

특허청구의 범위

청구항 1

YB2/0 (ATCC 1662)를 이용하여 제조된 폴리펩티드와 비교하여 실질적으로 감소된 푸코오스 함량을 갖는 것을 특징으로 하는 당화 폴리펩티드를 생산하는, 항체의 생산에 유용한 랫트 골수종 세포주 YB2/0 (ATCC 1662) 유래 분리 세포주.

청구항 2

제 1항에 있어서, 동물-단백질이 없는 배지인 CD-하이브리도마(CD-Hyb)에서 성장하도록 세포주를 적응시켜 랫트 하이브리도마 세포주 YB2/0 (C1083A)로부터 발생된 것을 특징으로 하는, C1083B로 명명되는 세포주.

청구항 3

제 1항에 있어서, 높은 형질감염 효능, 짧은 평균 배가 시간 및 CD-Hyb 중에서 높은 세포 밀도에 도달하는 능력 중 적어도 하나에 기초하여 선택된 C1083B의 서브 클론인 것을 특징으로 하는, C1083E로 명명되는 세포주.

청구항 4

제 1항에 있어서, fut8 mRNA 레벨이 야생형 YB2/0 세포주의 레벨보다 낮은 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 5

제 1항에 있어서, 렉틴에 대한 저항성으로 선택되는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 6

제 2항에 있어서, 세포주의 당화된 웨პ티드가 야생형 골수종 세포 및 CHO 세포주에 의해 생산된 웨პ티드와 비교하여 실질적으로 감소된 푸코오스 함량을 갖는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 형질 감염된 숙주 세포주에 의해 생산되며, 여기서 분자는 비-푸코실화된 N-링크 올리고당 그룹을 우세하게 지니는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 야생형 YB2/0 세포주에서 생산되는 항-조직 인자 항체와 비교하여 증가된 ADCC 활성을 지니는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 제 7항의 항체를 포함하는 생물약제학적 조성물(biopharmaceutical composition).

청구항 10

제 1항의 세포주에 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 형질감염시키는 단계; 및
검출가능하거나 회수 가능한 양으로 항체를 발현시키는 단계를 포함하는 항체의 제조 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 항체의 제조 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 항체는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 항체의 제조 방법.

청구항 13

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 항체가 세포의 표면에 부착될 수 있는 인간 폴리펩티드의 영역에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체의 제조 방법.

청구항 14

폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 회수된 항체가 비-푸코실화된 N-링크 올리고당 그룹을 우세하게 갖는 것을 특징으로 하는 제 10항에 따른 방법으로 제조된 항체.

청구항 15

서열 번호 9의 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 제 10 항에 따른 방법으로 제조된 항체.

청구항 16

서열 번호 11의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열 번호 10의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 제 10항에 따른 방법으로 제조된 항체.

청구항 17

제 14항 내지 제 16항 중 어느 하나의 항체를 대상, 세포 또는 조직에 투여하거나 접촉시키는 것을 포함하는, 질환 또는 증상의 치료 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 질환 또는 증상이 신생물성 질환 또는 항체가 결합할 수 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포 과정을 필요로 하는 면역-매개 장애인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 항체가 결합할 수 있는 폴리펩티드는 인간 조직 인자 또는 인간 TNF알파인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 18항에 있어서, 질환 또는 증상이 류마티스 관절염, 횡반변성, 건선 및 당뇨성망막병증으로 구성된 군에서 선택된 비정상 혈관신생인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 19항에 있어서, 질환 또는 증상이 세포로부터 폴리펩티드의 방출을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

본원에 개시된 임의의 발명.

SEQUENCE LISTING

<110> Centocor, Inc.
<120> HOST CELL LINES FOR PRODUCTION OF ANTIBODY CONSTANT REGION
WITH ENHANCED EFFECTOR FUNCTION
<130> -CEN5110PCT
<150> 60/712858
<151> 2005-08-31
<150> 60/713055
<151> 2005-08-31
<160> 11
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 1263
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
atgcgggcat ggactgggttccctggcggttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
tttttgtttt atatagggtt tcattttgtt cgagataatg accacccctga tcactctggc 120
agagaactct ccaaggatttct tgcaaggatggaaacgttcaa aacaacaaaaa tgaagacttg 180
aggcggatgg ctggatcttccatggatataccaa gggggcccca ttgaccaggg gaeccatcg 240
ggaaagatcc gtgtttttagaaagacatggctt gttaaaggccca aagaacatgg taaaattatc 300
aagaacaaacaa cccggaaatgg tctggggaaag gatcatgaaa tcttaaggag gaggattggaa 360
aatggagacta aagacttcttggtttttttccatggatggac tggaaatattt aagccattttt 420
gaaggatggaa aactccaaatggatccatggatgatggatatttttttggatgtttagg acaccatggaa 480
aggctctatca tgcggatattactacccatggccaaatggatggatggatggatggatggatgg 540
aaaaaaagagg cccaaaggatcttgcacatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 600
cccaaggacttgcacggaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 660
ggcggccacccatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 720
cttcatcttgg aatctcggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 780
cctgtatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 840
gtgaatgtaca aaaaatatttcaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 900
cccttcttacttacccatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 960
gggtatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 1020
tggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 1080
ggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 1140
gatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 1200
aaaaaaagag tataatctggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg 1260
taa
<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 2

```

atggcaccca gcgaacac

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 3

ctactggtgg atgggagact gtg                                23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 4

cttggcttca aacatccagt cat                                23

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 5

gaacagaggc agcctccat c                                21

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 6

tcatcttggaa atctcagaat tggcgctatg                                30

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 7

tggagtccat gtcagacgca cagaca                                26

<210> 8
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

```

<223> Humanized monoclonal antibody heavy chain based

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

445

<210> 9
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Humanized monoclonal antibody based on murine light chain CDRs

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 10
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala	Gly Asn Tyr Tyr Tyr	Tyr Gly
100	105	110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	125

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 재조합 DNA 기술에 유용하며, 세포 배양에서 단백질의 생산을 위한 세포, 세포주 및 세포 배양에 관한 것이다. 더욱 자세하게, 본 발명은 화학적으로 정의된 배지에서 자랄 수 있으며 증진된 항체 작용자 기능을 제공하는 클로널(clonal) 골수종 세포주에 관한 것이다.

배경기술

<2> 항체는 종종 체액성과 세포성 면역 기작을 연결시키는 어댑터(adaptor) 분자로 종종 언급된다: 체액성 반응은 가변 도메인의 고유의 특이성에 의해 부여된 바에 따라, 표적 항원에 높은 친화도로 결합할 수 있는 항체를 성숙, 분비, 순환시키는 데 주로 기여한다. 세포 반응은 항체-항원 (ab-ag) 복합체의 결합에 의한, 및 작용자 세포에 결합한 ab-ag 복합체의 결과로서 세포 매개자의 방출로 유발되는 다운스트림 후유증에 의한 세포 활성화의 결과에 기여한다. 이들 세포 반응은 표적의 중화, 읍소닌화 및 민감화(항원이 세포의 표면에 나타난다면), 비만 세포의 민감화 및 보체의 활성화를 포함한다. 세포 표면 항원인 세포 표적을 위하여, 이들 작용자 기능은 항체의 존세포매개세포독성(ADCC) 및 보체의 존성 세포독성(CDC)으로 공지된 것을 유발한다.

<3> 항원의 소위 가변 영역 및 과가변 도메인은 특정 항원을 인지하고, 헤테로다이머의 중쇄 부분, Fc 부분의 소위

불변 영역은 다양한 통상의 다운동성 세포에 존재하는 Fc-수용체와 상호작용하며, 이들 세포를 자극하여 항체 이용 및 세포독성 기작 또는 ADCC, CDC를 포함한 특정 기능에 영향을 주고, C1q 단백질과의 결합을 포함하는 다양한 수용체로의 항체 결합에도 영향을 줄 수 있다. 이들 수용체는 Fc-수용체로 알려져 있다.

<4> 항체 아이소타입(예를 들어, IgA, IgE, IgD, IgG, 및 IgM) 중에, IgG는 가장 유의미한 정도의 일련의 작용자 기능을 보유하는 IgG1 하위 분류와 함께 가장 많다. IgG1-형 항체는 암 면역요법에서 가장 일반적으로 이용되는 항체이다. 구조적으로, IgG 헌지 영역 및 CH2 도메인은 항체 작용자 기능에서 주요한 역할을 수행한다. N-링크된 올리고당은 Fc 영역(헌지, CH2 및 CH3 도메인의 이합체화에 의해 형성)에 존재하며, 작용자 기능에 영향을 미친다(도 1). 모든 자연적으로 발생한 항체의 Fc 부분은 중쇄 중 보존된 위치에서 탄수화물 쇄로 더 꾸며진다. IgG 아이소타입에서, N-링크된 당화 부위는 각 CH2 도메인에 위치한 Asn297이다. 아이소타입에서 불변 영역이 다양함에 따라, 각 아이소타입은 단백질 어셈블리(assembly), 분비 또는 기능적 활성에 다양하게 영향을 미치는 다른 배열의 N-링크 탄수화물 구조를 갖는다 (Wright, A., and Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)). 부착된 N-링크 탄수화물의 구조는 처리의 정도에 따라 매우 다양하며, 고-만노스, 다중-분지, 뿐 아니라 바이안테너리(biantennary) 복합체 올리고당 및 시알산(N-아세틸 뉴라민산 또는 NANA), 푸코오스, 갈락토오스 및 도 2에 나타낸 말단 당과 같은 GlcNAc (N-아세틸 글루코사민) 잔기를 함유할 수 있다. 항체의 올리고당 성분 및 숙주 세포의 작용자 기능에서의 영향력이 인지되었다 (Lifely, M. R., et al, 1995 Glycobiology 5:813-822; Jefferis, R., et al, 1998 Immunol Rev. 163:59-76; Wright, A. and Morrison, S. L., supra; Presta L. 2003. Curr Opin Struct Biol. 13(4):519-25). 더욱이, 항체에서 당쇄를 고려하여, 항체의 N-글리코시드-링크 당쇄에서 환원 말단의 근접 N-아세틸글루코사민에서 푸코오스의 부가 또는 변형이 항체의 ADCC 활성을 유의미하게 변경시키는 것이 기록되었다 (WO00/61739).

<5> 또한, 안정적으로 엔지니어링된 숙주 세포를 이용한 재조합 치료 단백질 생산은 전통적으로 화학적으로 정의되지 않은, 동물-유래의 성분, 이를 테면, 혈청 또는 기관 추출물로 보충된 배양 배지의 이용을 수반한다. 배치간 (batch-to-batch) 다양성의 문제를 제외하고, 이들 성분이 이용될 때 인간 병원균의 전달 가능성과 이 오염원으로부터 산물을 순수하게 할 필요가 높아진다. 소해면상뇌증(bovine spongiform encephalopathy; BSE), 광우병으로도 알려진 소의 퇴행성 신경 질환을 인간에 영향을 미치는 질환의 병원체라 여겨지는 크로이즈펠트 야콥병과 구별할 수 있는 것을 발견하고, 이러한 민감성이 최근에 더욱 심각해졌다 (Bruce, et al. Nature 389:498-501, 1997). 이에 따라, 많은 규제 기관은 세포 배양 배지에서 동물-유래 물질의 이용을 그만두거나 제한하기를 강하게 권장한다. 이에 따라, 혈청이-없는(SF) 및/또는 동물-유래 단백질이-없는(APF) 포유 동물 세포의 성장 및 유지를 위한 화학적으로 정의된 ("CD") 배지가 현재 유효하다. CD 배지의 결점은 가장 생산성 있는 세포주도 그 안에서 성장하지 않거나, 느리게 성장하고 부족하게 생산되는 것이다. 결과적으로, 당화 최적화된 치료 단백질을 제조하기 위한 이상적인 생산 세포주는 또한 CD 배지에서 성장하는 동안 상업적으로 재조합 단백질을 대량으로 제조할 수 있을 것이다.

<6> 이에 따라, 치료적 재조합 단백질을 산업적으로 생산하는 데에서, 혈청이 없는 및/또는 단백질이-없는 배지에서 성장하며, 발현 및 처리된 단백질 상에 최적화된 탄수화물 패턴에 영향을 미칠 수 있는 세포주가 필요하며, 이는 단백질의 효능을 개선하고, 최적화된 당화 패턴을 성취하기 위하여, 예를 들어 효소적 수단에 의한 수집-후 처리의 필요를 방지한다(참조예, 미국 특허 제 6,399,336호).

<7> 본 발명의 요약

<8> 본 발명은 화학적으로 정의된 동물-단백질이 없는 배지에서 성장할 수 있고, 최적으로 당화된 면역글로불린-유래 치료 단백질을 생산할 수 있는 세포, 세포주 및 세포 배양에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 세포주는 CD-배지에서 성장하도록 적응된 YB2/0 랫트 골수종 유래 세포주이다.

<9> 바람직한 구체예에서, 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양은 배양 배지 ℥ 당 약 10 mg 내지 약 10,000 mg로 재조합 단백질을 생산한다. 또다른 구체예에서, 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양은 약 0.1pg/세포/일 내지 약 100ng/세포/일의 레벨로 재조합 단백질을 생산한다.

<10> 본 발명은 또한 본 발명의 배양된 숙주 세포로부터 적어도 하나의 단백질, 예를 들어, 항체 또는 Fc-함유 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 적어도 하나의 목적하는 단백질을 발현하는 본 발명의 세포는 화학적으로 정의된 배지에서 배양되며, 단백질은 화학적으로 정의된 배지 또는 세포 그 자신으로부터 분리된다.

<11> 본 발명의 또다른 구체예는 본 발명의 세포주에 의해 생산되는 항체 또는 Fc-함유 치료 단백질을 포함한다. 본

발명의 항체 또는 Fc-함유 치료 단백질은 임의의 포유 동물, 이를 테면, 비제한적으로 인간, 마우스, 토끼, 랫트, 설치류, 영장류 또는 이의 임의의 조합을 포함하거나 이로부터 유래될 수 있으며, 분리된 인간, 영장류, 설치류, 포유 동물, 키메라, 인간화 및/또는 CDR-이식된 항체, 면역글로불린, 절단 산물 및 이의 다른 특정 부분 및 변형체를 포함한다.

<12> 본 발명의 일면에서, 항체는 항-인테그린 항체, 항-조직 인자 항체 또는 대상에서 세포의 표면에 나타난 항원과 결합할 수 있는 다른 항체이고, 여기서, 생체 내 상기 세포의 성장을 줄이거나 예방하는 것이 바람직하며, 이 활성은 본 발명의 세포주에서 항체의 생산에 의해 부여되거나 증진된다.

<13>

발명의 상세한 설명

약어

<29> Abs = 항체, 폴리클로널(polyclonal) 및 모노클로널(monoclonal); APF = 동물 단백질이 없는; CD = 화학적으로 정의된; CDR = 상보성 결정 영역; Ig = 면역글로불린; IgG = 면역글로불린 G; Mab = 모노클로널; 항체; TF = 조직 인자. 당 잔기에 관하여: Fuc = 푸코실; Gal = 갈락토실; Glc = 글루코실; GlcNAc = N-아세틸글루코사미닐; Man = 만노실; 및 NANA = 시알릴(N-아세틸뉴라미닐이나, "시알산"으로서 5-N-아세틸뉴라민산 (NeuAc) 또는 5-N-글리콜릴 뉴라민산 (NeuGc, NGNA)도 포함할 수 있다; Mab = 모노클로널 항체; MALDI-TOF-MS = 기질 보조 레이저 탈착 이온화 비행시간차 질량분석기.

정의

<32> 용어 "ADCC 활성"은 항체-의존적 세포-매개의 세포독성을 상정하며, 비-민감화 작용자 세포에 의한 항체-매개 표적 세포 파괴 현상을 의미한다. 표적 세포의 특성이 다양하나, Fc-수용체를 활성화시킬 수 있는 Fc-도메인 또는 Fc-도메인 부분을 갖는 표면 면역글로불린 G와 결합해야 한다. 작용자 세포는 Fc 수용체를 지닌 "킬러" 세포이다. 그것은 예를 들어, 표적 세포의 특성에 따라, 통상의 B- 또는 T-세포 마커가 결여된 립프구 또는 단핵구, 대식구 또는 다핵의 백혈구일 수 있다. 반응은 보체 독립적이다. ADCC 매개 세포 사멸을 나타내는 그의 능력이 대신하는 숙주 세포에 의해 생산되는 Fc-도메인과 실질적으로 유사한 서열의 항체 또는 단백질의 능력보다 뛰어나다면, 본 발명의 항체 또는 다른 Fc-함유 단백질의 ADCC 활성은 "증진"된다. ADCC 활성은 본원에 개시된 분석과 같은 생체내 또는 시험관내 세포 사멸 표준 분석에서 결정될 수 있다. 바람직하게, 증진된 ADCC 활성을 지니는 본 발명의 항체는 대신하는 숙주 세포에서 생산된 참조 항체보다 더 낮은 투여량 및/또는 더 짧은 시간에서 동일한 효과(종양 세포 성장의 예방 또는 억제)를 성취한다. 바람직하게, 본 발명의 범위 내에서 항체와 참조 항체 사이의 효능 차이는 예를 들어, 선택된 표준 크롬 방출 ADCC 분석에서 나란히 분석하여 결정된 것에 따라, 적어도 약 1.5배, 더욱 바람직하게 적어도 약 2배, 더더욱 바람직하게 적어도 약 3배, 가장 바람직하게 적어도 약 5배이다.

<33> "항체"는 면역글로불린의 Fc 영역과 동등한 영역을 포함하는 전체 항체 분자, 항체 단편 또는 융합 단백질을 포함하는 것을 의미한다.

