



등록특허 10-2709593



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월26일
(11) 등록번호 10-2709593
(24) 등록일자 2024년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/244 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7014850
- (22) 출원일자(국제) 2015년11월05일
심사청구일자 2020년10월29일
- (85) 번역문제출일자 2017년05월31일
- (65) 공개번호 10-2017-0075793
- (43) 공개일자 2017년07월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/059339
- (87) 국제공개번호 WO 2016/073791
국제공개일자 2016년05월12일

- (30) 우선권주장
62/075,792 2014년11월05일 미국(US)
62/207,882 2015년08월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

JP2004517614 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 50 항

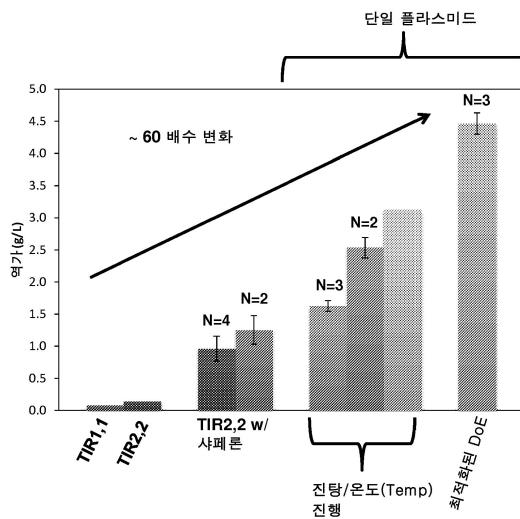
심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 박테리아 내 2쇄 단백질을 생산하는 방법

(57) 요약

2쇄를 함유한 폴리펩티드, 예컨대 경쇄 및 중쇄를 포함한 항체의 생산 방법이 본원에서 제공된다. 특히, 최적화된 발현 벡터의 및 배양 공정 이용을 통해 박테리아에서 이종 분비성 단백질의 생산 방법이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C07K 16/468 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020030074654 A*

Christoph Spiess et al., ‘Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies’, *Nature Biotechnology*, Vol. 31, No. 8, 2013.08.*

KR1020130103713 A

US20070128111 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

E. coli 숙주 세포에서 2개의 쇄를 포함하는 폴리펩티드의 생산 방법이며,

- (a) 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함하는 성장 단계, 및
생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함하는 생산 단계

를 포함하는 조건하에 상기 *E. coli* 숙주 세포를 배양 배지에서 배양하여 상기 폴리펩티드의 상기 2개의 쇄를 발현시켜서, 별현시 상기 2개의 쇄가 접혀지고 조립되어 상기 *E. coli* 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드가 형성되도록 하는 단계이며,

상기 *E. coli* 숙주 세포는

- (1) 상기 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화하는 제1 번역 단위체,
- (2) 상기 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화하는 제2 번역 단위체,
- (3) FkpA 단백질을 암호화하는 제3 번역 단위체,
- (4) DsbA 단백질을 암호화하는 제4 번역 단위체, 및
- (5) DsbC 단백질을 암호화하는 제5 번역 단위체

를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며,

상기 성장 온도는 상기 생산 온도보다 2°C 내지 10°C 높고,

상기 성장 교반 속도는 상기 생산 교반 속도보다 50 rpm 내지 250 rpm 높고,

상기 성장 온도가 상기 성장 단계 동안 30°C 내지 34°C의 범위이며, 상기 생산 온도가 상기 생산 단계 동안 25°C 내지 28°C의 범위이고,

성장 단계 동안의 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도가 3.5 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이며, 생산 단계 동안의 숙주 세포의 산소 흡수 속도가 1.0 내지 3.0 mmol/L/min의 범위인 단계, 및

- (b) 상기 *E. coli* 숙주 세포로부터 상기 생물학적 활성 폴리펩티드를 회수하는 단계

를 포함하고,

상기 폴리펩티드가, 상기 제1 쇄 및 상기 제2 쇄가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 1가 항체인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드가 프로모터의 3개 사본(copy)을 추가로 포함하고,

제1 사본이 상기 제1 번역 단위체와 작동가능하게 조합되고,

제2 사본이 상기 제2 번역 단위체와 작동가능하게 조합되고,

제3 사본이 상기 제3 번역 단위체와 작동가능하게 조합되어,

상기 제1 쇄, 상기 제2 쇄 및 상기 FkpA 단백질의 전사를 구동하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프로모터가 유도성 프로모터인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유도성 프로모터가, IPTG 유도의 부재하에 상기 제1 쇄, 상기 제2 쇄 및 상기 FkpA 단백질의 전사를 구동하는 IPTG-유도성 프로모터인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 유도성 프로모터가, 상기 배양 배지에서 포스페이트가 고갈된 경우에 상기 제1 쇄, 상기 제2 쇄 및 상기 FkpA 단백질의 전사를 구동하는 Pho 프로모터인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드가 선택가능한 마커를 추가로 포함하고,

상기 배양 배지가 단일 항생물질로 이루어진 선택체를 포함하여,

상기 숙주 세포가 상기 폴리뉴클레오티드를 보유하도록 유발시키는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 번역 단위체가 상기 제1 쇄의 암호화 영역과 작동가능하게 조합된 제1 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고,

상기 제2 번역 단위체가 상기 제2 쇄의 암호화 영역과 작동가능하게 조합된 제2 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고,

상기 제1 TIR에 대한 제2 TIR의 상대적 번역 강도가 1.0 내지 3.0인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FkpA 단백질이 *E. coli* FkpA인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, DsbA 단백질은 *E. coli* DsbA이고, DsbC 단백질은 *E. coli* DsbC인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *E. coli*가 *degP**S210A* 돌연변이를 갖는 균주인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *E. coli*가 W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA i1vG2096$ (Val^r) $\Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacI^Q \Delta ompT \Delta menE degP S210A$ 의 유전자형을 갖는 균주인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 이종이량체의 모노머인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 상기 2개의 쇄가 적어도 하나의 디설파이드 결합에 의해 서로 연결되는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1가 항체가 항원에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 분비성 단백질인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 분비성 단백질이 상기 숙주 세포의 주변세포질로부터 회수되는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성장 교반 속도가, 성장 단계 동안의 숙주 세포에서의 산소 흡수 속도가 생산 단계 동안의 숙주 세포에서의 피크 산소 흡수 속도보다 0.5 내지 2.5 mmol/L/min 높게 달성되도록 하는데 충분한 것인 방법.

청구항 18

E. coli 숙주 세포에서 중쇄 및 경쇄를 포함하는 절반 항체의 생산 방법이며,

- (a) 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함하는 성장 단계, 및
생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함하는 생산 단계

를 포함하는 조건하에 상기 *E. coli* 숙주 세포를 배양 배지에서 배양하여 상기 중쇄 및 상기 경쇄를 발현시켜서, 발현시 상기 중쇄 및 상기 경쇄가 조립되어 상기 *E. coli* 숙주 세포에서 절반 항체가 형성되도록 하는 단계이며,

상기 *E. coli* 숙주 세포는

- (1) 상기 절반 항체의 상기 중쇄를 암호화하는 제1 번역 단위체,
- (2) 상기 절반 항체의 상기 경쇄를 암호화하는 제2 번역 단위체,
- (3) FkpA 단백질을 암호화하는 제3 번역 단위체,
- (4) DsbA 단백질을 암호화하는 제4 번역 단위체, 및
- (5) DsbC 단백질을 암호화하는 제5 번역 단위체

를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 성장 온도는 상기 생산 온도보다 2°C 내지 10°C 높고,

상기 성장 교반 속도는 상기 생산 교반 속도보다 50 내지 250 rpm 높고,

상기 성장 온도가 상기 성장 단계 동안 30°C 내지 34°C의 범위이며, 상기 생산 온도가 상기 생산 단계 동안 25°C 내지 28°C의 범위이고,

성장 단계 동안의 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도가 3.5 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이며, 생산 단계 동안의 숙주 세포의 산소 흡수 속도가 1.0 내지 3.0 mmol/L/min의 범위인 단계, 및

- (b) 상기 *E. coli* 숙주 세포로부터 상기 절반 항체를 회수하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 절반 항체가 적어도 하나의 홀(hole)-형성 돌연변이 또는 적어도 하나의 크놈(knob)-형성 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

E. coli 숙주 세포에서 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-IL13 절반 항체의 생산 방법이며,

- (a) 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함하는 성장 단계, 및

생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함하는 생산 단계

를 포함하는 조건하에 상기 *E. coli* 숙주 세포를 배양 배지에서 배양하여 상기 중쇄 및 상기 경쇄를 발현시켜서, 발현시 상기 중쇄 및 경쇄가 조립되어 상기 *E. coli* 숙주 세포에서 항-IL13 절반 항체가 형성되도록 하는 단계이며,

(i) 상기 중쇄는 서열 번호: 9의 HVR-H1, 서열 번호: 10의 HVR-H2, 및 서열 번호: 11의 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고,

(ii) 상기 경쇄는 서열 번호: 12의 HVR-L1, 서열 번호: 13의 HVR-L2, 및 서열 번호: 14의 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하며,

상기 *E. coli* 숙주 세포는

- (1) 상기 절반 항체의 상기 중쇄를 암호화하는 제1 번역 단위체,
- (2) 상기 절반 항체의 상기 경쇄를 암호화하는 제2 번역 단위체,
- (3) FkpA 단백질을 암호화하는 제3 번역 단위체,
- (4) DsbA 단백질을 암호화하는 제4 번역 단위체, 및
- (5) DsbC 단백질을 암호화하는 제5 번역 단위체

를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 성장 온도는 상기 생산 온도보다 2°C 내지 10°C 높고,

상기 성장 교반 속도는 상기 생산 교반 속도보다 50 rpm 내지 250 rpm 높고,

상기 성장 온도가 상기 성장 단계 동안 30°C 내지 34°C의 범위이며, 상기 생산 온도가 상기 생산 단계 동안 25°C 내지 28°C의 범위이고,

성장 단계 동안의 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도가 3.5 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이며, 생산 단계 동안의 숙주 세포의 산소 흡수 속도가 1.0 내지 3.0 mmol/L/min의 범위인 단계, 및

(b) 상기 *E. coli* 숙주 세포로부터 상기 항-IL13 절반 항체를 회수하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항-IL13 절반 항체가 적어도 하나의 크냅-형성 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

E. coli 숙주 세포에서 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-IL17 절반 항체의 생산 방법이며,

(a) 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함하는 성장 단계, 및

생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함하는 생산 단계

를 포함하는 조건하에 상기 *E. coli* 숙주 세포를 배양 배지에서 배양하여 상기 중쇄 및 상기 경쇄를 발현시켜서, 발현시 상기 중쇄 및 경쇄가 조립되어 상기 *E. coli* 숙주 세포에서 항-IL17 절반 항체가 형성되도록 하는 단계이며,

(i) 상기 중쇄는 서열 번호: 20의 HVR-H1, 서열 번호: 21의 HVR-H2, 및 서열 번호: 22의 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하고,

(ii) 상기 경쇄는 서열 번호: 23의 HVR-L1, 서열 번호: 24의 HVR-L2, 및 서열 번호: 25의 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하며,

상기 *E. coli* 숙주 세포는

- (1) 상기 절반 항체의 상기 중쇄를 암호화하는 제1 번역 단위체,

- (2) 상기 절반 항체의 상기 경쇄를 암호화하는 제2 번역 단위체,
- (3) FkpA 단백질을 암호화하는 제3 번역 단위체,
- (4) DsbA 단백질을 암호화하는 제4 번역 단위체, 및
- (5) DsbC 단백질을 암호화하는 제5 번역 단위체

를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 성장 온도는 상기 생산 온도보다 2°C 내지 10°C 높고,

상기 성장 교반 속도는 상기 생산 교반 속도보다 50 rpm 내지 250 rpm 높고,

상기 성장 온도가 상기 성장 단계 동안 30°C 내지 34°C의 범위이며, 상기 생산 온도가 상기 생산 단계 동안 25°C 내지 28°C의 범위이고,

성장 단계 동안의 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도가 3.5 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이며, 생산 단계 동안의 숙주 세포의 산소 흡수 속도가 1.0 내지 3.0 mmol/L/min의 범위인 단계, 및

(b) 상기 *E. coli* 숙주 세포로부터 상기 항-IL17 절반 항체를 회수하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항-IL17 절반 항체가 적어도 하나의 홀-형성 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드가 프로모터의 3개 사본을 추가로 포함하고,

제1 사본이 상기 제1 번역 단위체와 작동가능하게 조합되고,

제2 사본이 상기 제2 번역 단위체와 작동가능하게 조합되고,

제3 사본이 상기 제3 번역 단위체와 작동가능하게 조합되어,

상기 중쇄, 상기 경쇄 및 상기 FkpA 단백질의 전사를 구동하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 프로모터가 유도성 프로모터인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 유도성 프로모터가, IPTG 유도의 부재하에 상기 중쇄, 상기 경쇄 및 상기 FkpA 단백질의 전사를 구동하는 IPTG-유도성 프로모터인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 유도성 프로모터가, 상기 배양 배지에서 포스페이트가 고갈된 경우에 상기 중쇄, 상기 경쇄 및 상기 FkpA 단백질의 전사를 구동하는 pho 프로모터인 방법.

청구항 28

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드가 선택가능한 마커를 추가로 포함하고,

상기 배양 배지가 단일 항생물질로 이루어진 선택제를 포함하여,

상기 숙주 세포가 1가 항체를 보유하도록 유발시키는 것인 방법.

청구항 29

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 번역 단위체가 상기 중쇄 가변 도메인의 암호화 영역과 작동가능하게 조합된 제1 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고,

상기 제2 번역 단위체가 상기 경쇄 가변 도메인의 암호화 영역의 작동가능하게 조합된 제2 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고,

상기 제1 TIR에 대한 제2 TIR의 상대적 번역 강도가 1.0 내지 3.0인 방법.

청구항 30

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FkpA가 *E. coli* FkpA인 방법.

청구항 31

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DsbA 단백질이 *E. coli* DsbA이고, 상기 DsbC 단백질이 *E. coli* DsbC인 방법.

청구항 32

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *E. coli*가 내인성 프로테아제 활성이 결핍된 균주인 방법.

청구항 33

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성장 교반 속도가, 성장 단계 동안의 숙주 세포에서의 산소 흡수 속도가 생산 단계 동안의 숙주 세포에서의 피크 산소 흡수 속도보다 0.5 내지 2.5 mmol/L/min 높게 달성되도록 하는데 충분한 것인 방법.

청구항 34

제1 항원에 결합하는 제1 절반 항체 및 제2 항원에 결합하는 제2 절반 항체를 포함하는 이중-특이적 항체의 생산 방법이며,

환원 조건에서 상기 제1 절반 항체를 상기 제2 절반 항체와 조합하여 이중-특이적 항체를 생산하는 단계를 포함하고,

상기 제1 절반 항체는 적어도 하나의 크냅-형성 돌연변이를 포함하고,

상기 제2 절반 항체는 적어도 하나의 홀-형성 돌연변이를 포함하고,

상기 제1 절반 항체 및 상기 제2 절반 항체 둘 모두는 제18항 내지 제23항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되는 것인

방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 제1 절반 항원 및 상기 제2 절반 항원이 상이한 항원인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 제1 절반 항체가 IL-13에 결합하는 것인 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 상기 제2 절반 항체가 IL-17에 결합하는 것인 방법.

청구항 38

제34항에 있어서,

상기 환원 조건을 달성하기 위해 환원제를 첨가하는 단계
를 추가로 포함하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 환원제가 글루타티온인 방법.

청구항 40

IL13에 결합하는 제1 절반 항체 및 IL17에 결합하는 제2 절반 항체를 포함하는 이중특이적 항체의 생산 방법이며,

(a) 제1 *E. coli* 숙주 세포를 배양하여 상기 제1 절반 항체의 제1 중쇄 및 제1 경쇄를 발현시켜서, 발현시 상기 제1 중쇄 및 상기 제1 경쇄가 조립되어 상기 *E. coli* 숙주 세포에서 상기 제1 절반 항체가 형성되도록 하고,

(i) 상기 제1 중쇄는 서열 번호: 9의 HVR-H1, 서열 번호: 10의 HVR-H2, 및 서열 번호: 11의 HVR-H3을 포함하는 제1 중쇄 가변 도메인을 포함하고,

(ii) 상기 제1 경쇄는 서열 번호: 12의 HVR-L1, 서열 번호: 13의 HVR-L2, 및 서열 번호: 14의 HVR-L3을 포함하는 제1 경쇄 가변 도메인을 포함하며,

(a') 제2 *E. coli* 숙주 세포를 배양하여 상기 제2 절반 항체의 제2 중쇄 및 제2 경쇄를 발현시켜서, 발현시 상기 제2 중쇄 및 상기 제2 경쇄가 조립되어 상기 *E. coli* 숙주 세포에서 상기 제2 절반 항체가 형성되도록 하고,

(i) 상기 제2 중쇄는 서열 번호: 20의 HVR-H1, 서열 번호: 21의 HVR-H2, 및 서열 번호: 22의 HVR-H3을 포함하는 제2 중쇄 가변 도메인을 포함하고,

(ii) 상기 제2 경쇄는 서열 번호: 23의 HVR-L1, 서열 번호: 24의 HVR-L2, 및 서열 번호: 25의 HVR-L3을 포함하는 제2 경쇄 가변 도메인을 포함하며,

상기 제1 *E. coli* 숙주 세포는

- (1) 상기 제1 중쇄를 암호화하는 제1 번역 단위체,
- (2) 상기 제1 경쇄를 암호화하는 제2 번역 단위체

를 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 제2 *E. coli* 숙주 세포는

- (1') 상기 제2 중쇄를 암호화하는 제3 번역 단위체, 및
- (2') 상기 제2 경쇄를 암호화하는 제4 번역 단위체

를 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 제1 폴리뉴클레오티드 및 상기 제2 폴리뉴클레오티드 둘 모두는 추가로

- (3) FkpA 단백질을 암호화하는 제5 번역 단위체,
- (4) DsbA 단백질을 암호화하는 제6 번역 단위체, 및
- (5) DsbC 단백질을 암호화하는 제7 번역 단위체

를 포함하고,

상기 제1 *E. coli* 숙주 세포 및 상기 제2 *E. coli* 숙주 세포 둘 모두는

성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함하는 성장 단계, 및

생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함하는 생산 단계

를 포함하는 조건하에 배양 배지에서 별도로 배양되고,

상기 성장 온도는 상기 생산 온도보다 2°C 내지 10°C 높고,

상기 성장 교반 속도는 상기 생산 교반 속도보다 50 rpm 내지 250 rpm 높고,

상기 성장 온도가 상기 성장 단계 동안 30°C 내지 34°C의 범위이며, 상기 생산 온도가 상기 생산 단계 동안 25°C 내지 28°C의 범위이고,

성장 단계 동안의 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도가 3.5 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이며, 생산 단계 동안의 숙주 세포의 산소 흡수 속도가 1.0 내지 3.0 mmol/L/min의 범위인 단계,

(b) 상기 제1 *E. coli* 숙주 세포로부터 상기 제1 절반 항체를 회수하는 단계,

(b') 상기 제2 *E. coli* 숙주 세포로부터 상기 제2 절반 항체를 회수하는 단계, 및

(c) 환원 조건에서 상기 제1 절반 항체를 상기 제2 절반 항체와 조합시켜 IL-13 및 IL-17 둘 모두에 결합하는 이중-특이적 항체를 생산하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서,

상기 제1 절반 항체가 적어도 하나의 크냅-형성 돌연변이를 포함하고,

상기 제2 절반 항체가 적어도 하나의 홀-형성 돌연변이를 포함하는 것인

방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서,

상기 환원 조건을 달성하기 위해 환원제를 첨가하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 환원제가 글루타티온인 방법.

청구항 44

제20항, 제21항, 제40항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-IL13 절반 항체의 상기 중쇄 가변 도메인이 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 항-IL13 절반 항체의 상기 경쇄 가변 도메인이 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 것인

방법.

청구항 45

제20항, 제21항, 제40항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL13 절반 항체의 상기 중쇄가 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제20항, 제21항, 제40항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL13 절반 항체의 상기 경쇄가 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제22항, 제23항, 제40항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-IL17 절반 항체의 상기 중쇄 가변 도메인이 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 항-IL17 절반 항체의 상기 경쇄 가변 도메인이 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제22항, 제23항, 제40항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL17 절반 항체의 상기 중쇄가 서열 번호: 26 또는 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제22항, 제23항, 제40항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-IL17 절반 항체의 상기 경쇄가 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제5항, 제18항 내지 제23항, 제40항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성장 교반 속도가 상기 생산 교반 속도보다 10% 내지 40% 더 높은 것인 방법.

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련출원(들)에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은, 이들 출원 그 전체가 본 명세서에 참고로 편입되는, 2015년 8월 20일 출원된 미국 가출원 번호 62/207,882 및 2014년 11월 5일 출원된 미국 가출원 번호 62/075,792의 이점을 주장한다.

[0003]

ASCII 텍스트 파일 상에서의 서열목록 제출

[0004]

ASCII 텍스트 파일 상에서의 하기 제출된 내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 146392024040SEQLIST.TXT, 기록된 날짜: 2015년 11월 5일 목요일, 크기: 49 KB).

[0005]

기술분야

[0006]

본 개시내용은 재조합 폴리펩티드, 예컨대 항체의 생산 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 재조합 폴리펩티드, 예컨대 항체의 생산 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 개시내용은 최적화된 발현 벡터 및 배양 공정의 사용을 통해 박테리아내 이종성 분비성 단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007]

원핵 숙주 세포에서 재조합 단백질 생산은 1978년 *E.coli* 내 인간 인슐린의 생산 이래 많은 중요한 치료제의 공급원이 되어 왔다. 문자 생물학 도구 및 지식이 진전됨에 따라, 재조합 치료제의 복합성이 또한 증가되어 있다. 이를 재조합 단백질의 생산은 생성물이 특성 예컨대 적절한 번역, 접힘, 조립, 디설파이드 결합, 및 주변세포질로 이송을 나타내는 것이 필요하다. 많은 재조합 단백질, 특히 디설파이드 결합을 갖는 것 (예를 들면, 제한 없이 항체 및 항체 단편을 포함한, 2쇄 단백질)이 원핵 숙주 세포에서 봉입체의 형성을 초래한다는 것이 공지된다 (Spadiut et al., Trends in Biotechnology, 32:54, 2014). 따라서, 산업적 규모로 원핵 숙주 세포에서 적절하게 접혀진 및 조립된 2쇄 단백질의 재조합 생산용 발현계 및 공정에 대한 요구가 있다.

[0008]

단클론성 항체는, 다양한 질환의 치료를 위하여 이미 승인된 또는 검토중인 수많은 단클론성 항체와, 재조합 치

요제의 가장 빠르게 성장하는 유형 중 하나를 나타낸다 (Nelson et al., *Nature Review Drug Discovery*, 9:767, 2010). 전통적 단클론성 항체는 단일 표적 항원에 결합한다. 많은 질환에 대하여, 1 초과의 표적 항원, 즉, 다중특이적 항체를 결합하는 항체를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 상기 항체는 다중 치료 표적에 관한 조합 접근법에서 이용될 수 있다 (참고: 예를 들면, Bostrom et al., *Science* 323:1610, 2009; 및 Wu et al., *Nature Biotechnology*, 25:1290, 2007). 예를 들어, 종양 세포의 T 세포-매개된 사멸을 유도하기 위해 암 세포의 표면상에서 발현된 에피토프 및 T 세포 상에서 발현된 에피토프를 동시에 결합하는 이중특이적 항체는 생산될 수 있다 (Shalaby et al., *Clinical Immunology*, 74:185, 1995).

[0009]

병상에서 이중특이적 항체의 사용은 산업적으로 관련된 양으로 2쇄 단백질을 생산하기 위한 능력을 필요로 한다. 원핵 숙주 세포에서 재조합 단백질 생산을 개선하는 벡터 성분이 기재되어 있는 반면 (참고, 예를 들면, Schlapschy et al., *Protein Engineering, Design and Selection*, 19:385, 2006; 및 Simmons et al., *Journal of Immunological Methods* 263: 133, 2002), 본원에서 기재된 결과는 발현 벡터 단독에 대한 변형이 2쇄 단백질의 제조 동안 마주치는 모든 생산 문제를 해결하지 않는다는 것을 입증한다. 실험 규모로 재조합 2쇄 단백질, 예컨대 항체 단편 및 절반-항체를 효율적으로 생산하기 위한 최적의 방법에 대한 필요성이 남아있다.

[0010]

특허 출원, 특허 공개, 및 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호를 포함하는, 본 명세서에서 인용된 모든 참조문헌은, 각 개별 참조가 참고로 편입될 수 있도록 구체적으로 그리고 개별적으로 지적된 바와 같이 그 전체가 참고로 본 명세서에 편입되어 있다.

[0011]

요약

[0012]

한 양태에서, 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 포함한 폴리펩티드의 생산 방법이 본원에서 제공되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 숙주 세포를 배양시켜 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키고, 이로써 발현시 2쇄가 접하고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하는 단계; 여기에서 숙주 세포는 (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; 및 (3) 웨티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 조건 하에 배양 배지에서 배양되고: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초파이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초파이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 생물학적 활성 폴리펩티드를 회수하는 단계. 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 포함한 폴리펩티드의 생산 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 상기 폴리펩티드의 상기 2쇄를 발현시키기 위해 상기 숙주 세포를 배양시켜: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계를 포함한 조건하에 배양 배지에서 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키, 이로써 발현시 2쇄가 접혀지고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하는 단계; 여기에서 숙주 세포는 (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; 및 (3) 웨티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초파이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초파이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 생물학적 활성 폴리펩티드를 회수하는 단계. 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 포함한 폴리펩티드의 생산 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 숙주 세포를 배양시켜 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키고, 이로써 발현시 2쇄가 접혀지고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성함; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함하고: (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2 및 제3 샤페론 단백질은 웨티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 배양되고: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초파이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초파이다; (b) 숙주 세포로부터 생물학적 활성 폴리펩티드를 회수함. 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 포함한 폴리펩티드의 생산 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 상기 폴리펩티드의 상기 2쇄를 발현시키기 위해 상기 숙주 세포를 배양시켜: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 이로

써 발현시 상기 2쇄가 접혀지고 조립되어 상기 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하는 단계; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함하고: (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2 및 제3 샤페론 단백질은 웨티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초파이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초파이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 생물학적 활성 폴리펩티드를 회수함. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 3, 4 또는 5 쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지의 pH는 생산 단계 동안 6.7 내지 7.3의 범위에서 pH로 유지된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 프로모터의 3개 사본을 포함하고, 여기에서 제1 사본은 제1 번역 단위체와 작동가능한 조합이고, 제2 사본은 제2 번역 단위체와 작동가능한 조합이고, 제3개 사본은 제1 쇄, 제2 쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하기 위한 제3 번역 단위체와 작동가능한 조합이다.

[0013]

일부 구현예에서, 3 샤페론 단백질의 2개를 암호화한 번역 단위체의 2개는 단일 전사 단위체 (2시스트론성 단위체)의 일부이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 각 번역 단위체와 작동가능한 조합으로 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 IPTG 유도의 부재하에 제1 쇄, 제2 쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하는 IPTG-유도성 프로모터이다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 배양 배지내 포스페이트가 고갈된 경우 제1 쇄, 제2 쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하는 Pho 프로모터이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 선택가능한 마커를 포함하고 배양 배지는 숙주 세포가 폴리뉴클레오티드를 보유하도록 유발시키는 단일 항생물질로 이루어진 선택제를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 번역 단위체는 제1 쇄의 암호화 영역과 작동가능한 조합으로 제1 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고, 제2 번역 단위체는 제2 쇄의 암호화 영역의 작동가능한 조합으로 제2 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고, 여기에서 제1 및 제2 TIR의 상대적 번역 강도는 약 1.0 내지 약 3.0이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 샤페론 단백질, 또는 제1 샤페론 단백질은 웨티딜-프롤릴 이소머라아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 웨티딜-프롤릴 이소머라아제는 FkpA 단백질이다. 일부 구현예에서, FkpA는 *E. coli* FkpA이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 샤페론 단백질은 추가로 단백질 디설파이드 산화환원효소를 포함하거나 또는 제2 샤페론 단백질 및 제3 샤페론 단백질의 한쪽 또는 양쪽은 단백질 디설파이드 산화환원효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 디설파이드 산화환원효소는 DsbA 단백질 및 DsbC 단백질의 한쪽 또는 양쪽이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 단백질 디설파이드 산화환원효소는 *E. coli* DsbA 및 *E. coli* DsbC의 한쪽 또는 양쪽이다. 일부 구현예에서, 원핵 숙주 세포는 그램-음성 박테리아이다. 일부 구현예에서, 그램-음성 박테리아는 *E. coli*이다. 일부 구현예에서, *E. coli*는, 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주의 것이다. 일부 구현예에서, *E. coli*는 *degP**S210A* 돌연변이를 갖는 균주이다. 일부 구현예에서, *E. coli*는 W3110 \triangle *fhuA* \triangle *phoA* *i1vG2096* (*Val^r*) \triangle *prc* *spr43H1* \triangle *degP* \triangle *manA* *lacI^Q* \triangle *ompT* \triangle *menE* \triangle *degP**S210A*의 유전자형을 갖는 균주이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 숙주 세포에 이종성이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 이중이량체의 모노머 (예를 들면, 이중-특이적 항체)이다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드의 2쇄는 적어도 하나의 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드의 2쇄는 폴리펩티드 링커에 의해 서로 연결된다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 제1 쇄 및 제2 쇄가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 1가 항체이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄는 IgG1 또는 IgG4 이소형이다. 일부 구현예에서, 1가 항체는 항원을 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원은 시토카인이다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 케모카인, 인터페론, 인터류킨, 림포카인, 및 종양 괴사 인자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 성장 인자는 혈관 내피 성장 인자이다. 일부 구현예에서, 항원은 IL-4, IL13, IL-14, IL-17, VEGFA 및 VEGFC로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 분비성 단백질이다. 일부 구현예에서, 분비성 단백질은 숙주 세포의 주변세포질로부터 회수된다. 일부 구현예에서, 항체는 숙주 세포의 주변세포질로부터 회수된다. 일부 구현예에서, 성장 온도는 성장 단계 동안 약 30°C 내지 약 34°C의 범위이고, 생산 온도는 생산 단계 동안 약 25°C 내지 약 29°C의 범위이다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 성장 단계 동안 약 600 내지 800 rpm의 범위이고, 생산 교반 속도는 생산 단계 동안 약 300 내지 약 500 rpm의 범위이다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 생산 단계 동안 숙주 세포에서 피크 산소 흡수 속도 0.5 내지 2.5 mmol/L/min 초파의 성장 단계 동안 숙주 세포에서 산소 흡수 속도를 달성하는데 충분하다. 일부 구현예에서, 성장 단계 동안 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도는 3.5 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이고, 생산 단계 동안 숙주 세포의 산소 흡수 속도는 1.0 내지 3.0 mmol/L/min의 범위이다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도보다 약 10% 내지 약 40% 더 높다.

[0014]

또다른 양태에서, 원핵 숙주 세포에서 중쇄 및 경쇄를 포함한 절반 항체의 생산 방법이 본원에서 제공되고, 상

기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 상기 중쇄 및 상기 경쇄를 발현시키기 위해 상기 숙주 세포를 배양시켜: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 이로써 발현시 중쇄 및 경쇄가 조립되어 숙주 세포에서 절반 항체를 형성하는 단계; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함하고: (1) 절반 항체의 중쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 절반 항체의 경쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2 및 제3 샤페론 단백질은 웹티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초파이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초파이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 절반 항체를 회수하는 단계. 일부 구현예에서, 절반 항체는 적어도 하나의 홀-형성 돌연변이 또는 적어도 하나의 크냅-형성 돌연변이를 포함한다. 원핵 숙주 세포에서 중쇄 및 경쇄를 포함한 항-IL13 절반 항체의 생산 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기를 포함한다: (a) 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 상기 중쇄 및 상기 경쇄를 발현시키기 위해 상기 숙주 세포를 배양시켜: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 여기에서 (i) 중쇄는 서열 번호: 9의 HVR-H1, 서열 번호: 10의 HVR-H2, 및 서열 번호: 11의 HVR-H3을 포함한 중쇄 가변 도메인을 포함하고; (ii) 경쇄는 서열 번호: 12의 HVR-L1, 서열 번호: 13의 HVR-L2, 및 서열 번호: 14의 HVR-L3을 포함한 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이로써 발현시 중쇄 및 경쇄는 조립되어 숙주 세포에서 항-IL13 절반 항체를 형성하고; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함한다: (1) 절반 항체의 중쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 절반 항체의 경쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2 및 제3 샤페론 단백질은 웹티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초파이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초파이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 항-IL13 절반 항체를 회수하는 단계. 일부 구현예에서, 항-IL13 절반 항체는 적어도 하나의 크냅-형성 돌연변이를 포함한다. 원핵 숙주 세포에서 중쇄 및 경쇄를 포함한 항-IL17 절반 항체의 생산 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기를 포함한다: (a) 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 상기 중쇄 및 상기 경쇄를 발현시키기 위해 상기 숙주 세포를 배양시켜: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 여기에서 (i) 중쇄는 서열 번호: 20의 HVR-H1, 서열 번호: 21의 HVR-H2, 및 서열 번호: 22의 HVR-H3을 포함한 중쇄 가변 도메인을 포함하고; (ii) 경쇄는 서열 번호: 23의 HVR-L1, 서열 번호: 24의 HVR-L2, 및 서열 번호: 25의 HVR-L3을 포함한 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이로써 발현시 중쇄 및 경쇄는 조립되어 숙주 세포에서 항-IL17 절반 항체를 형성하고; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 폴리뉴클레오티드를 포함한다: (1) 절반 항체의 중쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 절반 항체의 경쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2 및 제3 샤페론 단백질은 웹티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초파이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초파이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 항-IL17 절반 항체를 회수하는 단계. 일부 구현예에서, 항-IL17 절반 항체는 적어도 하나의 홀-형성 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 프로모터의 3개 사본을 포함하고, 여기에서 제1 사본은 제1 번역 단위체와 작동가능한 조합이고, 제2 사본은 제2 번역 단위체와 작동가능한 조합이고, 제3개 사본은 중쇄, 경쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하기 위해 제3 번역 단위체와 작동가능한 조합이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 IPTG 유도의 부재하에 중쇄, 경쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하는 IPTG-유도성 프로모터이다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 배양 배지에서 포스페이트가 고갈된 경우 중쇄, 경쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하는 pho 프로모터이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 선택가능한 마커를 포함하고 배양 배지는 숙주 세포가 1가 항체를 보유하도록 유발시키는 단일 항생물질로 이루어진 선택제를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 번역 단위체는 중쇄 가변 도메인의 암호화 영역과 작동가능한 조합으로 제1 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고, 제2 번역 단위체는 경쇄 가변 도메인의 암호화 영역과 작동가능한 조합으로 제2 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고, 여기에서 제1 및 제2 TIR의 상대적 번역 강도는 약 1.0 내지 약 3.0이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 샤페론 단백질, 또는 제1 샤페론 단백질은 웹티딜-프롤릴 이소머라아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 웹티딜-프롤릴 이소머라아제는 FkpA 단백질이다. 일부 구현예에서, FkpA는 *E. coli* FkpA이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 샤페론 단백질은 추가로 단백질 디설파이드 산화환원효소를 포함하거나 또는 제2 샤페론 단백질 및 제3 샤페론 단백질의 한쪽 또는 양쪽은 단백질 디설파이드

파이드 산화환원효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 디설파이드 산화환원효소는 DsbA 단백질 및 DsbC 단백질의 한쪽 또는 양쪽이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 단백질 디설파이드 산화환원효소는 *E.coli* DsbA 및 *E.coli* DsbC의 한쪽 또는 양쪽이다. 일부 구현예에서, 원핵 숙주 세포는 그램-음성 박테리아이다. 일부 구현예에서, 그램-음성 박테리아는 *E.coli*이다. 일부 구현예에서, *E.coli*는, 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주의 것이다. 일부 구현예에서, *E.coli*는 *degps210A* 돌연변이를 갖는 균주이다. 일부 구현예에서, *E.coli*는 W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA i\lambda G2096$ (Val^r) $\Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacI^0 \Delta ompT \Delta menE degpS210A$ 의 유전자형을 갖는 균주이다. 일부 구현예에서, 성장 온도는 성장 단계 동안 약 30°C 내지 약 34°C의 범위이고, 생산 온도는 생산 단계 동안 약 25°C 내지 약 29°C의 범위이다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 생산 단계 동안 숙주 세포에서 피크 산소 흡수 속도 0.5 내지 2.5 mmol/L/min 초과의 성장 단계 동안 숙주 세포에서 산소 흡수 속도를 달성하는데 충분하다. 일부 구현예에서, 성장 단계 동안 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도는 3.5 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이고, 생산 단계 동안 숙주 세포의 산소 흡수 속도는 1.0 내지 3.0 mmol/L/min의 범위이다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도보다 약 10% 내지 약 40% 더 높다. 제1 항원에 결합할 수 있는 제1 절반 항체 및 제2 항원에 결합할 수 있는 제2 절반 항체를 포함한 이중-특이적 항체의 생산 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 환원 조건에서 제1 절반 항체를 제2 절반 항체와 조합시켜 이중-특이적 항체를 생산하는 단계, 여기에서 제1 절반 항체는 적어도 하나의 크냅-형성 돌연변이를 포함하고 제2 절반 항체는 적어도 하나의 홀-형성 돌연변이를 포함하고, 여기에서 양쪽 제1 절반 항체 및 제2 절반 항체는 임의의 하나의 이전의 구현예의 방법으로 생산된다. 일부 구현예에서, 제1 절반 항원 및 제2 절반 항원은 상이한 항원이다. 일부 구현예에서, 제1 절반 항체는 IL-13에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 절반 항체는 IL-17에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가로 환원 조건을 달성하기 위해 환원제 부가의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 환원제는 글루타티온이다. 추가의 또 다른 양태에서, IL13에 결합할 수 있는 제1 절반 항체 및 IL17에 결합할 수 있는 제2 절반 항체를 포함한 이중특이적 항체의 생산 방법이 본원에서 제공되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 제1 원핵 숙주 세포를 배양시켜 제1 절반 항체의 제1 중쇄 및 제1 경쇄를 발현시키는 단계, 여기에서 (i) 제1 중쇄는 서열 번호: 9의 HVR-H1, 서열 번호: 10의 HVR-H2, 및 서열 번호: 11의 HVR-H3을 포함한 제1 중쇄 가변 도메인을 포함하고; (ii) 제1 경쇄는 서열 번호: 12의 HVR-L1, 서열 번호: 13의 HVR-L2, 및 서열 번호: 14의 HVR-L3을 포함한 제1 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이로써 발현시 제1 중쇄 및 제1 경쇄는 조립되어 숙주 세포에서 제1 절반 항체를 형성한다; 및 (a') 제2 원핵 숙주 세포를 배양시켜 제2 절반 항체의 제2 중쇄 및 제2 경쇄를 발현하는 단계, 여기에서 (i) 제2 중쇄는 서열 번호: 20의 HVR-H1, 서열 번호: 21의 HVR-H2, 및 서열 번호: 22의 HVR-H3을 포함한 제2 중쇄 가변 도메인을 포함하고; (ii) 제2 경쇄는 서열 번호: 23의 HVR-L1, 서열 번호: 24의 HVR-L2, 및 서열 번호: 25의 HVR-L3을 포함한 제2 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이로써 발현시 제2 중쇄 및 제2 경쇄는 조립되어 숙주 세포에서 제2 절반 항체를 형성하고; 여기에서 제1 숙주 세포는 하기: (1) 제1 중쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 제1 경쇄를 암호화한 제2 번역 단위체를 포함한 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 제2 숙주 세포는 하기: (1') 제2 중쇄를 암호화한 제3 번역 단위체; 제2 경쇄를 암호화한 (2') 제4 번역 단위체를 포함한 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 여기에서 양쪽 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 폴리뉴클레오티드는 추가로 하기를 포함하고: (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제6 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제7 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2 및 제3 샤페론 단백질은 웹터딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되고; 여기에서 양쪽 제1 숙주 세포 및 제2 숙주 세포는 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 별도로 배양되고: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초과이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초과이다; (b) 제1 숙주 세포로부터 제1 절반 항체를 회수하는 단계; (b') 제2 숙주 세포로부터 제2 절반 항체를 회수하는 단계; 및 (c) 양쪽 IL-13 및 IL-17에 결합할 수 있는 이중-특이적 항체를 생산하기 위해 환원 조건에서 제2 절반 항체와 제1 절반 항체를 조합하는 단계. 일부 구현예에서, 제1 절반 항체는 적어도 하나의 크냅-형성 돌연변이를 포함하고, 제2 절반 항체는 적어도 하나의 홀-형성 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가로 환원 조건을 달성하기 위해 환원제 부가의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 환원제는 글루타티온이다. 임의의 하나의 이전의 구현예의 이중-특이적 항체를 포함한 조성물이 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 항-IL13 절반 항체의 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하고 항-IL13 항체의 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-IL13 절반 항체의 중쇄는 서열 번호: 15 또는 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-IL13 절반 항체의 경쇄는 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-IL17 절반 항체의 중쇄 가변 도메인은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하고 항-IL17 절반

항체의 경쇄 가변 도메인은 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항 IL17 절반 항체의 중쇄는 서열 번호: 26 또는 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-IL17 절반 항체의 경쇄는 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함한다.

[0015]

본원에 기재된 다양한 구현예의 특징 중 하나, 일부 또는 모두는 조합되어 본 개시내용의 다른 구현예를 형성할 수 있음이 이해되어야 한다. 본 개시내용의 이러한, 그리고 기타 양태는 당해기술의 숙련가에게 분명할 것이다. 개시내용의 이들 및 다른 구현예는 후술하는 상세한 설명에 의해 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1A-C는 xIL13 절반-항체 (hAb) 생산 벡터로부터 총 경쇄 (LC) 및 중쇄 (HC) 하부단위체의 생산을 보여준다. **도 1A**는, RP-HPLC에 의해 측정된 바와 같이, TIR1,1 (흑색 바) 및 TIR2,2 (줄무늬 바) 생산 벡터로부터 생산된 LCs 및 HCs에 대한 총 하부단위체의 그래프를 제공한다. **도 1B**는 TIR1,1 생산 벡터로부터 LC 및 HC (흑색 바) 또는 가용성 LC 및 HC (회색 바)에 대한 생산된 총 하부단위체의 그래프를 제공한다. **도 1C**는 TIR2,2 생산 벡터로부터 총 LC 및 HC (흑색 바) 또는 가용성 LC 및 HC (회색 바)에 대한 생산된 총 하부단위체의 그래프를 제공한다.

도 2는 이중 컬럼 RP-HPLC로 측정된 바와 같이 TIR1,1 (흑색 바) 또는 TIR2,2 (줄무늬 바) hAb 생산 벡터를 이용한 xIL13 hAb의 역가를 보여준다.

도 3A-B는 박테리아성 숙주 세포에서 단백질의 접힘 및 조립을 예증한다. **도 3A**는, 샤페론을 이용한 주변세포 질에서 단백질의 접힘 및 조립을 예증하는, 박테리아성 단백질 생산을 도시하는 도식이다. **도 3B**는, 펩티딜-프롤릴 이소머라아제 ("Ppiases"), 산화환원효소, 및 다른 샤페론을 포함한, 샤페론 단백질의 목록이다.

도 4A는 FkpA 변이체를 스크리닝하기 위해 사용된 혼화성 시스템을 보여준다. **도 4B**는 항체 LC, HC, 및 FkpA를 암호화한 단일 xIL13 플라스미드 (pxIL13.2.2.FkpAc13)의 발생을 보여준다.

도 5A-B는 FkpA 발현의 적정시 xVEGF IgG1 hAb의 생산을 보여준다. **도 5A**는 상이한 수준의 FkpA 발현시 hAb 및 가용 모노머성 중쇄 축적을 보여주는 웨스턴 블랏을 도시하고, 반면에 쿠마씨-염색된 젤은 각 조건하에 총 가용성 단백질 생산을 보여준다. **도 5B A** 그래프는 상이한 수준의 FkpA 발현시 생산된 hAb의 역가를 보여준다.

도 6A-B는 상이한 수준의 FkpA 발현시 xIL13 IgG4 hAb의 생산을 보여준다. **도 6A**는 상이한 벡터 시스템을 이용하여 생산된 xIL13 hAb의 역가를 보여주는 그래프를 제공하고, 각 조건에서 hAb 및 가용 모노머성 중쇄 축적을 보여주는 웨스턴 블랏에 의해 동반된다. **도 6B**는 상이한 벡터 시스템을 이용하여 생산된 FkpA의 양을 보여주는 그래프를 제공하고, 각 조건에서 FkpA의 발현을 보여주는 웨스턴 블랏에 의해 동반된다. 모든 패널에서, "내인성 FkpA 수준"은 플라스미드 암호화 FkpA를 함유하지 않은 박테리아성 숙주 세포를 지칭하고; "혼화성 FkpA 수준"은 별도 (혼화성) 플라스미드로부터 xIL13 및 FkpA의 발현을 지칭하고; "단일 FkpA 수준"은 양쪽 xIL13 및 FkpA를 발현하는 단일 벡터를 지칭한다.

도 7A-B는 FkpA의 유도성 발현시 xIL4 IgG4 hAb의 생산을 보여준다. **도 7A**는 hAb 및 가용 모노머성 중쇄 축적을 보여주는 웨스턴 블랏을 도시한다. **도 7B**는 FkpA의 유도성 발현을 이용하여 생산된 xIL4 hAb의 역가를 보여주는 그래프이고, FkpA의 발현을 보여주는 웨스턴 블랏에 의해 동반된다. 모든 패널에서, 샘플 1은 xIL4 hAb의 생산용 TIR1,1 벡터를 이용하고 FkpA를 과발현하지 않고; 샘플 2는 xIL4 hAb의 생산용 TIR2,2 벡터를 이용하고 FkpA를 과발현하지 않고; 샘플 3은 TIR1,1을 이용하여 xIL4 hAb 및 IPTG를 생산시켜 FkpA 발현을 유도하고; 샘플 4는 TIR2,2를 이용하여 xIL4 hAb 및 IPTG를 생산시켜 FkpA 발현을 유도한다.

도 8A-C는 FkpA의 발현시 xVEGFC IgG1 hAb의 생산을 보여준다. **도 8A**는 상이한 벡터 시스템을 이용한 생산된 xVEGFC hAb의 역가를 보여주는 그래프를 제공한다. **도 8B**는, 표지된 채로 FkpA 밴드와, 모든 조건하에 총 가용성 단백질 생산을 보여주는 젤을 도시한다. **도 8C**는 xVEGFC hAb 및 가용 모노머성 중쇄의 축적을 보여주는 웨스턴 블랏을 도시한다. 패널 모든 패널에서, 샘플 1은 xVEGFC hAb의 생산용 TIR2,2 벡터를 이용하고 FkpA의 발현용 플라스미드를 함유하지 않고; 샘플 2는 FkpA 발현을 유도하기 위해 xIL4 hAb 및 IPTG 생산용 TIR2,2 벡터를 이용한다.

도 9는 xIL13 hAb (pxIL13.2.2.FkpAc13)의 발현용 제1 플라스미드 및 DsbA 및 DsbC (pJJ247)의 발현용 제2 플라스미드를 사용한 혼화성 플라스미드 시스템을 보여준다.

도 10은, IPTG 유도 있거나 없이, DsbA 및 DsbC의 발현을 위하여 혼화성 플라스미드 및 xIL13.2.2.FkpAc13 생

산 플라스미드를 이용하여 경시적으로 xIL13 hAb의 생산을 보여주는 그래프를 제공한다.

도 11A는 xIL14 hAb 혼화성 플라스미드 시스템을 보여준다. **도 11B**는 xIL14 hAb LC 및 HC, FkpA, DsbA, 및 DsbC를 암호화한 단일 플라스미드의 발생을 보여준다.

도 12A-B는 FkpA, DsbA, 및 DsbC 발현의 부재하에 (1 및 2, 표지됨); IPTG-유도된 FkpA 발현의 존재하에 (3 및 4, 표지됨); 및 IPTG의 부재하에 FkpA, DsbA, 및 DsbC와 플라스미드의 존재하에 (5 및 6, 표지됨) TIR1,1 또는 TIR2,2 벡터와 xIL4 hAb의 생산을 보여준다. **도 12A**는 다양한 조건하에 xIL4 hAb 및 가용 모노머성 중쇄의 축적을 보여주는 웨스턴 블랏을 도시한다. **도 12B**는 다양한 조건하에 생산된 xIL4 hAb의 역가를 보여주는 그래프를 제공하고, FkpA의 발현을 보여주는 웨스턴 블랏에 의해 동반된다.

도 13은 FkpA, DsbA, 및 DsbC 발현의 부재하에 (컬럼 1); IPTG-유도된 FkpA 발현의 존재하에 (컬럼 2); 및 IPTG의 부재하에 FkpA, DsbA, 및 DsbC와 플라스미드의 존재하에 (컬럼 3) TIR2,2 벡터와 xVEGFC hAb의 생산을 보여준다.

도 14는 FkpA, DsbA, 및 DsbC 발현의 부재하에 (1 및 3, 표지됨); 및 IPTG의 부재하에 FkpA, DsbA, 및 DsbC와 플라스미드의 존재하에 (2 및 4, 표지됨) TIR1,1 또는 TIR2,2 벡터와 xVEGFA IgG1 hAb의 생산을 보여준다.

도 15는, 항체 발현 벡터 없이 및 DsbA, DsbC, 및 FkpA 과발현 ("대조군") 없이 음성 대조군과 함께, FkpA, DsbA, 및 DsbC가 동일한 벡터 ("단일")로부터 발현된 경우 및 FkpA, DsbA 및 DsbC가 제2 혼화성 벡터 ("혼화성")로부터 발현된 경우 TIR2,2 벡터와 xIL4 hAb의 생산을 보여준다. 웨스턴 블랏은 DsbA, DsbC, 및 FkpA의 발현을 보여준다.

도 16A는 이전에 기재된 pxIL13.2.2.FkpAc13 생산 플라스미드 및 혼화성 산화환원효소 플라스미드 (pJJ247)를 사용한 xIL13 혼화성 플라스미드 시스템을 보여준다. **도 16B**는 pxIL13.2.2.FkpAc13 및 pJJ247로부터 개방형 판독 프레임 (ORFs)을 편입하는 단일 플라스미드 (MD157)의 발생을 보여준다.

도 17은 FkpA, DsbA, 및 DsbC가 동일한 벡터 ("단일")로부터 발현된 경우 및 DsbA 및 DsbC가 혼화성 벡터로부터 발현되고 FkpA가 xIL13.2.2.FkpAc13 벡터 ("혼화성")로부터 발현된 경우 TIR2,2 벡터와 xIL13 hAb의 경시적으로 생산을 보여준다. 이들 벡터는 phoA 프로모터를 이용하여 FkpA 발현을 구동한다.

도 18은 IPTG-유도성 프로모터하에 2개 벡터: xIL13 hAb 및 FkpA를 발현한 TIR2,2 벡터, 및 DsbA 및 DsbC를 발현한 벡터를 보유한 세포의 고정된 교반 속도하에 성장된 배양물에서 경시적으로 평균 산소 흡수 속도 (OUR)를 보여준다. OUR은 IPTG의 존재 또는 부재하에 성장된 배양물에 대하여 보여진다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 19는 IPTG-유도성 프로모터하에 2개 벡터: xIL13 hAb 및 FkpA를 발현한 TIR2,2 벡터, 및 DsbA 및 DsbC를 발현한 벡터를 보유한 세포의 고정된 교반 속도하에 성장된 배양물에서 평균 오스몰농도를 보여준다. 오스몰농도는 IPTG의 존재 또는 부재하에 성장된 배양물에 대하여 보여진다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 20은 IPTG-유도성 프로모터하에 2개 벡터: xIL13 hAb 및 FkpA를 발현한 TIR2,2 벡터, 및 DsbA 및 DsbC를 발현한 벡터를 보유한 세포로부터 경시적으로 생산된 xIL13 hAb의 평균 역가를 보여준다. 생산된 항체의 역가는 IPTG의 존재 또는 부재하에 성장된 배양물에 대하여 보여진다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 21은 26 시간 동안 650 rpm으로 교반하에 성장된, 그 다음 표지된 OUR 설정값을 달성하기에 충분한 더 낮은 교반 속도로 이동된 배양물에서 경시적으로 평균 OUR을 보여준다. 세포는 IPTG의 부재하에 2개 벡터: xIL13 hAb 및 FkpA를 발현한 TIR2,2 벡터, 및 DsbA 및 DsbC를 발현한 벡터를 보유하였다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 22는 26 시간 동안 650 rpm으로 교반하에 성장된, 그 다음 표지된 OUR 설정값을 달성하기에 충분한 더 낮은 교반 속도로 이동된 배양물에서 경시적으로 평균 오스몰농도를 보여준다. 세포는 IPTG의 부재하에 2개 벡터: xIL13 hAb 및 FkpA를 발현한 TIR2,2 벡터, 및 발현한 벡터를 보유하였다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 23은 26 시간 동안 650 rpm으로 교반하에 성장된, 그 다음 표지된 OUR 설정값을 달성하기에 충분한 더 낮은 교반 속도로 이동된 배양물에서 2 시점 (54 및 72 시간)에 xIL13 hAb 생산의 평균 역가를 보여준다. 세포는

IPTG의 부재하에 2개 벡터: xIL13 hAb 및 FkpA를 발현한 TIR2,2 벡터, 및 DsbA 및 DsbC를 발현한 벡터를 보유하였다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 24는 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 xIL13 hAb를 생산한 배양물의 경시적으로 평균 세포 밀도 (OD_{550nm})를 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C의 양쪽 성장 및 생산 (Tg/Tp) 상에 대하여 항온에서 성장되었다. 교반 시프트는 발효에 26 시간 수행되었다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 25는 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 xIL13 hAb를 생산한 세포의 배양물의 경시적으로 평균 OUR을 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C의 양쪽 성장 및 생산 (Tg/Tp) 상에 대하여 항온에서 성장되었다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 26은 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 xIL13 hAb를 생산한 세포의 배양물에서 경시적으로 평균 포스페이트 농도를 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C의 양쪽 성장 및 생산 (Tg/Tp) 상에 대하여 항온에서 성장되었다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 27은 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 세포의 배양물에서 생산된 xIL13 hAb의 평균 역가를 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C의 양쪽 성장 및 생산 (Tg/Tp) 상에 대하여 항온에서 성장되었다.

