



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0002713
(43) 공개일자 2016년01월08일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/04 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/241 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7025005</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년02월13일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년09월11일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/000692</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/125374
국제공개일자 2014년08월21일</p> <p>(30) 우선권주장
61/764,475 2013년02월13일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
라보라토이레 프란카이즈 듀 프락티온네먼트 에트 데스 바이오테크놀로지스
프랑스, 레스 올리스 에프-91940, 자 데 퀴타보에 프, 에비뉴 데스 트로피퀘스 3</p> <p>(72) 발명자
미드 해리 엠.
미국 02458 매사추세츠주 뉴턴 그래스미어 스트리트 62
첸 리하우
미국 01720 매사추세츠주 액턴 와우셋 드라이브 12</p> <p>(74) 대리인
김진희, 김태홍</p> |
|---|---|

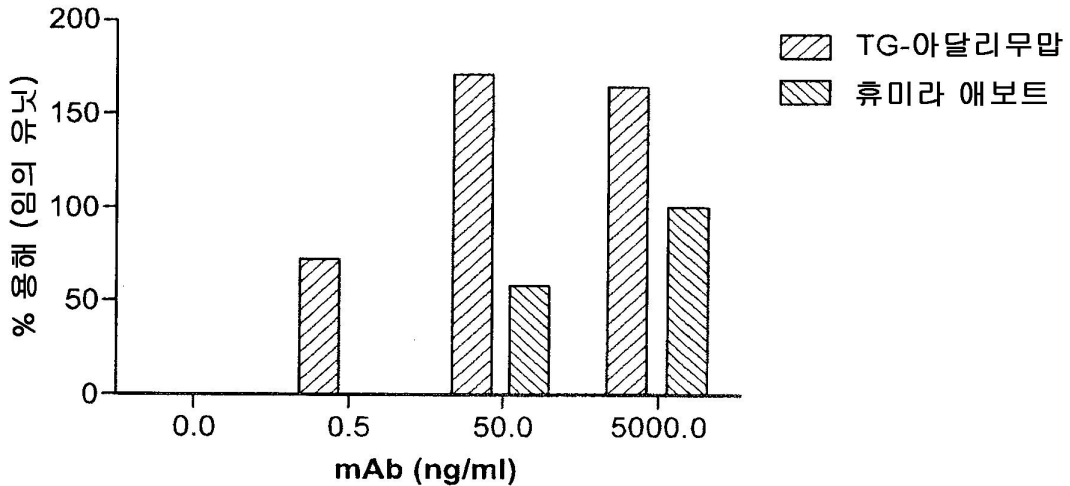
전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 **고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체 및 이의 용도**

(57) 요약

한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된(galactosylated) 항-TNF-알파 항체 및 이의 조성물에 관한 것이다. 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단 및 이의 조성물에 관한 것이다. 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체, 및 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙(adalimumab)이다.

대표도 - 도21



(52) CPC특허분류

C07K 16/04 (2013.01)

C07K 16/283 (2013.01)

C07K 2317/12 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/734 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

고도로 갈락토실화된(galactosylated) 항-TNF-알파 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 고도로 푸코실화된(fucosylated) 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 모노-갈락토실화된(mono-galactosylated) N-글리칸을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 바이-갈락토실화된(bi-galactosylated) N-글리칸을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 중쇄가 서열번호 1을 포함하고, 항체의 경쇄가 서열번호 2를 포함하는 것인 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 아달리무맙(adalimumab)인 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된 항체.

청구항 9

제8항 또는 제9항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마인 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소인 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체를 포함하고, 유즙(milk)을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 13

항체의 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준이 60% 이상인 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준이 70% 이상인 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준이 80% 이상인 조성물.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내의 항체의 푸코실화 수준이 50% 이상인 조성물.

청구항 17

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내의 항체의 푸코실화 수준이 60% 이상인 조성물.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 집단이 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 집단이 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준 대 집단 내의 항체의 푸코실화 수준의 비가 1.0 내지 1.4인 조성물.

청구항 21

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내의 항체의 35% 이상이 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하고, 집단 내의 항체의 25% 이상이 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 것인 조성물.

청구항 22

제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 중쇄가 서열번호 1을 포함하고, 항체의 경쇄가 서열번호 2를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제13항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 아달리무맙인 조성물.

청구항 24

제13항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 것인 조성물.

청구항 25

제13항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된 것인 조성물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소인 조성물.

청구항 28

제13항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 유즙을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 29

제13항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 집단이 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(Complement Dependent Cytotoxicity; CDC) 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 집단이 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된 것인 조성물.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 50% 이하인 조성물.

청구항 34

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 30% 이하인 조성물.

청구항 35

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 10% 이하인 조성물.

청구항 36

항체의 집단이 생성되도록 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 항체의 집단을 발현시키는 단계를 포함하는, 항체의 집단을 제조하는 방법으로서, 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준이 60% 이상인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 유선 상피 세포는 배양물에 존재하고 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산으로 형질감염된 것인 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 유선 상피 세포는, 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 유선에서 발현하도록 조작된 비인간 포유동물에 존재하는 것인 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 핵산이 서열번호 3 및 서열번호 4를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 유선 상피 세포가 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼,

버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마의 유선 상피 세포인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 유선 상피 세포가 염소의 유선 상피 세포인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항체 또는 제13항 내지 제35항 중 어느 한 항의 조성물의 항체의 집단을 생성하는 유선 상피 세포.

청구항 43

제42항의 유선 상피 세포를 포함하는 형질전환 비인간 포유동물.

청구항 44

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 제11항 내지 제35항 중 어느 한 항의 조성물을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 대상체가 염증 장애 또는 자가면역 장애를 갖는 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 염증 장애 또는 자가면역 장애가 류마티스성 관절염, 건선, 크론병, 소아 특발성 관절염, 강직성 척추염, 궤양성 대장염, 만성 염증, 간염, 베케트병(Behcet's disease), 베게너(Wegener) 육아종증 또는 사르코이드증인 방법.

청구항 47

Fc 글리코실화 부위(Asn297, EU 넘버링) 상에 글리칸 구조를 갖는 단일클론 항-TNF 항체를 포함하는 단일클론 항-TNF 항체 조성물로서, 상기 글리칸 구조는 60% 초과인 갈락토스 함량을 갖는 것인 단일클론 항-TNF 항체 조성물.

청구항 48

올리고만노스를 포함하는 항-TNF-알파 항체.

청구항 49

제48항에 있어서, 항체의 중쇄가 서열번호 1을 포함하고, 항체의 경쇄가 서열번호 2를 포함하는 것인 항체.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 아달리무맙인 항체.

청구항 51

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된 항체.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마인 항체.

청구항 54

제53항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소인 항체.

청구항 55

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항의 항체를 포함하고, 유즙을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 56

제48항 내지 제55항 중 어느 한 항의 항체를 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 57

항체의 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고 항체의 30% 이상이 하나 이상의 올리고만노스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서, 항체가 고만노스(high mannose) 글리코실화 패턴을 나타내는 것인 조성물.

청구항 59

제58항에 있어서, 유즙 유래의 항체의 하나 이상의 쇠가 올리고만노스를 포함하고 푸코실화되어 있지 않은 것인 조성물.

청구항 60

제57항에 있어서, 유즙 유래의 항체의 주요 탄수화물이 푸코실화되어 있지 않은 것인 조성물.

청구항 61

제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 중쇄가 서열번호 1을 포함하고, 항체의 경쇄가 서열번호 2를 포함하는 것인 조성물.

청구항 62

제57항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 아달리무맙인 조성물.

청구항 63

제57항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 것인 조성물.

청구항 64

제57항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된 것인 조성물.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마인 조성물.

청구항 66

제65항에 있어서, 비인간 포유동물이 염소인 조성물.

청구항 67

제57항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 유즙을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 68

제57항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 69

제63항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 집단이 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 70

제63항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 집단이 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단이 세포 배양으로 생성된 것인 조성물.

청구항 72

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고만노스가 Man5인 항체.

청구항 73

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고만노스가 Man6인 항체.

청구항 74

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고만노스가 Man7인 항체.

청구항 75

제57항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고만노스가 Man5인 조성물.

청구항 76

제57항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고만노스가 Man6인 조성물.

청구항 77

제57항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고만노스가 Man7인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본원은 2013년 2월 13일자로 출원된 미국 가출원 제61/764,475호(발명의 명칭: "Highly Galactosylated Anti-TNF- α Antibodies and Uses Thereof"; 이의 전체 개시내용은 전체로서 본원에 참고로 도입됨)의 이익을 미국 특허법 제119조 제(e)항(35 U.S.C. § 119(e)) 하에서 주장한다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 부분적으로 항-TNF-알파 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

TNF-알파는 정상 면역 반응에서 감염 및 손상에 대한 보호 역할을 수행하는 항염증성 사이토카인이다. 그러나, 만성적으로 상승된 수준의 TNF-알파는 많은 자가면역 및 염증 질환들의 발병과 관련되어 있다. 다수의 TNF-알파 결합 치료제들이 류마티스성 관절염, 건선, 크론병, 강직성 척추염 및 궤양성 대장염을 포함하는 자가면역 및 염증 질환의 치료를 위해 승인받았다. 사용 가능한 치료 TNF-알파 결합제는 항체, 예컨대, 인플릭시맵(infliximab)/레미케이드(Remicade)(센토코르(Centocor)) 마우스-인간 키메라 단일클론 항-TNF 항체, 아달리무맵(adalimumab)/휴미라(Humira)(애보트(Abbott)) 완전 인간 항-TNF 항체, 및 골리무맵(golimumab)/십포니

(Simponi)(센토코르) 완전 인간 항-TNF 항체를 포함한다. 항체에 기초한 치료 TNF-알파 결합체는 Ig1의 Fc 영역에 융합된 TNF 수용체의 세포외 도메인의 융합 단백질인 에타너셉트(Etanercept)/엔브렐(Enbrel)(암젠(Amgen)), 및 인간화된 단일클론 항-TNF 항체의 폐길화된(Pegylated) Fab' 단편인 서톨리주맙 페골(certolizumab pegol)/심지아(Cimzia)(유씨비(UCB))를 포함한다. 항체, 및 항체에 기초한 TNF-알파 결합체의 치료 효능은 표적화된 병리에 따라 달라진다. 또한, 대다수의 항-TNF-알파 치료제들이 원치않는 부작용을 보인다. 따라서, 개선된 치료 성질을 갖는 항-TNF-알파 항체가 요구된다.

발명의 내용

- [0006] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된(galactosylated) 항-TNF-알파 항체 및 이의 조성물에 관한 것이다. 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단 및 이의 조성물에 관한 것이다. 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체 및 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.
- [0007] 한 양태에서, 본 개시내용은 항-TNF-알파 항체를 제공하는데, 이때 상기 항체는 고도로 갈락토실화되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 고도로 푸코실화되어(fucosylated) 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 모노(mono)-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 바이(bi)-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 1을 포함하고, 상기 항체의 경쇄는 서열번호 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 아달리무맙이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소이다.
- [0008] 한 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 항체들 중 임의의 항체의 조성물을 제공하는데, 이때 상기 조성물은 유즙(milk)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0009] 한 양태에서, 본 개시내용은 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 60% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 80% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 푸코실화 수준은 50% 이상이다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 푸코실화 수준은 60% 이상이다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 집단은 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 집단은 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준 대 집단 내의 항체의 푸코실화 수준의 비는 1.0 내지 1.4이다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 35% 이상이 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하고, 집단 내의 항체의 25% 이상이 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 1을 포함하고, 상기 항체의 경쇄는 서열번호 2를 포함한다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 상기 항체는 아달리무맙이다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 상기 항체는 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 유즙을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0011] 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(Complement Dependent Cytotoxicity; CDC) 활성을 갖는다.
- [0012] 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) 활성을 갖는다.
- [0013] 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지

많은 항체의 집단에 비해 대상체에서 TNF-알파 활성을 억제하는 증가된 능력을 갖는다.

- [0014] 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 가용성 TNF-알파에 결합하는 증가된 능력을 갖는다.
- [0015] 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 막관통 TNF-알파에 결합하는 증가된 능력을 갖는다.
- [0016] 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다.
- [0017] 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 50% 이하이다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 30% 이하이다. 본원에서 제공된 조성물들 중 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 10% 이하이다.
- [0018] 한 양태에서, 본 개시내용은 항체의 집단이 생성되도록 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 항체의 집단을 발현시키는 단계를 포함하는, 항체의 집단을 제조하는 방법을 제공하는데, 이때 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 60% 이상이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 배양물에 존재하고, 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산으로 형질감염되어 있다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 그의 유선에서 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 발현하도록 조작된 비인간 포유동물에 존재한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 3 및 서열번호 4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마의 유선 상피 세포이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 염소의 유선 상피 세포이다.
- [0019] 한 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 항체들, 항체의 집단 또는 조성물들 중 임의의 항체, 항체의 집단 또는 조성물을 생성하는 유선 상피 세포를 제공한다.
- [0020] 한 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 유선 상피 세포들 중 임의의 유선 상피 세포를 포함하는 형질전환 비인간 포유동물을 제공한다.
- [0021] 한 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 항체들, 항체의 집단 또는 조성물들 중 임의의 항체, 항체의 집단 또는 조성물을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 염증 장애 또는 자가면역 장애를 갖는다. 일부 실시양태에서, 염증 장애 또는 자가면역 장애는 류마티스성 관절염, 건선, 크론병, 소아 특발성 관절염, 강직성 척추염, 궤양성 대장염, 만성 염증, 간염, 베체트병 (Behcet's disease), 베게너(Wegener) 육아종증 또는 사르코이드증이다.
- [0022] 한 양태에서, 본 개시내용은 Fc 글리코실화 부위(Asn297, EU 넘버링) 상에 글리칸 구조를 갖는 단일클론 항-TNF 항체를 포함하는 단일클론 항-TNF 항체 조성물을 제공하는데, 이때 상기 글리칸 구조는 60% 초과인 갈락토스 함량을 갖는다.
- [0023] 한 양태에서, 본 개시내용은 올리고만노스를 포함하는 항-TNF-알파 항체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 1을 포함하고, 상기 항체의 경쇄는 서열번호 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 아달리무맙이다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소이다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 올리고만노스를 포함하는 항-TNF-알파 항체는 유즙을 추가로 포함한다.
- [0026] 한 양태에서, 본 개시내용은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는, 올리고만노스를 포함하는 항-TNF-알파 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 한 양태에서, 본 개시내용은 항체의 집단을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 이때 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고, 30% 이상의 항체는 하나 이상의 올리고만노스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 고만노스 (high mannose) 글리코실화 패턴을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 유즙 유래의 항체의 하나 이상의 쇠는 올리고

만노스를 포함하고 푸코실화되어 있지 않다. 일부 실시양태에서, 유즙 유래의 항체의 주요 탄수화물은 푸코실화되어 있지 않다.

[0028] 일부 실시양태에서, 조성물 내의 항체의 중쇄는 서열번호 1을 포함하고, 상기 항체의 경쇄는 서열번호 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 아달리무맙이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소이다.

[0029] 일부 실시양태에서, 조성물은 유즙을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 조성물 내의 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖는다.

[0031] 일부 실시양태에서, 조성물 내의 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다.

[0032] 항체가 올리고만노스를 포함하는 일부 실시양태에서, 올리고만노스는 Man5이다. 항체가 올리고만노스를 포함하는 일부 실시양태에서, 올리고만노스는 Man6이다. 항체가 올리고만노스를 포함하는 일부 실시양태에서, 올리고만노스는 Man7이다. 조성물이 올리고만노스를 포함하는 항체를 포함하는 일부 실시양태에서, 올리고만노스는 Man5이다. 조성물이 올리고만노스를 포함하는 항체를 포함하는 일부 실시양태에서, 올리고만노스는 Man6이다. 조성물이 올리고만노스를 포함하는 항체를 포함하는 일부 실시양태에서, 올리고만노스는 Man7이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도면을 먼저 설명한다. 도면은 예시적인 것이며 본 발명의 실시가능성을 위해 요구되는 것은 아님을 이해해야 한다.

도 1은 염소 #1로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸의 대표적인 올리고사카라이드 시그너처(signature)를 보여준다.

도 2는 유즙분비(lactation) 7일째 날 염소 #1로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸의 올리고사카라이드 시그너처를 보여준다.

도 3은 유즙분비 17일째 날 염소 #1로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸의 올리고사카라이드 시그너처를 보여준다.

도 4는 유즙분비 32일째 날 염소 #1로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸의 올리고사카라이드 시그너처를 보여준다.

도 5는 유즙분비의 다양한 날 염소 #1로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸 올리고사카라이드의 백분율의 요약을 보여준다.

도 6은 호르몬 유도된 유즙분비 3일째 날 염소 #2로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸의 올리고사카라이드 시그너처를 보여준다.

도 7은 호르몬 유도된 유즙분비 11일째 날 염소 #2로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸의 올리고사카라이드 시그너처를 보여준다.

도 8은 호르몬 유도된 유즙분비 21일째 날 염소 #2로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸의 올리고사카라이드 시그너처를 보여준다.

도 9는 호르몬 유도된 유즙분비의 다양한 날 염소 #2로부터의 고도로 갈락토실화된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸 올리고사카라이드의 백분율의 요약을 보여준다.

도 10은 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체가 가용성 TNF-알파에 결합한다는 것을 보여준다.

도 11은 항-CD16 항체 3G8을 사용한 경쟁 분석에 의해 입증된 바와 같이 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체가 NK 세포 상에서 발현된 CD16에 결합한다는 것을 보여준다.

도 12는 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체가 가용성 TNF-알파 및 CD16 발현 주르카트(Jurkat) 세포 둘 다에 결합하는 반면, 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 아글리코실화된(aglycosylated) 버전은 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

도 13은 9마리의 상이한 염소 #1 내지 #9로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 집단에 존재하는 미세한 글리칸 형태의 요약을 보여준다.

도 14는 호르몬 유도된 유증분비 동안 염소 #10 및 염소 #1로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸 올리고사카라이드의 백분율의 요약을 보여준다.

도 15는 8마리의 상이한 염소(염소 #2 내지 #9)로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸 올리고사카라이드의 요약을 보여준다.

도 16은 막 TNF-알파로 형질감염된 주르카트 세포 클론 2B3에 대한 형질전환으로 생성된 아달리무맙("TG-아달리무맙") 및 휴미라 항체의 항원 인식을 보여준다. 제시된 결과는 MFI로서 표현되고 3회 실험의 평균으로부터 유도된다. 평균 +/- SEM.

도 17은 경쟁 분석에서 NK 세포에 의해 발현된 CD16에 대한 항-TNF-알파 항체의 결합을 보여준다. 관찰된 평균 형광 값(MFI)은 % 결합으로서 표현되고, 이때 100%는 시험된 항체의 부재 하에서 관찰된 최대 3G8 결합에 상응하는 임의(arbitrary) 값이고, 0%는 항체 3G8의 부재 하에서의 MFI에 상응한다. 3회 실험의 평균 +/- SEM.

도 18은 알렉사(Alexa) 488에 커플링된 리투시맙(Rituximab) 항체를 사용한 경쟁 분석에서 FcRn으로 형질감염된 주르카트 세포에 의해 발현된 FcRn에 대한 항-TNF-알파 항체의 결합을 보여준다. 관찰된 평균 형광 값(MFI)은 시험된 항체 농도의 함수로서 % 결합으로서 표현된다(100%는 최대 리투시맙-A488 결합 단독에 상응하는 임의 값이다).

도 19는 막 TNF-알파로 형질감염된 주르카트 세포 클론 2B3에 대한 항-TNF-알파 항체의 CDC 활성을 보여준다(4회 분석의 평균). 결과는 항체 농도의 함수로서 mbTNF-알파 주르카트 세포의 % 용해로서 표현된다. 평균 +/- SEM.

도 20은 항-TNF-알파 항체에 의한 L929 세포에서의 TNF-알파 매개 세포독성의 중화를 보여준다. 결과는 항체 농도의 함수로서 % 중화로서 표현된다. 4회 분석의 평균 +/- SEM.

도 21은 형질전환으로 생성된 아달리무맙에 의해 매개된 % 용해(임의 유닛)를 휴미라와 비교하여 보여준다.

도 22는 9마리의 상이한 염소들로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 CD16 결합 활성을 휴미라와 비교하여 보여주는 억제 곡선을 제시한다.

도 23은 NK 세포를 사용한 경쟁 분석에 의해 평가되었을 때 9마리의 상이한 염소들로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙 및 휴미라의 CD16 결합 활성과 관련된 IC₅₀ 값을 제시한다.

도 24는 9마리의 상이한 염소들로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 CDC 활성을 휴미라와 비교하여 보여준다.

도 25는 9마리의 상이한 염소들로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 CDC 활성과 관련된 EC₅₀ 값(ng/ml)을 휴미라와 비교하여 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체를 제공한다. 항-TNF-알파 항체는 TNF-알파에 결합하고 TNF-알파의 조절이상을 특징으로 하는, 염증 장애를 포함하는 다양한 질환들에서 치료제로서 사용되고 있다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 인플릭시맙/레미케이드(센토코르), 아달리무맙/휴미라(에보트), 또는 골리무맙/심포니(센토코르)이다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙이다.

[0035]

일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 서열번호 2를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1을 포함하는 중쇄 및 서열번호 2를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1로 구성된 중쇄를 포함한다.

일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 서열번호 2로 구성된 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1로 구성된 중쇄 및 서열번호 2로 구성된 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙이다.

