되고 유전자 조작된 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 특히, 상기 숙주 세포 발현 시스템은 구조적이거나 조절된 프로모터 시스템에 기능적으로 결합된 상기 융합 폴리웨티드를 코딩하는 재조합 핵산 분자를 포함하도록 유전자 조작할 수 있다.

[0132]

한 특이적인 구체예에서, 본 발명은  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종

성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포를 제공한다. 한 측면에서, 숙주 세포는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 유전자를 포함하는 핵산 분자로 유전자 조작된다.

[0133]

일반적으로, 배양된 세포주의 임의의 형태는 본 발명의 숙주 세포주를 유전자 조작하기 위한 배경으로서 사용할 수 있다. 바람직한 구체예에서, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 다른 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포를 배경 세포주로 사용하여, 본 발명의 유전자 조작된 숙주 세포를 생성한다(Ma, J. K. -C., et al., *Nature Genetics* 4: 794-805(October 2003) 및 이에 인용된 참고 문헌 참조)(본원에 그 전문이 참고 인용됨).

[0134]

본 발명은 본원에 정의한 바와 같이  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 발현하는 임의의 유전자 조작된 숙주 세포를 포함하고자 한다.

[0135]

$\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 또는 다수의 핵산은 구조 프로모터, 또는 대안으로 조절된 발현 시스템 하에서 발현될 수 있다. 적절하게 조절된 발현 시스템은 테트라사이클린-조절된 발현 시스템, 엑디손-유도성 발현 시스템, 락-스위치 발현 시스템, 글루코코르티코이드-유도성 발현 시스템, 온도-유도성 프로모터 시스템 및 메탈로티오네인 금속-유도성 발현 시스템을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 다양하고 상이한 핵산이 숙주 세포 시스템 내에 포함되는 경우, 이들 중 일부는 구조 프로모터의 조절 하에 발현되지만, 다른 것들은 조절 프로모터의 조절 하에 발현된다. 최대 발현 수준은 세포 성장 속도에 유의적인 역효과를 주지 않는, 안정한 융합 폴리펩티드의 발현이 가능한 최대 수준으로 간주하며, 일상적인 실험법을 사용하여 결정할 것이다. 발현 수준은 GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체 또는 GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드에 융합된 웨그에 대해 특이적인 항체를 사용하는 웨스턴 블로트 분석, GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 핵산 프로브 또는 GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드에 융합된 웨그를 코딩하는 핵산에 대해 특이적인 핵산 프로브를 사용하는 노던 블로트 분석, 또는 GnTIII 활성의 측정을 비롯하여, 일반적으로 당업자에게 알려진 방법으로 결정한다. 대안으로, GnTIII의 생합성 산물에 결합하는 렉틴(예, E<sub>4</sub>-PHA 렉틴)을 사용할 수 있다, 대안으로, GnTIII 활성을 가진 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과 유전자 조작된 세포에 의해 생산된 항체에 의해 매개된 증가된 Fc 수용체 결합 또는 증가된 효과기 기능을 측정하는 기능 분석을 사용할 수 있다. 다른 대안으로, 핵산은 리포터 유전자에 기능적으로 결합할 수 있고;  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드의 발현 수준은 리포터 유전자의 발현 수준과 서로 관련된 신호를 측정하여 결정한다. 리포터 유전자는 단일 mRNA 분자로서 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산(들)과 함께 전사할 수 있고; 이들 각각의 코딩 서열은 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 또는 캡-독립성 번역 인핸서(CITE)에 의해 연결될 수 있다. 리포터 유전자는  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산과 함께 번역되어, 단일 폴리펩티드 쇄를 형성할 수 있다. 본 발명의 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 단일 프로모터의 조절 하에 리포터 유전자에 기능적으로 결합할 수 있어서, 융합 폴리펩티드 및 리포터 유전자를 코딩하는 핵산은 2개의 별도의 메신저 RNA(mRNA) 분자로 택일적으로 스플라이싱되는 RNA 분자로 전사되고; 생성된 mRNA 중 하나는 리포터 단백질로, 다른 하나는 융합 폴리펩티드로 번역된다.

[0136]

$\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 다양하고 상이한 핵산이 발현되는 경우, 상기 핵산은 하나 또는 여러 mRNA 분자로 전사되는 방식으로 배열될 수 있다. 단일 mRNA 분자로 전사되는 경우, 이들 각각의 코딩 서열은 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 또는 캡-독립성 번역 인핸서(CITE)로 연결될 수 있다. 상기 핵산은 단일 프로모터에서 여러 개의 별도의 메신저 RNA(mRNA) 분자로 택일적으로 스플라이싱된 RNA 분자로 전사된 후, 이들 각각의 코딩된 융합 폴리펩티드로 각각 번역될 수 있다.

[0137]

다른 구체예에서, 본 발명은 증가된 Fc 수용체 결합 친화력, 특히 Fc 활성화 수용체에 대한 결합, 및 항체-의존성 세포의 세포독성을 비롯한 증가된 효과기 기능을 가지는, 치료적 항체의 생성을 위한 숙주 세포 발현 시스템을 제공한다. 일반적으로,  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지

주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산과 함께, 변형된 단백당형의 생산이 바람직하도록 항체를 코딩하는 핵산을 발현시키기 위해, 숙주 세포 발현 시스템을 유전자 조작 및/또는 선별해 왔다. 한 구체예에서, 숙주 세포 시스템은 상기 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산으로 형질감염된다. 통상적으로, 형질감염된 세포는 본 발명의 융합 폴리펩티드를 안정되게 발현하는 클론을 확인하고 분리하는 데 사용된다.

[0138] 본 발명의 숙주 세포주를 유전자 조작하기 위해 배양된 세포주의 임의의 형태를 배경으로 사용할 수 있다. 바람직한 구체예에서, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 다른 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 식물 세포를 사용할 수 있다. 통상적으로, 상기 세포주는 전체 항체 분자, 면역글로불린의 Fc 영역을 함유하는 항체 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 영역에 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 하나 이상의 세포감염된 핵산을 추가로 포함하도록 유전자 조작된다. 통상적으로, 상기 항체 생산 세포주는 20~120 pg/(세포. 일) 범위의 고 특이성 생산성에서 항체를 생산하고 배출하는 클론으로부터 유도된다. 대안 구체예에서, 소정의 특정 항체를 발현하는 하이브리도마 세포주는 본 발명의 유전자 조작된 숙주 세포를 제조하기 위한 배경 세포주로 사용된다.

[0139] 한 구체예에서, 항체, 항체 단편 또는 Fc-융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 항체-발현 벡터로 클로닝한 뒤, 숙주 세포로 형질감염시키고, 고 특이성 및 안정한 특이성 항체 생산성을 가진 세포 클론을 선별하며 스크리닝 한다. 이어서 상기 선별된 클론을, 예를 들어, (a)  $\beta$ 1,4-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제III(GnTIII) 활성을 가진 융합 폴리펩티드, 또는 (b)  $\beta$ 1,4-갈락토실트랜스퍼라제(GaIT) 활성을 가진 융합 폴리펩티드, 또는 (c) 골지  $\alpha$ -만노시다제II(ManII) 활성을 가지는 폴리펩티드, 또는 (d) GnTIII 활성을 가지는 융합 폴리펩티드 및 ManII 활성을 가지는 추가 폴리펩티드, 또는 (e) GaIT 활성을 가지는 융합 폴리펩티드 및 ManII 활성을 가지는 추가 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 함유하는 당단백질-변형 글리코실트랜스퍼라제 발현 벡터로 형질감염시킨다. 이어서 고 항체 특이적 생산성을 유도하는 수준에서 항체-코딩 유전자의 안정한 발현을 위해, 비제한적으로 Fc-의존성 세포의 세포 독성을 비롯하여 Fc 수용체 결합의 증가, 특히 Fc-Fc  $\gamma$ RIII 결합 친화력의 증가 및 Fc 수용체 매개성 효과기 기능의 증가와 관련된, 이분 또는 비-이분될 수 있고, 또한 복합체 또는 하이브리드 형태일 수 있는 비-푸코실화 올리고사카리드 분획의 증가를 비롯한 Fc 영역 글리코실화 패턴의 변형을 유도하는 발현 수준에서 당단백질-변형 글리코실트랜스퍼라제 유전자를 안정적으로 발현시켜 클론을 선별하고 스크리닝한다. 선별 및 스크리닝 방법은 하기에 기재되어 있다.

[0140] 다른 구체예에서, 상기 기재한 2개의 형질감염, 즉 항체 발현 벡터 형질감염 및 당단백질-변형 글리코실트랜스퍼라제 발현 벡터 형질감염의 순서는 바뀔 수 있는데, 즉 숙주 세포를 당단백질-변형 글리코실트랜스퍼라제 발현 벡터에 이어 항체 발현 벡터 순으로 형질감염시킨다. 이러한 방식으로, 처음 형질감염시킨 클론은 하기로 추가로 기재된 방법 중 임의의 것으로 또는 대안으로 항체 발현 벡터를 가진 상기 클론의 복제물을 임시로 형질감염시킨 뒤 Fc 영역 글리코실화 패턴의 변형 및 Fc  $\gamma$ RIII 수용체를 비롯한 Fc 수용체의 증가, 결합 친화력 및 Fc-의존성 세포의 세포독성을 비롯하여 Fc 수용체-매개성 효과기 기능의 증가를 유도하는 수준에서 글리코실트랜스퍼라제 유전자의 안정한 발현 수준으로 클론을 확인하기 위해 하기 추가로 기재된 스크리닝 방법을 적용하여, 글리코실트랜스퍼라제 유전자의 적절하게 안정한 발현 수준에 대해 스크리닝할 수 있다.

[0141] 추가 구체예에서, 항체-코딩 유전자 및 글리코실트랜스퍼라제 유전자는 단일 발현 벡터 또는 별도의 벡터에서, 단일 세포감염 단계에서 함께 세포감염시킨다.

[0142] 통상적으로, 숙주 세포 시스템 중 하나 이상의 핵산은  $\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제III(GnTIII) 활성을 또는, 대안으로  $\beta$ (1,4)-갈락토실트랜스퍼라제 활성을 가지고, 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하거나, 또는 대안으로 골지  $\alpha$ -만노시다제II 활성을 가진 폴리펩티드를 코딩한다.

[0143] 본 발명의 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 또는 다수의 핵산은 구조 프로모터, 또는 대안으로 조절된 발현 시스템의 조절 하에 발현될 수 있다. 적절하게 조절된 발현 시스템은 테트라사이클린-조절된 발현 시스템, 엑디손-유도성 발현 시스템, 락-스위치 발현 시스템, 글루코코르티코이드-유도성 발현 시스템, 온도-유도성 프로모터 시스템, 및 메탈로티오네인 금속-유도성 발현 시스템을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.  $\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 상이한 핵산이 숙주 세포 시스템 내에 포함되는 경우, 이들 중 일부는 구조 프로모터의 조절 하에 발현될 수 있지만, 다른 것들은 조절 프로모터의 조절 하에 발현된다. 최대 발

현 수준은 세포 성장 속도에 유의적인 역효과를 주지 않는, 안정한 융합 폴리펩티드의 발현이 가능한 최대 수준으로 간주하며, 일상적인 실험법을 사용하여 결정할 것이다. 발현 수준은, 예를 들어 GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체 또는 GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드에 융합된 웨그에 대해 특이적인 항체를 사용하는 웨스턴 블로트 분석, 예를 들어 GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 핵산 프로브 또는 GnTIII 활성을 가지는 폴리펩티드에 융합된 웨그를 코딩하는 핵산에 대해 특이적인 핵산 프로브를 사용하는 노던 블로트 분석, 또는 GnTIII 효소 활성의 측정을 비롯하여, 일반적으로 당업자에게 알려진 방법으로 결정한다. 대안으로, GnTIII의 생합성 산물에 결합하는 렉틴(예, E<sub>4</sub>-PHA 렉틴)을 사용할 수 있다.

대안으로, GnTIII 활성을 가진 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과 유전자 조작된 세포에 의해 생산된 항체에 의해 매개된 증가된 Fc 수용체 결합 또는 증가된 효과기 기능을 측정하는 기능 분석을 사용할 수 있다. 다른 대안으로, 핵산은 리포터 유전자에 기능적으로 결합할 수 있고; 본 발명의 융합 폴리펩티드의 발현 수준은 리포터 유전자의 발현 수준과 서로 관련된 신호를 측정하여 결정한다. 리포터 유전자는 단일 mRNA 분자로서 상기 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)과 함께 전사될 수 있고; 이들 각각의 코딩 서열은 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 또는 캡-독립성 번역 인핸서(CITE)에 의해 연결될 수 있다. 리포터 유전자는  $\beta$ (1,4)-N-아세틸 글루코스아미닐트랜스퍼라제III(GnTIII) 활성을 가지고, 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 핵산과 함께 번역되어, 단일 폴리펩티드 쇄를 형성할 수 있다. 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 단일 프로모터의 조절 하에 리포터 유전자에 기능적으로 결합할 수 있고, 본 발명의 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 및 리포터 유전자는 2개의 별도의 메신저 RNA(mRNA)로 택일적으로 스플라이싱되는 RNA 분자로 전사되는데; 이 때 생성된 mRNA 중 하나는 상기 리포터 단백질로 번역되고, 다른 하나는 상기 융합 폴리펩티드로 번역된다.

$\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미忸트랜스퍼라제III(GnTIII) 활성을 가지고 이종성 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 다양하고 상이한 핵산이 발현되는 경우, 상기 핵산은 하나 또는 여러 mRNA 분자로 전사되는 방식으로 배열될 수 있다. 단일 mRNA 분자로 전사되는 경우, 이들 각각의 코딩 서열은 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 또는 캡-독립성 변역 인핸서(CITE)에 의해 연결될 수 있다. 이들은 단일 프로모터로부터 다양한 별도의 메신저 RNA(mRNA) 분자로 택일적으로 스플라이싱되는 RNA 분자로 변역된 후, 이들 각각의 코딩된 융합 폴리펩티드로 각각 변역될 수 있다.

### i. 발현계

적절한 전사/번역 조절 신호에 따라 이종 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하고  $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코스아미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII) 활성을 갖는 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터를 작제하는 데에는 당업자에 널리 공지된 방법을 사용할 수 있다. 이들 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 시험관내 재조합/유전자 재조합을 포함한다. 예컨대, Maniatis 등의 *Molecular Cloning A Laboratory Manual* [미국 뉴욕 소재 Cold Spring Harbor Laboratory(1989)] 및 Ausubel 등의 *Current Protocols in Molecular Biology* [미국 뉴욕 소재 Greene Publishing Associates and Wiley Interscience(1989)]에 개시된 기술을 참조하기 바란다.

다수의 호스트-발현 벡터계를 사용하여 본 발명의 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 코딩 서열을 발현시킬 수 있다. 바람직하게는, 포유동물 세포는 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 코딩 서열을 함유하는 코스미드 DNA 발현 벡터 또는 재조합 플라스미드 DNA로 트렌스펙션된 호스트 세포 시스템으로서 사용된다. 가장 바람직하게는, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER. C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 기타 포유동물 세포, 효모균 세포, 곤충 세포 또는 식물 세포가 호스트 세포계로서 사용된다. 발현계의 일부 예 및 선택 방법은 하기 참조문헌 및 이러한 참조문헌 중의 참조문헌에 개시되어 있다: Borth 등의 *Biotechnol. Bioen.* 71 (4): 266-73 (2000-2001), Werner 등의 *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8): 870-80 (1998), Andersen and Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13: 117-123 (2002), Chadd and Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 188-194 (2001), 및 Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). 대안적인 구체예에서, 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모균 발현 벡터로 형질전환된 효모균 세포; 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포계; 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 또는 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 코딩 서열을 함유하는 재조합

플라스미드 발현 벡터(예컨대, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포계; 또는 안정하게 증폭되거나(CHO/dhfr) 또는 이중미세 염색체에서 불안정하게 증폭된(예컨대, 뮤린 세포주) 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 DNA 코딩 서열의 다중 카페를 함유하도록 조작된 세포주를 비롯한 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스)로 감염된 동물 세포주를 비롯하여 다른 진핵 호스트 세포계를 생각할 수 있다.

[0148] 본 발명 방법에서, 안정한 발현은 일반적으로 일시적인 발현에 바람직한데, 왜냐하면 이것이 재현 가능한 결과를 더 얻을 수 있고 대규모 제조, 즉 제조 규모 세포주에서 본 발명 글리코 조작된 항체의 제조에 적합하기 때문이다. 바이러스성 복제 기점을 함유하는 발현 벡터를 사용하기보다 적절한 발현 조절 성분(예컨대, 프로모터, 인 헨서, 서열, 전사 터미네이터, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선택 가능한 마커에 의하여 조절된 각각의 코딩 핵산으로 숙주 세포를 형질변환시킬 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 조작된 세포를 영양 배지에서 1~2일간 성장시킨 다음 선택 배지로 옮긴다. 재조합 플라스미드에서 선택 가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하며, 플라스미드를 염색체내로 안정하게 통합시키고 성장하여 차례로 클로닝되어 세포주로 확장된 세포의 선택을 가능하게 한다.

[0149] 각각 tk-, hgprt- 또는 aprt-세포에서 사용될 수 있는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제[Wigler 등, Cell 11 : 223 (1977)], 히포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제[Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 : 2026 (1962)], 아다데닌 포스포리보실트랜스퍼라제[Lowy 등, Cell 22 : 817 (1980)] 유전자를 비롯한 다수의 선택계를 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 항대사물질 내성을 메토트렉세이트에 대한 내성을 의미하는 dhfr[Wigler 등, Natl. Acad. Sci. USA77:3567 (1989); O'Hare 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527(1981)]; 미코페놀산에 대한 내성을 의미하는 gpt[Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)]; 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 의미하는 neo[Colberre-Garapin 등, J. Mol. Biol. 150:1(1981)]; 및 히그로마이신에 대한 내성을 의미하는 hygro[Santerre 등, Gene 30:147 (1984)] 유전자에 대한 선택 기준으로 사용할 수 있다. 최근, 추가의 선택 가능한 유전자, 즉, 세포가 트립토판 대신 인돌을 사용할 수 있게 하는 trpB; 세포가 히스티딘 대신 히스티놀을 사용할 수 있게 하는 hisD[Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:8047 (1988)]; 글루타민 합성효소; 및 오르니틴 데카르복실라제 억제제, 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴, DFMO(McConlogue, in: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)]에 대한 내성을 의미하는 ODC(오르니틴 데카르복실라제)가 개시되었다.

[0150] ii. 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질을 발현시키는 형질감염체 또는 형질전환체의 확인

[0151] 생물학적으로 활성인 유전자 생성물을 발현시키는 코딩 서열을 함유하는 숙주 세포는 적어도 (a) DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화; (b) "마커" 유전자 작용의 존부; (c) 숙주 세포에서 각각의 mRNA 전사체의 발현에 의하여 측정되는 바와 같은 전사 수준 측정; 및 (d) 면역분석 또는 생물학적 활성에 의하여 측정되는 바와 같은 유전자 생성물의 검출의 4가지 일반 방법으로 확인할 수 있다.

[0152] 제1 방법에서, 발현 벡터에 삽입된 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 코딩 서열의 존재는 각각의 코딩 서열 또는 이의 부분 또는 유도체와 상동성인 누클레오티드 서열을 포함하는 프로브를 사용하여 각각 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화에 의하여 검출할 수 있다.

[0153] 제2 방법에서, 재조합 발현 벡터/숙주계는 혹종의 "마커" 유전자 기능(예컨대, 티미딘 키나제 활성, 항생제에 대한 내성, 메토트렉세이트에 대한 내성, 형질전환 표현형, 바클로바이러스에서 폐색체 형성 등)의 존부에 따라 확인 및 식별할 수 있다. 예컨대, 목적 단백질의 코딩 서열 및 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열이 벡터의 마커 유전자 서열에 삽입되는 경우, 각각의 코딩 서열을 함유하는 재조합체는 마커 유전자 기능의 부재로 확인할 수 있다. 대안적으로, 마커 유전자는 코딩 서열의 발현을 조절하기 위해 사용되는 동일하거나 상이한 프로모터의 조절하에 코딩 서열을 갖도록 일렬로 위치시킬 수 있다. 도입 또는 선택에 대한 응답으로 마커가 발현되는 것은 목적 단백질의 코딩 서열 및 융합 폴리펩티드의 코딩 서열의 발현을 나타낸다.

[0154] 제3 방법에서, 목적 단백질의 코딩 서열 및 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열에 대한 전사 활성은 하이브리드화 분석으로 평가할 수 있다. 예컨대, RNA는 분리하여 목적 단백질의 코딩 서열 및 본 발명 융합 폴리펩티드의 코딩 서열에 상동성인 프로브를 사용하여 노던 블롯에 의하여 분석할 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포의 전체 핵산을 추출하여 이러한 프로브에 대한 하이브리화에 대하여 분석할 수 있다.

[0155] 제4 방법에서, 이종 골지 주재 폴리펩티드의 골지 편재 도메인을 포함하고  $\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜

스페라제 III (GnTIII) 활성을 갖는 융합 폴리펩티드의 코딩 서열 및 목적 단백질의 단백질 생성물의 발현은 예컨대 웨스턴블롯, 반사면역침강법과 같은 면역분석, 효소-관련 면역분석 등에 의하여 면역학적으로 분석할 수 있다. 그러나, 발현계 성공의 궁극적인 테스트는 생물학적으로 활성인 유전자 생성물의 검출을 수반한다.

[0156] b. 변화된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질 및 단백질 단편의 제조 및 용도

[0157] i. 항체-의존성 세포 독성을 비롯한 효과 기능이 증가된 항체의 제조 및 용도

[0158] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 항체-의존성 세포 독성을 비롯한 효과 기능 및/또는 Fc 수용체 결합 기능이 증가된 항체 및 항체 단편의 글리코형을 제공한다.

[0159] 일부 유형의 암의 치료에 대한 컨주게이트되지 않은 단클론 항체(mAbs)의 임상적 실험은 최근 고무적인 결과를 내었다. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo 등, *Immunology Today* 18:127 (1997). 가상의 비컨주게이트 IgG1은 저급 또는 여포성 B-세포 비-호지킨 림프종에 대하여 증명되었다. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25(1997). 반면 또다른 비컨주게이트 mAb, 인간화 IgG1 표적 고체 유방 종양도 III 단계 임상 실험에서 유망한 결과를 나타내었다. Deo 등, *Immunology Today* 18:127 (1997). 이들 두 mAbs 항체는 각각의 종양 세포에서 고도로 발현되며 항체는 시험관내 및 생체내 효과 세포에 의하여 강력한 종양 분해를 중개한다. 대조적으로, 미세한 종양 특이성을 갖는 다수의 다른 비컨주게이트 mAbs는 임상적으로 유용한 충분한 효능의 효과 기능을 유발할 수 없다. Frost 등, *Cancer* 80:317-33(1997); Surfus 등 *J. Immunother.* 19:184-91(1996). 이들 약 mAbs에 대하여, 보조 시토킨 요법이 현재 시험중이다. 시토킨의 첨가는 순환 림프구의 수 및 활성을 증가시킴으로써 항체-의존성 세포 독성(ADCC)을 자극할 수 있다. Frost 등, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus 등, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). ADCC, 항체-표적 세포에 대한 용해소공격은 항체의 일정 영역(Fc)에 백혈구 수용체가 결합할 때 유발된다. Deo 등, *Immunology Today* 18:127 (1997).

[0160] 비컨주게이트 IgG1의 ADCC 활성을 증가시키는 상이하지만 상보적인 방법은 항체의 Fc 영역을 조작하는 것이다. 단백질 조작 연구 결과는 Fc γ Rs가 IgG CH2 도메인의 하부 헌지 영역과 상호 작용함을 보여주었다. Lund 등, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996). 그러나, Fc γ R 결합은 또한 CH2 영역의 보존 Asn 297에 공유 결합된 올리고당의 존재를 필요로 한다. Lund 등, *J. Immunol.* 157 : 4963-69 (1996); Wright and Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997)은 올리고당 및 폴리펩티드는 둘다 상호작용 부위에 직접 기여하며 올리고당이 활성 CH2 폴리펩티드 배좌를 유지하기 위하여 요구됨을 시사한다. 따라서, 올리고당 구조의 변형은 상호작용의 친화도를 증가시키는 수단으로서 사용될 수 있다.

[0161] IgG 분자는 각각의 중쇄에 하나씩 Fc 영역에 N-결합된 2 개의 올리고당을 포함한다. 임의의 글리코단백질로서, 항체는 동일한 폴리펩티드 주체를 공유하지만 글리코실화 부위에 결합된 상이한 올리고당을 갖는 글리코형 개체군으로서 생성된다. 통상적으로 혈청 IgG의 Fc 영역에서 발견되는 올리고당은 복잡한 비안테나리형[Wormald 등, *Biochemistry* 36:130-38(1997)]으로서 말단 시알산 및 양분 N-아세틸글루코스아민(GlcNAc)의 레벨이 낮고 말단 갈락토실화도 및 핵 푸코실화도가 다양하다. 일부 연구는 Fc γ R 결합에 필요한 최소 카르보하이드레이트 구조는 올리고당 코어에 존재함을 시사한다. Lund 등, *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

[0162] 비컨주게이트 치료 mAbs 제조 산업 및 학계에서 사용되는 마우스- 또는 햄스터-유도된 세포주는 통상적으로 Fc 부위에 필요한 올리고당 결정소를 결합시킨다. 그러나, 이들 세포주에서 발현된 IgG는 혈청 IgG에서 소량으로 발견되는 이분 GlcNAc를 결여한다. Lifely 등, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). 대조적으로, 래트 미엘로마-생성된, 인간화된 IgG1(CAMPATH-1H)은 일부 글리코형 일부에 이분 GlcNAc를 포함하는 것으로 관찰되었다. Lifely 등, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). 래트 세포-유도된 항체는 표준 세포주에서 생성된 CAM:PATH-1H 항체와 비슷한 시험관내 최대 ADCC 활성에 이르거나 항체 농도가 현저히 더 낮다.

[0163] CAMPATH 항원은 통상적으로는 림프종 세포에 고농도로 존재하며, 이 키메라 mAb는 이분 GlcNAc 부재하에 높은 ADCC 활성을 가진다. Lifely 등, *Glycobiology* 318:813-22 (1995). N-결합 글리코실화 경로에서, 이분 GlcNAc에는 효소  $\beta$ (1,4)-N-아세틸글루코스아미닐트랜스페라제 III(GnT III)가 첨가된다. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).

[0164] 이전 연구에서는 미리 조작하여 외부적으로 조절되는 방식으로 상이한 수준의 클로닝된 GnT III 유전자 효소를 발현시킨 단일 항체-생성 CHO 세포주를 사용하였다[Umana, P. 등, *Nature Biotechnol.* 17:176-180(1999)]. 이러한 방법은 처음에는 GnT III의 발현 및 변성된 항체의 ADCC 활성 간에 염밀한 관계를 수립하였다.

[0165] Fc 수용체 결합 친화도 및 효과 가능성이 증가된 본 발명의 추가의 항체는 본발명 방법에 의해 생성된 항인간 신

경모세포종 단클론 항체(chCE7), 본 발명 방법으로 제조된 키메라 항인간 신장 세포 암종 단클론 항체(ch-G250), 본 발명 방법으로 제조된 인간화된 항-HER2 단클론 항체[예컨대, Trastuzumab (HERCEPTIN)], 본 발명 방법으로 제조된 키메라 항-인간 결장, 폐 및 유방 암종 단클론 항체(ING-1), 인간화된 항-인간 17-1A 항원 단클론 항체(3622W94), 본 발명 방법으로 제조된 인간화된 항-인간 결장직장 종양 항체(A33), 본 발명 방법으로 제조된 GD3 갠글리오사이드 지향성 항-인간 흑색종 항체(R24), 및 본 발명 방법으로 제조된 키메라 항-인간 비늘상 세포 암종 단클론 항체(SF-25), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 소세포 폐암 단클론 항체(BEC2, ImClone Systems, Merck KgaA), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 비호지킨 림프종 단클론 항체[Bexxar(tositumomab, Coulter Pharmaceuticals), Oncolym(Techniclon, Alpha Therapeutic)], 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 비늘상 세포 두부 및 경부암 단클론 항체(C225, ImClone Systems), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 직장 및 결장암 단클론 항체[Panorex(edrecolomab), Centocor, Glaxo Wellcome], 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 난소암 단클론 항체(Theragyn, Antisoma), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 급성 골수성 백혈병 단클론 항체(SmartM195, Protein Design Labs, Kanebo), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 악성 교종 단클론 항체(Cotara, Techniclon, Cambridge Antibody Technology), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 B 세포 비호지킨 림프종 단클론 항체(IDEC-Y2B8, IDEC Pharmaceuticals), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 고형 종양 단클론 항체(CEA-Cide, Immunomedics), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 결장직장암 단클론 항체(Iodine 131-MN-14, Immunomedics), 항-인간 난소, 신장, 유방 및 전립선암 단클론 항체(MDX-210, Medarex, Novartis), 항-인간 결장직장 및 췌장암 단클론 항체(TTMA, Pharmacie & Upjohn), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 TAG-72 발현 암종 단클론 항체(MDX-220, Medarex), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 EGFr-발현 암종 단클론 항체(MDX-447), 본 발명 방법으로 제조된 항-VEGF 단클론 항체(Genentech), 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 유방, 폐, 전립선 및 췌장암, 악성 흑색종 단클론 항체(BrevaRex, AltaRex), 및 본 발명 방법으로 제조된 항-인간 급성 골수성 백혈병 단클론 항체(Monoclonal Antibody Conjugate, Immune)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명은 면역글로부린의 Fc 영역과 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질 및 항체 단편에 관한 것이다.

[0166] ii. Fc 매개된 세포 독성을 촉진하는 면역글로부린의 Fc 영역과 등가인 영역을 포함하는 융합 단백질의 제조 및 용도

[0167] 상기 논의한 바와 같이, 본 발명은 Fc 수용체 결합 친화도 및/또는 치료 항체의 효과 기능을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이것은 이러한 항체의 Fc 영역의 글리코실화 패턴을 조작하여, 특히 항체-생성 세포를 조작하여 예컨대 GnTIII 활성 또는 Gal T 활성 또는 ManII 활성을 가져서 이러한 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당을 변성시키는 폴리펩티드를 생성시킴으로써 달성된다. 이 방법은 글리코실화 조작에 의하여 도입된 변화는 Fc 영역에만 영향을 미치므로 ADCC 기전에 수반된 주효 세포 표면에서의 Fc 수용체와의 상호작용에 영향을 미치므로 치료 항체에 의해서만이 아니라 면역글로부린의 Fc 영역과 등가인 영역을 포함하는 임의의 분자에 의하여 매개된 바람직하지 않은 세포에 대한 Fc-매개 세포 독성을 증가시는 데 적용될 수 있다. 현재 개시된 방법을 적용할 수 있는 Fc-함유 분자는 (a) Fc-영역의 N-말단에 융합된 표적 단백질 도메인으로 제조된 가용성 융합 단백질 [Chamov and Ashkenazi, *Trends Biotech.* 14:52 (1996)] 및 (b) Fc-영역의 N-말단에 융합된 플라즈마 맴브레인에 편재된 II형 트랜스멤브레인 도메인으로 제조된 플라즈마 맴브레인-앵커 융합 단백질[Stabila, P. F., *Nature Biotech.* 16 : 1357 (1998)]을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0168] 가용성 융합 단백질(a)의 경우, 표적 도메인은 융합 단백질이 암세포와 같은 바람직하지 않은 세포와 결합하도록, 즉 치료 항체와 유사한 방식으로 유도한다. 따라서, 이들 분자에 의하여 매개된, Fc-매개된 세포 독성 활성을 비롯한 효과 기능을 증대시키기 위하여 현재 개시된 방법의 적용은 치료 항체에 적용되는 방법과 동일할 것이다.

[0169] 맴브레인-앵커식 단백질(b)의 경우, 체내 바람직하지 않은 세포는 융합 단백질을 인코딩하는 유전자를 발현시켜야 한다. 이것은 유전자 치료 방법에 의하여, 즉 융합 단백질 인코딩 유전자의 발현을 바람직하지 않은 세포로 향하게 하는 플라스미드 또는 바이러스 벡터로 생체내에서 세포를 트랜스펙션시킴으로써 또는 표면 상의 융합 단백질을 발현시키도록 유전자 조작된 세포체에 이식시킴으로써 달성될 수 있다. 후자의 세포는 통상적으로 Fc-매개 세포 독성 기전에 의하여 파괴될 수 없는 중합체 캡슐안에서 채내 이식될 것이다. 그러나, 캡슐 장치가 파괴되면 유출된 세포는 바람직하지 않게 되며, 이후 Fc-매개 세포 독성에 의하여 제거될 수 있다. Stabila 등, *Nature Biotech.* 16:1357 (1998). 이 경우, 현재 개시된 방법은 본 발명 융합 폴리펩티드의 적당한 발현 수준 또는 최대 발현 수준을 이끄는 추가의 유전자 발현 카세트를 유전자 치료 벡터에 포함시키거나 또는 본 발명 융합 폴리펩티드가 적당하게 또는 최대로 발현되도록 세포 이식을 조작함으로써 적용될 것이다.

