



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0018071
(43) 공개일자 2010년02월16일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7000746(분할)

(22) 출원일자 2002년08월05일
심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2004-7001617

원출원일자 2004년02월02일

심사청구일자 2007년06월22일

(85) 번역문제출일자 2010년01월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2002/024739

(87) 국제공개번호 WO 2003/011878

국제공개일자 2003년02월13일

(30) 우선권주장

60/309,516 2001년08월03일 미국(US)

(71) 출원인

글리카트 바이오테크놀로지 아게
스위스 솔리렌-취리히 체하-8952 바기슈트라쎄 18

(72) 발명자

장-마이레 조엘

스위스 취리히 체하-8006 쇼이히처슈트라쎄 94

우마나 파블로

스위스 취리히 체하-8046 캐퍼홀츠슈트라쎄 #262

베일리 제임스 이

사망

(74) 대리인

김진희, 강승우

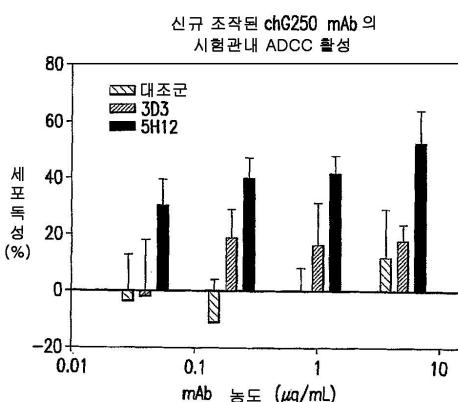
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 항체 의존적 세포 독성이 증가된 항체 글리코실화 변이체

(57) 요 약

본 발명은 단백질의 글리코실화 조작 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 개선된 치료 특성을 보유하는 단백질 예컨대, 항체 의존성 세포 독성이 증가된 항체를 제조하기 위한 글리코실화 조작에 관한 것이다.

대 표 도 - 도9



특허청구의 범위

청구항 1

암 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 글리코조작된(glycoengineered) 항체를 포함하는 약학 조성물로서, 상기 항체는 인간 CD20 항원에 특이적으로 결합하고, 상기 항체는 상기 글리코조작의 결과로 m/z 값이 1689, 1705, 1851 및 1867 달تون인 이분화된(bisected) 복합 올리고당의 비율이 증가되며, m/z 값이 1648 달تون인 비이분화된 복합 올리고당의 비율이 감소되고, 항체 의존성 세포 독성이 증가된 것인 약학 조성물.

청구항 2

만성 이식편 대 숙주간 질병에 있어서의 자가면역 혈소판감소증 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 글리코조작된 항체를 포함하는 약학 조성물로서, 상기 항체는 인간 CD20 항원에 특이적으로 결합하고, 상기 항체는 상기 글리코조작의 결과로 m/z 값이 1689, 1705, 1851 및 1867 달تون인 이분화된 복합 올리고당의 비율이 증가되며, m/z 값이 1648 달تون인 비이분화된 복합 올리고당의 비율이 감소되고, 항체 의존성 세포 독성이 증가된 것인 약학 조성물.

청구항 3

면역 매개성 후천적 순수 적혈구 형성 부전증 치료용 약제의 제조에 사용하기 위한 글리코조작된 항체를 포함하는 약학 조성물로서, 상기 항체는 인간 CD20 항원에 특이적으로 결합하고, 상기 항체는 상기 글리코조작의 결과로 m/z 값이 1689, 1705, 1851 및 1867 달تون인 이분화된 복합 올리고당의 비율이 증가되며, m/z 값이 1648 달トン인 비이분화된 복합 올리고당의 비율이 감소되고, 항체 의존성 세포 독성이 증가된 것인 약학 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항인간 CD20 모노클로날 항체인 것인 약학 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 특이적 결합 부위를 포함하는 항체 단편인 것인 약학 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질인 것인 약학 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항 있어서, 항체의 Fc 영역 중 50% 초과의 올리고당이 이분화된 것인 약학 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 Fc 영역 중 70% 초과의 올리고당이 이분화된 것인 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 암은 B 세포 램프종인 것인 약학 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 최대 ADCC 활성이 약 50%인 것인 약학 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 ADCC 활성은 글리코조작되지 않은 상응하는 항체의 2배 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체의 ADCC 활성은 글리코조작되지 않은 상응하는 항체의 3배 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 13

제2항에 있어서, 상기 항체는 약 4주의 기간동안 매주 375 mg/m² 주입으로 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 14

제3항에 있어서, 상기 항체는 1주당 약 375 mg/m²의 2회 복용량으로 정맥내 투여되는 것인 약학 조성물.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 단백질의 글리코실화 조작(glycosylation engineering)에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 항체 의존적 세포 독성이 증가된 항체를 포함하는, 치료적 특성이 개선된 단백질을 제조하기 위한 글리코실화 조작에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

당단백질은 인간, 기타 진핵 유기체 및 일부 원핵생물에 있어서, 촉매화, 신호전달, 세포-세포간 소통 및 분자적 인지 및 회합을 비롯한 다수의 필수적 기능을 조정한다. 상기 당단백질은 진핵 유기체에서 대부분의 비세포질 단백질을 구성한다[Lis 등, Eur. J. Biochem. 218:1-27(1993)]. 다수의 당단백질은 치료적 목적으로 이용되고 있으며, 지난 20여년 동안에는 자연 생성 개체의 재조합체인, 분비형 당단백질이 생물 공학 산업에서의 주요 산물이었다. 그 예로서는 적혈구 생성소(EPO), 치료적 모노클로날 항체(치료적 mAb), 조직 플라스미노겐 활성인자(tPA), 인터페론-β(INF-β), 과립백혈구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 및 인간 융모막성 생식선자극호르몬(hCG)를 포함한다[Cumming 등, Glycobiology 1:115-130(1991)].

[0003]

올리고당 성분은 신체적 안정성, 프로테아제 공격에 대한 저항성, 면역계와의 상호작용, 약리역학 및 특이적 생물 활성을 비롯한, 치료적 당단백질의 효능과 관련된 특성에 상당한 영향을 미칠수 있다. 이러한 특성은 올리고당의 존부 뿐만 아니라, 이 올리고당의 특이적 구조에 따라서 달라질 수 있다. 올리고당 구조 및 당단백질 기능 사이의 관계를 일반화시킬 수 있다. 예를 들어, 어떤 올리고당 구조체는 특정 탄수화물 결합 단백질과의 상호작용을 통하여 혈류로부터 당단백질을 신속히 제거하는 현상을 조정하는 반면에, 다른 올리고당 구조는 항체와 결합하여 바람직하지 않은 면역 반응을 촉진시킬 수 있다[Jenkins 등, Nature Biotechnol. 14:975-81(1996)].

[0004]

포유류 세포는 인간에 사용하기에 가장 적합한 형태를 취하고 있는 단백질을 글리코실화하는 능력을 보유하므로, 치료적 당단백질의 생성에 바람직한 숙주이다[Cumming 등, Glycobiology 1:115-30(1991); Jenkins 등, Nature Biotechnol. 14:975-81(1996)]. 박테리아는 단백질을 거의 글리코실화하지 않으며, 예컨대, 효모, 사상 진균, 곤충 및 식물 세포와 같은 기타 통상의 숙주는 혈류로부터 신속하게 제거되는 것과 관련된 글리코실화 패턴, 바람직하지 않은 면역 상호작용을 나타내며, 몇몇 특정한 경우에 있어서 감소된 생물 활성을 나타낸다. 포유류 세포중, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포는 지난 20여년 동안 가장 일반적으로 사용되고 있다. 상기 세포는 적당한 글리코실화 패턴을 나타냄과 아울러, 유전적으로 안정하고, 증식성이 큰 세포주 클론을 지속적으로 생산할 수 있다. 상기 세포들은 무혈청 배지를 사용하는 간단한 생물 반응기내에서 고밀도로 배양될 수 있으며, 이로써 안전하고 반복 가능한 생물공정을 개발할 수 있게 되었다. 기타 통상적으로 사용된 동물 세포는 새기 햄스터 신장(BHK) 세포, NS0-마우스 골수종 세포 및 SP2/0-마우스 골수종 세포를 포함한다. 더욱 최근 들어서는, 트랜스게닉 동물로부터의 생산성에 관하여도 테스트되었다[Jenkins 등, Nature Biotechnol. 14:975-81(1996)].

[0005]

모든 항체들은 중쇄 불변 영역의 보존된 위치에 탄수화물 구조를 함유하는데, 상기 항체의 각각의 동형체(isotype)는 N-결합 탄수화물 구조의 명확한 배열을 포함하며, 상기 구조는 단백질 조립, 분비 또는 작용 활성에 다양한 영향을 미친다[Wright, A., 및 Morrison, S.L., Trends Biotech. 15:26-32(1997)]. 부착된 N-결합

탄수화물의 구조는 프로세싱 정도에 따라서 매우 다양하며, 상기 구조는 고-만노즈, 다수 분지형 및 바이엔테너리(biantennary) 복합 올리고당을 포함한다[Wright, A. 및 Morrison, S.L., Trends Biotech. 15:26-32(1997)]. 통상적으로 특정 글리코실화 부위에 부착된 코어 올리고당 구조는 이종성 프로세싱을 거쳐 모노클로날 항체조차도 다수의 글리코형(glycoform)으로 존재한다. 이와 유사하게, 항체 글리코실화에 있어서 상당한 차이점을 나타내며, 심지어는 상이한 배양 조건하에서 성장한 세포주에서 조차도 경미한 차이점을 나타낸다[Lifely, M.R. 등, Glycobiology 5(8):813-22(1995)].

[0006] CD20 양성 B 세포, 하등 또는 여포 비호지킨 림프종 치료용 리턱시맙[Rituxan(상표명); IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA 및 Genentech Inc., San Francisco, CA], 진행성 유방암 치료용 트라스투즈맵[Herceptin(상표명); Genentech Inc.][Grillo-Lopez, A.J. 등, Semin. Oncol. 26:66-73(1999); Goldenberg, M.M., Clin. Ther. 21:309-18(1999)]의 미국 식품 의약청 승인에 의해 입증된 바와 같이, 비접합 모노클로날 항체(mAb)는 암 치료에 유용할 수 있다. 상기 제품의 성공 여부는 이의 효능 뿐만 아니라, 뛰어난 안전성 프로필에 좌우된다[Grillo-Lopez, A.J. 등, Semin. Oncol. 26:66-73(1999); Goldenberg, M.M., Clin. Ther. 21:309-18(1999)]. 상기 2개의 약물의 성공에도 불구하고, 현재는 비접합 mAb 치료법에 의하여 통상적으로 얻어지는 경우보다 더 높은 특이적 항체 활성을 얻는 것에 관하여 관심이 증대되고 있다.

[0007] 생산 공정이 간단하고 상당히 바람직하지 못한 부작용 발생을 잠재적으로 막으면서 약물의 효능을 증대시키기 위한 한가지 방법은, mAb의 올리고당 성분을 조작함으로써 mAb의 자연적 세포 매개성 효과기 작용을 강화시키는 것이다[Umafia, P. 등, Nature Biotechnol. 17:176-180(1999)]. 암 면역요법에서 가장 일반적으로 사용되는 항체인 IgG1형 항체는 각각의 CH2 도메인중 Asn297에 보존적 N-결합 글리코실화 부위를 보유하는 당단백질이다. Asn297에 부착된 2개의 복합 바이엔테너리 올리고당은 CH2 도메인 사이에 묻혀있어서 폴리펩티드 주체와 광범위하게 접촉할 수 있으며, 상기 복합 바이엔테너리 올리고당의 존재는 항체가 효과기 작용 예전대, 항체 의존성 세포 독성(ADCC)을 조정하는데 필수적이다[Lifely, M. R. 등, Glycobiology 5 : 813-822 (1995); Jefferis, R. 등, Immunol Rev. 163 :59-76 (1998); Wright, A. 및 Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15 : 26-32 (1997)].

[0008] 본 발명자들은 앞서 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포에서 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnT III)의 과발현, 이분화된 올리고당의 형성을 촉진하는 글리코실트랜스퍼라제, 조작된 CHO 세포에 의하여 생산된 항신경아세포종 키메라 모노클로날 항체(chCE7)의 시험관내 ADCC 활성의 유의적 증가에 관하여 규명하였다[Umana, P. 등, Nature Biotechnol. 17 : 176-180 (1999), 국제공개번호 WO 99/54342 참조; 상기 각 문헌의 내용은 본원에 전체로서 참고문헌으로 인용되어 있음]. 항체 chCE7은 GnTIII 효소가 결핍된 표준 산업용 세포주에서 생산될 때 종양 친화성 및 특이성은 높으나, 임상적으로 유용해야 할 효능은 낮은 비접합 mAb의 대부분에 속 한다[Umana, P., 등, Nature Biotechnol. 17 : 176-180 (1999)]. 이러한 연구는 시험관내 최대 ADCC 활성을 불변 영역(Fc)-결합된, 이분화 올리고당의 비율을 자연 생성 항체에서의 수준 이상으로 증가시킴으로써 상당한 정도로 증가될 수 있다는 사실을 처음으로 입증하는 것이었다. 이러한 발견이 이미 이분화된 올리고당의 부재하에서의 ADCC 활성이 상당히 증가된 비접합 mAb에 대해서 외삽될 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 이 기법을 리턱시맙, 항CD20, IDEC-C2B8 키메라 항체에 적용하였다. 마찬가지로 본 발명자들은 이 기법을 비접합 항암 mAb chG250에 적용하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 개요

[0010] 본 발명자들은 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII; EC 2.1.4.144)을 테트라사이클린 조절 방식으로 과발현하는 유전자 조작된 mAb-생성 세포주를 사용하여 항CD20 모노클로날 항체(mAb) IDEC-C2B8(리턱시맙; Rituximab) 및 항암 mAb chG250의 신규한 글리코실화 변이체를 제조하였다. GnTIII은 이분화된 올리고당의 합성에 필요한 것으로서, 자연 생성 인간 항체에 낮은 수준에서 중간 정도의 수준으로 발견되나, 표준적인 산업용 세포주에서 생산되는 mAb에서는 발견되지 않는다. 신규의 글리코실화된 개체는 Mabthera(상표명)[유럽에서 시판 중인 리턱시맙의 상표명]의 효능과, 마우스-골수종 유래 chG250의 생물 활성(ADCC)을 능가한다. 예를 들어, 이분화된 올리고당을 최고 수준으로 보유하는 변이체는 평소보다 10배 낮은 양으로 존재하더라도 Mabthera(상표명)과 같은 정도의 최대 ADCC 활성에 도달할 수 있다. chG250에 있어서, 이분화된 올리고당을 최고 수준으로 보유하는 변이체는 비변형 대조군 chG250에 의한 낮은 ADCC 활성을 검출하는데 필요한 수준 보다

