



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0005172
(43) 공개일자 2023년01월09일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61P 25/16</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 16/18</i> (2013.01)
 <i>A61P 25/16</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7036931</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년04월23일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년10월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/060637</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/214277
 국제공개일자 2021년10월28일</p> <p>(30) 우선권주장
 20171356.7 2020년04월24일
 유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
 에프. 호프만-라 로슈 아게
 스위스 체하-4070 바젤 그린짜체스트라체 124</p> <p>(72) 발명자
 샤오 지신
 독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노
 스틱스 게엠베하</p> <p>(74) 대리인
 제일특허법인(유)</p> |
|---|--|

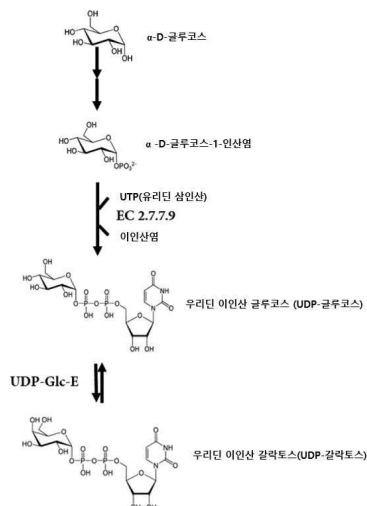
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **셀프히드릴 화합물 및 이의 유도체를 사용한 효소 및 경로 조절**

(57) 요약

본 발명은 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 단백질, 특히 항체, 예컨대 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 및 항 α -시누클레인 항체에 관한 것이다. 더 상세하게는, 본 발명은 증가한 역할을 가진 단백질을 포함하여 향상된 치료 특성을 갖는 단백질을 생성하기 위한 갈락토실화 조작에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 상기 단백질을 생성하기 위한 세포 배양 배지 및 포유동물 세포뿐만 아니라 상기 세포 배양 배지 및 상기 포유동물 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암, 특히 B 세포와 관련된 암, 또는 파킨슨병을 치료하기 위한 약제로서 상기 항체의 사용에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 α -시누클레인 항체로서, 상기 항 α -시누클레인 항체는,

- (a) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- (b) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- (c) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH); 및
- (d) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- (e) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- (f) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;

여기서 상기 항 α -시누클레인 항체는 총 글리칸당 17.2~48.0%(w/w)의 G1 및 3.1~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 25.4~48.0%(w/w)의 G1 및 3.5~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 27.2~47.0%의 G1 및 4.4 내지 15.0%의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 40.0~46.0%(w/w)의 G1 및 8.4~15.0%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 41.0~45.0%(w/w)의 G1 및 9.5~14.0%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 42.1~43.9%(w/w)의 G1 및 10.6~13.3%(w/w)의 G2를 가지는, 항 α -시누클레인 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항 α -시누클레인 항체는,

- (a) 서열번호 16의 VH 서열;
- (b) 서열번호 17의 VL 서열; 또는
- (c) (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함하는, 항 α -시누클레인 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항 α -시누클레인 항체는 서열번호 20의 중쇄 및 서열번호 21의 경쇄를 포함하는, 항 α -시누클레인 항체.

청구항 4

모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체로서,

상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 제1 항원 결합 도메인은,

- (a) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- (b) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- (c) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH); 및
- (d) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- (e) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- (f) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;

여기서 상기 제2 항원 결합 도메인은,

- (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH); 및
- (d) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- (e) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- (f) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;

여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 총 글리칸당 19.0~29.0%(w/w)의 G1 및 1.3~2.8%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 20.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.4~2.7%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.5~2.7%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~27.4%(w/w)의 G1 및 1.5~2.6%(w/w)의 G2를 가지는, 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체.

청구항 5

제4항에 있어서,

- (a) 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 28의 VH 서열 및 서열번호 29의 VL 서열을 포함하거나;
- (b) 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 40의 VH 서열 및 서열번호 41의 VL 서열을 포함하거나; 또는
- (c) 상기 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함하는, 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는,

- (a) 서열번호 46의 제1 중쇄 및 서열번호 45의 제2 중쇄;
- (b) 서열번호 33의 제1 경쇄 및 서열번호 44의 제2 경쇄; 또는
- (c) (a)에 정의된 제1 중쇄 및 제2 중쇄, 및 (b)에 정의된 제1 경쇄 및 제2 경쇄를 포함하는, 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는,

- (a) 서열번호 47의 제1 중쇄 및 서열번호 45의 제2 중쇄;
- (b) 서열번호 33의 제1 경쇄 및 서열번호 44의 제2 경쇄 및 제3 경쇄; 또는
- (c) (a)에 정의된 제1 중쇄 및 제2 중쇄, 및 (b)에 정의된 제1 경쇄, 제2 경쇄 및 제3 경쇄를 포함하는, 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체.

청구항 8

모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 항 α-시누클레인 항체를 생성하는 방법으로서,

- (a) 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설파드릴 화합물(들)로부터 설파히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과와 글루코스가 적어도 3일, 더 바람직하게는 적어도 4일, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 5일 동안 유지되는, 단계,

(b) 상기 항체를 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는 방법으로서,

(a) 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과의 글루코스가 적어도 3일, 더 바람직하게는 적어도 4일, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 5일 동안 유지되는, 단계,

(b) 상기 항체를 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

상기 농도는 적어도 5일 동안, 바람직하게는 적어도 7일 동안, 더 바람직하게는 적어도 10일 동안, 보다 더 바람직하게는 적어도 12일 동안, 및 가장 바람직하게는 적어도 14일 동안 유지되는, 방법.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 5.0 mM 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 9.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 8.0 mM 이하, 보다 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 7.0 mM 이하, 및 가장 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함하는, 방법.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 3.0 g/L 초과 내지 13 g/L 이하의 글루코스, 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 8.0 g/L 이하의 글루코스, 더 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 7.0 이하의 g/L의 글루코스, 보다 더 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 6.0 g/L 이하의 글루코스, 및 가장 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 5.0 g/L 이하의 글루코스를 포함하는, 방법.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인, 시스틴, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

B 세포 관련 암, 바람직하게는 만성 백혈병 및 림프종을 가진 환자 치료에 사용하기 위한, 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체.

청구항 16

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

파킨슨병을 가진 환자 치료에 사용하기 위한, 항 α -시누클레인 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 단백질, 특히 항체, 예컨대 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 및 항 α -시누클레인 항체에 관한 것이다. 더 상세하게는, 본 발명은 증가한 역가를 가진 단백질을 포함하는 향상된 치료 특성을 갖는 단백질을 생성하기 위한 갈락토실화 조작에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 상기 단백질을 생성하기 위한 세포 배양 배지 및 포유동물 세포뿐만 아니라 상기 세포 배양 배지 및 상기 포유동물 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암, 특히 B 세포와 관련된 암 또는 파킨슨병을 치료하기 위한 약제로서 상기 항체의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 많은 당단백질이 생명공학 산업의 주요 산물이었으며 특히 치료 목적으로 이용되어 왔다. 예로는 에리트로포이에틴(EPO), 치료용 단일클론 항체(치료용 mAb), 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA), 인터페론- α , 파립구-대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF) 및 인간 융모막 성선 자극 호르몬(hCG)이 포함된다(Cumming et al., Glycobiology 1: 115-130 (1991)). 따라서, 당단백질의 올리고당 성분은 물리적 안정성, 프로테아제 공격에 대한 내성, 면역계와의 상호작용, 약동학, 및 특정 생물학적 활성을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 치료용 당단백질의 효과와 관련된 이의 특성에 영향을 미칠 수 있다. 이런 특성은 올리고당류의 존재 또는 부재뿐만 아니라 이들의 특정한 구조에 의존할 수 있다.

[0003] 일반적으로, 이의 천연 형태의 면역글로불린 또는 항체는 일반적으로 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된 4량체 당단백질이다. 이러한 면역글로불린은 일반적으로 단백질 조립, 분비 또는 기능적 활성화에 가변적으로 영향을 미칠 수 있는 중쇄 불변 영역의 보존된 위치에서 올리고당을 함유한다(Boyd et al., (1995) Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwer A., and Howard, S.C. (1990) Biochem. 29:4175-4180; Wright, A., and Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32 (1997)).

[0004] 예를 들어, 항체의 증가된 갈락토실화는, 예컨대, 마우스에서 IgG 면역 복합체의 높은 갈락토실화가 Fc γ RIIB와 텍틴-1의 결합을 촉진하여 C5aR 및 CXCR226의 전염증 효과기 기능을 차단한다는 것을 보여준, Karsten et al. (Nature Medicine 18.9 (2012) 1401-1406)의 보고에서 기재된 바와 같이, 기능적으로 더 항염증성일 수 있다. IgG 분자에 미치는 갈락토실화 효과에 대한 다른 보고에는 입체형태 및 표면 접근성과 같은 물리화학적 특성의 변형이 포함된다(Krapp et al., J. Mol. Biol. 325 (2003) 979-89; Mimura et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 697-706). Fortunato and Colina (J. Phys. Chem. 118 (2014) 98449851)는 면역글로불린 G1의 Fc 도메인에서 갈락토실화의 효과를 연구하기 위해 명백한 물 원자 분자 역학 시뮬레이션을 사용하였다. 그들은 당화(glycosylation)가 치료를 위한 단일클론 항체의 응집 저항성을 개선하는 경로로 사용될 수 있다고 제안하였다.

[0005] 당단백질의 상이한 당화 수준 및/또는 당화 패턴이 이의 특성, 특히, 치료 효과와 관련된 특성에 미치는 영향의 관점에서, 특히 임상적 사용을 위해 생성된 당단백질의 당화 패턴이 균일하게 되고, 따라서 항체의 유리한 특성은 적어도 유지되도록 하는 것이 중요하다.

[0006] 하지만, 일반적으로 숙주 세포에서 제조한 당단백질의 발현은 생성된 당단백질이 다중 당형태로 존재하도록 특정 당화 부위에 부착된 올리고당 구조의 변형을 발생시킨다. 따라서, 지금까지 주어진 치료용 단백질 생성 과정에서 생체내 생성 세포 내의 당화 수준 및/또는 당화 패턴을 정확하게 조절하고 제어하는 것은 기술적으로 매우 도전적이었다.

[0007] 지난 수십 년 동안, 올리고당 생성(미국 특허 제5,047,355호, 미국 특허 제5,510,261호), 산소화 수준, pH, 정제 방식 등의 변화(Werner, R. and Noe, W. (1993), Drug Res. 43:1134-1139; Werner, R. and Noe, W. (1993), Drug Res. 43:1242-1249; Hayter et al., (1992) Biotech, and Bioeng. 39:327-335; Borys et al., (1994) Biotech and Bioeng. 43:505-514; Borys et al., (1993) Bio/technology 11:720-724; Hearing et al., (1989) J. Cell Biol. 108:339-353; Goochee et al., in Frontiers in Bioprocessing II, Todd et al., eds (1992) American Chemical Society pp.199-240; 미국 특허 제5,096,816호; Chotigeat, W., (1994) Cytotech. 15:217-221)에 관여하는 특정 효소를 숙주 세포에 도입하거나 과발현하는 것을 포함하여 숙주 세포에서 당단백

질의 당화 패턴을 변경할 수 있는 다양한 방법이 제안되었고 여러 공정 매개변수가 조사되었다.

[0008] 상기 요약된 바와 같이, 바람직한 당화 수준 및/또는 당화 패턴을 갖는 당단백질의 생성은 상기 항체의 유리한 특성, 특히, 이의 치료 효능과 관련된 특성을 적어도 유지하고, 선택적으로 최적화하는 데 중요하다.

[0009] 기술적 문제는 본원에서 하기에 제공되고 첨부된 청구범위에서 특징지어지는 구현예들의 제공에 의해 해결된다.

발명의 내용

[0010] 지난 수 년 동안, CHO 세포와 같은 포유류 세포에서 단백질 갈락토실화 과정을 기본적으로 이해하고 기술적으로 제어하기 위해 많은 노력이 있었다. 지금까지, 단백질 당화의 정도에 영향을 미치는 데 사용할 수 있는 몇 가지 일반적인 전략이 있었고, 여기서 이의 효과는 종종 세포 유형 및 생성물 특이적이다(Hossler et al., Glycobiology 19(9) (2009) 936-949; Hossler, Genomics and Systems Biology of Mammalian Cell Culture 127 (2012) 187-219): 1) 당화전달효소(glycosyltransferase)의 활성 개선, 2) 뉴클레오티드 당 전달을 위한 뉴클레오티드 당 수송체의 가용성 및 활성 개선, 3) 뉴클레오티드 당 기질의 가용성 증가; 및 4) 세포의 글리칸 분해에 대한 글리코시다아제(glycosidase) 감소. Crowell et al. (Biotechnol Bioeng 96(3) (2007) 538-549)은 올리고당전달효소(oligosaccharyltransferase) 복합체 및 β 1,4-갈락토스전달효소(galactosyltransferase)의 바람직한 보조인자인 망간으로 CHO 세포 배양물을 보충하면 이후 배양에서 rhEPO N-글리칸의 부위 점유 및 β 1,4-갈락토실화가 증가됨을 보여주었다. Gramer et al., (Biotechnol Bioeng. 108(7) (2011) 1591-602))은 우리딘, $MnCl_2$ 및 갈락토스의 상승적 조합이 공급된 총 UMG 농도와 관련하여 mAb 갈락토실화를 정량적으로 유의하게 증가시킨다고 보고하였다. 당화전달효소 및 뉴클레오티드 당 수송체의 과발현 및/또는 녹다운(knockdown)을 사용하는 일부 접근법(Jeong et al., J Microbiol Biotechnol 18(12) (2008) 1945-1952; Weikert et al., Nat Biotechnol 17(11) (1999) 1116-1121)이 또한 보고되었다. 뉴클레오티드 당 전구체 공급은 재조합 단백질의 당화를 제어하는 가능한 전략으로 보고되었다(Wong et al., Biotechnology and Bioengineering 107.2 (2010) 321-336). 구체적으로, 세포 배양 배지에 갈락토스, 글루코사민, 및 N-아세틸만노사민을 첨가하면 세포내 뉴클레오티드 당 수준이 증가하는 것으로 입증되었다. 하지만, 당화 유전자 발현에 미치는 증가된 세포내 뉴클레오티드 당 수준의 효과는 잘 규명되지 않았다. 또한, 세포내 뉴클레오티드 당 수준의 증가가 반드시 재조합 단백질의 당화 개선으로 이어지는 것은 아니었다. 일부 연구에서는 단백질 당화를 개선할 목적으로 세포 글리코시다아제를 녹다운하는 전략을 사용하였다(Ngantung et al., Biotechnol Bioeng. 95(1) (2006) 106-19). 하지만, 이러한 접근 방식은 경우에 따라 효과가 있었다. 요약하면, 다양한 외부 요인이 세포 내 갈락토실화 과정에 어떻게 영향을 미치는지 조사하기 위한 근본적인 연구가 여전히 필요하다.

[0011] 본원에 기재된 바와 같이, 항체 갈락토실화는 이들 당 분자가 갈락토실화에 필요한 기질로서 작용하기 때문에 세포에 존재하는 UDP-갈락토스의 농도에 의존한다. 이를 통해, UDP-갈락토스 함량의 증가는 CHO 세포에서 발현된 항체의 더 높은 갈락토실화 및 시알릴화(sialylation)와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 세포에서 다양한 UDP-갈락토스 수준은 글리칸 이질성에 유의한 의미를 가질 수 있다.

[0012] 이러한 맥락에서, 2개의 확인된 효소, 우리딘 이인산 α -D-글루코스 에피머화효소(UDP-Glc-E) 및 UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디릴 전달효소(UDP-Gal-T)를 포함하는 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스 전환 경로는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스 전환 경로 내에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

[0013] 이와 관련하여, UDP-Gal-T(EC 2.7.7.12)는 L-시스테인, 글루타티온, 2-메르캅토에탄올 및 DTT와 같은 몇 가지 간단한 설프히드릴 분자로 조절될 수 있는 매우 특별한 부류의 효소이다. 이미 1966년에 Mayes 및 Hansen(Methods Enzymol. 9 (1966) 708-713)은 L-시스테인을 사용하여 송아지 간에서 부분적으로 정제된 UDP-Gal-T의 효소 활성을 활성화하고 자극할 수 있음을 발견하였다. 다음 해에, Mayes(Arch. Biochem. Biophys. 172 (1976) 715-720)는 송아지 간에서 완전히 정제된 UDP-Gal-T로 광범위한 연구를 실시하고 L-시스테인의 이러한 활성화 기능을 추가로 확인하였다. 다른 유기체의 UDP-Gal-T에 대해서도 유사한 연구가 실시되었다. Saito et al. (J. Biol. Chem. 242 (1967) 2362-2368)은 L-시스테인이 정제된 대장균 UDP-Gal-T가 이의 최대 활성에 도달하도록 자극한다는 것을 입증하였다. Chowdhury (Indian J. Biochem. Biophys. 16 (1979) 273-277)은 또한 대장균에서 정제된 UDP-GAL-T로 이러한 관찰을 확인하였다.

[0014] 이로써, 본 발명은 설프히드릴 화합물 또는 이의 유도체를 이용한 제조 과정에서 항체와 같은 재조합 단백질의 세포내 UDP-갈락토스 함량 및 갈락토실화를 조절 및 제어할 수 있음을 발견하였다. 예를 들어, 본 발명은 설프히드릴 화합물 또는 이의 유도체를 이용한 제조 공정 동안 재조합 단일클론 항체의 N-글리칸 처리를 조절 및 제

어함으로써 항체 갈락토실화의 미세 조정을 위한 세포 배양 공정을 성공적이고 특이적으로 조작하는 것이 가능하다는 것을 발견하였다.

- [0015] 본 발명의 한 가지 특징은 L-시스테인과 같은 단순한 설프히드릴 분자 또는 화합물을 사용하여 CHO K1 및 이의 유도체 세포주와 같은 포유동물 세포주에서 UDP-Gal-T 생체내 활성을 조절함으로써 모노갈락토실화된(G1) 또는 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 재조합 단백질을 생성하는 것이다. 다시 말해서, 본 발명은 특히 모노갈락토실화된(G1) 또는 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 재조합 단백질을 생성하기 위해, CHO K1 및 이의 유도체 세포주와 같은 포유동물 세포에서 새로 확인되고 구체화된 전환 경로를 UDP-Gal-T 및 UDP-Glc-E의 두 가지 효소로 조절함으로써 생체 내에서 글루코(gluco-) 및 갈락토(galacto-)로 구성된 UDP-당을 조절하는 새로운 접근 방식을 제공한다. 본원의 실시예에 나타난 바와 같이, 특정 설프히드릴 화합물 또는 이의 유도체의 상대적 매질 농도를 조절함으로써, 상이한 항체의 갈락토실화가 다른 당형(glycoform), 기타 생성물 품질 속성, 또는 세포 배양 성능에 대해 최소한의 영향을 미치면서 고수율, 배치 또는 유가식 생산 공정에서 정밀하게 제어될 수 있음이 입증되었다. 또한, 이들 데이터는 재조합 항체 생성물 분자 이질성 및 생물학적 활성의 정의를 위해 생산 규모에서 복잡하고 역동적인 세포 과정의 정밀한 조절 및 제어가 가능함을 보여준다. 이를 통해, 세포 증식 및 생산성을 최대화하면서 특정 수준의 항체 갈락토실화를 달성하기 위해 세포 배양 배지 또는 공급물(feed) 조성의 지식 기반 설계를 뒷받침하는 주요 효과기(effector) 상호 작용을 이해할 수 있다.
- [0016] 특히, 본 발명은 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체에 관한 것으로서,
- [0017] 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 제1 항원 결합 도메인은,
- [0018] (a) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- [0019] (b) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- [0020] (c) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하며;
- [0021] 경쇄 가변 도메인(VL)으로서,
- [0022] (d) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- [0023] (e) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- [0024] (f) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하고;
- [0025] 여기서, 상기 제2 항원 결합 도메인은,
- [0026] (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- [0027] (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- [0028] (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하며;
- [0029] 경쇄 가변 도메인(VL)으로서,
- [0030] (d) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- [0031] (e) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- [0032] (f) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;
- [0033] 여기서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 총 글리칸당 19.0~29.0%(w/w)의 G1 및 1.3~2.8%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 20.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.4~2.7%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.5~2.7%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~27.4%(w/w)의 G1 및 1.5~2.6%(w/w)의 G2를 가진다.
- [0034] 바람직하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서:
- [0035] (a) 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 28의 VH 서열을 포함하고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 40의 VH 서열을 포함하거나;
- [0036] (b) 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 29의 VL 서열을 포함하고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호

41의 VL 서열을 포함하거나; 또는

- [0037] (c) 상기 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함한다.
- [0038] 더 바람직하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서:
- [0039] (a) 상기 제1 항원 결합 도메인의 VH 서열은 서열번호 28의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 상기 제2 항원 결합 도메인의 VH 서열은 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖거나;
- [0040] (b) 상기 제1 항원 결합 도메인의 VL 서열은 서열번호 29의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 상기 제2 항원 결합 도메인의 VL 서열은 서열번호 41의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖거나; 또는
- [0041] (c) 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 (a)에 정의된 제1 및 제2 항원 결합 도메인의 VH 서열 및 (b)에 정의된 제1 및 제2 항원 결합 도메인의 VL 서열을 포함한다.
- [0042] 보다 더 바람직하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는:
- [0043] (a) 서열번호 46의 제1 중쇄 및 서열번호 45의 제2 중쇄;
- [0044] (b) 서열번호 33의 제1 경쇄 및 서열번호 44의 제2 경쇄; 또는
- [0045] (c) (a)에 정의된 제1 중쇄 및 제2 중쇄, 및 (b)에 정의된 제1 경쇄 및 제2 경쇄를 포함한다.
- [0046] 가장 바람직하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는:
- [0047] (a) 서열번호 47의 제1 중쇄 및 서열번호 45의 제2 중쇄;
- [0048] (b) 서열번호 33의 제1 경쇄 및 서열번호 44의 제2 경쇄; 또는
- [0049] (c) (a)에 정의된 제1 중쇄 및 제2 중쇄, 및 (b)에 정의된 제1 경쇄, 제2 경쇄 및 제3 경쇄를 포함한다.
- [0050] 마찬가지로, 본 발명은 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 α -시누클레인 항체로서,
- [0051] 상기 α -시누클레인 항체는
- [0052] (a) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- [0053] (b) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- [0054] (c) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하며;
- [0055] 경쇄 가변 도메인(VL)으로서,
- [0056] (d) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- [0057] (e) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- [0058] (f) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;
- [0059] 여기서, 상기 항 α -시누클레인 항체는 총 글리칸당 17.2~48.0%(w/w)의 G1 및 3.1~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 25.4~48.0%(w/w)의 G1 및 3.5~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 27.2~47.0%의 G1 및 4.4 내지 15.0%의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 40.0~46.0%(w/w)의 G1 및 8.4~15.0%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 41.0~45.0%(w/w)의 G1 및 9.5~14.0%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 42.1~43.9%(w/w)의 G1 및 10.6~13.3%(w/w)의 G2를 가진다.
- [0060] 바람직하게는, 상기 항 α -시누클레인 항체는:
- [0061] (a) 서열번호 16의 VH 서열;
- [0062] (b) 서열번호 17의 VL 서열; 또는
- [0063] (c) (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함한다.

- [0064] 더 바람직하게는, 상기 항 α -시누클레인 항체는:
- [0065] (a) 서열번호 16의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열;
- [0066] (b) 서열번호 17의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는
- [0067] (c) (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함한다.
- [0068] 보다 더 바람직하게는, 상기 항 α -시누클레인 항체는 서열번호 20의 중쇄 및 서열번호 21의 경쇄를 포함한다.
- [0069] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸 또는 상기 항 α -시누클레인 항체는 N-아세틸글루코사민과 관련이 있다.
- [0070] 마찬가지로, 본 발명은 포유동물 세포에서 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 본 발명의 맥락에서 개시된 항체를 생성하기 위한 세포 배양 배지에 관한 것이고, 상기 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 설프히드릴 기(들)의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과의 글루코스의 농도를 포함한다.
- [0071] 바람직하게는, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지, 더 바람직하게는 화학적으로 정의된 배지, 더 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지이다.
- [0072] 마찬가지로, 본 발명은 본 발명의 맥락에서 개시된 제1 및 제2 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인을 부호화하는 폴리뉴클레오타이드와 80% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 본 발명의 맥락에서 개시된 제1 및 제2 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 부호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 80% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖거나, 또는
- [0073] 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 벡터를 갖는 본 발명의 맥락에서 개시된 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는 포유동물 세포에 관한 것으로서,
- [0074] 상기 세포는 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지에서 배양된다.
- [0075] 바람직하게는, 상기 포유동물 세포는 본 발명의 맥락에서 개시된 제1 및 제2 중쇄를 부호화하는 폴리뉴클레오타이드와 80% 동일성을 갖는 서열을 추가로 포함하거나, 본 발명의 맥락에서 개시된 제1 및 제2 경쇄를 부호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 80% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는
- [0076] 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 벡터를 추가로 포함하고,
- [0077] 상기 세포는 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지에서 배양된다.
- [0078] 마찬가지로, 본 발명은 본 발명의 맥락에서 개시된 중쇄 가변 도메인(VH)을 부호화하는 폴리뉴클레오타이드와 80% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 맥락에서 개시된 경쇄 가변 도메인(VL)을 부호화하는 폴리뉴클레오타이드와 80% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는
- [0079] 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 α -시누클레인 항체에 관한 것으로서,
- [0080] 상기 세포는 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지에서 배양된다.
- [0081] 마찬가지로, 본 발명은 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 본 발명의 맥락에서 개시된 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은,
- [0082] (a) 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지에서 본 발명의 맥락에서 개시된 포유동물 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과의 글루코스가 적어도 3일, 더 바람직하게는 적어도 4일, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 5일 동안 유지되는, 단계,
- [0083] (b) 상기 항체를 분리하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0084] 바람직하게는, 상기 농도를 유지하는 것은 총 글리칸당 19.0~29.0%(w/w)의 G1 및 1.3~2.8%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 20.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.4~2.7%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당

21.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.5~2.7%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~27.4%(w/w)의 G1 및 1.5~2.6%(w/w)의 G2를 가진 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는데 효과적이다.

[0085] 바람직하게는, 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설피드릴 화합물(들)로부터 설피드릴기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 역가에 비해 상기 항체의 역가를 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 더 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 보다 더 바람직하게는 적어도 60%, 및 가장 바람직하게는 적어도 80% 만큼 증가시킨다. 다른 예로서, 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설피드릴 화합물(들)로부터 설피드릴기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 역가에 비해 상기 항체의 역가를 30% 내지 75% 만큼 증가시킨다.

[0086] 마찬가지로, 본 발명은 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 본 발명의 맥락에서 개시된 항 α -시누클레인 항체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은,

[0087] (a) 명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지에서 본 발명의 맥락에서 개시된 포유동물 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설피드릴 화합물(들)로부터 설피드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과 및 10.0 g/L 이하의 글루코스가 적어도 3일, 더 바람직하게는 적어도 4일, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 5일 동안 유지되는, 단계,

[0088] (b) 상기 항체를 분리하는 단계를 포함한다.

[0089] 바람직하게는, 상기 농도는 총 글리칸당 17.2~48.0%(w/w)의 G1 및 3.1~15.0%(w/w)의 G2; 총 글리칸당 25.4~48.0%(w/w)의 G1 및 3.5~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 27.2~47.0%의 G1 및 4.4 내지 15.0%의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 40.0~46.0%(w/w)의 G1 및 8.4~15.0%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 41.0~45.0%(w/w)의 G1 및 9.5~14.0%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 42.1~43.9%(w/w)의 G1 및 10.6~13.3%(w/w)의 G2를 가지는, 항 α -시누클레인 항체를 생성하는데 효과적이다.

[0090] 바람직하게는, 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설피드릴 화합물(들)로부터 설피드릴기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 역가에 비해 상기 항체의 역가를 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 30%, 더 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 더 바람직하게는 적어도 60%, 더 바람직하게는 적어도 70%, 보다 더 바람직하게는 적어도 80%, 및 가장 바람직하게는 적어도 100% 만큼 증가시킨다.

[0091] 바람직하게는, 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설피드릴 화합물(들)로부터 설피드릴기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 항 α -시누클레인 항체의 비모노갈락토실화된(G1) 및 비디갈락토실화된(G2) 형태에 비해

[0092] (i) 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 35%, 보다 더 바람직하게는 적어도 45%, 및 가장 바람직하게는 적어도 50% 만큼 증가된 단백질 표적 결합;

[0093] (ii) 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 33%, 더 바람직하게는 적어도 40%, 및 가장 바람직하게는 적어도 45% 만큼 증가된 신생아 Fc 수용체(FcRn) 결합; 및/또는

[0094] (iii) 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 36%, 보다 더 바람직하게는 45%, 및 가장 바람직하게는 50% 만큼 증가된 Fc γ RIIa 결합을 특징으로 하는 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 α -시누클레인 항체를 발생시킨다.

[0095] 본 발명의 맥락에서 개시된 방법은 바람직하게는 하나 이상의 설피드릴 화합물(들)로부터의 적어도 3.0 초과 및 10.0 mM 미만의 설피드릴기(들)의 시작 농도에서 포유동물 세포의 배양을 포함한다. 바람직하게는, 상기 방법은 상기 배양 전에 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 사전 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 농도는 적어도 5일 동안, 바람직하게는 적어도 7일 동안, 더 바람직하게는 적어도 10일 동안, 보다 더 바람직하게는 적어도 12일 동안, 및 가장 바람직하게는 적어도 14일 동안 유지된다.

[0096] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지의 하나 이상의 설피드릴 화합물(들)로부터의 설피드릴기(들)는 환원 및/또는 산화된 형태로 함유되고, 더 바람직하게는 상기 설피드릴의 환원된 형태의 농도는 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 범위 및/또는 상기 설피드릴의 산화된 형태의 농도 범위는 2.0 mM 초과 및 5.0 mM 미만의 범위이다.

- [0097] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 방법은 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 또는 상기 항 α -시누클레인 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0098] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 방법은 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 또는 상기 항 α -시누클레인 항체의 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 방법은 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 또는 상기 항 α -시누클레인 항체를 약품으로 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0099] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 9.0 mM 이하, 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 8.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 7.0 mM 이하, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다.
- [0100] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 5.0 mM 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 9.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 8.0 mM 이하, 보다 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 7.0 mM 이하, 및 가장 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다.
- [0101] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지는 적어도 2.0 g/L 초과 및 13.0 g/L 이하의 글루코스, 바람직하게는 적어도 3.0 g/L 초과 및 13.0 g/L 이하의 글루코스, 및 가장 바람직하게는 적어도 4.0 g/L 초과 및 13.0 g/L 이하의 글루코스를 포함한다.
- [0102] 바람직하게는, 상기 세포 배양 배지는 13.0 g/L 이하의 글루코스, 바람직하게는 8.0 g/L 이하, 더 바람직하게는 7.0 g/L 이하, 보다 더 바람직하게는 6.0 g/L 이하, 및 가장 바람직하게는 5.0 g/L 이하의 글루코스를 포함한다.
- [0103] 바람직하게는, 상기 세포 배양 배지는 2.0 g/L 초과 내지 13.0 g/L 이하의 글루코스, 바람직하게는 2.0 g/L 초과 내지 8.0 g/L 이하의 글루코스, 더 바람직하게는 2.0 g/L 초과 내지 7.0 g/L 이하의 글루코스, 보다 더 바람직하게는 2.0 g/L 초과 내지 6.0 g/L 이하의 글루코스, 및 가장 바람직하게는 2.0 g/L 초과 내지 5.0 g/L 이하의 글루코스를 포함한다.
- [0104] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지의 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인, 시스틴, 석시머, 메티마졸, 시스테아민, 아자티오프린, 메르캅토프린, S-메틸시스테인, 셀레노시스테인, S-포스포시스테인, 4'-포스포판테테인, 부티릴티오펜올, 카르보시스테인, N-셀포시스테인, 알레틴, 아세틸시스테인, 다이머카프롤, 코엔자임 M, 소듐 아우로티오말레이트, 판테틴, 부실라민, 메틸셀레노시스테인, 다이머캅토숙신산, 아세틸시스테인 아마이드, 티오글리콜산, 2,3-다이머캅토프로판올, O-메틸메르캅토포에탄올, 메르캅토포에탄올, f1-메르캅토프로판올, 메틸메르캅탄, S-메틸메르캅토포에탄올, 글루타티온, 글루타티온 유도체, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인, 시스틴, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 더 바람직하게는, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인이고, 여기서 상기 세포 배양 배지 내 시스테인 농도는 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 상기 시스테인 농도는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하이다. 마찬가지로 바람직하게는, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스틴이고, 여기서 상기 세포 배양 배지 내 시스틴 농도는 2.0 mM 초과 및 5.0 mM 미만, 바람직하게는 상기 시스틴 농도는 적어도 3.0 mM 및 4.0 mM 이하이다.
- [0105] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 방법의 포유동물 세포의 배양은 대규모 형식의 생물반응기, 바람직하게는 10,000 L 생물반응기에서 이루어진다.
- [0106] 마찬가지로, 본 발명은 본 발명의 맥락에서 개시된 방법 또는 포유동물 세포에 의해 수득 가능한 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 본 발명의 맥락에서 개시된 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0107] 마찬가지로, 본 발명은 본 발명의 맥락에서 개시된 방법 또는 포유동물 세포에 의해 수득 가능한 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 본 발명의 맥락에서 개시된 항 α -시누클레인 항체에 관한 것이다.
- [0108] 바람직하게는, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 본 발명의 맥락에서 개시된 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체에 관한 것이다. 더 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 B 세포 관련 암을 가진 환자의 치료에 사용하기 위한 것, 바람

직하게는 만성 백혈병 및 림프종을 가진 환자의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0109]

마찬가지로 바람직하게는, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 α -시누클레인 항체에 관한 것이다. 더 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 항 α -시누클레인 항체는 파킨슨병을 가진 환자의 치료에 사용하기 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0110]

도면의 범례

도 1: CHO K1M에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스의 형성에서 글루코스 전환 경로. EC 2.7.7.9: UTP: α -D-글루코스-1-인산 우리디틸전달효소. UDP-Glc-E: 우리딘-2인산 글루코스 에피머화효소.

도 2: CHO K1M에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스에 대한 조합된 상호전환 경로. EC 2.7.7.9: UTP: α -D-글루코스-1-인산 우리디틸전달효소. UDP-Glc-E: 우리딘-2인산 글루코스 에피머화효소. UDP-Gal-T: UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소.

도 3: CHO K1M에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스에 대한 상호전환 경로를 설프히드릴 화합물로 조절. UDP-Glc-E: 우리딘-2인산 글루코스 에피머화효소. UDP-Gal-T: UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소.

도 4: CHO K1M에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스에 대한 상호전환 경로를 세포 배양 배지 내 L-시스테인으로 조절. UDP-Glc-E: 우리딘-2인산 글루코스 에피머화효소. UDP-Gal-T: UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소.

도 5: UDP-갈락토스는 UDP-글루코스로부터 생성되고 단백질 갈락토스화를 위해 골지(Golgi)에서 사용된다. UDP-Glc-E: 우리딘-2인산 글루코스 에피머화효소. UDP-Gal-T: UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소. EC2.4.1.38: β -N-아세틸-글루코사미닐글리코캡티드 베타-1,4-갈락토스전달효소.

도 6a: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO L965 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 G0 형태에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 G0 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 6b: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO L965 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 G1 형태에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 G1 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 6c: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO L965 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 G2 형태에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 G2 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 6d: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO L965 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 생성물 역가에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 생성물 역가의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 6e: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO L965 세포 배양물을 생성하는 항 α -시누클레인 항체의 세포 성장(IVCD)에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 세포 성장(IVCD)의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 7a: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양에서 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G0 형태에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G0 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 7b: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양에서 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G1 형태에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G1 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 7c: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양에서 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 생성물 역가에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체

의 생성물 역가의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 7d: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양물을 생성하는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 세포 성장(IVCD)에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 세포 성장(IVCD)의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 8a: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양에서 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G0 형태에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G0 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 8b: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양에서 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G1 형태에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 G1 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 8c: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양에서 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 생성물 역가에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 생성물 역가의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 8d: 생성 배지에서 5 mM L-시스테인 또는 10 mM L-시스테인을 이용한 CHO T104 세포 배양물을 생성하는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 bsAB의 세포 성장(IVCD)에 미치는 상이한 L-시스테인 농도의 효과. 세포 성장(IVCD)의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 9a: 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L967 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 G0 형태에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 G0 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 9b: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L967 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 G1 형태에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 G1 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 9c: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L967 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 G2 형태에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 G2 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 9d: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L967 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 생성물 역가에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 생성물 역가의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 9e: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L967 세포 배양물을 생성하는 항 α-시누클레인 항체의 세포 성장(IVCD)에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 세포 성장(IVCD)의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 10a: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 G0 형태에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 G0 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 10b: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 G1 형태에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 G1 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 10c: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 G2 형태에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 G2 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 10d: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α-시누클레인 항체의 생성물 역가에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 항 α-시누클레인 항체의 생성물 역가의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 10e: 생성 배지에서 2 mM L-시스틴 또는 4 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양물을 생성하는 항 α-시

뉴클레인 항체의 세포 성장(IVCD)에 미치는 상이한 L-시스틴 농도의 효과. 세포 성장(IVCD)의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 11a: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 3 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 G1 형태에 미치는 상이한 L-시스틴/L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 G1 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 11b: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 3 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 G2 형태에 미치는 상이한 L-시스틴/L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 G2 형태의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 11c: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 3 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 FcRn 상대 결합 수준에 미치는 상이한 L-시스틴/L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 FcRn 상대 결합 수준의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 11d: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 3 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 Fc γ -RIIa(H131) 상대 결합 수준에 미치는 상이한 L-시스틴/L-시스테인 농도의 효과. 항 α -시누클레인 항체의 Fc γ -RIIa(H131) 상대 결합 수준의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 11e: 생성 배지에서 6 mM L-시스테인 또는 3 mM L-시스틴을 이용한 CHO L971 세포 배양에서 항 α -시누클레인 항체의 상대 결합에 미치는 상이한 L-시스틴/L-시스테인 농도의 효과. 상대적인 표적 결합의 비율은 14일 생성 공정의 종료 시에 표시된다.

도 12: 항체의 Fab 영역(#4 Fab 결합) 및 C 말단 변형(#5 C 말단 변경)에서 항원 결합 부위의 Fc 영역(#1 Fc-당화), Fc γ IIa 및 FcRn 효과기 결합 부위(#2 Fc γ IIa 결합 및 FcRn 결합) 내 당화 부위에 대한 개략도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0111] 상이한 당화 패턴, 구체적으로, 갈락토실화 패턴을 갖는 재조합 단백질은 일반적으로 포유동물 발현 시스템을 이용한 발효 생산 공정에 의해 생성된다. 단백질의 번역 후 당화, 특히 갈락토실화는 단백질 용해도, 안정성, 제거율, 면역원성 및 면역 효과기 기능과 같은 중요한 물리화학적 특성 및 기능을 수행하는 데 필수적이다. 이와 관련하여, 재조합적으로 생성된 단백질의 당화 패턴, 구체적으로, 갈락토실화 패턴의 차이는 최근 가능성 있는 예방 및 치료제로서 생성된 재조합 단백질이 임상에 접근함에 따라 과학계에서 많은 주목을 받고 있다. 당단백질의 올리고당 측쇄는 단백질의 기능(Wittwer and Howard, Biochem. 29 (1990) 4175-4180) 및 단백질의 입체 형태 및 제시된 3차원 표면을 발생시키는 당단백질 부분 간의 분자내 상호작용에 영향을 미칠 수 있다(Hart, Curr. Op. Cell Biol., 4 (1992) 1017-1023; Goochee, et al., Bio/Technology 9 (1991) 1347-1355; Parekh, Curr. Op. Struct. Biol. 1 (1991) 750-754). 예를 들어, 재조합 단백질의 갈락토실화 상태는 상이한 효소에 의해 조절되며, 이들 효소 중 하나 이상의 기능의 차이는 재조합 단백질의 갈락토실화 상태에 유의한 영향을 미칠 수 있다. 이러한 맥락에서, 재조합 포유동물 세포, 예컨대, CHO 세포에 대한 효소 UDP-당 경로 조절의 다중 효과가 입증되었으며, 이는 세포 성장에 미치는 효과, 특히 갈락토실화 수준에서 재조합 단백질 생산성 및/또는 단백질 품질에 미치는 효과를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 재조합 mAb의 생물학적 기능에 대한 추가 효과가 입증되었다. 따라서, 재조합 단백질, 특히 치료제로 사용하기 위한 단백질의 갈락토실화 패턴을 유지하는 것이 중요하다.
- [0112] 재조합 단백질, 특히 항체와 같은 치료 단백질의 품질은 배지에 존재하는 다양한 영양소의 농도와 같은 다양한 매개변수에 의존하는 것으로 공지되어 있다. 왜냐하면, 상기 영양소, 예컨대, 당 분자가 당화에 필요한 세포 내부의 당-뉴클레오타이드 풀(pool)의 전구체로 작용하기 때문이다. 세포에서 다양한 당 뉴클레오타이드 농도 수준은 항체 이질성에 유의한 영향을 미칠 수 있으며, 특히 미리 결정된 임상 결과를 달성하기 위해 제품의 일관된 품질이 필요한 배치 또는 유가식 공정에서 중요하다.
- [0113] 따라서, 본 발명의 한 가지 주요 목적은 CHO K1 및 이의 유도체 세포주와 같은 포유동물 세포에서 세포내 UDP-글루코오스 및 UDP-갈락토오스 농도를 생체 내에서 조절하기 위해 시스테인 또는 시스틴과 같은 설폰히드릴 화합물을 사용함으로써 사전 정의된 임상 적용을 위한 최종 생성물 품질을 개선하는 것이다.
- [0114] 이런 맥락에서, 본 발명은 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 당단백질, 특히 재조합 당단백질뿐만 아니라 상기 당단백질을 생성하기 위한 수단 및 방법에 관한 것이다. 이에 따라, 본원 및 본 발명의 맥락에서 기재된 당단백질은, 예를 들어, 재조합 당단백질과 같은 치료용 당단백질일 수 있다. 따라서, 본원

에 개시되고 본 발명의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 재조합 단백질과 같은 당단백질은 하나 이상의 글리칸과 결합될 수 있는 단백질이다. 본원에 개시되고 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이, 하나 이상의 글리칸과 결합된 단백질은 모노갈락토실화된(G1) 또는 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 단백질을 지칭한다. 하나 이상의 글리칸을 갖는 단백질은 글리칸이 결합될 수 있는 여러 부위를 보유할 수 있다. 당업자는 글리칸이 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 단백질과 결합할 수 있는 잠재적인 부위를 알고 있다. 예를 들어, 단백질은 적어도 하나, 더 바람직하게는 적어도 2개의 갈락토실화된 글리칸을 포함할 수 있고, 여기서 상기 갈락토실화된 글리칸은 N-아세틸글루코사민과 결합할 수 있다. 상기 글리칸은 모노갈락토실화(G1) 또는 디갈락토실화(G2)될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 모노갈락토실화된(G1) 또는 디갈락토실화된(G2) 단백질의 수준은 당업자에게 공지된 수단 및 방법에 의해 그리고 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이 측정할 수 있다.

[0115] 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 바와 같이, 재조합 단백질은 치료 단백질일 수 있다. 이러한 치료용 단백질은, 예를 들어, 항체일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 상기 당단백질, 예컨대, 항체는 약제로서 사용할 수 있다. 치료 단백질은 비호지킨 림프종 및 만성 림프구성 백혈병, 파킨슨병 및 관련 장애와 같은 B 세포 증식성 장애의 치료에 사용하기 위한 치료 단백질을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정한 일 구현예에서, 상기 재조합 단백질은 항체일 수 있다. 예를 들어, 포유동물 세포에 의해 생성되는 항체는 치료에 사용되는 항체 또는 치료에 사용할 약물을 개발하기 위한 약물 후보로서 사용되는 항체이다. 일 구현예에서, 상기 재조합 단백질은 항 α -시누클레인 항체 또는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체일 수 있다.

[0116] 상기 당단백질, 예컨대, 항체는 상기 당단백질을 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 포유동물 세포에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 본원 및 본 발명의 맥락에서 기재된 포유동물 세포는 10,000 L 생물반응기와 같은 대규모 형식의 생물반응기에서 배양할 수 있다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포는 재조합 치료 단백질 생성을 위해 가장 자주 사용되는 진핵 숙주이다.