- [0170] 본 발명 방법에 따라 제조된 항체, 항체 단편 및
- [0171] 융합 폴리펩티드의 치료적 적용
- [0172] 본 발명 항체(즉, 면역글로부린의 Fc 영역과 등가의 영역을 포함하는 항체, 항체 단편 및 융합 단백질)를 단독으로 사용하여 생체내에서 종양 세포를 목표로 하여 죽일 수 있다. 또한 항체를 적절한 치료제와 함께 사용하여 인간의 암종을 치료할 수 있다. 예컨대, 항체는 화학요법, 방사선 요법과 같은 표준 또는 종래 치료 방법과 함께 사용되거나 또는 암종의 부위에 치료제를 전달하기 위하여 림포카인 또는 종양-의제 성장 인자 뿐만 아니라 치료 약물 또는 독소에 컨주케이트되거나 연결될 수 있다.
- [0173] 항체에 이러한 치료제를 컨주케이트시키는 기술도 공지이다[예컨대, Amon 등, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld 등(eds.), 243-56 페이지(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 등, "Antibodies For Drug Delivery", *Controlled Drug Delivery*(2판), Robinson 등(eds.), 623-53 페이지(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera 등(eds.), 475-506 페이지(1985); 및 Thorpe 등, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982)를 참조].
- [0174] 대안적으로, 글리코조작된 항체는, 종양 부위에 편재될 경우 일부 세포 반경을 박멸시키는 예컨대 <131>I과 같은 고에너지 방사선에 커플링될 수 있다[예컨대, Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 등(eds.), 303-16페이지 (Academic Press 1985)를 참조]. 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명 항체는 Segal이 미국 특허 제4,676,980호에 개시한 바와 같이 본 발명 항체를 제2 항체에 컨주케이트시켜 종양 세포의 치료를 위한 항체 이종 컨주케이트를 형성할 수 있다.
- [0175] 본 발명 항체에 대한 다른 치료적 적용은 예컨대 재조합 DNA 기법에 의하여 프로드력을 세포 독성 약물로 전환시킬 수 있는 효소에의 컨주케이트 또는 결합 및 종양 부위에서 프로드력을 세포독성제로 전환시키기 위하여 항체-효소가 프로드력과 함께 컨주케이트되는 용도를 포함한다[예컨대, Senter 등, "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49: 5789-5792 (1989); 및 Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4:188-193 (1990)을 참조].
- [0176] 본 발명 항체의 또 다른 치료적 용도는 항체-약물 또는 항체-독소 컨주케이트의 일부로서 또는 전체의 존재하에 암환자의 골수로부터 종양 세포를 제거하기 위한 사용을 포함한다. 이러한 방법에 따르면, 환자에 재주입된 골수 및 항체로 치료함으로써 자가 조직 골수를 생체 외로 퍼징할 수 있다[예컨대, Ramsay 등, "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8 (2): 81-88 (1988)을 참조].
- [0177] 또한, 소정 단클론 항체의 항원-결합 영역의 특이성을 갖는 본 발명의 키메라 항체, 재조합 면역독소 및 기타 재조합 구성체를 치료적으로 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 단일체 면역독소를 사용하여 생체내에서 인간 암종을 치료할 수 있다.
- [0178] 마찬가지로, 항종양 활성, 예컨대 적어도 림포카인 또는 온코스타틴을 갖는 제2 단백질의 작용 활성 부분에 결합된 본 발명 항체의 항원-결합 영역을 적어도 포함하는 융합 단백질을 사용하여 생체내에서 인간 암종을 치료할 수 있다. 또한, 업계에 공지된 재조합 기법을 사용하여 항체의 결합 특이 부위 중 하나가 종양-관련 항원 지향성이고 항체의 다른 결합 특이 부위는 상기 종양-관련 항원 이외의 분자에 관한 것인 특이 항체를 작제할 수 있다.
- [0179] 본 발명은 본 발명 단클론 항체 또는 작용상의 등가물에 특이적으로 결합하는 항원을 발현시키는 종양 세포를 선택적으로 사멸시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 본 발명의 글리코 조작된 항체 또는 이를 포함하는 면역컨주케이트(예컨대, 면역독소)를 상기 종양 세포와 반응시키는 것을 포함한다. 이를 종양 세포는 인간 암종에서 유래할 수 있다.
- [0180] 또한, 본 발명은 생체내에서 암종(예컨대, 인간 암종)을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 본 발명의 글리

코 조작된 항체 또는 이를 포함하는 면역컨주게이트(예컨대, 면역독소) 중 적어도 하나를 함유하는 약학적 유효량의 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0181]

추가의 양상에서, 본 발명은 B-세포 결실에 기초한 병원성 자기 항체에 의하여 전부 또는 일부 발생된 자가 면역 질환의 치료가 필요한 인간에게 약학적 유효량의 면역 활성 항체를 투여하는 것을 포함하는, B-세포 결실에 기초한 병원성 자기 항체에 의하여 전부 또는 일부 발생된 자가 면역 질환을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명 방법에 따라 제조된 ADCC가 증가된 항체의 치료 유효량을 투여하는 것을 특징으로 포함한다. 바람직한 구체예에서, 항체는 항-CD20 항체이다. 자가 면역 질환 또는 이상의 예에는 면역매개 저혈소판증, 예컨대 급성 특발성 혈소판 감소성 자반증 및 만성 특발성 혈소판 감소성 자반증, 피부근염, 시든햄 무도증, 루푸스 신염, 류마티스열, 다선증후군, 헤노호-센라인 자반증, 연쇄상구균 감염후 신염, 결절성 홍반, 다카야스 동맥염, 애디슨 질환, 다형홍반, 결절다발동맥염, 강직성 척추염, 구드페스츄어 증후군, 혈전혈관염, 원발성 담즙성 간경변증, 하시모토 갑상선염, 갑상선증독증, 만성 활동성 간염, 다발성근염/피부근염, 다발연골염, 심상성 천포창, 웨게너 육아종증, 막성 신증, 근위축성 측삭 경화증, 척수로, 다발성 근육통, 빈혈(비타민 B12 결핍성), 급성 진행 사구체신염 및 섬유성 폐렴, 염증 반응, 예컨대 건선 및 피부염(예컨대, 아토피성 피부염)을 포함하는 염증성 피부 질환; 전신성 경화증 및 동맥경화증; 염증성 장 질환(크론병 및 케양성 직장염) 관련 반응; 반응성 질환 증후군(성인 호흡기 질환 증후군; ARDS 포함); 피부염; 뇌염; 뇌염; 포도막염; 직장염; 사구체신염; 알레르기성 질환, 예컨대 습진 및 천식, 및 만성 염증성 반응 및 T-세포의 침습을 동반하는 기타 질환; 즉상동맥 경화; 백혈구흡착결핍증; 류마티스성 관절염; 전신성 홍반성 루푸스(SLE); 당뇨병(예컨대, 1형 당뇨병 또는 인슐린 의존성 당뇨병); 다발성 경화증; 레이노 증후군; 자가 면역 갑상선염; 알러지성 뇌척수염; 쇠그렌 증후군; 소아 당뇨병; 및 일반적으로 결핵, 유육종증, 다발성 근염, 육아종증 및 혈관염에서 발견되는 시토카인 및 T-림프구에 의하여 매개되는 급성 및 지연 고혈압 관련 면역 반응; 악성 빈혈(애디슨 질환); 백혈구 누출을 동반하는 질환; 중앙신경계(CNS) 염증 질환; 다발성 장기 손상 증후군; 용혈성 빈혈(크라이오글로빈 혈증 또는 Coombs 양성 빈혈을 포함하나 이에 한정되지 않음); 중증근무력증; 항원-항체 복합체 매개 질환; 항사구체기저막항체; 항인지질 증후군; 알러지성 신경염; 그레이브스씨병; 람버트-이튼 근무력증 증후군; 유천포창; 천포창; 자가 면역 다내분비병증; 라이터병; 근육강직 증후군; 베체트병; 거대세포 동맥염; 면역 복합체 신염; IgA 신증; IgM 다신경병증; 면역 혈소판 감소성 자반증(ITP) 또는 자가 면역 혈소판 감소증 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 이러한 측면에서, 본 발명 항체는 장기간 정상 B-세포의 혈액을 고갈시키는 데 사용된다.

[0182]

본 발명 실시에 따르면, 개체는 인간, 말, 돼지, 소, 뮤린, 개, 고양이 및 조류 개체일 수 있다. 다른 온혈 동물도 본 발명에 포함된다.

[0183]

본 발명은 또한 암에 걸린 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 개체는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 래빗, 말, 염소, 양, 소, 닭일 수 있다. 암은 유방, 방광, 망막아종, 난소의 유두낭샘암종, 빌리스 종양 또는 소세포 폐암으로서 확인할 수 있고 일반적으로 세포 표면 상에 종양 관련 항원을 갖는 세포군을 특징으로 한다. 이 방법은 세포독소제와 결합된 암 사멸량의 종양 표적 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 일반적으로, 종양 표적 항체와 세포독소제의 결합은 이렇게 결합된 항체가 세포 표면 상에서 그 표적에 결합하도록 허용하는 조건 하에서 이루어진다. 표적에 결합함으로써, 종양 표적 항체는 직간접적으로 결합된 세포의 사멸을 야기하거나 또는 이에 기여하도록 작용함으로써 개체를 치료한다.

[0184]

또한, 충분한 농도의 글리코 조작된 본 발명 항체 또는 이를 포함하는 면역 컨주게이트와 포유동물 종양 세포를 접촉시켜 포유동물 종양 세포의 증식을 억제하는 것을 포함하는 포유동물 종양 세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다.

[0185]

본 발명은 또한 인간 종양 세포의 억제하는 방법, 개체에서 종양을 치료하는 방법 및 개체에서 증식성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이들 방법은 유효량의 본 발명 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0186]

따라서, 본 발명은 약학 조성물, 조합물 및 인간 암종을 치료하는 방법을 포함하는 것은 명백하다. 예컨대, 본 발명은 약학적 유효량의 본 발명 항체 및 약학적 허용 담체를 포함하는 인간 암종의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물을 포함한다.

[0187]

조성물은 변성되지 않거나, 치료제(예컨대, 약물, 독소, 효소 또는 제2 항체)에 컨주게이트되거나 또는 재조합 형태(예컨대, 키메라 항체, 키메라 항체 단편, 특이적 항체)인 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있다. 조성물은 또한 암종의 치료를 위한 기타 항체 또는 컨주게이트(예컨대, 항체 치료제)를 포함할 수 있다.

[0188]

본 발명 항체, 항체 컨주게이트 및 면역독소 조성물을 정맥내, 복강내, 경구, 임파선내 또는 종양내의 직접 투

여를 포함하나 이에 한정되지 않는 종래의 투여 방법을 사용하여 투여할 수 있다. 정맥내 투여가 바람직하다.

[0189] 본 발명 조성물은 액체 용액 또는 혼탁액, 정제, 필, 분말, 좌약, 중합체성 마이크로캡슐 또는 마이크로포, 리포솜 및 주사 또는 주입 가능한 용액을 포함하나 이에 한정되지 않는 여러가지 제형일 수 있다. 바람직한 형태는 투여 방식 및 치료 적용에 따라 달라진다.

[0190] 본 발명 조성물은 또한, 바람직하게는 종래의 약학적 허용 담체 및 인간 혈청 일부민, 이온 교환제, 알루미나, 레시틴, 완충 물질, 예컨대 포스페이트, 글리신, 소르빈산, 소르빈산칼륨 및 프로타민 설페이트와 같은 전해질 또는 염과 같은 업계에 공지된 보조제를 포함한다.

[0191] 본 발명 조성물에 가장 효과적인 투여 방법 및 용량은 질환의 중증도 및 경로, 환자의 건강 및 치료에 대한 반응 및 치료의의 판단에 따라 달라진다. 따라서, 조성물의 용량은 개인 환자에 따라 적정하여야 한다. 그럼에도 불구하고, 효과적인 용량의 본 발명 조성물은 약 1 ~ 약 2000 mg/kg 범위일 수 있다.

[0192] 본원에 개시된 분자는 액체 용액 또는 혼탁액, 정제, 필, 분말, 좌약, 중합체성 마이크로캡슐 또는 마이크로포, 리포솜 및 주사 또는 주입 가능한 용액을 포함하나 이에 한정되지 않는 여러가지 제형일 수 있다. 바람직한 형태는 투여 방식 및 치료 적용에 따라 달라진다.

[0193] 본 발명 분자에 가장 효과적인 투여 방법 및 용량은 치료할 종양의 위치, 암의 중증도 및 경로, 환자의 건강 및 치료에 대한 반응 및 치료의의 판단에 따라 달라진다. 따라서, 분자의 용량은 개인 환자에 따라 적정하여야 한다.

[0194] 표면적 mg/kg을 기준으로 여러 크기 및 종의 동물 및 인간에 대한 용량의 관계는 Freireich, E. J. 등. *Cancer Chemother.*, Rep. 50(4):219-244 (1966)에 개시되어 있다. 용량 조절은 종양 세포 성장 억제 및 사멸 반응을 최적화하도록 할 수 있다. 예컨대 용량은 상황에 따라 비례적으로 감소된 용량 또는 일일 기준에 따라 나누어서 투여할 수 있다(예컨대, 몇으로 나눈 용량을 매일 또는 특정 치료 상황에 따라 비례적으로 감소된 양으로 투여 할 수 있다).

[0195] 치료에 필요한 본 발명 조성물의 용량은 계획적인 최적화로 더 감소시킬 수 있음을 명백할 것이다.

[0196] 본 발명 실시에 따르면, 약학적 담체는 액체 담체일 수 있다. 액체 담체는 인지질일 수 있다. 또한, 지질 담체는 지방산일 수 있다. 또한, 지질 담체는 세제일 수 있다. 본원에서 사용될 때, 세제는 액체의 표면 장력을 변화, 일반적으로 감소시키는 임의의 물질이다.

[0197] 본 발명의 하나의 실시예에서, 세제는 비이온성 세제일 수 있다. 비이온성 세제의 비제한적인 예로는 폴리솔베이트 80(트윈 80 또는 (폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레이트)로도 알려짐), 브리즈 및 트리톤(예컨대, 트리톤 WR-1339 및 트리톤 A-20)을 들 수 있다.

[0198] 대안적으로, 세제는 이온성 세제일 수 있다. 이온성 세제의 비제한적인 예로는 알킬트리메틸암모늄 브로마이드를 들 수 있다.

[0199] 또한, 본 발명에 따르면, 지질 담체는 리포솜일 수 있다. 본 출원에서 사용된 바의 "리포솜"이라는 용어는 본 발명의 임의의 분자나 이의 조합을 함유하는 소포에 결합된 임의의 막이다.

[0200] 본 발명을 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명한다. 하기 제조예 및 실시예는 당업자가 본 발명을 더욱 분명히 이해하고 실행할 수 있도록 하기 위해 주어진다. 그러나, 본 발명은 예시적 구체예에 의해 그 사상이 제한되지 않으며, 이는 본 발명의 하나의 측면만을 예시하기 위한 것이며, 작용적으로 동등한 방법은 본 발명의 범위 내에 있다. 실제로, 본 명세서에 설명한 것 이외에 본 발명의 다양한 변형이 가능함은 상기 설명과 동반되는 도면으로부터 당업자에게는 분명할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위의 사상 내에 있는 것으로 해석되어야 한다.

[0201] [실시예]

[0202] 실시예 1

[0203] 물질 및 방법

[0204] 1. 항체 발현 벡터의 구축

[0205] 항-CD20 항체 발현 벡터 pETR1502

- [0206] 항-CD20 항체 발현 벡터인 pETR1502는 네개의 독립적이고 개별적인 발현 카세트(하나는 C2B8 항체 경쇄이고, 하나는 C2B8 항체 중쇄이며, 하나는 네오마이신 내성 유전자이고, 하나는 마우스의 dhfr 유전자임)로 구성된다. 모든 유전자들은 골수증식 육종 바이러스(MPSV)의 촉진자의 조절 하에 있고, 토끼의  $\beta$ -글로빈 유전자의 폴리아데닐화로부터 유래된 합성 공동 폴리아데닐화 신호를 포함한다.
- [0207] 항-CD20 항체 C2B8의 가변성 중쇄(VH chain) 및 가변성 경쇄(VL chain) 영역을 암호화하는 CDNAs를 이용하는 1단계 공정에서 중첩되는 한 세트의 단일 가타 올리고뉴클레오티드로부터 어셈블링된다[문현(Kobayashi, N., et al., *Biotechniques* 23: 500-503(1997))]. C2B8 VL 및 VH 영역의 원래의 서열 코딩은 공개 국제 특허 출원(국제 공개 번호: WO 94/11026)으로부터 얻어졌다. 어셈블링된 VL 및 VH cDNA 단편을 pBluescript IIKS(+)로 서브클로닝하여 pBlue-C2B8VH 및 pBlue-C2B8VL 플라스미드를 얻고, 서열화하였다.
- [0208] C2B8의 가변성 사슬을 고정 영역에 대해 가변적인 이음부(경쇄에 대해서는 BsiWI이고, 중쇄에 대해서는 NheI임)에서 5' 말단과 적당한 제한 자리에서 AscI 제한 자리를 도입하는 프라이머를 이용하여 해당 pBlue-C2B8VH 및 pBlue-C2B8VL 플라스미드로부터 증폭시켰다. IgG1 고정 영역을 5' 및 3' 말단(고정 경쇄에 대해서는 BsiWI 및 BamHI이고, 고정 중쇄에 대해서는 NheI 및 BamHI임)에서 적절한 제한 자리를 도입하는 프라이머를 이용하여 인간의 백혈구 cDNA 라이브러리(클론테크 제품 퀵클론)로부터 증폭시켰다.
- [0209] 올바른 DNA 서열을 확인한 후, C2B8 항체 경쇄 및 중쇄를 각각 MPSV 촉진자 및 폴리아데닐화 신호와 조합하였다. 제1 단계에서, 2개의 상이한 발현 벡터를 구축하였다: 하나는 C2B8 경쇄(pETR1315)에 대한 것이고, 다른 하나는 C2B8 중쇄(pETR1316)에 대한 것이다. 제2 단계에서, 네오마이신 내성 발현 카세트(Tn5 전위 유전단위로부터 유래하고, 최소 MPSV 촉진자의 조절 하에 놓여 있는 네오마이신 내성 유전자)를 플라스미드 pETR1481에서 생기는 벡터 pETR1315에 도입하였다. MPSV 촉진자의 조절 하에 있는 dhfr 유전자 발현 카세트를 벡터 pETR1316에 삽입하여 플라스미드 pETR1328을 얻었다. 최종 단계에서, 양쪽 발현 모듈(C2B8-경쇄 + 네오 및 C2B8-중쇄 + dhfr)을 플라스미드 pETR1502로부터 생기는 하나의 벡터로 조합하였다.
- [0210] 항-CD20 항체 발현 벡터 pETR1520
- [0211] pETR1520은 C2B8 항-CD20 항체 발현 벡터를 EB 바이러스 핵 항원(Epstein Barr virus nuclear antigen, EBNA)을 생산하는 세포 내에서 애피솔 벡터 복제 및 유지를 위한 EB 바이러스(or iP)로부터의 복제의 개시점과 조합한다. C2B8 발현 벡터인 pETR1520의 구축을 위해, pETR1416으로부터의 C2B8 발현 모듈을 or iP를 함유하는 벡터 pETR1507에 HinDIII 단편으로서 삽입하였다. 벡터 pETR1416은 이 플라스미드에 있어서 네오마이신 내성 유전자 가 최소의 MPSV 촉진자의 조절 하에 있는 대신에 전체 MPSV 촉진자의 조절 하에 있다는 점 이외에는 pETR1502와 유사하다.
- [0212] 항-피브로네틴 항체 발현 벡터 pETR1546
- [0213] \*이 벡터는 C2B8 항-CD20 항체의 가변성 중쇄 및 경쇄 코딩과 영역이 피브로네틴의 ED-B 도메인을 인지하는 인간의 항체인 항체 L19의 각각의 코딩 영역으로 대체된다는 점을 제외하고는, 벡터 pETR1520과 동일하다. 가변성 영역 암호화 DNA 단편을 L19 항체의 가변성 영역의 서열에 기초하여 합성 올리고뉴클레오티드를 이용하여 중첩 연신 PCR법에 의해 합성하였다[문현(Pini, A. et al. *J. Biol. Chem.* 273(34): 21769-76(1998))].
- [0214] 항-EGFR 항체(C225) 발현 벡터 pURSI28
- [0215] 이 벡터는 C2B8 항-CD20 항체의 가변성 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 인간의 표피 성장 인자 수용체를 인지하는 키메릭 항체인 항체 C225의 각각의 코딩 영역으로 대체된다는 점을 제외하고는 벡터 pETR1520과 동일하다. 가변성 영역 암호화 DNA 단편을 C225 항체의 가변성 영역의 서열에 기초하여 합성 올리고뉴클레오티드를 이용하여 중첩 연신 PCR법에 의해 합성하였다(서열은 국제 공개 번호 WO 96/40210, 중쇄 및 경쇄 각각에 대한 특허 출원 명세서의 도 16 및 도 17의 공개 특허 출원에서 찾을 수 있다).
- [0216] 2. GnTIII-융합 발현 벡터의 구축
- [0217] pETR1166, GnTIII의 구축 발현을 위한 벡터
- [0218] GnTIII 발현 벡터 pETR1166의 구축을 위해, 토끼의 GnTIII를 PCR에 의해 토끼 신장 cDNA 라이브러리(클론테크사 제품)로부터 증폭시켰다. 웨스턴 블로트에 의한 GnTIII의 추후의 편리한 검출을 위해 C-말단 c-myc-에피토프 표지를 유전자(아미노산 서열: PEQKLISEEDL)의 정지 코돈의 상류에 곧바로 첨가하였다. GnTIII의 올바른 서열을 확

인한 후, MPSV 촉진자의 조절 하에서 유전자를 삽입하고, 토끼의 합성  $\beta$ -글로빈 폴리아데닐화 신호를 첨가하였다. 최종 GnTIII 발현 벡터는 또한 MPSV 촉진자의 조절 하에서 퓨로마이신 내성 유전자 및 토끼의 합성  $\beta$ -글로빈 폴리아데닐화 신호와 함께 선별을 위한 개별 퓨로마이신 내성 카세트도 함유하였다.

[0219] pETR1425 : GnTIII의 제1의 76개의 아미노산을 인간 GnTI의 제1의 102개의 아미노산으로 치환

이 하이브리드 글리코실트랜스퍼라아제 유전자의 구축은 후속 중첩 PCR 반응에 의해 수행되었다. 하나의 반응에서, 인간 GnTI의 줄기 영역을 프라이머 GAB-179 및 GAB-180을 이용하여 증폭시켰다. 이 PCR 반응 동안에, 코작 (Kozak) 공통 서열 및 AscI 제한 자리를 또한 5' 말단에 도입하였다. 생성된 PCR 단편은 229번 위치에서 시작하는 GnTIII과 23 bp 중첩하였다. 제2 PCR 반응에서, 229~380번 위치로부터의 GnTIII 영역은, 3' 말단에서 독특한 BstXI 자리를 갖고 5' 말단에서 GnTI 줄기 영역과 22 bp 중첩하는 PCR 단편을 생성하는 프라이머 GAB-177 및 GAB-178을 이용하여 증폭시켰다. 양쪽 PCR 단편을 정제하고, 제3 PCR 반응에서 주형(프라이머 GAB-179 및 GAB-178)으로 사용하였다. 생성된 단편을 정제하고, AscI로 분해시키고, 플라스미드 pETR1404에서 생성되는 벡터 pETR1001(AscI 및 SmaI로 절단됨)로 결합하였다. 삽입 서열을 확인한 후, MPSV 촉진자 요소를 플라스미드 pETR1423에서 얻어지는 AscI(부분 분해)/PmeI 단편으로서 pETR1404에 첨가하였다. 그 다음 원래의 래트의 GnTIII 유전자를 운반하는 발현 벡터인 pETR1166으로부터의 SphI/BstXI 단편을 MPSV 촉진자의 조절 하에서 GnTI-GnTIII 융합을 함유하는 플라스미드 pETR1425와 선별용 퓨로마이신 내성 카세트로부터 생성되는 pETR1423의 해당 단편으로 대체하였다.

프라이머 서열:

GAB-177: GCGTGTGCCTGTGACCCCCGCGCCCCCTGCTCCAGCCACTGTCCCC

GAB-178: GAAGGTTTCTCCAGCATTCTGGTACC

GAB-179: CTGAGGCGCGCCGCCACCATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGGGC

GAB-180:

GGGGACAGTGGCTGGAGCAGGGCGCGGGGTCACAGGCACACGCGGC

[0222]

[0223] pETR1506 : GnTIII의 76개의 N-말단 아미노산을 인간의 만노시다아제 II의 제1의 100개의 아미노산으로 치환

pETR1506의 구축을 pETR1425의 구축과 유사하게 수행하였다. 인간의 만노시다아제 II 유전자의 줄기 영역을 주형으로서 벡터 pBlue-man을 이용하여 프라이머 GAB-252 및 GAB-253으로 증폭시켰다. 이 PCR 동안, FseI 위치 및 코작 공통 서열을 5' 말단에 도입하였다. 생성된 PCR 단편은 23 bp에 의해 229번 위치에서 시작하는 GnTIII 유전자와 중첩한다. 제2 PCR 반응에서, 일부의 GnTIII 유전자(229~460 위치)가 프라이머 GAB-254 및 GAB-255로 증폭되었다. 이 PCR 반응은 5' 말단에서 만노시다아제 II 유전자와 3' 말단에서 독특한 StuI 자리를 가진 43 bp 중첩을 함유하는 단편을 생성시켰다. 양쪽 단편을 정제하고, 제3 PCR에서 주형으로서 프라이머 GAB-252 및 GAB-255와 함께 사용하였다. 생성된 단편을 pIC19H에 삽입하여 벡터 pETR1484를 얻었다. 삽입된 올바른 서열을 확인한 후, pETR1484의 FseI/StuI 단편을 벡터 pETR12177(FseI/BamHI)내 pETR1166으로부터의 StuI/BamHI 단편으로 결합함으로써 완전한 융합 유전자를 구축하였다. 생성된 플라스미드(pETR1500)는 MPSV 촉진자의 조절 하에서 하이브리드 manII-GnTIII 유전자(SEQ ID NO :14)를 함유하였다. 포유동물 세포 내에서 플라스미드를 선별하기 위해, 퓨로마이신 내성 카세트를 pETR1166으로부터 SpeI 단편으로서 삽입하여, 플라스미드 pETR1506을 얻었다.

프라이머 서열:

GAB-252:

GCTAGGCCGGCCGCCACCATGAAGTTAAGCCGCCAGTCACCGTGGTCGG

GAB-253:

GGGGACAGTGGCTGGAGCAGGGGTGAGCCAGCACCTGGCTGAAATTGCTTTGTG

AACTTTTCGG

GAB-254:

TCCGAAAAGTTCACAAAGCAATTTCAGCCAAGGTGCTGGCTACCCCTGCT

CCAGCCACTGTCCCC

GAB-255: ATGCCGCATAGGCCTCCGAGCAGGACCCC

[0226]

- [0227] pETR1519: 하이브리드 manII-GnTIII 융합 유전자와 앱스테인 바 바이러스로부터의 복제 개시점 or iP와의 조합
- [0228] 프라이머 GAB-261 및 GAB-262를 이용하여 or iP를 함유하는 2 kb 단편을 플라스미드 pCEP4(인비트로젠 제품)로부터 증폭시켰다. 이 PCR 반응 동안, 단편의 양말단에서 SspI 및 EcoRI 자리가 유도되었다. 서열화를 위해, or iP 단편을 벡터 pIC19H에 삽입하였다. 올바른 서열을 확인한 후, or iP를 SspI 단편으로서 벡터 pETR1001 (BsmBI로 분해시키고, 클레노브 중합효소를 이용하여 5' 중첩 말단을 채움)에 삽입하였다. 생성된 플라스미드는 지정된 pETR1507이었다. pETR1510로부터의 SphI/NruI manII-GnTIII 발현 카세트를 동일한 제한 핵산 내부 가수분해효소로 분해시킨 pETR1507에 삽입하여 플라스미드 pETR1519를 얻었다.
- [0229] 프라이머 서열:
- GAB-261 : GCTAAATATTGAATTCCCTTATGTGTAACCTCTGGCTGAAGC  
 GAB-262 : TAGCAATATTGAATTGCAGGAAAAGGACAAGCAGCGAAAATT  
 CACGC
- [0230]
- [0231] pETR1537: 하이브리드 manII-GnTIII 융합 유전자와 절단된 CD4 세포-표면 표지 유전자의 조합
- [0232] pETR1506 발현 벡터를 절단된 CD4 세포-표면 표지 유전자의 추가 발현을 위해 변형시켰다. 간단히, manII-GnTIII 융합의 정지 코돈의 하류에 폴리오 바이러스 IRES 요소를 삽입한 후, 절단된 인간의 CD4 단백질(분비 후, 막 횡단 및 세포외 도메인을 위한 인간의 CD4 선도 서열을 포함함)을 cDNA 암호화하여 하이브리드 manII-GnTIII 융합 유전자 발현 카세트를 모노시트론 발현 카세트에서 바이시트론 발현 카세트로 전환시켰다.
- [0233] 3. GnTIII-융합-발현 벡터 및 항체-발현 벡터를 이용한 포유 동물 세포의 형질 감염
- [0234] BHK 세포의 형질 감염
- [0235] 지수적으로 성장하는 세포(생활력 90-95 %)를 전기 천공 24 시간 전에  $0.9 \times 10^6$  개 세포/ml 농도에서 적당한 수의 T75 플라스스크에서 시딩하였다. 배양 배지로서, 10%의 우테아 혈청(FCS)으로 보충된 인비트러스(스위스 셀 컬쳐 테크놀로지 제품)를 사용하였다. 전기 천공 전에 세포를 계수하였다.  $8 \times 10^6$  개의 세포가 원심분리(5 분, 200 x g)에 의해 수확되었고, 상청액을 버렸다. 세포를  $800 \mu\text{l}$ 의 인바이러스 배지에서 재현탁하고, 이를 이미 8  $\mu\text{g}$ 의 원형 플라스미드 DNA를 함유하는 살균 전기 천공 큐벳(0.4 cm 간격)에 옮기고, 5 분간 실온에서 항온 처리하였다. 세포를 유전자 펄서 II(바이오래드 제품)를 이용하여 30 초 간격으로 2개의 펄스로 400 V, 960  $\mu\text{F}$ 의 조건으로 전기 천공하였다. 전기 천공 후, 세포를 곧바로 5 ml의 증식물 배지(인비트러스 제품/20 % (V/V) FCS/1.25 % (V/V) DMSO)를 함유하는 T25 플라스스크로 옮기고, 5%  $\text{CO}_2$ -대기 항온 처리기에서 37°C에서 항온 처리하였다. 변형되지 않은(글리코-조작되지 않은) 항체를 생산하기 위해, 세포를 항체 발현 벡터만으로 형질 감염시켰다. 글리코-조작된 항체를 생산하기 위해, 세포를 두개의 플라스미드, 즉 하나는 항체 발현을 위한 플라스미드, 나머지 하나는 융합 GnTIII 폴리펩티드의 플라스미드(SEQ ID NO: 15)로 각각 3:1의 비율로 공형질 감염시켰다.
- [0236] HEK293-EBNA 세포의 형질 감염
- [0237] 지수적으로 성장하는 HEK293-EBNA 세포를 인산칼슘법에 의해 형질 감염시켰다. 10% FCS로 보충된 DMEM 배양 배지를 이용하여 T 플라스스크 내에서 부착성 단층 배양물로서 세포를 성장시켰고, 이들이 50~80% 융합되었을 때 형질 감염시켰다. T75 플라스스크의 형질 감염을 위해, 형질 감염 24 시간 전 8백만개의 세포를 FCS(최종적으로 10% V/V), 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 네오마이신으로 보충된 14 ml의 DMEM 배양 배지 중에서 시딩하고, 세포를 5%  $\text{CO}_2$  대기로 항온 처리기 중에 37°C에 밤새 놓아두었다. 형질 감염될 각각의 T75 플라스스크에 대해, 47  $\mu\text{g}$ 의 총 플라스미드 벡터 DNA, 235  $\mu\text{g}$ 의 1 M  $\text{CaCl}_2$  용액을 혼합하고, 최종 부피 469  $\mu\text{g}$ 로 물을 첨가하여 DNA,  $\text{CaCl}_2$  및 물의 용액을 제조하였다. 이 용액에, 469  $\mu\text{l}$ 의 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, pH 7.05에서 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  용액을 첨가하고, 곧바로 10 초간 혼합하고, 실온에서 20 초간 방치하였다. 혼탁액을 2% FCS로 보충된 12 ml의 DMEM으로 희석하고, 존재하는 배지 대신에 T75에 첨가하였다. 세포를 37°C의 5%  $\text{CO}_2$ 에서 17~20 시간 동안 항온 처리한 다음, 배지를 12 ml의 DMEM, 10% FCS로 대체하였다. 변형되지 않은(글리코-조작되지 않은) 항체의 생산을 위해서, 세포를 항체 발현 벡터만으로 형질 감염시켰다. 글리코-조작된 항체를 생산을 위해, 세포를 두개의 플라스미드, 즉 하나는 항체 발현을 위한 플라스미드, 다른 하나는 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현의 플라스미드로 각각 4:1의 비율로 공형질 감염시켰다. 형질 감염 5 일 후, 상청액을 수확하고, 1200 rpm에서 5 분간 원심분리한 후, 4000 rpm에서

10 분간 제2 원심분리하고, 4°C에서 보관하였다.

[0238] 재조합 항-CD20 항체를 발현하는 안정된 포유동물 세포주의 생성

네오마이신 내성 유전자 발현 카세트를 함유하는 pETR1502 C2B8 항체-발현 벡터를 이용하여 전기 천공에 의해 BHK 세포(BHK21-13c)를 형질 감염시켰다. pETR1502 벡터 DNA를 염색체 통합한 한 세트의 클론을 얻기 위해 네오마이신-내성 클론을 우선 선별하였다. 그 다음 클론을 ELISA 분석을 이용하여 재조합 항체 생산에 대해 스크리닝하였다. 간단히, 전기 천공 24 시간 후, 세포를 계수한 다음, pEYFP-발현 벡터를 이용하여 행한 평형 조절 전기 천공의 형광 세포를 계수함으로써 형질 감염 계수를 측정하였다. 세포를 10% FCS 및 1 mg/ml의 네오마이신을 함유하는 인비트러스 선별 배지 중에 희석시켰다. 일반적으로 여덟개의 96-웰 플레이트를 상이한 농도의 형질 감염된 세포(웰당  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  및  $1 \times 10^2$ 개의 세포)를 이용하여 시딩하고, 클론을 확인할 수 있을 때 까지 항온 처리하였다. 일단 클론이 거의 융합성으로 성장하면, 상청액을 ELISA에 의해 항체 생산에 대해 분석하였다. ELISA 양성 클론을 24-웰에 우선 확장시키고, 이어서 6-웰 플레이트에 확장시킨 다음, T25 플라스크에 확장시켰다. T25 플라스크에서 성장시킨지 5 일 후, 최종 항체 적정량을 ELISA 분석을 이용하여 측정하였다. 이 전기 천공 및 선별 절차를 이용하여, C2B8 항-CD20 항체-발현 BHK 세포 클론(BHK-1502-28)을 분리하였는데, 상기한 배양 조건하에서  $13 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체가 생산되었다.

[0240] 재조합 항-CD20 항체 및 GnTIII-융합을 발현하는 안정한 포유동물 세포주의 생성

항-CD20 단일 클론 항체 유전자 및 네오마이신 내성 유전자를 구축 발현하는 클론 BHK-1502-28을 전기 천공에 의해 pETR1537 발현 벡터를 이용하여 형질 감염시켰다. pETR1537은 ManII-GnTIII 유전자와, 나중 IRES가 독립 발현된 인간의 CD4의 절단된 형태의 구축 발현을 위한 벡터이다. 벡터는 또한 퓨로마이신 내성 유전자 발현 카세트를 함유한다. pETR1537 벡터 DNA를 염색체 통합한 한 세트의 클론을 얻기 위해 퓨로마이신-내성 클론을 우선 선별하였다. 클론을 바이시트론 ManII-GnTIII+tCD4 유전자 발현 유닛의 발현 수준을 위한 표지로서 작용하는 절단된 CD4(tCD4)의 표면 발현에 대해 스크리닝하였다. 선별된 클론의 재조합 항체 생산을 ELISA 분석을 이용하여 검정하였다.

간단히, pETR1537 벡터 DNA를 XmnI로 선형화하였다. EYFP 발현 벡터로의 대조 형질 감염을 평행하게 실시하였다. 24 시간 후, 전체 세포에 대해 EYFP를 발현하는 세포를 계수함으로써 형질 감염 계수를 측정하였다. 모든 세포중 58%가 EYFP를 발현하고 있었다. 세포 생활력은 91%이었다. 형질 감염 1일 후, pETR1537 또는 pEYFP로 형질 감염된 세포를 1:100, 1:500, 1:1000 및 1:5000 희석으로 일련 희석시키고, 선별 배지(이비트러스 제품, 10% FCS, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 퓨로마이신, 1  $\text{ml}/\text{ml}$ 의 네오마이신)의 0.2  $\text{ml}$ 의 최종 부피로 96-웰 플레이트 내에서 시딩하였다. 클론은 2 주후 생활력을 갖았다. 이들을 확장시키고, 절단된 CD4(tCD4) 발현 및 항체 발현에 대해 스크리닝하였다.

[0243] tCD4 발현 수준의 스크리닝을 위해, 약 500,000개의 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 얼음 상에서 5  $\mu\text{l}$ 의 FITC 항-인간 CD4(스위스의 베톤 딱킨슨 제품)로 20 분간 항온 처리하였다. 2회 세척한 후, 세포를 0.5  $\text{ml}$ 의 FACS 완충액에 재현탁하고, FACS(도 17A-B)로 분석하였다. tCD4의 발현 수준이 양호한 클론을 분리하였다(BHK-1502-28-11). T25 플라스크에서 성장한지 5 일 후, 이는 ELISA에 의해 측정한 바, 17  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 적정량에서 대략 항-CD20 항체를 생산하였다.

[0244] 4. 비변형 및 글리코-조작된 항체의 생산 및 정제

[0245] 배양 배지의 수확

[0246] \*항체 발현 벡터로 형질 감염되거나, 또는 항체 발현 벡터 + GnTIII-융합 발현 벡터로 공형질 감염된 BHK 세포의 경우, 형질 감염 후 96 시간 동안 형질 감염된 세포를 배양한 후, 배양 상청액을 수확하였다. 예상 생산율에 따라, 몇몇 전기 천공(10-15)을 동일한 벡터에 대해 수행하였다.

[0247] 항체 발현 벡터로 형질 감염되거나, 또는 항체 발현 벡터 + GnTIII-융합 발현 벡터로 공형질 감염된 HEK293-EBNA 세포의 경우, 형질 감염 약 16 시간 후, 배양 배지를 신선한 배양 배지로 대체한 다음, 추가 120 시간 동안 형질 감염된 세포를 배양한 후 나중 배지를 수확하였다.

[0248] 안정된 BHK-1502-28-11 세포주에 대해, 배양물을 500,000개 세포/ml에서 시딩하고, 세포 밀도가  $1.7 \times 10^6$ 개 생활성 세포/ml이고, 세포 생활력이 69%인 배양 4 일 후 상청액을 수확하였다.

[0249] 항체\_정제

[0250] 2개의 순차 크로마토그래프 단계를 이용하여 단일 클론 항체를 배양 상청액으로부터 정제하였다. 제1 단계는 소의 IgGs 및 인간의 IgGs를 효율적으로 분리하는 pH 구배 용리를 이용한 단백질 A 크로마토그래피로 구성되었다. 이렇게 한 후, 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 행하여 샘플 완충액을 인산염 식염수(PBS)로 교환하였다.

## [0251] 5. 올리고사카라이드 분석

[0252] 항체를 PVDF 막 상에 또는 용액 중에 고정시킨 채로, PNGaseF 분해에 의하여 사카라이드를 항체로부터 효소적으로 방출하였다.