125배 낮은 농도로도 유의적인 ADCC 활성을 조정한다. GnTIII 발현과 ADCC 활성 사이에는 명확한 상관관계가 관찰된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사민트랜스퍼라제 III(GnTIII)를 암호화하는 1 이상의 핵산을 발현시킴으로써 Fc-매개성 세포 독성이 증가된 폴리펩티드를 생산하도록 조작된 숙주 세포에 관한 것으로서, 여기서 숙주 세포에 의하여 생산된 폴리펩티드는 전항체(whole antibody) 분자, 항체 단편 및 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 상기 GnTIII은 이분화된 하이브리드 올리고당 또는 갈락토실화된 복합 올리고당 또는 이들을 함께 보유하는 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서의 비율(Fc 영역 중 이분화된 복합 올리고당을 보유하는 폴리펩티드에 상대적인 비율)을 증가시키기에 충분한 양으로 발현된다.
- [0012] 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드는 IgG 또는 이의 단편, 가장 바람직하게는, IgG1 또는 이의 단편이다. 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 인간 IgG의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질이다.
- [0013] 본 발명의 다른 측면에서, GnTIII를 암호화하는 1 이상의 유전자를 포함하는 핵산 분자는 숙주 세포에 도입된다. 바람직한 구체예에서, GnTIII를 암호화하는 1 이상의 유전자는 숙주 세포 염색체에 도입된다.
- [0014] 이와는 달리, 숙주 세포는 내인성 GnTIII 유전자가 예를 들어, 유전자 발현을 증가시키는 DNA 요소를 숙주 염색체로 삽입함으로써 활성화되도록 조작된다. 바람직한 구체예에서, 내인성 GnTIII은 프로모터, 인핸서, 전사 인자 결합 부위, 트랜스포존, 레트로바이러스 요소 또는 이들의 조합체를 숙주 세포 염색체에 삽입함으로써 활성화된다. 다른 측면에서, 숙주 세포는 내인성 GnTIII의 발현을 촉진하는 돌연변이를 보유하도록 선택된다. 바람직하게, 상기 숙주 세포는 CHO 세포 돌연변이체 lec10이다.
- [0015] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예에서, GnTIII를 암호화하는 1 이상의 핵산은 구성적 프로모터 요소에 작동 가능하도록 결합된다.
- [0016] 추가의 바람직한 구체예에서, 숙주 세포로서는 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포 또는 하이브리도마 세포, Y0 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포 또는 PER.C6 세포가 있으며, 폴리펩티드는 항CD20 항체이다. 다른 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 SP2/0 세포이고, 폴리펩티드는 모노클로날 항체 chG250이다.
- [0017] 다른 측면에서, 본 발명은 항체 분자, 항체 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 1 이상의 형질감염된 핵산을 추가로 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 항CD20 항체, 키메라 항인간 신경아세포종 모노클로날 항체 chCE7, 키메라 항인간 신장 세포 암종 모노클로날 항체 chG250, 키메라 항인간 결장, 폐 및 유방 암종 모노클로날 항체 ING-1, 인간화된 항인간 17-1A 항원 모노클로날 항체 3622W94, 인간화된 항인간 결직장 종양 항체 A33, GD3 강글리오시드 R24에 대하여 유도된 항인간 흑색종 항체, 또는 키메라 항인간 편평세포 암종 모노클로날 항체 SF-25, 항인간 EGFR 항체, 항인간 EGFRvIII 항체, 항인간 PSMA 항체, 항인간 PSCA 항체, 항인간 CD22 항체, 항인간 CD30 항체, 항인간 CD33 항체, 항인간 CD38 항체, 항인간 CD40 항체, 항인간 CD45 항체, 항인간 CD52 항체, 항인간 CD138 항체, 항인간 HLA-DR 변이 항체, 항인간 EpCAM 항체, 항인간 CEA 항체, 항인간 MUC1 항체, 항인간 MUC1 코어 단백질 항체, 항인간 이상 글리코실화 MUC1 항체, ED-B 도메인을 포함하는 인간 피브로네틴 변이체에 대한 항체, 및 항인간 HER2/neu 항체를 암호화하는 1 이상의 형질감염된 핵산을 포함한다.
- [0018] 다른 측면에서, 본 발명은 전술한 숙주 세포 중 임의의 세포를, Fc-매개성 세포 독성이 증가된 폴리펩티드를 생성할 수 있는 조건하에서 배양하는 것을 포함하는, 숙주 세포에서 폴리펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 본 방법은 Fc-매개성 세포 독성이 증가된 폴리펩티드를 분리하는 것을 추가로 포함한다.
- [0019] 추가의 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 면역글로불린의 글리코실화된 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 1 이상의 핵산을 포함한다.
- [0020] 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드의 Fc 영역 중 이분화된 올리고당의 비율은 50% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상이다. 다른 구체예에서, 이분화된 하이브리드 올리고당 또는 갈락토실화된 복합 올리고당 또는 이들의 혼합물의 Fc 영역에서의 비율은 상기 폴리펩티드의 Fc 영역에서의 이분화된 복합 올리고당의 비율보다 크다.
- [0021] 본 발명의 방법의 바람직한 측면에서, 폴리펩티드는 항CD20 항체이고, 숙주 세포에 의하여 생성된 항CD20 항체는 MALDI/TOF-MS에 의하여 분석된 글리코실화 프로필을 나타내며, 이는 실질적으로 도 2e에 나타낸 바에 해당한

다.

[0022] 본 발명의 방법의 다른 바람직한 측면에서, 폴리펩티드는 chG250 모노클로날 항체이고, 숙주 세포에 의하여 생성된 chG250 항체는 MALDI/TOF-MS에 의하여 분석된 글리코실화 프로필을 나타내며, 이는 실질적으로 도 7d에 나타낸 바에 해당한다.

[0023] 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 방법들중 임의의 방법에 의하여 제조된, 항체 의존성 세포 독성(ADCC)이 증가된 항체에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 항CD20 항체, chCE7, chG250, 인간화된 항HER2 모노클로날 항체, ING-1, 3622W94, SF-25, A33 및 R24로 이루어진 군으로부터 선택된다. 대안적으로, 상기 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하고, Fc-매개성 세포 독성이 증가되었으며, 전술한 방법들중 임의의 방법에 의하여 제조된, 항체 단편일 수 있다.

[0024] 추가의 측면에서, 본 발명은 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하고, Fc-매개성 세포 독성이 증가되었으며, 전술한 방법들중 임의의 방법에 의하여 제조된, 융합 단백질에 관한 것이다.

[0025] 추가의 측면에서, 본 발명은 항체, 항체 단편, 또는 본 발명의 융합 단백질 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 관한 것이다.

[0026] 추가의 측면에서, 본 발명은 치료적으로 유효량의 약학 조성물을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법에 관한 것이다.

[0027] 추가의 측면에서, 본 발명은 전체적으로 또는 부분적으로, B 세포 결핍에 기초한, 병원성 자가항체에 의하여 유발되는 자가면역성 질환을 치료하는 개선된 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 치료적 유효량의 면역 활성 항체를 치료가 필요한 인간 개체에 투여하는 것을 포함하며, 이 개선된 방법은 전술한 바와 같이 제조되고 ADCC가 증가된, 치료학적으로 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 항체는 항CD20 항체이다. 자가 면역성 질환 또는 이상의 예로서는 면역 매개성 혈소판감소증 예컨대, 급성 특발성 혈소판감소성 자반병 및 만성 특발성 혈소판감소성 자반병, 피부근염, 시데남무도병, 루프스 신장염, 류머티스성 발열, 다선성 증후군, 헤노흐-쇤라인 자반병, 후-포도상구균성 신장염, 결정성 홍반, 다카야스 동맥염, 아디슨병, 다형성 적혈병(erythema multiforme), 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 굿파스튜어 증후군, 혈전 혈관염, 1차 담즙간경변, 하시모토 갑상선염, 갑상선 기능 항진증, 만성 활동성 간염, 다발성 근염/피부근염, 다연골염, 팜피구스 불가리스(pamphigus vulgaris), 베그너 육아종증, 막성 신장병증, 근위축성 측삭 경화증, 척수로, 다발성근육통, 악성 빈혈, 속행성(rapid progressive) 사구체신염 및 섬유성 폐포염, 염증 반응 예컨대, 건선 및 피부염(예를 들어, 아토피성 피부염)을 비롯한 염증성 피부병; 전신성 경피증 및 경화증; 염증성 복부 질병과 관련된 반응(예컨대, 크론병 및 케양성 대장염); 호흡 곤란 증후군(성인 호흡 곤란 증후군(ARDS) 포함); 피부염; 뇌막염; 뇌염; 포도막염; 대장염; 사구체신염; 알레르기 증상 예컨대, 습진 및 천식, 및 T 세포 침출 및 만성 염증 반응과 관련된 기타 증상; 동맥경화; 백혈구 부착성 결핍증; 류마티스성 관절염; 전신 루프스 홍반증(SLE); 진성 당뇨병(예를 들어, 1형 진성 당뇨병 또는 인슐린 의존성 진성 당뇨병); 다발성 경화증; 레이노드 증후군; 자가면역 갑상선염; 알레르기성 뇌척수염; 쇼그렌 증후군; 연소성 당뇨병; 및 결핵, 유육종증, 다발성 근염, 육아종증 및 맥관염에서 발견되는 시토킨 및 T-림프구에 의하여 매개되는 급성 및 지연성 과민증과 관련된 면역 반응; 악성 빈혈(아디슨병); 백혈구 혈관외유출을 초래하는 질병; 중추 신경계(CNS) 염증성 질환; 다발성 기관 손상 증후군(multiple organ injury syndrome); 용혈성 빈혈(한성글로불린혈증 또는 쿠움스 양성 빈혈 포함); 중증 근무력증; 항원-항체 복합체 매개성 질병; 항사구체기저막 질병(anti-glomerular basement membrane disease); 항인지질 증후군; 알레르기성 신경염; 그레이브스병; 램버트-이튼 근무력 증후군; 수포성 유천포창; 유천포창; 자가면역 다내분비질환; 라이터병; 인간 경직성 증후군(stiff-man syndrome); 베세트병; 거대 세포동맥염; 면역 복합체 신장염; IgA 신장병증; IgM 다발성 신경병; 면역 혈소판감소성 자반병(ITP) 또는 자가면역 혈소판감소증 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 이와 같은 측면에서, 본 발명의 항체는 정상적인 B 세포 혈액을 장기간 동안 방혈(depletion)시키는데 사용된다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 개선된 치료 특성을 보유하는 단백질의 제조가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 항체 제조물 C2B8-25t의 CD20 양성 SB 세포에 대한 반응성을 나타내는 간접 면역형광분석법의 결과를 나타내는 것이다. HSB CD20 음성 세포주와 2차 FITC-접합된 항인간 Fc 폴리클로날 항체만으로 처리된 세포를 포함

하는 음성 대조군은 나타내지 않았다.

도 2a ~ 2e는 Mabthera(상표명)(도 2a), C2B8-nt(도 2b), C2B8-2000t(도 2c), C2B8-50t(도 2d) 및 C2B8-25t(도 2e) 항체 샘플로부터 유래된 올리고당의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼을 나타내는 것이다. 올리고당은 $[M+Na^+]$ 및 $[M+K^+]$ 이온으로 나타내었다. 처음 2개의 스펙트럼에 나타난 올리고당은 GnTIII를 발현하지 않는 세포 배양액으로부터 유래된 것이었던 반면에, 도 2c, 2d 및 2e의 올리고당은 GnTIII를 상이한 수준(즉, 테트라사이클린 농도)으로 발현시키는 단일 세포주로부터 유래된 것이었다.

도 3a 및 3b는 통상의 인간 IgG Fc-결합 올리고당 구조(3a) 및 부분 N-결합 글리코실화 경로(3b)를 나타내는 것이다. 올리고당의 코어는 3개의 만노즈(M)와 Asp₂₉₇에 부착된 2개의 N-아세틸글루코사민(Gn) 단당류 잔기로 이루어져 있다. 갈락토즈(G), 프록토즈(F) 및 이분화 N-아세틸글루코사민(Gn, 박스안에 도시)은 존재하거나 또는 부재할 수 있다. 말단 N-아세틸뉴라민산 역시 존재할 수도 있지만, 본 도면에는 나타내지 않았다(도 3a). 도 3b는 올리고당의 주요군(점선 표시)을 형성시키는 부분 N 결합 글리코실화 경로를 나타낸다. 이분화 N-아세틸글루코사민을 Gn^b로 표시하였다. 아래 첨자로 나타낸 번호들은 각각의 올리고당중에 얼마나 많은 단당류 잔기들이 존재하는지를 나타내는 것이다. 각각의 구조를 이의 나트륨-결합형 $[M+Na^+]$ 의 질량분석 결과와 함께 나타냈다. 푸코즈(f)를 함유하는 이들 구조의 질량 분석 결과도 포함되어 있다.

도 4a 및 4b는 리ട시맵 글리코실화 변이체의 ADCC 활성을 나타내는 것이다. 상이한 mAb 농도에 의하여 조정되는, 인간 림프구(E:T의 비율 = 100:1)에 의한, ⁵¹Cr 표지화된 CD20-양성 SB 세포의 분해를 통하여 세포독성 비율을 측정하였다. 도 4a는 단일 세포주로부터 유래되어, GnTIII 발현 수준이 점진적으로 증가하는(즉, 테트라사이클린 농도가 감소하는) C2B8 샘플의 활성을 나타내는 것이다. 샘플로서는 C2B8-2000t, C2B8-50t, C2B8-25t 및 C2B8-nt(GnTIII를 발현하지 않는 클론으로부터 유래된 대조군 mAb)이 사용되었다. 도 4b는 C2B8-50t 및 C2B8-25t의 ADCC 활성과 Mabthera(상표명)를 비교한 결과를 나타내는 것이다.

도 5는 7개의 GnTIII 발현 클론 및 야생형의 웨스턴 블로트 분석 결과를 나타내는 것이다. 각 샘플 30 μ g을 8.75%의 SDS 겔상에 로딩시킨후, 이를 PVDF 막으로 옮겨 항c-myc 모노클로날 항체(9E10)로 프로빙하였다. WT는 wt-chG250-SP2/0 세포를 의미한다.

도 6은 용해된 정제 항체 샘플의 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 결과를 나타내는 것이다.

도 7a~7d는 GnTIII를 상이한 수준으로 발현시키는 클론 및 wt-chG250-SP2/0 세포에 의하여 생성된 chG250 mAb 샘플로부터 얻어진 중성 올리고당 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼을 나타내는 것이다 : WT(도 7a), 2F1(도 7b), 3D3(도 7c), 4E6(도 7d).

도 8a~8d는 GnTIII를 상이한 수준으로 발현시키는 클론에 의하여 생성된 chG250 mAb 샘플로부터 얻어진 중성 올리고당 혼합물의 MALDI/TOF-MS 스펙트럼을 나타내는 것이다 : 4E8(도 8a), 5G2(도 8b), 4G3(도 8c), 5H12(도 8d).

도 9는 대조군 wt-chG250-SP2/-세포 및 GnTIII 편절된 클론 3D3 및 5H12로부터 유래된 항체 샘플의 시험관내 ADCC 분석 결과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 발명의 상세한 설명

본원에 기재된 용어는 다음과 같이 특별한 언급이 없는 한, 본 기술분야에서 일반적으로 사용되는 용어를 사용하였다.

[0032] 용어 항체는 전항체(whole antibody) 분자, 항체 단편, 또는 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

[0033] 용어 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역은 치환, 부가 또는 결실을 형성하지만, 항체 의존적 세포 독성을 매개하는 면역글로불린의 기능이 거의 감소되지 않은 변형을 포함하는 변이체 뿐 아니라, 자연적으로 생성되는 면역글로불린의 Fc 영역의 대립 유전자 변이체를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들면, 생물학적인 기능의 실질적인 손상이 없이 1 또는 그 이상의 아미노산이 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단에서 결실될 수 있다. 이러한 변이체는 활성에 최소한으로 영향을 미치게 하기 위해 당해 기술분야에서 알려진 일반 규칙에 따

라 선별될 수 있다. (예컨대, Bowie, J.U. 등, *Science* 247:1306-10(1990) 참조)

[0034] 용어 당단백질 변형 글리코실 트랜스퍼라제는 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)을 의미한다.

[0035] 용어 조작자, 조작된, 조작 및 글리코실화 조작은 자연적으로 생성되는 폴리펩티드 또는 그것의 단편의 글리코실화 패턴을 임의로 조작하는 것을 포함한다. 글리코실화 조작은 세포에서 발현되는 당단백질의 변형된 글리코실화를 달성하기 위한 올리고당 합성경로의 유전적 조작을 포함하며, 세포의 글리코실화 기작을 대사적으로 조작하는 것을 포함한다. 나아가 글리코실화 조작은 글리코실화에 대한 돌연변이 효과 및 세포 환경의 효과를 포함한다.

[0036] 용어 숙주 세포는 단백질, 단백질의 단편 또는 항체와 항체 단편을 포함하는 목적하는 펩티드의 변형된 글리코형을 만들기 위해 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포계를 포함한다. 일반적으로 숙주 세포는 GnTIII를 적정 수준으로 발현시키도록 조작하여 왔다. 숙주 세포는 포유류의 배양된 세포, 즉 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포 및 곤충 세포등의 배양된 세포들을 포함하며, 소량이긴 하지만 트랜스제닉 동물 또는 배양된 조직도 포함한다.

[0037] 용어 *Fc 매개 세포* 독성은 항체 의존적 세포 독성과 인간의 Fc 영역을 포함하는 가용성의 Fc-융합 단백질에 의해 매개되는 세포 독성을 포함한다. 이는 "인간 면역 효과기 세포"에 의해 "항체 표적화 세포"를 용해시키는 면역 기작이다.

[0038] 여기서 "인간 면역 효과기 세포"는 이들이 항체의 Fc 영역 또는 Fc융합 단백질의 Fc 영역에 결합하는 표면상에 Fc 수용체를 제시하여 효과기 기능을 수행하는 백혈구 군집이다. 이와 같은 백혈구 군집은 말초혈액 단핵구 세포(PBMC) 및/또는 천연 킬러(NK) 세포를 포함하나 여기에 한정되는 것은 아니다.

