



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월25일

(11) 등록번호 10-2182885

(24) 등록일자 2020년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 5/0018 (2013.01)  
C07K 16/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7009991

(22) 출원일자(국제) 2013년09월27일

심사청구일자 2018년09월21일

(85) 번역문제출일자 2015년04월17일

(65) 공개번호 10-2015-0063441

(43) 공개일자 2015년06월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/062410

(87) 국제공개번호 WO 2014/055370

국제공개일자 2014년04월10일

(30) 우선권주장

61/708,554 2012년10월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Shields, R. et al., Journal of Biological  
Chemistry (2002) 277(30):26733-26740

WO2002066603 A1

(73) 특허권자

애브비 바이오테라퓨틱스 인크.

미국 캘리포니아 94063 레드우드 시티 씨포트 블  
러바드 1500

(72) 발명자

발마 애미트

미국 94536 캘리포니아주 프레몬트 킹 코트 35140

쿠앵카 제임스

미국 94587 캘리포니아주 유니온 시티 에메랄드  
테라스 1029

주 잉

미국 94301 캘리포니아주 팔로 알토 포레스트 애  
비뉴 865

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 16 항

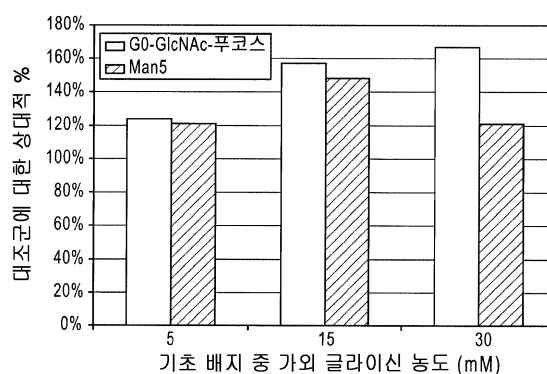
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 당단백질의 제조를 위한 조성물 및 방법

### (57) 요약

본 발명은 전통적인 기초 배지에 비하여 글라이신의 농도가 향상된 배양 배지에서 포유류 세포를 배양함으로써 비푸코실화 글리코형의 수준이 증가된 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

*C07K 16/2803* (2013.01)

*C07K 16/283* (2013.01)

*C07K 16/2842* (2013.01)

*C07K 16/2866* (2013.01)

*C07K 16/2878* (2013.01)

*C07K 16/2896* (2013.01)

*C07K 2317/14* (2013.01)

*C07K 2317/24* (2013.01)

*C07K 2317/41* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

IgG1 항체의 발현 및 분비에 적합한 조건 하에서 5 mM 내지 30 mM의 농도의 글라이신을 포함하는 세포 배양 배지에서 상기 IgG1 항체를 분비하고 발현하도록 엔지니어링된(engineered) NS0 세포를 배양함으로써 상기 IgG1 항체를 제조하는 단계를 포함하는, IgG1 항체의 제조 방법으로서,

상기 IgG1 항체가 서열번호: 1의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 2의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 3의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 4의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 5의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 6의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 7의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 8의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 9의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 10의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 11의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 12의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 13의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 14의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 15의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 16의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 17의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 18의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하거나; 또는

상기 IgG1 항체가 서열번호: 19의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 20의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖는, IgG1 항체의 제조 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 글라이신의 농도는 10 mM 내지 25 mM의 범위인, 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 배지는 단백질 무함유 배지인, 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG1 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 IgG1 항체를 회수하는 단계는 상기 NS0 세포를 배양 배지로부터 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 NS0 세포는 상기 배양 이전에  $1.5 \times 10^5$  세포/mL 내지  $2.5 \times 10^5$  세포/mL의

밀도로 과중되는, 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 1의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 2의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하는, 방법.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 5의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 6의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하는, 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 7의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 8의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖는, 방법.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 9의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 10의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하는, 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 11의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 12의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖는, 방법.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 13의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 14의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하는, 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 15의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 16의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖는, 방법.

#### 청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 17의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열번호: 18의 아미노산 서열의 VL 영역을 포함하는, 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 19의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 20의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖는, 방법.

#### 청구항 16

제7항에 있어서, 상기 IgG1 항체는 서열번호: 3의 전장 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 4의 전장 경쇄 아미노산 서열을 갖는, 방법.

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 전통적인 기초 배지에 비하여 글라이신의 농도가 향상된 배양 배지에서 포유류 세포를 배양함으로써 비푸코실화 글리코형의 수준이 증가된 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 1. 서열 목록

[0003] 본 출원은 EFS-웹을 통하여 ASCII 포맷(format)으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 2013년 9월 24일에 생성된 상기 ASCII 사본은 381493-735W0(118134)\_SL.txt로 명명되며, 크기가 42,313 바이트이다.

### 배경 기술

[0004] 2. 배경기술

[0005] 글리코실화를 통한 단백질의 번역 후 변형은 특유한 글리코형을 형성하며, 이는 흔히 독특한 특성을 갖는다. 단백질의 글리코실화에서의 차이는 특정 표적 분자에 대한 단백질의 결합 친화성을 비롯한 단백질의 물리적 특성 및 화학적 특성에 심원한 영향을 줄 수 있다. 단백질의 글리코실화를 조정하는 몇몇 방법이 공지되어 있다. 상이한 발현 시스템은 특유한 글리코실화 프로필을 부여할 수 있다. 게다가, 단백질 암호화 서열을 변형시켜 향상되거나 감소된 수준의 특정 글리코형을 갖는 단백질을 생성할 수 있다. 재조합 세포주가 배양되는 조건이 글리코실화 프로필에 또한 영향을 줄 수 있다.

[0006] 포유류 세포에서 재조합적으로 생성된 항체는 흔히 항체의 Fc 영역 및 Fab 영역 둘 모두에서 글리코실화된다. 많은 글리코실화된 항체는 당 푸코스를 함유한다. 항체에서의 푸코스의 존재는 세포 상의 특정 단백질에의 항체의 결합에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역 내에 높은 수준의 푸코스를 함유하는 항체는 림프구(예를 들어, 자연 살해 세포) 상의 수용체에 대한 결합성이 감소될 수 있다. 푸코스가 결합된 항체는, 특히 항

체의 낮은 용량에서, 향상된 ADCC(항체 의존성 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity))와 상관되었다. 문헌[Shields *et al.*, 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740]; 문헌[Shinkawa *et al.*, 2003, J. Biol. Chem. 278:3466]. 푸코스 무함유(fucose-less) 항체의 제조 방법은 래트 골수종 YB2/0 세포(ATCC CRL 1662)에서의 성장을 포함한다. YB2/0 세포는 낮은 수준의 FUT8 mRNA를 발현하는데, 상기 mRNA는 단백질의 푸코스 실화에 필요한 효소( $\alpha$  1,6-푸코실트랜스퍼라아제)를 암호화한다. ADCC 활성을 증가시키는 대안적인 방법은 항체의 Fc 부분에서의 돌연변이, 특히, Fc $\gamma$ R 수용체에 대한 항체 친화성을 증가시키는 돌연변이를 포함한다. 증가된 Fc $\gamma$ R 결합성과 돌연변이된 Fc 사이의 상관성이 표적화 세포독성 세포 기반 검정법을 이용하여 입증되었다. 문헌[Shields *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-6604]; 문헌[Presta *et al.*, 2002, Biochem Soc. Trans. 30:487-490].

[0007] 배양 배지 또는 영양공급(feed) 배지 중 성분의 농도는 단백질의 글리코실화 프로필에 영향을 줄 수 있다. 이상적으로, 재조합 세포주를 성장시키는 조건의 제어를 통하여 특정한 글리코형의 단백질이 향상되거나 감소될 수 있다. 배양 배지의 성분의 조작을 통하여 단백질의 수율을 증가시키는 것에 관한 다수의 연구가 있어 왔지만, 재조합적으로 엔지니어링된(engineered) 세포가 배양되는 세포 배양 배지의 변형을 통하여 단백질의 글리코실화를 조정하는 것에 관련된 보고서는 훨씬 더 적었다. 일례가 미국 특허 제5,705,364호에 개시되어 있는데, 상기 미국 특허는 알칸산을 배양 배지에 첨가하는 것을 통하여 포유류 세포에 의해 생성되는 당단백질의 시알산의 함량을 제어하는 방법에 관한 것이다. 그러나, 재조합 항체가 발현되는 배양 배지의 변형을 통한 항체의 ADCC 활성의 증가의 가능성은 충분히 다루어지지 않았다. 따라서, 감소된 수준의 푸코스 및 증가된 ADCC 활성을 갖는 항체를 발현하도록 포유류 세포를 배양하기 위한 세포 배양 배지의 개발이 고도로 바람직하다.

## 발명의 내용

[0008] 3. 발명의 개요

[0009] 본 발명은 높은 농도(예를 들어, 5 mM 이상)의 글라이신을 포함하는 배양 배지(이하, "고 글라이신 배지")에서 포유류 세포를 배양함으로써 유익한 특성을 갖는 당단백질(예를 들어, 항체)이 생성된다는 발견에 관한 것이다. 특히, 고 글라이신 배지에서의 포유류 숙주 세포의 배양은 비푸코실화 글리코형의 수준을 증가시킨다. 포유류 세포는 향상된 항체 의존성 세포 독성("ADCC") 활성을 비롯한 향상된 생물학적 활성을 나타내는 항체의 생성에 사용될 수 있다.

[0010] 따라서, 일반적으로 본 발명은 전통적인 배양 배지에서 발현되는 당단백질과 비교하여 변형된 글리코실화 프로필을 갖는 재조합 단백질(예를 들어, 항체)을 발현하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 방법 및 조성물은 포유류 세포에서 항체와 같은 당단백질을 발현하기 위하여 고 글라이신 배지를 이용하며, 유리하게는 전통적인 배양 배지에서 생성되는 당단백질과 비교하여 푸코실화 수준이 감소된 당단백질을 생성한다.

[0011] 부가적으로, 본 발명의 방법은 제조 동안 단백질 글리코실화를 조정 및 제어하는 데 사용될 수 있다. 제조 동안 생성물의 글리코실화의 제어의 개선이 바람직하며, 그 이유는 이것이 제조 현장들 사이의 기술 이전 동안 그리고 당해 공정의 규모 증대 동안 배치 거부(batch rejection)의 위험을 감소시키고 제어를 개선시키기 때문이다. 따라서, 본 방법은 공정 변화를 도입하지 않고서 재현가능한 생성물 글리코실화 프로필을 유지하는 데 사용될 수 있다.

[0012] 재조합 당단백질을 생성하도록 엔지니어링될 수 있는 포유류 세포는 NS0 세포, CHO 세포, 마우스 골수종 SP2/0 세포, 새끼 햄스터 신장 BHK-21 세포 및 인간 배아 신장 HEK0291 세포를 포함한다. 특정 실시 양태에서, NS0 세포는 항체를 생성하도록 재조합적으로 엔지니어링된다.

[0013] 일 측면에서, 본 발명은 5 mM 내지 100 mM의 농도의 글라이신 및 임의로, 본 개시 내용에 지시된 다양한 농도의 기타 아미노산을 포함하는, 포유류 세포 배양에 적합한 배양 배지를 제공한다. 본 배양 배지는 바람직하게는 화학적으로 규정된, 단백질 무함유 배지이다. 세포 배양 배지 중 글라이신의 농도는 예를 들어 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 22 mM, 25 mM, 30 mM 또는 50 mM일 수 있다. 특정한 실시 양태에서, 세포 배양 배지 중 글라이신의 농도는 상기 2가지의 전술한 실시 양태 중 임의의 것에 의해 경계가 이루어지며, 예를 들어, 5 mM 내지 10 mM, 7 mM 내지 10 mM, 10 mM 내지 15 mM, 12 mM 내지 17 mM, 15 mM 내지 20 mM, 16 mM 내지 18 mM, 10 mM 내지 30 mM, 10 mM 내지 25 mM, 20 mM 내지 30 mM, 10 mM 내지 50 mM, 20 mM 내지 50 mM 등의 범위의 농도이다. 다른 아미노산이 일반적으로 전통적인 기초 배지에서 전형적으로 발견되는 농도로 배양 배지에 존재할 수 있다. 일 실시 양태에서, 본 발명의 배양 배지 중 아미노산의 농도는 표 2에 열거된 범위 내에서 발견된다. 본 배양 배지는 1가지 이상의 추가



성분, 예컨대 비타민, 미량 원소, 에너지원, 지방산, 성장 인자, 뉴클레오타이드, 지질, 호르몬 및/또는 항생제를 또한 포함할 수 있다. 더욱이, 본 배지는 완충제, 오스몰 농도 조절제 및/또는 계면활성제를 포함할 수 있다. 이러한 추가 성분에 대한 추가의 상세 사항은 섹션(Section) 5.1에서 발견될 수 있다.

[0014] 또 다른 측면에서, 글라이신 이외의 1가지 이상의 아미노산은 표 3 또는 표 4에 나타난 농도 이하의 농도를 갖는다. 예를 들어, 2가지, 3가지, 4가지, 5가지, 6가지, 7가지, 8가지, 9가지, 10가지 또는 11가지의 아미노산이 표 3 또는 표 4에 열거된 농도 이하의 농도를 가질 수 있다. 일 실시 양태에서, 배양 배지 중 라이신의 농도는 0.5 mM 내지 5.0 mM이다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 관심 대상의 당단백질(glycoprotein of interest; "GOI"), 예를 들어, 관심 대상의 항체(antibody of interest; "AOI")를 제조하는 방법을 제공하며, 이는 5 mM 이상, 예를 들어 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 22 mM, 25 mM 또는 30 mM의 농도의 글라이신을 포함하는 세포 배양 배지에서 GOI 또는 AOI를 분비하고 발현하도록 엔지니어링된 포유류 세포, 예를 들어 NSO 세포를 배양하는 단계를 포함한다. AOI는 예를 들어 쥐(murine) 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 완전 인간 항체일 수 있다. 구체적인 실시 양태에서, 세포 배양 배지 중 글라이신의 농도는 상기 2가지의 전술한 실시 양태 중 임의의 것에 의해 경계가 이루어지며, 예를 들어, 5 mM 내지 10 mM, 7 mM 내지 10 mM, 10 mM 내지 15 mM, 12 mM 내지 17 mM, 15 mM 내지 20 mM, 16 mM 내지 18 mM, 10 mM 내지 30 mM, 10 mM 내지 25 mM, 20 mM 내지 30 mM 등의 범위의 글라이신의 농도이다. 특정한 실시 양태에서, 배양 배지는 화학적으로 규정된 단백질 무함유 배지이다.

[0016] 일 실시 양태에서, AOI는 HuLuc63(엘로투주맙(elotuzumab))이다. 엘로투주맙의 성숙  $V_H$  사슬의 아미노산 서열(서열 번호 1), 엘로투주맙의 성숙  $V_L$  사슬(서열 번호 2), 엘로투주맙의 전체 중쇄 서열(서열 번호 3) 및 엘로투주맙의 전체 경쇄 서열(서열 번호 4)이 표 7에 예시되어 있다. 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 4% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 2.5% 이상이 만노스5 글리칸인 엘로투주맙 분자의 집단을 생성한다. 일 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 5% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 3% 이상이 만노스5 글리칸인 엘로투주맙 분자의 집단을 생성한다.

[0017] 또 다른 실시 양태에서, 관심 대상의 항체는 다클리주맙(daclizumab)이다. 다클리주맙의 성숙  $V_H$  사슬의 아미노산 서열(서열 번호 5), 다클리주맙의 성숙  $V_L$  사슬(서열 번호 6), 다클리주맙의 전체 중쇄 서열(서열 번호 7) 및 다클리주맙의 전체 경쇄 서열(서열 번호 8)이 표 7에 예시되어 있다. 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 3% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 1.5% 이상이 만노스5 글리코형인 다클리주맙 분자의 집단을 생성한다. 일 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 4% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 2% 이상이 만노스5 글리칸인 다클리주맙 분자의 집단을 생성한다.

[0018] 또 다른 실시 양태에서, AOI는 볼록시시맙(volociximab)이다. 볼록시시맙의 성숙  $V_H$  사슬의 아미노산 서열(서열 번호 9), 볼록시시맙의 성숙  $V_L$  사슬(서열 번호 10), 볼록시시맙의 전체 중쇄 서열(서열 번호 11) 및 볼록시시맙의 전체 경쇄 서열(서열 번호 12)이 표 7에 예시되어 있다. 본 발명의 세포 배양 공정은 볼록시시맙 분자 중 1% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 0.5% 이상이 만노스5 글리칸인 볼록시시맙 분자의 집단을 생성한다.

[0019] 추가의 실시 양태에서, AOI는 PDL241이다. PDL241의 성숙  $V_H$  사슬의 아미노산 서열(서열 번호 13), PDL241의 성숙  $V_L$  사슬(서열 번호 14), PDL241의 전체 중쇄 서열(서열 번호 15), PDL241의 전체 경쇄 서열(서열 번호 16)이 표 7에 예시되어 있다. 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 14% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 8% 이상이 만노스5 글리칸인 PDL241 분자의 집단을 생성한다. 일 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 15% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 9% 이상이 만노스5 글리칸인 PDL241 분자의 집단을 생성한다.

[0020] 또 다른 실시 양태에서, AOI는 PDL192 (에나바투주맙(enavatuzumab))이다. 에나바투주맙의 성숙  $V_H$  사슬의 아미노산 서열(서열 번호 17), 에나바투주맙의 성숙  $V_L$  사슬(서열 번호 18), 에나바투주맙의 전체 중쇄 서열(서열 번호 19) 및 에나바투주맙의 전체 경쇄 서열(서열 번호 20)이 표 7에 예시되어 있다. 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 5% 이상이 푸코스가 결여되어 있고 글리칸 중 2.5% 이상이 만노스5 글리칸인 에나바투주맙 분자의 집단을 생성한다. 일 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정은 글리칸 중 6% 이상이 푸코스가 결여되어 있고

글리칸 중 3% 이상이 만노스5 글리칸인 에나바투주맵 분자의 집단을 생성한다.

## 도면의 간단한 설명

### 4. 도면의 간단한 설명

도 1은 일부의 전형적인 N-결합 글리칸 구조를 나타낸다.

도 2는 추가의 글라이신이 보충된 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 5가지의 상이한 항체에 있어서의, GlcNAc(N-아세틸글루코사민)이 부착되지 않은 비푸코실화 GO 글리칸의 상대적인 양을 나타낸다. 상기 양은 추가의 글라이신의 보충 없이 대조 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 항체에 존재하는 상기 글리칸의 양에 대한 백분율로서 표현된다.

도 3은 글라이신 농도가 17 mM인 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 5가지의 상이한 항체에 있어서의, 부착된 만노스5(Man5) 글리칸의 상대적인 양을 나타낸다. 상기 양은 추가의 글라이신의 보충 없이 대조 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 항체에 존재하는 상기 글리칸의 양에 대한 백분율로서 표현된다.

