

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0131201 (43) 공개일자 2012년12월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/79 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-7025803 (22) 출원일자(국제) 2011년03월02일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2012년10월02일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/053129 (87) 국제공개번호 WO 2011/107520 국제공개일자 2011년09월09일 (30) 우선권주장 1003701.8 2010년03월05일 영국(GB)		(71) 출원인 칠리안 악티엔게젤샤프트 독일 뮌스터 48149 요한-크라네-베흐 42 (72) 발명자 하트만, 마르쿠스 독일 뮌스터 48155 루트비히-안첸그루버-벡 6 아펠트, 제니 독일 뮌스터 48161 하빅스베커 스트라쎄 56 (74) 대리인 특허법인아주양현

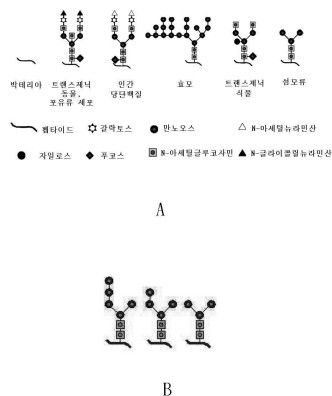
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **섬모류 숙주 세포 내의 모노클로날 항체의 발현**

(57) 요약

본 발명은 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 이중 발현을 위한 시스템에 관한 것이며, 상기 시스템은 하나 이상의 섬모류 숙주 세포, 및 상기 섬모류 숙주 세포 내에 혼입되는, 상기 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 이중 핵산 분자를 포함한다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 이중 발현을 위한 시스템으로서,

- a) 하나 이상의 섬모류 숙주 세포, 및
- b) 상기 섬모류 숙주 세포 내에 혼입되는, 상기 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 이중 핵산 분자를 포함하는 이중 발현을 위한 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체가 본질적으로 푸코스가 없는 N-글라이칸 구조를 갖는 이중 발현을 위한 시스템.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효과를 갖는 이중 발현을 위한 시스템:

- ? 증가된 항체-의존성 세포독성(ADCC),
- ? 증가된 보체-의존성 세포독성(CDC),
- ? 증가된 항체-의존성 세포자멸사, 및/또는
- ? 증가된 항체-의존성 옹소닌화(Opsonisation).

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체가 연장된 혈청 반감기를 갖는 이중 발현을 위한 시스템.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

- c) 상기 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 프로모터, 및/또는
- d) 상기 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 신호 서열로서, 상기 핵산 분자에 의해 암호화되는 모노클로날 항체 또는 그의 단편의 세포의 배지로의 분비의 원인이 되는 신호 서열을 추가로 포함하는 이중 발현을 위한 시스템.

청구항 6

제공되는 섬모류 숙주 세포의 트랜스팩션을 위한 벡터로서, 해당 벡터가 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 것인 벡터.

청구항 7

제1항에 따른 2개 이상의 섬모류 숙주 세포의 컨쥬게이션(conjugation)에 의해 획득되는 섬모류 숙주 세포를 포함하는 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 이중 발현을 위한 시스템.

청구항 8

제7항에 따른 하나 이상의 벡터로 트랜스팩션되거나, 제1항에 따른 2개 이상의 섬모류 숙주 세포의 컨쥬게이션에 의해 획득되는 섬모류 숙주 세포.

청구항 9

제8항에 따른 2개 이상의 섬모류 숙주 세포, 또는 제7항에 따른 2개 이상의 시스템을 포함하는 라이브러리로서,

각 숙주 세포에는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 이중 핵산 분자가 바람직하게는 벡터 형태로 혼입되며, 2개 이상의 섬모류가 그들이 서로 컨주게이트될 수 있는 방식으로 선택되는 라이브러리.

청구항 10

섬모류가 테트라하이메니대(*Tetrahymenidae*)과의 구성원인 제1항 내지 제5항 또는 제7항 중 어느 한 항에 따른 시스템 또는 제8항에 따른 섬모류 숙주 세포.

청구항 11

제1항 내지 제5항 또는 제7항 중 어느 한 항에 따른 시스템, 제8항에 따른 섬모류 숙주 세포 및/또는 제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 생성되는 항체 또는 단편의 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체.

청구항 12

제11항에 있어서, 표 1(ADCC) 또는 3(비-ADCC)에 기재된 하나 이상의 표적에 결합하는 모노클로날 항체, 단편 또는 유도체.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

- 뮤린, 키메라, 인간화 및/또는 인간 mAb,
- IgG, scFv, Fab 및/또는 F(ab)2, 및/또는
- 변형된 항체 포맷으로 이루어진 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체, 단편 또는 유도체.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

- 증가된 ADCC, CDC 및/또는 항체-의존성 세포자멸사
- 연장된 혈청 반감기, 및/또는
- 이중특이성, 삼중특이성 또는 다중특이성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 갖는 모노클로날 항체, 단편 또는 유도체.

청구항 15

섬모류 숙주 세포에서의 하나 이상의 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성 방법으로서,

- a) 하나 이상의 섬모류 숙주 세포를 상기 모노클로날 항체, 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자 또는 바람직하게는 제6항에 따른 하나 이상의 벡터로 트랜스펙션시키는 단계, 및
- b) 상기 숙주 세포를 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는 하나 이상의 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성 방법.

청구항 16

섬모류 숙주 세포에서의 하나 이상의 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성 방법으로서,

- a) 2개 이상의 상이한 섬모류 숙주 세포를 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자 또는 바람직하게는 제6항에 따른 하나 이상의 벡터로 트랜스펙션시키는 단계,
- b) 상기 2개의 섬모류 숙주 세포 또는 그의 소산물(offspring)을 컨주게이트시켜, 2개 이상의 상이한 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 2개 이상의 상이한 핵산 분자를 지니는 하나 이상의 섬모류 세포를 수득하는 단계, 및

c) 이에 따라 생성되는 섬모류 세포를 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는 하나 이상의 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성 방법.

청구항 17

a) 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 단편 또는 유도체 단백질을 제1항 내지 제5항, 제7항 또는 제10항 중 어느 한 항에 따른 섬모류 발현 시스템에서, 또는 제15항 또는 제16항에 따른 방법으로 발현시키는 단계, 및

b) 이에 따라 수득되는 단백질을 분리하고/거나 정제하는 단계를 포함하는, 약제학적 조성물의 제조 방법.

청구항 18

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 단편 또는 유도체, 및/또는 제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 생성되는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 포함하는 약제학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 섬모류 숙주 세포 내의 모노클로날 항체(mAb)의 이중 발현을 위한 시스템에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 오늘날, 인간 치료법을 위한 모노클로날 항체의 주요 징후는 암, 자가면역 질환 및 감염성 질환이다.

[0003] 한가지 작용 메커니즘은 예를 들어, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 표적으로 하고, 이에 따라, 종양을 아사시키는(starving) 아바스틴(베바시주마브)에 의해 수행되는 바와 같이, 종양-관련 혈관신생을 촉진하는 성장 인자의 신호전달 경로를 차단하는 것이다. 다른 표적은 예를 들어, 태반 성장 인자(PLGF)이다. 이들 목적을 위하여 항체 경쇄 및 중쇄(V_L 및 V_H)의 가변 영역에 위치한 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 매개되는 높은 표적 친화성이 요구되지만, Fc 영역에 의해 발휘되는 바와 같은 항체 이펙터(effector) 작용은 결정적이지 않다. 이들 목적을 위해, Fc 영역을 제거한 항체 단편(scFv 또는 Fab와 같이)이 사용될 수 있다.

[0004] 다른 작용 메커니즘은 TNF알파와 같은 사이토카인의 결합(휴미라), 또는 erbB-2와 같은 성장 인자 수용체의 차단(에르비투스), RSV F-단백질과 같은 세포 유입에 필수적인 바이러스 표면 항원의 차단(시나지스) 또는 RBC의 IIb/IIIa-수용체와 같은 혈액 응고의 원인이 되는 수용체의 차단(레오포로)이다.

[0005] 그러나, 모노클로날 항체는 또한 표적-세포 사멸 응용을 위해, 예컨대 암 세포 또는 병원체의 제거를 위해 사용될 수 있다. 컨쥬게이트된 항체, 즉, 특정 세포독소를 지니는 인공 항체가 이러한 목적을 위해 개발되었지만, 특정 세포독소가 제거된 컨쥬게이트되지 않은 항체도 또한 각각의 면역 반응을 일으킴으로서 이러한 목적을 만족시킬 수 있다. 그러나, 이들 목적을 위하여, IgG, 특히 IgG1에 제공되는 작용성 Fc 영역이 필수적이다. 기본적으로, 4개의 상이한 메커니즘이 이러한 문맥에서 알려져 있다:

[0006] ? 표적-세포 결합 항체의 Fc 영역은 면역 이펙터 세포의 표면 상의 Fc 감마 수용체($Fc\gamma R$, 특히 $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa$ 및/또는 $Fc\gamma RIII$)에 결합할 수 있으며, 면역 이펙터에 의하여 표적 세포의 $Fc\gamma R$ -매개의 사멸을 촉발시킬 수 있음("항체-의존성 세포독성" 또는 ADCC);

[0007] ? 표적-세포 결합 항체의 Fc 영역은 혈액에서 관찰되는 보체계의 용해성 단백질(예컨대, C1q)에 결합할 수 있으며, 표적 세포의 보체 매개의 용해를 촉발시킬 수 있음("보체-의존성 세포독성", CDC);

[0008] ? 항체의 표적 분자로의 직접적인 결합이 세포사-유도 메커니즘, 예컨대 세포자멸사(항체-의존성 세포자멸사)를 촉발시킬 수 있거나, 또는 세포 생존 인자, 예컨대 성장 인자의 작용을 차단할 수 있음;

[0009] ? 대식구 또는 호중구의 항체-매개의 결합 및 이후의 식세포작용에 의한 표적 세포의 옅소닌화(opsonisation).

[0010] ADCC는 세포-매개의 면역의 메커니즘이며, 이에 의해, 면역계의 이펙터 세포가 활동적으로 특이적 항체에 의해 결합되는 표적 세포를 용해시킨다. 이는 체액성 면역 반응의 일부로서 항체가 감염을 제한하고 억제하도록 작용할 수 있는 메커니즘 중 하나이다. 통상적인 ADCC-매개의 이펙터 세포는 자연 살해(NK) 세포이나; 단핵구 및 호산구도 또한 ADCC를 매개할 수 있다. ADCC는 기존 항체 반응에 대한 그의 의존성 때문에, 적응성 면역 반응의

부분이다.

- [0011] 표적 세포에서 ADCC를 유도하는데 사용되는 치료적 항체는 상기 이펙터 세포의 Fc 감마 수용체에 의해 인식되기 위해 Fc 영역을 필요로 한다. 이러한 항체에 대한 예에는 erbB-2를 인식하며 바람직하게는 erbB-2를 과발현하는 종양 세포에 결합하는 헤르셉틴 또는 악성 B-세포에서 CD20 수용체에 결합하는 리툭산이 있다.
- [0012] 다른 하나의 유력한 메커니즘은 다시 말해, 이중- 또는 그 이상의 특이적인 항체 작제물을 사용함에 의하여, 2 개 이상의 상이한 엔티티(entity)를 가까이 근접시키는 것이다. 이는 예를 들어, 종양 세포가 예컨대, 그들의 MHC 클래스 I 엔티티의 돌연변이 또는 소실에 의하여, 또는 T 세포 활성화를 억제하는 메신저(messenger) 물질을 분비함에 의하여, T 세포 공격으로부터 벗어날 수 있는 경우에, T 세포를 종양 세포에 대해 제지향시키는데 유용하다. 한 방법은 2개의 scFv 항체를 조합하는 것인데, 이중 하나는 T-세포-수용체(예컨대, CD3)에 대하여 지향되는 한편, 다른 하나는 종양 세포 항원(예컨대, EGFR)에 대하여 지향된다.
- [0013] 다른 방법은 (Fv 쇄 및 Fc-영역 둘 모두 내의 2개의 상이한 상보성 결정 영역을 포함하는 융합 분자의 수단에 의하여), 종양 세포(예를 들어, Fv의 EGFR 또는 EpCAM으로의 결합의 수단에 의하여), T-세포(예를 들어, 다른 Fv의 CD3과 같은 T-세포 수용체로의 결합의 수단에 의하여) 및 이펙터 세포, 예컨대 단핵구, 대식구 또는 자연 살해 세포(이러한 이펙터 세포 상의 Fc 감마 수용체에 의해 검출되는 Fc 영역의 수단에 의하여)를 연결하는 것이다. 이러한 방법은 종양 세포 용해 및 세포자멸사를 유도하는 T 살해 세포 및 식세포작용 또는 세포자멸사에 의하여 종양 세포를 제거하는 이펙터 세포의 항-종양 효과를 함께 합치는 한편, 이들은 추가로 T 세포 활성을 자극하는 사이토카인을 분비한다.
- [0014] 또 다른 방법은 2개의 상이한 항원이 모두 하나의 항원 결합 부위에 의해 높은 친화성으로 인식될 수 있는 항체를 설계하는 것이다. 이러한 항체는 장래에 2개의 상이한 항체를 사용하는 병용 요법을 대체할 수 있다. 더욱이 이러한 항체는 또한 동일한 항원, 특히 용해성 항원의 상이한 에피토프를 조합하는데 사용하여, 결합 활성 및 생체 내 효능을 증가시킬 수 있다.
- [0015] 현재, 치료적 용도를 위한 항체 또는 그의 단편 또는 유도체는 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 CHO(중국 햄스터 난소) 세포와 같은 포유류 세포주 중 어느 하나에서 발현된다. 이들 시스템은 ADCC를 증가시키거나 다중의 친화성을 갖는 항체를 제공하게 하지 않으며, 몇몇 다른 단점을 갖는다.
- [0016] 이. 콜라이에서 생성된 항체는 글라이코실화 또는 기타 번역후 변형 없이 생기며, 이에 따라, ADCC에 관하여 제한된 능력을 갖는다. 더욱이, 이. 콜라이 균주는 단백질을 배지 내로 분비하지 않으며, 이에 따라, 세포는 용해되어야 하고, 항체는 완전한 정제를 필요로 한다. 다른 널리 공지되어 있는 문제는 단백질의 잘못된 폴딩(folding)이며, 이는 불용성 불입체를 야기할 수 있다. 결과적으로, 이. 콜라이는 낮은 혈청 반감기를 갖는 Fab 및 scFv 단편의 생성에만 적절하다.
- [0017] 또한, 진핵세포 발현 시스템은 많은 단점을 갖는다. 효모 발현 시스템은 만노스가 풍부한 과다글라이코실화된(hyperglycosylated) 단백질을 생성하는 경향이 있으며, 이는 치료적 항체를 환자에게 투여하는 경우에 종종 원치 않는 면역 반응을 야기한다. 배큘로바이러스(Baculovirus) 감염된 곤충 세포계는 저글라이코실화(hypoglycosylation) 때문에 문제가 야기되며, 이는 치료적 항체의 이펙터 작용에 부정적인 영향을 미친다. 더욱이, 주요 단점은 전체 IgG 생성을 위한 창(window)을 좁히는 감염성 배큘로바이러스의 촉매적 특성이다.
- [0018] CHO 및 Per.C6 세포와 같은 포유류 및 인간 세포주는 배양하고 성장시키기 어려우며, 업스케일링(upscale)하는데 비용이 많이 든다. 또한, 이들 세포는 배양 배지에 관한 요구가 많다. 더욱이, 포유류 및 인간 세포주는 인간 또는 동물 기원의 박테리아 및 바이러스 감염의 위험을 갖는다.