[0253] 방출된 올리고사카라이드를 함유하는 생성된 분해 용액을 MALDI/TOF-MS 분석을 위해 직접 제조하거나, 또는 MALDI/TOF-MS 분석을 위한 샘플 제조 이전에 엔도H 글리코시다아제로 추가로 분해시켰다.

[0254] PVDF 막으로 고정된 항체의 올리고사카라이드 방출 방법

[0255] PVDF(매사츄세츠주 베드포드 밀리포어 소재의 이모빌론 피 제품) 막으로 제조된 96-웰 플레이트의 웰을 100  $\mu$ l의 메탄올로 습윤시키고, 다중 스크린 진공 다양체(매사츄세츠주 베드포드 밀리포어 소재의 이모빌론 피 제품)에 적용된 진공을 이용하여 PVDF 막을 통해 액체를 유출시켰다. PVDF 막을 300  $\mu$ l의 물로 3 회 세척하였다. 그 다음 웰을 50  $\mu$ l의 RCM 완충액(8 M 우레아, 360 mM 트리스, 3.2 mM EDTA, pH 8.6)으로 세척하였다. 30-40  $\mu$ g에서, 항체를 10  $\mu$ l의 RCM 완충액을 함유하는 웰에 넣었다. 진공을 적용하여 웰 내의 액체를 막을 통해 유출시키고, 이어서 막을 50  $\mu$ l의 RCM 완충액으로 2회 세척하였다. 37°C에서 1 시간 동안 RCM중 50  $\mu$ l의 0.1 M 디티오태이탈을 첨가하여 이황 가교의 환원을 수행였다.

[0256] 환원 후, 진공을 적용하여 웰로부터 디티오태이탈 용액을 제거하였다. RCM 완충액 중에 50  $\mu$ l의 0.1 M 요오드 아세트산을 첨가하고, 암실에서 30 분간 실온에서 항온 처리하여 시스테인 잔기의 카르복시메틸화를 수행하기 전에, 300  $\mu$ l의 물로 3 회 세척하였다.

[0257] 카르복시메틸화 후, 웰을 진공으로 유출시키고, 이어서 300  $\mu$ l의 물로 3 회 세척하였다. 그 다음 엔도글리코시다아제의 흡수를 방지하기 위해, 실온에서 1 시간 동안 100  $\mu$ l의 폴리비닐파롤리돈 360의 1% 수용액을 항온 처리하여 PVDF 막을 차단하였다. 그 다음 온화한 진공에 의해 차단 시약을 제거하고, 300  $\mu$ l의 물로 3 회 세척하였다.

[0258] 임의의 전위 하전된 단당류 잔기를 제거하기 위하여 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.0 중 최종 부피 25  $\mu$ l로 2.5 mU의 펩티드-N-글리코시다아제 F(재조합 N-글리시나아제, 캘리포니아주 노베이토 소재 글리코 제품) 및 0.1 mU의 시알리다아제(캘리포니아주 노베이토 소재 글리코 제품)을 첨가하여 N-결합된 올리고사카라이드를 방출하였다. 37°C에서 3 시간 동안 분해를 수행하였다.

[0259] 용액 내 항체의 올리고사카라이드 방출 방법

[0260] 40~50  $\mu$ g의 항체를 25  $\mu$ l의 최종 부피로 2 mM 트리스, pH 7.0 중에서 2.5 mU의 PNGaseF(미국 소재 글리코 제품)와 혼합하고, 혼합물을 37°C에서 3 시간 동안 항온 처리하였다.

[0261] MALDI/TOF-MS\_중화\_올리고사카라이드\_피크에\_대해\_하이브리드\_이분\_올리고사카라이드\_구조를\_할당하기\_위한\_PNGaseF-방출\_올리고사카라이드의\_엔도글리코시다아제\_H\_분해의\_용도

[0262] 이어서 PNGaseF 방출된 올리고사카라이드를 엔도글리코시다아제 H(EC 3.2.1.96)로 분해시켰다. 엔도H 분해를 위해, 15 mU의 엔도H(스위스 소재 로크 제품)를 PNGaseF 분해(상기 용액법에서의 항체)에 첨가하여 최종 부피 30  $\mu$ l가 되게 하고, 혼합물을 37°C에서 3 시간 동안 항온 처리하였다. 엔도H는 N-결합된 올리고사카라이드의 키토비오스 핵의 N-아세틸글루코사민 잔기 사이에서 분해된다. 효소는 올리고만노오스와 가장 하이브리드된 유형의 글리칸만을 분해할 수 있는데, 여기서 복잡한 유형의 올리고사카라이드는 가수분해되지 않는다.

[0263] MALDI/TOF-MS의 샘플 제조

[0264] 방출된 올리고사카라이드를 함유하는 효소 분해를 최종 농도 150 mM가 되도록 아세트산을 첨가한 후, 실온에서 추가 3 시간 동안 항온 처리하고, 이어서 마이크로-바이오-스핀 크로마토그래피 칼럼(스위스 소재 바이오래드 제품)에 채워진 0.6 mL의 양이온 교환 수지(AG50W-X8 수지, 수소 형태, 100-200 메쉬, 스위스 소재 바이오래드 제품)를 통과시켜 양이온과 단백질을 제거하였다. 1  $\mu$ l의 생성된 샘플을 스테인레스 스틸 표적 플레이트에 적용하고, 1  $\mu$ l의 sDHB 기질을 이용하여 플레이트 상에서 혼합하였다. 1 mL의 에탄올/10 mM의 수성 염화나트륨

1:1(v/v) 중에 2 mg의 2,5-디하드록시벤조산과 0.1 mg의 5-메톡시살리실산을 용해시켜 sDHB 기질을 제조하였다. 샘플을 공기 건조시키고, 0.2  $\mu$ l의 에탄올을 첨가하고, 샘플을 최종적으로 공기 하에 재결정화시켰다.

[0265]

#### MALDI/TOF-MS

[0266]

질량 스펙트럼을 얻기 위해 사용된 MALDI-TOF 질량 분석계는 보야저 엘리트(Voyager Elite)(퍼스펙티브 바이오 시스템 제품)이었다. 20 kV 및 80 ns 지연의 가속으로 기구를 선형 배치로 작동시켰다. 이온의 질량 할당을 위해 올리고사카라이드 표준을 이용한 외부 보정을 이용하였다. 200 레이저 샷으로부터의 스펙트럼을 합계를 내서 최종 스펙트럼을 얻었다.

[0267]

#### 6. PBMC 제조

[0268]

히스토파크-1077(미국 미저리주 63178 세인트루이스 소재의 시그마 다이애그노스틱스 인코포레이션 제품)을 사용하고, 제조자 지침서를 따라서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 제조하였다. 간단히 말하면, 혈액 내 자연살세포(NK)의 비율을 증가시키기 위해 최대 출력에서 1 분간 달리도록 요청받은 자원자로부터의 해파린 첨가 주사기를 취하였다. 혈액을 Ca나 Mg를 함유하지 않은 PBS를 사용하여 1:0.75-1.3으로 희석하고, 히스토파크-1077 상에 놓았다. 구배를 깨뜨리지 않고 실온에서 30 분간 400 x g에서 원심분리하였다. PBMC를 함유하는 간기를 수집하고, PBS(두개의 구배로부터 세포당 50 ml)로 세척하고, 실온에서 10 분 동안 300 x g에서 원심분리하여 수화하였다. 웰렛을 PBS로 재현탁한 후, PBMC를 계수하고, 실온에서 10 분간 200 x g에서 원심분리에 의해 2회 세척하였다. 그 다음 후속 처리를 위해 셀을 적당한 배지 내에서 재현탁시켰다.

[0269]

#### 7. NK 세포 분리

[0270]

CD16- 및 CD56-양성 세포(독일 51429 베기스크 글래바흐 소재의 밀테니 바이오테크 게엠바하 제품인 MACS 시스템)에 결합하지 않는 자기 구슬을 이용하여 음성 선별 절차를 적용하여 인간의 NK 세포를 PBMC로부터 분리하였다. PBMC를 빙냉 MACS 완충액(2% FCS 및 2 mM EDTA를 함유하는 PBS) 중에서 1회 세척하고, FCS와 MACS 완충액의 1:1 혼합물의 ml당 20 Mio 세포로 재현탁시키고, 4°C에서 10 분간 항온 처리하였다. 그 다음 세포를 웰렛화하고, 10% FCS를 함유하는 MACS 완충액을 이용하여 천만개의 세포당 80  $\mu$ l로 재현탁시켰다. 그 다음 천만개의 세포당 20  $\mu$ l의 햅텐-항체 용액을 첨가하였다. 관을 반복 와류시키면서 세포를 4°C에서 10 분간 항온 처리하였다. 10 x 이상의 표지 부피로 MACS 완충액으로 2회 세척한 후, 80  $\mu$ l당 천만개의 세포로 10% FCS를 함유하는 MACS 중에 세포를 재현탁시키고, 천만개의 세포당 20  $\mu$ l의 항-햅텐-마이크로비드를 첨가하였다. 관을 반복 와류시키면서 4°C에서 15 분간 항온 처리하였다. MACS 완충액으로 1회 세척한 후, 500  $\mu$ l의 MACS 완충액 중 일억개의 세포 이하로 세포를 재현탁시키고, MINI-MACS 마그넷 내에 위치한 LS MACS 칼럼 상에 넣고, 3 ml의 MACS 완충액으로 평형화시켰다. 칼럼을 3 x 3 ml의 MACS 완충액으로 세척하였다. 흐름-통과 분획 중 세포를 수집하고, 이어서 NK 세포로서 사용하였다. CD56 발현에 의해 측정된 순도는 88-95%였다.

[0271]

#### 8. ADCC 분석

[0272]

주효 세포로서 PBMC 또는 NK를 상기한 바와 같이 하여 제조하였다. 표적비에 대한 효과기는 PBMC 및 NK 세포 각각에 대해 25:1 및 10:1이었다. 동근 바닥 96 웰 플레이트의 웰당 50  $\mu$ l를 첨가하기 위해, 적절한 농도에서 AIM-V 배지 내에서 주효 세포를 제조하였다. C2B8 항체의 표적 세포는 10% FCS를 함유하는 DMEM에서 성장한 SKW6.4 또는 나말와 B 립프종 세포였다. 표적 세포를 PBS 중에 세척하고, 계수하고, 마이크로웰당 100  $\mu$ l로 30,000개의 세포를 첨가하기 위해 ml당 삼십만개로 AIM-V 중에 재현탁시켰다. 항체를 AIM-V 중에 희석시키고, 예비-플레이트된 표적 세포에 50  $\mu$ l로 첨가하고, 실온에서 10 분간 표적에 결합하도록 두었다. 그 다음 주효 세포를 첨가하고, 플레이트를 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 습한 대기 중에 37°C에서 4 시간 동안 항온 처리하였다. 세포독성 검출 키트(스위스 로트크류즈 소재 로크 다이애그노스틱스 제품)를 이용하여 순상된 세포로부터 냉출된 락테이트 디하이드로게나아제를 측정(LDH)하여 표적 세포 사멸을 측정하였다. 4 시간의 항온 처리 후, 플레이트를 800 x g에서 원심분리하였다. 각 웰로부터 100  $\mu$ l의 상청액을 새로운 투명한 평편 바닥 96 웰 플레이트로 옮겼다. 키트로부터 100  $\mu$ l의 착색 기재 완충액을 웰마다 첨가하였다. SOFTmax PRO 소프트웨어(미국 캘리포니아주 94089 서니베일 소재의 몰레큘라 디바이스 제품)를 이용하여 10 분 이상 동안 490 nm에서 ELISA 판독기로 착색 반응의 V<sub>max</sub> 값을 측정하였다. 표적 세포와 주효 세포만을 함유하고 항체를 함유하지 않는 웰로부터 자발적 LDH 방출을 측정하였다. 최대 방출은 표적 세포와 1% 트리톤 X-100만을 함유하는 웰로부터 측정되었다. 특정 항체-매개 사멸비는 다음과 같이 하여 계산하였다:  $((x-SR)/(MR-SR))^*$ 100(여기서, x는 특정 항체농도에서의 V<sub>max</sub>의 평균이고, SR은 자발적 방출의 V<sub>max</sub>의 평균이며, MR은 최대 방출의 V<sub>max</sub>의 평균임).

[0273]

9. NK 세포 상의 Fc<sub>γ</sub>RIIIA 결합

새로 분리된 NK 세포를 200 x g에서 5 분간 원심분리하고, 실온에서 5 분간 3 x 10<sup>5</sup>개 세포/ml로 항온 처리함으로써, 0.09%(중량/부피) 젖산 용액(140 mM NaCl, 5 mM KC1, pH 3.9)으로 예비처리하여 NK 세포 관련 IgG를 제거하였다[문헌(De Haas M., J. *Immuno1.* 156: 2948 (1996))].

[0275]

PBS, 0.1% BSA, 0.01% 나트륨 아지드로 세포를 2회 세척하고, 농도를 PBS, 0.15 BSA, 0.01% 나트륨 아지드 중 2.6 x 10<sup>6</sup>개 세포/ml로 조정하였다. 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µg/ml의 항체 변이체를 이용하여 4°C에서 30 분 동안 5 x 10<sup>5</sup>개 세포를 항온 처리하였다. 그 다음 세포를 2회 세척하고, 4°C에서 30 분 동안 1:200 형광물질 이소티오시아네이트-컨쥬게이트된 F(ab')<sub>2</sub> 염소 항인간 IgG(미국 펜실베이니아주 웨스트 그루브 소재의 잭슨 이뮤노리서치 제품) 및 5 µl/5 x 10<sup>5</sup>개 세포의 항인간 CD56-PE(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 비디 파르밍겐 제품)로 항온 처리하여 항체 결합을 검출하였다 [문헌(Shields R. et al. *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740(2002))].

[0276]

항체 변이체에의 결합을 의미하는 형광 세기를 FACSCalibur(미국 캘리포니아주 산호세 소재의 비디 바이오사이언스 제품) 상에서 CD56+ 세포에 대해 측정하였다.

[0277]

## 10. 라지 림프종 세포에 대한 FcgammaRIIb 결합

라지 B-세포 인간 림프종 세포를 PBS(농도 0.3 Mio 세포/ml) 중에서 37°C에서 20 분간 세척하였다. 그 다음 세포를 PBS, 0.1% BSA, 0.01% NaN<sub>3</sub> 중에 222만개 세포/ml로 재현탁시키고, FACS 판당 180 µl를 첨가하였다. 10 배 항체 희석액(0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 µl/ml)의 L19-비변형 및 L19 글리코-조작된 단일 클론 항체를 라지 세포에 첨가하고, 4°C에서 30 분간 항온 처리하였다(최종 세포 농도 2백만개 세포/ml). 2회 세척한 후, 1:200의 형광물질 이소티오시아네이트-컨쥬게이트된 F(ab')<sub>2</sub> 염소 항인간 IgG(미국 펜실베이니아주 웨스트 그루브 소재의 잭슨 이뮤노리서치 제품)를 세포에 첨가하고, 4°C에서 30 분간 항온 처리하였다. 1회 세척 후, 세포를 0.5 ml의 PBS, 0.1% BSA, 0.01% NaN<sub>3</sub>에 재현탁시키고, 항체 변이체에의 결합을 의미하는 형광 세기를 FACSCalibur(미국 캘리포니아주 산호세 소재의 비디 바이오사이언스 제품) 상에서 생세포에 대해 측정하였다.

## 11. 도움체 의존성 세포독성 분석

\*표적 세포를 계수하고, PBS로 세척하고, ml당 백만개의 세포로 AIM-V(인비트로겐 제품) 중에 재현탁시켰다. 50 µl의 세포를 평면 바닥 96 웰 플레이트에 웰마다 풀레이팅하였다. AIM-V 중에서 항체 희석액을 제조하고, 세포에 50 µl로 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 항체가 세포에 결합하도록 두었다. 인간 혈청 도움체(Quide1)를 새로 해동하고, AIM-V로 3 배로 희석하고, 세포에 50 µl로 첨가하였다. 토끼 도움체(세달레인 래보리토리즈 제품)를 제조자의 지침서대로 제조하고, AIM-V로 3 배로 희석하고, 세포에 50 µl로 첨가하였다. 대조로서, 분석에 첨가하기 전에 도움체 공급원을 56°C에서 30 분간 가열하였다.

분석 플레이트를 37°C에서 2 시간 동안 항온 처리하였다. LDH 방출을 측정하여 세포 사멸을 측정하였다. 간단히, 플레이트를 300 x g에서 3 분간 원심분리하였다. 웰당 50 µl의 상청액을 새로운 96 웰 플레이트에 옮기고, 세포독성 키트(로크 제품)로부터의 50 µl의 분석 시약을 첨가하였다. ELISA 판독기를 이용한 운동 측정은 상청액 중 LDH 농도에 해당하는 V<sub>max</sub>를 결정하였다. 1% 트리톤 X-100의 존재 하에 세포를 항온 처리하여 최대 방출을 측정하였다.

## 결과 및 논의

항-CD20 키메릭 IgG1 항체(C2B8 키메릭 항체, 또한 rituximab라고 공지되어 있기도 함)의 글리코조작된 버전은 포유동물 세포의 배양액을 항체 유전자의 발현을 위한 벡터로, 그리고 GnTIII 활성을 지닌 다양한 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 발현을 위한 벡터로 동시에-트랜스펙션 처리함으로써 제조하였다. 동일 항체의 비변형된(비-글리코조작된) 버전은 포유동물 세포를 단지 항체 유전자 발현을 위한 벡터만으로 트랜스펙션 처리함으로써 제조하였다. 이 트랜스펙션 처리된 세포를 적어도 3일 동안 배양 상태로 유지하고, 배양 배지로부터 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해, 분비된 제조합 항체를 정제하였다. GnTIII 활성을 지닌 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 발현은, 그러한 폴리펩티드를 생산하지 않는 세포와는 상대적으로, 세포 생존율, 세포 성장 또는 항체

생성에 영향을 미치는 어떠한 유의적인 작용을 갖고 있지 않았다.

[0284] 이어서, 정제된 항체는 그 글리코실화 패턴에 대하여 분석하였다. 이러한 항체는 오직 사람 IgG1 Fc 영역의 Asn297 잔기에만 부착된 N-연결된 올리고사카라이드를 운반한다. 이 올리고사카라이드는 PNGaseF 분해(digestion)로 항체로부터 효소적으로 제거하고, 이어서 MALDI/TOF-MS로 분석하였다. 이러한 기법을 이용하면, 총 원래 Fc-올리고사카라이드 집단 내에 있는 상이한 올리고사카라이드 종의 분율을 결정하는 것이 가능하고, 또한 스펙트럼에서 상이한 피크에 구조를 할당하는 것도 가능하다(Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180(1999)).

[0285] 도 1은 BHK 세포에서 생성된 재조합 C2B8 항-CD20 키메릭 IgG1 항체로부터 유래한 중성 올리고사카라이드 MALDI/TOF-MS 프로필을 도시한 것이다. 그러한 세포는 항체 발현 벡터 pETR1502로 트랜스펙션 처리하였다. 도 2 내지 도 4는 GnTIII 활성을 지닌 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로 조작한 BHK 세포에 의해 생성된 동일 항체의 경우에 상응하는 프로필을 도시한 것이다. 도 2에서 프로필은 벡터 pETR1166으로부터 발현된 야생형 GnTIII를 암호화하는 핵산의 사용으로 인한 결과로 형성된 것이다. 도 3에서 프로필은 GnTIII의 C-말단 촉매 도메인에 융합된 GnTI의 편재화 도메인을 N-말단에서 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 사용으로 인하여 결과로 형성된 것이다. 이 융합 유전자는 벡터 pETR1425로부터 발현되었다. 도 4에서 프로필은 GnTIII의 촉매 도메인에 융합된 골지  $\alpha$ -만노시다제II(ManII)의 편재화 도메인을 N-말단에서 포함하는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 사용으로 인하여 결과로 형성된 것이다. 이 융합 유전자는 벡터 pETR1506으로부터 발현되었다.

[0286] 비변형된 항체는 0개, 1개 및 2개 갈락토스 잔기를 각각 지닌 비안테나리(biantennary), 코어-푸코실화된 복합체 올리고사카라이드와 일치하는 1485, 1648 및 1810의  $m/z$  비에서 피크를 갖는, 전형적인 올리고사카라이드 프로필(도 1)을 갖는다. 유사한 프로필이 다른 표준 포유동물, 산업적 세포주, 예컨대 CHO 및 마우스 골수종 세포에서 생성된 비조작된 IgG1 항체의 Fc-영역 올리고사카라이드의 경우에 발견된다(Lifely, M.R. et al., *Glycobiology*, 5:813-822(1995)). 야생형 GnTIII의 발현에 의한 항체 생성 세포의 조작은, 비변형된 항체에서 발견되는 비이등분된 푸코실화 올리고사카라이드 피크의 이등분된 부분(counterpart)인 1689, 1851 및 2014의  $m/z$  비에서 피크를 갖춘, 이등분된 코어-푸코실화 복합체 비안테나리 올리고사카라이드(도 2)를 주로 유도한다. 또한, GnTIII 촉매 도메인이 GnTI 골지 편재화 도메인을 통해 편재화되어 있는 경우인 GnTI-GnTIII 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 발현에 의한 항체 생성 세포의 조작도, 이등분된 복합체 비안테나리 올리고사카라이드(도 3에서  $m/z$  1689 및 1851에서 존재하는 피크를 유의할 것)를 주로 유도한다. 그러나, 야생형 GnTIII과는 상대적으로, GnTI-GnTIII 융합의 이용은 이등분된 비푸코실화 구조 및 이등분된 하이브리드 구조의 증가를 유도한다(도 2 및 도 3에서 전체에 상대적인 1664, 1810, 1826 및 1973의  $m/z$ 를 지닌 피크의 비율을 비교한다). 이 등분된 비푸코실화 구조 및 이등분된 하이브리드 구조의 합성은, GnTI-변형된 올리고사카라이드 기질의 경우, 재조합 GnTIII-촉매 도메인과 (i) 내인성 코어,  $\alpha$ , 1,6-푸코실트란스퍼라제, (ii) 골지  $\alpha$ -만노시다제 II(ManII) 및 (iii) GnTII 간의 경쟁으로 인하여 결과로 형성되는데, 이는 일단 올리고사카라이드가 GnTIII-촉매화 반응을 통해 첨가된 양분하는 GlcNAc에 의해 변형된 후에는 3가지 다른 효소가 더 이상 이등분된 올리고사카라이드를 변형시키는 작용을 할 수 없기 때문이다. 그러므로, 양분하는 GlcNAc의 첨가에 의한 ManII의 차단 작용은 또한 GnTII를 효과적으로 차단하는데, 이는 GnTII가 N-연결된 올리고사카라이드 생합성 경로에서 ManII의 다운스트림을 작용하기 때문이다.  $m/z$  1664 및 1826에서 피크는 비푸코실화되고, 반면에  $m/z$  1810 및 1973에서 피크는 푸코실화된다. 하이브리드 올리고사카라이드와 복합체 올리고사카라이드(도 8a)를 구별할 수 있는 EndoH 글리코시다제 분해는, 이들 피크의 증가가 Fc-부착되어 있는 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드 및 이등분된 하이브리드 올리고사카라이드의 비율 증가에 기인한다는 점을 확인하는 데 이용하였다(하기 참조).

[0287] 본 명세서에서 사용된 다른 GnTIII 활성-암호화 핵산과는 대조적으로, GnTIII 촉매 도메인이 ManII 골지 편재화 도메인을 통해 편재화되어 있는 경우인 ManII-GnTIII 융합 폴리펩티드(서열 번호: 14)를 암호화하는 핵산의 발현에 의한 항체 생성 세포의 조작은, 이등분된 비푸코실화 구조 및 이등분된 하이브리드 구조를 주로 유도한다(도 4에서  $m/z$  1664, 1810, 1826 및 1973에서 피크를 비교한다). 그러므로, 야생형 GnTII 및 GnTI-GnTIII 융합(서열 번호: 12 및 13)과는 상대적으로, ManII-GnTIII 융합은 Fc-부착되어 있는 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드 및 이등분된 하이브리드 올리고사카라이드의 합성에서 보다 효율적이었다(도 2, 도 3 및 도 4에서 전체에 상대적인  $m/z$  1664 및 1810을 지닌 피크의 비율을 비교한다). 야생형 GnTIII, GnTI-GnTIII 융합 및 ManII-GnTIII 융합을 암호화하는 핵산의 발현으로 인하여 결과적으로 형성되는 이등분된 비푸코실화 Fc-올리고사카라이드는 각각 대략 4%, 13% 및 33%이었다. 이등분된 올리고사카라이드는 비변형된(비조작된) 항체에서는 겹출되지 않았다.

[0288] 항체 생성 세포에서 ManII-GnTIII 융합 구조체(construct)의 발현을 증가시키는 공정은 추가로 이등분된 비푸코

실화 올리고사카라이드의 비율 증가를 유도하였다. 이는 트랜스펙션 처리된 HEK293-EBNA 세포에서 에피솜(episomal) 복제를 위한 OrfP를 지닌 벡터(pETR1519)로부터 ManII-GnTIII 구성체를 발현시킴으로써 입증하였다. 이 발현 시스템은 높은 수준의 발현을 유도하는 것으로 공지되어 있으며, 또한 벡터 pETR1520로부터 항체 유전자를 발현시키는 데에도 이용하였다. 이러한 시스템에서 높은 수준으로 발현되는, 정제되어 있는 비변형된(비-글리코조작된) 항체로부터 유래한 올리고사카라이드 프로필은 도 5에 도시되어 있는데, 이 도 5는 역시 마찬가지로 0개, 1개 및 2개 갈락토스 잔기를 보유하는 비이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드 피크를 지닌 전형적인 올리코사카라이드 프로필을 도시한 것이다(예를 들면, BHK 세포에서 발현되거나 또는 HEK293-EBNA 세포에서 보다 높은 수준으로 발현되는 비변형된 항체의 유사한 올리고사카라이드 프로필을 도시하고 있는 도 1과 도 5를 비교한다). 이러한 시스템에서 보다 높은 수준으로 발현되는 ManII-GnTIII 융합을 암호화하는 핵산으로 항체 생성 세포를 조작하는 공정은, 대부분의 Fc-올리고사카라이드가 양분되어 비푸코실화되는 경우인 항체 생성을 유도하였다(도 6을 참조할 수 있는데, 이 도 6에서는  $m/z$  1664 및 1826에서 이등분된 비푸코실화 하이브리드 올리고사카라이드가 전체 올리고사카라이드의 90% 이상을 함께 구성한다).

[0289] 상기 언급한 바와 같이, 엔도글리코시다제 H(EndoH)는 이등분된 비푸코실화 구조와 이등분된 하이브리드 구조의 MALDI 프로필에서 관찰된 상이한 올리코사카라이드 피크에 대한 할당을 확인하는 데 사용하였다. GnTIII(M2) 과 다발현으로 글리코조작된 HEK293 세포에 의해 생성된, 항-CD20 키메릭 IgG1 항체로부터 유도되는 PNGaseF-분해된 글리칸 및 PNGaseF + EndoH 분해된 글리칸의 MALDI/TOF-MS 중성 올리코사카라이드 프로필은, 도 7에 도시되어 있다.  $m/z$  1664에서 피크는 2가지 상이한 글리칸, 즉 비푸코실화되어 있는 하이브리드-이등분된 유형 또는 비푸코실화되어 있는 복합체-비이등분된 유형으로 할당될 수 있다. 상이한 구조는 동일 모노사카라이드 조성으로 인하여 동일  $m/z$  비를 나타낸다(도 8b).

[0290] 엔도글리코시다제 H에 의한 PNGaseF-유리된 글리칸의 분해는 주요 피크가  $m/z$  1664에서 1460으로 이동한 새로운 구조를 생성한다(도 7b). 이 차이는 GlcNAc 잔기의 질량에 해당한다. 상기 언급한 바와 같이, EndoH는 복합체 유형 올리고사카라이드를 절단할 수 없다. 그러므로,  $m/z$  1664에서 주요 피크는 엔도글리코시다제 H 분해 후 비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형으로 할당될 수 있다.

[0291] 복합체 이등분된 글리칸 또는 하이브리드 이등분된 글리칸에 할당될 수 있는 다른 피크는  $m/z$  1810에서 존재한다. EndoH 분해 후, 피크가 사라져서 구조는 푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형으로 할당될 수 있다.  $m/z$  1810 피크로부터 1개 GlcNAc와 1개 푸코즈(코어 a-1,6-푸코실화되어 있는 환원성 말단 GlcNAc 잔기로부터 유래함)를 삼감하는 공정은  $m/z$  1460의 구조를 생성한다.  $m/z$  1502에서 EndoH 분해에 의한 그 피크의 소멸(GlcNAc 잔기가 제거됨) 및  $m/z$  1298에서 피크의 소멸은, 1502 피크가 비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형에 할당될 수 있다는 것을 입증해 보여준다.  $m/z$  1647에서, EndoH 분해 후 그 피크의 소멸은 그러한 피크가 푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 구조다는 것을 입증해 보여준다. 1개 GlcNAc 및 1개 푸코즈 잔기의 제거는  $m/z$  1298의 구조를 생성한다.  $m/z$  1826에서 피크, 비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형은 EndoH에 의해 분해되었다. 이는  $m/z$  1662를 지닌 구조를 생성하였다. EndoH 분해 후  $m/z$  1053에서 피크는 EndoH에 의해 분해된, 높은 만노즈 유형(1257  $m/z$ )에 할당될 수 있다.  $m/z$  689에서 피크(복합체 이등분된 유형)는 예상되는 바와 같이 EndoH 분해에 의해 영향을 받지 않았다. 합성에서, 표 1에서 얻어지는 데이터로부터, 본 발명자들은 올리고사카라이드 구조의 88%가 양분하는 GlcNAc를 운반하고, 그 중 60%가 비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 구조이며, 22%가 푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 올리고사카라이드 구조이고, 6%가 푸코실화되어 있는 복합체 이등분된 올리고사카라이드 구조이다.

### 표 1

$m/z$	가능한 구조	EndoH 전 상대적 %	EndoH 후 예상치 $m/z$	EndoH 후 관찰치 $m/z$	EndoH 후 상대적 %	할당
1256	고 만노즈	9	1053	1053	11	고 만노즈 (9%)
1502	비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형 또는 비푸코실화되어 있는 복합체 유형	7	1298 또는 1502	1298	13	비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형(7%)

1647	푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형 또는 푸코실화되어 있는 복합체 유형	7	1298 또는 1647	1298 -	13	푸코실화된 하이브리드 이등분된 유형 (7%)
1664	비푸코실화되어 있는 하이브리드이등분된 유형 또는 비푸코실화되어 있는 복합체 유형	49	1460 또는 1664	1460 -	60	비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형(49%)
1689	푸코실화되어 있는 복합체 이등분된 유형	3	1689	1689	5	푸코실화되어 있는 복합체 이등분된 유형(3%)
1810	푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형 또는 푸코실화되어 있는 복합체 유형	15	1460 또는 1810	1460 1810	60 20	푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형(13%) 및 푸코실화되어 있는 복합체 유형(2%)
1826	비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형	4	1622	1622	7	비푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형(4%)
1851	푸르코실화되어 있는 복합체 이등분된 유형	3	1851	1851	2	푸코실화되어 있는 복합체 이등분된 유형(3%)
1972	푸르코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형	3	1622	1622	7	푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형(3%)

[0293] 질량 벨런스(몰 분율, %):

[0294] a) m/z 1502 및 1647에서 피크:  $7\% + 7\% = 14\%$ (예상치). 양자의 피크에서 EndoH 분해는 m/z 1298(EndoH 후 13%가 얻어짐)을 생성한다.

[0295] b) m/z 1664 및 1810에서 피크:  $49\% + 13\% = 62\%$ . EndoH는 m/z 1460(60%가 얻어짐)을 생성한다.

[0296] c) m/z 1826 및 1972에서 피크:  $4\% + 3\% = 7\%$ . EndoH는 m/z 1662(7%)를 생성한다.

[0297] 요약:

[0298] 이등분하는 GlcNAc를 함유하는 구조의 총 상대적 백분율: 88%

[0299] 비푸코실화되어 있는 하이드리드 이등분된 유형: 60%

[0300] 푸코실화되어 있는 하이브리드 이등분된 유형: 22%

[0301] 푸코실화되어 있는 복합체 이등분된 유형: 6%

[0302] 상기 데이터(도 1 내지 도 6)는 GnTIII 발현의 수준과, 골지에 GnTIII 촉매 도메인을 표적화시키는 데 사용되는 특정한 편재화 도메인이 모두 재조합 GnTIII-촉매 도메인과 내인성 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트란스퍼라제, (ManII) 및 GnTII 효소 사이에서 GnTII-변형된 올리고사카라이드 기질에 대한 경쟁에 영향을 미친다는 것을 보여준다. 이러한 경쟁에서는 GnTII의 발현이 높아지면 높아질수록, 이등분된 하이브리드 올리고사카라이드 및 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드의 수준이 더욱더 높아지고, 이와 동시적으로 이등분된 복합체 올리고사카라이드 및 이등분된 푸코실화 올리고사카라이드의 수준이 더욱더 낮아진다. 또한, 이는 야생형 GnTIII의 경우에도 이미 주지되어 있다(Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180(1999)). 그러나, 이등분된 올리고사카라이드의 유사한 전반적인 수준에도 불구하고, GnTII를 통하거나, 또는 ManII 편재화 도메인을 통해 GnTIII 접촉 도메인을 편재화하는 공정은, 야생형 GnTIII과는 상대적으로, 내인성 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트란스퍼라제, ManII 및 GnTII 효

소에 대하여 GnTI-변형된 올리고사카라이드 기질의 경우 보다 효과적인 경쟁을 유도한다.

[0303]

GnTI-GnTIII 융합의 보다 높은 효율은, 야생형 GnTIII과 비교하여, 이등분된 하이브리드 올리고사카라이드 및 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드의 합성의 경우, GnTIII와는 상대적으로 GnTI를, 글리코프로테인 기질 수송의 시스 대 트랜스 방향으로, 초기 골지 분배시킴으로써, 설명할 수 있다. GnTI 및 ManII의 정교한 Glogi 분배는 이미 정량적인 면역전자 현미경법에 의해 결정되었다(Rabouille, C. et al. *J. Cell Sci.* 108:1617-27(1995)). 양자의 효소는 트랜스 시스테네(cisternae)에 대하여 중앙에서 보다 높은 수준으로, 골지 스택의 중앙 및 트랜스 시스테네에서 주로 편재화되면서, 골지를 따라 동시-분배되어 있다. 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트란스파라제, GnTII 및 야생형 GnTIII의 정교한 정량적 공간 분배는 아직까지 결정되어 있지 않았다. 그러나, 상기에서는, 이등분된 하이브리드 올리고사카라이드 및 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드의 합성의 경우, 왜 ManII-GnTIII 융합이 GnTI-GnTIII 융합보다 유의적으로 더 효율적인지를 설명하지 않고 있는데, 이는 GnTI 및 ManII가 모두 골지 소구획(subcompartment)을 따라 동일한 공간 분배를 갖고 있기 때문이다.

[0304]

ManII-GnTIII 융합의 보다 높은 효율은 중앙 골지 시스테네와 트랜스 골지 시스테네의 물리적 소구획 내에서 상대적으로 조직화된 작용성 글리코실화 반응 소구획의 존재를 나타낸다. 소위 "중앙 Glogi 글리코실화 효소", GnTI, GnTII 및 ManII는 고분자량 복합체로서 골지 내에 존재하는 것으로 생각된다. 그러나, 편재화 도메인이 이러한 효소들로 하여금 그러한 복합체의 부분을 형성하게 하는 경우, 이는 GnTI-GnTIII 융합 및 ManII-GnTIII 융합의 경우 동일하다. 재조합 GnTI-GnTIII 융합의 발현은 내인성 야생형 GnTI 효소를 Fc-올리고사카라이드의 합성에 유의적인 임의의 정도로 배치하는 것을 유도하지 못하는데, 이는 본 명세서에서 사용된 모든 GnTIII 구성체가 GnTI 및 GnTIII 반응에 의해 모두 변형되는 대부분의 올리고사카라이드를 유도하기 때문이다..