도 4는 글라이신 농도가 17 mM인 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 5가지의 상이한 항체에 있어서의, 부착된 총 비푸코실화 글리칸의 상대적인 양을 나타낸다. 상기 양은 추가의 글라이신의 보충 없이 대조 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 항체에 존재하는 상기 글리칸의 양에 대한 백분율로서 표현된다.

도 5는 상이한 농도의 글라이신(5, 15, 30 mM)이 보충된 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 PDL192에 있어서 GlcNAc(N-아세틸글루코사민) 및 Man5형 글리코형이 부착되지 않은 비푸코실화 GO 글리칸의 상대적인 양을 나타낸다. 상기 양은 추가의 글라이신의 보충 없이 대조 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 항체에 존재하는 상기 글리코형의 양에 대한 백분율로서 표현된다.

도 6은 추가의 글라이신이 보충된 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 4가지의 IgG1 항체(엘로투주맵, 다클리주맵, PDL192 및 PDL241)에 있어서의 CD16a 수용체에 대한 상대적인 결합력(binding potency)을 나타낸다. 상기 양은 추가의 글라이신의 보충 없이 대조 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 상기 항체의 CD16a 결합 친화도에 대한 백분율로서 표현된다.

도 7은 다양한 농도의 글라이신(5, 15, 30 mM)이 보충된 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 PDL192(에나바투주맵)에 있어서의 CD16a 수용체에 대한 상대적인 결합력을 나타낸다. 상기 양은 추가의 글라이신의 보충 없이 대조 기초 배지에서 배양된 NS0 세포에 의해 생성된 상기 항체의 CD16a 결합 친화도에 대한 백분율로서 표현된다.

도 8a 내지 도 8c는 대조군 및 고 글라이신 공정 둘 모두로부터 생성된 엘로투주맵의 ADCC 활성을 나타낸다. 3명의 상이한 공여체로부터의 인간 말초 혈액 단핵 세포(human peripheral blood mononuclear cell; PBMC)에서 연구를 수행하였다. ADCC 활성을 갖지 않는 대조 항체 및 항체를 첨가하지 않은 샘플을 이용하여 검정법에 음성 대조군을 포함시켰다.

도 9a 내지 도 9b는 대조군 및 고 글라이신 공정 둘 모두로부터 생성된 PDL 241의 ADCC 활성을 나타낸다. 2명의 상이한 공여체로부터의 PBMC에서 연구를 수행하였다. ADCC 활성을 갖지 않는 대조 항체 및 항체를 첨가하지 않은 샘플을 이용하여 검정법에 음성 대조군을 포함시켰다.

도 10a 내지 도 10b는 대조군 및 고 글라이신 공정 둘 모두로부터 생성된 PDL192(에나바투주맵)의 ADCC 활성을 나타낸다. 2명의 상이한 공여체로부터의 PBMC에서 연구를 수행하였다. ADCC 활성을 갖지 않는 대조 항체 및 항체를 첨가하지 않은 샘플을 이용하여 검정법에 음성 대조군을 포함시켰다.

도 11a 내지 도 11b는 대조군 및 고 글라이신 공정 둘 모두로부터 생성된 다클리주맵의 ADCC 활성을 나타낸다. 2명의 상이한 공여체로부터의 PBMC에서 연구를 수행하였다. ADCC 활성을 갖지 않는 대조 항체 및 항체를 첨가하지 않은 샘플을 이용하여 검정법에 음성 대조군을 포함시켰다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 5. 발명의 상세한 설명

본 발명은 재조합 당단백질(예를 들어, 항체) 발현을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 조성물 및 방법은 전통적인 배양 배지에서 생성된 당단백질과 비교하여 푸코실화 글리코형이 감소되고 ADCC 활성이 증가된 당단백

질을 생성한다. 본 발명의 조성물 및 방법을 이용한 발현 시스템에 의해 생성된 항체는 유리하게는 전통적인 배지에서의 배양에 의해 생성된 때보다 더 적은 푸코실화를 나타낸다. 본 발명의 다양한 측면이 하기에 기술되어 있다. 섹션 5.1에는 단백질을 발현할 수 있는 포유류 세포의 배양에 적합한 상승된 농도를 함유하는 배양 배지(즉, 고 글라이신 배지)가 기술되어 있다. 섹션 5.2에는 고 글라이신 배지에서 생성될 수 있는 다양한 당단백질(예를 들어, 항체)이 기술되어 있다. 섹션 5.3에는 당단백질을 생성하기 위한 핵산 및 발현 시스템이 기술되어 있다. 섹션 5.4에는 당단백질의 생성에 사용될 수 있는 배양 방법이 기술되어 있다. 섹션 5.5에는 본 발명의 방법에 의해 생성된 당단백질의 회수 및 정제 방법이 기술되어 있다. 섹션 5.6에는 본 발명의 방법에 의해 생성된 당단백질 집단이 기술되어 있다. 섹션 5.7에는 본 발명의 방법에 의해 생성된 당단백질의 제약 조성물이 기술되어 있다. 섹션 5.8에는 본 발명의 방법에 의해 생성된 예시적인 항체를 이용하여 다양한 질환을 치료하는 방법이 기술되어 있다.

[0024] 5.1. 세포 배양 배지

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 높은 농도의 글라이신을 포함하는, 포유류 세포 배양에 적합한 배양 배지를 제공한다. 본원에서 사용될 때, "배양 배지"라는 용어는 시험관내 배양 배지에서의 포유류 세포의 성장에 적합한 배지를 나타낸다. 본원에서 사용될 때, "세포 배양" 또는 "배양"이라는 용어는 시험관내 환경에서의 포유류 세포의 성장을 나타낸다. 전형적인 배양 배지는 아미노산, 비타민, 미량 원소, 유리 지방산 및 에너지를 함유한다. 추가의 성장 성분, 예컨대 성장 인자, 뉴클레오타이드, 지질, 호르몬 및 항생제가 배양 배지에 포함될 수 있다. 더욱이, 상기 배지는 완충제, 오스몰 농도 조절제 및 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0026] 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 재조합 단백질(예를 들어, 항체)의 생성을 위한 세포 배양에 사용되는 배양 배지 및 영양공급 배지와, 이외에도, 다른 변수, 예컨대 영양공급 스케줄, 성장 속도, 온도 및 산소 수준이 발현된 단백질의 수율 및 품질에 영향을 줄 수 있다. 이러한 조건의 최적화 방법은 당업자의 범위 내이며, 예시적인 조건은 본 발명의 예시적인 실시 양태에 개시되어 있다. 바람직하게는, 세포는 콜레스테롤 공급된 성분, 혈청 공급된 성분 및 기타 동물 공급된 성분이 부재하는 배지에서 성장하도록 적응되며, 이러한 예에서, 배양 및 영양공급 배지는 바람직하게는 이러한 성분을 대체하는 규정된 화학물질을 포함한다. 따라서, 재조합 단백질의 제조 방법은 본 발명의 재조합 포유류 세포를 동물 유래된 성분이 부재하는 화학적 규정 배지에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 배양 배지는 고 글라이신 배지이다. 본원에서 사용될 때, "고 글라이신 배지"라는 용어는 글라이신의 농도가 전형적인 세포 배양 배지에서 발견되는 글라이신의 농도보다 더 높은 배지를 나타낸다. 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 상업적 배양 배지(예를 들어, 기초 배지) 중 글라이신의 농도는 약 0.1 mM 내지 약 2 mM의 범위이다.

### 표 1

[0028] 전형적인 상업적 배양 배지 중 글라이신의 농도

표 1	
배지	글라이신 농도 (mM)
DMEM	0.4
DMEM/F12	0.25
IMDM	0.4
MEM, 햄 F12(Ham's F12)	0.1
배지 199	0.67
5 g/L의 가수분해물 (3% 글라이신으로 추정됨)이 보충된 배지	2.0

[0029] 본 발명의 배양 배지 중 글라이신의 농도는 바람직하게는 5 mM 이상이다. 예를 들어, 배양 배지 중 글라이신의 농도는 5 mM 내지 100 mM(예를 들어, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 22 mM, 25 mM, 30 mM 또는 50 mM)일 수 있다. 구체적인 실시 양태에서, 배양 배지 중 글라이신의 농도는 5 mM 내지 10 mM, 7 mM 내지 10 mM, 10 mM 내지 15 mM, 12 mM 내지 17 mM, 15 mM 내지 20 mM, 16 mM 내지 18 mM, 10 mM 내지 30 mM, 10 mM 내지 25 mM, 20 mM 내지 30 mM, 10 mM 내지 50 mM 또는 20 mM 내지 50 mM의 범위의 농도와 같은, 그러나 이로 한정되는 것은 아닌, 상기 2가지의 전술한 값 중 임의의 것에 의해 경계가 이루어질 수 있다.

[0030] 본 발명의 배양 배지는 글라이신에 더하여 다양한 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 배양 배지는 알라

닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린을 비롯한 기타 아미노산을 함유할 수 있다. 특정 실시 양태에서, 배양 배지는 전통적인 배지(예를 들어, 기초 배지)에서 보통 발견되는 농도로 존재하는 아미노산(글라이신 이외의 것)을 함유할 수 있다. 적합한 아미노산은 표 2에 열거된 범위의 농도를 갖는다.

표 2

[0031]

본 발명의 배양 배지 중 아미노산의 예시적인 농도 범위

표 2	
아미노산	배지 중 아미노산의 농도(mM)
알라닌	0.01-0.07
아르기닌	0.6-1.6
아스파라긴	0.08-1.5
아스파르트산	0.03-0.4
시스테인	0.1-0.9
글루탐산	0.03-0.1
글루타민	2-12
글라이신	8-35
히스티딘	0.09-0.7
이소류신	0.9-1.7
류신	1-1.8
라이신	0.8-1.6
메티오닌	0.1-0.5
페닐알라닌	0.2-1
프롤린	0.5-4
세린	0.1-0.8
트레오닌	0.7-1.5
트립토판	0.08-0.3
타이로신	0.2-3
발린	0.8-1.6

[0032]

특정한 실시 양태에서, 본 발명은 글라이신이 5 mM 내지 30 mM의 농도로 존재하고 글라이신 이외의 1가지 이상의 아미노산이 표 3에 열거된 농도 이하의 농도를 갖는 배양 배지를 제공한다. 예를 들어, 2가지, 3가지, 4가지, 5가지, 6가지, 7가지, 8가지, 9가지, 10가지 또는 11가지의 아미노산이 표 3에 열거된 농도 이하의 농도를 가질 수 있다. 일 실시 양태에서, 배양 배지 중 라이신의 농도는 0.5 mM 내지 5.0 mM이다. 표 2에서 확인되지 않은 다른 아미노산이 예를 들어 표 2에 열거된 범위 내의 농도로 배양 배지에 존재할 수 있다.

표 3

[0033]

본 발명의 특정한 실시 양태의 배양 배지 중 특정 아미노산의 예시적인 최대 농도

표 3		
아미노산	배지 중 아미노산의 농도(mM)	배지 중 아미노산의 농도(mg/L)
아스파라긴	2 mM	264
아스파르트산	2 mM	266
이소류신	2 mM	262
류신	2.5 mM	328
라이신	6 mM	876
메티오닌	0.45 mM	67
세린	4 mM	420
트레오닌	4 mM	476
트립토판	0.3 mM	61
타이로신	2.5 mM	145
발린	1.8 mM	211

[0034] 다른 측면에서, 본 발명은 글라이신이 5 mM 내지 30 mM의 농도로 존재하고 글라이신 이외의 1가지 이상의 아미노산이 표 4에 열거된 농도 이하의 농도를 갖는 배양 배지를 제공한다. 예를 들어, 2가지, 3가지, 4가지, 5가지, 6가지, 7가지, 8가지, 9가지, 10가지 또는 11가지의 아미노산이 표 4에 열거된 농도 이하의 농도를 가질 수 있다. 표 3에서 확인되지 않은 다른 아미노산이 예를 들어 표 2에 열거된 범위 내의 농도로 배양 배지에 존재할 수 있다.

표 4

[0035]

표 4		
아미노산	배지 중 아미노산의 농도(mM)	배지 중 아미노산의 농도(mg/L)
아스파라긴	1.5 mM	198
아스파르트산	1.5 mM	200
이소류신	1.5 mM	197
류신	2 mM	262
라이신	4 mM	584
메티오닌	0.4 mM	60
세린	2 mM	210
트레오닌	2 mM	238
트립토판	0.2 mM	41
타이로신	1.5 mM	128
발린	1.5 mM	178

[0036] 부가적으로, 본 발명의 배양 배지는 다양한 비타민을 함유할 수 있다. 전형적인 비타민은 비타민 B-12, 바이오틴, 콜린, 폴산, 니아신아미드, 판토텐산칼슘, 피리독살 히드로클로라이드, 리보플라빈 및 티아민 히드로클로라이드를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 비타민은 적합하게는 표 5에 예시된 농도 범위 내에서 사용될 수 있다.

표 5

[0037]

본 발명의 배양 배지 중 비타민의 예시적인 농도

표 5	
비타민	배지 중 비타민의 농도(mM)
비타민 B-12	0.00013-0.002
바이오틴	0.00001- 0.01
콜린	0.016-1.3
폴산	0.0015-0.02
니아신아미드	0.002-0.07
판토텐산칼슘	0.012-0.02
피리독살 히드로클로라이드	0-0.04
리보플라빈	0.00015-0.0023
티아민 히드로클로라이드	0-0.3

[0038] 부가적으로, 본 발명의 세포 배양 배지는 다양한 미량 원소를 함유할 수 있다. 전형적인 미량 원소는 무수 염화칼슘, 무수 염화마그네슘, 무수 황산마그네슘, 염화칼륨 및 무수 제이인산나트륨을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 미량 원소는 적합하게는 배양 배지 중에 표 6에 나타난 농도 범위로 사용될 수 있다.

표 6

[0039]

본 발명의 배양 배지 중 미량 원소의 예시적인 농도

표 6	
미량 원소	배지 중 미량 원소의 농도(mM)
무수 염화칼슘	0.2-1.1
무수 염화마그네슘	0.1-1.
무수 황산마그네슘	0.1-1.1
염화칼륨	2-8



무수 제이인산나트륨	0.5-5
------------	-------

- [0040] 배양 배지는 또한 1가지 이상의 에너지를 포함할 수 있다. 세포 배양물에 포함될 수 있는 에너지원의 예는 글루코스, 만노스, 갈락토스, 말토스 및 프룩토스를 포함한다. 글루코스는 5 g/L 내지 20 g/L의 범위의 농도로 배양 배지에 첨가될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 배양 배지는 또한 완충제를 함유할 수 있다. 완충제는 세포 배양물을 적합한 pH로 유지하는 데 사용된다. 배양 배지에서 사용될 수 있는 완충제는 HEPES, 인산염 완충제(예를 들어, 제일인산나트륨 및 제이인산나트륨) 및 탄산나트륨을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 완충제는 배양 배지의 pH를 허용가능한 범위 내에서, 전형적으로 6.5 내지 7.5의 범위의 pH로, 더 전형적으로, 6.8 내지 7.2의 범위의 pH로 유지하는 데 사용될 수 있다.
- [0042] 배양 배지는 오스몰 농도를 조절하기 위하여 염을 함유할 수 있다. 예를 들어, 전형적으로 오스몰 농도 조절제를 첨가하여 배양 배지의 오스몰 농도를 250 내지 400 밀리오스몰(mOsm), 더 전형적으로, 270 내지 350 mOsm의 범위로 유지한다. 특징적인 오스몰 농도 조절제는 염, 예컨대 염화나트륨 또는 염화칼륨을 포함한다. 배양 배지의 높은 글라이신의 양은 배지의 오스몰 농도에 영향을 준다는 것이 당업계의 숙련자에 의해 인지된다. 따라서, 배양 배지의 오스몰 농도는 고 글라이신 수준이 기여하는 오스몰 농도를 차지한 후 배지에 첨가하는 오스몰 농도 조절제의 양을 감소시킴으로써 적절한 범위에서 유지될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 배양 배지는 또한 지질 인자를 함유할 수 있다. 전형적인 지질 인자는 리포산, 콜린 클로라이드, 올레인산 및 포스파티딜콜린을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 5.2. 당단백질
- [0045] 본 발명은 비푸코실화 글리코형이 풍부한 당단백질을 제공한다. 섹션 5.2.1에는 본 발명의 방법에 의해 생성될 수 있는 항체가 기술되어 있다. 섹션 5.2.2에는 본 발명의 방법에 의해 생성될 수 있는 다른 유형의 당단백질이 기술되어 있다.
- [0046] 5.2.1. 항체
- [0047] 항체(Ab) 및 면역글로불린(Ig)은 동일한 구조적 특징을 갖는 당단백질이다. 항체는 특정 표적에 대한 결합 특이성을 나타내는 반면, 면역글로불린은 표적 특이성이 결여된 항체 및 기타 항체 유사 분자 둘 모두를 포함한다. 일반적으로 천연 항체 및 면역글로불린은 2개의 동일한 경쇄(L chain) 및 2개의 동일한 중쇄(H chain)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체(heterotetrameric) 당단백질이다. 각각의 중쇄는 1개의 말단에 가변 도메인(VH), 이어서 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 1개의 말단에 가변 도메인(VL), 및 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다.
- [0048] 본 발명은 비푸코실화 글리코형이 풍부한 항체를 제공한다. 달리 지시되지 않으면, "항체"(Ab)라는 용어는 특정 항원에 특이적으로 결합하거나 특정 항원과 면역학적 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 나타내며, 폴리클로날(polyclonal) 형태, 모노클로날(monoclonal) 형태, 유전자 엔지니어링된 형태 및 다르게는 변형된 형태의 항체를 포함하는데, 이는 키메라 항체, 인간화 항체, 헤테로콘주게이트(heteroconjugate) 항체(예를 들어, 2특이성 항체, 다이아바디(diabody), 트리아바디(tribody), 및 테트라바디(tetradody), 및 예를 들어, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, rIgG, 및 scFv 단편을 포함하는 항체의 항원 결합 단편을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 게다가, 달리 지시되지 않으면, "모노클로날 항체"(mAb)라는 용어는 온전한 분자와, 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 단편(예를 들어, Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편과 같은 것) 둘 모두를 포함하는 것으로 의미된다. Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 온전한 항체의 Fc 단편이 결여되어 있으며, 동물의 순한계로부터 더 빠르게 제거되고, 온전한 항체보다 덜한 비특이적 조직 결합성을 가질 수 있다(문헌[Wahl *et al.*, 1983, J. Nucl. Med. 24:316]). "scFv"라는 용어는 전통적인 항체로부터의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인이 연결되어 1개의 사슬을 형성한 단쇄 Fv 항체를 나타낸다.
- [0049] "VH"의 언급은 Fv, scFv, 또는 Fab의 중쇄를 포함하는, 항체의 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 나타낸다. "VL"의 언급은 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 경쇄를 포함하는, 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 나타낸다.
- [0050] 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인 둘 모두는 과가변 영역으로도 공지된 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)을 갖는다. 가변 도메인의 더 고도로 보존된 부분은 프레임워크(framework; FR)로 칭

해진다. 당업계에 공지된 바와 같이, 항체의 과가변 영역을 묘사하는 아미노산 위치/경계는 당업계에 공지된 다양한 정의 및 맥락에 따라 달라질 수 있다. 가변 도메인 내의 일부 위치는, 이들 위치가 한 세트의 기준 하에서는 과가변 영역 내에 있는 것으로 여겨지는 한편 상이한 세트의 기준 하에서는 과가변 영역 밖에 있는 것으로 여겨질 수 있다는 점에서 하이브리드(hybrid) 과가변 위치로 보일 수 있다. 또한 이러한 위치 중 1개 이상은 연장된 과가변 영역에서 발견될 수 있다. 각각의 사슬 내의 CDR들은 FR 영역에 의해 근접하게 규합되며, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께, 항체의 표적 결합 부위의 형성에 기여한다(문헌[Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987] 참조). 본원에서 사용될 때, 면역글로불린 아미노산 잔기의 넘버링(numbering)은, 달리 지시되지 않으면, 카밧(Kabat) 등의 면역글로불린 아미노산 잔기 넘버링 시스템에 따라 행해진다.