<34> "항체 단편"은 전장 항체의 부분, 일반적으로 이의 항원 결합 또는 가변 도메인을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편에서 형성된 다른 중특이적 항체를 포함한다. 그러한 항체 단편은 동일하거나 다른 종에서의 항체의 Fc-도메인 영역에, 또는 항체의 변형된 Fc-도메인 또는 CH2 도메인에 융합될 수 있다(도 1은 상기 항체의 기본 구조를 나타낸다).

<35> 본원에서 사용된 용어 "클론된", "클론으로 유래된" 또는 "클론 세포주"는 단일 선구 세포로부터 유래된 특정 세포주와 유전적으로 동일한 세포 집단을 증식시키는 것을 의미한다. YB2/0-유래 숙주 세포에서, 모 세포주는 미국 특허 제4,472,500호에 개시되고 ATCC CRL 1662로 저장된 랫트 골수종 세포주이다.

<36> 본원에 이용된 항체 또는 항체 유사체의 "작용자 기능"은 병원체 또는 비정상 세포, 예를 들어, 종양 세포가 신체로부터 파괴되거나 제거되는 작용이다. 선천성 및 적응성 면역 반응은 ADCC, CA (보체 활성화), C1q 결합 및 읍소닌화를 포함하는 병원체를 제거하기 위한 대부분의 동일한 작용자 기작을 이용한다.

<37> 본원에 사용된 용어 "Fc", "Fc-함유 단백질" 또는 "Fc-함유 분자"는 적어도 하나의 면역글로불린 CH2 도메인을 지니는 다이머(dimeric) 또는 헤테로다이머 단백질을 말한다. CH2 도메인은 단백질/분자(예를 들어, 항체)의 다이머 영역의 적어도 한 부분을 형성할 수 있다.

- <38> 푸코실 트랜스퍼라제 또는 "fut8" 또는 "푸다제"는 fut8으로 공지된 유전자와 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 활성을 지닌 유전자 산물을 말한다.
- <39> "Fc-함유 치료 단백질"은 항원 결합 도메인, Fc 영역을 갖거나, 항체의 Fc 또는 CH2-함유 부분이 당화될 수 있는 아스파라긴 잔기를 함유하는 적어도 하나의 면역글로불린 CH2 도메인을 포함하는 다이머 또는 헤테로다이아미 단백질을 의미한다.
- <40> 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 항체 및 항체 단편을 포함한 목적하는 단백질, 단백질 단편, 또는 햅티드를 생성하도록 엔지니어링될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 총칭한다. 숙주 세포는 비제한적으로, 배양된 세포, 예를 들어, 설치류(랫트, 마우스, 기니아 퍼그 또는 햄스터)에서 유래된 포유 동물 배양 세포, 이를 테면, CHO, BHK, NSO, SP2/0, YB2/0; 또는 인간 조직 또는 하이브리도마 세포, 이스트 세포 및 곤충 세포, 형진 전환 동물 또는 배양 조직에 포함되는 세포도 포함한다.
- <41> 본원에 사용된 용어 "모노클로널 항체" 또는 "모노클로널 항체 조성물" 또는 "Mab"는 실질적으로 단일 분자 조성물의 항체 분자 제제를 말한다. 모노클로널 항체 조성물은 특정 에피토프에 대하여 단일 특이성 및 친화도를 나타낸다. 단일 항원성 부위에 대하여 유도된 모노클로널 항체는 매우 특이적이다. 더욱이 전형적으로 다른 결정자(에피토프)에 대하여 유도된 다른 항체를 포함하는 통상(폴리클로널)의 항체 제제와 반대로, 각 모노클로널 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대하여 유도된다. 수식 어구 "모노클로널"은 실질적으로 동질인 집단의 항체로부터 수득된 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않을 것이다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용된 모노클로널 항체는 Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975)에 의해 처음 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(참조 예, 미국 특허 제4,816,567호). "모노클로널 항체"는 예를 들어, Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터도 분리될 수 있다.
- <42> 본원에서 모노클로널 항체는 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정 항체 분류 또는 하위 분류에 속하거나 특정 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 유사하나, 쇄(들)의 나머지는 또다른 항체 종류 또는 하위 분류에 속하거나 또다른 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 유사한 "키메라" 항체(면역글로불린), 뿐 아니라, 그들이 목적하는 생물학적 활성을 지니는 한 상기와 같은 항체의 단편을 포함한다(미국 특허 제4,816,567호 및 Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81 :6851-6855 (1984)).
- <43> 비-인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 서열 부분으로 실질적으로 치환된 키메라 항체이다. 대부분의 경우에서, 인간화 항체는 수여자의 과가변 영역(상보성 결정 영역 또는 CDR로도 공지) 잔기가 비-인간 종(공여 항체), 이를 테면, 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 지니는 마우스, 뱃트, 토끼 또는 비인간 영장류에서의 과가변 영역 잔기로 치환된 인간 면역글로불린(수여 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 더욱이, 인간화 항체는 수여 항체 또는 공여 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더 정련하기 위하여 수행된다. 일반적으로 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 과가변 영역이 비-인간 면역글로불린의 그것과 상응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR이 인간 면역글로불린 서열의 것인 가변 도메인 적어도 하나 및 전형적으로 둘 중 실질적으로 모두를 포함할 것이다. 인간화 항체는 전형적으로 인간 IgG 면역글로불린의 것인 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 한 부분도 임의로 포함할 것이다. 더욱 자세하게, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992) 참조.
- <44> 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 생식 계열 면역글로불린 서열으로부터 유래된 가변 및/또는 불변 영역을 지닌 아미노산 서열을 갖는 항체를 말한다. 인간 항체는 항체가 인간 면역글로불린 서열을 이용한 시스템으로부터, 예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자를 갖는 형질전환 마우스를 면역화하거나, 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 스크리닝하여 수득되는 경우, 특정 생식 계열 서열로부터 "유래"되며 여기서, 선택된 인간 항체는 생식 계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열에 대하여 적어도 90%, 보다 바람직하게 적어도 95%, 더욱 바람직하게 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 아미노산 서열이 동일하다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식 계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있고(예를 들어, 시험관내에서 임의의 또는 위치-특이적 돌연변이 형성에 의해 도입된 돌연변이 또는 생체내에서 체세포 돌연변이), 과가변 서열 또는 상보성 결정 영역(CDR) 서열은 항체 특이성의 독특한 결정자이며, 생식 계열에서 암호화되지 않는 한에서는 이들 영역이 서열 상동성 분석에서 배제될 것이다.

<45>

본원에서 사용된 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 모든 항체, 이를 테면, (a) 인간 면역글로불린 유전자 또는 이로부터 제조된 하이브리도마(하기에서 더 설명함)에 대한 형질전환 또는 트랜스염색체 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체 (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어, 형질감염세포(transfectoma)로부터 분리된 항체 (c) 재조합, 조합(combinatorial) 인간 항체 라이브러리에서 분리된 항체 및 (d) 다른 DNA 서열로 인간 면역글로불린 유전자 서열을 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단으로 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체를 포함한다. 재조합 인간 항체는 인간 생식 계열 면역글로불린 서열에서 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나 특정 구체예에서, 그러한 재조합 인간 항체는 시험관 내에서 돌연변이가 생성되도록 할 수 있으며(또는 인간 Ig 서열에 대하여 형질전환된 동물이 이용될 때, 생체내 체세포 돌연변이), 이에 따라, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식 계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되며, 이와 관련되나, 생체 내에서 인간 항체 생식 계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

<46>

본원에서 사용된 "분리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 말한다(예를 들어, 조직 인자에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 조직 인자를 제외한 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나 인간 조직 인자의 에피토프, 이의 아이소폼 또는 변형체에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 예를 들어, 다른 종(예를 들어, 조직 인자 종 호모로그)으로부터의 다른 관련 항원에 교차-반응성을 가질 수 있다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포적 물질 및/또는 화학 물질이 실질적으로 없을 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 다른 특이성을 갖는 "분리된" 모노클로널 항체의 조합은 정의된 조성물에서 조합된다.

<47>

용어 "이중기능성(bifunctional) 분자"는 두개의 상이한 결합 특이성을 갖는 임의의 제제, 예를 들어, 단백질, 웨티드 또는 단백질이나 웨티드 복합체를 포함한다. 예를 들어, 분자는 (a) 세포 표면 항원 및 (b) 작용자 세포의 표면에서 Fc 수용체에 결합하거나 이와 상호작용할 수 있다. 용어 "다중특이적 분자" 또는 "헤테로특이적 분자"는 둘을 넘는 상이한 결합 특이성을 갖는 임의의 제제, 예를 들어, 단백질, 웨티드 또는 단백질이나 웨티드 복합체를 포함한다. 예를 들어, 분자는 (a) 세포 표면 항원, (b) 작용자 세포의 표면에서 Fc 수용체 및 (c) 적어도 하나의 다른 성분에 결합하거나 이와 상호작용할 수 있다. 이에 따라, 본 발명은 비제한적으로 세포 표면 수용체 또는 상기 수용체에 대한 리간드일 수 있는 표적 단백질 및 다른 표적, 이를 테면, 작용자 세포상의 Fc 수용체로 유도되는 이중특이적, 삼중특이적, 사중특이적 및 다중특이적 분자를 포함한다.

<48>

본원에서 사용된 용어 "헤테로항체"는 서로 연결된 둘 이상의 항체, 항체 결합 단편(예를 들어, Fab), 이의 유도체, 또는 항원 결합 영역을 말하며, 이 중 적어도 둘은 상이한 특이성을 갖는다. 이를 상이한 특이성은 작용자 세포에서 Fc 수용체에 대한 결합 특이성 및 표적 세포, 이를 테면 종양 세포에서 에피토프 또는 항원에 대한 결합 특이성을 포함한다.

<49>

최적으로 당화된 면역글로불린-유래 치료 단백질은 생체 내에서 총체적으로 작용자 기능으로 공지된 세포적 면역 기작을 이끌어내기 위한 상기 치료 단백질의 변형된(상대적으로 증진되거나 감소된) 능력을 부여하는 글리칸에 의해 점령된 N-링크 당화 부위를 갖는 인간 또는 인간-유래 CH2 영역을 포함하는 재조합 단백질을 포함한다.

<50>

생물약제학적(biopharmaceutical) 산물을 생산하기 위하여, 재조합 폴리웨티드(들)를 효율적이고 재현가능하게 발현시킬 수 있는 생산 세포주가 요구된다. 세포주는 안정적이며 효율이 높다. 세포주는 배양 ml 당 500,000 (5×10^5) 세포 초과의 농도에서, 바람직하게 배양 ml 당 백만(1×10^6) 초과의 농도인 높은 밀도로 자랄 수 있다. 이 목적을 위하여 다양한 숙주 세포주를 채용할 수 있다. 세포 조직이 바이오 치료 산물의 조성물 및 최종 량에 영향을 미치는 방법의 복잡성을 이해함에 따라, 산물의 조성물 및 생산에 대해 필요한 속성을 나누어 가질 숙주 세포주의 선택이 더 명백해졌다.

<51>

미국 특허 제 4,472,500호는 하이브리도마 융합 파트너로 유용하며, 안정성 및 생산성 능력이 뛰어난 랫트 골수 종 세포주를 교시하였다. 후자 세포주는 다양하게 명명된 YO, YB2 Ag0, YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 세포 또는 YB2/0 (ATCC CRL 1662)이며, 이후 YB2/0로 언급될 것이다. Lifely et al. (1995 Glycobiology 5:813-822)는 CHO 세포주, NS0 세포, 또는 랫트 골수종 YO(YB2/0) 세포에 의해 생산된 CDR-이식된 인간 IgG1 항체, CAMPATH-1H에 결합된 당쇄의 조성물을 비교하였다. 또한, ADCC 활성을 평가하였다. YO 세포에 의해 생산된 CAMPATH-1H가 N-링크 올리고당의 양분하는 위치에서 가장 높은 함량의 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 가지며, 가장 높은 ADCC 활성을 나타낸다고 기록되었다(도 2A-E). 이는 양분하는 GlcNAc를 다양한 타입의 N-링크 올리고당에 부가하는 글리코실 트랜스퍼라제, GlcNAc-트랜스퍼라제 III (GnT III)가 CHO 세포에서 정상적으로 존재하지 않기 때문이다(Stanley and Campbell, 1984, J. Biol. Chem. 261 :13370-13378). 치료 항체, 이를 테면 C2B8, 리툭시마브(rituximab)의 ADCC 능력을 증가시키기 위한 다른 노력이 최적화된 레벨의 GnT 효소를 지닌 숙주 세포주를 엔지

니어링하는 데에 집중되었다(Umana et al. US6602684). 높은 레벨로의 GnT III의 과발현이 성장 억제를 유발할 수 있고, 상이한 글리코실 트랜스퍼라제인 GnT V의 과발현이 세포에 대하여 독성이 있는 것을 이후 발명자들이 발견하였다. 이에 따라, 감소된 세포 생존력 및 생산성은 당단백질-변형된 글리코실 트랜스퍼라제 과발현의 일반적 특성일 수 있다.

<52> 다양한 숙주 세포(Lifely supra)에 의해 생성된 Mab의 올리고당 조성물에 대한 두번째 발견은 CHO 및 NSO 생산된 Mab가 우세하게 푸코실화된 올리고당(도 2C-D, 구조 16-30)를 가지는 반면, YB2/0 생산된 Mab가 더욱 비-푸코실화된 구조를 포함하는 더욱 복잡한 패턴을 가지는 것이었다 (도 2A, B, & E; 구조 1-15 및 31-36).

<53> 이러한 관찰에 따라, 효소, 알파-1,6-푸코실 트랜스퍼라제, "푸다제"로도 언급되는 fut8의 유전자 산물이 N-링크 올리고당 구조를 푸코실화하는 데 관여하며, CHO 또는 NSO 세포주에서보다 YB2/0 세포에서 더 적은 것을 발견하였다. 이에 따라, fut8 유전자는 유사한 효과를 지닌 숙주 세포주에서 조작될 수 있다(Shinkawa, et al. 2003 J. Biol. Chem., 278: 3466-3473; EP1176195A1). 더욱이, 바이안테너리 올리고당의 갈락토실화, 양분되는 GlcNac의 존재 및 푸코실화의 상대 분포는 시험관내 및 생체내에서 측정한 것과 같이 비-푸코실화 Mab가 N-링크 바이안테너리 올리고당 구조에 대한 다른 변형보다 ADCC를 증진하기 위한 더 큰 능력을 지니는 것을 나타낸다 (Shields, et al. 2002. J Biol Chem. 277:26733-40; Ninwa, et al. 2004. Cancer Res. 64:2127-2133).

<54> 목적으로 유발된 세포주 발달

<55> 생산 세포주의 발달은 전형적으로 항체 유전자를 숙주 세포주(이를 테면, 마우스 골수종 Sp2/0, CD-적응된 Sp2/0 (C463) 및 NS/0)에 형질감염시키고, 목적하는 항체를 높은 레벨로 발현시키는 형질감염세포를 분리하는 것을 포함한다. 일부 예에서, 예를 들어, 치료 항체가 생물 표적 분자를 중화시키기 위하여 활동하는 cA2 항체는 순환하는 TNF- α 에 결합하고, 즉시 제거하여 작용된다. 다른 예에서, 항체는 특정 항원, 예를 들어, 조직 인자를 과발현하는 암 세포를 표적화하여 작용한다. 조직 인자에 항체가 결합하여 조직 인자 활성을 중화시키면서, 암 세포는 결합 Fc의 인지에 의해 활성화되는 보체-의존적-세포독성(CDC) 경로 및 항체-의존적-세포독성(ADCC)에 의해 사멸된다. ADCC, 항체-표적화 세포에 용해 공격은 항체의 불변 영역(Fc)에 대한 림프구 수용체, Fc γ R의 결합에 따라 자극된다.

<56> 본 발명의 조성물

<57> 본 발명은 CD 배지 중에서 계속해서 성장할 수 있는 클로널 골수종 세포주에 관한 것이다. 일 구체예에서, 클로널 골수종 세포주는 6 계대에 걸쳐 FBS-보충된 CD-Hyb (CD-하이브리도마, Gibco) 배지에서의 배양을 점진적으로 분리하여 YB2/0 세포 은행에서 클로닝된 자발적 돌연변이인 클로널 골수종 세포주에 관한 것이다. 본 구체예에서, 클로널 골수종 세포주는 C1083B로 명시된다. C1083B의 특성은 세포주가 모 YB2/0 세포와 관련되지 않은 수 많은 독특한 성장 특성을 갖는 것으로 나타난다. 예를 들어, C1083B는 YB2/0 모 세포주를 위해 필요한 냉동 보존체, 혈청의 부재하에서 냉각시키거나 녹일 수 있다. 또한 모 세포주와 달리, C1083B는 CD 배지에서 높은 세포 밀도로 자랄 수 있다. 다른 특성은, 혈청으로 보충된 성장 배지에서 세포가 유지될 때 관찰되는 것과 유사하거나 그보다 뛰어난 생존가능한 세포 밀도 및 배가(doubling) 시간을 포함한 성장 파라미터를 CD 배지에서 자란 C1083B가 갖는 것으로 나타난다. C1083E로 명명된 C1083A의 두번째 서브 클론은 3주 동안 6 mM 글루타민으로만 보충된 CD-Hyb 배지에 C1083A 세포 배양을 직접적으로 증식시켜 선택된다.

