(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0021375
(43) 공개일자 2017년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7004543(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년09월10일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7031066
원출원일자(국제) 2007년09월10일
심사청구일자 2015년10월28일
(85) 번역문제출일자 2017년02월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/007877
(87) 국제공개번호 WO 2008/028686
국제공개일자 2008년03월13일
(30) 우선권주장
06090162.6 2006년09월10일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
글리코토페 게엠베하
독일 베를린 로버트-로슬레 슈트라쎄 10 (우:13125)
(72) 발명자
골츠, 슈테펜
독일 16548 글리엔닉케-노르트반 에흐호른슈트라쎄 24
다니엘치크, 안트제
독일 16341 판케탈 곤타르트슈트라쎄 11
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **항체 발현을 위한 골수성 백혈병 기원의 인간 세포의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 무한증식(immortalized) 인간 혈액 세포인 숙주 세포에서 단백질의 적어도 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 도입하는 단계; (b) 상기 숙주 세포를 단백질 조성물의 생성을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계; 및 (c) 단백질 조성물을 분리하는 단계를 포함하여, 규정된 글리코실화 패턴을 지니는 단백질 분자 조성물을 생성하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 5/0006 (2013.01)
C12N 5/0634 (2013.01)
(72) 발명자
바우마이스터, 한스
독일 14169 베를린 호흐시트츠베크 159
스탄, 레나테
독일 13125 베를린 에우펜너 슈트라쎄 11아
뢰프플러, 안자
독일 16244 에흐호르스트 슐슈트라쎄 21
스퇴클, 라르스
독일 12203 베를린 맘링어슈트라쎄 8

(30) 우선권주장
06090171.7 2006년09월18일
유럽특허청(EPO)(EP)
06090190.7 2006년10월13일
유럽특허청(EPO)(EP)
07090094.9 2007년05월04일
유럽특허청(EPO)(EP)

명 세 서

청구범위

청구항 1

단백질 분자 조성물을 생성하는 방법으로서,

(a) 단백질의 적어도 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을, 세포주 K562 [ATCC CCL-243]로부터 유래된 무한증식(immortalized) 인간 혈액 세포인 숙주 세포에 도입하는 단계;

(b) 상기 숙주 세포를 상기 단백질 분자 조성물의 생성을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계; 및

(c) 상기 단백질 분자 조성물을 분리하는 단계를 포함하며,

상기 숙주 세포는 하기 글리코실화 특징을 갖는 단백질 분자 조성물을 생성하도록 선택되는 방법:

(i) 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다;

(ii) 알파2-6 결합된 NeuNAc를 포함한다; 및

(iii) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 15% 더 높은 NeuNAc의 양을 갖는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 숙주 세포가 하기 하나 이상의 특징을 갖는 단백질 분자 조성물을 생성하도록 선택되는 방법:

(i) 검출가능한 말단 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다;

(ii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 2%의 탄수화물 구조를 포함한다;

(iii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 5%의 탄수화물 구조를 포함한다;

(iv) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 20% 더 많은 양의 NeuNAc를 지니는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다;

(v) 푸코오스가 결여된 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 적어도 하나의 특수한 탄수화물 사슬의 탄수화물 구조 또는 전체 탄수화물 유닛의 탄수화물 구조를 적어도 50%로 포함한다; 및

(vi) NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 NM-D4 [DSM ACC2605] 세포에서 얻어진 것보다 더 높은 시알릴화 정도를 가지며, 상기 NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 NM-D4 [DSM ACC2605] 세포는 상기 숙주 세포에 대해서 얻어진 시알릴화 정도의 50 내지 60%로만 얻어진다.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 숙주 세포가 하기 글리코실화 특징 중 하나 이상의 특징을 갖는 단백질 조성물을 생성하도록 선택되고, 단백질 분자가 하기 글리코실화 특징 (i) 내지 (v) 중 하나 이상을 갖는 단백질 분자 조성물을 생성하는 방법:

(i) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실

화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 증가된 갈락토실화 정도를 지닌다;

(ii) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 높은 G2 구조의 양을 지닌다;

(iii) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 낮은 G0 구조의 양을 지닌다;

(iv) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 낮은 푸코오스의 양을 포함한다; 및

(v) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 시알릴화 패턴에 비해 변경된 시알릴화 패턴을 지닌다.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 시알릴화 패턴이 하기 특징 중 하나 이상을 특징으로 하는 방법:

발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 20% 더 높은 NeuNAc의 양을 갖는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다; 및

발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비해, 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 상기 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서 하나 이상의 특정 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 20%를 초과하는 하전된 N-글리코시드에 의해 결합된 탄수화물 사슬을 포함한다.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 숙주 세포가 하기 특징 중 하나 이상을 포함하고, 당단백질을 생성하도록 선택되는 방법:

푸코오스가 결여된 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 10% 이상의 탄수화물 구조를 포함한다;

2등분(bisecting) GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 5% 이상의 탄수화물 구조를 포함한다;

상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조 또는 전체 탄수화물 구조 상에서 35%를 초과하는 G2 구조를 포함한다; 및

상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조 또는 전체 탄수화물 구조 상에서 22% 미만의 G0 구조를 포함한다.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 생성된 단백질 분자 조성물이 하기 특징 중 하나 이상을 포함하는 방법:

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시, 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물에 비해 증가된 활성 및 증가된 수율을 지닌다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시, 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물에 비해 개선된 균질성을 지닌다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자로부터의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 수율 보다 적어도 10% 더 높은 증가된 평균 또는 최대 수율을 지닌다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물에 비해 개선된 글리코실화 균질성인 개선된 균질성을 지닌다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물에 비해 증가된 활성을 지닌다;

상기 단백질 분자가 항체 분자인 경우, 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 Fc-매개된 세포의 세포독성 보다 적어도 2배 더 높은 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성을 지닌다; 및

상기 단백질 분자가 항체 분자인 경우, 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 결합 보다 적어도 15% 더 높은 증가된 항원-매개된 결합 또는 Fc-매개된 결합을 지닌다.

청구항 7

제 1항에 있어서, 숙주 세포가 하기 특징적인 글리코실화 조합을 지니는 단백질 분자를 포함하는 단백질 조성물을 생성하도록 선택되는 방법:

(a) 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다

검출가능한 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다

제 3항에 정의된 갈락토실화 패턴을 포함한다

제 3항에 정의된 푸코오스 함량을 지닌다

2등분GlcNAc를 포함한다

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 단백질 조성물에 비해 또는 시알릴화 결손 세포주에 비해 증가된 양의 시알산을 포함한다;

(b) 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다

검출가능한 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다

제 3항에 정의된 갈락토실화 패턴을 포함한다

제 3항에 정의된 푸코오스 함량을 지닌다

2등분GlcNAc를 포함한다

2-6 NeuNAc를 포함한다.

청구항 8

제 1항에 있어서, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6[DSM ACC 2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC 2856] 또는 이로부터 유래된 세포 또는 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 숙주 세포가 이용되는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 핵산이 숙주 세포로 도입되어 안티폴레이트 내성 DHFR-변이체를 엔코딩하고, 상기 숙주 세포가 상기 안티폴레이트와 함께 배양되는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 하기 특징 중 하나 이상이 충족되는 방법:

(a) 안티폴레이트가 메토트렉세이트이다; 및

(b) 상기 안티폴레이트 내성 DHFR 변이체를 엔코딩하는 핵산이 서열번호 1 내지 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 엔코딩한다.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 단백질이 종양 괴사 인자 TNF-알파 및 TNF-베타를 포함하는 사이토킨 및 이들의 수용체군; 레닌; 사람 성장 호르몬 및 소(bovine) 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상샘 호르몬; 갑상샘 자극 호르몬; 지질단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-사슬 및 B-사슬; 난포 자극 호르몬 (FSH), 황체형성 호르몬 (LH), 티로트로핀, 및 사람 융모생식샘 자극 호르몬 (hCG)를 포함하는 생식샘자극 호르몬; 칼시토닌; 글루카곤; 인자 VIIIC, 인자 IX, 인자 VII를 포함하는 응고 인자, 조직 인자 및 본 빌레브란트 인자; 단백질 C를 포함하는 응고방지 인자; 심방 나트륨배출촉진 인자; 폐 계면활성제; 유로키나아제, 사람 소변 및 조직 타입의 플라스미노겐 활성화제를 포함하는 플라스미노겐 활성화제; 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 엔케팔리나아제; 사람 대식세포 염증성 단백질; 사람 혈청 알부민을 포함하는 혈청 알부민; 뮬레리안-억제(mullerian-inhibiting) 물질; 레락신 A-사슬 및 B-사슬; 프로레락신; 마우스 고난도트로핀-관련된 펩티드; 혈관 내피 성장 인자; 호르몬 또는 성장인자 수용체; 인테그린; 단백질 A 및 D; 류마토이드 인자; 뼈 유래의 향신경성 인자, 뉴로트로핀-3, -4, -5, -6 및 신경 성장 인자-베타를 포함하는 향신경성 인자; 혈소판 유래한 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 표피 성장 인자; TGF-알파 및 TGF-베타를 포함하는 전환되는 성장 인자; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질; CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19를 포함하는 CD 단백질; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 이뮤노톡신; 뼈 형성 단백질; 인터페론-알파, -베타 및 -감마를 포함하는 인터페론; M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF를 포함하는 콜로니 자극 인자 (CSF's); IL-1 내지 IL-12를 포함하는 인터루킨 (IL's); 수퍼옥사이드 디뮤타아제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 가속화 인자; 항체 및 면역접합체; 글리코포린 A; MUC1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 단백질이 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 항체가 강글리오시드 GD3에 대한 항체, 사람 인터루킨-5 수용체 알파-사슬에 대한 항체, HER2에 대한 항체, CC 케모킨 수용체 4에 대한 항체, CD20에 대한 항체, CD22에 대한 항체, 신경모세포종에 대한 항체, MUC1에 대한 항체, 표피 성장 인자 수용체에 대한 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 항체가 판코맵(Pankomab), 뮤로모맵(Muromomab),다클리주맵(Daclizumab), 바실릭시맵(Basiliximab), 아브식시맵(Abciximab), 리툭시맵(Rituximab), 헤르셉틴(Herceptin), 겜투주맵(Gemtuzumab), 알렘투주맵(Alemtuzumab), 이브리투모맵(Ibritumomab), 세툭시맵(Cetuximab), 베바시주맵(Bevacizumab), 토시투모맵(Tositumomab), 파블리주맵(Pavlizumab), 인플릭시맵(Infliximab), 이쿨리주맵(Eculizumab), 에프라투주맵(Epratuzumab), 오말리주맵(Omalizumab), 에팔리주맵(Efalizumab), 아달리무맵(Adalimumab), 캄파쓰-1H(Campath-1H), C2B8, 파노렉스(Panorex), 브레바렉스(BrevaRex), 시뮬렉트Simulect), 안토바(Antova), OKT3, 제나팍스(Zenapax), 레오프로(ReoPro), 시나기스(Synagis), 오스타비르(Ostavir), 프로토비르(Protovir), 오바렉스(OvaRex), 비탁신(Vitaxin), 항-CC 케모킨 수용체 4 항체 KM2160, 및 항-신경모세포종 항체 chCE7로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 항체가 판코맵, 판코 1 및 판코 2를 포함하는 MUC1에 대한 항체, 헤르셉틴을 포함하는 HER2에 대한 항체, 세툭시맵을 포함하는 EGFR에 대한 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 16

제 1항에 있어서, 상기 단백질이

(i) 다른 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에 융합되거나,

(ii) 시토킨, 공-자극 인자, 독소, 다른 항체들로부터의 항체 단편, 다량체화 서열, 검출, 정제, 분비 또는 안정화용 서열, 국소화 시그널 또는 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 서열을 포함하는 다른 단백질 서열과 융합된 항체이거나,

(iii) 치료 효과를 매개하는 이펙터 분자에 항체 또는 항체 단편에 커플링된 항체 또는 항체 단편이다.

청구항 17

(a) 세포주 K562 [ATCC CCL-243]로부터 유래되고, 상이한 글리코실화 패턴을 제공하는 둘 이상의 상이한 숙주 세포에서 단백질 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 도입하는 단계로서, 세포주 K562 [ATCC CCL-243]로부터 유래된 상기 숙주 세포 중 하나 이상이 무한증식 인간 혈액 세포인 단계:

(b) 상기 둘 이상의 상이한 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 각 상이한 숙주세포가 다른 숙주 세포에 의해 생성된 글리코실화 패턴과 다른 글리코실화 패턴을 지니는 단백질 조성물을 생성하는 단계;

(c) 둘 이상의 상이한 숙주 세포로부터 상이한 글리코실화 패턴을 지니는 상기 발현된 단백질 조성물을 분리시키는 단계; 및

(d) 하기 (i) 내지 (v)에 정의된 글리코실화 특징을 갖는 단백질 조성물을 생성하는 상기 숙주 세포를 선택하는 단계에 의해, 하기 글리코실화 특징을 갖는 단백질 조성물을 생성하는 숙주 세포를 선택하는 방법:

(i) 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다;

(ii) 검출가능한 말단 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다;

(iii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 2%의 탄수화물 구조를 포함한다;

(iv) 알파2-6 결합된 NeuNAc를 포함한다; 및

(v) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 15% 더 높은 NeuNAc의 양을 갖는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다.

청구항 18

제 1항에 따른 생성 방법에 의해 수득될 수 있는 단백질 분자 조성물로서, 상기 단백질 분자 조성물 내의 단백질이 하기 글리코실화 특징을 갖는 단백질 분자 조성물:

(i) 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다;

(ii) 알파2-6 결합된 NeuNAc를 포함한다; 및

(iii) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 15% 더 높은 NeuNAc의 양을 갖는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다.

청구항 19

제18항에 있어서, 하기 하나 이상의 특징을 갖는 단백질 조성물:

(i) 검출가능한 말단 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다;

(ii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 2%의 탄수화물 구조를 포함한다;

(iii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 5%의 탄수화물 구조를 포함한

다;

(iv) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 20% 더 많은 양의 NeuNAc를 지니는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다;

(v) 푸코오스가 결여된 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 적어도 하나의 특수한 탄수화물 사슬의 탄수화물 구조 또는 전체 탄수화물 유닛의 탄수화물 구조를 적어도 50%로 포함한다; 및

(vi) NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 NM-D4 [DSM ACC2605] 세포에서 얻어진 것보다 더 높은 시알릴화 정도를 가지며, 상기 NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 NM-D4 [DSM ACC2605] 세포는 상기 숙주 세포에 대해서 얻어진 시알릴화 정도의 50 내지 60%로만 얻어진다.

청구항 20

제 18항에 있어서, 하기 특징 중 하나 이상의 특징을 갖는 단백질 분자 조성물:

전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 증가된 갈락토오스의 갈락토실화 정도를 지닌다;

전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 높은 G2 구조의 양을 지닌다;

전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 낮은 G0 구조의 양을 지닌다;

전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 낮은 푸코오스의 양을 포함한다;

발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 20% 더 높은 NeuNAc의 양을 갖는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다;

발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 동일한 양의 단백질 분자에 비해, 상기 단백질 분자 조성물 중 상기 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 하나 이상의 특정 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 20%를 초과하는 하전된 N-글리코시드에 의해 결합된 탄수화물 사슬을 포함한다;

푸코오스가 결여된, 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 10% 이상의 탄수화물 구조를 포함한다;

2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 5% 이상의 탄수화물 구조를 포함한다;

상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조 또는 전체 탄수화물 구조 상에서 35%를 초과하는 G2 구조를 포함한다;

상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조 또는 전체 탄수화물

구조 상에서 22% 미만의 G0 구조를 포함한다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물에 비해 증가된 활성 또는 증가된 수율을 지닌다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물에 비해 개선된 균질성을 지닌다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 수율에 비해 적어도 10% 더 높은 증가된 평균 또는 최대 수율을 지닌다;

세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 활성에 비해 적어도 10% 더 높은 증가된 활성을 지닌다;

개선된 글리코실화 균질성인 개선된 균질성을 지니며, 여기서 항체 분자 조성물은 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 시알릴화 정도에 비해 보다 낮은 시알릴화 정도를 지닌다;

상기 단백질 분자가 항체 분자인 경우, 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 Fc-매개된 세포의 세포독성 보다 적어도 2배 더 높은 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성을 지닌다; 및

상기 단백질 분자가 항체 분자인 경우, 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 결합 보다 적어도 50% 더 높은 증가된 항원-매개된 결합 또는 Fc-매개된 결합을 지닌다.

청구항 21

제 18항에 있어서, 상기 단백질이 종양 괴사 인자 TNF-알파 및 TNF-베타를 포함하는 사이토킨 및 이들의 수용체군; 레닌; 사람 성장 호르몬 및 소(bovine) 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상샘 호르몬; 갑상샘 자극 호르몬; 지질단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-사슬 및 B-사슬; 난포 자극 호르몬 (FSH), 황체형성 호르몬 (LH), 티로트로핀, 및 사람 융모생식샘 자극 호르몬 (hCG)을 포함하는 생식샘자극 호르몬; 칼시토닌; 글루카곤; 인자 VIIIC, 인자 IX, 인자 VII를 포함하는 응고 인자, 조직 인자 및 본 빌레브란트 인자; 단백질 C를 포함하는 응고방지 인자; 심방 나트륨배출촉진 인자; 폐 계면활성제; 유로키나아제, 사람 소변 및 조직 타입의 플라스미노겐 활성화제를 포함하는 플라스미노겐 활성화제; 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 엔케팔리나아제; 사람 대식세포 염증성 단백질; 사람 혈청 알부민을 포함하는 혈청 알부민; 뮬레리안-억제(mullerian-inhibiting) 물질; 레락신 A-사슬 및 B-사슬; 프로레락신; 마우스 고난도트로핀-관련된 펩티드; 혈관 내피 성장 인자; 호르몬 또는 성장인자 수용체; 인테그린; 단백질 A 및 D; 류마토이드 인자; 뼈 유래의 향신경성 인자, 뉴로트로핀-3, -4, -5, -6 및 신경 성장 인자-베타를 포함하는 향신경성 인자; 혈소판 유래한 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 표피 성장 인자; TGF-알파 및 TGF-베타를 포함하는 전환되는 성장 인자; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질; CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19를 포함하는 CD 단백질; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 이뮤노톡신; 뼈 형성 단백질; 인터페론-알파, -베타 및 -감마를 포함하는 인터페론; M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF를 포함하는 콜로니 자극 인자 (CSF's); IL-1 내지 IL-12를 포함하는 인터루킨 (IL's); 수퍼옥사이드 디뮤타아제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 가속화 인자; 항체 및 면역접합체; 글리코포린 A; MUC1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단백질 분자 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 단백질이 항체 또는 그의 단편인 단백질 분자 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항체가 IgG 부류인 단백질 분자 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 항체가 인간 Fc 영역을 지니는 인간, 인간화된 또는 키메라 IgG인 단백질 분자 조성물.

청구항 25

제22항에 있어서, Fc 영역의 두 번째 도메인에서 아미노산 Asn-297 보다 항체 분자의 또 다른 글리코실화 부위에 부착되는 하나 이상의 탄수화물 사슬을 지니는 항체 분자의 하나 이상의 당형태를 포함하는 단백질 분자 조성물.

청구항 26

제22항에 있어서, 상기 항체가 Asn-Xaa-Ser/Thr의 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 N-글리코실화 부위 또는 하나 이상의 O-글리코실화 부위를 Fab 영역의 서열에 지니며, 상기 Xaa는 Pro를 제외한 임의의 아미노산일 수 있는 단백질 분자 조성물.

청구항 27

제22항에 있어서,

(a) Fc 부분의 두 번째 도메인에서 아미노산 Asn-297 보다 항체 분자의 또 다른 글리코실화 부위에 부착되는 하나 이상의 탄수화물 사슬을 포함하는 항체 분자로서, 항체 분자 조성물이 발현시 세포주 CHO, CHOdhfr-, BHK, NS0, SP2/0, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], PerC.6 또는 마우스 하이브리도마로부터 단리된 동일한 항체 분자의 항체 분자 조성물보다, 하나 이상의 포유동물에서 측정시 연장된 혈청 반감기 또는 생체이용성을 지니는 항체; 또는

(b) 항체 분자의 Fab 영역의 서열에서 하나 이상의 N-글리코실화 부위 또는 하나 이상의 O-글리코실화 부위에 부착되는 하나 이상의 탄수화물 사슬을 포함하며는 항체 분자로서, 항체 분자 조성물이 발현시 세포주 CHO, CHOdhfr-, BHK, NS0, SP2/0, PerC.6 또는 마우스 하이브리도마로부터 단리된 동일한 항체 분자의 항체 분자 조성물보다, 하나 이상의 포유동물에서 측정시 연장된 혈청 반감기 또는 생체이용성을 지니는 항체 분자

를 포함하는 단백질 분자 조성물.

청구항 28

제22항에 있어서, 상기 항체가

(i) 다른 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에 융합되거나,

(ii) 시토킨, 공-자극 인자, 독소, 다른 항체들로부터의 항체 단편, 다량체화 서열, 검출, 정제, 분비 또는 안정화용 서열, 국소화 시그널 또는 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 서열을 포함하는 다른 단백질 서열과 융합된 항체이거나,

(iii) 치료 효과를 매개하는 이펙터 분자에 커플링된 단백질 분자 조성물.

청구항 29

제22항에 있어서, 상기 항체가 강글리오시드 GD3에 대한 항체, 사람 인터루킨-5 수용체 알파-사슬에 대한 항체, HER2에 대한 항체, CC 케모킨 수용체 4에 대한 항체, CD20에 대한 항체, CD22에 대한 항체, 신경모세포종에 대한 항체, MUC1에 대한 항체, 표피 성장 인자 수용체에 대한 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 분자 조성물.

청구항 30

제22항에 있어서, 상기 항체가 판코맵, 뮤로모맵, 다클리주맵, 바실릭시맵, 아브식시맵, 리툭시맵, 헤르셉틴, 겜투주맵, 알렘투주맵, 이브리투모맵, 세툭시맵, 베바시주맵, 토시투모맵, 파블리주맵, 인플릭시맵, 이쿨리주맵, 에프라투주맵, 오말리주맵, 에팔리주맵, 아달리무맵, 캄파쓰-1H, C2B8, 파노렉스, 브레바렉스, 시물렉트, 안토바, OKT3, 제나팍스, 레오프로, 시나기스, 오스타비르, 프로토비르, 오바렉스, 비탁신, 항-CC 케모킨 수용체 4 항체 KM2160, 및 항-신경모세포종 항체 chCE7로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단백질 분자 조성물.

청구항 31

제22항에 있어서, 상기 조성물이 세포외 직렬식 반복 영역의 아미노산 DTR을 포함하는 MUC 1 에피토프에 결합되

는 하나 이상의 항체 분자를 포함하는 단백질 분자 조성물.

청구항 32

제 31항에 있어서, 상기 항체가 항체 판코맵, 항체 판코 1 및 항체 판코 2로부터 선택되는 단백질 분자 조성물.

청구항 33

제 18항에 있어서,

(i) 혈관 내피 성장 인자에 대한 항체;

(ii) HER2에 대한 항체;

(iii) CD20에 대한 항체;

(iv) 생식샘자극 호르몬; 및

(iv) 응고 인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 분자 조성물.

청구항 34

하기 글리코실화 특징을 갖는 단백질 분자 조성물을 생성할 수 있는, 세포주 K562 [ATCC CCL-243]로부터 유래된 무한증식 인간 혈액 세포:

(i) 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다;

(ii) 알파2-6 결합된 NeuNAc를 포함한다; 및

(iii) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 15% 더 높은 NeuNAc의 양을 갖는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 단백질 분자 조성물이 하기 하나 이상의 특징을 추가로 갖는 무한증식 인간 혈액 세포:

(i) 검출가능한 말단 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다;

(ii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 2%의 탄수화물 구조를 포함한다;

(iii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 5%의 탄수화물 구조를 포함한다;

(iv) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 20% 더 많은 양의 NeuNAc를 지니는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다;

(v) 푸코오스가 결여된 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 적어도 하나의 특수한 탄수화물 사슬의 탄수화물 구조 또는 전체 탄수화물 유닛의 탄수화물 구조를 적어도 50%로 포함한다; 및

(vi) NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 NM-D4 [DSM ACC2605] 세포에서 얻어진 것보다 더 높은 시알릴화 정도를 가지며, 상기 NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 NM-D4 [DSM ACC2605] 세포는, 세포주 K562 [ATCC CCL-243]로부터 유래된 숙주 세포에 대해서 얻어진 시알릴화 정도의 50 내지 60%로만 얻어진다.

청구항 36

제34항에 있어서, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC 2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC 2856] 및 이들로부터 유래된 세포 또는 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 무한증식 인간 혈액 세포.

청구항 37

제34항에 있어서, 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 하나 이상의 핵산, 및 서열번호 1 내지 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 하나 이상의 폴리펩티드를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 무한증식 인간 혈액 세포.

청구항 38

GT-2X [DSM ACC 2858], NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC 2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC 2856] 및 이들로부터 유래된 세포 또는 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 무한증식 인간 혈액 세포.

청구항 39

제34항에 있어서, 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분을 제조하기 위하여, 이들을 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 무한증식 인간 혈액 세포.

청구항 40

단백질 분자 조성물을 생성하는 방법으로서,

(a) 상기 단백질의 적어도 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을, 세포주 K562 [ATCC CCL-243]로부터 유래된 숙주 세포에 도입하는 단계;

(b) 상기 숙주 세포를 상기 단백질 분자 조성물의 생성을 가능하게 하는 조건하에서 배양하는 단계; 및

(c) 상기 단백질 분자 조성물을 분리하는 단계를 포함하며,

상기 숙주 세포가

NM-H9D8 [DSM ACC 2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC 2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC 2856] 및 이들로부터 유래된 세포 또는 세포주로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 41

제40항에 따른 생성방법에 의해 얻어진 단백질 분자 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 균질성 및 인간 글리코실화를 지니는 단백질 분자 조성물 및 특히 항체 분자 조성물을 생성하기 위한 생물공학적으로 유리한 방법을 제공한다. 본 발명은 신규한 숙주 세포, 핵산, 및 단백질 분자 조성물을 추가로 제공한다.

[0002] 산업에서의 중요한 특징 및 난제는 재조합 단백질의 생성이고, 생산성, 비용, 균질성 및 단백질 활성이 여전히 최적화되어야 하는 중요한 문제이다. 글리코실화도 균질한 재조합 당단백질의 생성을 위한 일련의 중요한 문제를 제기하는 이들의 높은 수율을 산출하는데 있어서의 중요한 문제이다. 현행의 각 생성 세포주는 글리코실화의 복잡성 및 종, 조직 및 부위 특이성에 크게 기인한 일련의 상이한 난제 및 문제들을 제공한다. 따라서, 글리코실화와 관련된 생성 시스템의 최적화는 최적화를 위한 중요한 측면들 중 하나로 남아 있다. 이것은 특히 글리코실화 패턴의 차이로서 단백질 분자의 활성, 면역원성, 생체이용성 및 반감기에 상당한 영향을 준다. 상이한 종들 및 비-포유동물 생성 시스템으로부터 유래된 상이한 세포주의 글리코실화 특성의 상세한 개관이 문헌 [Jenkins et al (Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry, Nat Biotechnology, 1996, 14: 975-981)에 제공된다.

[0003] 항체는 진단 및 리서치를 위한 주요 도구이고, 치료제의 가장 큰 부류가 될 것 같다. 10개의 재조합 항체에 관해 치료제가 판매 중이며 수 백개가 임상 개발중에 있다. 산업에서의 중요한 특징 및 난제는 재조합 항체("rMAb")의 생성이며 생산성, 비용, 균질성 및 항체 활성은 여전히 최적화되어야 하는 중요한 문제이다. 시판

중인 거의 모든 치료용 rMAb가 햄스터(CHO) 및 마우스(NS0 또는 Sp2/0)로부터의 설치류 세포주에서 생성되었다. 개발되는 대부분의 rMAb는 단연 설치류 세포에서 생성되며, 기타가 개발 중에 있으나, 어떤 것도 생산성, 비용, 균질성 및 항체 활성을 최적화시키는데 충분하지 않았다.

[0004] 글리코실화도 rMAb의 생성을 위한 일련의 중요한 문제를 제기하는 균질하고 잠재적인 rMAb의 높은 수율을 산출하는데 있어서의 중요한 문제이다. 현행의 각 생성 세포주는 글리코실화의 복잡성 및 종, 조직 및 부위 특이성에 크게 기인한 일련의 상이한 난제 및 문제들을 제공한다 [검토: Royston Jefferis, CCE IX: Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics; Biotechnol. Prog. 2005, 21, 11-16].

[0005] 따라서, 글리코실화와 관련된 단백질의 최적화 및 특히 항체 생성 시스템은 최적화되어야 하는 중요한 측면 중 하나로 남아 있다.

[0006] 본 발명은 무한증식(immortalized) 인간 혈액 세포 및 특히 골수성 백혈병 기원의 세포에 기초한 신규한 발현 시스템을 제공한다. 이러한 세포는 놀랍게도 활성, 수율 및.또는 균질성과 관련하여 글리코실화된 단백질 및 특히 항체의 생성을 개선시킨다.

배 경 기 술

[0007] 단백질은 기능 및 발생이 서로 간에 매우 변화되는 다양한 그룹이다. 치료 가능성을 지니는 단백질 중에서, 대부분의 단백질은 글리코실화되며, 예컨대 다수의 호르몬(예컨대, 성장 호르몬, 글리카곤, FSH 및 LH), 성장 인자(예컨대, GM-CSF, G-CSF, VEGF 및 에리트로포이에틴), 시토킨(예컨대, IL-2, IL-7, 인터페론-알파 및 -베타, TNF-알파), 항-응고제(예컨대, 레피루딘, 데시루딘), 혈액 응고 인자(예컨대, 인자 VII, VIII 및 IX), 백신(예컨대, B형 간염 항원) 및 항체이다. 확립된 세포 생성 시스템은 고유의 인간 글리코실화된 단백질을 생성할 수 없다. 원핵(예컨대, 세균) 및 대부분의 진핵 세포 시스템(예컨대, 효모, 곤충 및 식물 세포)은 글리코실화가 결여된 단백질을 합성하거나 인간 탄수화물 사슬과 크게 상이한 글리칸을 지닌다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포는 인간 세포와 유사한 방식으로 단백질을 글리코실화할 수 있는 보통 이용되는 생성 시스템이다. 그러나, 예컨대 갈락토실화, 푸코실화, 특히 N-아세틸글루코사민과의 글리코실화, 및 특히 시알릴화의 다양한 측면에 있어서 중요한 문제들이 남아 있다. 이러한 차이가 활성, 생체이용성, 면역원성 및 반감기에 영향을 미친다.

[0008] 이러한 생성 시스템이 확립된 시점에, 이것은 적어도 어느 정도 활성인 치료용 단백질을 생성하기에 충분하였다. 그러나, 오늘날 (i) 치료용 단백질의 적용되는 용량 횟수 및 농도를 감소시키고, (ii) 치료 비용을 경감하고, (iii) 부작용을 줄이기 위해 치료용 단백질의 활성을 개선시키는데 많은 노력이 집중되고 있다.

[0009] 단백질의 생체활성을 개선시키기 위한 주요 전략은 이들의 혈청 반감기를 연장시킴으로써 생체이용성을 길게 하는 것이다. 이것은, 예컨대 페길화(PEGylation)라 불리는 공정에 의해 수행될 수 있으며, 여기서 특정 형태의 폴리에틸렌글리콜을 생성되는 단백질에 화학적으로 첨가/결합시킨다. PEG는 분자량을 증가시키므로 혈청 반감기를 증가시킨다. 그러나, 이 공정에는 여러 문제가 수반된다. 예를 들어, 거의 모든 경우에, 페길화는 이의 세포 이펙터 기능에 의해 단백질의 활성을 감소시키고/거나, 인간에서의 반복적인 투여는 종종 항체를 중화시키는 불리한 면역 반응을 초래하고/거나 생성 공정은 추가의 화학적 변형을 요구하여 추가 비용, 소모 및 시간을 갖는 다단계 공정을 초래한다. 필적하는 단점을 지니는 유사한 담체 시스템(예컨대, 헤실화(HESylation) 또는 알부민의 부착)이 존재한다.

[0010] 또한 탄수화물 사슬 및 이에 따라 단백질의 글리코실화의 개질은 재조합에 의해 발현된 단백질의 혈청 반감기를 개선시키는데 집중된다. 이에 대한 기술은 재조합 당단백질의 시알릴화 정도를 최대화하는데 초점을 맞추고 있다. 시알산은 진핵 세포의 표면 상에 가장 많이 보급된 말단 모노사카라이드이며 일반적으로 더 많은 당단백질이 시알릴화될수록 순환 동안 이의 혈청 반감기는 더 길어지는 것으로 여겨진다. 이것은 순환하는 시알릴화되지 않은 단백질에 결합하여 이들을 분해용 세포로 유도하는 간에서 아시알로(asialo)단백질-수용체로서의 특정 수용체의 존재에 기초한다.

[0011] 다양한 부류의 항체가 인간 및 대부분의 포유동물에 존재하며, 즉 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD가 있다. 모든 항체 부류의 분자가 진단 또는 리서치 도구로서 이용되나, 판매되고 개발 중인 대부분의 항체 기재 치료제는 IgG이며 보다 적은 한도로 IgM이다. 인간 IgG 부류는 네 개의 아부류인 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 추가로 분류된다. IgG 분자의 기본적인 구조는 각각이 항원-결합 부위를 포함하는 하나의 가변 도메인 및 하나의 불변 도메인을 지니는 2개의 Fab 영역을 포함하는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄, 추가의 불변 도메인과 리간드에 대한 상호작용 부위를 포함하는 하나의 Fc 영역, 및 Fab 및 Fc 영역을 연결시키는 가요성 힌지 영역으로 구성된다. 항체는 전체 분자로서 존재할 수 있거나 항체 단편, 예컨대 링커를 통해 연결된 중쇄 및 경쇄의 두 가변 영역을 포함하는

Fab 단편 또는 단쇄 Fv로 존재할 수 있다. 도 18은 IgG 항체를 도시한다.

[0012] 치료용 재조합 항체는 이들의 면역원성을 감소시키기 위해 대체로 키메라, 인간화된 또는 소위 완전한 인간 단백질 서열이다. 그러나, 사실상 완전한 인간 분자는 용이하게 획득될 수 없었는데, 그 이유는 특히 글리코실화와 같은 번역후 개질이 설치류 또는 CHO 세포에서의 생성으로 인해 인간이 아니므로 사람 혈청의 인간 항체에서 발견되는 그러한 개질과 상이할 수 있기 때문이다. 개질, 특히 글리코실화 패턴에서의 차이는 개별적으로 생성된 항체의 활성 및 면역원성에 심각한 영향을 미칠 수 있다.

[0013] 항체의 활성은 조합된 실행에 기인하거나 이로 인해 영향을 받을 수 있다. 한편으로는, 항체가 Fab 영역에 위치한 항체의 가변 영역("V 영역"), 그 중에 V 영역의 특정 서열, CDR 영역에 의해 매개된 일정한 특이성을 지닌다. 이들은 항체의 특수한 특이성 및 친화력을 결정하는데 중요한 역할을 한다. 따라서, V 영역은 에피토프 결합 특성에 결정적이며 항체와 항체를 변경시킨다. 항체의 친화력은 에피토프에 대한 항체의 단일 결합 영역의 결합 세기 및 동역학을 나타낸다. 다양한 항체 부류 및 아부류가 하나의 항체 분자에 2 내지 10개의 동일한 가변 영역을 지니므로, 항체의 결합 세기 및 동역학은 표적 항원 또는 세포 상에서 에피토프에 대한 결합에 이용할 수 있는 결합 부위의 수 및 에피토프의 접근성에 의해 좌우되고 이의 항원항체결합력으로 표시된다.

[0014] 진단 및 특히 치료에 이용되는 항체의 품질을 위한 또 다른 중요한 인자는 표적 구조 또는 세포 상에서 항체의 결합 부위의 수 뿐만 아니라 이의 내재화 속도이다. 이러한 품질은 특히 치료에 이용되는 항체의 효과 및 적합성에 영향을 준다.

[0015] 다른 한편으로는, 항체의 치료 용도와 관련된 이펙터 메커니즘이 수 배(several fold)이며, 이로써 항체 중 일부가 단 하나의 메커니즘을 통해 작용하고 다른 것들이 다양한 이펙터 메커니즘의 조합에 의해 작용한다. 한 전략은 치료 효과를 매개하는 이펙터 분자에 항체 또는 항체 단편을 커플링시키는 것이며, 예컨대 항-종양 치료를 위해 면역 이펙터 분자, 예를 들어 인터루킨 2를 커플링시켜 면역 시스템을 동원하거나, 독소 또는 방사성동위원소를 커플링시켜 표적 세포를 치사시킨다. 방사성표지된 항체 또는 항체 단편도 생체내 진단을 위해 가치 있다.

[0016] 다른 전략은 낮은 독성학, 덜 복잡한 로지스틱, 천연 면역 이펙터 아암의 이용 또는 추가 이펙터 분자를 요구하지 않는 치료 효과의 개시와 같은 중요한 이점을 지닐 수 있는 비-표지된, 소위 "네이키드(naked)" 항체를 이용하는 것이다. 다수의 연구가 항체의 활성 메커니즘 및 작용 방식을 밝히고 이러한 활성을 이용하여 항체를 개발하기 위해 수행되었다. 그 중 가장 중요한 활성 및 효과는 전체 세트의 상이한 효과 및 활성을 포함하는 항체-의존적인 세포-매개된 세포독성 활성 (본원에서 "ADCC 활성"이라 함), 상보서열(complement)-의존적인 세포독성 활성 (본원에서 "CDC 활성"이라 함), 포식작용 매개된 세포독성 활성 (본원에서 "포식작용 활성"이라 함), 수용체 매개된 활성 (본원에서 "수용체 매개된 활성"이라 함)이다.

[0017] 수용체 매개된 활성은 주로 표적 세포 상의 분자 또는 수용체에 대한 항체의 결합에 기초하거나, 표적 세포에 대한 특정 분자의 결합을 억제하여 이러한 세포 상에서 길항 또는 효능 활성 또는 항체의 수용체 봉쇄와 같은 특정 효과를 유도 또는 억제하고, 이에 따라 표적 세포의 아폽토시스 또는 증식의 유도 또는 억제 또는 표적 세포에 있는 특정 분자의 분비 또는 분비의 억제를 초래함에 의하거나, 분자와 세포간 또는 세포들간 상호작용과 같은 특정 다른 수용체 매개된 사건을 차단하거나 개시함에 기초한다. ADCC 활성, CDC 활성 및 포식작용 활성은 항체의 Fc 영역에 의해 매개되는 세포독성 활성인 한편 (본원에서 "Fc 부분 매개된 활성"이라 함), 수용체 매개된 활성, 친화력, 항원항체결합력 및 항체의 특이성은 주로 Fab 영역에 포함된 항체의 결합 영역을 통해 매개된다.

[0018] Fc 부분 매개된 활성은 킬러 세포, 천연 킬러 세포 및 활성화된 매크로파지와 같은 면역학적인 이펙터 세포, 또는 상보서열의 Fc-감마RI, Fc-감마RII, Fc-감마RIII, C1q 성분과 같은 이펙터 리간드에 결합되는 다양한 상보서열 성분, 신생아 Fc 수용체(FcRn) 등을 통해 매개된다. 인간 IgG1 아부류는 인간 IgG 부류 분자 중에서 가장 높은 ADCC 및 CDC 활성을 지니는 것으로 보고된다. IgM의 경우, CDC 활성이 우세한 이펙터 메터니즘이다. ADCC 활성 및 CDC 활성은 이펙터 세포의 Fc-감마RI, Fc-감마RII, Fc-감마RIII와 같은 Fc-수용체 또는 C1q와 같은 상보서열 성분에 대한 항체의 불변 영역인 Fc 영역의 결합을 포함한다. 중요한 아미노산 잔기는 힌지 영역 및 특히 불변 영역의 두 번째 도메인에 있다 ("C감마2 도메인"). C감마2 도메인에 결합되는 탄소화물 사슬은 활성에 있어서 중요하다. 탄수화물 사슬은 C감마2 (N-글리코시드 결합된 탄수화물 사슬)의 아미노산 아스파라긴 297 (Asn-297)에 결합된다. 아스파라긴에 결합되는 탄수화물 사슬 말단을 환원 말단이라 하며, 반대 말단을 비-환원 말단이라 한다. IgG 항체의 Fc 영역은 두 개의 탄수화물 결합 부위를 지닌다. 도 18은 IgG 분자의 구조를 도시하며, 통상적으로 탄수화물 구조가 발견될 수 있는 위치를 나타낸다. 추가로, 이러한 탄수화물 구조의 화학적

구조 및 조성을 설명한다.