[0051] 또한 항체 단편이 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 생성될 수 있다. "항체 단편"이라는 용어는 전장 항체의 일부분, 일반적으로 표적 결합 또는 가변 영역을 나타낸다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편을 포함한다. "Fv" 단편은 전체 표적 인식 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단하게 비공유적으로 회합된 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체(VH-VL 이량체)로 이루어진다. 이러한 배위에서, 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR이 VH-VL 이량체의 표면 상의 표적 결합 부위를 규정하도록 상호작용한다. 흔히, 상기 6개의 CDR은 표적 결합 특이성을 항체에 부여한다. 그러나, 일부 예에서, 심지어 단일 가변 도메인(또는 표적에 특이적인 단지 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)도 표적을 인식하여 표적에 결합하는 능력을 가질 수 있다. "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커(linker)를 추가로 포함하며, 상기 링커는 scFv가 표적 결합에 있어서 요망되는 구조를 형성하는 것을 가능하게 한다. "단쇄 항체"는 표적에 대하여 충분한 친화도를 나타내는 단일 VH 또는 VL 도메인으로 구성된다. 구체적인 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 낙타화 항체이다(예를 들어, 문헌[Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38] 참조).

[0052] Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH<sub>1</sub>)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지(hinge) 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH<sub>1</sub> 도메인의 카르복실 말단의 몇 개의 잔기의 부가에 의해 Fab 단편과 상이해진다. F(ab')<sub>2</sub> 단편은 F(ab')<sub>2</sub> 펩신 소화 생성물의 힌지 시스테인에서의 디설피드 결합의 절단에 의해 생성된다. 항체 단편들의 추가의 화학적 커플링(coupling)이 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다.

[0053] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 모노클로날 항체이다. 본원에서 사용될 때, "모노클로날 항체"라는 용어는 하이브리도마(hybridoma) 기술을 통하여 생성되는 항체로 한정되는 것은 아니다. "모노클로날 항체"라는 용어는 임의의 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된 항체를 나타내는 것으로서 이것을 생성하는 방법은 아니다. 본 발명에서 유용한 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합체, 및 파지 디스플레이(display) 기술, 또는 이들의 조합의 이용을 포함하는, 당업계에 공지된 매우 다양한 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 항체는 키메라 항체, 영장류화 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체를 포함한다.

[0054] 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 생성된 항체는 키메라 항체일 수 있다. 본원에서 사용될 때, "키메라" 항체라는 용어는 비인간 면역글로불린, 예컨대 래트 또는 마우스 항체로부터 유래된 가변 서열, 및 인간 면역글로불린 주형으로부터 전형적으로 선택되는 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 항체를 나타낸다. 키메라 항체를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7]; 문헌[Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214-221]; 문헌[Gillies *et al.*, 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202]; 미국 특허 제5,807,715호; 미국 특허 제4,816,567호; 및 미국 특허 제4,816,397호를 참조하며, 이들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0055] 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 생성된 항체는 인간화될 수 있다. "인간화" 형태의 비인간(예를 들어, 쥐과) 항체는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편(예컨대 항체의 Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 다른 표적 결합 서브도메인(subdomain))이다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함하며, 여기서, CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 면역글로불린의 것에 상응하며, FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 또한 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로, 면역글로불린 콘센서스(consensus) 서열의 것을 포함할 수 있다. 항체 인간화 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-7]; 미국 특허 제5,530,101호;

미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제5,693,761호; 미국 특허 제5,693,762호; 및 미국 특허 제6,180,370호 (퀸(Queen) 등); 유럽 특허 제239400호; 국제 특허 공개 WO 91/09967호; 미국 특허 제5,225,539호; 유럽 특허 제592106호; 유럽 특허 제519596호; 문헌[Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498]; 문헌[Studnicka *et al.*, 1994, Prot. Eng. 7:805-814]; 문헌[Roguska *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973]; 및 미국 특허 제5,565,332호를 참조하는데, 이들 모두는 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0056] 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 생성된 항체는 인간 항체일 수 있다. 전적 "인간" 항체가 인간 환자의 치료적 치료에 바람직할 수 있다. 본원에서 사용될 때, "인간 항체"는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하며, 1가지 이상의 인간 면역글로불린에 대하여 트랜스제닉이고 내인성 면역글로불린을 발현하지 않는 동물로부터 또는 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 단리된 항체를 포함한다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하여 파지 디스플레이 방법을 포함하는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 미국 특허 제4,444,887호 및 미국 특허 제4,716,111호; 및 국제 특허 공개 WO 98/46645호; 국제 특허 공개 WO 98/50433호; 국제 특허 공개 WO 98/24893호; 국제 특허 공개 WO 98/16654호; 국제 특허 공개 WO 96/34096호; 국제 특허 공개 WO 96/33735호; 및 국제 특허 공개 WO 91/10741호를 참조하는데, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 또한 인간 항체는 기능성 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 국제 특허 공개 WO 98/24893호; 국제 특허 공개 WO 92/01047호; 국제 특허 공개 WO 96/34096호; 국제 특허 공개 WO 96/33735호; 미국 특허 제5,413,923호; 미국 특허 제5,625,126호; 미국 특허 제5,633,425호; 미국 특허 제5,569,825호; 미국 특허 제5,661,016호; 미국 특허 제5,545,806호; 미국 특허 제5,814,318호; 미국 특허 제5,885,793호; 미국 특허 제5,916,771호; 및 미국 특허 제5,939,598호를 참조하는데, 이들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 게다가, 메다렉스(Medarex)(미국 뉴욕주 프린스턴), 아스텔라스 파르마(Astellas Pharma)(미국 일리노이주 디어필드), 및 레제네론(Regeneron)(미국 뉴욕주 태리타운)과 같은 회사가 상기에 기술된 것과 유사한 기술을 이용하여, 선택된 항원에 대하여 유도된 인간 항체를 제공하도록 고용될 수 있다. 선택된 에피토프를 인식하는 전적 인간 항체는 "인도된 선발"로 칭해지는 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 접근법에서, 선발된 비인간 모노클로날 항체, 예를 들어 마우스 항체를 이용하여 동일 에피토프를 인식하는 전적 인간 항체의 선발을 인도한다(문헌[Jespersen *et al.*, 1988, Biotechnology 12:899-903]).

[0057] 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 생성된 항체는 영장류화될 수 있다. "영장류화 항체"라는 용어는 원숭이가 변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 항체를 나타낸다. 영장류화 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,658,570호; 미국 특허 제5,681,722호; 및 미국 특허 제5,693,780호를 참조하는데, 상기 미국 특허는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0058] 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 생성된 항체는 2특이성 항체일 수 있다. 2특이성 항체는 2가지 이상의 상이한 항원에 대하여 결합 특이성을 갖는 모노클로날, 흔히 인간 또는 인간화 항체이다.

[0059] 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 생성된 항체는 유도체화 항체를 포함한다. 예를 들어, 그러나 한정됨이 없이, 유도체화 항체는 전형적으로 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 포스포릴화, 아미드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질 분해적 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에의 결합 등에 의해 변형된다. 다수의 화학적 변형 중 임의의 것은 투니카마이신의 대사적 합성, 포르밀화, 아세틸화, 특정한 화학적 절단 등을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아닌 공지된 기술에 의해 실시될 수 있다. 부가적으로, 상기 유도체는 예를 들어 ambrx 기술을 이용하여 1가지 이상의 비천연 아미노산을 함유할 수 있다(예를 들어, 문헌[Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2] 참조).

[0060] 본 발명의 또 다른 실시 양태에서, 항체 또는 이의 단편은 상응하는 야생형 서열에 비하여 1가지 이상의 불변 영역 매개된 생물학적 이펙터 기능이 변경되도록 서열이 변형된 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

[0061] 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 본 발명의 항체는 비변형 항체에 비하여 1가지 이상의 불변 영역 매개된 생물학적 이펙터 기능이 감소되도록, 예를 들어 Fc 수용체(FcR)에의 결합성이 감소되도록 변형될 수 있다. FcR 결합성은 FcR 상호작용에 필요한 특정 영역에서 항체의 면역글로불린 불변 영역 절편을 돌연변이시킴으로써 감소될 수 있다(예를 들어, 문헌[Canfield and Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491]; 및 문헌[Lund *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:2657-2662] 참조).

[0062] 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 생성된 항체는 비변형 항체에 비하여 1가지 이상의 불변 영역 매개된 생물학적 이펙터 기능이 획득되거나 개선되도록, 예를 들어 Fc $\gamma$ R 상호작용이 향상되도록 변형된다(예를 들어, 미국 특허 공개 제2006/0134709호 참조). 예를 들어, 상응하는 야생형 불변 영역보다 더 큰



친화도로  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\gamma RIIB$  및/또는  $Fc\gamma RIIEA$ 에 결합하는 불변 영역을 포함하는 항체가 본원에 기술된 방법에 따라 생성될 수 있다.

[0063] 본 발명의 방법을 이용하여 생성될 수 있는 항체의 예는 아달리무맙(adalimumab), 엘로투주맙, 에나바투주맙, 다클리주맙, 볼록시시맙, 토시투모맙(tositumomab), 트라스투주맙(trastuzumab), 이스테키누맙(istekinumab), 압시시맙(abcicimab), 베실레소맙(besilesomab), 에타라시주맙(etaracizumab), 펙투모맙(pemtumomab), 오말리주맙(omalizumab), 페르투주맙(pertuzumab), 나탈리주맙(natalizumab), 슐레소맙(sulesomab), 테피바주맙(tefibazumab), 보투무맙(votumumab), 모타비주맙(motavizumab), 오레고보맙(oregovomab), 파니투무맙(panitumumab), 잘루투무맙(zalutumumab), 이고보맙(igovomab), 베바시주맙(bevacizumab), 바실릭시맙(basiliximab), 아틀리주맙(atlizumab), 벡투모맙(bectumomab), 벨리무맙(belimumab), 알렘투주맙(alemtuzumab), 니모투주맙(nimotuzumab), 메폴리주맙(mepolizumab), 알투모맙(altumomab), 라니비주맙(ranibizumab), 리톡시맙(rituximab), 팔리비주맙(palivizumab), 겐투주맙(gemtuzumab), 골리무맙(golimomab), 폰톨리주맙(fontolizumab), 노페투모맙(nofetumomab), 오파투무맙(ofatumumab), 아르시투모맙(arcitumomab), 세톡시맙(cetuximab), 임시로맙(imciromab), 세르톨리주맙(certolizumab), 로벨리주맙(rovelizumab), 루플리주맙(ruplizumab), 이필리무맙(ipilimumab), 라베투주맙(labetuzumab), 카투막소맙(catumaxomab), 카나키누맙(canakinumab), 데노수맙(denosumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 파놀레소맙(fanolesomab), 에팔리주맙(efalizumab), 인플릭시맙(infliximab), 에드레콜로맙(edrecolomab), 에푼구맙(efungumab), 기렌톡시맙(girentuximab), 에르투막소맙(ertumaxomab) 및 토클리주맙을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0064] 5.2.2. 기타 당단백질

[0065] 본 발명의 방법을 이용하여 치료 목적용의 단백질을 비롯한 임의의 단백질의 당단백질을 생성할 수 있다. 본 발명에 따라 생성될 수 있는 단백질의 예는 성장 인자, 예컨대 에리트로포이에틴(EPO), 인간 융모 성선 자극 호르몬(human chorionic gonadotropin; hCG), 과립구 콜로니 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor; GCSF), 항트롬빈 III, 인터류킨 1, 인터류킨 2, 인터류킨 6, 인간 융모 성선 자극 호르몬, 항트롬빈 III, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIm 인자 IX 및 인간 단백질 C, 표피 성장 인자, 성장 호르몬 방출 인자, 표피 성장 인자, 안지오스타틴(angiostatin), 혈관 내피 성장 인자-2 및 플라즈미노겐 활성자를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0066] 5.3. 핵산 및 발현 시스템

[0067] 표준 재조합 DNA 방법, 예컨대 문헌[Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. *et al.*, eds., Greene Publishing Associates, 1989)] 및 미국 특허 제4,816,397호에 기술된 것은 본 발명의 방법에 따라 당단백질을 생성하는 데 적합한 재조합 포유류 세포를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0068] 당단백질 서열은 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 당단백질이 항체인 실시 양태에서, 재조합 기술을 이용하여 항체 중쇄 및 경쇄 유전자를 수득하고, 이러한 유전자를 재조합 발현 벡터 내에 포함시키고, 상기 벡터를 숙주 세포 내에 도입할 수 있다. 항체를 재조합적으로 발현시키기 위하여, 숙주 세포는 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포에서 발현되고, 임의로, 숙주 세포가 배양되는 배지 내로 분비되도록, 항체의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 단편을 지닌 하나 이상의 재조합 발현 벡터로 형질감염되는데, 상기 배지로부터 항체가 회수될 수 있다. 항체를 암호화하는 핵산을 생성하기 위하여, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편이 먼저 수득된다. 이러한 DNA는 예를 들어 폴리머라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 이용하여, 경쇄 가변 서열 및 중쇄 가변 서열을 암호화하는 생식 세포 계열 DNA 또는 cDNA를 증폭 및 변형시킴으로써 수득될 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 생식 세포 계열 DNA 서열은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, "VBASE" 인간 생식 세포 계열 서열 데이터베이스를 참조하며; 또한, 문헌[Kabat, E. A. *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]; 문헌[Tomlinson *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 22T:116-198]; 및 문헌[Cox *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836]을 참조하는데, 이들 각각의 내용은 본원에 참고로 포함된다). 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편은 일상적인 돌연변이 유발 기술을 이용하여 본원에 기술된 바와 같이 변이체를 생성하도록 돌연변이 유발용 주형으로서 합성되어 사용될 수 있으며; 대안적으로, 상기 변이체를 암호화하는 DNA 단편이 직접적으로 합성될 수 있다.

[0069] 일단, 항체를 암호화하는 DNA 단편이 수득되면, 이러한 DNA 단편은 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체 사

을 유전자로, Fab 단편 유전자로 또는 scFv 유전자로 전환시키기 위하여, 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작될 수 있다. 이러한 조작에서, VL 또는 VH 암호화 DNA 단편은 또 다른 단백질, 예컨대 항체 불변 영역 또는 가요성 링커를 암호화하는 또 다른 DNA 단편에 작동되게 연결된다. 이러한 맥락에서 사용될 때, "작동되게 연결된"이라는 용어는 상기 두 DNA 단편에 의해 암호화된 아미노산 서열이 여전히 프레임에 맞게(in-frame) 있도록 상기 두 DNA 단편이 연결됨을 의미하는 것으로 의도된다.

[0070] VH 영역을 암호화하는 단리된 DNA는 VH 암호화 DNA를 중쇄 불변 영역(CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> 및, 임의로, CH<sub>4</sub>)을 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 작동되게 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며(예를 들어, 문헌[Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 획득될 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 특정 실시양태에서, IgG<sub>1</sub> 또는 IgG<sub>4</sub> 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자에 있어서, VH 암호화 DNA는 단지 중쇄 CH<sub>1</sub> 불변 영역을 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 작동되게 연결될 수 있다.

[0071] VL 영역을 암호화하는 단리된 DNA는 VL 암호화 DNA를 경쇄 불변 영역, CL을 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 작동되게 연결시킴으로써 전장 경쇄 유전자(이외에도, Fab 경쇄 유전자)로 전환시킬 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며(예를 들어, 문헌[Kabat, E. A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)] 참조), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 획득될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만, 특정 실시양태에서, 카파 불변 영역이다. scFv 유전자를 생성하기 위하여, VH 및 VL 암호화 DNA 단편은, VH 및 VL 서열이 연결 단쇄 단백질로 발현될 수 있도록, 가요성 링커를 암호화하는, 예를 들어, 아미노산 서열 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> (서열 번호 21)을 암호화하는 또 다른 단편에 작동되게 연결되며, 이때 VL 영역과 VH 영역은 가요성 링커에 의해 연결된다(예를 들어, 문헌[Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426]; 문헌[Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; 문헌[McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554] 참조).

[0072] 당단백질을 발현하기 위하여, 당단백질을 암호화하는 DNA를 발현 벡터 내에 삽입하여서 유전자가 전사 및 번역 제어 서열에 작동되게 연결되게 한다. 이와 관련하여, "작동되게 연결된"이라는 용어는, 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 당단백질 암호화 서열의 전사 및 번역을 조절하는 그의 의도된 기능을 하도록 핵산 암호화 당단백질이 벡터 내에 라이게이션됨을 의미하는 것으로 의도된다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현 숙주 세포와 양립가능하도록 선택된다. 당단백질이 항체일 경우, 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 별도의 벡터 내에 삽입될 수 있거나, 더 전형적으로, 상기 둘 모두의 유전자가 동일 발현 벡터 내에 삽입된다.

[0073] 당단백질 암호화 핵산은 표준 방법(예를 들어, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한효소 부위의 라이게이션, 또는 제한효소 부위가 존재하지 않을 경우 블런트(blunt) 말단 라이게이션)에 의해 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 당단백질이 항체일 경우, 항체 경쇄 또는 중쇄 서열의 삽입 이전에, 발현 벡터는 이미 항체 불변 영역 서열을 지닐 수 있다. 예를 들어, 항체의 VH 및 VL 서열을 전장 항체 유전자로 전환시키는 1가지 접근법으로는 상기 서열을 각각 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 이미 암호화하고 있는 발현 벡터 내에 삽입하여서 VH 절편이 벡터 내의 CH 절편(들)에 작동되게 연결되게 하고 VL 절편이 벡터 내의 CL 절편에 작동되게 연결되게 하는 것이 있다. 부가적으로, 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 돕는 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 프레임에 맞게 연결되도록 벡터 내에 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드(즉, 비면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.

