	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0027579 (43) 공개일자 2013년03월15일
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 5/10</i> (2006.01) <i>C12N 5/07</i> (2010.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) <i>C12N 5/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-7004422(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2006년07월14일 심사청구일자 2013년02월21일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2008-7002132 원출원일자(국제) 2006년07월14일 심사청구일자 2011년04월01일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2013년02월21일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2006/027820</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/015848 국제공개일자 2007년02월08일</p> <p>(30) 우선권주장 11/187,863 2005년07월25일 미국(US)</p>		<p>(71) 출원인 이뮤노메딕스, 인코오포레이티드 미국뉴저저주 07950 모리스플레인즈 어메리칸로 오드300</p> <p>(72) 발명자 골든버그 데이비드 엠 미국 뉴저저주 07950 모리스 플레인즈 아메리칸 로드 300 쿠 쟁청 미국 뉴저저주 07950 모리스 플레인즈 아메리칸 로드 300 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 특허법인태평양</p>

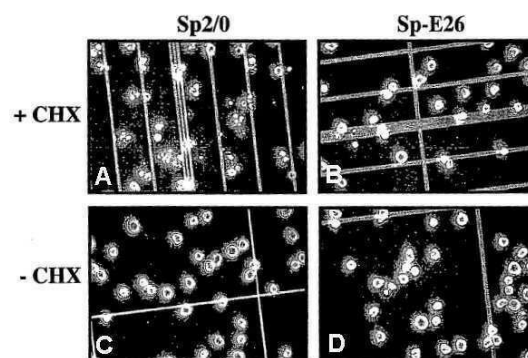
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양으로부터 수명 및 단백질 수율을 증가시키기 위한 개선된 방법 및 조성물

(57) 요약

세포 배양의 수명을 증가시키고 단백질, 바람직하게는 항체, 펩티드, 효소, 성장 인자, 인터루킨, 인터페론, 호르몬 및 백신과 같은 재조합 단백질의 생산 증가를 가능하게 하는 조성물 및 방법이 개시되어 있다. 삼중 돌연변이 Bcl-2와 같은 아포토시스를 억제하는 유전자 또는 벡터로 형질전환된 세포는 배양시 더 오래 살아남을 수 있어서 단백질 생합성의 상태 및 수율의 확장을 확장시킨다. 그러한 형질전환된 세포는 모 세포주에 의해 달성된 최대 밀도와 같거나 초과하는 최대 세포 밀도를 나타낸다. 형질전환된 세포는 또한 무혈청 배지에서의 성장을 위해 전-적응될 수 있으며, 이는 무혈청 배지에서 단백질을 생산하기 위해 필요한 시간을 크게 감소시킨다. 특정 방법에서, 상기 전-적응된 세포는 무혈청 조건하에서 형질변환된 후에 단백질을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 상기 방법은 바람직하게는 진행 세포와, 보다 바람직하게는 포유류 세포를 포함한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

창 시옌 싱

미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인스 아메리칸 로드 300

로시 에드워드 에이

미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인스 아메리칸 로드 300

양 쟁-다

미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인스 아메리칸 로드 300

노르드스트롬 다이안

미국 뉴저지주 07950 모리스 플레인스 아메리칸 로드 300

특허청구의 범위

청구항 1

T69E, S70E 및 S87E 돌연변이를 갖는 Bcl-2를 암호화하는 유전자를 포함하는 아포토시스 억제자로 형질전환되고 무혈청 배지에서 성장할 수 있는 포유류 세포주로서, 관심있는 단백질 및 선별마커 단백질을 암호화하는 플라스미드로 무혈청 배지에서 추가로 형질전환된 포유류 세포주.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 플라스미드는 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 다가 항체 또는 그의 절편을 암호화하는 세포주.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

아포토시스 억제자로 형질전환된 상기 세포주는 형질전환되지 않은 세포주에 의해 나타난 밀도보다 적어도 20% 이상 더 큰 밀도로 성장을 나타내는 세포주.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

아포토시스 억제자로 형질전환된 상기 세포주는 모 세포주보다 더 많은 단백질을 생산하는 세포주.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

하나 이상의 발현 벡터로 추가로 형질전환된 세포주.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 하나 이상의 발현 벡터는 염색체내로 삽입되는 세포주.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 세포주는 Sp2/0, Sp2/0 유도체, NSO 또는 YB2/0으로 구성된 군으로부터 선택되는 골수종 세포주인 세포주.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 세포주는 CHO, HEK 293, HEK 293T, COS-1, COS-7, HepG2, BHK21, P3X3Ag8.653 및 BSC-1으로 구성된 군으로부터 선택되는 세포주.

청구항 9

청구항 1 또는 청구항 4에 따른 세포주에 의해 생산된 단백질.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 단백질은 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 다가 항체

또는 그의 절편인 단백질.

청구항 11

청구항 9에 있어서,

상기 단백질은 성장 인자, 호르몬, 인터루킨, 인터페론, 사이토카인 또는 효소인 단백질.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 단백질은 EPO, G-CSF, GM-CSF, EGF, VEGF, 트롬보포이에틴, IL-1 내지 IL-31, 인터페론-알파, 인터페론-베타 및 인터페론-감마로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질.

청구항 13

- a) 무혈청 배지에서 성장하기 위해 적응되고, T69E, S70E 및 S87E 돌연변이를 갖는 Bcl-2를 암호화하는 유전자를 포함하는 아포토시스 억제자로 형질전환된 세포주를 얻는 단계;
- b) 저장을 위해 아포토시스 억제자로 형질전환된 상기 세포주를 무혈청 배지에서 냉동시키는 단계;
- c) 생산하려는 하나 이상의 단백질을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터로 형질전환시키기 전에 상기 냉동된 세포주를 해동시키는 단계;
- d) 무혈청 조건하에서 하나 이상의 발현 벡터로 상기 세포주를 형질전환시키는 단계; 및
- e) 무혈청 배지에서 상기 세포주를 배양함으로써 상기 하나 이상의 발현 벡터로부터 하나 이상의 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 단백질 생산 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 발현 벡터는 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 다가 항체 또는 그의 절편을 암호화하는 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서,

아포토시스 억제자로 형질전환된 상기 세포주는 형질전환되지 않은 세포주에 의해 나타난 밀도보다 적어도 20% 이상 더 큰 밀도로 성장을 나타내는 방법.

청구항 16

청구항 13에 있어서,

아포토시스 억제자로 형질전환된 상기 세포주는 모 세포주보다 더 많은 단백질을 생산하는 방법.

청구항 17

청구항 13에 있어서,

상기 세포주는 골수종 세포주인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 골수종 세포주는 Sp2/0 또는 그의 유도체, 쥐 NSO 또는 래트 YB2/0 세포주인 방법.

청구항 19

청구항 13에 있어서,

상기 세포주는 CHO, HEK 293, HEK 293T, COS-1, COS-7, HepG2, BHK21, P3X3Ag8.653 및 BSC-1로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 20

청구항 13에 있어서,

하나 이상의 카스파제 억제자를 포함하는 배지에서 상기 세포주를 성장시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

상기 카스파제 억제자는 카스파제-1, 카스파제-3, 카스파제-9, 카스파제-12 및 판-카스파제 억제자로 구성된 군 으로부터 선택되는 방법.

청구항 22

청구항 13에 있어서,

에리스로포이에틴을 포함하는 배지에서 상기 세포주를 성장시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

청구항 21에 있어서,

카스파제 억제자는 Z-VAD-fmk, Ac-DEVD-cho(서열번호: 7), Aven 및 XIAP로 이루어진 군 으로부터 선택되는 방법.

청구항 24

청구항 13에 있어서,

상기 형질전환되지 않은 세포주는 SP2/0이고, 상기 아포토시스 억제자는 Bcl-2-EEE이며, 상기 발현벡터는 플라스미드 pDHL2를 포함하고, 상기 Bcl-2-EEE 및 발현벡터로 형질전환된 세포주는 바이오리액터에서 단백질을 생산 하기 위해 선별 및 증폭되는 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명의 다양한 구현예들은 수명 및/또는 세포주로부터 수명 및 단백질 수율을 증가시키기 위한 방법 및 조성에 관한 것이다. 구체적인 구현예에서, 상기 세포주는 항체 또는 항체 절편을 생산하는 하이브리도마 세포주 일 수 있다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 E6, E7 및/또는 Bcl-2 또는 관련된 단백질을 암호화하는 유전자와 같은 하나 이상의 유전자로 세포주를 형질전환시키는 것을 포함할 수 있다. 그러한 단백질은 그들의 본래의 서열에 제한되지 않고, T69E, S70E 및 S87E에 점 돌연변이를 갖는 Bcl-2와 같이 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함할 수 있다. 다른 구현예는 무혈청 배지에서 성장 및 단백질 생산이 가능한 포유류 세포주에 관한 것이다. 그러한 세포주는 항체, 이중특이적(bispecific) 항체, 다항체 또는 다중특이적 항체 또는 그의 절편과 같은 이중 단백질을 발현하는 발현벡터로 세포주를 형질전환함으로써 단백질을 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 세포주는 무혈청 배지에서 형질전환되어, 무혈청 성장 및 단백질 생산을 위해 형질전환된 세포주를 적응시키는 것을 없앴으로써 상당한 시간을 절약할 수 있다.

배경 기술

[0002]

시험관에서, 특히 큰 바이오리액터(bioreactor)에서 세포를 배양하는 것은 수많은 생명공학 산물을 생산하는 기본이 되어왔고, 이러한 세포에 의해 지지배지로 단백질 산물을 합성(elaboration)하는 것을 포함하며, 상기 지지배지로부터 이러한 산물이 분리되고 임상에서 사용되기 전에 추가로 가공된다. 배양시 성장하는 세포로부터 시간에 따라 생산되는 단백질의 양은 예를 들어, 세포 밀도, 세포 주기 상(phase), 단백질의 세포 생합성율, 세포 생존과 성장을 지지하는데 사용되는 배지의 조건 및 배양시 세포의 수명(즉 그들이 프로그램화된 세포사 또는 아포토시스로 죽기 전까지의 기간)과 같은 수많은 인자에 달려있다. 배양시 세포의 생존 및 생존기간을 향

상시키는 다양한 방법이, 예를 들어 영양분, 세포 밀도, 산소 및 이산화탄소 함량, 젖산 탈수소효소, pH, 삼투압, 이화산물(catabolite) 등을 조절함으로써 원하는 단백질의 생산성을 증가시키는 방법과 함께 개발되어 왔다. 예를 들어, 세포 밀도를 증가시키는 것은 공정을 보다 생산적으로 만들 수 있으나, 배양시 세포의 생존 주기를 감소시킬 수도 있다. 그러므로, 가능한한 가장 생산적인 상태로 세포 집단을 유지하도록, 최대 밀도가 달성되었을 때에는, 배양시 세포의 증식율을 감소시키는 것이 바람직하다. 이는 생산 피크(peak)에서 바이오리액터 사이클을 증가시키거나 연장시켜 더 오랜 기간동안 원하는 단백질 산물을 합성하는 결과를 가져오고, 그 결과 바이오리액터 주기로부터 더 높은 수율을 가져온다.

[0003] 많은 서로 다른 접근방법이 바이오리액터 주기 시간을 증가시키는 것을 추구해 왔는데, 예를 들어 단백질 합성에 영향을 미치지 않고 세포 증식을 억제하는 것 뿐만 아니라 세포 증식을 지지하는 배지, 특정 성장 촉진 인자를 첨가하는 것을 조절하는 것과 같은 것이다. 한 구체적인 접근방법은 세포주기 표적에 영향을 미치는 유전자나 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 세포주기를 조절함으로써 배양된 세포의 생존기간을 증가시키는 것을 목표로 하는데, 이에 따라 세포는 세포 주기 진행을 방지하고 추가적인 세포 분열을 막고 배양시 단백질 합성 능력을 확장시키는 소위 가성-노화(pseudo-senescent) 상태로 유도하는 벡터로 형질전환, 형질변환 또는 감염시킴으로써 가성-노화 단계로 유도된다; 즉 가성-노화 상태는 세포 주기 억제자를 발현하는 벡터로 세포를 형질전환함으로써 유도될 수 있다(Buccigearelli et al., 미국 특허 출원 2002/0160450 A1; WO 02/16590 A2). 후자의 방법은 세포 복제를 억제함으로써 연장된 세포 배양 기간을 가지거나(Goldstein과 Singal, Exp Cell Res 88, 359-64, 1974; Brenner et al., Oncogene 17:199-205, 1998), 아포토시스에 저항할 수 있는 상태로 강제로 가도록 한다(Chang et al., Proc Natl Acad Sci USA 97, 4291-6, 2000; Javeland et al., Oncogene 19, 61-8, 2000).

[0004] 그 외에 또 다른 접근방법은 아데노바이러스 E1 유전자로 형질전환된 후에 제한없이 증식하는 1차 이배체 인간 세포 또는 그의 유도체를 확립하는 것을 포함한다. 새로운 세포주(이들 중 하나는 Ad5 E1A 및 E1B 유전자 산물을 발현하는 PER.C6(ATCC 기탁번호 96022940임)는 유전자 치료 및 백신용 뿐 아니라 인간 성장인자 및 인간 항체와 같은 재조합 치료용 단백질의 생산용으로 디자인된 다른 바이러스(예, 인플루엔자, 헤르페스 심플렉스, 로타바이러스, 홍역) 뿐 아니라 재조합 아데노바이러스를 생산할 수 있다(Vogels et al., WO 02/40665 A2).

[0005] 다른 접근방법은 세포에서 아포토시스를 방지하거나 지연시키기 위한 카스파제 억제자를 사용하는데 초점을 맞춰왔다(예를 들어, 미국특허 6,586,206 참조). 이 외에 다른 접근방법은 세포에서 아포토시스를 방지하거나 지연시키기 위해 Bcl-2 패밀리의 멤버와 같은 아포토시스 억제자를 사용하려고 시도해왔다(Arden et al., Bioprocessing Journal, 3:23-28, 2004 참조). 이러한 접근방법은 예상치 못한 결과를 낳았다. 예를 들어, 한 연구에서, Bcl-2의 발현은 세포 생존을 증가시켰으나 단백질 생산을 증가시키지는 않았다(Tey et al., Biotechnol. Bioeng. 68:31-43, 2000 참조). 또 다른 실시예는 CHO 세포에서 아포토시스를 지연시키기 위한 Bcl-2 단백질의 과발현을 기재하였는데, Bcl-2는 단백질 생산을 감소시킨 반면에 Bcl-xL은 단백질 생산을 증가시켰다(WO03/083093 참조). 추가적인 실시예는 배양시 Sp2/0-Ag14(ATCC # CRL-1581, 이하 "Sp2/0"이라 함) 세포의 생존을 연장시키기 위해 Bcl-2 단백질 발현을 이용한 실험을 기재하였다. 그러나, Bcl-2를 발현하는 클론의 세포 밀도는 그들의 모배양(parental culture)보다 20 내지 50% 낮아 생물약학 산업에서 그들의 실용적인 적용에 대한 우려를 일으켰다(WO03/040374; 미국 특허 6,964,199 참조).

[0006] 그러므로, 재조합 단백질을 높은 수준으로 발현하기 위한 개선된 숙주세포 및 숙주세포에서 재조합 단백질, 특히 항체 및 항체 절편, 다중특이적 항체, 절편 및 단쇄 컨스트럭트(construct), 펩타이드, 효소, 성장인자, 호르몬, 인터루킨, 인터페론 및 백신의 생산을 확실히 증가시키기 위한 방법이 당업계에서 필요하다는 것이 명백하다. 무혈청 조건하에서 발현 벡터로 형질전환될 수 있고 무혈청 성장 및 단백질 생산 전에 긴 적응 기간을 거치지 않고도 단백질을 생산하기 위해 사용될 수 있는 무혈청 또는 혈청-결핍 배지에서 성장에 전(pre)-적응된 세포주에 대한 필요성 또한 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 노화를 억제하거나 세포 생존을 촉진하는 제제(예, 항-아포토시스제)를 세포내로 도입함으로써 수명 및/또는 세포 배양의 재조합 단백질 수율을 증가시키는 개선된 숙주 세포 및 방법을 제공하는 것이다. 그러한 제제의 사용은 원하는 재조합 단백질의 생산을 위해 사용되는 세포의 배양시 생존기간 및 생존율을 증가시키고, 동시에 배양시 그러한 세포의 생산성 및 그에 의해 원하는 단백질의 최적의 수율을 증가시킨

다. 바람직하게는 본 발명의 방법에 사용되는 아포토시스 억제자는 Bcl-2 및 그 패밀리 멤버를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 선택적으로 세포 클론의 수명 및 재조합 단백질 수명은 p53 및 Rb와 같은 세포내 전(pro)-아포토시스 단백질의 레벨을 낮게 조절하거나 Bcl-2와 같은 세포내 항-아포토시스 단백질을 상향 조절하는 제제를 세포로 도입함으로써 개선될 수 있다.

[0008] 바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용되는 조절제는 인간 유두종 바이러스 타입 16(HPV-16) 종양단백질(oncoprotein) E6 및 E7, 항-아포토시스 단백질 Bcl-2 및 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가로, 본 명세서에 기재된 바와 같이 카스파제 억제자는 또한 아포토시스를 막거나 감소시키는데 기여하여 세포 생존을 증가시키고 배양시 상기 세포에 의한 재조합 단백질의 생산을 증가시킬 수 있다. 재조합 단백질의 생산을 증진시키기 위해 이러한 배양시 사용될 수 있는 항-아포토시스 제제의 추가적인 클래스는 에리스로포이에틴(EPO)과 같은 사이토카인 타입 I 수퍼패밀리의 특정 멤버를 포함한다. 이 클래스의 원형(prototype) 분자로서, EPO는 단지 적혈구 뿐만 아니라 복수의 세포 타입의 아포토시스의 주요 변형자이고, 따라서 신장, 피부 및 뉴런의 내피 세포, 심근 세포, 관 상피 세포와 같은 더 일반적인 세포 보호 기능을 갖는다[cf. review by P. Ghezzi and M. Brines, Cell Death and Differentiation 11 (suppl. 1), s37-s44, July 2004].

[0009] 다양한 구현예에서, HPV-16, E6 및/또는 Bcl-2와 같은 하나 이상의 조절제로 형질전환된 세포주는 무혈청 배지에서 성장을 위해 전-적응될 수 있다. Sp/ESF 세포주(하기 실시예 참조)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 그러한 전-적응된 세포주는 하나 이상의 발현 벡터로 무혈청 조건하에서 추가적인 형질변환을 거쳐서 무혈청 성장으로의 적응에 요구되는 많은 시간 없이 무혈청 조건하에서 발현 및 단백질 성장을 하게 할 수 있다. 이러한 놀라운 결과는 무혈청 또는 저혈청 조건하에서 단백질 생산을 가능하게 하여 배지 비용이 상당히 절약된다. 동시에 무혈청 조건하에서 형질전환 및 단백질을 생산하는 것은 혈청이 풍부한 조건하에서만 형질전환이 가능하고 무혈청 단백질 생산에 적응하기 위해 추가로 6 내지 12 개월을 필요로 하는 표준 포유류 세포주를 사용할 때 요구되는 무혈청 적응을 위해 필요한 상당한 시간을 절약한다.

[0010] 본 발명은 또한 세포 배양의 수명이 증가되거나 및/또는 원하는 재조합 단백질의 수율이 증가되는 세포 배양 조건을 만들기 위한 형질전환 벡터, 원하는 특성을 갖는 세포 클론의 스크리닝 및 선별, 세포 배양 배지, 성장 조건, 바이오리액터 배치 및 세포 타입을 포함하나 이에 제한되지는 않는 인자들의 신규한 조합을 도입하는 세포 배양 방법을 개시한다. 이러한 세포 배양 방법은 현탁액, 관류 및 유가식(fed-batch) 생산방법을 포함한다(Tey et al., J. Biotechnol. 79: 147-159 (2000); Zhang et al., J. Chem. Technol. Biotechnol. 79: 171-181 (2004); Zhou et al., Biotechnol. Bioeng. 55: 783-792 (1997) 참조).

[0011] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술적이고 과학적인 용어는 그 분명하고 고유한 의미를 갖는다. 추가로, 본 명세서에 인용되는 모든 특허 및 다른 참고문헌의 내용은 그 전체가 참조로 포함된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "하나" 나 "한"은 한 아이템의 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0013] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및" 및 "또는"은 결합하는 또는 분리하는 중 어느 하나를 의미하는데 사용될 수 있다. 즉 두 용어 모두 달리 기술되지 않는 한 "및/또는"과 등가로 이해되어야 한다.

[0014] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 $\pm 10\%$ 를 의미한다. 즉 "약 100"은 90 내지 110 사이의 수를 의미한다.

[0015] 본문에서 기재된 바와 같이, 항체는 전체-길이[즉 자연적으로 일어나는 또는 정상 면역글로불린 절편 재조합(recombinatorial) 공정에 의해 형성되는] 면역글로불린 분자(예, IgG 항체) 또는 항체 절편처럼 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인(즉 특이적으로 결합하는) 부분 또는 아날로그(analogue)를 일컫는다.

[0016] 항체 절편은 F(ab)₂, F(ab')₂, Fab, Fv, sFv 등과 같은 항체의 부분이다. 구조에 상관없이 항체 절편은 완전한 항체에 의해 인식되는 동일한 항원과 결합한다. 용어 "항체 절편"은 또한 복합체를 형성하기 위하여 특이적인 항원에 결합함으로써 항체와 같이 작용하는 합성의 또한 유전적으로 조작된 임의의 단백질을 포함한다. 예를 들어, 항체 절편은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역으로 이루어진 "Fv" 절편과 같은 가변 영역, 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 펩티드 링커에 의해 연결된 재조합 단쇄 폴리펩티드 분자("scFv 단백질") 및 초가변(hypervariable) 영역을 닮은 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인식 단위(minimal recognition unit)(CDR)로 이루어진 분리된 절편을 포함한다.

[0017] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "항체 융합 단백질"은 동일하거나 서로 다른 특성을 갖는 둘 이상의 scFv

또는 항체 절편이 연결된 재조합적으로 생산된 항원-결합 분자를 일컫는다. 융합 단백질의 수가(valency)는 융합 단백질이 단일 항원 또는 에피토프에 얼마나 많은 결합 팔 또는 부위를 갖는지, 즉 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적, 다중특이적인지를 표시한다. 다가 항체 융합 단백질은 항원에 결합할 때, 다수의 상호작용의 잇점을 취할 수 있어, 항원으로의 결합 강도를 증가시킨다. 특이성은 얼마나 많은 항원 또는 에피토프에 항체 융합 단백질이 결합할 수 있는지, 즉 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적, 다중특이적인지를 표시한다. 이러한 정의를 사용하여, 천연 항체, 예, IgG는 2 개의 결합팔을 갖기 때문에 2가이나 하나의 에피토프에 결합하기 때문에 단일특이적이다. 단일특이적, 다가 융합 단백질은 한 에피토프에 대해 하나 이상의 결합 부위를 갖지만 단지 하나의 그러한 에피토프에 결합한다. 예를 들어, 2 개의 결합 부위를 갖는 다이아바디(diabody)은 동일한 항원과 반응한다. 융합 단백질은 단일 항체 성분, 서로 다른 항체 성분의 다가 또는 다중특이적 조합 또는 동일한 항체 성분의 다중 카피(copy)를 포함한다. 융합 단백질은 항체 또는 항체 절편 및 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 그러한 융합 단백질용으로 적합한 치료제의 예는 면역조절자("항체-면역조절자 융합 단백질") 및 독소("항체-독소 융합 단백질")를 포함한다. 하나의 바람직한 독소는 리보뉴클레아제(RNase), 바람직하게는 재조합 리보뉴클레아제를 포함한다.