[0305]

본 발명자들의 데이터는, ManII 편재화 도메인에 의해, 보다 정교한 작용성 페어링(pairing) 공정이 내인성 GnTI의 촉매 도메인과 재조합 ManII-GnTIII 융합 사이에서 일어난다는 것을 보여준다. 반응 생성물이 효소로부터 멀리 확산되는 것과는 상대적으로 제1 반응 생성물이 제2 접촉 부위로 이동하는 것을 바람직하게 하는 방식으로, 생합성 경로에서 효소 촉매화 후속 반응을 조직적으로 페어링하는 공정은, 당분해 및 폴리케타이드 생합성과 같은 다른 생합성 경로에서도 일어날 수 있는 것으로 공지되어 있다. GnTI 및 ManII는, 적어도 이들 효소 중 하나를 소포체에 재편재화시키는 경우, "킨 올리고머(kin oligomer)"를 형성하는 것으로 보고되었다(Nilsson, T. et al. *EMBO J.* 13(3): 562-74(1994)). 이러한 2가지 효소의 줄기 영역 각각에서 전하를 띤 아미노산 잔기의 페어는 이러한 키 인지(kin recognition)에 결정적인 것으로 밝혀졌다. GnTI에서 잔기는 ManII의 것과 반대 전하를 보유하였다. 본 발명자들은 N-연결된 올리고사카라이드 생합성 경로의 이러한 부분과 관련된 다른 골지 글리코실화 효소, 즉 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트란스파라제(Man II의 경우에서와 같이 상보적 전하 대신 GnTI와 동일한 전하), ManI 및 GnTII의 줄기 영역의 동등한 위치에서 유사한 잔기를 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 이러한 잔기가 종에 걸쳐 보존되고 있다는 점도 확인하였다. 이러한 잔기는 효소에 의해 형성된 고분자량 복합체 내로 혼입하거나 또는 심지어 골지 편재화시키는 데 필수적인 것이 아님을 제시하고 있긴 하지만(Opat, A.S. et al. *J. Bio. Chem.* 276(16):11836-45(2000)), 상기 잔기는 올리고사카라이드 생합성 동안 촉매 도메인의 보다 정교한 페어링에 관련되어 있음을 추측할 수 있다. 그러한 페어링은 비가역적일 필요는 없지만, 효소들 간의 일시적인 역학적 상호작용에 의해 조정할 수 있다. 줄기 영역 또는 촉매 영역 이외에서 페어링에 대한 추가적인 결정자(determinant)가 존재할 수 있다. 그러나, ManII의 촉매 도메인으로부터 특이적 GnTI-ManII 페어링에 대한 임의적인 기여는 GnTIII 촉매 도메인을 함유하는 재조합 융합에서 손실될 수 있다.

[0306]

도 9 내지 도 11는 상이한 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화되어 있고 GnTIII 활성을 지닌 폴리펩티드를 암화화하는 핵산의 항체 생성 세포에서 과다발현으로 인하여 결과로 형성되는 증가된 항체-의존성 세포독성(ADC C)을 입증한 것이다. GnTI 골지 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화되고 있고 GnTIII 활성을 지닌 재조합 폴리펩티드의 발현으로 인하여 결과로 형성되는 증가된 ADCC는 도 9에 도시되어 있다. 도 9의 ADCC 분석(assay)에 사용된 대조군 항체의 올리고사카라이드 프로필은 도 1에 도시되어 있다. 도 9의 ADCC 분석에 사용된 글리코조작된 항체의 올리고사카라이드 프로필은 도 3에 도시되어 있다. 글리코시다제, ManII, 골지 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화되어 있고 GnTIII 활성을 지닌 재조합 폴리펩티드의 발현으로 인하여 결과로 형성되는 증가된 ADCC는 도 10에 도시되어 있다. 도 10의 ADCC 분석에 사용된 대조군 항체의 올리고사카라이드 프로필은 도 5에 도시되어 있다. 도 10의 ADCC 분석에 사용된 글리코조작된 항체의 올리고카사라이드 프로필은 도 6에 도시되어 있다.

[0307]

도 11은 ManII 골지 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화되어 있고 GnTIII 활성을 지닌 재조합 폴리펩티드의 발현이 야생형 GnTIII 폴리펩티드를 그 자체 GnTIII 골지 편재화 도메인과 함께 사용하는 것과는 상대적으로 증가된 ADCC 활성을 유도한다는 것을 보여주고 있다. 야생종 GnTIII의 발현에 의해 글리코조작되어 도 11의 ADCC 분

석에 사용되는 항체의 올리고사카라이드 프로필은 도 2에 도시되어 있다. GnTIII 활성을 지닌 융합 폴리펩티드의 발현에 의해 글리코조작되고, ManII 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화되어, 도 11의 ADCC 분석에 사용되는 항체의 올리고사카라이드 프로필은 도 4에 도시되어 있다. 이러한 데이터는 또한 이등분된 하이브리드 올리고사카라이드 및 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드를 비롯한 이등분된 올리고사카라이드를 지닌 항체가 복합체 푸코실화 비이등분된 올리고사카라이드를 지닌 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성을 증가시켰다는 것을 보여준다. 도 10의 ADCC 분석에서 사용된 보다 큰 활성 항체의 이등분된 올리고사카라이드 모두가 이등분된 비푸코실화 하이브리드 올리고사카라이드이다는 점을 유의해야 한다. 앞에서 설명한 바와 같이, GnTIII 활성을 지니고 ManII 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화된 융합 폴리펩티드는 비푸코실화되어 있는 이등분된 올리고사카라이드의 보다 효율적인 합성을 유도하고, 도 11은 이러한 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드의 증가된 수준을 지닌 항체가 보다 낮은 수준의 그러한 올리고사카라이드를 지닌 항체와는 상대적으로 ADCC에서 보다 더 활성을 갖는다는 것을 보여준다. ADCC 활성 증가는 Fc-결합된 올리고사카라이드 집단 내에 있는 그러한 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드 분율의 증가와 상관 관계가 있으며, 큰 증가는 이러한 분율이 15% 내지 20%인 경우에 나타난다.

[0308] 자연 사멸(NK) 세포는 ADCC의 중요한 매개자(mediator)인 것으로 공지되어 있다. 이러한 세포는 그 표면 상에 활성화 Fcgamma 수용체 IIIA(또한, CD16a라고 공지되어 있기도 함)를 운반한다. 표적-세포 결합된 항체 중 Fc 영역을 NK 세포 상에서 Fcgamma RIIIA 수용체에 결합시키는 공정은 NK 세포 상에서 그 수용체를 가교결합시키고 후속적으로 ADCC를 유도하는 데 필수적이다. 그러므로, 본 명세서에 설명된 방법에 의해 생성된 항체를 Fc 수용체, 특히 사람 면역 이펙터 세포(effector cell)가 나타내는 자연 형태의 수용체에 결합시키는 것을 평가하는 것이 중요하다. 도 12는 GnTIII 활성을 지닌 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 항체 생성 세포에서 발현에 의해 생성되는 글리코조작된 항체가 사람 활성화 Fc 수용체 FcgammaRIIIA에 대한 결합 친화성을 증가시켰다는 점을 입증해 보여준다. ADCC 분석에 대하여 상기 언급한 바와 같이, 이러한 항체는 GnTIII 활성을 지닌 융합 폴리펩티드의 항체 생성 세포에서 발현으로 인하여 결과로 형성되는 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드의 수준을 증가시켰다. 이 분석에 사용된 NK 세포는 이 NK 세포 상에서 FcgammaRIIC 수용체를 발현하지 못하는 유전자형의 도너로부터 유래하였다(Metes, D. et al., *J. Immunol. Methods* 258(1-2):85-95(2001)). 그러므로, 이러한 세포의 표면 상에서 유일한 Fc 수용체가 활성화 FcgammaRIIIA 수용체이다. 도 13은 결합 분석이 그러한 수용체에 대한 특이적 결합 친화성을 측정한다는 것을 보여준다. 이는 FcgammaRIII-특이적 차단 항체 단편(3G8 Fab2-단편)과 경쟁에 의해 나타낸 것이다.

[0309] 항종양 항체 요법의 결과에 미치는 향상된 Fc-FcR 상호작용의 영향에 대한 강력한 증거는, rituximab를 복용하는 림프종 환자에게서 발견되는, 림프종 효능과 동형접합체(homozygous) 고-친화성 FcgammaRIIA 수용체 유전자형 간의 상관 관계로부터 유래한다(Cartron, G. et al., *Blood* 99(3):745-8(2002)). 이것은 막대하게 향상된 목적물 반응 속도 및 분자 반응의 향상된 비율과 상관 관계가 있는 것으로 밝혀진 단일 파라미터였다. 향상된 FcgammaRIIA-Fc 상호작용으로 인한 증가된 효능은 자연 사멸(NK) 세포, 매크로파지, 단핵구 및 수지상 세포를 비롯하여 다양한 유형의 면역 세포에 의해 수행된 기능들로부터 유도할 수 있다. NK 세포, 매크로파지 및 단핵구 상에서 활성화 FcgammaRIIIA 수용체를 가교결합시키는 공정은 ADCC(생체내에서 프라임 FcR-의존성 사멸 메카니즘인 것으로 널리 인지되어 있음)에 의한 종양 세포 용해를 유도할 수 있고(Malone, D.G. et al., *Semin. Oncol.* 29(1 Suppl. 2):2-9(2002), Amigorena S., *J. Exp. Med.* 195(1):F1-3(2002)), 또한 항체-의존성 세포식세포작용(Hazenbos, W.L. et al., *J. Immunol.* 161(6):3026-32(1998), Reff, M.E. 및 Heard, C., *Crit Rev Oncol Hematol.* 40(1):25-35(2001)) 및 종양 세포 근방에서 사이토킨 방출(Carson, W.E. et al., *Eur. J. Immunol.* 31:3016-3025(2001))도 유도할 수 있다. 이어서, 그 사이토킨은 종양 세포에 미치는 직접적인 세포독성 효과, 산소 및 영양분의 제거에 의한 종양 성장을 억제하는 항-헬관형성성, 및 종양 세포에 대한 능동적인 T-세포 매개된 면역 반응의 부분으로서 향상된 종양 항원 제시(antigen presentation)를 유도할 수 있다. 수지상 세포는 T-세포에 대한 항원 제시에 중요하고, (예를 들면, 생체내에서 ADCC를 통해 초기 공격받고 있는 항체 결합된 사멸 중 종양 세포로부터) 그 세포 표면 상에서 FcgammaRIIA를 가교결합시키는 공정은 향상된 수지상 세포 성숙, T-세포에 대한 항원 흡수 및 제시, 및 세포독성 T-세포의 크로스-프라이밍(cross-priming)을 유도할 수 있고, 후자는 항종양 면역성을 활성화시키는 데 잠재적으로 매우 효율적인 메카니즘이다(Amigorena S., *J. Exp. Med.* 195(1):F1-3(2002), Kalergis, A.M. 및 Ravetch, J.V. *J. Exp. Med.* 195(12):1653-1659(2002), Selenko, N. et al., *J. Clin. Immunol.* 22(3):124-130(2002)). 또한, 면역 이펙터 세포 상에서 Fc 수용체에 의한 표적 세포 결합된 항체의 가교결합 공정은, 예를 들면 표적-항원 분자의 항체-매개된 가교결합에 의해 유도된 세포자가사멸을 통해, 표적 세포의 직접적인 치사의 증가도 유도할 수 있다(Reff, M.E. 및 Heard, C., *Crit Rev Oncol Hematol.* 40(1):25-35(2001), Cragg, M.S. et al., *Blood* 101(3):1045-1052(2003)). 이들 면역 이

펙터 세포 중, NK 세포는 단독으로 그 세포 표면 상에서 활성화 Fc<sub>gamma</sub>R를 유일하게 보유한다, 다른 유형의 세포에서는 그 활성화 Fc<sub>gamma</sub>RIII가 억제성 Fc<sub>gamma</sub>RIIb 수용체와 함께 존재하고, 항종양 이펙터 기능의 유도는 억제성 신호에 비하여 활성화 신호의 적극적인 균형으로 인하여 결과로 형성된다.

[0310] 도 15는 증가된 Fc 수용체 결합이 억제성 Fc<sub>gamma</sub>RIIb에 비교하여 활성화 수용체에 선택적이라는 점을 보여준다. 그러한 선택성은 상기 설명한 바와 같이 NK 세포를 제외한 면역 세포에 의해 수행된 이펙터 기능에 중요하다. 게다가, 본 명세서에 설명된 방법을 이용하여, Fc 항체 영역을 글리코조작함으로써 달성된 결합의 증가는, 표준 비변형된 항체를 복용하는 동형접합체 고-친화성 Fc<sub>gamma</sub>RIIIA 유전자형 환자/도너의 경우에 자연적으로 관찰된 것보다 훨씬 더 크고(도 16), 항종양 항체의 증가된 효능과 관련 있는 것으로 이미 알려져 있다 (Cartron, G. et al., *Blood* 99(3):754-8(2002)).

[0311] 활성화 Fc<sub>gamma</sub>RIIB 수용체의 결합 도메인은 Fc<sub>gamma</sub>RIIIA의 도메인과 거의 동일하다. 그러므로, 상기 데이터는 또한 본 명세서에 설명된 글리코조작된 항체가 독성 생성물의 방출 및 식세포작용을 비롯한, 다형핵(PMN: polymorphonuclear) 세포와 같은, Fc<sub>gamma</sub>RIIB를 나타내는 이펙터 세포에 의해 매개된 증가된 이펙터 기능을 유도할 수 있다는 것을 보여준다(Reff, M.E. 및 Heard, C. *Crit Rev Oncol Hematol.* 40(1):25-35(2001), Daeron, FM. *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-34(1997), Revertch, J.V. 및 Bolland S., *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-90(2001)).

[0312] 도 18은 재조합 항체 및 GnTIII 활성을 지닌 융합 폴리펩티드 양자의 구성적인 고-수준 발현을 위해 조작되고 혼탁 상태로 성장하는 BHK 세포로부터 생성된 항-CD20 항체의 올리고사카라이드 프로필을 도시한 것이다. 이 올리고사카라이드 프로필은 융합 GnTIII에 의해 조작된 세포로부터 유래하는 항체의 경우 이등분된 비푸코실화 올리고사카라이드 및 이등분된 하이브리드 올리고사카라이드의 증가된 수준을 보여준다(또한, 표 2 참조). 이들 구조는 비-글리코조작된 BHK 세포에 의해 생성된 비-글리코조작된 항체에서 발견되지 않는다(도 1 참조). GnTIII 융합을 발현하는 조작된 세포는 혼탁 생태의 정상적인 성장 및 우수한 항체 생산성을 억제하였다.

[0313] 안정한 BHK-1502-28-11 세포주에 의해 생성된 글리코조작된 모노클로날 항체의 올리고사카라이드의 상대적 백분율은 하기 표 2에 제시되어 있다.

표 2

	피크(m/z)	상대적 백분율
1	1257	2.5%
2	1484	2.8%
3	1647	6%
4	1664	22.30%
5	1680	2.5%
6	1689	4.8%
7	1705	3%
8	1810	27.8%
9	1826	10%
10	1851	7.5%
11	1972	9%
12	2012	1.75%

[0315] 총 이등분된 유형: 88.6%(4+5+6+7+8+9+10+11+12)

[0316] 총 비푸코실화되어 있는 이등분된 유형: 37.8%(4+5+7+9)

[0317] 총 푸코실화되어 있는 이등분된 유형: 50.8%(6+8+10+11+12)

[0318] 복합체 이등분된 유형: 17%(6+7+10+12)

[0319] 하이브리드 이등분된 유형: 71.6%(4+5+8+9+11)

[0320] 올리고사카라이드 분석에 의해 나타난에 따르면, 구조의 88.6%는 양분화 GlcNAc 잔기를 운반하고, 50.8%는 푸코실화되었으며, 37.8%는 비푸코실화되었다. 엔도글리코시다제 H에 의한 PNGaseF-방출된 올리고사카라이드의 분해는 얻어지는 대부분의 피크가 하이브리드 이등분된 유형을 갖는다는 점을 입증해 보여주었다(도 19). 도 20는, 사람 NK 세포 상의 활성화 Fc 수용체 Fc<sub>gamma</sub>RIIIA에 대한, BHK-1502-28-11 세포주에 의해 생성되는, 글

리코조작된 항체의 증가된 결합 친화성을 도시한 것이다. 항체 유전자 및 융합 GnTIII 폴리펩티드 양자의 구성적 안정한 발현에 의해 혼탁 상태로 성장하는 세포주는 치료용 항체의 대량 생산에 이상적이다. 표준 세포 조작 방법을 이용하면, 글리코조작은 융합 GnTII 유전자를, 항체 유전자를 함유하는 세포주 내로 도입하거나, 또는 항체 유전자를, 융합 GnTIII 유전자를 함유하는 세포주("예비-글리코조작된 생성 세포주") 내로 도입하거나, 또는 항체 및 GnTIII 융합 유전자를 동시에 도입함으로써 실시할 수 있다.

[0321] GnTIII 활성을 지닌 융합 폴리펩티드를 암호화하고 ManII 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화된 핵산의 발현이 고도한 수준인 경우 조작된 세포에서 생성된 항-CD20 항체는 또한 보체 매개된 용해(CML), 면역 이펙터 세포상의 Fc 수용체의 비의존적인 상이한 이펙터 기능에 대해서도 시험하였다. 이러한 글리코조작된 항체의 막대한 대부분의 올리고사카라이드는 이등분된 하이브리드 비푸코실화 유형을 갖게 되었다. 이러한 항-CD20 항체의 경우에는 비변형된 항체와 비교하여 감소된 CML 활성이 관찰되었다(도 21). 일부 용도의 경우, 증가된 ADCC를 지니지만 감소된 CML을 지닌 항체는, 예를 들면 CMS에 의해 매개된, 종양 부위에서 혈관내 맥관염과 같은 부작용을 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 다른 유의적인 CML 매개된 부작용이 항-CD20 항체 요법의 경우에서 관찰되었다(van der Kolk L.E. et al, *Br J Haematol*, 115(4):807-11(2001)). 그러나, 상기 올리고사카라이드 프로필은, 또한 글리코조작된 항체의 Fc 올리고사카라이드 집단에 속하는 복합체 올리고사카라이드의 유의적인 분율을 사용한다는 점을 제외하고는, 이등분된 하이브리드 비푸코실화 올리고사카라이드의 중간 수준(15% 이상)을 유도하는 중간 발현 수준에서 GnTIII 융합 폴리펩티드를 발현시키도록 항체 생성 세포를 조작하는 것도 가능하다는 점을 보여준다. 그러한 복합체 올리고사카라이드는 CML의 정상적인 비감소된 수준으로 회합된다. 그러므로, 데이터는 증가된 ADCC를 지닌 항체가 비조작된 항체에 비하여 매우 유사한 수준의 CML 활성을 유지하는 그러한 방식으로 생성될 수 있다는 점을 제시하여 보여준다.

[0322] 사람 상피 성장 인자 수용체(EGFR)를 인지하는 제2 키메릭 IgG1 항체, C225(또한 cetuximab라고 공지되어 있기 도 함)는 본 명세서에 설명한 방법으로 글리코조작하였다. 도 22는 비변형된 항-EGFR 항체 C225의 올리고사카라이드 프로필 및 동일 항체의 글리코조작된 베전의 올리고사카라이드 프로필을 도시한 것이다. 후자는 GnTIII 활성을 지닌 융합 폴리펩티드를 암호화하고 ManII 편재화 도메인을 통해 골지에 편재화되어 있는 핵산을 발현하는 세포에서 생성되었다. 도 23은 이러한 글리코조작으로 인하여 결과로 형성되는 항-EGFR 항체의 증가된 ADCC를 도시한 것이다. 본 명세서에서 설명한 방법에 의해 생성되고, 증가된 ADCC를 보유하며, 활성화 Fc 수용체에 대하여 증가된 결합 친화성을 보유하는 글리코조작된 항체는 암의 항체 요법 및 자가 면역 질환의 항체 요법에 있어 전망 있는 분자인데, 이는 상기 항체가 그러한 요법의 경우 그러한 항체의 상응하는 비변형된(비-글리코조작된) 베전과는 상대적으로, 증가된 효능을 유도하기 때문이다. 추가로, 비변형된 것과 비교하여 글리코조작된 항체에 대한 치료적 용량을 감소시킬 수 있는데, 이는 항체 생산의 경제성에 긍정적인 영향을 미칠 것이다.

## 실시예 2

### 만성 이식편-숙주 질환을 지닌 환자에서 면역 매개된 혈소판 감소증의 치료

[0323] 만성 이식편-숙주 질환에서 자가면역 혈소판 감소증은 임상적인 질환을 유도하는 B-세포 이상조절(dyregulation)의 대표적인 실제예이다. 만성 이식편-숙주 질환을 지닌 환자에 있어서 면역 매개된 혈소판 감소증을 치료하기 위해서, 본 발명의 방법에 제조되고 증가된 ADCC를 보유하는 항-CD20 키메릭 모노클로날 항체는 Ratanathathorn, V. et al., *Ann. Intern. Med.* 133(4):275-79(2000)(이 문헌의 전체 내용은 본 명세서에 참고 인용되어 있음)에서 설명한 바와 같이 환자에게 투여하였다. 구체적으로, 주당 항체의 주입에서는  $375 \text{ mg}/\text{m}^2$  를 4 주 동안 환자에게 투여하였다. 항체 요법은 말초 혈액내 B-세포의 현저한 고갈 및 혈소판-관련된 항체의 감소를 생성한다.

## 실시예 3

### 면역-매개된 중증 순수 적혈구 부전증(PRCA) 및 용혈성 빈혈의 치료

[0324] 면역-매개된 후천성 순수 적혈구 부전증(PRCA)는 종종 다른 자가면역 증상과 관련되는 희귀한 질병이다. 환자에서 면역-매개된 후천성 순수 적혈구 부전증을 치료하기 위하여, Zecca, M. 등, *Blood* 12:3995-97(1997)(이의 전체 내용이 참조 문헌으로 본 명세서에 편입된다)에 기재된 바와 같이, 본원 발명의 방법으로 제조되고 증가된 ADCC를 갖는 항-CD20 키메릭 단일클론 항체가 환자에 투여된다. 구체적으로, PRCA 및 자가면역성 용혈성 빈혈을 갖는 환자에  $375 \text{ mg}/\text{m}^2$  용량의 항체가 1주에 2회 투여된다. 항체 치료 후, 면역글로불린의 정맥 투여로 대체 치료가 개시된다. 이러한 치료는 B 세포를 현저하게 고갈시키고 혈모글로빈 수치의 증가와 동반하여 망상 적혈

구 수를 유의적으로 증가시킨다.

[0329] **실시예 4**

[0330] **재료 및 방법**

[0331] **1. GaIT-융합 발현 벡터의 제조**

[0332] GalT의 구조적 발현을 위한 벡터

[0333] GaIT 발현 벡터의 제조를 위하여, GaIT cDNA가 PCR에 의하여 cDNA 라이브러리(클론테크)로부터 증폭된다. 이후에 GaIT를 웨스턴 블로트에 의해 용이하게 검출하기 위하여, C-말단의 c-myc-에피토프 태그가 유전자의 중지 코돈(아미노산 서열: PEQKLISEEDL)의 바로 상부에 추가된다. GaIT의 올바른 서열을 확인한 후에, MPSV 프로모터의 조절 하에 유전자가 삽입되고 합성 래빗 베타-글로빈 폴리아데닌화 신호가 추가된다. 최종 GaIT 발현 벡터도 역시 MPSV 프로모터 및 합성 래빗 베타-글로빈 폴리아데닌화 신호의 조절 하에 퓨로마이신 내성 유전자를 갖는 선별용 퓨로마이신 내성 카세트를 포함한다.

[0334] GaIT의 편재 도메인을 암호화하는 아미노산을 인간 GnTI의 편재 도메인을 암호화하는 아미노산으로 치환.

[0335] 이러한 혼성 갈락토실트랜스퍼라제 유전자의 제조는, 예컨대, PCR 반응을 중첩시켜서 MPSV 프로모터 및 선별용 퓨로마이신 내성 카세트의 조절 하에 GnTI-GaIT 융합체를 포함하는 플라스미드를 얻음으로써, 이루어진다.

[0336] GalT의 편재 도메인을 암호화하는 아미노산을 인간 만노시다제 II의 편재 도메인을 암호화하는 아미노산으로 치환.

[0337] GaIT 발현 벡터의 제조가 이루어진다. 얻어진 플라스미드는 MPSV 프로모터 조절 하의 혼성 manII-GaIT 유전자를 포함한다.

[0338] 혼성 manII-GaIT 융합 유전자와 웨스타인 바 바이러스의 복제 개시점 or iP의 결합

[0339] or iP를 갖는 DNA 단편이 실시예 1에 기재된 바와 같이 전술한 혼성 ManII-GaIT 발현 벡터로 서브클로닝된다.

[0340] 혼성 ManII-GaIT 융합 유전자와 절단된 CD4 세포-표면 표지 유전자의 결합

[0341] 절단된 CD4 세포-표면 표지 유전자의 추가적 발현을 위하여 발현 벡터가 변형되었다. 요약하면, (막 횡단 및 세포 외 도메인이 뒤따르는 분비를 위한 인간 CD4 선도 서열을 포함하는) 절단된 인간 CD4 단백질을 암호화하는 cDNA가 뒤따르는 폴리오 바이러스 IRES 요소를 manII-GaIT 융합체의 중지 코돈의 하부에 삽입하여, 혼성 manII-GaIT 융합 유전자 발현 카세트를 모노스트론성 발현 카세트로 전환한다.

[0342] **3. 포유 동물 세포를 GaIT-융합- 및 항체- 발현 벡터로 형질 감염**

[0344] BHK 세포의 형질 감염

[0345] 지수적으로 성장하는 세포(생존율 90~95%)를 배양, 채취하고 이어서 실시예 1에 기재된 바와 같이 형질감염시킨다. 글리코-조작된 항체의 생산을 위하여, 하나는 항체 발현용이고 다른 하나는 융합 GaIT 폴리펩티드 발현용인 두 개의 플라스미드를 3:1의 비율로 각각 세포에 공-형질감염시킨다.

[0346] HEK293-EBNA 세포의 형질감염

[0347] 지수적으로 성장하는 HEK293-EBNA 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 형질감염시킨다. 글리코-조작된 항체의 생산을 위하여, 하나는 항체 발현용이고 다른 하나는 융합 GaIT 폴리펩티드 발현용인 두 개의 플라스미드를 4:1

의 비율로 각각 세포에 함께 형질감염시킨다. 형질감염 5일 후, 상청액을 채취하여 1200rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 4000rpm에서 10분간 2차 원심분리하고, 4°C에서 보관하였다.

[0348] 재조합 항-CD20 항체 및 Gal-T 융합체를 발현하는 안정한 포유 동물 세포주의 생산

항-CD20 단일클론 항체 유전자 및 네오마이신 내성 유전자를 구조적으로 발현하는 클론 BHK-1502-28을 전기천공법에 의하여 발현벡터로 형질감염시켰다. 벡터는 ManII-GalT 유전자 및 인간 CD4의 절단 형태을 구조적으로 발현시키는데, 후자는 IRES-의존적으로 발현된다. 또한, 벡터는 퓨로마이신-내성 유전자 발현 카세트를 포함한다. 염색체로 벡터 DNA를 통합한 클론 세트를 얻기 위하여 퓨로마이신-내성 클론이 먼저 선별된다. 이어서, 클론에서 바이시스트론성 ManII-GalT+tCD4 유전자 발현 유닛의 발현 수준의 표지로서 기능하는, 절단된 CD4(tCD4)의 표면 발현을 스크리닝한다. 선별된 클론의 재조합 항체 생산은 ELISA 분석을 이용하여 확인된다.

[0350] 형질감염 및 이후의 tCD4 발현 수준의 스크리닝은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행된다.

#### 4. 변형되지 않고 글리코-조작된 항체의 생산 및 정제

[0352] 항체 발현 벡터로 형질감염되거나 항체 발현 벡터와 GalT-융합 발현 벡터로 함께 형질감염된 BHK 세포의 경우, 형질감염 후 96시간 동안 형질감염된 세포를 배양한 후, 배양 상청액을 채취한다. 예측되는 생산성에 따라서, 동일 벡터에 다수의 전기천공(10~15)을 행한다.

[0353] 항체 발현 벡터로 형질감염되거나 발현 벡터와 GalT-융합 발현 벡터로 함께 형질감염된 HEK293-EBNA 세포의 경우, 배양 약 16시간 후 배양 배지를 신선한 배양 배지로 교체한 다음, 추가로 120시간 동안 형질감염된 세포를 배양한 후 이후의 배지를 채취한다.

[0354] 안정한 BHK-1502-28-11 세포주를 위하여, 배양액에 세포를 500,000 세포/ml로 시딩하고, 배양 4일 후에 상청액을 채취한다.

#### 항체 정제

[0356] 단일클론 항체는 단백질 A 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피의 두 개의 순차적인 크로마토그래피 단계를 이용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양 상청액으로부터 정제된다.

#### 5. 올리고사카라이드 분석

[0358] PVDF 막 위 또는 용액에 항체를 고정하고, PNGaseF 소화에 의하여 항체로부터 올리고사카라이드를 효소적으로 유리시킨다.

[0359] 유리된 올리고사카라이드를 포함하는 얻어진 소화 용액은 직접 MALDI/TOF-MS 분석을 위하여 준비되거나 MALDI/TOF-MS 분석을 위한 시료 제조 이전에 엔도H 글리코시다제로 추가적으로 소화된다.

[0360] PVDF 막에 고정된 항체를 위한 올리고사카라이드 유리 방법 및 용액 내의 항체를 위한 올리고사카라이드 유리 방법은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행된다.

[0361] 혼성 갈락토실화된 올리고사카라이드 구조를 MALDI/TOF-MS 중성 올리고사카라이드 피크에 할당하기 위한, PNGaseF로 유리된 올리고사카라이드의 엔도글리코시다제 H 소화의 이용

[0362] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 이어서 PNGase로 유리된 올리고사카라이드를 엔도글리코시다제 H(EC 3.2.1.96)로 소화시킨다.

#### MALDI/TOF-MS

[0364] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 유리된 올리고사카라이드를 포함하는 효소 소화물을 포함하는 시료를 준비하고 이어서 MALDI/TOF 질량 분광계에서 분석한다.

## [0365] 6. 세포 제조 및 분리

[0366] 실시예 1에 기재된 바와 같이 필수적으로 제조자의 지시 및 프로토콜을 따라서 히스토파크-1077(시그마 다이아 그노스틱스 인크., 세인트 루이스, M063178 미국)를 이용하여 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 제조한다.

[0367] 인간 NK 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 음성 선택 과정을 적용하여 PBMC로부터 분리된다.

## [0368] 8. ADCC 분석

[0369] 주효 세포인 PBMC 또는 NK는 전술한 바와 같이 제조되고 실시예 1에 기재된 바와 같이 항체 의존성 세포 독성 (ADCC) 분석에서 세포독성을 매개하는 능력을 측정한다.

## [0370] 9. NK 세포에 결합하는 Fc감마RIIIA 및 라지 림프종 세포에 결합하는 Fc감마RIIb

[0371] 각 분리된 NK 세포에 대한 Fc감마RIIIA의 결합 및 라지 림프종 세포에 대한 Fc감마RIIb의 결합을 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정한다.

## [0372] 10. 보체 의존성 세포독성 분석

[0373] 실시예 1에 기재된 방법에 따라서 항체 희석을 이용하여 보체 의존성 세포독성 분석을 수행한다.

## [0374] 결과 및 논의

[0375] 이러한 폴리펩타이드를 생산하지 않는 세포와 비교하여 GaIT 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 발현이 세포 생존율, 세포 성장 또는 항체 생산에 미치는 영향을 증명하기 위하여 분석을 수행한다.

[0376] 실시예 1에 기재된 바와 같이 MALDI/TOF-MS에 의하여 정제된 항체의 당화 패턴을 분석한다. 이러한 기술을 사용하여, 원시의 Fc-올리고사카라이드 군집 전체 내에서 상이한 올리고사카라이드 종의 부분을 확인할 수 있고, 구조들을 스펙트럼의 상이한 피크에 할당할 수 있다(Umana, P. 등, *Nature Biotechnol.* 17:176-180(1999)).

[0377] 변형되지 않은 항체 올리고사카라이드 프로파일이 측정된다. 특히, 야생형 GaIT의 발현에 의한 항체 생성 세포의 조작이 주로 갈락토실화되고 코어-푸코실화된 복합 비안테나리 올리고사카라이드를 초래하는지 여부가 측정된다. 또한, GaIT 촉매 도메인이 GnTI 골지 편재 도메인을 통하여 위치된, GnTI-GaIT 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 발현에 의한 항체 생성 세포의 조작이 야생형 GaIT와 비교하여 주로 갈락토실화된 복합 비안테나리 올리고사카라이드를 초래하는지 여부가 측정된다. 갈락토실화되고 비-푸코실화 및 갈락토실화된, 혼성 구조가 합성된다면, 이들은 GaIT 및 글리코실트랜스페라제 또는 글리코시다제 간의 경쟁에 기인한 것일 수 있다. 일단 GaIT 촉매 반응을 통하여 부가된 갈락토스로 올리고사카라이드가 변형되면,  $\alpha$ 1,6-코어 푸코실트랜스페라제, 골지  $\alpha$ -만노시다제 II(ManII) 및 GnTII는 더이상 갈락토실화된 올리고사카라이드를 변형시키는데 작용할 수 없을 것으로 기대된다.

[0378] 혼성 및 복합 올리고사카라이드를 구별할 수 있는 엔도H 글리코시다제 소화가 Fc-부착된 갈락토실화되고, 비-푸코실화 및 갈락토실화된 혼성 올리고사카라이드의 비율을 평가하기 위하여 사용된다.

[0379] GaIT 촉매 도메인이 ManII 골지 편재 도메인을 통하여 위치된, ManII-GaIT 융합 웨პ티드를 암호화하는 핵산의 발현에 의한 항체 생성 세포의 조작이 주로 갈락토실화되고 비-푸코실화 및 갈락토실화된 혼성체를 초래하는지 여부를 측정하기 위하여 테스트를 수행한다. 구체적으로, 야생형 GaIT 및 GnTI-GaIT 융합체와 비교하여, ManII-GaIT 융합체가 Fc-부착된 갈락토실화되고, 비-푸코실화 및 갈락토실화된 혼성 올리고사카라이드의 합성에 보다 효율적인지 여부를 측정한다.

[0380] 위에서 언급한 바와 같이, MALDI 프로파일에서 관찰된 상이한 올리고사카라이드 피크에 갈락토실화되고 비푸코 실화 및 갈락토실화된 혼성 구조의 할당을 확인하기 위하여 엔도글리코시다제 H(엔도H)가 사용된다. 갈락토스 잔기를 운반하는 올리고사카라이드 갈락토스 잔기 중에서, 비-푸코실화된 혼성 구조, 푸코실화된 혼성 및 푸코

실화된 복합 올리고사카라이드 구조의 비율을 측정한다.

[0381] GaIT 발현 수준 및 GaIT 촉매 도메인을 골지에 표적화하기 위해 사용된 특정 편재 도메인이, GnTII-변형된 올리고사카라이드 기질에 대한 재조합 GaIT-촉매 도메인과 내인성 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트랜스퍼라제, ManII 및 GnTII 효소 사이의 경쟁에 미치는 영향을 측정한다. 상이한 편재 도메인을 통하여 골지에 위치된, GaIT 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 항체 생성 세포에서 발현되어 나타나는 항체-의존성 세포독성(ADCC)의 수준을 측정한다.

[0382] 또한, GaIT 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 항체 생성 세포에서 발현되어 생성되는 글리코-조작된 항체가 인간 활성화 Fc 수용체 Fc $\gamma$ IIIa 또는 억제성 Fc $\gamma$ IIb에의 결합 친화력을 증가시키는지 여부를 측정한다.

[0383] GaIT 컨스트럭트는 내인성 코어  $\alpha$ 1,6-푸코실트랜스퍼라제의 활성을 능가하여 항체의 Fc 영역을 글리코-조작하고 그 결과 ADCC를 증가시킬 것이다.

[0384] 혼탁액에서 성장한 BHK 세포로부터 생산되고, 재조합 항체 및 GaIT 활성을 갖는 융합 폴리펩티드 모두를 고도로 구조적 발현하도록 조작된 항-CD20 항체의 올리고사카라이드 프로파일을 측정한다. 안정한 BHK-1502-28-11 세포주에 의하여 생산된 글리코-조작된 단일클론 항체의 올리고사카라이드의 상대적 비율 또한 측정한다.

## 0385] 실시예 5

### 재료 및 방법

#### 1. ManII 및 GnTII 발현 벡터의 제조

[0388] ManII 발현 벡터의 제조를 위하여, 인간 만노시다제 II(서열번호 17) cDNA가 MPSV 프로모터의 하부이고 합성 래빗 베타-글로빈 폴리아데닌화 신호의 상부에서 발현 벡터 플라스미드로 서브클로닝되었다. GnTII 발현을 위하여, 인간 GnTII cDNA를 인간 CMV 프로모터/인핸서의 하부이고 소의(bovine) 성장호르몬 폴리아데닌화 신호의 상부에서 서브클로닝한 발현 벡터 플라스미드를 사용한다.