[0039] "항체 표적화 세포"는 항체 또는 Fc융합 단백질에 의해 결합된 세포이다. 항체 또는 Fc융합 단백질은 Fc 영역의 N-말단 단백질을 통하여 표적화 세포와 결합한다.

[0040] 용어 증가된 *Fc매개 세포* 독성은, 표적 세포를 둘러싸고 있는 배지내에서, 소정의 시간안에, 항체 또는 Fc융합 단백질의 소정의 농도에서 상기에서 정의된 Fc매개 세포 독성 기작에 의해 용해되는 "항체 표적화 세포"의 수의 증가, 및/또는 소정의 수의 "항체 표적화 세포"를 용해하기 위해 필요한, 표적 세포를 둘러싸고 있는 배지내에서, 소정의 시간안에, Fc매개 세포 독성 기작에 의한 항체 또는 Fc-융합 단백질 농도의 감소로 정의된다. Fc매개 세포 독성의 증가는 본 기술분야에서 당업자에게 알려져 있는 동일한 표준의 제조, 정제, 제형화 및 저장 방법을 이용하여 동일한 종류의 숙주 세포에 의해 생성된 Fc융합 단백질 또는 동일한 항체에 의해 매개되는 세포 독성에 비례하지만, 본원에 개시한 방법에 의해 글리코실트랜스퍼라제 GnTIII를 발현하기 위해 조작된 숙주 세포에 의해 유발되지는 않는다.

[0041] 항체 의존적 세포 독성(ADCC)이 증가된 항체라는 것은 본 기술분야에서 통상의 기법을 가진 당업자에게 알려져 있는 임의의 적절한 방법에 의해 측정되는 ADCC가 증가된 항체를 의미한다. 시험관내에서 허용되는 ADCC 분석법의 하나는 다음과 같다.

[0042] 1) 항체의 항원 결합 영역에 의해 인식되는 표적 항원을 발현하는 것으로 알려진 표적 세포를 이용하는 분석법

[0043] 2) 효과기 세포로서 무작위로 선별된 건강한 공여자의 혈액으로부터 분리된 인간의 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMCs)를 사용하는 분석법

[0044] 3) 다음과 같은 순으로 행해지는 분석법:

[0045] i) PBMCs를 표준 밀도 원심분리 방법에 의해 분리하고, RPMI 세포 배양 배지에서 5×10^6 세포/ml로 혼탁시키는 단계;

[0046] ii) 표적 세포를 표준 조직 배양법에 의해 성장시키고, 생존도 90% 이상인 지수 생장기로부터 수집한 후, RPMI 세포 배양 배지에서 세척한 다음, $100 \mu\text{-Curies}^{51}\text{Cr}$ 로 표지하고, 세포 배양 배지로 2회 세척한 후, 세포 배양 배지에서 밀도 10^6 세포/ml로 재현탁시키는 단계;

[0047] iii) 상기의 최종 표적 세포 혼탁액 $100\mu\text{l}$ 를 96-웰 미량역가 평판의 각 웰에 옮기는 단계;

- [0048] iv) 항체를 세포 배양 배지에서 4000 ng/ml에서 0.04ng/ml로 순차희석하고, 남은 항체 용액 50μl를 96-웰 미량역가 평판에 있는 표적 세포에 첨가하여, 상기 농도 범위 전체를 포함하는 다양한 항체 농도에서 3회씩 반복 시험하는 단계;
- [0049] v) 최대 방출량(MR)을 조절하기 위해, 표지한 표적 세포를 포함하는 평판중 3개의 추가 웰에 항체 용액(상기 단계 iv)에서 지적한 대신에 비이온성 세제(Nonidet, Sigma, St. Louis)의 2 % (v/v) 수용액 50μl를 넣는 단계;
- [0050] vi) 자발적 방출량(SR)을 조절하기 위해, 표지한 표적 세포를 포함하는 평판중 3개의 추가 웰에 항체 용액(상기 단계 iv)에서 지적한 대신에 RPMI 세포 배양 배지 50μl를 넣는 단계;
- [0051] vii) 96-웰 미량역가 평판을 50 x g로 1분간 원심분리하고, 4°C에서 1시간 항온처리시키는 단계;
- [0052] viii) PBMC 혼탁액(상기 단계 i)에서 지적한 50μl를 각 웰에 첨가하여 효과기: 표적 세포 비를 25:1로 만들고, 평판을 37°C의 5% 이산화탄소 대기에서 4시간동안 배양기내에 방치하는 단계;
- [0053] ix) 각 웰로부터 세포가 없는 상청액을 수집하고, 실험적으로 방출된 방사능(ER)을 감마 카운터로 정량화하는 단계;
- [0054] x) 식 (ER-MR)/(MR-SR) x 100에 의해 각 항체 농도에 대한 특이적 용해 (specific lysis) 백분율을 계산하는 단계로서, 여기서 ER은 그 항체농도에서의 정량화된 평균 방사능(상기 단계 ix)에서 지적)이고, MR은 MR 대조군(상기 단계 v)에서 지적)에 대해 정량화된 평균 방사능(상기 ix) 단계에서 지적)이고, SR은 SR 대조군(상기 단계 ix)에서 지적)에 대해 정량화된 평균 방사능(상기 단계 ix)에서 지적)이다.
- [0055] 4) "증가된 ADCC"는 상기 시험된 항체 농도 범위내에서 관찰된 특이적 용해의 최대 백분율의 증가, 및/또는 상기 시험된 항체 농도 범위내에서 관찰된 특이적 용해 최대 백분율의 반을 얻는데 필요한 항체농도의 감소로 정의된다. ADCC의 증가는 본 기술분야에서 숙련된 당업자에게 알려져 있는 동일한 표준 제조, 정제, 제형화 및 저장방법을 사용하여, 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생성된 동일한 항체에 의해 매개되고, 상기 분석법에 의해 측정되는 ADCC에 비례하지만, 글리코실트랜스퍼라제 GnTIII를 과발현시키기 위해 조작된 숙주 세포에 의해서 유발되지는 않았다.
- [0056] 용어 항CD20 항체는, 일반적으로 CD20으로 칭하여지는 것으로서, 통상 인간 B 림프구 제한 분화 항원 Bp35로 명명된 35,000 달톤의 글리코실화 되지 않은 인단백질의 세포 표면을 특이적으로 인식하는 항체를 의미한다.
- [0057] **글리코실화 패턴의 변형이 소망되는 단백질을 암호화하는 핵산의 동정 및 제조**
- [0058] 본 발명은 항체 의존적 세포 독성이 증가된 항체의 단편을 포함하는 융합 단백질 또는 항체 또는 항체 단편의 글리코형을 제조하기 위한 숙주 세포주의 제조 방법 및 용도를 제공한다. 표적 에피토프의 동정 및 글리코실화 패턴의 변형이 소망되는 유효 치료가(potential therapeutic value)를 갖는 항체의 제조, 그리고 그것들의 각각의 암호화 핵산서열을 분리하는 것은 본 발명의 범주에 속한다.
- [0059] 본 기술분야에서 알려진 다양한 방법은 목적하는 에피토프를 표적화하는 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 단일쇄, Fab 단편 및 Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편을 포함하나 이것에 한정되는 것은 아니다. 그러한 항체는 예컨대, 진단 시약이나 치료 약물로써 유용할 수 있다. 치료 약물로써, 이를테면, 리간드, 기질 또는 어댑터(adapter) 분자와 결합하기 위해 경쟁하는 중화 항체가 특히 바람직한 관심사이다.
- [0060] 항체를 제조하기 위해 목적하는 표적 단백질을 주사하여 다양한 숙주 동물을 면역화시키며, 이 동물로서는 토끼, 마우스, 래트 등을 포함하나 이것만으로 한정되는 것은 아니다. 숙주의 종에 따라 면역 반응을 증가시키기 위해 다양한 애쥬반트를 사용할 수 있으며, 상기 애쥬반트로서는 Freund's(완전 및 불완전), 미네랄 젤, 예컨대 알루미늄히드록시드, 표면 활성 물질, 예컨대, 리소레시틴, 폴루로닉 폴리올, 다가음이온, 웨티드, 사포닌, 오일 에멀젼, 키홀 림펫(keyhole limpet) 헤모시아닌, 디니트로페놀, 및 BCG(bacille Calmette-Guerin) 및 코린박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*)과 같은 잠재적으로 유용한 인간 애쥬반트를 포함하나 여기에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 목적하는 표적에 대한 모노클로날 항체는 배양물중의 연속 세포주에 의해 항체 분자를 생성시키는 임의의 기법을 이용해서 제조될 수 있다. 이것은 문헌[Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-97 (1975)]에 최초로 발표된 하이브리도마 기법, 인간 B-세포 하이브리도마 기법 (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); Cote et

al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-30(1983)) 및 EBV-하이브리도마 기법 (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 77-96 (Alan R.Liss, Inc., 1985))을 포함하나 여기에 한정되는 것은 아니다. 게다가, 적절한 생물학적 활성을 갖는 인간 항체 분자로부터 만들어진 유전자와 적절한 항원 특이성을 갖는 마우스 항체 분자로부터 만들어진 유전자를 접합한 "키메라 항체"를 제조하기 위한 기법(Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-55(1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-08(1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-54 (1985))이 개발되었다. 대안적으로, 단일쇄 항체(미국특허 제 4,946,778 호) 제조를 위해 기술된 기법은 필요한 특이성을 갖는 단일쇄 항체를 제조하는 데에도 적용될 수 있다.

[0062] 목적하는 표적 단백질과의 특이적인 결합부위를 포함하는 항체 단편은 공지된 기법에 의해서도 만들어질 수 있다. 예를 들면, 그러한 단편은 항체 분자의 펩신 소화에 의해 제조될 수 있는 $F(ab')_2$ 단편 및 $F(ab')_2$ 단편의 이황화물 다리의 환원에 의해 제조될 수 있는 Fab 단편을 포함하나 여기에 한정되는 것은 아니다. 대안적으로, Fab 발현 라이브러리는 목적하는 표적 단백질에 대한 소정의 특이성을 갖는 모노클로날 Fab 단편에 대한 빠르고 쉬운 동정을 가능하게 하도록 구성될 수 있다(Huse et al., *Science* 246:1275-81 (1989)).

[0063] 일단 글리코실화 패턴의 변형이 소망되는 항체나 항체 단편을 동정했다면, 암호화 핵산 서열은 본 기술분야에서 널리 공지된 기법을 이용하여 동정되고 분리된다.

[0064] a. 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질을 제조하기 위한 세포주의 제조

[0065] 본 발명은 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질을 제조하는 숙주 세포 발현계를 제공한다. 특히, 본 발명은 개선된 치료적 가치를 갖는 단백질의 글리코형을 제조하는 숙주 세포계를 제공한다. 따라서 본 발명은 $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII)라 불리는 당단백질-변형 글리코실트랜스퍼라제의 발현을 증가시키기 위해 선별되거나 또는 조작된 숙주 세포 발현계를 제공한다. 구체적으로, 그러한 숙주 세포 발현계는 구성 또는 조절 프로모터계에 작동적으로 연결된 GnTIII 암호화 재조합 핵산 분자를 포함하도록 조작될 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포 발현계는 GnTIII를 자연적으로 생산하고, 이의 생산을 유도하여/유도하거나 이를 생산하기 위해 선별되는데에 이용될 수 있다.

[0066] 하나의 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 GnTIII 암호화 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 제공한다. 한편으로, 숙주 세포는 적어도 하나의 GnTIII 암호화 유전자를 포함하는 핵산 분자로 형질 전환되거나 또는 형질 감염된다. 또 다른 한편으로는, 숙주 세포는 내인성 GnTIII가 활성화되는 방식으로 조작되고/조작되거나 선별되었다. 예를 들면, 숙주 세포는 내인성 GnTIII의 발현을 일으키는 돌연 변이를 보유하도록 선별될 수 있다. 하나의 구체예에서, 숙주 세포는 CHO lec10 돌연변이체이다. 대안적으로, 숙주 세포는 내인성 GnTIII가 활성화되도록 조작될 수 있다. 추가의 대안으로서, 구성 프로모터 요소, 트랜스포존, 또는 레트로바이러스 요소를 숙주 세포의 염색체에 삽입하여 내인성 GnTIII가 활성화되도록 숙주 세포가 조작된다.

[0067] 일반적으로, 임의의 종류의 배양된 세포주라도 조작자에게 본 발명의 숙주 세포주의 백그라운드(background)로 사용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 또는 곤충 세포가 본 발명의 조작된 숙주 세포를 생산하기 위한 백그라운드 세포주로 사용된다.

[0068] 본 발명은 본 명세서에서 정의된 GnTIII를 발현하는 임의의 조작된 숙주 세포를 포함하는 것으로 간주한다.

[0069] GnTIII를 암호화하는 1개 또는 수개의 핵산이 구성 프로모터 또는, 대안적으로, 조절 발현계의 제어하에서 발현된다. 적당한 조절 발현계는 테트라사이클린-조절 발현계, 엑디슨-유도성 발현계, lac-스위치 발현계, 글루코코르티코이드-유도성 발현계, 온도-유도성 프로모터계, 및 메탈로티오네인 금속-유도성 발현계를 포함하나 여기에 한정되는 것은 아니다. 만약 GnTIII를 암호화하는 수개의 다른 핵산이 숙주계내에 포함되어 있다면, 그 중의 일부는 구성 프로모터의 제어하에서 발현될 수 있고, 나머지는 조절 프로모터의 제어하에서 발현된다. 최대 발현 수준은 세포 생장율에 심각한 악영향을 미치지 않으며, 통상적인 시험에 의해서도 결정될 안정한 GnTIII 발현의 가능한 최대수준으로 간주한다. 발현 수준은 GnTIII 특이적 항체를 이용하는 웨스턴 블릿 분석법, GnTIII 특이적 핵산 프로브를 이용하는 노던 블릿 분석법, 또는 효소 활성 측정법 등 본 기술분야에서 일반적으로 알려진 방법에 의해 결정된다. 대안적으로, GnTIII의 생합성 산물에 결합하는 렉틴 예컨대, E₄-PHA 렉틴에 사용될 수 있다. 추가의 대안에서, 핵산은 리포터 유전자에 작동적으로 결합될 수 있으며, GnTIII의 발현 수준은 리포터 유전자의 발현 수준과 상관된 신호를 측정함으로써 결정된다. 리포터 유전자는 단일 mRNA 분자로서 GnTIII를 암호화하는 핵산과 함께 전사되며, 이 핵산의 각각의 암호화 서열은 내부 리보좀 도입 부위(internal ribosome entry site, IRES) 또는 캡-독립적 변역 인핸서(cap-independent translation enhancer, CITE)에 의해 연결될 수 있다. 리

포터 유전자는 GnTIII를 암호화하는 적어도 하나의 핵산과 함께 번역되어 단일 폴리펩티드체를 형성할 수 있다. GnTIII 암호화 핵산은 단일 프로모터의 제어하에서 리포터 유전자에 작동적으로 연결되며 GnTIII 암호화 핵산과 리포터 유전자는 각각 두개의 mRNA 분자로 교번적으로 스플라이싱되는, RNA분자로 전사된다. 만들어진 mRNA중 하나는 리포터 단백질로 번역되고, 나머지 한개는 GnTIII으로 번역된다.

[0070] 만약 몇 개의 상이한 GnTIII 암호화 핵산이 발현되면, 이 핵산은 하나 또는 수개의 mRNA로 전사되는 방식으로 배열될 수 있다. 만약 상기 핵산이 단일 mRNA 분자로 전사된다면, 그들의 개별적인 암호화 서열은 IRES 또는 CITE에 의해 연결될 수 있다. 상기 핵산은 단일 프로모터로부터 몇개의 개별적 mRNA 분자로 교번적으로 스플라이싱된 RNA 분자로 전사될 수 있고, 각각 그들의 암호화된 GnTIII으로 번역된다.