발명의 내용

- [0019] **발명의 목적**
- [0020] 본 발명의 하나의 목적은 상술된 단점을 갖지 않는, 항체 또는 그의 단편 또는 유도체의 발현을 위한 시스템을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 다른 하나의 목적은 증가된 ADCC, CDC, 항체-의존성 세포자멸사 또는 항체-의존성 오프소닌화를 갖는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성을 가능하게 하는 시스템을 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 다른 하나의 목적은 다중의 특이성을 갖는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성을 가능하게 하는 시스템을 제공하는 것이다.

- [0023] 본 발명의 다른 하나의 목적은 연장된 혈청 반감기를 갖는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성을 가능하게 하는 시스템을 제공하는 것이다.
- [0024] 이들 목적은 독립 청구항에 따른 시스템으로 충족된다. 종속 청구항에는 바람직한 실시형태가 기재되는 한편, 다른 독립 청구항에는 변이형 및/또는 대안이 기재된다.
- [0025] **발명의 요약**
- [0026] 본 발명에 따르면, 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 이중 발현을 위한 시스템이 제공되며, 상기 시스템은
- [0027] a) 하나 이상의 세포주 숙주 세포, 및
- [0028] b) 상기 세포주 숙주 세포 내에 혼입되는, 상기 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 이중 핵산 분자를 포함한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이중 발현"은 발현이 발생하는 유기체에 대하여 외래의 유전자, 핵산 또는 cDNA의 단백질 발현을 지칭할 것이다.
- [0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산 분자"는 DNA(cDNA 및/또는 게놈 DNA), RNA(바람직하게는 mRNA), PNA, LNA 및/또는 모르폴리노(Morpholino)를 포함하는 임의의 단일- 또는 이중 가닥의 핵산 분자를 지시하고자 한다. 바람직하게는, 상기 핵산 분자는 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 cDNA를 포함한다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "cDNA"는 발현되어야 하는 단백질을 암호화하며, 임의의 비-암호화 부분, 예컨대 인트론이 없는 DNA 분자를 지칭할 것이다. 많은 경우에, cDNA는 역전사효소 및 올리고 dT-프라이머를 사용하여 RNA 주형으로부터 직접 합성된다. 그러나, 상기 용어는 또한 다르게 획득되는 합성 유전자 및 암호화 DNA를 포함할 것이다.
- [0032] 주어진 표적에 대한 주어진 모노클로날 항체를 암호화하는 핵산 서열을 문헌으로부터 취할 수 있다. 예를 들어, 유럽 특허 제EP0590058B1호에서, 인간화된 모노클로날 항-Her-2/neu 항체 헤르셉틴(트라스투주마브)의 V_L 도메인 및 V_H 도메인의 아미노산 서열이 개시되어 있다. 다른 참고문헌에는 심지어 전체 IgG에 대한 아미노산 서열이 기재되어 있다. 이러한 정보를 사용하여, 숙련자는 이러한 항체를 암호화하는 cDNA를 설계하고, 이를 본 발명의 목적을 위해 사용할 수 있다.
- [0033] 다른 자료는 예를 들어, 공개 데이터베이스(DrugBank) 데이터베이스(<http://www.drugbank.ca>)이며, 이는 대부분의 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체에 대한 서열 정보를 제공한다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체(mAb)"는 균질한 항체 집단, 즉, 전체 면역글로불린 또는 그의 단편 또는 유도체로 이루어진 균질한 집단을 갖는 항체 조성물을 지칭할 것이다. 특히 바람직하게는, 이러한 항체는 IgG, IgD, IgE, IgA 및/또는 IgM 또는 그의 단편 또는 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0035] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단편"은 일부 경우에, 예컨대, 하기와 같은 표적 결합능을 보유하는 항체의 단편을 지칭할 것이다:
- [0036] ? CDR(상보성 결정 영역),
- [0037] ? 초과변 영역,
- [0038] ? 가변 도메인(F_V),
- [0039] ? IgG 중쇄(V_H , C_H1 , 힌지, C_H2 및 C_H3 영역으로 이루어짐),
- [0040] ? IgG 경쇄(V_L 및 C_L 영역으로 이루어짐), 및/또는
- [0041] ? Fab 및/또는 $F(ab)_2$.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유도체"는 통상적인 항체 개념과 구조적으로 상이하나, 이에 대하여 일부 구조적 관련성을 갖는 단백질 작제물, 예컨대 scFv뿐 아니라 이중특이적, 삼중특이적 또는 그 이상 특이적인 항체 작제물을 지칭할 것이다. 모든 이들 항목이 하기에 설명된다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 2개의 상이한 의미를 가지며, 이는 각각의 문맥에 따라 이해될 수

있다. 이중 단백질 발현의 문맥에서, 용어 "숙주 세포"는 발현 숙주로 사용되는 트랜스제닉(transgenic) 세포를 지칭한다. 따라서, 상기 세포 또는 그의 전구세포(progenitor)는 발현될 단백질의 cDNA를 포함하는 적절한 벡터로 트랜스펙션시킨다.

- [0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 "섬모류 숙주 세포"는 유모동물문(이전에는: 섬모충강), 예컨대 섬모로 지칭되는 모-유사 세포소기관의 존재 및 핵 이형태성(nuclear dimorphism)을 특징으로 하는 원생동물로부터의 세포를 지칭할 것이다.
- [0045] 본 명세서에서 사용되는 용어 "혼입된"은 상기 핵산이 단백질 발현의 준비가 되도록 숙주 세포에 유입되는 것을 지칭할 것이다. 이러한 혼입은 섬모류에서 상이한 유형, 예컨대 "에피솜 혼입"(예컨대, 플라스미드와 같은 핵산 분자는 세포 핵에 유입되지 않으나 세포질 내에서 복제되고 번역됨) 및 "통합형 혼입"(예컨대, 핵산 분자가 세포 게놈 내에 통합됨)을 가질 수 있다.
- [0046] 섬모류는 이들을 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 위한 발현 숙주로 사용하기에 적절하게 만드는 몇몇 놀라운 특성을 갖는다. 이. 콜라이와 대조적으로, 이들은 scFv 및 Fab뿐 아니라, 전체 규모 면역글로불린(IgG)도 생성할 수 있다. 더욱이, 생성된 항체는 배지 내로 분비되므로, 세포 펠렛으로부터의 세포 용해 및 추출이 필요하지 않다.
- [0047] 포유류 세포주에 비하여, 항체 발현이 매우 저렴한데, 이는 섬모류가 배양 배지에 대한 요구가 거의 없으며, 액체 배지에서 배양될 수 있기 때문이다.
- [0048] 또한, 본 발명자들은 박테리아 또는 고등 진핵세포에 대해서와 달리, 섬모류에 대하여 특이적인 바이러스가 아직까지 알려져 있지 않다는 것을 알아냈다. 이는 섬모류에 공통적인 핵 이형태성 때문일 수 있다. 이에 대한 다른 이유는 섬모류에서의 통상적이지 않은 코돈 사용 및 AT-풍부 게놈일 수도 있다. 따라서, 본 발명자들은 고등 유기체의 병원성 바이러스가 대부분의 섬모류에서 증폭될 수 없다고 가정하였다. 지금까지 알려져 있는 바와 같이, 섬모류가 바이러스에 감수성이지 않다는 사실은 놀라운 이점으로 나타난다. 이는 섬모류에 기초한 생성 방법에서 우발적인 바이러스의 증폭 또는 성장이 발생하지 않는 것을 의미한다. 또한, 이는 단백질을 치료 용도로 생성하는 경우에, 인간 및 동물 세포 배양을 사용하는 산업적 방법에서 필요한, 비용이 드는 바이러스 제거 절차를 생략할 수 있음을 의미한다.
- [0049] 그러나, 섬모류 시스템은 모노클로날 항체의 발현에 관하여 몇몇 다른 이점을 갖는다. 이들은 하기에 논의될 것이다.
- [0050] 상기의 이점에도 불구하고, 섬모류 발현 시스템은 여전히 상대적으로 알려져 있지 않으며, 유력한 이중 단백질 발현 시스템에 관하여 질문을 받는 경우, 당업자는 오히려, 이. 콜라이, 효모, 곤충 세포계(배큘로바이러스) 및 포유류 세포주를 생각할 것이다.
- [0051] 본 발명의 문맥에서 사용될 수 있는 섬모류의 형질전환 방법에는 다른 것 중 특히, 미세주입법(microinjection), 전기천공법 및 유전자총(particle bombardment)이 포함되며, 예를 들어, 문헌[Tondravi & Yao (1986), Gaertig Gorovsky (1992)] 및 문헌[Cassidy-Hanley et al (1997)]에 기재되어 있다.
- [0052] 형질전환 및 이중 단백질 발현 방법은 소수의 원생생물에 대하여 기재되어 있다(제W000/58483호 및 제W000/46381호). 유사분열상 안정적인 섬모류 테트라하이메나 써모필라(*Tetrahymena thermophila*)의 형질전환체의 생성은 미세주입법, 전기천공법 또는 유전자총에 의한 체세포 대핵(macronucleus) 또는 생식세포 소핵(micronucleus) 중 어느 하나의 트랜스펙션 후에 달성될 수 있다.
- [0053] 형질전환체의 선택은 네오마이신 내성과 같은 상이한 선택 마커(문헌[Weide et al. 2006, BMC]) 및 안정적인 티미딘-영양요구성 테트라하이메나 세포를 야기하는 상동성 DNA 재조합에 의한 이중 유전자의 통합(문헌[Weide et al. 2006, BMC])을 사용하여 수행할 수 있다. 또한, 블라스티시딘 S(문헌[Weide et al. 2007, BMC]) 또는 파클리탁셀(제W000/46381호) 내성의 사용도 고려된다.
- [0054] 바람직하게는, 암호화 핵산은 섬모류 발현 숙주에 대하여 코돈 최적화한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "코돈 최적화"는 발현될 이중 단백질을 암호화하는 cDNA를 보편적인 유전자 코드 양식으로부터 유래한 숙주 특이적 코돈 사용에 적합하게 하는 과정을 지칭할 것이다. 섬모류는 AT-풍부 게놈을 가지며, 테트라하이메나 DNA는 대략 75%의 AT로 이루어진다(도 9 참조). 특히, 주어진 아미노산을 암호화하기 위하여 코돈이 얼마나 자주 사용되는지("코돈 편향(codon bias)")에서, 코돈 사용이 다른 유기체와 상이하였다. 이중 단백질을 암호화하는 비-최적화된 cDNA가 섬모류에서 드물게 사용되는 코돈을 사용한다면, 이는 단백질 발현 효능에 강력한 영향을 미칠 수

있다. 결과적으로, 이는 연구에서의 유전자의 코돈 빈도가 섬모류 발현 시스템의 코돈 사용과 매치되는 경우, 이중 단백질 발현이 급격히 향상될 수 있음을 의미한다. 더욱이, 많은 섬모류, 그들 중 특히 테트라하이메나는 글루타민을 암호화하는 UAA 및 UAG 트리플렛(triplet)을 사용하는 비-정규적 뉴클레오티드 코드를 사용하는 한편, 대부분의 다른 유기체에서, 이들 코돈은 번역을 종결시키는 정지 코돈으로 사용된다. 이는 정지 코돈으로서 UAA 및 UAG 트리플렛을 지니는 외래(비 섬모류) 유전자가 정확하게 발현되지 않게 야기할 수 있다. 이러한 목적을 위하여, 섬모류 숙주 세포를 형질전환시키기 전에, 이중 단백질을 암호화하는 cDNA는 UAA 및 UAG 트리플렛을 UAA로 수정하는 방식으로 코돈 최적화해야 한다. 예를 들어, 코드 최적화는 위치 지정 돌연변이생성에 의해 또는 새로운(de novo) cDNA 합성에 의해 달성할 수 있다.

[0055] 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 상기 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체는 본질적으로 푸코스가 없는 N-글라이칸 구조를 갖는다. 진핵세포 발현 시스템에서 발현되는 단백질은 글라이코실화를 포함하는 번역-후 변형의 과정을 겪는다. 오늘날 IgG 및 Fc 영역을 포함하는 다른 모노클로날 항체의 생성을 위하여 확립되어 있는 진핵세포 발현 시스템은 N-글라이칸을 폴리펩타이드 쇄에 가한다. IgG에서, 가장 중요한 N-글라이칸은 C_H2 쇄 둘 모두의 Asn 297에서 결합되며(도 1 참고), 이는 다른 것 중 특히, N-아세틸-뉴라민산(시알산), N-아세틸-글루코사민, 갈락토스, 만노스 및 푸코스 잔기를 포함한다. 이는 기본적으로 트랜스제닉 식물 발현 시스템뿐 아니라 포유류 세포주(도 2 참조), 곤충 세포주 등에 대하여 적용된다. 이들 모든 경우에, N-글라이칸은 폴리펩타이드 쇄의 Asn 잔기에 결합된 N-아세틸-글루코사민 잔기에 α-3-글라이코사이드에 의해, 또는 α-6-글라이코사이드에 의해 결합되는 하나 이상의 푸코스 잔기를 포함한다. 이와 대조적으로, 섬모류는 이것이 푸코스를 함유하지 않는다는 점에서 상기 언급된 발현 시스템에 의해 생성되는 글라이코실화 패턴과는 상당히 상이한 N-글라이칸 구조를 생성한다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 용어 "본질적으로 푸코스가 없는"은 하나 이상의 N-글라이칸, 바람직하게는 Asn 297 N-글라이칸에서 하나 이상의 푸코스 잔기를 지니는 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체의 공유가 본 발명에 따른 시스템으로 생성되는 전체 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체의 10%, 바람직하게는 5%, 더욱 바람직하게는 1%, 가장 바람직하게는 0.1%를 초과하지 않음을 의미한다.

[0057] 또한, 인간 세포주(PerC6)뿐만 아니라 통상의 포유류 세포주에서의 재조합 항체의 생성에 의해, 배양 조건과 배양 기간의 경과에 따라 달라지는 글라이코실화 프로파일이 초래된다. 항체 글라이코실화 패턴에서의 이러한 감소된 정확도는 치료 효능 감소의 원인이 되며, 부작용의 위험을 증가시킨다(문헌[Jefferis 2005]). 대조적으로, 섬모류는 매우 재현성 있는 바이안테너리(biantennary) 올리고만노스 N-글라이코실화 구조를 갖는 단백질을 분비할 수 있다(문헌[Banno et al. 1993]). 유사한 일관된 글라이코실화 패턴은 균일한 혈청 반감기, 부작용의 위험 감소를 야기하며, 균일하고 잘 관리될 수 있는 치료 효과를 가능하게 할 것이다.

[0058] 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효과를 갖는다:

[0059] ? 증가된 항체-의존성 세포독성(ADCC),

[0060] ? 증가된 보체-의존성 세포독성(CDC),

[0061] ? 증가된 항체-의존성 세포자멸사, 및/또는

[0062] ? 증가된 항체-의존성 옹소닌화.

[0063] 최근의 연구에 의해, 그의 글라이코실화 패턴에서 푸코스의 양이 감소된 모노클로날 항체가 푸코실화된 항체에 비하여, 훨씬 더 큰 항체-의존성 세포독성(ADCC) 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 다시 말하면, 이는 기본적으로 위치 Asn 297이며, 여기서, 푸코스 잔기의 결여는 ADCC의 증가를 야기한다. 저-푸코스 항체/푸코스가 없는 항체의 ADCC 증가의 이면의 메커니즘은 인간 면역 이펙터 세포에서 ADCC에 대한 주요 Fc 수용체인 FcγR, 예컨대 Fcγ IIIa(CD16)에 대한 그렇게 변경된 Fc 영역의 친화성 증가에 의해 매개되는 것으로 보인다(문헌[Shields et al., 2002]).