[0074] 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 당단백질 암호화 서열의 발현을 제어하는 조절 서열을 지닐 수 있다. "조절 서열"이라는 용어는 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터(promoter), 인핸서(enhancer) 및 기타 발현 제어 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열은 예를 들어 문헌[Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990)]에 기술되어 있다. 조절 서열의 선택을 비롯한 발현 벡터의 설계는 형질전환시킬 숙주 세포의 선택, 요망되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있음이 당업계의 숙련자에 의해 인지된다. 포유류 숙주 세포 발현에 적합한 조절 서열은 포유류 세포에서 높은 수준의 단백질 발현을 유도하는 바이러스 요소, 예컨대 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV)로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서(예컨대 CMV 프로모트

/인헨서), 시미안 바이러스(Simian Virus) 40(SV40)로부터 유래된 프로모터 및/또는 인헨서(예컨대 SV40 프로모터/인헨서), 아데노바이러스로부터 유래된 프로모터 및/또는 인헨서(예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(adenovirus major late promoter; AdMLP)) 및 폴리오마(polyoma)로부터 유래된 프로모터 및/또는 인헨서를 포함한다. 바이러스 조절 요소, 및 이의 서열의 추가의 설명에 대해서는, 예를 들어 스티스키(Stinski)의 미국 특허 제5,168,062호, 벨(Bell) 등의 미국 특허 제4,510,245호, 및 샤프너(Schaffner) 등의 미국 특허 제4,968,615호를 참조한다.

[0075] 재조합 발현 벡터는 추가의 서열, 예컨대 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예를 들어, 복제 기점) 및 선발가능한 마커 유전자를 지닐 수 있다. 선발가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선발을 돕는다(예를 들어, 미국 특허 제4,399,216호, 미국 특허 제4,634,665호 및 미국 특허 제5,179,017호(모두 악셀(Axel) 등) 참조). 예를 들어, 전형적으로 선발가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에게 약물, 예컨대 G418, 하이그로마이신 또는 메토평렉세이트에 대한 내성을 부여한다. 적합한 선발가능한 마커 유전자는 디히드로폴레이트 리덕타아제(dihydrofolate reductase; DHFR) 유전자(메토평렉세이트 선발/증폭에서 DHFR<sup>-</sup> 숙주 세포에서 사용하기 위한 것임) 및 neo 유전자(G418 선발을 위한 것임)를 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 발현을 위하여, 표준 기술에 의해 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)로 숙주 세포를 형질감염시킨다. "형질감염"이라는 용어의 다양한 형태는 외인성 DNA를 포유류 숙주 세포 내로 도입하는 데 일반적으로 사용되는 매우 다양한 기술을 포함하는 것으로 의도된다.

[0076] 본 발명의 당단백질은 적당하게 폴딩된(folded) 면역학적 활성 단백질의 최적의 분비를 위하여 포유류 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위한 예시적인 포유류 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary; CHO) 세포(예를 들어, 문헌[Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621]에 기술된 바와 같이, DHFR 선발가능 마커와 함께 사용되는, 문헌[Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기술된 DHFR<sup>-</sup> CHO 세포를 포함함), NSO 골수종 세포, COS 세포, SP2/0 세포, EB66<sup>®</sup> 세포, 및 PER.C6<sup>®</sup> 세포를 포함한다. 당단백질을 암호화하는 재조합 발현 벡터를 포유류 숙주 세포 내에 도입할 때, 당단백질은 숙주 세포에서의 당단백질의 발현 또는 숙주 세포를 성장시키는 배양 배지 내로의 당단백질의 분비를 허용하기에 충분한 시간 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생성된다. 적합한 배양 기술은 섹션 5.4에 기술되어 있다. 당단백질은 예를 들어 섹션 5.5에 기술된 바와 같이, 표준 단백질 정제 방법을 이용하여 배양 배지로부터 회수될 수 있다.

[0077] 5.4. 배양 방법

[0078] 본 발명은 고 글라이신 배양 배지, 예컨대 섹션 5.1에 기술된 배양 배지에서 당단백질을 발현하도록 엔지니어링된 포유류 세포를 배양함으로써 당단백질(예를 들어, 항체)을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 전통적인 배양 배지에서 생성한 당단백질과 비교하여 푸코실화 글리코형이 감소된 당단백질을 제공한다.

[0079] 섹션 5.3에 기술된 재조합 포유류 세포는 적합한 배지에서 그리고 당단백질이 발현되고/되거나 단리되게 하는 조건 하에서 수행되는, 실험실용 또는 공업용 발효기에서의 소규모 또는 대규모(연속식, 배치식, 유가식, 또는 고상 발효를 포함함)에서의 진탕 플라스크 배양에 의한 것과 같이 현탁 상태로 배양될 수 있다. 대안적으로, 포유류 세포는 고체 기체에 부착되어 있으면서 배양될 수 있다.

[0080] 특정 실시 양태에서, 재조합 포유류 세포는 0.5 내지  $5 \times 10^5$ 개의 세포/mL의 범위, 더 전형적으로, 1.5 내지  $2.5 \times 10^5$ 개의 세포/mL의 범위의 초기 세포 밀도로 기초 배지에 첨가된다. 일반적으로 배양물은 접종 후 대략 8 일 내지 20일 동안, 더 전형적으로, 접종 후 10일 내지 14일 동안 수확된다.

[0081] 포유류 세포의 접종 후, 상기 세포의 성장은 소정의 영양공급 스케줄에 따라 영양소를 첨가함으로써 촉진될 수 있다. 영양공급 배지를 배양물에 첨가하는 것은 당업계에 공지된 공정, 예컨대 연속식 배양, 배치식 배양 및 유가식 배양을 통한 것일 수 있다. 세포의 번식을 지원하기 위하여, 접종 후 영양공급 용액을 간헐적인 횟수로 배양물에 첨가할 수 있다. 본원에서 사용될 때, "영양공급물"이라는 용어는 접종 후 배양물에 첨가되는 영양소를 나타낸다. "영양공급 용액" 또는 "영양공급 배지"라는 용어는 접종 후 배양물에 첨가되는 영양공급물을 함유하는 용액을 나타낸다.

[0082] 5.5. 회수 및 정제

[0083] 발현된 단백질의 회수 및 정제 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 재조합 포유류 세포에 의해 발현되는 특정 당

단백질(들)에 맞추어질 수 있다. 당단백질은 배양 배지 및/또는 세포 용해물로부터 회수될 수 있다. 본 방법이 분비형 당단백질의 생성에 관한 실시 양태에서, 당단백질은 배양 배지로부터 회수될 수 있다. 단백질은 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발, 또는 침전을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아닌, 당업계에 공지된 다양한 절차에 의해 배양 배지로부터 회수되거나 정제될 수 있다. 그 후, 회수된 당단백질은 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성, 소수성, 크로마토포커싱(chromatofocusing), 및 크기 배제 크로마토그래피), 전기영동 절차(예를 들어, 예비 등전점 전기영동(isoelectric focusing; IEF), 시차적 용해도(예를 들어, 황산암모늄 침전), 또는 추출을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아닌, 당업계에 공지된 다양한 절차에 의해 추가로 정제될 수 있다(예를 들어, 문헌[Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989] 참조).

[0084] 당단백질이 항체인 실시 양태에서, 항체는 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 강력 음이온 교환(Q-세파로스(Sepharose)) 크로마토그래피 및 약한 양이온 교환(CM-650M) 크로마토그래피와 함께 이용하여 공정 중간체의 회색 없이 연속 유동 프로세싱을 가능하게 하는 공정에 의해 정제될 수 있다. 정제된 항체의 이러한 수득 방법은 하기 단계를 수반할 수 있다:

[0085] (i) 항체를 다른 세포 배양 성분으로부터 분리하기 위한 단백질 A 친화성 크로마토그래피 단계;

[0086] (ii) 저 pH 바이러스 불활성화 단계;

[0087] (iii) DNA를 제거하기 위한 강력 음이온 교환 크로마토그래피 단계;

[0088] (iv) 응집물을 감소시키기 위한 약한 양이온 교환 크로마토그래피 단계; 및

[0089] (v) 바이러스를 제거하기 위한 여과 단계.

[0090] 단계 (ii) 내지 (v)는 임의의 순서로 실시될 수 있다.

[0091] 일단 분리되면, 항체는 요망될 경우 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피(예를 들어, 문헌[Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980)] 참조) 또는 수퍼덱스(Superdex)<sup>TM</sup> 75 컬럼(스웨덴 옉살라 소재의 파마시아 바이오테크 에이비(Pharmacia Biotech AB))에서의 겔 여과 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다.

## [0092] 5.6. 단백질 글리코형

[0093] 글리코실화에 의한 단백질의 번역 후 변형은 그 단백질의 생화학적 특성 및 물리적 특성에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 항체의 특성은 항체의 Fc 영역 및 Fab 영역 둘 모두에서의 글리코실화에 의해 영향을 받을 수 있다. "글리코실화"는 탄수화물(예를 들어, 올리고당 사슬)에 의한 단백질(예를 들어, 항체)의 공유적 변형을 나타낸다. 당단백질에서의 전형적인 당류는 만노스, 글루코스, 갈락토스, 푸코스, N-아세틸갈락토사민(GalNAc), N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 및 시알산을 포함한다.

[0094] 개별적인 글리코실화 분자(예를 들어, 글리코실화 항체)는 본원에서 글리코형으로 칭해진다. "글리코실화 프로파일"은 특정 샘플에서의 글리코형의 세트를 나타낸다. 일반적으로 글리코실화는 N-결합 글리코실화 또는 O-결합 글리코실화를 나타낸다. "N-결합 글리코실화"라는 용어는 단백질의 아스파라긴 잔기에 올리고당 사슬이 공유 결합됨으로써 N-결합 올리고당류를 형성하는 것을 나타낸다. N-결합 올리고당류는 또한 N-결합 글리칸으로도 칭해진다. "O-결합 글리코실화"라는 용어는 단백질의 세린 또는 트레오닌 잔기의 히드록실기에 올리고당 사슬이 공유 결합됨으로써 O-결합 올리고당류를 형성하는 것을 나타낸다. O-결합 올리고당류는 또한 O-결합 글리칸으로도 칭해진다.

[0095] N-결합 글리칸은, 그의 말단에서의 갈락토스 잔기의 수에 의해 추가로 특성화되며, 이는 푸코스가 N-결합-N-아세틸 글루코사민에 부착된 것을 상기 글리칸이 함유하든지 함유하지 않든지 간에 그러하다. 푸코스 분자가 N-결합 N-아세틸 글루코사민에 부착된 N-결합 글리칸은 본원에서 푸코실화 글리코형으로 칭해진다. 4가지의 상이한 푸코실화 N-결합 글리칸의 특성이 하기에 열거되어 있다(또한 도 1 참조):

[0096] ● G0: 푸코스가 N-결합 N-아세틸 글루코사민에 부착된 2안테나형(biantennary)(즉, 2개의 안테나를 가짐) 코어 구조로서, 코어 구조의 각각의 분지체 상에 1개의 N-아세틸 글루코사민을 가짐 .

[0097] ● G1: 푸코스가 N-결합 N-아세틸 글루코사민에 부착된 2안테나형 코어 구조로서, 하나의 N-아세틸 글루코사민을 코어 구조의 각각의 분지체 상에 갖고 말단 갈락토스를 코어 구조의 하나의 분지체 상에 가짐.



- [0098] ● G2: 푸코스가 N-결합 N-아세틸 글루코사민에 부착된 2안테나형 코어 구조로서, 하나의 N-아세틸 글루코사민 및 하나의 말단 갈락토스를 코어 구조의 각각의 분지체 상에 가짐.
- [0099] ● G0-GlcNAc: 푸코스가 N-결합 N-아세틸 글루코사민에 부착된 2안테나형 코어 구조로서, 하나의 N-아세틸 글루코사민을 코어 구조의 하나의 분지체 상에 갖고 말단 갈락토스는 없음.
- [0100] 푸코스 분자를 함유하지 않는 N-결합 글리칸은 비푸코실화 글리칸으로 칭해진다. 비푸코실화 글리칸을 포함하는 단백질은 비푸코실화 글리코형으로 칭해진다. 예를 들어, G0-GlcNAc-푸코스 N-결합 글리칸은 N-결합 N-아세틸 글루코사민에 부착된 푸코스가 없는 2안테나형 코어 구조로서, 하나의 N-아세틸 글루코사민을 코어 구조의 하나의 분지체 상에 갖고, 말단 갈락토스는 없다. G0-GlcNAc-푸코스 N-결합 글리칸을 함유하는 항체는 본원에서 G0-GlcNAc-푸코스 N-결합 글리코형으로 칭해진다.
- [0101] N-결합 글리코실화 프로파일은 다양한 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, N-결합 글리코실화 프로파일은 트립신을 이용하여 항체를 소화시키고, 다양한 당펩티드의 질량 분광법적 검출 및 정량화를 이용하여 역상 크로마토그래피를 사용하여 생성 펩티드 혼합물을 분석함으로써 평가될 수 있다. 특정 방법에서, 소화된 펩티드는 YMC-Pack ODS-AQ, 5  $\mu$ m 입자 크기, 120 옴스트롬의 기공 크기, 2.0 mm x 250 mm의 역상 컬럼(와이엠씨 컴퍼니, 리미티드(YMC Co., Ltd), 카탈로그 번호: AQ12S05-2502WT)을 이용하여 분석되며, 용출된 펩티드는 서모(Thermo) LCQ 데카(Deca) XP+ 질량 분광계(서모 피니간(Thermo Finnigan))를 이용하여 검출되고 정량화된다. 각각의 글리코형의 상대적인 풍부성은 모든 관찰된 당펩티드의 피크 면적의 합계에 대한 상응하는 당펩티드의 질량 분광계 추출된 이온 크로마토그램 피크의 면적을 기반으로 하여 결정된다.
- [0102] 대안적으로, N-결합 글리코실화 프로파일은 N-결합 올리고당류를 아미다아제 PNGase F로 절단하고, 상기 올리고당류를 형광 표지체로 유도체화하고, 형광 검출을 이용하여 순상 HPLC를 통하여 생성 혼합물을 분석함으로써 평가될 수 있다. 특정 방법에서, 유도체화된, 절단된 N-결합 글리칸은 250 x 4.6 mm의 중합체성 아민 결합된 아사히파크 아미노(Asahipak Amino) NH<sub>2</sub>P-504E 컬럼(5  $\mu$ m의 입자 크기, 페노메넥스(Phenomenex), 카탈로그 번호: CHO-2628)에서 50°C에서 해상된다.
- [0103] IgG의 글리코실화 프로파일의 연구는, IgG가 30가지 이상의 상이한 N-결합 올리고당류를 지님을 나타냈다. 문헌 [Dwek *et al.*, 1995, J. Anat. 187:279-292]. N-결합 글리코실화 부위는 많은 항체의 Fc 영역 및 Fab 영역 둘 모두에서 발견된다. 어떠한 시알산 기도 포함하지 않는 N-결합 올리고당류는 흔히 중성 N-결합 올리고당류로 칭해진다. 올리고당의 비환원당 말단에 1개 또는 2개의 시알산 기를 갖는 N-결합 올리고당류는 각각 모노시알릴화 또는 디시알릴화 N-결합 올리고당류로 칭해진다. IgG와 관련하여, Fc 글리코실화는 낮은 발생률의 모노시알릴화 및 디시알릴화 구조를 특징으로 하는 반면, Fab 글리코실화는 높은 발생률의 모노시알릴화 및 디시알릴화 구조를 특징으로 한다.
- [0104] 추가의 N-결합 글리칸이 항체의 Fc 영역에서 확인되었다. 예를 들어, 만노스를 함유하는 잔존 잔기를 갖는, 2개의 N-아세틸 글루코사민만을 함유하는 글리칸을 특징으로 하는, 많은 양의 만노스를 함유하는 글리칸은 "고 만노스 글리칸"으로 칭해진다. 만노스 잔기는 올리고당의 2-위치에서 GlcNAc에 공유적으로 부착된다. 고 만노스 5 글리칸의 일례로는 "만노스5 글리칸"이 있다. 만노스 5 글리칸은 5개의 만노스 잔기를 함유한다. 만노스5 글리칸을 포함하는 단백질은 본원에서 "만노스5 글리코형"으로 칭해진다. 고 만노스 글리칸은 비푸코실화 글리칸의 예이다.
- [0105] 본 발명은 푸코스를 함유하지 않는 글리코형(즉, 비푸코실화 글리코형)이 풍부한 항체의 제조 방법을 제공한다. 비푸코실화 글리코형의 예는 G0-GlcNAc-푸코스 글리코형 및 만노스5 글리코형을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 푸코스가 결여된 항체는 향상된 ADCC(항체 의존성 세포 독성) 활성과 상관되었다. 림프구, 특히 자연 살해(NK) 세포는 항체의 Fc 영역에 결합할 수 있는 표면 결합된 수용체를 함유한다. 예를 들어, NK 세포 상의 인간 CD16a 수용체는 표적 세포에 결합된 항체의 Fc 영역에 결합함으로써 표적 세포의 살해를 개시한다. 이론에 구애됨이 없이, 본 발명의 방법에 따라 생성된 비푸코실화 글리코형은 푸코스를 함유하는 글리코형(즉, 푸코실화 글리코형)보다 NK 세포 상의 CD16a 수용체에 대하여 더 높은 결합 친화도를 나타내는 것으로 생각되며, 이는 ADCC 활성의 증가에 책임이 있다.
- [0106] 본원에 기술된 고 글라이신 배지에서 생성된 항체는 종래의 배지에서 생성된 항체보다 유의하게 더 많은 비푸코실화 글리코형을 함유한다. 섹션 5.3에 기술된 바와 같이, 일반적으로 푸코스가 결여된 글리칸의 총 양은 배양 배지 중 글라이신의 농도가 2 mM로부터 30 mM까지 증가함에 따라 증가한다. 특히, G0-GlcNAc-푸코스 및 만노스5 글리칸의 백분율은, NSO 세포가 본 발명에 따라 제조된 배양 배지에서 배양될 때 증가한다. 본 발명의 배양 배

지에서 생성된 비푸코실화 항체의 양은 AOI에 의존적인 반면, 푸코스가 결여된 글리칸의 백분율 증가는 일반적으로 종래의 배지(즉, 글라이신 농도가 2 mM 이하인 배지)에서 생성된 항체에 비하여 120% 이상이다. 예를 들어, 본 발명의 배양 배지에서 생성된 항체 상의, 푸코스가 결여된 총 글리칸의 백분율 증가는 종래의 배지에서 생성된 항체에 비하여 120%, 150%, 180%, 200%, 250%, 300% 또는 400%일 수 있다. 구체적인 실시 양태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 항체 상의, 푸코스가 결여된 총 글리칸의 백분율 증가는 120-150%, 150-180%, 150-200%, 또는 200-300%와 같은, 그러나 이로 한정되는 것은 아닌, 상기 2개의 전술한 값 중 임의의 것에 의해 경계가 이루어진다.