<58> 또다른 구체예에서, 클로널 골수종 세포주는 렉틴 보충된 CD 배지로 선택하여 C1083B 세포 은행에서 유래된다. 이러한 경우에 사용된 렉틴은 Lens Culinaris Agglutinin (LCA)이나; 두 푸코오스-특이적 렉틴 중 어느 쪽은 선택을 위해 사용될 수 있다. 본 구체예에서, 클로널 골수종 세포주는 C1083C 및 C1083D로 명명된다. C1083C 및 C1083D의 성장 특성은 CD-Hyb 중 C1083B와 비슷한 것으로 나타난다.

<59> 그러므로, C1083B 세포 및 유도체는 시험관 내에서 무한 유지, 성장 및 증식될 수 있다. 증식된 C1083B 세포는 계대 배양될 수 있고(예를 들어 새로운 배양관으로 반복하여 계대), 동결-보관될 수 있다(예를 들어, 동결-보존제, 이를 테면, 10% 디메틸설픰시드 또는 글리세롤과 함께 액체 질소의 증기 상에서 보관). C1083B 세포는 세포주로서 장기간 배양으로 유지될 수 있다.

<60> 대부분의 경우에, 본 발명의 세포는 가스 교환될 수 있는 적합한 멸균 환경을 제공하고, 세포를 배양하는 데 이용되는 임의의 관, 플라스크, 조직 배양 접시 또는 장치에서 성장한다. 전형적으로, 본 발명에서 사용되는 기초가 되는 배양은 존재하는 모 C1083B 세포 스톡(stock)으로부터 세포를 제거하고, 혈청 함유 및 혈청이-없는 배지의 혼합물 중의 배양관에 놓고, 그 다음 본원에 개시된 바와 같이 혈청이-없는 상태로 계대한 것이다.

<61> 바람직한 구체예에서, 설치류 또는 영장류에서 유래된 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양은 면역글로불린 또

는 이의 단편을 생산할 수 있다. 더욱 자세하게, 면역글로불린 또는 이의 단편은 마우스 또는 인간에서 유래될 수 있다. 선택적으로 면역글로불린 또는 이의 단편은 키메라이거나 엔지니어링될 수 있다. 실제로, 본 발명은 인간화, CDR-이식된, 파지 디스플레이된, 형질전환 마우스-생산, 최적화, 돌연변이화, 무작위화 또는 재결합된 면역글로불린 또는 이의 단편을 생산하는 세포, 세포주 및 세포 배양을 더 고려한다.

<62> 항원 분류 또는 아이소타입(IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM)은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화된 불변 영역에 의해 분류된다. 인간 IgG 분류에서, 네개의 하위 분류 또는 서브타입이 있다: 높은 것부터 낮은 것으로, 혈청 중 그의 원래의 존재량에 따라 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 명명하였다. IgA 항체는 두개의 하위분류, IgA1 및 IgA2로 발견되었다. 본원에 이용된 바와 같은 "아이소타입 스위칭(switching)"은 또한 IgG 하위 분류 또는 서브타입 사이의 변경을 말한다.

<63> 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양은 비제한적으로 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, sIgA, IgD, IgE, 및 이의 임의의 구조 또는 기능 유사체를 포함하는 면역글로불린 또는 이의 단편을 생산할 수 있다. 특정 구체 예에서, 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양에서 발현되는 면역글로불린은 CNT0860이다 (인간 huIgG1 유래된 불변 도메인에 융합된 cCLB8 가변 도메인).

<64> 본 발명은 항원, 사이토카인, 인테그린, 항체, 성장 인자, 세포 사이를 단백질, 호르몬, 신경전달물질, 수용체 또는 이의 융합 단백질, 혈액 단백질, 이의 임의의 단편 및 상기한 것 중 임의의 것 중 임의의 구조 또는 기능 유사체와 결합하는 CH2-도메인에서 당화될 수 있는 면역글로불린 또는 이의 단편을 발현하는 세포, 세포주 및 세포 배양을 추가로 제공한다. 바람직한 구체예에서, 면역글로불린, 이의 단편 또는 유도체는 표적 세포의 표면상에서 항원과 결합한다. 특히 바람직한 구체예에서, 표적 세포는 종양 세포, 종양 맥관 구조의 세포, 또는 면역 세포이다. 특정 구체예에서, 면역글로불린, 이의 단편 또는 유도체는 조직 인자에 결합한다. 본 발명의 항-조직 인자 항체의 예는 C1261로 명명된 세포주에 의해 생산되는 CNT0860이다.

<65> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양은 성장 인자 또는 호르몬을 포함하는 융합 단백질을 검출가능하게 발현할 수 있다. 본 발명에 고려되는 성장 인자의 예는 인간 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 상피 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 신경 성장 인자, 인간 융모성 고나도트로핀, 에리트로포에이틴, 트롬보포에이틴, 뼈 형태형성 단백질, 형질전환 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 또는 글루카곤-유사 웨티드 및 이의 구조 또는 기능 유사체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<66> 본 발명의 분리 항체는 ADCC 활성을 지닌 항체 아이소타입, 특히 인간 IgG1(예를 들어, IgG1κ 및 IgG1λ), 덜 바람직하게는 IgG2 및 IgG3 또는 다른 종에서 그 대응부(counterpart)인 Fc 도메인 중 특정 잔기에서 변경된 잔기를 함유하는 하이브리드 아이소타입을 갖는 것을 포함한다. 항체는 전장 항체(예를 들어, IgG1)이거나, 항원-결합 부분 및 Fc 부분 또는 ADCC, 보체 활성화 및 C1q 결합을 포함하는 작용자 기능을 도출할 수 있는 도메인을 포함할 수 있다.

<67> 더욱이, 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양에 의해 생산되는 면역글로불린 단편은 구조를 함유하는 Fc 또는 다른 CH2 도메인 및 이의 임의의 구조 또는 기능 유사체를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 일 구체예에서, 면역글로불린 단편은 다이머 수용체 도메인 융합 폴리웨티드이다. 특정 구체예에서, 다이머 수용체 도메인 융합 폴리웨티드는 이타너셉트(etanercept)이다. 이타너셉트는 피하내 투여되고, 환자의 혈청 중 TNF α에 결합하고, 그것을 생물학적으로 불활성화되게 하는 재조합, 수용성 TNF α 수용체 분자이다. 이타너셉트는 인간 IgG1의 Fc 부분에 연결된 인간 75 키로달톤(P75) 종양 피사 인자 수용체 (TNFR)의 세포외 리간드-결합 부분으로 구성된 다이머 융합 단백질이다. 이타너셉트의 Fc 성분은 CH2 도메인, CH3 도메인 및 헌지 영역을 함유하나, IgG1의 CH1 도메인은 함유하지 않는다.

<68> 본 발명의 세포주를 사용하여 제조될 수 있는 다른 산물은 통상 다른 타입의 동물 세포주에 의해 제조되며, 당화될 수 있는 CH2를 갖는 치료 또는 예방 단백질을 포함한다. 특히 바람직한 것은 세포 표면상의 표적 항원에 결합하는 치료의, 당화된, CH2-도메인 함유 단백질이며, 이 세포 타입은 신체로부터 무능력하게 하거나 제거하는 것이 유익하다. 수많은 치료 항체는 인간 IgG1, 특히 IgG1κ파, 인간 CH1, CH2 및 CH3 도메인을 함유하는 중쇄를 함유하도록 엔지니어링된다. 상기 치료 단백질을 REMICADE®로 시판되는 인플릭시마브(Infliximab)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<69> 인플릭시마브는 대략 149,100 달톤의 분자량을 지닌 키메라 IgG1κ 모노클로널 항체이다. 이는 인간 불변 및 뮤린 가변 영역으로 구성된다. 인플릭시마브는 $10^{10} M^{-1}$ 의 회합 상수로 인간 종양 피사 인자 알파(TNF(알파))에 특이적으로 결합한다. 인플릭시마브는 높은 친화도로 수용성 및 막횡단(transmembrane) 형태의 TNF(알파)에 결합

하여 TNF(알파)의 생물학적 활성을 중화시키며, TNF(알파)와 그의 수용체의 결합을 억제한다. 인플릭시마브에 의해 결합된 막횡단 TNF(알파)를 발현하는 세포는 시험관내 또는 생체내에서 용해될 수 있다. 인플릭시마브는 류마티스 관절염, 크론 질환 및 강직성 척추염의 치료용으로 적용된다. 인플릭시마브는 치료될 질환에 따라 이 후 2, 6, 및/또는 8 주에, 매 8주의 간격에 추가의 유사 투여량으로 수행된 정맥내 주입으로서 3 내지 5mg/kg의 투여량으로 제공된다.

<70> 다클리주마브(Daclizumab, ZENAPAX®로 시판)는 활성화된 램프구의 표면에서 발현되는 인간 고-친화도 인터루킨-2(IL-2) 수용체의 알파 서브유닛(p55 알파, CD25, 또는 Tac 서브유닛)에 특이적으로 결합하는 재조합 DNA 기술에 의해 생산되는 면역억제, 인간화 IgG1 모노클로널 항체이다. 다클리주마브는 상보성-결정 영역(CDR) 이식된 마우스-인간 키메라 항체이다. 인간 서열은 인간 IgG1의 불변 도메인 및 Eu 골수종 항체의 가변 프레임워크 영역에서 유래된다. 뮤린 서열은 뮤린 항-Tac 항체의 CDR에서 유래된다. 다클리주마브는 신장 이식을 받은 환자에서 급성 기관 거부의 예방을 위하여 적용되며, 이는 일반적으로 사이클로스포린 및 코르티코스테로이드를 포함하는 면역억제 치료법의 부분으로서 이용된다.

<71> 바실릭시마브(Basiliximab, SIMULECT®로 시판)은 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 키메라(뮤린/인간) 모노클로널 항체이며, 활성화된 T-램프구의 표면상 인터루킨-2 수용체(알파)-쇄(IL-2R(알파), CD25 항원으로도 공지)에 특이적으로 결합하고 이를 차단시키는 면역억제제로 작용한다. 아미노 서열에 기초하여, 단백질의 계측된 분자량은 144 키로달톤이다. 이는 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(IgG1) 및 IL-2R(알파)에 선택적으로 결합하는 RFT5 항체를 암호화하는 마우스 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자를 함유하는 플라스미드를 발현하도록 유전적으로 엔지니어링하여 확립된 마우스 골수종 세포주의 발효로부터 수득된 당단백질이다. 바실릭시마브는 사이클로스포린 및 코르티코스테로이드를 포함하는 면역억제 치료법의 부분으로서 이용될 때 신장 이식을 받은 환자에서 급성 기관 거부의 예방을 위하여 적용된다.

<72> 아달리무마브(Adalimumab, HUMIRA®로 시판)는 인간 중앙 괴사 인자(TNF)에 특이적인 재조합 인간 IgG1 모노클로널 항체이다. 아달리무마브는 인간 유래된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 인간 IgG1 카파 불변 영역을 지닌 항체가 되는 파지 디스플레이 기술을 이용하여 생산된다. HUMIRA®는 하나 이상의 DMARD에 대한 부적합한 반응을 지닌 중등 내지 심각한 류마티스 관절염을 지닌 성인 환자에서 증상 및 징후를 줄이고, 구조적 손상의 진행을 억제하기 위하여 적용된다. HUMIRA®는 단독으로, 또는 MTX 또는 다른 DMARD와 조합하여 이용될 수 있다.

<73> 리툭시마브(Rituximab, RITUXAN®로 시판)는 정상 및 악성 B 램프구의 표면에서 발견되는 CD20 항원에 대하여 유도되며 유전적으로 엔지니어링된 키메라 뮤린/인간 모노클로널 항체이다. 항체는 뮤린 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열 및 인간 불변 영역 서열을 함유하는 IgG1 카파 면역글로불린이다. 리툭시마브는 CD20 항원에 대하여 약 8.0nM의 결합 친화도를 갖는다. 리툭시마브는 재발 또는 불응성 저급 또는 소포의 CD-20 양성, B-세포 비-호지킨 램프종을 지닌 환자의 치료용으로 적용된다. RITUXAN®은 4 또는 8번 투여를 위해 일주일에 한번 375 mg/m²로 2번 정맥내 주입된다.

<74> 트라스투주마브(Trastuzumab, HERCEPTIN®로 시판)은 세포-기초 분석에서 높은 친화도($K_d = 5nM$)로 인간 상피 성장 인자 수용체 2 단백질, HER2의 세포외 도메인에 선택적으로 결합하는 재조합 DNA-유래 인간화 모노클로널 항체이다. 항체는 HER2에 결합하는 뮤린 항체(4D5)의 상보성-결정 영역을 지닌 인간 프레임워크 영역을 함유하는 IgG1 카파이다. HERCEPTIN®은 그 종양이 HER2 단백질을 과발현시키는 전이 유방암을 지니고 있으며, 그 전이 질환을 위해 한번 이상의 화학치료법을 받은 환자의 치료용 단일 약제 치료법으로 적용된다. 파클리타셀(paclitaxel)과 조합하여 HERCEPTIN®은 그 종양이 HER2 단백질을 과발현시키는 전이 유방암을 지니고 있으며, 그 전이 질환을 위해 화학치료법을 받지 않은 환자의 치료용으로 적용된다. 권장되는 투여량은 90-분 주입으로 투여되는 4 mg/kg 트라스투주마브의 초기 로딩 투여이며, 초기 로딩 투여가 잘 허용되는 경우, 2 mg/kg 트라스투주마브의 주간 유지 용량이 30-분 주입으로 투여될 수 있다.

<75> 알лем투주마브(Alemtuzumab, CAMPATH® 시판)은 21-28kD 세포 표면 당단백질에 대하여 유도된 재조합 DNA-유래 인간화 모노클로널 항체(Campath-1H)이다. 알лем투주마브는 본질적으로 모든 B 및 T 램프구, 대부분의 단핵구, 대식구 및 NK 세포, 과립구의 소집단 및 수컷 생식 시스템의 조직의 표면에 나타나는 비-조절 항원, CD52에 결합한다. Campath-1H 항체는 인간 가변 프레임워크 및 불변 영역과 뮤린(랫트) 모노클로널 항체(Campath-1G)에서의 상보성-결정 영역을 지닌 IgG1 카파이다. Campath는 알킬화제로 치료된 적이 있으며, 플루다라빈(fludarabine) 치료법에 실패한 환자에서 B-세포 만성 램프성 백혈병(B-CLL)의 치료용으로 적용된다. Campath의 효능의 결정은 전체 반응률에 기초한다. Campath는 처음에 매일 2시간 정맥내 주입으로서 3mg이 투여되며; 허용된 다음, 매일 투여량은 10 mg까지 단계적으로 증가될 것이며, 허용될 때까지 계속될 것이다. 이러한 투여량 레

벨이 허용된 다음, Campath 30mg의 유지 투여량이 시작될 수 있으며, 최대 12주 동안 일주일에 3회 투여될 수 있다. 대부분의 환자에서, 30mg까지의 단계적 확대는 3-7일 내에 성취될 수 있다.

<76> 오말리주마브(Omalizumab, XOLAIR®로 시판)는 인간 면역글로불린 E(IgE)에 선택적으로 결합하는 재조합 인간화 IgG1(카파) 모노클로널 항체이다. 오말리주마브는 비만 세포 및 호염기구의 표면에서 고-친화도 IgE 수용체(Fc(엡실론)RI)에 IgE가 결합하는 것을 억제한다. Fc(엡실론)RI-함유 세포에서 표면-결합 IgE의 감소는 알러지 반응의 매개체 방출 정도를 제한한다. 오말리주마브로 처리하면, 아토피 환자에서 호염기구 상의 Fc(엡실론)RI 수용체의 수가 감소된다. 오말리주마브는 중등 내지 심각한 지속적인 천식을 지니고 있으며, 양성 피부 테스트를 갖거나 시험관내에서 다년성 공기 알레르겐에 대해 반응성을 갖고, 그 증상이 흡입된 코르티코스테로이드로 부적절하게 조절되는 성인 및 청소년(12살 이상)을 위해 적용된다. 오말리주마브는 150 내지 375mg의 투여량으로 매 2 또는 4주 피하내 투여된다.

<77> 에팔리주마브(Efalizumab, RAPTIVA®)는 인간 CD11a에 결합하는 면역억제 재조합 인간화 IgG1 카파 아이소타입 모노클로널 항체이다. 에팔리주마브는 모든 백혈구에서 발현되는 백혈구 작용 항원-1(LFA-1)의 (알파) 서브유닛, CD11a에 결합하며, CD11a의 세포 표면 발현을 감소시킨다. 에팔리주마브는 세포내 부착 분자-1(ICAM-1)에 대한 LFA-1의 결합을 억제하며, 그 때문에, 다른 세포 타입으로 백혈구가 부착하는 것을 억제한다. LFA-1 및 ICAM-1 사이의 상호작용은 T 림프구의 활성화, 내피 세포에 T 림프구의 부착 및 건선 피부를 포함하는 염증 부위에 T 림프구의 이동을 포함하는 많은 과정의 개시 및 유지에 기여한다. 림프구 활성화 및 피부로의 트래피킹(trafficking)은 만성 플라그 건선의 병태생리학에서 역할을 수행한다. 건선 피부에서, ICAM-1 세포 표면 발현은 내피 및 각질형성세포에서 상향 조절된다. CD11a는 B 림프구, 단핵구, 호중구, 자연 살상 세포 및 다른 백혈구의 표면에 발현될 수도 있다. 이에 따라, 에팔리주마브가 활성화, 부착, 이주 및 T 림프구를 제외한 세포의 수에 영향을 미칠 가능성이 존재한다. RAPTIVA®의 추천된 투여량은 단일 0.7 mg/kg 의 조건형성 피하내 투여 이후 1 mg/kg의 주간 피하내 투여이다(최대 단일 투여는 200mg을 넘지 않는다).