[0117] 본원 및 본 발명의 맥락에서 기재된 바와 같이, 상기 당단백질은 이중특이적 항체, 예컨대, 항 CD20/항 CD3 항체와 같은 항체일 수 있다. 상기 항체는 상기 항체를 부호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 상에서 발현될 수 있다. 다른 예로서, 상기 항체는 항 α -시누클레인 항체일 수 있고 상기 항체는 LoxP.SV40.Puro.CMV.FseI nbe 또는 Loxfas.puro.CMV.2L.v1 발현 벡터를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 적합한 벡터 내로 복제(clone)될 수 있다. CHO-K1M TI 숙주 세포를 안정한 진핵 세포주를 생성하기 위해 이러한 다시스트론 플라스미드(polycistronic plasmid)로 형질감염시켰다. 본원에 사용된 용어 "벡터"는 적절한 제어 요소와 연관될 때 복제할 수 있고 세포 사이에 유전자 서열을 전달할 수 있는 플라스미드, 파지, 트랜스포존(transposon), 코스미드, 염색체, 바이러스, 비리온 등과 같은 임의의 유전 요소를 지칭한다. 따라서, 상기 용어는 복제 및 발현 비히클뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 하나 이상의 벡터는 다시스트론 벡터일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "다시스트론"은 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 부호화하는 mRNA를 지칭한다. 특정한 일 예로서, 하나 초과인 벡터가 사용될 수 있으며, 여기서 제1 벡터는 제1 경쇄 및 제2 중쇄를 발현할 수 있고 제2 벡터는 제2 경쇄 및 제1 중쇄를 발현할 수 있다. 당업자는 본원 및 본 발명의 맥락에서 기재된 항체를 발현하기에 적합한 벡터를 구성하는 방법을 알고 있다. 추가로, 재조합 세포주의 생성을 위해, 숙주 세포는 하나 이상의 벡터로 공동 형질감염시킬 수 있고, 여기서 상기 벡터는 디히드로엽산환원효소(dihydrofolate reductase, DHFR) 유전자와 같은 선택 마커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 뮤린 DHFR 유전자의 발현은 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터에 의해 구동되고 SV40 폴리아데닐화 신호(SV40 폴리 A)에 의해 종결된다.

[0118] 추가로, 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지는 항체와 같은 상기 당단백질을 생성하기 위해 사용될 수 있으며, 여기서 상기 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 설프히드릴 기(들)의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과의 글루코스의 농도를 포함한다. 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지일 수 있다. 예를 들어, 일반적인 화학적으로 정의된 세포 배양 배지는 에너지원, 아미노산, 비타민, 미량 원소 및 무기 염, 핵산 유도체, 지방산 및 지질, 기타 일부로 분류될 수 있는 최대 100개의 구성요소를 함유할 수 있다.

[0119] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 기재되고 첨부된 실시예에 의해 예시된 당단백질을 생성하는 포유동물 세포는 하기와 같이:

[0120] (a) 본원에 기재된 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 농도 및 적어도

3.0 g/L 초과와 글루코스가 적어도 3일, 더 바람직하게는 적어도 4일, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 5일 동안 유지되는, 단계;

[0121] (b) 상기 항체를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 배양할 수 있다.

[0122] 상기 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 역가에 비해 상기 당단백질의 역가를 증가시킨다. 상기 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 당단백질의 비모노갈락토실화된(G1) 및 비디갈락토실화된(G2) 형태에 비해 증가된 단백질 표적 결합, 증가된 신생아 Fc 수용체(FcRn) 결합, 및/또는 증가된 FcγRIIa 결합을 특징으로 하고 본원에 기재된 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 당단백질을 추가로 발생시킬 수 있다. 상세하게는, 포유동물 세포의 배양은 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 적어도 3.0 초과 및 10.0 mM 미만의 설프히드릴 기(들)의 시작 농도에서의 배양을 포함할 수 있다. 상기 방법은 상기 배양 전에 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 사전 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0123] 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 공정은 세포 배양 배지에 세포를 접종하는 것에서 시작하여 세포 배양 배지로부터 세포를 회수하는 것으로 끝날 수 있는 세포 배양 공정을 지칭한다. 상기 접종은 세포 배양 공정의 1일째를 말하며 상기 세포 배양 배지로부터 세포를 회수하는 것은, 예를 들어, 세포 배양 12일, 13일 또는 14일에 실시할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 당업자는 통상적인 일반 지식에 의해 세포 배양 공정의 적합한 기간을 선택하는 방법을 알고 있다. 이는 또한 첨부된 실시예에 의해 예시된다. 본원에 개시되고 본 발명의 맥락에서 사용된 전체 세포 배양 공정은 성장기 및 생성기를 포함할 수 있다. 본원에 기재되고 본 발명의 맥락에서 사용된 바와 같이, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)의 농도는 세포 배양 공정의 적어도 5일 동안, 바람직하게는 적어도 7일 동안, 더 바람직하게는 적어도 10일 동안, 보다 더 바람직하게는 적어도 12일 동안, 및 가장 바람직하게는 적어도 14일 동안 유지된다.

[0124] 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 방법은 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 사전 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 사전 배양 단계는 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 4.0 mM 내지 10.0 mM의 설프히드릴기(들)를 포함하는 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있거나, 또는 세포 배양 배지의 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)의 상기 농도를 포함하지 않을 수 있다. 상세하게는, 상기 사전 배양 단계의 세포 배양 배지는 생물반응기에 포유동물 세포를 접종하는데 사용되는 배지를 포함할 수 있거나, 또는 생물반응기에 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 포유동물 세포를 접종하는데 사용되는 배지를 포함하지 않을 수 있다.

[0125] 상기 세포 배양 배지 내 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)는 산화된 형태 및/또는 환원된 형태로 함유될 수 있다. 상기 산화된 형태는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)가 "결합된 형태"로 세포 배양 배지에 함유되어 있음을 의미하는 반면, 환원된 형태는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)가 설프히드릴 기(들)가 유리 -SH 기를 포함함을 의미하는 "유리 형태"로 함유되어 있음을 의미한다. 본원에 개시되고 본 발명의 맥락에서 사용된 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 4 mM 내지 10 mM을 이의 산화 및/또는 환원된 형태로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인, 시스틴, 석시머, 메티마줄, 시스테아민, 아자티오프린, 메르캅토프린, S-메틸시스테인, 셀레노시스테인, S-포스포시스테인, 4'-포스포판테테인, 부티릴티오펜, 카르보시스테인, N-설포시스테인, 알레틴, 아세틸시스테인, 다이머카프롤, 코엔자임 M, 소듐 아우로티오말레이트, 판테틴, 부실라민, 메틸셀레노시스테인, 다이머캅토숙신산, 아세틸시스테인 아마이드, 티오글리콜산, 2,3-다이머캅토프로판올, O-메틸메르캅토포에탄올, 메르캅토포아세트산, f1-메르캅토프로피온산, 메틸메르캅탄, S-메틸메르캅토포에탄올, 글루타티온, 글루타티온 유도체일 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시되고 본 발명의 맥락에서 사용되는 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물로부터의 설프히드릴 기는 시스테인일 수 있다. 다른 예로서, 본원에 개시되고 본 발명의 맥락에서 사용되는 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스틴일 수 있다. 또 다른 예로서, 본원에 개시되고 본 발명의 맥락에서 사용되는 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인일 수 있다.

[0126] 상기 방법은 본원에 기재된 항체와 같은 당단백질의 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0127] 당업자는 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 상기 함량을 측정

하고 결정하는 수단 및 방법을 알고 있다. 이러한 농도는 질량 분석에 의해 설프히드릴 화합물(들)의 양을 결정하고 상기 설프히드릴 화합물(들)에 존재하는 설프히드릴 기(들)의 양을 계산함으로써 수득할 수 있다. 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 농도를 측정하고 결정하는 방법에 대한 추가적인 수단 및 방법은 당업자의 일반적인 지식 범위 내에 있다.

[0128] 본원에 기재된 방법 또는 세포 배양 배지는, 예를 들어, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 9.0 mM 이하, 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 8.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 7.0 mM 이하, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다. 다른 예로서, 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 5.0 mM 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 9.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 8.0 mM 이하, 보다 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 7.0 mM 이하, 및 가장 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다.

[0129] 특정한 예로서, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인이고, 상기 세포 배양 배지 내 시스테인 농도는 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 상기 시스테인 농도는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하이다. 다른 특정한 예로서, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스틴이고, 상기 세포 배양 배지 내 시스틴 농도는 2.0 mM 초과 및 5.0 mM 미만, 바람직하게는 상기 시스틴 농도는 적어도 3.0 mM 및 4.0 mM 이하이다.

[0130] 포유동물 세포를 배양하기 위한 화학적으로 정의된 대부분의 세포 배양 배지에서, 글루코스는 세포 내로 효율적으로 운반될 수 있기 때문에 가장 일반적으로 사용되는 단일의 탄수화물이다(Wright et al., J Exp Biol 196 (1994) 197-212). 글루코스는 단순한 단당류이다. 에너지원으로 사용되는 것 외에도, 글루코스는 다른 많은 분자 및 구조의 빌딩 블록으로 사용될 수도 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는, 주어진 단당류가 먼저 "활성화"되어야 한다. 상기 활성화는 뉴클레오시드-이인산염 기를 당에 첨가하여, 뉴클레오타이드 당을 형성하는 것을 수반한다. 예를 들어, CHO 세포에서 대부분의 뉴클레오타이드-당은 글루코스로부터 잘 특성화된 반응으로 합성된다. 도 1에 도시된 바와 같이, D-글루코스는 D-글루코스-1-인산염으로 전환된다. UTP-글루코스-1-인산 우리디릴 전달효소(EC 2.7.7.9)를 통한 D-글루코스-1-인산염의 활성화는 UDP-글루코스의 세포질 풀을 생성한다(Turnquist and Hansen, The Enzymes, 3rd. Ed. (Boyer, P. D., ed.) 8 (1973) 51-71; Chang et al., Eur. J. Biochem. 236 (1996) 723-728).

[0131] 따라서, 본원에 기재되고 본 발명의 맥락에서 사용되는 세포 배양 배지는, 예를 들어, 적어도 3.0 g/L 초과와 글루코스 및 더 바람직하게는 적어도 4.0 g/L 초과와 글루코스를 포함할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 세포 배양 배지는, 예를 들어, 13.0 g/L 이하의 글루코스, 바람직하게는 8.0 g/L 이하, 더 바람직하게는 7.0 g/L 이하, 보다 더 바람직하게는 6.0 g/L 이하, 및 가장 바람직하게는 5.0 g/L 이하의 글루코스를 포함한다. 특정한 예로서, 상기 세포 배양 배지는 3.0 g/L 초과 내지 13 g/L 이하의 글루코스, 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 8.0 g/L 이하의 글루코스, 더 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 7.0 g/L 이하의 글루코스, 보다 더 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 6.0 g/L 이하의 글루코스, 및 가장 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 5.0 g/L 이하의 글루코스를 포함한다.

[0132] 상세하게는, 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 세포를 접종 및 배양하기 위한 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 3.0 mM 내지 10.0 mM의 설프히드릴 기(들)를 포함하는 반면, 상기 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인 및/또는 시스틴일 수 있다. 예를 들어, 재조합 단백질을 생성하는 세포는 항 α -시누클레인 항체 또는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는 CHO 세포일 수 있으며, 6 mM 시스테인을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양할 수 있다. 다른 예로서, 재조합 단백질을 생성하는 세포는 항 α -시누클레인 항체 또는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는 CHO 세포일 수 있으며, 5 mM 시스테인을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양할 수 있다. 또 다른 예로서, 재조합 단백질을 생성하는 세포는 항 α -시누클레인 항체 또는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는 CHO 세포일 수 있으며, 4 mM 시스틴을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양할 수 있다. 또 다른 예로서, 재조합 단백질을 생성하는 세포는 항 α -시누클레인 항체 또는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체를 생성하는 CHO 세포일 수 있으며, 4.0 mM 내지 5.0 mM의 조합된 시스틴 및 시스테인 농도와 같은 시스틴 및 시스테인을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양할 수 있다.

[0133] 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 바와 같이, 세포는 적어도 3 g/L 초과와 글루코스를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양할 수 있다. 상기 글루코스는 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지로 세포를 접종할 당시에 존재할 수 있거나, 또는 세포 배양 공정 동안에, 예컨대, 세포 배양 공정의 4일 내지 14일에 첨가할 수 있다. 일 구현예에서, 글루코스는 상기 세포 배양 공정의 생성기 동안 존재할 수 있다.

- [0134] 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이, 세포는 6 mM의 시스테인의 존재하에 및 적어도 3 g/L 초과, 예컨대, 4 g/L 이하의 글루코스의 존재하에 배양할 수 있다. 또한 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이, 세포는 5 mM의 시스테인의 존재하에 및 적어도 3 g/L 초과, 예컨대, 4 g/L 이하의 글루코스의 존재하에 배양할 수 있다.
- [0135] 실시예에 예시된 바와 같이, 글루코스는 세포 배양 공정의 4일 내지 14일 사이에 세포 배양 배지에 첨가할 수 있다. 즉, 실시예에 예시된 바와 같이, 상기 세포 배양 배지는 4일 내지 14일과 같이 세포 배양 배지에 글루코스를 첨가하는 시점부터 적어도 3 g/L 초과, 예컨대, 4 g/L 이하의 글루코스를 포함할 수 있다. 상기 글루코스는 유가식(fed-batch) 공정 또는 관류에 의해 본원에 개시되고 본 발명의 맥락에서 사용되는 세포 배양 배지에 첨가할 수 있지만, 상기 글루코스가 상기 세포 배양 배지에 첨가되는 공정은 이에 제한되지 않는다. 세포 배양 배지에 존재하는 글루코스 농도는 세포 성장 및/또는 상기 세포에 의한 재조합 단백질의 생성을 손상시키지 않는 농도를 의미하는 것으로 이해해야 한다. 다시 말해서, 세포 성장 및/또는 상기 세포에 의한 재조합 단백질의 생성을 유지 및/또는 증가시키기 위해 적합한 글루코스 농도가 선택된다.
- [0136] 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이, 상기 항 α -시누클레인 항체 또는 항 CD20-CD3 이중특이적 항체는 CHO K1M 세포주와 같은 CHO 세포주에서 생성할 수 있다. 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 재조합 단백질은 상기 재조합 단백질을 생성하기에 적합한 임의의 포유동물 세포주에서 생성할 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 맥락에서, 당업자는 상기 적합한 포유동물 세포를 알고 있고, 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 재조합 단백질을 생성하기 위해 상기 포유동물 세포를 선택하는 방법을 알고 있다. 항 α -시누클레인 항체 또는 항 CD20-CD3 이중특이적 항체와 같은 재조합 단백질을 생성하는 상기 세포는 CHO 세포, Vero 세포, BHK 세포, COS 세포 및 HEK293/293T 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기 포유동물 세포는 화학적으로 정의된 세포 배양 배지에서 배양할 수 있다. 본 발명과 관련하여 사용될 세포 배양 배지가 본원에 개시되어 있다. 이와 관련하여, 당업자는 DMEM을 포함하지만 이제 제한되지는 않는 본 발명의 맥락에서 사용될 적합한 상업적으로 입수가능한 화학적으로 정의된 세포 배양 배지를 알고 있다. 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이, 무혈청 및 화학적으로 정의된 배지를 사용하여 포유동물 세포를 배양할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지이다.
- [0137] 본원에 개시되고 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이, CHO 세포와 같은 포유동물 세포는 시스테인 및/또는 시스틴과 같은 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 4.0 mM 내지 10 mM의 설프히드릴 기(들), 및 적어도 3 g/L 초과, 예컨대, 최대 14일 동안 배양할 수 있다.
- [0138] 상기 방법은 본원에 기재된 항체와 같은 당단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 세포는 생성기 동안 또는 생성기의 종료 시에 세포 배양 배지로부터 회수할 수 있음을 이해해야 한다. 이에 의해, 당업자는 또한 첨부된 실시예에 의해 예시된 세포 배양 배지로부터 세포를 회수하는 적합한 시점을 선택할 수 있다. 상기 방법은 본원에 기재된 항체와 같은 당단백질을 약품으로 제형화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0139] 본 발명의 방법에 사용되는 세포 배양 배지의 맥락에서 하기에 기재되는 모든 양태는 또한 본 발명의 맥락에서 사용되는 세포 배양 배지를 설명한다. 또한, 본 발명은 갈락토실화된 글리칸의 바람직한 함량을 갖는 재조합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 재조합 단백질은 적어도 모노갈락토실화된, 더 바람직하게는 디갈락토실화된 글리칸을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 갈락토실화된 글리칸은 N-아세틸글루코사민과 결합한다. 본 발명의 방법에 의해 생성되는 재조합 단백질의 맥락에서 하기에 기재되는 모든 양태는 또한 본 발명의 맥락에서 제공되는 재조합 단백질을 설명한다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 수득 가능하고 하기에 개시된 바와 같은 재조합 단백질이 본 발명에 의해 제공된다.
- [0140] 이와 관련하여, 본 발명은 설프히드릴 화합물(들) 및 이의 유도체, 예컨대, L-시스테인 및/또는 시스틴이 UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디릴전달효소(EC 2.7.7.12)를 활성화하도록 사용될 수 있음을 발견하였다. 이에 의해, UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디릴전달효소가 효과적으로 활성화될 수 있다. 추가로, 설프히드릴 화합물(들)은, 특히 생체 내에서 UDP-당 경로를 조절하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, L-시스테인의 산화된 이량체 형태인 L-시스틴은, 특히 생체 내에서 UDP-당 경로를 조절하는 데 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 UDP-당 경로는, 특히 생체 내에서, 세포 성장, 재조합 단백질 생산성 및/또는 단백질 품질을 증가시키기 위해 설프히드릴 화합물(들) 및 이들의 유도체, 예컨대 시스틴 및/또는 시스테인을 첨가함으로써, 특히 포유동물 세포 배양에 의한 재조합 단백질의 갈락토실화 수준을 증가시킴으로써 조절할 수 있다.
- [0141] "산화 정도"라는 용어는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 산화 가능한 설프히드릴 기(들)가 세포 배양 배지에서 산화되는 정도를 지칭한다. 예를 들어, 설프히드릴 화합물이 다른(동일하거나 상이한) 설프히드릴 화합물의 설프히드릴기와 이황화 가교를 형성함으로써 산화되는 단일 설프히드릴기를 함유하는 경우, 상기 설프

히드릴 화합물의 질량 증가는 설프히드릴기의 산화를 나타낸다. 산화 상태는 산화된 잔기의 수, 질량 스펙트럼 피크 강도, 질량 스펙트럼 통합된 면적 등의 분석을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 단백질 및 펩티드 화학 분야에 공지된 메트릭스(metrics)에 의해 측정할 수 있다. 본원에 제공된 양태들 중 임의의 것에 대한 일부 구현예들에서, 산화 상태는 백분율로 보고되며, 여기서 0%는 산화가 없음을 나타내고 100%는 배지에서 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 잠재적으로 산화 가능한 설프히드릴 기(들)의 완전한 산화를 나타낸다. 용어 "잠재적으로 산화가능한 설프히드릴기" 등은, 예를 들어, 이황화 가교의 형성에 의해 산화될 수 있는 배지 내의 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 총량을 지칭한다.

[0142] 용어 "산화되지 않은 설프히드릴기" 등은 산화되지 않은 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 양을 지칭한다. 산화되지 않은 동일한 설프히드릴 화합물의 질량에 대한 설프히드릴 화합물의 질량 증가는 설프히드릴 화합물에서 산화된 설프히드릴기(들)의 수를 반영한다. 산화된 설프히드릴기(들)를 갖지 않는 설프히드릴 화합물(들)의 양에 비해 산화된 설프히드릴기(들)를 갖는 설프히드릴 화합물(들)의 양이 증가하는 것은 산화 정도를 반영한다. 그런 다음, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)의 산화 상태는 세포 배양 배지에서 하나 이상의 산화된 설프히드릴 기(들)를 갖는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)의 총량 및 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)의 총량으로부터 결정한다.

[0143] 예를 들어, 상기 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 산화 상태를 결정하는 것은 a) 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 질량 및 양을 결정하는 단계; b) 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)에 대해 측정된 질량을 산화되지 않은 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 질량과 비교하는 단계로서, 여기서 산화되지 않은 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 질량에 대한 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 질량 증가는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)에서 산화된 설프히드릴 기(들)의 수를 반영하는 단계; 및 c) 적어도 하나의 산화된 설프히드릴기를 갖는 하나 이상의 설프히드릴 화합물의 총량 및 이에 따른 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 설프히드릴기(들)의 총량으로부터 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 산화 상태를 결정하는 단계를 포함한다.

[0144] 표적 단편의 질량 측정은 질량 분석법을 사용한다. 용어 "질량 분석법", "MS" 등은 질량 대 전하(즉, "m/z") 비율을 기반으로 이온을 필터링, 검출 및 측정하는 방법을 나타낸다. 용어 "질량" 및 "m/z"는 질량 분석 결과의 맥락 내에서 함께 사용되며, 달리 명시되지 않는 한, 모든 m/z 값은 단일의 이온화된 종을 가정한다. "주 동위 원소 질량" 및 "주 동위원소 m/z"라는 용어는 각 원소의 가장 풍부한(즉, 주) 동위원소의 질량을 고려하여 분자 이온에 대해 보고된 질량을 나타낸다. 일반적으로, 하나 이상의 관심 분자가 이온화되고, 상기 이온은 이후 질량 분석기 내로 도입되고, 여기서 자기장 및 전기장의 조합으로 인해, 상기 이온은 질량("m") 및 전하("z")에 의존하는 공간 중 경로를 따른다. 예컨대, "Mass Spectrometry From Surfaces" 제목의 미국 특허 제 6,204,500호; "Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry" 제목의 미국 특허 제 6,107,623호; "DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry" 라는 제목의 미국 특허 제 6,268,144호; "Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes" 라는 제목의 미국 특허 제 6,124,137호; Wright et al., Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2:264-76 (1999); 및 Merchant and Weinberger, Electrophoresis 21:1164-67 (2000)을 참조하며, 이는 그 전체로서 본원에 인용된다. "적분 세기", "질량 스펙트럼 적분 면적", "적분 질량 스펙트럼 세기" 등의 용어는 당업계에 일반적으로 공지된바와 같이 특정 주동위원소 m/z를 갖는 분자 이온의 양에 해당하는 질량 분석 곡선 아래의 면적을 말한다.

[0145] 예를 들어, "사중극자" 또는 "사중극자 이온 트랩" 기기에서 진동하는 무선 주파수 영역의 이온은 전극 사이에 인가된 DC 전위, RF 신호의 진폭 및 m/z에 비례하는 힘을 경험한다. 특정 m/z를 갖는 이온만이 사중극자의 길이로 이동하고 다른 모든 이온은 편향되도록 전압 및 진폭을 선택할 수 있다. 따라서, 사중극자 기기는 "질량 필터"로서 및 기기에 주입된 이온에 대한 "질량 검출기"로서 모두의 역할을 할 수 있다.

[0146] 포유동물 세포의 우리딘 2인산(UDP)-당

[0147] 우리딘 이인산(UDP) α-D-글루코스 에피머화효소(EC 5.1.3.2) 및 UDP-α-D-글루코스: α-D-갈락토스-1-인산 우리딘전달효소(EC 2.7.7.12)는 포유동물 세포, 예를 들어, CHO 세포에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스 전환 경로 내에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

[0148] 본원에 사용된 용어 "우리딘 이인산(UDP) α-D-글루코스 에피머화효소" 및 "UDP-Glc-E"는 함께 사용되며, EC 5.1.3.2 부류에 속하는 세균, 진균, 식물 및 포유동물 세포에서 발견되는 동종이량체 에피머라화 효소를 지칭한다. 실시예 1에 나타난 바와 같이, 세포주 CHO K1M에서 UDP-Glc-E의 cDNA를 증폭, 서열분석 및 추가

분석하였다.

- [0149] 본원에 사용된 용어 "UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소", "UDP-Gal-T" 및 "EC 2.7.7.12"는 함께 사용되며, 우리딘 5'-이인산 글루코스(UDP-글루코스)와 갈락토스-1-인산염(Gal-1-P) 사이의 뉴클레오티드 교환을 촉매하여 가역 메커니즘을 통해 우리딘 5'-이인산 갈락토스(UDP-갈락토스) 및 글루코스-1-인산염(Glc-1-P)를 생성하는 효소를 지칭한다. 실시예 2에 나타난 바와 같이, 세포주 CHO K1M에서 UDP-Gal-T의 cDNA를 증폭, 서열분석 및 추가 분석하였다.
- [0150] 우리딘 2인산-글루코스 에피머화효소
- [0151] 상기 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스 합성 경로는 도 1에 도시되어 있다. 이로써, α -D-글루코스로부터 UDP-글루코스 형성에서의 UDP-당 상호전환 경로가 도시되고, 이후 UDP-글루코스 에피머화 효소(UDP-Glc-E: 우리딘-2인산 글루코스 에피머화효소, EC 5.1.3.2)에 의해 UDP-글루코스로부터 UDP-갈락토스를 형성한다.
- [0152] UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소
- [0153] UDP-갈락토스 및 UDP-글루코스 경로는 도 2에 도시된 바와 같이 추가로 확장되었다. 이로써, α -D-글루코스로부터 UDP-글루코스 형성에서의 UDP-당 상호전환 경로가 도시되고, 이후 UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소(UDP-Gal-T: UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디틸전달효소 2.7.7.12)에 의해 UDP-갈락토스를 UDP-글루코스로 다시 변환된다.
- [0154] UDP-글루코스/갈락토스 전환 경로의 확립
- [0155] 도 2에 도시된 바와 같이, UDP-Gal-T는 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스의 가역적 전환을 촉매한다. 하지만, Wagstaff et al. ((2015) Carbohydrate Research 404: 17-25)는 특정 상황(예: 과량의 글루코스-1-P가 존재하는 경우)에서 UDP-Gal-T가 주로 역변환을 실행하여, 대부분의 UDP-갈락토스를 UDP-글루코스로 조정한다는 것을 발견하였다. 이러한 메커니즘은 글루코스 및 갈락토로 구성된 UDP-당 풀의 세포내 변화를 일으켜, 세포내 UDP-갈락토스 농도를 감소시키고 세포내 UDP-글루코스의 양을 증가시킬 수 있다. 이러한 실험 결과에 기초하여, 예컨대, 도 2에 도시된 바와 같이, 과량의 글루코스가 있는 화학적으로 정의된 배지 플랫폼을 사용하는 주어진 치료 단백질 생성 공정의 경우 상기 새로운 UDP-글루코스/UDP-갈락토스 경로는 더 정확하게 설명할 수 있다.
- [0156] 설프히드릴 화합물을 사용한 포유동물 세포에서 UDP-글루코스/UDP-갈락토스 경로 조절을 위한 새로운 접근법
- [0157] 도 3에 도시된 바와 같이, 설프히드릴 화합물 및 이의 유도체, 예컨대, L-시스테인 및/또는 L-시스틴은 세포 배양 배지에 첨가되어 UDP-Gal-T를 추가로 활성화하고 CHO K1 및 이의 유도체 세포주와 같은 포유동물 세포에서 글루코스- 및 갈락토-구성된 UDP-당을 추가로 조절할 수 있다. 이에 의해, 본 발명가들은 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 첨가에 의해 모노갈락토실화 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 재조합 단백질이 생성될 수 있음을 발견하였다. 본원에 사용된 용어 "설프히드릴 화합물(들)"은 분자의 일체로 된 부분으로서 황을 함유하는 무기 또는 유기 화합물, 바람직하게는 -SH 라디칼을 함유하는 화합물; 및/또는 초기에 -SH 라디칼을 함유하고 환원 조건하에 함께 공유 결합되어 이황화 가교를 형성하는 화합물을 지칭한다. 본 발명가들은 포유동물 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질의 생성 동안 생존 세포 밀도 및/또는 생성물 역가를 증가시키는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)이 생성된 재조합 단백질의 갈락토스 함량에 대해 직접적인 상관관계에 있는 효과를 갖는다는 것을 발견하였다. 이와 관련하여, 본 발명은 포유동물 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질의 갈락토실화 정도를 조절하는 방법을 제공한다. 본원에 제공된 방법에 따라, 당업자는 포유동물 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질의 갈락토스 함량을 제어하기 위해 제공되는 정확한 공정 매개변수를 결정할 수 있다.
- [0158] 본 발명의 맥락에서 일 양태에서, 포유동물 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질의 생성 동안, 재조합 단백질의 갈락토스 함량이 증가될 수 있다. 본 발명의 추가적인 일 양태에서, 모노갈락토실화된(G1) 또는 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 재조합 단백질은 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체이고, 여기서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 총 글리칸당 19.0~29.0%(w/w)의 G1 및 1.3~2.8%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 20.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.4~2.7%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.5~2.7%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~27.4%(w/w)의 G1 및 1.5~2.6%(w/w)의 G2를 가진다.
- [0159] 특히, 모노갈락토실화된(G1) 또는 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 CD3에 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 CD20에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 중쇄 가변

영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0160] 더 특히, 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 여기서 상기 제1 항원 결합 도메인은,

[0161] (a) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,

[0162] (b) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및

[0163] (c) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하며;

[0164] 경쇄 가변 도메인(VL)으로서,

[0165] (d) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,

[0166] (e) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및

[0167] (f) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하고;

[0168] 여기서, 상기 제2 항원 결합 도메인은,

[0169] (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,

[0170] (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및

[0171] (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하며;

[0172] 경쇄 가변 도메인(VL)으로서,

[0173] (d) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,

[0174] (e) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및

[0175] (f) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;

[0176] 여기서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 총 글리칸당 19.0~29.0%(w/w)의 G1 및 1.3~2.8%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 20.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.4~2.7%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.5~2.7%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~27.4%(w/w)의 G1 및 1.5~2.6%(w/w)의 G2를 가진다.

[0177] 바람직하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서:

[0178] (a) 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 28의 VH 서열을 포함하고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 40의 VH 서열을 포함하거나;

[0179] (b) 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 29의 VL 서열을 포함하고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 41의 VL 서열을 포함하거나; 또는

[0180] (c) 상기 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함한다.

[0181] 더 바람직하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서:

[0182] (a) 상기 제1 항원 결합 도메인의 VH 서열은 서열번호 28의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 상기 제2 항원 결합 도메인의 VH 서열은 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖거나;

[0183] (b) 상기 제1 항원 결합 도메인의 VL 서열은 서열번호 29의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 상기 제2 항원 결합 도메인의 VL 서열은 서열번호 41의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖거나; 또는

[0184] (c) 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 (a)에 정의된 제1 및 제2 항원 결합 도메인의 VH 서열 및 (b)에 정의된 제1 및 제2 항원 결합 도메인의 VL 서열을 포함한다.

[0185] 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 바와 같이, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 CD20에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서 상기 항

CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 CD3에 결합하는 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 항원 결합 도메인에 대하여 용어 “제1”, “제2”, “제3” 등은 하나 초과와 각 유형의 도메인이 있을 때 식별의 편의상 이용된다. 이들 용어의 사용은, 명시적으로 진술되지 않는 한, 특정한 순서 또는 배향을 부여하는 것으로 의도되지 않는다.

- [0186] 예를 들어, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 CD3에 결합하는 제2 항원 결합 도메인, 및 CD20에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 더 특정한 예로서, 상기 제3 항원 결합 도메인은 상기 제1 항원 결합 도메인과 동일할 수 있다(즉, 상기 제1 및 제3 항원 결합 도메인은 동일한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함할 수 있다). 보다 더 상세하게는, 상기 제1 및 제3 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 및 제3 Fab 분자는 동일할 수 있고, 추가로 동일한 도메인 배열(즉, 통상적인 또는 교차)을 가질 수 있다.
- [0187] 다른 예로서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 CD3에 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 CD20에 결합하는 제2 및 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 더 특정한 예로서, 상기 제3 항원 결합 도메인은 상기 제2 항원 결합 도메인과 동일할 수 있다(즉, 상기 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 동일한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함할 수 있다). 보다 더 상세하게는, 상기 제2 및 제3 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 및 제3 Fab 분자는 동일할 수 있고, 추가로 동일한 도메인 배열(즉, 통상적인 또는 교차)을 가질 수 있다.
- [0188] 본원에 기재된 더 특정한 예로서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 상기 제3 항원 결합 도메인은,
- [0189] (a) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- [0190] (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- [0191] (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하며;
- [0192] 경쇄 가변 도메인(VL)으로서,
- [0193] (d) 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- [0194] (e) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- [0195] (f) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;
- [0196] 여기서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 총 글리칸당 19.0~29.0%(w/w)의 G1 및 1.3~2.8%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 20.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.4~2.7%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.5~2.7%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~27.4%(w/w)의 G1 및 1.5~2.6%(w/w)의 G2를 가진다.
- [0197] 보다 더 특정한 예로서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 항체이고, 여기서 상기 제3 항원 결합 도메인은 서열번호 40의 VH 서열 및 서열번호 41의 경쇄를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체는 항체이고, 여기서 상기 제3 항원 결합 도메인에서, 제3 항원 결합 도메인의 VH 서열은 서열번호 40의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 상기 제3 항원 결합 도메인의 VL 서열은 서열번호 41의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0198] 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이성 항체의 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환된 교차 Fab 분자일 수 있고, 존재하는 경우 제2 및 제3 항원 결합 도메인은 통상적인 Fab 분자일 수 있다. 예를 들어, CD3에 결합하는 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환되는(즉, 서로에 의해 대체되는) 교차 Fab 분자이다. 다른 더 특정한 예로서, 상기 제1 항원 결합 도메인치는 교차 Fab 분자이고, 상기 제2 및 제1 항원 결합 도메인치는 각각 통상적인 Fab 분자이다.
- [0199] “Fab 분자”는 면역글로불린의 중쇄의 VH 및 CH1 도메인(“Fab 중쇄”) 및 경쇄의 VL 및 CL 도메인(“Fab 경쇄”)으로 구성되는 단백질을 지칭한다. “융합된”은 구성요소(예컨대, Fab 분자 및 Fc 도메인 하위단위)가 직접적으로 또는 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 펩티드 결합에 의해 연결되는 것을 의미한다.
- [0200] “교차” Fab 분자(“Crossfab”으로 또한 명명됨)는 Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환되는(즉, 서로에 의해 대체되는) Fab 분자인 것을 의미한다. 다시 말하면, 교차 Fab 분자는 경쇄 가변 도메인 VL 및 중쇄 불변 도메인 1 CH1로 구성되는 펩티드 사슬(VL-CH1, N에서 C 말단 방향으로), 및 중쇄 가변 도메인 VH 및 경쇄 불변 도메인 CL로 구성되는 펩티드 사슬(VH-CL, N에서 C 말단 방향으로)을 포함한다. 명료함을

위해, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 도메인이 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 불변 도메인 1 CH1을 포함하는 펩티드 사슬은 본원에서 (교차) Fab 분자의 “중쇄” 로서 지칭된다. 반대로, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 불변 도메인이 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 가변 도메인 VH를 포함하는 펩티드 사슬은 본원에서 (교차) Fab 분자의 “중쇄” 로서 지칭된다.

[0201] 그것과 대조적으로, “전통적인” Fab 분자는 이의 자연 형식에서, 다시 말하면, 중쇄 가변과 불변 도메인으로 구성되는 중쇄(VH-CH1, N에서 C 말단 방향으로), 그리고 경쇄 가변과 불변 도메인으로 구성되는 경쇄(VL-CL, N에서 C 말단 방향으로)를 포함하는 Fab 분자인 것으로 의미된다.

[0202] 상기 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제1 또는 제2 하위단위의 N 말단으로 융합될 수 있다. 본원에 사용된 Fc 도메인의 “하위단위”는 이량체 Fc 도메인을 형성하는 2개의 폴리펩티드 중 하나, 즉, 안정한 자가 결합이 가능한 면역글로불린 중쇄의 C 말단 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, IgG Fc 도메인의 하위단위는 IgG CH2 및 IgG CH3 불변 도메인을 포함한다.

[0203] 예를 들어, 상기 제2 및 제3 Fab 분자는 각각 Fc 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 하위단위 중 하나의 N 말단으로 융합되고, 상기 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합된다. 더 상세하게는, 상기 항체는 제1, 제2 및 제3 Fab 분자, 제1 및 제2 하위단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 필수적으로 구성되고, 여기서 상기 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 제2 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합되고, 상기 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제1 하위단위의 N 말단으로 융합되며, 여기서 상기 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제2 하위단위의 N 말단으로 융합된다(또한, EP3252078 A1, 구체적으로 도 1b, 도 1e, 도 1i 및 도 1m을 단락[0338]과 조합하여 참조하며, 이는 본원에 원용됨).

[0204] 다시 말해서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 제2 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합되고, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제1 하위단위의 N 말단으로 융합되며, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제3 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제2 하위단위의 N 말단으로 융합된다.

[0205] 상기 제2 및 제3 Fab 분자는 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 및 제3 Fab 분자는 각각 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 상세하게는, 상기 면역글로불린 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이고, 특히 여기서 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 임의적으로, 상기 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄가 추가적으로 서로에 융합될 수 있다.

[0206] 대안적으로, 상기 제1 및 제3 Fab 분자는 각각 Fc 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 하위단위 중 하나의 N 말단으로 융합되고, 상기 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합된다. 더 상세하게는, 상기 항체는 제1, 제2 및 제3 Fab 분자, 제1 및 제2 하위단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 필수적으로 구성되고, 여기서 상기 제2 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합되고, 상기 제1 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제1 하위단위의 N 말단으로 융합되며, 여기서 상기 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제2 하위단위의 N 말단으로 융합된다(또한, EP3252078 A1, 구체적으로 도 1c, 도 1f, 도 1j 및 도 1n을 단락[0339]과 조합하여 참조하며, 이는 본원에 원용됨).

[0207] 다시 말해서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합되고, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제1 하위단위의 N 말단으로 융합되며, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제3 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제2 하위단위의 N 말단으로 융합된다.

[0208] 상기 제1 및 제3 Fab 분자는 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 및 제3 Fab 분자는 각각 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 상세하게는, 상기 면역글로불린 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이고, 특히 여기서 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 임의적으로, 상기 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 상기 제2 Fab 분자의 Fab 경쇄가 추가적으로 서로에 융합될 수 있다.

[0209] 추가적인 대안으로서, 상기 제1 및 제2 Fab 분자는 각각 상기 Fc 중쇄의 C 말단에서 상기 Fc 도메인의 하위단위 중 하나의 N 말단으로 융합되고, 상기 제3 Fab 분자는 Fab 중쇄의 C 말단에서 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말

단으로 융합된다. 더 상세하게는, 상기 항체는 상기 제1, 제2 및 제3 Fab 분자, 상기 제1 및 제2 하위단위로 구성되는 Fc 도메인, 및 임의적으로 하나 이상의 펩티드 링커로 필수적으로 구성되고, 여기서 상기 제3 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 제1 Fab 분자의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합되며, 상기 제1 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제1 하위단위의 N 말단으로 융합되고, 여기서 상기 제2 Fab 분자가 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제2 하위단위의 N 말단에 융합된다. 다시 말해서, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 제3 항원 결합 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제3 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 제1 항원 결합 도메인의 Fab 중쇄의 N 말단으로 융합되고, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제1 하위단위의 N 말단으로 융합되며, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 제2 항원 결합 도메인은 Fab 중쇄의 C 말단에서 Fc 도메인의 제2 하위단위의 N 말단으로 융합된다.

- [0210] 상기 제1 및 제2 Fab 분자는 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해 Fc 도메인에 융합될 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 및 제2 Fab 분자는 각각 면역글로불린 힌지 영역을 통해 Fc 도메인에 융합된다. 상세하게는, 상기 면역글로불린 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이고, 특히 여기서 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 임의적으로, 상기 제1 Fab 분자의 Fab 경쇄 및 상기 제3 Fab 분자의 Fab 경쇄가 추가적으로 서로에 융합될 수 있다.
- [0211] 본원 및 본 발명의 맥락에서 사용된 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 추가 구성은, 예컨대, EP3252078 A1, 특히 도 1 및 본원에 인용된 단락 [0335] 내지 [0367]에서 찾을 수 있다.
- [0212] 보다 더 상세하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는:
- [0213] (a) 서열번호 47의 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 제1 중쇄 및 서열번호 45의 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 제2 중쇄;
- [0214] (b) 서열번호 33의 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 제1 경쇄 및 서열번호 44의 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 제2 및 제3 경쇄; 또는
- [0215] (c) (a)에 정의된 제1 중쇄 및 제2 중쇄, 및 (b)에 정의된 제1 경쇄, 제2 경쇄 및 제3 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0216] 보다 더 상세하게는, 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는 항체이고, 여기서 상기 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체는:
- [0217] (a) 서열번호 47의 제1 중쇄 및 서열번호 45의 제2 중쇄;
- [0218] (b) 서열번호 33의 제1 경쇄 및 서열번호 44의 제2 경쇄; 또는
- [0219] (c) (a)에 정의된 제1 중쇄 및 제2 중쇄, 및 (b)에 정의된 제1 경쇄, 제2 경쇄 및 제3 경쇄를 포함한다.
- [0220] 본 발명의 다른 양태에서, 모노갈락토실화된(G1) 또는 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 재조합 단백질은 항 α -시누클레인 항체이고, 여기서 상기 항 α -시누클레인 항체는 총 글리칸당 17.2~48.0%(w/w)의 G1 및 3.1~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 25.4~48.0%(w/w)의 G1 및 3.5~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 27.2~47.0%의 G1 및 4.4 내지 15.0%의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 40.0~46.0%(w/w)의 G1 및 8.4~15.0%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 41.0~45.0%(w/w)의 G1 및 9.5~14.0%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 42.1~43.9%(w/w)의 G1 및 10.6~13.3%(w/w)의 G2를 가진다.
- [0221] 특히, 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 α -시누클레인 항체는
- [0222] (a) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1,
- [0223] (b) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및
- [0224] (c) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하며;
- [0225] 경쇄 가변 도메인(VL)으로서,
- [0226] (d) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1,
- [0227] (e) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및
- [0228] (f) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하며;

- [0229] 여기서, 상기 항 α -시누클레인 항체는 총 글리칸당 17.2~48.0%(w/w)의 G1 및 3.1~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 25.4~48.0%(w/w)의 G1 및 3.5~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 27.2~47.0%의 G1 및 4.4 내지 15.0%의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 40.0~46.0%(w/w)의 G1 및 8.4~15.0%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 41.0~45.0%(w/w)의 G1 및 9.5~14.0%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 42.1~43.9%(w/w)의 G1 및 10.6~13.3%(w/w)의 G2를 가진다.
- [0230] 더 바람직하게는, 상기 항 α -시누클레인 항체는:
- [0231] (a) 서열번호 16의 VH 서열;
- [0232] (b) 서열번호 17의 VL 서열; 또는
- [0233] (c) (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함한다.
- [0234] 보다 더 상세하게는, 상기 항 α -시누클레인 항체는:
- [0235] (a) 서열번호 16의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열;
- [0236] (b) 서열번호 17의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는
- [0237] (c) (a)에 정의된 VH 서열 및 (b)에 정의된 VL 서열을 포함한다.
- [0238] 보다 더 상세하게는, 상기 항 α -시누클레인 항체는 서열번호 20의 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 서열번호 21의 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함한다.
- [0239] 보다 더 상세하게는, 상기 항 α -시누클레인 항체는 서열번호 20의 중쇄 및 서열번호 21의 경쇄를 포함한다.
- [0240] 기준 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 기준 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기들의 백분율로 정의되는데, 이때 서열을 정렬시킨 후 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위하여 필요하다면 갭을 도입하며, 임의의 보존적 치환은 상기 서열의 동일성의 일부로서 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 해당 업계의 기술 범위에 속하는 다양한 방법으로 구현될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 구현하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열들을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에서 제작되었으며 소스 코드는 미국 워싱턴 D.C., 20559에 소재한 미국 저작권청에 사용자 문서와 함께 제출되었으며, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코에 소재한 Genentech, Inc.사로부터 공개적으로 이용가능하거나 소스 코드로부터 컴파일될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함한 UNIX 운영 체제에서 사용되도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 변경되지 않는다. ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에, 이와 관련한, 또는 이에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 %는(다른 방식으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 이와 관련한, 또는 이에 대한 특정 아미노산 서열 동일성 %를 가지는 또는 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음) 다음과 같이 계산된다: 분수 X/Y의 100배, 이때 X는 A 및 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 기록되는 아미노산 잔기의 수를 말하며, Y는 B의 전체 아미노산 잔기 수가 된다. 아미노산 서열 A의 길이는 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않는 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않은 것으로 이해될 것이다. 이와 다르게 특별히 명시되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 바로 전 단락에서 설명된 바와 같이 수득된다.
- [0241] 본원 발명의 참조 뉴클레오타이드 서열과 예를 들면, 적어도 95% "동일한" 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 뉴클레오타이드 서열의 각 100개 뉴클레오타이드마다 5개까지의 점 돌연변이를 포함할 수 있다는 점을 제외하고, 상기 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열이 참조 서열과 동일하다는 것으로 의도된다. 즉, 참조 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 수득하기 위해서, 상기 참조 서열 중 뉴클레오타이드의 5% 이하를 결실시키거나 또는 또 다른 뉴클레오타이드로 치환하거나, 상기 참조 서열의 전체 뉴클레오타이드의 5% 이하의 수의 뉴클레오타이드를 상기 참조 서열에 삽입할 수 있다. 상기 참조 서열의 이러한 변경은 상기 참조 서열 내 잔기들 간에 개별적으로 또는 상기 참조 서열 내 하나 이상의 인접 그룹들 중에 산재된, 상기 참조 뉴클레오타이드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또

는 상기 말단 위치들 사이의 어디에서나 발생할 수 있다. 실제 문제로서, 임의의 특정한 폴리뉴클레오티드 서열이 본 발명의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한지 여부는 통상적으로 공지된 컴퓨터 프로그램, 예를 들어, 폴리펩티드에 대해 상기 논의된 것들(예를 들어 ALIGN-2)을 사용하여 측정할 수 있다.

[0242] 바람직하게는, 본 발명의 맥락에서 개시된 바와 같은 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체의 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸 또는 상기 항 α -시누클레인 항체는 N-아세틸글루코사민과 관련이 있다.