[0019] Fc 부분 매개된 활성으로부터, 두 가지가 항체의 글리코실화에 의해 영향을 받을 것으로 추측된다: 항체의 Fc 부분에 있는 당 사슬의 제거는 CDC 및 ADCC 활성의 소실을 초래하고 이러한 N-글리칸에서 갈락토오스의 환원은 CDC 활성의 감소를 야기한다 [Boyd et al., Molecular Immunol., 32, 1311, (1995); US6946292]. 추가로, 래트 세포에서 항체의 발현은 햄스터 및 래트 세포에서 발현되는 동일한 항체와 비교하여 거기에서 발현되는 특정 항체의 ADCC 활성을 증가시킨다 [Lifely et al., Glycobiology, 1995 Dec; 5(8): 813-22; WO00/61739]. 두 보고서 모두는 글리코실화의 변화가 항체 ADCC 활성에서의 이러한 차이를 초래한다고 가정하나, 이것은 명백하지 않다. 문헌[Lifely et al. 1995]은 2등분 N-아세틸글루코사민 ("2등분GlcNAc")이 항체의 증가된 ADCC 활성의 원인이라고 가정한 반면, WO00/61739는 N-글리칸의 환원 말단에서 N-아세틸글루코사민에 결합된 푸코오스 알파1-6("코어-푸코오스")의 극적인 감소가 증가된 ADCC 활성의 원인이라고 가정한다. 더욱이, 당 2등분GlcNAc가 N-글리칸에 부착될 수 있게 하는 CHO 세포에서 효소 GnTIII의 재조합 발현은 이러한 세포의 발현시에, GnTIII로 재조합에 의해 트랜스펙션되지 않은 CHO 세포에서 발현된 동일한 항체와 비교하여, 특정 항체의 ADCC 활성의 증가를 초래한다고 기술되었다 [US 6602684, Umana et al., Nature Biotechn 17: 176-180 (1999)]. 추가로, CHO 세포에서 코어-푸코오스의 결핍을 초래하는 유전자 FUT8의 녹-아웃은 이러한 FUT8 KO CHO 세포에서의 발현시에 특정 항체의 ADCC 활성을 증가시킬 수 있다 [US 6946292]. 이러한 결과는 항체의 활성에 있어서 글리코실화 패턴의 중요성 및 복잡성을 입증한다.

[0020] 그러나, "외래" 및 이에 따른 최적화되지 않은 글리코실화 패턴은 활성에 유해할 뿐만 아니라 면역원성일 수도 있다. 단백질 및 특히 항체에 대한 현행 발현 및 생성 시스템은 주로 설치류에서 유래된 세포주이며 햄스터, 마우스, 또는 래트로부터의 세포주, 예컨대 CHO, BHK, NS0, Sp2/0 및 YB2/0에 기초한다. 설치류 세포는 비-최적 조건하에 효능이 결여되거나 면역원성인 다수의 비정상적으로 글리코실화된 단백질 생성물을 생성할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 추가로, 설치류 세포는 비-인간 당류의 존재 및 특정 인간 당 부분의 결여를 포함하는 인간 세포에서 발현되는 것들과 중요한 차이가 있는 탄수화물 구조를 발현시키는 것으로 공지되어 있으며, 이는 예를 들어 면역원성, 덜 효과적, 낮은 수율 또는 차선적인 구조 요건 또는 폴딩(folding)의 단백질이 이러한 세포에서 발현되도록 할 수 있다. 대부분의 설치류 세포는 인간에 존재하지 않는 N-아세틸뉴라민산 ("NeuNAc")에 대안적인 예를 들어 N-글리콜릴뉴라민산을 발현시키는데, 이들은 인간에서 면역원성이고/거나 면역원성 갈락토오스 알파(1-3) 갈락토오스 개질("Gal 알파1-3 Gal")이고/거나, 이들은 중요한 알파2-6 결합된 NeuNAc와 같은 중요한 탄수화물이 결여되어 있거나 2등분GlcNAc가 결여되어 있다. 또한 공지되거나 공지되지 않은 다른 차이들이 존재한다. 추가로, 설치류 생성으로부터 당형태 프로필이 대부분 외생성이고, 또한 클론-특이적 당형태가 CHO, NS0 또는 Sp2/0 세포에서 클론마다 매우 다양할 수 있고 생성 및 배양 조건의 방식에 의존적인 것으로 공지되어 있다.

[0021] 더욱이, 발현 시스템은 인간 세포, 예컨대 인간 태아 신장 세포로부터 유래된 Hek 293 세포 또는 단일 인간 망막-유래 세포로부터 유래된 세포 시스템 PerC6®을 포함하는 단백질의 생성을 위해 존재하며, 이것은 재조합 DNA 기술을 이용하여 일부러 무한증식되었다. 그러나, 이러한 세포주는 종종 비-인간 세포 시스템 보다 바람직할지라도, 여전히 다소의 단점을 지닌다. 이들은 개개 세포의 글리코실화 기작(machinery)에 기인할 수 있는 독특한 글리코실화 패턴을 지닌다. 그러나, 생성하려는 단백질에 따라서, 이들은 예컨대 단백질의 활성 및/또는 혈청 반감기와 관련하여, 최적화된 글리코실화 프로필을 운반할 수 없다. 특히, 시알릴화의 특정 정도 및 패턴을 이들 세포로 달성하기 어렵다. 예컨대, 당 분야에 공지된 세포 시스템은 종종 검출할 수 있는 알파 2-6 결합된 시알릴화를 제공할 수 없으나, 이것은 혈청 반감기에 중요한 것이다.

[0022] 이러한 사실로부터, 대안적이고/거나 개선된 발현 시스템을 제공함에 의해 생산성, 균질성, 및/또는 항체 활성을 추가로 최적화시킬 수 있는 발현 및 생성 시스템에 대한 요구가 여전히 존재함이 명백해진다. 더욱이, 이러한 사실로부터, 어떤 탄수화물 구조 및 특히 인간 탄수화물 구조가 단백질 및 항체의 활성 또는 균질성을 개선하는데 최선이고, 세포주 및 특히 인간 세포주가 단백질, 특히 항체의 활성을 최적화하기 위해 어떠한 종류의 글리코실화 패턴을 제공해야 한다고 말할 수 없음이 명백해진다. 따라서, 당 분야에 공지된 발현 시스템으로 수득된 생성물과 다른 글리코실화 패턴을 지니는 생성물을 제공하는 발현 시스템에 대한 요구가 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1: NM-F9, NM-D4, 및 NM-H9D8 [DSM ACC2806] 세포의 fut8 mRNA 발현. 대조군으로서 HepG2 세포를 이용하였다.

도 2: 표적 세포로서 LS174T 세포에 대해 NM-H9D8-E6 세포, CHOdhfr- 세포 또는 SP2/0 세포로부터 단리된 세툭

시맵을 이용한 유러퓸 방출 검정.

검정을 50:1의 이펙터 대 표적 세포 비로 0 내지 100 ng/ml 농도의 항체와 함께 인큐베이션하였다.

도 3: NM-F9로부터 단리된 키메라 판코맵의 ADCC 활성이 CHOdhfr-세포로부터 단리된 키메라 판코맵 보다 ~5배 더 높다.

도 4: 표적 세포로서 ZR-75-1 세포에 대해 NM-H9D8-E6 세포, CHOdhfr- 세포 또는 NM-H9D8 세포로부터 단리된 키메라 판코 1을 이용한 유러퓸 방출 검정.

검정을 80:1의 이펙터 대 표적 세포 비로 0 내지 1 ㎍/ml 농도의 항체와 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다.

도 5: 50:1의 이펙터 대 표적 세포 비 및 웰 당 5000개 표적 세포로 o.n. 인큐베이션 후 ZR-75-1 세포에 대한 유러품 방출 검정에서 키메라 판코 2의 ADCC 활성. 샘플을 삼중으로 인큐베이션하였다.

도 6: 50:1의 이펙터 대 표적 세포 비 및 웰 당 10.000개 표적 세포로 o.n. 인큐베이션 후 ZR-75-1 세포에 대한 유러품 방출 검정에서 키메라 판코 2의 ADCC 활성. 샘플을 삼중으로 인큐베이션하였다.

도 7: ZR-75-1에 대해 키메라 판코맵을 이용한 CDC 검정.

도 8: NM-F9로부터 합성 글리코실화된 MUC1 30-mer 펩티드로 단리된 키메라 판코맵의 결합 활성은 CHOdhfr- 세포로부터 단리된 키메라 판코맵의 결합 활성 보다 약 50% 더 높다.

도 9: GT-2x 및 NM-H9D8로부터 합성 글리코실화된 MUC1 30-mer 펩티드로 단리된 키메라 판코 2의 결합 활성은 CHOdhfr- 세포로부터 단리된 키메라 판코 2의 결합 활성 보다 약 50% 더 높다.

도 10: 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 CHOdhfr-, NM-F9, 또는 NM-H9D8 [DSM ACC2806]에서 발현된 항체 분자 조성물의 상이하게 시알릴화된 중쇄를 동정한다. 단백질을 니트로셀룰로오스로 트랜스퍽션하고 2-6 시알릴화를 검출하는 이차 항-인간 IgG 항체 (도 10A) 또는 SNA (도 10B)에 의해 가시화한다.

도 11: 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 CHOdhfr- 또는 NM-H9D8에서 발현된 항체 분자 조성물의 상이하게 시알릴화된 중쇄를 동정한다. 단백질을 니트로셀룰로오스로 트랜스퍽션하고 2-6 시알릴화를 검출하는 SNA에 의해 가시화한다.

도 12: ELISA 분석을 수행하여 CHOdhfr-, GT-2x, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6에서 발현된 상이하게 시알릴화된 항체 분자 조성물을 동정한다.

도 13: ELISA 분석을 수행하여 CHOdhfr-, NM-F9, 또는 NM-H9D8에서 발현된 세툭시맵의 상이하게 시알릴화된 항체 분자 조성물을 동정한다. 시알릴화를 (A) 뉴라미니다아제 처리를 하거나 처리하지 않고 알파2-6 시알릴화를 검출하는 SNA에 의해 그리고 (B) 알파2-3 시알릴화를 검출하는 MAL I에 의해 분석한다.

도 14: CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6 세포로부터 단리된 키메라 항체 판코 1 및 판코 2의 SNA에 의해 염색된 도트 블롯.

도 15: NM-H9D8 세포로부터 단리된 키메라 판코맵은 NM-F9에서 단리된 것 보다 누드 마우스의 혈청에서 더 오래 이용가능하다.

*도 16: NM-H9D8 (레인 1) 및 GT-2x (레인 2)에서 생성된 hFSH의 SDS-Page 분석. 5 ㎍의 정제된 hFSH를 환원 조건하에 레인 당 SDS-PAGE에 의해 분리하고 코마시 브릴리언트 블루로 염색하였다. 마커는 21-108 kD 범위를 나타낸다.

도 17: 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 상이하게 시알릴화된 hFSH 분자 조성물을 동정한다. CHO (레인 1), NM-H9D8 (레인 2) 및 GT-2x (레인 3)으로부터의 1 ㎍의 hFSH 분자를 10% 아크릴아미드 겔에서 환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스로 트랜스퍽션하고 2-6 시알릴화를 검출하는 SNA를 가시화하였다.

도 18: IgG 항체를 나타내며, 여기서 N-글리칸은 Fc의 C_H2 도메인에서 보존된 Asn 297 잔기에 공유적으로 부착된다. 표시된 대로, Fab 도메인에 추가의 N-결합된 올리고사카라이드가 존재할 수 있고, 이것은 항체의 결합 활성에까지 영향을 미칠 수 있다. 항체의 반에만 있는 글리칸 구조가 도시된다. Fc 탄수화물은 주로 두 C_H2 도메인 내에 있는 분지된 사슬 구조이고, 각 올리고사카라이드의 하나의 암/안테나가 C_H2 도메인의 소수성 영역과 상

호작용한다. 폴리클로날 및 골수종 인간 IgG의 구조적 분석으로, Fc가 도 18에서 입증되는 대로 다양한 양의 염기 바이안테너리 코어 구조를 함유하는 것이 입증되었다. 부호의 의미는 상응하는 표에 제시된다. 상기 코어 구조는 인접한 GlcNAc에 0개(G0), 1개(G1) 또는 2개(G2)의 말단 갈락토오스 잔기 및/또는 2등분 GlcNAc 및/또는 푸코오스 잔기를 함유할 수 있다. 추가의 푸코오스 분자는 다른 GlcNAc 잔기 또는 갈락토오스 잔기에도 존재할 수 있다. 시알산이 ADCC에 불리한 영향을 미치는 것이 보고되었기 때문에, 말단 시알산이 항체의 특성에 의존하여 존재하거나 존재하지 않음에 따라, 다양성도 증가된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 인간 무한증식 혈액 세포주 및 특히 골수성 백혈병 기원의 세포에 기초한 신규한 발현 시스템을 제공함에 의해 이러한 문제에 대한 해법을 제공한다. 무한증식 인간 혈액 세포를 이용하는 것은 종래 분야에 공지된 시스템에 비해 유리한데, 그 이유는 이러한 세포가 상이한 조직(예컨대, 신장 또는 망막)으로부터 유래된 다른 공지된 인간 세포 시스템과 상이한 글리코실화 프로필을 제공하기 때문이다. 이러한 차이는 활성, 균질성 및 생성물 수율과 관련하여 이로울 수 있다. 더욱이, 이러한 세포는 무-혈청 조건하에 현탁액에서 트랜스펙션되고 성장할 수 있다.

[0025] 따라서, 첫 번째 구체예에 따라서, 단백질 조성물을 생성하는 방법이 제공되며, 이는 하기 단계를 포함한다:

[0026] (a) 무한증식 인간 혈액 세포인 숙주 세포에서 상기 단백질의 적어도 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 도입하는 단계; 및

[0027] (b) 상기 숙주 세포를 상기 단백질 조성물의 생성을 허가하는 조건하에 배양하는 단계; 및

[0028] (c) 상기 단백질 조성물을 분리하는 단계.

[0029] 무한증식 인간 혈액 세포를 이용하는 이 방법은 활성, 수율 및/또는 균질성과 관련하여 단백질 및 특히 항체의 생성을 개선시킨다. 지금까지 무한증식 인간 혈액 세포 및 특히 골수성 백혈병 세포가 단백질 생성에 적합하고 특히 각기 개선된 특성을 지니는 항체를 유도한다고 제시된 바 없기 때문에 이것은 놀라운 것이다. 특정 래트 백혈병 세포를 항체의 발현에 이용하였으나, 인간과 래트간의 글리코실화 기작이 결정적으로 상이하므로, 후자는 인간에서 면역원성일 수 있는 NeuGc 및 Gal 알파1-3 Gal과 같은 탄수화물 부분을 발현시킬 수 있다. 래트 YB2/0 백혈병 세포는 2등분GlcNAc의 더 높은 존재 또는 코어-푸코오스의 강렬한 하향조절로 인해 더 높은 ADCC 활성을 지니는 항체를 생성한다고 기술되었다.

[0030] 무한증식 인간 혈액 세포 및 특히 골수성 세포를 이용한 본 발명에 의해 문제가 해결될 수 있었다는 것은 더욱 놀라운 것인데, 왜냐하면 세포주 K562 -골수성 백혈병 세포-가 GnTIII의 유전자 하이브리드화에 의해 기술되고 제시된 대로 [Yoshimura M et al., Cancer Res. 56(2): 412-8 (1996)] 2등분GlcNAc에 대한 효소를 발현시키지 않고 RT-PCR에 의해 제시된 코어-푸코오스의 첨가를 야기하는 푸코실트랜스퍼라아제를 발현시키는 유전자 FUT8을 발현시키지 않기 때문이다 [실시예 1]. 이것은 K562가 렉틴 처리에 내성이 없기 때문에 놀라운 것인데, 그 이유는 이것이 렉틴 LCA에 의해 강하게 결합되고, 이는 세포 네거티브 또는 코어-푸코실화에 대해 강하게 하향-조절되는 기초가 되기 때문이다. K562 세포의 글리코실화 프로필에 대한 이러한 정보로 인해, 유리한 활성 패턴에 필요한 글리코실화 기작이 존재하지 않는다고 추정되었기 때문에, 이러한 세포들이 그 안에서 발현되는 항체의 활성을 개선시킬 수 있으리라고 예상될 수 없었다. 증가된 결합 활성, 개선된 균질성 및/또는 더 높은 수율을 지니는 단백질 및 특히 항체가 현행의 발현 시스템의 세포와 비교하여 본 발명의 생성 방법으로 생성되고 달성될 수 있다는 것도 놀라운 것이다.

[0031] 본 발명의 전략은 인간 시스템에 가능한 한 근접한 전체 세트의 번역후 개질을 지니는 단백질 생성물을 제공할 수 있어서, 인간 시스템에서 비- 또는 덜 면역원성이고/거나 개선된 활성을 지닐 수 있는 시스템을 달성하기 위한 적합한 인간 세포주를 생성하는 것이다. 본 목적은 발현하려는 각 단백질/항체에 대해 맞춤 제조된 글리코실화 패턴을 제공하는 것이다.

[0033] *탄수화물 구조가 매우 복잡하고, 세포의 글리코실화 기작이 이들의 합성에 수반되는 수 백개의 효소를 포함하며, 이러한 효소가 주로 종 특이적 및 조직 특이적으로 발현된다는 사실에 기인하여, 인간 글리코실화를 달성하려는 본 발명자들의 주요 전략은 최적화된 글리코실화 패턴을 지니는 단백질 및 특히 항체를 발현하는 생물공학적으로 적합한 인간 발현 시스템을 제공하는 것이다. 최적화된 글리코실화 패턴이 단백질마다 그리고 항체마다 다를 수 있기 때문에, 본 발명은 상이한 글리코실화 패턴을 생성하는 세포주를 제공함으로써, 개개 단백질/항체

생성물에 대해 최적화된 글리코실화 패턴을 제공하는 생성용 세포주를 선택할 수 있게 한다.

[0034] 따라서, 하기 단계를 포함하여, 규정된 글리코실화 패턴을 지니는 단백질 조성물, 바람직하게는 항체 분자 조성물을 생성하는 방법이 제공된다:

[0035] (a) 숙주 세포로서 무한증식 인간 혈액 세포에서 단백질 또는 적어도 이의 일부분을 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 도입하는 단계;

[0036] (b) 상기 단백질 조성물의 생성을 가능하게 하는 조건하에 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0037] (c) 의도된 글리코실화 특성을 지니는 상기 단백질 조성물을 분리시키는 단계.

[0038] 본 발명에 따른 개선된 특성을 지니는 단백질 조성물 및 특히 항체 조성물을 수득하기 위해, 숙주 세포를 선택하여 하기 글리코실화 특성 중 하나 이상을 지니는 단백질/항체 조성물을 생성한다:

[0039] (i) 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다.

[0040] 상기 개요된 대로, NeuGc 글리코실화는 인간에서 면역원성을 지닐 수 있다. 따라서, 가능한 한 각각의 글리코실화를 회피하는 것이 바람직하다. 각각의 글리코실화는 무한증식 인간 혈액 세포를 이용하고 특히 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포를 이용하여 회피된다.

[0041] (ii) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 증가된 갈락토실화 정도를 지닌다.

[0042] 갈락토오스 잔기는 주로 항체의 착물형 N-글리칸의 안테나 상에서 GlcNAc 잔기에 결합된 베타 1-4로 발견되나, 또한 베타-1,3 결합도 발견되었다. 그러나, 이들은 일반적으로 트리안테너리(triantennary) 구조로 생성된다. 갈락토실화의 정도가 활성에 미치는 영향은 특히 현저한 항체와 관련된다. 갈락토오스의 고갈이 감소된 CDC 활성을 초래하는 것이 입증되었다. 따라서, 높은 정도의 갈락토실화를 지니는 것이 바람직할 수 있다. 갈락토실화는 다른 단백질에 대해서도 중요한 역할을 담당할 수 있다.

[0043] 단백질 분자의 전체 탄수화물 구조를 언급할 때, 단백질 분자의 모든 갈락토실화가 고려된다. 단백질 분자의 특수한 한 글리코실화 부위에서 탄수화물 구조를 분석하는 경우, 특정 탄수화물 구조(들), 예컨대 항체 분자의 Fc 부분의 Asn 297에 부착된 탄수화물 구조(들)에 초점을 맞춘다 (도 18 참조). 개개의 특정 구조를 평가하는 경우, 이 특이적 구조의 형식/조성이 결정된다. 상기 특성(이들은 동의어이다)을 정의하기 위해 전체 탄수화물 유닛 및 특수한 탄수화물 사슬도 참조할 수 있었다.

[0044] (iii) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 높은 G2 구조의 양을 지닌다.

[0045] 특히, 항체가 본 발명의 방법에 따라 생성되는 경우, 높은 양의 G2 구조가 유리하다. "G2 구조"는 글리코실화 패턴을 정의하고, 여기서 갈락토오스는 항체의 경우 Fc 영역에 결합된 바이안테너리 구조의 양 말단에서 발견된다 (도 18 참조). 하나의 갈락토오스 분자가 발견되는 경우, 이것을 G1 구조라 하고, 갈락토오스가 존재하지 않는 경우가 G0 구조이다. G2 글리코실화 패턴은 종종 항체의 CDC를 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 95% 또는 심지어 100%를 초과하는 더 높은 양의 G2 구조가 생성된 단백질/항체 조성물에 존재하는 것이 바람직하다. 개개의 높은 G2 글리코실화 패턴을 달성하는 적합한 세포주가 본원에 기술된다.

[0046] 높은 전체 갈락토실화 정도가 종종 항체의 CDC에 유리하기 때문에, 전체 탄수화물 구조 또는 단백질, 특히 항체 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 심지어 95%를 초과하는 G2 및/또는 G1 구조를 수득하는 것이 종종 바람직하다.

[0047] 추가의 구체예에 따라서, 35%를 초과하는 (40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% 초과) G2 구조가 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조 상에 존재한다.

[0048] (iv) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 낮은 G0 구조의 양을 지닌다.

[0049] 상기 개요된 대로, 높은 정도의 갈락토실화가 일반적으로 유리하다. 따라서, 세포주는 G0 구조를 회피하도록 선택되는 것이 바람직하다. G0 구조의 양은 바람직하게는 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 미만이거나, 심지어 더 낮다.

[0050] 추가의 구체예에 따라서, 22% 미만 (20%, 18%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5% 미만)의 G0 구조가 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조 상에 존재한다.

[0051] (v) 검출가능한 말단 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다.

[0052] 상기 개요된 대로, Gal알파1-3Gal 글리코실화는 인간에서 면역원성일 수 있다. 이 글리코실화는, 두 번째 갈락토오스 잔기가 첫 번째 갈락토오스 잔기의 알파 1,3 위치에서 결합하여, 고도로 면역원성인 Gal알파1-3Gal 디사카라이드를 초래하는 패턴을 특징으로 한다. 무한증식 인간 혈액 세포 및 특히 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포를 이용하여, 개개의 불리한 글리코실화를 회피한다.

[0053] (vi) 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 5% 더 낮은 푸코오스의 양을 포함한다.

[0054] 푸코오스 잔기는 N-글리칸 트리 내의 상이한 부위에서 발견되며, 특히 하기와 같다:

[0055] - 아미노산 균주에 인접한 GlcNAc 잔기에 결합된 알파 1,6;

[0056] - GlcNAc 잔기에 위치한 안테너리에 결합된 알파 1,3 및 알파 1,4;

[0057] - Gal 잔기에 위치한 안테너리에 결합된 알파 1,2.

[0058] N-글리칸에 부착된 항체 상에서, 매우 대다수의 푸코오스 잔기가 인접한 GlcNAc 잔기에 결합된 1,6으로 발견된다 (소위 "코어 푸코오스"). 항체에 부착된 N-글리칸의 환원 말단 상에 코어 푸코오스의 부재가 항체의 ADCC 활성을 25배 내지 100배 만큼 향상시키는 것이 발견되었다. ADCC에 대한 이러한 유리한 효과로 인해, 푸코오스의 양은 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500% 또는 2000%를 초과하는 만큼 더 적은 것이 바람직하다. 본 발명은 개개의 낮은 전체적인 푸코실화를 달성하는 특수하게 공학처리된 세포주도 제공한다.

[0059] 추가의 구체예에 따르면, 상기 숙주 세포는 푸코오스가 결여된 전체 탄수화물 구조의 탄수화물 또는 상기 단백질 분자 조성물의 상기 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 적어도 하나의 특수한 탄수화물 구조의 탄수화물을 적어도 10% (15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80% 초과) 포함하는, 당단백질을 생성하도록 선택된다. 항체와 관련하여, Fc 영역에 결합된 N-글리코시드 결합된 탄수화물 사슬은 GlcNAc를 포함하는 환원 말단을 포함하는 것이 특히 바람직하며, 여기서 탄수화물 사슬은 탄수화물 사슬의 환원 말단에서 GlcNAc의 6 위치에 결합된 푸코오스를 함유하지 않는다.

[0060] (vii) 2등분 GlcNAc를 함유하는 하나 이상의 탄수화물 구조를 포함한다.

[0061] 2등분 N-아세틸글루코사민 (bisGlcNAc)은 항체에서 발견되는 N-글리칸의 트리-만노실 코어 구조의 중심 만노오스 잔기에 부착된 베타 1,4로 종종 발견된다. 항체 Fc-N-글리칸의 중심 만노오스 잔기에 2등분 GlcNAc의 존재는 항체의 ADCC 활성을 증가시킨다.

[0062] 추가의 구체예에 따르면, 상기 숙주 세포는 2등분 GlcNAc를 함유하고 푸코오스를 함유하지 않는 개개 탄수화물 구조에 비해, 상기 생성된 단백질이 푸코오스 및 2등분 GlcNAc를 함유하지 않는 상기 단백질 분자 조성물 중 단백질 분자의 전체 탄수화물 유닛의 (또는 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 적어도 하나의 특수한 탄수화물 사슬의) 탄수화물 구조를 더 많이 포함하도록 선택된다.

[0063] 추가의 구체예에 따르면, 상기 숙주 세포는 2등분 GlcNAc를 함유하고 푸코오스를 함유하지 않는 개개 탄수화물 구조에 비해, 상기 생성된 단백질이 2등분 GlcNAc 및 푸코오스를 더 많이 함유하는 상기 단백질 분자 조성물 중 단백질 분자의 전체 탄수화물 유닛의 (또는 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 적어도 하나의 특수한 탄수화물 사슬의) 탄수화물 구조를 더 많이 포함하도록 선택된다.

[0064] (viii) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 시알릴화 패턴에 비해 변경된 시알릴화 패턴을 지닌다.

[0065] 활성, 반감기 및 생체이용성에 대한 시알릴화 정도/패턴의 영향은 상이한 단백질/항체 간에 다르다. 따라서, 각 단백질/항체 분자에 대해, 요망되는 글리코실화 패턴을 제공하는 가장 적합한 숙주 세포를 이용한 생성을 확립하기 전에, 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 이용하여 최적화된 시알릴화 패턴을 먼저 결정하는 것이 유리하다. 예컨대, 다운스트림 효과, 즉 CDC 및 ADCC에 대한 항체의 Fc 글리칸 상에 존재하는 시알산 잔기의 네거티브 효과를 보고하는 수 개의 공개문헌이 존재한다. 그러나, 높은 시알릴화가 시알릴화된 분자의 반감기를 연장시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 생성되는 단백질/항체에 따라서, 상이한 시알릴화 패턴이 유리할 수 있고 본 발명은 상이한 시알릴화 활성을 지니는 무한증식 인간 혈액 세포주를 제공함으로써 최적화된 글리코실화 패턴을 나타내는 단백질/항체를 수득할 수 있다.

[0066] 일 구체예에 따르면, 숙주 세포는, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비해, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 10% (바람직하게는 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, >95%) 더 적은 양의 시알산을 지니는 감소된 시알릴화 정도를 지니는 단백질을 생성하도록 선택된다. 일 구체예에 따르면, 생성물은 심지어 검출가능한 NeuNAc를 포함하지 않는다. 생성되는 단백질/항체에 따라서, 시알산 및 특히 NeuNAc의 존재가 단백질/항체의 활성에 기여하지 않을 수 있다. 이러한 경우에, 보다 균질한 생성물을 제조하기 위해 시알산 글리코실화를 피하는 것이 유리할 수 있다. 이것은 NeuNAc 글리코실화 패턴이 생성되는 단백질 조성물에서 다양할 수 있기 때문이다. 생성물이 덜 균질한 각기 다른 NeuNAc 함량에 기인하므로 이것은 생성물의 관리 승인에 어려움을 초래할 수 있다.

[0067] 활성에 있어서 NeuNAc 글리코실화의 존재에 의존하지 않는 단백질/항체의 경우, NeuNAc 글리코실화의 회피는 균질성을 증가시키는데 유리할 수 있다. 그러나, "검출할 수 없는 NeuNAc"가 반드시 NeuNAc가 전혀 존재하지 않음을 의미하는 것은 아니다. 바꾸어 말해, 다소 적은 정도의 NeuNAc (예컨대, 1 내지 10%)를 지니는 구체예도 포함된다. 개개 단백질의 일례는 FSH이다.

[0068] 일 구체예에 따라서, 생성물은 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 15% (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, >500%) 더 적은 양의 NeuNAc를 지니는 감소된 시알릴화 정도를 지닌다. 이 구체예는 단백질/항체가 발현되고, 여기서 시알릴화가 단백질/항체의 활성에 네거티브 효과를 지닐 것으로 추측되는 경우에 유리하다.

[0069] 개개의 글리코실화 (시알산 특히 NeuANc의 부재 또는 매우 낮은 수준)는 무-혈청 배지에서 NM-F9 및 NM-D4와 같은 시알릴화 결손 세포를 이용하여 달성될 수 있다.

[0070] 추가의 구체예에 따르면, 생성물은 전체 탄수화물 구조 또는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비해 적어도 15% (20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 또는 500% 초과) 더 많은 양의 NeuNAc를 지니는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다.

[0071] 상기 개요된 대로, 개개의 증가된 정도의 시알릴화는 단백질의 혈청 반감기를 연장시킴에 의해 이에 포지티브 효과를 제공할 수 있다. 이러한 경우, CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 달성된 것 보다 높은 정도의 시알릴화를 제공하고 시알릴화 결손 세포(예컨대, NM-F9 및 NM-D4)에서 달성된 것 보다 더 높은 정도의 시알릴화도 제공하는 세포주를 이용하는 것이 바람직하며, 여기서 전구체가 시알릴화를 발생시키기 위해 첨가될 필요가 있다. 그러나, 이러한 시알릴화 결손 세포를 성장시킬 때 개개 전구체가 첨가된 경우조차도, 상기 세포들은 일반적으로 시알릴화에 필요한 글리코실화 기작에서 유전자 돌연변이/결손을 지니지 않는 무한증식 인간 혈액 세포로 수

득되는 약 50 내지 60%의 시알릴화 정도에 도달할 뿐이다. 따라서, 더 높은 시알릴화 정도를 목표로 하는 구체예의 경우, NM-F9 및 NM-D4를 사용하지 않고 개개의 높은 시알릴화 정도를 제공할 수 있는 세포주를 이용하는 것이 바람직하다.

[0072] 추가의 구체예에 따르면, 생성물은 알파2-6 결합된 NeuNAc를 포함한다. 추가로, 알파2-3 결합된 NeuNAc가 어느 정도 존재할 수 있다. 일부 단백질/항체와 관련하여, NeuNAc 글리코실화의 존재는 단백질/항체의 반감기와 관련하여 특히 유리하다. 알파2-6 결합된 NeuNAc를 제공하는 것이 유리한데, 그 이유는 이러한 글리코실화 패턴이 인간 글리코실화 패턴과 유사하기 때문이다. 설치류 세포는 일반적으로 알파2-3 결합된 NeuNAc를 제공한다. 또한, 다른 현존하는 인간 세포주는 충분한 알파2-6 결합된 NeuNAc 글리코실화를 제공할 수 없다.

[0073] 개개 글리코실화 패턴을 제공하는 적합한 세포주는, 예컨대 NM-H9D8 및 NM-H9D8-E6이다.

[0074] 추가의 구체예에 따라서, 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비해, 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 상기 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서 하나 이상의 특정 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 20%가 넘는 하전된 N-글리코시드에 의해 결합된 탄수화물 사슬을 포함하는 단백질을 생성하는 숙주 세포를 이용한다.

[0075] 탄수화물 사슬의 하전 프로필은 특성에 영향을 미칠 수 있으므로 고려되어야 한다. 탄수화물 사슬을 하전시키는 화학기는 예컨대 황 기 또는 시알산이다.

[0076] 대안적인 구체예에 따라서, 상기 생성물은 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질 분자에 비해, 상기 단백질 분자 조성물의 상기 단백질 분자들 중 상기 단백질 분자의 특수한 글리코실화 부위에서 하나 이상의 특정 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 20% 미만인 하전된 N-글리코시드에 의해 결합된 탄수화물 사슬을 포함한다.

[0077] 추가의 구체예에 따르면, 상기 숙주 세포는 2등분 GlcNAc를 함유하는 상기 단백질 분자 조성물의 단백질 분자들 중 단백질 분자의 특수한 글루코실화 부위에서의 하나 이상의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 적어도 2% (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 45% 초과)의 탄수화물 구조를 포함하는 당단백질을 제공하도록 선택된다.

[0078] 일 구체예에 따르면, 숙주 세포는 하기 특성을 나타내는 단백질을 생성하기 위해 이용된다:

[0079] - 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 하나 이상의 단백질 분자 조성물에 비해 증가된 활성, 증가된 수율 및/또는 개선된 균질성을 지닌다; 및/또는

[0080] - 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자로부터의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 수율 보다 적어도 10% 더 높은 증가된 평균 또는 최대 수율을 지닌다; 및/또는

[0081] - 개선된 글리코실화 균질성인 개선된 균질성을 지니며, 여기서 상기 항체 분자 조성물은 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 시알릴화 정도 보다 낮은 시알릴화 정도를 지닌다; 및/또는

[0083] *- 상기 단백질 분자가 항체 분자인 경우, 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 Fc-매개된 세포의 세포독성 보다 적어도 2배 더 높은 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성을 지닌다; 및/또는

[0084] - 상기 단백질 분자가 항체 분자인 경우, 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 결합 보다 적어도 50% 더 높은 증가된 항원-매개된 또는 Fc-매개된 결합을 지닌다.

[0085] 상기 개요된 대로, 개개 특성은 본원에 개시된 단백질의 글리코실화를 최적화시킴에 의해 수득될 수 있다. 또한 결합 프로필이 글리코실화 프로필에 기초하여 일부 항체로 변경되거나 개선될 수 있다는 것은 놀라운 관찰이다. 적합한 숙주 세포도 본원에 개시되어 있다.

[0086] 추가의 구체예에 따르면, 상기 단백질 분자 조성물의 개선된 균질성은 하기 특성 중 하나 이상을 포함하는 상기 단백질 분자 조성물의 개선된 글리코실화 균질성이다:

[0087] - 검출할 수 없는 NeuGc;

[0088] - 검출할 수 없는 NeuNAc;

[0089] - 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자로부터의 단백질 분자 조성물 보다 많은 NeuNAc;

[0090] - 검출할 수 있는 알파2-6 결합된 NeuNAc.

[0091] 추가의 구체예에 따르면, 상기 숙주 세포는 하기 특징적인 글리코실화 패턴 중 하나를 지니는 단백질 분자를 포함하는 단백질 조성물을 생성하도록 선택된다:

[0092] (a) - 검출할 수 있는 NeuGc를 포함하지 않는다

[0093] - 검출할 수 있는 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다

[0094] - 제 2항에 정의된 갈락토실화 패턴을 포함한다

[0095] - 제 2항에 정의된 푸코오스 함량을 지닌다

[0096] - 2등분GlcNAc를 포함한다

[0097] - 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 단백질 조성물에 비해 또는 NM-F9 및 NM-D4와 같은 시알릴화 결손 세포주에 비해 증가된 양의 시알산을 포함한다.

[0098] (b) - 검출할 수 있는 NeuGc를 포함하지 않는다

[0099] - 검출할 수 있는 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다

[0100] - 제 2항에 정의된 갈락토실화 패턴을 포함한다

[0101] - 제 2항에 정의된 푸코오스 함량을 지닌다

[0102] - 2등분GlcNAc를 포함한다

[0103] - 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 단백질 분자의 단백질 조성물에 비해 감소된 양의 시알산을 포함한다.

[0104] (c) - 검출할 수 있는 NeuGc를 포함하지 않는다

[0105] - 검출할 수 있는 Gal알파1-3Gal을 포함하지 않는다

[0106] - 제 2항에 정의된 갈락토실화 패턴을 포함한다

[0107] - 제 2항에 정의된 푸코오스 함량을 지닌다

[0108] - 2등분GlcNAc를 포함한다

[0109] - 2-6 NeuNAc를 포함한다.

[0110] 추가로, 개선된 특징을 초래하는 적합한 특징적인 조합이 표 9에 개시되어 있다.

[0111] 본 발명에 따라, "단백질 분자"라는 용어는 관심있는 단백질 또는 이의 활성 단편 및/또는 돌연변이주를 의미하며, 이로써 임의의 단백질, 바람직하게는 인간 기원의 임의의 당단백질을 이용할 수 있다. 단백질 분자라는 용어는 임의의 폴리펩티드 분자 또는 이의 일부를 의미한다. 이것은 하나 또는 수 개의 핵산에 의해 엔코딩될 수 있다. 이것은 분비 양식 또는 이의 분획 또는 융합 파트너와 함께 융합 단백질로 생성될 수 있다. 바람직하게는, 단백질이 상청액으로 분비된다. 이 구체예는, 예컨대 흘림(shedding) 단계 (예컨대, 포르볼 에스테르 이용)가 회피될 수 있으므로, 전체 생성 공정에 관해 특히 유리하다.

[0112] 포유동물 당단백질의 예로는 시토킨 및 이들의 수용체와 같은 분자, 예를 들어 종양 괴사 인자 TNF-알파 및 TNF-베타; 레닌; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-사슬 및 B-사슬; 생식샘자극호르몬, 예컨대 난포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 갑상선자극호르몬 및 인간 융모 생식샘자극호르몬(hCG); 칼시토닌; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 인자 VII, 조직 인자 및 본 윌브랜즈(von Willebrands) 인자; 항-응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성제, 예컨대 유로키나아제, 사

람 소변 및 조직-형 플라스미노겐 활성제; 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 엔케팔리나아제; 인간 매크로파지 염증 단백질; 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 뮬레리안(mullerian)-억제 물질; 릴랙신 A-사슬 및 B-사슬; 프로릴랙신; 마우스 생식샘자극호르몬-관련 펩티드; 혈관 내피 성장 인자; 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 및 D; 류마티스 유사인자; 향신경 인자, 예컨대 골-유래 향신경 인자, 뉴로트로핀-3, -4, -5, -6 및 신경 성장 인자-베타; 혈소판-유래 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 표피 성장 인자; 전환성 성장 인자, 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대 CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19; 에리트로포이에틴(EPO); 뼈유도 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질; 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 콜로니 자극 인자(CSF's), 예컨대 M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터루킨(IL's), 예컨대 IL-1 내지 IL-12; 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제; T-세포 수용체; 표면막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 항체 및 면역부착소; 글리코포린 A; MUC1가 있다.

[0113] 상기 언급된 당단백질 중 다수가 면역 시스템의 세포에서 발생하는 일반적인 호르몬의 부류, 림포카인 및 모노카인 둘 모두 및 기타로 본원에서 언급되는 시토킨에 속한다. 이 정의는 국소적으로 작용하고 혈액에서 순환하지 않는 호르몬, 및 본 발명에 따라 이용될 때, 개체의 면역 반응의 변경을 초래할 호르몬을 포함하나, 이로 제한되지 않는다. 추가의 적합한 면역조절 시토킨의 예로는 인터페론 (예컨대, IFN-알파, IFN-베타 및 IFN-감마), 인터루킨 (예컨대, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 및 IL-12), 종양 괴사 인자 (예컨대, TNF-알파 및 TNF-베타), 에리트로포이에틴(EPO), FLT-3 리간드, 매크로파지 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구-매그로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), CD2 및 ICAM이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 에리트로포이에틴을 취할 경우, 분자는 적혈구로 성숙되는 선조 세포를 야기할 것으로 여겨지는 한편 트롬보포이에틴은 혈소판 경로에 따르는 선조 세포를 유도할 것으로 고려된다. CSF는 골수에서 발견되는 선조 세포를 유도하여 성숙한 혈액 세포의 특정 유형으로 분화되는 림포이신(lymphocine)의 패밀리를 언급한다. 선조 세포로부터 초래되는 성숙한 혈액 세포의 특정 유형은 존재하는 CSF의 유형에 의존적이다. 유사하게, 과립구-매크로파지 콜로니 형성은 GM-CSF의 존재에 의존적이다. 추가로, IL-2, GM-CSF, TNF-알파 및 기타의 인간 형태와 실질적으로 상동인 다른 포유동물의 시토킨이 면역 시스템 상에서 유사한 활성을 나타내는 것으로 입증된다면 본 발명에서 유용할 것이다. 부착소 또는 부속 분자 또는 이들의 조합물을 단독으로 또는 시토킨과 조합하여 적용할 수 있다.

[0114] 유사하게, 임의의 특정 단백질과 실질적으로 유사하나 단백질 서열에서 비교적 적은 변화가 있는 단백질도 본 발명에 이용될 것이다. 단백질 서열의 아미노산 서열에서 일부 적은 변경은 종종 단백질 분자의 기능적 능력을 방해하지 않을 수 있으므로, 본 발명에서 부모 단백질처럼 기능하나 현행의 공지된 서열과 다소 상이한 단백질도 제조될 수 있다. 따라서 생물학적 기능을 유지하는 개개 변이체도 포함된다.