도 28는 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 xIL13 hAb를 생산한 배양물의 경시적으로 평균 세포 밀도 (OD_{550nm})를 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C (Tg/Tp 28°C 또는 Tg/Tp 30°C, 각각)의 항온에서 성장되었거나, 또는 성장 단계 동안 30°C에서 성장되었고, 그 다음 생산 단계 (Tg 30 Tp 28) 동안 28°C까지 이동되었다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 29는 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 xIL13 hAb를 생산한 세포의 배양물에서 경시적으로 평균 포스페이트 농도를 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C (Tg/Tp 28°C 또는 Tg/Tp 30°C, 각각)의 항온에서 성장되었거나, 또는 성장 단계 동안 30°C에서 성장되었고, 그 다음 생산 단계 (Tg 30 Tp 28) 동안 28°C까지 이동되었다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 30은 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 xIL13 hAb를 생산한 세포의 배양물의 경시적으로 평균 OUR을 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C (Tg/Tp 28°C 또는 Tg/Tp 30°C, 각각)의 항온에서 성장되었거나, 또는 성장 단계 동안 30°C에서 성장되었고, 그 다음 생산 단계 (Tg 30 Tp 28) 동안 28°C까지 이동되었다. 각 조건에 사용된 샘플의 번호가 제공된다 ("N").

도 31은 phoA 프로모터에 의해 유도된 FkpA 및 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 경시적으로 생산된 xIL13 hAb의 평균 역가를 보여준다. 배양물은 28°C 또는 30°C, 표지됨 (Tg/Tp 28°C 또는 Tg/Tp 30°C, 각각)의 항온에서 성장되었거나, 또는 성장 단계 동안 30°C에서 성장되었고, 그 다음 생산 단계 (Tg 30 Tp 28) 동안 28°C까지 이동되었다.

도 32는 동반한 표에서 패턴에 의해 확인된 상이한 공정 조건하에 단일 플라스미드 (MD157)와 xIL13 hAb 역가의 실험 (DoE) 분석의 부분 요인 설계의 결과를 보여준다.

도 33은 IPTG의 부재하에 tacII 프로모터에 의해 유도된 FkpA, DsbA 및 DsbC를 또한 암호화한 TIR2,2 벡터로부터 생산된 xIL4 hAb의 역가를 보여준다. 배양물은 30°C (Tg/Tp 30°C)의 항온에서 성장되었거나, 또는 성장 단계 동안 34°C에서 성장되었고, 그 다음 생산 단계 (Tg 34 Tp 25) 동안 25°C까지 이동되었다.

도 34는 동반한 표에서 패턴에 의해 확인된 상이한 공정 조건하에 단일 플라스미드 (MD341)와 xIL17 hAb 역가의 실험 (DoE) 분석의 부분 요인 설계의 결과를 보여준다.

도 35는 제1 적합화 샤퍼론 단백질 공-발현 및 그 다음 xIL13 hAb 역가에 공정 단계 (예를 들면, 교반 속도, Tg , 및 Tp)의 효과를 보여준다.

도 36A는 66F8 및 67A6 숙주 균주에서 수행된 발효로부터 가용성 xIL13 hAb 역가를 보여준다. **도 36B**는 양쪽 66F8 및 67A6 숙주 균주에서 72 시간에 총 xIL13 경쇄 및 중쇄 농도를 보여준다. 양쪽 조건에 대하여 N = 2.

도 37A는 일정 발효 온도에서 66F8 및 67A6 숙주 균주에서 수행된 발효로부터 가용성 xIL4 hAb 역가를 보여준다. **도 37B**는 온도 시프트를 사용한 발효 조건하에 66F8 및 67A6 숙주 균주에서 수행된 발효로부터 총 가용성 xIL4 hAb 역가를 보여준다. 양쪽 조건에 대하여 N = 2.

도 38A는 xIL4 경쇄 역가를 보여주며, **도 38B**는 온도 시프트를 사용한 발효 조건하에 66F8 및 67A6 숙주 균주에서 수행된 발효로부터 xIL4 중쇄 역가를 보여준다. 양쪽 조건에 대하여 N = 2.

도 39는 xIL33 hAb 분비 플라스미드의 지도를 제공한다. LC 및 HC 개방형 판독 프레임은 TIR2와 작동가능한 조합으로 독립적으로 배치된다.

도 40은 30°C의 항온 (기본 사례)에서 샤페론 DsbA, DsbC, FkpA의 공-발현의 부재하에 수행된 발효, 및 동일한 공정 조건 (w/ 샤페론)하에 샤페론 DsbA, DsbC 및 FkpA 공-발현의 존재하에 수행된 발효에서 xIL33 hAb의 축적을 예증한다.

도 41은 샤페론 FkpA, DsbA, DsbC를 함유한 xIL33 hAb 단일 플라스미드로 수행된 실험 (DoE)의 설계로부터 aIL33 hAb 역가 차이를 보여준다. DoE 인자는 pH, 성장 온도 (Tg), 생산 온도 (Tp), 및 생산 단계 표적 산소 흡수 속도 (OUR)를 포함하였다.

도 42는 TIR1 (서열 번호: 42), TIR2 (서열 번호: 43) 및 TIR3 (서열 번호: 44) FkpA 신호 서열 변이체의 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 단일 뉴클레오티드 치환은 특이적 코돈의 제3 위치에서 실시되었고 FkpA 신호 웨티드 서열 (서열 번호: 45)의 아미노산 서열을 변경하지 않는 동의어 코돈 변화를 나타낸다.

도 43은 TIR1 FkpA 변이체 (플라스미드 19)에 비하여 FkpA TIR 변이체의 정량적 강도를 보여준다.

도 44는 TIR1, TIR2 및 TIR3 FkpA TIR 변이체로 수행된 발효에서 xIL13 hAb의 축적을 보여준다. 각 조건에서 생산된 역가는 TIR1, TIR2 및 TIR3 변이체, 각각에 대하여 1.5, 2.5 및 4.0 g/L이었다.

도 45는 TIR1, TIR2 및 TIR3 FkpA TIR 변이체로 수행된 발효에서 xIL33 hAb의 축적을 보여준다.

도 46은 TIR1, TIR2 및 TIR3 FkpA 변이체로 수행된 발효에서 xIL17 hAb의 축적의 플롯을 보여준다.

도 47A는 FkpA TIR 변이체로 수행된 발효에서 xIL13 hAb의 축적의 플롯을 보여준다. **도 47B**는 발효의 끝에서 xIL13 hAb 공정으로부터 가용성 분획에 존재한 FkpA의 수준을 보여준다.

도 48A는 변경된 산소 전달 속도 (OTR) 및 대조군 발효 조건에 대하여 산소 흡수 속도 (OUR)를 보여준다. 변경된 OTR 및 대조군 발효는 약 5 mmol/L/min의 유사한 피크 OUR 및 2.75 mmol/L/min의 유사한 교반후 시프트 표적 OUR을 달성하였다. **도 48B**는 변경된 OTR 및 대조군 발효 조건에 대하여 성장 프로파일을 보여준다. 변경된 OTR 및 대조군 발효는 유사한 성장 프로파일을 가졌고 모두는 피크 250의 OD₅₅₀을 달성하였다. xIL13 hAb 대조군 (Ctrl) 최상 조건 = 1 바 배압 (BP), 20 표준 리터 / 분 (SLPM), 및 교반 속도 시프트 650 내지 475 rpm. xIL13 hAb 변경된 OTR 조건 = 0.3 바 배압, 13 SLP, 및 교반 속도 시프트 880 내지 650 rpm.

도 49는 변경된 OTR 및 대조 조건에 대하여 xIL13 hAb 축적 프로파일을 보여준다. 변경된 및 대조 조건은 발효 동안 유사한 축적 프로파일을 가졌고 모두는 72 시간에서 최대 평균 역가 4.1 및 4.2 g/L, 각각을 달성하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본원에서 제공된 실시예는 다중 쇄 단백질의 각 쇄 (예를 들면, 절반-항체의 경쇄 및 중쇄)를 암호화한 번역 단위체와 조합으로 하나 이상의 특이적 샤페론 단백질의 공-발현이 원핵 숙주 세포 시스템에서 조립된 다중 쇄 단백질의 생산을 증가시킨다는 것을 입증한다. 실시예는 후속의 공정 개선, 예컨대 발효의 특정 상에 대한 특이적 온도 및 교반 속도가 발현 벡터 개선을 넘어 생산 및 강건성에서 유의미한 증대를 초래한다는 것을 추가로 입증한다. 전반적으로, 본원에서 기재된 방법은 예시적 2쇄 폴리펩티드 (예를 들면, 절반 항체)의 생산에서 적어도 10-배 증가를 달성한다.

[0018] 일 양태에서, 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키기 위해 숙주 세포를 순환시킴으로써 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 함유한 폴리펩티드의 생산 방법이 본원에서 제공되고, 숙주 세포를 배양시켜 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키고, 이로써 발현시 2쇄가 접히고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하는 단계; 여기에서 숙주 세

포는 (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; 및 (3) 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 함유하고; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 조건 하에 배양 배지에서 배양되고: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초과이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초과이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 생물학적 활성 폴리펩티드를 회수하는 단계. 한 양태에서 폴리펩티드는 2쇄로 이루어지고, 반면에 또다른 양태에서 폴리펩티드는 3, 4, 5 이상의 쇄를 포함한다.

[0019] 또다른 양태에서, 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키기 위해 숙주 세포를 순환시킴으로써 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 함유한 폴리펩티드의 생산 방법이 본원에서 제공되고, 여기에서 발현시 2쇄는 접혀지고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성함; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 폴리뉴클레오티드를 함유하고: (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2, 및 제3 샤페론 단백질은 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로부터 선택되고; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 조건하에 배양 배지에서 배양되고: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계, 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초과이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초과이다; 및 (b) 숙주 세포로부터 생물학적 활성 폴리펩티드를 회수함. 한 양태에서 폴리펩티드는 2쇄로 이루어지고, 반면에 또다른 양태에서 폴리펩티드는 3, 4, 5 이상의 쇄를 포함한다.

I. 정의

[0021] 본 개시내용을 상세히 기재하기 전에, 본 개시내용은 특정한 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되지 않으며, 그것은 물론 가변적일 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 구현예를 기재하기 위한 것이며 제한하는 것으로 의도되지 않음이 또한 이해되어야 한다.

[0022] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 ("a," "an," 및 "the")는, 그 내용이 다르게 명확히 지시되지 않으면, 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "분자"에 대한 지칭은 2개 또는 그 초과의 그와 같은 문자의 조합 등을 임의로 포함한다.

[0023] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "약"은 본 기술 분야의 숙련가에게 쉽게 공지된 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낸다. 본원에서 "약(about)" 값 또는 파라미터에 대한 지칭은 상기 값 또는 파라미터 그 자체에 관한 구현예를 포함한다 (그리고 기술한다). 최대로, 용어 "약"은 본원에서 사용된 바와 같이 값을 참조로, 그 값의 90% 내지 110%를 포함한다 (예를 들면, 제1 및 제2 TIR의 상대적 번역 강도 약 1.0 내지 약 3.0은 0.9 내지 3.3의 범위로 상대적 번역 강도를 지칭한다).

[0024] 본원에 기재된 개시내용의 양태 및 구현예는 "포함하는(comprising)", "구성되는(consisting) 및 "~로 본질적으로 구성되는"의 양태 및 구현예를 포함하는 것으로 이해된다.

[0025] 용어 "2쇄를 포함한 폴리펩티드"는, (용어 "2쇄 단백질" 및 "2쇄 폴리펩티드"는 본원에서 교환가능하게 또한 사용될 수 있다), 본원에서 사용된 바와 같이 1 초과의 상이한 폴리펩티드 쇄를 함유한 임의의 폴리펩티드를 지칭하기 위해 의도된다. 일부 구현예에서, 2쇄 단백질은, 제한 없이 디설파이드 결합을 포함하여, 하나 이상의 문자내 결합을 통해 함께 연결된 2 이상의 폴리펩티드의 거대분자 착물을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 2쇄 단백질은 폴리펩티드 링커에 의해 연결된 2개의 상이한 폴리펩티드 쇄 (예를 들면, 항체 중쇄 및 항체 경쇄)에 속하는 아미노산 서열을 갖는 단일 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이 경우에, 2쇄 단백질은 단일 쇄를 물리적으로 나타낼 수 있지만, 이들이 2개의 별도 단백질 쇄이면 단일 쇄의 2 이상의 분율은 기능적으로 행동할 수 있다. 예를 들어, 단일 쇄 항체는, 폴리펩티드 링커에 의해 연결되어도, 그럼에도 불구하고 이들이 문자간 결합 (예를 들면, 하나 이상의 디설파이드 결합)에 의해서만 관련된 별도 폴리펩티드인 것처럼 접혀지고 조립되는 기능적 중쇄 및 기능적 경쇄를 포함할 수 있다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 종류는 추가의 DNA 분절을 이에 결찰시킬 수 있는 환형 이중가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 벡터의 또 다른 유형은 파아지 벡터이다. 벡터의 또 다른 유형은 바이러스벡터이며, 여기서 추가의 DNA 분

절은 바이러스 계놈으로 결찰될 수 있다. 특정 벡터들은 이들이 도입된 숙주 세포에서 자율적으로 복제될 수 있다 (이를 테면, 복제의 세균성 원점 및 에피좀성 포유류 벡터들을 보유하는 세균성 벡터들). 다른 벡터들 (이를 테면, 비-에피좀성 포유류 벡터들)은 숙주 세포 안으로 도입시에 숙주 세포의 계놈안에 통합될 수 있고, 이로 인하여 숙주 계놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 주도할 수 있다. 그러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는, 간략히 "재조합 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있으며, 플라스미드가 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이다.

- [0027] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "시스트론"은 폴리펩티드 쇄 및 인접 조절 영역에 대한 뉴클레오티드 서열 암호화를 포함하는 번역 단위와 넓은 범위에서 상당한 유전 요소를 지칭하는 것으로 의도된다. "시스트론"은, 예를 들어, 하나 이상의 개방형-판독 프레임, 번역 개시 영역 (TIR; 아래 본원에서 정의됨), 신호 서열 및 종결 영역을 포함할 수 있다.
- [0028] "다시스트론성" 발현 벡터는 하나의 단일 프로모터의 조절적 제어 하에서, 다중 시스트론을 함유 및 발현하는 단일 벡터를 지칭한다. 다시스트론성 벡터의 통상적인 예시는 1개의 프로모터의 제어 하에서 2개의 상이한 폴리펩티드를 함유 및 발현하는 "디시스트론성(dicistronic)" 벡터이다. 디시스트론성 또는 다시스트론성 벡터의 발현에서, 다중 유전자는 우선 단일 번역 단위로 전사되고, 이후 개별적으로 번역된다.
- [0029] "전사 단위체"는 단일 RNA 전사체로서 전사되는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. "번역 단위체"는 폴리펩티드를 암호화하는 그리고, 번역된 경우, 폴리펩티드를 생산하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 상기 기재된 바와 같이, 다시스트론성 폴리뉴클레오티드는 다중 번역 단위체와 단일 전사 단위체를 함유할 수 있다.
- [0030] 본 개시내용에 따른 "개별 시스트론" 발현 벡터는 적어도 2개의 개별 프로모터-시스트론 쌍을 포함하는 단일 벡터를 지칭하고, 여기서 각 시스트론은 이의 고유 프로모터의 제어 하에 있다. 개별 시스트론 발현 벡터의 발현에서, 상이한 유전자의 전사 및 번역 둘 다는 개별적이고 독립적이다.
- [0031] "샤페론 단백질"은 본원에서 사용된 바와 같이, 제한 없이 2쇄 단백질을 포함하여, 다른 거대분자의 접힘 및 조립에 조력하는 임의의 단백질을 지칭한다. 일반적으로, 샤페론 단백질은 단백질 접힘 또는 조립을 촉진시키기 위해 많은 상이한 기전에 의해 작용할 수 있다. 예를 들어, 샤페론 단백질은 단백질 접힘 및/또는 조립을 촉진시킬 수 있고, 사슬내 디설파이드 결합의 형성을 촉매화할 수 있고, 단백질 펼침 및/또는 분해 (예를 들면, 오류-접힘 단백질 또는 다중단백질 착물의)를 촉진시킬 수 있고, 응집을 예방할 수 있고, 단백질 분해, 등등에 조력할 수 있다.
- [0032] "번역 개시 영역" 또는 TIR 또는 번역 개시 영역 또는 번역 개시 서열은, 본원에서 사용된 바와 같이, 관심 유전자의 번역 개시의 효율성을 제공하는 핵산 영역을 지칭한다. 일반적으로, 특정 시스트론 내의 TIR은 리보솜 결합 부위 (RBS) 및 RBS로의 5' 및 3' 서열을 포함한다. RBS는 최소한으로, 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 및 개시 코돈 (AUG)을 함유하도록 정의된다. 따라서, TIR은 또한 번역될 핵산 서열 중 적어도 부분을 포함한다. 바람직하게는, 본 개시내용의 TIR은 시스트론 내 경쇄 또는 중쇄에 대하여 암호화하는 서열에 선행하는 신호 웨პ티드를 암호화하는 분비 신호 서열을 포함한다. TIR 변이체는, TIR의 특성, 예컨대 본원 하기에 정의된 번역 강도를 변경하는, TIR 영역 내 서열 변이체 (특히 치환)을 함유한다. 바람직하게는, 본 개시내용의 TIR 변이체는 시스트론 내 경쇄 또는 중쇄에 대하여 암호화하는 서열에 선행하는 분비 신호 서열의, 우선 2 내지 약 14개, 바람직하게는 4 내지 12, 더욱 바람직하게는 약 6개 코돈 내의 서열 치환을 함유한다.
- [0033] 용어 "번역 강도"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 제어 시스템 내 분비된 폴리펩티드의 측정치를 지칭하며, 여기서 TIR의 하나 이상의 변이체는, 상동한 배양 및 검정 조건 하에서 야생형 TIR 또는 일부 다른 대조군과 비교하여, 폴리펩티드의 분비 및 그 결과를 지시하는데 사용된다. 임의의 하나의 이론에 제한됨 없이, "번역 강도"는 본원에서 사용된 바와 같이, 예를 들어 및 제한 없이, mRNA 안정성, 리보솜 결합 부위에 대한 리보솜 결합의 효율, 등등의 평가를 포함할 수 있다.
- [0034] "분비 신호 서열" 또는 "신호 서열"은 짧은 신호 웨პ티드에 대해 암호화하는 핵산 서열을 지칭하며, 이는 세포 막, 일반적으로 원핵생물의 내부 막 또는 내부 막과 외부 막 둘 다를 통하여 새롭게 합성된 관심 단백질을 지시하는데 사용될 수 있다. 이와 같이, 해당 단백질 예컨대 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 폴리펩티드는 원핵 숙주 세포의 주변세포질에 또는 배양 배지에 분비된다. 분비 신호 서열에 의하여 암호화된 신호 웨პ티드는 숙주 세포에 내인성이거나, 이는 외인성이 수 있다 (발현될 폴리펩티드에 천연인 신호 웨პ티드를 포함). 분비 신호 서열은 전형적으로, 발현될 폴리펩티드의 아미노 말단에서 존재하고, 전형적으로 세포질로부터의 폴리펩티드의 생합성

및 분비 사이에서 효소적으로 제거된다. 따라서, 신호 펩티드는 일반적으로 성숙 단백질 생성물에서는 존재하지 않는다.

[0035] "작동가능하게 연결된"은, 2개 이상의 성분의 병치를 지칭하며, 기술된 상기 성분은 그것들이 그들의 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계에 있다. 예를 들면, 프로모터는, 이것이 연결된 서열의 전사 또는 발현을 제어 또는 조절할 경우, 암호화 서열에 작동가능하게 연결된다. 필수적인 것은 아니나 일반적으로, "작동적으로 연결된" DNA 서열은 인접하고, 2개의 단백질 암호화 영역에 결합시킬 필요가 있거나 분비 리더의 경우에, 인접하고 판독 프레임 내에 있다. 그러나, 작동가능하게 연결된 프로모터가 일반적으로 암호화 서열의 업스트림에 위치하더라도, 이는 그것과 필수적으로 인접하는 것은 아니다. 작동가능하게 연결된 인핸서는 암호화 서열의 업스트림, 또는 그 내부, 또는 다운스트림에, 그리고 프로모터로부터 상당한 거리에 위치할 수 있다. 연결은, 본분야에 알려진 재조합 방법, 예를 들어 PCR 방법을 사용하여, 어닐링에 의하여, 또는 편리한 제한 부위에서의 결찰에 의하여 달성된다. 편리한 제한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커는 통상적인 관행에 따라 사용된다.

[0036] "조절 요소"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 이형 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 폴리펩티드로 전사 및 번역하는데 필요한, 시스로 존재하는 뉴클레오티드 서열이다. 전사 조절 요소는 일반적으로 발현될 유전자 서열 5' 프로모터, 전사 개시 및 종결 부위 및 폴리아데닐화 신호 서열을 포함한다. 용어 "전사 개시 부위"는 1차 전사체, 즉, mRNA 전구체로 편입된 제1 핵산에 상응하는 작제물 내의 핵산을 지칭하며; 전사 개시 부위는 프로모터 서열과 중첩된다.

[0037] "프로모터"는 이와 작동가능하게 연결된 유전자 또는 서열의 전사를 조절하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 프로모터는 RNA 폴리머라아제 결합 및 전사 개시에 대한 신호를 포함한다. 사용된 프로모터는 선택된 서열의 발현이 고려되는 숙주 세포의 세포 유형에서 기능적일 것이다. 다양한 상이한 공급원으로부터 유래된 구성적이고, 유도 가능하고, 그리고 억제 가능한 프로모터를 포함하는 다수의 프로모터는 본 분야에 잘 알려져 있고 (그리고 GenBank와 같은 데이터베이스에서 등록됨), (예를 들어, 보관소, 예컨대 ATCC, 뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개인적 공급원으로부터 유래된) 클로닝된 폴리뉴클레오티드 내로, 또는 이로서 이용 가능하다. 유도성 프로모터로, 프로모터의 활성은 신호, 예를 들면, IPTG 또는 포스페이트 고갈의 존재에 대한 반응에서 증가 또는 감소한다.

[0038] 용어 "숙주 세포" (또는 "재조합 숙주 세포")는, 본원에 사용된 바와 같이, 외인성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 재조합 플라스미드 또는 벡터의 유도에 의하여 유전적으로 변경된, 또는 유전적으로 변경될 수 있는 세포를 지칭한다. 그러한 용어는 특정 대상체 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적인 자손을 지칭하는 것으로 의도된다는 것이 이해된다. 특정 변형이, 예를 들면, 돌연변이 또는 환경적 영향에 기인하여 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 그러한 자손은 사실, 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다.

[0039] 용어 "약제학적 제형"은 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 허용하는 형태이고, 제형이 투여될 대상체에 허용 불가능하게 독성이 있는 추가 성분을 함유하지 않는 제조물을 나타낸다. 그러한 제형은 무균성일 수 있다. "약학적으로 허용 가능한" 부형제 (비히클, 첨가제)는 이용된 활성 성분의 유효한 용량을 제공하기 위해 대상체 포유동물에 합리적으로 투여될 수 있는 것이다.

[0040] 치료의 목적을 위한 "대상체" 또는 "개체"는, 인간, 가정용 및 농장용 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 등을 포함하여, 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0041] 용어 "항체"는 본원에서 광범위한 의미로 사용되며, 구체적으로는 단클론성 항체 (전장 단클론성 항체 포함), 다클론성 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내기만 한다면 항체 단편을 포함한다.

[0042] "단리된" 항체는 그것의 천연 환경의 성분로부터 확인되고 분리되고 및/또는 회수된 항체이다. 그 천연 환경의 오염물질 성분은 항체에 대한 연구, 진단적 또는 치료적 사용을 방해할 물질이며, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 (1) 예를 들면, Lowry 방법에 의해 결정된 항체의 95 중량% 초과로, 일부 구현예에서 99 중량% 초과로; (2) 예를 들면, 회전 컵 시퀴네이터를 이용해서 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 개 잔기를 수득하기 충분한 정도로, 또는 (3) 예를 들면, 쿠마씨 블루 또는 은 염색을 이용해서 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질성까지 정제된다. 단리된

항체는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에 재조합 세포 내에서 원위치에 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0043] "천연(native) 항체"는 보통 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 반면 디설파이드 연결기의 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄 중에서 다변한다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 디설파이드 가교를 가진다. 각 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인 (V_H)과 그 다음 수많은 불변 도메인을 가진다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인을 (V_L) 그리고 그 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 간 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0044] 용어 "불변 도메인"은, 항원 결합 부위를 함유하는, 면역글로불린의 다른 부분, 즉 가변 도메인에 비하여 더욱 보존된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분자의 부문을 지칭한다. 불변 도메인은 중쇄의 C_H1 , C_H2 및 C_H3 도메인 (집합적으로, CH) 및 경쇄의 CHL (또는 CL) 도메인을 함유한다.

[0045] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄의 가변 도메인은 " V_H "로 불릴 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 " V_L "로 불릴 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변성 부분이고 항원-결합 부위를 함유한다.

[0046] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체 중에 서열에서 광범위하게 상이하고 그리고 그것의 특정한 항원에 대한 각각의 특정한 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체를 통해 고르게 분포되어 있지 않다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변성 영역(HVR)으로 불리는 3 개 절편에 집중된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역(FR)으로 불린다. 원상태 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 대부분 베타-시트 배치를 채용하며, 베타-시트 구조를 연결하고 일부 경우에서 그 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3 개의 HVR에 의해 연결된 4 개의 FR 영역을 포함한다. 각 사슬에서 HVR은 FR 영역에 의해 가까운 부근에서 함께 유지되며, 다른 사슬로부터의 HVR과 함께 항체의 항원-결합 부위 형성에 기여한다(참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접적으로 관여되지는 않지만, 다양한 효과기 기능, 예컨대 항체-의존적 세포성 독성에서의 항체 참여를 나타낸다.

[0047] 임의의 포유동물 종으로부터의 항체(면역글로불린) "경쇄"는 그것의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2 개의 명확히 구별되는 유형 중 하나에 배정될 수 있다.

[0048] 용어 IgG "이소형" 또는 "하위부류"는 본원에서 사용된 바와 같이 그의 불변 영역의 화학적 및 항원성 특징에 의해 정의된 면역글로불린의 임의의 하위부류가 의미된다.

[0049] 이들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체(면역글로불린)는 상이한 부류로 배정될 수 있다. 면역글로불린의 5개의 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 있으며, 이를 중 몇몇은 하위부류(이소형), 예를 들면 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 추가 구분될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , γ , ϵ , δ , 및 μ 로 불린다. 면역글로불린의 상이한 부류의 하부단위체 구조 및 3-차원 입체배치는 잘 알려지고 일반적으로, 예를 들어, 하기에 기술된다: Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). 항체는 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드와 항체의 공유 또는 비-공유 회합에 의해 형성된 더 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0050] 용어 "전장 항체," "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 하기 정의된 바와 같이 항체 단편이 아닌, 그것의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 나타내는데 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 나타낸다.

[0051] 본원의 목적을 위한 용어 "네이키드 항체(naked antibody)"는 세포독성 모이어티 또는 방사성 표지에 콘주케이트되지 않은 항체이다.

[0052] "항체 단편"은 바람직하게는 이들의 항원-결합 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항체 단편은 항원-결합 단편이다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체(linear antibodies); 단일-사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를

포함한다.

[0053] 항체의 파파인 분해는, 각각이 단일 항원-결합 부위, 및 잔류 "Fc" 단편을 가지고, 그의 명칭이 쉽게 결정화하는 이들의 능력을 반영한 것으로, "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 $F(ab')_2$ 단편을 산출하는데, 이것은 2개의 항원 결합 부위를 갖고 항원을 여전히 가교결합할 수 있다.

[0054] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 일 구현예에서, 2-쇄 Fv 종은 밀접한 비-공유 결합으로 1 개의 중쇄 및 1 개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 단일-쇄 Fv(scFv) 종에서, 1 개의 중쇄 및 1 개의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv 종에서와 비슷한 "이량체" 구조로 결합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 결합될 수 있다. 이는 상기 입체배지에서 각각의 가변 도메인의 3 개의 HVR은 VH-VL 이량체의 표면 상에서 항원-결합 부위를 정의하도록 상호작용한다. 총괄적으로, 6 개의 HVR은 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위에 비해 더 낮은 친화도에서지만, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3 개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0055] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 한지 영역으로부터 하나 또는 그 초과의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇 개의 잔기를 부가함으로써 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 이들 사이에 한지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0056] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 VH와 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하며, 그것은 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다. sFv의 재고를 위해, 예를 들어, 하기 를 참고한다: Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0057] 용어 "디아바디"는 2 개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편을 나타내며, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄(VH-VL)에서 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 동일한 쇄 상에서 2 개의 도메인 간 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 이용함으로써, 도메인은 또 하나의 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 이루고 2 개의 항원-결합 부위를 생성하도록 유도된다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디는 하기에 더욱 충분히 기술된다: 예를 들면, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). 트리아바디 및 테트라바디가 또한 하기에 기술된다: Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[0058] 용어 "단클론성 항체"는 본원에서 사용된 바와 같이 실질적으로 균질한 항체 집단에서 수득된 항체를 나타낸다, 예컨대 집단을 이루는 개체 항체는 가능한 돌연변이, 예를 들면 소량으로 존재할 수 있는 천연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 따라서, 수식어 "단클론성"은 구별되는 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특징을 나타낸다. 특정 구현예에서, 그와 같은 단클론성 항체에는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체가 포함되며, 여기서 상기 표적 결합 폴리펩티드 서열은 복수의 폴리펩티드 서열로부터의 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택이 포함되는 방법에 의해 수득되었다. 예를 들면, 선택 방법은 복수의 클론, 예컨대 혼성세포 클론, 파아지 클론, 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터의 독특한 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열이, 예를 들면 표적에 대한 친화도를 향상하기 위해, 표적 결합 서열을 인간화하기 위해, 세포 배양에서 그 생성을 향상하기 위해, 생체내 그 면역원성을 감소시키기 위해, 다중특이적 항체를 생성하기 위해 등등 추가 변경될 수 있으며, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체가 또한 본 개시내용의 단클론성 항체라는 것이 이해되어야 한다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체가 포함되는 다클론성 항체 제조 물과는 대조적으로, 단클론성-항체 제조물의 각각의 단클론성 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 유도된다. 그들의 특이성에 부가하여, 단클론성 항체 제조는 전형적으로 다른 면역글로불린에 의하여 비오염된다는 점에 있어 이롭다.

[0059] 수식어 "단클론성"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득되는 항체의 특징을 시사하며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 사용될 단클론성 항체는, 예를 들면 하기를 포함하는 다양한 기술에 의하여 제조될 수 있다: 원핵생물 숙주 세포 내 발현, 혼성세포 방법 (예컨대, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), 재조합 DNA 방법 (참고: 예컨대, 미국 특허 번호 4,816,567), 파지-디스플레이 기술 (참고: 예컨대, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), 및 인간 면역글로불린 유전자좌(locus) 또는 인간 면역글로불린 서열을 암호화하는 유전자의 일부 또는 모두를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하기 위한 기술 (참고: 예를 들면, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0060]

본원의 단클론성 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄 부분이 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고 나머지 쇄(들)은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 “키메라” 항체, 및 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편들을 포함한다 (참고: 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 및 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). 키메라성 항체에는 PRIMATTZED® 항체가 포함되며, 여기서 항체의 상기 항원-결합 영역은, 예를 들면 관심 항원으로 마카크 원숭이를 면역화하여 생성된 항체로부터 유도된다.

[0061]

비-인간(예를 들면, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린에서 유도된 최소 서열을 포함하는 키메라성 항체이다. 일 구현예에서, 인간화 항체는 수령체의 HVR로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도, 및/또는 수용력을 갖는 비-인간 종(공여체 항체), 예컨대 마우스, 랫트, 토끼, 또는 비인간 영장류의 HVR로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린(수령체 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 FR 잔기는 대응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 더욱이, 인간화된 항체는 수령체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가 정련하기 위해 제조될 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 적어도 하나, 그리고 전형적으로는 2개의 모든 가변 도메인을 포함할 것이며, 모든 또는 실질적으로 모든 초가변성 루프는 비-인간 면역글로불린의 것과 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것들이다. 상기 인간화된 항체는 임의로 또한 적어도 면역글로불린 불변 영역(Fc) 부분, 전형적으로 인간 면역글로불린의 부분을 포함한다. 추가 세부사항에 대해서는, 예를 들면 하기를 참고한다: Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). 또한, 예를 들어 하기를 참고한다: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); 및 미국 특허 6,982,321 및 7,087,409.

[0062]

"인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체에 대응하고/하거나 본원에서 개시된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기술을 이용해서 제조된 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 특히 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함하는 당해기술에 공지된 다양한 기술을 이용해서 생성될 수 있다. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). 또한 인간 단클론성 항체의 제조를 위해 하기에 기재된 방법이 이용 가능하다: Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). 또한 하기를 참고한다: van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). 인간 항체는 항원 유발에 반응하여 그와 같은 항체를 생성하기 위해 변형되었지만, 그 내인성 유전자위가 불활성화된 형질전환(transgenic) 동물, 예를 들면 면역화된 제노마우스(예를 들면, 참고: XENOMOUSE™ 기술에 관한 미국 특허 6,075,181 및 6,150,584)에 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 또한 예를 들어, 다음을 참고한다: Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) (인간 B-세포 혼성세포 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관함).

[0063]

"종-의존성 항체"는 이것이 제2 포유동물 종 유래의 상기 항원의 상동체에 대해 갖는 것보다 제1 포유동물 종 유래의 항원에 대해 보다 강한 결합 친화성을 갖는 항체이다. 정상적으로, 종-의존성 항체는 인간 항원(예를 들

어, 약 1×10^{-7} M 이하, 바람직하게는, 약 1×10^{-8} M 이하 및 가장 바람직하게는 약 1×10^{-9} M 이하의 결합 친화성(Kd) 값을 갖는다)에 "특이적으로 결합"하지만 인간 항원에 대한 이의 결합 친화성 보다 적어도 약 50배, 또는 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 약한 제2 비인간 포유동물 종 유래의 항원의 상동체에 대해 결합 친화성을 갖는다. 종 의존성 항체는 상기 정의된 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있지만 바람직하게 인간화된 또는 인간 항체이다.

[0064] 본원에서 사용되는 용어 "초가변성 영역", "HVR" 또는 "HVR"는 서열이 초가변성이고/하거나 구조적으로 정의된 루프를 형성하는 항체-가변 도메인 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6 개의 HVR; VH에 3 개(H1, H2, H3), 및 VL에 3 개(L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6 개 HVR의 가장 큰 다양성을 나타내며, H3은 특히 항체에 대해 미세한 특이성을 부여하는데 있어서 독특한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. 참고: 예를 들면, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). 사실상, 중쇄만으로 구성된 천연 발생 낙타과(camelid) 항체는 경쇄의 부재 하에서 작용적이고 안정하다. 참고: 예를 들면, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

[0065] 수많은 HVR 묘사가 사용되며, 본원에서 포괄된다. 카밧 상보성-결정 영역(CDR)은 서열 가변성에 기반하며, 가장 일반적으로 사용된다(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 초티아는 대신에, 구조적 루프의 위치를 지칭한다 (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM HVR은 카밧 HVR 및 초티아 구조적 루프 간 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체-모델링 소프트웨어에 의해 이용된다. "접촉" HVR은 이용 가능한 착물 결정 구조의 분석에 기반한다. 이를 HVR 각각으로부터의 잔기가 아래에 주지된다.

표 1a. 항체 초가변 영역

루프	카밧	AbM	초티아	접촉부
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카밧 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (초티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0066]

[0068] HVR은 하기와 같이 "연장된 HVR"을 포함할 수 있다: 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) (VL 중) 및 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3) (VH 중). 초가변 도메인 잔기들은 이를 정의의 각각에 대해 문헌(Kabat et al., 상기)에 따라 넘버링한다.

[0069]

"프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 바와 같이 HVR 잔기 이외의 가변-도메인 잔기이다.

[0070]

용어 "카밧에서의 가변-도메인 잔기-넘버링" 또는 "카밧에서의 아미노산-위치 넘버링" 및 이들의 변형은 [Kabat et al., 상기]에서 항체 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 상기 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이것으로의 삽입에 대응하는 더 적거나 더 많은 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변 도메인에는 H2의 잔기 52 뒤에 단일 아미노산 삽입(카밧에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 뒤에 삽입된 잔기(예를 들면, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)가 포함될 수 있다. 잔기의 카밧 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카밧 넘버링된 서열과의 정렬에 의해 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0071]

카밧 넘버링 시스템은 가변 도메인 내 잔기(대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)에 대해 지칭할 때 일반적으로 사용된다(예를 들면, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 지수"는 일반적으로, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 지칭할 경우 사용된다(예컨대, 상기 Kabat et al.에 보고된 EU 지수). "카밧에서의 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0072]

어구 "선형 항체"는 하기에 기재된 항체를 지칭한다: Zapata et al. (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062). 간단히, 이를 항체는, 상보적 경쇄 폴리펩ти드와 함께, 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 Fd 분절 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

II. 분자 최적화

[0073] 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키기 위해 숙주 세포를 순환시킴으로써 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 함유한 폴리펩티드의 생산 방법이 본원에서 제공되고, 숙주 세포를 배양시켜 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키고, 이로써 발현시 2쇄가 접히고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하는 단계; 여기에서 숙주 세포는 (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; 및 (3) 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 함유하고; 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키기 위해 숙주 세포를 배양시킴으로써 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 함유한 폴리펩티드의 생산 방법이 본원에서 또한 제공되고, 여기에서 발현시 2쇄는 접혀지고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하고; 여기에서 숙주 세포는 하기를 포함한 폴리뉴클레오티드를 함유하고: (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체, 여기에서 제1, 제2, 및 제3 샤페론 단백질은 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0075] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키기 위해 배양되고, 여기에서 발현시 2쇄는 접혀지고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 2쇄 접힘 및 조립은 적절한 3-차원 2쇄 단백질 형태, 2쇄 단백질 조립, 또는 모두의 최종적인 채택을 촉진시키는 임의의 또는 모든 단계를 지칭할 수 있다. 접힘 및 조립은 그의 적절한 형태 및 접힘으로의 각 쇄의 접힘 및 조립을 지칭할 수 있거나, 또는 2 단백질 쇄의 분자내 결합에 의해 창출된 착물의 접힘 및 조립을 지칭할 수 있다. 유사하게, 각 쇄는 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하기 위해 접힘 및 조립될 수 있거나, 또는 2 단백질 쇄의 분자내 결합에 의해 창출된 착물은, 전체적으로, 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하기 위해 접힘 및 조립될 수 있다.

[0076] 생물학적 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드에 기인된 기능을 실시할 수 있는 임의의 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 생물학적 활성 폴리펩티드의 기능은, 제한 없이, 적절한 접힘 또는 조립, 또 다른 거대분자와 결합 또는 다른 상호작용, 및 효소 활성을 포함할 수 있다. 예증으로써, 생물학적으로 활성 항체는, 아래 추가 상세에 기재된 바와 같이, 제한 없이 에피토프에 대한 결합을 포함한 또는 항체 Fc 영역의 특성을 소지한, 항체에 기인된 적어도 하나의 기능을 실시할 수 있는 항체를 지칭할 수 있다.

샤페론 단백질

[0077] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 샤페론 단백질을 암호화한 번역 단위체를 함유한다. 상기 기재된 바와 같이, 샤페론 단백질은, 제한 없이 2쇄 단백질을 포함한, 다른 거대분자의 접힘 또는 조립에 조력하는 임의의 단백질을 지칭할 수 있다. 샤페론 단백질의 예는 제한 없이 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 열충격 단백질 (예컨대 Hsp60, Hsp70, Hsp90, 및 Hsp100 단백질)을 포함할 수 있다. 샤페론 단백질은 막을 통해 단백질의 이송, 예를 들면, 원형질막 또는 내형질망 막을 통해 폴리펩티드 쇄의 전좌에 또한 조력할 수 있다.

[0078] 일부 구현예에서, 샤페론 단백질은 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제일 수 있다. 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제 (용어 "프롤릴 이소머라아제", "로타마아제", 및 "PPiase"는 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다)는 프롤린 또는 프롤릴-이미노펩티드 결합의 시스 및 트랜스 이성질체의 상호전환을 촉매화하는 임의의 효소를 지칭할 수 있다. 상기 반응에 대한 EC 번호는 EC 5.2.1.8이다. 상기 EC 번호에 의해 기재된 반응을 촉매화하기 위해 공지된 또는 예상된 임의의 단백질은 본 개시내용의 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제일 수 있다. 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제 활성은 GO 용어 ID GO:0003755로 또한 기재될 수 있다. 상기 GO 용어 ID에 의해 기재된 분자 기능을 소지하기 위해 공지된 또는 예상된 임의의 단백질은 본 개시내용의 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제일 수 있다.

[0079] 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제 활성은 단백질 접힘 및 조립을 촉진시키기 위해 당해 기술에서 공지된다. 일부 구현예에서, 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제는 적절하게 접혀진 구조가 시스 프롤릴 결합을 포함하는 단백질에 대하여 트랜스 프롤릴 결합을 시스 프롤릴 결합으로 전환시킴으로써 단백질 접힘 및 조립에 조력할 수 있다. 일부 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제는 시스 프롤릴 결합이 부족한 단백질의 접힘 및 조립을 향상시키기 위해 또한 공지된다 (Bothmann H and Pluckthun A 2000 J. Biol. Chem. 275:17100). 일부 구현예에서, 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제는 시스 프롤릴 결합이 부족한 단백질의 조립 및 단백질 접힘에 조력할 수 있다. 따라서, 웨프티딜-프롤릴 이소머라아제 활성이 본원에서 기재된 방법에 유용한 샤페론 단백질을 확인하기 위해 기능적 특징으로서 작용할

수 있는 반면, 웨티딜-프롤릴 이소머라아제의 유용성은 그의 촉매적 활성 자체에 필연적으로 제한되지 않는다.

[0081] 일부 구현예에서, 웨티딜-프롤릴 이소머라아제는 FkpA 단백질이다. 일부 구현예에서, FkpA 단백질은 *E. coli* FkpA이다. *E. coli* FkpA는 종 *E. coli*에 속하는 박테리아의 단리물 또는 임의의 균주에서 fkpA 유전자에 의해 암호화된 임의의 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, *E. coli* FkpA는 EcoGene 수탁 번호 EG12900에 의해 기재된 fkpA 유전자에 의해 암호화된 단백질을 지칭한다. 일부 구현예에서, *E. coli* FkpA는 NCBI RefSeq 수탁 번호 NP_417806에 의해 기재된 서열을 갖는 단백질을 지칭한다.

[0082] 다른 FkpA 단백질은 당해 기술에 공지되어 있다. FkpA 단백질의 예는, 제한 없이, *S. 보이디* 웨티딜-프롤릴 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_000838252), *C. 영가에* 웨티딜-프롤릴 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_006687366), *K. 옥시토카* 웨티딜-프롤릴 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_004125943), *S. 엔테리카* 웨티딜-프롤릴 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_000838233), *K. 뉴모니애* 웨티딜-프롤릴 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_019704642), *S. 세레비지애* FPR3p (NCBI RefSeq 번호 NP_013637), *M. 머스큘러스* Fkpbl1a (NCBI RefSeq 번호 NP_032045), *M. 머스큘러스* Fkpbl2 (NCBI RefSeq 번호 NP_032046), *H. 사파엔스* FKBP2 (NCBI RefSeq 번호 NP_001128680), 및 *D. 멜라노가스테르* CG14715 (NCBI RefSeq 번호 NP_650101)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 FkpA 단백질은 *E. coli* FkpA에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 갖는다.

[0083] 일부 구현예에서, 샤퀘론 단백질은 단백질 디설파이드 산화환원효소일 수 있다. 단백질 디설파이드 산화환원효소 (용어 "단백질 디설파이드 이소머라아제" 및 "티올-디설파이드 이소머라아제"는 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다)는 단백질에서 디설파이드 결합의 재배열을 촉매화하는 임의의 효소를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 단백질 디설파이드 산화환원효소는 단백질에서 디설파이드 결합을 형성하기 위해 시스테인의 산화를 촉매화할 수 있다. 단백질 디설파이드 산화환원효소는 단백질에서 잘못 짹지음된 디설파이드 결합의 이성질체화를 또한 촉매화할 수 있다. 상기 반응의 EC 번호는 EC 5.3.4.1이다. 상기 EC 번호에 의해 기재된 반응을 촉미화하기 위해 공지된 또는 예상된 임의의 단백질은 본 개시내용의 단백질 디설파이드 산화환원효소일 수 있다. 단백질 디설파이드 산화환원효소 활성은 GO 용어 ID GO:0015035에 의해 또한 기재될 수 있다. 상기 GO 용어 ID에 의해 기재된 분자 기능을 소지하기 위해 공지된 또는 예상된 임의의 단백질은 본 개시내용의 단백질 디설파이드 산화환원효소일 수 있다.

[0084] 단백질 디설파이드 산화환원효소 활성은 단백질 접힘 및 조립을 촉진시키기 위해 당해 기술에 공지된다. 예를 들어, 단백질 디설파이드 산화환원효소 활성은 단백질 접힘 및 조립 동안 적절한 분자내 및 분자간 디설파이드 결합의 형성을 촉진시킨다. 특히, 단백질 디설파이드 산화환원효소 활성은 원핵 세포의 주변세포질에서 발현되는 디설파이드 결합을 갖는 단백질에 중요하다.

[0085] 일부 구현예에서, 단백질 디설파이드 산화환원효소는 DsbA 단백질이다. 일부 구현예에서, DsbA 단백질은 *E. coli* DsbA이다. *E. coli* DsbA는 종 *E. coli*에 속하는 박테리아의 단리물 또는 임의의 균주에서 dsbA 유전자에 의해 암호화된 임의의 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, *E. coli* DsbA는 에코진(EcoGene) 수탁 번호 EG11297에 의해 기재된 dsbA 유전자에 의해 암호화된 단백질을 지칭한다. 일부 구현예에서, *E. coli* DsbA는 NCBI RefSeq 수탁 번호 NP_418297에 의해 기재된 서열을 갖는 단백질을 지칭한다.

[0086] 다른 DsbA 단백질은 당해 기술에 공지되어 있다. DsbA 단백질의 예는, 제한 없이, *S. 플렉스네리*(*S. flexneri*) 티올-디설파이드 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_000725335), *S. 다이센테리애*(*S. dysenteriae*) 티올-디설파이드 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_000725348), *C. 영가에*(*C. youngae*) 티올-디설파이드 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_006686108), 및 *S. 엔테리카*(*S. enterica*) 티올-디설파이드 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_023240584)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 DsbA 단백질은 *E. coli* DsbA에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 갖는다.

[0087] 일부 구현예에서, 단백질 디설파이드 산화환원효소는 DsbC 단백질이다. 일부 구현예에서, DsbC 단백질은 *E. coli* DsbC이다. *E. coli* DsbC는 종 *E. coli*에 속하는 박테리아의 단리물 또는 임의의 균주에서 dsbC 유전자에 의해 암호화된 임의의 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, *E. coli* DsbC는 EcoGene 수탁 번호 EG11070에 의해

해 기재된 *dsbC* 유전자에 의해 암호화된 단백질을 지칭한다. 일부 구현예에서, *E.coli* DsbC는 NCBI RefSeq 수탁 번호 NP_417369에 의해 기재된 서열을 갖는 단백질을 지칭한다.

[0088] 다른 DsbC 단백질은 당해 기술에 공지되어 있다. DsbC 단백질의 예는, 제한 없이, *S. sonnei* 단백질-디설파이드 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_000715206), *S. dysenteriae* 단백질-디설파이드 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_000715209), *E. fergusonii* 단백질-디설파이드 이소머라아제 (NCBI RefSeq 번호 WP_000715225), *S. bongori* 티올:디설파이드 교환 단백질 DsbC (NCBI RefSeq 번호 WP_020845161), 및 *S. enterica* 단백질 디설파이드 이소머라아제 DsbC (NCBI RefSeq 번호 WP_023183515)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 DsbC 단백질은 *E.coli* DsbC에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성을 갖는다.

[0089] 2개의 아미노산 서열, 또는 2개의 핵산 서열의 퍼센트 동일성을 결정하기 위해, 서열을 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다 (예를 들면, 최적의 정렬을 위해 제 1 및 제 2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 캡을 도입할 수 있으며 비교를 위해 비-상동 서열을 무시할 수 있다). 일 구현예에서, 비교를 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열 길이의 적어도 50%, 전형적으로 적어도 75%, 그리고 더 더욱 전형적으로 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%이다. 이어서 대응 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교된다. 제1 서열의 위치가 제2 서열의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점거된 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다 (본원에서 사용된 바와 같이 아미노산 또는 핵산 "상동성"은 아미노산 또는 핵산 "상동"과 같다).

[0090] 2개의 서열들 사이의 퍼센트 동일성은, 2개의 서열들의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 캡의 수, 및 각 캡의 길이를 고려하여, 서열들에 의해 공유된 동일한 위치들의 수의 합수이다. 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 표준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리듬을 사용하는 경우, 시험 및 표준 서열은 컴퓨터에 입력하고, 필요한 경우 서브서열 코디네이트를 지정하고 서열 알고리듬 프로그램 파라미터를 지정한다. 디폴트 프로그램 파라미터가 사용될 수 있거나 대안적인 파라미터가 지정될 수 있다. 이어서 상기 서열 비교 알고리듬은 프로그램 파라미터를 기준으로 표준 서열에 상대적인 시험 서열에 대한 % 서열 동일성을 계산한다. 상동성에 대하여 2 서열을 비교한 경우, 서열이 인접할 필요는 없지만, 임의의 캡이 이와 함께 전체 퍼센트 상동성을 감소시킬 패널티를 가질 것이다. blastn에 대하여, 디폴트 파라미터는 캡 개방 패널티 = 5 및 캡 확대 패널티 = 2이다. blastp에 대하여, 디폴트 파라미터 캡 개방 패널티 = 11 및 캡 확대 패널티 = 1이다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같은 "비교 창"은 서열이 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후 동일한 수의 인접 위치들의 표준 서열과 비교될 수 있는 20 내지 600개, 일반적으로 약 50 내지 약 200개, 보다 일반적으로 약 100 내지 약 150개로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 다수의 인접 위치들 중 어느 하나의 분절에 대한 언급을 포함한다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 비교용 서열의 최적의 정렬은 공지된 알고리즘 (예를 들면, Smith and Waterman, Adv Appl Math, 2:482, 1981의 국부 상동 알고리즘에 의해; Needleman and Wunsch, J Mol Biol, 48:443, 1970의 상동 정렬 알고리즘에 의해; Pearson and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA, 85:2444, 1988의 유사성 방법의 조사에 의해; 이들 알고리즘 FASTDB의 컴퓨터화된 실행 (Intelligenetics)에 의해, BLAST (National Center for Biomedical Information), GAP, BESTFIT, FASTA, 및 위스콘신 유전학 소프트웨어 패키지 (Genetics Computer Group, Madison, WI)에서 TFASTA를 이용하여, 또는 매뉴얼 정렬 및 시력 검사에 의해 수행될 수 있다.

[0092] 퍼센트 서열 상동성 및 서열 유사성의 결정에 적합한 알고리즘의 바람직한 예는 FASTA 알고리즘 (Pearson and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA, 85:2444, 1988; 및 Pearson, Methods Enzymol, 266:227-258, 1996)이다. 퍼센트 상동성을 계산하기 위해 DNA 서열의 FASTA 정렬에 사용된 바람직한 파라미터는 최적화된, BL50 매트릭스 15:-5, k-튜플 = 2; 접합 패널티 = 40, 최적화 = 28; 캡 패널티 = -12, 캡 길이 패널티 = -2; 및 폭 = 16이다.

[0093] 퍼센트 서열 상동성 및 서열 유사성의 결정에 적합한 알고리즘의 또 다른 바람직한 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘 (Altschul et al., Nuc Acids Res, 25:3389-3402, 1977; 및 Altschul et al., J Mol Biol, 215:403-410, 1990, 각각)이다. BLAST 및 BLAST 2.0은 본원에 기재된 파라미터와 함께 사용하여 본 개시내용의 핵산 및 단백질에 대한 % 서열 동일성을 결정한다. BLAST 분석 수행용 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터 (National

Center for Biotechnology Information) 웹사이트를 통해 공개적으로 입수 가능하다. 상기 알고리듬은 먼저 데 이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어로 정렬되는 경우 일부 양성-값 역치 스코어 T와 일치하거나 이를 만족시키는, 탐색 서열에서 길이의 약어 W를 동정함에 의해 고도의 스코어링 서열 쌍(HSP)을 동정함을 포함한다. T는 이웃 워드 스코어 역치(neighborhood word score threshold)라고 한다. 이들 초기 이웃 단어 히트는 이들을 함유하는 보다 긴 HSP를 발견하는 검색을 개시하기 위한 씨드로서 작용한다. 워드 히트(word hit)는 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한 각 서열을 따라 양방향으로 연장된다. 누적 스코어는 뉴클레오티드 서열에 대해 파라미터 M(한쌍의 매칭 잔기에 대한 보상 스코어; 항상 > 0) 및 N(미쓰매칭 잔기에 대한 폐널티 스코어; 항상 < 0)을 사용하여 계산한다. 아미노산 서열에 대해, 스코어링 매트릭스를 사용하여 누적 스코어를 계산한다. 누적 정렬 점수가 이의 최대 달성을 것으로부터 X 양만큼 하락하였을 때; 1회 이상의 음의 점수화 잔기 정렬 누적에 기인하여 누적 점수가 0 이하가 되었을 때; 또는 양 서열의 단부에 도달되었을 때, 각 방향에서 워드 히트 확장을 중단된다. 상기 BLAST 알고리듬 파라미터 W, T, 및 X는 정렬 민감성 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열에 대한)은 디폴트로서 11의 워드 길이(W), 10의 예상치(E), M=5, N=-4 및 양 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열에 대해, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이 및 10의 예상치(E) 및 50의 BLOSUM62 스코어링 매트릭스(문헌참조: Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci USA, 89:10915, 1989) 정렬치(B), M=5, N=-4 및 양 가닥의 비교를 사용한다.