[0018] 세포주

[0019] 본 발명의 다양한 구현에는 숙주 세포주를 포함하는 개선된 조성물 및 그러한 세포주에서 재조합 단백질의 생산을 증가시키기 위한 방법에 관한 것이다. 세포주는 하나 이상의 항-아포토시스 유전자를 지속적으로 발현하고 항-아포토시스 유전자의 발현이 배양시 형질전환된 세포의 생존을 연장시키고 관심있는 단백질이나 펩티드의 증가된 수율을 제공하는 관심있는 단백질이나 펩티드를 암호화하는 발현 컨스트럭트로 형질전환될 수 있도록 만들어져 왔다.

[0020] 특정 구현에는 Sp-E26, Sp-EEE 및 Sp-ESF로 일컬어지는 신규한 세포주를 제공하는 Sp2/0 골수종 세포주의 유도체에 관한 것인데, 이는 배지 배양시 증진된 생존을 나타낸다. Sp-E26은 HPV-16의 E6 및 E7 단백질을 지속적으로 발현한다. Sp-EEE 및 Sp-E26은 Bcl-2-EEE로 일컬어지는 Bcl-2 돌연변이를 지속적으로 발현한다. 추가로 재조합 단백질 생산, 특히 재조합 항체 및 항체 절편의 생산은 관심있는 재조합 단백질용 발현벡터로 Sp-E26, Sp-EEE 또는 Sp-ESF를 형질전환함에 따라 개선될 수 있다. E6/E7 또는 Bcl-2-EEE 단백질은 숙주세포에서 아포토시스의 유도를 지연시키고 숙주세포에서 증가된 재조합 단백질 생산을 가능하게 한다. 단백질 생산은 하나 이상의 카스파제 억제자(예, 카스파제 1 및/또는 3 억제자)의 첨가(Bin Yang et al. Nephron Experimental Nephrology 2004;96:e39-e51) 및/또는 에리스로포이에틴(EPO)과 같은 사이토카인 타입 I 수퍼패밀리의 하나 이상의 멤버를 세포 성장 배지로 첨가함으로써 더욱 추가로 증진될 수 있다. 판-카스파제(pan-caspase) 억제자는 이에 관해서 특히 효과적이다.

[0021] 나아가, Sp-EEE 세포주는 무혈청 또는 저혈청 조건에서의 성장 및 단백질 생산을 위해 전-적응되어 Sp-ESF와 같은 무혈청 전-적응된 세포주로 될 수 있다. Sp-ESF 및 유사한 세포주는 항체, 항체 절편, 이중특이적 항체 등과 같은 관심있는 단백질을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터로 형질전환될 수 있다. 형질전환 및 단백질 생산이 가능한 포유류 세포주 사이에서 구별되는 형질전환용 무혈청 조건의 사용은 무혈청 성장에 적응하기 위해 요구되는 시간의 상당한 양을 절약한다.

[0022] 항체나 항체 절편과 같은 재조합 단백질의 생산은 Bcl-2와 같은 아포토시스 억제자의 공-발현(co-expression)에 의해 숙주세포에서 상당히 증가될 수 있다. 특히, 단백질 생산은 Sp2/0과 같이 항체나 항체 절편을 암호화하는 발현벡터로 안정하게 형질전환되고 Bcl-2와 같은 아포토시스 억제자를 암호화하는 발현벡터로 공-형질전환된 골수종 세포주에서 상당히 증가된다. 증가된 항체 생산은 또한 E6/E7 유전자로 형질전환된 숙주세포로부터도 얻어질 수 있다. 재조합 단백질의 생산은 세포의 성장 배지로 하나 이상의 카스파제 억제자를 첨가함으로써 더욱 추가로 증가될 수 있다. 판-카스파제 억제자는 이와 관련하여 특히 효과적이다. 또한, 재조합 단백질의 생산은 EPO 또는 또 다른 항-아포토시스 사이토카인을 세포 배양 배지로 공급함으로써 증가될 수 있다.

[0023] 아포토시스로 일컬어지는 생리학적 또는 프로그램화된 세포사(Kerr et al., Br J Cancer., 26:239-257, 1972)는 올바른 조직 발달 및 유지에 필수적이고 진화에서 보존되어온 내재적인 유전적 프로그램에 의해 조절된다(Ellis et al., Annu Rev Cell Biol, 7, 663-698, 1991). 그러므로, 세포가 세포 외(ex vivo) 배양과 같이 인위적인 환경에서 자랄 때, 이러한 유전적 자질은 유한한 생존기간을 초래한다. 그러므로, 연구 뿐 아니라 의학 및 산업에 사용되는 단백질 생산을 위한 그러한 세포 배양의 유용성은 그들이 아포토시스 기작에 따라 죽기 전에 생존기간 또는 주기를 연장시키기 위해 그러한 배양을 지속하는데 의존한다.

[0024] 아포토시스 효과로부터 세포 주기를 분화함으로써 세포 증식 및 세포사 이벤트와 독립적으로 작용하는 방법 및

약제가 발견되어 왔다. 공지된 세포내 아포토시스 조절자인 Bcl-2(Vaux et al., Nature 335, 440-2, 1988)는 세포 주기 진입에 대한 그 억제 영향과 유전적으로 다른 항-아포토시스 효과를 갖는 것으로 공지된 전종양유전자(proto-oncogene)이다(Huang et al., EMBO J 16, 4628-38, 1997). Bcl-2, Bcl-x_L 및 Bcl-w의 두 가지 유사체는 또한 세포 생존을 연장시키나, Bax 및 Bak과 같은 Bcl-2 패밀리의 다른 멤버들은 전-아포토시스성이다(Oltvai et al., Cell 74, 609-19, 1993; Chittenden et al., Nature 374, 733-6, 1995; Farrow et al., Nature 374, 731-3, 1995; Kiefer et al., Nature 374, 736-9, 1995). 다른 항-아포토시스 유전자는 Bcl-6 및 Mcl-1을 포함한다.

[0025] 그러므로, Bcl-2 및 그 패밀리 멤버의 어떤 것은 아포토시스를 방지하고, 배양시 단백질의 생산을 위해 사용되는 특정한 숙주 세포의 생존기간을 증가시키는 방법에 사용되어, 생산 및 분리되는 단백질의 양을 증가시킬 수 있다. Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w 또는 이러한 단백질의 돌연변이 변종과 같은 항-아포토시스 Bcl-2 패밀리 멤버의 과발현은 아포토시스를 억제하여 증가된 세포 밀도와 더 길어진 세포 생존을 초래한다. 그러므로, 항-아포토시스성 Bcl-2 패밀리 유전자의 형질전환은 다른 이들이 제안했던 것과 같이(ibid.) 그 자체로 세포 주기를 방해함으로써 세포 배양을 연장시키기 위한 필요성을 없앤다. 유사하게, Bcl-2에 대한 유전자로 섬유아세포를 형질전환하는 것은 이러한 세포에서 Bcl-2의 과-발현을 초래하고, 그 결과 아포토시스의 길항작용 및 이들 세포 수명이 증가되게 하며, 동시에 재조합 단백질의 생산 및 분리가 증가된다. 또한, 사이토카인이 줄어들 때 인터루킨-6(IL-6)-의존적인 쥐 골수종 세포가 그들이 아포토시스를 겪는 것처럼 소멸한다는 것이 관찰되었다. 그러한 세포에서 IL-6-수용체는 Bcl-2 또는 Bcl-x_L에 의해 조절되어 아포토시스를 연장할 수 있다는 것 또한 발견되었다(Schwarz et al., Cancer Res 55:2262-5, 1995).

[0026] 3점 돌연변이(T69E, S70E 및 S87E)를 갖는 돌연변이 Bcl-2가 야생형 또는 단일 점 돌연변이에 비해 상당히 많은 항-아포토시스 활성을 나타낸다는 것이 보고되어 왔다(Deng et al., PNAS (101) 153-158, 2004). 그러므로, 다양한 구현에는 개선된 수명 및 재조합 단백질 생산을 나타내는 Sp-EEE 클론 및 서브클론을 만들기 위해 Sp2/0을 형질전환하는데 사용되는 Bcl-2-EEE 삼중 돌연변이용 발현 벡터의 제작에 관한 것이다.

[0027] 종양유전자 바이러스와 같은 다른 제제는 또한 그들이 이끌어내는 세포의 불멸화 및 고-위험형 HPV 종양단백질 E6 및 E7과 같은 궁극적으로 온전한 악성 형질변환의 일부로서 아포토시스를 지지할 수 있다(Finzer et al., Cancer Lett 188, 15-24, 2002). 예를 들어, 바이러스 E6 단백질은 자외선에 대한 상피의 아포토시스 반응을 효율적으로 막는다(Storey, Trends Mol Med 8, 417-21, 2002). 간접적인 증거로부터 인간 유두종 바이러스가 편평(기저세포는 아님) 암종에서 감소된 아포토시스를 일으킬 수 있다는 것이 또한 제안되어 왔다(Jackson et al., Br J Cancer 87, 319-23, 2002). 그러나 모든 유두종 바이러스 종양단백질이 항-아포토시스 효과를 갖는 것은 아니다. 예를 들어, 다른 연구는 소 종(bovine species)의 유두종 바이러스 E6 단백질이 세포가 아포토시스에 민감하도록 한다고 보고했는데(Liu et al., Virology 295, 230-7, 2002), 이는 HPV-16 E7 유전자가 특정 자극에 의해 유도되는 아포토시스에 대해 정상세포를 보호하는 것을 나타내는 다른 연구에 반대된다(Lee et al., Yonsei Med J 42, 471-9, 2001). E6-결합 펩티드 앵타머(aptamer)를 사용함으로써, HPV E6 종양단백질이 HPV-양성 종양 세포에서 항-아포토시스 활성을 갖는다는 직접적인 실험 증거가 얻어졌다(Butz et al., Proc Natl Acad Sci USA 97, 6693-7, 2000). 그러나 다른 HPV 종양단백질은 반대의 효과를 가질 수 있다. E2 단백질은 다른 HPV 단백질의 부재시에 아포토시스를 유도한다(Webster et al., J Biol Chem 275, 87-94, 2000).

[0028] E6 및 E7 단백질 둘 다 연속적으로 발현되는 것은 경부암 세포의 최적의 증식을 위해 필요하다는 것이 알려져 있으며, 상기 2 가지 바이러스 단백질은 세포 생존에 별개의 효과를 발휘한다(DeFilippis et al., J Virol 77, 1551-63, 2003). HPV-16 E6의 1차 세포내 표적은 p53이다. E6는 p53과 4차 복합물을 형성하고 세포 유비퀴틴 리가제, E6AP는 프로테아좀 경로 및 p53 비활성화를 통해 p53의 유비퀴틴화 및 분해를 초래한다. 반면에, HPV-16 E7 단백질은 종양 억제자 단백질 Rb와 상호작용하고 불안정화시킨다. 더우기, Bcl-2, Bcl-x_L, p73, MDM2, p21, 사이클린 및 cdc, cdk 단백질 등과 같은 아포토시스 및 세포 주기 경로와 관련된 다양한 다른 세포내 단백질의 레벨이 E6 및 E7 형질변환에 의해 조절된다는 것이 보고되었다. 이러한 단백질 발현에서의 변화는 세포의 생리학적 특성에 크게 영향을 미칠 것이다. 그러므로 본 발명자들은 배양시 HPV-16 E6 및 E7에 의한 세포의 형질전환이 노화-배양-조건 유도된 아포토시스에 저항성이 있고 따라서 세포 배양의 생존기간을 연장시키는 유전적으로 변형된 클론을 생성하는데 효과적이라는 가설을 세웠다. 또한 HPV16 종양단백질 E7 또는 E6 중 어느 하나를 단독으로 세포에 도입하는 것은 노화-배양-조건 유도된 아포토시스에 상기 개선된 저항성을 갖는 유전적으로 변형된 클론을 생성하기에 충분할 것이라고 가정하였다. 세포가 재조합 단백질-생산 클론일 때, 개선된 생리학적 특성은 차례로 증진된 전체 단백질 생산성으로 번역될 것이다.

- [0029] **바이러스 항-아포토시스 유전자를 발현하는 신규한 숙주 세포의 생성**
- [0030] 골수종 숙주 세포와 같은 숙주 세포는 HPV16 E6 및 E7 단백질과 같은 바이러스 항-아포토시스 유전자를 지속적으로 발현하도록 생성될 수 있다. 이러한 숙주 세포는 관심있는 재조합 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 형질전환될 수 있고 항-아포토시스 유전자의 공-발현은 재조합 단백질의 상당히 증가된 생산을 초래한다.
- [0031] 숙주 세포는 필수적으로 바이러스 항-아포토시스 유전자로 안정하게 형질전환될 수 있는 재조합 단백질 생산에 적합한 임의의 숙주 세포가 될 수 있다. 많은 재조합 단백질에 있어서, CHO 및 COS 세포와 같은 숙주 세포가 유리한 반면, 항체와 같은 다른 단백질에 있어서는 골수종 세포 및 CHO 세포와 같은 숙주세포가 일반적으로 선택된다. 유용한 숙주 세포의 다른 예는 VERO 및 HeLa 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, NSO, NS1, RIN 및 MDCK 세포주이다. 사용하려는 세포주는 COS-1(예, ATCC CRL 1650), COS-7(예, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21(예, ATCC CRL-10), P3X3Ag8.653 (ATCC CRL-1580), CHO(예, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1(예, ATCC CRL-26) 세포주와 같이 상업적으로 도입될 수 있다. 바이러스(예, E6/E78) 및/또는 진핵세포 유전자는 상기 유전자의 지속적인 또는 유도가능한 발현을 초래하는 임의의 적합한 방법, 즉 유전자의 발현을 가능하게 하는 동안 숙주 세포 염색체로 유전자의 안정한 삽입을 가능하게 하는 임의의 방법에 의해 숙주세포로 도입될 수 있다. 관심있는 유전자를 숙주세포에 안정하게 형질변환하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 특히 유리한 방법은 바이러스 항-아포토시스 유전자를 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 사용하는 것이다. 적합한 벡터는 LSXN 벡터(Miller et al. Biotechniques 7, 980-90, 1989)를 포함한다. 그러나, 전기천공법이나 세포 융합과 같은 당업계에 공지된 임의의 다른 방법들도 사용될 수 있다.
- [0032] 유리하게, 숙주 세포를 형질전환하기 위해 사용되는 벡터는 상기 벡터를 포함하는 세포의 선별을 가능하게 하는 선별 마커를 함유한다. 형질전환된 세포에 항생제 내성을 부여하는 효소와 같은 적합한 선별 마커는 당업계에 잘 알려져 있다. 형질전환 후에, 세포는 항생제와 같은 선별제를 함유하는 배지에서 유지되고 마커에 대한 저항성을 위해 스크리닝한다. 세포는 종래의 방법을 사용하여 한계 희석에 의해 선별 및 클로닝될 수 있다.
- [0033] 세포 생존율을 높이기 위한 바이러스 항-아포토시스 유전자의 능력은 세포를 사이클로헥시미드(CHX)와 같은 아포토시스를 유도하는 제제로 처리함으로써 시험될 수 있다. 바이러스 항-아포토시스 유전자를 발현하지 않는 세포는 아포토시스가 상당히 개시되는 경향이 있는 반면에 상기 유전자를 발현하는 세포는 극적으로 감소된 아포토시스 활성을 나타낸다. 아포토시스를 검출하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 세포 표면 FITC-아넥신 V 결합 분석, DNA 래더링(laddering) 분석 및 TUNEL 분석을 포함한다.
- [0034] 바이러스 항-아포토시스 유전자를 발현하는 적합한 세포를 선별할 때, 세포는 선택한 재조합 단백질을 암호화하는 발현 벡터로 형질전환될 수 있다. 발현 벡터는 일시적인 발현을 위해 적합한 벡터이거나, 유리하게는, 진핵생물의 복제 기원(origin)을 함유하는 에피솜 벡터이거나 발현 카세트의 안정한 삽입 및 이어지는 유전자 증폭을 가능하게 하는 증폭가능한 벡터일 수 있다. 적합한 벡터는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 항체 및 항체 절편의 생산을 위해 특히 적합한 pHHL2 벡터를 포함한다. 증폭가능한 발현 카세트가 사용될 때, 형질전환된 세포의 선별을 가능하게 하기 위하여, 레트로바이러스 벡터에서 사용되는 선별 마커와 다른 선별 마커를 함유하는 것이 유리하다. 다시 한번, 적합하게 형질전환된 세포는 선별될 수 있고, 이후 한계 희석에 의해 클로닝될 수 있다.
- [0035] 적합한 클론을 선별할 때, 세포는 적합한 배지에 놓여 관심있는 원하는 단백질을 생산하기 위해 배양될 수 있다. 배지는 혈청을 포함하거나 바람직하게는 무혈청일 수 있다. 추가로, 세포 수명 및 단백질 생산은 또한 하나 이상의 카스파제 억제자(예, 카스파제 1 또는 3)를 배양 배지에 첨가함으로써 증가될 수 있다. 바람직하게는 상기 카스파제 억제자는 카스파제 3, 카스파제 9 및/또는 카스파제 12의 하나 이상을 억제하기 위해 작용한다. 세포-침투 카스파제 억제자가 유리하게 사용되고, 판-카스파제 억제자는 특히 유리하다. Z-VAD-fmk 및 Ac-DEVD-cho(서열번호: 7)와 같은 적합한 억제자가 당업계에 잘 알려져 있다. 대안적으로, 세포주는 아포토시스에 영향을 미침으로써 그 성장 특성을 증진시키기 위하여 Aven 또는 XIAP와 같은 카스파제 억제자를 발현하기 위해 추가로 형질전환될 수 있다. 이와 관련하여, EPO 같은 사이토카인 타입 I 수퍼패밀리의 특정 멤버가 또한 항-아포토시스 및 세포보호 작용을 가지는 것에 의해 세포 생존을 증가시킬 수 있다.
- [0036] 상기 방법은 필수적으로 임의의 원하는 유전자로 형질전환시키기 위해 사용될 수 있는 세포주를 생성한다. 그러나, 숙련자는 원하는 단백질 및 특히 재조합 단백질을 지속적으로 발현하는 확립된 세포주가 바이러스 또는 Bcl-2 수퍼패밀리 항-아포토시스 유전자를 암호화하는 적합한 벡터로 이어서 형질전환될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 하기 실시예 2 참조.

- [0037] 관심있는 단백질은 필수적으로 숙주 세포에서 검출가능한 양으로 생산될 수 있는 임의의 단백질일 수 있다. 실시예는 전통적인 IgG 타입 항체, Fab', Fab, F(ab')₂ 또는 F(ab)₂ 절편, scFv, 다이아바디, IgG-scFv 또는 Fab-scFv 융합 항체, IgG- 또는 Fab-캡티드 독소 융합 단백질, 또는 백신[예, 간염 바이러스 A, B 또는 C; HIV, 인플루엔자 바이러스, RSV(respiratory syncytial virus), 유두종 바이러스, 헤르페스 바이러스, 한탄 바이러스, 에볼라 바이러스, 로타 바이러스, 사이토메갈로 바이러스, 리슈마니아 RNA 바이러스, SARS, 말라리아, 결핵(미코박테리아), 탄저균, 천연두, 야토병, 및 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함되는 www.vaccines.org에 열거된 다른 것들을 포함하나 이에 한정되지 않음]을 포함한다. 본 명세서에 기재된 숙주 세포는 재조합 성장인자(예, EPO, G-CSF, GM-CSF, EGF, VEGF, 트롬보포이에틴), 호르몬, 인터루킨(예, IL-1 내지 IL-31), 인터페론[예, 알파, 베타, 감마 및 콘센서스(consensus)], 및 효소 뿐 아니라 실시예 1 및 2에 기재된대로 골수종 세포주에서 항체 및 항체 절편을 매우 효과적으로 생산하기에 특히 적합하다. 이러한 방법은 교세포 및 신경아교종 세포 뿐 아니라, 쥐 NSO 또는 래트 YB2/0와 같은 다른 골수종 세포주; CHO 및 HEK 293와 같은 상피 세포주; 섬유아세포주 COS-1 또는 COS-7와 같은 간엽 세포주; 및 망막 세포와 같은 신경 세포의 생산을 위해 사용되는 임의의 수의 세포주에 적용될 수 있다.
- [0038] **아포토시스 억제자를 발현하는 세포에서의 재조합 항체 발현**
- [0039] 이전의 연구는 키메라 항체(chimeric antibody)를 생산하는 재조합 CHO 세포에서 자연적으로 일어나는 아포토시스 억제자인 Bcl-2의 공-발현 효과를 기술해왔다(Tey et al., Biotechnol. Bioeng. 68:31-43 (2000) 참조). 증가된 세포 배양 수명이 관찰되었지만, 항체 생산은 Bcl-2 발현이 결여된 등가의 세포에 비해 증가하지 않았다. 그러나, 본 발명자들은 골수종 세포로부터의 재조합 항체의 생산은 세포가 또한 Bcl-2를 발현할 때 상당히 증가하는 것을 발견하였다.
- [0040] 유리하게, 골수종 세포주는 항체나 항체 절편을 암호화하는 발현 카세트로 안정하게 형질전환된다. 적합한 발현 카세트는 상기대로 선별 마커를 갖는 것과 함께 항체의 중쇄 및 경쇄(scFv의 경우에 단쇄)의 발현을 조절하는 하나 이상의 프로모터를 함유한다. 특히 유용한 벡터는 pdHL2이고, 상기 벡터는 선별 마커 효소를 암호화하는 DNA 서열에 작동하도록 연결된 프로모터; 관심있는 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 작동하도록 연결된 프로모터를 갖는 전사 단위; 선별 마커 유전자 및 전사 단위 사이의 증폭자(enhancer) 요소를 포함하며, 상기 증폭자는 첫번째 증폭자의 부재시에 선별 마커 유전자 및 첫번째 전사 단위 모두를 전사하는 것에 비교하여 선별 마커 유전자 및 첫번째 전사 단위 모두의 전사를 자극한다.
- [0041] 벡터는 또한 첫번째 증폭자 및 선별 마커 유전자 사이에 놓인 프로모터로 이루어진 블로킹 요소를 포함하는데 이는 선별 마커 유전자의 전사의 자극을 선별적으로 감소시키기 위해 잠재적으로 유용하다. V_H 및 V_L 서열은 분리된 프로모터에 의해 각각 조절되는 인간 경쇄 불변 영역, 중쇄 불변 영역 및 증폭가능한 dhfr 유전자에 대한 서열을 함유하는 증폭가능한 벡터인 pdHL2 내 라이게이션될 수 있다(Leung et al., Tumor Targeting 2:184, (1996) and Losman et al., Cancer 80:2660-2667, (1997) 참조). 이 벡터는 예를 들어 전기천공법에 의해 세포내로 형질전환될 수 있다. 선별은 0.1 μM 또는 적합한 농도의 메소트렉세이트(MTX)를 배양 배지로 첨가함으로써 수행될 수 있다. 증폭은 3 μM 또는 더 높은 농도까지 MTX를 증가시키며 단계적인 방식으로 수행될 수 있다. 그러므로, 발현 카세트로 안정하게 형질전환되어 관심있는 항체를 지속적으로 발현하는 세포는 그러므로 당업계에 잘 공지된 방법을 사용하여 얻어질 수 있고 특성화될 수 있다. 하기 실시예 4 참조. 선별 및 클로닝 후에, 항체-발현 세포주는 Bcl-2와 같은 항-아포토시스 유전자를 암호화하는 발현 벡터로 형질전환될 수 있다. 예를 들어, SV40 프로모터에 융합된 Bcl-2 유전자를 함유하는 벡터 pZeoSV(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)은 전기천공법과 같은 적합한 방법을 사용하여 세포내로 형질전환되고, 필요시 선별 및 유전자 증폭이 수행될 수 있다.
- [0042] 대안적으로 적합한 숙주 세포는 돌연변이 Bcl-2 유전자와 같은 아포토시스 억제자로 형질전환된 후 관심있는 원하는 단백질을 암호화하는 발현벡터로 바람직하게는 무혈청 배지에서 추가의 형질전환 전에 무혈청 배지에서 성장을 위해 적응될 수 있다. 결과 세포주를 이용한 항체 생산은 상기와 같이 수행되어 아포토시스 억제자를 발현하지 않는 세포에서의 생산과 비교될 수 있다.
- [0043] 본 발명을 예시하기 위한 대표적인 실시예는 아래에 주어지 있다. 실시예 1은 Sp2/0 세포로 HPV-16 E6/E7를 삽입하면 감소된/지연된 아포토시스의 특징을 나타내는 개선된 세포 클론인 Sp-E26으로 이끈다는 것을 개시한다. 실시예 2는 HPV-16 E7 요소 단독을 과-발현함으로써 숙주 세포주를 개선시키기 위한 방법을 개시한다. 실시예 3은 재조합 항체를 생산하는 형질전환체를 개발하기 위해 숙주로 Sp-E26을 사용하는 것을 개시한다. 실시예 4는 E6/E7 요소를 공-발현하는 항체-생산 세포주에 대해 관찰된 Mab의 증가된 생산을 개시한다. 실시예 5는 3