<78> 또다른 구체예에서, 본 발명의 세포주는 안정적으로 형질감염되거나 다르게는 비-면역글로불린 유래 폴리펩티드를 발현하도록 엔지니어링된다.

<79> 또다른 구체예에서, 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양은 재조합 혈액 단백질 또는 다른 결합 조직 단백질을 검출가능하게 발현할 수 있다. 상기와 같은 재조합 단백질은 에리트로포에이틴, 트롬보포에이틴, 조직 플라스미노겐 활성제, 피르비노겐, 혜모글로빈, 트랜스페린, 알부민, 단백질 c, 콜라겐 및 이의 임의의 구조 또는 기능 유사체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명의 세포, 세포주 및 세포 배양은 조직 플라스미노겐 활성제를 발현한다.

<80> 본 발명의 항체 및 단백질을 암호화하는 핵산은 본 분야에 공지인 몇가지 방법으로 유래될 수 있다. 일면에서, 항체는 통상적으로 본 발명의 웹티드로 마우스를 면역화시켜 제조된 하이브리도마에서 수득된다. 이에 따라 항체는 본 분야에 잘 알려진 임의의 하이브리도마 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 참조예, 본원에 참조로 인용된 Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987- 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

<81> 항체의 표적 결합 부분, 전형적으로 항체의 가변 중 및/또는 가변 경 도메인을 유도하는 또다른 통상의 방법에서, 이를 부분은 예를 들어, 파지 라이브러리에서 생성된 결합 도메인의 라이브러리로부터 선택된다. 파지 라이브러리는 무작위 올리고뉴클레오티드의 라이브러리 또는 이를 테면, 면역화 동물 또는 인간의 B-세포로부터의 관심 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드의 라이브러리를 삽입하여 생성될 수 있다(Smith, G.P. 1985. Science 228 : 1315-1317). 항체 파지 라이브러리는 단일-쇄 Fv 단편 또는 Fab 단편의 발현을 허용하는 한 파지에서 중쇄(H) 및 경쇄(L) 가변 영역 쌍을 함유한다(Hoogenboom, et al. 2000, Immunol. Today 21(8) 371-8). 파지미드 라이브러리의 다양성은 라이브러리의 모노클로널 항체의 면역특이성을 증가시키고/시키거나 변경시키도록 조작되어, 추가의, 바람직한 인간 모노클로널 항체를 생산하고, 그 다음 확인할 수 있다. 예를 들어, 유전자를 암호화하는 중쇄(H) 및 경쇄(L) 면역글로불린 분자는 임의로 혼합(재배치)되어, 어셈블리된 면역글로불린 분자 내에서 새로운 HL 쌍을 형성할 수 있다. 또한, H 및 L 쇄 암호화 유전자 둘 중 하나 또는 둘 다는 면역글로불린 폴리펩티드의 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR)에서 돌연변이가 형성되고, 그 다음, 목적하는 친화도 및 중화 특성을 위해 스크리닝될 수 있다. 항체 라이브러리는 하나 이상의 인간 프레임워크 서열을 선택하고, 인간 항체

레파토리로부터 유래된 CDR 카세트의 수집을 도입하여 또는 지정된 변화를 통하여 합성적으로 생성될 수 있다 (Kretzschmar and von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13:598-602). 변화 위치는 CDR에 한정되지 않고, 가변 영역의 프레임워크 세그먼트를 포함하거나, 항체 가변 영역을 제외한 것, 이를 테면 템터드를 포함할 수 있다.

<82> 항체 가변 영역을 제외한 것을 포함할 수 있는 표적 결합 성분의 다른 라이브러리는 리보솜 디스플레이, 효모 디스플레이 및 박테리아 디스플레이이다. 리보솜 디스플레이에는 단백질이 RNA에 부착된 채로 유지하면서 그 동족의 단백질로 mRNA를 번역하는 방법이다. 핵산 암호화 서열은 RT-PCR로 회수된다 (Mattheakis, L.C. et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9022). 효모 디스플레이에는 막-연관 알파-아글루티닌 효모 부착 수용체, aga1 및 aga2의 융합 단백질의 작제, 일부분의 교배 타입 시스템에 기초한다 (Broder, et al. 1997. Nature Biotechnology, 15:553-7). 박테리아 디스플레이에는 세포 막 또는 세포 벽과 회합하는 박테리아 단백질을 운반하기 위한 표적의 융합에 기초한다 (Chen and Georgiou 2002. Biotechnol Bioeng, 79:496-503).

<83> 하이브로도마 기술과 비교하여, 파지 및 다른 항체 디스플레이 방법은 항원에서 가능한 숙주 효과의 제한 없이, 또는 그 반대로, 시험관 내에서 항원 표적에 대한 선택을 조작하는 기회를 제공한다.

생산 과정

<85> 안정적으로 형질 감염된 것으로 확립되면, 본 발명의 YB2/0 세포주는 냉동 보관될 수 있으며, 회수하여 실운용을 시작할 수 있다. 전형적으로, 세포주는 10% DMSO로 보충된 CD-하이브리도마 배지 중에 바이얼당 1×10^7 세포로 보관된다. 실운용을 시작할 때, 한 바이얼의 세포를 녹이고, 10ml CD-하이브리도마 배지를 함유하는 플라스크로 내용물을 옮기고, 플라스크를 37 °C/5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 그 다음, 배양을 더 큰 관에 넣고, 그 후 원하는 용량의 관류 생물반응기에 옮겼다 (Deo et. al. 1996. Biotechnol. Prog. 12:57-64).

<86> 예를 들어, 본 발명의 클로렐 골수종 세포주는 조작되어 약 0.01mg/L(배양 배지) 내지 약 10,000mg/L(배양 배지)의 레벨로 재조합 단백질을 생산하도록 할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 클로렐 골수종 세포주는 조작되어, 약 0.1 pg/세포/일 내지 약 100 ng/세포/일으로 재조합 단백질이 생산되도록 할 수 있다.

<87> 본 발명의 C1083B-E 세포의 종식과 유지를 지지하기 위하여 본 발명에서 유용한 배양 배지 또는 성장 배지는 혈청이-없는 배지 (SFM), 단백질이-없는 배지 (PF), 동물-유래된 성분이-없는 (ADCF) 배지 및 화학적으로 정의된 (CD) 배합을 포함한다. 본 발명에서 이용되는 CD 배지는 혈청, 혈청 단백질, 가수분해물, 또는 미지의 조성물의 화합물을 포함하는 동물 기원의 임의의 성분이 없는 성장 배지를 포함한다. CD 배지의 모든 성분은 알려진 화학 구조를 가지며, 이전에 기술된 배취간 다양성을 없앤다.

<88> 본 발명에서 이용된 CD 배지는 비제한적으로 Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif. (Cat. No. 11279)에 의해 생산된 CD 배지, CD-하이브리도마를 비제한적으로 포함할 수 있다. CD 하이브리도마 배지는 정지된 및 휘저어진 혼탁액 시스템에서 모노클로렐 항체의 생산 및 다양한 하이브리도마와 골수종의 생산에 최적화된 화학적으로 정의된, 단백질이 없는 배지이다. CD 하이브리도마 배지는 동물, 식물 또는 합성 기원의 단백질을 함유하지 않는다. 또한, 배합에는 정의되지 않은 용해물 또는 가수분해물도 없다. CD 하이브리도마 배지는 안정성을 증가시키기 위하여 L-글루타민 없이 제제화된다. 글루타민은 이용 전 1,000 ml의 배지 당 40 ml의 200 mM L-글루타민 또는 40 ml의 GlutaMAX™-I Supplement (Invitrogen에서 구입가능)으로 첨가될 수 있다. 하이브리도마 배지 마스터 파일은 FDA에 제출되었다. CD 하이브리도마 배지는 지질-의존 또는 콜레스테롤-의존성 배양, 이를 테면, NSO-유래 세포주에 적합하지 않다.

<89> 성장 특성을 위하여, CD-하이브리도마 배지는 1 g/L NaHCO₃ 및 L-글루타민으로 보충되어, 6mM의 최종 농도가 된다. 본 발명은 또한 참조로 이용된 "Chemically Defined Medium For Cultured Mammalian Cells," 표제의 PCT WO02/066603호에 개시된 "CDM 배지"를 포함한 화학적으로 정의된 배지의 이용을 고려한다.

작용자 기능을 평가하는 방법

<91> 제거하는 데에서 항체 당화의 역할과 이에 따른 치료적 Fc 함유 단백질의 약동학의 역할이 명확하지 않다: 순환으로부터 IgG를 제거한다고 생각되는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대해 결합하면, 항체의 Fc 부분에서 N-링크 올리고당의 부족에 의해 교란되지 않는 것으로 보인다.

<92> IgG 항체-매개 면역 반응을 세포 작용자 기능과 연결시키는 IgG Fc 수용체 (FcR)는 Fc-감마 수용체를 포함한다: FcRI (CD64), FcRII (CD32), 및 FcRIII (CD16). 세개 모두는 단백구에서 나타나는 것으로 관찰된다. 그러나,

다양한 표적 세포에서 이들 수용체의 생성은 다른 인자에 반응하여, 그리고 차별적으로 발생하는 것으로 보인다. 이에 따라, Fc-감마 수용체에 대한 당화-변형된 Fc 함유 생물치료제의 친화도를 측정하여 증진된 작용자 기능을 예상할 수 있다.

<93>

그 Fc 글리칸에서 낮은 레벨의 푸코오스를 지닌 인간 IgG1 Abs는 인간 PBMC 작용자 세포를 이용한 ADCC 분석에서 인간 CD16FcR에 대하여 더 큰 친화도를 갖고, ADCC 분석에서 극적으로 증진된 시험관내 활성을 갖는 것으로 기록되었다(Shinkawa et al. J Biol Chem 278(5):3466-3473, 2003; Shields et al. J Biol Chem 277(30):26733-26740, 2002; Umana et al., Nat Biotech 17:176-180, 1999). 그러나 마우스 CD16 및 CD32 FcR에 대한 상기 Ab의 친화도가 높은 푸코오스 Ab의 그것보다 높지 않다는 것이 다음에서 기록되었으며(Shields et al., 2002), 마우스에서 낮은-푸코오스 Ab를 연구하는 것은 덜 효율적이다. 그럼에도 불구하고, CC 케모카인 수용체 4에 대한 키메라 인간 IgG1 Ab의 높은 푸코오스 및 낮은 푸코오스 버전의 항-종양 활성이 비교될 때, 그의 시험관내 ADCC 활성에 차이가 발견되지 않았으나(마우스 작용자 세포 이용), 낮은 푸코오스 Ab는 생체내에서 더욱 유력한 효능을 보였다. 비 인간 작용자 세포가 제공되며, 마우스는 내인성 NK 세포를 보유한다(Niwa et al. Cancer Res 64:2127-2133, 2004).

<94>

인간 NK 세포에서 CD16 수용체가 IgG1 Ab의 푸코오스 레벨에 대하여 증진된 민감성을 나타냄에 따라, 이들 데이터는 인간 작용자 세포에서 연구된 것과 다른 기작이 마우스에서 작동됨을 나타낸다. 한가지 가능성은 더욱 최근에 발견된 마우스 CD 16-2 수용체이다(Mechetina et al. Immunogen 54:463-468, 2002). 마우스 CD16-2의 세포의 도메인은 더 잘 알려진 마우스 CD16 수용체보다 인간 CD16A (65%)에 대해 유의적으로 더 높은 서열 상동성을 가지며, 그것이 결합하는 푸코오스 레벨의 IgG에 대하여 마우스 CD 16보다 더 민감할 수 있는 것을 제안한다. 마우스 대식구-유사 J774 세포에서 기록된 발현이 CD 16-2를 발현하는 마우스 대식구가 Niwa et al. (2004)에 의해 기재된 낮은 푸코오스 Ab에 의한 더 큰 항-종양 활성에 책임이 있을 수 있는 가능성과 일치한다고 기록되었다. 이에 따라, 인간 IgG1-타입 Fc 함유 단백질에 의해 뮤린 작용자 세포로 Fc-수용체가 결합하는 것에 대한 연구는 예측적이지 않다.

<95>

작용자 기능을 평가하는 또 다른 방법은 정량적 방법으로 시험관내 ADCC 분석을 이용하는 것이다. 이에 따라, 시험관내 분석은 표적 및 작용자 세포주의 정확한 선택에 의해 그의 동족 리간드를 나타내는 세포의 파괴를 유발하는 결합 항체의 능력을 측정하도록 디자인될 수 있으며, 계속 분열하지 못하는 세포 또는 내부 성분의 방출, 예를 들어⁵¹ 크로뮴 방출에 의해 "죽은" 세포를 평가할 수 있다. 표적 세포는 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 융합 단백질을 위한 표적 리간드를 정상적으로 발현하는 세포주이거나 그 표면에서 표적 단백질을 발현하고 보유하도록 엔지니어링될 수 있다. 엔지니어링된 세포주의 예는 그 표면에서 1-12가 제거한 성숙 사이토카인의 아미노산이 도입되어 막횡단 형태로 남아있는 재조합 인간 TNF를 안정적으로 발현하는 K2 세포, Sp2/0 마우스 골수종 세포주이다(Perez et al., Cell 63:251-258, 1990). 이러한 세포주는 Fc 도메인 또는 Fc 도메인 활성을 갖는 항-TNF 항체, 항체 단편 또는 엔지니어링된 항-TNF 알파 표적화 융합 단백질의 ADCC 활성의 변형을 평가하는 데 유용하다.

<96>

시험관 내 ADCC 활성 분석을 위한 작용자 세포는 인간 또는 다른 포유동물 원의 PBMC (말초 혈액 단핵 세포)일 수 있다. PBMC 작용자 세포는 기증자로부터 혈액을 수집한 후에, 승인된 방법으로 이로부터 신선하게 분리될 수 있다. 이용될 수 있는 다른 단핵구 또는 대식 세포는 말초 삼출물과 같은 유출액으로부터 유래된 것이다.

<97>

일반적인 용어로 본 발명을 기술하면서, 본 발명의 구체예는 다음 실시예에서 더 개시될 것이다.

<98>

실시예 1: APF-YB2/0 세포주의 적응 및 클로닝

<99>

5% FBS로 보충된 DMEM(DMEM+5%FBS)에서 배양된 랫트 하이브리도마 세포주, YB2/0 (C1083A)는 두가지 다른 방법에 의하여 APF 배지 CD-Hyb, CD-하이브리도마 (Gibco)에서 자라도록 적응되었다:

<100>

방법 1. 6mM 글루타민으로 보충된 CD-Hyb 배지에서 반복적으로 1:1로 계대하여 FBS 함유 배지로부터 천천히 세포를 분리하였다. 6번 계대 후, 세포는 APF 배지에서 자랄 수 있었다. 이러한 세포주를 C1083B(표 1)로 명명하였다. CD-Hyb 및 DMEM+5% FBS에서 C1083B의 성장 특성은 유사하다(도 3). DMEM+5% FBS를 이용한 제한 희석법에 의하여 C1083B로부터 각각의 클론을 분리하였다. 24개 클론을 대량화를 위해 옮기고, 이 실험으로부터 여덟개의 클론을 다음 연구를 위해 선택하였다. 이 여덟개 클론의 선택을 위한 기준은 평균 배가 시간(MDT), 쉐이크(shake)-플라스크 배양에서 높은 세포 밀도에 도달하는 능력과 다중 계대에 걸친 안정성이 포함된다.

표 1

세포주	유래	참고
C1083A	YB2/0	ATCC CRL-1662
C1083B	C1083A	CD-Hyb에 적응, 혈청이 없는 배지
C1083C	C1083B	fut8 mRNA 6배 더 발현
C1083D	C1083B	fut8 mRNA 2배 더 발현
C1083E	C1083B	C1083B의 서브클론
C1261A	C1083B	CNTO 860를 분비하는 형질 감염된 세포

<101>

<102>

방법 2. 6mM 글루타민으로 보충된 CD-Hyb 배지 중 96-웰 플레이트(각 종류당 5개 플레이트)의 웰 당 200, 500, 1000 또는 5000 C1083A 세포를 플레이팅하였다. 3주 동안 인큐베이션한 다음, 5000 세포/웰을 지닌 플레이트만이 약 10 웰/플레이트로 콜로니를 가진다. 24개 클론을 증식시키기 위하여 24-웰 플레이트로 옮겼다. 다른 연구를 위하여 평균 배가 시간, 쉐이크-플라스크 배양에서 높은 세포 밀도에 도달하는 능력과 다중 계대에 걸친 안정성을 기초로 네 개의 클론을 선택하였다.

<103>

12개 클론, 방법 1에 의해 생성된 8개 및 방법 2에 의해 생성된 4개를 CD-Hyb 배지 중에서 성장 특성, 예를 들어, 평균 배가 시간, 쉐이크-플라스크 배양에서 높은 세포 밀도에 도달하는 능력과 다중 계대에 걸친 안정성을 비교하였다. 네개의 클론을 다음 연구를 위하여 이들 실험으로부터 선택하였다(C1083B-1, C1083B-12, C1083-H18 및 C1083-H21). 넷 모두는 유사한 성장 특성을 지녔다. 그의 MDT는 약 22시간이었으며, 그들은 쉐이크-플라스크 배양에서 높은 세포 밀도($> 2 \times 10^6 / \text{ml}$)에 도달하였다(도 4). 그 다음, 네 세포주 중 셋, (C1083B-1, C1083B-12 및 C1083-H21)에서, 골수종 세포주 형질 감염을 위해 이전에 최적화된 설정(setting) 및 AMAXA 전기 천공기를 이용하여 그 형질 감염 효능을 결정하기 위하여 테스트하였다. 세포주 C1083B-12를 원하는 특성을 지닌 APF-YB2/0 세포주로서 본 연구로부터 선별하였으며, C1083B에 더하여 대신하는 형질감염 숙주 세포주로 적합할 것이다. 이는 C1083E로 명명된다.