[0107] 본 발명은 종래의 배지에서 생성된 항체에 비하여 글리코실화 프로파일 변경된 관심 대상의 특정 항체를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 특히, 본 발명의 방법에 의해 생성된 항체는 종래의 배지에서 생성된 항체보다 더 큰 백분율의 비푸코실화 글리코형을 갖는다. 그 결과, 본 발명의 방법에 의해 생성된 항체는 일반적으로 종래의 배지에서 생성된 항체보다 더 높은 ADCC 활성을 나타내며, NK 세포 상의 CD16a 수용체에 대하여 더 높은 결합성을 나타낸다.

[0108] 특정한 일 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 1의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 서열의 VL 영역을 갖는 모노클로날 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 엘로투주맵(HuLuc 63)으로 칭해지는 모노클로날 항체는 각각 서열 번호 41 및 서열 번호 44의 VH 및 VL 영역을 갖는 것으로 미국 특허 공개 제 2006/0024296호에 개시되었는데, 이의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 엘로투주맵은 서열 번호 3의 전체 중쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 4의 전체 경쇄 아미노산 서열을 갖는다. 엘로투주맵은 원발성 골수종 세포에서의 시험관내 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 및 생체내 항종양 활성을 나타낸다(문헌[Hsi *et al.*, (2008) Clin. Cancer Res. 14(9):2775]).

[0109] 본 발명은 엘로투주맵 분자의 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서, 글리칸 중 4% 이상은 푸코스가 결여되어 있는데, 이는 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된다. 예를 들어, 엘로투주맵 상의 글리칸 중 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상 또는 8% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된 엘로투주맵의 비푸코실화 글리칸은 N-결합 글리칸, 예컨대 G0-GlcNAC-푸코스 및 만노스5 글리칸을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 이들 실시 양태에서, N-결합 글리칸 중 4% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 총 글리칸 중 2.5% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재하는 엘로투주맵 분자를 제공한다. 예를 들어, 엘로투주맵 상의 글리칸 중 3% 이상, 4% 이상 또는 5% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재할 수 있다.

[0110] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 5의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열 번호 6의 아미노산 서열의 VL 영역을 갖는 모노클로날 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 다클리주맵으로 칭해지는 모노클로날 항체는 림프구 활성화의 중요한 매개자인 인간 인터류킨-2 수용체(IL-2R)의 알파 서브유닛(CD25 또는 Tac로도 칭해짐)에 특이적으로 결합하는 인간화 IgG<sub>1</sub> 항체이다. 다클리주맵은 서열 번호 7의 전체 중쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 전체 경쇄 아미노산 서열을 갖는다.

[0111] 본 발명은 다클리주맵 분자의 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서, 글리칸 중 3% 이상은 푸코스가 결여되어 있는데, 이는 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된다. 예를 들어, 다클리주맵 상의 글리칸 중 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상 또는 8% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된 다클리주맵의 비푸코실화 글리칸은 N-결합 글리칸, 예컨대 G0-GlcNAC-푸코스 및 만노스5 글리칸을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 이들 실시 양태에서, N-결합 글리칸 중 3% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 총 글리칸 중 2.5% 이상이 만노스5 글리 a a 칸으로 존재하는 다클리주맵 분자를 제공한다. 예를 들어, 다클리주맵 상의 글리칸 중 3% 이상, 4% 이상 또는 5% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재할 수 있다.

[0112] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 9의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열 번호 10의 아미노산 서열의 VL 영역을 갖는 모노클로날 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 볼록시시맵으로 칭해지는 모노클로날 항체는 다양한 진행형 병기의 종양의 치료에 사용되는  $\alpha_5\beta_1$  인테그린에 특이적으로 결합하는 고 친화도 IgG4 키메라(82% 인간, 18% 쥐과) 모노클로날 항체(mAb)이다. 볼록시시맵은 서열 번호 11의 전체 중쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 12의 전체 경쇄 아미노산 서열을 갖는다.

[0113] 본 발명은 볼록시시맵 분자의 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서, 글리칸 중 1% 이상은 푸코스가 결여되어 있는데, 이는 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된다. 예를 들어, 볼록시시맵 상의 글리칸 중 1% 이상

은 푸코스가 결여되어 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된 볼록시시맙의 비푸코실화 글리칸은 N-결합 글리칸, 예컨대 G0-G1cNAC-푸코스 및 만노스5 글리칸을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 이들 실시 양태에서, N-결합 글리칸 중 1% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 총 글리칸 중 0.5% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재하는 볼록시시맙 분자를 제공한다.

[0114] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 13의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열 번호 14의 아미노산 서열의 VL 영역을 갖는 모노클로날 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. PDL241로 칭해지는 모노클로날 항체는 단백질 CS1에(그러나, 엘로투주맙과는 다른 에피토프에서) 결합하는 인간화 IgG<sub>1</sub> 항체이다. PDL241은 서열 번호 15의 전체 중쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 16의 전체 경쇄 아미노산 서열을 갖는다.

[0115] 본 발명은 PDL241 분자의 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서, 글리칸 중 14% 이상은 푸코스가 결여되어 있는데, 이는 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된다. 예를 들어, PDL241 상의 글리칸 중 14% 이상, 15% 이상, 16% 이상, 17% 이상, 18% 이상 또는 19% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된 PDL241의 비푸코실화 글리칸은 N-결합 글리칸, 예컨대 G0-G1cNAC-푸코스 및 만노스5 글리칸을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 이들 실시 양태에서, N-결합 글리칸 중 14% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 총 글리칸 중 8% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재하는 PDL241 분자를 제공한다. 예를 들어, PDL241 상의 글리칸 중 9% 이상, 10% 이상, 11% 이상 또는 12% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재할 수 있다.

[0116] 또 다른 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 서열 번호 17의 아미노산 서열의 VH 영역 및 서열 번호 18의 아미노산 서열의 VL 영역을 갖는 모노클로날 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 에나바투주맙(PDL192)으로 칭해지는 모노클로날 항체는 하기의 2가지 기작을 통하여 전임상 모델에서 항종양 활성을 나타내는 트윙크R(TweakR)에 대한 인간화 IgG<sub>1</sub> 항체이다: 트윙크R을 통한 직접적인 신호전달 및 항체 의존성 세포 독성. 에나바투주맙은 서열 번호 19의 전체 중쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 20의 전체 경쇄 아미노산 서열을 갖는다.

[0117] 본 발명은 에나바투주맙 분자의 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서, 글리칸 중 5% 이상은 푸코스가 결여되어 있는데, 이는 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된다. 예를 들어, 에나바투주맙 상의 글리칸 중 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상 또는 10% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 세포 배양 공정에 따라 생성된 에나바투주맙의 비푸코실화 글리칸은 N-결합 글리칸, 예컨대 G0-G1cNAC-푸코스 및 만노스5 글리칸을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 이들 실시 양태에서, N-결합 글리칸 중 5% 이상은 푸코스가 결여되어 있다. 다른 실시 양태에서, 본 발명은 총 글리칸 중 2.5% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재하는 에나바투주맙 분자를 제공한다. 예를 들어, 엘로투주맙 상의 글리칸 중 3% 이상, 4% 이상 또는 5% 이상이 만노스5 글리칸으로 존재할 수 있다.

[0118] 하기 표 7은 상기에서 확인된 엘로투주맙, 다클리주맙, 볼록시시맙, PDL241 및 에나바투주맙의 서열을 제공한다.

표 7

엘로투주막, 다클리주막, 불룩시시막, PDL241 및 에나바투주막의 서열

표 7		
서열 번호	설명	서열
1	엘로투주막 중쇄 가변 영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFSRYYMSWVRQAPGKGLEWIGINPDSSITINYPAPSLK DKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQTLVTVSS
2	엘로투주막 경쇄 가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGIAYAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPRFSGSG SGTIDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYSSYPYTFGQGTKVEIK
3	엘로투주막 중쇄 전체 서열	MDFGLIFFIVALLKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDFSRYYMSWVRQAPGKGLE WIGINPDSSITINYPAPSLKDKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPPELLGGPSVFL FPPKPKDITLMISRTPDEVTCVVDVDSHEDPEVFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
4	엘로투주막 경쇄 전체 서열	METHSQVFVYMLLWLSGVEGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGIAYAWYQQKPGKVP KLLIYWASTRHTGVPRFSGSGGTIDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYSSYPYTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSS TLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	다클리주막 중쇄 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCAGGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYNPSTGYTEYNQKF KDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGVFDYWGGGTLITVSS
6	다클리주막 경쇄 가변 영역	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSISYMHVYQQKPGKAPKLLIYTTSNLASGVPARFSGSGSG TEFTLTISSLQPDDFATYYCHQRSTYPLTFGSGTKVEVQR



[0120]

표 7		
서열 번호	설명	서열
7	다클리주마 중쇄 전체 서열	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCCKASGYTFISYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKF KDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYW'QGTTILTVSSGPSVFPPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQIYICN VNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCAPPELLGGPSVFLPPKPKDITLMISRTPPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEV'HNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKKTIPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	다클리주마 경쇄 전체 서열	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCSASSISYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLASGVPARFSGSGG TEFTLTISSLQPDDEATYYCHQRTSYPLTFGSGTKVEVKTVAAPSVEFPPSPDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLILSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNR
9	불록시시마 중쇄 가변 영역	QVQLKESGPGLVAPSQSLSIITCTISGFSLTDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSSITYNSALKSR MTIRKDNSKQVFLIMNSLQIDDSAMYYCARHGTYYGMITTIGDALDYWGQGTSTVTVSS
10	불록시시마 경쇄 가변 영역	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMITCTASSSVSSNYLHWYQQKPGSAPNLWITYSTSNLASGVPARFSGS GSGTYSYSLTISSMEAEADAATYYCHQYLRSPPTFGGKTLEIKR
11	불록시시마 중쇄 전체 서열	QVQLKESGPGLVAPSQSLSIITCTISGFSLTDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSSITYNSALKSR MTIRKDNSKQVFLIMNSLQIDDSAMYYCARHGTYYGMITTIGDALDYWGQGTSTVTVSSATKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKITYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDITLMISRTPPEV CVVVDV'SQEDPEVQFNWYVDGVEV'HNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTIPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	불록시시마 경쇄 전체 서열	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMITCTASSSVSSNYLHWYQQKPGSAPNLWITYSTSNLASGVPARFSGS GSGTYSYSLTISSMEAEADAATYYCHQYLRSPPTFGGKTLEIKRTVAAPSVEFPPSPDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLILSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

[0121]

표 7		
서열 번호	설명	서열
13	PDL241 종새 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSWMNWRQAPQGQGLEWIGRIYPGDGDITKYNKGFKGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCARSTMIATGAMDYWGQGTLVTVSS
14	PD241 경새 가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFTGSGSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQHYSTPPYTFGGGTVKEIKR
15	PDL241 종새 전체 서열	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSWMNWRQAPQGQGLEWIGRIYPGDGDITKYNKGFKGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCARSTMIATGAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPAPPELLGGPSVFLPPKPKDQLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	PDL241 경새 전체 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFTGSGSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQHYSTPPYTFGGGTVKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	에나바투주립 종새 가변 영역	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMVSWVRQAPGKGLWVAEIRLKSDNYATHYAE SVKGRFTISRDDSKNSLYIQMNSLRAEDTAVYYCTGYADAMDYWGQGTLVTVSS
18	에나바투주립 종새 가변 영역	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASNLESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQHSWEIPYTFGGGTVKEIKR
19	에나바투주립 종새 전체 서열	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMVSWVRQAPGKGLWVAEIRLKSDNYATHYAE SVKGRFTISRDDSKNSLYIQMNSLRAEDTAVYYCTGYADAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPAPPELLGGPSVFLPPKPKDQLMSRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

표 7		
서열 번호	서열	서열
20	PDL241 경쇄 전체 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASNLESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDFAITYYCOHSWEIPYTFGGGIKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0122]

[0123] 5.7. 제약 조성물

[0124] 상기에 기술된 당단백질 조성물은 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 살균 제약 조성물의 일부로서 공급될 수 있다. 이 조성물은 (이것을 환자에게 투여하는 요망되는 방법에 따라) 임의의 적합한 형태로 존재할 수 있다. 당단백질 조성물은 경구 투여, 경피 투여, 피하 투여, 비강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 척추강내 투여, 국소 투여 또는 국부 투여와 같은 다양한 경로에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 임의의 주어진 경우에 있어서 투여에 가장 적합한 경로는 특정 당단백질, 대상체, 및 질환의 성질 및 중증도와, 대상체의 건강 상태에 따라 달라진다. 전형적으로, 당단백질 조성물은 정맥내 또는 피하 투여된다.

[0125] 제약 조성물은 편리하게는 용량당 본 발명의 당단백질 조성물의 소정량을 함유하는 단위 투약 형태로 제시될 수 있다. 이러한 단위는 예를 들어, 그러나 한정됨이 없이, 0.5 mg 내지 5 g, 예를 들어 10 mg 내지 1 g, 또는 20 내지 50 mg을 함유할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 제약상 허용가능한 담체는 예를 들어 치료될 병태 또는 투여 경로에 따라 매우 다양한 형태를 취할 수 있다.

[0126] 본 발명의 당단백질 조성물의 치료적 제형은 요망되는 정도의 순도를 갖는 당단백질을 당업계에서 전형적으로 이용되는 임의적인 제약상 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제(이들 모두는 본원에서 "담체"로 칭해짐), 즉, 완충제, 안정화제, 보존제, 등장제, 비이온성 세제, 항산화제 및 다른 기타 첨가제와 혼합함으로써 수성 용액 또는 동결건조된 제형으로서의 보관용으로 제조될 수 있다. 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th



edition (Osol, ed. 1980)]을 참조한다. 이러한 첨가제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수령체에게 비독성이어야 한다.

[0127] 완충제는 생리학적 조건에 가까운 범위 내에서 pH를 유지하는 것을 돕는다. 완충제는 약 2 mM 내지 약 50 mM의 범위의 농도로 존재할 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 완충제는 유기산 및 무기산 둘 모두와 이들의 염, 예컨대 시트레이트 완충제(예를 들어, 시트르산일나트륨-시트르산이나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산삼나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산일나트륨 혼합물 등), 숙시네이트 완충제(예를 들어, 숙신산-숙신산일나트륨 혼합물, 숙신산-수산화나트륨 혼합물, 숙신산-숙신산이나트륨 혼합물 등), 타르테이트 완충제(예를 들어, 타르타르산-타르타르산나트륨 혼합물, 타르타르산-타르타르산칼륨 혼합물, 타르타르산-수산화나트륨 혼합물 등), 푸마레이트 완충제(예를 들어, 푸마르산-푸마르산일나트륨 혼합물, 푸마르산-푸마르산이나트륨 혼합물, 푸마르산일나트륨-푸마르산이나트륨 혼합물 등), 글루코네이트 완충제(예를 들어, 글루콘산-소듐 글리코네이트 혼합물, 글루콘산-수산화나트륨 혼합물, 글루콘산-글루콘산칼륨 혼합물 등), 옥살레이트 완충제(예를 들어, 옥살산-옥살산나트륨 혼합물, 옥살산-수산화나트륨 혼합물, 옥살산-옥살산칼륨 혼합물 등), 락테이트 완충제(예를 들어, 락트산-락트산나트륨 혼합물, 락트산-수산화나트륨 혼합물, 락트산-락트산칼륨 혼합물 등) 및 아세테이트 완충제(예를 들어, 아세트산-아세트산나트륨 혼합물, 아세트산-수산화나트륨 혼합물 등)를 포함한다. 부가적으로, 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제 및 트리메틸아민염, 예컨대 트리스(Tris)가 사용될 수 있다.

[0128] 보존제가 미생물 성장의 지연을 위하여 첨가될 수 있으며, 이는 0.2% 내지 1%(w/v)의 범위의 양으로 첨가될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 보존제는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레졸, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤잘코늄 할라이드(예를 들어, 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드), 헥사메토늄 클로라이드, 및 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레소르시놀, 시클로헥산을 및 3-펜탄올을 포함한다. 때때로 "안정제"로 공지된 등장제가 본 발명의 액체 조성물의 등장성의 보장을 위하여 첨가될 수 있으며, 이는 다가 당 알코올, 예를 들어 3가 이상의 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다. 안정제는 벌킹제(bulking agent)로부터 첨가제까지의 기능의 범위일 수 있는 넓은 카테고리의 부형제를 나타내는데, 상기 첨가제는 치료제를 가용화하거나 변성 또는 용기 벽에의 유착의 방지를 돕는다. 전형적인 안정제는 다가 당 알코올(상기에 열거됨); 아미노산, 예컨대 아르기닌, 라이신, 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등, 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 리비톨, 미오이니시톨, 갈락티톨, 글리세롤 등(시클리톨, 예컨대 이노시톨을 포함함); 폴리에틸렌 글리콜; 아미노산 중합체; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타티온, 티옥티산, 티옥리콜산나트륨, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 티오황산나트륨; 저분자량 폴리펩티드(예를 들어, 10개 잔기 이하의 펩티드); 단백질; 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐 피롤리돈, 단당류, 예컨대 자일로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스; 이당류, 예컨대 락토스, 말토스, 수크로스 및 삼당류, 예컨대 라피노스; 및 다당류, 예컨대 텍스트란일 수 있다. 안정제는 활성 단백질 1 중량부당 0.1 내지 10,000 중량부의 범위로 존재할 수 있다.

[0129] 비이온성 계면활성제 또는 세제("습윤제"로도 공지됨)를 첨가하여 당단백질의 가용화를 돕고, 이외에도, 교반 유도된 응집에 대하여 당단백질을 보호할 수 있는데, 이는 제형이 단백질의 변성을 야기하지 않고서 응력을 받는 전단 표면에 노출되는 것을 또한 가능하게 한다. 적합한 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트(20, 80 등), 폴록사머(polyoxamer)(184, 188 등), 플루로닉(Pluronic) 폴리올, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르(트윈(TWEEN)<sup>®</sup>-20, 트윈<sup>®</sup>-80 등)를 포함한다. 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 예를 들어 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml의 범위로 존재할 수 있다.

[0130] 추가의 기타 부형제는 벌킹제(예를 들어, 녹말), 킬레이팅제(예를 들어, EDTA), 항산화제(예를 들어, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E), 및 공용매를 포함한다.

## [0131] 5.8. 치료 방법

### [0132] 5.8.1. 엘로투주맙 및 PDL241 조성물

[0133] 섹션 5.6에 기술된 엘로투주맙 및 PDL241 조성물은 예를 들어 다발성 골수종을 비롯하여 신생물성 세포 상에서의 단백질 CS1의 발현 증가가 연루된 것으로 생각되는 다양한 장애 및 병태를 치료하는 데 유용하다. 특정한 환자 집단, 제형, 투여 양식 및 다발성 골수종의 치료 또는 예방에 유용한 투여량 및 투여 스케줄은 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,709,610호에 기술되어 있다. 모든 이러한 제형, 투여 양식, 투약량 및 투약 스케줄과,

개시된 특정 환자 집단 및 병용 요법은 본원에 기술된 엘로투주맙 및 PDL241 조성물에 동일하게 적합하다.