[0064] ADCC를 유도하는 본 발명에 따른 치료적 항체에 대한 유력한 표적은 하기의 표에 나타나 있으며, 이는 본 출원서의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다(표적 약어는 표준 문헌으로부터 취함):

표 1

표적	유력한 징후	항체 예
CD3	이식편대숙주병, 신장 이식	OKT3
CD4	T-세포-림프종	HuMAX CD4
CD5	B/T 세포 항원: MCL, CLL, CTCL, 자가면역	
CD19	비호지킨 림프종, B 세포 악성종양 및 자가면역 질환	AFM12, XmAb 5574; XmAb5871
CD20	비호지킨 림프종, 류마티스 관절염, 만성 림프구성 백혈병, 여포성 비호지킨 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종	리툭산, 벡사르, HuMAX CD20, 제발린
CD22	비호지킨 림프종	LymphoCide
CD30	호지킨 림프종 및 미분화 대세포 림프종의 치료	XmAb2513; MDX060 (5F11)
CD33	급성 골수성 백혈병	Mylotarg
CD38	다발성 골수종	HuMAX CD38
CD40	알츠하이머병 발병; B 세포 악성종양 및 자가면역 질환	XmAb 5485
CD52	B-세포 만성 림프구성 백혈병	Campath
CD70	혈액암	SGN70 and SGN75
CEA	결장직장암/폐암/유방암	CEA-Scan
CTAA 16.88	결장직장암/유방암/전립선암/폐암/난소암/췌장암	HumaSpect-Tc
GD2	고형암	BIW-8137
VEGF-R/FLT-1	유방 및 결장암	BIW-8556
GM2	폐암 및 암에서의 류마티스 관절염	BIW-8962
IL-5 수용체	천식	BIW-8405
EGFR/Her2-neu	전이성 결장직장암 및 두경부암, 두경부의 편평세포암종(SCCHN)	에르비투스, HuMAX EGFr
EpCAM	결장암, 유방암 및 전립선암(고형 종양)	MT201, 파노렉스
ErbB2	ErbB2 를 과발현하는 전이성 유방암	헤르셉틴
FOLR1	난소암	
PLAC1	유방암, NSCL, 난소암	GT468
CLDN18.2	위암 및 췌장암	GC182
히스톤 H1	폐암/자궁암 신경아교육종	코타라
CD317	다발성 골수종	항-HM1.24
Muc1	결장 암종	PankoMab
PSMA	전립선암	ProstaScint
VEGF	전이성 결장직장암	아바스틴

[0065]

[0066]

숙련자가 상기 언급된 항체의 제조 프로토콜 및 아미노산 서열에 완전하게 접근할 수 있으며, 이에 따라, 예를 들어, 항체에 의해 유발되는 ADCC를 증가시키기 위하여, 본 발명의 교시를 상기 항체의 모두에 적용할 수 있을 것을 이해하는 것이 중요하다.

[0067]

미국 회사 젠코르(Xencor)는 아미노산 변화를 선택하기 위하여, 항체 Fc 영역을 엔지니어링함으로써, 항체 성분의 모듈러 스위트(modular suite)를 개발하였다. 일부 경우에, 이들 Fc가 ADCC를 100배 넘게 증가시켜, 다른 것 중 특히, 심지어 낮은 수준의 항원을 발현하는 세포주에 대한 ADCC 사멸 및 동일한 세포독성 효과를 유지하면서 mAb의 용량의 감소를 야기하는 것이 기록으로 나타나 있다. 그러나, 저자는 그들의 변형 사이의 인과 관계를 나타내지 않았으며, 이는 무작위 돌연변이/선택 과정과 얻어진 효과, 즉, ADCC 증가에 기초하는 것으로 보인다. 이러한 이유로, 이 개념은 완전히 재현할 수 없고, 이것이 다른 항체에 일반화될 수 있는지 여부가 알려져 있지 않다.

[0068]

일본 회사 바이오와(BIOWA)는 ADCC가 증가된 mAb의 발현을 위한 CHO(중국 햄스터 난소) 세포주를 개발하였다.

이러한 세포주에는, α -1,6 푸코실트랜스퍼라제("FUT8") 효소를 암호화하는 유전자가 낙아웃되어 있다(knocked out). 따라서, 번역후 글라이코실화 동안, 푸코스 잔기는 항체의 N-글라이코실화 부위에 가해질 수 없다. 이는 이에 따라 생성된 mAb가 ADCC 활성 증가를 보임을 청구하였다. 이 방법은 유럽 특허 제EP1176195호에 기재되어 있다. 이 기술의 주요 단점은 이것이 푸코스가 100% 없는 생성물을 보장하지 않는다는 점이다. 탈푸코실화(Defucosylation)는 α -1,6 푸코실트랜스퍼라제의 잠재적으로 남아있는 효소 활성에 매우 의존적이며, 이에 따라, 특히 배치-대-배치(batch-to-batch) 비교에서 상당한 변화에 처해진다. 또한, 이 시스템은 오직 CHO 세포(소위 FUT8 낙아웃 CHO)에서만 이용가능하며, 이는 일부 mAb 발현 응용을 위한 차선의 발현 숙주이다.

[0069] 미국 회사 글라이카트(Glycart)는 mAb의 생성을 위한 세포주를 개발하였으며, 이는 올리고당-변형 효소 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnT III)을 암호화하는 이중 유전자를 지닌다. 이들 세포를 이후에 mAb를 암호화하는 DNA로 트랜스펙션시키는 경우, 이들은 mAb를 생성할 것이며, 이는 먼저 푸코스 잔기의 혼입을 포함하는 통상의 글라이코실화 과정을 겪는다. 이어서, 제2 단계에서, 푸코스 잔기는 GnT III 효소의 수단에 의해 절단된다. 이에 따라, 얻어진 단백질은 더 많이 또는 더 적게 비푸코실화(unfucosylated)되며, ADCC 증가를 나타낸다. 다시 말하면, 이러한 기술은 푸코스가 100% 없는 생성물을 보장하지 않는다. 탈푸코실화는 상기 GnT III 효소 활성에 매우 의존적이며, 이에 따라, 특히 배치-대-배치 비교에서 상당한 변화에 처해진다.

[0070] 미국 회사 유레카 테라퓨틱스(Eureka Therapeutics)는 이들이 MAGE("글라이코실화 엔지니어링을 통해 확대된 ADCC")로 명명한 치료적 항체에서 ADCC를 증가시키는 방법을 개발하였다고 광고하고 있다. 그러나, 상기 방법의 기술적 상세사항이 드러나 있지 않다.

[0071] 놀랍게도, 본 발명의 발명자들은 그들의 실험에서, 섬모류가 ADCC를 유도할 수 있는 항체를 생성하지만, N-글라이칸 구조가 포유류 세포에서 발현되는 전형적인 항체와 상이함을 발견하였다. 결과적으로, 본 출원의 발명자들은 그들의 실험에서, 섬모류가 Fc-영역에서 푸코스를 함유하지 않는 N-글라이칸 구조를 갖는 항체를 생성하는 것을 발견하였다. 이는 포유류 세포에서 발현되는 항체에 비한, ADCC 이펙터 기능의 증가에 대한 설명이 될 수 있다.

[0072] 따라서, 본 발명에 따른 시스템은 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성을 위한 경제적이며, 간단하고 신뢰성 있는 방법을 제공하며, 이는 ADCC를 급격하게 증가시키고, 이에 따라 치료 능력이 매우 증가된다.

[0073] 효모-기반의 발현 시스템(예컨대, 사카로마이세스 종(*Saccharomyces sp.*) 또는 피키아 종(*Pichia sp.*))에서 또한 만노스가 풍부한 비푸코실화된 N-글라이칸을 생성한다(도 2)는 언급이 중요하다. 이들 발현 시스템이 특히 항체, 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성을 위한 집중적인 연구의 대상이지만(문헌[Wei et al, 2008]), 연구의 주요 초점은 인간 글라이코실화 패턴과 유사한 방식으로 효모-기반의 발현 시스템의 글라이코실화 패턴을 변경시키는 것에 관한 것으로 보인다(문헌[Gerngross, 2004]). 결과적으로, 이는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체에 유용할 뿐 아니라, 발현되는 다른 생물 약제(biopharmaceutical)에도 유용할 것이다.

[0074] 현재, 효모 스트레인(strain)에서 생성되는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체가 증가된 ADCC 또는 CDC 또는 항체-의존성 세포자멸사를 갖거나, 푸코실화의 결여가 임의의 다른 특정 효과를 갖는 것을 나타내는 보고를 입수할 수 없다. 다시 말하면, 이는 당업자에게 널리 공지되어 있는 사실로서 단독의 푸코실화의 결여가 자동적으로 ADCC 증가를 의미하지 않음을 나타낸다.

[0075] 또한, 본 발명에 따른 시스템으로 생성되는 치료적 항체 또는 그의 유도체 또는 단편은 또한 증가된 CDC를 갖는 것으로 보인다.

[0076] 또한, 본 발명에 따른 시스템으로 생성되는 치료적 항체 또는 그의 유도체 또는 단편은 또한 증가된 항체-의존성 세포자멸사 효과를 갖는 것으로 보인다.

[0077] 또한, 본 발명에 따른 시스템으로 생성되는 치료적 항체 또는 그의 유도체 또는 단편은 또한 증가된 항체-의존성 옉소닌화 효과를 갖는 것으로 보인다.

[0078] 특히 바람직한 실시형태에서, 추가의 N-글라이코실화 부위가 발현될 항체 또는 그의 단편 또는 유도체 내에 도입되는 것이 제공된다. 이는 예를 들어, 위치-지정 돌연변이생성에 의하여 또는 아미노산 잔기의 의도적인 교환에 의하여, 추가의 N-글라이코실화 모티프, 즉 트라이펩타이드 서열 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr(여기서, X는 임의의 아미노산 일 수 있지만, Pro 및 Asp은 드물게 관찰된다)을 도입함으로써 행해질 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 그의 단편 또는 유도체가 그의 쇄 내의 어딘가에 모티프 "Gly-X-Ser"을 갖는다면, 추가의 N-글라이코실화 부위를 생성하기 위하여 "Gly"은 "Asn"으로 치환할 수 있다. 물론, 상기 치환이 표적 친화성, Fc 감마 수용체

(FcγR)에 의한 결합 등의 단백질의 중요한 특성에 영향을 미치지 않는 것을 보장하는 것이 필요하다.

- [0079] 그러나, 예외적인 N-글라이코실화 패턴은 처음에는, 당업자가 이러한 비정상적인 글라이코실화 패턴이 이에 따라 생성되는 항체의 면역양립성(immunocompatibility)에 영향을 미치는 것으로 여기는 경우, 치료적 용도를 위한 항체에 대한 발현 시스템으로서의 테트라하이메나 써모필라의 사용을 배제하였다. 그러나, 본 발명자들은 이들 가정이 옳지 않음을 보여주었다.
- [0080] 또한, 섬모류 발현 시스템은 후술되는 포유류 세포주와 같은 다른 단백질 발현 시스템에 비하여 다른 이점을 갖는다.
- [0081] 또 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체는 연장된 혈청 반감기를 갖는다.
- [0082] 혈청 반감기는 치료적 목적을 위해 사용되는 모노클로날 항체에서 중요한 문제인데, 혈청 반감기의 연장이 용량 및/또는 투여 빈도를 감소시키는데 도움이 될 수 있기 때문이다. 모노클로날 항체가 경구로 투여될 수 없기 때문에, 환자의 순응도를 향상시키는 데 도움이 될 것이며, 더 낮은 용량 때문에 비용이 감소하고, 투여의 방법에 관련된 위험이 감소된다.
- [0083] 혈청으로부터 용해된 단백질을 제거하는 주요 경로는 간에서의 아시알로당단백질 수용체-매개의 제거이다. 통상, 포유류 단백질은 베타-갈락토스 잔기에 의해 지지되는 2개 이상의 말단 시알산 잔기(N-아세틸-뉴라민산)를 갖는 분기된 N-글라이칸으로 N-글라이코실화된다(도 2 참조). 이는 대상체의 내재적 단백질뿐 아니라 예를 들어, 포유류 세포주에서 발현되고 상기 대상체에게 투여되는 이종 단백질 둘 모두에 대해 적용된다.
- [0084] 단백질 수명 동안, 말단 시알산 잔기는 갈락토스 잔기가 노출될 때까지, 편재하는 뉴라미니다아제(neuraminidase) 때문에 글라이칸 쇄로부터 점차 제거된다. 이어서, 이들은 많은 탈시알릴화된(desialylated) 혈장 단백질의 갈락토스 잔기에 결합하는 간에 풍부한 렉틴인 아시알로당단백질 수용체에 의해 인식된다. 인식된 후에, 상기 단백질은 엔도시토시스(endocytosis)로 처리되며, 이어서 간에서 분해될 것이다.
- [0085] 상기에 나타낸 바와 같이, 섬모류에서 이종 발현되는 단백질은 자유롭게 부유하는 뉴라미니다아제에 의해 제거될 수 있는 말단 시알산 잔기나 아시알로당단백질 수용체에 대한 표적으로 소용될 수 있는 갈락토스 잔기 중 어느 것도 갖지 않는다. 이러한 이유로, 섬모류에서 발현되는 이종의 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체는 아시알로당단백질 수용체-매개의 제거로 처리되지 않으며, 이에 따라, 증가된 혈청 반감기를 갖는다. 섬모류 발현 방법은 모두 기본 항체 개념의 더 많거나 더 적은 급격한 변형을 수반하며, 면역원성 등에 대한 그의 결과를 예측하기 어려운 항체 혈청 반감기를 연장시키기 위한 다른 방법에 대하여 몇몇 유의미한 이점을 갖는다. 이들 방법은 하기에 기재된다.
- [0086] 미국 회사 도만티스(Domantis)는 항체에 결합된 항-알부민 도메인을 사용함으로써 혈청 반감기를 연장시키는 시도를 하는 한편, 제네테크 인코포레이티드(Genentech Inc.)는 CH₂-N-글라이칸 내의 갈락토스 함량을 증가시키는 방법을 개발하였다. 피디엘 바이오파마 인코포레이티드(PDL BioPharma Inc.)는 Fc-영역 내의 몇몇 아미노산 잔기를 다른 것으로 치환하여, 혈청 반감기의 연장을 야기하는 방법을 개발하였다. 또한, 폐길화(PEGylation)의 개념은 단백질의 혈청 반감기를 연장시키기 위하여 당업자에게 널리 공지되어 있다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 시스템은 추가로,
- [0088] c) 상기 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 프로모터, 및/또는
- [0089] d) 상기 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 신호 서열을 포함하며, 이 신호 서열은 상기 핵산 분자에 의해 암호화되는 모노클로날 항체 또는 그의 단편의 세포외 배지로의 분비의 원인이 된다.
- [0090] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동가능하게 연결된"은 유전자 생성물을 암호화할 수 있는 뉴클레오타이드 서열이 프로모터가 적절한 조건 하에서 유전자 생성물의 발현을 조절하는 방식으로 프로모터 및/또는 신호 서열에 연결되는 것을 의미한다.
- [0091] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로모터"는 일반적으로 유전자 또는 cDNA의 업스트림(센스(sense) 가닥의 5' 영역을 향해)에 위치하며, 유전자 또는 cDNA의 전사를 가능하게 하거나 심지어 증가시키는 필수 유전 요소를 함유하는 DNA의 조절 영역을 의미할 것이다.
- [0092] 본 명세서에서 사용되는 용어 "신호 서열"은 단백질의 특정 세포소기관, 예컨대, 핵, 미토콘드리아 기질, 소포체, 엽록체, 아포플라스트(apoplast) 및 퍼옥시좀으로의 수송을 지시하는 올리고펩타이드("신호 펩타이드" 또는

"수송 펩타이드")를 암호화하는 핵산 서열을 지칭할 것이다. 소포체로 수송되는 거의 모든 단백질은 N-말단에 5 내지 10개의 소수성 아미노산으로 이루어진 서열을 갖는다. 이들 신호 서열은 단백질의 ER의 내강으로의 번역과 동시의(cotranslational) 삽입 후에, 신호 펩타이드 가수분해효소(signal peptidase)에 의해 단백질로부터 절단된다. 그 다음, 대부분의 단백질은 골지체를 통해 분비 경로 상의 다운스트림으로 수송된다.