<104>

실시예 2: 푸코오스-특이 톱틴에 저항성이 있는 YB2/0 클론의 분리

<105>

렉틴은 특정 타입의 올리고당을 발현하는 세포주를 선택하기 위하여 이용될 수 있다(Ripka and Stanley, 1986. Somatic Cell Mol Gen 12:51-62). 이용가능한 두 푸코오스-특이적 톱틴 중, C1083B를 이용한 Lens Culinaris Agglutinin (LCA)를 사멸 곡선(막대 그래프 형태로)을 생성하기 위하여 선택하였다(도 5). C1083B 세포 (DMEM+5% FBS에서 배양)를 다양한 농도의 LCA 톱틴의 존재 하에 96-웰 플레이트 중에 5000 세포/웰로 플레이팅하였다. 5일 후, 생존력을 알라마 블루(Alamar Blue) 분석으로 결정하였다(Vybrant Cell Metabolic Assay Kit, Molecular Probes, Inc.).

<106>

감소된 레벨의 fut8 mRNA (서열 번호 1)을 발현하는 C1083B의 드문 자연 변형체를 50ug/ml LCA의 존재 하에서 96-웰 플레이트에 5 세포/웰을 플레이팅하여 선택하였다. 3주 후, 17개 저항성 클론(플레이팅된 2×10^4 세포 중)을 확인하였다. 이들을 대량화하고, CD-Hyb 배지에서 수회 계대하였다. 17개 클론 중 8개 클론을 활발한 성장, 쉐이크-플라스크 배양에서 높은 세포 밀도에 도달할 능력 및 다중 계대에 걸친 배양의 안정성을 기초로 선택하였다. 전체 RNA를 이들 클론으로부터 분리하였다. 정량적 PCR은 랙트 특이적 fut8 Taqman 프로브 (밀줄) 및 프라이머 (진하게 표시) (서열 번호 2-7, 도 6A) 두 세트를 이용하여 실험하였다.

<107>

이들 분석은 한 클론(A4)이 6배 적은 fut8 mRNA를 가지며, 두 개의 다른 클론(A8 및 A9)이 약 2배 적은 fut mRNA를 갖는 것을 나타낸다(도 6B). 클론 A4는 C1083C로 명명하였으며, 클론 A9은 C1083D로 명명하였다. 도 7A 및 B에서의 데이터는 CD-Hyb 중 C1083C 및 C1083D에서 배양 배지의 부피 당 생존가능 세포(도 7A) 및 전체 세포 생존력(도 7B)에 기초한 성장 특성이 모 세포주, C1083B의 것과 유사하다는 것을 나타낸다.

<108>

실시예 3: 항-조직 인자 항체 DNA로 C1083B 세포의 형질 감염

<109>

마우스의 인간 이종 이식 암 모델에서 테스트하여 종양 성장을 줄이거나 예방하는 그 효능 때문에 선택된 CNTO 860, 항-인간-조직 인자 항체는 ADCC 활성에 의존적이다. 도 8에 나타낸 바와 같은 CNTO 860 중쇄 및 경쇄를 암 호화하는 발현 벡터(p2401 및 p2402)는 WO/04110363 및 미국 특허 출원 제11/010,797호에서 더욱 기술되어 있

으며, pSV2DHFR (Promega) 및 선별 마커 MHX(마이코페놀산, 하이포잔틴 및 잔틴)에 저항성이 있는 클론과 공동-형질 감염되며, ELISA로 이의 항체 발현이 분석된다. 하나의 고 발현 세포주, C1261A를 다음 연구를 위해 선택하였다. 이는 쉐이크 플라스크 배양에서 CD-Hyb 배지 중에 45-50mg/L를 생산하였으며, 다중 계대에 걸친 발현에서 안정성을 나타냈다(도 9). 성장 및 항체 역가를 1x지질 (Gibco)의 부재 및 존재 하에서 모니터하였다.

<110> **실시예 4: C1083B로부터 유래된 항-조직 인자 항체의 ADCC 활성 결정**

<111> 일련의 시험관내 ^{51}Cr -방출 세포독성 분석을 이용하여 일부 항-조직 인자 항체의 ADCC 활성 증진을 나타냈다: 인간 IgG4 Fc를 함유하는 CNT0859(EP833911B1에 개시); CNT0859와 동일한 항원 결합 영역을 가지나, 인간 IgG1 프레임워크로 클로닝되고, 이에 따라, 경쇄에서 서열 번호 9 및 중쇄에서 서열 번호 8의 서열을 지닌 인간화 항체를 생산하는 CNT0860 (2004년 12월 3일자 출원된 미국 특허 출원 제11/010797호에 개시); 및 YB2/0 CD-Hyb 적응된 세포주에서 CNT0860 항체 생산의 결과로서의 당화 변형체 또는 fut8-결합 변형체.

<112> 인간 결장 암종 세포를 발현하는 조직 인자, HCT 116을 표적 세포로 이용하였다. 세포를 10% 열-불활성화 FBS 및 1% LNN (M5A-10)로 보충된 McCoy's 5A 배지에서 유지시켰다. 분석일에, 세포에 트립신 처리를 하고, 수집하고, 37°C에서 2시간 동안 1 mL M5A-10 중 200uCi의 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (PerkinElmer Life Science, Boston, MA) 당 10×10^6 세포로 표지하였다. 표지된 세포를 칼슘 또는 마그네슘이 없는(PBS $^-$) 50 mL PBS로 2회 세척하고, 4×10^5 세포/mL M5A-10로 재현탁하였다.

<113> PBMC를 건강한 공여자로부터 분리하였다. 정맥의 혈액을 혜파린 처리한 주사기에 수집하고, 50 mL 코니컬튜브 (conical tube)로 동일한 부피의 PBS $^-$ 로 희석하였다(20mL: 20mL). 이 혈액이 13mL Ficoll-Paque (Amersham, Uppsala, Sweden) 아래에 위치되도록 하고, 실온(RT), 2200 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 상부 혈장 층을 흡입시키고, PBMC를 함유하는 경계면(담황갈색층)을 수집하였다. 작용자 세포를 PBS $^-$ 중에 3회 세척한 다음, 5×10^6 세포/mL로 M5A-10 중에 재현탁하였다. 25:1의 작용자-대-표적 비를 모든 실험에 이용하였다.

<114> 첫번째 실험에서, 조직 인자에 대한 모노클로널 항체, 이른바 CNT0 859, CNT0 860 및 CNT0 860 YB2/0의 ADCC 활성을 다른 두개의 공여자로부터의 PBMC를 이용하여 특성화하였다 (도 10A). 4 시간 후에 특정 용해를 결정하고 각 막대는 각 공여자에서 세번의 평균을 나타낸다. 자발적 및 최대 방출 대조 샘플을 각각 작용자 세포 없이 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항체의 존재 하에서 배지만으로 처리하거나 0.5% Triton X-100로 처리하였다. 각 샘플에서 특정 용해 퍼센트를 자발적 방출 cpm으로 보정하여, Triton X-100(최대 방출)에 의해 방출된 cpm에 기초하여 계산하였다.

<115> CNT0 859, IgG4 서브타입은 CNT0 860과 유사한 최소 ADCC 활성을 지니며, IgG1 서브타입은 마우스 골수종 숙주 세포주, C463에 의해 생산된다. 반대로, 그 EC₅₀ 및 최대 용해 값을 비교할 때, YB2/0 숙주 세포주 C1083B에서 유래된 CNT0 860은 C463에서 유래된 것보다 대략 20-60배 더 효능이 있다(도 10A). YB2/0 유래된 CNT0 860은 99% 푸코실화된 C463 유래 CNT0 860과 비교하여 40% 푸코실화되었다.

<116> 두번째 실험에서, 3개의 세포주에서 유래된 CNT0 860의 상대 ADCC 효능을 비교하였다, 이른 바 C463; 동물 단백 질이 없는 적응된 YB2/0 세포주, C1083B 및 fut8 고갈된 YB2/0 세포주, C1083C. 4 시간 후에 특정 용해를 결정하였으며, 막대는 단일 공여자로부터 세 값의 평균을 나타낸다.

<117> C1083B 세포주에서 유래된 CNT0 860은 마우스 골수종 세포주, C463에서 유래된 것보다 대략 10-배 더 효능이 있다(도 10B).

<118> 모 YB2/0 유래 세포주, C1083B 및 fut8 제거된 클론 A4-2, C1083C 사이에 ADCC 활성에서 차이가 발견되지 않았다. 이들 결과는 시험관내 분석 방법을 이용하여 측정가능하지 않은 푸코오스 레벨을 감소시켜 ADCC 활성에서 추가의 증가를 나타낸다.

<119> **실시예 5: 항체 당화의 분석**

<120> C463에서 생성된 CNT0 860의 MALDI-TOF-MS 분석 및 다양한 숙주 세포주의 형질 감염을 수행하였다. C463A에서 생성된 CNT0 860 (도 11A), APF 적응된 랫트 골수종 YB2/0 숙주 세포주, C1083B (도 11B) 및 fut8 제거된 YB2/0 숙주 세포주, C1083C(도 11C)를 공지된 프로토콜에 따라 MALDI-TOF-MS 분석하였다(Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000).

<121> 시험 Ab를 다른 방법으로 구조적으로 분석하였다. 인접 IgG Ab의 MALDI-TOF-MS 분석을 수행하기 위하여, IgG 샘

풀을 10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.0에 가져오고, ~1 mg/mL 완충액으로 농도를 적정하였다. 약 2 μ L의 기질 용액(0.1% 트리플루오로아세트산을 함유하는 물 중 1.0mL의 50% 아세토니트릴 중에 10 mg의 시나핀(sinnapinic acid)을 용해시켜 기질 용액을 준비) 및 2 mL의 상기 용액을 표적에 로딩하고, 공기 중에 건조되도록 하였다. Applied BioSystems (Foster City, CA)으로부터의 Voyager DE 기기를 이용하여 MALDI-TOF-MS를 얻었다.

<122> 방출된 Fc 클리칸의 MALDI-TOF-MS 분석을 수행하기 위하여, IgG 샘플(~50 μ g)을 37°C에서 4 시간 동안 10 mM Tris-HCl buffer (50 μ L) pH 7.0 중 PNGase F로 절단하였다. 50% 아세트산(~5 μ L)으로 반응 혼합물을 산성화시켜 절단을 정지시킨 다음, 이전에 개시된 바와 같은 양이온-교환 수지 컬럼을 통과하도록 하였다(Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000). Applied BioSystems (Foster City, CA)로부터의 Voyager DE 기기를 이용하여 다른 경우에서 개시된 바와 같이(Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000), 양성 및 음성 이온 모드에서 산성 및 중성 올리고당의 혼합물을 함유하는 샘플을 MALDI-TOF-MS로 분석하였다.

<123> 다른 YB2/0 세포에서 생산된 항체 샘플로부터 방출된 클리칸의 MALDI-TOF-MS 분석을 도 11A-C에 나타내었으며, 올리고당의 구조를 도 2A-E에 도시하였다. 코어 푸코오스의 존재, 양분하는 GlcNAc, 말단 당, 이를 테면, 시알산, 갈라토오스 등의 존재 또는 부재에 기초하여 올리고당의 서열을 넘버링하였다. MALDI-TOF-MS 데이터는 YB2/0 세포에서 생산된 항체 샘플이 증가된 양의 비-푸코실화 올리고당을 함유하는 것을 나타낸다(도 2A-B, 구조 1-15). 특정 항체 샘플에 대한 비-푸코실화 올리고당의 양은 50% 내지 95%로 다양하다. 또한, 양분하는 GlcNAc를 함유하는 비-푸코실화 올리고당의 증가는 YB2/0 유래 항체 샘플에서도 발견되었다. 더욱이, YB2/0 세포에서 유래된 항체 샘플은 올리고당을 함유하는 비-푸코실화 및 양분하는 GlcNAc의 존재로 인한 더욱 균질한 구조 및/또는 증가된 동질성을 함유한다. 반면, 다른 세포 타입에서 생산된 항체 샘플은 더욱 이질적인 올리고당 구조를 함유하는 경향이 있으며(도 2A-E, 구조 1-36), 이는 더 정의된 동질 올리고당 구조의 존재로 인해 증가된 활성을 갖는 치료적 항체 샘플을 생산하기 위한 YB2/0 세포의 값은 나타낸다. 더욱이, YB2/0 세포에서 생산된 항체 샘플은 다른 세포주, 이를 테면, HEK 또는 NS/0에서 생산된 항체 샘플과 비교하여, 고 만노오스 내용물을 갖는 구조를 더 낮은 퍼센트로 함유하는 경향이 있다(도 2E, 구조 31-36).

<124> 실시예 6: 항-TNF 알파 Mab의 C1083B/C 발현

<125> 일부 골수종 숙주 세포주 (Sp2/0, NSO 및 YB2/0)에서 CNT0 860 발현 레벨의 시험은 이러한 세포주에서 생산된 다른 항체와 비교하여 상대적으로 더 낮은 레벨의 항체 생산을 나타낸다. 이에 따라, 본 발명의 YB2/0-유래 숙주 세포주에서 발현을 위해 대신하는 항체를 선택하였다. C1083B YB2/0 세포 및 C1083C YB2/0 세포를 CNT0 148으로 명명된 인간 항-TNF 알파 Mab를 암호화하는 플라스미드(각각 플라스미드 p1783 및 p1776)를 암호화하는 중쇄(이 가변 영역은 서열 번호 10) 및 경쇄(이 가변 영역은 서열 번호 11)로 개시된 바와 같은 전기천공법으로 형질감염하였다(Knight et al., MoI Immunol 30:1443- 1453, 1993; WO02/012502). 형질감염된 YB2/0-유래 세포의 마이코페놀산-저항성 콜로니에서 인간 IgG에 대해 기재된 바와 같은 ELISA(Knight et al., 1993)로 그 배양 상충액에서 CNT0 148의 존재를 분석하였다. 형질감염체(#14 C1083B 형질감염체 및 #1 C1083C 형질감염체)를 1리터 부피까지의 IMDM, 5% FBS, 1% 글루타민, 1X MHX 선별(0.5 μ g/ml 마이코페놀산, 2.5 μ /ml 하이포잔틴, 50 μ g/ml 잔틴) 중에서 대량화하고, 세포 생존력이 <20%가 될 때까지 배양이 과성장하도록 하였다. 표준 단백질 A 크로마토그래피를 CNT0 148의 두 샘플을 정제하는 데 이용하였다. 정제하여 C1083B-형질감염된 세포로부터 1.3mg의 CNT0 148을 생산하고, C1083C-형질감염된 세포로부터 3.2mg의 CNT0 148을 생산하였다.

<126> C1083B-148-14 및 또 다른 클론, C1083B-148-33를 할로(Halo) 서브클로닝하였다. 클론 33, 이 중 한 서브 클론, 쉐이크 플라스크에서 발현된 ~89 μ g/mL C1083B-148-33-19으로부터의 1차 할로에서 21 할로를 선택하였다. 증식과 2차 할로에 따라, 서브 클론 C1083B-148-33-19-42는 쉐이크 플라스크에서 ~105 μ g/mL의 역가를 보유한다. 이 클론은 APF 배지에 적응된다.

<127> YB2/0-유래 CNT0 148의 생물분석 특성

<128> 올리고당(도 12A-C)을 방출하는 PNGase F의 MALDI-TOF-MS 분석은 YB2/0-유래 숙주 세포, C1083B로부터 80%를 넘는 올리고당과 C1083B가 푸코실화되지 않았음을 나타낸다. 예상 외로, C1083C-유래 CNT0 148의 푸코오스 내용물이 C1083B-유래 CNT0 148의 것보다 더 낮은 것으로 발견되었다(도 12 B & C). 푸코오스 없이 양분하는 GlcNAc의 증가된 양을 함유하는 이들 항체 샘플로부터의 올리고당은 또한 NS/0 숙주 세포에서 생산된 항체로부터의 올리고당보다 더 균질할 것으로 보인다(도 12A).

<129> YB2/0-유래 CNT0 148를 이용한 시험관내 ADCC 활성

<130> K2 또는 C480A 세포로 명명된 표적 세포는 성숙 사이토카인의 아미노산 1-12의 결실이 도입되어, 그 표면에서 막횡단 형태로 남아있는 재조합 인간 TNF를 안정적으로 발현하는 Sp2/0 마우스 골수종 세포주이다(Perez et al, 1990 supra). K2 세포는 열 불활성화 FBS, 2mM L-글루타민, 1mM 피루브산 나트륨, 0.1mM 비필수아미노산 및 1X MHX 선별을 함유하는 이스코브(Iscove's) 배지에서 배양된다. K2 세포는 매 2-3일 마다 1:5로 계대된다.

<131> 분석 날에, K2 세포를 원심분리하고, PBS로 한번 세척하였다. 세포를 배양 배지를 이용하여 약 1×10^6 세포/ml로 적정하고, 15 마이크로리터의 BATDA 형광 표지 시약(Delfia EuTDA Cytotoxicity Reagent Kit, Perkin-Elmer Life Sciences)을 5ml의 세포에 첨가하였다(Blomberg et al., J hnmunl Methods 193:199-206, 1996). 세포를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 1000 rpm에서 5분 동안 PBS로 2회 세척하였다. PBMC 작용자 세포와 혼합하기 직전에, 표적 세포를 원심분리하고, 1% BSA를 함유하는 이소코브 배지 중에서 2×10^5 세포/ml로 재현탁하였다.