[0094]

BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열 사이의 유사성의 통계학적 분석을 수행한다(예를 들면, 참고: Karlin and Altschul, Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873-5877, 1993). BLAST 알고리즘에 의하여 제공된 유사성의 일 측정은 최소 총합 확률($P(N)$)이며, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 매치가 우연히 발생할 확률의 지표를 제공한다. 예를 들어, 핵산은, 만약 참조 핵산에 대한 시험 핵산의 비교에서의 최소 총합 확률이 약 0.2 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만, 그리고 가장 바람직하게는 약 0.001 미만일 때, 참조 서열과 유사한 것으로 고려된다.

[0095]

유용한 알고리즘의 또 다른 예는 PILEUP이다. PILEUP은 관계 및 퍼센트 서열 상동성을 보여주기 위해 진행성, 쌍별 정렬을 이용한 관련된 서열의 그룹으로부터 다중 서열 정렬을 창출한다. 정렬을 창출하기 위해 사용된 클러스터링 관계를 보여주는 트리 또는 덴도그램을 또한 작도한다. PILEUP은, 공개된 방법(Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989)과 유사한 방법을 사용하여, 진행성 정렬 방법(Feng and Doolittle, J Mol Evol, 35:351-360, 1987)의 단순화를 이용한다. 프로그램은, 각각 5,000 뉴클레오티드 또는 아미노산의 최대 길이의, 최대 300 서열을 정렬할 수 있다. 다중 정렬 절차는 2개의 가장 유사한 서열의 쌍별 정렬로 시작하여, 2개 정렬된 서열의 클러스터를 생산한다. 상기 클러스터는 그 다음 정렬된 서열의 클러스터 또는 다음의 가장 관련된 서열로 정렬된다. 서열의 2개 클러스터는 2개의 개별적 서열의 쌍별 정렬의 단순 확대에 의해 정렬된다. 최종 정렬은 일련의 진행성, 쌍별 정렬에 의해 달성된다. 프로그램은 서열 비교의 영역에 대한 특이적 서열 및 그의 아미노산 또는 뉴클레오티드 좌표의 지정 및 프로그램 파라미터의 지정에 의해 실시된다. PILEUP을 비교하여, 참조 서열은하기 파라미터: 디폴트 캡 중량(3.00), 디폴트 캡 길이 중량(0.10), 및 청량된 말단 캡을 이용한 퍼센트 서열 상동성 관계를 결정하기 위해 다른 시험 서열과 비교된다. PILEUP은 GCG 서열 분석 소프트웨어 패키지, 예를 들면, 베전 7.0(Devereaux et al., Nuc Acids Res, 12:387-395, 1984)로부터 수득될 수 있다.

[0096]

다중 DNA 및 아미노산 서열 정렬에 적합한 알고리즘의 또 다른 바람직한 예는 CLUSTALW 프로그램이다(Thompson et al., Nucl Acids. Res, 22:4673-4680, 1994). ClustalW는 서열의 그룹 사이에서 다중 쌍별 비교를 수행하고 이를 상동성에 기반된 다중 정렬로 조립한다. 캡 개방 및 캡 확대 폐널티는 각각 10 및 0.05이었다. 아미노산 정렬에 대하여, BLOSUM 알고리즘은 단백질 중량 매트릭스(Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci USA, 89:10915-10919, 1992)로서 사용될 수 있다.

[0097]

발현 카세트 및 벡터

[0098]

일부 구현예에서, 숙주 세포는 (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; 및 (3) 웨티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로부터 선택된 적어도 하나의 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 (1) 폴리펩티드의 제1 쇄를 암호화한 제1 번역 단위체; (2) 폴리펩티드의 제2 쇄를 암호화한 제2 번역 단위체; (3) 제1 샤페론 단백질을 암호화한 제3 번역 단위체; (4) 제2 샤페론 단백질을 암호화한 제4 번역 단위체; 및 (5) 제3 샤페론 단백질을 암호화한 제5 번역 단위체를 포함한 폴리뉴클레오티드를 함유하고, 여기에서 제1, 제2, 및 제3 샤페론 단백질은 웨티딜-프롤릴 이소머라아제, 단백질 디설파이드 산화환원효소, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 적절하게 접혀진 및 조립된 2쇄 단백질의 증가된 생산이 단일 플라스미드 시스템(즉, 2쇄 단백질의 각 쇄를 암호화한 번역 단위체 및 하나 이상의 샤페론 단백질

을 암호화한 하나 이상의 번역 단위체) 또는 혼화성 플라스미드 시스템 (즉, 2쇄 단백질의 각 쇄를 암호화한 번역 단위체를 함유한 제1 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상의 샤페론 단백질을 암호화한 하나 이상의 번역 단위체를 함유한 제2 폴리뉴클레오티드)을 이용하여 달성을 수 있음이 본 개시내용의 발견이다.

[0099] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 프로모터의 3개 사본을 함유하고, 여기에서 제1 사본은 제1 번역 단위체와 작동가능한 조합이고, 제2 사본은 제2 번역 단위체와 작동가능한 조합이고, 제3개 사본은 제1 쇄, 제2 쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하기 위해 제3 번역 단위체와 작동가능한 조합이다. 일부 구현예에서, 3개의 샤페론 단백질 중 2개를 암호화한 번역 단위체의 2개는 단일 번역 단위체의 일부이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 각 번역 단위체와 작동가능한 조합으로 프로모터를 함유한다.

[0100] 일부 구현예에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 상기 기술된 바와 같이, 유도성 프로모터의 활성은 신호에 반응하여 증가 또는 감소된다. 예를 들어, 유도성 프로모터는 신호, 예컨대 IPTG의 존재에 대한 반응으로 전사를 촉진시킬 수 있다. 유도성 프로모터는 신호, 예컨대 포스페이트의 부재에 대한 반응으로 전사를 촉진시킬 수 있다. 이들 시나리오 중 하나로, 전사의 양은 신호의 양, 또는 이의 결핍에 비례할 수 있거나 또는 아닐 수 있다. 원핵 숙주 세포에 적합한 유도성 프로모터의 수많은 예는 당해 기술에 공지되어 있다. 이들은 비제한적으로 하기를 포함할 수 있다: lac, tac, trc, trp, pho, recA, tetA, nar, 파아지 P_L , cspA, T7, and P_{BAD} 프로모터 (더욱 상세한 기술에 대하여 하기를 참고: Terpe K. 2006 Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:211)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터의 3개 사본은 공동작용의 방식으로 별도 번역 단위체, 예를 들면, 2쇄 단백질 및 샤페론 단백질의 모든 쇄의 발현을 구동하기 위해 사용된다.

[0101] 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 IPTG-유도성 프로모터이다. IPTG-유도성 프로모터는 lac 오페론 (예를 들면, 알로락토오스)으로부터 전사를 촉진시킬 수 있는 이소프로필 β -D-1-티오갈락토파라노시드 (IPTG) 또는 임의의 다른 락토오스 유도체에 반응성인 방식으로 전사를 촉진시키는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭할 수 있다. IPTG-유도성 프로모터의 많은 예는, 제한 없이 tac (예를 들면, tacI, tacII, 등) 프로모터, lac 프로모터, 및 이들의 유도체 (예를 들면, lacUV5, taclac, 등등)을 포함하여, 당해 기술에 공지되어 있다.

[0102] 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 제1 쇄, 제2 쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하는 IPTG-유도성 프로모터이다. 샤페론 단백질의 발현을 조절한 IPTG-유도성 프로모터가, IPTG의 유도 없이, IPTG-유도성 프로모터가 IPTG에 의해 유도된 경우 샤페론 단백질의 발현과 비교로, 더 높은 생성물 역가를 촉진시키는 수준에서 샤페론 단백질의 발현을 촉진시키는 것이 본 개시내용의 놀라운 발견이다.

[0103] 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 배양 배지내 포스페이트가 고갈된 경우 제1 쇄, 제2 쇄 및 샤페론 단백질의 전사를 구동하는 pho 프로모터이다. pho 프로모터는 세포외 포스페이트 (예를 들어, 무기 포스페이트)에 반응성인 방식으로 전사를 촉진시키는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭할 수 있다. 예를 들어, *E.coli*에서 포스페이트 (Pho) 레귤론은 세포외 포스페이트를 감지하는 및, 포스페이트 수준에 대한 반응으로, Pho 프로모터를 통한 수많은 다운스트림 유전자의 발현을 조절하는 단백질 성분을 포함한다 (참고: 더욱 상세한 설명을 위하여, Hsieh YJ and Wanner BL 2010 Curr. Opin. Microbiol. 13(2):198). 박테리아가 배양 배지에서 성장된 경우, 상기 Pho 레귤론의 발현은 포스페이트 (예를 들면, 무기 포스페이트, Pi)가 배지에서 이용 가능한 경우 재생되기 위해 공지되고 포스페이트가 고갈된 경우 유도된다. 본원에서 기재된 방법에서 사용된 pho 프로모터의 하나의 비-제한 예는 *E.coli* phoA 프로모터이다. 상기 프로모터는 세포 배양 배지에서 포스페이트의 농도에 의존한 방식으로 원핵 숙주 세포에서 재조합 단백질 발현을 조절하기 위해 당해 기술에서 사용되고 널리 공지된다 (참고: Lubke C et al. 1995 Enzyme Microb. Technol. 17(10):923).

[0104] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 선택가능한 마커를 함유하고 배양 배지는 숙주 세포가 폴리뉴클레오티드를 보유하도록 유발시키는 단일 항생물질을 갖는 선택제를 포함한다. 유리하게는, 본원에서 기재된 방법은 하나 이상의 샤페론 단백질의 공-발현으로 2쇄 단백질의 쇄의 생산을 허용하여 이로써 이들 성분의 각각을 암호화한 번역 단위체가 모두 단일 폴리뉴클레오티드 (예를 들면, 본원에서 기재된 바와 같이 발현 플라스미드 또는 단일 플라스미드 시스템)에 포함된다. 그와 같은 시스템의 이점은, 이들 성분의 모두가 동일한 플라스미드에 의해 암호화되고, 단 하나의 선택가능한 마커가 원핵 숙주 세포에서 이를 폴리뉴클레오티드의 유지를 위하여 요구된다는 것이다.

[0105] 선택가능한 마커는, 세포가 선택, 즉, 선택가능한 마커가 부족한 세포(들)의 존재도에 비하여 선택가능한 마커를 보유한 세포(들)의 존재도를 우선적으로 증가시키기 위해 사용된 임의의 조건을 경험하는 경우, 숙주 세포의 생존을 촉진시키는 단백질을 암호화하는 임의의 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수 있다. 선택가능한 마커의 예는 항생제의 존재하에 숙주 세포 생존을 촉진시키는 유전자이다. 단일 항생물질을 갖는 상응하는 선택제 및 수많은

선택가능한 마커는 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 그리고 비제한적으로, 다수의 선택가능한 마커 및 상응하는 항생제는 하기에 기술 및 인용된다: Jang CW and Magnuson T 2013 PLoS ONE 8(2):e57075. 일부 구현 예에서, 선택가능한 마커는 숙주 세포의 계놈 내에 존재한 유전자 결실을 보완하는 유전자 (예를 들면, 플라스미드로부터 발현된 유전자)를 지칭할 수 있다. 이들 실시예에서, 세포가 선택 (즉, 숙주 계놈으로부터 결실된 유전자의 활성을 요구하는 조건하에 성장)을 경험한 경우, 유전자의 사본은 숙주 계놈의 결핍을 보완하는 플라스미드에 의해 공급하였고, 그렇게 함으로써 외인성 보완 유전자를 보유한 세포(들)에 대해 선택하였다. 상기 유전자는 세포 배지에서 부족한 특이적 영양소를 생산하기 위해 요구된 영양요구성 마커 또는 유전자를 포함할 수 있고, 이의 예는 추가로 본원에서 기재된다. 몇 개의 예시적 선택가능한 마커 및 항생제는 아래 추가로 기재된다.

[0106] 일부 구현예에서, 제1 번역 단위체는 제1 쇄의 암호화 영역과 작동가능한 조합으로 제1 번역 개시 영역 (TIR)을 포함하고, 제2 번역 단위체는 제2 쇄의 암호화 영역과 작동가능한 조합으로 제2 번역 개시 영역 (TIR)을 포함한다. 번역 개시 영역 (TIRs)은 원핵 숙주 세포에서 재조합 단백질의 번역에 주요함이 공지된다 (참고, 예를 들면, Simmons LC and Yansura DG 1996 Nat. Biotechnol. 14:629 및 Vimberg V et al. 2007 BMC Mol. Biol. 8:100). TIR은 번역 단위체의 번역 효율을 결정할 수 있다. TIR은 전형적으로 번역 단위체 특징 예컨대 개시 코돈, 샤인-달가르노 (SD) 서열, 및 번역 인핸서를 포함한다. TIR은 신호 펩티드를 암호화하는 분비 신호 서열을 추가로 포함할 수 있다. TIR의 특징 서열 및 간격은 번역 개시 효율을 조절할 수 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 TIR의 상대적 번역 강도는 약 1.0 내지 약 3.0이다. 2쇄 단백질의 각 쇄를 암호화한 번역 단위체를 포함하는 백터가 본원에서 기재되고, 각 번역 단위체는 TIR을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "번역 강도"는 번역 단위체의 번역을 통한 폴리펩티드의 생산을 지칭할 수 있다. 상기 생산은, 제한 없이 mRNA 번역, mRNA 안정성, mRNA에 대한 리보솜 결합의 효율, 및 그렇게 함으로써 암호화된 폴리펩티드의 접힘, 조립, 및/또는 전좌를 포함하여, 수많은 특징에 의존할 수 있다. 모든 실험적 TIR 및 대조 TIR이 동일한 조건하에 배양된 유사한 원핵 숙주 세포 (예를 들면, 동일한 속 및 종)에 의해 발현된 경우, 상대적 번역 강도는, 야생형 또는 대조 TIR을 갖는 번역 단위체에 의해 암호화된 폴리펩티드의 생산과 비교로, 특이적 또는 실험적 TIR을 갖는 번역 단위체에 의해 암호화된 폴리펩티드의 생산을 지칭할 수 있다. TIRs의 추가 설명은 미국 특허 번호 8,361,744에서 찾아질 수 있다.

재조합 폴리펩티드

[0108] 본 개시내용의 특정 양태는 2쇄를 갖는 폴리펩티드의 생산 방법에 관한 것이다. 유리하게는, 본원에서 기재된 방법은 많은 상이한 유형의 단백질, 특히 디설파이드 결합을 갖는 것, 예컨대 상기 기재된 바와 같이 2쇄 단백질의 발현, 접힘 및 조립의 촉진에 유용할 수 있다. 특정한 2쇄 단백질은 아래 기재되고, 본원에서 기재된 방법은 비제한적으로 이들 특정한 구현예이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 2쇄 단백질은 1 초파의 상이한 폴리펩티드 쇄를 함유한 단백질을 포함할 수 있다. 본원에서 기재된 많은 구현예가 2개의 폴리펩티드 쇄를 갖는 2쇄 단백질을 포함하여도, 2 초파의 폴리펩티드 쇄 (예를 들면, 3 이상의 폴리펩티드)를 갖는 2쇄 단백질이 고려되고 본원에서 기재된 방법에 의해 생산될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 만일 이들이 2개의 상이한 폴리펩티드 쇄 (예를 들면, 단일 쇄 항체, 단일 쇄 가변형 단편, 등등)이면 그대로 다르게는 결합하는 단일 폴리펩티드 쇄로 만들어진 2쇄 단백질은 또한 고려되고 본원에서 기재된 방법에 의해 생산될 수 있다.

[0109] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 2쇄 폴리펩티드의 2쇄는 적어도 하나의 디설파이드 결합에 의해 서로에 연결된다. 디설파이드 결합은 2개 티올기를 연결하는 임의의 공유 결합을 지칭할 수 있다. 폴리펩티드에서 디설파이드 결합은 전형적으로 시스테인 잔기의 티올기 사이에서 형성한다. 폴리펩티드 디설파이드 결합은 많은 폴리펩티드, 예컨대 본 개시내용의 2쇄 단백질의 접힘 및 조립에 중요하다는 것이 당해 기술에 공지되어 있다. 폴리펩티드 디설파이드 결합은 단일 폴리펩티드 쇄내 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합 (즉, 분자내 또는 쇄내 디설파이드 결합)을 포함할 수 있다. 폴리펩티드 디설파이드 결합은 별도 폴리펩티드 쇄상에서 발견된 시스테인 잔기 사이의 디설파이드 결합 (즉, 분자간 또는 쇄간 디설파이드 결합)을 또한 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 2쇄 폴리펩티드의 2쇄는 적어도 하나의 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된다.

[0110] 디설파이드 결합은 항체 및 항체 단편의 접힘 및 조립에 중요하다는 것이 당해 기술에 공지되어 있다. 상이한 항체 동위원소, 및 동위원소 내의 상이한 하위부류는 디설파이드 결합의 상이한 패턴을 소유하도록 공지된다. 예를 들어, IgG 항체는, 특정한 IgG 하위부류에 의존하여, 12개의 쇄내 디설파이드 결합, 각 경쇄와 그의 상응하는 중쇄 사이의 1개의 쇄간 디설파이드 결합, 및 중쇄 사이의 2 내지 11 쇄간 디설파이드 결합을 함유할 수 있다 (더욱 상세한 기술에 대하여, 하기를 참고: Liu H and May K 2012 MAbs. 4(1):17). IgM (참고, 예컨대,

Wiersma EJ 및 Shulman MJ 1995 J. Immunol. 154(10):5265), IgE (참고, 예컨대, Helm BA et al. 1991 Eur. J. Immunol. 21(6):1543), IgA (참고, 예컨대, Chintalacharuvu KR et al. 2002 J. Immunol. 169(9):5072), 및 IgD (참고, 예컨대, Shin SU et al. 1992 Hum. 항체 혼성세포 3(2):65)는 접힘 및 조립 동안 디설파이드 결합을 형성하도록 또한 공지된다.

[0112] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 2쇄 폴리펩티드는 숙주 세포에 대해 이종성이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 숙주 세포에 참조로 사용될 때 이종성 폴리펩티드는, 즉, 숙주 세포가 자연으로부터 단리된 경우, 숙주 세포에서 내인성으로 발현되지 않은 임의의 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 이종성 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 내인성으로 발현될 수 있는 폴리펩티드를 또한 지칭할 수 있지만, 숙주 세포가 자연으로부터 단리된 경우보다 상이한 조절하에 발현된다. 상이한 조절의 예는, 예컨대 이종성 프로모터, 예컨대 유도성 프로모터의 사용에 의해, 제한 없이 발현의 상이한 양, 상이한 자극에 반응으로 발현, 또는 발현의 임의의 다른 변경된 맥락을 포함할 수 있다.

[0113] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 2쇄 폴리펩티드는 이종이량체의 모노머이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이종이량체는 작동가능한 연결로 2개의 상이한 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 착물을 함유하는 임의의 폴리펩티드 착물을 지칭할 수 있다. 이종이량체의 비-제한 예는 2개의 상이한 항체 모노머 (즉, 작동가능한 연결로 경쇄-중쇄 쌍)로 구성된 이중특이적 또는 2가 항체이다. 상기 예에서, 제1 항원을 인식한 제1 중쇄-경쇄 쌍의 접힘 및 조립은 제1 항체 모노머를 생산한다. 제2 항원을 인식한 제2 중쇄-경쇄 쌍의 접힘 및 조립은 제2 항체 모노머를 생산한다. 이를 모노머는 이종이량체를 형성하기 위해 (이중특이적 항체에 대해 더욱 상세히 아래 기재된) 당해 기술에서 공지된 임의의 수단으로 조립될 수 있다. 이종이량체 항체 형성의 예증적인 예에 관한 추가적인 기술에 대하여, 다음을 참고한다: Ridgway JBB et al. 1996 Protein Eng. 9(7):617.

[0114] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 2쇄 폴리펩티드는 제1 쇄 및 제2 쇄가 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 나타내는 1가 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 1가 항체는 중쇄-경쇄 쌍이 제2 중쇄-경쇄 쌍과 작동 가능하게 연결되지 않은 중쇄-경쇄 쌍을 형성하기 위해 함께 작동가능하게 연결된 항체 중쇄 및 항체 경쇄로부터 제조된 임의의 폴리펩티드 착물을 지칭할 수 있다. 용어 "절반-항체 (hAb)"는 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 1가 항체는 항원을 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이에 특이적으로 결합하는" 또는 "이에 특이적인"은, 표적 (즉, 및 항체 간의 결합과 같은 측정가능하고 재생가능한 상호작용을 지칭하며, 이는 생물학적 분자를 포함하는 분자의 이종성 집단의 존재 하에서의 표적의 존재에 대한 측정요인이다. 예를 들면, 표적 (에피토프일 수 있음)에 결합하거나, 또는 특이적으로 결합하는 항체는 다른 표적에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합능으로, 더욱 쉽게, 및/또는 더 긴 지속시간으로 상기 표적에 결합하는 항체이다. 일 구현예에서, 비관련 단백질에 대한 항체의 결합 정도는, 예를 들면, 방사면역검정법(RIA)으로 측정 시, 약 10% 미만의 항체의 결합이다. 특정 구현예에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$, 또는 $\leq 0.1 nM$ 의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 구현예에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 중에서 보존된 단백질의 에피토프에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 특이적 결합은 필연적으로 (비록 포함할 수 있어도) 배타적인 결합을 요구하지 않는다.

[0116] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 2쇄 폴리펩티드는 분비성 단백질이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 분비성 단백질은 숙주 세포 주변세포질 또는 세포외 환경 속으로 숙주 세포에 의해 분비되는 임의의 단백질을 지칭할 수 있다. 분비성 단백질은 숙주 세포에 의해 내인성으로 분비되는 단백질일 수 있거나, 또는 분비성 단백질은 숙주 세포에 의해 내인성으로 분비되지 않은 단백질일 수 있지만 그의 분비를 촉진시키기 위해 그와 같은 방식으로 변형된다. 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단에서 전형적으로 발견된, 신호 서열의 존재는 분비를 위하여 분비 경로에 폴리펩티드를 유도할 수 있다. 수많은 신호 서열은 당해 기술에 공지되어 있고 분비성 단백질의 분비 촉진 또는 숙주 세포에 의해 자연적으로 분비되지 않은 단백질의 분비 허용에 유용할 수 있다; 참고, 예를 들면, Picken et al., Infect. Immun. 42:269-275 (1983); Simmons and Yansura, Nature Biotechnology 14:629-634 (1996); 및 Humphreys DP et al. 2000 Protein Expr. Purif. 20(2):252. 신호 서열의 하나의 비-제한 예는 열 안정한 장독소 II (STII) 신호 서열이다.

[0117] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 분비성 단백질은 숙주 세포의 주변세포질로부터 회수된다. 주변세포질은 내부 또는 세포질 막과 그람-음성 박테리아성 세포의 외막 사이에서 공간을 지칭하기 위해 당해 기술에서 공지된다. 이론에 제한되도록 바람 없이, 주변세포질이 디설파이드 결합의 형성을 선호하는 산화 환경인 것이 고려된다. 따라서, 그의 적절하게 접혀진 및 조립된 구조의 일부로서 디설파이드 결합을 갖는 폴리펩티드 (예를 들면, 본

개시내용의 2쇄 단백질)를 주변세포질에 국소화하는 것이 유리할 수 있다 (더욱 상세한 기술에 대해, 하기를 참고: Schlapschy M et al. 2006 Protein Eng. Des. Sel. 19(8):385).

[0118] 주변세포질성 단백질의 수많은 회수 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 주변세포질성 단백질의 대규모 정제의 하나의 비-제한 예는 유럽 특허 번호 EP1356052 B1 (참고, 예를 들면, 실시예 4)에 기재된다. 주변세포질성 단백질은 스페로블라스트 제조물로부터 주변세포질성 분획을 추출함으로써 회수될 수 있다 (참고, 예를 들면, Schlapschy M et al. 2006 Protein Eng. Des. Sel. 19(8):385). 일단 주변세포질성 추출물이 생성되면, 주변세포질성 단백질은 당해 기술에서 공지된 임의의 표준 단백질 정제 기술, 예컨대 친화성 정제, 크로마토그래피, 등등으로 정제될 수 있다.

항체

[0120] 본원에서 기재된 2쇄 단백질은 당해 기술에서 공지된 임의의 적합한 기술에 의해 제조될 수 있다. 2쇄 단백질의 하나의 예시적 부류는 항체이다. 아래 기재된 바와 같이, 항체는 항체 생성을 위한 당해 기술에서 이용가능한 기술을 이용하여 제조되고, 이의 예시적 방법은 하기 섹션에서 더욱 상세히 기재된다. 당해 분야의 숙련가는 아래 기재된 많은 방법이 항체 이외의 2쇄 단백질에 적용될 수 있음을 인식할 것이다.

[0121] 항체는 해당 항원 (예를 들면, 그리고 제한 없이, PD-L1 (예컨대 인간 PD-L1), HER2, 또는 CD3 (예컨대 인간 CD3), IL13, IL4, VEGFC, VEGFA, 및 VEGF)에 관련된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고 장애를 앓는 포유동물에 항체의 투여는 그 포유동물에서 치료적 이점을 초래할 수 있다.

IL13 및 IL17 항체

[0123] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 (본원에서 IL-13 또는 IL13으로서 지칭된) 인터류킨-13에 관한 것이다. 예를 들어, 항체는 IL13에 관한 2개의 1가 중쇄-경쇄 쌍 (예를 들면, 2개의 동일한 1가 중쇄-경쇄 쌍; 2개의 1가 중쇄-경쇄 쌍, 각각은 IL13의 동일한 에피토프를 인식하는 상이한 HVR 또는 CDR을 포함하거나; 또는 2개의 1가 중쇄-경쇄 쌍, 각각은 IL13의 비-중첩 또는 부분적으로 중첩 에피토프를 인식하는 상이한 HVR 또는 CDR을 포함한다)을 포함한 완전 항체, 또는 IL13에 관한 중쇄-경쇄 쌍 및 상이한 항원에 관한 중쇄-경쇄 쌍을 포함한 이중특이적 항체인, IL13에 관한 1가 항체 또는 "절반-항체"일 수 있다.

[0124] IL13 폴리펩티드의 예는 당해 기술에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, IL13 폴리펩티드는 인간 IL13 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, IL13 폴리펩티드는 IL13의 전구체 형태이다. IL13 폴리펩티드의 전구체의 비-제한 예는 Swiss-Prot 수탁 번호 P35225.2에 의해 나타난 바와 같이 인간 IL13 전구체이다. 일부 구현예에서, IL13 폴리펩티드는 하기 서열을 포함한다:

[0125] MALLTTVIA LTCLGGFASP GPVPPSTALRELIEEL VNITQNQKAP LCNGSMVWSI NLTAGMYCAA LESLINVSGC SAIKEQTQRML SGFCPHKVSA QGFSSLHVRD TKIEVAQFVK DLLHLKKLF REGRFN (서열 번호: 1).

[0126] 다른 구현예에서, IL13은 IL13의 성숙한 형태이다 (예를 들면, 신호 서열 결핍). 일부 구현예에서, IL13 폴리펩티드는 하기 서열을 포함한다:

[0127] SPGPVPPSTALR ELIEELVNIT QNQKAPLCNG SMVWSINLTA GMYCAALESL INVSGCSAIE KTQRMLSGFC PHKVSAGQFS SLHVRDTKIE VAQFVKDLLL HLKKLFREGR FN (서열 번호: 2).

[0128] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 (본원에서 IL-17 또는 IL17로서 지칭되는) 인터류킨-17에 관한 것이다. 예를 들어, 항체는 IL17에 관한 2개의 1가 중쇄-경쇄 쌍 (예를 들면, 2개의 동일한 1가 중쇄-경쇄 쌍; 2개의 1가 중쇄-경쇄 쌍, 각각은 IL17의 동일한 에피토프를 인식하는 상이한 HVR 또는 CDR을 포함하거나; 또는 2개의 1가 중쇄-경쇄 쌍, 각각은 IL17의 비-중첩 또는 부분적으로 중첩 에피토프를 인식하는 상이한 HVR 또는 CDR을 포함한다)을 포함한 완전 항체, 또는 IL17에 관한 중쇄-경쇄 쌍 및 상이한 항원에 관한 중쇄-경쇄 쌍을 포함한 이중특이적 항체인, IL17에 관한 1가 항체 또는 "절반-항체"일 수 있다.

[0129] IL17 패밀리에서 6개의 구성원이 있다: IL17A, IL17B, IL17C, IL17D, IL17E 및 IL17F. IL17은 IL17 패밀리의 원형인, IL17A를 지칭하기 위한 분야에서 때때로 사용된다. IL17A 및 IL17F는 모든 IL17 패밀리 구성원 중에서 최고 서열 상동성을 공유한다. IL17 패밀리의 구성원은 동형이량체, 예를 들면, IL17AA 및 IL17FF를 형성한다. 게다가, IL17A 및 IL17F는 이종이량체 (예를 들면, IL17AF)를 형성한다. 참고: 예를 들면, Gaffen, S. L., 2009, *Nature Review* 9:556-567; Hymowitz et al., 2001, *EMBO J.* 20:5332-41; 및 WO 2005/010044 (이는 본원에 그 전체가 참고로 포함됨). 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 IL17A에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 IL17F에 대해 지시된다. 특정 구현예에서, 항-IL17 항체 또는 IL17에 결합하는 항체는 IL17AA,

FF 및 AF를 결합하는 항체 (또는 IL17A F 교차 반응성 항체)를 지칭한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 IL17A 및 IL17F (예를 들면, 항-IL17AA, AF, 및 FF)와 교차-반응한다. IL17AA, IL17FF, 및 IL17AF 항체의 추가 설명에 대하여 다음을 참고한다: 예를 들면, 미국 특히 번호 8,715,669.

- [0130] IL17 폴리펩티드 (예를 들면, IL17A 또는 IL17F)의 예는 당해 기술에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, IL17A 폴리펩티드는 인간 IL17A 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, IL17A 폴리펩티드는 IL17A의 전구체 형태이다. IL17A 폴리펩티드의 전구체 형태의 비-제한 예는 Swiss-Prot 수탁 번호 Q16552.1로 나타난 바와 같이 인간 IL17A 전구체이다. 일부 구현예에서, IL17A 폴리펩티드는 하기 서열을 포함한다:
- [0131] MTPGKTSVLSSLEAVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINA DGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPCNSFRLEKILSVGCTCVPINVHHVA (서열 번호: 3)
- [0132] 다른 구현예에서, IL17A는 IL17A의 성숙한 형태이다 (예를 들면, 신호 서열 결핍). 일부 구현예에서, IL17A 폴리펩티드는 하기 서열을 포함한다:
- [0133] GITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRRE PPHCPNSFRLEKILSVGCTCVPINVHHVA (서열 번호: 4).
- [0134] 일부 구현예에서, IL17F 폴리펩티드는 인간 IL17F 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, IL17F 폴리펩티드는 IL17F의 전구체 형태이다. IL17F 폴리펩티드의 전구체 형태의 비-제한 예는 Swiss-Prot 수탁 번호 Q96PD4.3으로 나타난 바와 같이 인간 IL17F 전구체이다. 일부 구현예에서, IL17F 폴리펩티드는 하기 서열을 포함한다:
- [0135] MTVKTLHGPAMVKYLLSILGLAFLSEAARKIPKVGHFFQKPCSCPVGSMKLDIGIINENQRVMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQC RNLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQGCSVSFQLEKVLTVGCTCVPINVHHQ (서열 번호: 5)
- [0136] 다른 구현예에서, IL17F는 IL17F의 성숙한 형태이다 (예를 들면, 신호 서열 결핍). 일부 구현예에서, IL17F 폴리펩티드는 하기 서열을 포함한다:
- [0137] RKIPKVGHFFQKPCSCPVGSMKLDIGIINENQRVMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQC RNLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQGCSVSFQLEKVLTVGCTCVPINVHHQ (서열 번호: 6).
- [0138] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한 항-IL13 항체가 본원에서 제공되고, 여기에서:
- [0139] (a) 중쇄 가변 도메인은 AYSVN(서열 번호: 9), MIWGDGKIVYNSALKS (서열 번호: 10) 및 DGYYPYAMDN (서열 번호: 11), 각각에 적어도 85% 서열 상동성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하고/하거나,
 - [0140] (b) 경쇄 가변 도메인은 RASKSVDSYGNFSMH (서열 번호: 12), LASNLES (서열 번호: 13) 및 QQNNEDPRT (서열 번호: 14), 각각에 적어도 85% 서열 상동성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0141] 특이적 양태에서, 서열 상동성은 참조 서열과 비교시 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.
- [0142] 일부 구현예에서, 상기 항-IL13 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 7의 중쇄 가변 도메인 서열 및/또는 서열 번호: 8의 경쇄 가변 도메인 서열. 또한 추가의 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-IL13 항체가 본원에서 제공되고, 여기서:
- [0143] (a) 중쇄 가변 도메인 서열은, 상기 참조 중쇄 서열에 대한 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖고:
 - [0144] EVTLRESPALVKPTQTLTCTVSGFSLAYSVNWIHQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRLTI SKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYYCAGDGYYP YAMDNWGQQSLTVSS (서열 번호: 7), 및/또는
 - [0145] (b) 경쇄 가변 도메인 서열은, 상기 참조 경쇄 서열에 대한 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖고:
- [0146] DIVLTQSPDSLSQLGERATINCRASKSVDSYGNFSMHWYQQKPGQPPKLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPRTF GGGTKVEIKR (서열 번호: 8).

- [0147] 일부 구현예에서, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한 항-IL17A F 교차 반응성 항체가 본원에서 제공되고, 여기에서:
- [0148] (a) 중쇄 가변 도메인은 DYAMH (서열 번호: 20), GINWSSGGIGYADSVKG (서열 번호: 21) 및 DIGGFGEFYWNFGL (서열 번호: 22), 각각에 적어도 85% 서열 상동성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하고/하거나,
- [0149] (b) 경쇄 가변 도메인은 RASQSVRSYLA (서열 번호: 23), DASN RAT (서열 번호: 24) 및 QQR SNWPPAT (서열 번호: 25), 각각에 적어도 85% 서열 상동성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0150] 특이적 양태에서, 서열 상동성은 참조 서열과 비교시 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.
- [0151] 일부 구현예에서, 상기 항 - IL17A F 교차 반응성 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 18의 중쇄 가변 도메인 서열 및/또는 서열 번호: 19의 경쇄 가변 도메인 서열. 또한 추가의 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-IL17A F 교차 반응성 항체가 본원에서 제공되고, 여기서:
- [0152] (a) 중쇄 서열은, 상기 참조 중쇄 서열에 대한 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖고:
- [0153] EVQLVESGGVLQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGINWSSGGIGYADSVKGRFTISRDNAKNNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDIGG FGEFYWNFGLWGRGLTVSS (서열 번호: 18), 및/또는
- [0154] (b) 경쇄 서열은, 상기 참조 경쇄 서열에 대한 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖고:
- [0155] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPATFGGG TKVEIK (서열 번호: 19).
- [0156] 본 발명의 하나의 양태에서, 다중특이적 항체가 제공되고, 여기에서 항체는 제1 1가 또는 절반 항체 및 제2 1가 또는 절반 항체를 포함하고, 여기에서 제1 절반-항체는 IL-17을 결합하는 제1 VH/VL 단위체를 포함하고 제2 절반 항체는 IL-13에 결합하는 제2 VH/VL 단위체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 절반 항체는 IL-13에 결합하지 않고, 제2 절반 항체는 IL-17에 결합하지 않는다. 임의의 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 다중특이적 항체는 IL-17AA, IL-17AF 및 IL-17FF에 결합하고, IL-17AA-, IL-17AF, 및 IL-17FF-유도된 활성을 억제하고, IL-13-유도된 활성을 억제한다. 임의의 상기 구현예에서, 항-IL-13/IL-17AA, AF 및 FF 이중특이적 항체는 IL-17A 또는 IL-17F 단독에 의해 유도된 활성과는 대조적으로 모든 IL-17A 및 F 사이토카인에 의해 유도된 활성을 유리하게는 차단한다. 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 다중특이적 항체는 IL-17AA, IL-17AF, 및 IL-17FF에 결합한다. 일부 구현예에서, IL-17AA-유도된 활성은 생체내 또는 시험관내 세포의 IL-17AA-유도된 유전자 발현 및/또는 증식이다. 일부 구현예에서, IL-17AF-유도된 활성은 생체내 또는 시험관내 세포의 IL-17AF-유도된 유전자 발현 및/또는 증식이다. 상기 일부 구현예에서, IL-17FF-유도된 활성은 생체내 또는 시험관내 세포의 IL-17FF-유도된 유전자 발현 및/또는 증식이다. 일부 구현예에서, IL-13-유도된 활성은 생체내 또는 시험관내 세포의 IL-13-유도된 유전자 발현 및/또는 증식이다. 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 다중특이적 항체는 IL-13Ra1에 IL-13의 결합을 억제하지 않는다.
- [0157] 일부 구현예에서, 항-IL13/IL17AA AF FF 이중특이적 항체 (또는 항-IL13/IL17 이중특이적 항체)는 제1 절반 항체 및 제2 절반 항체를 포함하고, 여기에서 제1 절반-항체는 IL-17AA, AF 및 FF를 결합하는 제1 VH/VL 단위체를 포함하고 제2 절반 항체는 IL-13에 결합하는 제2 VH/VL 단위체를 포함하고, 여기에서 제1 VH/VL 단위체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; 서열 번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 번호: 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및, 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 여기서 제2 VH/VL 단위체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및, 서열 번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 구현예에서, 제1 절반 항체는 IL-13에 결합하지 않고, 제2 절반 항체는 IL-17에 결합하지 않는다. 참고: 미국 특허 번호 8,715,669; 미국 특허 번호 8,771,697; 미국 특허 번호 8,088,618; 및 PCT/US2015/017168.
- [0158] 일부 구현예에서, 제1 VH/VL 단위체는 서열 번호: 18의 아미노산 서열에 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%,

적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 갖는 VH 서열 및 서열 번호: 19의 아미노산 서열에 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 갖는 VL 서열을 포함하고, 여기에서 제2 VH/VL 단위체는 서열 번호: 7의 아미노산 서열에 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 갖는 VH 서열 및 서열 번호: 8의 아미노산 서열에 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체가 제공되고, 여기에서 제1 VH/VL 단위체는 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열 번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열을 포함하고, 여기에서 제2 VH/VL 단위체는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 VH 서열 및 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0159] 특정 구현예에서, IL17AA AF 및 FF에 결합하는 제1 절반 항체는 하기를 포함하며: 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 그리고 IL13에 결합하는 제2 절반 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄. 특정 구현예에서, IL17AA AF 및 FF에 결합하는 제1 절반 항체는 하기를 포함하며: 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 그리고 IL13에 결합하는 제2 절반 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄.

[0160] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체의 CH3 및/또는 CH2 도메인은 IgG (예를 들면, IgG1 하위유형, IgG2 하위유형, IgG2A 하위유형, IgG2B 하위유형, IgG3, 하위유형, 또는 IgG4 하위유형) 유래의 것이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체의 CH3 및/또는 CH2 도메인은 하나 이상의 크냅- 또는 홀-형성 돌연변이, 예컨대 아래 표 2에 기재된 것을 포함할 수 있다.

[0161] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항체의 CH3 및/또는 CH2 도메인은 IgG4 하위유형 출신이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체의 IgG4 CH3 및/또는 CH2 도메인은 제한 없이 S228P 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하여 하나 이상의 추가의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0162] 본 개시내용의 항체 중쇄/경쇄 가변 도메인 또는 중쇄/경쇄를 암호화한 폴리뉴클레오티드 서열이 본원에서 추가로 제공된다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-IL13 항체 (예를 들면, IL13에 결합하는 절반 항체)는 서열 번호: 29를 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 번호: 30을 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-IL13 항체 (예를 들면, IL13에 결합하는 절반 항체)는 서열 번호: 31 또는 서열 번호: 32를 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 중쇄 및/또는 서열 번호: 33을 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-IL17A F 교차 반응성 항체 (예를 들면, IL17AA, AF, 및 FF를 결합하는 절반 항체)는 서열 번호: 34를 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 번호: 35를 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-IL17A F 교차 반응성 항체 (예를 들면, IL17AA, AF, 및 FF를 결합하는 절반 항체)는 서열 번호: 36 또는 서열 번호: 37을 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 중쇄 및/또는 서열 번호: 38를 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0163] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 특정한 숙주 세포, 예를 들면, 원핵 숙주 세포 예컨대 *E.coli*에서 발현에 최적화된 코돈인 폴리펩티드 서열을 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-IL17AF 항체 (예를 들면, IL17AA, AF, 및 FF를 결합하는 절반 항체)는 서열 번호: 39 또는 서열 번호: 40을 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 중쇄 및/또는 서열 번호: 41을 포함한 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

항체 특성

[0165] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 $\leq 1\mu M$, $\leq 150 nM$, $\leq 100 nM$, $\leq 50 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$, $\leq 0.1 nM$, $\leq 0.01 nM$, 또는 $\leq 0.001 nM$ (예컨대 $10^{-8} M$ 이하, 예컨대 $10^{-8} M$ 내지 $10^{-13} M$, 예컨대, $10^{-9} M$ 내지 $10^{-13} M$)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다.

[0166] 일부 구현예에서, Kd는 하기의 검정에 의해 기재된 바와 같은 목적하는 항체의 Fab 버전 및 이의 항원과 함께 수행된 방사능표지된 항원 결합 검정(RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화성은 일련의 적정된 비표지된 항원의 존재하에 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시키고 이어서 결합된 항원을 항

-Fab 항체 코팅된 플레이트로 포획함에 의해 측정된다 (예를 들어, 참고: Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). 검정용 조건을 수립하기 위해, MICROTITER[®] 다중-웰 플레이트 (Thermo Scientific)는 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6)에서 포착 항-Fab 항체 (Cappel Labs)의 5 µg/ml로 밤새 코팅되고, 그리고 그 뒤에 2 내지 5 시간동안 실온 (대략 23°C)에서 PBS내 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 차단된다. 비-흡착제 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [¹²⁵I]-항원은 해당 Fab의 연속 희석액과 혼합된다. 그 다음 해당 Fab는 밤새 항온처리되지만; 그러나, 항온처리는 평형이 달성됨을 확인하기 위해 더 오랜 기간 (예를 들면, 약 65 시간)동안 계속할 수 있다. 그 후에, 혼합물은 실온에서 (예를 들면, 1 시간 동안) 항온처리를 위해 포착 플레이트로 이동된다. 이어서, 상기 용액을 제거하고 플레이트는 PBS 중에서 0.1% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20TM)으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시키는 경우, 150 µl/웰의 섬광제 (MICROSCINT-20TM; Packard)를 첨가하고 플레이트는 10분 동안 TOPCOUNTTM 감마 카운터 (Packard) 상에서 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도는 경쟁 결합 검정에 사용하기 위해 선택한다.

[0167]

또 다른 구현예에 따라서, BIACORE[®]-2000 또는 BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 이용한 표면 플라스몬 공명 검정은 ~10 반응 단위체 (RU)에서 고정된 항원 CM5 칩으로 25 °C에서 수행된다. 간략하게, 카복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, BIACORE, Inc.)은 이의 공급업체의 설명서에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원은 pH 4.8, 10 mM 아세트산나트륨으로 5 µg/ml (~0.2 µM) 까지 희석되고, 그 다음 5 µl/분의 유속으로 주입되어 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위체 (RU)를 달성한다. 항원 주사 후, 1 M 에탄올아민을 주사하여 미반응된 그룹을 차단시킨다. 역학적 측정을 위해, 2배 연속 희석된 Fab (0.78 nM 내지 500 nM)를 대략 25 µl/min의 유속으로 25° C에서 PBS 중에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (TWEEN-20TM) 계면활성제 (PBST)와 함께 사용한다. 결합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 결합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅함에 의해 단순한 1 대 1 탕무이론 결합 모델 (BIACORE[®] 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 비율 k_{off}/k_{on} 로서 계산한다. 참고: 예를 들면, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). 만일 가역속도(on-rate)가 상기 표면 플라스몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 를 초과하면, 분광기, 예컨대 정지-유동 구비된 분광광도계 (Aviv Instruments) 또는 교반된 큐벳을 갖춘 8000-시리즈 SLM-AMINCOTM 분광광도계 (ThermoSpectronic)에서 측정된 바와 같이 항원의 증가 농도의 존재하에 25 °C에서 pH 7.2, PBS내 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 형광 방출 세기 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역통과)에서의 증가 또는 감소를 측정하는 형광성 켄칭 기술을 이용함으로써 가역 속도는 측정될 수 있다.

[0168]

(i) 항원 제조

[0169]

다른 문자에 선택적으로 접합된, 가용성 항원 또는 이의 단편은 항체 생성용 면역원으로서 사용될 수 있다. 막통과 문자, 예컨대 수용체에 대하여, 이들의 단편 (예를 들면 수용체의 세포외 도메인)은 면역원으로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 막통과 문자를 발현한 세포는 면역원으로서 사용될 수 있다. 상기 세포는 천연 공급원 (예를 들면 암 세포주)으로부터 유도될 수 있거나 또는 막통과 문자를 발현시키기 위해 재조합 기술로 형질전환되는 세포일 수 있다. 항체 제조에 유용한 다른 항원 및 이의 형태는 당해 기술의 숙련가에 명백할 것이다.

[0170]

(ii) 특정 항체-기반 방법

[0171]

다클론성 항체는 관련된 항원 및 보조제의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게는 상승된다. 면역화되기 위해 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들면, 키홀 림펫 혜모시아닌, 혈청 알부민, 소티로글로불린, 또는 이중작용성을 갖는 대두 트립신 억제제 또는 유도화제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 설포석신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 콘주게이션), N-하이드록시석신이미드 (라이신 잔기를 통한), 글루타르알데하이드, 석신산 무수물, SOC₁₂, 또는 R¹N=C=NR (여기에서 R 및 R¹은 상이한 알킬기이다)에 관련된 항원을 콘주게이션하는 것이 유용할 수 있다.

[0172]

동물은, 예를 들면, (토끼 또는 마우스, 각각용) 100 µg 또는 5 µg의 단백질 또는 콘주게이트를 3 용적의 프로인트 완전 보조제와 조합 및 다중 부위에서 진피내로 용액 주사에 의해 항원, 면역원성 콘주게이트, 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1 개월 후 동물은 다중 부위에서 피하 주사에 의해 프로인트 완전 보조제에서 웨პ티드

또는 콘주게이트의 최초 양의 1/5 내지 1/10로 부스팅된다. 7 내지 14 일 후 동물은 채혈되고 혈청은 항체 역가에 대하여 분석된다. 동물은 역가 안정기까지 부스팅된다. 바람직하게는, 동물은 동일한 항원의 콘주게이트로 부스팅되지만, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교결합 시약을 통해 콘주게이션된다. 콘주게이트는 또한 단백질 융합으로서 재조합 세포 배양물에서 제조될 수 있다. 또한, 응집화 제제 예컨대 명반은 면역 반응을 향상시키기 위해 적합하게 사용된다.

[0173] 본 개시내용의 단클론성 항체는 하기에 의하여 처음 기술된 혼성세포 방법을 사용하여 제조될 수 있다: ohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), (그리고 추가로 하기에 기술됨: 예를 들어, Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), 및 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (인간-인간 혼성세포에 관한 것임). 추가의 방법은 예를 들어 다음의 문현에 기재된 것들을 포함한다: 미국 특허 번호 7,189,826 (혼성세포 세포주 유래의 단클론성 인간 천연 IgM 항체에 관한 것임). 인간 혼성세포 기술 (Trioma technology)은 다음 문현에 기재되어 있다: Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005). 일단 원하는 단클론성 항체가 혼성세포로부터 단리되면, 이들을 암호화한 폴리뉴클레오티드는 원핵 발현 벡터로 아클론화될 수 있고, 항체는 본원에서 기재된 임의의 방법으로 원핵 숙주 세포에서 발현에 의해 생산될 수 있다.

[0174] (iii) 라이브러리-유도된 항체

[0175] 본 개시내용의 항체는 목적하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다. 예를 들면, 파아지 디스플레이 라이브러리를 생산하고 목적하는 결합 특징 예컨대 실시예 3에 기술된 방법을 갖는 항체에 대해 이러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 각종 방법들이 당업계에 공지되어 있다. 추가의 방법은 예를 들어, 하기에 검토되며: Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) 추가로 하기에 검토된다: 예를 들어, the McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

[0176] 일부 파아지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자 래퍼토리는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 별도로 클로닝되고 파아지 라이브러리에서 무작위로 재조합되며, 이후 하기에 기술된 바와 같이 항원-결합 파아지에 대해 스크리닝될 수 있다: Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). 파아지는 전형적으로 단일쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서 항체 단편을 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 혼성세포를 작제할 필요 없이 면역원에 대한 고친화성 항체를 제공한다. 대안적으로, 단순 래퍼토리는 (예를 들면, 인간으로부터) 클로닝되어 하기에 기재된 바와 같이 임의의 면역화 없이 광범위한 비자가 및 또한 자가 항원에 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다: Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). 최종적으로, 순수 라이브러리는 또한 줄기 세포로부터 비재배열된 V-유전자 분절을 클로닝하고 고도의 가변성 CDR3 영역을 암호하고 시험관내 재배열을 성취하기 위해 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함에 의해 합성적으로 제조될 수 있고, 이는 다음 문현에 기재된 바와 같다: Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). 인간 항체 파아지 라이브러리를 기재하는 특허 공보는 예를 들어, 다음의 문현을 포함한다: 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360.

[0177] 인간 항체 라이브러리에서 단리된 항체 또는 항체 절편은 본원의 인간 항체 또는 인간 항체 절편으로 간주된다.

[0178] (iv) 키메라, 인간화, 및 인간 항체

[0179] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 키메라성 항체이다. 특정 키메라성 항체는, 예를 들면 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 번호 4,816,567 및 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). 일 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역(예컨대, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이에서 유도된 가변 영역)과 인간 불변영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 부류로부터 변화된 “부류 스위칭된” 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원 결합 단

편을 포함한다.

- [0180] 특정 구현예에서, 키메라 항체는 인간화된 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 인간화되어 인간에 대한 면역 원성이 감소되어 있고 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 보유한다. 일반적으로, 인간화 항체는, HVR, 예를 들면, CDR, (또는 그 일부)가 비인간 항체로부터 유도되고, FR (또는 그 일부)가 인간 항체 서열로부터 유도되는 하나 또는 그 초과 가변 도메인을 포함한다. 인간화된 항체는 임의로 또한 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 비인간 항체 (예를 들면, HVR 잔기가 유도되는 항체)로부터 상응하는 잔기로 치환되어, 예를 들면, 항체 특이성 또는 친화성을 회복 또는 개선한다.
- [0181] 인간화 항체 및 이의 제조 방법은, 예를 들면, 하기에 고찰되고: Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), 그리고 추가로 하기에 기재된다: 예를 들면, Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 미국 특허 번호 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (하기를 기술: SDR (a-CDR) 그래프팅); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) ("재표면화" 기재); Dall' Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) ("FR 셀플링" 기재); 및 Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FR 셀플링에 대한 "유도된 선택" 접근법을 기재함).
- [0182] 인간화를 위해 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: "베스트-피트" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (참고: 예를 들어, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 특정 서브그룹의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (참고: 예를 들어, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 인간 성숙(체세포적으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역 (예를 들면, 참고: Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 및 스크리닝 FR 라이브러리로부터 유래된 프레임워크 영역 (참고: 예를 들어, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).
- [0183] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당해기술에 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 다음 문헌에 기재되어 있다: van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008). 인간 항체는, 예를 들어 및 제한 없이, 본원에서 기재된 임의의 방법으로 원핵 발현 벡터로부터 원핵 숙주 세포에서 발현에 의해 제조될 수 있다.
- [0184] 인간 항체는 또한 인간-유래 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생성될 수 있다. 상기 가변 도메인 서열은 이어서 목적하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 하기에 기재되어 있다.
- [0185] (v) 항체 단편
- [0186] 항체 단편은 전통적 수단, 예컨대 효소 소화로, 또는 재조합 기술로 생성될 수 있다. 특정 상황에서 전체의 항체보다는 항체 단편의 이점이 있다. 단편의 더 작은 크기는 급속 청소능을 허용하고, 고형 종양에 개선된 접근을 초래할 수 있다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 다음을 참고한다: Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.
- [0187] 항체 단편의 생산을 위하여 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백분해 소화를 통해 유도되었다 (참고: 예를 들면, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). 그러나, 이들 단편은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 이제 생산될 수 있다. Fab, Fv, 및 ScFv 항체 단편은 모두 *E.coli*에서 발현되고 분비될 수 있으며, 이로써 이들의 단편들의 많은 양의 용이한 생산을 가능케 한다. 항체 단편은 상기 고찰된 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 대장균에서 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab)₂ 단편을 형성할 수 있다(Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양으로부터 직접 단리될 수 있다. 재이용 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 번호 5,869,046. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 특정 구현예에서, 항체는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다. 참고 WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458. Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고; 따라서, 이들은 생체내 사용 동안 감소된 비특이적 결합에 적합할 수

있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카복시 말단에서 효과기 단백질의 융합을 수득하기 위해 작제될 수 있다. 참고: *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, 상기. 항체 단편은 또한, 예를 들면, 미국 특허 번호 5,641,870에서, 예를 들어 기재된 바와 같이 "선형 항체"일 수 있다. 상기 선형 항체는 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0188] (vi) 다중특이적 항체

[0189] 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 결합 특이성을 갖고, 여기에서 에피토프는 보통 상이한 항원 출신이다. 상기 분자가 정상적으로 2개의 상이한 에피토프 (즉 이중특이적 항체, BsAbs)를 단지 결합하는 반면, 추가의 특이성을 갖는 항체 예컨대 삼중특이적 항체는 본원에서 사용될 때 상기 발현에 의해 포함된다. 이중특이성 항체는 전장 항체 또는 항체 절편 (예컨대, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0190] 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 본 분야에 알려져 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적 생산은 두 면역글로불린 중쇄-경쇄 폐어의 공동 발현에 근거하며, 여기서 두 사슬은 상이한 특이성을 갖는다(Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 접합으로 인하여, 이러한 혼성세포 (4혼성체(quadroma))는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이중 오직 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 보통 친화도 크로마토그래피 단계에 의하여 수행되는, 정확한 분자의 정체는 다소 번거롭고, 생성물 산출량은 낮다. 유사한 절차가 하기에 개시된다: WO 93/08829, 및 Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

[0191] 이중특이적 항체 제조를 위한 당해 기술에 공지된 하나의 접근법은 "크냅-인투-홀" 또는 "돌출부-인투-공동" 접근법이다 (참고: 예를 들면, 미국 특허 번호 5,731,168). 상기 접근법에서, 2개의 면역글로불린 폴리펩티드 (예를 들면, 중쇄 폴리펩티드) 각각은 계면을 포함한다. 하나의 면역글로불린 폴리펩티드의 계면은 다른 면역글로불린 폴리펩티드 상에서 상응하는 계면과 상호작용하고, 그렇게 함으로써 2개 면역글로불린 폴리펩티드를 결합시킨다. 이를 계면은 하나의 면역글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "크냅" 또는 "돌출부" (이들 용어들은 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다)가 다른 면역글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "홀" 또는 "공동" (이들 용어들은 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다)과 상응하도록 가공될 수 있다. 일부 구현예에서, 홀은 크냅과 동일한 또는 유사한 크기이고, 2개의 계면이 상호작용하는 경우, 하나의 계면의 크냅이 다른 계면의 상응하는 홀에 위치할 수 있는 정도로 적합하게 배치된다. 이론에 제한되도록 바램 없이, 이중다량체를 안정화시키고 다른 종, 예를 들어 동종다량체보다 이중다량체의 형성을 선호한다고 생각된다. 일부 구현예에서, 상기 접근법은, 상이한 에피토프에 대하여 결합 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 폴리펩티드를 포함한 이중특이적 항체를 창출하는, 2개의 상이한 면역글로불린 폴리펩티드의 이중다량체화를 촉진시키기 위해 사용될 수 있다.