[0036] 아달리무맙의 중쇄는 서열번호 1에 제공되어 있다:

```
MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA
MHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVETRFTISRDNKNSLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0037]

[0038] 아달리무맙의 경쇄는 서열번호 2에 제공되어 있다:

```
MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLA
WYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYN
RAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC
```

[0039]

[0040] 상기 서열들은 미국 특허 제6,090,382호에 공개된 아달리무맙의 서열에 기초한다. 일부 실시양태에서, 아달리무맙의 서열은 미국 특허 제6,090,382호에 공개된 서열이다.

[0041] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 아달리무맙의 서열에 기초하지만 생체이용가능성, 안정성 등과 관련된 추가 유리한 원하는 성질을 갖는 항체를 제공하는 돌연변이를 포함하는 항체도 포함한다는 것도 인식해야 한다.

[0042] 한 양태에서, 본 개시내용은 소염 치료에 사용될 수 있는 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 인플릭시맙/레미케이드(센토코르), 아달리무맙/휴미라(에보트), 또는 콜리무맙/심포니(센토코르)이다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙이다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 염증 장애의 치료 및 자가면역 질환의 치료에 사용될 수 있다. 본원에서 입증된 바와 같이, 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 (고도로 갈락토실화되지 않은 항체에 비해) 그의 향상된 ADCC 및 CDC 활성 때문에 그의 소염 활성에서 놀라울 정도로 효과적이다. 그러나, 본원에 개시된 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 그의 소염 활성을 더 증가시키도록 추가 변경을 포함할 수 있다는 것을 인식해야 한다.

[0043] 정맥내 투여된 Ig의 소염 활성은 그의 Fc-연결된 글리칸 상에 말단 알파-2,6-시알산 연결을 갖는 Ig 분자의 서브세트로부터 비롯될 수 있다. 정맥내 투여된 Ig의 집단의 소염 활성은 모든 Fc-연결된 글리칸들 상에 말단 알파-2,6-시알산 연결을 도입함으로써 증가되었다(예를 들면, 문헌(Anthony et al., Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG, PNAS 105: 19571-19578, 2008) 참조).

[0044] 한 양태에서, 본 개시내용은 2,6-시알릴화된(sialylated) Fc 글리칸도 갖는 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체를 제공한다. 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체의 시알릴화는 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체의 소염 작용을 상승작용적으로 증가시키는 것으로 생각된다.

[0045] 한 양태에서, 본원에 개시된 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 형질전환 포유동물 또는 유선 상피 세포에서 항체를 생성함으로써 생성된다. 본원에서 입증된 바와 같이, 형질전환 포유동물 또는 유선 상피 세포에 의해 생성된 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 전체적으로 시알릴화되지 않는다. 이러한 항체의 시알릴화 수준은 예를 들면, 항체를 시알릴 트랜스퍼라제(transferases)에 노출시킴으로써 증가될 수 있다. 상기 항체는 시험관내에서 또는 생체내에서 시알릴 트랜스퍼라제에 노출될 수 있다. 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 완전히 또는 부분적으로 정제된 항체를 시알릴 트랜스퍼라제 및 적절한 사카라이드 기체의 기질에 노출시킴으로써 시험관내에서 시알릴화될 수 있다. 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 유선 또는 유선 상피 세포

에서 시알릴 트랜스퍼라제를 생성함으로써 생체내에서 시알릴화될 수 있다.

- [0046] 한 양태에서, 본 개시내용은 형질전환 동물의 유선 및 유선 상피 세포에서 증가된 수준의 알파-2,6-시알릴화를 갖는 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 따라서, 본원에서 제공된 방법은 형질전환 동물의 유선 및 유선 상피 세포에서 증가된 소염 성질을 갖는 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체를 제조할 수 있게 한다. 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체의 소염 성질을 증가시키기 위한 본원에서 제공된 방법은 임의의 항-TNF-알파 항체에 적용되어 상승작용적 작용 방식을 갖는 고도로 갈락토실화된 소염 항-TNF-알파 항체를 제공할 수 있다는 것을 인식해야 한다.
- [0047] 한 양태에서, 본 개시내용은 유선에서 항-TNF-알파 항체를 생성하도록 형질전환되어 있고 시알릴 트랜스퍼라제를 생성하도록 형질전환되어 있는 형질전환 동물(및 유선 상피 세포)을 제공한다. 이러한 동물 및 세포에 의해 생성된 치료 항체는 고도로 갈락토실화되어 있고 그의 Fc-연결된 글리칸 상에서 증가된 수준의 말단 알파-2,6-시알산 연결을 가질 것으로 예상된다. 일부 실시양태에서, 상기 형질전환 동물(및 유선 상피 세포)은 유선에서 외생성 항-TNF-알파 항체를 생성하도록 형질전환되어 있고 시알릴 트랜스퍼라제를 생성하도록 형질전환되어 있다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙이다.
- [0048] 한 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 염증 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법으로서, 그의 Fc-연결된 글리칸 상에서 증가된 수준의 말단 알파-2,6-시알산 연결을 갖는 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0049] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 고도로 푸코실화된 항-TNF-알파 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화되어 있고 고도로 푸코실화된 항-TNF-알파 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화되어 있고 고도로 푸코실화되어 있고 Fc 글리칸 상에서 말단 시알산 모이어티를 갖는 항-TNF-알파 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 하나 이상의 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다.
- [0050] 한 양태에서, 본 개시내용은 Fc 글리코실화 부위(Asn297, EU 넘버링) 상에서 글리칸 구조를 갖는 단일클론 항체를 포함하는 단일클론 항-TNF 항체 조성물을 제공하는데, 이때 상기 글리칸 구조는 60% 초과 갈락토스 함량을 갖는다. 한 실시양태에서, 항-TNF 단일클론 항체는 정제된다. "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 지수"는 일반적으로 면역글로불린 중쇄 불변 영역에서 잔기를 언급할 때 사용된다(예를 들면, 본원에 명백히 참고로 도입되는 문헌(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))에서 보고된 EU 지수). 항체에서 전형적인 글리코실화된 잔기 위치는 EU 넘버링 시스템에 따른 위치 297의 아스파라긴("Asn297")이다.
- [0051] 본원에 개시된 항-TNF 단일클론 항체들 중 임의의 항-TNF 단일클론 항체는 부분적으로 또는 완전히 정제될 수 있다는 것을 인식해야 한다.
- [0052] 항체는 Fc 영역의 중쇄 내의 Fc-감마 글리코실화 부위(Asn297)에서 N-글리칸으로 글리코실화될 수 있다. 일반적으로, 항체는 2개의 중쇄를 포함하므로, 각각의 항체는 2개의 Fc-감마 N-글리칸을 가질 수 있다. 다양한 글리코실화 패턴들이 Fc-감마 글리코실화 부위에서 관찰되었고, 이 부위에서 발견된 올리고사카라이드는 갈락토스, N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 만노스, 시알산, N-아세틸뉴라민산(NeuAc 또는 NANA), N-글리콜릴뉴라민산(NGNA) 및 푸코스를 포함한다. Fc-감마 글리코실화 부위에서 발견된 N-글리칸은 일반적으로 항체의 아스파라긴에 부착된 제1 N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 제1 GlcNAc에 부착된 제2 GlcNAc, 및 제2 GlcNAc에 부착된 제1 만노스의 비분지된 쇠로 구성된 공통 코어 구조를 갖는다. 코어 구조를 완성하고 추가 글리코실화를 위한 2개의 "아암(arms)"을 제공하기 위해 2개의 추가 만노스가 GlcNAc-GlcNAc-만노스 쇠의 제1 만노스에 부착된다. 추가로, 푸코스 잔기가 N-연결된 제1 GlcNAc에 부착될 수 있다.
- [0053] 2 아암 코어 구조는 "안테나(antenna)"로서도 지칭된다. 혈장 항체에서 발견된 N-글리칸 모티프의 "아암"의 가장 흔한 유형의 글리코실화는 복합체 유형의 글리코실화, 즉 하나 초과 유형의 모노사카라이드로 구성된 글리코실화이다. 이 N-글리칸 모티프로의 생합성 경로에서, 여러 GlcNAc 트랜스퍼라제들이 GlcNAc 잔기를 갈락토스, 시알산 및 푸코스 잔기에 의해 더 연장될 수 있는 글리칸 코어의 만노스에 부착시킨다. 이 글리코실화 모티프는 "복합체" 구조로서 지칭된다.
- [0054] N-글리칸 코어 구조의 "아암" 상에서 발견된 제2 글리코실화 모티프는 (분지된 또는 비분지된 쇠로서 부착된) 추가 만노스를 특징으로 하는 "고만노스" 모티프이다.

- [0055] 제3 글리코실화 모티프는 아암들 중 하나가 치환된 만노스인 반면 다른 아암이 복합체인 하이브리드 구조이다.
- [0056] 본원에서 사용된 바와 같이, "갈락토실화된" 항체는 그의 N-글리칸들 중 하나에서 하나 이상의 갈락토스 모노사카라이드를 갖는 임의의 항체를 지칭한다. 갈락토실화된 항체는 2개의 N-글리칸 각각이 N-글리칸 모티프의 각각의 아암 상에서 복합체 유형의 모티프를 갖는 항체, 2개의 N-글리칸이 N-글리칸 모티프의 아암들 중 단지 한 아암 상에서 복합체 유형의 모티프를 갖는 항체, N-글리칸의 각각의 아암 상에서 복합체 유형의 모티프를 갖는 1개의 N-글리칸을 갖는 항체, 및 N-글리칸 모티프의 아암들 중 단지 한 아암 상에서 복합체 유형의 모티프를 갖는 1개의 N-글리칸을 갖는 항체를 포함한다. 하나 이상의 갈락토스 모노사카라이드를 포함하는 항체는 N-글리칸, 예컨대, G1(1개의 갈락토스), G1F(1개의 갈락토스, 1개의 푸코스), G2(2개의 갈락토스) 및 G2F(2개의 갈락토스, 1개의 푸코스)를 갖는 항체를 포함한다. 또한, 하나 이상의 갈락토스 모노사카라이드를 포함하는 N-글리칸은 시알틸화될 수 있거나 시알틸화되지 않을 수 있다. N-글리칸이 복합체 글리칸 모티프의 하나 이상의 아암에서 추가 갈락토스 잔기, 예컨대, 알파-Gal을 함유하여 잠재적으로 4개의 갈락토스 모이어터를 갖는 N-글리칸을 생성할 수 있다는 것도 인식해야 한다.
- [0057] 본원에서 사용된 바와 같이, "고도로 갈락토실화된" 항체는 N-글리칸 모티프에서 2개 이상의 갈락토스 모노사카라이드를 포함하는 항체를 지칭한다. 고도로 갈락토실화된 항체는 2개의 N-글리칸 각각이 N-글리칸 모티프의 각각의 아암 상에서 복합체 유형의 모티프를 갖는 항체, 2개의 N-글리칸이 N-글리칸 모티프의 아암들 중 단지 한 아암 상에서 복합체 유형의 모티프를 갖는 항체, 및 N-글리칸의 각각의 아암 상에서 복합체 유형의 모티프를 갖는 1개의 N-글리칸을 갖는 항체를 포함한다. 따라서, 고도로 갈락토실화된 항체는 2개의 N-글리칸 각각이 글리칸 모티프 내에 1개의 갈락토스를 포함하는(예를 들면, G1 또는 G1F) 항체, 글리칸 모티프 내에 2개의 갈락토스를 갖는(예를 들면, G2 또는 G2F) 하나 이상의 N-글리칸을 포함하는 항체, 및 글리칸 모티프 내에 3개 또는 4개의 갈락토스를 갖는(예를 들면, (i) G1 글리칸 모티프를 갖는 1개의 N-글리칸 및 G2 또는 G2F 글리칸 모티프를 갖는 1개의 N-글리칸, 또는 (ii) G2 또는 G2F를 갖는 2개의 N-글리칸) 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 글리칸 모티프 내에 3개 이상의 갈락토스 모노사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 글리칸 모티프 내에 4개 이상의 갈락토스 모노사카라이드를 포함한다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 글리코실화는 고만노스 글리코실화 패턴을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, "고만노스 글리코실화 패턴"은 하나 이상의 올리고만노스를 포함하는 항체, 또는 30% 이상의 항체가 하나 이상의 올리고만노스를 포함하는 항체 조성물을 지칭하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 항체의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상의 탄수화물이 올리고만노스이다. 일부 실시양태에서, 항체의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상의 탄수화물이 푸코실화되지 않은 올리고만노스이다. 다른 실시양태에서, 항체의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만의 탄수화물이 푸코실 함유 탄수화물이다. 다른 실시양태에서, 항체는 푸코스 함량에서 낮고 올리고만노스 함량에서 높다. 따라서, 추가 실시양태에서, 항체의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상의 탄수화물이 올리고만노스이고, 항체의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만의 탄수화물이 푸코스 함유 탄수화물이다. 따라서, 추가 실시양태에서, 항체의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상의 탄수화물이 푸코실화되지 않은 올리고만노스이고, 항체의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만의 탄수화물이 푸코스 함유 탄수화물이다.
- [0059] 일부 양태에서, 만노스 함유 올리고사카라이드는 Man5 내지 Man9이고, 이때 숫자는 만노스 잔기의 수를 표시한다. 예를 들면, 만노스 함유 올리고사카라이드는 Man5, Man6, Man7, Man8 및 Man9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙은 본원에 기재된 염소 2, 4 및 5에 의해 입증된 바와 같이 높은 Man6 함량을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 주요 탄수화물은 Man5이다. 일부 실시양태에서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 10% 또는 15% 이상의 탄수화물이 Man5이다. 유리하게는, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 20% 이상의 탄수화물이 Man5이다. 다른 실시양태에서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 주요 탄수화물은 Man6이다. 일부 실시양태에서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 10% 또는 15% 이상의 탄수화물이 Man6이다. 유리하게는, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 20% 이상의 탄수화물이 Man6이다. 다른 실시양태에서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 주요 탄수화물은 Man7이다. 일부 실시양태에서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 10% 또는 15% 이상의 탄수화물이 Man7이다. 유리하게는, 형질전환으로 생성된 아달리무맙에서 20% 이상의 탄수화물이 Man7이다.
- [0060] N-글리칸의 글리코실화 패턴은 당분야에서 공지된 다양한 방법들에 의해 확인될 수 있다. 예를 들면, 단백질 상의 탄수화물을 분석하는 방법은 미국 특허출원 공보 제2006/0057638호 및 제2006/0127950호에 기재되어 있다. 단백질 상의 탄수화물을 분석하는 방법은 본원에 참고로 도입된다.

- [0061] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체는 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소이다.
- [0062] 일부 실시양태에서, 고도로 글리코실화된 항체는 비인간 포유동물의 유선 상피 세포 이외의 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 비인간 포유동물의 유선 상피 세포 이외의 세포에서 생성되고, 생성 후 (예를 들면, 효소, 예컨대, 트랜스퍼라제의 작용을 통해) N-글리칸 상의 갈락토스 기의 수를 증가시키도록 변경된다.
- [0063] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체를 포함하는 조성물은 유즙을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체를 포함하는 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0064] 한 양태에서, 본 개시내용은 Fc 글리코실화 부위(Asn297, EU 넘버링) 상에서 글리칸 구조를 갖는 단일클론 항-TNF 항체 조성물을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 단일클론 항체의 상기 글리칸 구조는 60% 초과인 갈락토스 함량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 단일클론 항-TNF 항체 조성물을 포함하는 조성물은 유즙을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일클론 항-TNF 항체 조성물을 포함하는 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0065] 항체의 집단
- [0066] 한 양태에서, 본 개시내용은 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 60% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 80% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 푸코실화 수준은 50% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 푸코실화 수준은 60% 이상이다. 일부 실시양태에서, 집단은 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 집단은 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준 대 집단 내의 항체의 푸코실화 수준의 비는 1.0 내지 1.4이다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 35% 이상이 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하고, 집단 내의 항체의 25% 이상이 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체의 시알릴화 수준은 50% 이상이다. 일부 실시양태에서, 항체의 시알릴화 수준은 70% 이상이다. 일부 실시양태에서, 항체의 시알릴화 수준은 90% 이상이다. 일부 실시양태에서, 항체는 전체적으로 시알릴화되어 있다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 인플릭시맵/레미케이드(센토코르), 아달리무맵/휴미라(애보트), 또는 골리무맵/심포니(센토코르)이다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 아달리무맵이다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 서열번호 2를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1을 포함하는 중쇄 및 서열번호 2를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1로 구성된 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 서열번호 2로 구성된 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1로 구성된 중쇄 및 서열번호 2로 구성된 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 항-TNF-알파 항체는 아달리무맵이다.
- [0068] N-글리칸의 생합성은 단백질의 경우처럼 주형에 의해 조절되지 않으나, 세포 내에서의 특정 글리코실트랜스퍼라제의 발현 및 활성에 주로 의존한다. 따라서, 당단백질, 예컨대, 항체 Fc 도메인은 정상적으로 동일한 단백질 골격 상에서 상이한 글리칸을 보유하는 당형태(glycoforms)의 불균질한 집단으로서 존재한다.
- [0069] 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체의 집단은 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 갈락토실화된 항체의 집단이다. 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 60% 이상이다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, 갈락토실화 수준은 하기 식에 의해 측정된다:

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{Gal의 수}}{\text{A의 수}} \right) * (\% \text{ 상대적 면적})$$

[0071]

상기 식에서,

[0072]

- n 은 크로마토그램, 예컨대, 순상 고성능 액체 크로마토그래피(NP HPLC) 스펙트럼의 분석된 N-글리칸 피크의 수를 나타내고;

[0073]

- "Gal의 수"는 피크에 상응하는 글리칸의 안테나 상의 갈락토스 모티프의 수를 나타내고;

[0074]

- "A의 수"는 피크에 상응하는 글리칸 형태의 안테나 상의 N-아세틸글루코스아민 모티프(코어 구조의 2개의 N-아세틸글루코스아민 모티프를 제외함)의 수에 상응하고;

[0075]

- "% 상대적 면적"은 상응하는 피크 아래의 면적의 %에 상응한다.

[0076]

항체의 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 예를 들면, 항체로부터 N-글리칸을 방출시키고 크로마토그램 상에서 N-글리칸을 해상하고 특정 피크에 상응하는 N-글리칸의 올리고사카라이드 모티프를 확인하고 피크 강도를 측정하고 데이터를 상기 제공된 식에 적용함으로써 측정될 수 있다.

[0077]

갈락토실화된 항-TNF-알파 항체는 모노-갈락토실화된 N-글리칸 및 바이-갈락토실화된 N-글리칸인 항체를 포함한다.

[0078]

고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 상기 집단은 시알틸화될 수 있거나 시알틸화되지 않을 수 있는 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 항체 N-글리칸이 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 25% 이상의 항체가 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다.

[0079]

고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 상기 집단은 시알틸화될 수 있거나 시알틸화되지 않을 수 있는 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 항체 N-글리칸이 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 35% 이상의 항체가 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다.

[0080]

고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 상기 집단은 시알틸화될 수 있거나 시알틸화되지 않을 수 있는 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체, 및 시알틸화될 수 있거나 시알틸화되지 않을 수 있는 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하는 항체를 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 99%의 항체 N-글리칸이 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하고, 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 99%의 항체 N-글리칸이 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다. 고도로 갈락토실화된 항체 N-글리칸의 집단의 일부 실시양태에서, 25% 이상의 항체 N-글리칸이 모노-갈락토실화된 N-글리칸을 포함하고 35% 이상의 항체가 바이-갈락토실화된 N-글리칸을 포함한다.

[0081]

고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 일부 실시양태에서, 상기 집단은 고도로 푸코실화된 항체를 포함한다. 고도로 푸코실화된 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준이 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 푸코실화인 항체의 집단이다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체의 집단에서 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준은 50% 이상이다.

[0082]

[0083] 본원에서 사용된 바와 같이, 푸코실화 수준은 하기 식에 의해 측정된다:

$$\sum_{n}^n (\text{푸코스의 수}) * (\% \text{상대적 면적})$$

[0084]

상기 식에서,

[0085]

- n 은 크로마토그램, 예컨대, 순상 고성능 액체 크로마토그래피(NP HPLC) 스펙트럼의 분석된 N-글리칸 피크의 수를 나타내고;

[0086]

- "푸코스의 수"는 피크에 상응하는 글리칸 상의 푸코스 모티프의 수를 나타내고;

[0087]

- "% 상대적 면적"은 푸코스 모티프를 함유하는 상응하는 피크 아래의 면적의 %에 상응한다.

[0088]

푸코실화된 항체는 그의 N-글리칸들 중 하나에서 하나 이상의 푸코스 모노사카라이드를 갖는 항체를 포함한다. 푸코실화된 항체는 그의 N-글리칸 각각에서 푸코스 모노사카라이드를 갖는 항체를 포함한다.

[0089]

[0090]