[0115] 바람직한 당단백질은 글리코포린 A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, 인퍼테론, 인터루킨, 항체 및/또는 이의 단편을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0116] 상기 언급된 모든 단백질 분자가, 예컨대 비제한적으로 링커, 활성화 분자 또는 독소와 같은 다른 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0117] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 핵산은 단백질 또는 이의 단편의 분비 형태를 엔코딩한다. 바람직한 구체예에서, 분비 형태에는 트랜스막 도메인이 없다.

[0118] 본 발명에 따라서, "단백질 분자 조성물"이라는 용어는 본 발명의 방법에 따라 발현되고 특히 단리될 수 있는 본 발명의 숙주 세포에서 발현되는 임의의 단백질 분자의 분자들을 의미한다. 상기 단백질 분자 조성물은 하나 이상의 단백질 분자를 포함한다. 상기 단백질 분자의 당형태는 적어도 하나의 당 빌딩 블록에서 상이한 특수한 글리코실화 또는 탄수화물 사슬을 지니는 단백질 분자를 의미하며, 예를 들어 추가의 갈락토오스, 시알산, 2등분GlcNAc, 푸코오스, 또는 예컨대 비제한적으로 동일한 단백질 분자의 또 다른 당형태로부터의 아세틸화 또는 황산화와 같은 또 다른 당 개질이 있다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 단백질 분자 조성물은 숙주 세포에서 발현되는 하나를 초과하는 단백질 분자의 분자들을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 단백질 분자 조성물은 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 적어도 하나, 바람직하게는 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 수득된 동일한 단백질 분자의 단백질 분자 조성물 보다 더 높은 활성을 매개하는 단백질 분자의 상기 당형태 또는 당형태들의 분자를 더 큰 퍼센트로 포함한다. 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 단백질 분자 조성물은 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마, 바람직하게는 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]로부터 수득된 동일한 단백질 분자의 단백질 분자 조성물 보다 더 높은 활성을 매개하는 단

백질 분자의 상기 당형태 또는 당형태들의 분자를 더 큰 퍼센트로 포함한다.

[0119] 본 발명에 따라서, "항체 분자"라는 용어는 임의의 전체 항체 또는 항체 단편 또는 항체 단편을 포함하는 분자를 의미한다. 상기 전체 항체는 동물 기원, 예컨대 이로 제한하는 것은 아니나 인간, 유인원, 설치류, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 낙타, 조류, 닭 또는 상어 기원의 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD를 비제한적으로 포함하는 당업자에게 공지된 하나 이상의 면역글로불린 도메인을 포함하는 임의의 부류 또는 아부류 또는 임의의 분자의 면역글로불린 분자 또는 임의의 항체일 수 있고, 예를 들어 당업자에게 공지된 대로 면역원성을 감소시키거나 친화력을 증가시키기 위해 다양한 비율의 예를 들어 뮤린 및 인간 서열이 전체 항체에 조합되고/거나 돌연변이된 키메라 또는 인간화된 항체와 같이, 다양한 동물 기원의 항체로부터의 단백질 서열을 포함하는 분자일 수도 있다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 전체 항체는 하나 이상의 추가 아미노산 또는 폴리펩티드 서열을 지니는 상기 개시된 전체 항체일 수도 있다.

[0120] 바람직한 구체예에서, 상기 전체 항체는 인간 Fc 영역을 포함하는 인간, 인간화된, 또는 키메라 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgM이다. 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 전체 항체는 인간 Fc 영역을 지니는 인간, 인간화된 또는 키메라 IgG1, IgG4 또는 IgM이다. 상기 인간 Fc 영역은 인간 항체의 Fc 영역의 불변 도메인의 20개 이상의 아미노산 서열, 보다 바람직하게는 100개 이상의 아미노산을 포함하고, 바람직하게는 인간 항체의 하나 이상의 Fc 도메인을 포함하며, 보다 바람직하게는 인간 C감마2 도메인을 포함하고, 더욱 바람직하게는 특정 부류 또는 아부류의 인간 항체의 Fc 영역의 모든 불변 도메인을 포함한다. 상기 인간 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산이 돌연변이된 인간 서열을 포함할 수도 있다.

[0121] 본 발명의 가장 바람직한 구체예에서, 전체 항체 분자는 (i) 예를 들어 인간 항체 생성용 혈액 세포 또는 세포들로부터 생성되거나 마우스 항체 유전자좌가 인간 항체 서열에 의해 적어도 부분적으로 교환된 유전자이식 마우스로부터 생성된 완전한 인간 항체이거나, (ii) 뮤린 또는 래트 항체의 가변 영역의 적어도 일부, 예컨대 프레임워크 영역 또는 프레임워크의 하나 이상의 아미노산이 인간 서열로 교환되거나 인간에서 덜 면역원성인 인간 불변 도메인을 포함하도록 돌연변이된 인간화된 전체 항체이거나, (iii) 가변 영역이 뮤린 또는 래트이고 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 전체 항체이다.

[0122] 상기 완전한 사람 항체, 인간화된 전체 항체, 및 키메라 전체 항체 또는 이들의 일부 뿐만 아니라 적합한 추가 서열을 지니거나 지니지 않는 이들 항체 분자를 작제, 동정, 시험, 최적화 및 선택하는 방법, 및 이들 항체 분자를 엔코딩하는 가장 적합한 핵산을 작제, 동정, 시험 및 선택하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0123] 상기 항체 단편은 상기 전체 항체로부터의 20개 이상의 아미노산, 바람직하게는 100개 이상의 아미노산을 포함하는 항체의 임의의 단편이다. 바람직한 구체예에서, 항체 단편은 Fab, F(ab)2, 디아보디, 트리아보디 또는 테트라보디와 같은 다중 결합 도메인을 포함하는 다중보디(multibodies), 단일 도메인 항체 또는 애피보디(affibodies)와 같은 항체의 결합 영역을 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 단편은, 바람직하게는 두 번째 도메인 (C감마2 도메인)을 포함하는, 이의 불변 도메인의 전부 또는 일부를 지니는 Fc 영역을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 항체 단편은 하나 이상의 아미노산, 폴리펩티드 스트레치 또는 전체 도메인이 결실된 트렁케이션된 전체 항체이다. 이러한 분자는 링커와 같이 분자의 결합을 안정화시키거나 개선시키는 추가의 서열과 조합될 수 있다.

[0124] 상기 항체 단편을 포함하는 분자는 적어도 20개의 아미노산의 임의의 상기 항체 단편 또는 다른 면역글로불린 도메인을 포함하는 임의의 분자이다. 바람직한 구체예에서, 항체 단편을 포함하는 상기 분자는 항체 단편이 이펙터 서열과 같은 다른 단백질 서열, 예를 들어 시토킨, 공-자극 인자, 독소, 또는 바이- 또는 트리-특이적 항체와 같은 다중 결합 특이성을 지니는 분자를 생성하기 위한 다른 항체로부터의 항체 단편, 또는 결합 도메인의 다량체화를 초래하는 MBP (만난 결합 단백질) 도메인과 같은 다량체화 서열, 또는 태그(tag)와 같은 검출, 정제, 분비 또는 안정화용 서열, 국소화 시그널 또는 링커 등에 융합된 융합 분자이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 단편을 포함하는 상기 분자는, 바람직하게는 두 번째 불변 도메인 (C감마2 도메인)을 포함하는, 전체 항체의 Fc 영역 또는 이의 일부를 포함하는 융합 분자이다. 상기 융합 분자는, 분자가 하나의 핵산에 의해 엔코딩되거나 둘 이상의 핵산의 공-발현에 의해 융합됨으로써 융합이 비-공유 또는 공유 단백질 상호작용에 의해 야기되거나 이 둘의 조합에 의해 융합되는 유전자 수단에 의해 융합된다. 항체 단편 및 또 다른 폴리펩티드 서열 또는 단백질 분자 간의 유전자 융합은 유전자 공학처리에 의해 달성될 수 있는데, 여기서 두 부분 모두가 사이에 추가의 아미노산을 지니거나 지니지 않은 단일 핵산에 의해 엔코딩된다. 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 융합 분자는 항체 단편, 예컨대 단일 도메인 항체로부터의 하나 이상의 결합 영역, 또는 Fab 또는 항체로부터 유래되지 않은 결합 서열, 예컨대 렉틴 도메인, 및 두 번째 도메인(C감마 도메인)을 포함하는 Fc 영역 또

는 이의 일부를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 융합 분자는 IL-2, IL-12, IL-15, GM-CSF, 펩티드 독소, 또는 이의 일부를 포함한다. 이들은, 예컨대 분자가 하나의 핵산에 의해 엔코딩되거나 둘 이상의 핵산의 공-발현에 의해 융합됨으로써 융합이 비-공유 또는 공유 단백질 상호작용에 의해 야기되거나 이 둘의 조합에 의해 융합되는 유전자 수단에 의해 항체 단편, 예컨대 단일 도메인 항체, Fab 또는 MBP의 다량체화 서열에 결합된 Fab로부터 융합된다.

[0125] 이러한 모든 항체 분자 또는 이의 일부 뿐만 아니라 적합한 추가 서열을 지니거나 지니지 않는 이들 항체 분자를 작제, 동정, 시험 및 선택하는 방법, 및 이들 항체 분자를 엔코딩하는 가장 적합한 핵산을 작제, 동정, 시험 및 선택하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0126] 본 발명에 따라서, "항체 분자 조성물"이라는 용어는 단리될 수 있는 본 발명의 숙주 세포에서 발현되는 임의의 항체 분자의 분자들을 의미한다. 상기 항체 분자 조성물은 하나 이상의 항체 분자를 포함한다. 상기 항체 조성물은 항체 분자의 하나 이상의 당형태를 포함한다. 상기 항체 분자의 당형태는 적어도 하나의 당 빌딩 블록이 상이한 특수한 글리코실화 또는 탄수화물 사슬을 지니는 단백질 분자를 의미하며, 예를 들어 추가의 갈락토오스, 시알산, 2등분GlcNAc, 푸코오스, 또는 예컨대 비제한적으로 동일한 항체 분자의 또 다른 당형태로부터의 아세틸화 또는 황산화와 같은 또 다른 당 개질이 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 항체 분자 조성물은 숙주 세포에서 발현되는 하나를 초과하는 항체 분자의 분자들을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체 분자 조성물은 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 적어도 하나, 바람직하게는 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 수득된 동일한 항체 분자의 항체 분자 조성물 보다 더 높은 Fc-매개된 세포의 세포독성 및/또는 개선된 결합을 매개하는 항체 분자의 상기 당형태 또는 당형태들의 분자를 더 큰 퍼센트로 포함한다. 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체 분자 조성물은 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마, 바람직하게는 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]로부터 수득된 동일한 항체 분자의 항체 분자 조성물 보다 더 높은 Fc-매개된 세포의 세포독성 및/또는 개선된 결합을 매개하는 항체 분자의 상기 당형태 또는 당형태들의 분자를 더 큰 퍼센트로 포함한다.

[0127] 본 발명에 따라서, "인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포" 또는 동등한 표현은 인간 골수성 백혈병 기원의 임의의 세포 또는 세포주, 또는 백혈병 환자로부터 수득될 수 있는 임의의 인간 골수성 또는 골수성 전구체 세포 또는 세포주, 또는 인간 공여체로부터 수득될 수 있는 임의의 골수성 또는 골수성 전구체 세포 또는 세포주, 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주, 또는 상기 언급된 세포들 중 하나 이상을 포함하는 세포 또는 세포주의 혼합물을 의미한다.

[0128] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포 또는 본 발명의 무한증식 인간 혈액 세포는 상기 언급된 숙주 세포들 중 하나 이상을 융합시킴에 의해 수득된 그러한 세포 또는 세포주, 특히 인간 또는 동물 기원의 다른 세포, 예컨대 이에 제한되지 않으나 B 세포, CHO 세포를 지니는 골수성 백혈병 기원의 것들을 포함한다. 당업자는 인간 골수성 백혈병 기원의 적합한 숙주 세포를 위해 적합한 공급원 및 인간으로부터 적합한 세포 및 세포주를 수득, 생성 및/또는 무한증식시키는 방법을 확인하고 이용할 수 있다.

[0129] 상기 숙주 세포로부터 유래된 세포 또는 세포주라는 용어는 골수성 백혈병 기원의 상기 숙주 세포의 사전 돌연변이 또는 유전자 공학처리를 이용하거나 이용하지 않고 배양 및 클로닝의 임의의 수단에 의해 수득될 수 있고 요망되는 특성을 지니는 상기 숙주 세포로부터 유래된 세포 또는 세포주의 선택을 포함하는 임의의 수단에 의해 수득될 수 있는 임의의 세포 또는 세포주를 의미한다. 상기 배양 및 클로닝은 상이한 특성을 지니는 세포 클론이, 바람직하게는 제한된 희석 또는 세포 분류에 기초한 유동세포분석법과 같은 단일 세포 클로닝 방법을 이용하여 다수 라운드의 게대 및 세포의 클로닝에 의해 일차 세포 배양액, 세포의 배양액 및 심지어 세포 클론의 배양액으로부터 수득될 수 있다는 사실에 기초한다. 바람직한 구체예에서, 상기 숙주로부터 유래된 상기 세포 또는 세포주를 렉틴 또는 탄수화물-결합 항체와 결합시켜 선택한다. 상기 돌연변이는 물리적, 화학적 또는 생물학적 돌연변이원으로 당업자에게 공지된 처리, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 방사, 알킬화제 또는 EMS (에틸 메탄설포네이트), 렉틴과 같은 단백질, 또는 바이러스 입자에 의해 수행될 수 있다. 상기 유전자 공학처리는 부위 특이적 상동 재조합을 통한 유전자의 녹-아웃, 트랜스포손의 이용, 부위-특이적 돌연변이발생, 특정 핵산의 트랜스펙션 또는 유전자의 침묵화(silencing), 또는 유전자 생성물과 같은 당업자에게 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 배양 및 클로닝 방법, 상기 돌연변이 및 돌연변이원 및 상기 유전자 공학처리는 당업자에게 공지되어 있고 일부 실시예가 WO2005/017130 A2, US2003/0115614 A1에 상세하게 개시되어 있거나, 본원에 개시되어 있다. 당업자는 본 발명의 상기 숙주 세포로부터 유래된 적합한 세포 또는 세포주를 생성하는 적합한 방법

또는 방법들의 조합을 선택하고/거나 채용하고/거나 개질시킬 수 있다.

[0130] 상기 숙주 세포로부터 유래된 상기 세포 또는 세포주는 이들의 부모 세포 또는 세포주와 비교할 때 유리한 이들 세포의 특성, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 짧은 배가 시간, 더 빠른 성장, 높은 밀도하에 성장할 가능성, 더 많이 생성할 수 있는가, 무혈청 조건하에 및/또는 무-단백질 배지에서 성장하는가, 더 높은 클로닝 효율, DNA의 경우 더 높은 트랜스펙션 효율, 항체 분자 조성물의 더 높은 발현 속도, 발현되는 항체 분자 조성물에 대한 더 높은 활성, 발현되는 항체 분자 조성물의 더 높은 균질성, 및/또는 규모확대에 더 많이 강한가에 기인하여 선택된다. 유리한 특성을 지니는 이러한 세포를 선택하는 방법이 당업자에게 공지되어 있거나 본원에 개시되어 있다. 본 발명은 (a) 인간 골수성 백혈병 세포를 렉틴 또는 탈시알릴화된 에피토프 또는 시알산이 결여된 에피토프를 인식하나 에피토프의 시알릴화된 형태에 결합되지 않거나 현저히 덜 결합되는 항체와 함께 인큐베이션하고, (b) 상기 렉틴 또는 항체에 결합된 세포를 단리시키고, (c) 단리된 세포를 적합한 시간 동안 배양하고, (d) 렉틴 또는 시알산을 지니는 에피토프에 결합되는 항체에 강하게 결합되는 세포, 세포들 또는 세포 클론을 선택하는 것을 포함하여, 본 발명의 숙주 세포를 생성하는 방법을 제공한다.

[0131] 더욱 바람직한 것은, 상기 렉틴 또는 탈시알릴화된 에피토프 또는 시알산이 결여된 에피토프를 인식하는 상기 항체가 Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, 또는 PNA이고, 상기 인간 골수성 백혈병 세포가 세포주 K562, KG-1, MUTZ-3, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, H9, NM-H10인 상기 개시된 방법이다.

[0132] 높은 시알릴화 및 신속한 세포 성장과 같은 유리한 생물공학적 특성을 지니는 숙주 세포를 생성하는 방법은 (i) 기원 세포로서 본 발명의 인간 골수성 백혈병 세포, 바람직하게는 K562를, 바람직하게는 자기 비즈에 결합된, 렉틴 또는 바람직하게는 탈시알릴화된 에피토프 또는 시알산이 결여된 에피토프를 인식하나 에피토프의 시알릴화된 형태에 결합되지 않거나 덜 결합되는 항체, 예컨대 이로 제한되지 않으나 Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, 또는 PNA (아라키스 히포게아, 땅콩 응집소로부터의 렉틴)과 함께 인큐베이션하고, (ii) 상기 렉틴 또는 항체에 결합된 세포를 단리시키고, (iii) 단리된 세포를 적합한 시간 동안 배양하고, (iv) 바람직하게는 단일 세포 클로닝 이후에, 시알산을 지니지 않는 에피토프에 결합된 항체 또는 렉틴, 예컨대 SNA (삼부쿠스 니그라 응집소) 또는 MAL (마악키아 아무렌시스 렉틴), MAL I (마악키아 아무렌시스 렉틴 I), 바람직하게는 SNA에 강하게 결합된 세포, 세포들 또는 세포 클론을 선택하는 것을 포함한다.

[0133] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 (i) K562를 자기 비즈에 결합된 Nemod-TF1, Nemod-TF2, A78-G/A7, 또는 PNA와 함께 인큐베이션시키고, (ii) 상기 렉틴 또는 항체에 결합된 세포를 단리시키고, (iii) 단리된 세포를 약 1 내지 6주의 적합한 시간 동안 배양하고, (iv) 단일 세포 클로닝 이후에 SNA에 강하게 결합된 세포 클론을 선택하는 것을 포함하여, 높은 시알릴화 및 신속한 세포 성장과 같은 유리한 생물공학적 특성을 지니는 본 발명의 숙주 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 이러한 세포는 기원 세포 보다 SNA에 더 강하게 결합되며, 또 다른 바람직한 구체예에서, 이들은 기원 세포 보다 더 빠르게 성장한다.

[0134] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 기원 세포를 단계 (i) 이전에 에틸메탄설포네이트로 처리한다.

[0135] 당업자는 적합한 조건 및 방법을 선택하고 본 발명의 관점에서 이러한 숙주 세포를 생성하기 위해 이들을 최적화할 수 있다. 일부 단계에 대한 보다 상세한 설명을 WO2005/017130 A2 및 WO2005/080585 A1에서 찾아볼 수 있다.

[0136] 일 구체예에 따르면, 하기 그룹 1 내지 4로부터 선택되는 무한증식 사람 혈액 세포가 숙주 세포로 사용된다:

[0137] (a) K562와 같은 높은 시알릴화 활성을 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 1;

[0138] (b) 유전적 결함 또는 발현 억제 수단(예를 들어, RNAi)으로 인해 낮거나 존재하지 않는 시알릴화; NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] 및 GTX-2에 필적하며 이를 포함하는 활성을 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 2;

[0139] (c) NM-H9 및 NM-H9D8과 같은 K562보다 더 높은 실알릴화도를 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 3;

[0140] (d) NM-H9D8-E6 및 NM H9D8-E6Q12와 같은 낮거나 심지어 존재하지 않는 푸코실화 활성을 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 4.

[0141] 바람직한 일 구체예에서, 상기 형성된 세포주는 NM-H9D8이다. 상기 기술된 방법으로 형성된 가장 바람직한 세포 클론으로, NM-H9D8을 선택하였고, 이것을 독일 13125 베를린 로베르트-로슬레-슈트라쎄 10에 소재한 글리코토페 게엠베하(Glycotope GmbH)에 의해 독일 브라운슈베이그에 소재한 "DSMZ-도이치 잠룽 폰 미크로오르가니스멘 운트 첼쿨투렌 게엠베하(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)"에 2006년 9월 15일 자

로 수탁 번호 DSM ACC 2806으로 수탁하였다. NM-E-2F9, NM-C-2F5, 또는 NM-H9D8-E6(DSM ACC 2807)과 같은 다른 세포 클론을, 모세포를 하나 또는 그 초과의 렉틴과 함께 인큐베이션시킨 다음 유세포 분석기에 의한 세포 분류를 이용하여 단일 세포 클로닝에 의해 선택하여, 이로써 포지티브 선택 과정 또는 네거티브와 포지티브의 조합된 선택 과정을 수행하였다. 안정된 특성을 갖는 세포 클론을 얻기 위해서, 얻어진 세포 클론을 상기 기술된 제한된 희석에 의해 적어도 1회 재클로닝하였다.

[0142] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 바람직하게는 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포인 상기 무한증식 사람 혈액 세포를 성장시키고 혈청 비함유 조건 하에서 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물을 생성한다. 더욱 추가의 바람직한 구체예에서, 바람직하게는 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포인 상기 무한증식 사람 혈액 세포를 혈청 비함유 조건 하에서 성장시킨다. 또한, 단백질/항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 이들 세포 내로 도입될 수 있고 단백질/항체 분자 조성물이 또한 혈청 비함유 조건 하에서 분리될 수 있다. 혈청 비함유 조건 하에서 작업할 수 있는 것은 혈청 오염이 조절 방법에서는 허용될 수 없기 때문에 치료 단백질을 제조하는 경우에 특히 중요하다.

[0143] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포는 세포 또는 세포주 K562, KG1, MUTZ-2, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래한 세포 또는 세포주, 상기 언급된 세포 중 적어도 하나를 포함하는 세포 또는 세포주의 혼합물이다. 숙주 세포는 바람직하게는, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC 2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC 2806], 또는 NM-H9D8-E6 DSM ACC 2807, 또는 NM H9D8-E6Q12 [DSM ACC 2856], GT-2X (독일 13125 베를린 로베르트-로슬레-슈트라쎄 10에 소재한 글리코토페 게엠베하에 의해 독일 브라운슈베이그에 소재한 "DSMZ-도이치 잠룽 폰 미크로오르가니스멘 운트 첼쿨투렌 게엠베하"에 2007년 9월 7일 자로 수탁 번호 DSM ACC 으로 수탁됨) 또는 이들 세포주의 임의의 것으로부터 유래한 세포 또는 세포주로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.

[0144] 세포 NM-F9 [DSM ACC2606] 및 NM-D4 [DSM ACC2605]를, 본 출원인에게 본원에 기재된 증착된 생물학적 물질을 지칭하도록 위임한, 독일 13125 베를린 로베르트-로슬레-슈트라쎄 10에 소재한 네모드 바이오테라퓨틱스 게엠베하 운트 코.카게(Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG)에 수탁하였다.

[0145] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 사람 골수성 백혈병 유래의 숙주 세포는 세포 또는 세포주 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래한 세포 또는 세포주이다.

[0146] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포는 세포 또는 세포주 K562 [ATCC CCL-243]과 같은 세포 또는 세포주 K562, 또는 상기 숙주세포로부터 유래한 세포 또는 세포주이다.

[0147] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포는 세포 또는 세포주 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC 2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, 또는 NM-H9D8-E6, 또는 GT-2X 또는 NM H9D8-E6Q12 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래한 세포 또는 세포주이다.

[0148] 본 발명의 더욱 더 바람직한 구체예에서, 본 발명의 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포는, 혈청 비함유 조건 하에 성장하여 본 발명의 항체 분자 조성물을 생성하는 세포, 세포들 또는 세포주 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC 2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, 또는 NM H9D8-E6, GT-2X, 또는 NM M9D8-E6Q12이며, 및 가장 바람직하게는 혈청 비함유 조건 하에서 성장하는 하기 기재된 세포, 세포들 또는 세포주이며, 항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 이들 세포 내에 도입될 수 있고, 항체 분자 조성물은 혈청 비함유 조건 하에서 분리된다.

[0149] 본 발명의 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명의 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포는, 혈청 비함유 조건 하에서 성장하여 본 발명의 항체 분자 조성물을 생성하는 세포, 세포들 또는 세포주 NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC 2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, GT-2X, 또는 NM H9D8-E6, 또는 NM M9D8-E6Q12이며, 및 가장 바람직하게는 혈청 비함유 조건 하에서 성장하는 하기 기재된 세포, 세포들 또는 세포주이며, 항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 이들 세포 내에 도입될 수 있고, 항체 분자 조성물은 혈청 비함유 조건 하에서 분리된다.

[0150] 일 구체예에 따르면, 무한증식 사람 혈액 세포 및 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포는 시알릴화 결핍된 세포주 NM-F9 및 NM-D4 또는 동일한 특성을 갖는 상기 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래한 세포 또는 세포주의 것이 아니다. 이 구체예는 높은 시알릴화도를 목적으로 하는 경우에 유리하다. 이들 구체예에 대해서, 숙주 세포는 바람직하게는 K562, NM H9D8, NM H9D8-E6, NM H9D8-E6Q12, 및 이들 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래한 숙주 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.

[0151] 본 발명과 함께 기재된 세포주는 14 내지 24시간의 배가 시간(doubling time)을 갖는데, 상기 배가 시간은 본

발명의 세포주에 따라 다르나 다른 포유동물 발현 시스템과 비교하여 매우 빠른 것이다.

[0152] 또한, 사람 세포주에서의 높은 수율의 항체 발현을 위해서는 어떠한 일반적으로 적합한 고 발현 벡터 시스템도 알려져 있지 않은데, 그 이유는 사람 세포들이 일반적으로 DHFR 유전자를 지니고 있어서 dhfr/메토트렉세이트 증폭 시스템의 사용을 허용하지 않기 때문이다. 따라서, 본 발명의 추가 구체예에 따르면, 생성물 수율을 증가시킬 수 있는 구체예가 제공된다.

[0153] 이 구체예에 따르면, 부가적으로 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체를 엔코딩하는 핵산이 숙주 세포 내에 도입된다. 디히드로폴레이트 리덕타아제, 또는 DHFR은 디히드로폴산을, 전자 공여체로서 NADPH를 사용하여, 1-탄소 전달 화학에서 테트라히드로폴레이트 보조인자의 종류로 전환될 수 있는 테트라히드로폴릭산으로 환원시킨다. 안티폴레이트는 세포사를 일으키는 DHFR 효소를 억제시킨다. 안티폴레이트 내성있는 DHFR 변이체를 엔코딩하는 핵산을 제공하기 위해서는, 핵산으로 형질감염된 세포를 선택하기 위한 도구가 제공되며, 또한 상기 도구에 의해 숙주 세포 내에서 발현될 핵산이 증폭될 수 있다.

[0154] 상기 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체를 엔코딩하는 핵산은 예를 들어, 숙주 세포 내에서 발현될 단백질/항체를 엔코딩하는 핵산과는 별도의 벡터를 통해 도입될 수 있다. 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체를 엔코딩하는 벡터를 기본적으로 단백질/항체를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 벡터와 동시에 형질감염시키는 것이 바람직하다. 이 구체예는, 발현될 상기 단백질/항체를 엔코딩하는 핵산이 상기 단백질/항체를 엔코딩하는 핵산의 증폭이 요망되는 경우에 유리한 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체를 엔코딩하는 핵산과 동일한 유전자 위치에 있는 숙주 세포 게놈 내에 통합되게 한다.

[0155] 다르게는, 발현될 상기 단백질의 적어도 일부를 엔코딩하는 핵산, 및 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체를 엔코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 시스템이 사용될 수 있다.

[0156] 이후 숙주 세포가 상기 안티폴레이트와 함께 배양된다. 이것은, 상기 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체를 엔코딩하는 핵산을 사용하여 성공적으로 형질감염된 그러한 숙주 세포가 안티폴레이트가 존재함에도 불구하고 성장할 수 있다는 효과를 갖는다. 이로써 성공적으로 형질감염된 세포가 선택될 수 있다.

[0157] 추가의 구체예에 따르면, 상기 단백질/항체의 적어도 일부를 엔코딩하는 핵산 서열은, 배양물 내에서 안티폴레이트 농도를 계단식으로 증가시킴으로써 증폭된다. 배지 중에서 안티폴레이트 농도가 증가하면 게놈 중에서 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체의 복사체(copiese)가 증가한다. 이것은 세포 내에서의 재조합 사건에 의해 이루어지는 것으로 추정된다. 이에 의해, 발현될 단백질의 적어도 일부를 엔코딩하는 핵산의 복사체의 수는, 상기 단백질을 엔코딩하는 핵산이 게놈 내의 안티폴레이트 내성있는 DHFR 변이체 근방에 위치하는 경우에 또한 증가되는데, 이것은 개별 벡터를 동시에 형질감염시키거나 양자의 핵산 서열을 포함하는 하나의 벡터를 이용함으로써 촉진될 수 있다. 이러한 메커니즘에 의해, 더욱 높은 수율로 단백질/항체를 발현하는 숙주 세포가 얻어진다.

[0158] 바람직하게는, 안티폴레이트는 메토트렉세이트이다.

[0159] 상기 단백질, 바람직하게는 항체 분자 또는 이의 일부를 엔코딩하는 핵산 서열은 바람직하게는, 상기 숙주 세포를 안티폴레이트, 바람직하게는 메토트렉세이트의 적어도 2개의 연속적인 라운드와 함께 배양시킴으로써 증폭되어, 이로써 상기 안티폴레이트, 바람직하게는 메토트렉세이트의 농도가 각각의 연속적인 라운드에서 적어도 100%까지 증가한다.

[0160] 상기 안티폴레이트 내성있는 DHFR-변이체를 제공하기 위한 적합한 핵산은 서열번호 1 내지 9의 그룹, 바람직하게는 서열번호 1의 폴리펩티드를 엔코딩한다.

[0161] 이러한 증폭 시스템에 대한 추가 상세사항 및 구체예가 또한 하기한 추가의 상세한 설명에 기술되어 있다.

[0162] 본 발명은 또한, 단백질, 바람직하게는 항체 분자 조성물을 생성하는 방법으로서,

[0163] (a) 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포 내에, 단백질 및 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산, 및 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹, 바람직하게는 서열번호 1의 적어도 하나의 폴리펩티드를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산을 도입시키는 단계;

[0164] (b) 상기 단백질, 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 핵산 서열을, 상기 숙주 세포를 메토트렉세이트와 함께 배양시킴으로써, 바람직하게는 상기 숙주 세포를 메토트렉세이트의 적어도 두개의 연속적인 라운드와 함께 배양시킴으로써 증폭시켜서, 이에 의해 메토트렉세이트의 농도가 각각의 연속적인

라운드 내에서 바람직하게는 적어도 약 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 100%까지 증가하는 단계;

[0165] (c) 상기 단백질, 바람직하게는 항체 분자 조성물을 생성시킬 수 있는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0166] (d) 바람직하게는 항체 분자 조성물인 상기 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0167] 본 발명은 또한 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질 조성물, 바람직하게는 항체 분자 조성물을 생성시키는 방법으로서,

[0168] (a) 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포 내에, 단백질, 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산을 도입시키는 단계;

[0169] (b) 바람직하게는 항체 분자 조성물인 상기 단백질 조성물을 생성시킬 수 있는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양시키는 단계; 및

[0170] (c) 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 바람직하게는 항체 분자 조성물인 상기 단백질 조성물을 분리시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0171] 더욱이, 본 발명은 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질 조성물, 바람직하게는 항체 분자 조성물을 생성시키는 방법으로서,

[0172] (a) 사람 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포 내에, 단백질, 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산, 및 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹, 바람직하게는 서열번호 1의 적어도 하나의 폴리펩티드를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 적어도 하나의 핵산을 도입시키는 단계;

[0173] (b) 상기 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 핵산 서열을, 상기 숙주 세포를 메토트렉세이트와 함께 배양시킴으로써, 바람직하게는 상기 숙주 세포를 메토트렉세이트의 적어도 두개의 연속적인 라운드와 함께 배양시킴으로써 증폭시켜, 이에 의해 메토트렉세이트의 농도가 각각의 연속적인 라운드 내에서 바람직하게는 적어도 약 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 100%까지 증가하는 단계;

[0174] (c) 바람직하게는 항체 분자 조성물인 상기 단백질 조성물을 생성시킬 수 있는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0175] (d) 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는, 바람직하게는 항체 분자 조성물인 상기 단백질 조성물을 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0176] 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 상기 핵산, 및 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹, 바람직하게는 서열번호 1의 적어도 하나의 폴리펩티드를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 상기 핵산은 하나의 핵산 또는 2개의 독립된 핵산일 수 있다.

[0177] 최적화된 글리코실화 프로필을 갖는 단백질을 얻기에 적합한 숙주 세포를 선택하기 위해서는, 본 발명에 따른 스크리닝/선택 방법을 실시하는 것이 유리하다. 적합한 숙주 세포가 본 발명에 따른 선택 방법에 의해 결정된 후에, 상기 숙주 세포는 이후 청구항 제 1항 내지 제 20항에 정의된 바와 같은 단백질을 생성하기 위해 사용된다.

[0178] 따라서, 본 발명은 또한 하기 글리코실화 특성 (i) 내지 (viii) 중 적어도 하나를 갖는 단백질을 생성하기 위해 숙주 세포를 선택하는 방법으로서,

[0179] (a) 적어도 두개의 상이한 무한증식 사람 혈액 세포 내에 숙주 세포로서 단백질 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산을 도입시키는 단계;

[0180] (b) 각각의 상이한 숙주 세포가 다른 숙주 세포에 의해 생성된 글리코실화 패턴과는 상이한 글리코실화 패턴을 갖는 단백질 조성물을 생성하는 상기 적어도 두개의 상이한 숙주 세포를 배양시키는 단계;

[0181] (c) 적어도 두개의 상이한 숙주 세포와 상이한 글리코실화 패턴을 보유하는 상기 발현된 단백질 조성물을 분리시키는 단계; 및

[0182] (d) 하기 (i) 내지 (viii)에서 정의된 글리코실화 특징 중 적어도 하나를 갖는 단백질 조성물을 생성하는 상기 숙주 세포를 선택하는 단계를 포함하는 방법:

[0183] (i) 단백질이 어떠한 검출가능한 NeuGc도 포함하지 않고/않거나;

[0184] (ii) 단백질이 전체 탄수화물 구조 또는 탄수화물 구조 상의 상기 단백질 분자 조성물 내 단백질 분자의 하나의 특정 글리코실화 부위에, 그 내부에서 발현되는 경우 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]으로부터 분리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물에서의 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 증가된 갈락토실화도를 지니고/지니거나;

[0185] (iii) 단백질이 전체 탄수화물 구조 또는 탄수화물 구조 상의 상기 단백질 분자 조성물 내 상기 단백질 분자의 하나의 특정 글리코실화 부위에, 그 내부에서 발현되는 경우 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]으로부터 분리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물에서의 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 5% 이상 더 많은 G2 구조의 양을 지니고/지니거나;

[0186] (iv) 단백질이 전체 탄수화물 구조 또는 탄수화물 구조 상의 상기 단백질 분자 조성물 내 상기 단백질 분자의 하나의 특정 글리코실화 부위에, 그 내부에서 발현되는 경우 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]으로부터 분리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물에서의 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 5% 이상 더 적은 G0 구조의 양을 지니고/지니거나;

[0187] (v) 단백질이 어떠한 검출가능한 말단 Gal알파-3Gal을 포함하지 않고/않거나;

[0188] (vi) 단백질이 전체 탄수화물 구조 또는 탄수화물 구조 상의 상기 단백질 분자 조성물 내 상기 단백질 분자의 하나의 특정 글리코실화 부위에, 그 내부에서 발현되는 경우 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]으로부터 분리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물에서의 동일한 양의 단백질 분자와 비교하여 5% 이상 더 적은 푸코스의 양을 포함하고/포함하거나;

[0189] (vii) 단백질이 이등분되는 GlcNAc를 함유하는 적어도 하나의 탄수화물 구조를 포함하고/하거나;

[0190] (viii) 그 내부에서 발현되는 경우 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]으로부터 분리된 동일한 단백질 분자의 적어도 하나의 단백질 분자 조성물의 시알릴화 패턴과 비교하여 변화된 시알릴화 패턴을 가짐.

[0191] 글리코실화 패턴에 관한 상세사항, 및 상기 패턴을 얻는데 적합한 세포주는 상기 기술되어 있고, 이는 또한 본 발명에 따른 적합한 숙주 세포를 선택하기 위한 스크리닝 방법에도 적용가능하며 이에도 적합하다.

[0192] 청구항 제 1항 내지 제 20항에 기재된 생성 방법을 확립하기 전에 각각의 스크리닝 단계를 실시하는 것이 유리한데, 그 이유는 이 구체예에 의해 최적화된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성하는데 가장 적합한 숙주 세포가 선택될 수 있기 때문이다. 이 스크리닝 시스템의 기본 구상에 따르면, 관심받는 단백질은 서로 다른 글리코실화 패턴을 갖는 적어도 2개의 상이한 세포주에서 발현된다. 예를 들어 하나의 세포주는 높은 시알릴화도를 나타낼 수 있고, 다른 하나는 낮은 시알릴화도(또는 푸코실화도 및/또는 갈락토실화도) 또는 심지어 알려지지 않은 글리코실화 특성을 나타낼 수 있다. 따라서 상이한 세포주로부터 얻어진 생성물은 각각의 세포주에 대한 글리코실화 패턴 특성을 보유한다.

[0193] 예를 들어 활성(예를 들어, 항체에서의 ADCC 및 CDC), 친화도, 혈청 반감기 및 다른 중요한 특성에 대해 상이한 세포주에서 생성된 단백질의 특성이 이후 측정될 수 있다. 그 결과 글리코실화 패턴에 관해 최적화되는 단백질을 얻기 위해 최선의 글리코실화 구성(machinery)을 갖는 세포주를 선택할 수 있게 된다. 결정적인 특성(예를 들어, 친화도, 혈청 반감기 등)이 달라지기 때문에, 이 방법이 특히 유리하다.

[0194] 바람직하게는, 생성될 상기 단백질은 하기 특징 중 적어도 하나를 나타낸다:

[0196] *(a) 상기 단백질이 항체 분자 조성물인 경우에, 이것은 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현되는 경우 동일한 항체 분자로부터 적어도 하나의 항체 분자 조성물의 Fc-매개된 세포독성보다 2배 이상 더 높은, 증가된 Fc-매개된 세포독성을 갖고/갖거나;

[0197] (b) 상기 단백질이 항체분자 조성물인 경우에, 이것은 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현되는 경우 동일한 항체 분자로부터 적어도 하나의 항체 분자 조성물의 결합보다 50% 이상 더 큰, 증가된 항원 매개된 또는 Fc-매개된 결합을 갖고/갖거나;

[0198] (c) 상기 단백질은, 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현되는 경우 동일한 단백질 분자로부터 적어도 하나의 항체 분자 조성물의 수율보다 10% 이상 더 큰, 상기 단백질 분자 조성물의 증가된 평균 또는 최대 수율

을 갖는다.

[0199] 일 구체예에 따르면, 상기 숙주 세포의 적어도 하나는 무한증식 사람 혈액 세포이고 바람직하게는 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주와 같은 사람 골수성 백혈병 기원의 세포이다.

[0200] 사람 골수성 백혈병 유래의 적어도 하나의 숙주 세포는 하기 그룹 1 내지 4 중 하나로부터 선택될 수 있다:

[0201] (a) K562 또는 이로부터 유래한 세포 또는 세포주와 같은 높은 시알릴화 활성을 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 1,

[0202] (b) 유전적 결함 또는 발현 억제 수단(예를 들어, RNAi)으로 인해 NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605] 및 GTX-2 또는 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주와 같은 낮거나 존재하지 않는 시알릴화를 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 2;

[0203] (c) NM-H9 및 NM-H9D8, 또는 이로부터 유래하는 세포 또는 세포주와 같은 K562보다 더 높은 시알릴화도를 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 3;

[0205] *(d) NM-H9D8-E6 또는 이로부터 유래하는 세포 또는 세포주와 같은 낮거나 존재하지 않는 푸코실화 활성을 갖는 숙주 세포를 포함하는 그룹 4.

[0206] 바람직하게는, 스크리닝 과정에 사용된 둘 또는 셋 이상의 숙주 세포가 상기 그룹으로부터 선택된다. 그러나, 분석된 상이한 글리코실화 패턴을 추가로 확장시키기 위해 본 발명에 따른 스크리닝 시스템 중에, 다른 기원으로부터 유래한 다른 숙주 세포(예를 들어, Hek 293 세포)를 포함할 수도 있다.

[0207] 바람직하게는 생성된 숙주 세포는 단백질, 특히 표 9에 도시된 글리코실화 패턴 중 하나 이상을 나타내는 항체를 생성한다.

[0208] 본 발명에 따르면, 용어 핵산을 도입하는이란, 하나의 핵산, 또는 둘 또는 그 초과의 핵산을, 이들로 제한되는 것은 아니나 전기천공법, 양이온 지질, 칼슘 포스페이트, DEAE-덱스트란을 이용한 형질감염, 또는 아데노바이러스 또는 레트로바이러스 또는 이들의 조합물과 같은 바이러스 입자에 의한 감염과 같은 방법으로 포유동물의 숙주 세포 또는 세포들 내로 도입시키기 위한 당업자에게 공지된 임의의 방법을 의미한다. 당업자는 본 발명의 하나 또는 그 초과의 핵산을 도입하기에 적합한 방법을 선택하고 최적화할 수 있다.