[0192] 일부 구현예에서, 크냅은 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄로 대체함으로써 작제될 수 있다. 일부 구현예에서, 홀은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄로 대체함으로써 작제될 수 있다. 크냅 또는 홀은 최초 계면에 존재할 수 있거나, 또는 이들은 합성으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 크냅 또는 홀은 적어도 하나의 "최초" 아미노산 잔기를 적어도 하나의 "도입" 아미노산 잔기로 대체하기 위해 계면을 암호화한 핵산 서열을 변경함으로써 합성으로 도입될 수 있다. 핵산 서열의 변경 방법은 당해 기술에서 잘 알려진 표준 분자 생물학 기술을 포함할 수 있다. 다양한 아미노산 잔기의 측쇄 용적은 하기 표에 나타난다. 일부 구현예에서, 최초 잔기는 작은 측쇄 용적 (예를 들면, 알라닌, 아스파라гин, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌, 또는 발린)을 갖고, 크냅 형성용 도입 잔기는 천연 발생 아미노산이고 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 최초 잔기는 큰 측쇄 용적 (예를 들면, 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판)을 가질 수 있고, 홀 형성용 도입 잔기는 천연 발생 아미노산이고 알라닌, 세린, 트레오닌, 및 발린을 포함할 수 있다.

[0193]

표 1b. 아미노산 잔기의 특성

아미노산	1글자 축약	질량 ^a (달톤)	용적 ^b (Å ³)	접근가능한 표면적 ^c (Å ²)
알라닌 (Ala)	A	71.08	88.6	115
아르기닌 (Arg)	R	156.20	173.4	225
아스파라긴 (Asn)	N	114.11	117.7	160
아스파르트산 (Asp)	D	115.09	111.1	150
시스테인 (Cys)	C	103.14	108.5	135
글루타민 (Gln)	Q	128.14	143.9	180
글루탐산 (Glu)	E	129.12	138.4	190
글리신 (Gly)	G	57.06	60.1	75
히스티딘 (His)	H	137.15	153.2	195
이소류신 (Ile)	I	113.17	166.7	175
류신 (Leu)	L	113.17	166.7	170
라이신 (Lys)	K	128.18	168.6	200
메티오닌 (Met)	M	131.21	162.9	185
페닐알라닌 (Phe)	F	147.18	189.9	210
프롤린 (Pro)	P	97.12	122.7	145
세린 (Ser)	S	87.08	89.0	115
트레오닌 (Thr)	T	101.11	116.1	140
트립토판 (Trp)	W	186.21	227.8	255
티로신 (Tyr)	Y	163.18	193.6	230
발린 (Val)	V	99.14	140.0	155

[0194]

[0195] ^a아미노산 분자량 - 물 분자량. 값은 하기에서 유래됨: Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.

[0196]

^b값은 하기에서 유래됨: A.A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972.

[0197]

^c값은 하기에서 유래됨: C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975. 접근가능한 표면적은 이 참조문헌의 도 6 내지 20에서 정의된다.

[0198]

일부 구현예에서, 크냅 또는 홀 형성용 최초 잔기는 이중다량체의 3-차원 구조에 기반하여 확인된다. 3-차원 구조를 수득하기 위하여 당해 기술에 공지된 기술은 X-선 결정학 및 NMR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 계면은 면역글로불린 불변 도메인의 CH3 도메인이다. 이를 구현예에서, 인간 IgG₁의 CH3/CH3 계면은 4 항-평행한 β-가닥에 위치한 각 도메인 상에 16 잔기를 포함한다. 이론에 제한되도록 바램 없이, 돌연변이된 잔기는 2개의 중심 항-평행한 β-가닥에 바람직하게는 위치하여 크냅과 파트너 CH3 도메인에서 보상성 홀 보다는 주위의 용매에 의해 수용될 수 있는 위험을 최소화시킨다. 일부 구현예에서, 2개의 면역글로불린 폴리펩티드에서 상응하는 크냅 및 홀을 형성한 돌연변이는 하기 표에서 제공된 하나 이상의 쌍에 상응한다.

[0199]

표 2. 상응하는 크냅-및 홀-형성 돌연변이의 예시적 세트

제1 면역글로불린의 CH3	제2 면역글로불린의 CH3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
T366W	T366S: L368A: Y407V
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

[0200]

돌연변이는 최초 잔기, 그 다음 카밧 넘버링 시스템을 이용한 위치, 및 그 다음 도입 잔기에 의해 표시된다 (모든 잔기는 단일-문자 아미노산 코드로 주어진다). 다중 돌연변이는 결장(colon)에 의해 분리된다.

[0202]

일부 구현예에서, 면역글로불린 폴리펩티드는 상기 표 2에서 열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 표 2의 왼쪽 컬럼에서 열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한 CH3 도메인을 포함한 제1 면역글로불린 폴리펩티드, 및 표 2의 오른쪽 컬럼에서 열거된 하나 이상의 상응하는 아미노산 치환을 포함한 CH3 도메인을 포함한 제2 면역글로불린 폴리펩티드를 포함한다. 크냅-및 -홀-형성 쌍의 비-제한 예로서, 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 T366W 돌연변이를 포함한 CH3 도메인을 포함한 제1 면역글로불린 폴리펩티드, 및 T366S, L368A, 및 Y407V 돌연변이를 포함한 CH3 도메인을 포함한 제2 면

역글로불린 폴리펩티드를 포함한다.

[0203]

상기에서 논의된 바와 같이 DNA의 돌연변이 이후, 하나 이상의 상응하는 크냅- 또는 홀-형성 돌연변이를 갖는 변형된 면역글로불린 폴리펩티드를 암호화한 폴리뉴클레오티드는 당해 기술에서 공지된 표준 재조합 기술 및 세포 시스템을 이용하여 발현 및 정제될 수 있다. 참고: 예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 7,642,228; 7,695,936; 8,216,805; 미국 공보 번호 2013/0089553; 및 Spiess et al., *Nature Biotechnology* 31: 753-758, 2013. 변형된 면역글로불린 폴리펩티드는 원핵 숙주 세포, 예컨대 *E.coli*를 이용하여 생산될 수 있다. 상응하는 크냅- 및 홀-보유 면역글로불린 폴리펩티드는 공-배양물내 숙주 세포에서 발현될 수 있고 이종다량체로서 함께 정제될 수 있거나, 또는 이들은 단일 배양물에서 발현, 별도로 정제, 및 시험관내 조립될 수 있다. 일부 구현예에서, 박테리아성 숙주 세포의 2개 균주 (하나는 크냅을 갖는 면역글로불린 폴리펩티드를 발현하고, 다른 것은 홀을 갖는 면역글로불린 폴리펩티드를 발현한다)는 당해 기술에서 공지된 표준 박테리아성 배양 기술을 이용하여 공-배양된다. 일부 구현예에서, 2개 균주는, 예를 들면, 배양물에서 동등한 발현 수준을 달성하기 위해 특이적 비로 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개 균주는 50:50, 60:40, 또는 70:30 비로 혼합될 수 있다. 폴리펩티드 발현 이후, 세포는 함께 용해될 수 있고, 단백질은 추출될 수 있다. 호모-다량체 대 헤테로-다량체 종의 존재도 측정을 허용하는 당해 기술에서 공지된 표준 기술은 크기 배제 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 각 변형된 면역글로불린 폴리펩티드는 표준 재조합 기술을 이용하여 별도로 발현되고, 회수되고, 시험관내 함께 조립된다. 아래 더 상세히 기재된 바와 같이, 조립은, 예를 들어, 각 변형된 면역글로불린 폴리펩티드의 정제, 이들을 함께 동등한 질량으로 혼합 및 인큐베이팅, 디설파이드 환원 (예를 들면, 디티오트레이틸로 처리), 농축, 및 폴리펩티드의 재산화에 의해 달성될 수 있다. 형성된 이중 특이적 항체는 양이온-교환 크로마토그래피를 포함한 표준 기술을 이용하여 정제될 수 있고 크기 배제 크로마토그래피를 포함한 표준 기술을 이용하여 측정될 수 있다. 이를 방법의 더욱 상세한 설명에 대하여, 다음을 참고한다: Speiss et al., *Nat Biotechnol* 31:753-8, 2013.

[0204]

각 절반-항체는 미국 특허 번호 7,642,228에 기재된 바와 같이 중쇄 속에서 가공된 크냅 (돌출부) 또는 홀 (공동)을 가질 수 있다. 간단히, CH3 크냅 돌연변이체는 최초로 생성될 수 있다. CH3 홀 돌연변이체의 라이브러리는 그 다음 파트너 CH3 도메인 상에서 크냅에 근접한 잔기 366, 368 및 407의 랜덤화에 의해 창출될 수 있다. 특정 구현예에서, 크냅 돌연변이는 T366W를 포함하고, 홀 돌연변이는 IgG1 또는 IgG4 골격에서 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 다른 면역글로불린 이소형의 등가 돌연변이는 당해 분야의 숙련가에 의해 제조될 수 있다. 추가로, 숙련가는 바람직하게는, 이중특이적 항체에 사용된 2개 절반-항체가 동일한 이소형임을 쉽게 인식할 것이다.

[0205]

크냅 또는 홀 돌연변이를 함유한 절반-항체는 박테리아성 숙주 세포, (예를 들면, *E.coli*)에서 중쇄 및 경쇄 작제물을 발현시킴으로써 별도 배양물에서 생성된다. 각 절반-항체는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 별도로 정제될 수 있다. 크냅 및 홀 절반-항체로부터 정화된 세포 추출물은 HiTrap MabSelect SuRe™ 컬럼에 의해 정제될 수 있다. 상이한 특이성을 갖는 단백질 A 정제된 절반 항체는 환원화 제제의 존재하에 시험관내 산화환원 반응에서 이중특이적 항체를 형성하기 위해 조립될 수 있다.

[0206]

임의의 적합한 방법은 원하는 환원 조건을 만들기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 원하는 환원 조건은 반응 (예컨대 본 발명의 조립 혼합물)에 환원제/환원화 제제 부가에 의해 만들어질 수 있다. 적합한 환원제는 제한 없이 디티오트레이틸 (DTT), 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP), 티오글리콜 산, 아스코르브산, 티올 아세트산, 글루타티온 (GSH), 베타-머캅토에틸아민, 시스테인/시스틴, GSH/글루타티온 디설파이드 (GSSG), 시스테아민/시스타민, 글라이실시스테인, 및 베타-머캅토에탄올, 바람직하게는 GSH를 포함한다. 임의의 특정 구현예에서, 환원제는 제한 없이 GSH, 베타-머캅토에틸아민, 시스테인/시스틴, GSH/GSSG, 시스테아민/시스타민, 글라이실시스테인, 및 베타-머캅토에탄올, 바람직하게는 GSH를 포함하는 약 환원제이다. 특정 바람직한 구현예에서, 환원제는 GSH이다. 특정 구현예에서, 환원제는 DTT가 아니다. 원하는 환원 조건을 반응에서 달성하기 위해 적합한 실험적인 조건하에 및 적합한 농도에서 적합한 환원제를 선택하는 것이 당해 분야의 숙련가의 능력 내이다. 예를 들어, 20°C에서 10g/L의 이중특이적 항체 단백질 농도를 갖는 용액내 10 mM L-환원된 글루타티온은 약 -400mV의 개시 산화환원 전위를 초래할 것이다. 예를 들어, 조립 혼합물에 부가된 글루타티온은 크냅-인투-홀 이중특이적 조립에 유리한 약 환원 조건을 창출한다. 유사한 부류 예컨대 BMEA (베타-머캅토에틸아민)에서 다른 환원제는 유사한 효과를 가질 수 있다. 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용되는 WO2013/055958를 참조한다. 반응의 환원 조건은 당해 기술에서 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 추정 및 측정될 수 있다. 예를 들어, 환원 조건은 레시주린 인디케이터 (환원 조건에서 청색에서 무색으로 탈색)를 이용하여 측정될 수 있다.

더욱 정확한 측정을 위하여, 산화환원-전위 계량기 (예컨대 BROADLEY JAMES® 제 ORP 전극)는 사용될 수 있다.

[0207] 임의의 특정 구현예에서, 환원 조건은 약 환원 조건이다. 용어 "약 환원제" 또는 "약 환원 조건"은 본원에서 사용된 바와 같이 25°C에서 음성 산화 전위를 갖는 환원제에 의해 제조된 환원제 또는 환원 조건을 지칭한다. pH 가 7 내지 9이고, 온도가 15°C 내지 39°C인 경우, 환원제의 산화 전위는 바람직하게는 -50 내지 -600 mV, -100 내지 -600 mV, -200 내지 -600 mV, -100 내지 -500 mV, -150 내지 -300 mV, 더욱 바람직하게는 약 -300 내지 -500 mV, 가장 바람직하게는 약 -400mV이다. 당해 분야의 숙련가는 원하는 환원 조건을 만들기 위하여 적합한 환원제를 선택할 수 있을 것이다. 숙련된 연구자는 강 환원제, 즉, 동일한 농도, pH 및 온도에 대하여 상기 지칭된 환원제보다 더욱 음성 산화 전위를 갖는 것이 더 낮은 농도에서 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 바람직한 구현예에서, 단백질은 상기-인용된 조건하에 항온처리된 경우 환원제의 존재하에 디설파이드 결합을 형성할 수 있을 것이다. 약 환원제의 예는 제한 없이 글루타티온, 베타-머캅토에틸아민, 시스틴/시스테인, GSH/GSSG, 시스테아민/시스타민, 클라이실시스테인, 및 베타-머캅토에탄올을 포함한다. 특정 구현예에서, GSH:항체의 200X 몰비의 것과 유사한 산화 전위는 다른 환원제를 이용한 효율적인 조립이 예상될 수 있는 약 환원 조건에 대한 참조의 요점으로서 사용될 수 있다.

[0208] 글루타티온 농도는 조립 혼합물에 존재한 절반-항체의 양에 관해 몰농도의 면으로 또는 몰비 또는 몰 과잉의 면으로 발현될 수 있다. 환원제의 표적 몰비 사용은 조립 혼합물에서 단백질 농도에 대해 제어하고; 이는 다양한 단백질 농도의 결과로서 과잉 환원 또는 과소 환원을 예방한다. 임의의 다른 구현예에서, 환원제는 절반 항체의 총량에 관해 2-600X, 2-200X, 2-300X, 2-400X, 2-500X, 2-20X, 2-8X, 20-50X, 50-600X, 50-200X, 또는 100-300X 몰 과잉, 바람직하게는 50-400X, 더욱 바람직하게는 100-300X, 및 가장 바람직하게는 200X, 몰 과잉으로 조립 혼합물에 부가된다. 특정 구현예에서, 조립 혼합물은 7 내지 9, 바람직하게는 pH 8.5의 pH를 갖는다.

[0209] 특정 구현예에서, 제1 절반 항체 및 제2 절반 항체의 배양물은 조합될 수 있고 그 뒤에 조합된 배양물에 용해될 수 있다. 조합에서 방출된 제1 절반 항체 및 제2 절반 항체는 환원 조건에서 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용되는 WO 2011/133886를 참조한다.

[0210] 상이한 접근에 따라, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 조합 부위)은 면역글로불린 불변 도메인 서열로 융합된다. 상기 융합은, 바람직하게는, 힌지, CH2, 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 융합의 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 전형적이다. 면역글로불린 중쇄 융합 및, 원활 시 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 DNA는 개별 발현 벡터에 삽입되고, 적절한 숙주 유기체에 공-형질감염된다. 이것은 작제물에서 사용된 3개의 폴리펩티드 사슬의 불균등 비가 최적의 수율을 제공하는 경우 구현예에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호분율 조정에서 큰 가요성을 제공한다. 그러나, 균등 비에서 적어도 2 폴리펩티드 사슬의 발현이 고수율을 초래하는 경우 또는 비가 특정한 유의성이 없는 경우 한 발현 벡터에서 2 또는 모든 3개의 폴리펩티드 사슬에 대한 암호화 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0211] 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 하나의 아암 내의 제1 결합 특이성을 갖는 혼성체 면역글로불린 중쇄 및 다른 아암 내의 혼성체 면역글로불린 경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 오직 1/2 내의 면역글로불린 경쇄의 존재가 분리의 용이한 방법을 제공하므로, 이러한 비대칭 구조는 원치않는 면역글로불린 쇄 조합으로부터의 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 촉진하는 것으로 발견되었다. 이러한 접근은 WO 94/04690에 개시된다. 이중특이적 항체 생성의 추가적인 세부사항에 대해서는, 예를 들어, 하기를 참조한다: Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[0212] WO96/27011에 기술된 또 다른 접근에 따르면, 항체 분자 쌍 간의 계면은 재조합 세포 배양으로부터 회수되는 이종이량체 백분율을 최대화하기 위해 가공될 수 있다. 일 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자 계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄(예로, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 작은 것(예로, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체하여 큰 측쇄(들)에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "내강"이 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종 산물에 비해 이종이량체 수율을 증가시키기 위한 기전을 제공한다.

[0213] 이중특이적 항체에는 가교결합되거나, "이종콘주게이트" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이종콘주게이트의 하나의 항체는 애비딘에, 다른 하나는 바이오틴에 커플링될 수 있다. 그러한 항체는, 예를 들어, 면역계 세포를 원치 않는 세포로 표적화하는데 제안되어 왔다 (미국 특허 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료에 대하여 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089). 헤테로콘주게이트 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교결합 제제 및 기술은 당해기술에서 잘 알려지고, 그리고 미국 특허 번호 4,676,980에

기재된다 (다수의 가교결합 기술과 함께).

[0214] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 하기 문헌에 기술되어 있다. 예를 들면, 이중 특이적 항체는 화학적 연결을 사용하여 제조될 수 있다. [Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체가 $F(ab') 단편을 생성하기 위하여 단백질가수분해적으로 절단되는 절차를 기술한다. 이러한 단편은 이웃한 디티올을 안정화하고 분자간 이황화 형성을 방지하기 위하여 디티올 복합화제 아비산나트륨의 존재 하에서 환원된다. 생성된 Fab' 단편은 이후 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. Fab' -TNB 유도체 중 하나는 이후 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의하여 Fab' -티올로 재전환되고, 기타 Fab' -TNB 유도체의 등물량으로 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다.$

[0215] 최근 발전은 *E.coli*로부터 Fab'-SH 단편의 직접적인 회수를 용이하게 하였고, 이는 이중특이적 항체를 형성하기 위해 화학적으로 커플링될 수 있다. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)는 완전히 인간화된 이중특이적 항체 $F(ab') 분자의 생산을 기술한다. 각 Fab' 단편은 *E.coli*로부터 개별 분비되고, 시험관내에서 화학적으로 커플링 지시되어 이중특이적 항체를 형성하였다.$

[0216] 재조합 세포 배양물로부터 직접 유래한 이중특이적 항체 단편을 제조하고 단리하는 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Fos 및 Jun 단백질 유래의 류신 지퍼 웨티드는 유전자 융합에 의한 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 영역에서 환원되어 모노머를 형성하고, 이후 재-산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 이러한 방법이 또한 항체 동종이량체의 생산을 위하여 이용될 수 있다. “디아바디” 기술은 하기에 의하여 기술되며: Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적 기전을 제공하였다. 단편은 동일한 사슬 상의 두 도메인 간 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_H)과 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적 V_H 및 V_L 도메인과 쌍형성하도록 유도되어 두 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용에 의한, 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 기타 전략이 또한 보고되었다. 참고: Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0217] 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 또 다른 기술은 “이중특이적 T 세포 연관체” 또는 BiTE® 접근법이다 (참고, 예를 들면, WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261, 및 WO2008/119567). 상기 접근법은 단일 폴리펩티드상에 배열된 2개 항체 가변 도메인을 사용한다. 예를 들어, 단일 폴리펩티드 쇄는 2 단일 쇄 Fv (scFv) 단편을 포함하고, 각각은 2개 도메인 사이에서 분자내 회합을 허용하기에 충분한 길이의 폴리펩티드 링커에 의해 분리된 가변형 중쇄 (V_H) 및 가변형 경쇄 (V_L) 도메인을 갖는다. 상기 단일 폴리펩티드는 추가로 2개 scFv 단편 사이에서 폴리펩티드 스페이서 서열을 포함한다. 각 scFv는 상이한 에피토프를 인식하고, 이들 에피토프는 상이한 세포 유형에 특이적일 수 있어서, 이로써 각 scFv가 그의 동족 에피토프와 연관되는 경우 2개의 상이한 세포 유형의 세포가 근접해서 접촉되거나 또는 둑여진다. 상기 접근법의 하나의 특정한 구현예는, 표적 세포, 예컨대 악성 또는 종양 세포에 의해 발현된 세포-표면 항원을 인식하는 또 다른 scFv에 연결된, 면역 세포에 의해 발현된 세포-표면 항원, 예를 들면, T 세포상의 CD3 폴리펩티드를 인식한 scFv를 포함한다.

[0218] 단일 폴리펩티드임에 따라, 이중특이적 T 세포 연관체는 당해 기술에서 공지된 임의의 원핵 세포 발현계를 이용하여 발현될 수 있다. 그러나, 특이적 정제 기술 (참고, 예를 들면, EP1691833)은, 모노머의 의도된 활성 이외의 생물학적 활성을 가질 수 있는, 다른 다양체 종으로부터 모노머성 이중특이적 T 세포 연관체를 분리하는데 필요할 수 있다. 하나의 예시적 정제 반응식에서, 분비된 폴리펩티드를 함유한 용액은 먼저 금속 친화성 크로마토그래피 처리되고, 폴리펩티드는 이미다졸 농도의 구배로 용출된다. 상기 용출물은 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제되고, 폴리펩티드는 염화나트륨 농도의 구배로 이용하여 용출된다. 마지막으로, 상기 용출물은 크기 배제 크로마토그래피 처리되어 다양체 종으로부터 모노머를 분리시킨다.

[0219] 2 초파의 원자가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. Tuft et al. *J. Immunol.*, 147: 60 (1991).

[0220] 일부 구현예에서, 2쇄 단백질은 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체의 일부이다. 다중특이적 항체 또는 이중 특이적 항체는 본 개시내용의 2 이상의 1가 항체를 함유할 수 있다.

[0221] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체의 제1 항원 결합 도메인은 하나 이상의 중쇄 불변 도메인을 포함하고, 여기

에서 하나 이상의 중쇄 불변 도메인은 제1 CH1 (CH1_1) 도메인, 제1 CH2 (CH2_1) 도메인, 제1 CH3 (CH3_1) 도메인으로부터 선택되고; 이중특이적 항체의 제2 항원 결합 도메인은 하나 이상의 중쇄 불변 도메인을 포함하고, 여기에서 하나 이상의 중쇄 불변 도메인은 제2 CH1 (CH1_2) 도메인, 제2 CH2 (CH2_2) 도메인, 및 제2 CH3 (CH3_2) 도메인으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 제1 항원 결합 도메인의 하나 이상의 중쇄 불변 도메인의 적어도 하나는 제2 항원 결합 도메인의 또 다른 중쇄 불변 도메인과 쌍으로 된다. 일부 구현예에서, CH3_1 및 CH3_2 도메인 각각은 돌출부 또는 공동을 포함하고, 여기에서 CH3_1 도메인에서 돌출부 또는 공동은 CH3_2 도메인에서 공동 또는 돌출부, 각각에서 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, CH3_1 및 CH3_2 도메인은 상기 돌출부 및 공동 사이의 계면에서 대면한다. CH3_1 및 CH3_2 도메인에서 아미노산 치환의 예시적인 세트는 본원에서 표 2에 보여진다. 일부 구현예에서, CH2_1 및 CH2_2 도메인 각각은 돌출부 또는 공동을 포함하고, 여기에서 CH2_1 도메인에서 돌출부 또는 공동은 CH2_2 도메인에서 공동 또는 돌출부, 각각에서 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, CH2_1 및 CH2_2 도메인은 상기 돌출부 및 공동 사이의 계면에서 대면한다. 일부 구현예에서, IgG의 CH3_1 및/또는 CH3_2 도메인은 하기에서 보이는 바와 같이 아미노산 넘버링에 따라 347, 349, 350, 351, 366, 368, 370, 392, 394, 395, 398, 399, 405, 407, 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 잔기에서 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다: 도 5 (미국 특허 번호 8,216,805). 일부 구현예에서, 돌출부는 아르기닌 (R) 잔기, 페닐알라닌 (F) 잔기, 티로신 (Y) 잔기, 및 트립토판 (W) 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 도입된 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 공동은 알라닌 (A) 잔기, 세린 (S) 잔기, 트레오닌 (T) 잔기, 및 발린 (V) 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 도입된 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, CH3 및/또는 CH2 도메인은 IgG (예를 들면, IgG1 하위유형, IgG2 하위유형, IgG2A 하위유형, IgG2B 하위유형, IgG3, 하위유형, 또는 IgG4 하위유형) 출신이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체의 하나의 CH3 도메인은 아미노산 치환 T366Y를 포함하고, 다른 CH3 도메인은 아미노산 치환 Y407T를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 CH3 도메인은 아미노산 치환 T366W를 포함하고, 다른 CH3 도메인은 아미노산 치환 Y407A를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 CH3 도메인은 아미노산 치환 F405A를 포함하고, 다른 CH3 도메인은 아미노산 치환 T394W를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 CH3 도메인은 아미노산 치환 T366Y 및 F405A를 포함하고, 다른 CH3 도메인은 아미노산 치환 T394W 및 Y407T를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 CH3 도메인은 아미노산 치환 T366W 및 F405W를 포함하고, 다른 CH3 도메인은 아미노산 치환 T394S 및 Y407A를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 CH3 도메인은 아미노산 치환 F405W 및 Y407A를 포함하고, 다른 CH3 도메인은 아미노산 치환 T366W 및 T394S를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 CH3 도메인은 아미노산 치환 F405W를 포함하고, 다른 CH3 도메인은 아미노산 치환 T394S를 포함한다. 돌연변이는 최초 잔기, 그 다음 카밧 넘버링 시스템을 이용한 위치, 및 그 다음 도입 잔기에 의해 표시된다. 또한, 참고: 하기에서의 넘버링: 도 5 (미국 특허 번호 8,216,805).

[0222] (vii) 단일-도메인 항체

[0223] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예에서, 단일-부위 항체는 인간 단일-부위 항체이다 (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 참고: 예컨대, 미국 특허 번호 6,248,516 B1). 하나의 구현예에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 모두 또는 일부로 이루어진다.

[0224] (viii) 항체 변이체

[0225] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 항체의 아미노산 서열 변형이 고려된다. 예를 들어, 상기 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성들을 향상시키는 것이 바람직한 일일 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 상기 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 적절할 변화를 도입시킴으로써, 또는 웨პ티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들면, 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 작제물에 도달하도록 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있으며, 단 최종 작제물은 목적하는 특징, 예컨대, 항원-결합을 가져야 한다. 아미노산 변경은 서열이 만들어지는 시간에서 대상체 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0226] (ix) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0227] 특정 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환적 돌연변이 생성을 위한 목적하는 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "보존적 치환"의 제목하에 표 1에서 보여준다. 보다 실질

적 변화는 "예시적 치환"의 표제하에 표 1에 제공되고, 추가로 아미노산 측쇄 부류를 참조로 하기에 기재된 바와 같다. 아미노산 치환은 목적하는 활성, 예컨대, 보유된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC를 위해 선별된 제품 및 관심 항체에 도입될 수 있다.

[0228] 표 3. 예시적인 치환

본래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0229]

[0230] 아미노산은 통상의 측쇄 성질에 따라 분류될 수 있다:

[0231] a. 소수성 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0232] b. 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0233] c. 산성: Asp, Glu;

[0234] d. 염기성: His, Lys, Arg;

[0235] e. 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

[0236] f. 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0237] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 다른 부류로 교체함을 수반할 것이다.

[0238] 치환형 변이체의 한 유형은 모 항체 (예를 들면 인간화 또는 인간 항체)의 하나 또는 그 초과 초가변 영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택되는 생성된 변이체(들)는 친계 항체에 비해 특정 생물학적 특성(예컨대, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)에 있어서 변형(예컨대, 개선)을 갖고/갖거나 친계 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙 항체이며, 이것은, 예를 들면, 본원에 기재된 바와 같은 파아지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 통상적으로 생성될 수 있다. 간략하게, 하나 이상의 HVR 잔기를 성숙시키고, 변이체 항체를 파아지 상에 디스플레이시키고, 특정 생물학적 활성(예컨대, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다.

[0239] 변형(예컨대, 치환)은 HVR에서, 예컨대, 항체 친화도를 개선시키기 위해 이루어질 수 있다. 상기 변경은 HVR "핫스팟," 즉, 체세포 성숙 공정 동안 높은 빈도로 돌연변이하는 코돈에 의해 암호화된 잔기 (참고, 예를 들면, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), 및/또는 SDR (a-CDR)에 의해 실시될 수 있고, 수득한 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화성에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터 작제하고 재선택함에 의한 친화성 성숙화가 예를 들어, 다음 문헌에 기재되어 있다: Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O' Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) 친화성 성숙화의 일부 구현예에서, 다양성이 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류 발생 경향 PCR, 쇠 셔플링 또는 올리고뉴클레오티드 지시된 돌연변이 생성)에 의한 성숙화를 위해 선택되는 가변 유전자에 도입된다. 이후 2차 라이브러리가 형성된다. 이후 라이브러리를 스크리닝하여 목적하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 식별한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지시된 접근법을 포함하며, 여기서 몇몇 HVR 잔기(예컨대, 한번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 관련된 HVR 잔기는 특히, 예컨대, 알라닌 주사 돌연변이생성(alanine scanning mutagenesis) 또는 모델링을 사용하

여식별할 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 특히 표적화된다.

[0240] 특정 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경이 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들면, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예컨대, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)은 HVR에서 이루어질 수 있다. 상기 변경은 HVR “핫스팟” 또는 SDR의 외부에 있을 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 구현예에서, 각각의 HVR는 변경되지 않거나, 또는 하나 이상, 두 개 또는 세 개의 아미노산 치환을 함유하지 않는다.

[0241] 돌연변이 생성을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기들 또는 영역들의 동정을 위해 유용한 방법은 다음 문헌에 기재된 바와 같이 “알라닌 스캐닝 돌연변이 생성”로 불리운다: Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. 이 방법에서는, 표적 잔기들(예컨대, arg, asp, his, lys, 및 glu와 같은 하전된 잔기)의 잔기 또는 그룹을 동정하고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예컨대, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지를 측정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감도를 입증하는 아미노산 위치에서 도입될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 항체와 항원 간의 접촉 지점을 식별하기 위한 항원-항체 착물의 결정 구조. 상기 접촉 잔기 및 인접 잔기가 치환을 위한 후보물질로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체는 이들이 목적하는 특성을 함유하는지 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0242] 아미노산 서열 삽입은 1 잔기 내지 100 이상 잔기를 함유하는 폴리펩티드 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열간 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 또 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 효소(예컨대, ADEPT에 대한)에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 융합을 포함한다.

(x) Fc 영역 변이체

[0244] 특정 구현예에서, 1종 이상의 아미노산 변형은 본 명세서에서 제공된 항체의 Fc 영역 안으로 도입될 수 있고, 그렇게 함으로써 Fc 영역 변이체를 생성한다. Fc 영역 변이체는 1종 이상의 아미노산 위치에 아미노산 변형(예를 들면 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들면, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0245] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 생체내 항체의 반감기가 여전히 어떤 효과기 기능(예컨대 보체 및 ADCC)이 중요한 적용에 대해 바람직한 후보자에 불필요한 또는 유해하게 하는, 모든 효과기 기능은 아니지만 일부를 보유하는 항체 변이체를 고려한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들면, Fc 수용체(FcR) 결합 검정은 항체가 Fc γ R 결합이 부족하지만(따라서 유사하게 ADCC 활성 부족), FcRn 결합 능력을 보유하는 것을 확보하기 위해 수행될 수 있다. ADCC, NK 세포 매개용 1차 세포는 Fc(RIII) 만을 발현하고, 반면에 단핵구는 Fc(RI), Fc(RII) 및 Fc(RIII)을 발현한다. 조혈 세포상의 FcR 빌현은 다음 문헌의 464 페이지 상의 표 3에 요약되어 있다: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). 해당 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비-제한적인 예는 하기에 기재된다: 미국 특허 번호 5,500,362 (참고, 예를 들면 Hellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) 및 Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (참고: Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). 대안적으로, 하기와 같은 비-방사능활성 검정 방법이 사용될 수 있다: 예를 들어, 유동 세포측정을 위한 ACTI™ 비-방사능활성 세포독성 검정(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비 방사성 세포독성 검정(Promega, Madison, WI). 그와 같은 분석을 위해 유용한 효과기 세포에는 말초 혈액 단핵구(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포가 포함된다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심 있는 분자의 ADCC 활성을 생체내, 예를 들면, 하기와 개시되어 있다: Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). C1q 결합 검정은 또한 항체가 C1q를 결합할 수 없음에 따라서 CDC 활성이 부재임을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 참고: 예를 들면, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정이 수행될 수 있다(참고: 예를 들면, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). FcRn 결합 및 생체내 청소능/반감기 결정은 또한 당해분야에서 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다(참고: 예를 들면, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

[0246] 감소된 효과기 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다(미국 특허 번호 6,737,056). 상기 Fc 돌연변이체는, 알라닌에 대해 잔기 265 및 297의 치환을 갖는 소위 “DANA” Fc 돌연변이체를 포함하여, 2 또는 그 초과의 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및

327에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).

[0247] FcRs로의 개선되거나 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 하기 참고: 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

[0248] 특정 구현예에서, 항체 변이체는 ADCC를 향상시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예컨대, Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다 (잔기의 EU 넘버링). 예시적 구현예에서, 이의 Fc 영역에서 하기 아미노산 치환을 포함한 항체: S298A, E333A, 및 K334A.

[0249] 일부 구현예에서, 변경은 예를 들어 하기에 기술된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선되거나 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 유발하는 Fc 영역 내에서 제조된다: 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0250] 증가된 반감기 및 태아로의 모체 IgG의 이동에 원인으로 작용하는, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)로의 개선된 결합을 갖는 항체 (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) 및 Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994))가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 상기 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선하는 그 안에 하나 또는 그 초과 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 상기 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434의 하나 이상에서 치환, 예를 들면, Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826). Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 또한 하기 참고: Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351.

[0251] (xi) 항체 유도체

[0252] 개시내용의 항체는 당해 기술에 공지되어 있고 및 쉽게 이용가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하기 위해 추가로 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 폴리머이다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈) 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에톡시화 폴리올(예컨대, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 수중 안정성으로 인해 제조시 이점을 가질 수 있다. 폴리머는 임의의 분자량일 수 있고, 그리고 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 폴리머의 수는 다양할 수 있고, 만일 1 초과 폴리머가 부착되면, 이들은 동일 또는 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용된 폴리머의 수 및/또는 유형은, 만일 항체 유도체가 한정된 조건하에서의 요법 등에서 사용된다면, 비제한적으로, 개선되는 항체의 특정한 특성 또는 기능을 포함하는 고려사항에 기반하여 결정될 수 있다.

[0253] (xii) 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0254] 항체는 재조합 방법을 이용하여 또한 생산될 수 있다. 항-항원 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 암호화하는 핵산을 단리하고 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 항체를 암호화하는 DNA는 쉽게 단리되고 (예를 들면, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 종래의 절차를 사용하여 서열분석될 수 있다. 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로, 비제한적으로, 하기 중 하나 또는 그 초과를 포함한다: 신호 서열, 복제기원, 하나 또는 그 초과의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종료 서열.

[0255] (a) 신호 서열 성분

[0256] 본 개시내용의 항체는 직접적으로 뿐만 아니라 이종 폴리펩티드와 함께 융합 폴리펩티드로서 재조합으로 생산될 수 있으며, 상기 이종 웨პ티드는 바람직하게 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드이다. 선택된 이종 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는 (예를 들면, 신호 웨პ티다아제에 의해 절단되는) 것이다. 원상태 항체 신호 서열을 인지하고 처리하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은, 예를 들면, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열안정성 장독소 II 리더의 그룹으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환된다.

[0257] (b) 복제 기점

[0258] 모든 발현 및 클로닝 벡터는 벡터를 하나 이상의 선택된 숙주 세포를 복제하게 할 수 있는 핵산 서열을 함유한

다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 상기 서열은 백터를 숙주 염색체 DNA와 별개로 복제하게 할 수 있는 것이고, 복제의 기원 또는 자율적으로 복제 서열을 포함한다. 상기 서열은 다양한 원핵 숙주 세포로 잘 알려진다. 예를 들어, 플라스미드 pBR322로부터 복제 기점은 대부분의 그램-음성 박테리아에 적합하다.

[0259] (c) 선택 유전자 성분

[0260] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 유전자, 또한 일명 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들면, 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트, 또는 테트라사이클린에 내성을 부여하는, (b) 영양요구성 결핍을 보완하는, 또는 (c) 착물 배지, 예를 들면, 바실러스용 유전자 암호화 D-알라닌 라세마제로부터 이용불가능한 결정적 영양소를 공급하는 단백질을 암호화한다.

[0261] 선택 반응식의 하나의 예는 숙주 세포의 성장을 억제하기 위해 약물을 이용한다. 이종성 유전자로 성공적으로 변형된 상기 세포는 약물 내성을 부여한 단백질을 생산하고 따라서 선택 레지멘을 견뎌낸다. 상기 우세한 선택의 예는 약물 네오마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신을 이용한다.

[0262] 또 다른 선택 반응식은 유전자 생성물이 특정한 배양 배지에서 성장에 필수적인 유전자를 제거하는 염색체 결실을 갖는 원핵 숙주 세포를 이용한다. 이들 실시예에서, 숙주 세포의 염색체 결실을 보완하는 이종성 유전자로 성공적으로 형질전환된 상기 세포는 특정한 배양 배지에서 성장된 경우 생존할 것이다. 상기 반응식에서 유용한 유전자의 예는 숙주 세포가 특정한 배양 배지에서 성장된 경우 필수 영양소를 생성하기 위해 요구되는 다른 유전자 또는 영양요구성 마커 유전자를 포함할 수 있다.

[0263] (d) 프로모터 성분

[0264] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 숙주 유기체에 의해 기술적으로 인식된 및 항체를 암호화한 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 원핵생물 숙주와 함께 사용되기에 적절한 프로모터는, *phoA* 프로모터, β -락타마제 및 락토오스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타아제 프로모터, 트립토판 (*trp*) 프로모터, 및 혼성체 프로모터 예컨대 *tac* 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아성 프로모터가 적합하다. 박테리아성 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 항체를 암호화한 DNA에 작동가능하게 연결된 Shine-Dalgarno (S.D.) 서열을 함유할 것이다.

[0265] (e) 번역 개시 영역 성분

[0266] 상기 기재된 바와 같이, 번역 개시 영역 (TIRs)은 원핵 숙주 세포에서 재조합 단백질의 번역에 주요함이 공지된다 (참고: 예를 들면, Simmons LC and Yansura DG 1996 Nat. Biotechnol. 14:629 및 Vimberg V et al. 2007 BMC Mol. Biol. 8:100). TIR은 번역 단위체의 번역 효율을 결정할 수 있다. TIR은 전형적으로 번역 단위체 특징 예컨대 개시 코돈, 샤인-달가르노 (SD) 서열, 및 번역 인핸서를 포함한다. TIR은 신호 웨პ티드를 암호화하는 분비 신호 서열을 추가로 포함할 수 있다. TIR의 특징 서열 및 간격은 번역 개시 효율을 조절할 수 있다. 단백질 생산에서 TIRs의 이용의 추가 설명에 대하여, 다음을 참고한다: 예를 들면, 발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열을 기재하는 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.).

[0267] (f) 전사 종결 성분

[0268] 원핵생물 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 수 있다. 원핵 세포에서, 종결부위는 Rho-의존적 또는 Rho-독립적 종결부위를 포함할 수 있다. 원핵 숙주 세포에서 유용한 종결부위의 하나의 예는 제한 없이 λ t0 종결부위를 포함한다 (Scholtissek and Grosse, Nucleic Acids Res. 15:3185, 1987).

III. 공정 최적화

[0269] 폴리펩티드의 2쇄를 발현시키기 위해 숙주 세포를 배양시킴으로써 원핵 숙주 세포에서 2쇄를 함유한 폴리펩티드의 생산 방법이 본원에서 제공되고, 여기에서 발현시 2쇄는 접혀지고 조립되어 숙주 세포에서 생물학적 활성 폴리펩티드를 형성하고, 여기에서 숙주 세포는 하기: 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함한 성장 단계, 및 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함한 생산 단계를 포함한 조건하에 배양 배지에서 배양되고, 여기에서 성장 온도는 생산 온도의 2 내지 10°C 초과이고, 성장 교반 속도는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초과이다. 특정 생산 공정 최적화가 본원에서 기재된 데이터에 의해 입증된 바와 같이 2쇄 단백질의 수율에서 극적인 증가를 갖는다는 것이 본 개시내용의 놀라운 발견이다.

[0271] (g) 숙주 세포의 선택 및 변형

- [0272] 본 개시내용의 특정 양태는 원핵 숙주 세포에 관한 것이다. 본원에서 백터에 DNA의 클로닝 또는 발현을 위하여 적합한 원핵생물은 진정박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 엔테로박테리아세속에 예컨대 에스케리치아, 예를 들면, *E.coli*, 엔테로박터, 어위니아, 클렙시엘라, 프로테우스, 살모넬라, 예를 들면, 살모넬라 타이피뮤리움, 세라티아, 예를 들면, 세라티아 마르체칸스, 및 시겔라, 뿐만 아니라 바실러스 예컨대 *B. 서브틸리스* 및 *B. 리케니포르미스* (예를 들면, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710에 개시된 *B. 리케니포르미스 41P*), 슈도모나스 예컨대 *P. 에어루기노사*, 및 스트렙토마이세스를 포함한다. 일 바람직한 *E.coli* 클로닝 숙주는 *E.coli* 294 (ATCC 31,446)이며, 한편 기타 균주 예컨대 *E.coli* B, *E.coli* X1776 (ATCC 31,537), 및 *E.coli* W3110 (ATCC 27,325)가 적합하다. 이러한 예시는 제한적이기 보다 예시적이다.
- [0273] 일부 구현예에서, 원핵 숙주 세포는 그람-음성 박테리아이다. 그람-음성 박테리아는 그람 염색에 의해 검출된 펩티도글리칸 층 주위의 외막을 함유하는 임의의 박테리아를 지칭한다. 많은 그람-음성 박테리아성 숙주 세포는 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 그람-음성 박테리아는 제한 없이 프로테오박테리아, 예컨대 알파프로테오박테리아, 베타프로테오박테리아, 감마프로테오박테리아, 세타프로테오박테리아, 엡실론프로테오박테리아, 델타프로테오박테리아, 및 아시도박테리아; 시아노박테리아; 및 스피로헤파를 포함하도록 공지된다. 잘 알려진 그람-음성 박테리아는 속 예컨대 에스케리시아, 살모넬라, 시겔라, 슈도모나스, 헬리오박터, 레지오넬라, 나이세리아, 및 클렙시엘라 유래의 종을 포함할 수 있다.
- [0274] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 그람-음성 박테리아는 *E.coli*이다. 본원에서 사용된 바와 같이, *E.coli*는 종 *E.coli*에 속하는 박테리아의 단리를 또는 임의의 균주를 지칭할 수 있다. *E.coli*는 예컨대 본원에서 기재된 바와 같이 플라스미드로 돌연변이 또는 형질전환에 의해 유전적으로 변형된 균주 또는 천연 발생 균주를 포함할 수 있다.
- [0275] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 *E.coli*는, 내인성 프로테아제 활성이 결여된 균주의 것이다. 이론에 제한되도록 바램 없이, 내인성 프로테아제 활성이 결핍된 균주가 본 개시내용의 재조합 단백질, 예컨대 주변세포질성 단백질의 향상된 생산을 허용할 수 있는 것은, 일부 내인성 프로테아제가 재조합으로 발현된 기재에 대하여 활성을 갖기 때문이라고 생각된다 (참고: 하나의 상기 예에 대하여, Baneyx F and Georgiu G 1990 J. Bacteriol. 172(1):491). 내인성 프로테아제 활성이 결핍된 균주는 내인성 프로테아제를 암호화한 유전자가 돌연변이된, 결실된, 또는 다르게는 불활성화된 균주를 포함할 수 있다. 상기 유전자의 예는, 제한 없이, *degP*, *prc*, 및 *ompT*를 포함할 수 있다. 다양한 원핵 숙주 세포에서 돌연변이 도입을 위한 (예를 들면, 내인성 프로테아제 활성이 결핍된 균주 엔지니어링을 위한) 방법은 당해 기술에서 잘 알려져 있으며; 다음을 참고한다: 예를 들면, Snyder L et al. 2013 Molecular Genetics of Bacteria 4th ed. ASM Press.
- [0276] 특히 당화 및 Fc 효과기 기능이 필요없는 경우, 예컨대 치료적 항체가 종양 세포 파괴에서 그만으로 유효성을 보이는 세포독성 약물 (예를 들면, 독소)에 콘주케이션된 경우, 2쇄 단백질 예컨대 전장 항체, 항체 융합 단백질, 및 항체 단편은 박테리아에서 생산될 수 있다. 전장 항체는 순환에서 더 큰 반감기를 갖는다. *E.coli*에서 생산은 더 빠르고 더욱 비용 효율적이다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩ти드의 발현에 대하여, 다음 문헌을 참조한다: 예를 들어, 발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열을 기재하는, 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et. al.), 미국 특허 번호 5,789,199 (Joly et al.), 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.). 또한 참고: Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254 (*E.coli* 내 항체 단편의 발현을 기술). *E.coli* 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고, 예를 들면, 이소형에 의존한 단백질 A 또는 G 컬럼을 통해 정제될 수 있다. 최종 정제는 예를 들면, CHO 세포에서 발현된 항체의 정제 방법과 유사하게 수행될 수 있다.
- [0277] 숙주 세포는 2쇄 단백질 생산을 위한 상기 기술된 발현 또는 클로닝 백터로 변형되고, 프로모터를 유도하거나, 변형체를 선택하거나, 또는 원하는 서열을 암호화하는 유전자를 중복하는데 적절한 것으로서 변형된 기준 영양 배지 내에서 배양된다.
- [0278] (h) 숙주 세포 배양
- [0279] 본 개시내용의 특정 양태는 성장 단계 및 생산 단계를 포함한 조건하에 배양 배지에서 숙주 세포 배양에 관한 것이다. 각각의 이들 단계는 숙주 세포가 특정한 단계 동안 성장된 조건을 추가로 지칭할 수 있다. 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이, 성장 단계는 성장 온도 및 성장 교반 속도를 포함할 수 있고, 생산 단계는 생산 온도 및 생산 교반 속도를 포함할 수 있다.
- [0280] 성장 단계는 숙주 세포의 배양물이 기하급수적으로 성장하는 동안의 임의의 시간을 지칭할 수 있다. 성장 온도

는 본원에서 사용된 바와 같이 숙주 세포의 성장 단계 동안 본 개시내용의 숙주 세포를 함유한 배양 배지의 온도를 지칭할 수 있다. 숙주 세포 배양물의 성장 단계는 당해 기술에서 통상적으로 공지된 방법, 예를 들면, 경시적으로 (예를 들면, 약 550 nm, 약 600 nm의 파장, 또는 이들 사이의 파장에서) 배양물의 광학적 밀도 측정 및 지수 성장 단계이 중단하는 시간 결정에 의해 결정될 수 있다. 숙주 세포가 pho 프로모터를 갖는 벡터를 함유하면, 성장 단계는 숙주 세포의 배양물이 기하급수적으로 성장하는 임의의 시간을 지칭할 수 있고 배양 배지에서 포스페이트의 농도는 pho 프로모터-매개된 유전자 전사의 유도를 예방하기에 충분하다.

[0281] 생산 단계는 숙주 세포의 배양물이 생성물을 생산하는 동안의 임의의 시간을 지칭할 수 있다. 생산 온도는 본원에서 사용된 바와 같이 숙주 세포의 생산 단계 동안 본 개시내용의 숙주 세포를 함유한 배양 배지의 온도를 지칭할 수 있다. 숙주 세포가 생성물의 발현을 구동한 pho 프로모터를 갖는 벡터를 함유하면, 생산 단계는 배양 배지에서 포스페이트의 농도가 pho 프로모터-매개된 생성물 유전자 전사를 유도하기에 충분히 낮은 동안의 임의의 시간을 지칭할 수 있다.

[0282] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 온도의 2°C 내지 10°C 초과의 성장 온도에서 배양된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 온도의 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 또는 10°C 초과 성장 온도에서 배양된다. 일부 구현예에서, 성장 온도는 약 임의의 하기 양 미만만큼 생산 온도 초과이다 (°C): 10, 9.5, 9, 8.5, 8, 7.5, 7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 또는 2.5. 일부 구현예에서, 성장 온도는 약 임의의 하기 양 초과만큼 생산 온도 초과이다 (°C): 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 또는 9.5. 즉, 성장 온도는 10, 9.5, 9, 8.5, 8, 7.5, 7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 또는 2.5의 상한 및 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 또는 9.5 (°C)의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 양의 임의의 범위 만큼 생산 온도 초과이고, 여기에서 하한은 상한 미만이다.

[0283] 일부 구현예에서, 성장 온도는 성장 단계 동안 약 30°C 내지 약 34°C의 범위이다. 일부 구현예에서, 성장 온도는 성장 단계 동안 약 30°C, 약 30.5°C, 약 31°C, 약 31.5°C, 약 32°C, 약 32.5°C, 약 33°C, 약 33.5°C, 또는 약 34°C이다. 일부 구현예에서, 성장 단계 동안 성장 온도는 약 임의의 하기 온도 미만이다 (°C): 34, 33.5, 33, 32.5, 32, 31.5, 31, 또는 30.5. 일부 구현예에서, 성장 단계 동안 성장 온도는 약 임의의 하기 온도 초과이다 (°C): 30, 30.5, 31, 31.5, 32, 32.5, 33, 또는 33.5. 즉, 성장 단계 동안의 성장 온도는 34, 33.5, 33, 32.5, 32, 31.5, 31, 또는 30.5의 상한 및 30, 30.5, 31, 31.5, 32, 32.5, 33, 또는 33.5의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도의 임의의 범위 만큼 생산 교반 속도 초과일 수 있고, 여기에서 하한은 상한 미만이다.

[0284] 일부 구현예에서, 생산 온도는 생산 단계 동안 약 25°C 내지 약 29°C의 범위이다. 일부 구현예에서, 생산 온도는 생산 단계 동안 약 25°C, 약 25.5°C, 약 26°C, 약 26.5°C, 약 27°C, 약 27.5°C, 약 28°C, 약 28.5°C, 또는 약 29°C이다. 일부 구현예에서, 생산 단계 동안 생산 온도는 약 임의의 하기 온도보다 더 작다 (°C): 29, 28.5, 28, 27.5, 27, 26.5, 26, 또는 25.5. 일부 구현예에서, 생산 단계 동안 생산 온도는 약 임의의 하기 온도보다 더 크다 (°C): 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 또는 28.5. 즉, 생산 단계 동안의 생산 온도는 29, 28.5, 28, 27.5, 27, 26.5, 26, 또는 25.5의 상한 및 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 또는 28.5의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도의 임의의 범위 만큼 생산 교반 속도 초과일 수 있고, 여기에서 하한은 상한 미만이다.

[0285] 교반 속도는 세포 배양물이 (예를 들면, 교반에 의해) 교반된 속도를 지칭한다. 성장 교반 속도는 본원에서 사용된 바와 같이 본 개시내용의 숙주 세포를 함유한 배양물이 숙주 세포의 성장 단계 동안 교반된 속도를 지칭할 수 있다. 생산 교반 속도는 본원에서 사용된 바와 같이 본 개시내용의 숙주 세포를 함유한 배양물이 숙주 세포의 생산 단계 동안 교반된 속도를 지칭할 수 있다. 세포 배양물은 세포 배양물의 통기를 유지하기 위해 교반될 수 있다.