[0134] 본원에 기술된 엘로투주맙 및 PDL241 조성물 및 제형은 치료적 이득을 제공하는 양으로 투여된다. 치료적 이득은 근원적인 장애의 치료를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 또한 치료적 이득은 표준 진단 테스트 및 다른 테스트를 이용하여 평가될 경우 특정 질환의 증상 또는 부작용을 개선시키거나 호전시키는 것을 포함할 수 있다. 다발성 골수종에 있어서, 치료적 이득을 평가하는 다양한 수단이 미국 특허 제7,709,610호에 기술되어 있다. 모든 이러한 다양한 테스트는 다발성 골수종을 앓고 있는 환자의 맥락에서 치료적 이득을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0135] 5.8.2. 볼록시시맙 조성물

[0136] 섹션 5.6에 기술된 볼록시시맙 조성물은 예를 들어 다양한 고형 종양을 비롯하여  $\alpha_5\beta_1$ 인테그린이 연루된 것으로 생각되는 다양한 장애 및 병태를 치료하는 데 유용하다. 특정한 환자 집단, 제형, 투여 양식 및 고형 종양의 치료 또는 예방에 유용한 투여량 및 투여 스케줄, 혈관 형성의 감소 및 암세포 증식의 축소는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,662,384호에 기술되어 있다. 모든 이러한 제형, 투여 양식, 투약량 및 투약 스케줄과, 개시된 특정 환자 집단 및 병용 요법은 본원에 기술된 볼록시시맙 조성물에 동일하게 적합하다.

[0137] 본원에 기술된 볼록시시맙 조성물 및 제형은 치료적 이득을 제공하는 양으로 투여된다. 치료적 이득은 근원적인 장애의 치료를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 또한 치료적 이득은 표준 진단 테스트 및 다른 테스트를 이용하여 평가될 경우 특정 질환의 증상 또는 부작용을 개선시키거나 호전시키는 것을 포함할 수 있다. 종양의 치료에 있어서, 치료적 이득을 평가하는 다양한 수단이 미국 특허 제7,662,384호에 기술되어 있다. 모든 이러한 다양한 테스트는 암을 앓고 있는 환자의 맥락에서 치료적 이득을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0138] 5.8.3. 에나바투주맙 조성물

[0139] 섹션 5.6에 기술된 에나바투주맙 조성물은 예를 들어 다양한 고형 종양을 비롯하여 트위크 수용체(트위크R)가 연루된 것으로 생각되는 다양한 장애 및 병태를 치료하는 데 유용하다. 특정한 환자 집단, 제형, 투여 양식 및 고형 종양의 치료 또는 예방에 유용한 투여량 및 투여 스케줄, 혈관 형성의 감소 및 암세포 증식의 축소는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2009/0074762호에 기술되어 있다. 모든 이러한 제형, 투여 양식, 투약량 및 투약 스케줄과, 개시된 특정 환자 집단 및 병용 요법은 본원에 기술된 에나바투주맙 조성물에 동일하게 적합하다.

[0140] 본원에 기술된 에나바투주맙 조성물 및 제형은 치료적 이득을 제공하는 양으로 투여된다. 치료적 이득은 근원적인 장애의 치료를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 또한 치료적 이득은 표준 진단 테스트 및 다른 테스트를 이용하여 평가될 경우 특정 질환의 증상 또는 부작용을 개선시키거나 호전시키는 것을 포함할 수 있다. 종양의 치료에 있어서, 치료적 이득을 평가하는 다양한 수단이 미국 특허 공개 제2009/0074762호에 기술되어 있다. 모든 이러한 다양한 테스트는 암을 앓고 있는 환자의 맥락에서 치료적 이득을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0141] 6. 실시예

[0142] 본원에 기술된 본 발명의 다양한 측면 및 태양을 하기 실시예에 의해 추가로 설명한다. 특정 실시 양태(상기 개요에 있든지 하기 실시예에 있든지 간에)와 관련하여 기술한 특징은 본 발명의 방법 및 조성물의 바람직한 특성에 실질적으로 영향을 주지 않고서 벗어날 수 있으며, 더욱이, 상기 상이한 실시 양태들은 이들이 명백하게 상호 배제적인 것이 아니라면 다양한 방식으로 함께 조합되어 이용될 수 있다. 따라서, 하기에 제공된 실시예는 예시적인 것으로 의도되며, 한정하는 것으로 의도되는 것은 아니고, 하기 특허청구범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다.

[0143] 6.1. NSO 안정 세포주의 생성

[0144] 6.1.1. 엘로투주맙

[0145] 문헌[Hartman *et al.*, 2007, Biotechnol. Bioeng. 96(2):294-306]에 기술된 바와 같이 마우스 골수종 세포주 NSO-W(W는 NSO 세포에서 혈청 및 콜레스테롤에 대한 그의 필요성이 끊겼음을 나타냄)를 단백질 무함유 기초 배지에서 유지하였다. NSO-W 세포를 전기천공에 의해 pHuLuc63 발현 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 상기 발현 플라스미드가 안정하게 통합된 형질감염체를 10% 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM 배지에서 마이코페놀산의 존재 하에 선발하였다. 높은 수준의 HuLuc63을 생성한 NSO-W 형질감염체로부터 출발하여, 제한 희석에 의해 서브

클로닝(subcloning)을 수행하였다. 허용가능한 생산성 및 생성물 특성을 갖는 서브클론을 최종 생산 세포주로 선발하고, 192-C17로 명명하였다.

[0146] 6.1.2. 다클리주맙

[0147] 마우스 골수종 세포주 NS0를 유러피안 콜렉션 오브 셀 컬처즈(European Collection of Cell Cultures)(ECACC 카탈로그 번호: 85110503, 영국 윌트셔 살리스베리 소재)로부터 획득하였다. 이러한 NS0 세포의 바이알을 10% FBS가 보충된 DMEM 내로 해동시켰다. 후속적으로, 상기 세포를 1 mg/mL의 BSA가 보충된 기초 배지 SFM-3에서 배양하였다. SFM-3은 10 mg/L의 인슐린 및 10 µg/mL의 트랜스페린(Transferrin)이 보충된 햄 F-12 및 DMEM의 1:1 혼합물이다. 대략 3개월의 기간에 걸쳐, 배양 배지에 존재하는 FBS의 양을 상기 FBS가 제거될 때까지 점진적으로 감소시키고, 그 후 마지막으로, BSA를 단일 단계에서 제거함으로써 보충물이 없는 SFM-3에 NS0 세포를 적응시켰다. 생성된 숙주 세포주를 SFM-3에서 15 내지 20회 계대하고, 냉동 은행을 제조하였다.

[0148] SFM-3 적응된 세포를 전기천공에 의해 pHAT.IgG1.rg.dE로 형질감염시켰다. 상기 벡터가 안정하게 통합된 형질감염체를 10% 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM 배지에서 마이코페놀산의 존재 하에 선발하였다. 높은 수준의 DAC HYP를 생성한 NS0 안정 형질감염체로부터 출발하여, 제한 회색 클로닝 또는 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting; FACS) 중 어느 하나에 의해 서브클로닝을 수행하였다. 허용가능한 생산성 및 생성물 특성을 갖는 서브클론을 최종 생산 세포주로 선발하고, 7A11-5H7-14-43으로 명명하였다.

[0149] 6.1.3. 블록시시맙

[0150] M200 생산 세포주, 46-12는 발현 플라스미드 P-200M으로 형질감염시킨 NS0-W 세포로부터 유래시켰다. 형질감염 이전에, ECACC로부터 수령한 NS0 세포(ECACC 번호: 85110503)를 PDLPTJ 혈청 무함유 및 콜레스테롤 무함유 조건에 적응시키고, NS0-W로 명명하였다. NS0-W 세포를 전기천공에 의해 P-200M 발현 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 상기 발현 플라스미드가 안정하게 통합된 형질감염체를 5% 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM 배지에서 마이코페놀산의 존재 하에 선발하였다. 높은 수준의 M200을 생성한 NS0-W 형질감염체로부터 출발하여, 제한 회색 클로닝에 의해 서브클로닝을 수행하였다. 허용가능한 생산성 및 생성물 특성을 갖는 서브클론을 최종 생산 세포주로 선발하고, 46-12로 명명하였다.

[0151] 6.1.4. PDL241

[0152] 문헌[Hartman *et al.*, 2007, Biotechnol. Bioeng. 96(2):294-306]에 기술된 바와 같이 마우스 골수종 세포주 NS0-W(W는 NS0 세포에서 혈청 및 콜레스테롤에 대한 그의 필요성이 끊었음을 나타냄)를 단백질 무함유 기초 배지에서 유지하였다. NS0-W 세포를 전기천공에 의해 PDL241 발현 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 상기 발현 플라스미드가 안정하게 통합된 형질감염체를 10% 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM 배지에서 마이코페놀산의 존재 하에 선발하였다. 높은 수준의 PDL241을 생성한 NS0-W 형질감염체로부터 출발하여, 제한 회색 클로닝에 의해 서브클로닝을 수행하였다. 허용가능한 생산성 및 생성물 특성을 갖는 서브클론을 선발하고, 26-5C6으로 명명하였다.

[0153] 6.1.5. 에나바투주맙

[0154] 문헌[Hartman *et al.*, 2007, Biotechnol. Bioeng. 96(2):294-306]에 기술된 바와 같이 마우스 골수종 세포주 NS0-W(W는 NS0 세포에서 혈청 및 콜레스테롤에 대한 그의 필요성이 끊었음을 나타냄)를 단백질 무함유 기초 배지에서 유지하였다. NS0-W 세포를 전기천공에 의해 pHu19.2.1 발현 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 상기 발현 플라스미드가 안정하게 통합된 형질감염체를 10% 소 태아 혈청을 함유하는 DMEM 배지에서 마이코페놀산의 존재 하에 선발하였다. 높은 수준의 PDL192를 생성한 NS0-W 형질감염체로부터 출발하여, 제한 회색에 의해 서브클로닝을 수행하였다. 허용가능한 생산성 및 생성물 특성을 갖는 서브클론을 최종 생산 세포주로 선발하고, 299-9로 명명하였다.

[0155] 6.2. 항체의 생성

[0156] 6.2.1. 세포의 배양 및 회수

[0157] 세포를 단일 세포 은행 바이알로부터 해동시키고, T-플라스크, 롤러 보틀(roller bottle), 스핀너(spinner) 플라스크 및 생물반응기 내에서, 생성 규모가 달성될 때까지 점진적으로 더 큰 부피로 확장시킨다. 생산 배양의 완료시에, 세포 배양액을 원심분리 및 침출 여과에 의해 청정시키고, 수확물 저장 탱크로 옮긴다. 생산 배양 지속 시간은 대략 10일이다.

[0158] 세포의 배양 및 회수는 당업계에 공지된 바와 같이, 표준 장비를 이용하여 다양한 상이한 세포 배양 설비에서 실시할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 세포를 단일 세포 은행 바이알로부터 해동시키고, 진탕 플라스크 및 생물 반응기 내에서, 생성 규모가 달성될 때까지 점진적으로 더 큰 부피로 확장시킨다. 생산 배양의 완료시에, 세포 배양액을 원심분리 및 침출 여과에 의해 청정시키고, 수확물 저장 탱크로 옮긴다. 생산 배양 지속 시간은 대략 10일이다.

[0159] 6.2.1.1. 접종물 제조

[0160] 생산 배치는 단일 세포 은행 바이알의 해동에 의해 개시한다. 대조 배지(즉, 가외의 글라이신을 포함하지 않음)를 생성하기 위하여, 세포를 화학적으로 규정된 배지, 단백질 무함유 기초 배지-2(Protein Free Basal Medium-2; PFBM-2)를 포함하는 T-플라스크로 옮긴다. PFBM-2 제조용의 주문 분말(Custom Powder)은 NaCl, 페놀 레드, 트랜스페린 및 인슐린을 포함하지 않고, 소정량의 EDTA 철 (III) 나트륨염을 포함하는, 제조된 하이브리도마(Hybridoma)-SFM 배지 분말을 요청함으로써 인비트로젠(Invitrogen)에 주문할 수 있는데, 이는 재구성될 경우, 5 mg/L의 농도를 생성하며, 재구성될 경우 농도가 재구성 하이브리도마-SFM과 동일해지도록 조정된 양의 나머지 성분을 갖는다. 제조된 PFBM-2 배지는 하기 성분을 함유한다: 8 g/L의 주문 분말; 2.45 g/L의 중탄산나트륨; 3.15 g/L의 NaCl; 및 16.5 g/L의 D-글루코스 일수화물(15 g/L의 글루코스). PFBM-2 배지 중 글라이신의 농도는 2 mM이다.

[0161] 글라이신 배지를 생성하기 위하여, 먼저 PFBM-2를 상기에 설명한 바와 같이 생성한다. 그 후, 추가의 글라이신(예를 들어, 5 mM, 15 mM, 또는 30 mM)을 PFBM-2 배지에 첨가한다. 고 글라이신 배지가 PFBM-2 대조 배지와 대략적으로 동일한 오스몰 농도를 가짐을 보장하기 위하여, 적절한 수준의 NaCl을 첨가함으로써 오스몰 농도를 조정한다. 예를 들어, 표 8은 대략 300 mOsm/kg의 오스몰 농도가 달성되도록 대조 배지 및 3가지의 고 글라이신 배지에 첨가한 NaCl의 양을 나타낸다.

## 표 8

[0162] 대조 배지 및 고 글라이신 배지 중 NaCl의 농도

표 8			
배지	NaCl (g/L)	총 글라이신 (mM)	최종 오스몰 농도 (mOsm/kg)
2L, 대조군	2.8	2	295
2L, 가외의 5 mM Gly을 포함함	2.8	7	298
2L, 가외의 15 mM Gly을 포함함	2.5	17	301
2L, 가외의 30 mM Gly을 포함함	2.1	32	300

[0163] 그 후, 세포를 2일마다 물러 보틀 또는 스피너 플라스크 내로 연속 계대함으로써 확장시킨다. T-플라스크, 물러 보틀 및 스피너 플라스크를 T-플라스크 및 물러 보틀의 경우 7.5% CO<sub>2</sub>의 분위기 하에서 그리고 스피너 플라스크의 경우 5% CO<sub>2</sub>의 분위기 하에서 37℃의 온도 설정점 하에서 작동하는 인큐베이터 내에 둔다.

[0164] 세포 배양물 부피에 따라 상부 공간 내로의 오버레이(overlay)에 의해 또는 배양물 내로의 살포에 의해 5% CO<sub>2</sub>를 스피너 플라스크에 보충하고, 임펠러(impeller) 속도를 일정한 분당 회전수(RPM)으로 제어한다. 모든 접종물 확장 계대에서의 표적 접종 밀도는 대략  $2.5 \times 10^5$ 개의 생존성 세포/mL이다.

[0165] 그 후, 세포를 2일마다 진탕 플라스크 내로 연속 계대함으로써 확장시킨다. 진탕 플라스크를 7.5% CO<sub>2</sub>의 분위기 하에 37℃의 온도 설정점 하에 작동하는 인큐베이터 내에 둔다.

[0166] 진탕 플라스크를 인큐베이터 내의 진탕기 플랫폼(platform) 상에서 일정한 분당 회전수(RPM)에서 교반시킨다. 모든 접종물 확대 계대에서의 표적 접종 밀도는 대략  $2.2 - 2.5 \times 10^5$ 개의 생존성 세포/mL이다.

[0167] 세포 은행을 해동시킨지 대략 14일 후에, 충분한 수의 생존성 세포가 생성되었을 때, 몇 개의, 전형적으로 3개 또는 4개의 스테인리스강 교반 탱크식 시드(seed)용 생물반응기 중 첫 번째의 것에 접종한다. 사용 이전에, 시드용 생물반응기를 제자리에서 세정하고, 제자리에서 스팀 처리하고, 적절한 부피의 PFBM-2 배양 배지를 로딩한다. 생물반응기를 제자리에서 스팀 처리하기 전에 pH 및 용존 산소 탐침자를 보정한다.  $2.0 - 2.5 \times 10^5$ 개의 생



존성 세포/mL의 초기 세포 밀도를 표적화하기에 충분한 수의 세포를 제1 시드용 생물반응기에 접종한다. 더 큰 부피로의 순차적인 이전(전형적으로, 100 L에서 300 L로, 그 후 1,000 L의 시드용 생물반응기로, 또는 60 L에서 235 L, 950 L, 및 3750 L의 시드용 생물반응기로)을 각각의 반응기에서의 대략 2일간의 성장 및  $2.0 - 2.5 \times 10^5$  개의 생존성 세포/mL의 표적 초기 세포 밀도 후 수행한다. 배양물 pH를 자동 제어를 통하여 1 M 탄산나트륨( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 또는  $\text{CO}_2$  가스의 첨가에 의해 유지한다. 시드용 및 생성용 생물반응기의 표적 작동 조건은 37°C의 온도 설정점, pH 7.0 및 30%의 용존 산소(공기 포화도의 백분율로서)를 포함한다. 100 L, 300 L 및 1,000 L의 생물반응기를 각각 100 rpm, 80 rpm 및 70 rpm에서 교반시킨다. 일부 예에서, 시드용 및 생성용 생물반응기의 표적 작동 조건은 37°C의 온도 설정점,  $\text{CO}_2$  살포 및 염기 첨가 제어에 의한 7.0의 pH 및 30%의 용존 산소(공기 포화도의 백분율로서)를 포함한다. 상기 더 큰 부피의 생물반응기를 100 rpm, 80 rpm, 70 rpm, 또는 40 rpm의 속도로 교반시킬 수 있다.

[0168] 6.2.2. 세포 배양물 생성용 생물반응기

[0169] 1,000 L의 시드용 생물반응기에서 대략 2일 후, 접종물을 스테인리스강 교반 탱크식 생성용 생물반응기 내로 이전시킨다. 생성용 생물반응기는 대략 10,000 L의 작동 부피를 갖는다. 사용 이전에, 생물반응기를 제자리에서 세정하고, 제자리에서 스팀 처리하고, 대략 4,000 L의 PFBM-2 대조 배지 또는 고 글라이신 배지를 로딩한다. 생물반응기를 제자리에서 스팀 처리하기 전에 pH 및 용존 산소 탐침자를 보정한다.

[0170] 또 다른 실시예에서, 작동 부피가 대략 15,000 L인 스테인리스강 교반 탱크식 생성용 생물반응기로 이전시키기 전에 상기 접종물을 3750 L의 시드용 생물반응기에서 성장시키는데, 상기 생성용 생물반응기는 제자리에서 세정하고, 제자리에서 스팀 처리하고, 대략 4,000-7,000 L의 PFBM-2 배지 또는 고 글라이신 배지를 로딩한 후 사용한다.