[0209] 본 발명에 따르면, 항체 분자를 엔코딩하는 핵산은 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 임의의 핵산이다. 이에 의해 본 발명의 항체 분자는 1개 또는 다수개의 핵산 분자에 의해 엔코딩될 수 있다.

[0210] 상기 핵산에 의해 엔코딩된 항체 분자의 상기 일부는 적어도 하나의 20개 아미노산의 서열, 더욱 바람직하게는 항체 분자 또는 이 항체 분자의 불변 및/또는 가변 도메인의 적어도 100개의 아미노산을 포함한다. 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 상기 포함된 서열은 적어도 하나의 다른 서열, 예컨대 인트론에 의해 분리될 수 있다. 도메인의 서열은 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0211] 본 발명에 따르면, 단백질 분자를 엔코딩하는 핵산은 단백질 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 임의의 핵산이다. 이에 의해 본 발명의 단백질 분자는 단일 또는 다수개의 핵산 분자에 의해 엔코딩될 수 있다. 단백질 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 서열은 예를 들어 인트론과 같은 적어도 하나의 다른 서열에 의해 분리될 수 있다. 단백질 분자의 서열은 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0212] 바람직한 구체예에서, 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 핵산은 항체 분자의 적어도 하나의 가변 및/또는 적어도 하나의 불변 도메인, 더욱 바람직하게는 상기 도메인 둘 모두, 더욱 바람직하게는 불변 도메인 또는 도메인들의 적어도 일부에서 사람 서열을 포함하는 그러한 것, 및 더욱 더 바람직하게는 사람 C감마2 도메인을 포함하는 그러한 것, 및 가장 바람직하게는 특정 부류 또는 하위부류의 사람 항체의 Fc 영역의 모든 불변의 도메인 및 가변 도메인을 포함하는 그러한 것을 포함한다.

[0213] 일 구체예에 따르면, 단백질 및 특히 항체 분자는 단일의 핵산에 의해 엔코딩된다. 다른 바람직한 구체예에서, 단백질, 특히 항체 분자는 2개의 핵산 또는 3개의 핵산에 의해 엔코딩된다.

[0214] 추가의 바람직한 구체예에서, 하나의 핵산은 가벼운 사슬의 가변 및/또는 불변 도메인을 엔코딩하는 항체 분자의 한 부분을 엔코딩하며, 다른 핵산은 무거운 사슬의 가변 및/또는 적어도 하나의 불변 도메인을 엔코딩하는

항체 분자의 다른 일부를 엔코딩한다.

[0215] 본 발명에 따르면, 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹의 적어도 하나의 폴리펩티드를 엔코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 핵산은, 상기 핵산이 서열번호 1내지 서열번호 9의 그룹, 바람직하게는 서열번호 1의 적어도 하나의 폴리펩티드를 엔코딩함을 의미한다. 상기 서열이 본 발명의 숙주 세포 내로 성공적으로 도입될 수만 있다면 임의의 수의 이들 서열이 적합하다. 바람직한 구체예에서, 상기 핵산은 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹의 1개, 2개 또는 3개의 폴리펩티드, 더욱 바람직하게는 1개의 폴리펩티드, 및 가장 바람직하게는 서열번호 1의 폴리펩티드를 엔코딩한다. 본 발명의 측면에서, 상기 핵산은 또한 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹, 바람직하게는 서열번호 1의 폴리펩티드를 엔코딩할 수 있는데, 이는 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 갖는데, 이 경우 상기 돌연변이는 본원의 다른 곳에 기재된 메토트렉세이트에 의해 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 핵산을 증폭시킬 수 있어야 한다.

[0216] 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹, 바람직하게는 서열번호 1의 적어도 하나의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열은 본원의 다른 곳에 기재된 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부를 엔코딩하는 핵산과 동일한 핵산 분자의 일부일 수 있거나 별도의 핵산 분자 상에 존재할 수 있다.

[0217] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹, 가장 바람직하게는 서열번호 1로부터 선택된 서열을 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 별개의 핵산이 본 발명의 항체 분자 또는 이의 일부를 엔코딩하는 상기 핵산 또는 핵산들과는 독립적으로 본 발명의 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 이것은, 본 발명의 항체 분자 또는 이의 일부를 엔코딩하는 상기 핵산 또는 핵산들을 도입시키기 전 또는 후에, 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹으로부터 선택된 서열을 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 별개의 핵산을 함께 도입시킴으로써 수행될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 이것은 나란히 수행되며, 다른 바람직한 구체예에서 본 발명의 숙주 세포는 이미 서열번호 1 내지 서열번호 9의 그룹, 가장 바람직하게는 서열번호 1로부터 선택된 서열을 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 별개의 핵산을 포함한다.

[0218] 추가의 바람직한 구체예는 실시예에 기재되어 있다.

[0219] 안정하게 도입된 상기 핵산, 또는 바람직하게는 항체 분자 또는 이의 분획인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산의 여러 복사물의 증폭은 본원의 다른 곳에서 그리고 실시예에 기재된 바와 같이 메토트렉세이트를 이용하여 수행될 수 있다.

[0220] 바람직한 구체예에서, 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부인 단백질을 엔코딩하는 핵산은 핵산이 성공적으로 도입된 그러한 세포의 선택을 허용하는 적어도 하나의 다른 유전자 요소, 예컨대 이들로 제한되는 것은 아니나 항생제 내성 유전자, 예컨대 이들로 한정되는 것은 아니나 푸로마이신 또는 네오마이신 내성에 대해 코딩되는 유전자 요소를 포함한다. 또한, 이들 핵산은 본 발명의 숙주 세포 내에서 항체 분자를 발현시키기 위한, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 부위, 및/또는 인트론과 같은 하나 또는 다수개의 유전자 요소; 및 복제의 세균 기원, 형질감염된 세균을 선택하기 위한 프로모터 및 요소, 세균에서 핵산을 증식시키기 위한 항생제 내성 유전자와 같은 유전자 요소를 포함한다.

[0221] 적합한 프로모터에는 사이토메갈로바이러스(CMV)의 IE(immediately early: 즉시 초기) 유전자의 프로모터, SV40 초기 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 열 충격(heat shock) 프로모터, SR 알파 프로모터, EF-1 알파 프로모터 등이 포함된다. 사람 CMV의 IE 유전자의 인핸서가 프로모터와 함께 사용될 수 있다.

[0222] 상기한 그리고 추가의 유전자 요소는 당업자에게 공지되어 있으며, 이들은 선택되고, 조합되고, 최적화된 다음, 당업자에 의해 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산 내로 도입된다. 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산 또는 핵산 조합체의 바람직한 구체예 및 사용 및 조합을 위한 바람직한 유전자 요소가 본원 및 실시예에 기술되어 있으나, 본 발명은 그러한 것들의 사용에 제한되지 않으며, 이들은 당업자에 의해 조합되어 추가로 최적화될 수 있다.

[0223] 당업자는 적합한 유전자 요소를 선택 및/또는 조합하고, 본 발명의 하나 또는 그 초과의 핵산을 본 발명에 따른 세포주 내로 도입시키도록 조화된 핵산 벡터 또는 요소를 작제할 수 있다.

[0224] 바람직하게는 항체 분자 또는 적어도 하나의 이의 일부인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산 또는 핵산의 조합체; 상기 추가의 유전자 요소; 항체 분자 조성물을 발현시키기 위해 본 발명의 숙주 세포 내에서 또는 증식을 위해 세균 내로 이들을 형질감염시키는 것과 같이 이들을 도입시키는 방법; 이들 핵산 또는 핵산들을 작제하고, 동정하고, 시험하고, 최적화하고, 선택하고, 조합시키고, 이들을, 성공적으로 형질감염되는 그러한 세포의 선택을

위해 적합한 추가의 서열과 조합시키는 방법; 및 이들 항체 분자를 엔코딩하는 가장 적합한 핵산을 작제하고, 동정하고, 시험하고 선택하는 방법이 당업자에게 공지되어 있다.

[0225] 본 발명의 바람직한 구체예를 실시예에서 상세하게 기술한다.

[0226] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 바람직하게는 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분인 단백질을 엔코딩하는 핵산은 핵산이 성공적으로 도입된 본 발명의 숙주 세포를 선택하기 위한 유전자 엘리먼트, 예컨대 이로 제한하는 것은 아니나 네오마이신 또는 푸로마이신을 포함하고, 보다 바람직하게는 EF-1알파 또는 CMV 프로모터와 같은 프로모터를 추가로 포함하며, 보다 바람직하게는 CMV 인핸서(enhancer)를 추가로 포함하고, 더욱 바람직하게는 복제용 유전자 엘리먼트 및 핵산으로 트랜스펙션된 세균을 선택할 수 있게 하는 유전자 엘리먼트, 예컨대 세균에서 상기 핵산의 증가(multiplication)를 위한 ColE1 복제 기원을 포함하며, 심지어 더욱 바람직하게는 COS 세포에서 상기 핵산의 증가를 위한 유전자 엘리먼트, 예컨대 SV40 기원을 추가로 포함한다. 이러한 엘리먼트는 당업자에게 공지되어 있고 당업자에 의해 선택되고, 조합되며, 최적화되고 이용될 수 있다.

[0227] 심지어 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 상기 개시된 핵산은 하나의 핵산 서열을 포함한다. 바람직하게는 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 핵산이 푸로마이신 내성 또는 네오마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트 또는 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열, 보다 바람직하게는 서열번호 1을 엔코딩하는 핵산 서열을 추가로 엔코딩한다.

[0228] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 상기 개시된 핵산은 항체 분자의 중쇄 및/또는 경쇄의 하나 이상의 불변 도메인 및 가변 도메인을 엔코딩하는 하나 이상의 서열을 포함한다.

[0229] 심지어 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 상기 개시된 핵산은 전체 항체 분자의 경쇄의 가변 도메인 및 불변 도메인 또는 전체 항체 분자의 중쇄의 가변 도메인 및 모든 불변 도메인을 엔코딩하는 하나 이상의 서열을 포함한다.

[0230] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 개시된 핵산 중 하나는 항체 분자의 경쇄의 가변 도메인 및 불변 도메인을 엔코딩하는 하나 이상의 서열을 포함하는 항체 분자의 적어도 일부분을 엔코딩하고, 상기 개시된 핵산 중 두 번째는 항체 분자의 중쇄의 가변 도메인 및 하나 이상의 불변 도메인, 바람직하게는 모든 불변 도메인을 엔코딩하는 하나 이상의 서열을 포함하는 항체 분자의 적어도 다른 일부분을 엔코딩하며, 두 핵산 모두는 본 발명의 동일한 숙주 세포에 도입된다. 바람직하게는, 상기 핵산 중 하나가 푸로마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩하고 다른 상기 핵산이 네오마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩한다.

[0231] 심지어 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 상기 개시된 핵산은 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분의 두 아미노산 서열을 엔코딩하는 적어도 2개의 핵산 서열을 포함한다.

[0232] 바람직하게는, 상기 핵산 중 하나가 푸로마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩하고, 하나의 다른 상기 핵산이 네오마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩한다. 보다 바람직하게는 상기 핵산 중 하나가 푸로마이신 또는 네오마이신 내성, 바람직하게는 푸로마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩하고 하나의 다른 상기 핵산이 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 1을 엔코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0233] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 상기 개시된 핵산은 단백질 분자 또는 이의 적어도 일부분의 3개의 아미노산 서열을 엔코딩하는 3개의 핵산 서열을 포함한다.

[0234] 바람직하게는, 상기 핵산 중 하나가 푸로마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩하고, 하나의 다른 상기 핵산이 네오마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩하며, 하나의 다른 상기 핵산이 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 1을 엔코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0235] 보다 바람직한 본 발명의 구체예에서, 상기 핵산 중 하나가 푸로마이신 또는 네오마이신 내성을 엔코딩하는 유전자 엘리먼트를 추가로 엔코딩하고 다른 상기 핵산이 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 1을 엔코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 심지어 더욱 바람직한

구체예에서, 상기 핵산 중 하나가 경쇄의 가변 도메인 및 불변 도메인을 엔코딩하는 서열을 포함하고 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열, 가장 바람직하게는 서열번호 1을 엔코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하며, 다른 상기 핵산이 항체 분자의 중쇄의 가변 도메인 및 하나 이상의 불변 도메인, 바람직하게는 모든 불변 도메인을 엔코딩하는 서열을 포함하고 푸로마이신 또는 네오마이신 내성, 바람직하게는 푸로마이신 내성을 엔코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0236] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 상기 핵산은 항체 분자의 경쇄의 가변 도메인 및 불변 도메인을 엔코딩하는 하나 이상의 서열 및 항체 분자의 중쇄의 가변 도메인 및 하나 이상의 불변 도메인, 바람직하게는 모든 불변 도메인을 엔코딩하는 하나 이상의 서열을 포함한다.

[0237] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 상기 또는 다른 곳에 개시된 핵산에 의해 엔코딩된 불변 도메인은 IgG 또는 IgM의 인간 불변 도메인, 바람직하게는 인간 IgG1, IgG4 또는 IgM이거나, 이러한 도메인들 중 한 도메인 또는 조합물이어서, 바람직하게는 하나 이상의 인트론을 포함하는 게놈 서열 또는 게놈 서열로부터 유래된 서열이 이용되고, 이것은 당업자에 의해 선택, 작제 및 최적화될 수 있다.

[0238] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 바람직하게는 본 발명의 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산은 EF-1알파 프로모터/CMV 인핸서 또는 CMV 프로모터 유래된 프로모터, 바람직하게는 CMV-E를 추가로 포함한다.

[0239] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 바람직하게는 본 발명의 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산은 분비 시그널 펩티드, 바람직하게는 T 세포 수용체 분비 시그널을 추가로 포함한다.

[0240] 심지어 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 바람직하게는 본 발명의 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산은 분비 시그널 펩티드, 바람직하게는 서열번호 10을 추가로 포함한다.

[0241] 바람직하게는 본 발명의 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분인 단백질을 엔코딩하는 상기 핵산 또는 핵산의 조합물 뿐만 아니라 상기 추가의 유전자 엘리먼트, 및 이들을 도입하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 이러한 핵산 또는 핵산들을 작제, 동정, 시험, 최적화, 선택 및 조합시키고 이들을 성공적으로 트랜스펙션된 이러한 세포의 선택을 위해 적합한 추가 서열과 조합시키는 방법 및 이러한 항체 분자를 엔코딩하는 가장 적합한 핵산을 작제, 동정, 시험 및 선택하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0242] 본 발명의 바람직한 구체예를 실시예에서 상세하게 기술한다.

[0243] 핵산의 도입은 일시적이거나 안정적일 수 있다.

[0244] 본 발명에 따라서, 상기 숙주 세포를 안티폴레이트, 특히 메토트렉세이트와 배양시킴에 의해 단백질 또는 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 핵산 서열을 증폭시킨다라고 하는 용어는 발현시키려는 단백질, 예컨대 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 하나 이상의 핵산, 및 안티폴레이트 내성 DHFR 변이체를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 핵산, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군, 바람직하게는 서열번호 1의 하나 이상의 폴리펩티드가 도입된 본원에 개시된 본 발명의 숙주 세포가 하나 이상의 안티폴레이트, 바람직하게는 메토트렉세이트 농도에 의해 배양되는 것을 의미한다. 통상적인 배양 시간은 각 라운드에 대해 약 20 nM 내지 3000 nM, 바람직하게는 약 50 nM 내지 2000 nM, 보다 바람직하게는 약 100 nM 내지 2000 nM의 통상적인 농도에서 1주 내지 2주이다. 안티폴레이트/메토트렉세이트 증폭 처리의 지속기간 및 본 발명의 핵산의 농도 및 그에 따른 벡터는 당업자에 의해 최적화될 수 있고, 실시예의 바람직한 구체예에도 개시되어 있다. 최적의 증폭 조건은 엔코딩되는 상이한 단백질/항체 분자 및 상기 개시된 상이한 핵산 또는 핵산 작제물 또는 이들의 조합물의 사용간에 상이할 수 있다. 당업자는 가장 적합한 조건 및 본 발명의 핵산을 선택하고 최적화할 수 있다. 상기 증폭은 안티폴레이트/메토트렉세이트가 없는 배양의 경우 또는 하나 이상의 안티폴레이트 내성 DHFR 변이체를 엔코딩하는 핵산 서열, 특히 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군의 폴리펩티드를 도입하지 않은 경우에 비해 단백질/항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 숙주 세포의 게놈으로 엔코딩하는 더 많은 핵산 복사체의 집적(integration)을 초래하고/거나 단백질/항체 분자 조성물의 증가된 생성을 초래한다.

[0245] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 바람직한 구체예를 포함하는 본원의 다른 곳에 기술된 대로, 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군, 바람직하게는 서열번호 1의 하나 이상의 폴리펩티드를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 핵산이 도입된 상기 숙주 세포에 도입된, 단백질/항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 핵산 또는 핵산들을 증폭시키기 위한 상기 숙주 세포는 인간 골수성 백혈병 기원이고, 바람직하게는 세포 또는 세포주 KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-

F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주, 보다 바람직하게는 세포 또는 세포주 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주, 및 심지어 보다 바람직하게는 세포 또는 세포주 NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주이다.

[0246] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 숙주 세포를 적어도 2회 연속 라운드의 안티폴레이트/메토트렉세이트와 배양함으로써, 안티폴레이트/메토트렉세이트의 농도가 각 연속 라운드에서 바람직하게는 약 50% 이상, 보다 바람직하게는 약 100% 이상까지 증가된다. 심지어 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 숙주 세포를 적어도 3회, 보다 바람직하게는 4회, 보다 바람직하게는 5회, 및 심지어 보다 바람직하게는 6회 연속 라운드의 안티폴레이트/메토트렉세이트와 배양함으로써, 안티폴레이트/메토트렉세이트의 농도가 각 연속 라운드에서 바람직하게는 약 50% 이상, 보다 바람직하게는 약 100% 이상까지 증가된다. 더욱 바람직한 것은 약 20 nM 내지 3000 nM의 안티폴레이트/메토트렉세이트의 농도이고, 약 50 nM 내지 2000 nM이 보다 바람직하며, 보다 바람직하게는 약 100 nM 내지 2000 nM이고, 심지어 더욱 바람직한 것은 약 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM이며, 이들은 바람직한 구체예에서 100 nM으로부터 개시된 연속 라운드로 이용된다.

[0247] 안티폴레이트 내성 DHFR-변이체를 엔코딩하는 핵산 서열 및 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군의 하나 이상의 폴리펩티드의 도입이, 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포 및 특히 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주에서 안티폴레이트/메톡트렉세이트와 함께 배양함에 의해 상기 단백질/항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 핵산 서열의 증폭을 가능하게 했다는 것이 놀랍다.

[0248] 서열번호 1의 하나 이상의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열의 도입이, 본 발명의 숙주 세포 및 특히 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주에서 메톡트렉세이트와 함께 배양함에 의해 상기 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 핵산 서열의 증폭을 가능하게 했다는 것이 특히 놀랍다.

[0249] 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군의 하나 이상의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열의 도입이, 본 발명의 숙주 세포 및 특히 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주에서, 상기 숙주 세포를 적어도 2회 연속 라운드의 메토트렉세이트와 배양시켜 메톡트렉세이트의 농도를 각 연속 라운드에서 적어도 약 50%, 보다 바람직하게는 적어도 약 100%까지 증가시킴에 의해 상기 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 핵산 서열의 추가의 증폭을 가능하게 했다는 것이 더욱 놀랍다.

[0250] 서열번호 1의 하나 이상의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열의 도입이, 본 발명의 숙주 세포 및 특히 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 어느 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주에서, 상기 숙주 세포를 적어도 2회 연속 라운드의 메토트렉세이트와 배양시켜 메톡트렉세이트의 농도를 각 연속 라운드에서 적어도 약 50%, 보다 바람직하게는 적어도 약 100%까지 증가시킴에 의해 상기 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 핵산 서열의 추가의 증폭을 가능하게 했다는 것이 더욱 놀랍다.

[0251] 바람직한 구체예에서, 증폭이 안정하다라는 용어는 숙주 세포 분할 사이클의 적어도 35 세대에 걸쳐 항체 분자 조성물이 높은 수율로 생성됨을 의미한다. 단백질/항체 분자 또는 이의 분획을 엔코딩하는 안정하게 도입된 핵산 또는 핵산들의 증폭은 상기 개시된 대로 그리고 메토트렉세이트를 이용한 실시예에서 수행될 수 있다.

[0252] 추가의 바람직한 구체예를 실시예에서 기술한다.

[0253] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 도입된 핵산을 지니는 본 발명의 숙주 세포는 적어도 1회 라운드의 단일 세포 클로닝 및 상기 단백질/항체 조성물의 적합한 발현 및 분비를 갖는 세포 클론의 선택 이후에 바람직하게 사용된다. 바람직하게는 상기 단일 세포 클로닝 및 상기 단백질/항체 조성물의 적합한 발현 및 분비를 갖는 세포 클론의 선택은 본원에 개시된 적어도 1회 라운드의 메토트렉세이트 증폭 이후에 일어난다. 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 세포 클론은 메토트렉세이트, 바람직하게는 증가된 농도의 메토트렉세이트, 바람직하게

는 적어도 약 2배 농도의 메토트렉세이트, 및 심지어 더욱 바람직하게는 추가 라운드의 단일 세포 클로닝 및 상기 단백질/항체 조성물의 적합한 발현 및 분비를 갖는 세포 클론의 선택 에 의해 추가로 증폭된다. 이러한 바람직한 구체예로 특히 높은 발현 수율을 지니는 세포 클론을 선택할 수 있다.

[0254] 본 발명에 따라서, 상기 항체 분자 조성물 또는 단백질에 대한 개개 제형의 생성을 허가하는 조건하에 상기 숙주 세포를 배양한다라는 용어는 일반적으로, 단백질/항체 분자를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산, 바람직하게는 본원에 개시된 본 발명의 상기 핵산의 바람직한 구체예를 포함하는 본 발명의 숙주 세포가 단백질/항체 분자 조성물의 형태로 단백질/항체 분자를 발현시킬 수 있고, 바람직하게는 본원에 개시된 높은 수율 및/또는 높은 활성 및/또는 높은 균질성을 지니며 배지로 분비시킬 수 있는 배양 조건하에 배양되는 것을 의미한다. 당업자는 적합한 배지 및 배양 조건, 예컨대 이로 제한하는 것은 아니나 적합한 시간, 온도, pH, 기체(gasing), 공급물, 배지, 배지 보충물, 용기 또는 반응기 크기 및 당업자에게 공지된 원칙을 이용하여 가장 적합한 배양 조건을 선택할 수 있다. 당업자는 가장 적합한 조건을 선택하고 최적화할 수 있다. 바람직한 구체예가 실시예에 개시되어 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0255] 본 발명의 세포를 배양하는 것은 요망되는 항체 분자 조성물을 효율적으로 생성할 수 있는 동물 세포용의 임의의 일반적인 배양 방법에 의해 수행될 수 있고, 예를 들어 회분 배양, 반복된 회분 배양, 유가식(fed)-회분 배양 및 관류 배양이 있다. 바람직하게는, 유가식-회분 배양 또는 관류 배양이 요망되는 폴리펩티드의 생산성을 높이기 위해 적용된다.

[0256] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 배양은 무-혈청 조건 및 심지어 추가로 바람직하게는 무-단백질 배지 또는 무-동물 성분 배지 하에 수행된다.

[0257] 본 발명에 따른 무-혈청 배지에 대한 본 발명의 숙주 세포의 적응은 놀랍게도 신속하고 강하다. 적응은, 예를 들어 혈청-함유 배지에서 2차 배양된 세포를 시판되는 무-혈청 배지에 직접 적응시키거나, 지속적인 적응에 의해 수행될 수 있는데, 무-혈청 배지에 대한 직접 적응이 바람직하고 유리하다. 무-혈청 배지에 대한 적응 공정 동안, 세포의 생활력(viability)은 일시적으로 낮아지는데, 이것은 때로 세포의 사멸을 야기한다. 따라서, 세포를 무-혈청 배지에 대한 적응을 위해 배지에 1 x 10^5 내지 5 x 10^5 세포/ml의 세포 밀도, 바람직하게는 2 x 10^5 세포/ml로 접종하여 세포의 생활력을 복구하거나 높게 유지하는 것이 바람직하다. 2일 내지 7일의 배양 후에, 밀도가 5 x 10^5 내지 10 x 10^5 세포/ml에 도달한 세포를 무-혈청 배지에 적응한 세포로서 선택한다. 무-혈청 배지에 대한 적응은 FCS로 보충된 배지를 무-혈청 배지 조성물에 의해 연속 희석시킴에 의해서도 수행될 수 있다(지속적인 적응). 당업자는 가장 적합한 조건을 선택하고 최적화할 수 있다. 바람직한 구체예가 실시예에 기술되나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0258] 본 발명의 세포를 무-혈청 배지에 적응시킨 후, 클로닝된 세포주를 96-웰 플레이트에서의 제한 희석 방법, 콜로니 형성 방법 등을 이용하여 제조할 수 있고, 세포 또는 세포주를 이들의 부모 세포 또는 세포주에 비해 유리한 세포 특성, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 짧은 배가 시간, 더 빠른 성장, 높은 밀도하에 성장할 가능성, 더 많이 생성할 수 있는가, 더 높은 클로닝 효율, DNA의 경우 더 높은 트랜스펙션 효율, 항체 분자 조성물의 더 높은 발현 속도, 발현되는 항체 분자 조성물에 대한 더 높은 활성, 발현되는 항체 분자 조성물의 더 높은 균질성, 및/또는 규모확대에 더 많이 강한가에 기인하여 선택한다. 유리한 특성을 지니는 세포를 선택하는 방법은 당업자에게 공지되어 있거나 본원에 개시되어 있다.

[0259] 본 발명에 따라서, 상기 항체 분자 조성물 또는 단백질에 대해 상응하는 제형을 단리시킨다라는 용어는 일반적으로 본원에 개시된 단백질/항체 분자 또는 이의 분획을 엔코딩하는 상기 핵산 중 하나 이상을 포함하는 상기 숙주 세포에 의해 발현된 단백질/항체 분자 조성물이 당업자에게 공지된 방법에 의해 상기 단백질/항체 분자 조성물 또는 상기 단백질/항체 분자 조성물의 일부를 배양 또는 추가로 부화 또는 정제시킨 후 배양 배지를 이용하여 획득됨을 의미한다. 본 발명의 관점에서 상기 단백질/항체 분자 조성물은 본원에 개시된 특정 단백질/항체 분자에 대해 부화된 상기 단백질/항체 분자 조성물의 일부도 의미한다.

[0260] 바람직한 일 구체예에서, 단백질/항체 분자 조성물은 배양 후, 예를 들어 원심분리 기술에 의해 배지를 세포 및/또는 세포 부스러기로부터 분리시킴에 의해 단리된다.

[0261] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물은 초여과, 침전 방법 또는 당업자에게 공지된 다른 농축 방법에 의해 단리되거나 추가로 부화된다.

[0262] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물은 크로마토그래피 방법, 예컨대 이

에 제한하는 것은 아니나 단백질 A, 단백질 G, 항-항체 이소형 항체, 렉틴 크로마토그래피, 항체 분자에 도입된 특정 태그, 예컨대 HIS-태그 또는 myc-태그에 대한 항체, 또는 항원과 같은 친화력 물질에 따라 이용되는 친화력 크로마토그래피, 또는 당업자에게 공지된 이온 교환 크로마토그래피에 의해 단백질/항체 분자 조성물을 정제시켜 단리된다.

[0263] 단백질 또는 단백질의 특정 당형태를 정제 또는 부화시키는 추가의 방법은 당업자에게 공지되어 있고 본 발명의 단백질 분자 조성물 또는 이의 분획을 단리시키거나 추가로 정제하거나, 분획화하거나 부화시키기 위해 단독으로 또는 상기 개시된 방법과 조합하여 당업자에 의해 선택, 적응, 최적화 및 이용될 수 있다.

[0264] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 주로 IgG의 본 발명의 항체 분자 조성물은 사전 초원심분리를 이용하거나 이용하지 않고 단백질 A 크로마토그래피에 의해 단리된다.

[0265] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 주로 IgM의 본 발명의 항체 분자 조성물은 사전 초원심분리를 이용하거나 이용하지 않고 항-IgM 항체 크로마토그래피에 의해 단리된다.

[0266] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 분자의 특정 당형태로 부화된 본 발명의 항체 분자 조성물은 사전 초원심분리를 이용하거나 이용하지 않고 렉틴 친화력 크로마토그래피에 의해 단리된다. 단백질 또는 단백질의 특정 당형태를 정제하거나 부화시키는 추가의 방법은 당업자에게 공지되어 있고 본 발명의 항체 분자 조성물 또는 이의 분획을 단리시키거나 추가로 정제하거나, 분획화하거나 부화시키기 위해 단독으로 또는 상기 개시된 방법과 조합하여 당업자에 의해 선택, 적응, 최적화 및 이용될 수 있다.

[0267] 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물은 단백질 A 컬럼을 이용하여 단리된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물은 항-IgM 컬럼을 이용하여 단리된다.

[0268] 본 발명에 따르면, "증가된 활성"이라는 용어는 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 발현된 본 발명의 단백질 및/또는 항체 분자 조성물의 활성이 세포주 CHO 또는 CHOdfhr- 또는 CHK 또는 NS0 또는 SP2/0 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 하나 이상에서 발현된 동일한 단백질/항체 분자로부터의 하나 이상의 단백질/항체 분자 조성물의 활성 보다 높은 것을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 이것은, 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 발현된 본 발명의 단백질 및/또는 항체 분자 조성물의 활성이 CHOdfhr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현된 동일한 단백질/항체 분자로부터의 단백질/항체 분자 조성물의 활성 보다 높은 것을 의미한다. 항체의 경우, 상기 증가된 활성은 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성 또는 증가된 결합 활성이다.

[0269] 본 발명의 의미에서, "활성"은 생물학적 상황에서 단백질 분자에 의해 수행된 기능 또는 일련의 기능이다. 본 발명의 의미에서, "증가된 활성", 내용상의 동등어 및 이의 문법상의 동등어는 선택된 적용과 관련하여 개선되거나 최적의 활성으로서 이해되며, 여기서 활성은, 예를 들어 최소화되거나 최대화된 제한적인 값에 가까워질 수 있거나, 종래 분야에 생성된 상응하는 단백질 분자와 비교하여 더 높거나 낮은 활성을 나타내는 중간 값으로 설정될 수 있다. 본 발명의 관점에서 개선되거나 증가된 활성은 개선된 혈청 반감기, 약물 동력학, 안정성, 생물학적 활성, 결합, 항원성 및/또는 면역원성을 의미하는 이의 생물학적 및/또는 약제학적 의미에서의 유리한 활성을 의미한다. 예를 들어, 단백질 분자 조성물의 생물학적 활성은 불리한 생물학적 효과를 감소시키는 한도까지, 예컨대 불리한 면역 효과의 감소된 자극 또는 감소된 면역원성까지 증가될 수 있었다.

[0270] 본 발명에 따른 단백질 분자 조성물의 활성은 단백질의 활성을 측정할 수 있는 적합한 생체검정으로 결정될 수 있다. 당업자는 적합한 생체검정을 확인하거나 적합한 생체검정을 수립할 수 있다. 본 발명에 따르면, 이러한 생체검정은 세포 또는 분자 또는 혼합 검정, 예컨대 증식 검정, 아폽토시스 검정, 세포 부착 검정, 시그널링 검정, 이동 검정, 세포독성 검정, 포식작용 검정, 용해 검정 및 결합 검정을 포함하는, 예를 들어 생물학적 시험관내 검정을 포함한다. 이러한 생체검정은 동물 모델 또는 인간을 이용하는 생체내 검정, 예컨대 생체분포, 약물 동력학, 약물역학 시험, 혈청 반감기 시험, 생체이용성에 대한 시험, 효능 시험, 국소화 시험, 임상 연구를 포함하는 질병의 치료 및 예방 시험도 포함한다. 이러한 생체검정은 화학적, 물리적, 물리화학적, 생체물리적 및 생화학적 시험, 예컨대 온도, 전단 스트레스, 압력, pH, 컨주게이션 등에 대한 안정성도 포함한다. 이러한 생체검정은 임상 용도와 관련하여 단백질 분자 조성물의 특성을 개선시키기 위해 면역원성 및/또는 항원성에 대한 시험도 포함한다. 당업자는 단백질 분자 조성물의 활성 또는 기술된 활성의 조합을 결정할 수 있다.

[0271] 바람직한 구체예에서, 단백질 분자 조성물의 더 높은 활성은 하나 이상의 생체검정에 의해 결정된 하나 이상의 시험관내 모델에서의 더 높은 활성 및/또는 하나 이상의 생체내 모델에서의 더 높은 활성 및/또는 더 높은 안정성 및/또는 더 긴 혈청 반감기 및/또는 더 긴 생체이용성 및/또는 개선된 면역원성 및/또는 개선된 항원성을 특징으로 한다. 본원에서 더 높은 활성이라고 불리는 전체 활성에서의 개선은 예를 들어 보다 낮은 투여량, 더 긴

투여 시간 간격, 덜한 부작용 및 인간에게 이용시 생성물의 낮은 독성 또는 독성 없음 또는 유기체에 따라서 크게 개선된 약제를 생성하는 것과 같은 개선을 초래할 수 있다.

[0272] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 발현되는 본 발명의 단백질 분자 조성물의 활성은 종래 분야에 생성된 동일한 단백질 분자로부터의 하나 이상의 단백질 분자 조성물의 활성 보다 높다.

[0273] 상기 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성은 증가된 항체 의존적인 세포의 세포독성(ADCC 활성), 상보서열 의존적인 세포독성(CDC 활성), 및/또는 포식작용에 의해 야기된 세포독성(포식작용 활성)이다. ADCC 활성, CDC 활성 또는 포식작용 활성을 포함하는 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성은 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있고 일부가 실시예에 상세하게 기술되어 있으나 그러한 방법으로 본 발명을 제한하는 것은 아니며 실시예에서 기술된 방법은 본 발명의 바람직한 구체예이다.

[0274] 상기 증가된 결합 활성은 항체 분자의 에피토프, 예컨대 에피토프, 항원, 에피토프를 포함하는 또 다른 폴리펩티드, 또는 항체 분자의 에피토프를 포함하는 세포에 대한 증가된 결합, 또는 하나 이상의 Fc 수용체 또는 또 다른 이펙터 리간드, 예컨대 Fc-감마RI, Fc-감마RII, Fc-감마RIII, 및 그로부터의 아부류, 예컨대 Fc-감마RIIa, Fc-감마RIIIa, Fc-감마RIIIb, 또는 상보서열의 C1q 성분, 또는 FcRn 또는 이러한 임의의 Fc 수용체 또는 이펙터 리간드를 포함하는 분자 또는 세포에 대한 증가된 결합이다. 증가된 결합 활성은 높은 친화력, 높은 항원항체결합력, 및/또는 더 많은 수의 결합 부위 또는 이들의 조합일 수 있다. 증가된 결합 활성은 다양한 효과 및 활성을 초래할 수 있고, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 본 발명의 배경기술에 개시된 수용체 매개된 활성의 형태가 있다. 증가된 결합 친화력, 항원항체결합력 및 수용체 매개된 활성은 당업자에게 공지된 다양한 방법들 중 하나 이상에 의해 결정될 수 있고, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 Biacore 측정, 스캐챠드(Scatchard) 분석, ELISA 또는 RIA 기재 측정, 유동 세포 분석법, 적합한 표적 세포에서 아폽토시스 유도를 결정하는 시험, 적합한 표적 세포의 증식을 결정하는 시험, 항체 분자 조성물의 길항, 효능 및/또는 수용체 차단 시험, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 세포-세포 매개된 결합의 억제, 세포 내부 분자 사건의 유도가 있다. 당업자는 결합 친화력, 항원항체결합력, 결합 부위의 수 및/또는 수용체 매개된 활성을 시험하는 적합한 방법 또는 방법의 조합을 선택하고/거나 채용하고/거나 변형시킬 수 있다.

[0275] 본 발명의 방법을 이용하여 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성, 바람직하게는 ADCC 활성, CDC 활성 및/또는 포식작용에 의해 야기된 세포 독성, 및/또는 항체 분자의 에피토프 또는 바람직하게는 하나 이상의 Fc 수용체 또는 또 다른 이펙터 리간드에 대한 증가된 결합 활성을 수득할 수 있는 항체의 능력을, 일반적으로 및/또는 특히 본 발명의 숙주 세포를 이용하여 시험할 수 있고 그 바람직한 구체예가 본원에 개시되어 있다.

[0276] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 발현된 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물의 활성은 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 적어도 하나, 바람직하게는 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]로부터의 동일한 항체 분자의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 활성 보다 높다.

[0277] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 발현된 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물의 활성은 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현된 동일한 항체 분자로부터의 항체 분자 조성물의 활성 보다 적어도 50% 더 높고, 보다 바람직하게는 2배 이상, 보다 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 보다 바람직하게는 5배 이상, 보다 바람직하게는 7배 이상, 보다 바람직하게는 10배 이상, 보다 바람직하게는 15배 이상, 보다 바람직하게는 23배 이상, 보다 바람직하게는 30배 이상, 보다 바람직하게는 50배 이상, 보다 바람직하게는 75배 이상, 보다 바람직하게는 100배 이상, 보다 바람직하게는 150배 이상, 보다 바람직하게는 230배 이상, 보다 바람직하게는 300배 이상, 보다 바람직하게는 500배 이상, 보다 바람직하게는 750배 이상, 및 가장 바람직하게는 1000배를 초과한다.

[0278] 이에 따라 각 생체검정이 더 높은 활성을 나타내야 하는 것이 아니라 특정 단백질 분자 조성물의 용도 및 특징에 따라, 일부 유리한 생물학적 효과가 덜 유리한 다른 효과를 보상할 수 있고 여전히 본 발명의 관점에서 단백질 분자 조성물의 전체적인 보다 높은 활성을 초래한다. 예를 들어, 특정 단백질 분자 조성물은 세포에 대한 이의 수용체의 결합에 의해 훨씬 높은 활성을 초래할 수 있으므로, 이차 효과, 예컨대 증식 유도를 일으킬 수 있으나 다소 감소된 혈청 반감기를 나타낸다. 수용체를 더 많이 유도하는 보다 높은 활성은 이후 전체적인 생체활성에 있어서 더 짧은 생체이용성을 보상한다. 또 다른 실시예에서, 보다 짧은 반감기 및 수용체 유도에 대한 보다 높은 활성은 둘 모두가 이롭다. 또 다른 실시예에서, 생체내 활성은 개선되지 않으나 시험관내 안정성이 단백질 분자 조성물의 생성 및 보관을 개선시킨다. 또 다른 실시예에서, 낮은 활성이 아닌 긴 반감기가 요구된다.

[0279] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 증가된 ADCC 활성이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 증가된 CDC이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 포식작용에 의해 야기된 증가된 세포독성이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 에피토프에 대한 증가된 결합 활성이다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 하나 이상의 Fc 수용체, 바람직하게는 FcɣRIIIA에 대한 증가된 결합 활성이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성 및 에피토프에 대한 증가된 결합 활성이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 증가된 ADCC 활성 및 에피토프에 대한 증가된 결합 활성이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 증가된 ADCC 활성, 증가된 CDC 활성, 에피토프에 대한 증가된 결합 활성 및 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 증가된 결합 활성이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 증가된 ADCC 활성, 포식작용에 의해 야기된 증가된 세포독성, 에피토프에 대한 증가된 결합 활성 및 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 증가된 결합 활성이다. 가장 바람직한 구체예에서, 항체 분자 조성물의 증가된 활성은 증가된 ADCC 활성, 포식작용에 의해 야기된 증가된 세포독성, 증가된 CDC 활성, 에피토프에 대한 증가된 결합 활성 및 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 증가된 결합 활성이다.

[0280] 본 발명에 따라서, "개선된 균질성"이라는 용어는 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 발현된 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물이 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 하나 이상으로부터 단리된 동일한 항체 분자의 하나 이상의 항체 분자 조성물에 비해, 보다 적은 수의 상이한 당형태, 또는 더 많은 수의 유리한 당형태 또는 유리한 당형태들, 또는 항체 분자의 더 적은 수의 하나 이상의 당형태 (바람직하게는, 이러한 당형태가 자진하여 총 항체 분자 조성물의 1% 이상을 나타낸다)를 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 이것은, 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 발현된 본 발명의 항체 분자 조성물이 발현시 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 항체 분자의 하나 이상의 항체 분자 조성물에 비해, 보다 적은 수의 상이한 당형태, 또는 더 많은 수의 유리한 당형태 또는 유리한 당형태들, 또는 항체 분자의 더 적은 수의 하나 이상의 당형태를 포함하는 것을 의미한다.

[0281] 생성 및 인간에게 사용시 특히 문제가 되는 하나의 이질성이 시알릴화이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물은 시알산 N-글리콜릴뉴라민산 (NeuGc)을 지니는 당형태를 포함하지 않음으로서 개선된 균질성을 지니며, 이에 따라 이 경우에 당형태가 없다는 것은 당형태가 정제된 항체 분자 조성물로부터 수득될 수 있는 모든 탄수화물 사슬의 1% 이하임을 의미하고, 보다 바람직하게는 당업자에게 공지된 방법에 의해 검출될 수 있는 탄수화물 사슬이 전혀 없음을 의미한다. NeuGc는 인간에서 면역원성일 수 있다고 공지되어 있으므로, 이것은 CHO, NS0, SP2/0과 같은 다른 생성 시스템 보다 본 발명의 숙주 세포의 큰 이점이다.