[0286] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 교반 속도의 50 내지 250 rpm 초과의 성장 교반 속도에서 배양된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 교반 속도의 50 rpm, 75 rpm, 100 rpm, 125 rpm, 150 rpm, 175 rpm, 200 rpm, 225 rpm, 또는 250 rpm 초과의 성장 교반 속도에서 배양된다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 약 임의의 하기 속도 미만 만큼 생산 교반 속도 초과이다 (rpm): 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 또는 75. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 약 임의의 하기 속도 초과 만큼 생산 교반 속도 미만이다 (rpm): 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 또는 225. 즉, 성장 교반 속도는 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 또는 75의 상한 및 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 또는 225의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 속도 (rpm)의 임의의 범위 만큼 생산 교반 속도 초과이고, 여기에서 하한은 상한 미만이다.

[0287] 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 성장 단계 동안 약 600 내지 800 rpm의 범위내이다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 성장 단계 동안 약 600 rpm, 약 625 rpm, 약 650 rpm, 약 675 rpm, 약 700 rpm, 약 725 rpm, 약

750 rpm, 약 775 rpm, 또는 약 800 rpm이다. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 약 임의의 하기 속도 미만이다 (rpm): 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 또는 625. 일부 구현예에서, 성장 교반 속도는 약 임의의 하기 속도 초과이다 (rpm): 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 또는 775 (성장 단계 동안). 즉, 성장 단계 동안의 성장 교반 속도는 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 또는 625의 상한 및 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 또는 775의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 속도 (rpm)의 임의의 범위이고, 여기에서 하한은 상한 미만이다.

[0288] 일부 구현예에서, 생산 교반 속도는 생산 단계 동안 약 300 내지 500 rpm의 범위이다. 일부 구현예에서, 생산 단계 동안의 성장 교반 속도는 생산 단계 동안 약 300 rpm, 약 325 rpm, 약 350 rpm, 약 375 rpm, 약 400 rpm, 약 425 rpm, 약 450 rpm, 약 475 rpm, 또는 약 500 rpm이다. 일부 구현예에서, 생산 단계 동안 생산 교반 속도는 약 임의의 하기 속도 미만이다 (rpm): 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 또는 325. 일부 구현예에서, 생산 단계 동안 생산 교반 속도는 약 임의의 하기 속도보다 더 크다 (rpm): 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 또는 475. 즉, 생산 단계 동안의 생산 교반 속도는 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 또는 325의 상한 및 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 또는 475의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 속도 (rpm)의 임의의 범위이고, 여기에서 하한은 상한 미만이다.

[0289] 이론에 의해 구속됨 없이, 산소 농도가 제한된 경우, 산소 전달 속도 (OTR)가 세포의 산소 흡수 속도 (OUR) 또는 대사성 속도와 동등한 것이 생각된다. OTR의 가공은 교반 속도를 조정함으로써, 따라서 OUR을 가공함으로써 용이하게 될 수 있다. OUR 및 이의 OTR와의 관계에 대한 추가의 기술은 하기에서 발견될 수 있다: Ochoa-Garcia et al., Biotechnol. Adv. 27:153, 2009. 세포 배양물의 OUR의 측정 기술은 당해 기술에 공지되어 있고, 제한 없이, 세포 배양물로부터 배기가스의 조성물을 모니터링하기 위한 질량 분광분석기 이용 및 세포 배양물의 산소 흡수 및 이산화탄소 진화 속도 계산을 포함한다.

[0290] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 단계 동안 숙주 세포에서 피크 산소 흡수 속도의 0.5 내지 2.5 mmol/L/min 초과의 성장 단계 동안 숙주 세포에서 산소 흡수 속도를 달성하기에 충분한 성장 교반 속도에서 배양된다. 성장 단계에 비교시 숙주 세포에서 약 2.5 mmol/L/min 미만의 산소 흡수 속도를 달성하기에 충분한 속도까지 생산 단계 동안 세포 배양물의 교반 속도 감소가 생성물, 예컨대 본 개시내용의 2쇄 폴리펩티드의 생산을 크게 향상시키는 것이 본 개시내용의 발견이다.

[0291] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 단계 동안 숙주 세포에서 피크 산소 흡수 속도의 0.5 mmol/L/min, 1.0 mmol/L/min, 1.5 mmol/L/min, 2.0 mmol/L/min, 또는 2.5 mmol/L/min 초과의 성장 단계 동안 숙주 세포에서 산소 흡수 속도를 달성하기에 충분한 성장 교반 속도에서 배양된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 단계 동안 숙주 세포에서 피크 산소 흡수 속도 초과의 약 임의의 하기 산소 흡수 속도 (mmol/L/min) 미만의 성장 단계 동안 숙주 세포에서 산소 흡수 속도를 달성하기에 충분한 성장 교반 속도에서 배양된다: 2.5, 2.0, 1.5, 또는 1.0. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 단계 동안 숙주 세포에서 피크 산소 흡수 속도 초과의 약 임의의 하기 산소 흡수 속도 (mmol/L/min) 보다 더 큰 성장 단계 동안 숙주 세포에서 산소 흡수 속도를 달성하기에 충분한 성장 교반 속도에서 배양된다: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 또는 2.5. 즉, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 단계 동안 숙주 세포에서 피크 산소 흡수 속도의 2.5, 2.0, 1.5, 또는 1.0의 상한 및 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 또는 2.5 초과의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 산소 흡수 속도 (mmol/L/min)의 임의의 범위의 성장 단계 동안 숙주 세포에서 산소 흡수 속도를 달성하기에 충분한 성장 교반 속도에서 배양된다.

[0292] 일부 구현예에서, 성장 단계 동안 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도는 3.5 mmol/L/min 내지 4.5 mmol/L/min의 범위이다. 일부 구현예에서, 성장 단계 동안 숙주 세포의 피크 산소 흡수 속도는 3.5 mmol/L/min, 3.75 mmol/L/min, 4.0 mmol/L/min, 4.25 mmol/L/min, 또는 4.5 mmol/L/min이다. 일부 구현예에서, 생산 단계 동안 숙주 세포의 산소 흡수 속도는 1.0 mmol/L/min 내지 3.0 mmol/L/min의 범위이다. 일부 구현예에서, 생산 단계 동안 숙주 세포의 산소 흡수 속도는 1.0 mmol/L/min, 1.25 mmol/L/min, 1.5 mmol/L/min, 1.75 mmol/L/min, 2.0 mmol/L/min, 2.25 mmol/L/min, 2.5 mmol/L/min, 2.75 mmol/L/min, 또는 3.0 mmol/L/min이다.

[0293] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 생산 교반 속도보다 약 10% 내지 약 40% (rpm/rpm) 더 높은 성장 교반 속도에서 배양된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 생산 교반 속도의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 또는 35% (rpm/rpm)의 하한 및 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 또는 15% (rpm/rpm) 이하의 독립적으로 선택된 상한을 갖는 성장 교반 속도에서 배양된다. 바람직한 구현예에서, 본 개시내용의 숙주 세포는 1 바 배압 및 20 L/min의 통기 속도에서 10 L 발효조에 배양된다.

[0294] 본 개시내용의 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. "배양 배지"는 본원에서 사용된 바와 같이 본 개시내용의 박테리아의 성장을 지지하는 액체배지 또는 임의의 조성물을 지칭한다. 적합한 배양 배지는 액체 또는 고체일 수 있고 임의의 영양소, 염, 베퍼, 요소, 및 세포의 성장 및 생존력을 지지하는 다른 화합물을 함유한다. 배양 배지의 공통의 영양소는 질소, 탄소, 아미노산, 탄수화물, 미량 원소, 비타민, 및 미네랄의 공급원을 포함할 수 있다. 이들 영양소는 (정의된 배양 배지에서와 같이) 개별 성분로서 또는 착물 추출물 (예를 들어, 효모 추출물)의 성분로서 부가될 수 있다. 배양 배지는 급속 성장을 지지하기 위해 영양소-풍부 또는 더 느린 성장을 지지하기 위한 최소일 수 있다. 배양 배지는 오염 유기체 (예를 들면, 항생제)의 성장을 억제하기 위해 또는 사멸하기 위해 사용된 임의의 제제를 또한 함유할 수 있다. 배양 배지는 유도성 프로모터 또는 효소의 활성을 대조하기 위해 사용된 임의의 화합물을 또한 함유할 수 있다 (하나의 예로서, IPTG는 lac 오피론 또는 기능적으로 유사한 프로모터에 의해 제어된 임의의 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하기 위해 포함될 수 있다). 적합한 배양 배지의 많은 예는 당해 기술에서 잘 알려지고 제한 없이 M9 배지, 용원성 액체배지 (LB), 엄청난 액체배지 (TB), NZY 액체배지, SOB 배지, 및 YT 액체배지를 포함한다.

[0295] 임의의 이들 배지는 필요에 따라 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 베퍼 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제, 항진균제, (마이크로몰 범위에서 최종 농도로 보통 존재한 무기 화합물로서 정의된) 미량 원소, 글루코오스, 및/또는 적절한 에너지 공급원으로 보강될 수 있다. 원핵 세포 배양 배지에서 발견된 전형적인 성분은 효모 추출물, 염 (예를 들면, NaCl), 트립톤, 베퍼 (예를 들면, 포스페이트 베퍼), 글리세롤, 등등을 포함한다. 임의의 다른 필수적인 보충물을 또한 당해기술의 숙련가에게 공지된 적절한 농도로 포함할 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 원핵생물 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 조건이며, 숙련가에게 분명할 것이다.

[0296] (i) 생물학적 활성 폴리펩티드의 정제

[0297] 본 개시내용의 특정 양태는 숙주 세포로부터 생물학적 활성 폴리펩티드 회수에 관한 것이다. 본 개시내용의 생물학적 활성 폴리펩티드의 전형적으로 회수 (용어 "정제하는" 또는 "정제"는 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다)는 숙주 세포 (또는 폴리펩티드가 배지 속으로 배출되면 세포 배양 배지)로부터 폴리펩티드 단리 및 다른 관련된 거대분자, 예를 들면, 세포성 잔해 및 다른 폴리펩티드로부터 폴리펩티드 정제를 포함한다. 다양한 숙주 세포 구획으로부터 다양한 단백질 정제를 위한 수많은 기술은 당해 기술에 공지되어 있다 (참고, 예를 들면, Evans, Jr., TC and Xu MQ (eds.) *Heterologous Gene Expression in E. coli* (2011) Methods in Molecular Biology Vol 705, Humana Press). 예시적 기술은 아래 기재되지만, 이들은 숙련가의 이해를 단지 보충하기 위해 예시적 목적으로 포함되고 결코 제한될 의미는 아니다.

[0298] 재조합 기술을 이용한 경우, 2쇄 단백질 예컨대 분비성 단백질은 주변세포질 공간에서 세포내로 생산될 수 있거나, 또는 배지에 직접적으로 분비될 수 있다. 분비성 단백질이 세포내로 생산되는 경우, 제1 단계로 숙주 세포 또는 용해된 단편인 미립자 잔해가, 예를 들면 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다.

[0299] 일부 구현예에서, 분비성 단백질은 숙주 세포의 주변세포질로부터 회수된다. [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]는 *E.coli*의 원형질막 주위 공간에 분비되는 분비성 단백질을 단리하기 위한 절차를 기재한다. 간략히, 세포 폐효모를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐서 해동시킨다. 세포 과편을 원심분리로 제거할 수 있다. 분비성 단백질이 배지 내로 분비되는 경우, 그와 같은 발현계의 상청액은 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 단위를 이용해서 농축된다. 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF가 단백질분해를 억제하기 위해 임의의 전술된 단계에 포함될 수 있고, 항생제가 우발적인 오염물질의 성장을 예방하기 위해 포함될 수 있다.

[0300] 세포로부터 제조된 분비성 단백질 조성물은, 예를 들면, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피(hydroxylapatite chromatography), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화도 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중 하나이다. 항체에 대하여, 친화성 리간드로서 단백질 A의 혼화성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 의존적이다. 단백질 A는 인간 γ 1, γ 2, 또는 γ 4 중쇄에 기반하는 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다(Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ 3에 대해 권장된다(Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 매우 종종 아가로스이지만, 다른 매트릭스가 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 조절된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 가공 시간을 허용한다. 항체가 C_H3 도메인을 포

함한 경우, Bakerbond ABX™ 수지 (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)는 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술 예컨대 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전법, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 상의 SEPHAROSE™ 크로마토그래피 (예컨대 폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전법이 또한 회수되는 항체에 따라 이용가능하다. 당해 분야의 숙련가는 항체 회수에 유용한 많은 이들 기술이 다른 2쇄 단백질, 예컨대 분비성 단백질을 회수하기 위해 쉽게 적용될 수 있음을 인식할 것이다.

[0301] 실시예

본 개시내용은 하기 실시예를 참조하여 더 완전히 이해될 것이다. 그러나 이들은 본 개시내용의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시적 목적을 위한 것이고, 이들의 견지에서 다양한 변형 또는 변화가 당해기술의 숙련가에게 제시될 것이며, 본 출원의 사상 및 범위 그리고 첨부된 청구범위의 범위 내에 포함될 것임이 이해된다.

약어: Ab (항체), hAb (절반 항체), HC (중쇄), IPTG (이소프로필 β -D-1-티오갈락토파라노시드), LC (경쇄), OD (광학적 밀도), ORF (개방형 해독틀), OTR (산소 전달 속도), OUR (산소 흡수 속도), Tg (성장 온도), Tp (생산 온도), TIR (번역 개시 영역), xIL4 (항-인터류킨-4), xIL13 (항-인터류킨-13), xIL17 (항-인터류킨-17), 및 xIL33 (항-인터류킨-33).

[0304] 실시예 1: 절반-항체 생산 역가에 관한 샤페론 및 산화환원효소 수준의 효과

재조합 기술을 이용한 이종성 분비된 단백질의 생산은 많은 치료적 분자에 중요하다. 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체)는 많은 중요한 치료 용도, 예컨대 암 및 기타 적용에서 면역요법을 이용한 이종성 분비된 단백질의 하나의 비-제한 예이다. 치료 용도를 위한 다중특이적 항체 생산은 산업적 규모로 이들 항체, 예컨대 절반-항체 (hAbs)의 빌딩 블록을 생산하기 위한 능력을 요구한다. 상기 요구를 충족시키기 위해, 표준 방법에 대하여 생산에서 유의미한 증가를 수득하는 최적화된 발현 벡터 및 공정 단계가 본원에서 기재된다. 중요하게는, 샤페론 단백질 FkpA, DsbA, 및 DsbC와 조합으로 hAb의 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC) 공-발현을 위한 단일 플라스미드 또는 혼화성 플라스미드 시스템은 조립된 hAb의 생산을 유의미하게 향상시키는 것이 발견되었다. 상기 시스템은 시험되었고 다중 hAbs의 생산을 개선하도록 발견되었고, 많은 분비된 단백질의 생산을 위한 그의 광범위한 유용성을 증명한다. (예를 들면, 배양의 상이한 상에서 교반 속도, pH, FkpA 프로모터, 및 배양물 온도를 포함한) 공정 단계의 후속의 최적화는 생성물 수율에서 더욱 유의미한 증가를 수득하였다.

[0306] 재료 및 방법

[0307] 절반-항체 (hAb) 벡터 작제

벡터는 EP1356052에 기재된 것과 유사한 방식으로 작제되었다. 특히, 다양한 발현 벡터는 hAbs의 발현을 위하여 제조되었다. 각 벡터에 대하여, 발현 카세트는 EcoRI 부위에서 *E.coli* 플라스미드 pBR322의 프레임워크로 클로닝되었다 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90, 1978). 각 발현 카세트는 적어도 하기 성분을 함유하였다: (1) 전사의 대조를 위한 phoA 프로모터 (Kikuchi et al., Nucleic Acids Res. 9:5671-5678, 1981); (2) *E.coli* trp, 열 안정한 장독소 II (STII) 신호 서열, 또는 번역 개시를 위하여 양쪽의 조합으로부터 샤인-달가르노 서열 (Chang et al., Gene 55:189-196, 1987); 및 (3) 말단 전사에 대한 $\lambda t0$ 종결부위 (Scholtissek and Grosse, Nucleic Acids Res. 15:3185, 1987). 추가로, STII 신호 서열 또는 그 신호 서열의 침묵의 코돈 변이체는 경쇄 또는 중쇄용 암호화 서열을 선택하였다. 상기 서열은 주변세포질속으로 폴리펩티드의 분비를 유도한다 (Picken et al., Infect. Immun. 42:269-275, 1983; 및 Simmons and Yansura, Nature Biotechnology 14:629-634, 1996).

별도 시스트론을 갖는 벡터는 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자의 독립적인 발현을 제공하도록 설계되었다. 상기 벡터에서, 각 쇄를 위한 시스트론 단위체는 그의 자체 PhoA 프로모터의 제어하에 있고 $\lambda t0$ 종결부위가 뒤따랐다. 더욱이, 각 시스트론은 TIR (번역 개시 영역)을 편입하여 모든 경쇄 및 중쇄의 발현을 조절하였다 (Simmons et al., J. Immunol. Meth., 263:133-147, 2002). 예시적 구현예에서, 발현 카세트는, 5'에서 3'까지, 제1 PhoA 프로모터 그 다음 경쇄 (TIR-L + 경쇄) 및 제1 $\lambda t0$ 종결부위용 시스트론, 및 제2 PhoA 프로모터 그 다음 중쇄 (TIR-H + 중쇄) 및 제2 $\lambda t0$ 종결부위용 시스트론을 함유한다. 대안적으로, 발현 카세트는, 5'에서 3'까지, 제1 PhoA 프로모터 그 다음 중쇄 (TIR-H + 중쇄) 및 제1 $\lambda t0$ 종결부위용 시스트론, 및 제2 PhoA 프로모터 그 다음 경쇄 (TIR-L + 경쇄) 및 제2 $\lambda t0$ 종결부위용 시스트론을 함유한다. 모든 TIR-L 및 TIR-

H는 STII 신호 서열 또는 이의 변이체 내에 함유된다.

[0310] xIL13 및 xIL4 IgG4 hAb 발현 벡터에 대하여 1,1 및 2,2의 TIR 조합은 평가되었다. xIL17 및 xIL33 IgG4 hAb 발현 벡터에 대하여 TIR2,2는 평가되었다. 제1 번호는 경쇄의 TIR 강도를 나타내고 제2는 중쇄의 TIR 강도를 나타낸다. xIL13, xIL4, xIL17 및 xIL33 IgG4 hAbs에 더하여, 다른 IgG1 이소형 hAb 벡터는 작제되었고 시험되었다.

샤페론 발현 플라스미드 작제

[0311] xIL13, xIL4, xIL17 및 xIL33 hAbs의 최고 역가를 수득하기 위해 상기 기재된 벡터와 조합되는 샤페론 발현을 결정하기 위해, 플라스미드는 공-발현을 위하여 제공되었다. 수많은 공지된 샤페론은 FkpA 단백질, 샤페론 활성을 갖는 웨티딜프로일 시스-트랜스 이소마리아제를 포함하여 시험되었다. 그렇게 하기 위해, EP1356 052 (참고, 예를 들면, 실시예 9-10, 특히 단락 [0207])에 기재된 바와 같이, FkpA용 ORF를 함유한 혼화성 플라스미드 (pACYC, Novagen, Madison, WI)는 작제되었다.

[0312] 현재 공정에 대하여 상기 작업을 확대하여, FkpA 혼화성 벡터의 세트는 FkpA 공-발현의 수준을 조절하기 위해 유사하게 생성되었다. FkpA 수준의 조절은 이전에 기재된 바와 같이 신호 웨티드의 최적화를 통해 달성되었다 (Simmons and Yansura, 상기, 1996). 간단히, FkpA ORF의 5' 말단은 FkpA 신호 웨티드 (원상태 또는 변이체), 또는 STII 신호 웨티드를 함유하였다. 모든 FkpA 변이체 유전자 작제물은 tacII 프로모터의 제어하에 있었다.

[0313] 이들 플라스미드는 그 다음 균주 66F8 속으로 상기 기재된 hAb 발현 플라스미드로 공-형질전환되었다. 숙주 균주 66F8의 유전자형은 W3110 $\triangle fhuA \triangle phoA ilvG2096$ (Val^r) $\triangle prc spr43H1 \triangle degP \triangle manA lacI^Q \triangle ompT \triangle menE$ 이다.

[0314] xIL13 hAb, TIR1,1 및 TIR2,2에 대하여 절반 항체 및 FkpA의 LC 및 HC를 암호화한 플라스미드는 작제되었고 66F8를 변형하기 위해 사용되었다. 이들 플라스미드 작제물에서, FkpA의 발현은 LC용 ORF의 phoA 프로모터 업스트림에 의해 제어되었다. pBR322 플라스미드는 대략 30 사본/세포 (Bolivar et al., Gene, 2:95-113, 1977)에서 전형적으로 유지되고 pACYC 플라스미드는 대략 15 사본/세포 (Chang and Cohen, J. Bacteriol., 134:1141-1156, 1978)에서 전형적으로 유지된다. 이론에 제한되도록 바램 없이, FkpA가 Ab 발현 플라스미드상으로 이동되는 경우 사본 번호는 제조된 FkpA의 양의 증가를 초래할 수 있다는 것이 생각된다.

산화환원효소 플라스미드 작제

[0315] FkpA의 공-발현을 위하여 기재된 혼화성 플라스미드 시스템과 유사하게, 혼화성 플라스미드는 이전에 기재된 FkpA TIR 변이체 중 하나를 편입한 hAb 발현 플라스미드와 조합으로 다양한 공지된 산화환원효소를 스크리닝하기 위해 이용되었다. 상기 작업은 pxIL13.2.2.FkpAc13으로서 확인된 TIR2,2 플라스미드로 수행되었다. 게다가 혼화성 플라스미드는 xIL4 및 다른 IgG1 hAbs와 조합으로 FkpA 및 산화환원효소를 스크리닝하기 위해 이용되었다.

[0316] 최초 산화환원효소 혼화성 플라스미드의 작제는 EP 1356052 (참고, 예를 들면, 실시예 9)에 기재된 바와 같다. 산화환원효소의 스크리닝은 hAb 발현 플라스미드 xIL13.2.2.FkpAc13을 갖는 혼화성 플라스미드 JJ247로부터 발현을 포함하였다. xIL13 hAb 예에서, 산화환원효소 발현은 1mM IPTG으로 유도되었거나 또는 산화환원효소 수준을 조절하기 위해 유도되지 않은 채 남겨졌다.

[0317] hAb의 LC 및 HC를 암호화한 단일 플라스미드 및 샤페론 FkpA, DsbA 및 DsbC는 또한 작제되었고 66F8를 변형하기 위해 사용되었다. xIL13 hAb 예에서, FkpA의 발현을 구동하기 위해 사용된 프로모터에서 상이한 2개의 TIR2,2 단일 플라스미드는 작제되었다. 단일 플라스미드 MD157은 FkpA 발현용 phoA 프로모터를 함유하였고 플라스미드 KA01은 tacII 프로모터를 함유하였다. 상이한 프로모터의 사용은 FkpA 발현의 추가 조절을 허용하였다. xIL17 hAb 예에서, TIR2,2 단일 플라스미드는 작제되었고 (MD341), FkpA 발현용 phoA 프로모터를 이용하였다. 모든 단일 플라스미드 조건에서, DsbA 및 DsbC의 발현은 다이스트론성 방식으로 tacII 프로모터의 제어하에 있었다. xIL4 hAb 예에서, 아래 기재된, 혼화성 샤페론 플라스미드 AH8145의 ORFs를 편입한, 및 CB1로서 확인된 TIR2,2 단일 플라스미드는 작제되었다.

[0318] 상기 기재된 단일 플라스미드 시스템에 더하여, 삼중 샤페론 혼화성 플라스미드 시스템은 모든 IgG1 및 IgG4 이소형의 수많은 hAbs로 또한 평가되었다. 혼화성 플라스미드 시스템에서 이전에 기재된 FkpA TIR 변이체 중 하나는 다이스트론성 DsbA 및 DsbC 혼화성 플라스미드 (JJ247)로 클로닝되었고 AH8145로 확인된다.

[0321] 발효 공정

[0322] 대규모 생산은 EP1356052 (참고, 예를 들면, 실시예 4 및 단락 [0159]-[160])에서 본질적으로 기재된 바와 같았다. 각 10-리터 발효에 대하여, (10-15% DMSO를 함유한) 0.5 mL의 냉동된 스톡 배양물은 해동되었고 0.5 mL의 테트라사이클린 용액 (5 mg/mL) 및/또는 2 mL의 카나마이신 용액 (5 mg/mL) 및 2.5 mL 1M 인산나트륨 용액으로 보강된 500 mL의 Soy LB 배지를 함유한 2L 진탕 플라스크를 접종하기 위해 사용되었다. 상기 종자 배양물은 진탕하면서 30°C에서 대략 16 시간 동안 성장되었고 그 다음 10-리터 발효조를 접종하기 위해 사용되었다.

[0323] 발효조는 1.1 g의 글루코오스, 100 mL의 1M 마그네슘 설페이트, 10 mL의 미량 원소 용액 (1 리터의 최종 용적으로, 100 mL 염산, 27 g 제이철 클로라이드 헥사하이드레이트, 8 g 아연 설페이트 헵타하이드레이트, 7 g 코발트 클로라이드 헥사하이드레이트, 7 g 나트륨 몰리브데이트 디히드레이트, 8 g 구리 설페이트 5수화물, 2 g 붕산, 5 g 망간 설페이트 1수화물), 20 mL의 테트라사이클린 용액 (에탄올내 5 mg/mL) 또는 250 mL의 암피실린 용액 (2 mg/mL), 1개 백(bag)의 HCD 염, (37.5 g 암모늄 설페이트, 19.5 g 인산칼륨 2염기성, 9.75 g 인산나트륨 1염기성 디히드레이트, 7.5 g 나트륨 시트레이트 디히드레이트, 11.3 g 인산칼륨 1염기성), 200 g의 BL4 콩 (콩 단백질 가수분해물), 및 100 그램의 효모 추출물을 함유한 대략 7.0 리터의 배지를 초기에 함유하였다. 발효는 기류의 20 표준 리터 / 분 (slpm)으로 30°C에서 초기에 수행되었고 (비록 상기 범위를 넘은 가끔의 편위는 일부 경우에서 발생하였어도) 7.0 ± 0.2의 pH에서 제어되었다. 발효조의 배암은 1 바 게이지에서 유지되었고 교반 속도는 초기에 650 rpm까지 설정되었다. 아래 실시예 2에서 상세히 논의된 바와 같이, 교반 속도는 발효조에서 산소 전달 속도를 가공하기 위해 또한 가변될 수 있고, 결과적으로, 세포성 호흡 속도를 제어한다. 게다가 아래 실시예 3에서 상세히 논의된 바와 같이, 성장 및 생산 단계 동안 온도는 생성물 수율을 최대화하기 위해 조정될 수 있다.

[0324] 진탕 플라스크로부터 세포-함유 배지로 발효조의 접종 이후, 배양물은 발효조에 농축된 글루코오스 용액을 공급하기 위해 컴퓨터-기반 알고리즘을 이용하여 높은 세포 밀도로 발효조에서 성장되었다. 수산화암모늄 (58% 용액) 및 황산 (24% 용액)은 pH를 제어하기 위해 필요에 따라 발효조에 공급되었다. L-61 기포저지는 포말화를 제어하기 위해 일부 경우에서 또한 부가되었다.

[0325] 배양물이 대략 40 OD₅₅₀의 세포 밀도를 달성한 경우, 추가의 100 mL의 1M 마그네슘 설페이트는 발효조에 부가되었다. 추가로, 농축된 염 공급물 (1250 mL의 최종 용적으로 12.5 g 암모늄 설페이트, 32.5 g 인산칼륨 2염기성, 16.25 g 인산나트륨 1염기성 디히드레이트, 2.5 g 나트륨 시트레이트 디히드레이트, 18.75 g 인산칼륨 1염기성, 10 mL의 2.7% 제이철 클로라이드 및 10 mL의 미량 원소)은 발효조에 부가되었고 배양물이 대략 20 OD₅₅₀를 달성한 경우 2.5 mL/min의 속도로 시작하였고 대략 1250 mL가 발효에 부가될 때까지 계속하였다. 발효는 70-80 시간 동안 전형적으로 계속되었다.

[0326] 전기영동, 면역블랏, 및 HPLC 분석용 샘플 제조

[0327] 비-환원된 가용성 샘플 준비물은 EP1356052 (참고, 예를 들면, 실시예 4, 특히 단락 [0162])에 기재된 것과 유사하다. 특히, 비-환원된 가용성 샘플은 아래와 같이 제조되었다: 발효의 과정 동안 취해진 냉동된, 1 mL 전체의 액체배지 샘플이 실온에서 해동되었다. 100 μL의 해동된 전체의 액체배지는 500 μL의 추출 버퍼에 부가되었다. (추출 버퍼: 10 mM Tris, pH 6.8, 5 mM EDTA, 새롭게 부가된 0.2 mg/mL의 hen egg 리소자임, 및 5-10 mM의 최종 농도까지 새롭게 제조된 아이오도아세트산). 전체의 액체배지 샘플 풀러스 추출 버퍼는 5-10 분 동안 얼음상에서 항온처리되었고, 그 다음 2 x 10 펄스 초음파처리되었고, 그 다음 15-20 분 동안 4°C 및 14,000 rpm에서 원심분리되었다. 상청액은 가용성 분획으로서 제거되었다. SDS-PAGE 및 면역블랏에 의한 분석을 위하여, 가용성 분획은 환원제 없이 2X Novex 트리신 샘플 버퍼로 1:10 희석되었다. 10 μL의 상기 준비물은 10 웨일 Novex 10% 비스-Tris NuPage 겔상에 부하되었고 MES 버퍼로 150 V에서 전기영동되었다. 겔은 그 다음 면역블랏에 사용되었거나 또는 쿠마씨 청색으로 염색되었다.

[0328] 가용성 분획의 샘플은 LC-카파/RP 검정에 의한 분석을 위하여 제출되었다. 상기 검정은 제1 컬럼이 IgG 성분을 함유한 카파-경-쇄를 포착하는 친화성 컬럼이고 제2 컬럼이 역전된-상 컬럼인 2-차원 HPLC 검정이다. 적분 HPLC 워크스테이션은 이중 컬럼 방식으로 구성되었다. 용매 저장기는 하기였다: 용매 1A, 친화성 부하 버퍼; 용매 1B, 친화성 용출 버퍼, 물내 0.2% TFA; 용매 2A, 역전된-상 수성 버퍼, 물내 0.1% TFA; 용매 2B, 역전된-상 유기 용출 버퍼, 80% 아세토니트릴내 0.1% TFA. 제1 컬럼은 Life Technologies (Carlsbad, CA)로부터 구매된 POROS® CaptureSelect™ LC 카파 친화성 컬럼 (2.1x 30 mm)이었다. 친화성 컬럼을 포함한 모든 절차는 주위 온도에서 수행되었다.

- [0329] 제2 컬럼은 Life Technologies (Carlsbad, CA)로부터 구매된 POROS® R2 20 μm 역전된-상 컬럼 (2.1x30 mm)이었다. 역전된-상 컬럼 온도는 80°C에서 유지되었다.
- [0330] 친화성 컬럼은 부하 버퍼에서 평형화되었고, 샘플은 2 ml/min의 유속으로 부하되었다. 통과액은 폐기물로 유도되었다. 샘플이 부하된 이후, 친화성 컬럼은 비-특이적으로 결합된 성분을 환원시키기 위해 부하 버퍼 (3 ml)로 세정되었다. 그 다음, 밸브 스위칭에 의해, 친화성 컬럼은 역전된-상 컬럼에 연결되었고 역전된-상 컬럼으로 친화성 포착된 성분을 이동시키기 위해 2 ml/min의 유속으로 용출 버퍼 (5 ml)로 용출되었다. 상기 이동 단계 동안, 적분 UV 검출기는 친화성 컬럼 뒤 및 역전된-상 컬럼 앞에 위치되었고, 따라서 친화성 컬럼의 용출 모니터링은 역전된-상 컬럼에 부하가 되었다. 역전된-상이 된 컬럼으로부터 용출 및 단절 이후, 친화성 컬럼은 물 (2ml)로 세정되었고 그 뒤에 부하 버퍼 (4 ml)로 재-평형화되었다.
- [0331] 부하된 역전된-상 컬럼은 수성 0.1 % TFA (1.1 ml)로 세정되었다. 유속은 2 ml/min으로 설정되었고 급속 구배 (0.25 min)는 35% 용매 2B (0.1% TFA/ 80% 아세토나트릴)까지 실시되었고 그 다음 적은 구배는 3 min에 걸쳐 50% 용매 2B까지였다. 용출은 0.5 min 지나서 100% 용매 2B까지 구배에 의해 완료되었고 1.5 min 동안 유지되었다. 역전된 상 컬럼은 그 다음 0.05 min 지나서 초기 조건으로 되돌려졌고 2 min 동안 유지되어 재-평형화시켰다. 컬럼 용출물은 280 및 214 nm에서 모니터링되었다. 정량화는 역전된-상 컬럼으로부터 분리에 기반된 공지된 농도의 표준의 것과 통합된 피크 면적의 비교로 수행되었다.
- [0332] 발효 공정 동안 생산된 LC 및 HC의 가용성 및 총량은 또한 정량화되었다. 총 RP-HPLC 정량화를 수행하기 위해 발효 액체배지 샘플은 200 mM와 6 M 구아니딘 HCl, 360 mM TRIS, 2mM EDTA pH 8.6)에서 100 mM DL-디티오티레이톨 (Sigma cat. # 43816)로 10 배 희석되었다. 샘플은 와동되었고, 60°C에서 20분 동안 항온처리되었고 15분 동안 4°C에서 13,000 RPM으로 원심분리되었다. 가용성 분획은 HPLC상으로 주사에 앞서 0.22 μm 필터를 이용하여 여과되었다. 사용된 HPLC 시스템은 Agilent Technologies 1290 무한대 시스템이었다. 샘플은 Zorbax 300SB-C3 급속 해상도 (4.6x150 mm 3.5 마이크론) 분석적 컬럼 (cat. #863973-909)상에서 주사되었다. 이동 상 A는 SQH20내 0.1 % 트리플루오로아세트산 (Thermo cat. # 28901)으로 이루어졌고 이동 상 B는 HPLC-등급 아세토나트릴 (Honeywell cat. # AH015-4)내 0.08% 트리플루오로아세트산으로 이루어졌다.
- [0333] 총 가용성 RP-HPLC 정량화를 수행하기 위해 발효 액체배지 샘플은 모두 균질화되었고 (10,000 RPM) Pro-Scientific DPS-20으로 4회 10초 동안 초음파처리되었다 (88% 진폭). 샘플은 그 다음 15-20 분 동안 4°C 및 14,000 rpm에서 원심분리되었다. 상청액은 가용성 분획으로서 제거되었고 상기 기재된 바와 같이 RP-HPLC 상에서 변성 및 가공되었다.
- [0334] **이중특이적 항-IL13/IL17 항체 조립**
- [0335] 친화성-정제된 항-IL13 및 항-IL17 절반 항체는 1:1 질량비로 조합되었고 그 다음 pH 8.5로 적정되었다. 조립 공정으로부터 예상된 이중특이적 항체의 이론적 최대 양에 관해 100x 과잉 몰비의 L-글루타티온, 환원된 (GSH)는 혼합물에 부가되었고 온도는 실온에서 35°C까지 조정되었다. 2개 절반 항체는 항-IL13/항-IL17 이중특이적 항체를 형성하기 위한 산화환원 반응에서 시험관내 조립되었다. 산화환원 반응은 35°C에서 12 - 24 시간 동안 계속되었다. 조립 반응은 6.5까지 pH 조정으로 켄칭되었고 풀은 물로 희석된 후 이중특이적 항체는 단독으로 또는 조합으로 이온 교환기 또는 소수성 컬럼 크로마토그래피에 의한 정제 처리되었다.
- [0336] **결과**
- [0337] *hAb 역가에 관한 FkpA 발현의 효과*
- [0338] 도 1A에서 보이는 바와 같이, xIL13 hAb TIR1,1 벡터로부터 경쇄 및 중쇄 하부단위체의 생산은 2.9 g/L 및 1.2 g/L, 각각의 경쇄 및 중쇄 생산의 총량을 초래하였다. TIR2,2에 대하여 생산된 경쇄 및 중쇄의 총량은 6.4 g/L 및 4.1 g/L, 각각이었다.
- [0339] 그러나, 총 하부단위체 생산의 양은 유의미한 가용성 하부단위체 축적을 초래하지 않았다. xIL13 TIR1,1 hAb 플라스미드를 이용하여, 생산된 경쇄 및 중쇄의 총 가용성 양은 0.2 g/L 및 0.1 g/L 미만, 각각이었다 (도 1B). TIR2,2 hAb에 대하여 생산된 경쇄 및 중쇄의 총 가용성 양은 0.3 g/L 및 0.3 g/L, 각각이었다 (도 1C). TIR1,1 발효에 대하여 생산되는 조립된 xIL13 hAb의 역가는 단지 0.1 g/L이었고, TIR2,2 발효에 대하여 역가는 0.2 g/L 미만이었다 (도 2). 이를 결과는 hAb 생성물의 접힘 및/또는 조립에서 유의미한 비효율성의 존재를 제안한다. 따라서, 샤페론의 공-발현으로 TIR1,1 및 TIR2,2 플라스미드 이용의 역가에 관한 효과를 평가한 추가 작업은 수행되었다.

- [0340] 몇 개의 부류의 샤파론 단백질은 단백질 접힘 및 조립을 촉진시키기 위해 공지된다 (도 3A-B). 해당 특정한 샤파론은 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라이제 및 샤파론으로서 기능하기 위해 공지된 FkpA, 및 산화환원효소로서 기능하기 위해 공지된 DsbA 및 DsbC를 포함한다. 실험은 FkpA, DsbA, 및 DsbC의 발현이 hAb 생산에 영향을 미치는지를 시험하기 위해 착수되었다.
- [0341] 특히, hAb HC 및 LC ORFs를 암호화한 별도 플라스미드 (혼화성 플라스미드 시스템) 또는 동일한 플라스미드 (단일 플라스미드 시스템)를 이용한 발현 FkpA의 효과는 조사되었다 (도 4A-B). 단일 발현 플라스미드의 사용은 다중 항생제 사용에 대한 필요성 또는 플라스미드 체류를 확보하기 위한 선택적 압력의 다른 수단을 제거한다. xIL13 hAb에 사용된 단일 플라스미드 시스템에서, FkpA 발현을 구동한 프로모터는 IPTG-유도성 tacII 프로모터에서 phoA 프로모터로 변화되었다. 따라서, 배양물에서 포스페이트 고갈은 HC, LC, 및 FkpA의 발현을 초래한다.
- [0342] FkpA 샤파론 공-발현의 증가된 수준은 IgG1 이소형 hAb (xVEGF)에 대하여 증가된 조립된 hAb에 더하여 가용 모노머성 중쇄 축적의 증가된 양과 상관하였다 (도 5A). 상기 실험에서, 이전에 기재된 바와 같이, FkpA 발현 변이체의 세트는 1 mM IPTG 유도로 스크리닝되었다. FkpA 공-발현 없이, xVEGF hAb의 역가는 0.2 g/L이었고 FkpA 공-발현 (FkpA(wt))의 최고 수준을 갖는 조건에서 hAb 역가는 대략 0.4 g/L이었다 (도 5B).
- [0343] xIL13 hAb의 생산에 대하여, TIR1,1 또는 TIR2,2 항체 발현 백터를 이용한 혼화성 플라스미드 시스템 (도 4A)에서 보이는 바와 같이, 하나의 플라스미드로부터 xIL13 HC 및 LC 그리고 또 다른 것으로부터 FkpA의 발현)은 시험되었다. FkpA의 공-발현을 구동하기 위해 1mM IPTG로 유도된 혼화성 플라스미드 시스템에 대하여, TIR1,1 플라스미드용 역가는 TIR2,2 플라스미드에 대하여 0.2 g/L 및 0.4 g/L이었다 (도 6A, 레인 3 및 4). 이는 FkpA의 내인성 수준을 갖는 TIR1,1 및 TIR2,2 조건과 비교된 역가에서 대략 2-배수 증가를 초래하였다 (도 6A, 레인 1 및 2). 도 6B는 밀리흡수 단위체 (mAu)으로 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC) 및 웨스턴 블랏에 의해 측정된 바와 같이 내인성 발현과 비교시 혼화성 시스템에서 유도된 FkpA 발현의 양을 보여준다.
- [0344] 도 4B에서 보이는 FkpA 발현 및 hAb 생산을 위한 단일 플라스미드 시스템은 또한 시험되었다. xIL13 hAb에 대하여, 단일 플라스미드 TIR1,1 및 TIR2,2용 역가는 0.4 g/L 및 0.7 g/L, 각각이었다 (도 6A). 이는 혼화성 플라스미드 시스템에 대한 역가에서 대략 2-배수 증가를 나타냈다. 단일 플라스미드 시스템에서 FkpA의 발현 수준은 유도된 혼화성 플라스미드 시스템에서보다 또한 대략 2-배 더 높았다 (도 6B). FkpA 발현의 증가된 수준은 모든 TIR 조건에서 가용 모노머성 중쇄 축적의 증가된 양과 상관하였다.
- [0345] 제3 hAb (xIL4 IgG4)은 혼화성 플라스미드 시스템으로부터 유도된 FkpA 공-발현을 갖는 양쪽 TIR1,1 및 TIR2,2 조건으로 시험되었다. 상기 실험에서 FkpA(wt) 공-발현은 모든 TIR 조건에서 가용 모노머성 중쇄의 양을 증가시켰지만 (도 7A), 생산된 hAb의 역가에서 증가를 초래하지 않았다 (도 7B).
- [0346] 제4 hAb (xVEGFC IgG1)는 혼화성 플라스미드 시스템으로부터 유도된 FkpA 공-발현으로 시험되었다. 상기 실험에서 FkpA(wt) 공-발현은 가용 모노머성 중쇄의 양을 증가시켰고 0.5 g/L에서 0.8 g/L까지 역가를 증가시켰다 (도 8A). 쿠마씨 염색에 의해 결정된 바와 같이 증가된 FkpA 발현 (도 8B)은 가용 모노머성 HC 쇄 축적에서 증가에 상관하였다 (도 8C). 합으로, 이들 결과는 FkpA 발현이 가용 모노머성 중쇄의 축적을 향상시키는 것, 그러나 조립된 hAb 역가에 관한 효과가 가변적이라는 것을 제안한다. 이는 추가 최적화가 바람직하다는 것을 나타낸다.
- [0347] *hAb 역가에 관한 DsbA 및 DsbC 발현의 효과*
- [0348] xIL13 hAb 생산은 산화환원효소 DsbA 및 DsbC의 발현을 위하여 혼화성 플라스미드와 상기 기재된 pxIL13.2.2.FkpAc13 (단일 플라스미드)의 조합에 의해 추가로 최적화되었다 (도 9). pxIL13.2.2.FkpAc13으로 모든 DsbA 및 DsbC (JJ247)를 발현한 플라스미드는 hAb 역가를 증가시켰다. 도 10은 DsbA 및 DsbC의 IPTG 유도의 존재 및 부재하에 경시적으로 생산된 xIL13 hAb의 역가를 보여준다. JJ247을 갖는 pxIL13.2.2.FkpAc13에 대한 최고 역가는 발효에 52 시간에서 달성되었다. 상기 시점에서, IPTG 없는 조건 (비-유도된 조건)에서, xIL13 역가는 1.2 ± 0.2 g/L이었고 IPTG 있는 조건 (유도된 조건)에서 xIL13 역가는 1.0 ± 0.2 g/L이었다 (도 10). 시험된 모든 조건에 대하여 52 내지 72 시간으로부터 역가의 하락은 유의미하였고 실시예 2에 기재된 바와 같이 발효 공정 동안 산소 흡수 속도 (OUR)에서의 하락 및 오스몰농도에서의 상승에 기인되었다.
- [0349] DsbA, DsbC, 및 FkpA (AH8145) 발현을 위한 혼화성 시스템은 xIL4 TIR1,1 및 TIR2,2 Ab 발현 플라스미드로 또한 평가되었다 (도 11A). 모든 3개 샤파론의 비-유도된 공-발현은 0.8 g/L 및 1.2 g/L, 각각의 TIR1,1 및 TIR2,2 역가를 초래하였다 (도 12 레인 5 및 6). 이는 이전에 기재된 FkpA 혼화성 TIR2,2 조건에 비교시 TIR2,2 조건에 대하여 역가의 대략 6-배수 증가를 나타냈다 (도 12 레인 3 및 4).

- [0350] 혼화성 비-유도성 AH8145 플라스미드 시스템은 또 다른 hAb로 추가로 평가되었다. xVEGFC IgG1 hAb를 생산하기 위해 TIR2,2-기반 벡터를 이용하여, 비-유도된 혼화성 AH8145 조건은 단지 FkpA 공-발현과 비교시 0.8 g/L에서 1.0 g/L까지 역가를 증가시켰다 (**도 13**). 모든 TIR1,1 및 TIR2,2 조건을 갖는 제5 hAb (xVEGFA IgG1)은 AH8145 혼화성 플라스미드로 시험되었다. 샤페론 공-발현 없이 모든 TIR1,1 및 TIR2,2 조건에 대한 역가는 유사한, 약 0.9 g/L (**도 14** 레인 1 및 3)이었다. 비-유도된 AH8145 조건에서 혼화성 플라스미드로, TIR1,1 및 TIR2,2 플라스미드에 대한 역가는 1.2 g/L 및 1.7 g/L, 각각이었다 (**도 14** 레인 2 및 4)이었다.
- [0351] AH8145의 샤페론 ORFs를 편입한 xIL4 TIR2,2 단일 플라스미드의 창출은 생성되었고 (**CB1**) **도 11B**에서 실증된다. IPTG의 부가 없이 CB1 플라스미드는 혼화성 플라스미드 시스템으로 관측된 것보다 약간 더 높은 역가를 생산하였다 (**도 15**). 상기 비교에서 보고된 hAb 역가가 실시예 2에 기재된 바와 같이 최적화된 교반 전략을 이용한 발효로부터 생성되었음을 유의해야 한다. 웨스턴 블랏에 의해, 모든 3개 샤페론의 수준은 CB1로 약간 더 높았다 (**도 15**). 이론에 제한되도록 바램 없이, 단일 플라스미드 시스템은 고수율을 초래할 수 있는 더 높은 플라스미드 사본 수를 허용할 수 있다.
- [0352] xIL13 단일 플라스미드 시스템 MD157은 비유도된 혼화성 pxIL13.2.2.FkpAc13 및 JJ247 혼화성 플라스미드 시스템과 비교되었다 (**도 16**). MD157 단일 플라스미드 조건은 혼화성 시스템에서 1.9 ± 0.04 g/L에 비교된 2.1 ± 0.3 g/L의 역가를 생산하였다 (**도 17**). 상기 비교로 보고된 역가가 실시예 2에 기재된 바와 같이 최적화된 교반 전략을 이용한 발효로부터 생성되었음을 유의해야 한다.
- [0353] 함께 고려하여, 이들 결과는 DsbA 및 DsbC와 함께 FkpA의 공-발현이 이들 효과를 확인하기 위해 다중 hAb 작제물을 이용하여 조립된 hAb의 생산을 증가시킨다는 것을 입증한다.
- [0354] **실시예 2: 절반-항체 생산에 관한 산소 흡수의 효과**
- [0355] 상기 결과는 hAb HC 및 LC와 함께 FkpA, DsbA, 및 DsbC의 공-발현에 의해 달성된 hAb 생산에서 개선을 입증한다. 그러나, 심지어 상기 향상된 생산으로, 역가는 안정기까지 발견되었거나 또는 심지어 생산의 52 시간 이후 시점에서 감소되었다. 따라서, 추가의 실험은 hAb 생산을 추가로 최적화하기 위해 착수되었다.
- [0356] 이전에 기재된 바와 같이, 발효는 기류의 20 표준 리터 / 분 (slpm)으로 30°C에서 초기에 수행되었고 7.0 ± 0.2의 pH에서 제어되었다. 발효조의 배암은 1 바 게이지에서 유지되었고 교반 속도는 초기에 650 rpm까지 설정되었다. 배암의 추가의 바 게이지는 200%의 초기 용해된 산소 농도 (dO₂)를 초래하였다. 놓축된 글루코오스 용액은 개시 수준의 2% 아래로 낙하된 dO₂ 신호 이후, 전형적으로 약 2 시간 후 생산 배양물에 공급되었고, 발효의 과정에 걸쳐 연속적으로 공급되어 이로써 글루코오스가 비-제한 영양소이었다.
- [0357] 12 시간에서 배양물내 세포 밀도는 0 퍼센트 또는 그 근처에서 dO₂ 농도를 측정하는데 충분하였다. 이론에 제한되도록 바램 없이, 산소 농도가 제한된 경우, 산소 전달 속도 (OTR)가 세포의 산소 흡수 속도 (OUR) 또는 대사성 속도와 동등한 것이 생각된다. OTR의 가공은 교반 속도 조정에 의해 용이하게 되었고 배양물 OUR에 관한 직접적인 효과를 가졌다. 질량 분광분석기는 발효로부터 배기ガ스의 조성물을 모니터링하기 위해 사용되었고 발효에서 산소 흡수 및 이산화탄소 진화 속도의 계산을 가능하게 하였다.
- [0358] **도 18**에서 보이는 바와 같이, 상기 기재된 JJ247 플라스미드 시스템을 갖는 pxIL13.2.2.FkpAc13에서, 양쪽 유도된 및 비-유도된 TIR2,2 배양물은 시간 12에서 4.25 mmol/L/min의 피크 OUR을 가졌고, 그 후 시점에서 dO₂는 제한되었다. 이들 배양물은 650 rpm의 일정 속도에서 교반 하에 성장되었다. **도 19**는 경시적으로 이들 배양물의 오스몰농도를 보여준다. **도 18-19**와 함께 고려하여, **도 18-19**는 50 시간 이후, 세포 배양물 OUR은 빈틈없이 감소하였고 오스몰농도는 상승하였음을 보여준다.
- [0359] **도 20**은 이들 배양물에서 경시적으로 생산된 xIL13 hAb 역가를 보여준다. 52 시간에서 1.2 g/L ± 0.2 g/L에서 72 시간에서 0.7 ± 0.04 g/L까지 역가의 하락이 관측되었다. 유사하게, 유도된 조건으로, 52 시간에서 1.0 ± 0.2 g/L에서 72 시간에서 0.5 ± 0.05 g/L까지 하락이 관측되었다. 흥미롭게도, 생산에서 상기 하락은 하락된 동일한 시간 OUR에서 발생하였고 오스몰농도는 이들 배양물에서 상승하였다.
- [0360] 역가에서 하락을 완화시키기 위해 및 오스몰농도에서 상승을 제거하기 위해, 26 시간에서 교반 시프트는 비-유도된 TIR2,2 조건으로 평가되었다. 교반 속도는 650 rpm에서 표적 OUR 설정값을 달성한 수준까지 이동되었다. 4 개의 상이한 OUR 표적 설정값은 시험되었다: 대략 1.5, 1.75, 2.0 및 2.5 mmol/L/min. 대략 1.5와 2.0 mmol/L/min 사이에서 OUR 설정값을 갖는 교반 시프트는 OUR에서 하락 (**도 21**) 및 오스몰농도에서 상승 (**도 22**)

을 제거하였다.

[0361] 중요하게는, 모든 교반 시프트 조건에서, 역가는 54 시간에서 비-이동된 조건에서 더 높았다 (도 23). 대략 2.5 mmol/L/min 조건에서 OUR은 ~ 60 시간에서 하락하였고 (도 21) 오스몰농도는 72 시간에서 1200 mOsm의 피크까지 상승하였다 (도 22). 72 시간에서, 대략 2.5 mmol/L/min 조건 역가 (0.7 g/L)는 비-이동된 조건 (0.6 ± 0.1 g/L)으로서 유사한 수준까지 하락하였다. 대략 2.0 mmol/L/min 조건에 대한 평균 역가는 시험된 4개 조건의 최고 (2.4 ± 0.6 g/L)이었지만; 그러나, 역가에서 일부 가변성이 있었고 OUR 프로파일에서 약간의 감소됨이 보여졌다. 대략 1.5 mmol/L/min 조건은 2.1 ± 0.3 g/L의 모든 재생산된 평균 역가를 가졌지만, 그러나 재차 발효에서 후기 OUR 프로파일에서 일부 가변성이 보여졌다. 대략 1.75 mmol/L/min 조건은 바람직한 설정값으로서 선택되도록 모든 재생가능한 역가 (1.8 ± 0.2 g/L), 뿐만 아니라 일치된 OUR 경향을 가졌다.

[0362] 이들 결과는 배양물의 교반 속도 시프팅이 OUR에서 관측된 감소 및 오스몰농도에서 상승을 완화시킨다는 것을 입증한다. 중요하게는, 이들 교반 시프트는 또한, 특히 후기 생산 시점에서 향상된 hAb 생산 역가를 허용한다.

실시예 3: 절반-항체 생산에 관한 온도의 효과

[0364] 이전의 실시예가 hAb 생산에서 유의미한 이득을 입증하는 반면, 추가의 시험은 생산 공정을 또한 추가로 최적화하기 위해 착수되었다. 따라서, xIL13 hAb 생산을 위하여, 실시예 1에 기재된 단일 플라스미드 시스템 및 실시예 2에 기재된 대략 1.75 mmol/L/min의 OUR 설정값에서 높은 성능은 개시점으로서 사용되었다. 상기 공정은 아래 기재된 바와 같이 유의미하게 더 큰 생산 수율을 수득하기 위해 또한 추가로 최적화되었다.

[0365] 본 개시내용의 바람직한 구현예의 발효 공정은 2개의 상이한 분절로 분할될 수 있다: 성장 단계 및 생산 단계. 성장 단계에서, 대부분의 영양소는 과잉이고, 배양물 밀도는 빠르게 증가한다. 생산 단계에서, 포스페이트는 제한되고, 성장이 멈추고, 해당 생성물의 발현이 시작한다. hAb 생산에 관한 온도의 효과는 이들 상의 각각에 대하여 시험되었다.