개의 점 돌연변이를 가지고 개선된 수명을 초래하는 돌연변이 Bcl-2(Bcl-2-EEE)를 지속적으로 발현하는 변형된 Sp2/0 세포주(Sp-EEE로 명명됨)의 생성 및 특징을 개시한다. 실시예 6은 Bcl-2를 발현하는 항체-생산 세포주의 개선된 성장 특성을 개시한다. 실시예 7은 실시예 6의 Bcl-2 발현 세포주에 대해 관찰된 MAbs의 증진된 생산을 개시한다. 실시예 8은 세포에 Bcl-2 발현을 도입함으로써 저-레벨 재조합 단백질을 생산하는 세포 클론을 개선하기 위한 방법을 개시한다. 실시예 9는 세포에 Bcl-2 발현을 도입함으로써 Sp-E26을 개선시키기 위한 방법을 기재한다. 실시예 10은 재조합 항체를 생산하는 형질전환체를 개발하기 위한 숙주로 Sp-EEE를 사용하는 것을 개시한다. 실시예 11은 수율을 최적화하기 위해 유가식 반응기 프로파일 및 식이 스케줄을 사용하는 것을 개시한다. 실시예 12는 무혈청 배지에서 형질전환 뿐 아니라 성장 가능한 Sp-EEE 서브클론의 생성을 개시한다.

[0044] 바람직한 구현예는 당업계에서 공지된 아포토시스의 억제자를 암호화하는 하나 이상의 유전자로 형질전환된 세포주에 의해 본 명세서에 예시되어 있지만, 숙련자는 대안적인 구현예에서 암호화된 단백질이 천연의 단백질과 동일한 생리학적 기능(항-아포토시스)을 나타내는 한, 청구된 방법 및 조성물의 범주 내에서 그러한 유전자의 암호 및/또는 비암호 서열에서 다양한 치환, 결실 또는 삽입이 만들어질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 특정 구현예에서, 암호화된 단백질은 천연의(야생형) 단백질과 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상, 가장 바람직하게는 99.5% 이상의 서열 동일성을 나타낼 수 있다.

[0045] 항체

[0046] 다양한 구현예는 관심있는 형질전환된 세포주로부터 발현되는 항체 및/또는 항체 절편에 관한 것일 수 있다. 용어 "항체"는 항원 결합 영역을 갖고, Fab', Fab, F(ab')₂, 단일 도메인 항체(DAB), Fv, scFv (단쇄 Fv) 등과 같은 항체 절편을 포함하는 임의의 항체-유사 분자를 언급하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 다양한 항체-기반 컨스트럭트 및 절편을 제작하고 준비하는 기술은 당업계 잘 알려져 있다. 항체를 준비하고 특징화하는 수단 또한 당업계에 잘 알려져 있다(예, Harlowe and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 참조). 사용하는 항체는 또한 공지된 매우 다양한 공급원으로부터 상업적으로 얻어질 수 있다. 예를 들어, 다양한 항체를 분비하는 하이브리도마주가 미국 타입 컬처 컬렉션(ATCC, Manassas, VA)으로부터 사용가능하다. 종양-관련 항원을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 질병 표적에 대한 많은 수의 항체가 ATCC에 기탁되어 왔고 청구된 방법 및 조성물에서 사용 가능하다(예를 들어, 미국 특허 번호 7,060,802; 7,056,509; 7,049,060; 7,045,132; 7,041,803; 7,041,802; 7,041,293; 7,038,018; 7,037,498; 7,012,133; 7,001,598; 6,998,468; 6,994,976; 6,994,852; 6,989,241; 6,974,863; 6,965,018; 6,964,854; 6,962,981; 6,962,813; 6,956,107; 6,951,924; 6,949,244; 6,946,129; 6,943,020; 6,939,547; 6,921,645; 6,921,645; 6,921,533; 6,919,433; 6,919,078; 6,916,475; 6,905,681; 6,899,879; 6,893,625; 6,887,468; 6,887,466; 6,884,594; 6,881,405; 6,878,812; 6,875,580; 6,872,568; 6,867,006; 6,864,062; 6,861,511; 6,861,227; 6,861,226; 6,838,282; 6,835,549; 6,835,370; 6,824,780; 6,824,778; 6,812,206; 6,793,924; 8,783,758; 6,770,450; 6,767,711; 6,764,681; 6,764,679; 6,743,898; 6,733,981; 6,730,307; 6,720,15; 6,716,966; 6,709,653; 6,693,176; 6,692,908; 6,689,607; 6,689,362; 6,689,355; 6,682,737; 6,682,736; 6,682,734; 6,673,344; 6,652,852; 6,635,482; 6,630,144; 6,610,833; 6,610,294; 6,605,441; 6,605,279; 6,596,852; 6,592,868; 6,576,745; 6,572,856; 6,566,076; 6,562,618; 6,545,130; 6,544,749; 6,534,058; 6,528,625; 6,528,269; 6,521,227; 6,518,404; 6,511,665; 6,491,915; 6,488,930; 6,482,598; 6,482,408; 6,479,247; 6,468,531; 6,468,529; 6,465,173; 6,461,823; 6,458,356; 6,455,044; 6,455,040; 6,451,310; 6,444,206; 6,441,143; 6,432,404; 6,432,402; 6,419,928; 6,413,726; 6,406,694; 6,403,770; 6,403,091; 6,395,274; 6,383,759; 6,383,484; 6,376,654; 6,372,215; 6,359,126; 6,355,481; 6,355,444; 6,355,245; 6,355,244; 6,346,246; 6,344,198; 6,340,571; 6,340,459, 각각은 항체-분비 하이브리도마 세포주에 대한 ATCC 기탁 번호 및 항체 또는 그의 절편에 대한 관련된 표적 항원에 대해 참조로 본 명세서에 포함되어 있다). 이들은 단지 예일 뿐이고 매우 다양한 다른 항체-분비 하이브리도마가 당업계 알려져 있다. 숙련자는 대부분의 임의의 질병-관련 항원에 대해 선별된 항체-분비 하이브리도마가 관심있는 선별된 질병-관련 표적에 대한 항체에 대해 ATCC, PubMed 및/또는 USPTO 데이터베이스를 단순 조사함으로써 얻어질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 클론된 항체의 항원 결합 도메인은 당업계에 잘 공지된 표준 기술을 사용하여 증폭되고, 절단되고, 발현 벡터내로 라이게이션되고, 적응된 숙주 세포내로 형질변환되고 단백질 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0047] 항체 절편의 생산

[0048] 청구된 방법 및/또는 조성물의 몇몇 구현예는 항체 절편에 관한 것일 수 있다. 항체 절편을 생산하기 위한 방법의 예시는 미국 특허 No. 4,036,945; 미국 특허 No. 4,331,647; Nisonoff et al., 1960, Arch. Biochem.

Biophys., 89:230; Porter, 1959, Biochem. J., 73:119; Edelman et al., 1967, METHODS IN ENZYMOLOGY, 페이지 422 (Academic Press), and Coligan et al. (eds.), 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, (John Wiley & Sons)에 개시되어 있다.

[0049] 1 개의 경-중쇄 절편을 형성하기 위한 중쇄의 분리, 추가로 절편의 절단과 같이 항체 절편을 형성의 다른 방법 또는 다른 효소적, 화학적 또는 유전적 기술 또한 상기 절편이 온전한 항체에 의해 인식되는 항원에 결합하는 한 사용될 수 있다. 예를 들어, F_v 절편은 V_H 및 V_L 쇠의 결합을 포함한다. 이러한 결합은 Inbar et al., 1972, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 69:2659에 기술된대로 비공유 결합성일 수 있다. 대안적으로 다양한 쇠가 분자내 이황화 결합에 의해 연결되거나 글루타르알데히드와 같은 화합물에 의해 가교-결합될 수 있다 (Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437 참조).

[0050] 바람직하게는, F_v 절편은 펩티드 링커에 의해 연결된 V_H 및 V_L 쇠를 포함한다. 이러한 단쇄 항원 결합 단백질 (sFv)는 V_H 및 V_L 도메인을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 구조 유전자를 올리고뉴클레오타이드 링커 서열에 의해 연결한 작제함에 의해 제조된다. 구조 유전자는 발현벡터로 삽입되고 이어서 숙주 세포로 도입된다. 이 제조합 숙주 세포는 상기 2 개의 V 도메인을 연결하는 링커 펩티드와 함께 단일 폴리펩티드쇄를 합성한다. sFv's를 생산하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(Whitlow et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97; Bird et al., 1988, Science, 242:423; 미국 특허 No. 4,946,778; Pack et al., 1993, Bio/Technology, 11:1271, 및 Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437 참조).

[0051] 항체 절편의 또 다른 형태는 단일 상보성-결정 영역(CDR)을 암호화하는 펩티드이다. CDR 펩티드("최소 인식 단위")는 관심있는 항체의 CDR를 암호화하는 유전자를 작제함으로써 얻어질 수 있다. 그러한 유전자는 예를 들어, 항체-생산 세포의 RNA로부터 가변 영역을 합성하기 위한 중합 효소 연쇄반응을 사용함으로써 제조된다 (Larrick et al., 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Ritter et al. (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, 페이지 166-179(Cambridge University Press); Birch et al., (eds.), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, 페이지 137-185 (Wiley-Liss, Inc.) 참조). 항체-분비 하이브리도마 세포주가 공개적으로 이용 가능한 곳으로부터 항원-결합 특이성을 암호화하는 CDR 서열이 얻어지고 키메라 또는 인간화된 항체로 삽입되어 사용될 수 있다.

[0052] 키메라 및 인간화된 항체

[0053] 키메라 항체는 인간 항체의 가변 영역이 예를 들어 마우스 항체의 상보성-결정 영역(CDR)을 포함하는 마우스 항체의 가변 영역에 의해 치환된 제조합 단백질이다. 키메라 항체는 대상에 투여되었을 때 감소된 면역원성 및 증가된 안정성을 나타낸다. 키메라 항체를 작제하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예, Leung et al., 1994, Hybridoma 13:469).

[0054] 키메라 단일클론 항체는 마우스 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 가변영역의 마우스 CDR을 인간 항체의 해당 가변 도메인으로 이동시킴으로써 인간화될 수 있다. 키메라 단일클론 항체에서 마우스 골격 영역(FR)은 또한 인간 FR 서열로 치환된다. 인간화된 단일클론의 안정성 및 항원 특이성을 보존하기 위해, 하나 이상의 인간 FR 잔기가 마우스의 상대 잔기에 의해 치환될 수 있다. 인간화된 단일클론 항체는 대상의 치료 처치를 위해 사용될 수 있다. 표적에 대한 인간화된 항체의 친화도는 또한 CDR 서열의 선별적인 변형에 의해 증가될 수 있다 (W00029584A1). 인간화된 단일클론 항체의 생산을 위한 기술은 당업계에 잘 알려져 있다(참조, 예, Jones et al., 1986, Nature, 321:522; Riechmann et al., Nature, 1988, 332:323; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534; Carter et al., 1992, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:4285; Sandhu, Crit. Rev. Biotech., 1992, 12:437; Tempest et al., 1991, Biotechnology 9:266; Singer et al., J. Immunol., 1993, 150:2844).

[0055] 다른 구현에는 비-인간 영장류 항체에 관한 것일 수 있다. 개코원숭이(baboon)에서 치료적으로 유용한 항체를 만들기 위한 일반적인 기술은 예를 들어, Goldenberg et al., WO 91/11465 (1991) 및 Losman et al., Int. J. Cancer 46: 310 (1990)에서 발견될 수 있다.

[0056] 인간 항체

[0057] 조합인 접근방법 또는 인간 면역글로불린 유전자좌로 형질변형된 형질전환 동물 중 어느 하나를 사용하여 완전한 인간 항체를 생산하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예, Mancini et al., 2004, New Microbiol. 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, Comb. Chem. High Throughput Screen. 8:117-26; Brekke and Loset,

2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50; 각각은 본 명세서에 참조로 포함됨). 그러한 완전한 인간 항체는 키메라 또는 인간화된 항체보다 훨씬 더 적은 부작용을 나타내고, 필수적으로 내재적인 인간 항체로서 생체 내(in vivo)에서 작용할 것으로 기대된다.

[0058] 하나의 대안에서, 파지 디스플레이 기술은 인간 항체를 생성하는데 사용될 수 있다(예, Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40, 본 명세서에 참조로 포함됨). 인간 항체는 정상적인 인간 또는 암과 같은 구체적인 질병 상태를 나타내는 인간으로부터 생성될 수 있다(Dantas-Barbosa et al., 2005). 환자로부터 인간 항체를 작제하는 잇점은 순환하는 항체 목록이 질병-관련 항원에 대한 항체쪽으로 편향되어 있을 수 있다는 점이다.

[0059] 본 방법론의 하나의 비-제한 실시예에서 Dantas-Barbosa et al. (2005)은 뼈육종 환자로부터 인간 Fab 항체 절편의 파지 디스플레이 라이브러리를 작제하였다. 일반적으로, 전체 RNA는 순환하는 혈액 림프구로부터 얻어졌다(*Id.*). 재조합 Fab는 항체 목록의 μ , γ 및 κ 채 항체 목록으로부터 클론되어 파지 디스플레이 라이브러리로 삽입되었다(*Id.*). RNA는 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 서열에 대한 특이적인 프라이머를 사용하여 cDNA로 전환되고 Fab cDNA 라이브러리를 만들기 위해 사용되었다(Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97, 본 명세서에 참조로 포함됨). 라이브러리 작제는 Andris-Widhopf 등의 문헌(2000, In: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbas et al. (eds), 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1 내지 9.22, 본 명세서에 참고문헌으로 삽입되어 있음)에 따라 수행되었다. 최종 Fab 절편은 제한효소로 절단되어 박테리오파지 계통으로 삽입되어 파지 디스플레이 라이브러리를 만들었다. 그러한 라이브러리는 당업계에 알려진대로 표준 파지 디스플레이 방법에 의해 스크리닝될 수 있다. 숙련자는 이 기술이 단지 예시일 뿐이고 파지 디스플레이에 의해 인간 항체 또는 항체 절편을 만들고 스크리닝하기 위한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0060] 또 다른 대안에서, 인간 항체를 생산하도록 유전적으로 조작된 형질전환 동물이 표준 면역화 프로토콜을 사용하여 필수적으로 임의의 면역원성 표적에 대한 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 시스템의 비-제한적 예는 Abgenix(Fremont, CA)사의 XenoMouse[®](예, Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, 본 명세서에 참조로 포함됨)이다. XenoMouse[®] 및 유사한 동물에서, 마우스 항체 유전자는 불활성화되고 기능적인 인간 항체 유전자로 치환되며, 나머지 마우스 면역 시스템은 온전한 채로 남아있다.

[0061] XenoMouse[®]는 보조 유전자 및 조절 서열과 함께 대다수의 가변 영역 서열을 포함하는 인간 IgH 및 Igk 유전자 좌의 일부를 포함하는 생식계열-매치된 YAC(yeast artificial chromosomes)으로 형질변환되었다. 인간 가변 영역 목록은 B 세포를 생산하는 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있으며, 이는 공지된 기술에 의해 하이브리도마 내로 가공될 수 있다. 표적 항원으로 면역화된 XenoMouse[®]은 정상 면역 반응에 의해 인간 항체를 생산할 것이고, 이는 상기 논의된 표준 기술에 의해 수확 및/또는 생산될 수 있다. 다양한 종의 XenoMouse[®]가 이용가능하고 이들의 각각은 항체의 서로 다른 클래스를 생산할 수 있다. 그러한 인간 항체는 화학적 가교-결합 또는 다른 공지된 방법론에 의해 다른 분자와 커플링 될 수 있다. 형질전환적으로 생산된 인간 항체는 정상 인간 항체의 약동학적(pharmacokinetic) 특성을 가지면서 치료 잠재력을 가지고 있는 것으로 나타났다(Green et al., 1999). 숙련자는 청구된 조성물 및 방법이 XenoMouse[®]의 사용에 제한되지 않고 인간 항체를 생산하기 위해 유전적으로 조작된 임의의 형질전환 동물을 사용할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 사이클로헥시미드로 처리되거나(+CHX) 처리되지 않은(-CHX) Sp2/0 및 Sp-E26 세포의 시각적 이미지를 나타낸다.

도 2는 CHX 처리에 더 저항성이 있는 HPV E6/E7 형질도입된 세포를 스크리닝한 결과를 나타낸다. 총 55 개 클론이 스크리닝되었다; 첫번째 실험에서, 31 개 클론이 스크리닝되었다(상위 패널); 두번째 실험에서, 24 개 클론이 스크리닝 되었다(하위 패널). 각 클론의 건강한 세포를 2 개의 동일한 부분으로 나누었다. 하나는 2 시간 동안 CHX로 처리하였고 다른 하나는 처리되지 않은 채 남겨놓았다. 그리고나서 이 두 가지 배양시 살아있는 세포를 MTT 분석으로 측정하고 처리(CHX⁺) 대 비처리(CHX⁻)된 살아있는 세포군의 비를 플롯팅하였다. 상위 패널에 나타난 바와 같이, CHX 처리는 Sp-E26 세포에서는 생존율이 단지 6% 감소한 반면 Sp2/0 세포에서는 30% 감소하는 결과를 초래하였다. 스크리닝된 31 개 클론 중 7 개(*로 표시된)는 Sp2/0 보다 상당히 더 좋게 수행하였

으나(생존율 <20% 감소) Sp-E26 만큼은 아니었다. 두번째 실험에서 스크리닝된 24 개 클론에서는(하위 패널), CHX 처리가 Sp2/0 세포에서 생존율이 약 50 감소하고 Sp-E26에서 생존율이 <20% 감소하는 결과를 초래하였다. 스크리닝된 24 개 클론 중 10 개(* 또는 **로 표시된)는 Sp2/0 보다 상당히 더 좋게(<30% 감소) 수행하였고 그들 중 6 개(**로 표시된)는 Sp-E26(<20%)과 같거나 더 좋았다. E28 및 E36은 Sp2/0 보다 더 좋게 수행하는 2 개의 추가의 대조 클론이지만 Sp-E26 만큼은 아니었다.

도 3은 구아바 넥신 V 분석의 닷 플롯을 나타낸다. 초기 아포토시스 세포(넥신 V-양성 및 7-AAD-음성)의 퍼센트는 오른쪽 하부에 표시되었다.

도 4는 CHX로 처리된 Sp2/0에서의 DNA 분절화를 나타낸다. 반대로, Sp-E26 세포는 처리에 저항성이 있다.

도 5는 T-플라스크에서 Sp2/0 및 Sp-E26의 성장 프로파일을 나타낸다. 건강한 세포(>95% 생존율)를 200,000/ml 초기 세포 밀도로 T-플라스크에 접종하였다. 살아있는 세포 및 죽은 세포를 구아바 비아카운트 시약(Guava Technologies, Inc) 및 PCA 인스트루멘테이션(Guava Technologies, Inc)를 사용하여 매일 계수하였다. NH_4^+ 및 젖산의 축적을 모니터링하였다.

도 6은 3-L 바이오리액터에서 회분식 배양용으로 측정된대로 Sp2/0 및 Sp-E26의 성장 프로파일을 비교한 것이다. 건강한 세포(>95% 생존율)를 250,000/ml의 초기 세포 밀도로 바이오리액터에서 접종하였다. 세포는 트립판 블루 및 현미경으로 매일 계수하였다.

도 7은 Bcl-2-EEE 발현용 클론의 스크리닝을 위하여 Bcl-2(100) 항체(Santa Cruz Biotech.)로 염색되고 증진된 화학발광(chemiluminescence)으로 현상된 대표적인 면역블롯을 나타낸다.

도 8은 구아바 익스프레스를 사용한 유세포 분석 결과의 그래프를 나타낸다. 피코에리스린(phycoerythrin)-접합된 항-Bcl-2 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 염색하기 전에 세포를 고정하고 투과시켰다. 몇가지 서브-클론이 비교되어 있다.

도 9는 구아바 익스프레스를 사용한 유세포 분석 결과의 그래프를 나타낸다. 피코에리스린-접합된 항-Bcl-2 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 염색하기 전에 세포를 고정하고 투과시켰다. Sp2/0, Raji 및 Daudi 세포를 Bcl-2-EEE 클론과 비교하였다.

도 10은 665.B4.1C1, Sp2/0, Raji, Daudi, Sp-EEE(87-29 클론) 및 Sp-EEE(7-16 클론) 세포 용해물의 면역블롯 분석 결과를 나타낸다. (A) 인간 Bcl-2 특이적인 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 염색된 블롯. (B) 마우스 및 인간 Bcl-2를 인식하는 항-Bcl-2 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 염색된 블롯.