[0282] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물은 5% 미만의 당형태, 바람직하게는 3% 미만, 보다 바람직하게는 1% 미만의 당형태를 포함하고 가장 바람직하게는 실시예에서 개시된 대로 검출될 수 있는 시알산을 지니는 단백질/항체 분자 조성물의 당형태가 전혀 없음에 의해 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지닌다. 추가의 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 단백질/항체 분자 조성물을, 당 누클레오티드 전구체 경로에 결함을 지녀서 CMP-시알산이 모자르거나 감소되고, 이에 따라 세포를 무-혈청 배지에서 성장시킬 때 단백질/항체 분자의 탄수화물 당 사슬의 시알릴화를 초래하지 않거나 크게 감소된 시알릴화를 초래하는 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포를 이용하여 획득한다. 심지어 추가의 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 상기 단백질/항체 분자 조성물을, 무-혈청 배지에서 성장시키고 실시예에 보다 상세하게 개시된 NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 NM-D4 [DSM ACC2605]를 본 발명의 숙주 세포로서 이용하여 획득할 수 있다.

[0283] 또 다른 추가의 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 단백질/항체 분자 조성물을, GMP-시알산의 당 누클레오티드 트랜스포터 또는 하나 이상의 시알릴트랜스퍼라아제에 결함을 지녀서 세포를 무-혈청 배지에서 성장시킬 때 단백질/항체 분자의 탄수화물 당 사슬의 시알릴화를 초래하지 않거나 감소된 시알릴화를 초래하는 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포를 이용하여 획득한다. 예로는 NM-F9, NM-D4 및 GT-2X가 있다.

[0284] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 단백질/항체 분자 조성물을, 증가된 시알릴화 정도를 갖는 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포를 이용하여 획득한다. 상기 시알릴화 정도라 함은, 항체 분자 조성물의 단백질/항체 분자 상에서 시알산 N-아세틸뉴라민산 (NeuNc 또는 NeuNAc)의 양이 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우

스 하이브리도마 중 하나 이상, 바람직하게는 CHOdfhr- [ACTT No. CRL-9096]로부터 단리된 동일한 단백질/항체 분자의 단백질/항체 분자 조성물 중 동일한 양의 단백질/항체 분자와 비교해 볼 때, 단백질/항체 분자의 특수한 글리코실화 부위에서의 특수한 탄수화물 사슬 또는 전체 탄수화물 유닛의 시알산 N-아세틸뉴라민산 (NeuNc 또는 NeuNAc)의 양 보다 적어도 5%, 보다 바람직하게는 적어도 15%, 보다 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 25%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 35%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 60%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 100%, 보다 바람직하게는 적어도 3배, 보다 바람직하게는 적어도 5배, 보다 바람직하게는 적어도 10배, 보다 바람직하게는 적어도 25배, 보다 바람직하게는 적어도 50배 더 높고, 및 가장 바람직하게는 100배를 초과하여 더 높은 것을 의미한다. 시알릴화 정도는 당업자에게 공지된 방법에 의해 검출될 수 있고, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 결합이 탄수화물 구조의 시알릴화에 의존적인 렉틴, 예컨대 SNA, MAL, MAL I 또는 PNA를 이용한 면역 블롯 분석 또는 ELISA, 화학적 검출 방법, 예컨대 티오바르비투르산 방법, HPLC 또는 질량 분광법 또는 이들의 조합이 있다. 당업자는 가장 적합한 방법을 선택하고 목적에 따라 이를 채택하고 최적화시킬 수 있으며, 상세한 것은 실시예에 개시되어 있다. 바람직한 것은 SNA를 이용한 면역블롯 분석이다.

[0285] 또 다른 추가의 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 단백질/항체 분자 조성물을, 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포, 바람직하게는 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 및 이로부터 유래된 세포 또는 세포주, 및 가장 바람직하게는 증가된 시알릴화 정도를 지녀서, 예를 들어 SNA 결합에 의해 검출할 수 있도록, 알파2-6 결합된 시알산을 포함하는 단백질/항체 분자 조성물을 초래하는 K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X를 이용하여 획득하고, 보다 바람직한 형태에서, 단백질/항체 분자 조성물은 알파 2-6 및 알파 2-3 결합된 시알산을 포함한다.

[0286] 또 다른 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 단백질/항체 분자 조성물을, 알파 2-3 결합의 NeuNAc을 당 기에 부착시킬 수 있는 하나 이상의 시알릴트랜스퍼라아제 및 알파 2-6 결합의 NeuNAc를 당 기에 부착시킬 수 있는 하나 이상의 시알릴트랜스퍼라아제를 포함할 수 있어서 단백질/항체 분자 조성물에서 단백질/항체 분자의 보다 바람직한 당형태들의 조성물을 야기하는 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 및 이로부터 유래된 세포 또는 세포주를 이용하여 획득한다.

[0287] 심지어 본 발명의 추가의 (바람직한) 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 상기 항체 분자 조성물이 Fc 영역의 두 번째 도메인 (C감마2 도메인)에서 아미노산 Asn-297 보다 항체 분자의 또 다른 글리코실화 부위에 부착되는 하나 이상의 탄수화물 사슬을 지니는 항체 분자의 하나 이상의 당형태를 포함한다.

[0288] 전자의 추가의 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 상기 항체 분자 조성물이, 증가된 시알릴화 정도를 지니고/거나 알파 2-3 결합에서 시알산을 당 기에 부착할 수 있는 하나 이상의 시알릴트랜스퍼라아제 및 알파 2-6 결합에서 시알산을 당 기에 부착할 수 있는 하나 이상의 시알릴트랜스퍼라아제를 포함하는 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포, 예컨대 K562, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 및 이로부터 유래된 세포 또는 세포주에서 발현된다.

[0289] 추가의 바람직한 구체예에서, 전자의 항체 분자는 하나 이상의 N-글리코실화 부위 (Asn-X-Ser/Thr, 여기서 X는 Pro를 제외한 임의의 아미노산일 수 있다) 및/또는 하나 이상의 O-글리코실화 부위를 Fab 영역의 서열에 지닌다.

[0290] 추가의 바람직한 구체예에서, Fc 부분의 두 번째 도메인 (C감마2 도메인)에서 아미노산 Asn-297 보다 항체 분자의 또 다른 글리코실화 부위에 부착되는 하나 이상의 탄수화물 사슬을 포함하는 항체 분자를 포함하는 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 상기 항체 분자 조성물은, 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 하나 이상, 바람직하게는 CHOdfhr- [ACTT No. CRL-9096]로부터 단리된 동일한 항체 분자의 항체 분자 단백질 보다, 하나 이상의 포유동물, 예컨대 마우스, 래트 또는 바람직하게는 인간에서 측정시 연장된 혈청 반감기 및/또는 생체이용성을 지닌다.

[0291] 항체의 생체이용성은 본 발명을 이용하여 최적화될 수 있다. 특히 높거나 매우 높은 시알릴화를 갖는 세포에서 (상기 논의된 그룹 1 및 3) 항체 분자의 발현은 연장된 생체이용성을 갖는 항체 조성물을 야기할 수 있으나, 그룹 2의 세포에서 항체 분자의 발현은 동등하게 감소된 생체이용성을 갖는 항체 조성물을 초래할 수 있다. 생체이용성은 동물 또는 바람직하게는 인간을 이용하여 당업자에게 공지된 대로 그리고 실시예에 개시된 대로 시험

될 수 있다. 동물은 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 또는 원숭이를 포함하나 이들 종으로 제한하는 것은 아니다. 인간 본질로 인해, 인간에 가장 근접한 글리코실화 및 가장 중요한 시알릴화를 지니는 동물이 바람직하며, 가장 바람직한 것은 인간이다.

[0292] 심지어 더욱 바람직한 구체예에서, 시알릴화와 관련하여 개선된 균질성을 지니는 상기 항체 분자 조성물은, 증가된 시알릴화 정도를 지니고/거나 알파 2-3 결합에서 시알산을 당 기에 부착할 수 있는 하나 이상의 시알릴트랜스퍼라아제 및 알파 2-6 결합에서 시알산을 당 기에 부착할 수 있는 하나 이상의 시알릴트랜스퍼라아제를 포함하는 본 발명의 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포, 예컨대 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, 및 이로부터 유래된 세포 또는 세포주에서 발현되고, 이는 항체 분자의 Fab 영역의 서열에서 하나 이상의 N-글리코실화 부위 및/또는 하나 이상의 O-글리코실화 부위에 부착되는 하나 이상의 탄수화물 사슬을 포함하며, 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 하나 이상, 바람직하게는 CHOdfhr- [ACTT No. CRL-9096]로부터 단리된 동일한 항체 분자의 항체 분자 단백질 보다, 하나 이상의 포유동물, 예컨대 마우스, 래트 또는 바람직하게는 인간에서 측정시 연장된 혈청 반감기 및/또는 생체이용성을 지닌다. 추가의 바람직한 구체예에서, 발현되는 항체 분자가 에르비툭스 (세툭시맵)이다.

[0293] 본 발명에 따르면, "증가된 수율"이라는 용어는 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 생성된 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물의 평균 또는 최대 수율이, 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 하나 이상에서 발현시 동일한 단백질/항체 분자로부터의 하나 이상의 단백질/항체 분자 조성물의 개개의 평균 또는 최대 수율 보다 높은 것을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 이것은, 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포에서 생성된 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물의 평균 또는 최대 수율이, CHOdfhr- [ACTT No. CRL-9096]에서 CHOdhfr-에서의 증폭을 위한 뮤린 dhfr 유전자 및 메토트렉세이트를 이용하여 발현시 동일한 단백질/항체 분자로부터의 하나 이상의 단백질/항체 분자 조성물의 개개의 평균 또는 최대 수율 보다 높은 것을 의미한다. 평균 및 최대 수율은 SPR로 측정되며, 이것은 세포, 세포 혼합물 또는 세포주의 생산성을 반영하고, 당업자에 의해 결정될 수 있으며 실시예의 바람직한 구체예에 개시되어 있다.

[0294] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 인간 골수성 백혈병 기원의 숙주 세포, 바람직하게는 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 및 이로부터 유래된 세포 또는 세포주에서 발현된 본 발명의 단백질/항체 분자 조성물의 평균 또는 최대 수율은 적어도, CHOdfhr- [ACTT No. CRL-9096]에서 CHOdhfr-에서의 증폭을 위한 뮤린 dhfr 유전자 및 메토트렉세이트를 이용하여 발현된 동일한 단백질/항체 분자로부터의 하나 이상의 단백질/항체 분자 조성물 보다 10% 이상 더 높고, 보다 바람직하게는 적어도 15%, 보다 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 25%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 35%, 보다 바람직하게는 적어도 45%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 55%, 보다 바람직하게는 적어도 60%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 100%, 보다 바람직하게는 적어도 3배, 보다 바람직하게는 적어도 4배 더 높고, 가장 바람직하게는 5배를 초과하여 더 높다.

[0295] 본 발명은 (a) 단백질, 바람직하게는 본원에 개시된 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 서열, 및 (b) 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군으로부터의 서열을 엔코딩하는 하나 이상의 서열을 포함하는 핵산을 추가로 제공한다.

[0296] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산은 (a) 단백질, 바람직하게는 본원에 개시된 항체 분자 또는 이의 적어도 일부분을 엔코딩하는 서열, 및 (b) 서열번호 1을 엔코딩하는 서열을 포함한다.

[0297] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 상기 개시된 핵산은 선택 마커를 엔코딩하는 서열, 바람직하게는 핵산이 도입된 숙주 세포의 항생제 내성을 유도하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열을 추가로 포함하며, 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 네오마이신 또는 프로마이신이 있다.

[0298] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 상기 개시된 핵산은 본원에 개시된 하나 이상의 유전자 엘리먼트의 하나 이상의 서열을 추가로 포함한다.

[0299] 본 발명은 인간 골수성 백혈병 기원 또는 백혈병 환자로부터 수득될 수 있는 임의의 인간 골수성 또는 골수성 전구체 세포 또는 세포주, 또는 인간 공여체로부터 수득될 수 있는 임의의 골수성 또는 골수성 전구체 세포 또는 세포주 또는 인간 골수성 백혈병 기원의 하나 이상의 세포를 포함하는 세포 또는 세포주의 혼합물, 또는 인

간 골수성 백혈병 기원 또는 백혈병 환자로부터 수득될 수 있는 임의의 인간 골수성 또는 골수성 전구체 세포 또는 세포주, 또는 인간 공여체로부터 수득될 수 있는 임의의 골수성 또는 골수성 전구체 세포 또는 세포주를 인간 또는 동물 기원의 또 다른 세포와 융합시킴에 의해 수득된 세포, 세포들 또는 세포주의 숙주 세포를 추가로 제공하고, 이는 예컨대 이에 제한하는 것은 아니나 상기 세포에 도입된 단백질/항체 분자 또는 이의 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 B 세포, CHO 세포이다.

[0300] 본 발명은 단백질/항체 분자 또는 이의 적어도 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 상기 개시된 본 발명의 숙주 세포를 제공한다.

[0301] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 숙주 세포 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주를 제공하고, 이들은 바람직하게는 무-혈청 조건하에 성장되며, 이로부터 단백질/항체 분자 조성물이 무-혈청 조건하에 분리되고, 더욱 바람직하게는 여기에 항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 무-혈청 조건하에 도입되며, 이는 단백질/항체 분자 또는 이의 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산, 바람직하게는 본원에 개시된 단백질/항체 분자 또는 이의 적어도 일부를 엔코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 포함한다.

[0302] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군, 바람직하게는 서열번호 1의 하나 이상의 폴리펩티드를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 상기 개시된 본 발명의 숙주 세포를 제공한다.

[0303] 본 발명은 항체 분자 또는 이의 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산 및 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군, 바람직하게는 서열번호 1의 하나 이상의 폴리펩티드를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 상기 개시된 본 발명의 숙주 세포를 제공한다.

[0304] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 숙주 세포 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-F9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래된 세포 또는 세포주를 제공하고, 이들은 바람직하게는 무-혈청 조건하에 성장되며, 이로부터 단백질/항체 분자 조성물이 무-혈청 조건하에 분리되고, 더욱 바람직하게는 여기에 단백질/항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 무-혈청 조건하에 도입되며, 이는 단백질/항체 분자 또는 이의 일부를 엔코딩하는 하나 이상의 핵산, 바람직하게는 본원에 개시된 단백질/항체 분자 또는 이의 적어도 일부를 엔코딩하는 서열을 포함하는 핵산, 및 서열번호 1 내지 서열번호 9의 군, 바람직하게는 서열번호 1로부터의 서열을 엔코딩하는 하나 이상의 서열을 포함한다.

[0305] 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명은 상기 개시된 숙주 세포를 제공하고, 여기서 엔코딩된 항체 분자는 WO2004/065423의 항체이다.

[0306] 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명은 상기 개시된 숙주 세포를 제공하고, 여기서 엔코딩된 항체 분자는 항체 판코맵(PankoMab) [Cancer Immunol Immunother. 2006 Nov; 55(11):1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al], 바람직하게는 모든 인간 불변 도메인을 지니는 판코맵의 키메라 형태, 및 보다 바람직하게는 인간화된 판코맵이다.

[0307] 본 발명은 본원에 개시된 본 발명의 임의의 방법에 의해 생성된 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 균질성 및 완전한 인간 글리코실화를 지니는 단백질/항체 분자 조성물을 추가로 제공한다.

[0308] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 방법에 의해 생성된 단백질/항체 분자 조성물을 제공하고, 이는 발현시 세포주 CHO, 또는 CHOdhfr-, 또는 BHK, 또는 NS0, 또는 SP2/0, 또는 PerC.6 또는 마우스 하이브리도마 중 하나 이상, 바람직하게는 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 단백질/항체 분자의 단백질/항체 분자 조성물과 비교하여, 본 발명의 임의의 방법에 의해 생성된 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 균질성 및 완전한 인간 글리코실화를 지닌다.

[0309] 발현된 단백질 분자 또는 이의 일부는 임의의 단백질 또는 단백질 부분 또는 단백질 단편일 수 있다. 발현된 항체 분자 또는 이의 일부는 임의의 항체 또는 항체 부분 또는 항체 단편일 수 있다.

[0310] 본 발명의 단백질 분자 조성물은 백혈병, 호중성백혈구감소증, 혈구감소증, 암, 골수 이식, 조혈계의 질병, 불임증 및 자가면역 질병과 같은 질병의 예방적 및/또는 치료적 처치에 이용될 수 있다. 당업자에게 공지된 단백질 분자 조성물의 치료적 적용 범위는 매우 광범위하다. 예를 들어, G-CSF는 백혈병 암 환자의 화학요법의 결과로서 생명을 위협하는 호중구의 감소인 호중성백혈구감소증을 치료하는 중요한 치료제이다. GM-CSF는 화학요법 후 호중성백혈구감소증으로부터의 빠른 회복을 위해 비교적 고령인 AML 환자의 치료에 특히 이용된다. GM-CSF는 골수 이식술에서의 여러 적용을 위한 치료제 및 말초혈 줄기 세포의 동원을 위한 치료제로서 추가로

허가되었다. 추가로, 예컨대 HIV 및 암을 치료하기 위한 것과 같은, 현재 연구 중인 GM-CSF의 여러 임상적 적용이 있다. 조혈계의 특정 질병은 EPO로 치료되며, IFN-베타는 현재 자가면역 질병인 다발성 경화증을 치료하기 위한 중요한 치료제이다. 또 다른 예는 남성 및 여성 불임증을 치료하는데 널리 이용되는 FSH이다. hCG도 불임증을 치료하기 위해 적용되나, 여성의 무배란에 초점을 맞추고 있다. hGF는 체지방 감소 및 근조직 증가와 같은 임상적으로 입증된 이점을 지닌다.

[0311] 본 발명의 단백질 분자 조성물은 백혈병, 호중성백혈구감소증, 혈구감소증, 암, 골수 이식, 조혈계의 질병, 불임증 및 자가면역 질병을 포함하는 군으로부터 선택된 질병의 예방적 및/또는 치료적 처치를 위한 약제의 제조에 이용될 수도 있다.

[0312] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 항체 분자는 건선, 류마티스 관절염, 크론병, 궤양 결장염, 자가면역 질병, SLE, 다발성 경화증, 자가면역 혈액 질환, 천식, 알레르기, 이식편대 숙주 질병, 동종이식 거부, 녹내장 수술, 심근경색증, RSV, HIV, Hep B 또는 CMV와 같은 바이러스, 암, 육종, CLL, AML 또는 NHL을 인식하는 항체 분자이다.

[0313] 심지어 본 발명의 바람직한 구체예에서, 발현되는 항체 분자는 적어도 한 사람에서 암, 종양 또는 전이, 하나 이상의 암세포 또는 종양 세포를 인식하는 항체 분자이고, 이는 바람직하게는 귀-코-인후 영역, 폐, 종격, 위장관, 비뇨생식계, 부인과계, 유방, 내분비계, 피부, 뼈 및 연-조직 육종, 중피종, 흑색종, 중추신경계의 신생물, 유아기 동안의 암성 질병 또는 종양 질병, 림프종, 백혈병, 부신생물 증후군, 알려지지 않은 일차 종양을 갖는 전이 (CUP 증후군), 복막 암종증, 면역억제-관련 악성암 및/또는 종양 전이로부터 선택된다.

[0314] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 발현되는 항체 또는 이의 일부는 항 MUC1 항체이다.

[0315] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들로 엔코딩된 항체 분자는 항체 리툭시맵, 헤르셉틴, 에르비툭스, 캄파쓰 1H 또는 이들로부터 유래된 항체이다.

[0316] 본 발명의 더욱 더 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/050707호에 기재된 항체이며, 더욱 바람직하게는 WO 2004/065423호에 기재된 항체이며, 더욱 더 바람직한 것은 판코맵(참조: Cancer Immunol Immunother. 2006 Nov; 55(11): 1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al)이며, 추가로 더욱 더 바람직한 것은 모든 사람 불변 도메인을 포함하는 이의 키메라 버전이며, 더욱 더 바람직하게는 이의 인간화된 항체이다.

[0317] 본 발명의 더욱 더 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 본 발명의 임의의 완전한 항체, 바람직하게는 리툭시맵, 헤르셉틴, 에르비툭스, 더욱 바람직하게는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 가장 바람직하게는 판코맵이며, 이에 의해 본 발명의 임의의 숙주 세포, 바람직하게는 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것으로부터 유래한 세포 또는 세포주로부터 분리된 항체 분자 조성물은 어떠한 검출가능한 NeuGc를 포함하지 않는다. 일반적으로 단백질에 대해서도 마찬가지의 설명이 적용된다.

[0318] 본 발명의 더욱 더 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 임의의 완전한 항체 분자, 또는 본 발명의 C감마2 도메인을 포함하는 항체 분자, 바람직하게는 리툭시맵, 헤르셉틴, 에르비툭스, 더욱 바람직하게는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 가장 바람직하게는 판코맵이며, 이에 의해 본 발명의 숙주 세포, 바람직하게는 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것들로부터 유래한 세포 또는 세포주로부터 분리된 항체 분자 조성물은 알파 2-6 시알산을 갖는 적어도 하나의 당형태를 포함한다. 일반적으로 단백질에 대해서도 마찬가지의 설명이 적용된다.

[0319] 본 발명의 더욱 더 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 임의의 완전한 항체 분자, 또는 본 발명의 C감마2 도메인을 포함하는 항체 분자, 바람직하게는 리툭시맵, 헤르셉틴, 에르비툭스, 캄파쓰-1H, 더욱 바람직하게는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 가장 바람직하게는 판코맵이며, 이에 의해 숙주 세포 NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것들로부터 유래한 세포 또는 세포주로부터 분리된 항체 분자 조성물은 알파 2-6 시알산을 포함하며, 상기 시알산은 실시예에 기재된 렉틴 SNA를 사용하여 면역블롯 검정에 의해 검출가능하다. 일반적으로 단백질에 대해서도 마찬가지의 설명이 적용된다.

[0320] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 임의의 항체 분자, 바람직하게는 리툭시맵, 헤르셉틴, 에르비툭스, 캄파쓰 1H, 더욱 바람직하게는 WO 2004/065423호에 기재

된 항체, 가장 바람직하게는 판코맵이며, 혈청 비함유 배지 및 더욱 바람직하게는 단백질 비함유 배지에서의 배양 후에 본 발명의 숙주 세포 NM-F9 또는 NM-D4로부터 분리된 항체 분자 조성물은 어떠한 검출가능한 시알산을 갖지 않으면서 개선된 동질성을 나타낸다. 일반적으로 단백질에 대해서도 마찬가지의 설명이 적용된다.

[0321] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 항체 리툭시맵, 헤르셉틴, 캄파쓰 1H, 또는 이들로부터 유래한 항체이며, 본 발명의 숙주 세포로부터 분리된 항체 분자 조성물은 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현된 동일한 항체 분자로부터의 항체 분자 조성물의 활성보다 적어도 4배 더 높은 증가된 ADCC 활성을 갖는다.

[0322] 본 발명의 더욱 더 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 더욱 바람직하게는 판코맵이며, 본 발명의 숙주 세포로부터 분리된 항체 분자 조성물은 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현된 동일한 항체 분자로부터의 항체 분자 조성물의 활성보다 세포 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것들로부터 유래한 세포 또는 세포주 중 적어도 하나에서 생성되는 경우 적어도 4배 더 높은 증가된 ADCC 활성을 갖는다.

[0323] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 더욱 바람직하게는 판코맵이며, 본 발명의 숙주 세포 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것들로부터 유래한 세포 또는 세포주로부터 유래한 항체 분자 조성물은, 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현된 동일한 항체 분자로부터의 항체 분자 조성물의 활성보다 적어도 50% 더 높은, 바람직하게는 2배 더 높은, 이의 에피토프에 대한 증가된 결합 활성을 갖는다.

[0324] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 더욱 바람직하게는 판코맵이며, 혈청 비함유 배지, 및 더욱 바람직하게는 단백질 비함유 배지에서 배양한 후에 본 발명의 숙주 세포 NM-F9 또는 NM-D4로부터 분리된 항체 분자 조성물은 어떠한 검출가능한 시알산도 갖지 않으면서 개선된 동질성을 갖는다. 일반적으로 단백질에 대해서도 마찬가지의 설명이 적용된다.

[0325] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 더욱 바람직하게는 판코맵이며, 숙주 세포 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 상기 숙주 세포 중 임의의 것들로부터 유래한 세포 또는 세포주로부터 분리된 항체 분자 조성물은, 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현된 동일한 항체 분자로부터의 항체 분자 조성물보다 적어도 10% 더 많은 시알산을 지니며 개선된 동질성을 갖는다. 일반적으로 단백질에 대해서도 마찬가지의 설명이 적용된다.

[0326] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 더욱 바람직하게는 판코맵이며, 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096]에서 발현된 동일한 항체 분자로부터의 항체 분자 조성물과 비교하여 NM-F9 또는 NM-D4에서 발현되는 경우에 더욱 높은 정도의 검출불가능한 시알산을 지니며 개선된 동질성을 갖는다. 일반적으로 단백질에 대해서도 마찬가지의 설명이 적용된다.

[0327] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 더욱 바람직하게는 판코맵이며, 본 발명의 숙주 세포로부터 분리된 항체 분자 조성물은 상기 기술된 바와 같이 개선된 동질성을 지니며, 그리고 세포주 CHOdhfr-[ATCC No. CRL-9096] 중에서 발현된 동일한 항체 분자로부터의 항체 분자 조성물의 활성보다 적어도 4배 더 높은 증가된 ADCC 활성을 갖는다.

[0328] 본 발명의 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명의 핵산 또는 핵산들에 의해 엔코딩된 항체 분자는 WO 2004/065423호에 기재된 항체, 더욱 바람직하게는 판코맵이다.

[0329] 본 발명은 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성, 및 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 본 발명의 측면에서 충분한 사람 글리코실화를 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위한 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포가 사람 골수성 백혈병 기원의 세포, 세포들 또는 세포주, 또는 백혈병 환자로부터 입수할 수 있는 임의의 사람 골수 또는 골수 전구체 세포 또는 세포주, 또는 사람 공여자로부터 입수할 수 있는 임의의 골수 또는 골수 전구체 세포 또는 세포주, 또는 사람 골수성 백혈병 기원의 적어도 하나의 세포를 포함하는 세포 또는 세포주의 혼합물, 또는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 이로부터 유래한 세포 또는 세포주, 또는 상기

언급된 세포 중 적어도 하나를 포함하는 세포 또는 세포주의 혼합물인 숙주 세포를 추가로 제공한다.

[0330] 본 발명은 또한 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성, 및 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 본 발명의 측면에서 충분한 사람 글리코실화를 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위한 숙주 세포로서, 상기 숙주 세포가, 사람 골수성 백혈병 기원의 세포, 세포들 또는 세포주, 또는 백혈병 환자로부터 입수할 수 있는 임의의 사람 골수 또는 골수 전구체 세포 또는 세포주, 또는 사람 공여자로부터 입수할 수 있는 임의의 골수 또는 골수 전구체 세포 또는 세포주를 B 세포, CHO 세포로 한정되는 것은 아니나 이와 같은 사람 또는 동물 기원의 다른 세포로 융합시킴으로써 얻어진 임의의 세포, 세포들 또는 세포주인 숙주 세포를 제공한다.

[0331] 바람직한 구체예에서, 세포 또는 세포주 KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주, 또는 그러한 상기 언급된 세포 중 적어도 하나를 포함하는 세포들 또는 세포주의 혼합물인 본 발명의 상기 숙주 세포는, 본원의 다른 곳에 기재된 발명의 측면에서 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위해 제공된다.

[0332] 추가의 바람직한 구체예에서, 세포 또는 세포주 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주 또는 본원의 다른 곳에 기재된 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주인 본 발명의 상기 숙주 세포는, 본원의 다른 곳에 기재된 발명의 측면에서 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위해 제공된다.

[0333] 추가의 바람직한 구체예에서, 세포 또는 세포주 NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주인 본 발명의 상기 숙주 세포는, 본원의 다른 곳에 기재된 발명의 측면에서 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위해 제공된다.

[0334] 더욱 추가의 바람직한 구체예에서, KG1, MUTZ-3, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X로부터 유래한 세포 또는 세포주, 또는 혈청 비함유 조건 하에서 성장시킨 본원의 다른 곳에 기재된 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주, 및 바람직하게는 단백질/항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 이들 세포 중에 도입되고 항체 분자 조성물이 혈청 비함유 조건 하에서 분리되는 그러한 것들인 본 발명의 상기 숙주 세포는, 본원의 다른 곳에 기재된 발명의 측면에서 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위해 제공된다.

[0335] 더욱 추가의 바람직한 구체예에서, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X로부터 유래한 세포 또는 세포주, 또는 혈청 비함유 조건 하에서 성장시킨 본원의 다른 곳에 기재된 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주인 본 발명의 상기 숙주 세포는, 본원의 다른 곳에 기재된 발명의 측면에서 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위해 제공된다.

[0336] 더욱 추가의 바람직한 구체예에서, K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X로부터 유래한 세포 또는 세포주, 또는 혈청 비함유 조건 하에서 성장시키고 단백질/항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 이들 세포 중에 도입되고 단백질/항체 분자 조성물이 혈청 비함유 조건 하에서 분리되는, 본원의 다른 곳에 기재된 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주인 본 발명의 상기 숙주 세포는, 본원의 다른 곳에 기재된 발명의 측면에서 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위해 제공된다.

[0337] 가장 바람직한 구체예에서, 세포 또는 세포주 NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, GT-2X, 또는 혈청 비함유 조건 하에서 성장시킨 본원의 다른 곳에 기재된 이들로부터 유래한 세포 또는 세포주, 및 바람직하게는 단백질/항체 분자를 엔코딩하는 핵산이 이들 세포 중에 도입되고 단백질 항체 분자 조성물이 혈청 비함유 조건 하에서 분리되는 그러한 것들인 본 발명의 상기 숙주 세포는, 본원의 다른 곳에 기재된 발명의 측면에서 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 단백질/항체 분자 조성물을 생성시키기 위해 제공된다.

[0338] 본 발명은 본원의 다른 곳에 기재된 본 발명의 방법 중 임의의 것에 의해 분리된 단백질/단백질 조성물을 추가로 제공한다.

[0339] 본 발명은, 본 발명의 측면에서 그리고 본원의 다른 곳에 기재된 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개

선된 동질성 및 충분한 사람 글리코실화를 갖는, 본원의 다른 곳에 기재된 본 발명의 방법 중 임의의 것에 의해 분리된 단백질 분자 조성물을 추가로 제공한다.

[0340] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, 단백질 분자 또는 이의 일부는 적어도 10 kDa의 크기, 바람직하게는 적어도 15 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 20 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 25 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 30 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 35 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 40 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 45 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 50 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 55 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 60 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 65 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 70 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 75 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 80 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 85 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 90 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 95 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 100 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 105 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 110 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 115 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 120 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 125 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 130 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 135 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 140 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 145 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 150 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 155 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 160 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 165 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 170 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 175 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 180 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 185 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 190 kDa의 크기, 더욱 바람직하게는 적어도 195 kDa의 크기, 및 가장 바람직하게는 적어도 200 kDa의 크기를 갖는다.

[0341] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 단백질 분자 조성물은 사이토킨 및 이들의 수용체의 그룹의 단백질 분자 중 임의의 것으로부터 유래하는데, 예를 들어 종양 괴사 인자 TNF-알파 및 TNF-베타; 레닌; 사람 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상샘 호르몬; 갑상샘 자극 호르몬; 지질단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-사슬 및 B-사슬; 생식샘자극 호르몬, 예를 들어 난포 자극 호르몬 (FSH), 황체형성 호르몬 (LH), 티로트로핀, 및 사람 융모생식샘 자극 호르몬 (hCG); 칼시토닌; 글루카곤; 인자 VIIIC, 인자 IX, 인자 VII와 같은 응고 인자, 조직 인자 및 본 빌레브란트 인자; 단백질 C와 같은 응고방지 인자; 심방 나트륨배출촉진 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 유로키나아제, 사람 소변 및 조직 타입의 플라스미노겐 활성화제; 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 엔케팔리나아제; 사람 대식세포 염증성 단백질; 혈청 알부민, 예컨대 사람 혈청 알부민; 뮬레리안-억제(mullerian-inhibiting) 물질; 레락신 A-사슬 및 B-사슬; 프로레락신; 마우스 고난도트로핀-관련된 펩티드; 혈관 내피 성장 인자; 호르몬 또는 성장인자 수용체; 인테그린; 단백질 A 및 D; 류마토이드 인자; 향신경성 인자, 예컨대 뼈 유래의 향신경성 인자, 뉴로트로핀-3, -4, -5, -6 및 신경성장 인자-베타; 혈소판 유래한 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 표피 성장 인자; 전환되는 성장 인자, 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대 CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 이뮤노톡신; 뼈 형성 단백질; 인터페론-알파, -베타 및 -감마와 같은 인터페론; 콜로니 자극 인자 (CSF's), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터루킨 (IL's), 예를 들어 IL-1 내지 IL-12; 수퍼옥사이드 디뮤타아제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 가속화 인자; 항체 및 면역접합체; 글리코포린 A; MUC1로부터 유래한다.

[0342] 본 발명의 더욱 바람직한 구체예에서, 상기 단백질 분자 조성물은 글리코포린 A, EPO, G-CSF, GM-CSF, FSH, hCG, LH, 인터페론, 인터루킨, 항체 및/또는 이의 단편으로 이루어진 그룹의 단백질 분자 중 임의의 것으로부터 유래한다.

[0343] 본 발명에 따른 생성 방법으로 수득될 수 있는 글리콜 단백질 또는 단백질 조성물이 또한 제공된다. 상기 단백질은 바람직하게는 청구항 제 27항에 정의된 글리코실화 특성을 갖는다.

[0344] 바람직하게는, 상기 단백질 조성물은 항체 분자 조성물이다. 본 발명은, 본 발명의 측면에서 그리고 본원의 다른 곳에 기재된 증가된 활성 및/또는 증가된 수율 및/또는 개선된 동질성을 갖는 본원의 다른 곳에 기재된 본 발명의 방법 중 임의의 것에 의해 분리된 항체 분자 조성물을 추가로 제공한다.

[0345] 상기 항체의 예에는 강글리오시드 GD3, 사람 인터루킨-5 수용체 알파-사슬, HER2, CC 케모킨 수용체 4, CD20, CD22, 신경모세포종, MUC1, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)에 대한 항체가 포함된다.

[0346] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 항체 분자 조성물은 뮤로모맵, 다클리주맵, 바실릭시맵, 아브식시맵, 리툭시맵, 헤르셉틴, 겜투주맵, 알렘투주맵, 이브리투모맵, 세툭시맵 (에르비툭스), 베바시주맵, 토시투모맵, 파블리주맵, 인플릭시맵, 이쿨리주맵, 에프라투주맵, 오말리주맵, 에팔리주맵, 아달리무맵, 캄파쓰-1H, C2B8, 파

노렉스, 브레바렉스, 시물렉트, 안토바, OKT3, 제나팍스, 레오프로, 시나기스, 오스타비르, 프로토비르, 오바렉스, 비탁신으로 이루어지는 그룹의 항체 분자 중 임의의 것으로부터 유래한다.

[0347] 본 발명의 더욱 바람직한 구체예에서, 상기 항체 분자 조성물은 리툭시맵, 헤르셉틴, 항-CC 케모킨 수용체 4 항체 KM2160, 캄파쓰-1H, C2B8, 에르비툭스, 항-신경모세포종 항체 chCE7로 이루어지는 그룹의 항체 분자 중 임의의 것으로부터 유래한다. 본 발명의 더욱 더 바람직한 구체예에서, 상기 항체 분자 조성물은 WO 2004/065423호에 기재된 그룹의 항체 분자, 더욱 바람직하게는 판코맵, 더욱 바람직하게는 이의 키메라 형태, 및 더욱 더 바람직하게는 이의 인간화된 형태의 항체 분자로부터 유래한다.

[0348] 아미노산 서열 DTR을 포함하며, 단백질이 MUC1 에피토프에 결합하는 항체인 본 발명의 생성 방법으로 수득될 수 있는 단백질 또는 단백질 조성물이 또한 제공된다.

[0349] MUC-1은 다양한 상피 종양 상에서 발현되는 확립된 종양 마커이고 잠재적인 종양 표적이다. MUC-1은 고도로 O-글리코실화된 큰 트랜스막 당단백질이다. 세포외 부분은 가변적인 수의 20개 내지 120개의 직렬식 반복(TR)으로 구성되고, 각각은 5개의 잠재적인 O-글리코실화 측을 지니는 20개의 아미노산으로 구성된다. MUC 1은 상피 조직에서 발현될 뿐만 아니라 조혈 세포에서도 발현된다. MUC 1의 DRT 모티프에 결합되는 여러 항체가 공지되어 있고, 이들은 본 발명의 관점에서 적합한 단백질/항체이다 (개략 참조 Karsten et al., 1998). Karsten은 ...PDT*RP...구조의 MUC 1 (TA MUC) 상에서 신규한 탄수화물 유도된 형태적 에피토프를 기술하였고, 여기서 T*는 O 글리코실화된다. 이 부위에 존재하는 글리칸은 자체적으로 종양-특이적인 탄수화물 구조이다.

[0350] 따라서, TA MUC 종양 에피토프 및 비-글리코실화된 에피토프를 구별할 수 있는 MUC 항체를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 글리코실화된 TA MUC 에피토프를 특이적으로 인식할 수 있는 한 적합한 항체는 판코맵 항체이다. 이의 생성이 문헌[Danielczyk et al 2006]에 상세히 기술되어 있고, 본원에서 전체가 참조로서 포함된다 (판코맵: 효능 있는 신규한 생성 항-종양 MUC-1 항체). 항체 판코맵 또는 이의 변이체는 부모 판코맵 항체가 바람직하게 이용되기 때문에 동일한 TA-MUC 1 에피토프에 경쟁적으로 결합된다. 이러한 항체 변이체는 하기 특징 중 하나 이상을 지닌다:

[0351] - 적어도 아미노산 서열 PDTRP를 포함하는 에피토프에 결합된다;

[0352] - PDTRP 서열에서 Gal-NAc알파로 글리코실화되나 동일한 펩티드가 글리코실화되지 않을 때 1,5 TR을 포함하는 30개 아미노산의 짧은 MUC 펩티드에 결합된다;

[0353] - 25 초과, 바람직하게는 28의 부가적인 길이 효과를 나타낸다 (가장 바람직하게는 29.5의 비);

[0354] - 조혈계의 세포에 대해 낮은 결합을 나타내거나 심지어 결합되지 않는다 (검출 방법과 관련하여, 문헌[Danielczyk et al 2006] 참조, 이는 본원에 참조로서 포함됨);

[0355] - 스캐챠드 플롯 분석에 의해 측정시 종양 세포에 대해 대략 적어도 K_{ass} = 0.2 - 1 x $10^9 M^{-1}$의 높은 친화력을 지닌다.

[0356] 개개 변이체의 적합한 예가 실시예에서 제공된다. 항체는 뮤린, 기원, 키메라 또는 인간화될 수 있다.

[0357] TA-MUC 1 에피토프에 결합된 항체, 바람직하게는 본원에 개시된 판코맵 항체 또는 항체 판코 1 및 판코 2는 하기 글리코실화 특징 중 하나 이상을 갖는다:

[0358] (i) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 항체 분자의 하나 이상의 항체 분자 조성물 중 동일한 양의 항체 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 항체 분자 조성물의 항체 분자들 중 항체 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 15% 더 높은 양의 N-아세틸뉴라민산을 지니는 증가된 시알릴화 정도를 지닌다;

[0359] (ii) 발현시 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]으로부터 단리된 동일한 항체 분자의 하나 이상의 항체 분자 조성물 중 동일한 양의 항체 분자와 비교하여, 전체 탄수화물 구조 또는 상기 항체 분자 조성물의 항체 분자들 중 항체 분자의 한 특수한 글리코실화 부위에서의 탄수화물 구조에 대하여, 적어도 5% 더 높은 양의 G2 구조를 지니는 더 높은 갈락토실화 정도를 지닌다;

[0360] (iii) 검출할 수 있는 양의 2등분GlcNAc를 포함한다;

[0361] (iv) 하이브리드 또는 고 만노오스 구조를 지니지 않거나 2% 미만으로 지닌다.

[0362] 개개 글리코실화 패턴은 하기의 놀랍고 유리한 활성 패턴을 초래한다:

[0363] (i) CHO 세포에서 발현된 동일한 항체의 활성 보다 15% 넘게 더 높은 CDC 활성;

[0364] (ii) 검출할 수 있는 시알릴화를 지니지 않은 항체와 비교하여 2배 만큼 (1.5배 초과) 연장된 혈청 반감기;

[0365] (iii) 세포주 CHOdhfr- [ATCC No. CRL-9096]에서 발현시 동일한 항체 분자로부터의 하나 이상의 항체 분자 조성물의 Fc-매개된 세포의 세포독성에 비해 적어도 2배 더 높은 증가된 Fc-매개된 세포의 세포독성.

[0366] 개개 항체는 높은 시알릴화 및 갈락토실화 정도, 그러나 바람직하게는 낮은 푸코실화를 제공하는 본 발명에 따른 세포주에서의 생성에 의해 수득될 수 있다. 적합한 예는 NM-H9D8 및 NM-H9D8-E6이다.

[0367] 하기 표 및 도면은 본 발명을 설명한다.