[0243] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 배양 배지" 및 "배양 배지"는 함께 사용되며, 일반적으로 하기의 범주 중 하나 이상으로부터 적어도 하나의 성분을 제공하는 포유류 세포 성장에 사용되는 영양 용액을 지칭한다: 1) 일반적으로 글루코스와 같은 탄수화물 형태의 에너지원; 2) 모든 필수 아미노산, 및 일반적으로 20개 아미노산과 시스테인의 기본 세트; 3) 낮은 농도에서 요구되는 비타민 및/또는 기타 유기 화합물; 4) 유리 지방산; 및 5) 미량 원소, 여기서 미량 원소는 일반적으로 마이크로몰 범위의 매우 낮은 농도에서 요구되는 무기 화합물 또는 자연 발생 원소로서 정의된다. 특정 세포주의 성장 인자와 같은 필수 구성 요소는, 예를 들어, 포유동물 세포 배양(Mammalian Cell Culture)에 기재된 대로 과도한 실험 없이 경험적으로 쉽게 결정된다(Mather, J.P. ed., Plenum Press, N.Y. [1984]), and Barnes and Sato. (1980) Cell. 22:649).

[0244] 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 바와 같이,

[0245] 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항체를 생성하기 위한 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 설프히드릴 기(들)의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과와 글루코스의 농도를 포함하는 세포 배양 배지이다.

[0246] 본 발명의 바람직한 양태에서, 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 9.0 mM 이하, 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 8.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 7.0 mM 이하, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다.

[0247] 다른 바람직한 양태에서, 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 5.0 mM 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 9.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 8.0 mM 이하, 보다 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 7.0 mM 이하, 및 가장 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다.

[0248] 대안적으로(예컨대, 시스테인 및/또는 시스틴의 경우), 상기 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 0.7 g/L 초과 내지 1.2 g/L 이하, 바람직하게는 0.7 g/L 초과 내지 1.1 g/L 이하, 더 바람직하게는 0.7 g/L 초과 내지 1.0 g/L 이하, 더 바람직하게는 0.7 g/L 초과 내지 0.9 g/L 이하, 보다 더 바람직하게는 0.7 g/L 초과 내지 0.8 g/L를 포함한다.

[0249] 본 발명의 맥락에서 개시된 세포 배양 배지 내 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴 기(들)는 환원 및/또는 산화된 형태로 함유된다. 예를 들어, 상기 설프히드릴의 환원된 형태는 4.0 mM 초과 내지 10.0 mM 미만의 범위이고, 그리고/또는 상기 설프히드릴의 산화된 형태의 농도는 2.0 mM 초과 내지 5.0 mM 미만의 범위이다.

[0250] 본원 및 본 발명의 맥락에서 개시된 바와 같이, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인, 시스틴, 석시머, 메티마줄, 시스테아민, 아자티오프린, 메르캅토프린, S-메틸시스테인, 셀레노시스테인, S-포스포시스테인, 4'-포스포판테테인, 부티리티오펀린, 카르보시스테인, N-설프시스테인, 알레틴, 아세틸시스테인, 다이머카프롤, 코엔자임 M, 소듐 아우로티오말레이트, 판테틴, 부실라민, 메틸셀레노시스테인, 다이머캅토숙신산, 아세틸시스테인 아미드, 티오글리콜산, 2,3-다이머캅토프로판올, O-메틸메르캅토포에탄올, 메르캅토아세트산, f1-메르캅토프로피온산, 메틸메르캅탄, S-메틸메르캅토포에탄올, 글루타티온, 글루타티온 유도체, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인, 시스틴, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0251] 상세하게는, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인, 시스틴, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)은 시스테인이고, 상기 세포 배양 배지 내 시스테인 농도는 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 상기 시스테인 농도는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하이다.

- [0252] 대안적으로(예컨대, 시스템인 및/또는 시스템의 경우), 포유동물 세포에서 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 재조합 단백질을 생성하기 위한 세포 배양 배지는 0.5 g/L 내지 1.2 g/L, 바람직하게는 0.6 g/L 내지 1.2 g/L의 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)을 포함한다.
- [0253] 본원 및 본 발명의 맥락에서 기재된 바와 같이, 상기 세포 배양 배지는 적어도 3.0 g/L 초과와 글루코스 및 더 바람직하게는 적어도 4.0 g/L 초과와 글루코스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 세포 배양 배지는 13.0 g/L 이하의 글루코스, 바람직하게는 8.0 g/L 이하, 더 바람직하게는 7.0 g/L 이하, 보다 더 바람직하게는 6.0 g/L 이하, 및 가장 바람직하게는 5.0 g/L 이하의 글루코스를 포함할 수 있다. 상세하게는, 본원 및 본 발명의 맥락에서 기재된 세포 배양 배지는 3.0 g/L 초과 내지 13 g/L의 글루코스, 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 8.0 g/L 이하의 글루코스, 더 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 7.0 g/L 이하의 글루코스, 보다 더 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 6.0 g/L 이하의 글루코스, 및 가장 바람직하게는 3.0 g/L 초과 내지 5.0 g/L 이하의 글루코스를 포함할 수 있다.
- [0254] 당업자가 인지할 수 있는 바와 같이, 재조합 단백질 생성을 위해 세포를 배양하는 데 사용되는 기본 및 공급 배지만 아니라 공급 일정, 성장률, 온도, 및 산소 수준과 같은 기타 변수가 발현된 단백질의 수율 및 품질에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 조건을 최적화하는 방법은 당업자의 지식 범위 내에 있고; 예시적인 조건은 본원의 실시예에 기재되어 있다. 본원 및 본 발명의 맥락에서 기재된 바와 같이, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지이다.
- [0255] 화학적으로 정의된 배지는 포유류 세포 배양용 배지를 포함하여 최근에 광범위하게 개발되고 출판되었다. 정의된 배지의 모든 구성 요소는 잘 특성화되어 있으며 이러한 배지에는 혈청 및 가수분해물과 같은 복잡한 첨가제가 함유되어 있지 않다. 일반적으로, 이러한 배지에는 정의된 양의 정제된 성장 인자, 단백질, 지단백질, 및 그렇지 않으면 혈청 또는 추출물 보충제에 의해 제공될 수 있는 기타 물질이 포함된다. 이러한 배지는 생산성이 높은 세포 배양물을 지원하기 위한 유일한 목적으로 생산되었다. 특정 정의된 배지는 저단백질 배지라고 하거나, 또는 저단백질 배지, 인슐린 및 트랜스페린의 전형적인 구성요소가 포함되지 않은 경우 단백질이 없을 수 있다. 그렇지 않으면, 무혈청 배지가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 이러한 배지는 일반적으로 혈청 또는 단백질 분획을 함유하지 않지만, 정의되지 않은 구성 요소를 함유할 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 배양 배지의 예는 Ham's F10(시그마(Sigma)), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium(MEM), 시그마), RPMI-1640(시그마) 및 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 시그마) 및 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)에서 판매하는 화학적으로 정의된 배지 및 보충제 공급을 포함한다. 임의의 이러한 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 기타 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자); 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액(예컨대, HEPES); 뉴클레오시드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, GENTAMYCIN™), 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 특정 세포주에 대하여, 이의 농도를 포함하여 배지에 필요한 영양소 및 성장 인자는, 예를 들어, 포유동물 세포 배양(Mammalian Cell Culture, Mather, Plenum Press: NY 1984); Barnes and Sato, Cell 22 (1980) 649 또는 Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach M. Butler (IRL Press, 1991))에 기재된 바와 같이 경험적으로 과도한 실험 없이 결정된다. 적합한 배지는 기본 배지 성분, 예컨대, 일부 성분, 예컨대, 아미노산, 염, 당 및 비타민의 농도가 변형되고, 임의적으로 글리신, 하이포크산틴, 티미딘, 재조합 인간 인슐린, 가수분해된 펩톤, 예컨대, 프리마톤(PRIMATONE) HS™ 또는 프리마톤 RL™(잉글랜드, 셰필드) 또는 이의 등가물, 세포 보호제, 예컨대, 플루로닉(PLURONIC) F68™ 또는 이의 동등한 플루로닉 폴리올 및 겐타마이신(GENTAMYCIN)™을 함유하는 DMEM/HA F12 기반 체제를 함유한다.
- [0256] 본 발명의 다른 양태에서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지이고; 상기 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 4.0 mM 내지 10.0 mM의 설프히드릴기(들)를 포함한다. 다른 바람직한 양태에서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지이고; 상기 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 9.0 mM 이하, 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 8.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 7.0 mM 이하, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 4.0 mM 초과 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 양태에서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지, 바람직하게는 무혈청, 무단백질 및/또는 올리고펩티드 비함유 세포 배양 배지이고; 상기 세포 배양 배지는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터의 설프히드릴기(들)의 적어도 5.0 mM 및 10.0 mM 미만, 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 9.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 8.0 mM 이하, 보다 더 바람직하게는 적어도 5.0 mM 및 7.0 이하 mM, 및 가장 바람

직하계는 적어도 5.0 mM 및 6.0 mM 이하의 농도를 포함한다.

- [0257] 상기와 같이 상업적 배지에 있는 것으로 계산된 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 그러한 매체에 형성 또는 펩톤과 같은 복합 성분이 보충되는 경우 변경될 것이다. 본 발명의 방법이 이들 설프히드릴 화합물(들)을 배지에 첨가함으로써 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 조정하는 단계를 포함하는 경우, 본원에서 제공되고 재조합 단백질의 생성을 위한 배양 배지에 포함하기에 적절한 임의의 설프히드릴 화합물이 사용될 수 있다.
- [0258] 도 3은 CHO K1M에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스에 대한 상호전환 경로를 설프히드릴 화합물로 조절하는 것을 도시한다. 도 3에 도시된 바와 같이, UDP-Gal-T를 자극하기 위해 L-시스테인과 같은 설프히드릴 화합물(들)을 첨가함으로써, 더 많은 UDP-갈락토스가 UDP-글루코스로 전환될 수 있고, 결과적으로 세포질에 더 적은 UDP-갈락토스가 남아있게 될 수 있다. 도 4에 도시된 바와 같이, 세포 배양 배지에 L-시스테인 대신 L-시스틴을 첨가함으로써, L-시스테인으로 UDP-Gal-T 효소 활성을 자극하는 효과가 세포질에서 약화될 수 있다. 다른 한편으로, 증가된 L-시스틴 흡수는 세포 생존을 조절하고 UDP-갈락토스 대사 과정을 개선하기 위한 보다 효과적인 산화환원 시스템을 제공할 수 있다.
- [0259] 본 발명의 다른 양태는 CHO K1 및 이의 유도체 세포주와 같은 포유동물 세포에서 세포내 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스 농도를 생체내 조절하기 위한 L-시스테인 및/또는 시스틴과 같은 단순한 설프히드릴 분자의 사용이다. 예를 들어, L-시스틴은 CHO K1에서 세포내 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스 농도를 생체내 조절하기 위해 배양 배지에 첨가할 수 있다. 이러한 방식으로, 최종 생성물의 양과 품질은 사전 정의된 임상 적용을 위해 제어하고 개선할 수 있다.
- [0260] UDP-글루코스/UDP-갈락토스 경로를 조절하여 생성물 당화 및 세포 배양 과정의 제어
- [0261] 도 5에서 도시된 바와 같이, UDP-갈락토스는 당화전달효소에 의해 촉매되는 상이한 갈락토실화 반응에서 갈락토실 공여체로서 작용한다. 예를 들어, UDP- α -D-갈락토스: N-아세틸- β -D-글루코사미닐글리코펩티드 4- β -갈락토실-전달효소(EC 2.4.1.38)는 UDP-갈락토스에서 GlcNAc로 갈락토실기를 전달함으로써 Gal β 1-4GlcNAc 연결의 형성을 촉매한다(Qasba et al., Curr. Drug. Targets. 9 (2008) 292-309).
- [0262] 세포질에서 증가된 L-시스테인은 효소 UDP-Gal-T를 자극하여 더 많은 UDP-갈락토오스를 UDP-글루코오스로 전환하여, 후속 갈락토실화 반응을 위한 UDP-갈락토스의 세포질 풀을 감소시킬 수 있다. 다른 한편으로, 세포 배양 배지에서 L-시스테인 대신에 L-시스틴이 존재하는 경우, L-시스틴은 시스템 x_c^- 를 통해 세포 내로 전달된다. L-시스틴 흡수가 증가하면, 효소 UDP-Gal-T 자극이 약화되어, 후속 갈락토실화 반응을 위한 UDP-갈락토스의 균형 잡힌 세포질 풀이 생성될 수 있다.
- [0263] 본 발명에 따르면, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 포유동물 세포에 의해 생성된 재조합 단백질의 갈락토실화 패턴에 영향을 미치도록 조절된다. 약 4 mM 내지 10 mM 범위의 설프히드릴기(들)를 갖는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 배양되는 특정 숙주 세포 및 생성된 재조합 단백질의 바람직한 갈락토실화 패턴에 따라 사용 및 변형될 수 있다. 바람직한 갈락토실화 패턴을 갖는 단백질을 생성하기 위해, 재조합 단백질의 일정한 균질한 갈락토실화 패턴을 제공하는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도가 선택된다. 재조합 단백질의 갈락토실화 함량을 증가시키기 위해, 일반적으로 더 낮은 농도는 포유동물 숙주 세포 배양물의 생존력을 유지하면서 향상된 갈락토실화 함량을 제공한다. 일반적으로, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들), 예컨대, 시스테인 및/또는 시스틴의 농도는 약 4 mM 내지 10 mM, 바람직하게는 약 5 mM 내지 10 mM 범위의 설프히드릴기(들)와 함께 사용된다. 더 바람직하게는, 적어도 약 5.0 mM 및 9.0 mM 이하, 더 바람직하게는 적어도 약 5.0 mM 내지 8.0 mM 이하, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 5.0 mM 내지 7.0 mM 이하, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 5.0 mM 내지 6.0 mM 이하의 농도가 사용된다. 대안적으로(예: 시스테인 및/또는 시스틴의 경우), 적어도 약 0.6 g/L 및 1.1 g/L 이하, 더 바람직하게는 적어도 약 0.6 g/L 및 1.0 g/L 이하, 더 바람직하게는 적어도 약 0.6 g/L 및 0.9 g/L 이하, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 0.6 g/L 및 0.8 g/L 이하, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 0.6 g/L 및 0.7 이하의 농도가 사용된다.
- [0264] 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)과 관련하여 용어 "농도"는 배양 배지 내에 포함된 모든 설프히드릴 화합물(들)의 총 농도를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 설프히드릴 기와 관련하여 용어 "농도"는 배양 배지 내에 포함된 모든 설프히드릴 화합물(들)의 총 농도를 지칭한다. 상기 문맥에서, 설프히드릴기는 -SH(본원에서는 "[SH]"라고도 함)를 의미하고, 또한 반응을 거친 설프히드릴기를 지칭할 수 있다. 여기서 수소는 설프히드릴기의 황 원자로부터 해리되고, 상기 황 원자는 상기 반응을 거친 다른 설프히드릴기와

S-S 결합을 형성한다. 다시 말해서, 용어 "설프히드릴기"는 또한, 예컨대, 이황화 가교에 의해 결합된 설프히드릴기(들)를 포함한다. 농도는 주어진 시점에서 세포를 둘러싸고 있는 배지에서 설프히드릴 화합물(들)의 측정된 또는 측정 가능하거나 계산된 또는 계산 가능한 실제 농도일 수 있다. 상기 배지 중 이들 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법의 예로는 PCI-MS(애질런트(Agilent)), 독일 비블링겐 소재)가 있다. 따라서, 농도는 또한 배양 동안 세포를 둘러싸는 배양 배지에 포함된 설프히드릴 화합물(들)의 양을 나타내며, 따라서 주어진 시점에서 각각의 설프히드릴 화합물(들)의 실제 농도이다. 상기 농도는 분석적으로 결정할 수 있으며, 예컨대, 설프히드릴 화합물(들)을 배양물에 도입(칭량, 사전 배양으로부터 세포 및 배지의 이동, 불순물 도입, 침출 등에 의해), 세포에 의한 방출(예컨대, 세포 사멸 또는 활성 분비에 의해), 세포의 흡수 및 기타 요인으로부터 기인한다.

[0265] 본 발명의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 세포 배양 배지는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 상승된 수준을 포함하지 않는 세포 배양 배지와 비교하여 상승된 수준의 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)을 포함한다.

[0266] 상세하게는, 본 발명은 재조합 단백질 또는 항체, 특히 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 또는 항 α -시누클레인 항체와 같은 당단백질을 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은,

[0267] (a) 본원에 기재된 세포 배양 배지에서 본원에 기재된 포유동물 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴기(들)의 적어도 4.0 mM 초과 및 10.0 mM 미만의 농도 및 적어도 3.0 g/L 초과의 글루코스가 적어도 3일, 더 바람직하게는 적어도 4일, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 5일 동안 유지되는, 단계,

[0268] (b) 상기 항체를 분리하는 단계를 포함한다.

[0269] 본 발명의 방법의 맥락에서, 상기 재조합 단백질은 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 상승된 수준을 포함하지 않는 배지를 사용하여 생성된 재조합 단백질의 상응하는 수준에 비해 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸의 증가된 수준을 갖는다. 본 발명의 방법의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 상기 재조합 단백질은 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸의 수준이 적어도 3%, 더 바람직하게는 적어도 5%, 보다 더 바람직하게는 적어도 10% 만큼 증가한다. 본 발명의 방법의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 상기 생성된 재조합 단백질의 역가는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 상승된 수준을 포함하지 않는 배지를 사용하여 생성된 상응하는 재조합 단백질의 역가에 비해 증가한다. 바람직하게는, 생성된 재조합 단백질의 역가는 적어도 2000 mg/L이다.

[0270] 본 발명의 방법의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 상기 세포 배양 배지 중 세포의 생존 세포 밀도는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 상승된 수준을 포함하지 않는 배지 중 세포의 상응하는 생존 세포 밀도에 비해 증가한다. 바람직하게는, 상기 세포 배양 배지에서 세포의 최대 생존 세포 밀도는 적어도 약 120×10^5 개 세포/mL이다.

[0271] 예를 들어, 상기 재조합 단백질은 총 글리칸당 19.0~29.0%(w/w)의 G1 및 1.3~2.8%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 20.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.4~2.7%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~28.0%(w/w)의 G1 및 1.5~2.7%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 21.0~27.4%(w/w)의 G1 및 1.5~2.6%(w/w)의 G2를 가진 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체일 수 있다. 상기 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 역가에 비해 상기 항체의 역가를 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 더 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 보다 더 바람직하게는 적어도 60%, 및 가장 바람직하게는 적어도 80% 만큼 증가시킬 수 있다.

[0272] 다른 예로서, 상기 재조합 단백질은 총 글리칸당 17.2~48.0%(w/w)의 G1 및 3.1~15.0%(w/w)의 G2; 총 글리칸당 25.4~48.0%(w/w)의 G1 및 3.5~15.0%(w/w)의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 27.2~47.0%의 G1 및 4.4 내지 15.0%의 G2; 바람직하게는 총 글리칸당 40.0~46.0%(w/w)의 G1 및 8.4~15.0%(w/w)의 G2; 더 바람직하게는 총 글리칸당 41.0~45.0%(w/w)의 G1 및 9.5~14.0%(w/w)의 G2, 및 가장 바람직하게는 총 글리칸당 42.1~43.9%(w/w)의 G1 및 10.6~13.3%(w/w)의 G2를 가진 항 α -시누클레인 항체일 수 있다. 상기 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 역가에 비해 상기 항체의 역가를 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 30%, 더 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 더 바람직하게는 적어도 60%, 더 바람직하게는 적어도 70%, 보다 더 바람직하게는 적어도 80%, 및 가장 바람직하게는 적어도 100% 만큼 증가시킬 수 있다. 다른 예로서, 상기 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에

서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 역가에 비해 상기 항체의 역가를 9.0 내지 75% 만큼 증가시킬 수 있다.

- [0273] 추가로, 상기 포유동물 세포의 배양은 세포 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)로부터 설프히드릴 기(들)의 농도를 적어도 4.0 초과 및 10.0 mM 미만으로 유지하지 않으면서 포유동물 세포의 상응하는 배양에서의 항 α -시누클레인 항체의 비모노갈락토실화된(G1) 및 비디갈락토실화된(G2) 형태에 비해
- [0274] (i) 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 35%, 보다 더 바람직하게는 적어도 45%, 및 가장 바람직하게는 적어도 50% 만큼 증가된 단백질 표적 결합;
- [0275] (ii) 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 33%, 더 바람직하게는 적어도 40%, 및 가장 바람직하게는 적어도 45% 만큼 증가된 신생아 Fc 수용체(FcRn) 결합; 및/또는
- [0276] (iii) 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 더 바람직하게는 적어도 36%, 보다 더 바람직하게는 45%, 및 가장 바람직하게는 50% 만큼 증가된 FcyRIIa 결합을 특징으로 하는 모노갈락토실화된(G1) 및 디갈락토실화된(G2) 글리칸을 갖는 항 α -시누클레인 항체를 발생시킨다.
- [0277] 본원에 사용된 "재조합 단백질" 또는 "재조합 발현된 단백질"은 이러한 발현의 목적을 위해 조작된 숙주 세포로부터 발현된 단백질을 지칭한다. 조작에는 발현된 단백질을 부호화하는 하나 이상의 이중 유전자의 도입과 같은 하나 이상의 유전적 변형이 포함된다. 상기 이중 유전자는 상기 세포에서 정상적으로 발현되거나 숙주 세포에 대해 외래인 단백질을 부호화할 수 있다. 조작은 대안적으로 하나 이상의 내인성 유전자를 상향 또는 하향 조절하는 것일 수 있다. 본 발명의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 상기 재조합 단백질은 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 가진다. 본원에서 사용된 바와 같이, 재조합 단백질의 "글리칸"이라는 용어는 당단백질을 의미한다. 본원에 사용된 "당단백질"은 일반적으로 약 10개 초과의 아미노산 및 적어도 1개의 올리고당 측쇄를 갖는 펩티드 및 단백질을 지칭한다. 상기 당단백질은 숙주 세포에 상동성일 수 있거나, 또는 바람직하게는, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 의해 생성된 인간 단백질과 같이 활용되는 숙주 세포에 이중, 즉, 외래일 수 있다. 바람직하게는, 포유동물 당단백질(원래 포유동물 유기체로부터 유래된 당단백질), 더 바람직하게는 배지로 직접 분비되는 폴리펩티드가 사용된다. 포유류 당단백질의 예는 분자, 예컨대, 사이토카인 및 이의 수용체뿐만 아니라, 예를 들어, 중앙 피사 인자 알파 및 베타, 이의 수용체 및 이의 유도체를 포함하는 사이토카인 또는 이의 수용체를 포함하는 키메라 단백질; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬을 포함하는 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 난포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체 형성 호르몬; 글루카곤; 인자 VIIIIC, 인자 IX 조직 인자 및 폰 빌레브란트(Willebrands) 인자와 같은 응고 인자; 단백질 C와 같은 항응고 인자; 심방 나트륨 이뇨 인자; 폐 계면활성제; 유로키나제 또는 인간 소변 또는 조직형 플라스미노겐 활성화제(t-PA)와 같은 플라스미노겐 활성화제; 붐베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 엔케팔리나제; RANTES(정상적으로 발현되고 분비되는 T-세포 활성화에 대해 조절됨); 인간 대식세포 염증성 단백질(MIP-1-알파); 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민; 뮐러 저해 물질; 틸렉신 A-사슬; 프로틸렉신; 마우스 성선 자극 호르몬 관련 펩티드; 베타-락타마제와 같은 미생물 단백질; DNase; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대, 골유래 신경영양 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6(NT-3, NT-4, NT-5, or NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대, NGF- β ; 혈소판 유래 성장 인자(PDGF); 섬유아세포 성장인자, 예컨대, aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자(EGF); 변형 성장 인자(TGF), 예컨대, TGF-베타 및 TGF-베타, 예컨대, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, 또는 TGF- β 5; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II(IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I(또는 IGF-I), 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대, CD-3, CD-4, CD-8, 및 CD-19; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골형성 단백질(BMP); 인터페론, 예컨대, 인터페론 알파, -베타, 및 -감마; 집락 자극 인자(CSFs), 예컨대, M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF; 인터루킨(ILs), 예컨대, IL-1 내지 IL-10; 과산화물 디스무타제; T 세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 가속 인자; 바이러스 항원, 예컨대, 예를 들어, AIDS 외피의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 항체; 키메라 단백질, 예컨대, 면역접합체, 및 상기 나열된 폴리펩티드 중 임의의 것의 단편을 포함한다. 당단백질과 관련하여 본원에 사용된 "갈락토실화된"은 G1 및 G2 당구조를 생성하는 하나 이상의 갈락토스 잔기를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 예를 들어, $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_1$, $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2$, $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{GalSia}_1$, $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2\text{Sia}_1$ 및 $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2\text{Sia}_2$ 와 같은 하나 이상의 시알산 잔기를 함유하는 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 갈락토실화 재조합 단백질이다.

- [0278] 본 발명의 맥락에서 사용되는 일 양태에서, 상기 재조합 단백질은 항체이다. 본원에 사용된 용어 "항체"(Ab)는 면역글로불린 분자 또는 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉, 천연이든 부분적으로든 또는 전체적으로든 합성으로 생산되었던 상관없이 Fab 또는 F(ab')₂ 단편과 같은 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭한다. 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한, 단일클론 항체(이뮤노글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체 또는 원형 단일클론 항체를 포함), 폴리엠포토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다클론 항체, 다가 항체(전형적으로 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 조작됨), 적어도 2개의 원형 항체로부터 형성된 다중특이적 항체(예: 이중특이적 항체), 디아바디 및 scFv 분자와 같은 단일 사슬 분자뿐만 아니라 항체 단편(예: Fab, F(ab')₂ 및 Fv)을 수반한다. "다중특이적 항체"는 적어도 2가지 상이한 부위들, 즉, 상이한 항원들 상의 상이한 에피토프 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지는 단클론 항체들이다. 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로 제조될 수 있다.
- [0279] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 동시 발현(Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)을 참조), 및 "구멍 내 돌기(knob-in-hole)" 공학(예컨대, 미국 특허 제 5,731,168호 및 Atwell et al., *J. Mol. Biol.* 270:26 (1997)). 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스테어링 효과를 가공하고(예컨대, WO 2009/089004를 참조); 2개 이상의 항체 또는 단편을 가교 결합하고(예컨대, 미국 특허 제 4,676,980호 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)을 참조); 튜신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체를 형성하고(예컨대, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992) 및 WO 2011/034605를 참조); 경쇄 쌍형성 오류 문제를 우회하기 위한 일반적인 경쇄 기술 사용하고(예컨대, WO 98/50431을 참조); 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 "디아바디" 기술을 사용하고(예컨대, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)을 참조); 단일 사슬 Fv(sFv) 이량체 사용하며(예컨대, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)을 참조); 및, 예컨대, Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에서 기재된 바와 같은 삼중특이적 항체를 제조하여 만들 수 있다.
- [0280] 항체의 정의에는 항체 약물 접합체(ADC)와 같은 항체 접합체 또는, 예컨대, 표지화 요소에 접합된 항체가 포함된다. 항체의 정의에는 항체가 특정 단백질을 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 특정 표적 단백질에 충분한 친화도로 결합하는 항체가 추가로 포함된다. 예를 들어, 항체는 항체가 α 시누클레인을 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 α 시누클레인에 결합할 수 있는 항-α 시누클레인 항체일 수 있다.
- [0281] 다른 예로서, 항체는 항체가 CD20-CD3을 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 CD20-CD3에 결합할 수 있는 항 CD20/항 CD3 항체일 수 있다. 일 양태에서, 관련 없는, 비 표적 단백질에 대한 항체의 결합 정도는, 예컨대, 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 측정될 때 표적에 대한 상기 항체의 결합의 약 10%보다 적다. 특정 양태에서, 표적에 결합하는 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM(예컨대, 10⁻⁸ M 이하, 예컨대, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹³ M, 예컨대, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹³ M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 항체의 K_D가 1 μM 이하인 경우, 상기 항체는 표적에 "특이적으로 결합한다"고 한다. 특정 양태들에서, 항체는 상이한 종으로부터 표적들 사이에서 보존되는 표적의 에피토프에 결합한다. 본 발명의 맥락에서 사용되는 다른 양태에서, 상기 재조합 단백질은 치료 단백질이다. 예를 들어, 상기 재조합 단백질이 항체인 경우, 상기 항체는 치료학적으로 효과적인 항체일 수 있고, 하기를 포함하는 임의의 단백질에 결합할 수 있다: 안지오펀에틴 계열의 구성요소, 예컨대, Ang1, Ang2, Ang3 및 Ang4 및 안지오펀에틴 계열의 구성요소에 대해 이중특이적인 항체 및 예컨대, Ang2/VEGF와 같은 VEGF; HER 수용체 계열의 구성요소, 예컨대, HER1(EGFR), HER2, HER3 및 HER4; CD 단백질, 예컨대, CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44 및 CD52; 세포 부착 분자, 예컨대, LFA-1, VLA04, ICAM-1, VCAM 및 인테그린(이의 α 또는 β 하위단위를 포함, 예컨대, 항 CD11 α, 항 CD18 또는 항 CD11 β 항체); 혈관 내피 성장 인자(VEGF)와 같은 성장 인자; 흥선 기질 림프포이에틴 수용체(TSLP-R)와 같은 사이토카인 수용체; IgE; 혈액형 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만(OB) 수용체 및 단백질 C. 다른 예시적인 단백질은 하기를 포함하는 성장 호르몬(GH)을 포함한다: 인간 성장 호르몬(hGH) 및 소 성장 호르몬(bGH); 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬, 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 인슐린 A 사슬; 인슐린 B 사슬; 프로인슐린, 난포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체 형성 호르몬; 글루카곤; 인자 VIIIC와 같은 응고 인자; 조직 인자(TF); 폰 빌레브란트 요인; 심방 나트륨 이뇨 인자; 폐 계면활성제; 유로키나제 또는 조직형 플라스미노겐 활성화제(t-PA), 붐바진, 트롬빈, 종양 괴사 인자-α 및 -β와 같은 플라스미노겐 활성화제; 엔케팔리나제; RANTES(정상적으로 발현되고 분비되는 T 세포 활성화에 대해 조절됨); 인간 대식세포 염증성 단백질(MIP-1-α); 인간 혈청 알부민(HSA)과 같은 혈청 알부민; 물러

저해 물질; 틸렉신 A-사슬, 틸렉신 B-사슬; 프로틸렉신; 마우스 성선 자극 호르몬 관련 펩티드; DNase; 인히빈; 액티빈; 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 섬유아세포 활성화 단백질(FAP); 암배아 항원(CEA); 류마티스 인자; 골유래 신경영양 인자(BDNF)와 같은 신경영양 인자; 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6(NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6) 또는 NGF- β 와 같은 신경 성장 인자; 혈소판 유래 성장 인자(PDGF); aFGF 및 bFGF와 같은 섬유아세포 성장 인자; 표피 성장 인자(EGF) 및 표피 성장 인자 수용체(EGFR); TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 또는 TGF- β δ 를 포함하는 TGF- α 및 TGF- β 와 같은 형질전환 성장 인자(TGF); 인슐린 유사 성장 인자-1 및 -II(IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-1(또는 IGF-1); 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(IGFBP); 에리트로포이에틴(EPO); 트롬보포이에틴(TPO); 골유도 인자; 면역독소; 골형성 단백질(BMP); 인터페론(인터페론- α , - β 또는 - γ); 집락 자극 인자(CSF), 예컨대, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터루킨(IL), 예컨대, IL-1 내지 IL-10 및 IL-17; 슈퍼옥사이드 디스무타제; T 세포 수용체; BlyS(Br3) 수용체; Br3-Fc 면역부착소; Apo-2 수용체; Fc 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 가속 인자(DAF); 예컨대, 예를 들어, AIDS 외피의 일부와 같은 바이러스 항원; 수송 단백질; 귀소 수용체; 주소; 조절 단백질; 면역접착제; 및 상기 중 임의의 것의 생물학적 활성 단편 또는 변이체. 대안적으로, 상기 항체는 유방 상피 세포에 대해 지향하거나 결장암 세포에 대해 결합하는 항체, 항 EpCAM 항체, 항 Gp1b/IIIa 항체, 항 RSV 항체, 항 CMV 항체, 항 HIV 항체, 항 간염 항체, 항 CA 125 항체, 항 인간 신장 세포 암종 항체, 항 인간 결장직장 종양 항체, GD3 ganglioside에 대한 항 인간 흑색종 항체 R24, 항 인간 편평세포 암종, 항 인간 백혈구 항원(HLA) 항체, 항 HLA DR 항체일 수 있다.

[0282] 본원에서 사용된 용어 "항원" 및 "에피토프"는 함께 사용되며, 항원 결합 모이어티가 결합되어 항원 결합 모이어티-항원 복합체를 형성하는 단백질성 또는 비단백질성인 항원 상의 부위(예컨대, 아미노산의 연속 신장부 또는 비연속 아미노산의 상이한 영역들로 구성된 입체형태 구조)를 말한다. 따라서, 에피토프는 항체에 의해 결합된 항원의 영역이다. 에피토프는 인접한 아미노산 스트레치(선형 에피토프)로부터 형성될 수 있거나, 또는 예를 들면, 항원의 접힘으로 인해, 다시 말하면 단백질성 항원의 삼차 접힘에 의해 공간적으로 근접하는 비인접한 아미노산(입체형태적 에피토프)을 포함할 수 있다. 선형 에피토프는 전형적으로, 변성제에 단백질성 항원의 노출 이후에도 항체에 의해 여전히 결합되는 반면, 입체형태적 에피토프는 전형적으로, 변성제로 처리 시에 파괴된다. 에피토프는 고유한 공간적 입체형태에서 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다.

[0283] 특정 구현예들에서, 에피토프 결정인자는 분자, 예컨대 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴, 또는 설포닐의 화학적 활성 표면 그룹화를 포함하고, 특정 구현예들에서, 특정 3차원 구조 특성, 및/또는 특정 전하 특성을 가질 수 있다. 유용한 항원 결정인자는 예를 들어 종양 세포의 표면, 바이러스에 감염된 세포의 표면, 다른 질환 세포의 표면, 면역 세포의 표면상에서, 혈청내 및/또는 세포의 기질(ECM) 중에서 자유롭게 발견될 수 있다. 본원에서 항원으로서 유용한 단백질은 달리 지시가 없는 한, 임의의 척추동물 출처, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 영장류(예를 들어 인간) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)로부터의 임의의 천연 형태의 단백질일 수 있다. 특정 에피토프에 결합하는 항체(즉, 동일한 에피토프에 결합하는 항체)에 대한 선별검사는, 예를 들어, 제한 없이, 알라닌 선별검사, 펩티드 블롯(Meth. Mol. Biol. 248 (2004) 443-463을 참조), 펩티드 절단 분석, 에피토프 절제, 에피토프 추출, 항원의 화학적 변형(Prot. Sci. 9 (2000) 487-496을 참조), 및 교차 차단("Antibodies", Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY를 참조)과 같이 당업계의 일상적인 방법을 사용하여 실시할 수 있다.

[0284] 특정 구현예에서, 상기 항원은 인간 단백질이다. 본원에서 특정 단백질을 지칭하는 경우, 이 용어는 "전장"의, 비가공 단백질뿐만 아니라 세포에서 가공된 임의의 형태의 단백질을 포함한다. 이 용어는 또한 단백질의 자연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 다시 말해서, 상기 용어는 또한 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 포함한다.

[0285] "항원 결합"은 항체 부분의 항원 결합 부위가 항원에 특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 다시 말해서, 용어 "항원 결합 부위"는 항원의 일부 또는 전체에 특이적으로 결합하고 이와 상보적인 영역을 포함하는 항체의 부분을 말한다. "특이적 결합"은 결합이 항원에 선택적이고, 그리고 원치 않는 또는 비특이적 상호작용으로부터 차별될 수 있다는 것으로 의미된다. 특정한 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 능력은 효소-결합된 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 다른 기술, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술(Biacore 장비상에서 분석됨)(Liljeblad 등, Glyco J 17, 323-329 (2000)), 및 전통적인 결합 분석(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다.

[0286] 면역글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체(Abs)의 불

변 영역은 면역계의 다양한 세포(예: 효과기 세포) 및 보체 시스템의 구성요소(예: 보체 활성화의 고전적 경로의 제1 구성 요소인 C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 본원에 사용된 "가변 도메인"(경쇄(VL)의 가변 도메인, 중쇄(VH)의 가변 도메인)은 항체를 항원에 결합시키는데 직접적으로 관여하는 경쇄와 중쇄 쌍 각각을 나타낸다. 가변 인간 경쇄 및 중쇄의 도메인은 동일한 일반 구조를 가지며 각 도메인은, 3개의 "초가변 영역"(또는 상보성 결정 영역, CDR)에 의해 연결되어 있고 그 서열들이 광범위하게 보존되는 4개의 프레임워크(FR) 영역을 포함한다. (예컨대, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)를 참조한다.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 더욱이, 특정 항원에 결합하는 항체는 상보성 VH 또는 VL 도메인의 라이브러리를 스크린하기 위하여 항원에 결합하는 항체의 VH 또는 VL 도메인을 이용하여 분리될 수 있다. 예컨대, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)을 참조한다. 본원에서 사용되는 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열에서 초가변적이고, 항원 결합 특이성을 결정하는 항체 가변 도메인의 영역들 각각, 예를 들어, "상보성 결정 영역"("CDR")을 지칭한다. 별도로 지시되지 않으면, CDR은 Kabat et al., *위와 같음*에 따라서 결정된다. 당업자는 CDR 지정이 Chothia, *위와 같음*, McCallum, *위와 같음*, 또는 임의의 다른 과학적으로 용인된 명명법 시스템에 따라서 또한 결정될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0287] 프레임워크 영역은 β -시트 입체형태를 채택하며 CDR은 β -시트 입체형태를 연결하는 루프를 형성할 수 있다. 각 사슬의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 3차원 구조로 유지되고 다른 사슬의 CDR과 함께 항원 결합 부위를 형성한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 영역은 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화도에서 특히 중요한 역할을 하므로 본 발명의 또 다른 목적을 제공한다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 가변 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 기재된 바와 같이 EU 색인이라고도 하는 EU 넘버링 시스템에 따른다. "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인들로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열들은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 다음의 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. VH의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원과 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은, 축약된-CDR 또는 a-CDR이라 불리는 CDR들의 영역 내에 포함된다. 예시적인 a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58, 및 H3의 95-102에서 발생한다. (Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008)을 참조).

[0288] 상기 나타난 바와 같이, 본원에서 용어 항체는 달리 언급되거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 항원 결합 단편인, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 전장 항체 및 항체의 단편을 포함한다. 다시 말해서, 본원에서 사용되는 용어 "단편"은 원형 항체가 결합하는 항원에 결합하는 원형 항체의 일부를 포함하는 원형 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 하기를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다: (i) Fab' 또는 Fab 단편; 디아바디, 선형 항체; 단일쇄 항체 분자(예: scFv 및 scFab), 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체, V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 구성된 1가 단편, 또는 W02007059782(Genmab)에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) $F(ab')_2$ 단편, 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) V_H 및 C_H1 도메인으로 필수적으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 V_L 및 V_H 도메인으로 필수적으로 이루어진 Fv 단편, (v) V_H 도메인으로 필수적으로 구성되고 도메인 항체로도 불리는 dAb 단편(Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989))(Holt et al; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) 낙타과 또는 나노바디(Revets et al; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan; 5(1): 111-24) 및 (vii) 고립된 상보성 결정 영역(CDR). 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위(2개의 Fab 단편) 및 Fc 영역의 일부를 갖는 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다. 구제 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편에 관한 논의를 위해, 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다. 이중체는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)을 참조). 또한, Fv 단편의 두 도메인인 V_L 및 V_H 가 별도의 유전자에 의해 부호화되지만, V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬로서 만들 수 있는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 결합할 수 있다(단일 사슬 항체 또는 단일 사슬 Fv(scFv)로 공지됨, 예를 들어 Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988) 및 Huston et al.,

PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)을 참조). 따라서, “단일 사슬 가변 단편” 또는 “scFv”는 링커에 의해 연결된, 항체의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 도메인의 융합 단백질이다. 특히, 링커는 10 내지 25개 아미노산의 짧은 폴리펩티드이고, 그리고 통상적으로, 유연성을 위한 글리신뿐만 아니라 용해도를 위한 세린 또는 트레오닌이 풍부하고, 그리고 VH의 N 말단을 VL의 C 말단과 연결하거나 또는 그 반대일 수 있다. 이 단백질은 불변 영역의 제거와 링커의 도입에도 불구하고 원래 항체의 특이성을 유지한다. scFv 단편들의 리뷰는 예로써, Plueckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; 그리고 미국 특허 제 5,571,894 및 5,587,458을 또한 참고한다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정한 양태들에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(Domantis, Inc., Waltham, MA; 참조: 예를 들면, U.S. 특허 번호 6,248,516 B1). 항체 단편은 본원에서 설명된 바와 같이, 무손상 항체의 단백질분해성 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들면 대장균(*E. coli*))에 의한 재조합 생산을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다.

[0289] 이러한 단일 사슬 항체는 달리 언급되거나 문맥에 의해 명확하게 표시되지 않는 한 용어 항체 내에 포함된다. 이러한 단편은 일반적으로 항체의 의미에 포함되지만, 이들은 집합적으로 및 각각 독립적으로 본 발명의 독특한 특징으로서 상이한 생물학적 특성 및 유용성을 나타낸다. 본 발명의 맥락에서 이들 및 다른 유용한 항체 단편뿐만 아니라 이러한 단편의 이중특이성 형식은 본원에서 추가로 논의된다. 특정 항체 단편들에 대한 검토는, Holliger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136 (2005)를 참고한다.

[0290] 용어 "전장 항체"는 2개의 "전장 항체 중쇄" 및 2개의 "전장 항체 경쇄"로 이루어진 항체를 나타낸다. "전장 항체 중쇄"는 서브클래스IgE의 항체의 경우에 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1(CH1), 항체 힌지 영역(HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2(CH2), 및 항체 중쇄 불변 도메인 3(CH3), 약칭 VH-CH1-HR-CH2-CH3; 및 선택적으로 항체 중쇄 불변 도메인 4(CH4)로 이루어진 폴리펩티드이다. 바람직하게는 "전장 항체 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH, CH1, HR, CH2 및 CH3로 구성된 폴리펩티드이다. "전장 항체 경쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL)으로 구성된 폴리펩티드이며, VL-CL로 약칭된다. 항체 경쇄 불변 도메인(CL)은 κ (카파) 또는 λ (람다)일 수 있다. 2개의 전장 항체 사슬은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이 및 전장 항체 중쇄의 힌지 영역들 사이의 폴리펩티드간 이황화 결합을 통해 함께 연결된다. 항체에는 5가지 주요 분류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 그리고 이들중 몇몇은 서브클래스(아이소형), 예컨대, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 더욱 세분될 수 있다. 특정 양태들에서, 상기 항체는 IgG₁ 동형의 항체이다. 항체의 “부류”는 이의 중쇄에 의해 소유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 특정 양태들에서, 상기 항체는 Fc 영역 효과기 기능을 감소시키기 위해 P329G, L234A 및 L235A 돌연변이를 갖는 IgG₁ 동형의 것이다. 다른 양태들에서, 상기 항체는 IgG₂ 동형의 항체이다. 특정 양태들에서, 상기 항체는 IgG₄ 항체의 안정성을 개선하기 위해 힌지 영역에서 S228P 돌연변이를 갖는 IgG₄ 동형의 것이다. 상이한 부류의 면역글로불린에 해당하는 중쇄 불변 도메인들은 각각 a, d, e, g, 및 m로 불린다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 카파(κ) 및 람다(λ)라고 하는 두 가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0291] 또한, 항체라는 용어는 달리 명시되지 않는 한 다클론 항체, 단일클론 항체(mAb), 항체 유사 폴리펩티드, 예컨대, 키메라 항체 및 인간화 항체, 그리고 효소 절단, 펩티드 합성, 및 재조합 기술과 같은 임의의 공지된 기술에 의해 제공되는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체 단편(항원 결합 단편)도 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 생성된 항체는 임의의 동형을 보유할 수 있다. 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 출처 또는 종들로부터 유래되는 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 출처 또는 종들로부터 유래되는 항체를 지칭한다.

[0292] 예를 들어, 상기 항체는 단일클론 항체일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 동질성 항체 집단으로부터 획득된 항체를 지칭한다, 즉, 해당 집단을 포함하는 개별 항체들은 동일하며 및/또는 동일한 에피토프에 결합하며, 다만, 예를 들어, 자연 발생적 돌연변이를 내포하는 또는 단일클론 항체 체제를 만드는 동안 발생하는 변이체 항체들이 있을 수 있으며, 이러한 변이체들은 일반적으로 소량으로 존재한다. 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다중클론 항체 제조물과 대조적으로, 단일클론 항체 제조물의 각 단일클론 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지향된다. 따라서, 수식어 "단일클론"은 항체의 실제적으로 균질한 개체군으로부터 획득되는 것으로서 항체의 특징을 표시하고, 그리고 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 단일클론 항체는 하이브

리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지 전사 방법, 그리고 인간 면역글로불린 좌위 중에서 전부 또는 일부를 내포하는 유전자도입 동물을 활용하는 방법 및 본원에서 설명된 단일클론 항체를 만들기 위한 다른 예시적인 방법들을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 만들어질 수 있다.