[0093] 섬모류에서 항체 발현에 적절한 프로모터는 예를 들어, 본 발명의 출원인에 대해 등록된 제W02007006812A1호에 개시되어 있으며, 그 내용은 본 명세서에 참고로 포함될 것이다. 상기 문헌에서는, 열-유도성 프로모터 및 메탈로티오네인-프로모터가 개시되어 있으며, 이는 또한 본 발명의 목적을 위해 사용될 수도 있다.

[0094] 적절한 신호 서열은 예를 들어, 본 발명의 출원인에 대해 등록된 제W003078566A1호에 개시되어 있으며, 그 내용은 본 명세서에 참고로 포함될 것이다. 상기 문헌에서는, 본 발명의 문맥에서 특히 바람직한 2개의 신호 펩타이드, 즉, 항체 중쇄 및 경쇄의 내재적 신호 펩타이드 및 섬모류 리파아제 신호 펩타이드가 개시되어 있다.

[0095] 또한, 섬모류 숙주 세포의 트랜스펙션을 위한 벡터가 제공되며, 상기 벡터는 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함한다.

[0096] 본 명세서에서 사용되는 용어 "벡터"는 외래 유전 물질을 다른 세포로 전달하는데 사용되는 분자 비히클(vehicle)을 지칭한다. 벡터 그 자체는 일반적으로, 삽입물(대상 서열) 및 벡터의 "백본"으로 사용되는 더 큰 서열로 이루어진 DNA 서열이다. 유전 정보를 다른 세포에 전달하기 위한 벡터의 목적은 전형적으로 표적 세포에서 삽입물을 분리하거나, 증가시키거나 발현하기 위한 것이다.

[0097] 본 명세서에서 사용되는 용어 "플라스미드"는 플라스미드 벡터, 즉, 복제 원점("ORI") 때문에, 적절한 숙주 내에서 자가 복제될 수 있는 원형의 DNA 서열을 지칭한다. 또한, 플라스미드는 형질전환, 또는 세포 내로 도입하는 것을 의미하는 다른 절차의 성공을 나타내는 선택가능한 마커 및 외래 DNA를 삽입물의 삽입을 가능하게 하는 다중 제한 효소 공통 부위를 포함하는 다중 클로닝 부위를 포함할 수 있다. 클로닝 또는 공여체 벡터로 지칭되는 플라스미드 벡터를 사용하여, 클로닝을 용이하게 하고, 대상 서열을 증폭시킨다. 발현 또는 수여체 벡터로 지칭되는 플라스미드 벡터는 특이적으로 규정된 표적 세포에서의 대상 유전자의 발현을 위한 것이다. 이들 플라스미드 벡터는 일반적으로, 프로모터, 트랜스유전자(transgene) 및 터미네이터(terminator) 서열로 이루어진 발현 카세트를 보여준다. 발현 플라스미드는 상이한 숙주 세포에서 증식 및 선택을 가능하게 하는 요소를 함유하는 셔틀(shuttle) 플라스미드일 수 있다.

[0098] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 이중 발현을 위한 시스템이 제공되며, 상기 시스템은 본 발명에 따른 2개 이상의 섬모류 숙주 세포의 컨주게이션에 의해 수득되는 섬모류 숙주 세포를 포함한다.

[0099] 모든 섬모류는 2개의 구조적으로, 그리고 기능적으로 상이한 유형의 핵을 갖는 핵 이형태성을 나타낸다. 큰 체세포 대핵(MAC)은 영양 증대 동안 활동적으로 발현된다. MAC는 45개 염색체 카피를 함유하며, 유사분열에 의해 나뉜다. 작은 이배체 소핵(diploid micronucleus, MIC)은 생식계열이며, 5개의 염색체 쌍을 함유한다. MIC는 생식에 의한 자손을 위하여 유전 정보를 보관한다. 영양기 동안 MIC는 유사분열에 의해 나뉜다. 섬모류의 라이프 사이클은 생식계열과 관련하여, 교대하는 단상 및 복상으로 이루어진다. 세포 재생(reproduction)은 배타적으로 무성생식이며, 오직 복상에서만 발생한다.

[0100] 상기 방법은 섬모류 숙주 세포의 독특한, 즉, 이들이 컨주게이션에 의하여 유전 물질을 교환할 수 있는 특징을 이용한다. 소정의 조건 하에서, 섬모류는 라이프 사이클의 생식 단계인 컨주게이션 사이클에 유입될 것이다. 예를 들어, 테트라하이메나에서, 7개의 상이한 교배 유형 중 2개 이상에 속하는 세포를 혼합하고, 이들을 적당히 기아상태에 있게 함으로써, 컨주게이트되도록 유도할 수 있다. 이러한 단계에서, 2개의 세포는 쌍을 이루어, 반수체 배우자(gametic) 핵과 교환된다. 핵의 컨주게이션 사건은 보통 감수분열, 배우자 핵 형성, 수정 및 핵 분화를 포함한다. 컨주게이션은 오직 - 그리고 매우 간단하게 - 섬모류 라이프 사이클의 반수체 단계만을 포함하며; 이는 감수분열이 뒤따르며, 수정 시에 신속하게 끝난다. 이러한 과정은 대다수의 섬모류에서 보존되어 있다.

[0101] 청구된 방법은 섬모류 숙주 세포의 독특한 특징, 즉 컨주게이션 동안 유전 물질의 교환 특징을 이용한다. 컨주게이션 과정의 주요 기지는 도 6에 나타내었다.

[0102] 컨주게이션의 시작 시에, 쌍을 이루는 세포 내의 소핵은 감수분열을 겪어 4개의 반수체 전핵(pronuclei)을 생성한다. 이들 전핵 중 3개는 파괴되는 한편, 나머지 하나는 분열하여, 2개의 배우자 핵을 형성한다: "이동상" 전핵 및 "정지상" 전핵. 이동상 전핵은 2개의 세포의 일시적인 접합을 통하여 교환되며; 이어서, 이들은 정지상

전핵과 융합되어, 각 세포에서 접합핵을 형성한다.

- [0103] 접합핵은 2회 분열하여, 4개의 유전적으로 동일한 핵을 형성하는 한편, 오래된 대핵은 분해된다. 4개의 접합 클론 중 2개(선행 생성물)는 새로운 대핵으로 발생되며, 이는 염색체 파괴, 프로그램화된 DNA 제거 및 텔로미어(telomere) 부가를 포함하는 매우 다양한 게놈 재배열을 겪는다. 테트라하이메나에서, 이들 과정에 의해 대략 300개의 개별 대핵 염색체가 생성된다. 이어서, 각 염색체는 45 카피로 증폭되어, 대핵 게놈의 발생을 완료한다.
- [0104] 2개의 나머지 접합 클론 중 하나는 분해되며; 새로운 소핵인 다른 것은 처음의 무성생식 사이클 동안 유사분열로 분열된다. 딸 세포에는 이러한 분열에서 각각 하나의 소핵과 하나의 대핵이 제공되어, 영양적으로 성장하는 섬모류 세포에서 관찰되는 핵의 통상의 보체를 제공한다.
- [0105] 원핵세포 발현 시스템뿐 아니라 효모, 곤충 세포계(배칼로바이러스), 포유류 발현 시스템, CHO 세포 또는 트랜스제닉 식물 또는 포유류와 같은 대부분의 다른 진핵세포 발현 시스템에서 컨주게이션의 원리는 없다. 2개의 상이한 상기 시스템에 따른 항체 발현 숙주 세포의 컨주게이트를 사용하는 이중특이적 또는 그 이상 특이적인 항체의 제조합 발현을 위해 사용되는 섬모류 숙주 세포는 몇몇 요건을 충족시켜야 한다:
- [0106] a) 2개 이상의 섬모류 세포는 상이한 교배형으로부터의 것이어야 함,
- [0107] b) 2개 이상의 섬모류 세포에서 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 핵산 분자를 그의 소핵 내로 도입시켜야 함.
- [0108] 세포를 컨주게이트시킴으로써, 둘 모두의 핵산 분자의 조합물을 지니는 세포가 생성될 수 있으며, 이에 따라 예를 들어, 둘 모두의 항원 특이성을 구성하는 2개의 모 항체의 조합으로 구성된 신규한 모노클로날 항체 또는 항체 작제물 또는 그의 단편 또는 유도체를 생성할 수 있다.
- [0109] 하기의 표는 상기 발명의 범주 내에 있는 몇몇 유력한 짜임관계(constellation)에 대한 개관을 제공한다. 각각 모노클로날 항체를 암호화하는 핵산을 지니는 2개의 숙주 세포의 컨주게이션 후에, 가능한 얻어지는 조합 항체, 그의 단편 또는 유도체를 나타내었다. 상기 목록은 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

표 2

컨주게이션 전의 세포 1	컨주게이션 전의 세포 2	컨주게이션 후
전체 IgG A	전체 IgG B	이중특이적 전체 IgG F(ab) ₂ A + FcB
중쇄(V _H) + 경쇄(V _L)	중쇄(V _H) + 경쇄(V _L)	전체 IgG
표적 1에 대한 중쇄(V _H) + 경쇄(V _L)	표적 2에 대한 중쇄(V _H) + 경쇄(V _L)	쿼드로마(quadroma)(이중 특이적)
표적 1(예컨대, EGFR)에 대해 특이적인 scFv	표적 2(예컨대, CD3)에 대해 특이적인 scFv	디아바디(diabody) 또는 탠덤(tandem) scFv
종양 세포 표적(예컨대, EGFR)에 대한 중쇄(V _H) + 경쇄(V _L)	T-세포 수용체(예컨대, CD3)에 대한 중쇄(V _H) + 경쇄(V _L)	종양 세포, T 세포 및 이펙터 세포에 결합하는 삼중특이적 항체
항체 A로부터의 Fab	항체 B로부터의 Fab	이중특이적 F(ab) ₂
항체 A로부터의 Fab	항체 B로부터의 Fab	이중특이적 항원 결합 부위(V _L (A) + V _H (B))가 있는 F(ab) ₂
이중특이적 전체 IgG (A+B)	전체 IgG C	삼중특이적 전체 IgG: F(ab) ₂ A+B + C로부터의 Fc

- [0110]
- [0111] 본 발명의 다른 실시형태에서, 본 발명에 따른 하나 이상의 벡터로 트랜스펙션되거나, 본 발명에 따른 둘 이상의 섬모류 숙주 세포의 컨주게이션에 의해 수득되는 섬모류 숙주 세포가 제공된다.
- [0112] 또한, 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 본 발명에 따른 2개 이상의 섬모류 숙주 세포 또는 본 발명에 따른 2개 이상의 시스템을 포함하는 라이브러리가 제공되며, 여기서, 각 숙주 세포에는 바람직하게는, 벡터의 형태의,

항체, 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 이중 핵산 분자가 통합되며, 2개 이상의 섬모류는 그들이 서로 컨주게이트될 수 있는 방식으로 선택된다.

[0113] 이러한 라이브러리는 예를 들어, 안정적으로 트랜스펙션된 섬모류 숙주 세포를 포함할 수 있으며, 이는 각각 주어진 표적(예컨대, 표 1 및 표 3 참조)에 대하여 특이적인 항체 또는 그의 단편 또는 유도체(하기 참조)를 암호화하는 핵산 분자를 지닌다. 각각에 대하여 핵산은 주어진 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화해야 하며, 적어도 2개, 바람직하게는 그 이상의 상이한 교배형의 숙주 세포가 이용가능해야 한다. 이중특이적 항체 작제물이 구축되어야 하는 경우에, 2개의 숙주 세포는 상기 작제물에 필요한 2개의 항체 또는 그의 단편 또는 유도체에 대한 핵산 분자를 운반하는 라이브러리로부터 선택될 수 있다. 상기 숙주 세포는 그들을 컨주게이트시키기 위한 상이한 교배형으로부터의 것이어야 한다.

[0114] 본 발명에 따른 시스템 또는 본 발명에 따른 섬모류 숙주 세포의 바람직한 실시형태에서, 상기 섬모류는 테트라하이메나대(*Tetrahymenidae*)과의 구성원이다.

[0115] 특히 바람직한 실시형태에서, 상기 트랜스제닉 섬모류는 테트라하이메나 종(특히, 테트라하이메나 써모필라)이다. 테트라하이메나는 비병원성 단세포 진핵 미생물이며, 이는 소수의 실험실에서 발현 숙주로서 확립되어 있다. 이는 이것을 이중 단백질 발현에 적절하게 하는 많은 이점을 특징으로 한다. 테트라하이메나는 광범위하게 시험된 모델 유기체이며, 50년이 넘는 기초 연구에서, 바이러스 또는 내부기생생물(endoparasite)이 관찰되지 않았다. 지시 세포주를 사용한 시험에 의해, 더 고등의 동물을 감염시킬 수 있는 바이러스 또는 마이코플라즈마(mycoplasma)와 같은 내인성 감염체가 나타나지 않았다.

[0116] 먼저, 섬모류에서의 코돈 사용과 관련된 것과 같은 상기의 고려사항도 또한 테트라하이메나에 적용한다. 또한, 미니염색체 rDNA로부터의 복제 원점(ori)을 함유하는 카피수가 높은 플라스미드가 테트라하이메나에 대하여 이용가능하다. 이러한 미니염색체 rDNA는 세포당 9,000 카피 이하로 존재한다. 그를 초과하면, 대핵 DNA 내로의 안정적인 통합이 발생할 수 있으며, 여기서, 모든 유전자는 45배 카피수로 존재한다. 높은 유전자 용량은 효과적인 단백질 생합성 및 이에 따른 높은 생산성을 위한 이상적인 전체 조건이다. 박테리아와 대조적으로, 테트라하이메나 속의 섬모류는 매우 효과적으로 상층액에 단백질을 생물학적으로 분비한다.

[0117] 테트라하이메나는 이황화 가교, GPI 앵커(anchor), 인산화, 아세틸화 및 글라이코실화와 같은 번역후 변형을 단백질에 가할 수 있으며, 이는 효모 또는 다른 진핵세포 발현 시스템에서 검출되는 것보다 포유류 세포에서의 것과 더 유사한 것이다.

[0118] 포유류 세포와 달리, 테트라하이메나는 성장의 용이성과 짧은 생성 시간(1.5 내지 3시간) 및 비용 감소를 결합시키는데, 이는 화학적으로 규명된 배지를 사용할 수 있고, 펩타이드 또는 성장 인자와 같은 혈청 성분에 대한 필요성이 존재하지 않기 때문이다.