<132> 혜파린 처리된 진공 채혈로부터 혈액을 수집한 후에, PBMC 작용자 세포를 건강한 공여자로부터 분리하였다. 30 ml의 희석 혈액을 50 ml 코니컬 투브에서 15 ml의 Ficoll-Paque (Amersham, Uppsala, Sweden)의 상부에 층을 이루게 하고, 1500 rpm, 실온에서 30분 동안 원심분리하였다. PBMC를 함유하는 경계면(담황갈색층)을 수집하고, PBS로 2회 세척하고, 1200 rpm, 실온에서 10 분 동안 원심분리하였다. 5% 열 불활성화 FBS, 2mM L-글루타민, 1mM 피루브산 나트륨 및 0.1mM 비필수 아미노산을 함유하는 이소코브 배지 중에 세포로 재현탁하였다. PBMC를 4°C에서 밤새 OKT3(PBS 중 10 ug/ml, Ortho Pharmaceutical)으로 코팅하고, PBS로 행군 100 mm 조직 배양 접시에서 인큐베이션하여 5% CO₂, 37°C에서 약 4시간 동안 활성화시켰다. PBMC를 수집하고, 1% BSA를 함유하는 이소코브 배지로 한번 세척하고, 수를 세고 약 1×10^7 세포/ml로 재현탁하였다.

<133> CNT0 148 테스트 샘플을 이소코브, 1% BSA 배지에서 연속하여 희석하였다. 50 μ l의 표적 세포 (-10,000) 및 100 μ l의 항체를 둘근 바닥의 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 50 μ l의 작용자 세포(~500,000 세포)를 혼합물에 첨가하고, 플레이트를 1000rpm에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다. 작용자 세포 대 표적 세포의 비(E:T)는 50:1 이었다. 백그라운드(background) 형광을 측정하기 위하여, 항체를 지니지 않은 배지 중 작용자 세포 및 표적 세포의 혼합물과 웰을 인큐베이션하였다. 최대 형광을 확립하기 위하여, 10 μ l의 용해 용액 (Delfia EuTDA Cytotoxicity kit에서)를 백그라운드 웰에 첨가하였다. ADCC 분석을 위하여, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 약 2시간 동안 인큐베이션하였다. 20 μ l의 상층액을 96웰의 납작한 바닥 플레이트에 옮겼다. Europium 용액 (Delfia EuTDA Cytotoxicity Kit) 200 μ l를 첨가하고, 플레이트를 플레이트 쉐이커에 실온에서 10분 동안 놔두었다. 시간 분석 형광계, En Vision Instrument (Perkin-Elmer Life Sciences)로 형광을 측정하였다. 각 샘플에서 특정 용해 퍼센트를 다음 식에 따라 계산하였다: % 특이적 방출 = ([실험적 방출-자발적 방출] ÷ [최대 방출-자발적 방출]) X 100.

<134> ADCC 분석의 결과는 C1083B-유래 CNT0 148이 마우스 골수종 세포로부터의 참조 물질, CNT0 148 보다 약 70배 더 유력한 것을 나타낸다(도 13). C1083C-유래 CNT0 148는 C1083B-유래 CNT0 148과 본질적으로 동일한 효능을 나타내며, 생물분석 데이터는 그들이 매우 유사한 레벨의 푸코오스를 갖는 것을 나타내었다. 푸코오스 레벨에서 기대치 않은 유사성의 결과로서, 이들 Ab 로트(lot)는 매우 낮은 레벨의 푸코오스(10-20%)가 시험관 내에서 CNT0 860(생체 내에서 2C11)로 관찰되는 푸코오스의 중등 레벨(40- 50%)을 갖는 것과 비교하여 ADCC 활성이 증진되지 않는지 테스트하기 위한 수단을 제공하지 않는다. 그럼에도 불구하고, 이러한 결과는 대신하는 숙주 세포에서 발현되는 동일한 Ab와 비교하여 매우 증진된 ADCC 활성을 나타내는 C1083B 또는 C1083C에서 발현된 Ab의 또다른 예를 제공한다.

<135> 실시예 7: HEK 293E 세포, C1083A 세포 및 C1083C 세포에서 발현되는 항-CD3 AB의 생체내 작용제 활성

<136> 항-CD3 모노클로널 Ab에 의한 T 세포 활성화가 이들 Ab가 Fc γ 수용체 (Fc γ Rs)에 결합하는 능력에 의존적인 것을 나타내는 이전 기록에 기초하여, 마우스가 그의 Fc 글리칸에서 상이한 레벨의 푸코오스를 지니는 인간 IgG1 Ab에 대한 상이한 정도의 Fc-의존적 반응을 나타내는지 여부를 테스트하기 위하여 단순한 모델 시스템을 사용하였다. 재조합 햄스터 항-마우스 CD3 ϵ -쇄 Ab, 145-2C11 (2C11)를 본 연구를 위해 이용하였다. 단쇄 Fv 버전 2C11을 암호화하는 플라스미드는 Dr. Jeffrey Bluestone (University of California, San Francisco)로부터 제공받았다. 이 플라스미드에서 중쇄 및 경쇄 가변(V) 영역 암호화 서열은 이전에 PCR-증폭시키고, 증폭된 DNA 단편은 첫번째로 게놈 중쇄 및 경쇄 V 영역 벡터로 클로닝한 다음, 각각 마우스 IgG2a 및 카파 쇄를 위한 게놈 불변 영역 발현 벡터로 클로닝하였다.

<137>

2C11의 인간 IgG1 변형체를 제조하기 위하여, 중쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 이전에-제조된 플라스미드 중 하나, p2213에서 증폭시키고, 인간 G1 불변 영역 암호화 서열을 함유하는 두개의 상이한 발현 벡터로 클로닝하였다. 이로써 Ab 유전자 전사가 CMV 프로모터에 의해 구동되는 발현 플라스미드 p2648과 전사가 마우스 면역글로불린 프로모터에 의해 구동되는 p2694가 생성된다. 2C11 경쇄가변 영역은 플라스미드 p2208에서 증폭시키고, 인간 카파 불변 영역을 함유하는 발현 벡터로 클로닝하였으며, 이는 CMV 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로 구동된다. 이로써 Ab 유전자 전사가 CMV 프로모터에 의해 구동되는 발현 플라스미드 p2623과 전사가 마우스 면역글로불린 프로모터에 의해 구동되는 p2669가 생성된다. CMV 프로모터-함유 플라스미드는 HEK 293E 세포에서 일시적으로 발현된다. 약 3.5×10^8 세포를 성장 배지(10% FBS와 함께 DMEM) 중 10층 세포 스택(Corning)에서 밤새 37°C, 5% CO₂에서 성장시켰다. 1.4 ml의 리포택타민 2000과 40ml의 Optimem (Invitrogen, Inc.) 중 각각의 p2648 또는 p2622 및 p2623 300 μ g을 혼합하여 제조된 형질감염 혼합물을 세포 스택에 첨가하고, 밤새 37°C에서 인큐베이션하였다. 다음 날, 형질감염 혼합물을 지닌 배지를 293 SFMII (Invitrogen, Inc.) + 4 mM 소듐 부티레이트 1ℓ에 넣고, 세포를 37°C에서 4일 동안 인큐베이션하였다. 발현된 항체를 함유하는 상층액을 수집하고, 원심분리하여 맑아지게 하고, 0.8 마이크론으로 여과하였다. 발현된 항체를 표준 단백질 A 친화도 크로마토그래피로 정제하였다.

<138>

면역글로불린 프로모터-함유 플라스미드를 안정적인 형질감염을 통하여 C1083A 및 C1083C YB2/0 세포에 도입하였다. 약 2×10^7 YB2/0 세포를 각각의 플라스미드 p2694 및 p2669 10 μ g으로 전기천공법에 의하여 형질감염시키고, 10% FBS, NEAA, L-글루타민 및 피루브산 나트륨으로 보충된 알파 MEM을 함유하는 성장 배지 중 96-웰 세포 배양 접시에 플레이팅하였다. 마이코페놀산으로 플라스미드가 안정적으로 통합된 세포를 선택하였다. 항체-분비, 마이코페놀산-저항성 클론을 항-인간 IgG ELISA로 스크리닝하였다. 고-발현, 안정적 클론을 5% FBS를 함유하는 배양 배지에서 대량화하였다. 발현된 항체를 표준 단백질 A 친화도 크로마토그래피로 정제하였다.

<139>

C1083A YB2/0에서 발현되어 준비된 2C11 huG1 Ab는 상기 실시예 5 및 6에 나타낸 바와 같이 MALDI-TOF-MS를 수행하였다(도 14). 이러한 분석은 혈청의 존재하에서 배양될지라도, 세포주가 계속 당화 산물 Ab를 생산하는 것을 나타내며, 여기서 우세한 종은 비-푸코실화된 것이다(도 2에서 구조 2). 2C11 제제는 Fc γ R-결합능이 결여된 대조군 Ab를 제조하기 위하여 효소적으로 탈당화시켰다. 37°C에서 24 시간 동안 1000 유닛의 PNGase F로 Ab를 처리하여 탈당화를 수행하였다(1.0 mL의 완충액 중 -10 mg Ab). 또다른 분주액의 효소를 첨가하고, 추가 24시간 동안 계속 인큐베이션하였다. 탈당화 IgG 샘플을 HiTrap Protein A 컬럼을 이용하여 정제하고, 인산-완충 용액, pH 7.0에 제제화하였다. 2C11 Gn0라 명명되는 만들어진 당형(glycoform)이 완전히 탈당화된 것이 MALDI-TOF-MS에 의해 나타났다(데이터 나타내지 않음).

<140>

분광광도법, 뿐 아니라 SDS-폴리아크릴아미드 젤의 염색에 의하여 OD₂₈₀을 측정하여 각 Ab 샘플의 농도를 결정하였다. LAL 분석을 모든 테스트 Abs에서 수행하여, 오염된 엔도톡신 레벨을 결정하였다. MALDI-TOF-MS 및 HPLC 분석을 상기 개시된 바와 같이 수행하였으며, 이는 HEK 293E-유래 Ab (2C11 huG1, HEK), C1083A-유래 Ab (2C11 huG1, C1083A), 및 C1083C-유래 Ab (2C11 huG1, C1083C)에서 각각 Fc 글리칸이 약 95%, 40%, 및 15% 푸코실화된 것을 나타내었다. 신선하게 분리된 마우스 비장 세포에서 CD3에 대한 정량적 결합 분석에서, 세개의 상이한 Ab 제제의 항원 친화도가 검출가능하지 않은 차이를 갖는 것으로 보인다(데이터는 나타내지 않음).

<141>

그의 생체내 T 세포 활성화 특성에 관하여 세 개의 Ab를 서로 비교하여 평가하기 위하여, 정상 암컷 Balb/c 마우스 (Charles River Laboratories)에 다양한 양의 테스트 Ab를 단일 복강내 주사로 투여하였다. 테스트 Ab를 주사하고 약 24 시간 후, CO₂ 질식으로 모든 마우스를 안락사시키고, 심장 천공으로 말단 혈액 샘플을 수집하고, 비장을 수집하고, 차가운 수집 배지 (RPMI 1640, 5% 열로 불활성화된 우태아 혈청, 1% L-글루타민)를 함유하는 투브에 넣었다. 비장을 100 μ m 나일론 그물 체를 통해 천천히 가압하고, RPMI-1640 배지로 한번 세척하여 비장세포의 단일 세포 혼탁액을 제조하였다. 그 다음 제조자의 지시에 따라(Pharmingen), 단일 세포 혼탁액에서 NH₄Cl 저장성 용해 용액을 이용하여 무핵의 적혈구를 제거하였다. 비장 세포를 PBS, 0.2% 소듐 아지드를 지닌 0.5% BSA로 2회 세척하고, 재현탁하였다. 비장 세포를 CD4 PE⁺/CD25 APC⁺/CD8 및 7-AAD 생존력 염색을 이용하여 면역염색하고 유동 세포 분석법으로 분석하였다. 항-CD16/CD32 mAb, 2.4G2의 존재 하에서 모든 수행을 수행하여, Fc 수용체 결합에 의해 매개되는 염색을 차단하였다.

<142>

동일한 정도의 T 세포 활성화를 성취하기 위하여 4배 더 Ab를 투여할 필요가 있는 고-푸코오스 변형체와 비교하여 중등-푸코오스 변형체로 투여된 마우스에서 더 큰 T 세포 활성화가 나타나는 것으로 보인다(도 15).

<143> 그러나, 낮은-푸코오스 변형체는 중등-푸코오스 변형체보다 더 활성이 있는 것이 아니었으며, 이는 마우스에서 낮은-푸코오스 변형체의 최대로 증진된 Fc 기능을 성취하기 위하여 푸코오스를 완전히 제거할 필요가 없는 것을 제안한다. 인간 낮은-친화도 Fc γR 중 하나, Fc γRIIA가 Fc 푸코오스 레벨에 대하여 민감한 것으로 주어졌으며, 이러한 발견은 마우스가 이전에 생각한 것보다 인간 세포에 의한 Fc-의존적 반응을 더 밀접하게 모방하는 것을 제안한다.

<144> 본원에 참조로 인용된 모든 문헌 및 특허는 기재된 본 발명과 연결되어 사용될 수 있는 문헌에서 기술된 예를 들어, 자체 및 방법을 설명하고 개시할 목적으로 삽입되었다. 본문을 통해 상기 기술된 문헌은 본 출원의 출원일 전에 그 개시를 위해 단독으로 제공된다. 본원에서 어느 것도 선행 발명의 장점에 의하여, 발명자들이 그러한 개시를 앞당기도록 하는 것으로 이해되지 않을 것이다.

도면의 간단한 설명

<14> 도 1은 전형적 IgG 하위 분류 포유동물 항체, 도메인 및 당화점을 도시적으로 나타낸 것이다.

<15> 도 2A-2E는 자연의 또는 포유 동물 세포 유래된 재조합 항체와 회합된 우세한 바이안테너리 올리고당 구조를 나타낸다: 당 구조 약어 Fuc = 푸코오스; Gal = 갈락토오스; Glc = 글루코오스; GlcNAc = N-아세틸글루코사민; Man = 만노오스; 및 NANA* = 시알릴 (N-아세틸뉴라민산).

<16> 도 3A 및 3B는 혈청이 없는 배지 및 혈청을 함유한 배지에서 배양된 다양한 세대에 걸친 APF-YB2/0 (C1083B) 세포주의 성장 및 생존력의 비교를 나타낸다. C1083B를 DMEM+5% FBS 및 6mM 글루타민으로 보충된 CD-Hyb 배지에서 배양하였다. 세포를 $2-3 \times 10^5$ 세포/ml의 씨딩(seeding) 밀도를 이용하여 주당 세번 계대하였다: (A) 성장 곡선 및 (B) 생존력.

<17> 도 4는 C1083B로부터 유래된 4개의 APF-YB2/0 세포주의 상대적 성장 특성을 나타낸다. CD-Hyb에 적응된 클론을 두가지 방법, 예를 들어, 분리 (C1083B-1 및 C1083B-12) 및 직접 선택 (C1083-H18 및 C1083-H21)으로 분리하였다. 세포를 6mM 글루타민으로 보충된 CD-Hyb에서 배양하였다. 세포를 $2-3 \times 10^5$ 세포/ml의 씨딩(seeding) 밀도를 이용하여 주당 세번 계대하였다:

<18> 도 5는 5일 후 C1083B에 대한 LCA 텍틴의 독성을 나타내는 그래프이다.

<19> 도 6A 및 도 6B는 다음을 나타낸다: (A) 프로브 및 프라이머 세트의 위치를 지니는 랫트 fut8 mRNA의 뉴클레오티드 서열(Genbank (NM_001002289)) 및 표시된 C1083B의 변형체에서 fut8 mRNA의 발현('Primer Express' 소프트웨어 (Applied Biosystems)를 이용해 디자인된 프라이머 (밑줄) 및 프로브 (진하게)) 및 (B) C1083B에서 유래된 8개의 텍틴-저항성 세포주의 QPCR 분석. 각 세포주는 DMEM+5% FBS에서 배양되며, 1×10^7 세포를 대수성장기 (exponential phase)에서 수집하였다. 각 클론에서 fut8 mRNA의 레벨을 QPCR로 분석하였다.

<20> 도 7A 및 도 7B는 C1083B로부터 유래된 푸코오스-제거 클론의 (A) 생존가능한 세포 농도 및 (B) 생존력을 나타낸 그래프이다. 세포주는 6mM 글루타민으로 보충된 CD-Hyb 배지에서 배양된다.

<21> 도 8A 및 8B는 세포주 생성에 이용되는 CNTO 860 발현 벡터를 개략적으로 나타낸 것이다: (A) 중쇄 발현 벡터인 p2401 및 (B) 경쇄 발현 벡터인 p2402.

<22> 도 9A 및 9B는 CNTO 860를 발현시키는 세포주인 C1261A의 안정성, 시간에 걸쳐 C1083B로부터 엔지니어링된 항-조직 인자 항체를 나타내는 그래프이다. 쉐이크-플라스크 배양에서 CD-Hyb 배지(Gibco)에 11번째 계대 세포를 두번 씨딩하였다(2×10^5 /ml). 1x 지질 (Gibco)의 부재 및 존재 하에서 성장 및 항체 역가를 모니터하였다.