[0293] 다른 예로서, 상기 항체는 인간화 항체일 수 있다. 용어 "인간화 항체"는 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)이 모 면역글로불린의 것과 비교하여 상이한 특이성의 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 지칭한다. 다시 말해서, 상기 용어는 비인간 CDR로부터 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 양태들에서, 인간화된 항체는 실질적으로 적어도 하나의, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함하는데, 여기서, CDR들의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 비-인간 항체에 대응하며, FR들의 모든 또는 실질적으로 모든 것은 인간 항체의 것에 대응한다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체의 "인간화 형태", 예를 들어, 비-인간 항체는 인간화를 거친 항체를 지칭한다. 인간화 항체를 생성하는 방법은 통상적인 재조합 DNA를 포함하고 유전자 형질감염 기술은 당업계에 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; 및 Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270 참조.

[0294] 다른 예로서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열들로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 한다. 다시 말해서, 상기 용어는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체 부호화 서열을 활용하는 비인간 공급원로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 특정적으로 배제한다. 인간 항체는 당업계에 잘 알려져 있다(van Dijk, M.A., 및 van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). 인간 항체는 당해 분야에서 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)를 참조한다. 인간 항체는 항원 공격에 대한 응답으로 무손상 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 포함하는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 유전자도입 동물에 면역원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이런 동물은 전형적으로, 내인성 면역글로불린 좌위를 대체하거나, 또는 염색체외로 존재하거나 또는 동물의 염색체 내로 무작위로 통합되는 인간 면역글로불린 좌위 중에서 전부 또는 일부를 내포한다. 상기 형질전환 마우스에서, 상기 내인성 면역글로불린 좌위는 일반적으로 비활성화되어 있다. 형질전환 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법을 검토하려면, Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)를 참조한다. 또한, 예로써, 미국 특허 제 6,075,181 및 6,150,584에서는 XENOMOUSE™ 기술을 설명하고; 미국 특허 제 5,770,429에서는 HuMab® 기술을 설명하고; 미국 특허 제 7,041,870에서는 K-M MOUSE® 기술을 설명하고, 그리고 U.S. 공개특허출원 US 2007/0061900에서는 VelociMouse® 기술을 설명한다). 이런 동물에 의해 산출된 무손상 항체로부터 인간 가변 영역은 예를 들면, 상이한 인간 불변 영역과 조합함으로써 더욱 변형될 수 있다.

[0295] 인간 항체는 또한, 하이브리도마-기초된 방법에 의해 만들어질 수 있다. 인간 단일클론 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 생쥐-인간 헤테로골수종 세포주가 설명되었다. (예컨대, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)을 참조한다.) 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체가 또한 Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)에 더 상세히 기재된다. 추가 방법은 예를 들면, U.S. 특허 번호 7,189,826(하이브리도마 세포주로부터 단일클론 인간 IgM 항체의 생산을 설명) 및 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 하이브리도마를 설명)에서 설명된 것들을 포함한다. 인간 하이브리도마 기법(트리오마 기술) 역시 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)에서 설명된다.

[0296] 인간 항체는 또한, 인간-유래된 파지 전사 라이브러리에서 선택되는 가변 도메인 서열을 단리함으로써 산출될 수 있다. 이런 가변 도메인 서열은 이후, 원하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 아래에 설명된다.

[0297] 본 발명의 맥락에서 사용된 일 양태에서, 상기 재조합 단백질은 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체로도 표시되는 CD3 및 CD20에 대한 항 α -시누클레인 항체 또는 이중특이적 항체이다. 본 발명의 맥락에서 용어 "이중특이적 항체"는 상이한 항체 서열에 의해 정의되는 2개의 상이한 항원 결합 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 이러한 목적에 유용할 수 있는 이중특이적 항체 형식의 실례는 2개의 scFv 분자가 유연한 링커에 의해 융합되는 이른바 “

BiTE" (이중특이적 T 세포 인게이지) 분자(참조: 예를 들면, WO 2004/106381, WO 2005/061547, WO 2007/042261 및 WO 2008/119567, Nagorsen and Baeuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)); 디아바디 (Holliger et al., *Prot Eng* 9, 299-305 (1996)) 및 이들의 유도체, 예컨대 탠덤 디아바디("TandAb"; Kipriyanov et al., *J Mol Biol* 293, 41-56 (1999)); 디아바디 형식에 기초되지만 추가 안정화를 위한 C 말단 이황화 다리를 특징으로 하는 "DART" (이중 친화성 재표적화) 분자 (Johnson et al., *J Mol Biol* 399, 436-449 (2010)), 그리고 전체 하이브리드 생쥐/쥐 IgG 분자인 이른바 트리옴(Seimetz et al., *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010))에서 검토됨)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 본원에 포함되는 특정한 T 세포 이중특이적 항체 형태들은 WO 2013/026833, WO 2013/026839, WO 2016/020309; Bacac 외, *Oncoimmunology* 5(8) (2016) e1203498에 기재되어 있다.

[0298] 용어 "항 α -시누클레인 항체", "항 α -시누클레인 항체" 및 " α -시누클레인에 결합하는 항체"는 α -시누클레인을 표적으로 하는 진단 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 인간 알파-시누클레인에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. α -시누클레인은 뇌에서 도파민성 뉴런 기능의 제어에서 중심적인 역할을 하고 파킨슨병(PD) 병태생리에 결정적으로 관여하는 것으로 생각되는 단백질이다. 예를 들어, 루이소체 질환(LBD)으로도 공지된 시누클레인병증은 도파민성 시스템의 퇴화, 운동 변화, 인지 장애, 루이소체(LB) 및/또는 루이 신경돌기의 형성을 특징으로 하고 (McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24) 항 α -시누클레인 항체로 치료할 수 있다. 이러한 시누클레인병증은 파킨슨 병(특발성 파킨슨 병을 포함), 루이소체를 동반한 치매(DLB)로도 공지된 미만성 루이소체 질환(DLBD), 알츠하이머병의 루이소체 변이체(LBV), 알츠하이머 병과 파킨슨 병, 순수 자율 부전 및 다계통 위축(MSA, 예컨대, 올리보폰토노브 위축, 선조체 변성 및 샤이-드래거 증후군)을 포함한다.

[0299] 알파-시누클레인은 베타 및 감마 시누클레인 및 시노레틴을 포함하는 대규모 단백질 계열의 일부이다. 천연 인간 야생형 알파-시누클레인은 하기의 아미노산 서열을 갖는 140개 아미노산의 펩티드이다:

[0300] MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA (서열번호 9)

[0301] (Ueda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:11282-6).; 젠뱅크(GenBank) 수탁번호: P37840). 단백질은 3개의 인식된 도메인, 즉, 아미노산 1-61을 수반하는 KTKE 반복 도메인, 약 아미노산 60-95에서 이어지는 NAC(비아밀로이드 성분) 도메인 및 약 아미노산 98 내지 140에서 이어지는 아미노산 C 말단 산성 도메인을 가진다. 알파-시누클레인 또는 이의 단편에 대한 언급은 상기 표시된 천연 인간 야생형 아미노산 서열 및 이의 인간 대립형질 변이체, 특히 루이소체 질환과 관련된 변이체(예: E46K, A30P 및 A53T, 첫 글자가 있는 아미노산을 나타냄: 서열번호 9, 숫자는 서열번호 9의 코돈 위치, 2번째 문자는 대립형질 변이체의 아미노산임)를 포함한다.

[0302] 알파-시누클레인은 시냅스와 관련된 정상 상태에서 발현되며 신경 가소성, 학습 및 기억에 역할을 하는 것으로 여겨진다. 여러 연구에 따르면, PD 환자의 중심 역할을 하는 알파-시누클레인이 관련되어 있다. 단백질은 병리학적 조건에서 응집하여 불용성 섬유소를 형성할 수 있다. 예를 들어, 시누클레인은 LB에 축적된다(Spillantini et al., *Nature* (1997) 388:839-40; Takeda et al., *J. Pathol.* (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 239:45-8). 알파-시누클레인 유전자의 돌연변이는 파킨슨병의 드문 가족성 형태와 함께 분리된다(Kruger et al., *Nature Gen.* (1998) 18:106-8; Polymeropoulos, et al., *Science* (1997) 276:2045-7). 형질전환 마우스(Masliyah et al., *Science* (2000) 287:1265-9) 및 초파리(Feany et al., *Nature* (2000) 404:394-8)에서 알파 시누클레인의 과발현은 루이소체 질환의 여러 병리학적 측면을 모방한다. 또한, 시누클레인의 가용성 올리고머는 신경독성이 있을 수 있다고 제안되었다(Conway KA, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97:571-576; VollesMJ, Lansbury PT, Jr *Biochemistry* (2003) 42:7871-7878). 인간, 생쥐, 파리와 같이 다양한 종 및 동물 모델에서 유사한 형태 및 신경학적 변화를 갖는 알파-시누클레인의 축적은 이 분자가 루이소체 질환의 발병에 기여함을 시사한다.

[0303] 예를 들어, 항 α -시누클레인 항체는 9E4(프라시네주맵), BIIB054, 1H7, 5C1, 6H7, 8A5 및 NI-202.21D11로 표시된 항체 및 이들의 관련 항체일 수 있다. 프라시네주맵 또는 9E4는 공개적으로 PRX002 및 RG7935로도 공지되어 있다. 첨부된 실시예에 예시된 바와 같이, CHO L965 세포(실시예 3), CHO L967 세포(실시예 6) 및 CHO L971 세포(실시예 7 및 8)는 각각 프라시네주맵을 생성한다. 이러한 항체에 대한 언급은 관련 기술분야, 예를 들어, 9E4(프라시네주맵)에서 찾을 수 있으며, 이의 관련 항체는 US 8,609,820; US 9,556,259; US 9,884,906; US 8,697,082; US 8,506,959; US 9,034,337; US 7,919,088; US 8,092,801; US 8,147,833; US 8,673,593; US 7,910,333 and US 7,674,599에서 찾을 수 있다. NI-202.12F4로도 공지된 BIIB054 및 이의 관련 항체에 대한 언급은, 예를 들어, US 10,301,381; US 9,975,947; US 8,896,504; US 9,580,493 및 US 8,940,276에서

찾을 수 있다. 1H7 및 이의 관련 항체에 대한 언급은, 예를 들어, US 7,910,333; US 8,790,644; US 9,234,031; US 9,217,030; US 9,670,273 및 US 10,118,960에서 찾을 수 있다. 5C1 및 이의 관련 항체에 대한 언급은, 예를 들어, US 9,605,056; US 10,081,674 및 US 10,301,382에서 찾을 수 있다. 6H7 및 이의 관련 항체에 대한 언급은, 예를 들어, US 8,673,593 및 US 7,910,333에서 찾을 수 있다. 8A5 및 이의 관련 항체에 대한 언급은, 예를 들어, US 8,673,593 및 US 7,910,333에서 찾을 수 있다. NI-202.21D11 및 이의 관련 항체에 대한 언급은, 예를 들어, US 9,580,493에서 찾을 수 있다.

[0304] 상세하게는, 파킨슨병 및 관련 장애를 가진 환자는 항 α -시누클레인 항체로 치료할 수 있다. 실제로, α -시누클레인이 루이 소체(LB)의 주요 단백질 성분이라는 사실 외에도, 유전 연구에 따르면 α -시누클레인 유전자의 특정 점 돌연변이 및 증식이 PD의 가족형을 유발한다는 사실이 밝혀졌다. 많은 증거에 따르면, 도파민성 시냅스의 α -시누클레인 병리가 PD 뇌의 신경 세포 기능 장애 및 퇴행 발병의 기저를 이룬다는 것으로 나타난다 (Bellucci, A., et al., Brain Res. 1432 (2012) 95-113).

[0305] "CD20"이라는 용어는 인간 CD20(유니프روت(UniProt)KB/스위스-프롯(Swiss-Prot) No P11836)을 말하며, 종양 세포를 포함한 세포에 의해 자연적으로 발현되거나 CD20 유전자 또는 cDNA로 형질감염된 세포에서 발현되는 CD20의 모든 변이체, 동형 및 종 상동체를 포함한다. CD20 분자(인간 B-림프구 제한 분화 항원 또는 Bp35라고도 함)는 pre-B 및 성숙한 B 림프구에 위치한 약 35kD의 분자량을 갖는 소수성 막관통 단백질이다 (Valentine et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(19) : 11282- 11287; 및 Einfield et al., (1988) EMBO J. 7(3) : 711-717). CD20은 말초 혈액 또는 림프 기관의 B 세포의 90%를 초과한 표면에서 발견되며 초기 pre-B 세포 발달 동안 발현되고 형질 세포 분화될 때까지 남아 있다. CD20은 정상적인 B 세포뿐만 아니라 악성 B 세포 둘 모두 상에 존재한다. 특히, CD20은 90% 초과인 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)에서 발현되지만 (Anderson et al. (1984) Blood 63(6): 1424-1433), 조혈 줄기 세포, pro-B 세포, 정상 형질 세포, 또는 기타 정상 조직에서는 발견되지 않는다 (Tedder et al. (1985) J. Immunol. 135(2) :973-979).

[0306] 본원에 사용된 용어 "CD3"은 T 세포 공동수용체 단백질 복합체의 일부이고 4개의 별개의 사슬로 구성된 분화 3 단백질 클러스터를 지칭한다. CD3은 또한 인간 및 다른 종에서도 발견되며, 따라서 "CD3"이라는 용어는 본원에서 사용될 수 있으며 문맥상 모순되지 않는 한 인간 CD3에 제한되지 않는다. 포유동물에서, 상기 복합체는 CD3 γ (감마) 사슬(인간 CD3 γ 사슬 유니프روتKB/스위스-프롯 No P09693, 또는 시노물구스 원숭이 CD3 γ 유니프روتKB/스위스-프롯 No Q95LI7), CD3 δ (델타) 사슬(인간 CD3 δ 유니프روتKB/스위스-프롯 No P04234, 또는 시노물구스 원숭이 CD3 δ 유니프روتKB/스위스-프롯 No Q95LI8), 2개의 CD3 ϵ (엡실론) 사슬(인간 CD3 ϵ 유니프روتKB/스위스-프롯 No P07766; 시노물구스 CD3 ϵ 유니프روتKB/스위스-프롯 No Q95LI5; 또는 레수스 CD3 ϵ 유니프روتKB/스위스-프롯 No G7NCB9), 및 제타 사슬(인간 CD3 ζ 유니프روتKB/스위스-프롯 No P20963, 시노물구스 원숭이 CD3 ζ 유니프روتKB/스위스-프롯 No Q09TK0)을 함유한다. 상기 사슬은 T 세포 수용체(TCR)로 공지된 분자와 결합하고 T 림프구에서 활성화 신호를 생성한다. TCR 및 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 포함한다.

[0307] 본 발명에 따르면, 포유동물 세포를 배양하여 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 재조합 단백질을 생성한다. 본 발명의 맥락 내에서 재조합 단백질의 생성을 위한 숙주 세포를 선택함에 있어서, 당업자는 상이한 숙주 세포가 당화 및 절단과 같은(이에 제한되지는 않음) 발현된 단백질의 번역 및 번역 후 처리 및 변형에 대해 상이한 특성 및/또는 특이적 메커니즘을 갖는다는 것을 인지한다. 이러한 맥락에서, 당업자는 본 발명의 맥락 내에서 적절한 세포주를 선택하는 방법을 알고 있다. 다시 말해서, 당업자는 번역 후 변형이 가능하도록 보장하기 위해 어떤 세포주가 선택되어야 하는지를 알고 있다. 대안적으로, 상기 숙주 세포는 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 재조합 단백질을 발현하기 위해 특정 번역 후 변형에 필요한 수단에 의해 변형될 수 있다. 항체와 같은 재조합 단백질을 생성하기 위한 재조합 방법은, 예컨대, US 4,816,567에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다. 이들 방법을 위해, 항체를 부호화하는 하나 이상의 단리된 핵산(들)이 제공된다. 천연 항체 또는 천연 항체 단편의 경우에, 2개의 핵산, 즉 경쇄 또는 이의 단편에 1개의 핵산 및 중쇄 또는 이의 단편에 1개의 핵산이 요구된다. 이러한 핵산(들)은 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH(예컨대, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄(들))를 포함하는 아미노산 서열을 부호화한다. 이들 핵산은 동일한 발현 벡터 상에 또는 상이한 발현 벡터 상에 있을 수 있다.

[0308] 이중이량체 중쇄가 있는 이중특이적 항체의 경우에 4개의 핵산, 즉 제1 경쇄에 1개의 핵산, 제1 이중단량체의 Fc 영역 폴리펩티드를 포함한 제1 중쇄에 1개의 핵산, 제2 경쇄에 1개의 핵산, 및 제2 이중단량체의 Fc 영역 폴리펩티드를 포함한 제2 중쇄에 1개의 핵산이 요구된다. 상기 4개의 핵산은 하나 이상의 핵산 분자 또는 발현 벡터에 포함될 수 있다. 이러한 핵산(들)은 제1 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 제1 이중단량체의 Fc 영역을 포함한 제1 VH를 포함하는 아미노산 서열 및/또는 제2 VL을 포함한 아미노산 서열 및/또는 상기 항체의 제2

이중단량체의 Fc 영역을 포함한 제2 VH를 포함하는 아미노산 서열을 부호화한다(예컨대, 항체의 제1 및/또는 제2 경쇄 및/또는 제1 및/또는 제2 중쇄들). 이들 핵산은 동일한 발현 벡터 상에 또는 상이한 발현 벡터 상에 있을 수 있으며, 보통 이들 핵산은 2개 또는 3개의 발현 벡터 상에 위치할 수 있다. 즉, 하나의 벡터가 이들 핵산 중 하나를 초과하여 포함할 수 있다. 이들 이중특이적 항체의 예는 CrossMab이다(예컨대, Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-11191을 참조). 예를 들어, 상기 이중단량체의 중쇄 중 하나는 EU 지수 번호체계에 따라 소위 "돌기 돌연변이"(T366W 및 선택적으로 S354C 또는 Y349C 중 하나)를 포함하고 다른 하나는 소위 "구멍 돌연변이"(T366S, L368A 및 Y407V와 선택적으로 Y349C 또는 S354C)를 포함한다(예컨대, Carter, P. et al., Immunotechnol. 2 (1996) 73을 참조).

[0309] 용어 "숙주 세포(host cell)", "숙주 세포주(cell line)", 및 "숙주 세포 배양물(culture)"은 호환적으로 이용되며, 외인성 핵산이 도입되어 있는 세포를 지칭하고 이러한 세포들의 후대를 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 계대 수에 관계없이 1차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량이 모체 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있지만 돌연변이를 포함할 수 있다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다. 항체 부호화 벡터의 복제 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현을 위해서는, 예컨대, US 5,648,237, US 5,789,199, 및 US 5,840,523을 참조한다. (또한, 대장균에서 항체 단편의 발현을 설명하는 Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254를 참조). 발현 후, 상기 항체는 가용성 분획 내의 박테리아 세포 덩어리로부터 분리되어 추가적으로 정제될 수 있다.

[0310] 용어 "포유류 숙주 세포", "포유류 숙주 세포주", 및 "포유류 숙주 세포 배양"은 함께 사용되며, 적절한 영양분 및 성장 인자를 함유하는 배지에서 단층 배양 또는 현탁 배양에 배치될 때 성장 및 생존할 수 있는 포유동물로부터 유래된 세포주를 지칭한다. 특정 세포주에 필요한 성장 인자는 Mammalian Cell Culture(Mather, J. P. ed., Plenum Press, N.Y. [1984]), and Barnes and Sato. ((1980) Cell. 22:649)에 기재된 바와 같이 과도한 실험없이 경험적으로 용이하게 결정된다. 전형적으로, 세포는 배양 배지 내로 관심의 특정 단백질을 대량으로 발현하고 분비할 수 있다. 본 발명의 맥락 내에서 적합한 포유동물 숙주 세포의 예는 하기를 포함할 수 있다: 중국 햄스터 난소 세포(-DHFR(CHO. Urlaub and Chasm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:4216 [1980])); dp12.CHO 세포(EP 307.247, 1989년 3월 15일에 공개됨); SV40으로 변형된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁액 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 [1977]); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 [1980]); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개의 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 쥐 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간의 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간의 간세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 [1982]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 계통(Hep G2). 본 발명의 바람직한 양태에서, 상기 포유동물 세포는 CHO 세포, Vero 세포, BHK 세포, COS 세포 및 HEK293/293T 세포로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더 바람직하게는 상기 포유동물 세포는 CHO 세포이다. 더 바람직하게는, 상기 포유동물 숙주 세포는 CHO 세포, 보다 더 바람직하게는 디히드로엽산환원효소(DHFR) 활성이 결여된 CHO 세포이다. 본 발명에 사용된 포유동물 세포는 재조합 단백질을 생성하도록 선택되거나 조작될 수 있다. 조작에는 발현될 단백질을 부호화하는 하나 이상의 이중 유전자의 도입과 같은 하나 이상의 유전적 변형이 포함된다. 상기 이중 유전자는 상기 세포에서 정상적으로 발현되거나 숙주 세포에 대해 외래인 단백질을 부호화할 수 있다. 조작은 추가적으로 또는 대안적으로 하나 이상의 내인성 유전자를 상향 또는 하향 조절하는 것일 수 있다. 종종, 세포는, 예를 들어, 단백질을 부호화하는 유전자의 도입 및/또는 관심있는 단백질을 부호화하는 유전자의 발현을 조절하는 제어 요소의 도입에 의해 재조합 단백질을 생성하도록 조작된다. 재조합 단백질 및/또는 제어 요소를 부호화하는 유전자는 플라스미드, 파지 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터를 통해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "벡터"는 이것이 연결되는 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어에는 자가-복제 핵산 구조체로서의 벡터 그리고 그것이 도입되는 숙주 세포의 게놈에 통합된 벡터가 포함된다. 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다.

[0311] 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있는 반면, 다른 벡터는 숙주 세포의 유전체에 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 유전체와 함께 복제될 수 있다. 다양한 벡터가 공개적으로 입수 가능하며 벡터의 정확한 성질은 본 발명에 필수적인 것이 아니다. 일반적으로, 벡터 성분은 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의

마커 유전자, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상기 성분들은 WO 97/25428에 기재된 바와 같다.

[0312] 세포 배양물의 “성장기”는 세포들이 일반적으로 급속하게 분열 중인 지수적 세포 성장 기간(로그기)을 지칭한다. 이러한 단계 동안, 세포들은 일정 시기 동안, 일반적으로 1~4 일, 및 세포 성장이 최대화되는 조건하에서 배양된다. 숙주 세포에 대한 성장주기의 결정은 과도한 실험없이 계획된 특정 숙주 세포에 대해 결정될 수 있다. “시기 및 세포 성장이 최대화되는 조건하에서” 등은, 특정 세포주에 대해, 세포 성장 및 분열에 최적인 것으로 결정되는 배양 조건들을 지칭한다. 성장기 동안, 세포는 필요한 첨가제를 함유한 영양 배지에서 배양된다. 추가로, 온도, pH, 용존 산소(dO_2) 등과 같은 배양 조건이 특정 숙주와 함께 사용되며 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 일반적으로, pH는 산(예: CO_2) 또는 염기(예: Na_2CO_3 또는 $NaOH$)를 사용하여 조정한다. CHO 세포와 같은 포유동물 세포를 배양하는 데 적합한 온도 범위는 약 30 내지 38°C이고, 적절한 dO_2 는 가습되고 제어된 대기에서 공기 포화도의 5~90%이며, 이에 따라 특정 세포주에 대해 최적의 성장이 달성된다. 예를 들어, 유가식 세포 배양 조건은 유가식 배양 조건이 세포 배양의 성장 단계에서 포유동물 세포의 성장을 향상시키기 위해 고안되었기 때문에 사용할 수 있다. 본원에 사용된 “유가식 배양”은 배양 과정의 시작 시에 또는 그 이후에 배양물에 추가 성분이 제공되는 세포 배양 방법을 지칭한다. 유가식 배양은 일반적으로 특정 시점에서 중단되고 배지의 세포 및/또는 성분이 회수되고 선택적으로 정제된다. 추가로, 특정 단계에서 세포들을 생성기 또는 세포 배양 단계에서 접종하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 생성기 또는 단계는 접종 또는 성장기 또는 단계와 연속적일 수 있다.

[0313] 세포 배양의 “전이기”는 생성기의 배양 조건이 관여하는 시기를 지칭한다. 전이기 동안 세포 배양 온도, 배지 삼투압 등과 같은 환경 요인은 성장 조건에서 생산 조건으로 이동된다.

[0314] 세포 배양물의 “생성기”는 세포 성장이 정제되는/정제되었던 중의 시기를 지칭한다. 생성기 동안, 로그 세포 성장은 종료되었고, 단백질 생성이 일순위가 된다. 이러한 시기 동안, 배지는 일반적으로 지속적인 단백질 생성을 지원하고 바람직한 당단백질 생성물을 구현하기 위해 보충된다. 예를 들어, 세포 배양의 생성기에서 세포 배양 환경이 제어된다. 본 발명의 방법에 따르면, 포유동물 숙주 세포 배양물의 생존 세포 밀도 및/또는 생성물 역가에 영향을 미치는 하나 이상의 인자는 발현된 재조합 단백질의 특정 갈락토실 함량이 달성되도록 조작된다. 본원에서 사용되는 “역가”는 주어진 양의 배지 부피에서 포유동물 세포 배양에 의해 생성된 재조합적으로 발현된 당단백질의 총량을 지칭한다. 역가는 일반적으로 배지 밀리리터당 당단백질의 밀리그램 단위로 표시한다. 특히, 재조합 단백질의 갈락토실 함량을 증가시키는 인자는 생성된 재조합 단백질이 특정 갈락토실 함량을 함유하도록 세포 배양 과정의 생성기에서 조절된다. 본원에 사용된 바와 같이, 세포 배양 공정의 생성기는 세포 배양의 생성기에 대한 매개변수가 관여하는 세포 배양의 전이기가 선행된다.

[0315] 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 및/또는 글루코스의 농도는 발효 과정의 성장기 또는 생성기의 일부 또는 전부에서 조정된다. 예를 들어, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 및/또는 글루코스의 농도는 성장기의 시작 시 또는 성장기 동안 및/또는 생성기의 시작 시 또는 생성기 동안 조정될 수 있다. 특히, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 및/또는 글루코스의 농도는 성장의 시작 및 생성기의 시작 또는 성장기의 시작 중 일부 또는 전체, 성장기 동안, 생성기의 시작, 및 생성기 동안 조정될 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 및/또는 글루코스는 생성기의 시작 또는 도중에 배지에 첨가되어, 상기 배지 내에 약 4 mM 내지 10 mM의 설프히드릴 기(들) 및/또는 적어도 3.0 g/L 초과인 글루코스를 갖는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 생성한다. 본 발명의 다른 바람직한 양태에서, 상기 방법은 약 4 mM 내지 10 mM의 설프히드릴기(들) 및/또는 적어도 3.0 g/L 초과인 글루코스를 함유하는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 없이 동일한 배지 내에서 포유동물 세포를 배양하는 초기 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 상기 방법은 약 4 mM 내지 10 mM의 설프히드릴기(들) 및/또는 적어도 3.0 g/L 초과인 글루코스를 함유하는 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 없이 동일한 배지 내에서 포유동물 세포를 배양하는 초기 단계를 추가로 포함하고, 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 및/또는 글루코스는 생성기의 시작 또는 도중에 배지에 첨가되어, 상기 배지 내에 약 4 mM 내지 10 mM의 설프히드릴 기(들) 및/또는 적어도 3.0 g/L 초과인 글루코스를 갖는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 생성한다.

[0316] 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 배양 배지에서 이러한 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 증가 또는 감소시킴으로써 조정될 수 있다. 본 발명에서, 이들 설프히드릴 화합물(들)의 농도가 증가 또는 감소될 때, 이러한 농도의 증가 또는 감소는 상기 증가 직전의 배양 단계에서 배지 내 설프히드릴 화합물(들)의 농도에 비례한다. 따라서, 생성기의 시작 시 배지에서, 예를 들어, 시스틴 및/또는 시스테인의 농도가 증가하는 경우, 이는

바로 이전 성장기의 배지에서 설프히드릴 화합물(들)의 농도에 비해 설프히드릴 화합물(들) 농도의 증가를 나타낸다. 마찬가지로, 생성기 동안에 배지에서, 예를 들어, 시스템 및/또는 시스템의 농도가 증가할 경우, 이는 바로 이전 생성기의 배지에서 설프히드릴 화합물(들)의 농도에 비해 설프히드릴 화합물(들) 농도의 증가를 나타낸다. 마찬가지로, 성장기 또는 생성기의 시작 시 또는 도중에 배지에서, 예를 들어, 시스템 및/또는 시스템의 농도가 감소할 경우, 이는 바로 이전 배양 단계의 배지에서 설프히드릴 화합물(들)의 농도의 감소를 나타낸다.

[0317] 상기 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 중 임의의 농도가 세포 배양 배지에서 조정될 때, 이들 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 모두의 농도가 동시에 조정되는 것이 일반적으로 바람직하다. 하지만, 본 발명의 방법은 또한 한 번에 제1 설프히드릴 화합물(들)을 조정하는 다음 두 번째를 조정함으로써 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)을 조정하는 것을 포함하고, 또는 그 반대로 포함한다. 특히, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도가 증가하고 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도가 감소하는 경우, 증가 및 감소에 대한 조정은 동시에 또는 다른 시간에 발생할 수 있다. 이러한 경우에, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 증가시키고 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 감소시키기 위한 조정은 동일한 시점 또는 동일한 배지 내에서 일어나는 것이 바람직하다.

[0318] 본 발명의 방법에서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 조절은 사용되는 발효 조건에 적절한 임의의 기술에 의해 달성될 수 있다. 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도를 조정하는 방법은 본 발명에 필수적인 것은 아니며 적절한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 조정은 세포가 배양되고 있는 배지(하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 증가의 경우)를 보충함으로써, 또는 세포의 전부 또는 일부를 원하는 농도의 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)을 함유하는 새로운 배지에(예컨대, 분할에 의해) 이동함으로써 이루어질 수 있다. 필요한 경우, 이러한 방법을 조합하여 사용할 수 있다.

[0319] 따라서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 조절은 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 연속적일 수 있거나, 또는, 예를 들어, 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 가정, 계산 또는 측정된 농도에 대한 반응으로서 간헐적으로 발생할 수 있다. 본 발명은 범위 내에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 조절을 정의한다. 정의된 배양 기간 동안, 예를 들어, 성장기 또는 생성기 동안 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 각각 또는 전부의 농도를 실제로 측정 또는 계산한 것이 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 각각 또는 전부의 농도가 본원에 언급된 범위 내에 속한다고 나타내는 경우, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 생성 농도가 언급된 범위 내로 유지되는 한, 상기 농도의 조정이 그럼에도 불구하고 일어날 수 있다. 필요한 경우, 상기 조정이 이루어지기 전에 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 실제 농도를 측정하기 위해 공지된 기술을 사용할 수 있다.

[0320] 따라서, 배치(batch) 발효 조건을 사용하는 경우, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)에서 농도 증가를 달성하는 것은, 예를 들어, 기존 배양 배지보다 증가된 적절한 농도의 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)을 함유하거나 보충된 새로운 배지에 분주하거나, 또는 기존 배지에 적절한 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 증가된 농도를 함유하거나 보충된 배지로 세포를 분할함으로써 이루어질 수 있다. 유가식 발효 조건을 사용하는 경우, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)에서 농도 증가를 달성하는 것은, 예를 들어, 증가된 농도의 적절한 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)을 함유하거나 보충된 새로운 배지에 분주하거나, 적절한 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 하나 이상의 볼루스(bolus) 또는 연속 공급물을 배양 배지에 제공하거나; 세포 수를 기반으로 하거나 공지된 대사 모델, 대사 대리 마커 등에 따라 계산된 공급 속도를 결정함으로써, 또는 적절한 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 증가된 농도를 함유하거나 보충된 배지로 배양물을 분할함으로써 이루어질 수 있다. 볼루스 또는 연속 공급물이 첨가되는 경우, 이는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 외에 배양에 필요한 다른 영양소/성분을 함유할 수 있다. 관류 발효 조건을 사용하는 경우, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 증가를 달성하는 것은, 예를 들어, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)을 반응기에 동시에 또는 별도로 관류 배양물에 추가되는 다른 영양소/성분에 지속적으로 또는 간헐적으로 첨가함으로써 달성될 수 있다.

[0321] 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도 감소가 필요한 경우, 이는 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도가 직전 배양 단계의 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도와 비교하여 감소된 새로운 배지로 세포를 분주함으로써 달성될 수 있다.

[0322] 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 감소 또는 증가된 농도의 특정 값은 배양 배지에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 실제 측정값 또는 세포를 둘러싼 배양 용액에서 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들) 농도의 이론적인 농도 또는 계산을 기반으로 한다. 의료 종사자는, 예를 들어, 불순물 및 침출을 통해 도입된 하나 이상

의 설프히드릴 화합물(들)의 일부 농도가 존재할 수 있음을 인식하고, 본 발명에 따른 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 감소되거나 증가된 농도를 계산할 때 이를 고려할 것이다.

[0323] 본 발명의 맥락에서 일 양태에서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 재조합 단백질의 글리칸의 갈락토오스화를 증가시키기 위해 배양 배지에서 조정될 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 생존 세포 밀도를 향상시키기 위해, 재조합 단백질의 생성물 역가를 향상시키기 위해, 그리고/또는 재조합 단백질의 글리칸의 갈락토오스화를 다시 증가시키기 위해 배양 배지에서 조정될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 배양 배지에서 먼저 조정되어 성장을 향상시키고 다시 재조합 단백질의 글리칸의 갈락토실화를 증가시키기 위해 조정될 수 있다. 다른 예로서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 배양 배지에서 조정되어 생존 세포 밀도를 향상시키고 다시 재조합 단백질의 글리칸의 갈락토실화를 증가시키기 위해 조정될 수 있다. 다른 예로서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 배양 배지에서 조정되어 재조합 단백질의 생성물 역가를 향상시키고 다시 재조합 단백질의 글리칸의 갈락토실화를 증가시키기 위해 조정될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 하나 이상의 설프히드릴 화합물(들)의 농도는 생존 세포 밀도를 향상시키기 위해, 재조합 단백질의 생성물 역가를 향상시키기 위해, 그리고 재조합 단백질의 글리칸의 갈락토오스화를 다시 증가시키기 위해 배양 배지에서 조정될 수 있다.

[0324] 본원에 사용된 용어 "생물반응기"는 원핵생물 또는 진핵생물 세포 배양물, 예컨대, 동물 세포 배양물(예: 포유 동물 세포 배양물)의 성장에 사용되는 임의의 용기를 지칭한다. 상기 생물반응기는 세포, 예컨대, 포유동물 세포의 배양에 유용하기만 하면, 임의의 크기일 수 있다. 전형적으로, 상기 생물반응기는 적어도 30 ml일 것이고 1, 10, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 8,000, 10,000, 12,000 리터 이상, 또는 임의의 중간 부피일 수 있다. pH 및 온도를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 생물반응기의 내부 조건은 일반적으로 배양 기간 동안 제어된다. 상기 생물반응기는 유리, 플라스틱 또는 금속을 포함하는, 본 발명의 배양 조건하에 배지에 현탁된 포유동물 세포 배양물을 유지하기에 적합한 임의의 재료로 구성될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "생성용 생물반응기"는 관심 폴리펩티드 또는 단백질의 생성에 사용되는 최종 생물반응기를 지칭한다. 대규모 세포 배양 생성용 생물반응기의 부피는 일반적으로 약 100 ml 초과, 일반적으로 약 10리터 이상이고, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 8,000, 10,000, 12,000리터 이상 또는 임의의 중간 부피일 수 있다. 예를 들어, 포유동물 세포의 배양은 대규모 형식의 생물반응기, 바람직하게는 10,000 L 생물반응기에서 실시한다.

[0325] 당업자는 본 발명을 실시하는데 사용하기에 적합한 생물반응기를 인지하고 선택할 수 있을 것이다.

[0326] 본 발명의 맥락에서 바람직한 양태에서 사용되는 바와 같이, 상기 방법은 포유동물 세포에 의해 생성된 재조합 단백질을 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 배양 기간 동안 또는 배양 기간 종료시, 바람직하게는 생성기에서 발현된 단백질을 회수하는 것은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 상기 단백질은 분비된 단백질로서 배양 배지로부터 회수될 수 있지만, 분비 신호 없이 직접 생성되는 경우 숙주 세포 용해물로부터 회수할 수 있다. 단백질이 막에 결합되어 있는 경우, 적합한 용제(예: 트리톤(Triton)-X 100)를 사용하여 막에서 방출되거나, 또는 이의 세포외 영역이 효소 절단에 의해 방출될 수 있다. 발현된 단백질은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 필요에 따라 단리 및/또는 정제될 수 있다. 항체와 같은 "단리된" 단백질은 이의 자연 환경의 구성요소로부터 분리된 단백질이다. 일부 양태들에서, 단백질, 예컨대, 항체는, 예를 들어, 전기영동(예컨대, SDS-PAGE, 등전위 초점조절(IEF), 모세관 전기이동) 또는 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환 또는 역상 HPLC) 방법에 의해 측정되었을 때 95% 또는 99% 순도를 초과하여 정제된다. 항체 순도를 평가하는 방법들을 검토하려면, 예컨대 Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)을 참조한다.

[0327] 본원에 사용된 용어 "발현" 또는 "발현하다"는 함께 사용되며, 숙주 세포 내에서 전사 및 번역을 지칭한다. 숙주 세포에서 재조합 단백질의 발현 수준은 세포에 존재하는 상응하는 mRNA의 양 또는 상응하는 유전자에 의해 부호화된 단백질의 양을 기준으로 결정할 수 있다. 예를 들어, 생성물 유전자로부터 전사된 mRNA는 바람직하게는 노던 혼성화에 의해 정량화된다(Sambrook et al. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)). 생성물 유전자에 의해 부호화된 단백질은, 단백질의 생물학적 활성을 분석하거나 이러한 활성과 무관한 분석법, 예컨대, 단백질과 반응할 수 있는 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅 또는 방사면역분석법을 사용하여 정량화할 수 있다(Sambrook et al. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, pp 18 1-18 88 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)).

[0328] 특히, 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 재조합 단백질을 발현하는 포유동물 세포는 본원에 기재된 바와 같은 적절한 조건하에 적절한 번역후 변형이 생체내에서 일어나도록 특정 효소를 발현하거나 발현하도록 조작되어야 한다. 효소는 N 결합 올리고당에 대해 상기 Hubbard 및 Ivan에 기재된 것과 같은 N- 및 O-결

합 탄수화물의 첨가 및 완성에 필요한 효소를 포함한다. 효소는 선택적으로 올리고당전달효소, 알파-글루코시다제 I, 알파-글루코시다제 II, ER 알파(1.2) 만노시다제, 골지 알파-만노다제 I, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 I, 골지 알파-만노다제 II, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 II, 알파(1.6) 푸코실트랜스퍼라제 및 β (1.4) 갈락토실트랜스퍼라제를 포함한다. 추가적으로, 숙주 세포는 숙주 세포 유전체의 일부로서 특정 위치 및 연결에 갈락토스를 부착할 것으로 예상될 수 있는 적절한 효소(들)를 발현한다. 선택적으로, 숙주 세포는, 예를 들어, 효소(들)를 부호화하는 DNA로 숙주 세포를 형질감염시킴으로써 적절한 효소(들)를 발현하도록 만들 수 있다. 상기에서 기재된 것과 같은 효소는 GlcNAc와 같은 적절한 올리고당 구조에 갈락토스를 첨가할 것으로 예상된다. 본 발명의 맥락에서 적절한 효소(들)는 N- 및 O-연결 올리고당의 갈락토실화 및 분지화를 촉매하는 효소(들)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0329] 원하는 단백질을 발현하고 특정 위치 및 연결에 원하는 탄수화물을 첨가할 수 있는 포유동물 세포의 배양을 위해, 배양되는 숙주 세포에 특히 주의하면서 다양한 배양 조건이 사용될 수 있다. 포유류 세포에 적합한 배양 조건은 당업계에 일반적으로 공지되어 있거나(J. Immunol. Methods (1983)56:221-234), 또는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있고(예를 들어, Animal Cell Culture: A Practical Approach 2nd Ed., Rickwood, D. and Hames, B.D., eds. Oxford University Press, New York (1992)), 선택된 특정 숙주 세포에 따라 가변된다.

[0330] 본 발명의 포유동물 세포 배양은 배양되는 특정 세포에 적합한 배지에서 준비될 수 있다. "배지", "세포 배양 배지" 및 "배양 배지"는 본원에서 함께 사용되며, 포유동물 세포의 성장을 지속시키는 영양소를 함유하는 용액을 지칭한다. 일반적으로, 상기 용액은 최소 성장 및/또는 생존을 위해 세포에 필요한 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 에너지원, 지질 및 미량 원소를 제공한다. 상기 용액은 또한 호르몬 및/또는 기타 성장 인자, 나트륨, 염화물, 칼슘, 마그네슘 및 인산염과 같은 특정 이온, 완충제, 비타민, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드, 미량 원소, 아미노산, 지질 및/또는 글루코스 또는 기타 에너지원을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 최소 비율 이상으로 성장 및/또는 생존을 향상시키는 보조 성분을 함유한다. 배지는 유리하게는 세포 생존 및 증식에 최적인 pH 및 염 농도로 제형화된다.

[0331] 상업적으로 구입가능한 배지, 가령, Ham사의 F10(시그마), 최소 필수 배지(MEM, 시그마), RPMI-1640(시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지(DMEM, 시그마)는 예시적인 영양 용액이다. 또한, Ham and Wallace (1979) Meth. Enz., 58:44; Barnes and Sato (1980) Anal. Biochem., 102:255; 미국 특허 제4,767,704호; 4,657,866호; 4,927,762 호; 5,122,469호 또는 4,560,655호; 국제 특허 공보 제WO 90/03430호; 및 WO 87/00195호에 기재되고; 이의 개시가 본원에 인용되는 배지들 중 임의의 것을 배양 배지로서 사용할 수 있다. 이러한 배지들 중 임의의 것은 필요에 따라 호르몬 및/또는 기타 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액(예컨대, HEPES), 뉴클레오타이드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, 겐타마이신™, 미량 원소(일반적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 지질(예컨대, 리놀레산 또는 기타 지방산) 및 이들의 적합한 담체, 글루코스 또는 균등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물 또한 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다.

[0332] 본원에 사용된 용어 "세포가 재조합 단백질을 발현하는 조건하에서"는 폴리펩티드를 발현하는 세포의 배양에 사용되는 조건을 나타내며, 이는 당업자에게 공지되어 있거나 결정할 수 있다. 이러한 조건은 배양된 세포의 유형 및 발현되는 재조합 단백질의 유형에 따라 달라질 수 있음이 당업자에게 공지되어 있다. 일반적으로, 세포는, 예컨대, 20°C 내지 40°C 사이에서 그리고 접합체의 효과적인 생성을 허용하기에 충분한 시간 동안, 예컨대, 4 내지 28일 동안 0.01 내지 10'리터의 부피로 배양된다.

[0333] 바람직하게는, 포유동물 숙주 세포는 CHO 세포, 바람직하게는 디히드로엽산환원효소(DHFR) 활성이 결여된 CHO 세포이고 적합한 배지는 DMEM/HAMF-12 기반 제형과 같은 기본 배지 성분을 함유하고(DMEM 및 HAM F12 배지의 조성의 경우, American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, Sixth Edition, 1988. pages 346-349를 참조) 아미노산, 염, 당 및 비타민과 같은 일부 성분들, 및 임의로 글리신, 하이포크산틴, 티미딘, 재조합 인간 인슐린, 가수분해된 펩톤, 세포 보호제, 예컨대, 플루로닉(Pluronic) F68 또는 동등한 플루로닉 폴리올, 겐타마이신 및 미량 원소를 함유하는 일부 성분들의 농도를 변경한다.

[0334] 본 발명에 따르면, 포유동물 숙주 세포를 배양하여 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 회복 가능한 재조합 단백질을 생성한다. 재조합 단백질에서 갈락토스의 전체 함량은 포유동물 세포에서 생존 세포 밀도, 생성물 역가 및/또는 갈락토스 함량에 영향을 미치는 세포 배양 매개변수를 제어함으로써 제어된다. 생존 세포 밀도 및/또는 생성물 역가에 영향을 미치는 인자는 당업계에 일반적으로 공지되어 있고, DNA RNA 복제 수에 영향을 미치는 인자, RNA에 영향을 미치는 인자, RNA를 안정화시키는 인자, 배지 영양소 및 기타 보충제, 전

사 증진제의 농도, 배양 환경의 삼투압 농도, 세포 배양의 온도 및 pH 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 따르면, 생존 세포 밀도 및/또는 생성물 역가를 증가시키기 위한 이들 인자들을 단독 또는 조합으로 조정하면 모노갈락토실화된 또는 디갈락토실화된 글리칸을 갖는 재조합 단백질을 생성한다. 생존 세포 밀도 및/또는 생성물 역가를 증가시키기 위해 이러한 인자들을 단독으로 또는 조합으로 조정하면 갈락토스 함량이 증가된 재조합 단백질이 생성된다.