[0171] 생성용 생물반응기의 표적 접종 밀도는  $2.0-2.5 \times 10^5$  개의 생존성 세포/mL의 범위이다. 화학적으로 규정된 단백질 무함유 영양공급 배지 농축물(PFFM-3)(PFFM3 하위성분(subcomponent) 1 및 하위성분 2, L-글루타민, D-글루코스, 제이인산나트륨 칠수화물, L-타이로신, 폴산, 염산 및 수산화나트륨을 계구성함으로써 제조한, 화학적으로 규정된 농축 영양공급 배지)을 배양 동안 첨가한다. PFFM3은 표 9에 나타난 성분을 함유한다.

표 9

[0172] PFFM3 배지 성분

성분	농도
PFFM3의 하위성분 1 (아미노산)	20.4 g/L로 제조
PFFM3의 하위성분 2 (비타민 및 미량 원소)	4.93 g/L로 제조
L-글루타민	11.0 g/L로 제조
D-글루코스	28.0 g/L로 제조
L-타이로신, 이나트륨염	1.32 g/L로 제조
폴산	0.083 g/L로 제조
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.74 g/L로 제조
수산화나트륨	달라짐, pH 제어용
글레이셜(Glacial) 염산	달라짐, pH 제어용
WFI수	

[0173] PFFM3의 하위성분 1은 하기 표 10에 나타난 성분을 함유한다:

표 10

[0174] PFFM3의 하위성분 1

배지 성분	MW (g/mole)	농도 (mg/L)	농도 (mM)
L-아르기닌 HCl	211.	1,900	9.00E+00
무수 L-아스파라긴	132.1	1,320	9.99E+00
L-아스파르트산	133.1	119	8.94E-01
L-시스테인 HCl $\cdot \text{H}_2\text{O}$	176.0	2,030	1.15E+01
L-글루탐산	147.1	510	3.47E+00



글라이신	75.1	157	2.09E+00
L-히스티딘 HCl · H <sub>2</sub> O	210.0	864	4.11E+00
L-이소류신	131.2	1,440	1.10E+01
L-류신	131.2	3,130	2.39E+01
L-라이신 HCl	183.0	2,160	1.18E+01
L-메티오닌	149.2	1,260	8.45E+00
L-페닐알라닌	165.2	918	5.56E+00
L-프롤린	115.1	806	7.00E+00
L-세린	105.1	709	6.75E+00
L-트레오닌	119.1	1,220	1.02E+01
L-트립토판	204.2	408	2.00E+00
L-발린	117.1	1,450	1.24E+01

[0175] PFFM3의 하위성분 2는 하기 표 11에 나타난 성분을 함유한다.

표 11

[0176] PFFM3의 하위성분 2

배지 성분	MW g/mole)	농도 (mg/L)	농도 (mM)
비타민 B-12	1,355.0	10.72	7.91E-03
바이오틴	244.0	0.156	6.39E-04
콜린 클로라이드	140.0	140	1.00E+00
I-이노시톨	180.0	197	1.09E+00
니아신아미드	122.0	31.5	2.58E-01
판토텐산칼슘	477.0	103.1	2.16E-01
피리독신 히드로클로라이드	206.0	0.484	2.35E-03
티아민 히드로클로라이드	337.0	99.8	2.96E-01
푸트레신(Putrescine) 2HCl	161.1	6.66	4.13E-02
DL-리포익 티옥탄산	206.0	4.84	2.35E-02
피루브산나트륨	110.0	1,716	1.56E+01
에탄올아민 HCl	97.54	76.1	7.80E-01
β-메르캅토에탄올	78.13	60.9	7.80E-01
리놀레산	280.48	0.655	2.34E-03
플루로닉 F-68	8,350.0	780	9.34E-02
염화칼륨	74.55	432	5.79E+00
리보플라빈	376.0	3.42	9.09E-03
무수 염화마그네슘	95.21	446	4.69E+00
무수 황산마그네슘	120.4	762	6.33E+00
아셀렌산나트륨	172.9	0.140	8.12E-04
황산제이구리 · 5H <sub>2</sub> O	249.7	0.1069	4.28E-04
황산제일철 · 7H <sub>2</sub> O	278.0	6.51	2.34E-02
질산칼륨	101.1	0.593	5.86E-03
황산아연 · 7H <sub>2</sub> O	287.5	15.0	5.23E-02
황산망간 일수화물	169.01	0.00264	1.56E-05
염화니켈 육수화물	237.7	0.00186	7.81E-06
염화제일주석 2H <sub>2</sub> O	225.63	0.001130	5.01E-06
몰리브덴산암모늄 4H <sub>2</sub> O	1,235.86	0.00193	1.57E-06
암모늄 메타바나테이트	116.98	0.00913	7.80E-05
소듐 메타실리케이트 9H <sub>2</sub> O	284.2	2.22	7.79E-03
EDTA, 철(III), 나트륨염	367.05	31.2	8.50E-02

[0177] 배양물체의 PFFM-3의 첨가의 타이밍 및 양은 하기 표 12에 나타난 바와 같이 나타난다:

표 12

[0178]

예시적인 DAC HYP 생물반응기 영양공급 스케줄

일(day)	PFFM-3의 양 (초기 질량의 %)
0	0
1	0
2	4-4.14
3	7.8-8.08
4	7.8-8.08
5	7.8-8.08
6	11-11.38
7	13-13.46
8	15-15.52
9	15-15.52
10	0

[0179]

배양물 pH는 CO<sub>2</sub> 가스의 자동 제어 및 1 M 탄산나트륨(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 첨가에 의해 대략 pH 7.0, 바람직하게는 pH 7.0 내지 pH 7.1로 유지한다. 용존 산소 함량은 대략 30%의 공기 포화도로 강하시킨다. 산소/공기 혼합물을 배양물 내에 살포하여 일정한 전체 가스 유량을 달성하고, 용존 산소는 필요할 경우 공기 대 산소 가스의 비를 조정함으로써 그리고 최대의 산소 대 공기의 비에 도달한 후 교반 속도를 증가시킴으로써 제어한다. 또 다른 실시예에서, 교반을 조정하여 일정한 동력/부피의 비를 유지한다. 시메티콘 기반의 소포 에멀전을 폼 수준을 기반으로 하여 필요한 것을 기반으로 생물반응기에 첨가한다. 샘플을 주기적으로 취하여 세포 밀도, 세포 생존성, 생성물 농도, 글루코스 및 락테이트 농도, 용존 O<sub>2</sub>, 용존 CO<sub>2</sub>, pH, 및 오스몰 농도에 대하여 테스트한다. 생물반응기 배양물은 집중하지 대략 10일 후에 수확한다. 수확 이전에, 생물반응기 내용물을 프로세싱되지 않은 벌크로서 샘플링한다.

[0180]

영양공급 조건 및 영양공급 스케줄은 역가를 최적화하기 위하여 각각의 항체의 생성에 대하여 조정할 수 있음이 이해된다. 필요할 경우 배양 배지의 오스몰 농도를 조정하여 최적 역가를 수득할 수 있다. 부가적으로, 글루코스 및 글루타민 수준을 생성 시기 동안 조정하여 최적 역가를 유지할 수 있다.

[0181]

### 6.2.3. 수확 및 세포의 제거

[0182]

수확 직전에, 생성용 생물반응기를 먼저 15°C 미만으로 냉각시키고, 그 후 0.5 M 또는 1 M 또는 2 M 시트르산을 이용하여 5.0 ± 0.1의 pH로 조정하고, 대략 30 내지 90분 또는 45 내지 60분의 기간 동안 유지하여 세포 및 세포 잔사를 응집시킨 후 수확용 용기로 이전시킨다. 그 후, pH 조정된 수확물을 배치 보고 문서에 정의된 바와 같이 볼 속도 및 유량에 대한 소정의 파라미터 하에서 작동시키는 연속 원심분리에 의해 청정시킨다.

[0183]

상기 농축물을 침출 필터, 이어서 0.22 μm 막 필터를 통하여 여과시키고, 사전 살균한 탱크 내에 수집한다. 세포 무함유 수확물을 1-2 M의 트리스(Tris) 용액을 이용하여 6.4의 대략적인 pH로 조정하고, 추가의 프로세싱을 위하여 2-8°C에서 보관한다. 일부 예에서, 이러한 pH 조정은 pH 5.0으로의 원래의 생물반응기 pH 조정을 한 지 12시간 이내에 일어난다.

[0184]

### 6.2.4. 항체 정제

[0185]

파일럿(pilot) 규모의 실행(50 리터 이상)으로부터의 수확 물질을 저 pH 바이러스 불활성화 단계, 바이러스 여과 단계, 한외여과/정용여과 단계, 및 제형화 단계와 조합된 3가지의 크로마토그래피 기술(맵셀렉트(MabSelect) 단백질 A 친화성 크로마토그래피, Q-세파로스 음이온 교환 크로마토그래피, 및 CM-세파로스 양이온 교환 크로마토그래피)을 기반으로 하여 정제하였다. 2리터의 수확물로부터의 물질을 단백질 A 컬럼, 이어서 크기 제외 크로마토그래피를 통하여 프로세싱하였다.

[0186]

### 6.3. 글리코실화 프로필의 결정

[0187]

#### 6.3.1. 재료 및 방법

[0188]

상이한 배양 조건(저 글라이신을 이용한 대조 조건 대 고 글라이신을 이용한 실험 조건)으로부터의 정제된 항체를 분석적으로 특성화하였다. 펩티드 지도화를 이용하여 항체 생성물 중 상이한 글리코형을 정량화하였다. 먼저 항체를 디티오트레이톨로 환원시키고, 요오도아세트산으로 알킬화하고, 그 후, 트립신으로 소화시키고, 마지막으로, MS 검출을 이용하여 RP-HPLC로 분석하였다. 각각의 글리코형의 피크 면적을 수득하고, 그 후, 각각의 글

리코형의 상대적인 백분율을 전체 피크 면적으로부터 계산하였다.

[0189]

### 6.3.2. 결과

[0190]

2 mM의 글라이신을 함유하는 대조 기초 배지 또는 15 mM이 보충된 기초 배지(총 농도: 17 mM) 중 어느 하나에서 배양한 NS0 세포로부터 생성한 5가지의 상이한 항체에 존재하는 각각의 글리코형의 상대적인 백분율을 표 13에 나타낸다. 대조 배지에 비하여 글라이신을 보충한 배지에서 형성시킨, 5가지의 상이한 항체에 있어서의 상기 2가지의 비푸코실화 글리코형인 G0-GlcNAc-푸코스 글리코형 및 Man5 글리코형의 백분율 증가가 도 2 및 도 3에 예시되어 있다. 대조군에 비하여 비푸코실화 항체의 합한 전체 백분율 증가가 도 4에 예시되어 있다. 데이터는, 높은 농도의 글라이신 하에서 배양한 세포로부터의 항체가 낮은 농도의 글라이신을 이용한 대조 공정으로부터의 동일 항체보다 더 높은 비푸코실화 글리코형 수준을 나타낸다는 것을 나타낸다. G0-GlcNAc-푸코스 글리코형과 관련하여, 더 높은 글라이신 농도의 배양 배지에서 배양한 세포로부터의 5가지의 항체 중 4가지는 대조군에 비하여 이 글리코형의 150% 내지 거의 300%를 나타낸다. Man5 글리코형과 관련하여, 5가지의 항체 중 4가지의 항체에 있어서의 상기 범위는 대조군에 비하여 150%로부터 200% 초과까지의 이 글리코형이다. 비푸코실화 항체의 총 양을 종합적으로 보면, 모든 5가지의 항체는 세포를 더 높은 글라이신 농도의 배지에서 배양할 때 1.5-2.5배 증가를 나타낸다.

표 13

본 발명에 따른 방법에 의해 생성한 4 가지의 항체의 글리코실화 프로필

표 13						
엘로투주맵	G0-GlcNAc-푸코스	Man 5	전체 비푸코실화 Ab	G0-GlcNAc	G0	G1
1kL 대조군	1.6	2.0	3.6	13.3	68.9	14.2
100L, 가외의 글라이신을 포함함	2.7	4.4	7.1	13.3	70.2	9.4
PDL241						
2L 대조군	4.9	7.4	12.3	20.6	58.0	9.1
2L, 가외의 글라이신을 포함함	6.0	11.8	17.7	20.7	56.6	5.0
PDL192						
1kL 대조군	1.8	2.1	3.9	9.7	76.7	9.7
50L, 가외의 글라이신을 포함함	4.2	4.4	8.6	11.6	75.2	4.5
다클리주맵						
2L 대조군	1.4	1.0	2.4	7.7	72.5	17.4
2L, 가외의 글라이신을 포함함	4	1.9	5.9	14.6	69.3	10.2
M200						
2L 대조군	0.4	0.4	0.8	4.3	66.1	28.8
2L, 가외의 글라이신을 포함함	0.7	0.5	1.2	5.7	80.2	12.9

[0191]

[0192]

용량 응답 연구에서, 2 mM 글라이신을 함유하는 대조 기초 배지 또는 상이한 농도의 글라이신(7, 17, 및 32 mM)이 보충된 기초 배지 중 어느 하나에서 배양한 세포로부터 생성한 항체 PDL192(에나바투주맵)에 존재하는 각각의 글리코형의 백분율을 표 14에 나타낸다. 대조 배지에 비하여 글라이신을 보충한 배지에서 형성시킨, PDL192의 2가지의 비푸코실화 글리코형인 G0-GlcNAc-푸코스 글리코형 및 Man5 글리코형의 백분율 증가가 도 5에 예시되어 있다. 데이터는, 가외의 글라이신을 포함하는 조건 하에서 생성한 PDL192가 대조 공정으로부터 생성한

항체보다 더 높은 비푸코실화 글리코형 수준을 나타낸다는 것을 나타낸다. 더 구체적으로, 비푸코실화 G0-GlcNAc-푸코스 글리코형에 있어서, 상기 글리코형의 양은 용량 의존적인 방식으로 배양 배지 중 글라이신의 농도의 증가에 의해 증가한다. 증가 백분율은 글라이신 농도를 7 mM로부터 32 mM까지 증가시켰을 경우 대조군에 비하여 120%로부터 160% 초과까지의 범위이다.

표 14

표 14							
PDL192	G0-GlcNAc-푸코스	Man5	전체 비푸코실화 Ab	G0-GlcNAc	G0	G1	기준과 비교한 CD16a 결합성
2L 대조군	2.1	5.2	7.3	12.3	70.6	9.8	130
2L, 가외의 5 mM 글라이신을 포함함	2.6	6.3	8.9	15.4	71.3	4.4	146
2L, 가외의 15 mM 글라이신을 포함함	3.3	7.7	11.0	13.5	70.5	4.9	151
2L, 가외의 30 mM 글라이신을 포함함	3.5	6.3	9.8	14.6	71.5	4.0	144

#### 6.4. CD16a 결합성 검정법

##### 6.4.1. 재료 및 방법

CD16a 결합성 검정을 알파스크린(AlphaScreen)(퍼킨엘머(PerkinElmer)) 방법을 이용하여 수행하여 4가지 상이한 항체의 항체 Fc 영역이 인간 CD16a 수용체에 결합하는 결합력을 평가하였다. 먼저 항체 용액을 재조합 인간 CD16a 용액 및 검정 완충제와 혼합하고, 그 후, 알파스크린 공여 비드 및 항체 수용 비드를 첨가하였다. 상기 혼합물을 광 차단된 장소에서 실온에서 4시간 동안 인큐베이션하고, 680 nm의 레이저 여기 및 520-620nm의 광 방출을 이용하여 플레이트 판독기를 사용하여 형광 신호를 검출하였다. 가외의 글라이신을 포함하지 않는 기초 배지에서 배양한 항체 기준물과 비교한 결합력을 기록하였다.

##### 6.4.2. 결과

4가지의 상이한 IgG1 항체(엘로투주맵, 다클리주맵, PDL192 및 PDL241)에 있어서의 CD16a 결합력에 대한 검정으로부터의 결과를 표 15에 나타낸다. 높은 농도의 글라이신 하에서 배양한 세포로부터의 모든 4가지 IgG1 항체는 인간 CD16a 수용체에 대한 결합 친화도의 40% 초과를 일관되게 나타냈으며, 가장 극단적인 경우에, 가외의 글라이신을 포함하지 않는 기초 배지(즉, 2 mM 글라이신의 배양 배지)에서 생성한 대조 항체에 비하여 결합력 면에서 2배 증가를 나타냈다. 도 6은 4가지의 IgG1 항체에 있어서의 CD16a 수용체에 대한 상대적인 결합력을 나타낸다. 그 양은 추가의 글라이신 보충이 없는 대조 기초 배지에서 배양한 NSO 세포에 의해 생성한 동일 항체의 CD16a 결합 친화도에 대한 백분율로서 표현한다.

표 15

본 발명에 따른 방법에 의해 생성한 4 가지의 항체의 CD16a 결합성

표 15	
엘로투주맵	기준과 비교한 CD16a 결합성
1kL 대조군	100%
100L, 가외의 글라이신을 포함함	128%
1kL, 가외의 글라이신을 포함함	146%
PDL241	
2L 대조군	147%
2L, 가외의 글라이신을 포함함	277%
250L 대조군	100%
100L, 가외의 글라이신을 포함함	137%
PDL192	
1kL 대조군(GMP)	65%
1kL 대조군	96%
100L 대조군	110%
50L, 가외의 글라이신을 포함함	136%
다클리주맵	
2L 대조군	69%
2L, 가외의 글라이신을 포함함	137%

[0199]

[0200]

PDL192에서의 용량-응답 연구로부터의 CD16a 결합력 결과를 표 14 및 도 7에 나타낸다. 5, 15 및 30 mM의 가외의 글라이신을 보충한 조건 하에서 배양한 세포로부터의 PDL192는 대조 공정으로부터의 항체보다 더 높은 CD16a 결합 친화성을 나타냈지만, CD16a 결합성이 용량 의존적 증가는 관찰되지 않았다.

[0201]

6.5. 항체 의존성 세포 독성(ADCC)

[0202]

6.5.1. 재료 및 방법

[0203]

발현시킨 항체의 ADCC 활성을 시험관내에서 분석하였다. 먼저, 표적 세포를 <sup>51</sup>Cr으로 표지하고, 이펙터 세포(인간 말초 혈액 단핵 세포, PBMC)를 전혈로부터 준비하였다. 그 후, 상기 세포 및 항체의 용액을 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 상청액 중에서의 방사능을 실험적 방출(E), 자발적 방출(S, 이펙터 세포 및 항체를 포함하지 않는 표적으로부터의 방출), 및 전체 용해물(T, 1% 트리톤(Triton) X-100의 세제를 이용하여 처리한 표적 세포로부터의 방출)에 대하여 측정하였다. 세포독성 백분율을 [(E-S)/(T-S)]x100으로 계산하였다.