[0119] 2×10^7 개 이하의 세포/ml의 세포 밀도 및 80g/l 이하의 건조 중량을 사용한 테트라하이메나의 배치식(batch), 유가식 및 연속식 발효가 확립되었고, 최대 1000 l의 생산 확대(업스케일링)는 어떠한 문제도 없이 보여줄 수 있었다. 리포터 단백질을 사용한 실행가능성 연구에서, 1일에 50 내지 90pg/세포의 시공간 수율은 이미 달성될 수 있었다. 동종의 발현을 갖는 첫번째 실험에 의해, 분비된 단백질에 대하여 1일에 200mg/l를 초과하는 수율이 야기되었다. 테트라하이메나는 미생물 발현 시스템(박테리아 또는 효모)을 위한 종래의 생산 시설에서 발효될 수 있다. 이는 기존의 생산 공장 또는 새로운 생산 시설의 건물에서 비용이 드는 개조가 필요하지 않음을 의미한다.

[0120] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체가 제공되며, 상기 항체 또는 단편은 본 발명에 따른 시스템, 본 발명에 따른 섬모류 숙주 세포 및/또는 본 발명에 따른 방법으로 생성된다.

[0121] 바람직하게는, 본 발명에 따른 모노클로날 항체, 또는 그의 단편 또는 유도체는 표 1(ADCC) 또는 3(비-ADCC)에 기재된 표적 중 하나 이상에 결합한다.

[0122] ADCC에 포함되지 않는 표적은 하기의 표에 열거되어 있으며, 이는 오직 예시적인 것이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

표 3

표적	징후	항체 예
TNF- α	류마티스 관절염, 건선, 베크테로병(Morbus Bechterew), 크론병(Morbus Crohn)	아달리무마브, 골리무마브, 인플릭시마브
CD25	신장 이식 후 조직 거부 예방	바실릭시마브, 다클리주마브
CD3	장기 이식 후 조직 거부 치료	무로모나브-CD3 (뮤린)
CD49d (α_4 -인테그린)	다발성 경화증	나탈리주마브
인터류킨 6 수용체	류마티스 관절염	토실리주마브
인터류킨 12/23	관상형 건선	유스테키누마브
RSV 표면 항원	신생아의 RSV 예방	모타비주마브, 팔리비주마브
VEGF-A	습성황반변성	루켄티스
CD11a-항원	건선	에팔리주마브
면역글로불린 E	기관지 천식	오말리주마브

[0123]

[0124]

다시 말하면, 숙련자는 상기 언급된 항체의 제조 프로토콜 및 아미노산 서열에 완전하게 접근할 수 있으며, 이에 따라, 예를 들어, 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여 발명의 교시를 상기 항체에 적용할 수 있을 것을 이해하는 것이 중요하다.

[0125]

또한, 본 발명에 따른 모노클로날 항체, 단편 또는 유도체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0126]

? 뮤린, 키메라, 인간화 및/또는 인간 mAb,

[0127]

? IgG, scFv, Fab 및/또는 F(ab)2,

[0128]

? 변형된 항체 포맷.

[0129]

키메라, 인간화 및/또는 인간 mAb의 생성 및/또는 선택 방법은 해당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 제네테크의 미국 특허 제US6331415호에서는 키메라 항체의 생성이 기재되어 있는 한편, 의학 연구 위원회(Medical Research Council)의 미국 특허 제US6548640호에서는 CDR 이식 기술이 기재되어 있고, 셀테크(Celltech)의 미국 특허 제US5859205호에는 인간화된 항체의 생성이 기재되어 있다. 시험관 내 항체 라이브러리는 다른 것 중 특허, 모르포시스(MorphoSys)의 미국 특허 제US6300064호 및 MRC/스크립스(Scripps)/스트라타진(Stratagene)의 미국 특허 제US6248516호에 개시되어 있다. 파지 디스플레이 기술은 예를 들어, 다이악스(Dyax)의 미국 특허 제US5223409호에 개시되어 있다. 예를 들어, 트랜스제닉 포유류 플랫폼은 타코닉아르테미스(TaconicArtemis)의 미국 특허 출원 제US200302048621호에 기재되어 있다.

[0130]

IgG, scFv, Fab 및/또는 F(ab)2는 숙련자에게 널리 알려져 있는 항체 포맷이다. 관련된 가능한 기술은 각각의 교과서로부터 입수할 수 있다.

[0131]

본 명세서에서 사용되는 용어 "Fab"는 항원 결합 영역을 포함하는 IgG 단편에 관한 것이며, 상기 단편은 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄로부터의 하나의 불변 도메인 및 하나의 가변 도메인으로 구성된다.

[0132]

본 명세서에서 사용되는 용어 "F(ab)2"는 이황화 결합에 의해 서로 연결되는 2개의 Fab 단편으로 이루어진 IgG 단편에 관한 것이다.

[0133] 본 명세서에서 사용되는 용어 "scFv"는 통상 세린(S) 또는 글라이신(G)인 짧은 링커로 함께 연결된 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 융합인 단쇄 가변 단편에 관한 것이다. 이러한 키메라 분자는 불변 영역의 제거 및 링커 펩타이드의 도입에도 불구하고, 원래 면역글로불린의 특이성을 유지한다.

[0134] 변경된 항체 포맷은 예를 들어, 표 2에 제공된 바와 같은 이중특이적 또는 삼중특이적 항체 작제물, 항체-기반의 융합 단백질, 항체-약물 컨쥬게이트, 면역독소 등이다. 이들 포맷의 일부는 하기 표에 열거되어 있으며, 이는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

표 4

회사	형식
아피드(Affimed)	scFv - 디아바디 - scFv
유니레버(Unilever)	카멜리드(camelid) 항체
아블린엑스(Ablynx)	카멜리드 VHH
도만티스(Domantis)	중쇄(V _H) 또는 경쇄(V _L)의 가변 영역
스캔셀(Scancell)	변경되지 않은 FC 도메인을 갖는 IgG 구조 상의 종양 에피토프
하이브리테크(Hybritech)	3 작용성 항체
트리온 파마(Trion Pharma)	3 작용성 IgG
아피테크(Affitech)	불변 도메인의 B-가닥과 항원 제시 세포에 대하여 특이적인 새로운 V-영역 사이에 T-세포 에피토프를 갖는 항체
아피테크	항원과 항체 이펙터 분자를 가교결합시킬 수 있는 항체 단편
백시바디(Vaccibody) AS	2 가 동종이량체, 각 쇄는 항원 제시 세포에 대하여 특이적인 scFv 표적화 유닛으로 이루어짐
플래닛 바이오테크놀로지(Planet Biotechnology)	IgA(J 쇄에 의해 연결된 2 개의 IgG 구조 및 분비 성분), 식물 숙주에서 발현, 분비 성분이 보호 단백질로 대체됨
트루비온(Trubion)	중쇄(V _H) 및 경쇄(V _L)의 가변 영역 + Fc
햅토젠(Haptogen)	경쇄가 결합된 면역화 된 얼룩상어에서 관찰되는 동종이량체 중쇄 복합체
아드알타(AdAlta)	재조합 상어 항체 도메인 라이브러리
젠코르(Xencor)	Fc 감마 수용체에 대한 친화성을 증가시켜, ADCC를 증가시키도록 변경된 Fc 영역
아라나(Arana)	신세계(new world) 영장류 프레임워크 + 비-신세계 영장류 CDR
시티 오브 호프(City of Hope)	"미니바디(minibody)"
씨애틀 제네틱스(Seattle Genetics)	효소-절단가능한 링커를 사용한 항체-약물 컨쥬게이트 기술

[0135]

[0136] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 모노클로날 항체, 단편 또는 유도체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 갖는다:

[0137] ? 증가된 ADCC, CDC 및/또는 항체-의존성 세포자멸사,

- [0138] ? 연장된 혈청 반감기, 및/또는
- [0139] ? 이중특이성, 삼중특이성 또는 다중특이성.
- [0140] 본 명세서에서 사용되는 용어 "증가된 ADCC", "증가된 CDC", "증가된 항체-의존성 세포자멸사", "증가된 항체-의존성 옹소닌화" 및 "연장된 혈청 반감기"는 종래의 항체 발현 시스템으로 생성된 항체, 예컨대 상업적으로 입수할 수 있는 분석으로 측정할 수 있는 포유류 세포 또는 이.콜라이 ADCC, CDC, 항체-의존성 세포자멸사 및 혈청 반감기와의 비교에 관한 것이다.
- [0141] 용어 "이중특이성", "삼중특이성" 또는 "다중특이성"은 바람직하게는 2개 이상의 상이한 표적의 2개 이상의 상이한 에피토프에 대한 친화성을 나타내는 2개 이상의 도메인을 갖는 항체, 그의 단편 또는 유도체를 지칭한다. 이러한 항체, 단편 또는 유도체에 대한 몇몇 예는 표 2 및 도 4에 제공되어 있다.
- [0142] 이러한 항체, 그의 단편 또는 유도체의 목적은 다시 말해, 이중특이적 또는 그 이상 특이적인 항체 작제물을 사용함으로써, 둘 이상의 상이한 엔티티를 가까이 접촉되게 하는 것이다. 이는 예를 들어 종양 세포가 예를 들어, 그들의 MHC 클래스 I 엔티티의 돌연변이 또는 소실에 의하여, 또는 T 세포 활성화를 억제하는 메신저 물질을 분비함에 의하여, T 세포 공격으로부터 벗어날 수 있는 경우에, 종양 세포에 대하여 T 세포를 재지향시키는데 유용하다. 하나의 방법은 2개의 scFv 항체를 조합하는 것인데, 이 중 하나는 T-세포-수용체(예컨대, CD3)에 대하여 지향되는 한편, 다른 하나는 종양 세포 항원(예컨대, EGFR)에 대하여 지향된다.
- [0143] 다른 방법은 둘 모두의 Fv쇄 내의 2개의 상이한 상보성 결정 영역의 수단에 의하여, 그리고 Fc-영역에 의하여, 종양 세포(예컨대, EGFR에 대한 Fv 결합의 수단에 의하여), T-세포(예컨대, CD3과 같은 T-세포 수용체에 대한 다른 Fv 결합의 수단에 의하여) 및 이펙터 세포, 예컨대, 단핵구, 대식구 또는 자연 살해 세포(이러한 이펙터 세포 상의 Fc 감마 수용체에 의해 검출되는 Fc 영역의 수단에 의하여)를 연결하는 것이다. 이러한 방법은 종양 세포 용해 및 세포자멸사를 유도하는 T 살해 세포의 항종양 효과 및 식세포작용 또는 세포자멸사에 의해 종양 세포를 제거하는 이펙터 세포의 항종양 효과를 함께 결합시키는 한편, 이들은 T 세포 활성을 추가로 자극하는 사이토카인을 분비한다.
- [0144] 하기의 표는 이중특이적 항체(첫번째 및 두번째 열) 및 삼중특이적 항체(모든 3개의 열)에서의 몇몇 예시적인 표적의 개관을 제공하나, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 다른 적절한 표적 에피토프는 표 1에 기재되어 있다.

표 6

이펙터 세포 에피토프	표적 세포 에피토프	T 세포 활성화 에피토프
Fc γ RI	EGFR	CD3
Fc γ RIIa	EpCAM	CD64
Fc γ RIII	CD20	CD16
Fc γ RIII	CEA	CD89
Fc γ RIII	CD19	CD89

- [0145]
- [0146] 유력한 포맷을 포함하는 이중특이적 항체뿐 아니라 표적의 몇몇 특징이 문헌[Kufer et. al (2004)]에 기재되어 있는 한편, 유력한 포맷을 포함하는 삼중특이적 항체뿐 아니라 표적의 특징은 예를 들어, 문헌[Ruf and Lindhofer (2001)]에 기재되어 있다.
- [0147] 또한, 섬모류 숙주 세포에서의 하나 이상의 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성 방법이 제공되며, 상기 방법은
- [0148] a) 하나 이상의 섬모류 숙주 세포를 상기 모노클로날 항체, 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자 또는 바람직하게는 본 발명에 따른 하나 이상의 벡터로 트랜스펙션시키는 단계, 및
- [0149] b) 숙주 세포를 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는 단계를 포함한다.

- [0150] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에서, 섬모류 숙주 세포에서의 하나 이상의 모노클로날 항체(mAb) 또는 그의 단편 또는 유도체의 생성 방법이 제공되며, 상기 방법은
- [0151] c) 2개 이상의 상이한 섬모류 숙주 세포를 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자 또는 바람직하게는 본 발명에 따른 하나 이상의 벡터로 트랜스펙션시키는 단계,
- [0152] d) 상기 2개의 섬모류 숙주 세포 또는 그의 소산물(offspring)을 컨주게이트시켜, 2개 이상의 상이한 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 암호화하는 2개 이상의 상이한 핵산 분자를 지니는 하나 이상의 섬모류 세포를 수득하는 단계, 및
- [0153] e) 이에 따라 생성되는 섬모류 세포를 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 배양하는 단계를 포함한다.
- [0154] 또한, 약제학적 조성물의 제조 방법이 제공되며, 상기 방법은
- [0155] a) 본 발명에 따른 섬모류 발현 시스템에서 본 발명에 따른 항체 또는 그의 단편 또는 유도체 단백질을 발현시키는 단계, 및
- [0156] b) 이에 따라 수득되는 단백질을 분리하고/거나 정제하는 단계를 포함한다.
- [0157] 또한, 약제학적 조성물이 제공되며, 상기 조성물은 본 발명에 따른 및/또는 본 발명에 따른 방법으로 생성된 항체 또는 그의 단편 또는 유도체를 포함한다.
- [0158] **면책 조항(disclaimer)**
- [0159] 상세한 설명을 지나치게 길게함이 없이 포괄적인 개시내용을 제공하기 위하여, 출원인은 상술된 각각의 특허 및 특허 출원을 본 명세서에 참고로 포함시켰다.
- [0160] 상기 상세한 실시형태의 요소 및 특징의 특정한 조합은 단지 예시적인 것이며; 본 명세서의 이러한 교시를 참고로 포함된 특허/출원서에서의 다른 교시로 교환하고 대체하는 것 또한 명백하게 예상된다. 당업자라면 청구된 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않고도 본 명세서에 기술된 것의 변이, 변형 및 다른 구현예가 발생할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 전술된 설명은 단지 예시일 뿐이며, 제한을 의도한 것이 아니다. 발명의 범주는 하기의 특허청구범위 및 이의 등가물에 의해 정의된다. 또한, 설명과 특허청구범위에 사용되는 참조 부호는 청구된 발명의 범주를 제한하는 것이 아니다.
- [0161] **실시에 및 도면의 간단한 설명**
- [0162] 본 발명의 대상의 추가의 상세사항, 특징, 특성 및 이점은 특허청구범위 및 하기의 각각의 도면 및 실시예의 설명에 개시되어 있으며, 이는 예시적 방식으로 본 발명의 바람직한 실시형태를 보여준다. 그러나, 이들 도면은 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0163] **실시예**
- [0164] **1. 발현 벡터의 작제**
- [0165] 항체 Gk1.5의 중쇄 및 경쇄에 대한 합성 유전자(서열 번호 1 및 2 참조)를 공여체 벡터 내로 클로닝하였다. 모든 공여체 벡터로부터의 발현 카세트를 Cre 의존성 재조합효소 시스템을 사용하여 수여체 벡터 내로 전달하였다(도 5 참조).
- [0166] **2. 야생형 테트라하이메나의 배양 및 발현 플라스미드의 형질전환**
- [0167] 야생형 테트라하이메나 써모필라 스트레인(예컨대, B 1868/4, B 1868/7 및 B 2068/1)을 탈지유 배지에서, SPP에서, 또는 화학적으로 규명된 배지에서 배양하였다. 테트라하이메나 써모필라 세포의 형질전환을 문헌[Cassidy-Hanley et al. 1997]에 이전에 기재되어 있는 바와 같이 수행하였다.
- [0168] **3. 항체 Gk1.5의 검출**
- [0169] 형질전환된 테트라하이메나 세포를 80rpm의 웨이커에서 30℃에서, 선택 압력 하에 SPP 배지 중에서 배양하였다. 표적 유전자 발현을 대수적으로 성장하는 배양물의 41℃에서의 열 쇼크(HSP-P)에 의해, 또는 20nM Cd²⁺(MTT1-P)의 첨가에 의해 유도하였다.
- [0170] 배양물의 분취물을 표적 유전자 발현을 유도한지 24시간 후에 수집하였다. 이후에, 세포 및 세포가 없는 상층액을 각각 얻었다. 세포를 얼음처럼 차가운 RIPA-완충액(5000개 세포/ μ l(150mM NaCl, 10mM TrisHCl, 5mM EDTA,