[0368] 하기 표 1 및 8 및 도면 1 내지 17은 본 발명을 설명한다.

[0369] 표 1: FCS가 보충된 배지에서 배양된 CHOdhfr- 및 NM-F9에서 발현된 키메라 판코맵의 수율.

[0370] 표 2: 무-혈청 배지에서 배양된 NM-H9D8 [DSM ACC2806]에서 발현된 키메라 판코맵의 수율.

[0371] 표 3: 판코맵 및 세툭시맵에서 시알산 함량의 정량: 항체를 지시된 세포주에 의해 생성하며 DMB 표지된 시알산 변이체의 역상 크로마토그래피에 의해 수득된 피크 면적을 적분함에 의해 정량한다. NeuGc 및 NeuAc를 시알산 표준을 이용하여 구별한다.

[0372] 표 4: 판코 1 및 판코맵에서 상이한 하전 구조의 정량: 2-AB 표지된 N-글리칸을 음이온 교환 크로마토그래피 (아사히-PAK 컬럼)로 처리하고 상이한 하전 구조에 상응하는 피크를 적분에 의해 정량하였다.

[0373] 표 5: 항체 판코 1 및 판코맵의 갈락토실화 정도를 2-AB 표지된 글리칸의 아미노상 HPLC (Luna-NH2-컬럼)DP 의해 측정하였다. 적분에 의해 피크를 정량하고 밑에 있는 글리칸 구조를 질량 분광법에 의해 분석하였다.

[0374] 표 6: 판코 1 및 판코맵에서 트리안테너리 및 바이안테너리+이등분 구조의 정량. 아미노상-HPLC로부터의 분획을 함유하는 잠재적인 2등분 GlcNAc를 수집하고 역상 크로마토그래피 (RP18-컬럼)으로 처리하였다. 이에 의해, 트리안테너리 및 바이안테너리+이등분 구조를 구분할 수 있다. 항체의 푸코실화 정도를 2-AB 표지된 글리칸의 아미노상 HPLC (Luna-NH2-컬럼)에 의해 결정하였다. 적분에 의해 피크를 정량하고 밑에 있는 글리칸 구조를 질량 분광법에 의해 분석하였다. 푸코실화되고 푸코실화되지 않은 구조를 결정하고 적분된 피크 면적을 정량하였다.

[0375] 표 7: FCS가 보충된 배지 (CHOdhfr-) 또는 무-혈청 배지에서 배양된 CHOdhfr- 및 GT-2x에서 발현된 hFSH의 수율.

[0376] 표 8: 무-혈청 배지에서 배양된 NM-H9D8 [DSM ACC5 수]에서 발현된 hFSH의 수율.

[0377] 표 9: 본 발명에 따른 방법으로 수득될 수 있는 적합한 글리코실화 및 활성 조합.

[0378] 표 10: 상이한 세포주에서 2등분GlcNAc 및 푸코오스의 수득된 값.

[0380] **[실시예]**

[0381] **실시예 1**

[0382] **세포에서 fut8 발현의 분석**

[0383] RNA를 표준 절차에 따라서 (RNeasy-Mini-Kit, Qiagen) NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, K562, NM-H9D8 [DSM ACC2806], GT-2x [DSM ACC] 및 HepG2 (대조군) 세포로부터 추출하였다. mRNA를 제조자의 지시에 따라서 (HDynabeads® Oligo(dT)25H, Invitrogen) 자기 비즈 기술을 이용하여 분리시켰다. 제1 가닥 P^PcDNA 합성을 위하여, 50 ㎕의 각 샘플의 비드 현탁액 및 옴니스크립트 역 트랜스크립타아제(Omniscript Reverse Transcriptase) (Qiagen)를 제조자의 지시에 따라 이용하였다. 후속적인 P^PRT-PCR 반응을 위해, 5 ㎕의 cDNA 생성물P^P 및 특이적인 *fut*8 프라이머를 이용하여 212bp 단편을 생성하였다. 대조군으로서 액틴 특이적인 프라이머를 이용하여 240bp 단편을 생성하였다. 생성된 PCR-생성물(들)P^P를 1.5% 겔 상에서 분석하였다.

[0384] NM-F9, NM-D4, NM-H9, K562, NM-H9D8 및 GT-2x는 *fut*8에 대한 mRNA를 발현시킨다.

[0385] 도 1은 NM-F9, NM-D4, 및 NM-H9D8의 fut8 mRNA 발현을 예로서 도시한다.

[0386] **실시예 2**

[0387] **K562 세포의 당공학처리(glycoengineering)**

[0388] K562 세포의 당공학처리 및 NM-D4 및 NM-F9 세포주의 생성이 EP1654353호에 개시되어 있다.

[0389] 높은 시알릴화 가능성을 지니는 NM-H9 세포, 및 이로부터 유래된 세포 또는 세포주를 하기와 같이 생성하였다. K562 세포를 알킬화제인 에틸 메탄설포네이트로 처리하여 랜덤 돌연변이발생을 수행하였다. 샘플 당 K562 세포를 PBS에서 세척하고 EMS (0.1 mg/ml, 에틸 메탄설포네이트, Sigma-Aldrich)가 보충된 세포 배양 배지 1 ml에 대하여 $10P^{6P}$ 세포로 밤새 37℃ 및 5 % COB_{2B}에서 시딩하였다. 세포를 세척하고 새로운 배지를 제공하였다. 매 2일마다 트립판 블루 염색에 의해 세포 활력을 측정하고, 세포를 면역세포화학 염색에 의해 분석하였다.

[0390] 후속하여, 높은 TF 발현의 신규한 표현형을 보이는 세포를 TF-특이적인 항체 수단에 의해 선택하였다. K562 세포를 B-PBS (PBS 중 0.5 % BSA)에서 세척하고, 모노클로날 항체 A78-G/A7 또는 판코맵의 하이브리도마 배양액의 50 ㎕의 상청액 및 950 ㎕의 B-PBS와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후에, 마이크로비즈(Miltenyi Biotec, KoIn, Germany)와 컨주게이션된 50 ㎕의 래트-항-마우스-IgM-항체 또는 래트-항-마우스-IgG-항체로 절차를 반복하였다. 세척 후, 자기적으로 표지된 TF-포지티브 K562 세포를 Miltenyi Biotec (KoIn, Germany)에 의해 제공된 두 연속 컬럼에 의해 제조자의 매뉴얼에 개시된 대로 분리시켰다. 배양한 지 9일 후에, 분리 절차를 총 3회 반복하였다. 항체 염색으로 개시된 FACS 분석 (유동세포분석법): 약 $3x10^5$ 세포를 4℃에서 1.5시간 동안 일차 모노클로날 항체 (A78-G/A7 (IgM), 판코맵 (IgG1)의 하이브리도마 배양 상청액, 모두 세포 배양 배지에서 1:2 희석됨)와 함께 인큐베이션하고, 이어서 PBS에서 1:200 희석된 이차 Cy3-컨주게이션된 염소 항-마우스 IgM 또는 IgG 항체와 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고 재세척하였다. 재현탁된 세포 (200 ㎕ PBS)를 유동세포분석법에 의해 조사하였다 (유동세포분석기: Coulter Epics, Beckman Coulter, Krefeld, Ger). 항체 표지된 세포에 대해 하기 파라메터: 전방 분산(forward scatter, FS): 26 V, 게인(gain) 1, 곁 분산(sideward scatter) (SS): 807 V, 게인 5, FL2: 740 V, 게인 1, 및 렉틴 표지된 세포에 대해 하기 파라메터: FS: 26 V, 게인 1, SS: 807 V, 게인 5, FL1:740 V, 게인 1을 갖는 Expo32 소프트웨어 (Becton Coulter)를 이용하여 정량 분석을 수행하였다.

[0391] 3회 라운드의 분리 후, 93% TF-포지티브 세포의 K562 세포 군집을 수득하였다. 그러나, TF-포지티브 K562 세포의 비율은 경시적으로 감소하여 단리 절차 이후 14일의 기간 동안 약 20%의 TF-포지티브 세포의 바닥 수준에 도달한다. TF-포지티브 표현형의 안정한 발현을 위해, K562 세포를 이후 시간 동안 단리시키고, 최종적으로 단리된 TF-포지티브 K562 세포를 이후 96-웰 플레이트에서의 제한된 희석에 의해 클로닝시켰다 (1 세포/100 ㎕). 수득된 30개의 K562 세포 클론 중에서, 17개의 세포 클론이 낮은 양의 TF 항원을 발현시키거나 TF 항원을 발현시키지 않았다. 이러한 세포 클론을 유동세포분석법으로 SNA 결합에 대해 그리고 증식 속도(배가 시간의 분석, 하기 참조)에 대해 분석하였다. 높은 SNA 결합 및 높은 증식 속도를 나타내는 세포 클론을 선택하였다. 안정한 NM-H9 클론을 단일 세포 클로닝에 의한 추가의 클론 개발을 위해 그리고 무-혈청 조건하에서 성장을 최적화시키기 위해 선택하였다. 가장 바람직하게는 세포 클론 NM-H9D8 [DSM ACC2806]을 선택하고 DSM ACC2806로 수탁하였다 ["DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" in Braunschweig (Germany), by Glycotope GmbH, Robert-Rossle-Str. 10, 13125 Berlin (Germany) at the September 15, 2006].

[0392] **실시예 3**

[0393] **K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-**H9D8-E6Q12, 및 GT-2x 세포주 및 CHOdhfr- 세포의 배양 및 무-혈청 세포주의 생성

[0394] K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856] ["DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" in Braunschweig (Germany), by Glycotope GmbH, Robert-Rossle-Str. 10, 13125 Berlin (Germany) on August 8, 2007], 또는 GT-2x [DSM ACC]를 10% FCS 및 2 mM 글루타민이 보충된 RPMI 1640 또는 무혈청 X-Vivo 20 배지에서 배양하고 8%의 습윤된 대기에서 37℃로 성장시켰다.

[0395] CHOdhfr- 세포 (ATCC No. CRL-9096)를 10% FCS, 2 mM 글루타민, 및 2% HT 보충물이 보충된 DMEM 또는 무혈청 CHO-S-SFM II 배지에서 배양하고 8%의 습윤된 대기에서 37℃로 성장시켰다.

[0396] K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], 또는 GT-2x [DSM ACC] 및 상기 숙주 세포로부터 유래된 세포 또는 세포주는 세포 배양 배지의 완전한 교환에 의해 무혈청 조건에 용이하게 적응된다. 본 발명에 따른 세포 및 세포주를 X-Vivo 20과 같은 무-혈청 배지에 1 x 10^5 내지 5 x 10^5 세포/ml, 바람직하게는 2 x 10^5 세포/ml의 밀도로 접종하고, 동물 세포에 대한 통상적인 배양 방법으로 배양시켰다. 배양한 지 4 내지 7일 후, 밀도가 5 x 10^5 내지 10 x 10^5 세포/ml에 도달한 세포를 무혈청 배지에 적응한 세포로서 선택하였다. 무혈청 배지에 대한 적응은 FCS가 보충된 배지를 무혈청 배지 조성물로 연속 희석시킴에 의해 수행될 수도 있다 (지속적인 적응). 본 발명의 숙주 세포를 생성하는 항체 조성물의 전환된 FCS 생성 클론의 생산성은 무혈청 조건에 대하여 대부분 보존된다.

[0397] 무혈청 조건에 대한 CHOdhfr- (ATCC No. CRL-9096)의 적응은 순차적으로 수행되어야 하고, 수 주가 소요되며 적어도 절반의 생산성의 손실이 보통이다.

[0398] **실시예 4**

[0399] **진핵 세포에서 키메라 항체 판코맵, 판코 1, 판코 2 또는 세툭시맵을 발현시**키는 벡터의 클로닝

[0400] 판코맵의 가변 서열을, 판코맵을 생성하는 뮤린 하이브리도마 세포로부터 특정 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시켰다 [HCancer Immunol Immunother.H 2006 Nov;55(11): 1337-47. Epub 2006 Feb. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. Danielczyk et al].

[0401] 판코 1 및 판코 2의 가변 서열 VH 및 VL이 본원에 참조로서 포함된 WO2004/065423에 개시되어 있다:

[0402] 판코 1의 가변 중쇄:

[0403] EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA
TYYAESVKGRFTISRDVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVS

[0404] 판코 1의 가변 경쇄:

[0405] DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELKR

[0406] 판코 2의 가변 중쇄:

[0407] EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT
THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNNLRVEDTGIYYCTRHYYFDYWGQGTTLTVS

[0408] 판코 2의 가변 경쇄:

[0409] DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMSNLASG
VPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKR

[0410] 세툭시맵 VH 및 VL의 가변 아미노산 서열을

[0411] http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=BTD00071.txt 로부터 수득하였고, 벡터NT1을 이용하여 cDNA 코딩 서열로 역번역하였다.

[0412] 세툭시맵의 가변 중쇄:

[0413] QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDY
N
TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVS

[0414] 세툭시맵의 가변 경쇄:

[0415] DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS
RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR

[0416] cDNA 서열을, VL의 경우 NcoI/NheI 및 VH의 경우 NcoI/SalI에 의해 연장시켜 cDNA를 생성하였다. NcoI/XhoI-cut 가변 중쇄 단편 VH를 WO2004/065423에 개시된 대로 NcoI/SalI-cut BS-리더 벡터로 클로닝하였다. BS-리더 벡터는 T 세포 수용체 시그널 펩티드 서열을 가변 도메인의 5' 말단에 그리고 스플라이스 공여체 서열을 3' 말단에 도입하기 위한 클로닝 카셋트를 포함한다. 상응하는 항체의 가변 경쇄 VL을 스플라이스 공여체 부위를 추

가로 엔코딩하는 3' 말단에서 특정 프라이머로 증폭시키고 NcoI/NheI을 통해 유사하게 소화된 BS-리더 벡터로 클로닝하였다. 이후, BS-리더 벡터로부터의 각 HindIII/BamHI 단편을 상응하는 진핵 발현 벡터로 클로닝시켰다. 이러한 벡터 (pEFpuroC감마1VB_{HB}, pEFdhfrC카파VB_{LB}, pEFdhfrB_{mutB}C카파VB_{LB})는 EF-1알파-프로모터 및 HCMV 인핸서, SV40 기원, 폴리아데닐화 시그널, 푸로마이신 내성 유전자를 중쇄용 벡터에 포함하고, 경쇄용 벡터에서 선택 및 유전자 증폭을 위해 CHO 세포 발현용 뮤린 디하이드로폴라아제 유전자(dhfr) 또는 K562, NM-F9 [DSM ACC2606], NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8 [DSM ACC2806], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], 또는 GT-2x [DSM ACC] 발현용 서열번호 1 (서열 1#)을 포함할 뿐 아니라, 중쇄용 인간 불변 감마1 영역 또는 경쇄용 인간 불변 카파 영역의 게놈 서열을 포함한다 (게놈 인간 DNA로부터의 증폭을 위한 프라이머 및 벡터 맵은 WO2004/065423 참조).

[0417] **실시예 5**

[0418] **키메라 항체, 판코맵, 판코 1, 판코 2 또는 세툭시맵을 발현시키는 진핵 세**포의 트랜스펙션 및 혈청 존재하에 높은 생성용 세포 클론을 생성하기 위한 유전자 증폭 절차

[0419] NM-F9 [DSM ACC2606] 또는 CHOdhfr- [ATCC No. CRL- 9096]에서 키메라 항체를 발현시키기 위해, NM-F9와 같은 현탁 세포의 경우 DMRIE-C 또는 일렉트로포레이션을 이용한 리포펙션에 의해 또는 부착 세포주 CHOdhfr-의 경우 리포펙타민 또는 일렉트로포레이션에 의해 중쇄 및 경쇄에 대한 상기 개시된 벡터들의 혼합물 (1:1 내지 1:3)로 세포를 공-트랙스펙션시켰다. 트랜스펙션 2일 후, 성장 배지를 1주일 동안 선택 배지로 교환하였다 (NM-F9 in RPMI 1640 + 10% FCS + 2 mM L-글루타민 + 0.75 ㎍/ml 푸로마이신 + 50 nM 메토트렉세이트; CHOdhfr- in DMEM + 10% 투석된 FCS + 2 mM L-글루타민 + 5 ㎍/ml 푸로마이신 + 50 mM 메토트렉세이트). 메토트렉세이트 농도를 추가 2주 동안 100 nM으로 증가시켜 첫 번째 증폭을 수행하였다. 증폭된 세포 군집의 일부가 푸로마이신 및 메토트렉세이트의 첨가 없이 배지에서 단일 세포 클로닝되었고, 세포의 나머지를 메토트렉세이트 농도를 증가시킴에 의해 새로운 라운드의 유전자 증폭으로 처리하였다. 이러한 방식으로 4회 내지 6회 라운드의 유전자 증폭 (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 nM 메토트렉세이트)을 수행하였다. 추가로, 클론 스크리닝 및 분석에 의해 동정된 가장 양호한 생성용 클론을 추가로 유사하게 증폭시켰다.

[0420] 제한된 희석을 이용한 96-웰 플레이트에서의 단일 세포 클로닝 이후에 (웰 당 0.5 세포), 성장하는 세포 클론을 현미경으로 분석하면서 세포를 2 내지 3주 동안 배양하고, 클로닝 효율을 %로 (성장하는 세포 클론을 지니는 웰의 수 x 100 / 시딩된 세포의 이론적인 수) 결정하였다. 성장하는 클론을, 부착 CHOdhfr- 세포 또는 NM-F9 현탁 세포에 대해 상이한 절차를 이용하여 생산성에 대해 스크리닝하였다.

[0421] **CHOdhfr-**: 성장하는 클론의 세포를 PBS로 세척하고 아쿠타아제(accutase) 처리에 의해 수거하였다. 재현탁된 세포의 절반을 96-웰 시험 플레이트에 시딩하고, 남은 절반을 추가 배양을 위해 24-웰 플레이트에 시딩하였다. 시험 플레이트를 20 내지 24시간 동안 배양하였다. 각 웰의 상청액을 특이적 생산 속도(SPR) 및 배가 시간(g)의 결정(하기 참조)에 개시된 대로 항체 역가에 대해 분석하였다. 상대 세포 밀도를 MTT 검정을 이용하여 측정하였다. 상세하게, 세포를 MTT 용액과 2시간 동안 인큐베이션하고, 용액을 폐기하고, 세포를 2-프로판올 중 0.04M HCl 용액으로 용해시켰다. 2시간 후, 플레이트를 중간 정도로 혼합하고, 570 nm 필터가 구비된 미세역가 플레이트 포토미터를 이용하여 이중 방식으로 630 nm 참조 필터에 대해 측정하였다.

[0422] **NM-F9**: 96-웰 플레이트를 원심분리하고 상청액을 폐기하였다. 세포를 200 ㎕의 새로운 배지에 재현탁시켰다. 재현탁된 세포의 절반을 96-웰 시험 플레이트에 시딩하고 100 ㎕ 배지로 희석시켰고, 남은 절반을 추가 배양을 위해 클로닝 플레이트에 두었다. 배양 2일 후, 시험 플레이트를 원심분리하고 20 ㎕의 상청액을 특이적 생산 속도(SPR) 및 배가 시간(g)의 결정(하기 참조)에 개시된 대로 항체 역가에 대해 분석하였다. 상대 세포 밀도를 각 웰에서 10 ㎕의 WST-1 용액 (Roche)을 첨가시킨 WST-1 검정을 이용하여 측정하였다. 인큐베이션한 지 1 내지 3시간 후에, 450 nm 필터가 구비된 미세역가 플레이트 포토미터를 이용하여 이중 방식으로 630 nm 참조 필터에 대해 측정을 수행하였다.

[0423] 높은 비율의 항체 역가 대 세포 밀도를 지니는 세포 클론을 선택하고, 배양하고, 추가로 분석하였다.

[0424] K562, NM-D4 및 NM-H9에 대한 조건은 동일하였다.

[0425] 특이적 생산 속도(SPR) 및 배가 시간(g)의 결정

[0426] 각 클론에 대해, $2x10P^{4P}$ 세포를 500 ㎕의 성장 배지에서 24-웰 조직 배양 플레이트의 웰 마다 시딩하였다. 세포가 3일 동안 성장하게 하고, 조건화된 배지를 분석을 위해 수거하고, 필요한 경우 세포를 아쿠타아제에 의해 제

거하고, 계수하였다. 특이적 항체 역가를 ELISA에 의해 배지 샘플로부터 정량적으로 결정하였다. 검정 플레이트를 인간 카파 사슬 특이적 항체(BD)로 코팅하였다. 결합된 재조합 항체를 항-인간 IgG (H+L) 호스래디쉬 과산화효소 (HRP) 컨주게이트로 검출하였다 (Jackson Immunoresearch Laboratories). 정량을 위해, 정제된 재조합 키메라 항체를 기준으로서 이용하였다.

[0427] 매일 세포 당 (pcd) 측정된 특정 단백질의 SPR (피코그램)은 성장 속도 및 생산성 둘 모두의 함수이며, 하기 방정식에 의해 산출되었다:

[0428] $$SPR = \frac{\text{총 단백질 질량}}{\text{적분 세포 면적}(ICA)}$$

[0429] $$ICA = \frac{(\text{최종 세포 수} - \text{초기 세포 수}) \; X \; \text{배양 일수}}{\log_{dB}(\text{최종 세포 수} / \text{초기 세포 수})}$$

[0430] 배가 시간은 하기 방정식에 의해 산출되었다:

[0431] g = log 2 x (배양 시간) / log (최종 세포 수 / 초기 세포 수)

[0432] 세포주에 대한 평균 수율 및 최대 수율의 결정

[0433] 200개의 이론적으로 플레이팅된 단일 클론으로부터, 상기 개시된 제한된 희석 (웰 당 0.5 세포)을 이용한 96-웰 플레이트에서의 단일 세포 클로닝 이후에, 성장하는 세포 클론에 대해 SPR을 측정하고 평균 및 오차를 결정하였으며, 상이한 세포주 및 상이한 조건에 대한 최대 수율을 결정하였다. 표 1은 혈청-함유 조건하에 생성된 CHOdhfr- 및 NM-F9의 키메라 판코맵-생성 세포 클론의 데이터를 비교한다.

[0434] **실시예 6**

[0435] **항체 분자 조성물을 생성하는 무-혈청 고수율 세포 클론의 생성**

[0436] 무-혈청 배지 X-Vivo 20에 적응된 NM-H9D8, NM-H9D8-E6, NM-H9D8-E6Q12, 또는 GT-2x의 트랙스펙션을 DMRIE-C 또는 일렉트로포레이션 (Nucleofector, Amaxa)을 이용한 무-혈청 조건하에 수행하였다. 트랜스펙션 2일 후에, 성장 배지를 1주 동안 선택 배지로 교환하였다 (X-Vivo 20 + 0.75 ㎍/ml 푸로마이신 + 50 nM 메토트렉세이트). 메토트렉세이트 농도를 추가 2주 동안 100 nM으로 증가시켜 첫 번째 증폭을 수행하였다. 증폭된 세포 군집의 일부가 푸로마이신 및 메토트렉세이트의 첨가 없이 X-Vivo에서 단일 세포 클로닝되었고, 세포의 나머지를 메토트렉세이트 농도를 증가시킴에 의해 새로운 라운드의 유전자 증폭으로 처리하였다. 이러한 방식으로 4회 내지 6회 라운드의 유전자 증폭 (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 nM 메토트렉세이트)을 수행하였다. 추가로, 클론 스크리닝 및 분석에 의해 동정된 가장 양호한 생성용 클론을 추가로 유사하게 증폭시켰다. 제한된 희석을 이용한 96-웰 플레이트에서의 단일 세포 클로닝 이후에 (웰 당 0.5 세포), 성장하는 세포 클론을 현미경으로 분석하면서 플레이트를 2 내지 3주 동안 배양하고, 클로닝 효율을 %로 (성장하는 세포 클론을 지니는 웰의 수 x 100 / 시딩된 세포의 이론적인 수) 결정하였다. 성장하는 클론을 NM-F9 현탁 세포와 동일한 절차를 이용하여 혈청의 존재하에 생산성에 대해 스크리닝하였다 (상기 참조).

[0437] 세포 클론의 평균 수율 및 최대 수율의 결정

[0438] 200개의 이론적으로 플레이팅된 단일 클론으로부터, 상기 개시된 제한된 희석 (웰 당 0.5 세포)을 이용한 96-웰 플레이트에서의 단일 세포 클로닝 이후에, 성장하는 세포 클론에 대해 SPR을 측정하고 평균 및 오차를 결정하였으며, 상이한 조건에 대한 최대 수율을 결정하였다. 표 2는 무-혈청 조건하에 완전히 생성된 NM-H9D8 [DSM ACC2806]의 키메라 판코맵-생성 세포 클론의 데이터를 제시한다.

[0439] 본 발명에 따른 세포주에서의 증폭 이후에 특이적 생산 속도(SPR)는 CHOdhfr- 보다 높고, 무-혈청 조건하에 생성된 키메라 판코맵-생성 NM-H9D8 [DSM ACC2806] 세포에서 가장 높았다.

[0440] 대부분의 클론의 생산 속도는 선택 압력 없이 적어도 6주에 걸쳐 매우 안정하다. 가장 양호한 클론은 24시간의 배가 시간을 지니며 6주에 걸쳐 30 pcd의 SPR로 안정하다.

[0441] 데이터는 공정 개발, 배지 최적화 및 발효에 의한 생산성 증가에 있어서 추가의 가능성을 지니는 소형-랩 규모에서의 클론의 생산성을 반영한다.

[0442] 무-혈청 조건하에 생성된 생성 클론의 보다 높은 생산성 및 수율이 바람직하며, 조건은 무-혈청 조건에 적응된

K562, NM-F9, NM-D4, NM-H9, NM-E-2F9, NM-C-2F5, NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], 또는 GT-2x [DSM ACC]와 같은 모든 세포주 및 모든 다른 항체에 대해 동일하다.

[0443] **실시예 7**

[0444] **항체 분자 조성물의 분리**

[0445] 본 발명에 따른 항체 분자 조성물의 생성 및 단리를 위해, 키메라 항체 판코맵, 판코 1, 판코 2 또는 세툭시맵을 분비하는 안정하게 트랙스펙션된 세포를 무혈청 배지에서, 세포 밀도가 약 1 내지 2 x $10P^{6P}$ 세포/ml에 도달할 때까지 배양하였다. 세포 배양 상청액으로부터 원심분리 (400 x g, 15분)에 의해 세포를 제거한 후, 키메라 항체를 단백질 A 컬럼 (HiTrap r-단백질 A FF, Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 정제하였다. 돌연한 pH 변화에 의해 용리된 정제된 항체 분획을 PBS에서 재-완충시키고, 센트리프렙(Centriprep) 원심분리 튜브 (컷오프 50 kDa, 밀리포어)를 이용하여 농축시켰다

[0446] **실시예 8**

[0447] **본 발명에 따른 항체 분자 조성물의 Fc-매개된 세포의 세포독성의 결정**

[0448] **혈액 공여체로부터 이펙터 세포로서 PBMC 분리**

[0449] 건강한 공여체의 혈액으로부터 피콜-하이파크(Ficoll-Hypaque)(Biochrom)를 이용한 밀도 원심분리에 의해 PBMC를 분리하였다. 세포를 5% FCS가 보충된 RPMI 1640으로 3회 세척하고 $5x10^7$ 세포의 별도의 회분으로 저온유지하였다. PBMC를 해동시키고, 직접 이용하거나 10% FCS가 보충된 RPMI 1640 (RPMI/FCS)에서 밤새 유지한 다음, 유동세포분석법에 이용하거나 세포독성 검정에서 이펙터 세포로서 이용하였다.

[0450] **시험관내 모델에서 항체-의존적인 세포의 세포독성의 검출**

[0451] 본 발명에 따른 재조합 항체의 항체-의존적인 세포의 세포독성(ADCC)을 유러퓸 방출 검정으로 조사하였다. 표적 세포 (ZR-75-1 , 5 x 10^6)를 6분 동안 얼음 상에서 800 ㎕의 유러퓸 완충액 (50 mM HEPES, pH 7.4, 93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM 디에틸렌트리아민펜타아세트산, 2 mM 유러퓸(III)아세테이트)에서 인큐베이션하고, 멀티포레이터 (에펜도르프)에서 일렉트로포레이션한 다음 (710 V, 1 펄스, 30 μs), 얼음 상에서 추가로 6분 동안 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 RPMI 1640/5% FCS에서 5회 세척하고 96-웰 둥근바닥 플레이트에 시딩하였다(Nunc; 웰 당 100 ㎕ 중 1 x 10^4 세포). 다양한 농도 (200 ㎕의 인큐베이션 부피 중 0.5 내지 25 ㎍/ml의 최종 농도)의 20 ㎕의 재조합 항체 또는 상응하는 대조군 (배지, 이소형 대조군 인간 IgG)을 첨가한 후, 인간 말초혈 세포 (웰 당 80 ㎕)를 이펙터 세포로서, 50:1의 이펙터/표적 세포 비를 이용하여 첨가하였다. 자발적인 방출을 결정하기 위해 이펙터 세포 없이 80 ㎕의 RPMI/FCS를 첨가하였다. 최대 방출을 에탄올을 이용한 표적 세포의 완전한 용해 후에 결정하였다. 인큐베이터에서 37℃로 4시간 동안 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 500 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 각 샘플의 25 ㎕를 증강(enhancement) 용액의 웰 당 200 ㎕로 피펫팅하였다 (Perkin-Elmer Wallac). 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 형광성을 측정하였다 ($VictorP^{2P}$ 플루오로메터, Perkin-Elmer Wallac). 방정식 (실험적인 용해 - 자발적인 용해) / (최대 용해 - 자발적인 용해) * 100으로부터 특이적 세포독성을 수득한다.

[0452] 대안적으로, 표적 세포 (LS174T 또는 ZR-75-1, 3 x 10^6 세포)를 6분 동안 얼음 상에서 100 ㎕의 유러퓸 완충액 (50 mM HEPES, pH 7.4, 93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM 디에틸렌트리아민펜타아세트산, 2 mM 유러퓸(III)아세테이트)에서 인큐베이션하고, 프로그램 A-011을 이용한 누클레오펙터 II (Amaxa)에서 일렉트로포레이션한 다음, 얼음 상에서 추가로 6분 동안 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 RPMI 1640/5% FCS에서 4회 세척하고 96-웰 둥근바닥 플레이트에 시딩하였다(Nunc; 웰 당 100 ㎕ 중 5 내지 10 x 10^3 세포). 다양한 농도 (세툭시맵의 경우 200 ㎕의 인큐베이션 부피 중 0.001 내지 100 ng/ml의 최종 농도; 키메라 판코맵, 판코 1 또는 판코 2의 경우 0.16 내지 5 ㎍/ml)의 20 ㎕의 재조합 항체 또는 상응하는 대조군 (배지, 이소형 대조군 인간 IgG)을 첨가한 후, 인간 말초혈 세포 (웰 당 80 ㎕)를 이펙터 세포로서, 100:1 내지 50:1의 이펙터/표적 세포 비를 이용하여 첨가하였다. 이펙터 세포가 없는 80 ㎕의 RPMI/FCS를 자발적인 방출을 결정하기 위해 첨가하였다. 최대 방출을 1% 트리톤 X-100을 이용한 표적 세포의 완전한 용해 후에 결정하였다. 인큐베이터에서 37℃로 4시간 동안 또는 밤새 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 500 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 각 샘플의 25 ㎕를 증강 용액(Perkin-Elmer Wallac)의 웰 당 200 ㎕로 피펫팅하였다 . 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 형광성을 측

정하였다 (Victor^{2} 플루오로메터, Perkin-Elmer Wallac). 방정식 (실험적인 용해 - 자발적인 용해) / (최대 용해 - 자발적인 용해) * 100으로부터 특이적 세포독성을 수득한다.

[0453] fut8^{-} 세포주 NM-H9D8-E6으로부터 단리된 세툭시맵의 ADCC 활성은 CHOdhfr- 세포 또는 SP2/0 세포로부터 단리된 세툭시맵의 ADCC 활성 보다 현저히 높다. 도 2에 도시된 대로, NM-H9D8-E6으로부터 단리된 세툭시맵은 CHOdhfr- 또는 SP2/0 세포(에르비툭스, Merck사로부터)로부터 단리된 세툭시맵 보다 약 30배 낮은 항체 농도에서 이와 동일한 LS174T의 특이적 용해를 유도한다. 이것은 시판되는 생성물 보다 30배 더 높은 ADCC 활성을 나타낸다. 이러한 결과는 최적화된 글리코실화 패턴을 초래하는 본 발명의 생성 방법을 이용하여 수득된 것이다.

[0454] 또한 NM-F9 [DSM ACC2606], K562, NM-H9, NM-D4 [DSM ACC2605], NM-H9D8-E6 [DSM ACC2807], NM-H9D8-E6Q12 [DSM ACC2856], GT-X2 [DSM ACC], 또는 NM-H9D8 [DSM ACC2806]로부터 단리된 키메라 판코맵의 ADCC 활성은 CHOdhfr- 세포로부터 단리된 키메라 판코맵의 ADCC 활성 보다 약 5배 더 높다. 대략 다섯 번째 키메라 판코맵 농도가 CHOdhfr- 세포에서 발현된 키메라 판코맵과 동일한 ADCC 활성을 초래한다. 도 3은 비교 목적을 위해 NM-F9 세포주를 이용한 개개 결과를 도시한다.

[0455] NM-H9D8-E6 또는 NM-H9D8-E6Q12로부터 단리된 키메라 판코 1의 ADCC 활성은 CHOdhfr- 세포로부터 단리된 키메라 판코 1의 ADCC 활성 보다 약 8배 더 높다. 대략 여덟 번째 키메라 판코 1 농도가 CHOdhfr- 세포에서 발현된 키메라 판코 1과 동일한 ADCC 활성을 초래한다. 개개 결과가 도 4에 도시된다.

[0456] NM-H9D8 또는 GT-2x로부터 단리된 키메라 판코 2의 ADCC 활성은 CHOdhfr- 세포로부터 단리된 키메라 판코 2의 ADCC 활성 보다 약 6배 더 높다. 대략 여섯 번째 키메라 판코 2 농도가 CHOdhfr- 세포에서 발현된 키메라 판코 2와 동일한 ADCC 활성을 초래한다. 개개 결과가 도 5에 도시된다.

[0457] NM-H9D8-E6으로부터 단리된 키메라 판코 2의 ADCC 활성은 NM-H9D8 세포로부터 단리된 키메라 판코 2의 ADCC 활성 보다 낮다. 개개 결과가 도 6에 도시된다.

[0458] **시험관내 모델에서 상보서열-의존적인 세포의 세포독성의 결정**

[0459] 항체의 상보서열-의존적인 세포의 세포독성(CDC)을 유러퓸 방출 검정으로 조사하였다. Eu^{3+}-로딩된 표적 세포 (ZR-75-1, 3 x 10^{6})를 상기 개시된 대로 제조하였다.

[0460] 이후, 세포를 96-웰 둥근바닥 플레이트에 시딩하였다 (Nunc; 웰 당 100 ㎕ 중 5 x 10^{3} 세포). 다양한 농도 (200 ㎕의 인큐베이션 부피 중 0.5 내지 50 ㎍/ml의 최종 농도)의 20 ㎕의 항체 또는 상응하는 대조군 (배지, 이소형 대조군 인간 IgG)을 첨가한 후, 세포를 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이후, 웰 당 10 ㎕의 새끼 토끼 상보서열 (Cedarline, 1:5 내지 1:10 희석됨)을 첨가하였다. 상보서열이 없는 10 ㎕의 RPMI/FCS를 첨가하여 자발적인 방출을 결정하였다. 최대 방출을 에탄올 또는 1% 트리톤 X-100을 이용한 표적 세포의 완전한 용해 후에 결정하였다. 인큐베이터에서 37℃로 3 내지 3.5시간 동안 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 500 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 각 샘플의 25 ㎕를 증강 용액(Perkin-Elmer Wallac)의 웰 당 200 ㎕로 피펫팅하였다 . 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 형광성을 측정하였다 (VictorP^{2P} 플루오로메터, Perkin-Elmer Wallac). 방정식 (실험적인 용해 - 자발적인 용해) / (최대 용해 - 자발적인 용해) * 100으로부터 특이적 세포독성을 수득한다.

[0461] NM-F9 세포로부터 단리된 키메라 판코맵의 CDC 활성은 CHOdhfr- 세포로부터 단리된 키메라 판코맵의 CDC 활성 보다 8배 더 높다. CHOdhfr- 세포에서 단리된 키메라 판코맵과 동일한 특이적 용해가 이 보다 8배 더 낮은 농도의 NM-F9로부터 단리된 키메라 판코맵에서 유도된다. 개개 결과가 도 7에 도시된다.

[0462] **항체 분자 조성물의 포식작용 활성을 분석하기 위한 컨주게이트 형성 검**정(CFA)

[0463] *PKH26으로 종양 세포 염색:*

[0464] 1x10P^{7P} 내지 2x10P^{7P} 종양 세포를 PBS에서 2회 세척하고, 1 ml의 희석제 C에 재현탁하고, 1 ml의 PKH26을 ZR-74-1, ZR-74-1TF, MCF-7 및 MT-3에 대해 12 x 10P^{-6P} M의 농도로 첨가하였다.

[0465] 실온에서 3분 인큐베이션 후, 2ml FCS를 1분 동안 실온에서 첨가함에 의해 염색을 중단하였다. 배지 (4ml, 1% L-글루타민, 10 % FCS가 보충된 RPMI)를 첨가하고, 세포를 스핀 다운(spun down)시키고, 배지로 4회 세척하였다. 종양 세포를 o.n. 37℃, 5% COB_{2B}에서 인큐베이션시켜 과도한 PKH-26이 방출되게 하였다.

[0466] PKH-26 염색의 최적화를 절반의 세포 수 및 부피를 이용하여 수행하였다.

[0467] *CFA:*

[0468] PKH-26 표지된 종양 세포를 트립신/EDTA로 수거하고, PBS로 1회 세척하고, 재조합 항체 분자 조성물의 존재 또는 부재하에 MAK 세포 배지(Invitrogen)에 0.8 x $10P^{6P}$ 세포/ml로 재현탁시켰다. 종양 세포 (250㎕, 0.2 x $10P^{6P}$ 세포)를 비-부착 폴리프로필렌 튜브에서 시딩하였다.

[0469] 문헌[Boyer et al., Exp. Hematol. 27, 751-761 (1999)]에 따라 MAK 세포를 제조하고, 세척하고, 1.6 x $10P^{6P}$ 세포/ml로 재현탁하였다. 250㎕의 MAK 세포 (0.2 x $10P^{6P}$ 세포)를 PKH-26 표지된 종양 세포 (E:T 비 2:1)에 첨가하였다. 개별적인 샘플을 이중으로 4℃ 및 37℃/5% COB_{2B}에서 3시간 또는 o.n. (18-20h) 동안 인큐베이션하였다.

[0470] 3h 또는 o.n.에서 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 세척하고 PBS/10% FCS에서 CD11c-FITC (1:18,5) + 7-AAD (1:500)으로 염색하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 400㎕ PBS에 재현탁하였다. 10.000개 세포 상에서 Epics XL (Beckman Coulter)에서 획득을 수행하였다. 콜로니화된 MAK 세포의 비율을 모든 생육할 수 있는 CD11c-FITC 포지티브 세포에 대해 게이팅된 세포 군집에서 PKH-26 포지티브 세포의 비율로서 결정하였다.

[0471] **실시예 9**

[0472] **ELISA에서 항체 분자 조성물 결합 활성의 분석**

[0473] 상이한 세포주에서 발현된 항체 분자 조성물의 항원 결합을 분석하기 위해, 키메라 판코맵 및 판코 2의 정제된 항체 분자 조성물을 서열 APPAHGVTSAPDT [GalNAc알파]RPAPGSTAPPAHGVTSA를 지니는 합성 글리코실화된 MUC1 30-mer 펩티드 상에서 ELISA로 측정하였다. 비-글리코실화된 MUC1 펩티드를 대조군으로서 이용하였다.

[0474] -20℃에서 부분으로 저장된 원액 (1 ml의 bidest 중 1 mg. $HB_{2B}O$)을 이용하여, PBS 중 1 ㎍/ml의 희석액을 생성하였다. 50 ㎕/웰을 NUNC 면역 플레이트 F96 맥시소프(MaxiSorp)에서 피펫팅하고, 시험 플레이트를 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 시험 플레이트를 PBS/0.2% 트윈-20으로 3회 세척하였다. 후속하여, 비-특이적인 결합 부위를 PBS 중 2% BSA로 차단하고, 1시간 이상 실온에서 인큐베이션하고, 50 ㎕의 재조합 판코맵을 적용하였다 (1-400 ng/ml PBS/1% BSA). PBS/0.2% 트윈-20을 이용한 3회 세척 단계 후, 과산화효소-커플링된 이차 항-인간 Fcγ1 항체를 적용시켜 특이적으로 결합된 항체를 검출하였다. 결합된 2차 항체를 검출하기 위해, TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)를 이용한 컬러 반응을 수행하였다. 15분 후, 2.5 N $HB_{2B}SOB_{4B}$를 첨가시켜 반응을 켄칭시켰다. 450 nm 필터가 구비된 미세역가 플레이트 포토미터를 이용하여 이중 방식으로 630 nm 참조 필터에 대해 측정을 수행하였다.