- [0335] 본원에 사용된 용어 "세포 밀도", "세포 농도" 등은 주어진 부피의 배지에 존재하는 세포의 수, 중량, 질량 등을 지칭한다. "피크 세포 밀도" 등은 주어진 부피의 배지에서 도달할 수 있는 최대 세포 수를 나타내고, "원하는 피크 세포 밀도" 등은 주어진 세포 부피에서 의료 종사자가 수득하고자 하는 최대 세포 수(예컨대, 표적)를 지칭한다. 이러한 목표 값(들)의 변화는 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 당업자는 원하는 세포 질량의 관점에서 목표 값(들)을 표현할 수 있고, 이러한 목표 값(들)은 하나 이상의 적절한 측정 단위일 수 있다(예: 원하는 세포 덩어리의 피크 단위).
- [0336] 본원에 사용된 용어 "세포 생존율"은 주어진 세트의 배양 조건 또는 실험적 변형하에서 생존하는 배양 세포의 능력을 지칭한다. 본원에 사용된 용어는 또한 그 당시 배양물에서 살아있는 세포 및 죽은 세포의 총 수와 관련하여 특정 시간에 살아있는 세포의 부분을 지칭한다.
- [0337] 본원에 사용된 용어 "배양물" 및 "세포 배양물"은 세포군의 생존 및/또는 성장에 적합한 조건하에서 세포 배양 배지에 현탁된 세포군을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 이러한 용어는 세포군(예: 동물 세포 배양물) 및 상기 군이 현탁된 배지를 포함하는 조합을 지칭할 수 있다.
- [0338] 일 양태에서, 상기 방법은 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 사전 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 제공된 바와 같이, 상기 세포는 하나 이상의 선프히드릴 화합물(들)로부터 선프히드릴 기(들)이 있거나 없는 적합한 세포 배양 배지에서 지수적 성장기로 사전 배양할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "사전 배양" 또는 "사전 배양하는"은 함께 사용되며 제2 배양 단계에서 세포를 배양하기 전의 배양 단계를 지칭한다. 예를 들어, 상기 세포는 사전 배양 단계로서 제1 세포 배양물에서 성장할 수 있고, 후속적으로 제2 세포 배양물, 예컨대, 생성용 생물반응기와 같은 생물반응기에서 제2 세포 배양물에서 집중될 수 있다. 당업자는 사전 배양 단계를 알고 있으며 이러한 사전 배양 단계를 실시하는 방법을 알고 있다.
- [0339] 본원에 사용된 용어 "통합된 생존 세포 밀도" 또는 "IVCD"는 배양이 진행된 시간을 곱한 배양 과정에 걸친 생존 세포의 평균 밀도를 지칭한다. 생성된 폴리펩티드 및/또는 단백질의 양이 배양 과정에 걸쳐 존재하는 생존 세포의 수에 비례한다고 가정하면, 통합된 생존 세포 밀도는 배양 과정 동안 생성된 폴리펩티드 및/또는 단백질의 양을 추정하는 유용한 도구이다.
- [0340] 본 발명의 재조합 단백질은 다양한 세포 배양 조건하에서 재조합 단백질을 발현하는 세포를 배양함으로써 생성될 수 있다. 다시 말해서, 포유동물 세포로부터의 바이오매스 생성 및 단백질 발현은 바이오매스 생성 및 단백질 발현을 위한 세포의 성장에 순응하는 임의의 발효 세포 배양 방법 또는 시스템하에서 세포의 배양에 의해 본 발명의 방법에 따라 달성되고, 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 세포는 회분식, 유가식, 관류식 또는 분할식 배양으로 성장할 수 있으며, 여기서 단백질의 충분한 발현이 발생한 후 배양이 종결되고, 그 후에 단백질이 회수되고, 필요한 경우 정제된다.
- [0341] 예를 들어, 본 발명의 세포 배양에서 유가식 배양 절차가 사용될 수 있다. 유가식 배양에서, 포유류 세포들이 초기에 배양 용기에 공급되고 추가적인 세포 영양소들이 배양하는 동안 연속으로 또는 증분으로 배양물에 공급되며, 배양 종료 전 주기적으로 세포 및/또는 생성물을 수집하거나 수집하지 않는다. 유가식 배양은, 예를 들어, 반연속 유가식 배양을 포함할 수 있으며, 여기서 주기적으로 전체 배양물(세포들 및 배지 포함)이 제거되고 새로운 배지로 대체된다. 유가식 배양은 세포 배양을 위한 모든 성분(세포 및 모든 배양 영양소 포함)이 배양 과정 시작시 배양 용기에 공급되는 단순 회분식 배양과 구별된다. 유가식 배양은 과정 중에 상청액이 배양 용기로부터 제거되지 않는 한 관류 배양과도 또한 구별될 수 있다(관류 배양에서, 세포는, 예컨대, 여과, 캡슐화, 마이크로담체에 고정, 등에 의해 배양물에서 제한되며, 배양 배지는 연속적으로 또는 간헐적으로 도입하고 배양 용기로부터 제거된다). 대안적으로, 세포는 배양이 종결되지 않고 새로운 영양소 및 성분이 주기적으로 또는 연속적으로 배양물에 첨가되고 발현된 당단백질이 주기적으로 또는 연속적으로 제거되는 관류 배양물에서 성장할 수 있다.
- [0342] 추가로, 배양 세포들은 특정 숙주 세포 및 고려되는 특정 생산 계획에 적합할 수 있는 임의의 계획 또는 경로에 따라 증폭될 수 있다. 예를 들어, 산소 농도 및 pH와 같은 바이오매스 생성 및 단백질 생성을 위한 세포의 발효

배양을 위한 반응기, 온도 및 기타 조건은 공지되어 있다. 선택된 포유동물 세포의 배양에 적절한 임의의 조건은 당업계에서 입수가능한 정보를 사용하여 선택할 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 일반적으로 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 조건이며, 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 원하는 경우, 온도 및/또는 pH 및/또는 CO₂는 수율을 증가시키고/하거나 원하는 단백질 품질의 상대적인 양을 증가시키기 위해 배양 동안 변경할 수 있다.

[0343] 추가로, 본 맥락에서, 본 발명은 단일 단계 또는 다단계 배양 절차를 고려한다. 단일 단계 배양에서, 상기 숙주 세포는 배양 환경에 접종되고, 본 발명의 공정들이 세포 배양의 단일 생산 단계 동안 사용된다. 대안적으로, 다단계 배양이 구상된다. 다단계 배양에서 세포들은 여러 단계들 또는 기체에서 배양 될 수 있다. 예를 들어, 세포들은 제 1 단계 또는 성장 단계 배양에서 성장될 수 있으며, 여기서 저장으로부터 제거될 수 있는 세포들은, 성장 촉진 및 높은 생존력에 적합한 배지에 접종된다. 본원에 사용된 용어 "세포 생존율"은 주어진 세트의 배양 조건 또는 실험적 변형하에서 생존하는 배양 세포의 능력을 지칭한다. 본원에 사용된 용어는 또한 그 당시 배양 물에서 살아있는 세포 또는 죽은 세포의 총 수와 관련하여 특정 시간에 살아있는 세포의 부분을 지칭한다. 숙주 세포 배양물에 신선한 배지를 첨가함으로써 세포는 적절한 시기 동안 성장 단계에서 유지될 수 있다.

[0344] 예를 들어, 대규모 또는 소규모 단백질 생산을 위한 세포 배양 절차는 본 발명의 내용에서 잠재적으로 유용하다. 유동층 생물반응기, 중공사 생물반응기, 롤러 병 배양물, 또는 교반 탱크 생물반응기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 절차는 회분식, 유가식 및/또는 관류 모드에서 대안적으로 사용 및 작동될 수 있다. 본원에 사용된 "관류 배양"은 집중 기본 배지 상에서 세포를 성장시키는 단계, 및 세포가 원하는 세포 밀도를 달성할 때 소모된 배지를 새로운 배지로 교체하는 단계를 포함하는 세포 배양 방법을 지칭한다. 관류는 연속적 또는 간헐적 관류를 포함할 수 있고 세포 배양물에 적어도 하나의 볼루스 공급물을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 관류 배양 후에 유가식 배양이 뒤따를 수 있다. 본원에 사용된 용어 "생물반응기"는 포유동물 세포 배양물의 성장에 사용되는 임의의 용기를 지칭한다. 전형적으로, 생물반응기는 적어도 1리터일 것이고, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,000리터 이상, 또는 그 사이의 임의의 부피일 수 있다. pH, 용존 산소 및 온도를 포함하지만 이에 제한되지 않는 생물반응기의 내부 조건은 일반적으로 배양 기간 동안 제어된다. 생물반응기는 유리, 플라스틱 또는 금속을 포함하는, 본 발명의 배양 조건하에 배지에 현탁된 포유동물 세포 배양물을 유지하기에 적합한 임의의 재료로 구성될 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 포유동물 세포의 배양은 생물반응기, 더 바람직하게는 대규모 형식의 생물반응기에서 이루어진다. 본 발명의 더 바람직한 양태에서, 포유동물 세포를 배양하는 것은 적어도 10,000 L 생물반응기에서 이루어진다.

[0345] 항체 Fc 갈락토실화의 중요성

[0346] 도 5에서 도시된 바와 같이, Asn297 연결 탄수화물 사슬은 4개의 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)과 3개의 만노스 잔기로 구성된 공통 바이안테나리(biantennary) 글리칸 구조로 구성되며 푸코스, 갈락토스 및 시알산 잔기가 다양하게 추가된다. 이러한 글리칸은 바이안테나리 말단 갈락토오스 잔기, 즉, G0(갈락토스 없음), G1(갈락토스 1개), G2(갈락토스 2개)의 수에 따라서, 및 핵심 푸코스 잔기, 즉 G0(갈락토스 없음), G1(갈락토스 1개), G2(갈락토스 2개)의 존재에 따라서 종종 명명된다.

[0347] 본 발명의 맥락에서 사용되는 바람직한 양태에서, 상기 재조합 단백질은 치료 약제로서 사용된다. 류마티스 관절염에서 IgG 갈락토실화의 변화가 처음 보고되었고(Parekh et al., Nature. 316 (1985) 452-457), 이후 건선성 관절염 및 강직성 척추염과 같은 다른 자가면역 질환에서 보고되었다(Martin et al., J Rheumatol 28 (2001) 1531- 1536). 임신 중 갈락토실화 증가가 관찰되었으며, 임신 유발 관해를 경험한 류마티스 관절염 환자에서도 관찰되었다(Bondt et al., J. Proteome. Res. 12 (2013) 4522-4531). 이는 항체의 증가된 갈락토오스가 기능적으로 더 항염증성일 수 있음을 시사하고(Zauner et al., Mol. Cell Proteomics. 12 (2013) 856-865). Karsten et al. (Nature Medicine 18.9 (2012) 1401-1406), IgG 면역 복합체의 높은 갈락토실화가 Fcγ RIIB 및 텍틴-1의 결합을 촉진하여 C5aR 및 CXCR226의 염증 촉진 효과를 차단한다는 것을 마우스에서 보여줌으로써 상기 항염증 특성을 확인하였다. 본 발명의 맥락에서 사용되는 다른 바람직한 양태에서, 상기 재조합 단백질은 비호지킨 림프종 및 만성 림프구성 백혈병과 같은 B 세포 증식성 장애를 가진 환자 또는 파킨슨병 및 관련 장애를 가진 환자의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0348] 말단 갈락토스의 기능적 영향을 볼 때 고려해야 할 다른 중요한 양태는 이것이 IgG-Fc 글리칸에서 가장 원위적인 당 모이어티인 시알산의 첨가에 대한 기초를 제공한다는 것이다. 올리고당 분석은 단백질 갈락토실화의 부족이 시알산 함량 감소의 잠재적 원인임을 밝혀내었다.

[0349] 갈락토스 종결 구조는 C1q 복합체에 대한 친화력에 실질적인 영향을 미치는 것으로 공지되어 있으며, 이를 제거

하면 보체 용해 활성이 감소한다(Hodoniczky, J. et al., *Biotechnol. Progr.* 21 (2005) 1644-1652). 더 구체적으로, Wright and Morrison (1998) (*J Immunol.* 1998;160:3393-3402) and Hodoniczky et al. (2005) mAb Fc 올리고당에 갈락토스가 없으면 Fc와 보체의 C1q 성분 사이의 친화도가 감소하여 CDC 활성이 감소한다는 것을 발견하였다.

[0350] 1997년에 처음 승인된 리투시맵(Rituxan® 항 CD20)은 비호지킨 림프종 및 기타 B 세포 관련 질병의 치료를 위해 CHO 세포에서 생성되는 키메라 단일클론 항체이다. 리투시맵은 Fc에서 당화되고, Fc 글리칸은 주로 말단 갈락토스 잔기의 가변적 존재로 인해 매우 이질적이다. 리투시맵의 말단 갈락토스 잔기가 CDC 활성에 미치는 영향은 리투시맵이 보체 C1q에 결합하는 데 이러한 잔기가 관여하기 때문이다(Hodoniczky et al. 2005).

[0351] IgG 글리칸에 대한 갈락토스의 존재 또는 부재는(Boyd et al., *Mol Immunol.* 32 (1995) 1311-1318; Wright and Morrison, *J Immunol.* 160 (1998) 3393-3402) 단일클론 IgG 항체의 전부는 아니지만 일부에서 변형된 Fc 효과기 기능과 상관관계가 있고, 관찰된 효과가 부분적으로 항체 특이적일 수 있음을 시사한다. Tsuchiya et al. (1989)는 아갈락토 IgG가 C1q 및 Fc 수용체 결합을 감소시켰음을 발견하였고, Boyd et al.은 아갈락토 캄파스(agalacto Campath)1(단일클론 항 CD52)은 세포 매개 용해(CML)를 감소시켰지만 ADCC를 유발하는 능력은 손상되지 않았음을 발견하였다. 따라서, 본원에 사용된 용어 “효과기 기능”은 항체의 Fc 영역에 기인한 생물학적 활성을 지칭하는데, 이들은 항체 동형에 따라서 가변된다. 항체 효과기 기능들의 예에는 다음이 포함된다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC); 식균 작용; 세포 표면 수용체들(예: B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화; 예컨대, Thomann et al, *PLoS One.* 2015 Aug 12;10(8):e0134949. doi: 10.1371/journal.pone.0134949. eCollection 2015를 참조한다.

[0352] 본원에서 용어 “Fc 영역”은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 규정하는 데 이용된다. 상기 용어는 선천적 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 비록 IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계가 약간 변할 수도 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로, Cys226부터, 또는 Pro230부터 중쇄의 카르복실 말단까지 걸쳐있는 것으로 규정된다. 하지만, 숙주 세포에 의해 생산되는 항체는 중쇄의 C 말단으로부터 하나 또는 그 이상, 특히 1개 또는 2개의 아미노산의 번역후 개열을 겪을 수 있다. 따라서, 전장 중쇄를 부호화하는 특이적 핵산 분자의 발현을 통해 숙주 세포에 의해 생성되는 항체는 전장 중쇄를 포함할 수 있거나, 또는 이는 전장 중쇄의 절단된 변이체(본원에서 “절단된 변이체 중쇄”로도 지칭됨)를 포함할 수 있다. 이는 중쇄의 최종 2개의 C-말단 아미노산이 글리신(G446) 및 리신(K447, Kabat EU 색인에 따른 넘버링)인 경우일 수 있다. 이런 이유로, Fc 영역의 C 말단 리신 (Lys447), 또는 C 말단 글리신 (Gly446) 및 리신 (Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 기재된 바와 같이 EU 인덱스라고도 하는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0353] 특정 양태들에서, 상기 재조합 단백질이 항체인 경우, 항체의 Fc 도메인은 야생형 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 변경을 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이들 Fc 도메인은 이들의 야생형 대응물과 비교하여 치료적 유용성에 필요한 실질적으로 동일한 특성을 보유할 것이다. 예를 들어, 특정 변경은, 예컨대, W099/51642에 기재된 바와 같이, 변경된(즉, 개선되거나 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)을 유발하는 Fc 영역 내에서 제조된다. 또한, Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 W094/29351를 참조한다. W000/42072(Presta) 및 W02004/056312(Lowman)는 FcR로의 개선되거나 감소된 결합을 갖는 항체 변이체를 기재한다. 이들 특허 간행물의 내용은 본원에 구체적으로 인용된다. 또한, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)를 참조한다. 반감기가 증가되고, 태아로의 모체 IgG의 이동에 원인으로 작용하는 신생아 Fc 수용체(FcRn)로의 결합이 개선된 항체(Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994))가 US2005/0014934A1(Hinton et al.)에 기재되어 있다. 항체의 반감기는 항체의 Fc 영역의 구조에 의존할 수 있으며, 이는 차례로 상기 Fc 영역의 신생아 수용체인 FcRn에 대한 결합 효능에 영향을 미친다. 이에 의해, Fc영역의 FcRn에 대한 결합을 유지함으로써 반감기를 증가시킨다. 상세하게는, 약 6.0의 pH에서, 상기 결합은 리소솜 분해 경로로부터 떨어져서 FcRn에 결합된 항체의 엔도솜 트래피킹(trafficking)을 유도하고, 대신에 이를 IgG는 pH 7.4에서 혈류로 재방출되는 원형질막으로 재순환시킨다. 따라서, 상기 경로에 의해 혈액 내 IgG 반감기가 증가하며, 이는 이의 표적에 대한 항체의 연장된 노출 및 치료 효능에 대한 향상된 잠재력에 필요하다; 본원에 구체적으로 인용된 Saxena, Abhishek; Bai, Bingxin; Hou, Shin-Chen; Jiang, Lianlian; Ying, Tianlei; et al. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1827: 399-417. (2018); Spearman, Maureen; Dionne, Ben;

Butler, Michael. Cell Engineering, Vol 7: Antibody Expression and Production 7: 251-292. SPRINGER. (2011)를 참조한다. 이들 항체는 FcRn에 Fc 영역의 결합을 향상시키는, 그 안에 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열 및 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 제6,194,551 및 국제 특허 공보 Wo99/51642에 기재되어 있다. 또한, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)를 참조한다. 이의 내용은 본원에 구체적으로 원용된다.

[0354] IgG 분자에 미치는 갈락토실화 효과에 대한 다른 보고에는 입체형태 및 표면 접근성과 같은 물리화학적 특성의 변형이 포함된다(Krapp et al., J. Mol. Biol. 325 (2003) 979-89; Mimura et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 697-706). Fortunato and Colina (J. Phys. Chem. 118 (2014) 98449851)는 면역글로불린 G1의 Fc 도메인에서 갈락토실화의 효과를 연구하기 위해 명백한 물 원자 분자 역학 시뮬레이션을 사용하였다. 그들은 당화(glycosylation)가 치료를 위한 단일클론 항체의 응집 저항성을 개선하는 경로로 사용될 수 있다고 제안하였다. 본원에서 이용된 바와 같이, “치료” (및 이의 문법적 변이, 예컨대 “치료한다” 또는 “치료하는”)는 치료되는 개체에서 질환의 자연 경과를 변경하려는 시도에서 임상적 개입을 지칭하고, 그리고 임상 병리의 예방을 위해 또는 임상 병리의 경과 동안 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과에는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 본원 발명의 항체는 질환의 발달을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 늦추는 데 이용된다.

[0355] 현재 입수 가능한 데이터에 따르면, 항체의 갈락토스 잔기는 특정 IgG 기능에 영향을 미치며 이러한 분자의 갈락토스화 동안 효과적으로 모니터링하고 제어해야 할 수 있다.

[0356] 상기 언급된 항체 갈락토실화는 이들 당 분자가 갈락토실화에 필요한 기질로서 작용하기 때문에 세포에 존재하는 UDP-갈락토스의 농도에 의존하는 것으로 공지되어 있다. UDP-갈락토스 함량의 증가는 CHO 세포에서 발현된 항체의 더 높은 갈락토실화 및 시알릴화(sialylation)와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 세포의 다양한 UDP-갈락토스 수준은 다른 치료 단백질의 다른 유형의 당화에도 유의한 의미를 가질 수 있다.

[0357] 0-연결된 당화를 위한 UDP-갈락토스 농도 조절

[0358] 일반적으로, 본원에 사용된 재조합 단백질에서, 당은 N 결합인 아스파라긴의 측쇄에 있는 아미드 질소 원자에, 또는 O 결합인 세린 또는 트레오닌의 측쇄에 있는 산소 원자에 부착될 수 있다. 0-연결된 당화는 효소 UDP-N-아세틸-D-갈락토사민:폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제(EC2.4.1.41)에 의해 세린 또는 트레오닌 잔기에 N-아세틸-갈락토사민을 첨가한 후, 다른 탄수화물, 예컨대, UDP-갈락토스로 발생할 수 있다. 따라서, 세포 내 UDP-갈락토스 농도는 0-연결된 당화에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명에 기재된 새로운 접근법은 세포 내 UDP-갈락토스 수준을 조절하고 최종 단백질 생성물에서 갈락토스 수준을 추가로 조절하는데 유용할 수 있다.

[0359] 항체 Fab 당화를 위한 UDP-갈락토스 농도 조절

[0360] IgG Fab 글리칸의 존재는 꽤 오래전부터 공지되어 있었다. Fab 글리칸은 아마도 당화전달효소에 더 쉽게 접근할 수 있으며, 결과적으로 CH2 도메인의 내부면에 공간적으로 국한된 Fc 글리칸에 비해 더 많은 처리가 이루어진다. 따라서, 세포 내 UDP-갈락토스 농도는 또한 IgG Fab 갈락토실화 과정에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명에 기재된 새로운 접근법은 세포 내 UDP-갈락토스 수준을 조절하고 최종 단백질 생성물에서 갈락토스 수준을 추가로 조절하는데 사용될 수 있다.

[0361] 본 발명의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 재조합 단백질의 N-연결된 갈락토실화된 글리칸의 수준이 증가한다. 따라서, 본 발명의 방법은 재조합 단백질의 N-연결된 갈락토실화된 글리칸의 생성을 증가시킨다. 본 발명의 바람직한 일 양태에서, 상기 재조합 단백질은 적어도 모노갈락토실화된, 더 바람직하게는 디갈락토실화된 글리칸을 포함하고, 여기서 갈락토실화된 글리칸은 N-아세틸글루코사민과 결합한다. 상기 재조합 단백질 내의 각각의 표적에 대한 갈락토스의 연결 및 재조합 단백질의 기능에 대한 이들의 효과는 하기와 같이 실시예에 의해 추가로 설명된다.

[0362] 본 발명은 또한 상기 재조합 단백질을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. "조성물" 및 "약학적 조성물"이라는 용어는 함께 사용되며 이의 개별 구성요소 또는 성분이 자체적으로 약학적으로 허용가능한 약학적 조성물을 정의하는 것으로 이해되어야 합니다. 예컨대, 경구 투여가 예상되는 경우, 경구 사용에 허용 가능하며, 국소 투여가 예상되는 경우, 국소적으로 허용 가능하며, 또한 이들의 조합을 포함한다. 즉, 경구 및 국소 투여가 예상되는 경우, 경구 및 국소 사용에 허용 가능하다. 상기 용어는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이

효과적이라도 허용하는 그런 형태이고, 이러한 약학적 조성물이 투여될 개체에게 받아들이기 어려울 정도로 독성인 추가 성분을 함유하지 않는 제제물을 지칭한다. “약학적으로 허용가능한 운반체”는 개체에게 비독성인, 제약학적 조성물 또는 제제에서 활성 성분 이외의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용가능한 담체는 완충액, 부형제, 안정화제, 또는 보존제다.

[0363] 약학적 조성물은 개별 환자의 임상 상태, 약학적 조성물의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정 및 의료 종사자에게 공지된 기타 요인을 고려하여 모범적 의료 행위와 일치하는 방식으로 제형화되고 투여될 것이다. 따라서, 본원의 목적을 위한 약학적 조성물의 “유효량”은 상기 고려사항에 의해 결정된다. 당업자는 개체에게 투여되는 약학적 조성물의 유효량이 특히 화합물의 성질에 의존할 것임을 알고 있다. 본 맥락에서, 작용제, 예컨대, 약학적 조성물의 “유효량”은 원하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는 데 필요한 용량에서 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0364] 본 발명의 항체(및 임의의 추가 치료제)와 같은 치료 단백질은 비경구, 폐내 및 비내를 포함한 임의의 적합한 수단에 의해, 그리고 국소 치료를 위해 원하는 경우에, 병소내 투여에 의해 투여할 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복막내, 또는 피하 투여를 포함한다. 투약은 투여가 단기 또는 장기인지에 부분적으로 따라서, 임의의 적합한 루트, 예를 들어, 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의할 수 있다. 단일 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 일시 투여 및 펄스 주입을 비롯한(하지만, 이에 제한되지 않는) 다양한 투약 일정이 본원에서 고려된다.

[0365] 본 발명의 항체는 양호한 의학적 수행과 합치하는 양상으로 제형화, 투약, 및 투여된다. 이와 관련하여 고려해야 할 요소에는 치료 중인 특정 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 병태, 장애의 원인, 제제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 종사자에게 알려진 기타 요소가 포함된다. 항체는 꼭 그럴 필요는 없지만, 문제의 장애를 예방하거나 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 함께 선택적으로 제제화된다. 상기 다른 작용제들의 유효량은 약학적 조성물 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 의존한다. 이들은 일반적으로 본 명세서에서 설명된 바와 같은 투여 경로로 동일한 투여량으로 이용되거나, 또는 본 명세서에서 논의된 투여량의 약 1 내지 99%, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 판단된 임의의 투여량 및 임의의 경로로 이용된다.

[0366] 질환의 예방 또는 치료를 위한, 본 발명의 항체의 적절한 용량(단독으로 또는 한 가지 이상의 다른 추가 치료제와 조합으로 이용될 때)은 치료되는 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 심각도 및 과정, 항체가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 이전 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 그리고 주치의의 재량에 의존할 것이다.

[0367] 본원에 사용된, 용어 “및/또는”는 본원에서 이용되는 경우에, 다른 특질 또는 성분과 함께 또는 다른 특질 또는 성분 없이 2개의 특정된 특질 또는 성분 각각의 특정된 개시로서 간주된다. 예를 들어, “A 및/또는 B”는 각각이 본원에서 개별적으로 제시되는 것처럼 (i) A, (ii) B 및 (iii) A 및 B 각각의 특정 개시로서 간주되어야 한다.

[0368] 본원에 기재된 본 발명의 다양한 양태 및 특징은 하기의 예로서 추가로 기재된다. 비록 전술한 발명이 이해의 명료함을 위해 예시 및 실례로서 일부 상세하게 설명되긴 했지만, 이들 설명 및 실례는 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0369] 본원에 인용된 모든 특허 및 비특허 참조는 그 전체가 본원에 원용된다.

[0370] 실시예

[0371] CHO K1M 세포주의 우리딘 이인산염(UDP) α-D-글루코스 에피머화 효소(UDP-Glc-E, EC 5.1.3.2) 및 UDP-α-D-글루코스: α-D-갈락토스-1-인산 우리딘전달효소의 cDNA가 각각 복제되고 서열분석된다. 이 두 효소는 CHO 세포에서 UDP-글루코스 및 UDP-갈락토스 전환 경로 내에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

[0372] 실시예 1: CHO K1M 세포주에서 우리딘 이인산 글루코스 에피머화 효소(UDP-Glc-E) cDNA 증폭 및 서열 분석

[0373] UDP-갈락토스 4-에피머화 효소로도 공지된 효소 우리딘 이인산(UDP)-글루코스 4-에피머화 효소(UDP-Glc-E, EC 5.1.3.2)은

[0374] 박테리아, 곰팡이, 식물, 및 포유동물 세포에서 발견되는 동종이량체 에피머화 효소이다. 상기 효소는 UDP-글루코스에서 UDP-갈락토스로의 가역적 전환을 촉매한다.

- [0375] CHO K1M 세포주로부터 총 세포 RNA 추출(W02009047007)은 로슈(Roche) MagNA 퓨어(Pure) LC 2.0 기기(제품 번호 05197686001, 로슈 디아그노스틱스 GmbH(Roche DiagnosticsGmbH))에서 작동하는 MagNA 퓨어 LC RNA 분리 키트 - 로슈의 고성능(제품 번호 03542394001)를 사용함으로써 실시하였다. 정제된 RNA의 농도는 NanoVue(GE 헬스케어바이오-사이언스 AB(GE Healthcare Bio-Science AB))로 측정하여 -70℃에서 보관하였다.
- [0376] 상기 정제된 세포 RNA는 UDP_Glc-E cDNA 합성 및 표적 증폭에 사용하였다. cDNA 합성 및 증폭은 NCBI 젠뱅크(GenBank) 데이터베이스에 따라 상동적으로 설계된 2개의 UDP_Glc-E 특이적 프라이머와 함께 로슈 트랜스크립터(Transcriptor) 원스톱(One-Step) RT-PCR 키트(제품 번호 04655877001, 로슈 디아그노스틱스 GmbH)를 사용하여 실시하였다.
- [0377] 본원에 사용된 상기 두 프라이머는 하기와 같다:
- [0378] 정방향 프라이머 UDP_GlcE-F2-21(서열번호 5):
- [0379] 5' ATGCCCGAGAAGGTGCTGGTC 3' , 및
- [0380] 역방향 프라이머 UDP_GlcE-R21(서열번호 6):
- [0381] 5' TTAGGCCTGTGCTCCAAAGCC 3' .
- [0382] RT-PCR 조건:
- [0383] 역전사: 50℃ 30분
- [0384] 초기 변성: 94℃ 7분
- [0385] 증폭 PCR:
- [0386] 변성: 94℃ 10초
- [0387] 어닐링: 56℃ 30초
- [0388] 신장: 68℃ 60초 (60초/kb)
- [0389] 주기: 10
- [0390] 변성: 94℃ 10초
- [0391] 어닐링: 56℃ 30초
- [0392] 신장: 68℃ 1:30 + 5초 (+5초/kb)
- [0393] 주기: 25
- [0394] 최종 신장: 68℃ 7분
- [0395] 증폭된 PCR 생성물을 먼저 로슈 하이 퓨어(High Pure) PCR 생성물 정제 키트(제품번호 11732668001, 로슈 디아그노스틱스 GmbH)로 정제한 다음, 직접적인 서열분석을 진행하였다. UDP_Glc-E cDNA의 서열은 SEQUENCE-1(서열번호 1)에 제시된다. 상기 cDNA는 예측된 348개 아미노산 단백질을 부호화한다. CHO K1M에서 UDP-글루코스 4-에피머화 효소의 유도된 아미노산 서열은 SEQUENCE-2(서열번호 2)에 제시된다.
- [0396] UDP-Glc-E CHO K1M에 의해 부호화된 단백질 서열은 인간 UDP-글루코스 4-에피머화 효소와 94.5% 동일하고 96.6% 유사하며, 소 및 마우스의 다른 UDP-글루코스 4-에피머화 효소와 밀접하게 관련되어 있다.
- [0397] 실시예 2: CHO K1M 세포주에서 UDP-α-D-글루코스: α-D-갈락토스-1-인산 우리디릴전달효소(UDP-Gal-T) cDNA 증폭 및 서열 분석
- [0398] UDP-α-D-글루코스: α-D-갈락토스-1-인산 우리디릴전달효소(UDP-Gal-T, EC2.7.7.12)는 우리딘 5'-이인산 글루코스(UDP-글루코스)와 갈락토스-1-인산염(Gal-1-P) 사이의 뉴클레오티드 교환을 촉매하여 가역 메커니즘을 통해 우리딘 5'-이인산 갈락토스(UDP-갈락토스) 및 글루코스-1-인산염(Glc-1-P)를 생성한다.
- [0399] CHO K1M 세포주로부터 총 세포 RNA 추출은 로슈 MagNA 퓨어 LC 2.0 기기(제품 번호 05197686001, 로슈 디아그노스틱스 GmbH)에서 작동하는 MagNA 퓨어 LC RNA 분리 키트 - 로슈의 고성능(제품 번호 03542394001)를 사용함으로써 실시하였다. 정제된 RNA의 농도는 NanoVue(GE 헬스케어 바이오-사이언스 AB)로 측정하여 -70℃에서 보관

하였다.

- [0400] 상기 정제된 세포 RNA는 UDP-Gal-T cDNA 합성 및 표적 증폭에 사용하였다. cDNA 합성 및 증폭은 NCBI 젠뱅크 데이터베이스에 따라 상동적으로 설계된 2개의 UDP-Gal-T 특이적 프라이머와 함께 로슈 트랜스크립터 원스톱 RT-PCR 키트(제품 번호 04655877001, 로슈 디아그노스틱스 GmbH)를 사용하여 실시하였다.
- [0401] 본원에 사용된 상기 두 프라이머는 하기와 같다:
- [0402] 정방향 프라이머 UDP-Gal-T-F2-21(서열번호 7):
- [0403] 5' ATGTCGCAAAACGGAGATGAT 3' , 및
- [0404] 역방향 프라이머 UDP-Gal-T-R18(서열번호 8):
- [0405] 5' TCAAGCAACAGCTGCTGT 3' .
- [0406] RT-PCR 조건:
- [0407] 역전사: 50℃ 30분
- [0408] 초기 변성: 94℃ 7분
- [0409] 증폭 PCR:
- [0410] 변성: 94℃ 10초
- [0411] 어닐링: 56℃ 30초
- [0412] 신장: 68℃ 60초 (60초/kb)
- [0413] 주기: 10
- [0414] 변성: 94℃ 10초
- [0415] 어닐링: 56℃ 30초
- [0416] 신장: 68℃ 1:30 + 5초 (+5초/kb)
- [0417] 주기: 25
- [0418] 최종 신장: 68℃ 7분
- [0419] 증폭된 PCR 생성물을 먼저 로슈 하이 퓨어 PCR 생성물 정제 키트(제품번호 11732668001, 로슈 디아그노스틱스 GmbH)로 정제한 다음, 직접적인 서열분석을 진행하였다. UDP-Gal-T cDNA의 서열은 SEQUENCE-3(서열번호 3)에 제시된다. 상기 cDNA는 예측된 379개 아미노산 단백질을 부호화한다. CHO K1M에서 UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디릴전달효소의 유도된 아미노산 서열은 SEQUENCE-4(서열번호 4)에 제시된다.
- [0420] UDP-Gal-T CHO K1M에 의해 부호화된 단백질 서열은 인간 UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디릴전달효소와 89.4% 동일하고 94.7% 유사하며, 마우스 및 소의 다른 UDP- α -D-글루코스: α -D-갈락토스-1-인산 우리디릴전달효소와 밀접하게 관련되어 있다.
- [0421] 실시예 3: 재조합 항 인간 α -시누클레인 항체 생성을 위한 CHO 세포주 L965에서 L-시스테인을 사용한 효소 및 경로 조절
- [0422] 본 실시예에서, 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포로부터 유래된 세포주인 CHO K1M을 숙주 세포주로 사용하였다(W02009047007).
- [0423] 상기 CHO K1M 세포는 항 인간 α -시누클레인 단일클론 항체(US9670274B2 및 US9890209B9에 기재됨)를 발현하도록 조작되었으며, 이는 본원에서 CHO L965 세포주로 지정된 단량체 또는 올리고머 인간 α -시누클레인에 결합한다.
- [0424] 인간 α -시누클레인은 원섬유형 응집체를 형성할 수 있으며, 이러한 응집체는 루이소체와 루이 신경돌기의 주성분이다. 최근의 과학적 연구에 따르면, 알파-시누클레인의 원섬유형 올리고머가 파킨슨병의 진행에 핵심적인 기여자가 될 수 있다(Luk et al., 2012).
- [0425] 특이적 항체 L965는 세포의 α -시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있고 세포간 응집체 전달 및 파킨슨병의 진

행을 예방하는데 사용할 수 있다.

- [0426] 세포 배양 공정의 경우, 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L965 세포를 배양하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 해동 후, 상기 세포를 3 μ g/mL 블라스티시딘(블라스티시딘(Blasticidin), 인비보젠(InvivoGen) S.A.S., 프랑스) 및 10 μ g/mL 퓨로마이신(퓨로마이신-솔루션(Puromycin-Solution), 인비보젠 S.A.S., 프랑스, Cat. No. ANT-PR)의 존재하에 3~4일의 일정으로 진탕 플라스크에서 상기 배지에서 계대배양하였다. 계대배양 조건은 쿠너 셰이커(Kuhner Shaker) X 플랫폼(아돌프 퀴너(Adolf Kuehner) AG, 비르스펠덴(Birsfelden), 스위스 바젤 소재)을 사용하여 125 mL 및 500 mL 플라스크에 대해 36.5°C, 7% CO₂ 및 160 rpm이었다.
- [0427] 접종 트레인(train) 및 생산 공정의 경우, 다른 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L965 세포를 증식하기 위한 기본 배지로서 사용되었다.
- [0428] 상기 생산 배지를 준비하는 동안, 추가 글루코스, 글루타민, 아미노산, 미량 원소(RTE1.2 솔루션(Solution), 깁코(Gibco), UK; 참조 번호 043-90585H) 및 염을 또한 포함하였다. 이 경우, 상기 배지에서 L-시스테인의 최종 농도는(메르크 케미칼스 GmbH(Merck Chemicals GmbH), Cat. No.: 1.02735.1000) 각각 6 mM 및 10 mM으로 조정하였다.
- [0429] 사전 배양된 세포를 사용하여 모두 블라스티시딘 및 퓨로마이신 없이 6 mM 또는 10 mM L-시스테인을 각각 함유하는 제조된 생산 배지와 나란하게 약 3.0×10^5 세포/mL로 N-2 단계 및 약 5.0×10^5 세포/mL로 N-1 단계를 접종하였다. 생산 생물반응기는 각각 6 mM 또는 10 mM L-시스테인을 함유하는 배지에 약 10.0×10^5 개 세포/mL로 접종하였다. 세포는 미리 정의된 pH, 용존 산소, 온도 및 영양 공급 전략이 있는 유가식 배양 조건하에 생산 생물반응기에서 배양하였다. 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 초기 배양 부피가 1.2 L인 2 L 생물반응기를 사용하였다.
- [0430] 생물반응기의 온도는 36.5°C로 제어하고 교반기 속도는 약 223 rpm으로 설정하였다. 공기, CO₂ 및 O₂를 함유하는 가스 혼합물이 제공되었다. 용존 이산화탄소 농도(dCO₂)는 하루에 한 번 오프라인으로 측정하였다. 용존 산소 농도(DO)를 온라인으로 제어하고 기체 혼합물의 산소 분압을 변화시켜 35%로 조정하였다. pH는 달리 명시되지 않는 한 CO₂ 또는 1.0 M NaHCO₃을 첨가하여 ± 0.03 pH 단위의 불감대와 함께 pH 설정점 7.00을 유지하였다.
- [0431] 공급 배지는 자체 배지와 글루코스, 글루타민, 아미노산 및 염의 조합을 포함하였다. 상기 공급 배지는 용액으로 제조하고, 3일, 6일 및 9일에 각각 작업 배양 부피의 약 10 부피%의 양으로 배양물에 첨가하였다.
- [0432] 글루코스 농도를 약 ≥ 4 g/l로 유지하기 위해, 추가 글루코스 공급 용액을 제조하고 4~14일 동안 배양물에 첨가하였다.
- [0433] 오프라인 분석을 위해 매일 주사기로 생산 세포 배양 샘플을 채취하였다. 생산 기간은 일반적으로 약 14일 동안 지속되었다. 세포 농도 및 생존율은 CEDEX 기기(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 트립판 블루(trypan blue) 배제 방법으로 측정하였다. 코바스 인테그라(COBAS INTEGRA)® 400 플러스(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 글루코스, 글루타민, 글루타메이트, 젖산염, 암모늄 및 생성물 농도에 대한 오프라인 측정을 실시하였다. 용존 이산화탄소는 코바스 b221 분석기(로슈 디아그노스틱스 리미티드, CH-6343, 스위스 로트크로이츠 소재)로 분석하였다. 삼투압 농도는 오스모맷 자동 삼투압계(Osmomat Auto Osmometer)(고노텍(Gonotec) GmbH, 독일 베를린 소재)의 어느점 내림으로 측정하였다.
- [0434] 본 배양 생산 공정이 끝나면, 원심분리를 통해 세포 배양액을 수집하였다. 상청액을 단백질-A로 소규모 mAb 정제에 추가로 적용하였다. 정제된 mAb의 당화 패턴을 2AB로 분석하였다.
- [0435] 도 6a-도 6e는 G0 형태의 항 α -시누클레인 항체 L965, G1 형태의 항 α -시누클레인 항체 L965, G2 형태의 항 α -시누클레인 항체 L965, 생성물 역가 및 세포 성장(IVCD)에 대한 상이한 L-시스테인 농도의 효과를 도시한다.
- [0436] 도 6a는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G0 형태의 항 α -시누클레인 항체 L965가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 10.4% 낮음을 도시한다.
- [0437] 도 6b는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G1 형태의 항 α -시누클레인 항체 L965가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 13% 높음을 도시한다.
- [0438] 도 6c는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G2 형태의 항 α -시누클레인

인 항체 L965가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 5% 높음을 도시한다.

- [0439] 도 6d는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 생산물 역가가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 73% 높음을 도시한다.
- [0440] 도 6e는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 세포 성장이 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 높음을 도시한다.
- [0441] 실시예-4: 재조합 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 생성을 위한 CHO 세포주 T104에서 L-시스테인을 사용한 효소 및 경로 조절
- [0442] 본 실시예에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 유래된 세포주인 CHO K1M을 숙주 세포주로 사용하였다 (WO2009047007). 상기 CHO K1M 세포는 CD20-CD3 표적화 T 세포 이중특이적 단일클론 항체, 항 CD20/항 CD3 bsAB(EP3252078A1에 기재됨)를 발현하도록 조작되었으며, 여기서 CHO T104 세포주로 지정된다.
- [0443] 항 CD20/항 CD3 bsAB는 B 세포에 발현된 CD20 및 T 세포에 존재하는 CD3 입실론 사슬(CD3)을 표적으로 하는 T 세포 이중특이적(TCB) 항체이다. 항 CD20/항 CD3 bsAB의 작용 기전은 CD20+ B 세포 및 CD3+ T 세포에 대한 동시 결합을 포함하여, B 세포의 T 세포 활성화 및 T 세포 매개된 사멸을 유도한다. 순환 또는 조직 상주 여부에 관계없이 CD20+ B 세포의 존재하에 약리학적 활성 용량은 T 세포 활성화 및 관련 사이토카인 방출을 촉발할 것이다. 항 CD20/항 CD3 bsAB는 질병, 특히 B 세포 증식성 장애를 치료하고, T 세포 활성화 치료제의 투여에 대한 부작용을 줄이기 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, 만성 림프구성 백혈병 환자는 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체로 치료할 수 있다.
- [0444] 세포 배양 공정의 경우, 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 T104 세포를 배양하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 해동 후, 상기 세포를 250 nM 메토틱세이트(MTX; 화이자(Pfizer), Cat. No. 13999031)의 존재하에 3~4일의 일정으로 진탕 플라스크에서 상기 배지에서 계대배양하였다. 계대배양 조건은 쿠너 셰이커(Kuhner Shaker) X 플랫폼(아돌프 쿠너(Adolf Kuehner) AG, 비르스펠덴(Birsfelden), 스위스 바젤 소재)을 사용하여 125 mL 및 500 mL 플라스크에 대해 36.5°C, 7% CO₂ 및 160 rpm이었다.
- [0445] 접종 트레인 및 생산 공정의 경우, 다른 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 T104 세포를 증식하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 상기 생산 배지를 준비하는 동안, 추가 글루코스, 글루타민, 아미노산, 미량 원소(RTE1.0 솔루션, SAFC, 참조 번호 CR40054-1000M SLBR5143V) 및 염을 또한 포함하였다. 이 경우, L-시스테인의 최종 농도는(메르크 케미칼스 GmbH, Cat. No.: 1.02735.1000) 각각 5 mM 및 10 mM으로 조정하였다.
- [0446] 사전 배양된 세포를 사용하여 모두 MTX 없이 5 mM 또는 10 mM L-시스테인을 각각 함유하는 제조된 생산 배지와 나란하게 약 3.0×10^5 세포/mL로 N-2 단계 및 약 5.0×10^5 세포/mL로 N-1 단계를 접종하였다. 생산 생물반응기는 각각 5 mM 또는 10 mM L-시스테인을 함유하는 배지에 약 10.0×10^5 개 세포/mL로 접종하였다. 세포는 미리 정의된 pH, 용존 산소, 온도 및 영양 공급 전략이 있는 유가식 배양 조건하에 생산 생물반응기에서 배양하였다. 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 초기 배양 부피가 1.2 L인 2 L 생물반응기를 사용하였다. 초기 배양 부피가 200 mL인 Ambr-250 생물반응기를 사용하였다.
- [0447] 생물반응기의 온도는 36.5°C로 제어하고 교반기 속도는 약 223 rpm으로 설정하였다. 공기, CO₂ 및 O₂를 함유하는 가스 혼합물이 제공되었다. 용존 이산화탄소 농도(dCO₂)는 하루에 한 번 오프라인으로 측정하였다. 용존 산소 농도(DO)를 온라인으로 제어하고 기체 혼합물의 산소 분압을 변화시켜 35%로 조정하였다. pH는 달리 명시되지 않는 한 CO₂ 또는 1.0 M NaHCO₃을 첨가하여 ±0.03 pH 단위의 불감대와 함께 pH 설정점 7.00을 유지하였다.
- [0448] 공급 배지는 자체 배지와 글루코스, 글루타민, 아미노산 및 염의 조합을 포함하였다. 상기 공급 배지는 용액으로 제조하고, 3일, 6일 및 9일에 각각 작업 배양 부피의 약 10 부피%의 양으로 배양물에 첨가하였다.
- [0449] 글루코스 농도를 약 ≥ 3 g/L로 유지하기 위해, 추가 글루코스 공급 용액을 제조하고 4~14일 동안 배양물에 첨가하였다.
- [0450] 오프라인 분석을 위해 매일 주사기로 생산 세포 배양 샘플을 채취하였다. 생산 기간은 일반적으로 약 14일 동안 지속되었다. 세포 농도 및 생존율은 CEDEX 기기(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 트립판 블루 배제 방법으로 측정하였다. 코바스 인테그라® 400 플러스(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 글루코스, 글루타민, 글루타마이트, 젖산염, 암모늄 및 생성물 농도에 대한 오프라인 측정을 실시하였다. 용존 이산화탄소

는 코바스 b221 분석기(로슈 디아그노스틱스 리미티드, CH-6343, 스위스 로트크로이즈 소재)로 분석하였다. 삼투압 농도는 오스모멧 자동 삼투압계(고노텍 GmbH, 독일 베를린 소재)의 어는점 내림으로 측정하였다.