[0071] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체-의존적 세포 독성이 증가된 치료용 항체를 생성하는 숙주세포 발현계, 및 Fc 매개 세포 독성을 증가시키기 위해 표면에 IgG Fc 영역을 제시하는 세포를 제공한다. 일반적으로 숙주 세포 발현계는 적어도 하나의 GnTIII 암호화 핵산과 함께, 변형된 글리코형으로의 생산이 소망되는 항체를 암호화하는 핵산을으로 발현하도록 조작되고/조작되거나 선별되었다. 하나의 구체예에서, 숙주 세포계는 GnTIII를 암호화하는 적어도 하나의 유전자로 형질 감염된다. 통상적으로, 형질 감염된 세포는 안정하게 GnTIII를 발현하는 클론을 동정 및 분리하도록 선별된다. 다른 구체예에서, 숙주 세포는 내인성 GnTIII 발현을 위해 선별된다. 예를 들면, 세포는 다른 잠재성(silent) GnTIII의 발현을 개시하는 돌연변이를 보유하는 것으로 선별된다. CHO 세포는 특정 돌연변이체 예를 들면, 돌연변이체 Lec10에서 활성인 잠재성 GnTIII 유전자를 보유하는 것으로 알려져 있다. 또한, 조절 또는 구성 프로모터의 삽입, 트랜스포존, 리트로 바이러스 요소 등의 이용 등을 포함하여, 본 기술 분야에 공지된 잠재성 GnTIII의 활성화 방법이 사용될 수 있다. 또한, 숙주 세포의 GnTIII 발현 수준을 조정하는데 이용될 수 있는 유전자 녹아웃(gene knockout) 기법의 이용 또는 리보자임 방법을 이용하는 것은 본 발명의 범주에 속한다.

[0072] 임의의 종류의 배양된 세포주는 조작자에게 본 발명의 숙주 세포주의 백그라운드로 사용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 또는 곤충 세포가 사용될 수 있다. 통상적으로, 그러한 세포주는 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질, 전항체 분자 또는 항체 단편을 암호화하는 적어도 하나의 형질 감염된 핵산을 더 포함하도록 조작된다. 다른 구체예에서, 원하는 특정한 항체를 발현해내는 하이브리도마 세포주는 본 발명의 조작된 숙주 세포를 생성하는 백그라운드 세포주로 이용된다.

[0073] 통상적으로, 숙주 세포계에서의 적어도 하나의 핵산은 GnTIII를 암호화한다.

[0074] GnTIII를 암호화하는 하나 또는 수개의 핵산은 구성 프로모터, 또는, 대안적으로, 조절 발현계의 제어하에서 발현될 수 있다. 적당한 조절 발현계로서는 테트라사이클린-조절 발현계, 엑디손-유도성 발현계, lac-스위치 발현계, 글루코코르티코이드-유도성 발현계, 온도-유도성 프로모터계, 및 메틸로티오네인 금속-유도성 발현계를 포함하나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 만약 GnTIII를 암호화하는 수개의 상이한 핵산이 숙주 세포계내에 포함되어 있다면, 그 중의 일부는 구성 프로모터의 제어하에서 발현될 수 있고, 나머지는 조절 프로모터의 제어하에서 발현된다. 최대 발현 수준은 세포생장율에 심각한 부작용이 없으며, 통상적인 시험에 의해서도 결정될 수 있는 안정한 GnTIII 발현의 최대가능 수준인 것으로 간주된다. 발현 수준은 GnTIII 특이적 항체를 이용하는 웨스턴 블러팅 분석법, GnTIII 특이적 핵산 프로브를 이용하는 노던 블러팅 분석법, 또는 GnTIII 효소 활성 측정법 등 본 기술 분야에서 일반적으로 알려진 방법에 의해 결정된다. 대안적으로, GnTIII의 생합성 산물에 결합한 렉틴 예컨대, E₄-PHA 렉틴이 이용될 수 있다. 추가의 대안에서, 핵산은 리포터 유전자에 작동적으로 결합되며, 당단백질 변형 글리코실 트랜스퍼라제(glycoprotein-modifying glycosyl transferase)의 발현 수준은 리포터 유전자의 발현 수준과 상관된 신호를 측정함으로써 결정된다. 리포터 유전자는 단일 mRNA 분자로서 당단백질 변형 글리코실 트랜스퍼라제를 암호화하는 핵산과 함께 전사될 수 있으며, 상기 핵산의 암호화 서열 각각은 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 또는 캡-독립적 번역 인핸서(CITE)에 의해 연결될 수 있다. 리포터 유전자는 GnTIII를 암호화하는 적어도 하나의 핵산과 함께 번역되어 단일 폴리펩티드 사슬을 형성할 수 있다. GnTIII 암호화 핵산은 단일 프로모터의 제어하에서 리포터 유전자에 작동적으로 연결되어 GnTIII 암호화 핵산과 리포터 유전자는 각각 두 개의 mRNA 분자로 교번적으로 스플라이싱되는 RNA 분자로 전사되며, 생성된 mRNA중 하나는 상기 리포터 단백질로 번역되고, 나머지 한개는 GnTIII으로 번역된다.

[0075] 만약 몇개의 상이한 GnTIII 암호화 핵산이 발현되면, 상기 핵산은 하나 또는 수개의 mRNA 분자로 전사되는 방식으로 배열될 수 있다. 만약 그것이 단일 mRNA 분자로 전사된다면, 그들의 암호화 서열 각각은 IRES 또는 CITE에 의해 연결될 수 있다. 상기 핵산은 단일 프로모터로부터 몇개의 mRNA 분자로 각각 교번적으로 스플라이싱되는

RNA 분자로 전사되고, 이들은 각각 그들의 암호화 GnTIII으로 번역된다.

[0076] i. 발현계

[0077] 목적하는 단백질의 암호서열 및 GnTIII 및 적당한 전사/번역 제어 신호의 암호 서열을 포함하는 발현 벡터를 구성하는데 본 기술분야에서 숙련된 당업자에게 널리 알려진 방법이 사용될 수 있다. 이런 방법은 시험관내에서의 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생생체내 재조합/유전자 재조합을 포함한다. 예를 들면, 문헌[Maniatis et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) 및 Ansubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)] 참조.

[0078] 다양한 숙주-발현 벡터계가 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열을 발현시키기 위해 활용될 수 있다. 바람직하게는, 포유류 세포는 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질 감염된 숙주 세포계로서 사용된다. 가장 바람직하게는, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 또는 곤충 세포가 숙주 세포계로서 사용된다. 다른 구체예에서, 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질 전환된 효모 세포; 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 바큘로바이러스 (baculovirus))로 감염된 곤충 세포계; 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 꽃상추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염시키거나, 또는 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예컨대, Ti 플라스미드)로 형질 전환된 식물 세포계; 또는 이중 미세 염색체(double-minute chromosome)에서 (예컨대, 뮤린 세포주) 안정하게 증폭되거나 (CHO/dhfr) 또는 불안정하게 증폭된 목적하는 단백질을 암호화하는 DNA 다중복사본을 포함하도록 조작된 세포주를 포함하는, 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 아데노 바이러스, 백시니아 바이러스)로 감염된 동물 세포계를 비롯한, 다른 진핵성 숙주 세포계가 고려될 수 있다.

[0079] 본 발명의 방법에서, 통상적으로 더욱 재현 가능한 결과를 얻을 수 있고 또한 보다 용이하게 대규모로 제조될 수 있기 때문에 안정한 발현이 일시적인 발현에 비해 일반적으로 바람직하다. 숙주 세포는 바이러스의 복제 원점을 포함하는 발현 벡터를 사용하기 보다, 적절한 발현 조절 요소(예컨대, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선별가능한 마커에 의해 제어되는, 각각의 암호화 핵산으로 형질 전환될 수 있다. 외부 DNA를 도입한 후에, 조작된 세포를 영양 배지에서 1 내지 2일 동안 성장시킬 수 있고, 그 후에 선별 배지로 옮겨지게 된다. 재조합 플라스미드에서 선별가능한 마커는 선별에 대한 내성을 제공하여, 플라스미드가 염색체로 안정하게 통합화된 세포를 선별 가능하게 하여, 차례로 세포주로 클로닝되고 복제할 수 있는 기점을 형성하도록 성장된다.

[0080] tk-, hgprt 또는 aprt~ 세포에 각각 사용될 수 있는, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler et al., *Cell* 11:223 (1977)), 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)), 및 아데닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (Lowy et al., *Cell* 22:817 (1980)) 유전자를 포함하는 다수의 선별계가 사용될 수 있으나, 이것에 한정되는 것은 아니다. 또한, 메토트렉세이트에 대한 내성을 제공하는 dhfr (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567(1989); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)), 미코페놀산에 대한 내성을 제공하는 gpt (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072 (1981)), 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 제공하는 neo (Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)) 및 하이그로마이신에 대한 내성을 제공하는 hygro (Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984)) 유전자를 선별하는 기초로서 항대사산물 내성(antimetabolite resistance)이 이용될 수 있다. 최근, 세포가 트립토판 대신에 인돌을 이용하게 하는 trpB, 세포가 히스티딘 대신에 히스티놀을 이용하게 하는 hisD (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)), 글루타민 합성효소계 및 오르니틴 디카복실라제 저해제인 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴, DFMO에 대한 내성을 제공하는 ODC(오르니틴 디카복실라제) (McConlogue, in: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)) 등으로 불리는 추가의 선별가능한 유전자에 대해서도 기법되었다.

[0081] ii. 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질을 발현하는 형질 감염체 또는 형질 전환체의 동정

[0082] 암호화 서열을 포함하고 생물학적 활성 유전자 생성물을 발현하는 숙주 세포는 적어도 다음 4가지의 연구법에 의해 동정될 수 있다. (a) DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화; (b) "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재; (c) 숙주 세포에서 각각의 mRNA 전사체의 발현에 의하여 측정되는 전사 수준의 평가; 및 (d) 면역분석법에 의해서

또는 유전자 생성물의 생물학적 활성에 의해 측정되는 유전자 생성물의 검출

- [0083] 첫번째 접근법에서, 발현벡터에 삽입된 목적 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열의 존재는, 각각 또는 그 일부 또는 유도체의 암호화 서열과 유사한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로브를 이용하는 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화에 의해 검출될 수 있다.
- [0084] 두번째 접근법에서, 재조합 발현 벡터계/숙주계는 특정 "마커" 유전자 기능(예컨대, 티미딘 키나아제 활성, 항생제에 대한 내성, 메토트렉세이트에 대한 내성, 형질 전환 표현형, 바클로바이러스에서의 폐색체 형성 등)의 존부에 근거하여 동정되고 선별될 수 있다. 예를 들면, 만약 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열이 벡터의 마커 유전자 서열에 삽입되면, 각각의 암호화 서열을 포함하는 재조합체는 마커 유전자 기능의 부재에 의해 동정될 수 있다. 대안적으로, 마커 유전자는 암호화 서열의 발현을 제어하기 위해 이용하는 동일한 또는 상이한 프로모터의 제어하에서 암호화 서열과 종별로 위치할 수 있다. 유도 또는 선별에 반응하는 마커의 발현은 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열의 발현을 나타낸다.
- [0085] 세번째 접근법에서, 목적하는 단백질의 암호 영역 및 GnTIII의 암호 서열에 대한 전사 활성은 하이브리드화 분석법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들면, 목적하는 단백질의 암호 서열 및 GnTIII의 암호 서열 또는 그것의 특정 일부분과 유사한 프로브를 이용하는 노던 블랏에 의해, RNA는 분리 및 분석될 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포의 전체 핵산은 추출되어 상기 프로브로의 하이브리드화에 대해 분석될 수 있다.
- [0086] 네번째 접근법에서, 목적하는 단백질의 단백질 생성물 및 GnTIII의 암호 서열의 발현은 면역학적으로, 예를 들면 웨스턴 블랏, 방사면역 침강반응 및 효소결합 면역 분석법 등과 같은 면역 분석법에 의해 평가될 수 있다. 그러나, 발현계의 성공에 대한 궁극적인 시험은 생물학적으로 활성인 유전자 생성물을 검출하는 것을 포함한다.
- [0087] b. 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 단백질 및 단백질 단편의 제조 및 이용
- [0088] i. 항체-의존적 세포 독성이 증가된 항체의 제조 및 이용
- [0089] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 항체 의존적 세포 독성이 증가된 항체 및 항체 단편의 글리코형을 제공한다.
- [0090] 몇가지 유형의 암을 치료하기 위한 비접합 모노클로날 항체(mAb)의 임상 시험이 최근 고무할만한 결과를 제공하였다[Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), Deo et al., *Immunology today* 18:127 (1997)]. 키메라 비접합 IgG1이 저급 또는 난포성 B-세포 비호지킨 림프종에 적용되어 효과를 나타내었고 (Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997)), 다른 비접합 mAb 즉, 고형 유방암을 표적으로 하는 인간화된 IgG1은 III상 임상 시험에서 유망한 결과를 보여주고 있다 (Deo et al., *Immunology today* 18:127 (1997)). 이러한 두 종류의 mAb의 항원은 그들 각각의 종양세포에서 과량으로 발현되며, 상기 항체들은 시험관내 또는 생체내에서 효과기 세포에 의한 잠재적 종양 파괴를 매개한다. 대조적으로, 정밀한 종양 특이성을 갖는 기타 다수의 비접합 mAb는 임상적으로 유용하기에 충분한 효능을 갖는 효과기 기능을 유발시킬 수 없다 [Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997), Surfus et al., *J. Immunother.* 19:187-91 (1996)]. 이와 같이 활성이 약한 일부 mAb에서, 보조 사이토카인 요법이 현재 시도중이다. 사이토카인을 첨가하면, 순환성 림프구의 활성과 수를 증가시킴으로써 항체 의존적 세포 독성(ADCC)을 자극할 수 있다(Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996)). ADCC 즉, 항체 표적화 세포에 대한 용해성 공격은 항체의 불변 영역(Fc)에 백혈구 수용체가 결합할 때 유발된다 (Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997)).
- [0091] 상이하되 보완적인, 비접합 IgG1의 ADCC 활성을 증가시키기 위한 방법은 림프구 수용체(Fc γ Rs)에 대한 항체의 친화성을 증가시키도록 항체의 Fc 영역을 조작하는 것이다. 단백질 조작 연구에서는 Fc γ Rs가 IgG CH2 도메인의 하부 힌지(hinge) 영역과 상호작용한다는 것을 보여주었다[Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)]. 그렇지만, Fc γ R 결합에는 또한 CH2 영역중 보존된 Asn 297에 공유적으로 부착된 올리고당이 존재해야 한다. 문헌 [Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996), Wright and Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997)]에서는 올리고당과 폴리펩티드 둘다 상호작용 부위에 직접 기여한다는 것 또는 활성 CH2 폴리펩티드 구조를 유지하는데 올리고당이 필요하다는 것을 제시하고 있다. 따라서, 올리고당 구조의 변형은 상호작용에 대한 친화력을 증가시키는 수단으로서 이용될 수 있다.
- [0092] IgG 분자는 그것의 Fc 영역중의 각 중쇄상에 하나씩, 2개의 N-결합 올리고 당을 보유한다. 어떠한 당단백질이라도, 항체는 동일한 폴리펩티드 주체를 공유하지만 글리코실화 부위에 부착된 상이한 올리고당을 보유하는 일군의 글리코형으로 생성된다. 혈청 IgG의 Fc 영역에서 통상적으로 발견되는 올리고당은, 말단의 시알릭산과 이분화된 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)의 양이 수준이 낮고, 말단 갈락토실화 및 코어 푸코실화 정도가 다양한 복합 바이앤테너리형이다(Wormald et al., *Biochemistry* 36:130-38 (1997)). 몇몇 연구에서는, Fc γ R 결합에 요구되

는 최소의 탄수화물 구조가 올리고당 코어에 존재한다고 제안한다[Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)]. 말단 갈락토즈를 제거하면 ADCC 활성을 대략 2배 감소시키게 되는데, 이는 Fc γ R 수용체 결합에서의 상기 잔기의 역할을 나타내는 것이다[Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)].

[0093] 비접합 치료용 mAb를 상업적 및 연구용으로 생성하는데에 사용되는 마우스 또는 햄스터 유래 세포주는 Fc 부위에 대한 올리고당 결정인자를 정상적으로 부착시키는데 필요하다. 그러나, 이러한 세포주에서 발현된 IgG는 혈청의 IgG에서 적은 양으로 발견된 이분화된 GlcNAc를 보유하지 않는다[Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1955)]. 대조적으로, 최근에 래트 골수종으로 생성된 인간화된 IgG1(CAMPATH-1H)는 이분화 GlcNAc를 글리코형으로 보유하는 것으로 관찰되었다[Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1955)]. 래트 세포 유래 항체는 표준 세포주에서 생성된 CAMPATH-1H 항체와 유사한 시험판내 ADCC 활성에 도달하였으나, 항체농도는 상당히 낮았다.