0.1% SDS, 0.1% DOC, 1% 트리톤 X100, 2.5 μ g/ml E64, pH 7.4))에 용해시키고, 초음파분해기에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 종래 기술에 따라 행하였다. 약술하면, 파괴된 세포(즉, 10000개 세포) 또는 세포가 없는 상층액 중 어느 하나의 분취물을 라엠리(Laemmli) 샘플 완충액(125mM Tris HCl pH 6.8, 10% 글라이세롤, 4% SDS)에 첨가하고, 8-16% SDS-PAGE를 사용하여 분리하였다. 단백질을 니트로셀룰로스 멤브레인으로 옮기고, 0.05% 트윈(Tween) 20 및 5% 소 혈청 알부민을 함유하는 PBS(PBS/TBSA) 중에서 블로킹하였다. 형질전환된 세포에서의 항체의 재조합 중쇄 및 경쇄의 발현은 Hrp 컨쥬게이트된 항-랫트(rat)-전체 IgG-항체로 검출하였다. 세정 후에, 블롯(blots)을 통상적인 X-선 필름 현상과 병용하여 슈퍼 시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate)(퍼바이오(Perbio), 피셔 사이언티픽(Fischer Scientific))을 사용하여 화학발광에 의해 현상하였다. 도 8은 표적 유전자 발현의 유도 후의 상이한 시점에, 형질전환된 세포의 세포 용해물 및 상층액의 웨스턴 블롯을 보여준다.

4. 항체 Gk1.5의 생성

발효를 위하여, 표준 해양 임펠러(marine impeller)가 장착된 식스포스 다중발효기(Sixforce multifermenter)(0.5 l)를 사용하였다. 각각, 교반기 속도를 900rpm으로 제한하고; pO₂를 25%로 설정하였으며, pH를 7.0으로 설정하였다. 발효를 표준 배지에서 수행하였다.

도면

도 1은 면역글로불린 G(IgG)의 개략적 표현을 보여준다. IgG는 2개의 동일한 경쇄(각각 2개의 도메인, V_L 및 V_H로 구성됨) 및 2개의 동일한 중쇄(각각 4개의 도메인, V_H, C_H1, C_H2 및 C_H3으로 구성됨)로 구성된다. 항원 결합 표면은 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인에 의해 형성되며, 이펙터 기능, 예컨대 보체 활성화 및 세포독성 세포의 결합은 항체의 V_c 영역에 의해 매개된다.

도 2는 상이한 분류군의 N-글라이칸 구조의 개관을 보여준다. 일반적으로, 용어 "N-글라이코실화"는 아미노산 잔기 아스파라긴(N)의 글라이코실화를 지칭한다. 본 명세서에서, 올리고당 쉼은 올리고당 전이효소(oligosaccharyltransferase)에 의해 트라이펩타이드 서열 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr(여기서, X는 Pro를 제외한 임의의 아미노산일 수 있다)에서 나타나는 아스파라긴 잔기에 부착된다. 원핵세포가 N-글라이코실화를 전혀 갖지 않는 한편, 섬모류는 푸코스 측쇄가 제거되고, 또한 베타-갈락토스 잔기에 의해 지지되는 말단 시알산 잔기(n-아세틸-뉴라민산)가 결합된 N-글라이칸 구조를 특징으로 하는 것이 명백하다. 도 2B는 몇몇 섬모류 종에서의 상기 패턴의 가능한 변이를 보여준다.

도 3은 IgG 및 그의 단편 및 유도체의 개략적 표현을 보여준다. 도 3A는 전체 IgG 항체를 나타낸다. 도 3B에는 F(ab)₂를 나타내고, 도 3C에는 Fab 단편을 나타내었다(Fc-단편의 제거). 유전적으로 엔지니어링된 류신 지퍼(zipper)의 포함에 의해 이량체 회합이 가능하게 된다. 재조합 기술을 사용하여, 더 작은 항체 단편의 생성이 가능하다. 단쇄 가변 단편(scFv, 도 3E)은 가요성 합성 링커 서열에 의해 연결되는 V_L 및 V_H 도메인을 조합한다. 링커 서열의 단축은 다이아바디(도 3F) 및 트리아바디(triobody)(도 3G) 또는 심지어는 테트라바디(tetradbody)(미도시)의 형성을 야기한다. scFv-단편을 C_H3 도메인과 같은 항체의 불변 도메인을 포함하도록 추가로 변형시켜, 미니바디의 발생을 야기하였다(도 3D).

도 4는 2가 및 3가 특이성을 생성하기 위한 항체 및 항체 단편의 가능한 조합의 개략적 표현을 보여준다. 안정적으로 트랜스펙션된 테트라하이메나 세포의 짝지움에 의한 2개의 상이한 항체(예컨대, 항체 A 및 B)의 조합에 의해, 도 4A에 나타난 가능한 상이한 이중특이적 항체가 야기되었다. 도 4B에는 상이한 이중특이적 및 삼중특이적 F(ab)₂ 및 다이아바디 및 미니바디를 야기하는 항체 단편의 가능한 조합을 나타내었다. 도 4C에는 가능한 상이한 삼중특이적 및 다중특이적 항체 및 항체 단편을 야기하는 안정적으로 트랜스펙션된 테트라하이메나 세포의 짝지움에 의한 항체(예컨대, 항체 C) 또는 항체 단편과 이중특이적 항체 또는 항체 단편의 가능한 조합을 나타내었다.

도 5A는 하나의 플라스미드 방법을 나타내는 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 섬모류 테트라하이메나 세포에서 사용하기 위한 발현 플라스미드를 보여준다. 플라스미드는 이. 콜라이에서의 선택을 위한 앰피실린(AmpR) 및 클로람페니콜(CmR) 내성 유전자, 테트라하이메나 세포에서의 플라스미드 안정성을 위한 테트라하이메나 세포 특이적 복제원점(rDNA ori), 형질전환된 섬모류의 확인을 위한 네오마이신 기반의 선택 카세트(Neo R) 및 유도가능한 프로모터의 제어 하의 표적 유전자의 2개의 전사해독틀(open reading frame)(중쇄 및 경쇄)에 이어서, 테트라하이메나 세포의 [베타]-튜불린 2 터미네이터 서열(BTU2)을 함유한다.

- [0179] 도 5B 및 도 5C에서, 2개의 플라스미드 방법을 나타내는 섬모류 테트라하이메나 씨모필라에서 사용하기 위한 발현 플라스미드를 나타내었다. 도 5B에서, 플라스미드는 이중 유전자의 지시된 통합을 위한 테트라하이메나 씨모필라 DHFR의 5' 및 3' 플랭킹(flanking) 영역, 이. 콜라이에서의 선택을 위한 앰피실린(AmpR) 및 클로람페니콜(CmR) 내성 유전자 및 형질전환된 섬모류의 확인을 위한 블라스티시딘 S 선택 카세트(BsdR) 및 유도가능한 프로모터의 제어 하의 목적하는 항체의 중쇄 또는 경쇄 중 어느 하나의 전사해독틀에 이어서, 테트라하이메나 씨모필라의 [베타]-튜불린 2 터미네이터 서열(BTU2)을 함유한다. 도 5C에서, 항체의 상응하는 중쇄 또는 경쇄를 암호화하며, 도 5A에 열거된 것과 동일한 특징을 갖는 발현 플라스미드를 나타내었다.
- [0180] 도 6은 테트라하이메나 컨주게이션에서의 상이한 단계의 개관을 보여준다. 컨주게이션 과정은 하나의 유전자좌에서 교대하는 대립형질에 대해 동형접합성인 세포의 짝지음과 함께 시작된다. MIC(작은 원)는 MAC(큰 원)에 내포되나, 물리적으로 분리되어 있다. MIC는 감수분열을 겪으며, 4개의 반수체 핵을 생성하며, 이중 오직 하나만이 작용성으로 유지되며(선행의 감수분열 생성물), 다른 3개는 봉쇄된다. 이러한 단계에서, 감수분열 교차가 발생하며, 이동상 전핵의 상호간의 교환으로 이어지고, 이는 수여체 세포의 정지상 전핵과 융합되어, 접합자 핵을 형성한다. 접합자 핵은 2개의 유사분열을 겪으며, 이는 4개의 상이한 유전적으로 동일한 이배체 핵을 야기한다. 이 단계에, 오래된 MAC가 분해된다. 이어서, 선행의 생성물은 새로운 MAC로 분화되며, 후행의 생성물은 이배체 MIC로 남아있다. 세포는 분리되고(이제 접합완료체로 지칭됨), 처음의 접합후 세포 분열을 겪어, 4개의 캐리오니드(karyonide) 세포를 형성한다. 각각의 캐리오니드에는 독립적으로 분화된 새로운 MAC 및 작용성 MIC의 유사분열 카피가 제공된다. 이어서, 캐리오니드는 이분법에 의하여 영양 증식을 시작한다.
- [0181] 도 7은 하나의 에피솜 및 하나의 통합 발현 플라스미드를 사용한 테트라하이메나 세포의 형질전환의 개관을 보여준다. 이러한 2개의 플라스미드 방법은 전체 IgG를 생성하며 티미딘 영양요구성을 나타내는 안정적으로 트랜스펙션된 테트라하이메나 세포를 야기한다.
- [0182] 도 8은 테트라하이메나 씨모필라 세포에서 발현되는 항-CD4 항체 Gk1.5 및 그의 단편의 대표적인 면역블롯을 보여주는 것이다. 도 8A에서, 안정적으로 형질전환된 세포의 세포 펠렛에서 그리고 그의 상층액에서의 Gk1.5 및 그의 단편의 발현을 재조합 단백질 발현(p.i.)의 유도 후 상이한 시간에 나타내었으며, 이는 다중발효기(0.5ℓ 실험실 규모)에서 배양하였다. 이바이오사이언스(eBioscience)로부터의 항-CD4 항체 클론 Gk1.5를 양성 대조군으로 삼았다. Hrp-컨주게이트된 항-팻트-IgG를 사용하여 염색을 행하였다. 도 8B에서, 단백질 G 컬럼을 사용하여, 생성된 상층액의 정제 후의 테트라하이메나 발현된 항체 Gk1.5 및 그의 단편의 대표적인 면역블롯을 나타내었다.
- [0183] 도 9는 테트라하이메나 씨모필라 및 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)에서의 코돈 사용의 비교를 보여준다. 호모 사피엔스는 모노클로날 항체 또는 그의 단편 또는 유도체에 대하여 적용가능하며, 이는 포유류 세포주에서 발현된다. 추가의 설명에 대해서는 문서를 참조한다.
- [0184] 도 10은 섬모류에서, 특히 테트라하이메나에서 사용되는 바와 같은 유전자 코드를 보여준다. 글루타민을 암호화하는 비-정규 뉴클레오티드 코드 UAA 및 UAG를 굵은 체로 인쇄하였다. 그러나, 일반적 유전자 코드에 따르면, 이들 트리플렛은 정지 코돈(선으로 지운 트리플렛을 참조)이다. "1LC"는 "1 문자 코드"를 나타내는 반면, "3LC"는 "3 문자 코드"를 나타낸다.

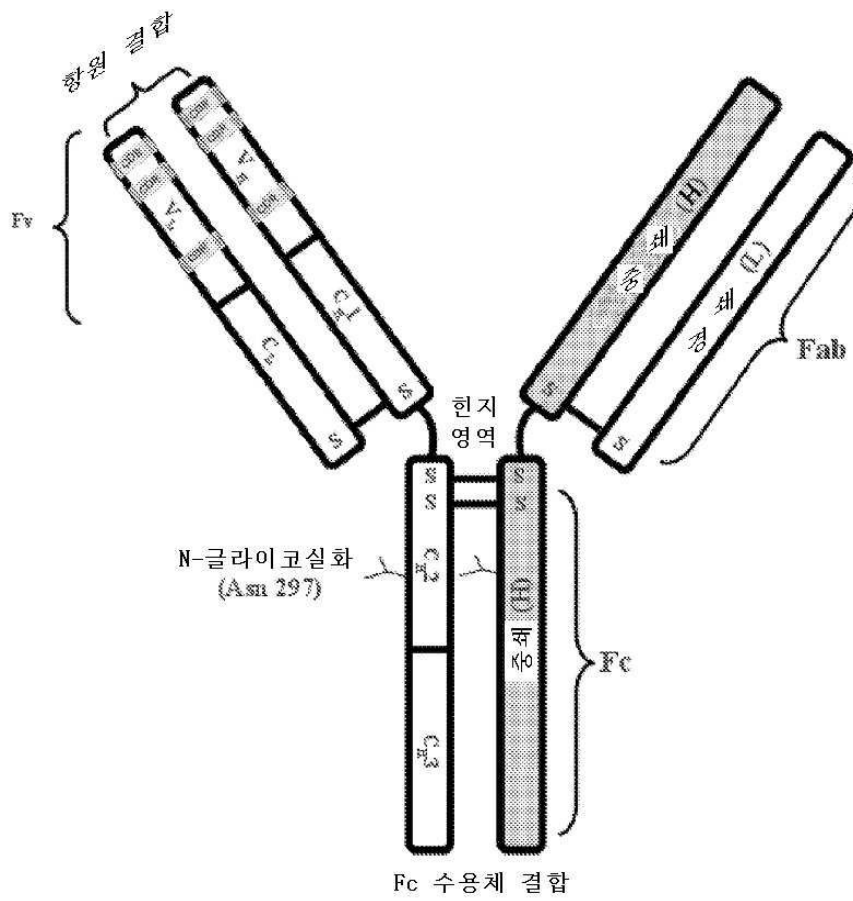
[0185] 참고문헌

- Tondravi,MM; Yao,M-C (1986): Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of ribosomal RNA genes. PNAS 83, 4369-4373.
- Gaertig,J; Gorovsky,MA (1992): Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. PNAS 89, 9196-9200.
- Cassidy-Hanley,D; Bowen,J; Lee,JH; Cole,E; VerPlank,LA; Gaertig,J; Gorovsky,MA;
- Bruns,PJ (1997): Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. Genetics 146, 135-147.
- Kufer,P; Lutterbüse,R; Bacuerle,PA (2004): A revival of bispecific antibodies. Trends in Biotechnology, Volume 22, Issue 5, 238-244, 1 May 2004
- Ruf,P; Lindhofer,H (2001): Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific Antibody. Blood, 15 October 2001, Vol. 98, No. 8, pp. 2526-2534
- Shields,RL et al, (2002): Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc_{RIII} and Antibody-dependent Cellular Toxicity. J Biol Chem Vol. 277, No. 30, pp. 26733-26740
- Wei,Y et al, (2008) Glyco-engineering of human IgG1-Fc through combined yeast expression and in vitro chemoenzymatic glycosylation. Biochemistry 30; 47(39): 10294
- Gerngross (2004): Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nature Biotechnology 22 (11), 1409
- Weide, T.; Bockau, U.; Rave, A.; Herrmann, L. & Hartmann, M. W. W.: A recombinase system facilitates cloning of expression cassettes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. BMC Microbiol, Vol. 7, pp. 12, 2007
- Weide, T.; Herrmann, L.; Bockau, U.; Niebur, N.; Aldag, I.; Laroy, W.; Contreras, R.; Tiedtke, A. & Hartmann, M. W. W.: Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. BMC Biotechnol, Vol. 6, pp. 19, 2006
- Banno, Y., Yano, K. & Nozawa, Y.: Purification and characterization of a secreted protease from *Tetrahymena pyriformis*. Eur J Biochem, Vol. 132(3), pp. 563-8, 1983