- [0451] 본 배양 생산 공정이 끝나면, 원심분리를 통해 세포 배양액을 수집하였다. 상청액을 단백질-A로 소규모 mAb 정제에 추가로 적용하였다. 정제된 mAb의 당화 패턴을 2AB로 분석하였다.
- [0452] 도 7a-도 7d는 G0 형태의 항 CD-20/항 CD3 bsAB, G1 형태의 항 CD20/항 CD3 bsAB, 세포 성장(IVCD), 및 생성물 역가에 대한 상이한 L-시스테인 농도의 효과를 도시한다.
- [0453] 도 7a는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G0 형태의 항 CD20/항 CD3 bsAB가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 5.5% 낮음을 도시한다.
- [0454] 도 7b는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G1 형태의 항 CD20/항 CD3 bsAB가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 3.4% 높음을 도시한다.
- [0455] 도 7c는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 생성물 역가가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 66% 높음을 도시한다.
- [0456] 도 7d는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 세포 성장이 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 높음을 도시한다.
- [0457] 실시예-5: 개선된 생산 공정을 위한 제조항 항 CD20/항 CD3 이중특이적 항체 생성 CHO 세포주 T104에서 L-시스테인을 사용한 효소 및 경로 조절
- [0458] 본 실시예에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 유래된 세포주인 CHO K1M을 숙주 세포주로 사용하였다 (W02009047007). 상기 CHO K1M 세포는 항 CD20/항 CD3 표적화 T 세포 이중특이적 단일클론 항체, 항 CD20/항 CD3 bsAB(EP3252078A1에 기재됨)를 발현하도록 조작되었으며, 여기서 T104 세포주로 지정된다.
- [0459] 항 CD20/항 CD3 bsAB는 B 세포에 발현된 CD20 및 T 세포에 존재하는 CD3 입실론 사슬(CD3)을 표적으로 하는 T 세포 이중특이적(TCB) 항체이다. 항 CD20/항 CD3 bsAB의 작용 기전은 CD20+ B 세포 및 CD3+ T 세포에 대한 동시 결합을 포함하여, B 세포의 T 세포 활성화 및 T 세포 매개된 사멸을 유도한다. 순환 또는 조직 상주 여부에 관계없이 CD20+ B 세포의 존재하에 약리학적 활성 용량은 T 세포 활성화 및 관련 사이토카인 방출을 촉발할 것이다. 항 CD20/항 CD3 bsAB는 질병, 특히 B 세포 증식성 장애를 치료하고, T 세포 활성화 치료제의 투여에 대한 부작용을 줄이기 위해 사용할 수 있다.
- [0460] 세포 배양 공정의 경우, 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 자체 배지가 T104 세포를 배양하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 해동 후, 상기 세포를 250 nM 메토타렉세이트(MTX; 화이자, Cat. No. 13999031)의 존재하에 3~4일의 일정으로 진탕 플라스크에서 상기 배지에서 계대배양하였다. 계대배양 조건은 쿠너 셰이커 X 플랫폼(아돌프 쿨너 AG, 비르스펠덴, 스위스 바젤 소재)을 사용하여 125 mL 및 500 mL 플라스크에 대해 36.5°C, 7% CO₂ 및 160 rpm이었다.
- [0461] 접종 트레인 및 생산 공정의 경우, 다른 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 T104 세포를 증식하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 상기 생산 배지를 준비하는 동안, 추가 글루코스, 글루타민, 아미노산, 미량 원소(RTE1.2 솔루션, 킵코, UK; 참조 번호 043-90585H), 및 염을 또한 포함하였다. 이 경우, L-시스테인의 최종 농도는(메르크 케미칼스 GmbH, Cat. No.: 1.02735.1000) 각각 5 mM 및 10 mM으로 조정하였다.
- [0462] 사전 배양된 세포를 사용하여 모두 MTX 없이 5 mM 또는 10 mM L-시스테인을 각각 함유하는 제조된 생산 배지와 나란하게 약 3.0×10^5 세포/mL로 N-2 단계 및 약 5.0×10^5 세포/mL로 N-1 단계를 접종하였다. 생산 생물반응기는 각각 5 mM 또는 10 mM L-시스테인을 함유하는 배지에 약 10.0×10^5 개 세포/mL로 접종하였다. 세포는 미리 정의된 pH, 용존 산소, 온도 및 영양 공급 전략이 있는 유가식 배양 조건하에 생산 생물반응기에서 배양하였다. 달리 명시되지 않는 한, 초기 배양 부피가 1.2 L인 2 L 생물반응기를 사용하였다. 달리 명시되지 않는 한, 초기 배양 부피가 200 mL인 Ambr-250 L 생물반응기를 사용하였다.
- [0463] 생물반응기의 온도는 36.5°C로 제어하고 교반기 속도는 약 223 rpm으로 설정하였다. 공기, CO₂ 및 O₂를 함유하는 가스 혼합물이 제공되었다. 용존 이산화탄소 농도(dCO₂)는 하루에 한 번 오프라인으로 측정하였다. 용존 산소 농도(DO)를 온라인으로 제어하고 기체 혼합물의 산소 분압을 변화시켜 35%로 조정하였다. pH는 달리 명시되지 않

는 한 CO₂ 또는 1.0 M NaHCO₃을 첨가하여 ±0.03 pH 단위의 불감대와 함께 pH 설정점 7.00을 유지하였다.

- [0464] 공급 배지는 RF1.0 분말(SAFC, Cat. No. CR60112), 글루코스, 글루타민, 아미노산, 및 염의 조합을 포함하였다. 상기 공급 배지는 용액으로 제조하고, 3일, 및 6일 및 9일에 각각 작업 배양 부피의 약 10 부피%의 양으로 배양 물에 첨가하였다.
- [0465] 글루코스 농도를 약 ≥ 3 g/l로 유지하기 위해, 추가 글루코스 공급 용액을 제조하고 4~14일 동안 배양물에 첨가하였다.
- [0466] 오프라인 분석을 위해 매일 주사기로 생산 세포 배양 샘플을 채취하였다. 생산 기간은 일반적으로 약 14일 동안 지속되었다. 세포 농도 및 생존율은 CEDEX 기기(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 트립판 블루 배제 방법으로 측정하였다. 코바스 인테그라® 400 플러스(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 글루코스, 글루타민, 글루타메이트, 젖산염, 암모늄 및 생성물 농도에 대한 오프라인 측정을 실시하였다. 용존 이산화탄소는 코바스 b221 분석기(로슈 디아그노스틱스 리미티드, CH-6343, 스위스 로트크로이츠 소재)로 분석하였다. 삼투압 농도는 오스모멧 자동 삼투압계(고노텍 GmbH, 독일 베를린 소재)의 어논점 내림으로 측정하였다.
- [0467] 본 배양 생산 공정이 끝나면, 원심분리를 통해 세포 배양액을 수집하였다. 상청액을 단백질-A로 소규모 mAb 정제에 추가로 적용하였다. 정제된 mAb의 당화 패턴을 2AB로 분석하였다.
- [0468] 도 8a-도 8d는 G0 형태의 항 CD-20/항 CD3 bsAB, G1 형태의 항 CD20/항 CD3 bsAB, 세포 성장(IVCD), 및 생성물 역가에 대한 상이한 L-시스테인 농도의 효과를 도시한다.
- [0469] 도 8a는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G0 형태의 항 CD20/항 CD3 bsAB가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 3.8% 낮음을 도시한다.
- [0470] 도 8b는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G1 형태의 항 CD20/항 CD3 bsAB가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 2.5% 높음을 도시한다.
- [0471] 도 8c는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 생산물 역가가 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 약 67% 높음을 도시한다.
- [0472] 도 8d는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 5 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 세포 성장이 생산 배지에 10 mM L-시스테인을 갖는 공정보다 높음을 도시한다.
- [0473] 실시예 6: 제조항 인간 α -시누클레인 항체 생성을 위한 CHO 세포주 L967에서 L-시스테인을 사용한 경로 조절
- [0474] 본 실시예에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 유래된 세포주인 CHO K1M을 숙주 세포주로 사용하였다(W02009047007). 상기 CHO K1M 세포는 항 인간 α -시누클레인 단일클론 항체(US9670274B2 및 US9890209B9에 기재됨)를 발현하도록 조작되었으며, 이는 본원에서 L967 세포주로 지정된 단량체 또는 올리고머 인간 α -시누클레인에 결합한다.
- [0475] 인간 α -시누클레인은 원섬유형 응집체를 형성할 수 있으며, 이러한 응집체는 루이소체와 루이 신경돌기의 주성분이다. 최근의 과학적 연구에 따르면, 알파-시누클레인의 원섬유형 올리고머가 파킨슨병의 진행에 핵심적인 기여자가 될 수 있다(Luk et al., 2012). 특이적 항체 L967은 세포의 α -시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있고 세포간 응집체 전달 및 파킨슨병의 진행을 예방하는데 사용할 수 있다.
- [0476] 세포 배양 공정의 경우, 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L967 세포를 배양하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 해동 후, 상기 세포를 5 μ g/mL 퓨로마이신(퓨로마이신-솔루션, 인비보젠 S.A.S., 프랑스, Cat. No. ANT-PR)의 존재하에 3~4일의 일정으로 진탕 플라스크에서 상기 배지에서 계대배양하였다. 계대배양 조건은 쿠너 셰이커 X 플랫폼(아돌프 쿨너 AG, 비르스펠덴, 스위스 바젤 소재)을 사용하여 125 mL 및 500 mL 플라스크에 대해 36.5°C, 7% CO₂ 및 160 rpm이었다.
- [0477] 접종 트레인 및 생산 공정의 경우, 다른 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L967 세포를 증식하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 상기 생산 배지를 준비하는 동안, 추가 글루코스, 글루타민, 아미노산, 미량 원소(희석된 RTE1.2 솔루션, 킵코, UK; 참조 번호 043-90585H), 및 염을 또한 포함하였다. 사용하기 전에, 배지 중 L-시스테인(L-시스테인 이나트륨 염 일수화물; SAFC, 공급업체 품목 번호 RES1523C-A154X)의 최종 농도를 각각 2 mM 및 4 mM으로 조정하였다.
- [0478] 사전 배양된 세포를 사용하여 2 mM 또는 4 mM L-시스테인을 각각 함유하는 제조된 생산 배지와 나란하게 약 3.0 x

10^5 세포/mL로 N-2 단계 및 약 5.0×10^5 세포/mL로 N-1 단계를 접종하였다. 생산 생물반응기는 각각 2 mM 또는 4 mM L-시스틴을 함유하는 배지에 약 10.0×10^5 개 세포/mL로 접종하였다. 세포는 미리 정의된 pH, 용존 산소, 온도 및 영양 공급 전략이 있는 유가식 배양 조건하에 생산 생물반응기에서 배양하였다. 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 초기 배양 부피가 1.2 L 인 2 L 생물반응기를 사용하였다. 초기 배양 부피가 200 mL 인 Ambr-250 생물반응기를 사용하였다.

[0479] 생물반응기의 온도는 36.5°C로 제어하고 교반기 속도는 약 223 rpm으로 설정하였다. 공기, CO₂ 및 O₂를 함유하는 가스 혼합물이 제공되었다. 용존 이산화탄소 농도(dCO₂)는 하루에 한 번 오프라인으로 측정하였다. 용존 산소 농도(DO)를 온라인으로 제어하고 기체 혼합물의 산소 분압을 변화시켜 35%로 조정하였다. pH는 달리 명시되지 않는 한 CO₂ 또는 1.0 M NaHCO₃을 첨가하여 ± 0.03 pH 단위의 불감대와 함께 pH 설정점 7.00을 유지하였다.

[0480] 공급 배지는 RF1.0 분말(SAFC, Cat. No. CR60112), 글루코스, 글루타민, 아미노산, 및 염의 조합을 포함하였다. 상기 공급 배지는 용액으로 제조하고, 3일, 6일 및 9일에 각각 작업 배양 부피의 약 10 부피%의 양으로 배양물에 첨가하였다.

[0481] 글루코스 농도를 약 ≥ 4 g/l로 유지하기 위해, 추가 글루코스 공급 용액을 제조하고 4~14일 동안 배양물에 첨가하였다.

[0482] 오프라인 분석을 위해 매일 주사기로 생산 세포 배양 샘플을 채취하였다. 생산 기간은 일반적으로 약 14일 동안 지속되었다. 세포 농도 및 생존율은 CEDEX 기기(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 트립판 블루 배제 방법으로 측정하였다. 코바스 인테그라® 400 플러스(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 글루코스, 글루타민, 글루타메이트, 젖산염, 암모늄 및 생성물 농도에 대한 오프라인 측정을 실시하였다. 용존 이산화탄소는 코바스 b221 분석기(로슈 디아그노스틱스 리미티드, CH-6343, 스위스 로트크로이츠 소재)로 분석하였다. 삼투압 농도는 오스모멧 자동 삼투압계(고노텍 GmbH, 독일 베를린 소재)의 어논점 내림으로 측정하였다.

[0483] 본 배양 생산 공정이 끝나면, 원심분리를 통해 세포 배양액을 수집하였다. 상청액을 단백질-A로 소규모 mAb 정제에 추가로 적용하였다. 정제된 mAb의 당화 패턴을 2AB로 분석하였다.

[0484] 도 9a-도 9e는 G0 형태의 항 α -시누클레인 항체 L967, G1 형태의 항 α -시누클레인 항체 L967, G2 형태의 항 α -시누클레인 항체 L967, 생성물 역가 및 세포 성장(IVCD)에 대한 상이한 L-시스틴 농도의 효과를 도시한다.

[0485] 도 9a는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 G0 형태의 항 α -시누클레인 항체 L967이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 6.6% 높음을 도시한다.

[0486] 도 9b는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 G1 형태의 항 α -시누클레인 항체 L967이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 5.9% 낮음을 도시한다.

[0487] 도 9c는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 G2 형태의 항 α -시누클레인 항체 L967이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 1.6% 낮음을 도시한다.

[0488] 도 9d는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 생산물 역가가 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 9% 낮음을 도시한다.

[0489] 도 9e는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 세포 성장이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 3.7% 낮음을 도시한다.

[0490] 실시예 7: 재조합 항 인간 α -시누클레인 항체 생성을 위한 CHO 세포주 L971에서 L-시스틴을 사용한 경로 조절

[0491] 본 실시예에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 유래된 세포주인 CHO K1M을 숙주 세포주로 사용하였다(WO2009047007). 상기 CHO K1M 세포는 항 인간 α -시누클레인 단일클론 항체(US9670274B2 및 US9890209B9에 기재됨)를 발현하도록 조작되었으며, 이는 본원에서 CHO L971 세포주로 지정된 단량체 또는 올리고머 인간 α -시누클레인에 결합한다.

[0492] 인간 α -시누클레인은 원섬유형 응집체를 형성할 수 있으며, 이러한 응집체는 루이소체와 루이 신경돌기의 주성분이다. 최근의 과학적 연구에 따르면, 알파-시누클레인의 원섬유형 올리고머가 파킨슨병의 진행에 핵심적인 기여자가 될 수 있다(Luk et al., 2012). 특이적 항체 L971은 세포의 α -시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있고 세포간 응집체 전달 및 파킨슨병의 진행을 예방하는데 사용할 수 있다.

- [0493] 세포 배양 공정의 경우, 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L971 세포를 배양하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 해동 후, 상기 세포를 5 µg/mL 퓨로마이신(퓨로마이신-솔루션, 인비보젠 S.A.S., 프랑스, Cat. No. ANT-PR)의 존재하에 3~4일의 일정으로 진탕 플라스크에서 상기 배지에서 계대배양하였다. 계대배양 조건은 쿠너 셰이커 X 플랫폼(아돌프 쿨너 AG, 비르스펠덴, 스위스 바젤 소재)을 사용하여 125 mL 및 500 mL 플라스크에 대해 36.5°C, 7% CO₂ 및 160 rpm이었다.
- [0494] 접종 트레인 및 생산 공정의 경우, 다른 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L971 세포를 증식하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 상기 생산 배지를 준비하는 동안, 추가 글루코스, 글루타민, 아미노산, 미량 원소(RTE1.2 솔루션, 킵코, UK; 참조 번호 043-90585H), 및 염을 또한 포함하였다. 사용하기 전에, 배지 중 L-시스틴(L-시스틴 이나트륨 염 일수화물; SAFC, 공급업체 품목 번호 RES1523C-A154X)의 최종 농도를 각각 2 mM 및 4 mM으로 조정하였다.
- [0495] 사전 배양된 세포를 사용하여 2 mM 또는 4 mM L-시스틴을 각각 함유하는 제조된 생산 배지와 나란하게 약 3.0 x 10⁵ 세포/mL로 N-2 단계 및 약 5.0 x 10⁵ 세포/mL로 N-1 단계를 접종하였다. 생산 생물반응기는 각각 2 mM 또는 4 mM L-시스틴을 함유하는 배지에 약 10.0 x 10⁵ 개 세포/mL로 접종하였다. 세포는 미리 정의된 pH, 용존 산소, 온도 및 영양 공급 전략이 있는 유가식 배양 조건하에 생산 생물반응기에서 배양하였다. 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 초기 배양 부피가 1.2 L인 2 L 생물반응기를 사용하였다. 초기 배양 부피가 200 mL인 Ambr-250 생물반응기를 사용하였다.
- [0496] 생물반응기의 온도는 36.5°C로 제어하고 교반기 속도는 약 223 rpm으로 설정하였다. 공기, CO₂ 및 O₂를 함유하는 가스 혼합물이 제공되었다. 용존 이산화탄소 농도(dCO₂)는 하루에 한 번 오프라인으로 측정하였다. 용존 산소 농도(DO)를 온라인으로 제어하고 기체 혼합물의 산소 분압을 변화시켜 35%로 조정하였다. pH는 달리 명시되지 않는 한 CO₂ 또는 1.0 M NaHCO₃을 첨가하여 ±0.03 pH 단위의 불감대와 함께 pH 설정점 7.00을 유지하였다.
- [0497] 공급 배지는 RF1.0 분말(SAFC, Cat. No. CR60112), 글루코스, 글루타민, 아미노산, 및 염의 조합을 포함하였다. 상기 공급 배지는 용액으로 제조하고, 3일, 6일 및 9일에 각각 작업 배양 부피의 약 10 부피%의 양으로 배양물에 첨가하였다.
- [0498] 글루코스 농도를 약 ≥ 4 g/l로 유지하기 위해, 추가 글루코스 공급 용액을 제조하고 4~14일 동안 배양물에 첨가하였다.
- [0499] 오프라인 분석을 위해 매일 주사기로 생산 세포 배양 샘플을 채취하였다. 생산 기간은 일반적으로 약 14일 동안 지속되었다. 세포 농도 및 생존율은 CEDEX 기기(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 트립판 블루 배제 방법으로 측정하였다. 코바스 인테그라® 400 플러스(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 글루코스, 글루타민, 글루타메이트, 젖산염, 암모늄 및 생성물 농도에 대한 오프라인 측정을 실시하였다. 용존 이산화탄소는 코바스 b221 분석기(로슈 디아그노스틱스 리미티드, CH-6343, 스위스 로트크로이즈 소재)로 분석하였다. 삼투압 농도는 오스모멧 자동 삼투압계(고노텍 GmbH, 독일 베를린 소재)의 어논점 내림으로 측정하였다.
- [0500] 본 배양 생산 공정이 끝나면, 원심분리를 통해 세포 배양액을 수집하였다. 상청액을 단백질-A로 소규모 mAb 정제에 추가로 적용하였다. 정제된 mAb의 당화 패턴을 2AB로 분석하였다.
- [0501] 도 10a-도 10e는 G0 형태의 항 α-시누클레인 항체 L971, G1 형태의 항 α-시누클레인 항체 L971, G2 형태의 항 α-시누클레인 항체 L971, 생성물 역가 및 세포 성장(IVCD)에 대한 상이한 L-시스틴 농도의 효과를 도시한다.
- [0502] 도 10a는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 G0 형태의 항 α-시누클레인 항체 L971이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 3% 높음을 도시한다.
- [0503] 도 10b는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 G1 형태의 항 α-시누클레인 항체 L971이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 2% 낮음을 도시한다.
- [0504] 도 10c는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 G2 형태의 항 α-시누클레인 항체 L971이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정과 비슷함을 도시한다.
- [0505] 도 10d는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 생산물 역가가 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약 30% 낮음을 도시한다.

- [0506] 도 10e는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 2 mM L-시스틴이 있는 공정에서 세포 성장이 생산 배지의 4 mM L-시스틴이 있는 공정과 비슷함을 도시한다.
- [0507] 실시예 8: L-시스테인 또는 L-시스틴을 이용한 공정에서 생산된 재조합 항인간 α -시누클레인 항체 L971의 기능적 비교
- [0508] 본 실시예에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 유래된 세포주인 CHO K1M을 숙주 세포주로 사용하였다(WO2009047007). 상기 CHO K1M 세포는 항 인간 α -시누클레인 단일클론 항체(US9670274B2 및 US9890209B9에 기재됨)를 발현하도록 조작되었으며, 이는 본원에서 CHO L971 세포주로 지정된 단량체 또는 올리고머 인간 α -시누클레인에 결합한다.
- [0509] 인간 α -시누클레인은 원섬유형 응집체를 형성할 수 있으며, 이러한 응집체는 루이소체와 루이 신경돌기의 주성분이다. 최근의 과학적 연구에 따르면, 알파-시누클레인의 원섬유형 올리고머가 파킨슨병의 진행에 핵심적인 기여자가 될 수 있다(Luk et al., 2012). 특이적 항체 L971은 세포의 α -시누클레인에 특이적으로 결합할 수 있고 세포간 응집체 전달 및 파킨슨병의 진행을 예방하는데 사용할 수 있다.
- [0510] 세포 배양 공정의 경우, 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L965 세포를 배양하기 위한 기본 배지로서 사용되었다. 해동 후, 상기 세포를 5 μ g/mL 퓨로마이신(퓨로마이신-솔루션, 인비보젠 S.A.S., 프랑스, Cat. No. ANT-PR)의 존재하에 3~4일의 일정으로 진탕 플라스크에서 상기 배지에서 계대배양하였다. 계대배양 조건은 쿠너 셰이커 X 플랫폼(아돌프 쿨너 AG, 비르스펠덴, 스위스 바젤 소재)을 사용하여 125 mL 및 500 mL 플라스크에 대해 36.5°C, 7% CO₂ 및 160 rpm이었다.
- [0511] 접종 트레인 및 생산 공정의 경우, 다른 맞춤형 버전의 무혈청, 화학적으로 정의된 배지가 L971 세포를 증식하기 위한 기본 배지로서 사용되었다.
- [0512] 상기 생산 배지를 준비하는 동안, 추가 글루코스, 글루타민, 아미노산, 미량 원소(RTE1.2 솔루션, 킵코, UK; 참조 번호 043-90585H), 및 염을 또한 포함하였다. 사용하기 전에, 배지 중 L-시스틴(L-시스틴 이나트륨 염 일수 화물; SAFC, 공급업체 품목 번호 RES1523C-A154X)의 최종 농도를 배지의 일 부분에서 3 mM로 조정하였다. 직접적인 비교를 위해, 배지 내 L-시스테인의 최종 농도는(메르크 케미칼스 GmbH, Cat. No.: 1.02735.1000) 배지의 다른 부분에서 6 mM로 조정하였다.
- [0513] 사전 배양된 세포를 사용하여 미리 정의된 양의 L-시스틴 또는 L-시스테인을 각각 함유하는 제조된 생산 배지와 나란하게 약 3.0×10^5 세포/mL로 N-2 단계 및 약 5.0×10^5 세포/mL로 N-1 단계를 접종하였다. 생산 생물반응기는 각각 미리 정의된 양의 L-시스틴(3 mM) 또는 L-시스테인(6 mM)인을 함유하는 배지에 약 10.0×10^5 개 세포/mL로 접종하였다. 세포는 미리 정의된 pH, 용존 산소, 온도 및 영양 공급 전략이 있는 유가식 배양 조건하에 생산 생물반응기에서 배양하였다. 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 초기 배양 부피가 1.2 L인 2 L 생물반응기를 사용하였다. 초기 배양 부피가 200 mL인 Ambr-250 생물반응기를 사용하였다.
- [0514] 생물반응기의 온도는 36.5°C로 제어하고 교반기 속도는 약 223 rpm으로 설정하였다. 공기, CO₂ 및 O₂를 함유하는 가스 혼합물이 제공되었다. 용존 이산화탄소 농도(dCO₂)는 하루에 한 번 오프라인으로 측정하였다. 용존 산소 농도(DO)를 온라인으로 제어하고 기체 혼합물의 산소 분압을 변화시켜 35%로 조정하였다. pH는 달리 명시되지 않는 한 CO₂ 또는 1.0 M NaHCO₃을 첨가하여 ± 0.03 pH 단위의 불감대와 함께 pH 설정점 7.00을 유지하였다.
- [0515] 공급 배지는 자체 배지와 글루코스, 글루타민, 아미노산 및 염의 조합을 포함하였다. 상기 공급 배지는 용액으로 제조하고, 3일, 6일 및 9일에 각각 작업 배양 부피의 약 10 부피%의 양으로 배양물에 첨가하였다.
- [0516] 글루코스 농도를 약 ≥ 4 g/l로 유지하기 위해, 추가 글루코스 공급 용액을 제조하고 4~14일 동안 배양물에 첨가하였다.
- [0517] 오프라인 분석을 위해 매일 주사기로 생산 세포 배양 샘플을 채취하였다. 생산 기간은 일반적으로 약 14일 동안 지속되었다. 세포 농도 및 생존율은 CEDEX 기기(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 트립판 블루 배제 방법으로 측정하였다. 코바스 인테그라® 400 플러스(로슈 디아그노스틱스 GmbH, 독일)를 사용하여 글루코스, 글루타민, 글루타메이트, 젖산염, 암모늄 및 생성물 농도에 대한 오프라인 측정을 실시하였다. 용존 이산화탄소는 코바스 b221 분석기(로슈 디아그노스틱스 리미티드, CH-6343, 스위스 로트크로이츠 소재)로 분석하였다. 삼투압 농도는 오스모멧 자동 삼투압계(고노텍 GmbH, 독일 베를린 소재)의 어는점 내림으로 측정하였다.

- [0518] 본 배양 생산 공정이 끝나면, 원심분리를 통해 세포 배양액을 수집하였다. 상청액을 단백질-A로 소규모 mAb 정제에 추가로 적용하였다. 정제된 mAb의 당화 패턴을 2AB로 분석하였다.
- [0519] 신생아 Fe 수용체(FcRn)는 초기 엔도솜에서 항체를 회수하고 다시 재순환시키는 이의 능력에 의해 IgG형 항체의 약동학(PK) 프로파일에 영향을 미친다. FcRn과의 상호작용은 IgG형 치료 항체의 PK를 결정하는 데 가장 중요한 요소로 간주되며 제거를 위한 대리로서 간주된(Nimmerjahn and Ravetch 2008의 검토를 참조).
- [0520] Fc γ -수용체는 면역 효과기 세포에 대한 효과기 기능의 매개체이다. 상이한 인간 Fc γ -수용체 중에서, Fc γ -RIIa는 항체 의존성 식균 작용(ADCP)을 매개하는 지배적인 인자로 간주된다. Fc γ -RIIa의 가장 널리 퍼진 두 동종형 중, 아미노산 위치 131(H131)에 히스티딘이 있는 형태는 종종 더 높은 친화도 동종형으로 묘사된다. (Nimmerjahn and Ravetch 2008, Yamada et al. 2013)
- [0521] 여기서, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의한 FcRn 및 Fc γ 11a(His131)에 대한 소규모 정제된 aSyn-L971-mAb 샘플의 상대적 결합을 결정하였다. 표적에 대한 소규모 정제된 aSyn-L971-mAb 샘플의 상대적 결합을 ELISA에 의해 결정하였다.
- [0522] 도 11a-도 11e는 각각 세포 배양 배지에서 3 mM L-시스틴 또는 6 mM L-시스테인과 세포 배양 공정에서 생성된 aSyn-L971 항체의 직접적인 비교를 도시한다.
- [0523] 도 11a는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G1 형태의 항 α -시누클레인 항체 L971이 생산 배지의 3 mM L-시스틴이 있는 공정보다 약간만 더 높음을 도시한다.
- [0524] 도 11b는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 G2 형태의 항 α -시누클레인 항체 L971이 생산 배지의 3 mM L-시스틴이 있는 공정과 비슷함을 도시한다.
- [0525] 도 11c는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 항 α -시누클레인 항체 L971의 경우(약 118%의 상대 수준) 생산 배지에 3 mM L-시스틴이 있는 공정에서 항 α -시누클레인 항체 L971의 경우(약 85%의 상대 수준)보다 약 33% 더 높은 FcRn 상대 결합 수준이 관찰됨을 도시한다.
- [0526] 도 11d는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 항 α -시누클레인 항체 L971의 경우(약 113%의 상대 수준) 생산 배지에 3 mM L-시스틴이 있는 공정에서 항 α -시누클레인 항체 L971의 경우(약 77%의 상대 수준)보다 약 36% 더 높은 Fc γ -RIIa(H131) 상대 결합 수준이 관찰됨을 도시한다.
- [0527] 도 11e는 14일의 생산 공정이 끝날 때 생산 배지에 6 mM L-시스테인을 갖는 공정에서 항 α -시누클레인 항체 L971의 경우(약 118%의 상대 수준) 생산 배지에 3 mM L-시스틴이 있는 공정에서 항 α -시누클레인 항체 L971의 경우(약 83%의 상대 수준)보다 약 35% 더 높은 표적 상대 결합 수준이 관찰됨을 도시한다.

표 1 - 실험 결과 요약

번호	항체	설명	G0 의 상대 수준 (14 일째) (%)	G1 의 상대 수준 (14 일째) (%)	G2 의 상대 수준 (14 일째) (%)	상대 역가 (14 일째) (%)	FcRn 결합의 상대적 수준 (14 일째) (%)	FcγRIIa 결합의 상대적 수준 (14 일째) (%)	표적 결합의 상대적 수준 (14 일째) (%)	IVCD 의 상대 수준 (14 일째) (%)
실시예-3	항 α-시누클레인 L965(6 mM Cys)	항 α-시누클레인 L965(6 mM Cys)	55.3	31.2	8.4	173.2	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	377.1
		항 α-시누클레인 L965(10 mM Cys)	71.7	17.2	3.1	100.0	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	100.0
실시예-4 (T 세포 이종특이적)	항 CD20-CD3 TCB (5 mM 시스테인)	항 CD20-CD3 TCB (5 mM 시스테인)	71.6	26.0	측정되지 않음	165.9	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	183.5
		항 CD20-CD3 TCB (10 mM 시스테인)	75.9	22.6	측정되지 않음	100.0	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	100.0
실시예-5	항 CD20-CD3 TCB (5 mM 시스테인)	항 CD20-CD3 TCB (5 mM 시스테인)	70.1	28.0	측정되지 않음	167.0	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	179.1
		항 CD20-CD3 TCB (10 mM 시스테인)	73.2	25.5	측정되지 않음	100.0	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	100.0
실시예-6	항 α-시누클레인 L967(2 mM 시스테인)	항 α-시누클레인 L967(2 mM 시스테인)	71.1	21.8	3.1	91.1	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	96.3
		항 α-시누클레인 L967(4 mM 시스테인)	64.0	27.8	4.7	100.0	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	100.0
실시예-7	항 α-시누클레인 L971(2 mM 시스테인)	항 α-시누클레인 L971(2 mM 시스테인)	65.6	25.5	4.2	69.5	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	101.4
		항 α-시누클레인 L971(4 mM 시스테인)	63.5	27.2	4.4	100.0	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	100.0
실시예-8	항 α-시누클레인 L971(3 mM 시스테인)	항 α-시누클레인 L971(3 mM 시스테인)	68.5	25.4	3.5	101.3	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	83.0
		항 α-시누클레인 L971(6 mM 시스테인)	66.6	27.2	4.6	100.0	측정되지 않음	측정되지 않음	측정되지 않음	100.0

표 2

[0529]

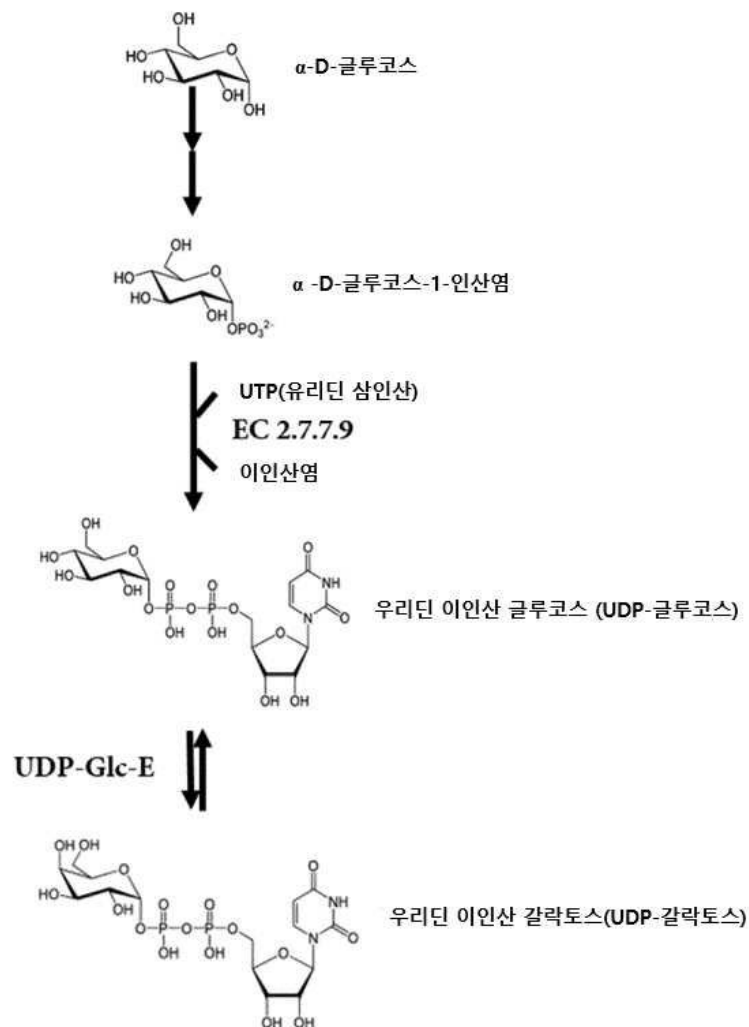
서열 식별	서열 및 서열식별번호(서열번호)
CHO K1M에서 UDP-글루코스 4-에피머화 효소의 cDNA 서열	atg gcc gag aag gtg ctg gtc aca ggc gga gct ggc tac att ggc agc cac acg gta ctg gag ctg ctg gag gca ggc tac gcc cct gtg gtc atc gac aac ttc cat aat gcc att cgt gga ggg gat tcc atg cct gag agc ctg cgg cgg gtc cag gaa ctg aca ggc cgc tct gtg gag ttt gag gag atg gac atc ttg gac cag gca gcg cta cag cac ctc ttt aag aag cac agc ttt aag gct gtc atc cac ttt gct ggg ctc aag gct gtg ggc gag tcg gtg cag aag cct ctg gat tat tat aga gtt aac cta aca ggg acc atc cag ctt ctg gag atc atg agg gcc cac ggg gtg aag aat ctc gtg ttc agc agc tca gcc acc gtg tat ggg aat ccc cag tac ctg cct ctg gat gag gcc cac ccc acc ggg ggt tgt acc aac ccc tat gga aag tcc aag ttc ttc atc gag gag atg gtc cgg gac ctg tgc cgg gca gat tcg gcc tgg aac gca gtg ctg cta cgc tac ttc aat ccc acg ggt gcc cac gcc tct ggc cgc atc ggc gag gat ccc cag ggc gtc ccc aac aac ctc atg ccc tat gtc tcc cag gtg gca att ggg cga cga gag gcc ctg aat gtc ttt ggt ggt gac tat gat aca gag gat ggc aca ggt gta agg gat tac att cat gtg gtg gat ctg gcg aag ggc cac atc gcc cct ttg aag aag ctg aag gag caa tgt ggt tgc cgg atc tac aac ctg ggc aca ggc aca ggc tac tct gtc ctg cag atg gtc caa gca atg gag aag gct tca ggg aag aag atc cca tac aag gtg gtg gca cgg cgg gaa ggt gac gtg gca gcc tgt tat gcc aac ccc agc ctg gcc cat gag gag ctg ggc tgg aca gca gcc ttg ggg ctg gac agg atg tgt gaa gat cta tgg cgc tggcag aag cag aac cct tca ggc ttt gga gca cag gcc taa (서열번호 1)
CHO K1M에서 UDP-글루코스 4-에피머화 효소의 아미노산 서열	MAEKVLVTGGAGYIGSHTVLELLEAGYAPVVIDNFHNAIRGGDSMPESLRRVQELTGRSVEFEEMDILDQ AALQHLFKKHSFKAVIHFAGLKAVGESVQPLDYRYRVNLGTITQLLEIMRAHGKVLNLFSSSATVYGNPQ YLPDEAHTPGGCTNPYKSKFFIEEMVRDLCRADSAWNAVLLRYFNPTGAHAGSRIGEDPQGVNNLMP YVSQVAIGRREALNVFGGDYDTEGTGVRDYIHVVDLAKGHI AALKLKEQCGCRIYNLTGTGTGYSVLQM VQAMEKASGKKIPYKVVARREGDVAACYANPSLAHEELGWTAAALGLDRMCEDLWRWQKQNP SGFGAQA (서열번호 2)
UDP- α-D-글루코스: α-D-갈락토스-1-인산염의 cDNA 서열 CHO K1M의 우리디틸 전달 효소	atg tcg caa aac gga gat gat cct gag cag cgc cag cag gcg tca gag gcg gac gcc atg gca gcg acc ttc cgg gcg agc gaa cac cag cat att cgc tac aat ccg ctc cag gat gag tgg gtg tta gtg tcg gcc cat cgc atg aag cgg ccc tgg caa gga caa gtg gag ccc cag ctt ctg aag aca gcg ccc cgc tat gac cca ctc aac cct ctg tgt ccc ggg gcc aca cga gcc aat ggc gag gtg aat cca cac tat gac agc acc ttc ctg ttt gac aat gac ttc cca gct ctg cag ccc gat gct ccg gat cca gga ccc agt gac cat cct ctt ttt cga gca gag gcg gcc aga gga gtt tgt aag gtc atg tgc ttc cat ccc tgg tcg gat gtg aca ctg cca ctc atg tca gtc cct gag atc cga gct gtc atc gat gcc tgg gct tca gtc acc gag gat ctg ggt gcc cag tat cct tgg gtg cag atc ttt gaa aac aaa gga gcc atg atg ggc tgt tct aac ccc cac ccc cac tgc cag gtt tgg gcc agc agt ttc ctg cca gat att gcc cag cgt gaa gtg cga tcc cag cag aac tat cac agc cag cat gga gaa cct ctg tta ctg gaa tat ggc cgc caa gaa ctc ctc agg aag gaa cgt ctg gtc tta tct agt gag cac tgg cta gtc ctg gtt ccc ttc tgg gca gtg tgg gct ttc cag aca cta ctg ctg ccc cgc cgg cat gta cgt cgg cta cct gag ctg acc cct gct gaa cgt gat gat cta gcc tcc atc atg aag aag cta ttg acc aag tat gac aac cta ttt gag aca tct ttt ccc tac tcc atg ggc tgg cat ggg gct ccc acg gga tta aag act gga gcc gcc tat gac cac tgg cag cta cat gct cat tac tat ccc cca ctc ctg cgc tct gct act gtc cgg aaa ttc atg gtt ggc tat gaa atg ctt gcc cat ggg cac cgg gac ctc act cct gaa cag gct gca gag aga cta agg gcg ctt cct gag gta cat tat tgc ctg gca aag aaa gac aag gaa aca gca gct gtt gct tga (서열번호 3)
UDP- α-D-글루코스: α-D-갈락토스-1-인산염의 아미노산 서열 CHO K1M의 우리디틸 전달 효소	MSQNGDDPEQRQQAASEADAMAATFRASEHQHIRYNPLQDEWVLVSAHRMKRPWQGQVEPQLLKTVPYRDP LNPLCPGATRANGEVNPHYDSTFLFDNDFPALQPDAPDPGPSDHPLFRAEAARGVCKVMCFHPWSDVTLP LMSVPEIRAVIDAWASVTEDLGAQYPWVQIFENKGAMMGCSNPHPHCQVWASSFLPDIAQREVRSQQNYH SQHGEPLLEYGREQELLRKERVLSSEHWLVLPFVAVWAFQTLTLLPRRHVRRLPELTPAERDDLASIMK KLLTKYDNLFETSFYPYSGWHGAPTGLKTAAYDHWQLHAHYYPPLRSATVRKFMVGYEMLAHGHRDLT PEQAAERLRALPEVHYCLAKKDKETAAVA (서열번호 4)
정방향 프라이머 UDP_GlcE-F2-21	atggccgaga aggtgctggt c (서열번호 5)
역방향 프라이머 UDP_GlcE-R21	ttaggcctgt gctccaaagc c (서열번호 6)
정방향 프라이머 UDP-Gal-T-F2-21	atgtcgcaaa acggagatga t (서열번호 7)
역방향 프라이머 UDP-Gal-T-R18	tcaagcaaca gctgctgt (서열번호 8)

천연 인간 야생형 알파-시누클레인의 아미노산 서열	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGAVATVAEKTKEQVTNVGGA VTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA (서열번호 9)
α-시누클레인; CDR1-중쇄(CDR-H1)	NYGMS (서열번호 10)
α-시누클레인; CDR2-중쇄(CDR-H2)	SISSGGGSTYYPDNVKG (서열번호 11)
α-시누클레인; CDR3-중쇄(CDR-H3)	GGAGIDY (서열번호 12)
α-시누클레인; CDR1-경쇄(CDR-L1)	KSIQTLTYSSNQKNYLA (서열번호 13)
α-시누클레인; CDR2-경쇄(CDR-L2)	WASIRKS (서열번호 14)
α-시누클레인; CDR3-경쇄(CDR-L3)	QQYYSYPLT (서열번호 15)
α-시누클레인; 중쇄 가변 도메인(VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASISSGGGSTYYPDNVKGRFTI SRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGAGIDYWGQGTLLTVSS (서열번호 16)
α-시누클레인; 경쇄 가변 도메인(VH)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSIQTLTYSSNQKNYLAWFQQKPGKAPKLLIYWASIRKSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDLATYYCQQYYSYPLTFGGGKLEIK (서열번호 17)
α-시누클레인; 중쇄 불변 도메인(CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT P EVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGEVFNHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP (서열번호 18)
α-시누클레인; 경쇄 불변 도메인(CL)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS SLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 19)
α-시누클레인; 중쇄(H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASISSGGGSTYYPDNVKGRFTI SRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGAGIDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GEVFNHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP (서열번호 20)
α-시누클레인; 경쇄(L)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSIQTLTYSSNQKNYLAWFQQKPGKAPKLLIYWASIRKSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDLATYYCQQYYSYPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (서열번호 21)
CD3; CDR1-중쇄(CDR-H1)	TYAMN (서열번호 22)
CD3; CDR2-중쇄(CDR-H2)	RIRSKYNNYATYYADSVKG (서열번호 23)
CD3; CDR3-중쇄(CDR-H3)	HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 24)
CD3; CDR1-경쇄(CDR-L1)	GSSTGAVTTSNYAN (서열번호 25)
CD3; CDR2-경쇄(CDR-L2)	GTNKRAP (서열번호 26)
CD3; CDR3-경쇄(CDR-L3)	ALWYSNLWV (서열번호 27)
CD3; 중쇄 가변 도메인(VH)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS (서열번호 28)
CD3; 경쇄 가변 도메인(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCGSSGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLG GKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKLTVL (서열번호 29)
CD3; 중쇄 불변 도메인(CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPK (서열번호 30)
CD3; 경쇄 불변 도메인(CL)	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS SLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 31)
CD3; 중쇄 불변 도메인(CD3 CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPK (서열번호 32)
CD3; 경쇄(CD3 VH-CL)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 33)
CD20; CDR1-중쇄(CDR-H1)	YSWIN (서열번호 34)
CD20; CDR2-중쇄(CDR-H2)	RIFPGDGDYDNGKFKG (서열번호 35)
CD20; CDR3-중쇄(CDR-H3)	NVFDGYWLVI (서열번호 36)
CD20; CDR1-경쇄(CDR-L1)	RSSKSLHSNGITYLY (서열번호 37)
CD20; CDR2-경쇄(CDR-L2)	QMSNLVS (서열번호 38)
CD20; CDR3-경쇄(CDR-L3)	AQNLELPYT (서열번호 39)