도 11은 10% 우태아 혈청이 첨가된 배지에서 Sp2/0 세포에 비교하여 Sp-EEE 클론의 성장 커브(A) 및 생존율(B)을 나타낸다.

도 12는 1% 우태아 혈청이 첨가된 배지에서 Sp2/0 세포에 비교하여 Sp-EEE 클론의 성장 커브(A) 및 생존율(B)을 나타낸다.

도 13은 무혈청 배지에서 자란 Sp2/0 세포에 비교하여 Sp-EEE 클론의 성장 커브(A) 및 생존율(B)을 나타낸다.

도 14는 Sp-EEE(87-29 클론) 세포에 대한 메토폭세이트 킬 커브(kill curve)를 나타낸다.

도 15는 1mg/ml 제오신의 존재 또는 부재에서 자란 Sp-EEE 클론과 비교하여 구아바 익스프레스를 사용한 유세포 분석 결과의 그래프를 나타낸다.

도 16은 인간화된 항체 서열 및 SV40 프로모터 및 증폭자 서열을 갖는 665.2B9 클론을 얻기 위해 Sp2/0 세포를 형질전환하기 위해 사용된 pdHL2 벡터의 지도를 나타낸다.

도 17은 클론 665.2B9의 형질전환을 위해 사용된 삽입된 Bcl-2 유전자를 갖는 DNA 플라스미드 지도를 나타낸다.

도 18 및 도 19는 Bcl-2 형질전환된 클론 665.2B9#4, Bcl-2 음성 클론 및 형질전환되지 않은 대조군의 성장 프로파일을 나타낸다. 건강한 세포(>95% 생존율)를 400,000/ml 초기 세포 밀도로 24-웰 플레이트에 접종하였다. 살아있는 세포 및 죽은 세포를 구아바 비아카운트 및 PCA 인스트루멘테이션을 사용하여 매일 계수하였다.

도 20 및 도 21은 서로 다른 MTX 농도의 Bcl-2 형질전환된 클론 665.25B#4 및 Bcl-2 음성 클론의 성장 프로파일을 나타낸다. 건강한 세포(>95% 생존율)를 100,000/ml 초기 세포 밀도로 T-플라스크에 접종하였다. 살아있는 세포 및 죽은 세포를 구아바 비아카운트 시약 및 PCA 인스트루멘테이션을 사용하여 매일 계수하였다.

도 22는 MTX 농도 증가에 따라 클론 665.2B9#4 및 클론 #13에 의해 발현된 인간 Bcl-2 레벨을 웨스턴 블롯에 의해 나타낸다.

도 23 및 도 24는 스파이킹(spiking) L-글루타민 및 글루코스의 존재 또는 부재시에 0.6 및 1 .mu.M의 MTX에서 배양된 클론 665.2B9#4 및 0.3 .mu.M MTX에서 배양된 Bcl-2 음성 클론 #13의 세포 생존율 및 살아있는 세포 밀도의 프로파일을 각각 나타낸다. 건강한 세포(>95% 생존율)를 200,000/ml 초기 세포 밀도로 물러 병에 접종하였다. 2 및 4일(화살표로 표시)에 글루코스 및 L-글루타민을 함유하는 영양 보충용액을 "스파이크(spiked)" 배양액에 첨가하였다. 살아있는 세포 및 죽은 세포를 구아바 비아카운트 시약 및 PCA 인스트루멘테이션을 사용하여 매일 계수하였다.

도 25는 적응된 Sp/EEE 서브-클론의 무혈청 배지에서의 배양 5일에 걸쳐 생존율을 나타낸 것이다.

도 26은 무혈청 Sp/EEE 서브-클론의 살아있는 세포 밀도를 배양 5일에 걸쳐 예시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 실시예 1. HPV-16 E6 및 E7 유전자의 안정된 발현에 의한 아포토시스-저항성 세포 클론의 생성

[0064] CHX 처리에 저항성이 있는 세포 클론의 선별

[0065] Sp2/0 세포는 HPV-16 E6 및 E7 유전자 발현 카세트를 MOI(감염 배수) 10:1로 포함하는 LXSX 레트로바이러스 벡터로 형질도입하였다. 24시간 동안 회복한 후에, 상기 감염된 세포는 G418(1000 µg/ml)에서 10일 동안 선별하였다. G418-저항성 세포는 한계 희석(0.5 세포/웰)에 의해 96-웰에서 클로닝하였다. 잠재적인 아포토시스-유도제인 사이클로헥시미드(CHX) 처리에 내성을 나타내는 안정한 감염물을 스크리닝하였다. 간단히, 건강한 세포(생존율 > 95%, 도 1C 및 D)를 CHX 25 µg/ml를 함유하는 배지에서 배양하였고 세포 형태를 현미경으로 검사하였다. 모 Sp2/0 세포의 50% 이상이 배양 2 내지 3 시간 후에 형태 변화를 겪고 절편화된 반면에(도 1A), 몇몇 E6/E7 형질전환된 클론은 형태 변화 정도가 덜한 것으로 나타났는데 이는 아포토시스 저항성을 나타낸다. Sp-E26으로 명명된 가장 좋은 클론은 처리 4 시간째에도 분명한 형태변화를 나타내지 않았다(도 1B).

[0066] 장황한 시각 검사를 피하기 위해, 살아있는 세포 집단에서의 변화를 평가하기 위해 MTT 분석을 사용하였다. 건강한 세포를 2-3 시간 동안 정상 배양 조건하에서 CHX와 함께 또는 없이 배양한 후에, MTT 염료를 웰에 첨가하였다. 2 시간 동안 추가로 배양한 후에, SDS 및 HCl을 포함하는 세포 용해 완충용액을 첨가함으로써 세포를 용해하였다. 플레이트는 37 °C에서 밤새 배양하였고 OD 판독은 ELISA 플레이트 리더를 사용하여 590 nm 에서 수행하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 살아있는 세포 집단은 Sp2/0 세포를 CHX로 처리하였을 때 상당히 감소하였다. 이에 비해, 동일한 처리 조건(CHX의 농도 및 시간 길이) 하에서, Sp-E26 세포는 CHX 처리에 대해 더 내성이 있었다. 이 방법으로, 많은 수의 클론을 스크리닝하고 추가 분석을 위해 선별하였다(도 2).

[0067] Sp-E26의 항-아포토시스 특성

[0068] Sp-E26 및 모 Sp2/0 세포에서 CHX-유도된 아포토시스를 아넥신 V 염색 및 DNA 절편화 분석에 의해 평가하였다. CHX 25 µg/ml를 함유하는 배지에서 배양한 후에 세포를 수확하여 구아바 넥신 시약(아넥신 V 염색과 등가)으로 염색하고 구아바 퍼스널 세포 분석 시스템(Guava Technologies, Inc.)에서 분석하였다. 도 3은 약 1.5 시간 동안 CHX 처리에 노출되었을 때 Sp2/0 세포의 30% 이상이 아넥신 V 양성인 되어 아포토시스를 나타낸 반면에 Sp-E26은 건강하게 남아있어 초기 아포토시스 세포가 증가되어 있지 않음을 나타낸다.

[0069] CHX에 의한 아포토시스의 유도는 아포토시스의 표지인 세포내 올리고뉴클레오타이드 DNA 절편이 형성되는 것을 분석함으로써 밝힐 수 있다. CHX-처리되고 처리되지 않은 Sp-E26 및 Sp2/0 세포로부터 세포의 DNA를 추출하였고 DNA 래더링 분석을 수행하였다. CHX로 처리된 Sp2/0 세포에서, 광범위한 DNA 절편화가 검출되었다(도 4). 반대로, 동일한 처리 조건 하에서, Sp-E26의 게놈 DNA는 여전히 온전하였고 DNA 절편화의 양상을 나타내지 않았다(도 4).

[0070] Sp-E26 세포에서 HPV E6 및 E7의 존재

[0071] E6 및 E7 유전자가 Sp-E26 세포의 게놈에서 안정하게 존재하는지를 확인하기 위해서, E6 및 E7 유전자에 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 디자인하고 주형으로 Sp-E26으로부터 추출한 게놈 DNA를 가지고 PCR 반응에서 사용하여 약 700 bp DNA 절편을 얻었다. 상기 PCR 산물을 클로닝하였고, DNA 시퀀싱에 의해 E6 및 E7 유전자임을 확인하였다. E6 및 E7 유전자는 모 Sp2/0 세포에서는 검출되지 않았다.

- [0072] *Sp-E26의 개선된 성장 특성*
- [0073] Sp-E26의 성장 특성을 T-플라스크(도 5) 및 3L-배치 바이오리액터(도 6)에서 평가하였다. Sp-E26은 회분식 배양에서 모 Sp2/0 세포에 비해 개선된 성장 특성을 나타내어 더 높은 최대 세포 밀도 및 더 긴 생존 시간을 달성하였다.
- [0074] **실시예 2. HPV16 E7 유전자의 안정한 과발현에 의한 아포토시스-저항성 세포 클론의 생성**
- [0075] 클론 Sp-E26의 게놈으로 삽입된 다-시스트론성(poly cistronic) HPV16 E6 및 E7 유전자의 구조를 프라이머쌍 E6-N8⁺(ATGTTTCAGGACCCACAGAGCGA; 서열번호: 8) 및 E7-C8⁻(TTATGGTTTCTGAGA ACAGATGGG; 서열번호: 9)을 사용하여 PCR 및 DNA 시퀀싱에 의해 분석하였다. 프라이머 E6-N8⁺ 및 E7-C8⁻의 서열은 각각 N-말단 8 개 아미노산 잔기에 대한 코딩 서열 및 E7의 C-말단 8 개 코돈에 대한 상보적인 서열과 매치되기 때문에, 전체-길이 E6 및 E7의 증폭물(amplicon)은 약 850 bp일 것으로 기대된다. 그러나 E6-N8⁺ 및 E7-C8⁻을 이용하여 Sp-E26 세포로부터 얻은 게놈을 증폭하면 단지 약 700 bp의 PCR 절편이 얻어졌다. 상기 700 bp PCR 산물의 DNA 시퀀싱 결과, E6 유전자로부터 182 폴리-뉴클레오티드가 결실된 것으로 나타났다. 결함있는 E6 유전자는 스플라이싱의 결과일 수 있으며, N-말단 43 개 아미노산 잔기를 갖는 잘린 E6 펩티드를 암호화하였다. E6으로 인한 주요 생리학적 활성이 p53 발현을 하향-조절하는 능력임을 고려할 때, Sp-E26에서 p53 발현 레벨이 Sp2/0에서의 것보다 더 안정하다는 것이 발견되었기 때문에 잘린 E6 단백질은 아마도 충분히 기능적이지 않을 것이다.
- [0076] 그러므로, HPV-16 E7 유전자 단독으로 항-아포토시스 효과를 갖고 Sp2/0 세포의 성장 특성을 개선시키기에 충분한지 평가하기 위해서, HPV-16 E7로 Sp2/0 세포의 형질전환을 다음과 같이 수행하였다;
- [0077] (i) E7을 암호화하는 DNA 서열은 RT-PCR에 의해 Sp-E26 세포로부터 클로닝한다. 포유류 발현 벡터인 pRc/CMV(Invitrogen)내로 유전자의 라이게이션을 용이하게 하기 위해 적당한 제한 부위를 도입한다. E7pRc로 명명된 벡터 내의 바이러스 유전자의 전사는 CMV 프로모터-증폭자 서열로부터 지시된다. 상기 벡터는 또한 네오마이신 저항성을 부여하는 유전자를 함유하고, 이는 SP40 프로모터로부터 전사된다.
- [0078] (ii) Sp2/0 세포는 HPV-16 E7 유전자의 발현 카세트를 함유하는 발현 벡터로 형질전환한다. 간단히, E7pRc 5 μ g은 ScaI 에 의해 선형화되고 전기천공법에 의해 세포로 형질전환한다.
- [0079] (iii) 24 시간 동안 회복한 후에, 형질전환된 세포는 10일 동안 G418(1000 μ g/ml)에서 선별한다.
- [0080] (iv) 이후, G418-저항성 세포는 그리고나서 한계 희석(0.5 세포/웰)에 의해 세포 배양 플레이트에서 클로닝한다. 안정한 형질전환체는 잠재적인 아포토시스-유도제인 사이클로헥시미드(CHX)에 의한 처리에 대한 내성으로 선별하고 스크리닝한다.
- [0081] (v) 건강한 세포(생존율 > 95%)는 CHX 25 μ g/ml를 함유하는 배지에서 또는 정상 배양 조건하에서 3-4 시간 동안 CHX의 부재시에 배양하고, 이어서 MTT 염료를 웰에 첨가한다. 2 시간 동안 추가로 배양한 후에, 세포는 SDS 및 HCl을 함유하는 세포 용해 완충용액을 첨가함으로써 용해시킨다. 플레이트는 37 °C에서 밤새 배양하고 OD 판독은 ELISA 플레이트 리더를 사용하여 590 nm에서 수행한다. CHX 처리에 저항성을 나타내는 세포 클론을 선별하고 추가 분석을 위해 증폭한다.
- [0082] (vi) E7-형질전환된 세포의 항-아포토시스 특성은 아넥신 V 염색 및 DNA 절편화 분석에 의해 평가한다. 아넥신 V 분석에서, CHX 25 μ g/ml를 함유하는 배지에서 배양한 후에, 세포를 회수하고 구아바 넥신 시약(아넥신 V 염색과 등가)으로 염색하고 구아바 퍼스널 세포 분석 시스템(Guava Technologies, Inc.)에서 분석한다. DNA 절편화 분석에서, 세포의 DNA는 CHX-처리되고 비처리된 E7-형질전환체 및 Sp2/0 세포로부터 추출하고 아가로스 젤 영동으로 분석한다.
- [0083] (vii) 바이러스 E7-형질전환체에서 종양유전자의 발현은 서던 블롯(게놈 레벨), 노던 블롯(mRNA 레벨) 및 면역블롯(단백질 레벨) 분석에 의해 평가한다. 아포토시스 공정과 관련되고 E7 단백질에 의해 영향을 받는 세포내 단백질의 발현은 면역블롯팅 분석에 의해 검사한다.
- [0084] (viii) 선별된 E7-형질전환체의 성장 특성은 T-플라스크 및 3L-배치 바이오리액터에서 평가한다. 형질전환체는 개선된 성장 특성, 즉 더 높은 최대 세포 밀도 및 더 긴 생존 시간을 달성하여 회분식 배양에서 모 Sp2/0 세포에 대비해 더 좋은 숙주 세포로 여겨진다.
- [0085] **실시예 3. Sp-E26에서 hLL2 IgG의 고-레벨 발현**

[0086] 본 실시예에서, Sp-E26은 NHL 및 자가면역 질환 환자를 치료하기 위해 개발된 인간화된 항-CD22 Ab인 hLL2를 생산하는 세포 클론을 생성하는 숙주로 사용된다. hLL2-생산 클론인 87-2-C9는 이전에 Sp2/0 세포를 숙주로 사용하여 생성되었는데(Losman et al., Cancer 80, 2660-2666, 1997), 이 경우에 하나의 양성 클론(약 2.5×10^{-7} 의 빈도)이 형질전환 후에 동정되었고, 증폭 전에, T-플라스크에서 조건화된 최종 배양 배지에서 항체의 농도로서 정의되는 상기 hLL2-생산 클론의 최대 생산성은 1.4 mg/L이었다. 동일한 hLL2pdHL2 벡터 및 Losman et al.(Cancer 80, 2660-2666, 1997)에 의해 기술된 것과 유사한 단계를 사용하여 Sp-E26 세포를 형질전환시킨 결과 200 개 이상의 안정한 hLL2-생산 클론($>10^{-4}$ 의 빈도)을 얻었다. 무작위로 선별된 12 개 클론의 P_{max} 는 평가하였으며, 13과 170 mg/L 사이, 평균 50 mg/L인 것으로 나타났다. 이러한 클론의 생산성은 MTX를 이용한 유전자 증폭에 의해 추가로 증가될 수 있다. 본 실시예는 재조합 단백질을 생산하는 세포 클론의 개발을 위한 숙주로써 그의 모 Sp2/0 세포에 비해 Sp-E26를 사용하는 것의 잇점을 입증하였다.

[0087] **실시예 4. HPV16 E6 및 E7 유전자의 안정한 발현에 의한 항체-생산 세포주의 개선**

[0088] 607-3u-8 세포는 본래 인간화된 단일클론 항체를 생산하기 위한 형질전환에 의해 Sp2/0으로부터 생성되었다. 클론은 150 mg/L까지 최대(항체) 생산성을 증진시키기 위해 유전자 증폭(MTX를 이용함) 및 서브클로닝에 의해 개발되었는데, 이는 배양 배지에서 이후의 혈청 보충을 낮추어 약 100 mg/L까지 감소시켰다. 무혈청 조건하에서 더 높은 항체 생산성을 얻기 위하여, HPV-16의 E6/E7 유전자를 607-3u-8으로 도입하고 항체-생산에 대한 E6/E7의 효과를 다음과 같이 평가하였다.

[0089] 607-3u-8 세포는 10% FBS와 3 μ M MTX로 보충된 HSFM에서 유지하였고 10:1의 MOI로 HPV-16 E6 및 E7의 발현 카세트를 포함하는 LXSX 레트로바이러스 벡터로 형질도입하였다. 24 시간 동안 회복한 후에, 안정하게 형질전환된 세포를 10일 동안 G418(400 μ g/ml)에서 선별하였다. G418-저항성 세포는 한계 희석(0.5 세포/웰)에 의해 96-웰 배양 플레이트에서 서브클로닝하였다. 평가를 위해 607E1C12로 명명된 살아있는 클론을 얻었다. E6/E7 형질전환되지 않은 607-3u-8 중에서 607-3u-8-7G7 및 607-3u-8-2D10로 명명된 2 개의 서브클론 또한 선별하였다. 이들 3 개의 클론의 P_{max} 를 측정하였고 상당한 차이는 없었다(표 1).

[0090] 이들 결과는 세포로 E6/E7 유전자로 도입하는 것이 항체를 생산하는 세포의 능력을 변경하지 않는다는 것을 제시한다. 다음, 607E1C12, 607-3u-8-7G7 및 607-3u-8-2D10을 무혈청 배지에서 성장시키기 위해 적응시키고 이들 클론의 생산성을 측정하였다. 모든 클론은 무혈청 배지에서 잘 성장하였다. 클론 607E1C12의 최종 항체 생산성은 150 mg/L로 유지된 반면, E6/E7 없는 2 개의 클론은 상당히 감소하였다. 추가로, 607E1C12의 생산성은 동결(냉동보관용) 및 해동 주기 후에도 안정하였다(표 1).

표 1

항체-생산 클론의 생산성		
클론	P_{max} (mg/L) ^a	
	혈청 첨가	무혈청
607-3u-8-7G7	127 \pm 16 (3) ^b	74 \pm 10 (4)
607-3u-8-2D10	140 \pm 4 (3)	35 \pm 2 (2)
607E1C12	154 (1)	142 \pm 13 (6)
607E1C12 (냉동) ^c		145 \pm 17 (5)

[0091] ^a 최종 배양 상층액으로부터 IgG의 단백질 정제에 의해 측정됨.

[0093] ^b 괄호 안의 숫자는 샘플 크기를 표시한다.

[0094] ^c 세포는 냉동보관을 위해 동결되었다.

[0095] **실시예 5. 구조적으로 돌연변이 Bcl-2를 발현하는 유전적으로 변형된 Sp2/0 세포주의 생성 및 동정**

[0096] 3 개의 점 돌연변이(T69E, S70E 및 S87E)를 갖는 돌연변이 Bcl-2가 야생형 또는 단일 점 돌연변이에 비해 상당히 많은 항-아포토시스 활성을 나타낸다는 증거가 제안되었다(Deng et al., PNAS 101: 153-158, 2004). 그러므로 이 삼중 돌연변이용 발현벡터(Bcl-2-EEE로 명명됨)를 작제하여 특히 바이오파브릭에서 생존 및 생산성을 증가시키기 위해 Sp2/0 세포를 형질전환시키기 위해 사용하였다. 클론은 분리하여 Bcl-2-EEE 발현 레벨, 성장

및 아포토시스 특성을 평가하였다. Bcl-2-EEE에 대한 핵산 서열은 서열번호. 3에 암호화되어 있다; Bcl-2-EEE 단백질에 대한 해당 아미노산 서열은 서열번호. 4에 암호화되어 있다.