#### 발현 벡터와 웨스타인 바 바이러스의 복제 개시점 oriP의 결합

[0390] oriP를 갖는 DNA 단편이 실시예 1에 기재된 바와 같이 상기 ManII 발현 벡터로 서브클로닝되어 ManII 발현 벡터 pCLF9을 얻었다. oriP를 갖는 DNA 단편이 실시예 1에 기재된 바와 같이 상기 GnTII 발현 벡터로 서브클로닝되어 GnTII 발현 벡터 pGnTII를 얻었다.

#### 2. HEK293-EBNA 세포의 형질감염

[0392] 지수적으로 성장하는 HEK293-EBNA 세포가 실시예 1에 기재된 바와 같이 형질감염되었다. 변형되지 않은 항체 "Cwt"를 제조하기 위하여, 세포는 항체 발현 벡터(pETR1520)으로 형질감염되었다. 글리코-조작된 항체 "Cbrt"를 제조하기 위하여, 세포는 항체 발현용 플라스미드(pETR1520) 및 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현용 플라스미드(pETR1519)의 두 개의 플라스미드가 각각 4:1의 비율로 공-형질감염되었다. 글리코-조작된 항체 "Cm"을 제조하기 위하여, 세포는 항체 발현용 플라스미드(pETR1520), 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현용 플라스미드(pETR1519) 및 만노시다제 II 발현용 플라스미드(pCLF9)의 3 개의 플라스미드가 각각 3:1:1의 비율로 공-형질감염되었다. 글리코-조작된 항체 "Cmg"를 제조하기 위하여, 세포는 항체 발현용 플라스미드(pETR1520), 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현용 플라스미드(pETR1519), 만노시다제 II 발현용 플라스미드(pCLF9) 및 GnTII 발현용 플라스미드(pGnTII)의 4개의 플라스미드가 각각 4:0.33:0.33:0.33의 비율로 공-형질감염되었다.

#### 3. 변형되지 않고 글리코-조작된 항체의 제조 및 정제

[0394] 형질감염 약 16시간 후에 상기 형질감염된 세포의 배양 배지를 신선한 배양 배지로 교체하고, 추가로 120시간 동안 형질감염된 세포를 배양한 후에 이후의 배지를 채취하였다. 채취된 상청액을 1200rpm에서 5분간 원심분리하고 4000rpm에서 10분간 2차 원심분리한 후, 4°C에서 보관하였다.

**[0395] 항체 정제**

실시예 1에 기재된 바와 같이 단백질 A 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피의 2 개의 순차적인 크로마토그래피 단계를 이용하여 배양 상청액으로부터 단일클론 항체를 정제하였다. 항체 cwt7, cbt5 및 cm1을 위하여, 슈퍼텍스 200 칼럼(아머샴 파마시아) 및 인산 완충 생리식염수를 사용하는 추가적인 크기 배제 크로마토그래피 단계가 양이온 교환 단계 이후에 추가되고 모노머릭 항체 퍼크가 수집되었다.

**[0397] 4. 올리고사카라이드 분석**

실시예 1에 기재된 바와 같이 PNGaseF 소화에 의하여 용액 중의 항체로부터 올리고사카라이드가 효소적으로 유리되었다.

**[0399] 이등분된 혼성 올리고사카라이드 구조를 MALDI/TOF-MS 중성 올리고사카라이드 퍼크에 할당하기 위한 PNGaseF-유리된 올리고사카라이드의 엔도글리코시다제 H 소화의 이용**

실시예 1에 기재된 바와 같이, 이어서 PNGase 유리된 올리고사카라이드가 엔도글리코시다제 H(EC 3.2.1.96)로 소화되었다.

**[0401] MALDI/TOF-MS**

실시예 1에 기재된 바와 같이, 유리된 올리고사카라이드를 포함하는 효소 소화물을 포함하는 시료를 준비하고, 이어서 MALDI/TOF 질량분석계에서 분석하였다.

**[0403] 5. 세포 제조 및 분리**

**[0404] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 필수적으로 제조자의 지시 및 프로토콜을 따라서 히스토파크-1077(시그마 다이아그노스틱스 인크., 세인트 루이스, M063178 미국)를 이용하여 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 제조하였다.**

**[0405] 6. NK 세포 분리**

인간 NK 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 음성 선택 과정을 적용하여 PBMC로부터 분리되었다.

**[0407] 7. ADCC 분석**

주효 세포인 PBMC는 전술한 바와 같이 제조되고 실시예 1에 기재된 바와 같이 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 분석에서 세포독성을 매개하는 능력을 측정하였다.

**[0409] 8. NK 세포에 결합하는 Fc감마RIIIA**

갓 분리된 NK 세포에 대한 Fc감마RIIIA의 결합 및 Fc감마RIIb의 결합을 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정하였다.

**[0411] 9. 보체 의존성 세포독성 분석**

인간 보체 공급원의 준비를 위하여 다음과 같은 변형을 하여, 실시예 1에 기재된 방법에 따라서 항체 희석을 이용하여 보체 의존성 세포독성 분석을 수행하였다. 요약하면, 건강한 자원자의 혈액에서 정상 인간 혈청(NHS)을 준비하였다. 혈액은 1시간 동안 응고된 다음, 1200g에서 20분 동안 원심분리되었다. 세포가 없는 상청액 혈청

을 분리하여 80°C에서 보관하였다. NHS는 최종 분석 부피의 20%로 사용하였다.

### [0413] 결과 및 논의

항-CD20 카메릭 IgG1 항체의 글리코-조작된 형태(C2B8 카메릭 항체, 리투시맙(rituximab)으로도 알려짐)은 포유 동물 세포의 배양물을 항체 유전자 발현용 벡터 및 GnTIII 활성과 만노시다제II 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자 발현용 벡터로 함께 형질감염시켜서 제조하였다. 추가의 글리코-조작된 항체 형태 역시 포유 동물 세포의 배양물을 항체 유전자 발현용 벡터 및 GnTIII 활성, 만노시다제 II 활성 및 GnTII 활성을 갖는 폴리펩티드들을 암호화하는 유전자 발현용 벡터로 공-형질감염시켜서 제조한다. 글리코-조작된 항체 "Cbtr"를 위하여, 세포는 항체 발현용 플라스미드(pETR1520) 및 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현용 플라스미드(pETR1519)의 두 개의 플라스미드로 공-형질감염되었다. 글리코-조작된 항체 "Cm"을 위하여, 세포는 항체 발현용 플라스미드(pETR1520), 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현용 플라스미드(pETR1519) 및 만노시다제 II 발현용 플라스미드(pCLF9)의 3 개의 플라스미드로 공-형질감염되었다. 글리코-조작된 항체 "Cmg"를 위하여, 세포는 항체 발현용 플라스미드(pETR1520), 융합 GnTIII 폴리펩티드 발현용 플라스미드(pETR1519), 만노시다제 II 발현용 플라스미드(pCLF9) 및 GnTII 발현용 플라스미드(pGnTII)의 4개의 플라스미드로 공-형질감염되었다. 동일한 항체의 변형되지 않은(글리코-조작되지 않은) 형태인, "Cwt"는 포유 동물 세포를 항체 유전자 발현용 벡터로만 형질감염시켜서 제조하였다. 형질감염된 세포를 5일간 배양하고 분비된 재조합 항체를 배양 배지로부터 정제하였다. GnIII 및 ManII 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 발현은 그러한 글리코실트랜스퍼라제 또는 글리코시다제 폴리펩티드를 생산하지 않는 세포와 비교하여 세포 생존율, 세포 성장 또는 항체 생산에 유의적인 영향을 미치지 아니하였다.

[0415] 그 다음, 정제된 항체의 당화 패턴을 분석하였다. 이들 항체는 인간 IgG1 Fc 영역의 Asn297 잔기에만 부착되는 N-연결된 올리고사카라이드를 운반한다. 상기 올리고사카라이드는 PNGaseF에 의하여 항체로부터 효소적으로 유리되고 이어서 MALDI/TOF-MS에 의하여 분석되었다. 이러한 기술을 사용하여, 원시의 Fc-올리고사카라이드 군집 전체 내에서 상이한 올리고사카라이드 종의 단편을 확인할 수 있고, 구조들을 스펙트럼의 상이한 피크에 할당할 수 있다(Umana, P. 등, *Nature Biotechnol.* 17:176-180(1999)).

[0416] 도 26은 변형되지 않은 재조합 C2B8 항-CD20 카메릭 IgG1 항체 Cwt로부터 얻은 중성 올리고사카라이드 MALDI/TOF-MS 프로파일을 나타낸다. 앞서 실시예 1, 도 5에 기재된 변형되지 않은 항체에서, Cwt는, 각각 0, 1- 및 2-갈락토스 잔기를 갖는 비안테나리, 코어-푸코실화된 복합 올리고사카라이드와 일치하는 1485, 1648 및 1810의  $m/z$  비율에서 피크를 나타내어, 전형적인 올리고사카라이드 프로파일을 가졌다.

[0417] GnTIII 효소 도메인이 ManII 골지 편재 도메인을 통하여 위치된, ManII-GnTIII 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 발현에 의한 항체 생산 세포의 조작은, Fc-올리고사카라이드의 대부분이 이등분되고 푸코실화되지 않은 혼성체인 항체(Cbtr)를 초래한다(도 27 참조). 실시예 1에 기재된 바와 같이, MALDI 프로파일에서 관찰된 상이한 올리고사카라이드 피크에 이등분되고 푸코실화되지 않은 그리고 이등분된, 혼성 구조의 할당을 확인하기 위하여 엔도글리코시다제 H(엔도H)가 사용되었다.

[0418] GnTIII 효소 도메인이 ManII 골지 편재 도메인을 통하여 위치된 ManII-GnTIII 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산과 ManII를 암호화하는 핵산의 공-발현에 의하여 항체 생산 세포를 조작하면, Fc-올리고사카라이드의 대부분이 이등분되고 푸코실화되지 않은 복합체인 항체(Cm)이 생산된다(도 28 참조). GnTIII 효소 도메인이 ManII 골지 편재 도메인을 통하여 위치된 ManII-GnTIII 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, ManII를 암호화하는 핵산 및 GnTII를 암호화하는 핵산의 공-발현에 의하여 항체 생산 세포를 조작하면, 이등분되고 푸코실화되지 않은 복합체의 Fc-부착된 올리고사카라이드 부분이 심지어 항체 Cm보다도 많은, Fc-올리고사카라이드의 대부분이 이등분되고 푸코실화되지 않은 복합체인 항체(Cmg)를 초래한다.

[0419] 도 29는 항체 생산 세포에서 GnTIII 효소 도메인이 ManII 골지 편재 도메인을 통하여 위치된, ManII-GnTIII 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 발현에 기인한 증가된 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 나타내는 자료를 보여주는데, 여기서 ManII-GnTIII 암호화 핵산은 단독으로 발현되거나(항체 Cbtr) 항체 생산 세포에서 ManII를 암호화하는 핵산과 함께 공-발현된다(Cm). 그러므로, 글리코-조작된 항체의 Fc 영역에서 혼성 또는 복합형 중 어느 하나의 이등분되고 푸코실화되지 않은 올리고사카라이드의 수준을 증가시키는 것은 증가된 ADCC 활성을 초래한다.

[0420] 자연 사멸 세포(NK 세포)은 ADCC의 중요한 매개자로 알려져 있다. 이들 세포는 CD16a로도 알려진 활성화 Fc 감

마 수용체 IIIA를 표면에 갖고 있다. NK 세포 위의 Fc감마RIIIA 수용체에 표적 세포에 결합된 항체의 Fc 영역이 결합하는 것이 NK 세포 위의 이들 수용체의 교차 결합과 이후의 ADCC 유도에 필수적이다. 그러므로, 여기에 기술된 방법에 의하여 생산된 항체의 Fc 수용체, 특히 인간 면역 주효 세포가 나타내는 천연형의 수용체에의 결합을 평가하는 것이 중요하다. 도 30은 단독으로 발현되거나(항체 Cbrt) ManII를 암호화하는 핵산과 함께 항체 생산 세포에서 공-발현된(Cm), GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 항체 생산 세포에서 발현되어 생산된 글리코-조작된 항체가 인간 활성화 Fc 수용체 Fc감마RIIIA과의 결합 친화력을 증가시킴을 나타낸다. ADCC 분석에 대하여 전술한 바와 같이, 이들 항체는, 항체 생산 세포에서의 GnTIII 활성을 갖는 융합 폴리펩티드의 발현에 기인하여, 이등분되고 비-푸코실화된 올리고사카라이드의 수준을 증가시켰다.

[0421] 그러므로, 글리코-조작된 항체의 Fc 영역에서 혼성 또는 복합형 중 하나의 이등분되고 푸코실화되지 않은 올리고사카라이드의 수준을 증가시키는 것은 ADCC 활성의 증가를 초래한다. 이러한 분석에서 사용된 NK 세포는 NK 세포 위에 Fc감마RIIc 수용체를 발현하지 않는 유전자형의 제공자로부터 얻었다(Metes, D. 등, J. Immunol. Methods 258(1-2):85-95(2001)). 따라서, 이들 세포의 표면에서 유일한 Fc 수용체는 활성화 Fc감마RIIIA 수용체이다.

[0422] 활성화 Fc감마RIIB 수용체의 결합 도메인은 Fc감마RIIIA의 결합 도메인과 거의 동일하다. 따라서, 상기 자료는 또한, 여기에 기재된 글리코-조작된 항체가 독성 산물의 방출 및 식세포 활동(phagocytosis)를 포함하여 다른 혈액 세포(PMN cells)와 같이 Fc감마RIIB를 나타내는 주효 세포에 의하여 매개되는 주효기 기능의 증가를 초래 할 수 있음을 나타낸다(Reff, M.E와 Heard, C. Crit Rev Oncol Hematol. 40(1):25-35(2001), Daeron, FM. Annu. Rev. Immunol. 15:203-34(1997), Ravetch, J.V와 Bolland S. Annu. Rev. Immunol. 19:275-90(2001)).

[0423] GnTIII 활성을 갖고 ManII 편재 도메인을 통하여 골지에 위치되는 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 발현을 위하여 조작된 세포에서 생산된 항-CD20 항체 Cbrt에서, 면역 주효 세포 위의 Fc 수용체에 의존하지 않는 다른 주효기 기능인 보체 매개된 용해(CML) 또한 측정하였다. 이러한 글리코-조작된 항체의 올리고사카라이드 거의 대부분이 이등분되고 푸코실화되지 않은 혼성형이었다. 변형되지 않은 항체 Cwt와 비교하여 Cbrt 항체에서 감소된 CML 활성이 관찰되었다(도 31). 몇몇 적용예을 위하여, 예컨대, CML에 의하여 매개되는, 종양 부위 혈관에서의 혈관염과 같은 부작용을 감소시키기 위하여, ADCC는 증가되지만 CML은 감소되는 항체가 바람직할 수 있다. 다른 중요한 CML-매개 부작용들이 항-CD20 항체 치료에서 관찰되어 왔다(van der Kolk L.E. 등. Br J Haematol. 115(4):807-11(2001)). 그러나, 항체 Cm의 경우에서와 같이, 변형되지 않은 항체와 비교하여 CML 활성을 유의적으로 감소시키지 않으면서, ADCC 활성 및 Fc감마RIII 결합이 증가된 글리코-조작된 항체를 생산하는 것이 가능하다(도 31). 이러한 항체는 최대 표적 세포 제거가 높은 ADCC와 높은 보체 활성화 및 CML 활성 모두를 요구하는 적용예에서 바람직할 것이다. 전술한 올리고사카라이드 프로파일은, GnTIII 융합 폴리펩티드를 ManII를 암호화하는 핵산과 함께 공-발현시키거나(항체 Cm) ManII를 암호화하는 핵산 및 GnTII를 암호화하는 핵산과 함께 공-발현시켜서(항체 Cmg), Fc-부착된 올리고사카라이드의 대부분이 혼성형 대신 이등분되고 푸코실화되지 않은 복합형인 항체를 생산하도록 세포를 조작할 수 있다는 것을 보여준다. 이들의 CML 활성을 복합 올리고사카라이드 부분이 혼성 올리고사카라이드 부분에 비례하여 증가됨에 따라서 증가되는 반면에, 글리코-조작된 항체는 이등분되고 푸코실화되지 않은 올리고사카라이드의 증가 수준과 상관관계를 갖는 ADCC 활성 및 Fc감마RIII 결합 친화력을 증가시켰다.

[0424] 본 실시예 및 이전의 실시예들은 핵산을 암호화하는 융합 폴리펩티드의 발현을 기재하고 있는데, 상기 융합 폴리펩티드는 골지 복합체에 위치하고 GnTI-촉매된 반응을 통하여 앞서 변형된 올리고사카라이드 수납자(acceptor)를 위해 내인성 푸코실트랜스퍼라제와 경쟁하는 촉매 도메인을 갖는다. 이렇게 조작된 호스트 세포에 의하여 생산된 재조합 당단백질은 푸코실화되지 않은 올리고사카라이드의 수준을 증가시켰다. 이러한 예는, 상기 융합 폴리펩티드 암호화 핵산과 함께 Man II 및/또는 GnTII를 암호화하는 핵산을 이러한 호스트 세포에서 공-발현시키면, 혼성 올리고사카라이드 대신 복합체 쪽으로 생합성 흐름의 증가를 초래하게 되므로, Man II- 및/또는 GnTII-암호화 핵산을 공-발현시키지 않은 세포에서 생산된 당단백질과 비교하여 푸코실화되지 않은 복합 올리고사카라이드 수준이 증가된 당단백의 합성을 초래함을 나타낸다.

#### [0425] 실시예 6

##### a-만노시다제의 과발현

분자 클로닝

[0428] 인간  $\alpha$ -만노시다제 II

[0429] MPSV 프로모터 조절 하에서 인간  $\alpha$ -만노시다제 II("hManII") (E.C.3.2.1.114) (서열번호 17)를 코딩하는 유전자가 OrIP 요소를 포함하는 발현 벡터에서 클로닝되었다. 얻어진 발현 벡터 pCLF9은 도 32A에 나타낸다. 항-CD20 단일클론 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 발현 벡터는 각각 pETR1842 및 pETR1843이었다(도 32B 및 32C).

[0430] 융합 단백질 ManII-GaIT

[0431] hManII CTS 및 인간  $\beta$ 1,4-갈락토실트랜스퍼라제의 효소 도메인(M22921, 아미노산 126-397)으로 이루어진 융합 단백질(서열번호 20)이 하기와 같이 제조되었다. hManII CTS 영역은 pETR1484로부터 PCR로 증폭되었다(CF33, GAB252). GaIT의 효소 도메인(아미노산 126-397)은 pBlueGaIT로부터 CF31 및 CF35를 사용하여 증폭되었다. hManII CTS가 GaIT의 효소 도메인과 결합되어 MPSV 프로모터(pCLF24)에 의하여 조절되는 융합 단백질을 얻었다. 전체 GaIT 유전자는 pBlueGaIT로부터 얻었다. GaIT를 코딩하는 유전자를 시퀀싱하였다(서열번호 16):

MRLREPLLSGSAAMPGASLQRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDI.SR  
 LPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGGDS  
 SPVVDSGPGPASNLTSPVPHITSLPACPEESPLLVGPMIIEFNMPVDL  
 ELVAKQNPNVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIPFRNRQEHLKYWLYYLHP  
 VLQRQQLDYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSDV  
 DLIPMNDHNAAYRCFSQPRHISVAMDKEFGFSLPYVQYFGGVSALSKQQFLT  
 INGFPNNYWCGWGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIRHSRDKK  
 NEPNPQRFDRIAHTKETMISDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS

[0432] GaIT의 5'을 CF32/CF38로 증폭하였고, FseI 제한 부위를 유전자의 전방에 부가하였다. 서열은 시퀀싱에 의하여 정확성을 확인하고 pCLF24에서 FseI/DraIII 소화에 의하여 교환되었다(pCLF26). OrIP가 pCLF24 및 pCLF26에 부가되어 각각 pCLF25 및 pCLF27을 형성하였다(도 33A 및 33B).

[0434] HEK 293-EBNA 세포에서의  $\alpha$ -만노시다제 및 ManII-GaIT의 발현

[0435] HEK 293-EBNA 세포를 칼슘 포스페이트 방법으로 형질감염시켰다. 요약하면, T150의 형질감염을 위하여, 형질감염 24시간 전에 28m1의 DMEM, 10% FCS, 250  $\mu$ g/ml의 네오마이신에 1,500만 세포를 시딩하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 오버나이트 배양하였다.

[0436] 각 T150 플라스크를 형질감염시키기 위하여, 94  $\mu$ g의 전체 플라스미드 벡터 DNA, 469  $\mu$ l의 1M CaCl<sub>2</sub> 용액을 혼합하고 물을 가하여 최종 부피가 938  $\mu$ l가 되게 함으로써 DNA, CaCl<sub>2</sub> 및 물의 용액을 준비하였다. 이 용액에, pH 7.05의 938  $\mu$ l 50mM HEPES, 280mM NaCl, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 용액을 가하고 즉시 10초간 혼합한 다음 20초간 실온에서 정지하였다. 혼탁액을 2% FCS가 첨가된 24m1의 DMEM으로 희석하고, 기존 배지 대신에 T150에 가하였다. 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 약 17~20시간 동안 배양하고, 배지를 30m1 DMEM, 10% FCS로 교체하였다.

[0437] 코어-푸코실트랜스퍼라제 경쟁에  $\alpha$ -만노시다제 II가 미치는 영향을 평가하기 위하여, 세포를 각각 2:2:1 비율의 pETR1842, pETR1843 및 pCLF9로 형질감염시켰다. 융합 단백질 ManII-GaIT를 위하여, 세포를 각각 2:2:1 비율의 pETR1842, pETR1843 및 pCLF25로 형질감염시켰다. 형질감염 5일 후, 상청액을 채취하고 1200rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 4000rpm에서 10분간 2차 원심분리하고, 4°C에서 보관하였다.

## [0438] 항-CD20 단일클론 항체의 정제

우선 단백질 A 크로마토그래피를 행하여 혈청 내 존재하는 소(cow)의 항체로부터 단일클론 항체를 분리하고, 이어서 양이온 교환 크로마토그래피를 행하여 PBS로 시료를 완충 교환하는 2단계 크로마토그래피에 의하여 30ml의 상청액으로부터 단일클론 항체를 정제하였다.

## [0440] 올리고사카라이드 분석

[0441] PNGaseF 소화

단일클론 항체 시료(50  $\mu$ g)를 0.1mU/  $\mu$ l로 0.1N-글루코시다제 F(재조합, 로슈, 스위스)와 함께 배양하였다. 소화는 2mM Tris, pH7.0의 완충액에서 37°C에서 3시간 동안 수행되었다. 그 다음, 유리된 중성 올리고사카라이드를 150mM 아세트산에서 실온에서 3시간동안 배양하였다. 마이크로 바이오-스핀 크로마토그래피 컬럼(바이오라드, 헤르쿨레스, 캘리포니아)에 충진된 0.6ml 양이온 교환 수지(AG50W-X8레진, 수소 형태, 100-200 메쉬, 바이오라드, 헤르쿨레스, 캘리포니아)로 시료를 탈염하였다.

## [0443] 엔도H 소화

아세트산 처리에 앞서, PNGaseF로 방출된 올리고사카라이드를 N-연결된 올리고사카라이드의 키토바이오스 코어의 N-아세틸글루코사민 잔기들 사이를 절단하는 효소인 엔도글리코시다제 H(EC 3.2.1.96, 로슈, 스위스)로 소화시켰다. 복합형 올리고사카라이드는 가수분해되지 않는 반면에, 올리고만노스와 대부분의 혼성형 글리칸들은 효소로 절단될 것이다.

올리고사카라이드는 2mM Tris, pH 7.0에서 0.2mU/  $\mu$ l 엔도글리코시다제 H로 소화되었다. 소화는 37°C에서 3시간동안 수행된다. 올리고사카라이드는 150mM 아세트산에서 실온에서 3시간 동안 배양된 후, 마이크로 바이오-스핀 크로마토그래피 컬럼(바이오라드, 스위스)에 충진된 0.6ml 양이온 교환 수지(AG50W-X8레진, 수소 형태, 100-200 메쉬, 바이오라드, 스위스)로 탈염되었다.

[0446] 기질 및 시료 제조

2mg의 2,5-디히드록시벤조산 + 0.1mg의 5-메톡시살리실산을 1ml의 에탄올/10mM 수용성 소듐 클로라이드 1:1(v/v)에 용해시켜서 2,5-디히드록시벤조익 산 기질(sDHB)을 제조하였다. 1  $\mu$ l의 시료를 스테인리스 스틸 타겟에 가하고, 1  $\mu$ l의 sDHB 기질을 혼합하였다. 시료를 자연 건조시키고 0.2  $\mu$ l의 에탄올을 가하였다.

[0448] MALDI/TOF 분석

질량 스펙트럼을 얻기 위하여 사용된 MALDI/TOF 질량 분석계는 지연 추출(delayed extraction)이 장치된 보이저 엘리트(퍼스펙티브 바이오시스템즈)였다. 기구는 리플렉터 모드(reflector mode)에서 작동되었다. 75ns 지연 후 양이온이 20kV로 가속되었다. 40 샷의 5개의 스펙트럼(200 샷)이 결합하여 최종 스펙트럼을 얻었다. 이온의 질량 할당을 위하여 올리고사카라이드 표준물을 사용한 외부 교정을 사용하였다.

[0450] 올리고사카라이드 프로파일

ManII 존재 하에 생산된 항-CD20 항체의 올리고사카라이드 프로파일을 도 34에 나타낸다. 항체의 Fc 부위와 관련된 올리고사카라이드는 48%에서 코어 푸코스가 결여된 복합 구조이다.  $\alpha$ -만노시다제 II는 코어-푸코실트랜스퍼라제와 경쟁하여, 48%의 푸코실화되지 않은 올리고사카라이드 구조를 형성한다.  $\alpha$ -만노시다제 II 없으면, 항체의 Fc 부위의 올리고사카라이드는 푸코실화된 구조만으로 이루어진다(야생형 항체).

융합 단백질 ManII-GaIT의 존재 하에 생산된 항-CD20 항체의 올리고사카라이드 프로파일이 도 35A-B에 도시되어 있다.  $\alpha$ -만노시다제 II에 관하여, 융합 단백질 ManII-GaIT의 경우에서도 푸코실화되지 않은 올리고사카라이드 구조의 양이 증가한다. 높은 비율의 푸코실화되지 않은 구조가 높은 만노스 구조에 존재한다(m/z 1256, 1419 및 1581). 푸코실화되지 않은 당의 이러한 67%에, 추가적으로 30%의 푸코실화되지 않은 혼성 구조가 발견되었

다(*m/z* 1622). 따라서, 융합 단백질 ManII-GaIT의 존재 하에 생산된 시료는 거의 100% 푸코실화되지 않은 구조를 나타낸다.

**[0453] *α*-만노시다제 II 또는 융합 단백질 ManII-GaIT의 존재 하에 생산된 항체의 생물학적 활성**

코어-푸코실트랜스퍼라제의 경쟁에서 *α*-만노시다제 II 및 ManII-GaIT 효소의 작용이 미치는 영향을 측정하기 위하여, 적절한 생물학적 분석이 수행되었다. 시험관 내에서 시료의 항체 의존성 세포독성(ADCC) 및 조작된 CHO 세포주(CHO-1708-37)의 표면에 발현된 CD16 수용체에의 결합을 측정하였다.

**[0455] CHO-1708-37에의 IgG 결합**

CHO-1708-37 세포주의 표면에 Fc  $\gamma$  RIIIA 수용체(CD16) 및 Fc  $\gamma$  RI 수용체의  $\gamma$  사슬을 발현시켰다. Fc  $\gamma$  RIIIA 수용체(CD16)의 발현을 3G8-FITC 단일클론 항체를 사용하여 FACS 분석으로 평가하였다(도 36). 상이한 농도로 (10, 3, 1, 0.3, 0.1  $\mu$ g/ml) 상이한 항체 변이체를 갖는 PBS, 0.1% BSA(각각 3개씩 제조)에서 1Mio/ml로 CHO-1708-37 세포를 배양하였다. 4°C에서 30분간 세포를 배양한 다음, PBS, 0.1% BSA로 세척하였다. 항체 결합은 1:200 펌루오레세인 이소치오시아네이트-컨쥬게이트된 F(ab')<sub>2</sub> 고우트 항-인간 IgG(잭슨 이뮤노리서치, 웨스트 그로브, 필라델피아)과 4°C에서 30분간 배양하여 측정하였다. 결합된 항체 변이체를 나타내는 형광 강도는 살아 있는 세포를 게이팅하여 FACS캘리버(BD 바이오사이언스, 산 조스, 캘리포니아)에서 측정하였다.

하기의 항체 변이체가 결합 분석 실험에 포함되었다:

Cwt8(야생형 1)

ManII( *α*-만노시다제 II)

**[0460] *α*-만노시다제 II(ManII)의 존재 하에 생산된 항체는 야생형 항체보다 높은 친화력을 갖고 Fc  $\gamma$  RIIIA 수용체에 결합한다.**

**[0461] 시험관 내 항체 의존성 세포 독성(ADCC)**

필수적으로 제조자의 지시를 따라서 히스토파크-1077(시그마 다이아그노스틱스 인크., 세인트 루이스, MO63178 미국)를 이용하여 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 준비하였다. 요약하면, 혈액 중 자연 사멸 세포(NK)의 비율을 증가시키기 위하여 전력을 다하여 1분간 달린 자원자로부터 해파린 처리된 주사기로 정맥혈을 취하였다. 칼슘 또는 마그네슘을 포함하지 않는 PBS로 1:0.75-1.3으로 혈액을 희석하고, 히스토파크-1077 위에 레이어링하였다. 그레이디언트(gradiant)는 중단 없이 실온, 400g에서 30분간 원심분리되었다. PBMC를 포함하는 인터페이스를 수집하고 PBS로 세척한 다음(2개의 그레이디언트로부터 얻은 세포마다 50ml) 실온, 300g에서 10분간 원심분리하여 채취하였다. 웰렛을 PBS로 재현탁 한 후, PBMC를 카운팅하고 실온 200g에서 10분간 원심분리하여 2차 세척하였다. 그 다음, 세포를 이후의 과정을 위하여 적절한 배지에 재현탁하였다.

라지 표적 세포를 PBS에서 세척하고, 카운팅하고, DMEM, 10% FCS, 1% 글루타맥스에 1 Mio/ml로 재현탁하였다. 이들에, 1:100 칼세인(calcein)을 가하고, 세포를 37°C에서 30분간 배양하였다. 그 다음, 세포를 PBS에서 세척하고, 카운팅하고, AIM-V에서 0.3 Mio/ml로 재현탁하였다. 이러한 세포 혼탁액 중에서, 100  $\mu$ l를 둥근 바닥 96 웰 플레이트의 각 웰에 가하였다. 항체는 AIM-V에서 희석되고, 50  $\mu$ l를 프리플레이팅된 표적 세포에 가하여 실온에서 10분간 표적에 결합하도록 하였다. 주효 세포로서 PBMC를 전술한 바와 같이 준비하였다. 주효기와 표적의 비율은 25:1이었다. 주효 세포를 AIM-V 배지에서 15Mio/ml로 준비하고 웰당 50  $\mu$ l를 가하였다. 플레이트는 5% CO<sub>2</sub>를 포함하는 가습된 공기에서 37°C 4시간 동안 배양되었다. 세포를 PBS에서 2회 세척하고 200  $\mu$ l의 봉산염 용액을 가하였다. 봉산염 용액으로 용해한 후 배지에 유리된 칼세인을 측정하여 표적 세포의 사멸을 평가하였다(도 37).

**[0464] 자발적 유리는 항체 없이 단지 표적과 주효 세포만을 포함하는 웰로부터 측정되었다. 단지 표적 세포와 1% 트리톤 X-100만을 포함하는 웰로부터 최대 유리가 확인되었다. 구체적인 항체-매개된 사멸의 비율은 다음과 같이 계산되었다:((x-SR)/(MR-SR)\*100, 여기에서 x는 특정 항체 농도에서 V<sub>max</sub>의 평균이고, SR은 자발적 유리의 V<sub>max</sub>**

의 평균이며, MR은 최대 유리의  $V_{max}$ 의 평균이다)

#### [0465] 실시예 7

##### [0466] 글리코-조작된 항-EGFR 단일클론 항체를 건선 치료에 사용

[0467] 건선을 앓는 환자는 본 발명의 방법에 따라서 생산된 글리코-조작된 항-EGFR 단일클론 항체로 치료될 수 있다. 구체적으로, 환자는 초기 용량  $400\text{mg}/\text{m}^2$ 으로 글리코-조작된 항체를 매주 주입받는다. 완전한 반응을 얻을 때까지 매주 유지 용량  $250\text{mg}/\text{m}^2$ 을 투여한다.

#### [0468] 실시예 8

##### [0469] 글리코-조작된 항-ErbB2 단일클론 항체를 전이성 전립선암, 전이성 유방암, 전이성 결장직장암 및 IIIb 또는 IV기 비-소세포성 폐암의 치료에 사용

[0470] RhuMAb2C4는 ErbB2에 대한 전장, 인간화 단일클론 항체(CHO 세포에서 제조된)이다. RhuMAb 2C4는 ErbB2가 다른 ErbB족 멤버와 결합하는 것을 차단하여 ErbB 경로를 통한 세포내 시그널링을 억제한다. RhuMAb 2C4는 ErbB2를 과발현하는 종양의 성장을 억제할 뿐 아니라, ErbB 리간드-의존성 시그널링을 요구하는 종양의 성장도 차단한다.

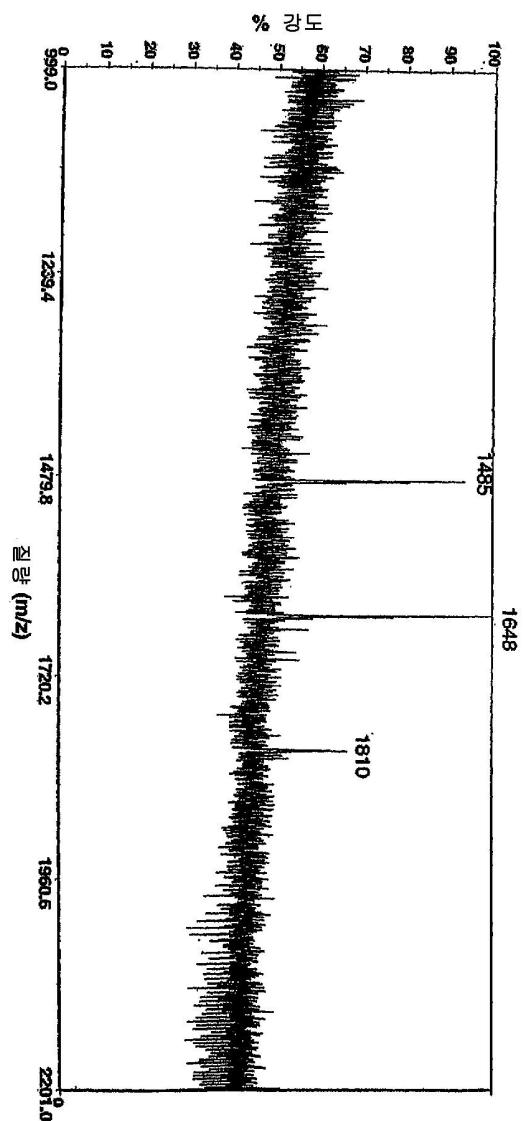
[0471] 본 발명의 방법에 의하여 제조된 RhuMAb 2C4의 글리코-조작된 형태는 호르몬-불응성(안드로겐 비의존성) 전립선암 환자, 전이성 유방암 환자, 전이성 결장직장암 환자 및 IIIb 또는 IV기 비-소세포성 폐암을 갖는 환자의 치료에 단일 약제로서 사용될 수 있다. 구체적으로, 글리코-조작된 RhuMAb 2C4는 질병의 진행이 중단될 때까지 각각 2 또는  $4\text{mg}/\text{kg}$ 로 매주 또는 3주마다 정맥으로(IV) 투여된다. 항체는 멀티도즈 액체 제형으로 공급된다 ( $20\text{mg}/\text{mL}$  또는 그 이상 농도의  $20\text{mL}$  용량).

[0472] 명백하게, 본 발명은 앞서 기술한 발명의 상세한 설명 및 실시예에 구체적으로 기재된 바와 다르게 실시될 수 있다. 상기 개시 내용에 기초하여 본 발명에 대한 다수의 변형 및 변이가 가능하며, 이들은 첨부된 청구항의 범위에 속한다.