일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-TNF-알파 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 60% 이상이고 집단 내의 항체의 푸코실화 수준이 50% 이상인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 50% 이상이고 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 60% 이상이고 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 70% 이상이고 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 80% 이상이고 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 90% 이상이고 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%인 집단에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단은 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준이 최대 100%이고 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준이 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%인 집단에 관한 것이다.

[0091]

한 양태에서, 본 개시내용은 Fc-감마 글리코실화 부위에서 갈락토실화된 항체 N-글리칸의 집단 내에서의 백분율 대 Fc-감마 글리코실화 부위에서 푸코실화된 항체 N-글리칸의 집단 내에서의 백분율의 특정 비를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항체의 집단을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 이때 상기 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준 대 상기 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준의 비는 0.5 내지 2.5, 0.6 내지 2.0, 0.7 내지 1.8, 0.8 내지 1.6, 또는 1.0 내지 1.4이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항체의 집단을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 이때 상기 집단 내의 항체 N-글리칸의 갈락토실화 수준 대 상기 집단 내의 항체 N-글리칸의 푸코실화 수준의 비는 1.0 내지 1.4, 예를 들면, 1.2이다.

[0092]

일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 및 항체의 집단은 고도로 시알릴화되어 있다. 일부 실시양태에서, 시알릴화는 Fc 글리칸의 말단 갈락토스 잔기 상의 2,6-알파 시알릴화를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 고도로 시알릴화된 항체의 집단에서 50% 이상의 말단 갈락토스 모이어티가 시알릴화되어 있다. 일부 실시양태에서, 고도로 시알릴화된 항체의 집단에서 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 말단 갈락토스 모이어티가 시알릴화되어 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 60% 이상 갈락토실화된 항체의 집단으로서, 이때 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 말단 갈락토스 모이어티가 시알릴화된 것인 항체의 집단을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 70% 이상 갈락토실화된 항체의 집단으로서, 이때 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 말단 갈락토스 모이어티가 시알릴화된 것인 항체의 집단을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 80% 이상 갈락토실화된 항체의 집단으로서, 이때 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 말단 갈락토스 모이어티가 시알릴화된 것인 항체의 집단을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 90% 이상 갈락토실화된 항체의 집단으로서, 이때 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 최대 100%의 말단 갈락토스 모이어티

가 시알릴화된 것인 항체의 집단을 제공한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체의 집단은 형질전환 비인간 포유동물에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마이다. 일부 실시양태에서, 비인간 포유동물은 염소이다.

[0094] 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포 이외의 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포 이외의 세포에서 생성된 후 (예를 들면, 효소, 예컨대, 트랜스퍼라제의 작용을 통해) 항체의 집단에서 갈락토스 잔기의 수를 증가시키도록 변경된다.

[0095] 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체를 포함하는 조성물은 유증을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체를 포함하는 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.

[0096] *항체의 집단의 생성*

[0097] 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준(예를 들면, 70% 이상)의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성되고, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 갈락토실화를 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 유선 상피 세포에서 생성된 항체에 비해 "세포 배양으로 생성된" 항체는 유선 상피 세포를 제외한 표준 생산 세포주(예를 들면, CHO 세포)에서 생성된 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 90% 이하, 80% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하 또는 10% 이하이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 50% 이하이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 30% 이하이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 갈락토실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 갈락토실화 수준에 비해 10% 이하이다.

[0098] 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준(예를 들면, 60% 이상)의 푸코실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성되고, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 푸코실화를 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 푸코실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 푸코실화 수준에 비해 90% 이하, 80% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하 또는 10% 이하이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 푸코실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 푸코실화 수준에 비해 50% 이하이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 푸코실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 푸코실화 수준에 비해 30% 이하이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 푸코실화 수준은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 푸코실화 수준에 비해 10% 이하이다.

[0099] 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화 및 푸코실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성되고, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 갈락토실화 및 푸코실화를 갖는다.

[0100] *항체*

[0101] 일부 실시양태에서, 용어 "항체"는 2개 이상의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로서 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, 즉 CL로 구성된다. VH 영역 및 VL 영역은 골격 영역(FR)으로서 지칭되는, 보다 더 보존된 영역들 사이에 배치된, 상보성 결정 영역(CDR)으로서

지칭되는 추가변 영역으로 더 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단부터 카복시 말단까지 하기 순서로 정렬된 3개의 CDR들 및 4개의 FR들로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 일부 실시양태에서, 항원은 가용성 형태, 막관통 형태, 또는 이들 둘 다의 TNF-알파이다. 항체의 불변 영역은 면역글로불린과, 면역 시스템의 다양한 세포들(예를 들면, 이펙터 세포) 및 고전적인 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자의 결합을 매개할 수 있다. 성숙 기능성 항체 분자의 형성은 2개의 단백질들이 화학량론적 양으로 발현되고 적절한 배열로 자가조립할 때 달성될 수 있다.

[0102]

용어 "항체"는 그의 항원 결합 단편도 포괄하기 위한 것이다. 항체 및 항원 결합 단편을 제조하는 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있다(예를 들면, 문헌(Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)); 문헌(Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990)); 문헌(Roitt et al., "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989)); 및 국제 특허출원 공보 제WO2006/040153호, 제WO2006/122786호 및 제WO2003/002609호 참조). 본원에서 사용된 바와 같이, 항체의 "항원 결합 단편"은 항원, 예를 들면, TNF-알파에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 부분을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능이 전체 길이 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것은 밝혀져 있다. 용어 항체의 "항원 결합 단편" 내에 포괄되는 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인들로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편들을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인들로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인들로 구성된 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)이 있다. 나아가, Fv 단편의 2개 도메인들, 즉 V 및 VH는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 이들이 제조방법의 이용을 통해 VL 및 VH 영역들이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇠(단일 쇠 Fv(scFv)로서 공지되어 있음; 예를 들면, 문헌(Bird et al. (1988) Science 242:423-426) 및 문헌(Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883) 참조)로서 만들어질 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다. 이러한 단일 쇠 항체도 용어 항체의 "항원 결합 부분" 내에 포괄되기 위한 것이다. 이들 항체 단편들은 본원에 참고로 도입되는 문헌(J. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 98-118 (N.Y. Academic Press 1983))에 기재된 통상적인 절차, 예컨대, 단백질용해 단편화 절차뿐만 아니라 당업자에게 공지된 다른 기법을 이용함으로써 얻는다. 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.

[0103]

일부 실시양태에서, 항체는 동종형(isotype) IgG, IgA 또는 IgD의 항체이다. 추가 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 및 IgE로 구성된 군으로부터 선택되거나, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 또는 IgE의 면역글로불린 불변 및/또는 가변 도메인을 갖는다. 다른 실시양태에서, 항체는 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다. 대안적 실시양태에 따라, 본 개시내용의 항체는 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체의 형태로 존재하도록 변경될 수 있다. 용어 "이중특이적 항체"는 (a) 세포 표면 항원 및 (b) 이펙터 세포의 표면 상의 Fc 수용체와 결합하거나 상호작용하는, 2종의 상이한 결합 특이성을 갖는 임의의 물질, 예를 들면, 단백질, 펩티드, 또는 단백질 또는 펩티드 복합체를 포함하기 위한 것이다. 용어 "다중특이적 항체"는 (a) 세포 표면 항원, (b) 이펙터 세포의 표면 상의 Fc 수용체 및 (c) 하나 이상의 다른 성분과 결합하거나 상호작용하는, 2중 초과 상이한 결합 특이성을 갖는 임의의 물질, 예를 들면, 단백질, 펩티드, 또는 단백질 또는 펩티드 복합체를 포함하기 위한 것이다. 따라서, 본 개시내용은 세포 표면 항원 및 이펙터 세포 상의 Fc 수용체에 대해 유도된 이중특이적 항체, 삼중특이적 항체, 사중특이적 항체 및 다른 다중특이적 항체를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 용어 "이중특이적 항체"는 다이바디(diabodies)도 포함한다. 다이바디는 VH 및 VL 도메인들이 단일 폴리펩티드 쇠 상에서 발현되지만, 동일한 쇠 상의 상이 2개 도메인들 사이에 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧아 상이 도메인들이 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 하여 2개의 항원 결합 부위를 생성하는 링커를 사용하는 2가 이중특이적 항체이다(예를 들면, 문헌(Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448) 및 문헌(Poijak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123) 참조).

[0104]

용어 "항체"는 상이한 유형의 항체, 예를 들면, 재조합 항체, 단일클론 항체, 인간화된 항체 또는 키메라 항체, 또는 이들의 혼합물도 포괄한다.

[0105]

일부 실시양태에서, 항체는 재조합 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조된, 발현된, 생성된 또는 단리된 항체, 예를 들면, 또 다른 종의 면역글로불린 유전자에 대한 형질전환 동물로부터 단리된 항체, 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용함으로써 발현된 항체, 재조합

조합적 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 또는 다른 DNA 서열로의 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조된, 발현된, 생성된 또는 단리된 항체를 포함하기 위한 것이다.

[0106] 다른 실시양태에서, 항체는 키메라 또는 인간화된 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항체"는 비인간(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼) 항체의 일부와 인간 항체의 일부를 겸비하는 항체를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간화된 항체"는 인간 골격 영역과 함께 모 항체로부터의 항원 결합 CDR들만을 보유하는 항체를 지칭한다(예를 들면, 문헌(Waldmann, 1991, Science 252:1657) 참조). 무린 항체의 결합 특이성을 보유하는 이러한 키메라 또는 인간화된 항체는 본 개시내용에 따라 진단, 예방 또는 치료 적용을 위해 생체내로 투여될 때 감소된 면역원성을 가질 것으로 예상된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역들을 갖는 항체를 포함하기 위한 것이다. 본 개시내용의 인간 항체는 인간 생식세포주 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기(예를 들면, 시험관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 인간 항체는 마우스 시스템보다는 오히려 인간 면역 시스템의 일부를 보유하는 형질전환 마우스를 사용함으로써 생성된다. 완전 인간 단일클론 항체도 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 좌위의 큰 부분에 대한 형질전환 마우스를 면역화시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,591,669호, 제5,598,369호, 제5,545,806호, 제5,545,807호 및 제6,150,584호, 및 이들에서 인용된 참고문헌(이들의 내용은 본원에 참고로 도입됨)을 참조한다. 이들 동물은 내생성(예를 들면, 무린) 항체의 생성에서 기능적 결실이 있도록 유전적으로 변경되어 있다. 동물은 이들 동물의 면역화가 관심있는 항원에 대한 완전 인간 항체의 생성을 유발하도록 인간 생식세포주 면역글로불린 유전자 좌위의 전부 또는 일부를 함유하도록 더 변경된다. 이들 마우스(예를 들면, 제노마우스(XenoMouse)(아브게닉스(Abgenix))), HuMAb 마우스(메다렉스(Medarex)/젠팜(GenPharm))의 면역화 후, 단일클론 항체는 표준 하이브리도마 기술에 따라 제조된다. 이들 단일클론 항체는 인간 면역글로불린 아미노산 서열을 가지므로 인간에게 투여될 때 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응을 일으키지 않을 것이다. 본원에서 제공된 항체들 중 임의의 항체처럼 인간 항체는 단일클론 항체일 수 있다.

[0108] 일부 실시양태에서, 항체는 전체 길이 항체이다. 일부 실시양태에서, 전체 길이 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항-TNF-알파 항체이다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 1을 포함하고 경쇄는 서열번호 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 아달리무맙이다.

[0109] CDC 활성

[0110] 한 양태에서, 고수준(예를 들면, 70% 이상)의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 한 양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물은 높은 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물은 높은 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖고 높은 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다.

[0111] 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단은 저수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단 및 저수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단은 동일한 항원 에피토프에 대해 유도된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체의 집단 및 저수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단은 동일한 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 항체 아달리무맙을 코딩한다.

[0112] 본원에서 사용된 바와 같이, 저수준의 갈락토실화("적은 갈락토스")를 갖는 항체의 집단은 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준이 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만 또는 최소 0%인 항체의 집단을 지칭한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 고수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단의 CDC 활성은 저수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단에 비해 1.1배 이상 더 높거나, 1.2배 이상 더 높거나, 1.3배 이상 더 높거나, 1.4배 이상 더 높거나, 1.5배 이상 더 높거나, 1.6배 이상 더 높거나, 1.7배 이상 더 높거나, 1.8배 이상 더 높거나, 1.9배 이상 더 높거나, 2배 이상 더 높거나, 3배 이상 더 높거나, 5배 이상 더 높거나, 10배 이상 더 높거나 최대 100배 이상 더 높다.

[0114] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체의 집단은 고도로 푸코실화되어 있다(고수준의 푸코실화를 갖는다). 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 고도로 푸코실화되어 있는 항체의 집단은 적은 갈락토스 및 적은 푸코스를 갖는(저수준의 갈락토실화 및 푸코실화를 갖는) 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 보체

의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 고도로 푸코실화되어 있는 항체의 집단, 및 적은 갈락토스 및 적은 푸코스를 갖는 항체의 집단은 동일한 항원 에피토프에 대해 유도된다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 고도로 푸코실화되어 있는 항체의 집단, 및 적은 갈락토스 및 적은 푸코스를 갖는 항체의 집단은 동일한 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 항체 아달리무맙을 코딩한다.

[0115] 본원에서 사용된 바와 같이, 적은 푸코스를 갖거나 저수준의 푸코실화를 갖는 항체의 집단은 집단 내의 항체의 푸코실화 수준이 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만 또는 최소 0%인 항체의 집단을 지칭한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 고도로 푸코실화되어 있는 항체의 집단의 CDC 활성은 적은 갈락토스 및 적은 푸코스를 갖는 항체의 집단에 비해 1.1배 이상 더 높거나, 1.2배 이상 더 높거나, 1.3배 이상 더 높거나, 1.4배 이상 더 높거나, 1.5배 이상 더 높거나, 1.6배 이상 더 높거나, 1.7배 이상 더 높거나, 1.8배 이상 더 높거나, 1.9배 이상 더 높거나, 2배 이상 더 높거나, 3배 이상 더 높거나, 5배 이상 더 높거나, 10배 이상 더 높거나 최대 100배 이상 더 높다.

[0117] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성된 고도로 갈락토실화된 항체의 집단, 및 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 동일한 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 항체 아달리무맙을 코딩한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단의 CDC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 1.1배 이상 더 높거나, 1.2배 이상 더 높거나, 1.3배 이상 더 높거나, 1.4배 이상 더 높거나, 1.5배 이상 더 높거나, 1.6배 이상 더 높거나, 1.7배 이상 더 높거나, 1.8배 이상 더 높거나, 1.9배 이상 더 높거나, 2배 이상 더 높거나, 3배 이상 더 높거나, 5배 이상 더 높거나, 10배 이상 더 높거나 최대 100배 이상 더 높다.

[0119] 한 양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단의 조성물은 높은 (보체 의존적 세포독성) CDC 활성을 갖는다. 항체는 다양한 기작들(이들 중 하나가 CDC 활성을 통한 기작임)을 통해 치료제로서 작용할 수 있다. 표적 세포 수용체에 결합하는 일부 치료 항체들은 보체 경로의 단백질에 결합할 수도 있다. 보체 단백질의 결합은 궁극적으로 치료 항체가 결합하는 세포의 세포 용해 및 사멸을 야기하는 "막 공격 복합체"의 형성을 유발하는 (C1-복합체 활성화를 통한) 보체 캐스케이드(cascade)를 유발한다(예를 들면, 문헌(Reff M. E. Blood 1994, 83: 435) 참조).

[0120] 일부 실시양태에서, 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖는 항체의 집단은 증가된 수준의 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 갖지 않는 항체의 집단에 비해 더 많은 양의 세포 용해를 유도하는 항체의 집단이다. CDC의 수준을 측정하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 종종 세포 용해의 양의 측정에 기초한다. CDC 활성을 측정하기 위한 시판되는 키트는 예를 들면, 진스크립트(Genscript)(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)로부터 구입될 수 있다.

[0121] ADCC 활성

[0122] 한 양태에서, 고수준(예를 들면, 70% 이상)의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단은 저수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성되고, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다. 일부 실시양태에서, 고수준(예를 들면, 70% 이상)의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단은 아글리코실화된 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는다.