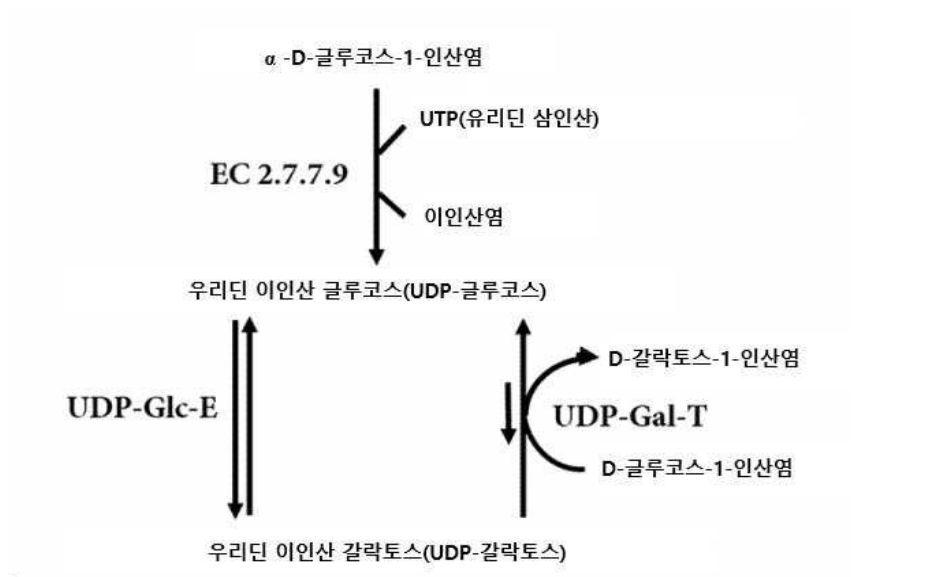
CD20; 중쇄 가변 도메인(VH)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS (서열번호 40)
CD20; 경쇄 가변 도메인(VL)	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCAQNLLELPYTFGGGKVEIKRTV (서열번호 41)
CD20; 중쇄 불변 도메인(CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPK (서열번호 42)
CD20; 경쇄 불변 도메인(CL)	AAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 43)
CD20; 경쇄(VL-CL)	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCAQNLLELPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 44)
CD20; 중쇄[CD20 VH-CH1(EE)-Fc (구멍, P329G LALA)]	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP (서열번호 45)
CD3; 중쇄[CD3 VL-CH1-Fc (돌기, P329G LALA)]	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP (서열번호 46)
CD20-CD3; 중쇄[CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (돌기, P329G LALA)]	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP (서열번호 47)