[0204]

6.5.2. 결과

[0205]

4가지의 상이한 항체(엘로투주맵, PDL241, PDL192 및 다클리주맵)의 ADCC 검정으로부터의 결과를 도 8a 내지 도 8c, 도 9a 내지 도 9b, 도 10a 내지 도 10b 및 도 11a 내지 도 11b에 나타내며, 이때 각각의 검정은 상이한 두 공여체 또는 세 공여체로부터의 PBMC에서 수행한다. 모든 4개의 도면에서, 더 높은 농도의 글라이신 하에서 배양한 세포로부터의 항체는 대조 공정 하에 배양한 세포로부터의 동일 항체와 비교하여 ADCC 활성의 증가를 나타냈다. 결과는, ADCC 활성이 CD16a 결합력과 일치하며, 둘 모두의 검정 결과는 항체의 글리코실화 패턴과 상관된다.

[0206]

7. 특정 실시 양태, 참고 문헌

[0207]

본 출원에서 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 다른 문서는 각각의 개별적인 간행물, 특허, 특허 출원 또는 다른 문서가 모든 목적을 위하여 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 지시되는 경우와 동일한 정도로 모든 목적을 위하여 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

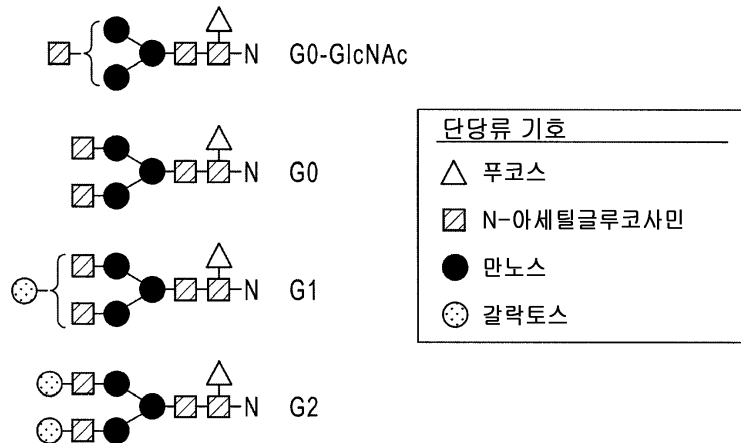
[0208]

다양한 구체적인 실시 양태가 예시되고 기술되었지만, 본 발명(들)의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않고서 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 인지된다.

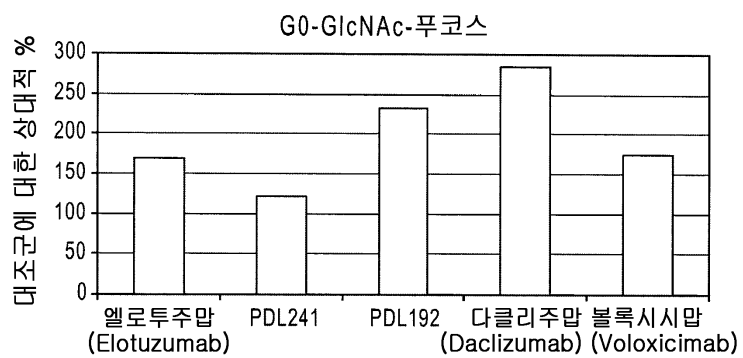
도면

도면1

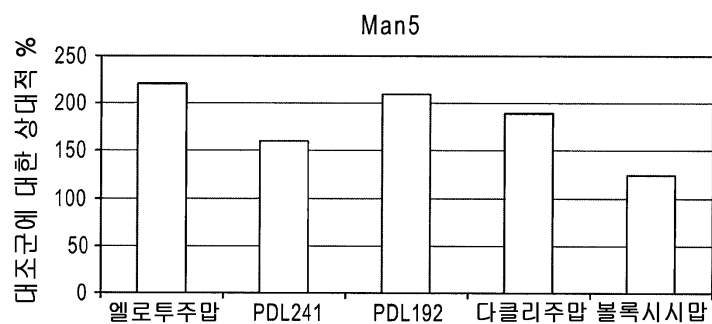
### 전형적인 N-결합 글리칸 구조



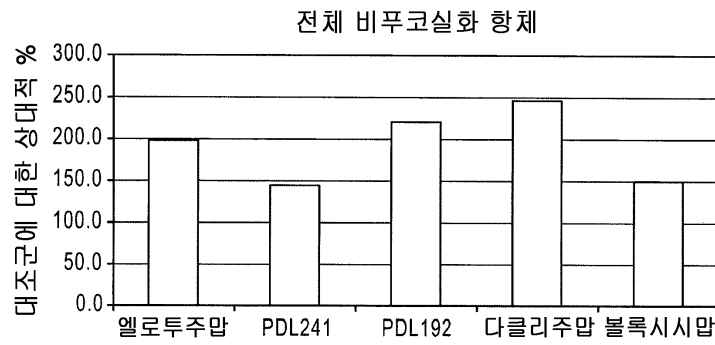
도면2



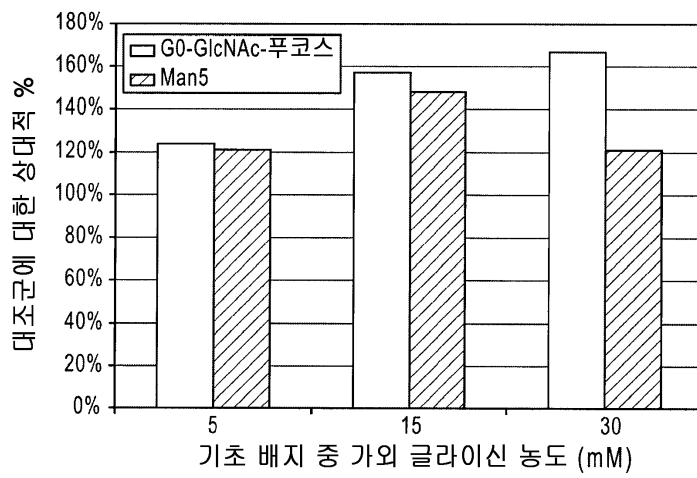
도면3



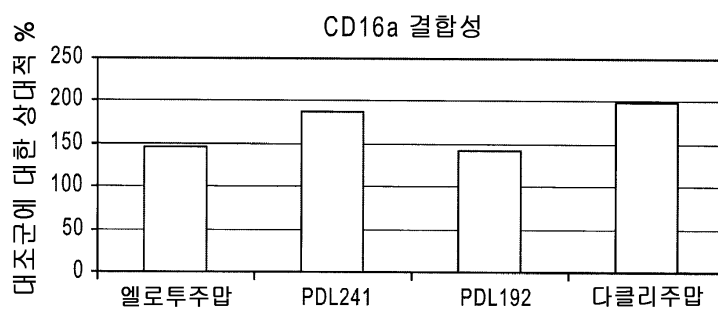
도면4



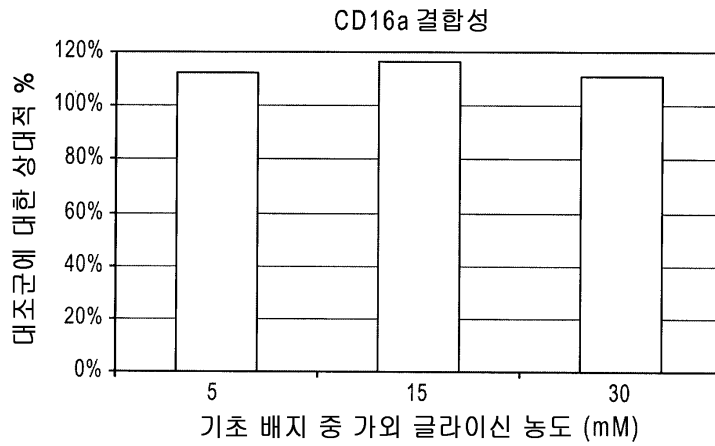
도면5



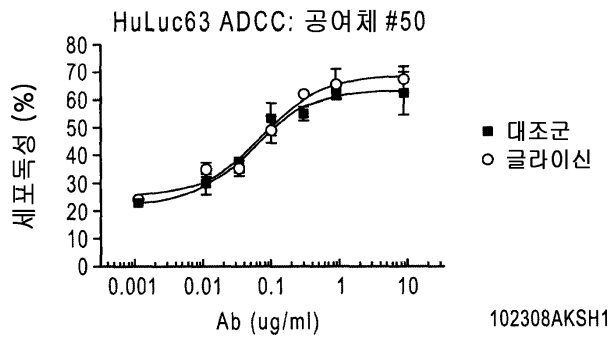
도면6



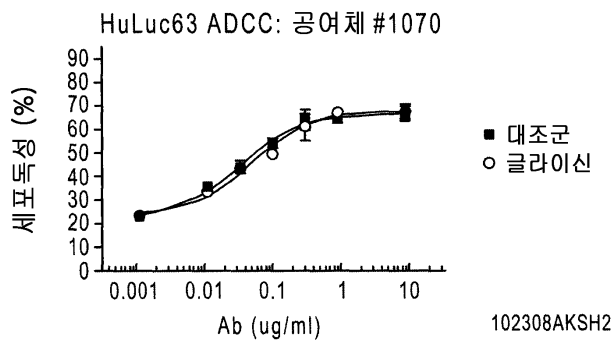
도면7



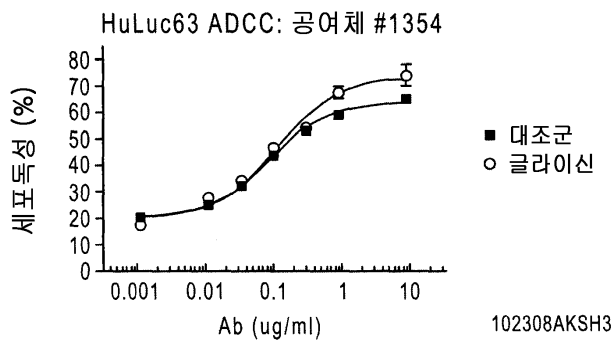
도면8a



도면8b

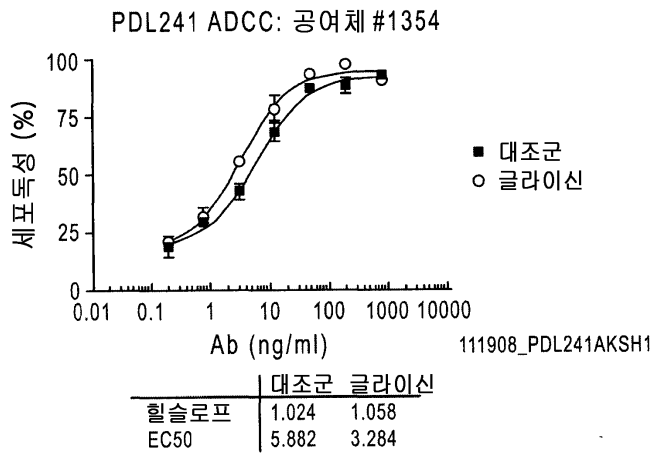


도면8c

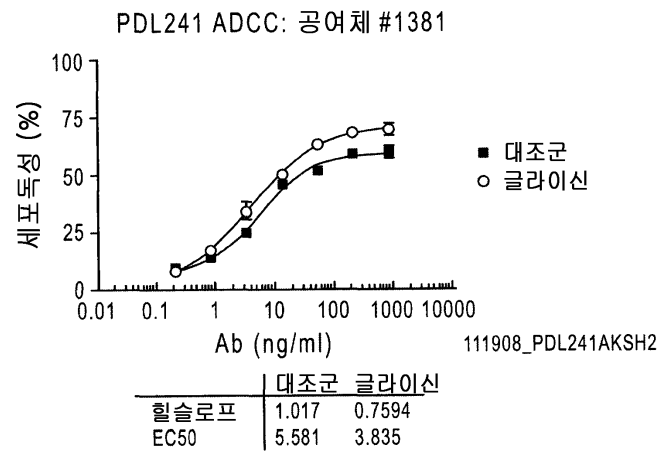




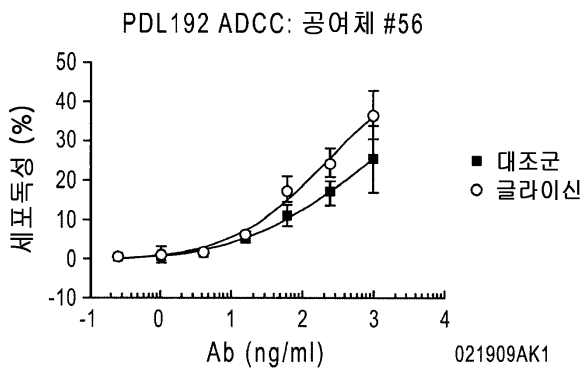
도면9a



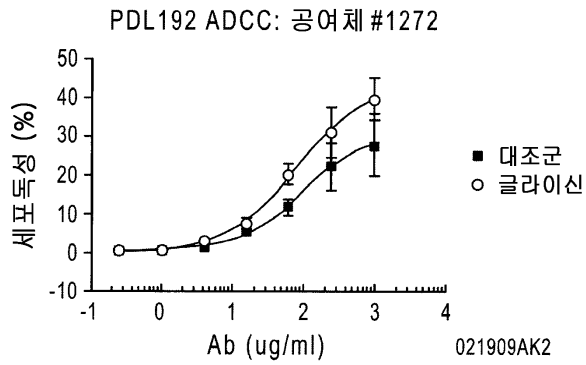
도면9b



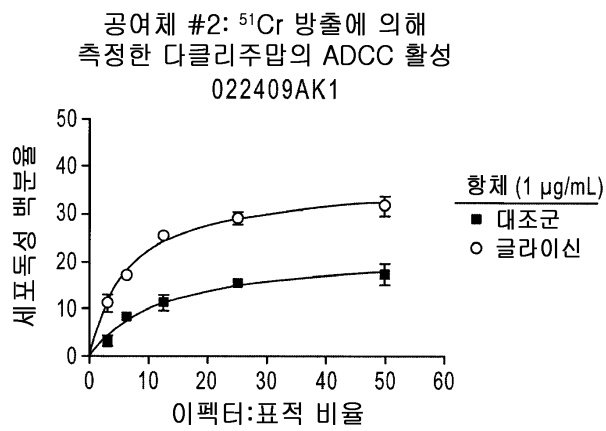
도면10a



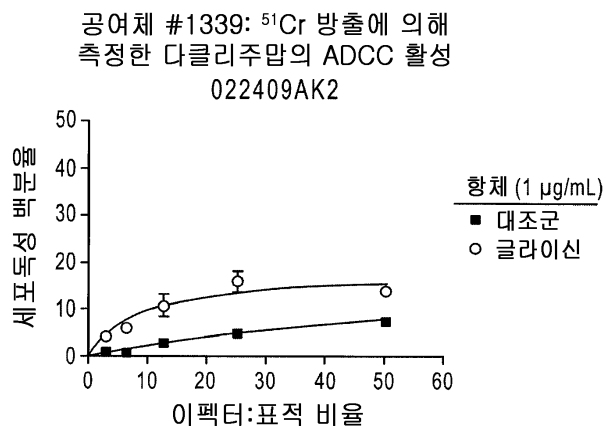
도면10b



도면11a



도면11b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRODUCING GLYCOPROTEINS

<130> 381493-735WO (118134)

<140><141><150> 61/708,554

<151> 2012-10-01

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

65	70	75	80
Glu	Asp	Val	Ala
Thr	Tyr	Tyr	Cys
Gln	Gln	Tyr	Ser
Ser	Ser	Tyr	Pro
Tyr			
85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln
Gly	Thr	Lys	Val
Glu	Ile	Lys	
100	105		

<210> 3

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 3

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val

1	5	10	15
Gln	Cys	Glu	Val
Gln	Leu	Val	Glu
Ser	Gly	Gly	Gly
Leu	Val	Gln	Pro
20	25	30	
Gly	Gly	Ser	Leu
Arg	Leu	Ser	Cys
Ala	Ala	Ser	Gly
Phe	Asp	Phe	Ser
35	40	45	
Arg	Tyr	Trp	Met
Ser	Trp	Val	Arg
Gln	Ala	Pro	Gly
Lys	Gly	Leu	Glu

50                      55                      60  
 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro  
  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser  
                     85                      90                      95  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                     100                      105                      110  
 Tyr Cys Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
                     115                      120                      125  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
  
 130                      135                      140  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 145                      150                      155                      160  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
                     165                      170                      175  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
                     180                      185                      190  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
  
 195                      200                      205  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
                     210                      215                      220  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
                     245                      250                      255  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
  
 260                      265                      270  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                     275                      280                      285  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                     290                      295                      300



His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

385 390 395 400  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 420 425 430  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460  
 Pro Gly Lys  
 465  
 <210> 4  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"  
 <400> 4  
 Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 1 5 10 15

Gly Val Glu Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

Val Gly Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser  
100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met

20 25 30  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45  
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp  
65 70 75 80  
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr

85 90 95  
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg  
100 105

<210> 7

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30  
Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95  
Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100	105	110	
Thr Val Ser Ser Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
115	120	125	
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
130	135	140	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
145	150	155	160
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
165	170	175	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
180	185	190	
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
195	200	205	
Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
210	215	220	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
225	230	235	240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
245	250	255	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
260	265	270	
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
275	280	285	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
290	295	300	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
305	310	315	320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
325	330	335	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
340	345	350	



Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 355 360 365  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 370 375 380  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 385 390 395 400  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

405 410 415  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 420 425 430  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440

<210> 8

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205  
 Asn Arg  
 210  
 <210> 9  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"  
 <400> 9  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80  
Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp  
100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn  
20 25 30  
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Asn Leu Trp  
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Arg Ser Pro  
85 90 95  
Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 11

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn

195	200	205
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser		
210	215	220
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly		
225	230	235
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln		
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445



Leu Gly Lys

450

<210> 12

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 12

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ala Pro Asn Leu Trp

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Arg Ser Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190  
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205  
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala
Thr	Tyr	Tyr	Cys
Gln	Gln	His	Tyr
Ser	Thr	Pro	Pro
85	90	95	
Tyr	Thr	Phe	Gly
Gly	Gly	Thr	Lys
Val	Glu	Ile	Lys
Arg			
100	105		

<210> 15

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val
Ser	Cys	Lys	Ala
Ser	Gly	Tyr	Ala
Phe	Ser	Ser	Ser
20	25	30	

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 16

<211> 215

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly



1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
                   20                    25                    30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
                   50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro  
                   85                    90                    95  
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
                   100                    105                    110  
  
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
                   115                    120                    125  
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
                   130                    135                    140  
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 145                    150                    155                    160  
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
                   165                    170                    175  
  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
                   180                    185                    190  
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
                   195                    200                    205  
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210                    215  
 <210> 17  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30  
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45  
Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95  
Tyr Cys Thr Gly Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30  
Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45  
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

<210> 19

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 19

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

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

115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp  
85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 115 120 125  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 130 135 140  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 180 185 190  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 195 200 205  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215  
 <210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"  
 <400> 21  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15