[0123] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체의 집단은 적은 갈락토스를 갖는 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 ADCC 활성은 적은 갈락토스를 갖는 항체의 집단에 비해 1.1배 이상 더 높거나, 1.2배 더 높거나, 1.3배 더 높거나, 1.4배 더 높거나, 1.5배 더 높거나, 1.6배 더 높거나, 1.7배 더 높거나, 1.8배 더 높거나, 1.9배 더 높거나, 2배 더 높거나, 3배 더 높거나, 5배 더 높거나, 10배 더 높거나, 100배 더 높거나 이보다 더 높다.

[0124] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단은 유선 상피 세포에서

생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단의 ADCC 활성은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 1.1배 이상 더 높거나, 1.2배 더 높거나, 1.3배 더 높거나, 1.4배 더 높거나, 1.5배 더 높거나, 1.6배 더 높거나, 1.7배 더 높거나, 1.8배 더 높거나, 1.9배 더 높거나, 2배 더 높거나, 3배 더 높거나, 5배 더 높거나, 10배 더 높거나, 100배 더 높거나 이보다 더 높다.

[0125] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다.

[0126] 한 양태에서, 본원에 개시된 항체의 집단의 조성물은 높은 ADCC 활성을 갖는다. 항체는 다양한 기작들(이들 중 하나가 ADCC 활성을 통한 기작임)을 통해 치료제로서 작용할 수 있다. 표적 세포 상의 세포 수용체에 결합하고 Fc 글리코실화 부위를 포함하는 치료 항체는 Fc 수용체에도 결합하여 Fc 수용체를 발현하는 세포를 표적 세포에 고착시킬 수 있다. 항체의 Fc 영역의 결합 친화성은 일반적으로 Fc 글리코실화 부위의 글리코실화 성질에 의존한다. Fc 수용체는 천연 살해 세포, 대식세포, 호중구 및 비만 세포를 포함하는 다수의 면역 세포 상에서 발견된다. Fc 수용체에의 결합은 면역 세포가 사이토카인(예컨대, IL-2) 및 식세포작용을 유도하여 표적 세포를 사멸시키게 한다. 일부 실시양태에서, 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는 항체의 집단은 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖지 않는 항체의 집단에 비해 CD16을 발현하는 세포와의 증가된 결합을 보이는 항체의 집단이다. 일부 실시양태에서, 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖는 항체의 집단은 증가된 수준의 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성을 갖지 않는 항체의 집단에 비해 (예를 들면, 천연 살해 세포에서) 증가된 IL-2 생성 유도를 보이는 항체의 집단이다. ADCC 활성을 측정하기 위한 시판되는 키트는 예를 들면, 진스크립트(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재) 및 프로메가(Promega)(미국 위스콘신주 매디슨 소재)로부터 구입될 수 있다. 일부 실시양태에서, ADCC 활성의 측정은 CD16에 결합하는 능력을 평가함으로써 수행된다.

[0127] 항-TNF-알파 활성

[0128] 한 양태에서, 고수준(예를 들면, 70% 이상)의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단은 저수준의 갈락토실화를 갖는 항체의 집단에 비해 대상체에서 TNF-알파 활성을 억제하는 증가된 능력을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성되고, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 대상체에서 TNF-알파 활성을 억제하는 증가된 능력을 갖는다.

[0129] 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성되고, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 가용성 TNF-알파에 결합하는 증가된 능력을 갖는다.

[0130] 한 양태에서, 본 개시내용은 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 포함하는 조성물을 제공하는데, 이때 상기 항체의 집단은 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 생성되고, 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 막관통 TNF-알파에 결합하는 증가된 능력을 갖는다.

[0131] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화된 항체의 집단은 적은 갈락토스를 갖는 항체의 집단에 비해 TNF-알파 활성을 억제하고/하거나, 가용성 TNF-알파에 결합하고/하거나 막관통 TNF-알파에 결합하는 증가된 능력을 갖는다. 일부 실시양태에서, TNF-알파 활성을 억제하고/하거나, 가용성 TNF-알파에 결합하고/하거나 막관통 TNF-알파에 결합하는 고도로 갈락토실화된 항체의 집단의 증가된 능력은 적은 갈락토스를 갖는 항체의 집단에 비해 1.1배 이상 더 높거나, 1.2배 더 높거나, 1.3배 더 높거나, 1.4배 더 높거나, 1.5배 더 높거나, 1.6배 더 높거나, 1.7배 더 높거나, 1.8배 더 높거나, 1.9배 더 높거나, 2배 더 높거나, 3배 더 높거나, 5배 더 높거나, 10배 더 높거나, 100배 더 높거나 이보다 더 높다.

[0132] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 TNF-알파 활성을 억제하고/하거나, 가용성 TNF-알파에 결합하고/하거나 막관통 TNF-알파에 결합하는 증가된 능력을 갖는다. 일부 실시양태에서, TNF-알파 활성을 억제하고/하거나, 가용성 TNF-알파에 결합하고/하거나 막관통 TNF-알파에 결합하는, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단의 증가된 능력은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 1.1배 이상 더 높거나, 1.2배 더 높거나, 1.3배 더 높거나, 1.4배 더 높거나, 1.5배 더 높거나, 1.6배 더 높거나, 1.7배 더

높거나, 1.8배 더 높거나, 1.9배 더 높거나, 2배 더 높거나, 3배 더 높거나, 5배 더 높거나, 10배 더 높거나, 100배 더 높거나 이보다 더 높다.

[0133] 일부 실시양태에서, 고도로 갈락토실화되어 있고 유선 상피 세포에서 생성된 항체의 집단은 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단에 비해 TNF-알파 활성을 억제하고/하거나, 가용성 TNF-알파에 결합하고/하거나 막관통 TNF-알파에 결합하는 증가된 능력을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성되지 않은 항체의 집단은 세포 배양으로 생성된다.

[0134] 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성된 항-TNF-알파 항체의 집단은 대상체에서 TNF-알파 활성을 억제하는 데 있어서 비유선 상피 세포에서 생성된 항체보다 더 우수하다. 대상체에서의 TNF-알파 활성 수준의 측정은 예를 들면, 항체의 집단을, 증가된 TNF-알파 활성을 특징으로 하는 질환(예를 들면, 류마티스성 관절염)을 앓고 있는 대상체 또는 이러한 질환에 대한 확립된 모델에게 투여함으로써 평가될 수 있다(예를 들면, 문헌(Horiuchi et al., Rheumatology et al. 49:1215) 참조).

[0135] 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성된 항-TNF-알파 항체의 집단은 가용성 TNF-알파에의 결합에 있어서 비유선 상피 세포에서 생성된 항체보다 더 우수하다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포에서 생성된 항-TNF-알파 항체의 집단은 막관통 TNF-알파와의 결합에 있어서 비유선 상피 세포에서 생성된 항체보다 더 우수하다. 가용성 TNF-알파 또는 막관통 TNF-알파에의 결합 수준을 측정하는 분석은 잘 확립되어 있다(예를 들면, 문헌(Horiuchi et al., Rheumatology et al. 49:1215) 참조).

[0136] *비인간 유선 상피 세포 및 형질전환 동물*

[0137] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체 또는 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 생성하는 유선 상피 세포를 제공한다.

[0138] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체 또는 고수준의 갈락토실화를 갖는 항-TNF-알파 항체의 집단을 생성하는 형질전환 비인간 포유동물을 제공한다.

[0139] 한 양태에서, 본 개시내용은 글리코실화된 항체를 생성하는 포유동물 유선 상피 세포에 관한 것이다. 포유동물 유선 상피 세포에서 글리코실화된 항체를 제조하는 방법이 본원에서 제공된다. 이것은 (시험관내에서 또는 생체 외에서) 유선 상피 세포를 배양함으로써 세포 배양에서 달성될 수 있다. 이것은 형질전환 동물(생체내)에서 달성될 수도 있다.

[0140] 일부 실시양태에서, 포유동물 유선 상피 세포는 형질전환 동물에 존재한다. 일부 실시양태에서, 포유동물 유선 상피 세포는 형질전환 동물, 예컨대, 마우스 또는 염소의 유즙에서 재조합 항체를 발현하도록 조작되어 있다. 이를 달성하기 위해, 재조합 단백질 코딩하는 유전자(들)의 발현은 예를 들면, 염소 베타 카세인 조절 요소의 조절 하에서 달성될 수 있다. 마우스 및 염소 유즙 둘 다에서의 재조합 단백질, 예를 들면, 항체의 발현은 이미 확립되어 있다(예를 들면, 미국 특허출원 공보 제2008-0118501-A1호 참조). 일부 실시양태에서, 발현은 유즙 단백질을 생성하는 개별 유관 상피 세포에 대해 최적화된다.

[0141] 재조합 항체를 생성할 수 있는 형질전환 동물은 당분야에서 공지된 방법에 따라 생성될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제5,945,577호 및 미국 특허출원 공보 제2008-0118501-A1호 참조). 형질전환 발현에 적합한 동물은 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 적합한 동물은 각각 소, 염소, 양 및 돼지(또는 돈(豚))의 다양한 종들을 의미하는 숫과 동물, 염소과 동물, 양과 동물 및 돼지과 동물도 포함한다. 적합한 동물은 유계류도 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "유계류"는 양, 돼지, 염소, 소 및 말을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 발굽이 있는 전형적으로 초식성 네발 짐승 포유동물이거나 이러한 포유동물을 의미한다. 적합한 동물은 착유 동물, 예컨대, 염소 및 소, 또는 마우스도 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질전환 발현에 적합한 동물은 염소이다.

[0142] 한 실시양태에서, 형질전환 동물은 관심있는 구축물을 포함하는 일차 세포를 생성한 후 일차 세포 핵을 제핵된 난모세포 내로 핵 전달함으로써 생성된다. 관심있는 구축물을 포함하는 일차 세포는 관심있는 항체의 코딩 서열, 예를 들면, 아달리무맙의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 단일 구축물을 일차 세포에 주입하거나 이러한 단일 구축물로 일차 세포를 형질감염시키므로써 생성되거나, 항체, 예를 들면, 아달리무맙의 중쇄 및 경쇄의 코딩 서열을 포함하는 별개의 구축물들로 일차 세포를 동시형질감염시키거나 이러한 별개의 구축물들을 일차 세포에 동시주입함으로써 생성된다. 그 다음, 이들 세포는 형질전환유전자(transgene) 카피 수, 형질전환유전자 구조 무결성 및 염색체 삽입 부위를 평가하기 위해 증폭되고 특징규명된다. 그 다음, 원하는 형질전환유전자 카피 수, 형질전환유전자 구조 무결성 및 염색체 삽입 부위를 갖는 세포는 형질전환 동물을 생성하기 위한 핵 전달에 사

용된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "핵 전달"은 핵이 공여자 세포로부터 제핵된 난모세포 내로 이식되는 클로닝 방법을 지칭한다.

[0143] 포유동물 유선 상피 세포에서 발현될 항체에 대한 코딩 서열은 선택된 동물(예컨대, 인간, 소 또는 마우스)로부터 유래된 게놈 물질 또는 역방향-번역된 메신저 RNA의 라이브러리의 스크리닝에 의해 획득될 수 있거나, 서열 데이터베이스, 예컨대, NCBI 또는 진뱅크(Genbank)로부터 획득될 수 있거나, 당분야에서 공지된 방법, 예를 들면, 펩티드 맵핑을 이용하여 항체의 서열을 획득함으로써 획득될 수 있다. 서열은 적절한 플라스미드 벡터 내로 클로닝될 수 있고 이. 콜라이(*E. coli*)와 같은 적합한 숙주 유기체에서 증폭될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "벡터"는 상이한 유전적 환경들 사이의 수송 또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 원하는 서열이 제한 및 결합(ligation)에 의해 삽입될 수 있는 다수의 핵산들 중 임의의 핵산일 수 있다. RNA 벡터도 이용가능하지만, 벡터는 전형적으로 DNA로 구성된다. 벡터는 플라스미드 및 파지미드를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 클로닝 벡터는 숙주 세포에서 복제할 수 있고, 새로운 재조합 벡터가 숙주 세포에서 그의 복제 능력을 보유하도록 벡터가 확인 가능한 방식으로 절단될 수 있고 원하는 DNA 서열이 결합될 수 있는 하나 이상의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한 부위를 추가 특징으로 하는 벡터이다. 발현 벡터는 원하는 DNA 서열이 조절 서열에 작동 가능하게 연결되고 RNA 전사체로서 발현될 수 있도록 제한 및 결합에 의해 삽입될 수 있는 벡터이다. 벡터는 벡터로 형질전환된 또는 형질감염된 세포와 벡터로 형질전환되지 않은 또는 형질감염되지 않은 세포의 식별에 사용되기에 적합한 하나 이상의 마커 서열을 추가로 함유할 수 있다. 마커는 예를 들면, 항생제 또는 다른 화합물에 대한 내성 또는 민감성을 증가시키거나 감소시키는 단백질을 코딩하는 유전자, 당분야에서 공지된 표준 분석에 의해 검출 가능한 활성(예를 들면, β -갈락토시다제(galactosidase) 또는 알칼리성 포스파타제(phosphatase))을 갖는 효소를 코딩하는 유전자, 및 형질전환된 또는 형질감염된 세포, 숙주, 콜로니 또는 플라크의 표현형에 가지적으로 영향을 미치는 유전자를 포함한다.

[0144] 항체, 또는 관심있는 항체의 중쇄 및 경쇄의 코딩 서열은 코딩 서열이 형질전환 비인간 포유동물의 유즙에서 발현될 수 있게 하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 벡터의 증폭 후, DNA 구축물은 절단될 수 있고, 벡터의 나머지에서 정제될 수 있고, 형질전환 동물의 생성에 사용될 수 있는 발현 벡터 내로 도입될 수 있다. 형질전환 동물은 그의 게놈 내로 삽입된 원하는 형질전환 단백질을 가질 것이다.

[0145] 형질전환 동물의 유즙으로의 생성을 유도하기에 적합한 DNA 서열은 천연 유래의 유즙 단백질로부터 유래된 5' 프로모터 영역을 보유할 수 있다. 이 프로모터는 결과적으로 호르몬 및 조직 특이적 인자의 조절 하에 있고 유즙분비 유선 조직에서 가장 활성적이다. 일부 실시양태에서, 사용된 프로모터는 유즙 특이적 프로모터이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "유즙 특이적 프로모터"는 단백질을 유즙 내로 분비하는 세포(예를 들면, 유선 상피 세포)에서 유전자의 발현을 천연적으로 유도하는 프로모터이고, 예를 들면, 카세인 프로모터, 예를 들면, 알파 카세인 프로모터(예를 들면, 알파 S-1 카세인 프로모터 및 알파 S-2 카세인 프로모터), 베타 카세인 프로모터(예를 들면, 염소 베타 카세인 유전자 프로모터(DiTullio, BIOTECHNOLOGY 10:74-77, 1992)), 감마 카세인 프로모터, 카파 카세인 프로모터, 유장 산성 단백질(WAP) 프로모터(Gorton et al., BIOTECHNOLOGY 5: 1183-1187, 1987), 베타 락토글로불린 프로모터(Clark et al., BIOTECHNOLOGY 7: 487-492, 1989) 및 알파 락트알부민 프로모터(Soulier et al., FEBS LETTS. 297:13, 1992)를 포함한다. 유선 조직에서 특이적으로 활성화되는 프로모터, 예를 들면, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV)의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터도 이 정의에 포함된다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 염소과 동물 베타 카세인 프로모터이다.

[0146] 프로모터는 형질전환 단백질이 유선 상피를 횡단하여 유즙 내로 분비되도록 유도하는 단백질 리더 서열의 생성을 유도하는 DNA 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 코딩 서열 및 조절 서열(예를 들면, 프로모터)은 이들이 코딩 서열의 발현 또는 전사를 조절 서열의 영향 또는 조절 하에 놓이게 하는 방식으로 연결되어 있을 때 "작동 가능하게 결합되어" 있거나 "작동 가능하게 연결되어" 있다고 말한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "리더 서열" 또는 "신호 서열"은 단백질 분비 신호를 코딩하고 형질전환 단백질을 코딩하는 다운스트림 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되어 있을 때 분비를 유도하는 핵산 서열이다. 리더 서열은 천연 인간 리더 서열 또는 인위적으로 유도된 리더일 수 있거나, 형질전환유전자 코딩 서열의 전사를 유도하는 데 사용된 프로모터와 동일한 유전자로부터, 또는 세포, 예컨대, 포유동물 유선 상피 세포로부터 정상적으로 분비되는 또 다른 단백질로부터 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 천연적으로 분비되는 유즙 단백질로부터 유래될 수 있는 3' 서열이 mRNA의 안정성을 개선하기 위해 추가될 수 있다.

[0147] 일부 실시양태에서, 핵 전달에 의한 형질전환 염소의 생성에 사용될(예를 들면, 아달리무맙 항체를 코딩하는) 구축물을 함유하는 일차 세포주를 생성하기 위해, 중쇄 및 경쇄 구축물이 일차 염소 피부 상피 세포 내로 형질감염될 수 있고, 이 세포는 형질전환유전자 카피 수, 형질전환유전자 구조 무결성 및 염색체 삽입 부위를 평가

하기 위해 증폭되고 전체적으로 특징규명된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "핵 전달"은 핵이 공여자 세포로부터 제핵된 난모세포 내로 이식되는 클로닝 방법을 지칭한다.

[0148] 클로닝은 관심있는 항체 또는 다른 유전자 구축물을 각각 생성할 수 있는 다수의 형질전환 동물들을 생성할 것이다. 생성 방법은 클로닝된 동물, 및 이 동물의 자손의 사용을 포함한다. 클로닝은 태아의 핵 전달, 핵 전달, 조직 및 장기 이식, 및 키메라 자손의 생성도 포괄한다. 클로닝 과정의 한 단계는 관심있는 형질전환유전자를 함유하는 세포, 예를 들면, 일차 세포의 계놈을 제핵된 난모세포 내로 전달하는 것을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "형질전환유전자"는 인위적으로 세포 또는 이의 조상세포 내로 삽입되고 그 세포로부터 발생하는 동물의 계놈의 일부가 되는 핵산 분자의 임의의 조각을 지칭한다. 이러한 형질전환유전자는 형질전환 동물에 대한 부분적 또는 전체적 외생성(즉, 외래) 유전자인 유전자를 포함할 수 있거나, 상기 동물의 내생 유전자에 대한 동일성을 갖는 유전자를 나타낼 수 있다. 난모세포에 대한 적합한 포유동물 공급원은 염소, 양, 소, 돼지, 토끼, 기니 피그, 마우스, 햄스터, 래트, 비인간 영장류 등을 포함한다. 바람직하게는, 난모세포는 유제류, 가장 바람직하게는 염소 또는 소로부터 얻는다. 난모세포의 단리 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있다. 본질적으로, 상기 방법은 포유동물, 예를 들면, 염소의 난소 또는 생식관으로부터 난모세포를 단리하는 단계를 포함한다. 용이하게 입수 가능한 유제류 난모세포 공급원은 호르몬에 의해 유도된 암컷 동물이다. 유전적 조작, 핵 전달 및 클로닝과 같은 기법의 성공적인 사용을 위해, 난모세포는 바람직하게는 이들 세포가 핵 전달을 위한 수용자 세포로서 사용될 수 있기 전, 및 이들이 정자 세포에 의해 수정되어 배아로 발생하기 전에 생체내에서 성숙될 수 있다. 생체내에서 성숙된 중기 II 난모세포는 핵 전달 기법에서 성공적으로 사용되고 있다. 본질적으로, 성숙 중기 II 난모세포는 발정기의 시작 후 또는 인간 융모막 성선자극호르몬(hCG) 또는 유사한 호르몬의 주입 후 수시간 이내에 과배란되지 않은 또는 과배란된 동물로부터 수술에 의해 채취된다.

[0149] 일부 실시양태에서, 형질전환 동물(예를 들면, 염소) 및 유선 상피 세포는 마이크로주입을 통해 생성된다. 염소에서의 마이크로주입은 예를 들면, 미국 특허 제7,928,064호에 기재되어 있다. 요약하면, 염소 수정란은 입체현미경 상에서 PBS 난관 수세로부터 채취되고, 10% 태아 소 혈청(FBS)을 함유하는 배지로 세척된다. 전핵이 보이는 경우, 배아는 즉시 마이크로주입될 수 있다. 전핵이 보이지 않는 경우, 배아는 전핵이 보이게 될 때까지 단기간 배양 동안 배지 내에 놓일 수 있다(Selgrath, et al., Theriogenology, 1990. p. 1195-1205). 1개 세포 염소 배아는 유리 오목 슬라이드 상에서 오일 하의 배지 마이크로소적(microdrop) 내에 놓인다. 2개의 보이는 전핵을 갖는 수정란은 고정된 단을 갖는 수직 현미경 상의 불꽃 윤곽 홀딩(flame-polished holding) 마이크로피펫 상에 고정될 수 있다. 미세한 유리 마이크로바늘을 이용하여 주입 완충제 중의 적절한 항체 코딩 구축물로 전핵을 마이크로주입할 수 있다(Selgrath, et al., Theriogenology, 1990. p. 1195-1205). 마이크로주입 후, 생존 배아는 배양물 내에 놓고 수용자 동물이 배아를 전달받을 준비가 될 때까지 항온처리된다(Selgrath, et al., Theriogenology, 1990. p. 1195-1205).

[0150] 따라서, 한 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 항체 또는 항체의 집단을 생성하는 유선 상피 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열번호 3을 포함하는 핵산 및 서열번호 4를 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열번호 3을 포함하는 핵산과 서열번호 4를 포함하는 핵산은 연결된다. "연결된"은 핵산이 예를 들면, 동일한 벡터 내에서 또는 거의 동일한 계놈 위치 내에서 물리적으로 연결된다는 것을 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 유선 상피 세포는 형질전환 비인간 포유동물 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 형질전환 비인간 포유동물은 염소이다.

[0151] 아달리무랍의 중쇄를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 3에 제공되어 있다:

ATGGAATTCGGCCTGAGCTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGT
 GCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGCAGAAGCC
 TGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCGACGACTACGCCATGCACTG
 GGTCCGCCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCACCTGGAA
 CAGCGGCCACATCGACTACGCCGACAGCGTGGAGGGCAGGTTACCATCAGCAG
 GGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA
 CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGTGTCCTACCTGAGCACCGCCAGCAGCCTG
 GATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGC
 CCTAGCGTGTCCCTCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGCACAGCCG
 CTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAA
 CTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACATTCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGC
 GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCTAGCAGCTCTCTGGGCACCC
 AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
 AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCCCC
 TGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACC
 CTGATGATCAGCAGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAC
 GAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAT
 GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC
 GTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAG
 GTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG
 GGCCAGCCCAGAGAACCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGGGACGAGCTG
 ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATA
 TCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACC
 CCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGA
 CAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC
 CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGTAATG
 A

[0152]

[0153] 아달리무랍의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 4에 제공되어 있다:

ATGGACATGAGAGTGCCCGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGAGA
 GGCGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGC
 GTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGGCCAGCCAGGGCATCAGGAACTAC
 CTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCC
 GCCAGCACCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGC
 ACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACT
 ACTGCCAGAGGTACAACAGGGCCCCCTACACCTTCGGACAGGGCACCAAGGTGG
 AGATCAAGAGGACCGTGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCGACGA
 GCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAATTCTACCCC
 CGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGC
 CAGGAAAGCGTCAACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACTCCCTGTCCAGC
 ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAAGGTGTACGCCTGCGAA
 GTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAG
 TGCTAATGA

[0154]

[0155] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 형질전환 항체 및 이의 집단을 제조하는 방법으로서, 형질전환 비인간 포유동

물의 유즙에서 핵산 구축물에 의해 코딩된 형질전환 항체를 발현시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체를 제조하는 방법은

- [0156] (a) 항-TNF-알파 항체를 코딩하는 형질전환유전자 DNA 구축물로 비인간 포유동물 세포를 형질감염시키는 단계;
- [0157] (b) 상기 항-TNF-알파 형질전환유전자 DNA 구축물이 세포의 게놈 내로 삽입되어 있는 세포를 선택하는 단계; 및
- [0158] (c) 제1 핵 전달 절차를 수행하여 항-TNF-알파 항체에 대한 이형접합성을 갖고 이 항체를 그의 유즙에서 발현할 수 있는 비인간 형질전환 포유동물을 생성하는 단계
- [0159] 를 포함한다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙이다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 형질전환유전자 DNA 구축물은 서열번호 3 및/또는 서열번호 4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비인간 형질전환 포유동물은 염소이다.
- [0162] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은
- [0163] (a) 항-TNF-알파 항체를 발현하도록 조작된 비인간 형질전환 포유동물을 제공하는 단계;
- [0164] (b) 비인간 형질전환 포유동물의 유즙에서 항-TNF-알파 항체를 발현시키는 단계; 및
- [0165] (c) 유즙에서 발현된 항-TNF-알파 항체를 단리하는 단계
- [0166] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0167] 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 서열번호 1을 포함하는 중쇄 및 서열번호 2를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙이다.
- [0168] 유선에서 발현된 재조합 단백질의 양 및 질을 예측하는 데 사용되는 수단들 중 하나는 유즙분비의 유도이다 (Ebert KM, 1994). 유도된 유즙분비는, 임신한 지 적어도 1년 후에 임신으로부터 비롯되는 최초의 자연적 유즙 분비부터가 아니라 형질전환 생성의 초기 단계부터 단백질의 발현 및 분석을 가능하게 한다. 유즙분비의 유도는 호르몬에 의해 또는 수작업으로 행해질 수 있다.
- [0169] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 글리코실화된 항체의 조성물은 유즙을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법은 형질전환 동물의 유즙으로부터 항체의 집단을 단리하는 단계를 포함한다. 형질전환 동물의 유즙으로부터 항체를 단리하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Pollock et al., Journal of Immunological Methods, Volume 231, Issues 1-2, 10 December 1999, Pages 147-157)에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법은 원하는 양의 갈락토실화를 갖는 글리코실화된 항체를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0170] *치료 방법, 약학 조성물, 용량 및 투여*
- [0171] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항체, 고도로 갈락토실화된 항체의 조성물, 고도로 갈락토실화된 항체를 갖는 항체의 집단, 또는 고도로 갈락토실화된 항체를 갖는 항체의 집단을 포함하는 조성물을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 염증 장애 또는 자가면역 장애를 갖는다. 일부 실시양태에서, 염증 장애 또는 자가면역 장애는 류마티스성 관절염, 건선, 크론병, 소아 특발성 관절염, 강직성 척추염, 궤양성 대장염, 만성 염증, 간염, 베체트병, 베게너 육아종증 또는 사르코이드증이다.
- [0172] 한 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 항체들 또는 조성물들 중 어느 하나를, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역 장애 또는 염증과 관련된 장애를 갖는다. 면역 장애 및 염증과 관련된 장애는 성인 호흡곤란 증후군, 동맥경화증, 천식, 죽상동맥경화증, 당뇨병, 간경화증, 크론병, 진성 당뇨병, 폐기종, 과다호산구증가증, 염증, 자극성 장 증후군, 다발성 경화증, 중증근육 무력증, 심근 또는 심낭 염증, 골관절염, 골다공증, 췌장염, 류마티스성 관절염, 공피증, 결장염, 전신홍반루푸스, 루푸스 신염, 진성 당뇨병, 염증 장 질환, 복강 질환, 자가면역 갑상선 질환, 에디슨병, 쇼그렌 증후군, 시덴함무도병, 다카야스 관절염, 베게너 육아종증, 자가면역 위염, 자가면역 간염, 피부 자가면역 질환, 자가면역 확장 심근병증, 다발성 경화증, 심근염, 중증근육무력증, 악성 빈혈, 다발근육통증, 건선, 급속 진행성 사구체 신염, 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, 혈관염, 근육의 자가면역 질환, 정소의 자가면역 질환, 난소의 자가면역 질환 및 눈의 자가면역 질환, 보통여드름, 천식, 자가면역 질환, 복강 질환, 만성 전립선염, 사구체신염,

과다민감성, 염증 장 질환, 골반 염증 질환, 재관류 손상, 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 이식 거부, 혈관염 및 간질성 방광염을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0173] 한 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 항체들 또는 조성물들 중 어느 하나를, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 대상체는 TNF 수준의 조절이상을 특징으로 하는 질환을 갖는 대상체이다. TNF 수준의 조절이상을 특징으로 하는 질환은 상기 논의된 염증 장애 및 면역장애 이외에 알츠하이머, 암 및 우울증을 포함한다.

[0174] 한 양태에서, 본 개시내용은 소정량의 항체 또는 항체의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 비히클, 희석제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 유즙을 포함한다.

[0175] 한 양태에서, 본 개시내용은 대상체가 갖거나 가질 위험이 있는 질환의 치료에 효과적인 양으로 제공된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 비인간 동물, 예를 들면, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소 또는 영장류이다.

[0176] 본원에서 제공된 치료 유효량의 항체를, 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 수반하는 실시양태에 따라, "치료 유효량" 또는 "치료에 효과적인 양"은 질환 상태를 억제하거나 역전시키기 위해(예를 들면, 염증을 치료하기 위해) 필요한 항체 또는 조성물의 양을 의미한다. 치료 유효량의 결정은 구체적으로 약제의 독성 및 효능과 같은 인자에 의존한다. 이들 인자는 다른 인자, 예컨대, 효능, 상대적 생체이용가능성, 환자 체중, 불리한 부작용의 중증도 및 바람직한 투여 방식에 따라 상이할 것이다. 독성은 당분야에서 잘 공지된 방법을 이용함으로써 측정될 수 있다. 효능은 동일한 지침을 이용함으로써 측정될 수 있다. 예를 들면, 효능은 염증의 감소에 의해 측정될 수 있다. 따라서, 약학적 유효량은 임상외에 의해 독성학적으로 용인될 수 있되 효과적인 것으로 간주되는 양이다.

[0177] 용량은 투여 방식에 따라 원하는 국소 또는 전신 약물(예를 들면, 항-TNF-알파 항체) 수준을 달성하도록 적절하게 조절될 수 있다. 대상체에서의 반응이 이러한 용량에서 불충분한 경우, 환자 내약성이 허용하는 정도까지 훨씬 더 높은 용량(또는 상이한 보다 더 국소화된 전달 경로에 의한 효과적인 보다 더 높은 용량)이 사용될 수 있다. 항체의 적절한 전신 수준을 달성하기 위해 1일당 다회 용량이 예상된다. 적절한 전신 수준은 예를 들면, 환자의 약물 피크 또는 지속된 혈장 수준의 측정에 의해 결정될 수 있다. "용량" 및 "복용량"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0178] 일부 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 항체 또는 약학 조성물의 양은 주당 50 내지 500 mg/kg, 100 내지 400 mg/kg, 또는 200 내지 300 mg/kg이다. 한 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 항체 또는 약학 조성물의 양은 주당 250 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 400 mg/kg의 초기 용량이 제1주에서 대상체에게 투여된 후, 250 mg/kg이 후속 주에서 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 속도는 10 mg/분 미만이다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 항체 또는 약학 조성물의 투여는 또 다른 치료제를 사용한 치료 1시간 이상 전에 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 약학 조성물의 투여 전에 예비치료가 투여된다.

[0179] 일부 실시양태에서, 제공된 조성물은 생체내 적용을 위해 사용된다. 의도된 생체내 투여 방식에 따라, 사용된 조성물은 고체, 반고체 또는 액체의 제형, 예를 들면, 정제, 환제, 산제, 캡슐제, 겔, 연고, 액체, 현탁액 등으로 존재할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 정확한 용량의 단위 투여에 적합한 유닛 제형으로 투여된다. 원하는 제제에 따라, 조성물은 동물 또는 인간에게 투여될 약학 조성물을 제제화하기 위해 통상적으로 사용되는 수계 비히클로서 정의되는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제도 포함할 수 있다. 희석제는 관심있는 인간 재조합 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는 증류수, 생리식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액 및 헵크 용액이다. 상기 희석제는 관심있는 동결건조된 재조합 단백질을 재구성하는 데 사용될 수 있다. 추가로, 약학 조성물은 다른 의약, 약제, 담체, 보조제, 무독성 비-치료 비-면역원성 안정화제 등도 포함할 수 있다. 이러한 희석제 또는 담체의 유효량은 성분의 가용성, 생물학적 활성 등의 관점에서 약학적으로 허용 가능한 제제를 얻는 데 효과적인 양이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 조성물은 멸균 상태로 존재한다.

[0180] 생체내 치료 동안 투여는 경구, 비경구, 근육내, 코내, 설하, 기관내, 흡입, 눈, 질 및 직장을 포함하는 임의의 수의 경로에 의한 투여일 수 있다. 피막내, 정맥내 및 복강내 투여 경로도 이용될 수 있다. 당업자는 투여 경로가 치료될 장애에 따라 달라진다는 것을 인식한다. 예를 들면, 본원의 조성물 또는 항체는 경구, 비경구 또는 국소 투여를 통해 대상체에게 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원의 조성물 또는 항체는 정맥내 주입에 의

해 부여된다.

- [0181] 조성물은 이를 전신적으로 전달하는 것이 바람직할 때 주사, 예를 들면, 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 방부제가 첨가된 유닛 제형, 예를 들면, 앰플 또는 다회 용량 용기 내에 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 유화액과 같은 형태를 취할 수 있고, 제제화제, 예컨대, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다.
- [0182] 비경구 투여용 약학 제제는 수용성 형태의 활성 조성물의 수용액을 포함한다. 추가로, 활성 조성물의 현탁액이 적절한 유성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 지방유, 예컨대, 참깨유, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트 또는 트리글리세라이드, 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점성을 증가시키는 물질, 예컨대, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의적으로, 현탁액은 적합한 안정화제, 또는 조성물의 가용성을 증가시켜 고도로 농축된 용액의 제조를 가능하게 하는 물질도 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 조성물은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들면, 멸균 발열원 무함유 물로 재구성될 산제 형태로 존재할 수 있다.
- [0183] 경구 투여의 경우, 약학 조성물은 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 부형제, 예컨대, 결합제(예를 들면, 미리 젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들면, 락토스, 미세결정성 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들면, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 붕해제(예를 들면, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤화제(예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트)를 사용함으로써 통상적인 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐제의 형태를 취할 수 있다. 정제는 당분야에서 잘 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 예를 들면, 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있거나, 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로 재구성될 건조 생성물로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 예컨대, 현탁제(예를 들면, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들면, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클(예를 들면, 아몬드유, 유성 에스테르, 에틸 알코올 또는 분획화된 식물유); 및 방부제(예를 들면, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)를 사용함으로써 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 상기 제제는 적절한 경우 완충제 염, 풍미제, 착색제 및 감미제도 함유할 수 있다. 성분 또는 성분들은 항체의 경구 전달이 효과적이도록 화학적으로 변경될 수 있다. 일반적으로, 예상되는 화학적 변경은 하나 이상의 분자를 항체에 부착시키는 것인데, 이때 상기 분자는 (a) 단백질용해의 억제; 및 (b) 위 또는 장으로부터 혈류 내로의 흡수를 허용한다. 항체의 전체 안정성의 증가 및 체내 순환 시간의 증가도 요구된다. 이러한 분자의 예로는 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸 셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리프롤린이 있다(Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hochenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189). 사용될 수 있는 다른 중합체는 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-티옥소칸이다. 상기 표시된 바와 같이, 폴리에틸렌 글리콜 분자가 약학 사용에 바람직하다. 경구 조성물의 경우, 방출 위치는 위, 소장(십이지장, 공장 또는 회장), 또는 대장일 수 있다. 당업자는 위에서 용해되지 않을 것이지만 십이지장 또는 장내의 다른 부위에서 물질을 방출시킬 제제를 이용할 수 있다. 바람직하게는, 방출은 항체의 보호에 의해, 또는 위 이외의 환경, 예컨대, 장에서의 생물학적 활성 물질의 방출에 의해 위 환경의 유해한 효과를 피할 것이다.
- [0184] 협측 투여의 경우, 조성물은 통상적인 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.
- [0185] 흡입에 의한 투여의 경우, 본 개시내용에 따라 사용될 조성물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체의 사용을 통해 가압된 팩 또는 분사기로부터 에어로졸 분무 제제의 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우, 용량 유닛은 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 조성물과 적합한 산제 기체, 예컨대, 락토스 또는 전분의 산제 혼합물을 함유하는, 흡입기 또는 취입기에서 사용될 예를 들면, 젤라틴의 캡슐 및 카트리지가 제제화될 수 있다.
- [0186] 폐 전달도 본원에서 예상된다. 조성물은 흡입하는 동안 포유동물의 폐로 전달될 수 있고 폐 상피 내층(lining)을 횡단하여 혈류로 들어갈 수 있다. 분사기, 계량된 용량 흡입기 및 산제 흡입기(이들 모두 당업자에게 익숙함)를 포함하나 이들로 한정되지 않는, 치료 제품의 폐 전달을 위해 디자인된 매우 다양한 기계 장치들이 본 개시내용의 실시예에 사용될 것으로 예상된다.
- [0187] 본원에 개시된 약학 조성물의 코 전달도 예상된다. 코 전달은 치료 제품이 코에 투여된 후 폐에서의 상기 제품

의 침착을 필요로 하지 않으면서 본 개시내용의 약학 조성물이 혈류 내로 직접 통과할 수 있게 한다. 코 전달용 제제는 텍스트란 또는 사이클로텍스트란을 갖는 제제를 포함한다.

[0188] 조성물은 예를 들면, 통상적인 좌제 기제, 예컨대, 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드를 함유하는 직장 또는 질 조성물, 예컨대, 좌제 또는 체류 관장제로 제제화될 수도 있다.

[0189] 약학 조성물은 적합한 고체 또는 겔 상 담체 또는 부형제도 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예로는 탄산칼슘, 인산칼슘, 다양한 당, 전분, 셀룰로스 유도제, 젤라틴 및 중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜이 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0190] 적합한 액체 또는 고체 약학 제형은 예를 들면, 흡입용 수성 또는 식염수 용액, 마이크로캡슐화된 상태, 엔코클리에이트화된(encochleated) 상태, 미시적 금 입자 상에 코팅된 상태, 리포솜에 함유된 상태, 연무화된 상태, 에어로졸, 피부 내로 이식될 펠렛, 또는 피부 내에 긁힌 자국을 만들 날카로운 물체 상에 건조된 상태로 존재한다. 약학 조성물은 과립제, 산제, 정제, 코팅된 정제, (마이크로)캡슐제, 좌제, 시럽, 유화액, 현탁액, 크림, 점적제, 또는 활성 조성물의 방출을 지연시키는 제제도 포함하고, 이때 이들의 제조에서 부형제 및 첨가제 및/또는 보조제, 예컨대, 붕해제, 결합제, 코팅제, 팽윤제, 유희제, 풍미제, 감미제 또는 가용화제가 전술된 바와 같이 통상적으로 사용된다. 약학 조성물은 다양한 약물 전달 시스템들에서 사용되기에 적합하다. 약물 전달 방법의 간단한 검토를 위해서는 본원에 참고로 도입되는 문헌(Langer, Science 249:1527-1533, 1990)을 참조한다.

[0191] 항체 및 임의적으로 다른 치료제는 그 자체로(순수한 상태로), 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 투여될 수 있다. 의약에서 사용될 때, 염은 약학적으로 허용가능해야 하지만, 약학적으로 허용가능하지 않은 염이 그의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조에 편리하게 사용될 수 있다. 이러한 염은 하기 산들로부터 제조된 염들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 설푼산, 주석산, 구연산, 메탄 설푼산, 포름산, 말론산, 석신산, 나프탈렌-2-설푼산 및 벤젠 설푼산. 또한, 이러한 염은 알칼리성 금속 또는 알칼리성 토류 염, 예컨대, 카복실산 기의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염으로서 제조될 수 있다.

[0192] 적합한 완충제는 아세트산 및 염(1 내지 2 중량/부피%); 구연산 및 염(1 내지 3 중량/부피%); 붕산 및 염(0.5 내지 2.5 중량/부피%); 및 인산 및 염(0.8 내지 2 중량/부피%)을 포함한다. 적합한 방부제는 염화벤즈알코늄(0.003 내지 0.03 중량/부피%); 클로로부탄올(0.3 내지 0.9 중량/부피%); 파라벤(0.01 내지 0.25 중량/부피%); 및 티메로살(0.004 내지 0.02 중량/부피%)을 포함한다.

[0193] 본 개시내용의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 내에 포함된 유효량의 항체 및 임의적으로 치료제를 함유한다. 용어 약학적으로 허용 가능한 담체는 인간 또는 다른 척추동물에게 투여되기에 적합한 하나 이상의 상용 가능한 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 용어 담체는 적용을 용이하게 하기 위해 활성 성분과 조합되는 천연 또는 합성 유기 또는 무기 성분을 의미한다. 또한, 약학 조성물의 성분들은 원하는 약학적 효능을 실질적으로 손상시킬 상호작용이 존재하지 않는 방식으로 본 개시내용의 조성물과 혼합될 수 있고 서로 혼합될 수 있다.

[0194] 구체적으로 항체를 포함하나 이것으로 한정되지 않는 치료제(들)는 입자 내에 제공될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 입자는 전체적으로 또는 부분적으로 항체, 또는 항체와 함께 투여된 다른 치료제로 구성될 수 있는 나노입자 또는 마이크로입자(또는 일부 경우 더 큰 입자)를 의미한다. 입자는 치료제(들) 이외에 부식성, 비부식성, 생체분해성 또는 비생체분해성 물질, 또는 이의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 약학 및 의약 분야에서 관용적으로 사용되는 물질들 중 임의의 물질을 포함할 수 있다. 입자는 용액 또는 반고체 상태로 항체를 함유하는 마이크로캡슐일 수 있다. 입자는 사실상 임의의 형태의 입자일 수 있다.

[0195] 항체의 제조 방법

[0196] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체 및 고도로 갈락토실화된 항체를 갖는 집단의 제조 방법을 제공한다.

[0197] 한 양태에서, 본 개시내용은 항체의 집단이 생성되도록 비인간 포유동물의 유선 상피 세포에서 항체의 집단을 발현시키는 단계를 포함하는 항체의 집단을 제조하는 방법을 제공하는데, 이때 상기 항체는 항-TNF-알파 항체이고, 집단 내의 항체의 갈락토실화 수준은 70% 이상이다. 일부 실시양태에서, 항-TNF-알파 항체는 아달리무맙이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 배양물에 존재하고 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산으로 형질 감염되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 서열번호 3 및 서열번호 4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유

선 상피 세포는 그의 유선에서 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 발현하도록 조작된 비인간 포유동물에 존재한다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 염소, 양, 들소, 낙타, 소, 돼지, 토끼, 버팔로, 말, 래트, 마우스 또는 라마의 유선 상피 세포이다. 일부 실시양태에서, 유선 상피 세포는 염소의 유선 상피 세포이다.

[0198] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체, 또는 본원에 개시된 고도로 갈락토실화된 항체를 갖는 집단을 발현하는 유선 상피 세포를 제공한다.

[0199] 한 양태에서, 본 개시내용은 고도로 갈락토실화된 항-TNF-알파 항체, 또는 본원에 개시된 고도로 갈락토실화된 항체를 갖는 집단을 발현하는 유선 상피 세포를 포함하는 형질전환 비인간 포유동물을 제공한다.

[0200] 한 양태에서, 본 개시내용은 글리코실화된 항체 또는 글리코실화된 항체의 집단을 제조하는 방법으로서, 형질전환 비인간 포유동물의 유즙에서 핵산 구축물에 의해 코딩된 글리코실화된 항체를 발현시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 포유동물 유선 상피 세포는 그의 유즙에서 상기 항체를 발현하도록 조작된 비인간 포유동물의 유선 상피 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 포유동물 유선 상피 세포는 배양물 중의 포유동물 유선 상피 세포이다.

[0201] 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은

[0202] (a) 항체를 발현하도록 조작된 비인간 형질전환 포유동물을 제공하는 단계;

[0203] (b) 비인간 형질전환 포유동물의 유즙에서 항체를 발현시키는 단계;

[0204] (c) 유즙에서 발현된 항체를 단리하는 단계; 및

[0205] (d) 단리된 항체 상의 갈락토스의 존재를 검출하는 단계

[0206] 를 포함한다.