- [0097] 116 bp의 합성 DNA 이중체(duplex)는 인간 Bcl-2의 아미노산 잔기 64-101에 대한 코딩 서열에 기초하여 디자인 하였다. 잔기 69, 70 및 87에 대한 코돈은 모두 글루타르산(E)에 대한 것으로 변경하였다. 전체 서열은 비정상적으로 GC가 풍부했고 수많은 폴리 G 및 폴리 C 런(run)을 가졌다. G 및 C를 바꾸고 전체 GC 함량을 감소시키기 위해 몇 가지 코돈에 보존적 변화(conservative change)를 만들었다.
- [0098] 2 개의 80-머(mer) 올리고뉴클레오타이드는 합성였으며, 이들을 조합하면 116 bp 서열에 이르고 이들의 3' 말단에 서 22 bp가 오버랩한다(서열번호. 5 및 6 참조). 올리고뉴클레오타이드는 어닐링되고, Taq DNA 중합효소로 프라이머 연장시켜 이중체 DNA가 생성된다. 이중체는 PCR 프라이머인 Bcl-2-EEE PCR 좌 (TATATGGACCCGGTCGCCAGAGAAG; 서열번호: 10), 및 Bcl-2-EEE PCR 우(TTAATCGCCGGCCTGGCGGAGGGTC; 서열번호: 11)를 사용하여 증폭하였다.
- [0099] 이후, 상기 126 bp 증폭자는 pGemT PCR 클로닝 벡터로 클로닝하였다. 상기 Bcl-2-EEE-pGemT 컨스트럭트는 TthI 및 NgoMI 제한효소로 절단하고, 상기 105 bp 절편을 젤 분리하고, TthI 및 NgoMI로 절단된 hBcl-2-puc19 벡터(ATCC 79804)로 라이게이션하여 hBcl-2(EEE)-puc19를 생성하였다. 이 컨스트럭트의 서열을 확인하였다.
- [0100] 948 bp의 삽입 절편을 EcoRI으로 hBcl-2(EEE)-puc19로부터 잘라낸 후, EcoRI으로 잘라내고 알칼라인 포스포타제 로 처리한 pZeoSV2+ 벡터로 라이게이션하였다. 결과 컨스트럭트는 hBcl-2(EEE)-pZeoSV2+이다.
- [0101] 이후, Sp2/0 세포(5.6×10^6)는 Sp2/0 세포에 대한 프로토콜을 따라 hBcl-2(EEE)-pZeoSV2+ 60 μ g로 전기천공법에 의해 형질전환하였다. 세포는 6 개의 96-웰 플레이트로 분주한 후, 선별없이 48 시간 동안 배양하였다. 2 일 후에, 제오신 800 μ g/ml를 배지에 첨가하였다.
- [0102] 40 웰로부터 세포는 24-웰 플레이트로 증폭하고 항-hBcl-2 및 항-베타 액틴으로 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 40 개 중에 5 개를 제외하고 모두는 Bcl-2-EEE 발현의 중간 내지 높은 레벨을 나타내었다. 4 개의 젤 중 하나에 대한 결과는 도 7에 나타내었다. 야생형 Bcl-2로 미리 형질전환된 Sp2/0 유도된 hMN 14 세포 주(Clone 664.B4)는 양성 대조군(+)으로 사용하였다. Deng et al.에 의해 입증된 바와 같이, Bcl-2-EEE는 SDS-PAGE에서 야생형 Bcl-2보다 약간 더 천천히 이동한다.
- [0103] 3 개의 강하게 양성인 웰(#7, #25 및 #87)을 선택하여 추가로 평가 및 서브-클로닝하였다. 한계 희석 플레이팅 결과 96-웰 플레이트당 20 개 미만의 양성 웰이 나타났는데, 이는 각각의 웰에서 상기 세포가 실제 클론될 가능성(>99%)이 매우 높다는 것을 나타낸다. 처음에, 3 개 본래의 웰 유래의 23 개 서브클론은 항-hBcl-2-PE를 사용하여 구아바 익스프레스에 의해 분석하였다(도 8). 그 결과, 본래의 웰이 혼합된 세포 클론을 포함한다는 것을 확인하였다. 웰 #7은 가장 강한 신호를 갖는 클론을 생성하였고 웰 #25는 가장 낮은 것을 생성하였다. 클론 7-12, 7-16, 87-2 및 87-10는 추가 분석을 위해 증폭하였다. 이어서, 몇몇 초기에 더 느리게 자라는 서브클론은 유사하게 분석하였고, 하나의 클론 87-29은 임의의 다른 클론보다 20% 더 높은 신호를 보여 추가 분석을 위해 증폭하였다.
- [0104] 2 개의 높게 발현하는 SP-EEE 클론(87-29 및 7-16)은 형질전환되지 않은 Sp2/0, Raji 및 Daudi 세포와 비교하였다(도 9). Sp-EEE 클론은 둘 다 아마도 정상 세포 레벨로 Bcl-2를 발현할 것이라고 알려져 있는 Raji 및 Daudi 세포보다 약 20 배 더 높게 발현하였다. Sp2/0 세포는 음성이었다. 이는 추가로 항-Bcl-2 면역블롯에 의해 명확하게 되었다(도 10). Bcl-2는 높은 단백질 로딩(50K 세포)으로도 엑스-선 필름의 긴 노출로도 Sp2/0 세포에서 인간 Bcl-2 특이적인 항체로 검출되지 않았다. 마우스, 래트 및 인간 Bcl-2를 인식하는 항-Bcl-2 MAb(C-2, Santa Cruz Biotech.)으로 면역블롯 분석한 결과, 높은 단백질 로딩(100K 세포) 및 엑스선 필름의 긴 노출로도 형질전환되지 않은 Sp2/0 세포에서는 어떠한 Bcl-2도 검출되지 않았다(도 10B). 만약 Sp2/0 세포에서 발현된 임의의 Bcl-2가 있다면 클론 87-29에서의 Bcl-2-EEE 보다 10^2 이상의 적은 레벨일 것이다.
- [0105] 성장 커브는 5 개의 Sp-EEE 서브클론 및 Sp2/0 세포에 대해 비교하였다. 3 개의 Sp-EEE 서브클론은 Sp2/0 세포에 대해 분명한 잇점을 나타내었다. 이들 3 개(7-12, 7-16 및 87-29)는 또한 Bcl-2-EEE를 가장 높은 레벨로 발현하였다. 7-12 및 7-16이 동일한 본래의 웰 유래이고 거의 동일한 특성(Bcl-2-EEE 레벨 및 성장 커브)을 가지고 있기 때문에, 그들은 동일한 초기 클론으로부터 유래되었을 가능성이 높다. 가장 좋은 2 개의 SP-EEE 서브클론 7-16 및 87-29은 추가 평가를 위해 사용하였다.
- [0106] 상기 클론들은 10%, 1% 또는 0% 혈청(감소 없이)으로 보충된 배지에 평판배양하고 세포 밀도 및 생존율을 모니터

터하였다. 10% 혈청에서 87-29는 높은 밀도로 자랐고 Sp2/0 세포에 비해 4일 이상 생존이 증가되었다(도 11). 1% 혈청에서, 모든 세포는 10% 혈청에서 달성된 밀도의 약 35-40%로 자랐고 Bcl-2-EEE 형질전환체는 Sp2/0에 대해 유사한 생존 잇점을 가졌다(도 12). 무혈청 배지로 직접 이동시켰을 때, 87-29 세포는 두배 더 높은 밀도로 자란 반면에 Sp2/0 세포는 단지 600K 세포/ml로 자랐다(도 13). 각각의 혈청 농도에서 87-29 세포는 Sp2/0 세포보다 4-6일 더 오래 살아남았다.

[0107] 메소트렉세이트(MTX) 민감성을 87-29에 대해 측정하였다(도 14). 상기 데이터는 0.04 μ M의 최소 MTX 농도가 MTX-저항성 클론의 초기 선별에 충분하다는 것을 제시한다. 그러므로, Sp2/0 세포에 사용되는 동일한 선별 및 증폭 프로토콜은 SP-EEE 세포에도 사용될 수 있다.

[0108] Bcl-2는 전-생존/항-아포토시스 단백질이다. 유연한 루프 도메인(flexible loop domain, FLD)이 없는 Bcl-2 결실 돌연변이가 아포토시스를 억제하는 증가된 능력을 갖는다는 것이 몇 개의 그룹에 의해 입증되었다(Figueroa et al., 2001, Biotechnology and Bioengineering, 73, 211-222; Chang et al., 1997, EMBO J., 16, 968-977). 보다 최근에, 인산화를 모방하도록 Bcl-2의 FLD에서 1 내지 3 개의 S/T 잔기를 글루탐산으로 돌연변이시키면 항-아포토시스 능력을 상당히 증가시킨다는 사실이 입증되었다(Deng et al. 2004, PNAS, 101, 153-158). 삼중 돌연변이(T69E, S70E 및 S87E)는 가장 현저한 생존 증진을 제공하였다. 여기서, 유사한 Bcl-2 삼중 돌연변이 컨스트럭트(Bcl-2-EEE)를 Sp2/0를 안정하게 형질전환하기 위해 사용하였다.

[0109] 모든 상기 실험은 Bcl-2-EEE의 발현이 Sp2/0 세포에서 아포토시스 비율을 감소시킨다는 것을 입증한다. 이 효과는 더 높은 발현 레벨을 갖는 클론이 더 낮은 레벨을 갖는 것들보다 더 오래 생존한다는 점에서 대체로 용량 의존적이다. 가장 우수한 클론인 87-29는 Sp2/0 세포에 비해 15-20% 더 높은 세포 밀도로 성장하고 추가로 4-6 일을 생존하였다.

[0110] 클론(87-29)에서 Bcl-2-EEE 레벨은 정상 Daudi 또는 Raji 세포보다 대략 20배 더 높다. Bcl-2 발현은 형질전환되지 않은 Sp2/0 세포에서 검출되지 않았다. 실시예 6에 기술된 바와 같이, hMN-14-발현 Sp2/0 세포는 야생형 Bcl-2의 발현을 위한 유사한 컨스트럭트로 형질전환되었고, 예외적인 성장 특성 및 증가된 생산성을 갖는 클론을 분리하였다. 이 클론(664.B4)이 추가로 MTX로 증폭될 때, Bcl-2 레벨은 상당히 증가하였다. 최종적으로, 증폭된(3 μ M MTX) 세포주는 서브-클로닝하였고 하나의 클론(664.B4.1C1)의 Bcl-2 레벨은 664.B4보다 2 배 더 높았다. 이 특정 서브클론은 더 우수한 생산성 및 성장 특성을 갖는다. 87-29에서 Bcl-2-EEE 레벨은 증폭된 664.B4.1C1에서의 Bcl-2 레벨보다 대략 두 배 더 높다. 87-29 세포의 성장속도는 Sp2/0 세포의 것에 비교할만하고, 추가로 하루 동안 분명히 계속 자라며, Sp2/0보다 15-20% 더 높은 최대 밀도에 도달한다. 유사한 특성이 E6/E7 발현 Sp-E26 세포주에 대해서도 발견되었다. 모 Sp2/0 세포에 비해 추가로 4-6일 생존하는 상기 Bcl-2-EEE 발현 87-29 클론은 단지 추가로 하루 더 생존하는 Sp-E26 클론보다 더 우수하다.

[0111] 87-29 클론으로 대표되는 Sp-EEE 세포주는 재조합 단백질을 위한 유전자를 포함하는 적합한 벡터로 형질전환할 때 재조합 단백질 발현용 아포토시스-내성 숙주로서 유용하다. 이 세포주가 유용하기 위해서는, 형질전환 및 증폭 후에 그리고 연장된 배양 동안 그 Bcl-2-EEE 발현 및 생존 잇점을 유지해야 한다. 안정하게 형질전환된 Bcl-2-EEE 유전자는 이후의 형질전환 동안 거의 잃어버리지 않을 것이므로, 생존 특성은 줄어들지 않을 것이다. MTX 증폭이 Bcl-2 단백질의 발현을 증가시킴으로써 생산하는 클론의 생존을 훨씬 개선시킬 수 있는 것이 가능하다. 실제로, 야생형 Bcl-2로 형질전환된 hMN-14 664.B4 세포주의 경우에는 그러하다. 증폭 및 서브-클로닝 후에 Bcl-2 레벨은 몇 배 증가했고 세포 생존이 상당히 개선되었다.

[0112] 최종 Sp/EEE 클론(#87-29)은 모 Sp2/0 세포에 비교할만한 성장율을 갖는다. 그러나 Sp/EEE 87-29 세포는 Sp2/0에 비해 추가로 하루 동안 계속 성장하고, 15-20% 더 큰 최대 밀도에 도달하며, 추가의 4-6일 생존을 나타낸다. 추가로, 상기 Sp/EEE 세포주는 Sp2/0 세포에 비해 혈청 결핍에 대해 상당히 더 내성이 있다.

[0113] **실시예 6. 인간 Bcl-2 유전자의 안정한 발현에 의한 정치 회분식 배양에서 항체-생산 세포 생존의 개선**

[0114] *Bcl-2-형질전환된 세포주의 생성*

[0115] 세포 클론 665.2B9은 본래 인간화된 단일클론 항-CEA 항체를 생산하기 위해 형질전환에 의해 Sp2/0으로부터 생성되었다(Qu et al., 공개되지 않은 결과). hMN14pdHL2로 명명된 벡터는 세포 클론 665.2B9를 얻기 위해 Sp2/0 세포를 형질전환시키기 위해 사용되었다. pdHL2 벡터는 먼저 Gillies et al.에 의해 기술되었고 메소트렉세이트 처리 이후의 선별 및 증폭이 가능하도록 하는 증폭가능한 쥐 dhfr 유전자를 가졌다(Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191 (1989)). 일반적으로, 상기 pdHL2 벡터는 2 개의 메탈로티오닌(metallothionine) 프로모터 및 IgH 증폭자에 의해 독립적으로 조절되는 IgG 중쇄 및 경쇄 둘 다의 발현을 제공

한다. hMN14pdHL2 벡터의 다이어그램은 도 16에 나타내었다. 서열번호. 1은 벡터의 서열을 나타낸다; 서열번호. 2는 증폭자 서열로 정의된 72 bp 서열을 나타낸다; 프로모터 서열은 hMN14pdHL2의 nt2908-2979에 해당한다.

[0116] Sp2/0 세포는 일반적으로 이 예에서 사용되는 hMN14pdHL2 벡터와 같은 선형화된 pdHL2 벡터로 전기천공법에 의해 형질전환될 수 있다. 선별은 0.05 내지 0.1 μ M MTX를 포함하는 배지로 세포를 배양함으로써 형질전환 48 시간 후에 개시될 수 있다. 삽입된 항체 서열의 증폭은 5 μ M까지 MTX 농도를 단계적으로 증가시킴으로써 달성된다.

[0117] 클론은 0.3 μ M까지 단계적으로 증가된 MTX로 유전자 증폭하였는데, 그 시점에서 항체의 최대 생산성(P_{max})은 약 100 mg/L까지 증가하였다. 세포 성장 특성을 개선시키기 위하여, 665.2B9 세포는 인간 Bcl-2 유전자를 함유하는 플라스미드 발현 벡터(도 17)로 전기천공법에 의해 형질전환하였다. Bcl-2 유전자는 ATCC (pB4, catalog #79804)로부터 구입한 pB4 플라스미드로부터 EcoRI 부위를 사용하여 절단하였고 동일한 제한효소를 사용하여 포유류 발현 벡터 pZeoSV(+)의 MCS로 삽입하였다. 제오신 저항성 유전자는 벡터의 일부이기 때문에, 형질전환된 세포는 50-300 μ g/ml 범위의 제오신을 함유하는 배지에 두었다. 안정한 클론은 300 mg/ml 제오신을 함유하는 배지로부터 선택하였고, 0.5 세포/100 μ L/웰의 밀도로 96-웰 플레이트로 평판배양에 의해 제오신 없는 배지에서 서브클로닝하였다. 제오신 없는 상기 배지는 그 후에 사용하였다.

[0118] 웰에서 클론의 형성은 현미경하에서 시각 관찰에 의해 확인하였다. 단지 1 클러스터의 세포를 갖는 웰로부터 세포는 증폭하였다. 각각의 96-웰 플레이트는 약 30 개 클론을 생산했고, 이로부터 14 개 클론은 무작위로 추가의 연구를 위해 선별하였다. 이들 클론의 성장 특성은 비아카운트 시약 및 구아바 PCA로 세포 계수 및 생존을 측정에 의해 평가하였다. 24-웰 플레이트에서 평가된 14 개의 클론으로부터(도 18, 19), 개선된 성장 특성(더 높은 세포 밀도 및 연장된 세포 생존)을 나타내는 하나의 Bcl-2-형질전환된 클론은 동정하고 665.2B9#4(또는 클론 #4)로 명명하였다. 모 665.2B9 클론과 비교하여, 클론 #4는 T-플라스크에서 더 높은 세포 밀도(약 1.7-배)로 성장했고 4-6일 더 오래 생존했으며, 더 나은 성장의 결과로서, 클론 #4의 P_{max} 는 ELISA 적정 및 단백질 A 컬럼 정제에 의해 측정된대로 약 170 mg/L까지 증가하였다.

[0119] 665.2B9#4에서 Bcl-2의 발현

[0120] 665.2B9#4의 개선된 성장 특성이 Bcl-2의 형질전환으로 인한 결과임을 확인하기 위해서, 인간 Bcl-2 단백질의 세포내 레벨을 구아바 익스프레스 시약 및 구아바 PCA 기기를 사용함으로써 측정하였다. 간단히, 1.5 ml 스핀-튜브에 놓인 4×10^5 세포를 1500 rpm에서 5 분 동안 원심분리하고, 1xPBS로 세번 세척하였다. 상층액은 주의깊게 통기하였다. Santa Cruz Biotechnology (SCB) 사의로부터 고정 용액(cat. # sc-3622, 10x, 60 μ L)을 15 분 동안 세포 펠렛에 첨가하고 얼음에서 배양하였다. 고정 용액은 4 $^{\circ}$ C에서 4x1 ml PBS로 제거하였고 각 시간 조합(time spinning)은 기술된대로이다.

[0121] 20 $^{\circ}$ C(SCB cat. # sc-3623)에서 투과 완충용액을 교반하에 한방울씩 첨가하고 이어서 15분 동안 얼음에서 배양하였다. 이후, 세포를 회전하고 0.5 ml FCM 세척 완충용액(SCB cat. # sc-3624)으로 두 번 세척하였다. 최종 세포 펠렛을 FCM 세척 완충용액 100 μ L에서 재현탁하고 PE에 결합된 항-Bcl-2 마우스 모노클론 항체(SCB로부터 얻음) 10 μ L로 Bcl-2 세포내의 단백질을 염색하였다. 배양은 1 시간 동안 어둠상태에서 상온에서 수행하였다. 이후에 FCM 세척 완충용액 0.5 ml로 두번 세척하였다. 최종 세포 펠렛은 0.4 ml FCM 세척 완충용액으로 재현탁하고 세포는 구아바 PC에서 분석하였다. 각 클론에 대한 형광 강도의 평균값(MFI)은 비-특이적인, PE와 연결된 아이소타입(isotype) 마우스 IgG1를 대조군 염색으로 하여 비교하였다. 표 2에 요약된 결과는 클론 665.2B9#4 이 모 세포주에 비해 Bcl-2 단백질을 더 높은 레벨로 발현한다는 것을 확인한다. 모 665.2B9과 같이 유사한 성장 프로필을 나타내는 제오신-저항성 클론(#13)은 Bcl-2 염색에 음성이었고 이는 Bcl-2 발현이 성장 개선에 필요하다라는 것을 확인한다.

표 2

구아바 익스프레스에 의해 측정된 Bcl-2의 세포내 레벨		
세포	생존율 ^a (%)	평균 FI(AU)
665.2B9	84	42
665.2B9#4	97	110
클론#13	92	14
비-특이적 항체 염색		12

[0122]

[0123] ^a건강한 세포가 사용되었음을 확인하기 위해 분석 전에 측정됨

[0124] ^bPE 결합된 아이소타입-매치된 마우스 IgG 항체로 염색된 665.2B9 세포

[0125] 구아바 익스프레스 분석으로 Bcl-2 레벨에 해당하는 형광 염색의 강도가 클론 665.2B9#4의 MTX 증폭과 함께 상승한다는 것을 발견하였는데, 이는 dhfr 유전자와 함께 Bcl-2가 공-증폭되었음을 제시한다. 증폭된 세포의 세포내 Bcl-2의 레벨을 비교하기 위하여, 항-인간 Bcl-2 항체를 사용하여 665.2B9#4(Bcl-2 양성) 및 클론 #13(Bcl-2 음성)의 세포 용해물에 대해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 밀도 평가 결과, 1.0 μ M MTX에서 성장하는 클론 665.2B9#4의 Bcl-2 신호가 0.6 μ M MTX에서 성장하는 세포보다 2 배 더 강하다는 것을 나타내었다. 클론 #13의 용해물에서는 Bcl-2 단백질이 존재하지 않았다(도 22).

[0126] 실시예 7. 배치 배양 조건하에서 클론 665.2B9#4의 개선된 항체-생산

[0127] 종말기 근처 세포 배양에서 영양분 소비를 모니터링함으로써 글루코스 및 L-글루타민이 소비되는 첫번째 성분이라는 것을 발견하였다. 실험은 이들 한계 영양분의 보충이 최종 항체 수율을 개선시키는지를 측정하기 위해 수행하였다. 두 가지 타입의 배양을 개시하였다; 스파이크 유가식-여기서 이들 한계 성분은 이들이 소비되자마자 보충하였다; 및 비유가식(unfed-batch)--영양분 보충 없음. MTX 0.6 및 1 μ M를 함유하는 배지에서 성장하는 Bcl-2-양성 클론 665.2B9#4 및 MTX 0.3 μ M에서 성장하는 Bcl-2-음성 클론을 테스트하였다. 도 23 및 24는 그들이 종말 단계에 도달할 때까지 양쪽 배양 타입 둘 다에서 세포 생존율 및 세포 밀도의 프로파일을 나타낸다. mg/L로 표시된 단백질 수율은 표 3에 나타내었다. 이 실험의 결과는 영양분 스파이킹은 전체 생산된 항체의 수율을 모든 배양에 대해 약 2 배 개선시킨다는 것을 제시한다.

표 3

배치 배양 조건하에서 항체 생산		
세포/MTX(μ M)	비유가식 ^a (ml)	스파이크 유가식 ^a (ml)
665.2B9#4/0.6	117	286
665.2B9#4/1.0	156 ^b	296
클론#13/0.3	74.1	165

[0128] ^a단백질 A 컬럼 정제에 의해 측정됨

[0129] ^b두 번의 정제의 평균

[0130] 실시예 8. 재조합 단백질을 저-레벨로 생산하는 세포주로 Bcl-2 유전자의 도입

[0131] 세포 클론 482.2C4A은 본래 IgG(항-CEA) 및 각각 IgG 중쇄의 C-말단에 공유결합되어 있는 2 개의 scFV(항-DTPA) 형태의 이중특이적 항체를 생산하기 위해 형질전환에 의해 Sp2/0으로부터 생성되었다(Leung et al., J. Nuc. Med. 41: 270P, 2000; Hayes et al., Proc. Am. Asso. Cancer. Res. 43: 969, 2002). 상기 클론은 유전자 증폭을 하였고, 약 20 ml의 최종 생산성을 가졌다. 성장 특성 및 최종적으로는 항체 생산성을 개선시키기 위하여, 482.2C4A 세포는 실시예 6에 기술된대로 전기천공법에 의해 인간 Bcl-2 유전자를 함유하는 플라스미드 발현 벡터로 형질전환하였다. 형질전환체는 3 주 후에 제오신 750 μ g/ml를 함유하는 배지에서 선별하였다.

[0132] 제오신-저항성 세포는 아포토시스-민감성 세포를 제거하기 위해 5 시간 동안 CHX 25 μ g/ml로 처리하였다. 처리된 세포는 CHX를 제거하기 위해 신선한 배양 배지로 두 번 세척하였고, 신선한 배양 배지에서 재현탁하였다. 24 시간 동안 회복한 후에, 살아있는 세포는 한계 희석(0.5 세포/웰)에 의해 96-웰 세포 배양 플레이트로 클로닝하였다. 클론은 2 주 내에 웰에서 생성되었고, 성장 프로파일 뿐 아니라 CHX-유도된 아포토시스에 저항성이 있는 항체 생산을 위해 스크리닝하였다. 모든 면에서 모 482.2C4A 보다 더 잘 수행한 클론들을 선별하였고, 추가로 특성분석하였다. 가장 좋은 클론은 스트레스 조건하에서 자랄 때 보다 튼튼하고, 노화-배양 조건 유도성 아포토시스에 저항성이 있으며, 모 482.2C4A 세포에 비교하여 더 높은 최대 항체 생산성(ca. 150% 또는 그 이상)을 가질 것으로 기대된다.