<23> 도 10A 및 10B는 (A) 마우스 골수종 세포주 C463 및 랫트 YB2/0 숙주 세포주 C1083B에서 생성된 CNTO 859 및 CNTO 860에 의해 도출되는 용량 의존적인 항체 특이적 세포 용해를 나타내는 막대 그래프이다. (B) C1083B 및 fut8 제거된 YB2/0 세포주 C1083C (A4-3)와 비교하여, C463에서 CNTO 860과의 ADCC 차이를 나타내는 막대 그래프이다.

<24> 도 11 A-C는 다양한 세포주에 의해 생성되는 CNTO860의 MALDI-TOF-MS 분석으로부터 추적되는 기록계를 나타낸다; (A) C463A, APF 적응된 랫트 골수종 YB2/0 숙주 세포주에서 (B) C1083B, 및 (C) fut8 결합 YB2/0 숙주 세포주, C1083C.

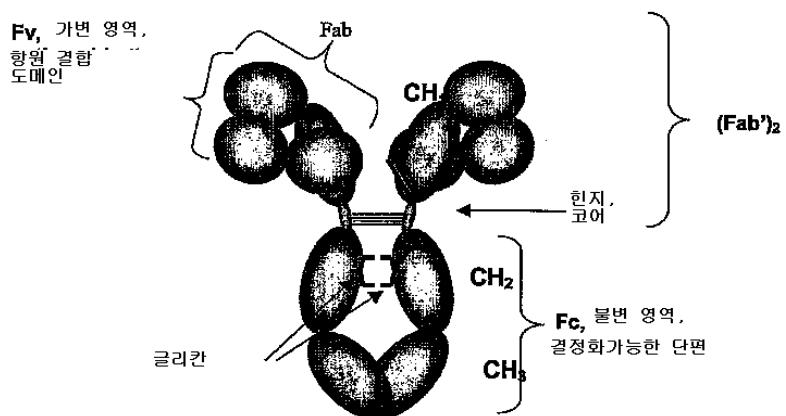
<25> 도 12A-C는 다양한 세포주에 의해 생성되는 CNTO 148의 MALDI-TOF-MS 분석으로부터 추적되는 기록계를

나타낸다; (A) C463A, APF 적응된 랫트 골수종 YB2/0 숙주 세포주에서 (B) C1083B, 및 (C) fut8 결합 YB2/0 숙주 세포주, C1083C.

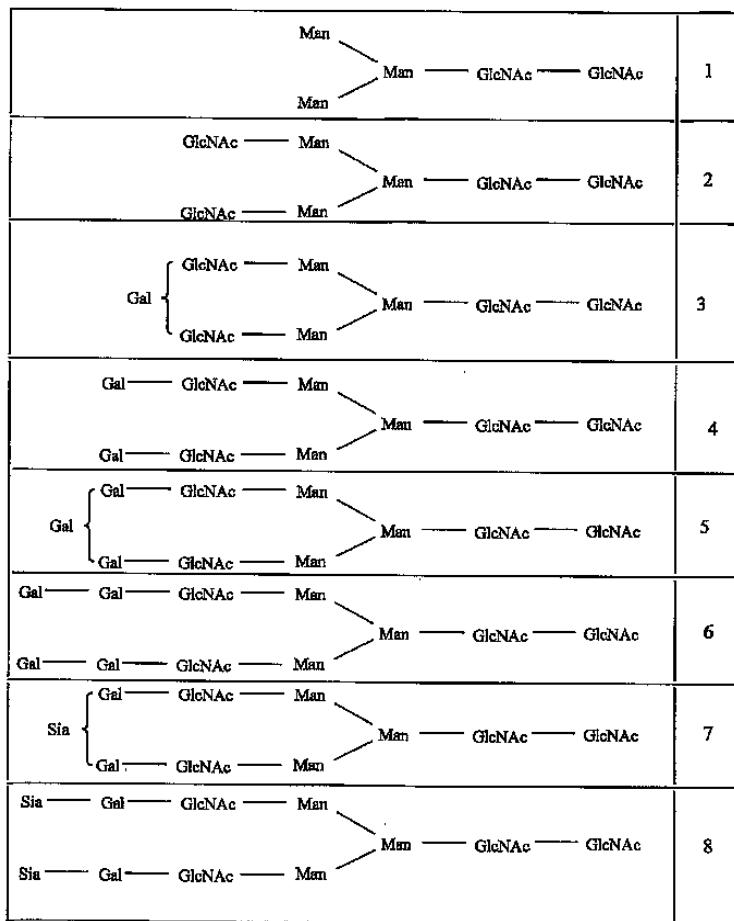
- <26> 도 13은 다른 숙주 세포에서 발현되는 항-TNF알파 Mab, CNTO 148의 몇몇 뱃취(batch)에서 농도-의존성 및 상대적 ADCC 활성을 나타내는 그래프이다(표적 세포 특이적 용해에 의하여 측정).
- <27> 도 14는 YB2/0 숙주 세포주, C1083A에 의해 생산된 2C11 항-CD3 Mab의 MALDI-TOF-MS 분석으로부터 추적한 기록계를 나타낸다.
- <28> 도 15는 기록된 다양한 항체 제제로 투여된 마우스에서 수집한 비장 세포에서 비장 세포 마커에 의해 측정된 T-세포 활성화를 나타낸 그래프이다.

도면

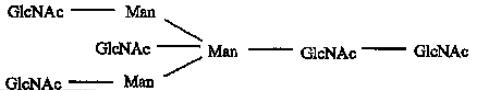
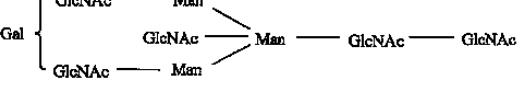
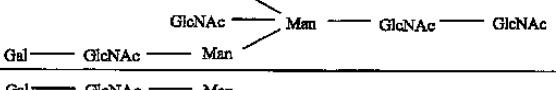
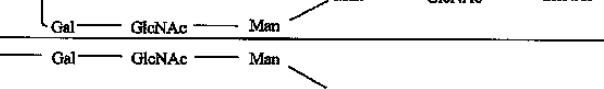
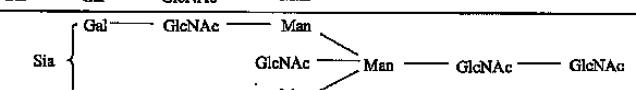
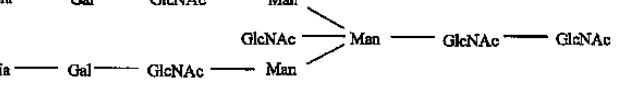
도면1



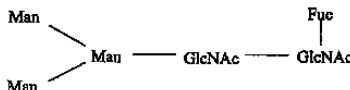
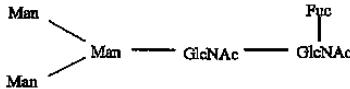
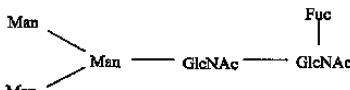
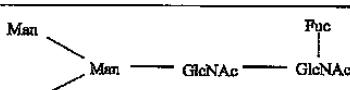
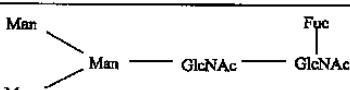
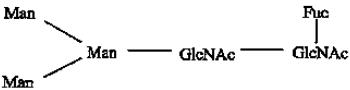
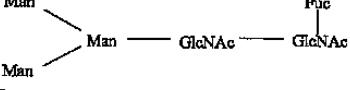
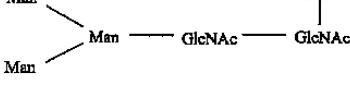
도면2A



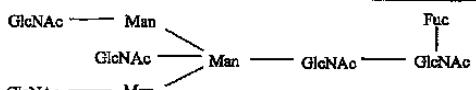
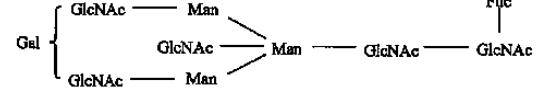
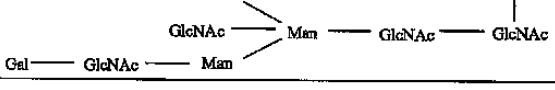
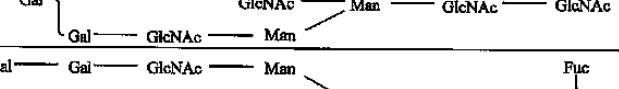
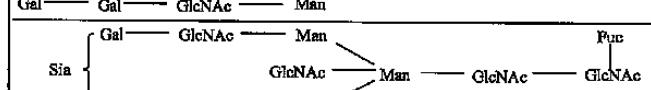
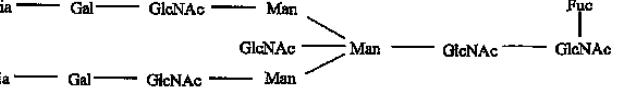
도면2B

	9
	10
	11
	12
	13
	14
	15

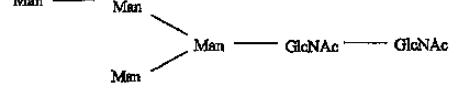
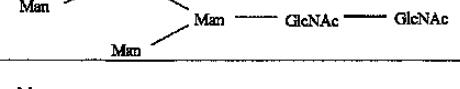
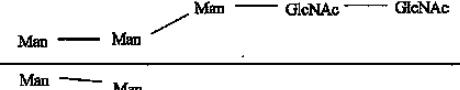
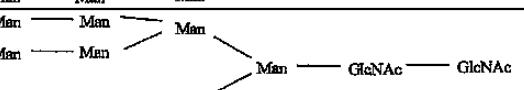
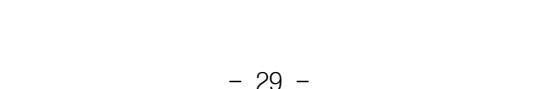
도면2C