[0207] 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 생성된 글리코실화된 항체의 집단이 특정 백분율(예를 들면, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 이보다 더 높은 백분율)의 갈락토실화를 포함하도록 유선 상피 세포에서 글리코실화된 항체의 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항-TNF-알파 항체이다. 일부 실시양태에서, 글리코실화된 항체는 서열번호 1을 포함하는 중쇄 및 서열번호 2를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이 방법은 시험관내에서 수행된다. 다른 실시양태에서, 이 방법은 생체내에서, 예를 들면, 형질전환 염소의 유선에서 수행된다.

[0208] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 유즙분비를 유도하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 방법은 추가 단리 및/또는 정제 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 방법은 수득된 항체의 글리코실화 패턴을 세포 배양, 예를 들면, 비유선 세포 배양으로 생성된 항체와 비교하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 상기 방법은 수득된 항체의 글리코실화 패턴을 비유선 상피 세포에 의해 생성된 항체와 비교하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 세포는 세포 배양의 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리코실화 패턴은 항체 또는 항체의 집단에 존재하는 갈락토스의 양이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 글리코실화된 항체의 집단에 존재하는 갈락토실화의 백분율을 세포 배양, 예를 들면, 비유선 세포 배양으로 생성된 글리코실화된 항체의 집단에 존재하는 갈락토실화의 백분율과 비교하는 단계를 추가로 포함한다. 항체의 글리코실화 패턴을 평가하는 실험 기법은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 실험 기법들 또는 본원, 예를 들면, 하기 실시예에서 제공된 실험 기법들 중 임의의 실험 기법일 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 액체 크로마토그래피 질량 분광측정, 탠덤(tandem) 질량 분광측정 및 웨스턴 블롯 분석을 포함한다.

[0209] 일부 실시양태에서, 항체는 본원에서 제공된 바와 같이 생성된 형질전환 동물의 유즙, 또는 상기 형질전환 동물의 자손으로부터 항체를 채취함으로써 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 형질전환 포유동물에 의해 생성된 항체는 생성된 유즙 ℓ 당 1 g 이상의 수준으로 생성된다. 유리하게는, 본 발명에 따른 방법은 생성된 유즙 ℓ 당 4 g 이상, 유리하게는 ℓ 당 5, 10, 15, 20, 25, 30 또는 35 g 이상, 유리하게는 ℓ 당 최대 70 g의 생성을 가능하게 한다.

[0210] 본원에서 달리 정의되어 있지 않은 한, 본 개시내용과 관련하여 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 추가로, 문맥이 달리 요구하지 않은 한, 단수형 용어는 복수형을 포함할 것이고 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다. 본 개시내용의 방법 및 기법은 일반적으로 당분야에서 잘 공지된 통상적인 방법에 따라 수행된다. 일반적으로, 본원에 기재된 생화학, 효소학, 분자 및 세포 생물학, 미생물학, 유전학, 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용된 명명법

및 이들의 기법은 당분야에서 잘 공지되어 있고 통상적으로 이용되는 명명법 및 기법이다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 본 개시내용의 방법 및 기법은 일반적으로 당분야에서 잘 공지되어 있고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반적인 참고문헌들 및 보다 더 구체적인 참고문헌들에 기재되어 있는 통상적인 방법에 따라 수행된다.

[0211] 본 발명은 결코 추가 한정으로서 간주되어서는 안 되는 하기 실시예에 의해 더 예시된다. 본원 전체에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌들(논문 참고문헌, 발행된 특허, 공개된 특허출원, 및 동시계류 특허출원을 포함함)의 전체 내용은 본원에 명백히 참고로 도입된다.

[0212] **실시예**

[0213] *재료 및 방법*

[0214] *아달리무맙을 생성하는 형질전환 염소의 생성*

[0215] 그의 계놈 내에 아달리무맙 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 형질전환 염소를 생성하였다. 전통적인 마이크로주입 기법을 이용하여 아달리무맙을 생성하는 염소를 생성하였다(예를 들면, 미국 특허 제7,928,064호 참조). 공개된 아미노산 서열(미국 특허 제6,090,382호)에 기초하여 중쇄 및 경쇄(서열번호 3 및 서열번호 4)를 코딩하는 cDNA를 합성하였다. 이들 DNA 서열들을 베타 카세인 발현 벡터와 결합시켜 구축물 BC2601 HC 및 BC2602 LC를 생성하였다. 이들 플라스미드들에서, 아달리무맙을 코딩하는 핵산 서열은 염소의 유전에서 아달리무맙의 발현을 촉진하는 프로모터의 조절 하에 있다. 원핵 서열을 제거하고 DNA를 염소의 착상 전 배아 내로 마이크로주입하였다. 그 다음, 이들 배아들을 가임신 암컷에게 전달하였다. 생성된 자손을 형질전환유전자의 존재에 대해 스크리닝하였다. 상기 새들 둘 다를 보유하는 자손은 형질전환 파운더(founder)로서 확인되었다.

[0216] 연령이 적절한 경우, 파운더 동물들을 교배하였다. 임신 및 분만 후, 이들을 착유하였다. 시간 경과를 분만 후 유즙분비 시작으로부터 경과한 날(예를 들면, 3일째 날, 7일째 날, 11일째 날)이었다. 각각의 시점에서 유즙으로부터 아달리무맙 항체를 정제하고 본원에 기재된 바와 같이 특징규명하였다.

[0217] *ELISA에 의한 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 결합의 측정*

[0218] 웰당 100 μ l의 PBS 중의 5 μ g/ml TNF-알파를 4°C에서 96웰 플레이트에 밤새 코팅하였다. 비특이적 부위의 차단(200 μ l PBS/1% BSA와의 항온처리, 1시간 실온) 후, 형질전환으로 생성된 아달리무맙 또는 탈글리코실화된 아달리무맙을 PBS/1% BSA 중의 다양한 농도(0 내지 10 μ g/ml)로 20분 동안 첨가하였다. 세척 후, 퍼록시다제에 커플링된 염소 항-인간 IgG(H+L)에 이어서 기질(H₂O₂ 및 테트라메틸벤지딘)을 첨가함으로써 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 코팅된 TNF-알파의 결합을 평가하였다. 20분의 항온처리 후, 50 μ l의 희석된 H₂SO₄을 사용하여 반응을 중단시키고 450 nm에서 OD를 판독하였다. 형질전환으로 생성된 아달리무맙에 대한 결과는 도 10에 제시되어 있다.

[0219] *CD16에의 결합, 3G8 항체의 경쟁*

[0220] 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 CD16의 결합을 평가하기 위해, 항-CD16 결합 항체 3G8(산타 크루즈 바이오텍(Santa Cruz Biotech))을 사용한 치환 연구를 수행하였다. 치환 시험은 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 NK 표면 막에서 발현된 CD16 수용체의 결합을 측정할 수 있게 하였다.

[0221] 음성 고갈(밀테니이(Miltenyi))로 건강한 공여자의 말초혈로부터 천연 살해 세포(NK 세포)를 정제하였다. 그 다음, NK 세포를 다양한 농도(0 내지 83 μ g/ml)의 형질전환으로 생성된 아달리무맙 및 고정된 농도의 플루오로크롬에 접합된 항-CD16 항체 3G8(3G8-PE)과 항온처리하였다. 세척 후, 3G8-PE와 NK 세포 상의 CD16 수용체의 결합을 유동 세포측정(flow cytometry)으로 평가하였다. 관찰된 평균 형광 값(MFI)을 % 결합으로서 표현하였는데, 이때 100%의 값은 시험된 형질전환으로 생성된 아달리무맙 없이 관찰된 값에 상응하므로 최대 3G8 결합에 상응한다. 0%의 값은 항체 3G8의 부재 하에서의 MFI에 상응한다. 프리즘(PRISM) 소프트웨어를 이용하여 I_{max}의 50%까지 3G8 결합의 억제를 유도하는 데 요구된 항체 농도인 IC₅₀을 계산하였다. 결과는 도 11에 제시되어 있다.

[0222] *형질전환으로 생성된 아달리무맙의 Fc 단편을 통한 주르카트 세포에 의해 발현된 CD16 상에서의 가용성 TNF-알파와 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 결합*

[0223] 주르카트-CD16 세포를 4°C에서 20분 동안 10 μ g/ml의 형질전환으로 생성된 아달리무맙 또는 이의 탈글리코실화된 버전과 항온처리하였다. 세척 후, 100 μ l의 TNF-알파를 4°C에서 20분 동안 1 μ g/ml의 최종 농도로 세포 펠렛에 첨가하였다. 후속 세척 후, 세포를 4°C에서 20분 동안 5 μ g/ml의 바이오티닐화된 염소 항-인간 TNF-알파 항

체와 항온처리하였다. 또 다른 라운드의 세척 후, PE-플루오로코롬에 커플링된 스트렙타비딘을 첨가하여 4℃에서 20분 동안 TNF-알파의 결합을 가시화하였다. 샘플을 유동 세포측정으로 분석하였다. 결과는 도 12에 제시되어 있다.

[0224] 실시예 1: 형질전환으로 생성된 아달리무맙

[0225] 항체로부터 N-글리칸을 방출시키고 방출된 올리고사카라이드를 컬럼 상에서 런닝시킴으로써 형질전환 염소의 유즙에서 생성된 아달리무맙 항체의 글리코실화 패턴("올리고사카라이드 시그너처")을 확인하였다.

[0226] 도 1 내지 4 및 6 내지 8은 염소 #1(도 1 내지 4) 및 염소 #2(도 6 내지 8)로부터 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체로부터 방출된 N-글리칸 올리고사카라이드를 보여준다. 모노사카라이드 기는 다음과 같이 표시되어 있다:

[0227] 흑색 정사각형: N-아세틸글루코사민(GlcNAc)

[0228] 삼각형: 푸코스

[0229] 회색 원형: 만노스

[0230] 백색 원형: 갈락토스

[0231] 회색 마름모형: N-글리콜릴뉴라민산(NGNA): 시알산

[0232] 백색 마름모형: N-아세틸뉴라민산(NANA): 시알산

[0233] 도 1은 염소 #1의 유즙에서 생성된 형질전환 아달리무맙 항체로부터 방출된 N-글리칸 올리고사카라이드의 대표적인 크로마토그램을 보여준다. 이 크로마토그램은 생성된 14종의 주요 N-글리칸 올리고사카라이드들 중 12종이 N-글리칸 쇠에서 하나 이상의 갈락토스를 갖고, 이들 중 4종의 올리고사카라이드가 2개의 갈락토스를 갖는다는 것을 보여준다. 상기 올리고사카라이드들 중 2종만이 순수하게 올리고만노스이다(피크 1 및 피크 3 참조). 도 1은 생성된 14종의 주요 올리고사카라이드들 중 9종이 푸코실화되어 있다는 것도 보여준다. 푸코실화된 올리고사카라이드 전부가 또한 갈락토실화되어 있다.

[0234] 도 2 내지 4는 7일의 유즙분비(도 2), 17일의 유즙분비(도 3) 및 32일의 유즙분비(도 4) 후 채취된 염소 #1의 유즙에서 생성된 형질전환 아달리무맙 항체로부터 방출된 N-글리칸 올리고사카라이드의 크로마토그램을 보여준다.

[0235] 염소 #1의 유즙에서 생성된 아달리무맙 항체로부터 단리된 모든 N-글리칸 올리고사카라이드들의 상대적 백분율은 도 5에 표시되어 있다. 또한, 도 5는 모노-갈락토실화의 총 백분율, 바이-갈락토실화의 백분율, 총 갈락토실화(모노-갈락토실화 + 바이-갈락토실화)의 백분율, 상기 제공된 식에 따라 계산된 갈락토실화의 백분율, 상기 제공된 식에 따라 계산된 푸코실화의 백분율, 갈락토실화 대 푸코실화의 비, 및 하나 이상의 시알산(% 시알릴화)을 갖는 글리칸 구조의 백분율을 표로 작성하여 보여준다. 결과는 하기 표 1에도 요약되어 있다:

표 1

염소 #1로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	<u>7일째 날</u>	<u>17일째 날</u>	<u>32일째 날</u>	<u>평균</u>
모노-Gal(%)	30.8	42.9	44.1	39.2
바이-Gal(%)	53.1	46.0	47.0	48.7
모노-Gal + 바이-Gal(%)	83.9	88.9	91.1	88.0
Gal*(%)	82.9	88.2	89.8	87.0
Fuc*(%)	63.5	74.9	81.9	73.4
비 Gal/Fuc	1.30	1.17	1.10	1.18
시알릴화(%)	50.4	59.3	62.7	57.5

* 명세서에 기재된 식에 따라 계산됨

[0236]

[0237] 도 6 내지 8은 3일의 유즙분비(도 6), 11일의 유즙분비(도 7) 및 21일의 호르몬 유도된 유즙분비(도 8) 후 채취된 염소 #2의 유즙에서 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체로부터 방출된 N-글리칸 올리고사카라이드의 크로마토그램을 보여준다.

[0238] 염소 #2의 유즙에서 생성된 아달리무맙 항체로부터 단리된 모든 N-글리칸 올리고사카라이드들의 상대적 백분율은 도 9에 표시되어 있다. 또한, 도 9는 모노-갈락토실화의 총 백분율, 바이-갈락토실화의 백분율, 총 갈락토실화(모노-갈락토실화 + 바이-갈락토실화)의 백분율, 상기 제공된 식에 따라 계산된 갈락토실화의 백분율, 상기 제공된 식에 따라 계산된 푸코실화의 백분율, 갈락토실화 대 푸코실화의 비, 및 하나 이상의 시알산(% 시알릴화)을 갖는 글리칸 구조의 백분율을 표로 작성하여 보여준다. 결과는 하기 표 2에도 요약되어 있다:

표 2

염소 #2로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	3일째 날	11일째 날	21일째 날	평균
모노-Gal(%)	27.3	25.7	27.5	26.8
바이-Gal(%)	39.0	43.0	31.4	37.8
모노-Gal + 바이-Gal(%)	66.3	68.7	58.9	64.6
Gal*(%)	64.6	67.9	57.8	63.4
Fuc*(%)	51.6	54.0	46.0	50.5
Gal/Fuc	1.25	1.25	1.25	1.25
시알릴화(%)	40.8	42.6	39.1	40.8

* 명세서에 기재된 식에 따라 계산됨

[0239]

실시예 2: 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 결합 연구

[0240]

[0241] 도 10은 형질전환으로 생성된 아달리무맙이 96웰 플레이트에 코팅된 가용성 TNF-알파에 결합할 수 있다는 것을 보여준다. 아글리코실화된 형질전환으로 생성된 아달리무맙은 가용성 TNF-알파에도 결합할 수 있었다(데이터는 제시되어 있지 않음).

[0241]

[0242] 도 11은 형질전환으로 생성된 아달리무맙이 천연 살해(NK) 세포에 의해 발현된 CD16에 결합한다는 것을 보여준다. 결합은 항-CD16 결합 항체 3G8을 사용한 경쟁 실험에서 입증되었다. 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 CD16의 결합은 약하게 갈락토실화된 항체와 CD16의 결합보다 더 강하다(데이터는 제시되어 있지 않음). 따라서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙은 더 높은 ADCC 활성을 가질 것으로 예상된다.

[0242]

[0243] 도 12는 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체가 가용성 TNF-알파 및 CD16 발현 주르카트 세포 둘 다에 결합하는 반면, 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 아글리코실화된 버전은 결합하지 못한다는 것을 보여준다. 따라서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체는 ADCC 활성을 보이는 반면, 아글리코실화된 항체는 이러한 활성을 보이지 않을 것으로 예상된다.

[0243]

실시예 3: 추가 동물에서의 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 글리코실화 분석

[0244]

표 3

아달리무맙 생성 데이터의 요약

염소	#경과일 유즙분비	평균 유즙 부피(ml)	WM에서 추정된 mg/ml	% 응집	정제된 총 #mg
1	32	245	29	20	400(더 많은 TBD)
8	36	350	14*	20	1496
9	36	382	35**	25	3929
3	36***	634	5	14	502
4	29***	1458	4	12	390
5	29***	1663	4	8	341
6	36***	1899	4	12	374
7	29***	1676	5	8	395
2	36	260	34**	3	3719

*: 20 mg/ml에서 시작되어 10 mg/ml까지 떨어진 농도

**: 단백질 A 컬럼이 파다로딩된 경우 값은 더 높을 수 있다.

***: 유즙분비 부피는 건조되었을 때 여전히 높았다.

[0245]

[0246]

아달리무맙은 천연 유즙분비 동안 다수의 상이한 염소들에서 형질전환으로 생성되었다. 형질전환으로 생성된 아달리무맙에 대한 글리칸 프로파일을 조사하였다. 도 13은 표 3에 나열된 9마리의 상이한 염소들로부터 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 집단에 존재하는 상이한 글리칸 형태들의 백분율의 요약을 제공한다.

[0247]

도 14는 호르몬 유도된 유즙분비 동안 염소 #10 및 염소 #1로부터 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸 올리고사카라이드의 백분율의 요약을 보여준다.

[0248]

도 15는 8마리의 상이한 염소들(염소 #2부터 #9까지)로부터 형질전환으로 생성된 아달리무맙 항체의 집단의 N-글리칸 올리고사카라이드의 요약을 보여준다. 도 15에 제공된 데이터는 표 4 내지 11에 요약되어 있다.

표 4

염소 #2로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	29 일째 날
모노-Gal(%)	6.9
바이-Gal(%)	11.9
모노-Gal + 바이-Gal(%)	18.8
Gal*(%)	16.9
Fuc*(%)	13.2
비 Gal/Fuc	1.28

[0249]

표 5

엽소 #4 로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	<u>29 일째 날</u>
모노-Gal(%)	23.2
바이-Gal(%)	11.3
모노-Gal + 바이-Gal(%)	34.5
Gal*(%)	24.1
Fuc*(%)	30.4
비 Gal/Fuc	0.79

[0250]

표 6

엽소 #7 로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	<u>29 일째 날</u>
모노-Gal(%)	28.1
바이-Gal(%)	14.3
모노-Gal + 바이-Gal(%)	42.4
Gal*(%)	30.7
Fuc*(%)	47
비 Gal/Fuc	0.65

[0251]

표 7

엽소 #6 으로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	<u>29 일째 날</u>
모노-Gal(%)	31.9
바이-Gal(%)	14.3
모노-Gal + 바이-Gal(%)	47
Gal*(%)	34.2
Fuc*(%)	49.6
비 Gal/Fuc	0.69

[0252]

표 8

염소 #3 으로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	29 일째 날
모노-Gal(%)	29.4
바이-Gal(%)	23.6
모노-Gal + 바이-Gal(%)	53
Gal*(%)	46.1
Fuc*(%)	52.8
비 Gal/Fuc	0.87

[0253]

표 9

염소 #9 로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	29 일째 날
모노-Gal(%)	37.7
바이-Gal(%)	44
모노-Gal + 바이-Gal(%)	81.7
Gal*(%)	81.7
Fuc*(%)	78.2
비 Gal/Fuc	1.04

[0254]

표 10

염소 #5 로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	29 일째 날
모노-Gal(%)	26.2
바이-Gal(%)	11.8
모노-Gal + 바이-Gal(%)	38.0
Gal*(%)	27.6
Fuc*(%)	39.4
비 Gal/Fuc	0.70

[0255]

표 11

염소 #8 로부터의 아달리무맙 항체로부터 단리된 N-글리칸 올리고사카라이드

	29 일째 날
모노-Gal(%)	18.6
바이-Gal(%)	65.4
모노-Gal + 바이-Gal(%)	84
Gal*(%)	80.4
Fuc*(%)	74.0
비 Gal/Fuc	1.09

[0256]

- [0257] 실시예 4: 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 특징규명
- [0258] 염소 유즙으로부터 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 생물학적 특징을 아달리무맙(휴미라)과 비교하였다. 상대적 Kd, CD16 결합 및 FcRn 결합을 조사하였다. 나아가, 보체 의존적 세포독성(CDC), 및 TNF-알파 매개 세포 독성의 중화를 막 TNF-알파로 형질감염된 주르카트 세포에 대해 평가하였다.
- [0259] 유동 세포측정에 의해 얻은 임의 Kd(정체기 값의 50%를 제공하는 농도)는 휴미라(0.09 $\mu\text{g/ml}$)와 형질전환으로 생성된 아달리무맙(0.11 $\mu\text{g/ml}$) 사이에 차이를 보이지 않았다($p=0.54$). 형질전환으로 생성된 아달리무맙은 휴미라의 경우 측정된 56.67 $\mu\text{g/ml}$ 의 IC_{50} 값과 대조적으로 25.7 $\mu\text{g/ml}$ 의 IC_{50} 값으로 CD16 수용체에 결합하였다. 따라서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 CD16의 결합은 휴미라의 결합보다 2.2배 더 높았다.
- [0260] 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 FcRn의 결합은 동일한 Fc 부분을 가졌음에도 불구하고 휴미라의 결합보다 더 높았다. CDC 활성은 휴미라 항체에 비해 형질전환으로 생성된 아달리무맙을 사용하였을 때 우세하였다(196 ng/ml 대 399 ng/ml). 형질전환으로 생성된 아달리무맙 및 휴미라는 둘 다 TNF-알파에 의해 유도된 L929 아포토시스를 유사하게 중화하였다(각각 $\text{EC}_{50} = 110 \text{ ng/ml}$ 및 98 ng/ml).
- [0261] 재료 및 방법
- [0262] 시약
- [0263] - 항-TNF-알파 시약:
- [0264] o 항체:
- [0265] ■ 형질전환으로 생성된 아달리무맙
- [0266] ■ 휴미라(아달리무맙, 애보트)
- [0267] - 항-CD160: 음성 대조군으로서 사용된 정제 n° 829 10 049
- [0268] - 새끼 토끼 혈청(세더란(Cederlane))
- [0269] - 악티노마이신 D(시그마)
- [0270] - 인간 TNF-알파(밀테니이 바이오텍)
- [0271] - 셀 타이터(Cell titer) 96[®] 수성 1 용액 세포 증식 분석(프로메가)
- [0272] 세포
- [0273] - 막 TNF-알파로 형질감염된 주르카트 세포 클론 2B3을 클로닝으로 수득하였다(상대적 Kd 분석 및 CDC를 위해 사용됨).
- [0274] - 무린 섬유모세포 L929 세포
- [0275] 막 TNF-알파에의 결합 및 상대적 Kd 측정
- [0276] TNF-알파로 형질감염된 2×10^5 개의 주르카트 세포를 4°C에서 30분 동안 상이한 농도(0 내지 100 $\mu\text{l/ml}$, 최종 농도)의 100 μl 항-TNF 알렉사 488-커플링된 항체와 항온처리하였다. 세척 후, 파이코에리쓰린에 커플링된 염소 항-인간 Fc 감마(100 μl 의 1:100 희석물)를 4°C에서 30분 동안 첨가하였다. 세포를 세척하고 평균 형광 강도(MFI)를 유동 세포측정으로 연구하였다. 프리즘 소프트웨어를 이용하여 임의 Kd를 계산하였다.
- [0277] CD16에의 결합
- [0278] 마우스 파이코에리쓰린-표지된 항-CD16 3G8(3G8-PE) 및 NK 세포를 사용하여 경쟁 분석으로 CD16에의 결합을 연구하였다. 요약하면, 밀테니이로부터의 NK 세포 단리 키트를 사용하여 말초혈 단핵 세포(PBMC)로부터 NK 세포를 단리한 후, 고정된 농도로 사용된 마우스 항-CD16 mAb 3G8-PE와 동시에 다양한 농도(0 내지 83 $\mu\text{g/ml}$)의 시험된 항체와 항온처리하였다. 세척 후, 3G8-PE와 NK 세포에 의해 발현된 CD16의 결합을 유동 세포측정으로 평가하였다. 관찰된 평균 형광 값(MFI)은 %로 표현되는데, 이때 100%는 3G8-PE만을 사용하여 얻은 값이고, 0%는 3G8-

PE의 부재 하에서 얻은 값이다. 프리즘 소프트웨어를 이용하여 IC₅₀ 값(3G8 결합의 50% 억제를 유도하는 데 요구된 항체 농도)을 계산하였다.

[0279]

FcRn에의 결합

[0280]

알렉사 488로 표지된 항-CD20 리튬산(RTX-알렉사) 및 형질감염된 FcRn 주르카트 세포를 사용하여 경쟁 분석으로 FcRn에의 결합을 연구하였다. 요약하면, 형질감염된 FcRn 주르카트 세포를 pH=6에서 고정된 농도의 RTX-알렉사 (50 µg/ml)와 동시에 다양한 농도(0 내지 1000 µg/ml)의 시험된 mAb와 항온처리하였다. pH=6에서 세척한 후, RTX-알렉사와 형질감염된 FcRn 주르카트 세포에 의해 발현된 FcRn의 결합을 유동 세포측정으로 평가하였다. 관찰된 평균 형광 값(MFI)은 %로 표현되는데, 이때 100%는 RTX-알렉사만을 사용하여 얻은 값이고, 0%는 RTX-알렉사의 부재 하에서 얻은 값이다. 프리즘 소프트웨어를 이용하여 IC₅₀ 값(RTX-알렉사 결합의 50% 억제를 유도하는 데 요구된 항체 농도)을 계산하였다.

[0281]

CDC

[0282]

막 TNF-알파로 형질감염된 주르카트 세포(mbTNF-알파 주르카트)를 보체 공급원인 새끼 토끼 혈청(1/10까지 희석)의 존재 하에서 증가하는 농도의 항-TNF 항체(0 내지 5000 ng/ml)와 항온처리하였다. 37°C에서 2시간 동안 항온처리한 후, 용해된 표적 세포에 의해 상청액 내로 방출된 LDH의 양을 측정하였다(로슈 어플라이드 사이언시스(Roche Applied Sciences) 세포독성 검출 키트). 연구된 항체에 의해 매개된 보체 의존적 세포독성(CDC)에 상응하는 % 용해를 하기 식에 따라 계산하였다:

[0283]

$$\% \text{ 용해} = (\text{ER} - \text{SA})$$

[0284]

상기 식에서,

[0285]

ER은 효과적인 반응(LDH 방출)이고,

[0286]

SA는 표적 세포가 항체 없이 보체의 존재 하에서 항온처리되었을 때 얻어진 자연발생적 활성이다. % 용해는 항체 농도의 함수로서 표현된다. 프리즘 소프트웨어를 이용하여 Emax(최대 용해의 백분율) 및 EC₅₀(최대 용해의 50%를 유도하는 항체의 양)을 계산하였다.

[0287]

sTNF-알파의 중화

[0288]

다양한 농도의 항-TNF 및 고정된 농도의 TNF(100 pg/ml)를 사용하여 무린 섬유모세포 L929 생물분석(bioassay)에서 인간 TNF의 중화를 평가하였다. 요약하면, 시험된 항체의 일련의 희석물(0 내지 1000 ng/ml)로 전처리된 TNF-알파(20 ng/ml)를 37°C에서 16시간 동안 악티노마이신 D(2 µg/ml)의 존재 하에서 18시간 동안 L929 세포와 항온처리하였다. 그 다음, 20 µl/웰의 셀 타이터 96[®] 수성 1 용액 세포 증식 분석(MTS)을 추가 1시간 동안 첨가하여 비색 분석으로 생존 세포의 수를 측정하였다. 플레이트를 490 nm에서 판독하고 결과(OD)를 항체 농도의 함수로서 표현하였다. 프리즘 소프트웨어를 이용하여 50%의 TNF-알파 활성을 중화하는 항체 농도의 역수로서 표현된 중화 역가를 계산하였다.

[0289]

약어

[0290]

TNF-알파: 종양 괴사 인자 알파

[0291]

CDC: 보체 의존적 세포독성