[0094] CAMPATH 항원은 보통 림프종 세포에 다량 존재하고, 그리고 이 키메라 mAb는 이분화 GlcNAc가 없이도 높은 ADCC 활성을 나타낸다[Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1955)]. N-연결 글리코실화 경로에서, 이분화 GlcNAc는 효소 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스파라제 III(GnTIII)에 의해 첨가된다[Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986)].

[0095] 본 발명자는 외부에서 조절하는 방식으로, 클로닝된 GnTIII 유전자를 상이한 수준으로 발현시키도록 사전에 조작된 단일 항체 생성 CHO 세포주를 사용하였다. 이 방법은 변형된 항체의 GnTIII의 발현과 ADCC 활성간의 엄격한 상관관계를 최초로 확립하였다.

[0096] 본 발명자는 개시된 방법에 의해 변형된 C2B8 항체의 ADCC 활성이 동일한 세포 배양 및 정제 조건하에서 생성된 변형되지 않은 표준 C2B8 항체보다 약 16배 높다고 이미 소개하였다. 간략히 말해서, GnTIII를 발현하지 않는 CHO-tTA-C2B8 세포에서 발현된 C2B8 항체 샘플은, 인간 림프구에 의한 SB 세포(CD20+)의 시험판내 분해로서 측정된, 약 31%의 세포 독성을 활성(항체 농도 1 μ g/ml에서)을 나타내었다. 대조적으로, 상당히 억제된 항체 수준인 기저 수준으로 GnTIII를 발현하는 CHO 세포 배양액으로부터 유래된 C2B8 항체는 동일한 항체 농도로 존재하는 대조군에 비해 최대 ADCC 활성이 33% 증가하였다. 게다가, GnTIII 발현의 증가는 동일한 항체 농도 대조군에 비해 최대 ADCC 활성을 대략 80%만큼(항체 농도 1 μ g/ml) 크게 증가시켰다(International Publication No. WO 99/54342, 본 문헌의 전제 내용은 본원에서 참조문헌으로 인용하고 있다).

[0097] 항체 의존적 세포 독성이 증가된 본 발명의 추가 항체는 다음과 같은 항체를 포함하나, 여기에 한정되는 것은 아니다: 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 신경아세포종 모노클로날 항체 (chCE7), 본 발명의 방법에 의해 생성된 키메라 항인간 신장 세포 암종 모노클로날 항체 (ch-G250), 본 발명의 방법에 의해 생성된 인간화된 항HER2 모노클로날 항체 (예컨대, 트라스투즈맙(Trastuzumab; HERCEPTIN)), 본 발명의 방법에 의해 생성된 키메라 항인간 결장, 폐, 및 유방암 모노클로날 항체 (ING-1), 본 발명의 방법에 의해 생성된 인간화된 항인간 17-1A 항원 모노클로날 항체 (3622W94), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 결장직장 종양 항체 (A33), 본 발명의 방법에 의해 생성되고 GD3 강글리오시드에 대하여 유도된 항인간 흑색종 항체 (R24), 및 본 발명의 방법에 의해 생성된 키메라 항인간 편평세포 암종 모노클로날 항체 (SF-25), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 소형세포 폐 암종 모노클로날 항체 (BEC2, ImClone Systems, Merck, KgaA), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 비호지킨 림프종 모노클로날 항체 (Bexxar (토시투모맙 (tositumomab, Coulter Pharmaceuticals), 본 발명의 방법에 의해 생성된 Oncolym (Techniclon, Alpha Therapeutic)), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 편평세포 머리 및 목 암종 모노클로날 항체 (C225, ImClone Systems), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 직장 및 결장 암종 모노클로날 항체 (Panorex 에드레콜레맙(edrecolomab), Centocor, Glaxo Wellcome), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 난소 암종 모노클로날 항체 (Theragyn, Antisoma), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 급성 골수성 백혈병 암종 모노클로날 항체 (SmartM195, Protein Design Labs, Kanebo), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 악성 교종 모노클로날 항체 (Cotara, Techniclon, Cambridge Antibody Technology), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 B 세포 비호지킨 림프종 모노클로날 항체 (IDE-C2B8, IDEC Pharmaceuticals), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 고형 종양 모노클로날 항체 (CEA-Cide, Immunomedics), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 결장성직장 암종 모노클로날 항체 (Iodine 131-MN-14, Immunomedics), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 난소, 신장, 유방, 및 전립선 암종 모노클로날 항체 (MDX-210, Medarex, Novartis), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 결장성직장 및 췌장 암종 모노클로날 항체 (TTMA, Pharmacie & Upjohn), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 TAG-72 발현 암종 모노클로날 항체 (MDX-220, Medarex), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 EGFR-발현 암종 모노클로날 항체 (MDX-447), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항VEGF 모노클로날 항체 (Genentech), 본 발명의 방법에 의해 생성된 항인간 유방,

폐, 전립선 및 췌장 암종 및 악성 흑색종 모노클로날 항체 (BrevaRex, AltaRex), 및 본 발명의 방법에 의해 생성된 항 인간 급성 골수성 백혈병 모노클로날 항체 (Monoclonal Antibody Conjugate, Immunex). 추가적으로, 본 발명은 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질 및 항체의 단편에 관한 것이다.

[0098] ii. Fc 매개 세포 독성을 증가시키는 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 포함하는 융합 단백질의 제조와 이용

[0099] 전술한 바와 같이, 본 발명은 치료용 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이것은 상기 항체들의 Fc 영역의 글리코실화 패턴을 조작함으로써, 특히 상기 항체를 Fc 영역에 보존된 글리코실화 부위에 N-결합된 이분화된 복합 올리고당 및 이분화된 하이브리드 올리고당을 보유하는 항체 분자의 비율을 최대화함으로써 가능해진다. 이 기법은, 치료용 항체에 의해서만이 아닌, 면역글로불린의 Fc 영역에 상당하는 영역을 보유하는 임의의 분자에 의해서 매개되는 바람직하지 않은 세포에 대한 Fc 매개 세포독성을 증가시키는데 사용될 수 있는데, 그 이유는 오로지 Fc 영역에만 영향을 주는 글리코실화를 조작함으로써, ADCC 작용기작에 관여하는 효과기 세포 표면의 Fc 수용체와의 상호작용이 변화하기 때문이다. 본 문헌에 개시되어 있는 방법이 적용될 수 있는 Fc 포함 분자는 다음의 두가지를 포함하나, 이것에 한정되는 것은 아니다: (a) Fc 영역의 N-말단에 융합된 표적화 단백질 도메인으로 제조된 가용성 융합 단백질 (Chamov and Ashkenazi, *Trends Biotech.* 14:52 (1996)) 및 (b) Fc 영역의 N-말단에 융합된 세포질 막에 국소화된 II형 경막 도메인으로 이루어진 세포질 막 고착(membrane-anchored) 융합 단백질 (Stabila, P.F., *Nature Biotech.* 16:1357 (1998)).

[0100] 가용성 융합 단백질 (a)의 경우에서, 표적화 도메인은 치료용 항체와 유사한 방식으로 암세포와 같은 바람직하지 못한 세포에 융합 단백질을 결합시킨다. 따라서, 이런 분자들에 의해 매개되는 Fc 매개 세포 독성 활성을 향상시키기 위해 본 문헌에서 개시하고 있는 방법을 사용하는 것은 치료용 항체에 적용되는 방법과 동일하다.

[0101] 막고착 융합 단백질 (b)의 경우에서, 생체의 바람직하지 못한 세포는 융합 단백질을 암호화하는 유전자를 발현시켜야 한다. 이는 유전자 치료 방법 즉, 바람직하지 못한 세포에 대한 융합 단백질 암호화 유전자를 발현시키는 플라스미드 또는 바이러스 벡터로 생체내에서 세포를 형질 감염시킴으로써, 또는 융합 단백질을 세포 표면에 발현시키도록 유전자 조작된 세포를 생체에 이식시키는 방법에 의해서 수행될 수 있다. 후자의 세포는 이것이 Fc 매개 세포 독성 기작에 의해 파괴될 수 없는 고분자 캡슐(피낭 세포 치료)로 생체 내부에 정상적으로 이식될 것이다. 캡슐 장치가 잘못되어 바람직하지 않게는 세포가 탈출하게 되면, 이 세포는 Fc-매개 세포 독성에 의해 제거될 수 있다[Stabila et al., *Nature Biotech.* 16:1357 (1998)]. 이 경우, 본 문헌에 개시되어 있는 방법은, GnTIII를 적정 수준으로 또는 최대 수준으로 발현시키는 부가적 유전자 발현 카셋트를 유전자 요법용 벡터 내부로 도입하거나, 또는 GnTIII를 적정 수준으로 또는 최대 수준으로 발현시키기 위해 이식된 세포를 조작하여 실현될 수 있다. 두 경우, 개시된 방법의 목적은 이분화된 복합 올리고당 및/또는 이분화된 하이브리드 올리고당을 보유하는 Fc 영역이 표면에 제시되는 비율을 증가시키거나 최대화하는 것이다.

[0102] 하기의 실시예는 본 발명을 더 상세히 설명한다. 다음의 제조방법과 실시예는 본 기술분야에서 숙련된 당업자가 본 발명을 더 명확하게 이해하고 실시할 수 있도록 한다. 그러나, 본 발명은 본 발명의 일면을 설명하고자 하는 구체예 및 본발명의 범주내에서 기능적으로 동일한 방법으로 제한되는 것은 아니다. 사실, 본 문헌에서 개시하고 있는 것에 추가하여, 본 발명은 본 기술분야에서 숙련된 당업자에 의해 상세한 설명이나 첨부 도면으로부터 변형 가능하다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위의 범주내에 속한다.

0103] 실시예 1

[0104] IDEC-CEB8 생성 세포주를 글리코실화 조작하여 제조된, 항체 의존적 세포 독성이 증가된 키메라 항CD20 항체 IDEC-C2B8의 신규 개체

0105] IDEC-C2B8의 VH 및 VL 암호화 영역의 합성 및 포유류 발현 벡터의 구성

[0106] PCR을 이용하여 IDEC-C2B8 항체의 VH 및 VL 영역을 암호화하는 cDNA를 한세트의 중첩 단일체 올리고뉴클레오티드로부터 1단계 프로세스로 조립하였다[Kobayashi, N. 등, *Biotechniques* 23: 500-503 (1997)]. IDEC-C2B8 VL 및 VH를 암호화하는 원래의 서열 데이터를 공개된 국제 특허 출원(국제 공개 번호 : WO 94/11026)으로부터 입수하였다. 조립된 VL 및 VH cDNA 단편을 pBluescript IIKS(+)에 서브클로닝하고, 이를 시퀀싱한 다음, 원래의 아미노산 잔기 서열을 변형시키지 않고 가변 영역 및 불변 영역 접합부에 도입된 특이 제한 부위를 사용하여, 인간 불변 경쇄(Igκ) 및 중쇄(IgG1) cDNA에 각각 결합시켜 직접 연결시켰다[Umana, P. 등, *Nat Biotechnol.* 17 : 176-180 (1999); Reff, M. E. 등, *Blood* 83 :435-445 (1994)]. 각각의 전장 cDNA를 pcDNA3.1(+)[Invitrogen, Leek, The Netherlands]에 별도로 서브클로닝하여 키메라 C2B8 경쇄(pC2B8L) 및 중쇄(pC2B8H)에 대한 포유류

발현 벡터를 만들었다.

[0107] **GnTIII을 상이한 수준으로 발현하는 CHO 세포에서의 IDEC-C2B8의 제조**

[0108] 전술한 바와 같이, 2개의 CHO 세포주 즉, 배양 배지중 테트라사이클린 농도에 따라서 GnTIII을 상이한 수준으로 발현하는 CHO-tet-GnTIII; 및 GnTIII을 발현하지 않는 CHO-tTA(부모 세포주)를 확보하였다[Umana, P. 등, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999); Umana, P. 등, Biotechnol Bioeng. 65 : 542-549 (1999)]. 칼슘 포스페이트 법을 사용하여 각각의 세포주에 pC2B8L, pC2B8H 및 pZeoSV2(+) [제오신 내성; Invitrogen, Leek, The Netherlands] 벡터들을 공동형질감염시켰다. 제오신 내성 클론을 96웰 평판에 옮긴후, 인간 불변 영역에 특이적인 ELISA 분석법을 이용하여 IDEC-C2B8 생성 여부에 관해 분석하였다. 선택된 클론(CHO-tet-GnTIII-C2B8)을 동시에 배양하여 3개의 IDEC-C2B8 샘플을 얻었으며, 이때 배양시 상기 배지에는 테트라사이클린의 농도만을 달리하여 (각각 25, 50 및 2000 ng/ml) 첨가하였다. 후기 대수기에 배양 상청액을 수집하였다. 동일한 조건하에서 배양하되 배지에 테트라사이클린을 첨가하지 않고 배양된, CHO-tTA 유래 클론인 CHO-tTA-C2B8로부터 추가의 항체 샘플을 얻었다. 전술한 바와 같이, 양이온 교환 컬럼상에서 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의하여 배양 배지로부터 항체 샘플을 정제하였으며, 이후 완충액을 PBS로 바꾸었다[Umana, P. 등, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999)]. Molecular Probes社(Leiden, The Netherlands) 제품인 형광계 키트(표준 물질 : 리터시맵)를 사용하여 항체 농도를 측정하였다.

[0109] **간접 면역형광성**

[0110] CD20-양성 세포(SB 세포; ATCC 수탁번호 = ATCC CCL120) 및 CD20-음성 세포(HSB 세포; ATCC 수탁번호 = ATCC CCL120.1)를 각각 1 시간 동안 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CHO-tet-GnTIII 유래 IDEC-C2B8 항체와 함께 햄크 밸런싱 염 용액 [GibcoBRL, Basel, Switzerland] 및 2% 소 혈청 알부민 분획 V [Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland] (HBSSB)중에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 음성 대조군으로서는 C2B8 항체 대신에 HBSSB를 사용하였다. 모든 샘플에 대해서 FITC-접합된 항인간 Fc 폴리클로날 항체(SIGMA, St. Louis)를 2차 항체로서 사용하였다. 라이카 형광 현미경[Wetzlar, Germany]을 사용하여 세포를 관찰하였다.

[0111] **MALDI/TOF-MS에 의한 올리고당 프로필 분석**

[0112] 전술한 바와 같이, C2B8 항체 샘플 즉, MabThera(유럽에서 통용되고 있는 리터시맵; 스위스 Universitatspital 의 R. Stahel 기증), C2B8-25t, C2B8-50t, C2B8-2000t 및 C2B8-nt(각각 100 μg 씩)로부터 중성의 N-결합 올리고당을 얻었다[Umana, P. 등, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999)]. 간단히 요약하면, 처음에 항체 샘플을 아스로박터 우레아파이센스(*Arthrobacter ureafaciens*) 시알리다제 [Oxford Glycosciences, Abingston, UK]로 처리하여, 임의의 시알산 단당류 잔기를 제거하였다. 이후 중성의 N-결합 올리고당을 펩티드-N-글리코시다제 F(Oxford Glycosciences)를 사용하여, 탈시알릴화된 항체 샘플로부터 방출시키고, 마이크로컬럼을 이용하여 정제한 다음, Elite Voyager 400 분광계(Perceptive Biosystems, Farmingham, MA)에서 MALDI/TOF-MS에 의해 분석하였다.

[0113] **ADCC 활성 분석**

[0114] Ficoll-Paque(Pharmacia Biotech, Dubendorf, Switzerland) 구배에서 원심분리하여 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 새로이 해파린 처리된 인간 혈액(모든 실험에서 건강한 동일 성인 공여자로부터 채혈함)으로부터 분리하였다. PBMC(효과기)를 플라스틱에 부착시켜 모두 골라내었다. CD20-양성 SB(표적) 세포를 37°C에서 90분 동안 100 μCi ^{51}Cr (Amersham, Dubendorf, Switzerland)로 표지화하고, 이를 RPMI (GibcoBRL, Basel, Switzerland)중에서 2회 세척한 다음, 10^5 세포/ml의 농도로 재현탁시켰다. RPMI 배지에 희석시킨 50 μl 의 C2B8 mAb를, 96 웰 등근 바닥 미량역가 평판[Greiner, Langenthal, Switzerland]중 100 μl 의 SB 세포(10,000 세포/웰)에 첨가하고, 50 x g에서 1 분 동안 원심분리시킨 다음, 4°C에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 그후, 효과기 세포(RPMI 배지중 2×10^7 세포/ml의 농도로 혼탁시킴) 50 μl 를 각각의 96웰에 넣어 최종 E:T 비율을 100으로 만들었다. 이 평판들을 37°C에서 4 시간 동안, 5% CO_2 하에서 항온처리하고, 상청액을 Skatron 수집 시스템(Skatron Instruments, Sterling, VA)으로 수집하여, Cobra 05005 y 카운터(Canberra Packard, Meriden, CT)에서 계수[ER, 실험 방출량(experimental release)]하였다. C2B8 mAb 대신에, 100 μl 의 1% Nonidet(Sigma, St. Louis) 또는 100 μl 의 RPMI 배지를 각각 100 μl 의 표지화된 표적 세포에 첨가하여, 최대 방출량(MR) 및 자발적 방출량(SR)을 구하였다. 모든 데이터는 실험을 3회씩 실시하여 얻었다. 다음의 식을 통하여 특이적 분해율(%)을 계산하였다 : (ER-SR)/(MR-SR) x 100.