	16
	17
	18
	19
	20
	21
	22
	23

도면2D

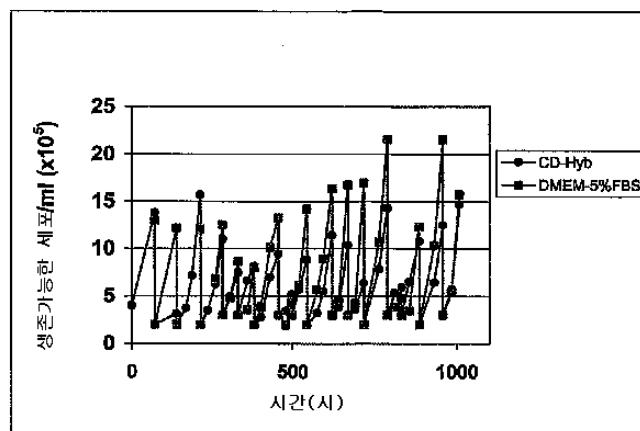
	24
	25
	26
	27
	28
	29
	30

도면2E

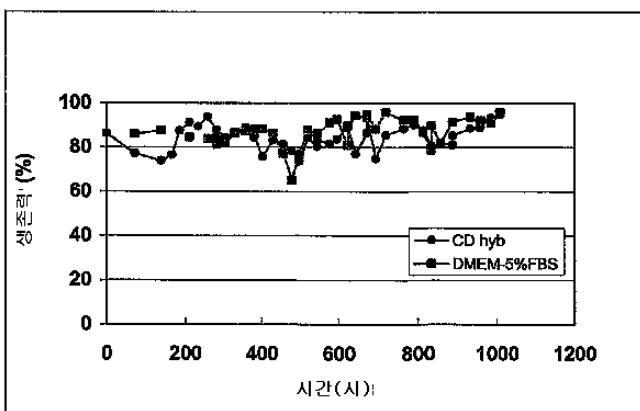
	31
	32
	33
	34
	35
	36

도면3

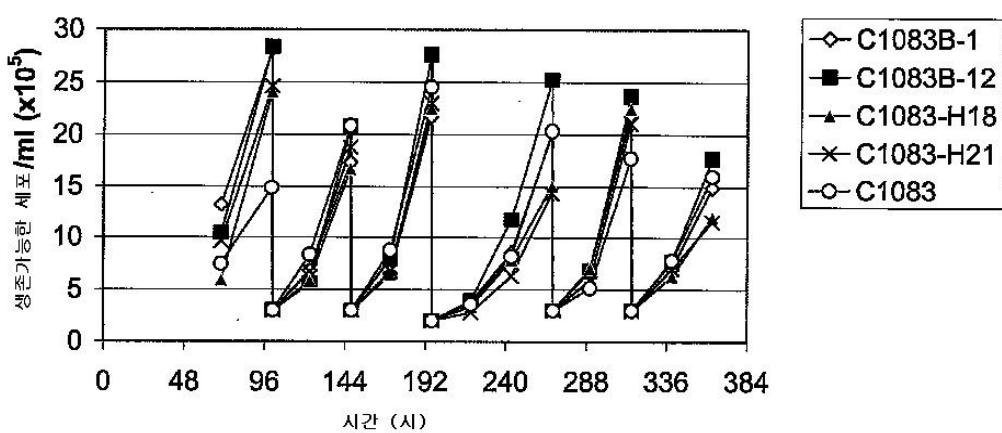
도 3A



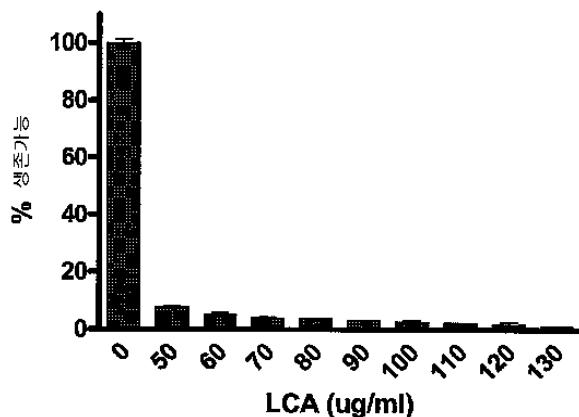
도 3B



도면4



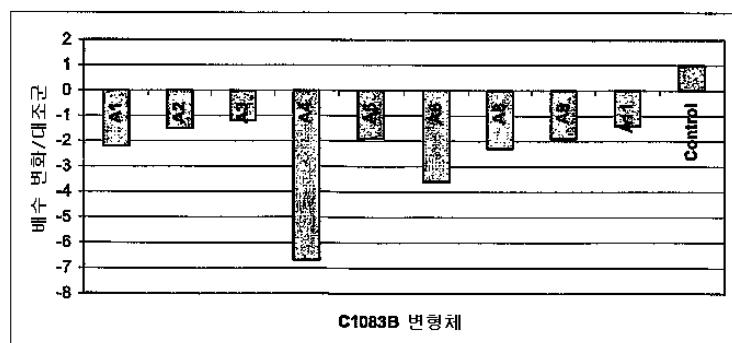
도면5



도면6

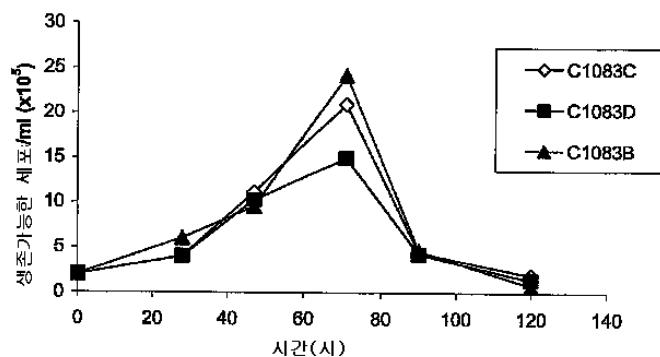
— 6A —

도 6B

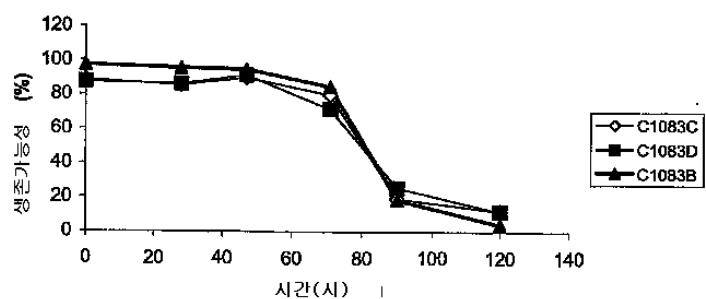


도면7

도 7A

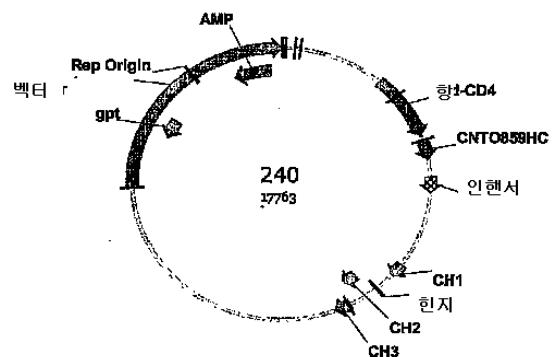


도 7B

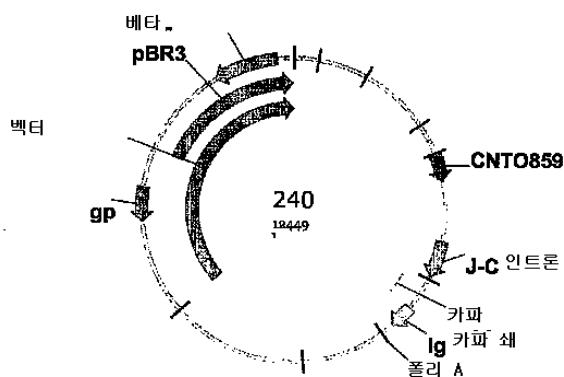


도면8

도 8A

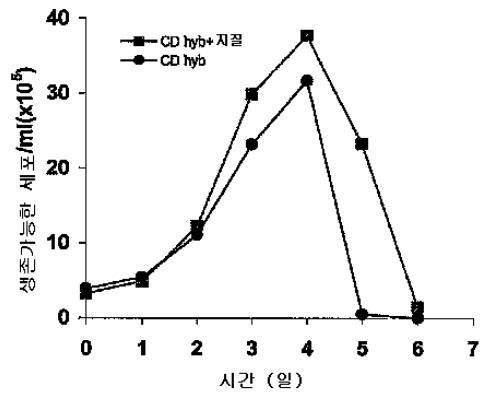


도 8B

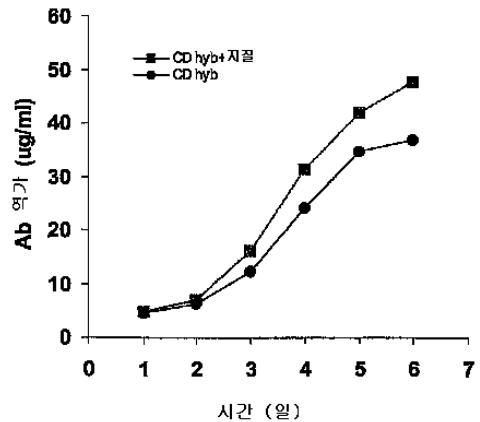


도면9

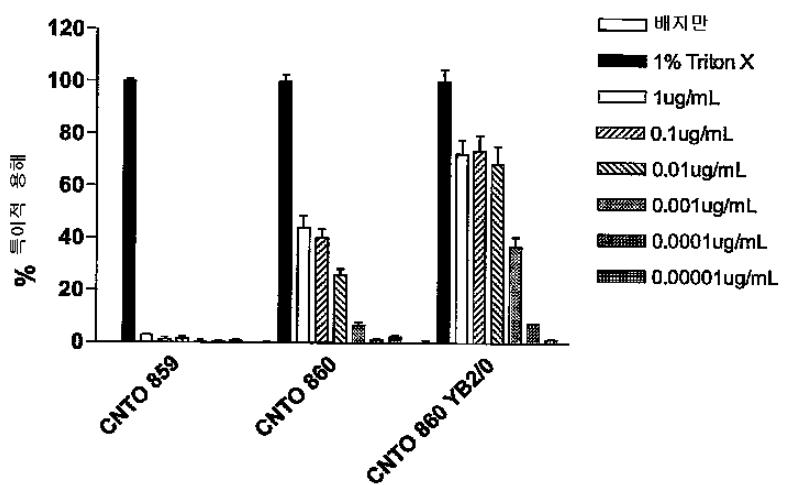
도 9A



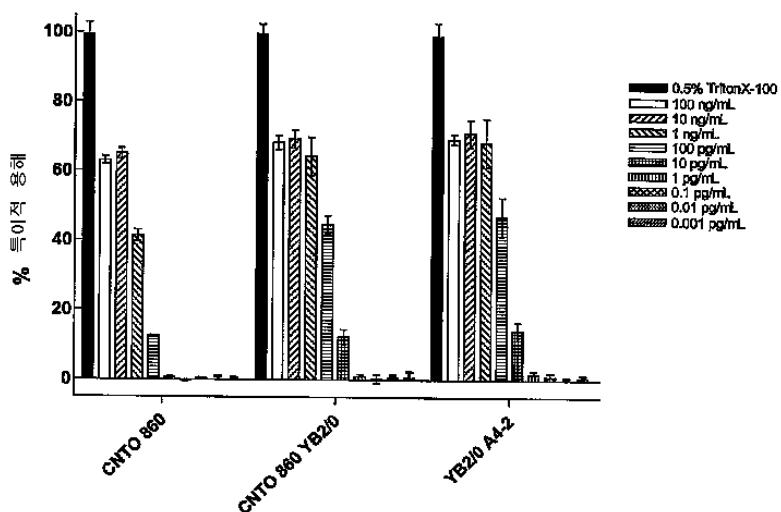
도 9B



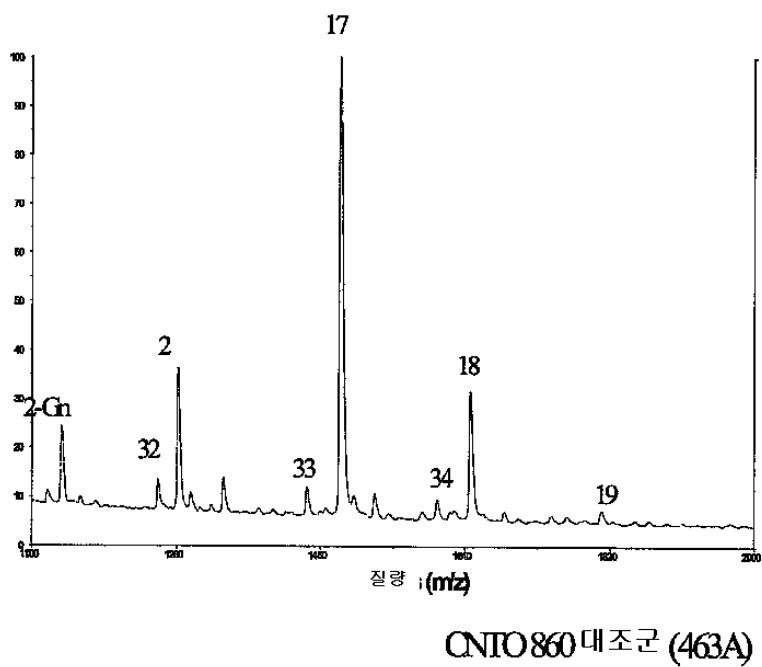
도면10A



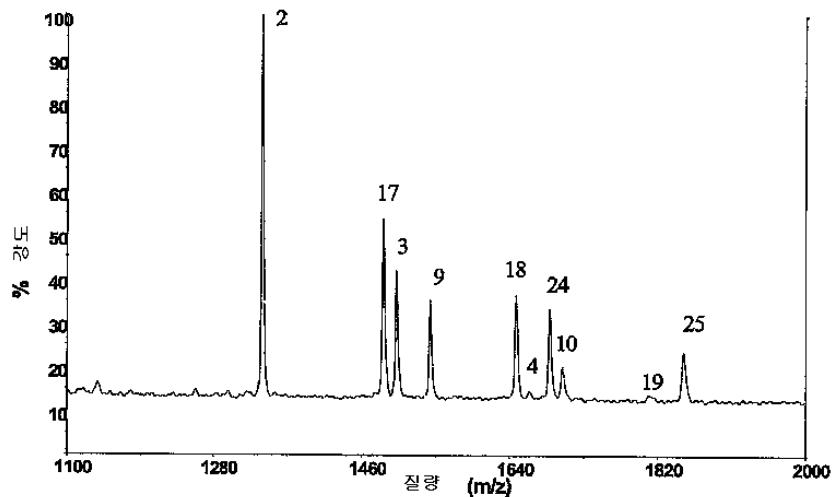
도면10B



도면11A

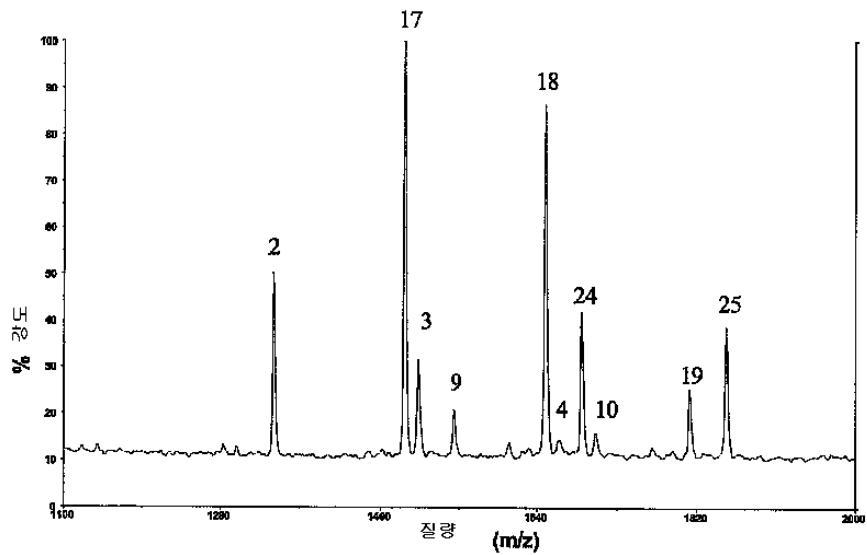


도면11B



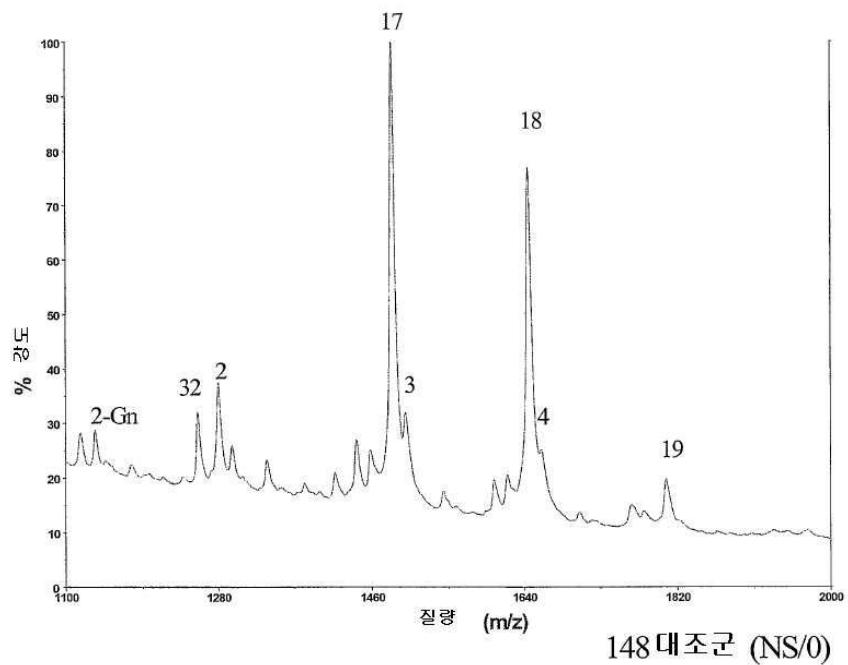
CNTO 860 (YB2/0)

도면11C

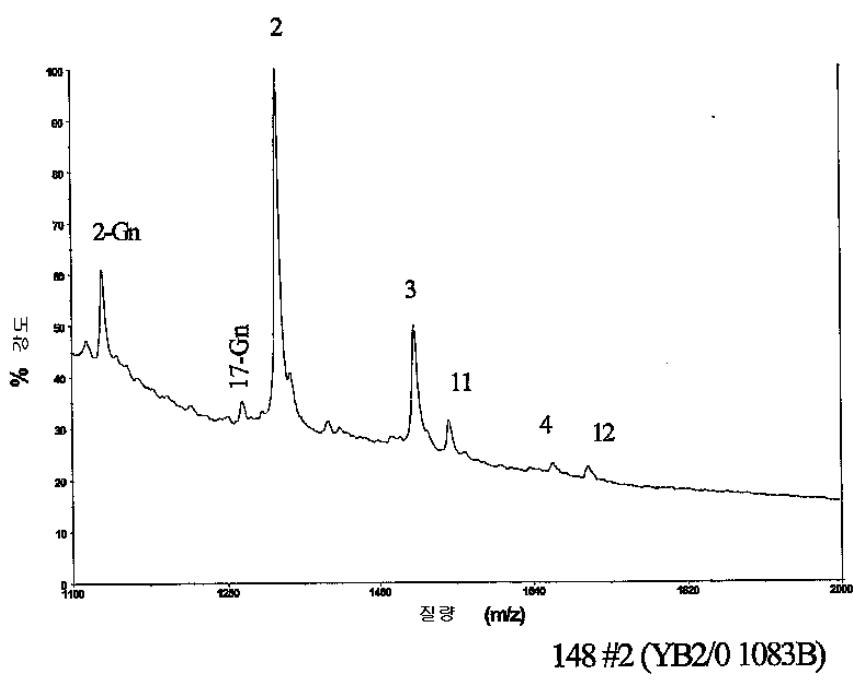


CNTO 860 (YB2/0 c1261A)

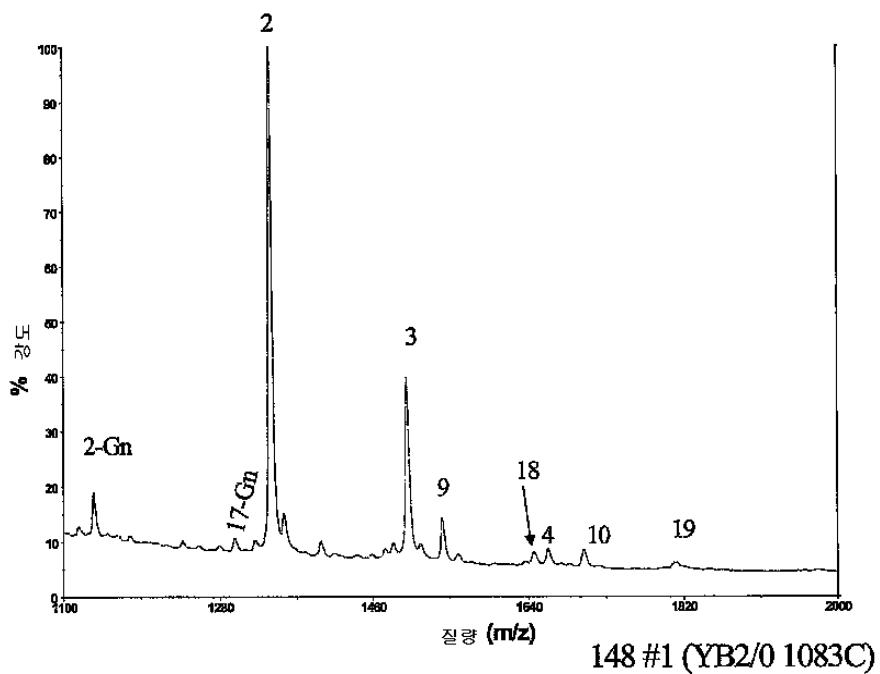
도면12A



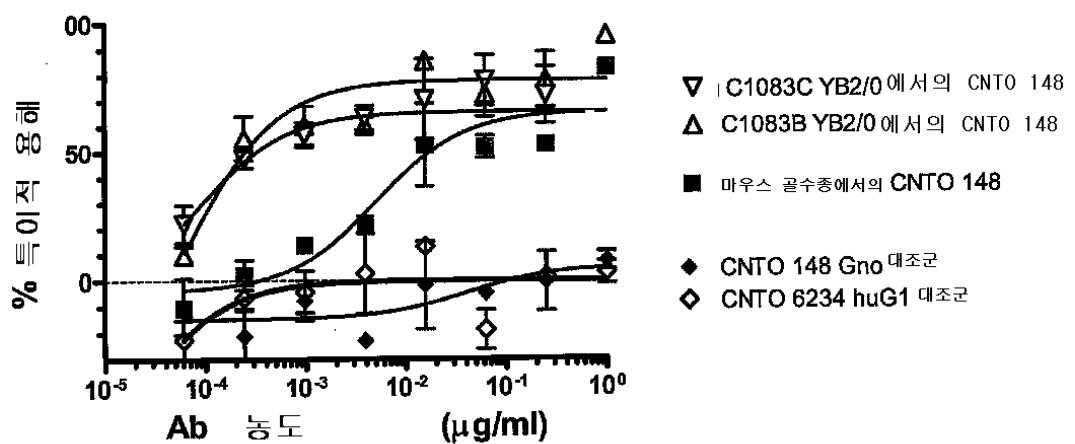
도면12B



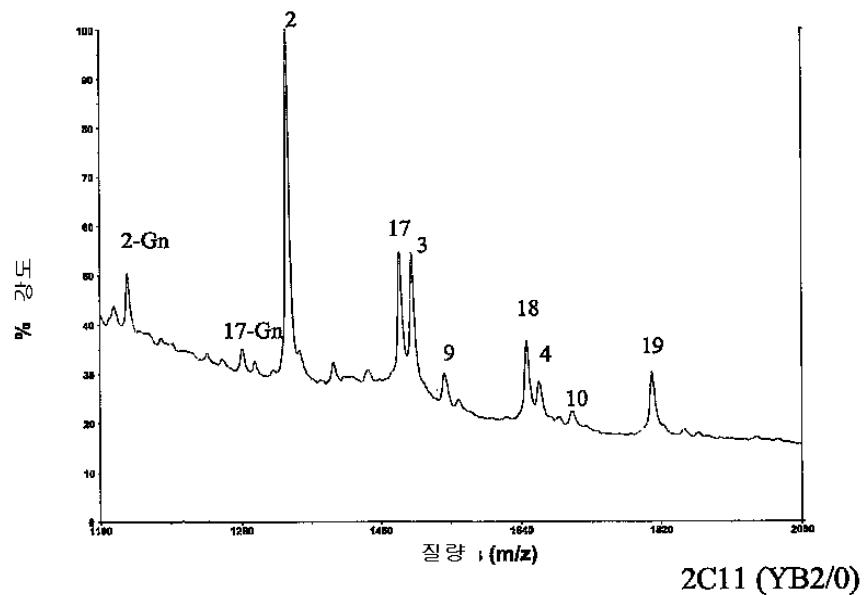
도면12C



도면13



도면14



도면15