[0133] 실시예 9. 세포 성장 특성을 추가로 개선시키기 위한 Sp-E26으로의 Bcl-2 유전자의 도입

- [0135] Sp-E26 세포는 전기천공법에 의해 실시예 5에 기술된대로 인간 Bcl-2-EEE 유전자를 함유하는 플라스미드 발현 벡터로 형질전환하였다. 형질전환체는 3 주 후에 제오신 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함유하는 배지에서 선별하였다.
- [0136] 제오신-저항성 세포는 아포토시스-민감성 세포를 제거하기 위해 5 시간 동안 CHX 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였다. 처리된 세포는 CHX를 제거하기 위해 신선한 배양 배지로 두 번 세척하고 신선한 성장 배지에서 재현탁하였다. 24 시간 동안 회복한 후에, 살아있는 세포는 한계 희석(0.5 세포/웰)에 의해 96-웰 세포 배양 플레이트로 클로닝하였다. 클론은 2 주 내에 웰에서 생성되었고, 성장 프로파일 뿐 아니라 CHX-유도된 아포토시스에 저항성이 있는 항체 생산을 위해 스크리닝하였다. 모든 면에서 Sp-EEE 뿐만 아니라 모 Sp-E26 보다 더 잘 수행하였고 추가로 특성분석하였다. HPV-16 E6/E7 및 Bcl-2-EEE를 함유하는 가장 좋은 수행자는 스트레스 조건하에서 자랄 때, 모 Sp-E26 및 Sp/EEE 세포보다 노화-배양 조건 유도된 아포토시스에 저항성이 있을 것으로 기대된다; 그러므로, 재조합 단백질 생산을 위한 더 좋은 숙주 세포이다.
- [0137] **실시예 10. Sp-EEE 세포주를 갖는 재조합 단백질의 개선된 생산**
- [0138] 재조합 단백질의 생산을 위해 증가된 생존을 갖는 세포주를 개발할 때, 선택할 수 있는 경로가 두 가지 있다. 실시예 6에 기술된대로 아주 성공적으로 달성되어온 하나의 방법은 Bcl-2와 같은 프로-생존 유전자를 갖는 이미 생산하는 세포주의 안정한 형질전환을 포함한다. 그러나, 이 방법은 추가의 형질전환, 분별 및 클로닝 단계를 필요로 하므로, 적어도 두 달 아마도 그 이상 세포주 개발 공정이 길어진다. 추가로, 성장/생존, Bcl-2 발현 레벨 및 생산성을 포함하여 많은 변수가 각 클론을 측정하는데 필요하기 때문에, "가장 좋은" 클론을 위한 스크리닝이 다소 관련이 있다. 그러므로, 단지 소수의 클론만이 평가될 수 있다. 가장 높은 생산성을 갖는 클론이 더 우수한 생존을 가지지 않을 가능성도 꽤 있고 그 반대로 가능하다. 여기서 사용되는 대안적인 전략은 더 나은 성장 및 생존 특성을 갖는 모 세포주를 개발하는 것인데 이는 이어서 원하는 단백질의 생산용 발현 벡터로 형질전환된다.
- [0139] Sp2/0 세포와 비교하면, Sp-EEE 세포는 배양시 추가로 하루 동안 계속 성장하고, 15-20% 더 높은 최대의 밀도에 도달하며, 추가로 4-6일을 생존한다. 세포는 이어서 IgG, 항체 절편 및 융합 단백질과 같은 재조합 단백질, G-CSF, GM-CSF, EPO, EGF, VEGF와 같은 성장 인자, 인터루킨 패밀리를 포함하여 많은 변수가 각 클론을 측정하는데 필요하기 때문에, "가장 좋은" 클론을 위한 스크리닝이 다소 관련이 있다. 그러므로, 단지 소수의 클론만이 평가될 수 있다. 가장 높은 생산성을 갖는 클론이 더 우수한 생존을 가지지 않을 가능성도 꽤 있고 그 반대로 가능하다. 여기서 사용되는 대안적인 전략은 더 나은 성장 및 생존 특성을 갖는 모 세포주를 개발하는 것인데 이는 이어서 원하는 단백질의 생산용 발현 벡터로 형질전환된다.
- [0140] IgG와 같은 재조합 단백질에 대한 하나 이상의 발현 카세트를 포함하는 pHL2와 같은 DNA 벡터는 전기천공법과 같은 표준 방법에 의해 Sp-EEE 세포를 형질전환시키기 위해 사용된다. 형질전환체는 96-웰 플레이트에 평판배양하고 클론은 ELISA나 BIOCORE와 같은 확립된 기술에 의해 단백질 생산을 위해 분석한다. 생산성 있는 클론은 유전적 복제 수를 증폭시키기 위해 몇 달에 걸쳐 배양 배지에서 MTX의 농도를 증가시킨다. Bcl-2-EEE-발현 클론은 Bcl-2 음성 Sp2/0 세포에서 생성된 클론과 비교하면 약 20% 보다 더 높은 세포 밀도로 성장하고, 적어도 추가로 4일 동안 생존하기 때문에, 전자는 표준 플라스크 또는 롤러 병(roller bottle) 배양에서 적어도 20% 더 많은 재조합 단백질을 생산할 것이다. 현탁, 관류 또는 유가식 바이오리액터 배양에서 훨씬 크게 증가되는 것으로 인식된다.
- [0141] **실시예 11. 바이오리액터에서 Bcl-2 형질전환된 클론 665.B4.1C1의 개선된 항체-생산**
- [0142] 실시예 6의 665.2B9#4 및 모 클론 665.2B9 둘 다를 무혈청 배지로 떼어놓았다. 세포는 몇 달 동안 T-플라스크에서 연속적인 2차 배양에 의해 3 μM MTX를 함유하는 하이브리도마 무혈청 배지(HSFM)(Immunomedics PN 10070)의 주문자 제조법(customized formulation)에 적응시켰다. 적응된 세포는 저장을 위해 T-플라스크로부터 롤러 병으로 용량을 높였다. 각 세포주용 마스터 세포 은행(MCB)은 45% 조건화된 배지(지수 성장기에서 배양액 원심분리 후에 상층액으로서 모은 배지), 10% DMSO 및 45% HSFM로 이루어진 FBS가 포함되지 않은 냉동보관 용액을 사용하여 각각 1-ml 바이알에서 1×10^7 살아있는 세포로 만들었다. MCB 세포주는 각각 665.2B9.1E4(Bcl-2 유전자 없음) 및 665.B4.1C1(Bcl-2 유전자 있음)로 명명하였다. 이들 두 클론의 성장 특성 및 항체 생산을 배지 배양 조건하에서 비교하였다.
- [0143] 실험은 MCB로부터 증폭된 상기 세포를 사용하여 3-L 벤치-스케일(bench scale) 바이오리액터에서 수행하였다. 3-L 바이오리액터 시스템은 2500-L cGMP 바이오리액터 시스템의 용량을 낮춘 모델이다. 그러므로, 평가 결과는 대용량 상업 제조용 이들 세포주의 적합성을 뒷받침할 것이다.

[0144] MCB(Immunomedics PN 10070)을 만드는데 사용되는 것과 같이 동일한 성장 HSFM은 세포주를 유지하고 접종물을 제작하는데 사용하였다. 상업화된 변형(Immunomedics PN 10194)으로 성장 HSFM을 기초로 한 주문자 제조법인 기저 HSFM은 3-L 유가식 바이오리액터 공정에서 사용하였다. 양쪽 배지 모두 단지 소량(trace) 단백질로서 인슐린 및 트랜스페린을 함유한다. 추가로 0.1% 플루론 F68을 교반 및 통기에 의해 일어난 응력(shear)으로부터 세포를 보호하기 위해 제형 내로 삽입하였다. 상기 배지는 또한 3 μ M MTX를 포함한다.

[0145] 연속적인 식이 용액 및 펄스 식이 용액의 구체적인 특징은 다음과 같이 표 4 및 5에 나타냈다.

표 4

연속적인 식이 용액	
용액	제형(달리 구체화되지 않으면 WF I에 용해)
글루코스 및 글루타민 용액(G/G)	글루코스 13.3 g/L; 글루타민, 20 mM
ImmuC2 용액	글루코스 13.3 g/L; 글루타민 20 mM; PNS A, 50 ml/L; NaOH 50 mM
ImmuC5 용액	글루코스 26.6 g/L; 글루타민 40 mM; PNS A, 100 ml/L; NaOH 100 mM

[0146]

표 5

펄스 식이 용액	
용액	제형(달리 특정하지 않으면 WF I에 용해)
TC Sov Plus	120 g/L
리놀레산/시클로덱스트린	1.5 mg/ml
HD 지질	500X
베타-머캅토에탄올/EDTA	BME 0.01 M; EDTA 0.1mM
ImmuVitamin	용매로서 MEM Vitamin Solution(100x); 콜린 클로라이드 500 mg/L; 마이오-이노시톨 600 mg/L
TEC 용액	용매로서 트랜스페린 용액(4 mg/ml); CaCl ₂ 125 mM; 에탄올아민-HCl 1 g/L
인슐린	4 mg/ml

[0147]

[0148] 유가식 실험은 2 L 작용 부피로 3L 벨코 스피너-플라스크 바이오리액터 시스템즈(Bellco glasses, Vineland, N.J.)에서 수행하였다. 바이오리액터 온도, pH 및 용해된 산소(DO)는 단일 루프 조절기에 의해 모니터 및 조절하였다. 반응 온도는 가열 블랭킷에 의해 37 °C에서 조절하였다. 배양 pH는 CO₂나 Na₂CO₃의 첨가에 의해 7.3에서 조절하였다. 통기는 10 ml/분으로 원통형 신터드 스파저(sintered sparger)를 통해 수행하였다. DO는 배지로 O₂를 간헐 살포(intermittent sparging)함으로써 공기 포화 40% 이상으로 조절하였다. 50 내지 60 rpm의 일정한 교반속도를 배양 내내 사용하였다.

[0149] MCB 유래의 동결된 바이알을 녹이고 약 1 내지 2 주 동안 T-플라스크에서 회복시켰다. 그리고나서 세포는 바이오리액터로 접종하기 전에 T-플라스크로부터 롤러 병으로 증폭시켰다. 세포는 5% CO₂ 대기, 37°C에서 배양하였고 증폭 공정을 통해 대수성장기로 유지하였다.

[0150] 접종 전에, 기저 HSFM 1.2 리터는 무균상태로 바이오리액터로 펌프-이동시켰다. 배지는 용해된 산소(DO) 프로브를 재기 위해 공기 포화시켰다. 또한 pH 프로브를 재기 위해 배지 샘플은 취하였다. pH 프로브 및 DO 프로브를 켜 후, 조절자 둘 다 AUTO 모드(mode)에 맞췄다. 시스템이 pH(7.3) 및 온도(37 °C)의 세트 포인트에 도달하면 롤러 병으로부터 채어진 양은 접종물의 바이오리액터로 펌프 이동시켰다. 접종 후 살아있는 세포 밀도(VCD)는 약 2×10^5 바이알 세포/ml이었다.

[0151] 식이 전략은 다음과 같다. 배양 동안, 농축된 영양분 용액을 세포에 필요하지만 과도하지 않은 정도로 제공하기 위해 바이오리액터로 식이한다. 농축된 영양 용액은 연속적인 식이 및 펄스 식이를 통해 배양액으로 전달한다. 연속 식이 용액은 연동 펌프(Watson-Marlow 101U/R)를 사용하여 연속적으로 리액터로 펌프 전달한다. 펄스 식이 용액은 배양액으로 하루에 한번 펄스 식이한다.

[0152] 두 가지 유가식 식이 전략을 개발하여 세포주 둘 다에 적용하였다. 공정 #2는 공정 #1에 기반을 두고 변형된

리놀레산 및 지질 식이 스케줄 및 인슐린을 추가한 식이로 디자인하였다. 다음의 표는 세포주 둘 다를 위한 양쪽 공정의 식이를 요약한다.

표 6

세포주 665.2B9.1E4을 위한 공정 #1					
연속적인 식이					
		연속적인 식이율(ml/일)			
일	기대되는 생존 세포 밀도(세포/ml)	글루코스 및 글루타민	ImmuC2	ImmuC5	
2일	0.4~0.7E6	60	0	0	
3일 오전	1.0~1.7E6	0	60	0	
3일 오후	1.01~2.5E6	0	90	0	
4일 오전	2.51~3.5E6	0	90	0	
4일 오후	2.51~4.5E6	0	150	0	
5일 오전	4.51~6.5E6	0	0	90	
5일 오후	4.51~7.5E6	0	0	120	
6일	7.51~12E6	0	0	120	
7일	13E6 미만인 경우	0	0	120	
	13.1E6 초과인 경우	0	0	150	
펄스 식이					
		펄스 식이(ml)			
일	TC Soy Plus (120 g/L)	LA/CD (1.5 mg/ml)	지질 (500X) TEC 용액	Immu Vitamin	BME/EDTA
3일	12.5	4	3	-	15
4일	25	8	-	-	-
5일	50	12	-	4	15
6일	60	8	2	8	-
7일	60	-	1	-	-
8일	25				

[0153]

표 7

세포주 665.2B9.1E4을 위한 공정 #2							
연속적인 식이							
		연속적인 식이율(ml/일)					
일	기대되는 생존 세포 밀도(세포/ml)	글루코스 및 글루타민	ImmuC2	ImmuC5			
2일	0.4~0.7E6	60	0	0			
3일 오전	1.0~1.7E6	0	60	0			
3일 오후	1.01~2.5E6	0	90	0			
4일 오전	2.51~3.5E6	0	90	0			
4일 오후	2.51~4.5E6	0	150	0			
5일 오전	4.51~6.5E6	0	0	90			
5일 오후	4.51~7.5E6	0	0	120			
6일	7.51~12E6	0	0	120			
7일	13E6 미만인 경우	0	0	120			
	13.1E6 초과인 경우	0	0	150			
8일	10E6 미만인 경우	0	0	90			
	10.1~13E6	0	0	120			
	13.1E6 초과인 경우	0	0	150			
펄스 식이							
펄스 식이(ml)							
일	TC Soy Plus (120 g/L)	LA/CD (1.5 mg/ml)	지질 (500X)	TEC 용액	Immu Vitamin	BME/EDTA	인슐린 (4 mg/ml)
3일	12.5	2	3	-	-	15	-
4일	25	4	-	-	-	-	-
5일	50	6	-	4	15	15	4
6일	60	4	-	8	-	-	8
7일	60	4	-	-	-	15	8
8일	50	-	-	-	-	-	8

[0154]

표 8

세포주 665.B4.1C1을 위한 공정 #1						
연속적인 식이						
		연속적인 식이율(ml/일)				
일	기대되는 생존 세포 밀도(세포/ml)	글루코스 및 글루타민	ImmuC2	ImmuC5		
2일	0.4~0.7E6	60	0	0		
3일 오전	1.0~1.7E6	0	90	0		
3일 오후	1.01~2.5E6	0	120	0		
4일 오전	2.51~3.5E6	0	0	60		
4일 오후	2.51~4.5E6	0	0	90		
5일 오전	4.51~6.5E6	0	0	120		
5일 오후	4.51~7.5E6	0	0	150		
6일	7.51~12E6	0	0	180		
7, 8, 9일	15E6 미만인 경우	0	0	180		
	15.1E6 초과인 경우	0	0	240		
10일	10E6 미만인 경우	0	0	120		
	만약 10.1~13E6	0	0	150		
	13.1E6 초과인 경우	0	0	180		
세포주 665.B4.1C1을 위한 공정 #1						
펄스 식이						
펄스 식이(ml)						
일	TC Soy Plus (120 g/L)	LA/CD (1.5 mg/ml)	지질 (500X)	TEC 용액	Immue Vitamin	BME/EDTA
3일	12.5	4	3	-	-	15
4일	25	8	-	-	-	-
5일	50	12	-	4	15	15
6일	60	8	2	8	-	-
7일	60	-	1	-	-	15
8일	60	-	-	-	-	-
9일	60	-	-	-	-	15
10일	50	-	-	-	-	-

[0155]

표 9

세포주 665.B4.1C1을 위한 공정 #2							
연속적인 식이							
		연속적인 식이율(ml/일)					
일	기대되는 생존 세포 밀도(세포/ml)	글루코스 및 글루타민	ImmuC2	ImmuC5			
2일	0.4~0.7E6	60	0	0			
3일 오전	1.0~1.7E6	0	90	0			
3일 오후	1.01~2.5E6	0	120	0			
4일 오전	2.51~3.5E6	0	0	60			
4일 오후	2.51~4.5E6	0	0	90			
5일 오전	4.51~6.5E6	0	0	120			
5일 오후	4.51~7.5E6	0	0	150			
6일	7.51~12E6	0	0	180			
7, 8, 9일	만약<15E6	0	0	180			
	만약>15.1E6	0	0	240			
10일	만약<10E6	0	0	120			
	만약 10.1~13E6	0	0	150			
	만약>13.1E6	0	0	180			
펄스 식이							
펄스 식이(ml)							
일	TC Soy Plus (120 g/L)	LA/CD (1.5 mg/ml)	지질 (500X)	TEC 용액	Immue Vitamin	BME/EDTA	인슐린 (4 mg/ml)
3일	12.5	2	3	-	-	15	-
4일	25	4	-	-	-	-	-
5일	50	6	-	4	15	15	4
6일	60	4	-	8	-	-	8
7일	60	4	-	-	-	15	8
8일	60	4	-	-	-	-	8
9일	60	4	-	4	15	15	8
10일	60	-	-	-	-	1	8

[0156]

[0157]

배양 동안, 바이오리액터 샘플은 오프-라인 분석을 위해 주기적으로 취하였다. 살아있는 세포 밀도(VCD) 및 세포 생존율은 0.4% 트립판 블루 염료로 염색한 후에 혈구 계산기를 사용하여 현미경 계수에 의해 측정하였다. 글루코스, 젖산, 글루타민, 암모니아 농도는 Nova Bioprofile 200을 사용하여 측정하였다. 항체 농도는 단백질 A 친화도 크로마토그래피 컬럼(Applied Biosystems, P/N 2-1001-00)을 사용하여 HPLC에 의해 측정하였다.

[0158]

특이적인 항체 생산성은 배양시 생산된 누적된 항체를 전체 살아있는 세포의 시간 적분으로 나눔으로써 계산하였다.

$$Q_{[Mab]} = \frac{([Mab]_{t1} \cdot V_{t1} - [Mab]_{t0} \cdot V_{t0})}{\int_0^{t1} VCD \cdot V dt}, \text{ 여기서}$$

$\int_0^{t1} VCD \cdot V dt$ 은 다음에 의해 추정된다

$$\text{Trapezium Rule: } \frac{(VCD_{t0} \cdot V_{t0} + VCD_{t1} \cdot V_{t1})(t1 - t0)}{2}$$

[0159]

[0160]

공정 #1에 의해, 665.2B9.1E4 세포는 성장하여 6일에 생존율의 86%로 1×10^7 살아있는 세포/ml의 최대 VCD를 얻었다. 6일 후에, VCD 및 V%는 빨리 감소했고 배양액은 8일에 회수하였다. 공정 #2는 배양액이 1.2×10^7 살아있는 세포/ml의 더 높은 VCD에 도달하여 1일 이상 유지하도록 하였다.

[0161]

665.2B9.1E4 세포와 비교하면, 665.B4.1C1 세포는 양쪽 공정에서 훨씬 더 좋은 성장을 나타내었다. 공정 #1에서 VCD는 7일에 97% 생존율로 2×10^7 살아있는 세포/ml에 도달하였다. 배양액은 또한 감소하기 시작하기 전에 2일 동안 더 이 VCD 및 V%를 유지하였다. 배양액은 11일에 회수하였다. 공정 #2에서, 665.B4.1C1 세포는 공정 #1에서와 같이 유사한 성장 프로파일을 나타내었다. 이것은 665.2B9.1E4 세포주와는 다소 다른데, 이는 공정

#2에서 성장 잇점이 있음을 입증한다.

[0162] 공정 #1 및 #2에서 두 가지 세포주의 항체 수율을 비교하였다. 665.2B9.1E4 세포의 최종 수율은 공정 #1에서 0.42 g/L였고 공정 #2에서 0.55 g/L였다. 비교에서 665.B4.1C1 세포는 양쪽 공정에서 1.5 g/L의 더 높은 최종 수율을 냈다.

[0163] 매일의 특이적인 항체 생산성(세포 기준 당)을 계산하였고 665.2B9.1E4 세포는 양쪽 공정 동안 배양 코스를 통하여 대략 15 pg/세포/일의 평균 매일의 $Q_{[Mab]}$ 를 가졌다. 공정 #2에서 가장 높은 VCD에서 성장의 추가의 일은 더 높은 최종 항체 농도를 초래하였다.

[0164] 665.B4.1C1 세포는 양쪽 공정에서 유사한 매일의 특이적이 항체 생산성 프로파일을 나타내었고 공정 #1에서 약간 더 높은 생산성을 나타내었다. 매일의 $Q_{[Mab]}$ 는 9일까지 약 20 내지 25 pg/세포/일 사이에서 유지되었다. 그 후에 생산성은 감소하였다.

[0165] 665.2B9.1E4 세포주와 비교하면, 665.B4.1C1 세포주는 15 pg/세포/일에 비해 약 25 pg/세포/일의 더 높은 특이적인 항체 생산성을 나타내었다. 더 좋은 성장과 결합하여, 665.B4.1C1 세포주는 665.2B9.1E4 세포주에 의해 달성된 0.55 g/L에 비해 1.5 g/L로 최종 항체 수율이 3 배였다. 이들 결과는 재조합 단백질(이 경우 임상 사용을 위한 항체)의 대용량 상업적 제조용 바이오횰액터 모델에서 무혈청 배지에서 그의 성장 및 항체 수율을 증진시키기 위해 숙주 세포주로 Bcl-2 유전자를 삽입하는 것의 혜택을 입증한다.

[0166] **실시예 12. Sp/ESP 무혈청 전-적응된 세포주의 개발**

[0167] 세포 형질변환 및 단백질 생산용 표준 프로토콜은 다음과 같이 요약된다. Sp2/0 세포 또는 Sp2/0 유도된 세포주는 10% FBS에서 유지하고 관심있는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 전기천공법에 의해 형질전환한다. 10% FBS 보충된 배지에서 형질전환체 세포주를 유지하는 동안, 배양 배지에서 메토크세이트(MTX)의 단계적인 증가에 의해 발현을 증폭하기 위한 시도가 이루어진다. 단지 때때로 그리고 일반적으로 더 낮은 초기 생산성을 갖는 세포주로 작용하는 것처럼 보이는 이 증폭 공정은 보통 4-8 개월 걸린다. 한번 MTX 증폭이 완료되면, 클론은 3-6 개월의 기간에 걸쳐 무혈청 배지에서 성장을 위해 점차적으로 적응하는데 이는 일반적으로 50% 까지 생산성의 손실을 초래한다.

[0168] Sp/EEE 세포주가 혈청 결핍에 대해 더 우수한 내성 뿐 아니라 증가된 성장 및 생존 특성을 나타냈기 때문에, 무혈청 배지에서 성장에 전-적응된 Sp/EEE 세포주를 개발하는 실행가능성을 알아보고 형질전환, 클로닝 및 증폭을 위해 이 세포주를 사용하기로 결정하였다. 항체 또는 항체 절편과 같은 클론된 단백질의 생산을 위한 실행가능성은 C-AD2-Fab-h679-pdHL2 발현 벡터로 형질전환에 의해 입증하였다.

[0169] *무혈청 배지에서 성장에 대한 적응 및 서브클로닝*

[0170] Sp/EEE 세포는 2-개월의 기간에 걸쳐 무혈청 배지(SFM)에서 성장에 적응하였다. 형질전환이 FBS 없이 SFM에서 시행가능인지 결정하려는 시도에서, 무혈청-적응된 Sp/EEE 세포는 그들이 낮은 밀도로부터 회복할지 결정하기 위해 한계 희석으로 평판배양하였다. 세포는 96-웰 플레이트의 첫번째 줄에 5 세포/웰의 농도로 평판배양하였다. 한계 희석 결과 7 개의 전체 클론이 생성되었다. 이들 결과는 세포가 형질전환을 위해 필요한 조건하에서 생존할 수 있다는 것을 입증한다. 성장 커브 실험은 가장 좋은 성장 특성을 갖는 클론을 선별하기 위해 7 개의 서브클론 중 4 개를 사용하여 수행하였다. 모 클론 뿐 아니라 4 개의 클론(#1, 3, 4 및 5)은 배양 배지의 6 ml 에서 T25 플라스크에서 3×10^5 세포/ml의 밀도로 분리하였다. 세포 생존율(도 25) 및 밀도(도 26)는 제로 생존율에 도달할 때까지 모니터링하였다.