도면

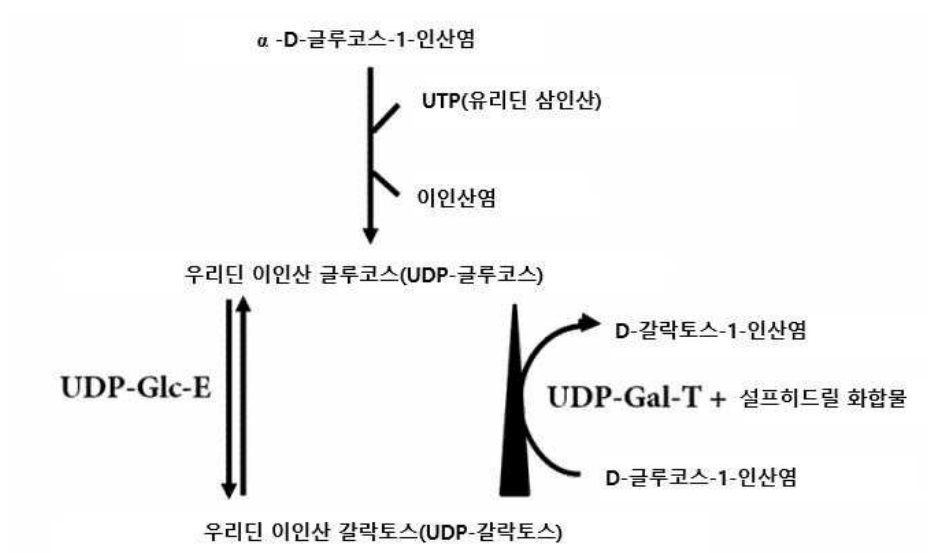
도면1



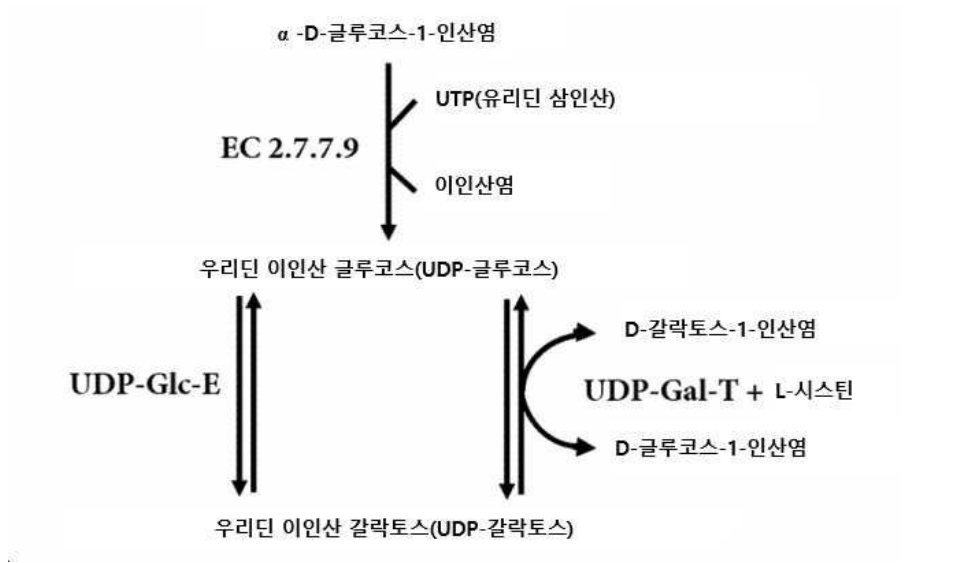
도면2



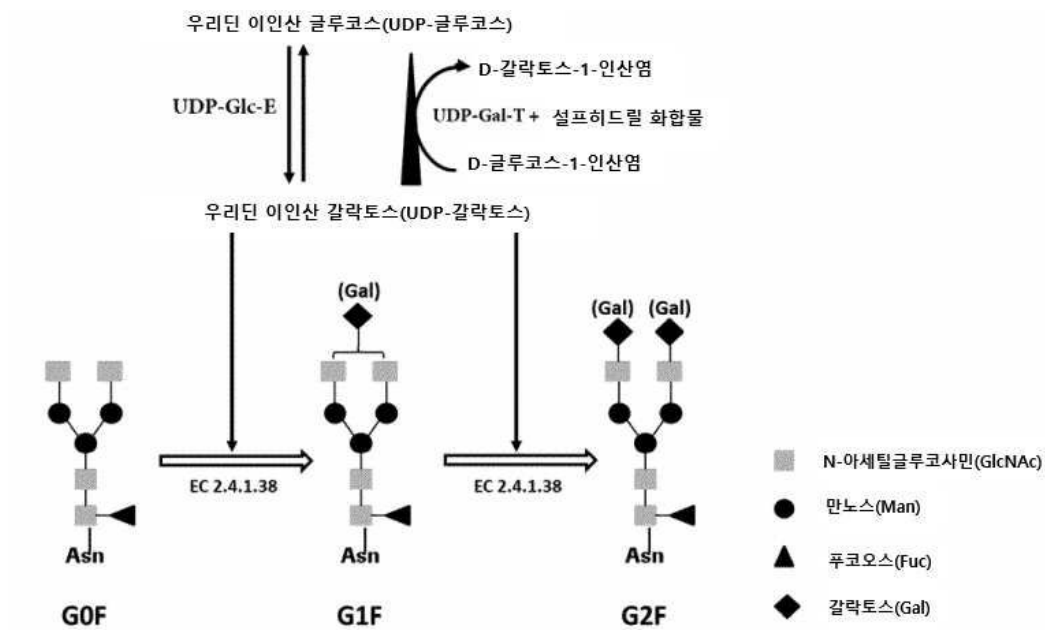
도면3



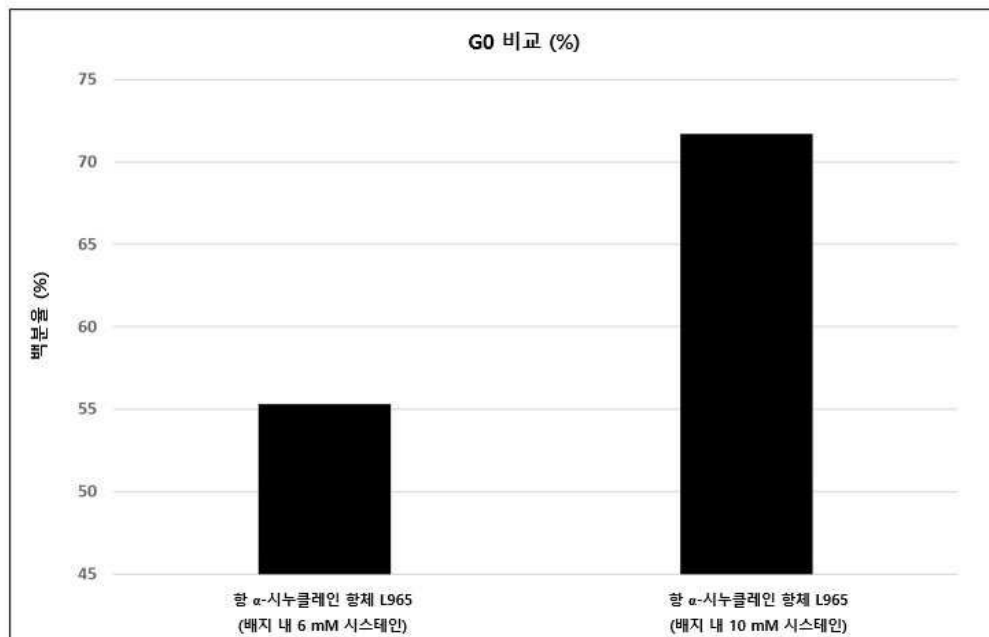
도면4



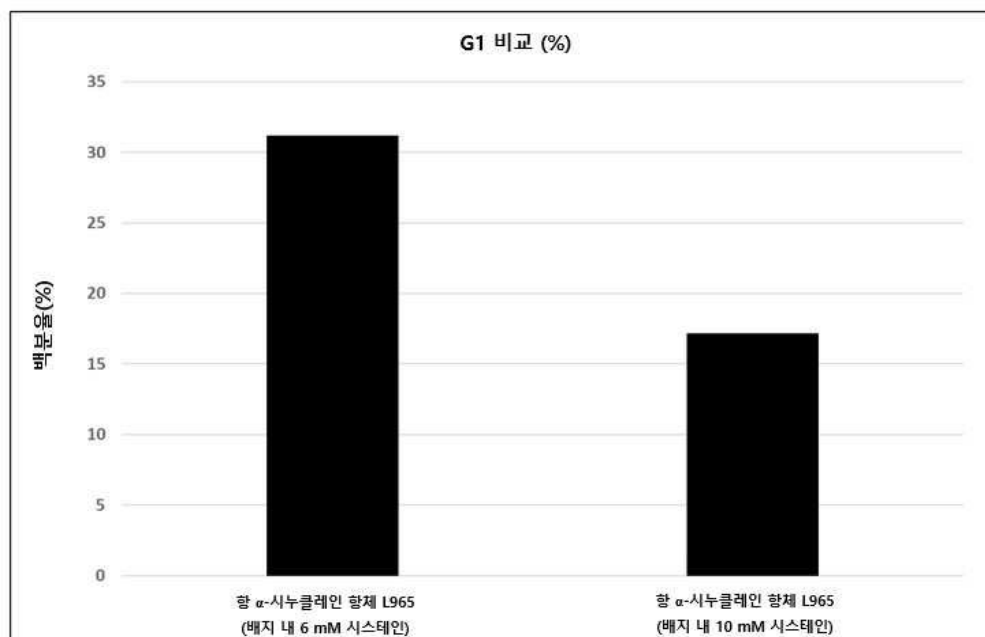
도면5



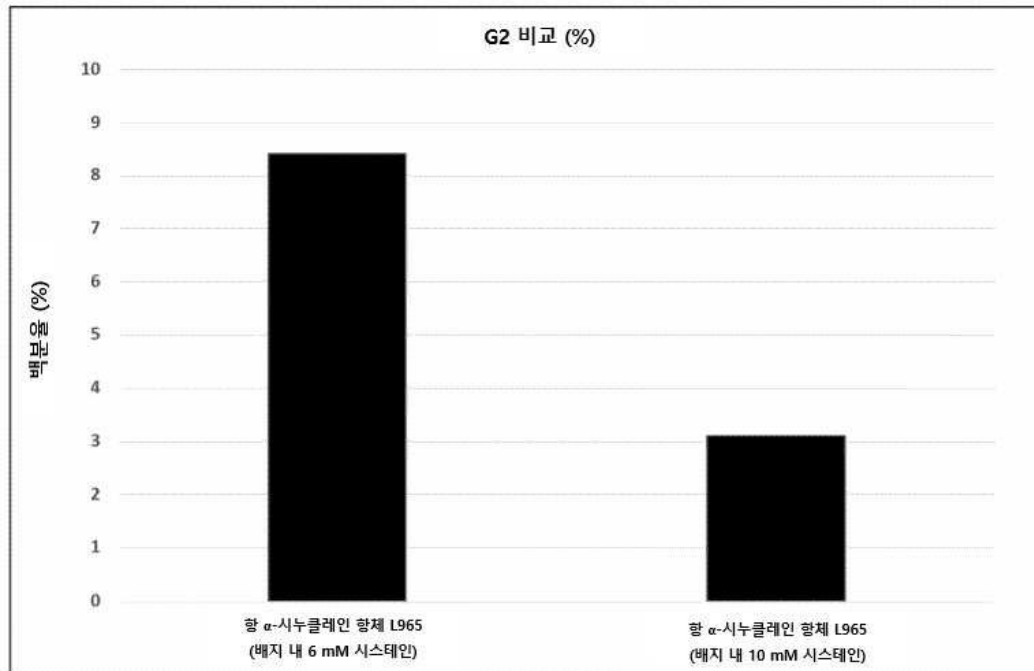
도면6a



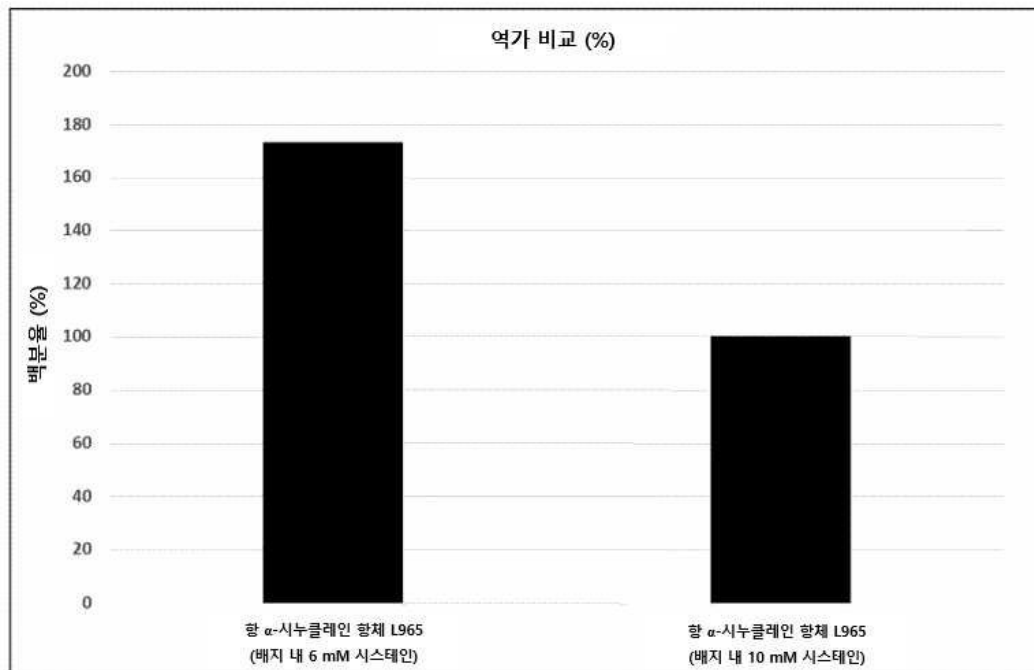
도면6b



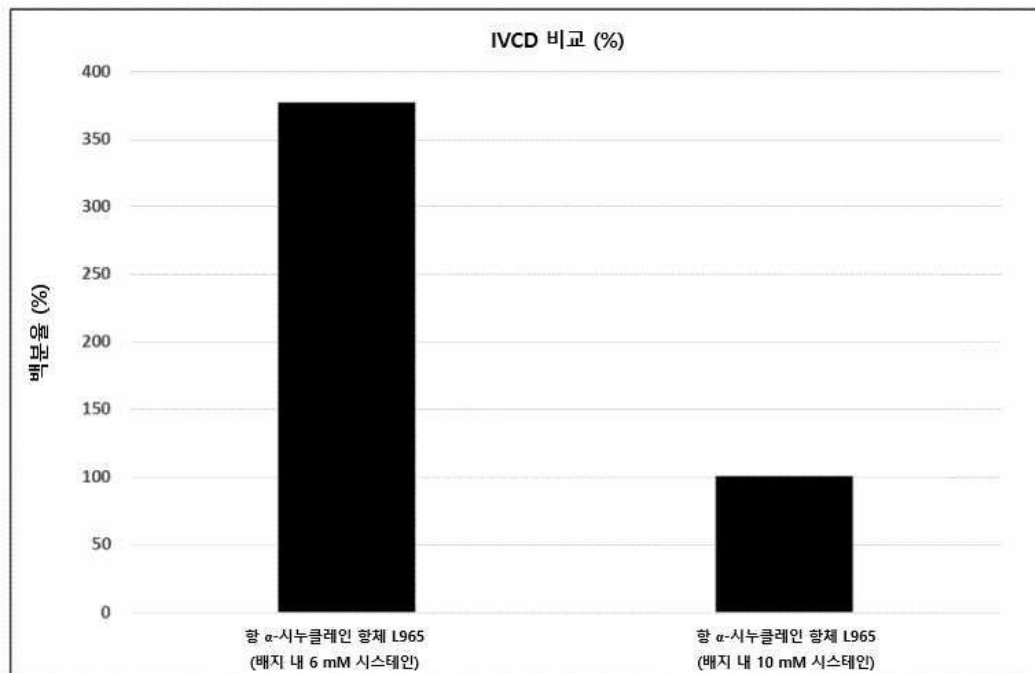
도면6c



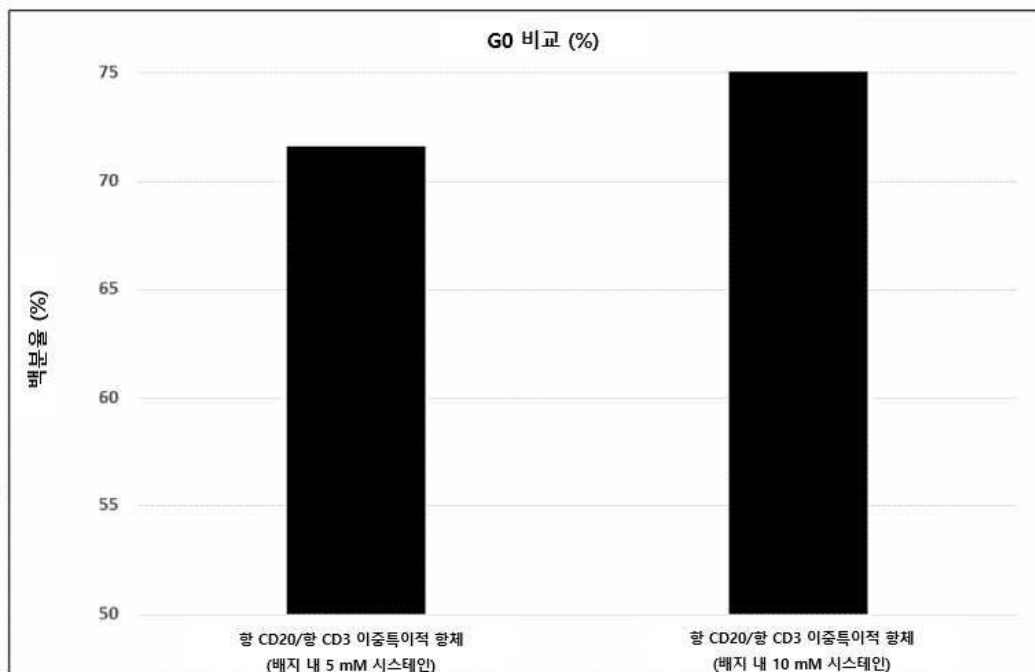
도면6d



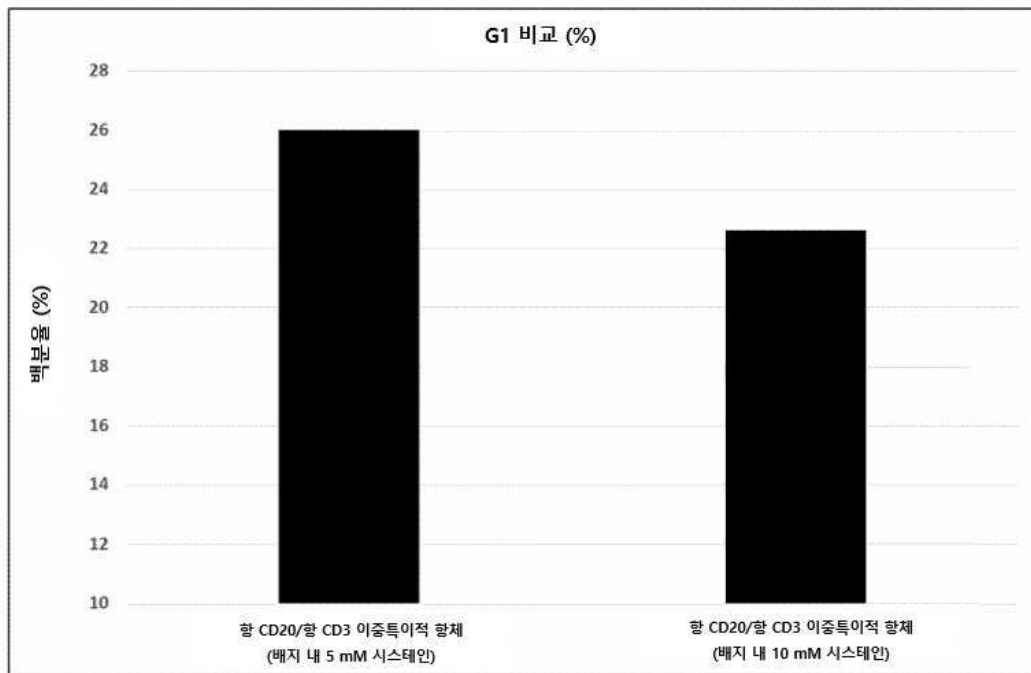
도면6e



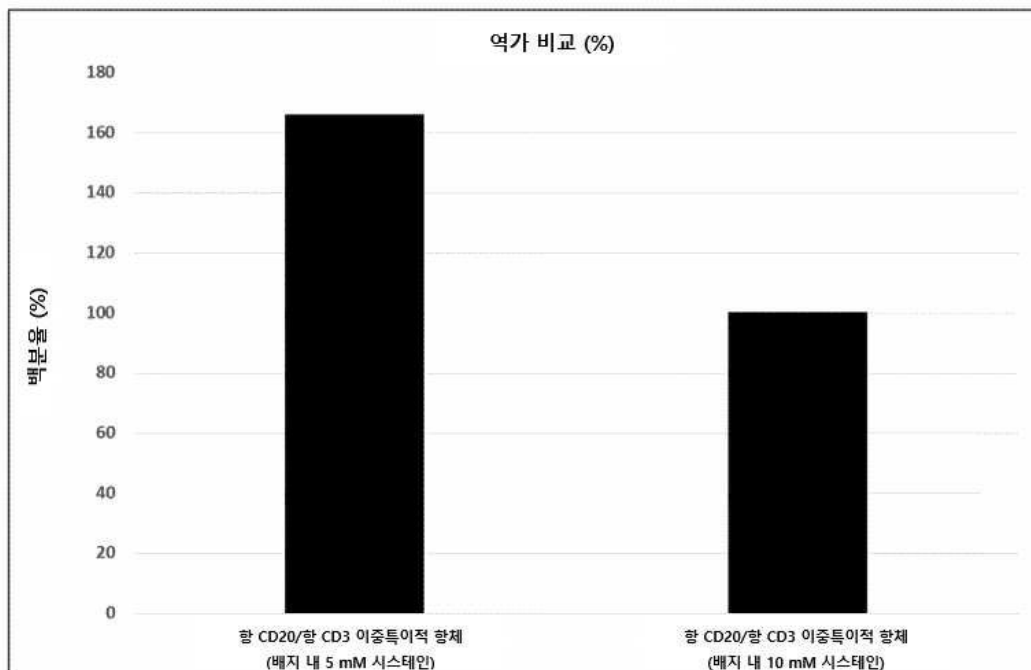
도면7a



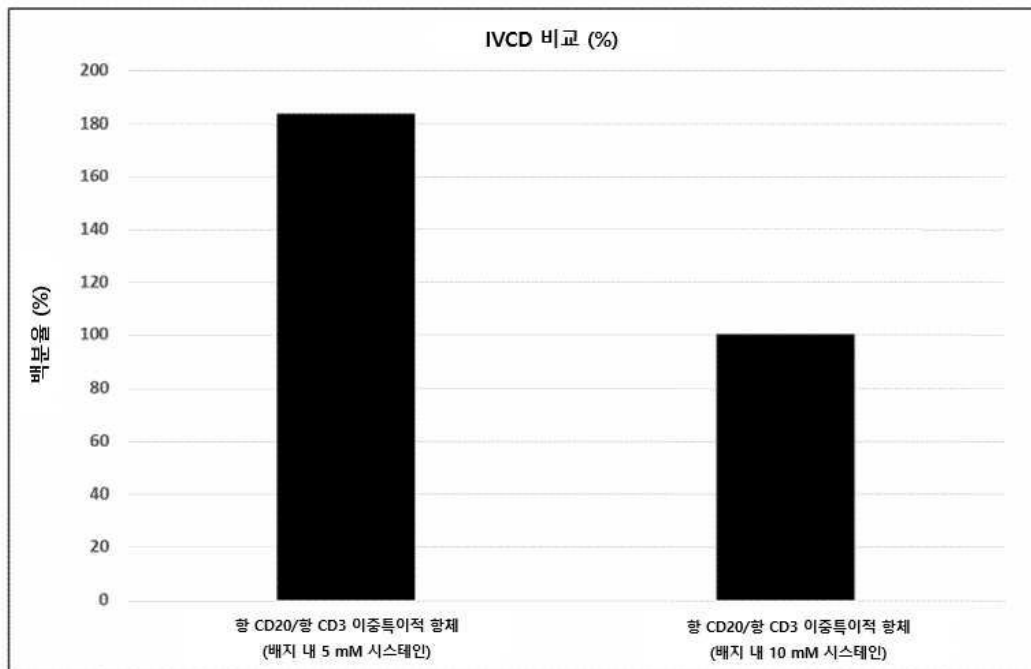
도면7b



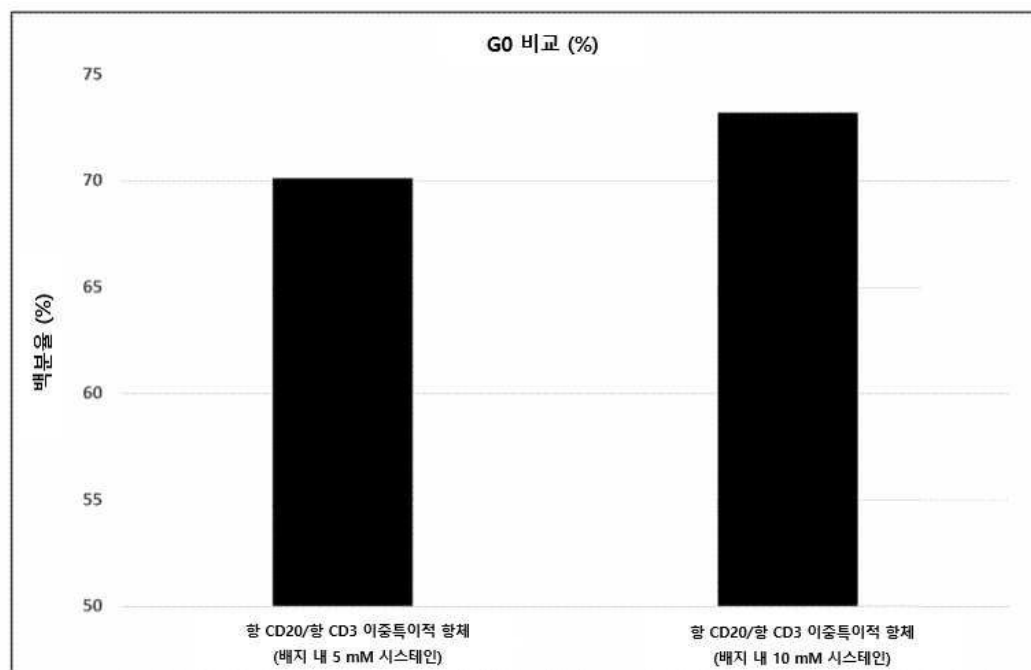
도면7c



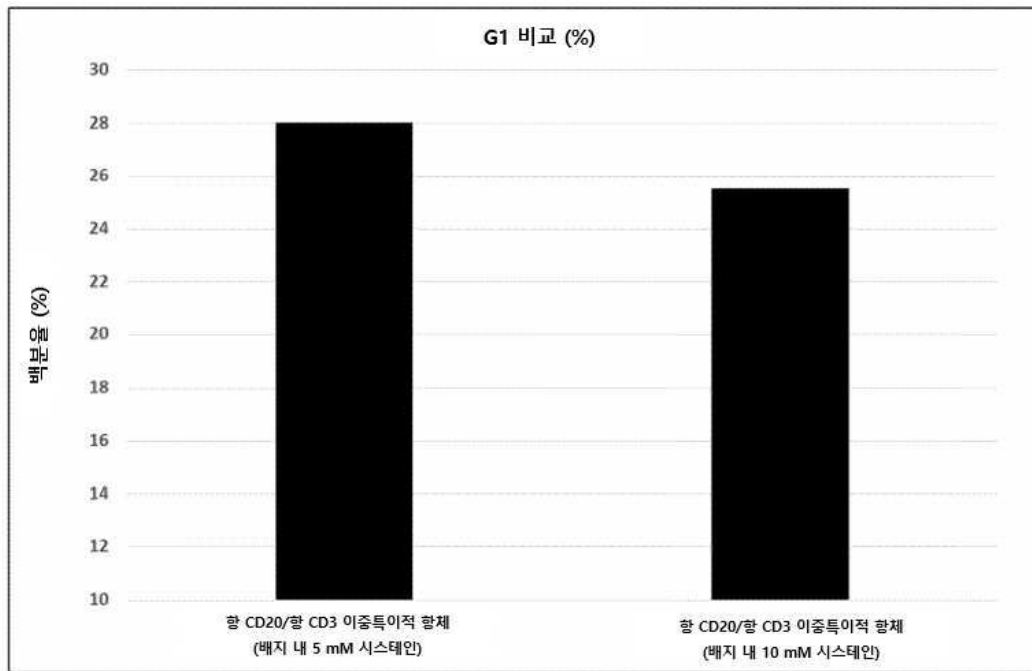
도면7d



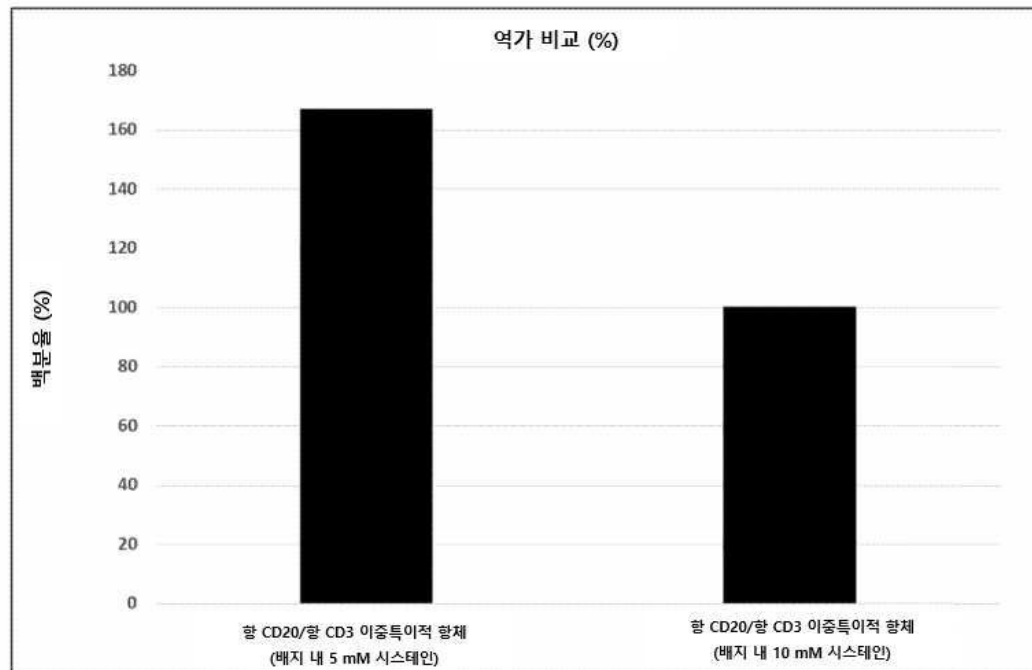
도면8a



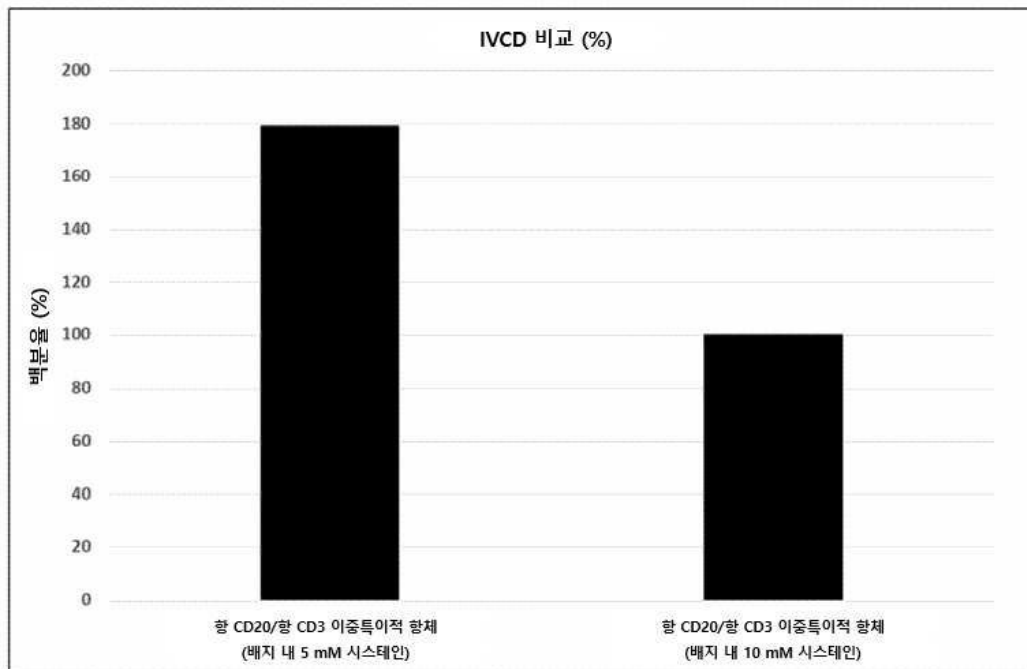
도면8b



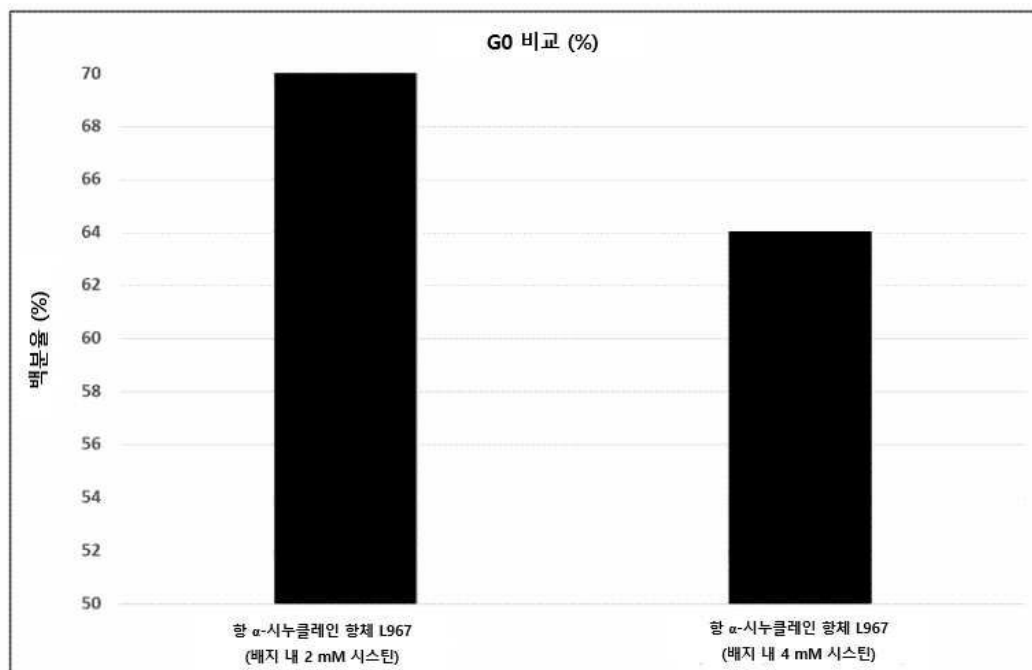
도면8c



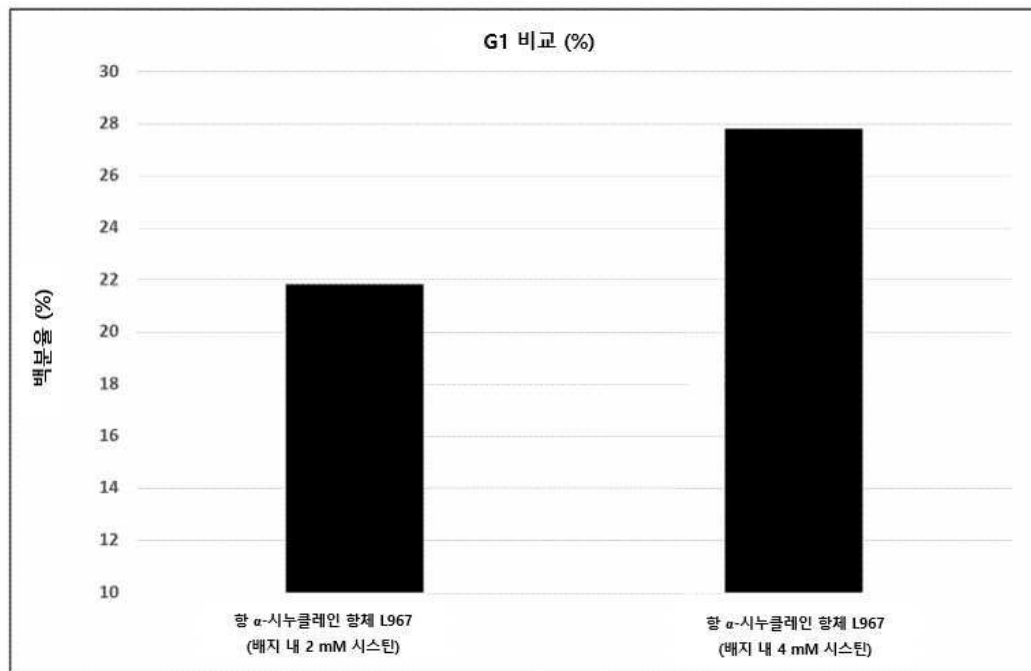
도면8d



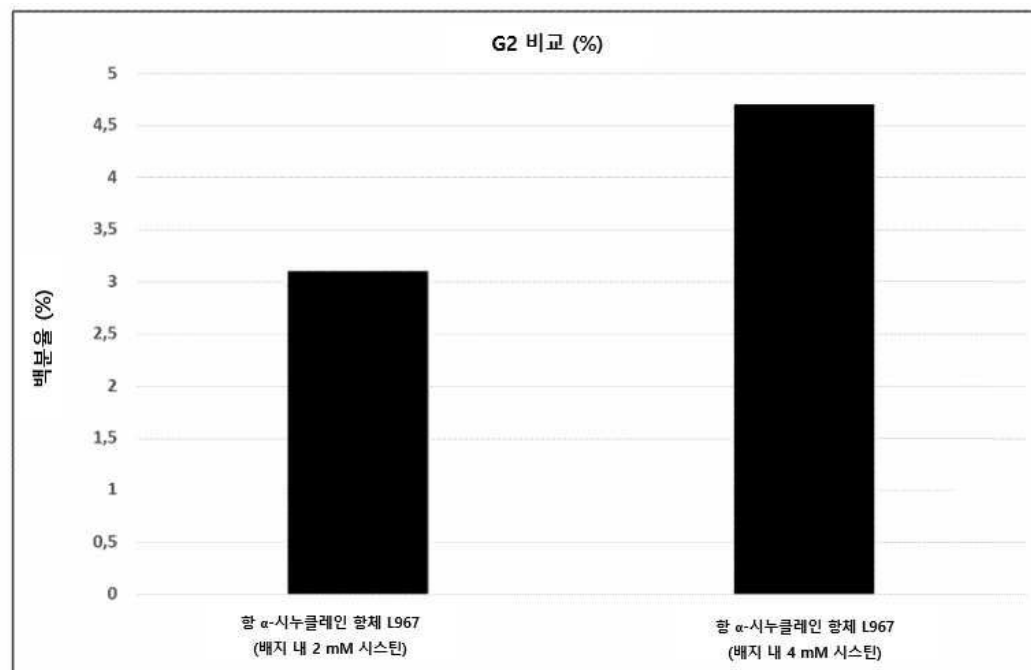
도면9a



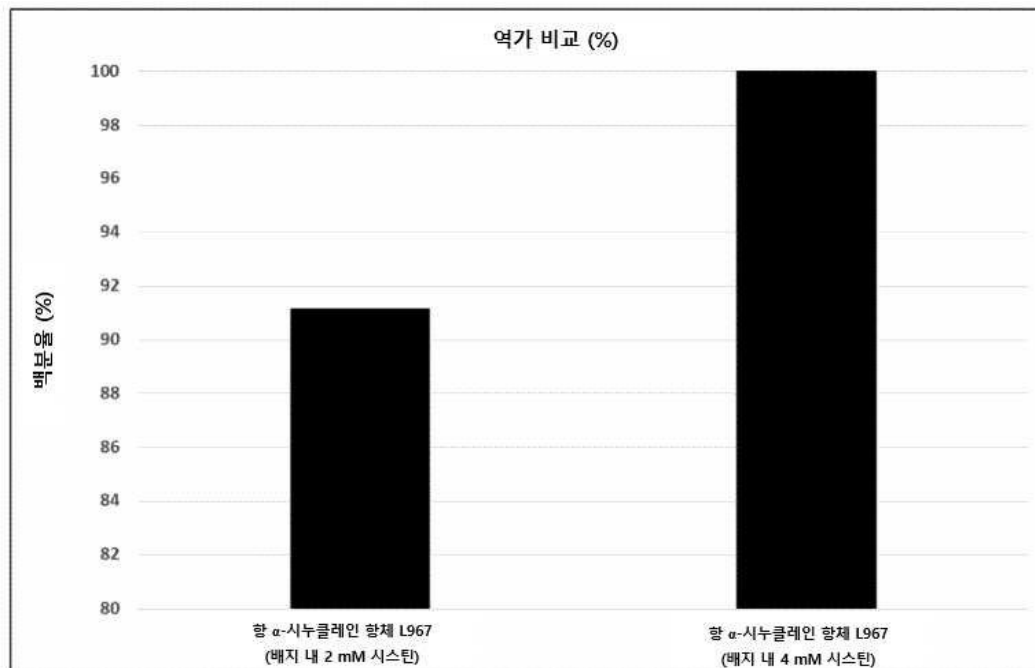
도면9b



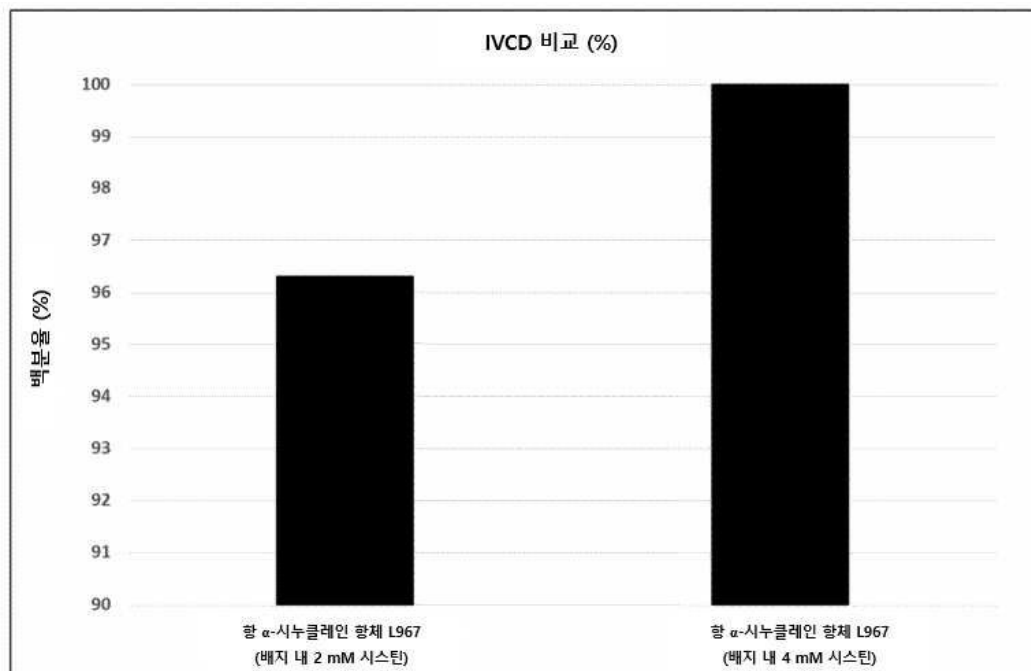
도면9c



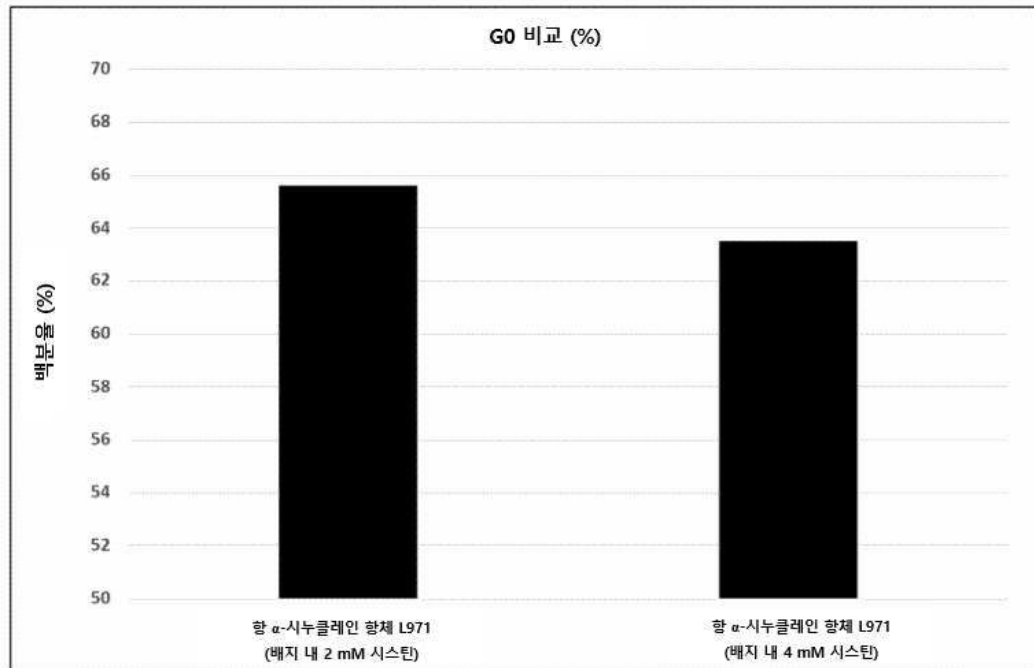
도면9d



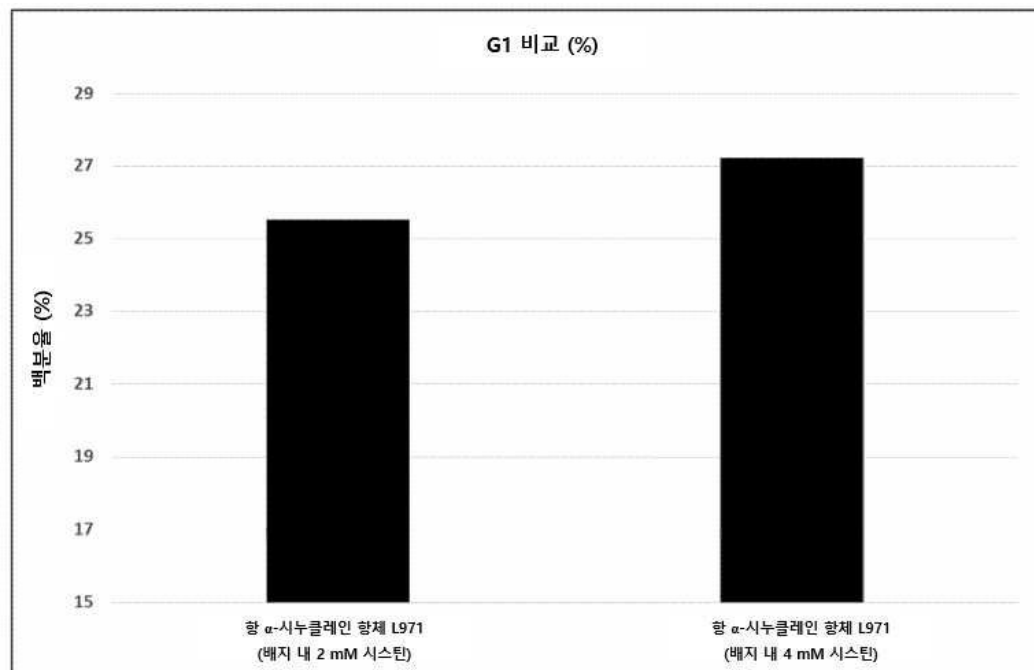
도면9e



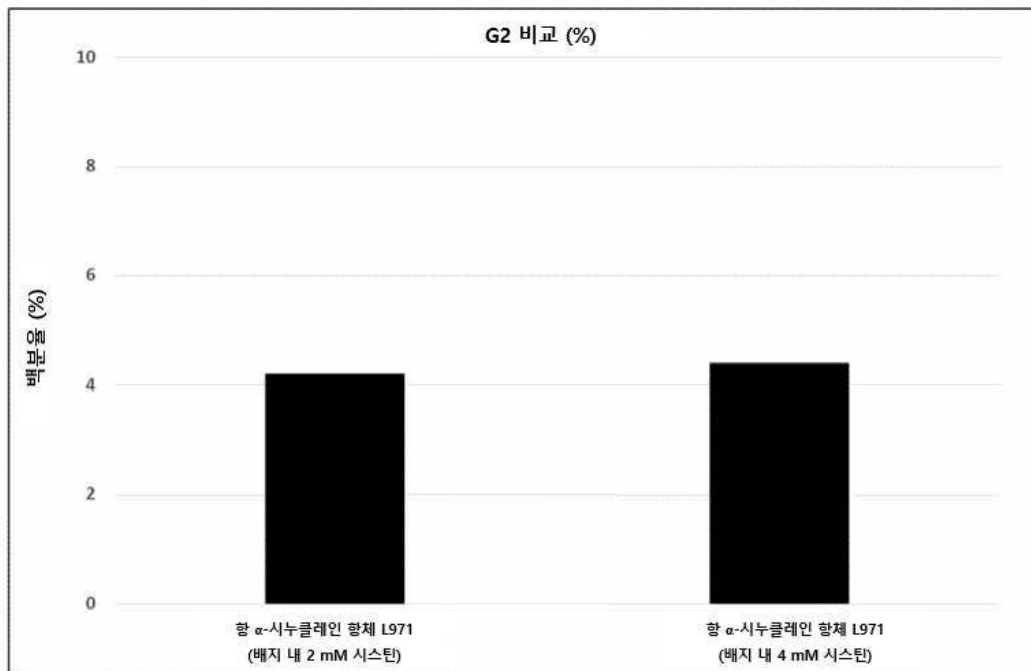
도면10a



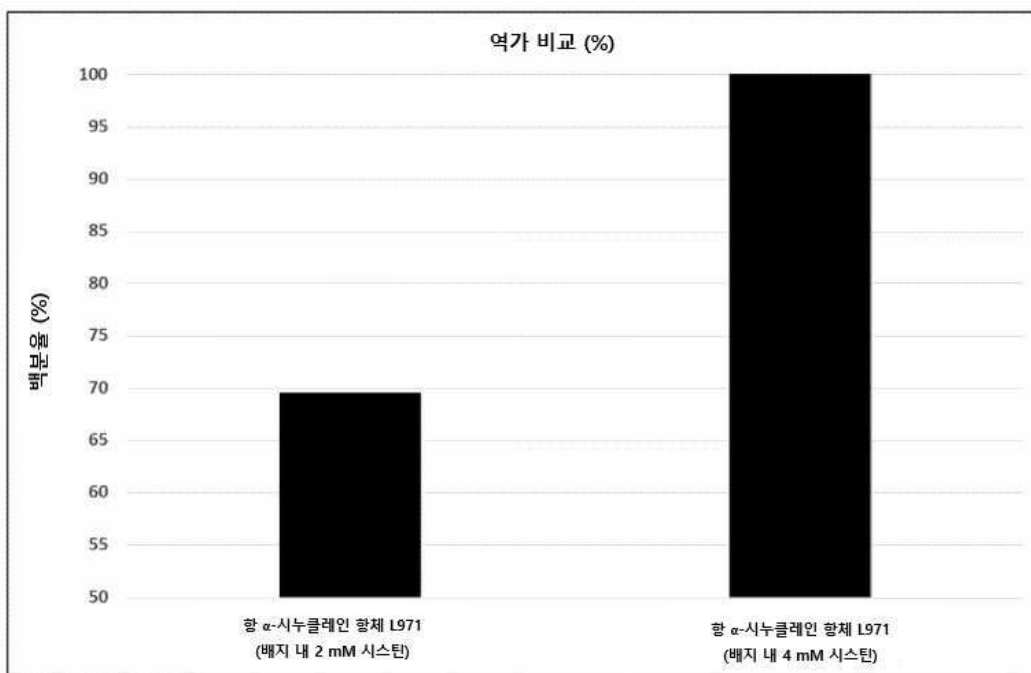
도면10b



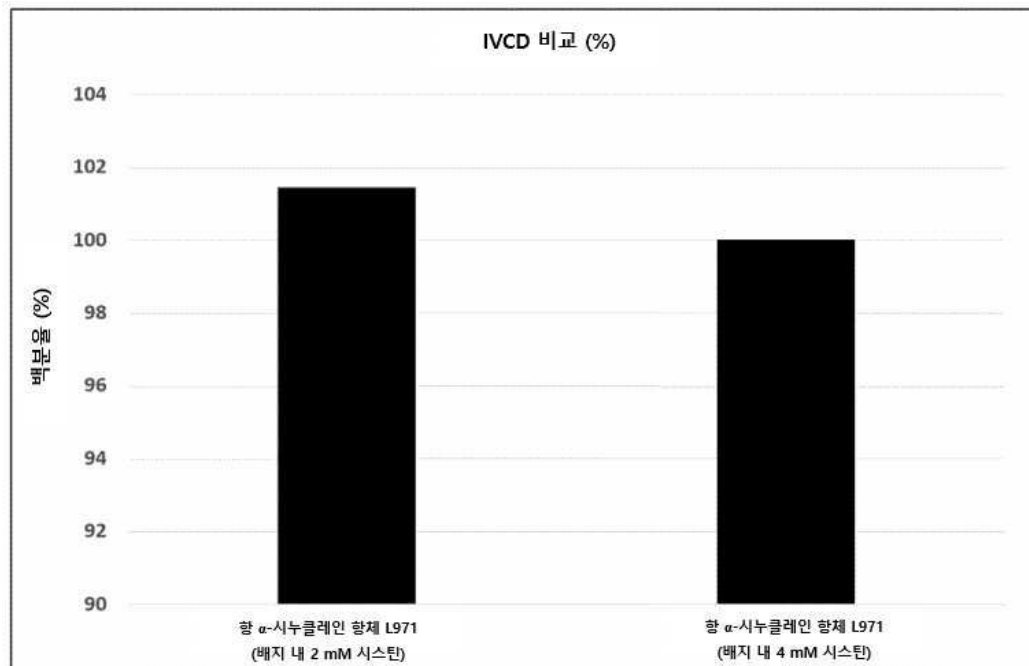
도면10c



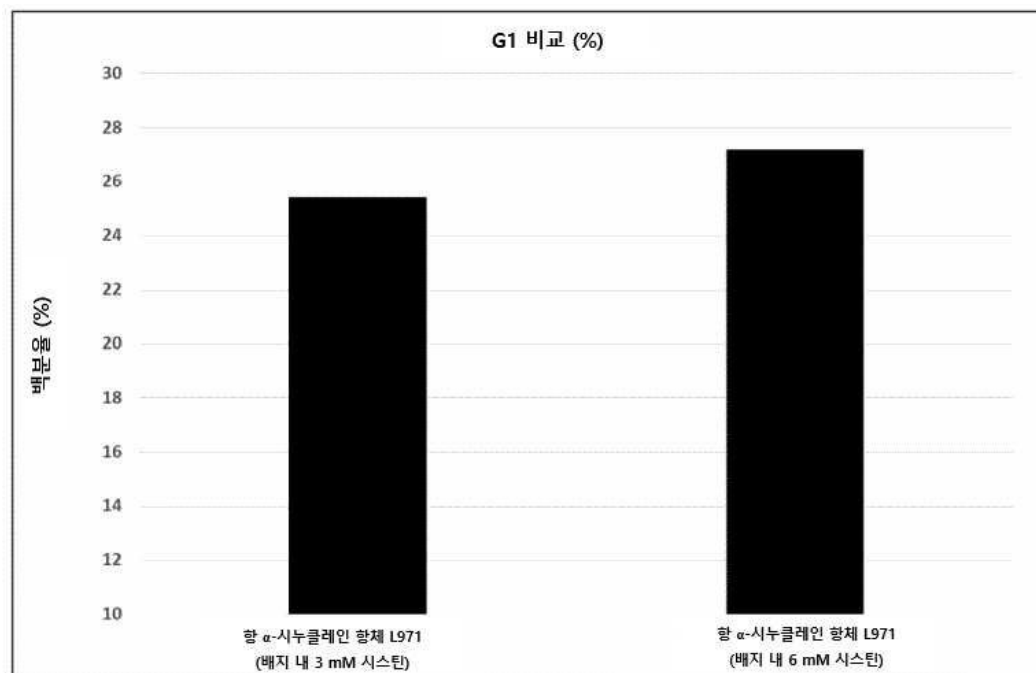
도면10d



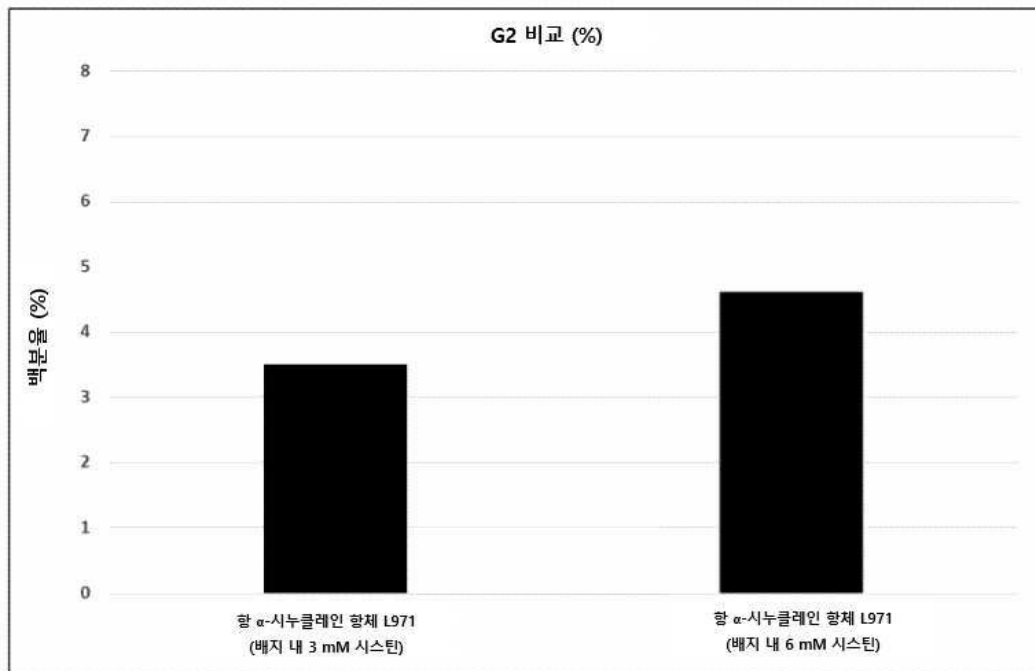
도면10e



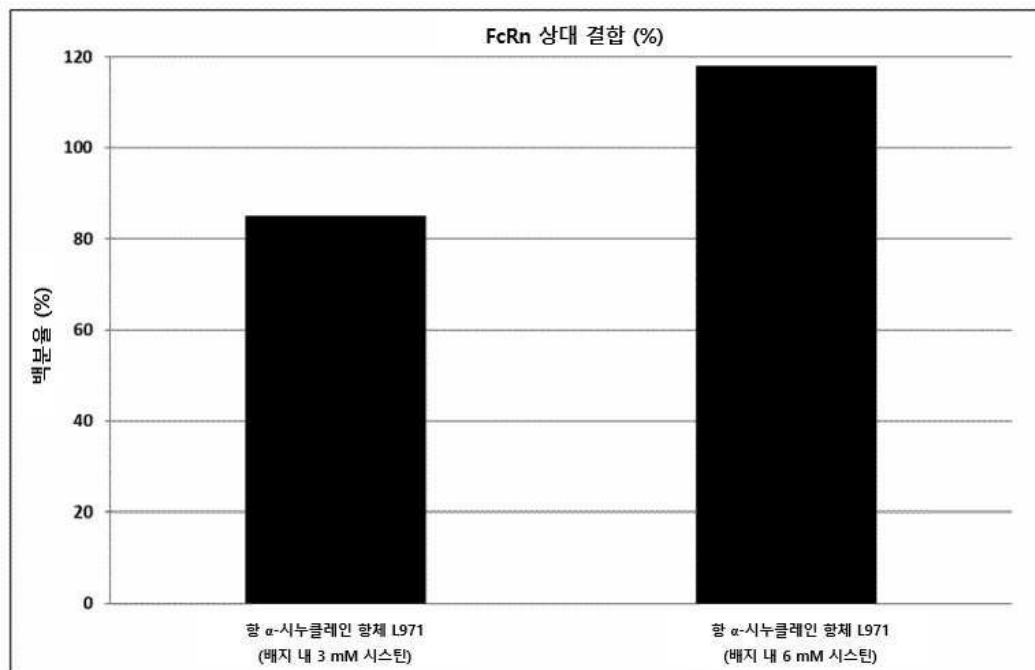
도면11a



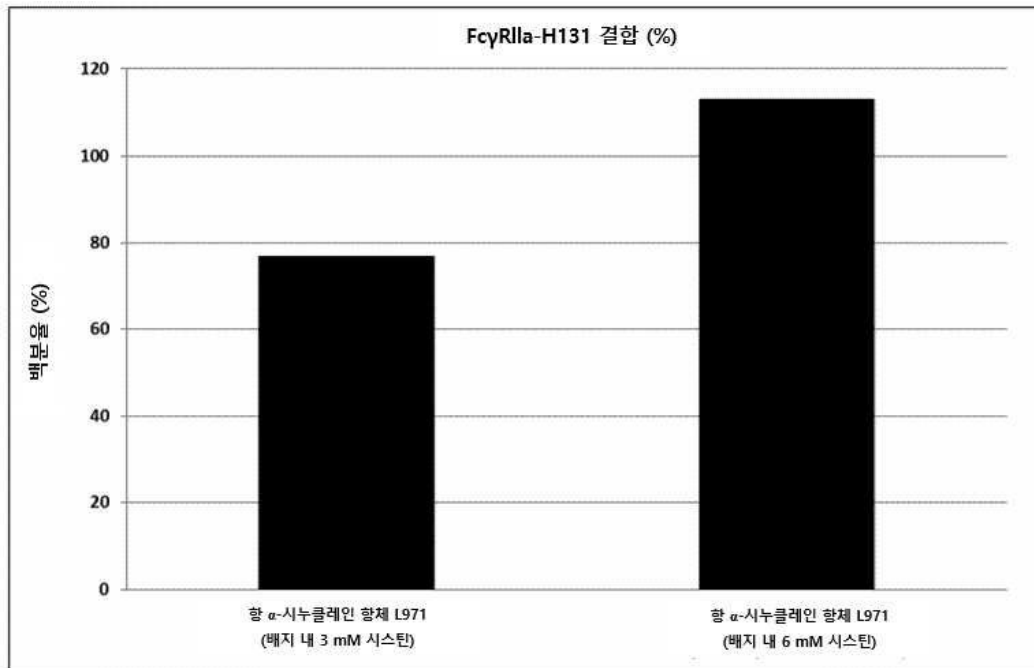
도면11b



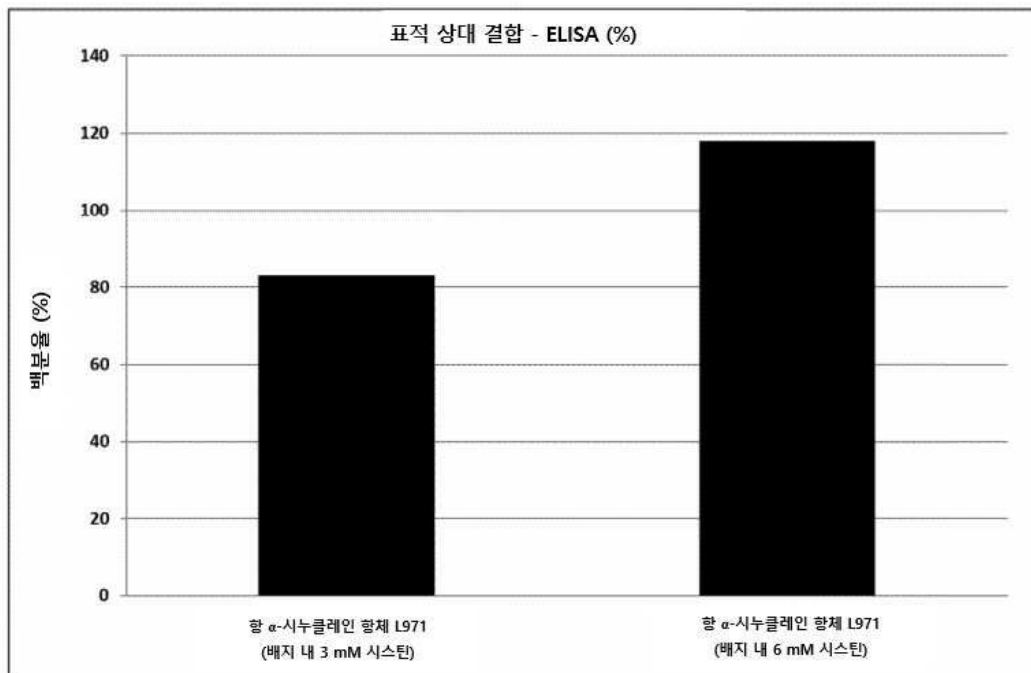
도면11c



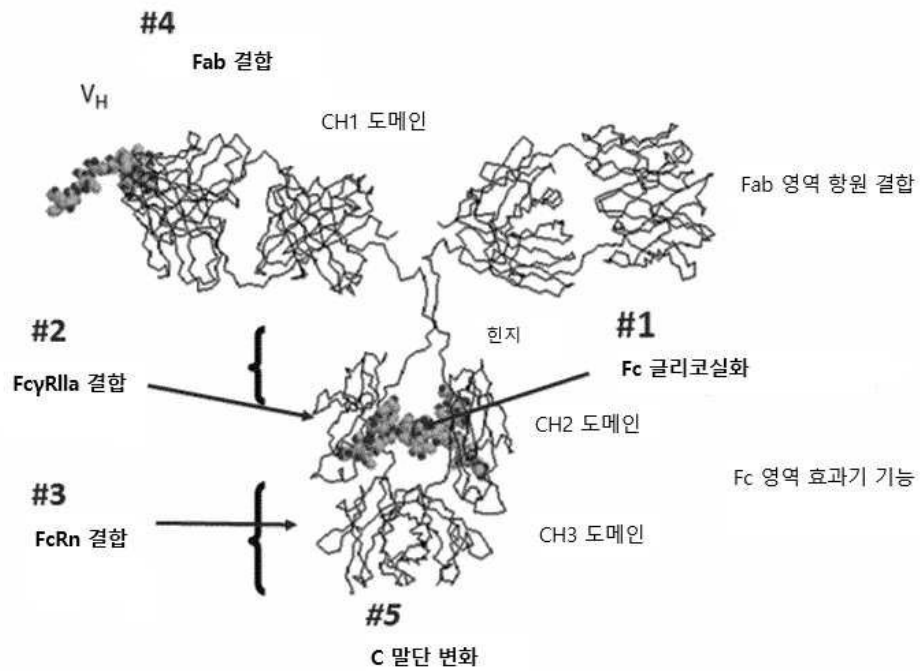
도면11d



도면11e



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

Hoffmann-La Roche Inc.

<120> ENZYME AND PATHWAY MODULATION WITH SULFHYDRYL COMPOUNDS AND THEIR DERIVATIVES

<130> AC1883 PCT S3

<140> PCT/EP2021/060637

<141> 2021-04-23

<150> EP 20171356.7

<151> 2020-04-24

<160> 47

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1047

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The cDNA sequence of UDP-glucose 4-epimerase in CHO K1M

<220>

<221> CDS

<222> 1..1047

<223> /transl_table=1

<400> 1

atg gcc gag aag gtg ctg gtc aca ggc gga gct ggc tac att ggc agc	48
Met Ala Glu Lys Val Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly Tyr Ile Gly Ser	
1 5 10 15	
cac acg gta ctg gag ctg ctg gag gca ggc tac gcc cct gtg gtc atc	96
His Thr Val Leu Glu Leu Leu Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Val Val Ile	
20 25 30	
gac aac ttc cat aat gcc att cgt gga ggg gat tcc atg cct gag agc	144
Asp Asn Phe His Asn Ala Ile Arg Gly Gly Asp Ser Met Pro Glu Ser	
35 40 45	
ctg cgg cgg gtc cag gaa ctg aca ggc cgc tct gtg gag ttt gag gag	192
Leu Arg Arg Val Gln Glu Leu Thr Gly Arg Ser Val Glu Phe Glu Glu	
50 55 60	
atg gac atc ttg gac cag gca gcg cta cag cac ctc ttt aag aag cac	240
Met Asp Ile Leu Asp Gln Ala Ala Leu Gln His Leu Phe Lys Lys His	
65 70 75 80	
agc ttt aag gct gtc atc cac ttt gct ggg ctc aag gct gtg ggc gag	288
Ser Phe Lys Ala Val Ile His Phe Ala Gly Leu Lys Ala Val Gly Glu	
85 90 95	
tcg gtg cag aag cct ctg gat tat tat aga gtt aac cta aca ggg acc	336
Ser Val Gln Lys Pro Leu Asp Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Thr Gly Thr	
100 105 110	
atc cag ctt ctg gag atc atg agg gcc cac ggg gtg aag aat ctc gtg	384
Ile Gln Leu Leu Glu Ile Met Arg Ala His Gly Val Lys Asn Leu Val	
115 120 125	
ttc agc agc tca gcc acc gtg tat ggg aat ccc cag tac ctg cct ctg	432
Phe Ser Ser Ser Ala Thr Val Tyr Gly Asn Pro Gln Tyr Leu Pro Leu	
130 135 140	
gat gag gcc cac ccc acc ggg ggt tgt acc aac ccc tat gga aag tcc	480

Asp	Glu	Ala	His	Pro	Thr	Gly	Gly	Cys	Thr	Asn	Pro	Tyr	Gly	Lys	Ser	
				150				155				160				
aag	ttc	ttc	atc	gag	gag	atg	gtc	cgg	gac	ctg	tgc	cgg	gca	gat	tcg	528
Lys	Phe	Phe	Ile	Glu	Glu	Met	Val	Arg	Asp	Leu	Cys	Arg	Ala	Asp	Ser	
				165				170				175				
gcc	tgg	aac	gca	gtg	ctg	cta	cgc	tac	ttc	aat	ccc	acg	ggg	gcc	cac	576
Ala	Trp	Asn	Ala	Val	Leu	Leu	Arg	Tyr	Phe	Asn	Pro	Thr	Gly	Ala	His	
				180				185				190				
gcc	tct	ggc	cgc	atc	ggc	gag	gat	ccc	cag	ggc	gtc	ccc	aac	aac	ctc	624
Ala	Ser	Gly	Arg	Ile	Gly	Glu	Asp	Pro	Gln	Gly	Val	Pro	Asn	Asn	Leu	
				195				200				205				
atg	ccc	tat	gtc	tcc	cag	gtg	gca	att	ggg	cga	cga	gag	gcc	ctg	aat	672
Met	Pro	Tyr	Val	Ser	Gln	Val	Ala	Ile	Gly	Arg	Arg	Glu	Ala	Leu	Asn	
				210				215				220				
gtc	ttt	ggg	ggg	gac	tat	gat	aca	gag	gat	ggc	aca	ggg	gta	agg	gat	720
Val	Phe	Gly	Gly	Asp	Tyr	Asp	Thr	Glu	Asp	Gly	Thr	Gly	Val	Arg	Asp	
				230				235				240				
tac	att	cat	gtg	gtg	gat	ctg	gcg	aag	ggc	cac	atc	gca	gcc	ttg	aag	768
Tyr	Ile	His	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Lys	Gly	His	Ile	Ala	Ala	Leu	Lys	
				245				250				255				
aag	ctg	aag	gag	caa	tgt	ggg	tgc	cgg	atc	tac	aac	ctg	ggc	aca	ggc	816
Lys	Leu	Lys	Glu	Gln	Cys	Gly	Cys	Arg	Ile	Tyr	Asn	Leu	Gly	Thr	Gly	
				260				265				270				
aca	ggc	tac	tct	gtc	ctg	cag	atg	gtc	caa	gca	atg	gag	aag	gct	tca	864
Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Leu	Gln	Met	Val	Gln	Ala	Met	Glu	Lys	Ala	Ser	
				275				280				285				
ggg	aag	aag	atc	cca	tac	aag	gtg	gtg	gca	cgg	cgg	gaa	ggg	gac	gtg	912
Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Tyr	Lys	Val	Val	Ala	Arg	Arg	Glu	Gly	Asp	Val	
				290				295				300				
gca	gcc	tgt	tat	gcc	aac	ccc	agc	ctg	gcc	cat	gag	gag	ctg	ggc	tgg	960
Ala	Ala	Cys	Tyr	Ala	Asn	Pro	Ser	Leu	Ala	His	Glu	Glu	Leu	Gly	Trp	

305 310 315 320
aca gca gcc ttg ggg ctg gac agg atg tgt gaa gat cta tgg cgc tgg 1008
Thr Ala Ala Leu Gly Leu Asp Arg Met Cys Glu Asp Leu Trp Arg Trp
 325 330 335
cag aag cag aac cct tca ggc ttt gga gca cag gcc taa 1047

Gln Lys Gln Asn Pro Ser Gly Phe Gly Ala Gln Ala

 340 345

<210> 2

<211> 348

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> [CDS]:1..1047 from SEQ ID NO 1

<400> 2

Met Ala Glu Lys Val Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly Tyr Ile Gly Ser

1 5 10 15

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

 20 25 30

Asp Asn Phe His Asn Ala Ile Arg Gly Gly Asp Ser Met Pro Glu Ser

 35 40 45

Leu Arg Arg Val Gln Glu Leu Thr Gly Arg Ser Val Glu Phe Glu Glu

50 55 60

Met Asp Ile Leu Asp Gln Ala Ala Leu Gln His Leu Phe Lys Lys His

65 70 75 80

Ser Phe Lys Ala Val Ile His Phe Ala Gly Leu Lys Ala Val Gly Glu

 85 90 95

Ser Val Gln Lys Pro Leu Asp Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Thr Gly Thr

 100 105 110

Ile Gln Leu Leu Glu Ile Met Arg Ala His Gly Val Lys Asn Leu Val

115 120 125

Phe Ser Ser Ser Ala Thr Val Tyr Gly Asn Pro Gln Tyr Leu Pro Leu

130 135 140

Asp Glu Ala His Pro Thr Gly Gly Cys Thr Asn Pro Tyr Gly Lys Ser
 145 150 155 160
 Lys Phe Phe Ile Glu Glu Met Val Arg Asp Leu Cys Arg Ala Asp Ser

 165 170 175
 Ala Trp Asn Ala Val Leu Leu Arg Tyr Phe Asn Pro Thr Gly Ala His
 180 185 190
 Ala Ser Gly Arg Ile Gly Glu Asp Pro Gln Gly Val Pro Asn Asn Leu
 195 200 205
 Met Pro Tyr Val Ser Gln Val Ala Ile Gly Arg Arg Glu Ala Leu Asn
 210 215 220
 Val Phe Gly Gly Asp Tyr Asp Thr Glu Asp Gly Thr Gly Val Arg Asp

 225 230 235 240
 Tyr Ile His Val Val Asp Leu Ala Lys Gly His Ile Ala Ala Leu Lys
 245 250 255
 Lys Leu Lys Glu Gln Cys Gly Cys Arg Ile Tyr Asn Leu Gly Thr Gly
 260 265 270
 Thr Gly Tyr Ser Val Leu Gln Met Val Gln Ala Met Glu Lys Ala Ser
 275 280 285
 Gly Lys Lys Ile Pro Tyr Lys Val Val Ala Arg Arg Glu Gly Asp Val

 290 295 300
 Ala Ala Cys Tyr Ala Asn Pro Ser Leu Ala His Glu Glu Leu Gly Trp
 305 310 315 320
 Thr Ala Ala Leu Gly Leu Asp Arg Met Cys Glu Asp Leu Trp Arg Trp
 325 330 335
 Gln Lys Gln Asn Pro Ser Gly Phe Gly Ala Gln Ala
 340 345
 <210> 3
 <211> 1140
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> The cDNA sequence of UDP-慣-D-glucose: 慣-D-galactose-1-phosphate

uridylyltransferase in CHO K1M

<220>

<221> CDS

<222> 1..1140

<223> /transl_table=1

<400> 3

atg tcg caa aac gga gat gat cct gag cag cgc cag cag gcg tca gag 48

Met Ser Gln Asn Gly Asp Asp Pro Glu Gln Arg Gln Gln Ala Ser Glu

1 5 10 15

gcg gac gcc atg gca gcg acc ttc cgg gcg agc gaa cac cag cat att 96

Ala Asp Ala Met Ala Ala Thr Phe Arg Ala Ser Glu His Gln His Ile

20 25 30

cgc tac aat ccg ctc cag gat gag tgg gtg tta gtg tcg gcc cat cgc 144

Arg Tyr Asn Pro Leu Gln Asp Glu Trp Val Leu Val Ser Ala His Arg

35 40 45

atg aag cgg ccc tgg caa gga caa gtg gag ccc cag ctt ctg aag aca 192

Met Lys Arg Pro Trp Gln Gly Gln Val Glu Pro Gln Leu Leu Lys Thr

50 55 60

gtg ccc cgc tat gac cca ctc aac cct ctg tgt ccc ggg gcc aca cga 240

Val Pro Arg Tyr Asp Pro Leu Asn Pro Leu Cys Pro Gly Ala Thr Arg

65 70 75 80

gcc aat ggg gag gtg aat cca cac tat gac agc acc ttc ctg ttt gac 288

Ala Asn Gly Glu Val Asn Pro His Tyr Asp Ser Thr Phe Leu Phe Asp

85 90 95

aat gac ttc cca gct ctg cag ccc gat gct ccg gat cca gga ccc agt 336

Asn Asp Phe Pro Ala Leu Gln Pro Asp Ala Pro Asp Pro Gly Pro Ser

100 105 110

gac cat cct ctt ttt cga gca gag gcg gcc aga gga gtt tgt aag gtc 384

Asp His Pro Leu Phe Arg Ala Glu Ala Ala Arg Gly Val Cys Lys Val

115 120 125

atg tgc ttc cat ccc tgg tgc gat gtg aca ctg cca ctc atg tca gtc	432
Met Cys Phe His Pro Trp Ser Asp Val Thr Leu Pro Leu Met Ser Val	
130 135 140	
cct gag atc cga gct gtc atc gat gcc tgg gct tca gtc acc gag gat	480
Pro Glu Ile Arg Ala Val Ile Asp Ala Trp Ala Ser Val Thr Glu Asp	
145 150 155 160	
ctg ggt gcc cag tat cct tgg gtg cag atc ttt gaa aac aaa gga gcc	528
Leu Gly Ala Gln Tyr Pro Trp Val Gln Ile Phe Glu Asn Lys Gly Ala	
165 170 175	
atg atg ggc tgt tct aac ccc cac ccc cac tgc cag gtt tgg gcc agc	576
Met Met Gly Cys Ser Asn Pro His Pro His Cys Gln Val Trp Ala Ser	
180 185 190	
agt ttc ctg cca gat att gcc cag cgt gaa gtg cga tcc cag cag aac	624
Ser Phe Leu Pro Asp Ile Ala Gln Arg Glu Val Arg Ser Gln Gln Asn	
195 200 205	
tat cac agc cag cat gga gaa cct ctg tta ctg gaa tat ggc cgc caa	672
Tyr His Ser Gln His Gly Glu Pro Leu Leu Leu Glu Tyr Gly Arg Gln	
210 215 220	
gaa ctc ctc agg aag gaa cgt ctg gtc tta tct agt gag cac tgg cta	720
Glu Leu Leu Arg Lys Glu Arg Leu Val Leu Ser Ser Glu His Trp Leu	
225 230 235 240	
gtc ctg gtt ccc ttc tgg gca gtg tgg gct ttc cag aca cta ctg ctg	768
Val Leu Val Pro Phe Trp Ala Val Trp Ala Phe Gln Thr Leu Leu Leu	
245 250 255	
ccc cgc cgg cat gta cgt cgg cta cct gag ctg acc cct gct gaa cgt	816
Pro Arg Arg His Val Arg Arg Leu Pro Glu Leu Thr Pro Ala Glu Arg	
260 265 270	
gat gat cta gcc tcc atc atg aag aag cta ttg acc aag tat gac aac	864
Asp Asp Leu Ala Ser Ile Met Lys Lys Leu Leu Thr Lys Tyr Asp Asn	
275 280 285	
cta ttt gag aca tct ttt ccc tac tcc atg ggc tgg cat ggg gct ccc	912

Leu Phe Glu Thr Ser Phe Pro Tyr Ser Met Gly Trp His Gly Ala Pro
 290 295 300
 acg gga tta aag act gga gcc gcc tat gac cac tgg cag cta cat gct 960
 Thr Gly Leu Lys Thr Gly Ala Ala Tyr Asp His Trp Gln Leu His Ala
 305 310 315 320
 cat tac tat ccc cca ctc ctg cgc tct gct act gtc cgg aaa ttc atg 1008
 His Tyr Tyr Pro Pro Leu Leu Arg Ser Ala Thr Val Arg Lys Phe Met
 325 330 335
 gtt ggc tat gaa atg ctt gcc cat ggg cac cgg gac ctc act cct gaa 1056
 Val Gly Tyr Glu Met Leu Ala His Gly His Arg Asp Leu Thr Pro Glu
 340 345 350
 cag gct gca gag aga cta agg gcg ctt cct gag gta cat tat tgc ctg 1104
 Gln Ala Ala Glu Arg Leu Arg Ala Leu Pro Glu Val His Tyr Cys Leu
 355 360 365
 gca aag aaa gac aag gaa aca gca gct gtt gct tga 1140

Ala Lys Lys Asp Lys Glu Thr Ala Ala Val Ala
 370 375

<210> 4

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> [CDS]:1..1140 from SEQ ID NO 3

<400> 4

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

35 40 45
 Met Lys Arg Pro Trp Gln Gly Gln Val Glu Pro Gln Leu Leu Lys Thr
 50 55 60

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

305 310 315 320
 His Tyr Tyr Pro Pro Leu Leu Arg Ser Ala Thr Val Arg Lys Phe Met
 325 330 335
 Val Gly Tyr Glu Met Leu Ala His Gly His Arg Asp Leu Thr Pro Glu
 340 345 350
 Gln Ala Ala Glu Arg Leu Arg Ala Leu Pro Glu Val His Tyr Cys Leu

 355 360 365
 Ala Lys Lys Asp Lys Glu Thr Ala Ala Val Ala

 370 375
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer UDP_GlcE-F2-21

<400> 5
 atggccgaga aggtgctggt c 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer UDP_GlcE-R21

<400> 6
 ttaggcctgt gctccaaagc c 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer UDP-Gal-T-F2-21

<400> 7
 atgtcgcaaa acggagatga t 21

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer UDP-Gal-T-R18

<400> 8

tcaagcaaca gctgctgt

18

<210> 9

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 9

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1	5	10	15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys			
20	25	30	
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val			
35	40	45	
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr			
50	55	60	
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys			
65	70	75	80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys			
85	90	95	
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile			
100	105	110	
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro			
115	120	125	
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala			

130	135	140
-----	-----	-----

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; CDR1 of heavy chain (CDR-H1)

<400> 10

Asn Tyr Gly Met Ser

1	5
---	---

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; CDR2 of heavy chain (CDR-H2)

<400> 11

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; CDR3 of heavy chain (CDR-H3)

<400> 12

Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr

1	5
---	---

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; CDR1 of light chain (CDR-L1)

<400> 13

Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; CDR2 of light chain (CDR-L2)

<400> 14

Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; CDR3 of light chain (CDR-L3)

<400> 15

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 16

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; heavy chain variable domain (VH)

<400> 16

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

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

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

115

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; light chain variable domain (VL)

<400> 17

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

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 18

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; heavy chain constant domain (CH)

<400> 18

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

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

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

130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; light chain constant domain (CL)

<400> 19

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 20

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; heavy chain (H)

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440

<210> 21

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 慣-synuclein; light chain (L)

<400> 21

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175

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

180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; CDR1 of heavy chain (CDR-H1)

<400> 22

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; CDR2 of heavy chain (CDR-H2)

<400> 23

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

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; CDR3 of heavy chain (CDR-H3)

<400> 24

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; CDR1 of light chain (CDR-L1)

<400> 25

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; CDR2 of light chain (CDR-L2)

<400> 26

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; CDR3 of light chain (CDR-L3)

<400> 27

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 28

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; heavy chain variable domain (VH)

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 29

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; light chain variable domain (VL)

<400> 29

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 30

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; heavy chain constant domain (CH)

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys
100

<210

> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; light chain constant domain (CL)

<400> 31

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 32

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3 heavy chain constant domain (CD3 CH)

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys

100

<210> 33

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3; light chain (L)

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

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

 130 135 140
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; CDR1 of heavy chain (CDR-H1)

<400> 34

Tyr Ser Trp Ile Asn

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> CD20; CDR2 of heavy chain (CDR-H2)

<400> 35

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

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; CDR3 of heavy chain (CDR-H3)

<400> 36

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; CDR1 of light chain (CDR-L1)

<400> 37

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; CDR2 of light chain (CDR-L2)

<400> 38

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; CDR3 of light chain (CDR-L3)

<400> 39

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; heavy chain variable domain (VH)

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; light chain variable domain (VL)

<400> 41

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

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

100

105

110

Arg Thr Val

115

<210> 42

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; heavy chain constant domain (CH)

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys
 100

<210

> 43

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20; light chain constant domain (CL)

<400> 43

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 20 25 30
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 35 40 45
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 65 70 75 80
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 85 90 95

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

<210> 44

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20 light chain (CD20 VL-CL)

<400> 44

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

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

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg

115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

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

195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 45

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20 heavy chain [CD20 VH-CH1(EE)-Fc (hole, P329G LALA)]

<400> 45

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

385						390						395					400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
					405					410					415		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
			420					425					430				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
		435					440						445				
<210>	46																
<211>	439																
<212>	PRT																
<213>	Artificial Sequence																
<220>																	
<223>	CD20-CD3 heavy chain [CD3 VL-CH1-Fc (knob, P329G LALA)]																
<400>	46																
Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser		
			20					25					30				
Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly		
		35					40					45					
Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala		
65					70					75					80		
Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn		
				85					90					95			
Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala		
			100					105						110			
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser		
			115					120						125			
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe		

130 135 140
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190

 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 290 295 300
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

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

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

<210> 47

<211> 673

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD20 heavy chain [CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (knob, P329G
 LALA)]

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
210 215 220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln
225 230 235 240
Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys
245 250 255
Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val
260 265 270
Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn
275 280 285
Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly
290 295 300
Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala
305 310 315 320
Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
325 330 335
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
340 345 350
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
355 360 365
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

370 375 380
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 385 390 395 400
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 405 410 415
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 420 425 430
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

 435 440 445
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 450 455 460
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 465 470 475 480
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 485 490 495
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

 500 505 510
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 515 520 525
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 530 535 540
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 545 550 555 560
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

 565 570 575
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 580 585 590
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 595 600 605
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 610 615 620

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

625 630 635 640

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

645 650 655

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

660 665 670

Pro