[0292]

LDH: 락테이트 데하이드로게나제

[0293]

MFI: 평균 형광 강도

[0294]

SA: 자연발생적 활성

[0295]

SR: 자연발생적 방출

[0296]

결과

[0297]

세포 상에서의 항원 결합 및 상대적 Kd 측정

[0298]

3회 분석의 평균은 도 16에 제시되어 있고, 상응하는 데이터는 표 13에 제시되어 있다. 막 TNF-알파로 형질감염된 주르카트 세포 클론 2B3에 대한 항-TNF 항체의 결합은, 시험된 각각의 항체 농도(0 내지 10 µg/ml)에 대한

평균 형광 강도(MFI)로서 표현된다. 이하에 기재된 임의 Kd는 실제 친화성 값(nM)을 나타내지는 않지만, 연구된 항체의 친화성에 대해 유사한 크기의 자릿수를 제공한다.

[0299]

표 12a에 기재된 결과는 개별 EC₅₀ 값(표 12b)을 사용함으로써 수행된 통계학적 분석(p=0.54)으로 입증된 바와 같이 형질전환으로 생성된 아달리무맙(Bmax: MFI=12.46; Kd=0.11 µg/ml) 및 휴미라(Bmax: MFI=10.72; Kd=0.09 µg/ml)가 Bmax 값(정체기) 및 임의 Kd(정체기 값의 50%를 제공하는 농도)에서 유사하다는 것을 보여준다.

표 12

표 12a: 도 16에 상응하는 Bmax, 상대적 Kd 값 및 원래의 데이터

	형질전환으로 생성된 아달리무맙	휴미라(에보트)	항-CD160
Bmax(MFI)	12.46	10.72	na
Kd(µg/ml)	0.1194	0.09874	na

[0300]

표 12b: 개별 EC₅₀ 값 및 P 값(스튜던트 검정)

	형질전환으로 생성된 아달리무맙	휴미라(에보트)
EC50-1	1	5.57142857
EC50-2	1	0.09640719
EC50-3	1	0.81034483
p 스튜던트		0.536862306

[0301]

표 13

도 16에 상응하는 데이터

mAb (µg/ml)	형질전환으로 생성된 아달리무맙			휴미라(에보트)		
	0.502	1.36	0.816	0.502	1.36	0.816
0	0.502	1.36	0.816	0.502	1.36	0.816
0.01	0.81	1.81	1.69	0.87	1.69	1.63
0.1	2.50	5.80	6.99	3.34	5.66	6.57
0.2	3.33	9.45	9.86	4.30	8.74	8.41
0.3	3.84	12.90	10.30	4.66	11.50	8.76
0.4	5.23	14.50	10.60	4.65	11.80	9.19
0.5	5.14	15.50	10.40	4.86	13.10	9.15
1	6.05	17.20	11.20	5.10	14.10	9.32
2	5.80	17.80	11.30	5.40	15.00	9.76
5	5.56	18.40	11.60	5.78	15.70	9.85
10	6.30	18.00	12.10	6.33	16.60	9.89

[0302]

CD16에의 결합, 3G8 항체의 경쟁

[0303]

[0304]

표 14에 표시된 IC₅₀ 값은 NK 세포에 의해 발현된 CD16 수용체에 대한 3G8 결합의 50% 억제를 유도하는 데 요구된 항체 농도를 나타낸다. 형질전환으로 생성된 아달리무맙("TG-휴미라") 및 휴미라 항체는 각각 25.7 µg/ml 및 56.7 µg/ml의 IC₅₀ 값으로 CD16 수용체에 결합한다. 따라서, 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 CD16의 결합은 휴미라의 결합보다 거의 2배 더 높다.

표 14

프리즘 소프트웨어에 의한 곡선의 모델링 후 도 17에 상응하는 IC₅₀(3G8 결합의 50% 억제를 유도하는 데에 요구된 항체 농도)

	휴미라(에보트)	형질전환으로 생성된 아달리무맙
IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	57	26

[0305]

표 15

도 17에 상응하는 데이터

Log C $\mu\text{g}/\text{ml}$	휴미라(에보트)			형질전환으로 생성된 아달리무맙		
0.01	100	100	100	100	100	100
0.11	96.95	89.81	96.44	96.06	95.59	101.36
0.41	99.24	89.81	102.59	94.49	88.97	98.98
0.72	97.71	85.35	102.27	88.19	75.74	93.54
1.02	90.08	71.34	99.68	78.35	57.06	82.65
1.32	83.21	55.92	91.91	62.76	41.03	71.43
1.62	71.3	39.94	83.5	45.67	28.31	56.12
1.92	56.95	28.22	67.96	34.65	19.34	42.52

[0306]

[0307]

FcRn에의 결합

[0308]

항-TNF-알파 항체와, FcRn으로 형질감염된 주르카트 세포에 의해 발현된 FcRn의 결합을 알렉사 488 커플링된-리톡시맙 항체로 경쟁 분석에서 시험하였다. (표 17의 데이터에 상응하는) 도 18에 제시된 결과는 모든 시험된 항체들이 FcRn 수용체에 결합하였다는 것을 시사한다. 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 FcRn의 결합은 휴미라의 결합보다 더 높은 듯하였다.

표 16

프리즘 소프트웨어에 의한 곡선의 모델링 후 도 18에 상응하는 IC₅₀(리톡시맙 결합의 50% 억제를 유도하는 데에 요구된 항체 농도)

	리톡산	형질전환으로 생성된 아달리무맙	휴미라(에보트)
IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	233	195	366

[0309]

표 17

도 18에 상응하는 데이터

Ac ng/ml (Log)	형질전환으로 생성된 아달리무맙			휴미라(에보트)		
-1	96.6	93.75	92.4	107.4	101.25	114
0.602	112.7	84.75	96	118.3	86.25	132
0.903	117.8	81	94.7	135.5	85.5	138.2
1.204	113.2	73.65	90.2	125.4	85.5	144
1.505	111.1	66.675	89.5	123.6	78.75	144.3
1.806	99.9	64.125	83.7	114.1	65.625	125.3
2.097	94.3	51.825	72.8	95	58.425	104
2.398	67.4	33.9	53.1	75	45.525	89.2
2.699	39.8	22.875	35.4	50.6	32.925	64.1

[0310]

[0311] CDC 활성

[0312] 2회 분석의 평균은 도 19에 제시되어 있고, 상응하는 데이터는 표 18에 제시되어 있다. CDC 활성은 시험된 각각의 항체 농도(0 내지 5000 ng/ml)에 대한 % 용해로서 표현된다. 도 19는 형질전환으로 생성된 아달리무맙(TG-휴미라; 최대 용해: 34%) 및 휴미라(최대 용해: 33%) 항체가 CDC 활성에 의한 mbTNF-알파 주르카트의 유사한 용해를 유도한다는 것을 보여준다. 이 시스템에서 EC₅₀ 값의 분석(표 19)은 벤치마크 휴미라 항체에 비해 형질전환으로 생성된 아달리무맙이 다소 유리하다는 것을 보여주었다(195.8 대 399.3 ng/ml)

표 18

프리즘 소프트웨어로 도 19를 디자인하기 위해 시험되고 사용된 항체로 수행된 3회 실험 각각으로부터 취득된 원래의 데이터

[0313]

Ac ng/ml (Log)	형질전환으로 생성된 아달리무맙				휴미라(애보트)			
-1	0	0	0	0	0	0	0	0
1.6	0	6	0	10	0	2	0	10
1.9	0	10	0	21	0	2	0	19
2.2	6	20	9	30	1	10	3	23
2.5	11	30	13	35	6	23	8	24
2.8	18	43	16	35	13	25	11	31
3.1	19	37	20	38	14	30	16	39
3.4	23	42	17	44	13	38	21	45
3.7	25	48	23	48	16	36	22	48

표 19

프리즘 소프트웨어에 의한 곡선의 S 자형 모델링 후 도 19에 상응하는 Emax(최대 용해) 및 EC₅₀(최대 용해의 50%를 유도하는 데에 요구된 항체 농도)

[0314]

	형질전환으로 생성된 아달리무맙	휴미라(애보트)	항-CD160
Emax(% 용해)	34.31	33.14	2.839
EC ₅₀ (ng/ml)	195.8	399.3	na

[0315]

항-TNF 항체의 중화 활성

[0316]

도 20에 제시된 바와 같이, 20 ng/ml의 인간 TNF-알파로 처리된 L929 세포에서의 TNF-알파 매개 세포독성은, 유사한 용량 의존적 방식으로, 형질전환으로 생성된 아달리무맙(TG-휴미라) 및 휴미라 mAb 둘 다에 의해 효과적으로 중화되었다. 휴미라 정제기 값의 50%를 달성하는 데 요구된 항체 농도에 상응하는 50% 값은 휴미라의 경우 97.7 ng/ml이었고 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 경우 109.7 ng/ml이었다.

표 20

프리즘 소프트웨어에 의한 곡선의 S 자형 모델링 후 도 20에 상응하는 최대 중화 및 50% 값(휴미라 정제기 값의 50%를 달성하는 데에 요구된 항체 농도)

[0317]

	형질전환으로 생성된 아달리무맙	휴미라(애보트)
% 중화 최대	66.2	54.6
50%의 휴미라 중화(ng/ml)	109.65	97.72

표 21

프리즘 소프트웨어로 도 20을 디자인하기 위해 시험되고 사용된 항체로 수행된 3회 실험 각각으로부터 수득된 원래의 데이터

% TNF 중화

Ac ng/ml (Log)	형질전환으로 생성된 아달리무맙				휴미라(에보트)			
1	0	2.17	2.58	0	0	1.24	0.47	0
1.4	0	0.71	1.84	0	0.25	0.73	0.7	0
1.7	0	1.56	2.01	0	0.17	0.45	1.22	5.71
1.9	0.17	7.08	5.87	19.93	0.88	5.7	11.69	19.25
2	4.35	32.77	13.15	47.85	6.98	21.39	42.07	55.18
2.2	31.78	63.85	54.7	56.47	42.01	58.88	40.68	59.71
2.3	49.64	76.17	63.88	55.87	52.04	59.01	43.6	60.98
2.8	54.62	88.3	46.78	75.94	60.47	68.4	39.53	60.68

[0318]

[0319]

고찰

[0320]

TNF에 의해 유도된 L929 아포토시스의 중화는, 형질전환으로 생성된 아달리무맙과 휴미라(에보트) 간에 유사하였다. CDC 활성, 및 CD16 및 FcRn에의 결합이 개선되었고, 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 경우 증가된 CDC 및 CD16 결합이 관찰되었다.

[0321]

실시예 5: 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 ADCC 활성

[0322]

형질전환으로 생성된 아달리무맙의 ADCC 활성을 휴미라의 ADCC 활성과 비교하였다. 도 21은 형질전환으로 생성된 아달리무맙이 3개의 상이한 농도 0.5 ng/ml, 50 ng/ml 및 5000 ng/ml에서 휴미라보다 더 높은 ADCC 활성을 나타내었다는 것을 보여준다.

[0323]

- 항체: - 휴미라(에보트)

[0324]

- 형질전환으로 생성된 아달리무맙

[0325]

- 세포: - mTNF로 형질감염된 주르카트 세포(클론 2F8)

[0326]

- 건강한 공여자로부터 단리된 NK 이펙터 세포

[0327]

음성 고갈 키트(밀테니이 바이오텍)를 사용하여 건강한 공여자로부터의 말초혈 샘플로부터 NK 이펙터 세포를 단리하였다. mTNF로 형질감염된 주르카트 세포를 96웰 플레이트 내에 플레이팅하고 4°C에서 증가하는 농도의 항-TNF 항체(0.5, 50 및 5000 ng/ml)와 항온처리하였다. 2시간 후, 단리된 NK 세포를 첨가하고 37°C에서 또 다시 4시간 동안 항온처리하였다. 용해된 표적 세포에 의해 상청액 내로 방출된 세포내 효소 락테이트 데하이드로게나제(LDH)를 정량함으로써 시험된 항-TNF 항체에 의해 유도된 표적 세포의 용해를 발색적으로(chromogenically) 측정하였다(로슈(Roche)). % 용해를 하기 식에 따라 계산하였다:

[0328]

$$\% \text{ 용해} = [(ER - SR)/(100 - SR)] - [(NC - SR)/(100 - SR)]$$

[0329]

상기 식에서, ER 및 SR은 각각 실험적 LDH 방출 및 자연발생적 LDH 방출을 나타내고, NC는 천연 세포독성을 나타낸다. 최종 결과는 임의 유닛으로 표현되고, 이때 100%는 5000 ng/ml의 농도에서 휴미라(에보트)를 사용하여 얻은 값이다. 도 21에 제시된 바와 같이, 형질전환으로 생성된 아달리무맙은 휴미라(에보트)보다 더 많은 ADCC를 유도하였다.

[0330]

실시예 6: 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 CD16 결합 및 CDC 활성의 평가

[0331]

NK 세포를 사용하여 경쟁 분석으로 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 CD16 결합 활성을 측정하고 휴미라와 비교하였다. 도 22는 9마리의 상이한 염소들로부터의 모든 형질전환으로 생성된 아달리무맙이 NK 세포에서 휴미라보다 더 큰 정도로 CD16에 결합하였다는 것을 보여주는 억제 곡선을 제시한다. 도 23은 CD16 경쟁 결합 분석으

로부터의 IC₅₀ 값을 제시한다. 형질전환으로 생성된 아달리무맙에 대한 IC₅₀ 값은 휴미라에 대한 IC₅₀ 값보다 1.5 내지 5배 더 낮았다.

[0332] 형질전환으로 생성된 아달리무맙의 CDC 활성을 휴미라의 CDC 활성과 비교하였다. 도 24는 시험된 9마리의 염소들 중 8마리의 염소들로부터의 형질전환으로 생성된 아달리무맙이 휴미라보다 더 큰 CDC 활성을 가졌다는 것을 보여주는 용량 반응 곡선을 제시한다. 도 25는 CDC 활성 분석에 대한 EC₅₀ 값(ng/ml)을 제시한다.

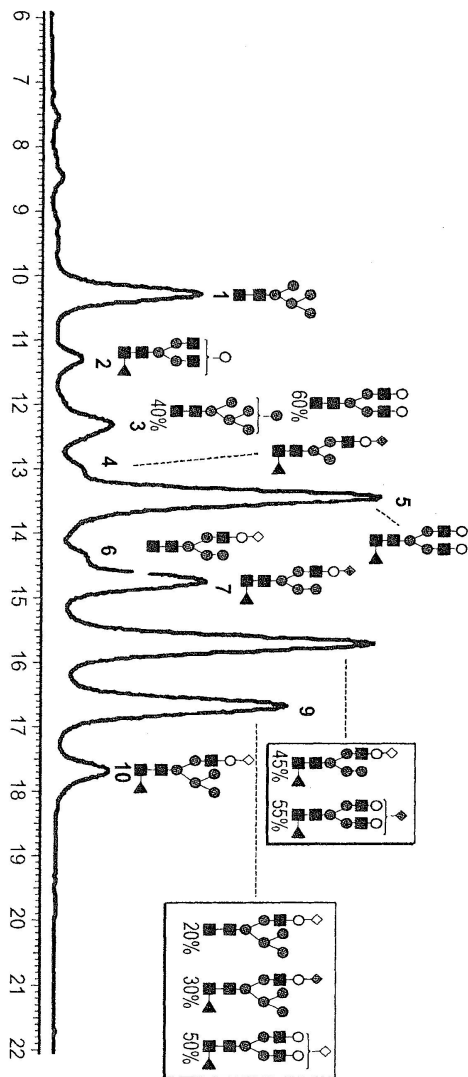
[0333] 다른 실시양태

[0334] 본 명세서에 개시된 모든 특징들은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각각의 특징은 동일한, 동등한 또는 유사한 목적에 기여하는 대안적 특징에 의해 교체될 수 있다. 따라서, 달리 명시되어 있지 않은 한, 개시된 각각의 특징은 포괄적인 일련의 동등한 또는 유사한 특징들의 단지 일례이다.

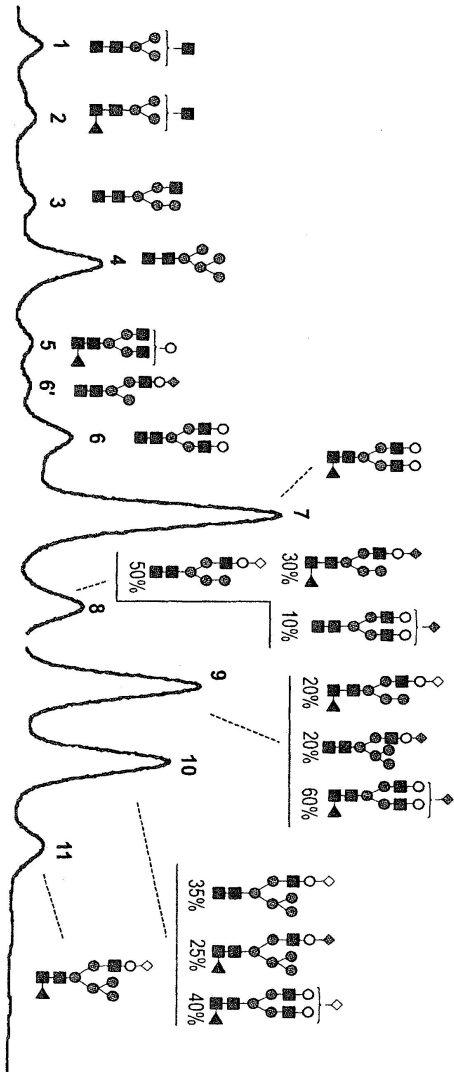
[0335] 상기 설명으로부터, 당업자는 본 발명의 본질적인 특징을 용이하게 확인할 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명을 다양한 용도 및 조건에 맞추기 위해 본 발명의 다양한 변화 및 변경을 만들 수 있다. 따라서, 다른 실시양태들도 하기 특허청구범위 내에 있다.

도면

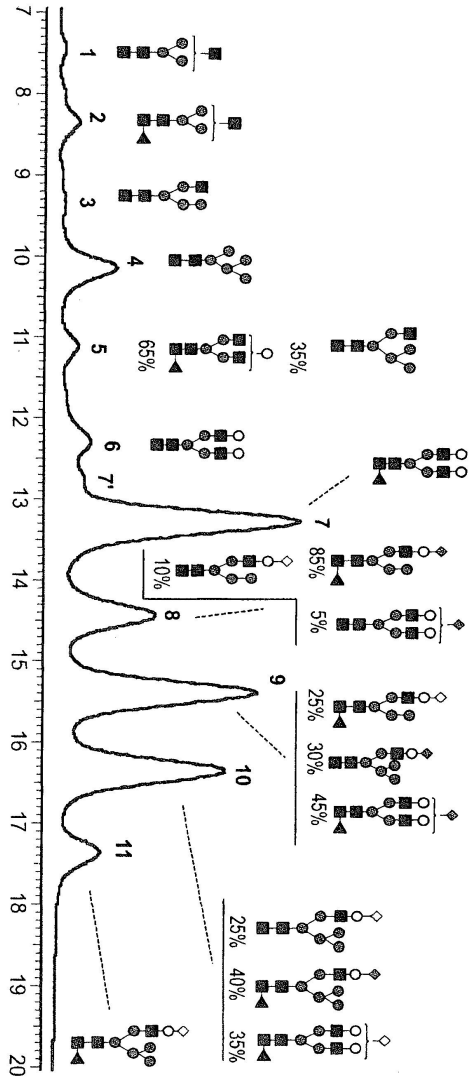
도면1



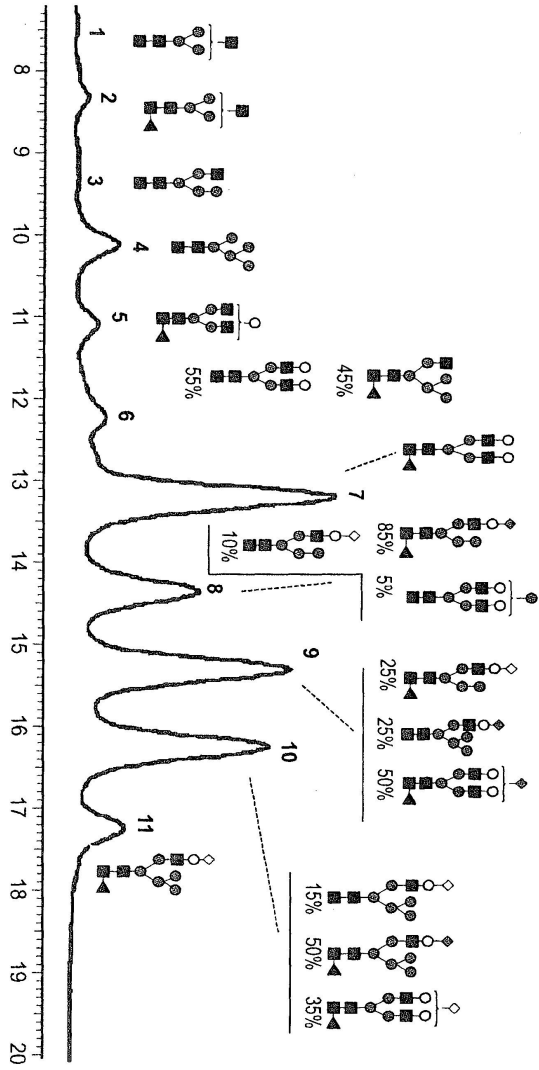
도면2



도면3



도면4



영속 #1에서 생성된 아달리무만

RT	제7일			제17일			제32일			이른치	주석	구조
	피크	질량	%	피크	질량	%	피크	질량	%			
7.4	1	1233.3	2.8	1	1233.3	0.8	1	1233.5	0.5	1233.5		
8.3	2	1379.4	2.2	2	1379.4	2.3	2	1379.4	1.6	1379.5		
9.3	3	1395.3	2.2	3	1395.5	0.8	3	1395.5	0.5	1395.5		
10.1	4	1354.3	9.2	4	1354.3	6.4	4	1354.3	4.6	1354.5		
11	5			5	1557.6	0.8	5	1557.5	미량	1557.6		
		1744.3	2.0		1744.5	1.4		1744.5	2.6	1744.6		
11.6	6'	1686.3	1.8							1686.6		
12.3	6			6			6	1703.4	1.5	1703.6		
		1760.5	6.0		1760.5	3.7		1760.5	1.9	1760.6		
12.7				7'	1832.5	3.0				1832.7		
13.2	7	1906.6	27.5	7	1906.2	25.9	7	1906.5	26.5	1906.7		
14.3	8	1864.5	3.7	8	1864.5	1.1	8	1864.5	1.3	1864.6		

도면5a

5-1

5-1

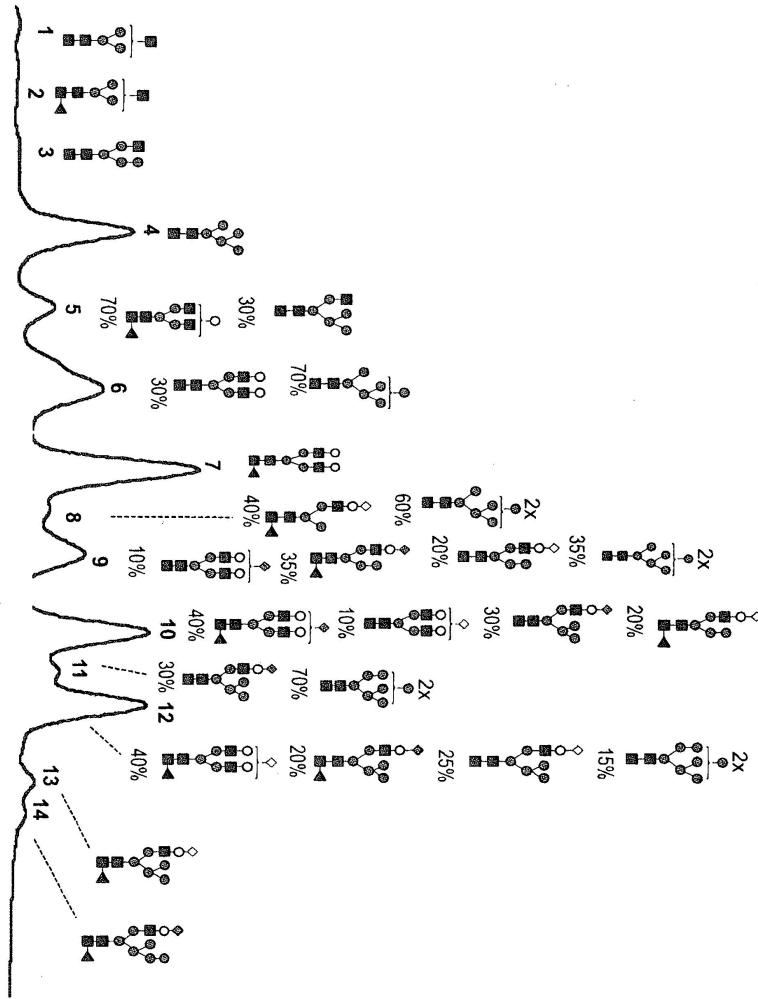
도면5b

	1994.5	2.2		1994.5	9.0		1994.5	10.9	1994.7		
	2051.5	1.5		2051.6	0.5		2051.6	0.6	2051.7		
15.4	9	3.9	9	2010.5	5.3	9	2010.5	5.5	2010.7		
		3.9			6.5			5.5			
	2197.5	11.6		2197.5	9.6		2197.5	11.0	2197.7		
16.3	10	2026.5	10	2026.5	4.5	10	2026.3	3.0	2026.7		
		2156.5		2156.6	7.2		2156.6	10.0	2156.8		
		2213.5		2213.5	6.3		2213.5	7.0	2213.8		
17.3	11	2172.5	11	2172.5	4.9	11	2172.5	5.3	2172.8		

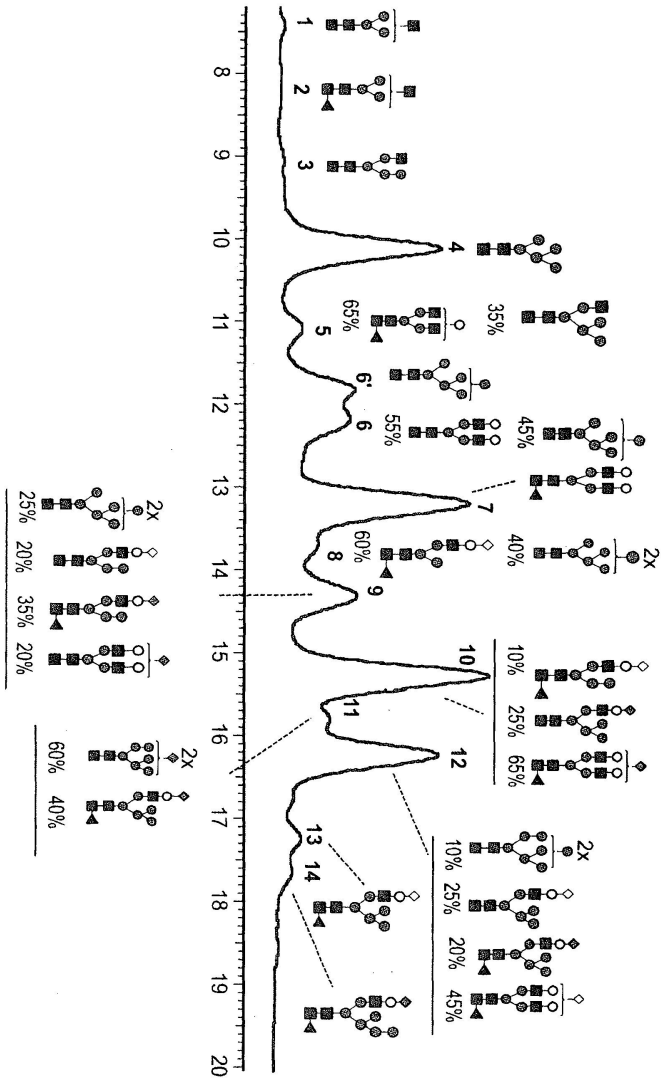
모노-Gal (%): 30.8
 비-OI-Gal (%): 53.1
 모노-Gal + 비-OI-Gal (%): 83.9
 Gal* (%): 82.9
 Fuc* (%): 63.5
 비 Gal/Fuc: 1.30
 시알린화 (%): 50.4
 * 열세서에 기재된 식에 따라 계산됨

42.9
 46.0
 88.9
 88.2
 74.9
 1.17
 59.3
 44.1
 47.0
 91.1
 89.8
 81.9
 1.10
 62.7
 av: 39.2
 av: 48.7
 av: 88.0
 av: 87.0
 av: 73.4
 av: 1.18
 av: 57.5

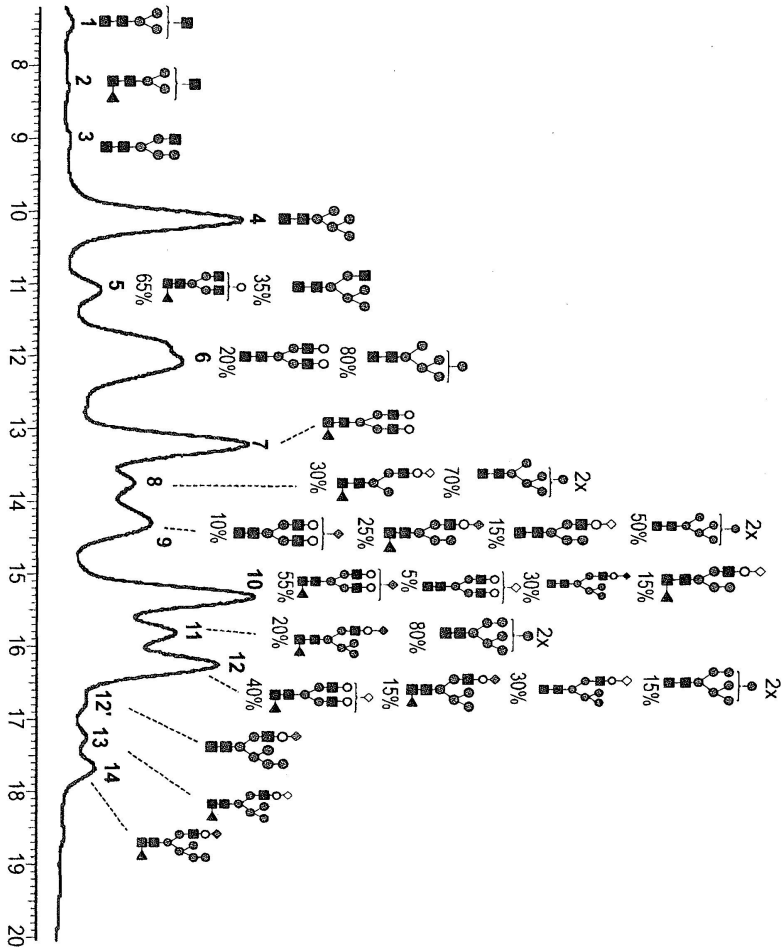
도면6



도면7



도면8



원소 #2에서 생성된 아탈리무만

RT	피크	제3일		제11일		제21일		이론치	주석	구조
		질량	%	질량	%	질량	%			
7.4	1	1233.3	0.8	1233.8	0.7	1233.4	0.9	1233.5		
8.3	2	1379.8	0.6	1379.2	0.5	1379.2	0.6	1379.5		
9.2	3	1395.4	0.8	1395.4	0.6	1395.7	0.7	1395.5		
10.2	4	1354.4	13.0	1354.3	14.2	1354.4	14.1	1354.5		
11.2	5	1557.5	1.4	1557.4	0.8	1557.4	1.1	1557.6		
		1744.5	3.3	1744.6	1.5	1744.5	2.1	1744.6		
11.7				1516.5	6.9			1516.5	이성질체	
12.2	6	1516.4	7.0	1516.4	2.9	1516.5	7.6	1516.6		
		1760.5	3.0	1760.5	3.6	1760.5	1.9	1760.6		
13.2	7	1906.5	21.0	1906.5	17.6	1906.6	15.6	1906.7		
13.8	8	1678.3	1.8	1678.5	0.9	1678.5	3.5	1678.8		
		1848.6	1.2	1848.5	1.8	1848.6	1.2	1848.7		
14.3	9	1678.5	2.8	1678.5	1.8	1678.4	3.6	1678.8	미량	
		1864.5	1.6	1864.5	1.4	1864.5	1.1	1864.6		
		1994.6	2.8	1994.6	2.5	1994.6	1.8	1994.7		
		2051.7	0.8	2051.7	1.5	2051.4	0.7	2051.7		

도면9a

9-1

9-1

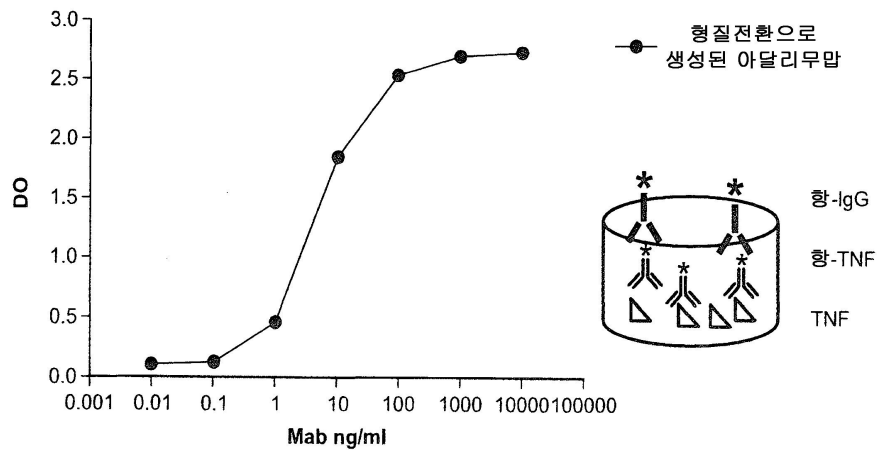
도면9b

9-1		9-1									
15.3	10	2010.5	2.6	10	2010.5	1.9	10	2010.5	2.0	2010.7	2010.7
		2010.5	4.8		2010.5	4.4		2010.5	4.8	2010.7	2010.7
		2067.5	1.5		trace			2067.5	2067.7		
		2197.5	6.9		2197.6	13.3		2197.5	8.3	2197.7	
15.9	11	1840.5	3.5	11	1840.5	2.5	11	1840.5	7.2	1840.8	1840.8
		2156.4	0.5		2156.6	0.70		2156.5	1.8	2156.8	2156.8
		1840.5	2.2	12	1840.6	0.40	12	1840.5	1.8	1840.8	1840.8
16.3	12	1840.5	2.2	12	1840.6	0.40	12	1840.5	1.8	1840.8	1840.8
		2026.5	3.6		2026.6	3.4		2026.5	3.7	2026.7	2026.7
		2156.5	2.9		2156.6	3.4		2156.6	1.8	2156.8	2156.8
		2213.5	5.8		2213.5	7.0		2213.5	4.9	2213.8	2213.8
16.8	13	2172.6	2.5	13	2172.6	2.3	12	2172.6	1.3	2172.8	2172.8
		2318.8	1.5	14	2318.8	1.5	14	2318.8	3.4	2318.8	2318.8
17.3	13	2172.6	2.5	13	2172.6	2.3	13	2172.6	2.5	2172.8	2172.8
17.7	14	2318.8	1.5	14	2318.8	1.5	14	2318.8	3.4	2318.8	2318.8

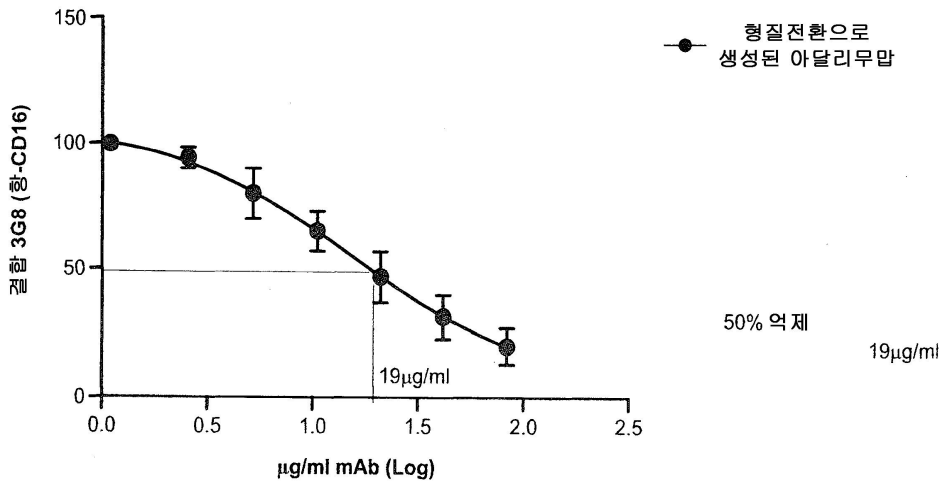
모노-Gal (%):	27.3	25.7	27.5	av: 26.8
바이-Gal (%):	39.0	43.0	31.4	av: 37.8
모노-Gal + 바이-Gal (%):	66.3	68.7	58.9	av: 64.6
Gal* (%):	64.6	67.9	57.8	av: 63.4
Fuc* (%):	51.6	54.0	46.0	av: 50.5
Gal / Fuc:	1.25	1.25	1.25	av: 1.25
시일량화 (%):	40.8	42.6	39.1	av: 40.8

* 명세서에 기재된 식에 따라 계산됨

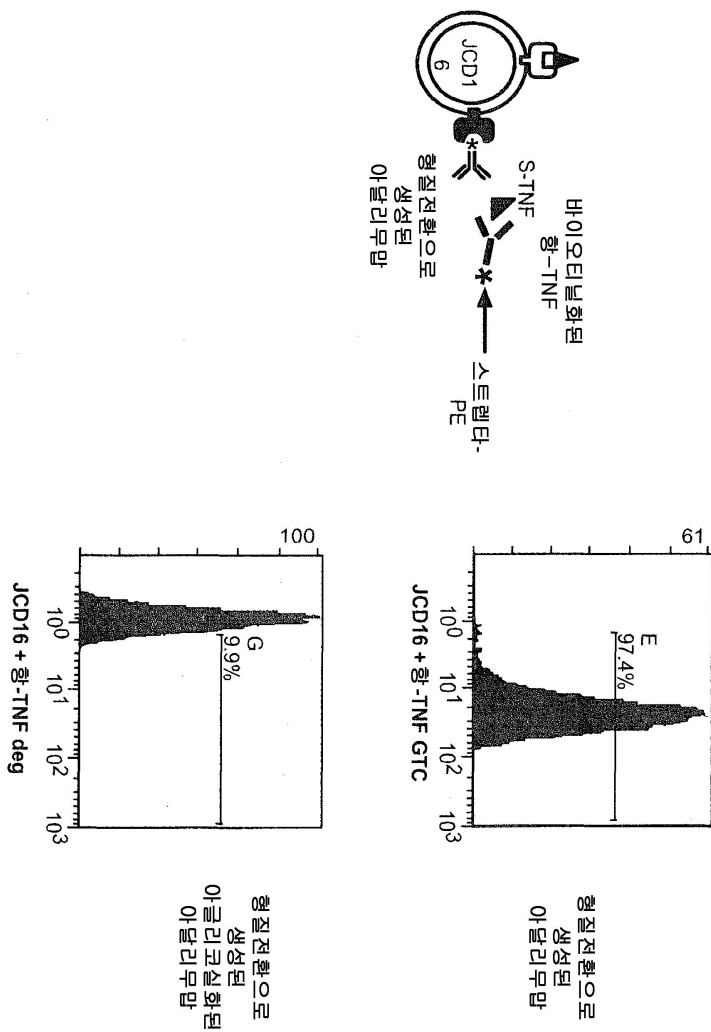
도면10



도면11



도면12



도면13a

이탈리무판 상대적 % 클리안 형태

	염소 발현	염소 #3 5 g/L	염소 #4 4 g/L	염소 #5 4 g/L	염소 #6 4 g/L	염소 #7 5 g/L
유형분비	NL1 d29	NL1 d29	NL1 d29	NL1 d29	NL1 d29	NL1 d29
총 아시알로 총 시알릴화	81	97	93	94	95	95
고만노스	19	3	7	6	5	5
하이브리드	43	60	56	46	49	49
복합체	30	23	25	30	28	28
시알릴화된 하이브리드	28	17	19	24	23	23
시알릴화된 복합체	16	2	5	6	5	5
시알릴화된 복합체	4	1	2	0	0	0
시알릴화 기질	37	32	33	41	38	38

13-1

13-2

13-2

13-1

도면13b

(13-2)

염소 #1	염소 #8	염소 #9	염소 #2
29 g/L	14 g/L	35 g/L	34g/L
NL1 d32	NL1 d29	NL1 d29	NL1 d29
40	80	50	96
60	20	50	4
5	15	16	80
46	16	37	7
50	68	47	13
42	10	36	3
19	10	15	1
50	73	44	16

(13-3) (13-2) (13-3)

도면13c

우세한 형태		19%		26%		20%		24%		23%
		14%		20%		19%		22%		22%
		13%		18%		13%		12%		13%
		13%		11%		13%		10%		10%
		8%		8%		9%		7%		9%
		66%		83%		73%		76%		77%
	우세한 형태의 합계									
	66%									
	83%									
	73%									
76%										
77%										

13-1

13-4

13-1

13-4

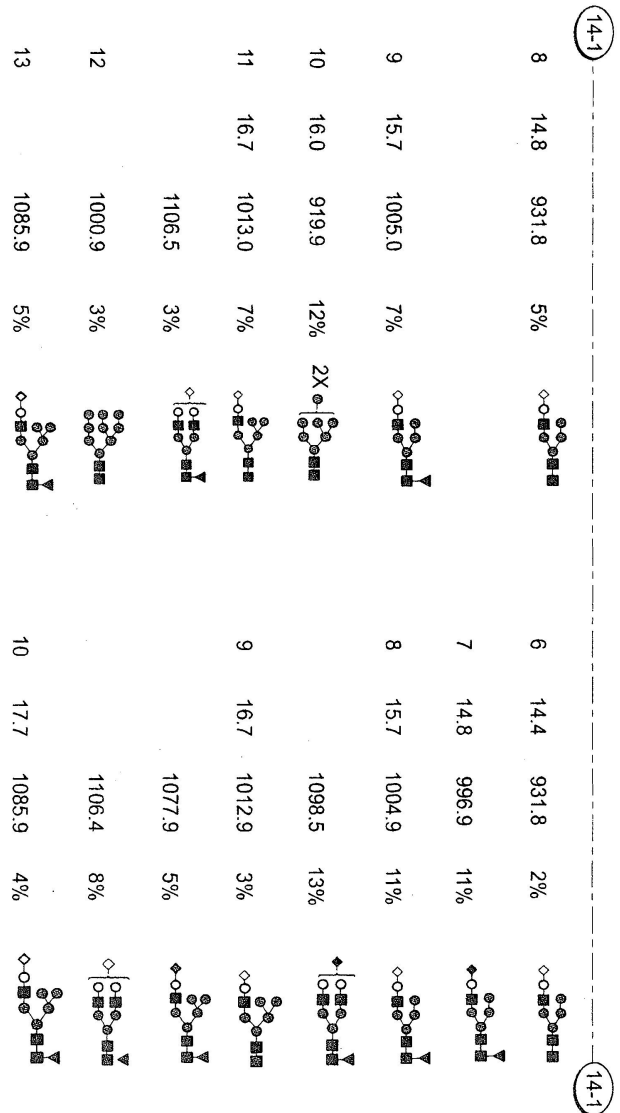
도면14a

염소 #10					염소 #1				
피크	RT	MS	%	추정 구조	피크	RT	MS	%	추정 구조
1	9.5	790.8	2%		1	10.2	1354.5	11%	
2	10.2	1354.6	12%		2	11.4	871.9	2%	
3	11.4	871.9	6%		3	12.5	1516.5	2%	
4	12.0	1516.4	13%		4	13.1	915.8	2%	
5	12.8	915.8	1%		5	13.5	952.9	24%	
6	13.3	952.9	11%						
7	14.2	838.9	13%						

14-1

14-1

도면14b



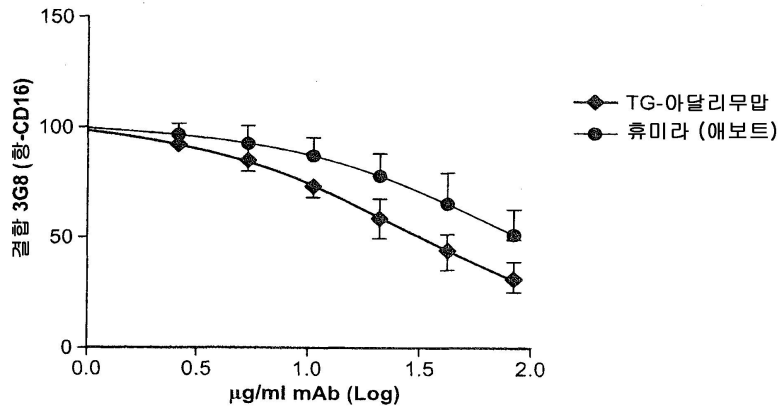
도면15a

질량	임스#2	임스#4	임스#7	임스#6	임스#3	임스#9	임스#5	임스#8	구조
1432.7	0.6%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
1595.8	16.9%	17.9%	6.1%	5.5%	12.8%	11.1%	8.7%	6.7%	
1799.9	25.3%	26.1%	21.5%	22.2%	14.0%	2.1%	20.0%	4.8%	
1840.9	1.1%	0.0%	1.0%	0.0%	1.2%	1.4%	1.5%	0.5%	
1852.0	0.0%	5.1%	7.6%	7.1%	3.2%	0.7%	5.3%	0.0%	
1882.0	1.5%	1.0%	1.0%	1.5%	1.0%	0.0%	2.3%	1.4%	
2004.0	18.4%	8.4%	9.4%	10.1%	8.0%	0.0%	12.5%	2.9%	
2056.1	2.4%	19.9%	22.5%	24.1%	12.8%	0.0%	18.5%	5.8%	
2086.1	3.0%	0.0%	1.2%	3.0%	1.2%	0.0%	0.8%	5.8%	
2208.1	15.7%	6.9%	10.2%	7.1%	7.2%	3.1%	12.5%	1.0%	
2232.1	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.1%	0.0%	1.4%	

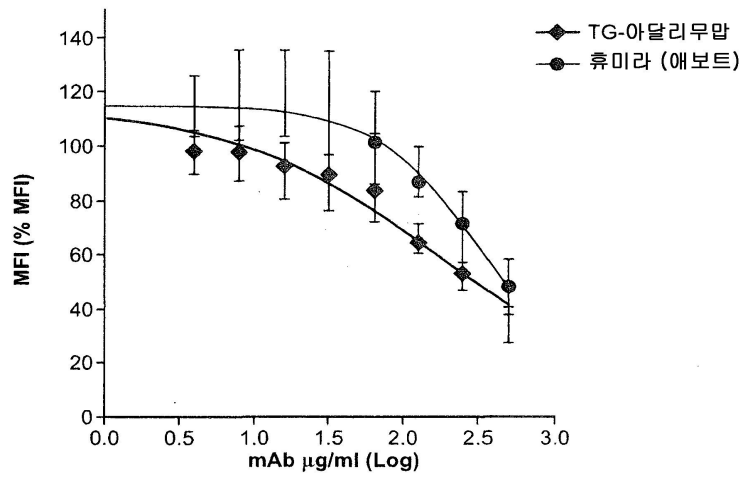
15-1

15-1

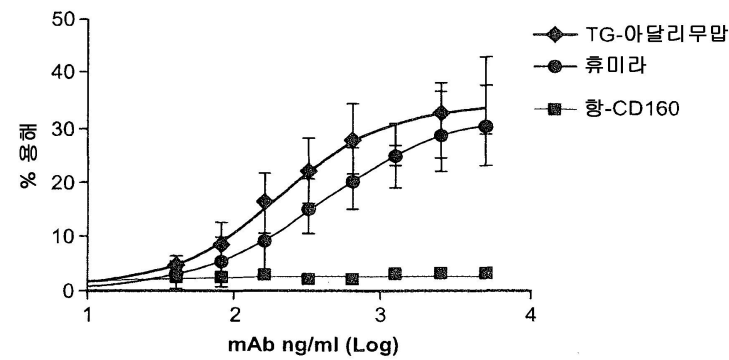
도면17



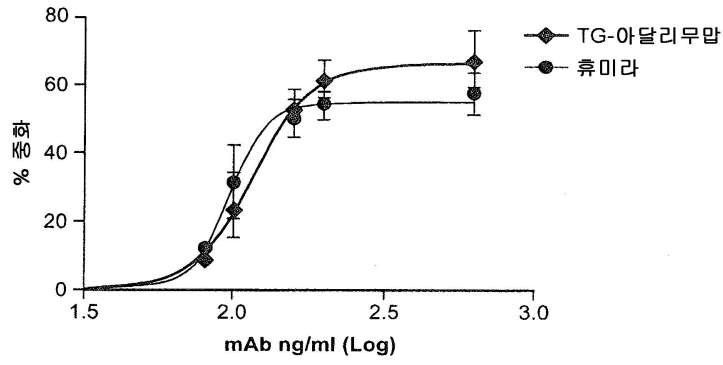
도면18



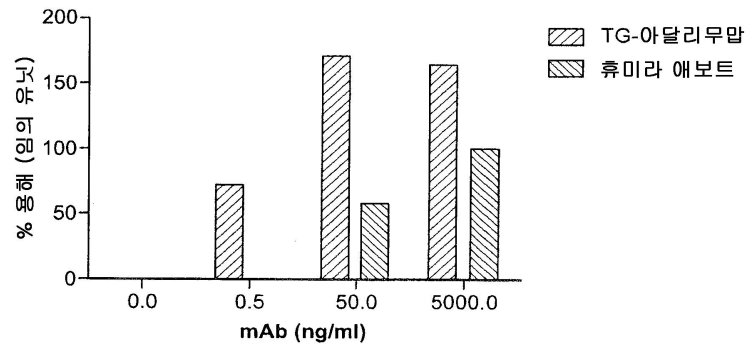
도면19



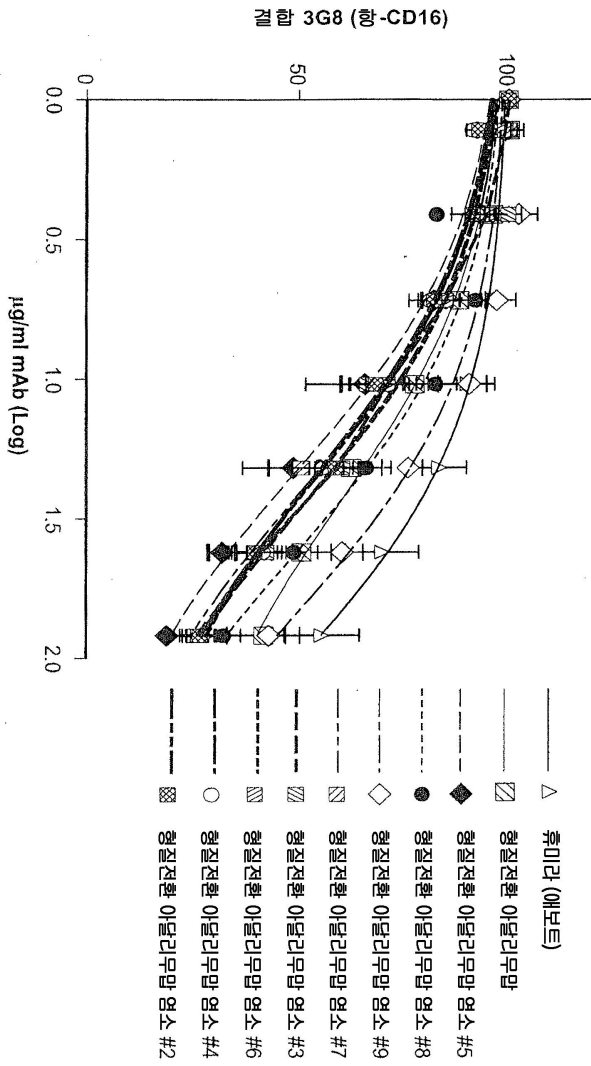
도면20



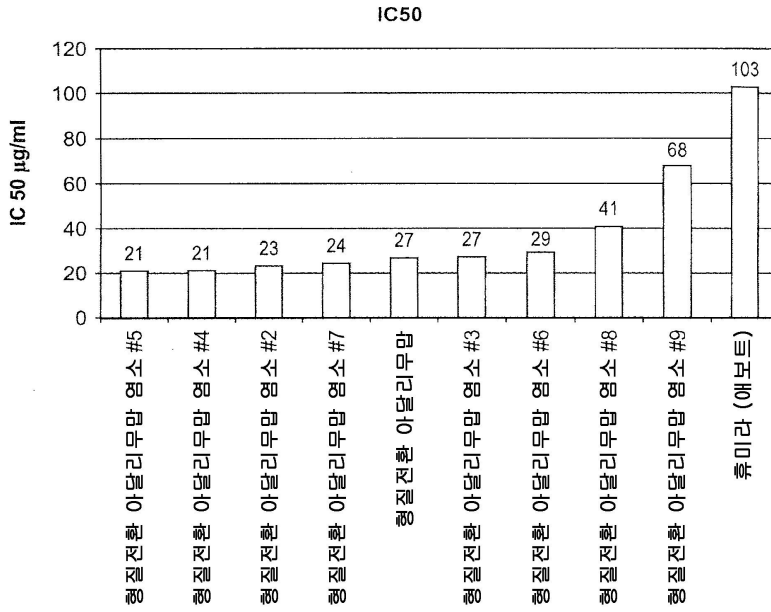
도면21



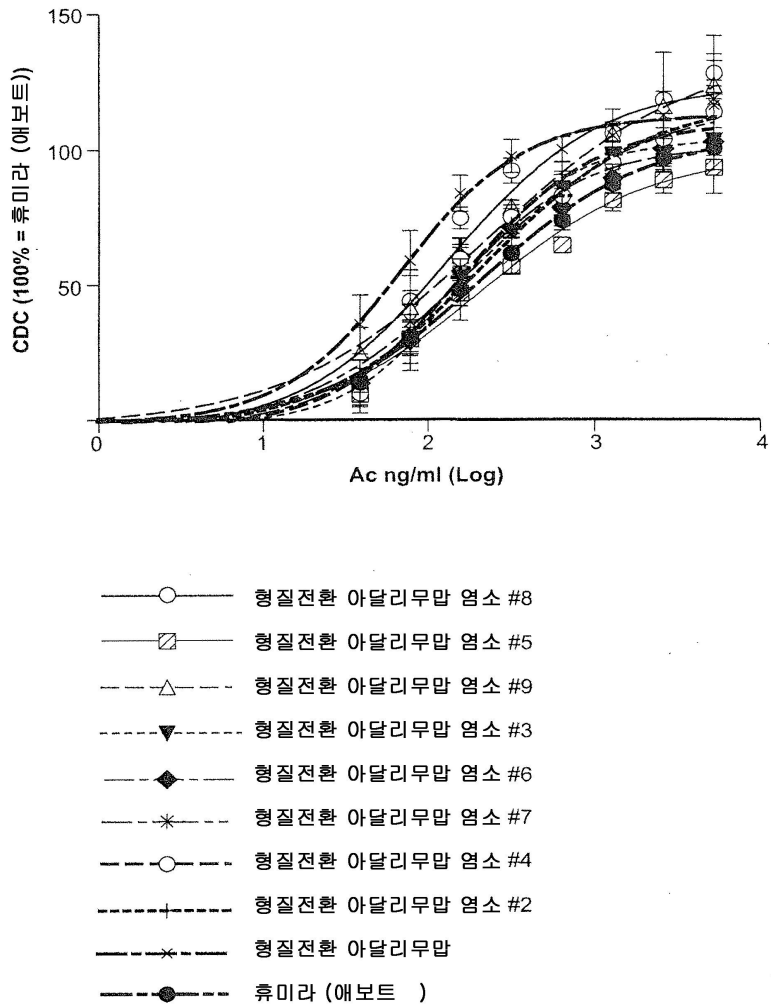
도면22



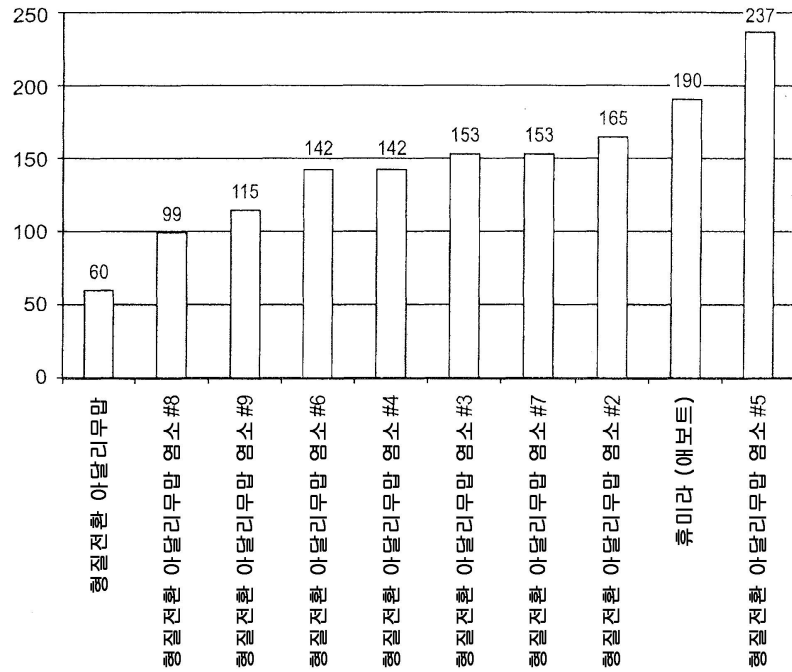
도면23



도면24



도면25



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Laboratoire Francais du Fractionnement et des
Biotechnologies
Meade, Harry M.
Chen, Li-How
- <120> Highly galactosylated anti-TNF-alpha antibodies and uses thereof
- <130> L0719.70005W000
- <150> 61/764475
- <151> 2013-02-13
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 470
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

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

 Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

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

 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 2

<211> 236

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

 35 40 45

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

 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

 210 215 220

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

225 230 235

<210> 3

<211

> 1416

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 3