[0366] 온도 실험과 조합으로 제2 숙주는 평가되었다. 이들 실험에서 MD157 플라스미드는 67A6 생산 숙주로 형질전환되었다. 67A6 균주의 유전자형은 하기이다: *W3110 Δ fhuA Δ phoA iIVG+ Δ prc spr43H1 Δ degP Δ manA lacIQ Δ ompT Δ menE742 degPS2104*.

[0367] 67A6 균주는, DegP를 암호화하는, (*htrA* 및 *ptd*로서 또한 공지된) *degP* 유전자의 프로테아제 결핍된 대립유전자의 녹인(knockin)을 함유한다. (프로테아제 Do로서 또한 공지된) DegP는 높은 온도에서 생존을 위하여 요구된 주변세포질 성 세린 프로테아제이다. 추가로, DegP는 분자 샤퍼론으로서 작용한다. 세린에 대한 알라닌의 치환은 DegP의 단백분해 활성을 제거하지만 그의 샤퍼론 기능에 영향을 미치지 않는다 (Spiess et al., Cell, 97:339-347, 1999).

[0368] 온도 최적화는 xIL13 TIR2,2 단일 플라스미드 시스템에 대하여 모든 성장 단계 (Tg) 및 생산 단계 (Tp)에 대해 수행되었다. 도 24는 30°C 또는 28°C의 일정 Tg/Tp로 성장된 배양물의 성장을 보여준다. 28°C의 일정 Tg/Tp는 30°C의 일정 Tg/Tp에 비교시 성장 속도에서 지체를 초래하였다. 도 25는 이들 온도에서 성장된 배양물의 OUR을 보여준다. 성장 속도와 유사하게, 배양물이 30°C와 비교시 28°C의 일정 Tg/Tp에서 성장된 경우 OUR은 지연된다.

[0369] 도 26에서 보이는 바와 같이, 포스페이트는 30°C의 일정 Tg/Tp를 이용하여 22±2 시간에서 고갈되었다. Tg/Tp가 28°C까지 아래로 이동된 경우, 배양물의 성장 속도는 상기 기재된 바와 같이 지연되었고, 포스페이트 고갈은 26±2 시간까지 이동되었다.

[0370] 도 27은 이들 배양물의 xIL13 hAb 생산을 보여준다. 각 조건에 대하여, 생성물 발현은 포스페이트 고갈이 발생한 경우의 시간에서 시작하였다. 일정 28°C Tg/Tp 조건은 일정 30°C Tg/Tp 조건에 대하여 1.3 ± 0.2 g/L에 비교시 2.5 ± 0.2 g/L의 최종 역가를 달성하였다.

[0371] 생산 단계에서 시간의 양을 증가시키기 위한 노력으로, 온도 시프트 전략은 시험되었다. 상기 실험에서 성장 단계 온도는 30°C에서 설정되었고 20 시간에서 온도는 28°C까지 이동되었다. 성장 (도 28), 포스페이트 (도 29), 및 OUR (도 30) (0 및 20 시간에서) 프로파일은 Tg30/Tp28°C 시프트 및 일정 Tg/Tp 30°C 조건과 유사하였다.

[0372] 도 31에서 보이는 바와 같이, 생성물 유도의 시간에서 28°C까지 온도 시프트의 이용은 일정 Tg/Tp 28°C 조건하에 생산된 2.5 g/L의 최종 역가에 Tg30/Tp28°C 조건하에 생산된 3.1 g/L의 최종 역가를 비교하여, 역가에서 추가로 0.6 g/L 증가를 제공하였다. 이들 결과는 더 높은 온도에서 배양물 성장, 그 다음 생산의 시간에서 배양물 온도 감소가 생성물 형성에서 유의미한 증가를 초래할 수 있음을 입증한다.

[0373] 실험 (DoE)의 부분 요인 설계는 67A6 숙주 균주를 이용한 xIL13 hAb에 대하여 최적의 작동 조건을 결정하기 위해 수행되었다. DoE는 3개의 작동 파라미터 및 FkpA의 수준에 집중하였다.

표 3-1. xIL13 hAb 파라미터

패턴	성장 (분) (Tg)	생산 (분) (Tp)	pH	FkpA 프로모터	역가 (g/L)
-++	30	28	6.7	phoA	2.8
0001	32	26.5	6.85	phoA	1.9
----	30	25	6.7	tac	1.4
++-	34	25	7	tac	2.9
+--	34	25	6.7	phoA	4.6
--+	30	25	7	phoA	1.8
-+-	30	28	7	tac	1.6
+++	34	28	7	phoA	2.8
++-	34	28	6.7	tac	1.6
0002	32	26.5	6.85	phoA	3.3

[0375] [0376] 표 3-1에서 보이는 바와 같이, 작동 파라미터는 Tg 및 Tp 뿐만 아니라 pH를 포함하였다. 패턴은 특이적 파라미터에 대한 작동 범위를 지칭하고; (-)는 낮은 값 파라미터를 지칭하고, (+)는 높은 값 파라미터를 지칭하고, 0001 및 0002는 중심 점 파라미터를 지칭한다. Tg는 30 내지 34°C 범위이었고, Tp는 25 내지 28°C 범위이었고, pH는 6.7 내지 7.0 범위이었다. 생산된 FkpA의 양은 사용된 프로모터에 의해 조절되었다. 높은 수준의 FkpA는 MD157에 관해 phoA 프로모터로부터 생성되었고 낮은 수준의 FkpA는 KA01에 관해 비-유도된 tac 프로모터로부터 생성되었다. 부분 요인 분석은 10회 실험 실시에 의해 수행되었다.

[0377] 도 32에서 보이는 바와 같이, 이들 인자는 생산된 xIL13 hAb의 역가에 유의미한 효과를 가졌다. 표 3-1에서 기재된 DoE 실험에 사용된 조건에 의해 생산된 hAb의 역가는 대략 1.5 내지 대략 4.5 g/L 범위이었다.

[0378] xIL4 단일 플라스미드 (CB1)는 xIL13 DoE로부터 확인된 최적의 발효 조건 (Tg 34°C, Tp 28°C, pH 7.0)으로 시험되었다. 그러나 CB1 조건에서 IPTG 유도가 없는 tacII 프로모터는 FkpA 발현을 구동하기 위해 사용되었다. xIL14 hAb 역가는 Tg/Tp가 30°C에서 일정하게 유지되었고 pH가 7.0에서 유지된 발효 조건에 비교되었다. xIL4 hAb 역가는 IPTG의 부가 없이 신규 공정 조건으로 1.3 g/L에서 3.1 g/L까지 증가하였다 (도 33).

[0379] 부분 요인 DoE는 xIL17 hAb에 대한 최적의 작동 조건을 결정하기 위해 수행되었다. MD341 단일 플라스미드는 xIL13 hAb 단일 플라스미드 (MD157) LC 및 HC에 대한 ORFs를 xIL17 LC 및 HC의 ORF로 대체함으로써 작제되었다. 항체 단편 및 샤페론의 발현에 사용된 프로모터는 xIL13 (MD157) 플라스미드와 동일하였다. DoE는 3개의 작동 파라미터에 집중하였다.

표 3-2. xIL17 hAb 파라미터

패턴	성장 (분) (Tg)	생산 (분) (Tp)	pH	역가 (g/L)
-+	30	30	6.7	0.38
0001	32	27.5	7.0	2.0
---	30	25	6.7	2.5
-+	30	25	7.3	2.6
++	34	25	7.3	2.6
0002	32	27.5	7.0	1.9
+-	34	30	6.7	0.34
+-	34	25	6.7	2.0
-+	30	30	7.3	0.2
++	34	30	7.3	0.12

[0380] [0382] 표 3-2에서 보이는 바와 같이 작동 파라미터는 Tg 및 Tp, 뿐만 아니라 pH를 포함하였다. Tg는 30 내지 34°C 범위이었고, Tp는 25 내지 30°C 범위이었고, pH는 6.7 내지 7.3 범위이었다. 도 34는 가장 유의미한 역가 축적이 25°C의 Tp를 갖는 조건에서 달성되었음을 보여준다.

[0383] 도 35는 xIL13 hAb 역가의 생산에 관한 제1 작동 샤페론 단백질 공-발현 및 그 다음 공정 단계 (예를 들면, 교반 속도, Tg, 및 Tp) 최적화의 효과를 보여준다. 예시적 구현예에서, 분자 최적화 (예를 들면, 샤페론 단백질 발현 및 백터 특징)는 역가에서 대략 16-배수 증가를 제공하였다. 상기 수준의 생산은 공정 발달 (예를 들면, 교반 속도, Tg, 및 Tp)을 통해 대략 3.5-배 만큼 추가로 향상되었다. 함께 고려하여, 이를 결과는 생산 및 강건성에서 유의미한 이득이 샤페론 발현, 백터 시스템, 교반 속도, pH, 및 성장/생산 온도를 포함한 최적화 변수를

통해 달성될 수 있음을 입증한다. 궁극적으로, 34°C의 Tg, 25°C의 Tp, 6.7의 pH, 및 phoA 프로모터에 의해 생산된 FkpA의 수준을 갖는 조건이 최고 xIL13 hAb 역가를 초래하였음이 결정되었다.

[0384] 실시예 4: 절반-항체 생산에 관한 숙주 균주의 효과

이전의 실시예가 hAb 생산에서 유의미한 이득을 입증하는 반면, 추가의 시험은 숙주 균주 66F8 및 67A6 사이에서 hAb 생산의 전위 차이를 특성화하기 위해 착수되었다. 따라서, hAb 생산을 위하여, 실시예 1에서 기재된 높은 성능 단일 플라스미드 시스템, 실시예 2에서 기재된 OUR 시프트, 및 실시예 3에서 기재된 온도 시프트는 2개의 *E. coli* 숙주 균주: 66F8 및 67A6에서 평가되었다. 66F8 균주의 유전자형은 하기이다: W3110 Δ^{fhuA} Δ^{phoA} i^{lvG+} Δ^{prc} spr43H1 Δ^{degP} Δ^{manA} lacIQ Δ^{ompT} Δ^{menE742}. 67A6 균주의 유전자형은 하기이다: W3110 Δ^{fhuA} Δ^{phoA} i^{lvG+} Δ^{prc} spr43H1 Δ^{degP} Δ^{manA} lacIQ Δ^{ompT} Δ^{menE742} degPS210A.

[0386] xIL13 hAb는 모든 66F8 및 67A6 숙주 균주에서 발현되었다. 발효는 상기 기재된 바와 같이 온도 및 교반 속도 시프트를 사용한 조건하에 수행되었다. 67A6 균주의 이용은 가용성 xIL13 hAb 역가에서 증가 (도 36A) 및 66F8 균주와 비교시 모든 LC 및 HC의 총 하부단위체 축적 (도 36B)을 초래하였다.

[0387] xIL4 hAb는 모든 66F8 및 67A6 숙주 균주에서 또한 발현되었다. xIL4 hAb 발효가 30°C의 항온에서 수행된 경우, 약 1.5 g/L의 유사한 역가는 모든 균주로부터 수득되었다 (도 37A). 그러나, Tg가 34°C에서 25°C의 Tp까지 감소되는 발효 조건하에 67A6 균주는 3.0 g/L의 평균을 생산하였고 66F8 균주는 2.0 g/L의 평균을 생산하였다 (도 37B). 게다가, 67A6 발효에서 모든 LC 및 HC의 총 하부단위체 축적은 온도 시프트를 사용한 조건하에 66F8 발효 보다 더 컸다 (도 38A 및 도 38B).

[0388] 따라서, 모든 xIL13 hAb 및 xIL4 hAb는 67A6 숙주 균주에 의해 제공된 역가가 이점 및 성장 온도에 비하여 감소된 생산 온도의 2개 예이다. 이론에 의해 제한됨 없이, 재조합 단백질 축적은 DegP가 없는 숙주 균주에서 안정기로 보였고, 반면에 돌연변이체 DegPS210A를 갖는 숙주 균주에서, 재조합 단백질은 발효가 끝날 때까지 축적하는 것으로 보였다.

[0389] 실시예 5: 최적화된 발현 벡터 및 최적화된 배양물 조건을 이용한 xIL33 hAb의 생산

[0390] xIL33 hAb (MD501 플라스미드)는 xIL13 hAb 단일 플라스미드 (MD157) LC 및 HC용 ORFs를 xIL33 LC 및 HC의 ORF로 대체함으로써 작제되었다. 항체 단편 및 샤페론의 발현에 사용된 프로모터는 xIL13 (MD157) 플라스미드에 동일하였다 (도 39). 단일 발효는 xIL33 LC 및 HC (MD481)용 ORF만 함유한 xIL33 hAb 발현 벡터로 수행되었다. MD481 플라스미드는 분자 샤페론 DsbA, DsbC 또는 FkpA용 ORFs를 함유하지 않았다. 발효는 30°C의 항온, 7.0의 pH, 및 650 RPM의 교반 속도에서 수행되었다 (도 40의 기본 사례). 다음으로, 단일 발효는 xIL33 LC 및 HC용 ORFs, 뿐만 아니라 분자 샤페론 DsbA, DsbC 또는 FkpA (MD501)용 ORFs를 함유한 xIL33 hAb 발현 벡터로 수행되었다. 동일한 작동 조건은 MD481 발효에 대해서와 같이 MD501 발효에 대해 사용되었다. 단일 플라스미드 (MD501)의 이용은 기본 사례와 비교시 xIL33 hAb 역가에서 대략 10-배수 증가를 초래하였다.

[0391] 부분 요인 DoE는 xIL33 hAb MD501 단일 플라스미드를 위한 최적의 배양물 조건을 결정하기 위해 수행되었다. DoE는 67A6 숙주에서 2개 중심 점 복제물을 포함한 10개 실험을 갖는 단편적인 요인으로 4개 파라미터에 집중하였다 (표 5-1). 교반 속도 및 온도 시프트는 150의 OD₅₅₀에서 실시되었다.

표 5-1. xIL33 hAb 파라미터

페더	성장 (분) (Tg)	생산 (분) (Tp)	pH	표적 OUR	역가 (g/L)
-++-	34	30	6.7	1.9	2.7
--++	30	30	6.7	2.8	1.7
+++	30	30	7.3	1.9	3.2
0000	32	27.5	7.0	2.3	4.1
+++	34	25	6.7	2.8	3.0
+--+	30	25	7.3	2.8	3.3
++--	34	25	7.3	1.9	3.2
0000	32	27.5	7.0	2.3	4.0
++++	34	30	7.3	2.8	2.6
----	30	25	6.7	1.9	2.5

[0393]

[0394] 표 5-1에서 보이는 바와 같이, Tg는 30 내지 34°C 범위이었고, Tp는 25 내지 30°C 범위이었고 pH는 6.7 내지 7.3 범위이었고, OUR 설정값은 1.9 내지 2.8 mmol O₂/L/min 범위이었다. 도 41은 중심 점 조건이 4.0 ± 0.05 g/L인 달성된 최고 역가를 갖는 역가에 가장 유의미한 이점을 제공하였음을 보여주고, 이는 기본 사례 작동 조

건에 비교시 hAb 역가에서 추가 증가와 같다 (도 40). 최상의 배양물 조건은 7.0의 pH, 32°C의 Tg, 27.5°C의 Tp (2 hr 램프), 및 대략 2.3 mmol/Lmin의 표적 OUR (2hr 교반 속도 램프)을 포함하였다.

[0395] 실시예 6: FkpA 최적화

FkpA의 발현 수준을 최적화하기 위한 노력으로, 2개의 추가 FkpA TIR 변이체는 xIL13, xIL17 및 xIL33 hAbs에 대한 단일 플라스미드 (MD157, MD341 및 MD501 플라스미드)에서 시험되었다. FkpA TIR 변이체는 내인성 FkpA 신호 서열과 비교로 기재된 바와 같이 특성화되었다 (도 42). MD157, MD341 및 MD501 플라스미드는 FkpAc13-용 ORF을 편입하였고, 이는 3의 TIR 강도와 상관되었다 (도 43). MD157, MD341 및 MD501 단일 플라스미드에서 FkpAc13 ORF은 FkpA TIR1 또는 TIR2 ORF로 대체되었고 각 hAb에 대하여 이전에 확인된 최적화된 발효 조건에서 시험되었다.

[0397] FkpA 발현의 증가된 수준은 증가된 xIL13 hAb 축적과 상관하였다 (도 44). FkpA TIR1 및 TIR2 조건은 0.5 및 2.5 g/L의 최종 FkpA 양 및 1.5 및 2.5 g/L, 각각의 xIL13 hAb 역가를 초래하였다. TIR 3 조건은 4 g/L의 FkpA 및 3.8 g/L의 hAb를 생산하였다. FkpA 발현의 수준은 또한 생산 단계 OUR 프로파일에 영향을 가졌다. 전체 FkpA의 적정은 생산된 hAb의 양을 약 3 배만큼 증가시켰다.

[0398] xIL33 hAb 발효에서 최저 역가 축적 프로파일은 2.4 g/L의 실시 역가의 말단을 갖는 FkpA TIR1 조건과 상관하였다 (도 45). xIL33 TIR2 및 TIR3 조건은 TIR1 조건과 비교된 경우 xIL33 hAb 역가에서 대략 2 배수 증가를 초래하였다 (도 45). 데이터는 FkpA의 증가된 수준이 hAb 생산에 유익함을 제안한다.

[0399] xIL17 hAb 발효에서 최저 역가 축적 프로파일은 2.0 g/L의 실시 역가의 말단을 갖는 FkpA TIR1 조건과 상관하였다 (도 46).

[0400] 2개 추가의 FkpA TIR 변이체는 xIL13 hAb에 대하여 이전에 기재된 최상의 조건을 이용하여 시험되었다 (TIR2.3 및 TIR6). TIR2.3 역가 프로파일은 이전에 시험된 TIR2 조건보다 더 높은 경향이었지만, 여전히 대조 TIR3 조건보다 낮았다 (도 47A). TIR6 조건은 TIR 2.3 조건과 유사한 역가 축적 프로파일을 수득하였지만, 그러나 재차 TIR3 대조보다 낮았다. 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정된 바와 같이 FkpA 축적은 TIR 변이체를 거친 FkpA의 적정을 보여주었다 (도 47B). 데이터는, xIL13 hAb (MD157 단일 플라스미드)의 경우에서 TIR3인, hAb 생산과 상관하는 FkpA 발현의 최적의 양이 있음을 제안한다.

[0401] 실시예 7: 산소 전달 속도 (OTR) 조건의 효과

[0402] 실시예 3에서 확인된 xIL13 hAb 최상의 조건은 제2 OTR 전략으로 또한 시험되었다. 실험 (N=3)에서 용기 배압 (BP) 및 살포 속도는 1.0에서 0.3 바까지 및 20에서 13 SLPm까지, 각각으로 감소되었다. 배압 및 살포 속도에서 감소 때문에 OTR에서 손실을 회수하기 위한 노력으로, 성장 및 생산 단계 교반 속도는 650에서 880 RPM까지 및 475에서 650 RPM까지 증가되었다. 용기 배압, 살포 속도, 및 교반 속도의 상이한 조합은 이전의 실시예에서 인용된 것과 유사한 OTR 조건을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0403] 발효는 전체 발효 공정에 대한 일정 BP로 수행되었다. 변경된 OTR 조건에서 배압은 0.3 바 (N=3)로 유지되었고, 대조 조건에서 배압은 1.0 바 (N=5)로 유지되었다. 발효는 전체 발효 공정에 대한 일정 기류로 수행되었다. 변경된 OTR 조건에서 기류는 13 SLPm (N=3)으로 유지되었고, 대조 조건에서 기류는 20 SLPm (N=5)으로 유지되었다. 발효는 모든 변경된 OTR 및 대조 조건에서 150 OD₅₅₀으로 교반 시프트를 시행하였다. 변경된 OTR 조건에서 초기 교반 속도는 880 RPM까지 설정되었고 650 RPM까지 이동되었고, 대조 조건에서 초기 교반 속도는 650 RPM까지 설정되었고 475 RPM까지 이동되었다.

[0404] 교반 속도에서의 증가는 살포 및 배압에서의 감소 때문에 OTR에서의 하락을 보상하였다. 변경된 OTR 조건은 대조 조건에 대해 사한 피크 및 생산 단계 OUR (도 48A) 및 성장 프로파일 (도 48B)을 초래하였다. 변경된 OTR 조건은 대조 조건과 유사한 축적 프로파일 및 피크 역가 (4.1 ± 0.4 g/L)를 초래하였다 (도 49).

[0405] 서열

[0406] 달리 지칭되지 않는다면, 모든 폴리펩티드 서열 N-말단 내지 C-말단이 제시된다.

[0407] 달리 지칭되지 않는다면, 모든 폴리펩티드 서열 5' 내지 3' 가 제시된다.

[0408] 인간 IL13 전구체 폴리펩티드

MALLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAI EKTQRMLSGFCPHKVSA GQFSSL

HVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFN (서열 번호: 1)

[0410] 성숙 인간 IL13 폴리펩티드

[0411] SPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLL HLKKLFREGRFN (서열 번호: 2)

[0412] 인간 IL17A 전구체 폴리펩티드

[0413] MTPGKTSVLSSLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINA DGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA (서열 번호: 3)

[0414] 성숙 인간 IL17A 폴리펩티드

[0415] GITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINA DGNVDYHMNSVPIQQEILVLRRE PPHCNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA (서열 번호: 4)

[0416] 인간 IL17F 전구체 폴리펩티드

[0417] MTVKTLHGPAMVKYLLSILGLAFLSEAARKIPKVGHFFQKPESCAPPVGSMKLDIGIINENQRVMSMRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQC RNLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQGCSVSFQLEKVLTVGCTCVTPVIIHHQ (서열 번호: 5)

[0418] 성숙 인간 IL17F 폴리펩티드

[0419] RKIPKVGHFFQKPESCAPPVGSMKLDIGIINENQRVMSMRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQCRLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRR KHQGCSVSFQLEKVLTVGCTCVTPVIIHHQ (서열 번호: 6)

[0420] 항-IL13 중-쇄 가변 도메인

[0421] EVTLRESPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSVNWIHQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYYCAGDGYY P YAMDNWGQQGSLTVTSS (서열 번호: 7)

[0422] 항-IL13 경-쇄 가변 도메인

[0423] DIVLTQSPDSLSVSLGERATINCRASKVDSYGNFSFMHWYQQKPGQPPKLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPRTF GGGTKVEIKR (서열 번호: 8)

[0424] 항- IL13 HVR-H1

[0425] AYSVN(서열 번호: 9)

[0426] 항- IL13 HVR-H2

[0427] MIWGDGKIVYNSALKS (서열 번호: 10)

[0428] 항- IL13 HVR-H3

[0429] DGYYPYAMD (서열 번호: 11)

[0430] 항- IL13 HVR-L1

[0431] RASKVDSYGNFSMH (서열 번호: 12)

[0432] 항- IL13 HVR-L2

[0433] LASNLES (서열 번호: 13)

[0434] 항- IL13 HVR-L3

[0435] QQNNEDPRT (서열 번호: 14)

[0436] 항-IL13 IgG4 중쇄 (크노-형성 T366W 돌연변이를 가짐)

[0437] EVTLRESPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSVNWIHQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYYCAGDGYY P YAMDNWGQQGSLTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNQGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL

TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSG (서열 번호: 15)

[0438] 항-IL13 IgG4 중쇄 (크노-형성 T366W 돌연변이를 가짐)

[0439] EVTLRESPGA LVKPTQLTLC TCTVSGFSL AYSVNWRQPGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMNTMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSA TKGPSVFLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVPS SSSLGKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPAP EFLGGPSVFL FPPPKDLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTAKPR EEQFNSTYRV VSLLVHLQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAQGQ PREPQVYTLPS QSEEMTKNQ VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNY TPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRSRQEGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSL LSLGK (SEQ ID NO: 16)

[0440] 항-IL13 경쇄

[0441] DIVLTQSPDSLSQLGERATINCRASKSVDSYGNFSFMHWYQQKPGQPKLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNNEDPRTF GGGTKVEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 17)

[0442] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab 중-쇄 가변 도메인

[0443] EVQLVESGGLVQPGRLSRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGINWSSGGIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLMQNSLRAEDTALYYCARDIGG FGEFYWNFGLWGRGLTVTSS (서열 번호: 18)

[0444] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab 경-쇄 가변 도메인

[0445] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQEDFAVYYCQQRSNWPPATFGGG TKVEIK (서열 번호: 19)

[0446] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab HVR-H1

[0447] DYAMH (서열 번호: 20)

[0448] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab HVR-H2

[0449] GINWSSGGIGYADSVKG (서열 번호: 21)

[0450] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab HVR-H3

[0451] DIGGFGEFYWNFGL (서열 번호: 22)

[0452] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab HVR-L1

[0453] RASQSVRSYLA (서열 번호: 23)

[0454] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab HVR-L2

[0455] DASNRAT (서열 번호: 24)

[0456] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab HVR-L3

[0457] QRNSWPPAT (서열 번호: 25)

[0458] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab IgG4 중쇄(홀-형성 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 가짐)

[0459] EVQLVESGGLVQPGRLSRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGINWSSGGIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLMQNSLRAEDTALYYCARDIGG FGEFYWNFGLWGRGLTVTSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAEFLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTAKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGYPDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSG (서열 번호: 26)

[0460] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab IgG4 중쇄(홀-형성 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 가짐)

[0461] EVQLVESGGLVQPGRLSRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGINWSSGGIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLMQNSLRAEDTALYYCARDIGG FGEFYWNFGLWGRGLTVTSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAEFLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTAKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGYPDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF

LVSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열 번호: 27)

- [0462] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab 경쇄

[0463] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAQQKPGQAPRLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPATFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 28)

[0464] 항-IL13 중-쇄 가변 도메인 폴리뉴클레오티드 서열

[0465] GAAGTTACCTGCGAGAGCGGCCAGCCCTGGTAAGCCAACCCAGACCCCTGACCTGACCGTCAGCGCTTCAGCCTGAGCGCTACAGCGTGAAGTGATCCGCCAGCCACCAGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGCCATGATCTGGGCGACGGCAAGATGTGTACAACAGGCCCTGAAGAGGCCCTGACCCAGCCTGACCTGACCCAGGGACACCAAGGGTGGTGTGACCATGACCAACATGGACCCAGTGGACACGCCACCTACTACTGCACGGCAGCGCTACTACCCA TACGCCATGGACAACGGGCCAGGGCAGCCTGGTACCGTGAGCAGC (서열 번호: 29)

[0466] 항-IL13 경-쇄 가변 도메인 폴리뉴클레오티드 서열

[0467] GATATCGTGTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGTCTGTGAGCCTGGCGAGCGGCCACCATCAACTGCCGCCAGCAAAGCGTGGACAGCTACGCCAAC AGCTTCATGCACTGGTATCAGCAGAAAGCCAGGCCACCAAGCTGCTGATCTACCTGCCAGCAACCTGGAGAGCGCGTGCCAGCCGCTTCAGCGGCCAGCGCAGCGGCCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCTCTGAGGCCAGGGATGTGGCGTGTACTACTGCCAGCAGAACACAGGAGGCCACGCACCTTC GGTGGCGGTACCAAGGTGGAGATCAA (서열 번호: 30)

[0468] 항-IL13 IgG4 중쇄 폴리뉴클레오티드 서열 (크냅-형성 T366W 돌연변이를 가짐)

[0469] AGAGCCACAGGTGTACCCCTGCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACGCCAGCTGTGGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAGGCTAACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTCTCATGCTCCGTATGCACTGGCTCTGCCACAACCACACACAGAACAGGCTCTCCGTCTGGG T (서열 번호: 31)

[0470] 항-IL13 IgG4 중쇄 폴리뉴클레오티드 서열 (크냅-형성 T366W 돌연변이를 가짐)

[0471] AGAGCCACAGGTGTACCCCTGCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACGCCAGCTGTGGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAGGCTAACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTCTCATGCTCCGTATGCACTGGCTCTGCCACAACCACACACAGAACAGGCTCTCCGTCTGGG TAAATAA (서열 번호: 32)

[0472] 항-IL13 경 쇄 폴리뉴클레오티드

[0473] GATATCGTGTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGTCTGTGAGCCTGGCGAGCGGCCACCATCAACTGCCGCCAGCAAAGCGTGGACAGCTACGCCAAC AGCTTCATGCACTGGTATCAGCAGAAAGCCAGGCCACCAAGCTGCTGATCTACCTGCCAGCAACCTGGAGAGCGCGTGCCAGCCGCTTCAGCGGCCAGCGCAGCGGCCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCTCTGAGGCCAGGGATGTGGCGTGTACTACTGCCAGCAGAACACAGGAGGCCACGCACCTTC GGTGGCGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGGAACGTGCTCTGGT GTGTGCCGTGCTGAATAACTCTATCCCGTGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCAATGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGAACAGGACACGACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAACACAAAGTCTACGCCCTGCAAGTCAACCCATCAGGGC CTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAA (서열 번호: 33)

[0474] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab 중-쇄 가변 도메인 폴리뉴클레오티드

[0475] GAAGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACGCCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGACGCCCTGGATTACCTTGTATGATTATGCCATG CACTGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGGTATTAATTGGAGCAGTGGTGGCATAGGCTATGCGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGAACGCCAAGAACCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGCCCTGTATTACTGTGCAAGAGATATCGGGGGG TTCGGGGAGTTTACTGGAACCTCGGTCTCTGGGGCGTGGCACCTGGTACTGTCTCCTCA (서열 번호: 34)

[0476] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab 경-쇄 가변 도메인 폴리뉴클레오티드

[0477] GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTGCTCCAGGGGAAAGGCCACCCCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAGAGTGTAGAACAGCTACTTAGCC TGGTACCAACAGAACACTGGCCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGATGCACTAACAGGGCCACTGGCATCCAGGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCAGTGGGCTGGG ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTGCAAGTGTCTTATTACTGTCACTGGCAGCGTAGCAACTGCCCTCCGGCCACTTCGGCGAGGGG ACCAACAGTGGAGATCAA (서열 번호: 35)

- [0478] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab IgG4 중쇄 폴리뉴클레오티드 (홀-형성 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 가짐)
- [0479] CAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGCGCTGTCAAAGGCTTCTA
CCCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT
TAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGACAACCAACTACACACAGAAGGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGT (서열 번호: 36)
- [0480] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab IgG4 중쇄 폴리뉴클레오티드 (홀-형성 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 가짐)
- [0481] CAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGCGCTGTCAAAGGCTTCTA
CCCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT
TAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGACAACCAACTACACACAGAAGGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGTAAATAA (서열 번호: 37)
- [0482] 항-IL17A F 교차 반응성 Ab 경쇄 폴리뉴클레오티드
- [0483] GAAATTGTGTTGACACAGTCTCAGCCACCCTGCTTGTCTCCAGGGAAAGAGGCCACCCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGAGCTACTTAGCC
TGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCACTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGG
ACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTGAGTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGCCCTCCGGCCACTTCGGGGAGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGACCATCTGCTTCATCTCCCGCATCTGATGAGCAGTGAATCTGAAACTGCTCTGTTGTGCGCTG
CTGAATAACTTCTATCCCGTGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGTAA (서열 번호: 38)
- [0484] 코돈-최적화된 항-IL17A F 교차 반응성 Ab IgG4 중쇄 폴리뉴클레오티드 (홀-형성 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 가짐)
- [0485] CAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGCGCTGTCAAAGGCTTCTA
CCCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT
TAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGACAACCAACTACACACAGAAGGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGT (서열 번호: 39)
- [0486] 코돈-최적화된 항-IL17A F 교차 반응성 Ab IgG4 중쇄 폴리뉴클레오티드 (홀-형성 T366S/L368A/Y407V 돌연변이를 가짐)
- [0487] CAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGCGCTGTCAAAGGCTTCTA
CCCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT
TAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGACAACCAACTACACACAGAAGGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGTAAATAA (서열 번호: 40)
- [0488] 코돈-최적화된 항-IL17A F 교차 반응성 Ab 경쇄 폴리뉴클레오티드
- [0489] GAAATTGTCTGACCCAGAGTCCGCAACCCCTGAGCCTGAGTCCGGTGAACGTGCCACCCCTGAGCTGCGTGAAGCCAGAGCGTCAGCTATCTGGCA
TGGTATCAGCAGAAACGGGTCAAGGCACCGCGTCTGCTGATTATGATGCAAGCAATCGCAAGCCTGGTATTCCGGCACGGTATTAGGGTAGCGGTAGTGGC
ACCGATTTCACCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTGAGTGTATTATGTCAGCAGCGTAGCAATTGCCACCGAACCTTGGTGGTGGC
ACCAAAGGTGAAATTAACGAACGTGGCTGACCCTGCTTCTCATCTCCCGCATCTGATGAGCAGTGAATCTGAAACTGCTCTGTTGTGCGCTG
CTGAATAACTTCTATCCCGTGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGTAA (서열 번호: 41)
- [0490] FkpA TIR1
- [0491] GAATTATGAA GTCCCTGTTT AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTGCT (서열 번호: 42)
- [0492] FkpA TIR2
- [0493] GAATTATGAA GTCGCTATTG AAAGTGACGC TGCTGGCGAC CACAATGGCC GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTGCT (서열 번호: 43)

[0494] FkpA TIR3 (c13)

[0495] GAATTATGAA GTCGCTGTT AAAGTTACGC TGCTGGGAC CACAATGGCC GTTGCCCTGC ATGCACCAAT CACTTTGCT (서열 번호: 44)

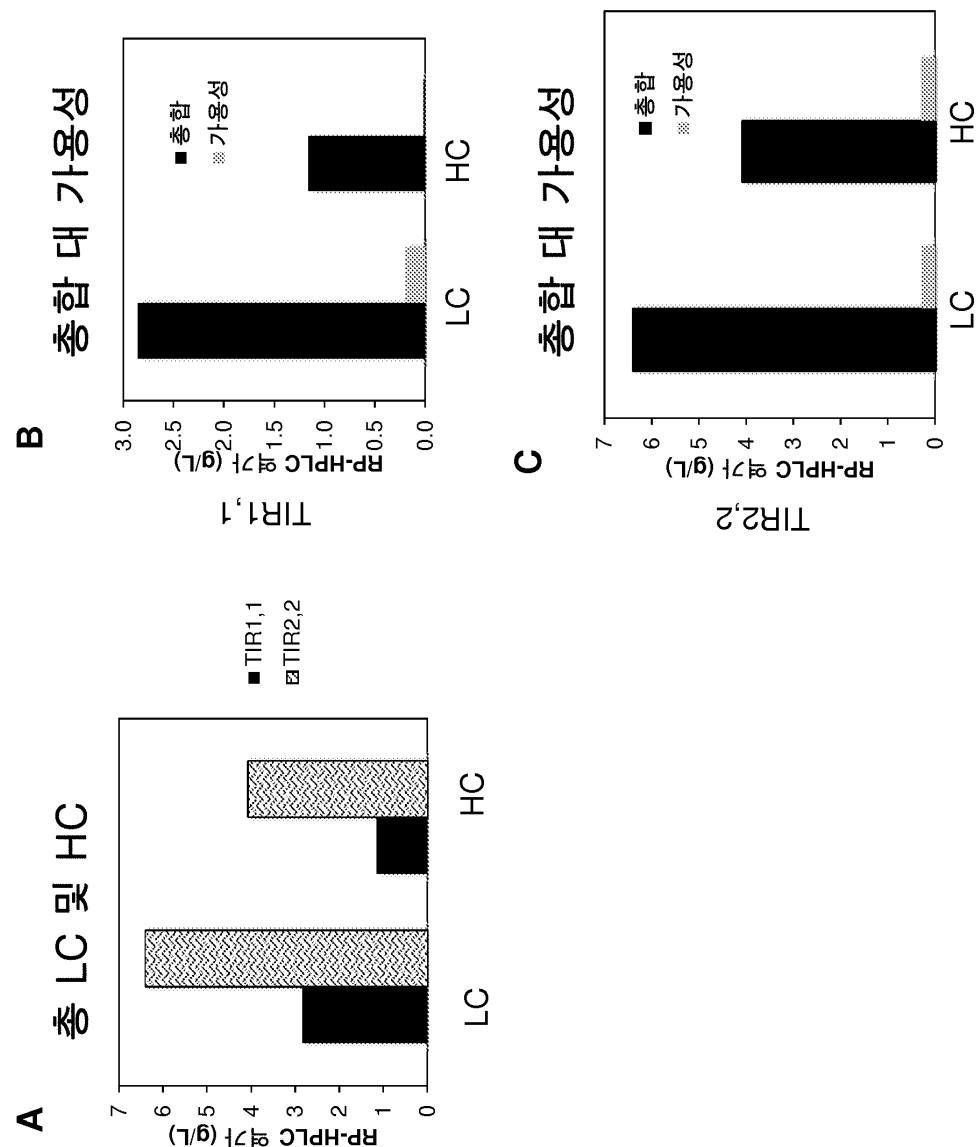
[0496] FkpA 신호 팝티드

[0497] MKSLFKVTLLATTMAVALHAPITFA

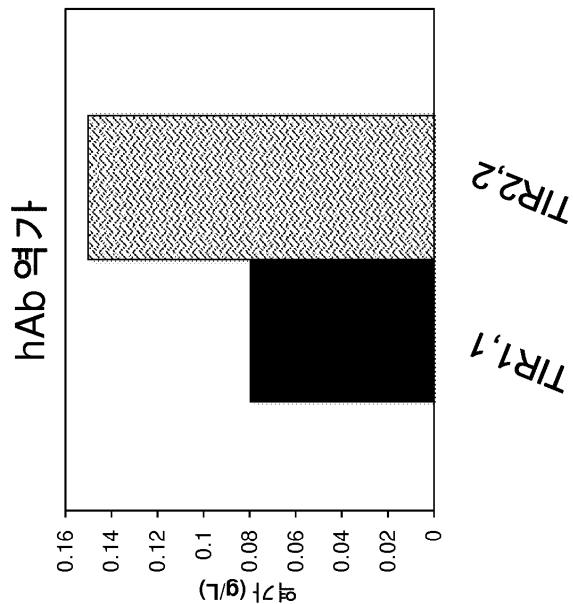
[0498] (서열 번호: 45)