[0171] 서브클론 중에 #3은 다른 서브클론 또는 모 세포주보다 24 시간 더 오래 생존하였다. 추가로, 서브클론 #3 및 #1은 다른 클론보다 더 높은 최대 세포 밀도(3.2 내지 3.3 백만/ml, 도 26)에 도달하였다. 이는 서브클론 #3이 성공적인 형질전환을 겪기 위해 더 잘 적응할 수 있다는 것을 입증한다. 그러므로, 서브클론 #3은 Sp/ESP로 새롭게 명명하였고 이어진 형질전환을 위해 사용하였다.

[0172] *h679-AD2로 Sp/ESP 세포의 형질전환*

[0173] 상기 데이터에 기초하여 Sp/ESP 세포(서브클론 #3)는 SP2/0 세포를 위한 표준 프로토콜에 따라 h679-AD2-pdHL2 30 μ g로 전기천공법에 의해 형질전환하였다. 48 시간 후에 세포는 0.1 μ M MTX로 선별하였다. 대조군으로서 10% FBS에서 SP/EEE 세포는 또한 동일한 조건하에서 전기천공법에 의해 h679-AD2-pdHL2 로 형질전환하였다. 10 일 후에 플레이트는 BSA-IMP-260 코팅된 플레이트를 사용하여 ELISA를 통해 스크리닝을 위한 준비를 하였다.

양쪽 형질전환의 경우, 대략 400 개 중 130 개 웰이 양성 클론을 함유하였다. 40 개의 가장 높은 OD 리더값을 갖는 웰로부터 양성 Sp/ESF 세포는 24-웰 플레이트로 형질전환하였고 MTX는 0.2 μ M MTX까지 증가시켰다. 24-웰 플레이트에서 세포가 종말에 도달한 후에, HSG 센서칩을 사용한 BIACORE 분석에 의해 추가의 스크리닝을 수행하였다. 스크리닝된 클론 중 4 개는 50 mg/L 초과 생산성을 가졌다. 가장 높은 생산 클론(h679-AD2-SF #T6)은 82 mg/L의 초기 생산성을 가졌다. 이들 초기 생산성 결과는 10% FBS 세포에서 SP/EEE 세포를 사용하여 이 컨스트럭트의 이전 형질전환으로부터 얻어진 것들과 매우 유사하다.

[0174] 증폭

[0175] h679-AD2-SF# T6 클론은 MTX 증폭을 위해 분별하였다. 2 주 후에 MTX 농도는 0.2 μ M에서 0.4 μ M로 증가시켰다. 2 MTX 증가 후에만 생산성에서 약간의 증폭을 관찰할 수 있었다.

표 10

MTX 농도	생산성
0.1 μ M MTX	82 mg/L
0.2 μ M MTX	93 mg/L
0.4 μ M MTX	103 mg/L

[0177] 결론

[0178] SP/ESF에 대해 상기에서 제시된 데이터는 형질전환, 한계 회색에 의한 클로닝 및 MTX 증폭이 모두 한 달 이내에 무혈청 조건하에서 달성될 수 있다는 것을 나타낸다. 이는 82 mg/L의 초기의 매우 높은 생산성을 초래하고 이는 2 주 내에 103 mg/L로 증폭될 수 있는 h679-Fab-AD2-pdHL2 발현벡터의 형질전환으로 입증된다. MTX를 더 오랜 기간 노출하면 추가로 증폭된 것으로 기대된다. 82 mg/L의 가장 좋은 클론(T6)의 초기의 생산성은 10% FBS에서 수행된 모 SP/EEE 세포주의 본래의 형질전환으로부터 가장 좋은 h679-AD2-pdHL2 클론(5D8)의 초기의 생산성을 능가하는데, 이는 약 50 mg/L였다. SP/ESF 세포는 또한 에리스로포이에틴의 생산을 위해 EPO-DDD2-pdHL2로 형질전환시켰다.

[0179] 표 11은 현존하는 PER.C6 세포주(Jones et al in Biotechnol. Prog. 2003, 19: 163-168)와 SP/ESF의 주요 변수를 비교한 것인데, SP/ESF는 많은 분류에서 PER.C6을 앞선다.

표 11

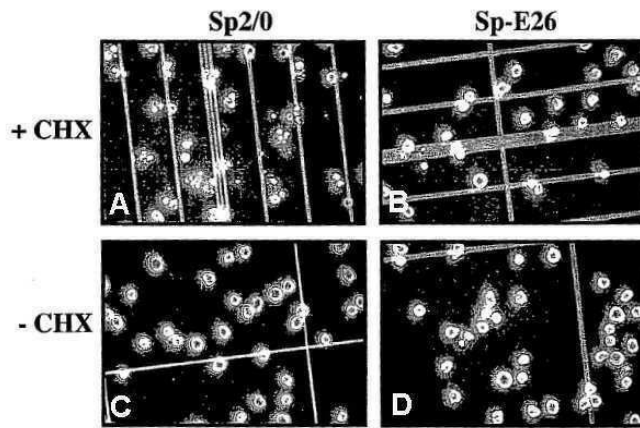
		Sp/ESP	PER.C6
모 세포주		마우스 골수종	인간 배아 망막 + E1
항-아포토시스 유전자		Bcl-2-EEE	없음
형질전환	방법	전기 천공법	리포펙타민
	효율	130/400	?
	성장	현탁	부착
	배지	SFM	10% FBS
스크리닝	성장	현탁	부착
	배지	SFM	10% FBS
선별된 클론	성장	현탁	현탁
	배지	SFM	SFM
	적용 시간	없음	4주
2배가 되는 시간		~12 시간	30-33 h
			SFM
세포 배양	용기	T-25	롤러 병
	배지	SFM	SFM
	최대 밀도	3.3×10^6 /ml	5×10^6 /ml
	생산성	Fab*의 103 mg/l	IgG의 300-500 mg/l
*IgG의 300 mg/L와 등가임			

[0181] 본문에 기재되고 주장된 모든 조성물 및/또는 방법 및/또는 기구는 본 기재에 비추어 과도한 실험없이 만들어지고 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 실시예의 용어에 기술되어 있는 한, 본 발명의 개념, 정신 및 범주로부터 벗어나지 않고 본 명세서에 기술된 방법의 단계 또는 단계의 순서에서 조성물 및/또는 방법 및/또는 기구에 변화가 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다. 보다 구체적으로, 동일하거나 유사한 결과가 달성되는 한 화학적 및 생리적으로 둘 다 관련된 특정 제제는 본 명세서에 기술된 제제를 대

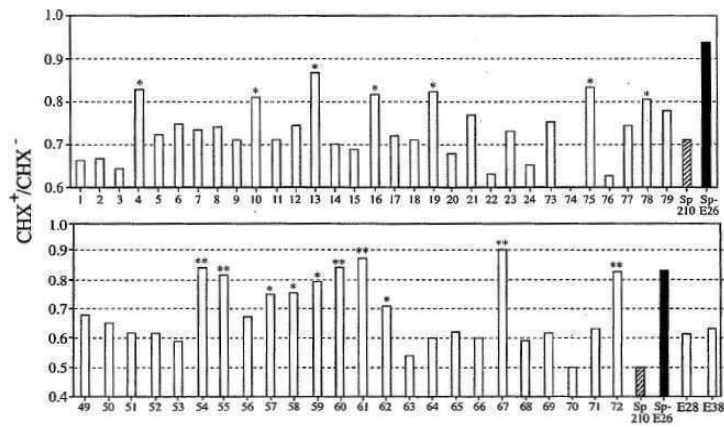
체할 수 있다. 당업자에게 명확한 모든 그러한 유사한 치환 및 변경은 첨부된 청구항에 의해 정의된대로 본 발명의 정신, 범주 및 개념 내에 있는 것으로 간주될 것이다.