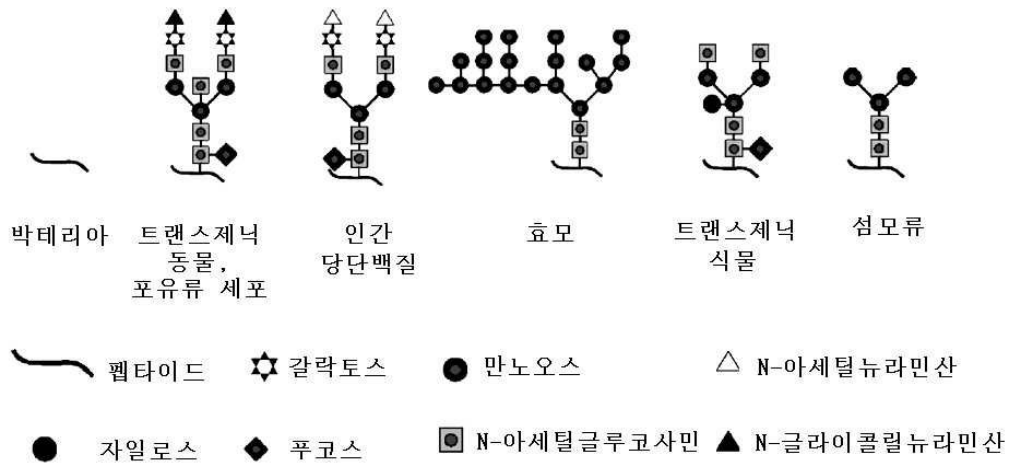
[0187]