도면

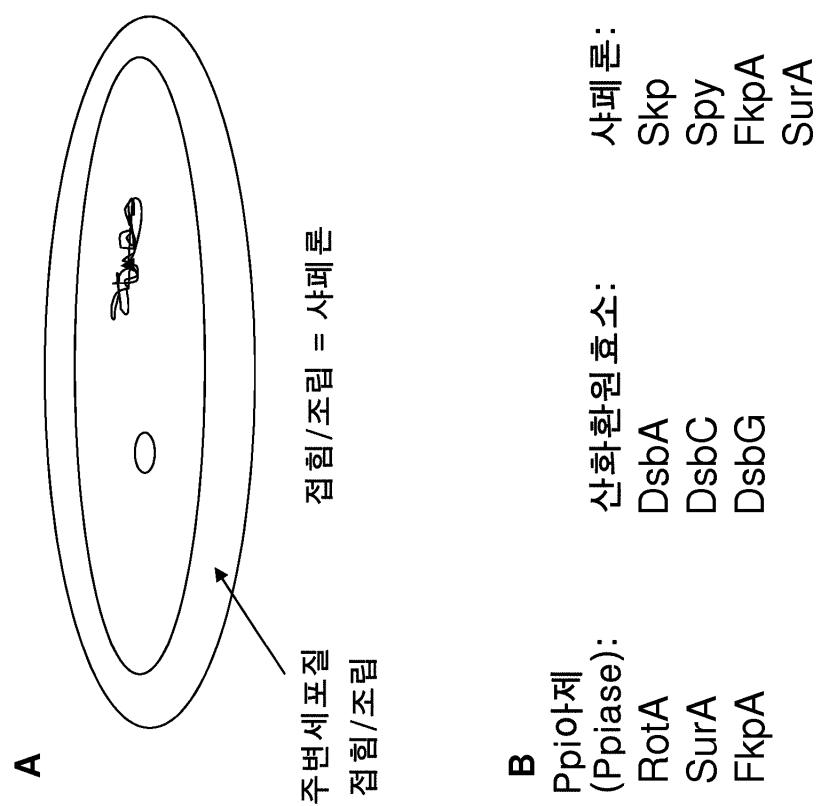
도면 1



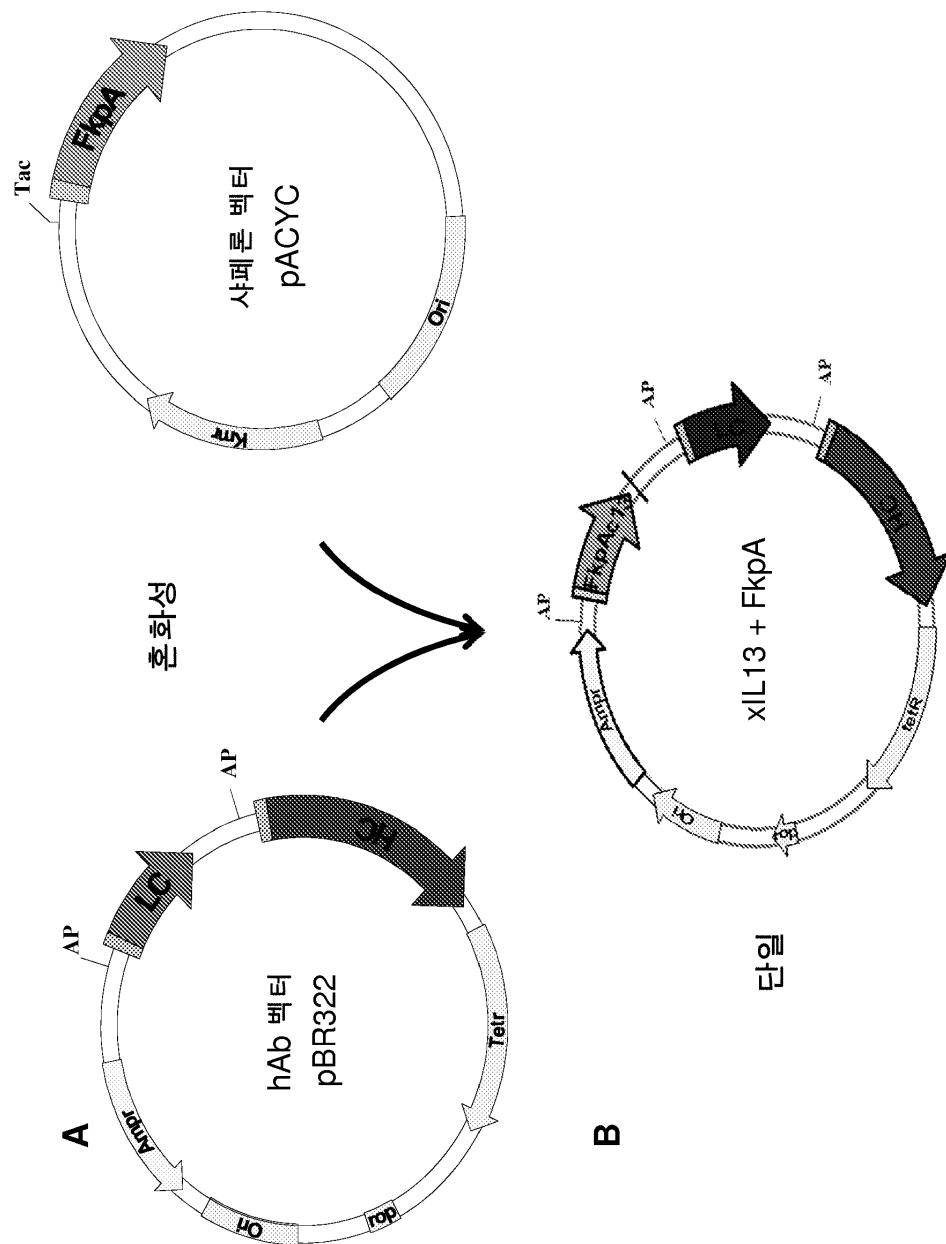
도면2



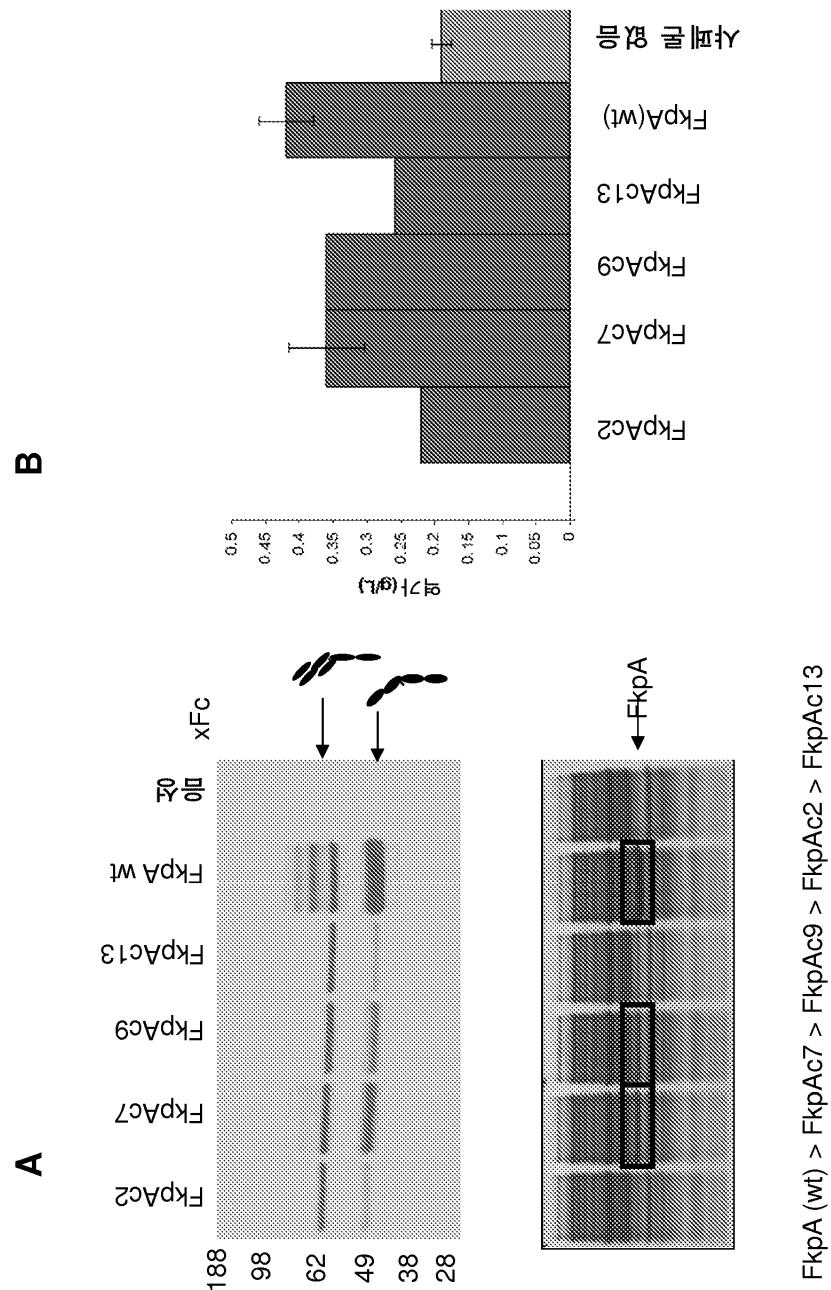
도면3



도면4

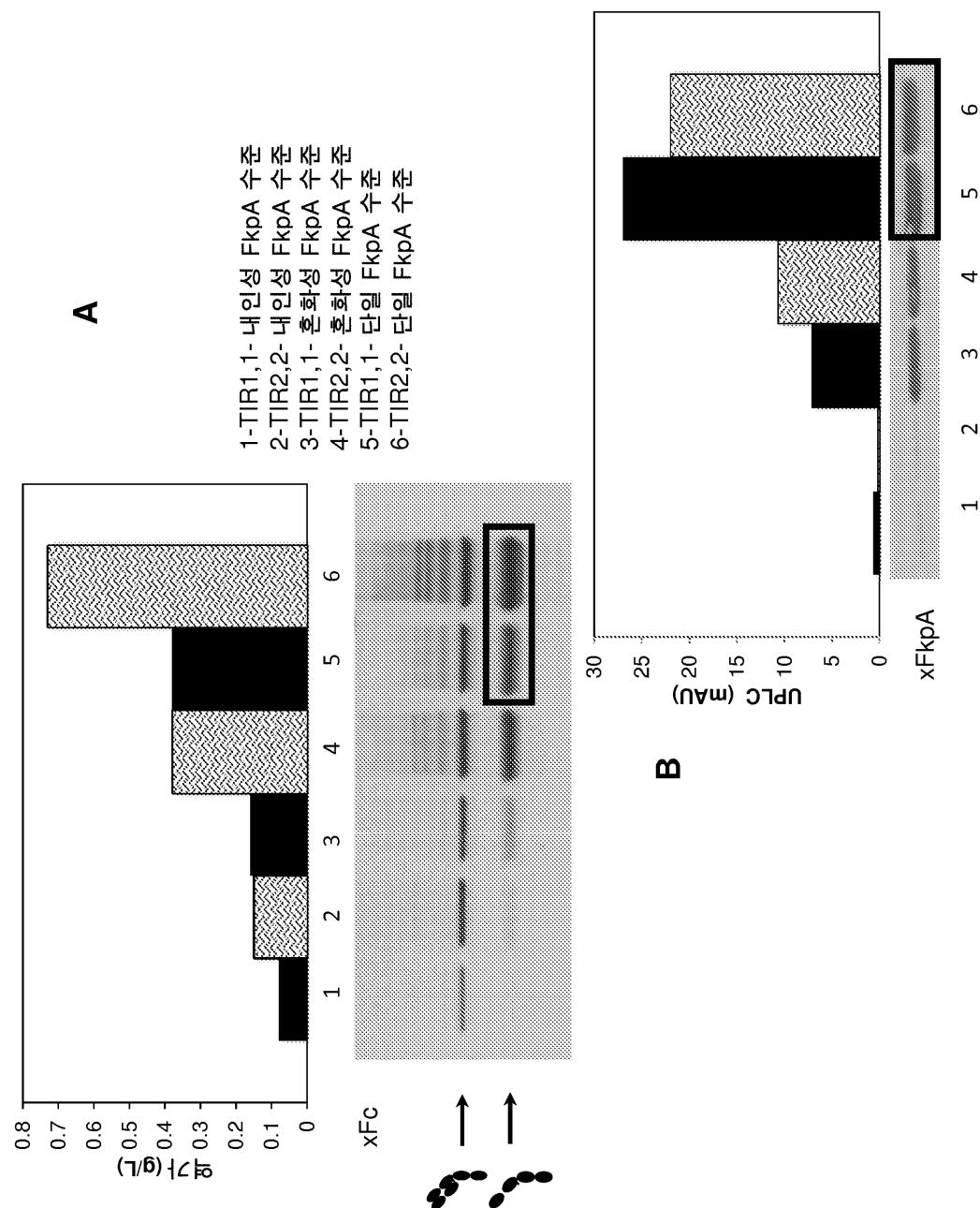


도면5

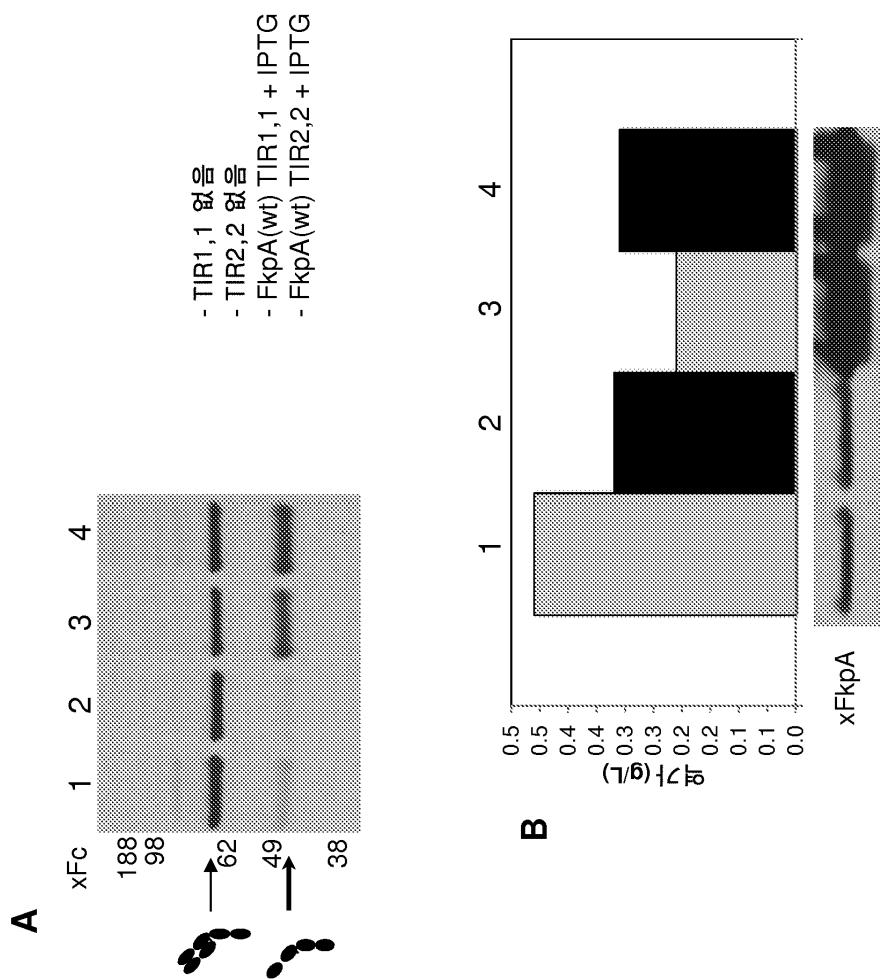


$FkpA$ (wt) > $FkpAc7$ > $FkpAc9$ > $FkpAc2$ > $FkpAc13$

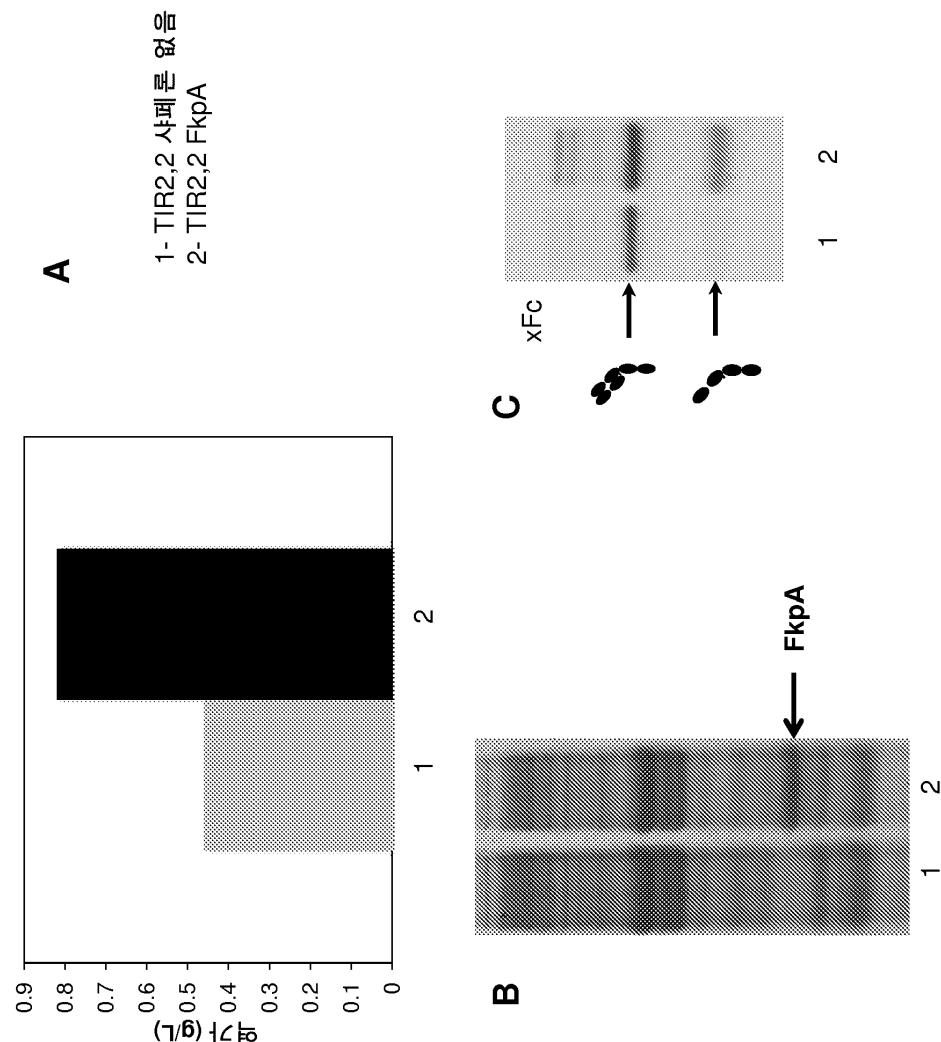
도면6



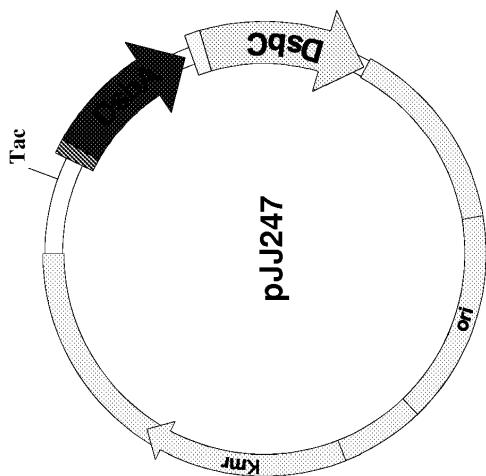
도면7



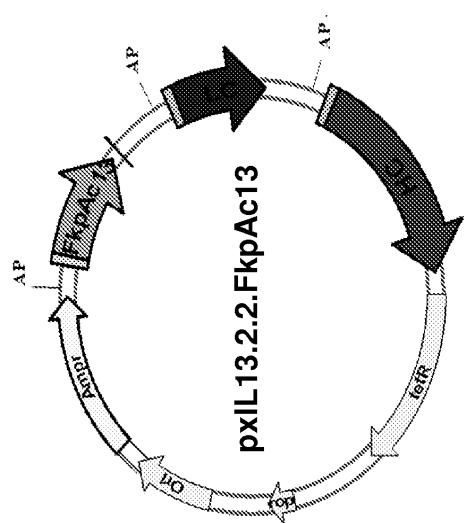
도면8



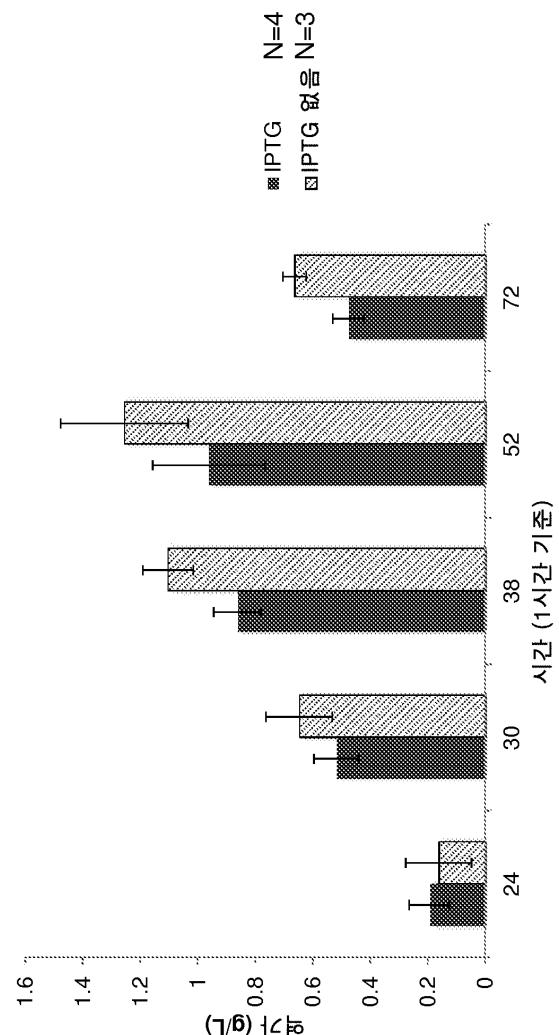
도면9



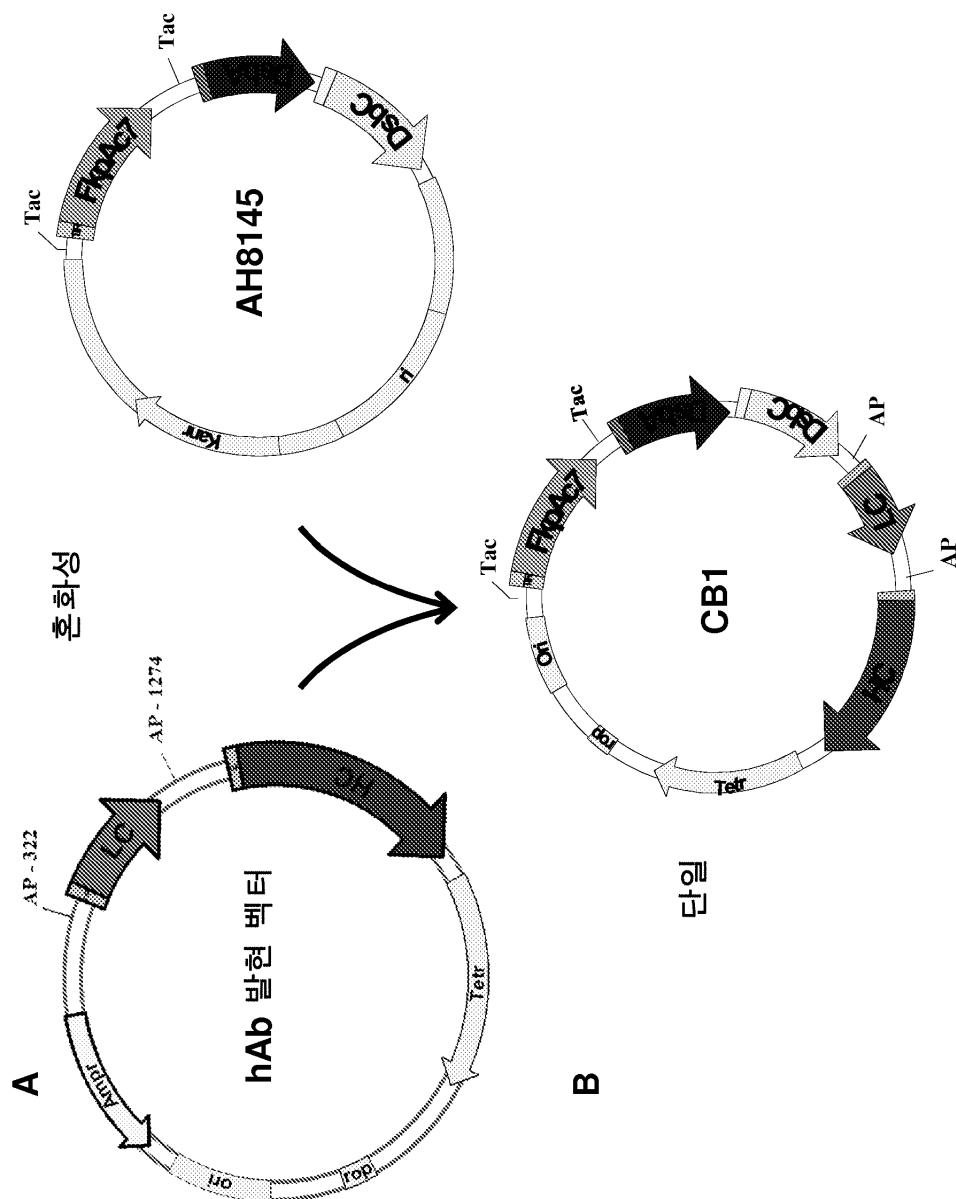
호성



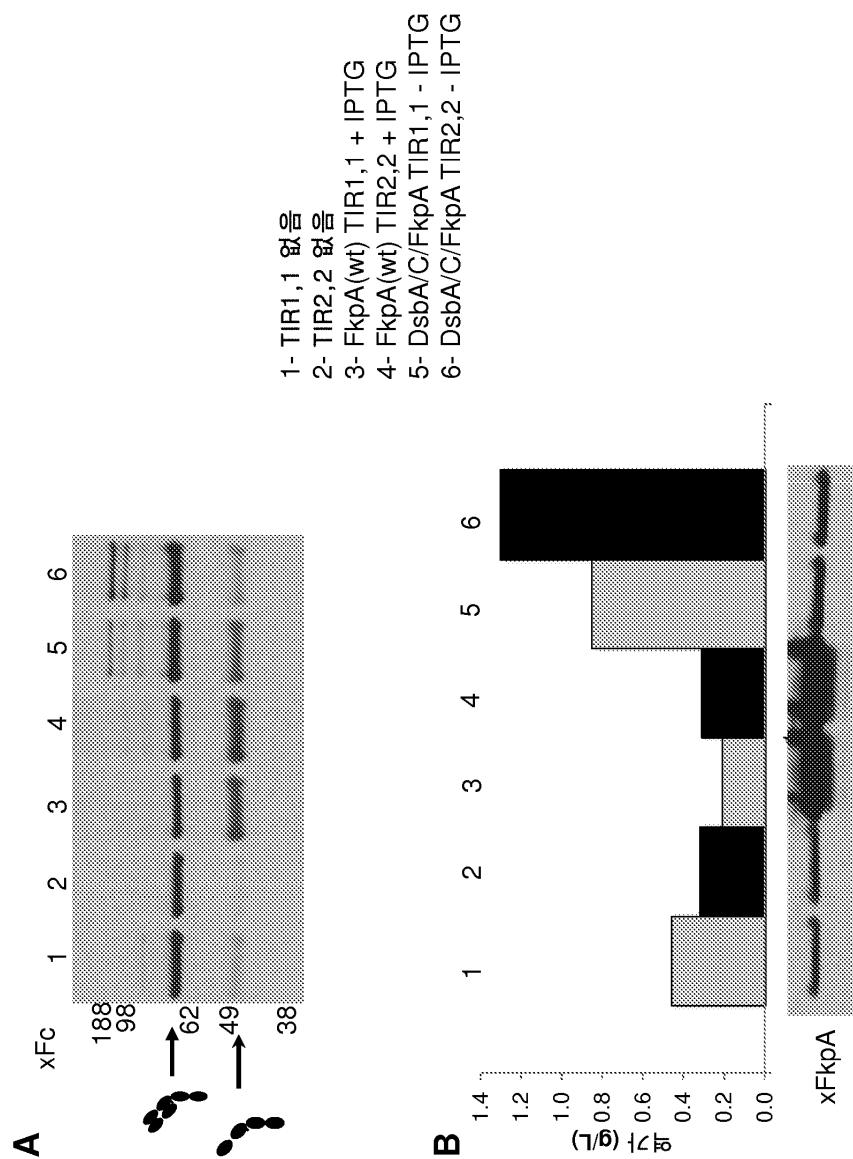
도면 10



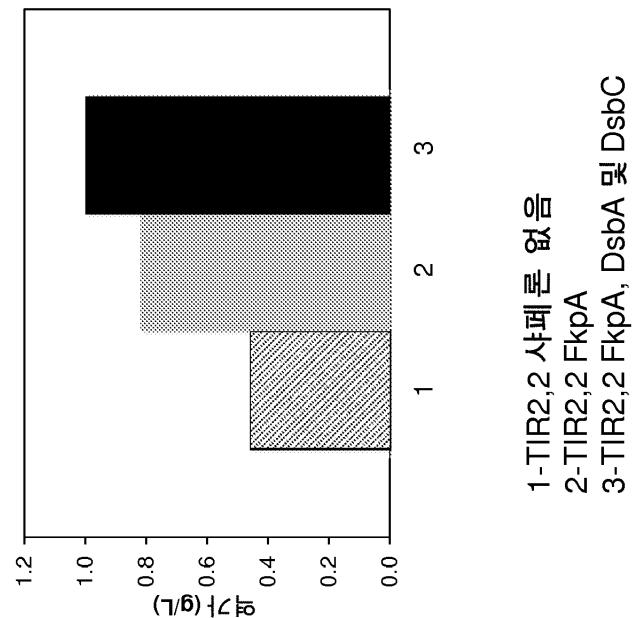
도면 11



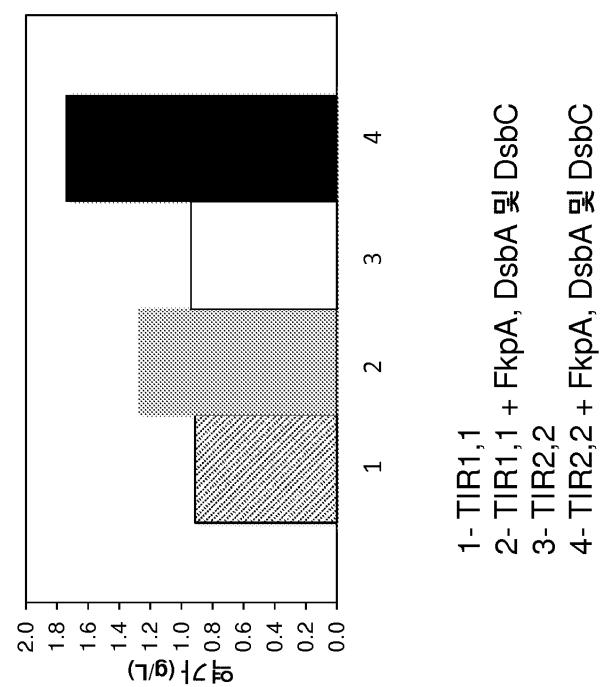
도면 12



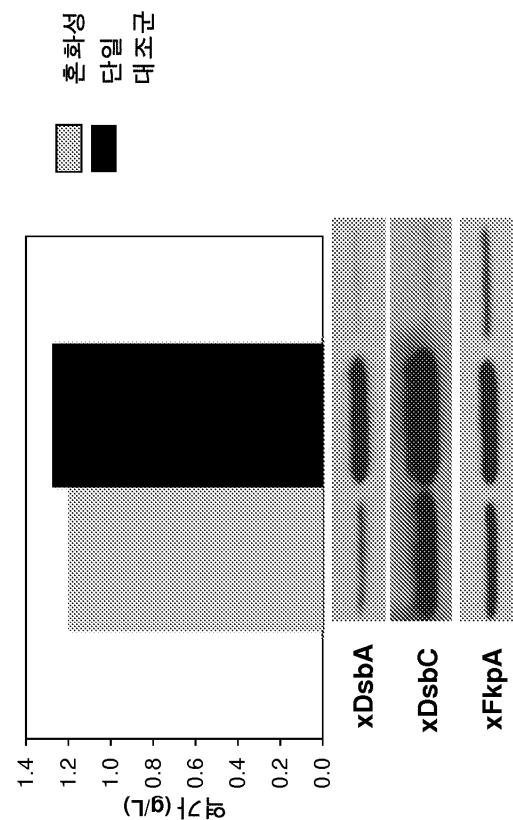
도면13



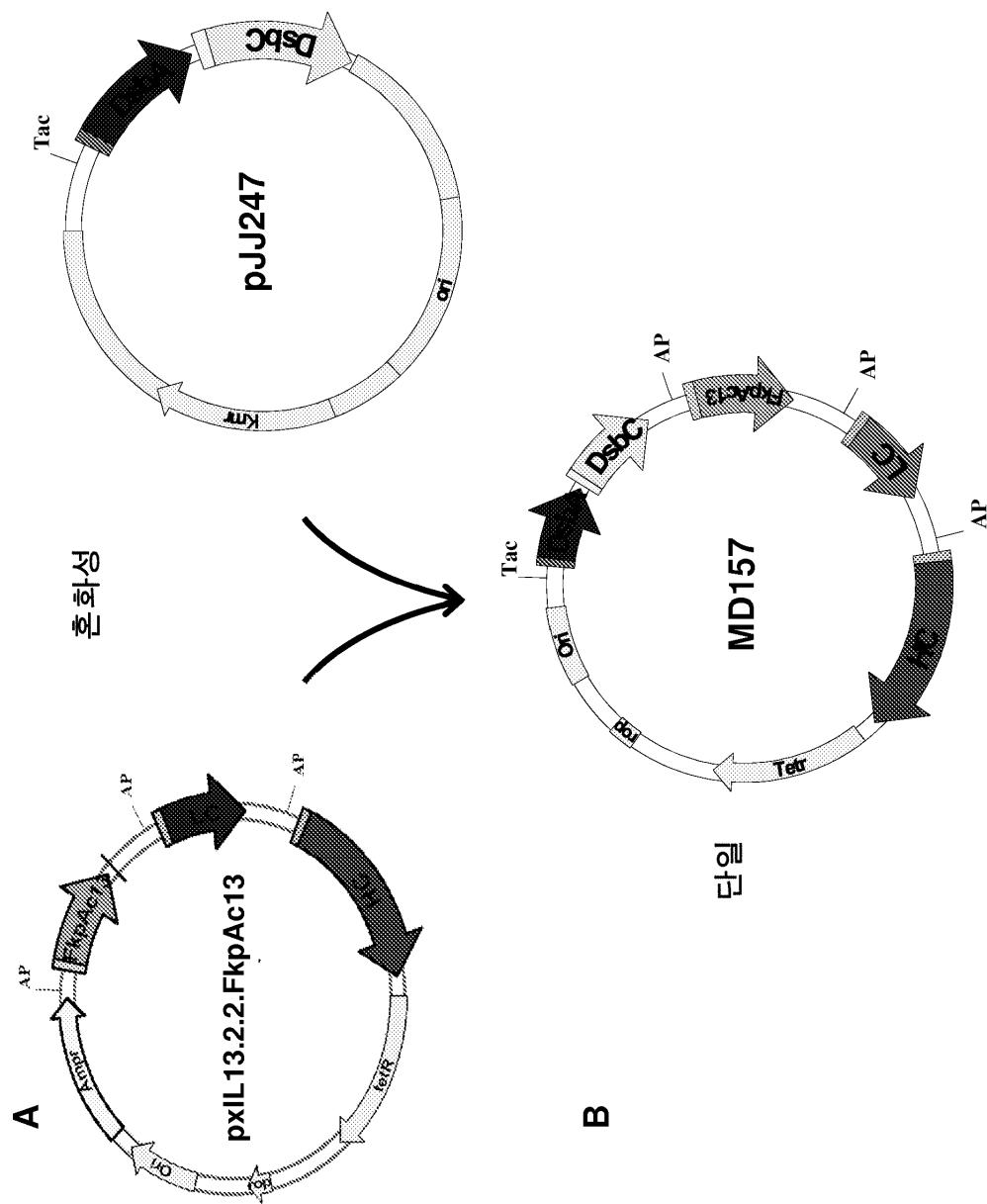
도면14



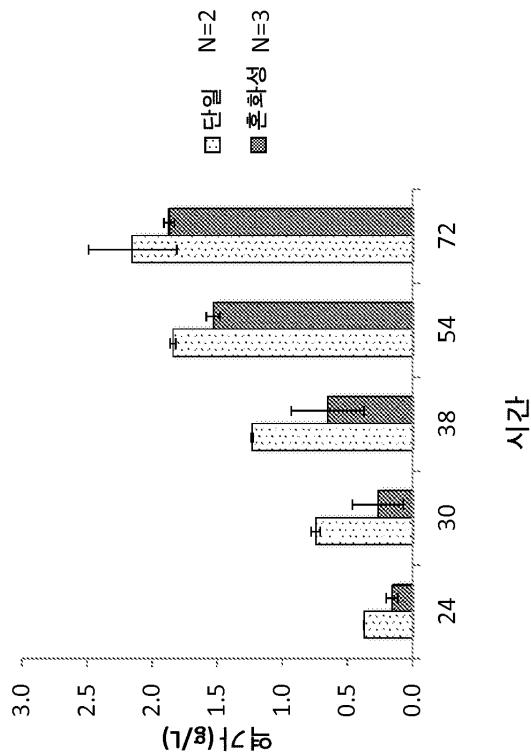
도면 15



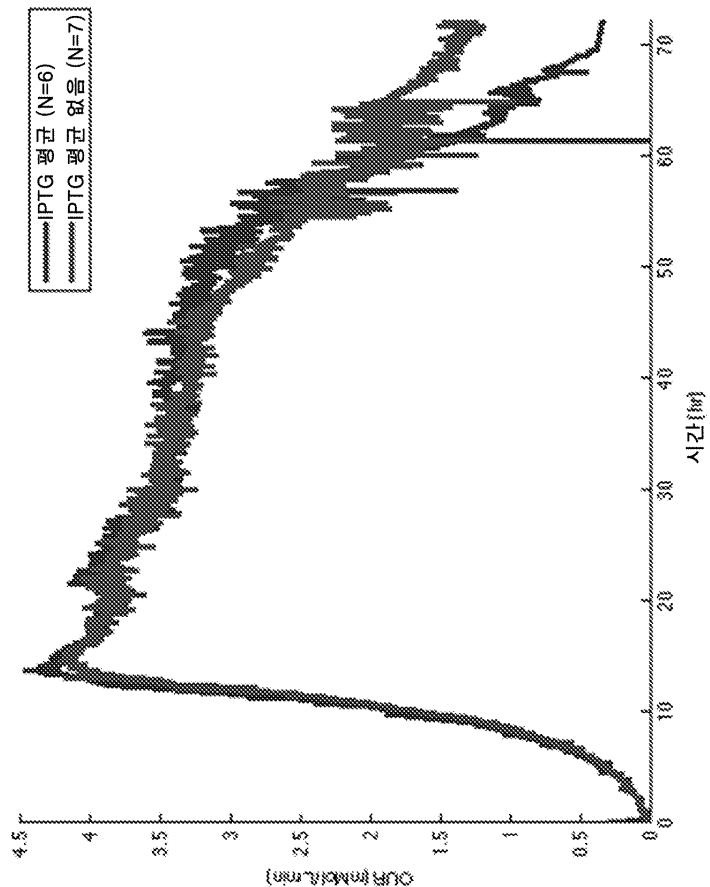
도면 16



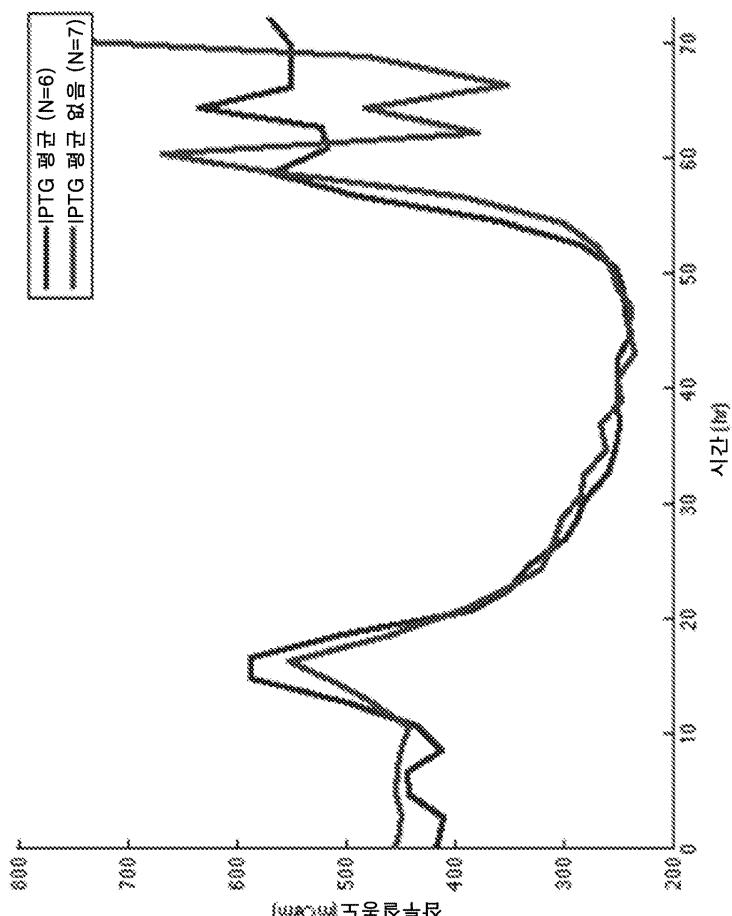
도면17



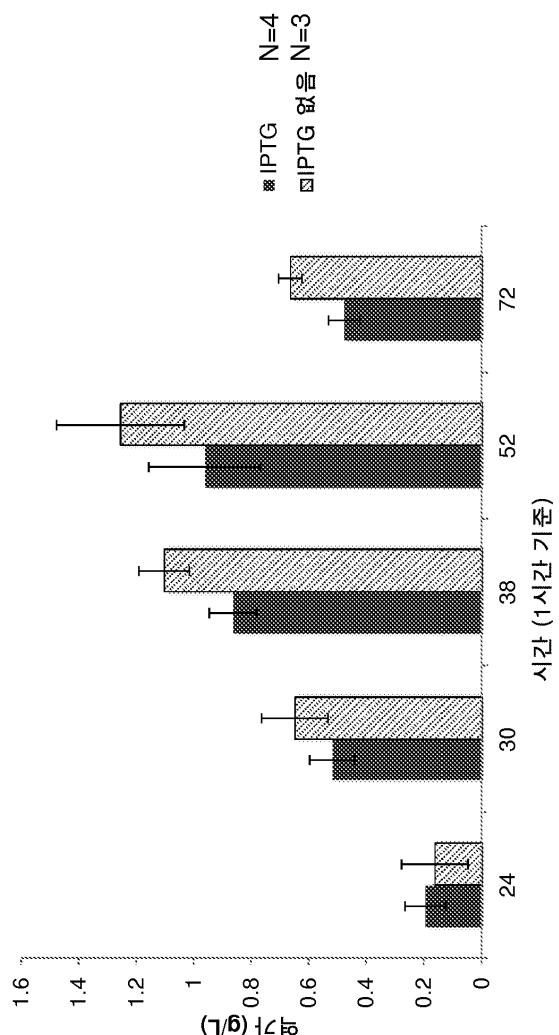
도면18



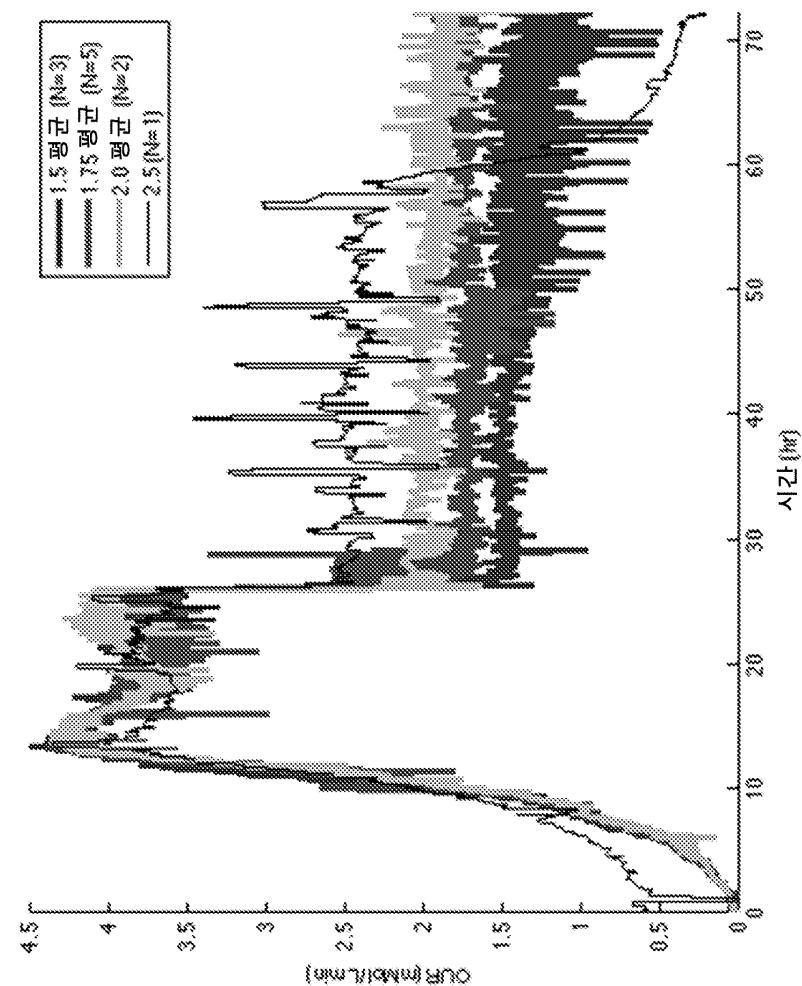
도면19



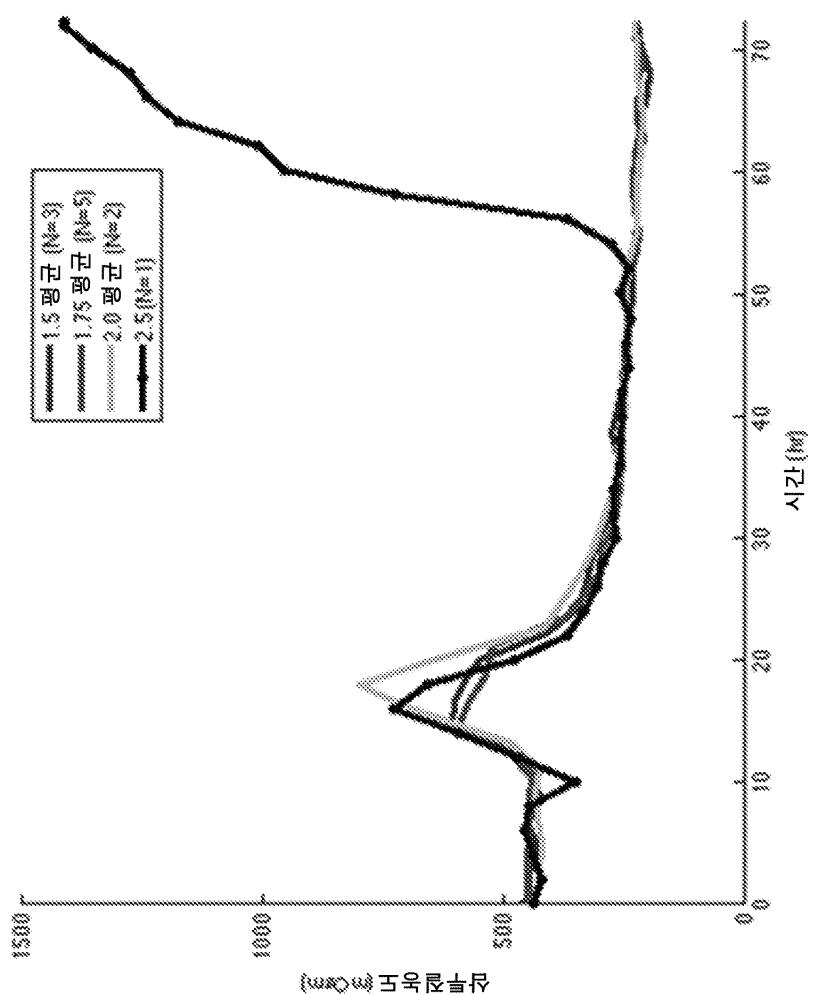
도면20



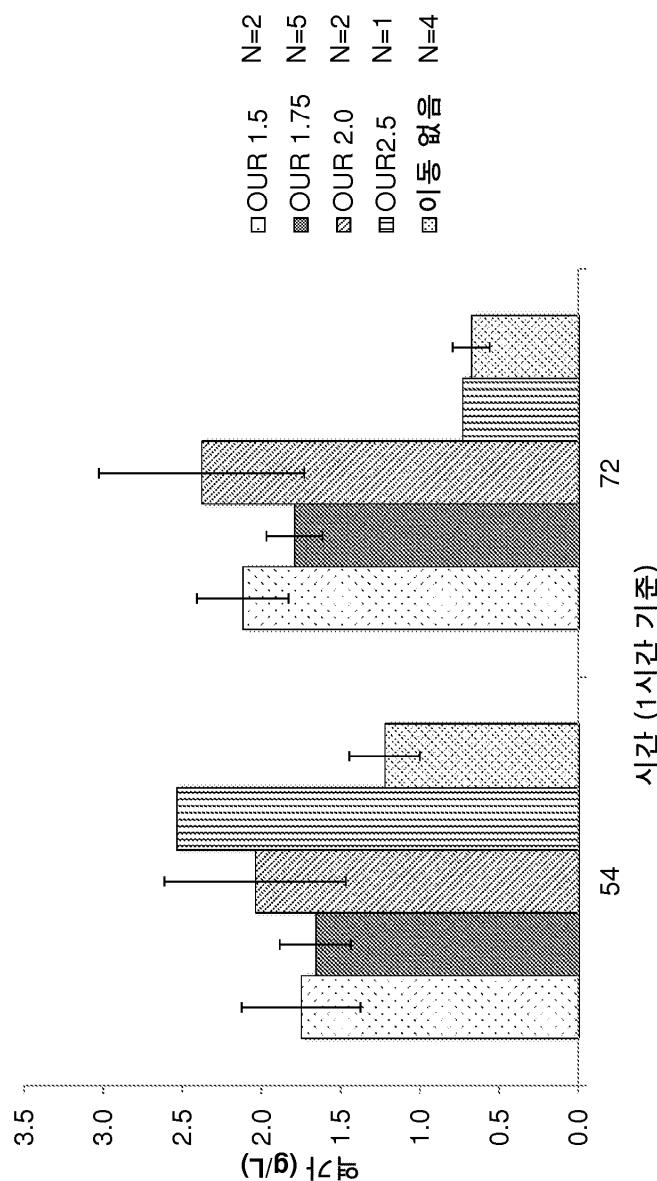
도면21



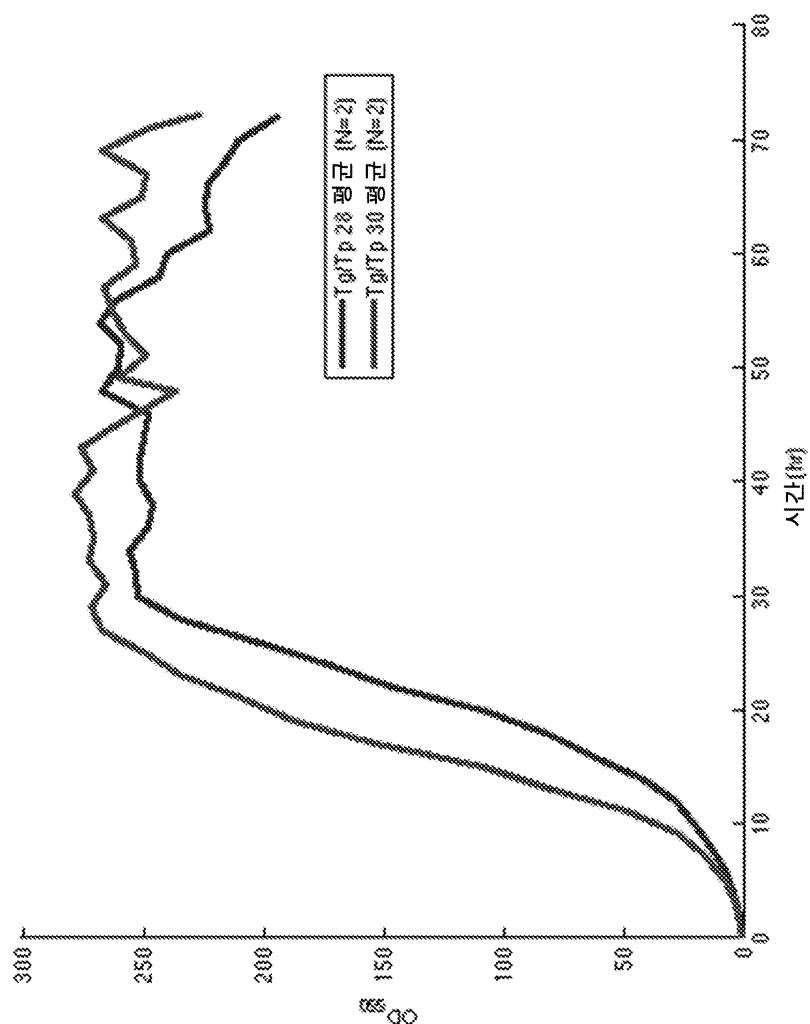
도면22



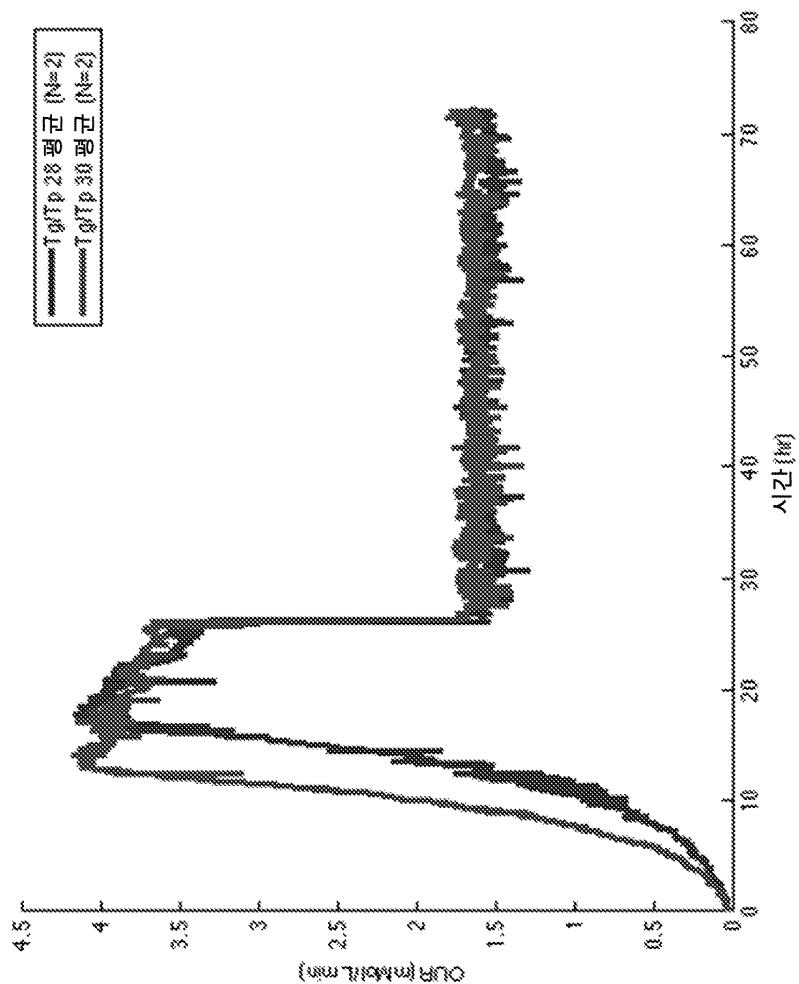
도면23



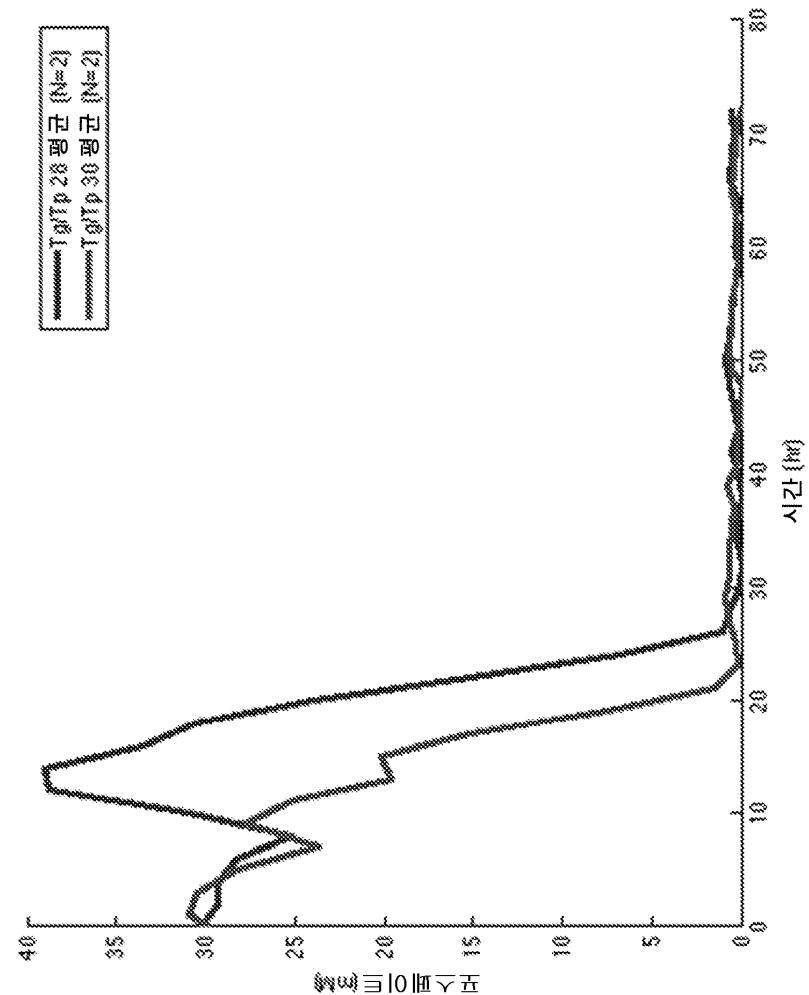
도면24



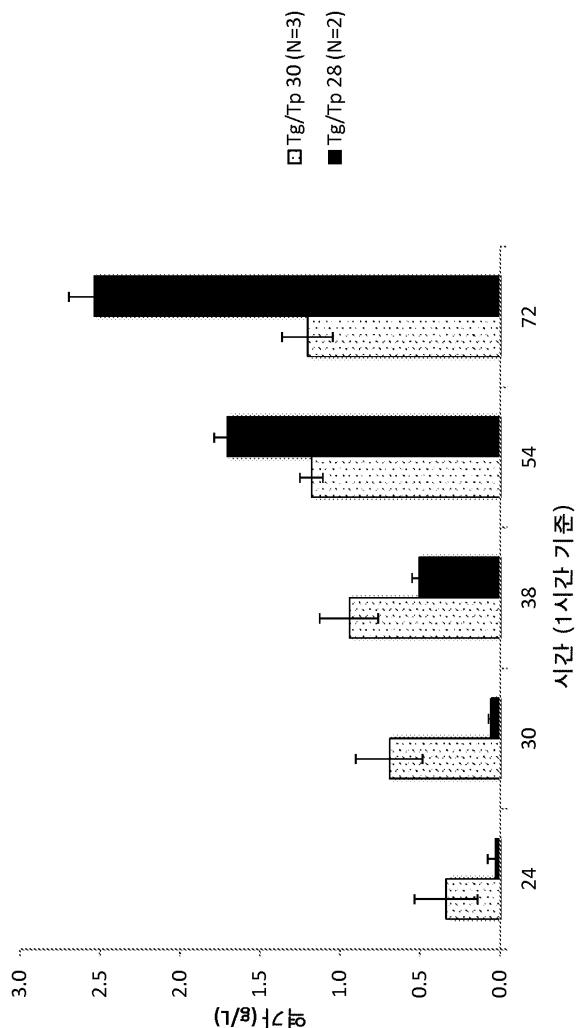
도면25



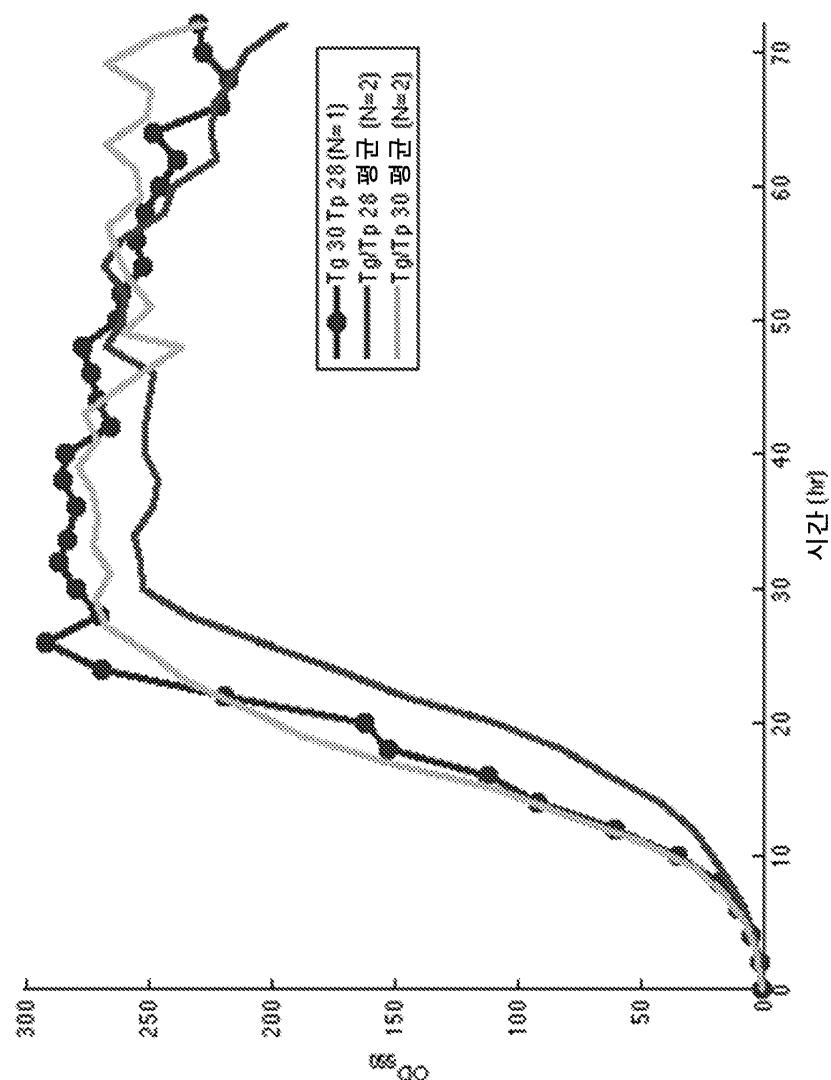
도면26



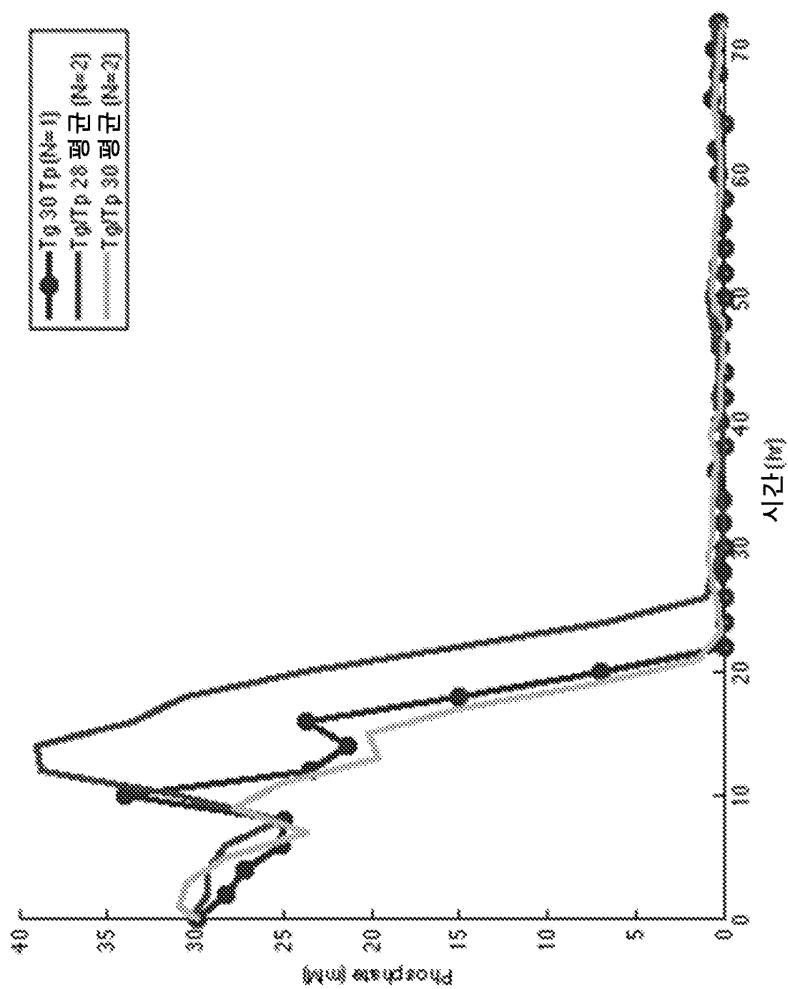
도면27



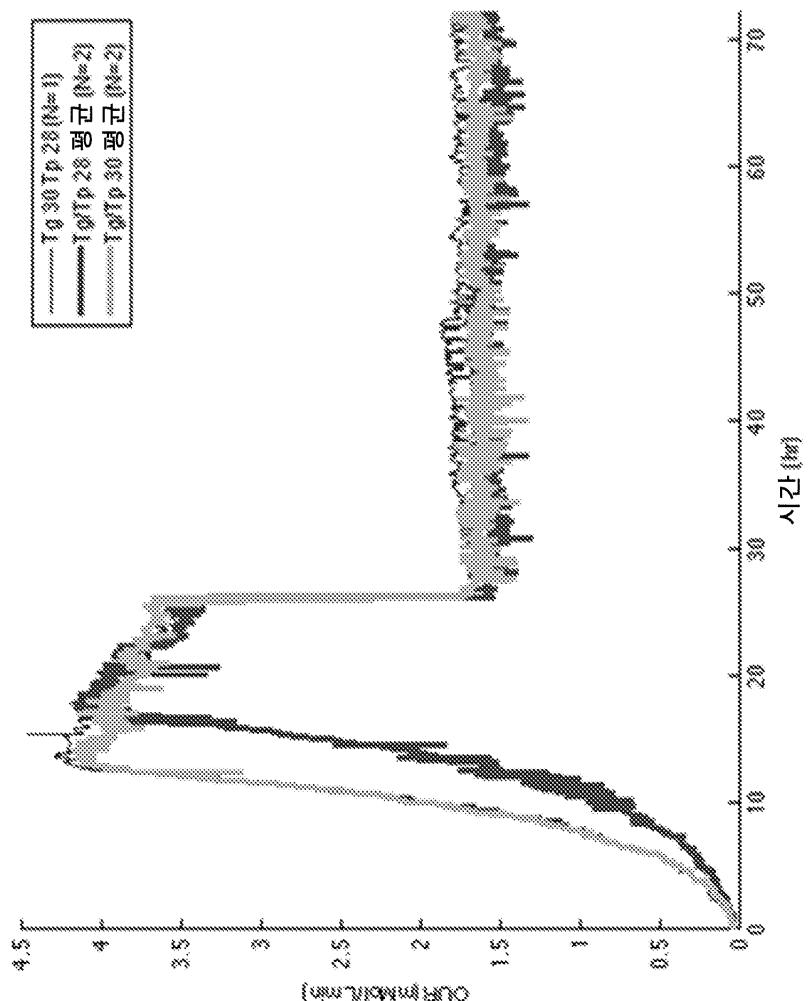
도면28



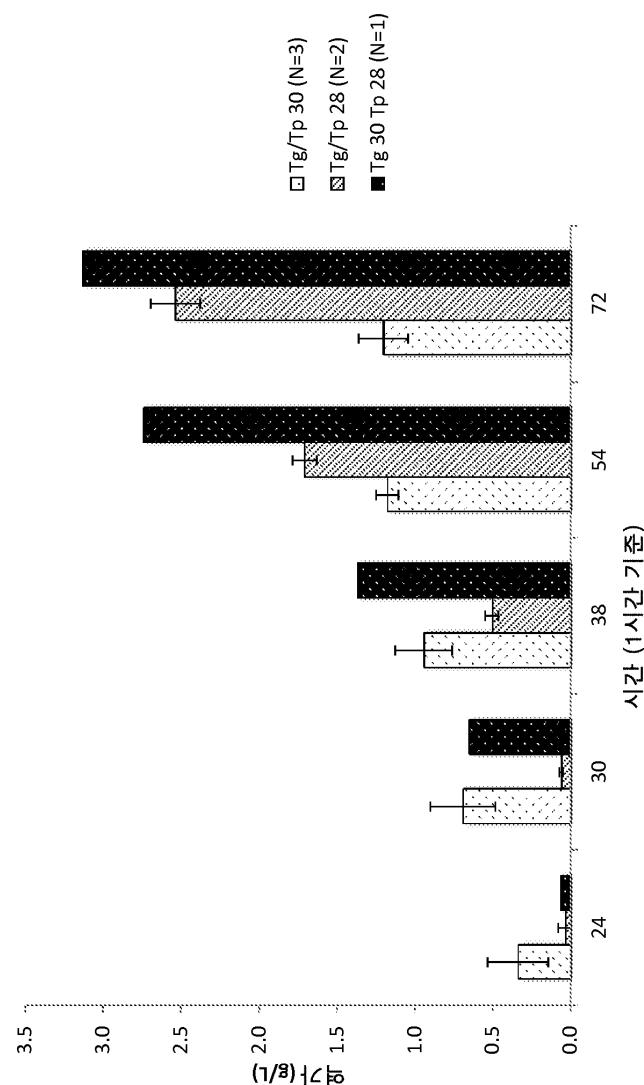
도면29



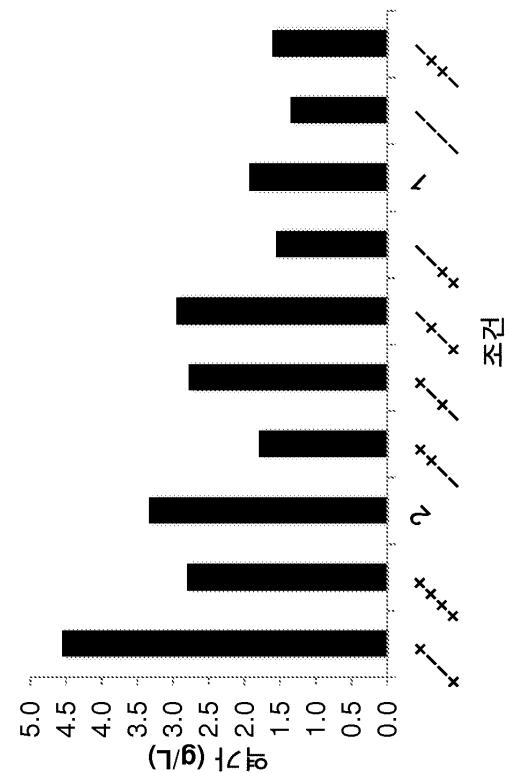
도면30



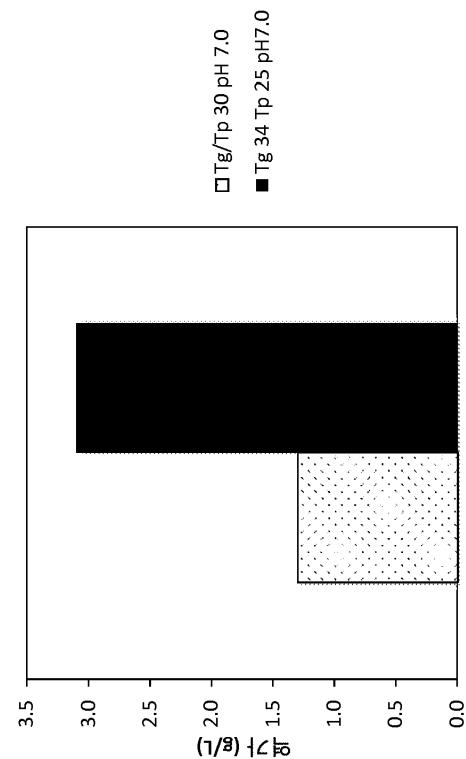
도면31



도면32

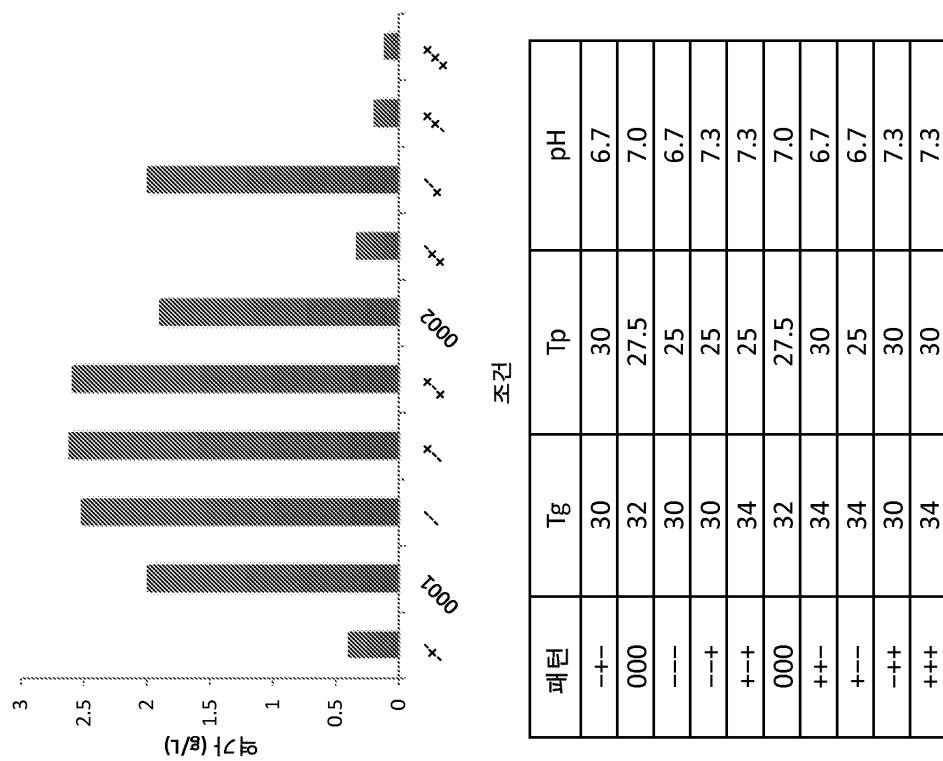


도면33

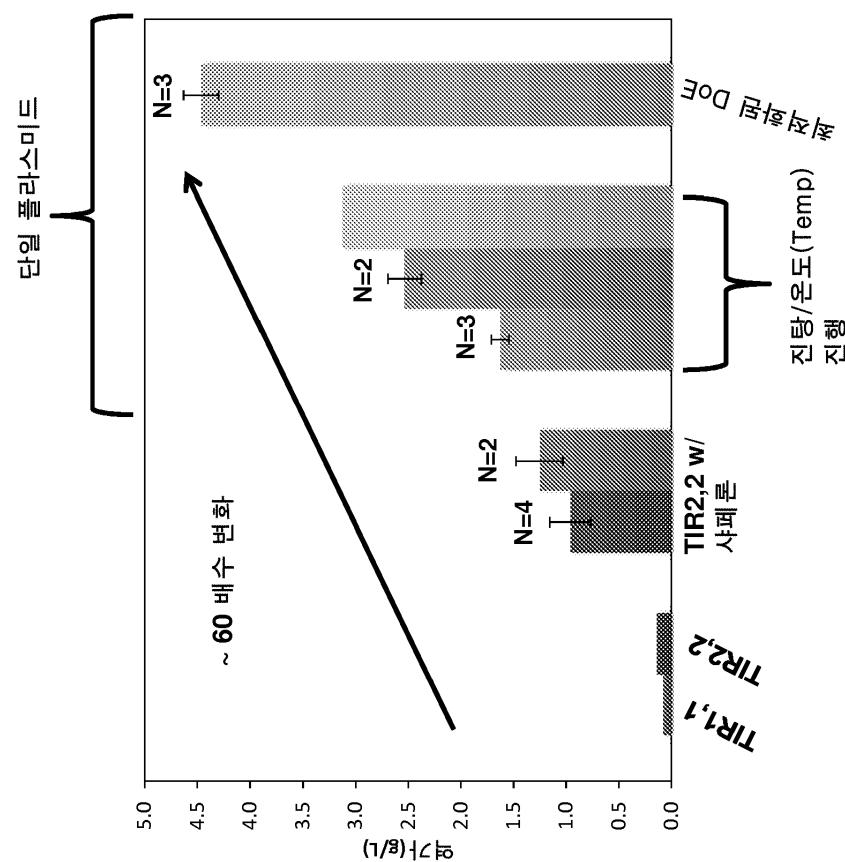


패턴	T_g	T_p	pH	Fkpa
-+--+	30	28	6.7	pho
0001	32	26.5	6.85	pho
----	30	25	6.7	tac
+--+ (dotted)	34	25	7	tac
+---+	34	25	6.7	pho
---++ (dotted)	30	25	7	pho
-++-	30	28	7	tac
++--	34	28	7	pho
+--+	34	28	6.7	tac
0002	32	26.5	6.85	pho

도면34



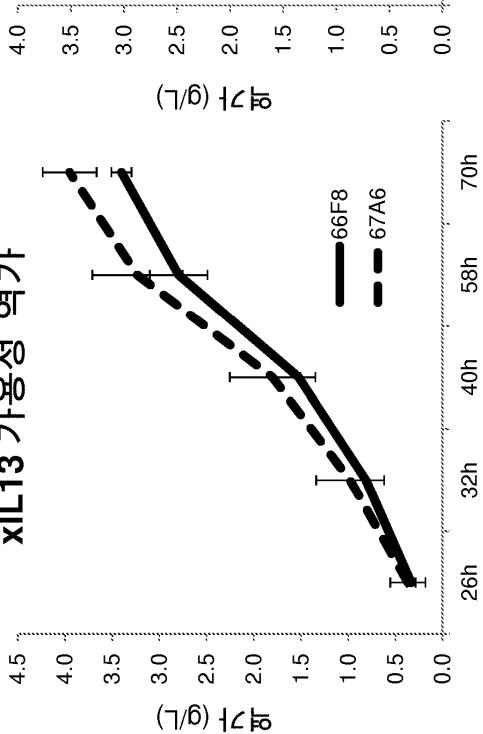
도면35



도면36

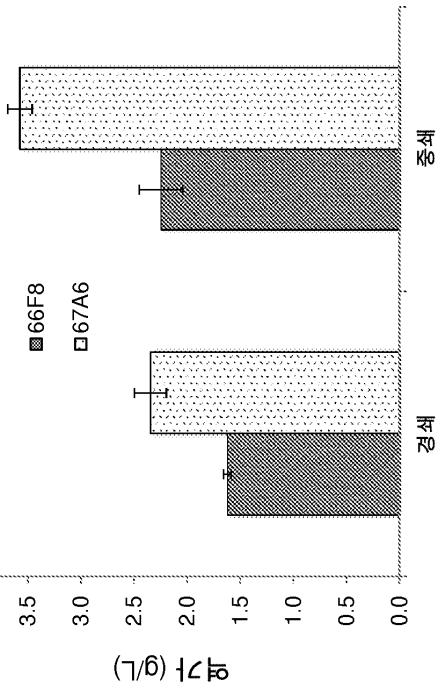
B

xII13 가용성 역가†



$$\begin{aligned} 66F8 &= \Delta \text{DegP} \\ 67A6 &= +\text{DegPS210A} \end{aligned}$$

xII13 총 역가† (72h에 서의)



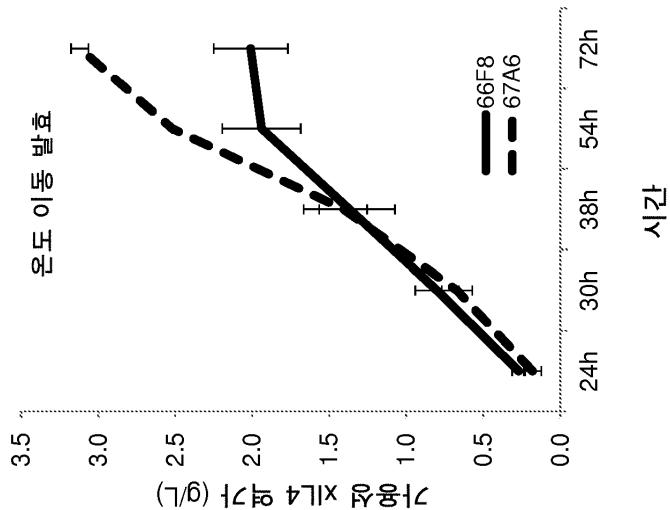
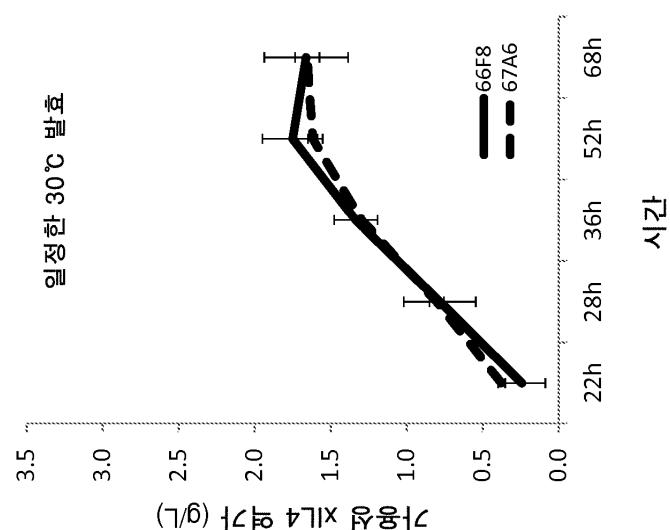
A

중쇄

경쇄

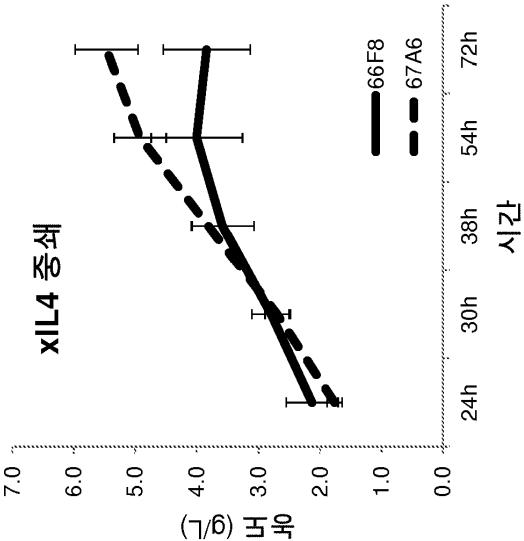
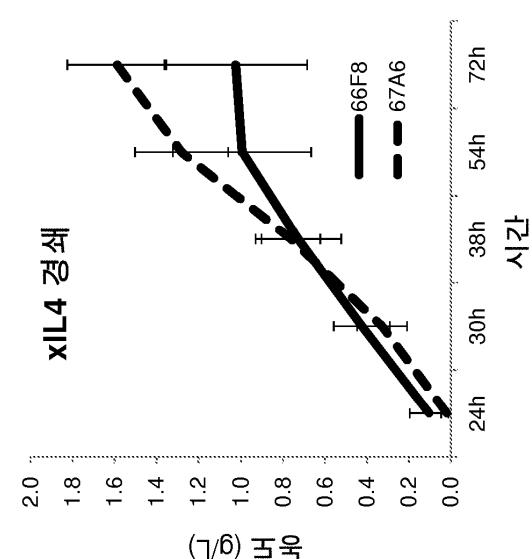
도면37

B

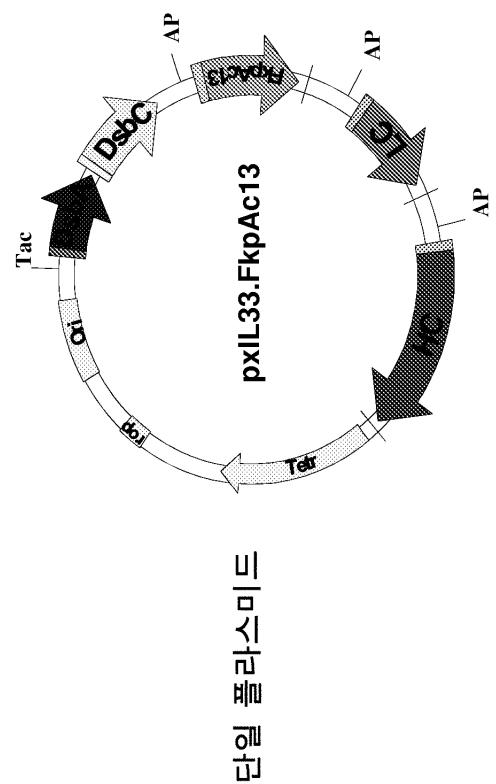


도면38

B

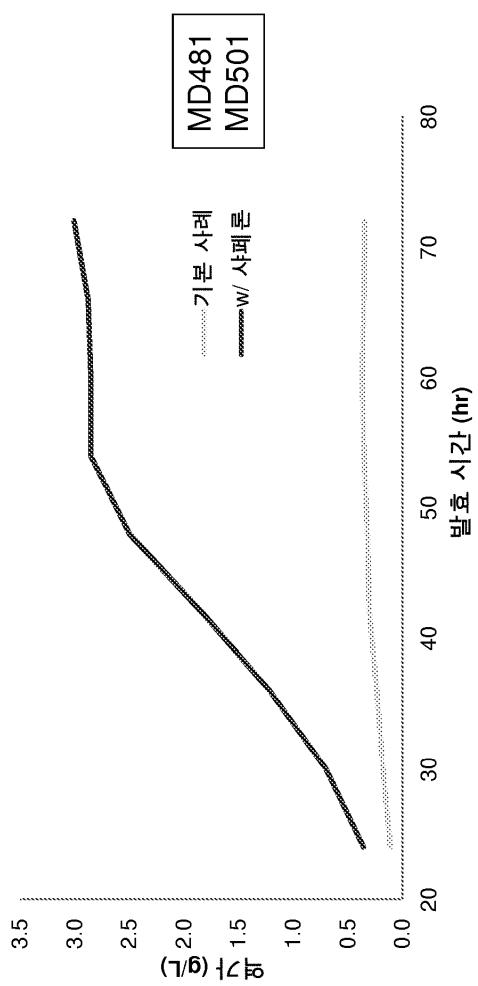


도면39

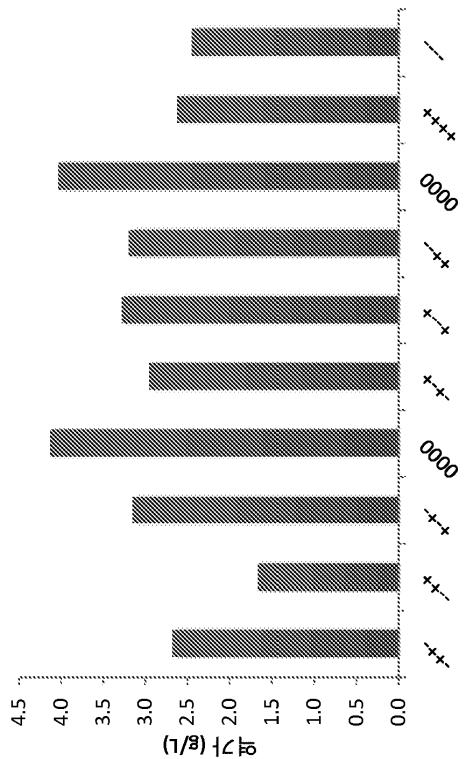


도면40

30°C, 650 rpm, 및 pH 7에서 수행된 발효



도면41



조건

폐탄	성장온도 (Tg)	생산온도 (Tp)	pH	포적 OUR
-+--+	34	30	6.7	1.9
--++-	30	30	6.7	2.8
+--+	30	30	7.3	1.9
0000	32	27.5	7.0	2.3
-+--+	34	25	6.7	2.8
+--+	30	25	7.3	2.8
++--+	34	25	7.3	1.9
0000	32	27.5	7.0	2.3
+4++	34	30	7.3	2.8
----	30	25	6.7	1.9

도면42

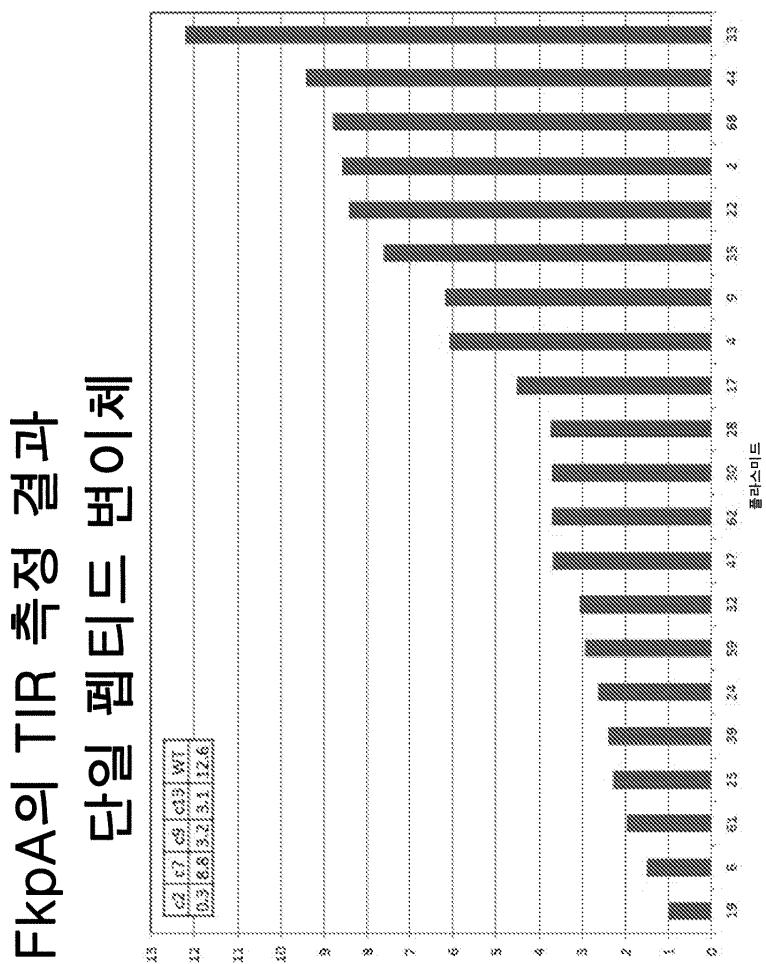
FlpA 단일 펩티드 변이체의 서열

GAATTCCTT GTCCTCTT AACGTTACCC TGTGGGAAAC CAAATGCCG CTCGGCGC ATGGCCAT CACTTTCCT
CTTAACTT CACCCCAA TTTCAGCCG ACCACCTGC GCGTACCGG CAAACGAG TACCTGCTA CGCAAAACCA
K K S L P K V T L K A T T N A V A L H A P Y T Y A
~FlpA SP (C13)

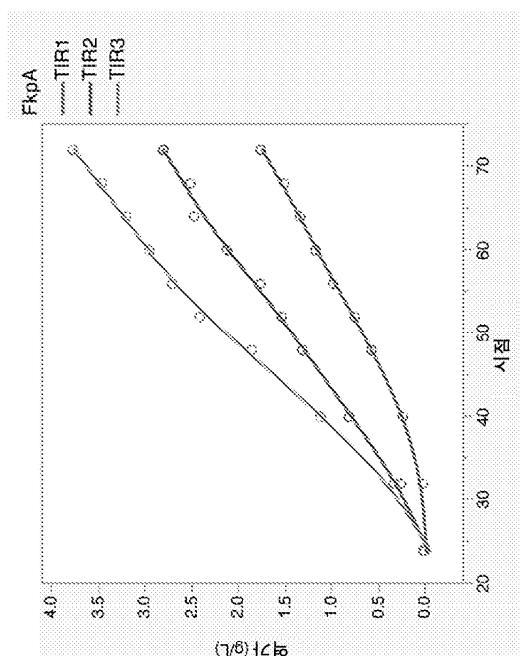
 GAATTCCTT GTCCTCTT AACGTTACCC TGTGGGAAAC CAAATGCCG CTCGGCGC ATGGCCAT CACTTTCCT
CTTAACTT CACCCCAA TTTCAGCCG ACCACCTGC GCGTACCGG CAAACGAG TACCTGCTA CGCAAAACCA
K K S L P K V T L K A T T N A V A L H A P Y T Y A
~FlpA SP (Y13)

 GAATTCCTT GTCCTCTT AACGTTACCC TGTGGGAAAC CAAATGCCG CTCGGCGC ATGGCCAT CACTTTCCT
CTTAACTT CACCCCAA TTTCAGCCG ACCACCTGC GCGTACCGG CAAACGAG TACCTGCTA CGCAAAACCA
K K S L P K V T L K A T T N A V A L H A P Y T Y A
~FlpA SP (T12)

도면43

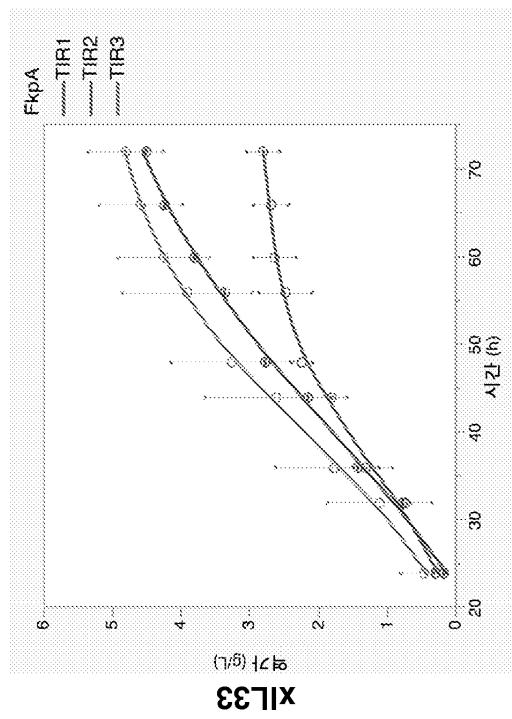


도면44



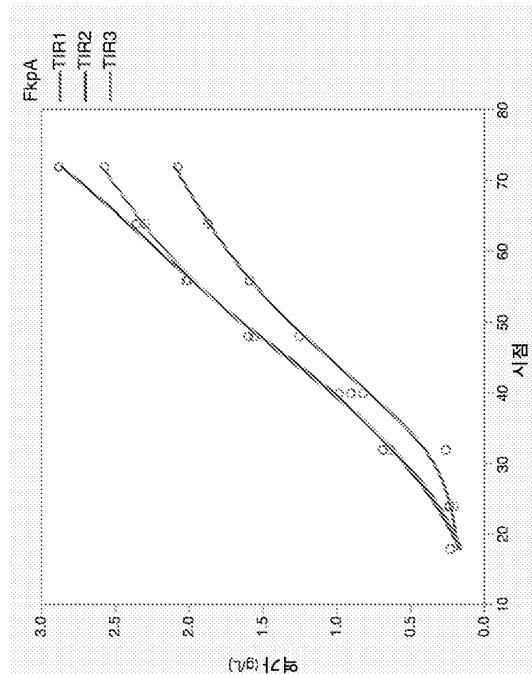
XIL13

도면45



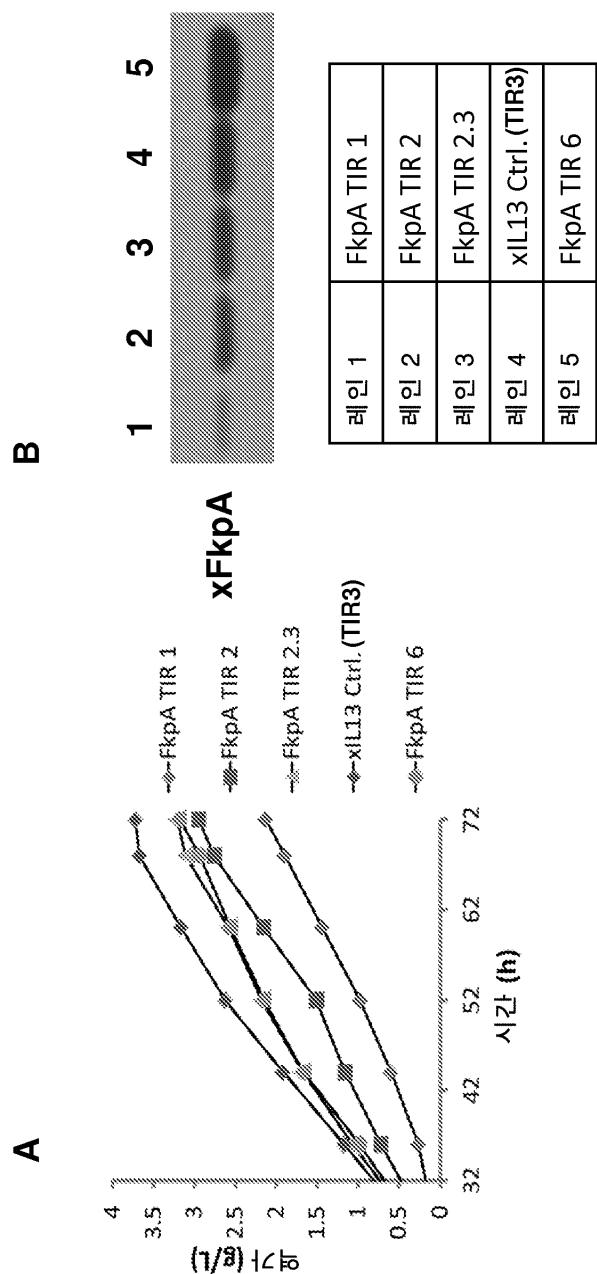
XIL33

도면46

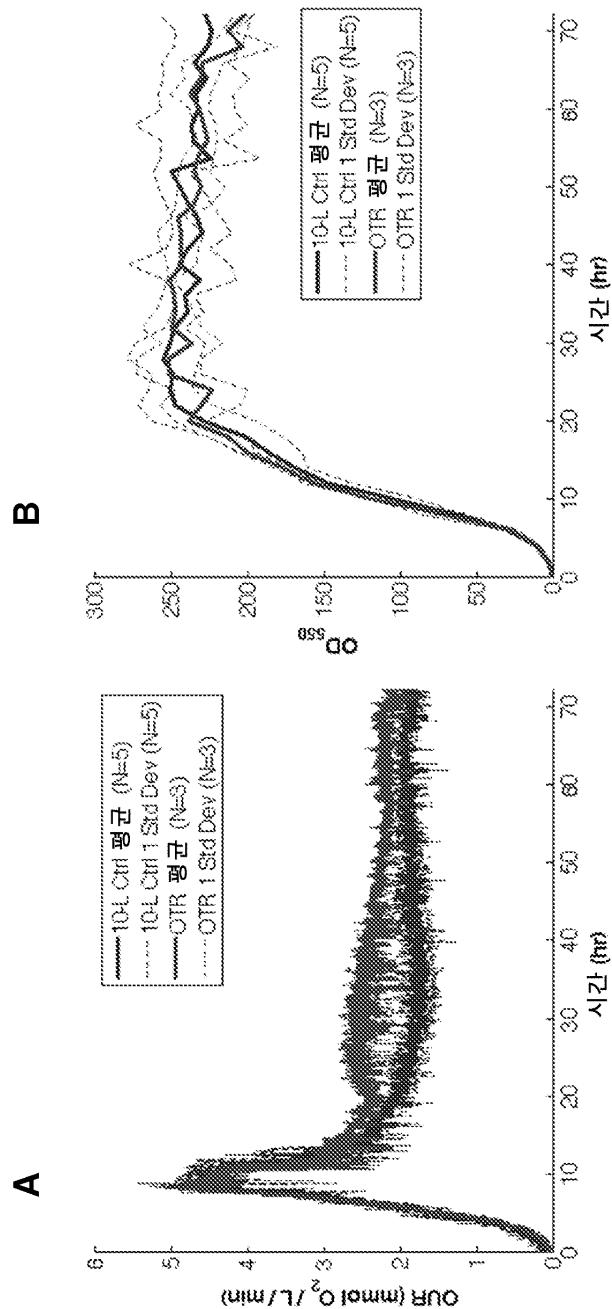


XIL17

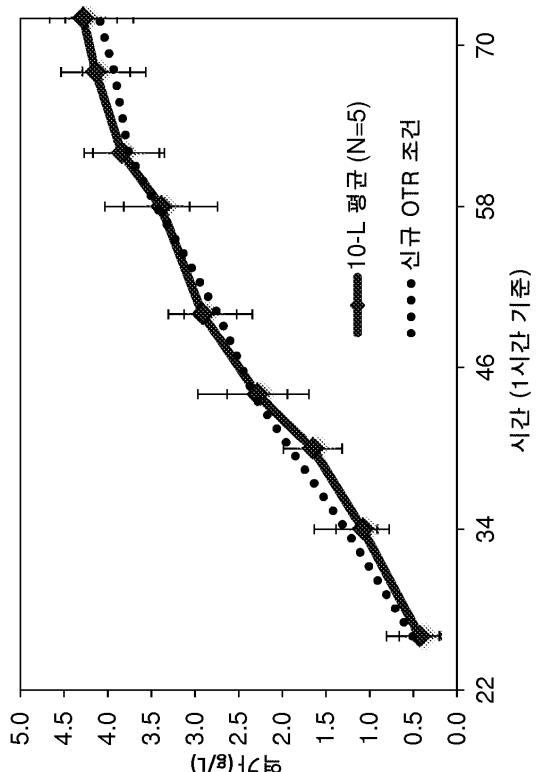
도면47



도면48



도면49



서 열 목 록

- <110> Genentech, Inc.
 GIULIANOTTI, James
 REILLY, Dorothea
- <120> METHODS OF PRODUCING TWO CHAIN PROTEINS IN BACTERIA
- <130> 146392024040
- <150> US 62/207,882
- <151> 2015-08-20
- <150> US 62/075,792
- <151> 2014-11-05
- <160> 45
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 132
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic Construct
- <400> 1
- Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly

1 5 10 15

Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu

20 25 30

Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys

35 40 45

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys

50 55 60

Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu

65 70 75 80

Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala

85 90 95

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala

100 105 110

Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu

115 120 125

Gly Arg Phe Asn

130

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu

1 5 10 15

Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly

20 25 30

Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala

35 40 45

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

50 55 60

Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln

65 70 75 80

Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe

85 90 95

Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg

100 105 110

Phe Asn

<210> 3

<211> 155

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn

35 40 45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser

50 55 60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu

65 70 75 80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His

85 90 95

Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser

100 105 110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His

115 120 125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys

130 135 140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala

145 150 155

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys

1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
20 25 30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser

50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
115 120 125

His His Val Ala

130

<210> 5
<211> 163
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 5

Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu

1	5	10	15
Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys			
20	25	30	
Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro			
35	40	45	
Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu			
50	55	60	
Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser			
65	70	75	80
Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu			
85	90	95	
Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly			
100	105	110	
Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu			
115	120	125	
Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu			
130	135	140	
Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His			
145	150	155	160
His Val Gln			
<210>	6		
<211>	133		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic Construct		
<400>	6		
Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser			
1	5	10	15
Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile			
20	25	30	
Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser			

35	40	45
Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro		
50	55	60
Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala		
65	70	75
Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu		
85	90	95
Thr Leu Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln		
100	105	110
Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val		
115	120	125
Ile His His Val Gln		
130		
<210>	7	
<211>	118	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	7	
Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln		
1	5	10
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr		
20	25	30
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu		
35	40	45
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu		
65	70	75
Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser		
80		
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95

	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	8		
<211>	112		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic Construct		
<400>	8		

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn			
	85	90	95

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

	100	105	110
--	-----	-----	-----

<210>	9
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	Synthetic Construct
<400>	9

Ala Tyr Ser Val Asn

1	5
<210>	10
<211>	16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn

1 5 10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr

1 5

<210> 15

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415

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

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435 440

<210> 16

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 17

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

210 215
 <210> 18
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Ser Ser Gly Gly Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ile Gly Gly Phe Gly Glu Phe Tyr Trp Asn Phe Gly Leu
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 19
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Ala Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

Gly Ile Asn Trp Ser Ser Gly Gly Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 22

Asp Ile Gly Gly Phe Glu Phe Tyr Trp Asn Phe Gly Leu

1	5	10
<210>	23	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	23	

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala

1	5	10
<210>	24	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	24	

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1	5	
<210>	25	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Construct	
<400>	25	

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala Thr

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

<210> 26
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ile Gly Gly Phe Gly Glu Phe Tyr Trp Asn Phe Gly Leu
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165 170 175

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

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

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

<210> 27

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

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

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

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Ser Gly Ile Asn Trp Ser Ser Gly Gly Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Asp Ile Gly Gly Phe Gly Glu Phe Tyr Trp Asn Phe Gly Leu

100	105	110
-----	-----	-----

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165	170	175
-----	-----	-----

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

180	185	190
-----	-----	-----

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

195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys

210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

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

435

440

445

Gly Lys

450

<210> 28

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

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

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

	180	185	190													
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
	195	200		205												
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210		215													
<210>	29															
<211>	354															
<212>	DNA															
<213>	Artificial Sequence															
<220>																
223>	Synthetic Construct															
<400>	29															
gaagttaccc	tgcgcgagag	cggcccagcc	ctggtaagc	caaccagac	cctgaccctg											60
acctgcaccc	tcagcggtt	cagcctgagc	gcctacagcg	tgaactggat	ccggcagcca											120
ccaggcaagg	ccctggagtg	gctggccatg	atctggggcg	acggcaagat	cgtgtacaac											180
agcgcctgta	agagccgcct	gaccatcagc	aaggacacca	gcaagaacca	ggtggtgctg											240
accatgacca	acatggaccc	agtggacacc	gccacctact	actgcgcgg	cgacggctac											300
taccatacgt	ccatggacaa	ctggggccag	ggcagcctgg	tgaccgtgag	cagc											354
<210>	30															
<211>	333															
<212>	DNA															
<213>	Artificial Sequence															
<220><223>	Synthetic Construct															
<400>	30															
gatatcgtgc	tgacccagag	cccagacagc	ctgtctgtga	gcctgggcga	gcgcgccacc											60
atcaactgcc	gcccagcaa	aagcgtggac	agctacggca	acagcttcat	gcactggtat											120
cagcagaagc	caggccagcc	acccaagctg	ctgatctacc	tggccagcaa	cctggagagc											180
ggcgtgccag	accgcttcag	cggcagcggc	agcggcaccc	acttcaccct	gaccatcagc											240
tctctgcagg	ccgaggatgt	ggccgtgtac	tactgccagc	agaacaacga	ggacccacgc											300
accttcggtg	gccccatcaa	ggggagatc	aaa													333
<210>	31															
<211>	1332															
<212>	DNA															

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

gaagttaacc	tgcgcgagag	cggcccagcc	ctggigaagc	caacccagac	cctgacccttg	60
acctgcaccc	tcagcggtt	cagcctgagc	gcctacagcg	tgaactggat	ccgcccagcca	120
ccaggcaagg	ccctggagtg	gctggccatg	atctggggcg	acggcaagat	cgttacaac	180
agcgcctga	agagccgcct	gaccatcagc	aaggacacca	gcaagaacca	ggtggtgctg	240

accatgacca	acatggaccc	agtggacacc	gccaccta	actgcgcgg	cgacggctac	300
taccatc	ccatggacaa	ctggggccag	ggcagctgg	tgaccgttag	cagcgcttcc	360
accaaggggcc	catcggttt	ccccctggca	ccctgtccc	gcagtacttc	tgagtccaca	420
gcggccctgg	gtgccttgtt	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggt	gtcggtggaa	480
tcaggcgccc	tgaccagcg	cgtgcacacc	ttcccggtg	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgttgtt	gactgtgccc	tctagcagct	tgggcaccaa	gacctacacg	600