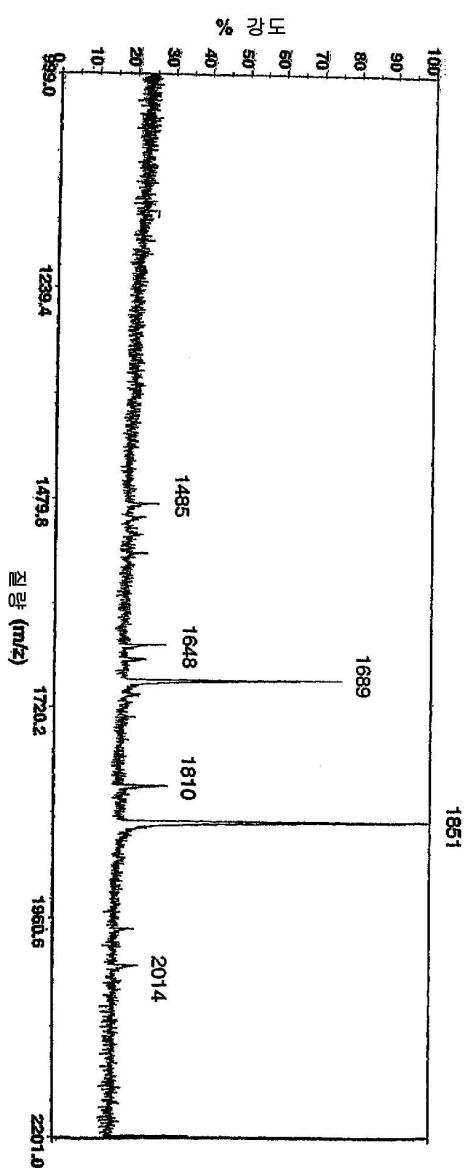
[0473] 여기에서 인용된 모든 간행물(특허, 특허출원, 학회지 논문, 실험 메뉴얼, 서적 또는 다른 문서들을 포함하여)의 전체 개시 내용이 여기에 참조 문헌으로 편입된다.

도면

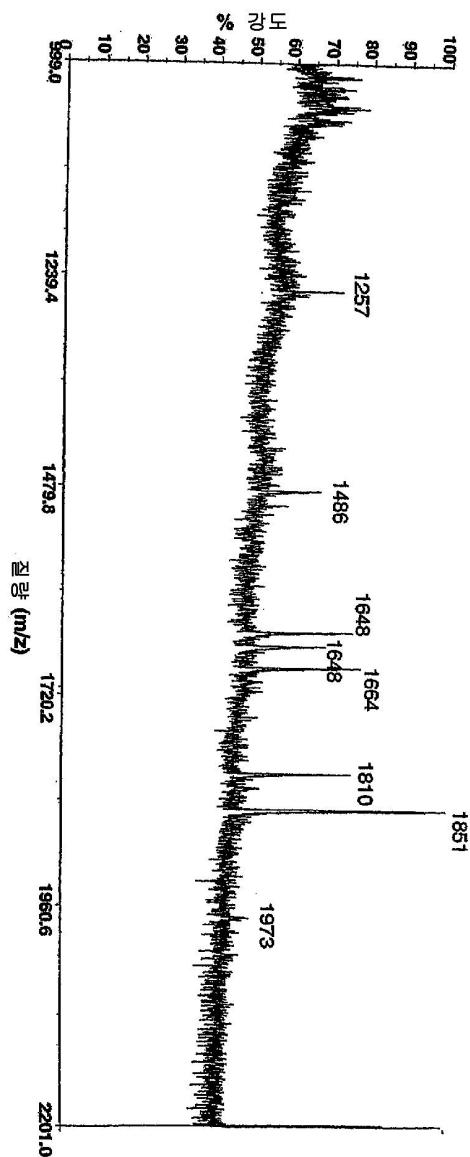
도면1



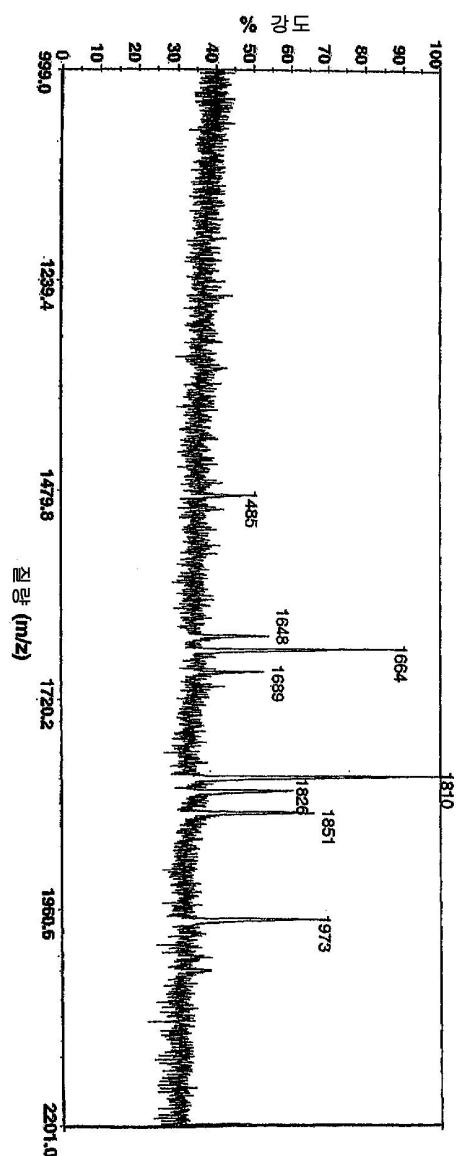
도면2



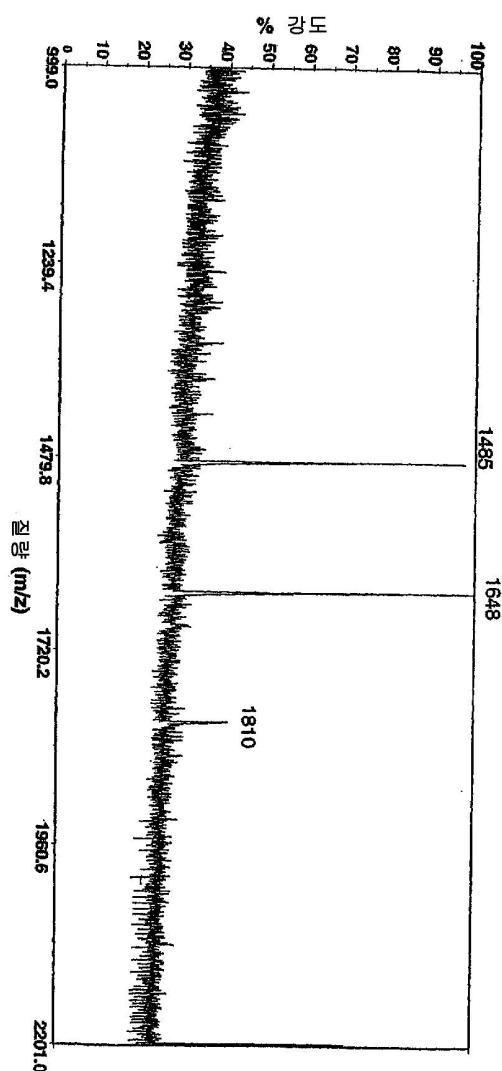
도면3



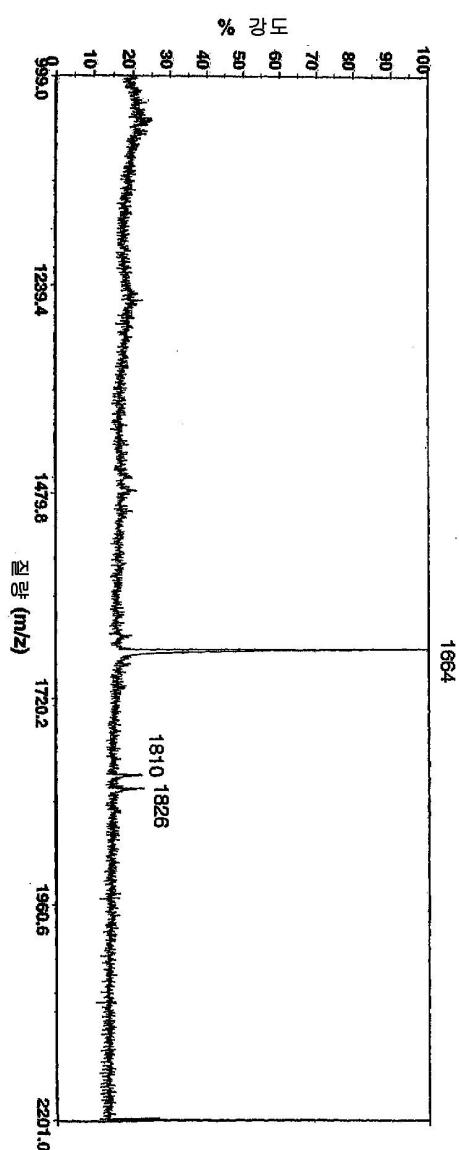
도면4



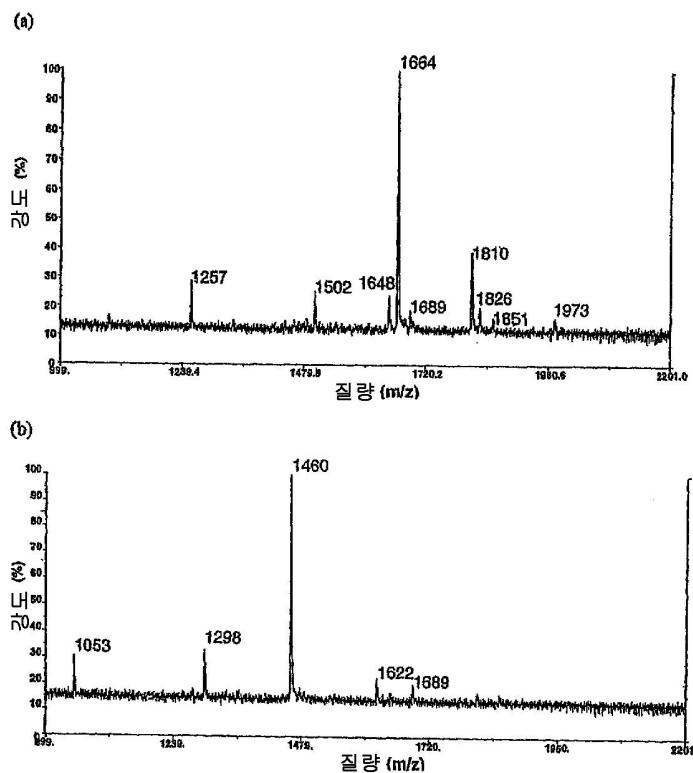
도면5



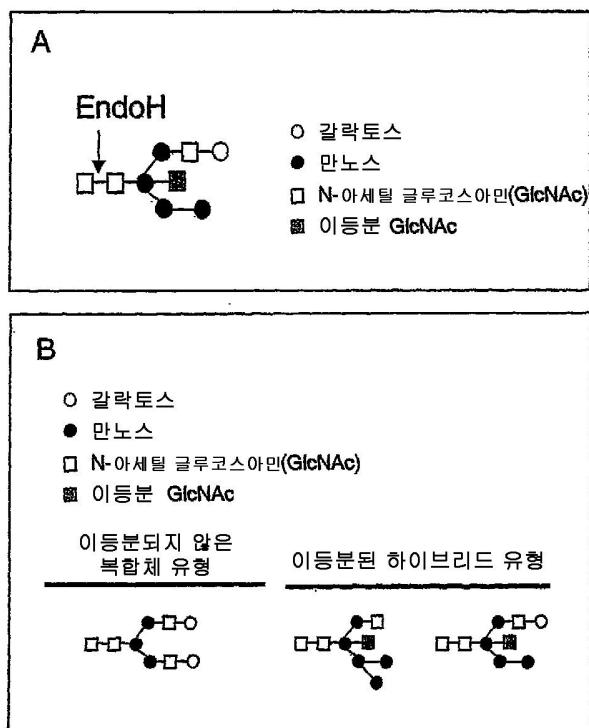
도면6



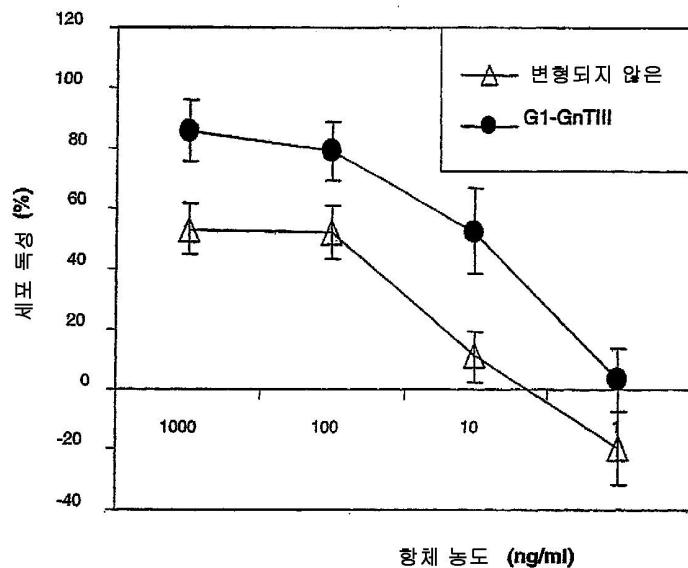
## 도면7



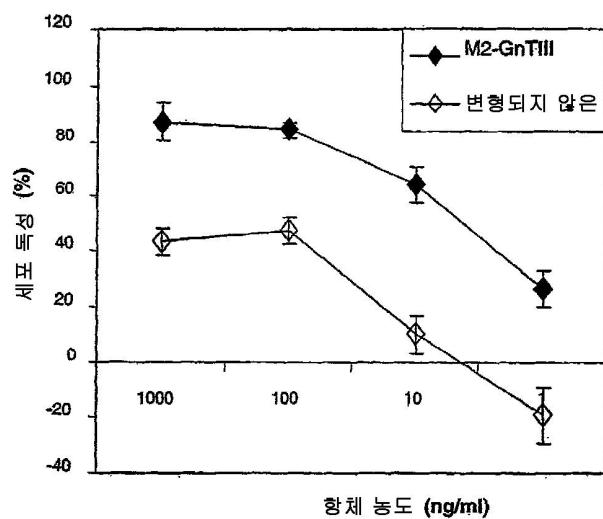
## 도면8



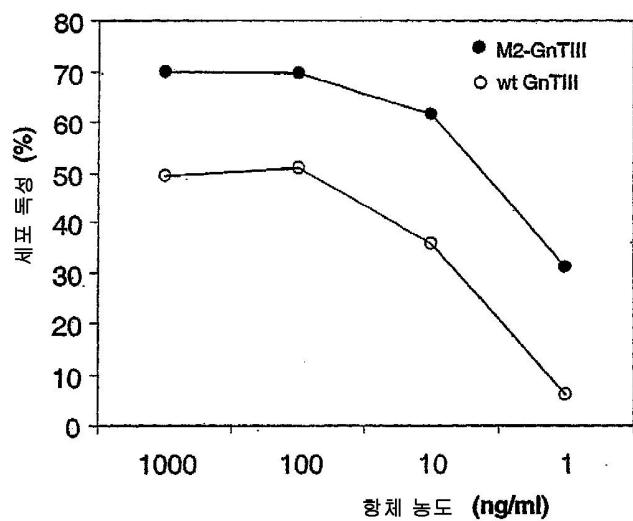
도면9



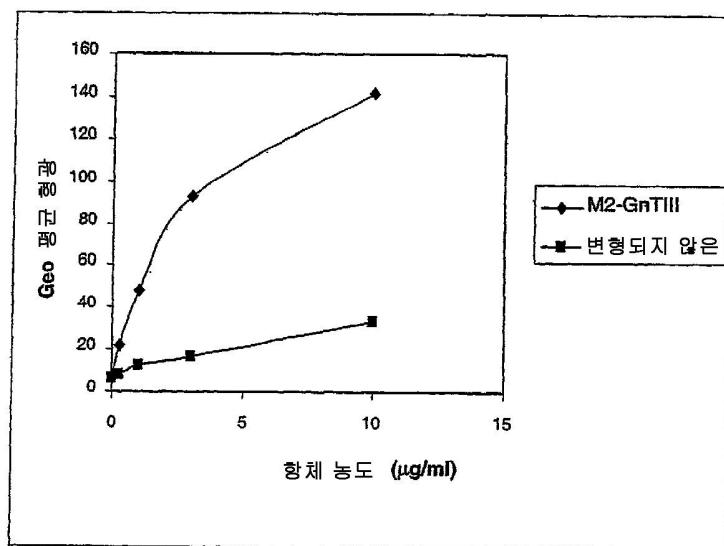
도면10



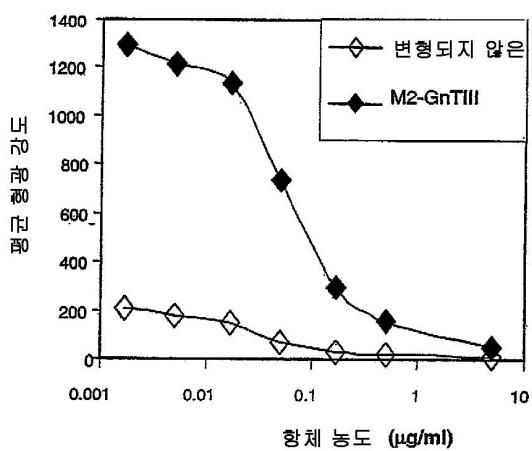
도면11



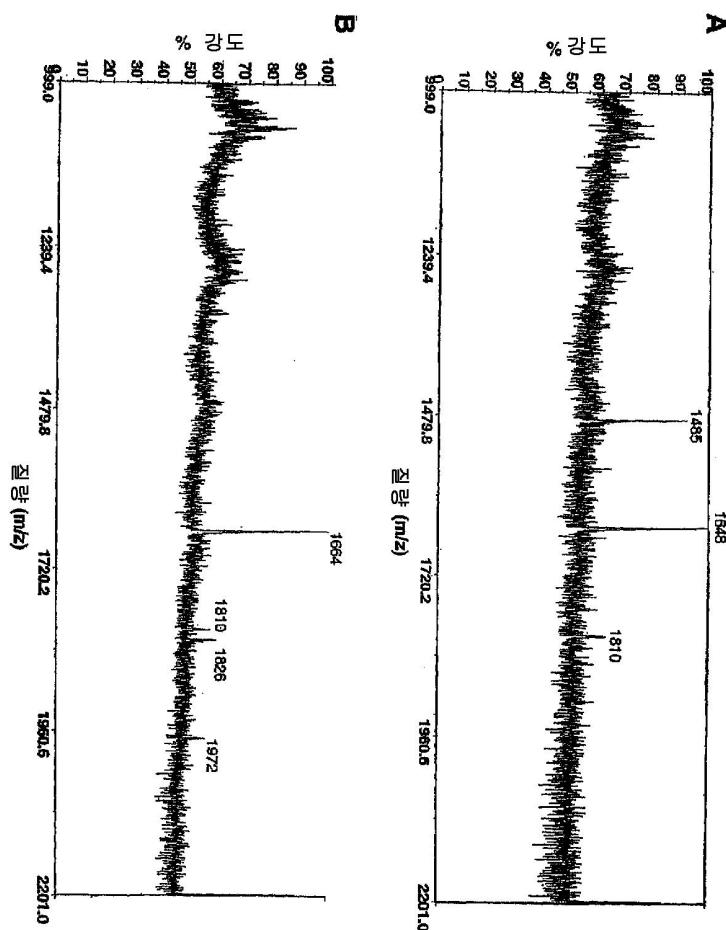
도면12



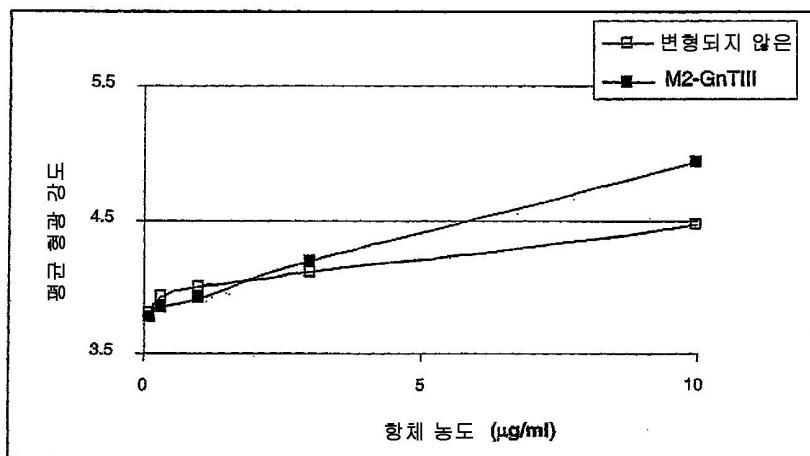
도면13



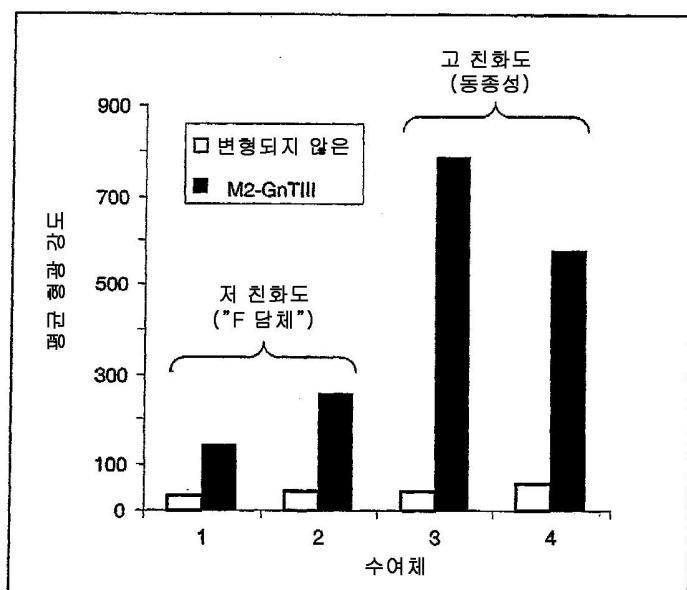
도면14



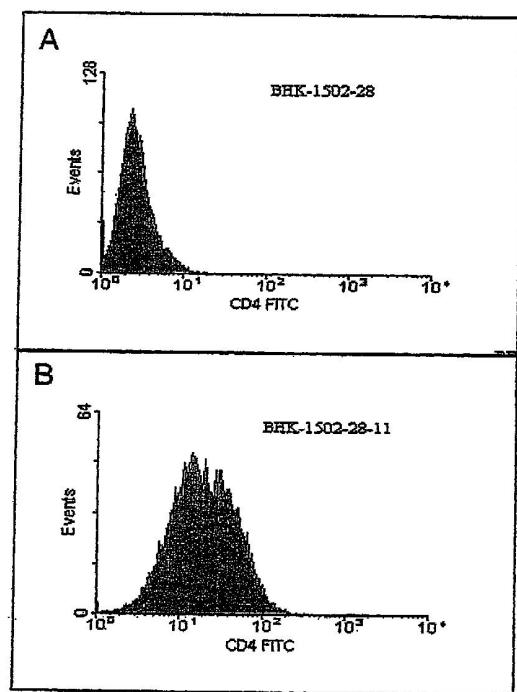
도면15



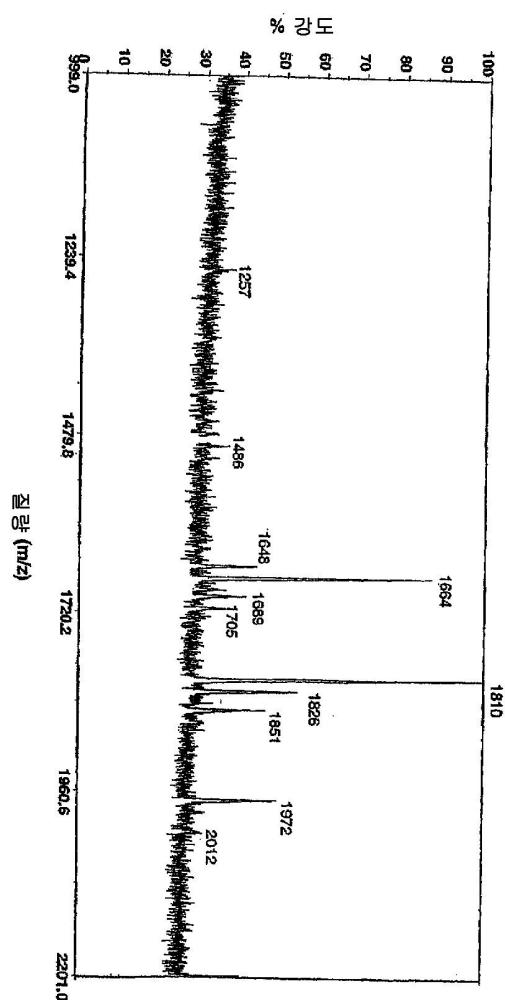
도면16



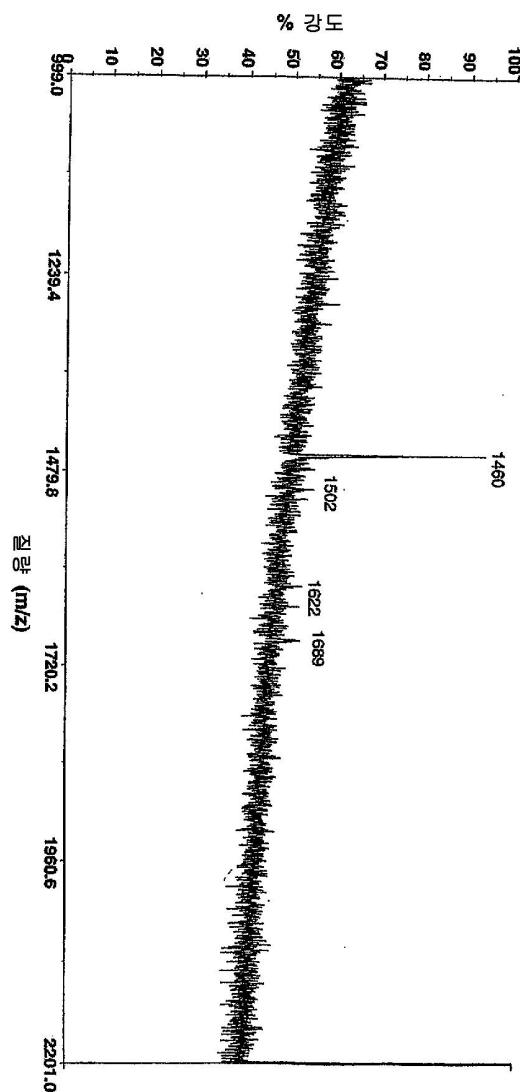
도면17



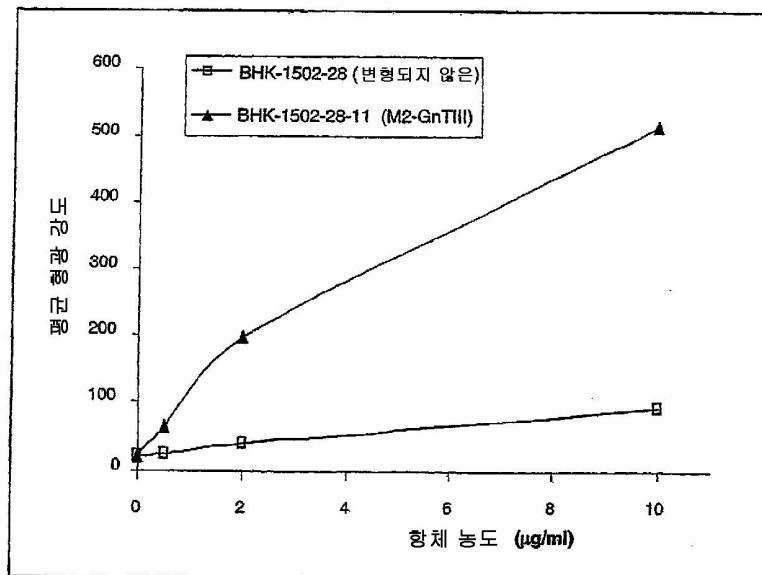
도면18



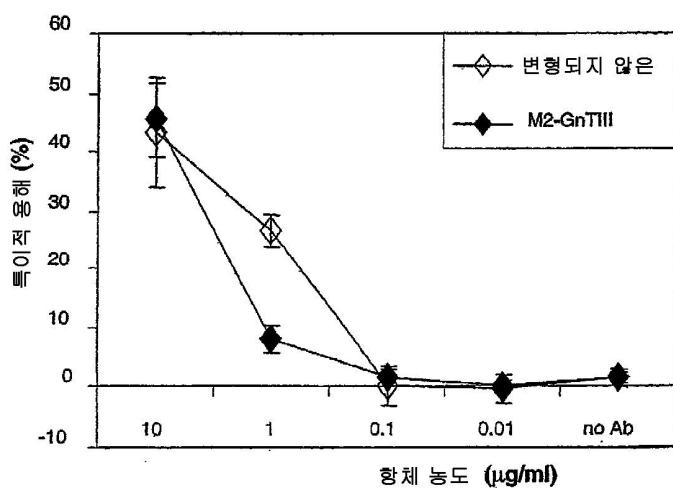
도면19



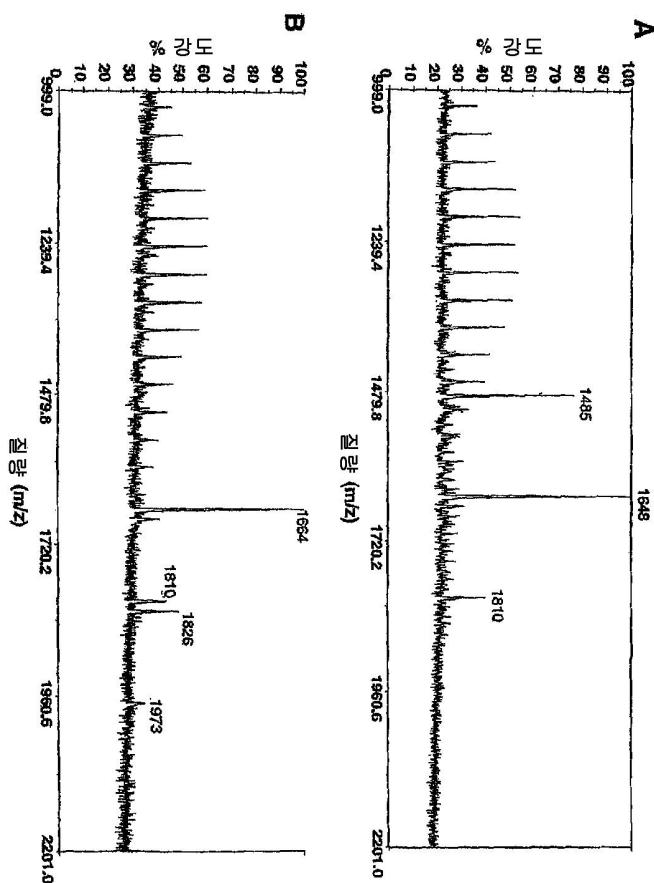
도면20



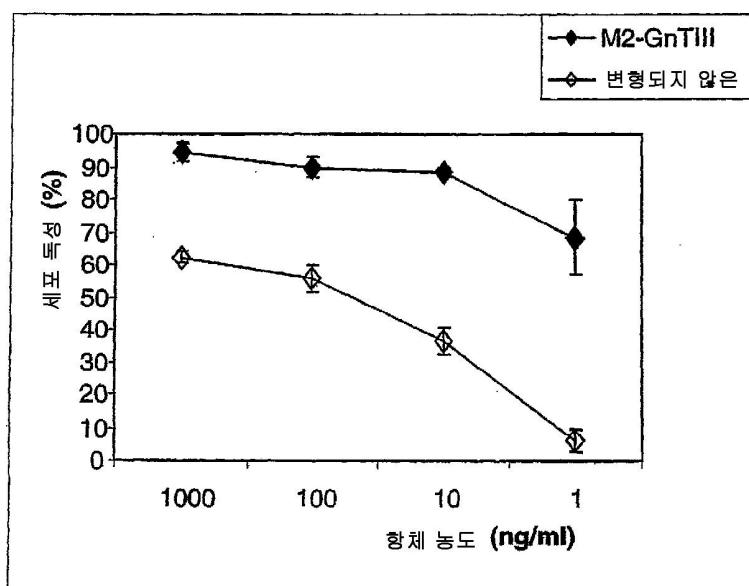
도면21



도면22



도면23



## 도면24

ManII-GnIII:

굵은체 : MainII 편재 도메인 (원형질 내 테일 + 트랜스멤브레인 영역 + 줄기 영역)

ATGAAAGTTAACCGCGCCAGTTACCGTGTTGGCAGTGGGATCTTCTGTGTGGTGAATTTC  
 TCGCTCTACCTGATGCTGGACCGGGGTCACTTAGACTACCCCAAGGAAACCGCGCCGGCGAG  
 GGCTACCTCCCTCAAGGGCAGCTCTCAAGATGTTGCAAGAAAAAAATAGACCAATTGGAGCGT  
 TTGCTAGCTGAGAATTAATGAGATCATCTCAAAATTAGAGACTCAGTCATCAATTGGAGT  
 GAGTCAGTGGAGGAATGGCTCGAAAAGTTCACAAAGCATTAGGCCAGGGTCTGGCTCA  
 CCCCTGCTCCAGCACTGTCCCCTAGCAAGGCCACCGAAGAAACTGCACCGGGTGGACTTC  
 GTGTTGCGGAGGAACACAGAGTATTGTCGGCACAAAAGCTGGCGGTGTGTCCTTC  
 AAACCAAGGTACCAAGGATGCTGAGAAAACCTCTCCAGGGGGACAGAGGAGAAAGACCAAG  
 GTGGCTGAGGGTCTCGGTGCGGGGCTTGCTGGAGGCCATGCGCATGTGTTGAGT  
 GCACCGGAGGCCCTGGAGGCCGGGCACTAGGGCAAGTGGGTTGAGTGTGTGTGCGCTG  
 CCAGGCTGGCACGGCCAGCTGGCGGGGTGCCCCACTGTGGTCCAGTATTCCAACCTGGCC  
 ACCAAGGAGGCCCTGCTACCCAGGGAGGTGCCAGGGGGTTATCAACGCCATCAACATC  
 AACCATGAGTTGACCTGCTGGATGTGGCTTCATGAGCTGGCGATGTGTGGACGCC  
 TTTGTTGTCAGCGAAATCAATTACCGGCTTACGGGGACCTCGGCCTCAAGGTTCCGA  
 GAGATGCTGACCAATTCGAGTACATCCGCCACAAAGGTCTTACGTCCTTCCG  
 GACCAACTCCCACTTGGTGGCCGTAGGAGCGGTGGATGCAAGACACTACCTGGCTTACCC  
 TTCCCTACCCAGGATGGTGTCTCCCGCTGCGAACCTGACCTGATGACGTCATTATC  
 ATCGACGACGGGAGGAGATCCCTCGCCGTGATGGTGCTGCTGTCCTCAAGCTCTACGAT  
 GGCTGGACAGAGCCCTTCCATATGCGCAAGTCCCTGTATGGTTTCTTTGGAAAG  
 CAACCAAGGACACACTGGAGGTGGTGTGAGGCTGACCCATTGACATGCTGCAAGGCTGTGAT  
 GGGCTGGACGCATCCGCTTGCACGGGCTCAGTACTACACCATGCCAACCTTCGACAG  
 TATGAGAACCGCACCCGACATCTACTGGTCTCTGGCAACTGGTCTCTGGCAGGCCCTGCACTTC  
 CGGGCTGGCACTGCTCTGGCTTCACACCCGAGGGCATCTACTTCAAACACTCGTGTGCG  
 GCCCAGAAATGGTACTTCCCGCTGGGGTACTACGAGGAACAGGGGACTCAATTAC  
 ATCCGAAGGCTTGAACTGGTACTGGGGATGGTCTGACCCGACCCAGCAGGAGTACCCCTCT  
 GCAGACCCAGTGAACACATGTATGCTCTTAAGTACCTGCTCAAGAAACTATGACCGATTC  
 CGCTACTTGTGAAATCCCTACCGGAGGCCAACGACACTGTAGGGTGGGCCCG  
 AACCAAGGGCTCAGACGGAAGGTATGCTGTCAGGGCAAGTTGGATAACACGGAGGGC  
 CGGAACAGAAACTGATCTGAAAGAGGACCTGTAG