도면

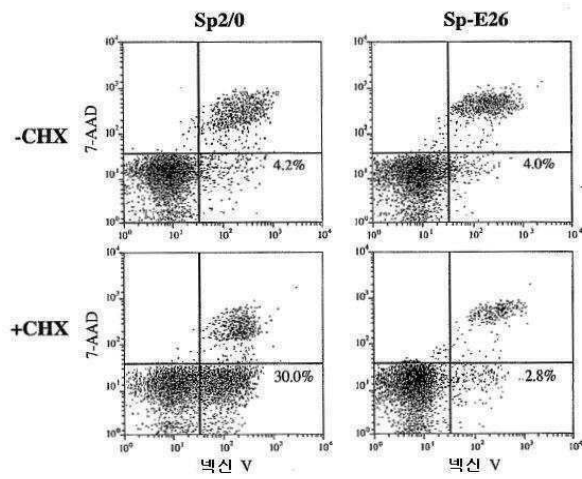
도면1



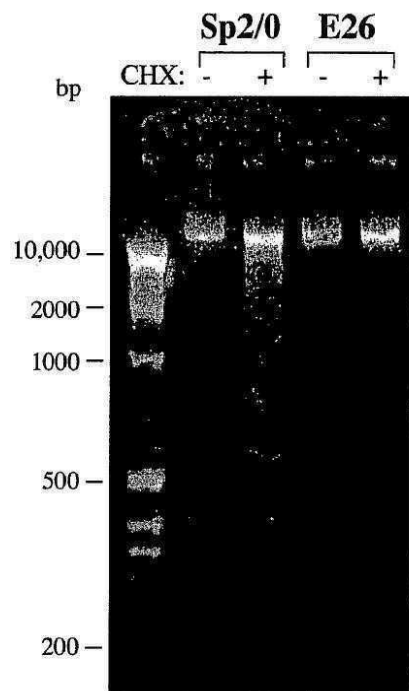
도면2



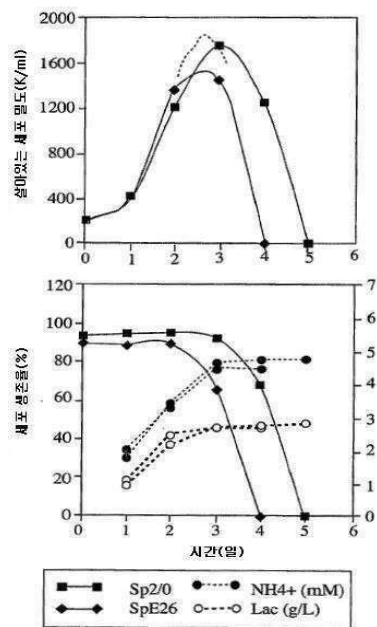
도면3



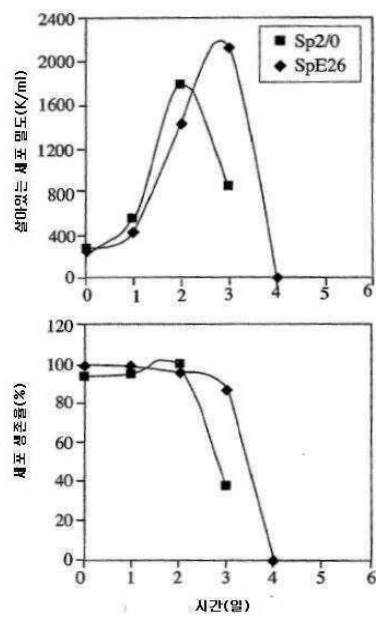
도면4



도면5



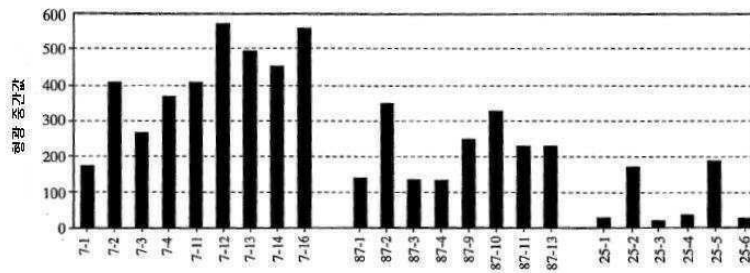
도면6



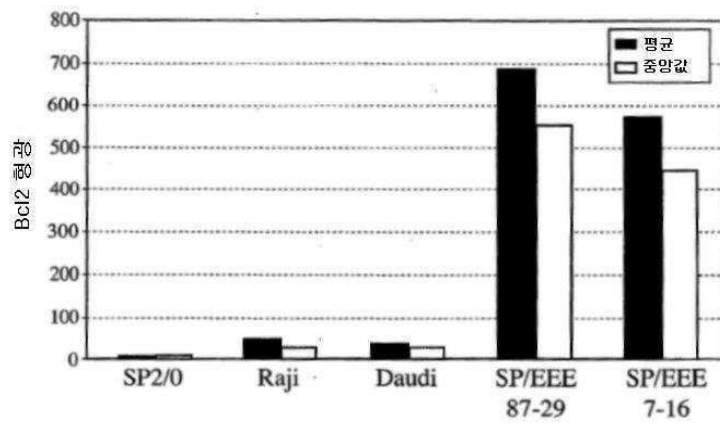
도면7



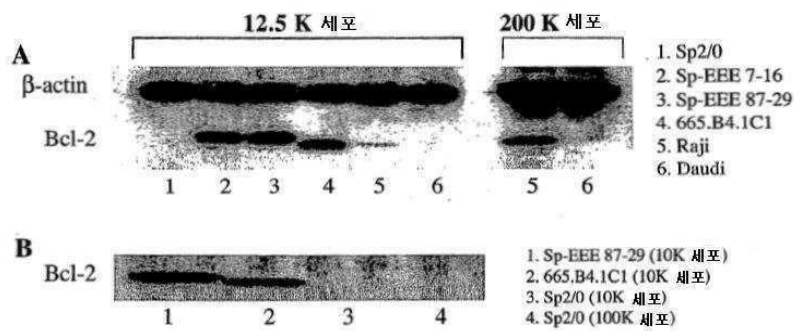
도면8



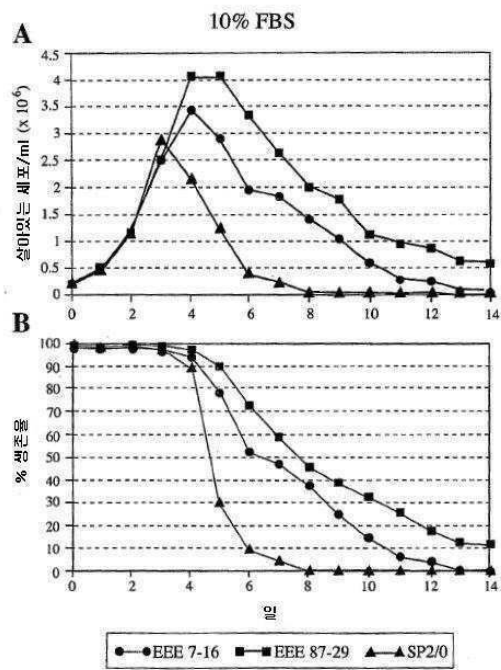
도면9



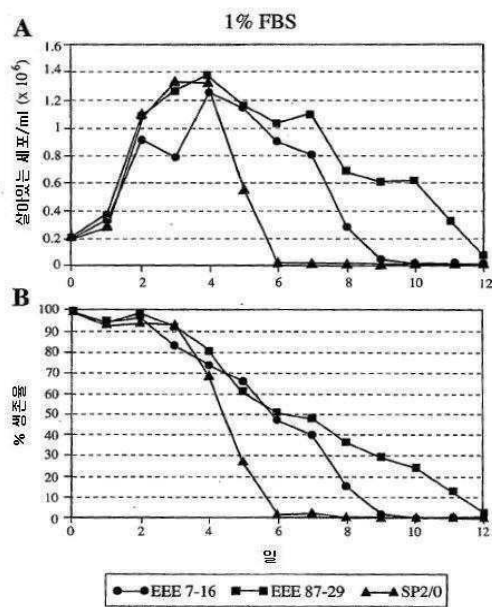
도면10



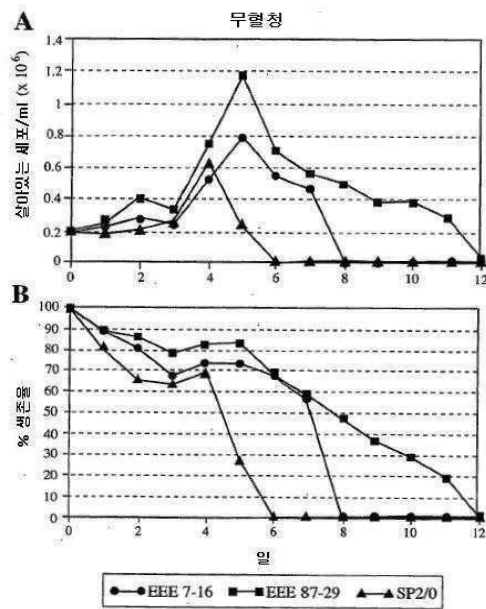
도면11



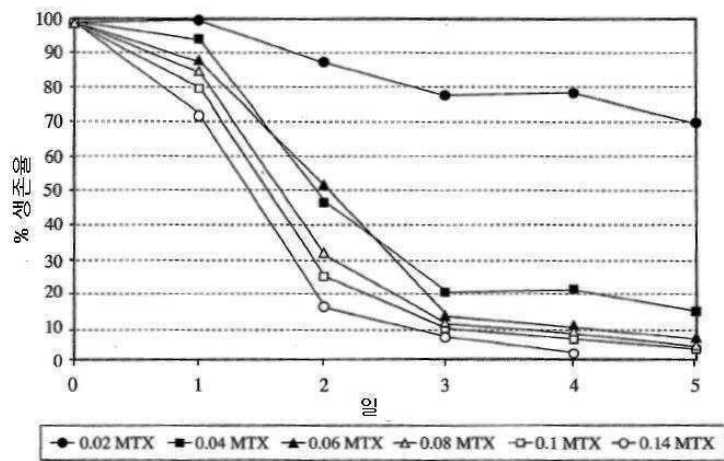
도면12



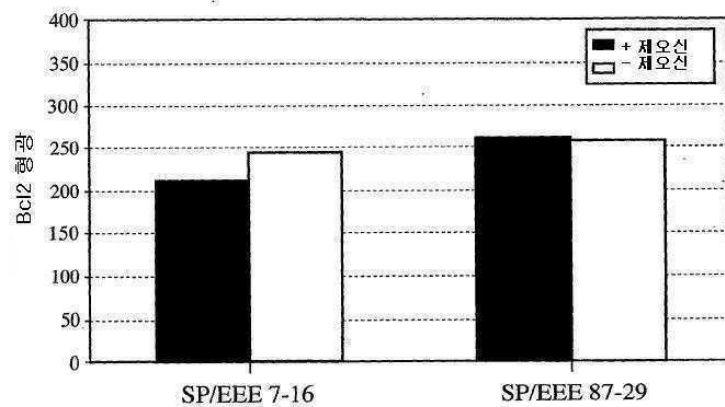
도면13



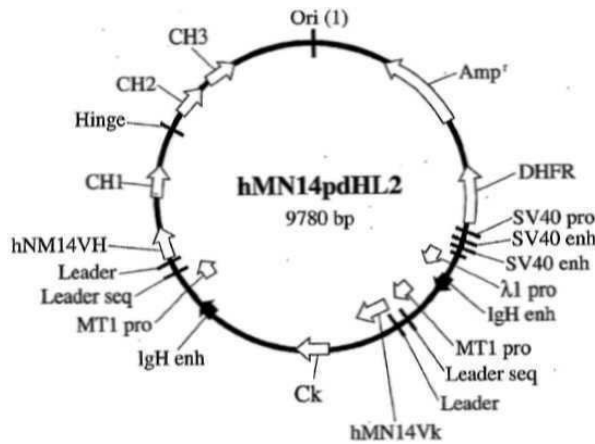
도면14



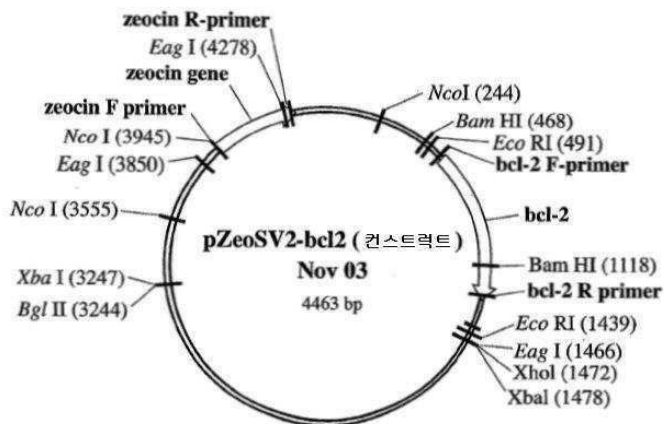
도면15



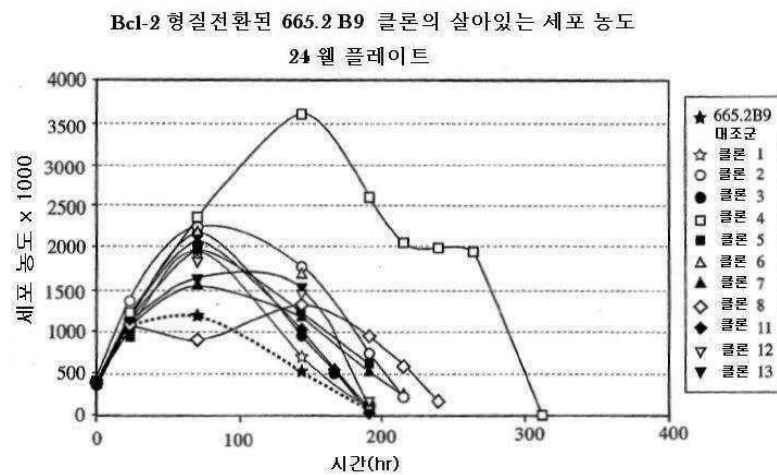
도면16



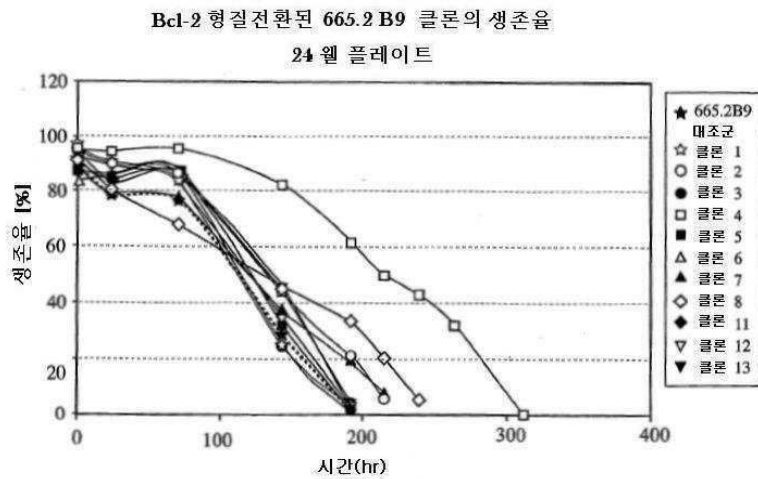
도면17



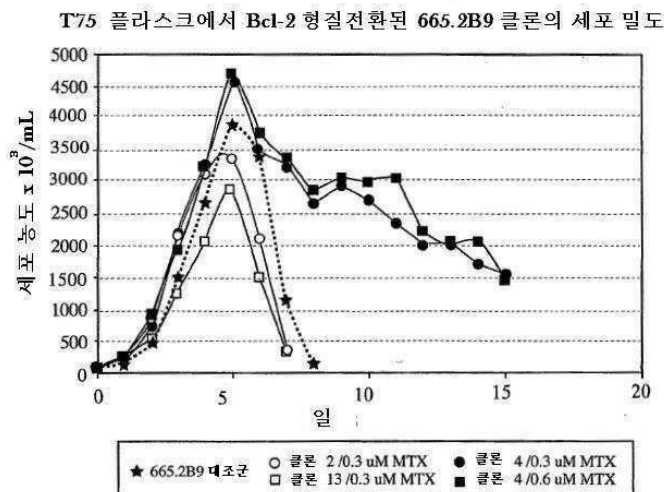
도면18



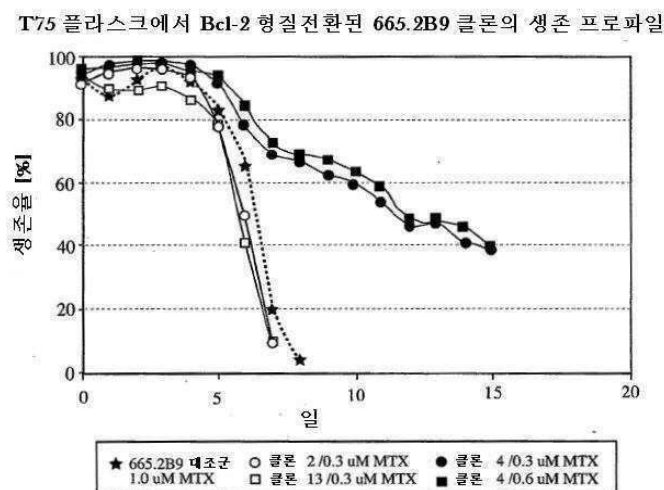
도면19



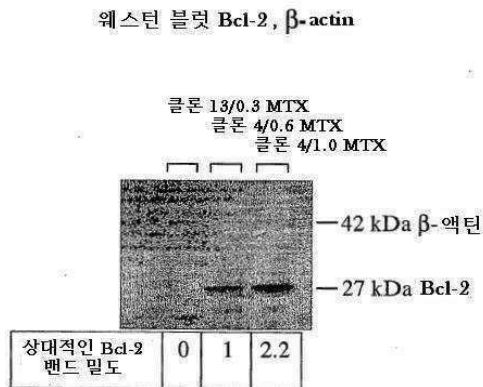
도면20



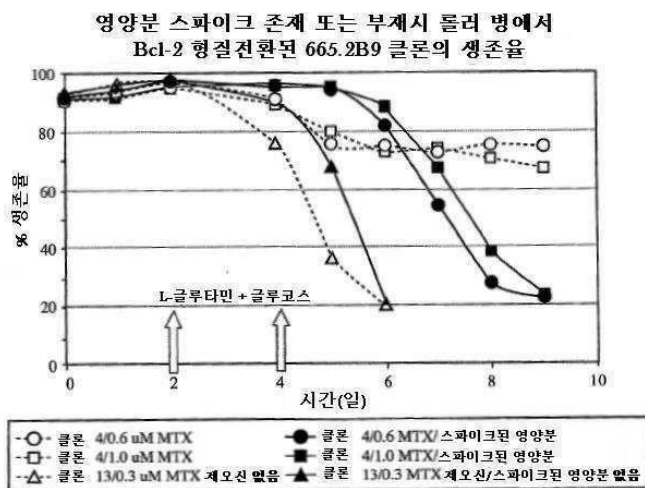
도면21



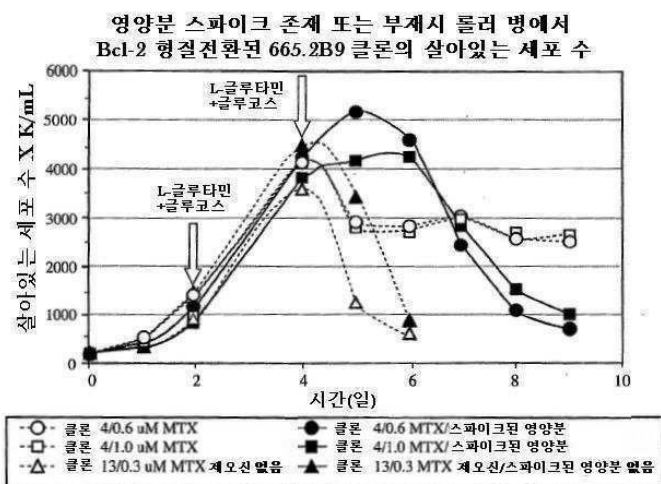
도면22



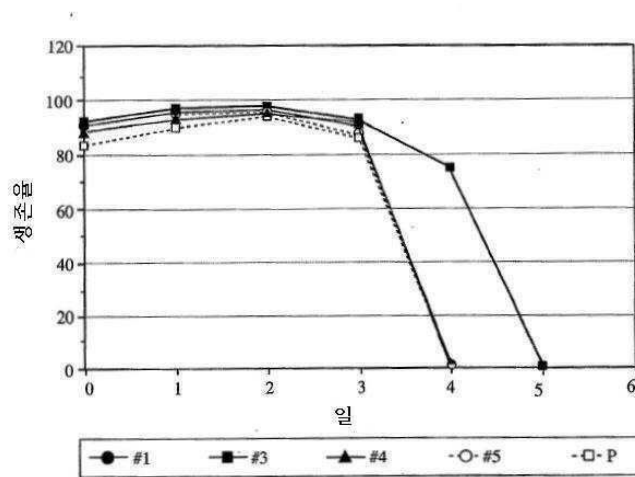
도면23



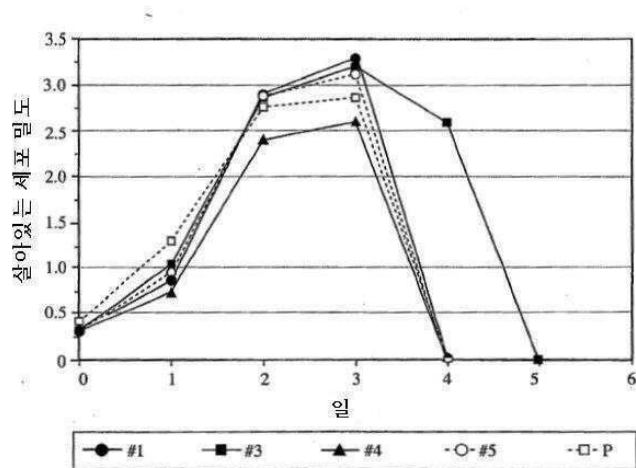
도면24



도면25



도면26



서열 목록

- <110> IMMUNOMEDICS, INC.
- <120> IMPROVED METHODS AND COMPOSITIONS FOR INCREASING LONGEVITY AND PROTEIN YIELD FROM A CELL CULTURE
- <130> 2013-FPA-5827d
- <150> 60/590,349
- <151> 2004-07-23
- <150> 11/187,863
- <151> 2005-07-25
- <160> 11
- <170> PatentIn Ver. 3.3
- <210> 1
- <211> 9780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide construct

<400> 1

ttccataggc tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg	60
cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc	120
tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc	180
gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc	240
aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	300
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	360
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtgcct	420
aactacggct acactagaag gacagtatct ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	480
ttcgaaaaa gatttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgtgg tagcgtggt	540
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg	600
atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc	660
atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa	720
tcaatctaaa gtatataatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag	780
gcacatatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg	840
tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca	900
gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag	960
cgcagaagtgt gtcttgaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa	1020
gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc	1080
atcgtggtgt cagctctgct gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca	1140
aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctctccg	1200
atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat	1260
aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcctttctg tgactggtga gtactcaacc	1320
aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg	1380
gataataacc cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg	1440
gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatga acccactcgt	1500
gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca	1560

ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata	1620
ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac	1680
atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa	1740
ggccacctga cgictaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta	1800
tcacagggcc ctttcgtctt caagaattcc gatccagaca tgataagata cattgatgag	1860
tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat	1920
gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaaca caacaattgc	1980
attcatTTTA tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac	2040
ctctacaaat gtggtatggc tgattatgat ctaaagccag caaaagtccc atggtcttat	2100
aaaaatgcat agcttttaga ggggagcaga gaacttgaaa gcacttcct gttagtcttt	2160
cttctcgtag acttcaaact tatacttgat gcctttttcc tcttgacct cagagaggac	2220
gcctgggtat tctgggagaa gtttatattt ccccaaatca atttctggga aaaacgtgtc	2280
actttcaaat tctgcatga tcttgtcac aaagagtctg aggtggcctg gttgattcat	2340
ggcttctcg taaacagaac tgccctcgac tatccaaacc atgtctactt tacttgccaa	2400
ttccggttgt tcaataagtc ttaaggcatc atccaaactt ttggcaagaa aatgagctcc	2460
tcgtggtggt tctttgagtt ctctactgag aactatatta attctgtcct ttaaaggtcg	2520
attcttctca ggaatggaga accaggtttt cctaccata atcaccagat tctgtttacc	2580
ttccactgaa gaggttgttg tcattctttg gaagtacttg aactcgttcc tgagcggagg	2640
ccagggtcgg tctccgttct tgccaatccc catatttttg gacacggcga cgatgcagtt	2700
caatggtcga accatgaggg caccaagctc gctttttgca aaagcctagg cctccaaaaa	2760
agcctctca ctacttctgg aatagctcag aggccgaggc ggccctcgcc tctgcataaa	2820
taaaaaaaaat tagtcagcca tggggcggag aatgggcgga actgggcgga gttagggcg	2880
ggatgggcgg agttaggggc gggactatgg ttgctgacta attgagatgc atgctttgca	2940
tacttctgcc tgcTggggag cctggggact ttccacacct ggttgctgac taattgagat	3000
gcattgcttg catacttctg cctgctgggg agcctgggga cttccacac cctaactgac	3060
acacattcca cagtcgacta gaatatgat agtgggtgtt tatgactctg gataagcctg	3120
aacaattgat gattaatgcc cctgagctct gttcttagta acatgtgaac atttacttgt	3180
gtcagtgtag tagatttcac atgacatctt ataataaacc tgtaaatgaa agtaatttgc	3240
attactagcc cagcccagcc catactaaga gttatattat gtctgtctca cagcctgctg	3300
ctgaccaata ttgaaaagaa tagaccttcg actggcagga agcaggtcat gtggcaaggc	3360

tatttgggga agggaaaata aaaccactag gtaaacttgt agctgtggtt tgaagaagtg	3420
gttttgaaac actctgtcca gccccaccaa accgaaagtc caggctgagc aaaacaccac	3480
ctgggtaatt tgcatttcta aaataagttg aggattcagc cgaaactgga gaggtcctct	3540
tttaacttat tgagttcaac cttttaattt tagcttgagt agttctagtt tcccaaact	3600
taagtttata gactttctaa atgtatttag aatttcgacc aattctcatg tttagacagt	3660
tatcatcgct gcactccgcc cgaaaagtgc gctcggtctt gccaaaggacg cggggcgct	3720
gactatgcgt gggctggagc aaccgcctgc tgggtgcaaa cctttgctgc ccggactcgt	3780
ccaacgacta taaagagggc aggtgtctct ctaagcgtca ccacgacttc aacgtctga	3840
gtaccttctc ctcaattact ccgtagctcc agcttcacca gatccctcga ctctagaggc	3900
cttaagggcc ttactgagca cacaggacct caccatggga tggagctgta tcactctctt	3960
cttggtagca acagctacag gtaaggggct cacagtagca ggcttgaggt ctggacatat	4020
atatgggtga caatgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac tccgacatcc	4080
agctgacca gagcccaagc agcctgagcg ccagcgtggg tgacagagt accatcacct	4140
gtaaggccag tcaggatgtg ggtacttctg tagcctggta ccagcagaag ccaggtaagg	4200
ctccaaagct gctgatctac tggacatcca cccggcacac tgggttgcca agcagattca	4260
gcggtagcgg tagcggtagc gacttcacct tcaccatcag cagcctccag ccagaggaca	4320
tcgccaccta ctactgccag caatatagcc tctatcggtc gttcggccaa gggaccaagg	4380
tggaaatcaa acgtgagtag aatttaaact ttgcttctc agttggatcc cgcaattcta	4440
aactctgagg gggtcggatg acgtggccat tctttgccta aagcattgag ttactgcaa	4500
ggtcagaaaa gcatgcaaag cctcagaat ggctgcaaag agctccaaca aaacaattta	4560
gaactttatt aaggaatagg gggaagctag gaagaaactc aaaacatcaa gattttaat	4620
acgtttcttg gtctccttgc tataattatc tgggataagc atgtgtttt ctgtctgtcc	4680
ctaactgcc ctgtgattat ccgcaaaca cacaccaag ggcagaactt tgttacttaa	4740
acaccatect gtttcttct ttectcagga actgtggtg caccatctgt ctctatctc	4800
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	4860
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	4920
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	4980
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagtct acgcctgcga agtcacccat	5040
cagggcctga gctcgccctg cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gagggagaag	5100

tgccccacc tgctcctcag ttccagcctg accccctccc atcctttggc ctctgaccct	5160
ttttccacag gggacctacc cctattgcgg tcctccagct catctttcac ctcaccccc	5220
tcctcctcct tggttttaat tatgctaata ttggaggaga atgaataaat aaagtgaatc	5280
tttgcacctg tggtttctct ctttctcat ttaataatta ttatctgttg tttaccaac	5340
tactcaattt ctcttataag ggactaaata ttagtcac ctaaggcgca taaccattta	5400
taaaaatcat ctttcattct attttacct atcatcctct gcaagacagt cctccctcaa	5460
accacaagc ctctgtcct cacagtcctc tgggcatgg taggagagac ttgcttcctt	5520
gttttccct cctcagcaag cctcatagt ctttttaag ggtgacaggt cttacagtca	5580
tatatccttt gattcaattc cctgagaatc aaccaaagca aatttttcaa aagaagaaac	5640
ctgtataaa gagaatcatt cattgcaaca tgatataaaa taacaacaca ataaaagcaa	5700
ttaaataaac aaacaatagg gaaatgttta agttcatcat ggtacttaga cttaatggaa	5760
tgatcatgct tatttacatt tttaacagg tactgaggga ctctgtctg ccaagggccg	5820
tattgagtag ttccacaac ctaatttaat ccacactata ctgtgagatt aaaaacattc	5880
attaaaatgt tgcaaagggt ctataaagct gagagacaaa tatattctat aactcagcaa	5940
ttcccacttc taggggttcg actggcagga agcaggctcat gtggcaaggc ttttgggga	6000
agggaaaata aaaccactag gtaaacctgt agctgtggtt tgaagaagtg gttttgaaac	6060
actctgtcca gcccaccaa accgaaagtc caggctgagc aaaacaccac ctgggtaatt	6120
tgcatttcta aaataagttg aggattcagc cgaaactgga gaggtcctct tttacttat	6180
tgagttcaac cttttaattt tagcttgagt agttctagtt tccccaaact taagtttacc	6240
gacttctaaa atgtatttag aatttcgacc aattctcatg ttgacagct tatcatgct	6300
gcactccgcc cgaaaagtc gctcggctct gccaaaggac cggggcgcgt gactatgcgt	6360
gggctggagc aaccgcctgc tgggtgcaaa ccttttgccg ccggactcgt ccaacgacta	6420
taaagagggc aggtgtcct ctaagcgtca ccacgacttc aacgtcctga gtacctctc	6480
ctcacttact ccgtagctcc agcttcacca gatccctga gcacacagga cctcaccatg	6540
ggatggagct gtatcatcct cttcttggta gcaacagcta caggtaaggg gctcacagta	6600
gcaggcttga ggtctggaca tataatatggg tgacaatgac atccactttg cttttctctc	6660
cacaggtgtc cactccagg tccaactgca ggagagcggg ggaggtgttg tgcaacctgg	6720
ccggtccctg cgctgtcct gctccgcatc tggcttcgat ttaccacat attggatgag	6780
ttgggtgcga caggcacctg gaaaaggctc tgagtggatt ggagaaattc atccagatag	6840
cagtacgatt aactatgcgc cgtcgctaaa agatagattt acaatatcgc gagacaacgc	6900
caagaacaca ttgttcctgc aaatggacag cctgagaccc gaagacaccg gggtctattt	6960

ttgtgcaagc ctttacttcg gcttccccctg gtttgcttat tggggccaag ggaccccggt	7020
caccgtctcc tcaggtgagt ccttacaacc tctctcttct attcagctta aatagatttt	7080
actgcatttg ttggggggga aatgtgtgta tctgaatttc aggtcatgaa ggactaggga	7140
caccttggga gtcagaaagg gtcattggga gccccaaagt ttctggggca ggccaggcct	7200
gaccttggct ttggggcagg gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccaggtgca	7260
caccaatgc ccatgagccc agacactgga cgtgaacct cgcggacagt taagaacca	7320
ggggcctctg cgccttgggc ccagctctgt cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct	7380
cttgacgct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc	7440
tctggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	7500
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttcccggc tgcctacag	7560
tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ctgggcacc	7620
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt	7680
ggtgagaggc cagcacaggg agggagggtg tctgctggaa gccaggctca gcgtcctgc	7740
ctggacgcat cccggctatg cagccccagt ccagggcagc aaggcaggcc cgtctgcct	7800
cttccccgg agcctctgcc cgccccactc atgctcaggg agagggtctt ctggctttt	7860
cccagctct gggcaggcac aggttaggtg cccctaacc aggcctgca cacaagggg	7920
caggtgctgg gtcagacct gccaaagacc atatccggga ggacctgcc cctgacctaa	7980
gccccccca aaggccaaac tctccactcc ctgagctcg acaccttctc tctcccaga	8040
ttccagtaac tccaatctt ctctctgcag agcccaaac ttgtgacaaa actcacacat	8100
gcccaccgtg ccaggtaag ccagcccagg cctcgccctc cagctcaagg cgggacaggt	8160
gccttagagt agcctgcac cagggacagg cccagccgg gtgctgacac gtccacctcc	8220
atctcttct cagcacctga actcttgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa	8280
ccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg	8340
agccacgaag acctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	8400
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgggtggt cagcgtctc	8460
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	8520
gccccccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggtgggac ccgtgggggtg	8580
cgagggccac atggacagag gccggctcgg cccacctct gccctgagag tgaccgtgt	8640
accaacctct gtcctacagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc	8700
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg ctctatccc	8760
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	8820

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag	8880
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgagc tctgcacaac	8940
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gagtgcgacg gccggcaagc	9000
ccccgtccc cgggctctcg cggctgcacg aggatgcttg gcacgtaccc cgtctacata	9060
cttcccaggc acccagcatg gaaataaagc acccaccact gccctgggcc cctgcgagac	9120
tgtgatggtt ctttccacgg gtcaggccga gtctgaggcc tgagtggcat gagggaggca	9180
gagcgggtcc cactgtcccc acactggccc aggctgtgca ggtgtgcctg ggccgcctag	9240
ggtggggctc agccaggggc tgccctcggc aggggtggggg atttgccagc gtggccctcc	9300
ctccagcagc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca	9360
gtccccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca	9420
gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccagc cactagcga	9480
tagcggagtg tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac	9540
catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgtct	9600
tccgttctct cgtcactga ctcgtgcgc tcggctgttc ggctgcggcg agcggtatca	9660
gtcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac	9720
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa agccgcggtt gctggcgttt	9780
	9780
<210> 2	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide sequence	
<400> 2	
caatggtcga accatgaggg caccaagcta gctttttgca aaagcctagg cctccaaaaa	60
agcctcctca ctacttctgg aatagctcag aggccgaggc ggccctggcc tctgcataaa	120
taaaaaaat tagtcagcca tggggcggag aatgggcgga actgggcgga gttaggggcg	180
ggatggggcg agttaggggc gggactatgg ttgctgacta attgagatgc atgctttgca	240
tacttctgcc tgctggggag cctggggact ttccacacct ggttgctgac taattgagat	300
gcatgctttg catacttctg cctgctgggg agcctgggga ctttccacac cctaactgac	360
acacattcca cagtcgacta gaatatggat agtgggtgtt tatgactctg gataagcctg	420
	420

<210> 3

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic nucleotide sequence

<400> 3

```
atggcgcacg ctgggagaac ggggtacgat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat      60
tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgcgggag atgtgggcgc cgcgcccccg      120
ggggccgccc ccgcaccggg catcttctcc tcccagcccg ggcacacgcc ccatccagcc      180
gcatcccgcg acccggctgc cagagaagaa ccgtgcaga ctccggctgc tcctggagca      240
gctgcaggac ctgcgtcga accggtgcc cctgtgtcc acctgaccct ccgccaggcc      300
ggcgacgact tctcccgcg ctaccgccgc gatttcgcc agatgtccag ccagctgcac      360
ctgacgccct tcaccgcgc gggacgcttt gccacggtgg tggaggagct cttcaggggac      420

ggggtgaact gggggaggat tgtggccttc tttagattcg gtggggtcat gtgtgtggag      480
agcgtcaacc gggagatgtc gcccttggtg gacaacatcg cctgtggat gactgagtac      540
ctgaaccggc acctgcacac ctggatccag gataacggag gctgggatgc ctttgtggaa      600
ctgtacggcc ccagcatgcg gcctctgttt gatttctcct ggctgtctct gaagactctg      660
ctcagtttgg ccttggtggg agcttgcac accctgggtg cctatctggg ccacaagtga      720
720
```

<210> 4

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic protein

<400> 4

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


Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp

50 55 60

Pro Val Ala Arg Glu Glu Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala

65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly

115 120 125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp

130 135 140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu

145 150 155 160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp

165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn

180 185 190

Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro

195 200 205

Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala

210 215 220

Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys

225 230 235

<210> 5

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

ggacccggtc gccagagaag aaccgctgca gactccggct gctcctggag cagctgcagg 60

acctgcgctc gaaccggtgc 80

<210> 6

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

cgccggcctg gcggagggtc aggtggacca caggtggcac cggttcgagc gcaggtcctg 60

cagctgctcc aggagcagcc 80

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 7

Asp Glu Val Asp

1

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 8

atgtttcagg acccacagga gcga 24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 9

ttatggtttc tgagaacaga tggg 24

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 10

tatatggacc cggtcgccag agaag 25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 11

ttaatcgccg gcctggcgga gggtc 25