[0115] 결과 및 고찰

[0116] IDEC-C2B8의 제조 및 특이적 항원 결합의 확인

GnTIII이 안정적으로 테트라사이클린 조절되면서 발현되고, IDEC-C2B8을 안정적이면서 구성적으로 발현하는, CHO-tet-GnTIII 세포를 확보하고, 항체 샘플 세트 생산을 위해 규모를 확대하였다. 규모 확대시, 동일한 클론으로부터 얻어진 동일한 배양액들을 3가지 상이한 농도(25, 50 및 2000 ng/ml)의 테트라사이클린하에서 성장시켰다. 이미 상기 테트라사이클린 농도에 따라서 GnTIII 및 이분화된 올리고당의 농도가 상이함을 규명하였다 [Umana, P. 등, NatBiotechnol. 17 : 176-180 (1999); Umana, P. 등, Biotechnol Bioeng. 65 : 542-549 (1999)]. GnTIII을 발현하지 않는 C2B8 생산 대조군 세포주도 확보하고, 이를 CHO-tet-GnTIII의 3개의 동일 배양액에 대한 조건과 동일한 조건하에서 배양하였다. 단백질 A-친화성 크로마토그래피 이후, SDS-PAGE 및 쿠마쉬-블루 염색에 의하여 mAb 순도를 측정한 결과 95% 이상임을 알 수 있었다. 증식을 위하여 배양 배지에 첨가된 테트라사이클린의 농도에 따라서 샘플을 다음과 같이 명명하였다 : C2B8-25t, C2B8-50t, C2B8-2000t 및 C2B8-nt[즉, 비이분화 대조군에 대한 테트라사이클린 무첨가 샘플]. CD20-양성 및 CD20-음성 세포를 이용하는 간접 면역 형광법에 의하여(도 1), 샘플 C2B8-25t는 항원과 특이적으로 결합하였음을 알 수 있었는데, 이는 합성된 VL 및 VH 유전자 단편이 기능적으로 교정되었음을 시사하는 것이다.

[0118] MALDI/TOF-MS을 이용한 올리고당 프로필 분석

방출된 중성 올리고당 혼합물의 MALDI/TOF-MS에 의하여 각각의 항체 샘플의 글리코실화 프로필을 분석하였다. 이 기법에서, 상이한 질량을 갖는 올리고당은 스펙트럼에 있어서 별개의 피크를 나타내었으며, 피크의 상대적인 높이는 이들의 비율을 적량적으로 나타내는 것이다[Harvey, D. J., Rapid Common Mass Spectrom. 7:614-619 (1993); Harvey, D. J. 등, Glycoconj J. 15 : 333-338 (1998)]. 올리고당 구조의 예상 분자량, 동일한 숙주에서 생성된 IgG1 mAb로부터 유래된 올리고당에 대한 기존의 구조 데이터 및 N-결합 올리고당의 생합성 경로에 관한 정보를 기초로 하였을때, 올리고당 구조는 상이한 피크를 나타내었다.

GnTIII 발현 수준(즉, 테트라사이클린 농도)과, 상이한 항체 샘플로부터 유래된 이분화 올리고당의 양 사이에 명확한 상관성이 관찰되었다. 예상대로, GnTIII을 발현하지 않는 숙주로부터 유래된 MabThera(상표명) 및 C2B8-nt는 이분화 올리고당을 보유하지 않았다[도 2a 및 2b]. 대조적으로, 이분화 구조는 C2B8-2000t 샘플중 올리고당 푸울의 약 35% 이하(즉, GnTIII 발현의 기저 수준)로 축적되었다. 이 경우, 주요 이분화 올리고당 피크는 복합적 형태를 띠고 있었는데, 즉, m/z 1689 및 m/z 1851에서의 피크가 거의 구별이 되지 않았다(도 2c). GnTIII 발현 수준이 그 다음으로 가장 높은 C2B8-50t 샘플(m/z 1705 및 1861에서 이들과 결합된 칼륨 아 닉트 포함)은 이들 피크를 약 20% 정도 증가시켰다. 이와 같이 증가함에 따라서 m/z 1486 및 1648에서의 상기 샘플의 비이분화 상대물(non-bisectioned counterpart)들도 각각 감소하였다(도 2d). GnTIII의 발현 수준이 가장 높을때, GnTIII (m/z 1486)에 대한 주요 기질인 C2B8-25t 샘플의 수준은 거의 기저 수준까지 감소하였던 반면에, 이분화 복합구조(m/z 1689 및 1851)의 수준은 감소하여 m/z 1664, 1810 및 1826에서의 피크는 증가하였다(도 2e). 이러한 피크는 이분화된 하이브리드 화합물, 갈락토실화된 복합 올리고당 또는 이들의 혼합물에도 해당하였다. 그러나, 이들의 상대적 증가량은, GnTIII의 과발현이 생합성 흐름을 경로의 초기 단계에서 바꿀 수 있으므로, 이분화된 하이브리드 화합물이 축적됨에 따라서 증가하였다(도 3a 및 3b 참조). 이분화 올리고당 구조(복합형 및 하이브리드형)의 양은 이 샘플의 약 80%에 육박했다.

[0121] IDEC-C2B8 글리코실화 변이체의 ADCC 활성

상이한 C2B8 mAb 글리코실화 변이체들을 ADCC 활성(CD20-양성 SB 세포의 시험관내 분해를 통해 측정)에 대하여 비교하였다. GnTIII이 존재하지 않는 부모 세포주로부터 유래된 추가의 mAb 샘플인 C2B8-nt에 관하여도 연구하였다. GnTIII 발현 수준이 기저 수준이고, 이분화 올리고당을 저수준으로 함유하는 C2B8-2000t 샘플은 C2B8-nt보다 활성이 약간 더 높았다(도 4a). GnTIII 발현 수준이 그 다음으로 높은 C2B8-50t 샘플은 거의 동일한 수준의 이분화 및 비이분화 올리고당을 보유하였으나, 표적 세포 분해를 상당 수준 조정하지는 않았다. 그러나, 가장 낮은 농도의 테트라사이클린에서, 이분화 올리고당 구조를 80% 이하 포함하는 C2B8-25t 샘플은 전항체 농도 범위에 있는 나머지 샘플보다 활성이 상당히 더 높았다. 10배 낮은 항체 농도에서 C2B8-nt 샘플의 ADCC 활성은 최대의 수준에 이르렀다(도 4a). C2B8-25t 샘플은 또한 대조군에 대한 최대 ADCC 활성(50% 대 30% 분해율)이 상당히 증가하였다.

이분화 올리고당의 비율이 가장 높은 C2B8-50t 샘플 및 C2B8-25t 샘플의 Mabthera(상표명)[현재 유럽에서 시판 중인 리턱시맵(상표명)에 해당]에 대한 ADCC 활성을 추가로 비교하였다(도 4b). 샘플 C2B8-50t는 활성이 경미하

계 증가하였던 반면에, 샘플 C2B8-25t는 모든 항체 농도에서 Mabthera(상표명)의 효능을 확실히 증가하였다. C2B8-25t의 약 5~10배 낮은 농도로도 Mabthera(상표명)는 최대 ADCC 활성을 나타냈으며, C2B8-25t의 최대 활성은 Mabthera보다 약 25% 컸다.

[0124] 이러한 결과는, 일반적으로 C2B8 항체의 시험판내 ADCC 활성이 이분화 올리고당을 함유하는 분자의 Fc 영역에서의 비율과 상관되어 있음을 나타내는 것이다. 본 발명자들은, chCE7 즉, ADCC 활성이 기저 수준으로 낮은 항체의 경우, 이분화 올리고당 비율을 자연 생성 항체에서 확인할 수 있는 수준 이상으로 증가시킴으로써 그 활성을 상당 수준 증가시킬 수 있음을 이미 보고한 바 있다(Umana, P. 등, *Nat Biotechnol.* 17 : 176-180 (1999)). 이 분화 올리고당이 존재하지 않을 때의 ADCC 활성이 이미 증가한 C2B8 mAb에 있어서도 동일하다. 그러나, chCE7의 경우, 이분화 올리고당이 복합형의 대부분을 차지할 때의 GnTIII 발현 수준에서, ADCC 활성은 상당히 많이 증가하였음이 관찰되었다[Umana, P. 등, *Nat Biotechnol.* 17 : 176-180 (1999)]. 이분화 올리고당이 대부분 하이브리드형으로 변형된 경우, 효능을 갖는 C2B8 mAb에 있어서는, 연구된 GnTIII 발현 수준이 가장 높을 때 활성이 대폭 증가하였다(도 2). 상기 2개의 mAb에 대해서, 활성이 가장 높은 샘플의 이분화된 올리고당의 수준은 비이분화된 올리고당의 수준보다 훨씬 높았다. 또한, 이러한 관찰 결과는 복합형 및 하이브리드 이분화 올리고당 모두가 ADCC 활성에 중요할 수 있다는 사실을 말해주는 것이다.

[0125] 복합 올리고당 및 하이브리드 올리고당 모두에서, 이분화 GlcNAc는 올리고당의 형태를 상당히 변형시킨다 [Balaji, P. V. 등, *Int.J. Biol. Macromol.* 18 : 101-114(1996)]. CH2 도메인에서 폴리펩티드와 광범위하게 상호작용하는 올리고당의 일부가 변형된다[Jefferis, R. 등, *Immunol Rev.* 163 : 59-76 (1998)]. 폴리펩티드는 이 위치에서 비교적 가변적이며[Jefferis, R. 등, *Immunol Rev.* 163 : 59-76(1998)], 이분화 N-아세틸글루코사민은 Fc 영역의 형태를 변화시킴으로써 이의 생물학적 효과를 조정할 수 있다. 모든 혈청 IgG가 이분화된 올리고당을 보유하므로, 잠재적으로 변형된 형태는 이미 자연에 존재한다. 조작된 항체와 자연 생성된 항체 사이의 주요 차이점은 더욱 활성인 형태를 제시하는 분자의 비율이다.

[0126] 현재 사용되고 있는 비접합 mAb의 활성을 증가시키는 다른 연구법으로서는, 방사성 면역요법, 항체 의존적 효소/전구약물 요법, 시토킨을 사용하는 면역독소 및 애쥬반트 요법을 비롯한 임상학적 평가 방법이 있다[Hjelm Skog, A. 등, *Cancer Immunol Immunother.* 48 :463-470 (1999); Blakey, D. C. 등, *Cell Biophys.* 25 : 175-183 (1994); Wiseman, G. A. 등, *Clin Cancer Res.* 5 : 3281s-3296s (1999); Hank, J. A. 등, *Cancer Res.* 50 : 5234-5239 (1990)]. 이 기법들은 활성을 상당 수준 증가시킬 수는 있으나, 이에 못지 않게 부작용도 상당한 수준으로 유발시키고, 생산 비용도 증가시키며, 비접합 mAb와 비교하였을 때 생성 단계로부터 환자에의 투여 단계에 이르기까지의 기술이 복잡하다. 본원에 제시된 기법은 제조 공정을 그대로 단순하게 유지시키면서 효능을 증가시키는 대안적 방법을 제공하며, 또한 이 기법은 다수의 비접합 mAb에도 적용될 수 있어야 한다.

실시예 2

[0128] chG250 생산 세포주의 글리코실화 조작에 의하여 얻어진 항체 의존적 세포 독성이 증가된 항신장 세포 암종 항체 chG250의 신규한 개체

1. 세포 배양

[0130] 1:100(v/v) 페니실린/스트렙토마이신/항진균 용액으로 보충한 표준적인 세포 배양 배지(SIGMA, Buchs, Switzerland)에서 chG250 키메라 mAb(wt-chG250-SP2/0 세포)를 생산하는 SP2/0 마우스 골수종 세포를 성장시켰다. 조직 배양 플라스크중 37°C 및 5% CO₂ 함습 대기하에서 세포를 배양하였다. 배지를 3~4일마다 교환하였다. 세포를 10% DMSO를 함유하는 배양 배지중에서 동결시켰다.

2. pGnTIII-퓨로를 발현하는 SP2/0 세포의 제조

[0132] 퓨로마이신 내성 유전자에 IRES를 통하여 작동 가능하도록 연결된, GnTIII을 구성적으로 발현시키기 위한 벡터로 wt-chG250-SP2/0 골수종 세포를 전기천공법을 사용하여 형질감염시켰다. 전기천공법 수행 24시간 이전에, 배양 배지를 교환하고, 세포를 5 x 10⁵ 세포/ml로 종균시켰다. 700만개의 세포를 4°C에서 1300 rpm으로 4분 동안 원심분리시켰다. 세포를 3ml 새 배지로 세척하고 다시 원심분리하였다. 세포를 배양 배지중 1.25% (v/v) DMSO 및 20~30μg DNA를 함유하는, 부피 0.3~0.5 ml의 반응 혼합물중에 재현탁하였다. 이후 전기천공 혼합물을 0.4 cm 큐벳에 옮긴 후, Bio Rad사 제품인 Gene Pulser를 이용하여 저전압(250~300 V) 및 고전기용량(960 μF)에서 펄스화하였다. 전기천공 후 세포를 T25 배양 플라스크중 1.25% (v/v) DMSO 배양 배지(6 ml)로 신속하게 옮긴 후, 이를 37°C에서 항온처리하였다. 전기천공법 수행 후 2일 경과시 2μg/ml의 퓨로마이신을 배지에 첨가하여 안정한 내

화체(integrant)를 선택하였다. 2~3주 경과후, 안정한 퓨로마이신 내성 혼합 군집을 얻었다. FACS로 단일 세포 유래 클론을 얻은후 퓨로마이신 선별하에서 증식 및 유지시켰다.

[0133] 3. 웨스턴 블렛

퓨로마이신-내성 클론을 웨스턴 블렛으로 GnTIII 발현에 대해서 스크리닝하였다. 웨스턴 블렛을 통하여 클론 5H12, 4E6 및 4E8은 GnTIII을 최대 수준으로 발현한다는 사실을 확인하였다. 5G2는 중간정도의 강도를 갖는 GnT III 밴드를 나타내었던 반면에, 2F1, 3D3 및 4G3는 밴드 강도가 가장 작은 것으로 보아 GnTIII의 발현량이 보다 적다는 것을 알 수 있었다(도 5).

[0135] 4. 야생형을 포함하여 7개의 GnTIII-발현 클론으로부터의 chG250 모노클로날 항체의 제조 및 정제

클론 2F1, 3D3, 4E6, 4E8, 4G3, 5G2, 5H12 및 야생형(wt-chG250-SP2/0 세포)을 총부피 130 ml의 배양 배지중에 3×10^5 세포/ml로 종균시키고, 3개의 플라스크에서 1회 배양시켰다. 종균에 사용된 세포는 모두 완전 대수 생장기(full exponential growth phase)에 있는 것이었으므로, 세포는 생산 회분 배양을 개시할때, 동일한 성장 상태에 있는 것으로 간주하였다. 세포를 4일 동안 배양하였다. 항체를 함유하는 상청액을 후기 대수 생장기에서 수집하여 생식능을 확인하였다. 2 단계의 크로마토그래피로 chG250 모노클로날 항체를 정제하였다. 처음에 각각의 회분에서 유래된 chG250 모노클로날 항체를 함유하는 배양 상청액을 HiTrap 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 단백질 A는 인간 IgG Fc 영역에 대한 특이성이 매우 높다. 단백질 A 용리액으로부터 풀링한 샘플은 완충액으로서, 추후 이것을 Resource S 1ml 컬럼(Amersham Pharmacia Biotech)상에서의 양이온 교환 크로마토그래피를 통하여 PBS로 교환하였다. SDS-염색 및 쿠마쉬 블루 염색 결과를 통하여, 최종 순도는 95% 이상인 것으로 판단되었다(도 6). 각 샘플의 농도는 기지의 농도로 존재하는 야생형 항체를 사용한 표준 보정 곡선으로 측정하였다.