MKLSRQFTVFGSAIFCVVIFSLYLMRGEHDYPRNPRREGSFPPQQLSMLQEKİDHLER  
 LLABNNETISNIRDTSVNLSESEVEDGPRBSQSNFSQGAGSFLQPLSPSKATEELHRVDF  
 VLPEPDTPPEYFVRLTKAGGVCFKPGTRMLBKPSGRTEEKTKVAEGSSVRGPARRPMRHVLIS  
 ARERLGGRTTRRKWVECVCLPGWHPGSCGVPTVQVSNLPKERLVPREVRVVINAINI  
 NHEDILLDVRFHIELGDVVDASFVVCESNPTAYGEPRPLKFREMLTNGTFEYIRHKVLYVFL  
 DHFPPGGRQDGWIAADDYLRTFL/TQDGVSRLRNLRPDDVFIIDDAEIPARDGVLFLKLYD  
 GWTEPFAFHMRKSLYGFFWKQPGTLEVVSGCTIDMLQAVYGLDGIRLRRQYTTMPNFRQ  
 YENRTGHILVQWSLGSPLHFAFWHWCSCWCFTEPEGIYFKLVSQAQNQDFPRWGDYEDKRDLY  
 IRSLLRTGGWFQDGTQQEYEPADPSEHMYAPKLLKNYDQFRYLLENPYREPKSVEGGRR  
 NQGSDGRSSAVRCKLDTTEGPEQKLISEEDL

## 도면25

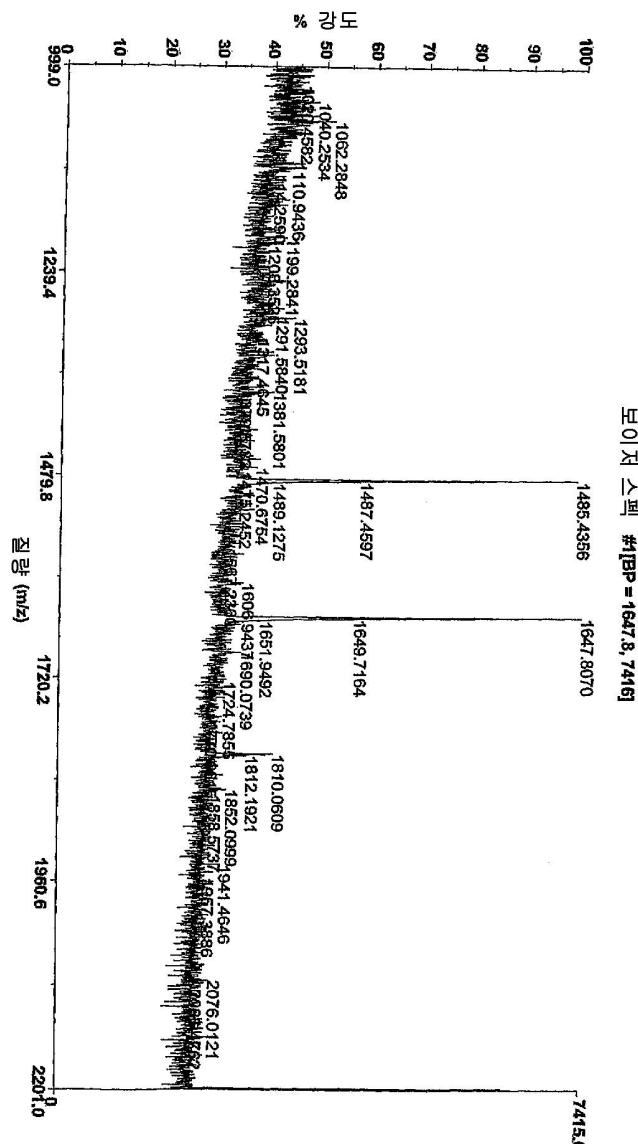
GnTI-GnTIII

굵은 체 : GnTI MainII 편재 도메인 (원형질 내 테일 + 트랜스엠브레인 영역 + 줄기 영역)

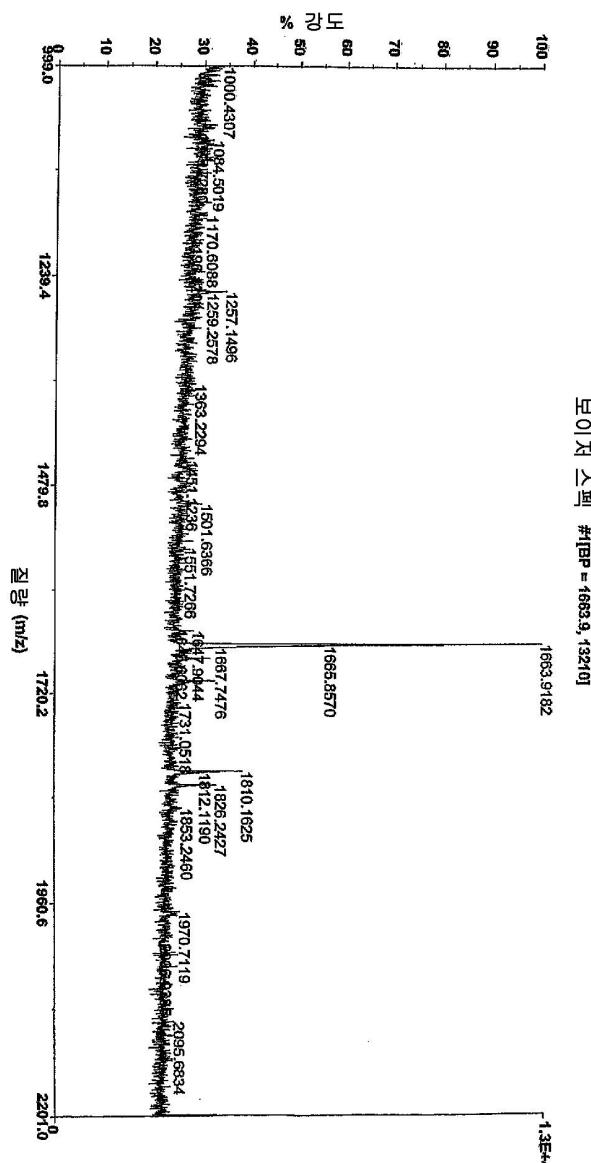
ATGCTGAAAAGCAGTCAGGCTTGTCTGTGGGGGCGTATCCCTTTGGCCCTGG  
 AATGCCCTGCCTCTCTCTTCAGACCGCCAGCACCTGGCAGGCCACCCCTCAGTC  
 AGUGCTCTCGATGGCGACCCGCCAGCCCTACCCGGGAGTGAATTCGCCCTGCCCAAGAC  
 'GCCAGGGAGCTGGAGCGGCAGCGTGGGCTGCTGCAGCAGATCGGGATGCCCTGTCG  
 AGCCAGCGGGAGGGAGCCAGGCCCTCCGCCAGGCCAGGCCCTGGCCCTGTCAGC  
 CCCGCCCTGCTCCAGGCACTGCTCCCTAGCAAGGCCACCGAAGAACATGCACCGGGTG  
 GACTTCGTGTTGGAGGACACCAAGAGTATTTGTTGCGCACCAAAGCTGGCGGTG  
 TGCTTCACACAGGTAACCAAGGATGCTGGAGAAACCTTCTCCAGGGCGGACAGAGGAGAAG  
 ACCAAGGTGGCTGGCTGGGAGGCTGGGAGGCTATGCCGCAAGTGGGTTGAGTGTCTG  
 TTGAGTCACGGAGGCCCTGGAGGCCGGCAACTAGGCCAAGTGGGTTGAGTGTCTG  
 TGCTGCCAGGTGGCACGGGCCAGCTGGGGGTGCCACTGGTCAGTATTCCAC  
 CTGGCCACCAAGGAGGCCCTGGTACCCAGGGAGGTGCCAGGGGGTATCAACGCCATC  
 AACATCAACCATGAGTCGGATGCTGGGATGCTGGGATGAGCTGGCGATGTTG  
 GACGCCCTTGTGGTCAGCAATCCAAATTCAACCCCTACGGGGAGGCCCTGGCGCTCAAG  
 TTCCGAGAGATGCTGACCAATGCCACCTCGAGTACATGCCACAAAGGTGTCTACGTC  
 TTGCTGGACCACTTCCCACCTGGTGGCCGTCAGGACGCCCTGGGATTGCAAGACGACTACCTG  
 CGTACCCCTCCAGGATGGTGTCTCCCGCTGCCAACCTGCGACCTGATGAGCGTC  
 TTTATCATCGACGACGCCGACAGATCCCCTGGCGTGAATGGGTTGCTGTTCTCAAGCTC  
 TACGATGGCTGGACAGAGGCCCTCGCCTCCATATGCCAAGTCCCTGTATGGTTCTTT  
 TGGAAAGCAACAGGACAGGCCCTGGGACTGGGACTGGCTCACCATGACATGCTGAGGCT  
 TGTGATGGCTGGACGCCATCCGGCTGGCGCCGCTGAGTACTACACCATGCCAACCTT  
 CGACAGTATGAGAACCGCACCGGCCACATCTAGTCAGTGGTCTCTGCCAGCCCCCTG  
 CACTTCGGGGCTGGCACTGCTCCCTGGCTCACACCCGAGGGCATCTACTTCAAACCTC  
 GIGTCGGCCCAGAATGGTGAATGGGTGACTACGGGACAAGAGGGACCTC  
 AATTAACATCGCAAGGATGGTGAATGGGTGACTACGGGACAAGAGGGACCTC  
 CCTCTGCAAGCCCCAGTGAACACATGTATGCTCTTAAGTACCTGCTCAAGAACTATGAC  
 CAGITCCGCTACTTGCTGAAAATCCCTACCGGGAGCCAAAGAGCACTGTAGAGGTGG  
 CGCCGGAAACCGGGCTGAGCGGAAGGTGATCTGCTGTCAGGGCAAGTGGATAACAAC  
 GAGGGCCGGAAACGAAACTGATCTGAAGAGGACTGTAG

MLKKQSAGLVLWGAILEFWVANNALLLFFWTRPAPGRPPSVSALDGDPASLTREVIRLAQD  
 AEVELERERQGLLQQIGDALSSQRGRVPTAAPPQPRVPTFAPPLQPLSPSKATEELHRV  
 DFVLPEDTTEYFVRTKAGGVCFKPGRTRMILEKPSGRTEEKTVAEGSSVRGPARRPMRHV  
 LSARERLGGRTTRRKWVECVCLPGWHGPSCGVTVVQYSNLTKERLVPREVPRREVINA  
 NINHEFDLLDVRFHEDGVVDAFVVCESNFTAYGEPRPLKFRIMLTNGTFEYIRHKVLYV  
 FLDHFPPGGRQDGWIADDYLRTFLTDQGVSRRLNLRPDDVFLIDDADEIIPARDGVFLFLKL  
 YDGWTBPFAPFHMRKSLYGFFWKQPGTLEVVSGCTIDMLQAVYGLDGIRLRRRQYYTMPNF  
 RQYENRTGHILVQWSLGSPLHFAGWHCWSCTFPEGTYFKLVSQNGDFPRWGDYEDKRD  
 NYLRSLIRTRGGWFDTQQEYPPADPSEHMYAPKYLLKNYDQFRYLLLENPYREPCKSTVEGG  
 RRNQGSGDGRSSAVRGKLDTEGPBOKLISEEDL

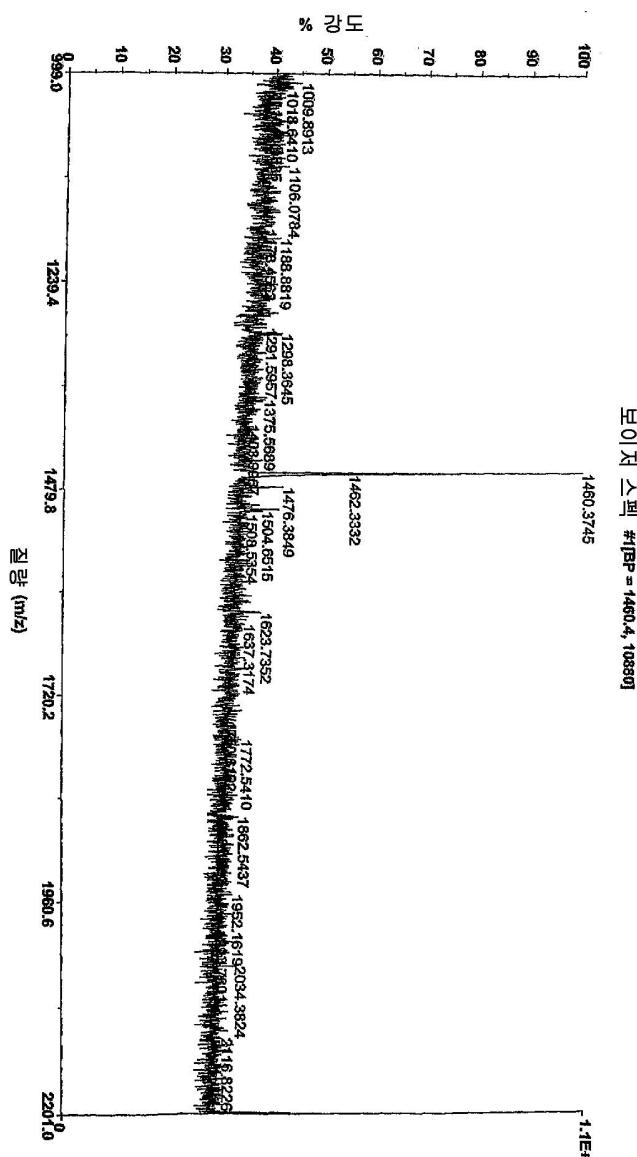
도면26



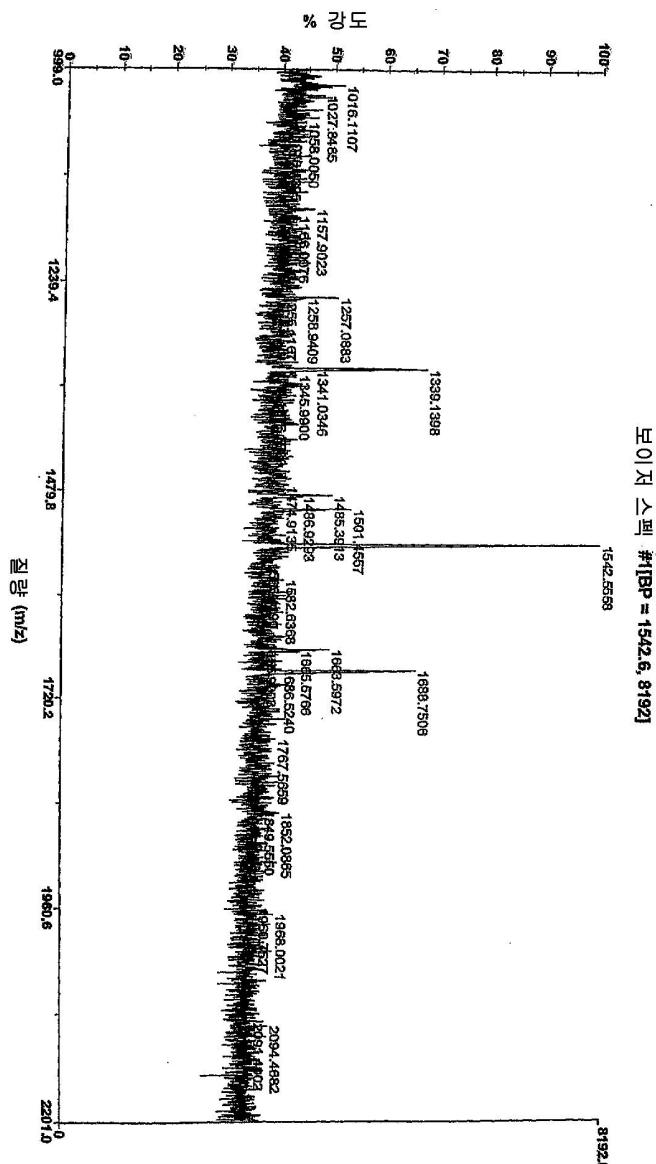
도면27a



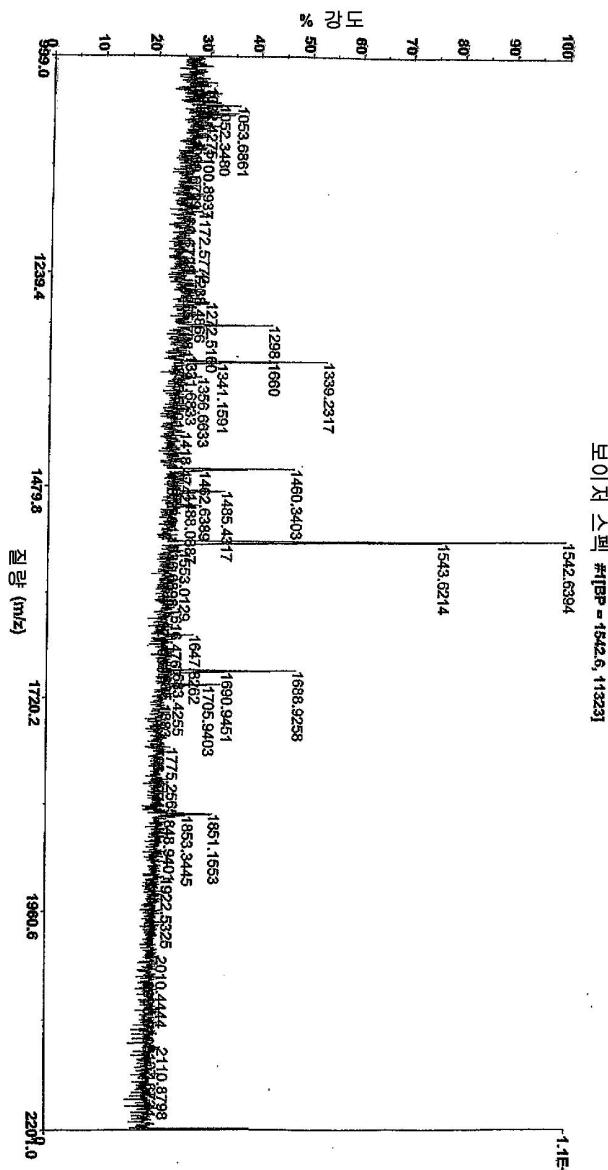
도면27b



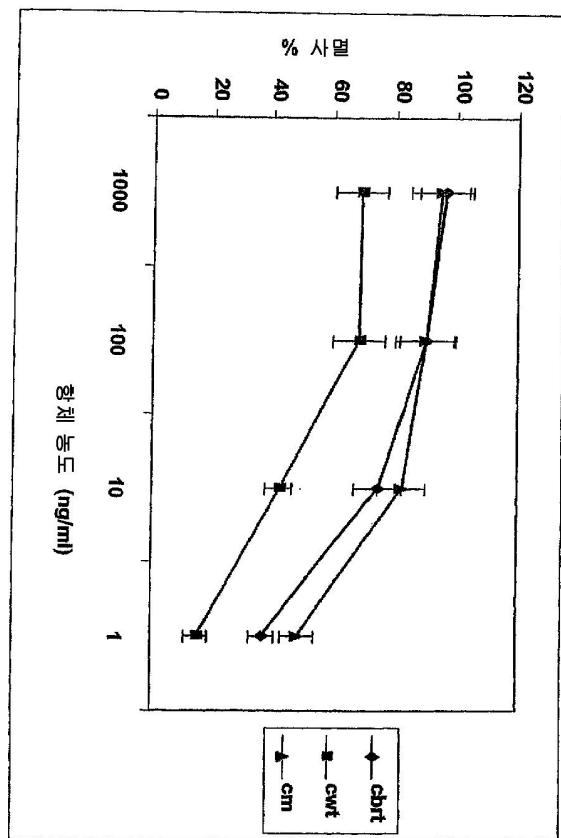
### 도면28a



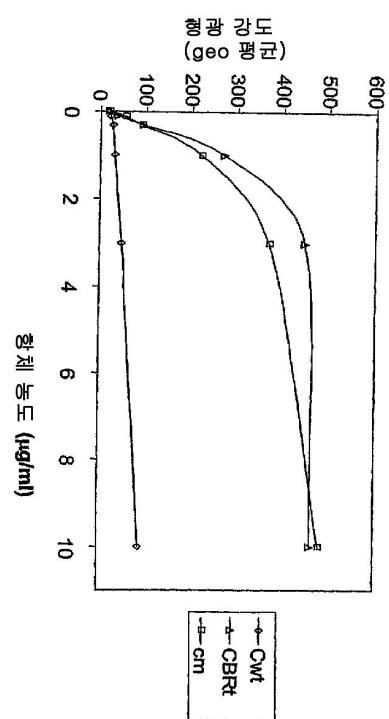
### 도면28b



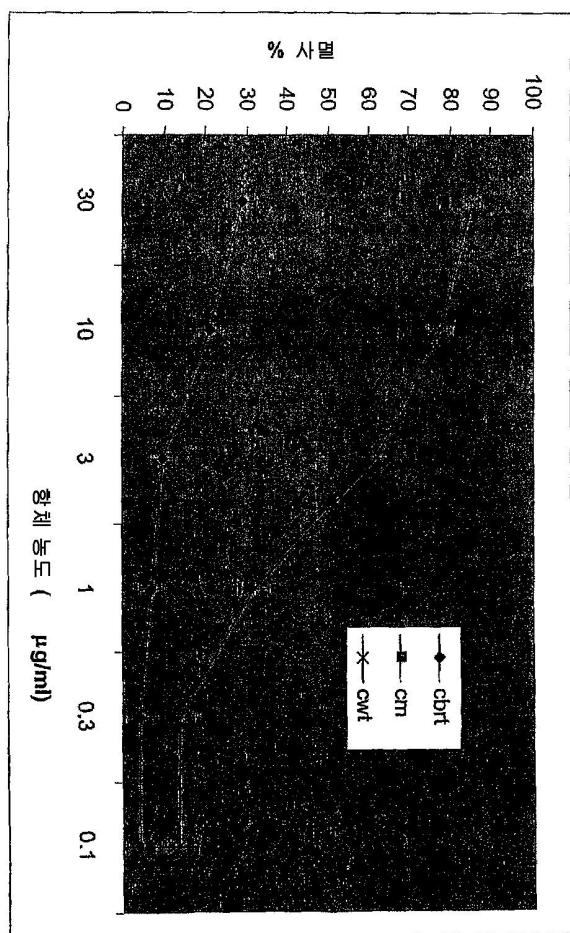
도면29



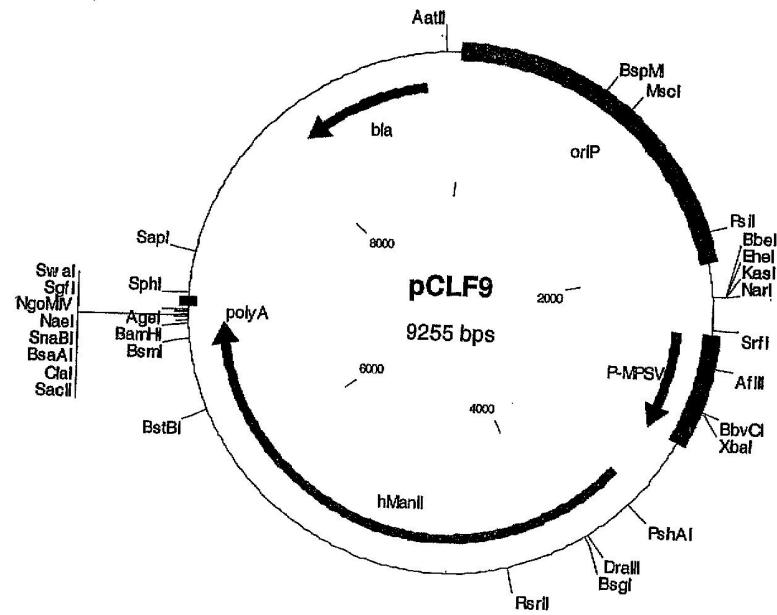
도면30



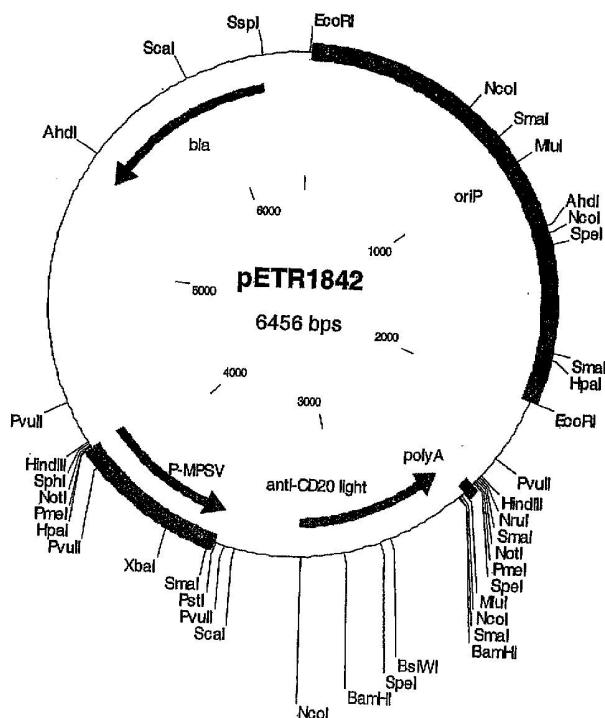
도면31



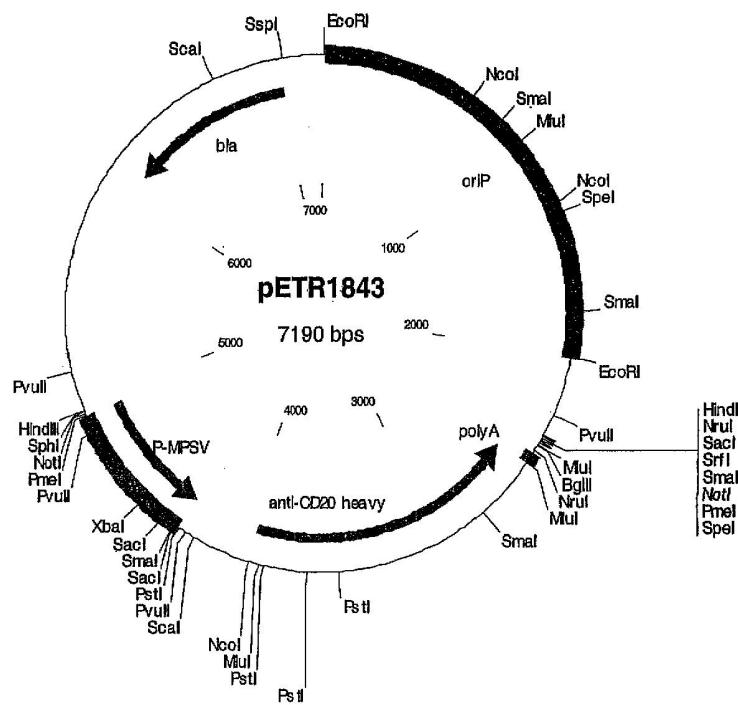
### 도면32a



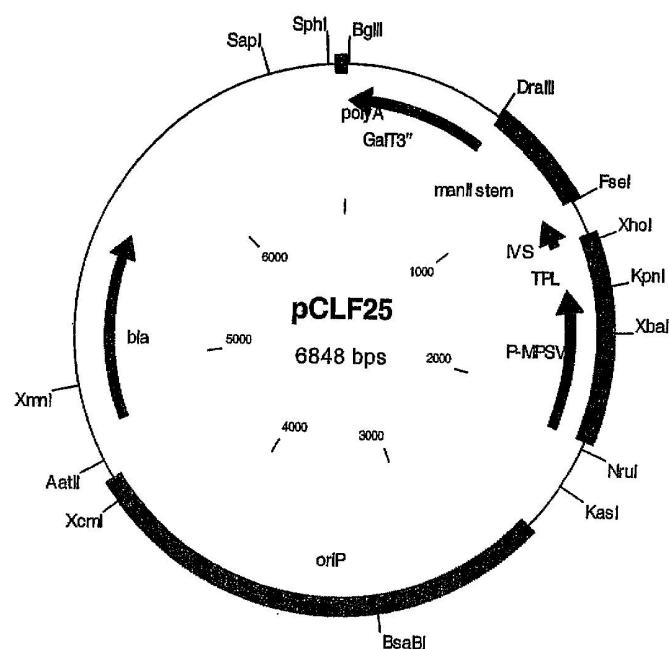
### 도면32b



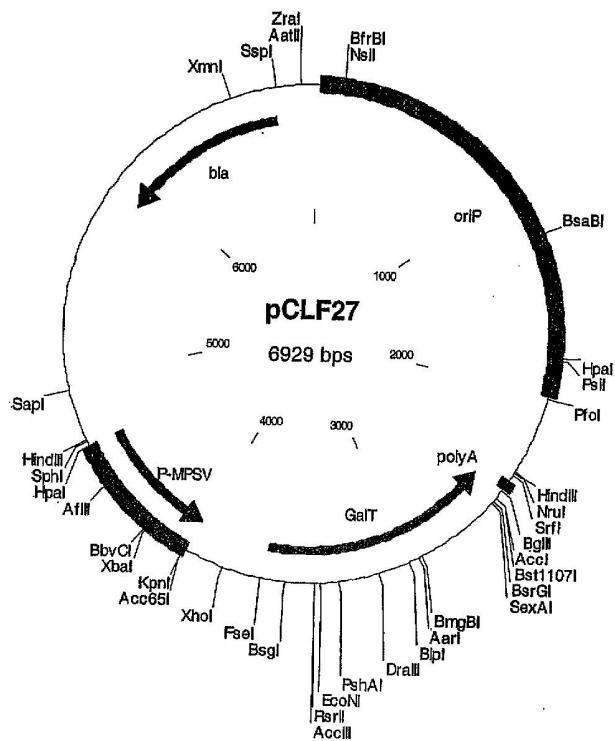
도면32c



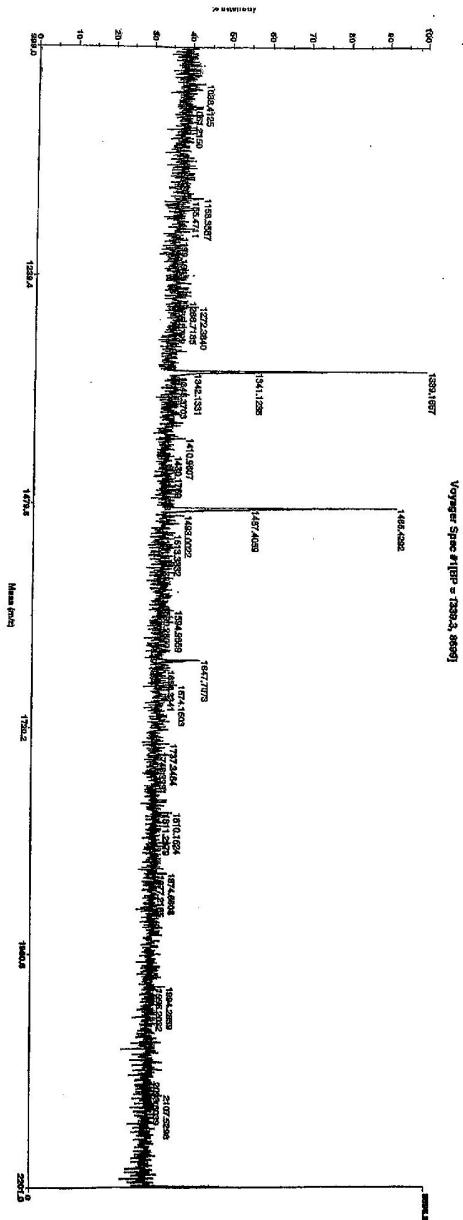
도면33a



### 도면33b

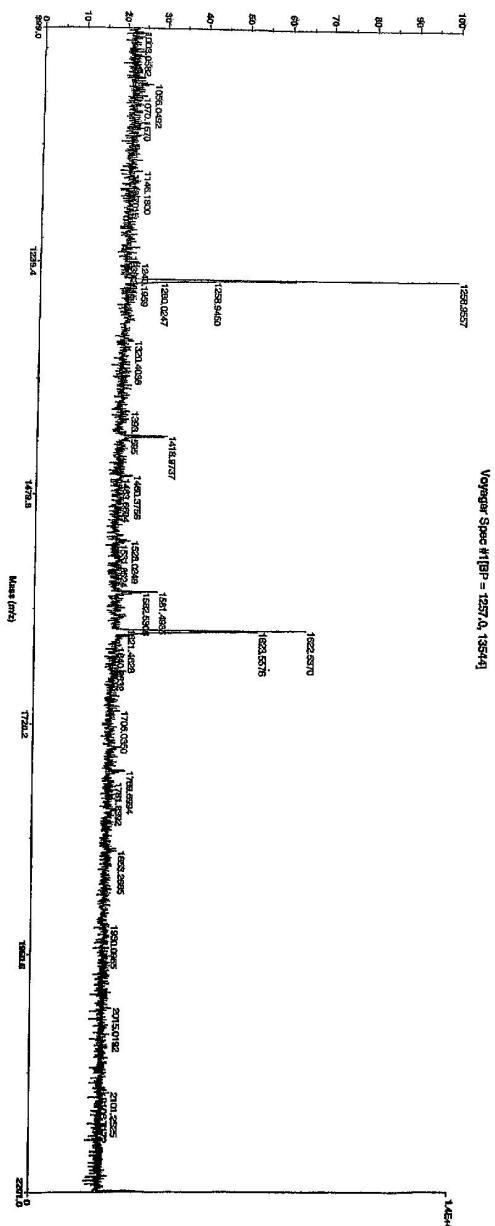


### 도면34

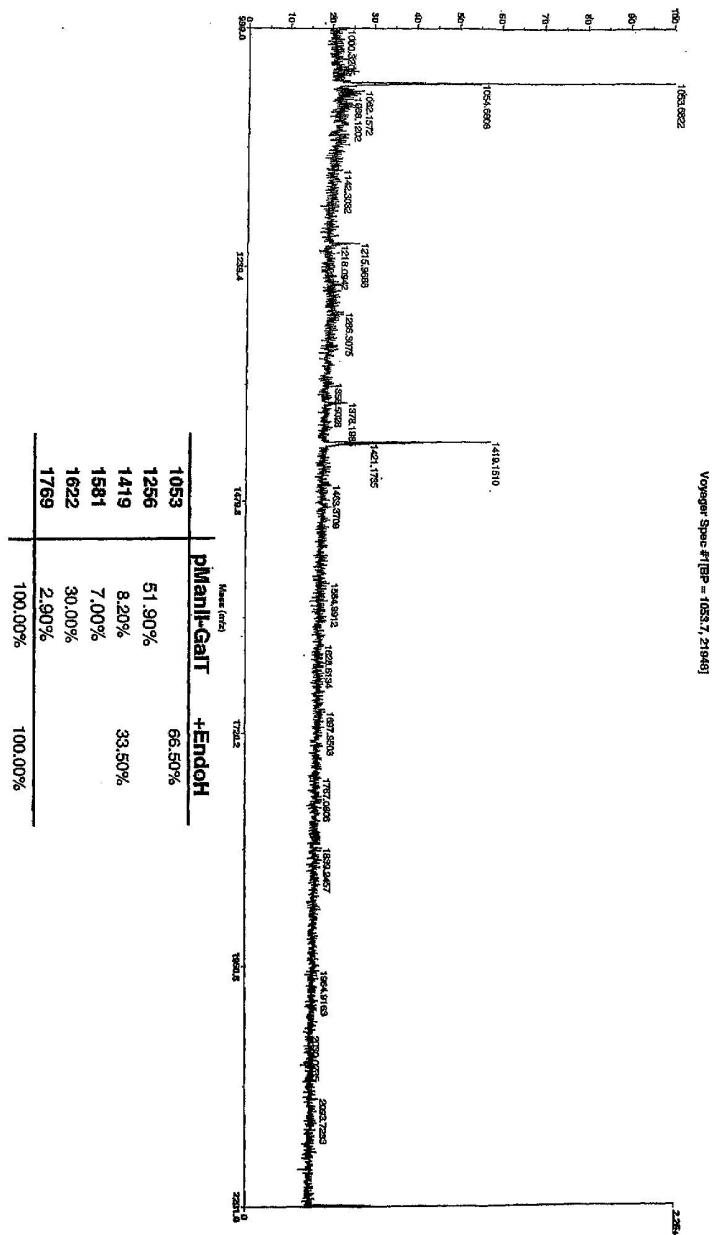


Mani	
총 특합처	1339
부코실화되지 않은 특합처	1436
	1647
100.00%	48.40%
48.40%	43.30%
	8.30%

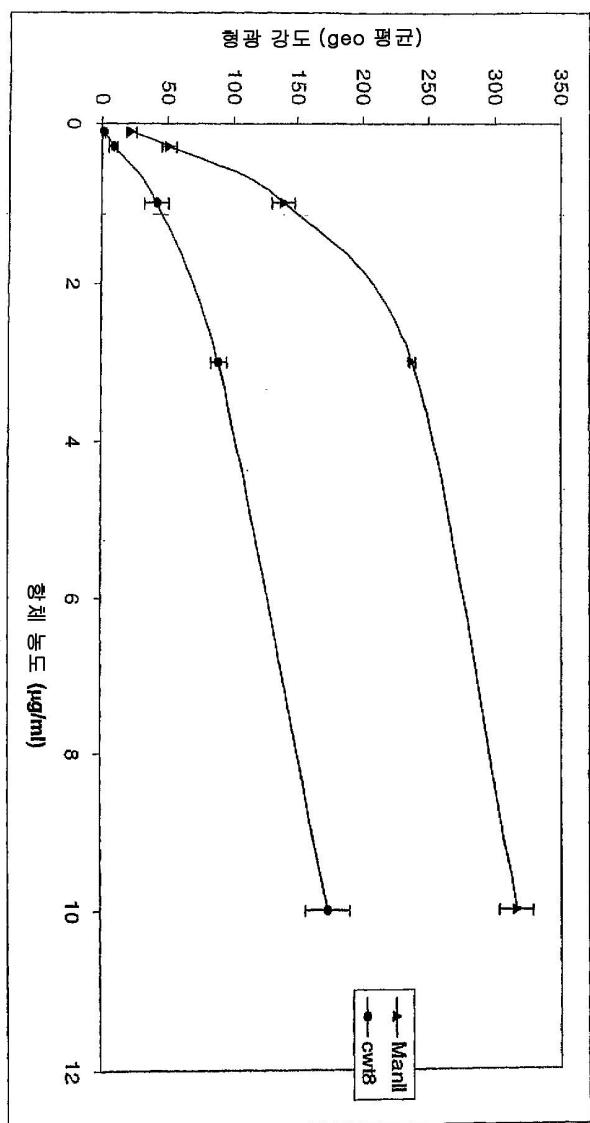
### 도면35a



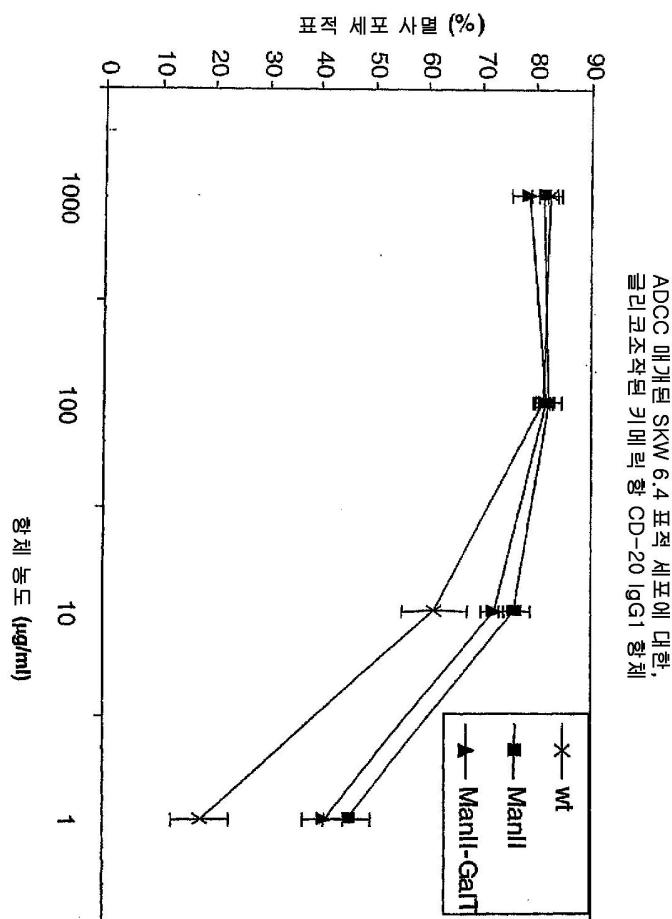
### 도면35b



도면36



## 도면37



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GlycArt Biotechnology AG

Umana, Pablo

Bruenker, Peter

Ferrara, Claudia

Suter, Tobias

<120> Fusion Constructs and Use of Same to Produce Antibodies with  
Increased Fc Receptor Binding Affinity and Effector Function