도면

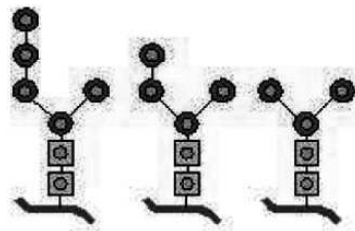
도면1



도면2

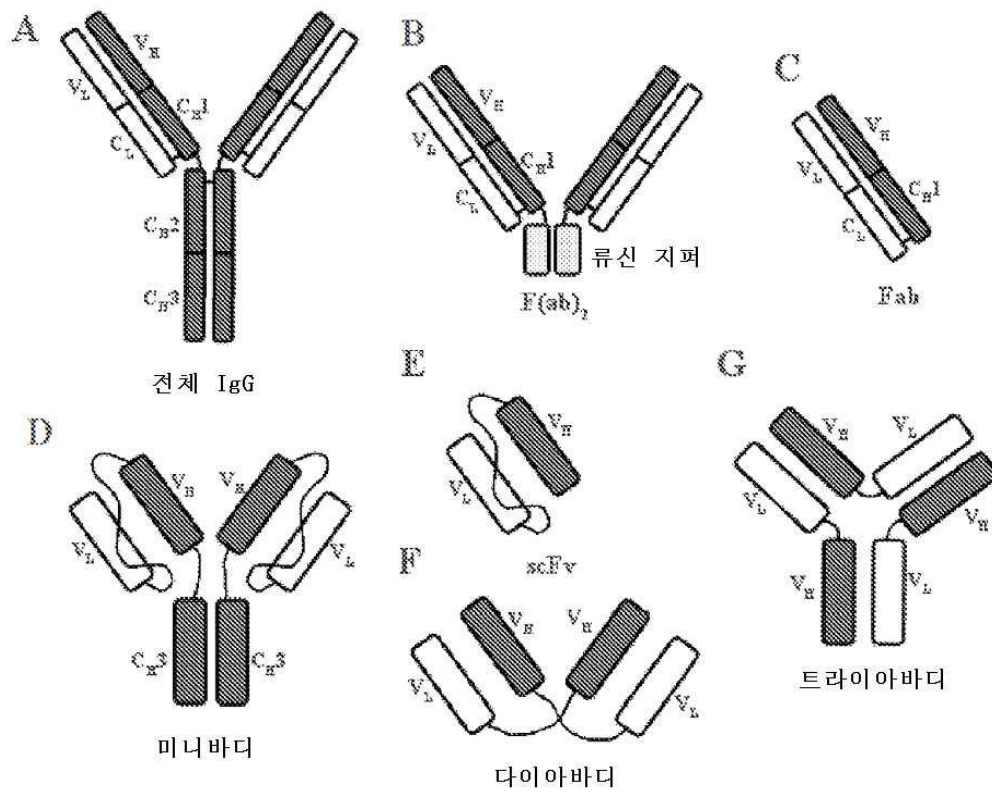


A

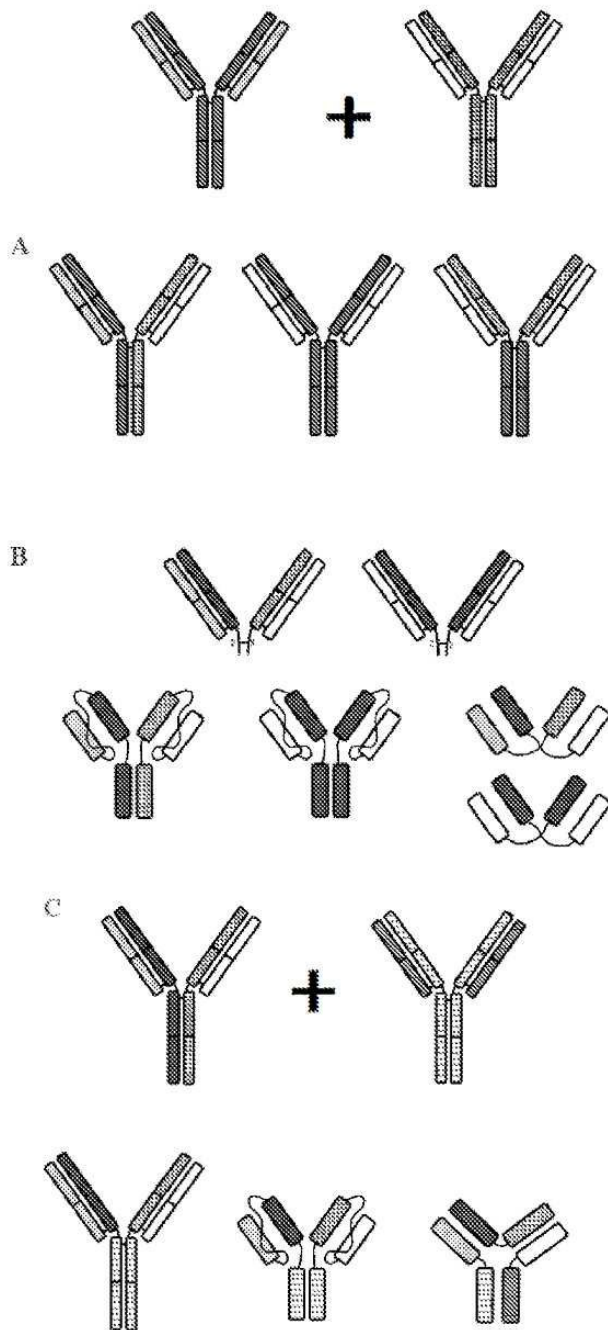


B

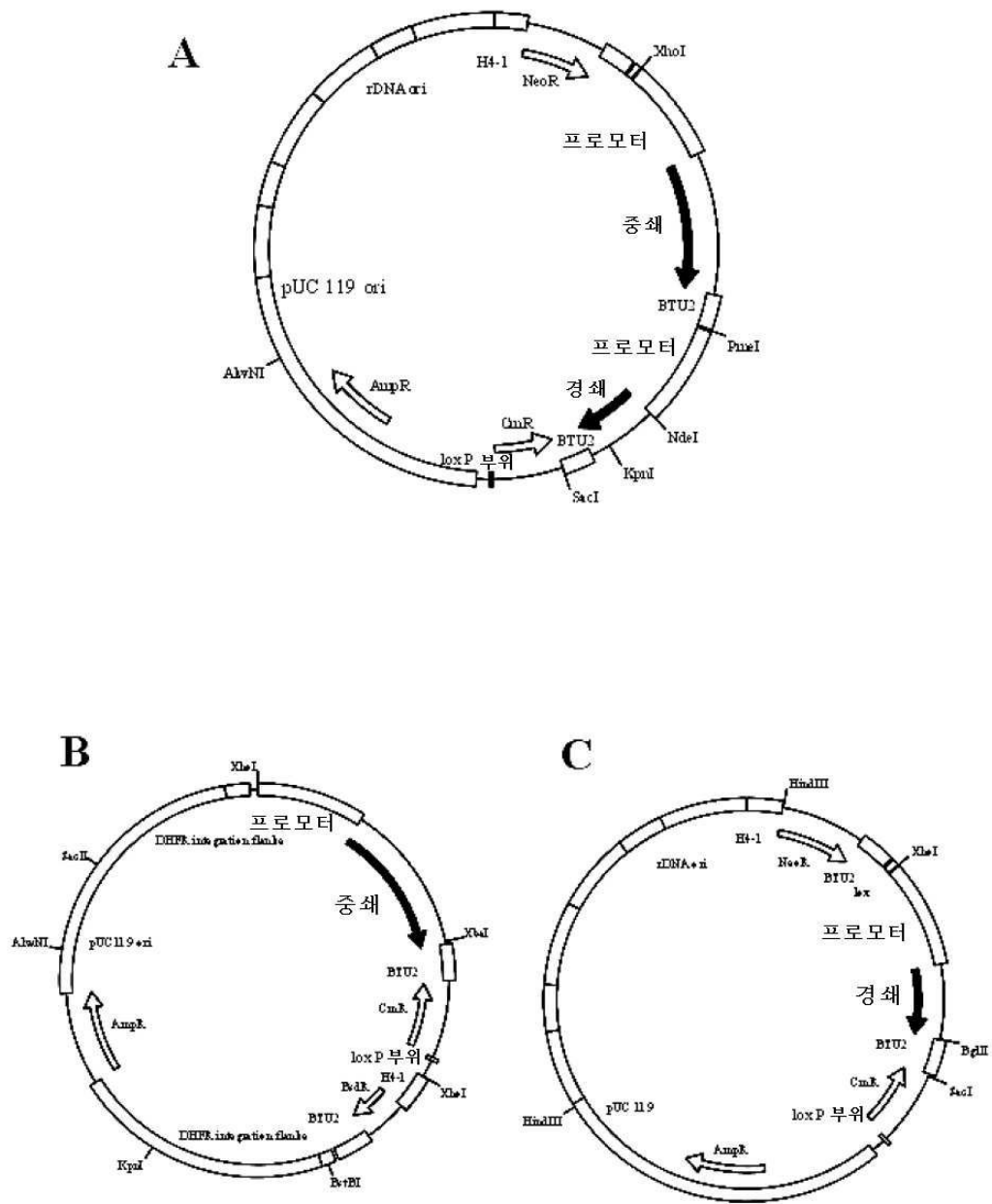
도면3



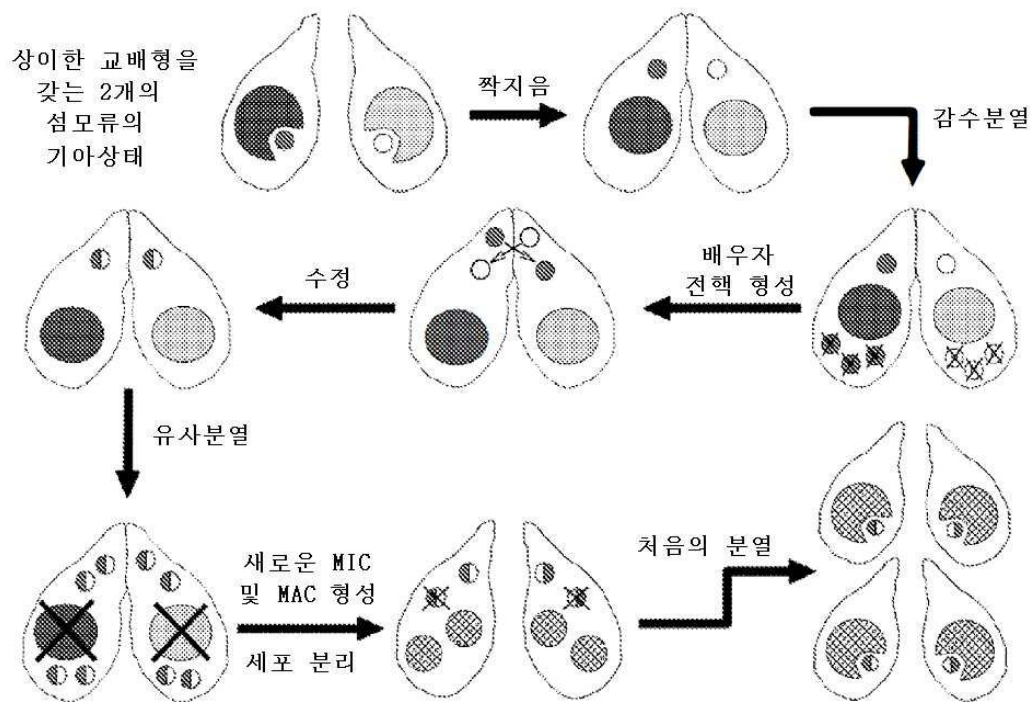
도면4



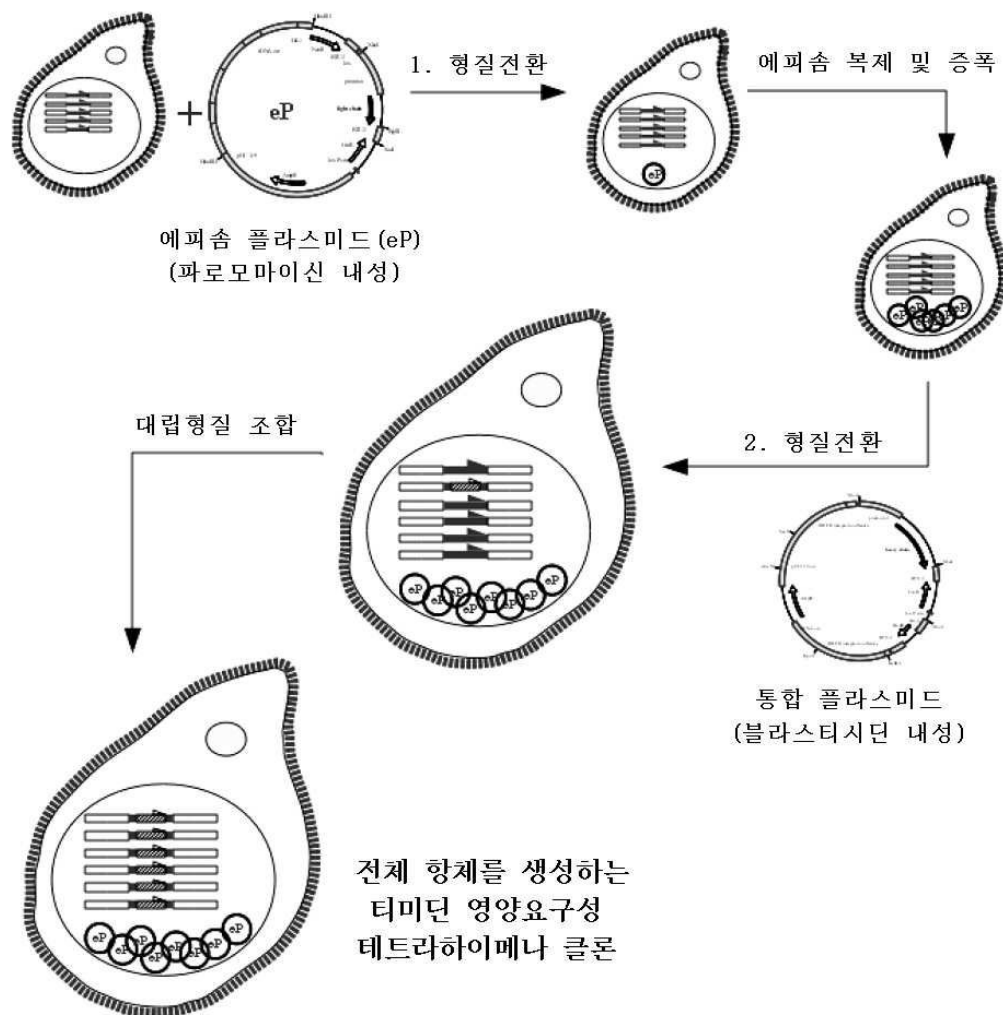
도면5



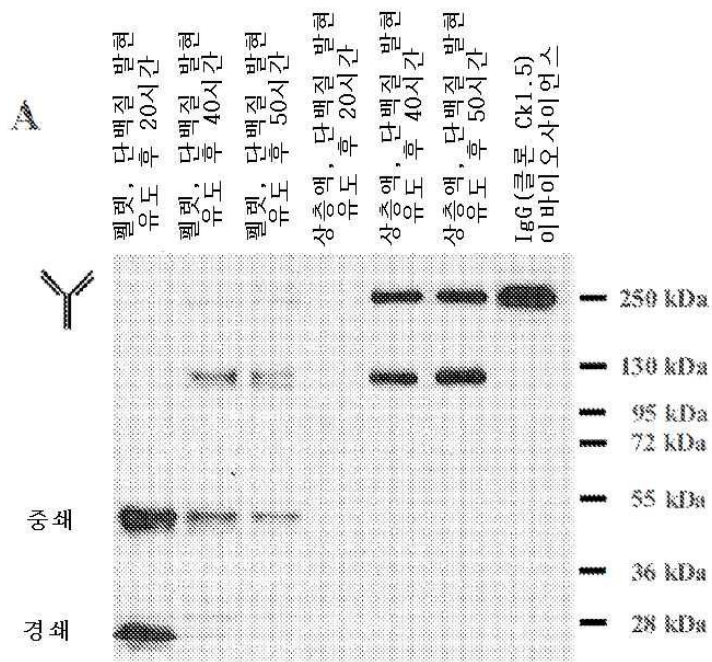
도면6



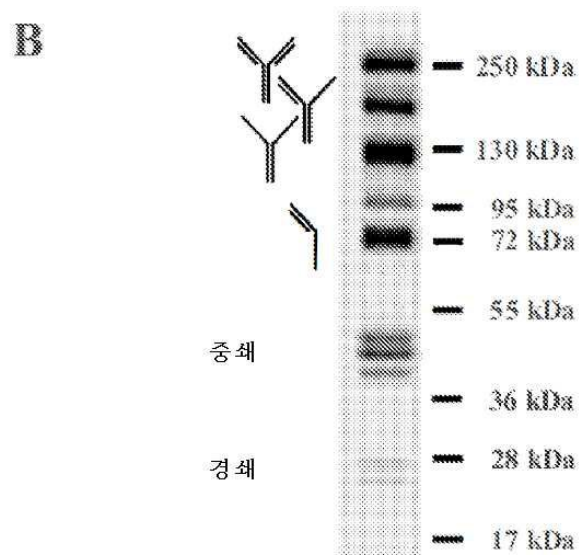
도면7



도면8



0.5L 실험실 규모 발효



단백질 G 컬럼

도면9

테트라하이페나 써모필라[gbinv] : 283개 CDS(145922개 코돈)

필드: [트리플렛] [빈도: 일천당] ([개수])

UUU 26.1(3815)	UCU 24.4(3557)	UAU 23.3(3407)	UGU 9.7(1412)
UUC 19.4(2827)	UCC 6.5(948)	UAC 14.5(2110)	UGC 8.8(1282)
UUA 29.8(4346)	UCA 16.8(2453)	UAA 36.8(5366)	UGA 2.0(286)
UUG 14.1(2054)	UCG 1.5(222)	UAG 11.0(1606)	UGG 7.4(1080)
CUU 20.3(2955)	CCU 17.6(2574)	CAU 8.7(1267)	CGU 4.6(677)
CUC 10.3(1497)	CCC 4.6(676)	CAC 6.4(930)	CGC 0.9(136)
CUA 7.4(1078)	CCA 8.2(1202)	CAA 19.8(2894)	CGA 0.5(73)
CUG 2.6(378)	CCG 0.5(68)	CAG 3.3(477)	CGG 0.1(8)
AUU 39.3(5733)	ACU 27.2(3968)	AAU 48.0(7002)	AGU 13.5(1963)
AUC 16.2(2367)	ACC 7.8(1140)	AAC 24.2(3530)	AGC 9.2(1344)
AUA 19.1(2783)	ACA 14.8(2153)	AAA 58.7(8562)	AGA 26.6(3887)
AUG 19.3(2811)	ACG 0.8(111)	AAG 34.3(5001)	AGG 2.8(412)
GUU 25.8(3763)	GCU 30.3(4428)	GAU 42.5(6208)	GGU 24.5(3576)
GUC 10.1(1469)	GCC 7.5(1098)	GAC 12.4(1815)	GGC 4.3(629)
GUA 11.6(1693)	GCA 11.8(1726)	GAA 58.2(8499)	GGA 15.1(2205)
GUG 3.1(451)	GCG 0.6(88)	GAG 11.2(1630)	GGG 1.5(216)

암호화 GC 32.53% 첫번째 문자 GC 38.64% 2번째 문자 GC 31.25%
3번째 문자 GC 27.69%

호모 사피엔스 [gbpri] : 93487개 CDS (40662582개 코돈)

필드: [트리플렛] [빈도: 일천당] ([개수])

UUU 17.6(714298)	UCU 15.2(618711)	UAU 12.2(495699)	UGU 10.6(430311)
UUC 20.3(824692)	UCC 17.7(718892)	UAC 15.3(622407)	UGC 12.6(513028)
UUA 7.7(311881)	UCA 12.2(496448)	UAA 1.0(40285)	UGA 1.6(63237)
UUG 12.9(525688)	UCG 4.4(179419)	UAG 0.8(32109)	UGG 13.2(535595)
CUU 13.2(536515)	CCU 17.5(713233)	CAU 10.9(441711)	CGU 4.5(184609)
CUC 19.6(796638)	CCC 19.8(804620)	CAC 15.1(613713)	CGC 10.4(423516)
CUA 7.2(290751)	CCA 16.9(688038)	CAA 12.3(501911)	CGA 6.2(250760)
CUG 39.6(1611801)	CCG 6.9(281570)	CAG 34.2(1391973)	CGG 11.4(464485)
AUU 16.0(650473)	ACU 13.1(533609)	AAU 17.0(689701)	AGU 12.1(493429)
AUC 20.8(846466)	ACC 18.9(768147)	AAC 19.1(776603)	AGC 19.5(791383)
AUA 7.5(304565)	ACA 15.1(614523)	AAA 24.4(993621)	AGA 12.2(494682)
AUG 22.0(896005)	ACG 6.1(246105)	AAG 31.9(1295568)	AGG 12.0(486463)
GUU 11.0(448607)	GCU 18.4(750096)	GAU 21.8(885429)	GGU 10.8(437126)
GUC 14.5(588138)	GCC 27.7(1127679)	GAC 25.1(1020595)	GGC 22.2(903565)
GUA 7.1(287712)	GCA 15.8(643471)	GAA 29.0(1177632)	GGA 16.5(669873)
GUG 28.1(1143534)	GCG 7.4(299495)	GAG 39.6(1609975)	GGG 16.5(669768)

암호화 GC 52.27% 첫번째 문자 GC 55.72% 2번째 문자 GC 42.54%
3번째 문자 GC 58.55%

도면10

1LC	3LC	아미노산	코돈					
A	Ala	알라닌	GCU	GCA	GCC	GCG		
C	Cys	시스테인	UGU	UGC				
D	Asp	아스파르트산	GAU	GAC				
E	Glu	글루탐산	GAA	GAG				
F	Phe	페닐알라닌	UUU	UUC				
G	Gly	글라이신	GGU	GGA	GGC	GGG		
H	His	히스티딘	CAU	CAC				
I	Ile	이소류신	AUU	AUA	AUC			
K	Lys	리신	AAA	AAG				
L	Leu	류신	UUA	CUU	UUG	CUC	CUA	CUG
M	Met	메티오닌 / 시작	AUG					
N	Asn	아스파라긴	AAU	AAC				
P	Pro	프롤린	CCU	CCA	CCC	CCG		
Q	Gln	글루타민	CAA	CAG	UAA	UAG		
R	Arg	아르기닌	AGA	CGU	AGG	CGC	CGA	CGG
S	Ser	세린	UCU	UCA	AGU	AGC	UCC	UCG
T	Thr	트레오닌	ACU	ACA	ACC	ACG		
V	Val	발린	GUU	GUA	GUC	GUG		
W	Trp	트립토판	UGG					
Y	Tyr	티로신	UAU	UAC				
		정지	UGA	UAA	UAG			

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CILIAN AG

<120> EXPRESSION OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN CILIATE HOST CELLS

<130> WO/2011/107520

<140> PCT/EP2011/053129

<141> 2011-03-02

<150> GB 1003701.8

<151> 2010-03-05

<160> 8

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 1416

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> codon optimized nucleotide sequence of Gk1.5 heavy chain

<400> 1

catatgaagt gttcttggat tatctctcttc cttatggtctc ttaccactgg tgtcaattcc 60

gaagttcaac tccaataaga cggctgctgaa cttggtaagc ccggtacttc tgtaagctt 120

tcttgaagg tttccgatta caacattaga agaacttata tgcactgggt caaccaaaga 180

cccggtaagg gtttgaatg gattggtaga attgatcctg ccaacggtaa cactatctat 240

ggtgaaaagt tcaagtctaa ggccaccttg actgctgaca cctcttccaa cactgcttac 300

atgcaattgt ctcaattgaa gtccgacgat actgctatit atttctgtgc catcggtgtc 360

caatacctcg attactgggg tcaagggtgt atggtcaccg tctcctctgc ttaaaccact 420

gctccctctg tttaccacct cgctcctggt tgcggtgata ccacttcttc cactgttact 480

ttgggttgcc tcgtcaaggg ttatttcccc gaacccttta ctgtcacctg gaactccggt 540

gccttatctt ccgacgttca cactttccct gctgttttac aatctggtct ttacaccctc 600

acttcttccg ttacctcttc tacttggccc tcccaaaccg tcaactgtta cgtcgtcac 660

cctgcttctt ccaccaaggt cgataagaag gtcgaaagaa gaaacggtgg tatcggtcac 720

aagtgcacca cctgtcctac ctgccacaag tgcctcgctc ccgaattatt ggggtgtcct 780

tccgtcttca ttttccccc taagcccaag gatattctac ttatttctta aaacgctaag 840

gtcacttgcg ttgtcgttga tgtttctgaa gaagaacctg acgtttaatt ctcttggttc 900

gtcaacaatg ttgaagtcca caccgttaa acccaacca gagaagaata atacaactct 960

actttcagag tcgtttctgc tttacctatc caacactaag attggatgtc cggtaaggaa 1020

ttcaagtgtg aggtcaacaa taaggctctc ccctctccta tcgaaaagac catttccaag 1080

cctaagggtc tcgttagaaa gcccgaagt taccgttatgg gtccctctac cgaacaactc 1140

actgaacaaa ctgtttctt aacttgctta acctccggtt tcttgcccaa cgatatcggt 1200

gttgaatgga cctccaatgg tcacatcgaa aagaactaca agaacaccga acctgtcatg 1260

gactccgatg gttctttctt catgtactct aagcttaacg tcgaaagatc cagatgggat 1320

tccagagccc ccttcgtttg ctccgtctgc caccgaaggt tacacaacca ccacgtcgaa 1380

aagtctatct ctagaccccc cggtaagtga agatct 1416

<210> 2

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> codon optimized nucleotide sequence of Gk1.5 kappa light chain

<400> 2

atggaaactg atagattatt gctctgggtc ttacttttat gggccccga ctctaccggt 60

gataccgtcc tcaactaatc tctgcttta gctgtctctc ctggtgaaag agttaccatc 120

tcctgcagag ctactgaaag attctctact cttatccact ggttacaaca aagacctggt 180
caacaacca agttgcttat ttacttgacc tcccacttag attctggtgt tcccgctaga 240

ttctccggtt ctggttctgg tactgacttc acccttacca ttgacctgt tgaagctgat 300
gatactgcta cctactactg ctaataaacc tggaacgata cctggacatt cgggtggtggt 360
actaagctcg aactcaagag agccgatgcc gctcccactg tttccatctt cctccctct 420
actgaataac ttgtaccgg tgggtcttct gtcgtttgct tgatgaataa cttctacccc 480
agagacattt ctgttaagtg gaagatcgac ggtaccgaaa gaagagatgg tgcctcgat 540
tccgtcaccg atcaagattc caaggactcc acttattcca tgcctctac tctctctctc 600
actaaggcgg attacgaatc tcacaacttg tatacctgcg aagttgtcca caagacttcc 660

tcctcccccg tcgttaagtc cttcaacaga aacgaatggt gaagatct 708

<210> 3
<211> 135
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> amino acid sequence encoded by Sequence No.1
<400> 3

Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Asp Gly Ala Glu Leu Gly Lys
20 25 30
Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Asp Tyr Asn Ile

35 40 45
Arg Arg Thr Tyr Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Gly
65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Gln Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile

100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Ile Gly Val Gln Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125
Val Met Val Thr Val Ser Ser
130 135
<210> 4
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> amino acid sequence sequence encoded by Sequence No.2
<400> 4
Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro
85 90 95
Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Asn
100 105 110
Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
115 120 125

<210> 5
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> codon optimized nucleotide sequence of endogenous Gk1.5 heavy

chain signal peptide
<400> 5

catatgaagt gtctttggat tatctcttc cttatggctc ttaccactgg tgtcaattcc 60

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence sequence encoded by Sequence No.5

<400> 6

Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val Asn Ser

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> codon optimized nucleotide sequence of endogenous Gk1.5 kappa

light chain signal peptide

<400> 7

atggaaactg atagattatt gctctgggtc ttacttttat ggggtccccga ctctaccggt 60

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence encoded by Sequence No.7

<400> 8

Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Asp Ser Thr Gly

20