[0137] 5. GnTIII을 상이한 수준으로 발현하는 7개의 클론으로부터 유래된 mAb 제조물의 올리고당 프로필 분석

상이한 올리고당 구조의 분자량을 정확하게 제공하는 플라이트 질량 분석 분광법(flight mass spectrometry; MALDI/TOF-MS)의 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 시간으로 올리고당 프로필을 구하였다. 이 기법을 통하여 혼합물중 상이한 올리고당 구조간 비율을 정량적으로 분석할 수 있다. 중성 올리고당은 주로 $[M + Na^+]$ 이온으로 나타났던 반면에, 이 중성 올리고당은 가끔씩 보다 소량의 $[M + K^+]$ 이온을 수반하기도 하여, 질량 분석 결과(m/z)를 16으로 증가시켰다. 칼륨 이온 부산물로서 나타나는 구조의 비율은 매트릭스의 함량에 따라서 달라지므로, 샘플간에는 많은 차이를 나타냈다. 2,5-디히드로벤조산(2,5-DHB)을 매트릭스로 하여 각 항체 제조물로부터 유래된 중성 N-결합 올리고당 혼합물을 분석하였다. 스펙트럼의 피크중 일부는 공지된 단당류 조성 및 특이한 질량으로 인하여, 특정 올리고당 구조에 있어서는 분명하게 차이가 났다. 그러나, 때로는 특정 질량에 따라서 다수의 구조가 나타기도 하였다. MALDI는 질량을 측정할 수는 있지만, 이성체간 구별은 할 수 없다. 생합성 경로 및 이전의 구조 데이터에 관한 지식은 대부분의 경우 스펙트럼중 올리고당 구조의 피크를 지정할 수 있도록 한다.

[0139] GnTIII을 발현하지 않는 wt-chG250-SP2/0 세포주에서 생성된 mAb 샘플로부터 유래된 올리고당은 이분화되지 않은 바이엔테너리 복합 구조(m/z 1486) 및 모노- 또는 디-갈락토실화 바이분화 바이엔테너리 복합 구조를 포함하였으며(도 7a), 상기 두개의 구조는 코어 영역이 $\alpha(1,6)$ -푸코실화되어 있었다[m/z 1648 및 1810에서 각각 피크가 나타남].

[0140] GnTIII을 발현시키면 2가지 유형의 이분화 Fc-결합 올리고당 구조 즉, 복합형 또는 하이브리드형 구조가 생성되었다. 복합 이분화 올리고당은 m/z 1543, 1689, 1705, 1851 및 1867에서 분명한 피크를 나타냈다($[M+K^+]$ 아 닥트). 예상한 바대로, 이분화된 올리고당이 증가함에 따라서 m/z 1486 및 1648에서의 피크는 줄어들었는데, 이는 이것이 이분화되지 않은 복합 올리고당임을 나타내는 것이다. GnTIII 발현 클론으로부터 유래된 모든 샘플에 있어서, GnTIII의 주요 기질(m/z 1486)은 급격히 감소하였다. 예상한 바대로, m/z 1648에서 피크를 나타내는 바이분화 복합 올리고당 유형의 비율은 GnTIII을 가장 높은 수준으로 발현하는 클론(클론 4E6, 4B8, 5G2 및 5H1 2)에 대한 수치가 가장 낮았다. 이를 2개의 피크는 이분화 복합형 올리고당 및 이분화 하이브리드형 올리고당이 축적됨으로 인하여 감소하였다(도 7a~7d 및 도 8a~8d). 이분화 복합 올리고당의 비율은 GnTIII를 소량 발현하는 클론으로부터 유래된 샘플보다 더욱 높았다. 이는 GnTIII 발현 수준이 높을수록 생합성의 흐름을 이분화 하이브리드 구조로 바꾸어, 복합 화합물 및 복합 이분화 화합물의 상대적 비율을 감소시킨다는 사실과 부합된다. 이분화 하이브리드 구조에 있어서, 2개의 가능한 구조는 때때로 단일 피크를 나타낼 수도 있었다. 따라서, 총

올리고당 푸울에 대한 이들 구조의 비율을 맞추기 위하여 몇가지 추측이 이루어졌다. 이분화 하이브리드형, 갈락토실화된 복합 올리고당 또는 이들의 혼합물은 m/z 1664, 1680, 1810 및 1826에서 피크를 나타냈다. wt-항체 제조물은 1664에서의 피크의 비율이 상대적으로 낮다는 사실로 인하여, 상이한 클론으로부터 유래된 항체 샘플에서 가장 많이 나타나는 상기 피크는 주로 이분화 하이브리드 구조에 해당한다는 것을 추측할 수 있었다(도 7a~7d 및 도 8a~8d). 그러나, m/z 1810 및 1826에서의 피크에 특정 구조를 지정하기 위하여는 추가의 특성 규명 작업이 수행되어야 한다. 요약하면, GnTIII를 과발현시킴으로써, 이분화 올리고당 구조가 생성되었으며, 이 구조의 상대적 비율은 GnTIII 발현 수준과 상관되었다.

[0141] 6. Calcein-AM 보유로 인한 항체 매개성 세포 독성의 측정

[0142] 세포독성을 특정하는 Calcein-AM 보유법(Calcein-AM retention method)으로 항체를 사용한 항온처리 이후의 세포에 잔류하는 염료의 형광성을 측정하였다. 37°C 및 30분 동안 5% CO₂ 함습 대기하에 10% 소 태아 혈청으로 보충한 1.8 ml RPMI-1640 세포 배양 배지(GIBCO BRL, Basel, Switzerland)중에서 400만개의 G250 항원-양성 세포(표적)를 10 μM Calcein-AM (Molecular Probes, Eugene, OR)으로 표지화하였다. 상기 세포를 배양 배지중에서 2회 세척하고, 이를 12 ml AIMV 무혈청 배지중에 재현탁하였다(GIBCO BRL, Basel, Switzerland). 이후 표지화된 세포를 U자형 바닥의 96-웰(30,000 세포/웰)로 옮기고, 상이한 농도의 항체를 함유하는 3개의 배지에서 1시간 동안 4°C하에 항온처리하였다. Ficoll-Paque(Pharmacia Biotech, Dubendorf, Switzerland) 구배에 대해서, 혜파린 처리된 새로운 인간 혈액[모든 실험에서 건강한 동일 공여자로부터 입수]으로부터 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 원심분리하여 분리하였다. 부피 50μl인 3개의 웰에 PBMC를 첨가하여, 효과기:표적의 비율(E:T 비율)을 25:1로 만들고, 최종 부피는 200μl가 되도록 하였다. 이후 상기 96웰 평판을 5% CO₂ 대기하에 4시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 그후 상기 96 웰 평판을 5 분 동안 700 ×g에서 원심분리한후 상청액을 폐기하였다. 세포 펠렛을 헤크 벌런싱 염 용액(HBSS)로 2회 세척하고, 200 μl의 0.05M 나이트륨 보레이트, pH 9, 0.1% Triton X-100 중에서 용해시켰다. 표적 세포중 형광 염료의 보유량을 FLUO 스타 마이크로평판 판독기(BMG Lab Technologies, Offenburg, Germany)로 측정하였다. 표적 세포를 항체에 노출시키는 대신에 사포닌(200 μg/ml AIMV; SIGMA, Buchs, Switzerland)에 노출시킴에 따른, 총 분해 대조군에 대한 특이적 분해율을 계산하였다. 특이적 분해율(%)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

수학식 1

$$\text{세포독성\%} = \frac{F_{\text{med}} - F_{\text{exp}}}{F_{\text{med}} - F_{\text{del}}}$$

[0143] [0144] 상기 식중, F_{med}는 배지만으로 처리한 표적 세포의 형광도로서 PMBC에 의한 비특이적 분해를 나타내고, F_{exp}는 항체로 처리한 세포의 형광도를 나타내며, F_{del}은 항체 대신 사포닌으로 처리한 세포의 형광도를 나타낸다.

[0145] 시험관내 ADCC 활성에 대한 chG250의 변형된 글리코실화 변이체의 효과를 측정하기 위하여, G250 항원-양성 표적 세포를 PBMC와 함께(chG250 항체 샘플 없이, 또는 상이한 농도의 상기 항체 샘플과 함께) 배양하였다. 야생형 세포주로부터 유래된 비변형 chG250 항체의 세포독성을, GnTIII 발현 수준이 중간정도 및 높은 2개의 세포주(3D3, 5H12) 각각으로부터 유래한 2개의 항체 제조물과 비교하였다(도 5 참조).

[0146] 비변형 chG250 항체는 본 분석법에 적용된 전체 농도 범위에 걸친 ADCC 활성을 거의 조정하지 않았다(상기 활성은 백그라운드(background)와 거의 동일함). GnTIII 발현 수준이 중간 정도인 클론 3D3으로부터 유래된 항체 샘플을 사용하였을때 ADCC 활성은 2 μg/ml에서 증가(거의 20%, 도 9 참조)하였다. 상기 항체 샘플의 세포독성 활성은 항체 농도가 보다 많아졌을 때에는 증가하지 않았다. 예상한바와 같이, 클론 5H12로부터 유래된 항체 제조물은 표적 세포에 대한 ADCC를 조정하는 능력에 있어서 샘플 3D3 및 비변형 항체보다 상당히 증가하였다. 상기 항체의 최대 ADCC 활성은 약 50%였으며, 이는 비변형 대조군 샘플과 비교하였을때, 125배 더 둡은 농도에서 ADCC 활성을 상당한 정도로 조정하였다.

[0147] 실시예 3

[0148] 만성 이식편 대 숙주간 질병을 앓는 환자에 있어서의 면역 매개성 혈소판감소증의 치료

[0149] 만성 이식편 대 숙주간 질병에 있어서 자가면역 혈소판 감소증은 임상적 질병을 유발하는 B-세포 조절 이상의 예이다. 만성 이식편 대 숙주간 질병을 앓고 있는 개체내에서 면역 매개성 혈소판감소증을 치료하기 위하여, 본 발명의 방법에 의하여 제조되었으며 ADCC이 증가한 항CD20 키메라 모노클로날 항체를 문헌[Ratanatharathorn, V. 등, Ann. Intern. Med. 133 (4) : 275-79 (2000) (전체 내용은 본원에 참고 문헌으로 인용됨)]에 기술된 바와 같이, 개체에 투여하였다. 특히, 1주일에 걸쳐 항체(375 mg/m²)를 침출시키고, 이 항체 375 mg/m²를 4주 동안 개체에 투여하였다. 항체 요법 결과 말초 혈액중 B-세포를 방혈시켰으며, 또한 혈소판 결합 항체의 수준을 감소시켰다.

[0150] 실시예 4

[0151] 중증, 면역 매개성, 순수 적혈구 형성 부전증 및 용혈성 빈혈의 치료

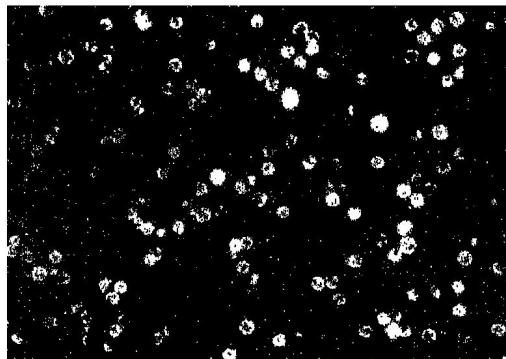
[0152] 면역 매개성 후천적 순수 적혈구 형성 부전증(PRCA)은 종종 기타 자가면역 현상과 관련되어 발생하는 희귀 질환이다. 개체의 면역 매개성의 순수 적혈구 형성 부전증을 치료하기 위하여, 본 발명의 방법에 의하여 제조되었으며, ADCC이 증가된 항CD20 키메라 모노클로날 항체를 개체에 문헌[Zecca, M. et al., Blood 12 : 3995-97 (1997) (본 문헌의 내용은 본원에 전체로서 참고 문헌으로 인용되어 있음)]에 기술된 바와 같이 투여한다. 특히, PRCA 및 자가면역 용혈성 빈혈 환자에 매주 항체를 375 mg/m²씩 2회 투여한다. 항체 요법후, 정맥 면역 글로불린을 이용하는 대체 치료법을 개시하였다. 이 치료법은 B 세포를 방혈시켰으며, 헤모글로빈의 수준이 증가함에 따라서 망상적혈구 수치도 상당히 증가하였다..

[0153] 본 발명은 전술한 상세한 설명 및 실시예에 구체적으로 기술된 바대로가 아니더라도 수행될 수 있음은 명백하다. 본 발명은 상기 교시한 바에 비추어 보았을때 변형 및 수정 가능하므로, 이러한 수정 및 변형에는 이하 첨부된 청구의 범위에 포함된다.

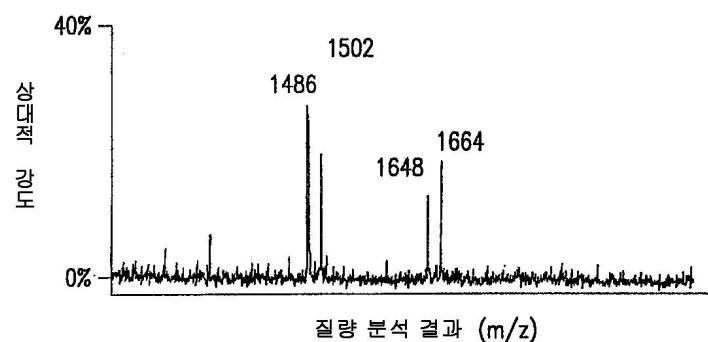
[0154] 본원에 인용된 모든 문헌(특히, 특히 출원, 논문, 실험실 매뉴얼, 책 또는 기타 문헌을 포함)은 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있다.