[0475] NM-F9로부터 단리된 키메라 판코맵의 결합 활성은 CHOdhfr- 세포로부터 단리된 키메라 판코맵의 결합 활성 보다 약 50% 더 높다 (도 8).

[0476] 높은 시알릴화 클론 NM-H9D8로부터 ELISA에서 발현되고 단리된 키메라 판코 2의 결합 활성은 GT-2x의 것에 필적하거나 CHOdhfr-의 것에 비해 높다 (도 9).

[0477] **실시예 10**

[0478] **NM-F9, NM- 및 CHOdhfr-세포에서 발현된 항체 분자 조성물의 글리칸 분석**

[0479] 적어도 100㎍의 정제된 항체의 글리칸을 산 가수분해에 의해 절단하였다. 시알산을 형광성 염료 DMB와의 컨주게이션에 의해 특이적으로 표지시켰다. 분석을, 예컨대 아사히팩(Asahipak)-NH2 컬럼 상에서 HPLC에 의해 수행하여 사카라이드를 분리하였다. 시알산의 동정 및 산출을 적합한 시알산의 표준 물질에 의해 수행하였다.

[0480] CHOdhfr- 또는 NM-F9 세포에서 발현된 키메라 판코맵 항체 분자 조성물의 분석은 CHOdhfr- 생성물의 <10% 모노시알릴화를 나타내었고 NM-F9 또는 GT-2x 생성물의 시알릴화는 거의 전혀 없었다. 후자는 비-하전된 글리칸만을 함유하였다.

[0481] 보다 상세히 말해, 적어도 100 ㎍의 정제된 항체의 글리칸을 산 가수분해에 의해 절단하였다. 시알산을 DMB와 같은 형광성 염료와의 컨주게이션에 의해 특이적으로 표지시켰다. 분석을, 예컨대 RP-18 컬럼 상에서 역상 크로마토그래피에 의한 HPLC에 의해 수행하였다. 시알산의 동정 및 산출을 적합한 시알산의 표준 물질에 의해 수행

하였다.

[0482] 하전된 글리칸 구조 및 갈락토실화 상태를 결정하기 위해, 100 ㎍의 항체를 트립신에 의해 소화시키고, N-글리칸을 PNGaseF 처리에 의해 수득하였다. 정제된 글리칸을 2-아미노벤즈아미드 (2-AB)로 표지시키고 하전된 N-글리칸 구조의 결정을 위해 음이온 교환 크로마토그래피 HPLC (Asahi-PAK-컬럼)로 처리하였다. 갈락토실화 상태의 측정을 위해, -N- 글리칸을 시알산 함량의 고갈을 위한 뉴라미니다아제에 의해 처리하고, 아미노상 HPLC (Luna-NH2-컬럼)에 의해 분리하고, 피크를 질량 분광법에 의해 분석하였다.

[0483] 잠재적인 2등분 GlcNAc 운반 글리칸을 함유하는 피크를 역상 크로마토그래피 (RP18-컬럼)에 의해 두 번째 단계에서 분리하였다. 이에 의해 트리안테너리 및 바이안테너리+2등분된 구조가 구별될 수 있다. 항체의 푸코실화 정도를 2-AB 표지된 글리칸의 아미노상 HPLC (Luna-NH2-컬럼)에 의해 결정하였다. 피크를 적분에 의해 정량하고 밑에 있는 글리칸 구조를 질량 분광법에 의해 분석하였다. 푸코실화되고 푸코실화되지 않은 구조를 결정하고, 적분된 피크 면적을 정량하였다.

[0484] NM-F9, GT-2x, NM-H9D8, NM-H9D8-E6, 또는 CHOdhfr- 세포에서 발현된 세툭시맵, 판코맵 및 판코 1의 상이한 항체 분자 조성물을 분석하고, 그 결과를 표 3 내지 4에 요약하였다.

[0485] 알파2-6 (SNA) 또는 알파2-3 (MAL-I) 결합된 시알산에 우선적으로 결합되는 렉틴을 이용하여 ELISA 또는 웨스턴 블롯 분석에 의해 항체 시알릴화를 특성규명하였다.

[0486] 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 CHOdhfr-, NM-F9, 또는 NM-H9D8 [DSM ACC2806]에서 발현된 항체 분자 조성물의 상이하게 시알릴화된 중쇄를 동정하였다. 5 ㎍의 각 항체 분자 조성물은 SDS-Page에 의해 10% 아크릴아미드 겔에서 환원 조건하에 분리하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스로 이동시키고, 렉틴 및/또는 이차 항-인간 IgG 항체에 의해 가시화하였다. 도 10은 2-6 시알릴화를 검출하는 이차 항-인간 IgG 항체 (도 10A) 또는 SNA (도 10B)에 의해 CHOdhfr-, NM-F9, 또는 NM-H9D8 [DSM ACC2806]에서 발현된 키메라 판코맵의 항체 분자 조성물의 상이하게 시알릴화된 중쇄를 도시한다. 도 11은 SNA 결합에 의해 가시화된 CHOdhfr- 또는 NM-H9D8에서 발현된 세툭시맵의 항체 분자 조성물의 상이하게 시알릴화된 중쇄를 도시한다.

[0487] ELISA 실험을 이용하여 NM-F9, NM-H9D8, 또는 NM-H9D8-E6 세포의 상청액으로부터 단리된 항체의 시알릴화를 분석하였다. PBS 중 2 ㎍/ml 및 웰 당 50 ㎕의 정제된 항체를 96웰 미세역가 플레이트 (Maxisorp)로 4℃에서 밤새 코팅시키고, 차단하고 (PBS/BSA), 세척하고, 비오티닐화된 SNA (2 ㎍/ml, PBS/1% BSA)와 1시간 동안 인큐베이션하고 다시 세척하였다. 이후, 웰을 POD-스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하고, 세척하고, TMB로 생성하였다. 2.5N H_2SO_4를 첨가하여 반응을 중단시키고, 광학 밀도를 450 nm에서 참조로서 630 nm에 대하여 측정하였다. 도 12는 SNA의 결합이 NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6 세포에서 발현되는 항체를 발생시키나, CHOdhfr- 또는 GT-2x 세포에서 발현되는 항체를 발생시키지 않음을 보여준다. 결합의 세기는 개별적인 항체의 미세 구조에 의해 야기된 상이한 시알릴화 정도를 나타내는 개별적인 항체 또는 사용된 조건하에 사카라이드의 이용가능성에 대하여 상이하다.

[0488] ELISA 실험은, 미세역가 플레이트 (2 ㎍/ml, 웰 당 50㎕)의 웰에서 상이한 세포주에서 발현된 정제된 항체를 코팅하고, 적합한 비오티닐화된 렉틴 SNA 및 MAL I를 검출함에 의해 수행되었다. 시알릴화에 의한 렉틴 결합의 의존성을, 뉴라미니다아제 처리 (0.1 U/ml 및 실온에서 1시간 동안 인큐베이션)에 의해 조사하였다. 세툭시맵에 대힌 결과를 도 13A 및 13B에 예시하였다.

[0489] 도트 블롯 분석을 수행하여 CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8, 및 NM-H9D8-E6 세포에서 발현된 항체의 시알릴화에 있어서의 차이를 확인하였다. 3 ㎍의 정제된 항체를 니트로셀룰로오스에 각각 스폿팅하고, PBS/BSA로 차단하고, 세척하고, 2,6-시알릴화를 검출하는 SNA에 의해 가시화하였다. 도 14는 CHOdhfr-, NM-F9, NM-H9D8, 또는 NM-H9D8-E6 세포로부터 단리된 키메라 항체 판코 1 및 판코 2의 블롯을 도시한다. 2,6-시알릴화는 NM-H9D8 또는 NM-H9D8-E6 세포로부터 단리된 항체 상에서만 검출할 수 있다.

[0490] **실시예 11**

[0491] **NM-F9, NM-H9D8 및 CHOdhfr-세포에서 발현된 항체 분자 조성물의 생체이용성**의 검출

[0492] 누드 마우스에서 NM-F9 세포에서 발현된 시알릴화되지 않은 항체 판코맵에 비해 NM-H9D8에서 발현된 시알릴화된 항체 판코맵에서 더 긴 생체이용성이 측정되었다. 마우스 당 5 ㎍의 정제된 항체를 그룹 당 적어도 3마리의 마우스에게 i.v. 주입하였다. 주사 후 상이한 시점에 (주사 후 5분, 2, 5, 8, 24, 48, 72, 및 144시간) 혈액 샘플을 수집하고, 혈청을 분리하고, 샘플을 분석시까지 -80℃에서 저장하였다. 항체 역가를 이러한 샘플에서

ELISA에 의해 결정하였다. 도 15는, NM-H9D8 세포로부터 단리된 키메라 판코맵이 NM-F9 세포로부터 단리된 것에 비해 더 길게 이용될 수 있음을 나타내며, 이것은 아마도 항체의 상이한 시알릴화에 의해 야기된 것이다.

[0493] **실시예 12**

[0494] **진핵 세포에서 hFSH를 발현시키는 벡터의 클로닝**

[0495] FSH 알파 및 FSH 베타 사슬의 코딩 서열을 RZPD(독일)로부터 수득된 BAC 클론 RZPDB737B122053D (FSH알파 게놈), IRAUp969E0752D (FSH알파 cDNA) 및 RZPDB737H0619D6 (FSH베타 게놈)을 이용하여 특이적 프라이머로 PCR 증폭시켰다.

[0496] FSH 알파 사슬용 프라이머:

[0497] FSHa-wt-f-KpnI : AAAGGTACCATGGATTACTACAGAAAATATG /
FSHa-b-BamHI: AAAGGATCCTTAAGATTTGTGATAATAAC;

[0498] FSH 베타 사슬용 프라이머:

[0499] FSHb-wt-f-HindIII: TTTAAGCTTATGAAGACACTCCAGTTTTTC /
FSHb-b-BamHI: TTTGGATCCTTATTCTTTCATTTCACC

[0500] 증폭시킨 후, 생성물을 HindIII/BamHI (FSH게놈베타) 및 KpnI/BamHI (FSH게놈알파 또는 FSHcDNA알파)를 통해 상응하는 진핵 발현 벡터로 클로닝시켰다. cDNA 서열을 TCR-리더 서열에 융합된 FSH 베타 사슬을 코딩하는 유전자합성(Genesynthesis)에 의해 생성하고 진핵 발현 벡터 (FSHcDNA베타)로 클로닝시켰다.

[0501] 서열 FSHcDNA베타 (TCR-리더 서열 밑줄로 표시):

[0502] atggcctgccccggcttcctgtgggccctggtgatcagcacctgcctggaattctccatggctaacagctgcgagctgacc
aacatcaccatcgccatcgagaaagaggaatgccggttctgcatcagcatcaacaccacctggtgcgccggctactgc
tacacccgggacctggtgtacaaggaccccgccaggcccaagatccagaaaacctgcaccttcaaagaactggtgta
cgagaccgtgcgggtgcccggctgcgcccaccacgccgacagcctgtacacctaccccgtggccacccagtgccact
gcggcaagtgcgacagcgacagcaccgactgcaccgtgaggggcctgggccccagctactgcagcttcggcgagat
gaaagagtga

[0503] 발현 벡터 (pEFpuro 및 pEFdhfrB_{mutB})는 EF-1알파-프로모터 및 HCMV 인핸서, SV40 기원, 폴리아데닐화 시그널, 푸로마이신 내성 유전자를 알파 사슬용 벡터에 포함하고, CHO 세포 발현을 위해 뮤린 디하이드로폴라아제 유전자(dhfr) 또는 선택 및 유전자 증폭을 위해 NM-F9, GT-2x, K562, NM-H9, NM-D4, 또는 NM-H9D8 발현을 위한 서열번호 1 (서열 1#)을 베타 사슬용 벡터에 포함한다.

[0504] **실시예 13**

[0505] **인간 재조합 hFSH를 발현시키는 진핵 세포의 트랜스펙션 및 무혈청 조건** (GT-2x 및 NM-H9D8) 또는 혈청 함유 조건 (CHOdhfr-) 하에 높은 생성용 세포 클론을 생성시키기 위한 증폭 절차

[0506] GT-2x [DSM ACC], NM-H9D8 (DSM ACC2806) 및 CHOdhfr- (ATCC No. CRL-9096)에서 hFSH를 발현시키기 위해, GT-2x (FSHcDNA 알파 / FSH게놈베타) 및 NM-H9D8 (FSHcDNA알파 / FSHcDNA베타)와 같은 현탁 세포의 경우 DMRIE-C 또는 일렉트로포레이션 (누클레오펙터; Amaxa)을 이용한 리포펙션에 의해 또는 부착 세포주 CHOdhfr- (FSH게놈알파 / FSH게놈베타)의 경우 리포펙타민 또는 일렉트로포레이션에 의해 알파 및 베타 사슬에 대한 상기 개시된 벡터들의 혼합물 (1:1 내지 1:3)로 세포를 공-트랙스펙션시켰다. 이것은 본 단계설정에서 사용된 예시적인 조합이다. hFSH알파 및 hFSH 베타 사슬 발현 플라스미드의 각각의 다른 조합이 필적하는 결과를 초래한다.

[0507] 트랜스펙션 2일 후, 성장 배지를 1주일 동안 선택 배지로 교환하였다 (GT-2x 및 NM-H9D8NM-F9 in X-Vivo20 배지 + 0.75 ㎍/ml 푸로마이신 + 50 nM 메토트렉세이트; CHOdhfr- in DMEM + 10% 투석된 FCS + 2 mM L-글루타민 + 5 ㎍/ml 푸로마이신 + 50 mM 메토트렉세이트). 메토트렉세이트 농도를 추가 2주 동안 100 nM으로 증가시켜 첫 번째 증폭을 수행하였다. 증폭된 세포 군집의 일부가 푸로마이신 및 메토트렉세이트의 첨가 없이 배지에서 단일 세포 클로닝되었다. 세포의 나머지를 메토트렉세이트 농도를 증가시킴에 의해 새로운 라운드의 유전자 증폭으로 처리하였다. 이러한 방식으로 2회 내지 3회 라운드의 유전자 증폭 (100, 200, 500 nM 메토트렉세이트)을 수행하였다. 추가로, 클론 스크리닝 및 분석에 의해 동정된 가장 양호한 생성용 클론을 추가로 유사하게 증폭시켰다.

[0509] *CHOdhfr-: 성장하는 클론의 세포를 PBS로 세척하고 아쿠타아제 처리에 의해 수거하였다. 재현탁된 세포의 절반을 96-웰 시험 플레이트에 시딩하고, 남은 절반을 추가 배양을 위해 24-웰 플레이트에 시딩하였다. 시험 플레이트를 20 내지 24시간 동안 배양하였다. 각 웰의 상청액을 특이적 생산 속도(SPR) 및 배가 시간(g)의 결정(하기 참조)에 개시된 대로 항체 역가에 대해 분석하였다. 상대 세포 밀도를 MTT 검정을 이용하여 측정하였다. 상세하게, 세포를 MTT 용액으로 2시간 동안 인큐베이션하고, 용액을 폐기하고, 세포를 2-프로판올 중 0.04M HCl 용액으로 용해시켰다. 2시간 후, 플레이트를 중간 정도로 혼합하고, 570 nm 필터가 구비된 미세역가 플레이트 포토미터를 이용하여 이중 방식으로 630 nm 참조 필터에 대해 측정하였다.

[0510] GT-2x 및 NM-H9D8: 96-웰 플레이트를 원심분리하고 상청액을 폐기하였다. 세포를 200 ㎕의 새로운 배지에 재현탁시켰다. 재현탁된 세포의 절반을 96-웰 시험 플레이트에 시딩하고 100 ㎕ 배지로 희석시켰고, 남은 절반을 추가 배양을 위해 클로닝 플레이트에 두었다. 배양 2일 후, 시험 플레이트를 원심분리하고 20 ㎕의 상청액을 특이적 생산 속도(SPR) 및 배가 시간(g)의 결정(하기 참조)에 개시된 대로 항체 역가에 대해 분석하였다. 상대 세포 밀도를 각 웰에서 10 ㎕의 WST-1 용액 (Roche)을 첨가시킨 WST-1 검정을 이용하여 측정하였다. 인큐베이션한 지 1 내지 3시간 후에, 450 nm 필터가 구비된 미세역가 플레이트 포토미터를 이용하여 이중 방식으로 630 nm 참조 필터에 대해 측정을 수행하였다.

[0511] 특이적 생산 속도(SPR) 및 배가 시간(g)의 결정

[0512] 각 클론에 대해, $2x10P^{4P}$ 세포를 500 ㎕의 성장 배지에서 24-웰 조직 배양 플레이트의 웰 마다 시딩하였다. 세포가 3일 동안 성장하게 하고, 조건화된 배지를 분석을 위해 수거하고, 필요한 경우 세포를 아쿠타아제에 의해 제거하고, 계수하였다. 특이적 항체 역가를 ELISA에 의해 배지 샘플로부터 정량적으로 결정하였다. 검정 플레이트를 hFSH 베타(ab22473)에 특이적인 마우스 mAB로 코팅하였다. 결합된 재조합 hFSH를 hCG 알파(ab20712)에 특이적인 염소 폴리클로날 항체와 함께 인큐베이션하고 당나귀 항 염소 IgG H+L-POD (Jacksonlmmuno Cat.No 305-035-003)으로 검출하였다. 정량을 위해, 정제된 재조합 hFSH를 기준으로서 이용하였다.

[0513] 매일 세포 당 (pcd) 측정된 특정 단백질의 SPR (피코그램)은 성장 속도 및 생산성 둘 모두의 함수이며, 하기 방정식에 의해 산출되었다:

[0514] $$SPR = \frac{\text{총 단백질 질량}}{\text{적분 세포 면적}(ICA)}$$

[0515] $$ICA = \frac{(\text{최종 세포 수} - \text{초기 세포 수}) X \text{배양 일수}}{\log B_{eB}(\text{최종 세포 수} / \text{초기 세포 수})}$$

[0516] 배가 시간은 하기 방정식에 의해 산출되었다:

[0517] g = log 2 x (배양 시간) / log (최종 세포 수 / 초기 세포 수)

[0518] 세포주에 대한 평균 수율 및 최대 수율의 결정

[0519] 200개의 이론적으로 플레이팅된 단일 클론으로부터, 상기 개시된 제한된 희석 (웰 당 0.5 세포)을 이용한 96-웰 플레이트에서의 단일 세포 클로닝 이후에, 성장하는 세포 클론에 대해 SPR을 측정하고 평균 및 오차를 결정하였으며, 상이한 세포주 및 상이한 조건에 대한 최대 수율을 결정하였다. 표 7 및 표 8은 혈청-함유 조건 (CHOdhfr-) 및 무혈청 조건 (GT-2x 및 NM-H9D8)하에 생성된 CHOdhfr-, GT-2x 및 NM-H9D8의 hFSH 생성용 세포 클론의 데이터를 비교한다.

[0520] **실시예 14**

[0521] **hFSH 분자 조성물의 분리**

[0522] 본 발명에 따른 hFSH 분자 조성물의 생성 및 단리를 위해, hFSH를 분비하는 안정하게 트랙스펙션된 세포를 무혈청 배지에서, 세포 밀도가 약 1 내지 2 x $10P^{6P}$ 세포/ml에 도달할 때까지 배양하였다 세포 배양 상청액으로부터 원심분리 (400 x g, 15분)에 의해 세포를 제거한 후, 키메라 항체를 NHS 활성화된 컬럼 (HiTrap NHS-활성화된 HP; GE Healthcare)에 커플링된 hCG알파에 대하여 폴리클로날 항체를 이용한 친화력 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다 돌연한 pH 변화에 의해 용리된 정제된 FSH 분획을 PBS에서 재-완충시키고, 센트리프렙 원심분리 튜브 (컷오프 10 kDa, 밀리포어)를 이용하여 농축시키고, SDS-PAGE에 의해 분석하였다 (참조 도 16).

[0523] **실시예 15**

[0524] **본 발명에 따른 FSH 분자 조성물의 활성의 결정**

[0525] 상이한 글리코실화 패턴을 지니는 FSH 분자의 활성을 후속하여 개시된 방법에 따라 결정할 수 있다. 최적화된 글리코실화를 제공하는 적합한 세포주를 본 발명에 따른 스크리닝 방법으로 선택하기 위해, FSH 분자를 상이한 세포주에서 발현시킴으로써 예컨대 시알릴화 정도, 갈락토실화 및/또는 푸코실화 정도와 관련하여 각기 다른 글리코실화 패턴을 나타내는 개별적인 세포주로부터의 FSH 조성물을 수득하였다. 가장 유리한 활성 및 이에 따라 글리코실화 패턴을 지니는 FSH 분자/조성물을 하기 방법 중 하나 이상에 의해 결정할 수 있다:

[0526] **래트 과립층 세포 검정:**

[0527] 과립층 세포를 DES 처리된 뇌하수체절제된 래트로부터 수득하였다. 세포의 제조 방법은 문헌[Jia and Hsueh 1985]에 상세하게 개시되어 있다.

[0528] 수득된 세포를 ~160000 세포/웰을 갖는 24웰 규모로 100 nM DES, 0,125 M 1-메틸-3-이소부틸크산틴, 2 mM 글루타민, 1 μM 안드로스텐디온, 100 U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신, 1 μg/ml 소 인슐린 및 GT-2x 및 NM-H9D8 세포 (0-1 μg/ml)로부터 유래된 증가된 농도의 rFSH 제조물을 함유하는 맥코이(McCoy's) 5A 배지에서 72시간 이내로 배양하였다. 배지를 인큐베션한 지 72시간 후에 수집하고 ELISA(Calbiotech # ES071S)에 의한 오에스트라디올의 정량시까지 -20℃에서 저장하였다.

[0529] **293HEK 검정:**

[0530] hFSH-수용체 ($2x10^5$ 세포/35mm 배양 디시)로 안정하게 트랜스펙션된 HEK293 세포를, 0.125 mM 1-메틸-3-이소부틸크산틴의 존재하에 0-1 μg/ml FSH의 범위로 24시간 동안 GT-2x 및 NM-H9D8 세포로부터 수득된 FSH의 증가된 용량의 각 단백질 분자 조성물에 37℃에서 72시간 이내로 노출시켰다. 인큐베이션 후, 총 (세포내- 및 세포외) cAMP 농도를 cAMP 다이렉트 바이오트랙(Biotrak)™ EIA (GE Healthcare, Cat.no.: RPN225)에 의해 제조자의 지시에 따라 결정하였다.

[0531] **GFSHR-17 세포 검정:**

[0532] 세포를 5% 우태아 혈청 (Biochrom KG, Berlin, Germany)을 함유하는 둘베코 개질된 이글 배지 Ham F12 (1:1 v:v; Biochrom KG, Berlin, Germany)로 배양하였다. 세포를 $2x10^5$ 세포/24 웰 플레이트로 플레이팅하고 GT-2x 및 NM-H9D8 세포로부터 24시간 동안 0-1 μg/ml의 범위로 수득된 FSH 단백질 분자 조성물과 1-24 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 배지를 수집하고 프로게스테론 ELISA 검정 (Biochem Immunosystems, Freiburg, Germany)을 이용하여 제조자의 지시에 따라 프로게스테론을 정량할 때까지 -20℃에서 저장하였다.

[0533] **인간 과립층 세포 검정**

[0534] 뮌스터 대학의 시험관내 수정 프로그램에 참여한 여성으로부터 수득된, 난포 흡인물로부터의 과립층-루테인 세포를 문헌[Khan et al., 1990]에 개시된 대로 부화시키고 6-웰 플레이트로 시딩하였다 (웰 당 1-1.5 x 10^5 성장할 수 있는 세포). 세포를 37℃에서 10% 열-불활성화된 우태아 혈청 (FCS; Gibco, Eggenstein, Germany), 페니실린 (50 유닛/ml), 스트렙토마이신 (50 pg/ml), 젠타마이신 (100 pg/ml) 및 암포테리신 (0.6 pg/ml)이 보충된 HAM's F12/둘베코 개질된 필수 배지(DMEM) (1: 1; ICN Biomedicals, Meckenheim, Germany)에서 5% CO_2 대기하에 인큐베이션하였다. 세포를, 0.125 mM 1-메틸-3-이소부틸크산틴의 존재하에 0-1 μg/ml FSH의 범위로 24시간 동안 GT-2x 및 NM-H9D8 세포로부터 수득된 FSH의 증가된 용량의 각 단백질 분자 조성물에 37℃에서 72시간 이내로 노출시켰다. 인큐베이션 후, 총 (세포내- 및 세포외) cAMP 농도를 cAMP 다이렉트 바이오트랙™ EIA (GE Healthcare, Cat.no.: RPN225)에 의해 제조자의 지시에 따라 결정하였다.

[0535] **실시예 16**

[0536] **GT-2x 및 CHOdhfr- 세포에서 발현된 FSH 조성물의 글리칸 분석**

[0537] 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 CHOdhfr-, GT-2x [DSM ACC], 또는 NM-H9D8 [DSM ACC2806]에서 상이하게 시알릴화된 FSH 분자 조성물을 동정하였다. 5 μg의 각 항체 분자 조성물을 SDS-Page에 의해 10% 아크릴아미드 겔에서 환원 조건하에 분리하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스로 이동시키고, 2-6 시알릴화를 검출하는 SNA에 의해 가시화하였다 (도 17).

[0538] 시알산 함량, 전하 분포, 푸코오스 함량, 갈락토실화 상태 및 2등분 GlcNAc 함량을 결정하기 위해 실시예 10에 따라서 상세한 글리칸 분석을 수행할 수 있다.

[0539] 이 결과는, FSH가 GT-2x에서 매우 높은 수율로 생성될 수 있음을 나타낸다 (참조 도 17) 여기서, 생성물은 또한 임의의 검출가능한 2-6 결합된 NeuNAc를 나타내지 않았다 (참조, 도 17의 레인 1) 반대로, NM-H9D8에서 생성된 FSH는 검출가능한 다소 높은 양의 2-6 결합된 NeuNAc를 나타내었다 실시예 15에 개시된 방법에 의해 활성을 검출할 수 있다.

[0540] **IUPAC-IUBMB 추천에 따른 정의 (1996):**

[0541] **Neu5Gc:** 5-N-글리콜릴-α-뉴라민산

[0542] **Neu5Ac 및 NeuNAc:** 5-N-아세틸-α-뉴라민산

[0543] **Gala 1,3Gal 및 Gal알파 1,3Gal:** α-D-갈락토피라노실-(1→3)-갈락토피라노실-인접 사카라이드

[0544] **2,3 결합된 뉴라민산:** 5-N-아세틸-α-뉴라미닐-(2→3)-인접 사카라이드

[0545] **2,6 결합된 뉴라민산:** 5-N-아세틸-α-뉴라미닐-(2→6)-인접 사카라이드

[0546] 본원에 개시된 특수한 방법, 프로토콜 및.또는 시약이 다양할 수 있으므로 본 발명이 이들로 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다 본원에 사용된 용어는 구체적인 예를 기술하기 위한 것일 뿐이고 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

서열번호:

서열 #1
서열번호 1
MVRPLNCIVAVSQDMGIGKNGDLPWPPLRNEWKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVG
GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
FEVYEKKD

서열 #2
서열번호 2
MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNESRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

서열 #3
서열번호 3
MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEARYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

서열 #4
서열번호 4
MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEGRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

서열 #5
서열번호 5
MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

서열 #6
서열번호 6
MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV

[0547]

GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

서열 #7
서열번호 7
MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDFPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

서열 #8
서열번호 8
MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVG
GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
FEVYEKKD

서열 #9
서열번호 9
MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVG
GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
FEVYEKKD

서열 #10
서열번호 10
MWLGSLLLLGTVACSISA

[0549]

표 1

[0550]

	CHOdhfr-	NM-F9
생산 속도 (clgG1) 이론적으로 200개 시딩된 클론으로부터(제한 희석) 1st 내지 4th 라운드의 유전자 증폭(메토트렉세이트) 및 단일 세포 클로닝 후 결정된 pcd	1st 라운드 (100nM MTX) 평 균 : 2 +/- 1 pcd; 최대: 3 pcd 2nd 라운드 (200nM MTX) 평 균 : 5 +/- 1 pcd; 최대: 7 pcd 3rd 라운드 (500nM MTX) 평 균 : 9 +/- 5 pcd; 최대: 17 pcd 4th 라운드 (1000nM MTX) 평 균 : 13 +/- 5 pcd; 최대: 22 pcd	1st 라운드 (100nM MTX) 평 균 : 5 +/- 1,5 pcd; 최대: 13 pcd 2nd 라운드 (200nM MTX) 평 균 : 7.5 +/- 4.5 pcd; 최대: 19 pcd 3nd 라운드 (500nM MTX) 평 균 : 12.5 +/- 4.5 pcd; 최대: 19 pcd 4nd 라운드 (1000nM MTX) 평 균 : 16.5 +/- 6 pcd; 최대: 27 pcd

표 2

[0551]

	NM-H9D8
생산 속도 (clgG1) 이론적으로 200개 시딩된 클론으로부터(제한 희석) 1st 내지 5th 라운드의 유전자 증폭(메토트렉세이트) 및 단일 세포 클로닝 후 결정된 pcd	1st 라운드 (100nM MTX) 평 균 : 7 +/- 4 pcd; 최대: 14 pcd 2nd 라운드 (200nM MTX) 평 균 : 14 +/- 4 pcd; 최대: 23 pcd 3rd 라운드 (500nM MTX) 평 균 : 13 +/- 6 pcd; 최대: 31 pcd 4th 라운드 (1000nM MTX) 평 균 : 23 +/- 8 pcd; 최대: 34 pcd 5th 라운드 (2000nM MTX) 평 균 : 23 +/- 9 pcd; 최대: 38 pcd

표 3

[0552]

	pmol Neu5Gc	pmol Neu5Ac	pmol Neu5Gc / μg 단백질	pmol Neu5Ac / μg 단백질
에르비톡스 *(Merck; SP2/0)*	0,149	0,000	**1,784**	0,000
세툭시맵 ***GT-2x***	0,000	0,278	0,000	**3,335**
세툭시맵 ***NM-H9D8***	0,000	1,156	0,000	**12,003**
c 판코맵 ***CHOdhfr-***	0,000	0,477	0,000	**4,921**
c 판코맵 ***GT-2x***	0,000	0,248	0,000	**2,990**
c 판코맵 ***NM-H9D8***	0,000	0,776	0,000	**13,856**

표 4

[0553]

	A0	A1	A2	A3	A4
판코 ***1 CHOdhfr-***	75	9	11	4	1
판코 ***1 NM-H9D8***	43	14	32	10	1
판코 ***1 NM-H9D8-E6***	40	16	33	10	1
c 판코맵 ***CHOdhfr-***	93	7	0	0	0
c 판코맵 ***NM-F9***	99	1	0	0	0
c 판코맵 ***NM-H9D8***	62	26	11	1	0

표 5

[0554]

	G0[%]	G1[%]	G2[%]	G3[%]
판코 ***1 CHOdhfr-***	22	45	33	0
판코 ***1 NM-H9D8***	7	8	66	14
판코 ***1 NM-H9D8-E6***	5	18	58	19
c 판코맵 ***CHOdhfr-***	28	36	35	1
c 판코맵 ***NM-F9***	7	26	65	2
c 판코맵 ***NM-H9D8***	7	32	59	0

표 6

	푸코실화	비푸코실화	바이안테너리+2등분 GlcNAc
판코 *1 CHOdhfr-*	100	0	0
판코 *1 NM-H9D8*	45	55	5
판코 *1 NM-H9D8-E6*	21	79	2

	바이안테너리	바이안테너리+2등분 GlcNAc	비푸코실화
c 판코맵 *-CHO*	99	0	0
c 판코맵 *-NM-F9*	68	29	6
c 판코맵 *-NM-H9D8*	59	39	1

[0555]

표 7

	CHOdhfr-	GT-2X
생산 속도 (FSH)	3rd 라운드 (500nM MTX)	2nd 라운드 (200nM MTX)
이론적으로 200개 시딩된 클론으로부터(제한 희석) 3rd 라운드의 유전자 증폭(메토트렉세이트) 및 단일 세포 클로닝 후 결정된 pcd	평 균 : <1 pcd; 최대: 0,05 pcd	평 균 : 2.5 +/- 2.0 pcd; 최대: 6 pcd 3rd 라운드 (500nm MTX) 평 균 : 2.5 +/- 1.3 pcd; 최대: 12 pcd

[0556]

표 8

	NM-H9D8
생산 속도 (FSH) 이론적으로 200개 시딩된 클론으로부터(제한 희석) 2nd 라운드의 유전자 증폭(메토트렉세이트) 및 단일 세포 클로닝 후 결정된 pcd	2nd 라운드 (200nM MTX) 평 균 : 2.2 +/- 1.2 pcd; 최대: 4 pcd

[0557]

표 9

[0558]

- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 보다 높은 친화력 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 보다 높은 친화력 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 보다 높은 친화력 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc

- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 높은 갈락토오스 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc

- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 보다 높은 친화력 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 보다 높은 친화력 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 보다 높은 친화력 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 제2항 및 종속항에 정의된 낮은 푸코오스 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc

- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 2등분GlcNAc - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 높은 활성, 특히 Fc 활성 - 2-6 NeuNAc
- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc - 2-3 NeuNAc - 제2항 및 종속항에 정의된 더 많은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 높은 수율 - 제2항 및 종속항에 정의된 적은 시알산	- NeuGc 없음 - 검출가능한 말단 Gal알파 1-3Gal 없음 - 높은 수율 - 2-6 NeuNAc

표 10

판코 1		
Fuc neg + BisGlcNAc neg.	H9D8 = 54 %	H9D8-E6=79%
Fuc pos + BisGlcNAc pos	H9D8 = 5 %	H9D8-E6= 2 %
Fuc neg + BisGlcNAc pos	H9D8 = 0 %	H9D8-E6=0 %
판코 2		
Fuc neg + BisGlcNAc neg.	H9D8 = ~0 %	F9 and GT-2X = ~5-6%
Fuc pos + BisGlcNAc pos	H9D8 = 36 %	F9 and GT-2X = 29 %
Fuc neg + BisGlcNAc pos	H9D8 = 0 %	F9 and GT-2X = 0 %

[0559]

Applicant's or agent's file reference 48 377 K	International application No.

수탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에
대한 표시
(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 23, line 1 (inter alia).

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☒

Name of depositary institution
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

Address of depositary institution *(including postal code and country)*
Mascheroder Weg 1b
38124 Braunschweig
DE

Date of deposit	Accession Number
2003-08-14	DSM ACC2606

C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)* This information is continued on an additional sheet ☒

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer Poels, Richard	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

[0560]

[0561] 참조 번호: 48 377 K

[0562] 수탁 번호 DSM ACC2606에 대한 PCT/RO/134 형식에 따른 추가 표시:

[0563] 본 출원인은 개개 규정을 갖는 국가에 대하여 본 출원에 언급된 수탁된 생물학적 물질의 샘플의 제공이 독립적인 지명된 전문가에게만 소용될 수 있도록 요청한다 (적용할 수 있는 "전문 액제"의 요청, 특히 호주, 캐나다, 크로아티아, 덴마크, 핀랜드, 독일, 아이슬란드, 노르웨이, 싱가폴, 스페인, 스웨덴, 영국, 유럽).

[0564] 따라서, 유럽의 경우, 본 출원인은 수탁된 생물학적 물질의 샘플이 특허 결정의 공개시까지 또는 출원이 거절되거나 취하되거나 취하된 것으로 여겨지는 경우 출원일로부터 20년 동안 Rule 28(3) EPC에 제공된 대로, 샘플의 지급에 의해 샘플을 요청하는 사람에 의해 지명된 전문가에게만 (Rule 28(4) EPC) 이용될 수 있도록 요청한다.

특허절차상 미생물수탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국 제 양 식

네모드 바이오테라퓨틱스 게엠베하 & 코. 카게
로버트-로슬레 슈트라쎄 10
13125 베를린

하기의 국제기탁기관에 의해 규칙 제 7.1 에 따라 발행된 원 기탁의 수탁증

Ⅰ. 미생물의 확인

기탁자에 의한 식별표시	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 :
NM-F9	DSM ACC2606

Ⅱ. 과학적 설명 및 /또는 분류학적 표시

상기 제 Ⅰ 난의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부된다 :
(X) 과학적 설명
( ) 제시된 분류학적 표시

Ⅲ. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 당국은 상기 제 Ⅰ 난의 미생물을 2003년 8월 14일(원기탁일)[1]에 수령하였다.

Ⅳ. 전환 요청의 수리

상기 제 Ⅰ 난의 미생물은 본 국제기탁당국에 년 월 일(원기탁일)에 수령되었고 부다페스트 조약하의 기탁으로 원기탁을 전환시키려는 요청은 년 월 일(전환요청수리일)에 수령되었다.

Ⅴ. 국제 기탁 당국

명칭 : DSMZ-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨트렌 게엠베하 주소 : 독일연방공화국 데-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베크 1베	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 사람 또는 담당 사무관의 서명 : 2003년 10월 16일

[1] 규칙 6.4(d)가 적용되는 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 자위 취득일이다.

서식 DSMZ-BP/4 12/2001

[0565]

Applicant's or agent's file reference 48 377 K	International application No.

수탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에
대한 표시
(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 23, line 1 (initial)	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	Further deposits are identified on an additional sheet ☐
Name of depositary institution Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Address of depositary institution *(including postal code and country)* Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit 2003-08-14	Accession Number DSM ACC2605
C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	This information is continued on an additional sheet ☒
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer Poels, Richard	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

[0566]

[0567] 참조 번호: 48 377 K

[0568] 수탁 번호 DSM ACC2605에 대한 PCT/RO/134 형식에 따른 추가 표시:

[0569] 본 출원인은 개개 규정을 갖는 국가에 대하여 본 출원에 언급된 수탁된 생물학적 물질의 샘플의 제공이 독립적인 지명된 전문가에게만 소용될 수 있도록 요청한다 (적용할 수 있는 "전문 액제"의 요청, 특히 호주, 캐나다, 크로아티아, 덴마크, 핀랜드, 독일, 아이슬란드, 노르웨이, 싱가폴, 스페인, 스웨덴, 영국, 유럽).

[0570] 따라서, 유럽의 경우, 본 출원인은 수탁된 생물학적 물질의 샘플이 특허 결정의 공개시까지 또는 출원이 거절되거나 취하되거나 취하된 것으로 여겨지는 경우 출원일로부터 20년 동안 Rule 28(3) EPC에 제공된 대로, 샘플의 지급에 의해 샘플을 요청하는 사람에 의해 지명된 전문가에게만 (Rule 28(4) EPC) 이용될 수 있도록 요청한다.

특허절차상 미생물수탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국 제 양 식

네모드 바이오테라퓨틱스 게엠베하 & 코. 카게
로버트-로슬레 슈트라쎄 10
13125 베를린

하기의 국제기탁기관에 의해 규칙 제 7.1 에 따라 발행된 원 기탁의 수탁증

Ⅰ. 미생물의 확인

기탁자에 의한 식별표시	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 :
NM-D4	DSM ACC2605

Ⅱ. 과학적 설명 및 /또는 분류학적 표시

상기 제 Ⅰ 난의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부된다 :
(X) 과학적 설명
( ) 제시된 분류학적 표시

Ⅲ. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 당국은 상기 제 Ⅰ 난의 미생물을 2003년 8월 14일(원기탁일)[1]에 수령하였다.

Ⅳ. 전환 요청의 수리

상기 제 Ⅰ 난의 미생물은 본 국제기탁당국에 년 월 일(원기탁일)에 수령되었고 부다페스트 조약하의 기탁으로 원기탁을 전환시키려는 요청은 년 월 일(전환요청수리일)에 수령되었다.

Ⅴ. 국제 기탁 당국

명칭 : DSMZ-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨트렌 게엠베하 주소 : 독일연방공화국 데-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베크 1베	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 사람 또는 담당 사무관의 서명 : 2003년 10월 16일

[1] 규칙 6.4(d)가 적용되는 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 자위 취득일이다.

서식 DSMZ-BP/4 12/2001

[0571]

Applicant's or agent's file reference 48 377 K	International application No.

수탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에
대한 표시
(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 61, line 21 (mineralin).	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	Further deposits are identified on an additional sheet ☐
Name of depositary institution Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Address of depositary institution *(including postal code and country)* Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit 2006-09-15	Accession Number DSM ACC2806
C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	This information is continued on an additional sheet ☒
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer Poels, Richard	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

[0572]

[0573] 참조 번호: 48 377 K

[0574] 수탁 번호 DSM ACC2806에 대한 PCT/RO/134 형식에 따른 추가 표시:

[0575] 본 출원인은 개개 규정을 갖는 국가에 대하여 본 출원에 언급된 수탁된 생물학적 물질의 샘플의 제공이 독립적인 지명된 전문가에게만 소용될 수 있도록 요청한다 (적용할 수 있는 "전문 액제"의 요청, 특히 호주, 캐나다, 크로아티아, 덴마크, 핀랜드, 독일, 아이슬란드, 노르웨이, 싱가폴, 스페인, 스웨덴, 영국, 유럽).

[0576] 따라서, 유럽의 경우, 본 출원인은 수탁된 생물학적 물질의 샘플이 특허 결정의 공개시까지 또는 출원이 거절되거나 취하되거나 취하된 것으로 여겨지는 경우 출원일로부터 20년 동안 Rule 28(3) EPC에 제공된 대로, 샘플의 지급에 의해 샘플을 요청하는 사람에 의해 지명된 전문가에게만 (Rule 28(4) EPC) 이용될 수 있도록 요청한다.