```

atggaattcg gcctgagctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgcgag      60
gtgcagctgg tggagtctgg cggaggactg gtgcagcccg gcagaagcct gagactgagc      120
tgcgccgcca gcggttcac cttcgacgac tacgccatgc actgggtccg ccaggcccct      180
ggaaagggcc tggaatgggt gtcgccatc acctggaaca gcgccacat cgactacgcc      240
gacagcgtgg agggcaggtt caccatcagc agggacaacg ccaagaacag cctgtacctg      300
cagatgaaca gcctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcaa ggtgtcctac      360

ctgagcaccg ccagcagcct ggattactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgtccagc      420
gccagcacca agggccctag cgtgttcctt ctggcccca gcagcaagtc tacctctggc      480
ggcacagccg ctctgggtctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtcc      540
tggaaactctg gcgccctgac cagcggcgtg cacacattcc ctgccgtgct gcagagcagc      600
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgaca gtgcctagca gctctctggg cacccagacc      660
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc      720
aagagctgcg acaagacca cacctgtccc ccttgtctctg cccctgagct gctgggcgga      780

cccagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacacc tgatgatcag caggaccccc      840
gaagtgacct gcgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggacc ctgaagtga gttcaattgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaatgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac      960
agcacctaca ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa      1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccctcgagaa aaccatcagc      1080
aaggccaagg gccagcccag agaaccccag gtgtacacc tgccccctag cagggacgag      1140
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgatata      1200

gccgtggagt gggagtctaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg      1260
ctggacagcg acggcagctt cttctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagcagatgg      1320
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc      1380
cagaagtccc tgagcctgag ccccggcaag taatga                                1416

```

<210> 4

<211> 714

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 4

atggacatga gaggccccgc tcagctgctg ggactgctgc tgctgtggct gagaggcgcc	60
agatgcgaca tccagatgac ccagagcct tctagcctga gcgccagcgt gggcgacaga	120
gtgaccatca cctgtagggc cagccagggc atcaggaact acctggcctg gtatcagcag	180
aagcccggca agggcccaaa gctgctgac tacgcccca gcacctgca gagcggcgtg	240
cccagcagat tcagcggcag cggtccggc accgacttca cctgacat cagcagcctg	300
cagcctgagg acgtggccac ctactactgc cagaggtaca acagggcccc ctacaccttc	360
ggacagggca ccaaggtgga gatcaagagg accgtggcgg ctcccagcgt gttcatcttc	420
ccaccagcg acgagcagct gaagtctggc accgcctcgg tggctgcct gctgaacaac	480
ttctaccccc gcgaggccaa ggtgcagtgg aaggtggaca acgcctgca gtcggcaac	540
agccaggaaa gcgtcaccga gcaggacagc aaggactcca cctactcct gtcagcacc	600
ctgacctgga gcaaggccga ctacgagaag cacaaggtgt acgcctgcga agtgaccac	660
cagggcctga gcagccctgt gaccaagagc ttcaacaggg gcgagtgcta atga	714