도면

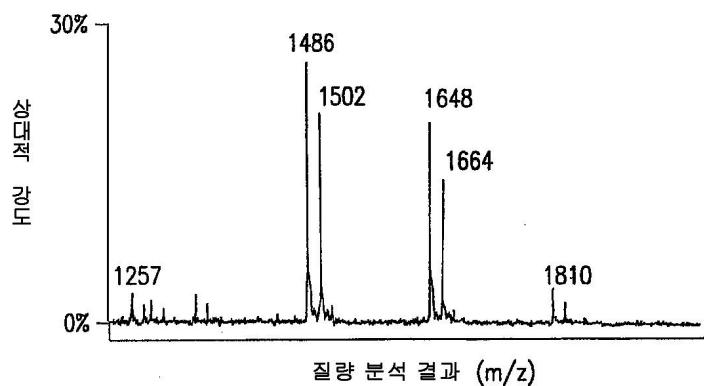
도면1



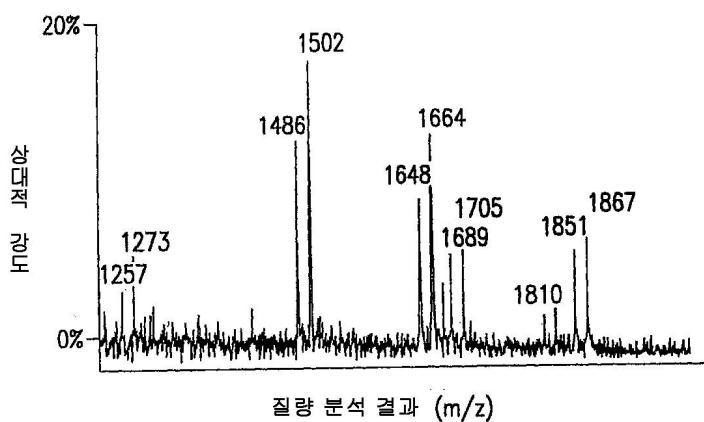
도면2a



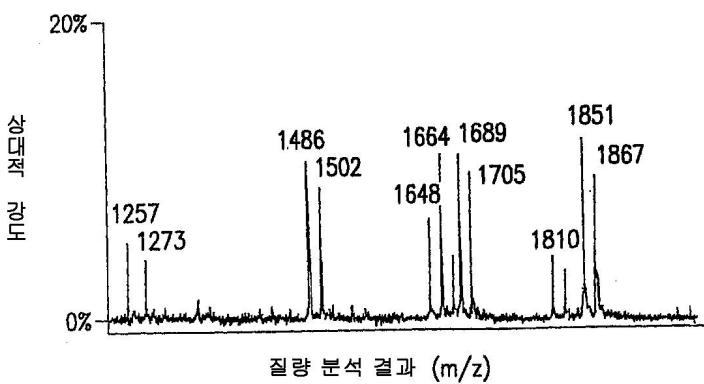
도면2b



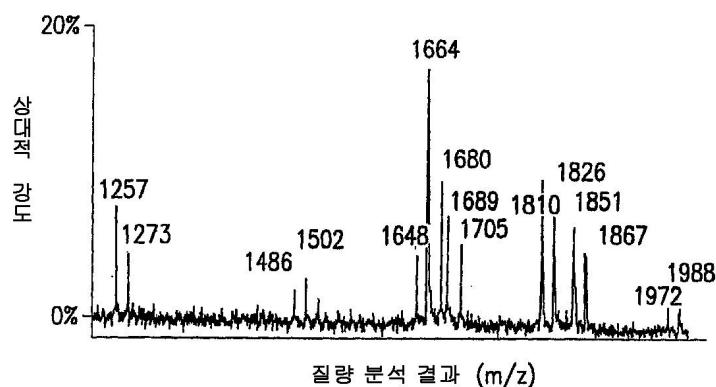
도면2c



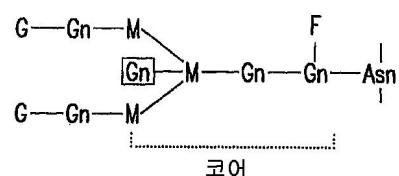
도면2d



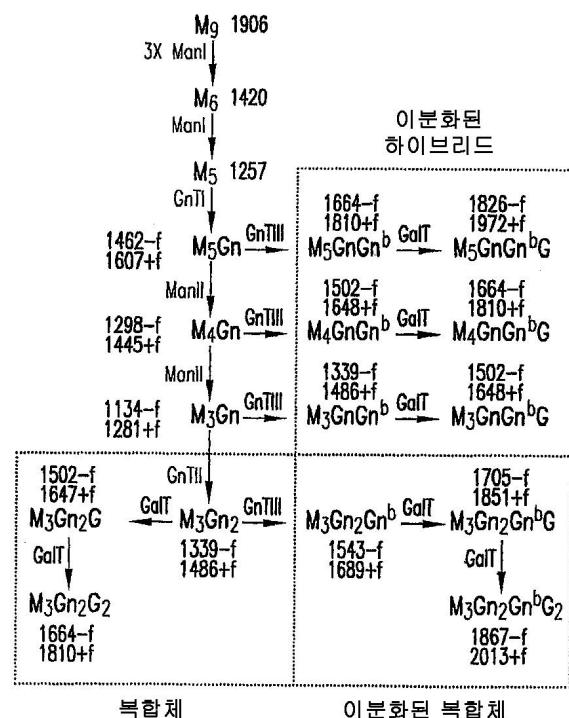
도면2e



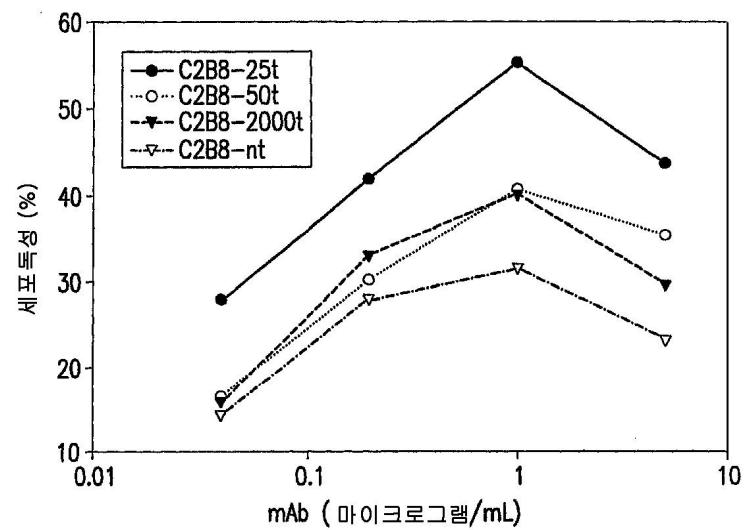
도면3a



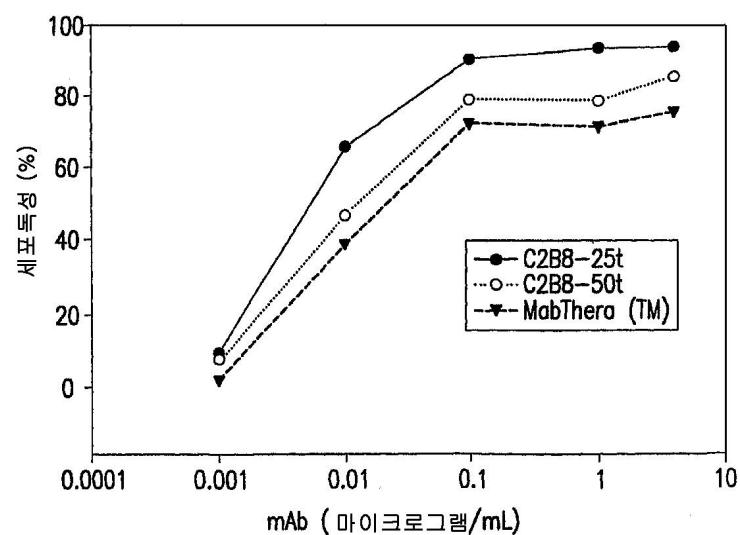
도면3b



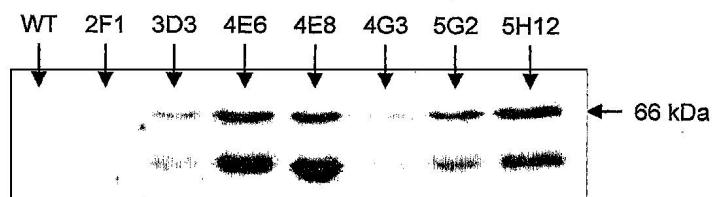
도면4a



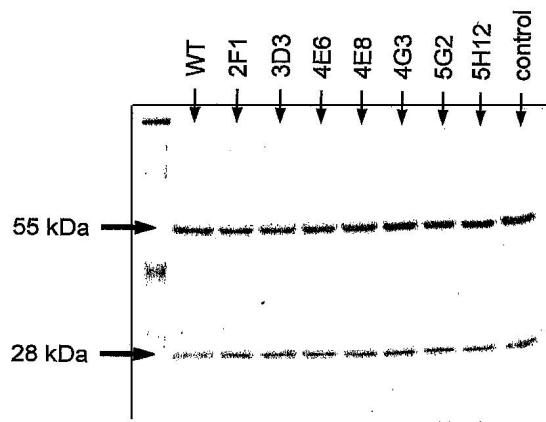
도면4b



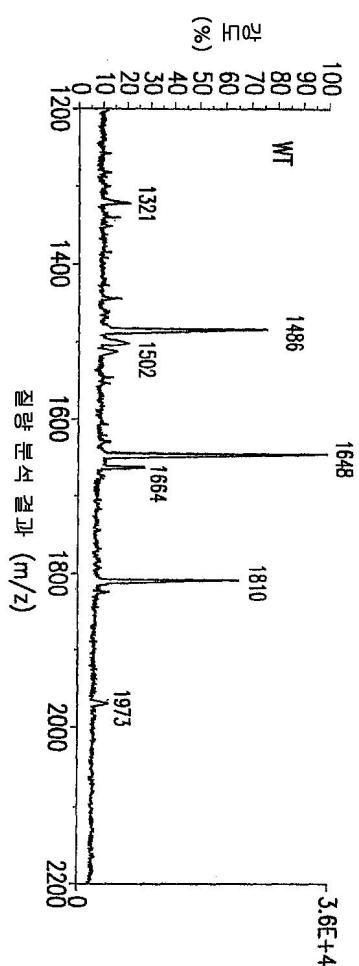
도면5



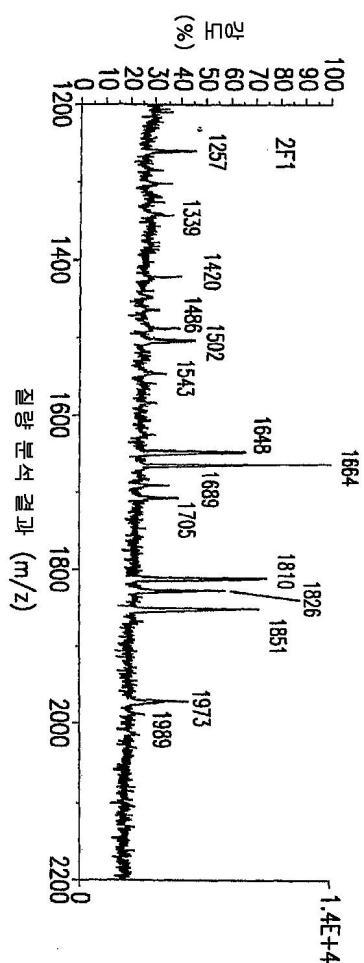
도면6



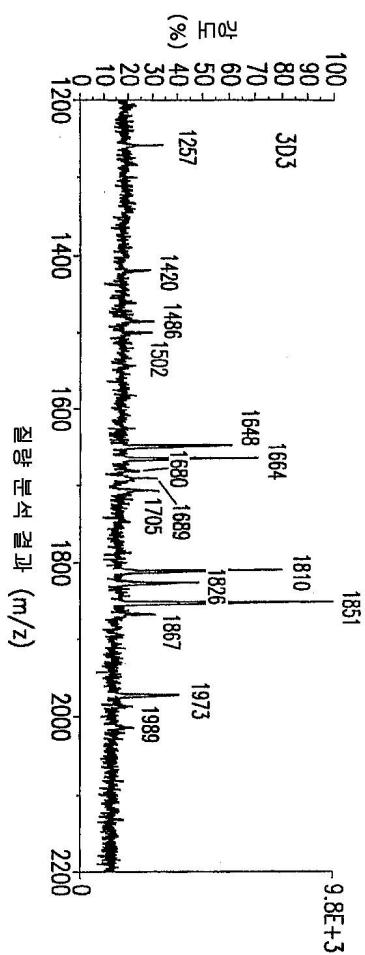
도면7a



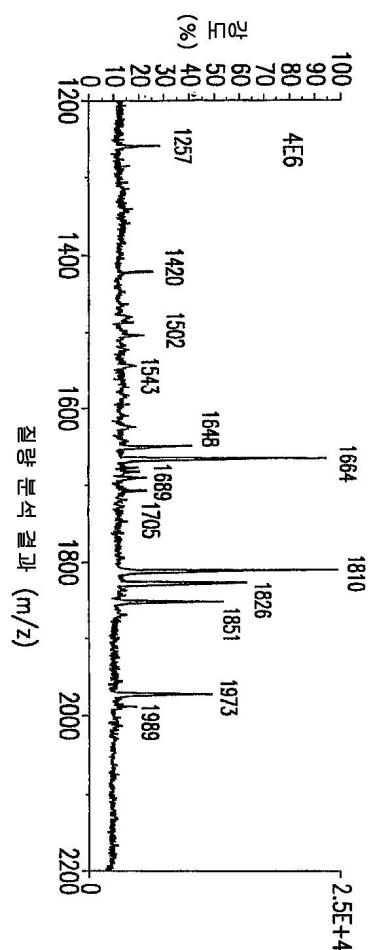
도면7b



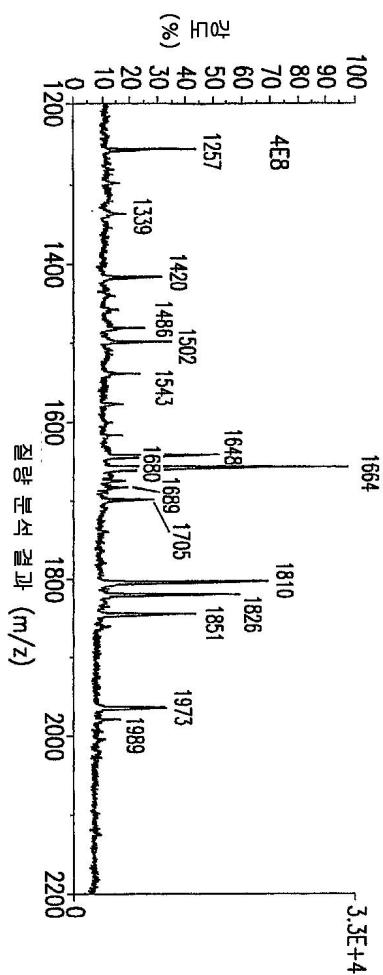
도면7c



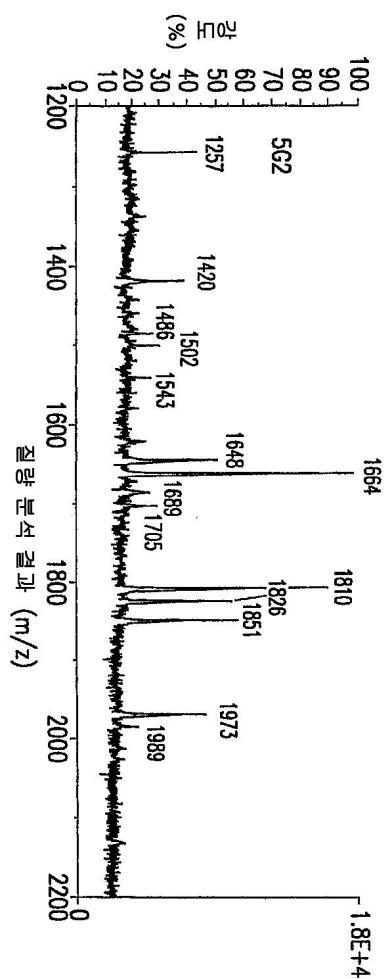
도면7d



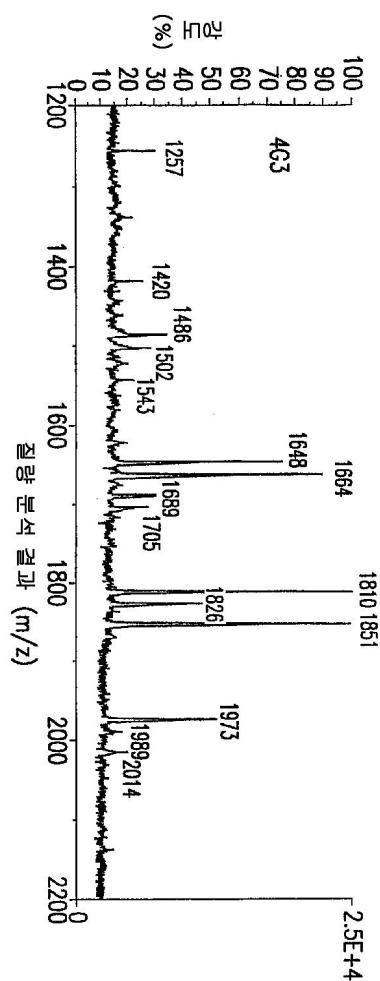
도면8a



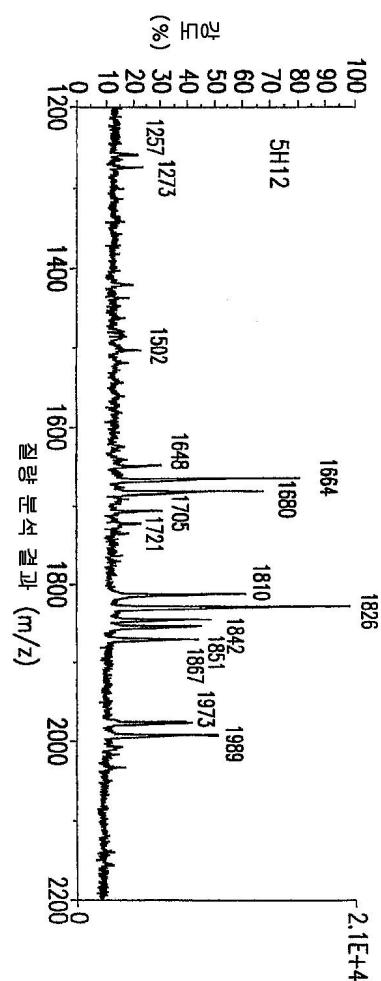
도면8b



도면8c



도면8d



도면9