특허절차상 미생물수탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국 제 양 식

글리코토페 게엠베하
로버트-로슬레 슈트라쎄 10
13125 베를린

하기의 국제기탁기관에 의해
규칙 제 7.1 에 따라 발행된
원 기탁의 수탁증

Ⅰ. 미생물의 확인

기탁자에 의한 식별표시	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 :
NM-H9D8	DSM ACC2806

Ⅱ. 과학적 설명 및 /또는 분류학적 표시

상기 제 Ⅰ 난의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부된다 :
( ) 과학적 설명
( ) 제시된 분류학적 표시

Ⅲ. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 당국은 상기 제 Ⅰ 난의 미생물을 2006년 9월 15일(원기탁일)[1]에 수령하였다.

Ⅳ. 전환 요청의 수리

상기 제 Ⅰ 난의 미생물은 본 국제기탁당국에 년 월 일(원기탁일)에 수령되었고 부다페스트 조약하의 기탁으로 원기탁을 전환시키려는 요청은 년 월 일(전환요청수리일)에 수령되었다.

Ⅴ. 국제 기탁 당국

명칭 : DSMZ-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨트렌 게엠베하 주소 : 독일연방공화국 데-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베크 1베	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 사람 또는 담당 사무관의 서명 : 2006년 10월 9일

[1] 규칙 6.4(d)가 적용되는 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 자위 취득일이다.

서식 DSMZ-BP/4 12/2001

[0577]

Applicant's or agent's file reference 48 377 K	International application No.

수탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에
대한 표시
(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 22, line 16 (Linkerung)	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	Further deposits are identified on an additional sheet ☐
Name of depositary institution Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Address of depositary institution *(including postal code and country)* Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit 2006-10-05	Accession Number DSM ACC2807
C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	This information is continued on an additional sheet ☒
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer Poels, Richard	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

[0578]

[0579] 참조 번호: 48 377 K

[0580] 수탁 번호 DSM ACC2807에 대한 PCT/RO/134 형식에 따른 추가 표시:

[0581] 본 출원인은 개개 규정을 갖는 국가에 대하여 본 출원에 언급된 수탁된 생물학적 물질의 샘플의 제공이 독립적인 지명된 전문가에게만 소용될 수 있도록 요청한다 (적용할 수 있는 "전문 액제"의 요청, 특히 호주, 캐나다, 크로아티아, 덴마크, 핀랜드, 독일, 아이슬란드, 노르웨이, 싱가폴, 스페인, 스웨덴, 영국, 유럽).

[0582] 따라서, 유럽의 경우, 본 출원인은 수탁된 생물학적 물질의 샘플이 특허 결정의 공개시까지 또는 출원이 거절되거나 취하되거나 취하된 것으로 여겨지는 경우 출원일로부터 20년 동안 Rule 28(3) EPC에 제공된 대로, 샘플의 지급에 의해 샘플을 요청하는 사람에 의해 지명된 전문가에게만 (Rule 28(4) EPC) 이용될 수 있도록 요청한다.

특허절차상 미생물수탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국 제 양 식

글리코토페 게엠베하
로버트-로슬레 슈트라쎄 10
13125 베를린

하기의 국제기탁기관에 의해
규칙 제 7.1 에 따라 발행된
원 기탁의 수탁증

Ⅰ. 미생물의 확인

기탁자에 의한 식별표시	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 :
NM-H9D8-E6	DSM ACC2807

Ⅱ. 과학적 설명 및 /또는 분류학적 표시

상기 제 Ⅰ 난의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부된다 :
( ) 과학적 설명
( ) 제시된 분류학적 표시

Ⅲ. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 당국은 상기 제 Ⅰ 난의 미생물을 2006년 10월 5일(원기탁일)[1]에 수령하였다.

Ⅳ. 전환 요청의 수리

상기 제 Ⅰ 난의 미생물은 본 국제기탁당국에 년 월 일(원기탁일)에 수령되었고 부다페스트 조약하의 기탁으로 원기탁을 전환시키려는 요청은 년 월 일(전환요청수리일)에 수령되었다.

Ⅴ. 국제 기탁 당국

명칭 : DSMZ-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨트렌 게엠베하 주소 : 독일연방공화국 데-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베크 1베	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 사람 또는 담당 사무관의 서명 : 2006년 10월 18일

[1] 규칙 6.4(d)가 적용되는 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 자위 취득일이다.

[0583] 서식 DSMZ-BP/4 12/2001

Applicant's or agent's file reference 48 377 K	International application No.

수탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에
대한 표시
(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 61, line 28 (Cinderella).	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	Further deposits are identified on an additional sheet ☐
Name of depositary institution Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Address of depositary institution *(including postal code and country)* Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit 2007-08-08	Accession Number DSM ACC2856
C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	This information is continued on an additional sheet ☒
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer Poels, Richard	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

[0584]

[0585] 참조 번호: 48 377 K

[0586] 수탁 번호 DSM ACC2856에 대한 PCT/RO/134 형식에 따른 추가 표시:

[0587] 본 출원인은 개개 규정을 갖는 국가에 대하여 본 출원에 언급된 수탁된 생물학적 물질의 샘플의 제공이 독립적인 지명된 전문가에게만 소용될 수 있도록 요청한다 (적용할 수 있는 "전문 액제"의 요청, 특히 호주, 캐나다, 크로아티아, 덴마크, 핀랜드, 독일, 아이슬란드, 노르웨이, 싱가폴, 스페인, 스웨덴, 영국, 유럽).

[0588] 따라서, 유럽의 경우, 본 출원인은 수탁된 생물학적 물질의 샘플이 특허 결정의 공개시까지 또는 출원이 거절되거나 취하되거나 취하된 것으로 여겨지는 경우 출원일로부터 20년 동안 Rule 28(3) EPC에 제공된 대로, 샘플의 지급에 의해 샘플을 요청하는 사람에 의해 지명된 전문가에게만 (Rule 28(4) EPC) 이용될 수 있도록 요청한다.

특허절차상 미생물수탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국 제 양 식

글리코토페 게엠베하
로버트-로슬레 슈트라쎄 10
13125 베를린

하기의 국제기탁기관에 의해 규칙 제 7.1 에 따라 발행된 원 기탁의 수탁증

Ⅰ. 미생물의 확인

기탁자에 의한 식별표시	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 :
NM-H9D8-E6Q12	DSM ACC2856

Ⅱ. 과학적 설명 및 /또는 분류학적 표시

상기 제 Ⅰ 난의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부된다 :
( ) 과학적 설명
( ) 제시된 분류학적 표시

Ⅲ. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 당국은 상기 제 Ⅰ 난의 미생물을 2007년 8월 8일(원기탁일)[1]에 수령하였다.

Ⅳ. 전환 요청의 수리

상기 제 Ⅰ 난의 미생물은 본 국제기탁당국에 년 월 일(원기탁일)에 수령되었고 부다페스트 조약하의 기탁으로 원기탁을 전환시키려는 요청은 년 월 일(전환요청수리일)에 수령되었다.

Ⅴ. 국제 기탁 당국

명칭 : DSMZ-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨트렌 게엠베하 주소 : 독일연방공화국 데-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베크 1베	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 사람 또는 담당 사무관의 서명 : 2007년 8월 23일

[1] 규칙 6.4(d)가 적용되는 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 자위 취득일이다.

서식 DSMZ-BP/4 12/2001

[0589]

Applicant's or agent's file reference 48 377 K	International application No. PCT/EP2007/007877

수탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에
대한 표시
(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 94 (with alt.) line 33 (Claim 10)	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	Further deposits are identified on an additional sheet ☐
Name of depositary institution Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)	
Address of depositary institution *(including postal code and country)* Mascheroderweg 1b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit 2007-09-07	Accession Number DSM ACC2858
C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	This information is continued on an additional sheet ☒
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*	

For receiving Office use only	*For International Bureau use only*
☐ This sheet was received with the international application	☒ This sheet was received by the International Bureau on: 19 November 2007 (19.11.2007)
Authorized officer	Authorized officer Kari Huynh-Khuong

Form PCT/RO/134 (July1998; reprint January 2004)

[0590]

[0591] 참조 번호: 48 377 K

[0592] 수탁 번호 DSM ACC2858에 대한 PCT/RO/134 형식에 따른 추가 표시:

[0593] 본 출원인은 개개 규정을 갖는 국가에 대하여 본 출원에 언급된 수탁된 생물학적 물질의 샘플의 제공이 독립적인 지명된 전문가에게만 소용될 수 있도록 요청한다 (적용할 수 있는 "전문 액제"의 요청, 특히 호주, 캐나다, 크로아티아, 덴마크, 핀랜드, 독일, 아이슬란드, 노르웨이, 싱가폴, 스페인, 스웨덴, 영국, 유럽).

[0594] 따라서, 유럽의 경우, 본 출원인은 수탁된 생물학적 물질의 샘플이 특허 결정의 공개시까지 또는 출원이 거절되거나 취하되거나 취하된 것으로 여겨지는 경우 출원일로부터 20년 동안 Rule 28(3) EPC에 제공된 대로, 샘플의 지급에 의해 샘플을 요청하는 사람에 의해 지명된 전문가에게만 (Rule 28(4) EPC) 이용될 수 있도록 요청한다.

특허절차상 미생물수탁의 국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국 제 양 식

글리코토페 게엠베하
로버트-로슬레 슈트라쎄 10
13125 베를린

하기의 국제기탁기관에 의해
규칙 제 7.1 에 따라 발행된
원 기탁의 수탁증

Ⅰ. 미생물의 확인

기탁자에 의한 식별표시	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 :
GT-2x	DSM ACC2858

Ⅱ. 과학적 설명 및 /또는 분류학적 표시

상기 제 Ⅰ 난의 미생물에는 다음 사항을 기재한 문서가 첨부된다 :
(X) 과학적 설명
( ) 제시된 분류학적 표시

Ⅲ. 수령 및 수탁

본 국제 기탁 당국은 상기 제 Ⅰ 난의 미생물을 2007년 9월 7일(원기탁일)[1]에 수령하였다.

Ⅳ. 전환 요청의 수리

상기 제 Ⅰ 난의 미생물은 본 국제기탁당국에 년 월 일(원기탁일)에 수령되었고 부다페스트 조약하의 기탁으로 원기탁을 전환시키려는 요청은 년 월 일(전환요청수리일)에 수령되었다.

Ⅴ. 국제 기탁 당국

명칭 : DSMZ-도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨트렌 게엠베하 주소 : 독일연방공화국 데-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베크 1베	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 사람 또는 담당 사무관의 서명 : 2007년 9월 20일

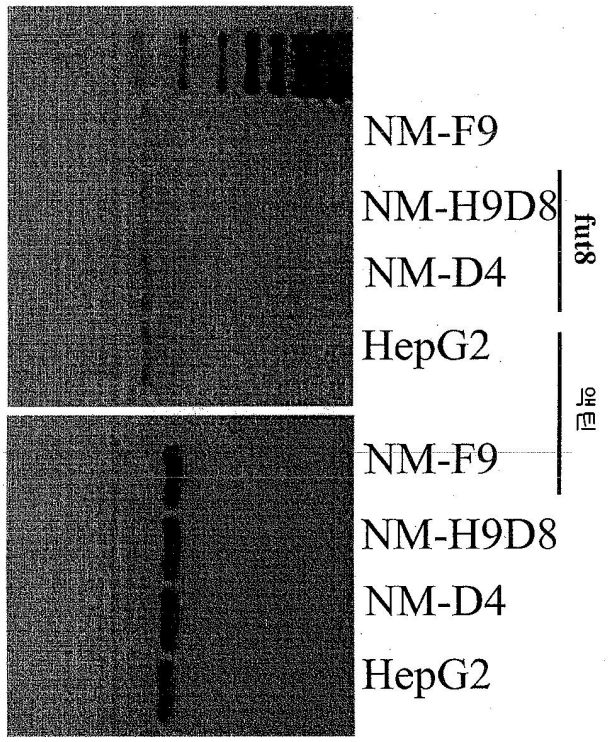
[1] 규칙 6.4(d)가 적용되는 경우, 원기탁일은 국제기탁기관의 자위 취득일이다.

서식 DSMZ-BP/4 12/2001

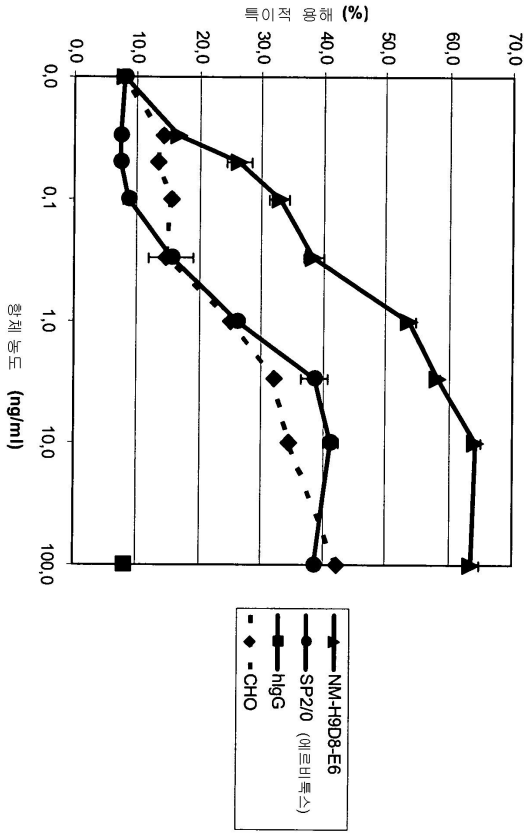
[0595]

도면

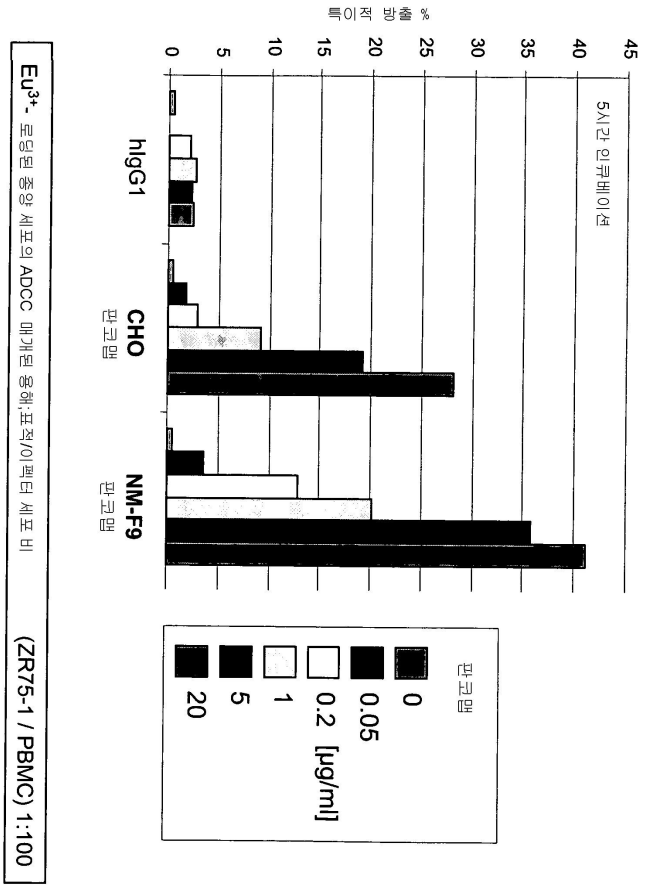
도면1


NM-F9
NM-H9D8
NM-D4
HepG2
fut8
NM-F9
NM-H9D8
NM-D4
HepG2
액틴

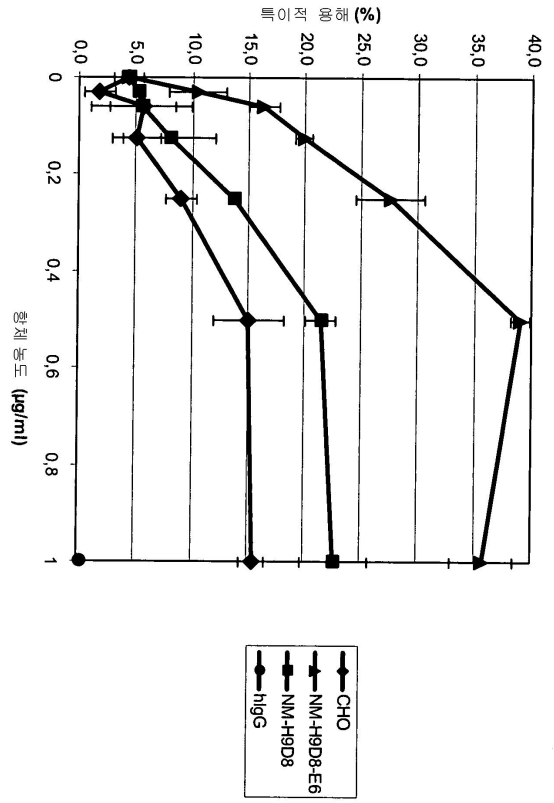
도면2


특이적 용해 (%)
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0
항체 농도 (ng/ml)
0,0
0,1
1,0
10,0
100,0
NM-H9D8-E6
SP2/0 (에르비톡스)
hIgG
CHO

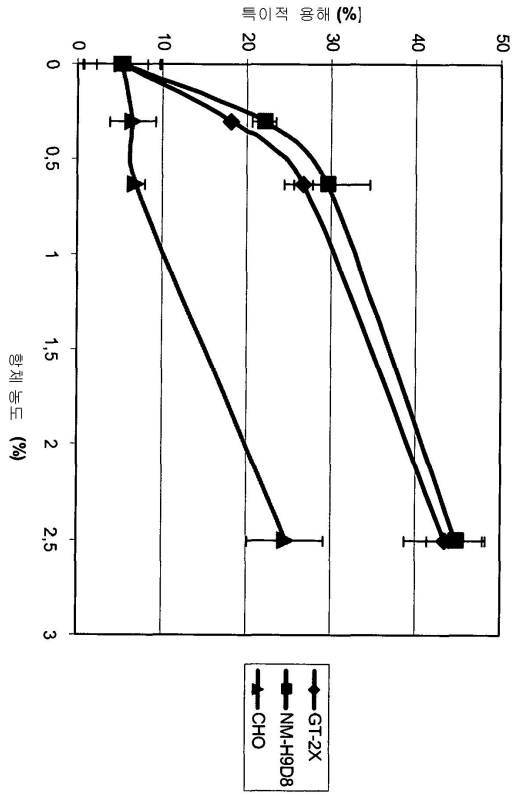
도면3


특이적 방출 %
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
5시간 인큐베이션
hIgG1
CHO
NM-F9
표준 mAb
표준 mAb
표준 mAb
0
0.05
0.2 [μg/ml]
1
5
20
Eu3+- 로딩된 중양 세포의 ADCC 매개된 용해;표적/이펙터 세포 비
(ZR75-1 / PBMC) 1:100

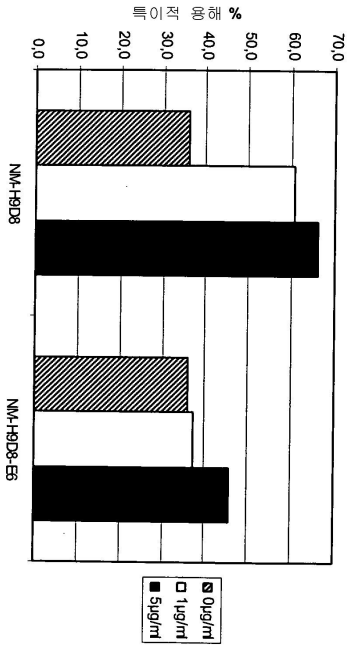
도면4


특이적 용해 (%)
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
25,0
30,0
35,0
40,0
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
항체 농도 (μg/ml)
CHO
NM-H9D8-E6
NM-H9D8
hIgG

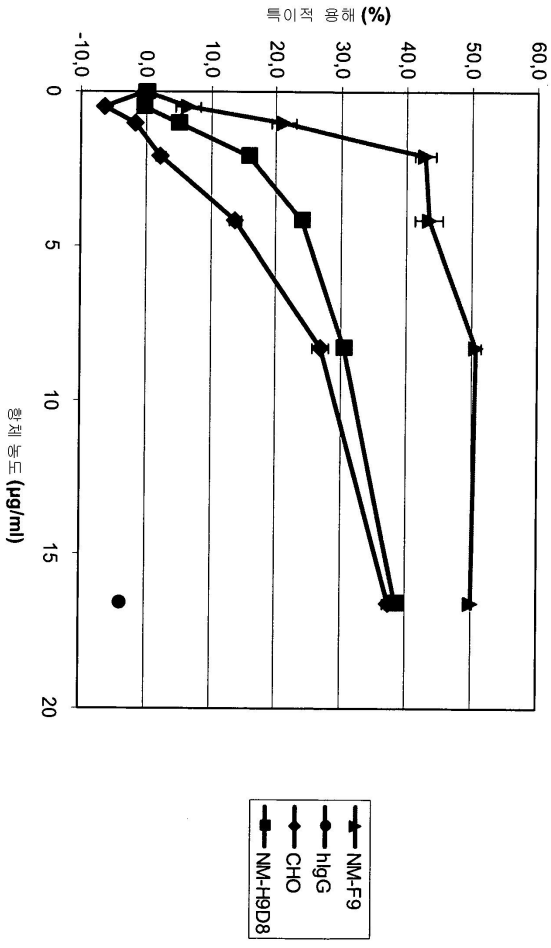
도면5


특이적 용해 (%)
0
10
20
30
40
50
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
항체 농도 (%)
GT-2X
NM-H9D8
CHO

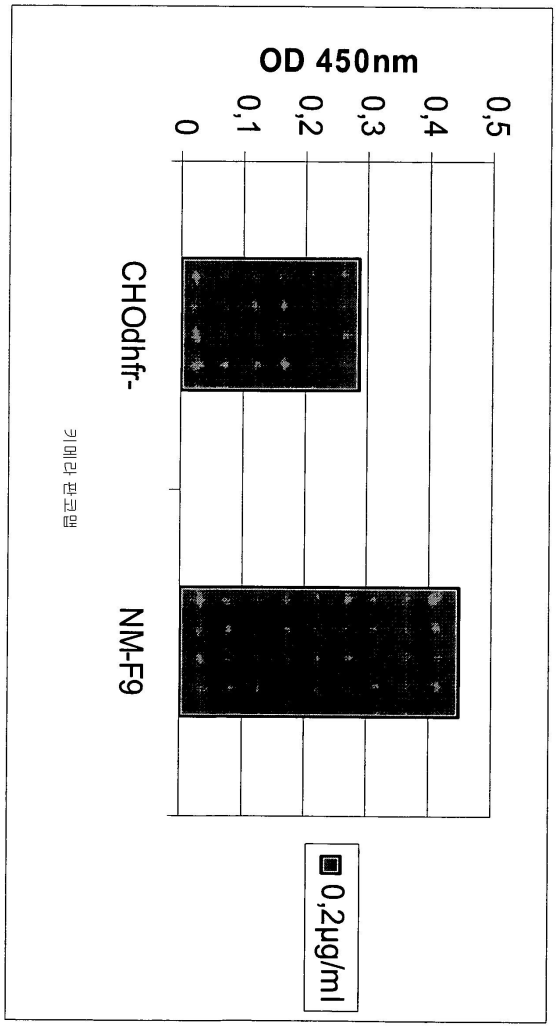
도면6


특이적 용해 %
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0
NM-H9D8
NM-H9D8-EB
0μg/ml
1μg/ml
5μg/ml

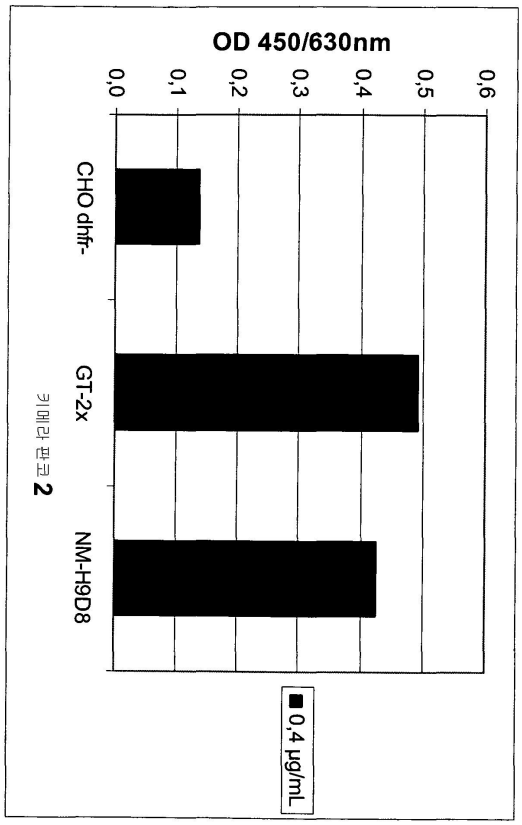
도면7


특이적 용해 (%)
-10,0
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
0
5
10
15
20
항체 농도 (μg/ml)
NM-F9
hIgG
CHO
NM-H9D8

도면8

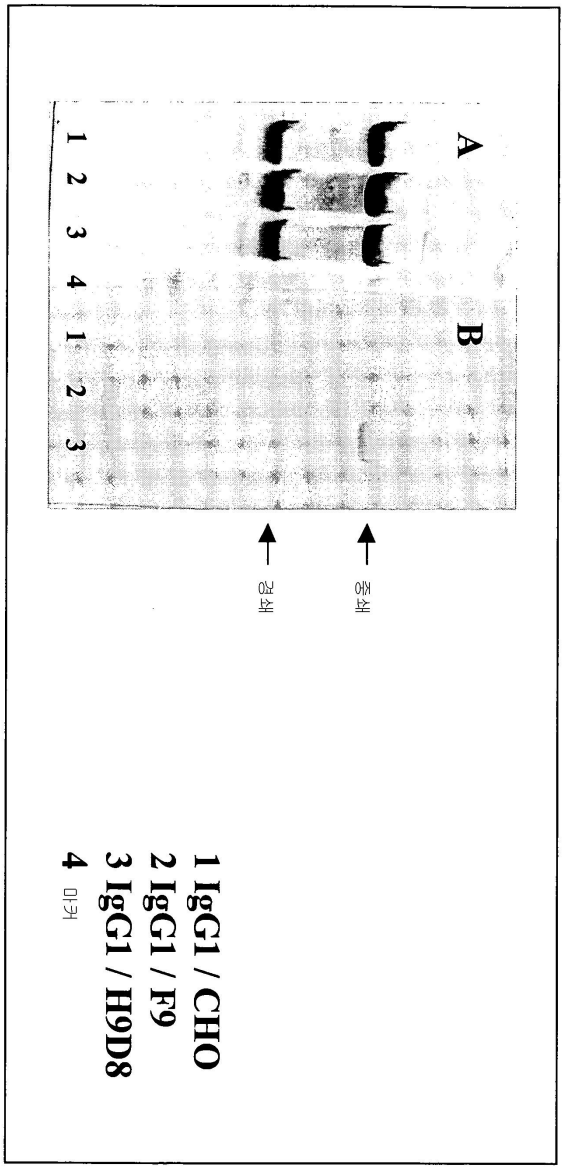


도면9

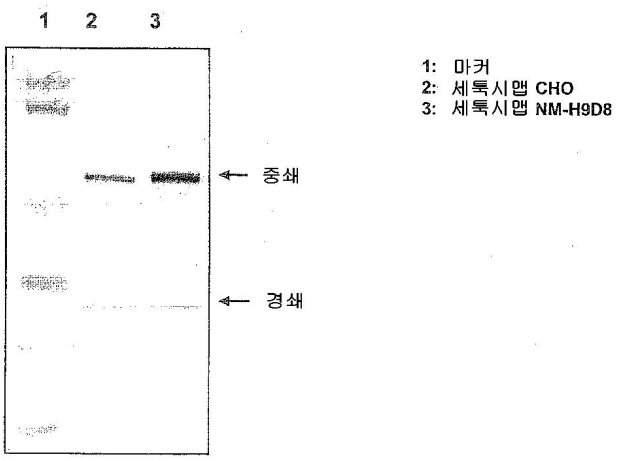


키메라 항체 2

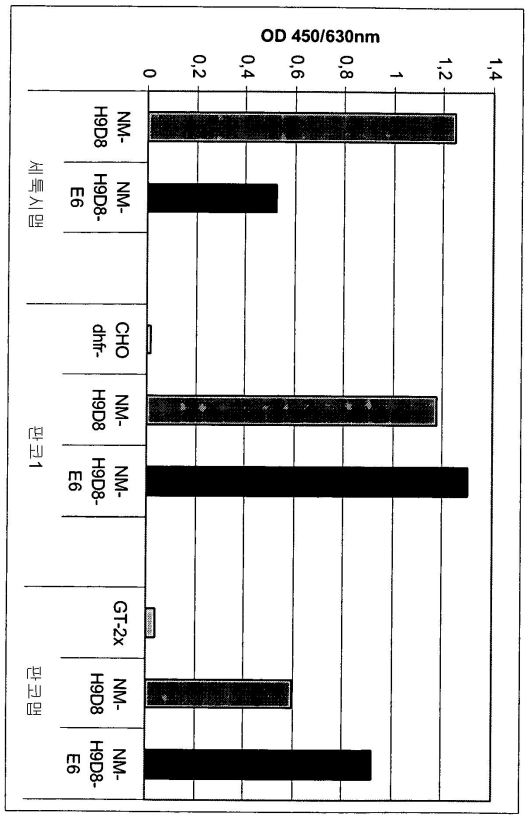
도면10


A
B
1 2 3 4
1 2 3
경쇄
중쇄
1 IgG1 / CHO
2 IgG1 / F9
3 IgG1 / H9D8
4 마커

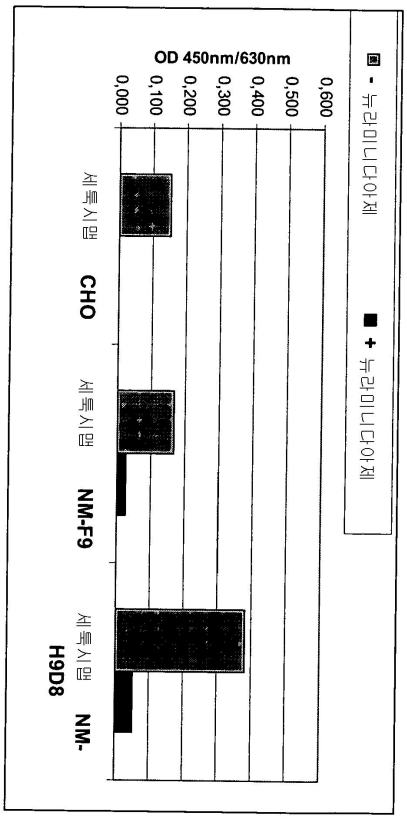
도면11


1 2 3
중쇄
경쇄
1: 마커
2: 세둑시맵 CHO
3: 세둑시맵 NM-H9D8

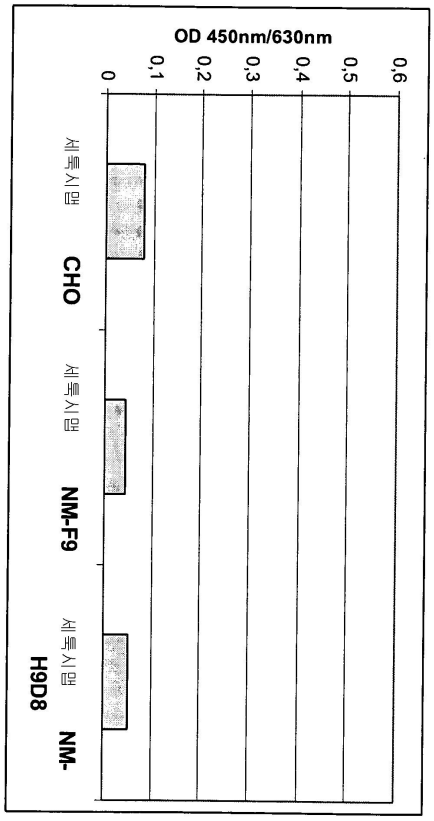
도면12


OD 450/630nm
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
세포주 1
NM-H9D8-E6
CHO dhfr-
NM-H9D8
NM-H9D8-E6
세포주 2
GT-2x
NM-H9D8
NM-H9D8-E6

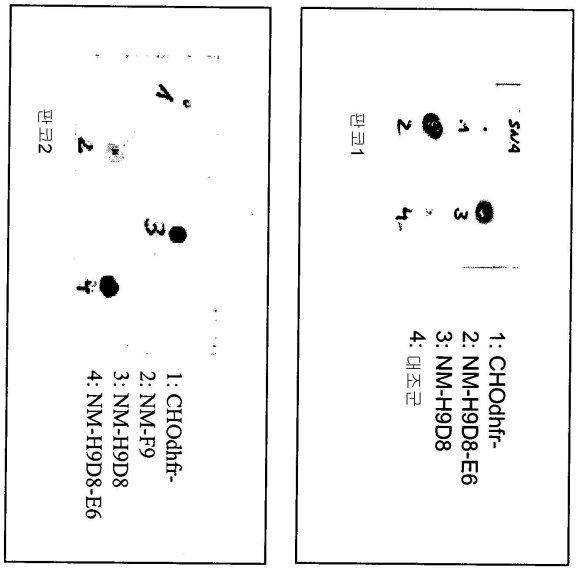
도면13a


OD 450nm/630nm
0,000
0,100
0,200
0,300
0,400
0,500
0,600
- 뉴라미니다아제
+ 뉴라미니다아제
세포주 1
CHO
세포주 2
NM-F9
세포주 3
NM-H9D8

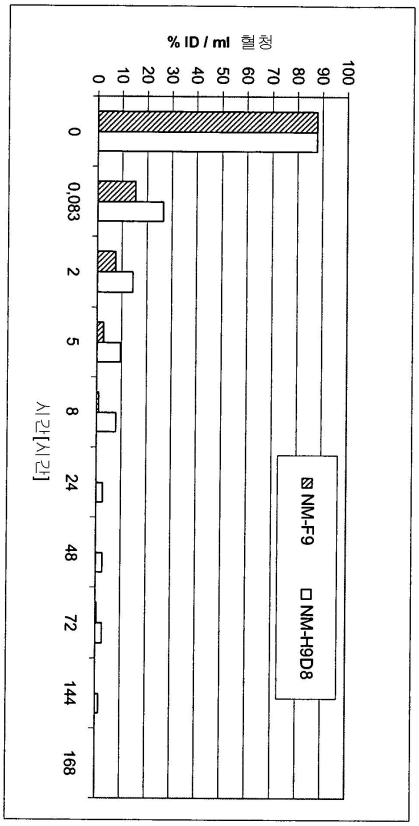
도면13b


OD 450nm/630nm
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
세툭시맵
CHO
세툭시맵
NM-F9
세툭시맵
NM-H9D8

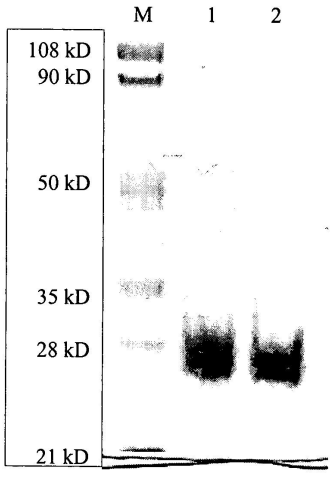
도면14


1: CHOdhfr-
2: NM-H9D8-E6
3: NM-H9D8
4: 대조군
판코1
1: CHOdhfr-
2: NM-F9
3: NM-H9D8
4: NM-H9D8-E6
판코2

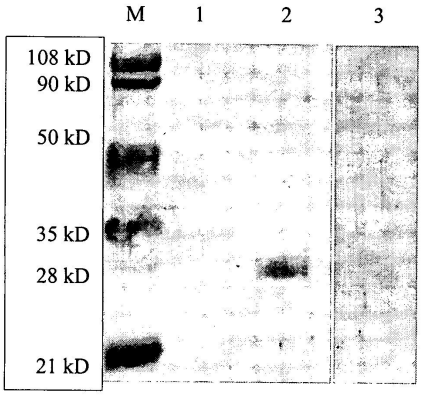
도면15


% ID / ml 혈청
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
0.083
2
5
8
24
48
72
144
168
시간[시간]
NM-F9
NM-H9D8

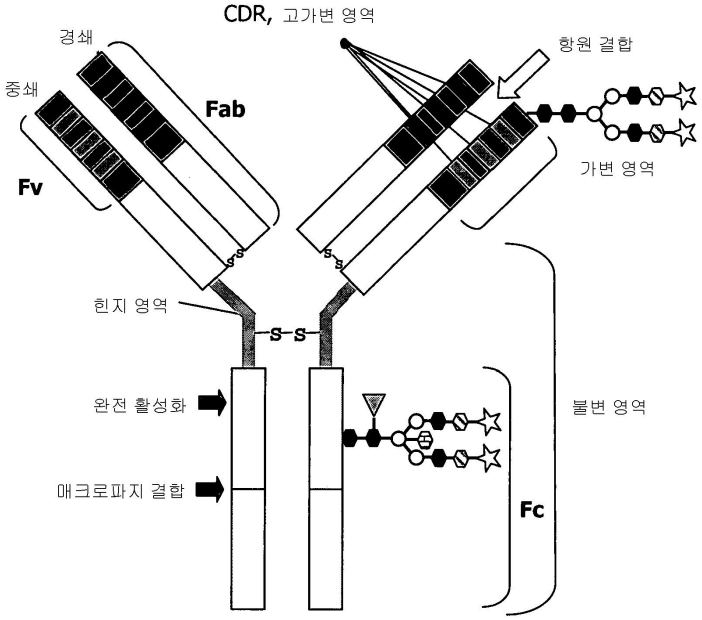
도면16


M
1
2
108 kD
90 kD
50 kD
35 kD
28 kD
21 kD

도면17



도면18



	= 시알산
	= 갈락토오스
	= GlcNAc
	= 만노오스
	= 푸코오스
	= 2등분 GlcNAc

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Glycotope GmbH

<120> Fully human high yield production system for improved antibodies and proteins

<130> 48 377

<140> PCT/EP2007/007877

<141> 2007-09-10

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX resistant DHFR variant

<400> 1

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asp Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Trp
20 25 30

Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
115 120 125

Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160
Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175
Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
180 185

<210> 2
<211> 187
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> MTX resistant DHFR variant
<400> 2

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly

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

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

130 135 140
Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
180 185

<210> 3

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX resistant DHFR variant

<400> 3

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ala
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His
115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp

180 185

<210> 4

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX resistant DHFR variant

<400> 4

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly

1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Gly

20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln

35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys

50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu

65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp

85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met

100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His

115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu

130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu

145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile

165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp

180 185

<210> 5

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX resistant DHFR variant

<400> 5

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Tyr Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys

50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His

115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
180 185

<210> 6

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX resistant DHFR variant

<400> 6

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Arg Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys

50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His

115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
180 185

<210> 7

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX resistant DHFR variant

<400> 7

Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys

50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His

115 120 125

Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
180 185

<210> 8

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX resistant DHFR variant

<400> 8

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1 5 10 15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Arg Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20 25 30

Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35 40 45

Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys

50 55 60

Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80

Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
100 105 110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln

115 120 125

Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
130 135 140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
180 185

<210> 9

<211> 187

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> MTX-resistant DHFR variant

<400> 9

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

50 55 60
Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
65 70 75 80
Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
85 90 95
Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
100 105 110
Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln

115 120 125
Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
130 135 140
Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
145 150 155 160
Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165 170 175
Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Asp
180 185

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> secretion peptide signal
<400> 10
Met Trp Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15

Ser Ala

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> variable heavy chain of the antibody Panko -1

<400> 11

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Gly Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser
115

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> variable light chain of the antibody Panko 1

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
Arg

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> variable heavy chain of the antibody Panko 2
<400> 13
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Thr Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Ser Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg His Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser
115

<210> 14
<211> 113
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> variable light chain of the antibody Panko 2
<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Phe Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Leu Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> variable heavy chain of the antibody Cetuximab
<400> 15
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Unknown
<220><223> variable light chain of the antibody Cetuximab
<400> 16
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer for FSH alpha chain

<400> 17

aaaggtacca tggattacta cagaaaatat g 31

<210> 18

<211> 29

<212

> DNA

<213> artificial

<220><223> primer for FSH alpha chain

<400> 18

aaaggatcct taagatttgt gataataac 29

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Primer for FSH beta chain

<400> 19

tttaagctta tgaagacact ccagtttttc 30

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer for FSH beta chain

<400> 20

tttggatcct tattctttca tttcacc 27

<210> 21

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> cDNA sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(63)

<223> TCR leader sequence

<400> 21

atggcctgcc ccggcttcct gtgggccctg gtgatcagca cctgcctgga attctccatg 60

gctaacagct gcgagctgac caacatcacc atcgccatcg agaaagagga atgccggttc 120

tgcatcagca tcaacaccac ctggtgcgcc ggctactgct acacccggga cctggtgtac 180

aaggaccccg ccaggcccaa gatccagaaa acctgcacct tcaaagaact ggtgtacgag 240

accgtgcggg tgcccggctg cgcccaccac gccgacagcc tgtacaccta ccccgtggcc 300

acccagtgcc actgcggcaa gtgcgacagc gacagcaccg actgcaccgt gaggggcctg 360

ggccccagct actgcagctt cggcgagatg aaagagtga 399