tgcaacgtgg	atcacaagcc	cagcaacacc	aagggtggaca	aacgcgttga	gtccaaatat	660

ggtccccat	gccaccatg	cccagcacct	gagttcctgg	ggggaccatc	agtttcttg	720
ttcccccaa	aaccaagga	cactctcatg	atctcccgga	cccctgaggt	cacgtgcgtg	780
gtggtgacg	tgagccagga	agaccccgag	gtccagttca	actggtagt	ggatggcgtg	840
gaggtgcata	atgcaagac	aaagccgcgg	gaggagcgt	tcaacagcac	gtaccgtgtg	900
gtcagcgcc	tcaccgtct	gcaccaggac	tggctgaacg	gcaaggagta	caagtgcag	960
gtctccaaca	aaggcctccc	gtcctccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	1020
ccccgagac	cacaggtgta	caccctgccc	ccatcccagg	aggagatgac	caagaaccag	1080

gtcagcctgt	ggtgcccttgtt	caaaggcttc	tacccagcg	acatgcgcgt	ggagtggag	1140
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgcgtga	ctccgacggc	1200
tccttctcc	tctacagcag	gctaaccgtg	gacaagagca	ggtggcagga	ggggaatgtc	1260
ttctcatgt	ccgtgtatgca	tgaggctctg	cacaaccact	acacacagaa	gagcctctcc	1320
ctgtctctgg	gt					1332

<210> 32

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

gaagttaccc	tgcgcgagag	cggcccagcc	ctggtaagc	caacccagac	cctgaccctg	60
acctgcaccc	tcagcggtt	cagcctgagc	gcctacagcg	tgaactggat	ccgcccagcca	120
ccaggcaagg	ccctggagtg	gctggccatg	atctggggcg	acggcaagat	cgttacaac	180
agcgcctgta	agagccgcct	gaccatcagc	aaggacacca	gcaagaacca	ggtggtgctg	240
accatgacca	acatggaccc	agtggacacc	gccacctact	actgcgcgg	cgacggctac	300
taccatacg	ccatggacaa	ctggggccag	ggcagcctgg	tgaccgttag	cagcgcttcc	360
accaagggcc	catcggttt	ccccctggca	ccctgtccc	gcagtacttc	tgagtccaca	420
gcggccctgg	gctgcctggt	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacgg	gtcggtggAAC	480
tcaggcgccc	tgaccagcg	cgtgcacacc	ttcccggtg	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgtggt	gactgtgcc	tctagcagct	tggcaccaa	gacctacacg	600
tgcaacgtgg	atacaagcc	cagcaacacc	aaggfgaca	aacgcgttga	gtccaaatat	660
ggtccccat	gcccaccatg	cccagcacct	gagttcctgg	ggggaccatc	agtcttcctg	720
ttcccccaa	aacccaagga	cactctatg	atctccgga	cccctgaggt	cacgtgcgtg	780
gtggtgacg	tgagccagga	agaccccgag	gtccagttca	actggtatgt	ggatggcgtg	840
gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	tcaacagcac	gtaccgtgtg	900
gtcagcgtd	tcacccgtct	gcaccaggac	tggctgaacg	gcaaggagta	caagtgcag	960
gtctccaaaca	aaggcctccc	gtcctccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	1020
ccccgagac	cacaggtgta	caccctgccc	ccatcccagg	aggagatgac	caagaaccag	1080
gtcagcctgt	ggtgcctggt	caaaggcttc	tacccagcg	acatgcgcgt	ggagtggag	1140
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgttgg	ctccgacggc	1200
tccttcttcc	tctacagcag	gctaaccgtg	gacaagagca	ggtggcagga	ggggaatgtc	1260
ttctcatgct	ccgtgtatgca	tgaggctctg	cacaaccact	acacacagaa	gagcctctcc	1320
ctgtctctgg	gtaaataa					1338
<210>	33					
<211>	657					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Construct					
<400>	33					
gatatcggtc	tgacccagag	cccagacagc	ctgtctgtg	gcctggcg	gcccaccc	60

atcaactgcc	gcccagcaa	aagcgtggac	agctacggca	acagcttcat	gcactggtat	120
cagcagaagc	caggccagcc	acccaagctg	ctgatctacc	tggccagcaa	cctggagagc	180
ggcgtgccag	accgcttcag	cgccagcggc	agcggcaccg	acttcacct	gaccatcagc	240
tctctgcagg	ccgaggatgt	ggccgtgtac	tactgcagc	agaacaacga	ggaccacgc	300
accttcggtg	gccccatcaa	ggtggagatc	aaacgaactg	tggctgcacc	atctgtttc	360
atcttccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaactg	cttctgttgt	gtgcctgctg	420
aataacttct	atccccgtga	ggccaaagta	cagtggagg	tggataacgc	cctccaatcg	480
gttaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	540
agcacccctga	cgtcgagcaa	agcagactac	gagaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	600
acccatcagg	gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagttca	acaggggaga	gtgttaa	657
<210>	34					
<211>	369					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Construct					
<400>	34					
gaagtgcagc	tggtgagtc	tgggggaggc	ttggtagcagc	ctggcaggc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cacctttat	gattatgcca	tgcactgggt	ccggcaagct	120
ccagggagg	gccctggagg	gtctcaggt	attaatttga	gcagtgggt	cataggctat	180
gcggactctg	tgaaggccg	attaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctccctgtat	240
ctgcaaatga	acagtctgag	agctgaggac	acggccttgt	attactgtgc	aagagatatc	300
ggggggttcg	gggagttta	ctggaacttc	ggtctctgg	gccgtggcac	cctggtcact	360
gtctcctca						369
<210>	35					
<211>	324					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Construct					
<400>	35					
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgttttgt	ctccagggg	aagagccacc	60
ctctcctgca	ggccagtc	gagtgttaga	agctacttag	cctggtagca	acagaaacct	120

ggccaggcgc	ccaggctct	catctatgt	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	180
aggttcagt	gcagtggc	tggcacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	240
gaagatttg	cagtttata	ctgtcagcag	cgttagcaact	ggcctccggc	cacttcggc	300
ggagggacca	aggtggagat	caaa				324
<210>	36					
<211>	1347					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	Synthetic Construct					
<400>	36					
gaagtgcage	tggtgagtc	tggggaggc	ttggtagc	ctggcaggc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttgat	gattatgcca	tgcactgggt	ccggcaagct	120
ccagggaaagg	gcctggagtg	ggtctcagg	attaatttga	gcagtggtg	cataggctat	180
gccccactcg	tgaaggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctccctgtat	240
ctgcaaatga	acagtctgag	agctgaggac	acggccttgt	attactgtgc	aagagatatc	300
ggggggttcg	gggagttta	ctggaaacttc	ggtctctgg	gccgtggcac	cctggtaact	360
gtctcctcag	cctccaccaa	ggcccatcg	gtttcccc	tggcaccc	ctccgcagt	420
acttctgagt	ccacagccgc	cctggctgc	ctggtaagg	actactccc	cgaaccggtg	480
acggtgtcgt	ggaactcagg	cgccctgacc	agccgcgtgc	acaccttccc	ggctgtcc	540
cagtcctcag	gactctactc	cctcagcagc	gtggtgactg	tgcctctag	cagcttggc	600
accaagac	acacgtgca	cgtggatcac	aagcccagca	acaccaagg	ggacaaacgc	660
gttgagtc	aatatggcc	ccatgccc	ccatgccc	cacctgagtt	cctggggg	720
ccatcagtc	tcctgttccc	cccaaaa	aaggacactc	tcatgatc	ccggaccc	780
gaggtcacgt	gcgtgggt	ggacgtgagc	caggaagacc	ccgagg	tcaactgg	840
tacgtggatg	gcgtggaggt	gcataatgc	aagacaa	cgccgg	gagga	900
agcacgtacc	gtgtggtc	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactgg	gaa	960
gagtacaagt	gcaagg	tctc	caacaaaggc	ctccgt	ccatcg	1020
aaagccaaag	ggcagcccc	agagccac	gtgtacaccc	tgc	ccaggagg	1080
atgaccaaga	accagg	tcag	cctgag	gtc	tcaac	1140
ccgtggagt	gggagagcaa	tggcagccg	gagaaca	acta	agaccac	1200
ctggactccg	acggctc	ttc	ctcg	agcagg	taa	1260

caggagggga atgtttctc atgctccgtg atgcattgagg ctctgcacaa ccactacaca	1320
cagaagagcc tctccctgtc tctgggt	1347
<210> 37	
<211> 1353	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 37	
gaagtgcagc tggtgagtc tgggggaggg ttggtaacagc ctggcagggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt gattatgccca tgcactgggt ccggcaagct	120
ccagggagg gcctggagtg ggtctcaggat attaatttggaa gcagtgggtt cataggctat	180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat	240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgtt attactgtgc aagagatatac	300
ggggggttcg gggagttta ctgaaacttc ggtctctggg gccgtggcac cctggtaact	360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtctcccccc tggcacccctg ctcccgact	420
acttctgagt ccacagccgc cttggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg	480
acgggtcggt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acacccccc ggctgtctta	540
cagtcctcag gactctactc ctcagcagc gtggtgactg tgccctctag cagcttggc	600
accaagacct acacgtgcaa cgtggatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaaacgc	660
gtttagtcca aatatggtcc cccatgcccac ccatgcccag cacctgagtt cctgggggaa	720
ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccct	780
gaggtcacgt gcgtgggtgtt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg	840
tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcaggtaac	900
agcacgttacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag	960
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaaggc ctccctcctt ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccattt ccaggaggag	1080
atgaccaaga accaggtcag cctgagctgc gctgtcaaag gcttctaccc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgt	1200
ctggactccg acggctcctt cttcctcggtt agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtgg	1260
caggagggga atgtttctc atgctccgtg atgcattgagg ctctgcacaa ccactacaca	1320
cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa taa	1353

<210> 38
<211> 648
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 38

gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtttgt ctccaggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggcagtca gagtgtaga agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgt gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcaactcta ccatcagcag cctagagcct	240
gaagatttg cagttatta ctgtcageag cgtagcaact ggctccgac cacttcggc	300
ggagggacca agtgtggat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catttcccg	360
ccatctgatg accagttgaa atctgaaact gcttctgtg tgtgcctgct gaataacttc	420

tatccccgtg aggccaaagt acagtggaaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtgc tacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttaa	648

<210> 39
<211> 1347
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 39

gaagttcagc tggttgaag cggtggtgt ctggttcagc ctggtcgttag cctgcgtctg	60
--	----

agctgtgcag caagcggtt tacttttagt gattatgcca tgcattgggt tcgtcaggca	120
ccgggtaaag gtctggaatg ggttagcggt attaattgga gcagcggtgg tattggttat	180
gcagatagcg ttaaaggctcg ttttaccatt agccgtgata atgcaaaaaa tagcctgtac	240
ctgcagatga atagtctgcg tgcagaagat accgcactgt attattgtgc acgtgatatt	300
ggtgttttg gcgaattcta ttgaaattt ggtctgtgg gtcgtggcac cctggttacc	360
gttagcagcg cctccaccaa gggcccatcg gtctcccc tggcacccctg ctcccgagt	420
acttctgagt ccacagcgcc cctggcgtgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg	480

acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	540
cagtcctcag gactctactc cctcagcgc gtggtgactg tgccctctag cagcttggc	600
accaagacct acacgtcaa cgtggatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaaacgc	660
gtttagtcca aataatggtcc cccatgccc ccatgccag cacctgagtt cctggggga	720
ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccct	780
gaggtaacgt gcgtgggtt ggacgtgagc caggaagacc ccgagggtcca gttcaactgg	840
tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagc cgcgggagga gcagttcaac	900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag	960
gagtaacagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccgctt ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag	1080
atgaccaaga accaggttag cctgagctgc gctgtcaaag gttctaccc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg	1200
ctggactccg acggctcctt cttcctcgat agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtag	1260
caggagggaa atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca	1320
cagaagagcc tctccctgtc tctgggt	1347
<210> 40	
<211> 1353	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 40	
gaagttcagc tggttggaaag cggtgggtt ctggttcagc ctggcgttag cctgcgtcg	60
agctgtgcag caagcggtt tacctttagt gattatgcca tgcattgggt tcgtcaggca	120
ccgggtaaag gctggaaatg gtttagcggt attaatttggaa gcagcggtgg tattggttat	180
gcagatagcg ttaaaggctg tttaccatt agccgtgata atgccaaaaa tagcctgtac	240
ctgcagatga atagtctgctg tgcagaagat accgcactgt attattgtgc acgtgatatt	300
ggtgttttg gcaattcta ttggaaattt ggtctgtgg gtcgtggcac cctggttacc	360
gttagcagcg cctccaccaa gggcccatcg gtctcccc tggcacccctg ctcccgagt	420
acttctgagt ccacagcgcc cctggcgtgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg	480
acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	540
cagtcctcag gactctactc cctcagcgc gtggtgactg tgccctctag cagcttggc	600

accaagacct acacgtgcaa cgtggatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaaacgc 660

gtttagtcca aatatggtcc cccatgccca ccatgcccg cacctgagtt cctggggga 720

ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccct 780

gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 840

tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagc cgccggagga gcaggtaaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag 960

gagttacaagt gcaaggcttc caacaaaggc ctcccgctt ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccattt ccaggaggag 1080

atgaccaaga accaggtcag cctgagctgc gctgtcaaag gttctaccc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcggtt agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtgg 1260

caggagggga atgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 1320

cagaagagcc tctccctgtc tctggtaaa taa 1353

<210> 41

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

gaaatttgttc tgacccagag tccggcaacc ctgagcctga gtccgggtga acgtgccacc 60

ctgagctgtc gtgcagcca gagcggtcg agctatctgg catggatca gcagaaacccg 120

ggtcaggcac cgcgtctgct gatttatgt gcaagcaatc gtcaaccgg tattccggca 180

cgttttagcg gtacggtag tggcaccgtt ttacccttgc ccattagcag cctgaaaccg 240

gaagattttgc cagtgttata ttgtcagcag cgttagcaatt ggccaccggc aacctttgg 300

ggtgccacca aagttgaaat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catttcccg 360

ccatctgtatg agcagttgaa atctggaact gcttctgttgc tgcctgtctt gaataacttc 420

tatccccgtg aggccaaagt acagtggaaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtgc tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acageccatc cagcacccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600

ggcctgagct cgcgcgtcac aaagagcttc aacagggag agtgtttaa 648

<210> 42

<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 42
gaattatgaa gtcctgttt aaagtgacgc tgctggcgac cacaatggcc gttgccctgc 60
atgcaccaat cactttgct 80
<210> 43
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 43
gaattatgaa gtcgttattc aaagtgacgc tgctggcgac cacaatggcc gttgccctgc 60
atgcaccaat cactttgct 80
<210> 44
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 44
gaattatgaa gtcgtgttt aaagttacgc tgctggcgac cacaatggcc gttgccctgc 60
atgcaccaat cactttgct 80
<210> 45
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 45
Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
1 5 10 15
Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala
20 25