&lt;130&gt; 1975.018PC04

&lt;150&gt; US 60/441,307

&lt;151&gt; 2003-01-22

&lt;150&gt; US 60/491,254

&lt;151&gt; 2003-07-31

<150> US 60/495,142  
 <151> 2003-08-15  
 <160> 20  
 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Unknown  
 <220><223> c-myc epitope tag  
 <400> 1

Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 2  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAB-177 PCR primer  
 <400> 2

gcgtgtgcct gtgaccccg cgccctgct ccagccactg tcccc 45

<210> 3  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAB-178 PCR primer  
 <400> 3

gaaggttctt ccagcatctt ggtacc 26

<210> 4  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAB-179 PCR primer  
 <400> 4  
 ctgaggcgcg cggccaccat gctgaagaag cagtctgcag ggc 43

<210> 5  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAB-180 PCR primer  
 <400> 5  
 ggggacagtg gctggagcag gggcgccggg gt cacaggca cacgcggc 48  
 <210> 6  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAB-252 PCR primer  
 <400> 6  
 gctaggccgg ccgccaccat gaagtttaagc cgccagttca ccgtgttcgg 50  
  
 <210> 7  
 <211> 65  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAB-253 PCR primer  
 <400> 7  
 ggggacagtg gctggagcag gggtgagcca gcaccttggc taaaatttgc ttgtgaactt 60  
 ttccgg 65  
 <210> 8  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAB-254 PCR primer  
 <400> 8  
 tccgaaaagt tcacaaagca atttcagcca aggtgctggc tcacccctgc tccagccact 60  
 gtcccc 66  
  
 <210> 9  
 <211> 29  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
<220><223> GAB-255 PCR primer  
<400> 9  
atgccgcata ggcctccgag caggacccc 29

<210> 10  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> GAB-261 PCR primer  
<400> 10  
gctaaatatt gaattccctt tatgtgtaac tcttggtctga agc 43

<210> 11  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> GAB-262 PCR primer  
<400> 11  
tagcaatatt gaattcgcag gaaaaggaca agcagcgaaa attcacgc 48

<210> 12  
<211> 1715  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Nucleotide sequence of GnTI-GnTIII  
<400> 12  
atgaagttaa gcccgcagg taccgtgttc ggcagtgcga tcttctgtgt ggtgatttc 60  
tcgctctacc ttagtgcgttcc cccgggtcac tttagactacc ccaggaaccc ggcgcgcgag 120  
ggctccttcc ctcaggccca gctctcaatg ttgcaagaaa aaatagacca tttggagcgt 180  
ttgcttagctg agaataatga gatcatctca aatatttagag actcagtcata caatttgagt 240  
gagtctgtgg aggtatggtcc gaaaaggta caaagcaatt tcagccaagg tgctggctca 300  
ccctgtctcc agccactgtc ccctagcaag gccaccgaag aactgcaccg ggtggacttc 360

gtgttgcgg aggacaccac agagtatttt gtgcgcacca aagctggcgg tgtgtgttc 420  
aaaccaggta ccaggatgct ggagaaacct tctccaggc ggacagagga gaagaccaag 480  
gtggctgagg ggtcctcggt ccgggtctt gctcgaggc ctatgcggca tgtgttgagt 540

gcacgggagc gcctgggagg ccggggcact aggccaat gggttgatg tgggtgcctg 600  
 ccaggctggc acggcccaag ctgcgggtg cccactgtgg tccagtattc caacctgcc 660  
 accaaggagc gcctggtacc cagggaggtg ccgaggcggg ttatcaacgc catcaacatc 720  
 aaccatgatc tcgacctgtggatgtgcgc ttccatgagc tggcgatgt tggacgccc 780

tttgtggctc gcgaatccaa tttcaccgcc tacggggagc ctggccgct caagttccga 840  
 gagatgtga ccaatggcac ctgcgatgtac atccgcaca aggtgtctta cgtttccctg 900  
 gaccacttcc cacctgggtt ccgtcaggac ggctggattt cagacgacta cctgcgtacc 960  
 ttccctcaccc aggtgggtt ctccgcctg cgcaacctgc gacctgtatc cgttttata 1020  
 atcgacgacg cggacgagat ccctgcgcgt gatgggtgc tggcttcaa gctctacgt 1080  
 ggctggacag agcccttcgc ctccatatg cgcaagtccc tgtatggttt ctggaaag 1140  
 caaccaggca cacggagggtt gtgtcaggct gcaccattga catgtgcag gctgtgtatg 1200

ggctggacgg catccgcctg cgccgcgtc agtactacac catgccaac tttcgacagt 1260  
 atgagaaccc caccggccac atcctagatgc agtggctct cggcagcccc ctgcacttcg 1320  
 cggcgtggca ctgctcctgg tgcttccaccc ccgaggcat ctacttcaaa ctcgtgtcgg 1380  
 cccagaatgg tgacttcccc cgctgggtt actacgagga caagaggac ctcaattaca 1440  
 tccgaagctt gattcgact ggggatgtt tcgacggcac gcagcaggag taccctccgt 1500  
 cagaccccaag tgaacacatg tatgctcta agtaccgtt caagaactat gaccagttcc 1560  
 gctacttgctt cggaaatccc taccgggagc ccaagagcac tgtatgggtt gggcgccgga 1620

accagggctc agacggagg tcatctgctg tcagggcaa gttggataca acggagggcc 1680  
 cggAACAGAA actgatctt gaagaggacc tggtag 1715

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 571

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Amino acid sequence of GnTI-GnTIII

&lt;400&gt; 13

Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys

1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp

20 25 30

Tyr Pro Arg Asn Pro Arg Arg Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu

35	40	45
Ser Met Leu Gln Glu Lys Ile Asp His Leu Glu Arg Leu Leu Ala Glu		
50	55	60
Asn Asn Glu Ile Ile Ser Asn Ile Arg Asp Ser Val Ile Asn Leu Ser		
65	70	75
Glu Ser Val Glu Asp Gly Pro Lys Ser Ser Gln Ser Asn Phe Ser Gln		
85	90	95
Gly Ala Gly Ser Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr		
100	105	110
Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu Pro Glu Asp Thr Thr Glu		
115	120	125
Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro Gly Thr		
130	135	140
Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys Thr Lys		
145	150	155
Val Ala Glu Gly Ser Ser Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro Met Arg		
165	170	175
His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Gly Arg Gly Thr Arg Arg		
180	185	190
Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro Ser Cys		
195	200	205
Gly Val Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys Glu Arg		
210	215	220
Leu Val Pro Arg Glu Val Pro Arg Arg Val Ile Asn Ala Ile Asn Ile		
225	230	235
Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu Gly Asp		
245	250	255
Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala Tyr Gly		
260	265	270
Glu Pro Arg Pro Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly Thr Phe		
275	280	285

Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val Phe Leu Asp His Phe Pro  
 290 295 300  
 Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu Arg Thr  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg Pro Asp  
 325 330 335  
 Asp Val Phe Ile Ile Asp Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg Asp Gly  
 340 345 350  
  
 Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu Pro Phe Ala Phe  
 355 360 365  
 His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro Gly Thr  
 370 375 380  
 Leu Glu Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala Val Tyr  
 385 390 395 400  
 Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr Met Pro  
 405 410 415  
  
 Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val Gln Trp  
 420 425 430  
 Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser Trp Cys  
 435 440 445  
 Phe Thr Pro Glu Gly Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln Asn Gly  
 450 455 460  
 Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys Arg Asp Leu Asn Tyr  
 465 470 475 480  
  
 Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr Gln Gln  
 485 490 495  
 Glu Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro Lys Tyr  
 500 505 510  
 Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Tyr  
 515 520 525  
 Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Gly Arg Arg Asn Gln Gly Ser

530 535 540

Asp Gly Arg Ser Ser Ala Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Thr Glu Gly

545 550 555 560

Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

565 570

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1722

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Nucleotide sequence of ManII-GnTIII

&lt;400&gt; 14

atgctgaaga	agcagtctgc	aggcctgtg	ctgtggcg	ctatccctt	tgtggctgg	60
aatgccctgc	tgctccctt	cttctggacg	cgeccagcac	ctggcaggcc	accctcagtc	120
agcgctctcg	atggcgaccc	cggcagccctc	accggaaag	tgattcgcc	ggcccaagac	180

gccgagggtgg	agctggagcg	gcagcgtggg	ctgctgcagc	agatgggga	tgcctgtcg	240
agccagcggg	ggaggggtgcc	caccgcggcc	cctccgcgcc	agccgcgtgt	gcctgtgacc	300
cccgcgcccc	tgctccagcc	actgtcccct	agcaaggcca	ccgaagaact	gcacgggtg	360
gacttcgtgt	tgccggagga	caccacagag	tatttgtgc	gcaccaaagc	tggcggtgt	420
tgcttcaaac	caggtaccag	gatgctggag	aaacccctc	cagggcggac	agaggagaag	480
accaagggtgg	ctgaggggtc	ctcggtccgg	ggctctgctc	ggaggcctat	gcccgtatgt	540
ttgagtgcac	gggagcgcct	gggaggccgg	ggcacttaggc	gcaagtgggt	ttagtgtgt	600

tgcctgccag	gctggcacgg	gcccagctgc	gggggtgccca	ctgtggtcca	gtattcaac	660
ctgcccacca	aggagcgcct	gttacccagg	gaggtgccga	ggcgggttat	caacgcccac	720
aacatcaacc	atgagttcga	cctgctggat	gtgcgttcc	atgagctggg	cgtatgtgt	780
gacgcctttg	tggtctgcga	atccaatttc	accgcctacg	gggagcctcg	gccgctcaag	840
ttccgagaga	tgtgaccaa	tggcacccctc	gagttacatcc	gccacaaggt	gctctacgtc	900
ttcctggacc	acttccacc	tggtggccgt	caggacggct	ggattgcaga	cgactacctg	960
cgtacccctcc	tcacccagga	tggtgtctcc	cgcctgcgca	acctgcgacc	tgtatgacgtc	1020

tttatcatcg	acgacgcgga	cgagatccct	gcmcgtgatg	gtgtgctgtt	cctcaagctc	1080
tacgatggct	ggacagagcc	cttcgccttc	catatgcgca	agtccctgta	tggtttcttt	1140
tggaagcaac	caggcacact	ggaggtggtg	tcaggctgca	ccattgacat	gctgcaggct	1200

gtgtatggc tggacggcat ccgcctgcgc cgcgtcagt actacaccat gccaaactt 1260  
 cgacagtatg agaaccgcac cggccacatc ctagtgcagt ggtctctcg cagccccctg 1320  
 cacttcgcgg gctggcactg ctctgtgc ttcacacccg agggcatcta cttcaaactc 1380  
 gtgtcgccc agaatggtga ctccccgc tgggtgact acgaggacaa gagggacctc 1440

aattacatcc gaagcttgat tcgcactggg ggtatggttcg acggcacgca gcaggagtac 1500  
 cctcctgcag accccagtga acacatgtat gctccctaagt acctgctcaa gaactatgac 1560  
 cagttccgcgt acttgctcgaaatccctac cgggagccca agagcactgt agagggtggg 1620  
 cgcggaaacc agggctcaga cggaaaggta tctgctgtca gggcaagtt ggataacaacg 1680  
 gagggcccgaaacagaaact gatctctgaa gaggacctgt ag 1722

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 573

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Amino acid sequence of ManII-GnTIII fusion

&lt;400&gt; 15

Met Leu Lys Lys Gln Ser Ala Gly Leu Val Leu Trp Gly Ala Ile Leu

1	5	10	15
Phe Val Ala Trp Asn Ala Leu Leu Leu Phe Phe Trp Thr Arg Pro			
20	25	30	
Ala Pro Gly Arg Pro Pro Ser Val Ser Ala Leu Asp Gly Asp Pro Ala			
35	40	45	
Ser Leu Thr Arg Glu Val Ile Arg Leu Ala Gln Asp Ala Glu Val Glu			
50	55	60	
Leu Glu Arg Gln Arg Gly Leu Leu Gln Gln Ile Gly Asp Ala Leu Ser			
65	70	75	80
Ser Gln Arg Gly Arg Val Pro Thr Ala Ala Pro Pro Ala Gln Pro Arg			
85	90	95	
Val Pro Val Thr Pro Ala Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys			
100	105	110	
Ala Thr Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu Pro Glu Asp Thr			
115	120	125	

Thr Glu Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro

130	135	140
Gly Thr Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys		
145	150	155
Thr Lys Val Ala Glu Gly Ser Ser Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro		
165	170	175
Met Arg His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Gly Arg Gly Thr		
180	185	190
Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro		
195	200	205
Ser Cys Gly Val Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys		
210	215	220
Glu Arg Leu Val Pro Arg Glu Val Pro Arg Arg Val Ile Asn Ala Ile		
225	230	235
Asn Ile Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu		
245	250	255
Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala		
260	265	270
Tyr Gly Glu Pro Arg Pro Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly		
275	280	285
Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val Phe Leu Asp His		
290	295	300
Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu		
305	310	315
Arg Thr Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg		
325	330	335
Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg		
340	345	350
Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu Pro Phe		
355	360	365
Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro		

370	375	380	
Gly Thr Leu Glu Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala			
385	390	395	400
Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr			
405	410	415	
Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val			
420	425	430	
Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser			
435	440	445	
Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln			
450	455	460	
Asn Gly Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys Arg Asp Leu			
465	470	475	480
Asn Tyr Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr			
485	490	495	
Gln Gln Glu Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro			
500	505	510	
Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn			
515	520	525	
Pro Tyr Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Gly Arg Arg Asn Gln			
530	535	540	
Gly Ser Asp Gly Arg Ser Ser Ala Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Thr			
545	550	555	560
Glu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu			
565	570		
<210> 16			
<211> 398			
<212> PRT			
<213> Unknown			
<220><223> Galt amino acid sequence from pBlueGalt			
<400> 16			

Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
 20 25 30  
 His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser  
 35 40 45  
 Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro  
 85 90 95  
 Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser  
 100 105 110  
 Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro  
 115 120 125

Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu  
 130 135 140  
 Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn  
 145 150 155 160  
 Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His  
 165 170 175  
 Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys  
 180 185 190

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

245 250 255

His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala

260 265 270

Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly

275 280 285

Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro

290 295 300

Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg

305 310 315 320

Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly

325 330 335

Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn

340 345 350

Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser

355 360 365

Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr

370 375 380

Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser

385 390 395

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 3435

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

atgaagttaa gccgccagtt caccgtgttc ggcagtgcga tcttctgtgt ggtgatttc	60
tgcgtctacc ttagtgcgttcc ccggggcacac tttagactacc ccaggaaccc ggcggcgag	120
ggctccttcc ctcaggccca gctctcaatg ttgcaagaaa aaatagacca ttggagcgt	180
ttgcttagctg agaataatga gatcatctca aatattagag actcagtcat caatttgagt	240
gagtctgtgg aggatggtcc gaaaaggtaa caaagcaatt tcagccaagg tgctggctca	300

catcttctgc ctcacaatt atccctctca gttgacactg cagactgtct gtttgcctca	360
caaagtggaa gtcacaattc agatgtgcag atgttggatg ttacagtct aatttcttt	420

gacaatccag atggtgagtttggaaagcaa ggatttgaca ttacttatga atctaataatgaa	480
tgggacactg aacccttca agtcttggcgttgcctcatt cccataacga cccaggttgg	540
ttgaagactt tcaatgacta ctttagagac aagactcagt atattttaa taacatggc	600
ctaaagctga aagaagactc acggaggaag ttatggatctc ttaccttca	660
aagtggggg atattataga tattcagaag aaggatgcgtt taaaaggttt aatagaaaat	720
ggtcagcttg aaattgtgac aggtggctgg gttatgcctg atgaagctac tccacattat	780
tttgccctaa ttgatcaact aattgaagga catcgtggc tggaaaataa tataggagtg	840
aaacctcggt ccggctgggc tattgatccc ttggacact caccacaaat ggcttatctt	900
ctaaaccgtg ctggactttc tcacatgtt atccagagag ttcatatgc agttaaaaaa	960
cactttgcac tgcataaaac attggagttt tttggagac agaattggga tctggatct	1020
gtcacagata tttatgcca catgatgccc ttctacagct atgacatccc tcacacttgt	1080
ggacctgatc ctaaaatatg ctgccagttt gatttaaac gtctcctgg aggagattt	1140
ggttgtccct ggggagtc cccagaaaca atacatcctg gaaatgtcca aagcaggct	1200
cggatgtac tagatcagta ccgaaagaag tcaaagctttt ttcgtaccaa agtttcctg	1260
gctccactag gagatgatcc ctgcgtactgt gaatacacgg aatgggattt acagtttaag	1320
aattatcagc agcttttga ttatatgaat tctcagtcca agttaaagt taagatacag	1380
tttggaaattt tatcagattt ttttgcgtcg ctggataaag cagatgaaac tcagagagac	1440
aaggccagt cgatgtccc tgtttaagt ggagatttt tcacttatgc cgatcgagat	1500
gatcattact ggagtggcta tttacatcc agaccctttt acaaacgaat ggacagaatc	1560
atggaatctc attaaggc tgctgaaattt ctacttatt tcgcctgag acaagctcac	1620
aaatacaaga taaataaattt tctctcatca tcacttaca cggcactgac agaaggccaga	1680
aggaatttgg gactgtttca acatcatgat gctatcacag gaactgaaa agactgggt	1740
gttgtggattt atggtaaccag acttttcat tcgttaatgg tttggagaa gataattgga	1800
aattctgcat ttcttcttat ttgaaggac aaactcacat acgactcttca ctctcctgat	1860
accttcctgg agatggattt gaaacaaaaa tcacaagattt ctctgccaca aaaaaatata	1920
ataaggctga gtgcggagcc aaggtaacctt gtggctata atcctttaga acaagaccga	1980
atctcggttgg tctcagtcta tggatgttcc ccgacagtgc aagtgttctc tgcttcaggaa	2040
aaacctgtgg aagtcaagt cagcgcgtt tggatacag caaatactat ttcatggaaaca	2100
gcctatgaga tctctttcg agcacatata ccgcattgg gactgaaagt gtataagatt	2160
ttgaaatcag caagttcaaa ttcacatata gctgattatg tcttgtataa gaataaagta	2220
gaagatagcg gaattttcac cataaagaat atgataaata ctgaaagg tataacacta	2280

gagaactcct ttgtttact tcgggttgcgaaactggac ttatgaagca aatgtatgact 2340  
 aaagaagatg gtaaacacca tgaagtaaat gtgcaattt catggatgg aaccacaatt 2400

aaaagagaca aaagtggcgc tacaccccttc ttacccatgt gtaatgcac gccttatgtt 2460  
 tacacaacac cgcccttgcgatcagatgaca catggaaaggat tttatcgaa agtgcattgc 2520  
 tttttgacc atgttactca tagatccgcataaccaca tacaggaaat agaaggacag 2580  
 tctgtggaaat tttccaaat tttggacatc cgaaaatgtatataaccgtga gattgcaatg 2640  
 aaaaattctt ctgatataaa aagccaaat agatttata ctgacctaata tgggtaccag 2700  
 attcaaccta gaatgacact gagcaatttgccttcaag caaatgtcta tcccatgacc 2760  
 acaatggcct atatccagga tgccaaacat cggttgcac tgctctgc tcagtctta 2820

ggggtttcga gtttgaatag tggtcagatt gaagttatca tggatcgaag actcatgca 2880  
 gatgataatc gtggccttgcgaaaggatc caggataaca agattacagc taatctat 2940  
 cgaataactac tagaaaaaaat aagtgcgtt aatacggaaat aagaaaaagaa gtcggcgt 3000  
 tattcccttc tctttagcca cataacttct tctctcatga atcatccatg cattccatg 3060  
 gcaataatgt tcttctcacc tacccttgcgatcagatc aattctctcc attacatgtca 3120  
 tctttgcctt gtgacattca tctggtaat ttgagaacaa tacagtcaaa ggtggcaat 3180  
 gggcactcca atgaggcagc ctgtatccac cacagaaaat ggtttgatig tcggttctct 3240

agcaaaggca caggcgtt ttgttctact actcaggaa agatattggt acagaaactt 3300  
 ttaaacaatgt ttattgtcga aagtctcaca cttcatcataatgtatgcattcac 3360  
 cccggcactc agaatataag tgagatcaac ttgagtcacatggaaatcag cacattccga 3420  
 atccagttga ggtgt 3435

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1144

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys

1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp

20 25 30

Tyr Pro Arg Asn Pro Arg Arg Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu

35 40 45

Ser Met Leu Gln Glu Lys Ile Asp His Leu Glu Arg Leu Leu Ala Glu  
 50 55 60  
 Asn Asn Glu Ile Ile Ser Asn Ile Arg Asp Ser Val Ile Asn Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Ser Val Glu Asp Gly Pro Lys Ser Ser Gln Ser Asn Phe Ser Gln  
 85 90 95  
 Gly Ala Gly Ser His Leu Leu Pro Ser Gln Leu Ser Leu Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Thr Ala Asp Cys Leu Phe Ala Ser Gln Ser Gly Ser His Asn Ser Asp  
 115 120 125  
 Val Gln Met Leu Asp Val Tyr Ser Leu Ile Ser Phe Asp Asn Pro Asp  
 130 135 140  
 Gly Gly Val Trp Lys Gln Gly Phe Asp Ile Thr Tyr Glu Ser Asn Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Asp Thr Glu Pro Leu Gln Val Phe Val Val Pro His Ser His Asn  
 165 170 175  
 Asp Pro Gly Trp Leu Lys Thr Phe Asn Asp Tyr Phe Arg Asp Lys Thr  
 180 185 190  
 Gln Tyr Ile Phe Asn Asn Met Val Leu Lys Leu Lys Glu Asp Ser Arg  
 195 200 205  
 Arg Lys Phe Ile Trp Ser Glu Ile Ser Tyr Leu Ser Lys Trp Trp Asp  
 210 215 220  
 Ile Ile Asp Ile Gln Lys Lys Asp Ala Val Lys Ser Leu Ile Glu Asn  
 225 230 235 240  
 Gly Gln Leu Glu Ile Val Thr Gly Gly Trp Val Met Pro Asp Glu Ala  
 245 250 255  
 Thr Pro His Tyr Phe Ala Leu Ile Asp Gln Leu Ile Glu Gly His Gln  
 260 265 270  
 Trp Leu Glu Asn Asn Ile Gly Val Lys Pro Arg Ser Gly Trp Ala Ile  
 275 280 285  
 Asp Pro Phe Gly His Ser Pro Thr Met Ala Tyr Leu Leu Asn Arg Ala

290	295	300
Gly Leu Ser His Met Leu Ile Gln Arg Val His Tyr Ala Val Lys Lys		
305	310	315
His Phe Ala Leu His Lys Thr Leu Glu Phe Phe Trp Arg Gln Asn Trp		
325	330	335
Asp Leu Gly Ser Val Thr Asp Ile Leu Cys His Met Met Pro Phe Tyr		
340	345	350
Ser Tyr Asp Ile Pro His Thr Cys Gly Pro Asp Pro Lys Ile Cys Cys		
355	360	365
Gln Phe Asp Phe Lys Arg Leu Pro Gly Gly Arg Phe Gly Cys Pro Trp		
370	375	380
Gly Val Pro Pro Glu Thr Ile His Pro Gly Asn Val Gln Ser Arg Ala		
385	390	395
Arg Met Leu Leu Asp Gln Tyr Arg Lys Lys Ser Lys Leu Phe Arg Thr		
405	410	415
Lys Val Leu Leu Ala Pro Leu Gly Asp Asp Phe Arg Tyr Cys Glu Tyr		
420	425	430
Thr Glu Trp Asp Leu Gln Phe Lys Asn Tyr Gln Gln Leu Phe Asp Tyr		
435	440	445
Met Asn Ser Gln Ser Lys Phe Lys Val Lys Ile Gln Phe Gly Thr Leu		
450	455	460
Ser Asp Phe Phe Asp Ala Leu Asp Lys Ala Asp Glu Thr Gln Arg Asp		
465	470	475
Lys Gly Gln Ser Met Phe Pro Val Leu Ser Gly Asp Phe Thr Tyr		
485	490	495
Ala Asp Arg Asp Asp His Tyr Trp Ser Gly Tyr Phe Thr Ser Arg Pro		
500	505	510
Phe Tyr Lys Arg Met Asp Arg Ile Met Glu Ser His Leu Arg Ala Ala		
515	520	525
Glu Ile Leu Tyr Tyr Phe Ala Leu Arg Gln Ala His Lys Tyr Lys Ile		
530	535	540

Asn Lys Phe Leu Ser Ser Ser Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Glu Ala Arg  
 545 550 555 560  
 Arg Asn Leu Gly Leu Phe Gln His His Asp Ala Ile Thr Gly Thr Ala  
 565 570 575  
 Lys Asp Trp Val Val Val Asp Tyr Gly Thr Arg Leu Phe His Ser Leu  
 580 585 590  
 Met Val Leu Glu Lys Ile Ile Gly Asn Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu  
 595 600 605  
 Lys Asp Lys Leu Thr Tyr Asp Ser Tyr Ser Pro Asp Thr Phe Leu Glu  
 610 615 620  
 Met Asp Leu Lys Gln Lys Ser Gln Asp Ser Leu Pro Gln Lys Asn Ile  
 625 630 635 640  
 Ile Arg Leu Ser Ala Glu Pro Arg Tyr Leu Val Val Tyr Asn Pro Leu  
 645 650 655  
 Glu Gln Asp Arg Ile Ser Leu Val Ser Val Tyr Val Ser Ser Pro Thr  
 660 665 670  
 Val Gln Val Phe Ser Ala Ser Gly Lys Pro Val Glu Val Gln Val Ser  
 675 680 685  
 Ala Val Trp Asp Thr Ala Asn Thr Ile Ser Glu Thr Ala Tyr Glu Ile  
 690 695 700  
 Ser Phe Arg Ala His Ile Pro Pro Leu Gly Leu Lys Val Tyr Lys Ile  
 705 710 715 720  
 Leu Glu Ser Ala Ser Ser Asn Ser His Leu Ala Asp Tyr Val Leu Tyr  
 725 730 735  
 Lys Asn Lys Val Glu Asp Ser Gly Ile Phe Thr Ile Lys Asn Met Ile  
 740 745 750  
 Asn Thr Glu Glu Gly Ile Thr Leu Glu Asn Ser Phe Val Leu Leu Arg  
 755 760 765  
 Phe Asp Gln Thr Gly Leu Met Lys Gln Met Met Thr Lys Glu Asp Gly  
 770 775 780  
 Lys His His Glu Val Asn Val Gln Phe Ser Trp Tyr Gly Thr Thr Ile

785	790	795	800
Lys Arg Asp Lys Ser Gly Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asp Gly Asn Ala			
805	810	815	
Lys Pro Tyr Val Tyr Thr Thr Pro Pro Phe Val Arg Val Thr His Gly			
820	825	830	
Arg Ile Tyr Ser Glu Val Thr Cys Phe Phe Asp His Val Thr His Arg			
835	840	845	
Val Arg Leu Tyr His Ile Gln Gly Ile Glu Gly Gln Ser Val Glu Val			
850	855	860	
Ser Asn Ile Val Asp Ile Arg Lys Val Tyr Asn Arg Glu Ile Ala Met			
865	870	875	880
Lys Ile Ser Ser Asp Ile Lys Ser Gln Asn Arg Phe Tyr Thr Asp Leu			
885	890	895	
Asn Gly Tyr Gln Ile Gln Pro Arg Met Thr Leu Ser Lys Leu Pro Leu			
900	905	910	
Gln Ala Asn Val Tyr Pro Met Thr Met Ala Tyr Ile Gln Asp Ala			
915	920	925	
Lys His Arg Leu Thr Leu Leu Ser Ala Gln Ser Leu Gly Val Ser Ser			
930	935	940	
Leu Asn Ser Gly Gln Ile Glu Val Ile Met Asp Arg Arg Leu Met Gln			
945	950	955	960
Asp Asp Asn Arg Gly Leu Glu Gln Gly Ile Gln Asp Asn Lys Ile Thr			
965	970	975	
Ala Asn Leu Phe Arg Ile Leu Leu Glu Lys Arg Ser Ala Val Asn Thr			
980	985	990	
Glu Glu Glu Lys Lys Ser Val Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Ser His Ile			
995	1000	1005	
Thr Ser Ser Leu Met Asn His Pro Val Ile Pro Met Ala Asn Lys			
1010	1015	1020	
Phe Phe Ser Pro Thr Leu Glu Leu Gln Gly Glu Phe Ser Pro Leu			
1025	1030	1035	

Gln Ser Ser Leu Pro Cys Asp Ile His Leu Val Asn Leu Arg Thr

1040	1045	1050
Ile Gln Ser Lys Val Gly Asn Gly His Ser Asn Glu Ala Ala Leu		
1055	1060	1065
Ile Leu His Arg Lys Gly Phe Asp Cys Arg Phe Ser Ser Lys Gly		
1070	1075	1080
Thr Gly Leu Phe Cys Ser Thr Thr Gln Gly Lys Ile Leu Val Gln		
1085	1090	1095
Lys Leu Leu Asn Lys Phe Ile Val Glu Ser Leu Thr Pro Ser Ser		

1100	1105	1110
Leu Ser Leu Met His Ser Pro Pro Gly Thr Gln Asn Ile Ser Glu		
1115	1120	1125
Ile Asn Leu Ser Pro Met Glu Ile Ser Thr Phe Arg Ile Gln Leu		
1130	1135	1140

Arg  
<210> 19  
<211> 1116

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of ManII-GaLT

<400> 19

atgaagttaa gccgccagtt caccgtgttc ggcagtgcga tcttctgtgt ggtgatttc 60

tcgctctacc ttagtgcgttgc cgggggtcac tttagactacc ccaggaaccc ggcgcgcgag	120
ggctccttcc ctcaggccca gctctcaatg ttgcaagaaa aaatagacca ttggagcgt	180
ttgcttagctg agaataatga gatcatctca aatatttagag actcagtcat caatttgagt	240
gagtcgtgtgg aggtggtcc gaaaaggta caaagcaatt tcagccaagg tgctggctca	300
ccgcgcgtcc ctgaggagtc cccgctgttt tgggcccca tgctgattga gtttaacatg	360
cctgtggacc tggagcttgt ggcaaagcag aacccaaatg tgaagatggg cggccgtat	420
gccccccaggc actgcgtctc tcctcacaag gtggccatca tcattccatt ccgcaaccgg	480

caggaggcacc tcaagtactg gctatattat ttgcacccag tcctgcagcg ccagcagctg	540
gactatggca tctatgttat caaccaggcg ggagacacta tattcaatcg tgctaagctc	600

ctcaatgttg gcttcaaga agccttgaag gactatgact acacctgctt tgtgttttagt 660  
 gacgtggacc tcattccat gaatgaccat aatgcgtaca ggtgttttc acagccacgg 720  
 cacatttccg ttgcaatgga taagtttggta ttccgcctac cttatgttca gtatttggta 780  
 ggtgtctctg ctctaagtaa acaacagttt ctaaccatca atggatttcc taataattat 840  
 tggggctggg gaggagaaga tgatgacatt tttaacagat tagtttttag aggcattgtct 900

atatctcgcc caaatgctgt ggtcgaggagg tgtcgcatga tccgccactc aagagacaaa 960  
 aaaaatgaac ccaatcctca gaggttgac cgaattgcac acacaaagga gacaatgctc 1020  
 tctgatgggt tgaactcact cacctaccag gtgctggatg tacagagata cccattgtat 1080  
 acccaaatca cagtggacat cgggacacccg agctag 1116

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 371

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Amino acid sequence of ManII-GalT

&lt;400&gt; 20

Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys

1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp

20 25 30

Tyr Pro Arg Asn Pro Arg Arg Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu

35 40 45

Ser Met Leu Gln Glu Lys Ile Asp His Leu Glu Arg Leu Ala Glu

50 55 60

Asn Asn Glu Ile Ile Ser Asn Ile Arg Asp Ser Val Ile Asn Leu Ser

65 70 75 80

Glu Ser Val Glu Asp Gly Pro Lys Ser Ser Gln Ser Asn Phe Ser Gln

85 90 95

Gly Ala Gly Ser Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly

100 105 110

Pro Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala

115 120 125

Lys Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp

130	135	140
Cys Val Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg		
145	150	155
Gln Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln		
165	170	175
Arg Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp		
180	185	190
Thr Ile Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala		
195	200	205
Leu Lys Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu		
210	215	220
Ile Pro Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg		
225	230	235
His Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val		
245	250	255
Gln Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr		
260	265	270
Ile Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Gly Glu Asp Asp		
275	280	285
Asp Ile Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro		
290	295	300
Asn Ala Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys		
305	310	315
Lys Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys		
325	330	335
Glu Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu		
340	345	350
Asp Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly		
355	360	365
Thr Pro Ser		
370		